

3. CRISTAL·LITZACIÓ EN PRESENCIA DE FÀRMACS DE LES SEQÜÈNCIES d(CGATCG), d(TGGCCA), d(TGTACA), d(GCGAATTCG), d(CCAGGCCTGG), d(CGCGAATTCGCG) i d(CGCTAGCG)

A continuació es resumeixen les condicions de cristal·lització provades per intentar cristal·litzar aquestes seqüències. Cap d'elles ha donat un cristall prou bo com per poder resoldre l'estructura però algunes sí que han donat motius cristal·lins.

Consideracions generals

El mètode que s'ha emprat majoritàriament per cristal·litzar és la difusió de vapor en gota penjant, amb un volum de gota de 8 µl i un volum de reservori de 800 µl. En els casos en que s'obté alguna forma cristal·lina prometedora, s'intenta millorar els cristalls utilitzant la difusió de vapor en gota assegurada però en cap ocasió han millorat substancialment els resultats.

En els casos en que a la gota hi ha una concentració elevada de sal (>50 mM) s'afegeix també sal al reservori a la mateixa concentració de la gota.

La concentració de precipitant al reservori es va augmentant fins a obtenir la fase sòlida. Aquest augment es fa ràpid en les primeres proves de cristal·lització per determinar el límit de solubilitat d'una seqüència, però un cop es coneix, s'intenta arribar a la fase sòlida molt lentament.

L'objectiu és sempre intercalar fàrmac en aquestes seqüències, però en les proves de cristal·lització sempre es fa alguna gota sense fàrmac per veure com es comporta l'oligo sol.

La majoria dels assajos s'han fet a una temperatura de 20°C. En alguns casos s'ha comprovat l'efecte de la temperatura baixant-la a 13°C però no s'han millorat els resultats. També en alguna ocasió s'ha escalfat la gota fins a uns 50°C per tal de dissoldre els cristalls irregulars obtinguts deixant després refredar lentament per tornar a induir la cristal·lització. Tampoc ha donat bons resultats.

La concentració de DNA s'ha calculat sempre per dúplex, no per cadena senzilla.

3.1 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(CGATCG)

Aquest hexàmer ha estat ja cristal·litzat en nombroses ocasions en presència de diferents fàrmacs intercalants. La majoria d'aquestes estructures són molt semblants i el seu grup espacial és $P4_12_12$ (Moore *et al.*, 1989, Howerton *et al.*, 2003). Hi ha però una estructura amb simetria $P3_1$ (Dautant *et al.*, 1995) i una estructura amb simetria $P6_122$ (Lipscomb *et al.*, 1996).

En aquest treball s'ha intentat cristal·litzar aquesta seqüència en presència dels fàrmacs: $AcrK(K)_4$, $AcrK(R)_4$, $Acr(RRRR)$, $Acr(RGR)$, $Acr(RSR)$, proflavina, AQK, BSU-9022, BSU-1073, BSU-9010 i BSU-9042. De les condicions que es resumeixen a continuació s'han fet unes 130 gotes aproximadament:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.5/0.15, 0.5/0.3, 0.5/0.5, 0.5/1, 0.5/2, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20, 40, 50 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 15, 40, 70, 100 mM

NaCl: 10, 50 mM

KCl: 10 mM

BaCl₂: 10, 100 mM

NiCl₂: 0.8, 5 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 10 + 1, 2 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 4 + 1 mM

espermina: 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 3, 2, 4 mM

precipitant:

MPD: 0, 5, 8, 10, 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD, PEG 1000, PEG 4000, isopropanol, etanol.

A la majoria de les gotes s'ha obtingut precipitat amorf. Només amb el fàrmac BSU-9022 apareixen uns cristallets petits però irregulars que milloren una mica

quan s'utilitza etanol com a precipitant (Fig. III-3.1). Els cristalls però, no són prou grans com per difractar-se.

3.2 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(TGGCCA)

Aquesta seqüència també ha estat ja cristal·litzada en el grup espacial $P4_12_12$ en presència d'un fàrmac intercalant (Leonard *et al.*, 1993).

Els fàrmacs que s'han utilitzat amb aquesta seqüència són: AcrK(K)₄, AcrK(R)₄, Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR), BSU-9022, BSU-9042 i BSU-9010. S'han fet unes 60 proves de les combinacions que es mostren a continuació, centrant-se sobretot en el fàrmac Acr(RRRR) que és el que dona motius cristal·lins més estables.

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.2/2, 0.5/1, 0.5/2, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 0.8, 5, 10, 15, 100 mM

BaCl₂: 10, 100 mM

NiCl₂: 1, 5 mM

CoCl₂: 5 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 4, 10 + 1 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0.5, 1.5, 3 mM

precipitant:

MPD: 10%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

Només s'han aconseguit motius cristal·lins amb els fàrmacs BSU-9022 i Acr(RRRR). En el cas del fàrmac BSU-9022 s'obtenen cristallets petits de forma hexagonal, plans i molt inestables. En canvi, en el cas de l'acridina Acr(RRRR) s'obtenen agulles molt primes i llargues (Fig. III-3.2).

A part de les gotes que s'han dissenyat, s'ha utilitzat també un kit comercial de la casa *Hampton* per intentar cristal·litzar aquest oligo sol. Aquest kit conté 48 condicions diferents de cristal·lització. Les gotes són de 3 µl i es preparen en plaques especials utilitzant el mètode del batch. Aquestes condicions no han donat res interessant, sembla que no són adequades per aquest tipus de seqüència.

3.3 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(TGTACA)

En aquest cas, la seqüència està ja cristal·litzada en dos grups espacials diferents (P4₁2₁2, Nunn *et al.*, 1991 i P2₁2₁2₁, Smith *et al.*, 1996) sempre amb fàrmac intercalat.

Els fàrmacs que s'han intentat intercalar en aquest oligo són: Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR), BSU-9022, BSU-9010 i BSU-9042.

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/2, 0.5/1, 0.65/ 1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 10, 15, 100 mM

BaCl₂: 10, 100 mM

NiCl₂: 0.5, 1, 5 mM

CoCl₂: 5 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 4, 10 + 1 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0. 0.5, 1, 1.5, 3 mM

precipitant:

MPD: 10, 15, 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

S'han fet pocs assajos amb aquesta seqüència (30 gotes aproximadament) ja que no s'ha obtingut res prometedor, només precipitat amorf.

3.4 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(GCGAATTCG)

Aquest nonàmer ha estat ja cristal·litzat sense fàrmac amb el grup espacial P₂₁₂₁₂₁ (Soler-López *et al*, 2000). En aquesta tesi s'ha intentat cristal·litzar amb els següents fàrmacs: Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR), proflavina, AQK, BSU-9022 i BSU-9042.

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.2/2, 0.3/1, 0.3/1.5, 0.4/0.4, 0.5/0.3, 0.5/0.5, 0.5/1, 0.5/4, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 15, 40, 70, 100 mM

NaCl: 50 mM

BaCl₂: 1, 5, 10 mM

NiCl₂: 0.8 mM

ZnSO₄: 5 mM

NH₄Cl: 10 mM

MnCl₂: 5 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 10, 4 + 1 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 mM

precipitant:

MPD: 0, 5, 8, 10, 15, 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

S'han preparat 60 de les combinacions possibles presentades i els millors resultats s'han obtingut amb el fàrmac BSU-9022 amb el qual s'observen dues formes cristal·lines diferents: varetes colorades bastant planes però llargues i hexàgons també colorats que apareixen d'una separació de fases de la gota. Aquests hexàgons tarden molt a formar-se i la majoria són gelatinosos (Fig. III-3.3).

S'han difractat a l'*Image Plate* que es disposa al laboratori alguna de les varetes obtingudes i també algun dels hexàgons. Només en el cas de les varetes es detecta l'apilament de les bases (stacking) de l'oligo però molt difús, indicant desordre en el cristall.

3.5 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(CCAGGCCTGG)

Aquesta seqüència ha estat ja cristal·litzada en diferents grups espacials sense fàrmac: P2₁2₁2₁ (van Aalten *et al.*, 1999), C121 (Heinemann i Alings, 1989), P6 (Heinemann i Hahn, 1992). Hi ha una altra estructura de la mateixa seqüència en que l'oligo interacciona amb un fàrmac a través del solc menor (Kielkopf *et al.*, 1998). En canvi, no hi ha cap estructura d'aquest oligo amb fàrmac intercalat entre les bases.

Els fàrmacs que s'han utilitzat per cristal·litzar aquesta seqüència són: AcrK(K)₄, AcrK(R)₄, Acr(RRRR), proflavina i BSU-9022 i s'han realitzat uns 60 assajos de les condicions que es mostren a continuació:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.4/0.4, 0.4/1, 0.5/0.5, 0.5/1, 0.5/1.5 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 40, 80, 100 mM

NaCl: 40, 100 mM

CaCl₂: 10, 100 mM

BaCl₂: 10, 100 mM

espermina: 0, 0.5, 1, 2 mM

precipitant:

MPD: 0-30%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

En algunes gotes s'han obtingut fragments cristal·lins irregulars però en cap cas suficientment bons com per difractar-se (Fig. III-3.4).

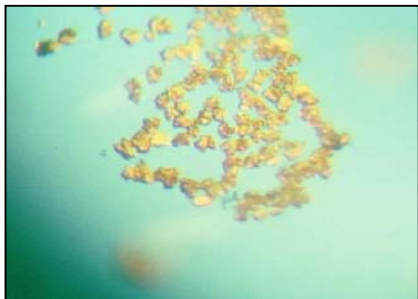


Fig. III-3.1. Cristalls obtinguts amb la seqüència d(CGATCG) i el fàrmac BSU-9022. Els cristalls són massa irregulars com per difractar-se.



Fig. III-3.2. Agulles cristal·lines obtingudes amb la seqüència d(TGGCCA) i el fàrmac Acr(RRRR).

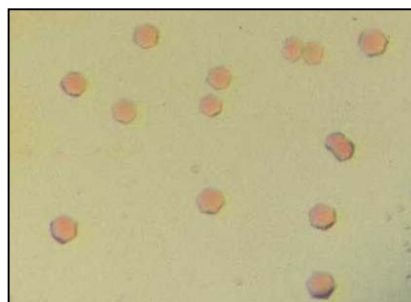
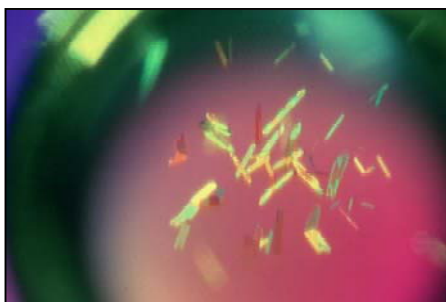


Fig. III-3.3. Dues formes cristal·lines obtingudes amb el nomàmer d(GCGAATTCG) i el fàrmac BSU-9022. El color dels cristalls és degut al fàrmac. A l'esquerra varetes planes, a la dreta hexàgons d'una mida de 50x50 μm aproximadament.



Fig. III-3.4. Fragments cristal·lins obtinguts amb la seqüència d(CCAGGCCTGG) i el fàrmac BSU-9022.

3.6 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(CGCGAATTCGCG)

Aquest dodecàmer és una de les seqüències més estudiades per cristal·lografia de raigs X. Ha estat cristal·litzat en nombroses ocasions sol, en presència de fàrmacs que interaccionen amb el solc menor i recentment ha estat cristal·litzat en el laboratori en presència del fàrmac Acr(RRRR) que es troba intercalat en un pas AA/TT (Malinina *et al.*, 2002).

Els intents de cristal·litzar aquesta seqüència s'han fet amb els següents fàrmacs: Acr(RRRR), proflavina, Acr(RGR), Acr(RSR) i BSU-9022. S'han realitzat un total de 20 assajos a les següents condicions:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.3/1, 0.4/0.4, 0.5/1, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 5 mM

BaCl₂: 10 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 4, 5, 10 + 1 mM

espermina: 0, 0.4, 0.5, 1, 3 mM

precipitant:

MPD: 10, 15%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

S'obtenen varetes irregulars i petites que es degraden ràpidament en la majoria de les gotes. En una de les gotes però, s'ha aconseguit una vareta molt gran, de mides: 1.2x0.14x0.7 mm. Aquesta vareta es va difractar a l'*Image Plate* del laboratori i difracta però no d'una manera regular. Es van fer varies fotos a diferents angles i es veu clarament com hi ha zones més ordenades que d'altres. Tot i difractant, el cristall no era prou bo com per fer una recollida.

3.7 CRISTAL·LITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA d(CGCTAGCG)

Aquest octàmer s'ha cristal·litzat ja en el laboratori amb el grup espacial $P2_12_12_1$ (Urpí *et al.*, 1996).

Ara s'ha intentat complexar amb els següents fàrmacs: AcrK(K)₄, Acr(RGR) i BSU-9022. S'han fet molt poques gotes amb aquesta seqüència (concretament 12).

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.5/1, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6,5, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂ + CoCl₂: 10, 4 + 1 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

CaCl₂: 4 + 1 mM

espermina: 0.5, 1.5, 3 mM

precipitant:

MPD: 10%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

En cap de les gotes s'ha obtingut res cristal·lí, només precipitat amorf i separació de fases en alguna gota.

4. EL DECÀMER d(CGCAATTGCG): CRISTAL·LITZACIÓ EN PRESENCIA DE Co^{2+} I COMPARACIÓ AMB ALTRES ESTRUCTURES

4.1 CRISTAL·LITZACIÓ

El decàmer d(CGCAATTGCG) ha estat ja descrit anteriorment en quatre grups espacials diferents (Spink *et al.*, 1995, Nunn *et al.*, 1997, Wood *et al.*, 1997, Soler-López *et al.*, 2002). Tot i que tots els intents de cristal·lització s'havien fet o bé amb fàrmacs que interaccionen amb el solc menor o bé amb pèptid, només en un dels casos van poder detectar el fàrmac, concretament la netropsina (Nunn *et al.*, 1997).

En aquest treball es va intentar cristal·litzar aquest oligo amb els següents fàrmacs intercalants: AcrK(K)₄, AcrK(R)₄, Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR), proflavina, BSU-1073, BSU-9022 i BSU-9042.

S'han realitzat amb aquesta seqüència prop de 300 gotes, emprant majoritàriament els fàrmacs Acr(RRRR) i Acr(RGR) que aparentment eren els que donaven uns cristalls millors. A continuació es resumeixen les condicions utilitzades:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.25/0.5, 0.3/1, 0.4/0.4, 0.4/1, 0.5/0.5, 0.5/1, 0.5/1.5, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 40, 80, 100 mM

NaCl: 40, 100 mM

BaCl₂: 5, 10, 100 mM

NiCl₂: 5 mM

MgCl₂ + NiCl₂: 5, 10 + 1 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 4, 5, 10 + 0.5, 0.8, 1, 3 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 4, 5, 10 + 0.5, 0.8, 1, 4, 5 mM

BaCl₂ + NiCl₂: 4 + 1 mM

CaCl₂ + NiCl₂: 4 + 1 mM

MgCl₂ + MnCl₂: 10 + 1 mM

CaCl₂ + CoCl₂: 4, 10 + 0.5, 0.8, 1 mM

espermina: 0, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 3 mM

precipitant:

MPD: 0-30%

PEG₄₀₀: 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD, PEG₄₀₀

Totes aquestes condicions han donat tres formes de cristalls diferents de les quals només una va difractar bé:

En primer lloc, es van obtenir cristalls hexagonals petits (màxim 60 µm), plans i que es degradaven ràpidament. Aquests cristalls apareixen utilitzant el fàrmac Acr(RRRR), MgCl₂ com a sal a diferents concentracions (10-100 mM), amb i sense espermina. Encara que el rang en que apareixen aquests cristallets és força ampli, no es va aconseguir millorar-los.

També amb el fàrmac Acr(RRRR) s'han obtingut uns cristalls aparentment molt regulars, de forma piramidal i que extingien molt bé la llum polaritzada (Fig. III-4.1). Els cristalls arriben a fer 120x100x50 µm i creixen en presència de Co²⁺. S'han difractat diversos cristalls d'aquest tipus però no s'observa res en els espectres. Tot i que els cristalls tenen molt bon aspecte i són molt estables, sembla que estan mig buits i per això no difracten.

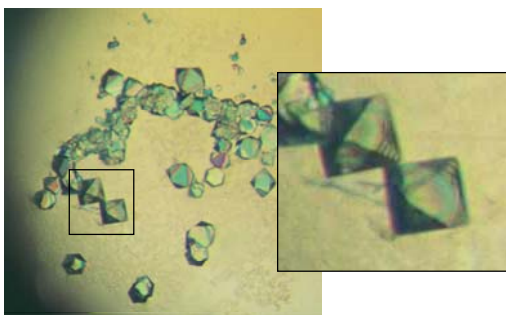


Fig. III-4.1. Cristalls de forma piramidal obtinguts amb el decàmer d(CGCAATTGCG) i el fàrmac Acr(RRRR). A la dreta de la figura es mostra una ampliació dels cristalls, d'una mida real de 100x80x60 µm.

Per últim, s'obtenen unes varetes bastant grans quan s'utilitzen els fàrmacs Acr(RGR) i Acr(RSR). Les varetes apareixen en un rang de condicions molt ampli però milloren clarament quan s'utilitza el Co^{2+} com a ió. El mètode utilitzat per cristal·litzar va ser la difusió de vapor en gota penjant. S'han provat de difractar varies d'aquestes varetes i la millor recollida s'obté amb el fàrmac Acr(RGR) a les següents condicions:

oligo: 0.5 mM
fàrmac AcrRGR: 1 mM
tampó: cacodilat de sodi 20 mM, pH = 6.5
CaCl_2 : 4 mM
CoCl_2 : 1 mM
espermina: 0.5 mM
MPD: 10%

Quan s'arriba a una concentració de MPD al reservori del 25%, apareixen després d'unes tres setmanes, unes varetes de dimensions 200x60x60 μm aproximadament.

De les cristal·litzacions realitzades amb aquesta seqüència cal destacar dues variables que han sigut crítiques per obtenir uns bons cristalls: per una banda el fàrmac. Tot i que com es veurà després en la descripció de l'estructura el fàrmac no hi és present, ajuda a millorar la qualitat dels cristalls. De la mateixa manera, quan s'utilitza l'ió Co^{2+} (sempre a concentracions baixes i en presència d'una altra sal), els cristalls es fan més resistents i millora també la seva difracció.

4.2 RECOLLIDA DE DADES I PROCESSAT

El cristall es va congelar amb nitrogen líquid i va ser recollit a la línia BM14 (antiga línia espanyola) del sincrotró de Grenoble (ESRF). La longitud d'ona del raig era 0.917038 Å i el detector emprat va ser un CCD (MARCCD).

Donat que el cristall va difractar fins a una resolució força alta (1.6 Å) i les taques de baixa resolució eren molt més intenses que les d'alta resolució es varen fer dues recollides del mateix cristall: la primera, a una distància del detector de 150 mm amb un temps d'exposició de 6 segons (fins a una resolució de 2.25 Å), per recollir bé les reflexions de baixa resolució. La segona recollida es va realitzar amb el cristall més a prop del detector ($d = 100$ mm, resolució màxima de 1.6 Å) i deixant més temps d'exposició (12 segons) per així poder detectar bé les taques d'alta resolució. En els dos casos, l'angle d'oscil·lació de cada foto va ser 3° (Fig. III-4.2).

El processat i escalat de les dades es va dur a terme amb els programes DENZO i SCALEPACK, respectivament. En combinar les dades d'alta i baixa resolució s'obtenen les estadístiques de difracció que es mostren a la taula III-4.1:

Grup espacial	$I2_12_12_1$
Dimensions cel·la (Å)	a = 26.22 b = 44.36 c = 52.34
Temperatura de la recollida (K)	120
Rang de resolució (Å)	25-1.6 (1.66-1.6)
Completitud (%)	98.4 (89.1)
Reflexions úniques	4174
Redundància†	17.7
R_{merge}	0.077 (0.60)

Taula III-4.1. Resultats i estadístiques de les dades de difracció del decàmer d(CGCAATTGCG). Entre parèntesis es mostren els valors per a l'última capa de resolució. † Reflexions totals recollides dividides entre el número de reflexions úniques.

