



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica

***“Aplicaciones catalíticas de
oligonucleótidos modificados”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Bioq. María Dellafiore

Director de Tesis: **Dr. Javier M. Montserrat**

Director Adjunto de Tesis: **Dr. Adolfo M. Iribarren**

Consejera de Estudios: **Dra. Albertina Moglioni**

Lugar de Trabajo: **Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular “Dr. Héctor Torres” (INGEBI-CONICET)**

2017

“Aplicaciones catalíticas de oligonucleótidos modificados”

Hoy en día, se conocen oligonucleótidos cuya función se encuentra asociada a procesos catalíticos o de reconocimiento molecular. Estas macromoléculas han sido agrupadas bajo el término de oligonucleótidos funcionales. Entre ellos podemos mencionar a las ribozimas, las DNAzimas, y los aptámeros cuyas aplicaciones se han destacado en el campo de la terapia de silenciamiento génico, el desarrollo de herramientas de diagnóstico y sensores, la biocatálisis y la nanotecnología.

En la primera parte de este trabajo, se aborda el problema de la estabilidad de los oligonucleótidos funcionales en medios biológicos degradantes mediante la incorporación de nucleósidos modificados en su secuencia. Se utiliza como modelo la DNAzima 8-17, una fosfodiesterasa compuesta por un núcleo catalítico de 15 nucleótidos de longitud flanqueado por dos brazos de reconocimiento de sustrato. Se estudia cómo la incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilpirimidín nucleósidos, incorporados en distintas posiciones del núcleo catalítico afecta la actividad y estabilidad del oligonucleótido teniendo como objetivo la obtención de DNAzimas resistentes a la degradación nucleolítica que preserven su actividad hidrolítica frente a ARNm de interés terapéutico. Los resultados demostraron que la actividad de la DNAzima luego de la incorporación de modificaciones en el núcleo catalítico es dependiente de la posición siendo posible, luego de estudiar distintas variantes, la obtención de DNAzimas más resistentes que conserven su actividad.

Para estudiar el efecto de los 2'-desoxi-2'-C-metilpirimidín nucleósidos en un sistema diferente al de la DNAzima 8-17 pero con un fin común, el de silenciamiento génico, se modificaron siRNAs en distintas posiciones. Éstos análogos de nucleósidos fueron capaces de modular tanto la potencia silenciadora como la especificidad del sistema de interferencia siendo también un efecto posición dependiente.

Teniendo en cuenta la propiedad que poseen los 2'-desoxi-2'-C-metilpirimidín nucleósidos de adoptar una conformación preferencial según la configuración del carbono 2', se estudió cómo la presencia de los mismos afecta la estabilidad termodinámica de un dúplex de ADN y de una estructura de i-motif. Mientras que en los dúplex de ADN ambos diastereoisómeros resultaron desestabilizantes, la presencia de (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina aumentó la estabilidad de los i-motif permitiendo su formación en un rango más amplio de pH y temperatura.

Por último, se amplió el estudio de los oligonucleótidos funcionales a la DNAzima peroxidasa que consiste en un oligonucleótido unido de manera específica a la hemina potenciando la actividad peroxidasa intrínseca de la misma. Se trabajó con el oligonucleótido en su forma L y con la secuencia inmovilizada demostrando una actividad comparable a la

secuencia sin alteraciones para un amplio repertorio de sustratos, entre ellos sulfuros y paracetamol.

Palabras clave:

Oligonucleótidos funcionales

2'-desoxi-2'-C-metilpirimidín nucleósidos

DNAzima

Aptámero

DNAzima 8-17

DNAzima peroxidasa

siRNA

i-motif

“Catalytic applications of functional oligonucleotides”

Oligonucleotides whose function is associated with catalytic or molecular recognition processes are known as functional oligonucleotides (ribozymes, DNAzymes, aptamers) and their applications include gene silencing therapy, diagnostic tools and sensor development, biocatalysis and nanotechnology.

In this work, we studied how to optimize the use of these oligonucleotides by incorporating chemical modifications.

Initially, we studied the modulating effect of 2'-deoxy-2'-C-methylpyrimidin nucleosides on: the hydrolytic activity and stability in biological media of 8-17 DNAzyme when incorporated in different positions of its catalytic core; the silencing potency and specificity of siRNA when incorporated in different positions of the antisense and sense strands; the thermodynamic stability of duplex and i-motif-forming DNA.

Finally, the study was extended to the peroxidase DNAzyme using a fully modified sequence with L-nucleotides and also an immobilized sequence testing a wide repertoire of substrates, including sulfides and paracetamol.

Key words:

Functional oligonucleotides

2'-deoxy-2'-C-methylpyrimidin nucleosides

DNAzyme

Aptamer

8-17 DNAzyme

Peroxidase DNAzyme

siRNA

i-motif

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que a lo largo de estos años, tanto desde lo científico como desde lo personal, formaron parte de este trabajo y lo hicieron posible.

A Javier y Adolfo, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y convertirse en personas clave en mi formación como profesional, por todo su tiempo y dedicación, por sentarse a escuchar mis problemas y mis ideas, por saber transmitir el entusiasmo por lo que hacen y generar un lindo ambiente de trabajo... y por un montón de cosas mas...

Al INGEBI, por haber sido mi lugar de trabajo por todos estos años, a todos los becarios, investigadores, personal de apoyo y administrativo, por haberme acompañado en el día a día y ayudado siempre que los necesité.

A Male por ser una excelente compañera de laboratorio, por sentarse enfrente mio y escuchar todos mis problemas con el sintetizador entre otras cosas, siempre tomarse el tiempo para ayudarme a buscar explicaciones y reírse conmigo cuando nada parece tener lógica.

A los chicos del laboratorio 222 por su compañía y amistad, por su ayuda, por las salidas, por el café, por alegrarme las tardes en el INGEBI y en especial a Fran y Lean por las TaLuln que fueron geniales!

Al Dr. Ramón Eritja por recibirme en su laboratorio y brindarme la posibilidad de realizar un trabajo en colaboración, por poner a mi disposición todos los materiales e instrumentos de su laboratorio y por tener siempre una historia para contarme. A él y a todo su grupo por hacerme sentir como en mi casa, por las charlas de los almuerzos y por haberme hecho pasar una estadia inolvidable. A Anna por dedicarme tanto tiempo, por los cientos de oligos que hicimos juntas, por sus charlas y su compañía. A Adele por enseñarme a trabajar con células y compartirme sus técnicas. A Andreia por su compañía fuera del laboratorio y todas nuestras salidas.

A los chicos de la UNQ por ser mis compañeros de congresos y hacerme sentir una más del grupo, y también gracias a ellos y a los chicos de la UNGS por prestarme miles de cosas, por escuchar mis seminarios, por resolverme dudas y hacerme compañía algunos días en el INGEBI.

A Laura por transmitirme todos sus conocimientos y experiencia, sobre todo por su ayuda con el sintetizador, por responder siempre mis mails llenos de preguntas. A Marisa por acompañarme los últimos meses que estuve en el laboratorio y darme consejos para la tesis.

A Daniel por ayudarnos con el sintetizador tantas veces...

A ANPCyT, a CONICET, a la UBA, a la OPCW y a EMBO por las becas y el financiamiento para mi formación.

A Juli por su amistad de tantos años, por bancarme durante el doctorado aunque no hayamos compartido el mismo lugar de trabajo. Por conocerme y avisarme de un cartel de búsqueda de becario que me podía interesar...

A mi familia, Ana, Alberto y Sofia, y a Santiago por brindarme siempre su apoyo, su ayuda y darme todas las herramientas no relacionadas a la ciencia pero igual de importantes y necesarias para lograr este trabajo.

ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	1
Estructura primaria de los ácidos nucleicos	1
Estados conformacionales de la furanosa	4
Orientación de las bases nitrogenadas	6
Orientación del fosfato	7
Estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos	8
Interacciones por puente de hidrógeno	8
Interacciones por apilamiento o stacking	9
Interacciones con el medio	10
Motivos estructurales más frecuentes	10
Otros motivos estructurales menos frecuentes	13
G-quadruplex o cuartetos de G	13
I-motif o i-ADN	15
MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	16
Modificaciones del esqueleto fosfato	17
Modificaciones del azúcar	18
2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos	19
OLIGONUCLEÓTIDOS CON FINES CATALÍTICOS Y DE RECONOCIMIENTO	20
Oligonucleótidos antisentido	20
ARN de interferencia	20
Oligonucleótidos funcionales: DNAzimas y aptámeros	22
Aspectos generales de las DNAzimas	22
Aspectos generales de los aptámeros	26
DNAzima 8-17	29
DNAzima peroxidasa	31
Aplicaciones de oligonucleótidos funcionales	33
Aplicaciones terapéuticas	33
Aplicaciones diagnósticas	34
Aplicaciones en el desarrollo de sensores y nanoestructuras	35
Ventajas del uso de oligonucleotides funcionales	39

1.4 REFERENCIAS	40
-----------------	----

Capítulo 2: SÍNTESIS DE 2'-DESOXI-2'-C-METILNUCLEÓSIDOS

CONSIDERACIONES PREVIAS	47
OBJETIVOS	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina y sus fosforamidas	48
Síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina y sus fosforamidas	50
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	52

Capítulo 3: SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADOS

CONSIDERACIONES PREVIAS	54
OBJETIVOS	60
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Síntesis y purificación de DNazimas 8-17 modificadas	60
Síntesis del oligonucleótido inmovilizado para la DNazima peroxidasa.	63
Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ADN modificados para estudios de formación de dúplex	63
Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ADN modificados para estudios de formación de estructuras i-motif	64
Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ARN modificados para la posterior construcción de siRNAs	65
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	66

Capítulo 4: ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE DNAZIMAS 8-17 MODIFICADAS

CONSIDERACIONES PREVIAS	68
OBJETIVOS	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
Cinética de hidrólisis de un sustrato corto catalizada por la DNazima 8-17 no modificada a distintas concentraciones de cloruro de magnesio	70
Cinéticas de hidrólisis de sustrato corto catalizada por DNazimas 8-17 modificadas con 2'-C-metilnucleósidos en el núcleo catalítico	74

Índice

Estabilidad de las DNazimas 8-17 modificadas	80
CONCLUSIONES	84
REFERENCIAS	85

Capítulo 5: ESTUDIOS DE POTENCIA EN siRNAs MODIFICADOS

CONSIDERACIONES PREVIAS	86
OBJETIVOS	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
Preparación de los dúplex de siRNA	87
Estudios de potencia y estabilidad termodinámica de siRNAs modificados	87
Estudios de silenciamiento ON/OFF- <i>target</i> de siRNAs modificados	92
CONCLUSIONES	94
REFERENCIAS	95

Capítulo 6: ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE DÚPLEX E I-MOTIF EN CADENAS DE ADN MODIFICADAS

CONSIDERACIONES PREVIAS	96
OBJETIVOS	97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
Análisis de dúplex de ADN modificados por curvas de fusión	98
Análisis de i-motif modificados por curvas de fusión, dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear	99
CONCLUSIONES	105
REFERENCIAS	105

Capítulo 7: EXPLORACIÓN DEL USO DE LA DNAZIMA PEROXIDASA

CONSIDERACIONES PREVIAS	107
OBJETIVOS	108
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
7.3.1 Oxidación de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	108
7.3.2 Oxidación de tioanisol por D y L-DNAzima peroxidasa	110

Índice

Oxidación de tioanisol por la DNAzima peroxidasa inmovilizada (I-Dz)	115
Oxidación de otros sulfuros por la D y la L-DNAzima peroxidasa	117
Oxidación de Paracetamol	120
Oxidación de ácido indol acético (IAA)	122
Oxidación de fenol	123
CONCLUSIONES	124
REFERENCIAS	125

Capítulo 8: CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES FUTURAS

CONCLUSIONES GENERALES	126
PROYECCIONES FUTURAS	128

Capítulo 9: MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIALES	130
1 Reactivos y solventes	130
Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos (Capítulo 2)	130
Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)	131
Estudios de actividad y estabilidad de DNAzimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)	132
Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)	133
Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)	133
Exploración del uso de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 7) 9. 1. 2 Buffers y soluciones	134
Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)	135
Estudios de actividad y estabilidad de DNAzimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)	135
Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)	137
Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)	137
Exploración del uso de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 7)	
3 Equipamiento	137
2 MÉTODOS	138
	139

Índice

Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos (Capítulo 2)	139
Síntesis de 3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (2)	139
Síntesis de 2'-ceto-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (3)	140
Síntesis de 2'-desoxi-2'-metiliden-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (4)	142
9.2.1.4 Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (Mezcla 5)	143
9.2.1.5 Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-O ⁴ -p-nitrofeniluridina (6 y 7)	144
9.2.1.6 Síntesis de (2'S) y (2'R) 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tertaisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (8 y 9)	145
Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (10 y 11)	146
Síntesis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (12 y 13)	147
Síntesis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (14 y 15) 9.2.1.10	148
Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)citidina (16 y 17)	150
9.2.1.11 Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-N ⁴ -benzoilcitidina (18 y 19)	151
9.2.1.12 Análisis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metil-N ⁴ -benzoilcitidina (24 y 25) por ³¹ P-RMN	153
Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)	153
Síntesis de DNazimas 8-17 y DNazima peroxidasa inmovilizada	153
Síntesis de secuencias de ADN para evaluar formación de dúplex e i-motif	154
Síntesis de secuencias de ARN para la construcción de siRNAs modificados	155
Desprotección, purificación y destritolación de DNazimas 8-17	155
Desprotección, destritolación y cuantificación del oligonucleótido de la DNazima peroxidasa	156
Desprotección, destritolación y purificación de oligonucleótidos de ADN para dúplex e i-motif	157

Desprotección, destritilación y purificación de oligonucleótidos de	
ARN	157
Control de pureza e integridad de oligonucleótidos por RP-HPLC	158
Control de pureza e integridad de oligonucleótidos por espectrometría de masas	158
Estudios de actividad y estabilidad de DNAzimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)	158
Preparación de geles de poliacrilamida	159
Reacción de marcación del sustrato de la DNAzima 8-17 con [$\gamma^{32}\text{P}$]	
ATP en el extremo 5'	159
Reacciones de hidrólisis de un sustrato corto utilizando la DNAzima 8-17	160
Estabilidad de las DNAzimas 8-17 frente a la endonucleasa RQ1	161
Estabilidad de las DNAzimas 8-17 frente a lisado celular T47D	161
Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)	162
Preparación de los dúplex de siRNA	162
Curvas de fusión y determinación de temperatura de fusión (T_m)	162
Mantenimiento de la línea celular y armado de placas de 24 pocillos	163
Sistema reportero psiCHECK2	163
Transfección de células HeLa y ensayo dual de la luciferasa	164
Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)	165
Obtención de curvas de fusión para dúplex de ADN	165
Obtención de curvas de fusión y espectros de dicroísmo circular para secuencias formadoras de i-motif	166
Obtención de espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) para secuencias formadoras de i-motif.	167
Exploración del uso de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 7)	167
Oxidación de TMB catalizada por la D y la L-DNAzima peroxidasa	167
Oxidación de TMB catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada	168
Obtención de tiempos de retención y curvas de calibración de sulfuros, sulfóxidos y sulfonas utilizando estándares	169
Curvas de actividad para la oxidación de tioanisol catalizada por D y L-DNAzima peroxidasa	169
Oxidación de tioanisol catalizada por la DNAzima peroxidasa	

Índice

inmovilizada	170
Oxidación de sulfuros catalizadas por D y L-DNAzima peroxidasa	171
Oxidación de Paracetamol catalizada por D y L-DNAzima peroxidasa	
Oxidación de paracetamol catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada	172
Oxidación de ácido indolacético (IAA) por la D-DNAzima peroxidasa	173
Oxidación de fenol por la DNAzima peroxidasa	174
	175

Capítulo 10: ANEXO

Material suplementario al Capítulo 2	176
Material suplementario al Capítulo 3	180
Material suplementario al Capítulo 4	195
Material suplementario al Capítulo 5	201
Material suplementario al Capítulo 6	217
Material suplementario al Capítulo 7	236
Abreviaciones	253
Publicaciones relacionadas a este trabajo	256

INTRODUCCIÓN



Los ácidos nucleicos constituyen uno de los principales tipos de macromoléculas biológicas. Los primeros estudios vincularon esta clase de polímeros (ARN y ADN) al almacenamiento, transferencia y expresión de la información génica, pero hoy en día, luego de varias décadas de investigación, se sabe que sus funciones se extienden mucho más allá de las propuestas iniciales. Actualmente, se conocen oligonucleótidos (secuencias habitualmente de hasta 100 nucleótidos) capaces de actuar como catalizadores o asistir en un proceso catalítico (Ribozimas, DNAzimas, siRNA, miRNA), así como también otros que pueden reconocer específicamente una molécula blanco (aptámeros). Los oligonucleótidos asociados a las funciones catalíticas o de reconocimiento molecular reciben la denominación de “oligonucleótidos funcionales”. Estas moléculas han encontrado diversos usos en el campo de la terapia de silenciamiento génico,^{1,2} el desarrollo de herramientas de diagnóstico y sensores,^{3,4} la biocatálisis,⁵ la nanotecnología^{6,7} y la creación de circuitos computacionales.⁸ Algunas de estas aplicaciones catalíticas de los ácidos nucleicos fueron estudiadas en este trabajo y serán desarrolladas en los capítulos subsiguientes. Por ello, se introducen a continuación las características generales, estructurales, funciones y usos de los oligonucleótidos.

1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.

1.1.1 Estructura primaria de los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos constituyen polímeros lineales formados por monómeros denominados nucleótidos, unidos entre sí por enlaces covalentes de tipo fosfodiéster (Figura 1.1).^{9,10}

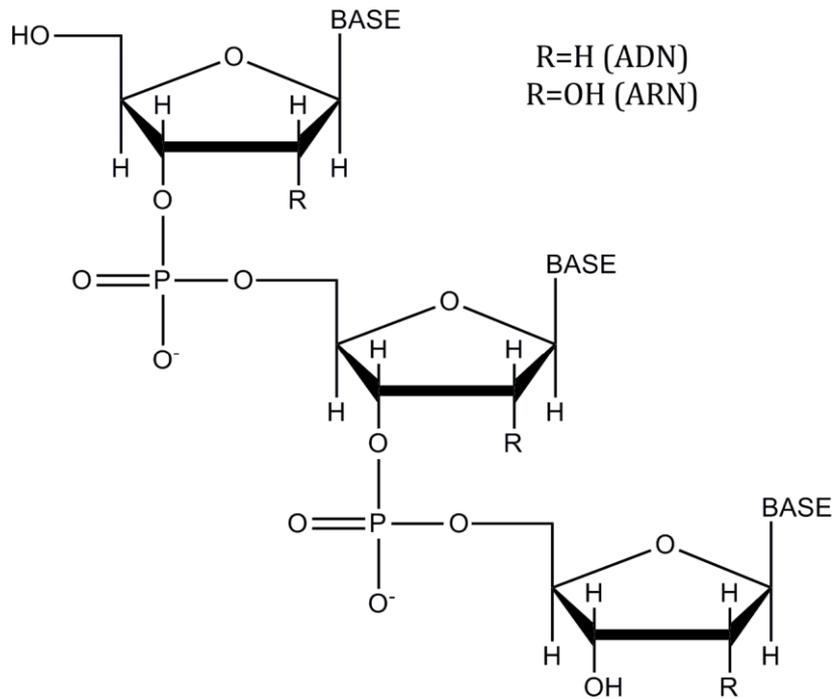


Figura 1.1 Estructura primaria de los ácidos nucleicos.

La estructura química de un nucleótido está formada por una pentosa unida mediante un enlace fosfoéster a un grupo fosfato y mediante un enlace β -glicosídico a una base nitrogenada. Según el tipo de pentosa podemos distinguir entre el ácido ribonucleico (ARN), cuando el anillo furanósico que compone el nucleótido es la β -D-ribosa, y el ácido desoxirribonucleico (ADN) cuando posee la β -D-2'-desoxirribosa.

Dentro de las bases nitrogenadas naturales más comunes existen aquéllas de tipo pirimidínicas como la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U); y las de tipo púricas como la adenina (A) y la guanina (G). Las pirimidinas se encuentran unidas por el carbono 1 al carbono 1' de la pentosa mientras que las purinas se encuentran unidas por el carbono 9. A, G y C se encuentran presentes tanto en el ADN como en el ARN mientras que T se encuentra solamente en el ADN y U en el ARN. El producto de la unión de la base nitrogenada al azúcar recibe el nombre de nucleósido (Figura 1.2).

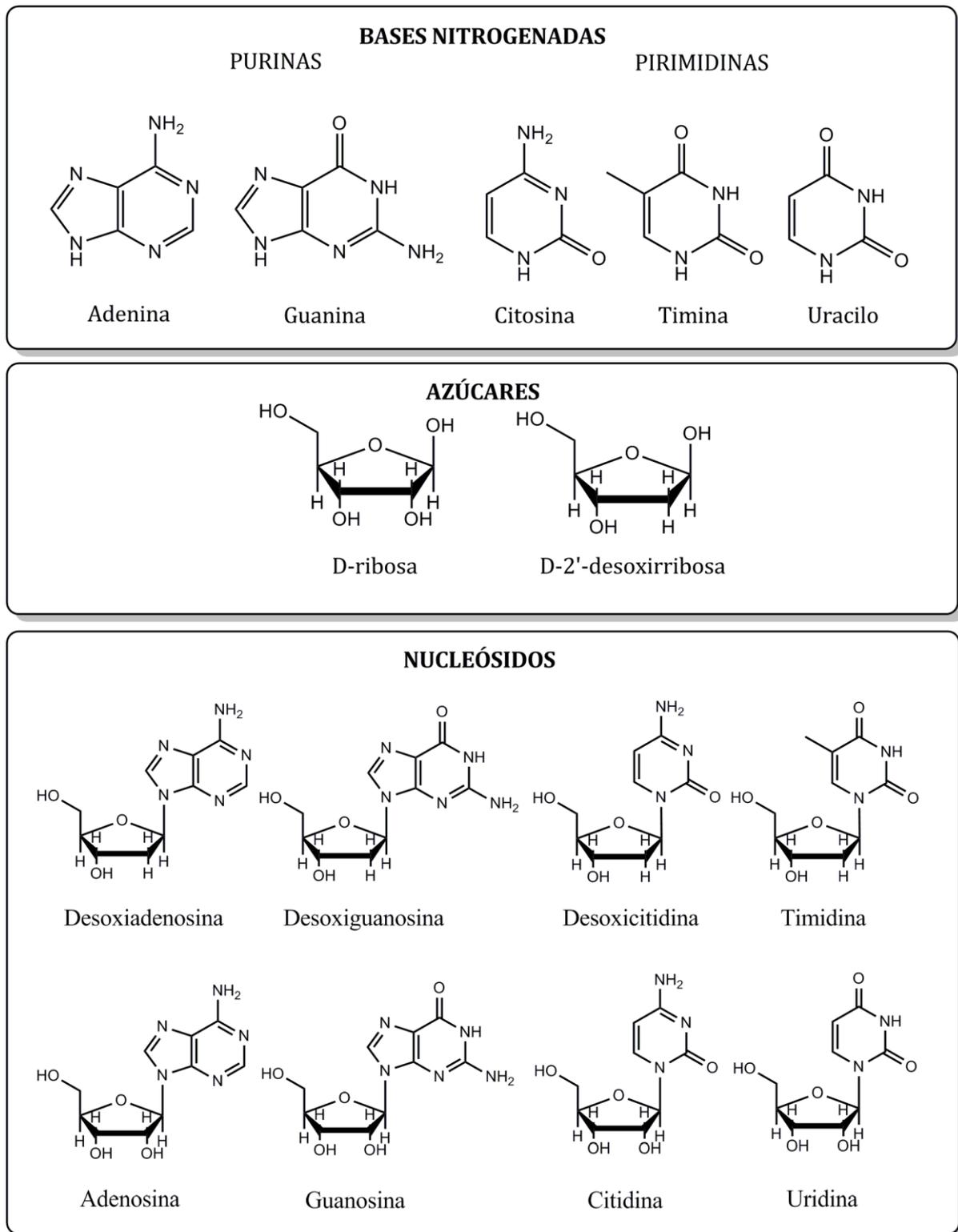


Figura 1.2 Estructura de los nucleósidos

La esterificación entre un hidroxilo del nucleósido y un resto fosfato da origen a un nucleótido (Figura 1.3).

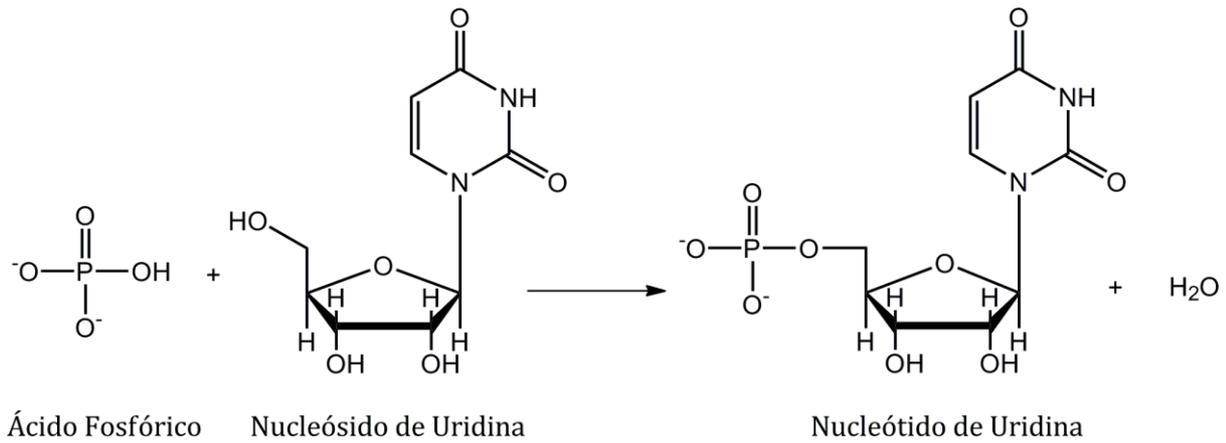


Figura 1.3 Formación del nucleótido de uridina.

Estados conformacionales de la furanosa.

Los cinco átomos del anillo furanósico no se encuentran en un plano, debido a que esta conformación es energéticamente desfavorable. Es por ello que el anillo adquiere conformaciones de menor energía generadas por el movimiento de uno o dos átomos fuera del plano. Las conformaciones más estables son la tipo sobre o “envelope” (E), donde 4 átomos se encuentran en un plano y uno de los átomos es desplazado hacia arriba o hacia abajo de éste; y la conformación torcida o “twist” (T) donde tres átomos se encuentran en un plano y los dos restantes se ubican uno por debajo y otro por encima del mismo (Figura 1.4). A los átomos que se encuentran fuera del plano se los denomina *endo* si están del lado del carbono 5' o *exo* si están del lado opuesto (Figura 1.4)

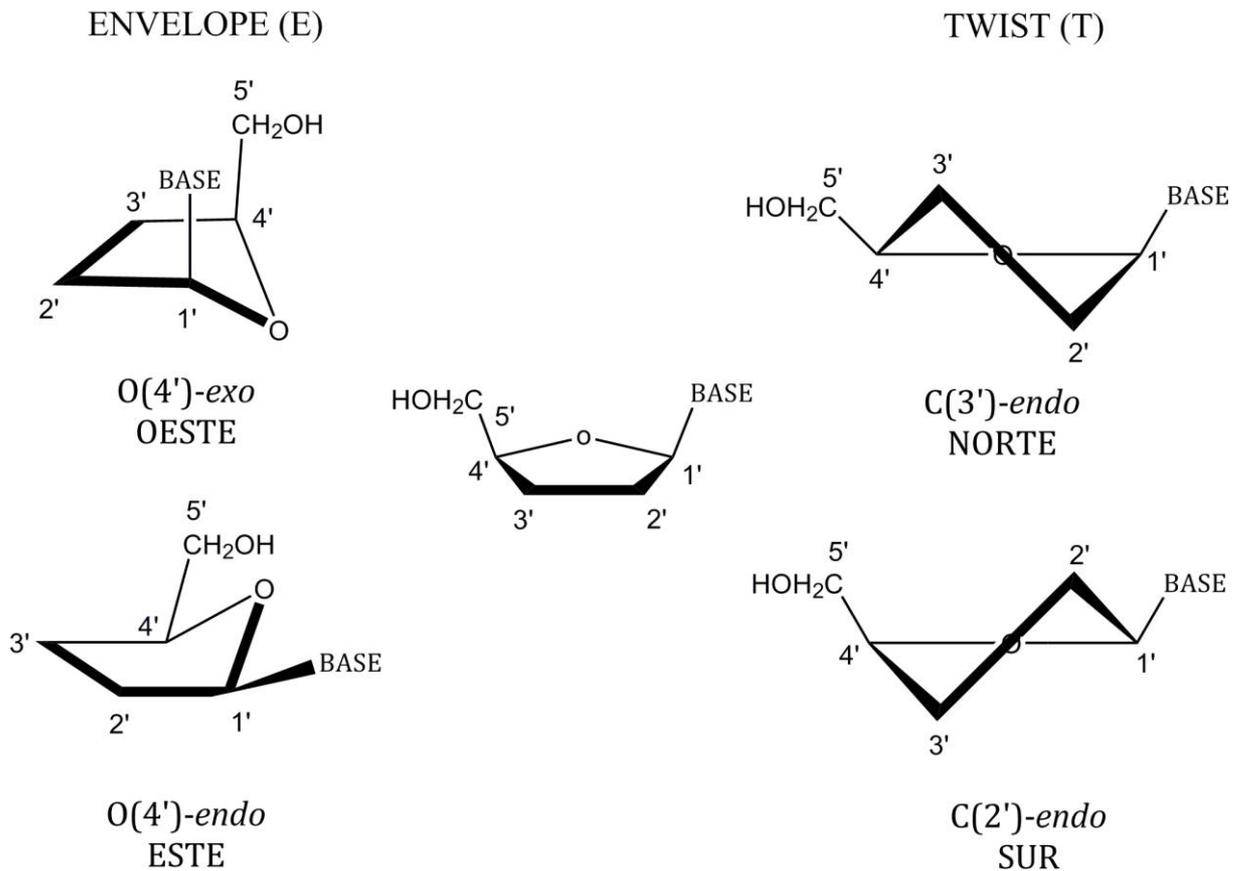


Figura 1.4 Estados conformacionales de la furanosa.

Los estados conformacionales de la furanosa de los nucleósidos pueden describirse utilizando lo que se denomina ciclo pseudorrotacional.¹¹ En éste podemos distinguir distintas conformaciones del azúcar según su ángulo de fase pseudorrotacional (P), el cual se calcula a partir de los ángulos de torsión endocíclicos. Se conoce como conformaciones Norte a aquellas que presentan configuración C3'-endo con ángulos de fase entre 0° y 30° y como conformación Sur a aquellas que presentan configuración C2'-endo con ángulos de fase entre 150° y 180° (Figura 1.5). Mientras que los ácidos nucleicos naturales se ubican en dos zonas restringidas del ciclo pseudorrotacional, la sur y la norte, para los nucleótidos o nucleósidos en solución ambas conformaciones son accesibles a través de un equilibrio de interconversión rápido. La transición entre las conformaciones norte y sur generalmente se da a través de un intermediario con conformación O4'-endo (Este) donde el grupo fosfato y la base nitrogenada se encuentran alejadas, siendo la transición a través de la conformación opuesta (Oeste) de mayor costo energético. En el caso de las moléculas de ADN los nucleósidos suelen adoptar la conformación sur mientras que para el ARN suelen adoptar una conformación norte.

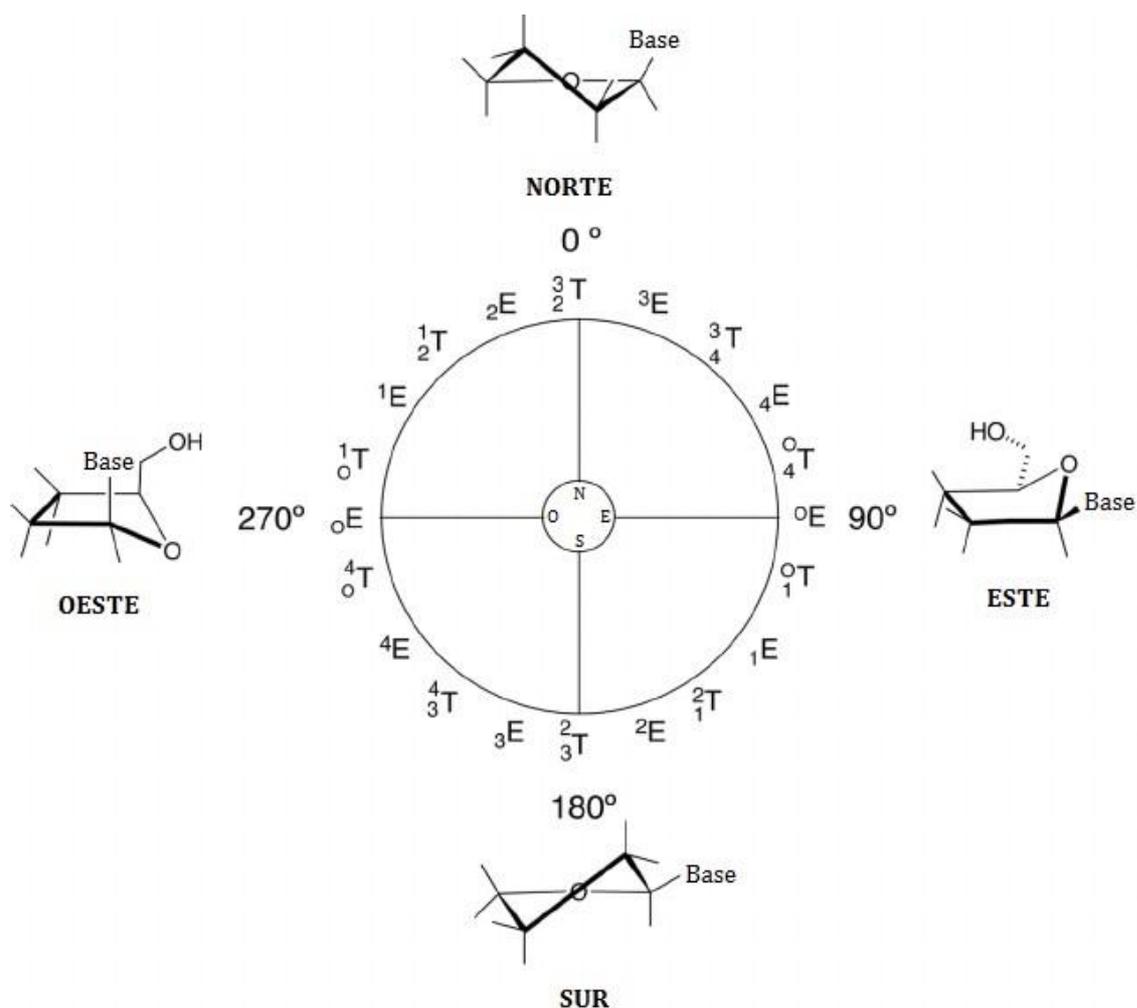


Figura 1.5 Ciclo pseudorrotacional de las pentosas.

Orientación de las bases nitrogenadas.

Las bases nitrogenadas son anillos aromáticos heterocíclicos unidos al C1' del azúcar a través de un enlace glicosídico. Presentan una desviación muy pequeña de la planaridad y son casi perpendiculares a un hipotético plano del resto furanósico. El ángulo x describe la orientación de la base respecto al azúcar considerando la rotación en torno al enlace glicosídico (O4'-C1'-N9-C4 para purinas y O4'-C1'-N1-C2 para pirimidinas). Podemos distinguir dos orientaciones mayoritarias: *syn* cuando el enlace O4'-C1' se encuentra eclipsado con el enlace N9-C4 en purinas o N1-C2 en pirimidinas, y *anti* cuando se encuentra opuesto. La conformación más estable es la *anti* debido a una disminución de la repulsión estérica entre la base y el azúcar al quedar la base hacia afuera. Sin embargo, algunos factores tales como estabilización por puente de hidrógeno, grupos voluminosos en la base o en el azúcar e interacciones con otras moléculas, pueden desplazar el equilibrio en dirección del conformero *syn* (Figura 1.6).

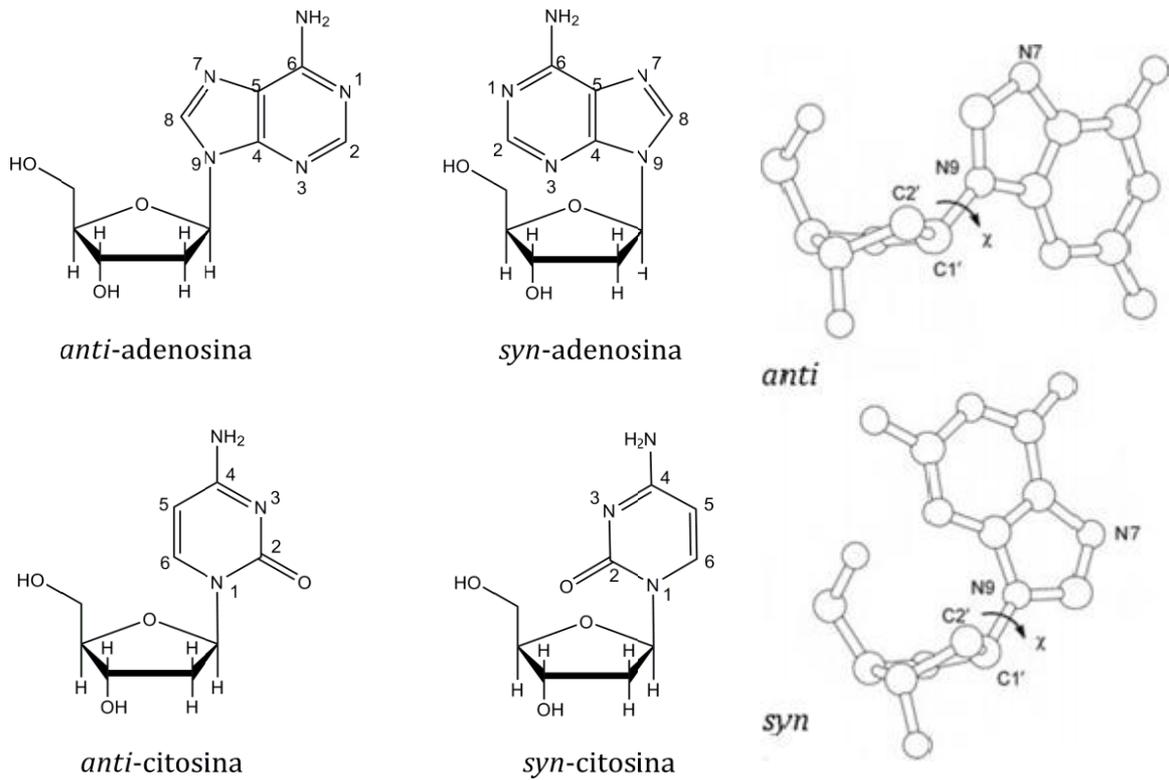


Figura 1.6 Orientación de las bases nitrogenadas

Orientación del fosfato.

La rotación alrededor del enlace C4'-C5' le permite al O5' adoptar distintas orientaciones respecto de la furanosa. Existen tres conformaciones principales: *gauche-gauche* si el O5' se encuentra entre el O4' y el C3' en una proyección de Newman; *gauch-trans* si el O5' se encuentra trans al C3' pero al lado del O4'; y *trans-gauche* si esta trans al O4' pero al lado de C3' (Figura 1.7).

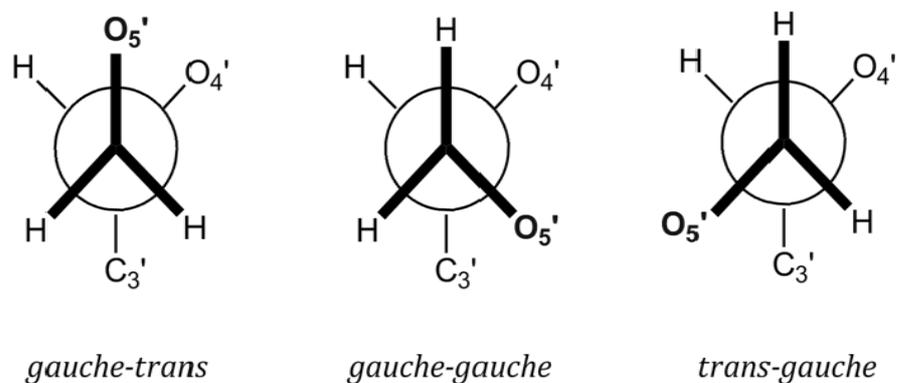


Figura 1.7 Orientación del fosfato.

Estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos.

La manera en que las bases nitrogenadas interactúan o se aparean ya sea dentro de una misma cadena o entre dos o más cadenas distintas determinará la forma o estructura secundaria del ácido nucleico que a su vez se plegará en el espacio tridimensional adquiriendo una determinada estructura terciaria. Existen dos tipos de interacciones principales entre las bases: las uniones por puentes de hidrógeno en el mismo plano de las bases, y las fuerzas de apilamiento o *stacking*, perpendiculares a dicho plano. Estas interacciones dependen de la densidad de carga, el pKa y la capacidad de tautomerizar de cada base.

Interacciones por puente de hidrógeno.

Los equilibrios ceto-enólicos y amino-imínicos de las bases están desplazados hacia las formas ceto y amino haciendo que el nitrógeno funcione como donador y el oxígeno como aceptor de puentes de hidrógeno. Dentro de todas las posibles interacciones por puente de hidrógeno entre las bases, el patrón más encontrado en los ácidos nucleicos naturales es el apareamiento de Watson y Crick.¹² Se caracteriza por la unión de adenina a timina o uracilo a través de dos puentes de hidrógeno y la unión de citosina a guanina a través de tres puentes de hidrógeno. Este tipo de apareamiento purina-pirimidina resulta el más estable debido a que la distancia entre las bases y el enfrentamiento de donores y aceptores provee la condición energéticamente más favorable para la formación de los puentes (Figura 1.8).

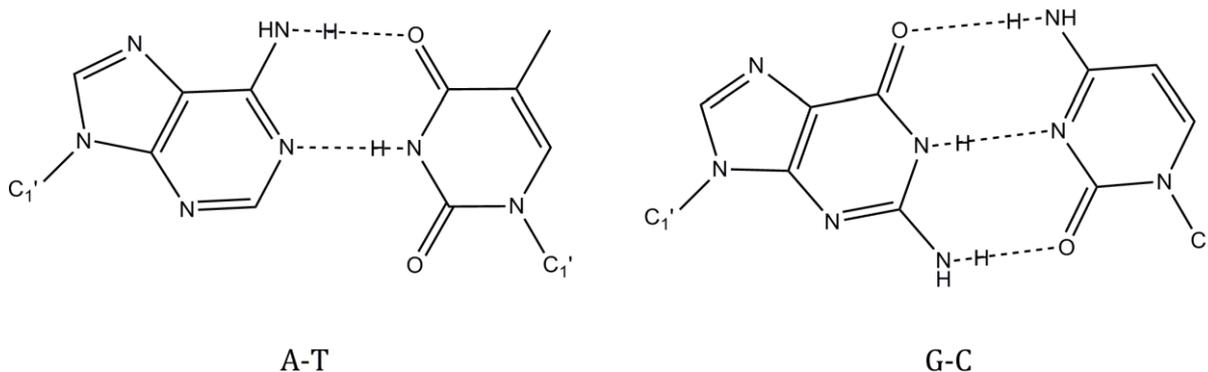


Figura 1.8 Apareamientos de tipo Watson y Crick

Estas uniones permiten que dos cadenas se asocien formando estructuras de doble hélice y que moléculas simple cadena adopten en ciertas regiones distintos motivos estructurales.

En los apareamientos purina-purina las bases quedan demasiado cerca y en los apareamientos pirimidina-pirimidina demasiado lejos para favorecer la formación del enlace, mientras que en otros apareamientos purina-pirimidina como ser A-C o G-T(U) los donores y aceptores no quedan convenientemente alineados. Otros tipos de apareamiento que pueden encontrarse son: los de tipo Wobble¹³ y los de tipo Hoogsteen.¹⁴ Los primeros pueden encontrarse en algunas moléculas de ARN de transferencia entre G y U, y entre la hipoxantina (I) con C, U y A. Los segundos pueden encontrarse en estructuras de triple hélice y cuartetos de G, donde el N7 de la purina actúa como aceptor y el C6 como donador enfrentándose a la cara Watson y Crick de la otra base (Figura 1.9).

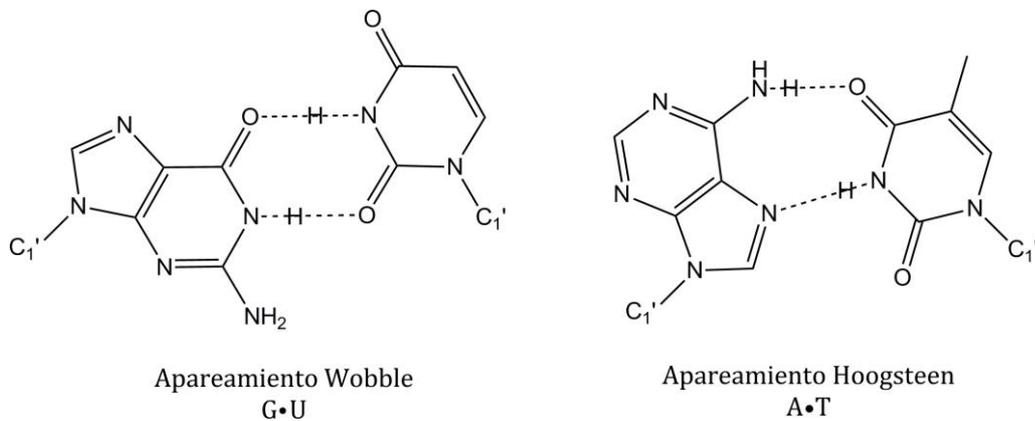


Figura 1.9 Apareamientos de tipo Wobble y Hoogsteen.

Interacciones por apilamiento o *stacking*.

En soluciones acuosas donde las interacciones por puente de hidrógeno son débiles, las bases, tanto libres como en cadena, tienden a apilarse por medio de interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas de modo de exponer la menor superficie al agua.¹⁵ Al apilarse, los grupos polares de las bases se superponen sobre el sistema aromático de la base adyacente. Para las bases o nucleótidos libres en solución el apilamiento puede exceder la formación de dímeros. Cuanto mayor sea la superficie de interacción mayor será la estabilidad generada a partir del *stacking* por lo que las interacciones purina:purina son más estables que las purina:pirimidina y pirimidina:pirimidina.

Interacciones con el medio.

Los ácidos nucleicos se rodean de una primera capa de moléculas de agua que interactúan directamente con fosfatos y azúcares. En las capas adyacentes se encuentran moléculas de agua menos estructuradas y con características similares a las del seno de la solución. El grado de solvatación juega un papel muy importante en los cambios conformacionales de los ácidos nucleicos. Al ser éstos polianiones, están rodeados de cationes o moléculas que apantallan las repulsiones de carga entre fosfatos. Los más comunes son Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Los cationes monovalentes interactúan de manera poco específica con la secuencia, en cambio, los divalentes están normalmente ligados a los oxígenos, o asociados con los átomos de las bases y los azúcares o coordinados a moléculas de agua para favorecer zonas específicas de interacción con el ácido nucleico. Los ácidos nucleicos pueden interactuar con otras moléculas, generalmente a nivel de los surcos de la doble hélice por fuerzas electrostáticas como es el caso de algunas proteínas mientras que otras moléculas pueden intercalarse entre las bases o apilarse por fuerzas de *stacking*.

Motivos estructurales más frecuentes.

Los oligonucleótidos simple cadena pueden adoptar varias estructuras entre las cuales se puedan reconocer zonas doble cadena, “*loops*”, “*hairpins*”, “*bulges*”, que a su vez pueden adoptar una estructura tridimensional formando “*junctions*”, “*pseudoknots*” y “*kissing hairpins*” (Figura 1.10).¹⁶ Básicamente, su estabilidad está gobernada por las interacciones de *stacking* e interacciones con agua e iones. Dado que estas estructuras son dinámicas, su elucidación estructural es dificultosa, y generalmente se consideran estructuras promedio.

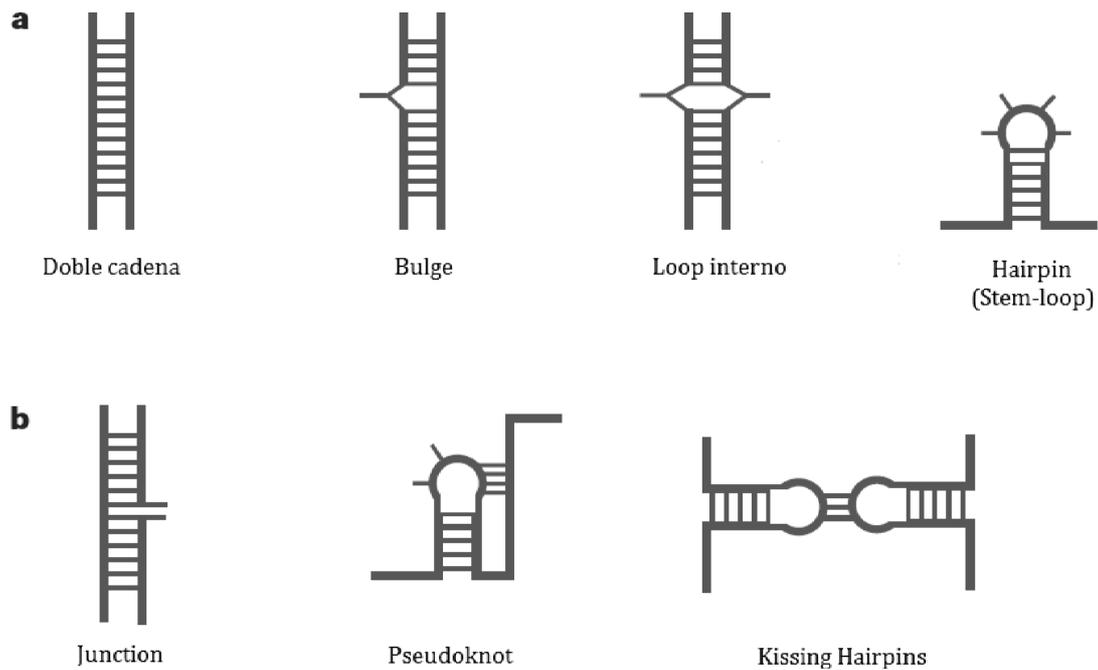


Figura 1.10 Motivos estructurales más frecuentes.

a) Estructuras secundarias de ácidos nucleicos. b) Representación en el plano de las estructuras terciarias de ácidos nucleicos.

Las cadenas tienen una orientación química determinada siendo el extremo 5' aquel con el hidroxilo o fosfato libre en el C5' y el extremo 3' aquel con el hidroxilo del C3' libre. La interacción de dos cadenas por fuerzas de *stacking* e interacciones de tipo Watson y Crick entre las bases, es decir, dos cadenas complementarias, lleva a la formación de una doble hélice donde el esqueleto azúcar-fosfato se ubica hacia el exterior en contacto con el medio acuoso y las bases se proyectan hacia el interior. La orientación de ambas cadenas es antiparalela, es decir, una cadena va en dirección 5'-3' y la otra en sentido contrario.

Entre los parámetros estructurales que sirven para caracterizar a la doble hélice podemos mencionar aquellos que involucran a las bases que forman el par (intra-par) y aquellos que relacionan a pares de bases adyacentes (inter-par). Entre los parámetros intra-par podemos mencionar los traslacionales como *shear* (traslación con respecto del eje x), *stretch* (traslación con respecto al eje y) y *stagger* (traslación con respecto al eje z); y los rotacionales como *buckle* (rotación alrededor del eje x), *propeller* (rotación alrededor del eje y) y *opening* (rotación alrededor del eje z). Entre los parámetros inter-par traslacionales podemos mencionar *shift* (traslación con respecto al eje x), *slide* (traslación con respecto al eje y) y *rise* (traslación con respecto al eje z); mientras que entre los rotacionales se encuentran *tilt* (rotación alrededor del eje x), *roll* (rotación alrededor del eje y) y *twist* (rotación alrededor del eje z) (Figura 1.11).

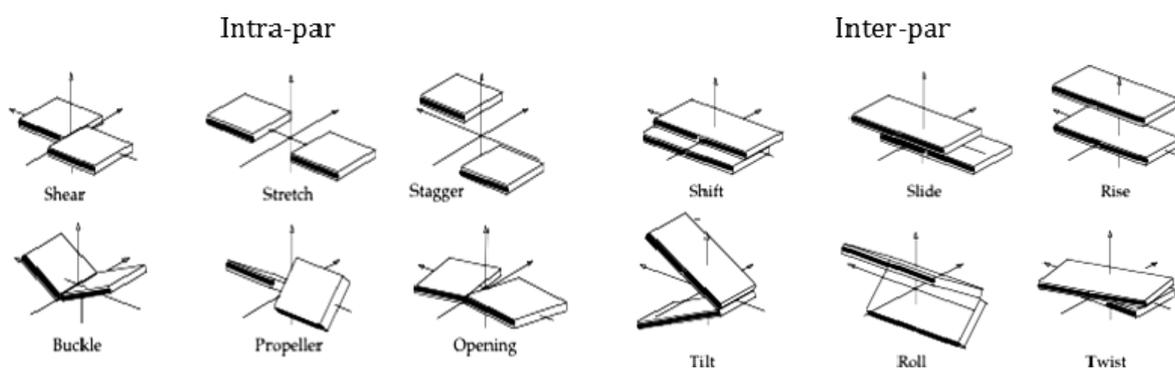


Figura 1.11 Parámetros intra e inter-par que caracterizan la doble hélice.

Según sus parámetros estructurales los principales tipos de hélices pueden agruparse en tres familias mayoritarias: A, B y Z (Figura 1.12). Algunas diferencias entre ellas se detallan en la Tabla 1.1.

Parámetro	A	B	Z
Orientación del azúcar	C3'-endo	C2'-endo	ambas
Sentido de giro	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Nº de bases por vuelta	11	10	12
Rise (nm)	0,26	0,34	0,45
Pitch (°)	28	34	45
Tilt (°)	20	-6	7
Twist (°)	33	36	-30
Diámetro (nm)	2,3	2,0	1,8

Tabla 1.12 Parámetros que caracterizan las hélices tipo A, B y Z.

La hélice de tipo A es un poco más ancha que la B y la Z debido a que las bases se apilan desplazadas del centro generando una cavidad interior paralela al eje de la hélice, haciéndola menos estable. La hélice de tipo B es característica del ADN doble cadena mientras que la A es característica del ARN doble cadena y de los híbridos ARN-ADN ya que no hay espacio suficiente en la hélice B para acomodar el hidroxilo extra. En el ADN Z la doble hélice gira en sentido levógiro. Es más larga y delgada que las anteriores con una estructura tipo zigzag del esqueleto fosfato y una conformación del azúcar que varía entre 2'-endo y 3'-endo. Se ha detectado *in vivo* en secuencias purina-pirimidina alternantes o en secuencias en las que alguna

base se ha modificado por metilación o bromación, pudiéndose interconvertir espontáneamente en B-ADN por cambios del medio.¹⁷

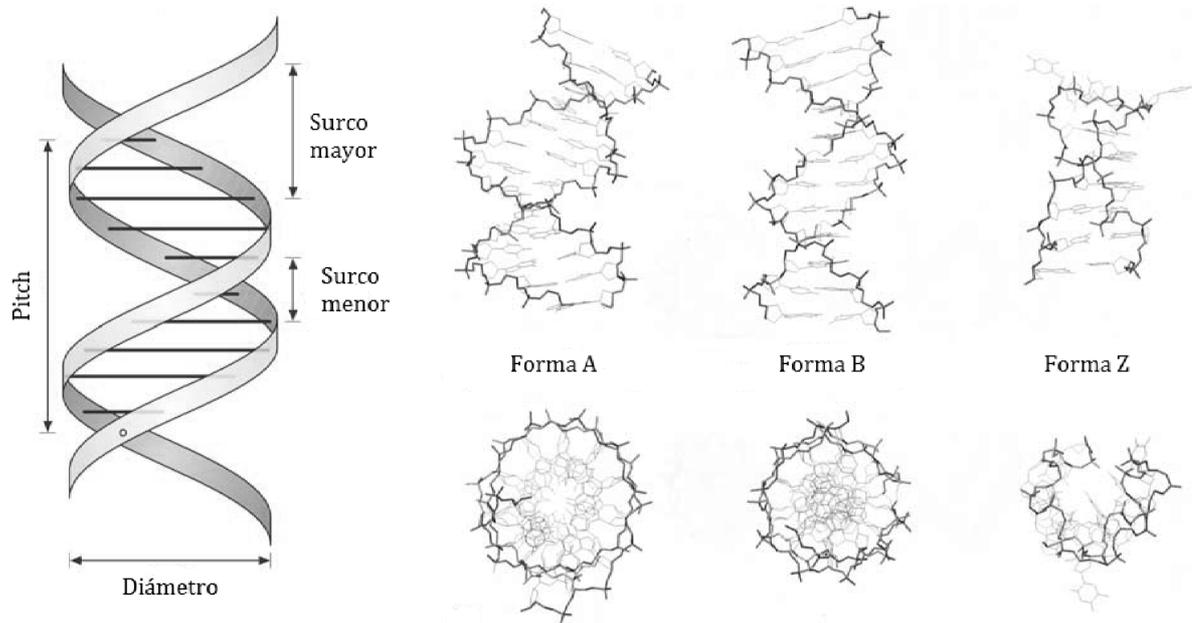


Figura 1.12 Estructura y ipos de doble hélice.

Si bien las familias A, B y Z de dobles cadenas son las principales, no son las únicas sino que existen otras estructuras posibles como las α -B', C, D, E y S.

Otros motivos estructurales menos frecuentes.

G-quadruplex o cuartetos de G.

La formación de los cuartetos de G ha sido observada tanto *in vitro* como *in vivo*. La capacidad de las guaninas de asociarse para formar estructuras compuestas por cuatro hebras se conoce desde la década del '60. Este motivo se forma en algunos oligonucleótidos de ADN o ARN cuya secuencia es rica en guaninas y estas agrupaciones de guaninas se encuentran separadas por otros nucleótidos que funcionan como *loops*. Los "pisos" que forman los cuartetos de G se denominan tétradas y están compuestas por cuatro guaninas que se unen entre sí formando una estructura planar por medio de enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen. Las tétradas se apilan entre sí por interacciones de *stacking* dando origen al cuarteto. La estructura es estabilizada por cationes monovalentes principalmente potasio. Los *G-quadruplex* pueden ser muy polimórficos pudiendo originarse de manera intra o intercatenaria. Los intracatenarios requieren de al menos cuatro regiones ricas en G en una misma molécula mientras que los

intercatenarios pueden surgir de dos o cuatro moléculas diferentes. Dependiendo de la orientación de las hebras los cuartetos formados pueden ser paralelos o antiparalelos (Figura 1.13).¹⁸

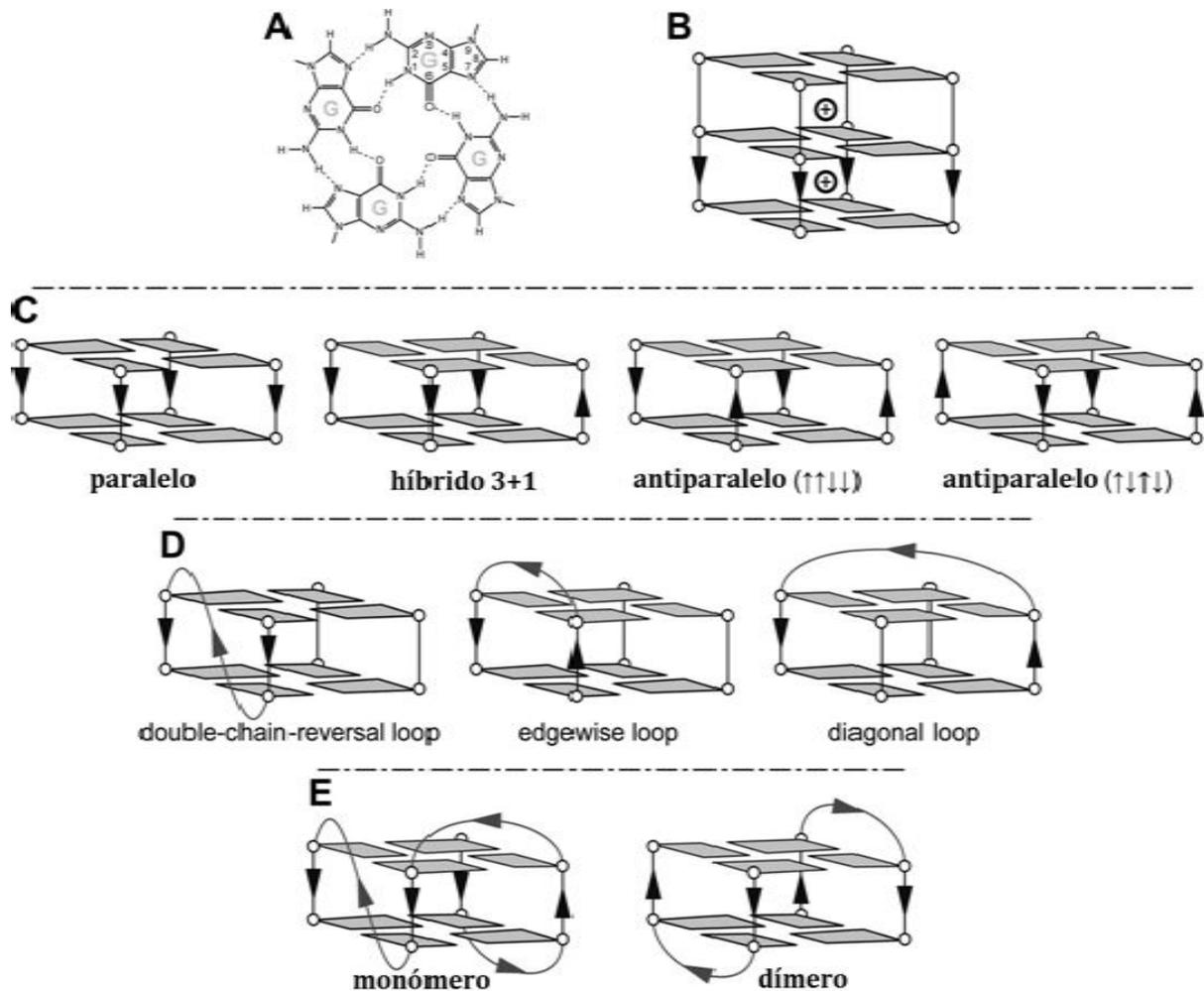


Figura 1.13 Estructura del cuarteto de G.

A) Estructura de una tétrada. B) Esquema de un cuarteto de G estabilizado por cationes monovalentes. C) Tipos de cuarteto de G según la orientación 5'-3' de las hebras. D) Tipos de *loops*. E) Esquema de un cuarteto de G monomérico y otro dimérico. Las líneas negras indican las regiones compuestas por nucleótidos de G y las líneas rojas las regiones compuestas por nucleótidos de otras bases pertenecientes a los *loops*. El sentido de las flechas indica la orientación 5'-3'.¹⁹

La estabilidad termodinámica de los cuartetos de G depende del número de tétradas que lo componen, la longitud y composición de los *loops*. En situaciones *in vitro* estas estructuras pueden llegar a ser más estables que el ADN doble cadena o estructuras de tipo *hairpin*. *In vivo*

podrían obstruir el metabolismo del ADN o ARN y su presencia en las células ha llevado a identificar proteínas que regulan específicamente su formación. Han sido encontrados en regiones funcionales del genoma como telómeros, promotores, sitios de recombinación de genes de inmunoglobulinas, intrones y regiones 5' no traducibles, además de estar conservados en diferentes especies. Por otro lado, fuera del genoma, se ha visto esta estructura en oligonucleótidos funcionales como el aptámero de trombina y la DNAzima peroxidasa entre otros.

1.1.2.5.2 I-motif o i-ADN.

Algunas regiones ricas en C tienen la habilidad de formar una estructura denominada i-motif ó i-ADN. Su nombre se debe a que probablemente sea la única estructura de ADN que consiste en un dúplex de hebras paralelas que se mantiene unido por pares de bases “intercalados” mientras que en otras estructuras como el dúplex de ADN tipo B o el cuarteto de G, las hebras se mantienen unidas principalmente por fuerzas de *stacking* entre las bases. La unidad de formación del i-motif es el apareamiento de una citosina neutra y una protonada en N3 formando el par C-C⁺, unido por tres puentes de hidrógeno, por lo que suelen ser estables a pH ácido. Pueden ser intra o intercatenarios y en ambos casos las regiones ricas en C se disponen como un tetrámero compuesto de dos dúplex de hebras paralelas siendo los dúplex antiparalelos entre sí. La interacción entre los pares de bases consecutivos es principalmente provista con fuerzas de *stacking* entre los carbonilos y aminos exocíclicos y no se observa entre los anillos aromáticos de las bases. Esta aparente falta de estabilidad es compensada por la formación de una red de interacciones por puente de hidrógeno C-H...O entre las desoxirribosas de los dúplex antiparalelos. Este rearrreglo espacial da origen a dos surcos mayores anchos y planos y dos surcos menores extremadamente angostos (Figura 1.14).

La estabilidad termodinámica del i-motif depende de la secuencia, el pH, la fuerza iónica y la temperatura entre otras cosas. Debido a que el pKa de C es 4,6, ésta se encuentra parcialmente protonada en un rango de pH de 4 a 7, rango en el cual es posible la formación de los pares C-C⁺. Su estabilidad podría ser modulada a través de la incorporación de modificaciones químicas.

La estabilidad termodinámica de los dúplex estabilizados por uniones de tipo Watson y Crick es mayor que el de los i-motif en condiciones fisiológicas. Sin embargo se han encontrado este tipo de estructuras en secuencias teloméricas y centroméricas, así como también proteínas capaces de unirse a este motivo. Se cree que al igual que los cuartetos de G cumplen funciones regulatorias *in vivo* y su formación podría encontrarse favorecida en ciertas situaciones como en el superenrollamiento negativo producido durante los procesos de replicación y transcripción,

en situaciones patológicas donde disminuya el pH o en interacciones con proteínas. Por otro lado también han despertado interés en el área de la nanotecnología asociadas al desarrollo de sensores. ²⁰

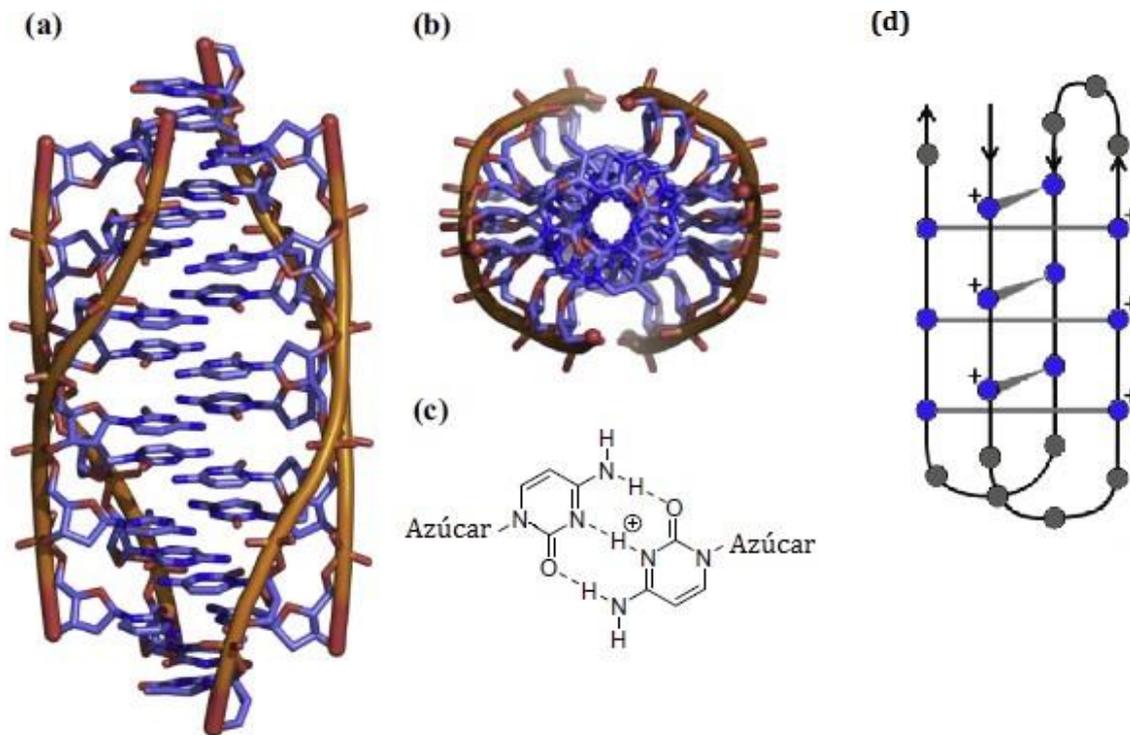


Figura 1.14 Estructura del i-motif.

A) Imagen tridimensional de un i-motif mostrando los pares C-C⁺. B) Vista superior del i-motif. C) El par C-C⁺. D) Esquema de un i-motif.

MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.

El uso de los ácidos nucleicos como herramientas terapéuticas, de diagnóstico y biotecnológicas requiere de su obtención de manera sintética a gran escala. La necesidad del desarrollo de oligonucleótidos químicamente modificados se debe en primer lugar a la inestabilidad de este polímero en medios biológicos o con propiedades degradantes. Además la farmacocinética de los oligonucleótidos es desfavorable para su uso como agentes terapéuticos. Éstos poseen baja capacidad de unión a las proteínas del plasma y son rápidamente filtrados y excretados. La incorporación de nucleótidos modificados en cadenas de ADN y ARN ha demostrado ser útil no sólo para mejorar éstas cuestiones, sino también en algunas ocasiones, para lograr un aumento de la actividad catalítica, un aumento de la afinidad por la molécula

blanco o sustrato, una disminución de la toxicidad y efectos no deseados, o una mejoría en el delivery.²¹⁻²³

Las modificaciones químicas de los nucleótidos se han llevado a cabo en el azúcar, en la base y en el esqueleto fosfato. En la Figura 1.15 pueden observarse las más utilizadas en la preparación de oligonucleótidos sintéticos.

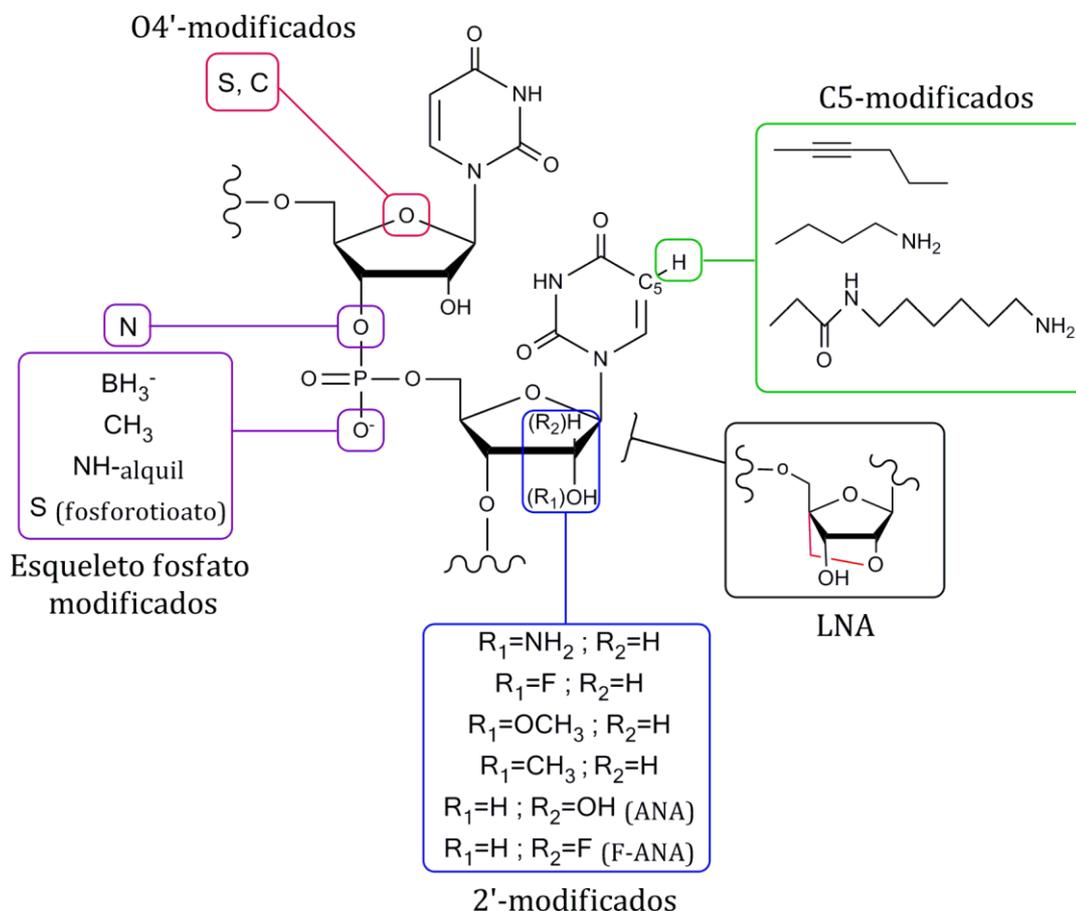


Figura 1.15 Algunas modificaciones químicas de los nucleótidos.

Modificaciones del esqueleto fosfato.

Una de las modificaciones más utilizadas y destacadas por su capacidad de conferir resistencia ante el ataque de nucleasas son los fosforotioatos. Inicialmente encontraron su aplicación en metodologías de terapia antisentido debido a la incrementada resistencia a la degradación que confiere la unión fosforotioato con respecto a la fosfato. Posteriormente se vio que oligonucleótidos portadores de esta modificación presentaban además otras ventajas como un aumento de la capacidad de ingreso a la célula, un aumento de la biodisponibilidad *in vivo* y capacidad para activar a la RNAsaH.²⁴

Modificaciones del azúcar.

La principal diferencia entre el ADN y el ARN es el sustituyente en la posición 2' del anillo furanósico. Sustituyentes electronegativos como el flúor y el oxígeno desplazan el equilibrio conformacional de la ribosa hacia C3'-endo. Como consecuencia de este fenómeno las moléculas de ARN se encuentran adoptando esta conformación y formando hélices de tipo A en su forma de doble cadena. Los dúplex de ARN son termodinámicamente más estables que los de ADN, lo que sugiere que para incrementar la capacidad de unión de los oligonucleótidos antisentido modificados a su target, sería beneficioso imitar esta estructura. Este efecto se observó en oligonucleótidos con análogos de nucleósidos de tipo 2'-O-metil y 2'-F que presentaron una afinidad aumentada por su blanco. Otro factor que afecta la unión de los ácidos nucleicos modificados en 2' a su blanco es el tamaño del sustituyente. A medida que éste es de mayor tamaño, aumenta la inestabilidad de la unión al ARN blanco pero por el contrario, aumenta la resistencia a la degradación.²⁵

Uno de los primeros ejemplos a destacar de oligonucleótidos modificados en el azúcar, involucra el aptámero de ARN del factor de crecimiento de fibroblastos modificado con nucleótidos de pirimidina 2'-NH₂. Éste oligonucleótido resultó ser 1000 más estable en medios biológicos que el no modificado.²⁶ Al ser esta modificación difícil de utilizar en síntesis en fase sólida ha entrado en desuso. El primer aptámero aprobado por la FDA, Pegaptanib, dirigido contra el factor de crecimiento vascular-endotelial para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, presenta modificaciones de tipo 2'-F.²⁷ Ésta modificación ha sido muy utilizada en oligonucleótidos con fines terapéuticos sin embargo los 2'-O-metil los han superado en cuanto a la cantidad de aplicaciones.^{28,29} Esto se debe a que además de proveer alta resistencia a nucleasas y gran afinidad por secuencias blanco, son más fáciles y económicos de preparar que los anteriormente mencionados.

