

1166860

R-10.574

1/216

# *El transplatino: de isómero inactivo a nuevo agente terapéutico*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Se declara registrada esta Tesis Doctoral  
el día 7 de febrero de 1998 del libro  
de registro de tesis doctorales  
Sevilla, a las 4 de la tarde de 1998

El Jefe del Registro de Tesis,

*Alena Caffaro*

*Tesis Doctoral presentada para la obtención del título de  
Doctor en Ciencias Químicas por Eloy Bernal Méndez*

*Presentada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de  
Ciencias Químicas de la Universidad de Sevilla*

*Noviembre, año MCMXCVIII*



DEPARTAMENTO DE QUIMICA INORGANICA  
"PROF. F. GONZALEZ GARCIA"  
FACULTAD DE QUIMICA

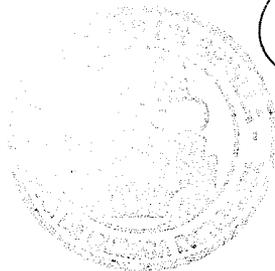
CAMPUS DE REINA MERCEDES  
APDO. 553, 41071 - SEVILLA  
TLFN. 95 455 71 61  
Fax n.º 34-5-95 455 71 34

D. José M<sup>a</sup> Trillo de Leyva, Director del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Sevilla,

INFORMA:

Que en el Consejo de Departamento celebrado el pasado 4 de Noviembre se dio Visto Bueno a la presentación de la Tesis Doctoral de Eloy Bernal Méndez.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Sevilla, a 1 de Diciembre de 1998.



A large, stylized handwritten signature in black ink, enclosed within a rectangular box that has been drawn around it. The signature is written in a cursive style.

D. José M<sup>a</sup> Trillo de Leyva  
Director del Dpto. Química Inorgánica.

# *El transplatino: de isómero inactivo a nuevo agente terapéutico*

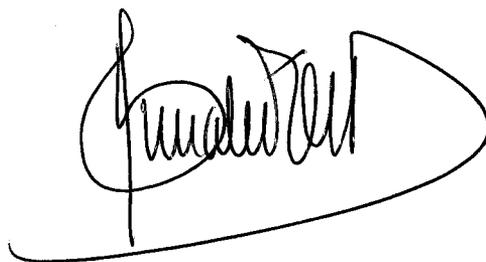
Memoria presentada por **Eloy Bernal Méndez** para la obtención del título de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Noviembre de 1998

A handwritten signature in black ink, consisting of several horizontal strokes followed by a large, stylized 'B' and 'M'.

Fdo: Eloy Bernal Méndez

El Director:

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'F' and 'G'.

Fdo: Francisco González Vílchez

Catedrático de Química Inorgánica

de la Universidad de Sevilla

Este espacio está dedicado a todas aquellas personas que han influido de algún modo en el largo proceso que me ha llevado a concluir con éxito esta etapa de mi vida.

A Don Francisco González Vilchez, Director de esta tesis, que un día me seleccionó para formar parte de su grupo de trabajo, por haberme iniciado en la investigación experimental, por su orientación constante y el mucho tiempo y medios que dedicó a mi formación. Su conocimiento científico y el apoyo prestado en las dificultades y en la burocracia ha facilitado el trabajo aquí expuesto.

A Monsieur Marc Leng, Director del Grupo de Carcinogénesis Química en el *Centre de Biophysique Moléculaire* en Orleans (Francia), por haberme acogido en su grupo de investigación, haber dedicado mucho tiempo y esfuerzos a mi formación y haber compartido conmigo su pasión por la bioquímica. Siempre le estaré agradecido por haber puesto a mi servicio todos los medios materiales y humanos a su alcance, lo que me ha permitido trabajar allí en las mejores condiciones posibles, y sobre todo por haber confiado en mi en todo momento.

A la Dra. Rosario Vilaplana que me ayudó en mis primeras experiencias de laboratorio y que ha corregido parte de este trabajo, por su interés y afecto.

A todos los miembros del tribunal, por haber aceptado juzgar este trabajo y por su lectura crítica del mismo.

A Khalid Akhdi, Marc Boudvillain, Caroline Colombier, Annie Schwartz y mis otros compañeros de laboratorio, tanto en Sevilla como en Orleans, por que en todo momento me habeis sabido ofrecer vuestro apoyo y amistad sin límites. Este agradecimiento se extiende también a los otros miembros del *Centre de Biophysique Moleculaire* que han hecho inolvidable mi estancia entre ellos.

A mis amigos, por todo lo que hemos hecho juntos, por lo que me habeis aguantado y por el apoyo moral y estabilidad emocional que me habeis procurado, a veces sin saberlo, por vuestra sola presencia a mi lado.

A mi Madre, mi Padre y mis hermanos, porque entre todos habeis forjado mi personalidad y me habeis enseñado a sacar lo mejor que hay en mi para emplearlo en acciones útiles. Lo hago extensivo a mi sobrino, en esta última época de mi vida y primera de la suya.

A mi padre y a Don Emilio Maqueda, por haberme inculcado el gusto por la ciencia y haberme iniciado en los secretos de la química.

A Ti, por todo lo que me has hecho descubrir, por tus apoyos y críticas sinceras, y por ofrecerme la felicidad y la serenidad que solo se encuentran en el amor.

# Sumario

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>PRÓLOGO</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>I.- PROPIEDADES QUÍMICAS DEL PLATINO(II)</b> .....                              | <b>6</b>  |
| 1.- ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DEL PLATINO(II) .....                                   | 7         |
| 2.- COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DEL PLATINO(II) .....                               | 11        |
| 3.- EL EFECTO <i>TRANS</i> .....   | 12        |
| 4.-LA REACCIÓN DE SUSTITUCIÓN .....  | 15        |
| 5.- FACTORES QUE AFECTAN A LA CINÉTICA DE SUSTITUCIÓN .....                        | 18        |
| <i>El grupo sustituido</i> .....   | 18        |
| <i>El ligando entrante</i> .....   | 19        |
| <i>Los ligandos inertes</i> .....  | 21        |
| <i>El disolvente</i> .....   | 22        |
| <i>La carga del compuesto</i> .....  | 23        |
| <i>El impedimento estérico</i> .....   | 23        |
| <i>La catálisis electrofílica</i> .....  | 24        |
| <b>II.- QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....                     | <b>26</b> |
| <b>A. NUCLEOBASES, POLINUCLEÓTIDOS Y DOBLE HÉLICE DE ADN</b> .....                 | <b>27</b> |
| 1.- Los componentes de los ácidos nucleicos: los nucleótidos .....                 | 27        |
| 2.- Estructura primaria de los ácidos nucleicos: la cadena nucleotídica .....      | 33        |
| 3.- Estructura secundaria del ADN: las dobles hélices .....                        | 33        |
| <b>B. LAS TRIPLES HÉLICES</b> .....  | <b>41</b> |
| 1.- Introducción histórica .....   | 41        |
| 2.- Estructura .....   | 44        |
| 3.- Termodinámica .....  | 45        |
| 4.- Estabilidad .....  | 47        |
| <i>i) Fuerzas participantes</i> .....  | 47        |
| <i>ii) Factores que influyen sobre la estabilidad de las triples hélices</i> ..... | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.-Cinética.....   | 52        |
| <b>C. OTRAS ESTRUCTURAS .....</b>  | <b>54</b> |
| 1.- El ARN.....  | 54        |
| 2.- Las dobles hélices híbridas ADN-ARN .....  | 55        |
| 3.- El ADN-H .....   | 55        |
| 4.- Las tetrahélices-G .....   | 56        |
| <br>   |           |
| <b>III.- INTERACCIONES DE CISPLATINO Y TRANSPLATINO CON EL<br/>ADN .....</b>                               | <b>58</b> |
| <b>A. REACTIVIDAD INTRACELULAR DEL <i>CIS</i>-DDP Y DEL <i>TRANS</i>-DDP. EFECTOS<br/>BIOLÓGICOS .....</b> | <b>61</b> |
| <b>B. REACCIONES CON EL ADN .....</b>  | <b>65</b> |
| Aductos monofuncionales de <i>cis</i> -DDP y <i>trans</i> -DDP .....                                       | 65        |
| Aductos bifuncionales del <i>cis</i> -DDP .....  | 68        |
| Aductos bifuncionales del <i>trans</i> -DDP .....  | 71        |
| Transformación de los aductos intracatenarios del <i>trans</i> -DDP.....                                   | 74        |
| <b>C. DEFORMACIONES PRODUCIDAS EN LA DOBLE HÉLICE .....</b>  | <b>79</b> |
| Aductos monofuncionales .....  | 79        |
| Aductos bifuncionales del <i>cis</i> -DDP .....  | 80        |
| Aductos bifuncionales del <i>trans</i> -DDP .....  | 82        |
| <b>D. ESTRATEGIAS ANTISENTIDO Y ANTIGÉN; USO DEL TRANSPLATINO EN<br/>TERAPIA GÉNICA.....</b>               | <b>84</b> |
| <br>   |           |
| <b>IV.- APORTE PERSONAL .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>91</b> |
| 1.- Oligonucleótidos. Recepción, purificación y acondicionamiento .....                                    | 92        |
| 2.- Preparación de los aductos monofuncionales <i>trans</i> -Pt-ADN y dien-Pt-ADN ..                       | 94        |
| 3.- Cromatografía de intercambio iónico .....  | 98        |
| 4.- Marcaje radiactivo de oligonucleótidos .....   | 103       |

|  |            |
|--|------------|
| 5.- Fosforilación-ligación de oligonucleótidos .....   | 105        |
| 6.- Sondas químicas .....  | 108        |
| 7.- Secuenciación (Método de Maxam-Gilbert) .....  | 112        |
| 8.- Electroforesis en gel de acrilamida .....  | 118        |
| 9.- Curvas de fusión de oligonucleótidos .....   | 122        |
| 10.- Cinética de conversión de los aductos monofuncionales <i>trans</i> -DDP- ADN en<br>aductos bifuncionales .....                                | 125        |
| <b>1<sup>ER</sup> PROYECTO: REACTIVIDAD QUÍMICA DE LOS ADUCTOS MONOFUNCIONALES<br/>DEL TRANSPLATINO EN ADN PLATINADO DE FORMA ESPECÍFICA .....</b> | <b>127</b> |
| Introducción .....   | 129        |
| Experimental.....  | 130        |
| Resultados .....   | 134        |
| Discusión .....  | 142        |
| <b>2<sup>O</sup> PROYECTO: REACTIVIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADOS CON EL<br/>TRANSPLATINO EN EL ADN EN TRIPLE HÉLICE .....</b>                | <b>148</b> |
| Introducción .....   | 150        |
| Experimental.....  | 151        |
| Resultados .....   | 154        |
| Discusión .....  | 160        |
| <b>CONCLUSIONES, CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>163</b> |
| <b>REFERENCIAS .....</b>   | <b>171</b> |

SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

A, C, G, T: Adenina, citosina, guanina, timina (nucleobases).

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

*cis*-DDP: *cis*-diclorodiaminplatino(II), (*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]), cisplatino.

*trans*-DDP: *trans*-diclorodiaminplatino(II), (*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]), transplatino.

Dien-Pt: Cloruro de clorodietilentriaminplatino(II), ([Pt(dien)Cl]Cl).

dA, dC, dG, dT: Adenosina, citidina, guanosina, timidina (desoxiribonucleótidos).

d(CpGpTp...), d(CGT...): Polidesoxiribonucleótido.

r(CpGpUp...), r(CGU...): Poliribonucleótido.

DEPC: Dietilpirocarbonato ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

DMF: Dimetilformamida (HC(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

DMS: Dimetilsulfato (SO<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético [(HOOC-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub>-N-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-N-(CH<sub>2</sub>-COOH)<sub>2</sub>].

FPLC<sup>®</sup>: Fast Protein Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de baja presión).

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta presión).

OsO<sub>4</sub>: Tetróxido de osmio.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

Tris: tri-(hidroximetil)-aminometano H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.

ε: Coeficiente de extinción molar.

λ: longitud de onda.

r<sub>b</sub> (razón molar): Cantidad de un compuesto enlazado a un polinucleótido, expresada en moles del compuesto por mol de mononucleótido.

# Prólogo

La búsqueda de sustancias que alivien o remedien las disfunciones del organismo humano ha sido una constante en la historia. Hasta la llegada de este siglo, dicha búsqueda se localizó en las sustancias naturales y en sus mezclas, generándose así recetas a veces milenarias y de resultados sorprendentes si se tiene en cuenta el conocimiento casi nulo de los principios relativos al origen de su actividad y de las causas últimas de la enfermedad tratada. El escaso conocimiento de la biología molecular y celular hacía muy difícil la mejora de las terapias y muy lento el desarrollo de nuevos medicamentos.

Desde la segunda mitad de este siglo se ha producido un rápido y extraordinario avance en el área de las ciencias de la vida relacionado con el progreso técnico y el desarrollo tecnológico que han hecho posible el estudio de la composición y estructura de moléculas, de su presencia en los distintos compartimentos celulares y de sus interacciones mutuas. El descubrimiento de la estructura y función del ADN y de los mecanismos de replicación, translación y traducción han permitido la comprensión del origen de la herencia genética, de su modo de transmisión a través de las generaciones y de los procesos en que se manifiesta mediante las características propias de cada individuo.

La facilidad creciente que existe para llevar a cabo procesos tales como la secuenciación de porciones de ADN de cualquier longitud, la introducción de genes humanos en bacterias, clonaje y amplificación automática y manejo de muchas otras técnicas, han conducido al conocimiento detallado de las características de muchos genes. Este hecho fundamental permite prever las enfermedades hereditarias y otras relacionadas con defectos genéticos mediante la localización y observación de los genes implicados en las mismas incluso antes del nacimiento.

Los conocimientos más recientes sobre los temas mencionados han permitido el estudio profundo de los mecanismos de acción de los medicamentos y, en su caso, de su transformación mediante la introducción de modificaciones que mejoran la especificidad por el substrato y por tanto la actividad del medicamento. La modificación estructural de

los medicamentos mediante diseño, ha supuesto un gran ahorro de tiempo y esfuerzos en el proceso de síntesis y estudio de los mismos.

En el año 1965, B. Rosenberg observó la inhibición del proceso de multiplicación celular de un cultivo bacteriano (*E. coli*) causado por las sales de platino presentes en el medio procedentes de la disolución del platino de los electrodos utilizados en las experiencias (Rosenberg et al., 1965). Este mismo grupo demostró más tarde la actividad antitumoral del cisplatino (Rosenberg et al., 1969), abriendo por primera vez un amplio campo de investigación en el que se combinan la biología y la medicina con la química puramente inorgánica y de coordinación. En la actualidad existen bastantes grupos de investigación especializados en lo que se ha dado en llamar química bioinorgánica o bioquímica inorgánica, un campo en pleno desarrollo y con perspectivas prometedoras tanto para las ciencias de la vida (estudio del estado y el comportamiento de los iones metálicos en condiciones fisiológicas), como para la química de coordinación, con nuevos retos en el estudio de esferas de coordinación y reacciones cada vez más complejas.

En este contexto, relacionado con la química inorgánica y la biología molecular y celular, se desenvuelve la investigación relativa a la mejora terapéutica del cisplatino, mediante la búsqueda de las razones últimas de su citotoxicidad y síntesis de derivados igualmente activos y con efectos secundarios menores. Los trabajos presentados en esta tesis versan sobre una de las vertientes de esta investigación, relativa a la explicación de la inactividad del isómero transplatino como agente antitumoral, y su utilización muy reciente en nuevas estrategias terapéuticas.

En el primer capítulo se presenta una revisión de las propiedades más características del platino(II) en el contexto descrito. El efecto *trans* y la reacción de sustitución nucleofílica, que originan sus propiedades singulares, se tratan con énfasis especial y mayor detalle.

En el segundo capítulo se realiza una introducción a las características de los ácidos nucleicos, necesariamente superficial por la magnitud y extensión del tema. Se detallan las características más interesantes relacionadas con su reactividad frente a compuestos del platino(II) y se examinan los trabajos más actuales sobre esta materia.

El tercer capítulo trata de las interacciones entre los compuestos del platino(II) y el ADN en sus distintas formas. Se describen los efectos que cisplatino y transplatino producen sobre el ADN y la posible utilización terapéutica del transplatino, aspectos que constituyen la temática principal de este trabajo.

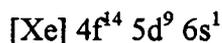
El cuarto y último capítulo reúne las experiencias realizadas en el laboratorio y los resultados y conclusiones obtenidos de las mismas. En primer lugar se exponen las reacciones del transplatino con el ADN de doble hélice, ya que a pesar de su reconocida inactividad terapéutica, no se conoce la naturaleza de los aductos mayoritarios que forma con el ADN; los resultados de las experiencias realizadas hasta hoy a este respecto resultan contradictorios. Este trabajo ha conducido a un conocimiento más exacto de las reacciones del transplatino con el ADN y de los parámetros que afectan a dichas reacciones.

Los resultados de estas experiencias, concordantes con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, han conducido a una investigación diferente relacionada con el uso del transplatino como sustancia capaz de aumentar la estabilidad de las triples hélices, en el contexto de la estrategia antigén. Aunque este tema requiere aún una investigación más detallada de todos sus aspectos, las experiencias realizadas han permitido la definición de parámetros que se espera sean de utilidad para el avance de esta línea de investigación y el establecimiento de las condiciones ideales de la reacción.

## **Capítulo I**

# **Propiedades químicas del Platino(II)**

El platino es un elemento de transición del grupo VIII de la tabla periódica, con la configuración electrónica siguiente:



El platino puede existir en tres estados de oxidación principales:  $\text{Pt}^0$  (metálico),  $\text{Pt}^{\text{II}}$  y  $\text{Pt}^{\text{IV}}$ . En cada uno de ellos, el platino forma compuestos de coordinación de geometría variable, cuya composición, número de ligandos y reactividad dependen tanto del número de electrones de valencia del átomo de platino como del tipo de ligandos que interaccionan con éste. A continuación se tratan los aspectos relacionados con el ion metálico  $\text{Pt}^{\text{II}}$ , centrandó la presentación en los tipos de interacción que este catión puede mantener con ligandos diferentes y en el efecto ejercido por cada interacción sobre la fuerza del enlace formado con los compuestos de coordinación. Tras este enfoque se presta atención al denominado “efecto *trans*” y a las reacciones de sustitución nucleofílica que caracterizan a este tipo de sustancias. Por la naturaleza de esta investigación se detallan los casos del complejo diclorodiaminplatino(II) en sus formás *cis*- y *trans*- y su capacidad diferente para reaccionar con el ácido desoxiribonucleico (ADN) y otras moléculas biológicas, propiedad íntimamente ligada a la actividad terapéutica de estos compuestos.

### 1.- Estructura electrónica del platino(II).

El platino(II) forma compuestos de coordinación diamagnéticos con ligandos de tipo base de Lewis, neutros o de carga negativa. Aunque en un principio se pensó que se trataba de compuestos tetraédricos, la existencia de dos formás isoméricas en el compuesto diclorodiaminoplatino(II),  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ , llevo finalmente a la conclusión de que su geometría es plana cuadrada, ya que en el caso de ser un compuesto tetraédrico la equivalencia entre todas las posiciones de coordinación impide la existencia de distintos isómeros (Basolo y Pearson, 1967) (Fig. I.1).

Dada su posición en la tabla periódica, el platino es un elemento con elevado peso atómico y configuración electrónica tal ( $4f^{14} 5d^9$ ) que el efecto de apantallamiento de la carga nuclear procedente de las capas electrónicas internas es muy grande ;

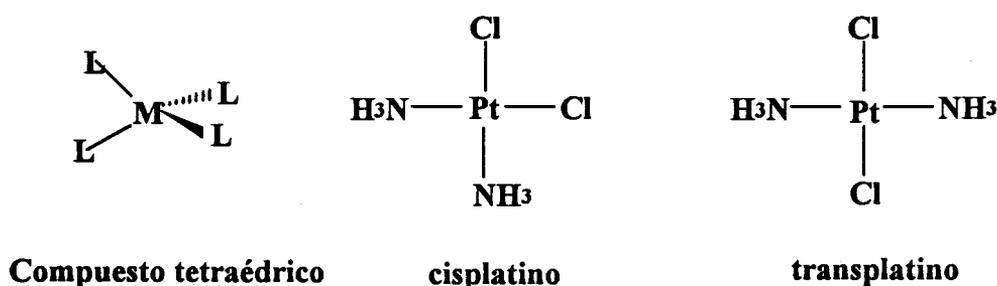


Figura I.1: Representación esquemática del cisplatino (*cis*-diaminodichloroplatino(II)) y del transplatino (*trans*-diaminodichloroplatino(II)), y de la estructura de un compuesto de coordinación tetraédrico.

Como consecuencia, la carga nuclear efectiva ejercida sobre los electrones localizados en los orbitales periféricos es muy pequeña. El platino(II), con ocho electrones en su orbital más externo ocupado 5d, posee cinco orbitales vacíos capaces de aceptar los electrones de los enlaces de tipo  $\sigma$  que forma con sus ligandos:  $5d_{x^2-y^2}$ , 6s,  $6p_x$ ,  $6p_y$  y  $6p_z$ . En estas condiciones podrían formarse cinco orbitales híbridos de tipo  $dsp^3$ , y por tanto un complejo pentacoordinado, pero el efecto de apantallamiento aumenta la energía de los orbitales 6p respecto a la de los orbitales 5d, con lo que la hibridación se hace difícil y se favorece la formación de cuatro orbitales híbridos  $dsp^2$  (Fig. I.2). No obstante, algunos ligandos con propiedades específicas favorecen la formación de compuestos pentacoordinados (Belluco, 1974).

Los cuatro orbitales  $dsp^2$  se sitúan en el plano XY (por convenio, se excluye de la hibridación el orbital  $6p_z$ ), con sus densidades electrónicas dirigidas en el mismo sentido que dichos ejes. (Fig. I.2). También el orbital ocupado  $5d_{z^2}$  tiene la simetría adecuada para hibridarse con los cuatro anteriores, pero su geometría, principalmente orientada sobre el eje Z, y su nivel energético hacen la interacción tan débil que en general no se la considera.

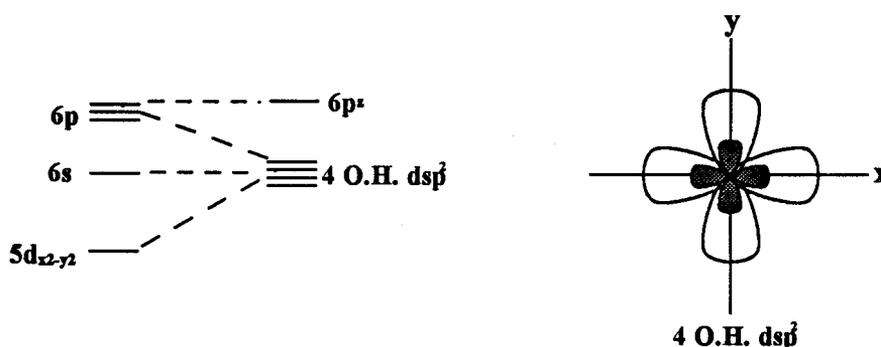


Figura I.2: Formación de cuatro orbitales híbridos (O.H.) en el platino(II), y representación de dichos orbitales.

El platino(II) puede formar también enlaces de tipo  $\pi$ , para lo que posee seis orbitales de simetría y energía favorables:  $5d_{xy}$ ,  $5d_{xz}$ ,  $5d_{yz}$ ,  $6p_x$ ,  $6p_y$  y  $6p_z$ . De estos, el  $6p_x$  y el  $6p_y$  están ya involucrados en la formación de los enlaces de tipo  $\sigma$ , lo que reduce a cuatro el número de enlaces de tipo  $\pi$  posibles. Estos enlaces pueden clasificarse en tres categorías (Gray, 1965; Belluco, 1974):

- a)  $\pi_h$ : Son interacciones que se sitúan sobre el plano XY (horizontal) y que se realizan entre el orbital ocupado  $5d_{xy}$  del átomo de platino(II) y los orbitales de simetría adecuada de los ligandos (Fig. I.3a). Para esta interacción, las cuatro posiciones de coordinación son equivalentes.
- b)  $\pi_v$  -*trans*: Pertenecen a este grupo los enlaces  $\pi$  formados entre los orbitales ocupados  $5d_{xz}$  y  $5d_{yz}$  del centro metálico y aquellos de simetría adecuada de los ligandos. Cada uno de estos orbitales  $5d$  puede interactuar exclusivamente con dos ligandos en posición respectiva *trans* dentro del compuesto (Fig. I.3b). Este tipo de interacción puede tener consecuencias importantes sobre la estabilidad del compuesto, que se discutirán más adelante en el apartado dedicado al “efecto *trans*”.

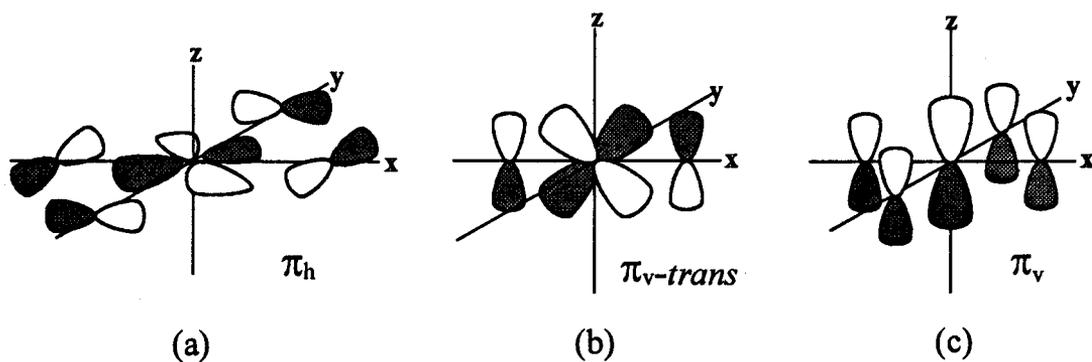


Figura I.3: Representación de los orbitales del metal y de los ligandos que participan en las interacciones de tipo  $\pi$  en un compuesto de coordinación plano cuadrado del platino(II).

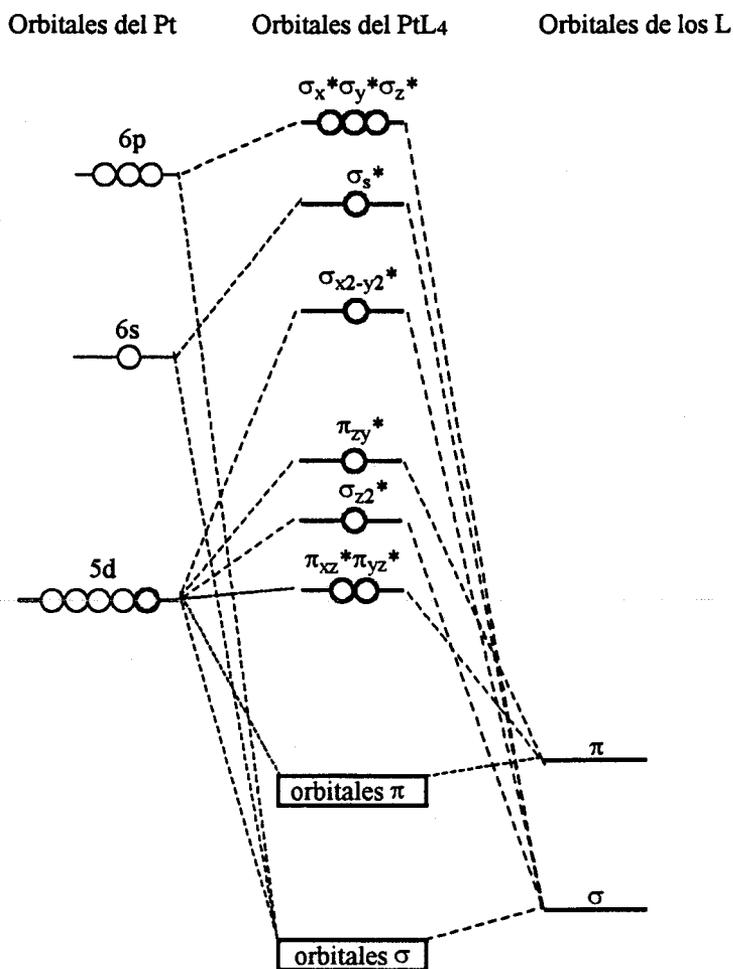


Figura I.4: Diagrama de energía relativa de los orbitales atómicos y moleculares para un compuesto de tipo  $Pt^{II}L_4$ .

c)  $\pi_v$ : Son las interacciones en las que participa el orbital  $6p_z$  del átomo de platino(II). La interacción es en principio equivalente con las cuatro posiciones de coordinación (Fig. I.3c).

La figura I.4 muestra un diagrama energético aproximado válido para este tipo de compuestos. Los orbitales de enlace  $\sigma$  y  $\pi$  son los de más baja energía, seguidos por los  $\sigma^*$  y  $\pi^*$ , de anti-enlace, en el orden energético definido por el origen de dichos orbitales y la fuerza de las diversas interacciones. La existencia o no de enlaces  $\pi$ , así como la fuerza de cada uno de los enlaces existentes, definida por las propiedades de los ligandos, pueden variar en cierta medida el orden energético de los orbitales.

## 2.- Compuestos de coordinación del platino(II)

La interacción  $Pt^{II}$ -ligando se justifica de forma sencilla y clásica según la teoría de la dureza-blandura de ácidos y bases. En efecto, los átomos metálicos con una alta razón carga/radio (R) presentan un orden de afinidad por los haluros inverso al que muestran los átomos metálicos con una razón carga/radio baja. Por ejemplo, para el  $Fe^{III}$  ( $R = 4.69$ ) y el  $Zn^{II}$  ( $R = 2.70$ ) el orden de afinidad es  $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ , mientras que para el  $Hg^{II}$  ( $R = 1.82$ ) y  $Pb^{II}$  ( $R = 1.67$ ), este orden se invierte. La explicación es que los electrones de la capa de valencia de los iones con una razón carga/radio grande están muy cerca del núcleo y resultan poco apantallados por los electrones internos, por lo que muestran escasa tendencia a la interacción covalente con un ligando. Los ligandos de electronegatividad elevada que pueden unirse a esta clase de iones metálicos formando enlace iónico fuerte, se denominan respectivamente ligandos y metales duros. Los metales blandos poseen carga menor o más electrones en las capas internas capaces de apantallar la atracción del núcleo por los electrones más externos. Como consecuencia, los orbitales de valencia estarán más extendidos y sus electrones tenderán a la interacción covalente con los ligandos del mismo tipo (revisión: Huheey et al., 1993; Gerloch y Constable, 1994)

Según esta teoría, el platino(II) es un metal blando ( $R = 2.08$ ), y tiende a la formación de compuestos estables con ligandos blandos como fosfinas, sulfuros, alquenos y arenos. Los ligandos de mayor dureza como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  y  $\text{Cl}^-$  formaran enlaces más débiles. Una clasificación aceptable de la afinidad de varios ligandos comunes de los compuestos de platino(II) es la siguiente:  $\text{CN}^- > \text{NH}_3 \sim \text{OH}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \gg \text{F}^- \sim \text{H}_2\text{O}$  (Basolo y Pearson, 1967). En esta clasificación se aprecia que la afinidad por los ligandos halogenuro aumenta con la disminución de su electronegatividad. En este mismo sentido, el enlace de un ligando de tipo sulfidrilo sería más estable que el del ligando hidroxilo equivalente, y los complejos con arsinas y fosfinas resultarían más estables que los formados con aminas del mismo tipo.

### 3.- El efecto *trans*

Los primeros compuestos de coordinación de platino(II) se sintetizaron y estudiaron a principios del siglo XX, y muy pronto se observó un efecto direccional en las reacciones de sustitución de ligandos de estos compuestos, que depende de la naturaleza del ligando en posición *trans* respecto al que se sustituye. Aunque la denominación "efecto *trans*" se utilizó desde el principio, su definición ha cambiado mucho a medida que sus aplicaciones se extendían a un número mayor de ligandos. En general, un ligando *trans*-activador, (efecto *trans* fuerte), es aquel que facilita la sustitución de otro ligando que se encuentra en posición *trans* respecto a si mismo. El efecto *trans* es por tanto un efecto cinético. La complejidad de este fenómeno se debe al hecho de que son dos los efectos distintos que justifican la capacidad de un ligando como *trans*-activadores: efectos  $\sigma$ - y  $\pi$ -*trans*.

Las reacciones de sustitución nucleofílica en los compuestos de platino(II) son de tipo asociativo, con un estado de transición pentacoordinado. La disminución de la energía de activación que se necesita para facilitar este tipo de reacción se consigue de dos formas: aumentando la energía del producto inicial o disminuyendo la energía del estado de transición de la reacción. Aunque se conoce que el efecto  $\pi$ -*trans* actúa sobre

el estado de transición, no existe unanimidad sobre el papel que desempeña el efecto  $\sigma$ -*trans*.

Los ligandos que poseen carácter  $\pi$ -aceptor ejercen efecto  $\pi$ -*trans*. Los orbitales del platino(II)  $5d_{xy}$ ,  $5d_{xz}$ ,  $5d_{yz}$  y  $6p_z$ , que se utilizan para la formación de enlaces  $\pi$ , interaccionan a la vez con dos ligandos en posición respectiva *trans* o con los cuatro ligandos (Fig. I.3). Si uno de estos ligandos, L, es un buen  $\pi$ -aceptor, su interacción con dichos orbitales será fuerte y los electrones se deslocalizarán sobre el ligando. Este hecho facilitará la entrada del grupo sustituyente nucleófilo Y. Si éste interacciona fuertemente con el centro metálico, el estado de transición se estabilizará aun más por el aumento del número de interacciones  $\pi$  y la consecuente bajada energética de los orbitales correspondientes (Fig. I.5).

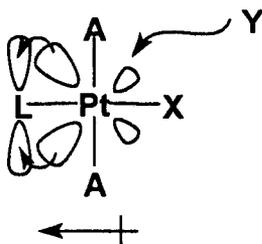


Figura I.5: Efecto  $\pi$ -*trans*. El ligando L es un buen  $\pi$ -aceptor y deslocaliza la densidad electrónica del metal, facilitando la entrada del nucleófilo Y.

El efecto  $\sigma$ -*trans* se ha explicado también en términos de estabilización del estado de transición. En el estado inicial dos ligandos X y L en posición respectiva *trans* comparten un mismo orbital del átomo metálico ( $6p_x$  o  $6p_y$ ) para sus enlaces de tipo  $\sigma$ . En el estado de transición la entrada del grupo sustituyente Y hace que el grupo sustituido X se salga del plano, formando así una bipirámide trigonal y posibilitando la interacción de ambos con el orbital  $6p_z$ . Así, mientras que en el estado inicial existe un orbital compartido entre dos ligandos, en el estado de transición habrá dos orbitales entre tres ligandos (Fig. I.6a). Si el grupo L es un buen  $\sigma$ -donador, aprovechará la mayor proporción disponible para reforzar su enlace, estabilizándolo así respecto al estado inicial (Belluco, 1974). Se ha estudiado también la posibilidad de que el efecto  $\sigma$ -*trans*

actúe sobre el estado inicial, por labilización del enlace Pt-X, debido a la mayor hibridación del ligando en trans L con el orbital 6p compartido (fig. I.6b). Esta ultima posibilidad carece de importancia, según una serie de cálculos *ab initio* realizados recientemente (Lin y Hall, 1991), que confirman también el efecto de estabilización del estado de transición.

En definitiva, existen tres tipos distintos de ligandos capaces de producir un efecto de *trans*-activación: Por una parte, los que forman enlaces  $\pi$  fuertes, como el monóxido de carbono (CO) y el etileno ( $C_2H_4$ ), por efecto  $\pi$ -*trans*. Por otra, los que forman enlaces  $\sigma$  fuertes, aunque no formen enlaces de tipo  $\pi$ , como los iones  $H^+$  y

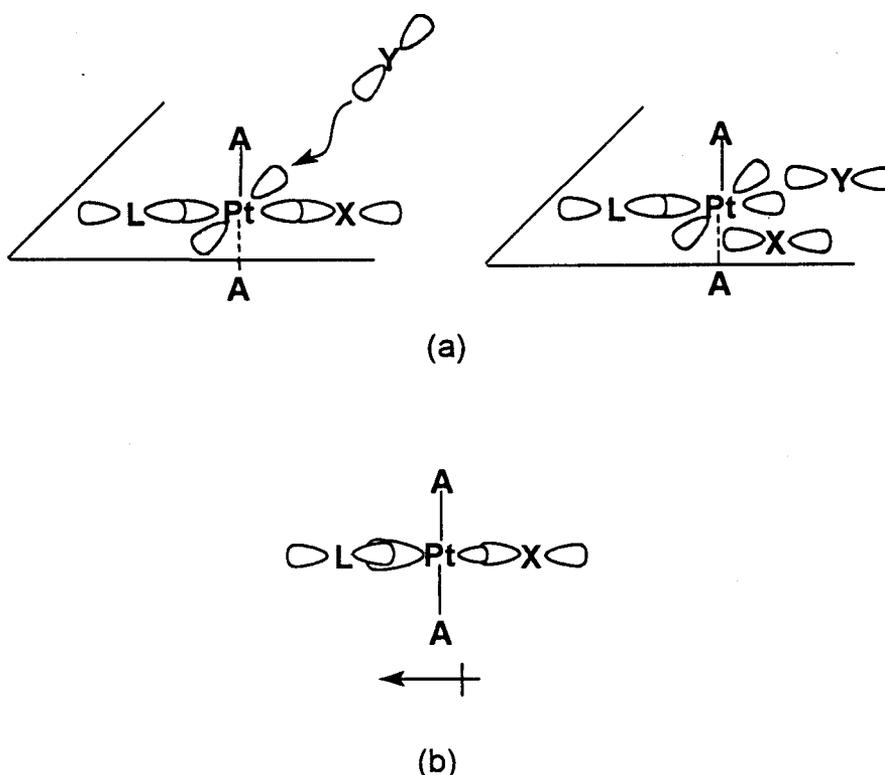


Figura I.6: Efecto  $\sigma$ -*trans*. (a): La entrada del nucleófilo Y coloca a los ligandos Y, L y X en triángulo en el estado de transición, permitiendo la interacción  $\sigma$  con dos orbitales del metal, contra uno solo en el estado inicial. (b): Los ligandos L y X, en posición *trans* entre si, comparten el mismo orbital 6p del platino(II) para la formación de su enlace  $\sigma$ ; El enlace Pt-X se labiliza debido a la mejor hibridación del ligando L.

$\text{H}_3\text{C}^-$ , por efecto  $\sigma$ -*trans*. Y finalmente, los que pueden formar tanto enlaces  $\sigma$  como enlaces  $\pi$  sin que ninguno sea muy fuerte, ya que se produciría una suma de ambos efectos. En este caso se encuentran el ion yoduro ( $\text{I}^-$ ) y la tiourea [ $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ ].

#### 4.-La reacción de sustitución.

Una característica de gran importancia para la comprensión de la reactividad de los compuestos de coordinación planos cuadrados del platino(II) radica en su bajo número de coordinación, que genera a su vez un gran espacio a ambos lados del plano ocupado por el compuesto, por el que se aproximan otras sustancias sin impedimento estérico apreciable. Además, el átomo de platino(II) presenta un orbital  $6p_z$  vacío perpendicular al plano, capaz de interactuar con un nucleófilo entrante. El orbital  $5d_{z^2}$  puede desfavorecer este tipo de interacción en mayor o menor medida, según cuales sean sus interacciones con los ligandos. Por tanto, las reacciones de sustitución de estos compuestos deben producirse por un mecanismo asociativo bimolecular de tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$ . Esta suposición se ha demostrado mediante experimentación (revisiones: Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974):

Retención de la configuración. Solo un mecanismo asociativo resulta capaz de mantener la configuración de una molécula tras una reacción de sustitución. Si el mecanismo fuera disociativo, existiría en algún momento una especie tricoordinada que podría ser atacada por el nucleófilo entrante desde cualquier ángulo, provocando la formación de una mezcla de productos con todas las configuraciones posibles (Fig. I.7).

Detección de compuestos penta y hexacoordinados en sistemas  $d^8$  (Maresca y Natile, 1993; Albano et al., 1994). Especies como el  $\text{Fe}^0$  y el  $\text{Ni}^{\text{II}}$  pueden formar especies penta y hexacoordinadas, lo que sugiere que dichas especies puedan ser de transición en el caso del platino(II). Los ligandos

capaces de formar enlaces  $\pi$  fuertes estabilizan estos compuestos pentacoordinados.

Efecto de la naturaleza y concentración del nucleófilo entrante sobre la velocidad de la reacción de sustitución. En mecanismos disociativos, el factor limitante de la velocidad de la reacción será la disociación del primer ligando, en la que no interviene el ligando entrante (Bellicini et al., 1994).

Factor estérico. El aumento del número de coordinación durante el transcurso de la reacción asociativa la hace más sensible a problemas de tipo estérico (Bellicini et al., 1994).

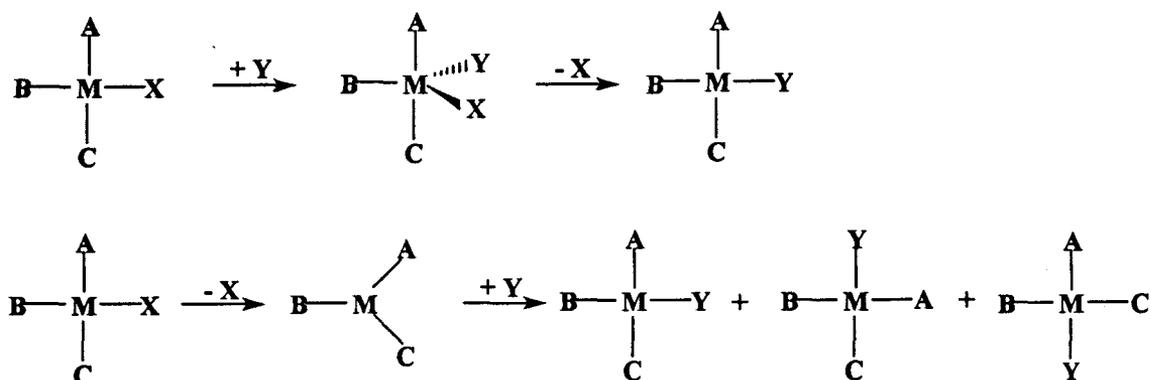


Figura I.7: Mecanismos posibles para la reacción de sustitución. Arriba: Mecanismo asociativo, con intermedio pentacoordinado y retención total de la configuración. Abajo: Mecanismo disociativo, con pérdida de la configuración inicial, obteniéndose una mezcla de isómeros.

Una reacción de sustitución puede transcurrir por dos vías diferentes, que dependen del mecanismo asociativo seguido: mediante ataque directo del grupo entrante o por formación de una etapa previa solvolítica (Fig. I.8).

Por lo tanto, la expresión de la velocidad de reacción tendrá dos términos:

$$v = k_1[\text{PtA}_3\text{X}] + k_2[\text{PtA}_3\text{X}][\text{Y}] \quad (1)$$

donde  $k_1$  es la constante de primer orden para el camino solvolítico y  $k_2$  es la constante de segundo orden para el camino de ataque directo. En condiciones de pseudo primer orden (exceso de Y), la constante de velocidad experimental será:

$$k_{obs} = k_1 + k_2[Y] \quad (2)$$

Lo que significa que si se representa gráficamente la  $k_{obs}$  respecto a  $[Y]$ , debe obtenerse una línea recta con  $k_2$  como pendiente y  $k_1$  como ordenada en el origen. La contribución de cada una a la constante experimental  $k_{obs}$  depende de la diferencia en el carácter nucleofílico entre el disolvente y el ligando entrante Y.

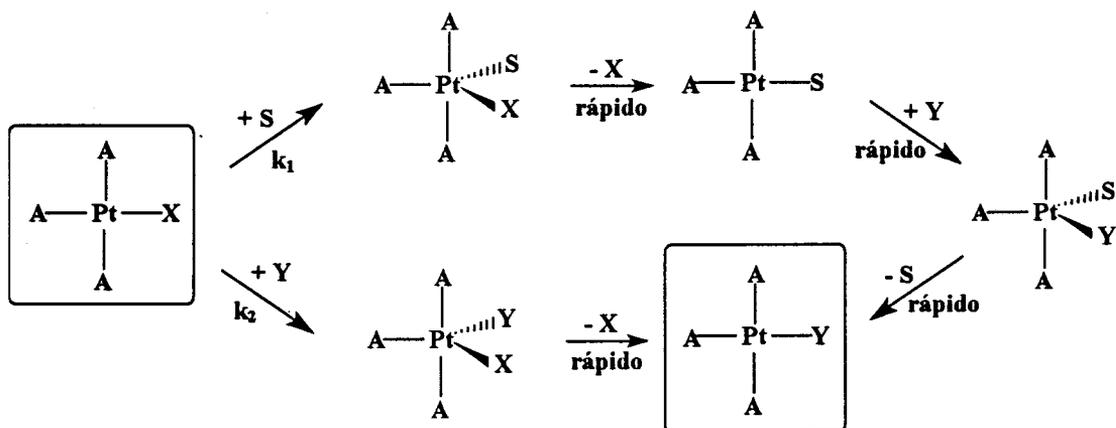


Figura I.8: Caminos posibles para la reacción de sustitución nucleofílica de los complejos del platino(II), con etapa previa de solvolisis (arriba) o ataque directo del grupo entrante Y (abajo).

En la figura I.9 se ilustran los perfiles de reacción posibles. Se observa que mientras el estado de transición es hexacoordinado, los estados intermedios son pentacoordinados. Los efectos de ambos estados sobre la velocidad de reacción serán diferentes dependiendo de la naturaleza de la etapa cinéticamente limitante (Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974).

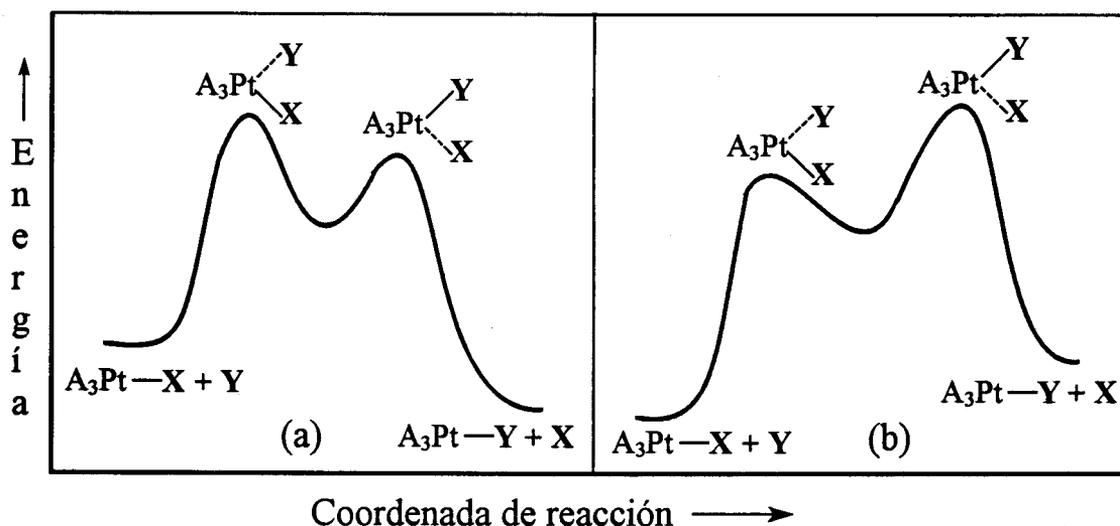
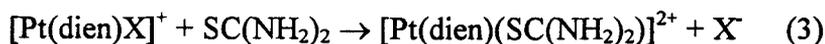


Figura I.9: Perfiles de reacción posibles para la reacción de sustitución. La etapa cinéticamente limitante de la reacción es la entrada del nucleófilo Y (a), o la rotura del enlace del grupo saliente X (b) (según Basolo y Pearson, 1967).

## 5.- Factores que afectan a la cinética de sustitución.

### *El grupo sustituido.*

La comprensión del comportamiento de una reacción de sustitución cuando se cambia el grupo sustituido requiere el conocimiento del proceso cinéticamente limitante, según las dos posibilidades descritas en la figura I.9. Por ejemplo, para la reacción



el orden de energías de activación según la naturaleza de X<sup>-</sup> es Cl<sup>-</sup> ~ Br<sup>-</sup> ~ I<sup>-</sup> << N<sub>3</sub><sup>-</sup> ~ NO<sub>2</sub><sup>-</sup> < SCN<sup>-</sup> < CN<sup>-</sup> (Basolo y Pearson, 1967), lo que indica que la estabilidad del enlace Pt-X (Cl<sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> < I<sup>-</sup>) no es determinante para su sustitución. Los ligandos sustituidos se dividen en dos grupos: (i) Ligandos fácilmente sustituibles, en los que la velocidad de sustitución es prácticamente igual para todos, y (ii) ligandos difícilmente sustituibles, para los que la velocidad de la reacción depende fuertemente de su naturaleza. Las reacciones del tipo (i) siguen una cinética como la indicada en la figura I.9a, con la entrada del nuevo ligando como factor cinéticamente limitante, mientras que las

reacciones del tipo (ii) siguen el camino indicado en I.9b, donde la etapa de ruptura del enlace Pt-X limita la velocidad de reacción, y por tanto la naturaleza de X será de importancia mayor.

En general, los ligandos con efecto *trans* fuerte pertenecen al grupo (ii), ya que, como se ha descrito, la *trans*-activación implica una fuerte interacción con el centro metálico. Sin embargo, otros ligandos con efecto *trans* débil, como NH<sub>3</sub> o OH<sup>-</sup>, se sustituyen muy lentamente debido a su carácter electronegativo, que condiciona su interacción con los orbitales de energía más baja (no direccionales) 5d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub> y 6s. Con ello se producen enlaces fuertes sin que su efecto *trans* sea excesivo (Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974).

#### *El ligando entrante.*

La afinidad de un nucleófilo por un compuesto de coordinación de platino(II) no depende de su basicidad, sino de su capacidad para formar enlaces sinérgicos  $\sigma$ -donador- $\pi$ -aceptor (Belluco, 1974; Bellicini et al, 1994). En general, puede decirse que existe una buena correlación entre la importancia del efecto *trans* de un ligando y su reactividad como grupo entrante, por lo que, para un mismo compuesto, puede preverse una escala de reactividad con distintos ligandos. Sin embargo, la presencia de ligandos con efecto *trans* fuerte o la carga del compuesto puede alterar la escala de reactividades. Para compuestos cargados positivamente, la capacidad  $\sigma$ -donadora del ligando entrante, y por tanto su basicidad, cobrará mayor importancia. A este respecto se ha determinado la llamada "constante de reactividad nucleofílica" ( $n_{Pt}^0$ ), que permite clasificar los distintos grupos entrantes según su afinidad por un compuesto de referencia dado (Belluco et al., 1965; Pearson et al., 1968; Henderson, 1993). Así,

$$n_{Pt}^0 = \log (k_y/k_s)_0 \quad (4)$$

Donde  $k_s$  y  $k_y$  son las constantes de velocidad para la reacción según el camino de solvólisis o de ataque directo, respectivamente, a 30°C y en metanol. Otra forma de la misma expresión

$$\log(k_y) = n_{Pt}^0 + \log (k_s) \quad (5)$$

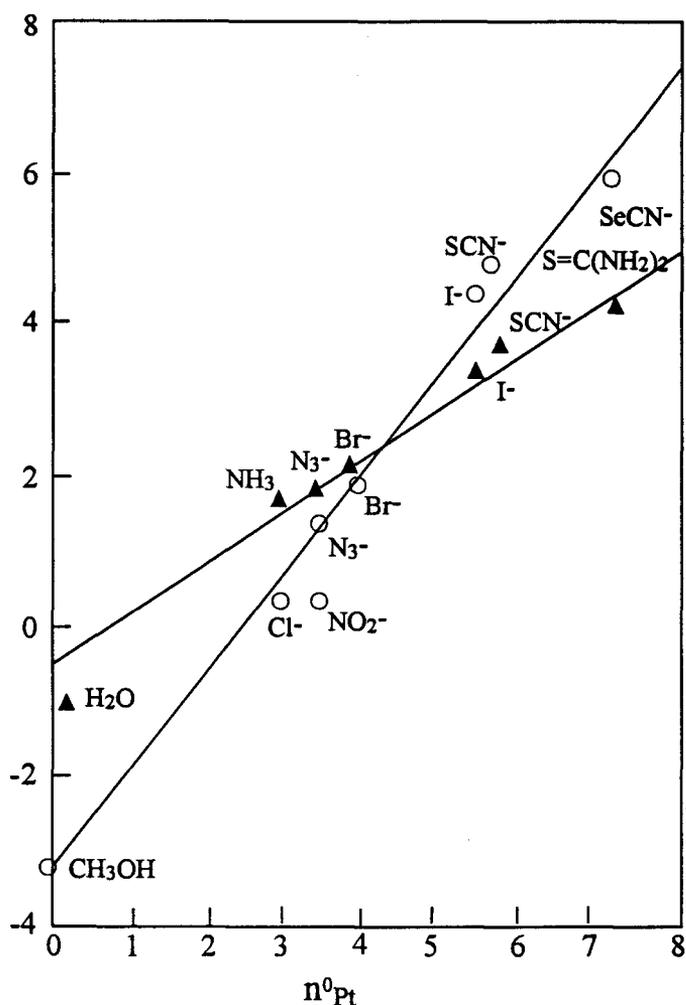


Figura I.10: Representación gráfica de las constantes de reactividad nucleofílica ( $n_{Pt}$ ) frente a las constantes de velocidad de segundo orden ( $k_y$ ) de los compuestos del platino(II)  $trans$ - $[Pt(PEt_3)_2Cl_2]$  en metanol a 30 °C (○) y  $[Pt(en)Cl_2]$  en agua a 35 °C (▲), con varios grupos entrantes (según Belluco, 1974).