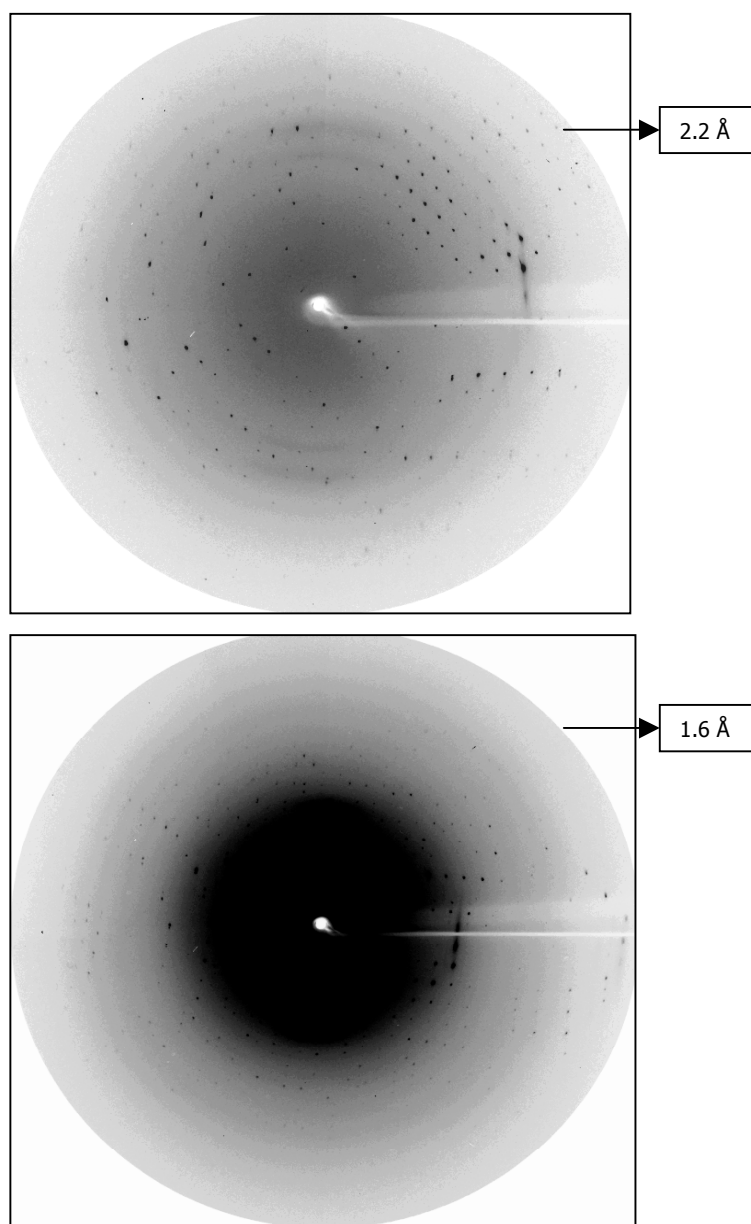


Fig. III-4.2. *Espectres de difracció del decàmer d(CGCAATTGCC). A la part superior, una foto de la recollida de baixa resolució que arriba fins a 2.2 Å. A la part inferior, una foto de la recollida d'alta resolució (fins a 1.6 Å). En aquesta es poden apreciar algunes reflexions a alta resolució.*

4.3 RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA I AFINAT

L'estructura va ser resolta per reemplaç molecular amb l'ajuda del programa EPMR. Es va utilitzar com a model aquest mateix decàmer descrit per Spink *et al.* (1995) ja que cristal·litza amb el mateix grup espacial i amb unes dimensions de cel·la molt semblants. Donat que les bases terminals (tant la citosina com la guanina) estan desaparellades en l'estructura model, es van eliminar d'aquest. Així, tenint present que la unitat asimètrica està formada per una cadena senzilla d'oligonucleòtid, el model inicial consta de 8 bases. El rang de resolució utilitzat per realitzar el reemplaç molecular va ser de 15-3 Å.

La solució obtinguda es va començar a afinar amb el programa CNS utilitzant un 10% de les reflexions per calcular el factor R_{free} . Es va realitzar un afinament de cos rígid en un rang de resolució de 25 a 2 Å per tal d'optimitzar la posició de tota la molècula primer, i un afinament de cos rígid per parells de bases en segon lloc. En aquest punt, els mapes de densitat $F_o - F_c$ mostraven una clara densitat per la posició de la guanina terminal absent en el model (G10). Així es va posicionar aquesta guanina juntament amb un ió Co^{2+} que es troba en una posició especial (en un eix de simetria) i per això la seva ocupació és de 0.5. El model va ser subjecte de diverses minimitzacions per cos rígid i del factor B de temperatura donant uns factors R de $R = 0.32$ i $R_{\text{free}} = 0.36$ en un rang de resolució de 25 a 2 Å. En els mapes de diferència es detectava una densitat provinent de la citosina terminal (C1) però no era prou clara com per posicionar-la. Com que semblava que l'afinament estava estancat, es va decidir continuar-lo amb el programa REFMAC5 utilitzant el mateix rang de resolució anterior. Després de diversos cicles d'afinament isotròpic per la màxima probabilitat, els mapes de densitat van permetre posicionar la citosina 1. Un cop modelada tota la seqüència, es van afegir aigües en pics de densitat per sobre de 3σ en els mapes de diferències i que satisfien els criteris de ponts d'hidrogen. Finalment, es va afegir tot el rang de resolució (fins a 1.6 Å) el que va permetre afegir alguna aigua més i afinar els àtoms d'hidrògens a les seves posicions teòriques. A més, es va poder detectar dues posicions pel fosfat de la citosina 9 i pel sucre de la guanina 8.

Encara que les estadístiques del processat per a l'última capa de resolució no són molt bones, en incloure's en l'afinament ens aporten informació i per això es van afegir. Les estadístiques finals de l'afinat es mostren a la taula III-4.2:

Contingut de la unitat asimètrica	Una cadena 0.5 Co ²⁺ 46 H ₂ O
Z†	8
Rang de resolució (Å)	25-1.6
Reflexions	3746
R/ R _{free} (10%)	0.21/0.281
R (total)	0.214

Taula III-4.2. Resultats i estadístiques finals de l'afinat del decàmer d(CGCAATTGCG). †Nombre d'unitats asimètriques relacionades per simetria presents a la cel·la.

4.4 DESCRIPCIÓ DE L'ESTRUCTURA

Empaquetament: paper del Co²⁺ en el cristall

El decàmer d(CGCAATTGCG) ha cristal·litzat en el grup espacial I2₁2₁2₁ amb una cadena a la unitat asimètrica. El dúplex adopta una forma B-DNA per als 8 parells de bases centrals, mentre que les bases terminals (C1 i G10) no s'aparellen amb la seva base complementària (Fig. III-4.3). Els dúplex s'apilen entre sí formant columnes contínues paral·leles. Les columnes interaccionen entre elles amb l'ajuda de l'ió Co²⁺ que fa de pont a través de les guanines terminals. El Co²⁺ doncs, té un paper molt important en l'empaquetament d'aquesta estructura. Aquest ió forma una interacció específica amb el N7 de dues guanines terminals relacionades per simetria i té a més, quatre molècules d'aigua associades adoptant així una conformació octaèdrica ($d(\text{Co}^{2+}\text{-N7}) = 2.28 \text{ \AA}$, $d(\text{Co}^{2+}\text{-H}_2\text{O}) = 1.96 \text{ \AA}$). Aquest tipus d'interacció ja s'ha descrit en diverses ocasions pel Co²⁺ (per exemple, Yang *et al.*, 2000) i també pel Ni²⁺ (Abrescia *et al.*, 1999).

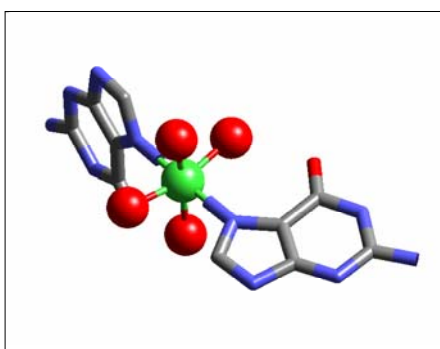
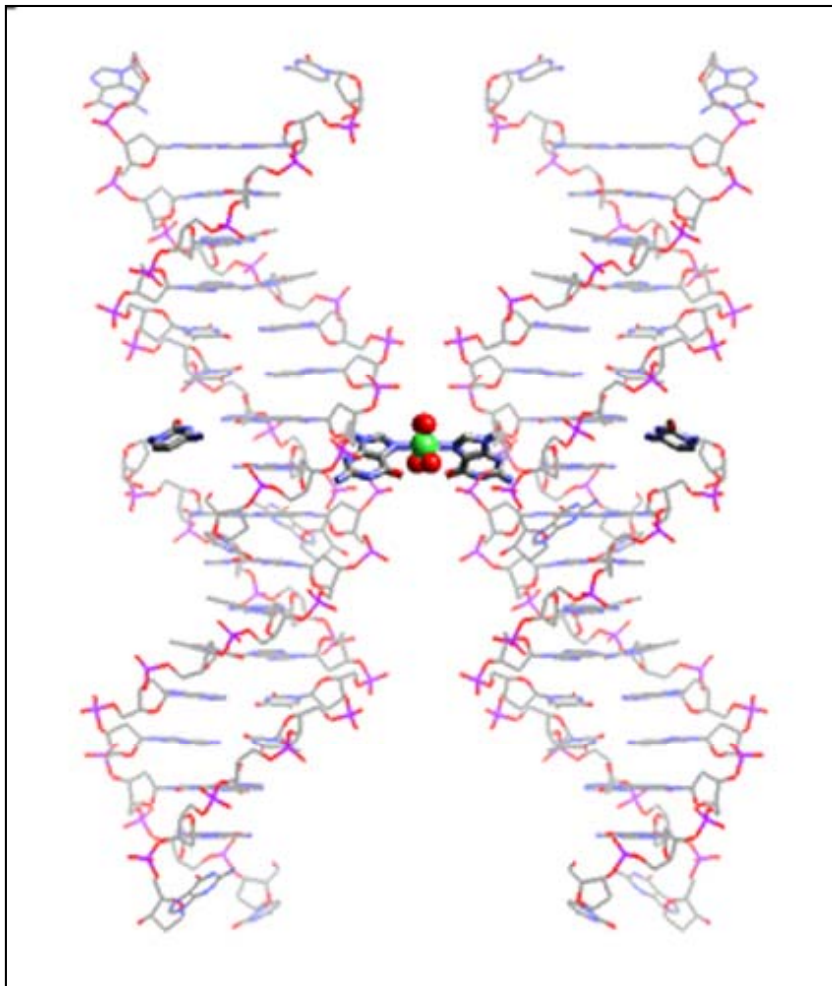


Fig III-4.3. A la part superior, representació de dues columnes de dúplex veïnes interaccionant a través de les guanines i de l'ió Co^{2+} (en color verd). Les citosines terminals entren al solc major. A la part inferior-esquerra, detall de la interacció entre el Co^{2+} amb els N7 de les guanines i quatre aigües (color vermell). Les guanines es disposen perpendiculars entre sí.

Guanina terminal

La guanina terminal G10 de l'oligonucleòtid està desaparellada, surt fora del dúplex per interaccionar amb el dúplex següent en una mateixa columna. La guanina entra al solc menor del dúplex contigu i forma dos ponts d'hidrogen amb la seva guanina 2 a través dels N2 i N3 de les bases (Fig. III-4.4). Aquesta geometria de la guanina també s'ha descrit en diverses ocasions (Subirana i Abrescia, 2000). L'ió Co^{2+} en aquest cas i els ponts d'hidrogen que forma amb la guanina 2 donen a aquesta conformació molta estabilitat.

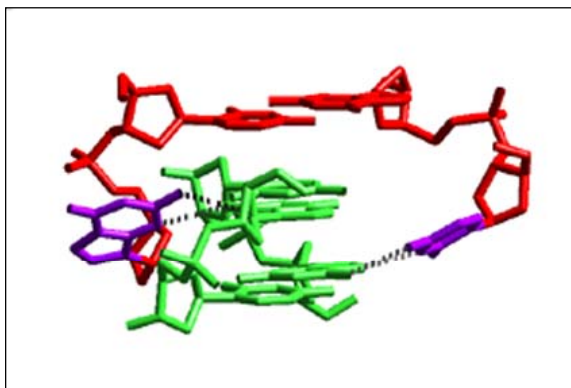


Fig. III-4.4. Representació detallada de la interacció entre dos dúplex (color verd i vermell) en una columna. En color lila es mostren les bases terminals desaparellades (C1 i G10). Les línies discontinües representen ponts d'hidrogen.

Triplet C1⁺:G8-C3

Les citosines terminals sovint es troben molt desordenades en els cristalls, són bases molt mòbils que són difícils de posicionar i de veure en els mapes de densitat. Gràcies a la relativament alta resolució de les noves dades que es presenten s'ha pogut modelar acuradament aquesta base en el cristall, on es troba formant un triplet amb bases del dúplex contigu (Fig. III-4.4 i Fig. III-4.5). El N3 de la citosina es troba protonat i forma ponts d'hidrogen amb la guanina 8 del dúplex contigu, estabilitzant així el triplet. Tot i que el mapa de densitat és molt

clar per aquesta base, els seus factors de temperatura B més alts que la resta de l'estructura, demostren que és una base més mòbil que les altres.

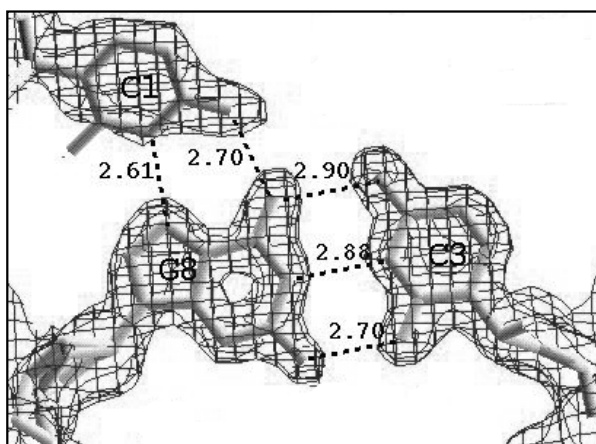


Fig. III-4.5. Mapa de densitat electrònica $2F_o-F_c$ (1σ) del triplet format per les bases C1, G8 i C3. Els ponts d'hidrogen estan marcats amb línies discontinües i les distàncies en Å.

Esquelet d'aigües

L'estructura té 46 molècules d'aigua de les quals una d'elles es troba en dues posicions. Tots els fosfats interaccionen amb molècules d'aigua formant ponts d'hidrogen. També algunes bases es troben associades amb molècules d'aigua formant ponts d'hidrogen amb els seus nitrògens. Algunes de les molècules d'aigua fan de pont entre diferents columnes d'oligonucleòtids.

En la part central del decàmer, concretament en les bases AATT hi ha un esquelet d'aigües molt ben definit en el solc menor. Aquest esquelet es troba idèntic en altres estructures com per exemple la seqüència d(GCGAATTCG) descrita a alta resolució per Soler-López *et al.* (1999), que també conté la seqüència AATT a la zona central (Fig. III-4.6).

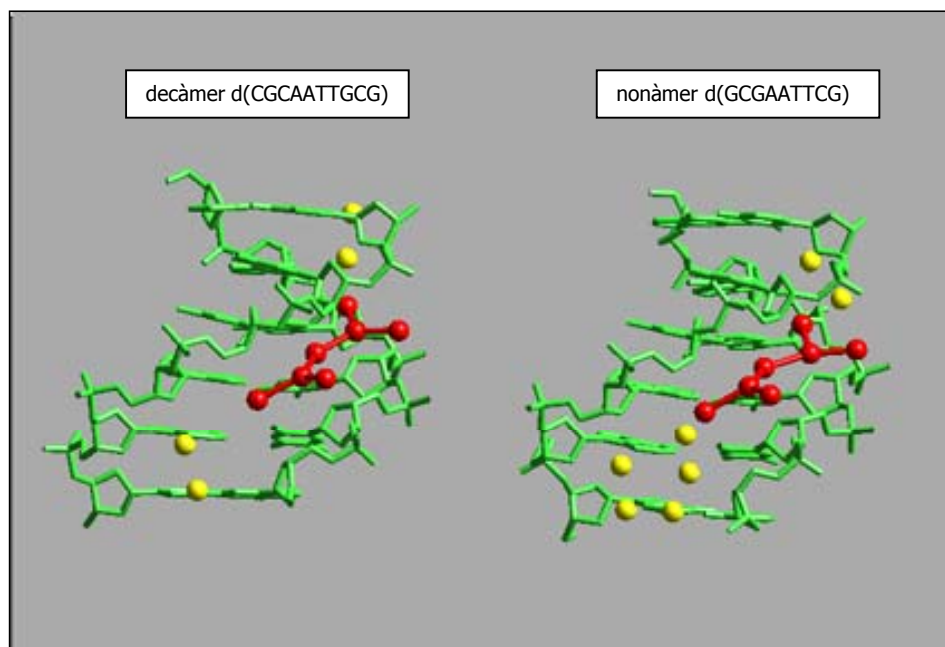


Fig. III-4.6. Comparació de l'esquelet d'aigües present a l'estructura d'aquest treball (esquerra) amb l'esquelet d'aigües present a l'estructura descrita per Soler-López et al. (1999). En vermell es mostren les aigües que es troben en posicions idèntiques a les dues estructures. Els ponts d'hidrogen entre les aigües es mostren com enllaços. Les aigües que es troben lluny de la regió central (color groc) tenen diferents posicions.

4.5 COMPARACIÓ AMB ALTRES ESTRUCTURES

Característiques generals

Hi ha ja descrites a la literatura quatre estructures del decàmer d(CGCAATTGCG). Totes elles cristal·litzen en diferents grups espacials, amb diferents condicions de cristal·lització, diferents fàrmacs, etc. A la taula III-4.3, es resumeixen tots els estudis fets per aquest decàmer incloent-hi el present treball:

no.	Codi NDB	Grup espacial	Contingut unitat asimètrica	Res. (Å)	Ions	C1	G10	<Dz> [†] (Å)	solc menor [‡] (Å)	Volum p.b. (Å ³)	Ref.
1	UDJ031	I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Una cadena	2.5	Mg ²⁺	Fora dúplex	Solc menor	3.27 (0.07)	3.8	1432	Spink <i>et al.</i> , (1995)
2	GDJ046	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Un dúplex	2.4	Mg ²⁺ , netropsina	C1 ⁺ :G8-C13	Solc menor	3.36 (0.14)	4.1	1337	Nunn <i>et al.</i> , (1997)
3	BDJ069	C2	Un dúplex	2.3	Mg ²⁺	Dúplex	Dúplex	3.37 (0.35)	5.0	1237	Wood <i>et al.</i> , (1997)
4	UD0012	C22 ₂	Una cadena	2.9	Zn ²⁺ , pèptid	Fora dúplex	Solc menor	3.34 (0.10)	3.1	1638	Soler-López <i>et al.</i> , (2002)
5	BD0066	I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Una cadena	1.6	Co ²⁺	C1 ⁺ :G8-C13	Solc menor	3.25 (0.07)	3.2	1510	Aquesta tesi

Taula III-4.3. Característiques generals del decàmer d(CGCAATTGCG) en els diferents cristalls. [†]<Dz> valor promig de l'ascensió. Entre parèntesi es mostra la seva desviació estàndard. [‡]Amplada del solc menor de l'octàmer central mesurada amb el programa 3-DNA (Lu *et al.*, 2003).

Així doncs, en total hi ha cinc estructures del decàmer cristal·litzades en quatre grups espacials diferents. Fins ara, la màxima resolució obtinguda per aquesta seqüència era 2.3 Å mentre que el nou cristall que es presenta difracta fins a 1.6 Å. Aquesta resolució és considerablement més alta, el que ha permès fer un estudi comparatiu més exhaustiu.

Tots ells s'han intentat cristal·litzar en presència de fàrmacs que interaccionen amb el solc menor (estructures no. 1-3 a la taula), en presència de pèptid (estructura no. 4) o en presència de fàrmac intercalant (estructura no. 5). Però només en el cas del cristall descrit per Nunn *et al.* (1997) van poder veure el fàrmac en l'estructura.

Totes les estructures exceptuant la no. 3, tenen les bases terminals (C1 i G10) desaparellades.

Les estructures no. 1-3 van ser recollides a temperatura ambient i s'espera que presentin més desordre que la resta. Tot i així, l'estructura no. 4 també presenta desordre causat pel pèptid que té unit covalentment (format per quatre arginines). Aquest pèptid també és el causant de donar un volum per parell de bases major que la resta de cristalls com es pot veure a la taula III-4.3.

S'han comparat també els octàmers centrals de les cinc estructures: eliminant les bases terminals que són les que tenen posicions més diferents, s'han superposat els vuit parells de bases restants (Fig. III-4.7). La desviació r.m.s entre elles es va calcular amb el programa CNS i els seus valors estan compresos entre 0.71 Å (per a les estructures no. 1 i 3) i 1.22 Å (per a les estructures no. 2 i 4).