Otra estrategia para mejorar la hibridación con el blanco ha sido la generación de nucleótidos de conformación restringida por la presencia de una unión covalente entre el carbono 2' y el carbono 4' formando un puente metileno que fuerza a la molécula a adoptar la orientación norte. Éstos 2'-O-4'-C-metilen-β-D-ribofuranosilnucleósidos se denominan “*Locked Nucleic Acids*” (LNA) y presentan un marcado aumento de las propiedades de hibridación y de resistencia a nucleasas.³⁰

Los ácidos arabinonucleicos (ANA) fueron estudiados para conocer el efecto de la inversión de la configuración del C2'. Los dúplex ANA/ARN presentaron menor estabilidad termodinámica que los dúplex ADN/ARN. Se logró aumentar la temperatura de fusión de los dúplex ANA/ARN cambiando el hidroxilo por un sustituyente más pequeño como el flúor. De esta manera surgieron los ácidos fluoroarabinonucleicos (F-ANA).³¹

1.2.2.1 2'-Desoxi-2'-C-metilnucleósidos.

Estudios de la influencia de grupos 2'-C-alquilo sobre la conformación del azúcar han demostrado que cuando la configuración del C2' es *S* el anillo furanósico adopta la conformación C3'-*endo* o norte mientras que en la configuración *R* predomina la conformación C2'-*endo* o sur. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el sustituyente 2'-C-alquilo adopta una orientación pseudoecuatorial para disminuir el impedimento estérico, a diferencia de los sustituyentes como el hidroxilo o el flúor que tienden a adoptar una orientación pseudoaxial por la estabilización que confiere el efecto *gauche* O4'-O2'.^{32,33}

En este trabajo se utilizaron nucleósidos de pirimidina modificados con un metilo en la posición C2' cuya estructura puede observarse en la Figura 1.16.

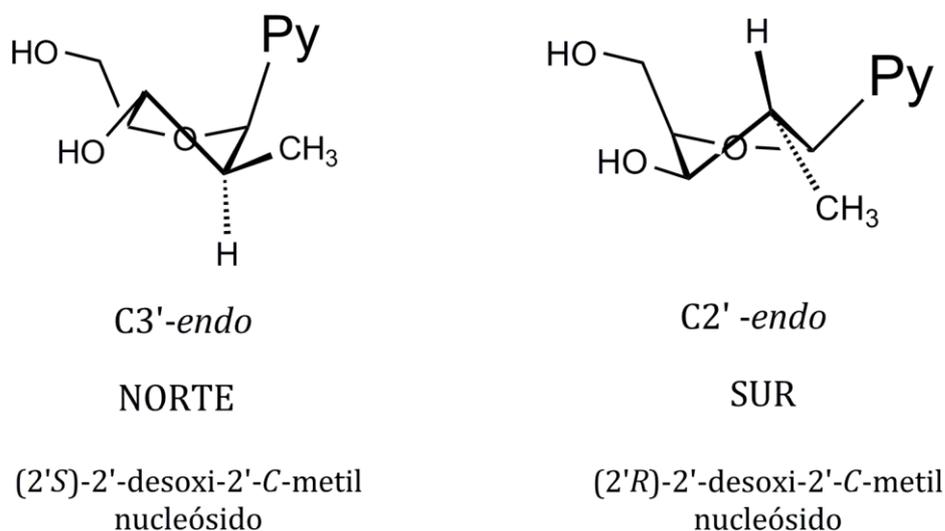


Figura 1.16 Estructura de (2'*S*) y (2'*R*)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos.

Py: pirimidina (uracilo ó citosina)

En trabajos previos se ha observado que oligonucleótidos modificados con el isómero *S* hibridan mejor con secuencias de ARN complementario que aquellas conteniendo el isómero *R*, lo cual puede explicarse teniendo en cuenta que la configuración *S* desplaza el equilibrio conformacional hacia la forma norte característica de las hélices tipo A que se observan en dúplex de ARN.³³

El interés en el empleo de estos análogos en oligonucleótidos de aplicación diagnóstica o terapéutica radica en su capacidad de aumentar la resistencia frente a la degradación por nucleasas.³⁴ Además al ser incorporados en el núcleo catalítico de la DNAzima

, no sólo han aumentado la estabilidad de la molécula en medios degradantes sino que también permitieron mantener una conformación activa del núcleo catalítico a diferencia de análogos de LNA cuya conformación C3' -endo es rígida.³⁵

OLIGONUCLEÓTIDOS CON FINES CATALÍTICOS Y DE RECONOCIMIENTO.

Oligonucleótidos antisentido.

Son oligonucleotidos simple cadena de entre 8-50 mer de longitud que se unen al ARNm por apareamiento de bases. Esta unión genera un impedimento estérico que bloquea la transcripción pudiendo además desencadenar la degradación del blanco por la RNAsa H.³⁶

Los oligonucleótidos antisentido eran inicialmente no modificados siendo muy susceptibles a la degradación. Modificaciones químicas de los mismos han sido capaces de mejorar su estabilidad, su fuerza y especificidad de unión a la secuencia blanco.^{37, 38} Hasta ahora dos de estas moléculas han sido aprobadas por la FDA para su uso en humanos. El primero, Formivirsén, un oligonucleótido modificado con fosforotioatos complementario a una región del ARNm del citomegalovirus implicada en la replicación viral, se inyecta una vez por semana en el humor vítreo para tratar la retinitis.³⁹ El segundo, Mipomersén, modificado con fosforotioatos y 2'-O-metoxietil nucleótidos, es complementario al ARNm de la apolipoproteína B y se aplica en pacientes que padecen hipercolesterolemia familiar homocigota inyectándose de manera subcutánea una vez por semana.⁴⁰

ARN de interferencia.

El mecanismo de los ARN de interferencia fue descubierto por primera vez en el nematode *C. elegans* en 1998.⁴¹ Su función natural en la célula es de defensa, protegiendo el genoma contra la invasión de material genético móvil proveniente de infecciones virales. Los siRNAs (*short interfering RNAs*) son moléculas de ARN doble cadena de 21-23 nucleótidos de longitud compuestos por una hebra denominada sentido o pasajera cuya secuencia es igual a la secuencia blanco y una hebra antisentido o guía cuya secuencia es complementaria a la secuencia blanco. Podemos identificar en la cadena antisentido la región "seed" integrada por los nucleótidos desde la posición 2 hasta la 8 y una región simple cadena denominada "3'-overhang" integrada por los dos últimos nucleótidos del extremo 3' (Figura 1.17).⁴²

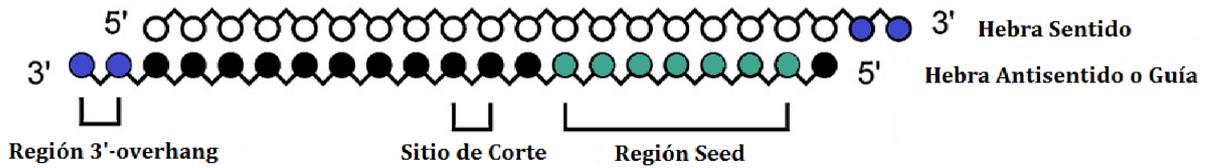


Figura 1.17 Esquema general de un siRNA de 21 mer.

El mecanismo por el cual se produce el silenciamiento génico involucra la degradación del ARN doble cadena por la proteína Dicer en fragmentos más cortos para formar los siRNAs. Éstos interactúan con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) el cual desdobla la doble cadena descartando la hebra sentido. La hebra antisentido se une a la región blanco complementaria del ARNm y la endonucleasa Argonata2 (Ago2), una subunidad del complejo proteico RISC, hidroliza el mensajero rompiendo el enlace fosfodiéster opuesto a los nucleótidos 10 y 11 de la cadena antisentido (Figura 1.17).³⁶

Se ha observado que la estabilidad termodinámica de la región terminal del dúplex de siRNA es un factor que influye en la selección de la hebra por el complejo RISC. La hebra que posea su extremo 5' menos estable será preferentemente seleccionada como guía por lo que sería conveniente que la hebra antisentido sea rica en AU en esta zona y más rica en CG en la región 3'.

En principio las modificaciones químicas de los siRNA buscaban mejorar la estabilidad en medios degradantes pero luego se observó que además podían modular la potencia, la especificidad y la inmunogenicidad de los mismos. Sin embargo, sólo con algunas modificaciones se ha logrado un incremento de la potencia como es el caso de los nucleósidos 2'-O-metil y 2'-F. También se ha visto que modificaciones de las regiones 3'-overhang pueden alterar la elección de la hebra guía por el complejo RISC. Estas modificaciones también han logrado disminuir la respuesta inmune innata generada por estos agentes. Uno de los principales problemas de la administración exógena de siRNAs son los efectos *OFF-target*. Si bien el complejo Ago2 cliva el ARN por un mecanismo que es secuencia específica y que sólo permite pequeños desajustes en el apareamiento de la hebra antisentido con su secuencia blanco, el siRNA puede llegar a silenciar otros genes pudiendo tener efectos tóxicos por un mecanismo de tipo miRNA. La región *seed* interactúa inicialmente con el blanco y su estabilidad termodinámica se correlaciona con los efectos *OFF-target*. Modificaciones de esta región pueden modular este tipo de efectos.⁴²

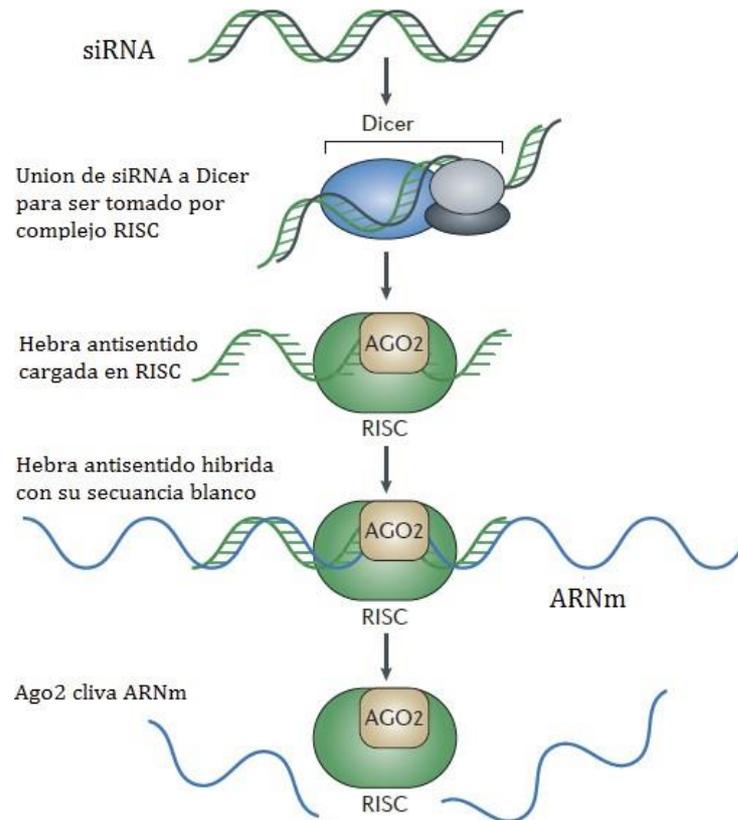


Figura 1.18 Mecanismo de interferencia inducido por siRNA.

Según la base de datos de estudios clínicos hay al momento alrededor de 40 siRNAs en distintas fases de desarrollo que podrían ser aprobados en los próximos años.⁴³ Sin embargo, tanto los oligonucleótidos antisentido como los siRNA modulan la expresión génica induciendo la degradación enzimática del ARNm por un complejo proteico. Debido a que las enzimas deben reconocer estos oligonucleótidos, la capacidad de aceptar modificaciones químicas se encuentra limitada y por lo tanto también la posibilidad de potenciar por este mecanismo sus propiedades farmacológicas. Es por eso que vale la pena estudiar también otra clase de oligonucleótidos independientes de la maquinaria celular por poseer actividad catalítica intrínseca, las DNAzimas.

Oligonucleótidos funcionales: DNAzimas y aptámeros

Aspectos generales de las DNAzimas

La noción de que otras macromoléculas además de las proteínas podían tener propiedades catalíticas surge en la década de 1980 cuando se descubren ARN naturales con la capacidad de auto-escindirlos denominados ribozimas.^{44,45} Este tipo de moléculas fue obtenido

también de manera sintética logrando además ampliar el repertorio de sustratos.⁴⁶ Hasta el momento no se han encontrado ácidos desoxirribonucleicos catalíticos en la naturaleza. Esto puede deberse a que en casi todos los casos el ADN se encuentra adoptando la forma de doble hélice, mientras que la actividad enzimática requiere de conformaciones terciarias irregulares que puedan unirse a sustratos exponiendo diversos grupos funcionales para la catálisis. Sin embargo si consideramos el ADN simple cadena, se observa que éste puede adoptar diversas estructuras secundarias y terciarias que le permiten llevar adelante un proceso catalítico. El primer reporte de una DNAzima sintética se produjo en 1994 por Breaker y Joyce. Esta desoxirribozima catalizaba la ruptura de un enlace fosfodiéster en una molécula de ARN de manera análoga a las RNAsas proteicas.⁴⁷

Para la obtención de estos oligonucleótidos de forma sintética se utiliza un proceso denominado selección *in vitro*. El proceso comienza con la síntesis de secuencias aleatorias de entre 40-80 nucleótidos de longitud flanqueadas por regiones constantes. Luego se diseña un sistema donde todas las moléculas son incubadas en condiciones que permitan la catálisis de la reacción deseada lo que produce la separación de las cadenas activas de las inactivas. La estrategia para la separación de secuencias de ADN activo depende de la actividad catalítica buscada. En la Figura 1.19 se puede observar un esquema de selección *in vitro* para una DNAzima con actividad fosfodiesterasa de ARN. En este proceso la biblioteca de secuencias aleatorias flanqueadas por regiones constantes se encuentra unida a una secuencia de ARN anclada a biotina. Este conjunto de oligonucleótidos se hace pasar por una columna de estreptavidina de la cual aquellas secuencias con actividad de fosfodiesterasa de ARN podrán autoescindir y eluir de la columna. Una vez recolectadas se amplifican, se unen a biotina y ARN blanco y se vuelven a pasar por la columna iniciando la siguiente ronda de selección. Varias rondas de selección son necesarias ya que secuencias inactivas tienen una baja probabilidad de liberarse de la columna y por lo tanto este proceso se repite la cantidad de veces que permita obtener un conjunto de secuencias con una actividad lo suficientemente alta como para justificar su clonado y secuenciación.⁴⁸

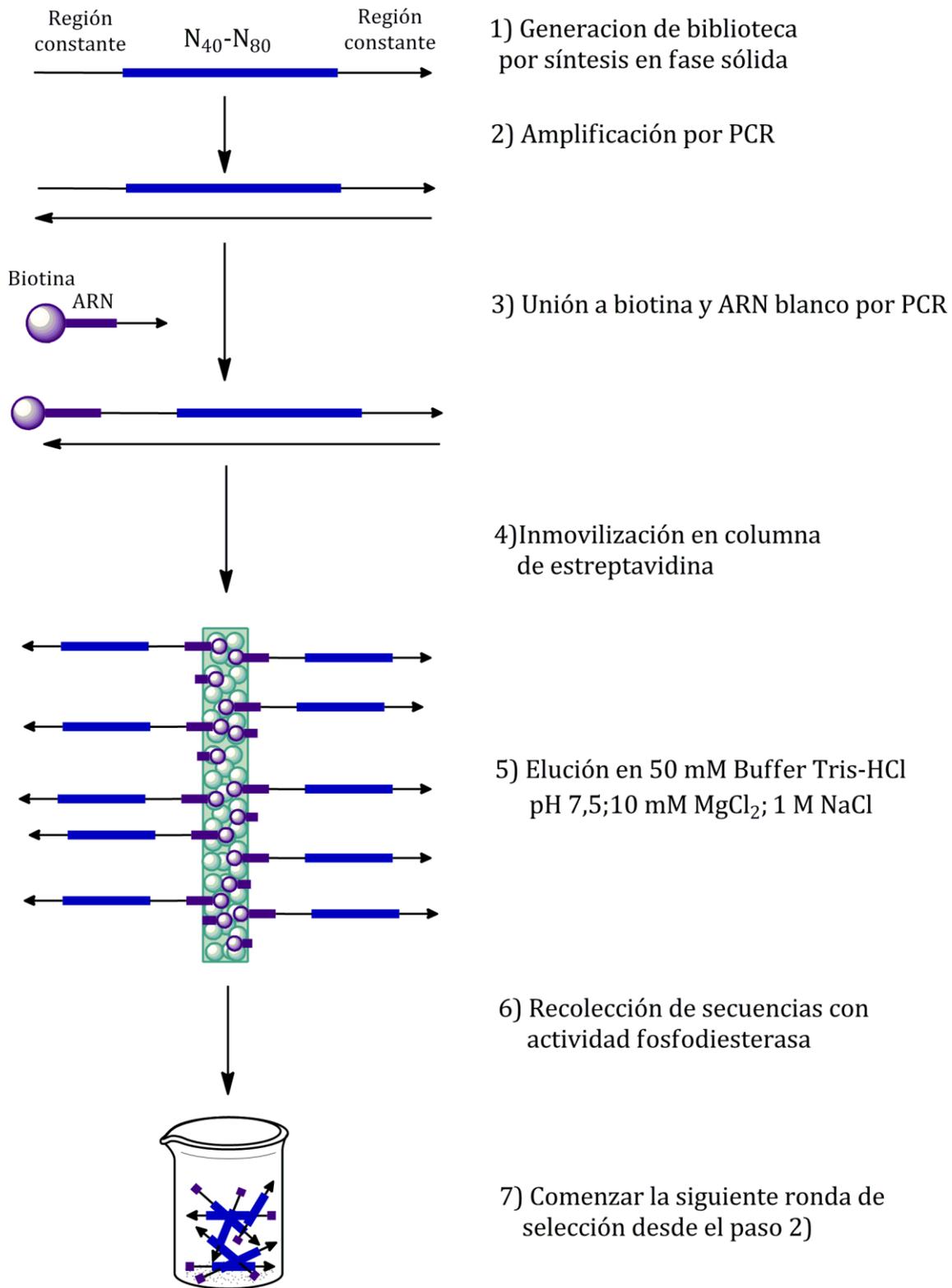


Figura 1.19 Selección *in vitro* de una DNAzima con actividad de fosfodiesterasa de ARN.

Las primeras DNAzimas y las más estudiadas fueron aquellas con actividad de fosfodiesterasas de ARN. Se han seleccionado distintos motivos pero todas están formadas por

dos zonas denominadas brazos de reconocimiento que se unen al sustrato por complementariedad de bases y una zona simple cadena, que puede adoptar distintas estructuras secundarias y terciarias, denominada núcleo catalítico. En la Figura 1.20 se pueden observar las principales DNAzimas fosfodiesterasas seleccionadas.

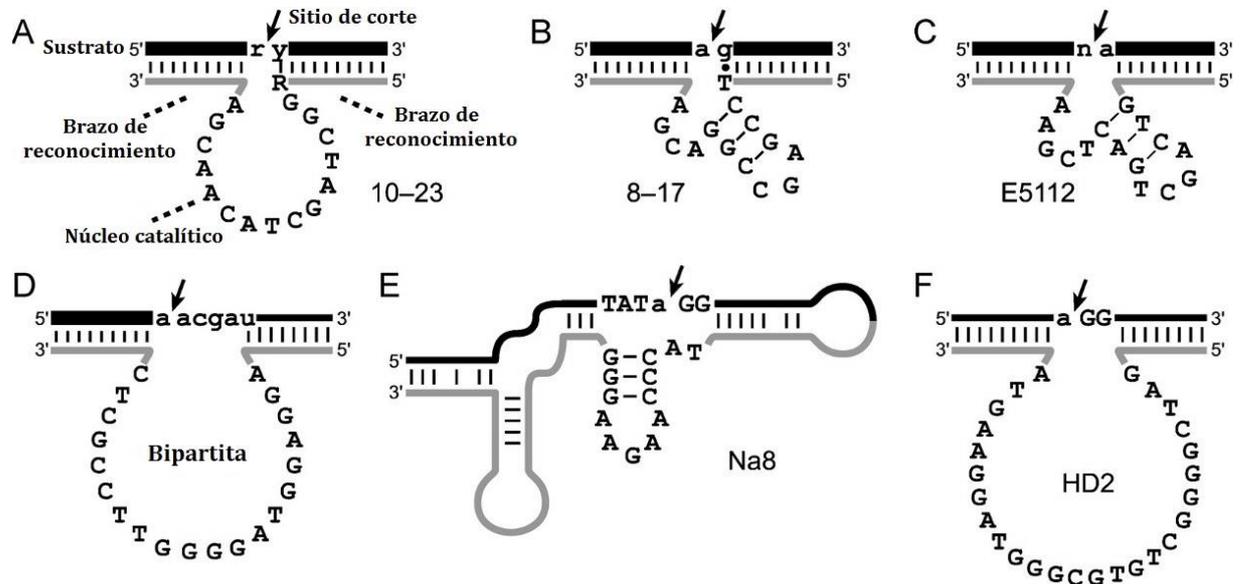


Figura 1.20 DNAzimas fosfodiesterasas de ARN.

Las líneas gruesas negras y las letras minúsculas representan el sustrato de ARN mientras que las líneas finas grises y las letras mayúsculas representan ADN (R=purina, Y=pirimidina y N=cualquier nucleótido). (A) DNAzimas 10-23. (B) DNAzima 8-17. (C) Variante de la DNAzima 8-17 denominada E5112. (D) DNAzima bipartita por tener en su núcleo catalítico un lado purínico y otro pirimidínico. (E) DNAzima Na8 no requiere de metales divalentes como cofactores a diferencia de las anteriores. (F) DNAzima HD2 requiere histidina como cofactor.⁴⁹

La reacción de ruptura del enlace fosfodiéster se produce por el ataque nucleofílico del hidroxilo 2' al enlace fosfodiéster adyacente para formar un 2',3' - fosfato cíclico, siendo el grupo saliente el hidroxilo 5' (Figura 1.21).

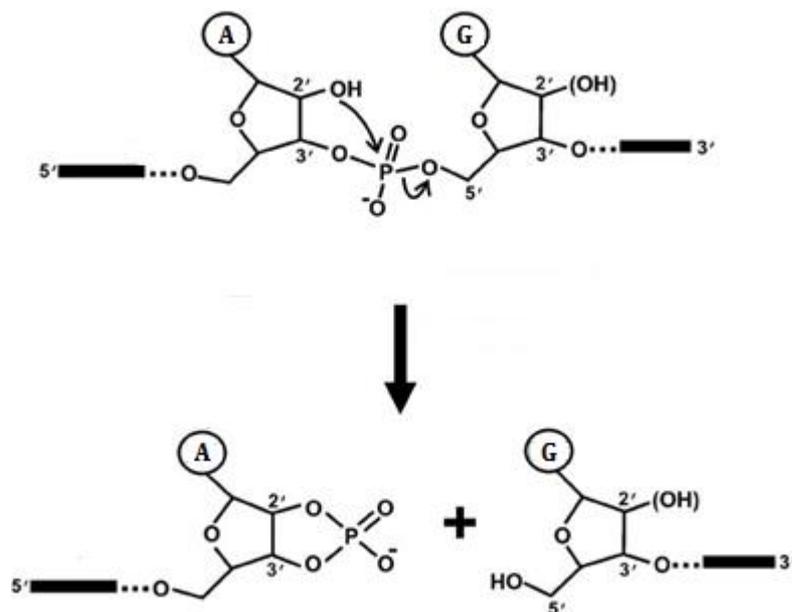


Figura 1.21 Reacción de ruptura del enlace fosfodiéster en ARN.

Esta reacción ocurre naturalmente a una baja velocidad con una constante catalítica observada de 10^{-7} min^{-1} mientras que la reacción catalizada por la DNAzima se encuentra en el orden de 10^{-2} min^{-1} . Esto se debe a que el catalizador provee de una plataforma que permite el alineamiento y acercamiento de los grupos funcionales a reaccionar. Esta reacción, es también catalizada por muchas proteínas ribonucleasas pero la particularidad de la reacción catalizada por la DNAzima es que permite la ruptura de un determinado ARN blanco con una alta especificidad dada por la secuencia de los brazos de reconocimiento. En la mayoría de los casos se requiere un metal divalente como cofactor para asistir en la desprotonación y coordinación del hidroxilo 2', estabilizar las cargas negativas originadas en el fosfato cíclico y ayudar al correcto plegamiento de la DNAzima.⁵⁰ Los motivos más estudiados han sido la DNAzima 10-23 y la DNAzima 8-17 denominadas a partir del número de ronda y número de clon provenientes del proceso de selección *in vitro*.

Otras de las reacciones catalizadas por DNAzimas incluyen la ruptura de enlaces fosfodiéster en ADN,⁵¹ formación de enlaces fosfodiéster en ARN⁵² y ADN,⁵³ la fosforilación de ADN,⁵⁴ la adenilación de ADN,⁵⁵ la formación de enlaces nucleopeptídicos,⁵⁶ la depurinación de ADN,⁵⁷ la reacción de Diels-Alder,⁵⁸ la ruptura de dímeros de timina,⁵⁹ y reacciones de peroxidación.⁶⁰

Aspectos generales de los aptámeros

El término aptámero fue introducido en 1990 y hace referencia a pequeñas moléculas sintéticas de ADN o ARN simple cadena que se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional determinada, permitiéndoles unirse con alta afinidad y selectividad a una molécula blanco.⁶¹

Los aptámeros se obtienen por un proceso denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*).⁶¹⁻⁶² Este procedimiento permite aislar un oligonucleótido funcional que puede reconocer una molécula de manera específica a partir de una biblioteca de secuencias simple cadena de ADN o ARN. Dentro de esta biblioteca algunas secuencias adquieren una estructura secundaria y terciaria formada por *loops*, *stems*, *hairpins*, *pseudoknots*, *bulges*, o cuartetos de G; que por medio de interacciones intermoleculares electrostáticas, hidrofóbicas, de *stacking* y de puentes de hidrógeno se unen a su *target* con una afinidad determinada.

La biblioteca se genera a partir de la síntesis química de secuencias aleatorias de alrededor de 20-80 nucleótidos flanqueadas por regiones constantes de unión a *primers*, generando alrededor de 10^{15} oligonucleótidos diferentes. Una vez obtenida la biblioteca esta se incuba con la molécula blanco, algunos oligonucleótidos tendrán la capacidad de unirse mientras que otros quedarán libres. Las moléculas unidas de las no unidas se separan mediante algún proceso físico, por ejemplo si la molécula blanco se encontraba unida a una partícula magnética podremos separar lo unido de lo no unido por medio de un imán. Luego se eluyen las secuencias aptaméricas separándolas de su *target*. Estas secuencias son amplificadas por PCR utilizando las regiones constantes para dar origen a una nueva biblioteca para la segunda ronda de selección y de esta manera ir aislando secuencias cada vez más afines. También se pueden realizar selecciones negativas, es decir utilizar una molécula de estructura muy parecida a nuestro blanco de interés para retirar de la biblioteca aquellas secuencias aptaméricas que tengan la posibilidad de unirse también a ella y de esta manera aumentar la especificidad del aptámero. En la Figura 1.22 se muestra un esquema del proceso de SELEX.

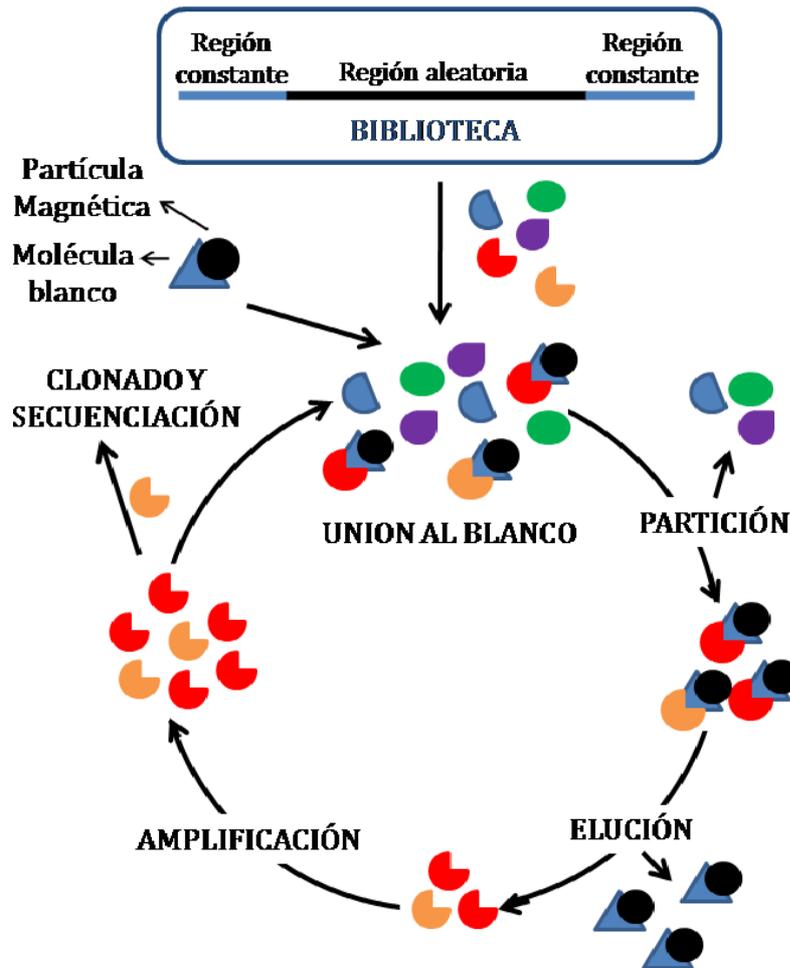


Figura 1.22 SELEX

La selectividad que se puede alcanzar a través de estos procesos de selección puede ser muy alta como es el caso del aptámero de teofilina. La teofilina es utilizada como droga para el tratamiento de enfermedades respiratorias pero al ser su rango terapéutico muy acotado, su detección sérica para prevenir toxicidad es de suma importancia. El aptámero se une a la teofilina con una afinidad diez mil veces mayor que a la cafeína de la que solo difiere en un metilo y que se encuentra normalmente en el suero.⁶³ Los aptámeros también pueden ser enantioselectivos como es el caso del aptámero de L-arginina, el cual se une a la misma con una afinidad doce mil veces mayor que a la D-arginina.⁶⁴

Los blancos de los aptámeros pueden variar desde moléculas pequeñas (adenosina, teofilina, arginina, citrulina, hemina), hasta proteínas (trombina, nucleolina, insulina) y pueden encontrarse libres en solución o estar anclados a la membrana celular. Para este último caso se utiliza una modificación del proceso llamada *cell-SELEX* donde se utiliza como blanco células enteras.⁶⁵ Es importante destacar este procedimiento para la selección de aptámeros para marcadores tumorales, donde se puede hacer una selección positiva con células cancerígenas y

una selección negativa con células normales permitiendo distinguir diferencias moleculares entre ambas.⁶⁶

Al igual que para el caso de las DNazimas, resulta de interés la obtención de aptámeros modificados químicamente que no pierdan sus propiedades, en este caso su afinidad por el target. Los aptámeros modificados pueden obtenerse por modificaciones *post*-SELEX o generando bibliotecas con nucleótidos modificados y realizando la selección a partir de la misma por un proceso de SELEX modificada o *mod*-SELEX. El primer caso posee la ventaja de trabajar con ácidos nucleicos naturales durante el proceso de selección pero la desventaja de no conocer que efectos provocarán las modificaciones posteriores de la secuencia aptamérica seleccionada. El segundo caso propone una selección mucho más difícil de llevar a cabo requiriendo de la síntesis de una biblioteca con modificaciones químicas y el uso de enzimas que acepten estas modificaciones para poder lograr la amplificación, pero como ventaja, se obtendrá al final del proceso un aptámero modificado de alta afinidad.⁶⁷

DNazima 8-17

El interés por la DNazima 8-17 surge de su pequeño tamaño y su habilidad para catalizar la ruptura de moléculas de ARN con alta actividad y especificidad. Fue reportada por primera vez en 1997 por Santoro y Joyce ⁶⁸ siendo este motivo hallado repetidas veces en experimentos de selección *in vitro* independientes y realizados por diferentes grupos.

La DNazima 8-17 se une a su sustrato por apareamiento de bases de tipo Watson y Crick a través de sus brazos de reconocimiento, que flanquean su núcleo catalítico central y el sitio de corte. El apareamiento de la DNazima con su sustrato ocurre desde los nucleótidos adyacentes al sitio de corte hasta los extremos, mientras que el nucleótido 5' del sitio de corte queda desapareado y el 3' queda formando un apareamiento no estándar. El núcleo catalítico suele estar formado por 14-15 nucleótidos y se caracteriza por una región *stem-tri*loop y una región simple cadena. En la primera secuencia reportada, secuencia canónica, el apareamiento de bases no estándar correspondía a G en el sustrato y T en la DNazima, un *stem* que contenía al menos dos pares G-C, un *tri*loop invariable AGC y una secuencia simple cadena WCGR (W= A ó T y R= A ó G). Estudios subsiguientes demostraron que los requerimientos de secuencia para esta DNazima eran mucho más versátiles y se llegó a una secuencia consenso en donde sólo cuatro posiciones estaban estrictamente conservadas (A6 y G7 en el *tri*loop, C13 y G14 en la región simple cadena). El reemplazo de A6 y G7 dan como resultado una DNazima 50 veces menos activa mientras que el reemplazo de C13 y G14 dan como resultado una 1000 veces menos activa. Otras posiciones que podríamos denominar semiconservadas son T2.1 y C8, que producen una DNazima 10 veces menos activa. El *tri*loop puede funcionar como un *tetra*loop, el

stem de tres pares de bases puede tolerar uno o dos cambios y la región simple cadena puede tener una variación mucho mayor que la inicialmente reportada (Figura 1.23).^{69,70}

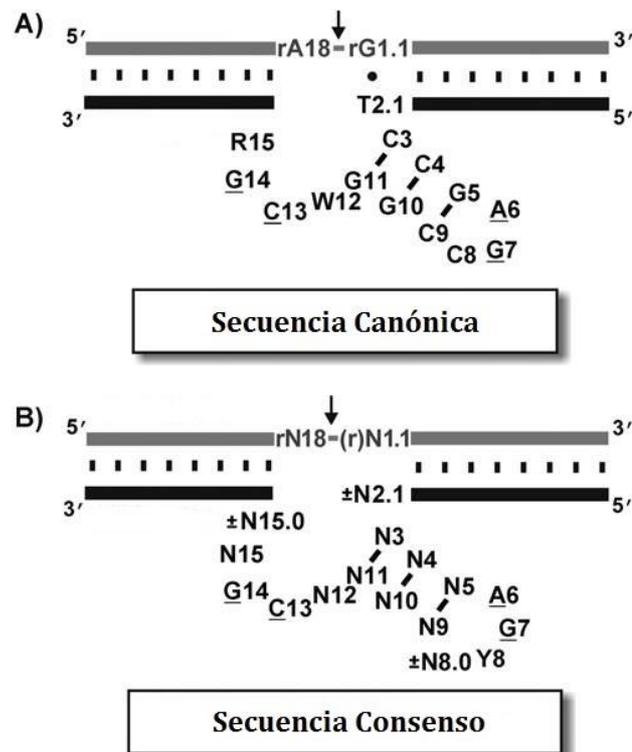


Figura 1.23 Secuencia canónica (A) y consenso (B) de la DNAzima 8-17.

Se muestra el sustrato en gris y la DNAzima 8-17 en negro. El sitio de corte se indica con una flecha. W = A o T; R = A, G ó AA; N = A, G, C ó T; Y = C ó T. Los ribonucleótidos se denotan con “r”.

En cuanto a los requerimientos de sustrato, debemos prestar atención al dinucleótido presente en el sitio de corte mientras que la secuencia de los brazos de reconocimiento del sustrato puede diseñarse para cada blanco de interés. Estudios mutacionales del núcleo catalítico han revelado que la secuencia del mismo influye también en la especificidad por el dinucleótido del sitio de corte. Mientras que la DNAzima canónica sólo cortaba el enlace fosfodiéster de la unión AG, se ha demostrado que entre todas las variantes de DNAzimas 8-17 encontradas, puede cortarse cualquiera de los 16 dinucleótidos posibles.⁷¹ Esta fosfodiesterasa ha sido utilizada para hidrolizar sustratos de ARN en su totalidad o sustratos quimera donde la cadena es de ADN excepto por los dos ribonucleótidos del sitio de corte, siendo la actividad de la misma para cada tipo de sustrato dependiente del contexto y pudiendo variar según el dinucleótido a hidrolizar, la variante de 8-17 utilizada, y el metal utilizado como cofactor. Se ha observado una tendencia de la DNAzima a tener una mayor actividad para los sustratos quimera, alrededor de diez veces mayor que para los sustratos de ARN.⁷⁰

Se estableció una dependencia de la actividad de la DNAzima con el pH, incrementándose la actividad de la misma en un rango entre 6 y 8. Esto es consistente con la desprotonación del hidroxilo 2' para producir el ataque nucleofílico sobre el fósforo del enlace fosfodiéster adyacente.

Esta desoxirribosima ha sido clasificada como una metaloenzima por su necesidad de utilizar un metal divalente como cofactor. En general, los metales de transición son más efectivos que los alcalino-térreos y suele usarse magnesio para los ensayos *in vitro* ya que además de ser de los más efectivos es el que se encuentra en mayor concentración en la célula.

Se ha estudiado el efecto de la incorporación de nucleótidos modificados en el núcleo catalítico de la DNAzima 8-17 sobre su actividad. Algunas de las modificaciones ensayadas comprenden nucleótidos abásicos, reemplazo de un nucleótido por una molécula espaciadora y distintos análogos de purinas. Los resultados obtenidos han sido variados, observándose tanto disminuciones como aumentos de la actividad catalítica, siendo estos cambios posición y modificación dependientes.^{72,73,74}

DNAzima peroxidasa

El complejo hierro-protoporfirina IX tanto, con el hierro en su estado ferroso (Hemo) como en su estado férrico (Hemina), es un cofactor utilizado por un gran número de proteínas (Hemoproteínas). Este grupo prostético juega un papel crucial en los procesos de transferencia de electrones, transporte y sensado de gases, y catálisis oxidativa.

Dentro de las hemoporteínas, se encuentran las enzimas con actividad peroxidasa, entre las cuales podemos diferenciar las “clásicas”, como la peroxidasa de rábanopicante (HRP), que catalizan oxidaciones que involucran la transferencia de un electrón y las “no clásicas” como la cloroperoxidasa, que catalizan oxidaciones de transferencia de 1 ó 2 electrones.

A fines de los '90 el grupo de Sen reportó un oligonucleótido de ADN rico en guaninas, denominado PS2.M, capaz de unirse con alta afinidad a la hemina y catalizar reacciones de peroxidación a una velocidad mucho mayor (250 veces) que la hemina por sí sola, de manera análoga a lo que sucede con las hemoporteínas.^{60, 75} Esta molécula de ADN es un oligonucleótido de 18 mer que forma un cuarteto de G intramolecular de hebras paralelas, compuesto por tres tétradas apiladas unidas por loops, formando un aptámero para la hemina. Ésta se apila sobre la tétrada próxima al extremo 3' para formar la DNAzima peroxidasa (Figura 1.24).⁷⁶

La reacción de peroxidación se lleva a cabo en presencia de peróxido de hidrógeno, se produce en un amplio rango de pH y está favorecida por buffers nitrogenados.

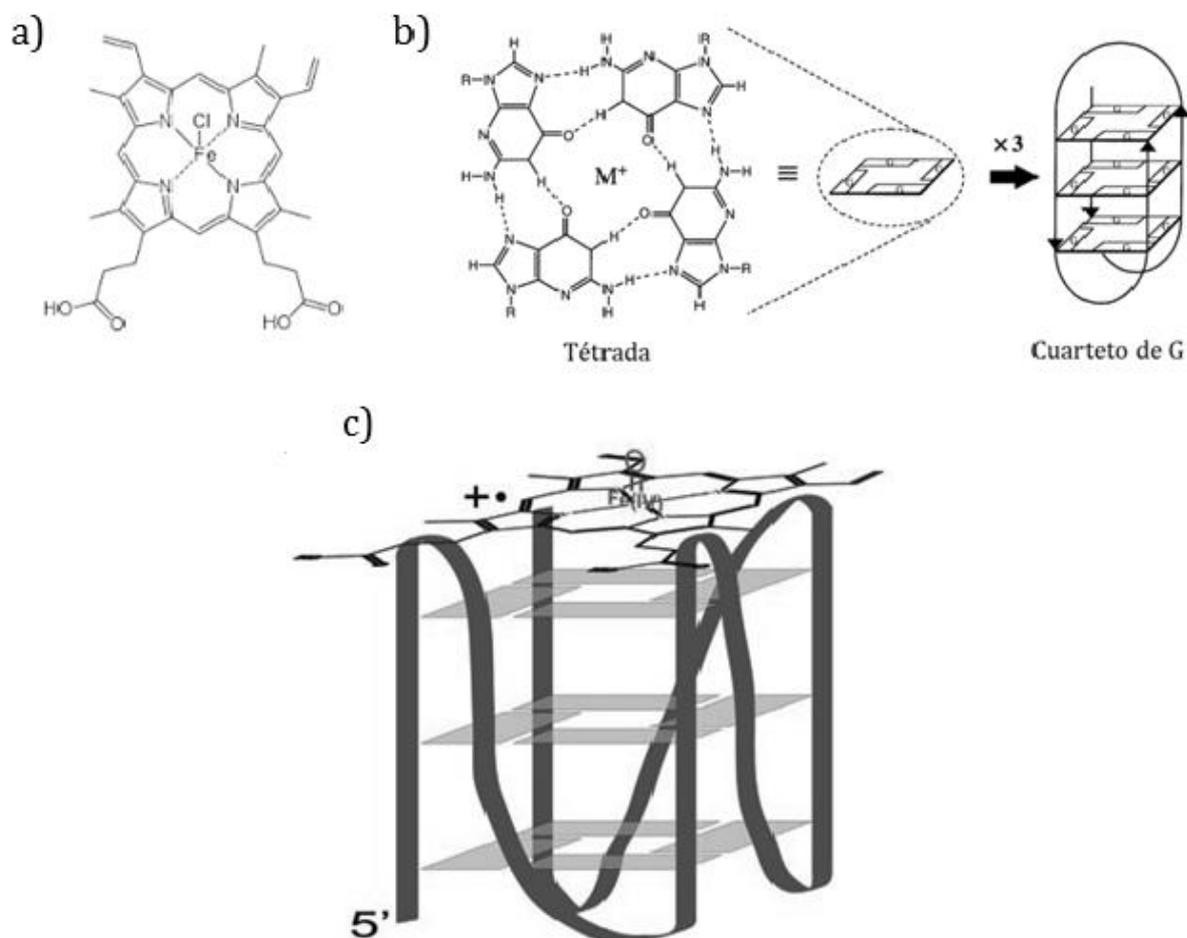


Figura 1.24 DNAzima peroxidasa.

- a) Estructura de la Hemina. b) Estructura de la tétrada y el cuarteto de G. c) Esquema del oligonucleótido unido a la hemina para formar la DNAzima.

Además de la capacidad de oxidar sustratos colorimétricos por transferencia de un electrón como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o ABTS, la tetrametilbencidina (TMB) y el luminol, se ha demostrado su capacidad de oxidar una amplia gama de sustratos, entre ellos compuestos fenólicos dentro de los cuales se encuentra la L- y D-tirosina, la *N*-acetil-L-tirosina y el ácido hidroxicinámico, mostrando velocidades superiores a la peroxidasa proteica de rábano picante.⁷⁷ Posteriormente se demostró también su capacidad para catalizar oxidaciones de transferencia de dos electrones, es decir de transferencia de oxígeno, como en el caso de la oxidación de tioanisol, indol y estireno.⁷⁸

Aplicaciones de oligonucleótidos funcionales.

Aplicaciones terapéuticas.

En cuanto a las aplicaciones de las DNAzimas podemos mencionar el uso de las fosfodiesterasas de ARN como agentes terapéuticos *in vivo*. Dentro de los blancos podemos destacar el ARNm de proteínas responsables de la resistencia a antibióticos en *S. aureus*, como el mensajero de la β -lactamasa⁷⁹ y el de la proteína de unión a penicilina⁸⁰ lográndose una disminución de los niveles de ARNm y del número de unidades formadoras de colonias aumentando la sensibilidad a antibióticos. Otras DNAzimas han sido diseñadas para tener como blancos terapéuticos ácidos nucleicos de origen viral como el HIV⁸¹ y el virus de la hepatitis B.⁸² También se ha logrado la ruptura de diversos ARNs celulares asociados a tumores tanto *in vitro* como en cultivos, como por ejemplo, la inhibición de la expresión de Stat3 en líneas celulares de cáncer de mama.⁸³ En cuanto a experimentos *in vivo*, DNAzimas dirigidas contra los mensajeros del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR),⁸⁴ c-Jun⁸⁵ y Egr-1⁸⁶ disminuyeron el tamaño del tumor en modelos murinos. Hoy en día todavía existen muchos desafíos para poder utilizar estos agentes en terapias *in vivo*. La mayoría de las DNAzimas alcanza su actividad máxima *in vitro* a concentraciones de metal divalente mucho más altas (10-100 mM) que las fisiológicas (menor a 1 mM). Este problema podría abordarse con nuevos experimentos de selección *in vitro* donde se trabaje a menores concentraciones de metal y de esta manera forzar la selección de secuencias más activas en las condiciones celulares. Como todas las aplicaciones *in vivo* de ácidos nucleicos las DNAzimas también presentan el problema del transporte de la molécula activa al blanco terapéutico (delivery). Dado que los ácidos nucleicos son moléculas cargadas a pH fisiológico y con longitudes de entre 15-40 nucleótidos, para facilitar su delivery se ha utilizado la electroporación y complejos con dendrímeros. Hasta ahora para que estos agentes actúen en un determinado tejido o área de interés han sido inyectados directamente en la zona a tratar lo cual no siempre es posible en términos generales. Uno de los procedimientos para mejorar el delivery tejido específico podría ser la incorporación en nanopartículas dirigidas a un determinado tipo celular. Otro reto consiste en incrementar la estabilidad en medios biológicos. Si bien el ADN es más estable que el ARN, el tiempo de vida media de un oligonucleótido no modificado en un medio degradante sigue siendo muy corto. Numerosas modificaciones químicas previamente mencionadas en este capítulo han sido incorporadas en las DNAzimas para lograr un aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas y muchos de los ejemplos mencionados anteriormente para aplicaciones *in vitro*, en cultivos e *in vivo* han hecho uso de DNAzimas químicamente modificadas.

En cuanto a los aptámeros como agentes terapéuticos podemos mencionar al Macugen o Pegabtanib aprobado por la FDA, que consta de un oligonucleótido modificado que reconoce con alta afinidad y especificidad al factor de crecimiento vascular endotelial. Su inyección en el humor vítreo ha sido efectiva para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. Diversas terapias asociadas a aptámeros se encuentran hoy en distintas fases de investigación clínica. Entre ellas podemos mencionar el aptámero de la nucleolina para tratamiento de la leucemia mieloide aguda, el aptámero del factor de Von Willebrand para tratar diversos trastornos de la coagulación, y los aptámeros de trombina y del factor IX de la coagulación para tratar enfermedades cardiovasculares.^{87,88} En todos estos casos el aptámero funciona como un antagonista impidiendo a la molécula blanco desarrollar su función.

Otro grupo de aptámeros de gran relevancia para futuras terapias son aquellos seleccionados por *cell*-SELEX para unirse específicamente a blancos en la superficie celular. A partir de este proceso se derivan dos principales mecanismos de acción: aptámeros que pueden funcionar como agonistas y antagonistas de receptores de membrana, o el uso de aptámeros que reconocen marcadores celulares para la generación de conjugados aptámero-droga que dirijan el fármaco a un tejido de manera específica. Por ejemplo el aptámero de EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial) se conjugó con la droga Doxorubicina, un agente quimioterapéutico, para tratamiento del retinoblastoma. El conjugado fue incorporado preferentemente por las células tumorales mejorando la eficiencia de la terapia y disminuyendo efectos secundarios. De manera análoga, los aptámeros pueden conjugarse con agentes fotosensibilizadores para aplicar terapias fotodinámicas en cáncer y con oligonucleótidos como siRNA para aumentar la especificidad celular de la terapia de silenciamiento.⁸⁷⁻⁸⁹

Aplicaciones diagnósticas.

Debido a que la expresión anormal de marcadores de superficie celular está relacionada con la generación de tumores, muchos aptámeros han sido seleccionados y estudiados para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, pulmonares, hepáticas, mamarias, ováricas, cerebrales y pancreáticas malignas así como también para la identificación y caracterización de células madre.⁸⁸

Para diagnóstico por imágenes tanto *in vivo* como *in vitro* pueden utilizarse aptámeros conjugados con fluoróforos, *quantum dots* o radioisótopos. El diagnóstico por imágenes basado en aptámeros puede dividirse en marcación directa ó sondas activables. En el primero, la manera más simple consiste en visualizar el aptámero a través de la emisión de fluorescencia. En el segundo caso, se diseñan sondas en donde la unión del aptámero a su blanco provoque un

cambio conformacional que “encienda” el fluoróforo. Como ejemplo de este tipo de sondas pueden mencionarse la de trombina y la de ATP.⁸⁷

Se han evaluado también posibles aplicaciones de la DNazima peroxidasa en inmunohistoquímica para reemplazar el uso de la peroxidasa proteica de rábano picante. Conjugados de biotina con la DNazima permitieron detectar PSA, en tejidos de próstata incubados con anticuerpo anti-PSA conjugado con avidina, mediante la oxidación de 3,3'-diaminobencidina (DAB).⁹⁰

Aplicaciones en el desarrollo de sensores y nanoestructuras.

Otra de las aplicaciones de las DNazimas y aptámeros es su uso como herramientas analíticas y bioquímicas en el desarrollo de sensores. Dos grandes grupos han sido mayormente utilizados para este fin: las fosfodiesterasas de ARN y las peroxidases. Debido a que la mayoría de las fosfodiesterasas requieren de un metal divalente como cofactor, muchos sensores de metales han sido desarrollados teniendo en cuenta esta propiedad.⁹¹ Entre ellos podemos mencionar sensores de Pb^{2+} , Zn^{2+} , catión uranilo, Hg^{2+} y Cu^{2+} (Figura 1.25).⁹²⁻⁹⁵ Tanto las fosfodiesterasas como las peroxidases han sido utilizadas también para detección de una secuencia oligonucleotídica específica (Figuras 1.25 y 1.26).^{96,97}

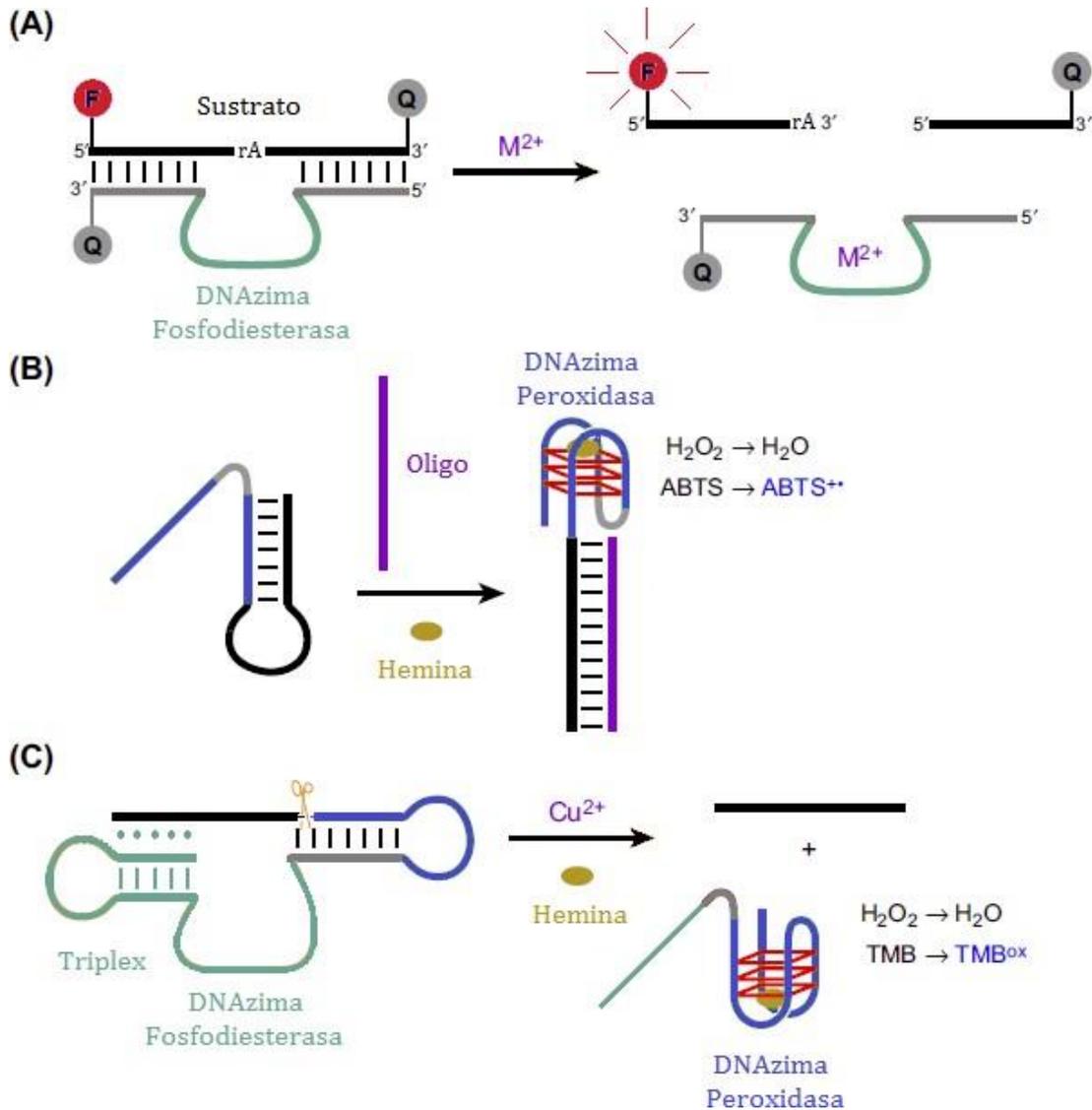


Figura 1.25 Aplicaciones de las DNAzimas fosfodiesterasa y peroxidasa en sensores.

A) En presencia de un metal divalente a detectar (M^{2+}), la DNAzima fosfodiesterasa hidroliza a su ARN sustrato separando el fluoróforo (F) del *quencher* (Q) y dando lugar a una señal fluorescente. B) En presencia del oligonucleótido a detectar (violeta), éste se aparea con su secuencia complementaria (negro) desarmando la estructura de *stem-loop* y permitiendo la formación del oligonucleótido de la DNAzima peroxidasa (azul) que en presencia de hemina y peróxido de hidrógeno oxida al ABTS dando una señal colorimétrica. C) En presencia de Cu^{2+} la DNAzima fosfodiesterasa dependiente de cobre libera un fragmento de ADN que permite la formación de la DNAzima peroxidasa en presencia de hemina. Ésta junto con peróxido de hidrógeno oxida TMB dando una señal colorimétrica.

Para la detección de secuencias oligonucleotídicas, se desarrollaron complejos denominados DNazimas multicomponente (MNAzimas) que producen una señal amplificada de salida frente a una señal de entrada. Múltiples oligonucleótidos se ensamblan para formar una MNAzima activa sólo en presencia de un oligonucleótido facilitador, la secuencia a detectar, desencadenando una reacción que genera una señal (Figura 1.26).

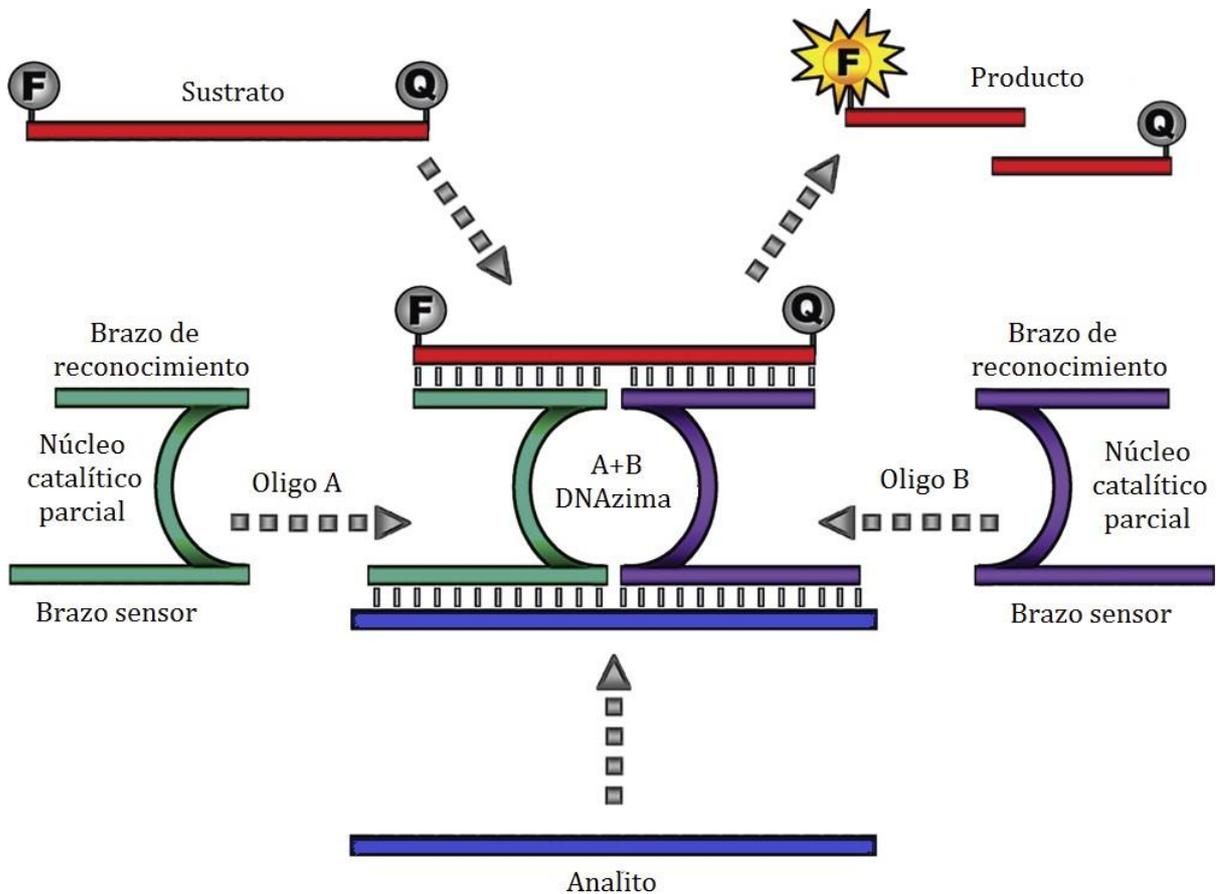


Figura 1.26 Sensor de secuencias oligonucleotídicas por ensamblado de una DNazima fosfodiesterasa. La presencia del oligonucleótido a detectar permite el ensamblado de una DNazima fosfodiesterasa activa que hidroliza a su sustrato alejando al fluoróforo (F) del *quencher* (Q) con la consiguiente emisión de fluorescencia.

Además de participar en el diseño de sensores de metales y de oligonucleótidos, las DNazima peroxidasa ha sido utilizada en el armado de sensores para moléculas pequeñas y proteínas. Conjugados aptámero-DNAzima, en donde el aptámero permite el reconocimiento específico del analito y la DNazima la emisión de una señal, son fáciles de obtener. Estas construcciones se denominan aptazimas y funcionan como aptasensores alostéricos. La unión del analito a la región del conjugado que constituye su aptámero, permite que la región que

contiene la secuencia de la DNAzima adquiera su conformación activa y catalice la reacción que da la señal. Dentro de este tipo de sensores podemos mencionar el de AMP (Figura 1.27), adenosina (Figura 1.28), ATP, cocaína y trombina.⁹⁸⁻¹⁰⁰

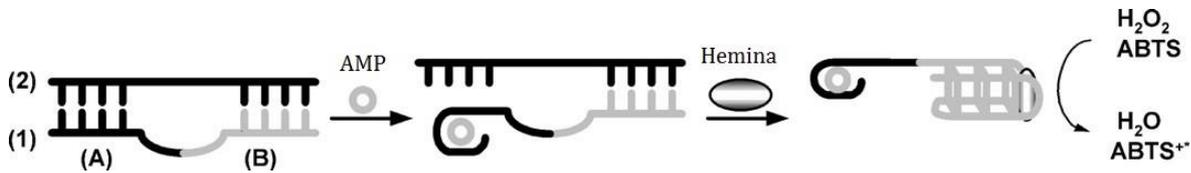


Figura 1.27 Aptasensor de AMP.

El oligonucleótido (1) está formado por la secuencia correspondiente al aptámero de AMP (A) y la secuencia correspondiente a la DNAzima peroxidasa (B), el oligonucleótido (2) se aparea parcialmente con el (1) impidiéndole adquirir su conformación activa. Cuando el AMP se une a su aptámero, el oligonucleótido (1) se libera del (2) y (B) forma el cuarteto de G que reconoce a la hemina para formar la DNAzima peroxidasa produciendo una señal colorimétrica por oxidación del ABTS con H₂O₂.

Los nanomateriales cuentan con propiedades ópticas, magnéticas y electrónicas particulares que hacen que combinados con las propiedades catalíticas y de reconocimiento de los ácidos nucleicos funcionales, se puedan desarrollar nanobioconjugados con diversas aplicaciones. El acoplamiento de DNAzimas con *quantum dots*, nanopartículas de oro, superficies de oro, óxido de grafeno y nanotubos de carbono abre nuevas puertas para el desarrollo de biosensores, nanodispositivos, y mecanismos de amplificación de señales. También se han utilizado DNAzimas para la generación de motores moleculares controlados por la presencia de un blanco así como también se pudo obtener nanomateriales cuyo ensamblado depende de la presencia de un analito.^{101, 102}

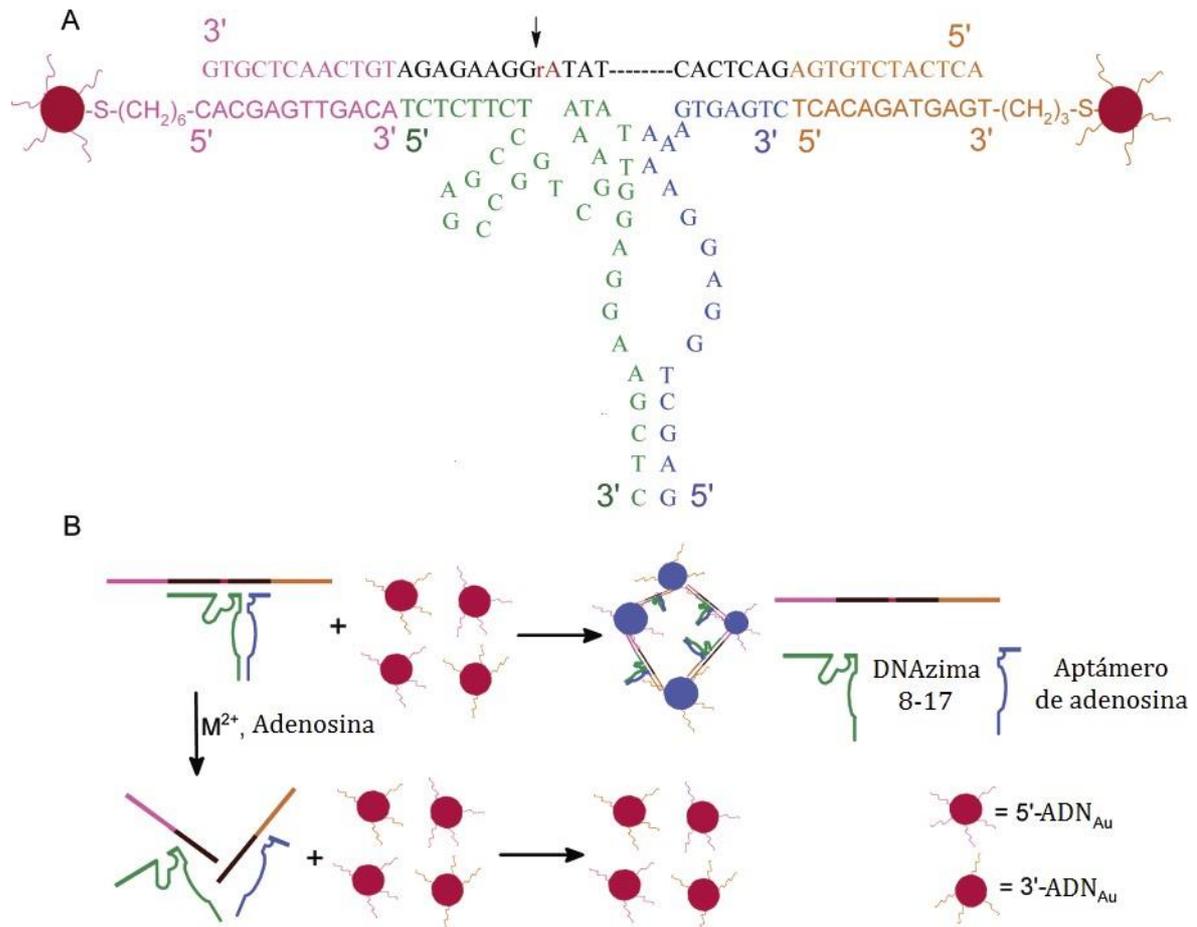


Figura 1.28 Aptasensor de Adenosina.

A) La aptazima se encuentra formada por dos oligonucleótidos. El primero contiene la secuencia de la DNAzima 8-17 (verde) y un extremo 5' (rosa) anclado a una nanopartícula de oro. El segundo contiene la secuencia del aptámero de adenosina (azul) y un extremo 3' (naranja) anclado a una nanopartícula de oro. El oligonucleótido sustrato posee un sitio de corte para la DNAzima 8-17 indicado por una flecha. B) En ausencia de adenosina, el oligonucleotido sustrato mantiene ambos oligonucleótidos unidos funcionando de conector entre las nanopartículas. Cuando las nanopartículas de oro se encuentran agregadas dan un color azul. En presencia de adenosina, ésta se une a su aptámero y la DNAzima 8-17 queda libre para catalizar el corte del sustrato, rompiéndose el agregado de nanopartículas y dando un color rojizo característico de las nanopartículas de oro desagregadas.

Ventajas del uso de oligonucleótidos funcionales.

Los oligonucleótidos funcionales presentan diversas ventajas frente a sus análogos proteicos, enzimas y anticuerpos, en cuanto a sus diversas aplicaciones clínicas y la menor dificultad para su obtención a gran escala. Los oligonucleótidos pueden penetrar los tejidos de

manera más rápida y eficiente debido a su menor tamaño. Por otro lado, al ser ácidos nucleicos, no deberían provocar una respuesta inmune *in vivo*. Estudios clínicos recientes han demostrado, que a diferencia de los anticuerpos, los aptámeros resultaron no inmunogénicos. Los ácidos nucleicos tienen la propiedad intrínseca de ser térmicamente estables, incluso luego de su desnaturalización a 95 °C, pueden volver a plegarse recuperando su estructura tridimensional a temperatura ambiente mientras que las proteínas no pueden replegarse y se inactivan de manera irreversible. Un buen protocolo de síntesis junto con estrategias de modificación química permite la obtención de estas moléculas a gran escala de manera rápida y mucho más económica. Además se cuenta con un amplio repertorio de modificaciones químicas a disposición. No requieren de organismos vivos como bacterias, levaduras o animales para su producción, pero de ser necesario también pueden generarse *in vivo* con el uso de plásmidos. El hecho de no requerir el uso de organismos vivos o de inmunizaciones como en el caso de los anticuerpos permite que los diferentes lotes de producción sean homogéneos.⁸⁸

Los blancos o analitos pueden ser muy variados, desde iones y secuencias oligonucleotídicas, hasta drogas, toxinas, péptidos, e incluso proteínas. También se ha logrado el reconocimiento específico de virus, bacterias, células y tejidos.

Son fácilmente inmovilizados tanto a soportes de fase sólida utilizados para la síntesis, como nanopartículas o nanosuperficies. Se pueden conjugar fácilmente con otros ácidos nucleicos, péptidos, proteínas o diversas moléculas inorgánicas u orgánicas de interés biológico o farmacéutico.

1.4. REFERENCIAS

¹ Dass CR, Choong PFM, Khachigian LM. DNAzyme technology and cancer therapy: cleave and let die. *Mol. Cancer Ther.* 2008, 7:243-251.

² Bennett CF, Swayze EE. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 50:259-293.

³ Kim HN, Ren WX, Kim JS, Yoon J. Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41:3210-3244.

⁴ Turner APF. Biosensors: Sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42:3184-3196.

⁵ Travascio P, Sen D, Bennet AJ. DNA and RNA enzymes with peroxidase activity. An investigation into the mechanism of action. *Can. J. Chem.* 2006, 84:613-619.

⁶ Gong L, Zhao Z, Lv YF, Huan SY, Fu T, Zhang ZB, Shen GL, Yu RQ. DNAzyme-based biosensors and nanodevices. *Chem. Commun. (Camb).* 2015, 51:979-95.

⁷ Aldaye FA, Palmer AL, Sleiman HF. Assembling Materials with DNA as the Guide. *Science* 2008, 321:1795-1799.

- ⁸ Orbach R, Willner B, Willner I. Catalytic nucleic acids (DNAzymes) as functional units for logic gates and computing circuits: From basic principles to practical applications. *Chem. Commun.* 2015, 51:4144–4160.
- ⁹ Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, 1984.
- ¹⁰ Neidle S. Principles of Nucleic Acid Structure. Elsevier, 2008.
- ¹¹ Altona C, Sundaralingam M. Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. New description using the concept of pseudorotation. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94:8205-8212.
- ¹² Watson J, Crick FH. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953, 171:737-738.
- ¹³ Crick FH. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 1966, 19: 548-555.
- ¹⁴ Hoogsteen K, The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta. Crystallogr.* 1963, 16:907.
- ¹⁵ Luo R, Gilson HS, Potter MJ, Gilson MK. The Physical Basis of Nucleic Acid Base Stacking in Water. *Biophys. J.* 2001, 80:140-148.
- ¹⁶ Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A, Mathews MB. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5:1013-1023
- ¹⁷ Ussery DW. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. Encyclopedia of life sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002.
- ¹⁸ Rhodes D, Lipps HJ. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nuc. Acids Res.* 2015, 43: 8627–8637.
- ¹⁹ Adrian M, Heddi B, Phan AT. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods* 2012, 57:11-24.
- ²⁰ Benabou S, Aviñó A, Eritja R, González C, Gargallo R. Fundamental aspects of the nucleic acid i-motif structures. *RSC Adv.* 2014, 4:26956-26980.
- ²¹ Vester V, Wengel J. LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 2004, 43:13233–13241.
- ²² Li C, Zhu L, Zhu Z, Fu H, Jenkins G, Wang C, Zou Y, Lua X, Yang CJ. Backbone modification promotes peroxidase activity of G-quadruplex-based DNAzyme. *Chem. Commun.* 2012, 48:8347-8349.
- ²³ Deleavey GF, Damha MJ. Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing. *Chem. Biol.* 2012, 9:937-954
- ²⁴ Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24:374-87.
- ²⁵ Prakash TP. An Overview of Sugar-Modified Oligonucleotides for Antisense Therapeutics. *Chem. Biodivers.* 2011, 8:1616-1641.

- ²⁶ Jellinek D, Green LS, Bell C, Lynott CK, Gill N, Vargeese C, Kirschenheuter G, McGee DP, Abesinghe P, Pieken WA et al. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1995, 34:11363-11372.
- ²⁷ Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjic N. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 1998, 273:20556-20567.
- ²⁸ Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C et al. Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem. Biol.* 2005, 12:25-33
- ²⁹ Aartsma-Rus A, Kaman WE, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther.* 2004, 11:1391-1398.
- ³⁰ Jepsen JS, Sørensen MD, Wengel J. Locked Nucleic Acid: A Potent Nucleic Acid Analog in Therapeutics and Biotechnology. *Oligonucleotides* 2004, 14:130-146.
- ³¹ Giannaris P, Damha MJ. Hybridization properties of oligoarabinonucleotides. *Can. J. Chem.* 1994, 72:909-918.
- ³² Cicero DO, Iribarren AM, Bazzo R. Conformational analysis by NMR spectroscopy of 2'-deoxy-2'-C-alkylnucleosides: Building blocks of new antisense fragments. *Appl. Magn. Reson.* 1994, 7:95-105.
- ³³ Cicero DO, Gallo M, Neuner PJ, Iribarren AM. Synthesis and properties of (2'S)- and (2'R)-2'-deoxy-2'-C-methyl oligonucleotides. *Tetrahedron* 2001, 57:7613-7621.
- ³⁴ Iribarren AM, Cicero DO, Neuner PJ. Resistance to degradation by nucleases of (2'S)-2'-deoxy-2'-C-methyloligonucleotides, novel potential antisense probes. *Antisense Res. Dev.* 1994, 4:95-98.
- ³⁵ Robaldo L, Montserrat JM, Iribarren AM. 10-23 DNAzyme modified with (2'R)- and (2'S)-2'-deoxy-2'-C-methyluridine in the catalytic core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010;20:4367-4370.
- ³⁶ Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012, 11:125-140.
- ³⁷ Wan WB, Migawa MT, Vasquez G, Murray HM, Nichols JG, Gaus H, et al. Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42:13456-68.
- ³⁸ Yu RZ, Grundy JS, Geary RS. Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2013, 9:169-82.

- ³⁹ Orr RM. Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc./CIBA vision. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2001, 3:288-94.
- ⁴⁰ Wong E, Goldberg T. Mipomersen (Kynamro). A novel antisense oligonucleotide inhibitor for the management of homozygous familial hypercholesterolemia. *Pharm. Therapeut.* 2014, 39:119-22.
- ⁴¹ Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391: 806-11.
- ⁴² Engels JW. Gene silencing by chemically modified siRNAs. *N. Biotechnol.* 2013, 30:302-307.
- ⁴³ Sridharan K, Gogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2016. (DOI:10.1111/bcp.12987)
- ⁴⁴ Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 1982, 31:147-157.
- ⁴⁵ Jimenez RM, Polanco JA, Lupták A. Chemistry and biology of self-cleaving ribozymes. *Trends Biochem. Sci.* 2015, 40:648-661.
- ⁴⁶ Jaeger L. The new world of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7:324-335.
- ⁴⁷ Breaker RR, Joyce GF. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* 1994 1:223-229.
- ⁴⁸ Baum DA, Silverman SK. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Life Sci.* 2008, 65:2156-2174.
- ⁴⁹ Silverman SK. *In vitro* selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:6151-6163.
- ⁵⁰ Lan T, Lu Y. Metal Ion-Dependent DNAzymes and Their Applications as Biosensors. *Met. Ions Life Sci.* 2012, 10:217-248.
- ⁵¹ Carmi N, Balkhi SR, Breaker RR. Cleaving DNA with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:2233-2237.
- ⁵² Flynn-Charlebois A, Wang Y, Prior TK, Rashid I, Hoadley KA, Coppins RL, Wolf AC, Silverman SK. Deoxyribozymes with 2'-5' RNA ligase activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125:2444-2454.
- ⁵³ Cuenoud B, Szostak JW. A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* 1995, 375:611-614.
- ⁵⁴ Wang W, Billen LP, Li Y. Sequence diversity, metal specificity, and catalytic proficiency of metal-dependent phosphorylating DNA enzymes. *Chem. Biol.* 2002, 9:507-517.
- ⁵⁵ Li Y, Liu Y, Breaker RR. Capping DNA with DNA. *Biochemistry* 2000, 39:3106-3114.
- ⁵⁶ Pradeepkumar PI, Hobartner C, Baum DA, Silverman SK. DNA-catalyzed formation of nucleopeptide linkages. *Angew. Chem. Int.* 2008, 47:1753-1757.
- ⁵⁷ Hobartner C, Pradeepkumar PI, Silverman SK. Site-selective depurination by a periodate-dependent deoxyribozymes. *Chem. Commun.* 2007, 2255-2257.