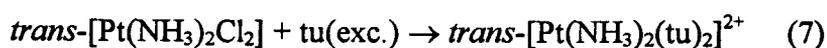
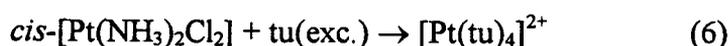
permite la representación gráfica del “ $\log(k_y)$ ” respecto a  $n^0_{Pt}$ , obteniéndose una recta de pendiente 1 y ordenada en el origen “ $\log(k_s)$ ”. Para otros compuestos distintos del de referencia, donde  $n_{Pt} = s \cdot n^0_{Pt}$ , “s” se conoce como “factor de discriminación nucleofílica”, mientras que “ $\log(k_s)$ ” se conoce como “reactividad intrínseca” del compuesto (Fig. I.10).

Los compuestos con una reactividad intrínseca elevada, en los que la solvólisis es muy rápida, tendrán lógicamente un bajo poder de discriminación nucleofílica, y viceversa.

En general, la previsión de la escala de reactividades de un compuesto respecto a varios ligandos en base a este planteamiento, requiere la elección de otro compuesto como referencia, cuyas características, principalmente carga y capacidad *trans*-activadora de sus ligandos, sean muy parecidas a las del compuesto en cuestión.

### *Los ligandos inertes.*

El papel que juegan los ligandos inertes en la reacción de sustitución se limita prácticamente al efecto *trans* del ligando en dicha posición respecto al reemplazado. Este efecto produce, por ejemplo, una reactividad muy distinta del cisplatino y el transplatino con la tiourea (tu):



El primer paso en ambas reacciones es el mismo, es decir la sustitución de un ligando cloruro por una molécula de tiourea. Entre los tres ligandos participantes en esta reacción, el orden de *trans*-activadores es  $tu > Cl^- > NH_3$ , pero como el enlace Pt-NH<sub>3</sub> es más fuerte que el Pt-Cl, es el cloruro el primero sustituido. La velocidad de esta primera reacción es unas 300 veces mayor en el transplatino, probablemente debido al mayor efecto *trans* producido por el otro cloruro en esta substancia respecto al ligando amino en el cisplatino (Dedon y Borch, 1987; Borch et al., 1988). En el caso del cisplatino, y tras la sustitución de ambos ligandos cloruro, el efecto *trans* producido por la tiourea labiliza los enlaces Pt-NH<sub>3</sub> lo suficiente como para que estos sean sustituidos a su vez por otras dos moléculas de tiourea. En el caso del transplatino las dos moléculas de tiourea quedan en situación respectiva *trans*, y *cis* respecto a las NH<sub>3</sub>, por lo que no afectan a los enlaces Pt-NH<sub>3</sub> y éstos permanecen como tales (Basolo y Pearson, 1967).

El hecho de que la tiourea, como posiblemente ocurre con otros compuestos con átomos de azufre, sea capaz de desplazar un enlace Pt-N en posición *trans*, es muy importante en el contexto de la reactividad de estos productos con el ADN en el interior de la célula. El aducto monofuncional  $cis-[Pt(NH_3)_2(N^7-G)Cl]^+$  podrá bloquearse únicamente por un compuesto sulfurado intracelular (como por ejemplo el glutatión),

impidiendo la formación de aductos bifuncionales. Sin embargo, un aducto de tipo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)Cl]<sup>+</sup> podrá ser bloqueado y posteriormente eliminado del ADN (Fig. I.11). Además, la velocidad de reacción del transplatino con estos compuestos puede hacer que éste no reaccione con el ADN, quedando así desactivado durante su tránsito intracelular (Lepre y Lippard, 1990; Eastman y Barry, 1986).

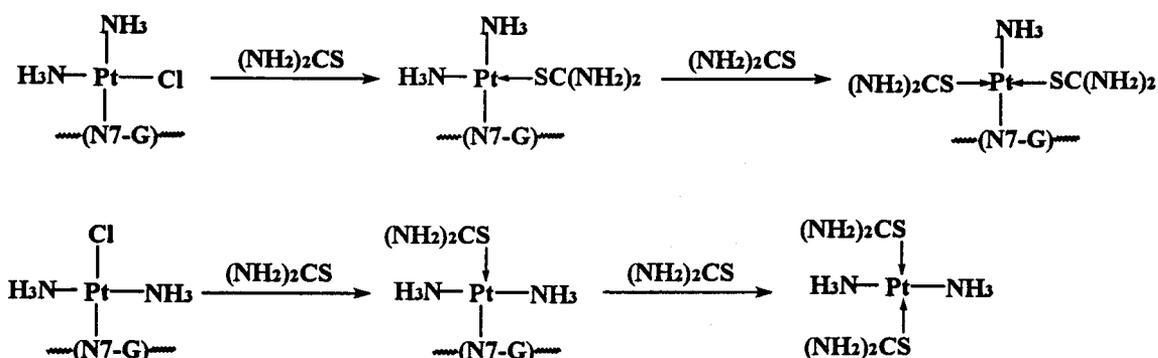


Figura I.11: Reacción de un aducto monofuncional cisplatino-ADN (arriba) o transplatino-ADN (abajo) con la tiourea. Solo el aducto del transplatino puede ser eliminado, por efecto *trans*.

Respecto al llamado “efecto *cis*”, es decir, la labilización del enlace de un ligando debido al efecto ejercido por otro ligando en posición *cis* respecto a él, no existe aún una regla fiable que permita preverlo, pero se conoce que se trata de un efecto mucho más débil que el *trans*, con actividad apreciable solo cuando el grupo en *trans* es un *trans*-labilizante muy débil (Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974).

#### El disolvente.

Puesto que la reacción de sustitución puede transcurrir por vía solvolítica (Fig. I.7), es previsible que la contribución de esta vía de reacción se haga más importante ( $k_s \gg k_y[Y]$ ) cuando aumente la capacidad del disolvente para coordinarse al centro metálico. En general, la vía solvolítica es muy efectiva para los disolventes polares (DMSO > CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> ~ H<sub>2</sub>O > R-OH), y lo es menos en el caso de disolventes poco polares o apolares.

Un disolvente actúa también en otros ámbitos de la reacción, mediante la solvatación del compuesto de coordinación (la geometría plana cuadrada facilita la interacción del centro metálico con el disolvente por ambos lados del eje perpendicular al plano del compuesto), del ligando entrante y del sustituido. La mejor solvatación de un grupo saliente respecto a otro en el estado de transición disminuye la energía del mismo y facilita su salida (Bellicini et al., 1994; Pitteri et al., 1994). La reacción de un ligando entrante polar, en el seno de un disolvente apolar, se producirá principalmente por vía de ataque directo, ya que la escasa solvatación del ligando lo hace más reactivo (aumenta la energía del estado inicial y por tanto la  $k_y$ ). Por otra parte, la baja coordinación del disolvente con el ion metálico dificulta la vía de solvatación (disminuye  $k_s$ ) (Basolo y Pearson, 1967).

#### *La carga del compuesto.*

El efecto de la carga sobre la velocidad de la reacción de sustitución es, en general, poco relevante. En el caso de los nucleófilos capaces de formar enlaces  $\pi$ , la interacción con los orbitales 5d llenos del metal es más fuerte en el estado de transición, lo que acelera la reacción. Si el complejo está cargado positivamente, la carga nuclear efectiva sentida por los electrones en estos orbitales es mayor, y por lo tanto su expansión en el espacio estará más restringida, lo que hará disminuir su solapamiento con los orbitales  $\pi$  de los ligandos y, como consecuencia, aumentará la barrera de activación (Belluco, 1974).

#### *El impedimento estérico.*

En las reacciones de tipo asociativo, su velocidad disminuye con el aumento de tamaño del ligando entrante. Del mismo modo, la existencia en el compuesto de ligandos voluminosos hará más difícil la expansión del número de coordinación en el estado de transición. La posición de un ligando voluminoso respecto al ligando sustituido influye sobre la velocidad de la reacción. En el estado de transición pentacoordinado (bipirámide trigonal) los ligandos en *cis* del sustituido quedan en las posiciones apicales, mientras que el entrante, el sustituido y el ligando en *trans* quedan en las posiciones axiales (Fig. I.12). Así, un ligando voluminoso en *cis* queda más cerca de los grupos reactivos en el estado

de transición que un ligando en *trans*, y por lo tanto su efecto estérico será mayor (Basolo y Pearson 1967; Bonivento et al., 1983).

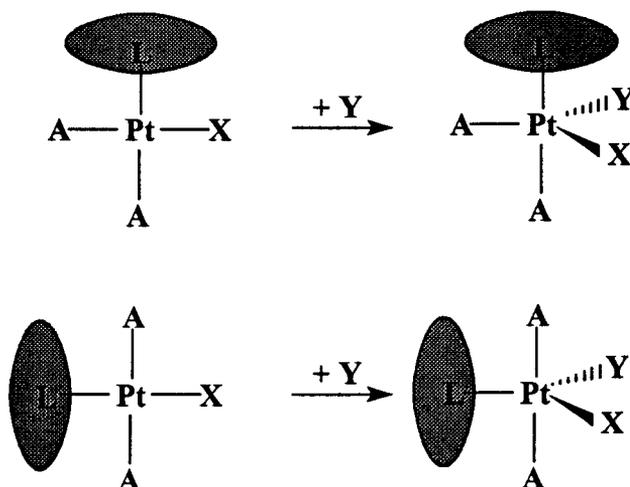


Figura I.12: Efecto estérico producido por un ligando voluminoso L en posición *cis* (arriba) o *trans* (abajo) respecto al grupo saliente X. En el estado de transición pentacoordinado, el ángulo entre L y los grupos reactivos es cercano a los 90° (arriba) o a los 120° (abajo).

El compuesto  $[\text{Pt}(\text{Et}_4\text{dien})\text{Cl}]^+$  ( $\text{Et}_4\text{dien} = (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{NHC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ) representa un ejemplo extremo de impedimento estérico. En este compuesto, los cuatro grupos etilo se sitúan a ambos lados del plano del compuesto, de tal forma que la aproximación de un reactivo resulta prácticamente imposible, y su reacción de hidratación es unas  $10^4$  veces más lenta que para el compuesto de referencia  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ . Esta reacción es independiente del ligando entrante, lo que se ha interpretado como indicación de un mecanismo disociativo (Basolo y Pearson, 1967).

### La catálisis electrofílica.

Se llama así al efecto de aceleración de la velocidad de sustitución que ejercen ciertos ácidos ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) en pequeñas concentraciones. Este efecto está relacionado con la capacidad de dichos ácidos para interactuar con los orbitales d llenos del centro metálico mediante la formación de enlaces  $\pi$ . De este modo la densidad electrónica alrededor del platino(II) disminuye, lo que hace más fácil la

entrada del nucleófilo sustituyente. La constante de velocidad de pseudo primer orden queda entonces compuesta por los tres términos siguientes [véanse las expresiones (1) y (2)]:

$$k_{\text{obs}} = k_1 + k_2[\text{Y}^-] + k_3[\text{Y}^-][\text{AH}] \quad (8)$$

El tercer término es el correspondiente a la vía en la que tanto el reactivo  $\text{Y}^-$  como el ácido  $\text{AH}$  participan en el complejo activado.

Este efecto no tiene lugar en todos los casos, y existen dos excepciones bien conocidas: por un lado, los compuestos que ya tienen ligandos  $\pi$ -aceptores no necesitan este tipo de interacción para deslocalizar su densidad electrónica, y en caso de existir, la interacción sería más débil. Por otra parte, los compuestos con ligandos voluminosos dificultan la aproximación de dichos catalizadores, por lo que su interacción resulta difícil o imposible (revisión: Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974).

## **Capítulo II**

# **Química y estructura de los Ácidos Nucleicos**

El ácido desoxiribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) constituyen los soportes de la información genética en todos los sistemas vivos. El ADN, que representa entre el 5 y el 15% del peso celular seco (Sriram y Wang, 1996), fue aislado por primera vez durante la segunda mitad del siglo XIX, pero luego fue necesario el paso de un largo periodo de tiempo para que se desarrollaran las técnicas adecuadas que condujeron a la definición de su estructura química y sus propiedades físico-químicas. En 1952 se le reconoció como soporte de la información genética (Hershey y Chase, 1952), papel que hasta ese momento se disputaba con las proteínas, mas complejas (20 monómeros posibles contra 4 para los ácidos nucleicos) y presentes también en todos los seres vivos, que parecían mejores candidatas para contener tal cantidad de información. Sin embargo, el punto de partida para el nacimiento de la bioquímica tal como la conocemos hoy fue la publicación en 1953, por parte de Watson y Crick, de la estructura tridimensional del ADN en doble hélice (Watson y Crick, 1953). Otras estructuras en doble hélice del ADN, como la forma A y la forma Z se descubrieron más tarde, y aún hoy las implicaciones y funciones de estas estructuras en la maquinaria celular siguen siendo objeto de estudio.

Existen muchas revisiones generales dedicadas a la bioquímica y a la estructura de los ácidos nucleicos. Para la confección de este trabajo se han utilizado principalmente las debidas a Saenger, 1984; Mathews y van Holde, 1990; Blackburn y Gait, 1990; y Sinden, 1994.

## **A. NUCLEOBASES, POLINUCLEÓTIDOS Y DOBLE HÉLICE DE ADN**

### **1.- Los componentes de los ácidos nucleicos: los nucleótidos.**

Un ácido nucleico es un heteropolímero constituido por unidades llamadas nucleótidos. Cada nucleótido se compone de un grupo fosfato unido a una pentosa cíclica (D-ribosa para el ARN, 2'-desoxi-D-ribosa para el ADN) por esterificación del hidroxilo en posición 3', y de un compuesto heterocíclico (base) unido también al azúcar

por un enlace, llamado “enlace glicosídico”, entre el carbono anomérico ( $C^1$ ) del azúcar y un átomo de nitrógeno endocíclico de la base (Fig. II.1). La parte fosfato-azúcar es común a todos los nucleótidos de un mismo polímero, y solo las bases permiten diferenciarlos. Clásicamente, estas bases son la guanina (G), la adenina (A), la citosina (C), y la timina (T) en el ADN o el uracilo (U) en el ARN (Fig. II.2). Distintas modificaciones químicas de estas bases pueden llevar a la presencia de otras en el polímero, siempre en una cantidad mucho menor pero de importancia cierta para distintos procesos de la vida celular (Fig. II.3). Por su naturaleza química, la adenina y la

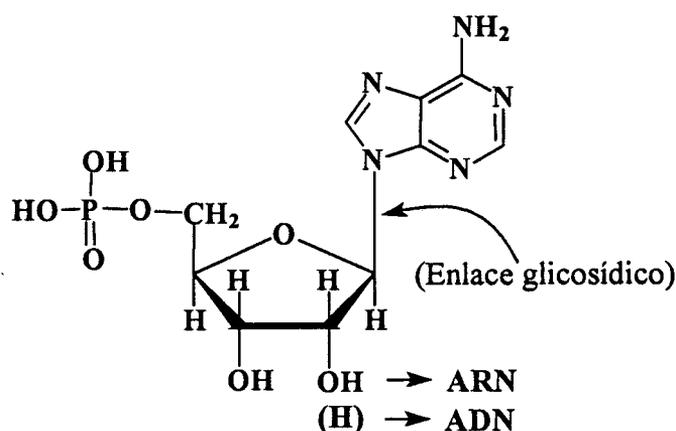


Figura II.1: Estructura de un nucleótido del ADN o del ARN, con la Adenina como base.

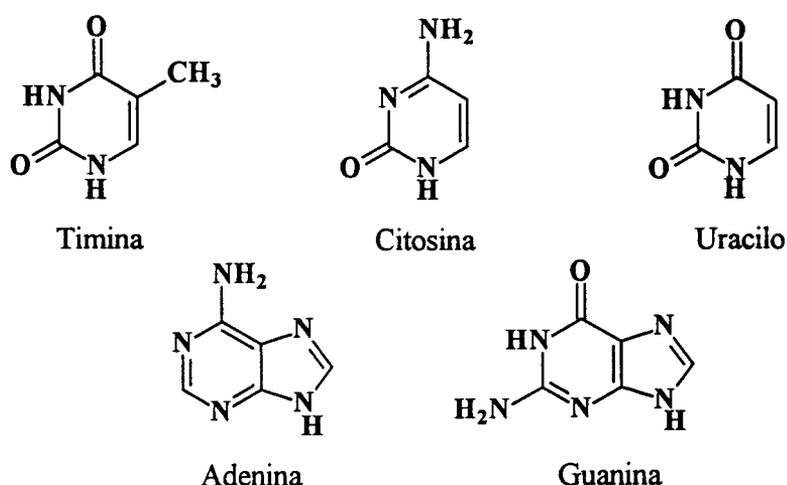


Figura II.2: Las cinco bases aromáticas nucleotídicas principales.

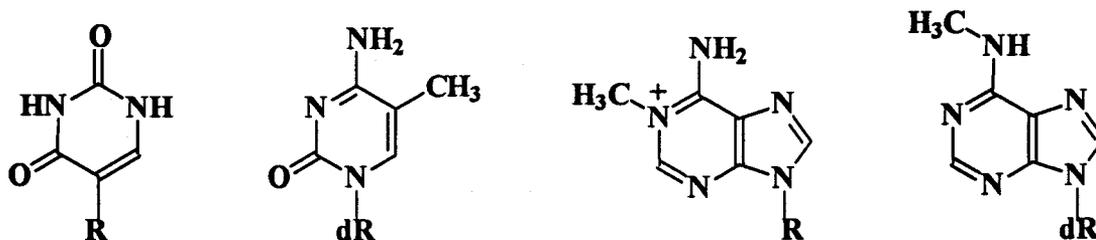


Figura II.3: Ejemplos de bases nucleotídicas modificadas. De izquierda a derecha: Pseudouridina ( $\psi$ ), 5-Metildesoxicitidina ( $m^5$ -dC), 1-Metiladenosina ( $m^1$ -A) y 6-Metildesoxiadenosina ( $m^6$ -dA).

guanina (derivadas de la purina y unidas al azúcar por el nitrógeno  $N^9$ ) se denominan bases púricas, y la citosina, timina y uracilo (derivadas de la pirimidina y unidas al azúcar por el átomo de nitrógeno  $N^1$ ), bases pirimidínicas.

Los nucleótidos se caracterizan sobre todo por su comportamiento químico ácido-base. De este carácter dependen sus propiedades fundamentales de reconocimiento mutuo y de emparejamiento (ver sección A.3). A pH fisiológico, las bases y los anillos furanosa son neutros, y los grupos fosfato están doblemente cargados. En estas condiciones resultan posibles varias formas tautoméricas definidas según los equilibrios ceto-enol y amino-imino (Fig. II.4) que son de una importancia capital, ya que de ellos depende el carácter donador-aceptor de cada base y la formación de los enlaces de hidrógeno con su base complementaria. Las formas tautoméricas dominantes de las bases nucleotídicas están hoy bien establecidas (por espectroscopía UV, RMN e IR) y corresponden, en proporción superior al 99,99% a las formas amino y ceto (Fig. II.4).

Los nucleótidos presentan un gran número de conformaciones posibles, que se describen en función de los ángulos de torsión de los enlaces de los grupos azúcar ( $\nu_0$  a  $\nu_4$ ), fosfato ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) y unión glicosídica ( $\chi$ ) (Fig. II.5).

El enlace glicosídico presenta dos conformaciones energéticamente favorables según su ángulo de torsión glicosídico  $\chi$ : *anti* y *syn* (Fig. II.6). La configuración *anti* ( $\chi \approx 180^\circ$ ) es en general la más favorecida, pues impone un impedimento estérico mínimo

para el azúcar y la base. La conformación *syn* ( $\chi \approx 0^\circ$ ) se puede encontrar en la guanidina, en la que se estabiliza por una interacción electrostática entre el grupo fosfato cargado negativamente y el grupo amino electrófilo en la posición 2 de la guanina. Estas conformaciones de la unión glicosídica son importantes para la estructura secundaria de los ácidos nucleicos y se discutirán posteriormente.

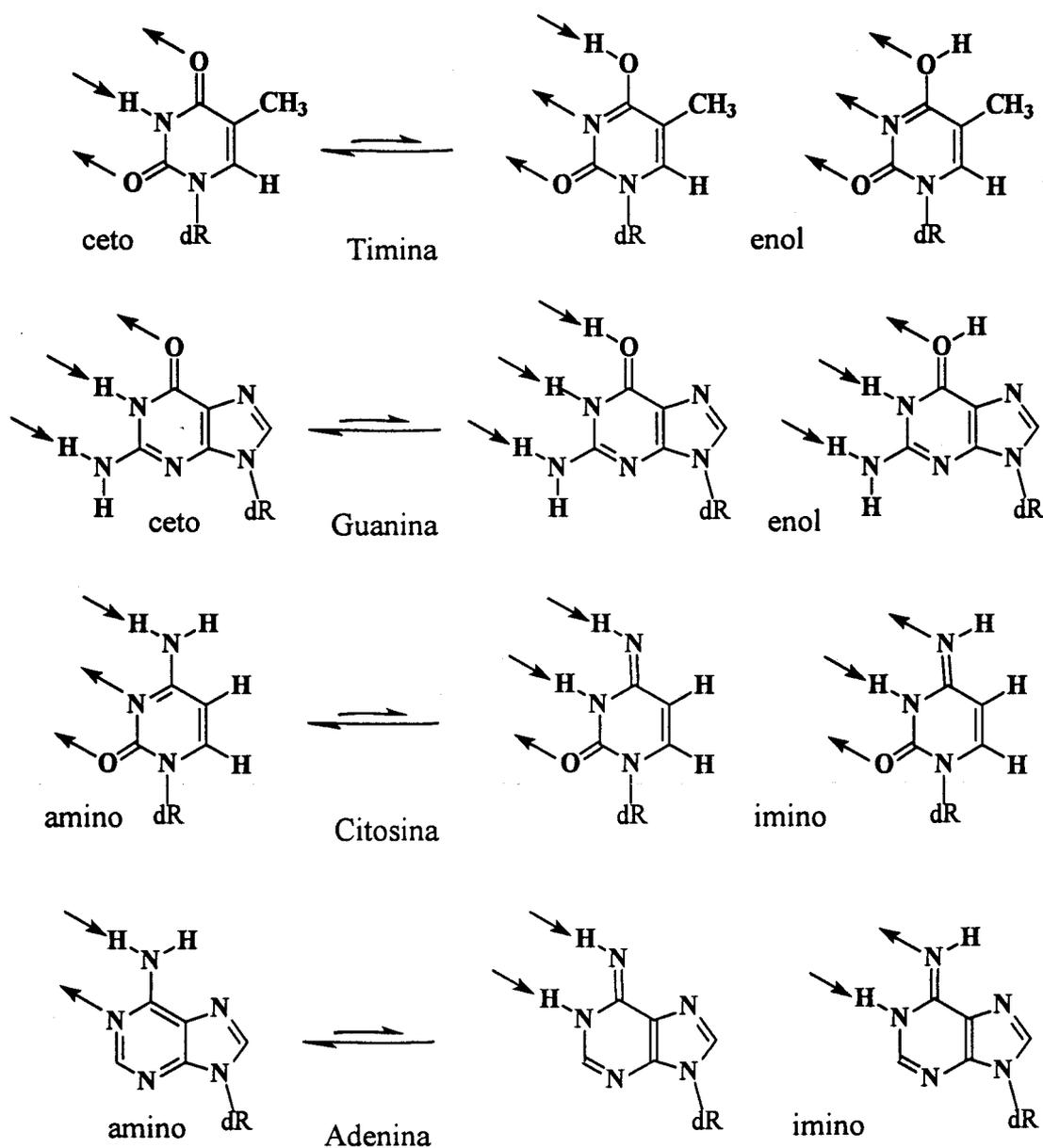


Figura II.4: Equilibrio ceto-enol en la Timina y en la Guanina, y equilibrio amino-imino en la Citosina y en la Adenina. Las flechas indican la dirección de los enlaces de hidrógeno que puede formar cada especie, que determinan sus posibilidades de emparejamiento con otras bases.

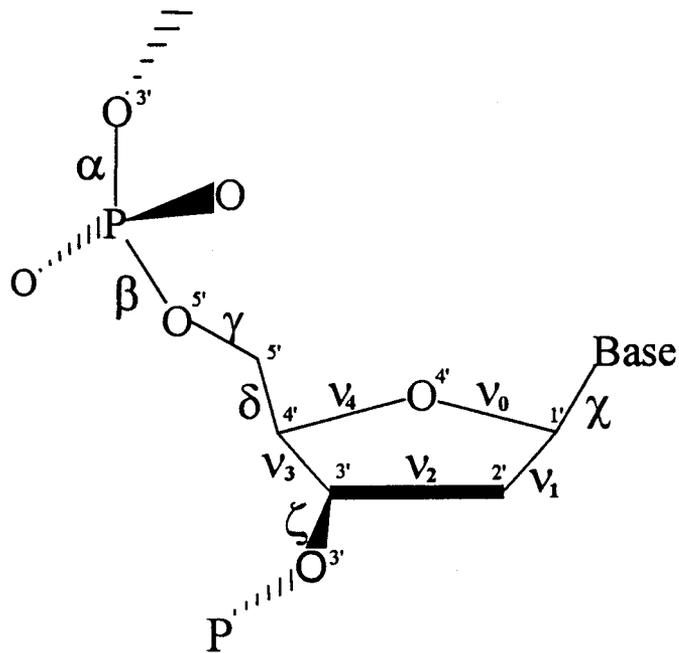


Figura II.5: Denominación de los ángulos de torsión de cada uno de los enlaces del esqueleto del azúcar, grupo fosfato y enlace glicosídico.

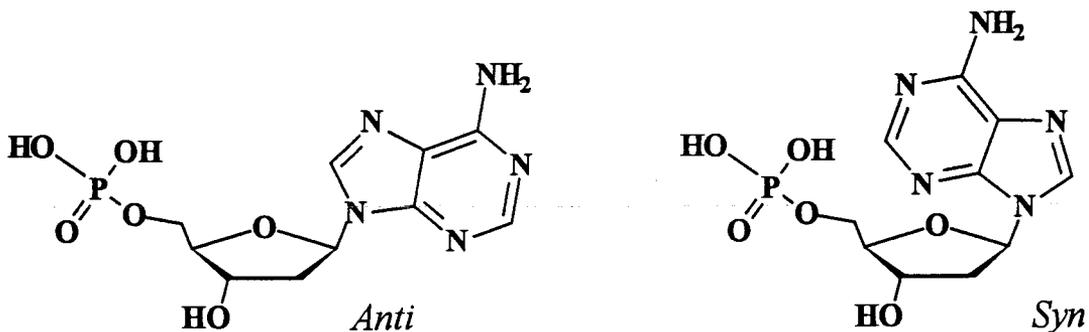


Figura II.6: Conformaciones *anti* (arriba) y *syn* (abajo) del enlace glicosídico en el caso de la desoxiadenosina, que evidencia la mayor posibilidad de interacciones entre la base y el azúcar y el grupo fosfato en la conformación *syn*.

En el azúcar, el ángulo de fase ( $\rho$ ) y la amplitud de pseudorrotación ( $\Phi$ ) resumen las posibilidades de rotación de los enlaces endocíclicos ( $\nu_0$  a  $\nu_4$ ) (Fig. II.7). De este modo, se distinguen dos dominios conformacionales principales que dependen de la

posición de los carbonos C<sup>2'</sup> y C<sup>3'</sup> respecto al plano formado por los otros átomos del ciclo (C<sup>1'</sup>-O<sup>4'</sup>-C<sup>4'</sup>): las conformaciones C<sup>2'</sup>-endo (o tipo S, con 150° < P < 194°) y C<sup>3'</sup>-endo (o tipo N, con 1° < P < 34°) (Saenger, 1984 ; Sriram y Wang, 1996).

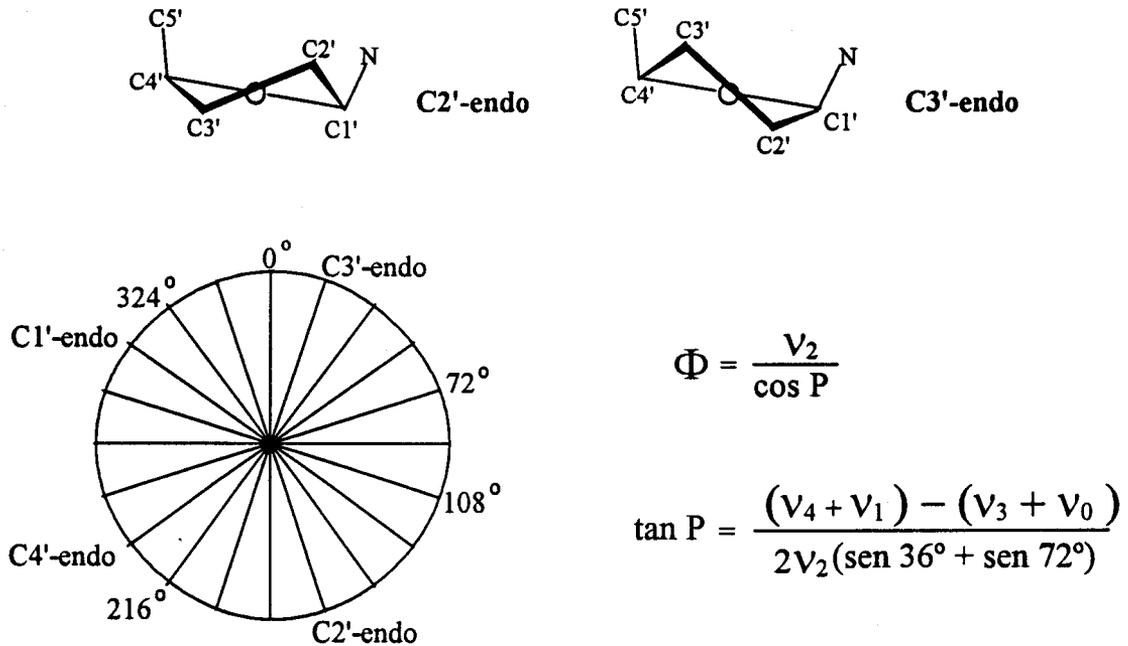


Figura II.7: Arriba: Representación de las dos conformaciones principales (C<sup>2'</sup>-endo y C<sup>3'</sup>-endo) del anillo furanosa en los nucleótidos. Abajo: Círculo de pseudorotación del ángulo diedro del azúcar, y fórmulas matemáticas que relacionan el ángulo de fase P y la amplitud de pseudorotación  $\Phi$  con los ángulos de torsión de los enlaces del anillo ( $v_0$  a  $v_4$ ).

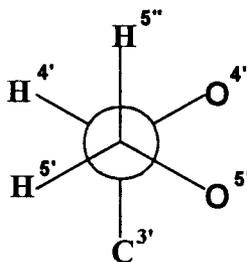


Figura II.8: Conformación sinclinal del enlace C<sup>4'</sup>-C<sup>5'</sup>.

La posición del fosfato respecto al azúcar está determinada por la conformación de los enlaces  $C^{4'}-C^{5'}$  y  $C^{5'}-O^{5'}$ . En general, la conformación sinclinal resulta mas favorecida energéticamente, tanto para  $C^{4'}-C^{5'}$  como para  $C^{5'}-O^{5'}$  (Fig. II.8) (Blackburn, 1990).

## 2.- Estructura primaria de los ácidos nucleicos: la cadena nucleotídica.

La estructura primaria de los ácidos nucleicos consiste en un encadenamiento lineal de nucleótidos (2'-desoxi-D-ribonucleótidos para el ADN, D-ribonucleótidos para el ARN) mediante enlaces de tipo fosfodiéster entre el hidroxilo en 3' de un nucleótido y el hidroxilo en 5' del siguiente. Este encadenamiento lleva a la formación de un esqueleto hidrofílico cargado negativamente, formado por los grupos azúcar y fosfato, y de una secuencia de bases alineadas, relativamente hidrófobas, donde reside toda la información de la molécula (Fig. II.9). A pesar de su aparente simpleza, esta estructura confiere a la molécula las propiedades esenciales necesarias para su papel primordial en los diferentes procesos celulares y permite la formación de las estructuras secundarias y terciarias. Si a este nivel las moléculas de ADN y de ARN resultan similares, la ausencia o presencia del hidroxilo en la posición 2' del azúcar las hace tan diferentes como para permitir su discriminación por parte de las enzimas celulares. Además, el ARN (y sobre todo el ARNt) contiene un número mayor de modificaciones químicas de las bases que el ADN, lo que modula también su actividad biológica (Long, 1996).

## 3.- Estructura secundaria del ADN: las dobles hélices.

En el momento de la descripción de la estructura en doble hélice del ADN por Watson y Crick (forma ADN-B), se había identificado por rayos X otra forma del ADN, el ADN-A, encontrada en condiciones de menor humedad (75% de humedad relativa) y de menor fuerza iónica ( $[NaCl] < 10\%$ ) que para la forma B. Gracias en gran parte al desarrollo de la síntesis química de oligonucleótidos en cantidades suficientes, se ha descrito después toda una familia de ADN-B (ADN-B', C', C'', D, E, T) y la forma ADN-Z, cuyos parámetros estructurales se han determinado a nivel de resolución

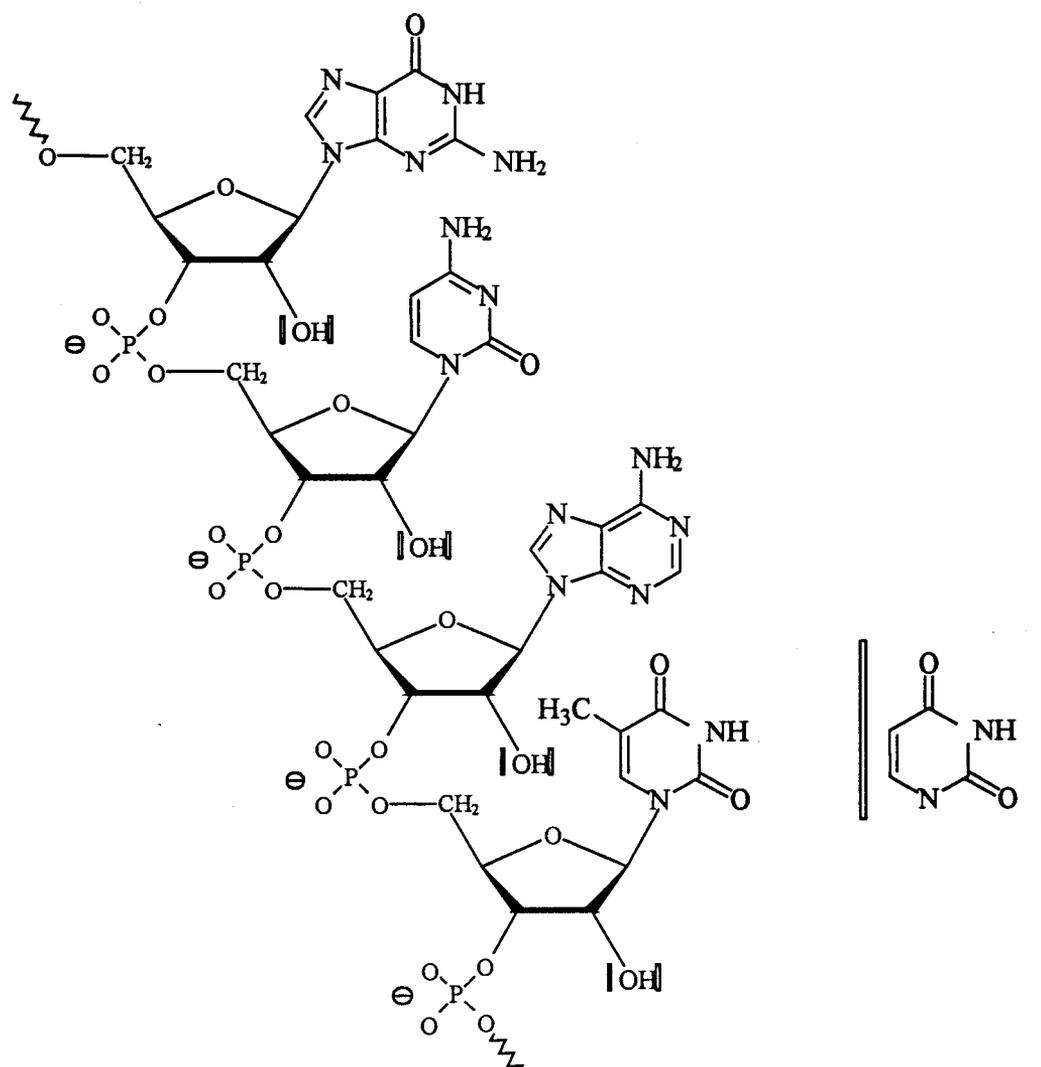


Figura II.9: Representación de una secuencia polinucleotídica con las bases principales. Entre corchetes, las modificaciones a realizar si queremos representar el ARN en vez del ADN: adición del hidroxilo en posición 2' y sustitución de la Timina por el Uracilo.

atómica (Fig. II.10). De esta forma, se ha demostrado que la conformación final de la doble hélice formada por una secuencia dada de ADN depende, no solo del nivel de humedad y de la concentración salina, sino también de la composición en nucleótidos, temperatura, naturaleza de las sales y disolvente y de las posibles modificaciones químicas de las bases (Saenger, 1984). Estos estudios permiten concluir que la estabilidad y la conformación de una estructura de doble hélice están intrínsecamente unidas a las interacciones de la molécula de ADN con el disolvente y con los iones

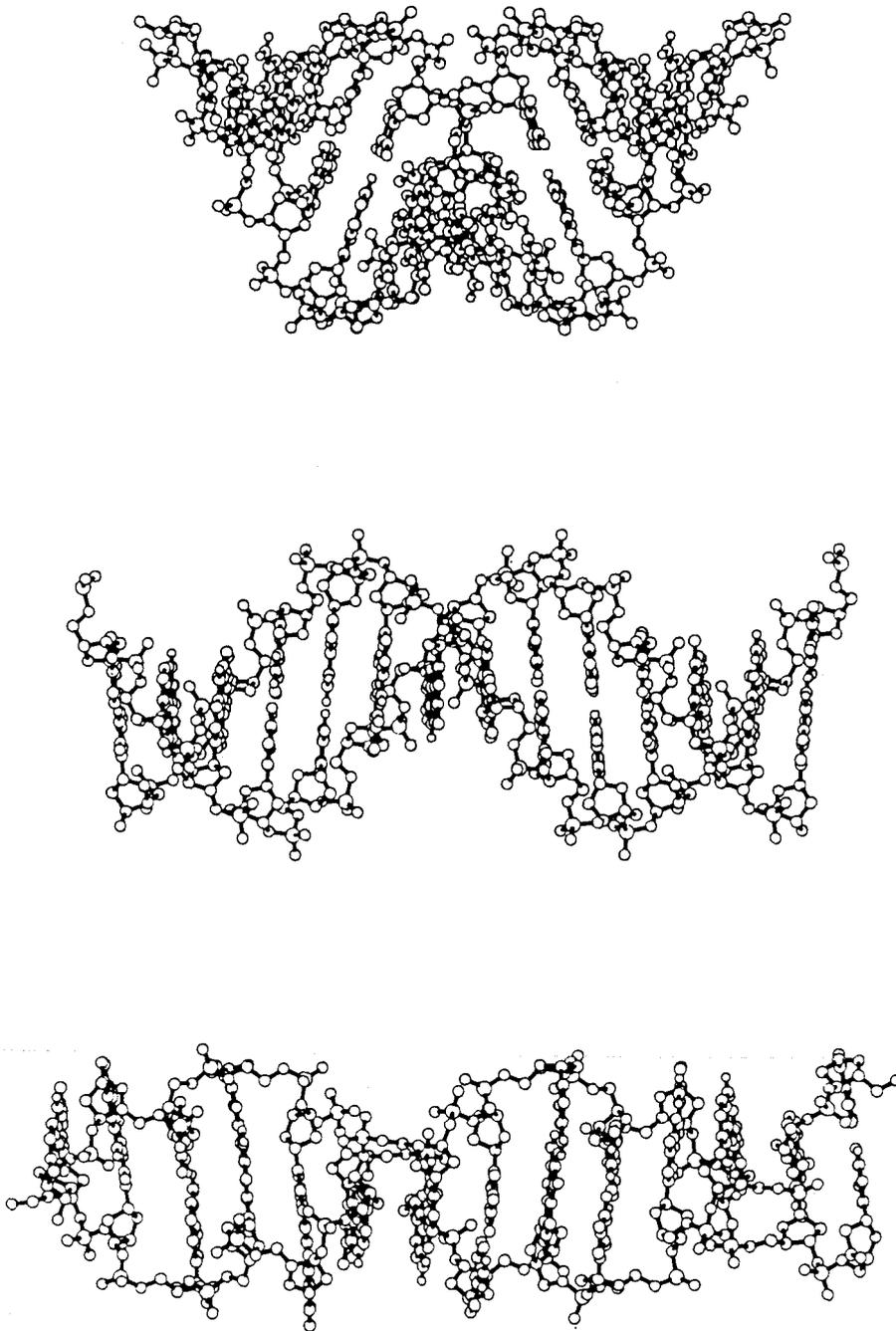


Figura II.10: Comparación de las estructuras de las dobles hélices A, B y Z (arriba, enmedio y abajo, respectivamente) del ADN.

presentes en el medio, así como con toda otra molécula capaz de interactuar con la doble hélice de ADN (Dickerson, 1982 ; Saenger, 1984 ; Blackburn, 1990).

Las dobles hélices de ADN se caracterizan todas por dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas unidas entre si por enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias A.T y G.C (Fig. II.11) y enrolladas entre si en espiral. Las bases se encuentran situadas hacia el interior de la hélice, y el esqueleto fosfodiéster hacia el exterior, más en contacto con el disolvente y los iones del medio. Esta estructura se encuentra estabilizada por:

- Los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases.
- Las interacciones hidrofóbicas,  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento y dipolares entre las bases.
- Las interacciones con los contraiones que disminuyen las repulsiones entre los fosfatos cargados negativamente, y las capas de hidratación que interactúan a la vez con el esqueleto y con los grupos carboxilo, imino y amino accesibles de las bases (Saenger, 1984 ; Blackburn, 1990).

Esta estructura en doble hélice crea dos zonas bien diferenciadas a un lado y al otro de los enlaces glicosídicos: el surco mayor y el surco menor (Fig. II.11). Estos surcos cambian con la conformación de la molécula y constituyen por si mismos dominios de interacción específicos para los diferentes ligandos del ADN (Seeman et al., 1976). Otras características estructurales de las dobles hélices están definidas por los parámetros helicoidales, utilizados para cuantificar la posición de cada base respecto al eje de la doble hélice y a su base complementaria (Dickerson, 1989 ; Fig. II.12), y por los ángulos de torsión del esqueleto fosfato-azúcar (ver Fig. II.5). En la tabla se indican los valores medios de los parámetros estructurales mas representativos de las dobles hélices A, B y Z del ADN. Bajo ciertas condiciones específicas, la posible interconversión entre estas estructuras puede tener consecuencias biológicas importantes para la célula (revisiones: Sinden, 1994 ; Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995).

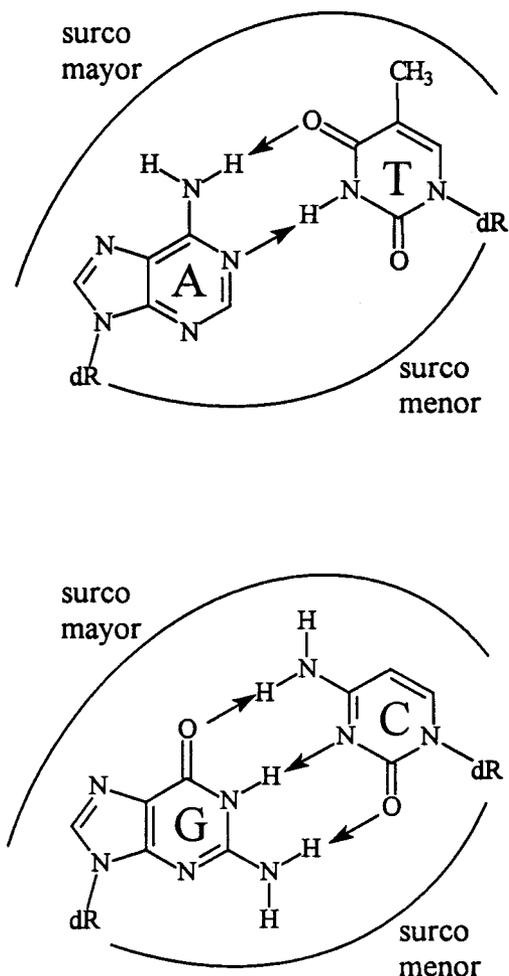


Figura II.11: Los dos pares de bases A.T y G.C de la doble hélice del ADN. Los enlaces de hidrógeno se representan por flechas para indicar su direccionalidad. Los trazos alrededor de cada par de bases indican la extensión de los surcos mayor y menor.

### i) ADN-B

Se trata de la forma más estable del ADN bicatenario bajo las condiciones fisiológicas. Los pares de bases se encuentran centrados y perpendiculares al eje de la doble hélice, y la hélice se enrolla hacia la derecha. Con el enlace glicosídico en *anti* y el azúcar en C<sup>2'</sup>-endo, el esqueleto forma un surco menor estrecho y profundo y un surco mayor ancho, profundo y como consecuencia más accesible para un gran número de

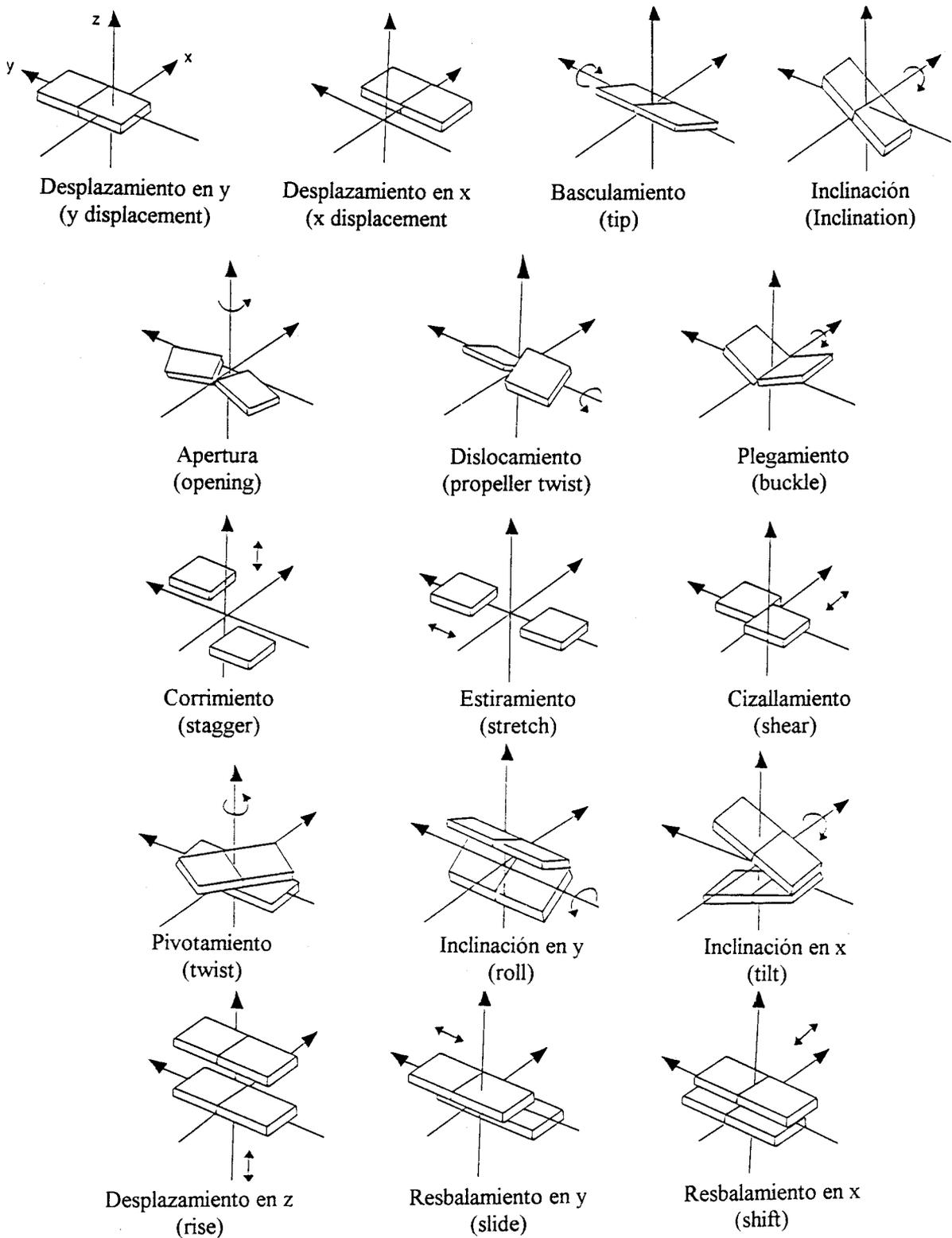


Figura II.12: Parámetros helicoidales, que definen la posición de los pares de bases respecto al eje helicoidal (eje z), y de las bases complementarias entre si.

| Conformación                        | A                     | B                     | Z  |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| Sentido de enrollamiento            | derecho               | derecho               | izquierdo  |
| diámetro<br>(Å)                     | 26                    | 20                    | 18   |
| Forma del surco mayor               | profundo y estrecho   | profundo y ancho      | inexistente; superficie convexa                      |
| Forma del surco menor               | ancho y poco profundo | profundo y estrecho   | profundo y estrecho                                  |
| Unidad de repetición                | par de bases          | par de bases          | dos pares de bases                                   |
| Pares de bases por paso de hélice   | 11                    | 10                    | 12   |
| Paso de hélice<br>(Å)               | 26                    | 34                    | 45   |
| Conformación del enlace glicosídico | anti                  | anti                  | G: syn<br>C: anti                                    |
| Conformación del azúcar             | C <sup>3'</sup> -endo | C <sup>2'</sup> -endo | G: C <sup>3'</sup> -endo<br>C: C <sup>2'</sup> -endo |
| Pivotamiento<br>(°)                 | 33                    | 36                    | -GpC-: -50<br>-CpG-: -10                             |
| Inclinación<br>(°)                  | 20                    | 0                     | -7   |
| Dislocamiento<br>(°)                | 15,4                  | 11,7                  | 4,4  |

Tabla: Valores medios de los parámetros estructurales más representativos de las conformaciones A, B y Z de la doble hélice de ADN.

ligandos que el surco menor (Fig. II.10). La tabla muestra los parámetros estructurales medios para una estructura muy heterogénea en la que cada par de bases se considera una entidad diferente, con una forma propia e interacciones distintas con los pares de bases vecinas (Drew y Travers, 1984). Así, la forma de una región de un ADN-B y su reconocimiento por parte de proteínas y otras moléculas específicas dependen en gran parte de su secuencia de bases (Long, 1996).

### ii) ADN-A

Esta estructura se observó por primera vez en cristales con baja humedad (Franklin y Gosling, 1953). Se caracteriza por su enrollamiento hacia la derecha y por sus enlaces glicosídicos en *anti* y azúcares en posición C<sup>3'</sup>-endo. La vuelta de hélice es de 28 Å, con 11 pares de bases por vuelta, y la distancia normal de apilamiento de las bases (interacciones de tipo van der Waals, unos 3,4 Å) se mantiene gracias a un basculamiento de 20 grados y al desplazamiento de los pares de bases hacia el surco menor. Esto genera un surco mayor mas profundo y estrecho que para el ADN-B y un surco menor superficial y ancho (Fig. II.10). La doble hélice de tipo A, más rígida que la B, se ve favorecida en secuencias ricas en pares de bases G.C con G consecutivas (Verdaguer et al., 1991 ; Bingman et al., 1992), y en las dobles hélices de ARN y mixtas ADN-ARN, donde el grupo hidroxilo en C<sup>2'</sup> obliga estéricamente al azúcar a adoptar una conformación C<sup>3'</sup>-endo (Long, 1996).

### iii) ADN-Z

Descrita por primera vez al principio de los años 70 en secuencias poli[d(GC)] (Pohl y Jovin, 1972), la doble hélice de ADN-Z se diferencia de las formas A y B por estar enrollada hacia la izquierda. Además, la conformación del esqueleto alterna entre C<sup>2'</sup>-endo/*anti* y C<sup>3'</sup>-endo/*syn*. Esto conduce a un esqueleto en forma de zigzag, origen de su nombre, y a tener un surco menor muy profundo que contiene a los grupos fosfato, muy próximos entre las dos cadenas (8 Å, contra 11,7 Å en el ADN-B) (Fig. II.10). Como consecuencia, se necesitan concentraciones muy altas de NaCl o de iones

multivalentes (espermina,  $Mg^{2+}$ ) para estabilizar la estructura (Wang et al., 1979 ; Ramstein y Leng, 1980; Egli et al., 1991). La presencia de etanol, el superenrollamiento negativo y algunas sustituciones en las bases ( $C^5$ -Me-C,  $C^5$ -Br-C,  $N^7$ -dienPt-G) son también factores estabilizantes de esta forma (Malfoy et al., 1981).

## B. LAS TRIPLES HÉLICES

### 1.- Introducción histórica

Felsenfeld, Davis y Rich demostraron la existencia de las estructuras en triple hélice para los polinucleótidos mediante la publicación de los espectros de absorbancia de UV de mezclas diferentes de oligonucleótidos poli(A) y poli(U), de los que se deducía una estequiometría poli(A):poli(U) 1:2 (Felsenfeld et al., 1957). Estos autores sugirieron la formación de enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick entre la cadena poli(A) y una de las cadenas poli (U), y otros enlaces de hidrógeno nuevos entre la otra cadena poli(U) y otros grupos accesibles de la cadena poli(A). Esta hipótesis se confirmó poco después por Hoogsteen con la publicación de la estructura cristalina de los tripletes formados entre la 9-Me-adenina y la 1-Me-timina (Hoogsteen, 1959). Estos nuevos enlaces entre la tercera cadena y la cadena rica en purinas de la doble hélice han tomado el nombre de enlaces de Hoogsteen por oposición a los enlaces de Watson-Crick característicos de la doble hélice (Fig. II.13). En los años siguientes, un gran número de estudios de cinética y de termodinámica de las triples hélices han constituido un sólido aporte para la comprensión de este tipo de estructura, y en particular de su capacidad para formarse en otras secuencias polinucleotídicas (poli-CGC...).