Com es veu a la figura i també segons els r.m.s., totes elles són molt semblants i presenten les majors diferències als fosfats.

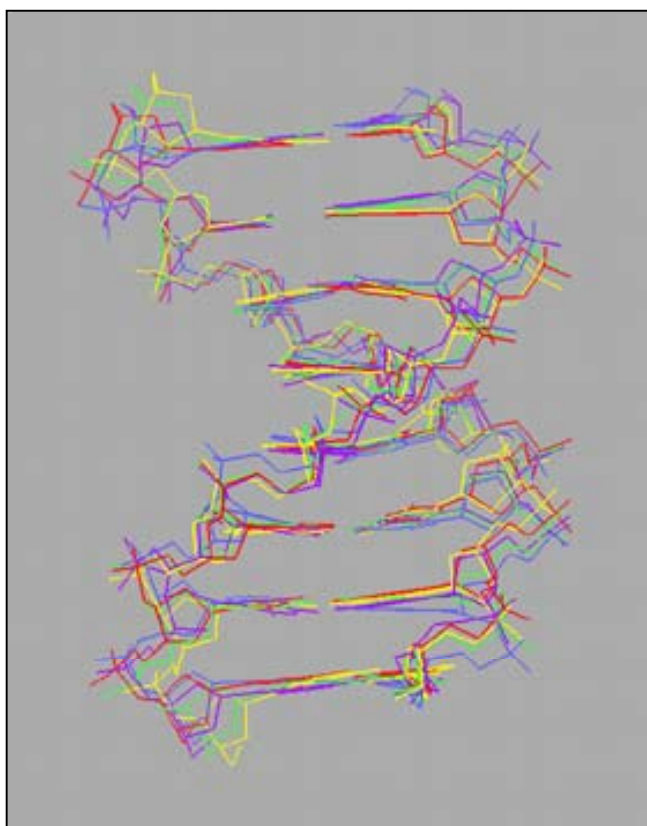


Fig. III-4.7. *Superposició de les cinc estructures. S'ha pres com a referència l'estructura no. 1 (color verd). L'estructura no. 2 ve representada pel color blau, la 3 pel color lila, la 4 pel groc i la 5 pel vermell.*

Empaquetament

L'empaquetament de totes aquestes estructures és molt semblant amb excepció de la que cristal·litza en el grup espacial monoclínic $C2$, la qual té una organització de les columnes de dúplexs diferent: aquestes, formen capes de columnes però amb una inclinació entre elles de 42° (Fig. III-4.8). En canvi, la resta de cristalls estan formats per columnes de dúplexs paral·leles: per les estructures no. 1 i 5, les columnes d'oligonucleòtids tenen la mateixa posició relativa mentre que les estructures no. 2 i 4, també tenen les columnes paral·leles però es troben desplaçades en el cristall. En aquestes últimes, no hi ha interaccions entre dues guanines de columnes diferents.

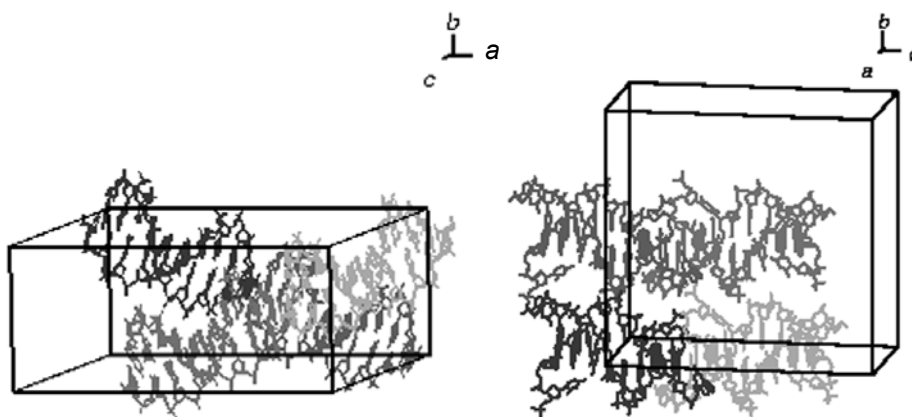


Fig. III-4.8. Empaquetament dels cristalls formant columnes de dúplexs. A l'esquerra, les columnes formen un angle (cristall del grup $C2$). A la dreta, columnes paral·leles, concretament del cristall del grup $C22_1$.

Tot i que els cristalls no. 1 i 5 s'han obtingut en condicions molt diferents (tipus de sal, concentració de sal, fàrmac, etc.) les estructures són pràcticament idèntiques. Les dues uneixen columnes de dúplexs a través de les guanines terminals (G10) però mentre que en l'estructura no. 5 el que fa de pont és un ió Co^{2+} , en l'estructura descrita per Spink *et al.*, (1995) les dues guanines interaccionen a través de molècules d'aigua. Una altra petita diferència entre aquestes dues estructures és la posició de la citosina 1 (C1): en el cas de l'estructura no. 5, forma un triplet amb les bases G8 i C3 del dúplex veí (comentat anteriorment), interaccionant a través de dos ponts d'hidrogen amb la G8. En canvi, en l'estructura no. 1 la citosina 1 està modelada interaccionant amb les bases G2 i C9

del següent dúplex. Aquesta última presenta un mapa de densitat poc clar i donat que l'estructura no. 5 té una resolució més alta, sembla que ha permès posicionar millor aquesta base. També en les estructures no. 2 i 4 la citosina terminal està desaparellada; en el primer cas, es troba a la mateixa posició que en el cristall no. 5 mentre que en el cristall no. 4, es troba molt desordenada. Això és degut un altre cop a la presència del pèptid.

Pel que fa a les guanines terminals (G10), totes, excepte en el cas de l'estructura no. 3 (que forma dúplex), entren al solc menor del dúplex contigu.

Els ions tenen també un paper important en la cristal·lització d'oligonucleòtids. En aquest cas, tres dels cristalls (no. 1-3) s'han obtingut en presència de Mg^{2+} però en cap d'elles el poden veure en l'estructura. En canvi, el Zn^{2+} i el Co^{2+} sí que es detecten en els mapes de densitat de les estructures no. 4 i 5, respectivament. El Zn^{2+} es troba de dues maneres: interaccionant amb els oxígens dels fosfats i interaccionant amb el N7 d'una guanina. El Zn^{2+} però, no actua de pont entres dues columnes com ho fa el Co^{2+} en el cristall no. 5.

Solc menor

Com es mostra a la taula III-4.3, en general, el solc menor d'aquestes estructures és estret com s'espera en seqüències riques en bases A i T. En el cas però de l'estructura no. 2, el solc menor és més ample degut a la presència de la netropsina. També l'estructura no. 3 presenta un solc menor més ample però en aquest cas s'explica per la manera que es disposen els dúplexs de diferents columnes interaccionant a través dels seus solcs.

Detalls estructurals

S'han comparat els paràmetres conformacionals de totes les estructures utilitzant les dades disponibles en el NDB (Berman *et al.*, 1992) i amb l'ajuda del programa 3DNA (Lu *et al.*, 2003) per calcular els paràmetres de la nova estructura no. 5 (veure annex). En general, no s'han trobat grans diferències entre les estructures amb excepció del cristall no. 3 en que diversos fosfats adopten una conformació BII (Fratini *et al.*, 1982).

Respecte als parells de base AT centrals, tots mostren un propulsor d'hèlix (*propeller twist*) relativament gran i negatiu (-14° aproximadament) com s'espera per aquest tipus de seqüències. El resultat d'això és que la distància entre l'àtom C2 d'adenina i l'àtom O2 de timina en parells de bases veïns de l'estructura no. 5

és més curta (3.27 Å). Això es pot considerar com un pont d'hidrogen addicional i feble (Madhumalar i Bansal, 2003) malgrat que l'angle C2-H2...O2 és només 114° i no és òptim per un pont d'hidrogen.

A la taula III-4.4 es mostren els valors dels girs per a les cinc estructures i es comparen amb uns valors de gir esperats descrits a la literatura (Subirana i Faria, 1997). Com es veu a la taula, la majoria dels valors estan dins del valor esperat exceptuant alguns casos marcats en negreta a la taula. Aquestes diferències poden ser degudes a les diferents interaccions presents en cada cristall. En el cas però de les diferències a la regió central AATT, poden ser degudes també a la baixa resolució i per tant a la baixa acuràcia d'algunes de les dades. Un fet sorprenent és que els valors de gir del pas CA/TG són força constants, mentre que aquest és un pas molt variable (Subirana i Faria, 1997).

Cal remarcar de l'estructura no. 5 que les desviacions estàndard de per exemple els girs, així com les dels angles conformacionals (es mostren alguns a la taula III-4.5), d'ascensió (com es veu a la taula III-4.3) són baixes, fet que s'atribueix a la major resolució d'aquestes dades.

no	GpC	CpA/TpG	ApA/TpT	ApT	<Ω> †
1	37.4	38.1	30.0	41.5	36.1 (4.4)
2	34.0/38.2	32.3/32.3	37.1/37.2	34.5	35.1 (2.4)
3	24.9 /37.9	35.8/38.7	38.2/39.6	30.4	35.1 (5.4)
4	39.0	31.7	43.3	29.6	36.8 (5.7)
5	31.8	33.2	36.2	34.9	33.9 (1.8)
esperat	37.5 (2.7)	38.5 (8.6)	35.3 (3.2)	32.0 (2.8)	

Taula III-4.4. Valor dels girs ($^{\circ}$) pels diferents passos del decàmer d(CGCAATTGCG), considerant només l'octàmer central. † valor promig del gir (entre parèntesi es mostra la desviació estàndard). Els valors esperats i la seva desviació estàndard s'han obtingut de Subirana i Faria (1997). Els valors que es desvien més de 2σ estan marcats en negreta. Com que per a les estructures 2 i 3 la unitat asimètrica és un dúplex, tenen dos valors de gir per a cada pas.

Base	ϵ (°)	δ (°)	ζ (°)
G2	179.8	145	-95.6
C3	168.2	101.9	-92.5
A4	176.9	136.9	-96.8
A5	179.1	127.8	-93.8
T6	181.7	118.9	-98.8
T7	186.5	122.0	-87.8
G8	198.6	123.8	-99.4
C9		132.7	
Valor promig	181.5 (9.3)	126.1 (13)	-95.0 (4.0)

Taula III-4.5. *Valors d'alguns dels angles conformacionals per al decàmer d(CGCAATTGCG). Es mostra el valor promig i la seva desviació estàndard entre parèntesis.*

S'ha analitzat també la curvatura de l'octàmer central per a cada estructura. Per això, es van calcular els vectors normalitzats de cada parell de bases amb el programa 3DNA. Prèviament es van haver de situar les cinc estructures al mateix origen, amb la mateixa orientació. El resultat d'això es mostra a la figura III-4.9 on s'han representat angles de 5° pel cercle intern i 10° pel cercle extern respecte el centre del dúplex, és a dir, entre els parells de bases 4 i 5.

Es veu clarament com els parells de bases terminals presenten una major curvatura que els centrals degut a les pròpies interaccions dins del cristall.

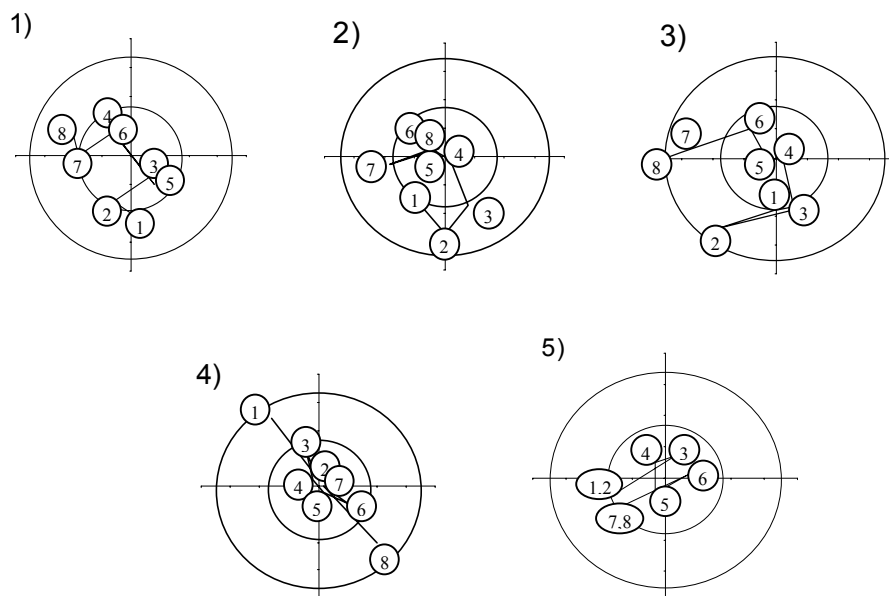


Fig. III-4.9. Representació dels vectors normalitzats dels parells de base per a cada estructura (1-5). Els cercles intern i extern representen angles de 5° i 10° , respectivament, respecte el centre del dúplex (entre els parells de bases 4 i 5).

4.6 DISCUSSIÓ

S'ha determinat un nou entorn de cristal·lització per al decàmer d(CGCAATTGCG) i s'ha comparat amb altres estructures ja descrites per aquesta mateixa seqüència.

Ja des de la cristal·lització es va observar una clara millora dels cristalls en utilitzar Co^{2+} a les gotes i posteriorment, s'ha vist el paper important d'aquest ió en l'estabilització de l'estructura i en l'empaquetament. Per exemple, el decàmer d(CGTATATACG) cristal·litzat amb condicions semblants però utilitzant Ni^{2+} en comptes de Co^{2+} , l'empaquetament va donar lloc al grup espacial $P4_12_12$ (Abrescia *et al.*, 1999). En aquesta estructura, guanines desaparellades també interaccionen amb el Ni^{2+} que fa de pont entre dues columnes de dúplex, però en aquest cas les columnes es disposen perpendiculars en comptes de paral·leles. Segurament, el

Co²⁺ ha ajudat també a obtenir dades a major resolució que les anteriorment descrites per aquesta seqüència.

Un altre element que ajuda a estabilitzar l'empaquetament és la formació del triplet C1⁺:G8·C3 amb la citosina terminal, que tot i sent més mòbil que la resta de l'estructura s'ha posicionat d'una manera molt fiable formant dos ponts d'hidrogen amb la base G8.

Pel que fa al fàrmac que s'ha utilitzat, es pot dir de les proves de cristal·lització que ajuda clarament a obtenir millors cristalls. Però no deu ser prou específic (com es va mostrar en estudis de footprinting) com perquè es quedi fixat intercalant entre un mateix parell de bases. L'estabilització doncs dels cristalls gràcies al fàrmac, es deu atribuir a la seva cadena peptídica que interacciona amb els fosfats més que a la intercalació.

S'ha pogut observar també l'efecte de la relativament alta resolució de les noves dades: per una banda, ha permès veure l'esquelet ben definit d'aigües a la regió AATT de la seqüència que no s'havia observat en les altres estructures d'aquesta seqüència descrites a menor resolució. En canvi, sí que s'ha detectat en altres estructures a una resolució moderada com per exemple la descrita per Vlieghe *et al.* (1996). S'ha observat també una menor variabilitat de l'estructura (com per exemple en el gir, angles conformationals, etc.) i finalment s'ha pogut detectar la citosina 1 a una posició més clara.

Respecte a la comparació entre les cinc estructures, s'ha vist en general, una variació de la part central del decàmer molt petita presentant les majors diferències a les bases terminals.

Finalment, es conclou d'aquestes anàlisis, que les condicions de cristal·lització tenen poca influència sobre la conformació de l'estructura però en canvi, afecten d'una manera important a l'empaquetament del cristall.

5. ESTUDI ESTRUCTURAL DE L'HEPTÀMER d(GAATTCTG). POSSIBLES APLICACIONS EN NANOESTRUCTURES

5.1 CRISTAL·LITZACIÓ

L'oligonucleòtid d(GAATTCTG) no s'havia cristal·litzat prèviament. Aquesta seqüència es va sintetitzar amb una guanina extra (sense la seva base complementària) per tal de que aquesta interaccionés amb ions Ni^{2+} o Co^{2+} i actués de pont per unir diferents oligonucleòtids. En aquesta tesi s'han fet intents de cristal·litzar aquesta seqüència amb les següents acridines: Acr(RGR), Acr(RSR), Acr(GR) i AcrK(R)₄. També s'han fet proves de cristal·lització sense fàrmac. En total, s'han realitzat unes 120 gotes les condicions de les quals es resumeixen a continuació:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.5/0, 0.5/0.5, 0.5/1 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20 mM

sal:

MgCl₂: 10, 100 mM

BaCl₂: 10 mM

NiCl₂: 2, 3, 4, 5, 8 mM

CoCl₂: 3, 5, 7 mM

MgCl₂ + NiCl₂: 5, 10 + 1, 2 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0, 0.5, 1 mM

precipitant:

MPD: 5, 10, 15, 20, 25%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

Els millors cristalls d'aquesta seqüència s'obtenen utilitzant els ions Co^{2+} o Ni^{2+} a una concentració 5 mM, sense espermina i sense fàrmac. Aquesta és l'única

seqüència utilitzada en aquesta tesi en que els cristalls milloren quan no hi ha fàrmac a la gota.

S'obtenen en una mateixa gota dues formes cristal·lines mostrades a la figura III-5.1: varetes irregulars i cristalls de forma cúbica que no extingeixen la llum polaritzada.

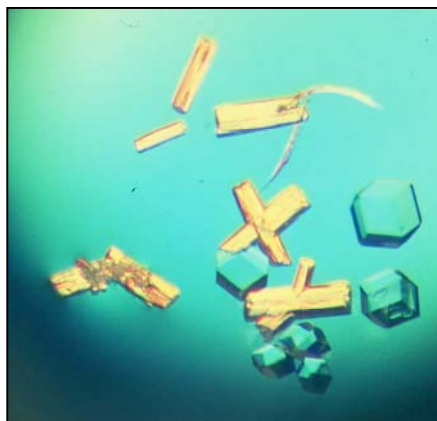


Fig. III-5.1. Dues formes cristal·lines de l'heptàmer d(GAATTCG): varetes irregulars i cristalls de forma cúbica.

S'ha difractat alguna vareta de les que es mostren a la figura III-5.1 però sense bons resultats. En canvi, els cristalls de forma cúbica sí que han difractat suficientment bé com per recollir-se. Els cristalls s'han obtingut a una temperatura de 20°C, emprant la difusió de vapor en gota penjant i a les següents condicions:

oligo: 0.5 mM tampó: cacodilat de sodi 20 mM, pH = 6.5 NiCl ₂ : 5 mM MPD: 10%

Per obtenir aquests cristalls cal una concentració de MPD al reservori del 20% i després d'unes dues setmanes, apareixen els cristalls d'una mida de 150x150x150 µm aproximadament.

5.2 RECOLLIDA DE DADES I PROCESSAT

S'han recollit dos cristalls diferents a la línia BM14 del sincrotró de Grenoble utilitzant un detector CCD (MARCCD). El primer cristall (cristall 1) es va recollir a una longitud d'ona d'1.00 Å amb una resolució màxima de 2.8 Å (Fig. III-5.2). Donat que les condicions de cristallització contenien níquel, es va voler utilitzar aquest ió per resoldre l'estructura amb el mètode de MAD. El fet que la seqüència conté una guanina desaparellada, o millor dit, sense la seva base complementària, i tenint present que el Ni^{2+} ja s'ha descrit interaccionant de manera específica amb el N7 de guanines desaparellades (Abrescia *et al.*, 1999), feia pensar que en la present estructura el Ni^{2+} podia formar també interaccions amb la guanina i poder-lo detectar per MAD. Així, el cristall 2 es va recollir a tres longituds d'ona diferents fins a una resolució de 2.9 Å. Prèviament a les recollides es va realitzar l'espectre d'absorció del mateix cristall per tal de poder determinar les longituds d'ona del pic i del punt d'inflexió del níquel, i també per trobar els seus factors de dispersió anòmala f' i f'' experimentals. D'aquí s'obté l'espectre que es mostra a la figura III-5.3.