- ⁵⁸ Chandra M, Silverman SK. DNA and RNA can be equally efficient catalysts for carbon-carbon bond formation. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130:2936-2937.
- ⁵⁹ Chinnapen DJ, Sen D. A deoxyribozyme that harnesses light to repair thymine dimers in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101:65-69.
- ⁶⁰ Travascio P, Li Y, Sen D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* 1998, 5:505-517.
- ⁶¹ Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990, 346:818-822.
- ⁶² Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990, 249:505-510.
- ⁶³ Jenison R, Gill S, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 1994, 263:1425-1429.
- ⁶⁴ Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24:1029-1036.
- ⁶⁵ Morris KN, Jensen KB, Julin CM, Weil M, Gold L. High affinity ligands from *in vitro* selection: Complex targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:2902-2907.
- ⁶⁶ Li S, Xu H, Ding H, Huang Y, Cao X, Yang G, Li J, Xie Z, Meng Y, Li X, *et al.* Identification of an aptamer targeting hnRNP a1 by tissue slide-based SELEX. *J. Pathol.* 2009, 218:327-336.
- ⁶⁷ Dellafiore MA, Montserrat JM, Iribarren AM. Modified Nucleoside Triphosphates for *In-vitro* Selection Techniques. *Front. Chem.* 2016, 4:18.
- ⁶⁸ Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:4262-4266.
- ⁶⁹ Cruz RP, Withers JB, Li Y. Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme. *Chem. Biol.* 2004, 11:57-67.
- ⁷⁰ Schlosser K, Li Y. A Versatile Endoribonuclease Mimic Made of DNA: Characteristics and Applications of the 8-17 RNA-Cleaving DNzyme. *ChemBioChem* 2010, 11:866-879.
- ⁷¹ Schlosser K, Gu J, Sule L, Li Y. *In vitro* selection of small RNA-cleaving deoxyribozymes that cleave pyrimidine-pyrimidine junctions. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36:1472-1481.
- ⁷² Rätz MH, Hollenstein M. Probing the effect of minor groove interactions on the catalytic efficiency of DNzymes 8-17 and 10-23. *Mol. Biosyst.* 2015, 11:1454-1461.
- ⁷³ Wang B, Cao L, Chiuman W, Li Y, Xi Z. Probing the Function of Nucleotides in the Catalytic Cores of the 8-17 and 10-23 DNzymes by Abasic Nucleotide and C3 Spacer Substitutions. *Biochemistry* 2010, 49:7553-7562.

- ⁷⁴ Rong W, Xu L, Liu Y, Yu J, Zhou Y, Liu K, He J. 8-17 DNAzyme modified with purine analogs in its catalytic core: The conservation of the five-membered moieties of purine residues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22:4238-4241
- ⁷⁵ Li Y, Sen D. Toward an efficient DNAzyme. *Biochemistry* 1997, 36:5589-5599.
- ⁷⁶ Sen D, Poon LCH. RNA and DNA complexes with hemin [Fe(III) heme] are efficient peroxidases and peroxygenases: how do they do it and what does it mean? *Crit. Rev. in Biochem. Mol. Biol.* 2011, 46:478-492.
- ⁷⁷ Rojas AM, Gonzalez PA, Antipov E, Klivanov AM. Specificity of a DNA-based (DNAzyme) peroxidative biocatalyst. *Biotechnol. Lett.* 2007, 29:227-232.
- ⁷⁸ Poon LCH, Methot SP, Morabi-Pazooki W, Pio F, Bennet AJ, Sen D. Guanine-rich RNAs and DNAs that bind heme robustly catalyze oxygen transfer reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133: 1877-1884.
- ⁷⁹ Hou Z, Meng JR, Zhao JR, Hu BQ, Liu J, Yan XJ, Jia M, Luo XX. Inhibition of β -lactamase mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a deoxyribozyme. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007, 28:1775-1782.
- ⁸⁰ Hou Z, Meng JR, Niu C, Wang HF, Liu J, Hu BQ, Jia M, Luo XX. Restoration of antibiotic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by targeting *mecR1* with a phosphorothioate deoxyribozyme. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007, 34:1160-1164.
- ⁸¹ Dash BC, Banerjee AC. Sequence-specific cleavage activities of DNA enzymes targeted against HIV-1 Gag and Nef regions. *Oligonucleotides* 2004, 14:41-47.
- ⁸² Hou W, Ni Q, Wo J, Li M, Liu K, Chen L, Hu Z, Liu R, Hu M. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by 10-23 DNAzymes. *Antiviral Res.* 2006, 72:190-196.
- ⁸³ Robaldo L, Izzo F, Dellafiore M, Proietti C, Elizalde PV, Montserrat JM, Iribarren AM. Influence of conformationally restricted pyrimidines on the activity of 10-23 DNAzymes. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20:2581-6.
- ⁸⁴ Zhang L, Gasper WJ, Stass SA, Ioffe OB, Davis MA, Mixson AJ. Angiogenic inhibition mediated by a DNAzyme that targets vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res.* 2002, 62:5463-5469.
- ⁸⁵ Zhang G, Dass CR, Sumithran E, Di Girolamo N, Sun LQ, Khachigian LM. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004, 96:683-696.
- ⁸⁶ Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, Khachigian LM. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumor growth by DNAzymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32:3065-3069.

- ⁸⁷ Kong HY, Byun J. Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization, and Application in Biomedical Science. *Biomol Ther* 2013, 21:423-434.
- ⁸⁸ Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2014, 3:e182.
- ⁸⁹ Subramanian N, Raghunathan V, Kanwar JR, Kanwar RK, Elchuri SV, Khetan V, Krishnakumar S. Target-specific delivery of doxorubicin to retinoblastoma using epithelial cell adhesion molecule aptamer. *Mol Vis.* 2012, 18:2783-95.
- ⁹⁰ Thirstrup D, Baird GS. Histochemical Application Of A Peroxidase DNAzyme with a Covalently Attached Hemin Cofactor. *Anal. Chem.* 2010, 82:2498-2504.
- ⁹¹ Silverman SK. Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.* 2016, 41:595-609.
- ⁹² Lana T, Furuyab K, Lub Y. A highly selective lead sensor based on a classic lead DNAzyme. *Chem Commun (Camb).* 2010, 46:3896-3898.
- ⁹³ Wu P, Hwang K, Lan T, Lu Y. A DNAzyme-gold nanoparticle probe for uranyl ion in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135:5254-5257.
- ⁹⁴ Hollenstein M, Hipolito C, Lam C, Dietrich D, Perrin DM. A highly selective DNAzyme sensor for mercuric ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47:4346-4350.
- ⁹⁵ Yin BC, Ye BC, Tan W, Wang H, Xie CC. An allosteric dual-DNAzyme unimolecular probe for colorimetric detection of copper(II). *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131:14624-14625.
- ⁹⁶ Xiao Y, Pavlov V, Niazov T, Dishon A, Kotler M, Willner I. Catalytic beacons for the detection of DNA and telomerase activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126:7430-7431.
- ⁹⁷ Mokany E, Bone SM, Young PE, Doan TB, Todd AV. MNAzymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132:1051-1059.
- ⁹⁸ Li D, Shlyahovsky B, Elbaz J, Willner I. Amplified analysis of low-molecular-weight substrates or proteins by the self-assembly of DNAzyme-aptamer conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129:5804-5805.
- ⁹⁹ Liu J, Lu Y. Anal. Adenosine-Dependent Assembly of Aptazyme-Functionalized Gold Nanoparticles and Its Application as a Colorimetric Biosensor. *Chem.* 2004, 76:1627-1632.
- ¹⁰⁰ Kosman J, Juskowiak B. Peroxidase-mimicking DNAzymes for biosensing applications: A review. *Analytica Chimica Acta* 2011, 707:7-17.
- ¹⁰¹ Lu Y, Liu J. Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNAzymes and aptamers. *Curr. Opin. Biotech.* 2006, 17:580-588.
- ¹⁰² Gong L, Zhao Z, Lv YF, Huan SY, Fu T, Zhang XB, Shen GL, Yu RQ. DNAzyme-based biosensors and nanodevices. *Chem Commun (Camb).* 2015, 51:979-95.

SÍNTESIS DE 2'-DESOXI-2'-C-METILNUCLEÓSIDOS



CONSIDERACIONES PREVIAS

En este capítulo se detalla la ruta sintética que lleva a la obtención de los análogos de nucleósidos utilizados en la mayor parte de este trabajo, los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos de pirimidina (Figura 2.1). Debido a la presencia de un gran número de grupos funcionales en nuestro compuesto de partida, la uridina, la obtención del producto final requiere de varios pasos donde la protección ortogonal juega un papel indispensable. Una vez obtenidos, estos nucleósidos no naturales, fueron incorporados como monómeros en cadenas de ADN y ARN con el fin de obtener oligonucleótidos portadores de modificaciones químicas. Por esta razón, se debió primero transformarlos en precursores para la síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida, es decir, en fosforamiditas.

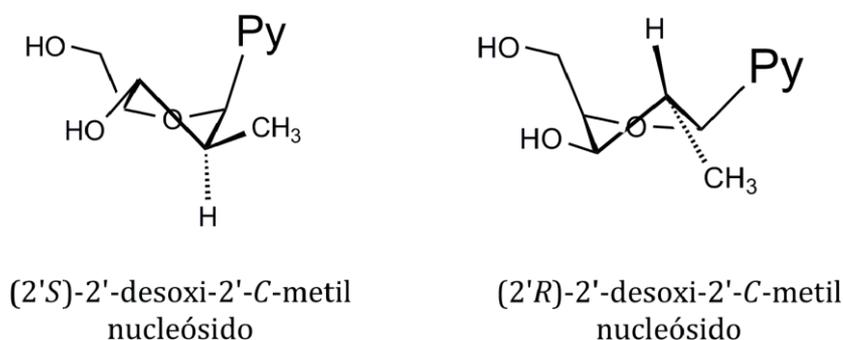


Figura 2.1 Estructura de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos de pirimidina (Py = pirimidina).

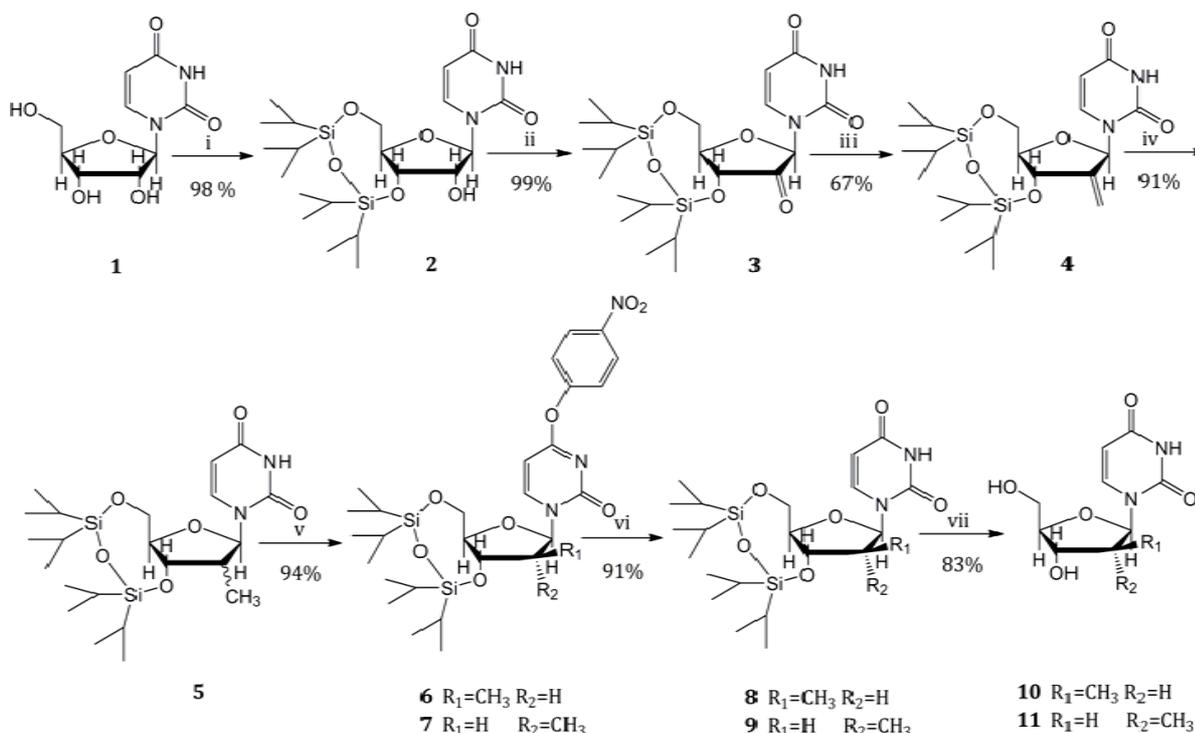
OBJETIVOS

Obtención de (2'*R*) y (2'*S*)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos y sus respectivas fosforamiditas para ser utilizadas como precursoras en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina y sus fosforamiditas.

La preparación de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina se llevó a cabo siguiendo la ruta sintética detallada en la Figura 2.2.



i) TIPDSCl₂, Py; ii) Cr₃, Py, Ac₂O, CH₂Cl₂; iii) Ph₃PCH₃Br, BuLi, THF; iv) H₂ (55 psi), AcOEt, Pd/C 10%; v) ClPTS, CH₂Cl₂, TEA, DMAP, 4-nitrofenol, DABCO; vi) 2-nitrobenzaldoxima, tetrametilguanidina, ACN; vii) TBAF, THF, Py:MeOH:H₂O 3:3:1.

Figura 2.2 Síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina

Se utilizó la uridina (1) como compuesto de partida y se procedió a la protección conjunta de los hidroxilos de las posiciones 3' y 5' utilizando 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (TIPDSCl₂) o también llamado reactivo de Markiewicz (reacción i).¹ Esta reacción consiste en dos sustituciones nucleofílicas. El hidroxilo del carbono 5', por ser el más reactivo, lleva a cabo el primer ataque nucleofílico a uno de los silicios, mientras que el cloruro unido a éste actúa como grupo saliente. Esto favorece el ataque del hidroxilo del carbono 3' al silicio restante liberando un segundo cloruro. De esta manera se obtuvo la uridina protegida con un puente disiloxano, 5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (2) con un rendimiento del 98 %.

A continuación se llevó a cabo la oxidación del hidroxilo 2', el único libre para reaccionar, utilizando trióxido de cromo en piridina y diclorometano (reacción ii) y de esta manera se obtuvo la 2'-ceto-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**3**) con un 99 % de rendimiento.²

Luego se realizó la reacción de Wittig (reacción iii)³ sobre el carbonilo de la posición 2' para dar 2'-desoxi-2'-metiliden-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**4**) con un 67 % de rendimiento. La caída en el rendimiento podría atribuirse a una menor reactividad de las cetonas en comparación con los aldehídos para esta reacción y al impedimento estérico que puede generar el puente disiloxano en la formación del intermediario oxafosfetano.

Se procedió a la hidrogenación del doble enlace en la posición 2' (reacción iv) para dar lugar a la mezcla de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**5**) en proporción equimolar con un rendimiento del 91 %.⁴

Para separar la mezcla de diastereoisómeros se procedió a la derivatización de la base con 4-nitrofenol (reacción v). Primero se produce el ataque nucleofílico del oxígeno de la posición 4 de la base sobre el cloruro de *p*-toluensulfonilo, siendo el cloruro el grupo saliente. Luego el hidroxilo del 4-nitrofenol ataca el carbono 4 de la base, siendo el *p*-toluensulfonato el grupo saliente. De esta manera se obtuvo la mezcla de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-O⁴-*p*-nitrofeniluridina (**6** y **7** respectivamente) que se separó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel. El rendimiento global de la reacción es de un 94 %. A partir de este momento se continuó la ruta de síntesis para cada diastereoisómero por separado.

A continuación se eliminó el 4-nitrofenol por medio de un ataque nucleofílico con 2-nitrobenzaldoxima (reacción vi) para dar (2'S) ó (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**8** ó **9** respectivamente) con un rendimiento del 91 %.

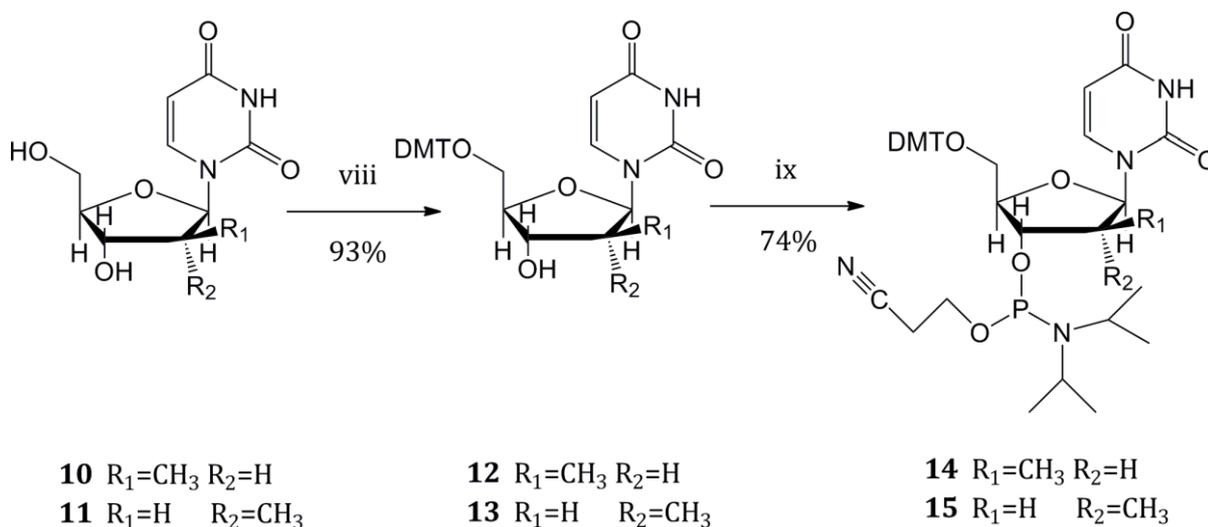
Finalmente se eliminó el puente disiloxano utilizando un nucleófilo como el fluoruro de tetrabutilamonio (reacción vii) obteniendo como producto final (2'S) ó (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (**10** u **11** respectivamente), con un rendimiento del 83 %, que fueron utilizadas para la preparación de las fosforamiditas correspondientes.⁵

Al ser una vía sintética compuesta por numerosos pasos es importante ajustar las condiciones de cada uno para lograr el máximo rendimiento posible. En general se lograron buenos rendimientos, siendo el menor y el más difícil de mejorar el correspondiente a la reacción de Wittig.

El rendimiento final de este proceso fue de 42 % tomando como producto final la suma de ambos diastereoisómeros.

Los nucleósidos utilizados como monómeros para la síntesis en fase sólida automatizada de oligonucleótidos poseen grupos funcionales que permiten una desprotección selectiva a lo largo de los distintos pasos del ciclo de síntesis.

La preparación de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina se llevó a cabo utilizando la ruta sintética descrita en la Figura 2.3.



viii) DMTCl, TEA, Py; ix) β-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina, DIPEA, CH₂Cl₂.

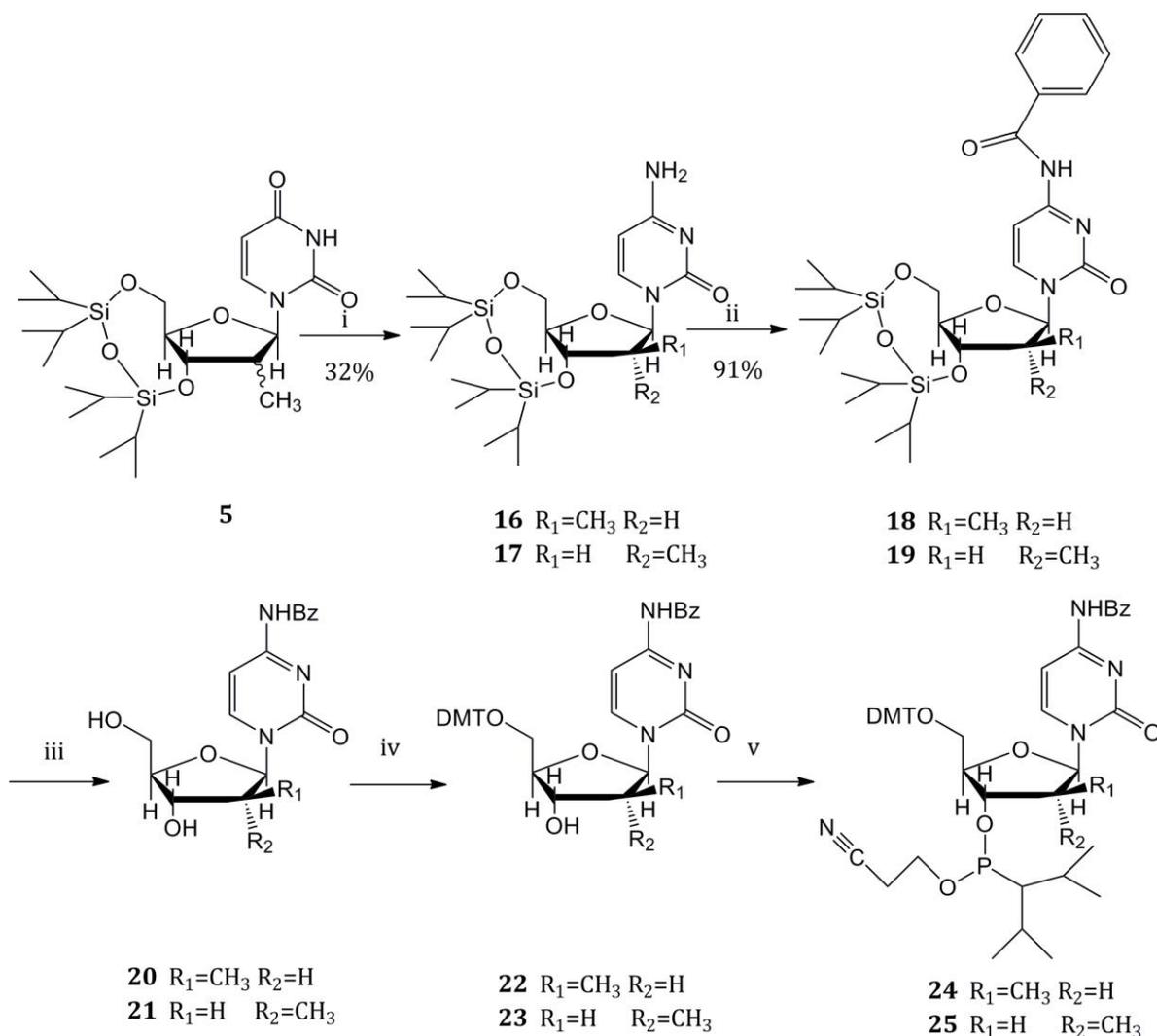
Figura 2.3 Preparación de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina.

Partiendo de los compuestos **10** u **11**, se procedió a la protección regioselectiva del hidroxilo en posición 5' utilizando cloruro de dimetoxitritilo (reacción viii) para dar lugar a (2'S) ó (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (**12** ó **13** respectivamente) con un 93% de rendimiento. La reacción siguiente es una sustitución nucleofílica en donde el hidroxilo del carbono 3' ataca al fósforo de la β-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina (reacción ix) para dar lugar al producto final (2'S) ó (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (**14** ó **15** respectivamente) con un 74% de rendimiento.^{6,7}

El rendimiento de la conversión a fosforamidita resultó entonces en un 69% y teniendo en cuenta la conversión desde la uridina se tuvo un rendimiento global del 29%.

Síntesis de (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina y sus fosforamiditas.

Siguiendo el camino de la ruta sintética para la obtención de los nucleósidos modificados de uridina hasta el compuesto 5 se puede obtener nucleósidos modificados con citosina como base como se muestra en la Figura 2.4.



i) a) $POCl_3$; 2,4,6-triazol, ACN, TEA b) dioxano, amoníaco. ii) Cloruro de benzoílo, piridina. iii) TBAF, THF, Py:MeOH:H₂O 3:3:1. iv) DMTCl, TEA, Py; v) β -cianoetoxi-*N,N*-diisopropilaminoclorofosfina, DIPEA, CH₂Cl₂.

Figura 2.4 Síntesis de (2'*R*) y (2'*S*)-2'-desoxi-2'-C-metil-*N*⁴-benzoilcitidina.

Lo primero que se hizo fue producir la aminólisis de la base. Se utilizó oxiclورو de fósforo y 1,2,4-triazol para formar un intermediario triazólido (reacción ia).⁸ El posterior tratamiento con amoníaco acuoso (reacción ib) dio como resultado la mezcla de diastereoisómeros (2'*S*) y (2'*R*)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)citidina (**16** y **17**). Esta segunda parte de la reacción, dio como producto secundario el nucleósido de uridina nuevamente, ya que si bien la mayoría de las moléculas son atacadas por

el amoníaco para dar citidina, una parte de ellas puede ser atacada por el agua volviéndose a formar el grupo carbonilo del uracilo. El bajo rendimiento obtenido, estimado en un 30 % podría deberse a esta reacción secundaria. Para tratar de mejorar este paso, en lugar de utilizar amoníaco acuoso, se disolvió el compuesto en tetrahidrofurano anhidro y se le burbujeó amoníaco gaseoso. Pero los rendimientos obtenidos no se diferenciaron de la técnica anterior.

Para proteger el grupo amino en los siguientes pasos de obtención de la fosforamidita y para protegerlo en el proceso de síntesis de oligonucleótidos, se lo convirtió en un grupo amido mediante una reacción de sustitución nucleofílica con cloruro de benzoílo (reacción ii) obteniéndose *N*⁴-benzoilcitidina como base.⁷ La presencia de este grupo aumenta la hidrofobicidad del nucleósido permitiendo separar ambos diastereoisómeros por columna de sílica gel obteniéndose (2'*S*) y (2'*R*)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-*N*⁴-benzoilcitidina (**18** y **19**) con un rendimiento del 91 %.

El resto de los pasos que completan la ruta sintética hasta la obtención de las fosforamiditas de citidina son análogos a la ruta de la uridina. Al no aportar nuevos conocimientos en materia de síntesis orgánica y debido a que en nuestro laboratorio se contaba con masa suficiente de (2'*S*) y (2'*R*)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-*O*-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metil-*N*⁴-benzoilcitidina (**24** y **25**) de síntesis realizadas en trabajos previos, se decidió no continuar con la ruta sintética luego de obtener los compuestos **18** y **19**.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron los diastereoisómeros (2'*R*) y (2'*S*)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina. Éstos fueron convertidos a sus respectivas fosforamiditas para ser utilizados como monómeros en la síntesis de oligonucleótidos. Se realizaron modificaciones en algunos procedimientos de la ruta sintética con respecto a la ya puesta a punto en el laboratorio que permitieron una mejoría en los rendimientos.

Se sintetizaron 2'-C-metilnucleósidos de citidina a partir de uridina que pueden ser utilizados para la preparación de fosforamiditas de citidina modificadas.

REFERENCIAS

¹ Markiewicz WT, Wiewiórowski M. A new type of silyl protecting groups in nucleoside chemistry. *Nucl. Acids Res.* 1978, 1:185-190.

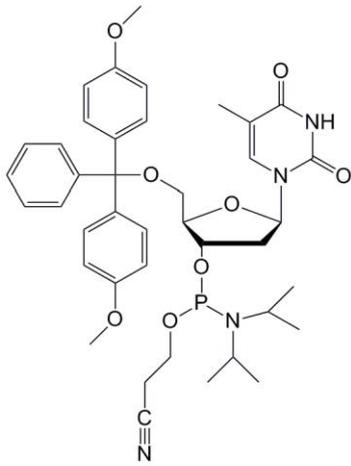
- ² Hansske F, Madej D, Robins MJ. 2' and 3-ketonucleosides and their arabino and xylo reduction products. Convenient access via selective protection and oxidation of ribonucleosides. *Tetrahedron* 1984, 40:125-135.
- ³ Samano V, Robins MJ. Stereoselective addition of a Wittig reagent to give a single nucleoside oxaphosphetane diastereoisomer. Synthesis of 2' (and 3')-deoxy-2' (and 3')-methylneuridine (and cytidine). Derivatives from uridine ketonucleosides. *Synthesis* 1991, 4:283-288.
- ⁴ Cicero DO, Neuner PJS, Franzese O, D'onofrio C, Iribarren AM. Stereoselective synthesis of novel analogues of 2'-deoxy- and 2', 3'- dideoxynucleosides with potential antiviral activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4:861-866.
- ⁵ Cicero DO, Gallo M, Neuner PJS, Iribarren AM. Synthesis and properties of (2'S) and (2'R)-2'-deoxy-2'-C-methyloligonucleotides. *Tetrahedron* 2001, 57:7613-7621.
- ⁶ Gallo, Monteagudo, Cicero, Torres, Iribarren. 2'-C-methyluridine phosphoramidite: a new building block for the preparation of RNA analogues carrying the 2'-hydroxyl group. *Tetrahedron* (2001) 57, 5707-5713.
- ⁷ Gait MJ. Oligonucleotide synthesis. A practical approach. IRL Press 1984.

SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADOS

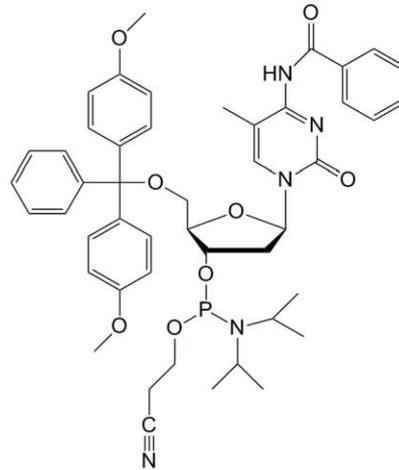


CONSIDERACIONES PREVIAS

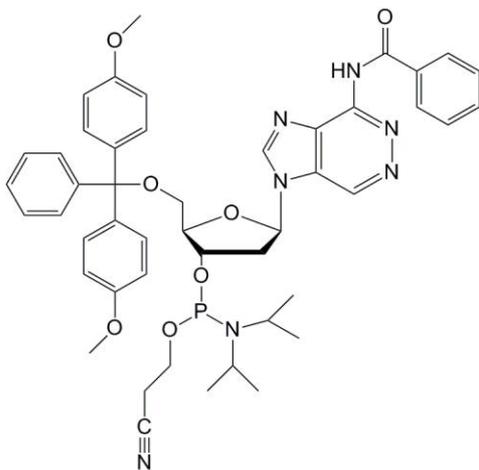
La síntesis automatizada de oligonucleótidos se lleva a cabo en fase sólida mediante una serie de pasos que se repiten en forma cíclica. Esta metodología se basa en la química del fosfito triéster^{1,2} y utiliza como monómeros nucleósidos cuyas posiciones 3' están funcionalizadas con β-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita. Además, las cianoetilfosforamiditas poseen grupos protectores que permiten una desprotección selectiva durante los distintos pasos del ciclo. En la Figura 3.1 se puede observar la estructura de los monómeros utilizados. El grupo dimetoxitritilo protege el hidroxilo 5' y se pueden encontrar distintas protecciones en la bases. La timina no posee grupo protector mientras que la citosina se emplea como *N*⁴-benzoilcitosina, la adenina como *N*⁶-benzoiladenina y la guanosina como *N*²-isobutirilguanina.



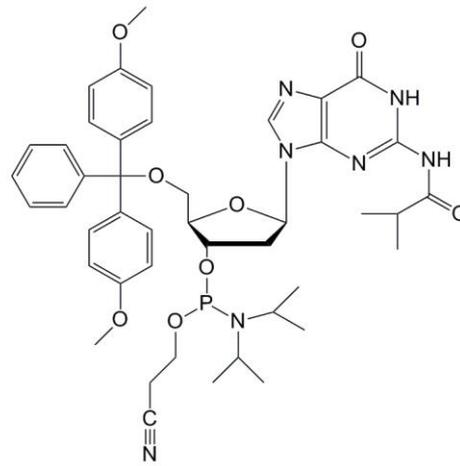
Fosforamidita de T



Fosforamidita de C



Fosforamidita de A



Fosforamidita de G

Figura 3.1 5'-O-dimetoxitritil-3'-O-(β-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxinucleósidos. Estructura de los monómeros utilizados para la síntesis en fase sólida de ADN.

La síntesis química de oligonucleótidos se lleva a cabo en dirección 3' a 5', contraria a la síntesis biológica. Esto permite lograr una mayor eficiencia en la reacción de condensación de monómeros al aprovechar la alta reactividad del hidroxilo primario en 5'. En la Figura 3.2 se muestra un esquema del ciclo de síntesis.

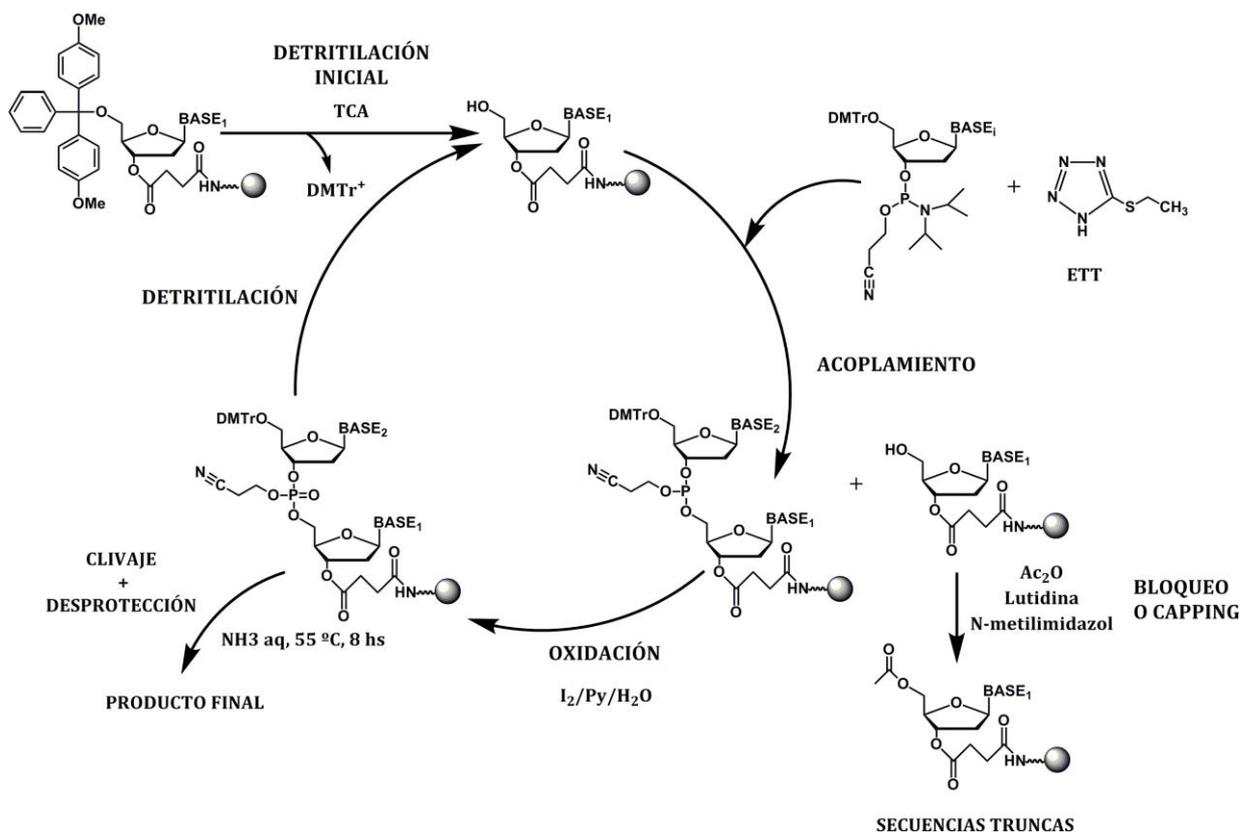


Figura 3.2 Esquema del ciclo de síntesis en fase sólida.

En general, se utiliza como fase sólida sílice de poro controlado (CGP) o poliestireno que contienen unido el primer monómero que corresponde al nucleósido del extremo 3' de la cadena a sintetizar.

El nucleósido anclado al soporte posee el grupo dimetoxitritilo en su posición 5' cuya función es prevenir la polimerización durante la funcionalización de la resina. Por lo tanto, el primer paso de la síntesis consiste en la desprotección del extremo 5' del nucleósido anclado mediante una solución de ácido tricloroacético al 3% en diclorometano, con la consiguiente liberación del catión dimetoxitritilo de color naranja (destritilación).

El siguiente paso consiste en el agregado en exceso del siguiente monómero en presencia de un activador, en este caso, el etiltiotetrazol (ETT), ambos disueltos en acetonitrilo anhidro. El ETT protona el grupo amino de la cianoetilfosforamidita del nucleósido, convirtiendo a la diisopropilamina en un buen grupo saliente frente al ataque nucleofílico al fósforo por el hidroxilo del extremo 5' de la cadena en formación, generando un fosfito triéster (acoplamiento). Gracias a las protecciones presentes en las bases, es el hidroxilo 5' el único nucleófilo capaz de reaccionar. Para obtener buenos rendimientos finales de síntesis, este paso debe tener una eficiencia mínima de 99 %.

Aún agregando el monómero y el activador en exceso, hay grupos hidroxilo 5' que quedan sin reaccionar. Éstos deben bloquearse para que no puedan reaccionar en el siguiente

paso de acoplamiento y así evitar la formación de secuencias n-1. Para esto, se utiliza una solución de anhídrido acético y lutidina en THF y una solución de *N*-metilimidazol en THF. El anhídrido acético acetila al *N*-metilimidazol liberando ácido acético el cual es neutralizado por la lutidina manteniendo el pH básico para evitar la destrilación. Luego el grupo acetilo se transfiere rápidamente al hidroxilo 5' libre volviéndolo inerte (bloqueo o *capping*). Éste bloqueo origina secuencias trucas que son fácilmente separadas mediante una purificación cromatográfica o extracción en fase sólida.

El fosfito triéster formado durante la reacción de acoplamiento es inestable en medio ácido, por eso el siguiente paso, consiste en la oxidación del mismo con una solución de iodo, piridina y agua para dar el fósforo pentavalente característico del enlace fosfato en los ácidos nucleicos (oxidación). El grupo 2-cianoetil todavía presente, protege al fósforo de reacciones no deseadas durante los siguientes ciclos de síntesis.

Una nueva destrilación da comienzo al siguiente ciclo que se repetirá tantas veces como monómeros contenga la secuencia deseada.

Una vez finalizada la síntesis, el tratamiento con amoníaco concentrado a 55 °C durante 8 horas produce:

- Ruptura del enlace succinato que ancla el hidroxilo 3' del nucleósido terminal a la fase sólida liberando el oligonucleótido a la solución.
- β -eliminación de los grupos protectores β -cianoetil de las uniones internucleotídicas
- Desprotección de las aminas exocíclicas de las bases. ³

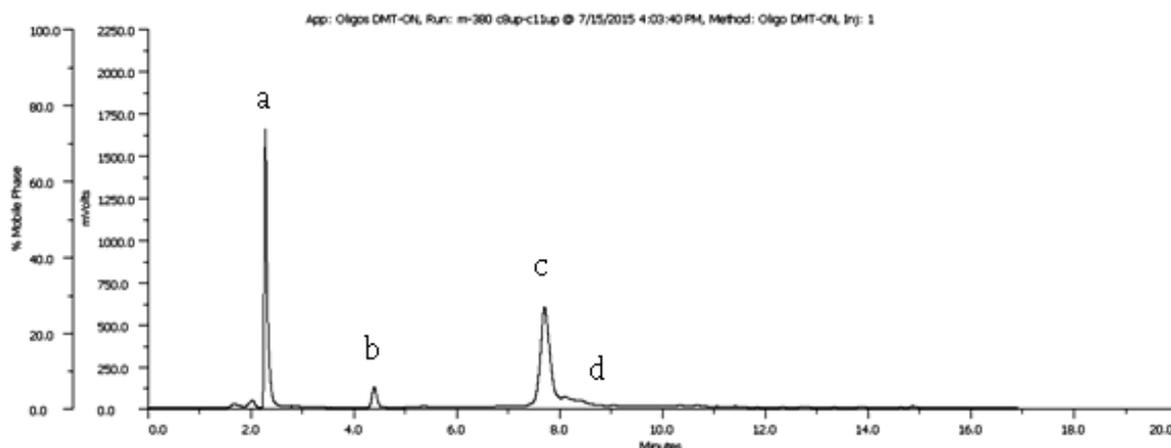
Esto da como resultado una mezcla de:

- Secuencias que contienen el grupo dimetoxitritilo en su extremo 5' (secuencias DMT-ON) que en su mayoría corresponden a la secuencia completa deseada y una minoría de secuencias más cortas (n-1, n-2, n-i) cuya proporción depende de la eficiencia de la reacción de bloqueo o *capping*.
- Secuencias con el extremo 5' libre (Secuencias DMT-OFF) que corresponden a secuencias más cortas cuya proporción dependerá de la eficiencia de la reacción de acoplamiento.
- Grupos protectores de las bases y de los fosfatos.

Esta mezcla se analiza por HPLC de fase reversa en condiciones DMT-ON (condiciones del programa de HPLC) obteniéndose un perfil como el que se muestra en la Figura 3.3a que corresponde al producto de síntesis de una DNazima 8-17 (31 mer). Lo primero en eluir de la columna son las secuencias trucas, luego se observa el pico correspondiente a la benzamida y a continuación el pico correspondiente al oligonucleótido deseado que por poseer el grupo hidrofóbico dimetoxitritilo queda más retenido. El último pico que puede también ser nulo o

verse como una cola del pico de la DNAzima, corresponde a secuencias DMT-ON de menor longitud (n-1, n-2, n-i). Una vez purificada la DNAzima se procede a la remoción del grupo dimetoxitritilo en medio ácido obteniéndose el producto final, el cual se analiza por HPLC en fase reversa en condiciones DMT-OFF obteniéndose un perfil como el que se muestra en la Figura 3.3b. ⁴

a)



b)

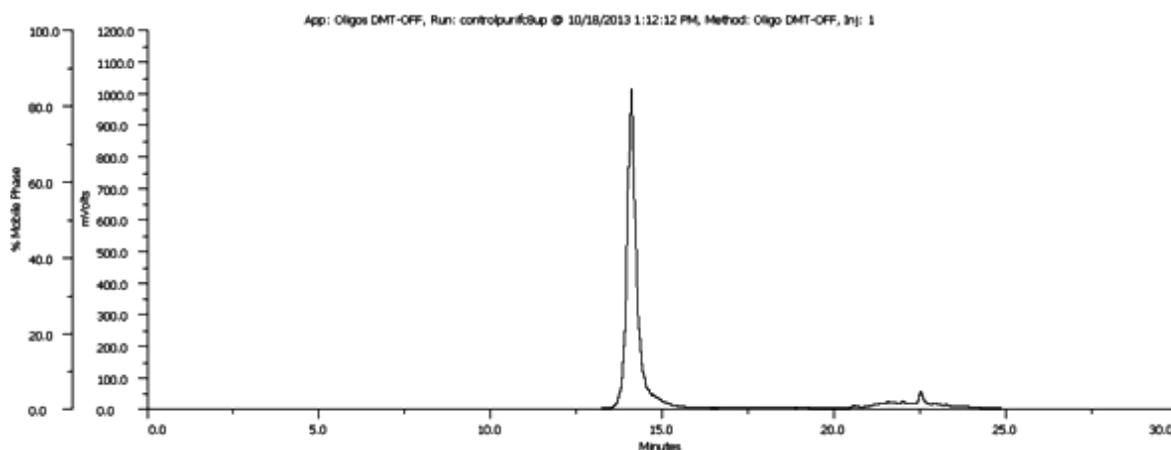
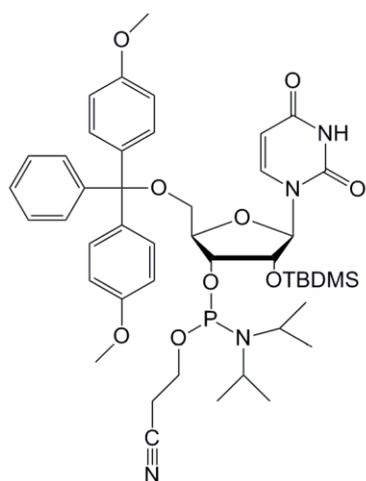


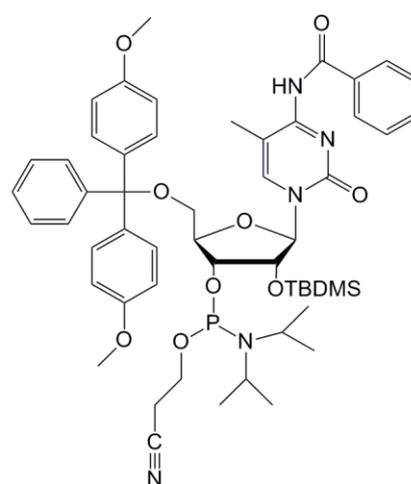
Figura 3.3 a) Análisis de la mezcla de síntesis de oligonucleótidos luego del tratamiento con amoníaco por HPLC en fase reversa en condiciones DMT-ON. Se observa el pico correspondiente a secuencias truncas (a), el pico característico de benzamida (b), el pico correspondiente al oligonucleótido dimetoxitritilado deseado (c) y el pico de secuencias dimetoxitritiladas de menor longitud (d). b) Análisis por HPLC en fase reversa en condiciones DMT-OFF del producto final purificado.

La síntesis en fase sólida de oligonucleótidos de ARN utiliza, al igual que la síntesis de oligonucleótidos de ADN, β -cianoetilfosforamiditas. Pero la presencia del hidroxilo en la posición

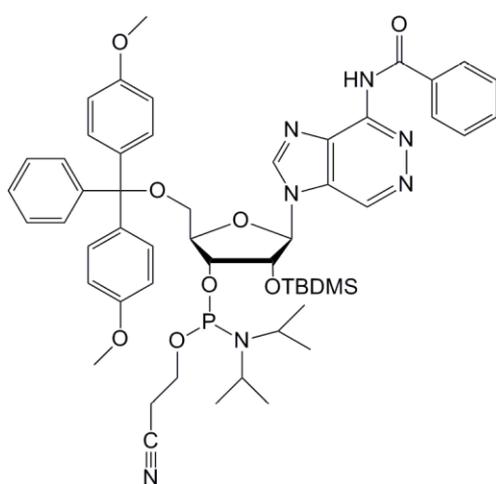
2' requiere de un grupo protector adicional, el *ter*-butildimetilsilil (TBDMS).⁵ La presencia de este grupo voluminoso en 2', genera un impedimento estérico para el ataque nucleofílico de la fosforamidita al fósforo de la cadena en formación. Por esta razón, para obtener buenos rendimientos de síntesis de secuencias de ARN, el tiempo de reacción necesario para el paso de acoplamiento debe extenderse considerablemente con respecto a la síntesis de oligonucleótidos de ADN. Los ciclos de síntesis se llevan a cabo como fueron descritos anteriormente para la síntesis de oligonucleótidos de ADN. Las estructuras de los monómeros utilizados para la síntesis se detallan en la Figura 3.4.



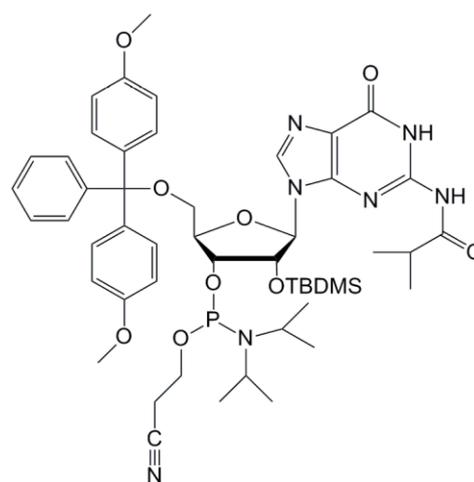
Fosforamidita de U



Fosforamidita de C



Fosforamidita de A



Fosforamidita de G

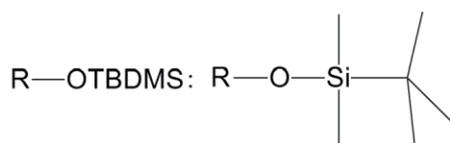


Figura 3.4 5'-O-dimetoxitritil-3'-O-(β-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamida)-2'-O-terbutildimetilsililnucleósidos. Estructura de los monómeros utilizados para la síntesis en fase sólida de ARN.

A diferencia de los productos de síntesis de ADN, los de ARN deben desprotegerse en dos pasos. En el primer paso se desprende el oligonucleótido del soporte y se eliminan los grupos protectores de las bases y los fosfatos. Esto se lleva a cabo utilizando una mezcla de amoníaco acuoso concentrado y etanol e incubando a 55 °C por una hora. Estas condiciones previenen la pérdida prematura del grupo protector TBDMS, evitando así la degradación del ARN en condiciones básicas. En un segundo paso, se remueve el TBDMS utilizando una solución de N-metilpirrolidona/trietilamina/trietilamina TRIS(hidrofluoruro) a 55 °C por dos horas.

OBJETIVOS

Obtención de oligonucleótidos de ADN correspondientes a la DNAzima 8-17 modificados con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en su núcleo catalítico, para su uso posterior en ensayos de actividad y estabilidad.

Obtención del oligonucleótido correspondiente a la DNAzima peroxidasa inmovilizado en resina de poliestireno para ser evaluado en reacciones de oxidación.

Obtención de oligonucleótidos de ADN complementarios modificados con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos para estudios de formación de dúplex en cadenas modificadas.

Obtención de oligonucleótidos correspondientes a fragmentos de secuencias teloméricas modificados con (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina para estudios de formación de i-motif en cadenas modificadas.

Obtención de oligonucleótidos de ARN modificados con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos para la construcción siRNAs para la evaluación de su potencia.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y purificación de DNAzimas 8-17 modificadas

Los sintetizadores comerciales, si bien ofrecen protocolos estándar para síntesis de oligonucleótidos en base ARN y ADN en distintas escalas, también permiten la modificación de los mismos para ajustarlos a nuestras necesidades. Para el caso de las DNAzimas 8-17, al ser de 31 mer de longitud se modificaron las condiciones de la reacción de acoplamiento para lograr un

mejor rendimiento de síntesis. A diferencia del protocolo estándar, el volumen total de reactivos a utilizar para este paso se dividió en tres agregados sucesivos, y se aumentó el tiempo de contacto entre los reactivos y la cadena en formación. Además, para las posiciones modificadas se aumentó aún más el tiempo de contacto de cada reacción de acoplamiento con respecto a las posiciones no modificadas. De esta manera, se mejoró la eficiencia del paso de acoplamiento en cada ciclo y como consecuencia se lograron mejorías en el rendimiento total del proceso.

Se obtuvieron las DNAzimas 8-17 modificadas utilizadas en los ensayos de actividad y de estabilidad realizados posteriormente. Los rendimientos finales de síntesis obtenidos rondaron un 50 %, que para un oligonucleótido de 31 mer de longitud, significa que el rendimiento del paso de acoplamiento fue aproximadamente 98 %. Las secuencias de las DNAzimas 8-17 sintetizadas se detallan en la Tabla 3.1.

DNazima	Secuencia (5'-3')
DZ8-17	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(R) _{2.1}	ATGAAACAU(R) _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(R) ₄	ATGAAACAT _{2.1} GU(R) ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(R) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(R) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) _{2.1}	ATGAAACAU(S) _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) ₄	ATGAAACAT _{2.1} GU(S) ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₅	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C(R) ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₈	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(R) ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₁₁	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC(R) ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₁₃	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C(R) ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₅	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C(S) ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₈	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(S) ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₁₁	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC(S) ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₁₃	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C(S) ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) ₄ -U(S) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GU(S) ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) _{2.1} -U(S) ₁₂	ATGAAACAU(S) _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) _{2.1} -U(S) ₄	ATGAAACAU(S) _{2.1} GU(S) ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(R) _{2.1} -U(S) ₁₂	ATGAAACAU(R) _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(S) ₄ -U(R) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GU(S) ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(R) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 U(R) _{2.1} -U(R) ₁₂	ATGAAACAU(R) _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ U(R) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(S) ₈ GAC(S) ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(R) ₈ GAC(S) ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₈ -U(S) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(S) ₈ GAC ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(S) ₁₁ -U(S) ₁₂	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC(S) ₁₁ U(S) ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 B	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₈ B	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(R) ₈ GAC ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC
DZ8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁ B	ATGAAACAT _{2.1} GT ₄ C ₅ AGC(S) ₈ GAC(S) ₁₁ T ₁₂ C ₁₃ GAAAACGTGGC

Tabla 3.1 DNazimas 8-17 sintetizadas.

X: nucleótido de brazos de reconocimiento de sustrato, X: nucleótido de núcleo catalítico, U(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, U(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, C(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina, C(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina, X: 2'-O-metilnucleósido, X: fosforotioato.

Se obtuvieron las DNAzimas puras utilizando HPLC en fase reversa en condiciones DMT-ON. Luego de su destritolación, se determina su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm. Se controla su integridad y pureza por HPLC en fase reversa en condiciones DMT-OFF (Ver cromatogramas en Capítulo 10: Anexo, Figuras 10.9 - 10.17).

Síntesis del oligonucleótido inmovilizado para la DNAzima peroxidasa.

Se obtuvo el oligonucleótido correspondiente a la DNAzima peroxidasa inmovilizada sintetizando la secuencia 5' GGG TAG GGC GGG TTG GG 3' en una fase sólida comercial de poliestireno con la cual no se produce la liberación de la resina durante la desprotección en amoníaco. La masa de oligonucleótido producto de la síntesis se obtuvo midiendo la absorbancia del dimetoxitritilo liberado cuya concentración es equivalente a la del oligonucleótido de cadena completa, dando como resultado una masa de 103 nmoles de oligonucleótido.

Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ADN modificados para estudios de formación de dúplex.

Se procedió a la síntesis de secuencias de ADN de 15 mer que portan una modificación ya sea en la C de la posición 8 o en la T de la posición 9 de modo de estudiar cómo las modificaciones empleadas afectan a la formación del dúplex de ADN. Las modificaciones utilizadas para la posición 8 corresponden a (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina, y las empleadas para la posición 9 corresponden a (2'R) y (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina; 2'-O-metiluridina, 2'-desoxiuridina y uridina. Se utilizó un programa estándar para la síntesis de ADN pero aumentando los tiempos de acoplamiento para las posiciones modificadas. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados se detallan en la Tabla 3.2.

Oligonucleótido ADN para dúplex	Secuencia (5' - 3')
ADN-NM	CAATGGACTTGTGA
ADN-NMC	TCAACAAGTCCATTG
ADN-C(S)	CAATGGAC(S)TTGTTGA
ADN-C(R)	CAATGGAC(R)TTGTTGA
ADN-U(S)	CAATGGACU(S)TGTTGA
ADN-U(R)	CAATGGACU(R)TGTTGA
ADN-dU	CAATGGACdUTGTTGA
ADN-UOMe	CAATGGACUOMeTGTTGA
ADN-U	CAATGGACUTGTTGA

Tabla 3.2 Secuencias de oligonucleótidos de ADN para ensayos de formación de dúplex. ADN-NM: ADN no modificado, ADN-NMC: ADN no modificado complementario, C(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina, C(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina, U(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, U(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, dU: 2'-desoxiuridina, UOMe: 2'-O-metiluridina, U: uridina.

A excepción de la secuencia ADN-U que fue tratada como un oligonucleótido de ARN por poseer un ribonucleótido, los oligonucleótidos restantes fueron desprotegidos en amoníaco utilizando el protocolo correspondiente a secuencias de ADN. Se obtuvieron las secuencias que portan 2'-desoxi-2'-C-metinnucleósidos puros utilizando cartuchos comerciales. El resto, se purificó y se removieron las sales utilizando columnas comerciales empacadas con Sephadex G-25. La pureza de los oligonucleótidos se controló por espectrometría de masas (Ver valores de m/z obtenidos y espectros de masa en Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.1 y Figuras 10.18 - 10.24).

Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ADN modificados para estudios de formación de estructuras i-motif.

Se procedió a la síntesis de secuencias ricas en C de 22 mer presentes en el telómero de los vertebrados, que forman estructuras secundarias denominadas i-motif. Se modificaron las posiciones 1, 2 y 14 con (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina para estudiar de que manera estos nucleósidos afectan la formación de esta estructura. Los oligonucleótidos se sintetizaron utilizando un programa estándar para la síntesis de ADN pero aumentando los tiempos de acoplamiento para las posiciones modificadas. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados se detallan en la Tabla 3.3.

Oligonucleótido telomérico para i-motif	Secuencia (5' - 3')
T-NM	CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT
T-C(S) ₁	C(S)CCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT
T-C(S) ₂	CC(S)CTAACCCCTAACCCCTAACCCCT
T-C(S) ₂ C(S) ₁₄	CC(S)CTAACCCCTAACCC(S)CTAACCCCT

Tabla 3.3 Secuencias de oligonucleótidos de ADN para estudios de formación de i-motif.

T-NM: secuencia telomérica no modificada, C(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina.

Los oligonucleótidos fueron desprotegidos en amoníaco y purificados por cartuchos comerciales. La pureza e integridad fue controlada por espectrometría de masas (Ver valores de m/z y espectros de masa en Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.2, Figuras 10.25 - 10.28).

Síntesis y purificación de oligonucleótidos de ARN modificados para la posterior construcción de siRNAs.

Se obtuvieron oligonucleótidos modificados con 2'-C-metilnucleósidos correspondientes a las cadenas antisentido y sentido de siRNAs dirigidos contra el ARN mensajero de la *Renilla* luciferasa. Para la cadena antisentido, se modificaron las posiciones 2, 5 y 20 utilizando (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina y la posición 6 utilizando (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina. Para la cadena sentido se modificó la posición 20 utilizando (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina. Se obtuvieron los siguientes oligonucleótidos cuyas secuencias se detallan en la Tabla 3.4.

Oligonucleótido para cadena antisentido de siRNA	Secuencia (5'-3')
ASLucNM	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUTT
ASLucU(S) ₂	UU(S) ₂ UUUCUCCUUCUUCAGAUTT
ASLucU(R) ₂	UU(R) ₂ UUUCUCCUUCUUCAGAUTT
ASLucU(S) ₅	UUUUU(S) ₅ CUCCUUCUUCAGAUTT
ASLucU(R) ₅	UUUUU(R) ₅ CUCCUUCUUCAGAUTT
ASLucU(S) ₂₀	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUU(S) ₂₀ T
ASLucU(R) ₂₀	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUU(R) ₂₀ T
ASLucC(S) ₆	UUUUUC(S) ₆ UCCUUCUUCAGAUTT
Oligonucleótido para cadena sentido de siRNA	Secuencia (5'-3')
SLucNM	AUCUGAAGAAGGAGAAAAATT
SLucU(S) ₂₀	AUCUGAAGAAGGAGAAAAAU(S) ₂₀ T
SLucU(R) ₂₀	AUCUGAAGAAGGAGAAAAAU(R) ₂₀ T

Tabla 3.4 Secuencias de oligonucleótidos de ARN para las cadenas antisentido y sentido de siRNAs modificados. ASLuc: cadena antisentido dirigida contra ARNm de *Renilla Luciferasa*, SLuc: cadena sentido dirigida contra ARNm de *Renilla Luciferasa*, NM: no modificado, U(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, U(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina, C(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina.

Los oligonucleótidos fueron desprotegidos, purificados por cartuchos comerciales y la pureza e integridad fue controlada por espectrometría de masas (Ver valores de m/z y espectros de masa en Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.3, Figuras 10.29 - 10.36).

CONCLUSIONES

Se estudió con profundidad el funcionamiento del sintetizador de oligonucleótidos y las variables que afectan el rendimiento y calidad de la síntesis evaluando las mejores condiciones para la preparación de reactivos en forma anhidra y la optimización del protocolo de síntesis para el uso de fosforamiditas químicamente modificadas.

Se sintetizaron las DNAzimas 8-17 modificadas en su núcleo catalítico con (2'*R*) y (2'*S*)-2'-desoxi-2'-*C*-metilnucleósidos y DNAzimas que además de tener modificado su núcleo catalítico, portan modificaciones de tipo fosforotioato y 2'-*O*-metil en sus brazos de reconocimiento.

Se obtuvo el oligonucleótido correspondiente a la DNAzima peroxidasa inmovilizado en fase sólida de poliestireno.

Se obtuvieron oligonucleótidos de ADN complementarios modificados con 2'-desoxi-2'-*C*-metilnucleósidos para estudios de formación de dúplex en cadenas modificadas.

Se obtuvieron oligonucleótidos correspondientes a fragmentos de secuencias teloméricas modificados con (2'*S*)-2'-desoxi-2'-*C*-metilcitidina para estudios de formación de i-motif en cadenas modificadas.

Se estudiaron las diferencias de la síntesis de oligonucleótidos de ARN con respecto a los de ADN, y las precauciones a tomar para evitar su degradación.

Se obtuvieron oligonucleótidos de ARN modificados con 2'-desoxi-2'-*C*-metilnucleósidos para construir siRNAs para evaluar su potencia.

REFERENCIAS

- ¹ Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1981, 22:1859-1862.
- ² Beaucage SL, Caruthers MH. Synthetic strategies and parameters involved in the synthesis of oligodeoxyribonucleotides according to the phosphoramidite method. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2001, 3.3.1-3.3.20.
- ³ Eckstein F. Oligonucleotides and analogs. A practical approach. IRL Press 1991.

Capítulo 3: Síntesis de oligonucleótidos modificados.

⁴ Becker CR, Efcavitch JW, Heiner CR, Kaiser NF. Use of a C4 column for reverse-phase high performance liquid chromatographic purification of synthetic oligonucleotides. *J. Chromatography* 1985, 326:293-299.

⁵ Sproat BS. RNA synthesis using 2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)protection. *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*. Humana Press In.

ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE DNAZIMAS 8-17



CONSIDERACIONES PREVIAS

En condiciones de recambio múltiple la DNAzima presenta una cinética de Michaelis-Menten. El esquema de cinética de hidrólisis para un recambio (Figura 4.1) involucra la unión de la enzima al sustrato para formar el complejo enzima-sustrato (E-S), la escisión del sustrato para formar el complejo enzima-producto (E-P1-P2) y la liberación de los productos para regenerar la enzima libre.¹ Estos procesos proceden a una velocidad dada por las constantes k_1 , k_2 y k_3 respectivamente. Si bien todos los pasos son reversibles, hay una fuerte preferencia por la reacción de hidrólisis con respecto a la de ligación, siendo k_2 mucho mayor que k_{-2} . El valor de las constantes k_1 y k_3 se relacionan con la formación de la doble hélice entre los brazos de reconocimiento de la DNAzima y el sustrato, por lo tanto, el largo y la composición de los brazos, afectarán el valor de las mismas. Generalmente, brazos de reconocimiento entre seis y nueve nucleótidos presentan una relación especificidad-eficiencia catalítica óptima. Además se demostró que la liberación del producto es mucho más rápida que la velocidad de hidrólisis siendo k_3 mucho mayor que k_2 .² Por lo tanto, el paso de disociación no es el paso limitante del mecanismo cuando los brazos de reconocimiento tienen un largo de hasta 10 nucleótidos.³

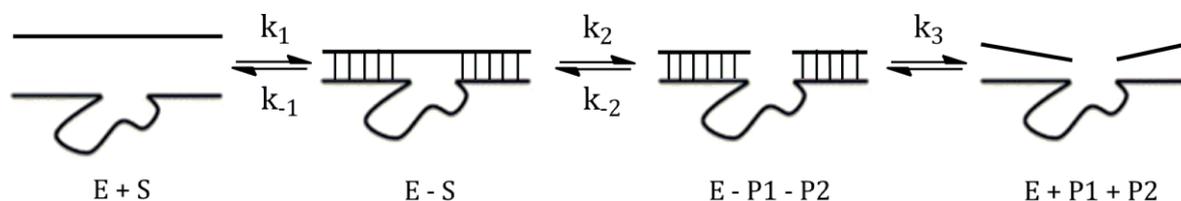


Figura 4.1 Esquema simplificado de la cinética de hidrólisis de la DNAzima 8-17.

Se ha observado un incremento lineal de k_2 al aumentar el pH lo cual se correspondería con la desprotonación del hidroxilo 2' del sitio de corte. Los valores de k_2 fueron también estudiados para distintos tipos de metales a distintas concentraciones. Las velocidades

de hidrólisis en presencia de metales divalentes resultaron mucho mayores que en presencia de metales monovalentes. El valor de k_2 aumenta con la concentración del metal siguiendo una cinética de segundo orden que involucra la unión al metal y el paso de hidrólisis. Existe una relación directa entre k_2 , el pKa del metal utilizado, y la estabilidad del complejo que éste forma con el ácido nucleico. Esto concuerda con la hipótesis de que el metal actuaría como ácido de Lewis asistiendo en la desprotonación del hidroxilo en 2' o bien estabilizando el oxígeno 5' cargado negativamente.²

Dada la dependencia de la actividad con la identidad de catión y debido a que mutaciones del núcleo catalítico pueden alterar la preferencia por el metal, se postula que éste también tiene un rol estructural relacionado con el alcance de la conformación activa del núcleo catalítico.⁴

Debido a que no se conoce la conformación activa del núcleo catalítico, es difícil predecir qué efecto podría provocar la incorporación de modificaciones químicas al mismo y cómo éstas pueden afectar la actividad catalítica de la DNAzima.

Para evaluar el efecto de la incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en el núcleo catalítico sobre k_2 , se realizaron ensayos de hidrólisis *in vitro* de un sustrato corto. Se utilizó como sustrato un oligonucleótido de 18 mer cuya secuencia nucleotídica se corresponde con un fragmento del ARN mensajero de STAT 3. El uso de sustratos cortos permite independizarnos de las constantes de asociación y disociación (k_1 , k_{-1}).

Para independizarnos de k_3 , se trabajó en condiciones de exceso de DNAzima con respecto al sustrato. De esta manera la constante observada de actividad, k_{act} , depende solamente de k_2 , es decir, del paso químico de hidrólisis.

Se utilizaron dos tipos de sustrato:

Sustrato quimera: compuesto de desoxirribonucleótidos a excepción de dos ribonucleótidos en el sitio de corte, cuya secuencia es 5' GCC ACG TTrG rGTG TTT CAT 3'. El uso de la quimera permitió trabajar con un sustrato más estable a la degradación por nucleasas y fue utilizado para la puesta a punto de los ensayos, la evaluación de la DNAzima no modificada y todas las DNAzimas modificadas.

Sustrato ARN: compuesto en su totalidad por ribonucleótidos, cuya secuencia es 5' GCC ACG UUG GUG UUU CAU 3'. Fue utilizado para evaluar la DNAzima no modificada y aquellas DNAzimas modificadas seleccionadas durante los ensayos con el sustrato quimera.

En la Figura 4.2 puede verse un esquema del complejo enzima-sustrato correspondiente a la DNAzima 8-17 y el sustrato quimera utilizado en este trabajo.

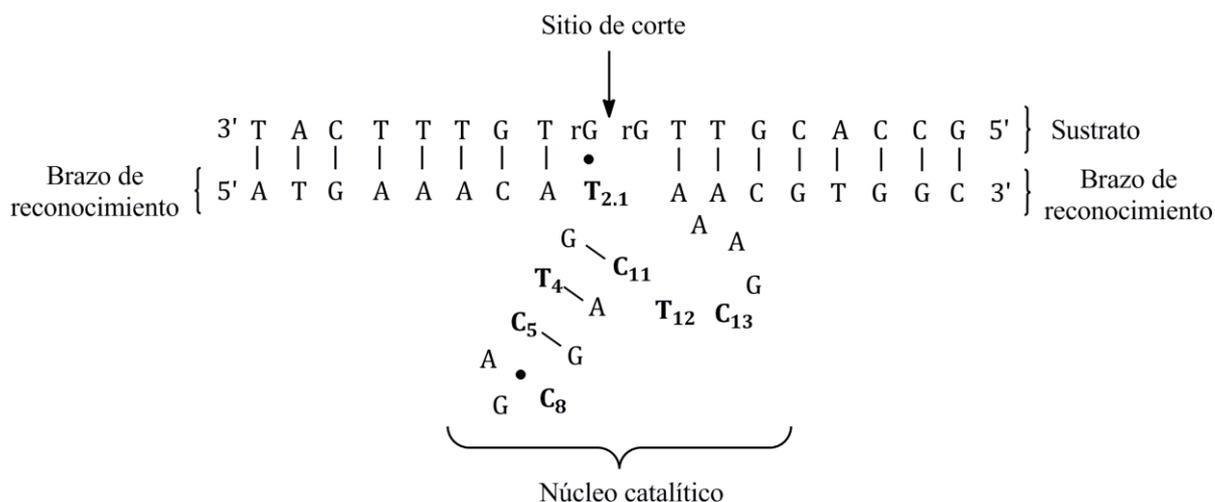


Figura 4.2 Estructura de complejo enzima-sustrato.

Se puede observar el sustrato quimera formado por 16 desoxirribonucleótidos y dos ribonucleótidos ubicados en el sitio de corte y la variante de DNAzima 8-17 utilizada formada por un núcleo catalítico flanqueado por dos brazos de reconocimiento, los cuales se unen al sustrato por puentes de hidrógeno. Las posiciones del núcleo catalítico sobre las cuales se ensayaron modificaciones se muestran en negrita.

OBJETIVOS

Estudiar el efecto que produce la presencia de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en el núcleo catalítico sobre la actividad de DNAzimas 8-17.

Analizar cómo se ve afectada la actividad según el tipo de pirimidina, según el diastereoisómero y según la posición dentro del núcleo catalítico.

Evaluar la estabilidad de las DNAzimas modificadas en medios con actividad degradante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de hidrólisis de un sustrato corto catalizada por la DNAzima 8-17 no modificada a distintas concentraciones de cloruro de magnesio.

Debido a que el fin de este estudio es comparativo, comparar actividades catalíticas de DNAzimas 8-17 modificadas entre sí y con respecto a la no modificada, se deseaba elegir la concentración de cloruro de magnesio que mejor sirva para este fin. Ésta sería aquella que permitiese un avance de la reacción lo suficientemente rápido como para medir el punto final de

la reacción en un tiempo apropiado, y lo suficientemente lento que permitiese tomar varias alícuotas cuyos porcentajes de hidrólisis caigan en la zona lineal de la curva de porcentaje de hidrólisis en función del tiempo.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el sustrato marcado radioactivamente con ^{32}P en su extremo 5'. En condiciones de exceso de DNAzima se dio inicio a la reacción con el agregado de cloruro de magnesio y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Se analizaron las alícuotas por geles de poliacrilamida y se determinó el porcentaje de hidrólisis para cada una (Figura 4.3). Estos valores se ajustaron a una cinética de pseudoprimer orden que responde a la ecuación $P = P_{\infty} * [1 - e^{-k_{\text{act}}*t}]$ donde P_{∞} corresponde al máximo porcentaje de producto de hidrólisis y k_{act} , o constante de actividad, es la constante observada que se relaciona directamente con la constante de hidrólisis k_2 . Estos parámetros permitieron establecer comparaciones entre la DNAzima no modificada y las portadoras de modificaciones.



Figura 4.3 PAGE correspondiente a una cinética de hidrólisis. Se observan las bandas correspondientes a sustrato y producto a distintos tiempos de reacción.

Se ensayaron las reacciones de hidrólisis de sustrato catalizadas por la DNAzima 8-17 sin modificar a 0, 10, 30, 50, 75 y 100 mM de cloruro de magnesio. Los gráficos de porcentaje de hidrólisis del sustrato quimera y del sustrato ARN en función del tiempo se muestran en la Figura 4.4 (Ver también Capítulo 10: Anexo, Tablas 10.4 - 10.5).

En el caso de ausencia de MgCl_2 no se observó formación de producto, en los demás casos se observó un aumento de la formación de producto en función del tiempo. Se obtuvieron los valores de la constante de actividad (k_{act}) y de porcentaje de producto de hidrólisis máximo (P_{∞}) para cada concentración del catión. Los valores de k_{act} y P_{∞} correspondientes a la reacción de hidrólisis del sustrato quimera y del sustrato ARN pueden observarse en la Tabla 4.1 mientras que en la Figura 4.5 se puede observar la dependencia de k_{act} de la concentración de cloruro de magnesio para la reacción de hidrólisis de ambos sustratos.

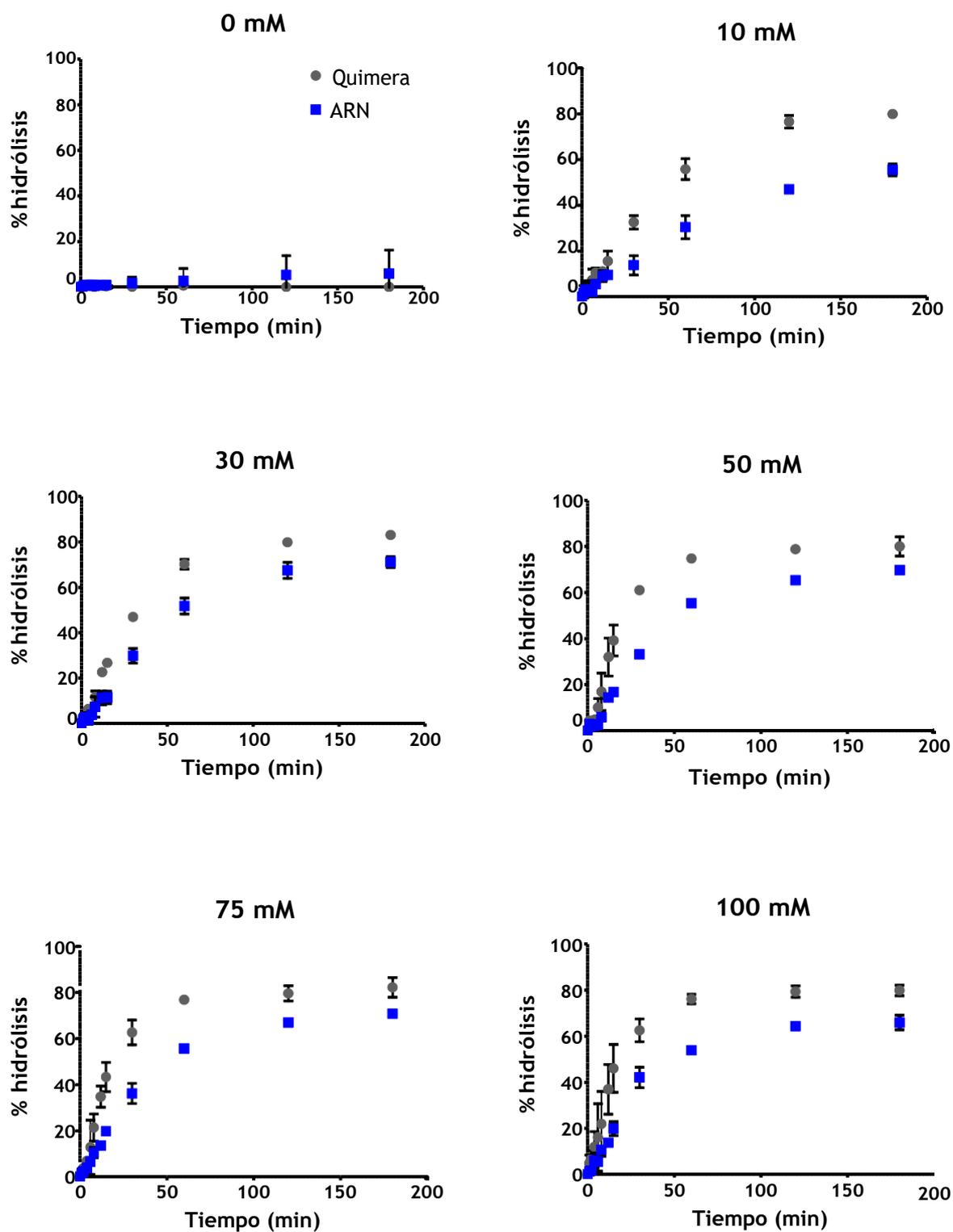


Figura 4.4 Cinética de hidrólisis de sustrato corto quimera y ARN catalizada por la DNAzima 8-17 a 0, 10, 30, 50, 75 y 100 mM de $MgCl_2$.