En los años 80 se ha despertado de nuevo un gran interés por las estructuras en triple hélice en razón de los estudios que muestran una mayor sensibilidad a la Nucleasa S1 de ciertas zonas del ADN, de la cromatina y del ADN superenrollado (revisiones en Mirkin y Kamenetskii, 1994 ; Soyfer, 1996). Se han propuesto diversas estructuras para explicar esta hiperreactividad a la Nucleasa S1, localizada en secuencias homopurina-

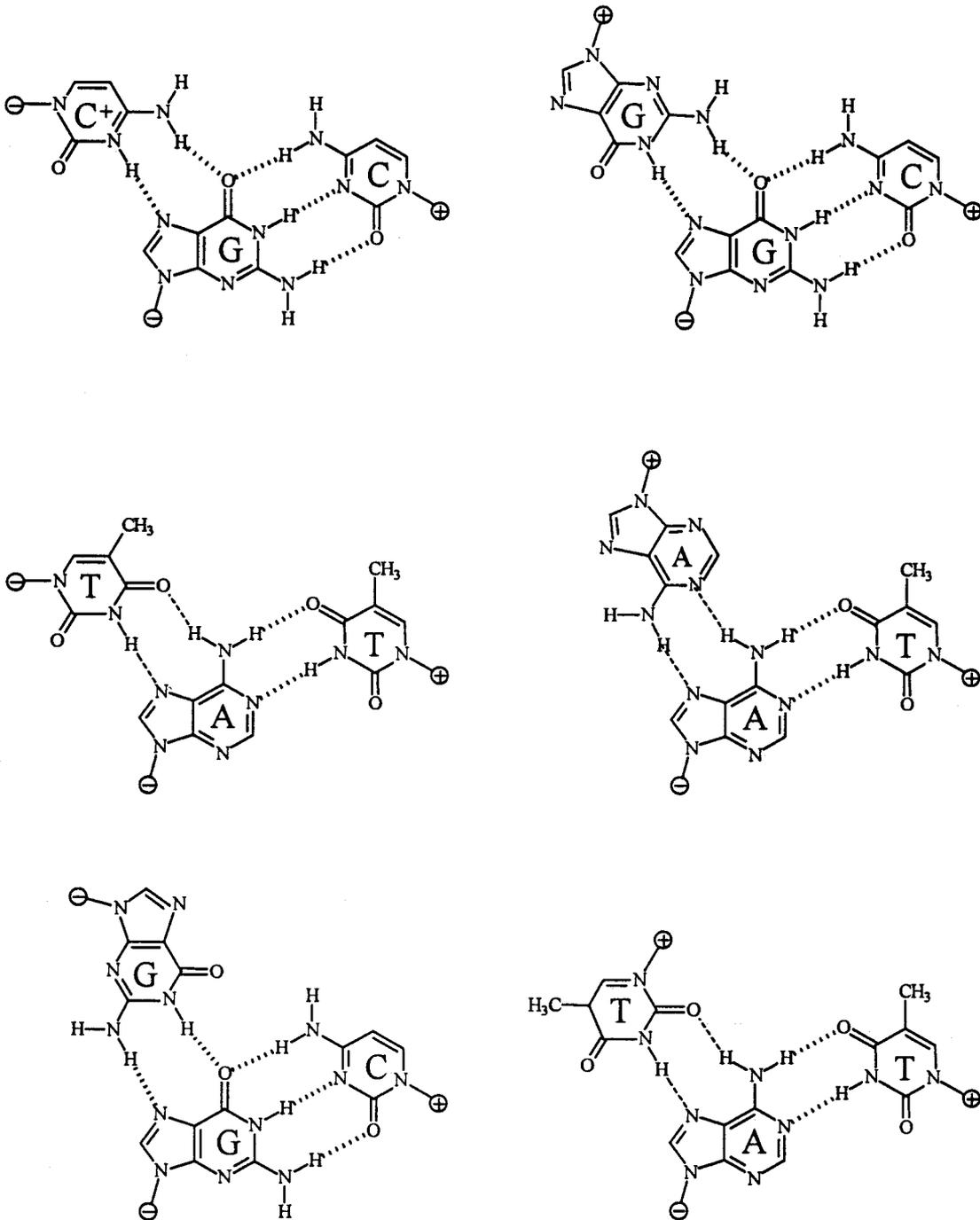


Figura II.13: Triplettes de bases característicos de las triples hélices de ADN. Los símbolos (+) y (-) indican el sentido de las cadenas. Izquierda: triplettes C.G\*C<sup>+</sup>, T.A\*T y C.G\*G con la tercera cadena paralela a la cadena polipurina. Derecha: triplettes C.G\*G, T.A\*A y T.A\*T con la tercera cadena paralela a la cadena polipirimidina. Los dos últimos triplettes (C.G\*G paralelo y T.A\*T antiparalelo) se pueden dar solamente con terceras cadenas de tipo poli(GT), para las cuales la orientación depende de la secuencia.

homopirimidina. Finalmente, los estudios de migración electroforética del ADN superenrollado confirmaron la formación de un tipo de triple hélice intramolecular y dependiente del pH, llamada ADN-H (Lyamichev et al., 1985, 1986 ; Mirkin et al., 1987). En esta estructura, la mitad de la cadena rica en pirimidinas se pliega sobre ella misma para formar enlaces de tipo Hoogsteen C.G\*C<sup>+</sup> y T.A\*T (donde “.” representa los enlaces de tipo Watson-Crick, y “\*” los de tipo Hoogsteen) con la cadena rica en purinas de la doble hélice (Fig II.14). Esta estructura necesita de la protonación de la mitad de las citosinas, lo que la convierte en dependiente del pH. Otros grupos han demostrado que resulta posible la formación de triples hélices estables y con fuerte especificidad de secuencia entre una secuencia purina-pirimidina de ADN en doble hélice y un oligonucleótido polipurina o simplemente rico en purinas (Le Doan et al., 1987 ; Moser y Dervan, 1987).

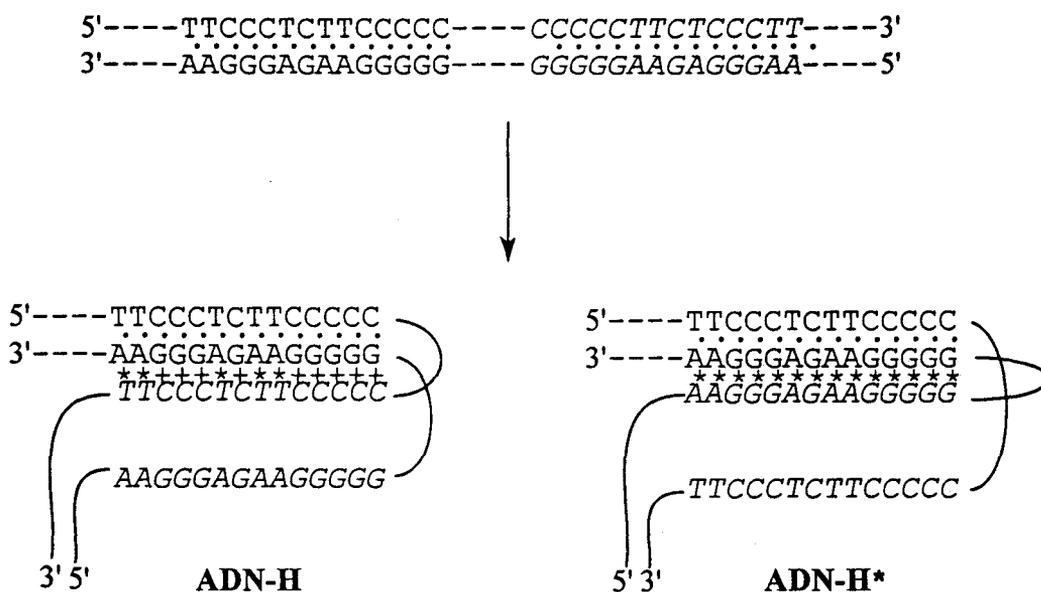


Figura II.14: Formación de triples hélices intramoleculares en una secuencia palindrómica de una doble hélice de ADN. Existen dos posibilidades de formación, según que sea la secuencia polipirimidina o la polipurina la que se une a la doble hélice como cadena Hoogsteen, dando lugar a la forma ADN-H o ADN-H\* respectivamente. (...): enlaces de tipo Watson-Crick. (\*\*\*\*): enlaces de tipo Hoogsteen entre bases no cargadas. (++++): enlaces Hoogsteen de tipo C.G\*C<sup>+</sup>.

Mientras que el descubrimiento del ADN-H (y de su forma isomérica ADN-H\*) (Fig. II.14) contribuyó a la búsqueda del papel biológico desempeñado por las triples hélices, la posibilidad de diseñar oligonucleótidos capaces de reconocer específicamente una secuencia de una doble hélice de ADN sugirió la utilización de los triplexes como agentes terapéuticos (terapia antígeno, ver capítulo III) y en varias aplicaciones biotecnológicas y genéticas (revisiones: Soyfer y Potaman, 1996, capítulo 7).

## 2.- Estructura

Para la formación de la triple hélice, las bases de una secuencia polinucleotídica deben de interaccionar con las de una doble hélice formando otros enlaces de hidrógeno distintos de los de Watson-Crick. En el surco mayor de una doble hélice B, cuyo tamaño le permite acoger una tercera cadena nucleotídica, las bases púricas poseen dos grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno. Las posibilidades de formación de los tripletes de bases son los que se indican en la figura II.13, con una orientación entre los esqueletos de la cadena polipurina y de la tercera cadena que puede ser paralela (a la izquierda, estos enlaces son llamados de tipo Hoogsteen) o antiparalela (a la derecha, enlaces llamados de tipo Hoogsteen inverso). Los enlaces glicosídicos de la tercera cadena están en conformación anti, como se ha demostrado por espectroscopía de RMN (Radhakrishnan et al., 1991, 1993) y como era de esperar según los cálculos teóricos de las energías internas de solvatación y la simulación de dinámica molecular (Cheng y Pettitt, 1992).

El apilamiento de bases representa un factor de gran importancia en la estabilidad de las triples hélices (Turner et al., 1988), y exige la presencia de una estructura en la que las bases púricas de la doble hélice que participan en los enlaces Hoogsteen estén todas en la misma cadena, y que por lo tanto la secuencia de la doble hélice sea poliPu.poliPir. Si la orientación de la cadena Hoogsteen es paralela, solo podrán coexistir los tripletes isomorfos T.A\*T y C.G\*C<sup>+</sup>, que formarán una triple hélice Pir.Pu\*Pir como en el caso de las intramoleculares de tipo ADN-H; Si la orientación es antiparalela, la coexistencia de los tripletes cuasi-isomórficos T.A\*A y C.G\*G resulta energéticamente posible a

pesar de la deformación producida en el esqueleto fosfodiéster (triples hélices Pir.Pu\*Pu), existiendo aún la posibilidad de introducir algunas timinas a pesar de una pequeña pérdida de estabilidad (Beal y Dervan, 1991 ; Radhakrishnan et al., 1991). Se ha demostrado la posibilidad de formar triples hélices con oligonucleótidos de secuencia poli(GT) como tercera cadena, con orientación dependiente de la secuencia (Sun y Hélène, 1993).

En los últimos años se ha realizado un estudio estructural intenso y detallado, mediante el uso de espectroscopía (FTIR, Raman, RMN), cristalografía de rayos X, simulación de dinámica molecular, sondas químicas y otras técnicas (Shafer, 1998 ; Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995 ; Sun et al., 1996 ; Soyfer y Potaman, 1996). En general, estos estudios demuestran una gran dependencia estructura-secuencia para las triples hélices, con diferentes conformaciones para cada cadena e incluso para cada base de la tercera cadena. El hecho más común es el de la presencia de una conformación cercana a la forma B o intermedia entre las formas A y B de la doble hélice. Cuando existen cadenas de ARN participando en la triple hélice, se favorece la forma A (Raghuathan et al., 1995 ; Dagneaux et al., 1995).

### 3.- Termodinámica

Para el establecimiento de un modelo capaz de predecir la estabilidad de una triple hélice en un medio dado, resulta necesaria la determinación de los parámetros termodinámicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ) que controlan su formación, en función de aquellos factores tanto internos (secuencia, longitud, desemparejamiento, etc.) como externos (concentración y naturaleza de las sales y del disolvente, pH, temperatura, etc.) que actúan sobre su estabilidad. Las técnicas que se utilizan para la medida de estos parámetros se clasifican en dos grupos según que los valores obtenidos procedan de las medidas realizadas o del empleo de un modelo teórico para la reacción que permite la transformación de dichas medidas en valores termodinámicos (revisiones: Kenneth y Breslauer, 1987; Plum, 1995; Shafer, 1998).

- En el primer grupo, las medidas realizadas por calorimetría de barrido diferencial (DSC) y la calorimetría de mezcla isotérmica conducen directamente a los valores de los parámetros termodinámicos. La DSC permite la medida directa de  $T_{max}$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta C_p$ , e indirecta de  $\Delta S$  y  $\Delta G$  para la transición de triple hélice a doble hélice más cadena simple. La calorimetría de mezcla isotérmica se utiliza poco debido al valor excesivamente grande de las constantes de asociación para la formación de las triples hélices.
- En el segundo grupo, que incluye las técnicas espectroscópicas UV, RMN y DC, un modelo teórico para el curso de la reacción permite transformar las medidas realizadas en valores termodinámicos. A partir de la ecuación de van't Hoff

$$\partial \ln K / \partial (1/T) = -\Delta H/R,$$

se utiliza la relación que existe entre la variación de una medida espectroscópica y la variación de la constante de equilibrio (K) de la reacción en función de la temperatura.

Para la realización de medidas de parámetros termodinámicos de formación de las triples hélices debe tenerse en cuenta un gran número de factores difícilmente controlables como los siguientes:

- Una cinética de formación mucho mas lenta que para el caso de las dobles hélices (Rougée et al., 1992 y capítulo de cinética de las triples hélices en esta tesis) que permita la obtención de medidas termodinámicas válidas en un sistema en equilibrio.
- Es bien conocido que la presencia de equilibrios secundarios (formación de cuádruplexes, disociación de la doble hélice, auto-asociación de la tercera cadena, etc.) influye en la termodinámica del sistema. Como lo que se intenta medir son diferencias de energía entre dos estados determinados del sistema (estado de triple hélice y estado de doble hélice mas cadena simple), hay que asegurar que cada uno de estos estados no participen en otras estructuras.

- La utilización de la ecuación de van't Hoff está restringida a reacciones donde no existan estados intermedios o semi-emparejados. Así, el modelo estudiado deberá de poseer un alto grado de cooperatividad en la formación de los tripletes y comportarse como un sistema bimolecular, con un equilibrio determinado por la etapa de iniciación de la reacción, y no por la de propagación (Plum et al., 1990).

#### 4.- Estabilidad

##### i) Fuerzas participantes

Las fuerzas que actúan en la formación y estabilización de las triples hélices son de naturaleza diversa e interactiva, por lo que resulta muy difícil la evaluación de la contribución de cada una a la estabilización global de la estructura. Aunque son las mismas de las dobles hélices, varían mucho su importancia y los factores internos y externos que las afectan. Se clasifican en cinco tipos (revisión: Soyfer y Potaman, 1996):

- *Fuerzas electrostáticas*: se establecen principalmente entre los fosfatos del esqueleto y los cationes del medio que ayudan a la neutralización de las cargas negativas y permiten así a las tres cadenas acercarse entre si. También las hay que se producen entre algunos cationes y las nucleobases, originando un efecto de polarización que refuerza los enlaces de hidrógeno entre los tripletes de bases.
- *Interacciones de apilamiento* (interacciones  $\pi$ - $\pi$ ) entre las bases de cada cadena, que necesitan una estructura regular para ser efectivas.
- *Enlaces de hidrógeno* (de tipo Watson-Crick, Hoogsteen y Hoogsteen inverso), cuya fuerza varía en función de la estructura, de los cationes presentes en el medio y del tipo de tripletes formados (canónicos o no, enlaces  $>N-H\cdots O=$ ,  $-OH\cdots N\equiv$  u otros), permitiendo o no una distancia óptima entre las bases.

- *Fuerzas de hidratación*: el cambio de grado de hidratación de una molécula de ADN puede conducir a un cambio de conformación (B→A, B→Z) o también a la estabilización de otra estructura, como la triple hélice.
- *Fuerzas hidrofóbicas*: el carácter hidrofóbico de las nucleobases se ve afectado por sustituciones puntuales (metilaciones, por ejemplo), que pueden influir, según la secuencia y el tipo de disolvente y de sustitución, sobre la estabilidad de la triple hélice. Este efecto resulta particularmente difícil de estudiar, puesto que se relaciona directamente con las fuerzas de hidratación y con los enlaces Hoogsteen.

## ii) Factores que influyen sobre la estabilidad de las triples hélices:

Existe un gran número de factores internos y externos que afectan a una o varias de las fuerzas enumeradas. Los más conocidos y estudiados son:

- *La concentración y naturaleza de los cationes presentes*: El comportamiento de las triples hélices respecto a los cationes es mucho más complejo que el de las dobles hélices. Las triples hélices de tipo Pir.Pu\*Pir (Felsenfeld et al., 1957) y el ADN-H, se estabilizan únicamente con cationes monovalentes, pero la presencia de cationes bivalentes como el  $Mg^{2+}$  o el  $Ca^{2+}$  permiten la obtención del mismo grado de estabilización en concentración 10 veces menor. Sin embargo, los cationes multivalentes son necesarios para la formación de las triples hélices de tipo Pir.Pu\*Pu, y para el ADN-H\* intramolecular (revisiones: Thomas y Thomas, 1993 ; Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995 ; Plum et al., 1995 ; Soyfer y Potaman, 1996). En efecto, la existencia de una densidad de carga negativa mayor en las triples hélices respecto a las dobles requiere la presencia de cationes más cargados. Estos cationes (contra-iones) neutralizan las cargas de los grupos fosfato del esqueleto de la hélice y les permiten el acercamiento mutuo. Sin embargo, en las triples hélices existen también posiciones específicas de interacción entre las bases y ciertos cationes, cuyo efecto sobre la estabilidad de la estructura depende de la naturaleza del catión que

interacciona (mayor o menor afinidad por la posición), de la mezcla de cationes y concentración de cada uno (competencia entre diversos cationes por una misma posición) y de la secuencia de la triple hélice (presencia o no de posiciones específicas de interacción para los cationes presentes, cambios estructurales relacionados con la secuencia). En todo caso, hay que tener en cuenta también la capacidad de ciertos cationes para estabilizar otras estructuras mejor que la triple hélice para ciertas secuencias, como por ejemplo el  $K^+$  y el  $NH_4^+$  con los cuadruplexes-G (revisiones: Williamson, 1993, 1994 ; Hud et al., 1998), o incluso para desestabilizar la triple hélice, como se ha demostrado para el  $Na^+$  en secuencias ricas en tripletes C.G\*C<sup>+</sup> y en presencia de policationes (Soyfer y Potaman, 1996).

Un caso interesante de estabilización de las triples hélices por parte de policationes es el de las poliaminas. Estas sustancias están compuestas por grupos amino unidos entre si por cadenas policarbonadas y que, a pH y salinidad fisiológicas, se encuentran totalmente protonados (Hague y Moreton, 1994). Ciertas poliaminas como putrescina, espermidina y espermina (Fig. II.15), que se encuentran en la célula de forma ubicuitaria y tienen un importante papel en la vida celular (Tabor y Tabor, 1984), ejercen un efecto estabilizador de la doble hélice conocido desde hace tiempo (Tabor, 1962), mas eficaz en el caso de las poliaminas más cargadas (con más grupos amino). Sin embargo, su efecto sobre la triple hélice es más complejo y depende del número de cargas, de la longitud de las cadenas carbonadas que las separan y de los substituyentes sobre el átomo de nitrógeno (Thomas y Thomas, 1993 ; Musso et al., 1997). Se han propuesto muchos modelos para las interacciones entre las poliaminas y la triple hélice, y parece claro que, además de una acción como contra-iones de los fosfatos, deben de existir otras interacciones, probablemente hidrofóbicas y con las bases (Jain et al., 1989; Xiao et al., 1991). Este tema ha sido objeto reciente de varias revisiones (Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995 ; Plum et al., 1995 ; Soyfer y Potaman, 1996).

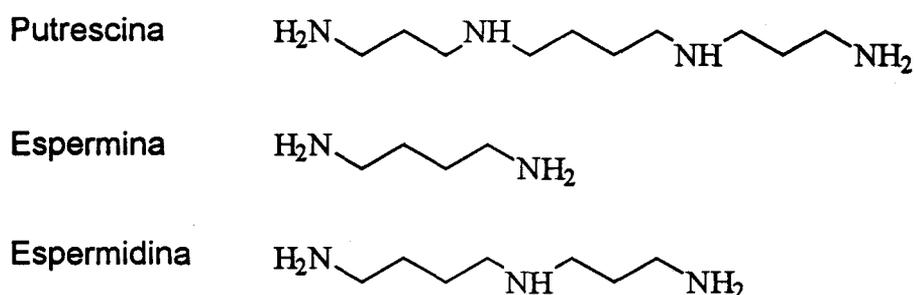


Figura II.15: Fórmulas desarrolladas de poliaminas presentes en las células. En condiciones fisiológicas, todos los grupos amino se encuentran protonados.

- *El pH*: La necesidad de protonación en el proceso de formación de los tripletes C.G\*C<sup>+</sup> y C.G\*A<sup>+</sup> (Fig. II.16) hace que las triples hélices que los contienen sean pH-dependientes. El pK<sub>a</sub> de estas bases (citosina y adenina) aisladas es muy bajo (3,8 para la adenina y 4,3 para la citosina), pero en la estructura de la triple hélice estos valores aumentan hasta 6,0 para la adenina (Antao et al., 1988) y 5,5 para la citosina (Xodo et al., 1991). Además, la presencia de poliaminas ayuda a la formación y estabilización de este tipo de tripletes a pH neutro (Hampel et al., 1991), lo que hace muy probable su formación en condiciones fisiológicas.
- *La longitud de las cadenas polinucleotídicas*: La longitud de la doble hélice es un factor determinante para la formación de la triple hélice. La hibridación de un oligonucleótido con una doble hélice dada, supone la existencia de la secuencia apropiada y de longitud suficiente para obtener una estabilidad y una selectividad óptimas. La falta de isomorfismo entre los diferentes tripletes de bases (ver sección II.B.2) puede originar una acumulación de deformaciones en la estructura que la desfavorezcan energéticamente para esa secuencia (Broitman et al., 1987). Este efecto puede hacerse mínimo por la presencia de cationes polivalentes (ver Soyfer y Potaman, 1996, pp. 197-199).

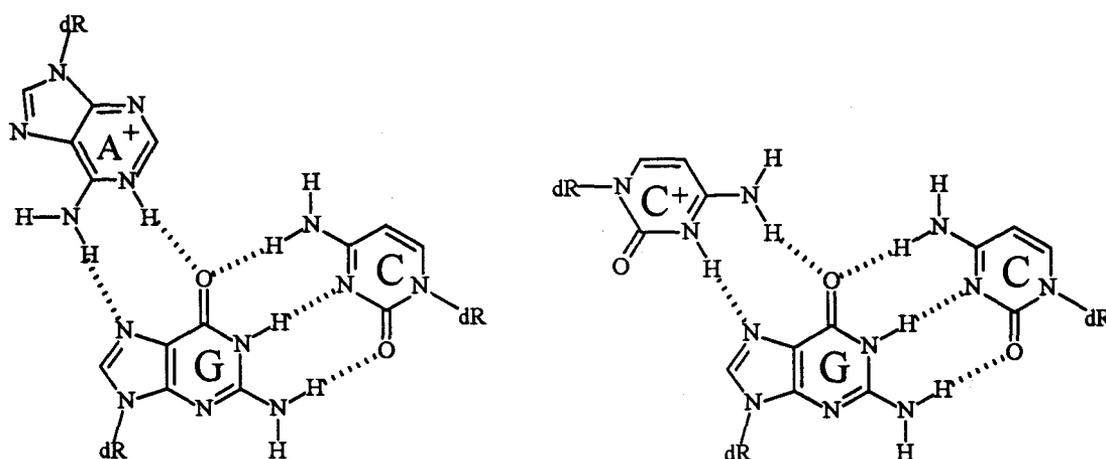


Figura II.16: Tripletes de bases pH-dependientes C.G\*A<sup>+</sup> (orientación antiparalela) y C.G.C<sup>+</sup> (orientación paralela).

- *Los efectos propios de la secuencia de los polinucleótidos:* Además de la falta de isomorfismo de los tripletes, ya discutida, hay que tener en cuenta otros efectos debidos a la secuencia. En general, los defectos de emparejamiento o de apilamiento, tales como ausencia puntual de nucleobases, bases que no encajan, tripletes no canónicos y otros, aunque tolerados hasta cierto límite, desestabilizan la estructura en distinto grado. Otro efecto desestabilizante es la repulsión que tiene lugar entre las C<sup>+</sup> adyacentes, que disminuye las interacciones de apilamiento.
- *La hidrofobicidad:* La sustitución de citosinas por 5-Me-citosinas en una triple hélice aumenta su estabilidad gracias a las interacciones hidrofóbicas creadas (Xodo et al., 1991; Singleton y Dervan, 1992). También la sustitución de las timinas (o 5-Me-uracilos) por 5-propil-uracilos en una triple hélice Pir.Pu\*Pyr que contiene 5-metil-citosinas produce un efecto estabilizador (Froehler et al., 1992). Otras combinaciones ensayadas encuentran el problema en el impedimento estérico creado por los grupos hidrófobos incorporados en la estructura (revisiones: Sun y Hélène, 1993; Soyfer y Potaman, 1996).

## 5.- Cinética.

La reacción de formación de una triple hélice a partir de una doble y de una tercera cadena simple es un proceso bimolecular (en la gama de longitudes de los oligonucleótidos normalmente utilizados), en el que la velocidad de formación (constante de asociación,  $k_{as}$ ) depende de las concentraciones de las dos especies. La reacción se produce en dos etapas: la iniciación y la propagación (Craig et al., 1971) (Fig. II.17). La primera consiste en la formación de pocos tripletes, entre 2 y 4, y es la etapa cinéticamente limitante. En la etapa de propagación se produce el cierre del resto de triplete, y su mayor velocidad se debe a las interacciones de apilamiento de las bases. De acuerdo con este modelo de reacción, se ha demostrado que la presencia de un triplete

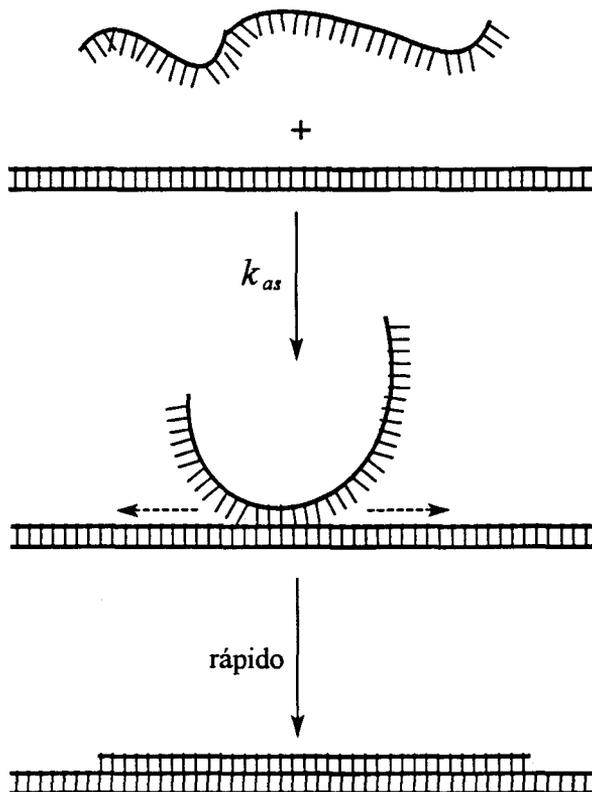


Fig. II.17: Formación de una triple hélice a partir de una cadena simple y una doble hélice complementaria, con la etapa de iniciación, cinéticamente limitante, y la propagación posterior.

no canónico o que no encaja en una triple hélice no afecta a la constante  $k_{as}$ , pero aumenta  $10^3$  veces la constante de disociación  $k_{dis}$  (Rougée et al., 1992).

En general, la cinética de formación de las triples hélices es  $10^2$ - $10^4$  veces más lenta que la de formación de las dobles hélices, lo que se debe a varios factores (Porschke y Eigen, 1971; Xodo et al., 1997):

- Mayor rigidez de la doble hélice respecto a la cadena simple, que origina una asociación más fácil de dos cadenas simples entre si respecto a la de una cadena simple con una doble hélice.
- Los cambios estructurales que deben producirse en la doble hélice para acomodar a la tercera cadena.
- La repulsión electrostática entre los esqueletos fosfodiéster es también mas importante en la triple hélice que en la doble, en razón de su mayor densidad de carga.

El valor de  $k_{as}$  de las cadenas pirimidínicas es también diez veces mas grande que el de las cadenas púricas (Xodo et al., 1997), lo que se explica en parte por la mayor tendencia que tienen algunas de estas últimas a la formación de estructuras secundarias dependientes de la secuencia, de modo que la iniciación de la formación de la triple hélice supone la ruptura previa de las estructuras restantes.

Se ha estudiado también el efecto de los iones mono y multivalentes. En general se encuentra un aumento de la constante  $k_{as}$  paralelo al aumento de la concentración de los iones (Felsenfeld y Rich, 1957), tanto para los cationes monovalentes (a mayores concentraciones) como para los bivalentes. Sin embargo, en presencia de  $Mg^{2+}$  el aumento de la concentración de  $Na^+$  provoca una disminución de la constante  $k_{as}$  (Xodo et al., 1997). Este hecho concuerda con el modelo de estabilización de las triples hélices por neutralización de las cargas de los fosfatos y estabilización del complejo de iniciación, y también con los efectos estabilizadores encontrados para estos mismos cationes (ver sección II.B.4). El efecto de las poliaminas es más complicado, debido a la existencia de una cierta selectividad de secuencia (Xodo et al., 1997).

Puesto que la estabilidad de ciertas triples hélices es suficiente para hacerlas biológicamente activas, la barrera cinética se mantiene como factor limitante, sobre todo si se tiene en cuenta que la triple hélice debe competir con las enzimas en lo que respecta a su interacción con la doble hélice de ADN (revisiones: Thuong y Hélène, 1993 ; Soyfer y Potaman, 1996).

## C. OTRAS ESTRUCTURAS

Las cadenas nucleotídicas se asocian y mantienen su estructura mediante fuerzas conocidas (enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento, interacciones hidrofóbicas y dipolares entre las bases, interacciones electrostáticas entre los fosfatos y los iones y disolvente). Pero las características singulares debidas a la secuencia de bases, tipo de azúcar (furanosa o 2'-desoxifuranosa), medio (pH, iones, disolvente, temperatura) y a otros parámetros (como el superenrollamiento) favorecen o reprimen la acción de aquellas fuerzas de forma que resulte más estable una determinada estructura en unas condiciones estrictas. Por ejemplo, se ha demostrado claramente que existen distintas conformaciones en las dobles hélices favorecidas por la secuencia: pares G.C con G consecutivas para la forma A, pares G.C y C.G alternantes para la forma Z. Otras condiciones particulares producen estructuras distintas, más o menos similares a la doble hélice pero de importancia biológica desconocida.

### 1.- El ARN

La célula sintetiza la mayoría de las moléculas de ARN como cadenas simples, aunque se conoce también el ARN de doble hélice. Este último adopta la forma A, con una rigidez importante causada por las interacciones del grupo hidroxilo en posición 2' del azúcar. El ARN de cadena simple no es lineal, sino de estructura tridimensional llamada "estructura terciaria", con diferentes motivos estructurales (dobles, triples y cuádruples hélices, pseudonudos, porciones desemparejadas) que interaccionan entre sí. Esta estructura terciaria desempeña un papel esencial en las diversas funciones biológicas

de las moléculas de ARN, tales como la actividad catalítica de las ribozimas, la regulación de procesos bioquímicos o su propia protección contra la degradación por las nucleasas (revisiones: Pyle y Green, 1995; Kolchanov et al., 1996).

## 2.- Las dobles hélices híbridas ADN-ARN

Este tipo de doble hélice se forma en la célula durante los procesos de replicación, transcripción y transcripción inversa. La importancia del estudio de su estabilidad y estructura está relacionada con su papel primordial en la “estrategia antisentido” (revisión: Hélène y Toulmé, 1990). Su estructura, estudiada por difracción de rayos X, está muy próxima a la forma A (revisión: Sriram y Wang, 1996). Se ha descrito que los azúcares de la cadena de ADN, en disolución, prefieren una conformación intermedia entre las formas A (C<sup>3'</sup>-endo) y B (C<sup>2'</sup>-endo) (Lane et al., 1993; Salazar, 1993). Este tipo de doble hélice posee estabilidad intermedia entre la de las dobles hélices puras de ARN y las de ADN, y depende mucho de la secuencia y del número de pares G.C (Lesnik y Freier, 1995).

## 3.- El ADN-H

Como se ha indicado anteriormente, el ADN-H (triple hélice intramolecular) es una estructura dependiente del pH y del superenrollamiento negativo del ADN que produce hipersensibilidad a la endonucleasa S1 (revisión: Mirkin y Frank-Kamenetskii, 1994). Al igual que el ADN cruciforme, el ADN-H se forma gracias a la energía del superenrollamiento negativo, y provoca la formación de una secuencia en cadena simple. La presencia de secuencias polipurina.polipirimidina resulta necesaria para la formación del ADN-H (Pir.Pu\*Pu) y del ADN-H\* (Pyr.Pu\*Pyr) (Fig. II.14). Sin embargo, la posibilidad de incorporar tripletes de tipo T.A\*T y C.G\*A+ y otros menos estables en el ADN-H\* lo diversifica más que el ADN-H. Estas estructuras se estabilizan por cationes multivalentes y poliaminas, como ocurre con las triples hélices intermoleculares.

Aunque no se conoce la actividad biológica de estas estructuras, parece ser que ejercen una influencia significativa sobre la actividad de la ADN polimerasa (revisiones: Mirkin y Frank-Kamenetskii, 1994 ; Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995).

#### 4.- Las tetrahélices-G

La capacidad de agregación en disolución de las guaninas se conoce desde hace tiempo (revisión: Guschlbauer et al., 1990). Esta capacidad se basa en la disposición espacial de los grupos funcionales de la guanina para la formación de enlaces de hidrógeno. Por una parte, el N<sup>7</sup> y el O<sup>6</sup> poseen pares de electrones libres, y por el otro, el N<sup>5</sup> y el N<sup>4</sup> poseen átomos de hidrógeno aceptores de dichos electrones. De este modo puede imaginarse una estructura con cuatro guaninas en el mismo plano y un total de ocho enlaces de hidrógeno entre ellas (Fig. II.18). La existencia de cuatro cadenas en la estructura hace posible una gran variedad de conformaciones dependiendo de que las

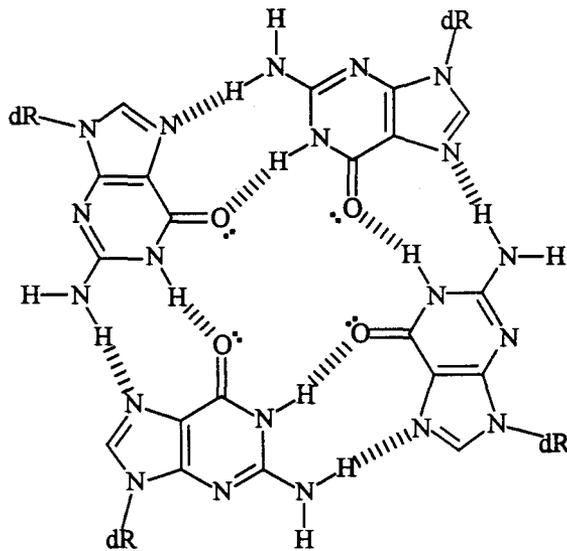


Figura II.18: Enlaces de hidrógeno en una tetrahélice-G. Los enlaces glicosídicos pueden estar en conformación *syn* o *trans* según el sentido de cada cadena. Se ha indicado la presencia de los pares de electrones libres de los átomos O<sup>6</sup>, que pueden coordinar a ciertos cationes del tamaño adecuado para introducirse en el hueco interno, estabilizando así la tetrahélice.

guaninas que forman los cuadrupletes procedan de cuatro cadenas diferentes, dos cadenas plegadas o una sola plegada tres veces, según cual sea la orientación de unos respecto a otros y que las uniones glicosídicas estén en *anti* o en *syn* (revisiones: Williamson, 1993, 1994 ; Sinden, 1994 ; Shafer, 1998).

La secuencia y las condiciones del medio pueden favorecer una estructura u otra. Solamente ciertos cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), que actúan como contra-iones para los fosfatos, estabilizan las tetrahélices gracias a su capacidad para introducirse entre los planos de bases y coordinarse a ocho guaninas de dos planos contiguos (Williamson et al., 1989 ; Hud et al., 1998).

El interés de las tetrahélices-G procede de su posible formación en los telómeros, secuencias polinucleotídicas repetitivas en cadena simple que se encuentran en el extremo de los cromosomas y contienen, en todos los casos estudiados, secuencias  $(\text{G})_n$  unidas por timinas y/o adeninas. Puesto que los telómeros participan en la replicación y en la organización espacial de los cromosomas, la formación de tetrahélices-G podría contribuir al aumento de su resistencia a las nucleasas (revisiones: Williamson, 1994 ; Shafer, 1998). Se han propuesto otras posibilidades de formación de tetrahélices-G *in vivo*, como por ejemplo las que tienen lugar en una secuencia del gen de las inmunoglobulinas (Sen y Gilbert, 1988), o en el ARN genómico del virus HIV-1 (Sundquist y Heaphy, 1993).

## **Capítulo III**

# **Interacciones de Cisplatino y Transplatino con el ADN**

Las formas *cis* y *trans* del diamindicloroplatino(II) (Fig. III.1) se conocen desde el siglo XIX, y tuvieron gran importancia en el desarrollo y estudio de la reactividad de compuestos complejos, pero su fuerte toxicidad no los predisponía para una utilidad terapéutica. Esta situación solo cambió en 1965, con el descubrimiento por parte del grupo de Rosenberg de la actividad antitumoral del cisplatino (o *cis*-DDP) (Rosenberg et al., 1965, 1969). Después de unos años, el cisplatino comenzó a utilizarse en el tratamiento de varios tipos de cancer (ovárico, cabeza y cuello y testicular) con resultados eficaces y alentadores, en combinación con otros medicamentos. Sin embargo, su isómero el *trans*-DDP, mucho menos citotóxico y mutágeno, resulta ineficaz como agente anticancerígeno (Macquet y Butour, 1983; Johnson et al., 1986; Farrell et al., 1989).

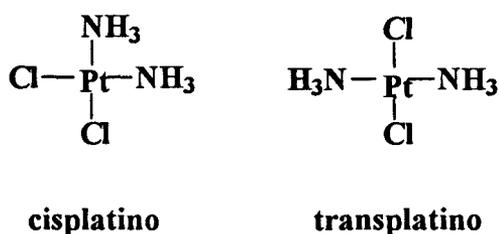


Figura III.1: Las dos formas isómeras del compuesto  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ .

Se acepta generalmente que la principal diana intracelular del *cis*-DDP, del *trans*-DDP y de otros derivados del platino(II y IV) es el ADN. La reactividad de un compuesto de platino con el ADN se ve influenciada por muchos factores relacionados con las características fisico-químicas del centro metálico (carga, estado de hidrólisis, ligandos lábiles e inertes), del ADN (secuencia, estructura, basicidad) y del medio de reacción (pH, fuerza iónica, iones y otros compuestos reactivos presentes).

Tras el descubrimiento de la actividad anticancerígena del *cis*-DDP, se sintetizaron otros derivados del platino(II y IV) y de otros metales de transición, originándose una nueva generación de compuestos de actividad variable, de los que el más importante es el carboplatino (Fig. III.2). Estas experiencias permitieron la

definición de algunas reglas empíricas que parecían determinar la actividad anticancerígena de estos derivados. Entre ellas, las más importantes se refieren al tipo de estructura molecular (moléculas plano-cuadradas y octaédricas) y a la presencia de dos ligandos lábiles en posición *cis* (Rosenberg, 1980).

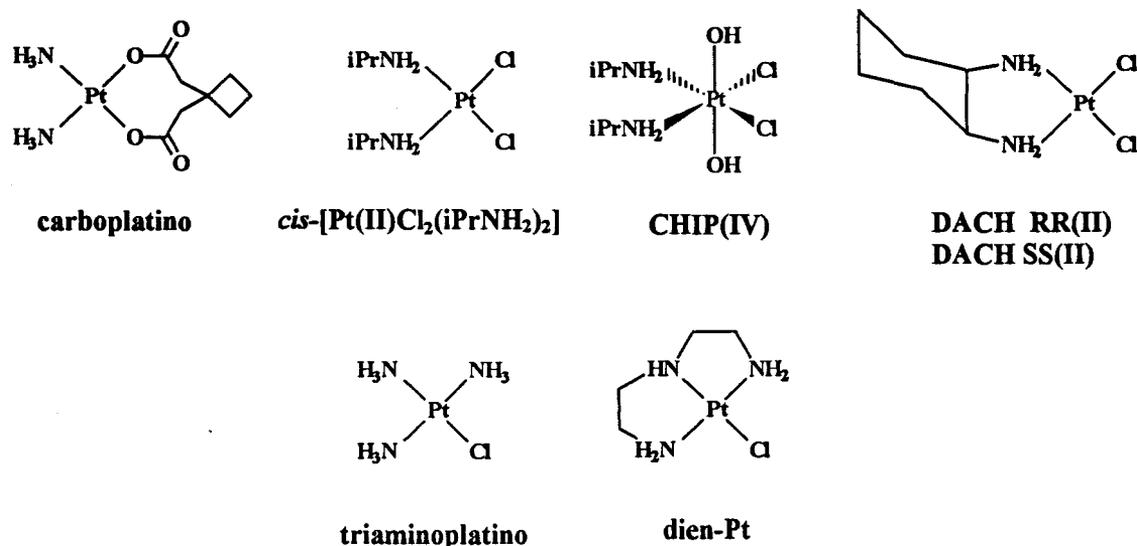


Figura III.2: Complejos del platino(II y IV) de segunda generación, cuyas actividades antitumorales han sido ensayadas. En la línea de arriba, compuestos que han resultado activos, y en la de abajo, compuestos terapéuticamente inactivos.

Durante los últimos años, se han descrito varios compuestos activos que no obedecen estas reglas, como los de tipo *cis*-[PtA<sub>2</sub>(Am)Cl], con grupos amina o alquilamina (A) y una amina aromática (Am) (Hollis et al., 1989), de tipo *trans*-{[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(μ-NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NH<sub>2</sub>)}Cl<sub>2</sub>, binucleares y de geometría *trans* (Farrell et al., 1990), o aún otros de tipo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>L<sub>2</sub>] con iminoéteres de geometría E (Coluccia et al., 1993) (Fig. III.3). Los estudios sobre la reactividad de estos compuestos con el ADN son escasos. El trabajo de Payet y Leng en 1994, que demuestra una labilización eventual del grupo Am en los compuestos de tipo *cis*-[PtA<sub>2</sub>(Am)Cl] por efecto *trans*, cuando el complejo se coordina a una guanina en el ADN, indica que resulta necesario el estudio más detallado de las reacciones intracelulares de estos productos.

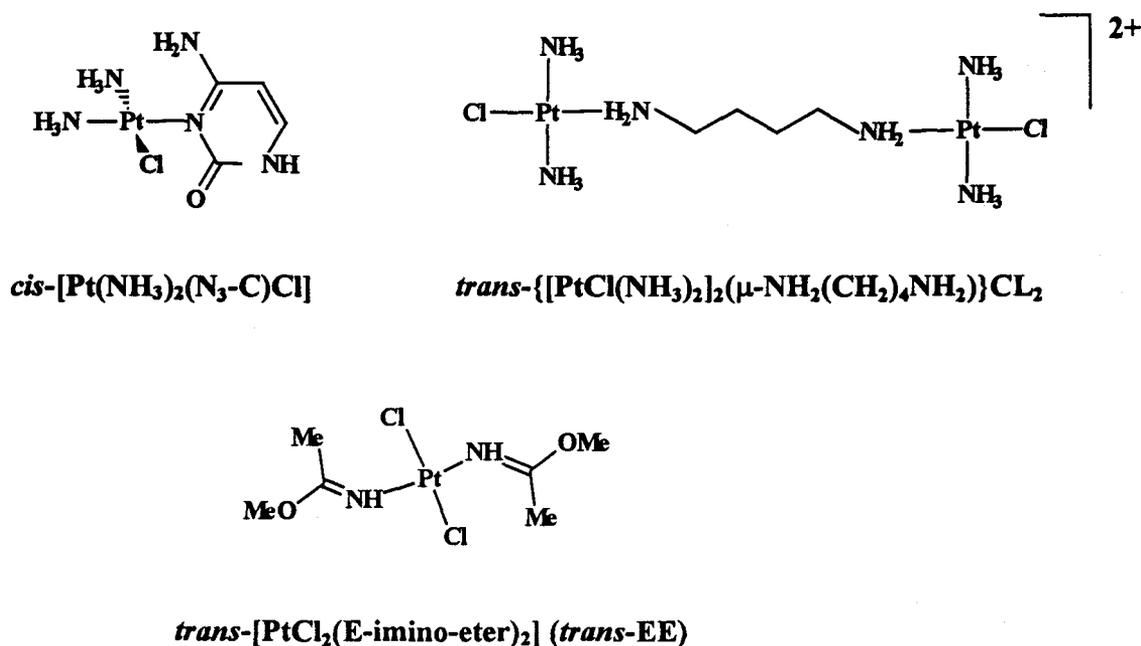


Figura III.3: Complejos del platino(II) con actividad antitumoral y estructura distinta de la clásica de los compuestos activos: Con un solo grupo lábil (Hollis et al., 1989), *trans*-binuclear y con un solo grupo saliente en cada átomo de platino (Farrell et al., 1990), y de geometría *trans* y con iminoéteres en lugar de aminas (Coluccia et al., 1993).

## A. REACTIVIDAD INTRACELULAR DEL *CIS*-DDP Y DEL *TRANS*-DDP.

### EFFECTOS BIOLÓGICOS.

El *cis* y el *trans*-DDP inhiben la replicación del ADN con la misma eficacia para una misma tasa de platino fijado al ADN, pero, *in vivo*, resultan necesarias dosis superiores de *trans*-DDP para llegar a una misma tasa de platinación del ADN (Ciccarelli et al., 1985; Pinto et Lippard., 1985; Heiger-Bernays et al., 1990). Esta diferencia en el nivel de fijación al ADN *in vivo* se debe probablemente a la mayor afinidad del *trans*-DDP por los nucleófilos sulfurados, como el glutatión, presentes en la célula (Bancroft et al., 1990), pero también a la menor velocidad de transformación de los aductos monofuncionales del *trans*-DDP sobre el ADN en aductos bifuncionales, respecto al *cis*-DDP. En este último caso, se produce la reacción de los aductos monofuncionales con

otros nucleófilos del medio en lugar de con otra base del ADN, y por tanto su desactivación o incluso su desplazamiento del ADN (Eastman y Barry, 1987; Brabec y Leng, 1993).

Los efectos del *cis*- y del *trans*-DDP sobre la transcripción son, sin embargo, muy diferentes. Mientras que el *cis*-DDP inhibe casi totalmente la transcripción *in vivo*, el *trans*-DDP solo produce una inhibición pequeña. Para explicar esta diferencia se han sugerido dos razones fundamentales: una facilidad mayor de reparación de los aductos del *trans*-DDP por parte de la célula, o la ineficacia de los aductos mayoritarios de *trans*-DDP y ADN para bloquear la maquinaria de transcripción (Cicarelli et al., 1985; Roberts y Friedlos, 1987; Corda et al., 1991, 1993; Mello et al., 1995).

El camino seguido por el *cis*- y el *trans*-DDP en el organismo hasta que llegan al ADN es bastante complejo y todavía desconocido. Desde su inyección en el flujo sanguíneo hasta su entrada en la célula (cancerosa o no), no tienen lugar cambios importantes. En ambos isómeros existen dos enlaces Pt-N y dos Pt-Cl. Como los primeros son mas fuertes, los ligandos cloruro se sustituyen antes (Basolo y Pearson, 1967; ver capítulo I de esta tesis). En los compuestos de coordinación del platino(II) plano-cuadrados, la sustitución nucleofílica se produce por un mecanismo bimolecular, de tipo SN<sub>2</sub>, que implica la interacción previa del grupo entrante (intermedio de reacción pentacoordinado) y ruptura posterior del enlace entre el platino y el grupo saliente. (Fig. III.4). Este hecho supone un efecto estérico importante de todos los ligandos implicados (inertes, entrante y saliente) y la retención total de la configuración inicial (*cis* o *trans*)

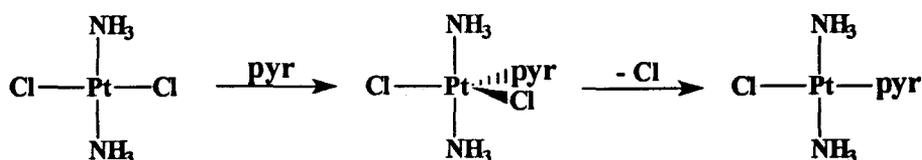


Figura III.4: Reacción de sustitución nucleofílica SN<sub>2</sub> en el *trans*-DDP, con intermedio pentacoordinado.

(revisiones: Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974; Maresca y Natile, 1993; Albano et al., 1994). La concentración elevada de iones cloruro en la sangre ( $C_{Cl} = 103 \text{ mM}$ ), evita la hidrólisis del *cis*- o el *trans*-DDP, lo que impide la transformación del producto y evita su toxicidad mediante reacciones indeseables con los nucleófilos de la sangre. De este modo, dichos compuestos reaccionan como tales cuando acceden al interior celular (Lippert, 1989; Lepre y Lippard, 1990).

La entrada en la célula parece producirse por difusión pasiva a través de la membrana celular (Ogawa et al., 1975), aunque recientemente se han identificado unas proteínas de membrana que pueden influir sobre la entrada y la salida del *cis*-DDP en la célula (Bernal et al., 1990; Kawai et al., 1990). Una vez en la célula, la concentración de iones cloruro es mucho menor que en la sangre ( $C_{Cl} = 4 \text{ mM}$ ), y la reacción de hidrólisis del *cis*- y *trans*-DDP comienza en ese momento (Fig. III.5), originando distintos productos, como los derivados aqua- cloro- e hidrox-. Está demostrado que la forma aqua, cargada positivamente, es muy reactiva, ya que la molécula  $\text{H}_2\text{O}$  es un buen grupo saliente. La especie diaqua del cisplatino ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ) es tóxica e ineficaz en tratamientos anticancerosos, probablemente por su reactividad excesiva con otras biomoléculas, lo que impide su interacción con el ADN (Cleare y Hoeschele, 1980). La primera hidrólisis es muy lenta y constituye la etapa de control cinético de la reacción del *cis*- y del *trans*-DDP con el ADN, con un  $t_{1/2}$  (vida media) de 2 a 3 horas (revisiones: Lepre y Lippard, 1990; Lippert, 1996). La constante de equilibrio,  $K_1$ , de esta reacción es unas diez veces mayor en el caso del *cis*-DDP ( $6,31 \cdot 10^{-3}$  y  $6,22 \cdot 10^{-4}$ , respectivamente) (Miller et al., 1991). Sin embargo, como la reacción de los productos activados (aqua-) con los nucleófilos de la célula es relativamente rápida, el equilibrio no se alcanza, y resulta necesaria la consideración de la constante de velocidad para conocer los productos reactivos presentes en el medio (Lepre y Lippard, 1990). La forma reactiva mayoritaria es la especie monoaqua-  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$  (Johnson et al., 1980; Bancroft et al., 1990), y la constante de velocidad de formación de esta especie,  $k_1$ , es la misma para el *cis*-DDP ( $10.2 \pm 0.7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 1.9 \pm 0.1 \text{ h}$ ) que para el *trans*-DDP ( $9.6 \pm 0.7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 2.0 \pm 0.1 \text{ h}$ ) (revisión: Lepre y Lippard, 1990).

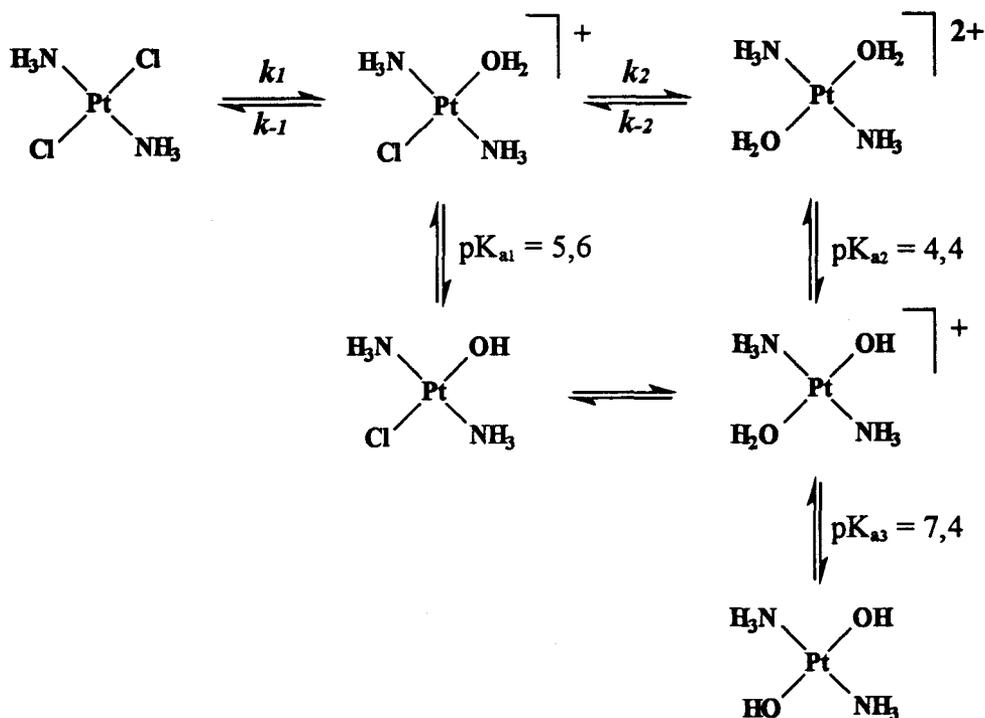


Figura III.5: Reacciones de hidrólisis del transplatino en medio acuoso y pobre en cloruro. La hidrólisis del cisplatino se produce por mecanismos similares. Las especies más reactivas son las que contienen un grupo (H<sub>2</sub>O).