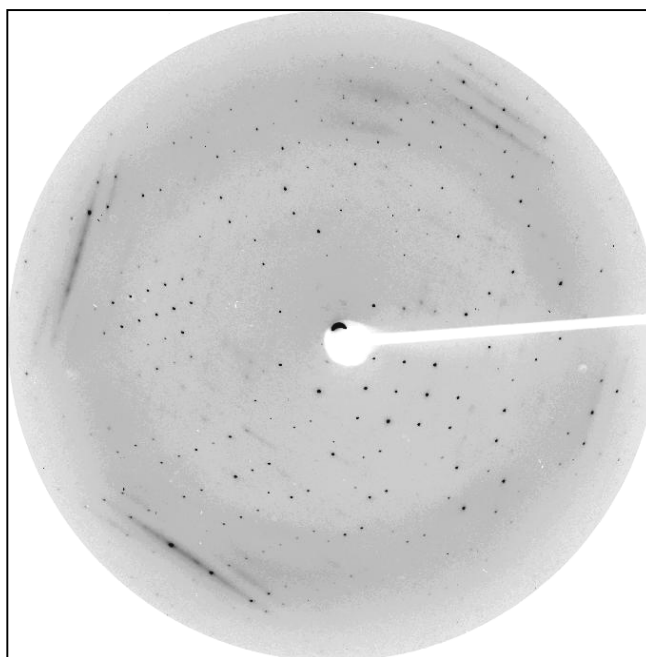


Fig. III-5.2. Espectre de difracció del cristall 1 de la seqüència d(GAATTCG). Foto recollida amb una oscil·lació de 1.5°.

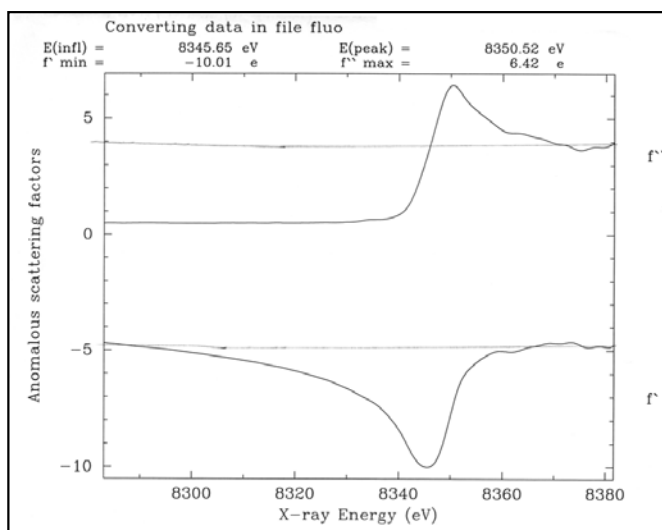


Fig. III-5.3. Espectre d'absorció del níquel en el cristall de d(GAATTCG). La corba superior representa f'' i la inferior f' .

Així doncs, es troben el valors presentats a la taula III-5.1:

	E(KeV)	λ (Å)	f'	f''
Pic	8.35155	1.48475	-7.4	6.4
Inflexió	8.34660	1.48563	-10	3.6
remota	9.45444	1.31155	-2	3.5

Taula III-5.1. Valors d'E, λ , f' i f'' de les tres recollides realitzades. Els valors de f' i f'' de la remota s'han trobat a partir de l'espectre teòric del níquel i els del punt d'inflexió i del pic a partir del cristall.

El processat i escalat dels dos cristalls es van realitzar amb els programes DENZO i SCALEPACK, respectivament, sense unir els parells de Friedel. Per aprofitar la millor resolució del cristall 1 i el senyal anòmal del cristall 2, les reflexions obtingudes dels dos cristalls es van combinar amb el programa XPREP (Sheldrick, 2003). A la taula III-5.2 es resumeixen les estadístiques de les dades de difracció:

	Cristall 1	Cristall 2			
		Pic	Punt d'inflexió	Remota	Dades combinades*
λ (Å)	1.00000	1.48475	1.48563	1.31155	
Grup espacial	I23	I23	I23	I23	I23
Dimensions cel·la (Å)	a = 70.87	A = 70.87	a = 70.87	a = 70.87	a = 70.87
Temperatura recollida (K)	120	120	120	120	
Rang de resolució (Å)	25-2.8 (2.9-2.8)	25-2.9 (3.0-2.9)	25-2.9 (3.0-2.9)	26-2.9 (3.0-2.9)	25-2.8 (2.91-2.85)
Completitud (%)	93.4 (54.3)	95.6 (88.5)	99.2 (93.3)	99.5 (100)	97.4 (82.8)
Reflexions úniques	2644	2454	2532	2561	1491
Redundància†	4.1	18.9	18.4	18.3	
R_{merge}	0.024 (0.299)	0.058 (0.761)	0.054 (0.610)	0.052 (0.639)	0.095 (0.273)

Taula III-5.2. Resultats i estadístiques de les dades de difracció de la seqüència d(GAATTCG). Entre parèntesis es mostren els valors corresponents a l'última capa de resolució. *Estadístiques després d'unir les dades de les quatre longituds d'ona (s'han unit els parells de Freidel). †Reflexions totals recollides dividides entre el número de reflexions úniques.

5.3 RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA I AFINAT

L'estructura es va resoldre pel mètode de MAD emprant el Ni^{2+} com a àtom pesat. El primer pas després de processar les dades, era localitzar els àtoms de Ni^{2+} . Per això es va utilitzar el programa shelxd. Es van detectar quatre pics corresponents a quatre àtoms de níquel i un cop fet això, es van determinar les fases de la resta de l'estructura amb el programa shelxe. Per optimitzar les fases es va modificar la quantitat de dissolvent estimada obtenint els millors resultats amb un 50% de dissolvent. Les fases es van visualitzar amb el programa XtalView i a partir d'aquí es va crear un model que s'aproximés a la densitat experimental trobada. El model utilitzat va ser un dúplex de forma B-DNA ideal de la seqüència GAATTC creat amb el programa TURBO-FRODO (la guanina terminal que no té la seva base complementària no s'ha utilitzat pel model inicial).

L'afinat de l'estructura es va dur a terme amb el programa REFMAC5 utilitzant el model creat i les fases experimentals obtingudes per MAD. Per tal d'obtenir el factor R_{free} , es van utilitzar el 5% de les reflexions. Després de diversos cicles d'afinament isotròpic per la màxima probabilitat, es van afegir els quatre àtoms de Ni^{2+} (que de fet ja els havíem determinat prèviament) que interaccionen amb les quatre guanines del dúplex, i també es van afegir les dues guanines terminals que es troben desaparellades interaccionant amb dos dels Ni^{2+} a través del N7. Finalment, es van afegir cinc molècules d'aigua al voltant de cada àtom de Ni^{2+} , que juntament amb el N7 de les guanines, formen un octàedre. L'ocupació dels àtoms de Ni^{2+} és 0.7 així com la de les molècules d'aigua que l'envolten. Donat la baixa resolució de les dades no es van detectar més molècules d'aigua en l'estructura.

El dúplex presenta una pseudosimetria que es va aprofitar en l'afinament utilitzant-la com a restriccions de simetria no cristal·logràfica.

Els factors R finals que s'obtenen són $R = 0.282$ i $R_{\text{free}} = 0.264$ en un rang de resolució de 25-2.8 Å.

Com es pot veure el factor R és força elevat. Això és degut a l'elevada quantitat de dissolvent desordenat present en l'estructura (un 76% aproximadament). Però el fet que s'han utilitzat les fases experimentals durant tot l'afinat juntament amb la bona qualitat dels mapes de densitat indiquen que l'estructura s'ha resolt correctament amb la limitació és clar, de la resolució de les dades. Un exemple del mapa de densitat es mostra a la figura III-5.4. També s'han obtingut uns valors

estàndard dels paràmetres conformacionals de l'hèlix, calculats amb el programa 3DNA (veure annex).

Un altre fet poc habitual és obtenir un valor del factor R_{free} més baix que el factor R ; cal tenir present que per tal de no perdre moltes reflexions (ja partim de poques degut a la baixa resolució de les dades) només s'ha utilitzat un 5% de reflexions per calcular el R_{free} . Per tant, conté molt poques reflexions i pot donar valors estranys però tot i així, ha sigut un bon indicador de l'afinat. Els resultats finals de l'afinat es resumeixen a la taula III-5.3:

Contingut de la unitat asimètrica	Un dúplex 4 Ni^{2+} 20 H_2O
Z†	24
Rang de resolució (Å)	25-2.8
Reflexions	1388
R/ R_{free} (5%)	0.282/0.264
R (total)	0.291
wMPE (°)*	27.2

Taula III-5.3. Resultats i estadístiques finals de l'afinat de la seqüència d(GAATTCG). †Nombre d'unitats asimètriques relacionades per simetria presents a la cel·la. *weighted mean phase error.

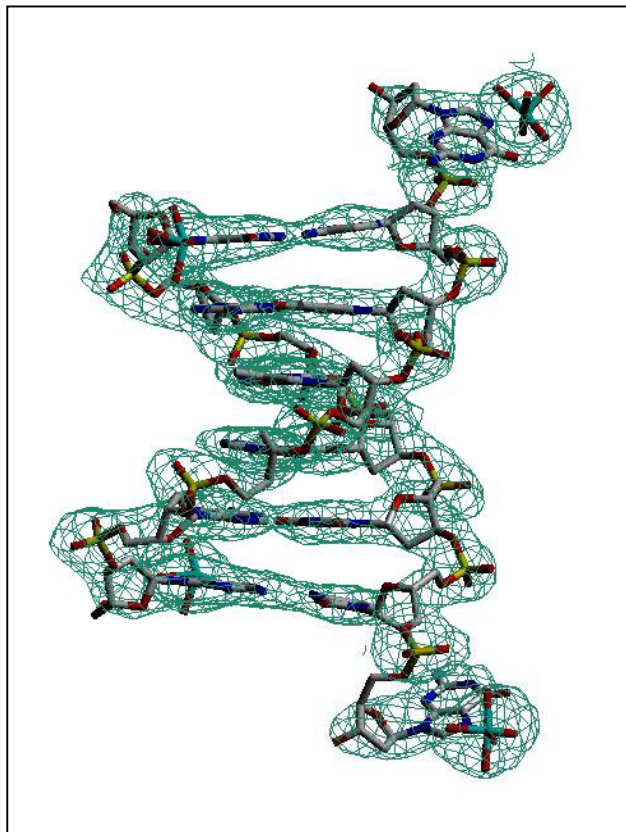


Fig. III-5.4. Mapa de densitat electrònica $2F_o-F_c$ (1σ) de la unitat asimètrica del cristall de d(GAATTCG). Es poden veure els quatre ions Ni^{2+} amb les seves aigües coordinades.

5.4 ESTUDI ESTRUCTURAL

Descripció de l'estructura

Com es mostra a la figura III-5.4, la unitat asimètrica del cristall està formada per un dúplex i quatre àtoms de Ni^{2+} que interaccionen amb el N7 de les quatre guanines presents. Tots els àtoms de Ni^{2+} es troben hidratats adoptant una conformació octaèdrica. Dues d'aquestes guanines (una a cada extrem del dúplex) es troben desaparellades i entren al solc menor del dúplex veí. Aquesta interacció serveix d'unió entre diferents dúplexs que s'apilen per formar columnes.

Concretament, la guanina desaparellada forma dos ponts d'hidrogen N3-N2 amb la guanina del dúplex veí. També hi ha interacció amb el dúplex veí a través d'una molècula d'aigua coordinada al níquel i l'oxigen d'un fosfat de l'altre dúplex. Aquesta unió entre dos dúplex d'una mateixa columna es mostra a la figura III-5.5.

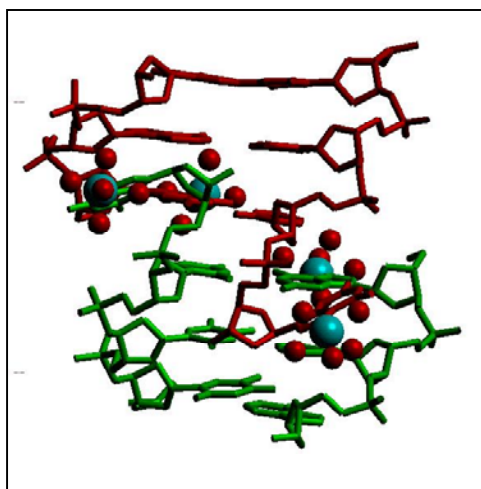


Fig. III-5.5. *Unió entre dos dúplex (mostrats en color vermell i verd) d'una mateixa columna a través de les guanines terminals. Els ions de Ni^{2+} es mostren com esferes blaves i les molècules d'aigua del seu voltant es mostren com esferes vermelles.*

Les columnes de dúplex interaccionen entre elles a través d'un dels àtoms de Ni^{2+} , concretament el que es troba interaccionant amb la guanina 1. Aquest forma ponts d'hidrogen a través de les seves aigües d'hidratació amb un fosfat de l'adenina 3 del dúplex de l'altra columna. Hi ha dos ponts d'hidrogen presents com es mostra a la figura III-5.6. Cada dúplex presenta dues d'aquestes interaccions idèntiques i relacionades per simetria. Aquestes interaccions fan que els dúplex no es troben paral·lels entre sí, sinó que es creuen. Això determina la organització de les columnes de dúplex presents en el cristall.

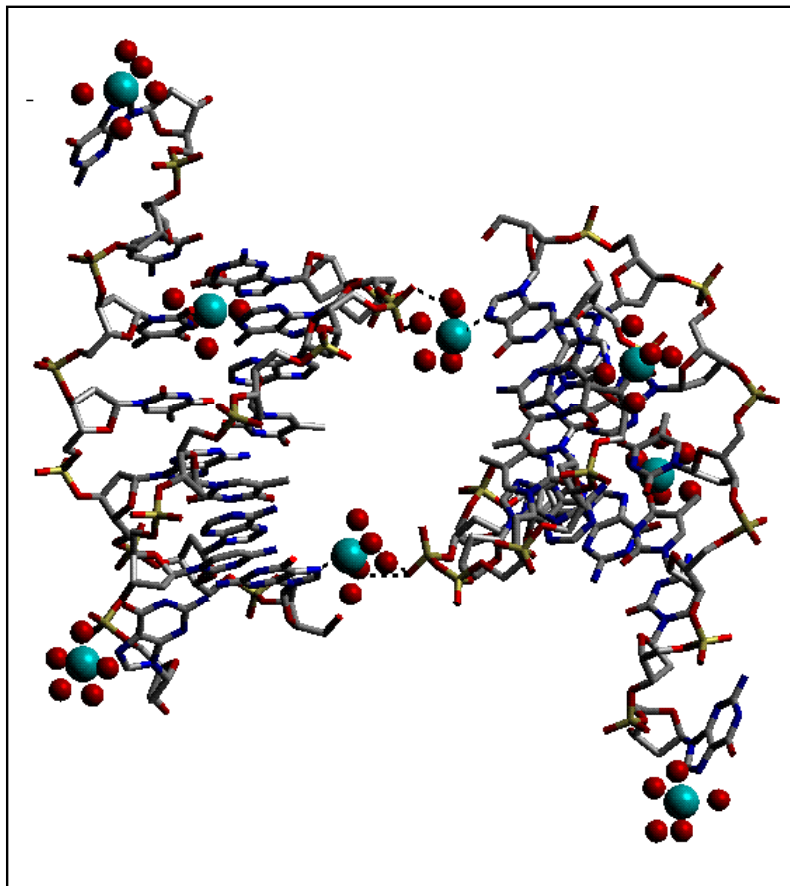


Fig. III-5.6. *Interacció entre dos dúplexs de dues columnes diferents. Les esferes blaves representen els àtoms de Ni²⁺ i les vermelles les molècules d'aigua. Els ponts d'hidrogen es mostren amb línies discontinües.*

La combinació dels dos tipus d'interaccions que es mostren a les figures III-5.5 i III-5.6 són les responsables d'estabilitzar el cristall i defineixen el seu empaquetament. Un exemple de la organització de les columnes es mostra a la figura III-5.7:

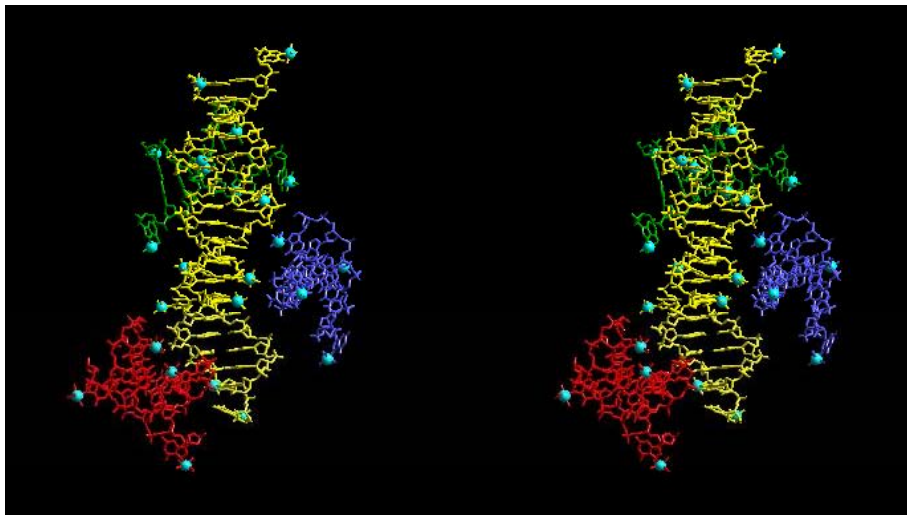


Fig. III-5.7. Visió estereogràfica de la interacció dels dúplex de diferents columnes. En groc, tres dúplex d'una mateixa columna. En blau, vermell i verd, tres dúplex de columnes diferents que interaccionen amb la columna central.

Empaquetament del cristall

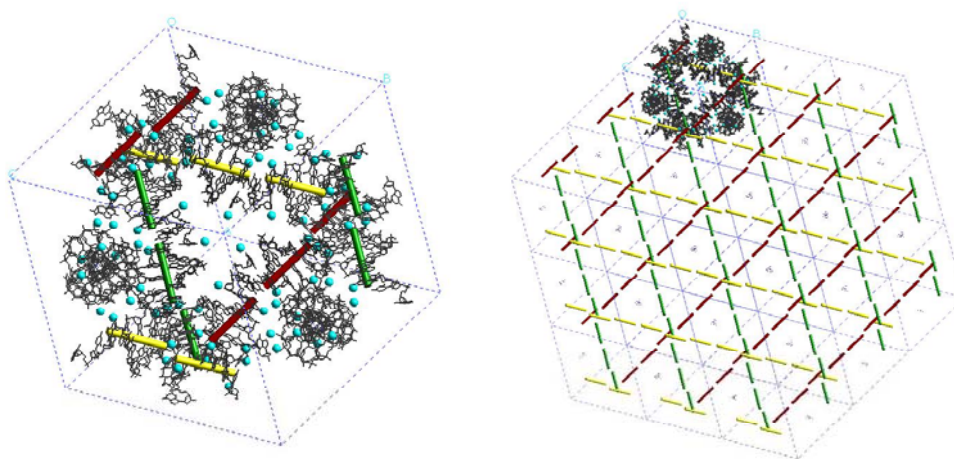


Fig. III-5.8. A l'esquerra, representació d'una cel·la del cristall de d(GAATTCG). A la dreta, 27 cel·les del cristall. Els eixos de les hèlices vénen representats per columnes de diferents colors.

Una cel·la del cristall cúbic I23 està formada per 24 dúplexs i 96 àtoms de Ni^{2+} la organització dels quals ve governada per les interaccions anteriorment descrites. Les diferents columnes de dúplexs es disposen paral·leles a les diagonals de la cel·la com es mostra a la figura III-5.8 i es creuen entre elles a través del Ni^{2+} que interacciona amb el fosfat de la columna de dúplexs veïns.

Cavitats de dissolvent

El cristall presenta unes grans cavitats on no s'ha trobat res en els mapes de densitat. En aquestes hi ha el dissolvent desordenat i ocupen una gran part del cristall. De fet, s'ha calculat el volum que ocupen els àtoms de DNA i és només del 24% aproximadament. El càlcul s'ha fet prenent els següents volums estimats de les bases: pdCpdG = 550 \AA^3 , pdApdT = 555 \AA^3 i pdG = 295 \AA^3 . Així, un dúplex ocuparia 3615 \AA^3 però com que hi ha 24 dúplexs a la cel·la, el volum de DNA a la cel·la és de 86760 \AA^3 . El volum aproximat de la cel·la és 357911 \AA^3 .

Aquestes cavitats de dissolvent es troben al centre i a les cantonades de les cel·les i es poden descriure com icosaèdres, unint dotze àtoms de Ni^{2+} . Dins d'aquests icosaèdres no s'hi troba cap àtom, tenen una mida d'uns 50 \AA i estan interconnectats per canals de dissolvent. A la figura III-5.9 es mostren les cavitats de dissolvent.