MgCl ₂ (mM)	k _{act} ± SD		P _∞ ± SD	
	Quimera	ARN	Quimera	ARN
10	0,016±0,001	0,009±0,001	80±1	56±3
30	0,028±0,002	0,017±0,002	83±1	71±2
50	0,044±0,004	0,022±0,002	80±4	70±2
75	0,048±0,004	0,023±0,001	82±4	70,8±0,3
100	0,051±0,003	0,028±0,003	80±2	66±3

Tabla 4.1 Valores de k_{act} y P_∞ correspondientes a la reacción de hidrólisis del sustrato corto, para las distintas concentraciones de MgCl₂ ensayadas.

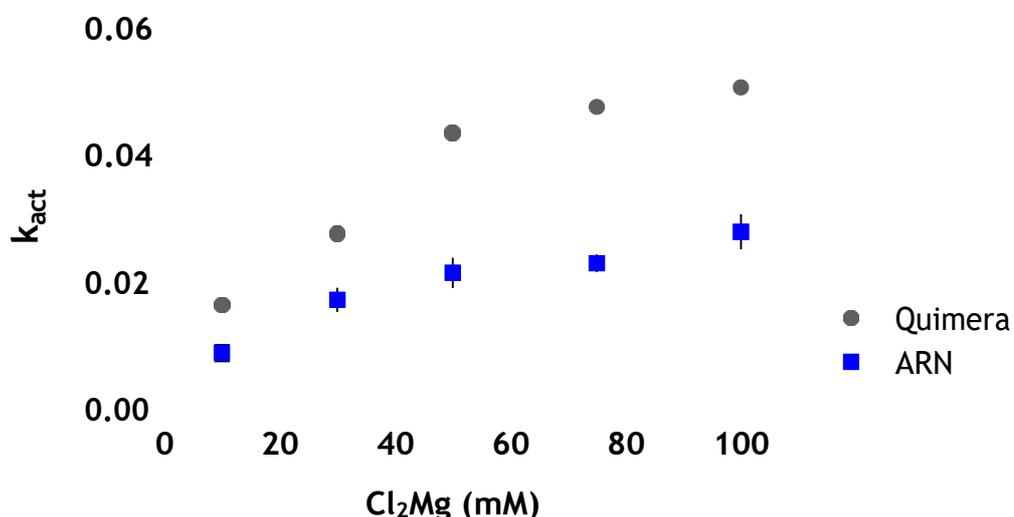


Figura 4.5 k_{act} obtenidas para la reacción de hidrólisis catalizada por la DNAsima 8-17 sin modificar a distintas concentraciones de MgCl₂.

Analizando las Figuras 4.4 y 4.5 se observa una dependencia lineal entre la k_{act} y la concentración del metal a concentraciones bajas del mismo, mientras que a mayores concentraciones hay una saturación de la enzima. Si bien la velocidad resulta ser magnesio dependiente, el porcentaje final de hidrólisis alcanzado para cada sustrato, no varió significativamente con las distintas concentraciones de cloruro de magnesio. Podemos observar que las reacciones de hidrólisis de sustrato corto ocurren a una mayor velocidad cuando el sustrato es una quimera que cuando el sustrato es de ARN. Hasta el momento no se ha realizado un estudio sistemático que permita responder cual será el tipo de sustrato de preferencia en cada caso pero se ha visto que es contexto dependiente y es afectada por la variante de DNAsima 8-17 utilizada, el dinucleótido ubicado en el sitio de corte y el metal utilizado como cofactor.³

En líneas generales se ha observado una mayor actividad de la DNAzima frente al sustrato quimera, como sucede en este caso. Se ha visto que cuanto mayor es el carácter de hélice tipo B entre los brazos de reconocimiento de la DNAzima y el sustrato, más eficiente la reacción de hidrólisis.³

A partir de aquí, en base a los resultados anteriores, se eligió para realizar las comparaciones de actividad con las DNAzimas modificadas, la concentración de 50 mM de cloruro de magnesio ya que nos permite una velocidad apropiada para la toma de alícuotas donde la DNAzima todavía no se encuentra saturada.

Cinéticas de hidrólisis de sustrato corto catalizada por DNAzimas 8-17 modificadas con 2'-C-metilnucleósidos en el núcleo catalítico.

En una primera instancia se realizó una evaluación de todas las DNAzimas modificadas sintetizadas tomando alícuotas solamente a tiempo cero y a un tiempo de 180 minutos para diferenciar rápidamente las DNAzimas activas de las inactivas o de muy baja actividad, utilizando el sustrato quimera (Tabla 4.2).

DNAzima 8-17 modificada	% de hidrólisis a los 180 min
DZ8-17	80
DZ8-17 U(R) _{2.1}	2
DZ8-17 U(R) ₄	9
DZ8-17 U(R) ₁₂	0
DZ8-17 U(S) _{2.1}	0
DZ8-17 U(S) ₄	20
DZ8-17 U(S) ₁₂	10
DZ8-17 C(R) ₅	13
DZ8-17 C(R)₈	66
DZ8-17 C(R)₁₁	34
DZ8-17 C(R) ₁₃	0
DZ8-17 C(S) ₅	11
DZ8-17 C(S)₈	66
DZ8-17 C(S)₁₁	62
DZ8-17 C(S) ₁₃	9
DZ8-17 U(S) ₄ -U(S) ₁₂	16
DZ8-17 U(S) _{2.1} -U(S) ₁₂	5
DZ8-17 U(S) _{2.1} -U(S) ₄	23
DZ8-17 U(R) _{2.1} -U(S) ₁₂	4
DZ8-17 U(S) ₄ -U(R) ₁₂	1
DZ8-17 U(R) _{2.1} -U(R) ₁₂	2
DZ8-17 C(S)₈-C(S)₁₁	59
DZ8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	9
DZ8-17 C(S) ₈ -U(S) ₁₂	21
DZ8-17 C(S) ₁₁ -U(S) ₁₂	4

Tabla 4.2 Porcentaje de hidrólisis del sustrato quimera a los 180 minutos catalizada por las DNAzimas 8-17.

En todos los casos la modificación introducida alteró la actividad de la DNAzima. No se ha logrado ninguna DNAzima medianamente activa al reemplazar posiciones de T por U-modificada mientras que el reemplazo de C por C-modificada fue posición dependiente. Si bien la presencia de 2'-desoxi-2'-C-metilcitidina en las posiciones 5 ó 13 provocó la pérdida de actividad de la DNAzima, la modificación de las posiciones 8 u 11 permitieron mantener la actividad, incluso en una DNAzima doblemente modificada. Si comparamos los resultados obtenidos para

DZ8-17 C(R)₈-C(S)₁₁ y para DZ8-17 C(S)₈-C(S)₁₁ podemos deducir que la combinación de dos modificaciones favorables no siempre produce una DNAzima activa.

Se procedió a realizar las curvas de porcentaje de hidrólisis en función del tiempo para aquellas que aún conservaban un grado de actividad considerable con respecto a la DNAzima sin modificar (Figura 4.6) y de esta manera obtener los parámetros de k_{act} y P_{∞} que se observan en la Tabla 4.3 (Ver también Capítulo 10: Anexo, Tablas 10.6 - 10.7).

Sustrato Quimera		
DNAzima	$k_{act} \pm SD$	$P_{\infty} \pm SD$
DZ8-17	0,044±0,004	80±4
DZ8-17 C(S) ₈	0,0054±0,0007	76±3
DZ8-17 C(R) ₈	0,012±0,001	77±9
DZ8-17 C(S) ₁₁	0,0044±0,0006	79±5
DZ8-17 C(R) ₁₁	0,0011±0,0007	52±3
DZ8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁	0,0065±0,0009	68,7±0,2

Tabla 4.3 Valores de k_{act} y P_{∞} correspondientes a la reacción de hidrólisis del sustrato quimera catalizadas por DNAzimas 8-17 modificadas a 50 mM de MgCl₂.

No parece haber una tendencia a una mayor o menor actividad según el diastereoisómero incorporado en el núcleo catalítico. Este fenómeno también resulta posición dependiente pudiendo observarse una mayor actividad con el isómero *R* para la posición 8 y con el isómero *S* para la posición 11.

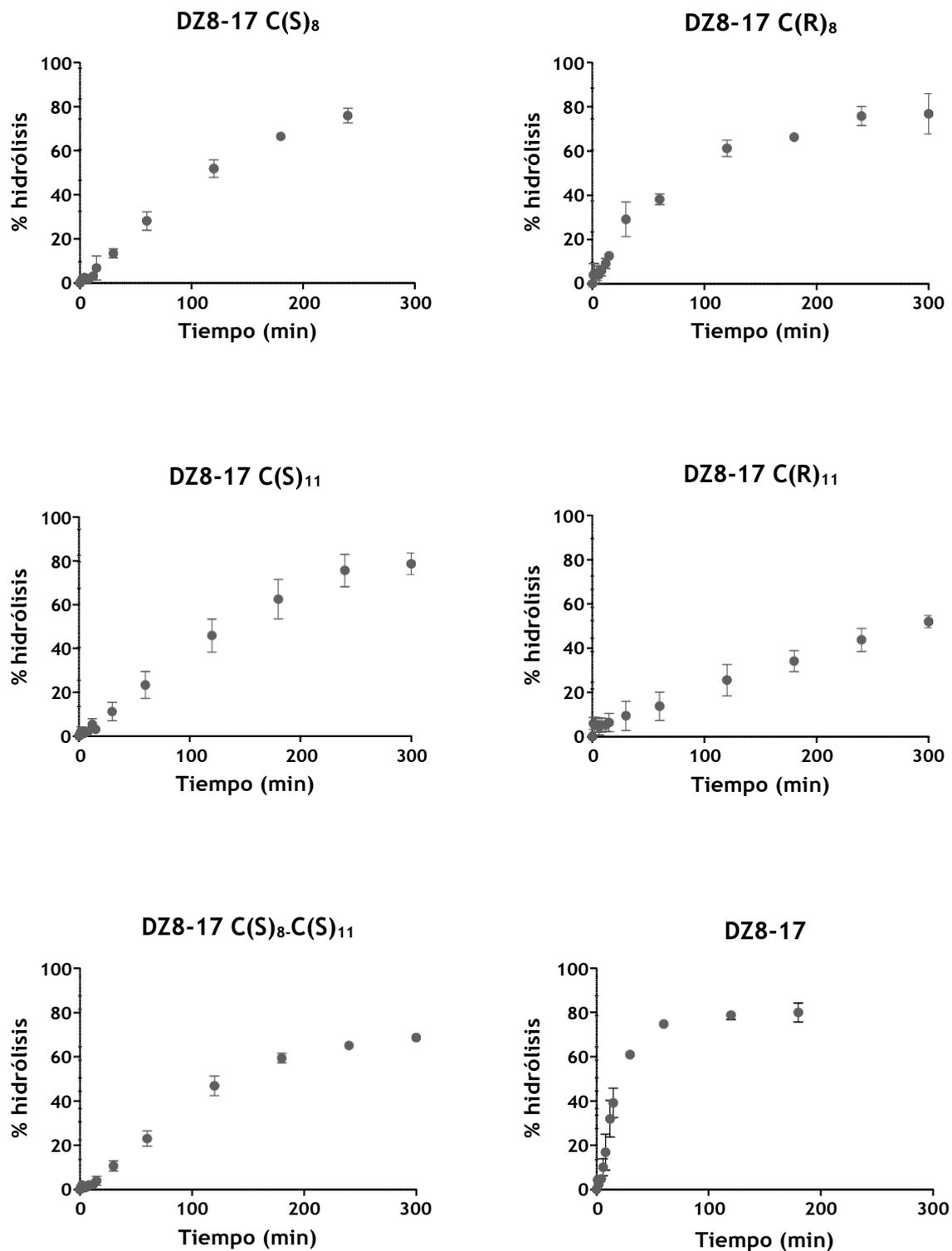


Figura 4.6 Cinéticas de hidrólisis de sustrato quimera catalizadas por DNAzimas 8-17 modificadas a 50 mM de MgCl₂.

Se realizó la cinética de hidrólisis con el sustrato ARN para la DNAzima de mayor actividad con una modificación, y para la DNAzima con dos modificaciones (Figura 4.7) y se obtuvieron los parámetros de k_{act} y P_{∞} (Tabla 4.4).

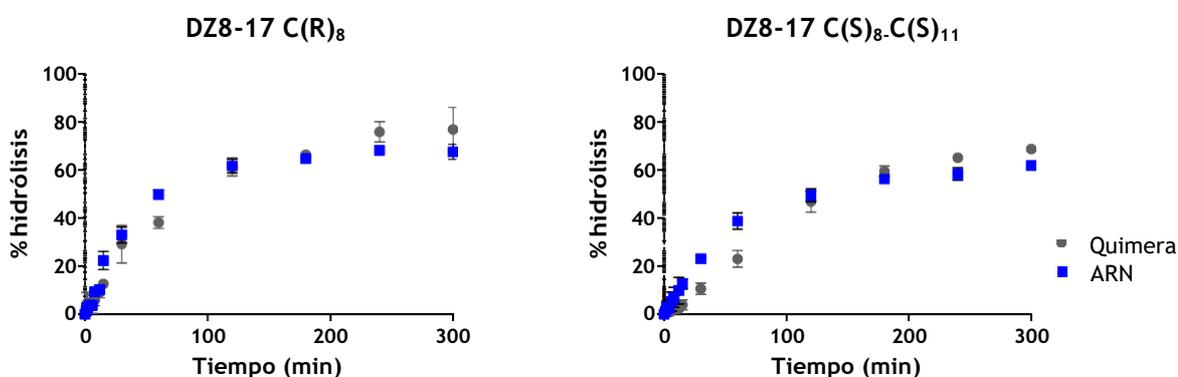


Figura 4.7 Cinéticas de hidrólisis de sustrato quimera y ARN catalizadas por DNAzimas 8-17 modificadas a 50 mM de $MgCl_2$.

Sustrato ARN		
DNAzima	$k_{act} \pm SD$	$P_{\infty} \pm SD$
DZ8-17	$0,022 \pm 0,002$	70 ± 2
DZ8-17 C(R) ₈	$0,022 \pm 0,002$	68 ± 3
DZ8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁	$0,0158 \pm 0,0008$	62 ± 2

Tabla 4.4 Valores de k_{act} y P_{∞} correspondientes a la reacción de hidrólisis del sustrato ARN, catalizadas por DNAzimas 8-17 modificadas a 50 mM de $MgCl_2$.

La DNAzimas sin modificar (DZ8-17), la DNAzima más activa con una modificación (DZ8-17 C(R)₈) y la DNAzima más activa con dos modificaciones (DZ8-17 C(S)₈-C(S)₁₁), fueron seleccionadas para la introducción de modificaciones comerciales en los brazos de reconocimiento (DNAzimas Serie B). Se incorporaron modificaciones de tipo 2'-O-metil para brindar mayor protección contra la acción de las endonucleasas y fosforotioatos en los extremos para proteger contra el efecto degradante de las exonucleasas.

Para conocer cómo la incorporación de estas modificaciones afecta la actividad de las DNAzimas se ensayaron las cinéticas de hidrólisis del sustrato quimera y ARN (Figura 4.8) y se calcularon los valores de k_{act} y P_{∞} (Tabla 4.5).

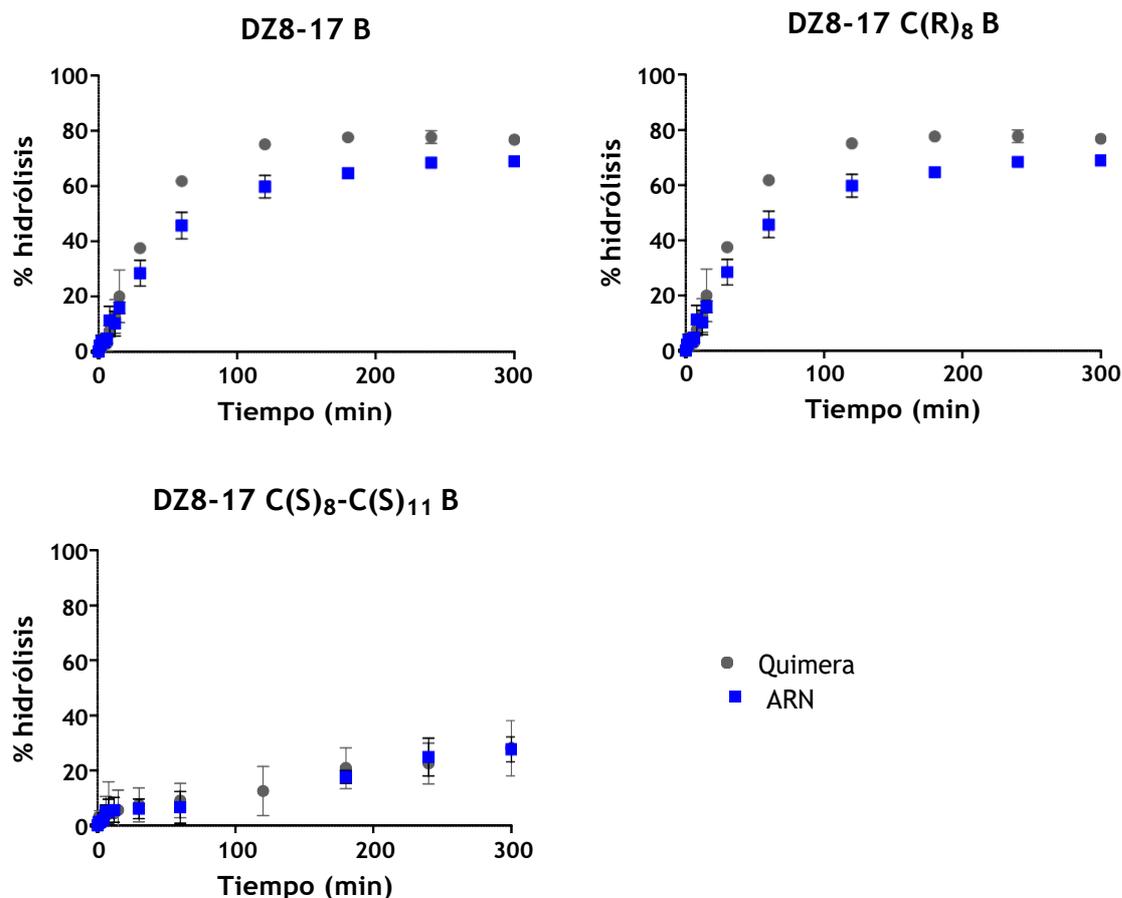


Figura 4.8 Cinéticas de hidrólisis de sustrato corto quimera y ARN catalizadas por DNazimas 8-17, modificadas en su núcleo catalítico y brazos de reconocimiento (DNazimas serie B), a 50 mM de $MgCl_2$.

DNazima	$k_{act} \pm SD$		$P_{\infty} \pm SD$	
	Quimera	ARN	Quimera	ARN
DZ8-17 B	0,014±0,002	0,0131±0,0007	58,3±0,8	62±2
DZ8-17 C(R) ₈ B	0,023±0,002	0,017±0,001	77±1	69±2
DZ8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	0,002±0,001	0,001±0,001	28±5	28±5

Tabla 4.5 Valores de k_{act} y P_{∞} correspondientes a la reacción de hidrólisis del sustrato corto quimera y ARN, catalizadas por DNazimas 8-17 modificadas en su núcleo catalítico y brazos de reconocimiento (DNazimas Serie B), a 50 mM de $MgCl_2$.

En términos generales la incorporación de modificaciones en el núcleo catalítico y brazos de reconocimiento para las reacciones de hidrólisis de sustrato quimera provocó un

marcado detrimento de la actividad de la DNAzima. No obstante, para las DNAzimas seleccionadas que se muestran en la Figura 4.9, la actividad persistió y los porcentajes finales de hidrólisis no variaron. Las DNAzimas que sólo poseen modificaciones en su núcleo catalítico, disminuyeron su actividad frente al sustrato quimera a medida que aumentó el número de modificaciones mientras que la actividad frente al sustrato de ARN se mantuvo con una sola modificación y disminuyó levemente con dos. Mientras que las DNAzimas no modificadas fueron más activas frente a las quimeras, las DNAzimas modificadas prefirieron ARN como sustrato. En cuanto a las DNAzimas modificadas tanto en el núcleo catalítico como en los brazos de reconocimiento, no hubo una preferencia por el tipo de sustrato. Esto puede deberse a que al estar los brazos de reconocimiento modificados, la estructura de la hélice formada entre éstos y el sustrato ha sido alterada en ambos casos. La incorporación de una modificación en el núcleo catalítico resultó beneficiosa para la actividad mientras que el agregado de otra provoca una pérdida importante de la misma.

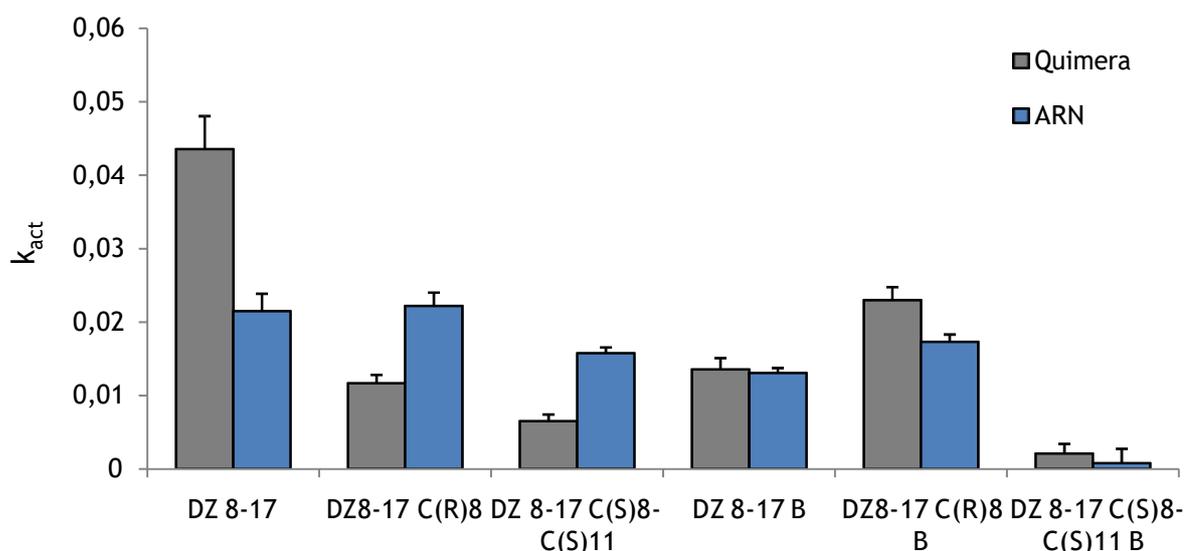


Figura 4.9 Comparación de las actividades de las distintas DNAzimas 8-17 modificadas y no modificada en reacciones de hidrólisis de sustrato quimera y ARN.

Estabilidad de las DNAzimas 8-17 modificadas

La incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en el núcleo catalítico de las DNAzimas ha sido asociada con un aumento de su resistencia a nucleasas.^{6,7} Es por eso que, si bien se observó en ciertos casos un detrimento de la actividad a causa de estas modificaciones, se espera que el aumento de la estabilidad haga que permanezcan activas por más tiempo en medios biológicos o con actividad degradante.

En primera instancia se evaluó la estabilidad de las DNAzimas frente a la endonucleasa comercial RQ1. Se analizó por geles de poliacrilamida (PAGE) el porcentaje de DNAzima remanente a distintos tiempos (Ver Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.8). La cinética de degradación del oligonucleótido responde a la función $Y = Y_0 * e^{-k_{deg}.t}$ donde Y es el porcentaje de DNAzima remanente, Y_0 el porcentaje inicial de DNAzima, k_{deg} es la constante de degradación y t es el tiempo. Se calcularon las constantes de degradación para cada una de las DNAzimas seleccionadas durante los ensayos de actividad y se analizó el aumento de la estabilidad conferido por la incorporación de las modificaciones (Figura 4.10), definiendo la estabilidad como la inversa de la constante de degradación ($1/k_{deg}$).

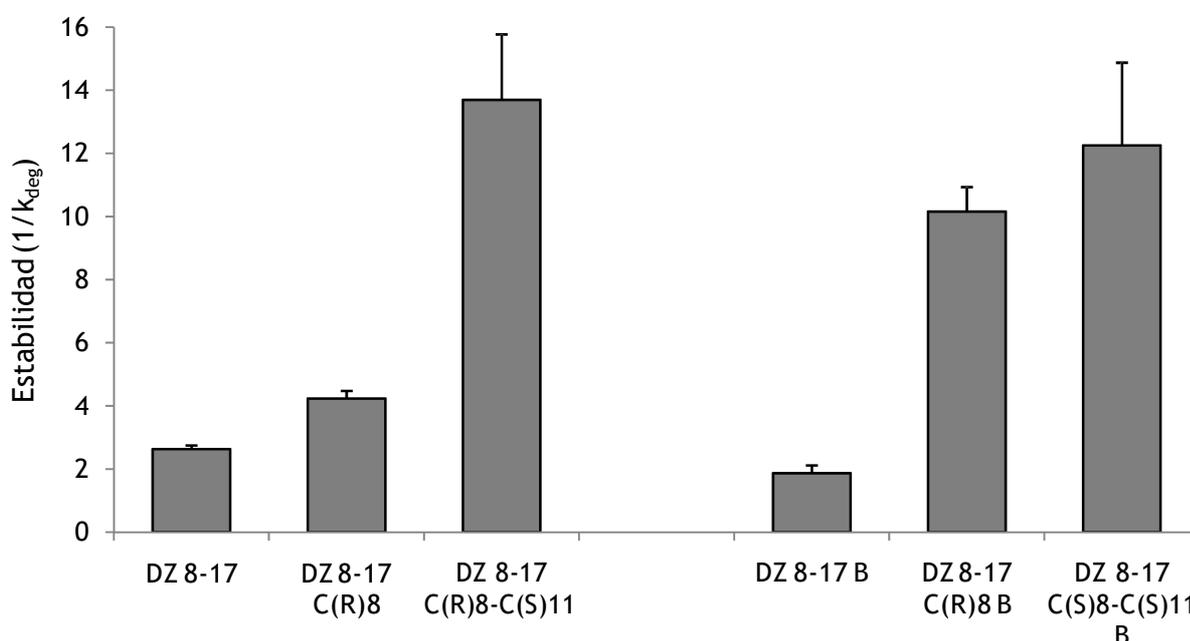


Figura 4.10 Estabilidad de DNAzimas 8-17 modificadas frente a la endonucleasa RQ1.

Para evaluar si el aumento de la estabilidad compensó la caída en la actividad de la DNAzima y ver cuál sería la más apropiada para utilizar en medios degradantes se analizaron en conjunto la actividad y estabilidad de cada una estableciendo la relación entre sus constantes de actividad (k_{act}) y de degradación (k_{deg}) (Figura 4.11; Capítulo 10: Anexo, Tablas 10.10 - 10.11).

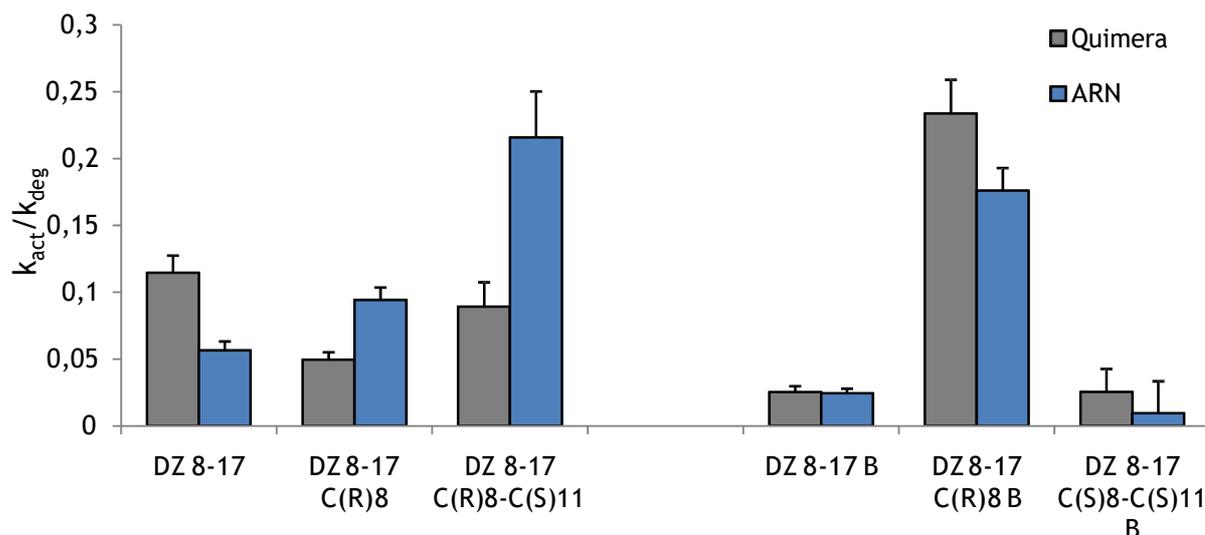


Figura 4.11 Relación entre la actividad y la estabilidad de las DNAzimas 8-17 frente a la endonucleasa RQ1.

En las DNAzimas que sólo portan modificaciones en el núcleo catalítico, mientras que con el sustrato quimera el aumento de la estabilidad no compensó la caída en la actividad, con el sustrato de naturaleza ribonucleotídica se pudo observar cómo la relación k_{act}/k_{deg} fue en aumento con el número de modificaciones. Para el caso de las DNAzimas de la serie B, la incorporación de una modificación en el núcleo catalítico resultó beneficiosa, pero una segunda modificación generó una caída en la actividad de la DNAzima que no puede ser compensada con el aumento de la estabilidad. No se observó diferencia entre ambos sustratos y esto puede deberse a las modificaciones incorporadas en los brazos de reconocimiento que alteran en ambos casos el apareamiento de los brazos con el sustrato.

En una segunda instancia se evaluó la degradación de DNAzimas de la Serie B en un medio degradante más complejo, en este caso, un lisado celular de la línea T47D. En este caso la degradación está a cargo de un amplio número de endonucleasas y también de exonucleasas. En los brazos de reconocimiento, las modificaciones de fosforotioatos ubicadas en los extremos, protegen el ADN de la degradación por exonucleasas, mientras que las modificaciones de tipo 2'-O-metil brindan protección contra endonucleasas. Las tres DNAzimas son equivalentes en cuanto a la estabilidad de sus brazos de reconocimiento y su variación en la estabilidad sólo difiere en el aporte brindado por la incorporación de los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en su núcleo catalítico.

Se incubaron las DNAzimas en un medio conteniendo el lisado celular y se tomaron alícuotas a distintos tiempos que fueron analizadas por PAGE (Ver Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.9). Se calcularon los valores de k_{deg} en cada caso (Figura 4.12).

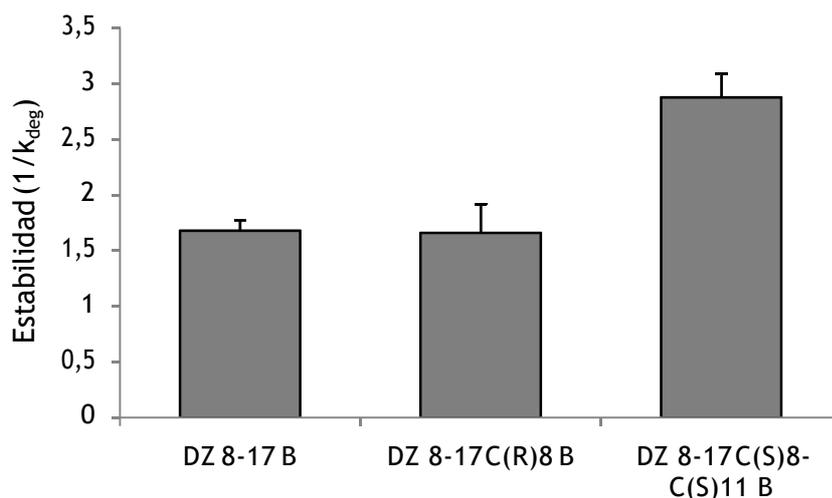


Figura 4.12 Estabilidad de las DNAzimas para de la Serie B en lisado celular.

Lógicamente, el efecto observado para el lisado es menos marcado que para el caso del análisis de estabilidad frente a RQ1. Esto se debe a que los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos ubicados en el núcleo catalítico, sólo confieren estabilidad frente a endonucleasas como lo es la RQ1, y en el caso del lisado hay otros agentes que intervienen en la degradación. Aun así, en este medio más complejo, puede observarse como la DNAzima doble modificada es un 70% más estable que la DZ 8-17 B. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4.13, este aumento de la estabilidad no compensa la caída en la actividad de DZ 8-17 C(S)₈-C(S)₁₁ B dando como resultado final una DNAzima menos eficiente que la DNAzima no modificada. En cuanto a DZ 8-17 C(R)₈ B es necesario recordar que si bien una modificación al núcleo catalítico no aporta un aumento a la estabilidad ya conferida por las modificaciones de los brazos de reconocimiento, ésta sí confiere un aumento de la actividad dando como resultado una DNAzima más eficaz (Ver también Capítulo 10: Anexo, Tablas 10.12 - 10.13).

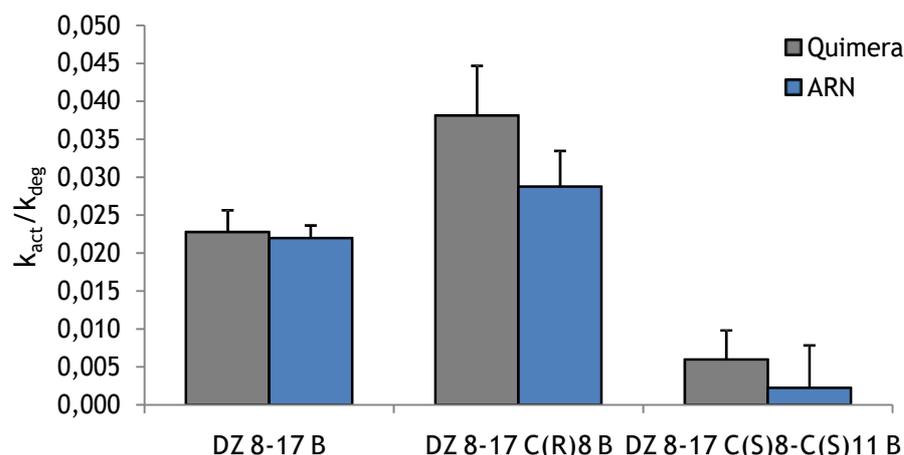


Figura 4.13 Relación entre la actividad y la estabilidad en lisado celular de las DNAzimas 8-17 para ensayos biológicos.

CONCLUSIONES

Se determinó la constante de actividad de la DNAzima 8-17 no modificada a distintas concentraciones de cloruro de magnesio y se eligió la más adecuada para los ensayos. Se observó la dependencia de la constante de actividad con la concentración del metal hasta cierto punto donde la actividad alcanzó un máximo.

La actividad de la DNAzima fue mayor cuando catalizó la hidrólisis de un sustrato quimera que cuando el sustrato fue ARN en su totalidad, lo cual concuerda con estudios previos donde la formación de una hélice tipo B entre los brazos de reconocimiento y el sustrato favorecen la actividad de la DNAzima.

Se evaluó la actividad de DNAzimas 8-17 modificadas con uno y dos 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en su núcleo catalítico mediante la determinación de la constante de actividad. En todos los casos las modificaciones afectaron la actividad de la DNAzima siendo mejor toleradas las modificaciones de C que las de T. Las posiciones del núcleo catalítico más permisivas a alteraciones fueron la 8 y la 11 siendo las DNAzimas modificadas con mayor actividad la DZ8-17 C(R)₈ y la DZ8-17 C(S)₈-C(S)₁₁. La preferencia por uno u otro diastereoisómero dependió de la posición a modificar. Puede establecerse una cierta correlación con estudios mutacionales realizados en el núcleo catalítico de la DNAzima 8-17 donde se observó que la posición 13 debe ser conservada para mantener la actividad mientras que mutaciones de la posición 8 permitieron mantener la actividad aunque con un cierto detrimento.⁵

La incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos aumentó la estabilidad de la DNAzima. Si bien al aumentar el número de modificaciones en el núcleo catalítico aumentó la

estabilidad, el mejor compromiso entre actividad y estabilidad para las DNAzimas de la serie B se obtuvo para la DNAzima con una modificación, DZ8-17 C(R)₈B.

REFERENCIAS

- ¹ Santoro SW, Joyce GF. Mechanism and Utility of an RNA-Cleaving DNA Enzyme. *Biochemistry* 1998, 37:13330-13342.
- ² Bonaccio M, Credali A, Peracchi A. Kinetic and thermodynamic characterization of the RNA-cleaving 8-17 deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32:916-925.
- ³ Ota N, Warashina M, Hirano K, Hatanaka K, Taira K. Effects of helical structures formed by the binding arms of DNAzymes and their substrates on catalytic activity. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26:3385-3391.
- ⁴ Sugimoto N, Okumoto Y, Ohmichi T. Effect of metal ions and sequence of deoxyribozymes on their RNA cleavage activity. *J. Chem., Perkin Trans. 2*, 1999, 1381-1386.
- ⁵ Schlosser K, Li Y. A Versatile Endoribonuclease Mimic Made of DNA: Characteristics and Applications of the 8-17 RNA-Cleaving DNAzyme. *ChemBioChem* 2010, 11:866-879.
- ⁶ Iribarren AM, Cicero DO, Neuner PJ. Resistance to Degradation by Nucleases of (2'S)-2'-Deoxy-2'-C-methyloligonucleotides, Novel Potential Antisense Probes. *Antisense Research and Development* 1994, 4:95-98.
- ⁷ Robaldo L, Izzo F, Dellafiore M, Proietti C, Elizalde PV, Montserrat JM, Iribarren AM. Influence of conformationally restricted pyrimidines on the activity of 10-23 DNAzymes. *Bioorg Med Chem.* 2012, 20:2581-2586.

ESTUDIOS DE POTENCIA EN siRNAs MODIFICADOS



CONSIDERACIONES PREVIAS

La optimización de siRNAs por introducción de modificaciones químicas ha sido abordada en varios estudios demostrando en la mayoría de los casos que los dúplex con elevada eficiencia de silenciamiento sólo toleran un número limitado de modificaciones y su tolerancia es posición dependiente.¹ Se ha visto que modificaciones en la región *seed* que introduzcan una asimetría termodinámica pueden favorecer la selección de la cadena antisentido por el complejo RISC al igual que ciertas modificaciones incorporadas en la región 3'-*overhang*, pueden llevar a un incremento de la potencia y una reducción de los efectos *OFF-target*.²

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se seleccionaron las posiciones 2, 5 y 6 de la región *seed* de la cadena antisentido y la posición 20 de la región 3'-*overhang* de ambas cadenas para estudiar los efectos producidos por la incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos.

Los siRNAs de 21 nucleótidos de longitud fueron diseñados para poder evaluarlos mediante el ensayo dual de la luciferasa utilizando el plásmido reportero psiCHECK2. La secuencia de interés contra la cual se diseñó el siRNA se introdujo en la región de clonado múltiple localizada en la región 3' no traducible (3'-UTR) del gen reportero de la *Renilla* luciferasa. Luego de la transfección del plásmido junto con el siRNA, el transcripto, compuesto por una fusión del gen de *Renilla* luciferasa y la secuencia introducida, sufre un proceso de interferencia mediado por el siRNA, siendo la caída de la actividad de *Renilla* luciferasa un indicador del efecto de interferencia. El vector además posee el gen de *Firefly* luciferasa para poder normalizar la señal de la luciferasa de *Renilla* a la de *Firefly*. Un mapa de los plásmidos utilizados puede verse en *Capítulo 9: Materiales y métodos (Sección 9.2.4.4)*.

OBJETIVOS

Combinar las distintas cadenas antisentido y sentido no modificadas y modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos para formar los dúplex de siRNA.

Evaluar la potencia de los dúplex en cultivos celulares de la línea HeLa y analizar el efecto de las modificaciones según la hebra y posición en la que se encuentran.

Evaluar el efecto de la introducción de las modificaciones en silenciamiento *OFF-target*.

Evaluar cómo los cambios introducidos afectan la estabilidad termodinámica del dúplex a través de curvas de fusión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de los dúplex de siRNA

Una vez sintetizadas las cadenas antisentido y sentido sin modificaciones, las 7 cadenas antisentido y las 2 cadenas sentido portadoras de una modificación, se procedió a la preparación de los 24 dúplex de siRNA posibles realizando el alineamiento de ambas hebras en buffer HEPES-KOH pH 7,4. En la Figura 5.1 se puede observar un esquema del Dúplex 1 (D1) compuestos por las hebras antisentido y sentido sin modificar.



Figura 5.1 Esquema del dúplex D1.

Estudios de potencia y estabilidad termodinámica de siRNAs modificados.

Para evaluar si los siRNAs modificados son capaces de ser incorporados por el complejo RISC y regular la expresión génica del blanco por el mecanismo de ARN de interferencia, se utilizó el ensayo dual de luciferasa. Para evaluar cada uno de los dúplex, se transfectaron cultivos de la línea celular HeLa con distintas concentraciones de siRNA y con el plásmido psiCHECK2-AS que contiene el gen de la *Renilla* luciferasa utilizado como gen reportero, y el gen de Firefly luciferasa utilizado como control. Se determinó luminiscencia 24 hs después de la transfección. Luego, se normalizó la actividad de *Renilla* luciferasa a la actividad de *Firefly* luciferasa para cada concentración y se calculó el porcentaje de actividad tomando como 100% la actividad registrada para la transfección *mock*, es decir, la correspondiente a 0 nM de siRNA. Las concentraciones ensayadas fueron 0; 0,002; 0,008; 0,016; 0,06; 0,16; 0,3 y 1 nM.

El porcentaje de actividad de luciferasa de *Renilla* normalizado (Y) en función del logaritmo de la concentración de siRNA (X) se ajustó a la función $Y = 100 / (1 + 10^{(x - \log(C50))})$. Se

determinó así la concentración necesaria de siRNA que genera un 50% de inhibición (IC_{50}) y se utilizó como indicador de la potencia (Figura 5.1).

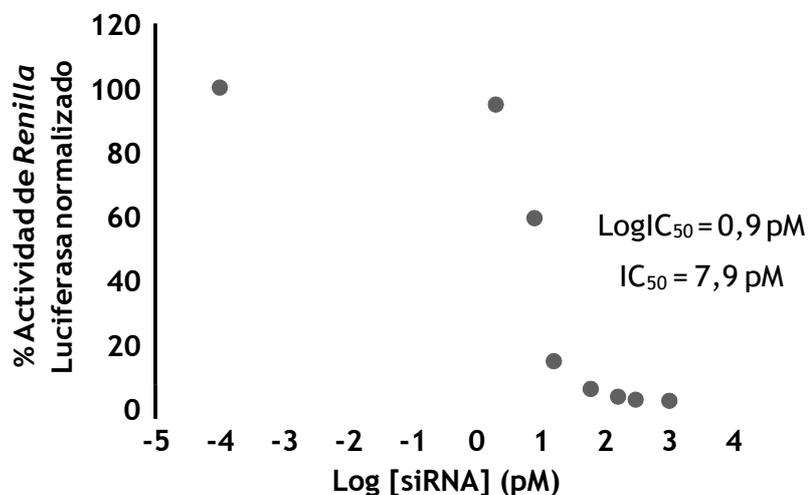


Figura 5.1. Actividad de *Renilla* luciferasa normalizada en función del logaritmo de la concentración de siRNA para el Dúplex 1 compuesto por las hebras antisentido y sentido sin modificar.

Por otro lado se determinó la temperatura de fusión de cada dúplex monitoreando los cambios de absorbancia a 260 nm en función del aumento de la temperatura. Para evaluar posibles cambios en la estabilidad termodinámica del dúplex causado por las modificaciones se comparó las temperaturas de fusión de los dúplex modificados con respecto al no modificado.

En la Tabla 5.1 se pueden observar los valores de IC_{50} ; los valores de la temperatura de fusión (T_m) y los correspondientes ΔT_m con respecto al Dúplex 1 o no modificado. En la Figura 5.2 se muestran los valores de IC_{50} para cada dúplex (Ver curvas de fusión de los dúplex y porcentajes de actividad de *Renilla* luciferasa normalizados para las distintas concentraciones de siRNA para cada dúplex en Capítulo 10: Anexo, Figuras 10.37 - 10.60 y Tabla 10.14).

Dúplex	Antisentido	Sentido	IC ₅₀ (pM)	Tm (° C)	ΔTm (° C)
D1	ASLucNM	SLucNM	7.9 ± 2.0	70,1	-
D2	ASLucU(R) ₂₀	SLucNM	5.0 ± 0.4	70,0	-0,1
D3	ASLucU(S) ₂₀	SLucNM	4.0 ± 0.2	70,2	0,1
D4	ASLucU(S) ₂	SLucNM	10.2 ± 0.8	69,4	-0,7
D5	ASLucU(R) ₂	SLucNM	11.7 ± 0.5	69,1	-1,0
D6	ASLucU(S) ₅	SLucNM	8.7 ± 1.2	65,5	-4,6
D7	ASLucU(R) ₅	SLucNM	9.9 ± 0.3	67,9	-2,2
D8	ASLucNM	SLucU(S) ₂₀	16.7 ± 1.2	70,5	0,4
D9	ASLucNM	SLucU(R) ₂₀	21.4 ± 3.2	69,9	-0,2
D10	ASLucU(S) ₂₀	SLucU(S) ₂₀	9.8 ± 0.6	68,9	-1,2
D11	ASLucU(S) ₂₀	SLucU(R) ₂₀	19.1 ± 2.1	69,3	-0,8
D12	ASLucU(R) ₂₀	SLucU(S) ₂₀	10.7 ± 2.0	69,8	-0,3
D13	ASLucU(R) ₂₀	SLucU(R) ₂₀	7.4 ± 1.0	71,0	0,9
D14	ASLucU(S) ₂	SLucU(S) ₂₀	63.0 ± 6.4	69,4	-0,7
D15	ASLucU(S) ₂	SLucU(R) ₂₀	39.1 ± 3.2	69,6	-0,5
D16	ASLucU(R) ₂	SLucU(S) ₂₀	8.9 ± 2.5	69,4	-0,7
D17	ASLucU(R) ₂	SLucU(R) ₂₀	9.1 ± 1.3	69,0	-1,1
D18	ASLucU(S) ₅	SLucU(S) ₂₀	35.4 ± 12.1	65,6	-4,5
D19	ASLucU(S) ₅	SLucU(R) ₂₀	24.7 ± 4.0	65,1	-5,0
D20	ASLucU(R) ₅	SLucU(S) ₂₀	27.7 ± 7.8	67,6	-2,5
D21	ASLucU(R) ₅	SLucU(R) ₂₀	8.6 ± 1.1	67,2	-2,9
D22	ASLucC(S) ₆	SLucNM	24.6 ± 4.8	64,7	-5,4
D23	ASLucC(S) ₆	SLucU(S) ₂₀	37.1 ± 5.3	68,6	-1,5
D24	ASLucC(S) ₆	SLucU(R) ₂₀	58.4 ± 8.2	65,4	-4,7

Tabla 5.1 Valores de IC₅₀, Tm y ΔTm para los 24 dúplex ensayados.

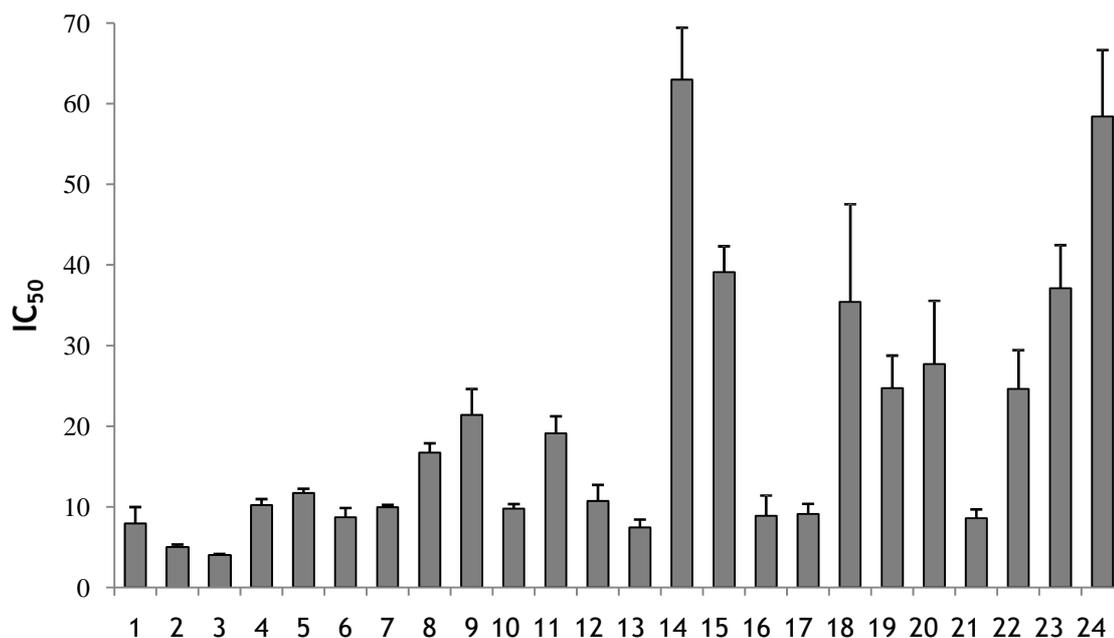


Figura 5.2 Valores de IC₅₀ para los 24 dúplex ensayados.

En cuanto a las modificaciones de la región 3'-*overhang* se observó un aumento de la potencia reflejado en valores de IC₅₀ reducidos a aproximadamente la mitad con respecto al duplex no modificado (D1) cuando las modificaciones se encuentran en la cadena antisentido (D2 y D3). Por en contrario, cuando las modificaciones se encuentran en la cadena sentido (D8 y D9), se vio una caída de la potencia con valores de IC₅₀ de aproximadamente el doble. Combinaciones de ambas cadenas modificadas dieron valores de potencia intermedios (D10, D11, D12, D13). No se observó una diferencia según si el isómero utilizado es R o S. Se sabe que la región 3'-*overhang* interactúa con la proteína Ago2 del complejo RISC interviniendo en el proceso de selección de la hebra.^{2,3,4} Por lo tanto, modificaciones que estabilicen la interacción de la región 3'-*overhang* de la cadena antisentido con RISC ó modificaciones que desestabilicen la interacción de la región 3'-*overhang* de la cadena sentido, favorecerán la selección de la cadena antisentido por el complejo proteico potenciando el efecto silenciador del siRNA. Esto concuerda con el efecto observado, donde las 2'-desoxi-2'-C-metiluridinas tuvieron un efecto positivo en la interacción de la región 3'-*overhang* con RISC. De esta manera su presencia en la cadena antisentido provocó un aumento de la potencia mientras que su presencia en la cadena sentido provocó el efecto contrario. Es difícil de predecir el comportamiento cuando ambas cadenas están modificadas, ya que el efecto de modificar una es contrario al de la otra y esto explicaría porque se obtuvieron valores intermedios de potencia. Para el caso de estos dúplex, al estar la posición modificada en una región simple cadena, resultó lógico que los valores de T_m presenten ninguna o muy poca diferencia con respecto al siRNA no modificado.

Es importante recordar que la región *seed* de la cadena antisentido interviene por un lado en la selección de la hebra por el complejo RISC y por el otro establece las interacciones iniciales con el ARN blanco. Por lo tanto, se cree que una leve desestabilización termodinámica del dúplex por modificaciones de esta región es favorable para la selección de la cadena antisentido por RISC mientras que una elevada desestabilización reduce la capacidad de silenciamiento al debilitar la interacción con el ARN blanco. Además, se observó que modificaciones altamente estabilizantes de dúplex reducen la capacidad de silenciamiento.²

Al introducir 2'-desoxi-2'-C-metilpirimidín nucleósidos en las posiciones 2, 5 y 6 de la región *seed* de la cadena antisentido, se observó una disminución de T_m en todos los casos implicando que éstos análogos interfieren en el apareamiento de las hebras. Entre éstos dúplex se observó una mayor desestabilización cuando la modificación se ubica más hacia el centro de la cadena. En el caso de los dúplex modificados en la posición 2, el incremento en los valores de IC_{50} parece deberse a una selección errónea de la hebra por el complejo RISC ya que los valores de T_m son similares a D1 (D4, D5, D14-D17). En cambio, para los dúplex modificados en las posiciones 5 y 6 los aumentos de IC_{50} podrían estar más relacionados con una desestabilización termodinámica del dúplex que se evidencia con una disminución de T_m más marcada (D6, D7, D18-D24).

Observando los dúplex que poseen la cadena antisentido con la región *seed* modificada y la cadena sentido con la región 3'-*overhang* modificada, es interesante destacar que en algunos casos la combinación de ambas hebras llevó a una mejora de la potencia con respecto a los siRNA donde cada una de estas cadenas se hallaba combinada con una no modificada. Es decir, D16 y D17 han dado mejores resultados que D5, D8 y D9, como así también D21 ha dado mejor resultado que D7 y D9. En contraste, para los dúplex D14, D15, D18, D19 y D20 se observó un aumento marcado de la IC_{50} . Con esto podemos decir que la combinación de cada cadena modificada con su complementaria no modificada no necesariamente sirve para predecir el comportamiento de esas mismas cadenas con otras modificadas.

Entre los dúplex que poseen modificaciones en la posición 2 de la cadena antisentido (D4, D5, D14, D15, D16 y D17) los valores de T_m prácticamente no variaron. A pesar de que las IC_{50} de D4 y D5 son similares, se observó una gran diferencia en la potencia de los siRNA según estén modificados en la cadena antisentido con el isómero *R* ó *S* cuando fueron combinados con cadenas sentido modificadas. De esta manera, se vio cómo los dúplex con el isómero *R* de la uridina (D16 y D17) presentaron una potencia similar a D1 mientras que los dúplex con el isómero *S* (D14 y D15) presentaron una caída importante de su potencia silenciadora.

En los dúplex que poseen la posición 5 de la cadena antisentido modificada sí se pudo ver una diferencia en las T_m donde el isómero *S* provocó una desestabilización termodinámica del dúplex mayor que el isómero *R*. En cuanto a los valores de IC_{50} , se observó un

comportamiento similar que en el caso de las modificaciones de la posición 2 ya que en este caso los dúplex con ambas cadenas modificadas que poseen el isómero *R* de la uridina en la cadena antisentido presentaron valores menores de IC₅₀ que sus análogos con el isómero *S*.

5.3.3 Estudios de silenciamiento *ON/OFF-target* de siRNAs modificados

Uno de los principales problemas del uso de ARN de interferencia es la presencia de efectos *OFF-target*. Una de las principales fuentes de este efecto no deseado proviene de la selección incorrecta de la hebra antisentido por el complejo RISC. Esta selección es influida en parte por la estabilidad termodinámica de las regiones 5' de ambas cadenas, siendo la menos estable preferentemente incorporada en el complejo proteico. ²

La actividad de cada una de las cadenas que componen el siRNA se evaluó utilizando el sistema del plásmido reportero psiCHECK2. Para evaluar la actividad silenciadora de la cadena antisentido se utilizó la misma construcción que los ensayos anteriores de estudios de potencia, en donde el plásmido contiene en la región 3'-UTR del gen de *Renilla* luciferasa (*Rluc*) una secuencia que al transcribirse será complementaria a la cadena antisentido (plásmido psiCHECK2-AS). Mientras que para evaluar la actividad de la cadena sentido, es decir, cuando ésta es seleccionada erróneamente como antisentido, se utilizó el mismo plásmido conteniendo en la región 3'-UTR de *Rluc* una secuencia que al transcribirse será complementaria a la hebra sentido (plásmido psiCHECK2-S).

Se evaluó la actividad silenciadora de cada hebra por separado para dúplex seleccionados de los ensayos anteriores a dos concentraciones de siRNA: 1 nM y 16 pM (Figura 5.3). En primer lugar, se pudo observar cómo la especificidad del siRNA está influenciada por la concentración utilizada del mismo. Cuando se transfectó las células con una alta concentración de siRNA, 1 nM, se observó una mayor diferencia en los efectos *ON/OFF-target* para cada dúplex que cuando se utilizó una baja concentración como 16 pM. Además, una mayor concentración permitió resaltar las diferencias de especificidad entre los distintos dúplex evaluados. Esto puede observarse en los valores de especificidad calculados a partir de la relación entre el porcentaje de actividad de *Renilla* luciferasa obtenido con el plásmido psiCHECK2-S y el porcentaje de actividad obtenido con el plásmido psiCHECK2-AS (Capítulo 10: Anexo, Tabla 10.15). Mientras que para 1 nM de siRNA estos valores oscilaron entre 5 y 50 pudiéndose ver claras diferencias en la especificidad de los dúplex, en el caso de 16 pM estos valores se encontraron entre 1 y 4, no permitiendo establecer diferencias importantes entre los dúplex seleccionados.

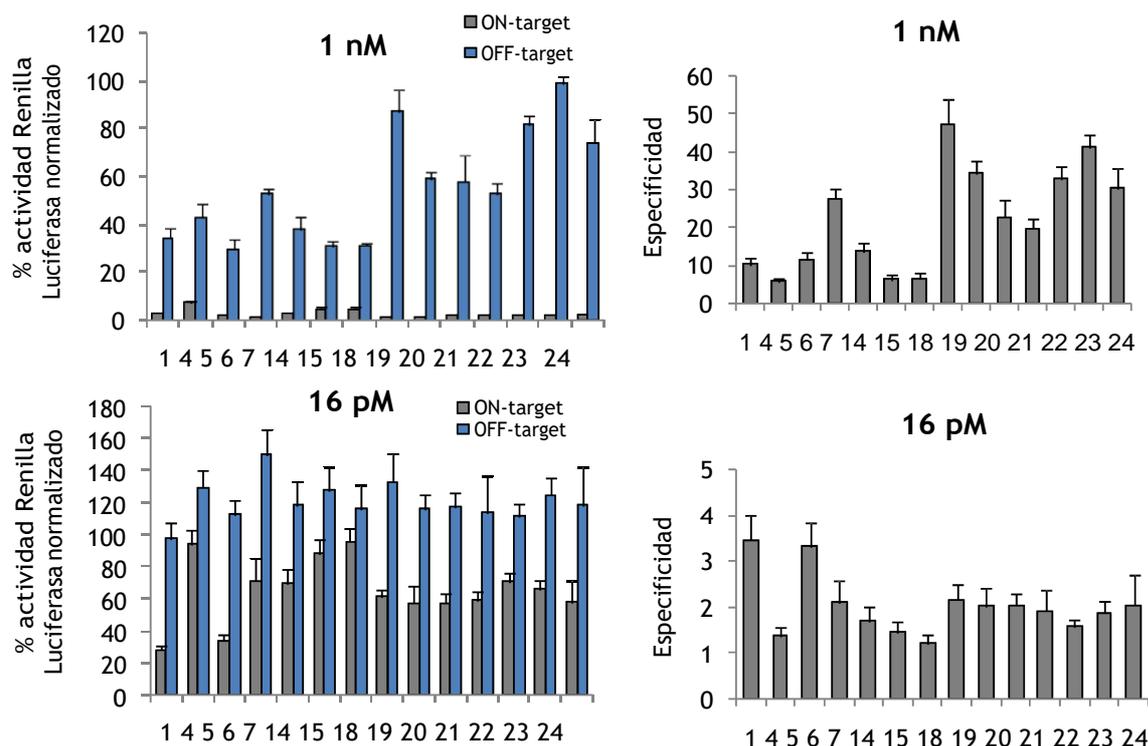


Figura 5.3 Efectos ON/OFF-target de siRNAs modificados.

A la izquierda se observa el porcentaje de actividad de *Renilla* luciferasa normalizado para concentraciones de siRNA de 1nM (superior) y 16 pM (inferior) para cada dúplex seleccionado. El porcentaje de actividad de *Renilla* luciferasa obtenido utilizando el plásmido psiCHECK2-AS que evalúa la actividad silenciadora de la hebra antisentido se muestra en gris (efecto *ON-target*) mientras que el porcentaje de actividad de *Renilla* luciferasa obtenido utilizando el plásmido psiCHECK2-S que evalúa la actividad silenciadora de la hebra sentido se muestra en azul (efecto *OFF-target*). A la derecha se observa la relación entre el porcentaje de actividad de luciferasa obtenido con el plásmido psiCHECK2-S y el obtenido con psiCHECK2-AS como una medida de la especificidad de cada dúplex.

Al observar el gráfico de especificidad para cada dúplex a 1nM podemos decir que la incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos puede en ciertas posiciones provocar un marcado aumento de la especificidad con respecto al dúplex no modificado (D6, D18, D19, D20, D21, D22, D23 Y D24).

Si comparamos aquellos dúplex cuyas potencias de silenciamiento *ON-target* fueron similares al no modificado (D4, D5, D6, D7, D21), vemos cómo en algunos casos la incorporación de modificaciones ha disminuido la especificidad como en el caso de D4, mientras que en otros la ha incrementado (D6, D21). De esta manera se puede decir que aún teniendo la misma potencia

ON-target, distintos dúplex pueden revelar diferentes intensidades de silenciamiento *OFF-target*.

Entre los dúplex cuya potencia de silenciamiento *ON-target* era considerablemente menor que D1 podemos encontrar dos grupos, aquéllos cuya especificidad también fue menor (D14 y D15) y otros que sorpresivamente presentaron una especificidad incrementada con respecto al no modificado (D18, D19, D20, D22, D23 y D24).

En las modificaciones de la posición 2 de la región *seed* que provocaron un cambio en la especificidad, ésta fue en detrimento mientras que para las posiciones 5 y 6 la modificación provocó un incremento de la misma.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que si bien la construcción de siRNAs modificados es un proceso complejo dependiente de múltiples variables donde no siempre puede predecirse el resultado, hay ciertas tendencias que pueden tenerse en cuenta para un diseño racional de los mismos. Aquellos factores que beneficien la selección de la cadena antisentido por el complejo RISC como ser, la estabilización de la interacción del extremo 3' con el complejo proteico, o la moderada desestabilización termodinámica del dúplex en la región *seed* de la cadena antisentido llevarán a un aumento de la potencia y especificidad de la respuesta silenciadora. Estos cambios no deben alterar la hibridación con la secuencia blanco ya que esto traerá una disminución de la potencia.

En particular para el caso de los siRNA modificados con 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos podemos concluir que estas modificaciones fueron capaces de provocar un aumento de la potencia y de la especificidad habiendo sido este efecto posición dependiente. Estos nucleósidos han tenido un efecto estabilizante de las regiones 3'-*overhang* y por lo tanto han aumentado la potencia de los siRNA al estar ubicadas en la cadena antisentido, mientras que han producido una disminución de la misma al estar ubicados en la cadena sentido. En esta región la presencia de uno u otro diastereoisómero no es discriminada.

Como resultado de las modificaciones de las uridinas de la región *seed*, si bien se obtuvieron dúplex modificados en las posiciones 2 ó 5 con potencias similares, las modificaciones en la posición 5 provocaron un aumento de la especificidad con respecto al dúplex no modificado, lo que resultó importante a la hora de evaluar el efecto global de la estrategia de silenciamiento, donde no sólo importa el mayor silenciamiento posible del target sino también la disminución al mínimo de efectos secundarios.

Casos donde las modificaciones han provocado una marcada disminución de la potencia pero a su vez un marcado aumento de la especificidad, podrían deberse a un efecto

positivo sobre la selección de la cadena antisentido por RISC debido a una desestabilización del dúplex, aumentando la especificidad, acompañado de inconvenientes en la hibridación con el *target* disminuyendo la potencia.

Pudo observarse una relación entre los valores de T_m y la especificidad. En las cadenas antisentido modificadas en las posiciones 5 y 6 se observó un aumento de la especificidad acompañado de mayores ΔT_m o mayor desestabilización termodinámica del dúplex, mientras que para las cadenas modificadas en la posición 2, los valores de especificidad fueron iguales o menores que D1 coincidiendo con valores similares de T_m .

REFERENCIAS

- ¹ Engels JW. Gene silencing by chemically modified siRNAs. *N Biotechnol.* 2013, 30:302-307.
- ² Bramsen JB, Laursen MB, Nielsen AF, Hansen TB, Bus C, Langkjaer N, Babu BR, Hojland T, Abramov M, Van Aerschot A, Odadzic D, Smicius R, Haas J, Andree C, Barman J, Wenska M, Srivastava P, Zhou C, Honcharenko D, Hess S, Müller E, Bobkov GV, Mikhailov SN, Fava E, Meyer TF, Chattopadhyaya J, Zerial M, Engels JW, Herdewijn P, Wengel J, Kjems J. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37:2867-2881.
- ³ Kandeel M, Kitade Y. Computational analysis of siRNA recognition by the Ago2 Paz domain and identification of the determinants of RNA-induced gene silencing. *Plos One* 2013, 8, e57140.
- ⁴ Deleavey GF, Damha MJ. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem. Biol.* 2012, 19:937-954

ESTUDIOS DE FORMACIÓN DE DÚPLEX E I-MOTIF EN CADENAS DE ADN



CONSIDERACIONES PREVIAS

En este capítulo se estudió cómo influye la presencia de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en dos tipos de estructura secundaria: doble hélice e i-motif.

Para estudiar los efectos producidos sobre estructuras doble cadena se determinaron las temperaturas de fusión o *melting* (T_m) de los dúplex de ADN sintetizados en el Capítulo 3 que corresponden al dúplex sin modificar y modificados en una de las hebras con los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos sintetizados. Ya se ha visto en trabajos anteriores cómo nucleósidos conteniendo un grupo metilo en la posición 2' pueden provocar variaciones de T_m y causar distorsiones localizadas en dúplex de ARN.¹

Para estudiar los efectos producidos sobre estructuras i-motif, se determinaron las temperaturas de fusión y se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular (DC) y de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ($^1\text{H-RMN}$) para un fragmento del telómero de los vertebrados cuya secuencia es 5' CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC T 3'. La secuencia sin modificar y las modificadas obtenidas se muestran en el capítulo 3.

Se sabe que esta secuencia se pliega de forma intramolecular dando una estructura de i-motif como se muestra en la Figura 6.1 donde las cuatro regiones ricas en C se disponen para formar 6 pares C-CH⁺ mientras que las regiones de secuencia TAA forman los loops que ocupan los dos surcos mayores en la región inferior y el surco menor en la región superior.²

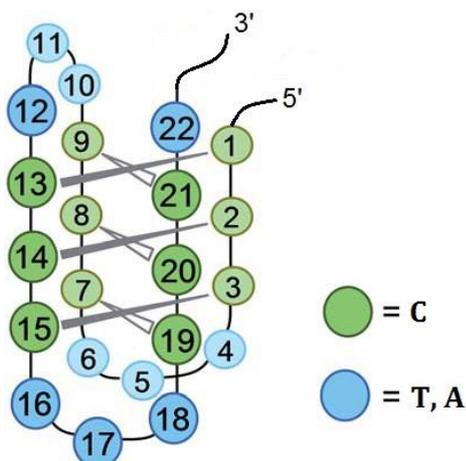


Figura 6. 1 Esquema de la estructura de i-motif adoptada por la secuencia 5' CCC TAA CCC TAA
CCC TAA CCC T 3'

En las estructuras i-motif de oligonucleótidos de ADN no modificado, los desoxirribonucleótidos se encuentran adoptando la conformación C3'-endo. En general, pocas alteraciones del ADN son toleradas en los i-motif. Sin embargo los ribonucleótidos, que adoptan esta conformación, tienen un efecto desestabilizante y los análogos 2'-O-metil son incapaces de formar este arreglo. Esto sugiere un impedimento estérico y una repulsión de carga entre los sustituyentes de C2' en el surco menor de la estructura. Por el contrario, cuando se utiliza arabinonucleótidos donde el grupo polar queda orientado hacia el surco mayor la estabilidad del i-motif no se ve afectada. Las modificaciones de tipo LNA, cuya conformación está restringida a C3'-endo y las de tipo 2'-F-araC permitieron la formación de i-motif estables. También se observó que reducciones de la repulsión de carga en la cadena pueden ser aliviadas usando análogos neutros como los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) obteniéndose estructuras estables compuestas por híbridos ADN-ANP.³⁻⁷

Teniendo en cuenta estos antecedentes resulta de interés evaluar el efecto de la incorporación de (2'5)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina en un oligonucleótido capaz de formar i-motif debido a que esta modificación tiene su equilibrio conformacional desplazado hacia C3'-endo para ubicar el resto alquilo en una posición pseudoecuatorial por razones estéricas. Además el sustituyente polar 2'-OH ha sido sustituido por uno no polar como el metilo disminuyendo la repulsión de carga en el surco menor.

OBJETIVOS

Evaluar los cambios en la estabilidad termodinámica de un dúplex de ADN debido a la incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos.

Evaluar los cambios en la estabilidad termodinámica de una estructura de i-motif al incorporar (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de dúplex de ADN modificados por curvas de fusión.

Utilizando el oligonucleótido de ADN no modificado (ADN-NM), las 7 cadenas modificadas y la cadena complementaria no modificada (ADN-NMC) sintetizadas en el capítulo 3 (Sección 3.3.3) se prepararon los 8 dúplex posibles en buffer fosfato 10 mM pH 7, 150 mM de cloruro de sodio. Se obtuvieron las curvas de fusión para cada dúplex midiendo la absorbancia a 260 nm entre los 20 y 80 °C con una rampa lineal de 0,5 °C. Las T_m obtenidas para cada dúplex pueden observarse en la Tabla 6.1 (Ver curvas de fusión en Capítulo 10: Anexo, Figuras 10.61 - 10.68).

Dúplex	T _m (°C)	ΔT (°C)
NM-NMC	55,8	-
dU-NMC	54,1	-1,7
UOMe-NMC	54,0	-1,8
U-NMC	52,1	-3,7
U(S)-NMC	50,3	-5,5
U(R)-NMC	48,8	-7,0
C(S)-NMC	49,7	-6,1
C(R)-NMC	49,2	-6,6

Tabla 6.1 Valores de T_m (°C) para los 8 dúplex de ADN analizados y ΔT_m (°C) de los dúplex modificados con respecto al no modificado.

En principio podemos decir que todas las modificaciones ensayadas presentaron un efecto desestabilizante del dúplex de ADN evidenciado en una caída de la temperatura de fusión. De manera esperada, la modificación dU, es la que menos distorsionó la doble cadena ya que su estructura es la que más se asemeja a la T que reemplaza en la cadena no modificada. Las modificaciones que son de tipo ARN como UOMe y U también provocaron una desestabilización del dúplex que podría atribuirse a una configuración C-2'-endo característica de la hélice tipo A del ARN o a la distorsión provocada por el sustituyente en el carbono 2'. En comparación con

estas modificaciones comerciales, los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos tuvieron un efecto desestabilizante aún mayor, ya sea con una conformación del azúcar C2'-endo o C3'-endo. El hecho de no observar una diferencia entre ambos diastereoisómeros sobre la estabilidad de la doble cadena sugiere una cierta flexibilidad de los mismos dada por un estado conformacional que no se encuentra bloqueado y un efecto desestabilizante para la formación de la doble hélice debido a la presencia del metilo.

Análisis de i-motif modificados por curvas de fusión, dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear.

Para evaluar el efecto provocado por la (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina en la estabilización de una estructura i-motif se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de las secuencias modificadas en la posición 1, 2, y 2 + 14 y se compararon con la no modificada (Figura 6.2).

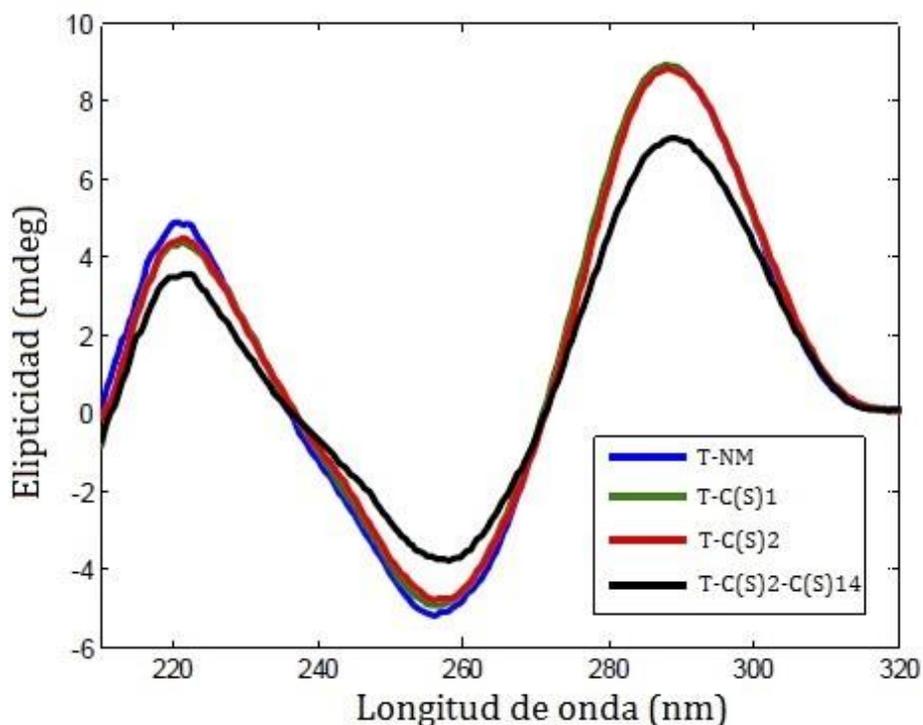


Figura 6.2 Dicroísmo circular de las secuencias formadoras de i-motif a pH 5,5 y 15 °C.

T-NM al igual que las cadenas modificadas presentaron máximos y mínimos alrededor de 286 nm y 254 nm respectivamente. Estos picos, como ha sido reportado previamente, indican la formación de pares C⁺CH⁺ y son característicos de estructuras i-motif.⁸ Estos resultados muestran que los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos pueden dar estructuras i-motif estables en condiciones ácidas (pH 5,5).

Para investigar la estabilidad de los i-motif modificados frente a variaciones de pH, se realizaron espectros de dicroísmo circular a diferentes pH entre 5 y 7 a 25 °C (Ver espectros de dicroísmo circular en Capítulo 10: Anexo Figuras 10.69 - 10.72). Luego se graficó la fracción de ADN plegado en función del pH y se ajustó a una curva sigmoidea de titulación ácido-base con un solo evento de protonación donde la población protonada corresponde al oligonucleótido plegado como i-motif y la población no protonada corresponde al oligonucleótido no plegado como i-motif o plegado al azar (Figura 6.3).