Una vez activados en la célula, el *cis*- y el *trans*-DDP son electrófilos potentes capaces de reaccionar con todos los nucleófilos del medio intracelular, especialmente con los grupos sulfidrilo de las proteínas y de los mono- y polipéptidos (His, Met, Cys, glutatión (GSH), metalotioneína), y con las bases aromáticas de los ácidos nucleicos (revisiones: Lepre y Lippard, 1990; Reedjik, 1992; Chu, 1994). Puesto que la reactividad con las proteínas puede originar una toxicidad paralela indeseable de estas drogas, se dedican en la actualidad muchos esfuerzos a la búsqueda de sustituyentes capaces de favorecer la reacción con el ADN o desfavorecerla con las proteínas. La modificación del impedimento estérico de los ligandos, de su capacidad para formar enlaces de hidrógeno y de la importancia de su efecto *trans*, puede originar variaciones en la reactividad, selectividad y penetración celular de estos compuestos (Segal-Bendirdjian et al., 1991; Souchard et al., 1991; Reedjik, 1992).

## B. REACCIONES CON EL ADN.

### Aductos monofuncionales de *cis*-DDP y *trans*-DDP.

Como se ha mencionado antes, el ADN es el blanco celular principal del *cis*- y del *trans*-DDP. Esta gran afinidad no se explica simplemente por el carácter nucleofílico de las nucleobases que constituyen el ADN, sino por un conjunto de interacciones adicionales que contribuyen a la formación de los enlaces Pt-ADN. En condiciones fisiológicas, el ADN es una macromolécula con una superficie polianiónica (grupos fosfato), y una zona interior hidrofóbica que incluye las bases aromáticas. Su estructura particular es flexible y dependiente de varios parámetros. Así, la molécula de ADN crea a su alrededor un microambiente bastante estructurado que modula las interacciones con otras moléculas (proteínas, cationes, intercaladores). Como consecuencia, el estudio de la reactividad de una molécula cualquiera con el ADN, requiere el conocimiento de las condiciones globales de reacción (pH, concentraciones de sales y de reactivos), estructura del ADN en dichas condiciones y efectos que ésta pueda ejercer sobre la reacción objeto de estudio.

Las formas reactivas del *cis*- y del *trans*-DDP son especies cargadas positivamente ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ ), fácilmente interactivas con las cadenas polinucleotídicas polianiónicas, que soportan una carga negativa por grupo fosfato del esqueleto. Este hecho aumenta la concentración local de *cis*- y de *trans*-DDP en torno al ADN y la probabilidad de unión con los átomos apropiados de la cadena polinucleotídica. La atracción electrostática resultante es rápida e inespecífica, con fuerza proporcional a la densidad de carga del centro metálico y del ADN. Así, la atracción entre cationes y ADN de doble o triple hélice, (densidad de carga elevada) es más efectiva que en el caso de ADN de cadena sencilla. Este hecho desempeña un papel determinante en la preferencia de los compuestos del platino por el ADN y no por el ARN, proteínas u otros nucleófilos celulares (Saenger, 1984; Reedjik, 1992; Elmroth et Lippard, 1993, 1995).

Cuando el complejo metálico se aproxima a la molécula de ADN, se manifiestan interacciones con determinados átomos nucleófilos de las cadenas nucleotídicas. En condiciones fisiológicas, las interacciones más importantes tienen lugar con los átomos de oxígeno de los fosfatos y átomos endocíclicos accesibles de las bases aromáticas (Marzilli, 1977; Martin y Marian, 1979). La preferencia de un complejo metálico por los grupos fosfato o por las bases aromáticas es función de la naturaleza del centro metálico, de los ligandos y de la carga del compuesto. En concreto, *cis*- y *trans*-DDP, prefieren unirse a los átomos de nitrógeno de las nucleobases (revisiones generales: Basolo y Pearson, 1967; Belluco, 1974; ver también el capítulo I de esta tesis).

Los blancos más importantes para los compuestos de platino son los átomos de nitrógeno endocíclicos de las nucleobases ( $N^7$ -G,  $N^1$ -G,  $N^7$ -A,  $N^1$ -A,  $N^3$ -C,  $N^3$ -T) (Fig. III.6). Para que la unión tenga lugar es necesaria una electronegatividad elevada, un  $pK_a$  apropiado (el Pt entra en competición con el  $H^+$  por el átomo de nitrógeno) y una accesibilidad suficiente como para permitir el acercamiento del compuesto metálico (Lippert, 1996; Lepre y Lippard, 1990) Los átomos  $N^3$  de las purinas, por ejemplo, no

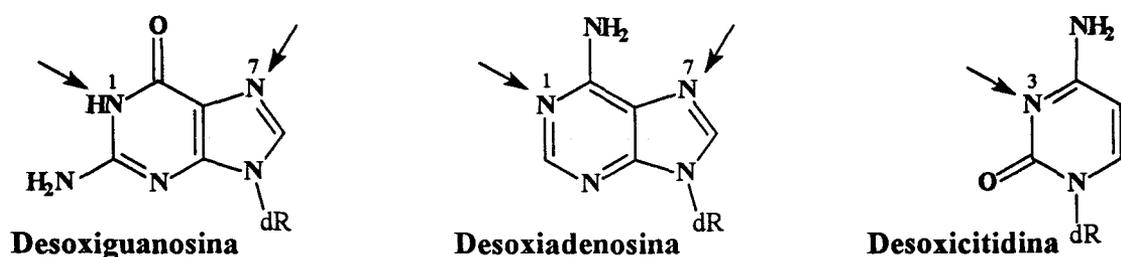


Figura III.6: Átomos de las bases nucleofílicas más reactivos frente a los compuestos de coordinación del platino(II).

pueden reaccionar a causa del impedimento estérico producido por el residuo glucosídico (Kazakov, 1996), y el  $N^3$  de las timidinas por su elevado  $pK_a$ . El orden de reactividad en la doble hélice B es, por consiguiente:  $N^7$ -G >  $N^7$ -A >  $N^1$ -A >  $N^3$ -C (Mansy et al., 1973, 1978). Los átomos  $N^1$ -A y  $N^3$ -C tampoco son inmediatamente accesibles debido a su implicación en los enlaces de hidrógeno de la doble hélice, mientras que los  $N^7$  de las

purinas son los más expuestos en el surco mayor. En condiciones fisiológicas, el átomo más favorecido cinéticamente para que reaccione con el *cis*- y el *trans*-DDP es el N<sup>7</sup>-G (Fitchinger-Schepman et al., 1982, 1985; Eastman, 1983; Butour y Johnson, 1986; Eastman y Barry, 1987; Bancroft et al., 1990). Por otra parte, la velocidad de formación de los aductos monofuncionales corresponde a la de hidrólisis del primer ligando cloruro ( $t_{1/2}$  entre 2 y 4 horas).

Una razón complementaria para la sorprendente preferencia de *cis*- y *trans*-DDP por la guanina radica en la interacción del grupo amina en posición *cis* del enlace Pt-G con el átomo O<sup>6</sup>-G (Fig. III.7), que estabiliza termodinámicamente el enlace Pt-N<sup>7</sup>(G) y favorece la cinética del acercamiento y posicionamiento del centro metálico respecto a la guanina. Sin embargo, la repulsión con el grupo -NH<sub>2</sub> del carbono 6 de la adenina no favorece la interacción Pt-Adenina. En el caso del *trans*-DDP, otros enlaces de hidrógeno entre sus ligandos restantes (NH<sub>3</sub>, OH o H<sub>2</sub>O) y los oxígenos de los grupos fosfato pueden contribuir también a la estabilidad del enlace transplatino-N<sup>7</sup>(G) (revisiones: Lepre y Lippard, 1990; Reedjik, 1992; Lippert, 1996)

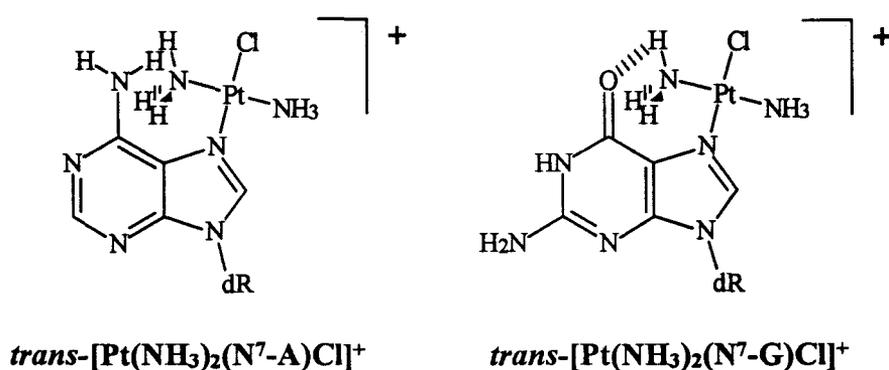


Figura III.7: Aductos monofuncionales del transplatino con el N<sup>7</sup> de las bases púricas. Se muestra la formación de un enlace de hidrógeno entre uno de los grupos amina del metal y el O<sup>6</sup> de la guanina (derecha), y la coincidencia espacial del mismo grupo amina del metal con el grupo amina en posición 6 de la Adenina (izquierda), que provoca un efecto de repulsión.

Tras la formación del aducto monofuncional Pt-N<sup>7</sup>(G), tanto el *cis*- como el *trans*-DDP pueden continuar la reacción mediante un mecanismo similar al del primer enlace: etapa de hidrólisis inicial seguida por la reacción con otro átomo nucleofílico que puede ser de la misma cadena de ADN (aducto intracatenario), de la cadena complementaria (aducto intercatenario o ICL) o de una proteína u otra sustancia del medio de reacción. La escasa estabilidad de los aductos monofuncionales del *cis*- y del *trans*-DDP, aconseja la utilización de otros derivados para el estudio de los aductos citados. A este respecto, los compuestos más apropiados son los derivados con un solo grupo lábil, incapaces de formar aductos bifuncionales, como por ejemplo los cloruros de dietilentriaminomonocloroplatino(II) ([Pt(dien)Cl]Cl, dien-Pt) y de triaminomonocloroplatino(II) ([Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl]Cl) (ver Fig. III.2) (Sundquist y Lippard, 1986; van Garderen et al., 1989).

#### **Aductos bifuncionales del *cis*-DDP.**

El *cis*-DDP se considera en la actualidad un agente terapéutico eficaz, hecho que ha motivado la realización de numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que tienen por objeto la identificación de los aductos que forma con el ADN y el estudio de los efectos de estos aductos sobre los procesos en los que está implicado el ADN. Con objeto de identificar y cuantificar estos aductos se han empleado numerosas técnicas, entre las que se encuentran la inhibición de la actividad enzimática de la ADN o la ARN polimerasa, la RMN, la inmunodetección o la hidrólisis enzimática (revisión: Lepre y Lippard, 1990). Los resultados sobre la transformación de los aductos monofuncionales *cis*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N7-G)]<sup>+</sup> en bifuncionales indican que la reacción es rápida ( $t_{1/2}$  entre 2 y 4 horas a 37°C) (Malinge y Leng, 1988; Bancroft et al., 1990; Lambert et al., 1995), con formación mayoritaria de aductos intracatenarios entre dos purinas consecutivas (60-70% en sitios d(GpG) y 20-30% en sitios d(ApG)) (revisiones: Lepre y Lippard, 1990; Sip y Leng 1993). Estos aductos bifuncionales no se forman a la misma velocidad, debido a la dificultad de acceso del centro metálico a la base aromática. (Payet et al., 1993). Los aductos minoritarios formados son intracatenarios entre dos guaninas en sitios d(GpXpG) (X es una base cualquiera) y entre una guanina y una adenina en sitios

d(GpA), e intercatenarios entre dos guaninas en sitios d(GpC).d(GpC) (Fig. III.8) (Hopkins et al., 1991; Lemaire et al., 1991). Los aductos monofuncionales o puentes ADN-Pt-proteína son poco numerosos y representan menos del 1% del total.

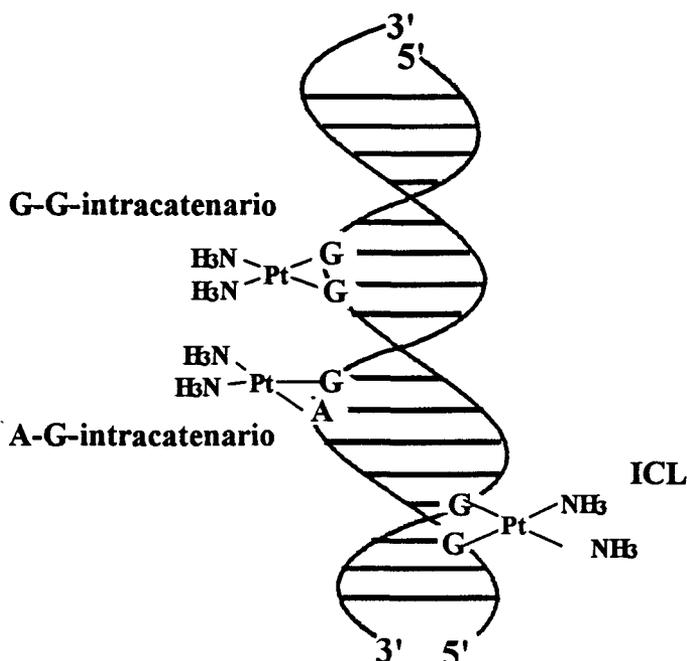


Figura III.8: Ejemplos de aductos formados entre el *cis*-DDP y el ADN-B.

Los aductos formados por el *cis*-DDP con la doble hélice del ADN se han estudiado por separado empleando oligonucleótidos de secuencia adecuada. De este modo se han determinado las velocidades de formación de cada aducto bifuncional. La etapa cinéticamente limitante para la formación de los aductos bifuncionales en los sitios d(GpG) y d(ApG) (90% de los aductos formados por el *cis*-DDP sobre el ADN en doble hélice B) es la hidrólisis del ligando cloruro ( $t_{1/2} = 2$  h.) (Malinge et al., 1988; Bancroft et al., 1990). Para los aductos intracatenarios minoritarios en los sitios d(GpXpG), el tiempo medio de reacción encontrado es superior a 20 horas, y para los aductos intercatenarios (sitios d(GpC)), entre 2,8 y 12 horas, según la secuencia (Payet et al., 1993). En este último trabajo, en el que se empleó un oligonucleótido de secuencia

central d(ApGpCpT) platinado en la guanina, solo se detectó el aducto intercatenario formado con la guanina complementaria de la citosina adyacente a la guanina platinada. No se formó el aducto intracatenario con la adenina adyacente, como era previsible. Este resultado concuerda con otro trabajo realizado sobre un oligonucleótido de secuencia central d(ApGpC), y demuestra la importancia de la secuencia y de la conformación local de la doble hélice del ADN en relación con la reactividad de los aductos del platino (Malinge et al, 1987; Payet et al., 1993).

Conviene destacar que la secuencia y la estructura del ADN desempeñan un papel esencial en sus interacciones con otras moléculas y concretamente con los derivados del platino(II). Mientras que la proporción estadísticamente esperada para la quelación de un sitio d(GpG) es del 36,8%, la cantidad real formada es el 65%. Este resultado sugiere que además de la platinación preferencial de las guaninas, tiene lugar la de secuencias con guaninas consecutivas, debido probablemente a las interacciones mutuas entre las bases apiladas y a las variaciones estructurales y electrostáticas promovidas por la secuencia (Pullman y Pullman, 1981; Sip y Leng, 1993; Elmroth y Lippard, 1994, 1995; Saito et al., 1995; Sugiyama y Saito, 1996). Otra experiencia relacionada con la reactividad de los complejos activados  $cis\text{-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  y  $cis\text{-[Pt(NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  sobre la secuencia en doble cadena d(TpTpGpGpCpCpApA)<sub>2</sub> indica que la reactividad de la guanina más próxima al extremo 5' es de 5 a 10 veces mayor que la de la guanina en 3'. En este sentido, la formación del aducto bifuncional desde el monofuncional sobre la guanina en 3' es diez veces mas rápido que a la inversa (Reeder et al., 1996). Otros resultados indican también diferencias de reactividad significativas entre distintos sitios d(GpG) en un mismo fragmento de ADN (Hemminki y Thilly, 1988).

Es destacable asimismo la platinación preferente de sitios d(ApG) sobre los d(GpA). El aducto monofuncional se forma siempre sobre el átomo N<sup>7</sup> de la guanina, y el cierre preferencial sobre el átomo N<sup>7</sup> de la adenina en 5' puede deberse a una mayor proximidad del platino respecto al mismo átomo de la adenina en 3' (Eastman, 1985). Otra explicación de este fenómeno radica en la diferencia de estabilización del intermedio

pentacoordinado de la reacción de formación del aducto bifuncional entre los sitios d(ApG) y d(GpA) (Laoui et al., 1988).

La importancia de la conformación de la doble hélice se demuestra por el hecho de que el *cis*-DDP solo forma aductos monofuncionales con el ADN-Z, que no evolucionan hacia aductos bifuncionales (Malinge y Leng, 1984). La formación de los aductos de *cis*-DDP ocurre también en el ADN superenrollado negativamente (forma presente en todas las células eucariotas y procariotas); se han encontrado de nuevo grandes diferencias respecto al ADN lineal (relajado), principalmente en la frecuencia mayor de los aductos intercatenarios, tanto en sitios d(GpC) como en d(CpG) (Vrána et al., 1996).

#### **Aductos bifuncionales del *trans*-DDP.**

El *cis*- y *trans*-DDP (ver Fig. III.1) se diferencian fuertemente en su actividad biológica general. Con objeto de conocer mejor las causas de la actividad terapéutica del *cis*-DDP, diversos grupos de investigación han estudiado la naturaleza de los aductos formados por el *trans*-DDP con el ADN. Estos estudios han permitido un conocimiento mejor del comportamiento del *trans*-DDP frente al ADN y otros nucleófilos intracelulares. En la actualidad se investiga sobre la utilización del *trans*-DDP en las estrategias terapéuticas antigén y antisentido, que se presentaran más tarde.

Los aductos monofuncionales formados por el *trans*-DDP y el ADN contienen la unión Pt-N<sup>7</sup>(G), y la hidrólisis del primer ligando cloruro es la etapa limitante de la reacción ( $t_{1/2}$  entre 2 y 4 horas a 37°C) (Johnson et al., 1980; Ushay et al., 1981; Bancroft et al., 1990). La conversión en aductos bifuncionales con el ADN de cadena simple se produce con tiempos de reacción en el rango de tiempo necesario para la hidrólisis del ligando cloruro restante. Este hecho indica que la hidrólisis es una vez más la etapa de control cinético de la reacción (Eastman y Barry, 1987; Bancroft et al., 1990). Los aductos bifuncionales se forman entre dos guaninas (alrededor del 60% de los aductos), entre una guanina y una adenina (35%) o entre una guanina y una citosina

(5%) (Eastman y Barry, 1987) (Fig. III.9). Los resultados correspondientes se obtuvieron por digestión enzimática del ADN platinado y detección cromatográfica de los productos de la digestión. Estas técnicas no permiten identificar los aductos formados (distancia entre las bases platinadas en la secuencia), sino solamente cuales son las bases enlazadas. En todo caso, el *trans*-DDP no puede formar aductos bifuncionales entre dos bases adyacentes debido a impedimentos estéricos (revisión: Lepre y Lippard, 1990).

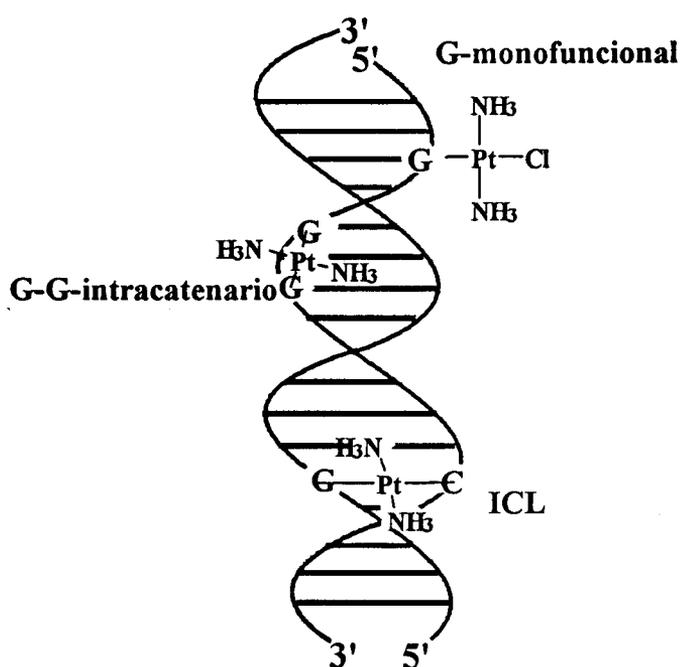


Figura III.9: Aductos formados entre el *trans*-DDP y el ADN-B.

En lo que respecta al ADN de doble hélice, se han llevado a cabo estudios *in vitro*, con resultados contradictorios. En efecto, en el ADN de esperma de salmón platinado con una razón platino/nucleótido ( $r_b$ ) de 0,01, se identificaron las bases enlazadas por absorción atómica y RMN tras digestión enzimática y separación de los productos por HPLC. El tiempo medio de reacción necesario para la formación de aductos bifuncionales desde los monofuncionales es  $t_{1/2} \approx 24$  h., mucho mayor que para la cadena simple (ver arriba). Las bases platinadas identificadas fueron una guanina y una

citocina en el 50% de los casos, dos guaninas en el 40% de los casos y una guanina y una adenina en el 10% restante (Eastman y Barry, 1987; Eastman et al., 1988).

Por otra parte (Bancroft et al., 1990), se platinaron diversos fragmentos de ADN de longitud comprendida entre 20 y 60 pares de bases ( $r_b = 0,07$ ). La cinética de cierre de los aductos monofuncionales se controló por RMN de  $^{195}\text{Pt}$ . El resultado ( $t_{1/2} = 3,1$  h) indica una velocidad mucho mayor a la obtenida en el trabajo anterior y similar al valor obtenido para la platinación de la cadena simple. Las bases platinadas son, en gran mayoría, guaninas.

En una última investigación (Boudvillain et al., 1995) se platinó ( $r_b = 0,005$ ) un fragmento de restricción de ADN (164 pares de bases) y se analizó por absorción atómica y técnicas bioquímicas. El resultado muestra una formación de aductos bifuncionales muy lenta (20% tras 24h de incubación a 37°C), y formación únicamente de aductos intercatenarios.

Las diferencias principales entre los tres trabajos señalados radican en el número de aductos por nucleótido ( $r_b$ ) y la longitud del ADN utilizado. Los aductos monofuncionales y bifuncionales del *trans*-DDP influyen en la conformación de la doble hélice de ADN en zonas próximas a los mismos, y pueden afectar a la reactividad de esta zona del ADN con otros aductos monofuncionales contiguos. Posteriormente se realizaron otras experiencias tratando de confirmar la causa de la disparidad en los resultados obtenidos. En las mismas se estudió el efecto de la longitud de la doble hélice y de la razón de platinación sobre la cinética de cierre de los aductos monofuncionales del *trans*-DDP. Este trabajo será discutido en el capítulo de aporte personal.

Se ha estudiado también la formación de aductos intercatenarios con ADN en triple hélice a 37°C, que transcurre con una velocidad correspondiente a tiempos de vida media (aducto monofuncional → aducto bifuncional) comprendidos entre 2 y 6 horas (Colombier et al., 1996). El puenteo se produce con la base complementaria de la inicialmente platinada, sobre la cadena rica en purinas de la doble hélice (Fig. III.10).

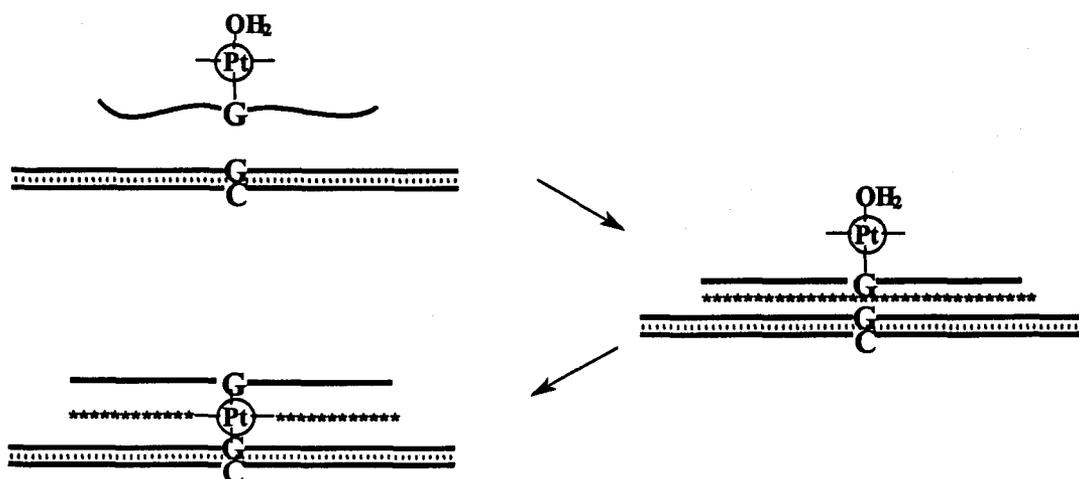


Figura III.10: Reacción de formación de un aducto intercatenario del *trans*-DDP entre una cadena Hoogsteen con un aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)Cl]<sup>+</sup> y la guanina complementaria de la cadena polipurina de la doble hélice. El símbolo “-(Pt)-” representa al grupo (NH<sub>3</sub>)-Pt-(NH<sub>3</sub>). Las pequeñas líneas verticales representan las interacciones de tipo Watson-Crick. Los asteriscos representan las interacciones de tipo Hoogsteen, que se siguen produciendo tras la formación del aducto intercatenario.

### Transformación de los aductos intracatenarios del *trans*-DDP.

Aunque se acepta de modo general que los aductos bifuncionales de *cis*- y *trans*-DDP son estables en condiciones fisiológicas, se han descrito dos casos de inestabilidad de aductos intracatenarios de *trans*-DDP (Comess et al., 1990; Dalbiès et al., 1994). En ambos, se produce una reacción de isomerización con formación de un nuevo aducto bifuncional, intracatenario en el primero de los estudios e intercatenario en el segundo. Puesto que esta reacción podría ser útil en la estrategia terapéutica antisentido, se discuten a continuación sus aspectos más importantes.

La primera reacción de isomerización de un aducto de *trans*-DDP con ADN se describió empleando un oligonucleótido de cadena simple y de secuencia d(TpCpTpApCpGpCpGpTpTpCpT), con un aducto 1,3-*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. El aducto se isomeriza, de forma independiente del pH (entre pH 5 y 9) y de la naturaleza y concentración de las sales en el medio de reacción (NaCl o NaClO<sub>4</sub>, entre 10 y 400 mM),

y se transforma en el aducto 1, 4-*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)(N<sup>3</sup>-C)]<sup>2+</sup> entre la guanina inicialmente platinada situada en el lado 3' y la citosina que se encuentra cuatro bases más allá en el lado 5'. El tiempo de vida media de esta reacción se encuentra entre 4 horas a 60°C y 120 horas a 30°C, con una constante de equilibrio de 10 en favor del aducto 1,4 (Comess et al., 1990; Dalbiès et al., 1995). Se ha estudiado asimismo el efecto de la longitud del oligonucleótido y de la naturaleza de las bases próximas a las quelatadas. La reacción se produce en todas las secuencias en cadena simple de tipo d(CpGpXpG) (con X = A, C o T), pero no en las secuencias d(NGpXpGpC) (N = A, G o T; X = A, C o T) ni en la doble hélice, indicando un fuerte efecto direccional.

El segundo caso de inestabilidad se estudió en secuencias d(GpXpG), para los aductos de tipo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, que se transforman en aductos intercatenarios, como indicado en la figura III.11 (Dalbiès et al., 1994). Como en el caso precedente, esta reacción es independiente de la naturaleza (NaCl o NaClO<sub>4</sub>) y concentración de las sales, siempre que la doble hélice permanezca como tal. Sin embargo, la naturaleza y la velocidad de la reacción cambian según la naturaleza de la base Y (complementaria de la X). Cuando Y es una base púrica (G o A), los tiempos medios de reacción del aducto intracatenario están comprendidos entre 4 y 24 horas, y la reacción se produce entre la guanina del lado 5' y su citosina complementaria, y en menor proporción (sobre un 20%) entre la misma guanina del lado 5' y la base Y. Cuando Y es una base pirimidínica (C o T), el tiempo de vida medio del aducto intracatenario es más corto (entre 1 y 6 horas), y el único aducto intercatenario formado se produce entre la guanina en 5' y su citosina complementaria. Para esta reacción se ha propuesto un mecanismo de ataque directo del centro metálico por parte de la citosina complementaria. Se ha comprobado asimismo la importancia de la conformación de la doble hélice en la vecindad del aducto: en efecto, la reacción no se produce cuando no existe emparejamiento por el lado 5' o por el lado 3' del aducto (Dalbiès et al., 1994).

En resumen, el aducto intracatenario sería estable en condiciones fisiológicas mientras permanece en forma de cadena simple (Comess et al., 1990; Dalbiès et al., 1994, 1995), mientras que la formación de la doble hélice daría lugar a la reacción de

isomerización en la que se forma el aducto intercatenario. Como se ha indicado anteriormente, esta reacción podría utilizarse en la estrategia antisentido, que consiste en inhibir la expresión de un gen de forma específica mediante dos mecanismos posibles (Hélène et Toulmé 1990): emparejamiento de un oligonucleótido (o un oligonucleótido modificado) con la porción de ARN a eliminar para que este se degrade por la ribonucleasa H (Rnasa H), o emparejamiento del oligonucleótido a la porción de ARN de forma irreversible, es decir mediante la formación de un enlace covalente entre ambos. Este enlace impediría que la molécula de ARN cumpliera sus funciones en la vida celular.

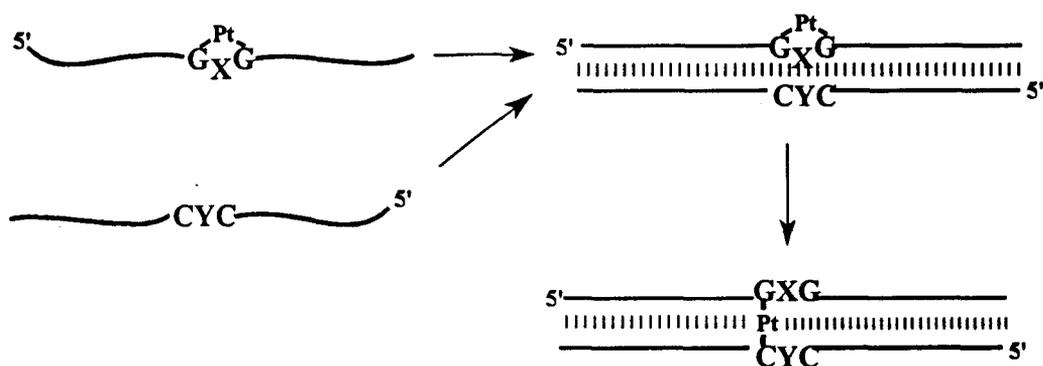


Figura III.11: Reacción de isomerización de un aducto intracatenario 1,3-*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> a aducto intercatenario entre la guanina platinada del lado 5' y su citosina complementaria. El símbolo Pt representa al grupo (NH<sub>3</sub>)-Pt-(NH<sub>3</sub>). Las líneas verticales representan los enlaces de tipo Watson-Crick entre las dos cadenas de la doble hélice.

Con el mismo fin práctico podría utilizarse la reacción covalente del ARN diana con un oligonucleótido modificado. Dicha reacción requiere que la droga alcance su diana y reaccione con ella de forma específica y rápida. Con el fin de verificar esta posibilidad, se llevan a cabo actualmente ensayos con oligonucleótidos de distintas secuencias y con modificaciones en el esqueleto (Boudvillain et al., 1997; Colombier et al., 1997). La sustitución de la secuencia complementaria r(CpYpC) por una secuencia r(CpA) o r(UpA) hace que la reacción de isomerización sea mucho más rápida ( $t_{1/2} < 5$

min.), y el puenteo se produce sobre la adenina (Fig. III.12). La velocidad aumenta mucho más mediante sustitución de la cadena de ADN platinada por una cadena 2'-O-metil-ribonucleotídica ( $r_{OMe}$ ) platinada (Fig. III.13). De este modo se introduce la ventaja suplementaria de que los 2'-O-metil-ribonucleótidos son más resistentes a las endonucleasas que los nucleótidos naturales. Los experimentos con 2'-O-metil-ribonucleótidos platinados de secuencia complementaria a dos regiones del ARN<sub>m</sub> del gen de Ha-ras (salvo la secuencia central, que es  $r_{OMe}(UpA)$  para una de las secuencias y  $r_{OMe}(CpA)$  para la otra), *in vitro* e *in vivo* en células HBL100-ras1, demuestran una inhibición específica de la síntesis de la proteína Ha-ras, de la transcripción del ARN<sub>m</sub> y del crecimiento celular (Boudvillain et al., 1997). Los estudios llevados a cabo sobre el mecanismo de la reacción demuestran, efectivamente, que esta se produce por ataque directo del nucleótido quelatado de la cadena de ARN diana y que ni el esqueleto ni la base existente entre las dos guaninas platinadas desempeñan un papel importante en la reacción (Colombier et al. 1997).

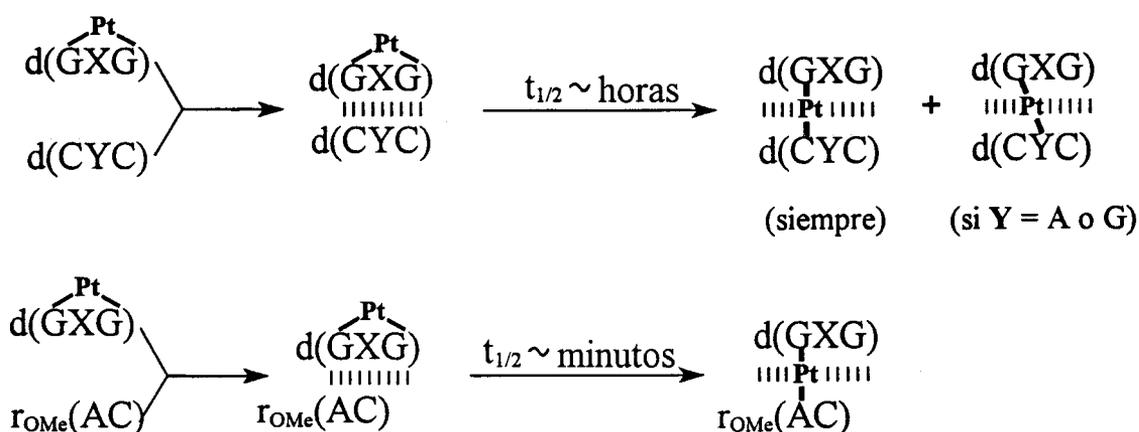


Figura III.12: Velocidad de la reacción de isomerización del aducto intracatenario 1,3-*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> en distintas dobles hélices. Los oligonucleótidos son representados por su secuencia central y el tipo de esqueleto ("d" para desoxiribonucleótidos, y "r<sub>OMe</sub>" para 2'-O-metilribonucleótidos) El símbolo Pt representa al grupo (NH<sub>3</sub>)-Pt-(NH<sub>3</sub>). Las líneas verticales representan los enlaces de tipo Watson-Crick.

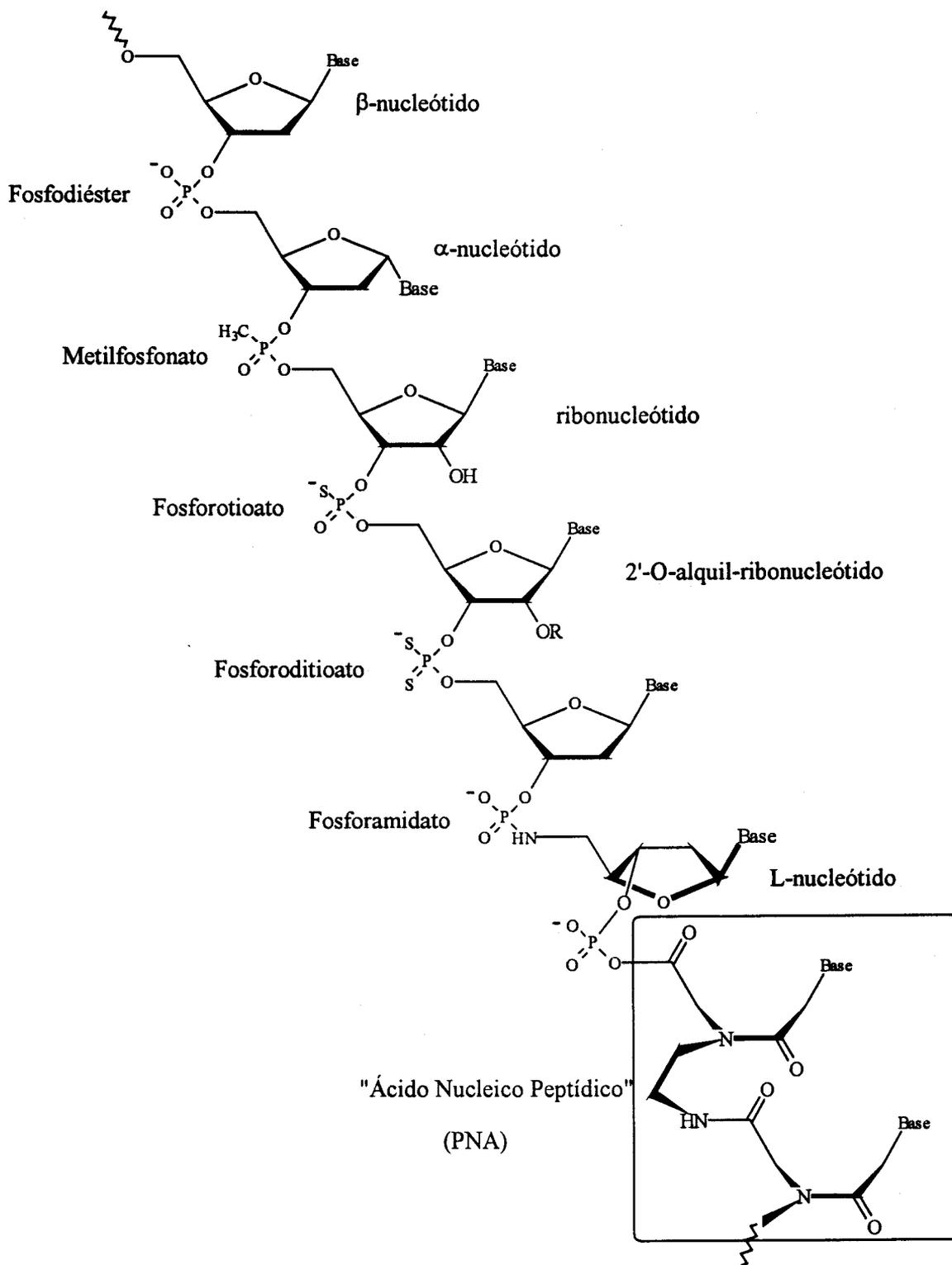


Figura III.13: Distintas modificaciones del esqueleto fosfodiéster, el azúcar y el enlace glicosídico diseñados para aumentar la estabilidad de las dobles hélices y/o para incrementar la estabilidad intracelular de los oligonucleótidos. En el caso del PNA, el esqueleto se reemplaza completamente por otra estructura.

## C. DEFORMACIONES PRODUCIDAS EN LA DOBLE HÉLICE.

### Aductos monofuncionales.

Los complejos de platino modifican la conformación de la doble hélice de ADN cuando se unen a la misma, a causa del efecto estérico y las nuevas interacciones intramoleculares que producen y a las cargas positivas que aportan al polianión.

Por su inestabilidad, los aductos monofuncionales de *cis*- y *trans*-DDP son difíciles de estudiar por lo que a menudo se utilizan como modelos otros compuestos monodentados, como el dien-Pt o el triaminoplatino (Fig. III.2), incapaces de formar aductos bifuncionales. No obstante, la ausencia de un segundo ligando lábil y, por tanto, de las interacciones con el ADN que éste pudiera generar, aconsejan una interpretación prudente de los resultados obtenidos con sus análogos monodentados. Los análisis por métodos espectrofotométricos y químicos muestran un mismo efecto de los aductos monofuncionales del dien-Pt, del cisplatino y del transplatino, es decir una alteración similar de la conformación de la doble hélice a lo largo de varios pares de bases alrededor del aducto (Brabec et al., 1992). La fijación del dien-Pt favorece la transición B→Z en las secuencias poli(dG-dC).poli(dG-dC), mientras que ésta no se produce en el caso de aductos bifuncionales de *cis*- y *trans*-DDP (Malfoy et al., 1981; Ushay et al., 1982). Sin embargo, el dien-Pt inhibe la transición B→A (Balcarová y Brabec, 1986).

Los aductos monofuncionales del dien-Pt y del *cis*-DDP desestabilizan térmicamente la doble hélice, produciendo variaciones en su temperatura de fusión ( $T_m$ ) que dependen de la secuencia (van Garderen et al., 1989; Brabec et al., 1992). Otras experiencias, de polarografía, RMN y dicroísmo circular, han mostrado la alteración de la conformación en doble hélice por la presencia de un aducto del dien-Pt (Vràna et al., 1986; Brabec et al., 1990; van Garderen et al., 1990), el desenrollamiento (6-8°) de la misma y la permanencia del emparejamiento de la base platinada (Sundquist y Lippard 1986; Keck y Lippard, 1992).

### Aductos bifuncionales del *cis*-DDP

La estructura del aducto mayoritario del *cis*-DDP sobre el ADN en doble hélice, el intracatenario entre dos guaninas consecutivas, se ha estudiado por técnicas tales como la RMN, difracción de rayos X, sondas químicas y retraso en la migración electroforética.

Los trabajos llevados a cabo sobre modelos con bi- tri- y tetranucleótidos muestran que el azúcar de la guanina platinada en 5' adopta una conformación C<sup>3'</sup>-endo, con las dos guaninas platinadas en posición "cabeza-cabeza" (Fig. III.14) (den Hartog et al., 1982; Sherman et al., 1985, 1988; Admiraal et al., 1987). Las dos guaninas mantienen la conformación *anti* respecto a sus azúcares, pero no se encuentran apiladas, y el ángulo diedro entre ellas es de 76-87°. El fosfato del lado 5' juega un importante papel mediante su interacción por enlaces de hidrógeno con un grupo amino del platino (revisiones: Sherman et Lippard, 1987; Reedjik, 1992). En la doble hélice, este aducto no impide la formación de enlaces de hidrógeno Watson-Crick por parte de las guaninas platinadas, pero la estructura se ve perturbada y la doble hélice desestabilizada (Girault et al., 1982; den Hartog et al., 1984, 1985). El desenrollamiento de la doble hélice provocado por el aducto es de 13°, y el plegamiento del eje longitudinal hacia el surco mayor varía según los estudios, entre 30-40° (Rice et al., 1988; Marrot y Leng, 1989; Bellon y Lippard 1990) y 78° (Gelasco y Lippard, 1998). Las distintas técnicas utilizadas (difracción de rayos X, retraso en migración electroforética, RMN) constituyen probablemente el origen de las divergencias en los resultados. El desenrollamiento de una parte de la doble hélice y la apertura del surco menor hacen que el ADN adopte una estructura local próxima al ADN-A. Se ha propuesto que el pliege producido se utiliza como motivo posible de reconocimiento por parte de ciertas proteínas (Takahara et al 1995, 1996; Gelasco y Lippard, 1998).

Los estudios sobre la estructura del aducto intracatenario en los sitios d(ApG) producen resultados globales muy similares a los obtenidos para los aductos en los sitios d(GpG) discutidos más arriba, con diferencias más importantes a nivel nucleotídico

detectadas por retraso en la migración electroforética y mediante el uso de pruebas químicas. (Marrot y Leng, 1989; Schwartz et al., 1989; Bellon y Lippard, 1990; Bellon et al., 1991; Fouchet et al., 1992).

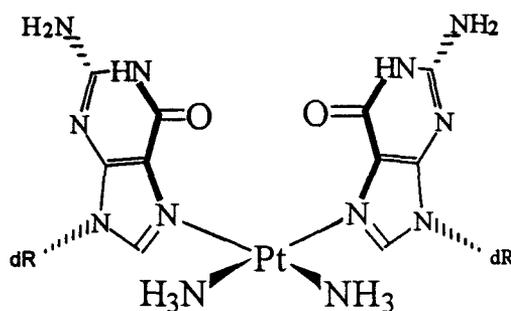


Figura III.14: Aducto *cis*-{[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>[d(pGpG)]]<sup>2+</sup> con las dos guaninas platinadas en posición “cabeza-cabeza” (Sherman et al., 1985). Para mayor claridad, no se han dibujado los fosfatos ni los azúcares del dinucleótido.

Los experimentos de retraso en migración electroforética (Anin y Leng, 1990; Bellon y Lippard, 1990; Bellon et al., 1991), y los modelos deducidos de los datos de RMN (den Hartog et al., 1985; Mazeau et al., 1989; Ptak et al., 1989; van Garderen y van Houte, 1994) para el caso del aducto intracatenario minoritario en los sitios d(GpXpG), indican el desapilamiento del nucleótido central, que queda en el surco menor, un pliege del eje longitudinal de  $30 \pm 5^\circ$  hacia el surco mayor, y un desenrollamiento de  $23^\circ$  de la doble hélice. La temperatura media de fusión descende en  $26^\circ$  respecto al oligonucleótido sin platar, es decir mucho más que para los aductos en los sitios d(GpG) (den Hartog et al., 1985; Ptak et al., 1989). La guanina quelatada del lado 5' no se mantiene emparejada (den Hartog et al., 1985; Marrot y Leng 1989; Anin y Leng 1990) y, en el caso de la secuencia central d(GpTpG), el azúcar de la guanina del lado 5' cambia su conformación hacia C<sup>3'</sup>-endo (van Garderen et van Houte, 1994).

El otro aducto minoritario del *cis*-DDP con el ADN es el intercatenario en los sitios d(GpC).d(GpC) (Hopkins et al., 1991; Lemaire et al., 1991). En este caso, dos estudios por RMN y modelización molecular muestran que las dos guaninas quelatadas

giran 180° para dejar al aducto de platino situado en el surco menor, mientras que las citosinas complementarias se desvían hacia el exterior de la doble hélice (Huang et al., 1995; Paquet et al., 1996). Los modelos indican un pliege del eje longitudinal de entre 20 y 40° y un desenrollamiento muy pronunciado respecto a los otros aductos del *cis*-DDP, lo que se interpreta como una inducción por parte de este aducto de una hélice izquierda local al nivel de las bases platinadas. Los valores de pliege y desenrollamiento determinados por retraso en la migración electroforética (Malinge et al., 1994) están de acuerdo con los resultados de la modelización molecular (45° de pliege y 79° de desenrollamiento).

#### **Aductos bifuncionales del *trans*-DDP.**

En la actualidad no se conoce cuales son los aductos formados por el *trans*-DDP con el ADN *in vivo*. Los aductos bifuncionales formados *in vitro* son intracatenarios entre dos guaninas, o una guanina y una adenina, separadas al menos por un nucleótido (el impedimento estérico evita la quelatación de dos bases adyacentes) y también aductos intercatenarios entre una guanina y su citosina complementaria. Se han estudiado por RMN las estructuras de la doble hélice de ADN modificado por un aducto intracatenario en el sitio d(GpXpG) o intercatenario en el sitio d(GpC).d(GpC). Estos estudios se han complementado con otros de reactividad frente a las sondas químicas y migración electroforética.

Los oligonucleótidos en doble hélice que contienen un sitio d(GpXpG) modificado por un aducto bifuncional del *trans*-DDP contienen una base central desapilada y desemparejada (Anin y Leng, 1990; Lepre et al., 1990). Puesto que la sustitución de la misma por un puente de propileno, o la sustitución de su base complementaria por otra base cualquiera, no afectan a la temperatura de fusión de la doble hélice, se ha deducido que esta base no participa en la estructura de la doble hélice (Boudvillain et al., 1995). El azúcar de la guanosina en 5' adopta una conformación C<sup>3'</sup>-endo, mientras que las de la otra guanina y la base central se encuentran en equilibrio conformacional C<sup>2'</sup>-endo/C<sup>3'</sup>-endo (Boogard et al., 1993).

Los resultados de retraso en la movilidad electroforética procedentes de dos estudios independientes sobre las modificaciones estructurales de la doble hélice producidas por dichos aductos son divergentes. En uno de ellos, los autores muestran el desenrollamiento de la doble hélice (entre 6 y 13°) y una fuerte flexibilidad al nivel del aducto, mediante un efecto denominado "junta flexible" (Bellon y Lippard, 1990; Bellon et al., 1991). Esta junta flexible se deduce del hecho de que el retraso en la migración electroforética de multímeros de varios oligonucleótidos sea independiente de la longitud de los oligonucleótidos. En un segundo trabajo se observa un pliege orientado del eje longitudinal de 26°, y un desenrollamiento de la doble hélice de 45° (Anin y Leng, 1990; Boudvillain et al., 1995). Este retraso, dependiente en este caso de la longitud de los oligonucleótidos, es máximo para una longitud de 22 o 23 pares de bases.

El cambio de la temperatura de fusión de la doble hélice debido a la platinación produce resultados contradictorios. Mientras que unos autores encuentran un pequeño aumento de  $T_m$  (Lepre et al., 1990) en un oligonucleótido de secuencia central d(GpApG), otros muestran una disminución de entre 15 y 20°C, para varias secuencias diferentes (Anin y Leng 1990; Boudvillain et al., 1995). En el último de los trabajos citados se propone la posible isomerización del aducto intracatenario en intercatenario durante el transcurso del experimento como causa de la discordancia. La disminución importante de la  $T_m$  está más de acuerdo con los resultados obtenidos con los aductos intracatenarios del *cis*-DDP (den Hartog et al., 1985; Ptak et al., 1989).

Se han realizado experiencias concretas sobre la deformación producida por el *trans*-DDP en la doble hélice de oligonucleótidos de secuencia conocida (19 a 22 pares de bases). Dicha deformación se origina por la formación de aductos intercatenarios en sitios d(GpC).d(GpC), y se pone de manifiesto mediante hiperreactividad de las bases en presencia de sondas químicas diversas y por modelización molecular. En concreto, y como consecuencia de estas experiencias, se deduce que la deformación se debe a que la guanina platinada adopta conformación *syn*. Por otra parte, el retraso en la migración electroforética produce una curvatura de 26° y un desenrollamiento de 12° (Brabec et al., 1993).

Resulta interesante comprobar que la conformación de la doble hélice se altera únicamente en la posición de los cuatro pares de bases en torno al aducto, sin que se produzca desnaturalización. El cambio de configuración de la guanina permite la formación de un enlace de hidrógeno entre el átomo O<sup>6</sup> de la guanina platinada y el grupo amina en posición 4 de la citosina complementaria (Fig. III.15), lo que concuerda con los resultados obtenidos desde las estructuras cristalinas de los modelos estudiados (Hitchcock et al., 1983; Dieter-Wurm et al., 1992).

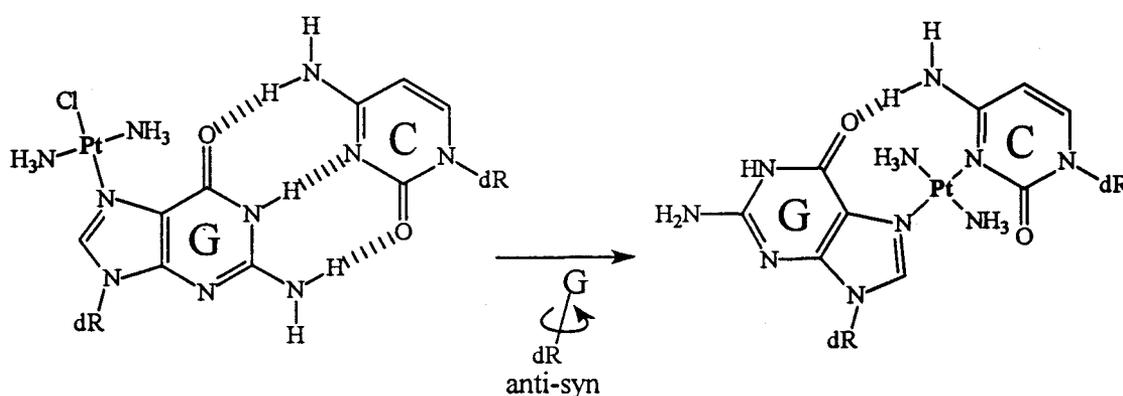


Figura III.15: Cambio de conformación del enlace glicosídico de la guanina platinada, que permite la formación del aducto intercatenario  $trans-[Pt(NH_3)_2(N^7-G)(N^3-C)]^{2+}$  y la conservación de un enlace de hidrógeno O<sup>6</sup>(G)-H-N<sup>4</sup>(C).

#### D. ESTRATEGIAS ANTISENTIDO Y ANTIGÉN; USO DEL TRANSPLATINO EN TERAPIA GÉNICA.

El desarrollo en estos últimos años de las técnicas que permiten la síntesis química en cantidades mensurables de oligonucleótidos de longitud suficiente, que pueden incluir modificaciones químicas tanto en las bases como en el esqueleto, ha despertado gran interés por la utilización posible de estos oligonucleótidos en el estudio de las funciones genéticas celulares. Asimismo se ha estudiado el uso de estos

oligonucleótidos como drogas terapéuticas específicas para la regulación de la actividad de ciertos genes responsables de enfermedades genéticas humanas.