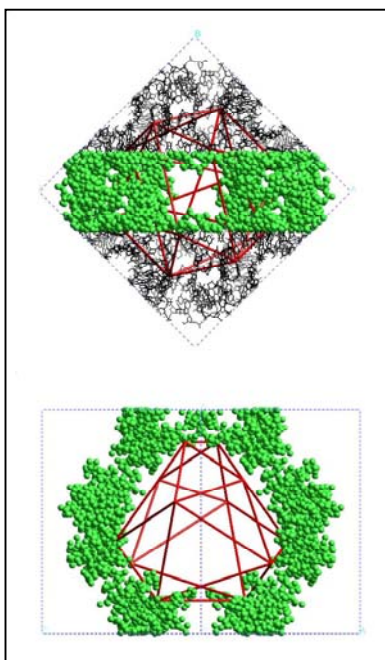


Fig. III-5.9. Representació de les cavitats de dissolvent. En vermell es mostra l'icosaedre que s'obté unint els níquels. A la part superior, una cel·la completa on els àtoms centrals es mostren com a esferes verdes. A la part inferior, només es mostren aquests àtoms resultants de fer un tall transversal pel centre de la cel·la. Es pot veure més clarament la cavitat de dissolvent.

5.5 POSSIBLES APLICACIONS EN NANOESTRUCTURES

Degut a les propietats úniques del DNA, s'ha estudiat la seva utilització per aplicacions en nanotecnologia. Aquestes propietats que li donen un especial interès són per una banda la seva mida, i sobretot la seva capacitat de reconeixement per formar una doble hèlix. Aquest reconeixement es basa en els aparellaments de les bases complementàries C amb G i T amb A. Aquesta especificitat de seqüència s'ha utilitzat per dissenyar nanoestructures com s'esmenta a la revisió feta recentment per Seeman (2003). Calen però, molècules de DNA ramificades amb extrems cohesius per a construir aquest tipus de sistemes i per això s'estan desenvolupant fragments de DNA sintètics amb aquestes propietats. L'objectiu final és obtenir un sistema tridimensional com el cub que es mostra a la figura III-5.10.

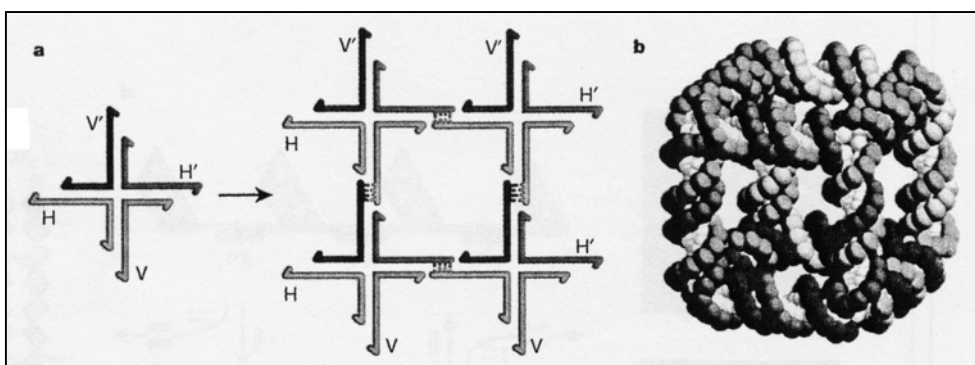


Fig. III-5.10. a) unions de DNA ramificat per formar un cristall bidimensional. Els extrems cohesius són els responsables d'estabilitzar aquesta estructura. b) estructura tridimensional cúbica obtinguda amb DNA.

Una altra manera d'obtenir aquestes nanoestructures és mitjançant la utilització de metalls que ajudin i enforteixin l'aparellament de les bases (Wagenknecht, 2003). Per això, es substitueixen les bases del DNA per agents quelants que tindran gran afinitat per ions com poden ser el Cu^{2+} , Pd^{2+} i Ag^+ . A la figura III-5.11 es mostra algun d'aquests exemples:

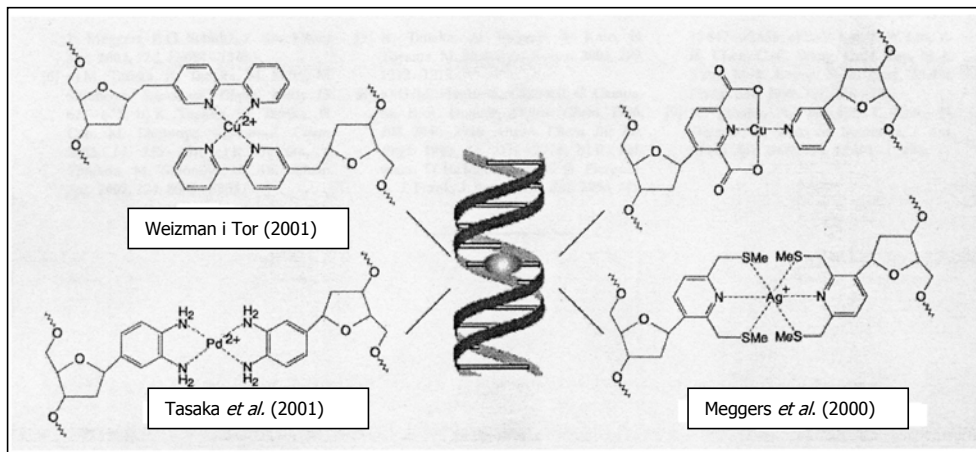


Fig. III-5.11. Diverses modificacions de parells de bases en un dúplex de DNA. Aquestes bases interaccionen amb ions estabilitzant més el dúplex.

L'estructura cúbica que s'ha obtingut amb la seqüència d(GAATTCG) presenta unes característiques semblants a les requerides per formar aquest tipus de nanoestructures: s'obté un arranjamnt cúbic a través d'unes interaccions molt concretes. Aquestes interaccions ja s'han descrit en apartats anteriors i tenen lloc gràcies als ions de Ni^{2+} presents que tenen una especial afinitat pels N7 de les guanines. També el fet que la seqüència té una guanina desaparellada fa que actui d'extrem cohesiu entrant al solc menor del dúplex veí.

5.6 DISCUSSIÓ

El cristall de la seqüència d(GAATTCG) és el primer cristall de B-DNA que ha cristal·litzat en un grup espacial cúbic. El fet de tenir una guanina desaparellada feia pensar que el cristall s'estabilitzaria a través d'interaccions guanina- Ni^{2+} -guanina com les descrites anteriorment tant per l'ió Ni^{2+} (Abrescia *et al.*, 1999) o per l'ió Co^{2+} (per exemple, Valls *et al.*, 2004). Aquestes interaccions no s'han trobat en el cristall però clarament, tant la guanina terminal com l'ió Ni^{2+} són els causants de l'empaquetament (com s'ha descrit prèviament). L'organització del cristall consta de columnes de dúplex presents en quatre direccions diferents a la cel·la que es creuen entre elles. En altres estructures descrites també amb columnes de dúplex que es creuen, les interaccions entre columnes tenen lloc a

través d'interpenetració dels seus solcs (per exemple, les descrites per Heinemann *et al.*, 1992, Goodsell *et al.*, 1995, Timisit *et al.*, 1989). En canvi, en aquest cas no es dona aquesta interpenetració sinó que hi ha interaccions guanina-Ni²⁺-fosfat.

Les grans cavitats de dissolvent són d'uns 50 Å de diàmetre i formen un icosaèdre definit pels àtoms de Ni²⁺. Aquest icosaèdre no és del tot regular però sí que té una alta simetria: els 12 vèrtexs que el formen són idèntics i té cares i eixos de tres tipus diferents. Les repulsions entre els àtoms de Ni²⁺ que formen l'icosaèdre poden ser les causants d'aquestes regions de dissolvent tan grans. Veient aquests grans espais buits de l'estructura, pot ser interessant intentar cristal·litzar aquesta seqüència amb proteïnes o altres substàncies que puguin acomodar-se en aquestes cavitats.

L'estructura presentada pot obrir les portes per a dissenyar seqüències que pugin formar nanoestructures de diferent manera que les revisades per Seeman (2003) i Wagenknecht (2003). Per una banda, el paper de les guanines desaparellades que poden servir com un nou mode d'extrems cohesius. A més, presenta una nova manera de ramificar-se el DNA, utilitzant l'ió Ni²⁺ (o possiblement també el Co²⁺ que presenta propietats semblants) per formar interaccions guanina-Ni²⁺-fosfats o guanina-Ni²⁺-guanina.

6. ESTUDI ESTRUCTURAL DE L'HEXÀMER d(CGTACG) UNIT A DOS FÀRMACS INTERCALANTS DIFERENTS

6.1 CRISTAL·LITZACIÓ

La seqüència d(CGTACG) ha estat cristal·litzada en nombroses ocasions en presència de diferents fàrmacs intercalants. Presenta estructures en diferents grups espacials com per exemple P6₄ (Todd *et al.*, 1999), P6₅22 (Shui *et al.*, 2000), C222 (Yang *et al.*, 2000), P4₁2₁2 (Wang *et al.*, 1987), F222 (Wang *et al.*, 1984), P1 (Cirilli *et al.*, 1993), P6₁ (Gao *et al.*, 1990), P6₁22 (Egli *et al.*, 1991) i P121 (Williams *et al.*, 1990). Totes aquestes estructures contenen diversos fàrmacs intercalats però aquest oligo també ha estat cristal·litzat sense fàrmac en la forma Z del DNA (Wang *et al.*, 1984, Parkinson *et al.*, 1995).

En aquest treball s'ha intentat complexar aquesta seqüència amb els següents fàrmacs: AcrK(K)₄, AcrK(R)₄, Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR), proflavina, BSU-9010, BSU-1073, BSU-9022 i BSU-9042. S'han fet unes 130 gotes de les següents condicions:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/1, 0.2/2, 0.5/1, 0.65/1.3 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20, 40 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 40, 100 mM

BaCl₂: 5, 10, 100 mM

NiCl₂: 0.8 mM

MgCl₂ + NiCl₂: 5, 10 + 1 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 4, 10 + 0.5, 1, 2, 4 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 4, 5, 10 + 1, 3 mM

BaCl₂ + NiCl₂: 4, 5 + 1 mM

BaCl₂ + MnCl₂: 5 + 1 mM

CaCl₂ + CoCl₂: 4 + 1 mM

CaCl₂ + NiCl₂: 5 + 1 mM

espermina: 0, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mM

precipitant:

MPD: 0, 4, 10, 15, 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

De totes aquestes condicions s'ha obtingut precipitat cristal·lí amb els fàrmacs Acr(RSR) i Acr(RGR) però no s'han pogut millorar les condicions per a obtenir un cristall. Amb dos dels fàrmacs sí que s'han aconseguit cristalls prou bons com per ser recollits (Fig. III-6.1). Aquests fàrmacs són l'acridina AcrK(K)₄ i l'antraquinona BSU-9022. Els millors cristalls es van aconseguir emprant la difusió de vapor en gota penjant i a les següents condicions:

oligo: 0.5 mM
fàrmac AcrK(K)₄: 1 mM
tampó: cacodilat de sodi 20 mM, pH = 7.0
BaCl₂: 4 mM
CoCl₂: 1 mM
espermina: 0.5 mM
MPD: 10%

oligo: 0.5 mM
fàrmac BSU-9022: 1 mM
tampó: cacodilat de sodi 20 mM, pH = 6.5
BaCl₂: 4 mM
CoCl₂: 1 mM
MPD: 10%

Els cristalls apareixen en dues setmanes, amb una concentració de MPD al reservori del 30% i a una temperatura de 20°C. En el cas de l'acridina, les mides dels cristalls són de 150x150x100 μm mentre que per l'antraquinona tenen unes dimensions més petites, de 100x80x80 μm aproximadament. En els dos casos els cristalls són del color del fàrmac corresponent. Un cop apareixen els cristalls es congelen a 120 K amb nitrogen líquid.

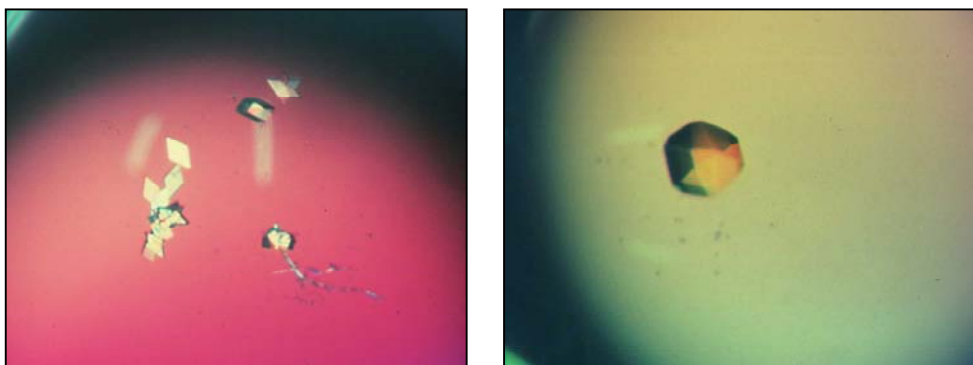


Fig. III-6.1. Cristalls obtinguts amb la seqüència d(CGTACG). A la dreta, cristall de forma pseudo-piramidal obtingut amb el fàrmac AcrK(K)₄. El color groc del cristall és degut al fàrmac. A l'esquerra, cristalls en forma de paral·lelopíped obtinguts amb el fàrmac BSU-9022. Aquests cristalls també presenten un color ataronjat.

6.2 RECOLLIDA DE LES DADES I PROCESSAT

Complex d(CGTACG)-antraquinona (E1): el cristall va ser recollit a la línia BM14 del sincrotró de Grenoble (ESRF) emprant un detector CCD (MARCCD) i a una longitud d'ona de 0.79986 Å. La distància del cristall al detector era 150 mm i la màxima resolució de les dades és de 2.0 Å. Es van recollir 120 fotos del cristall amb una oscil·lació de 1.5° per a cada foto.

Complex d(CGTACG)-acridina (E2): en aquest cas es tenen diverses recollides de diferents cristalls. S'han recollit dades tant amb llum sincrotró (de Grenoble i Hamburg) com amb una font convencional de raigs X que es disposa al laboratori. Per a resoldre l'estructura final, s'han utilitzat les millors dades recollides a la línia X13 del sincrotró d'Hamburg (DESY) emprant un detector MARCCD ($\lambda = 0.800$ Å). La màxima resolució assolida és de 1.4 Å i per tal de no saturar les reflexions de baixa resolució es van fer dues recollides del mateix cristall. Una recollida es va fer a una distància de 120 mm del detector amb una determinada dosi (el sincrotró d'Hamburg funciona amb dosi i no amb temps d'exposició) per tal de recollir bé les reflexions corresponents a l'alta resolució. L'altra recollida es va fer a una distància de 200 mm amb una dosi més baixa evitant així la supersaturació de les reflexions de baixa resolució. L'oscil·lació de cada foto va ser de 0.5° per a les dues

recollides. S'han obtingut recollides d'altres cristalls d'aquest complex que com es veurà posteriorment, han ajudat en alguns estadis de l'afinat.

A la figura III-6.2 es mostra un exemple dels espectres de difracció dels dos cristalls:

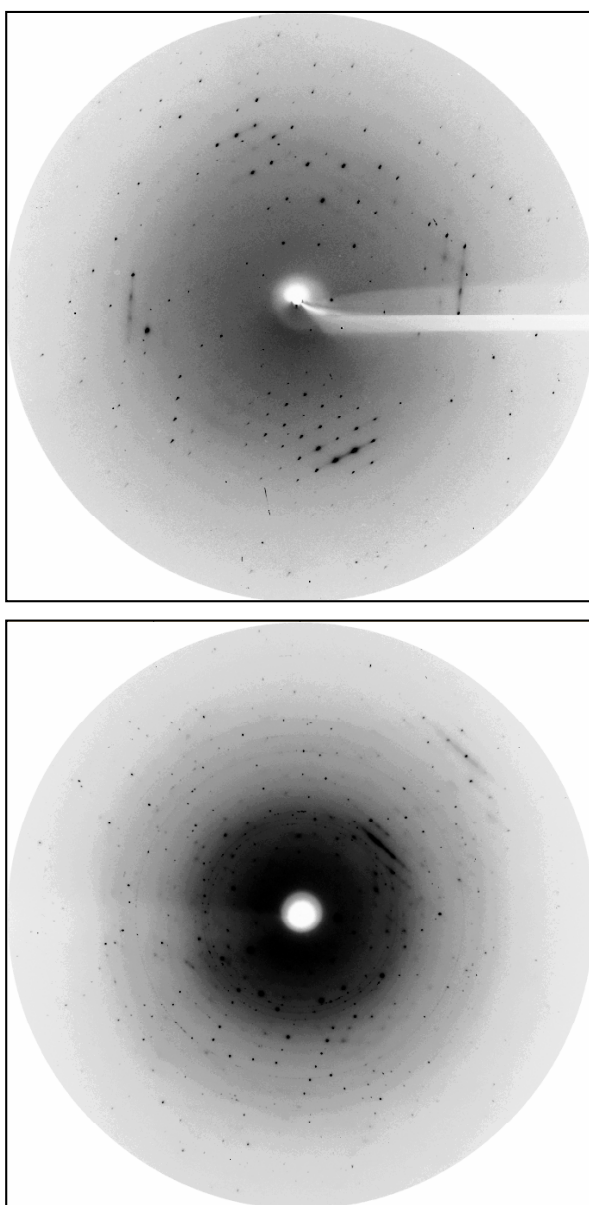


Fig. III-6.2. Espectres de difracció dels cristalls obtinguts amb la seqüència $d(\text{CGTACG})$. A la part superior, espectre del cristall amb el fàrmac BSU-9022. A la part inferior, cristall del fàrmac AcrK(K)₄. D'aquest últim es mostra un dels espectres de la recollida a alta resolució, per això es pot veure com les reflexions de baixa resolució estan supersaturades.

Totes les dades s'han processat i escalat amb els programes DENZO i SCALEPACK, respectivament. Per l'estructura E2, com que es tenien dues recollides diferents del mateix cristall, es van processar i escalar per separat i després es van combinar les reflexions de cada recollida. Les estadístiques finals dels dos cristalls es mostren a la taula III-6.1 i com es veu, les dues estructures són isomòrfiques, cristal·litzen en el mateix grup espacial i amb unes dimensions de cel·la molt semblants:

	E1 (antraquinona)	E2 (acridina)
Grup espacial	C222	C222
Dimensions cel·la (Å)	a = 29.056 b = 52.856 c = 40.084	a = 28.66 b = 53.47 c = 40.69
Temperatura recollida (K)	120	120
Rang de resolució (Å)	25-2.0 (2.07-2.0)	25-1.4 (1.45-1.40)
Completitud (%)	96.2 (78.7)	96.0 (95.2)
Reflexions úniques	2190	6152
Redundància†	16.4	11.8
R _{merge}	0.035 (0.101)	0.082 (0.117)

Taula III-6.1. Resultats i estadístiques de les dades de difracció de la seqüència d(CGTACG) amb dos fàrmacs diferents. Entre parèntesis es mostren els valors corresponents a l'última capa de resolució. † Reflexions totals recollides dividides entre el número de reflexions úniques.

6.3 AFINAT DE LES ESTRUCTURES

Recentment s'han descrit diverses estructures d'aquesta seqüència isomòrfiques entre elles i isomòrfiques a les estructures E1 i E2 (Thorpe *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2000, Adams *et al.*, 2000, Teixeira *et al.*, 2002 i Adams *et al.*, 2004). Per això, s'ha utilitzat com a model per resoldre les dues estructures una de les ja publicades, concretament la descrita per Yang *et al.* (2000). Tant les molècules d'aigua, els ions i el fàrmac s'han tret del model inicial, deixant així només un dúplex de la seqüència de DNA. En el model hi falta una de les citosines terminals, la qual està massa desordenada per detectar-se en els mapes de densitat.

Donat que la cel·la del model és molt semblant a la de les estructures que es volen resoldre, s'ha afinat directament el model sense emprar el reemplaç molecular. El programa que s'ha utilitzat per afinar les dues estructures és el REFMAC5 i en els dos casos s'ha utilitzat un 10% de les reflexions per tal de calcular el valor de R_{free} .