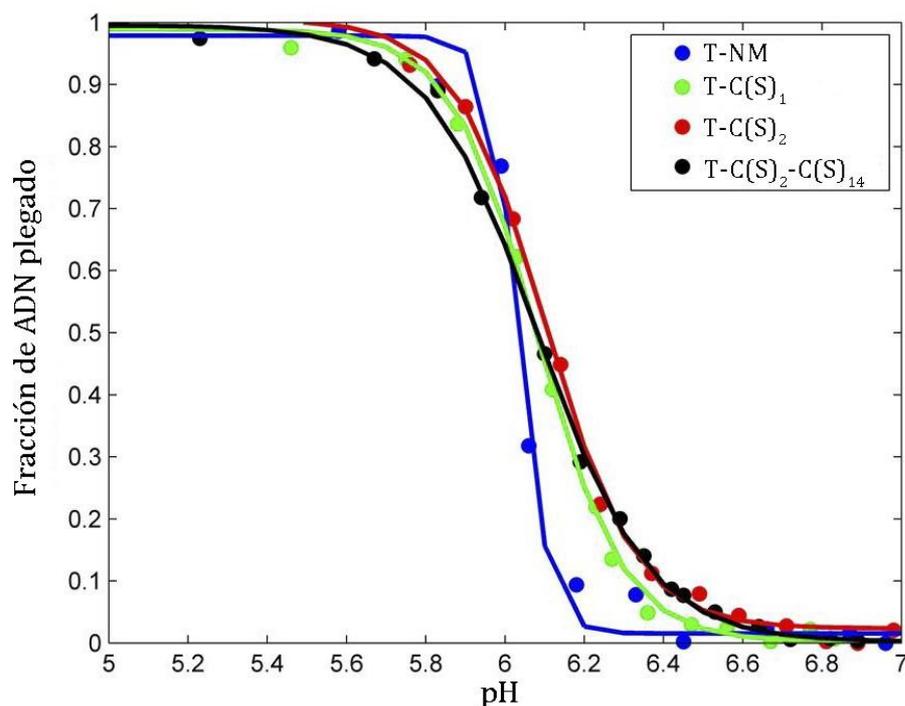


Figura 6.3 Estabilidad de las secuencias formadoras de i-motif a distintos pH.

Fracción de ADN plegado como i-motif en función del pH en un rango de 5 a 7 a 25 °C.

Las modificaciones provocan un leve aumento en el punto medio de transición de pH. La modificación introduce un metilo en la posición 2', con lo cual no se esperaba un gran impacto sobre este parámetro. Por el contrario, se observa un mayor efecto sobre el rango de transición de pH (R_T) (Tabla 6.3). En otras palabras, la curva de titulación ácido-base para la secuencia no modificada tiene una pendiente pronunciada indicando un fuerte efecto cooperativo en la desprotonación del i-motif. La pérdida de un protón lleva rápidamente a la pérdida del resto con la consiguiente desestabilización de la estructura. Con las secuencias modificadas se observa una pendiente menos pronunciada indicando menor cooperatividad lo que podría explicar la estabilización de las mismas a pHs mayores.

Secuencia	pH _{1/2}	pH _{90%}	pH _{10%}	R _T
T-NM	6,03±0,02	5,92	6,14	0,22
T-C(S) ₁	6,08±0,02	5,83	6,33	0,50
T-C(S) ₂	6,10±0,02	5,85	6,39	0,54
T-C(S) ₂ -C(S) ₁₄	6,08±0,02	5,76	6,40	0,64

Tabla 6.3 Estabilidad de las secuencias formadoras de i-motif a distintos pH.

Se registra para cada secuencia el valor de pH al cual se obtiene la mitad, un 10% y un 90 % de la secuencia plegada y se obtiene su rango de transición de pH (R_T).

Para el cálculo de T_m y parámetros termodinámicos se registró la absorbancia a 280 nm en función de la temperatura a pHs 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. Los valores obtenidos pueden observarse en la Tabla 6.2 (Ver curvas de fusión en Capítulo 10: Anexo, Figuras 10.73 - 10.84).

Observando los valores de T_m podemos decir que las modificaciones incorporadas provocaron un aumento de las mismas revelando ser levemente estabilizantes, siendo la modificación en la posición 2 mas estabilizante que en la posición 1. Además se pudo ver un efecto aditivo en la secuencia doble modificada que resulta ser la más estable. Este efecto también puede corroborarse observando los valores obtenidos para la energía libre de Gibbs, que se van haciendo cada vez más negativos para un mismo pH a medida que descendemos en la tabla. Valores más negativos de ΔG implican una mayor espontaneidad en el proceso de formación de la estructura y por lo tanto un i-motif termodinámicamente más estable.

Las variaciones de T_m en función de los cambios de pH se condicen con los valores de R_T obtenidos previamente. Podemos observar que a medida que aumenta el pH, aumenta la diferencia de estabilidad del i-motif de las cadenas modificadas con respecto a la no modificada.

i-motif	pH	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	ΔH ⁰ (kcal/mol)	ΔS ⁰ (cal/K·mol)	ΔG ⁰ _{37°C} (kcal/mol)
T-NM	5,5	43,4	-	-70±8	-222±27	-1,42
T-C(S) ₁	5,5	43,5	0,1	-76±7	-240±23	-1,57
T-C(S) ₂	5,5	44,8	1,4	-67±6	-211±18	-1,65
T-C(S) ₂ -C(S) ₁₄	5,5	45,5	2,1	-63±6	-197±20	-1,68
T-NM	6,0	26,7	--	-69±8	-231±26	+2,33
T-C(S) ₁	6,0	27,0	0,3	-55±7	-184±23	+1,84
T-C(S) ₂	6,0	28,1	1,4	-60±7	-200±22	+1,77
T-C(S) ₂ -C(S) ₁₄	6,0	30,2	3,5	-47±3	-155±11	+1,05
T-NM	6,5	--	--	--	--	--
T-C(S) ₁	6,5	~15	--	--	--	--
T-C(S) ₂	6,5	~20	--	--	--	--
T-C(S) ₂ -C(S) ₁₄	6,5	~20	--	--	--	--
T-NM	7,0	--	--	--	--	--
T-C(S) ₁	7,0	--	--	--	--	--
T-C(S) ₂	7,0	--	--	--	--	--
T-C(S) ₂ -C(S) ₁₄	7,0	12	--	--	--	--

Tabla 6.2 Valores de T_m, ΔH, ΔS, ΔG para las secuencias formadoras de i-motif obtenidos a partir de curvas de fusión realizadas a 280 nm a pHs 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0.

Se investigó también la estabilidad térmica utilizando dicroísmo circular obteniendo resultados similares. Se verificó la mayor estabilidad de los oligonucleótidos modificados siendo la mayor la de la secuencia doblemente modificada. A medida que aumenta la temperatura de 15 a 45 °C, los picos sufren un corrimiento al azul y la magnitud de la elipticidad decrece. A partir de los 50 °C el espectro muestra un máximo alrededor de 272 nm y un mínimo alrededor de 248 nm característicos del plegamiento al azar o *random coil* (Figura 6.4).

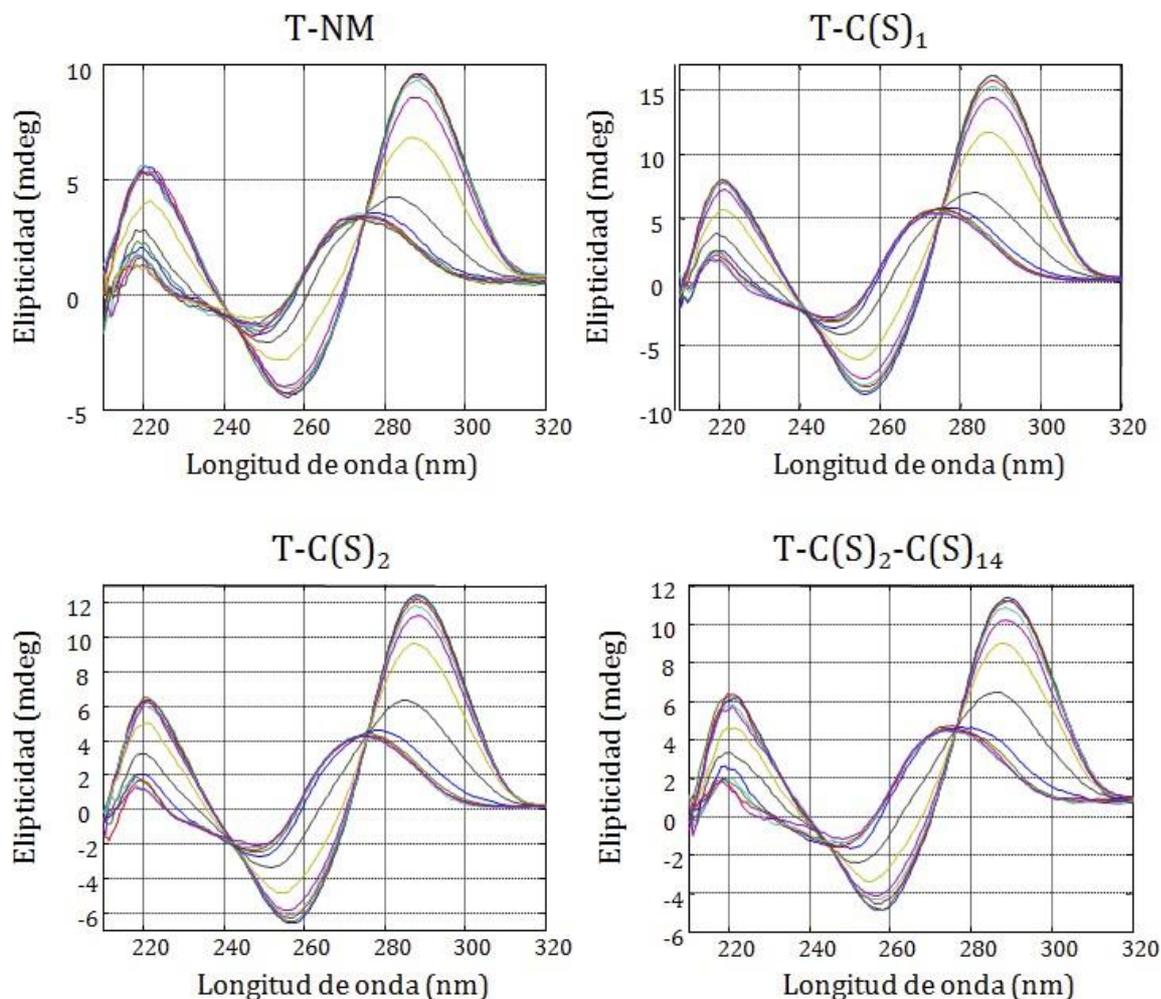


Figura 6.4 Espectros de dicroísmo circular para las secuencias formadoras de i-motif, medidos de 15 a 80 °C cada 5 °C de 350 a 210 nm, a una velocidad de 100 nm/min y un ancho de banda de 1 nm a pH 5,5.

La formación del i-motif también puede detectarse por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (¹H-RMN). Señales características de los protones del imino de las citosinas de los pares C-CH⁺ pueden observarse entre 15-16 ppm y los imino de las T de los *loops* alrededor de 11 ppm.⁹ Para el caso de T-C(S)₂-C(S)₁₄ puede comprobarse la formación de estructuras i-motif, por la presencia de estas señales características a distintos pHs y temperaturas (Figura 6.4). La importancia de este resultado radica no sólo en la capacidad de este análogo de nucleósido para estabilizar la estructura sino en la posibilidad de poder obtener un i-motif a un pH neutro y temperaturas de hasta 45 °C. Estudios de la estabilidad de los i-motif han sido direccionados a encontrar secuencias capaces de formar este tipo de estructuras en condiciones similares a las

fisiológicas en lugar de a pH ácido. Hasta el momento muy pocos casos de i-motif a pH neutro o levemente básico han sido encontrados y en general suelen suceder a bajas temperaturas.¹⁰

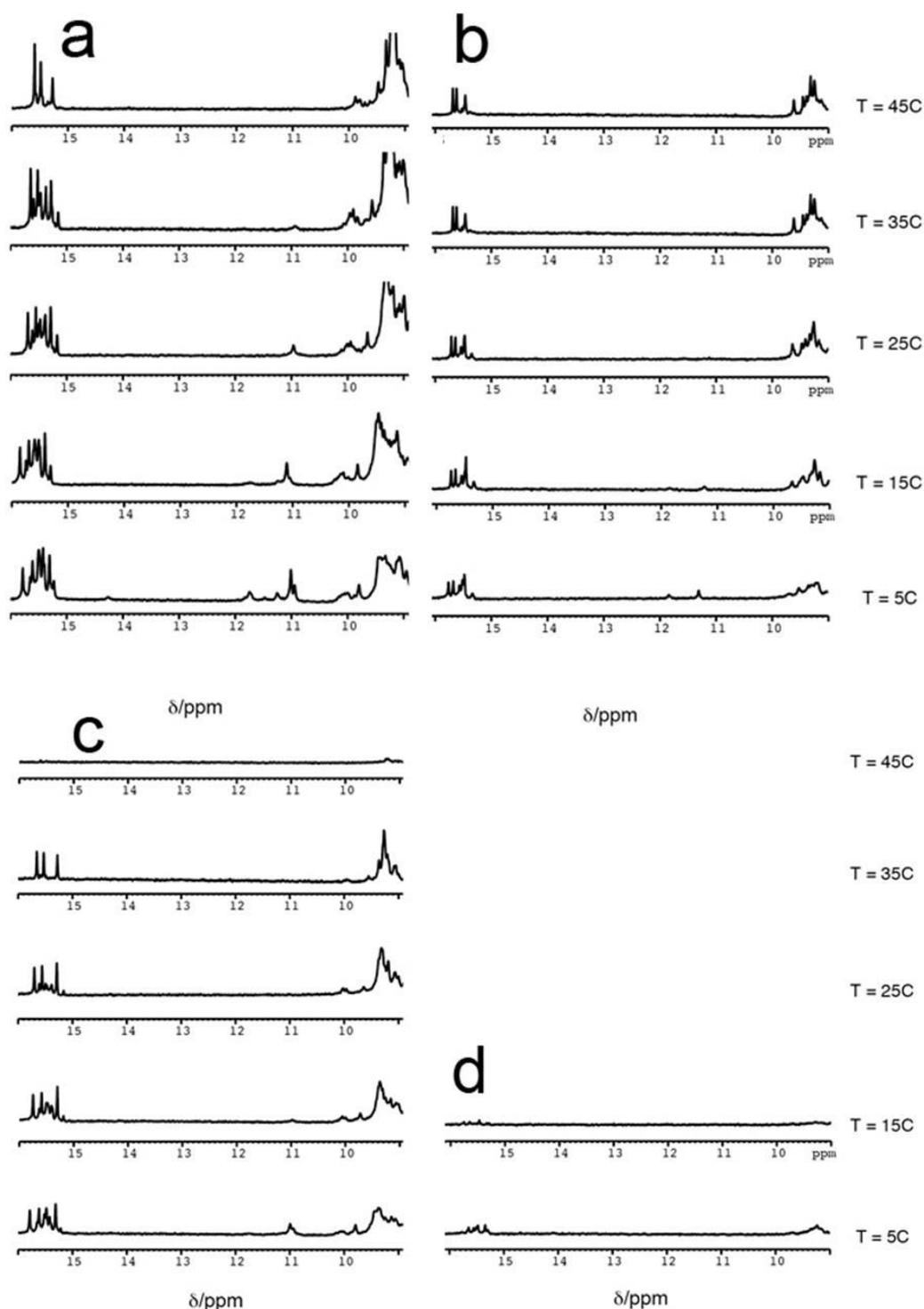


Figura 6.5 Experimentos de fusión por ^1H -RMN. Se muestran los espectros correspondientes a la región del protón intercambiable para el oligonucleótido T-C(S)₂-C(S)₁₄ a pH 5 (a) y a pH 7 (c) y para el oligonucleótido sin modificaciones a pH 5 (b) y pH 7 (d).

CONCLUSIONES

Se evaluó por primera vez los cambios provocados por la presencia de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos sobre la estabilidad termodinámica de estructuras secundarias de doble hélice de ADN e i-motif.¹¹ Mientras que para la doble hélice de ADN los efectos fueron desfavorables causando una caída de la temperatura de fusión para los i-motifs se produjo un efecto estabilizante en mayor o menor medida dependiendo de la posición donde se introdujo la modificación. El i-motif más estable resultó ser el doble modificado pudiéndose formar incluso en condiciones de pH y temperatura similares a las fisiológicas. Probablemente esta propiedad estabilizante de la (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina radique en su desplazamiento hacia la conformación C3'-endo y en su sustituyente no polar en el C2'.

REFERENCIAS

- ¹ Robaldo L, Pontiggia R, Di Lella S, Estrin DA, Engels JW, Iribarren AM, Montserrat JM. Conformational States of 2'-C-Methylpyrimidine Nucleosides in Single and Double Nucleic Acid Stranded Structures. *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117:57-69.
- ² Phan AT, Guéron M, Leroy JL. The Solution Structure and Internal Motions of a Fragment of the Cytidine-rich Strand of the Human Telomere. *J. Mol. Biol.* 2000, 299:123-144.
- ³ Day HA, Pavlou P, Waller ZAE. i-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22:4407-4418.
- ⁴ Assi HA, Harkness RW, Martin-Pintado N, Wilds CJ, Campos-Olivas R, Mittermaier AK, González C, Damha MJ. Stabilization of i-motif structures by 2'-β-fluorination of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44:4998-50091.
- ⁵ Fenna CP, Wilkinson VJ, Arnold JRP, Cosstick R, Fisher J. The effect of 2'-fluorine substitutions on DNA i-motif conformation and stability. *Chem. Commun.* 2008, 14:3567-3569.
- ⁶ Kumar N, Nielsen JT, Maiti S, Petersen M. i-Motif Formation with Locked Nucleic Acid (LNA). *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46:9220-9222.
- ⁷ Robidoux S, Damha MJ. D-2-Deoxyribose and D-Arabinose, but not D-Ribose, Stabilize the Cytosine Tetrad (i-DNA) Structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 15:529-535.
- ⁸ Manzini G, Yathindra N, Xodo LE. Evidence for intramolecularly folded i-DNA structures in biologically relevant CC-repeat sequences. *Nucleic Acids Res.* 22:4634-4640.
- ⁹ Pérez-Rentero S, Gargallo R, González C, Eritja R. Modulation of the stability of i-motif structures using an acyclic threoninol cytidine derivative. *RSC Adv.* 2015, 5:63278-63281.
- ¹⁰ Zhou J, Wei C, Jia G, Wang X, Feng Z, Li C. Formation of i-motif structure at neutral and slightly alkaline pH. *Mol. BioSyst.* 2010, 6:580-586.

¹¹ Aviñó A, Dellafiore M, Gargallo R, González C, Iribarren AM, Montserrat J, Eritja R. Stabilization of Telomeric I-Motif Structures by (2'S)-2'-Deoxy-2'-C-Methylcytidine Residues. *Chembiochem* 2017, 18, 1-7.

EXPLORACIÓN DEL USO DE LA DNAZIMA PEROXIDASA



CONSIDERACIONES PREVIAS

En este capítulo se trabaja con el oligonucleótido de secuencia 5' GGG TAG GGC GGG TTG GG 3' en el cual todos sus nucleótidos se encuentran en la configuración D para la D-DNAzima peroxidasa y para la DNAzima peroxidasa inmovilizada y en la configuración L para la L-DNAzima peroxidasa, siendo ésta la imagen especular de la D-DNAzima. Esta secuencia es levemente diferente a la usualmente utilizada para formar la DNAzima peroxidasa, la secuencia PS2.M (5' GTG GGT AGG GCG GGT TGG 3').¹ Se ha visto que un re arreglo de la PS2.M al oligonucleótido de 17 mer elegido, donde la G del extremo 5' queda adyacente a las dos G del extremo 3', da como resultado un cuarteto de G más estable y una DNAzima más activa.^{2,3} Por otro lado este re arreglo resulta más compatible con el anclaje del extremo 3' a un soporte sin que se vea afectada la formación del cuarteto (Figura 7.1).

El interés de trabajar con un oligonucleótido enteramente modificado capaz de formar cuartetos de G como puede ser la forma L,^{4,5} surge de la posibilidad de obtener una molécula de gran estabilidad en medios biológicos que mantenga una actividad comparable a la forma D. Sin ser completo, el alto grado de simetría y planaridad de la hemina son compatibles con la posibilidad de que pueda comportarse como ligando tanto de su aptámero en forma D como de su imagen especular.

Por otro lado, teniendo en cuenta el uso de esta DNAzima como catalizador de oxidaciones de compuestos orgánicos, surge el interés de obtener una molécula que pueda recuperarse del medio de reacción y que no pierda su actividad a lo largo de sucesivos reusos. Es por este motivo que se busca la inmovilización del oligonucleótido de manera tal que no pierda su capacidad de interacción con la hemina, y que el conjunto mantenga su actividad peroxidasa.

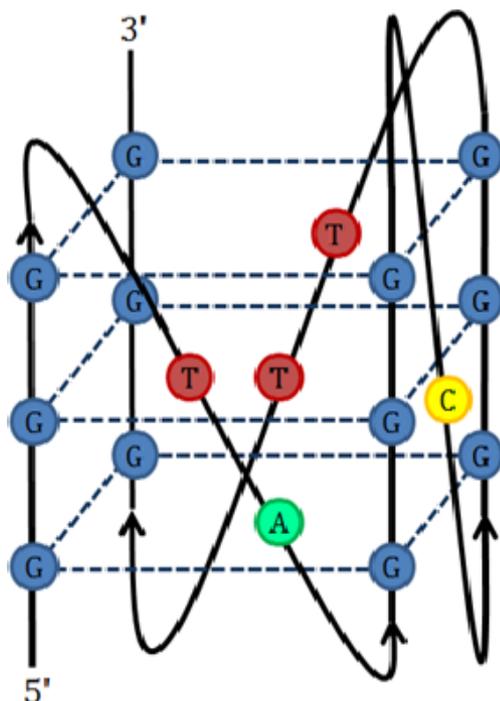


Figura 7.1. Esquema del oligonucleótido empleado en la DNAzima peroxidasa.

● G : guanosina; ● T : timidina; ● A :adenosina; ● C : citidina; la línea entera representa la cadena con su sentido 5' -3' indicado con flechas; las líneas punteadas representan las uniones por puente de hidrógeno entre las guanosinas formadoras de cada tétrada.

OBJETIVOS

Explorar el uso de la DNAzima peroxidasa y de su forma L como catalizadores de reacciones de oxidación.

Evaluar la actividad de la DNAzima peroxidasa inmovilizada. Evaluar su capacidad de recuperación y reuso.

Estudiar la aceptación de distintos sulfuros y otros compuestos orgánicos como sustratos.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Oxidación de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)

Para estudiar y comparar en primera instancia las actividades de la D-DNAzima (D-DZ), la L-DNAzima (L-DZ) y la DNAzima inmovilizada (I-DZ), se eligió la reacción colorimétrica de oxidación de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Este sustrato es incoloro y se oxida muy

lentamente con peróxido de hidrógeno dando un *background* muy bajo. En presencia de la DNAzima la reacción avanza rápidamente hacia la formación de dos productos coloreados. El primero es un complejo color azul formado por una molécula de TMB en su forma de diamina, es decir, sin oxidar, y una molécula de TMB en su forma de diimina, es decir, oxidada. Esta especie existe en equilibrio con su catión radical y presenta sus máximos de absorbanza a 370 nm y 650 nm. En exceso de peróxido o con el agregado de ácido la reacción progresa hacia la formación de la diimina de color amarillo cuyo máximo de absorbanza se encuentra a 450 nm (Figura 7.2). Este sustrato presenta ventajas con respecto al sustrato más utilizado para medir actividad peroxidasa, el ácido 2,2-acino-di-(3-etil)benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), debido a que el producto diimina es mucho más estable en el tiempo mientras que el producto de oxidación del ABTS de color verde desaparece luego de 10 minutos en solución acuosa.⁶

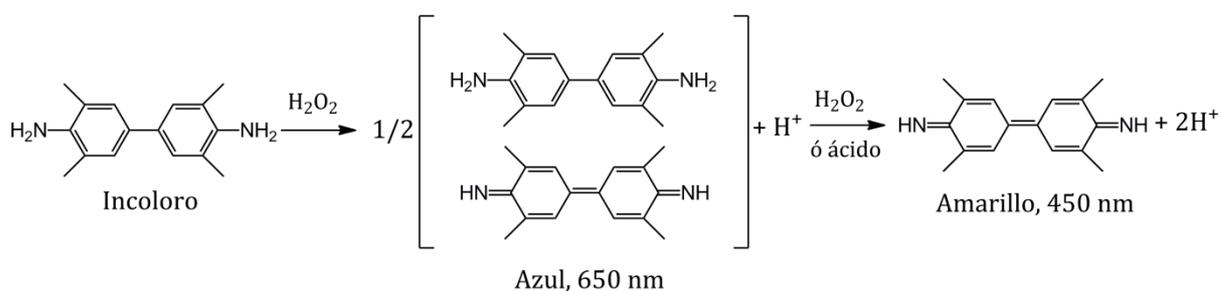


Figura 7.2. Reacción de oxidación del TMB.

En el caso de las DNAzimas en solución el agregado de TMB y peróxido de hidrógeno lleva gradualmente a la formación del compuesto de color azul y luego el amarillo. Luego de 15 minutos de reacción, ésta se detiene con el agregado de ácido. En el caso de I-DZ, el agregado del TMB y peróxido de hidrógeno provoca una coloración azul en el soporte de poliestireno mientras que la solución permanece incolora. Pruebas con el soporte y el compuesto coloreado demostraron que éste se adsorbe sobre el soporte de poliestireno. Con el agregado de ácido la solución se vuelve amarilla y el soporte retorna a su color blanco original siendo la absorbanza medida menor que en el caso de las DNAzimas solubles (Figura 7.3). Este valor puede ser explicado teniendo en cuenta que el color azul corresponde a la formación de un complejo coloreado donde la mitad de las moléculas de TMB se encuentran en estado oxidado. Al quedar este complejo adsorbido no puede continuar oxidándose con lo cual al finalizar la reacción y liberarlo con el agregado de ácido, el valor de absorbanza leído será menor. Es interesante destacar que el color azul sobre el soporte permaneció estable durante meses y continúa sin cambios, por lo que combinando esta DNAzima con este soporte podemos obtener una reacción colorimétrica estable y localizada.

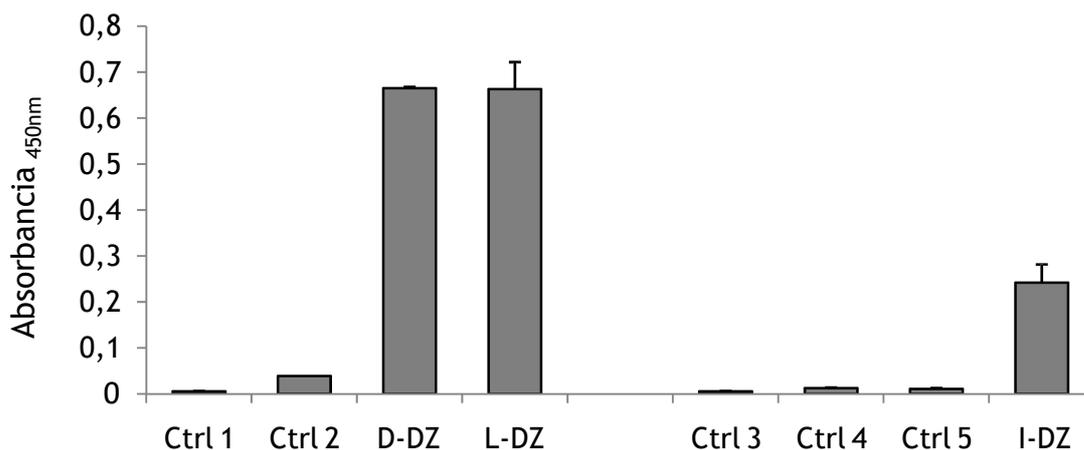


Figura 7.3. Oxidación de TMB catalizada por D-DZ, L-DZ e I-DZ.

El Control 1 (Ctrl 1) corresponde a la reacción catalizada por peróxido de hidrógeno, mientras que el Control 2 (Ctrl 2) contiene además hemina. D-DZ y L-DZ corresponden a las reacciones catalizadas por la D-DNAzima y la L-DNAzima respectivamente ambas conteniendo hemina y peróxido. Los Controles 3 y 4 (Ctrl 3 y Ctrl 4) son análogos a los Controles 1 y 2 pero con el agregado de soporte de poliestireno sin derivatizar. El Control 5 (Ctrl 5) contiene peróxido de hidrógeno y DNAzima inmovilizada mientras que I-DZ es la reacción catalizada por la DNAzima inmovilizada en presencia de hemina y peróxido de hidrógeno.

Para evaluar la posibilidad de recuperación y reuso de I-DZ, la DNAzima fue recuperada del medio de reacción por centrifugación seguida de lavados con DMSO y luego agua para dar comienzo a una nueva reacción. Se repitió este ciclo 5 veces sin observar una tendencia a la caída en la actividad a medida que aumentan los reusos (Tabla 7.1).

n° de reusos	Abs _{450nm}	Abs.min ⁻¹
1	0,297	2.0 x 10 ⁻²
2	0,256	1.7 x 10 ⁻²
3	0,207	1.4 x 10 ⁻²
4	0,252	1.7 x 10 ⁻²
5	0,199	1.3 x 10 ⁻²

Tabla 7.1 Recuperación y reuso de I-DZ en la reacción de oxidación de TMB. Valores de absorbancia a 450 nm medidos a los 15 minutos de reacción luego del agregado de ácido.

. 2 Oxidación de tioanisol por D y L-DNAzima peroxidasa

Para explorar el uso de ambas formas de la DNAzima peroxidasa como catalizadoras de reacciones con transferencia de dos electrones y poner a punto la oxidación del sulfuros, se utilizó como modelo la reacción de oxidación del tioanisol (Figura 7.4). Como punto de partida se consideró el trabajo realizado por Sen y colaboradores donde, utilizando el oligonucleótido rico en guanina PS2.M, hemina y peróxido de hidrógeno, se logró una completa oxidación del tioanisol a su correspondiente sulfóxido.⁷

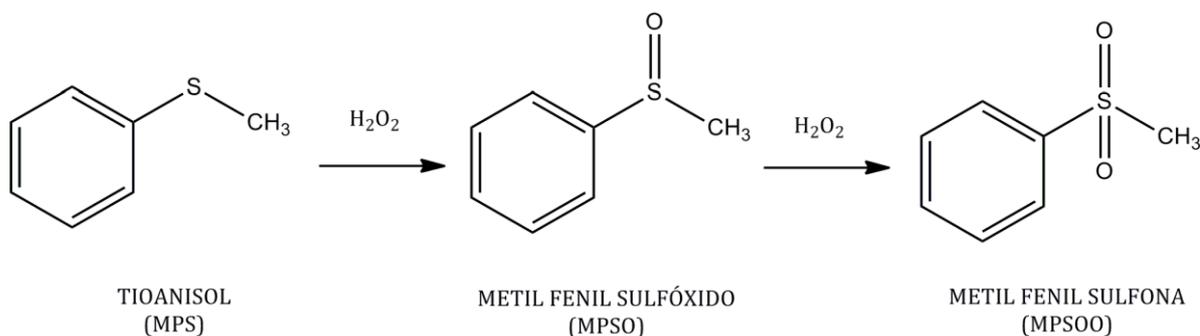


Figura 7.4 Ecuación de oxidación de tioanisol (MPS).

Para poner a punto la reacción de oxidación de tioanisol con la D-DNAzima peroxidasa utilizando como método de seguimiento de la misma RP-HPLC-UV, se evaluó primero la solubilidad del tioanisol en el medio de reacción y su absorptividad molar a 254 nm, eligiendo como concentración óptima 2,5 mM. A partir de ello se calculan las concentraciones de DNAzima y de H₂O₂ a utilizar para mantener la misma relación molar que las condiciones ya reportadas por Sen. Utilizando estas condiciones (12,5 μM de hemina, 12,5 μM de oligonucleótido y 12,5 mM de H₂O₂) la reacción avanzó muy rápido dificultando el seguimiento de la misma y ocurrió la sobre-oxidación a sulfona. Como se observa en la Tabla 7.2 al disminuir la concentración de H₂O₂ se logró una disminución de la velocidad de reacción acompañada de una disminución del porcentaje de conversión a sulfona. Utilizando 4 mM de H₂O₂ la reacción se completó a la media hora con solo un 13 % de conversión a sulfona.

H ₂ O ₂ (mM)	Tiempo (seg)	% de conversión				
		15	30	60	240	1800
12,5	MPSO	60	68	68	68	68
	MPSOO	32	32	32	32	32
	Total	92	100	100	100	100
6,25	MPSO	--	--	66	73	--
	MPSOO	--	--	16	16	--
	Total	--	--	82	89	--
4	MPSO	29	39	54	79	84
	MPSOO	13	13	13	13	13
	Total	42	52	67	92	97

Tabla 7.2 Porcentajes de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) y metil fenil sulfona (MPSOO) a distintas concentraciones de H₂O₂. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 12,5 μM de D-DNAzima peroxidasa y 2,5 mM de tioanisol en buffer HEPES-NH₄ pH 8.

Luego se evaluó la posibilidad de reducir la concentración de DNAzima a utilizar pero se vio que para las condiciones elegidas se necesita 12 μM para lograr la completa oxidación del sustrato (Tabla 7.3)

DNAzima (μM)	Tiempo (min)	% Conversión	
		30	60
3	MPSO	39	--
	MPSOO	12	--
	Total	51	--
6	MPSO	46	48
	MPSOO	11	11
	Total	57	59
12	MPSO	89	89
	MPSOO	11	11
	Total	100	100

Tabla 7.3 Porcentajes de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) y metil fenil sulfona (MPSOO) a distintas concentraciones de D-DNAzima peroxidasa. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 2,5 mM de tioanisol y 4 mM de H₂O₂ en buffer HEPES-NH₄ pH 8.

Una vez elegidas las condiciones óptimas, se utilizó la reacción de oxidación del tioanisol como modelo para comparar las actividades de las formas D y L de la DNAzima peroxidasa y de esta manera evaluar la posibilidad de utilización de un oligonucleótido enteramente modificado para la catálisis de reacciones de transferencia de oxígeno (Tabla 7.4, Figura 7.5, ver cromatogramas en Capítulo 8: Anexo, Figuras 10.92 - 10.93).

T i e m p o (seg)	D-DNAzima			L-DNAzima			Control 1			Control 2		
	% M P S O	% M P S O	% T o t a l									
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	30,3	9,0	39,3	24,0	11,4	35,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	47,3	10,2	57,5	28,3	12,4	40,7	1,3	12,2	13,4	0,9	11,2	12,1
30	52,4	10,9	63,3	37,9	13,9	51,8	1,1	12,2	13,3	0,9	10,9	11,8
60	64,6	10,6	75,2	55,3	12,9	68,2	1,0	11,7	12,7	1,0	11,5	12,5
120	78,9	10,5	89,4	63,6	11,8	75,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
240	84,9	10,7	95,5	67,5	11,8	79,3	1,8	11,8	13,6	1,0	11,0	12,1
480	86,5	10,2	96,7	71,9	12,0	83,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
900	89,6	10,0	99,6	77,1	12,2	89,3	1,1	11,8	12,9	1,5	10,5	12,1
1800	91,2	8,4	99,6	80,9	12,5	93,4	1,2	12,3	13,6	2,0	12,0	14,0

Tabla 7.4 Porcentajes de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) y metil fenil sulfona (MPSOO) a partir de tioanisol utilizando D y L-DNAzima peroxidasa. Para las reacciones se utilizó 12 μ M de DNAzima, 2,5 mM de tioanisol y 4 mM de H₂O₂ en buffer HEPES-NH₄ pH 8 a 25 ° C. Control 1 no contiene ni hemina ni oligonucleótido. Control 2 no contiene oligonucleótido. ND = No Determinado.

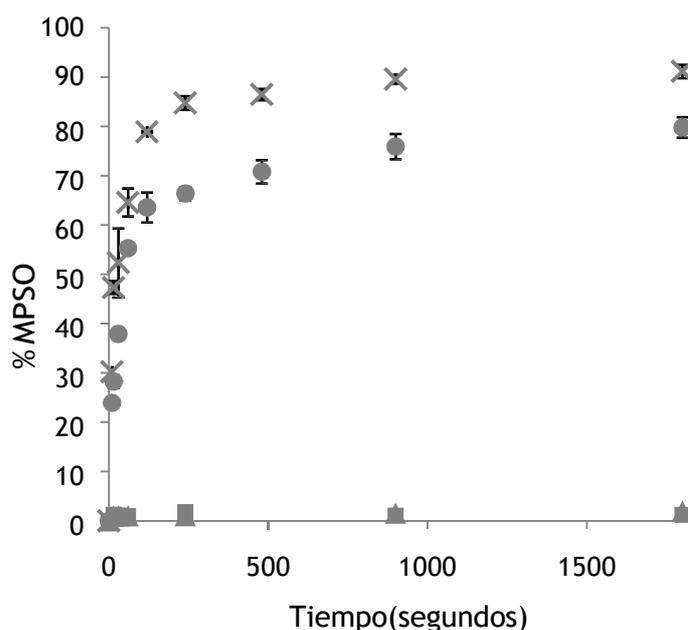


Figura 7.5 Curvas de porcentaje de oxidación a metil fenil sulfóxido (MPSO) en función del tiempo utilizando D y L-DNAzima peroxidasa. D-DNAzima peroxidasa (x); L-DNAzima peroxidasa (●); Control 1 (■); Control 2 (▲).

Como se puede observar en la Figura 7.5 ambas DNAzimas fueron capaces de catalizar la oxidación del tianisol. Se obtuvieron actividades comparables para las formas D y L siendo las velocidades iniciales de reacción $3,1 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ y $2,0 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente. Si bien ambos oligonucleótidos han demostrado ser capaces de formar cuartetos de G y de unirse a la hemina, esta leve diferencia en su actividad podría deberse a que la hemina, si bien tiene un alto grado de simetría, no es completamente simétrica.

Los porcentajes de conversión a sulfóxido de ambas reacciones en comparación con el control 2 demostraron que la unión del oligonucleótido rico en guanina a la hemina potencia significativamente su capacidad como catalizador de reacciones de oxidación.

Observando las Tablas 7.2 y 7.4 podemos concluir que la formación de sulfona depende exclusivamente de la concentración de H_2O_2 siendo una conversión rápida que luego se mantiene constante a lo largo del tiempo y que es independiente de la presencia de hemina o DNAzima en el medio. Esto explicaría por qué en las condiciones reportadas por Sen, donde se utilizó 1 mM de H_2O_2 , no se observó formación de sulfona durante el transcurso de la reacción mientras que en las condiciones aquí utilizadas hubo una conversión del 12 % aproximadamente utilizando 4 mM de H_2O_2 . También es interesante aclarar que luego de 24 horas de reacción, los porcentajes de MPSO y MPSOO se mantuvieron constantes, indicando que no ocurrió una sobreoxidación a sulfona a tiempos prolongados.

7.3.3 Oxidación de tioanisol por la DNAzima peroxidasa inmovilizada (I-DZ)

Para probar la actividad del complejo formado por la hemina y el oligonucleótido inmovilizado se utilizó la reacción de oxidación del tioanisol en las mismas condiciones para luego poder comparar con sus análogas en solución.

Para una manipulación más sencilla del oligonucleótido inmovilizado se utilizó toda la masa obtenida en la síntesis asumiendo como concentración de DNAzima activa, la concentración de hemina (12 μ M) y quedando oligonucleótido en exceso. El tioanisol presentó la particularidad de adsorberse al soporte y por lo tanto su concentración en el sobrenadante fue estabilizada a 2,5 mM previo al inicio de la reacción.

En la Figura 7.6 podemos observar cómo la actividad de I-DZ se diferenció significativamente de los controles presentando una actividad levemente menor que la de sus análogas en solución (Ver Cromatograma en Capítulo 8: Anexo, Figura 10.94).

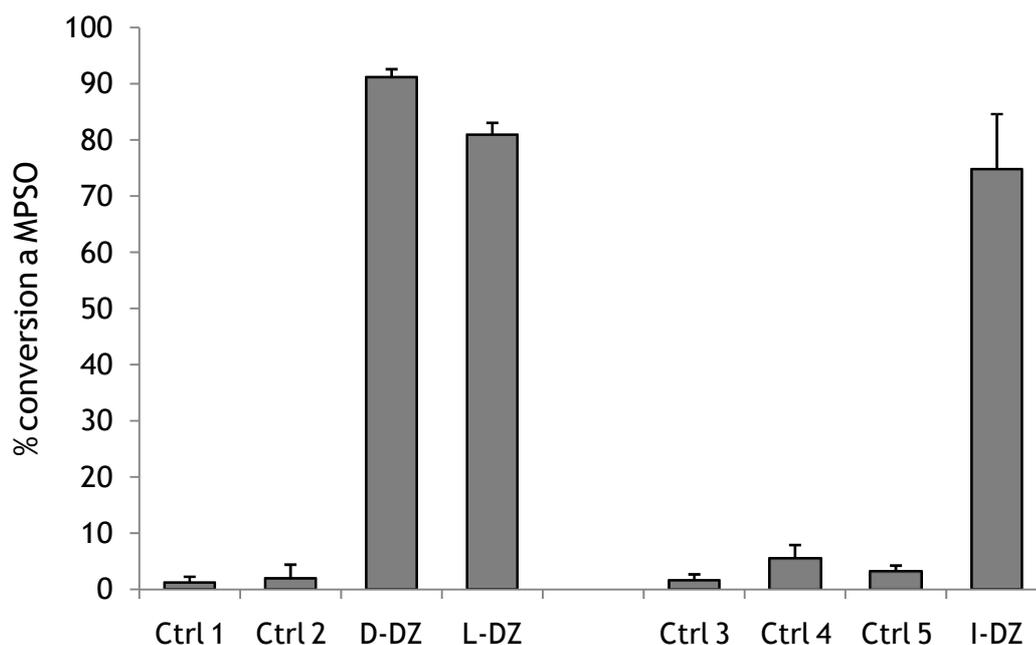


Figura 7.6 Porcentaje de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) a los 30 minutos de reacciones catalizadas por D-DZ, L-DZ e I-DZ. El Control 1 (Ctrl 1) corresponde a la reacción catalizada por peróxido de hidrógeno, mientras que el Control 2 (Ctrl 2) contiene además hemina. D-DZ y L-DZ corresponden a las reacciones catalizadas por la D-DNAzima y la L-DNAzima respectivamente ambas conteniendo hemina y peróxido. Los Controles 3 y 4 (Ctrl 3 y Ctrl 4) son análogos a los Controles 1 y 2 pero con el agregado de soporte de poliestireno sin derivatizar. El Control 5 (Ctrl 5) contiene peróxido de hidrógeno y DNAzima inmovilizada

mientras que I-DZ es la reacción catalizada por la DNAzima inmovilizada en presencia de hemina y peróxido de hidrógeno.

Debido a la particularidad de la fase de adsorber el sustrato, si seguimos la reacción más allá de la media hora podemos ver una liberación del sustrato desde el soporte al sobrenadante de la reacción para mantener un equilibrio y por lo tanto la reacción continúa hasta el agotamiento del peróxido de hidrógeno. Aquí también se puede observar cómo la formación de sulfona inicial depende de la concentración inicial de peróxido y se mantiene constante a lo largo de la reacción, mientras que el producto mayoritario sigue siendo el sulfóxido (Tabla 7.5).

Tiempo (min)	MPSO (mM)	% MPSO	MPSOO (mM)	%MPSOO
0	0,00	0,0	0,00	0,0
1	0,32	11,3	0,23	8,1
30	2,15	75,7	0,26	9,2
60	3,19	112,0	0,29	10,2
90	3,58	126,0	0,24	8,5
120	4,03	142,0	0,23	8,1

Tabla 7.5 Porcentaje de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) y metil fenil sulfona (MPSOO) a partir de tioanisol utilizando como catalizador I-DZ.

La ventaja que aporta la inmovilización del catalizador, es la posibilidad de recuperación y reuso. Para probar esto, la reacción fue realizada cuatro veces consecutivas. Entre cada reacción el soporte fue lavado varias veces con DMSO y luego con agua. En la Tabla 7.6 observamos cómo la DNAzima continúa siendo activa luego de sucesivos usos. Además es interesante tener en cuenta que se trató del mismo oligonucleótido utilizado tanto en la puesta a punto de esta reacción como en los ensayos colorimétricos de oxidación de TMB.

	% MPSO	% MPSOO	% MPSO.min-1
Control 3	1,7	13,8	0,06
Control 4	5,5	8,2	0,18
Control 5	3,2	8,6	0,11
I-DZ 1	88,3	9,8	2,94
I-DZ 2	66,1	10,0	2,20
I-DZ 3	69,3	5,4	2,31
I-DZ 4	75,5	9,2	2,52

Tabla 7.6 Recuperación y reuso de I-DZ. Porcentaje de conversión a metil fenil sulfóxido (MPSO) y metil fenil sulfona (MPSOO) a los 30 minutos de reacciones catalizadas por la DNAzima peroxidasa inmovilizada (I-DZ).

Oxidación de otros sulfuros por la D y la L-DNAzima peroxidasa

Debido a que los sulfóxidos con actividad biológica son más voluminosos que el tioanisol y debido a que no se conoce cuál es el rango de aceptación de sustratos de esta DNAzima, se exploró la preparación de otros sulfóxidos de mayor peso molecular utilizando la D y la L-DNAzima peroxidasa.

Se mantuvieron las mismas condiciones de reacción utilizadas para la oxidación de tioanisol (12 μM de oligonucleótido, 12 μM de hemina y 4 mM de H_2O_2 en buffer HEPES- NH_4 a 25 $^\circ\text{C}$) exceptuando la concentración de sustrato utilizada, la cual fue optimizada en cada caso teniendo en cuenta la solubilidad de cada sustrato en el medio de reacción y la absortividad molar de los mismos.

Los sustratos utilizados fueron el difenil sulfuro (DPS), dibencil sulfuro (DBS) y el dibenzotiofeno (DBT) (Figura 7.7).

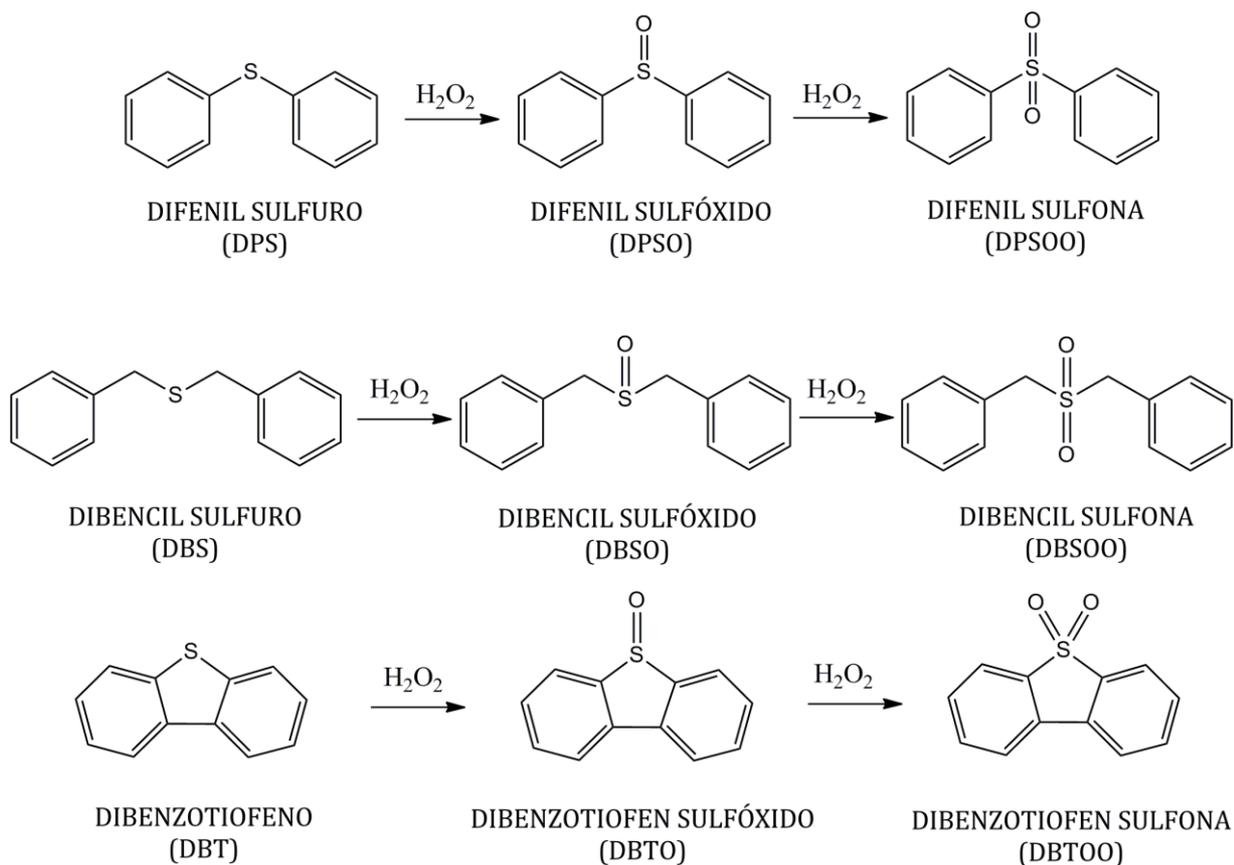


Figura 7.7 Reacciones de oxidación de difenil sulfuro (DPS), dibencil sulfuro (DBS) y dibenzotiofeno (DBT).

Los porcentajes de conversión a sus respectivos sulfóxidos y sulfonas pueden observarse en la Tabla 7.7 y la Figura 7.8 (Ver cromatogramas en Capítulo 8: Anexo, Figuras 10.95 - 10.100).

	Tiempo (min)	Difenil sulfuro			Dibencil sulfuro			Dibenzotiofeno		
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
		DPSO	DPSOO	Total	DBSO	DBSOO	Total	DBTO	DBTOO	Total
D-Dz	1	70,9	0,0	70,9	28,1	0,0	28,1	69,4	8,8	78,1
	30	100,0	0,0	100,0	31,2	0,0	31,2	78,3	10,2	88,4
L-Dz	1	67,2	0,0	67,2	32,1	0,0	32,1	90,3	4,5	94,7
	30	93,9	0,0	93,9	46,5	0,0	46,5	92,0	4,5	96,5
Control 1	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	30	0,7	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Control 2	1	1,9	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	1,4
	30	2,9	0,0	2,9	2,6	0,0	2,6	2,4	0,0	2,4

Tabla 7.7 Porcentajes de conversión a sulfóxidos y sulfonas a partir de difenil sulfuro, dibencil sulfuro y dibenzotiofeno utilizando como catalizador D y L-DNAzima peroxidasa a 1 y 30 minutos de reacción. Para las reacciones se utiliza 12 μM de DNAzima, 4 mM de H_2O_2 en buffer HEPES- NH_4 pH 8 a 25 °C. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron 0,1 mM DPS, 0,25 mM DBS, y 0,15 mM DBT. Control 1 no contiene ni hemina ni oligonucleótido. Control 2 no contiene oligonucleótido.

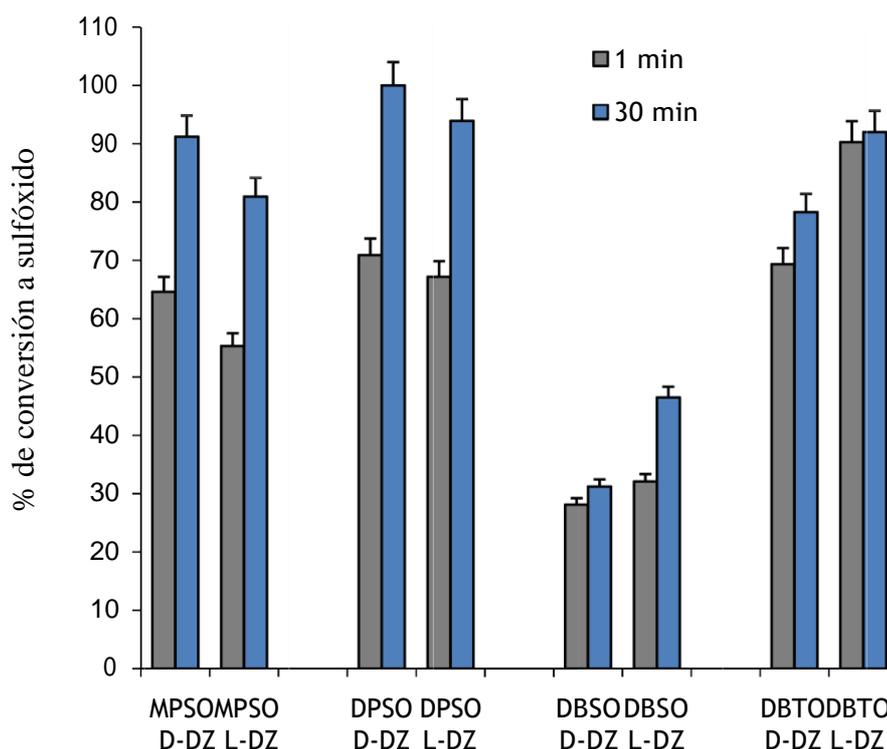


Figura 7.8. Porcentajes de conversión a sulfonamidos a partir de tioanisol, difenil sulfuro, dibencil sulfuro y dibenzotiofeno a 1 y 30 minutos de reacción, utilizando como catalizador D y L-DNAzima peroxidasa.

En todos los casos el sulfuro elegido fue aceptado como sustrato por ambas DNAzimas las cuales presentaron actividad comparable. Para todos los sustratos los porcentajes de oxidación de las reacciones catalizadas por las DNAzimas fueron muy superiores a los obtenidos para los controles.

Oxidación de Paracetamol

A modo de ampliar nuestro conocimiento sobre la variedad de sustratos que pueden ser aceptados por la DNAzima peroxidasa se decidió ensayar la oxidación del paracetamol. Este sustrato resultó de interés ya que ha sido oxidado por la análoga proteica de la DNAzima, la peroxidasa de rábano picante (*Horseradish peroxidase* o HRP).⁸ A partir de esta reacción han surgido aplicaciones interesantes como el uso de HRP/Paracetamol en terapias antitumorales de enzima/prodroga debido a la citotoxicidad de los productos de oxidación⁹ y, por otro lado, el uso de HRP inmovilizada para la remoción de este analgésico de aguas contaminadas¹⁰

Con la idea de ver si la DNAzima peroxidasa también es capaz de catalizar este tipo de oxidación se ensayó la reacción bajo las mismas condiciones que las utilizadas para la oxidación de sulfuros. En la Figura 7.9 se puede observar la estructura química de Paracetamol.

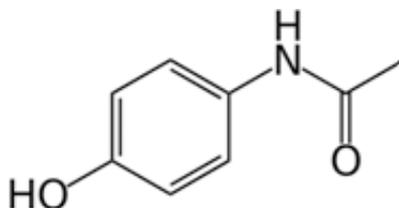


Figura 7.9 Estructura química del Paracetamol.

En la Figura 7.10 se pueden observar los porcentajes de conversión a productos para las reacciones de oxidación catalizadas por la D, L e I-DZ. El control 1 que corresponde a la oxidación utilizando solamente peróxido de hidrógeno, no presentó conversión a productos así como tampoco lo hizo el control 3 que es igual al control 1 con el agregado de soporte sin derivatizar. El control 2 corresponde a la oxidación utilizando solamente hemina como catalizador y el control 4 es análogo al 2 con el agregado de soporte sin derivatizar.

Para las reacciones con las DNAzimas solubles, la reacción alcanzó su meseta a los 60 minutos con una conversión cercana al 100% diferenciándose significativamente de la reacción catalizada por la hemina. Para el caso de la DNAzima inmovilizada se pudo ver cómo a medida que avanzaba la reacción había una mayor diferencia con respecto al control logrando la meseta a los 120 minutos y con un menor porcentaje de conversión que las DNAzimas solubles. Si bien fue menos activa, la ventaja de esta última radica en su posibilidad de recuperación y reuso. En los replicados de la oxidación del paracetamol se utilizó la misma I-DZ que es a su vez la misma que la utilizada para la oxidación de TMB y de tioanisol.

Otro aspecto importante del uso del paracetamol como sustrato fue la posibilidad de ensayar una reacción catalizada por I-DZ donde el sustrato no quede adsorbido al soporte como en el caso del tioanisol, lo cual fue controlado incubando I-DZ y el sustrato por 24 horas observando que la concentración en el sobrenadante se mantuvo constante (Ver cromatogramas en Capítulo 8: Anexo, Figuras 10.101 - 10.103).

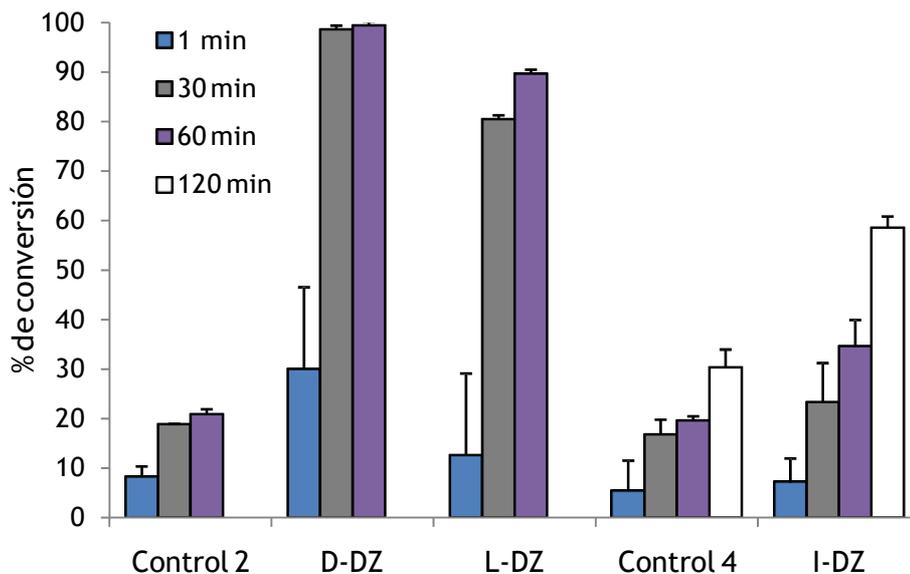


Figura 7.10 Porcentaje de conversión a productos de oxidación del paracetamol utilizando como catalizador las formas D y L de la DNAzima peroxidasa y la DNAzima peroxidasa inmovilizada. El Control 2 corresponde a la oxidación catalizada por la hemina y el control 4 corresponde a la oxidación catalizada por la hemina en presencia de soporte sin derivatizar.

Oxidación de ácido indol acético (IAA)

Teniendo en cuenta la capacidad de PS2.M de oxidar indol,⁷ se quiso explorar la posibilidad de obtener productos de oxidación del IAA utilizando como catalizador D-DZ peroxidasa. Este sustrato resultó de interés ya que sus productos de oxidación resultaron ser citotóxicos y pudieron ser obtenidos utilizando la peroxidasa de rábano picante (HRP) en protocolos de terapias antitumorales de enzima/prodroga.^{11,12}

En la Figura 7.11 puede observarse la estructura química del ácido indol acético.

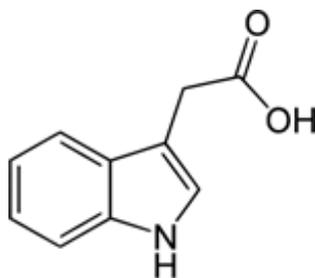


Figura 7.11 Estructura química del ácido indol acético.

En la Tabla 7.8 pueden observarse los porcentajes de conversión a productos para la oxidación del IAA utilizando hemina o D-DZ peroxidasa. Utilizando las mismas condiciones que para la oxidación de sulfuros el control de oxidación con hemina presentó porcentajes de conversión demasiado altos con sólo un minuto de iniciada la reacción. Por esta razón se ensayaron varias condiciones siendo E y F las que mejor nos permitieron distinguir el control de la reacción catalizada por la DNAzima. De todos modos las reacciones no presentaron altos porcentajes de conversión y no lograron diferenciarse de los controles de manera que amerite el uso de la DNAzima como catalizador.

	ADN (μM)	Hemina (μM)	H_2O_2 (mM)	% de conversión a productos		
				1 minuto	30 minutos	60 minutos
Control A	0	12	4	54,7	--	--
Control B	0	8	4	36,5	--	--
Control C	0	8	2,5	42,4	--	--
Control D	0	6	1	32,3	--	--
Control E	0	4	1	22,6	23,2	23,2
Reacción E	4	4	1	27,0	44,2	48,5
Control F	0	2	1	0,0	19,8	35,4
Reacción F	2	2	1	14,2	31,3	31,3

Tabla 7.8 Porcentaje de conversión a productos para la oxidación del ácido indol acético (IAA) utilizando hemina y D-DNAzima peroxidasa.

Oxidación de fenol

Considerando el trabajo de Rojas y colaboradores donde se analizó la oxidación de fenol utilizando PS2.M y HRP, ¹³ se intentó reproducir esta reacción con D-DZ para luego evaluar la posibilidad de oxidación del mismo con L e I-DZ y de utilizar fenoles sustituidos para analizar cómo pueden afectar distintos sustituyentes la velocidad de reacción y el porcentaje de conversión.

En la Tabla 7.9 se pueden observar los porcentajes de conversión obtenidos para la oxidación de fenol. Se ensayó la reacción utilizando las condiciones reportadas (Reacción A) pero no se detectó un avance de la misma. Por esta razón se probaron las condiciones utilizadas para la oxidación de sulfuros con dos concentraciones de sustrato diferentes (Reacciones B y C). En ambos casos los porcentajes de conversión a productos resultan bajos inclusive luego de 24 horas de reacción y no se diferencian de los controles realizados con hemina. Por lo tanto en este

caso, al igual que en la oxidación del IAA no se ve justificado el uso de la DNAzima como catalizador de la reacción.

	Fenol (mM)	ADN (μ M)	Hemina (μ M)	H ₂ O ₂ (mM)	% de conversión a productos			
					1 min	30 min	60 min	24 hs
Reacción A	1	4	4	10	NR	NR	NR	NR
Reacción B	1	12	12	4	14,3	20,4	18,4	26,5
Control B	1	0	12	4	0	8,2	10,2	14,3
Reacción C	2,5	12	12	4	0	10,2	15,3	17,8
Control C	2,5	0	12	4	0	4,5	13,2	22,8

Tabla 7.9 Porcentajes de conversión a productos para la oxidación de fenol catalizada por D-Dz (NR = no reacciona).

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad de D-DZ, L-DZ e I-DZ a través de la oxidación del sustrato colorimétrico TMB. Las actividades de D y L-DZ fueron equivalentes y se diferenciaron significativamente de los controles, mientras que la comparación de actividad con I-DZ se vió dificultada por una adsorción del intermediario de reacción al soporte. De todos modos demostró que conserva su actividad estando inmovilizada y que la construcción es de utilidad para un sistema donde se requiera una reacción colorimétrica localizada y estable en el tiempo.

Se logró obtener metilfenil sulfóxido a partir de tioanisol utilizando tanto L-DZ como I-DZ con actividades comparables a las de D-DZ. D y L-DZ fueron capaces de oxidar otros sulfuros más voluminosos obteniéndose porcentajes de conversión similares para ambas.

La recuperación y reuso de la DNAzima inmovilizada fue evaluada tanto en la reacción de oxidación de TMB como de tioanisol observándose en ambos casos una permanencia de la actividad con los sucesivos reusos.

Se evaluó la capacidad de la DNAzima peroxidasa de oxidar otros grupos funcionales además de los sulfuros. Mientras que la degradación del paracetamol fue posible utilizando tanto D-DZ como I-DZ, no se lograron porcentajes de conversión significativamente diferentes del control con sustratos como IAA y fenol.

La DNAzima peroxidasa fue capaz de catalizar reacciones de transferencia de oxígeno tanto en su forma D como L e inmovilizada a un soporte de poliestireno. La DNAzima inmovilizada mantuvo su actividad con los sucesivos reusos sugiriendo una posible aplicación en

síntesis orgánica. La posibilidad de aceptación de sulfuros voluminosos y paracetamol como sustratos invita a explorar el posible repertorio de compuestos a oxidar por esta DNAzima.

REFERENCIAS

- ¹ Travascio P, Li Y, Sen D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin Complex. *Chem. Biol.* 1998, 5:505-517.
- ² Xiao Y, Pavlov V, Niazov T, Dishon A, Kotler M, Willner I. Catalytic Beacons for the Detection of telomerase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126:7430-7431.
- ³ Zhang M, Li H, Deng M, Weng X, Ma H, Feng S, Zhou Y, Zhou X. Studies of the activity of peroxidase-like DNAzyme by modifying 3'- or 5'-end of aptamers. *Chem. Biodivers.* 2012, 9:170-180.
- ⁴ Tran PLT, Moriyama R, Maruyama A, Rayner B, Mergny JL. A mirror-image tetramolecular DNA quadruplex. *Chem. Commun.* 2011, 47:5437-5439.
- ⁵ Yuan L, Tian T, Chen Y, Zhang Z, Zhou X. An LDNA G-Quadruplex: Application for Peroxidase DNAzyme. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2013, 32:589-598.
- ⁶ Li B, Dua Y, Li T, Donga S. Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. *Analytica Chimica Acta* 2009, 651:234-240.
- ⁷ Poon LCH, Methot SP, Morabi-Pazooki W, Pio F, Bennet AJ, Sen D. Guanine-rich RNAs and DNAs that bind heme robustly catalyze oxygen transfer reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133:1877-1884.
- ⁸ Potter DW, Hinson JA. Mechanisms of Acetaminophen Oxidation to N-Acetyl-P-benzoquinone Imine by Horseradish Peroxidase and Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 1987, 262:966-973.
- ⁹ Tupper J, Tozer GM, Dachs GU. Use of horseradish peroxidase for gene-directed enzyme prodrug therapy with paracetamol. *Br. J. Cancer* 2004, 90:1858-1862.
- ¹⁰ Xu R, Si Y, Li F, Zhang B. Enzymatic removal of paracetamol from aqueous phase: horseradish peroxidase immobilized on nanofibrous membranes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015, 22:3838-3846.
- ¹¹ Greco O, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/ indol-3-acetic acid. *Cancer Gene Ther.* 2000, 7:1414-1420.
- ¹² Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU. Horseradish Peroxidase-mediated Gene Therapy: Choice of Prodrugs in Oxic and Anoxic Tumor Conditions. *Mol. Cancer Ther.* 2001, 1:151-160.
- ¹³ Rojas AM, Gonzalez PA, Antipov E, Klibanov AM. Specificity of a DNA-based (DNAzyme) peroxidative biocatalyst. *Biotechnol Lett.* 2007, 29:227-32.

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES FUTURAS



1 CONCLUSIONES GENERALES

El descubrimiento de las propiedades catalíticas y de reconocimiento molecular de los ácidos nucleicos y su enorme potencial como herramientas terapéuticas y diagnósticas nos ha llevado a profundizar sobre las posibles aplicaciones de los mismos mejorando en algunas ocasiones aspectos que pueden limitar su uso como ser su baja estabilidad en fluidos biológicos. Para abordar esta dificultad, se sintetizaron los diastereoisómeros ($2'R$) y ($2'S$)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos de uridina y citidina que fueron convertidos a sus respectivas fosforamidas para ser utilizados como monómeros en la síntesis de oligonucleótidos modificados. Estudios cinéticos realizados sobre la DNAzima fosfodiesterasa 8-17 revelaron que la incorporación de modificaciones químicas en el núcleo catalítico es posición dependiente. En todos los casos las modificaciones afectaron la actividad de la DNAzima siendo mejor toleradas las modificaciones de C que las de T. Las posiciones del núcleo catalítico más permisivas a alteraciones fueron la 8 y la 11 siendo las DNAzimas modificadas con mayor actividad la DZ8-17 C(R)₈ y la DZ8-17 C(S)₈-C(S)₁₁. La preferencia por uno u otro diastereoisómero dependió de la posición a modificar no observándose una relación entre la configuración del carbono 2' y la consiguiente conformación preferencial del nucleósido, con la actividad de la DNAzima. La incorporación de 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos aumentó la resistencia de la DNAzima en medios degradantes. Si bien al aumentar el número de modificaciones en el núcleo catalítico aumentó la estabilidad, el mejor compromiso entre actividad y estabilidad para las DNAzimas modificadas tanto en el núcleo catalítico como en los brazos de reconocimiento, se obtuvo para la DNAzima con una modificación en el núcleo catalítico, DZ8-17 C(R)₈ B.

Para evaluar el efecto de ($2'R$) y ($2'S$)-2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en un sistema diferente a la DNAzima 8-17 pero con el mismo fin, el silenciamiento génico, se obtuvieron oligonucleótidos de ARN modificados para construir siRNAs. A diferencia de la DNAzima 8-17 donde el proceso de silenciamiento depende solamente de la actividad y estabilidad del oligonucleótido, en el caso de los siRNA se ve involucrado un complejo proteico con el cual el

oligonucleótido debe interactuar. Por lo tanto, la introducción de modificaciones químicas en la cadena de los mismos afectará la potencia del siRNA debido a alteraciones de esta interacción. La construcción de siRNAs modificados resultó un proceso complejo donde al igual que para el caso de la DNazima 8-17 resultó difícil predecir el resultado. Sin embargo, una vez obtenidos los resultados de la potencia para cada modificación pudieron establecerse ciertas tendencias. Sabiendo que aquellos factores que benefician la selección de la cadena antisentido por el complejo RISC como ser, la estabilización de la interacción del extremo 3' con el complejo proteico, o la moderada desestabilización termodinámica del dúplex en la región *seed* de la cadena antisentido llevan a un aumento de la potencia y especificidad de la respuesta silenciadora y que alteraciones en la hibridación con la secuencia blanco traen una disminución de la potencia, se analizó cómo se reflejaban en la actividad silenciadora cambios en estas regiones. Los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos fueron capaces de provocar un aumento de la potencia y de la especificidad siendo este efecto posición dependiente. Estas modificaciones han tenido un efecto estabilizante de las regiones 3'-*overhang* aumentando la potencia de los siRNA al estar ubicadas en la cadena antisentido, mientras que han producido una disminución de la misma al estar ubicados en la cadena sentido. En esta región la presencia de uno u otro diastereoisómero no es discriminada. En la región *seed*, si comparamos los siRNAs modificados en la posición 5 con los modificados en la posición 2, podemos decir que en los primeros se observa una mayor potencia y especificidad, importante a la hora de evaluar el efecto global provocado por esta estrategia de silenciamiento que busca además de maximizar la potencia, minimizar los efectos secundarios. Casos en donde las modificaciones provocaron una marcada disminución de la potencia pero un marcado aumento de la especificidad podrían deberse al aumento por un lado de la selección de la cadena antisentido por RISC debido a una desestabilización del dúplex, acompañado de inconvenientes en la hibridación con el *target*. Pudo observarse una relación entre los valores de T_m y la especificidad. En las cadenas antisentido modificadas en las posiciones 5 y 6 se observó un aumento de la especificidad acompañado de mayores ΔT_m o mayor desestabilización termodinámica del dúplex, mientras que para las cadenas modificadas en la posición 2, los valores de especificidad fueron iguales o menores que el dúplex no modificado coincidiendo con valores similares de T_m .

Para ampliar nuestros conocimientos sobre los efectos de los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos en la formación de estructuras doble cadena, se obtuvieron oligonucleótidos de ADN complementarios y se evaluaron los cambios provocados por la presencia de estas modificaciones sobre la estabilidad termodinámica del dúplex de ADN. Los efectos fueron desfavorables causando una caída de la temperatura de fusión y no se observaron diferencias según el tipo de diastereoisómero empleado, coincidiendo con los resultados obtenidos para la DNazima 8-17 y los siRNA modificados. Con el fin de explorar el efecto de estos análogos en otro

tipo de estructura, se obtuvieron oligonucleótidos modificados cuya secuencia corresponde a un fragmento del telómero de los vertebrados y cuya estructura secundaria predominante en medio ácido, es el i-motif. En este caso, se produjo un efecto estabilizante en mayor o menor medida dependiendo de la posición donde se introdujo la modificación. El i-motif más estable resultó ser el doble modificado pudiéndose formar incluso a pH neutro y en condiciones similares a las fisiológicas. Probablemente esta propiedad estabilizante de la (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina radique en su desplazamiento hacia la conformación C3'-endo y en su sustituyente no polar en el C2'.

Con el fin de explorar el uso de los oligonucleótidos funcionales como catalizadores en la síntesis de compuestos orgánicos se empleó a la DNAzima peroxidasa para la obtención de sulfóxidos a partir de sulfuros obteniéndose rendimientos comparables a las enzimas proteicas tanto con la DNAzima sin modificar como con la DNAzima enteramente modificada con L-nucleótidos. Se inmovilizó exitosamente el oligonucleótido manteniendo éste su capacidad de reconocer a la hemina y observándose una permanencia de la actividad con los sucesivos reusos.

Se evaluó la capacidad de la DNAzima peroxidasa de oxidar otros grupos funcionales además de los sulfuros siendo posible la degradación del paracetamol.

PROYECCIONES FUTURAS

Con respecto a la obtención de los 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos, sería interesante llevar a cabo la síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metiladenosina y 2'-desoxi-2'-C-metilguanosina para poder ampliar el número de posiciones modificables del núcleo catalítico de la DNAzima generando así nuevas combinaciones. En este trabajo se logró obtener DNAzimas con hasta dos modificaciones en el núcleo catalítico con apropiada actividad, pudiendo evaluarse a futuro posibles combinaciones para la síntesis de una triple modificada.

Sería de interés para nuestro grupo evaluar las DNAzimas con la mejor relación entre actividad y estabilidad obtenidas para los ensayos de hidrólisis con sustratos cortos, en cultivos celulares. Las DNAzimas ya sintetizadas podrían evaluarse en cultivos que sobre-expresen STAT3 o podrían sintetizarse nuevas DNAzimas con diferente secuencia en sus brazos de reconocimiento para ampliar el análisis a otros targets, como por ejemplo ARN virales en cultivos celulares infectados.

En cuanto a los resultados obtenidos para los siRNA modificados sería interesante continuar evaluando la especificidad de todos los dúplex y en el caso de contar con los nucleósidos modificados de adenosina y guanosina estudiar los efectos causados al modificar estas posiciones. Por otro lado también se podría combinar en el mismo dúplex las modificaciones ya estudiadas con otras comerciales que también han dado buenos resultados.

Capítulo 8: Conclusiones generales y proyecciones futuras.

Debido a los resultados alentadores obtenidos en la estabilización de i-motif por la (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina sería interesante incluir más posiciones modificadas realizando un estudio más exhaustivo.

La posibilidad de aceptación de sulfuros voluminosos y paracetamol como sustratos por la DNAzima peroxidasa invita a explorar el posible repertorio de compuestos a oxidar por esta DNAzima y la posibilidad de inmovilización de la misma nos lleva a pensar en otros posibles soportes que se adapten mejor a las condiciones y medios de reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS



9 . 1 M A T E R I A L E S

9 . 1 . 1 Re a c t i v o s y s o l v e n t e s

Síntesis de 2-desoxi-2'-C-metilnucleósidos (Capítulo 2)

- 1,2,4-Triazol (Sigma Aldrich)
- 1,3-Dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (ChemGenes)
- 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octano (Fluka)
- 2-Nitrobenzaloxima (SigmaAldrich)
- 4-Dimetilaminopiridina (Fluka)
- 4-Nitrofenol (Riedel de Haën)
- 7-Metilguanosina (Promega)
- Acetato de etilo (Sintorgan)
- Acetonitrilo (Sintorgan)
- Agua desionizada
- Amoníaco (J.T. Baker)
- Anhídrido acético (Sintorgan)
- Benzofenona (Riedel-de Haën)
- Bicarbonato de sodio (Anedra)
- Bromuro de metiltrifenilfosfonio (Sigma Aldrich)
- Cloroformo (Sintorgan)
- Cloroformo deuterado (Sigma Aldrich)
- Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (Sigma Aldrich)
- Cloruro de amonio (Merck)
- Cloruro de benzoílo (Sigma Aldrich)
- Cloruro de *p*-toluensulfonilo (Sigma Aldrich)

Capítulo 9: Materiales y métodos.