En efecto, el reconocimiento mutuo y específico entre las bases nucleotídicas, con formación de enlaces de tipo Watson-Crick o de tipo Hoogsteen señala a estos oligonucleótidos como una nueva generación de agentes terapéuticos posibles. Hasta hoy, los productos utilizados que interactuaban con los ácidos nucleicos como diana (*cis*-DDP, *trans*-DDP, psoraleno), solo reconocían secuencias de dos o tres bases, induciendo lesiones sobre el genoma total de las células. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden reconocer secuencias de ácidos nucleicos mucho más largas y únicas para un solo gen en todo el genoma celular. En este caso, El oligonucleótido interactúa solamente con esa secuencia del gen, o con su ARNm correspondiente, y con las funciones que los mismos realizan, mientras que el resto de las funciones celulares no sufren efecto alguno.

Existen dos vías mediante las que un oligonucleótido puede actuar sobre la expresión de un gen, denominadas *Estrategia Antigén* y *Estrategia Antisentido*.

Un oligonucleótido antisentido se diseña con el fin de que se hibride específicamente con una secuencia dada de un ARN mensajero o de su precursor (antes de la etapa de corte y unión). De este modo ocurre su destrucción por la Rnasa H, que reconoce los híbridos ADN.ARN y digiere la cadena de ARN de estos, o el bloqueo estérico de las funciones de este último respecto a la traducción o a la transcripción inversa (para virus de ARN).

Un oligonucleótido antigén dirigido hacia una secuencia de ADN en doble hélice se hibrida con una de las cadenas del ADN mediante la formación de enlaces de tipo Hoogsteen o Hoogsteen inverso. Dicha cadena es, por lo general, rica en bases de tipo purina, que se encuentran a menudo en las regiones promotoras de los genes de eucariotas. Esta hibridación debe dar lugar a la inhibición de la transcripción del gen por

bloqueo físico de la actividad de la ARN polimerasa (revisiones: Miller, 1996; Vasquez y Wilson, 1998).

A continuación se describen brevemente otras aproximaciones al problema de la utilización de los oligonucleótidos en terapia génica:

Los oligonucleótidos en “pinza”, con dos secuencias polipirimidínicas unidas por una cadena carbonada o por una secuencia de 3 a 5 bases, utilizan como diana una secuencia de ADN polipurínica en cadena simple, de forma que una de las secuencias de la pinza forma enlaces de tipo Watson-Crick, mientras que la otra forma enlaces de tipo Hoogsteen. Mediante esta aproximación, cada base de una cadena polipurina resulta reconocida por cuatro (en el caso de las adeninas) o cinco (en el caso de las guaninas) enlaces de hidrógeno. De este modo, esta técnica resulta muy específica respecto a la secuencia reconocida. También se han utilizado oligonucleótidos circulares con el mismo objetivo (revisiones: Thuong y Hélène, 1993; Giovannangéli et al., 1996).

Se han utilizado oligonucleótidos enlazados a un agente capaz de puentear o intercalante, para aumentar la estabilidad de la interacción con su diana, en doble o en triple hélice (revisiones: Thuong y Hélène, 1993; Sun y Hélène, 1993). En este mismo contexto se ha pensado en la utilización de derivados del platino(II) (Vlassov et al., 1983; Gruff y Orgel, 1991) y más concretamente del *trans*-DDP (Colombier et al., 1996, 1997; Boudvillain et al., 1997) para la formación de enlaces covalentes con el ADN o ARN diana (ver aporte personal).

A pesar de los progresos realizados estos últimos años, quedan aún muchos problemas por resolver relacionados con el comportamiento terapéutico de los oligonucleótidos *in vivo*. En resumen:

1) *Penetración y transporte celulares*: La entrada de los oligonucleótidos en la célula por difusión pasiva a través de la membrana parece poco probable por su naturaleza polianiónica, que los hace poco liposolubles. Esta vía no se ha demostrado con derivados neutros o cargados positivamente, cuya penetración celular se mantiene en valores bajos. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran una penetración preferente por endocitosis con un rendimiento muy variable según el tipo de células utilizadas (revisiones: Miller, 1996; Lebleu et al., 1997). Se ha empleado otra estrategia que radica en la unión de un grupo que facilite la penetración celular a una de las extremidades del oligonucleótido (revisión: Lebleu et al., 1997). Las modificaciones consiguientes del esqueleto o de las bases del oligonucleótido varían su capacidad para atravesar la membrana celular, por lo que debe variarse la técnica utilizada para que esta etapa resulte mas fácil.

2) *Estabilidad intracelular*: Numerosas enzimas de tipo nucleasa degradan rápidamente los oligonucleótidos naturales en el interior celular. Para que este proceso no ocurra, resulta conveniente la variación de la naturaleza del esqueleto y/o de los azúcares de la biomolécula (Fig. III.13) que ha conducido a numerosos éxitos. También ha producido resultados positivos la unión de moléculas tales como poliaminas, colesterol, acridina, etc al extremo 3' o 5' del oligonucleótido. (Boiziau y Toulmé, 1991; Xodo et al., 1994; Miller, 1996).

3) *Especificidad*: La especificidad de los oligonucleótidos como agentes terapéuticos respecto al ADN diana es tal vez una de las propiedades mas destacables de los mismos. Es interesante la comprobación de que los efectos originados por la adición del oligonucleótido al medio celular se deben a su hibridación con la molécula-blanco y nunca a otras posibles interacciones o a efectos producidos por la degradación del oligonucleótido en el medio celular. Se han utilizado técnicas diferentes



En el caso de dos secuencias polipurina adyacentes, cada una en una cadena de la doble hélice, se ha propuesto la posibilidad de utilizar una tercera cadena capaz de intercambiarse de una a otra cadena de la doble hélice (Horne y Dervan, 1991). En el lugar de intercambio tiene lugar un enlace 5'-5' o 3'-3', lo que permite el cambio de polaridad necesario (Fig. III.17-a). También se ha propuesto la utilización de  $\alpha$ -oligonucleótidos con el mismo objetivo (Fig. III.17-b) (revisiones: Thuong y Hélène, 1993; Soyfer y Potaman, 1995).

## **Capítulo IV**

### **Aporte personal**

# **Materiales y Métodos**

## 1.- OLIGONUCLEÓTIDOS: RECEPCIÓN, PURIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO

Los oligonucleótidos sintéticos se adquirieron en el Instituto Pasteur (París, Francia) o en Eurogentec (Bélgica) en estado liofilizado. Tras su disolución en agua se centrifugan diez minutos a 15000 r.p.m. con objeto de eliminar las impurezas insolubles. El sobrenadante se recupera y se lleva a cabo una cromatografía líquida (FPLC), utilizando una columna Pharmacia MonoQ de intercambio aniónico fuerte. El detector de absorbancia se ajusta a 260 nm (pico de absorbancia típico de los oligonucleótidos) para comprobar la pureza del oligonucleótido.

La concentración de una disolución de oligonucleótido se calcula a partir de su absorbancia a 260 nm y de su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ). Cada base nucleotídica tiene un espectro de absorción distinto, y por tanto su propio coeficiente de extinción molar a 260 nm. Las interacciones entre bases, en cadena simple o en doble hélice, disminuyen su absorbancia. Por tanto, el cálculo de  $\epsilon$  de un oligonucleótido requiere la siguiente expresión:

$$\text{oln. d}(A_w C_x G_y T_z): \quad \epsilon_{\text{oln}} = 0,9 (w \cdot \epsilon_A + x \cdot \epsilon_C + y \cdot \epsilon_G + z \cdot \epsilon_T)$$

Y su concentración:

$$A = \epsilon_{\text{oln}} \cdot l \cdot C$$

Donde  $\epsilon_n$  = coeficiente de extinción molar del nucleótido n (n = A, G, C o T), A = absorbancia a 260 nm; l = paso de luz en cm; C = concentración molar de la muestra.

En caso necesario se realiza la purificación del producto por FPLC, empleando NaOH 10 mM y con un gradiente típico de NaCl 0,2 a 0,8 M durante 30 minutos, aunque las condiciones del gradiente pueden variarse según el tiempo de retención del oligonucleótido (que cambia con su longitud y con su secuencia) y según la resolución deseada. A la salida se recupera el producto y se comprueba la cantidad aproximada recuperada mediante medida de la absorbancia a 260 nm. Puesto que el oligonucleótido

se encuentra en medio básico y salino, es necesaria la neutralización y eliminación de las sales. Para el ajuste correspondiente se utiliza ácido acético 10 mM y tampón Tris-HCl 10 mM a pH=7,5.

La desalinización requiere columnas cromatográficas de fase inversa C18 (Sep-Pac, de Waters), con acetonitrilo como fase orgánica. Mediante ésta técnica, el oligonucleótido queda retenido en la columna, las sales se eluyen primero en fase acuosa, y después se eluye el oligonucleótido con la fase apolar (acetonitrilo) (ver figura IV.1), que se evapora en rotavapor hasta sequedad del oligonucleótido en forma sódica. Conviene destacar la importancia de la neutralización previa a la desalación, ya que el medio básico soporte puede degradar la columna. Luego, se disuelve el oligonucleótido en el tampón deseado. Si se utiliza inmediatamente se conserva en agua destilada a -20°C, pero para mayores periodos de tiempo se aconseja el empleo de un tampón TE (Tris-EDTA) de pH 8 a -20°C (congelador) o liofilizado a -4°C (frigorífico). Si se conocen las condiciones de uso y éstas no son extremas (pH muy ácido o muy básico), puede diluirse directamente en el tampón deseado.

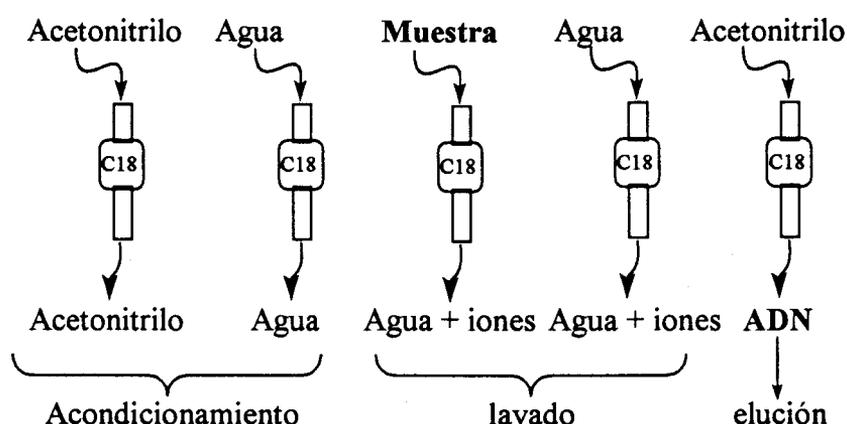


Figura IV.1: Esquema del proceso de desalado de oligonucleótidos mediante utilización de columnas "Sep-Pac C18".

## 2.- PREPARACIÓN DE LOS ADUCTOS MONOFUNCIONALES

### *trans*-Pt-ADN Y *dien*-Pt-ADN

El *trans*-DDP y el *dien*-Pt son poco solubles en agua pero fácilmente solubles en dimetilformamida (DMF, CH<sub>3</sub>-C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Para su utilización en la platinación de oligonucleótidos se disuelven en DMF a una concentración 10<sup>-2</sup> M y se conservan en la obscuridad a -20°C. Las diluciones posteriores se llevan a cabo con agua, de modo que la cantidad de DMF en la mezcla de reacción sea siempre pequeña.

$P_m$  (*trans*-DDP) = 300,1 g/mol ;  $\Rightarrow$  Para disolución 10<sup>-2</sup> M en DMF : 3,00 mg/ml

$P_m$  (*dien*-Pt) = 333,6 g/mol ;  $\Rightarrow$  Para disolución 10<sup>-2</sup> M en DMF : 3,34 mg/ml

#### Activación:

El *trans*-DDP y el *dien*-Pt reaccionan con el ADN en general y con los oligonucleótidos en particular formando aductos monofuncionales mediante una reacción de sustitución que se produce en dos etapas. En la primera, un ligando cloruro se sustituye por una molécula de agua, y en la segunda se produce la reacción con la base nucleotídica, con pérdida de la molécula de agua enlazada (Ver capítulo III.A y fig. III.5 de esta tesis). La hidrólisis es la etapa cinéticamente limitante del proceso, con  $t_{1/2} \approx 3$  horas para ambos compuestos.

Con el fin de que la reacción se acelere se utilizan derivados hidrolizados, consiguiéndose tiempos de reacción inferiores a la hora. En el caso del *trans*-DDP, se hace reaccionar el compuesto con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) en DMF, en proporción Pt:Ag de 1:1 o 1:2, según se pretenda la activación de una o dos posiciones de sustitución, respectivamente. La activación de una sola posición facilita la reacción de formación del aducto monofuncional y evita al mismo tiempo la formación de los bifuncionales. La mezcla de reacción se forma con un ligero exceso (~10%) de *trans*-DDP, que asegura la formación mínima de especies doblemente activadas. La reacción progresa durante unas 12 horas a 37 °C y en la obscuridad:



La mezcla resultante se centrifuga durante 15 minutos a 15000 r.p.m. para eliminar completamente el cloruro de plata, AgCl, y el sobrenadante se conserva a -20 °C en la obscuridad. En el caso del dien-Pt, la activación requiere 2 equivalentes de AgNO<sub>3</sub>, y las condiciones de reacción y de recuperación del producto activado son idénticas a las del *trans*-DDP.

### *Trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)Cl]<sup>+</sup>

El átomo N<sup>7</sup> de la guanina es el de unión preferente del ADN con el *trans*-DDP, lo que no significa que no exista reacción con otras bases, principalmente con el N<sup>7</sup> de la adenina. Para que la reacción ocurra con la guanina se aprovecha la circunstancia de que su N<sup>7</sup> tiene el valor mas bajo de pK<sub>a</sub> de todos los átomos susceptibles de reaccionar con el *trans*-DDP (pK<sub>a</sub> ≈ 2,7); así, disminuyendo el pH hasta un valor apropiado se anula practicamente la reacción con las posiciones restantes sin afectar la de la guanina. Para ello se añade sobre la mezcla un tampón acetato a pH 3,6 (Condiciones de salinidad: NaClO<sub>4</sub> 10 mM, tampón AcO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup> 10 mM de pH 3,6).

La concentración de oligonucleótido se ajusta entre 25 y 45 μM (4 o 5 DO). El número de equivalentes de *trans*-DDP que se adiciona depende del número de guaninas que se pretende platinar y del que existe en el oligonucleótido. Para el caso común de un oligonucleótido con una sola guanina, se añaden 4 o 5 equivalentes de *trans*-DDP y se deja reaccionar la mezcla entre 10 y 30 minutos a 37°C. La reacción se controla cada cierto tiempo sometiendo partes alícuotas a la cromatografía de FPLC. Si el oligonucleótido posee varias guaninas pero solo se quiere realizar una modificación, se añaden entre 1,1 y 1,5 equivalentes de *trans*-DDP y se deja reaccionar la mezcla durante 30 a 60 minutos. Una cantidad de platino pequeña hace la reacción más lenta, pero reduce la cantidad de producto doblemente platinado.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se bloquea ésta añadiendo NaCl hasta 0,1 o 0,2 M con el recipiente sumergido en hielo. Los productos de interés se

separan por FPLC (ver apartado de cromatografía). Finalizada la cromatografía, se realiza una diálisis utilizando 500 ml de NaCl 0,1 M, tampón fosfato sódico 5 mM (pH = 7,5), a 4°C, en la obscuridad y cambiando tres veces el electrolito. Los productos se conservan a -20 °C en la obscuridad. La conservación en NaCl 0,1 M ayuda a la estabilización de los aductos monofuncionales.

### ***Trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>3</sup>-C)Cl]<sup>+</sup>**

El inconveniente de la platinación de citosinas por el *trans*-DDP radica en la baja reactividad de estas nucleobases frente a la de las guaninas y adeninas. Aunque en la actualidad no se ha logrado superar este inconveniente, la platinación específica de una sola base nucleotídica mediante síntesis automatizada hace pensable su resolución a corto plazo (Schliepe et al., 1996; Manchanda et al, 1996).

En las experiencias realizadas en esta tesis se describe la platinación de citosinas en oligonucleótidos formados únicamente por bases púricas (T y C), por lo que el problema mencionado no se ha planteado. Para la obtención de productos con un solo aducto monofuncional se necesita una concentración de oligonucleótido de 42 μM (5 DO), 4 equivalentes de *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> y NaClO<sub>4</sub> 10 mM, durante 30 minutos a 37 °C. El bloqueo de la reacción y la recuperación y conservación de productos se realiza como se ha descrito.

### **[Pt(dien)(N<sup>7</sup>-G)]<sup>+</sup> y [Pt(dien)(N<sup>3</sup>-C)]<sup>+</sup>**

El dien-Pt reacciona con el ADN de forma similar al *trans*-DDP cuando se forman aductos monofuncionales, pero estos no evolucionan hacia aductos bifuncionales por la ausencia de un segundo ligando lábil. Este hecho facilita el trabajo de platinación puesto que no resulta necesario impedir la progresión de los aductos monofuncionales hacia bifuncionales. Así, las condiciones de platinación son similares a las descritas para el *trans*-DDP; los pequeños cambios en los tiempos de reacción y número de equivalentes se deben concretar en cada caso.

La diferencia principal se produce en la desalación posterior a la purificación por FPLC. Como los oligonucleótidos platinados con dien-Pt son estables, pueden desalarse como los no modificados, es decir por cromatografía en fase inversa sobre resina C18 (ver apartado de purificación de oligonucleótidos).

### 3.- CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La purificación de oligonucleótidos puede realizarse principalmente por dos métodos: por electroforesis en gel de acrilamida o por cromatografía. El método cromatográfico es más rápido y sencillo para pequeños oligonucleótidos, por lo que se ha elegido para las experiencias en este trabajo. Este método permite la detección de cantidades mínimas de oligonucleótido, (cantidades picomolares), y la separación rápida (menos de una hora) de productos que se diferencian hasta en un solo nucleótido.

El cromatógrafo utilizado (Waters), es de tipo HPLC compatible para su utilización a bajas presiones (FPLC) con las disoluciones salinas utilizadas en la purificación de oligonucleótidos. Todas las conducciones, conexiones y piezas en contacto con los eluyentes y con la muestra son de material plástico o de cuarzo, como en el caso de los pistones de las bombas y cubeta de detección. El aparato, que consta de cuatro partes además de la columna (de Pharmacia), se detalla a continuación.

#### Bombas (Waters 600):

El bombeo en dos tiempos garantiza la estabilidad de la presión, factor muy importante para evitar la presencia de artefactos y asegurar la reproducibilidad de los espectros. Además, un dispositivo incorporado (silke) controla la presión y suaviza las variaciones que inevitablemente se producen. El sistema de bombeo se encuentra al principio del sistema, con lo que solo pasan los eluyentes, y nunca las muestras. Este hecho evita la posible contaminación y la degradación de los pistones en caso de presencia de impurezas en la muestra. Es aconsejable filtrar y sonicar los eluyentes para evitar dicha degradación y la formación de burbujas de aire, que pueden provocar cambios drásticos de presión y la pérdida del espectro. Las presiones normales de trabajo en condiciones de FPLC están comprendidas entre 500 y 1000 psi, según el aparato y la columna utilizados

Además del sistema de bombeo, se incluyen el sistema de inyección y el control de "by-pass" de la columna. El puerto de inyección posee dos posiciones (figura IV.2).

En la posición “load” se inyecta la muestra en el sistema, quedando bloqueada en un bucle de volumen conocido. En esta posición el flujo corre sin pasar por el bucle. Es muy importante el conocimiento del volumen exacto del bucle para que la muestra sea de volumen igual o menor, ya que el volumen en exceso se pierde. En la posición “Inject”, el bucle que contiene la muestra se encuentra dentro del circuito, por lo que la muestra se desplaza en el sentido de la presión. El circuito seguido es inyector - columna - detector - salida. El control de “by-pass” de la columna sirve para lavar rápidamente el sistema usando flujos mayores de los que la columna es capaz de aceptar.

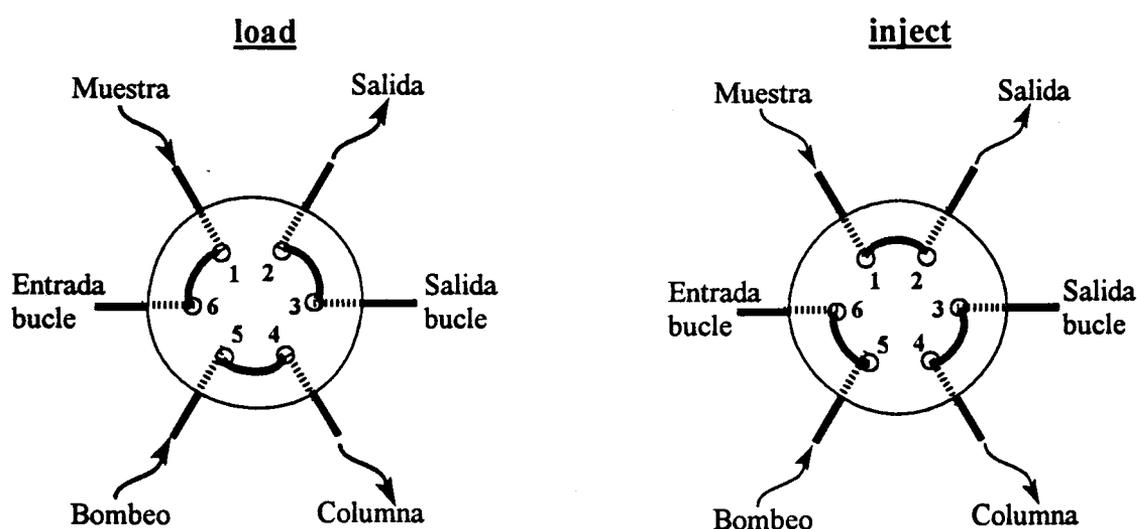


Figura IV.2: Puerto de inyección del sistema de FPLC. La muestra se carga en posición “Load” (izquierda), pero el proceso cromatográfico solo comienza al pasar a la posición “Inject” (derecha), en la que la muestra comienza a desplazarse hacia la columna.

### Control:

La función original de este componente es el control del gradiente, flujo, presión y longitud de onda del detector. La presencia de un ordenador incorporado al sistema, con un programa capaz de realizar estas funciones, lo relega en condiciones normales de uso al papel de interface entre el ordenador y las otras partes del sistema, aunque su mayor velocidad de respuesta y la posibilidad de utilizarlo en modo manual, sin gradiente

programado, lo hace más útil durante las operaciones de lavado y en caso de problemas (caídas o subidas excesivas de presión, fugas).

El ordenador que complementa el sistema de control permite la grabación de espectros para su visualización posterior si fuera necesario. También permite la visualización simultánea de varios espectros y de la presión del aparato durante el gradiente, con lo cual se detectan posibles artefactos del espectro originados por diferencias de presión. Las funciones de edición permiten no solo la integración y cuantificación de las señales, sino también la optimización de los resultados.

#### Detector (Waters 486):

La muestra pasa por el detector en último lugar, justo antes de la salida y después de su paso por la columna. Así, los productos que absorben a la longitud de onda elegida se detectan y aparecen en el espectro. El detector puede trabajar en el rango UV-visible, lo que permite, si es necesario, la detección en una misma muestra de productos que absorben a longitudes de onda distintas y su utilización para proteínas o ácidos nucleicos sin necesidad de cambiar de lámpara. La longitud de onda de trabajo puede cambiarse también durante el transcurso de un gradiente.

#### La columna:

La resina cromatográfica utilizada para los oligonucleótidos es un intercambiador aniónico fuerte, con un soporte de micropartículas de sílice de diámetro medio igual a 10  $\mu\text{m}$ . El grupo activo enlazado a la base de sílice es el catión trimetilamonio ( $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), y la capacidad iónica de la resina es de 0,27-0,37 mmol/ml. Los flujos utilizables con esta resina varían normalmente entre 1 ml/min para una columna de 5 mm de diámetro y 4 ml/min para una columna de 10 mm de diámetro. Los tamaños (cm) de columna utilizados son, (longitud x diámetro), de 5 x 0,5 (vol = 1 ml) para inyecciones analíticas y pequeñas preparativas, y de 10 x 1 (vol = 8 ml) para cantidades de oligonucleótidos mayores de 5 DO ( $\sim 40$  pmol). En este trabajo se han utilizado columnas pre-empaquetadas "Pharmacia MonoQ HR 5/5" y una columna Pharmacia 10/10 rellena

con resina "Protein-Pack Q 15HR 1000Å 15 µm" de Waters-Millipore, de características similares a la de Pharmacia.

Los eluyentes y la muestra:

Los oligonucleótidos son polianiónicos, y su número de cargas depende del número de grupos fosfato que poseen (es decir, de su longitud), del pH y en cierta medida también de su secuencia. Como tales polianiones, interaccionan con los grupos de la resina cromatográfica cargados positivamente, de modo que el de mayor carga (el más largo) interaccionara mejor y será más difícil de desplazar. Cuando el medio contiene otros aniones, por ejemplo cloruros (Cl<sup>-</sup>), se produce una competición por los grupos activos en la resina; a medida que avanza el gradiente y aumenta la concentración en cloruro los oligonucleótidos se desplazan y son eluidos. Por tanto, la elución tiene lugar desde tamaño menor a mayor.

En el caso de oligonucleótidos modificados con aductos del platino(II), se producen aportaciones de cargas positivas a la molécula, una en el caso de aductos monofuncionales del *trans*-DDP (o del *cis*-DDP) y dos en el de bifuncionales y aductos del dien-Pt. Como consecuencia, los oligonucleótidos platinados eluyen con tiempos de retención menores que los correspondientes sin modificar, hecho que permite la separación de los distintos productos (no modificado, con un aducto, con dos, etc.) tras las reacciones de platinación. Cuando la longitud de los oligonucleótidos aumenta, la fracción de carga neutralizada por un aducto respecto a la carga total de la molécula disminuye, lo que dificulta la separación por esta técnica. En este trabajo no se produjo problema alguno, pero es apropiado tener en cuenta este inconveniente.

Sin embargo, algunos oligonucleótidos son capaces de autoasociarse para formar estructuras más o menos estables que alteran sus interacciones con la resina y por tanto su tiempo de retención. El cambio de pH varía las características donadoras-aceptoras de las bases, y resulta un sistema eficaz que evita la formación de las estructuras mencionadas. En medio básico NaOH 10 mM no hay autoasociación, y se utiliza a

menudo por esta causa, a menos que la naturaleza del oligonucleótido o las modificaciones realizadas en el mismo lo desaconsejen. En nuestro trabajo se han utilizado siempre eluyentes básicos, si no se indica lo contrario.

Las condiciones utilizadas son las siguientes:

*Eluyentes básicos:* A.- NaOH 10 mM, NaCl 50 mM.

B.- NaOH 10 mM, NaCl 1 M.

*Eluyentes neutros:* A.- Tris-HCl 10 mM pH 7,5 , NaCl 50 mM.

B.- Tris-HCl 10 mM pH 7,5 , NaCl 1 M.

Como se ha indicado, el gradiente de NaCl que se utiliza depende de las características del oligonucleótido y de la resolución necesaria para la separación del producto de interés. Teniendo en cuenta los valores de longitud de los oligonucleótidos utilizados (entre 6 y 30 nucleótidos), el gradiente será el siguiente:

|               |    |    |    |     |     |     |     |
|---------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| tiempo (min.) | 0  | 5  | 35 | 40  | 44  | 45  | 53  |
| % tampón A    | 80 | 80 | 20 | 0   | 0   | 100 | 100 |
| % tampón B    | 20 | 20 | 80 | 100 | 100 | 0   | 0   |

Durante los primeros cinco minutos en régimen isocrático se equilibra el sistema en las condiciones iniciales del gradiente. El gradiente principal tiene lugar entre 5 y 35 minutos. El gradiente se aumenta hasta un tiempo de 40 minutos en el que se alcanza el 100% de tampón B y se asegura la salida de todos los productos. Estas condiciones se mantienen unos minutos, y luego se vuelve a 100% del tampón A para que se elimine el exceso de cloruro y pueda comenzar de nuevo el gradiente.

#### 4.- MARCAJE RADIOACTIVO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el marcaje radiactivo del extremo 5' de los oligonucleótidos se ha utilizado el material siguiente:

- T4 Polinucleótido Kinasa: New England Biolabs (USA). 10 u/μl en KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, ATP 0,1 μM y glicerol al 50%.
- Tampón para la reacción (tpnx10): New England Biolabs (USA). Tris-HCl 0,7 M (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, DTT 50 mM. A utilizar en dilución 1/10.
- <sup>32</sup>γ-ATP: Amersham (UK). 10 mCi/ml , > 5000 Ci/mmol.

La T4 Polinucleótido Kinasa cataliza la unión del fosfato en posición γ del ATP (adenosina trifosfato) al extremo 5' del ADN. Mediante la utilización de un ATP que contiene un átomo de <sup>32</sup>P radiactivo en su posición γ se consigue que el oligonucleótido fosforilado quede marcado (ver figura IV.3).

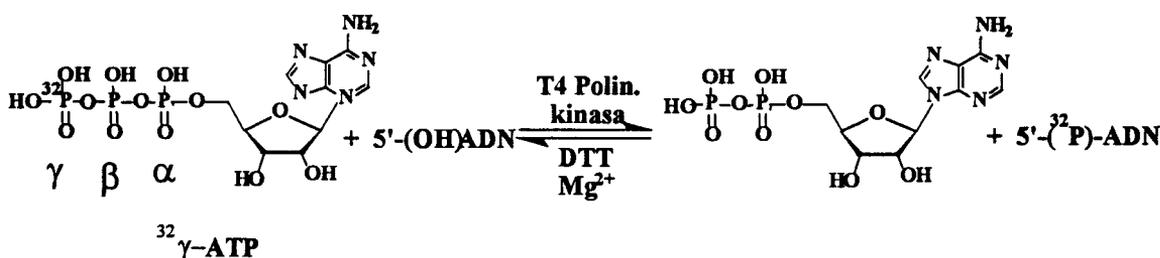


Figura IV.3: Esquema de la reacción de marcaje del ADN con <sup>32</sup>γ-ATP y la enzima T4 Polinucleótido Kinasa.

Las condiciones de reacción que se han utilizado son las siguientes:

Una cantidad entre 1 y 5·10<sup>-3</sup> DO (cantidades picomolares) del oligonucleótido a marcar, en 7 μl de H<sub>2</sub>O, se mezcla con 1 μl de "tpnx10", 1 μl de <sup>32</sup>γ-ATP y 1 μl de enzima Kinasa. Se deja reaccionar durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, la mezcla se pasa por una columna de cromatografía de exclusión (resina G25) donde queda retenido el exceso de <sup>32</sup>γ-ATP. Tras la comprobación de la radiactividad de la muestra con una

sonda Geiger, se conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la obscuridad y en un recipiente de protección radiactiva.

Este protocolo es válido para oligonucleótidos sin modificar y para aquellos otros que contengan aductos del dien-Pt o aductos bifuncionales del *trans*-DDP.

#### Aductos monofuncionales del *trans*-DDP.

En el caso de oligonucleótidos modificados con uno o varios aductos monofuncionales del *trans*-DDP, el protocolo de marcaje radiactivo ha de variarse para considerar la posible reacción de cierre de dichos aductos monofuncionales a bifuncionales. La estrategia consiste en el aumento de la concentración de iones cloruro en la mezcla de reacción con disminución del tiempo de reacción. Finalizada la misma se separa el ATP en exceso por precipitación en etanol. El protocolo empleado es el siguiente:

- Se toma una cantidad comprendida entre 1 y  $5 \cdot 10^{-3}$  DO del oligonucleótido platinado en 6  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , y se añade 1  $\mu\text{l}$  de "tpnx10" ( $\text{MgCl}_2$  0,1 M, NaCl 0,6 M) , 2  $\mu\text{l}$  de  $^{32}\gamma\text{-ATP}$  y 1  $\mu\text{l}$  de enzima T4 polinucleótido kinasa (10 u/ $\mu\text{l}$ ). Se deja reaccionar 15 minutos en el baño maría a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Se añaden 0,2  $\mu\text{l}$  EDTA 0,5 M + 0,5  $\mu\text{l}$   $\text{AcONH}_4^+$  8 M + 9,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 30  $\mu\text{l}$  fenol; Se agita y centrifuga durante 4 minutos para recuperar la fase acuosa.
- Se añaden 30  $\mu\text{l}$  de fenol y se repite la operación.
- Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de éter; se agita y centrifuga 4 minutos; se elimina el éter y se repite la operación. El éter restante se deja evaporar manteniendo abierto el recipiente durante 5 minutos.
- Se añaden 10  $\mu\text{l}$   $\text{AcONH}_4^+$  8 M + 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 140  $\mu\text{l}$  EtOH frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) para precipitar.
- Se lava con 200 $\mu\text{l}$  de EtOH al 80%, se centrifuga durante 2 minutos y se recupera el precipitado.
- Se deja secar totalmente (a vacío) y se recoge en NaCl 0,1 M.

## 5.- FOSFORILACIÓN-LIGACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para la unión de dos oligonucleótidos mediante enlaces fosfodiéster se recurrió a la actividad enzimática de la T4 DNA Ligasa. El material utilizado fue el siguiente:

- Enzima T4 DNA Ligasa: New England Biolabs (USA). 400.000 u/ml en KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM, BSA 200 µg/ml y glicerol al 50%.
- Tampón de reacción (tpnx10): New England Biolabs (USA). Tris-HCl 0,5 M (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, DTT 0,1 M, ATP 10 mM, BSA 0,5 mg/ml. A utilizar en dilución 1/10.
- ATP (5'-adenosina trifosfato): Boehringer Manheim (Alemania). 10 mM, en agua.

La T4 DNA Ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre dos extremidades nucleotídicas 3'-hidroxilo y 5'-fosfato adyacentes en una doble hélice. Puesto que los oligonucleótidos utilizados en nuestras experiencias están defosforilados en ambos extremos, el paso previo al enlace es la fosforilación del oligonucleótido que se pretende enlazar por su extremo 5'.

El protocolo utilizado es el siguiente:

### **1º - Fosforilación:**

a) 0,1 DO (cantidades micromolares) del oligonucleótido que se quiere enlazar por su lado 5', y que posee un hidroxilo como terminal, se diluyen hasta 7µl con agua, y se añade 1 µl de tampón de reacción (tpnx10), 1 µl de enzima T4 polinucleótido kinasa (de 10 u/µl) y 1 µl de ATP (5'-adenosina trifosfato, 10 mM). Se introduce la mezcla 30 minutos a 37 °C en el baño maría.

b) Se vuelve a añadir 1  $\mu\text{l}$  de enzima y 1  $\mu\text{l}$  de ATP, y se mantiene durante 30 minutos a 37 °C.

c) Se lleva la mezcla hasta 10 mM en EDTA y 0,3 M en  $\text{AcONa}^+$ , y un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ , mediante la adición de 68  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 10  $\mu\text{l}$  EDTA 100 mM + 10  $\mu\text{l}$   $\text{AcO}^- \text{Na}^+$  3 M.

d) Se lava con fenol (100  $\mu\text{l}$ ), mezclando bien y centrifugando 5 minutos a 15.000 r.p.m. hasta separación, y luego se lava dos veces con éter (200  $\mu\text{l}$ ), centrifugando 2 minutos cada vez. Se dejan reposar los tubos abiertos 5 minutos para evaporar el éter.

e) Se realizan dos precipitaciones con etanol al 75% (20 minutos a -78 °C, 15 minutos a 15.000 r.p.m.), y un lavado con etanol al 75% en agua. El precipitado resultante se lleva a sequedad.

## **2°- Ligación:**

a) Se mezclan 0,1 DO (cantidades micromolares) de uno de los oligonucleótidos a enlazar, la cantidad equimolar del otro y un ligero exceso del oligonucleótido complementario de ambos y se diluye la mezcla hasta 42  $\mu\text{l}$  con agua. Se calienta a 65 °C durante 5 minutos y se deja enfriar lentamente hasta 0 °C, asegurando así la formación de la doble hélice. Se añaden 5  $\mu\text{l}$  de tampón ligasa "tpnx10" y se deja reposar la mezcla 5 minutos a 16 °C. Se añaden 3  $\mu\text{l}$  de enzima T4 ADN Ligasa y se incuba 120 minutos a 16 °C.

b) El volumen resultante se aumenta hasta 100  $\mu\text{l}$  y se lleva la mezcla a 10 mM en EDTA y 0,3 M en  $\text{AcONa}^+$ , añadiendo 27  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  + 10  $\mu\text{l}$   $\text{AcONa}^+$  + 10  $\mu\text{l}$  EDTA 100 mM.

c) Se realiza un lavado con fenol y dos con éter, como se indicó en el apartado anterior.

d) Se precipita con etanol del modo señalado. Se lleva hasta sequedad.

El modo general de preparación de cantidades mayores de oligonucleótido enlazado implica un proceso de fosforilación y unión simultaneo sobre varias muestras.

La purificación de la especie enlazada se realiza por separación mediante migración electroforética en gel de acrilamida 24% desnaturizante (una muestra por pocillo). Finalizada la electroforesis, se separa el gel de las placas de vidrio, se envuelve en plástico alimentario transparente y se coloca sobre una placa cromatográfica que contiene un indicador de fluorescencia. Bajo la luz de una lámpara UV, las bandas de los oligonucleótidos aparecen como manchas oscuras, y puede señalarse su posición sobre el plástico con un marcador normal. Con el conocimiento previo de la longitud de las especies y realizando la migración de los oligonucleótidos iniciales en paralelo y por separado, puede identificarse la especie enlazada, que se recupera así:

Tras el recorte de la banda del gel donde está el producto de la unión enzimática, se separa esta del plástico y se lava con agua para eliminar la urea. Se introduce la banda en 250  $\mu$ l de TBEx0,5 (tampón Tris-ácido bórico-EDTA, ver abreviaciones) recién preparado. Se deja eluir durante un mínimo de 5 horas. Tras la elución, se recupera el sobrenadante, y se añade  $\text{AcONa}^+$  hasta 0,3 M. Se añaden 650  $\mu$ l de etanol frío y se precipita (20 minutos a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 minutos a 15.000 r.p.m.,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Se lava con 200  $\mu$ l de etanol al 70% frío, y se deja secar. Se diluye nuevamente en una cantidad suficiente de agua y se mide su absorbancia a 260 nm.

## 6.- SONDAS QUÍMICAS

Las sondas químicas son moléculas que reaccionan con los ácidos nucleicos, modificando ciertas bases nucleotídicas con una intensidad dependiente de la estructura local del ácido nucléico. En general, estas sondas son hiperreactivas con las bases que se encuentran en forma de cadena simple o en regiones deformadas de la doble hélice respecto a su reactividad con el ADN-B. Este hecho permite medir el grado de perturbación que origina una modificación química (formación de aductos de compuestos del platino(II)) sobre la estructura en doble hélice. En este trabajo se han utilizado como sondas el tetróxido de osmio  $\text{OsO}_4$  y el dietilpirocarbonato (DEPC).

Las reacciones de las sondas químicas no son cuantitativas y su dependencia de la secuencia no es bien conocida; por esta razón resulta necesario llevar a cabo reacciones paralelas con el ADN modificado y sin modificar (como control), en cadena simple y en doble hélice.

Las experiencias de este trabajo se han llevado a cabo siguiendo el protocolo de Marrot y Leng, 1989, modificando convenientemente las condiciones de reacción con objeto de hacer nuestros resultados coherentes con los de experiencias previas (ver primer proyecto).

### $\text{OsO}_4$

El tetróxido de osmio es una sustancia electrófila que reacciona con la nucleobase timina del ADN en cadena simple o en regiones deformadas de la doble hélice. La reacción se produce sobre el doble enlace entre los átomos  $\text{C}^5$  y  $\text{C}^6$  de la timina (ver figura IV.4), desapareciendo la aromaticidad del anillo y debilitándose el enlace glicosídico. De este modo, este último se convierte en sitio preferente para la reacción con piperidina.

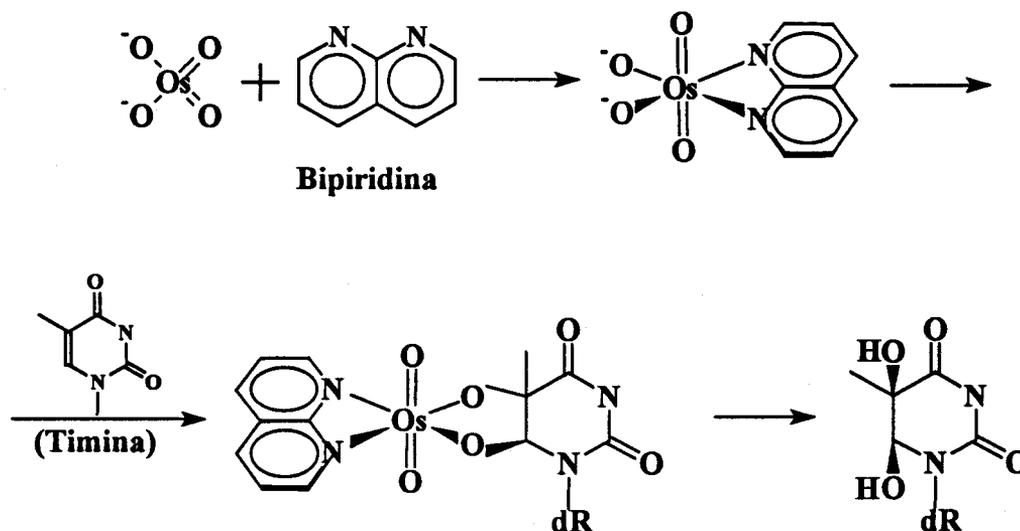


Figura IV.4: Reacción del tetróxido de Osmio con la timidina, previa coordinación a la bipiridina. La presencia de bipiridina mejora la selectividad de la reacción.

Las etapas a seguir son las siguientes:

- La doble hélice radiomarcada en una de las cadenas (o la cadena simple) se lleva hasta sequedad y se adicionan 2  $\mu\text{g}$  de ADN competidor (un ADN cualquiera desnaturalizado, que se añade para modular la reacción con el oligonucleótido que se utiliza en el trabajo).
- Se añaden 25  $\mu\text{l}$  de “tampón  $\text{OsO}_4$ ” (ver composición mas abajo) y 1  $\mu\text{l}$  de bipiridina (25 mM en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, 15 minutos a 0  $^\circ\text{C}$  y otros 5 minutos a la temperatura de reacción.
- Se añaden 0,8  $\mu\text{l}$  de  $\text{OsO}_4$  25 mM, se agita y se deja en reposo durante 8 minutos a la temperatura de reacción.
- Se añaden 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{AcONa}^+$  3 M y 1,5  $\mu\text{l}$  de  $^3\text{H}$ RNA. Se agita y se adicionan 60  $\mu\text{l}$  de éter. Se agita de nuevo y se centrifuga durante 5 minutos a 15.000 r.p.m. Se quita el sobrenadante y se repite el lavado con éter. Se dejan los tubos abiertos durante 5 minutos hasta evaporación del éter restante.

- e) Se añaden 90  $\mu\text{l}$  de etanol frío, se agita y se mantiene durante 15 minutos a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se centrifuga después durante 15 minutos a 15.000 r.p.m. y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se elimina el sobrenadante.
- f) Se añaden 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{AcONa}^+$  0,3 M y 90  $\mu\text{l}$  de etanol frío y se repite la precipitación como se ha explicado en la etapa anterior.
- g) Se lava dos veces el precipitado con 150  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% frío y se hace secar.
- h) Finalmente se trata el producto con 100  $\mu\text{l}$  de disolución acuosa de piperidina 1/10 durante 30 minutos a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se congela y liofiliza para la eliminación de la piperidina. El liofilizado se lava dos veces con agua (50-100  $\mu\text{l}$ ).

Tampón  $\text{OsO}_4$ :  $\text{NaClO}_4$  100 mM, EDTA 0,2 mM, tampón fosfato sódico (pH 7,5) 3 mM.

El tetróxido de Osmio en disolución acuosa se degrada muy rápidamente, por lo que, al prepararla, hay que dividir dicha disolución en partes alicuotas del volumen apropiado para utilizar cada una una sola vez, y conservarlas a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## DEPC

El dietilpirocarbonato reacciona con el átomo de nitrógeno endocíclico  $\text{N}^7$  de las bases pirimidínicas del ADN en cadena simple o regiones deformadas de la doble hélice B (ver figura IV.5). Esta reacción produce una pérdida de aromaticidad que se ve traducida en un debilitamiento del enlace glicosídico, lábil de este modo a la reacción con piperidina.

El protocolo seguido para esta reacción es el mismo citado para la reacción del tetróxido de Osmio, con tan solo dos variantes:

- En lugar de OsO<sub>4</sub> se añaden 0,6 µl de DEPC puro.
- No se añade biperidina.

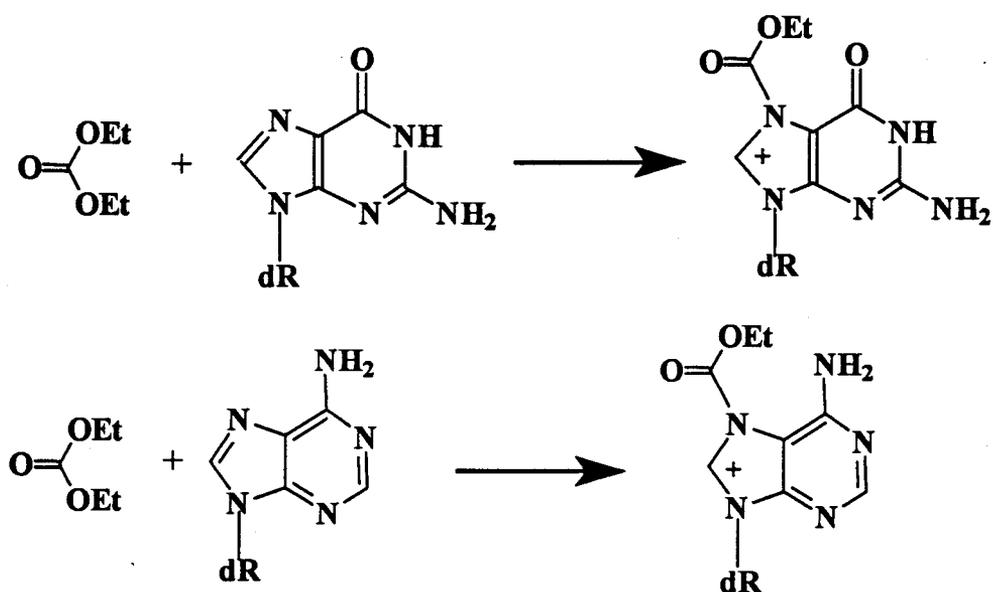


Figura IV.5: Reacción del dietilpirocarbonato con la guanidina (arriba) y con la adenosina (abajo).

## 7.- SECUENCIACIÓN (MÉTODO DE MAXAM-GILBERT)

Este método de secuenciación del ADN se describió por primera vez en 1977 (Maxam y Gilbert, 1977), y consiste en la modificación química de las bases nucleotídicas por agentes que, en las condiciones del experimento, solo reaccionan con una base o con un tipo de bases (púricas o pirimidínicas). Se han utilizado para este fin diversas reacciones (Maxam y Gilbert, 1980), que poseen un modo de actuación común, englobable en tres etapas:

- i) Modificación de la o las bases (especificidad de la reacción).
- ii) Eliminación de las bases modificadas.
- iii) Excisión del ADN en el sitio de la eliminación.

Es importante señalar que las condiciones de la reacción de modificación deben ser tales que se produzca una modificación como máximo por cadena nucleotídica. De este modo podrá detectarse la secuenciación de la cadena mediante visualización de la migración electroforética del trozo de ADN restante en el lado marcado. Sin embargo, si se produce más de un corte en una cadena, solo se podrá secuenciar la base modificada más próxima al lado marcado.

En las reacciones utilizadas en este trabajo, las tres etapas se llevan a cabo en dos fases, ya que el ácido fórmico protona y cataliza la depurinación del polinucleótido, mientras que en los otros casos la piperidina desplaza las bases modificadas y cataliza la  $\beta$ -eliminación de los fosfatos del azúcar desprovista de nucleobase. Las reacciones se llevan a cabo en paralelo sobre alícuotas del mismo oligonucleótido marcado, mediante los protocolos siguientes:

### **Modificación de las bases púricas.**

- Condiciones iniciales: 19  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O + 1  $\mu$ l oligonucleótido marcado + 1  $\mu$ l de oligonucleótido complementario (exceso).

- Reacción: Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico ( $\text{HC}(\text{O})\text{OH}$ ) y se incuba 5 minutos a  $20^\circ\text{C}$ .
- Parada: Se añaden 180  $\mu\text{l}$  de tampón “HF-STOP” y se introduce en hielo.

#### **Modificación de las guaninas (figura IV.6).**

- Condiciones iniciales: 200  $\mu\text{l}$  de “tampón cacodilato” + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido marcado + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido complementario (exceso).
- Reacción: Se añade 1  $\mu\text{l}$  de DMS (dimetilsulfato,  $\text{SO}_4(\text{CH}_3)_2$ ), y se incuba 6 minutos a  $20^\circ\text{C}$ .
- Parada: se añaden 50  $\mu\text{l}$  de tampón “DMS-STOP” (ver composición mas abajo) y se introduce en hielo.

#### **Modificación de las bases pirimidínicas (figura IV.7).**

- Condiciones iniciales: 19  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido marcado + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido complementario (exceso).
- Reacción: Se añaden 30  $\mu\text{l}$  de hidrazina ( $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ ) fría, y se incuba 9 minutos a  $20^\circ\text{C}$ .
- Parada: Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de tampón “HF-STOP” y se introduce en hielo.

#### **Modificación de las citosinas.**

- Condiciones iniciales: 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaCl}$  5 M + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido marcado + 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido complementario (exceso).
- Reacción: Se añaden 30  $\mu\text{l}$  de hidrazina fría y se incuba 12 minutos a  $20^\circ\text{C}$ .
- Parada: Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de tampón “HF-STOP” y se introduce en hielo.

### **Precipitación y lavado (para todas las modificaciones).**

- a) Se añaden 750  $\mu\text{l}$  de etanol frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se deja en reposo durante 15 minutos a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta precipitación.
- b) Se centrifuga durante 15 minutos a 15.000 r.p.m. y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Después se elimina el sobrenadante libre de radiactividad.
- c) Se añaden 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{AcONa}^+$  0,3 M frío y 750  $\mu\text{l}$  de EtOH frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); Se deja en reposo durante 15 minutos a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta precipitación.
- d) Se repite el apartado b).
- e) Se lava el precipitado con 180  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% en agua fría sin deshacerlo; Se centrifuga durante 2 minutos a 15000 r.p.m.; Se elimina el sobrenadante tras comprobar la ausencia de radiactividad en el mismo.
- f) Se repite el lavado.
- g) Se deja secar bajo presión reducida.

### **Excisión del ADN modificado.**

- a) Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de disolución acuosa de piperidina (1/10) y se incuba durante 30 minutos a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  en baño maría.
- b) Se enfría en hielo y se congela unos minutos a  $-78^{\circ}\text{C}$ . La piperidina se elimina por liofilización. Se lava el liofilizado dos veces con 50-100  $\mu\text{l}$  de agua.
- c) Se lleva a cabo una nueva dilución con volumen final apropiado para la carga de la cantidad necesaria de cada muestra en el gel de secuencia.

### **Gel de secuencia**

Para la separación de las fracciones de ADN generadas de distinta longitud, se cargan las muestras modificadas mediante cada una de las cuatro reacciones descritas sobre gel de acrilamida al 24% desnaturalizante (8 M en urea) y se deja migrar a 3000 V y 40 W (placas de 45 cm de longitud) durante el tiempo necesario para una buena

separación de las fracciones más grandes sin eliminación de las más pequeñas. Aunque se puede optimizar mediante variación del porcentaje de acrilamida en el gel, en estas experiencias el 24% es la concentración más conveniente.

Para la detección de las fracciones separadas se utilizan técnicas como la autoradiografía y “PhosphorImager” que detectan y permiten visualizar las especies radiactivas presentes en el gel. Su empleo se detalla en la descripción de la electroforesis.

### **Disoluciones.**

#### Tampón “cacodilato”:

250  $\mu$ l de tampón cacodilato sódico-HCl (pH 8,0) 1 M.

10  $\mu$ l de EDTA 0,5 M.

4,74 ml de H<sub>2</sub>O.

#### Tampón “DMS-STOP”:

2,5 ml de AcO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup> 3 M.

350  $\mu$ l de  $\beta$ SH (mercaptoetanol) 14,3 M (puro).

50  $\mu$ l de DEXTRAN T40 de 10 g/l.

2,1 ml de H<sub>2</sub>O.

#### Tampón “HF-STOP”:

500  $\mu$ l de AcO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup> 3 M.

1  $\mu$ l de EDTA 0,5 M.

12,5  $\mu$ l de DEXTRAN T40 de 10 g/l.

4,486 ml de H<sub>2</sub>O.