E1

L'estructura que conté l'antraquinona s'ha afinat utilitzant el mètode de la màxima probabilitat amb un afinament isotròpic dels factors d'estructura. Després de diversos cicles d'afinament es van afegir dos ions Co^{2+} que es troben interaccionant amb el N7 de les guanines 2 i 12 juntament amb les seves aigües de coordinació. Proper també a la guanina 12 es va afegir un ió Ba^{2+} interaccionant amb l'O6 d'aquesta guanina. També es va poder modelar un ió Na^+ entre quatre fosfats de la guanina 8 relacionats per simetria. La densitat electrònica provinent d'un ió Na^+ és la mateixa que la d'una molècula d'aigua, i des d'aquest punt de vista no es poden diferenciar (Subirana i Soler-López, 2003). La posició de la densitat trobada entre quatre fosfats, fa poc possible la presència d'una molècula d'aigua i per això es proposa un ió Na^+ en aquesta posició. Finalment, quedava per assignar una densitat positiva en els mapes F_o-F_c present entre quatre fosfats de la guanina 6. Aquesta densitat no tenia un màxim al centre dels quatre fosfats sinó que presentava quatre màxims a una distància d'uns 2 Å dels quatre oxígens. Aquesta distància feia pensar en la possibilitat de tenir un ió Co^{2+} en aquest lloc. Per comprovar-ho, es va calcular el mapa anòmal de les dades. Tot i que la longitud d'ona de la recollida no era l'òptima per detectar el Co^{2+} , el mapa anòmal mostrava també quatre pics en aquesta posició (Fig. III-6.3). Per tant, tenint present la distància de coordinació als oxígens i el mapa anòmal, es va modelar aquesta densitat com un ió Co^{2+} amb quatre posicions diferents, cada una amb

una ocupació de 0.25. Degut al desordre que presenta l'ió no s'han pogut detectar totes les seves aigües de coordinació.

Ja els primers mapes F_o-F_c i $2F_o-F_c$ presentaven una densitat corresponent al fàrmac entre les bases C5 i G6. Per modelar aquesta densitat, es va afegir primer la part aromàtica del fàrmac amb uns pocs àtoms de les cadenes laterals. El fet de que cap de les posicions explicava totalment la densitat indicava que el fàrmac podia estar desordenat i adoptar varies posicions. Així, finalment es van trobar dues posicions pel fàrmac que podien explicar millor els mapes de densitat electrònica. També es van poder afegir alguns àtoms més de les cadenes laterals però sense arribar a veure tota la cadena completa. El fàrmac està situat en un eix de simetria i per això li correspondria una ocupació de 0.5. Però com que presenta desordre, a cada posició del fàrmac li correspon en realitat una ocupació de 0.25.

Els resultats finals de l'afinat després d'afegir totes les molècules d'aigua es mostren a la taula III-6.2.

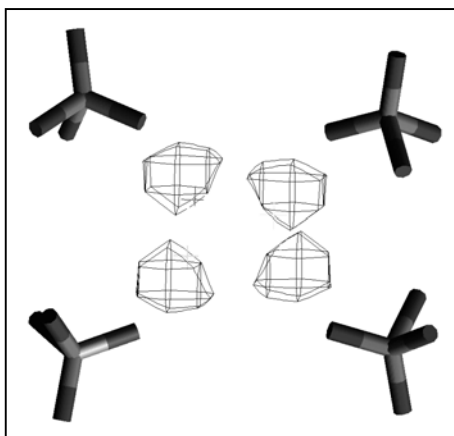


Fig. III-6.3. Mapa anòmal F_o-F_c (2.5σ) calculat per l'estructura E1. Es poden veure clarament quatre màxims de densitat propers als fosfats que corresponen a l'ió Co^{2+} .

E2

En aquest cas el mètode d'afinament és el mateix que l'estructura anterior però donat que la resolució és considerablement més alta, va permetre realitzar un afinament dels factors de temperatura anisotròpic. Com en l'estructura anterior, els mapes de diferències mostraven una clara densitat positiva corresponent a dos ions Co^{2+} que es troben interaccionant amb les guanines 2 i 12. A més, en el mateix lloc on l'estructura E1 presenta un Na^+ l'estructura E2 hi té un ió Ba^{2+} .

El fàrmac en aquesta estructura va ser més difícil de modelar. Es troba també intercalat entre les bases C5 i G6 però amb un patró de densitat diferent. Els mapes de densitat electrònica mostren una densitat semblant a la d'un anell aromàtic i separadament, i en un pla diferent, presenten un altre núvol de densitat positiva. El fet de veure tan clarament un anell aromàtic però no els altres dos que conté l'acridina, feia pensar que el fàrmac s'havia trencat. Per comprovar-ho, es va fer un espectre de masses de la gota on havia crescut el cristall i es va detectar clarament un pic corresponent a la molècula de fàrmac sencera. Amb això i analitzant la reactivitat dels anells d'acridina, es va descartar la possibilitat de que el fàrmac s'hagués trencat. Per descartar que el problema estigués al cristall, a les dades, es van fer rèpliques d'aquest obtenint però el mateix patró de densitat en tots els cristalls. Així finalment es proposa una posició per l'acridina tot i que segur que presenta altres posicions possibles. A part de l'anell aromàtic, l'altre fragment de densitat que s'obté, s'explicava bé modelant-lo com un tros de cadena peptídica que conté el fàrmac. Aquest fragment sembla que ha quedat atrapat entre dues bases a través d'interaccions π - π .

Finalment es van afegir les molècules d'aigua i els resultats finals de l'afinat es mostren també a la taula III-6.2.

Els paràmetres conformacionals de les dues estructures es van calcular amb el programa 3DNA (veure annex).

	E1	E2
Contingut de la unitat asimètrica	1 dúplex 1.75 Co ²⁺ , 0.25 Na ⁺ , 0.25 Ba ²⁺ 1 fàrmac 27 H ₂ O	1 dúplex 1.5 Co ²⁺ , 0.25 Ba ²⁺ 1 fàrmac 44 H ₂ O
Z†	8	8
Rang de resolució (Å)	25-2	25-1.4
Reflexions	1984	5550
R/R _{free}	0.213/0.252	0.199/0.251
R (total)	0.210	0.202

Taula III-6.2. Resultats de l'afinament de les estructures E1 i E2 per a tot el rang de resolució prèviament processat. †Nombre d'unitats asimètriques relacionades per simetria presents a la cel·la.

6.4 DESCRIPCIÓ DE LES ESTRUCTURES

Com que les dues estructures són isomòrfiques, els trets generals d'empaquetament, conformació de bases, etc. són molt semblants i per això, bona part de la descripció de les dues estructures serà conjunta. Evidentment, hi ha detalls diferencials entre elles que s'explicaran per separat.

Empaquetament

La unitat asimètrica de les dues estructures conté un dúplex de la seqüència d(CGTACG). Com es mostra a la figura III-6.4 només els quatre parells de bases centrals adopten una conformació B del DNA. La resta de bases estan implicades en les interaccions entre dúplexs veïns o bé formant la cavitat del fàrmac, com es descriurà posteriorment. Cada dúplex s'uneix a dos dúplexs diferents relacionats per simetria formant així columnes contínues de dúplexs. Les columnes es disposen en dues direccions diferents formant un angle entre elles de 56° . A la figura III-6.5 es mostra la projecció d'una cel·la unitat d'aquestes estructures. Es pot veure com un pla que conté diversos ions separa dues cel·les unitat. Al centre de la cel·la s'hi troben cavitats de dissolvent delimitades per una posició ocupada per un ió. Aquest ajuda a estabilitzar el cristall ja que uneix columnes de dúplexs diferents.

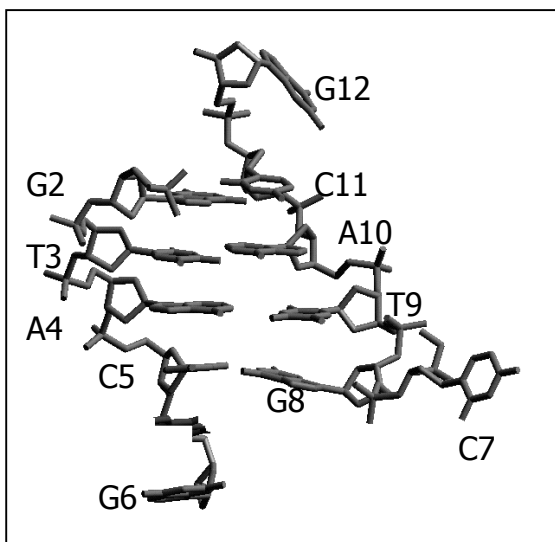


Fig. III-6.4. Unitat asimètrica dels cristalls de d(CGTACG), és la mateixa pels dos cristalls. Només es mostra el DNA; els fàrmacs, ions i molècules d'aigua s'han eliminat de la figura. La base C1 està desordenada.

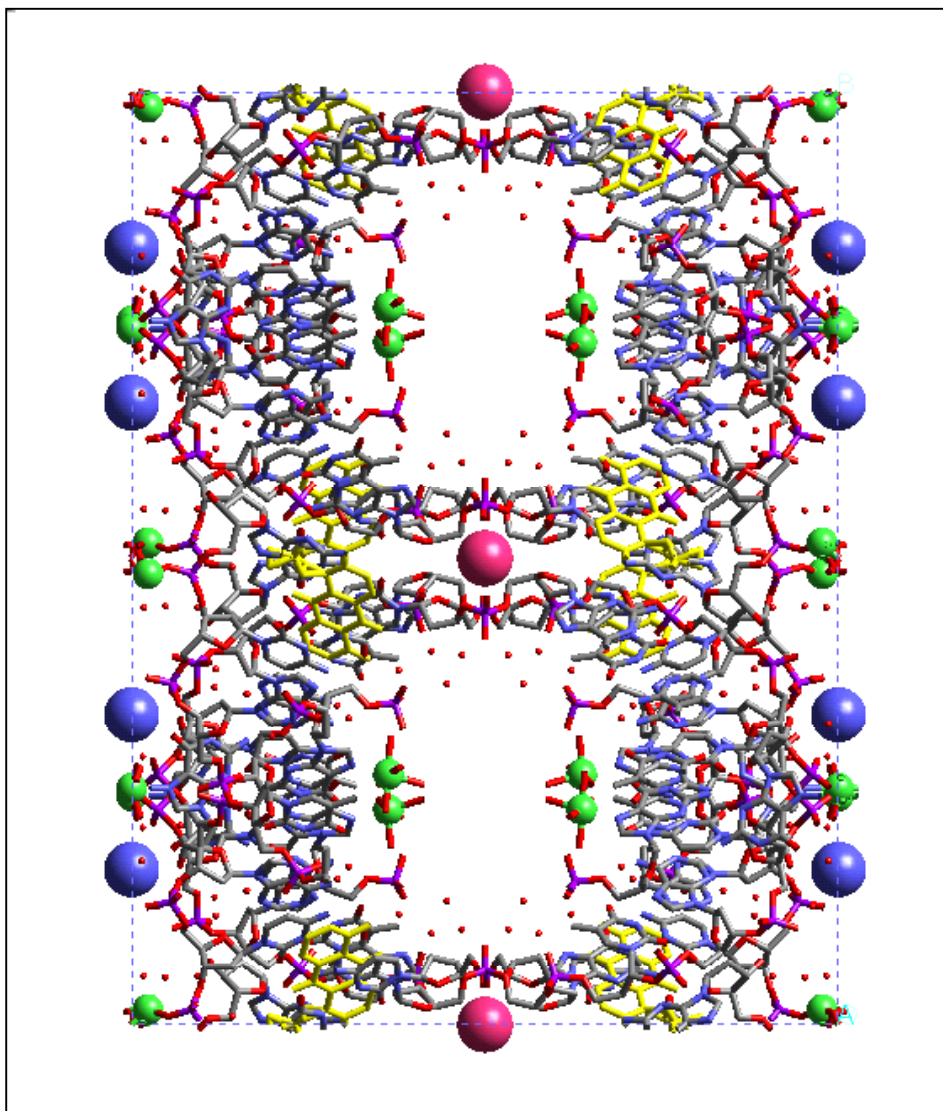


Fig. III-6.5. Cel·la unitat. Per fer la figura s'ha utilitzat concretament l'estructura E1 amb els seus ions i una de les posicions del fàrmac (l'altra posició s'ha eliminat per major claredat). Els ions vénen representats com esferes verdes pel Co^{2+} , blaves pel Ba^{2+} i roses pel Na^+ . El fàrmac es mostra en color groc.

Bases terminals

Com es veu a la figura III-6.4, als dos extrems del dúplex hi ha bases que no es troben aparellades de manera convencional. Aquestes intervenen tant en la unió entre dúplexs diferents com en la formació de la cavitat en que hi ha el fàrmac intercalat. Cal esmentar que la citosina 1 es troba desordenada i no es detecta densitat electrònica corresponent a aquesta base en cap de les dues estructures E1 i E2. En les altres estructures isomòrfiques descrites passa exactament el mateix. Aquesta base deu estar situada en la cavitat de dissolvent que es mostra a la figura III-6.5 sense formar interaccions concretes que la puguin mantenir ordenada.

Cada dúplex s'uneix a dos dúplexs diferents per formar les columnes, i ho fa de dues maneres diferents com es mostra a la figura III-6.6. En un dels extrems, la guanina 12 surt fora del dúplex i entra al solc menor del dúplex veí interaccionant amb la seva guanina 2 a través de ponts d'hidrogen N2·N3. Aquest tipus d'interacció va ser descrita per primer cop per Spink *et al.* (1995). A l'altre extrem del dúplex hi ha per una banda la citosina 7 que surt completament del dúplex i interacciona amb una guanina 6 d'un dúplex veí. La interacció és a través de ponts d'hidrogen Watson-Crick. Aquest parell de bases intervé en la formació d'un quadruplet que es descriurà posteriorment. Per altra banda, la guanina 6 està girada respecte el dúplex i intervé en la formació de la cavitat on hi ha el fàrmac. Com s'ha dit, forma ponts d'hidrogen amb una citosina 7 d'un dúplex veí. També interacciona amb una guanina 8 d'un altre dúplex la qual està aparellada amb la seva corresponent citosina 5. Aquestes quatre bases formen un quadruplet que es mostra en detall a la figura III-6.7. Aquest quadruplet està format per bases de tres dúplexs diferents. Una interacció similar va ser descrita per primer cop en el dodecàmer de Drew-Dickerson (Dickerson i Drew, 1981).

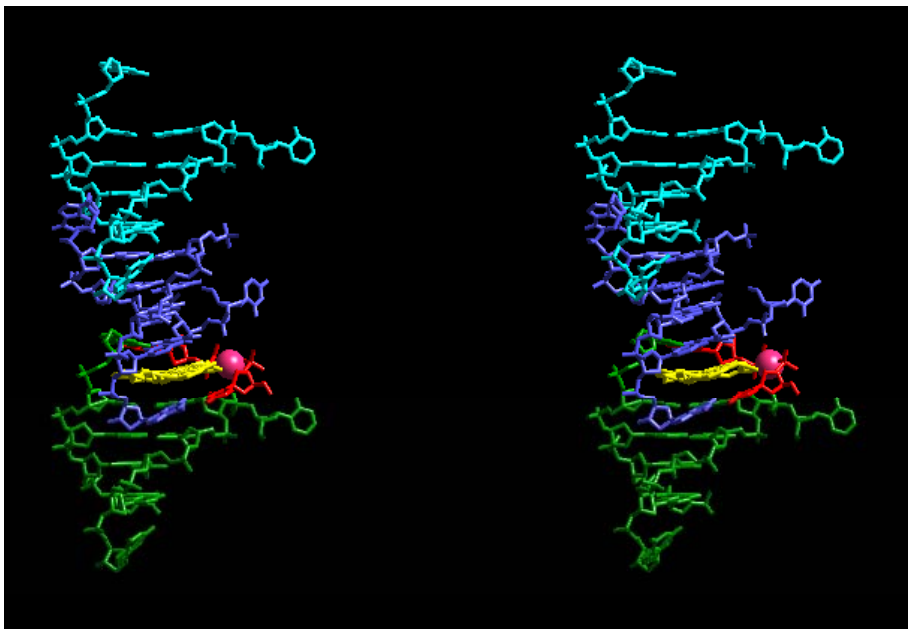


Fig. III-6.6. Visió estereogràfica d'una columna de dúplexs. Es mostren tres dúplexs sencers de tres colors diferents on el dúplex central interacciona de dues maneres diferents amb els altres dúplexs. En vermell es mostren les citosines 7 de dos dúplexs addicionals que intervenen a la formació de la cavitat del fàrmac. En groc, el fàrmac de l'estructura E1 intercalat. L'ió Na^+ proper al fàrmac de l'estructura E1 es mostra com una esfera rosa.

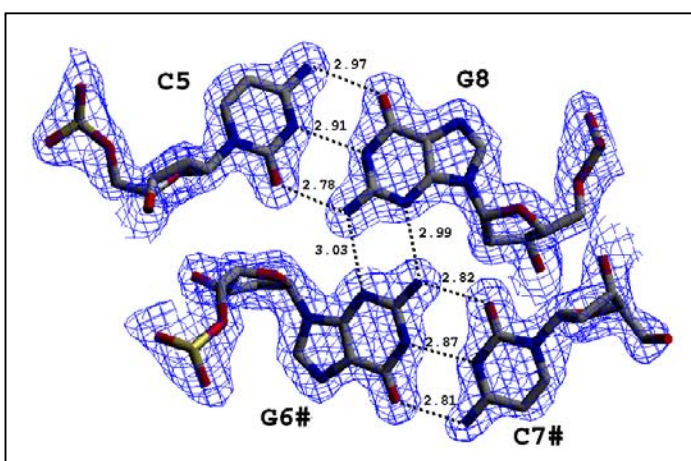


Fig. III-6.7. Mapa de densitat electrònica $2F_o - F_c$ (1σ) del quadruplet present en les estructures.

Cavitat intercaladora

A la figura III-6.8 es mostra la cavitat on hi ha els fàrmacs. Està formada per dos quadruplets com els descrits anteriorment on els fàrmacs hi queden intercalats. Tant en les dues estructures que es presenten com en les estructures ja descrites, els fàrmacs es troben sempre en aquesta cavitat però no exactament en la mateixa posició. En general, aquests fàrmacs estan desordenats, no queden fixats en un lloc concret de la cavitat. A més, tot i que tots els fàrmacs tenen a part de l'anell aromàtic un o més braços laterals, no es detecten en els mapes de densitat. Per tant, sembla que no influeix gaire el fet de tenir els braços laterals, sinó que l'únic imprescindible són els anells aromàtics.

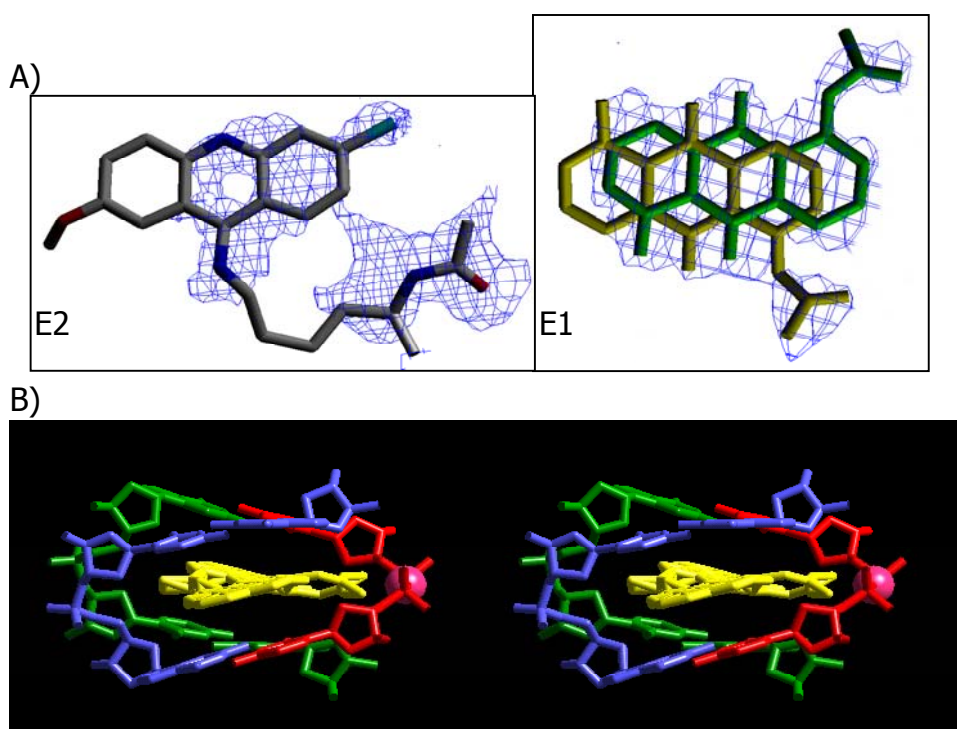


Fig. III-6.8. A) Mapa de densitat electrònica $2F_o - F_c$ dels fàrmacs en les estructures E1(dreta) i E2 (esquerra), a 0.8 i 1 σ , respectivament. A la figura es mostren només els àtoms utilitzats en l'afinament. B) Visió estereogràfica de la cavitat on es torben els fàrmacs, concretament es mostra el fàrmac de l'estructura E1 en color groc.