Cloruro de sodio (Anedra)
Diclorometano (Sintorgan)
Dioxano (Sintorgan)
Dowex 50WX4-400 (Sigma Aldrich)
Etanol absoluto (Sintorgan)
Fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF (Sigma Aldrich)
Hidrógeno (Linde)
Hidróxido de sodio (Anedra)
Hidruro de calcio (Sigma Aldrich)
Metanol (Sintorgan)
N,N-diisopropiletilamina (Sigma Aldrich)
n-Butil litio 2 M en ciclohexano (Sigma Aldrich)
Nitrógeno (Linde)
Oxicloruro de fósforo (Sigma Aldrich)
Paladio-carbon 10% (Sigma Aldrich)
Pentóxido de fósforo (Merck-Anedra)
Piridina (Sintorgan)
Placas de sílica gel 60F254 aluminio (Merck)
Sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) (Merck)
Sodio (Sigma Aldrich)
Sulfato de sodio anhidro (Anedra)
Tetrahidrofurano (Sintorgan)
Tetrametilguanidina (Sigma Aldrich)
Tolueno (Sintorgan)
Trietilamina (Sintorgan)
Trióxido de cromo (Sigma Aldrich)
Uridina (Sigma Aldrich)
 β -cianoetoxi-*N,N*-diisopropilaminoclorofosfina (ChemGenes)

Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)

2,6-Lutidina (Sigma Aldrich)
5-Etiltiotetrazol (ChemGenes)
Acetonitrilo anhidro (J. T. Baker-Tedia)
Ácido *p*-toluensulfónico (Sigma Aldrich)
Ácido tricloroacético (Sigma Aldrich)

Capítulo 9: Materiales y métodos.

Ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich)
Amoníaco (c) (Merck - J. T. Baker - Anedra)
Agua desionizada
Anhídrido acético (Sintorgan)
Argón (Linde)
Bicarbonato de amonio (Sigma Aldrich)
Buffer de Quenching Glen-Pak (GlenResearch)
Cartucho de purificación de ADN Glen-Pak (GlenResearch)
Cartucho de purificación ARN Glen-Pak (Glen Research)
Cloruro de Sodio (Sigma Aldrich)
Columnas Sephadex G-25 ilustra NAP-10 (GE Healthcare)
Diclorometano (Merck)
CPG (*Controlled pore glass*) (ChemGenes)
Etanol (Sigma Aldrich)
Fase sólida de poliestireno (ChemGenes)
Fosforamiditas (2'-O-metil) (ChemGenes)
Fosforamiditas (ADN) (ChemGenes)
Fosforamiditas (ARN) (ChemGenes)
N-metilimidazol (Sigma Aldrich)
N-metilpirrolidona (Sigma Aldrich)
Piridina (Merck)
Reactivo de Beaucage (ChemGenes)
Tetrahidrofurano (Merck)
Trietilamina-TRIS hidrofúorhídrico (Sigma Aldrich)
Yodo (Sigma Aldrich)

Estudios de actividad y estabilidad de DNAsimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)

[γ -³²P] Adenosina trifosfato (Perkin Elmer)
Ácido acético (J. T. Baker - Sintorgan)
Acido Bórico (Sigma Aldrich)
Ácido clorhídrico (c) (Sintorgan)
Acrilamida (Invitrogen)
Alcohol isoamílico (Cicarelli)
Azul de bromofenol (Sigma Aldrich)
Cloruro de magnesio (Anedra)

Capítulo 9: Materiales y métodos.

DNAzima 8-17 (5' ATGAAACATGTCAGCGACTCGAAAACGTGGC 3') (Sigma Aldrich)

EDTA (Anedra)

Endonucleasa RQ1 (Promega)

Formamida (Sintorgan)

Glicerol (Sintorgan)

Lisado de células T47D

N,N'-metilenbisacrilamida (Invitrogen)

Persulfato de amonio (Sigma Aldrich)

Sustrato corto stat3 ARN (5' GCCACGTTGGTGTTCAT 3') (Sigma Aldrich)

Sustrato cortostat3 Quimera (5' GCCACGTTGrGTGTTCAT 3') (Integrated DNA Technologies)

T4 polinucleótido quinasa 10 U/μl (Invitrogen)

TRIS (Invitrogen)

Ultra-0.5 Centrifugal Filter 3K (Amicon)

Urea (Invitrogen)

Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)

Agua destilada, libre de RNAsas (Gibco)

Buffer fosfato salino (PBS) (Gibco)

Cloruro de magnesio (Sigma Aldrich)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco)

Ensayo reporter dual de la luciferasa (kit): Reactivo ensayo luciferasa, Buffer ensayo luciferasa,

Buffer Stop & Glo 50X, Reactivo Stop & Glo, Buffer de lisis pasiva 5X (Promega)

HEPES (Sigma Aldrich)

Hidróxido de potasio (Sigma Aldrich)

Línea celular HeLa (ATCC)

Lipofectamina 2000 (Invitrogen)

Opti-MEM (Gibco)

Plásmido psiCHECK2 (Promega)

Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco)

Tripsina-EDTA 0,25%, Rojo de fenol (Gibco)

Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)

Acetato de sodio (Sigma Aldrich)

Capítulo 9: Materiales y métodos.

Ácido acético (Sigma Aldrich)

Agua destilada

Agua deuterada (Sigma Aldrich)

Cloruro de potasio (Sigma Aldrich)

Cloruro de sodio (Sigma Aldrich)

Fosfato de sodio dibásico (Sigma Aldrich)

Fosfato de sodio monobásico (Sigma Aldrich)

Exploración del uso de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 7)

3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma Aldrich)

Ácido sulfúrico (c) (Anedra)

Bisulfito de sodio (J.T.Baker)

Citrato de sodio (Anedra)

D-DNAzima Peroxidasa (5' GGGTAGGGCGGGTTGGG 3') (Integrated DNA Technologies)

Dibencil sulfona (Sigma Aldrich)

Dibencil sulfóxido (Sigma Aldrich)

Dibencil sulfuro (Sigma Aldrich)

Dibenzotiofeno (Sigma Aldrich)

Dibenzotiofenosulfona (Sigma Aldrich)

Difenil sulfona (Sigma Aldrich)

Difenil sulfóxido (Sigma Aldrich)

Difenil sulfuro (Sigma Aldrich)

Dimetilsulfóxido (Sintorgan)

Fenol (Invitrogen)

Fosfato disódico (Anedra)

Fosfato monosódico (Anedra)

Hemina (Sigma Aldrich)

HEPES (Sigma Aldrich)

L-DNAzima Peroxidasa (5' GGGTAGGGCGGGTTGGG 3') (ChemGenes)

Metil fenil sulfona (Sigma Aldrich)

Metil fenil sulfóxido (Sigma Aldrich)

Peróxido de hidrógeno 30% (w/w) (Sigma Aldrich)

Tioanisol (Sigma Aldrich)

Tritón (Invitrogen)

9.1.2 Buffers y soluciones

Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)

Soluciones para el sintetizador:

Solución de activante: 0,25 M etiltiotetrazol en acetonitrilo anhidro.

Solución de fosforamiditas: 0,1 M fosforamidita en acetonitrilo anhidro.

Solución para Destritilación: 3 % tricloroacético en diclorometano

Solución capping A: THF/lutidina/anhidrido acético (8:1:1).

Solución capping B: 16% N-metilimidazol en THF.

Solución oxidante: 0,02 M Iodo en THF/piridina/agua (70:20:10).

Solución sulfurizante: 0,05 M reactivo de Beaucage en acetonitrilo.

RP-HPLC de oligonucleótidos:

TEAA 10 X

Acetato de trietilamonio 1M pH 7

Estudios de actividad y estabilidad de DNazimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)

Electroforesis en geles de poliacrilamida:

TBE 5 X

Tris-HCl pH 8.3 445 mM

Ácido bórico 44 mM

EDTA 10 mM

Buffer de siembra

TBE 1 X

Urea 7 M

EDTA 17 mM

Azul de bromofenol 0.1%

Formamida 50%

Glicerol 4,2 %

Reacción de marcación de oligonucleótidos con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP:

T4 Polinucleótido Kinasa Invitrogen

T4 Polinucleótido Kinasa 10 U/ μl

TRIS-HCl (pH 7,6) 50 mM

KCl 25 mM

DTT 5 mM

ATP 0,1 μM

BSA 0.2 mg/ml

Glicerol 50 % (v/v)

5X Forward reaction buffer Invitrogen

Tris-HCl 350 mM pH 7,6

MgCl₂ 50 mM

KCl 500 mM

2-Mercaptoetanol 5 mM

Reacciones de hidrólisis catalizadas por DNazima 8-17:

Buffer de reacción

TRIS-HCl 50 mM pH 7

Solución stop (Buffer de siembra)

TBE 1 x

Urea 7 M

EDTA 17 mM

Azul de bromofenol 0.1%

Formamida 50%

Glicerol 4,2 %

Ensayos de estabilidad para DNazimas 8-17:

Endonucleasa RQ1

RQ1 1 U/ μl

HEPES (pH 7,5) 10 mM

Capítulo 9: Materiales y métodos.

Glicerol 50 % (v/v)

CaCl₂ 10 mM

MgCl₂ 10 mM

Buffer RQ1 10X

TRIS-HCl (pH 8) 400 mM

MgSO₄ 100 mM

CaCl₂ 10 mM

Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)

Buffer HEPES 10X

HEPES 300 mM (pH 7,4)

KOH 1M

MgCl₂ 20 mM

Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)

Buffer para curvas de fusión de dúplex de ADN

Fosfato de sodio 10 mM pH 7

NaCl 150 mM

Buffer 50X para curvas de fusión y dicroísmo circular de secuencias formadoras de i-motif

Acetato de sodio 1M pH 5

Exploración del uso de la DNazima peroxidasa (Capítulo 7)

Buffer de incubación

HEPES-NH₄ 25 mM pH 8

NaCl 200 mM

KCl 20 mM

Buffer C-P para solución de trabajo

Citrato de sodio 0,1 M (pH 4,5)

Capítulo 9: Materiales y métodos.

Na₂HPO₄ 0,2 M

KCl 20 mM

Agua

Solución de trabajo para reacción colorimétrica

TMB 0,2 mM

H₂O₂ 1 mM

Buffer C-P

9 . 1 . 3 E q u i p a m i e n t o

Agitador orbital TT400 (Ferca)

Balanza analítica (Adventurer)

Bombas de vacío (Pascal)

Calentador de bloque seco (Thermo)

Cámara de Neubauer (Celeromics)

Campanas de extracción (Industrias Jones)

Contador de centelleo líquido (Pharmacia Biotech)

Contador Geiger (Ludlum measurements inc.)

Espectrómetro de masa Applied Biosystems 4800 Plus MS Sciex MALDI/TOF/TOF (Applied Biosystems)

Espectrómetro de masa LCQ Advantage MAX - Electrospray (Thermo Finnigan)

Espectrofotómetro UV-VIS JASCO V-650 (JASCO)

Espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)

Espectrómetro de RMN Bruker Advance 500 (Bruker)

Espectrómetro de RMN Bruker Advance 600 (Bruker)

Espectropolarímetro de dicroísmo circular JASCO J-815V (JASCO)

Flujo Laminar (Thermo)

HPLC 321 Pump. Detector UV/VIS 152 (Gilson)

HPLC Columna Apollo C18 (5 µm 150 x 4,6 mm) (Alltech)

Incubadora de CO₂ con calor directo (Thermo)

Liofilizador (Labconco)

Luminómetro Glomax-Multi (Promega)

Microcentrifuga (Dragonlab)

Micropipetas automáticas (Gilson)

Microscopio óptico (Motic)

Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD)

Fuente Power Pack Basic (BIO-RAD)

Nano drop 1000 UV/VIS (Thermo Scientific)

pH-metro (Hanna Instruments)

Phosphorimager -Storm (Applied Biosystem)

Rotavap (Büchi)

Secador de geles Modelo SE540 (Hoefer Scientific instruments)

Sintetizador de Oligonucleótidos MerMade 6 (Bioautomation)

Sintetizador de oligonucleótidos Applied Biosystems 3400 (Applied Biosystems)

Sonicador (Testlab)

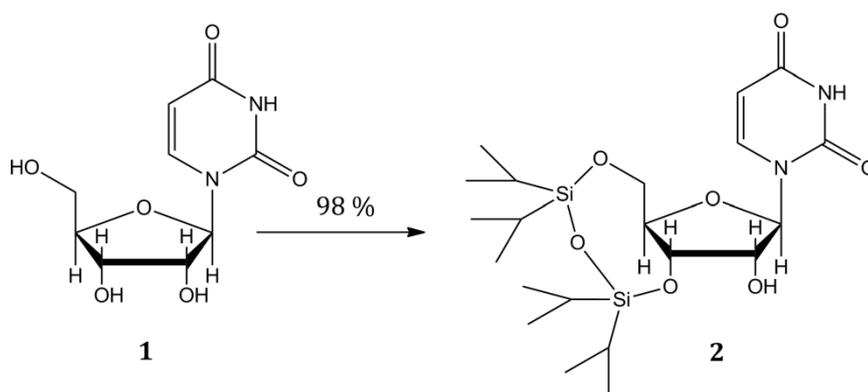
Speed-vac. RCT 60 (Jouan)

Vortex (Arcano)

9 . 2 MÉT O DOS

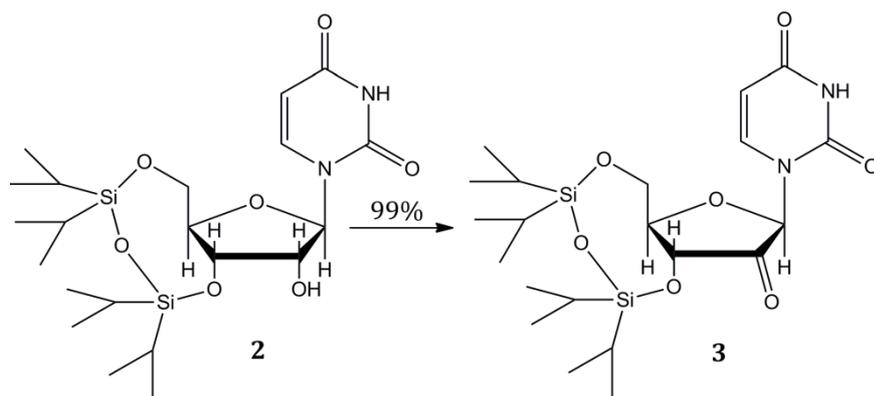
9.2.1 Síntesis de 2-desoxi-2'-C-metilnucleósidos (Capítulo 2)

Síntesis de 3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (2).



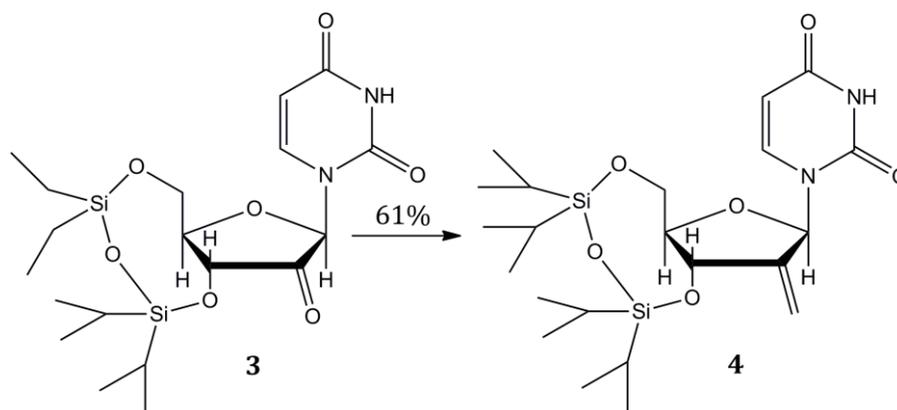
REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Uridina	6 g ; 24,3 mmol	A una solución de uridina (1) seca en piridina anhidra bajo atmósfera de nitrógeno, agitación magnética y enfriada 0 °C en baño de hielo, se le gotea una solución de 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (TIPDSCl ₂) en diclorometano seco. Al finalizar el goteo, se retira el baño de hielo, y se deja que la mezcla alcance temperatura ambiente.
Piridina	60 ml	
TIPDSCl ₂	8,4 ml ; 25.3 mmol	
Diclorometano	6 ml	
Metanol	3,6 ml	
Acetato de etilo	180 ml	
Bicarbonato de sodio 5% P/V	240 ml	
<p>A partir de las 3 horas se comienza a controlar el avance de la reacción por TLC. Una vez completa, se detiene por el agregado de metanol. Se evapora el solvente al vacío, y el residuo se disuelve en acetato de etilo. Se realizan dos lavados con una solución de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se evapora el solvente al vacío obteniéndose el producto (2) Rendimiento: 98% Mr 1 = 244,2; Mr 2 = 486,7; Rf 2 = 0,6 hexano/acetato de etilo 1:2</p>		
¹³ C-RMN		
<p>Compuesto 2 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 12.65, 13.10, 13.16, 13.56 (CH isopropilos); 16.97, 17.10, 17.13, 17.21, 17.41, 17.47, 17.55, 17.64 (CH₃ isopropilos); 60.31 (C5'); 68.87 (C3'); 75.31 (C2'); 82.06 (C4'); 91.19 (C1'); 102.20 (C5); 140.10 (C6); 150.55 (C2); 163.91 (C4).</p>		
¹ H-RMN		
<p>Compuesto 2 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 1.01-1.12 (m, 28H, isopropilos); 4.02 (dd, 1H, J_{5'-5''}=13.3 Hz, J_{4'-5''}=2.2 Hz, H5''); 4.18-4.25 (m, 3H, H2', H4', H5'); 4.30-4.34 (m, 1H, H3'), 5.72 (d, 1H, J₅₋₆=8.4 Hz, H5); 5.76 (s, 1H, H1'); 7.80 (d, 1H, J₅₋₆=8.4 Hz, H6); 9.98 (s, 1H, NH).</p>		

Síntesis de 2'-ceto-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (3).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 2	5,7 g; 11,7 mmol	<p>En una suspensión de trióxido de cromo en diclorometano seco, se gotea bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética una solución de piridina anhidra y anhídrido acético destilado. Luego de 15 minutos, se enfría a en baño de hielo y se agrega el compuesto 2 disuelto en diclorometano seco. Se deja reaccionar a temperatura ambiente.</p> <p>A partir de las 2 horas se controla el avance de la reacción por TLC revelando con calentamiento. Una vez completa la reacción, se vuelca la mezcla sobre acetato de etilo frío y se realiza una percolación en sílica gel. El filtrado se concentra al vacío.</p> <p>Se realiza una purificación por columna de sílica gel utilizando como fase móvil una mezcla hexano/acetato de etilo 2:1. Rendimiento: 99%</p> <p>Mr 3 = 484,7; Rf 3 = 0,7 hexano/acetato de etilo 1:2</p>
Trióxido de cromo	3,7 g; 36,3 mmol	
Piridina	6,3 ml	
Anhídrido acético	3,7 ml	
Diclorometano p/CrO ₃	125,4 ml	
Diclorometano p/2	38,5 ml	
Acetato de etilo	1140 ml	
¹³ C-RMN		
<p>Compuesto 3 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ,ppm) 12.57, 12.76, 13.27, 13.64 (CH isopropilos); 16.99, 17.03, 17.07, 17.09, 17.41, 17.45, 17.49, 17.61 (CH₃ isopropilos), 62.60 (C5'); 72.09 (C3'); 79.89 (C2'); 85.76 (C4'); 103.45 (C1'); 143.91 (C5); 149,46 (C6); 163.02 (C2); 204.93 (C4).</p>		
¹ H-RMN		
<p>Compuesto 3 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ,ppm) 1.01-1.18 (m, 28H, isopropilos); 3.96 (m, 1H, H4'); 4.15 (m, 2H, H5', H5''); 5.02 (s, 1H, H1'); 5.07 (d, 1H, J_{3'-4'}=9Hz, H3'); 5.78 (d, 1H, J₅₋₆=8Hz, H5); 7.18 (d, 1H, J₅₋₆=8 Hz, H6); 8.75 (sa, 1H, NH).</p>		

Síntesis de 2'-desoxi-2'-metiliden-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3- diil)uridina (4).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 3	5,6 g ; 11,6 mmol	<p>A una suspensión de bromuro de trifenilmetilfosfonio en THF bajo atmósfera de nitrógeno, agitación magnética y enfriada en baño de hielo, se le gotea el butilitio. La mezcla toma una coloración naranja-rojiza propia del iluro. Se deja reaccionar una hora a temperatura ambiente.</p> <p>Se agrega el compuesto 3 disuelto en THF al iluro y se deja reaccionar por 2 horas. Se controla el avance de la reacción por TLC. Al finalizar se agrega una solución de cloruro de amonio. Se extrae el compuesto con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua, se seca con sulfato de sodio, se filtra y se evapora el solvente al vacío.</p> <p>Se purifica por una columna de sílica gel usando como fase móvil inicial hexano/acetato de etilo 7:3, y luego aumentando la polaridad a 1:1. Rendimiento: 61%</p> <p>Mr 4 = 482,7; Rf 4 = 0,7 hexano/acetato de etilo 1:1</p>
Bromuro de trifenilmetilfosfonio	12,5 g ; 34,3 mmol	
<i>n</i> -butillitio 2M en ciclohexano	14,5 ml	
Tetrahidrofurano p/iluro	86,8 ml	
Tetrahidrofurano p/3	81,8 ml	
Cloruro de amonio 1M	97,5 ml	

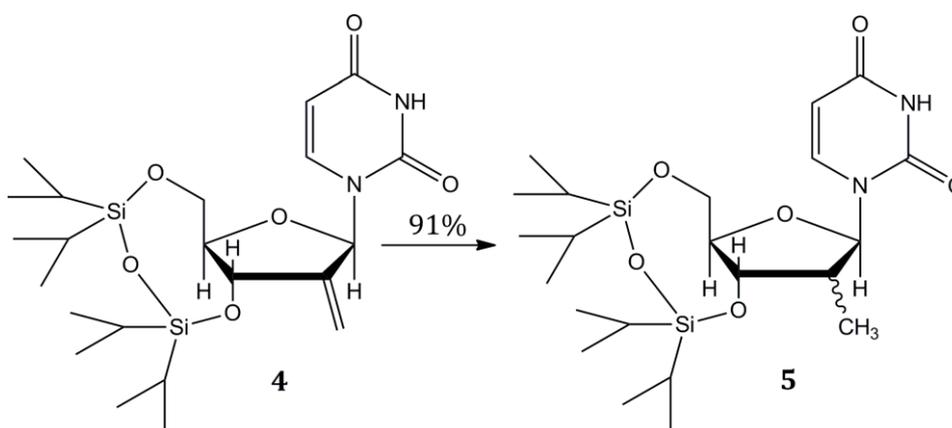
¹³C-RMN

Compuesto 4 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 12.20, 12.51, 12.66, 13.23 (CH isopropilos); 16.53, 16.64, 16.69, 16.97, 17.03, 17.11 (CH₃ isopropilos); 60.20 (C5'); 69.59 (C3'); 82.68 (C4'); 83.56 (C1'); 102.37 (C5); 111.69 (CH₂ 2'); 139.45 (C6); 146.40 (C2'); 150.57 (C2); 163.63 (C4).

¹H-RMN

Compuesto 4 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.97-1.02 (m, 28H, isopropilos); 3.61 (ddd, 1H, J_{3'-4'} = 8.8 Hz, J_{4'-5'/5''} = 2.3 Hz, H4'); 3.93-4.10 (m, 2H, H5', H5''); 4.74 (dd, 1H, J_{3'-4'} = 8.8 Hz, J_{3'-6'} = 1.5 Hz, H3'); 5.36 (d, 1H, J_{6'-6''} = 3.0 Hz, H6'' CH₂); 5.47 (dd, 1H, J_{3'-6'} = 1.5 Hz, J_{6'-6''} = 3.0 Hz, H6' CH₂); 5.64 (d, 1H, J₅₋₆ = 8.2 Hz, H6); 10.38 (sa, 1H, NH).

Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (Mezcla 5).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 4	3,4 g ; 7 mmol	Se disuelve la muestra en acetato de etilo, se agrega el paladio, se coloca la muestra en un hidrogenador y se deja reaccionando overnight. Luego se realiza una percolación en sílica para quitar el catalizador y se evapora el solvente al vacío. Rendimiento: 91% Mr 5 = 484,7; Rf 5 = 0,85 hexano/acetato de etilo 1:1; 0,45 hexano/acetato de etilo 2:1
Acetato de etilo	250 ml	
Paladio/Carbono 10%	972,4 mg	
Hidrógeno	50 psi	

¹³C-RMN

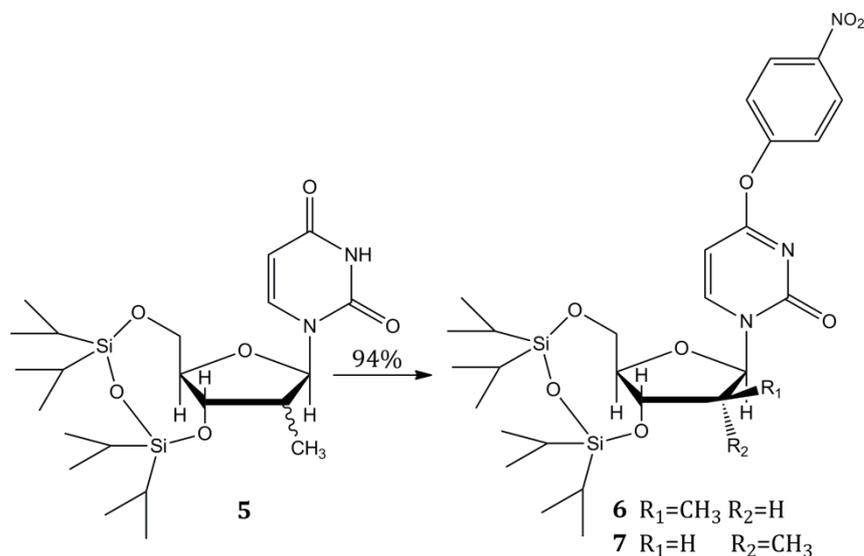
Compuesto 5 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 10.78-11.21 (CH₃); 12.46-12.49, 12.89-12.94, 13.02-13.11, 13.39-13.67 (CH isopropilos); 16.85-16.92, 16.98-17.02, 17.06-17.09, 17.17-17.27, 17.31-17.36, 17.44-17.48 (CH₃ isopropilos); 43.46-44.16 (C2'); 59.66-60.49 (C5'); 71.74-72.16 (C3'); 85.38-85.93 (C1'); 88.80-89.10 (C4'), 101.52-101.89 (C5); 139.52-140.44 (C6); 150.56-150.86 (C2); 163.94-164.22 (C4).

¹H-RMN

Compuesto 5 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.90-1.10 (m, 28H, isopropilos); 1.20 (m, 3H, CH₃); 2.10 (m, 1H, H2'), 3.76 (dd, 1H, J_{3'-4'} = 8.7 Hz, J_{4'-5'/65''} = 2.4 Hz, H4'); 3.98 (m, 1H, H5'), 4.16 (m,

1H, H5''); 4.40 (m, 1H, H3'); 5.71 (dd, 1H, $J_{5-6}=8.2$ Hz, $J=3.5$ Hz, H5); 6.26 (d, 1H, $J_{1'-2'}=8$ Hz, H1'); 7.82 (dd, 1H, $J_{5-6}=8.2$ Hz, $J=3.5$ Hz, H6); 9.00 (sa, 1H, NH).

Síntesis de 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-O⁴-*p*-nitrofeniluridina (6 y 7).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Mezcla 5	1 g ; 2,1 mmol	A la mezcla de diastereoisómeros disuelta en diclorometano se le agrega trietilamina, cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo y dimetilaminopiridina bajo atmósfera de Nitrógeno y agitación magnética. Se deja reaccionar a temperatura ambiente. A partir de la hora se controla por TLC el avance de la reacción hasta observar la desaparición de los compuestos de partida. Se agrega <i>p</i> -nitrofenol, diazobiciclooctano y trietilamina. Se deja reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Se purifican y separan los diastereoisómeros por medio de una columna de sílica gel usando como fase móvil hexano/acetato de etilo 4:1. Rendimiento: 94% Mr 6 ó 7 = 605,8; Rf 6 = 0,6 hexano/acetato de etilo 2:1; Rf 7 = 0,7 hexano/acetato de etilo 2:1
Diclorometano	7 ml	
Trietilamina	1,5 ml ; 10,8 mmol	
Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo	0,5 g ; 2,6 mmol	
Dimetilaminopiridina	95 mg ; 0,8 mmol	
Diazobiciclooctano	44 mg ; 0,4 mmol	
<i>p</i> -nitrofenol	0,8 g ; 5,6 mmol	
Bicarbonato de sodio 5% P/V	40 ml	

¹³C-RMN

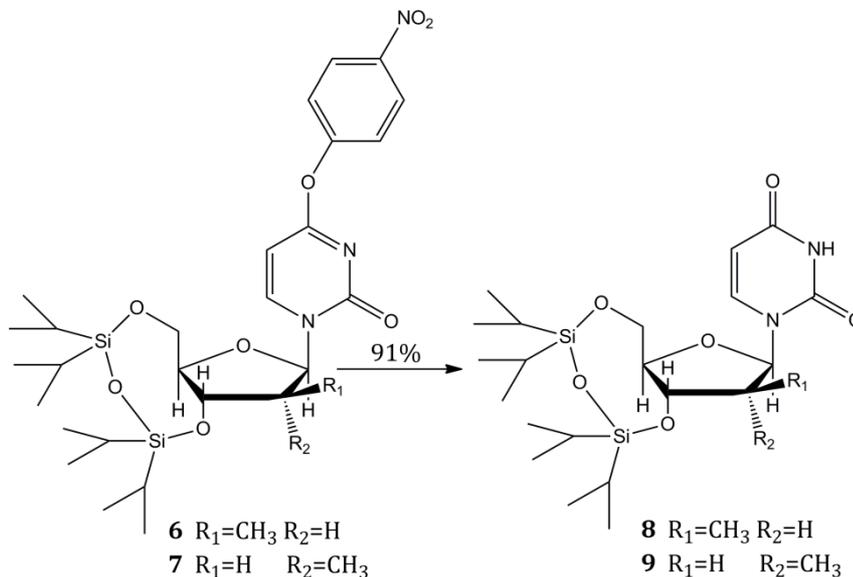
Compuesto **6** ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.38 (CH₃); 12.43, 12.85, 12.91, 13.66 (CH isopropilos); 16.83, 16.89, 16.95, 16.98, 17.22, 17.40 (CH₃ isopropilos); 44.79 (C2'); 60.39 (C5'); 72.74 (C3'); 84.83 (C4'); 87.80 (C1'); 95.25 (C5); 123.40 (C2 NO₂Ph); 125.94 (C3 NO₂Ph); 145.97 (C6); 146.27 (C1 NO₂Ph); 155.82 (C2); 156.91 (C4 NO₂Ph); 170.81 (C4).

¹H-RMN

Compuesto **6** ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.99 (d, 3H, J_{CH₃-2'} = 6.9 Hz, CH₃); 1.02-1.11 (m, 28H, isopropilos); 2.70 (m, 1H, H2'); 3.80 (m, 1H, H4'); 4.00 (m, 2H, H3', H5''); 4.19 (d, 1H, J_{5'-5''} = 13.6 Hz, H5'); 6.13 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.4 Hz, H5); 6.35 (d, 1H, J_{1'-2'} = 7.4 Hz, H1'); 7.37 (d, 2H, J₂₋₃ = 9.2 Hz, H2 NO₂Ph); 8.28 (m, 3H, H3 NO₂Ph, H6).

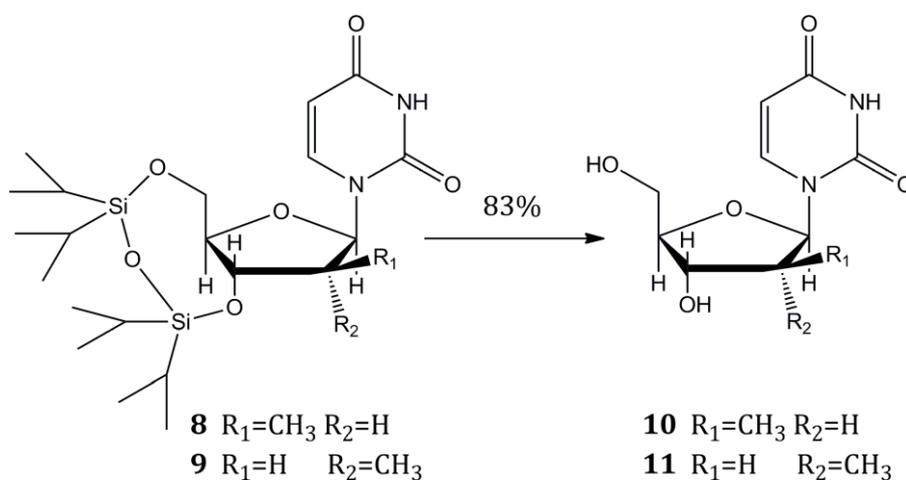
Compuesto **7** ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.95-1.10 (m, 28H, isopropilos); 1.28 (d, 3H, J_{CH₃-2'} = 7.4 Hz, CH₃); 2.41 (m, 1H, H2'); 4.00 (m, 1H, H4', H5''); 4.24 (d, 1H, J_{5'-5''} = 13.0 Hz, H5'); 4.37 (t, 1H, J_{3'-4''} = 7.4 Hz, H3'); 5.66 (s, 1H, H1'); 6.13 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.4 Hz, H5); 7.37 (d, 2H, J₂₋₃ = 9.2 Hz, H2 NO₂Ph); 8.28 (d, 2H, J₂₋₃ = 9.2 Hz, H3 NO₂Ph); 8.34 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.4 Hz, H6).

9.2.1.6 Síntesis de (2'S) y (2'R) 2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tertaisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**8** y **9**)



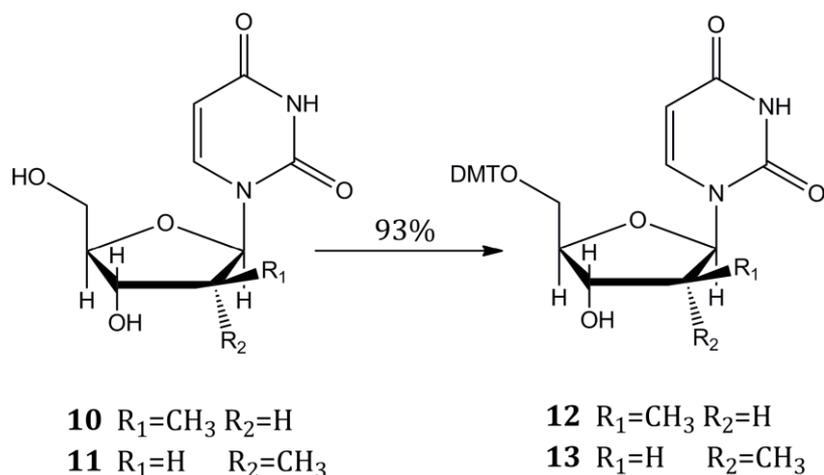
REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 6 ó 7	700 mg ; 1,2 mmol	A una solución del compuesto 6 ó 7 en acetonitrilo seco, se le agrega 2-nitrobenzaldoxima y tetrametilguanidina bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética. Se deja reaccionar a temperatura ambiente. Luego de 3 horas se controla el avance de la reacción por TLC. Una vez completa, se evapora el solvente al vacío. Se disuelve el residuo en diclorometano y se realizan 2 lavados con agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se elimina el solvente al vacío. Se realiza una purificación por columna de sílica gel usando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo 10:1. Rendimiento: 91% Mr 8 ó 9 = 484,7; Rf 8 y 9 = 0,45 hexano/acetato de etilo 2:1
Acetonitrilo	4 ml	
2-nitrobenzaldoxima	300 mg ; 1,8 mmol	
Tetrametilguanidina	145 µl ; 1,1 mmol	

Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (**10** y **11**).



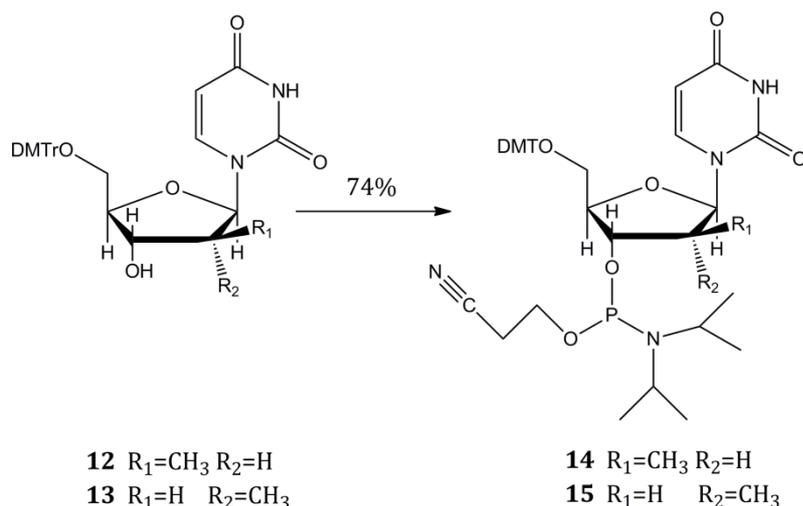
REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 8 o 9	1 g ; 2,1 mmol	<p>Al compuesto disuelto en THF anhidro, se le gotea una solución de fluoruro de tetrabutilamonio en THF bajo agitación magnética y atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se deja reaccionar por 5 minutos. Se controla por TLC. La reacción se detiene agregando una mezcla de piridina/metanol/agua 3:1:1.</p> <p>Se realiza una suspensión de la resina Dowex en la mezcla de piridina/metanol/agua 3:1:1 y se espera 5 minutos para que la resina adquiera la forma de piridonio. Luego se agrega a la mezcla de reacción y se agita suavemente por 10 minutos.</p> <p>La mezcla se filtra y el filtrado se lava con metanol. El volumen recogido de la filtración más el de los lavados con metanol se evapora al vacío hasta sequedad.</p> <p>El residuo se purifica mediante una columna de sílica gel utilizando como fase móvil diclorometano/metanol 6:1. Rendimiento: 83% Mr 10 ó 11 = 242,2; Rf 10 y 11 = 0,7 diclorometano/metanol 5:1</p>
Tetrahidrofurano	34 ml	
Fluoruro de tetrabutilamonio 1M en THF	4,5 ml, 4,4 mmol	
Dowex 500WX4-400 Py ⁺	2,8 g	
Piridina/metanol/agua 3:3:1 p/reacción	0,7 ml	
Piridina/metanol/agua 3:3:1 p/Dowex	1,3 ml	
Metanol	3 ml	
¹H-RMN		
<p>Compuesto 10 ¹H-RMN (Piridina-d₅): (δ, ppm) 0.85 (m, 3H, CH₃); 2.80 (m, 1H, H_{2'}); 3.35 (sa, 1H, OH); 3.46 (m, 1H, H_{4'}); 4.08 (d, 1H, J_{5'-5''}=12 Hz, H_{5''}); 4.21 (m, 1H, H_{5'}); 4.45 (m, 1H, H_{3'}); 5.75 (d, 1H, J₅₋₆=8.8 Hz, H₅); 6.62 (d, 1H, J_{1'-2'}= 9.6 Hz, H_{1'}); 8.52 (d, 1H, J₅₋₆=8.8 Hz, H₆).</p> <p>Compuesto 11 ¹H-RMN (Piridina-d₅): (δ, ppm) 0.85 (m, 3H, CH₃); 2.73 (m, 1H, H_{2'}); 4.15 (m, 2H, H_{5'} y H_{5''}); 4.54 (s, 1H, H_{4'}); 4.79 (d, J_{3'-2'}= 6.6 Hz 1H, H_{3'}); 5.85 (d, 1H, J₅₋₆=8.4 Hz, H₅); 6.67 (d, 1H, J₅₋₆= 8.4 Hz, H₆); 8.38 (d, 1H, J_{1'-2'}=9.6 Hz, H_{1'}); 13.36 (sa, 1H, NH).</p>		

Síntesis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (12 y 13).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 10 u 11	226 mg ; 0,9 mmol	Se disuelve al compuesto 10 u 11 bien seco junto con la dimetilaminopiridina y cloruro de dimetoxitritilo, en piridina anhidra bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética. Se agrega la trietilamina destilada. Se deja reaccionar a temperatura ambiente overnight. La reacción se detiene por el agregado de metanol y evaporación del solvente al vacío. Se disuelve el residuo en diclorometano y se lava con una solución de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se evapora el solvente al vacío. Se purifica por columna de sílica gel usando como fase móvil diclorometano/metanol/trietilamina 50:1:1. Rendimiento: 93% Mr 12 ó 13 = 544,2; Rf 12 y 13 = 0,4 diclorometano/metanol/trietilamina 50:1:1
Piridina	2,7 ml	
Trietilamina	0,3 ml ; 2,2 mmol	
Cloruro de dimetoxitritilo	0,5 g ; 1,5 mmol	
Dimetilaminopiridina	5,7 mg ; 0,05 mmol	
Bicarbonato de sodio 5% P/V	10 ml	

Síntesis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidata)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (14 y 15).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 12 ó 13	400 mg ; 0,7 mmol	A una solución del compuesto 12 ó 13 bien seco, en diclorometano anhidro, se le agrega <i>N,N</i> -diisopropiletilamina bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética. Se enfría en baño de hielo y luego se agrega β-cianoetoxi- <i>N,N</i> -diisopropilaminoclorofosfina. Se controla el avance de la reacción por TLC y se finaliza por el agregado de metanol. Se realizan dos lavados con una solución de bicarbonato de sodio y dos lavados con una solución de cloruro de sodio saturada. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se evapora el solvente al vacío. Se realiza una purificación en columna de sílica gel usando como fase móvil hexano/acetato de etilo 1:3 + 1% de trietilamina. Rendimiento: 74% Mr 14 ó 15 = 743,8; R _f 14 y 15 = 0,7 hexano/acetato de etilo 1:3 + 1% de trietilamina.
Diclorometano	3 ml	
<i>N,N</i> -diisopropiletilamina	260 μl ; 1,5 mmol	
β-cianoetoxi- <i>N,N</i> -diisopropilaminoclorofosfina	174 μl ; 0,8 mmol	
Metanol	11,4 μl	
Bicarbonato de sodio 5% P/V	20 ml	
Cloruro de sodio (ss)	20 ml	

³¹P-RMN

Compuesto **14** ³¹P-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 148.2, 150.8. (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.1)

Compuesto **15** ³¹P-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 149.4, 150.2. (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.4)

¹³C-RMN

Compuesto **14** ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.42, 11.62 (CH₃); 20.33, 20.39 (CH₂-CN fosforamidita); 24.43, 24.62 (CH₃ fosforamidita), 43.23, 43.33 (CH fosforamidita); 45.29,

45.34 (C2'); 55.21, 55.27 (OCH₃ DMT); 58.16, 58.21 (OCH₂ fosforamidita); 60,61 (C5'); 75.96, 76.09 (C3'); 83.21, 83.24 (C4'); 86.13, 86.34 (C1'); 86.99, 87.01 (C-Ar₃ DMT); 101.85 (C5); 113.17 (Ar, DMT); 117.35, 117.44 (CN fosforamidita); 127.15, 127.27, 128.37, 128.54, 130.34, 130.45, 135.07, 135.24 (Ar, DMT); 141.08, 141.11 (C6); 144.20, 144.27 (Ar, DMT); 150.58, 150.60 (C2); 158.68, 158.74 (C_{Ar}-OCH₃, DMT); 163.37 (C4). (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.2)

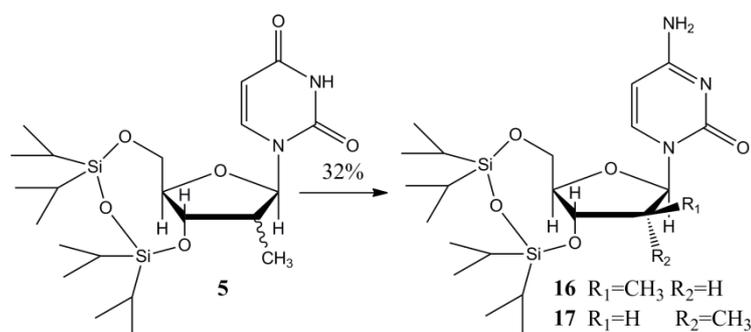
Compuesto 15 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 9.65-10.19 (CH₃); 20.33, 20.39 (CH₂-CN fosforamidita); 24.60, 24.65 (CH₃ fosforamidita), 42.88, 42.98 (CHs fosforamidita); 43.13, 43.23 (C2'); 55.21, 55.23 (OCH₃ DMT); 58.34, 58.49 (OCH₂ fosforamidita); 63.15, 63.23 (C5'); 74.92, 75.05 (C3'); 84.36-84.39 (C4'); 86.99 (C1'); 89.51, 89.82 (C-Ar₃ DMT); 102.34, 102.44 (C5); 113.22, 113.24 (Ar, DMT); 117.61, 117.63 (CN fosforamidita); 127.08, 127.11, 128.11, 128.16, 130.08, 130.12, 135.29, 135.35 (Ar, DMT); 140.09, 140.12 (C6); 144.25, 144.31 (Ar, DMT); 150.54, 150.57 (C2); 158.65, 158.69 (C_{Ar}-OCH₃, DMT); 163.03, 163.09 (C4). (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.5)

¹H-RMN

Compuesto 14 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 1.05 (d, 3H, J_{CH₃,2'} = 7 Hz, CH₃); 1.07, 1.14, 1.18, 1.29 (m, 12H, CH₃ fosforamidita), 2.61 (t, 2H, J_{CH₂-CH₂'} = 6.2 Hz, CH₂-CN); 2.77 (m, 1H, H2'); 3.43 (m, 2H, CHs fosforamidita); 3.48-3.72 (m, 2H, H5', H5''); 3.80 (s, 6H, OCH₃ DMT); 3.82 (s, 2H, CH₂O-fosforamidita) 3.96 (m, 1H, H-4'); 4.42 (m, 1H, H-3'); 5.11 (d, 1H, J_{1',2'} = 7.9 Hz, H-1'); 5.18 (d, 1H, J_{5,6} = 8.2 Hz, H5); 6.32-7.41 (m, 13H, Ar-DMT), 8.09 (d, 1H, J_{6,5} = 8.2 Hz, H-6). (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.3)

Compuesto 15 ¹H-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 1.07 (d, 3H, J_{CH₃,2'} = 7 Hz, CH₃); 1.18 (m, 12H, CH₃ fosforamidita), 2.36 (m, 2H, CH₂-CN); 2.63 (m, 1H, H2'); 3.42 (m, 2H, CHs fosforamidita); 3.54-3.63 (m, 2H, H5', H5''); 3.78 (m, 3H, OCH₃ DMT); 3.80-3.89 (m, 2H, CH₂O-fosforamidita) 4.02 (m, 1H, H-4'); 4.21 (m, 1H, H-3'); 5.38 (m, H-5); 5.97 (m, 1H, H-1'); 6.83-7.38 (m, 13H, Ar-DMT), 7.75 (m, 1H, H-6). (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.6)

9.2.1.10 Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)citidina (16 y 17).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 5	150 mg ; 0,3 mmol	Se suspende el 1,2,4-triazol en acetonitrilo bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética. Se enfría en baño de hielo y se gotea oxocloruro de fósforo. Se adiciona trietilamina y se deja reaccionar por 30 minutos. Se observará una suspensión amarillo-anaranjada. Se agrega el compuesto 5 disuelto en acetonitrilo y se deja reaccionar por dos horas a temperatura ambiente. Se controla la reacción por TLC. Rf de intermediario = 0,47 hexano/acetato de etilo 1:1. La mezcla se vuelca en una solución de bicarbonato de sodio y se extrae con diclorometano. Se rotaevapora el solvente y se disuelve en dioxano. Se agrega amoníaco acuoso y se deja reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Luego se purifica por columna de sílica utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo 1:1. Rendimiento: 32% Mr 16 ó 17 = 483,3; Rf 16 y 17 = 0,85 hexano/acetato de etilo 1:1.
1,2,4-triazol	225 mg ; 3,2 mmol	
POCl ₃	62 µl ; 0,7 mmol	
Trietilamina	420 µl ; 3 mmol	
Acetonitrilo	2 ml	
p/reactivos		
Acetonitrilo	2,25 ml	
p/Compuesto 5		
Bicarbonato de sodio 5% P/V	10 ml	
Diclorometano	10 ml	
Amoníaco	0,8 ml ; 20,1 mmol	
Dioxano	1,8 ml	

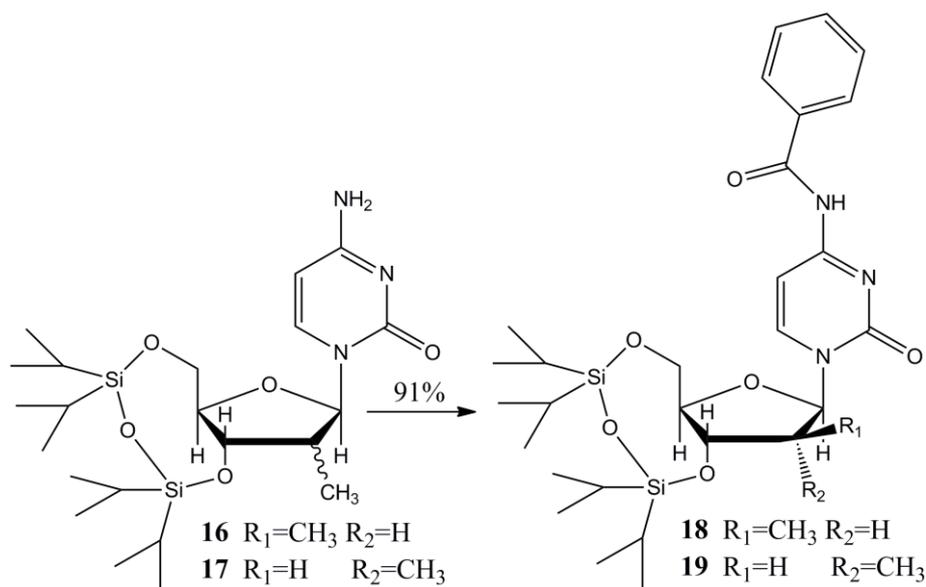
¹³C-RMN

Compuesto 16 y 17 ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.06-11.50 (CH₃); 12.49-12.52, 12.95-12.97, 13.41-13.72 (CH isopropilos); 16.91-16.95, 16.99-17.01, 17.06-17.07, 17.31-17.35, 17.43-17.47, 17.48-17.52 (CH₃ isopropilos); 43.47-44.17 (C2'); 59.83-60.32 (C5'); 67.94-72.41 (C3'); 82.40-83.92 (C4'); 86.33-91.27 (C1'), 93.64-94.09 (C5); 141.17-142.16 (C6); 155.74-155.98 (C2); 165.10-165.33 (C4).

¹H-RMN

Compuesto 16 y 17 ¹H-RMN (CDCl₃): 0.98-1.14 (m, 28H, isopropilos); 1.27 (m, 3H, CH₃); 2.68 (m, 1H, H2'), 3.78 (m, 1H, H4'); 3.95 (m, 1H, H3'), 4.02 (m, 1H, H5'); 4.19 (m, 1H, H5''); 5.74 (m, 1H, H5); 6.36 (d, 1H, J_{1'-2'} = 10 Hz, H1'); 7.94 (dd, 1H, J₅₋₆ = 7.5 Hz, J = 31 Hz, H6).

9.2.1.11 Síntesis de (2'S) y (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-N⁴-benzoilcitidina (18 y 19).



REACTIVO	CANTIDAD	PROCEDIMIENTO
Compuesto 16 y 17	50 mg ; 0,1 mmol	Se disuelven los compuestos 16 y 17 en piridina anhidra bajo atmósfera de nitrógeno. Se enfría en baño de hielo y se gotea lentamente cloruro de benzoílo. Se deja reaccionar a temperatura ambiente por dos horas. Se controla el avance de la reacción por TLC. Se evapora el solvente, se disuelve el residuo en diclorometano y se lava con una solución de bicarbonato de sodio al 5 %. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el solvente. Los productos se purifican en una columna de sílica gel utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo 1:1. Rendimiento: 91% Mr 18 ó 19 = 587,3; Rf 18 y 19 = 0,5 y 0,6 respectivamente en hexano/acetato de etilo 2:1.
Piridina	1 ml	
Cloruro de benzoílo	37 µl ; 0,3 mmol	
Bicarbonato de sodio 5% P/V	20 ml	
Diclorometano	10 ml	

¹³C-RMN

Compuesto **18** ¹³C-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.45 (CH₃), 12.49, 12.93, 13.01, 13.69 (CH isopropilos); 16.90, 16.97, 17.04, 17.06, 17.28, 17.30, 17.40, 17.48 (CH₃ isopropilos); 44.75 (C2'); 59.77 (C5'); 72.27 (C3'); 84.16 (C4'); 86.88 (C1'); 96.52 (C5); 127.69, 127.72, 128.88, 129.47, 130.59, 133.04 (Ar-benzoilo); 145.12 (C6); 155.11 (C2); 162.28 (C4), 172.6 (CO-benzoílo).

Compuesto **19** ¹³C RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 11.45 (CH₃), 12.49, 12.93, 13.01, 13.69 (CH

isopropilos); 16.90, 16.97, 17.04, 17.06, 17.28, 17.30, 17.40, 17.48 (CH₃ isopropilos); 44.75 (C2'); 59.77 (C5'); 72.27 (C3'); 84.16 (C4'); 86.88 (C1'); 96.52 (C5); 127.69, 127.72, 128.88, 129.47, 130.59, 133.04 (Ar-benzoilo); 145.12 (C6); 155.11 (C2); 162.28 (C4), 172.6 (CO-benzoilo).

¹H-RMN

Compuesto 18 ¹H RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 1.00 (d, 3H, J_{CH₃-2'} = 7.3 Hz, CH₃); 1.01-1.15 (m, 28H, isopropilos); 2.7 (m, 1H, H2'); 3.8 (m, 1H, H4'); 3.97 (m, 1H, H3'); 4.05 (dd, 1H, J_{5'-5''} = 12.3 Hz, J_{5'-4'} = 2.9 Hz, H5'); 4.17 (d, 1H, J_{5'-5''} = 12.3 Hz, H5''); 6.37 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.3 Hz, H5); 6.37 (d, 1H, J_{1'-2'} = 7.2 Hz, H1'); 7.47-7.93 (m, 4H, Ar-benzoilo); 8.24 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.7 Hz, H6).

Compuesto 19 ¹H RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.87 (d, 3H, J_{CH₃-2'} = 7.6 Hz, CH₃); 0.99-1.14 (m, 28H, isopropilos); 2.52 (m, 1H, H2'); 3.21 (m, 1H, H4'); 3.55 (m, 1H, H3'); 4.00 (d, 1H, J_{5'-5''} = 13.0 Hz, H5'); 4.22 (d, 1H, J_{5'-5''} = 13.0 Hz, H5''); 6.09 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.9 Hz, H5); 6.12 (d, 1H, J_{1'-2'} = 6.9 Hz, H1'); 7.34-7.87 (m, 4H, Ar-benzoilo); 8.04 (d, 1H, J₅₋₆ = 7.9 Hz, H6), 9.11 (s, 1H, NH).

9.2.1.12 Análisis de (2'S) y (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina (24 y 25) por ³¹P-RMN.

Se controla la integridad de las fosforamiditas de citidina por ³¹P-RMN sintetizadas en el laboratorio previo a su uso en la síntesis de oligonucleótidos modificados.

Compuesto 24 ³¹P-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 148.21, 150.69. (Capítulo 10: Anexo, Figura 10.7)

Compuesto 25 ³¹P-RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 149.84, 150.13. (Capítulo 10: Anexo Figura 10.8)

9.2.2 Síntesis de oligonucleótidos modificados (Capítulo 3)

Síntesis de DNAzimas 8-17 y DNAzima peroxidasa inmovilizada.

Se utilizan reactivos de alta pureza y solventes de bajo contenido de agua. El acetonitrilo utilizado para la disolución de los reactivos, fosforamiditas y lavados posee un contenido de agua menor o igual a 10 ppm. La pureza de las fosforamiditas se evaluó por RMN 500 MHz. Todas las soluciones utilizadas, excepto el reactivo oxidante, se prepararon en condiciones anhidras y bajo atmósfera de argón. Se probaron varias metodologías para lograr la menor humedad posible en las mismas. Para la síntesis automatizada en fase sólida, se empleó el método del fosfito triéster en un sintetizador de oligonucleótidos Mermade 6, Bioautomation.

Se utilizó un programa estándar de síntesis de oligonucleótidos de ADN, el cual se modificó para optimizar el rendimiento de síntesis de secuencias que presentan fosforamiditas

modificadas. Se agregó un paso de desprotección, un paso de bloqueo y lavados con acetonitrilo entre los pasos del ciclo. Se cambiaron dos pasos de acoplamiento por ciclo utilizando 50 µl de fosforamidita y 65 µl de ETT en cada uno, con un tiempo de reacción de 100 segundos, por 3 pasos de acoplamiento por ciclo utilizando 35 µl de fosforamidita y 45 µl de ETT en cada uno con un tiempo de reacción de 100 segundos para fosforamiditas estándar y de 120 segundos para fosforamiditas modificadas. La escalada de síntesis fue 50 nmol. Se fijó el vacío en 5 pulgadas de mercurio y las presiones de argón para amiditas y reactivos en 5,5 psi. Las columnas se rellenaron con fase sólida hasta una altura de 3 mm. Para DNAzimas 8-17 se utilizó sílice de poro controlado (CPG) estándar unida a la fosforamidita de citidina como primer monómero. Para la DNAzima peroxidasa inmovilizada se utilizó poliestireno con un linker comercial no clivable que contiene la fosforamidita de guanosina como primer monómero.

Se realizó la calibración del tiempo de apertura de válvulas para cada volumen y la calibración de los tiempos del pulso de vacío.

Para todos los protocolos de síntesis se utilizó el modo DMT-ON de modo de facilitar la posterior purificación.

Las DNAzimas 8-17 sintetizadas poseen la secuencia 5' ATG AAA CAT GTC AGC GAC TCG AAA ACG TGG C 3' donde uno o más monómeros fueron sustituidos por fosforamiditas modificadas. Para la DNAzima peroxidasa inmovilizada la secuencia es 5' GGG TAG GGC GGG TTG GG 3'.

Síntesis de secuencias de ADN para evaluar formación de dúplex e i-motif.

Para la síntesis automatizada en fase sólida de estas secuencias, se empleó el método del fosfito triéster en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Biosystems 3400.

El acetonitrilo utilizado para la disolución de fosforamiditas y lavados posee un contenido de agua menor o igual a 10 ppm. Las fosforamiditas a utilizar se autodiluyeron en el equipo y se utilizaron los reactivos comerciales de Applied Biosystems para las soluciones de destrilación, bloqueos, oxidante y activante.

Se utilizó un programa estándar de síntesis de oligonucleótidos de ADN (LV200-PO), que trabajó a una escala de 200 nmol y donde los tiempos de acoplamiento fueron de 30 segundos para las fosforamiditas estándar y de 300 segundos para las modificadas.

Se utilizaron columnas de poliestireno pre-empaquetadas que contienen anclado el primer monómero.

Se utilizó el modo DMT-ON para las secuencias que contienen 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos y el modo DMT-OFF para el resto de las secuencias.

Síntesis de secuencias de ARN para la construcción de siRNA modificados

Se utilizó el sintetizador de Applied Biosystems y los reactivos comerciales. Las fosforamiditas de ARN poseen como grupo protector en 2' el TBDMS.

Se utilizó un programa estándar de síntesis de oligonucleótidos de ARN (LV200RNA), que trabajó a una escala de 200 nmol y donde los tiempos de acoplamiento fueron de 600 segundos para todas las fosforamiditas.

Se utilizaron columnas de poliestireno pre-empaquetadas que contienen anclado el primer monómero.

Desprotección, purificación y destrilación de DNAzimas 8-17.

Una vez finalizada la síntesis, se colocó la fase sólida en un vial hermético con 1 ml de amoníaco a 55 °C durante 8 horas. El oligonucleótido de ADN, se liberó del soporte y quedó completamente desprotegido salvo por el grupo DMT en el extremo 5'. Para el oligonucleótido de la DNAzima 8-17 que quedó en solución, se filtró la muestra y el filtrado se evaporó a sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente agregando durante el proceso de evaporación gotas de trietilamina a modo de evitar un pH ácido que pueda provocar la desprotección del extremo 5'. El oligonucleótido seco se redisolvió en 995 µl de buffer TEAA 0,01 M pH 7 y 5 µl de trietilamina.

Al haber utilizado durante la síntesis el modo DMT-ON, pudimos diferenciar las secuencias de cadena completa de aquellas secuencias trucas que se originan por fallas durante el paso de acoplamiento, a través de HPLC en fase reversa, así como también pudimos ver secuencias n-1 originadas por fallas en el proceso de capping. De esta manera se pudo estimar el rendimiento del proceso de síntesis. Para esto se utilizó como fase estacionaria una columna C-18 y como fase móvil un gradiente de buffer TEAA 0,1 M pH 7 y acetonitrilo a un flujo de 1 ml/min. La detección se realizó midiendo la absorbancia a 254 nm. El gradiente utilizado se detalla en la Tabla 9.1.

PROGRAMA RP-HPLC DMT-ON	
Tiempo (min)	% Acetonitrilo
0	16
5	25
12	80
14	80
17	16
10	16

Tabla 9.1 Programa RP-HPLC DMT-ON.

El volumen de muestra se redujo a aproximadamente 60 μl usando el speed-vac. Se dividió en tres alícuotas de 20 μl y se purificó el pico correspondiente al oligonucleótido DMT-ON utilizando el programa RP-HPLC DMT-ON. Una vez purificada, se evaporó la muestra a sequedad utilizando el speed-vac.

Para remover el grupo dimetoxitritilo, se trató la muestra con 300 μl de ácido acético 80 % a temperatura ambiente por 20 min. Luego se agregó igual volumen de etanol y se evaporó en el speed-vac. Varias co-evaporaciones con agua destilada fueron necesarias para terminar de eliminar las sales volátiles presentes en la muestra que se observaron como un precipitado blanco. Finalmente se disolvió la muestra en 500 μl de agua destilada y se extrajo con éter etílico para el eliminar el DMT hidrolizado. Se evaporó a sequedad.

Desprotección, destritilación y cálculo de nmoles del oligonucleótido de la DNAzima peroxidasa.

Una vez finalizada la síntesis, se colocó la fase sólida en un vial hermético con 1 ml de amoníaco a 55 °C durante 8 horas. Se desprotegió sin ser liberado del soporte debido a la naturaleza del mismo. Se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante, se agregó agua y se repitió el proceso hasta eliminar el amoníaco, obteniéndose el oligonucleótido anclado al soporte con el grupo protector DMT en la posición 5'. Al pellet de fase sólida con el oligonucleótido inmovilizado en la etapa anterior se le agregó 375 μl de una solución de ácido tricloroacético al 3 % en diclorometano. La solución tomó un color naranja por la liberación del catión DMT. Se centrifugó, se tomó una alícuota del sobrenadante, se diluyó con ácido *p*-toluensulfónico y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 498 nm. Utilizando la ley de Lambert-Beer y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del catión DMT es 70 ml/ μmol , se calcularon los nmoles de DMT presentes en la solución que equivalen a los nmoles

de oligonucleótido. Se centrifugó la muestra, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con acetonitrilo y dos veces con agua obteniéndose el soporte con el oligonucleótido inmovilizado ya desprotegido y con su extremo 5' libre.

Desprotección, destrilación y purificación de oligonucleótidos de ADN para dúplex e i-motif.

Una vez finalizada la síntesis, se colocó la fase sólida en un vial hermético con 1 ml de amoníaco a 55 °C durante 8 horas.

Las secuencias que poseen modificaciones 2'-desoxi-2'-C-metilnucleósidos se purificaron utilizando cartuchos comerciales para la purificación de ADN. Luego de la desprotección en amoníaco se agregó a los viales 1 ml de una solución 10 mg/ml de NaCl. Se acondicionó el cartucho con 1 ml de acetonitrilo, seguido de 1 ml de Buffer TEAA 2 M. Se cargó la solución salina de oligonucleótido en el cartucho. Se eluyeron las secuencias DMT-OFF con 2 ml de una solución 100 mg/ml de NaCl con 5% de acetonitrilo. Se eliminó el grupo DMT pasando 2 ml de una solución de trifluoroacético al 2 %. Se lavó con 2 ml de agua destilada y luego se eluyó el oligonucleótido de interés con 1 ml de una mezcla de agua y acetonitrilo al 50 %.

El resto de las secuencias, que ya no poseían el DMT en el extremo 5', se purificaron por columnas pre-empaquetadas de Sephadex G-25. Para esto, luego de la desprotección con amoníaco, se filtraron y se llevaron a sequedad en speed-vac. Luego se disolvieron en 1 ml de agua destilada. Se vació la columna de Sephadex que viene cargada con un buffer de almacenamiento. Se lavó la columna tres veces con agua destilada. Se cargó la solución de oligonucleótido y se eluyó el volumen muerto para descartar. Luego se agregó 1,5 ml de agua y se eluyó el oligonucleótido.

Desprotección, destrilación y purificación de oligonucleótidos de ARN.

Una vez finalizada la síntesis, se colocó la fase sólida en un vial hermético con 1,5 ml de amoníaco y 0,5 ml de etanol a 55 °C durante una hora. El oligonucleótido de ARN, se liberó del soporte y quedó completamente desprotegido salvo por el grupo TBDMS en el hidroxilo 2' y el DMT en el extremo 5'. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se filtró para eliminar la fase sólida. Se llevó a sequedad en speed-vac.

Para eliminar el grupo TBDMS, se agregaron 115 µl de *N*-metilpirrolidona, 75 µl de TEA-TRIS hidrofúorídrico y 60 µl de TEA. Se incubaron a 55 °C por dos horas.

Luego de la desprotección se agregó 1,75 ml de Quenching buffer de Glen Pack para proceder a la purificación por cartuchos comerciales. Se acondicionó el cartucho con 2 ml de

acetonitrilo, seguido de 2 ml de Buffer TEAA 2 M. Se cargó la solución de oligonucleótido en la columna. Se eluyeron las secuencias DMT-OFF con una solución 90 % de TEAA 2 M y 10 % de acetonitrilo. Se lavó con 2 ml de agua libre de RNAsas, se eliminó el DMT con 2 ml de TFA al 2 % y se volvió a lavar con 2 ml de agua. Se eluyó el oligonucleótido con una solución 70 % de bicarbonato de amonio 1 M y 30 % de acetonitrilo.

Control de pureza e integridad de oligonucleótidos por RP-HPLC

La pureza se controló por RP-HPLC utilizando como fase estacionaria una columna de C-18 y como fase móvil un gradiente de buffer TEAA 0,1 M pH 7 y acetonitrilo a un flujo de 1 ml/min. La detección se realizó midiendo la absorbancia a 254 nm. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 9.2.

PROGRAMA RP-HPLC DMT-OFF	
Tiempo (min)	%Acetonitrilo
0	7
18	20
21	80
24	7
27	7

Tabla 9.2 Programa RP-HPLC DMT-OFF.

Las DNazimas puras se liofilizaron, se disolvieron en agua mili-Q y se midió la absorbancia a 254 nm para calcular su concentración.

Control de pureza e integridad de oligonucleótidos por espectrometría de masas.

Para corroborar la pureza e integridad de los oligonucleótidos por espectrometría de masas, se empleó un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF y las muestra se sembraron en mezcla en una solución acuosa de citrato de amonio y utilizando como matriz 2'-4'-6'-trihidroxiacetofenona (THAP). Para la adquisición de los espectros se usó el modo lineal negativo.

Estudios de actividad y estabilidad de DNazimas 8-17 modificadas (Capítulo 4)

Preparación de geles de poliacrilamida

Se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida al 20 % según la Tabla 9.3.

Reactivo	Cantidad
Urea	5,0 g
Acrilamida/bisacrilamida (29:1)	6,7 ml
Buffer TBE 5X	1,0 ml
Agua destilada	2,3 ml
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	7,0 μ l
Persulfato de amonio (PSA) 10 %	134 μ l

Tabla 9.3 Preparación de geles de poliacrilamida desnaturizantes.

Primero se mezcló la urea en la solución de acrilamida/bisacrilamida, buffer y agua. Se sonicó por unos minutos hasta observar disolución completa. Se colocó la solución en hielo. Se agregó el TEMED y luego el PSA.

Para el armado de los geles y corridas electroforéticas se utilizó el sistema Mini Protean Tetra Cell de Bio-Rad. Las pre-corridas y corridas se realizaron a un voltaje constante de 200 V durante 30 min y se utilizó como buffer de corrida TBE 1 X pH 8,3.

Reacción de marcación del sustrato de la DNAzima 8-17 con [γ ³²P] ATP en el extremo 5'.

La mezcla de reacción se preparó según la Tabla 9.4.

Reactivo	Cantidad
Oligonucleótido	5 pmol
5X Foward Reaction Buffer Invitrogen	5 μ l
T4 polinucleótido quinasa	10 unidades
[γ - ³² P]ATP	25 μ Ci
Agua estéril	Hasta 25 μ l

Tabla 9.4 Preparación de la mezcla de la reacción de marcación de la DNAzima 8-17 con [γ ³²P] ATP

Se incubó la mezcla 10 minutos a 37 °C. Luego se detuvo la reacción calentando a 65 °C por 10 minutos. Se extrajo con 100 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. El oligonucleótido marcado presente en la fase acuosa se purificó utilizando filtros para centrifuga con corte de peso molecular igual a 3000 Da. La integridad de oligonucleótido marcado se controló con un gel de poliacrilamida al 20 % en condiciones desnaturizantes y se reveló utilizando un STORM phosphorimager. Se analizaron las imágenes por Image-Quant 5.0. La actividad se determinó con un contador de centelleo líquido.

Reacciones de hidrólisis de un sustrato corto utilizando la DNAzima 8-17

Para cada DNAzima cuya actividad se quiere evaluar se preparó la mezcla de la Tabla 9.5.

Reactivo	Concentración/Cantidad
Sustrato corto STAT 3 frío	0,5 µM
Sustrato corto STAT 3 marcado	10.000 cpm
DNAzima 8-17	5 µM
Buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7	Hasta 30 µl

Tabla 9.5 Mezcla para reacción de hidrólisis de sustrato corto por la DNAzima 8-17.

Se desnaturizó la muestra a 95 °C por un minuto y luego se incubó por 10 minutos a 37 °C. Para dar inicio a la reacción, se agregó 2 µl de una solución de cloruro de magnesio cuya concentración dependió de la concentración final que se deseaba alcanzar en el medio de reacción. Se extrajeron alícuotas de 2 µl a distintos tiempos y todas ellas se mezclaron con 4 µl de buffer de siembra cuya composición detiene la reacción.

Para cada DNAzima a evaluar, las reacciones se realizaron por triplicado y se preparó un blanco en donde se reemplazó el volumen de DNAzima por agua para evaluar degradación inespecífica.

Se prepararon cuatro geles de poliacrilamida al 20 % en condiciones desnaturizantes y se utilizó uno por cada reacción y uno para el blanco. Una vez finalizada la corrida los geles se lavaron por media hora en una solución de agua/ácido acético/metanol (8:1:1) para eliminar la urea. Luego se colocaron en un secador de geles con vacío y calor por una hora. Los geles secos se incubaron en una placa sensible a ³²P *overnight* y se determinó la marca radioactiva con un STORM phosphorimager. Utilizando el Image Quant 5.0 se realizó una

cuantificación relativa de las bandas obteniendo así el porcentaje de hidrólisis para cada tiempo de reacción.

Estabilidad de las DNazimas 8-17 frente a la endonucleasa RQ1.

Para los ensayos de estabilidad de las DNazimas frente a la endonucleasa RQ1 se preparó la mezcla de reacción detallada en la Tabla 9.6.

Reactivo	Concentración/ cantidad
DNazima marcada	10.000 cpm
DNazima fría	0,5 μ M
Buffer RQ1 10X	3 μ L
Endonucleasa RQ1 (1U/ μ L)	2 U
Agua estéril	Hasta 30 μ L

Tabla 9.6 Mezcla de reacción para los ensayos de estabilidad de DNazimas 8-17 frente a la endonucleasa RQ1.

Se mezcló la DNazima fría, la marcada, el buffer y el agua y se calentó un minuto a 95 °C. Luego se incubó 15 minutos a 37 °C. Se agregó la RQ1 para dar comienzo a la reacción. Se tomaron alícuotas de 2 μ L a tiempos 0, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos y se mezclaron con 4 μ L de buffer de siembra. Luego se corrieron en un gel de poliacrilamida al 20 % en condiciones desnaturalizantes y se revelaron utilizando un STORM phosphorimager. Se analizaron las imágenes por Image-Quant 5.0 y se calculó el porcentaje de DNazima remanente a cada tiempo de reacción.

Estabilidad de las DNazimas 8-17 frente a lisado celular T47D.

Para los ensayos de estabilidad de las DNazimas frente a un lisado de células T47D se preparó la mezcla de reacción detallada en la Tabla 9.7.

Reactivo	Concentración/ cantidad
DNAzima marcada	10.000 cpm
DNAzima fría	0,5 μ M
Lisado celular T47D	15 μ l
Agua estéril	Hasta 30 μ l

Tabla 9.7 Mezcla de reacción para los ensayos de estabilidad de DNazimas 8-17 frente al lisado celular T47D.

Se mezcló la DNAzima fría, la marcada y el agua y se calentó un minuto a 95 °C. Luego se incubó 15 minutos a 37 °C. Se agregó el lisado para dar comienzo a la reacción. Se tomaron alícuotas de 2 μ L a tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 24 horas y se mezclaron con 4 μ L de buffer de siembra. Luego se corrieron en un gel de poliacrilamida al 20 % en condiciones desnaturalizantes y se reveló utilizando un STORM phosphorimager. Se analizaron las imágenes por Image-Quant 5.0 y se calculó el porcentaje de DNAzima remanente a cada tiempo de reacción.

Estudios de potencia de siRNAs modificados (Capítulo 5)

Preparación de los dúplex de siRNA.

Se utilizaron las cadenas antisentido y sentido sintetizadas y purificadas en el capítulo 3 (Sección 3.3.5). Para los dúplex empleados en ensayos en cultivos celulares, se prepararon soluciones 60 μ M para cada cadena, en agua destilada, estéril y libre de RNAsas. Para la formación del dúplex se utilizaron 8 μ L de la solución 60 μ M de la hebra antisentido y lo mismo de la hebra sentido, y 8 μ L de buffer HEPES-KOH 3X pH 7,4. Para los dúplex empleados en las curvas de fusión y determinación de temperatura de fusión (T_m), se preparó una solución de 1,2 ml con 2 μ M de cada hebra en buffer HEPES-KOH 1X pH 7,4. Se incubaron las soluciones dos minutos a 95 °C y luego se enfriaron lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente. Se conservaron congeladas hasta su uso.

Curvas de fusión y determinación de temperatura de fusión (T_m).

Las curvas de fusión para los dúplex de ARN se construyeron midiendo la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura. Las muestras se analizaron en un rango de temperatura de 25 a 85 °C, con una rampa lineal de 1 °C/min y registrando la absorbancia cada 0,5 °C, en un

espectrofotómetro JASCO V-650. Se determinó la T_m para cada dúplex por medio del análisis de las curvas utilizando el software del equipo.

Mantenimiento de la línea celular y armado de placas de 24 pocillos.