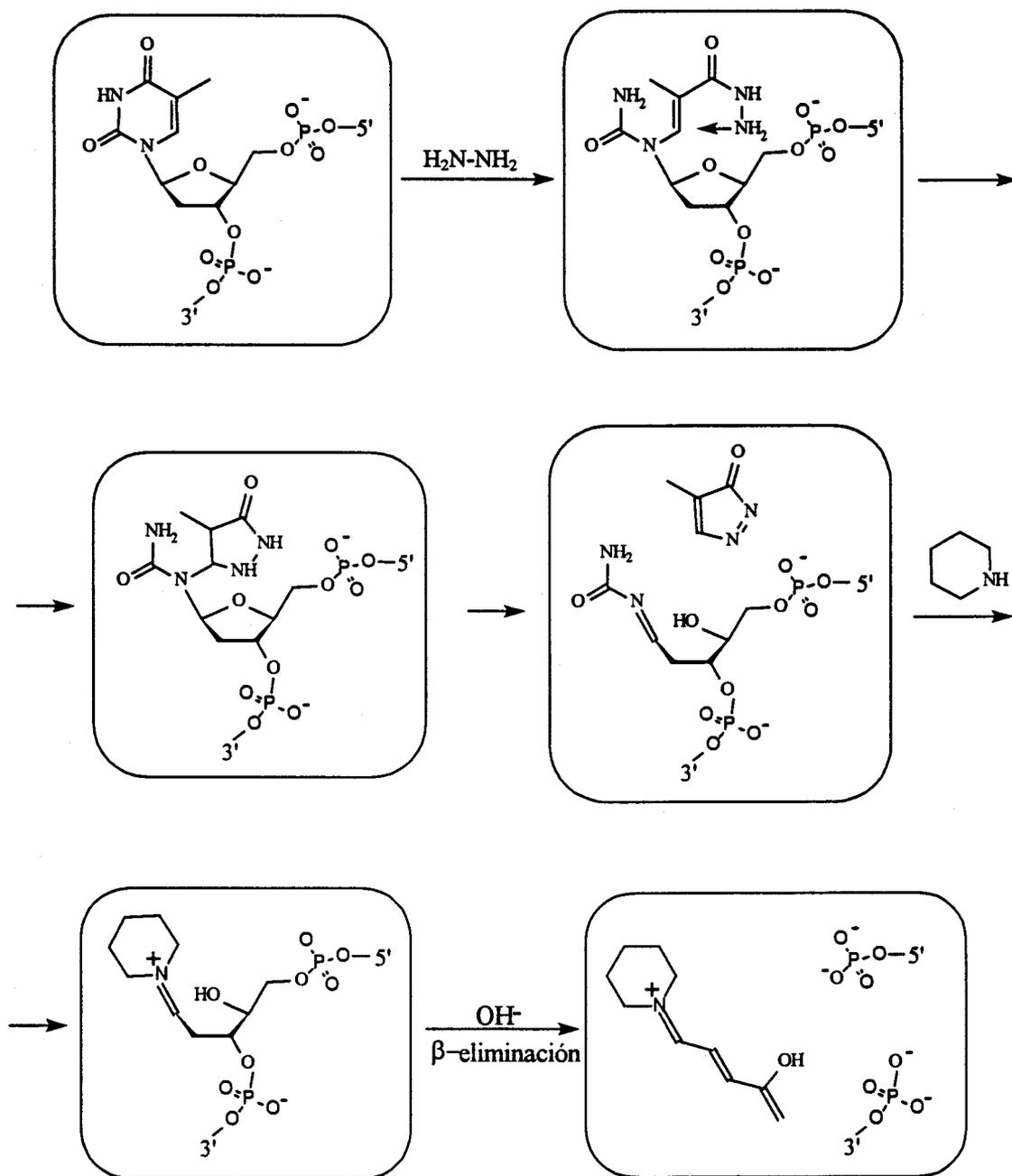


Figura IV.6: Secuenciación de las timinas por reacción sucesiva con Hidrazina y piperidina. La Hidrazina modifica y elimina las bases, y la piperidina cataliza la reacción de  $\beta$ -eliminación de los fosfatos.

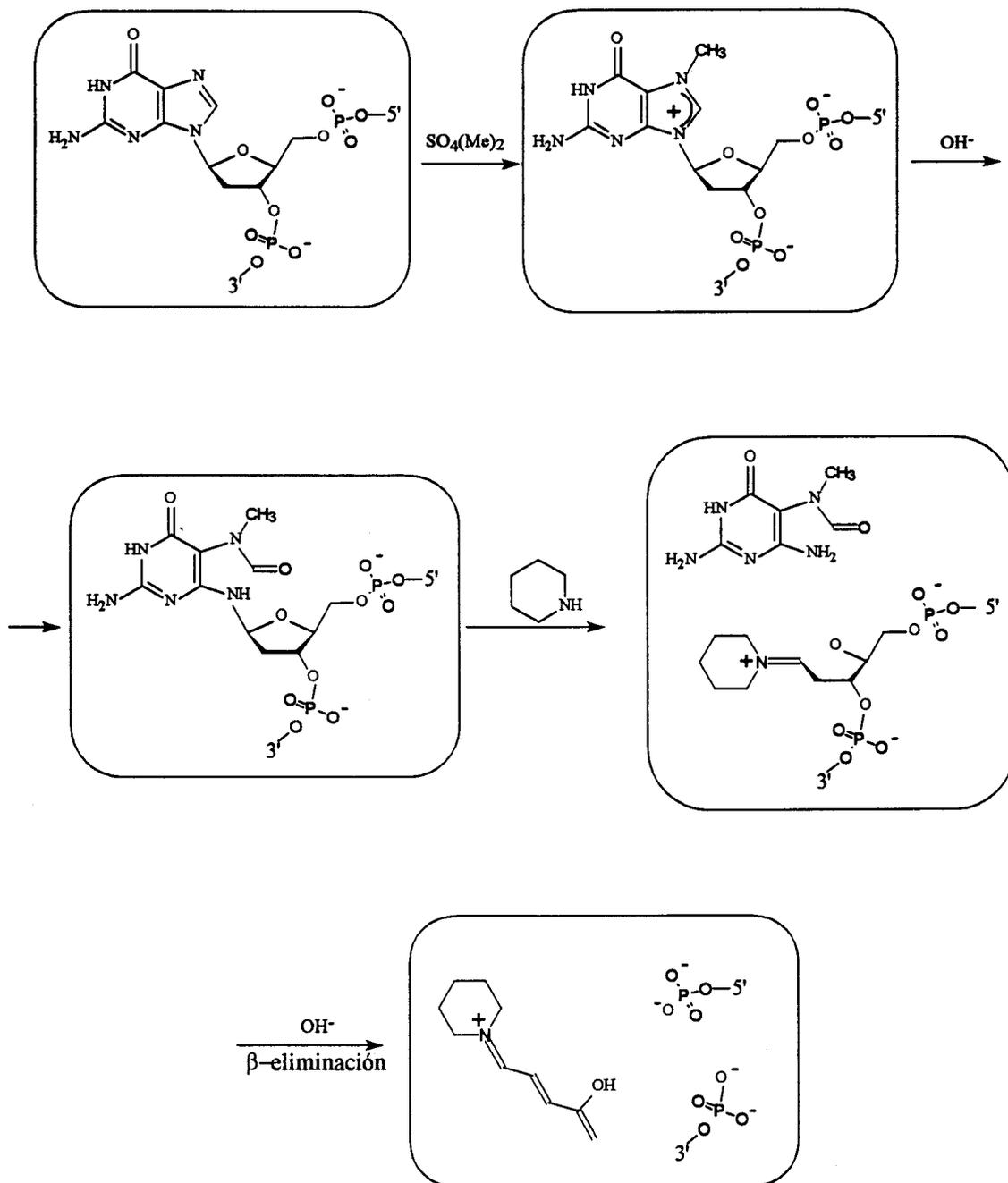


Figura IV.7: Secuenciación de las guaninas por reacción con dimetilsulfato y piperidina. El DMS rompe la aromaticidad de las guaninas por metilación de su  $\text{N}^7$ , y la piperidina las elimina del ADN y cataliza el  $\beta$ -eliminación de los fosfatos.

## 8.- ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo presentan longitudes comprendidas entre 6 y 30 bases. En experiencias tales como secuenciaciones, purificaciones a pequeña escala, seguimiento de cinéticas de reacción y movilidad electroforética se ha utilizado la electroforesis como técnica de visualización de los resultados. En todos los casos se ha recurrido a la electroforesis en gel de acrilamida, técnica de gran poder de resolución, que permite la separación de especies que se diferencian únicamente en un nucleótido y la recuperación de productos extremadamente puros y reutilizables para cualquier otro propósito. En combinación con el marcado radiactivo, la electroforesis en gel de acrilamida es un método muy potente para la detección y purificación, en su caso, de especies presentes en cantidades mínimas.

La acrilamida es una molécula capaz de polimerizarse, en presencia de radicales, produciendo largas cadenas. En presencia de N,N'-metilenbisacrilamida (o bisacrilamida), estas cadenas se cruzan formando un gel cuya porosidad y densidad dependen de la concentración en acrilamida y de la proporción de bisacrilamida presentes.

La electroforesis se basa en la migración de las moléculas cargadas en el seno de un campo eléctrico hacia el polo de signo contrario. Si se colocan dos electrolitos idénticos cada uno en contacto con un extremo del gel de acrilamida y se hace pasar una corriente eléctrica entre ellos, las moléculas polinucleotídicas depositadas en el gel en el extremo en contacto con el polo negativo tenderán a alejarse de este migrando necesariamente a través del gel. Las moléculas mas cargadas (los polinucleótidos mas largos) sentirán una mayor atracción, por lo que migrarán mas rápido. Sin embargo, los polinucleótidos con una forma determinada, curvados, en doble hélice o modificados, podrán migrar de modo diferente a pesar de tener la misma carga o longitud, dependiendo de la porosidad del gel. Para la interpretación correcta de los resultados se evalúan ambos factores.

A continuación se detallan los productos y disoluciones utilizadas en este trabajo:

**Productos químicos:**

Acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida en polvo.

Persulfato de amonio (PSA) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)  
(polimerización del gel).

Tris, ácido bórico y EDTA en polvo (para el electrolito).

Azul de bromofenol y xilen-cianol, (marcadores de migración).

Dimetilformamida (DMF) y sucrosa (tampones de carga).

Silicona "Sigmacote" (para aplicar sobre las placas de vidrio, lo que facilita la deposición del gel).

Urea (agente desnaturalizante que se incluye en los geles cuando se necesita).

**Preparación de disoluciones:**

TBEx20: Se utiliza para la preparación del electrolito. Contiene Tris (1,78 M), ácido bórico (1,78 M) y EDTA (40 mM), y se usa normalmente diluida entre 20 y 40 veces (TBEx1 y TBEx0,5 , respectivamente) respecto a la disolución madre.

Preparación: 216 g. de Tris + 110 g. de ácido bórico + 14,9 g. de EDTA; se añade agua hasta que se alcanza un volumen final de 1 l. Por último se filtra.

Polímero: La proporción acrilamida:bisacrilamida utilizada es de 30:1. Para geles desnaturalizantes se añade urea en la cantidad indicada.

Preparación: 120 g. de Acrilamida + 4 g. de bisacrilamida + 240 g. de urea (8 M, para geles desnaturalizantes) + 25 ml de TBEx20 (para concentración final TBEx1); se añade agua hasta que se alcanza un volumen final de 0,5 l. Finalmente se filtra.

### Tampón de carga:

Para condiciones desnaturizantes: DMF, con los marcadores de migración.

Para condiciones no desnaturizantes: sucrosa al 50% en agua, con Tris 40 mM y EDTA 4 mM. Se utiliza diluida entre 4 y 5 veces respecto a la original.

### **Experiencias en condiciones desnaturizantes**

Las condiciones desnaturizantes se alcanzan añadiendo al gel urea 8 M, lo que impide la formación de pares de bases. Como se ha indicado antes, la concentración de acrilamida del 24% resulta ideal para la longitud de los oligonucleótidos utilizados y tiene la ventaja adicional sobre geles más diluidos de que no necesita secarse antes de la lectura del resultado. Mediante esta técnica se llevan a cabo secuenciaciones, seguimiento de cinéticas de reacción, y purificación de oligonucleótidos tras ligación o formación de aductos bifuncionales intercatenarios de *trans*-DDP. Para la migración se empleó una potencia constante (40 W para geles de 24x40 cm y 20 W para geles de 24x20 cm).

### **Experiencias en condiciones no desnaturizantes**

Este tipo de geles se utiliza en experiencias en las que se mantiene el emparejamiento de bases, tales como comprobaciones de la estabilidad de la doble hélice respecto a la temperatura en distintas condiciones o de la cantidad de una disolución de un oligonucleótido que se añade a la disolución de su complementario para la formación de doble hélice sin que resulte exceso de ninguno de los dos. Otras experiencias consisten en el análisis de la formación y estabilidad de triples hélices a distintas temperaturas. En aquellas experiencias en las que resulta importante la temperatura de migración para evitar la desestabilización de las dobles y triples hélices, el voltaje utilizado se mantiene lo suficientemente bajo para que el gel no se caliente. (~ 10 V/cm).

### **Lectura de resultados**

Los resultados se obtienen mediante la técnica de Phosphorimager (Molecular Dynamics) con el programa ImageQuant versión 3.3, que permite la cuantificación de las bandas en caso necesario. Esta técnica es muy rápida y sensible y permite la obtención de resultados en el mismo día. En las ocasiones en que se creyó oportuno se hizo posteriormente una autoradiografía del gel sobre una película sensible a la radiación gamma emitida por el  $^{32}\text{P}$ .

## 9.- CURVAS DE FUSIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La determinación de la “temperatura de fusión” ( $T_m$ ) de una estructura secundaria de un ácido nucleico resulta una buena medida de su estabilidad termodinámica y de la intensidad de las diversas fuerzas que participan en la formación de dicha estructura (vease el capítulo II.B).

Las características espectroscópicas de los ácidos nucleicos facilitan dicha determinación, puesto que la formación de estructuras secundarias distintas produce variaciones (en general, incrementos) de la absorbancia en el ultravioleta (260 nm). La curva resultante de la representación gráfica de la absorbancia respecto a la temperatura se denomina “curva de fusión”, y se acepta que la  $T_m$  de una estructura secundaria de un ácido nucleico es la temperatura a la que la mitad de las moléculas se encuentran en dicha estructura y la otra mitad desestructuradas. En la figura IV.8-a se aprecia un modelo de curva de fusión resultante de la medida de  $T_m$ . La forma de la curva se debe al carácter cooperativo de las uniones de hidrógeno entre cadenas polinucleotídicas, originado a su vez por las interacciones de apilamiento entre bases de cada cadena.

El problema más común en este tipo de medidas consiste en que los extremos de la curva no son en realidad horizontales, sobre todo en casos de poca cooperatividad. Lo mismo acontece si los valores de  $T_m$  son muy pequeños, caso en el que la curva se inclina a temperaturas muy bajas y el plano inferior apenas existe. En estos casos, el cálculo de la temperatura de fusión se realiza mediante derivación matemática de la curva de fusión (fig. IV.8-b), apareciendo un máximo correspondiente al punto de inflexión existente en la curva de fusión. Esta medida de la  $T_m$  es la que hemos utilizado en todos los casos en los trabajos aquí presentados.

Las experiencias de determinación de  $T_m$  constituyen medidas termodinámicas del sistema, por lo que este ha de encontrarse en equilibrio en cada punto en que se tomen las medidas. Para asegurar esta circunstancia se determina la curva de fusión tanto en sentido ascendente como descendente (subiendo y bajando posteriormente la

temperatura). Si las dos curvas se superponen, la medida corresponde a un estado de equilibrio. Si se obtiene una curva de histéresis, la medida realizada no resulta termodinámicamente válida.

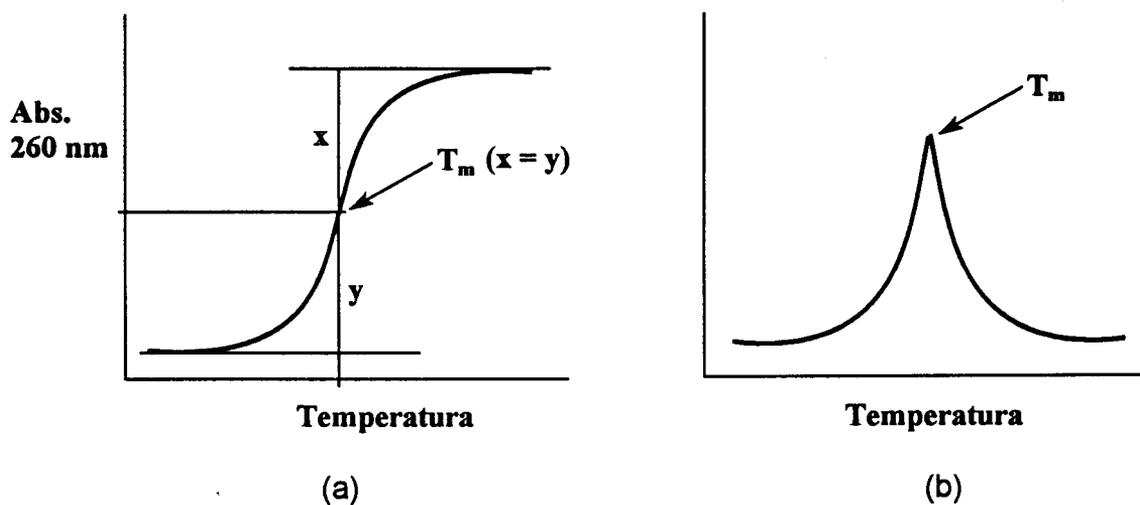


Figura IV.8: (a): Curva de fusión de una doble o triple hélice de ADN, con el cálculo de la temperatura de fusión. (b): Primera derivada de una curva de fusión. La determinación de la temperatura de fusión es más evidente que para la curva original.

Este último problema se acentúa en el caso de las triples hélices, puesto que su cinética de formación es mucho más lenta que la de las dobles hélices (entre  $10^2$  y  $10^4$  veces) y muy variable según la secuencia de la cadena Hoogsteen (Xodo et al., 1997). El problema cinético se agrava por la tendencia de ciertas cadenas ricas en pirimidinas a la formación de otras estructuras, lo que ralentiza aún más (a veces incluso impide) la formación de la doble o triple hélice. Esta tendencia puede modularse por las condiciones del medio (pH y naturaleza de los iones).

El estado inicial del sistema posee gran importancia y resulta necesario asegurar la formación correcta de la doble o triple hélice. Para ello se han calentado las mezclas oportunas de oligonucleótidos hasta temperaturas mucho más altas que su  $T_m$ , con lo que se asegura la ausencia de estructuración previa alguna; luego se deja enfriar la disolución

muy lentamente en el mismo baño maría, primero a temperatura ambiente y luego a 4 °C, durante al menos doce horas.

Por último, en el tratamiento de las curvas de fusión de las triples hélices hay que tener en cuenta que la diferencia entre las  $T_m$  de triple y doble hélice ha de ser elevada (al menos 10 °C) con objeto de que se visualicen ambas transiciones. No obstante, en el caso de dobles hélices muy largas (se favorecería el incremento de dicha diferencia) ocurre un incremento pequeño de la absorbancia debida a la liberación de la cadena Hoogsteen respecto a la de la mezcla y respecto al aumento debido a la disociación de la doble hélice. En consecuencia se visualiza mucho peor la citada transición triple hélice-doble hélice/cadena simple y se produce un error considerable en la medida de  $T_m$ . En este trabajo se han determinado las curvas de fusión de la doble y triple hélice en las mismas condiciones experimentales y se han substraído posteriormente los valores correspondientes.

## 10.- CINÉTICA DE CONVERSIÓN DE LOS ADUCTOS MONOFUNCIONALES *trans*-DDP-ADN EN ADUCTOS BIFUNCIONALES

La cinética de conversión de aductos monofuncionales de *trans*-DDP en aductos bifuncionales se ha estudiado en sistemas distintos: en cadena simple, doble hélice y triple hélice, a distintas condiciones de salinidad, con aductos *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>7</sup>-G)Cl]<sup>+</sup> y *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>3</sup>-C)Cl]<sup>+</sup> y, en el caso de la doble hélice, a distintas longitudes de la misma y distintos grados de platinación. A pesar de estas circunstancias, se ha mantenido un protocolo similar en todos los casos.

A continuación se exponen las etapas seguidas para la realización de este tipo de experiencias, su objetivo y las condiciones generales utilizadas. Las condiciones particulares de cada experimento en casos concretos aparecen en la discusión de los proyectos que se presentan mas adelante.

### Etapas

- 1.- Mezcla e incubación de las cadenas para la formación de la doble o triple hélice. Esta operación se realiza en presencia de NaCl, que impide la progresión de la reacción de conversión en aductos bifuncionales y facilita la formación de las hélices. Por las mismas razones, la incubación finaliza con el sistema introducido en hielo.
- 2.- Precipitación con etanol al 75% para eliminar el cloruro. Debe lavarse hasta eliminación del NaCl, ya que su presencia alteraría de forma apreciable la cinética del proceso.
- 3.- Incubación en tampón adecuado. Se recogen partes alícuotas por duplicado a cada tiempo previsto según la cinética de la reacción.

4.- La mitad de las partes alicuotas se tratan con tiourea con el fin de eliminar y cuantificar los aductos monofuncionales por comparación con las muestras no tratadas. Se añade el tampón y se carga en gel de acrilamida al 24% desnaturizante.

5.- Lectura y cuantificación de los resultados.

Los aductos monofuncionales del *trans*-DDP añaden una carga positiva al oligonucleótido, y los bifuncionales añaden dos. Así, las especies platinadas migran más lento que las no modificadas, diferenciándose fácilmente. Sin embargo, los aductos monofuncionales originan una disminución de la movilidad del oligonucleótido muy similar a la de los aductos bifuncionales intracatenarios, por lo que debe utilizarse la reacción con la tiourea, que elimina los aductos monofuncionales y permite así la diferenciación clara de los bifuncionales intracatenarios. En el caso del *trans*-DDP, un tratamiento de 10 minutos con tiourea 10 mM a 37 °C basta para eliminar cuantitativamente los aductos monofuncionales (Eastman y Barry, 1987).

Los aductos bifuncionales intercatenarios se diferencian bien por electroforesis en gel desnaturizante ya que la existencia de un enlace covalente entre dos cadenas impide la migración independiente de estas, y la migración resulta mucho más lenta que en el caso de las cadenas simples, platinadas o no. Por otra parte, aductos intercatenarios distintos de un mismo oligonucleótido, incluso procedentes de un mismo aducto monofuncional, migran a distinta velocidad, hecho que permite el conocimiento del número de este tipo de aductos que se forma y el porcentaje de cada uno.

# **1<sup>er</sup> PROYECTO**

**Reactividad Química de los Aductos  
Monofuncionales del Transplatino en  
ADN Platinado de Forma Específica.**

## RESUMEN

La primera etapa de la reacción entre el ADN y la droga antitumoral cisplatino o su isómero clínicamente inactivo transplatino supone la formación de aductos monofuncionales. La mayor parte de los aductos de cisplatino así formados reacciona luego rápidamente (vida media inferior a unas horas) para formar aductos bifuncionales intra o intercatenarios. En general, se acepta que la actividad clínica del cisplatino está relacionada con la formación de aductos bifuncionales. En lo que respecta al transplatino, los estudios se diferencian en lo que se refiere a la velocidad de reacción de los aductos monofuncionales y a la naturaleza de las uniones bifuncionales. Tratando de explicar estas diferencias, se han preparado en este trabajo dobles cadenas de ADN que contienen un solo aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> y entre cero y dos aductos monofuncionales [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> en posiciones definidas. En estas dobles cadenas, el aducto inerte [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> imita la presencia de aductos monofuncionales de transplatino. Mostramos así que la reacción de los aductos monofuncionales de transplatino se ve seriamente afectada por la presencia de otros aductos y por la longitud de las dobles hélices. Estos descubrimientos indican que las discrepancias que aparecen en la literatura científica están originadas por la naturaleza de las muestras platinadas (razón molar de platino enlazado por nucleótido, longitud de los fragmentos de ADN). La conclusión general de este trabajo está relacionada con la evolución de la transformación de aducto monofuncional a bifuncional. En concreto, los aductos monofuncionales ADN-transplatino, a nivel bajo de platinación, evolucionan lentamente (vida media mayor de 24h) hacia uniones bifuncionales mayoritariamente intercatenarias. Este hecho explica en parte la ineficacia clínica del transplatino.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se acepta que la actividad antitumoral del cisplatino está relacionada con su capacidad de formación de uniones bifuncionales con el ADN, en su mayoría aductos bidentados N<sup>7</sup>,N<sup>7</sup> entre residuos púricos adyacentes (Lepre y Lippard, 1990; Reedijk, 1992; Sip y Leng, 1993). Se conoce también que el isómero *cis* posee propiedades de droga antitumoral, mientras que el isómero *trans* (*trans*-DDP, *trans*platino) carece de actividad biológica, aunque reaccione con el ADN (Lepre y Lippard, 1990; Lippert, 1996). En efecto, ambos isómeros interaccionan con el ADN en un proceso en dos etapas, que supone en primer lugar la formación de aductos monofuncionales (preferentemente en el N<sup>7</sup> de las guaninas) que evolucionan luego a uniones bifuncionales. Se cree que la naturaleza y cinética de formación de las uniones bifuncionales producidas por cada derivado están relacionadas con su actividad biológica diferente (Lepre y Lippard, 1990; Dalbiès et al., 1996; Lippert, 1996). Alternativamente, la reacción selectiva y eliminación de los aductos monofuncionales del *trans*-DDP por el glutatión influye en la ineficacia del *trans*-DDP, hecho consecuente con la observación de que la disminución de los niveles de glutatión aumenta la sensibilidad de células cancerosas del ovario hacia el *trans*- pero no hacia el *cis*-DDP (Richon et al., 1987). Esta ineficacia podría explicarse también por la diferente facilidad de reparación o los distintos efectos de las uniones del *cis*- y del *trans*- sobre la replicación o transcripción, relacionados con su capacidad para distorsionar la doble hélice de ADN o para promover la interacción del ADN platinado con proteínas (Lepre y Lippard, 1990; McA'Nulty y Lippard, 1995).

Es evidente que el conocimiento detallado de la interacción de cada isómero con el ADN resulta necesario para el análisis posterior de los factores que determinan la acción biológica de dichos isómeros. Por otra parte se desconocen los modos de unión del *trans*platino *in vivo*, mientras que la experimentación *in vitro* ha dado lugar a conclusiones divergentes sobre la naturaleza y cinética de formación de los aductos (Eastman y Barry, 1987; Eastman et al., 1988; Bancroft et al., 1990; Boudvillain et al., 1995). Recientemente se han descubierto nuevos compuestos de platino que muestran

actividad antitumoral (Hollis et al., 1989; Farrell et al., 1992; Coluccia et al., 1993; Farrell, 1996). Algunos de ellos tienen propiedades estructurales (geometría *trans*, por ejemplo) que violan las reglas clásicas que relacionan actividad y estructura en los complejos de platino(II). Aunque aún no se ha establecido de manera definitiva que el ADN sea la diana biológica de todos estos compuestos, su actividad antitumoral puede deberse a modos diferentes de interacción con el ADN y/o alteraciones estructurales de la doble hélice de ADN. Por todo ello resulta importante la identificación de los aductos resultantes de la platinación del ADN y el estudio de los factores que gobiernan su formación y/o eliminación. De este modo se conocerían las vías de intervención de los complejos de platino(II) en actividades biológicas específicas. En este trabajo se demuestra que la platinación de una doble hélice de ADN en lugares específicos influye sobre la formación de aductos bifuncionales de *trans*-DDP a partir de los monofuncionales. Los resultados clarifican las discrepancias entre estudios previos dedicados al conocimiento de la naturaleza y cinética de formación de los aductos del *trans*-DDP (Eastman y Barry, 1987; Eastman et al., 1988; Bancroft et al., 1990; Boudvillain et al., 1995).

## EXPERIMENTAL

### General

Los oligodesoxiribonucleótidos procedentes del Instituto Pasteur (Francia) se purificaron según protocolos ya publicados (Boudvillain et al., 1995). Las secuencias de los oligonucleótidos aparecen en la figura IV.9). La T4 polinucleótido Kinasa y la T4 ADN ligasa proceden de New England Biolabs. Los productos radiactivos se adquirieron en Amersham. El yoduro de iododietilentriaminplatino(II) (dien-Pt) es un obsequio del Prof. Lippert (Dortmund, Germany). Los reactivos restantes se adquirieron en la firma Merck excepto el *trans*-DDP que procede de Johnson Matthey (U.K.).

### Reacción de platinación.

El *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> y el [Pt(dien)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> se obtuvieron mediante reacción del *trans*-DDP o del dien-Pt con 0,9 o 1,8 equivalentes, respectivamente, de

AgNO<sub>3</sub> a 37°C durante unas 15 horas y en la obscuridad. El oligonucleótido con un solo aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> se obtuvo haciendo reaccionar el oligonucleótido A (la secuencia del oligonucleótido A se da en la figura IV.9) (27 μM) con *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> a una razón de platino/oligonucleótido de 4,4 durante 10 minutos a 37°C en NaClO<sub>4</sub> 10 mM y tampón acetato 10 mM a pH 3,6 (Brabec y Leng, 1993). El oligonucleótido platinado se purificó por cromatografía FPLC de intercambio aniónico fuerte (columna Mono Q HR 5/5, Pharmacia) con NaOH 10 mM y un gradiente de NaCl comprendido entre 0,2 y 0,8 M. La fracción recogida se dializó durante 2 horas a 4 °C frente a 3 veces 500 ml de NaCl 0,1 M y tampón fosfato 5 mM a pH 7,5, y se conservó a -20 °C. El oligonucleótido B (24 μM) se hizo reaccionar con 2,5 equivalentes de [Pt(dien)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> durante 10 minutos a 37 °C en NaClO<sub>4</sub> 10 mM y tampón acetato 10 mM a pH 3,6. El producto crudo se introdujo en una columna MonoQ y se eluyó con un gradiente del 20 al 80 % de tampón B durante 40 minutos, (tampón B: NaOH 10 mM y NaCl 1 M; tampón A: NaOH 10 mM y NaCl 10 mM; flujo: 1 ml/min). Se recogieron cuatro fracciones correspondientes a los oligonucleótidos con dos aductos monofuncionales de [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> o un solo aducto monofuncional en una de las dos guaninas o ningún aducto, respectivamente. Las fracciones se neutralizaron posteriormente con ácido acético y Tris-HCl y se desalaron en columnas Sep-Pak C18 (Waters). La naturaleza y posición de los aductos en los oligonucleótidos platinados se comprobaron del modo descrito previamente (Lemaire et al., 1991; Brabec y Leng, 1993).

### Ligación.

Los oligonucleótidos de 26 nucleótidos de longitud, platinados o no, se prepararon por ligación dirigida de los oligonucleótidos A o B, platinados o no, con los correspondientes oligonucleótidos de 6 nucleótidos de longitud a o b fosforilados en el extremo 5' (ver figura IV.9) usando T4 ADN Ligasa y procedimientos establecidos

## Oligonucleótidos

|              |                             |
|--------------|-----------------------------|
| A (20 bases) | 5'-d(CCTCTCTATAACAATGTACTT) |
| B (20 bases) | 5'-d(CACACCAAGTACATTGTATA)  |
| a (6 bases)  | 5'-d(GGTGTG)                |
| b (6 bases)  | 5'-d(GAGAGG)                |

## Preparación de las dobles hélices platinadas

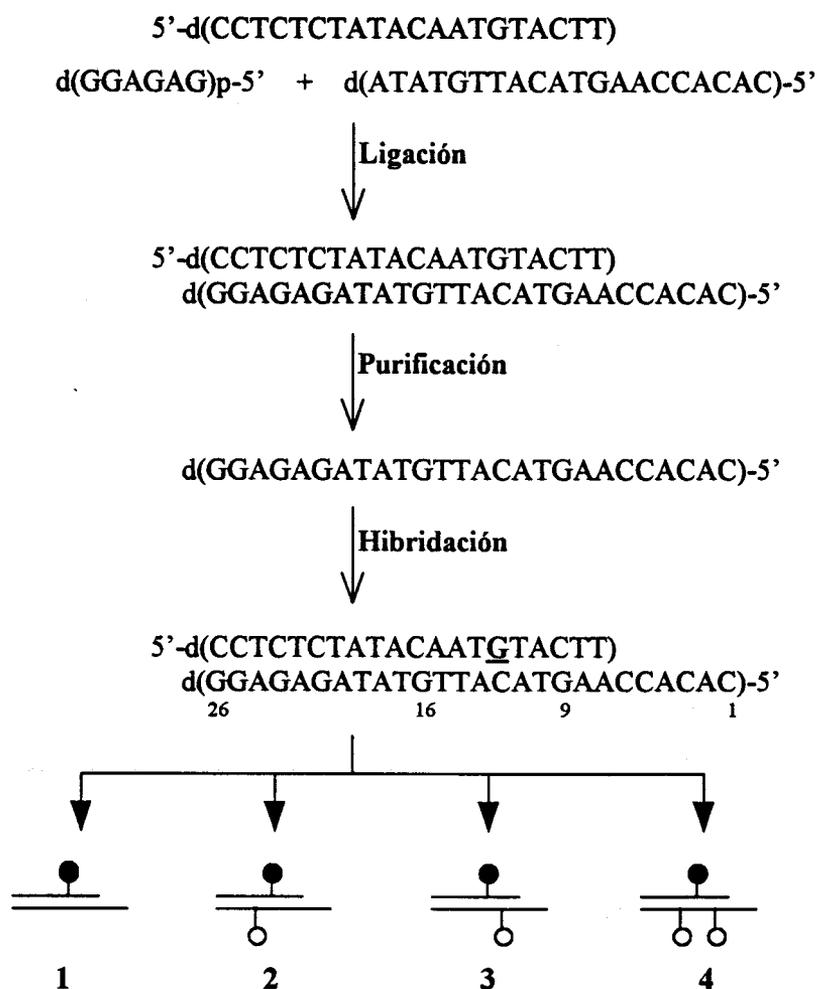


Figura IV.9: Secuencias de los oligodesoxiribonucleótidos (arriba) y esquema del procedimiento utilizado para la preparación de las dobles cadenas (abajo). Para mayor claridad, solo se indican los pasos de la preparación de una de las dobles hélices. Las cuatro dobles hélices platinadas se representan esquemáticamente, correspondiendo los símbolos blancos y negros a los aductos monofuncionales  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$  y  $\text{trans}-[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$ , respectivamente. La G subrayada de la cadena superior indica la localización del aducto  $\text{trans}-[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$ .

(Maniatis et al., 1982). Los productos así ligados se purificaron después por electroforesis en gel de poliacrilamida al 24%, en condiciones desnaturalizantes.

### **Conversión de los aductos monofuncionales de transplatino**

El oligonucleótido A (2,7  $\mu\text{M}$ ) con un solo aducto monofuncional *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  se unió con su cadena complementaria de 26 nucleótidos, platinada o no, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego 60 minutos a 0 °C. Las cuatro dobles hélices (55 pmol) marcadas en el extremo 5' de la cadena superior o de la inferior se precipitaron con etanol y se resuspendieron después en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaClO}_4$  100 mM, EDTA 0,2 mM y tampón fosfato 3 mM a pH 7,5. Las mezclas se incubaron a 37 °C. A tiempos determinados se recogieron partes alícuotas, que se trataron con tiourea (10 mM) durante 15 min a 37°C para eliminar los aductos monofuncionales (Eastman y Barry, 1987) y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 24% en condiciones desnaturalizantes. Los tiempos de vida media se dedujeron por cuantificación de la intensidad de las bandas con un Phosphorimager (Molecular Dynamics) usando el programa Imagequant, versión 3.3, para el procesamiento de los datos y asumiendo una cinética de pseudo primer orden (Bancroft et al., 1990). Las dobles cadenas con un aducto bifuncional intercatenario resultado del cierre del aducto monofuncional *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  se purificaron por electroforesis (poliacrilamida al 24%) en condiciones desnaturalizantes. Las bases implicadas en el aducto intercatenario se identificaron por secuenciación de Maxam-Gilbert de las dobles cadenas purificadas marcadas en el extremo 5' de la cadena inferior o de la superior (Lemaire et al., 1991; Dalbiès et al., 1994).

### **Modificaciones químicas**

Las modificaciones químicas se realizaron sobre los oligonucleótidos en cadena simple radiomarcados en el extremo 5' o sobre las dobles hélices radiomarcadas sobre el extremo 5' superior o inferior. Las modificaciones de los oligonucleótidos con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) o dietilpirocarbonato (DEPC) se realizaron según lo previamente

descrito (Marrot y Leng., 1989), con las modificaciones que siguen: Las condiciones de salinidad, concentración y temperatura fueron idénticas a las de los experimentos de cinética, y el tiempo de reacción se redujo a 8 minutos. Los productos de reacción se trataron con piperidina en las condiciones usuales y se separaron usando un gel de secuenciación de poliacrilamida al 24%.

## RESULTADOS

### Síntesis de las dobles hélices platinadas

Estudios anteriores han demostrado que los aductos monofuncionales *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  y  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$  distorsionan la doble hélice del ADN, en posiciones próximas a los aductos (Brabec et al., 1992, 1994). En este trabajo se ha tratado de conocer la medida en que diversos aductos monofuncionales del platino(II) próximos entre sí interfieren mutuamente en el proceso de formación de aductos bifuncionales. Con este objetivo se prepararon cuatro dobles hélices platinadas con un solo aducto *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  en la cadena superior y ninguno, uno o dos aductos  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$  en la inferior. Los aductos inertes de dien-Pt así formados pueden considerarse modelos de los aductos monofuncionales del transplatino. En la parte baja de la figura IV.9 se muestra una representación esquemática de estas dobles cadenas platinadas.

La síntesis de las dobles hélices platinadas se llevó a cabo según el esquema siguiente. Los dos oligonucleótidos de 20 nucleótidos de longitud A y B, complementarios sobre 14 bases, (Figura IV.9) se diseñaron para que contuvieran solo una y dos guaninas, respectivamente. Estas guaninas pueden platinarse selectivamente a pH ácido. Así, se hizo reaccionar el oligonucleótido B con  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ; los diferentes productos de la mezcla de reacción (el oligonucleótido con un solo aducto en una guanina, en la otra, en las dos o sin aducto) se purificaron luego por FPLC con columna de intercambio aniónico fuerte y bajo condiciones desnaturalizantes. Cada

oligonucleótido purificado se hibridó con el A, y su extremo 3' se extendió por ligación con el oligonucleótido de 6 nucleótidos de longitud b (ver figura 1 para la síntesis de la doble cadena que contiene solo un aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>). Los cuatro oligonucleótidos de 26 nucleótidos de longitud se purificaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes y luego se emparejaron con el oligonucleótido A modificado con un aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>. A las cuatro dobles hélices platinadas se les llamó 1, 2, 3, y 4.

### Pruebas químicas sobre las dobles hélices platinadas

En una etapa previa a la medida de la velocidad de la reacción de formación de aductos bifuncionales desde monofuncionales de *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, se comprobó la conformación de las cuatro dobles hélices mediante el uso de las sondas químicas tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) y dietilpirocarbonato (DEPC). Estas sondas son hiperreactivas con el ADN distorsionado, en comparación con sus actividades frente a ADN-B (revisiones generales: Palecek et al., 1990; Nielsen, 1990). Tras el tratamiento de las dobles hélices con las sondas químicas, los fragmentos resultantes de la rotura con piperidina se analizaron por secuenciación en gel de electroforesis. A modo de ilustración, en la figura IV.10 se muestran los resultados de la reacción entre el OsO<sub>4</sub> y la cadena inferior de las cuatro dobles cadenas, y las reacciones de secuenciación de Maxam-Gilbert. Las pistas (G+A) confirman la localización de los aductos (se sabe que la platinación en el N<sup>7</sup> de los residuos de guanina disminuye la hidrólisis ácida de las purinas (Johnson et al., 1985), y por lo tanto, las bandas correspondientes a las guaninas platinadas no se ven). De este modo se demuestra (figura IV.11) que los aductos originan distorsiones, pero las dobles hélices no se desnaturalizan. En la doble hélice 4, que contiene tres aductos, la ausencia de reactividad de la T10, la reactividad débil de la A11 (cadena inferior), y la reactividad nula de sus bases complementarias (cadena superior) concuerdan con el apareamiento de las bases. En las cadenas inferiores de las dobles hélices 1 y 2, e incluso de la doble hélice no platinada (no mostrada), la reactividad del DEPC con la A7 y A8 no contradice la desnaturalización local. El DEPC posee un tamaño demasiado grande, comparado con el tamaño del surco mayor del

ADN-B, como para reaccionar con las adeninas (Nielsen, 1990). Esto no ocurre con las dos adeninas situadas en el extremo de las dobles hélices.

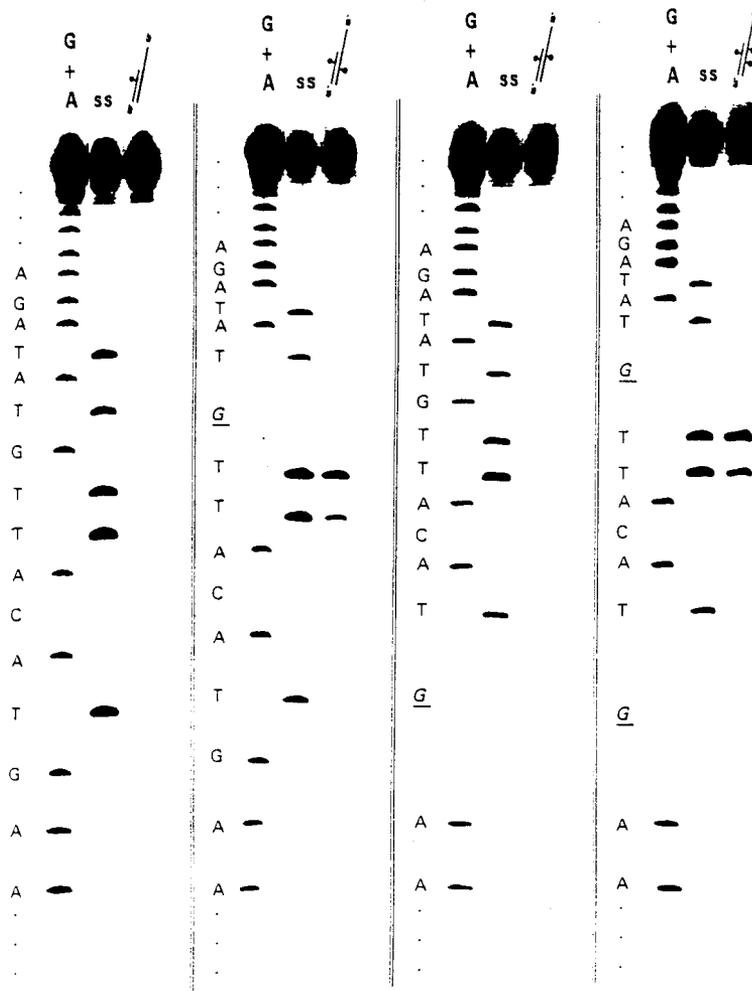


Figura IV.10: Reactividad de las dobles hélices (1-4) frente a las sondas químicas  $\text{OsO}_4$  y DEPC. Corte específico, por acción de la piperidina, de las cadenas modificadas con el  $\text{OsO}_4$  en las dobles hélices platinadas. Las pistas (G+A) se refieren a las reacciones de secuenciación de Maxam-Gilbert de las cadenas inferiores marcadas en 5', utilizadas como testigo. Las pistas (ss) se refieren a la reacción del  $\text{OsO}_4$  con la cadena inferior correspondiente de cada doble hélice. Al lado de las pistas se dan las secuencias de los oligonucleótidos, con las G platinadas subrayadas. Conviene subrayar que los aductos de platino no se eliminaron antes de la electroforesis y por tanto la migración de los fragmentos que contienen a los aductos es más lenta que la de los no platinados

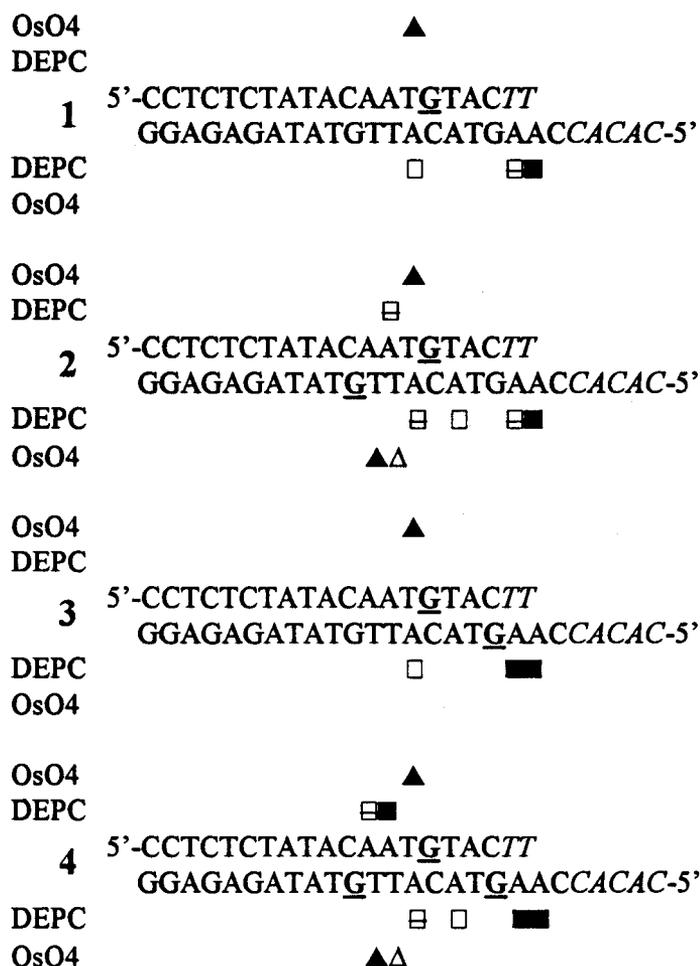


Figura IV.11: Reactividad de las dobles hélices (1-4) frente a las sondas químicas OsO<sub>4</sub> y DEPC. Resumen de la hiperreactividad al OsO<sub>4</sub> y al DEPC. Los símbolos “lentos”, “rallados” y “vacíos” indican hiperreactividad fuerte, media y baja, respectivamente. En los residuos escritos en cursiva (las últimas dos T del lado 3' en la cadena superior y los últimos cuatro residuos del lado 5' en la cadena inferior) no se pudo evaluar la hiperreactividad frente a OsO<sub>4</sub> y DEPC a causa de la resolución del gel. Los residuos subrayados y en negrita indican la posición de los aductos de platino.

### Conversión de los aductos monofuncionales del transplatino

Las dobles hélices platinadas (1-4), marcadas en el extremo 5' de la cadena superior, se incubaron a 37 °C. A tiempos determinados se recogieron partes alícuotas que se incubaron con tiourea, para la eliminación de los aductos monofuncionales, (Eastman y Barry, 1987), y se analizaron luego por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Como se ha mostrado previamente, los oligonucleótidos que contienen

aductos intracatenarios o intercatenarios se separan fácilmente por esta técnica (Gaucheron et al., 1991; Payet et al., 1993). En función del tiempo, la intensidad de la banda inicial (cadena superior de las dobles hélices) decrece, mientras aparecen nuevas bandas (figura IV.12). Los resultados son distintos en función de la naturaleza de la doble hélice. En el caso de la 1, solo aparece una banda nueva, que migra mucho más lentamente que la inicial. Este hecho indica la formación de un aducto intercatenario como mínimo. En lo que respecta a la 2, aparecen dos bandas nuevas: una de ellas migra más lentamente que la inicial, lo que indica la formación de uno o varios aductos intracatenarios, mientras que la segunda migra mucho más lentamente, debido a la formación de un aducto intercatenario. En las dobles cadenas 3 y 4, aparecen dos bandas

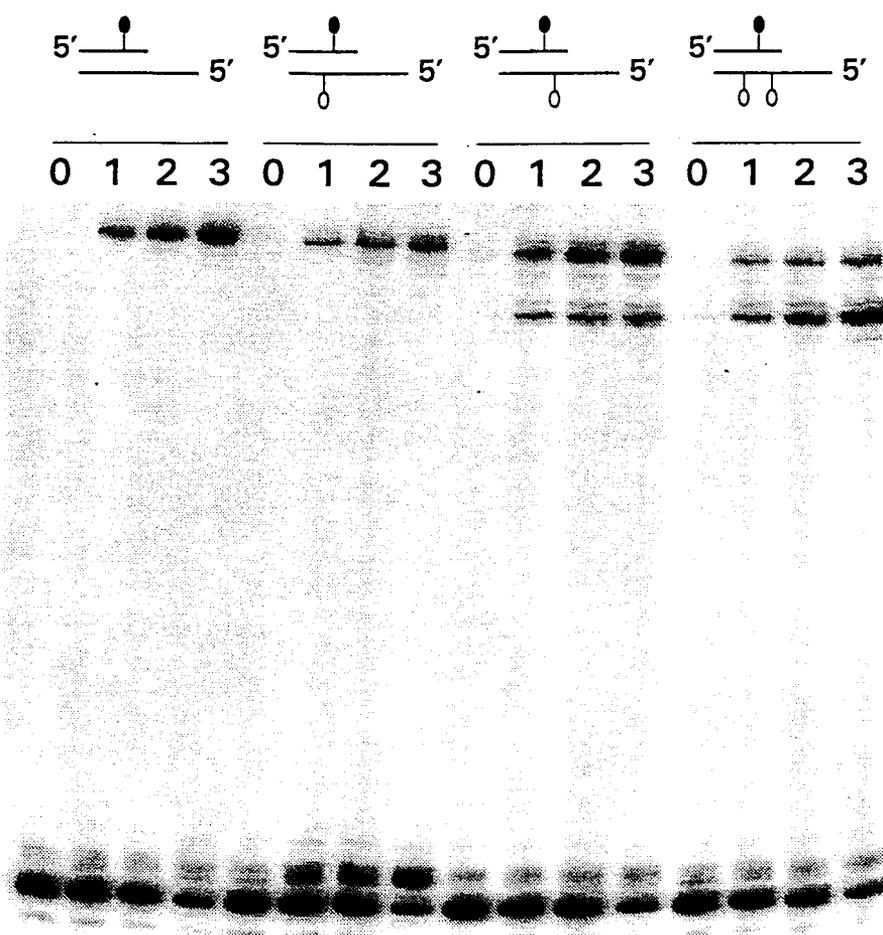


Figura IV.12: Cinética de transformación del aducto monofuncional  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  en las cuatro dobles hélices (20 pares de bases). Autorradiograma de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 24%. Las pistas 0-3 indican tiempos de incubación de 0, 9, 20 y 50 horas, respectivamente

nuevas que migran lentamente, y por lo tanto existen al menos dos tipos de aductos intercatenarios (Millard et al., 1991; Dalbiès et al., 1994).

Las velocidades de desaparición de los aductos monofuncionales  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  se han deducido a partir de las gráficas lineales del logaritmo de los porcentajes de  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  (calculados a partir de la razón de la intensidad de la banda correspondiente respecto a la intensidad total de las bandas de la pista) frente al tiempo de reacción. Las vidas medias del aducto en las cuatro dobles hélices son del mismo orden de magnitud (24 a 43 horas, ver tabla IV.1).

Como control, se realizó el mismo experimento con las cuatro dobles hélices marcadas en el extremo 5' de las cadenas inferiores. En este caso solo se detectaron bandas de migración lenta, indicadoras de la formación de aductos intercatenarios.

Tabla IV.1: Transformación de los aductos monofuncionales de transplatino en las dobles hélices<sup>a</sup>.

| <i>Doble hélice</i> | $t_{1/2}^b$ | <i>Doble hélice</i> | $t_{1/2}^b$ |
|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| 1                   | 43          | 3                   | 32          |
| 1'                  | 44          | 3'                  | 51          |
| 2                   | 26          | 4                   | 24          |
| 2'                  | 46          | 4'                  | 81          |

<sup>a</sup> Las cinéticas se midieron a 37°C en  $\text{NaClO}_4$  100 mM y tampón fosfato a pH 7,5. <sup>b</sup> Los valores de  $t_{1/2}$  (horas) corresponden a los tiempos de desaparición de la mitad de los aductos monofuncionales. Los errores son del 10%. Las dobles cadenas (1-4 y 1'-4') contienen 20 y 26 pares de bases, respectivamente.

### Identificación de los aductos intercatenarios

La naturaleza de los aductos intercatenarios en las cuatro dobles hélices se determinó por reacciones de secuenciación de Maxam-Gilbert. El tratamiento con piperidina posterior al ataque con hidracina provoca la rotura del enlace fosfodiéster próximo a los residuos pirimidínicos, incluyendo la citosina platinada (Comess et al., 1990; Dalbiès et al., 1994). Mediante migración electroforética se detectarán todas las

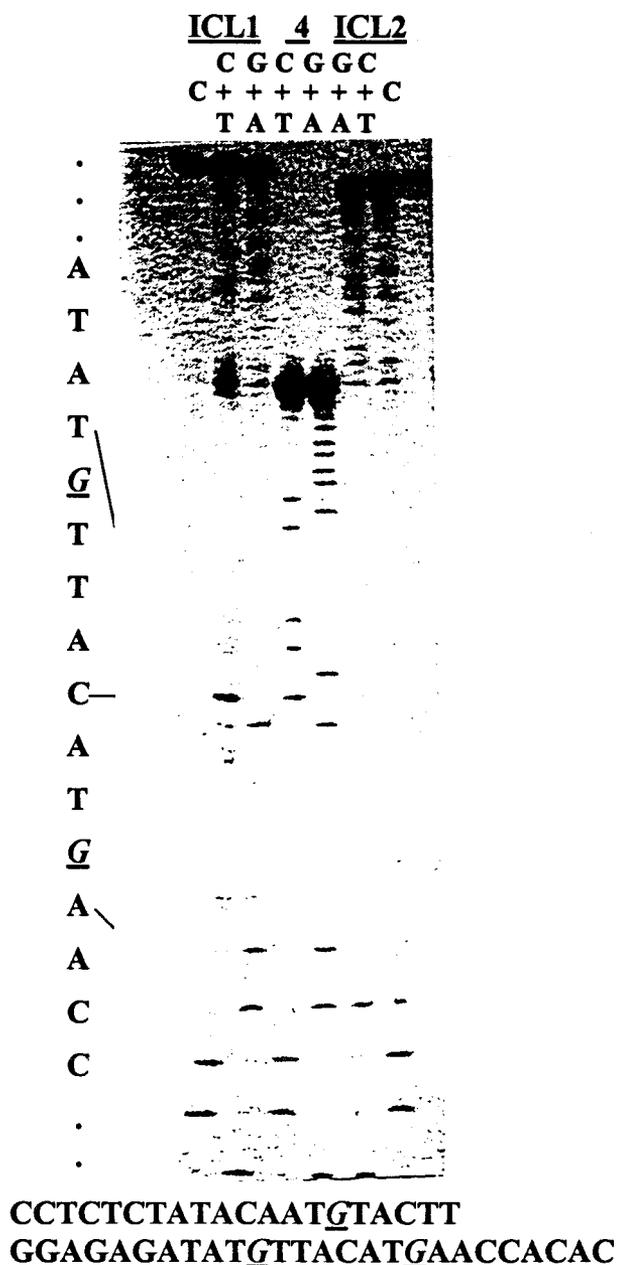


Figura IV.13: Identificación de los aductos intercatenarios producto de la reacción de cierre de los aductos monofuncionales *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> en la doble hélice 4. La secuenciación de Maxam-Gilbert se realizó sobre las dobles hélices purificadas, con un aducto intercatenario y marcadas en el extremo 5' de la cadena inferior. (ICL<sub>1</sub>) e (ICL<sub>2</sub>) indican los aductos intercatenarios superior e inferior que se muestran en la Figura IV.12, respectivamente. El (4) indica la doble cadena sin dicho aducto. Las pistas (C+T) y (G+A) indican las reacciones con hidracina y ácido fórmico, respectivamente. Las pistas (C) indican las dobles hélices sin tratar.

bases pirimidina (incluso la platinada) en las posiciones previstas; Las correspondientes al otro lado de la cadena no se detectarán, puesto que no se ha eliminado el aducto intercatenario. En la figura IV.13 se muestran los resultados correspondientes a la doble hélice 4 (marcada en el extremo 5' de la cadena inferior), aunque los experimentos se han realizado con las cuatro dobles hélices. Tras la incubación de la doble hélice 4, se forman dos productos de migración lenta, ICL<sub>1</sub> e ICL<sub>2</sub>, siendo el primero el de migración más lenta. Ambos productos se eluyeron del gel y trataron con hidracina o ácido fórmico. Como se aprecia en la figura IV.13 (pista C+T izquierda), se detectan todas las bandas hasta la de la C12. Por tanto, en el caso del ICL<sub>1</sub>, la guanina del antiguo aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> (cadena superior) está unida a su citosina complementaria, resultado que se confirma por tratamiento con ácido fórmico (pista G+A). Un análisis similar del ICL<sub>2</sub> muestra que el aducto se forma con la guanina del antiguo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> y la base A8 de la cadena inferior (asumiendo que la platinación se lleva a cabo en el N<sup>7</sup>, lo que provoca una estabilización de la base en medio ácido). Puede ocurrir que la platinación se produzca en el N<sup>1</sup> del residuo A7 (lo que mantendría al residuo sensible al tratamiento ácido). El análisis de los otros productos de migración lenta formados en las dobles hélices 1 a 3 confirma que solo se forman estos dos tipos de aductos intercatenarios.