6.5 PAPER DELS IONS EN L'ESTABILITAZIÓ DE LES ESTRUCTURES

Tipus d'ions presents

A la figura III-6.9 es mostren tots els ions que s'han trobat en aquestes dues estructures. Resumidament, hi ha tres tipus d'ions Co^{2+} , dos tipus d'ions Ba^{2+} i un Na^+ . D'aquests, hi ha posicions que estan clarament sempre ocupades per ions i n'hi ha d'altres que varien en funció de l'estructura. A continuació es descriuen més en detall tots els ions trobats:

Ions comuns en les dues estructures:

Hi ha dos ions Co^{2+} situats a la mateixa posició en les dues estructures E1 i E2, i es troben també en les altres estructures d'aquest tipus ja descrites a la literatura. Els dos ions interaccionen amb el N7 de guanines. Un d'ells interacciona concretament amb el N7 de la guanina 2 i l'envolten a més cinc molècules d'aigua, dues de les quals formen ponts d'hidrogen amb els oxígens del fosfat d'aquesta base. Tot i que es troba en una zona de dissolvent desordenat, aquest ió queda molt estable en aquesta posició. L'altre ió Co^{2+} comú en totes aquestes estructures es troba interaccionant amb els N7 de dues guanines 12 relacionades per simetria. Aquest ió fa de pont entre dues columnes de dúplex i per tant, ajuda a l'estabilització del cristall. Aquest tipus d'interaccions específiques entre l'ió Co^{2+} o Ni^{2+} amb el N7 de guanines s'han descrit també en les altres estructures presentades en aquesta tesi (Valls *et al.*, 2004) o en algunes estructures trobades a la literatura (Subirana i Abrescia, 2000) i en totes elles es veu el seu paper important en l'estabilització de l'estructura.

Ions particulars de l'estructura E1:

En el complex obtingut amb l'antraquinona, a part dels ions Co^{2+} ja mencionats, es té un tercer ió Co^{2+} interaccionant amb els oxígens O1P de quatre fosfats relacionats per simetria de la guanina 6. L'ió es troba desordenat adoptant quatre posicions diferents com es veu a la figura III-6.9 i s'ha comprovat la seva posició amb un mapa anòmal (descriu anteriorment durant l'afinat).

L'estructura E1 presenta també un ió Ba^{2+} interaccionant amb l'O6 de dues guanines 12 relacionades per simetria, les mateixes que interaccionen amb un dels ions Co^{2+} ja descrits. El Ba^{2+} interacciona també amb dues molècules d'aigua. Les distàncies d'interacció d'aquest ió són: $d(\text{Ba}^{2+}\dots\text{O6}) = 2.65 \text{ \AA}$ i $d(\text{Ba}^{2+}\dots\text{H}_2\text{O}) = 2.88 \text{ \AA}$.

Finalment, l'estructura conté un ió Na^+ en una posició especial: es troba entre dos eixos binaris interaccionant amb quatre fosfats de la guanina 8 relacionats per simetria.

Ions particulars de l'estructura E2:

L'únic ió que trobem a part dels cobalts, és un Ba^{2+} . Aquest està en el mateix lloc on l'estructura E1 conté un ió Na^+ , interaccionant així amb el O2P de quatre fosfats a una distància de 2.69 Å.

Zones iòniques característiques d'aquest tipus d'estructures

Hi ha llocs concrets en aquest grup d'estructures que sempre estan ocupats per ions, sigui el mateix ió per a totes o ions diferents.

Una de les zones és l'ocupada per l'ió Co^{2+} que fa de pont entre dues guanines 12. Està situat en la interfase iònica entre dues cel·les unitat com es pot veure a la figura III-6.5. Com ja s'ha dit, aquest Co^{2+} és molt important en l'estabilització del cristall i es troba en totes les estructures isomòrfiques d'aquesta seqüència. En el cas de l'estructura E1, aquesta zona està reforçada per un ió Ba^{2+} mentre que altres estructures tenen una molècula d'aigua en el seu lloc (com és el cas de l'estructura E2).

L'altra zona típicament ocupada per un ió es troba en el centre de la cel·la unitat (Fig. III-6.5). Es tracta dels ions presents entre els quatre fosfats de diferents guanines 8. Aquesta posició iònica uneix quatre dúplexs diferents, d'aquí la seva importància en l'estabilització de l'empaquetament d'aquests cristalls. En les estructures E1 i E2 aquesta posició està ocupada per un ió Ba^{2+} o un ió Na^+ , però en altres estructures s'hi ha proposat un ió Mg^{2+} tot i que la coordinació tetraèdrica no és corrent per aquest ió.

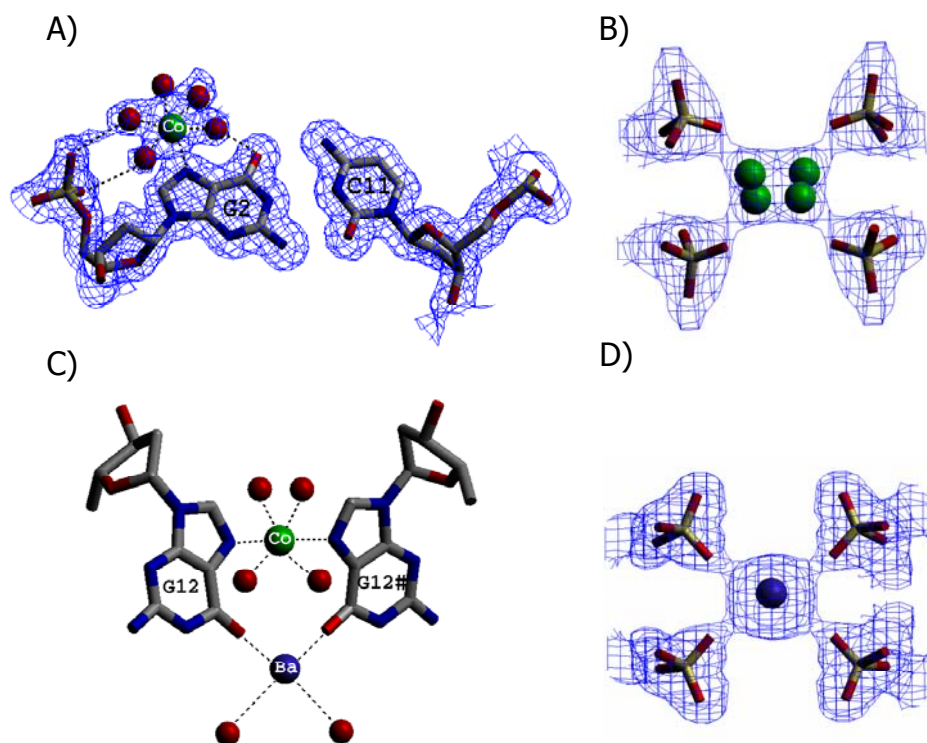


Fig. III-6.9. Ions presents en les estructures E1 i E2. A) Mapa de densitat electrònica $2F_o-F_c$ (1σ) de l'ió Co^{2+} (esfera verda) que interacciona amb la guanina 2 present en les dues estructures. Les molècules d'aigua coordinades al Co^{2+} es mostren també com esferes, dues d'elles formen ponts d'hidrogen amb el fosfat. B) Mapa de densitat electrònica $2F_o-F_c$ (1σ) de l'ió Co^{2+} present en l'estructura E1 i que es troba desordenat en quatre posicions diferents. C) Ió Co^{2+} (en verd) que fa de pont entre dues guanines en les dues estructures. En color blau es mostra l'ió Ba^{2+} present en l'estructura E1. D) Mapa de densitat electrònica $2F_o-F_c$ (1σ) de l'ió que interacciona amb quatre fosfats de quatre guanines 8 relacionades per simetria. L'estructura E1 hi conté un Na^+ mentre que en l'estructura E2 hi ha un Ba^{2+} . Es mostra concretament l'ió de E2.

6.6 DISCUSSIÓ

En aquesta tesi s'han aportat dues estructures més de la seqüència d(CGTACG) complexada amb dos fàrmacs intercalants diferents. Les estructures han resultat ser isomòrfiques entre elles i isomòrfiques a un grup d'estructures descrites recentment. El fet de tenir diverses estructures tan semblants, ens ha permès fer una anàlisi per una banda de la intercalació del fàrmac i per altra banda del paper dels ions en aquestes estructures.

Pel que fa als fàrmacs, tots ells intercaladors, podem concloure que tots s'intercalen en la mateixa cavitat però presentant un cert desordre. Tots tenen un sistema aromàtic derivat de l'antracè (acridina o antraquinona) i un o més braços laterals situats a diferents posicions dels anells aromàtics i que contenen diferents substituents. Analitzant tots els cristalls, s'observa que la naturalesa dels substituents així com la seva posició no afecta gaire a la intercalació. Sembla doncs, que l'únic necessari és tenir el sistema aromàtic.

Pel que fa als ions (cations), es demostra un cop més que tenen un paper molt important en la cristal·lització del DNA en general, i concretament en l'estabilització d'aquest tipus de cristalls: comparant totes aquestes estructures isomòrfiques, veiem que hi ha dues posicions ocupades per ions Co^{2+} invariables en totes les estructures. En aquestes l'ió Co^{2+} interacciona d'una manera específica amb el N7 de la guanina 12 i 2. Per altra banda, hi ha l'altra zona on l'ió interacciona amb fosfats, en que les interaccions són electrostàtiques, i s'hi troben ions diferents. En aquesta doncs, el tipus d'ió no sembla tan determinant.

Finalment, destacar la presència de l'ió Ba^{2+} en les dues estructures que s'han presentat (E1 i E2). Aquest ió no es detecta fàcilment per raigs X, hi ha molt poques estructures de DNA que continguin Ba^{2+} . Només hi ha una estructura resolta per raigs X (Spingler *et al.*, 2001) on el Ba^{2+} fa de pont entre una guanina i una adenina. En canvi, en estructures de la forma Z o A del DNA, s'ha trobat el Ba^{2+} unint dues guanines (Gao *et al.*, 1993 i Gao *et al.*, 1995). En aquestes últimes el Ba^{2+} interacciona amb l'O6 i N7 de dues guanines mentre que en l'estructura E1 que s'ha presentat, interacciona només amb l'O6 de dues guanines ja que el N7 està ocupat per un ió Co^{2+} , molt específic per aquest tipus d'interaccions.

7. EL DECÀMER d(CAATTAATTG): CRISTAL·LITZACIÓ I ESTUDI ESTRUCTURAL

7.1 CRISTAL·LITZACIÓ

El decàmer d(CAATTAATTG) no s'havia cristal·litzat prèviament ni en presència de fàrmacs ni sol. En aquesta tesi s'ha intentat complexar aquesta seqüència rica en passos AA/TT amb les acridines següents: Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR) i Acr(GR). Amb això, s'intentava induir la intercalació en un pas AA/TT. S'han fet prop de 50 proves de cristal·lització les condicions de les quals es resumeixen a continuació:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.5/0, 0.5/1, 0.5/1.5 mM

pH, tampó: 6, 6.5, 7, cacodilat de sodi 20 mM

sal:

MgCl₂: 10, 50, 100 mM

BaCl₂: 10 mM

NiCl₂: 2, 3, 4, 5, 8 mM

CoCl₂: 3, 5 mM

MgCl₂ + NiCl₂: 10 + 1 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

BaCl₂ + NiCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0, 1 mM

precipitant:

MPD: 5, 10, 15, 18, 20%

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

La majoria de les condicions provades han donat precipitat cristal·lí o varetes també cristal·lines. Però l'únic cristall que ha difractat és el que es mostra a la figura III-7.1 i s'ha obtingut amb el fàrmac Acr(RGR) a les següents condicions:

oligo: 0.5 mM
fàrmac Acr(RGR): 1 mM
tampó: cacodilat de sodi 20 mM, pH = 6.5
MgCl₂: 10 mM
NiCl₂: 1 mM
Espermina: 1 mM
MPD: 10%

El mètode utilitzat per a cristal·litzar és el de la difusió de vapor en gota penjant. Després d'una setmana aproximadament apareix un únic cristall a la gota, amb una concentració de MPD al reservori del 40% i a una temperatura de 20°C. El cristall té unes mides força grans, de 200x150x150 µm, aproximadament.

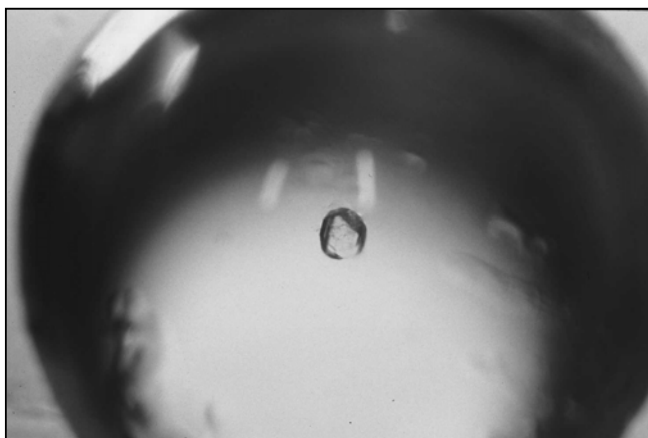


Fig. III-7.1. *Cristall obtingut amb la seqüència d(CAATTAATTG).*

7.2 RECOLLIDA DE LES DADES I PROCESSAT

El cristall va ser recollit utilitzant la font de raigs X que es disposa al laboratori, un tub d'ànode rotatori que dóna una radiació d'una longitud d'ona de 1.54178 Å (del Cu). Un exemple dels espectres de difracció d'aquest cristall es mostra a la figura III-6.2. El detector emprat és un *Image Plate* i el cristall es va recollir a una distància del detector de 110 mm amb una oscil·lació de cada foto de 2°. Les dades van ser processades i escalades amb els programes DENZO i SCALEPACK, respectivament, fins a una resolució màxima de 2.8 Å. En realitat s'obtenen dades fins a una resolució més alta però en estadis més avançats de l'afinament es va veure que no eren prou bones com per utilitzar-se. Les estadístiques finals obtingudes es presenten a la taula III-7.1.

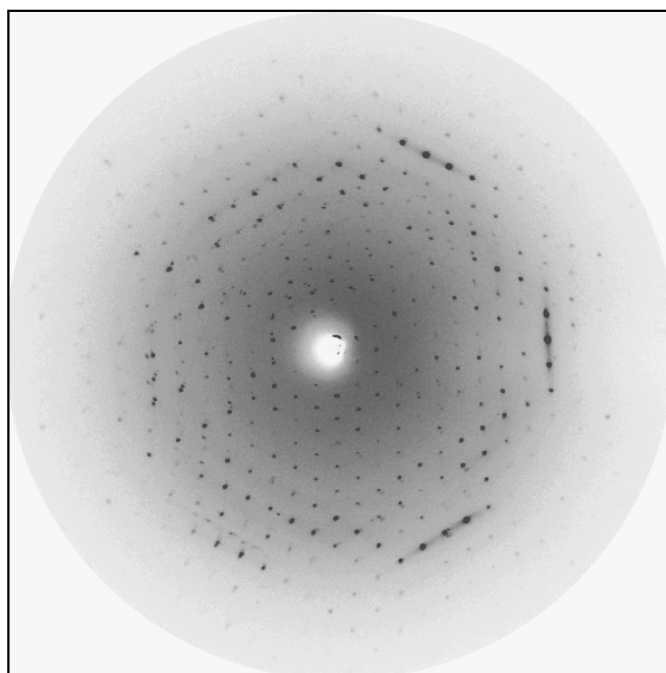


Fig. III-7.2. Espectre de difracció del decàmer d(CAATTAATTG)

Grup espacial	P3 ₂ 21
Dimensions cel·la (Å)	a = 32.85 c = 94.93
Temperatura recollida (K)	120
Rang de resolució (Å)	30-2.80 (2.90-2.80)
Completitud (%)	89.4 (91.2)
Reflexions úniques	1501
Redundància†	16.9
R _{merge}	0.052 (0.207)

Taula III-7.1. Resultats i estadístiques de les dades de difracció del decàmer d(CAATTAATTG). Entre parèntesis es mostren el valors corresponents a l'última capa de resolució. † Reflexions totals recollides dividides entre el número de reflexions úniques.

7.3 RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA I AFINAT

Com s'ha dit anteriorment la seqüència d(CAATTAATTG) no ha estat cristal·litzada prèviament. Per tant, per tal de trobar un model adequat per a resoldre l'estructura es va fer una cerca al NDB (Berman *et al.*, 1992) de seqüències de DNA cristal·litzades en el grup espacial P3₂21 (que és el grup espacial del decàmer problema). Es va trobar un grup d'estructures que no només cristal·litzen en aquest grup espacial sinó que també presenten una cel·la molt semblant a la que es vol resoldre (Baikalov *et al.*, 1993, Lipanov *et al.*, 1993, Shakked *et al.*, 1994, Goodsell *et al.*, 1994 i Goodsell *et al.*, 1995). Aquestes estructures són quatre decàmers i un nonàmer totes elles de seqüències diferents. L'estructura de seqüència més semblant a la que es vol resoldre és la descrita per Goodsell *et al.* (1994), concretament el decàmer d(CCATTAATGG) i un dúplex d'aquesta va ser el que es va utilitzar com a model inicial. El primer pas va ser substituir en el model les bases C2 i G9 i les seves complementàries per bases A i T segons la seqüència que es vol resoldre. Amb aquest segon model i les dades de difracció obtingudes es va aplicar el reemplaç molecular emprant el programa MolRep. D'aquí s'obté

una solució amb un factor $R = 0.48$ i un coeficient de correlació de 54.1. Aquesta solució va ser el model de partida per a realitzar l'afinament.

Els primers passos de l'afinat es van dur a terme amb el programa CNS, separant un 10% de les reflexions per a calcular el factor R_{free} . Després de realitzar afinament de cos rígid i minimitzacions en un rang de resolució de 25-3 Å s'obté un factor $R = 0.32$ i $R_{\text{free}} = 0.36$. En aquest punt es calculen els mapes de densitat electrònica $2F_o - F_c$ i $F_o - F_c$ els quals indiquen una clara densitat propera a la guanina 10 que es va modelar com a un ió Ni^{2+} . Després d'afegir aquest ió i de fer diversos cicles d'afinament s'obtenen uns factors R de $R = 0.31$ i $R_{\text{free}} = 0.33$ pel mateix rang de resolució anterior. Donat que els mapes no acaben de ser prou nets i l'afinament sembla estancat, es decideix canviar de programa i s'intenta acabar l'afinat amb el programa REFMAC5. Després de diversos cicles d'afinat a la mateixa resolució anterior, es construeixen els mapes de densitat electrònica que semblen ser millors que els anteriors obtinguts amb el programa CNS. Aquests ens permeten veure algunes molècules d'aigua que són afegides a l'afinament.

Tot i que es tenen dades recollides fins a uns 2.5 Å, l'afinat no convergeix si s'utilitza tot aquest rang de resolució. La resolució màxima final de l'afinat va ser de 2.8 Å.

Els mapes de diferències no mostren densitat positiva corresponent a les aigües de coordinació del Ni^{2+} però tot i així es van afegir ja que segur que aquest ió està hidratat. La baixa resolució de les dades no permet diferenciar aquestes aigües.

Els resultats finals de l'afinat es mostren a la taula III-7.2:

Contingut de la unitat asimètrica	Un dúplex 1 Ni^{2+} 16 H_2O
Z†	6
Rang de resolució (Å)	25-2.8
Reflexions	1359
R/R_{free}	0.229/0.295
R (total)	0.227

Taula III-7.2. Resultats i estadístiques finals de l'afinat del decàmer d(CAATTAATTG). †Nombre d'unitats asimètriques relacionades per simetria presents a la cel·la.

7.4 DESCRIPCIÓ DE L'ESTRUCTURA

La unitat asimètrica del cristall està formada per un dúplex les bases del qual adopten una conformació B del DNA (Fig. III-7.3). Totes les bases es troben aparellades amb la seva complementària formant ponts d'hidrogen Watson i Crick. La unitat asimètrica conté també un ió Ni^{2+} que es troba unit a la guanina 10. Aquest interacciona amb el seu N7 a una distància típica de 2.0 Å i com ja s'ha comentat durant l'afinat, s'han afegit les seves aigües de coordinació tot i que en els mapes de densitat no es veuen bé. Curiosament, la guanina 20 que es troba a l'altre extrem del dúplex no presenta cap ió Ni^{2+} coordinat tot i havent-hi suficient espai per aquest i les seves aigües de coordinació.