Se utilizaron cultivos en monocapa de la línea celular HeLa (ATCC) en etapa de crecimiento exponencial. Como medio de cultivo se utilizó DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado con calor (FBS). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en ambiente de atmósfera controlada de 5% de CO₂ y fueron periódicamente controlados para detectar posibles contaminaciones. El tiempo de duplicación de esta línea celular es de 24 h.

Para realizar el pasaje de células se retiró el medio de cultivo, se lavó con buffer fosfato salino (PBS) y se colocó una solución de tripsina 0,25 %. Se incubó por tres minutos a 37 °C. Se rompieron agregados y se resuspendieron las células en 8 ml de DMEM + 10% FBS. Se separaron unas gotas y se realizó conteo en cámara de Neubauer.

Se centrifugaron las células, se retiró el medio. Se agregaron al pellet tantos ml de medio como millones de células contadas de modo de tener una solución de 1 millón de células/ml. De esta solución se tomaron 0,5 ml y se colocaron en una nueva botella con 10 ml de medio para mantener la línea. Se almacenaron en estufa a 37 °C hasta un 70-90 % de confluencia y se repitió el procedimiento.

Para preparar las placas de 24 pocillos requeridas para los ensayos, se requieren 2,4 millones de células por placa, es decir, 0,1 millones de células por pocillo. Se tomaron 2,4 ml de la solución que contenía 1 millón de células/ml y se la llevó a 12 ml con medio de cultivo. Se colocó 0,5 ml en cada pocillo. Se incubó 24 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se realizó la transfección.

Sistema reporter psiCHECK2.

Para llevar a cabo los estudios de silenciamiento de los dúplex siRNA, se utilizaron dos construcciones. Para evaluar la potencia de los dúplex de siRNA por medio del cálculo de IC₅₀ y los efectos de silenciamiento ON-*target* a 1 nM y 16 pM se utilizó el plásmido psiCHECK2-AS que evalúa el efecto de interferencia cuando la cadena antisentido es correctamente seleccionada por el complejo RISC. Para evaluar los efectos de silenciamiento OFF-*target* que evalúan el efecto de interferencia producido cuando la cadena sentido es erróneamente seleccionada por el complejo RISC, se utilizó la construcción psiCHECK2-S. El mapa del vector y las secuencias insertadas pueden observarse en la Figura 9.1.

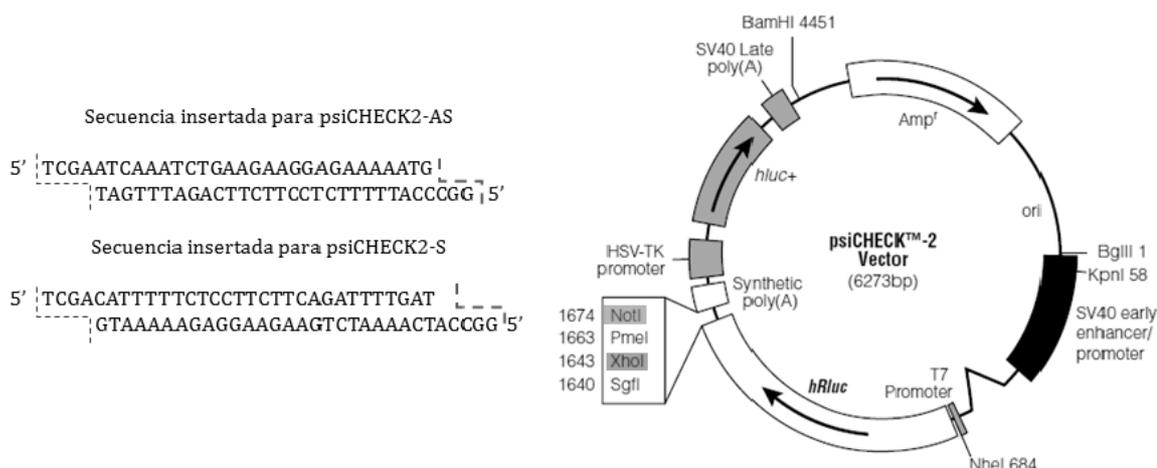


Figura 9.1 Mapa del vector psiCHECK2 y secuencias insertadas para obtener los vectores AS y S utilizando las enzimas de restricción NotI y XhoI.

Transfección de células HeLa y ensayo dual de la luciferasa.

Se utilizaron placas de 24 pocillos donde cada pocillo contenía 0,1 millones de células HeLa 24 hs antes de la transfección. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se colocaron 500 μ L DMEM + 10% FBS por pocillo. Para evaluar la potencia ON-*target* de cada dúplex se realizó la transfección con distintas concentraciones de siRNA. Se utilizaron concentraciones de 0; 0,002; 0,008; 0,016; 0,06; 0,16; 0,3 y 1 nM para el cálculo de IC₅₀ y concentraciones de 0; 0,016 y 1 nM para los estudios de comparación de silenciamiento ON/OFF-*target*. Los siRNAs se transfectaron junto con el plásmido psiCHECK2-AS utilizando lipofectamina 2000. Para los ensayos de silenciamiento OFF-*target* se utilizaron concentraciones de siRNA de 0; 0,016 y 1 nM, el plásmido psiCHECK2-S y lipofectamina 2000. Cada concentración se ensayó por triplicado. Para realizar la transfección se prepararon las soluciones detalladas en la Tabla 9.8.

Solución 1 para cada pocillo	
Concentración final de siRNA por pocillo	Cantidades
1 nM siRNA	0,6 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,3 nM siRNA	0,18 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,16 nM siRNA	0,096 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,06 nM siRNA	0,036 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,016 nM siRNA	0,0096 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,008 nM siRNA	0,0048 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0,002 nM siRNA	0,0012 pmol siRNA; 1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
0 nM siRNA ó MOCK	1 µg psiCHECK2; 50 µl Opti-MEM
Solución 2 para cada pocillo	
1,3 µl Lipofectamina 2000; 48,7 µl Opti-MEM	

Tabla 9.8 Preparación de soluciones 1 y 2 para la transfección de células HeLa con siRNA y psiCHECK2 utilizando lipofectamina 2000.

Una vez preparadas las soluciones 1 y 2 para cada pocillo, se mezclaron, se colocaron en un vortex por 10 segundos y se dejaron reposar por 10 minutos. Luego se agregó la mezcla al pocillo correspondiente. Una vez lista la placa se incubó a 37 °C por 24 horas.

Una vez pasado este tiempo, se retiró el medio y se enjuagaron los pocillos con PBS. Se agregó a cada pocillo 100 µl de buffer de lisis 1X y se colocó la placa en agitador orbital por 15 minutos en oscuridad. Luego, se tomó el volumen de cada pocillo resuspendiendo para romper agregados, y se traspasó a un microtubo rotulado en baño de hielo.

Las alícuotas se sembraron en una placa de 96 pocillos apta para el luminómetro. Las actividades de *Renilla* y *Firefly* luciferasa se midieron utilizando el ensayo reportero dual de la luciferasa (Promega) y el luminómetro Glomax-Multi (Promega). Se normalizó la actividad de *Renilla* luciferasa a la de *Firefly* luciferasa, se tomó la actividad de la transfección mock como 100% y se calcularon los porcentajes de actividades relativas para cada concentración. Los valores de LogIC₅₀ y de IC₅₀ se obtuvieron mediante una regresión no lineal de Log[siRNA] vs. respuesta normalizada utilizando el software GraphPad Prism.

Estudios de formación de dúplex e i-motif en cadenas de ADN modificadas (Capítulo 6)

Obtención de curvas de fusión para dúplex de ADN.

Se prepararon las soluciones de dúplex de ADN con 3 μM de cada cadena, en 1,5 ml de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7 y 150 mM de NaCl. Se incubaron las soluciones dos minutos a 95 °C y luego se enfriaron lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente. Se guardaron a 4 °C durante la noche para realizar las curvas de fusión al día siguiente.

Para realizar las curvas de fusión se estabilizaron las muestras a la temperatura inicial de 20 °C. Luego se midieron las variaciones de absorbancia a 260 nm en función de la temperatura en un espectrofotómetro UV-VIS JASCO V-650 equipado con una unidad de control de temperatura Pelthier. Se utilizó una rampa lineal de temperatura de 0,5 °C/min desde 20 °C hasta 80 °C. Las medidas se registraron cada 0,5 °C. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Una vez obtenidas las curvas se utilizó el software del equipo para el cálculo de las temperaturas de fusión de cada dúplex.

Obtención de curvas de fusión, espectros de dicroísmo circular y curvas de titulación para secuencias formadoras de i-motif.

La preparación de las muestras se llevó a cabo utilizando una concentración de oligonucleótido de 1,3 μM en 1,5 ml de buffer citrato/fosfato 20mM para pHs 5,5; fosfato de sodio 20 mM para pHs 6, 6,5 y 7 conteniendo 50 mM de KCl. Se incubaron las soluciones dos minutos a 95 °C y luego enfriaron lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente. Se guardaron a 4 °C durante la noche para realizar las mediciones al día siguiente.

Para realizar las curvas de fusión, se estabilizaron las muestras a la temperatura inicial de 15 °C. Luego se midieron las variaciones de absorbancia a 280 nm en función de la temperatura. Se utilizó una rampa lineal de 2 °C/min desde 15 °C hasta 80 °C. Las medidas se registraron cada 0,5 °C. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. A partir de las curvas de fusión se obtuvieron los valores de temperaturas de fusión y los parámetros termodinámicos.

Los espectros de dicroísmo circular fueron realizados registrando la elipticidad en función de la variación de la longitud de onda con una variación de 100 nm/min desde 210 nm hasta 350 nm con un ancho de banda de 1 nm y un tiempo de respuesta de 4 segundos. Se registraron los espectros desde 15 °C hasta 80 °C cada 5 °C. Todas las medidas se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815V con una unidad de control de temperatura Julabo F-25/HD.

Para realizar las titulaciones ácido-base se utilizó el mismo espectropolarímetro mencionado anteriormente. Los experimentos se realizaron a 25 °C, en buffer fosfato 20 mM con

50 mM de KCl. Las titulaciones se llevaron a cabo ajustando el pH de las soluciones de oligonucleótido 2 μ M en celdas de cuarzo Hellma (10 mm de paso óptico, 3 ml). Se registraron los espectros de dicroísmo circular con la variación de pH a 280 nm. Los valores de elipticidad fueron convertidos a “fracción de ADN plegado” utilizando la ecuación:

$$\text{fracción de ADN plegado} = \frac{1 - \frac{BS_{\text{plegado}} - \text{elipticidad}_{\text{pH}}}{BS_{\text{plegado}} - BS_{\text{no plegado}}}}{1}$$

donde $\text{elipticidad}_{\text{pH}}$ es la elipticidad a 280 nm a un determinado pH, “ BS_{plegado} ” y “ $BS_{\text{no plegado}}$ ” corresponden a valores basales de las especies plegadas y no plegadas respectivamente. Los valores basales elegidos corresponden a pH de 3,5 y 7,5 y el punto medio de transición ($\text{pH}_{1/2}$) fue obtenido graficando la fracción de ADN plegado vs. pH y ajustando a una función sigmoidea.

Obtención de espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) para secuencias formadoras de i-motif.

Las muestras fueron disueltas en una mezcla 9:1 de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Los experimentos se realizaron en buffer fosfato de sodio 10 mM y 100 mM de NaCl. Para cada caso se ajustó el pH con DCl y NaOD. Los espectros se realizaron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker a 600 MHz con software Topspin. Para suprimir las señales del agua se utilizó un módulo Watergate.

9.2.6 Exploración del uso de la DNAzima peroxidasa (Capítulo 7)

Oxidación de TMB catalizada por la D y la L-DNAzima peroxidasa.

Las concentraciones utilizadas de reactivos se muestran en la Tabla 9.9.

Reactivo	Concentración/Cantidad
D ó L-oligonucleótido	10,5 μ M
Hemina	15,75 μ M
Buffer de incubación	40 μ l
Solución de trabajo (0,2 mM TMB; 1 mM H_2O_2)	150 μ l (0,16 mM TMB; 0,8 mM H_2O_2)

Tabla 9.9 Mezcla de reacción utilizada para la oxidación de TMB catalizada por D y L-DZ.

Se mezcló el oligonucleótido con la hemina y el buffer de incubación y se dejó 15 minutos a 25 °C para permitir la formación de la DNAzima. Luego se agregó la solución de trabajo que contiene el sustrato TMB y el H₂O₂. Se dejó reaccionar por 15 minutos y luego se agregaron 100 µl de H₂SO₄, se agitó, y se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm en el nanodrop. La reacción se realizó por duplicado. Se realizaron los siguientes controles:

Control 1: se reemplazó el volumen de hemina y de oligonucleótido por agua

Control 2: se reemplazó el volumen de oligonucleótido por agua.

Oxidación de TMB catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada.

Las concentraciones utilizadas de reactivos se muestra en la Tabla 9.10.

Reactivo	Concentración/Cantidad
Oligonucleótido inmovilizado	103 nmoles
Hemina	10,5 µM
Buffer de incubación	40 µl
Solución de trabajo (0,2 mM TMB; 1 mM H ₂ O ₂)	150 µl (0,16 mM TMB, 0,8 mM H ₂ O ₂)

Tabla 9.10 Mezcla de reacción utilizada para la oxidación de TMB catalizada por I-DZ.

Se utilizó el total de oligonucleótido inmovilizado obtenido en la síntesis para facilitar su manipulación. Se agregó la hemina, el buffer de incubación y se dejó 15 minutos a 25 °C para permitir la formación de la DNAzima cuya concentración en este caso está determinada por la concentración de hemina y por lo tanto es de 10,5 µM. Luego se agregó la solución de trabajo que contiene el sustrato TMB y el H₂O₂. Se dejó reaccionar por 15 minutos y luego se agregaron 100 µl de H₂SO₄, se agitó, se le dio un spin y se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm en el nanodrop.

La reacción se repitió cinco veces, lavando varias veces con DMSO y luego varias veces con agua la fase sólida entre reacción y reacción. Se realizaron los siguientes controles:

Control 3: se reemplazó volumen de hemina por agua y la masa de fase sólida con oligonucleótido inmovilizado por la misma masa de fase sólida sin derivatizar.

Control 4: se reemplazó la masa de fase sólida con oligonucleótido inmovilizado por la misma masa de fase sólida sin derivatizar.

Control 5: se reemplazó el volumen de hemina por agua.

Obtención de tiempos de retención y curvas de calibración de sulfuros, sulfóxidos y sulfonas utilizando estándares.

Se prepararon soluciones madre 100 mM de todos los estándares en DMSO y sus respectivas diluciones para lograr las concentraciones deseadas para confeccionar la curva. Se realizaron curvas de calibración midiendo por RP-HPLC el área de pico en función de la concentración (Capítulo 8: Anexo, Figuras 10.85 - 10.90).

Para el tioanisol, metil fenil sulfóxido, metil fenil sulfona, difenil sulfuro, difenil sulfóxido y difenil sulfona la detección se efectuó a 254 nm. Para dibencil sulfuro, dibencil sulfóxido, dibencil sulfona, dibenzotiofeno y dibenzotiofeno sulfona la detección se hizo a 220 nm.

Como fase estacionaria se utilizó una columna C-18 y como fase móvil un gradiente de agua pH 3 y acetonitrilo. El gradiente utilizado se detalla en la Tabla 9.11.

PROGRAMA RP-HPLC PARA OXIDACIÓN DE SULFUROS	
Tiempo (min)	% Acetonitrilo
0	30
1	30
7	80
9	80
13	30
15	30

Tabla 9.11 Programa RP-HPLC para oxidación de sulfuros.

Curvas de actividad para la oxidación de tioanisol catalizada por D y L-DNAzima peroxidasa.

Las concentraciones de la mezcla de reacción se detallan en la Tabla 9.12.

Reactivo	Concentración
Hemina	12 μM
D ó L-oligonucleótido	12 μM
Tioanisol	2,5 μM
H ₂ O ₂	4 mM
Buffer de incubación HEPES pH 8	Hasta 2 ml

Tabla 9.12 Mezcla de reacción utilizada para la oxidación de tioanisol catalizada por D y L-DZ.

Para la reacción de oxidación de tioanisol, se mezcló la hemina con el oligonucleótido en buffer de incubación HEPES pH 8 durante 15 minutos a 25 °C para permitir la formación de la DNAzima peroxidasa. Luego se agregó el tioanisol y se tomó una alícuota de 20 μl para el tiempo cero. Se agregó el peróxido de hidrógeno para comenzar la reacción. Se tomaron alícuotas de 20 μl a 10, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 900 y 1800 segundos. Todas se mezclaron con 19 μl de DMSO y 1 μl de bisulfito de sodio 150 mM para detener la reacción. Se prepararon los siguientes controles:

Control 1: se reemplazó el volumen de hemina y el de oligonucleótido por agua.

Control 2: se reemplazó el volumen de oligonucleótido por agua.

Todas las fracciones se analizaron por RP-HPLC utilizando el programa de oxidación de sulfuros descrito anteriormente.

Se midió el área de cada pico y se calculó la concentración de cada producto utilizando las curvas de calibración previamente confeccionadas. Una vez obtenida de concentración de productos para cada tiempo se calculó el porcentaje de conversión tomando como 100 % la concentración tioanisol calculada a partir del área de pico a tiempo cero. Una vez obtenidas las curvas de porcentaje de conversión en función del tiempo para cada DNAzima, se calculó la pendiente de la zona lineal para obtener el valor de velocidad inicial observada.

Oxidación de tioanisol catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada.

Las concentraciones de la mezcla de reacción se detallan en la Tabla 9.13.

Reactivo	Concentración
Oligonucleótido inmovilizado	103 nmoles
Hemina	12 μ M
Tioanisol en sobrenadante	2,5 mM
Buffer de incubación	Hasta 100 μ l
H ₂ O ₂	4 mM

Tabla 9.13 Mezcla de reacción utilizada para la oxidación de tioanisol catalizada por I-DZ.

Se utilizó el total de oligonucleótido inmovilizado obtenido en la síntesis y ya utilizado para la oxidación del TMB, luego de someterlo a lavados con DMSO y agua. Se agregó la hemina y el buffer de incubación. Como la fase sólida adsorbe el tioanisol, se agregó 1 μ l de tioanisol puro, se agitó y se incubó por 15 minutos para permitir la formación de la DNAzima y para saturar la fase sólida. Luego se mide la concentración de tioanisol del sobrenadante por HPLC y se ajustó a 2,5 mM. Se tomó una alícuota de 10 μ l para tiempo cero y luego se agregó el H₂O₂. Se tomaron alícuotas de 10 μ l a 1 y 30 minutos. Todas las alícuotas se mezclaron con 19 μ l de DMSO y 1 μ l de bisulfito de sodio 150 mM para detener la reacción. Se realizaron los siguientes controles:

Control 3: se reemplazó volumen de hemina por agua y la masa de fase sólida con oligonucleótido inmovilizado por la misma masa de fase sólida sin derivatizar.

Control 4: se reemplazó la masa de fase sólida con oligonucleótido inmovilizado por la misma masa de fase sólida sin derivatizar.

Control 5: se reemplazó el volumen de hemina por agua.

Las fracciones se midieron por RP-HPLC utilizando las mismas condiciones descritas para la oxidación del tioanisol con la DNAzima peroxidasa soluble y se calculó el porcentaje de conversión de la misma manera, tomando como 100 % la concentración de tioanisol presente en el sobrenadante a tiempo cero.

La reacción se repitió cuatro veces, lavando varias veces con DMSO y luego varias veces con agua la fase sólida entre reacción y reacción.

Oxidación de sulfuros catalizadas por D y L-DNAzima peroxidasa.

La reacción se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento que para la oxidación de tioanisol. Se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos excepto por la concentración de sulfuro que fue distinta para cada uno debido a su distinta solubilidad en buffer y su distinta absortividad molar.

Para difenil sulfuro la concentración utilizada fue 0,1 mM, para dibencil sulfuro fue de 0,25 mM y para dibenzotiofeno fue de 0,15 mM. El volumen final de reacción fue de 300 µl. Se tomaron alícuotas de 30 µl a 0, 1 y 30 minutos y se mezclaron con 1 µl de bisulfito de sodio 150 mM para detener la reacción. Se prepararon los siguientes controles para cada sulfuro:

Control 1: se reemplazó el volumen de hemina y el de oligonucleótido por agua.

Control 2: se reemplazó el volumen de oligonucleótido por agua.

Todas las fracciones se analizaron por RP-HPLC utilizando el programa oxidación de sulfuros y los porcentajes de conversión fueron calculados de la misma manera que para la oxidación del tioanisol. En el caso del dibenzotiofeno sulfóxido, cuyo estándar no estaba comercialmente disponible, se procedió a calcular el porcentaje de conversión por balance de masa teniendo en cuenta el porcentaje de conversión a sulfona y el sulfuro remanente. La identidad de pico con un tiempo de retención de 5,57 min, se confirmó por LC-MS obteniendo un valor de $m/z=201,08$ que se corresponde con la especie [DBTO+H⁺] (Capítulo 8: Anexo, Figura 10.74).

Oxidación de Paracetamol catalizada por D y L-DNAzima peroxidasa.

Se utilizó la mezcla de reacción detallada en la Tabla 9.14.

Reactivo	Concentración
Oligonucleótido	12 µM
Hemina	12 µM
Paracetamol	2,5 mM
H ₂ O ₂	4 mM
Buffer de incubación	Hasta 300 µl

Tabla 9.14 Mezcla de reacción para la oxidación del Paracetamol.

Se mezcló la hemina con el oligonucleótido en buffer de incubación durante 15 minutos a 25 °C. Luego se agregó el paracetamol y se tomó una alícuota de 30 µl para el tiempo cero.

Luego se agregó el H₂O₂ para dar inicio a la reacción tomando alícuotas de 30 µl al minuto, a los 30 minutos y a los 60 minutos.

Se realizaron los controles 1 (reemplazado el volumen de oligonucleótido y hemina por agua) y 2 (reemplazando el volumen de oligonucleótido por agua).

Las alícuotas fueron analizadas por RP-HPLC utilizando como fase estacionaria una columna de C-18 y como fase móvil un gradiente de agua pH 3 y acetonitrilo. El gradiente utilizado se encuentra detallado en la Tabla 9.15. La detección se realizó midiendo la absorbancia a 254 nm. Los porcentajes de conversión se calcularon midiendo el área bajo la curva del pico correspondiente al paracetamol en cada alícuota.

PROGRAMA RP-HPLC PARA OXIDACIÓN DE PARACETAMOL	
Tiempo (min)	% Acetonitrilo
0	5
3	5
8	70
9	70
11	5
13	5

Tabla 9.15. Programa RP-HPLC para la oxidación de paracetamol.

Oxidación de paracetamol catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada.

Las concentraciones utilizadas para la reacción se detallan en la Tabla 9.16.

Reactivo	Concentración
Oligonucleótido inmovilizado	103 nmoles
Hemina	12 μ M
Paracetamol	2,5 mM
Buffer de incubación	Hasta 100 μ l
H ₂ O ₂	4 mM

Tabla 9.16. Mezcla de reacción utilizada para la oxidación de paracetamol catalizada por I-DZ.

Se mezclaron los 103 nmoles de oligonucleótido inmovilizado con la hemina en buffer de incubación durante 15 minutos a 25 °C. Luego se agregó el paracetamol. Se tomó una alícuota para el tiempo cero y se dio inicio a la reacción con el agregado de H₂O₂. Se tomaron alícuotas a tiempos 0, 1, 30, 60, 120 y 150 minutos.

Se realizaron los controles 3 (donde reemplazó la masa de oligonucleótido inmovilizado por soporte sin derivatizar y el volumen de hemina por agua) y 4 (donde se reemplazó la masa de oligonucleótido inmovilizado por soporte sin derivatizar).

Se realizó un control para verificar que el paracetamol no se adsorba al soporte. Se mezcló el oligonucleótido inmovilizado y el paracetamol en buffer incubación por 24 horas tomando alícuotas a tiempo 0 y 24 horas.

Todas las alícuotas se analizaron por RP-HPLC de la misma forma que se describe en el protocolo de oxidación del paracetamol con la D y la L-DNAzima peroxidasa.

Oxidación de ácido indolacético (IAA) por la D-DNAzima peroxidasa.

Se probaron varias condiciones de oxidación utilizando D-DNAzima peroxidasa ó Hemina sin oligonucleótido (Tabla 9.17)

Reactivo	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	Condición 5	Condición 6
Oligonucleótido	0 ó 12 μM	0 μM	0 μM	0 μM	0 ó 4 μM	0 ó 2 μM
Hemina	12 μM	8 μM	8 μM	6 μM	4 μM	2 μM
IAA	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
H ₂ O ₂	4 mM	4 mM	2,5 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Buffer de incubación	p/300 μl	p/300 μl	p/300 μl	p/300 μl	p/300 μl	p/300 μl

Tabla 9.17 Oxidación de IAA catalizada por D-Dz. Ensayos en distintas condiciones.

Se mezclaron la hemina y el ADN (cuando corresponda) por 15 minutos a 25 °C en buffer de incubación y luego se agregó el sustrato. Se tomó una alícuota de 30 μl para tiempo cero y luego se agregó el H₂O₂. Se tomaron alícuotas a 1, 30 y 60 minutos. Se realizó el control 1.

Se analizaron por RP-HPLC utilizando como fase estacionaria una columna de RP-C18 y como fase móvil un gradiente de agua pH 3 y acetonitrilo. El gradiente se detalla en la Tabla 9.18. Se midió absorbancia a 280 nm.

PROGRAMA RP-HPLC PARA OXIDACION DE IAA	
Tiempo (min.)	% Acetonitrilo
0	5
15	60
17	60
20	5
23	5

Tabla 9.18 Programa RP-HPLC para la oxidación de IAA.

Se analizó la desaparición de IAA en el transcurso de la reacción midiendo el área bajo la curva del pico de sustrato en cada alícuota. Se calcularon los porcentajes de conversión.

Oxidación de fenol por la DNAzima peroxidasa.

Para probar la oxidación del fenol utilizando la DNAzima peroxidasa se evaluaron tres condiciones (Tabla 9.19).

Reactivo	Condición 1	Condición 2	Condición 3
Oligonucleótido	4 μ M	12 μ M	12 μ M
Hemina	4 μ M	12 μ M	12 μ M
Fenol	1 mM	1 mM	2,5 mM
H ₂ O ₂	10 mM	4 mM	4 mM
Buffer de incubación	Hasta 300 μ l	Hasta 300 μ l	Hasta 300 μ l

Tabla 9.19 Ensayo de distintas condiciones para la oxidación de fenol catalizada por D-Dz.

Se mezcló el oligonucleótido con la hemina y el buffer de incubación durante 15 min a 25 °C para permitir la formación de la DNAzima. Luego se agregó el fenol. Se tomó una alícuota de 30 μ l para el tiempo cero. Se agregó H₂O₂ para dar comienzo a la reacción. Se tomaron alícuotas a 1, 30 y 60 minutos. Se realizaron los controles 1 y 2.

Las fracciones se analizaron por RP-HPLC utilizando el mismo programa que para la oxidación de sulfuros, midiendo la absorbancia a 254 nm. Se analizó la desaparición de fenol en el transcurso de la reacción midiendo el área bajo la curva del pico del sustrato y se calcularon los porcentajes de conversión.

ANEXO

10

Material suplementario al Capítulo 2.

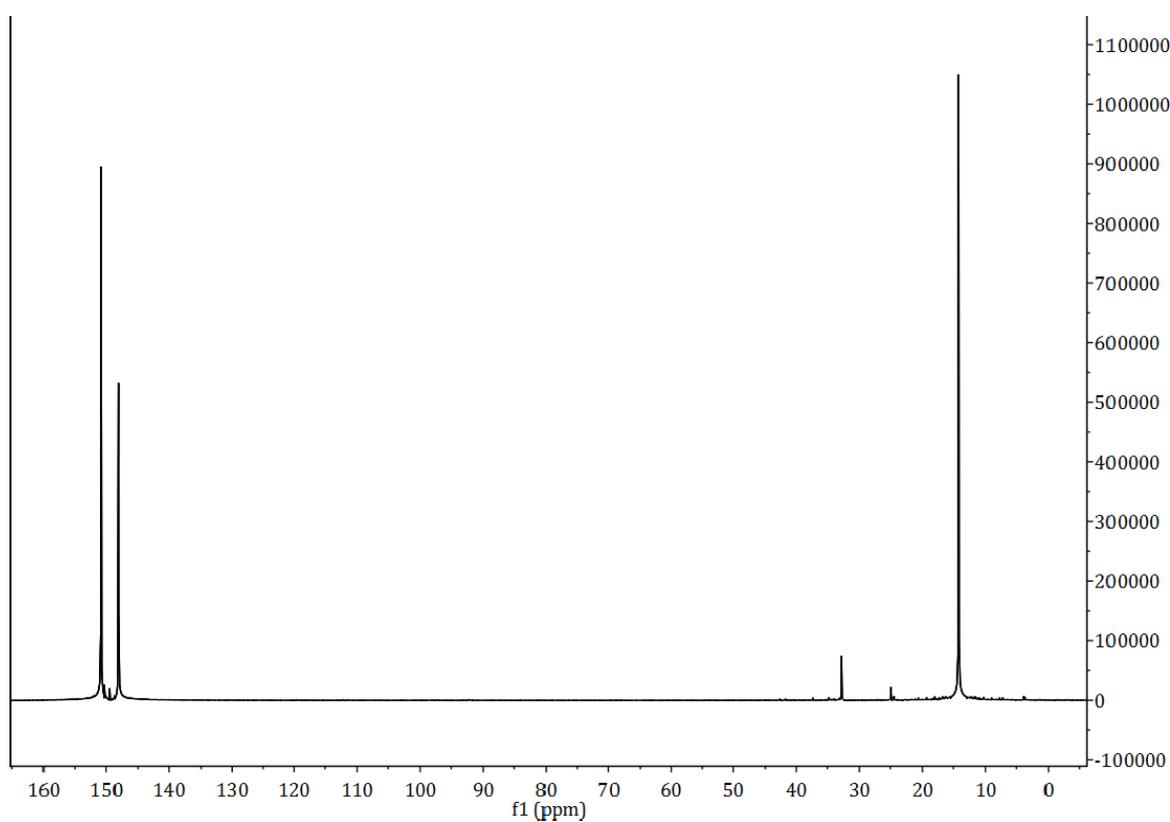


Figura 10.1 ^{31}P -RMN de (2'S)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (Compuesto 14).

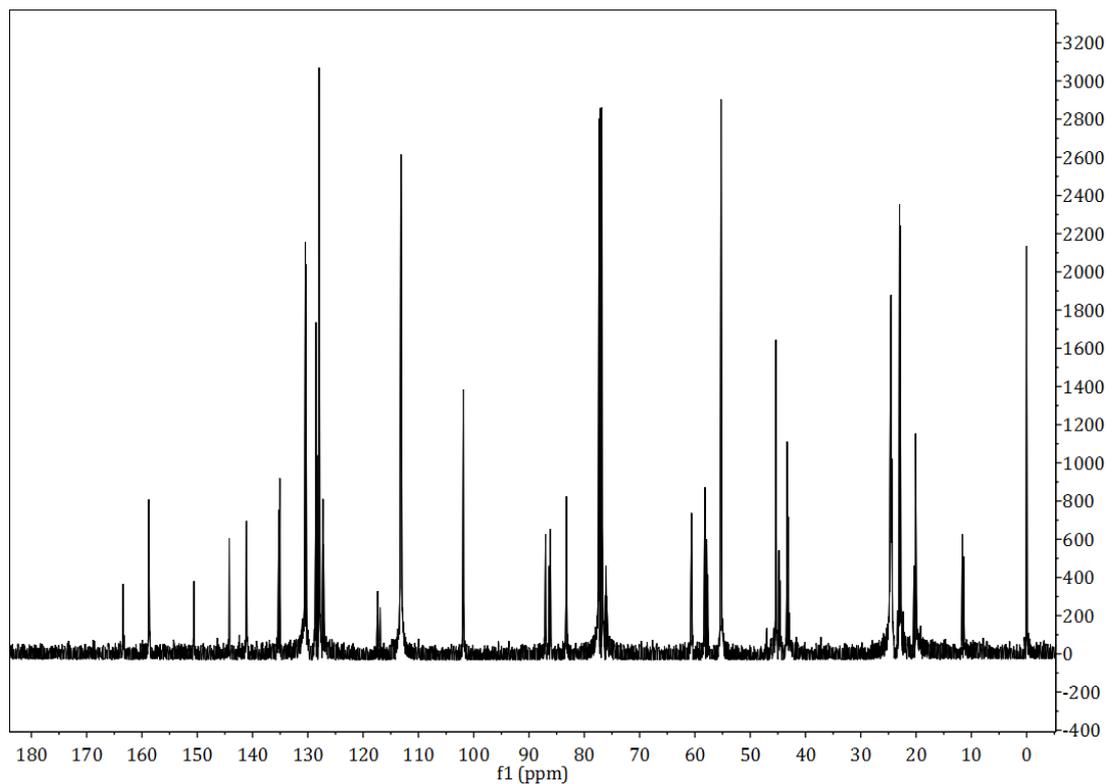


Figura 10.2 ^{13}C -RMN de (2'S)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (Compuesto 14).

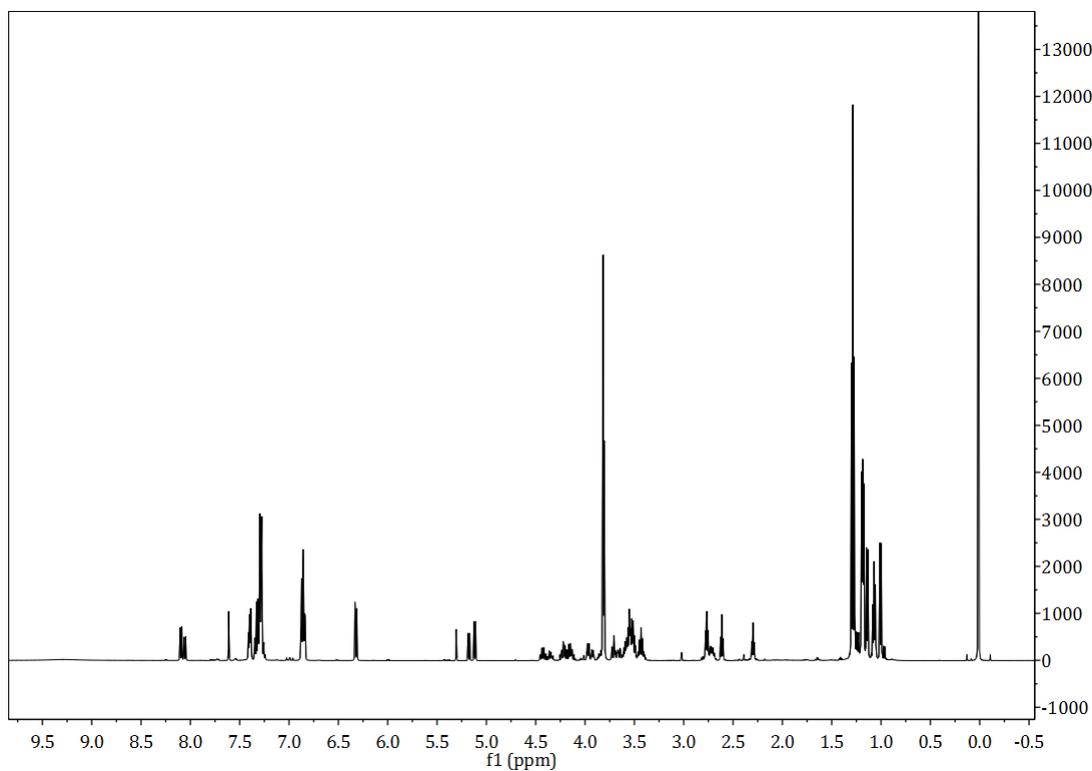


Figura 10.3 ^1H -RMN de (2'S)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (compuesto 14).

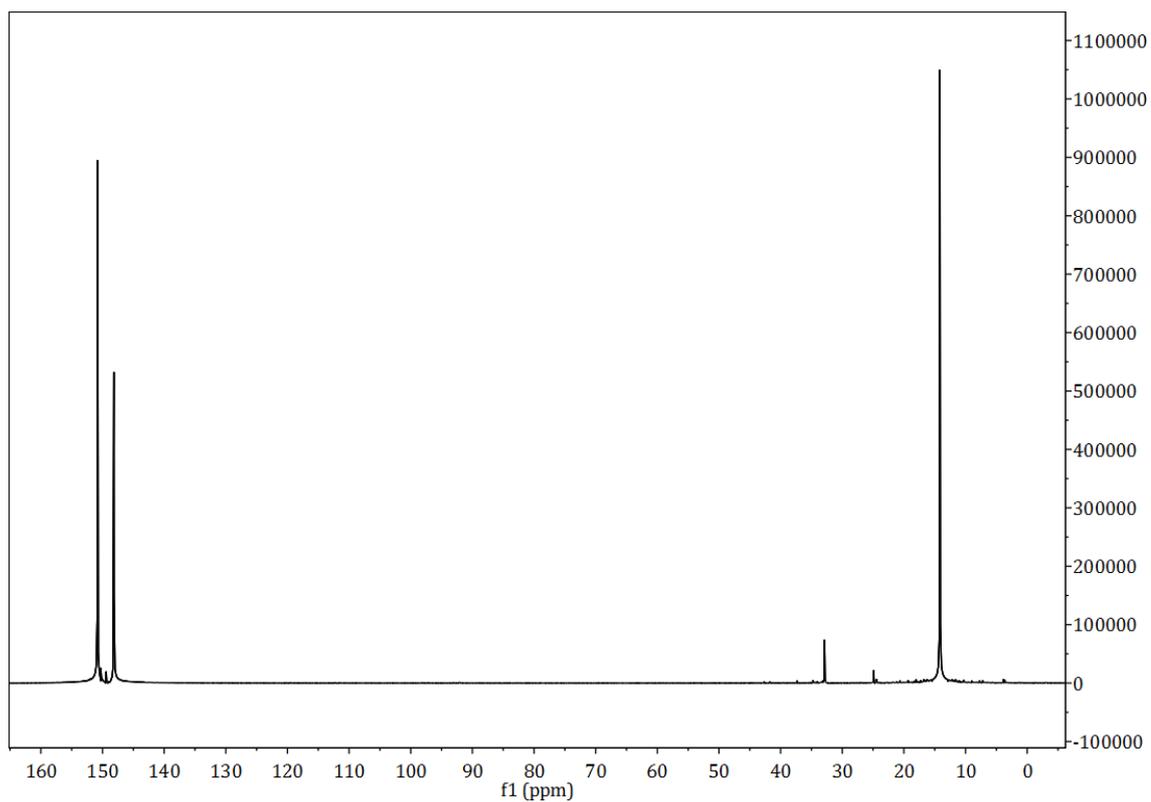


Figura 10.4 ^{31}P -RMN de (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (Compuesto 15).

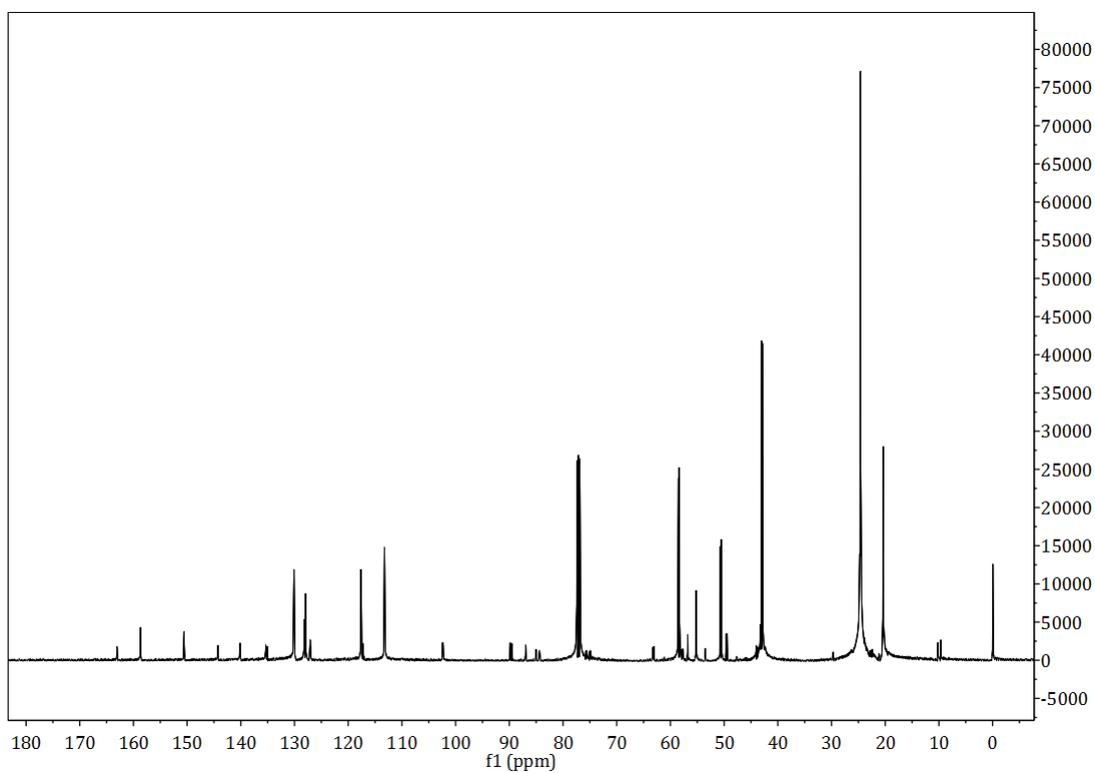


Figura 10.5 ^{13}C -RMN de (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina (Compuesto 15).

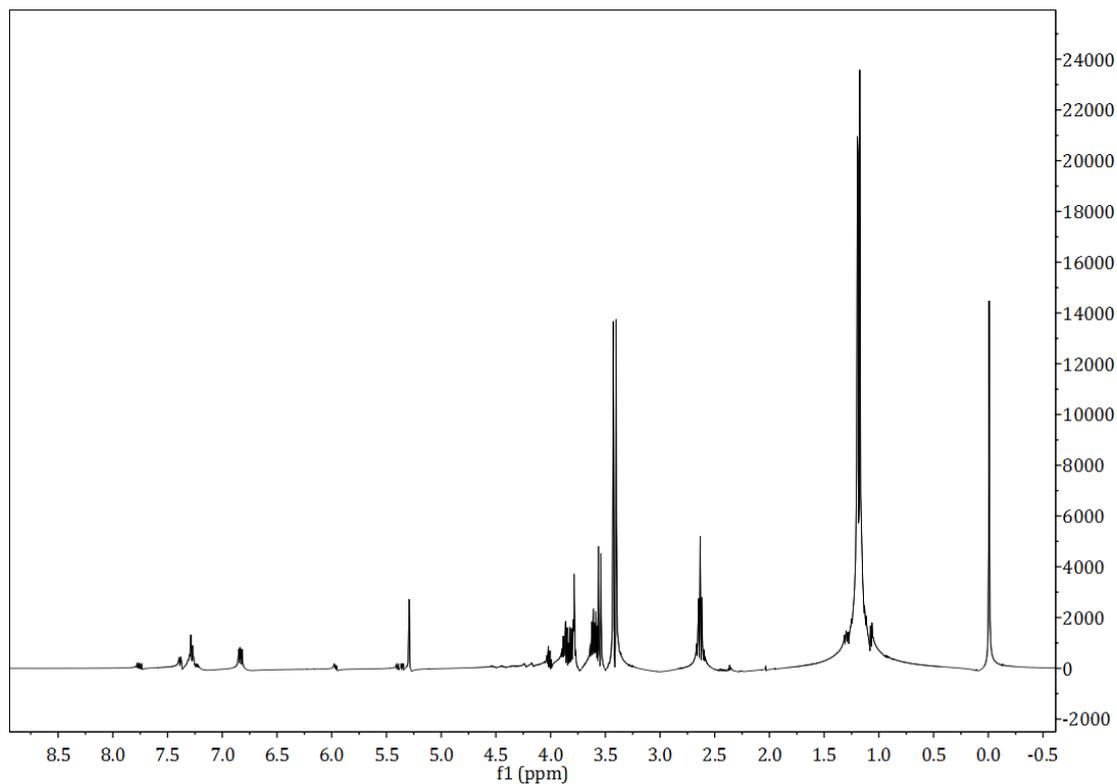


Figura 10.6 ^1H -RMN de (2'*R*)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-*C*-metiluridina (Compuesto 15).

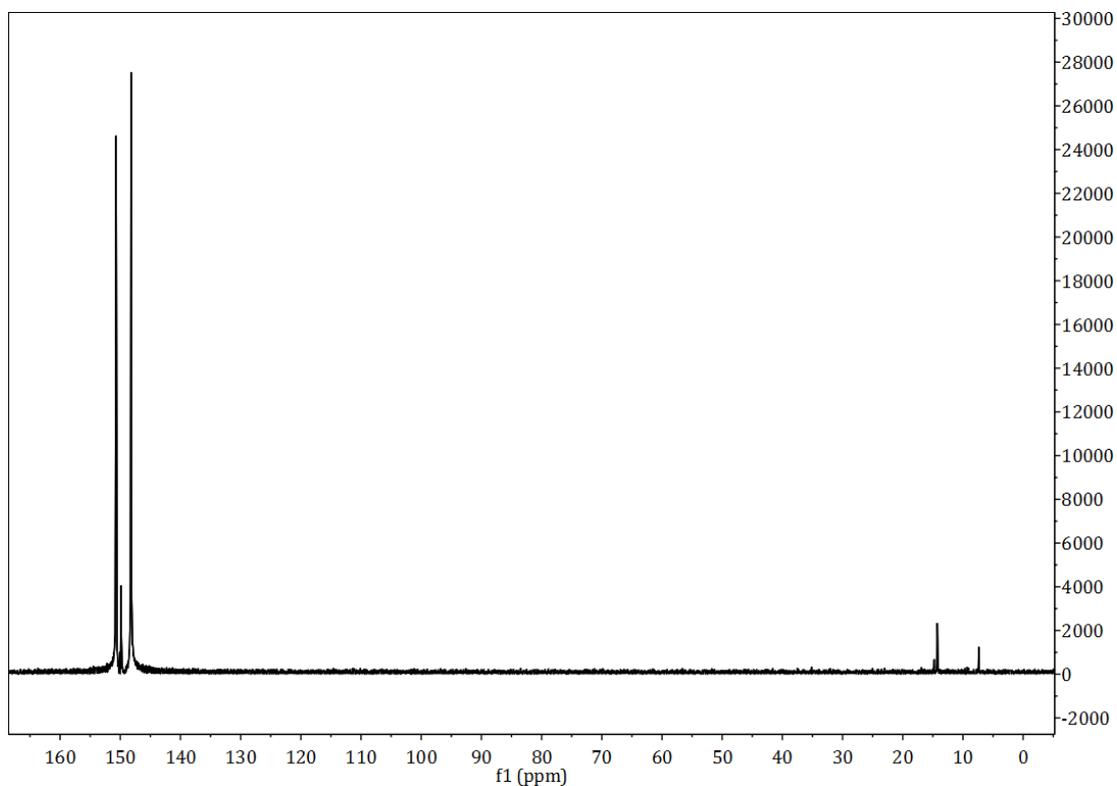


Figura 10.7 ^{31}P -RMN de (2'*S*)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-*O*-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita)-2'-desoxi-2'-*C*-metil-*N*4-benzoilcitidina (Compuesto 24).

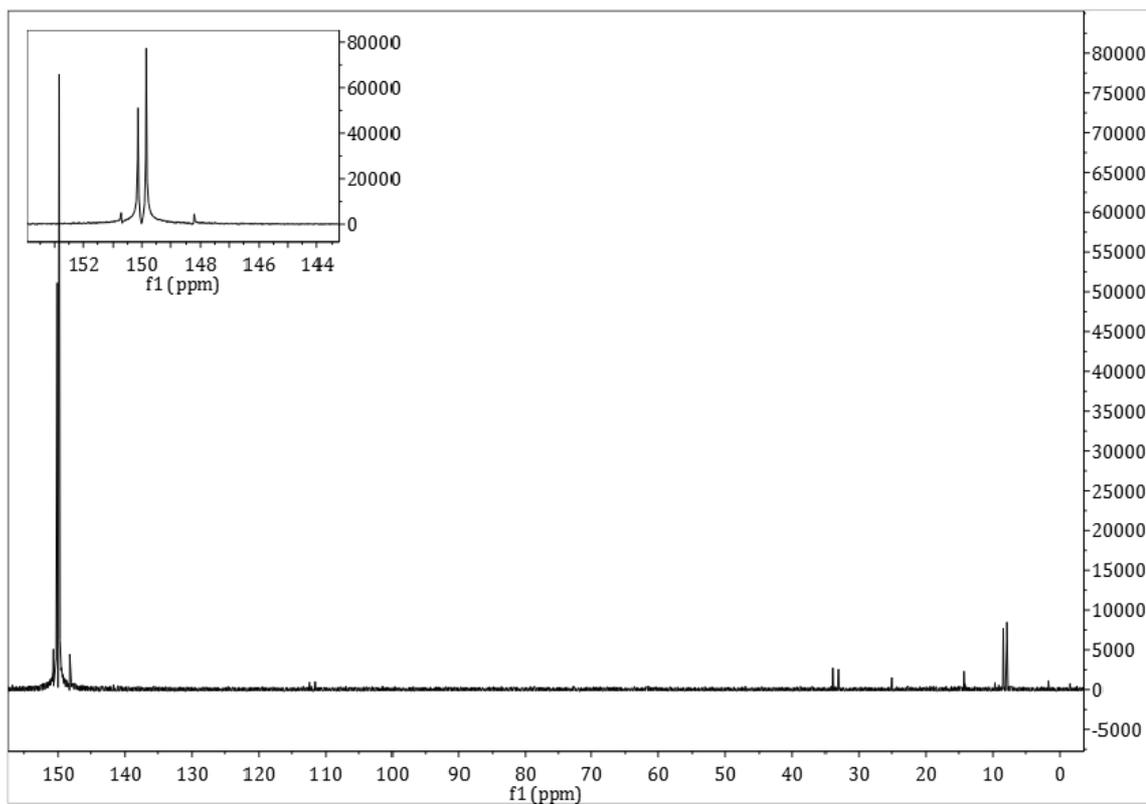


Figura 10.8 ^{31}P -RMN de (2'R)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita)-2'-desoxi-2'-C-metil-N4-benzoilcitidina (Compuesto 25).

Material suplementario al Capítulo 3.

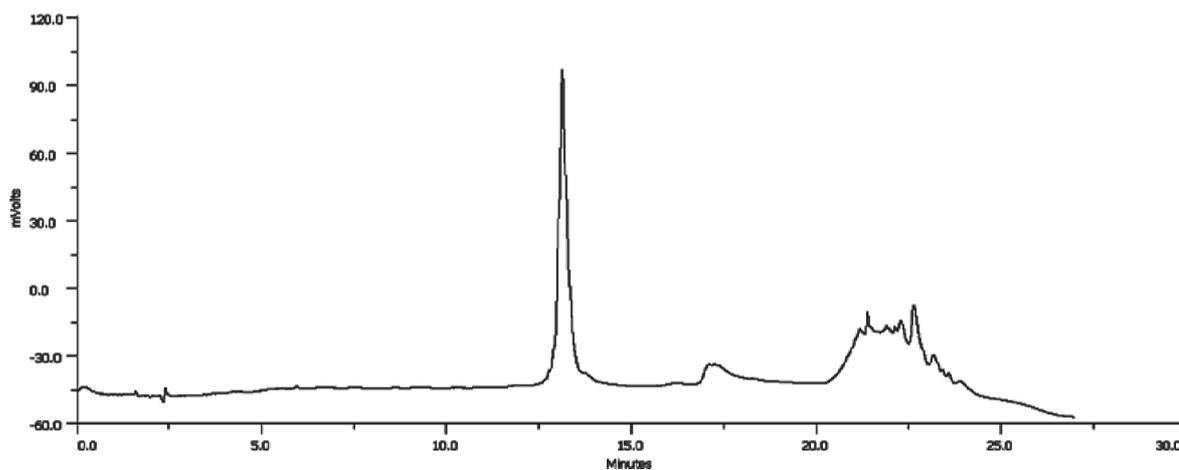


Figura 10.9 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17.

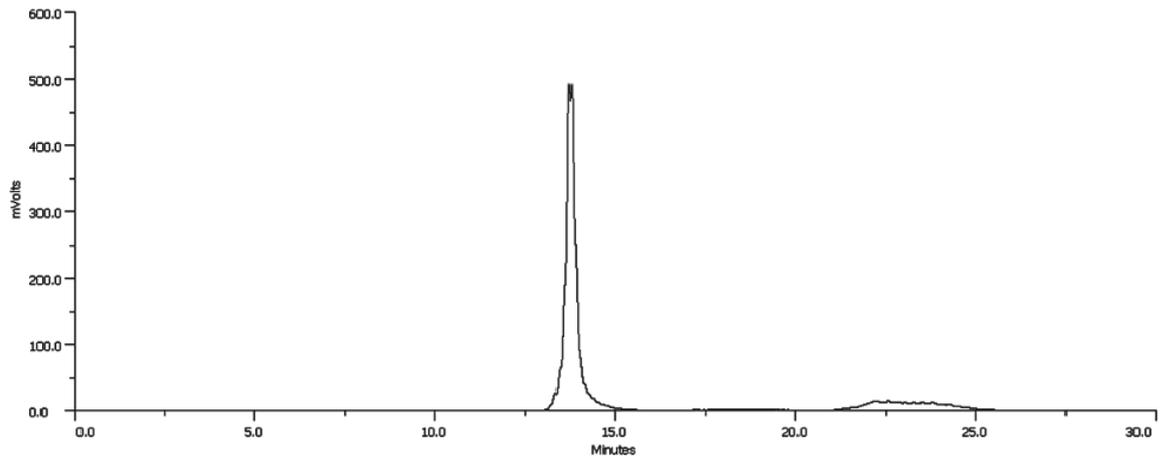


Figura 10.10 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(R)₈ purificada.

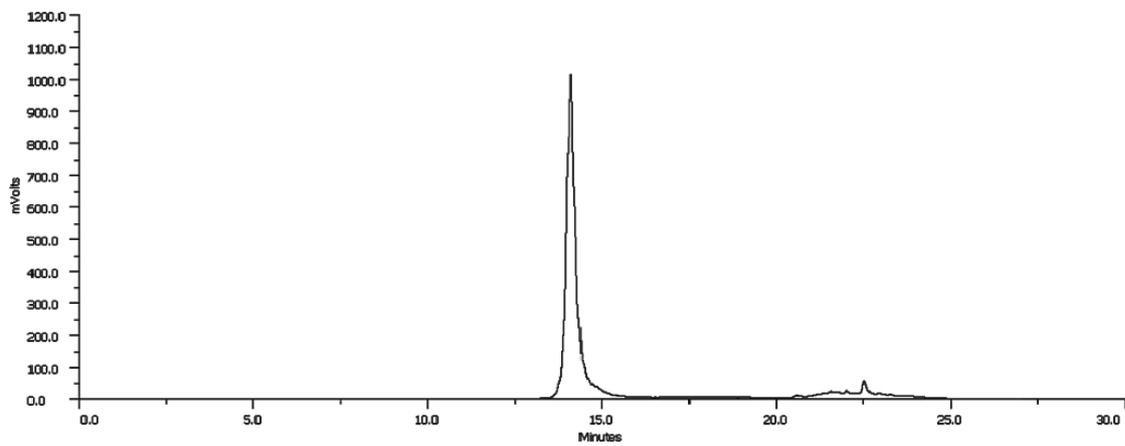


Figura 10.11 Cromatograma en condiciones DMT OFF de DZ 8-17 C(S)₈ purificada.

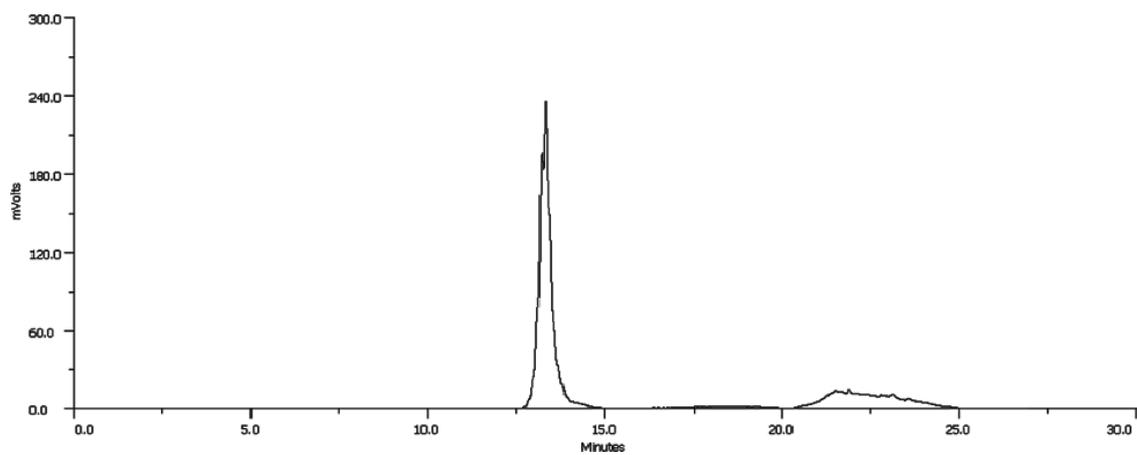


Figura 10.12 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(R)₁₁ purificada.

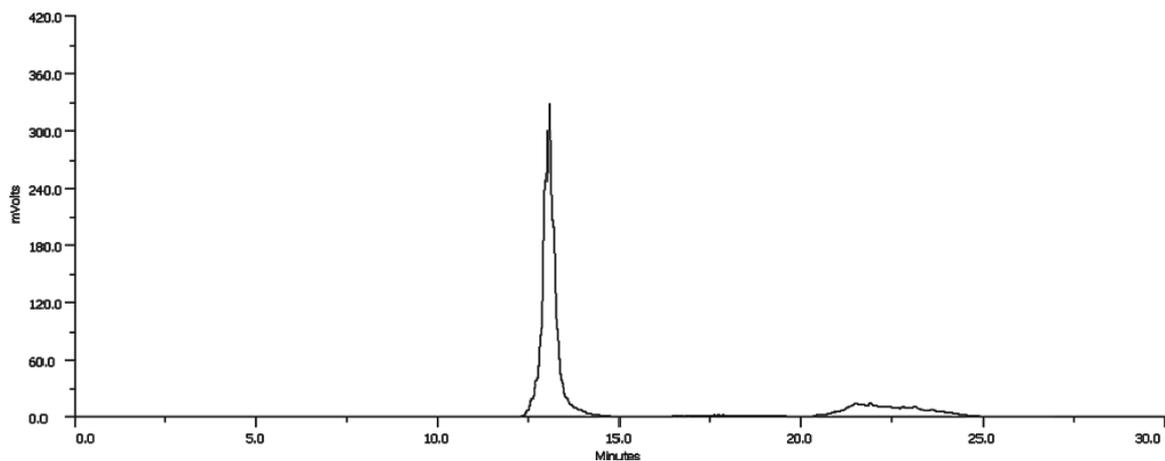


Figura 10.13 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(S)₁₁ purificada.

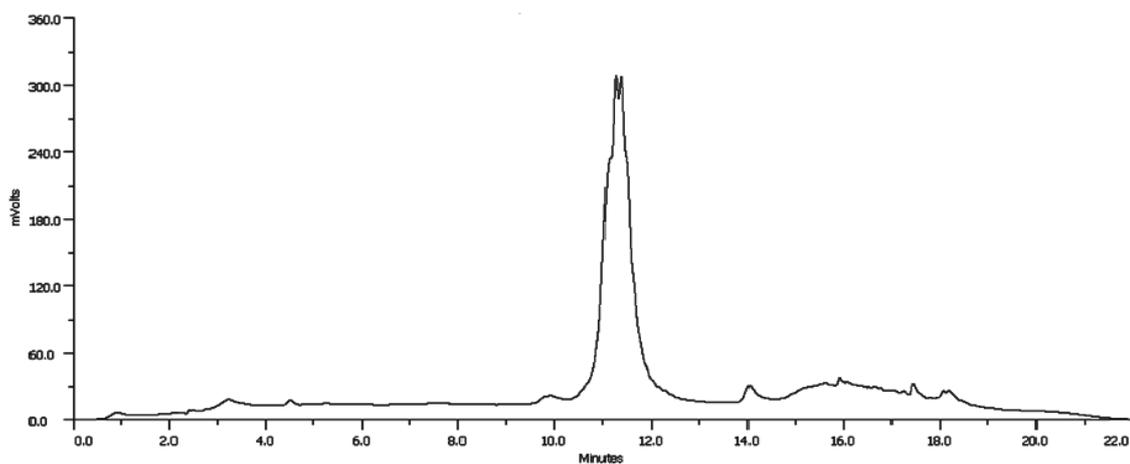


Figura 10.14 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 B purificada.

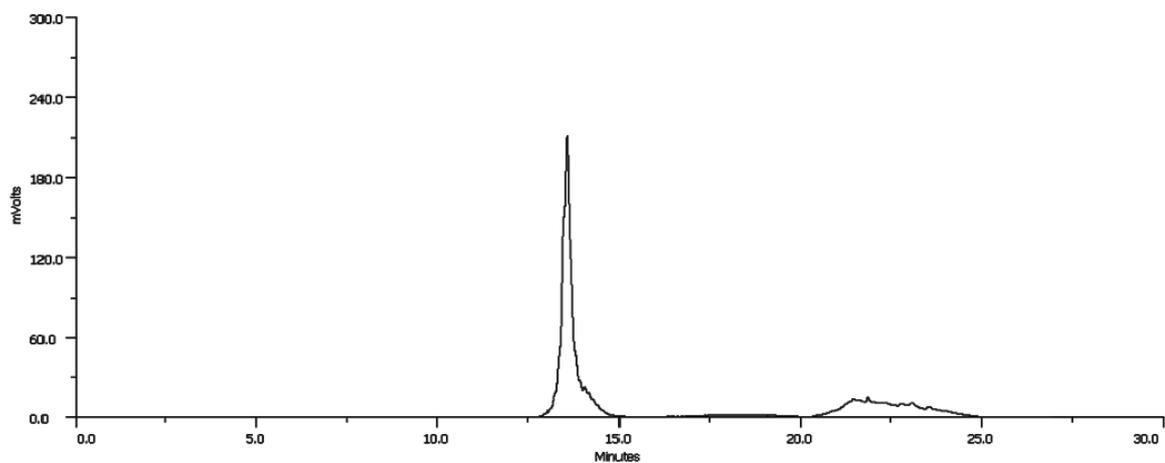


Figura 10.15 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(R)₈ B purificada.

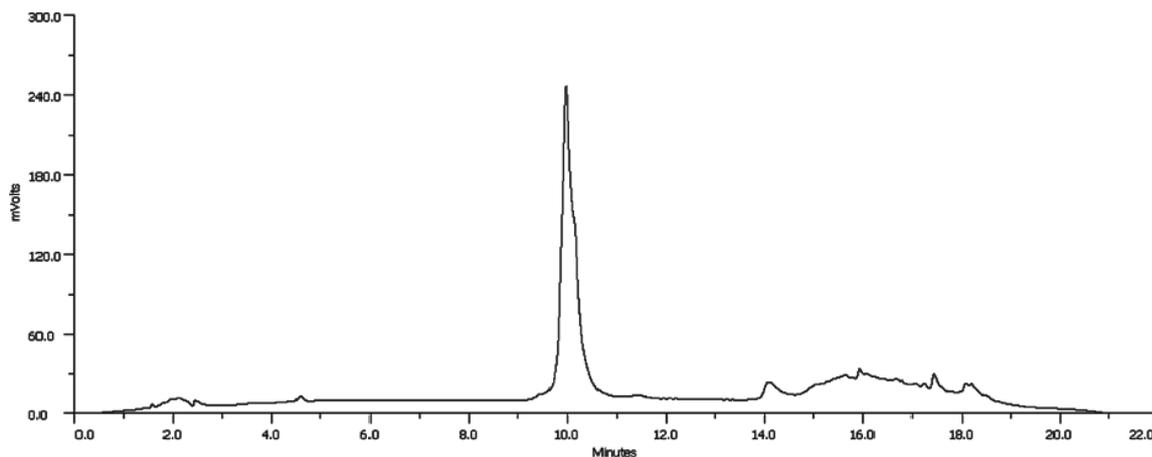


Figura 10.16 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(S)₈-C(S)₁₁ purificada.

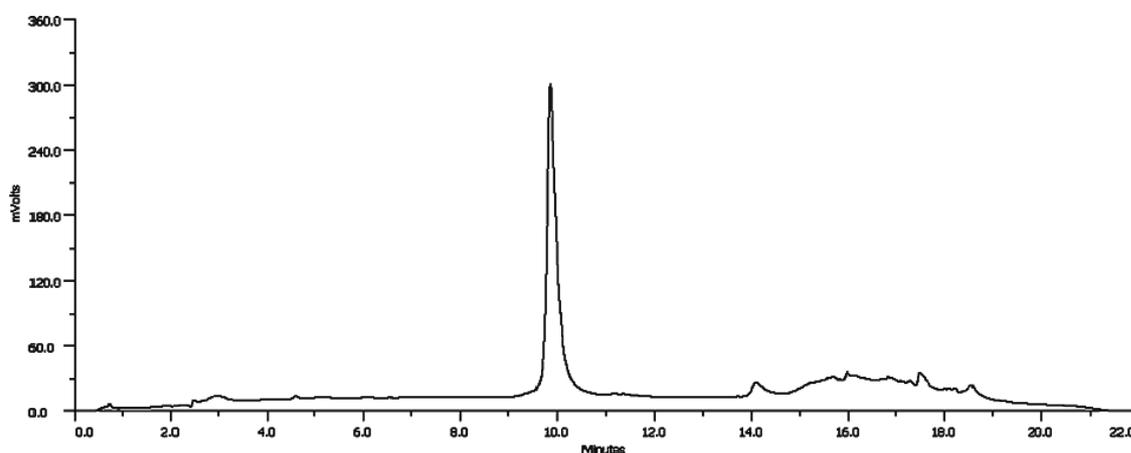


Figura 10.17 Cromatograma en condiciones DMT-OFF de DZ 8-17 C(S)₈-C(S)₁₁B purificada.

Oligonucleótido ADN para dúplex	Secuencia (5' - 3')	Masa calculada	Masa encontrada
ADN-C(S)	CAATGGAC(S)TTGTTGA	4621.1	4621.4
ADN-C(R)	CAATGGAC(R)TTGTTGA	4621.1	4618.0
ADN-U(S)	CAATGGACU(S)TGTTGA	4607.1	4603.5
ADN-U(R)	CAATGGACU(R)TGTTGA	4607.1	4604.8
ADN-dU	CAATGGACdUTGTTGA	4593,1	4589.9
ADN-UOMe	CAATGGACUOMeTGTTGA	4623.1	4622.1
ADN-U	CAATGGACUTGTTGA	4609.1	4606.2

Tabla 10.1 Valores de m/z hallados para los oligonucleótidos de ADN para dúplex purificados.

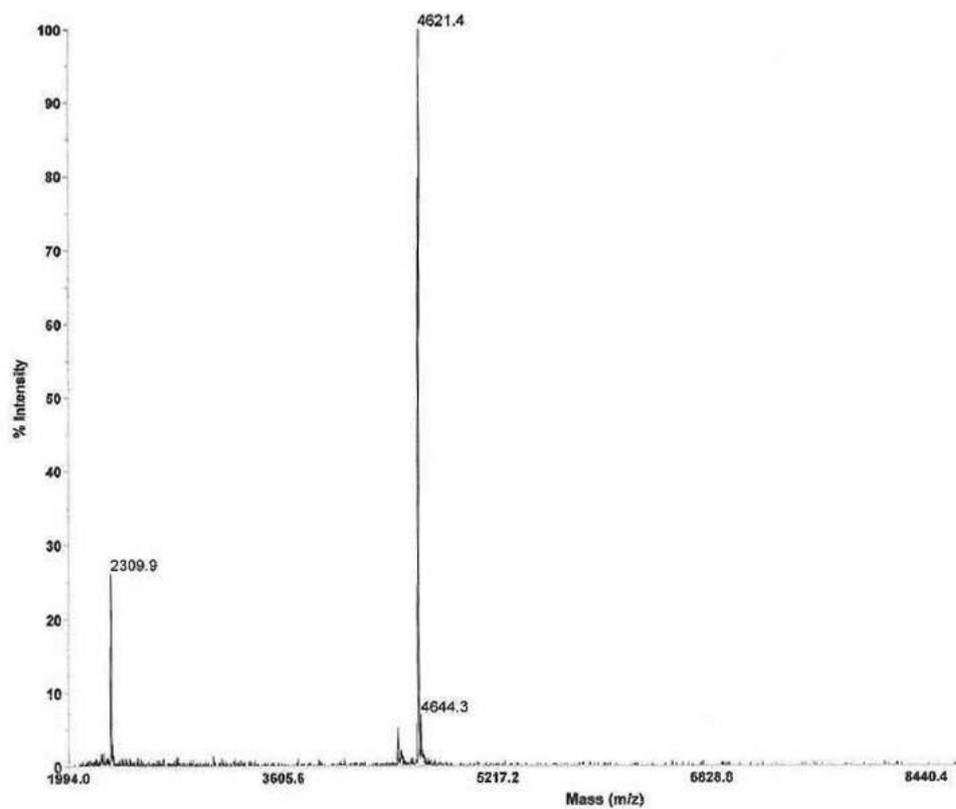


Figura 10.18 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-C(S).

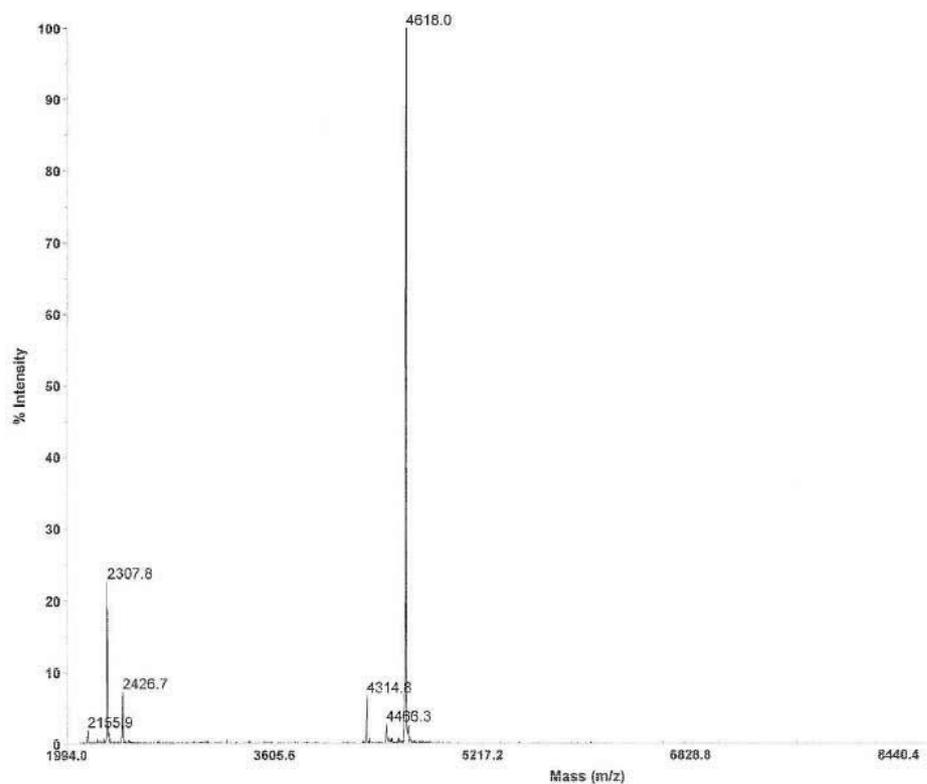


Figura 10.19 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-C(R)

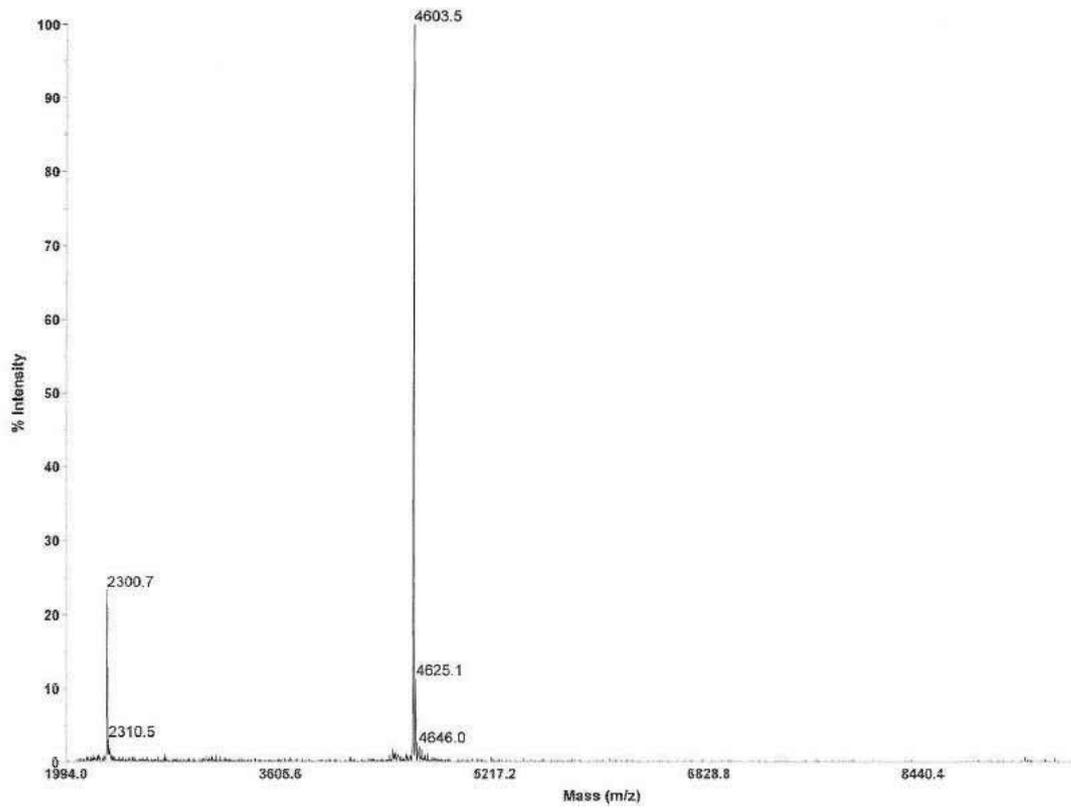


Figura 10.20 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-U(S).