### **Transformación de los aductos monofuncionales de transplatino en dobles hélices mayores**

La posición de los aductos, bastante cerca del extremo 3' de las dobles hélices, podría generar un aumento de las distorsiones estructurales inducidas e influir así sobre la velocidad de formación y naturaleza de los aductos bifuncionales. Se ha estudiado la formación de los aductos bifuncionales con las mismas dobles hélices platinadas pero tras la elongación de la cadena superior (que se consiguió mediante ligación dirigida de las cadenas superiores con el oligonucleótido a marcado con <sup>32</sup>P; figura IV.9). Las cuatro dobles hélices de 26 pares de bases (1'-4') se incubaron a 37 °C. A continuación se tomaron partes alícuotas a tiempos distintos que se analizaron por electroforesis en gel desnaturalizante (figura IV.14). En comparación con la de las dobles hélices más cortas,

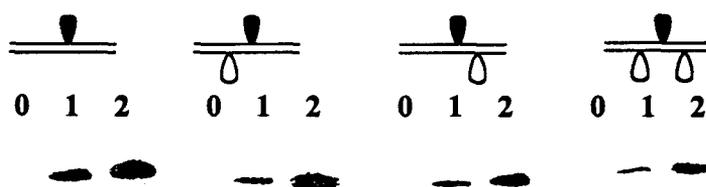


Figura IV.14: Cinéticas de transformación del aducto monofuncional  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  en las cuatro dobles hélices de 26 pares de bases. Autorradiograma de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 24%. Las pistas 0-2 indican tiempos de incubación de 0, 24 y 48 horas, respectivamente.

la velocidad de desaparición de  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  no cambia significativamente, excepto en el caso de la doble hélice 4', que contiene tres aductos (tabla IV.1). Por otra parte, existen dos diferencias principales: (i) Solo se detecta un tipo de aducto intercatenario, y éste resulta de la reacción de  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  con su base complementaria. (ii) En la doble hélice 4' se forman los aductos intracatenarios, aunque de modo más lento que los intercatenarios.

## DISCUSIÓN

Entre los objetivos de este trabajo destaca la comprensión de las diferencias existentes en la formación de los aductos bifuncionales por la reacción del transplatino con ADN (Eastman y Barry., 1987; Eastman et al., 1988; Bancroft et al, 1990; Boudvillain et al., 1995). Estas diferencias no conciernen al primer paso de la reacción

(formación del aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>), sino al segundo (la velocidad de reacción del aducto monofuncional para dar los bifuncionales, y la naturaleza de estos).

En un primer trabajo (Eastman y Barry., 1987; Eastman et al., 1988), se platinó el ADN de espermatozoos de salmón a  $r_b = 0,01$  ( $r_b$  es la razón molar de platino enlazado por nucleótido). La muestra se digirió enzimáticamente, y tras separación por HPLC, se analizaron los productos por absorción atómica y RMN. La transformación de los aductos monofuncionales en bifuncionales alcanzó el 80% en 48 horas. Los aductos se formaron entre una guanina y una citosina (50%), entre dos guaninas (40%), y entre una guanina y una adenina (10%). En otro trabajo (Boudvillain et al., 1995), un fragmento de ADN de restricción (164 pares de bases) platinado a  $r_b = 0,005$  se analizó por absorción atómica y técnicas bioquímicas. Tras 24 horas de reacción, un 80% de los aductos eran monofuncionales y los bifuncionales eran intercatenarios. En un tercer trabajo (Bancroft et al, 1990), una muestra de ADN de eritrocitos de pollo se digirió enzimáticamente produciéndose dobles cadenas de 20 a 60 pares de bases que se plataron a  $r_b = 0,07$ . La cinética correspondiente se estudió por RMN de <sup>195</sup>Pt, comprobándose el alto valor de la velocidad de reacción de los aductos monofuncionales (vida media de 3,1 horas). Los resultados están de acuerdo con la formación de aductos intracatenarios 1,3 o formados a distancias aún mayores.

De lo expuesto en el párrafo anterior puede deducirse que el origen de las diferencias apreciadas entre las reacciones de formación de aductos bifuncionales, radica principalmente en el tamaño del ADN y en el grado de platinación, y no depende en un porcentaje tan importante de las técnicas empleadas. Con objeto de comprobar esta hipótesis, se ha llevado a cabo en nuestro trabajo un estudio de la reactividad del aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> en varios oligonucleótidos de doble hélice que difieren entre sí en su longitud (20 o 26 pares de bases), posición del aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> en la cadena superior, y naturaleza de la cadena inferior, que no está platinada o contiene uno o dos aductos monofuncionales inertes [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> que modelizan en cierto modo la presencia de aductos monofuncionales del transplatino.

La conformación de las dobles hélices más cortas se ha estudiado por reactividad frente a OsO<sub>4</sub> y DEPC. Estas sondas químicas son muy sensibles a la presencia de conformaciones distintas de la B en el ADN. La doble hélice 1 contiene un solo aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>. Las bases adyacentes al aducto, a los lados 5' y 3', son timinas. El OsO<sub>4</sub> reacciona con la T en 5', pero no con la base en 3'. Se obtuvieron resultados similares con dobles hélices que contienen un solo aducto monofuncional de *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> (Brabec et al., 1992). Este hecho justifica, *a posteriori*, el uso del [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> como modelo de aductos monofuncionales de transplatino. En el caso de que las dobles hélices contengan los aductos *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup>, se producen distorsiones mayores pero diferentes según la localización de los aductos. Aún así, la falta de reactividad del par A.T en posición 10 y la reactividad débil del par T.A en posición 11 eliminan la posibilidad de una separación de las cadenas en las cuatro dobles hélices.

Si se consideran las cinéticas en las dos dobles hélices (20 y 26 pares de bases) que contienen un solo aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, la velocidad de reacción del aducto monofuncional del transplatino y la naturaleza de la unión bifuncional son independientes de la longitud de la cadena. La reacción es lenta (velocidad media 43 horas, ver tabla IV.1) y produce un solo tipo de aducto bifuncional de carácter intercatenario entre la guanina y su citosina complementaria, lo que confirma los resultados previos (Brabec y Leng, 1993). La información recogida de este trabajo y los resultados previos (Boudvillain et al, 1995) permiten concluir que tras 24 horas de reacción entre el transplatino y ADN en doble hélice, a baja r<sub>b</sub>, la mayoría de los aductos son monofuncionales, y los restantes son intercatenarios. Bajo las mismas condiciones experimentales, la reacción del *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> es rápida (vida media de 2 horas) y produce principalmente aductos bidentados N<sup>7</sup>,N<sup>7</sup> entre bases púricas adyacentes (revisiones generales: Lepre y Lippard, 1990; Reedijk, 1992; Sip y Leng, 1993). Se trata, pues, de una diferencia primordial en el comportamiento de ambos isómeros respecto al ADN. De los datos conocidos sobre la actividad antitumoral del cisplatino (Lepre y Lippard, 1990; McA'Nulty y Lippard, 1995), principalmente aquellos que relacionan su eficacia terapéutica con la formación de aductos bifuncionales (Fichtinger-Schepman et

al., 1990, 1995), y teniendo en cuenta la inactividad antitumoral del dien-Pt, que solo forma aductos monofuncionales, puede concluirse que la ineficacia clínica del transplatino se debe al menos parcialmente a la transformación lenta de sus aductos monofuncionales con el ADN en bifuncionales. En procesos *in vivo*, la reacción de formación de aductos intercatenarios se ve obstaculizada por la presencia de glutatión, que, como es sabido, reacciona con rapidez con los aductos monofuncionales del transplatino (Eastman y Barry, 1987; Eastman et al., 1988; Bancroft et al., 1990).

Es también importante la consideración de las experiencias realizadas con las dobles hélices citadas incluyendo un aducto  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$  en la cadena inferior, localizado a 3 pares de bases del aducto *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  y en su lado 5', o a dos pares de bases y en el lado 3'. Los resultados son diferentes según sea la localización del aducto citado.

En el primer caso se forman aductos intra e intercatenarios en los dos tipos de doble hélice de longitud distinta, aunque su cantidad relativa depende de la longitud de las mismas. La formación de aductos intercatenarios se ve favorecida en la doble hélice más larga, mientras que su naturaleza es independiente de la longitud de la doble hélice (se forman entre las bases G y C complementarias entre si).

En el segundo caso no se forman aductos intracatenarios para ninguna de las longitudes de la doble hélice (20 o 26 pares de bases). Las distorsiones inducidas en las dobles cadenas por los dos aductos son tales que la formación de aductos intercatenarios es mayoritaria. Sorprendentemente, en la doble cadena más corta se forman dos tipos de aductos intercatenarios entre la guanina platinada en un principio (en la cadena superior) y su citosina complementaria o con una adenina localizada 3 o 4 pares de bases más lejos. El aducto a larga distancia refleja una apertura momentánea de la doble hélice y/o una estructura plegada que lleva al aducto monofuncional reactivo y a la adenina a la orientación y distancia adecuadas para reaccionar. Puesto que dicho aducto no se forma en la doble hélice más larga, parece probable una apertura momentánea de la doble hélice.

A partir de estos resultados para las dobles hélices que contienen dos aductos, *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> y [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup>, se concluye que la presencia de los dos aductos distorsiona a la doble hélice lo suficiente como para permitir la formación de varios tipos de aductos bifuncionales. Por tanto, los estudios comparativos entre la platinación *in vitro* e *in vivo* del ADN deben de realizarse a bajas r<sub>b</sub> con objeto de eliminar interacciones significativas entre aductos vecinos. Aunque esta conclusión es aplicable también al cisplatino, sus consecuencias se ven enmascaradas por el enlace preferencial del cisplatino con las series de G y la capacidad de los aductos monofuncionales para reaccionar rápidamente con residuos púricos adyacentes. En contraste, en el caso de una doble cadena con un solo aducto monofuncional, la velocidad de reacción para formar un aducto intracatenario en el sitio d(GTG) es muy lenta (vida media superior a de 20 horas) (Payet et al., 1993).

El último grupo de experimentos, que concierne a las dobles hélices con dos aductos [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup> en la cadena inferior, pone de manifiesto la importancia de los efectos conjugados de aductos vecinos en oligonucleótidos cortos. En las dobles hélices más cortas (20 pares de bases), solo se forman aductos intercatenarios a larga distancia, de modo preferente entre la guanina de la cadena superior y una adenina separada por 3 (o 4) pares de bases. En la doble hélice más larga, se detectan aductos intracatenarios e intercatenarios (entre la guanina y su citosina complementaria).

Los resultados presentados muestran que la reactividad química de los aductos del platino(II) puede modularse por factores que afectan a la conformación local y a la estructura dinámica de la doble hélice de ADN. La profundización en estos aspectos facilitará el diseño racional de nuevos derivados del platino(II) con propiedades terapéuticas. Entre los nuevos tipos de agentes antitumorales poseen especial interés los complejos dinucleares de platino, que muestran una gran actividad *in vitro* e *in vivo* contra varias líneas celulares tumorales (Farrell, 1993, 1996; Farrell et al., 1995). En esta clase de complejos dinucleares, los residuos de platino se unen por una cadena diamínica que, en contacto íntimo con la doble hélice, modifica localmente la estructura dinámica del ADN (Sip y Leng, 1993). La introducción de cambios en la naturaleza de los

complejos dinucleares de platino debería influir sobre la formación de aductos bifuncionales en la reacción entre el ADN y estos complejos.

## **2º PROYECTO**

# **Reactividad del ADN en Doble Hélice con Oligonucleótidos Modificados con Transplatino.**

## RESUMEN

En este trabajo se estudia la formación de aductos intercatenarios en triples hélices de ADN, formadas mediante la asociación del ADN en doble hélice y un oligonucleótido complementario con un aducto monofuncional de transplatino, de tipo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup>. La estabilidad térmica del ADN en triple hélice con una guanina platinada en la tercera cadena varía según la posición ocupada por dicha guanina en el oligonucleótido. Esta dependencia es demostrada en este trabajo en modelos en los que el aducto monofuncional de transplatino se ha sustituido por otro de dien-Pt. La reacción de formación de aductos intercatenarios (ICL) se ha estudiado en función de diversos parámetros. La velocidad de conversión del aducto monofuncional en bifuncional intercatenario depende de la naturaleza del aducto, con una influencia leve de su posición en la cadena Hoogsteen. El aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> se transforma más rápidamente que el *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, disminuyendo la velocidad de conversión de *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> con el aumento de la concentración de NaCl en el medio. Estos resultados adquieren especial relevancia cuando se refieren al uso potencial de oligonucleótidos platinados en los procesos de modulación de la expresión genética.

## INTRODUCCIÓN

En la bibliografía reciente aparecen numerosos trabajos dedicados al estudio de oligonucleótidos capaces de reconocer específicamente secuencias de un ADN en doble hélice mediante la formación de triples hélices. Uno de los objetivos principales de estos trabajos es la utilización de oligonucleótidos en la modulación de la expresión génica, conocido como estrategia antigén (Miller, 1996; Giovannangeli y Hélène, 1997; Shafer, 1998). Una de las dificultades principales de la citada estrategia radica en la escasa estabilidad termodinámica de la triple hélice y el consiguiente desplazamiento de los oligonucleótidos enlazados por la maquinaria celular. Entre los métodos que tratan de aumentar la fuerza de la interacción del oligonucleótido se destaca el que propone el enlace previo de un grupo reactivo con el oligonucleótido, que produciría luego una reacción reversible con el ADN diana (Thuong y Hélène, 1993; Plum et al., 1995). Entre los agentes que pueden reaccionar espontáneamente con el ADN se han utilizado con éxito derivados del platino (II) (Gruff y Orgel, 1991). En concreto se ha demostrado que oligonucleótidos que contienen un aducto monofuncional de transplatino interactúan con las dobles hélices complementarias y que los aductos monofuncionales reaccionan luego para formar aductos intercatenarios (Colombier et al., 1996).

Se han obtenido previamente resultados alentadores utilizando una secuencia homopirimidina con un solo aducto monofuncional, *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> (Colombier et al., 1996). En este trabajo se analiza con mayor detalle la reacción de formación de los aductos intercatenarios. Los resultados se han extendido a otra secuencia que contiene varias purinas, tratando de resolver la problemática siguiente: a) Posible aumento de la estabilidad térmica de la triple hélice por la presencia de un aducto monofuncional de transplatino. Es evidente que este aducto aporta carga positiva, que contribuye a la disminución de las repulsiones entre los esqueletos fosfodiéster cargados negativamente en las tres cadenas. b) Dependencia de la reactividad del aducto monofuncional de su propia posición en el oligonucleótido. c) Naturaleza de la especie reactiva en el proceso de conversión del aducto monofuncional en intercatenario.

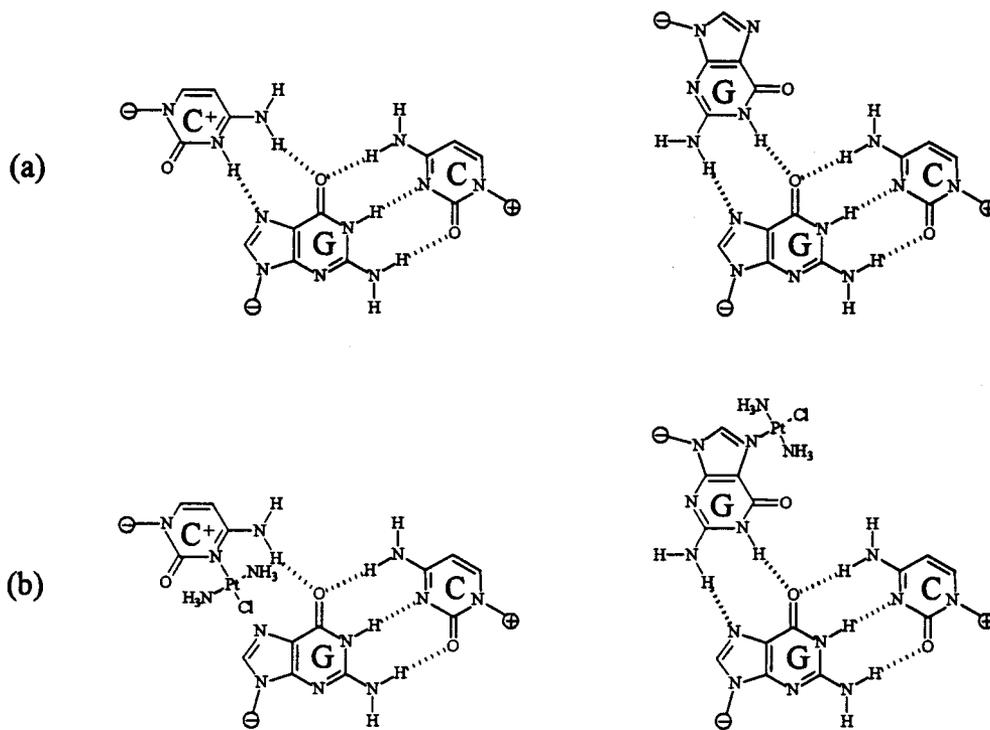
## EXPERIMENTAL

### General

Los oligodesoxiribonucleótidos empleados en este trabajo se adquirieron en Eurogentec y se purificaron según se ha descrito previamente (materiales y métodos). Sus secuencias son las indicadas en la figura IV.15. A las triples hélices obtenidas mezclando cantidades equimolares de la doble hélice A con los oligonucleótidos 1 o 2 o de la doble hélice B con los oligonucleótidos 3 o 4 se las denomina A.1, A.2, B.3 y B.4, respectivamente. El transplatino procede de Johnson Matthey (U.K.), y el ioduro de iododietilentríamínplatino(II) (dien-Pt) es una donación del Prof. Reedijk (Leiden, Países Bajos). La T4 Polinucleótido Kinasa es de New England Biolabs. Los productos radiactivos son de Amersham. Los productos químicos restantes se adquirieron en Sigma, excepto la acrilamida que procede de Appligene.

### Platinación de los oligonucleótidos

Las reacciones de platinación se realizaron siguiendo los protocolos ya descritos en materiales y métodos con mínimas modificaciones. Para la preparación de los oligonucleótidos 1<sup>t</sup>, 2<sup>t</sup> y 3<sup>t</sup>, con el aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, se incubaron los oligonucleótidos 1, 2 y 3 (35 μM) con *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> (generado mediante reacción del transplatino con AgNO<sub>3</sub>, según lo indicado en materiales y métodos) a 37 °C en NaClO<sub>4</sub> 10 mM, tampón acetato 10 mM a pH 3,6. En el caso del oligonucleótido 1 se llevó a cabo la incubación con una razón platino/oligonucleótido  $r_i = 1,5$  durante 60 minutos, mientras que para los oligonucleótidos 2 y 3 se empleó la razón  $r_i = 4$  (30 minutos). El oligonucleótido 4<sup>t</sup> con el aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> se obtuvo por reacción del oligonucleótido 4 (42 μM) con *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> a  $r_i = 4$  durante 30 minutos a 37 °C en NaClO<sub>4</sub> 10 mM. Los oligonucleótidos platinados se purificaron por cromatografía FPLC de intercambio aniónico fuerte (columna MonoQ HR 5/5, Pharmacia) en NaOH 10 mM, con un gradiente de NaCl 0,3-1 M en 40 minutos. Los oligonucleótidos purificados se dializaron durante dos horas a 4 °C frente a un



1: 5'-TTTT<sup>m</sup>CTTTTGggggGT-3'

2: 5'-TTTT<sup>m</sup>CTTTTgggggGT-3'

A  $\left\{ \begin{array}{l} 5'-\text{CCACTTTTTTAAAGAAAAGGGGGACTGG}-3' \\ 3'-\text{GGTGAAAAATTTTCTTTCCCCCTGACC}-5' \end{array} \right.$

3: 5'-GTTTTTCTTTCTTTCTTT-3'

4: 5'-TTTTTCTTTCTTTCTTT-3'

B  $\left\{ \begin{array}{l} 5'-\text{GTCAGAAAAGAAAAGAAAAGAAACG}-3' \\ 3'-\text{CAGTCTTTTCTTTCTTTCTTTGC}-5' \end{array} \right.$

Fig. IV.15: Arriba: Tripletes de bases formados entre una pareja Watson-Crick C≡G y (a) una tercera base G o C (emparejamiento Hoogsteen) o (b) una base G o C modificada con transplatino. Abajo: Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo y sus abreviaturas. El símbolo "g" significa 7-deazaguanina, y "mC" 5-metilcitosina. Los símbolos en negrita indican las bases que se platinaron. Las bases subrayadas indican la zona de las dobles hélices A y B complementarias a los oligonucleótidos 1 y 2 o 3 y 4 respectivamente.

volumen de 3 x 500 ml de NaCl 0,1 M y tampón fosfato 5 mM a pH 7,5, y se conservaron a -20 °C.

Los oligonucleótidos **1<sup>d</sup>** y **2<sup>d</sup>**, con el aducto monofuncional  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$ , se obtuvieron por reacción de los oligonucleótidos **1** y **2** (35  $\mu\text{M}$ ) con  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  a  $r_i = 3$  o 1,2 respectivamente durante 10 minutos a 37 °C en  $\text{NaClO}_4$  10 mM y tampón acetato 10 mM a pH 3,6. Los oligonucleótidos platinados se purificaron por FPLC y las fracciones recogidas se neutralizaron con ácido acético y Tris-HCl y se desalaron posteriormente con columnas Sep-Pak C18 (Waters). La posición de los aductos se comprobó por la ausencia de reactividad entre dimetilsulfato (DMS) y las guaninas platinadas.

### Curvas de fusión

Se mezclaron los oligonucleótidos **1** y **2** con o sin aducto  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$  con su doble hélice correspondiente **A** en  $\text{NaClO}_4$  50 mM,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  10 mM y tampón fosfato 10 mM a pH 6,8, siendo la concentración de triple hélice igual a 1,5  $\mu\text{M}$ . Se calentó la mezcla a 50 °C durante 10 minutos y luego se la dejó enfriar lentamente durante unas quince horas hasta 4 °C. Se midió la absorbancia de la mezcla a 260 nm en función de la temperatura usando un espectrofotómetro Kontron Uvikon 923. El gradiente de temperatura fue de 0,15 °C/min. Se tomó como temperatura de fusión ( $T_m$ ) la temperatura correspondiente al máximo de la primera derivada de la curva de fusión.

### Conversión de los aductos monofuncionales de *trans*-DDP

Las terceras cadenas (cadenas Hoogsteen) con un solo aducto *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  o *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$ , marcadas ( $^{32}\text{P}$ ) en el extremo 5' (Gaucheron et al., 1991), se mezclaron con sus dobles hélices correspondientes (1,5  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron en NaCl 50 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos en hielo. Las triples hélices se precipitaron en etanol y se resuspendieron en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  10 mM, tampón fosfato 10 mM a pH 6,8 para las triples hélices **A.1<sup>t</sup>** y **A.2<sup>t</sup>** o

en 20  $\mu$ l de  $\text{NaClO}_4$  150 mM,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  5 mM, tampón acetato 5 mM a pH 5,0 para las triples hélices **B.3<sup>t</sup>** y **B.4<sup>t</sup>**. Las mezclas se incubaron a 25 °C o 37 °C. A tiempos determinados se recogieron alícuotas que se trataron en caso necesario con tiourea para eliminar los aductos monofuncionales (Eastman y Barry, 1987) y se analizaron por electroforesis en gel bajo condiciones desnaturalizantes (poliacrilamida al 24%, urea 8 M). La cuantificación de las bandas del gel se realizó en un Phosphorimager (Molecular Dynamics) con el programa ImageQuant versión 3.3.

## RESULTADOS

### Estabilidad térmica de las triples hélices platinadas.

Para estudiar el efecto de los aductos monofuncionales sobre la estabilidad térmica de las triples hélices, se hizo reaccionar a los oligonucleótidos Hoogsteen 1 y 2 (Fig. IV.15) con dien-Pt. El dien-Pt forma aductos monofuncionales estables  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$ . Diversos resultados han demostrado que estos aductos imitan en cierto modo a los aductos monofuncionales del transplatino (Brabec et al., 1992; 1<sup>er</sup> proyecto en esta tesis). En las triples hélices **A.1** y **A.2**, resultado de la interacción de los oligonucleótidos 1 o 2, respectivamente, con la doble hélice **A**, la cadena Hoogsteen se sitúa en el surco mayor de la doble hélice **A** en orientación paralela respecto a la cadena purina (Giovannangeli et al., 1992), de modo que el átomo  $\text{N}^7$  de sus guaninas no forma enlaces de hidrógeno (Fig. IV.15). Este hecho hace que la platinación del nitrógeno  $\text{N}^7$  de las guaninas no interfiere directamente con los enlaces de hidrógeno. Si las guaninas se sustituyen por 7-deazaguaninas se reduce el número de sitios reactivos con los complejos de platino(II) sin que varíen los emparejamientos de las bases, evitándose al mismo tiempo la autoasociación de los oligonucleótidos 1 y 2 (ver tetrahélices-G en el capítulo II). Estos experimentos no fueron realizados con las triples hélices **B.3** y **B.4**. La platinación del átomo  $\text{N}^3$  de una citosina da como resultado la pérdida de un enlace de hidrógeno (Fig. IV.15), y la desestabilización consiguiente de la triple hélice.

El oligonucleótido 2 contiene una guanina, que es la única nucleobase reactiva con el dien-Pt a pH ácido. En el oligonucleótido 2, que contiene dos bases guanina, la situada en posición 10 resulta mucho más reactiva que la correspondiente a la posición 15, como se aprecia claramente por la reacción del oligonucleótido platinado 1<sup>d</sup> con el DMS (Fig. IV.16). La platinación de la guanina impide la reacción del DMS con su nitrógeno N<sup>7</sup>, y por lo tanto no se produce el corte del ADN en esa posición al tratar con la piperidina (Lemaire et al., 1991). Aunque no se puede excluir totalmente la existencia de un efecto estructural, la platinación preferencial de la guanina G10 se debe probablemente a un efecto electrostático a lo largo de la cadena (Elmroth y Lippard, 1994, 1995; Saito et al., 1995; Reeder et al., 1996).

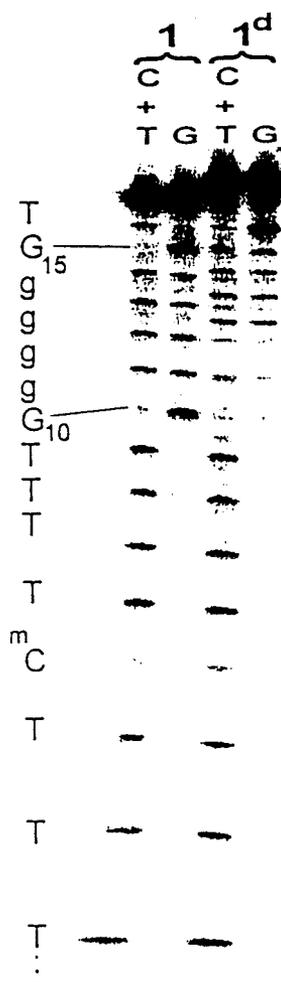


Fig. IV.16: Identificación de los productos platinados resultantes de la reacción del oligonucleótido 1 con el dien-Pt. Las pistas (C+T) y (G) se refieren a las reacciones de secuenciación de Maxam-Gilbert con hidrazina y dimetilsulfato, respectivamente. Las pistas 1 y 1<sup>d</sup> se refieren al oligonucleótido 1 con 0 o 1 aducto de platino, respectivamente.

Mediante medida de la absorbancia a  $\lambda = 260$  nm se ha estudiado la estabilidad térmica de las triples hélices A.1 y A.2 y de las correspondientes A.1<sup>d</sup> y A.2<sup>d</sup> que contienen un solo aducto monofuncional  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}(\text{dG})]^{2+}$ . En un trabajo reciente se ha verificado que la triple hélice resultante de la asociación de la doble hélice A y un oligonucleótido como el 1, en el que todas las deazaguaninas han sido sustituidas por guaninas, presenta un perfil de fusión bifásico con una primera disociación de la cadena Hoogsteen y disociación posterior de la doble hélice A (Giovannangeli et al., 1992). En la figura IV.17 se muestran solamente algunos datos relativos a la disociación de la cadena Hoogsteen. Las dos triples hélices A.1 y A.2 funden de modo cooperativo y poseen la misma  $T_m$  (30 °C). La triple hélice A.2<sup>d</sup> funde también de forma cooperativa y la  $T_m$  aumenta ligeramente (35 °C). La fusión de la triple hélice A.1<sup>d</sup> (guanina platinada en posición 10) se produce a menor temperatura y el proceso resulta de cooperatividad baja, lo que revela un fuerte efecto desestabilizador de la base platinada.

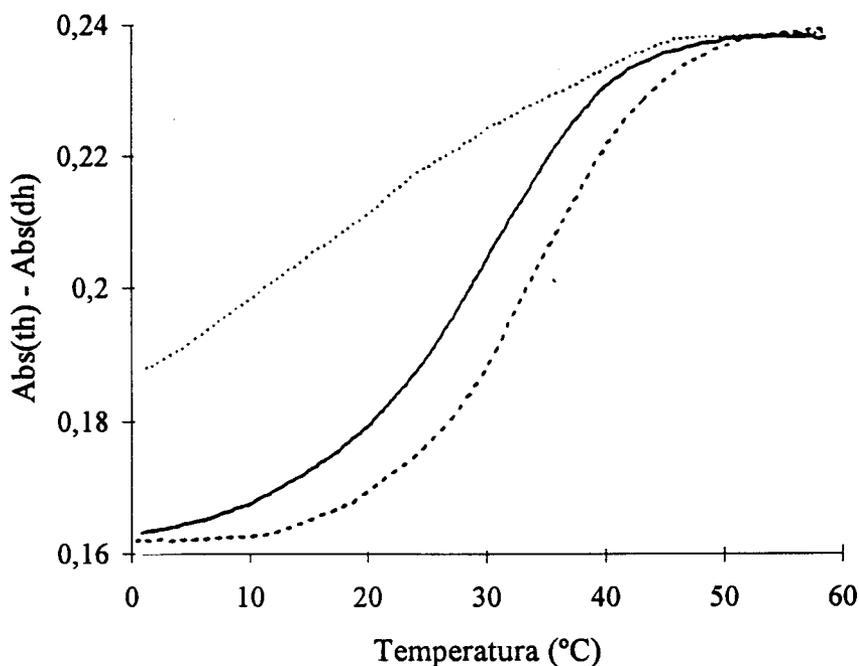


Fig. IV.17: Curvas de fusión de las triples hélices A.1 y A.2 con o sin un aducto  $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{dG})]^{2+}$ , en  $\text{NaClO}_4$  50 mM,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  10 mM, tampón fosfato 10 mM a pH 6,8. Para mayor claridad se ha substraído la absorbancia de la doble hélice de la correspondiente a la triple hélice. (—), triple hélice A.1; (...), triple hélice A.1<sup>d</sup> con un aducto en G10; (---), triple hélice A.2<sup>d</sup> con un aducto en G15. La curva de fusión de la triple hélice A.2 es idéntica a la de la triple hélice A.1, y por lo tanto no se incluye en el gráfico.

Finalmente, se ha estudiado también la estabilidad térmica de la triple hélice formada por la asociación de la doble hélice A con el oligonucleótido 1 que contiene dos aductos en las posiciones 10 y 15. El resultado es idéntico al obtenido para la triple hélice A.1<sup>d</sup>, confirmándose el mayor efecto desestabilizador del aducto en posición 10.

### **Conversión del aducto monofuncional en intercatenario en las triples hélices.**

La etapa siguiente consiste en la determinación de la velocidad de la reacción de conversión en triples hélices cuya cadena Hoogsteen contiene un solo aducto monofuncional  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}(\text{dG})]^{2+}$ . Como en el caso del dien-Pt, el transplatino reacciona primero con la base G10 y luego con la G15 del oligonucleótido 1. Las cadenas Hoogsteen platinadas, marcadas con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', se mezclaron con las dobles hélices complementarias. Las triples hélices A.1<sup>t</sup> y A.2<sup>t</sup> se incubaron a 25 °C. Se recogieron partes alícuotas a diversos tiempos de reacción que se analizaron posteriormente por electroforesis en gel bajo condiciones desnaturalizantes. Se ha demostrado previamente que los oligonucleótidos que contienen aductos intracatenarios o intercatenarios se separan fácilmente mediante esta técnica (Gaucheron et al., 1991; Payet et al., 1993). La intensidad de la banda inicial (cadena Hoogsteen) disminuye en función del tiempo, mientras que una nueva banda de migración mucho más lenta va apareciendo (Fig. IV.18, derecha). Este hecho indica la formación de aductos intercatenarios. En el caso de la triple hélice A.2<sup>t</sup> (aducto monofuncional localizado en la penúltima posición del lado 3') solo aparece una banda de migración lenta. El tiempo ( $t_{1/2}$ ) al que la mitad del aducto monofuncional ha desaparecido es de unas 20 horas. Se ha verificado que la reacción competitiva de suicidio (disociación de la cadena Hoogsteen seguida por la formación de aductos intracatenarios en el oligonucleótido libre) es un suceso de mínima importancia (la incubación de la muestra durante 24 horas y reacción posterior con tiourea 10 mM durante 10 minutos elimina casi completamente el aducto monofuncional (pista T) lo que excluye la formación de aductos intracatenarios).

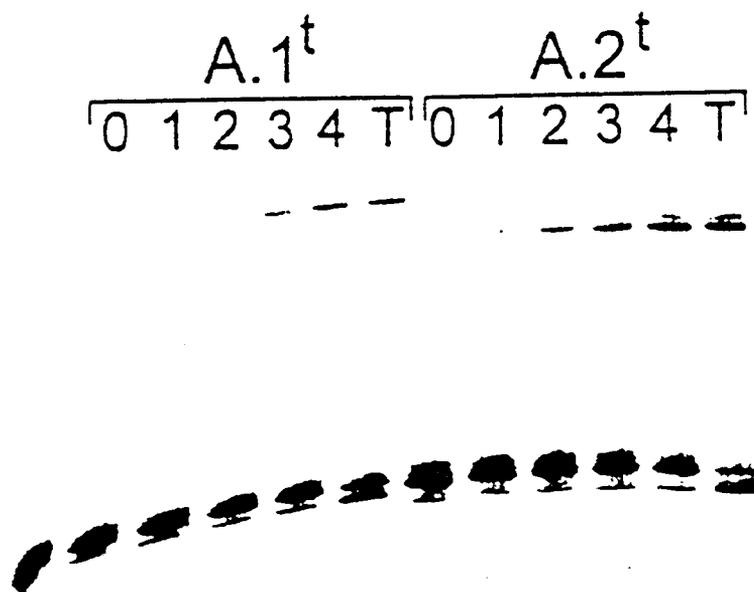


Fig. IV.18: Cinéticas de cierre del aducto monofuncional  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  en las dos triples hélices A.1<sup>t</sup> (aducto en G10) y A.2<sup>t</sup> (aducto en G15). Autoradiografía de un gel desnaturalizante al 24% en poliacrilamida. Las pistas (0-4) refieren a tiempos de incubación de 0, 3, 6, 12 y 24 horas respectivamente, a 25 °C y en  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  10 mM, tampón fosfato 10 mM a pH 6,8. Las pistas (T) corresponden al tratamiento de los productos con tiourea 10 mM durante 10 minutos a 37 °C tras 24 horas de incubación.

La conversión del aducto monofuncional en intercatenario en la triple hélice A.1<sup>t</sup> resulta aparentemente más lenta (Fig. IV.18, izquierda). Sin embargo, a 25 °C, la triple hélice se encuentra probablemente parcialmente disociada, lo que se deduce de los resultados de la estabilidad térmica de la triple hélice que contiene un solo aducto de dien-Pt (Fig. IV.17) y se confirma además por tratamiento con tiourea de la triple hélice incubada 24 horas. La formación de aductos intracatenarios (reacción de suicidio) resulta apreciable (Fig. IV.18, izquierda, pista T), y el  $t_{1/2}$  del aducto monofuncional en la triple hélice es de 24 horas, de acuerdo con la cantidad de aducto intracatenario.

En un trabajo previo (Colombier et al., 1996) se llevaron a cabo experimentos similares a 35 °C con las triples hélices B.3<sup>t</sup> y B.4<sup>t</sup> en las que la cadena Hoogsteen contenía un aducto monofuncional  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  o  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$  respectivamente. Dichos experimentos se han realizado en nuestro caso a 25 °C (ver Fig.

IV.19). Condiciones en las que no se detectó reacción de suicidio; los valores de  $t_{1/2}$  de los aductos monofuncionales son 15 horas y 9 horas, respectivamente.

Los resultados de la velocidad de conversión de los aductos monofuncionales  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  en aductos intercatenarios, muestran que la reacción no se ve seriamente afectada por la posición del aducto en la cadena Hoogsteen (los  $t_{1/2}$  son, respectivamente, 15, 20 y 24 horas para el aducto colocado en el extremo 5', una base anterior al extremo 3' o situada en mitad de la secuencia).

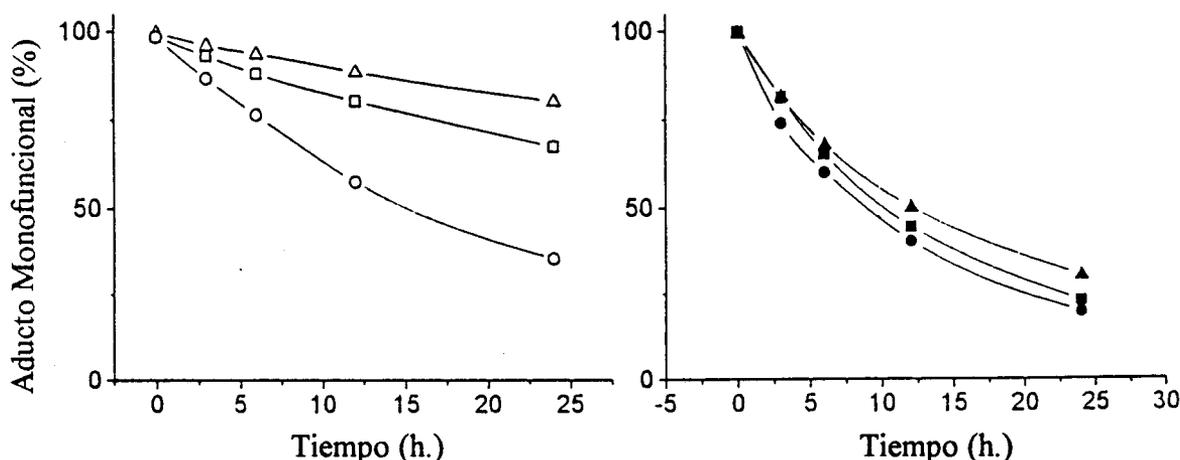


Fig. IV.19: Cinéticas de cierre de los aductos monofuncionales  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$  (izquierda) y  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$  (derecha) en las triples hélices B.3' y B.4' respectivamente, a 25 °C y en  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  5 mM, tampón acetato 5 mM a pH 5,0 y  $\text{NaClO}_4$  o  $\text{NaCl}$  (ver más abajo). Los porcentajes de aducto monofuncional se calcularon a partir de la razón entre la suma de las intensidades de las bandas de migración lenta y la suma de las intensidades de todas las bandas del autoradiograma. ( $\Delta/\blacktriangle$ ):  $\text{NaCl}$  0,5 M; ( $\square/\blacksquare$ ):  $\text{NaCl}$  0,15 M; ( $\circ/\bullet$ ):  $\text{NaClO}_4$  0,15 y 0,5 M.

### Reacción de puenteo intercatenario en triples hélices en presencia de $\text{NaCl}$

Otro aspecto importante se relaciona con la determinación de la naturaleza de la especie reactiva. La mayoría de las reacciones entre el ADN y el cisplatino o transplatino se producen a través de intermedios de reacción con moléculas de disolvente asociadas (Lepre y Lippard, 1990; ver también el capítulo I de esta tesis). Se trata de averiguar si la posición de los aductos monofuncionales, y particularmente del  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$ , en las triples hélices favorecería un desplazamiento directo del cloruro por la base

entrante en lugar de la formación de un intermedio de tipo “aqua”. Para decidir entre los dos mecanismos, se determinó la velocidad de la reacción de puenteo en presencia de NaCl, en lugar de NaClO<sub>4</sub> como se hizo en las experiencias arriba descritas. Estos experimentos se llevaron a cabo con las triples hélices B.3<sup>t</sup> y B.4<sup>t</sup> en NaCl y NaClO<sub>4</sub>, en el rango de concentraciones 0,15- 0,5 M.

En la triple hélice B.3<sup>t</sup>, el complejo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> se encuentra en el extremo 5' de la cadena Hoogsteen y está por tanto muy expuesto al disolvente. La velocidad de la reacción de puenteo intercatenario es la misma en NaClO<sub>4</sub> 0,15 M o bien 0,5 M, pero disminuye en un factor de 5 en NaCl 0,5 M (Fig. IV.19, izquierda). Este hecho sugiere que la hidrólisis del cloruro participa en la reacción de cierre del aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>. En la triple hélice B.4<sup>t</sup>, el complejo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> se encuentra situado en la mitad de la cadena Hoogsteen. La velocidad de la reacción de puenteo intercatenario es la misma en las dos concentraciones de NaClO<sub>4</sub> y disminuye levemente en NaCl 0,5 M (Fig. IV.19, derecha), lo que puede explicarse de dos modos diferentes. Puede suponerse que el aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> se inserta en la triple hélice, alejado de los iones cloruro, aunque no se encuentre enlazado con su base complementaria. En este caso, la formación de la aquoespecie controla cinéticamente la conversión del aducto monofuncional en intercatenario. Una segunda explicación tendría en cuenta el ataque directo de la base complementaria al ion cloruro. La primera de las dos hipótesis nos parece mas razonable, sin que nuestros resultados nos permitan excluir la segunda.

## DISCUSIÓN

A partir de los resultados de este trabajo y de los publicados previamente (Colombier et al., 1996) se obtienen conclusiones importantes sobre la reacción de puenteo intercatenario en triples hélices con un aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup>. Estos aductos no modifican la orientación de la tercera cadena en las triples hélices. La reacción es específica, puesto que no se

observa reacción de puenteo del oligonucleótido platinado con ADN de doble cadena que no contiene la secuencia diana (Colombier et al., 1996). La velocidad de la reacción de puenteo intercatenario es mayor en el caso del aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup>. Otra característica del aducto *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup> es que la velocidad de la reacción de puenteo no cambia prácticamente cuando se añade NaCl. Este hecho sugiere que el aducto contenido en la triple hélice es casi inaccesible a las pequeñas moléculas y no se ataca por compuestos como el glutatión u otras biomoléculas que reaccionan en gran extensión con los complejos del platino(II).

En el caso de los aductos monofuncionales *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, la reacción de puenteo intercatenario supone la rotación de la guanina platinada de la cadena Hoogsteen sobre su enlace glicosídico, de modo que el átomo de platino se sitúe en posición favorable respecto a la guanina entrante de la cadena homopurina.

Los resultados de este trabajo sugieren que la rotación citada puede ocurrir tanto en el centro como en los extremos de la triple hélice, lo que obedece probablemente a la distorsión de ésta en las cercanías del aducto monofuncional. El hecho de que un aducto monofuncional del dien-Pt en el centro de la secuencia induzca un gran descenso en la estabilidad térmica de la triple hélice, es también un argumento favorable a la citada distorsión local. La consecuencia de la misma es el aumento del grado de libertad de la guanina platinada, que facilita la conversión de la conformación *anti* a la *syn*.

En la actualidad resultan necesarias mejoras importantes previas a la utilización de estos oligonucleótidos platinados como herramientas en biología molecular, en el contexto de la estrategia antigén. Todavía resulta difícil el proceso de platinación de una citosina dada en un oligonucleótido que contenga varias citosinas o varias citosinas y guaninas. Parece razonable suponer que esta dificultad será resuelta gracias a la síntesis automática en fase sólida de oligonucleótidos platinados en bases específicas (Schliepe et al., 1996; Manchanda et al., 1996), como complemento a otras técnicas (Berghoff et al., 1998).

Otro aspecto de gran interés se relaciona con la desestabilización de las triples hélices originada por aductos monofuncionales. A partir de las experiencias de estabilidad térmica de las triples hélices platinadas, llevadas a cabo con aductos monofuncionales  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}(\text{dG})]^{2+}$ , se concluye que la existencia de una guanina platinada en la cadena Hoogsteen produce dos efectos opuestos. Por una parte se estabiliza la triple hélice, lo que se debe probablemente a la presencia de cargas positivas, como ocurre en la triple hélice A.2<sup>d</sup>, y por otra parte se desestabiliza la triple hélice por un efecto estérico que prevalece en el caso de la triple hélice platinada A.1<sup>d</sup>. Se espera un efecto similar para el caso del aducto monofuncional  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}(\text{dG})]^{2+}$ . La presencia de una citosina platinada disminuye también la estabilidad térmica de la triple hélice, lo que se debe a la pérdida de emparejamiento entre la base platinada y su guanina complementaria, y posiblemente también a la distorsión local causada por el impedimento estérico. Por otro lado, el aducto monofuncional se encuentra próximo a la guanina entrante de la cadena homopurina, lo que puede justificar que el cierre del aducto monofuncional de la citosina sea más rápido que el de la guanina.

Se sabe que las triples hélices pueden estabilizarse mediante reemplazamiento de los oligodesoxiribonucleótidos (cadena Hoogsteen) por oligo(2'-O-metil)ribonucleótidos (Roberts y Crothers, 1992; Escudé et al., 1993). Algunos resultados preliminares demuestran que esta sustitución no impide la reacción de puenteo intercatenario. Finalmente, en el caso de aplicaciones *in vivo*, la velocidad de la reacción de puenteo debería aumentarse, lo que no resulta posible mientras que en la reacción se formen intermedios con moléculas de disolvente asociadas. En la actualidad se investiga para encontrar las condiciones que favorezcan un desplazamiento directo de los grupos salientes del complejo de platino por la base nucleotídica entrante.

**Conclusiones,  
Consideraciones  
y Perspectivas**

## CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan de este trabajo son las siguientes:

1.- Las deformaciones producidas por el aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> sobre la estructura del ADN de doble hélice B son similares a las generadas por *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> y [Pt(dien)(dG)]<sup>2+</sup>, localizándose aquellas en el lado 5' del aducto de platino.

2.- La velocidad de transformación de los aductos monofuncionales *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> en bifuncionales se ve afectada por la presencia de otros aductos monofuncionales próximos.

3.- La estructura de la doble hélice de ADN origina cambios en el tipo de aductos bifuncionales formados con el transplatino, intra o intercatenarios, y con unas bases u otras.

4.- En condiciones de trabajo próximas a las fisiológicas (cantidad pequeña de aductos de platino), el transplatino reacciona con el ADN de doble hélice. Tras 24 horas de reacción, los aductos mayoritarios son monofuncionales y los minoritarios bifuncionales, formados entre una guanina y la citosina complementaria en la doble hélice. No se forman aductos intracatenarios.

5.- La influencia de los aductos monofuncionales situados a un lado u otro (3' o 5') de aquel cuya conversión en bifuncional se estudia depende de su localización y distancia al mismo.

6.- Cuando se forma una triple hélice de ADN con la tercera cadena modificada por un aducto monofuncional de transplatino de tipo *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup> o *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dC)Cl]<sup>+</sup>, dicho aducto se transforma en aducto bifuncional mediante reacción

con la guanina complementaria a la base inicialmente platinada, en la cadena polipurina de la doble hélice.

7.- La velocidad de la reacción de puenteo intercatenario de transplatino en una triple hélice depende de la naturaleza de la base platinada, de modo que resulta mayor si la base es la citosina, como en el caso del  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$ , y menor si es la guanina, como ocurre con el  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$ .

8.- La reacción de puenteo no resulta seriamente afectada por la posición del aducto monofuncional en la tercera cadena (en la mitad de la cadena, en un extremo o en otro), cuando se parte del aducto  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dG})\text{Cl}]^+$ .

9.- Si la tercera cadena de una triple hélice está modificada por el aducto  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{dC})\text{Cl}]^+$ , la reacción de puenteo intercatenario no resulta apenas afectada por la presencia y concentración de iones cloruro en el medio.

10.- Cuando la base inicialmente platinada es la guanina, la velocidad de la reacción de puenteo es la misma a distintas concentraciones de ion perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), pero disminuye fuertemente ante la presencia de iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). Este hecho indica que la etapa de control cinético de la reacción es la hidrólisis del ligando cloruro.

## CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo general de los grupos de investigación en los que se ha realizado este trabajo es la síntesis y estudio de nuevos agentes antitumorales derivados de los metales de transición capaces de mejorar la eficacia de los ya existentes (cisplatino, carboplatino). Los nuevos compuestos deben mostrar efectos secundarios de menor importancia que los ya existentes y ser específicos de otros tipos de cáncer o incluso aplicables a otras enfermedades. Para el logro parcial de estos objetivos se han seguido dos líneas de actuación.

La primera línea estudia detalladamente las causas de la actividad antitumoral de compuestos de actividad probada, tratando de conocer los blancos celulares de las drogas y las reacciones responsables de su actividad antitumoral. Se estudian asimismo sus efectos secundarios, los procesos de la vida celular en los que interfieren los aductos formados y los procesos involucrados en la muerte celular. En esta línea de trabajo se incluyen también los compuestos terapéuticamente inactivos que presentan reacciones celulares similares a los activos, tales como el cloruro de monoclorotriaminplatino(II) ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}]\text{Cl}$ ), el cloruro de dietilentriamin-monocloroplatino(II) ( $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ ), y el *trans*-diclorodiaminplatino(II) (transplatino,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ). El estudio de su reactividad y la comparación de la misma con la de compuestos activos permite un conocimiento de los orígenes de su actividad terapéutica y de las reacciones que fundamentan sus propiedades biológicas.

La segunda línea de actuación comprende la síntesis y caracterización de nuevos compuestos de coordinación formados por el  $\text{Pt}^{\text{II}}$ ,  $\text{Pt}^{\text{IV}}$  y metales de la mena del platino con nuevos ligandos, de modo que pueda predecirse su interacción con los blancos celulares. Asimismo se estudia su ensayo en sistemas biológicos como medio de comprobación de la veracidad de los planteamientos previos. Una parte de este tipo de investigación se dedica expresamente a la síntesis y el estudio biológico de derivados de los compuestos que se sabe son activos, modificando en cada etapa un número mínimo de sus propiedades estructurales, con objeto de potenciar no solo la actividad

antineoplástica del compuesto en cuestión sino también su interacción molecular en el interior de la célula.

Los resultados obtenidos en los dos proyectos aquí presentados han permitido avanzar significativamente en el logro del citado objetivo general mediante la obtención de conclusiones de gran interés y utilidad futura.

En el primero de estos proyectos se ha estudiado la reactividad del aducto monofuncional *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dG)Cl]<sup>+</sup>, el más común de los formados entre el ADN y el transplatino, en dobles hélices de distinta longitud y a distintos niveles de platinación. Los cambios producidos en la conformación de cada doble hélice se han estudiado por reactividad frente a las sondas químicas OsO<sub>4</sub> y DEPC. Los resultados obtenidos indican claramente que la reactividad de los aductos monofuncionales Pt<sup>II</sup>-ADN depende de diversos factores que influyen sobre la conformación local de la doble hélice (formación de otros aductos monofuncionales próximos, longitud de la doble hélice utilizada). Dichos factores originan cambios en:

- a) cinética de conversión de aductos monofuncionales a bifuncionales, proceso en el que existen diferencias en la velocidad superiores al factor tres desde un mismo aducto monofuncional.
- b) tipo de aductos bifuncionales formados, intra o intercatenarios, con unas bases u otras.

La influencia de los aductos formados a un lado u otro (3' o 5') de aquel cuya conversión a bifuncional se estudia depende de su localización y distancia al mismo. El estudio profundo de las características mencionadas debe conducir al desarrollo de nuevos derivados metálicos cuya actividad sea consecuencia de las mismas.

En concreto, este trabajo confirma el hecho de que el transplatino, a bajos niveles de platinación, forma aductos intercatenarios entre la guanina y su citosina correspondiente, a velocidades muy lentas (vida media > 24 horas), y nunca forma aductos intracatenarios. Esta reactividad ya había sido observada (Brabec y Leng, 1993; Boudvillain et al., 1995), pero otros trabajos presentaban resultados muy distintos

(Eastman y Barry, 1987; Eastman et al., 1988; Bancroft et al., 1990). Nuestras experiencias han demostrado que estas diferencias proceden de las condiciones en que se realizaron las experiencias (distintos niveles de platinación y longitudes del ADN utilizado).