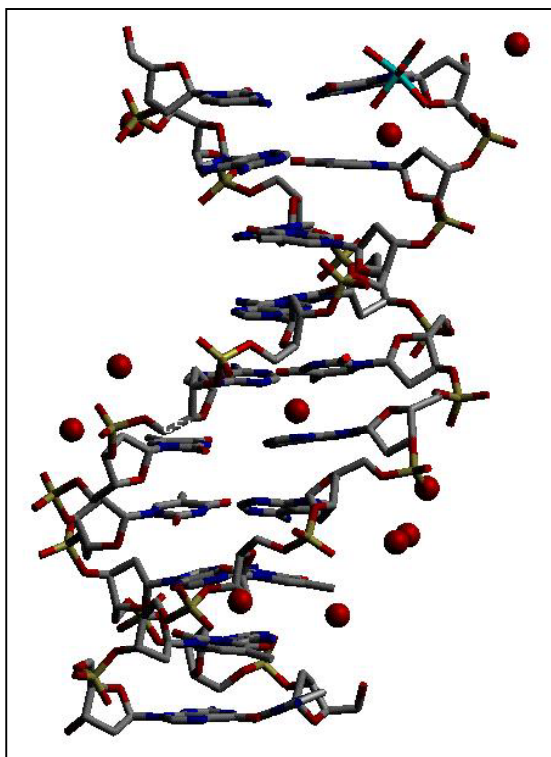


Fig. III-7.3. Unitat asimètrica del decàmer d(CAATTAATTG). Les molècules d'aigua es mostren com esferes vermelles i en color blau l'ió Ni^{2+} unit a les seves aigües de coordinació.

Els dúplexs s'apilen per formar columnes contínues de DNA. La interacció entre les bases de diferents dúplexs d'una mateixa columna és comparable a la interacció entre bases d'un mateix dúplex. En el cristall es troben columnes en tres direccions diferents. L'organització d'aquestes és la següent: columnes paral·leles de dúplexs es troben relativament properes entre elles interaccionant només en un punt on hi intervé la guanina 20 d'un dúplex i l'adenina 6 de l'altre (Fig. III-7.4). Cada columna interacciona a més amb columnes que es disposen en una altra direcció (Fig. III-7.5), hi ha concretament columnes de dúplexs en tres direccions diferents. Aquestes es creuen interpenetrant una al solc menor de l'altra. Aquesta interacció es troba propera a les bases T15 i A16.

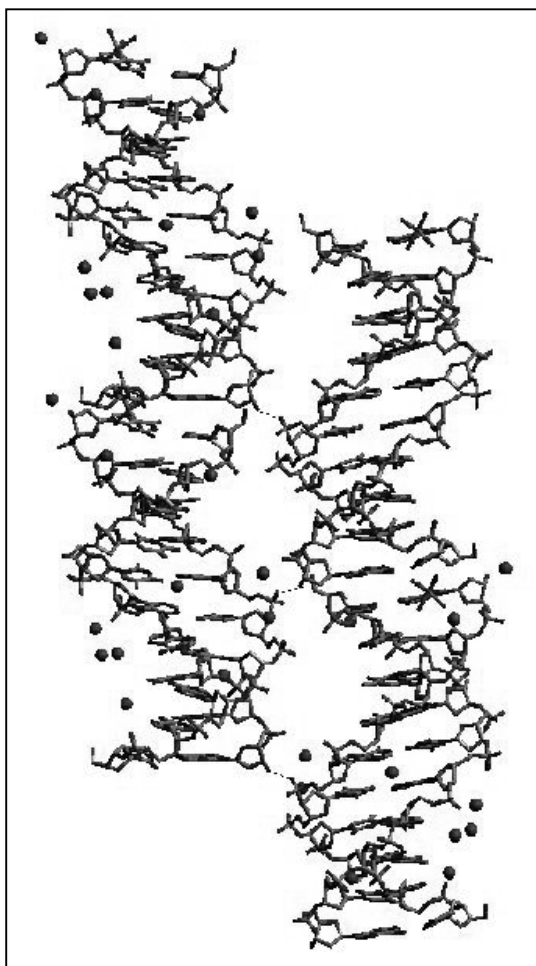


Fig. III-7.4. Columnes de dúplexs presents en el cristalls. La interacció entre elles es mostra amb línies discontinües. Aquesta interacció és a través de l'O3' terminal de G20 i l'O2P de l'A6.

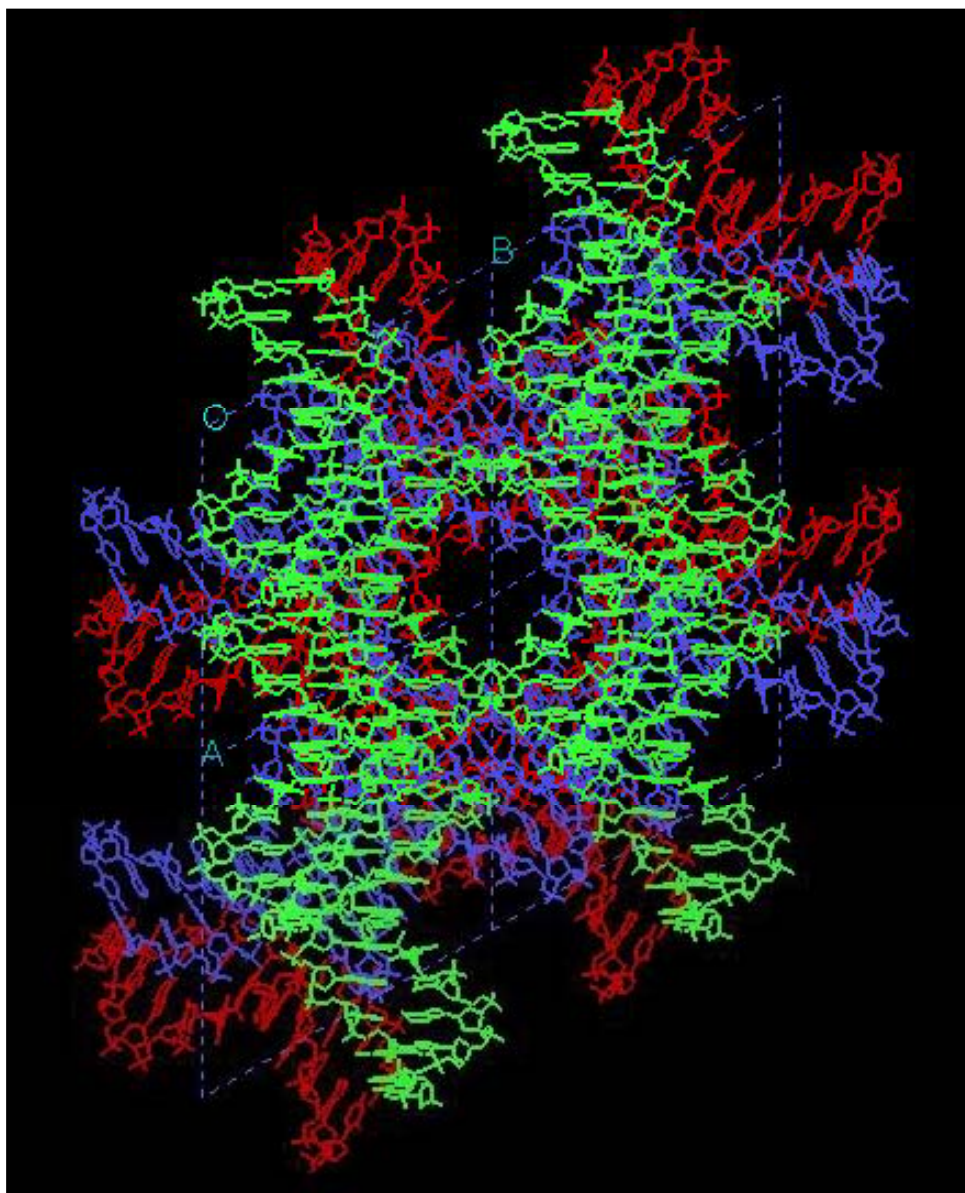


Fig. III-7.5. Organització de les columnes d'oligonucleòtids presents en el cristall. Aquest presenta columnes en tres direccions diferents que es mostren en diferents colors a la figura.

A part de les cinc molècules d'aigua coordinades al Ni^{2+} , s'han pogut localitzar onze molècules més d'aigua. D'aquestes n'hi ha una en el solc menor típica de l'esquelet d'aigua que presenten altres estructures amb la mateixa regió central (AATT) (Valls *et al.*, 2004, Soler-López *et al.*, 1999). En aquest decàmer però, no s'ha vist l'esquelet complet degut potser a la baixa resolució de les dades o al diferent entorn de seqüència de les bases centrals.

Al solc major i a una posició especial, hi ha una molècula d'aigua formant ponts d'hidrogen amb quatre molècules d'aigua més (dues de les quals estan relacionades per simetria) a una distància de 3.04 i 2.50 Å. Aquesta molècula podria ser també un ió Na^+ provinent del tampó utilitzat per cristal·litzar però la densitat electrònica que s'espera d'un Na^+ o d'una molècula d'aigua és igual i no es poden diferenciar fàcilment per raigs X.

7.5 ANÀLISI DELS PARÀMETRES CONFORMACIONALS

Tots els paràmetres conformacionals de l'hèlix s'han calculat amb el programa 3DNA (veure annex).

El decàmer d(CAATTAATTG) està format en un 80% per bases adenines i timines. Donat que no hi ha gaires seqüències amb un contingut tan elevat d'aquestes bases és interessant analitzar els seus paràmetres conformacionals i comparar-los amb alguns dels valors esperats descrits prèviament (Subirana i Faria, 1997). Cal però tenir present que la baixa resolució en que s'ha resolt l'estructura pot estar limitant la informació.

En primer lloc el dúplex té un solc menor relativament estret (3.8 Å) com ja s'ha trobat en altres seqüències riques en bases A i T a les regions centrals (per exemple: Valls *et al.*, 2004, Goodsell *et al.*, 1994).

Pel que fa als valor del gir (taula III-7.3) s'obtenen uns valors molt alts a les bases de les puntes del dúplex. Aquest pas CpA/TpG ja s'ha descrit com un pas molt variable i el fet que en aquest decàmer estigui als extrems del dúplex encara pot afavorir més la irregularitat en els seus valors. La resta de passos presenten uns valors de gir més o menys regulars.

A la taula III-7.3 es mostren també els valors de l'ascensió. S'observa molta variabilitat en aquests valors que s'atribueix en primer lloc al tipus de bases (majoritàriament A i T) i en segon lloc a la resolució de les dades. De fet, en

general, tots els paràmetres calculats presenten una desviació estàndard força elevada degut un altre cop al mateix.

pas	Dz (Å)	Ω (°)
CpA/TpG	3.80	44.60
ApA/TpT	3.17	26.60
ApT/ApT	2.66	37.08
TpT/ApA	3.29	36.32
TpA/TpA	3.73	37.98
ApA/TpT	3.12	34.86
ApT/ApT	3.46	34.28
TpT/ApA	3.05	31.53
TpG/CpA	3.04	41.76
Valor promig	3.26 (0.36)	36.11 (5.30)

Fig. III-7.3. *Valors de l'ascensió (Dz) i gir (Ω) de l'estructura d(CAATTAATTG). Entre parèntesis es mostra la desviació estàndard dels valors.*

El propulsor d'hèlix té un valor promig de -16.60 relativament alt i negatiu, que també és el que s'espera per seqüències riques en adenines i timines.

Pel que fa als angles conformacionals hi ha alguna irregularitat en els seus valors: a part de les bases terminals que sovint presenten alteracions, les bases centrals T15 i A16 estan distorsionades. Això pot ser degut a que just en aquestes bases és per on el dúplex interacciona amb una columna veïna que es creua interpenetrant pel solc menor. Aquestes forces d'interacció poden afectar a la conformació de les bases que hi intervenen.

7.6 DISCUSSIÓ

La seqüència d(CAATTAATTG) ha estat cristal·litzada per primer cop i en presència de Ni^{2+} . En aquest cas el Ni^{2+} ha ajudat clarament a obtenir millors cristalls però analitzant l'estructura no té un paper tan important en el seu empaquetament com en d'altres estructures presentades en aquesta tesi (Valls *et al.*, 2004) o descrites a la literatura (Abrescia *et al.*, 1999). Això està relacionat amb el fet que en aquest decàmer totes les bases estan aparellades: sovint les bases terminals són susceptibles a formar altres tipus d'interaccions i concretament, una guanina terminal pot interaccionar amb un dúplex veí a través d'un ió Ni^{2+} (o Co^{2+}) afavorint l'empaquetament del cristall. Aquest és el cas d'algunes de les estructures ja descrites en aquesta tesi i també d'altres que es troben a la literatura, però això no passa en el present decàmer. Tot això i el fet que com ja s'ha dit hi ha altres estructures de seqüència diferent que cristal·litzen amb el mateix grup espacial i amb una cel·la molt semblant, fa pensar que el contingut de la seqüència no és determinant en aquest grup d'estructures ja que empaqueten sempre de la mateixa manera fins i tot en presència de l'ió Ni^{2+} .

Hi ha diversos estudis comparatius relacionats amb decàmers (Tereshko i Subirana, 1999, Heinemann i Alings, 1991) i es pot concloure que en general, el decàmer d(CAATTAATTG) segueix les pautes descrites pels altres decàmers.

8. CRISTAL·LITZACIÓ DEL DODECÀMER d(AATTAATTAATT)

Continuant amb la idea d'intentar induir la intercalació en un pas AA/TT, es va sintetitzar el dodecàmer d(AATT)₃ format només per adenines i timines. Aquest no ha estat cristal·litzat prèviament. El fet de suprimir les bases C i G dels extrems dificulta la cristal·lització ja que aquestes bases normalment són determinants en l'empaquetament del cristall. Hi ha molts pocs precedents de seqüències cristal·litzades amb només bases A i T. De fet, només s'ha cristal·litzat la seqüència d(AT)₃ en dos grups espacials diferents (Abrescia *et al.*, 2002 i Abrescia *et al.*, 2004) i la seqüència d(ATAT) (Viswamitra *et al.*, 1982).

S'ha intentat cristal·litzar aquesta seqüència en presència de fàrmac però també sol ja que és interessant veure com cristal·litzen seqüències que contenen només A i T. Els fàrmacs que s'han utilitzat són les acridines: Acr(RRRR), Acr(RGR), Acr(RSR) i Acr(GR). S'han fet unes 60 gotes a les següents condicions:

Condicions de la gota:

relació oligo/fàrmac: 0.2/0, 0.5/0, 1/0, 0.5/1, 0.5/1.5 mM

pH, tampó: 6.5, cacodilat de sodi 20 mM

sal:

MgCl₂: 5, 10, 50, 100 mM

BaCl₂: 5, 10 mM

CaCl₂: 10 mM

NaCl: 20 mM

KCl: 20 mM

MgCl₂ + NiCl₂: 10 + 1 mM

MgCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

BaCl₂ + CoCl₂: 10 + 1 mM

espermina: 0, 0.5, 1, 1.5, 2 mM

precipitant:

MPD: 0, 10 %

Condicions del reservori:

precipitant: MPD

Les proves de cristal·lització s'han fet totes utilitzant la difusió de vapor en gota penjant. També s'han fet gotes a diferents temperatures: a 20 i 13°C. En general la cristal·lització de les seqüències riques en A i T està molt influenciada per la temperatura, sent millors les temperatures baixes.

Moltes de les condicions provades han donat alguna forma cristal·lina que es poden dividir en dues: en primer lloc, cristallets petits de forma semi-piramidal que s'han intentat difractar però sense cap resultat. En segon lloc, i de forma majoritària, s'obtenen varetes planes algunes de les quals han resultat ser cristalls líquids. Algunes d'aquestes varetes es van poder congelar i recollir algun espectre de difracció. Les condicions de cristal·lització de les millors de les varetes contenen sempre $MgCl_2$ a una concentració relativament baixa (10 mM) i no contenen fàrmac.

D'aquestes varetes s'han fet dues recollides al sincrotró de Grenoble emprant un detector MARCCD. Un exemple del patró de difracció que donen aquests cristalls es mostra a la figura III-8.1. La resolució de les dues recollides és molt baixa i la qualitat dels espectres no és prou bona com per poder resoldre l'estructura. A més, moltes de les varetes provades no cristal·litzen com a cristall únic sinó que formen macles.

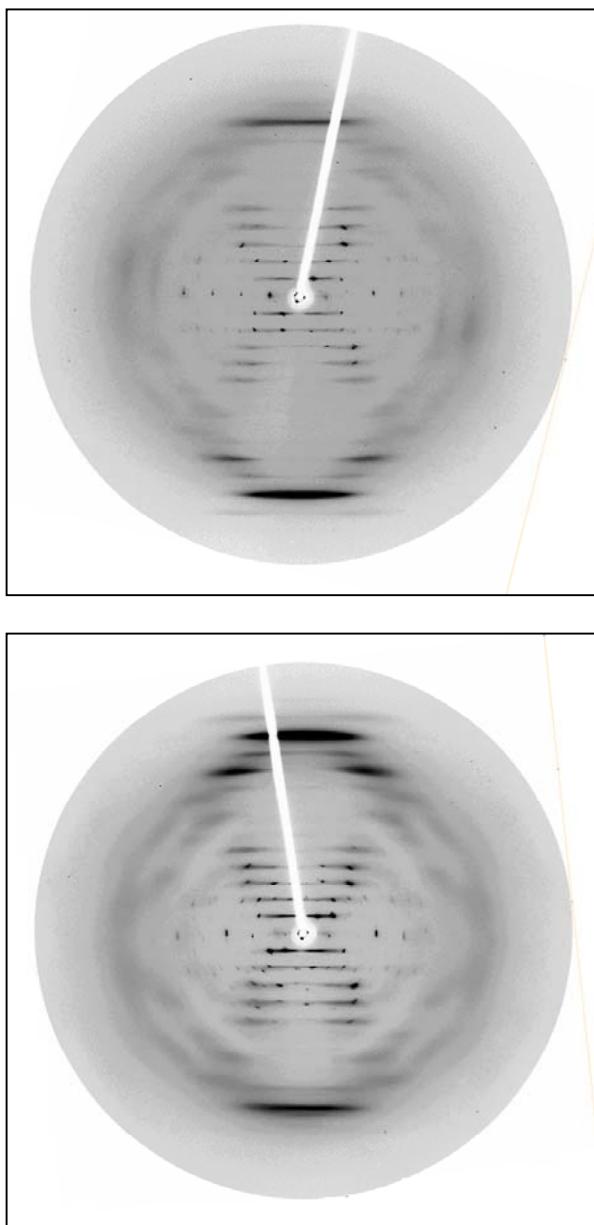


Fig. III-8.1. Exemple dels espectres de difracció de la seqüència $d(AATT)_3$. A la figura es mostren dues fotos del mateix cristall amb una orientació diferent.

Les fotos de difracció són molt difícils de processar. S'ha intentat obtenir alguna informació d'elles però sempre d'una manera aproximada. El que es pot extreure d'aquests diagrames de difracció és el següent:

Clarament hi ha una part molt desordenada que dóna uns senyals tipus fibra (veure taques difuses dels espectres) i una part més cristal·lina. Les reflexions corresponents a la part cristal·lina estan sempre a sobre dels estrats (*layer lines*) provinents de la part desordenada (fibra).

Després de diversos intents de processat i analitzant els espectres, una proposta de cel·la aproximada és: $a = 45$, $b = 45$ i $c = 39$. Els angles indiquen que es pot tractar d'una cel·la hexagonal o pseudo-hexagonal.

El senyal corresponent a l'apilament de les bases (stacking) es troba a 3.24 \AA .

Al laboratori s'estan intentant cristal·litzar moltes seqüències riques en A i T i vàries d'aquestes han donat uns patrons de difracció semblants: tenen també una part ordenada del cristall i una altra part que difracta com una fibra. Una de les hipòtesis que es té sobre aquestes estructures i que pot ser vàlida pel dodecàmer d(AATT)₃ és que els dúplex s'apilen entre ells i formen super-hèlixs. Evidentment, la qualitat de les dades i la baixa resolució d'aquestes no permeten arribar a unes conclusions més detallades de l'estructura.

Caldria millorar els cristalls obtinguts però això no és trivial ja que el desordre que s'obté en l'estructura pot ser en part inherent a aquest tipus d'estructures.