La formación de aductos bifuncionales transplatino-ADN exclusivamente intercatenarios en las condiciones adecuadas no está exenta de consecuencias importantes. Si, por ejemplo, se sintetiza un oligonucleótido platinado con una secuencia concreta complementaria de otra conocida, y se dejan aparear, se producirá la formación del aducto intercatenario, provocando la unión covalente de ambas cadenas de modo que su separación por parte, por ejemplo, de las enzimas que necesitan leer la secuencia diana no tiene lugar. El efecto sobre la actividad biológica es inmediato. Aunque esta posibilidad ya se había anunciado, utilizándose diversos complejos de platino mono y binucleares y oligonucleótidos modificados o no (Vlassov et al., 1983; Chu y Orgel, 1990; Gruff y Orgel, 1991), los resultados obtenidos no resultan convincentes. En los citados trabajos nunca se utilizaron oligonucleótidos con alguna base modificada por el transplatino.

En el laboratorio de M. Leng se han llevado a cabo diversos trabajos en la dirección señalada. En este contexto se ha realizado el segundo proyecto que se incluye en este trabajo, enmarcado en el ámbito de la estrategia antigén. Dicha estrategia consiste en la formación de una triple hélice mediante la unión de un oligonucleótido con una secuencia determinada de ADN en doble hélice, perteneciente a un gen concreto. La unión resulta tan fuerte que el oligonucleótido no resulta desplazado por otros agentes celulares, impidiéndose así la expresión del gen mencionado. En el laboratorio (Colombier et al., 1996), se había demostrado que la reacción de formación de aductos intercatenarios por el transplatino se produce también en secuencias en triple hélice, con el aducto monofuncional inicial situado sobre una guanina o una citosina de la cadena Hoogsteen. En este trabajo, que continua el anterior, se ha intentado mejorar la velocidad de la reacción de puenteo y se ha estudiado su extensión a otras triples hélices de distinta secuencia y a otras posiciones distintas del aducto del transplatino en dicha

triple hélice. Los resultados obtenidos indican que la reacción se produce más rápidamente cuando la citosina, y no la guanina, es la base inicialmente platinada. En este caso, la reacción de puenteo no resulta apenas afectada por la presencia de iones cloruro en el medio. La citosina platinada se encuentra en la posición ideal para la reacción de puenteo, con el Pt(II) dirigido hacia el N<sup>7</sup> de la guanina complementaria en la doble hélice. Este hecho causa que el aducto de platino, en el interior de la estructura de la triple hélice, no resulta afectado por los iones cloruro, que permanecen en el exterior.

En lo que respecta a su posible aplicación terapéutica, este tipo de reacciones de puenteo encuentra determinadas dificultades en ambas clases de terapia, antígeno (triple hélice) o antisentido (en doble hélice, con una cadena de ARN como mínimo). El problema principal radica en la reactividad de los aductos monofuncionales del platino(II) con los nucleófilos sulfurados de la célula, que facilita la pérdida del producto. La solución consiste en el encuentro de un sustituto para el ligando cloruro que no sea desplazado por este tipo de nucleófilos, y que no impida ni ralentice la reacción de puenteo cuando se forman la doble o triple hélice. A este respecto podría ser beneficioso el uso de la inestabilidad de los aductos monofuncionales del *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AmCl]<sup>+</sup> en la doble hélice, con pérdida de la amina aromática "Am" y formación de aductos bifuncionales, puesto que este aducto es perfectamente estable en cadena simple (Payet et al., 1993; Payet y Leng, 1994). Para ello, el grupo Am ha de producir una reacción lo más rápida posible y probablemente substituir el ligando amino en *trans* favorecería aún más la reacción. En el caso del *trans*platino podría plantearse una situación similar, teniendo en cuenta que las características del efecto *trans* son totalmente distintas (el grupo "Am" quedaría en posición *trans* respecto a la base platinada).

El problema de la inestabilidad de los aductos monofuncionales se solucionó por el descubrimiento en el laboratorio de M. Leng de la reacción de isomerización de los aductos de tipo 1,3 (G-G) intracatenarios del *trans*platino en aductos intercatenarios al formarse la doble hélice (Dalbiès et al., 1994). Puesto que los aductos monofuncionales no participan en el proceso y la isomerización solo se produce tras la formación de la doble hélice, se evitaban los problemas de reactividad con otros nucleófilos. Se han

encontrado las condiciones para aumentar la velocidad de esta reacción de modo que finalice en pocos minutos. Los estudios *in vivo* muestran también resultados esperanzadores (Boudvillain et al., 1997; Colombier et al., 1997) y se prevé comprobar la posibilidad de la aplicación de esta reacción a la triple hélice.

En la actualidad puede esperarse con optimismo razonable que los avances científicos señalados vean la luz en un plazo de tiempo corto. A esta conclusión se llega mediante el conocimiento detallado de la reactividad de los distintos aductos formados por derivados de Pt<sup>II</sup> con el ADN y de las deformaciones producidas en esta molécula por los citados aductos. También contribuye significativamente a la previsión de una pronta aplicación el avance espectacular en la síntesis de nuevos derivados de los ácidos nucleicos que contienen modificaciones estructurales en su esqueleto, grupos azúcar y bases, que los estabilizan frente a la acción de las nucleasas y aumentan la estabilidad de las dobles y triples hélices formadas.

Con este trabajo se ha pretendido, en suma, la aportación de nuevos datos que permitan acelerar la puesta en práctica de los avances señalados.

## Referencias

- Admiraal, G., van der Veer, J. L., De Graaf, R. A. G., den Hartog, J. H. J. & Reedijk, J. (1987) "Intrastrand bis(guanine) chelation of d(CpGpG) to *cis*-platinum: an X-ray single-crystal structure analysis", *J. Am. Chem. Soc.* 109, 592-594.
- Albano, V. G., Natile, G. & Panunzi, A. (1994) "Five-coordinate alkene complexes of Palladium(II) and Platinum(II)", *Coordination Chemistry Reviews* 133, 67-114.
- Anin, M. F. & Leng, M. (1990) "Distortions induced in double stranded oligonucleotides by the binding of *cis*- or *trans*-diamminedichloroplatinum(II) to the d(GTG) sequence", *Nucleic Acids Res.* 18, 4395-4400.
- Antao, V. P., Gray, D. M. & Ratliff, R. L. (1988) "CD of six conformational rearrangements of poly[d(A-G).d(C-T)] induced by low pH.", *Nucleic Acids Res.* 16, 719-738.
- Balcarová, Z. & Brabec, V. (1986) "DNA modified by Platinum derivatives cannot adopt the A form", *Biochim. Biophys. Acta* 867, 31-35.
- Bancroft, D. P., Lepre, C. A. & Lippard, S. J. (1990) "<sup>195</sup>Pt NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6860-6871.
- Basolo, F. & Pearson, R. G. (1967) "Mechanisms of inorganic reactions", 2<sup>ème</sup> ed., Wilson (New York).
- Beal, P. A. & Dervan, P. B. (1991) "Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide directed triple-helix formation." *Science* 251, 1360-1363.
- Bellicini, M., Cattalini, L., Marangoni, G. & Pitteri, B. (1994) "Reactivity of neutral nitrogen donors in planar d<sup>8</sup> metal complexes. Part 1. The system [1,2-bis(phenylsulfanyl)-ethane]dichloroplatinum(II) with pyridines in methanol. Effect of Basicity and Steric Hindrance", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1805-1811.
- Bellon, S. F. & Lippard, S. J. (1990) "Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>-cytosine)Cl]<sup>+</sup>", *Biophys. Chem.* 35, 179-188.
- Bellon, S. F., Coleman, J. H. & Lippard, S. J. (1991) "DNA unwinding produced by site specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II)", *Biochemistry* 30, 8026-8035.
- Belluco, U. (1974) "Organometallic and coordination chemistry of Platinum", Academic Press (London).
- Berghoff, U., Schmidt, K., Janik, M., Schroder, G. & Lippert, B. (1998) "Monofunctional *trans*-Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> modification of pyrimidine-rich

- deoxyoligonucleotides: Direct platination and use of a protective group", *Inorg. Chim. Acta* 269, 135-142.
- Bernal, S., Speak, J., Boheim, K., Dreyfuss, A., Wright, J., Teicher, B., Rosowsky, A., Tsao, S. & Wong, Y. (1990) "Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cisplatin", *Mol. Cell. Biochem.* 95, 61-70.
- Bernal-Méndez, E., Boudvillain, M., González-Vílchez, F. & Leng, M. (1997) "Chemical versatility of transplatin monofunctional adducts within multiple site-specifically platinated DNA." *Biochemistry* 36, 7281-7287.
- Bernal-Méndez, E., Sun, J., González-Vílchez, F. & Leng, M. (1998) "Reactivity of transplatin-modified oligonucleotides in triple-helical DNA complexes", *New J. Chem.* (en presse)
- Bingman, C. A., Zon, G. & Sundaralingam, M. (1992) "Crystal and molecular structure of the A-DNA dodecamer d(CCGTACGTACGG)", *J. Mol. Biol.* 227, 738-742.
- Blackburn, G. M. (1990) "DNA and RNA structure" *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (ed. Blackburn, G. M. & Gait, M. J.) Oxford University Press (New York).
- Boiziau, C. & Toulmé, J.-J. (1991) "Modified oligonucleotides in rabbit reticulocytes: uptake, stability and antisense properties", *Biochimie* 73, 1403-1408.
- Bonivento, M., Canovese, L., Cattalini, L., Marangoni, G., Michelon, G. & Tobe, M. L. (1983) "Mechanism of nucleophilic displacement of the bromide ion by thioethers in the Bromo(1,5-diamino-3-azapentane)platinum(II) cation", *Inorg. Chem.* 22, 802-805.
- Boogard, N., Altona, C. & Reedijk, J. (1993) "Conformational differences between the adducts of *cis*-DDP and *trans*-DDP with the trinucleotide d(GpTpG). A <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR investigation", *J. Inorg. Biochem.* 49, 129-147.
- Borch, R. F., Dedon, P. C., Gringeri, A. & Montine, T. J. (1988) "Inhibition of Platinum drug toxicity by Diethyldithiocarbamate", *Platinum and Other Metal Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy* (ed. Nicolini, M.), Nihjoff (Boston) pp. 216-227.
- Boudvillain, M., Dalbiès, R., Aussourd, C. & Leng, M. (1995) "Intrastrand cross-links are not formed in the reaction between transplatin and native DNA: Relation with the clinical inefficiency of transplatin", *Nucleic Acids Res.* 23, 2381-2388.

- Boudvillain, M., Guérin, M., Dalbiès, R., Saison-Behmoaras, T. & Leng, M. (1997) "Transplatin-modified Oligo(2'-O-methylribonucleotides): a new tool for selective modulation of gene expression", *Biochemistry* 36, 2925-2931.
- Brabec, V., Kleinwächter, V., Butour, J. L. & Johnson, N. P. (1990) "Biophysical studies of the modification of DNA by antitumor Platinum coordination complexes", *Biophys. Chem.* 35, 129-141.
- Brabec, V., Reedjik, J. & Leng, M. (1992) "Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional Platinum(II) binding", *Biochemistry* 31, 12397-12402.
- Brabec, V. & Leng, M. (1993) "DNA interstrand cross-links of *trans*-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between Guanine and complementary cytosine residues" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5345-5349.
- Brabec, V., Sip, M. & Leng, M. (1993) "DNA conformational change produced by the site-specific interstrand cross-link of *trans*-diamminedichloroplatinum(II)", *Biochemistry* 32, 11676-11681.
- Brabec, V., Boudný, V., & Balcarová, Z. (1994) "Monofunctional adducts of Platinum(II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturation", *Biochemistry* 33, 1316-1322.
- Broitman, S. L., Im, D. D. & Fresco, J. R. (1987) "Formation of the triple-stranded polynucleotide helix, Poly(A-A-U).", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5120-5124.
- Butour, J. L. & Johnson, N. P. (1986) "Chemical reactivity of monofunctional Platinum-DNA adducts", *Biochemistry* 25, 4534-4539.
- Cheng, Y. K., Pettitt, B. M. (1992) "Hoogsteen versus reverse-Hoogsteen base pairing: DNA triple helices.", *J. Am. Chem. Soc.* 114, 4465-4474.
- Chu, B. C. F. & Orgel, L. E. (1990) "Optimization of the efficiency of cross-linking Pt<sup>II</sup> oligonucleotide phosphorothioate complexes to complementary oligonucleotides", *Nucleic Acids Res.* 18, 5163-5171.
- Chu, G. (1994) "Cellular responses to cisplatin", *J. Biol. Chem.* 269, 7878-790.
- Ciccarelli, R. B., Solomon, M. J., Varshavsky, A. & Lippard, S. J. (1985) "In vivo effects of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: Differential repair, DNA-protein-cross-linking, and inhibition of replication", *Biochemistry* 24, 7533-7540.
- Cleare, M. J. & Hoeschele, J. D. (1980) "", *Bioinorg. Chem.* 2, 187-

- Colombier, C., Lippert, B. & Leng, M. (1996) "Interstrand cross-linking reaction in triplexes containing a monofunctional transplatin-adduct", *Nucleic Acids Res.* 24, 4519-4524.
- Colombier, C., Boudvillain, M. & Leng, M. (1997) "Interstrand crosslinking reaction in transplatin-modified oligo-2'-O-methylribonucleotide-RNA hybrids", *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 7, 397-402.
- Coluccia, M., Nassi, A., Loseto, F., Boccarelli, A., Mariggio, M. A., Giordano, D., Intini, F. P., Caputo, P. & Natile, G. (1993) "A *trans*-platinum complex showing higher antitumor activity than the *cis* congeners", *J. Med. Chem.* 36, 510-512.
- Comess, K. M., Costello, C. E. & Lippard, S. J. (1990) "Identification and characterization of a novel linkage isomerization in the reaction of *trans*-diamminedichloroplatinum(II) with 5'-d(TCTACGCGTTCT)", *Biochemistry* 29, 2102-2110.
- Corda, Y., Job, C., Anin, M. F., Leng, M. & Job, D. (1991) "Transcription by eucariotic and procariotic RNA polymerases of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II)" *Biochemistry* 30, 222-230.
- Corda, Y., Job, C., Anin, M. F., Leng, M. & Job, D. (1993) "Spectrum of DNA-Platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases" *Biochemistry* 32, 8582-8588
- Craig, M. E., Crothers, D. M. & Doty, P. (1971) "Relaxation kinetics of dimer formation by self-complementary oligonucleotides" *J. Mol. Biol.* 62, 383-401.
- Dagneaux, C., Liquier, J. & Taillandier, E. (1995) "Sugar conformation in DNA and DNA-RNA triple helices determined by FTIR spectroscopy: role of backbone composition." *Biochemistry* 34, 16618-16623
- Dalbiès, R., Payet, D. & Leng, M. (1994) "DNA double helix promotes a linkage isomerization reaction in *trans*-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8147-8151.
- Dalbiès, R., Boudvillain, M. & Leng, M. (1995) "Linkage isomerization reaction in *trans*-diamminedichloroplatinum(II)-modified single-stranded oligonucleotides", *Nucleic Acids Res.* 23, 949-953.
- Dedon, P. C. & Borch, R. F. (1987) "Characterization of the reactions of Platinum antitumor agents with biologic and non-biologic sulfur-containing nucleophiles", *Biochem. Pharmacol.* 36, 1955-1964.

- Den Hartog, J. H. J., Altona, C., Chottard, J. C., Girault, J. P., Lallemand, J. Y., de Leeuw, F. A. M., Marcelis, A. T. M. & Reedijk, J. (1982) "Conformational analysis of the adduct  $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>d(GpG)]<sup>+</sup> in aqueous solution. A high field (500-300 MHz) Nuclear Magnetic Resonance investigation", *Nucleic Acids Res.* **10**, 4715-4730.
- Den Hartog, J. H. J., Altona, C., van Boom, J. H., van der Marel, G. A., Haasnoot, C. A. G. & Reedijk, J. (1984) "cis-diamminedichloroplatinum(II) induced distortion in a double helical DNA fragment", *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 1528-1530.
- Den Hartog, J. H. J., Altona, C., van Boom, J. H., van der Marel, G. A., Haasnoot, C. A. G. & Reedijk, J. (1985) "cis-diamminedichloroplatinum(II) induced distortion of a single and double-stranded deoxydecanucleosidenonaphosphate studied by Nuclear Magnetic Resonance", *J. Biomol. Struct. & Dyn.* **2**, 1137-1155.
- Dickerson, R. E. (1989) "Definition and nomenclature of nucleic acid structure parameters" *J. Biomol. Struct. Dynam.* **6**, 627-634.
- Dickerson, R. E., Drew, H. R., Connor, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V., and Kapka, M. L. (1982) "The anatomy of A-, B-, and Z-DNA". *Science* **216**, 475-485.
- Dieter-Wurm, I., Sabat, M. & Lippert, B (1992) "Model for a platinated DNA triplex: Watson-Crick and metal-modified Hoogsteen pairing", *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 357-360.
- Drew, H. R., & Travers A. A. (1984) "DNA structural variations in the *E. Coli* tyrT promoter." *Cell* **37**, 491-502.
- Eastman, A. (1983) "Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-dichloro-(ethylenediamine)-platinum(II)", *Biochemistry* **22**, 3927-3933.
- Eastman, A. (1985) "Interstrand crosslinks and sequence specificity in the reaction of *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA", *Biochemistry* **24**, 5027-5032.
- Eastman, A. (1987) "The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer Platinum complexes", *Pharmacol. Ther.* **34**, 155-166.
- Eastman, A. & Barry, M. A. (1987) "Interaction of *trans*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation of Monofunctional adducts and their Reaction with Glutathione", *Biochemistry* **26**, 3303-3307.
- Eastman, A., Jennerwein, N. N. & Nagel, D. L. (1988) "Characterization of bifunctional adducts produced in DNA by *trans*-diamminedichloroplatinum(II)", *Chem. Biol. Interact.* **67**, 71-80.

- Egli, M., Williams, L. D., Gao, Q. & Rich, A. (1991) "Structure of a pure-spermine form of Z-DNA (Magnesium free) at 1 Å resolution." *Biochemistry* 30, 11388.
- Elmroth, S. K. C. & Lippard, S. J. (1993) "Platinum binding to d(GpG) target sequences and phosphorothioate linkages in DNA occurs more rapidly with increasing oligonucleotide length", *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3633-3634.
- Elmroth, S. K. C. & Lippard, S. J. (1995) "Surface and electrostatic contributions to DNA-promoted reactions of Platinum(II) complexes with short oligonucleotides: A kinetic study", *Inorg. Chem.* 34, 5234-5243.
- Escudé, C., François, J. C., Sun, J., Ott, G., Sprinzl, M., Garestier, T. & Hélène, C. (1993) "Stability of triple helices containing RNA and DNA strands: experimental and molecular modeling studies", *Nucleic Acids Res.* 21, 5547-5553.
- Farrell, N., Ha, T. T. B., Souchard, J.-P., Wimmer, F. L., Cros, S. & Johnson, N. P. (1989) "Cytostatic *trans*-Platinum(II) complexes", *J. Med. Chem.* 32, 2240-2241.
- Farrell, N., Qu, Y. & Hacker, M. P. (1990) "Cytotoxicity and antitumor activity of bis(platinum) complexes. A novel class of Platinum complexes active in cells lines resistant to both cisplatin and 1,2-diaminocyclohexane complexes", *J. Med. Chem.* 33, 2179-2184.
- Farrell, N., Kelland, L. R., Roberts, J. D., & van Beusichem (1992) "Activation of the *trans* geometry in Platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of *trans* complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action", *Cancer Res.* 52, 5065-5072.
- Farrell, N., Appleton, T. G., Qu, Y., Roberts, J. D., Soares Fontes, A. P., Skov, K. A., Wu, P. & Zou, Y. (1995) "Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear Platinum complexes on binding properties and conformational changes in DNA", *Biochemistry* 34, 15480-15486.
- Farrell, N. (1996) "", in *Advances in DNA Sequence Specific Agents* (Hurley, L. H., Chaires, J. B., Eds.) JAI Press. Inc.: Greenwich, CT, pp. 187-216.
- Felsenfeld, G., Davies, D. R. & Rich, A. (1957) "Formation of a three-stranded polynucleotide molecule" *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2023-2024.
- Felsenfeld, G., & Rich, A. (1957) "Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 26, 457-468.
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., Lohman, P. H. M. & Reedijk, J. (1982) "Detection and quantification of adducts formed upon interaction of Diamminedichloroplatinum(II) with DNA, by anion exchange chromatography after enzymatic degradation", *Nucleic Acids Res.* 10, 5345-5357.

- Fichtinger-Schepman, A. M. J., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H. J., Lohman, P. H. M. & Reedijk, J. (1985) "Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification and quantitation", *Biochemistry* 24, 707-713.
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Velde-Visser, S. D., van Dijk-Knijenburg, H. C. M., van Oosterom, A. T., Baan, R. A. & Berends, F. (1990) "Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with *in vitro* adduct formation", *Cancer Res.* 50, 7887-7894.
- Fichtinger-Schepman, A. M., van Dijk-Knijenburg, H. C. M., van der Velde-Visser, S. D., Berends, F. & Baan, R. A. (1995) "Cisplatin and carboplatin-DNA adducts: is Pt-AG the cytotoxic lesion?", *Carcinogenesis* 16, 2447-2453.
- Fouchet, M. H., Gauthier, C., Guittet, E., Girault, J. P., Igolen, J. & Chottard, J. C. (1992) "Synthesis and characterization of a d(ApG) platinated nonanucleotide duplex", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182, 555-560.
- Frank-Kamenetskii, M. D., Mirkin, S. M. (1995) "Triplex DNA structures" *Annu. Rev. Biochem.* 64, 65-95.
- Franklin, R. E. & Gosling, R. (1953) "Molecular configuration in Sodium thymonucleate", *Nature* 171, 740-741.
- Froehler, B. C., Wadwani, S., Terhorst, T. J. & Gerrard, S. R. (1992) "Oligodeoxynucleotides containing C-5 Propyne analogs of 2'-Deoxyuridine and 2'-Deoxycytidine." *Tetrahedron Lett.* 33, 5307-5310.
- Gaucheron, F., Malinge, J. M., Blacker, A. J., Lehn, J. M. & Leng, M. (1991) "Possible catalytic activity of DNA in the reaction between the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and the intercalator N-methyl-2,7-diazapyrenium", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3516-3519.
- Gelasco, A. & Lippard, S. J. (1998) "NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin", *Biochemistry* 37, 9230-9239.
- Gerloch, M. & Constable, E. C. (1994) "Transition metal chemistry" VCH (New York).
- Giovangeli, C, Rougée, M., Garestier, T., Thuong, N. T. & Hélène, C. (1992) "Triple-helix formation by oligonucleotides containing the three bases Thymine, Cytosine, and Guanine", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8631-8635.
- Giovangeli, C, Sun, J. S. & Hélène, C. (1996) "Nucleic acids: supramolecular structures and rational design of sequence-specific ligands", *Comprehensive*

*Supramolecular Chemistry. Supramolecular Reactivity and Transport: Bioorganic Systems, vol 4* (ed. Murakami, Y.) Elsevier Science (Oxford).

- Giovannangeli, C. & Hélène, C. (1997) "Progress in developments of triplex-based strategies", *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 413-21.
- Girault, J. P., Chottard, G., Lallemand, J. Y. & Chottard, J. C. (1982) "Interaction of cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> with Ribose and Deoxyribose Diguanosine phosphates", *Biochemistry* 21, 1352-1356.
- Gray, H. B. (1965) "Electronic structures of square planar metal complexes", *Metal Complexes in Transition Metal Chemistry* (ed. Carlin, R. L.), Marcel Dekker inc. (New York), vol 1, 240-286)
- Gruff, E. S. & Orgel, L. E. (1991) "An efficient, sequence-specific method for crosslinking complementary oligonucleotides using binuclear Platinum complexes", *Nucleic Acids Res.* 19, 6849-6854.
- Guieysse, A.-L., Praseuth, D., François, J.-C. & Hélène, C. (1995) "Inhibition of replication initiation by triple helix-forming oligonucleotides", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217, 186-194.
- Guschlbauer, W., Chantot, J. F. & Thiele, D. (1990) "Four-stranded nucleic-acid structures 25 years later: from Guanosine gels to telomeric DNA." *J. Biomol. Struct. Dyn.* 8, 491-511.
- Hague, D. N. & Moreton, A. D. (1994) "Protonation sequence of linear aliphatic polyamines by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 265-270.
- Hampel, K. J., Crosson, P. & Lee, J. S. (1991) "Polyamines favor DNA triplex formation at neutral pH", *Biochemistry* 30, 4455-4459.
- Heiger-Bernays, W. J., Essigmann, J. M. & Lippard, S. J. (1990) "Effect of the antitumor drug *cis*-diamminodichloroplatinum(II) and related Platinum complexes on eukariotic DNA replication", *Biochemistry* 29, 8461-8466.
- Hélène, C. & Toulmé, C. (1990) "Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids." *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 99-125.
- Hemminki, K. & Thilly, W. G. (1988) "Binding of cisplatin to specific sequences of human DNA *in vitro*", *Mutat. Res.* 202, 133-138.
- Henderson, R. A. (1993) "The mechanisms of reactions at transition metal sites", Oxford University Press (Oxford).

- Hershey, A. D. & Chase, M. (1952) "Independent function of viral protein and nucleic acid on growth of bacteriophage", *J. Gen. Physiol.* 36, 39-56.
- Hitchcock, A. P., Lock, C. J. L., Pratt, W. M. C. & Lippert, B. (1983) "", Platinum, Gold and other metal chemotherapeutic agents (ed: Lippard, S. J.) American Chemical Society (Washington D.C.) ACS Symp. Series 209, pp. 209-
- Hollis, L. S., Amundsen, A. R. & Stern, E. W. (1989) "Chemical and biological properties of a new series of *cis*-diammineplatinum(II) antitumor agents containing three Nitrogen donors: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)(N-donor)Cl]<sup>+</sup>", *J. Med. Chem.* 32, 128-136.
- Hoogsteen, K. (1959) "The structure of crystals containing a Hydrogen-bonded complex of 1-Methylthymine and 9-Methyladenine", *Acta Crystallogr.* 12, 822-823.
- Hopkins, P. B., Millard, J. T., Woo, J., Weidner, M. F., Kirchner, J. J., Sigurdsson, S. T. & Raucher, S. (1991) "Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents: importance of minimal DNA structural reorganization in the cross-linking Reactions of mechlorethamine, cisplatin and mitomycin C", *Tetrahedron* 47, 2475-2489.
- Horne, D. A. & Dervan, P. B. (1991) "Effects of an abasic site on triple helix formation characterized by affinity cleaving", *Nucleic Acids Res.* 19, 4963-4965.
- Huang, H., Zhu, L., Reid, B. R., Drobny, G. P. & Hopkins, P. B. (1995) "Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link", *Science* 270, 1842-1845.
- Hud, N. V., Schultze, P. & Feigon, J. (1998) "Ammonium ion as an NMR probe for monovalent cation coordination sites of DNA quadruplexes", *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6403-6404.
- Huheey, J. E., Keiter, E. A. & Keiter, R. L. (1993) "Inorganic chemistry; principles of structure and reactivity" Harper Collins College Publishers.
- Jain, S., Zon, G. & Sundaralingam, M. (1989) "Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTCAC)", *Biochemistry* 28, 2360-2364.
- Johnson, N. P., Hoeschele, J. D. & Rahn, R. O. (1980) "Kinetic analysis of the *in vitro* binding of radioactive *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) to DNA", *Chem. Biol. Interact.* 30, 151-169.
- Johnson, N. P., Lapetoule, P., Razaka, H. & Villani, G. (1986) "Biological and biochemical effects of DNA damage caused by Platinum compounds",

- Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumour Drugs* (de McBrien, D. C. H. & Slater, T. F.) IRL Press (Oxford) pp. 1-28.
- Johnson, N. P., Butour, J. L., Villani, G., Wimmer, F. L., Defais, M., Pierson, V. & Brabec, V. (1989) " ", *Prog. Clin. Biochem. Med.* 10, 1-24.
- Kawai, K., Kamatani, N., Georges, E. & Ling, V. (1990) "Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to *cis*-diamminedichloroplatinum(II)", *J. Biol. Chem.* 265, 13137-13142.
- Kazakov, S. A. (1996) "Nucleic acid binding and catalysis by metal ions", *Bioorganic Chemistry, Nucleic Acids* (ed. Hecht, S. M.), Oxford University press (Oxford), pp. 244-287.
- Keck, M. V. & Lippard, S. J. (1992) "Unwinding of dupercoiled DNA by Platinum-ethidium and related complexes", *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3386-3390.
- Kolchanov, N. A., Titov, I. I., Vlassova, I. E. & Vlassov, V. V. (1996) "Chemical and computer probing of RNA structure." *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 53, 131-196.
- Lambert, B., Jestin, J. L., Bréhin, P., Oleykowski, C., Yeung, A. T., Mailliet, P., Prétot, C., Le Peck, J. B., Jacquemin-Sablon, A. & Chottard, J. C. (1995) "Binding of the *Escherichia coli* UvrAB proteins to the DNA mono- and diadducts of *cis*-[N-2-amino-N-2-methylamino-2,2,1-bicycloheptane]dichloroplatinum(II) and cisplatin. Analisis of the factors controlling recognition and proof of monoadduct-mediated UvrAB cross-linking", *J. Biol. Chem.*, 270, 21251-21257.
- Lane, A. N., Ebel, S. & Brown, T. (1993) "NMR assignments and solution conformation of the DNA-RNA hybrid duplex d(GTGAAGCTT).r(AAGUUCAC)." *Eur. J. Biochem.* 215, 297-306.
- Laoui, A., Kozelka, J., & Chottard, J. C. (1988) "*cis*-Diamminediaquaplatinum(II) selectivity for GpG: influence of the adjacent base of the first platination step", *Inorg. Chem.* 27, 2751-2753.
- Le Doan, T., Perrouault, L., Praseuth, D., Habhoub, N., Decoult, J. L., Thuong, N. T., L'homme, J. & Hélène, C. (1987) "Sequence-specific recognition, photocrosslinking, and cleavage of the DNA double-helix by an oligo-[ $\alpha$ ]-thymidilate covalently linked to an azidoproflavine derivative." *Nucleic Acids Res.* 15, 7749-7760.
- Lebleu, B., Robbins, I., Bastide, L., Vives, E. & Gee, J. E. (1997) "Pharmacokinetics of oligonucleotides in cell culture", *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*. Ciba Foundation. Wiley, J. & Sons (West Sussex, U. K.), pp. 47-59.

- Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R. & Leng, M. (1991) "Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminodichloroplatinum(II) and DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1982-1985.
- Lepre, C. A. & Lippard, S. J. (1990) "Interaction of Platinum antitumor compounds with DNA" *Nucleic Acids and Mol. Biol.*, vol. 4 (ed. Eckstein, F. & Lilley, D. M. J.), Springer-Verlag (Berlin).
- Lepre, C. A., Chassot, L., Costello, C. & Lippard, S. L. (1990) "Synthesis and characterization of *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] adducts of [d(CCTCGAGTCTCC).d(GGAGACTCGAGG)]", *Biochemistry* 29, 811-823.
- Lesnik, E. A. & Freier, S. M. (1995) "Relative thermodynamic stability of DNA, RNA and DNA/RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure." *Biochemistry* 34, 10807-10815.
- Lin, Z & Hall, M. B. (1991) "Theoretical studies of inorganic and organometallic reaction mechanisms. 2. The *trans* effect in square-planar Platinum(II) and Rhodium(I) substitution reactions", *Inorg. Chem.* 30, 646-651.
- Lippert, B. (1989) "Platinum nucleobase chemistry", *Progress in Inorg. Chem.* vol 17 (ed. Lippard, S. J.), John Wiley & Sons Inc., pp. 1-89.
- Lippert, B. (1996) "*trans*-diammineplatinum(II): what makes it different from cis-DDP? coordination chemistry of a neglected relative of cisplatin and its interaction with nucleic acids", *Metal Ions in Biological Systems* vol. 33 (ed. Sigel, A. & Sigel, H.), Marcel Decker Inc. (New York), pp. 105-141.
- Long, E. C. (1996) "Fundamentals of nucleic acids" *Bioorganic Chemistry, Nucleic Acids* (ed. Sidney, M. H.) Oxford University Press (New York), pp. 3-35.
- Lyamichev, V. I., Mirkin, S. M. & Frank-Kamenetskii, M. D. (1985) "Structure of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA.", *J. Biomol. Struct. Dynam.* 3, 327-338.
- Lyamichev, V. I., Mirkin, S. M. & Frank-Kamenetskii, M. D. (1986) "Structures of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA.", *J. Biomol. Struct. Dynam.* 3, 667-669.
- Macquet, J. P. & Butour, J. L. (1983) "Platinum-amine compounds: importance of the labile and inert ligands for their pharmacological activities toward L1210 leukemia cells", *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 899-905.

- Malfoy, B., Hartmann, B. & Leng, M. (1981) "The B→Z transition of poly(dGdC).poly(dGdC) modified by some Platinum derivatives", *Nucleic Acids Res.* 9, 5659-5669.
- Malinge, J. M. & Leng, M. (1984) "Reaction of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and DNA in B or Z conformation", *EMBO J.* 3, 1273-1279.
- Malinge, J. M. & Leng, M. (1988) "Reactivity of monofunctional *cis*-platinum adducts as a function of DNA sequence", *Nucleic Acids Res.* 16, 7663-7672.
- Malinge, J. M., Schwartz, A. & Leng, M. (1987) "Characterization of the ternary complexes formed in the reaction of *cis*-diamminedichloroplatinum(II), Ethidium bromide and nucleic acids", *Nucleic Acids Res.* 15, 1779-1797.
- Malinge, J. M., Pérez, J. M. & Leng, M. (1994) "Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA", *Nucleic Acids Res.* 22, 3834-3839.
- Manchanda, R., Dunham, S. U. & Lippard, S. J. (1996) "Automated solid-phase synthesis of site-specifically platinated oligodeoxyribonucleotides", *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5144-5145.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Mansy, S., Rosenberg, B. & Thomson, A. J. (1973) "Binding of *cis*- and *trans*-dichlorodiammineplatinum(II) to nucleosides. I Location of the binding sites", *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1633-1640.
- Mansy, S., Chu, G. Y. H., Duncan, R. E. & Tobias, R. S. (1978) "Heavy metal nucleotide interactions. 12. Competitive reactions in systems of four nucleotides with *cis*- or *trans*-diammineplatinum(II). Raman difference spectrophotometric determination of the relative nucleophilicity of Guanosine, Cytidine, Adenosine and Uridine monophosphates as well as the analogous bases in DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 100, 607-616.
- Maresca, L. & Natile, G. (1993) "Five coordination in Platinum(II) and Palladium(II) chemistry", *Comments Inorg. Chem.* 14, 349-366.
- Marky, L. A. & Breslauer, K. J. (1987) "Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves.", *Biopolymers* 26, 1601-1620.
- Martin, R. B. & Mariam, Y. H. (1979) "" *Metal Ions in Biological Systems*, vol 8 (ed. Sigel, H.), Marcel Dekker, (New York) pp. 57-124.

- Marzilli, L. G. (1977) "", *Prog. Inorg. Chem.* 23, 255-378.
- Marrot, L. & Leng, M. (1989) "Chemical probes of the conformation of DNA modified by *cis*-diamminedichloroplatinum(II)", *Biochemistry* 28, 1454-1461.
- Mathews, C. K. & van Hodke, K. E. (1990) "Biochemistry", Benjamin/Cummings publishing Comp., Inc, California.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977) "A new method for sequencing DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1980) "Sequencing with base-specific chemical cleavages" *Methods in Enzimology*, vol. 65, part I, pp. 499-560.
- Mazeau, K., Vovelle, F., Rahmouni, A. & Leng, M. (1989) "Structure of the Intrastrand *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GCG)}] Adduct in a Dodecanucleotide Duplex. II. A Molecular Mechanics Modelling Study", *Anti-Cancer Drug Design* 4, 63-78.
- McANulty, M. M., & Lippard, S. J. (1995) "Consequences of HMG-Domain protein binding to cisplatin modified DNA", in *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Eckstein, F., & Lilley, D. M. J., Eds) Vol. 9, pp 264-284, Springer-Verlag, Berlin.
- Mello, J. A., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1995) "DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and its *trans*- isomer inhibit RNA polymerase II differentially *in vivo*" *Biochemistry* 34, 14783-14791.
- Millard, J. T., Weidner, M. F., Kirchner, J. J., Ribeiro, S. & Hopkins, P. B. (1991) "Sequence preferences of DNA interstrand crosslinking agents: quantitation of interstrand crosslink locations in DNA duplex fragments containing multiple crosslinkable sites", *Nucleic Acids Res.* 19, 1885-1891.
- Miller, P. S. (1996) "Development of antisense and antigene oligonucleotide analogs", *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 52, 261-269.
- Miller, S. E., Gerard, K. J. & House, D. A. (1991) "The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II): A kinetic comparison of the *cis* and *trans* isomers and others *cis*-di(amine)di(chloro)platinum(II) compounds", *Inorg. Chim. Acta*, 190, 135-144.
- Mirkin, S. M., Frank-Kamenetskii, M. D. (1994) "H-DNA and related structures", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 541-576.
- Mirkin, S. M., Lyamichev, V. I., Drushlyak, K. N., Dobrynin, V. N., Filippov, S. A., Frank-Kamenetskii, M. D. (1987) "DNA H form requires a homopurine-homopyrimidine mirror repeat", *Nature* 330, 495-497.

- Moser, H. & Dervan, P. B. (1987) "Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triplex helix formation.", *Science* 238, 645-650.
- Musso, M., Thomas, T., Shirahata, A., Sigal, L. H., Van Dyke, M. W. & Thomas, T. J. (1997), "Effects of chain length modification and Bis(ethyl) substitution of spermine analogs on purine-purine-pyrimidine triplex DNA stabilization, aggregation, and conformational transitions", *Biochemistry* 36, 1441-1449.
- Nielsen, P. E. (1990) "Chemical and photochemical probing of DNA complexes", *J. Mol. Recognit.* 3, 1-25.
- Ogawa, M., Gale, G. R. & Keirn, S. S. (1975) "Effects of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) on murine and human hemopoietic precursor cells" *Cancer Res.* 35, 1398-1401.
- Palecek, E., Boublikova, P., Jele, F., Krejcova, P., Makaturova, E., Nejedly, K., Pecinka, P., & Vojtiskova, M. (1990) " ", in *Structure and Methods* (Sarma, R. H., & Sarma, M. H., Eds.) Vol. 3, pp 237-253, Adenine Press, Schenectady.
- Paquet, F., Pérez, C., Leng, M., Lancelot, L. & Malinge, J. M. (1996) "NMR solution structure of a DNA decamer containing an interstrand cross-link of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II)", *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 14, 67-77.
- Payet, D., Gaucheron, F., Sip, M. & Leng, M. (1993) "Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N7-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]<sup>2+</sup>-modified DNA: Rates of cross-linking reactions in cis-platinum modified DNA", *Nucleic Acids Res.* 21, 5846-5851.
- Payet, D. & Leng, M. (1994) "DNA, cis-platinum and heterocyclic amines: catalytic activity of the DNA double helix", *Structural Biology: The State of the Art* (ed. Sarma, R. H. & Sarma, M. H.), Adenine Press (New York), vol. 2, 325-333.
- Pinto, A. L. & Lippard, S. J. (1985) "Sequence-dependent termination of *in vitro* DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II)", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 4616-4619.
- Pitteri, B., Marangoni, G. & Cattalini, L. (1994) "Reactivity of neutral Nitrogen donors in planar d<sup>8</sup> metal complexes. Part 2. The system [2,6-bis(methylsulfanylmethyl)pyridine]chloroplatinum(II) with pyridines and amines in methanol. Effect of basicity, π-acceptor capacity and steric hindrance", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3539-3543.
- Plum, G. E., Pilch, D. S., Singleton, S. F. & Breslauer, K. J. (1995) "Nucleic acid hybridization: triplex stability and energetics.", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 319-350.

- Plum, G. E., Park, Y.-W., Singleton, S. F., Dervan, P. B. & Breslauer, K. J. (1990) "Thermodynamic characterization of the stability and the melting behavior of a DNA triplex: a spectroscopic and calorimetric study.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9436-9440.
- Pohl, F. M., & Jovin, T. M. (1971) "Salt induced cooperative conformational changes of a synthetic DNA: equilibrium and kinetics studies with poly(dG-dC)", *J. Mol. Biol.* 67, 375-396.
- Porschke, D. & Eigen, M. (1971) "Cooperative non-enzymic base recognition. III. Kinetics of the helix-coil transition of the oligoribouridylic-oligoriboadenylic-acid system, and of oligoriboadenylic acid alone at acidic pH." *J. Mol. Biol.* 62, 361-381.
- Ptak, M., Rahmouni, A., Mazeau, K., Thuong, N. T. & Leng, M. (1989) "Structure of the intrastrand *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GCG)}] adduct in a dodecanucleotide duplex. II. A <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR study", *Anti-Cancer Drug Design* 4, 53-61.
- Pullman, A. & Pullman, B. (1981) "Molecular electrostatic potential of the nucleic acids", *Q. Rev. Biophys* 14, 289-380.
- Pyle, A. M. & Green, J. B. (1995) "RNA folding." *Curr. Op. Struct. Biol.* 5, 303-310.
- Radhakrishnan, I., de los Santos, C. & Patel, D. J. (1991) "Nuclear Magnetic Resonance structural studies of intramolecular purine.purine.pyrimidine DNA triplexes in solution - base triple pairing alignments, and strand direction." *J. Mol. Biol.* 221, 1403-1418.
- Radhakrishnan, I., de los Santos, C. & Patel, D. J. (1993) "Nuclear Magnetic Resonance structural studies of A.A.T base triple alignments in intramolecular purine.purine.pyrimidine DNA triplexes in solution." *J. Mol. Biol.* 234, 188-197.
- Raghunathan, G., Miles, H. T. & Sasisekharan, V. (1995) "Symmetry and structure of RNA and DNA triple helices." *Biopolymers* 36, 333-343.
- Ramstein, J. & Leng, M. (1980) "Salt dependent dynamic structure of poly(dG-dC) x poly(dG-dC)", *Nature* 288, 413-414.
- Reeder, F., Gonnet, F., Kozelka, J. & Chottard, J. C. (1996) "Kinetic analysis of the reactions between GG-containing oligonucleotides and Platinum complexes: reactions of the double-stranded oligonucleotide d(TTGGAACC)<sub>2</sub> with *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> and [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>", *Inorg. Chem.* 35, 1653-1658.
- Reedijk, J. (1992) "The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of Platinum antitumor compounds", *Inorg. Chim. Acta* 198, 873-881.

- Rice, J. A., Crothers, D. M., Pinto, A. L. & Lippard, S. J. (1988) "The major adduct of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by  $\sim 40^\circ$  towards the major groove", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4158-4161.
- Richon, V. M., Schulte, N., & Eastman, A. (1987) "Multiple mechanisms of resistance to *cis*-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells", *Cancer Res.* 47, 2056-20061.
- Roberts, J. J. & Friedlos, F. (1987) "Differential toxicity of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) toward mammalian cells: lack of influence of any difference in the rates of loss of their DNA-bound adducts" *Cancer Res.* 47, 31-36.
- Roberts, R. W. & Crothers, D. M. (1992) "Stability and properties of Double and Triple helices: dramatic effects of DNA or RNA backbone composition", *Science* 258, 1463-1466.
- Rosenberg, B., van Kamp, L., & Krigas, T. (1965) "Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a Platinum electrode", *Nature* 205, 698-699.
- Rosenberg, B., van Kamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, H. V. (1969) "Platinum Complexes: a New Class of Potent Antitumor Agents", *Nature* 222, 385-386.
- Rosenberg, B. (1980) "Platinum complexes for the treatment of cancer", in *Nucleic-acid-metal-ion interactions (Metals ions in biology, vol. 1)* (ed. Wiley, J.) Spiro TG, New York.
- Rougée, M., Faucon, B., Mergny, J. L., Barcelo, F., Giovannangeli, C., Garestier, T. & Hélène, C. (1992) "Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatches.", *Biochemistry* 31, 9269-9278.
- Saenger (1984) "Principles of nucleic acid structure" (ed. Cantor, C. R.), Springer-Verlag (New York).
- Saito, I., Takayama, M., Sugiyama, H. & Nakatani, K. (1995) "Photoinduced DNA cleavage via electron transfer: demonstration that Guanine residues located 5' to Guanine are the most electron-donating sites", *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6406-6407.
- Salazar, M., Fedoroff, O. Y., Miller, J. M., Ribeiro, N. S. & Reid, B. R. (1993) "The DNA strand in DNA.RNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution." *Biochemistry* 32, 4207-4215.

- Schliepe, J., Berghoff, U., Lippert, B & Cech, D. (1996) "Automatisierte festphasensynthese platinierter oligonucleotide via nucleosidphosphonate", *Angew. Chem.* 108, 705-707.
- Schwartz, A., Marrot, L. & Leng, M. (1989) "Conformation of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II)", *Biochemistry* 28, 7975-7979.
- Seeman, N. C., Rosenberg, J. M., & Rich, A. (1976) "Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 804-808
- Segal-Bendirdjian, E., Brehin, P., Lambert, B., Laoui, A., Kozelka, J., Garrot, J., Maillet, P., Barreau, M., Lavelle, F., Fichtinger-Schepman, A. M. J., Yeung, A. T., Jacquemin-Sablon, A., Le Pecq, J. B. & Chottard, J. C. (1991) "From the modelization of DNA platination to the conception of new drugs", *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy* (ed. Howell, S. B.), Plenum press (New York), pp. 37-49.
- Sen, D. & Gilbert, W. (1988) "Formation of parallel four-stranded complexes by Guanine-rich motifs for meiosis." *Nature* 334, 364-366.
- Shafer, R. H. (1998) "Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands.", *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59, 55-94.
- Sherman, S. E., Gibson, D., Wang, A. H. J. & Lippard, S. J. (1985) "X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(pGpG)}]", *Science* 230, 412-421.
- Sherman, S. E. & Lippard, S. J. (1987) "Structural aspects of Platinum anticancer drug interactions with DNA", *Chem. Rev.* 87, 1153-1181.
- Sherman, S. E., Gibson, D., Wang, A. H. J. & Lippard, S. J. (1988) "Crystal and molecular structure of *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(pGpG)}], the principal adduct formed by *cis*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7368-7381.
- Sigel, H. (1993) "Interactions of metal ions with nucleotides and nucleic acids and their constituents", *Chem. Soc. Rev.* 22, 255-262.
- Sinden, R. R. (1994) "DNA structure and function", Academic Press (New York).
- Singleton, S. F. & Dervan, P. B. (1992) "Influence of pH on the equilibrium association constants for oligodeoxyribonucleotide-directed triple-helix formation at single DNA sites." *Biochemistry* 31, 10995-11003.

- Sip, M. & Leng, M. (1993) "DNA, cis-Platinum and intercalators: catalytic activity of the DNA double helix", *Nucleic Acids & Molecular Biology* vol. 7 (ed. Eckstein, F. & Lilley, D. M. J.), Springer-Verlag (Berlin), pp. 1-15.
- Souchard, J. P., Ha, T. T. B., Cros, S. & Johnson, N. P. (1991) "Hydrophobicity parameters for Platinum complexes", *J. Med. Chem.* 34, 863-864.
- Soyfer, V. N. & Potaman, V. N. (1996) "Triple-helical nucleic acids" Springer-Verlag (New York).
- Sriram, M. & Wang, A. H.-J. (1996) "Structure of DNA and RNA", *Bioorganic Chemistry, Nucleic Acids* (ed. Sidney M. H.) Oxford University Press (New York), pp. 105-143.
- Sugiyama, H. & Saito, I. (1996) "Theoretical studies of GG-Specific photocleavage of DNA via electron transfer: significant lowering of ionization potential and 5'-localization of HOMO of stacked GG bases in B-Form DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7063-7068.
- Sun, J.-S. & Hélène, C. (1993) "Oligonucleotide-directed triple-helix formation." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 345-356.
- Sun, J.-S. Garestier, T. & Hélène, C. (1996) "Oligonucleotide directed triple helix formation." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 327-333.
- Sundquist, W. I. & Heaphy, S. (1993) "Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3393-3397.
- Sundquist, W. Y. & Lippard, S. J. (1986) "Binding of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) to Deoxyribonucleic acid exposes nucleosides as measured immunochemically with anti-nucleoside antibodies", *Biochemistry* 25, 1520-1524.
- Tabor, H. (1962) "The protective effect of spermine, and other polyamines against heat denaturation of Deoxyribonucleic acid (DNA)", *Biochemistry* 1, 496-501.
- Tabor, C. W. & Tabor, H. (1984) "Polyamines", *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
- Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. & Lippard, S. J. (1995) "Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin", *Nature* 377, 649-652.
- Takahara, P. M., Frederick, C. A. & Lippard, S. J. (1996) "Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA", *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12309-12321.

- Thomas, T. & Thomas, T. J. (1993) "Selectivity of polyamines in Triplex DNA stabilization", *Biochemistry* 32, 14068-14074.
- Thuong, N. T. & Hélène, C. (1993) "Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides". *Angew. Chem. Int. Ed; Eng.* 32, 666-690.
- Turner, D. H., Sugimoto, N., Dreiker, S. D. & Freier, S. M. (1988) "Hydrogen bonding and stacking contributions to nucleic acid stability" *Structure and Expression* (ed. Sarma, R. H. & Sarma, M. H.) Adenine Press (New York), pp. 249-259.
- Ushay, H. M., Tullius, T. D. & Lippard, S. J. (1981) "Inhibition of the BamHI cleavage and unwinding of pBR322 Deoxyribonucleic acid by the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II)", *Biochemistry* 20, 3744-3748.
- Ushay, H. M., Santella, R. M., Caradonna, J. P., Grunberger, D. Et Lippard, S. J. (1982) "Binding of [(dien)PtCl]Cl to poly(dG-dC).poly(dG-dC) facilitates the B→Z conformational transition", *Nucleic Acids Res* 10, 3573-3588.
- van Garderen, C. J.; van den Elst, H.; van Boom, J. H.; Reedjik, J. & van Houte, L. P. A. (1989) "A double stranded DNA fragment shows a significant decrease in double-helix stability after binding of monofunctional Platinum amine compounds", *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4123-4125.
- van Garderen, C. J., Altona, C. & Reedjik, J. (1990) "Conformational changes in a single- and double-stranded nonanucleotide upon complexation of a monofunctional Platinum compound as studied by <sup>1</sup>H NMR, <sup>31</sup>P NMR and CD methods", *Inorg. Chem.* 29, 1481-1487.
- van Garderen, C. J., van Houte, L. P. A. (1994) "The solution structure of a DNA duplex containing the *cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>[d(-GTG-)N7(G), N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics", *Eur. J. Biochem.* 225, 1169-1179.
- Vasquez, K. M. & Wilson, J. H. (1998) "Triplex-directed modifications of genes and gene activity", *Trends Biochem. Sci.* 23, 4-9.
- Verdaguer, N., Aymami, J., Fernandez-Fornier, D., Fita, I., Coll, M., Huynh-Dinh, T., Igolen, J. & Subirana, J. A. (1991) "Molecular structure of a complete turn of A-DNA" *J. Mol. Biol.* 221, 623-630.
- Vlassov, V. V., Gorn, V. V., Ivanova, E. M., Kazakov, S. A. & Mamaev, S. V. (1983) "Complementary addressed modification of oligonucleotide d(pGpGpCpGpGpA) with Platinum derivative of oligonucleotide d(pTpCpCpGpCpCpTpTpT)", *FEBS Lett.* 162, 286-289.

- Vrána, O., Brabec, V. & Kleinwächter, V. (1986) "Polarographic studies on the conformation of some Platinum complexes: relations to antitumor activity", *Anticancer Drug Design* 1, 95-109.
- Vrána, O., Boudný, V. & Brabec, V. (1996) "Superhelical torsion controls DNA interstrand cross-linking by antitumor *cis*-diamminedichloroplatinum(II)", *Nucleic Acids Res.* 24, 3918-3925.
- Wang, A. H.-J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Crawford, J. L., van Boom, J. H., van der Marel, G. & Rich, A. (1979) "Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution", *Nature* 282, 680-686.
- Watson J. D. & Crick, F. H. C. (1953) "A structure of Deoxyribose nucleic acid" *Nature* 171, 737-738.
- Williamson, J. R. (1993) "Guanine quartets", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 357-362.
- Williamson, J. R. (1994) "G-quartet structures in telomeric DNA", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 703-730.
- Williamson, J. R., Raghuraman, M. K., Cech, T. R. (1989) "Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model." *Cell* 59, 871-880.
- Xiao, L., Swank, R. A. & Matthews, H. R. (1991) "Photoaffinity polyamines: sequence-specific interactions with DNA.", *Nucleic Acids Res.* 13, 3701-3708.
- Xodo, L. E., Manzini, G., Quadrioglio, F., van der Marel, G. & van Boom, J. (1991) "Effect of 5-Methylcytosine on the stability of triple-stranded DNA - a thermodynamic study.", *Nucleic Acids Res.* 19, 5625-5631.
- Xodo, L. E., Alunni-Fabroni, M., Manzini, G. & Quadrioglio, F. (1994) "Pyrimidine phosphorothioate oligonucleotides form triple-stranded helices and promote transcription inhibition", *Nucleic Acids Res.* 22, 3322-3330.
- Xodo, L. E., Pirulli, D. & Quadrioglio, F. (1997) "A kinetic study of triple-helix formation at a critical R-Y sequence of the murine *c-Ki-ras* promoter by (A,G) and (G,T) oligonucleotides." *Eur. J. Biochem.* 248, 424-432.



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Eloy Bernal Mendez  
El transplante: de número madre a  
nuevo agente terapéutico

~~El~~ Soberalmente un tarde por humanidad

3

Mayo

99

El Vicerrector,  
Haclemey  
Haclemey  
El Doctorado

~~Auto de P...~~  
a J. Pacheco

~~El~~ en salas  
El Doctorado

fulárig  
a J. Márquez

El Doctorado, Samuel G. Baralote

~~El~~