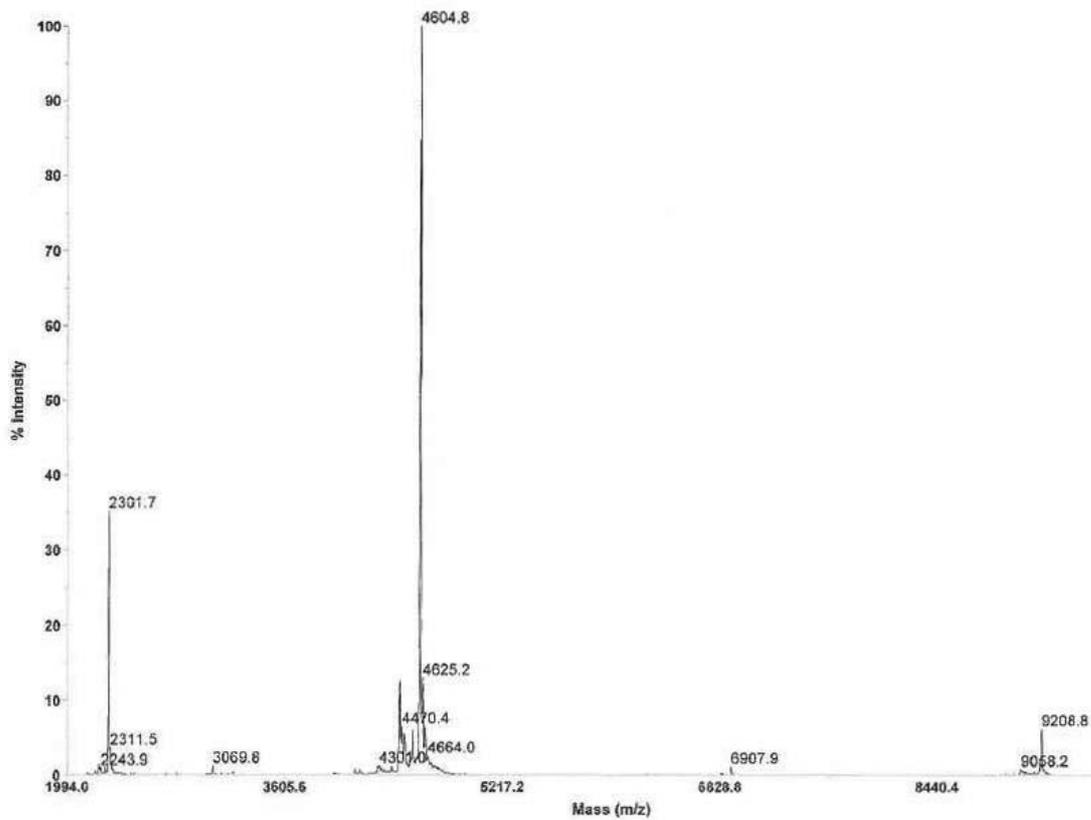


Figura 10.21 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-U(R).

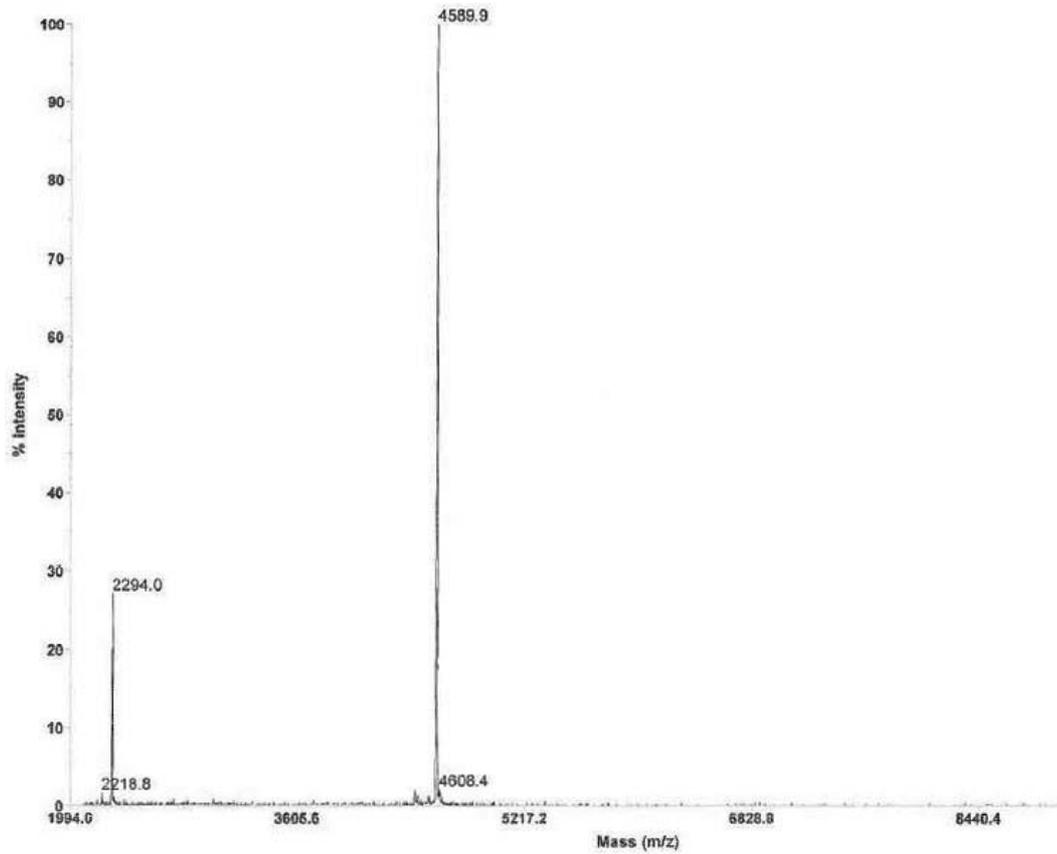


Figura 10.22 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-dU.

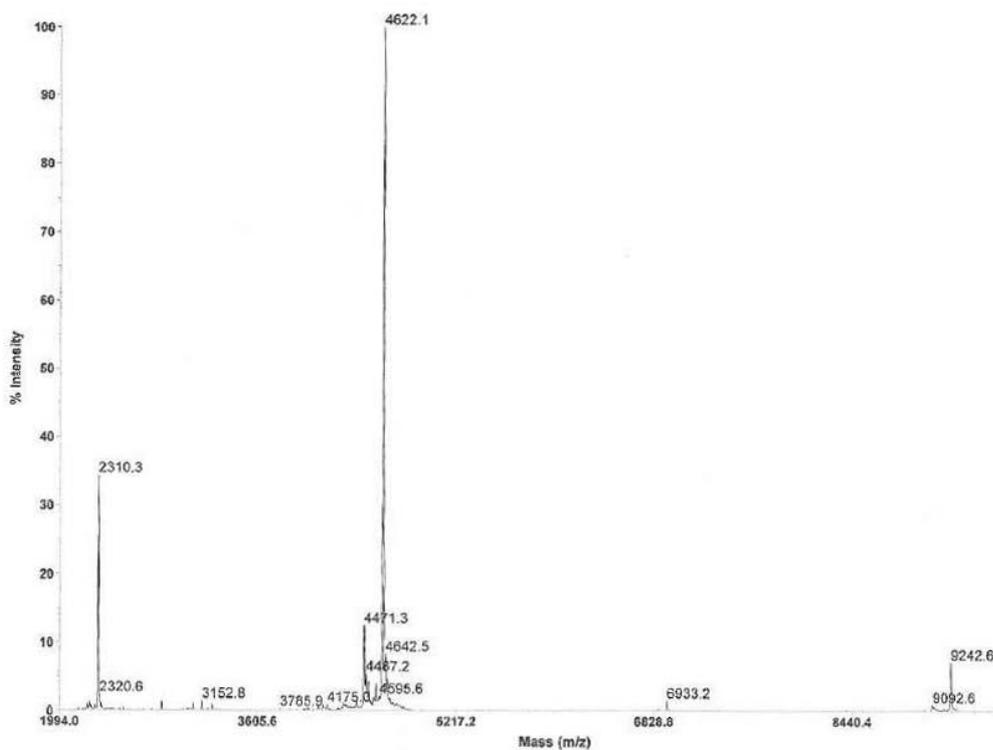


Figura 10.23 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-UOMe

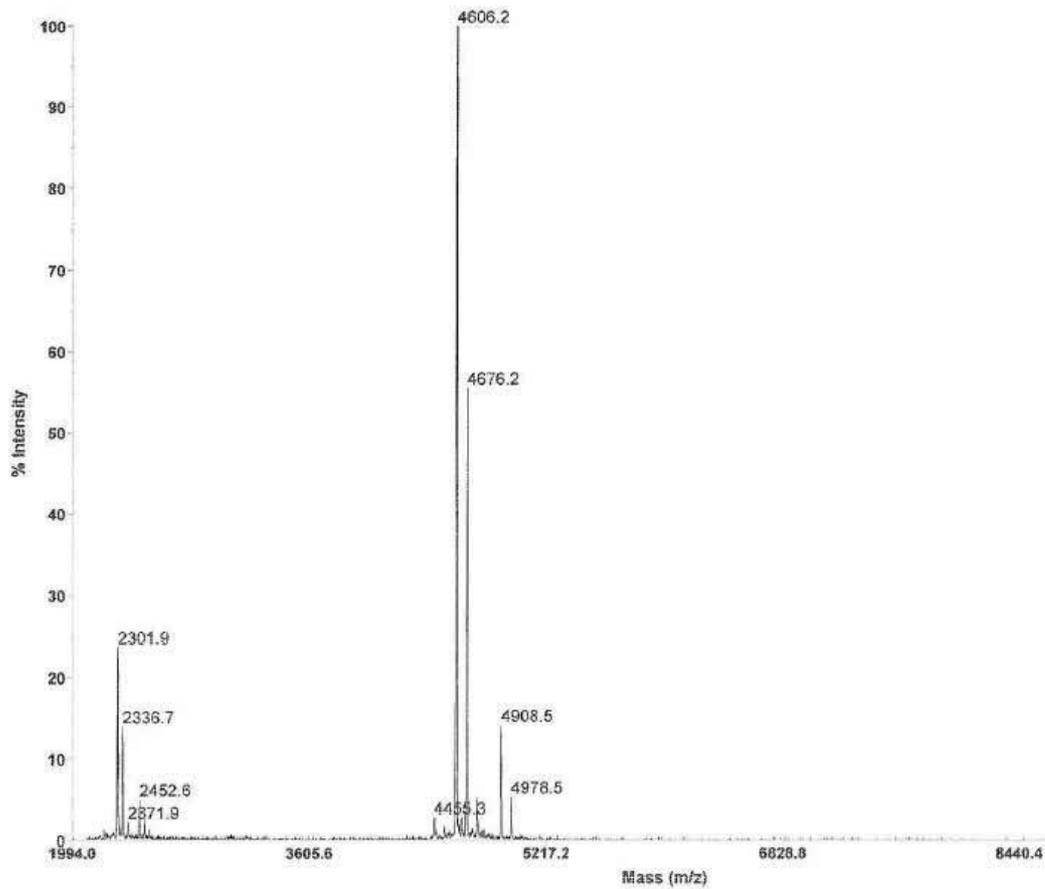


Figura 10.24 Espectro de masa del oligonucleótido ADN-U.

Oligonucleótido telomérico para i-motif	Secuencia (5' - 3')	Masa calculada	Masa encontrada
T-NM	CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT	6504.3	6502.2
T-C(S) ₁	C(S)CCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT	6518.3	6516.6
T-C(S) ₂	CC(S)CCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT	6518.3	6515.2
T-C(S) ₂ C(S) ₁₄	CC(S)CCTAACCCCTAACCC(S)CCTAACCCCT	6532.3	6530.3

Tabla 10.2 Valores m/z hallados para los oligonucleótidos de ADN purificados para estudios en i-motif.

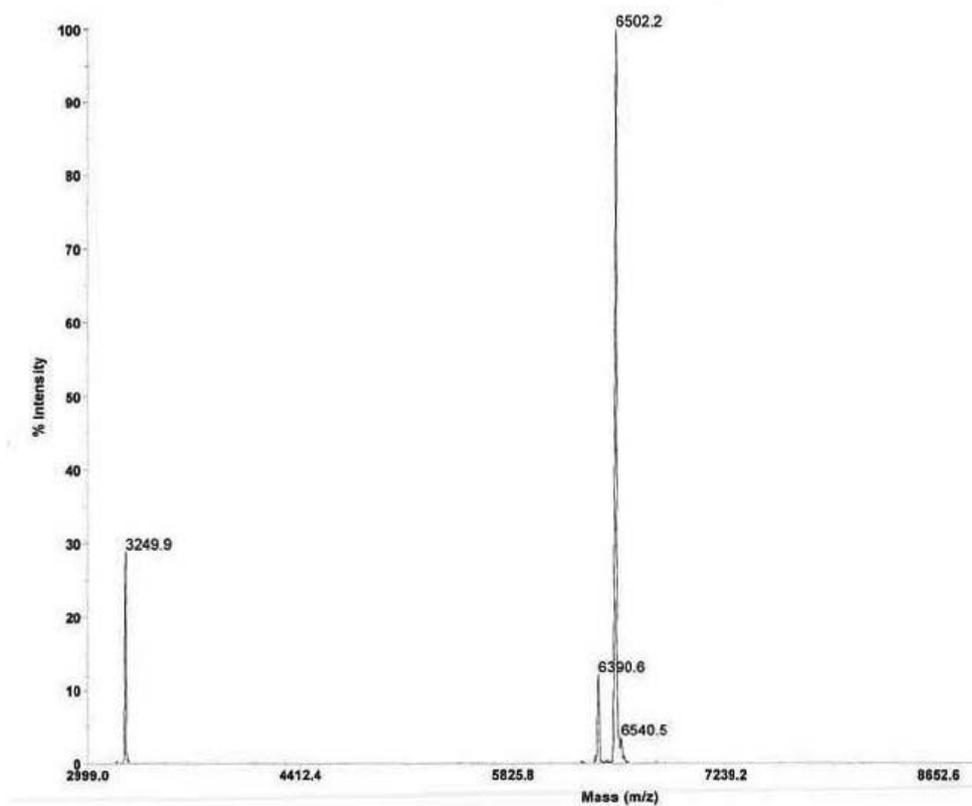


Figura 10.25 Espectro de masa del oligonucleótido T-NM.

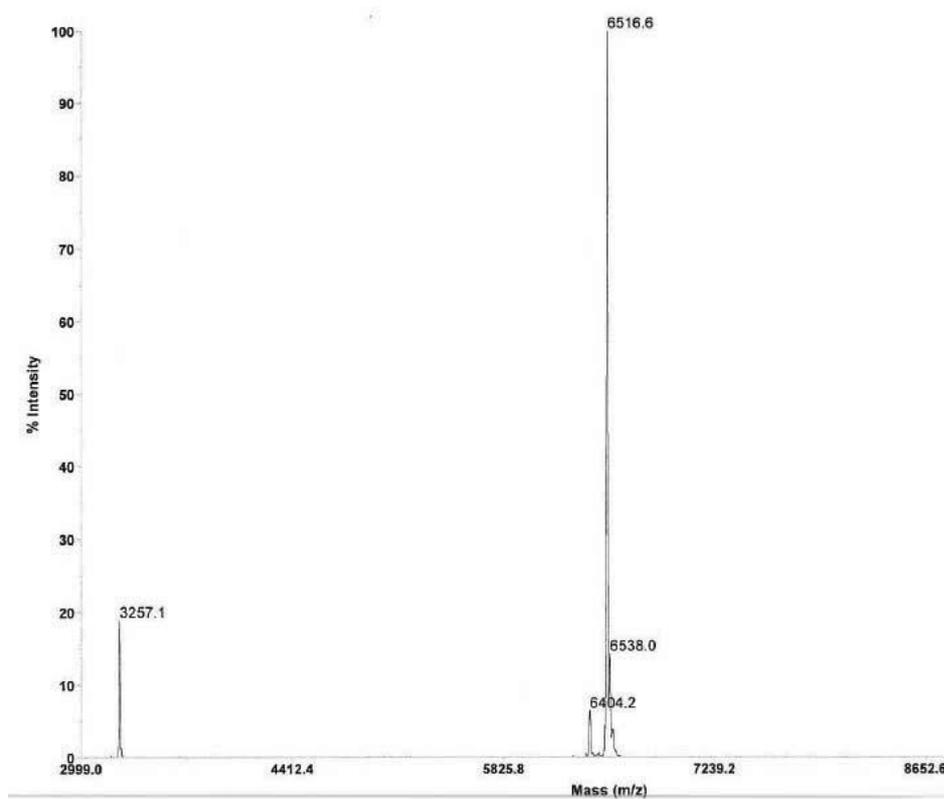


Figura 10.26 Espectro de masa del oligonucleótido T-C(S)₁

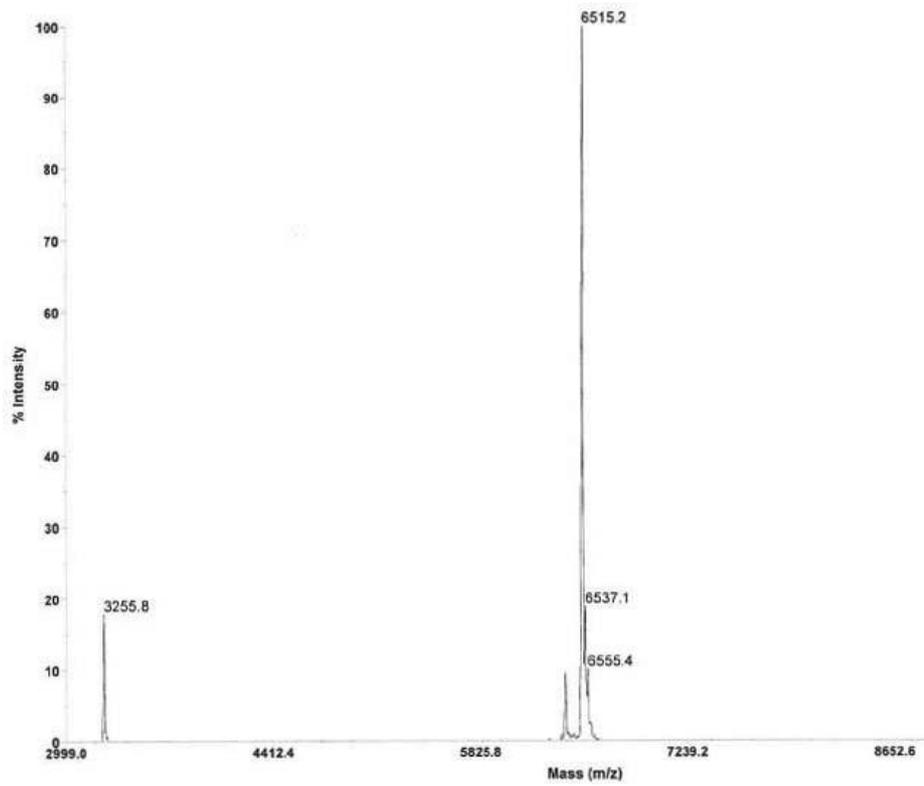


Figura 10.27 Espectro de masa del oligonucleótido T-C(S)₂

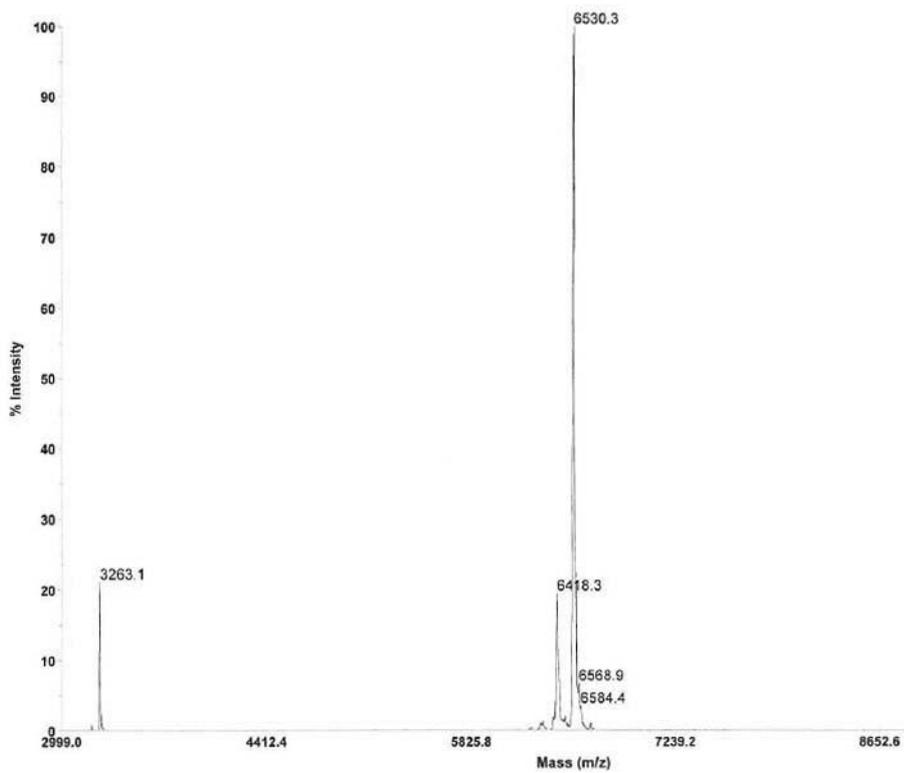


Figura 10.28 Espectro de masa del oligonucleótido T-C(S)₂C(S)₁₄

Olignucleótido para cadena antisentido de siRNA	Secuencia (5'-3')	Masa calculada	Masa encontrada
ASLucU(S) ₂	UU(S) ₂ JUUUCUCCUUCUUCAGAU	6439.8	6435.5
ASLucU(R) ₂	UU(R) ₂ JUUUCUCCUUCUUCAGAU	6439.8	6436.7
ASLucU(S) ₅	UUUUU(S) ₅ CUCCUUCUUCAGAU	6439.8	6437.7
ASLucU(R) ₅	UUUUU(R) ₅ CUCCUUCUUCAGAU	6439.8	6437.2
ASLucU(S) ₂₀	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUU(S) ₂₀ T	6441.7	6438.8
ASLucU(R) ₂₀	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUU(R) ₂₀ T	6441.7	6437.2
ASLucC(S) ₆	UUUUUC(S) ₆ UCCUUCUUCAGAU	6439.8	6420.0

Olignucleótido para cadena sentido de siRNA	Secuencia (5'-3')	Masa calculada	Masa encontrada
SLucU(S) ₂₀	AUCUGAAGAAGGAGAAAAAU(S) ₂₀ T	6809.2	6805.4
SLucU(R) ₂₀	AUCUGAAGAAGGAGAAAAAU(R) ₂₀ T	6809.2	6805.3

Tabla 10.3 Valores de m/z para los oligonucleótidos de ARN preparados para siRNA.

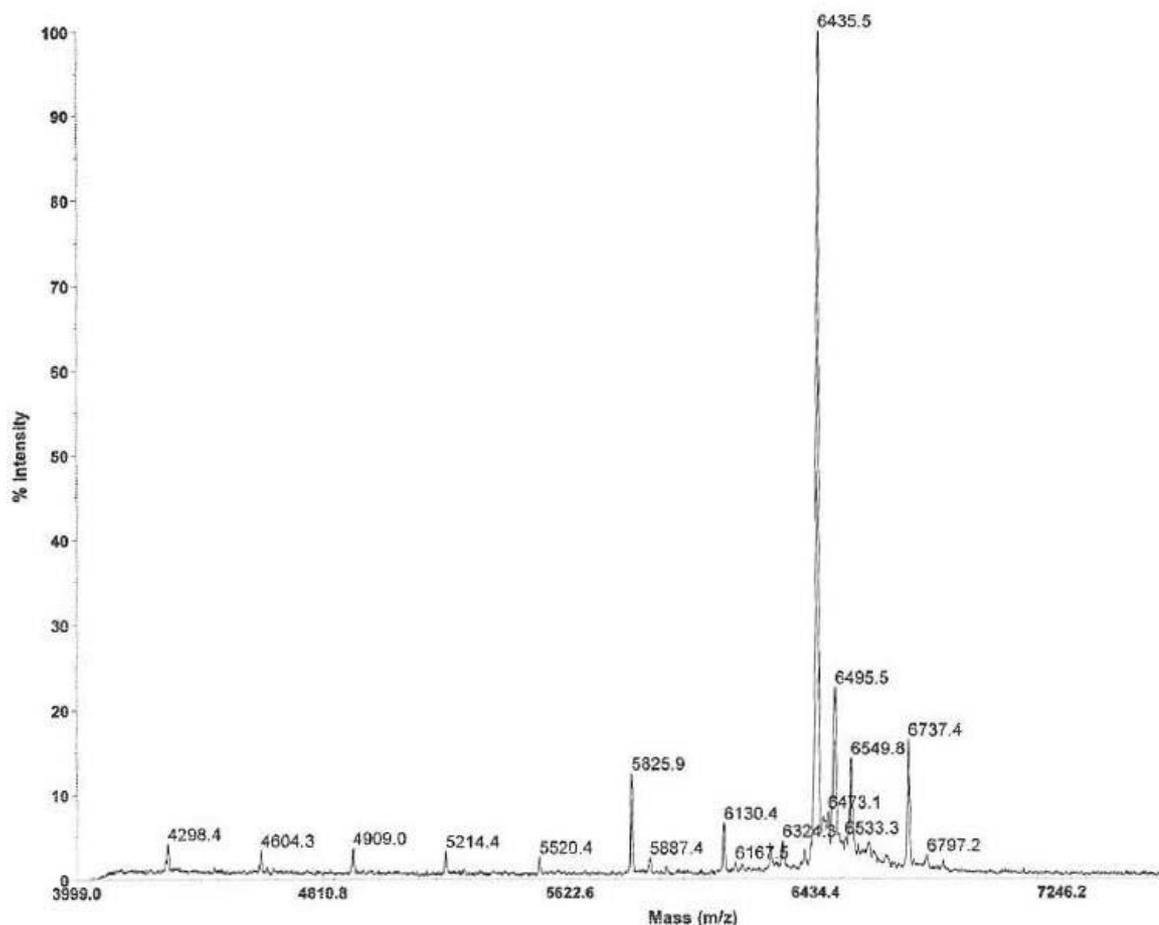


Figura 10.29 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(S)₂

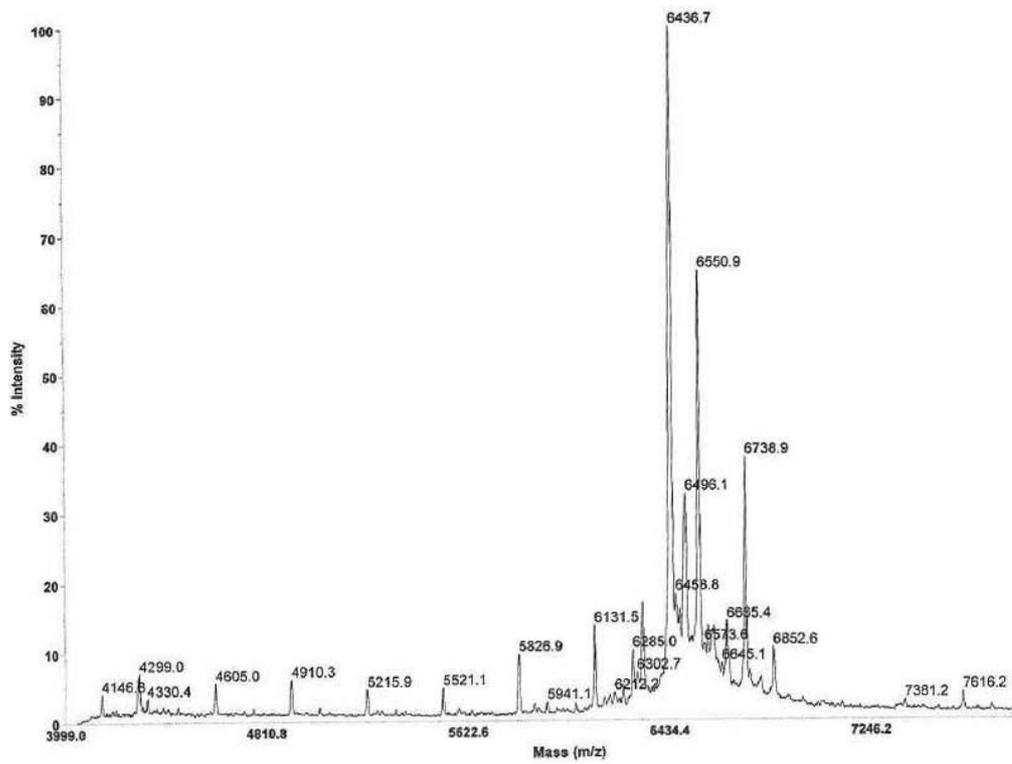


Figura 10.29 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(R)₂

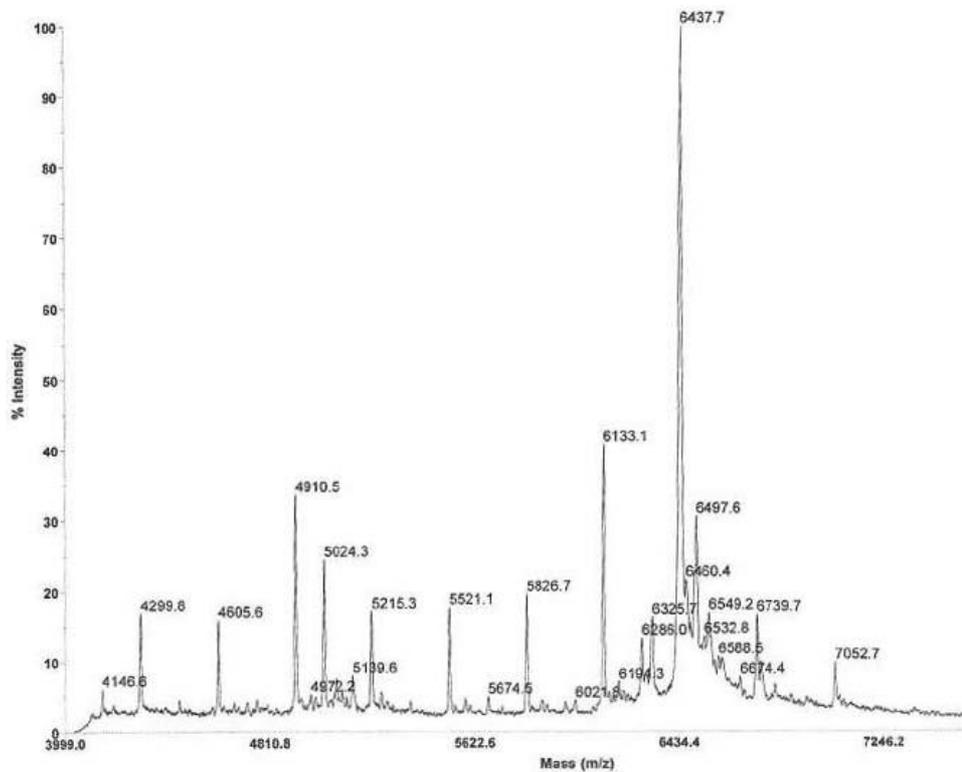


Figura 10.30 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(S)₅

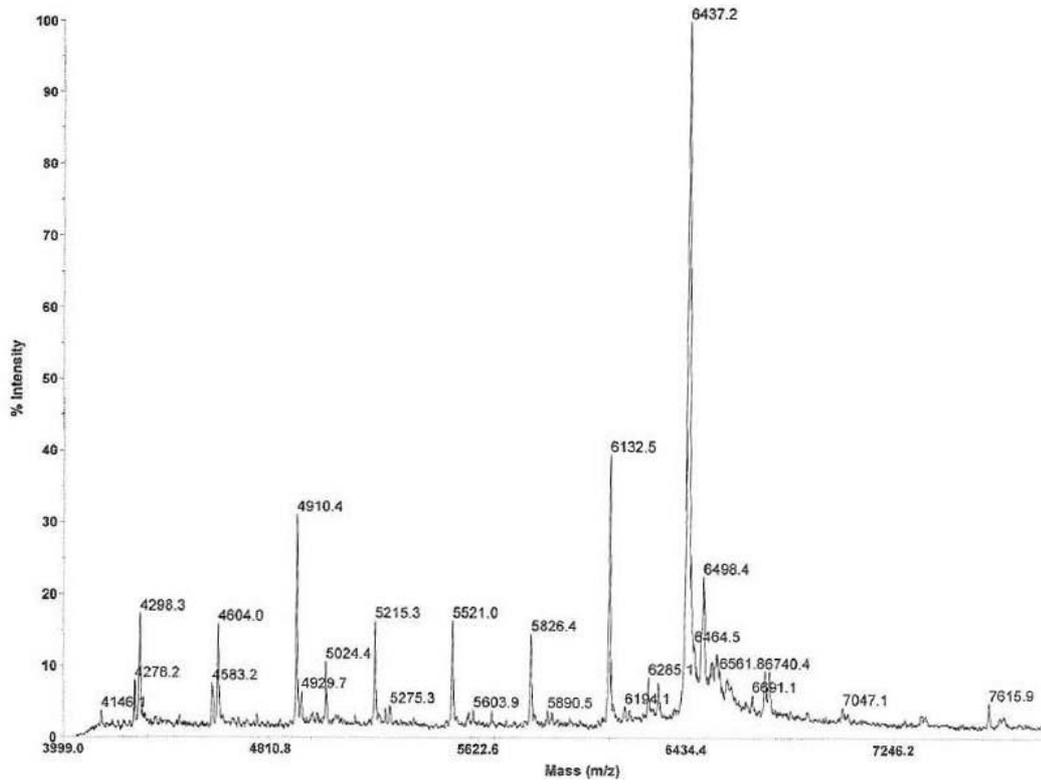


Figura 10.31 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(R)₅

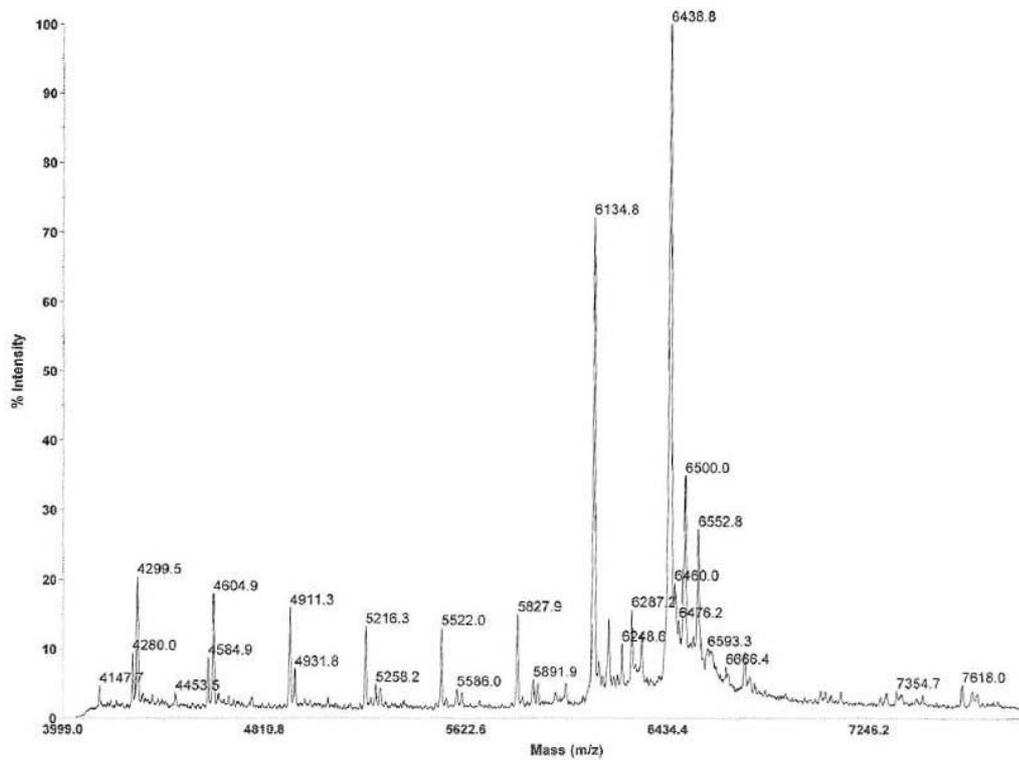


Figura 10.32 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(S)₂₀

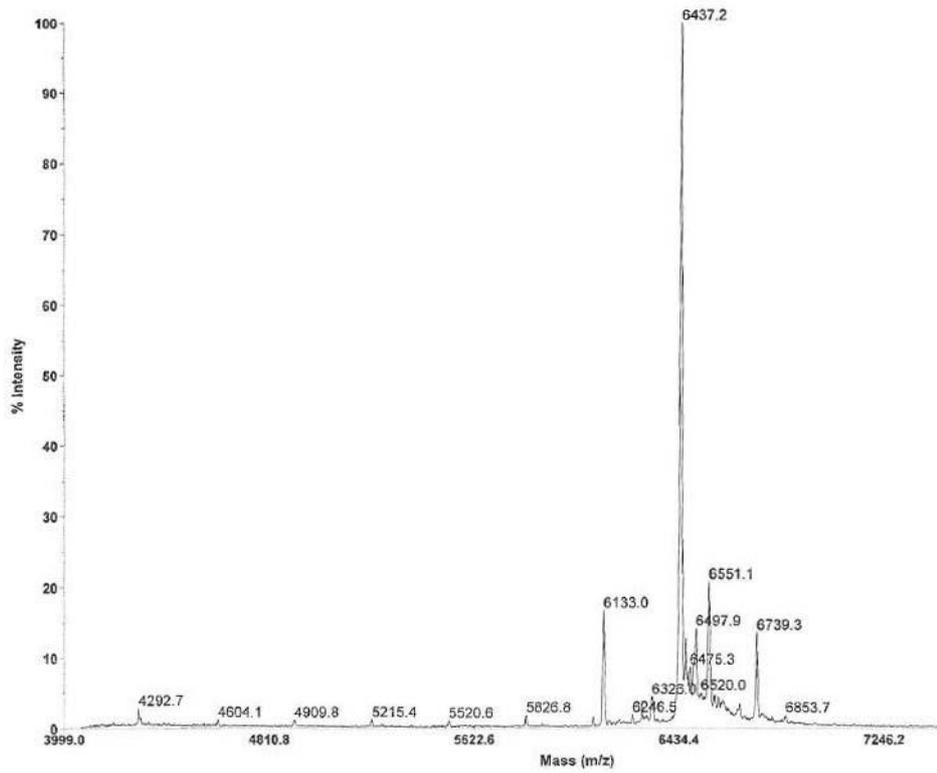


Figura 10.33 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucU(R)₂₀

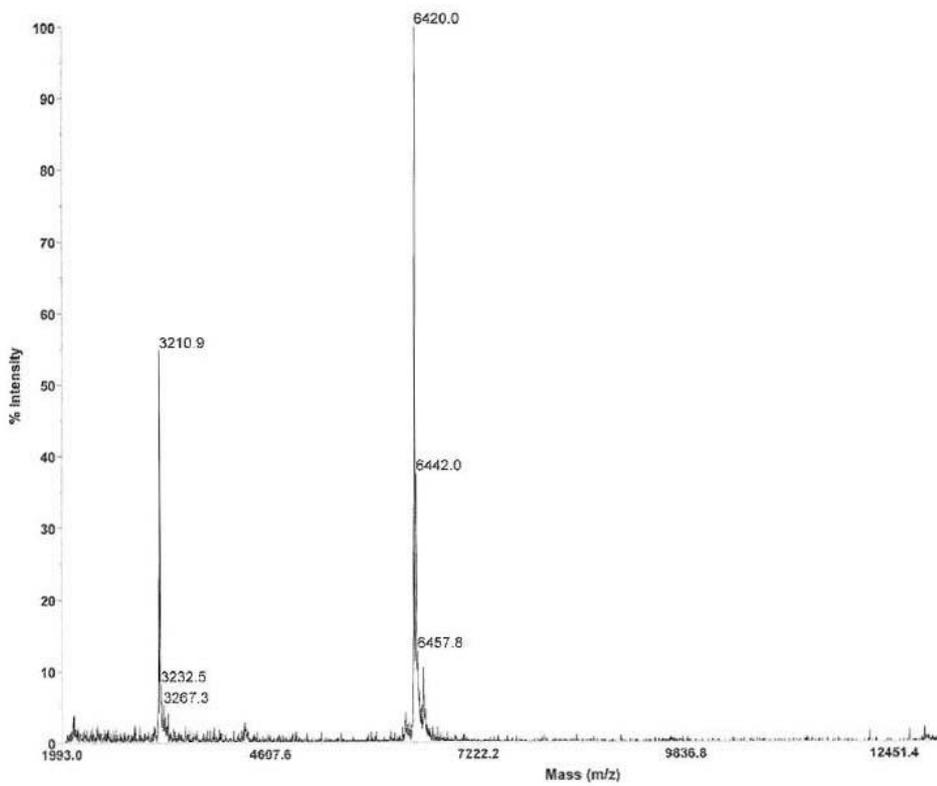


Figura 10.34 Espectro de masa del oligonucleótido ASLucC(S)₆

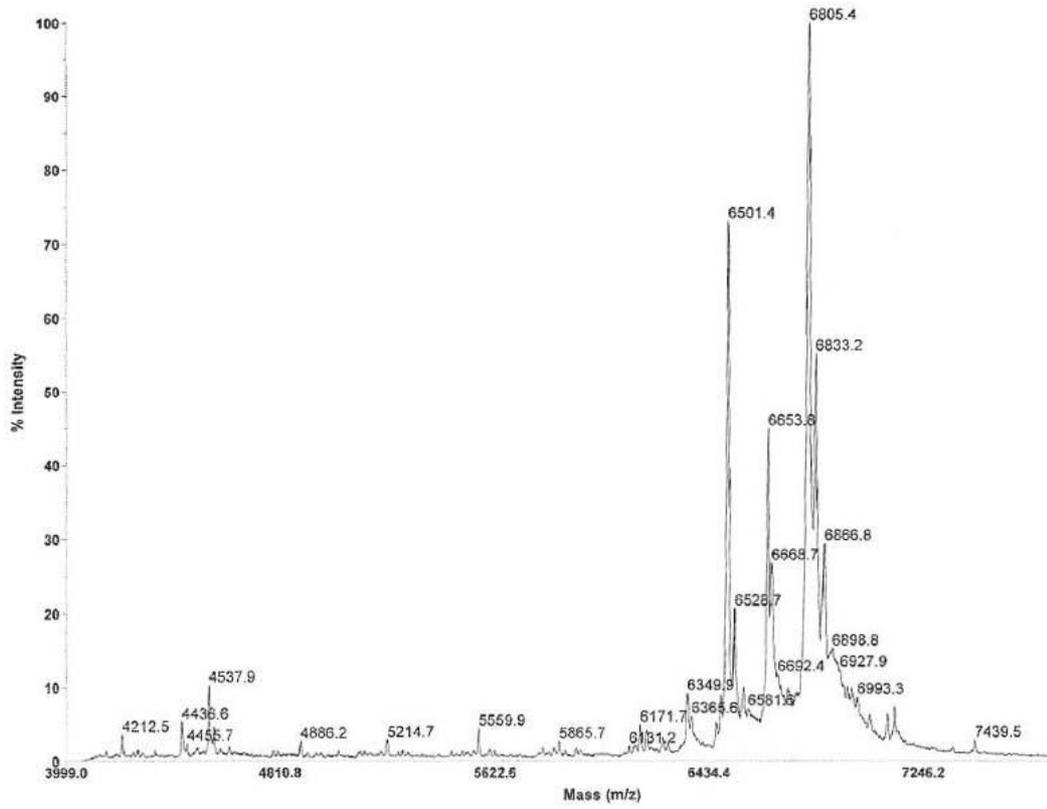


Figura 10.35 Espectro de masa del oligonucleótido SLucU(S)₂₀

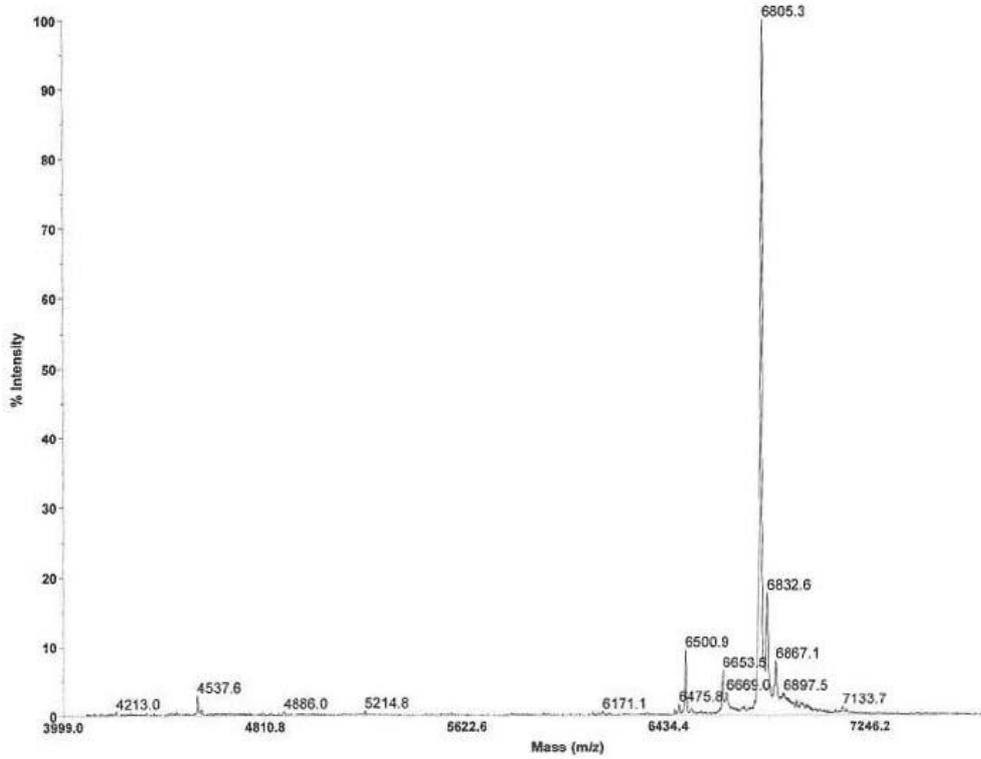


Figura 10.36 Espectro de masa del oligonucleótido SLucU(R)₂₀

Material suplementario al Capítulo 4.

Tiempo (min)	MgCl ₂									
	10 mM		30 mM		50 mM		75 mM		100 mM	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	1,4	1,8	1,9	1,6	4,3	0,6	2,7	1,0	4,8	3,6
2	2,4	3,5	2,7	0,8	4,9	4,7	3,8	3,5	6,5	3,9
4	4,6	2,3	6,3	1,2	7,7	0,0	6,9	1,3	11,9	6,7
6	7,4	4,7	6,7	1,2	10,1	3,9	12,8	11,8	16,0	14,7
8	10,5	2,1	11,6	2,7	16,9	8,2	21,4	5,9	22,0	14,1
12	11,1	1,3	22,6	2,0	35,4	8,3	34,8	4,6	36,9	10,8
15	15,5	4,4	26,7	1,6	39,2	6,7	43,3	6,3	46,0	10,4
30	32,6	2,9	47,0	1,2	61,1	1,8	62,7	5,4	62,5	5,0
60	55,8	4,5	70,2	2,2	74,8	0,4	76,9	1,1	76,1	2,1
120	76,5	2,8	79,8	1,9	78,8	2,0	79,6	3,3	79,4	2,5
180	79,9	1,4	83,0	0,9	80,0	4,2	82,2	4,3	79,9	2,3

Tabla 10.4 Actividad de DZ 8-17 en función de la concentración de MgCl₂ con sustrato quimera.

%; Porcentaje de hidrólisis de sustrato quimera; SD: desvío estándar del promedio de triplicados.

Tiempo (min)	MgCl ₂									
	10 mM		30 mM		50 mM		75 mM		100 mM	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	1,7	3,2	1,9	1,5	2,7	0,6	1,8	1,5	1,3	0,4
2	3,1	3,4	2,6	2,3	1,9	0,0	2,4	1,9	1,6	1,3
4	2,8	4,2	1,4	0,8	2,2	0,6	3,9	0,9	6,0	3,1
6	2,3	2,4	3,8	0,2	2,6	1,5	6,4	1,3	5,5	1,0
8	5,5	1,7	7,2	4,5	5,8	1,7	10,5	2,2	10,7	1,7
12	9,1	2,4	11,3	3,0	14,4	0,7	13,5	1,4	13,7	1,3
15	9,6	0,0	11,4	2,8	16,8	0,9	19,8	1,8	19,9	3,0
30	13,8	4,2	29,9	3,3	33,1	0,9	36,2	4,4	42,1	4,5
60	30,5	5,1	51,7	3,5	55,3	0,7	55,7	1,0	53,9	0,1
120	47,0	1,7	67,4	3,5	65,4	0,2	67,0	0,8	64,3	1,2
180	55,5	2,6	71,1	2,4	69,8	1,9	70,8	0,3	65,9	3,2

Tabla 10.5 Actividad de DZ 8-17 en función de la concentración de MgCl₂ con sustrato ARN. %: Porcentaje de hidrólisis de sustrato quimera; SD: desvío estándar del promedio de triplicados.

Tiempo (min)	DZ 8-17		DZ 8-17 C(R) ₈		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	
	%	SD	%	SD	%	SD
	hidrólisis		hidrólisis		hidrólisis	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	4,3	0,6	4,1	5,1	1,2	0,8
2	2,3	1,6	4,7	4,4	2,0	0,3
4	4,7	0,0	4,8	3,2	0,9	0,1
6	10,1	3,9	4,2	3,8	1,2	0,6
8	16,9	8,2	6,0	2,4	2,0	1,3
12	32,0	8,3	9,2	2,2	2,3	0,6
15	39,2	6,7	12,6	1,5	4,0	2,1
30	61,1	1,8	29,2	7,8	10,7	2,3
60	74,8	0,4	38,2	2,4	23,1	3,5
120	78,8	2,0	61,3	3,8	46,9	4,4

180	80,0	4,2	66,3	0,8	59,5	2,2
240	80,0	4,2	75,9	4,2	65,1	1,1
300	80,0	4,2	76,9	9,1	68,7	0,2
	DZ 8-17 B		DZ 8-17 C(R) ₈ B		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁ B	
Tiempo (min)	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,9	1,8	1,3	0,0	2,9	1,2
2	2,8	1,5	1,1	0,2	2,3	1,1
4	2,1	2,6	2,9	3,6	2,9	1,3
6	3,9	1,5	3,0	2,6	3,4	3,5
8	5,7	3,0	7,5	2,1	4,3	5,8
12	5,1	2,6	12,8	6,1	4,4	0,8
15	6,7	6,1	20,1	9,5	5,6	3,6
30	19,0	2,2	37,5	0,2	7,5	3,1
60	35,1	3,6	61,8	1,0	9,1	3,1
120	54,5	0,2	75,1	1,2	12,5	4,5
180	58,9	5,2	77,6	0,9	20,9	3,7
240	64,0	2,6	77,7	2,3	22,5	3,7
300	58,3	0,8	76,8	1,4	28,1	5,0

Tabla 10.6 Actividad de las DNazimas 8-17 frente al sustrato quimera.

		DZ 8-17		DZ 8-17 C(R) ₈		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	
Tiempo (min)	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
1	2,7	0,6	1,3	1,7	1,3	0,6	
2	1,9	0,0	2,8	1,7	2,9	2,6	
4	2,2	0,6	3,8	1,8	2,6	3,3	
6	2,6	1,5	3,7	1,9	5,3	4,0	
8	5,8	1,7	9,4	1,5	7,1	4,2	
12	14,4	0,7	10,2	1,8	9,9	5,5	
15	16,8	0,9	22,4	3,7	12,7	2,1	
30	33,1	0,9	33,1	3,3	23,2	1,7	
60	55,3	0,7	49,7	1,9	38,8	3,4	
120	65,4	0,2	61,7	2,9	49,5	2,6	
180	69,8	1,9	64,7	1,0	56,2	0,9	
240	--	--	68,2	0,7	58,3	2,6	
300	--	--	67,5	3,2	61,9	1,5	

		DZ 8-17 B		DZ 8-17 C(R) ₈ B		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁ B	
Tiempo (min)	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD	% hidrólisis	SD	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
1	1,6	2,1	2,2	1,6	1,0	0,8	
2	1,5	1,8	3,8	2,2	1,3	0,6	
4	1,2	3,9	3,5	1,0	2,0	2,6	
6	1,8	2,7	4,7	0,9	5,2	2,3	
8	4,6	3,9	11,4	5,1	5,0	4,6	
12	9,0	4,0	10,2	4,5	5,6	4,5	
15	10,6	2,9	15,9	2,1	4,4	0,9	
30	18,9	4,8	28,5	4,6	6,1	3,6	
60	35,4	3,8	45,7	4,8	6,6	5,8	
120	50,0	1,5	59,8	4,1	9,6	0,9	
180	56,9	2,2	64,7	1,0	17,6	2,4	
240	60,4	2,0	68,5	1,3	24,9	6,9	

300	62,1	1,7	68,9	1,8	27,7	4,5
-----	------	-----	------	-----	------	-----

Tabla 10.7 Actividad de las DNAzimas 8-17 frente al sustrato ARN.

Tiempo (min)	DZ 8-17		DZ 8-17 C(R) ₈		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁		DZ 8-17 B		DZ 8-17 C(R) ₈ B		DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁ B	
	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD
0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
2	52,9	9,2	61,9	4,0	87,2	3,4	45,2	2,6	81,6	5,5	83,1	0,7
4	26,1	8,2	43,7	3,2	72,4	2,5	35,8	3,4	66,5	6,6	72,4	0,9
8	9,6	2,9	24,6	3,1	53,8	3,2	28,8	2,2	50,3	6,6	44,6	0,6
15	7,7	3,7	12,9	2,3	39,8	0,7	25,4	5,3	31,5	4,5	41,1	0,5
30	8,3	4,5	9,0	1,5	30,9	7,0	22,0	3,8	20,2	1,9	30,3	1,7
60	8,3	4,0	7,2	1,2	13,8	2,2	20,3	3,8	14,9	1,0	14,3	1,3
120	6,2	5,2	9,7	4,7	9,1	0,5	18,4	3,9	10,6	0,4	8,4	1,1

Tabla 10.8 Estabilidad de las DNAzimas 8-17 frente a la endonucleasa RQ1.

Tiempo (horas)	DZ 8-17		DZ 8-17 C(R) ₈		DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁		DZ 8-17 B		DZ 8-17 C(R) ₈ B		DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	
	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD	% Dz	SD
0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
1	86,8	5,6	81,6	2,4	81,4	2,4	76,3	1,7	84,4	3,7	83,3	1,5
2	65,5	3,0	61,5	0,4	65,2	1,8	65,4	3,6	67,8	0,6	67,1	2,3
3	50,2	4,5	52,1	3,6	53,8	0,8	55,1	3,7	57,3	1,8	58,6	4,2
4	38,6	2,1	45,4	1,9	48,5	2,6	51,7	3,1	57,5	3,8	51,2	4,5
5	34,1	2,2	43,0	0,0	42,9	4,0	50,7	3,1	54,3	6,3	47,4	3,7
6	30,0	2,1	39,0	2,8	38,3	1,4	48,3	3,9	56,4	4,0	43,4	3,2
7	18,7	3,0	34,3	3,4	33,9	1,4	48,2	4,6	56,2	3,7	36,9	5,9
24	15,8	0,7	32,8	3,4	33,6	1,5	48,8	3,9	54,4	5,7	36,5	1,6

Tabla 10.9 Estabilidad de las DNAzimas 8-17 frente a un lisado celular.

DNAzima	k_{act}	Error	k_{deg}	Error	k_{act}/k_{deg}	Error
DZ 8-17	0,044	0,004	0,38	0,02	0,11	0,01
DZ 8-17 C(R) ₈	0,012	0,001	0,24	0,01	0,049	0,006
DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	0,0065	0,0009	0,07	0,01	0,09	0,02
DZ 8-17 B	0,014	0,002	0,54	0,07	0,025	0,004
DZ 8-17 C(R) ₈ B	0,023	0,002	0,098	0,008	0,23	0,03
DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	0,002	0,001	0,08	0,02	0,03	0,02

Tabla 10.10 Relación actividad-estabilidad con sustrato quimera y endonucleasa RQ1

DNAzima	k_{act}	Error	k_{deg}	Error	k_{act}/k_{deg}	Error
DZ 8-17	0,022	0,002	0,38	0,02	0,057	0,007
DZ 8-17 C(R) ₈	0,022	0,002	0,24	0,01	0,094	0,009
DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	0,0158	0,0008	0,07	0,01	0,22	0,03
DZ 8-17 B	0,0131	0,0007	0,54	0,07	0,024	0,003
DZ 8-17 C(R) ₈ B	0,017	0,001	0,098	0,008	0,18	0,02
DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	0,001	0,001	0,08	0,02	0,01	0,01

Tabla 10.11 Relación actividad-estabilidad con sustrato ARN y endonucleasa RQ1.

DNAzima	k_{act}	Error	k_{deg}	Error	k_{act}/k_{deg}	Error
DZ 8-17	0,044	0,004	0,29	0,03	0,15	0,02
DZ 8-17 C(R) ₈	0,012	0,001	0,40	0,03	0,029	0,004
DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	0,0065	0,0009	0,37	0,02	0,018	0,002
DZ 8-17 B	0,014	0,002	0,60	0,03	0,023	0,003
DZ 8-17 C(R) ₈ B	0,023	0,002	0,60	0,09	0,038	0,007
DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	0,002	0,001	0,35	0,03	0,006	0,004

Tabla 10.12 Relación actividad-estabilidad con sustrato quimera y lisado celular

DNAzima	k_{act}	Error	k_{deg}	Error	k_{act}/k_{deg}	Error
DZ 8-17	0,022	0,002	0,29	0,03	0,07	0,01
DZ 8-17 C(R) ₈	0,022	0,002	0,40	0,03	0,056	0,006
DZ 8-17 C(R) ₈ -C(S) ₁₁	0,0158	0,0008	0,37	0,02	0,043	0,004
DZ 8-17 B	0,0131	0,0007	0,60	0,03	0,022	0,002
DZ 8-17 C(R) ₈ B	0,017	0,001	0,60	0,09	0,029	0,005
DZ 8-17 C(S) ₈ -C(S) ₁₁ B	0,001	0,001	0,35	0,03	0,002	0,006

Tabla 10.13 Relación actividad-estabilidad con sustrato ARN y lisado celular

Material suplementario al Capítulo 5.

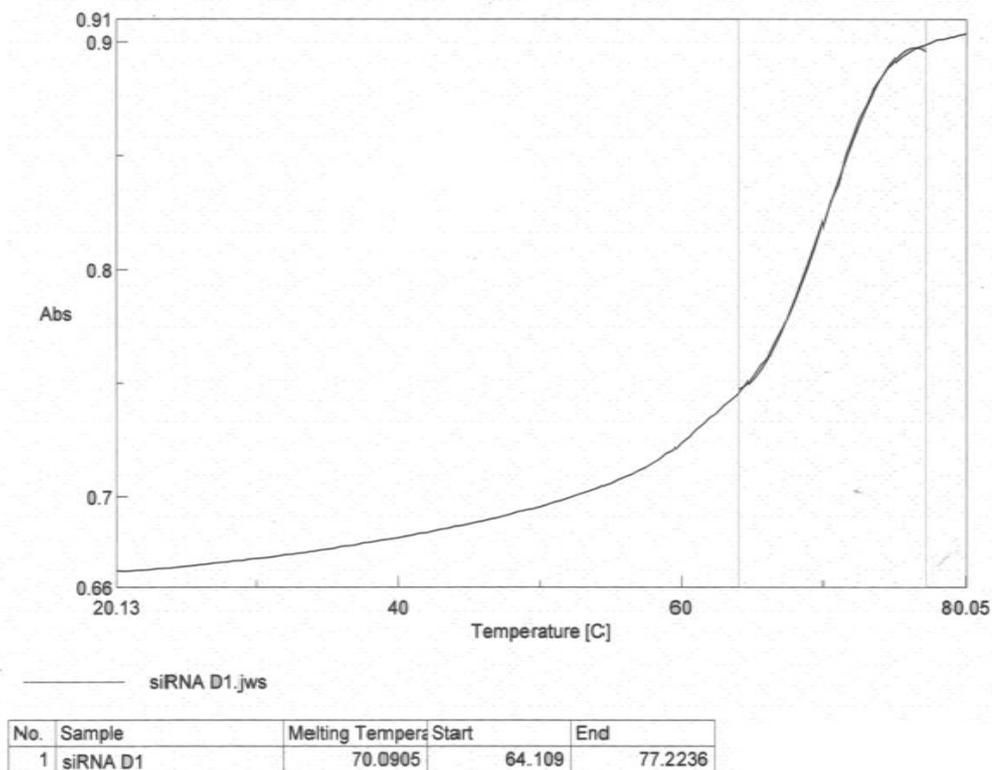


Figura 10.37 Curva de fusión del siRNA D1

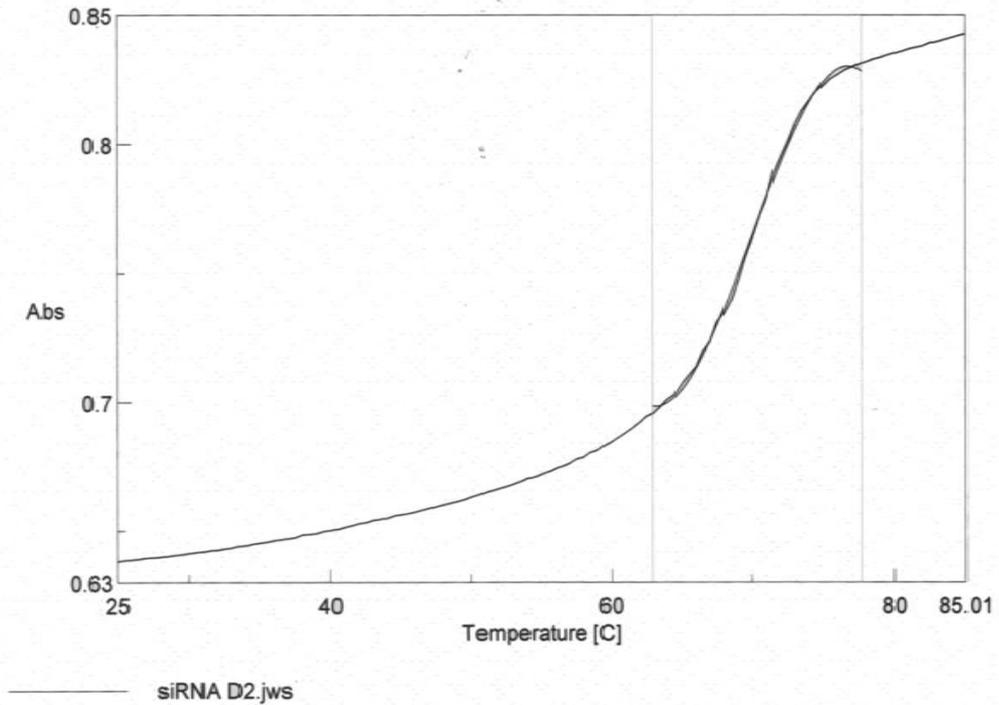


Figura 10.38 Curva de fusión del siRNA D2

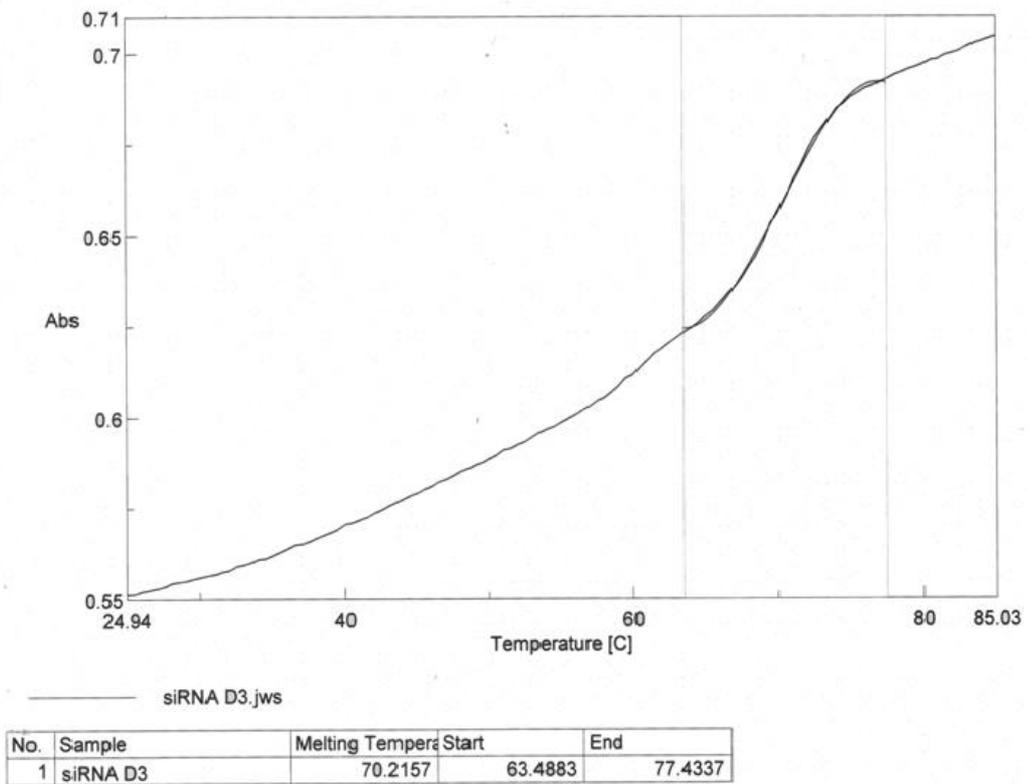


Figura 10.39 Curva de fusión del siRNA D3

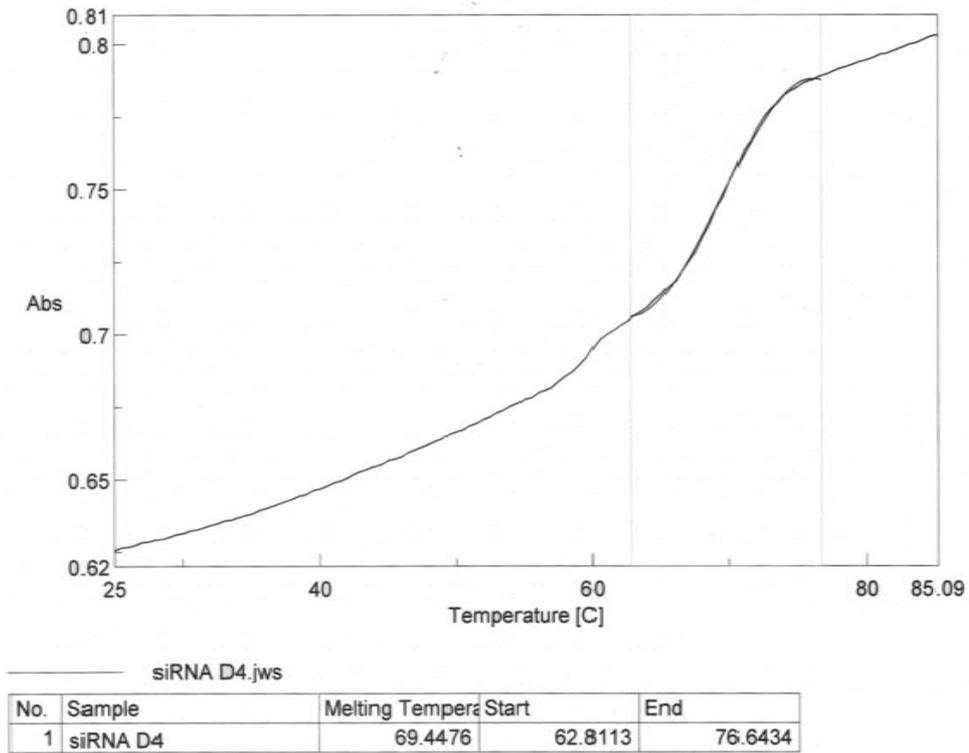


Figura 10.40 Curva de fusión del siRNA D4

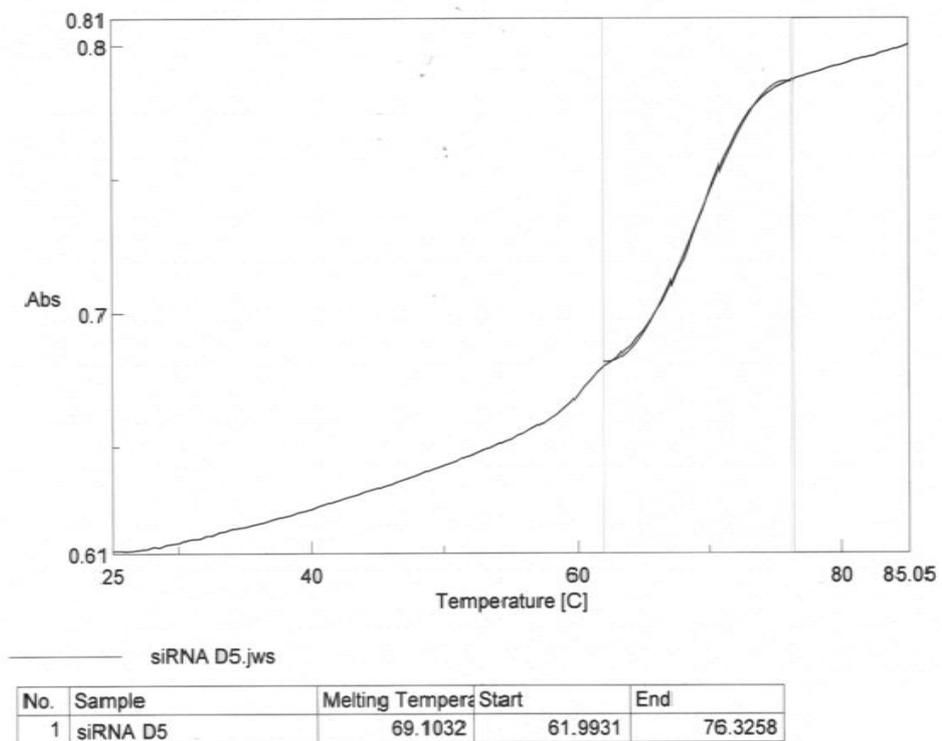
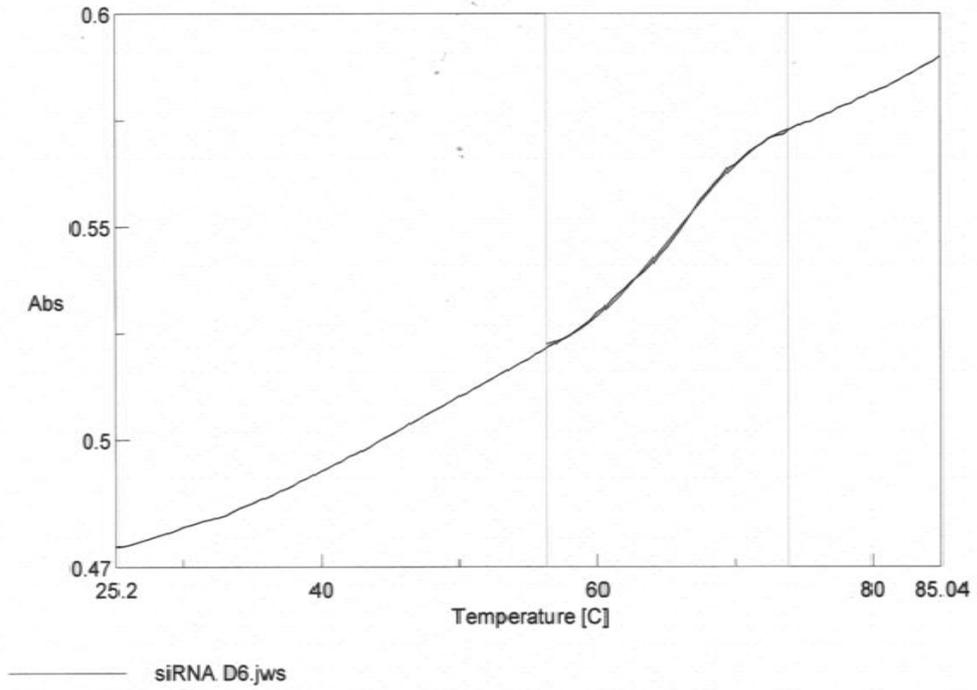
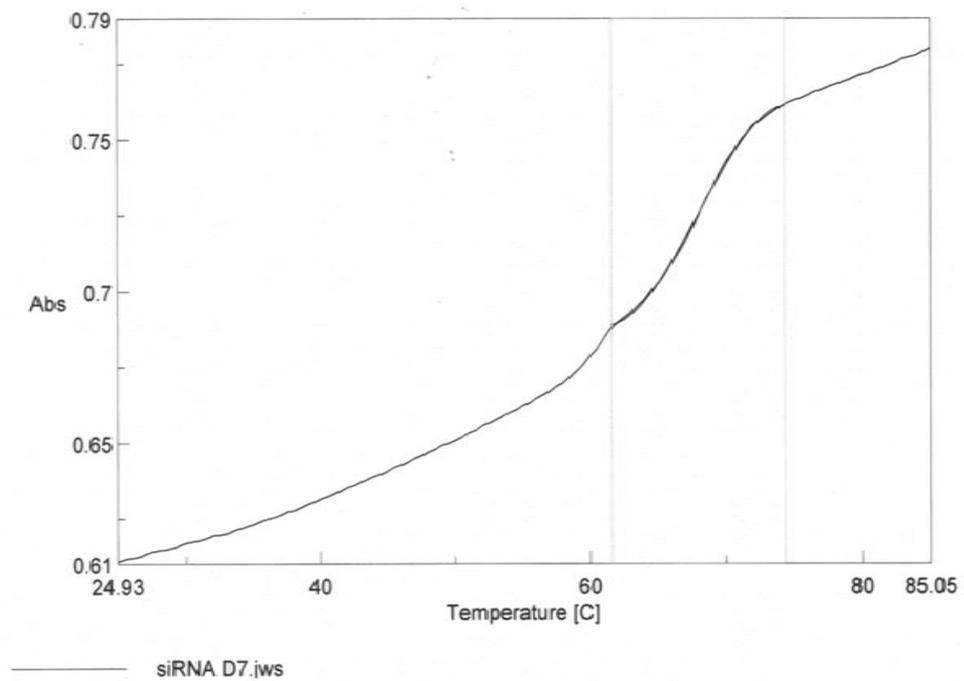


Figura 10.41 Curva de fusión del siRNA D5



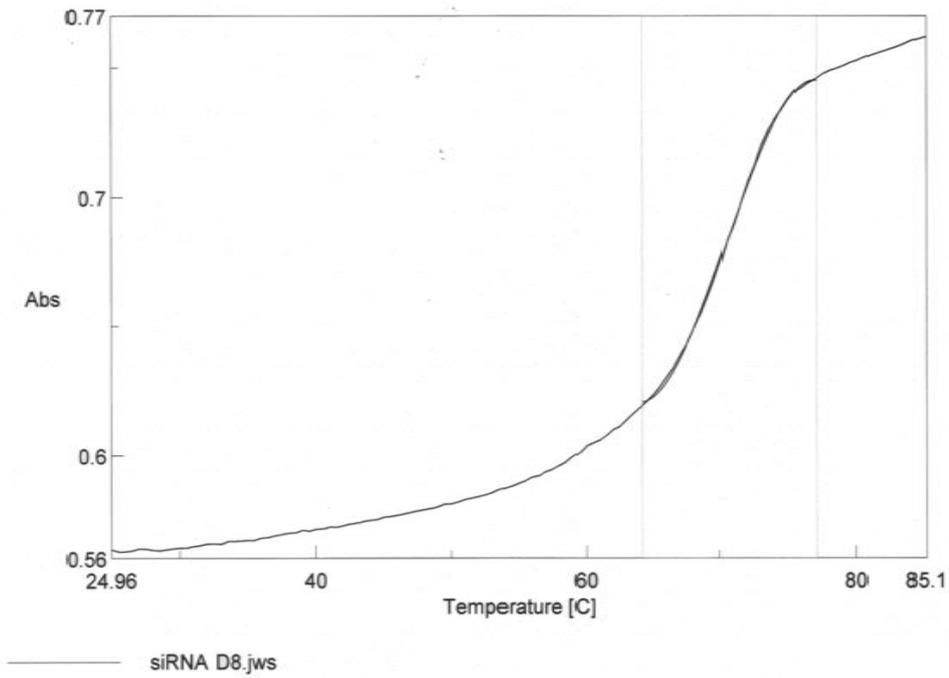
No.	Sample	Melting Temperature	Start	End
1	siRNA D6	65.4869	56.362	73.9188

Figura 10.42 Curva de fusión del siRNA D6



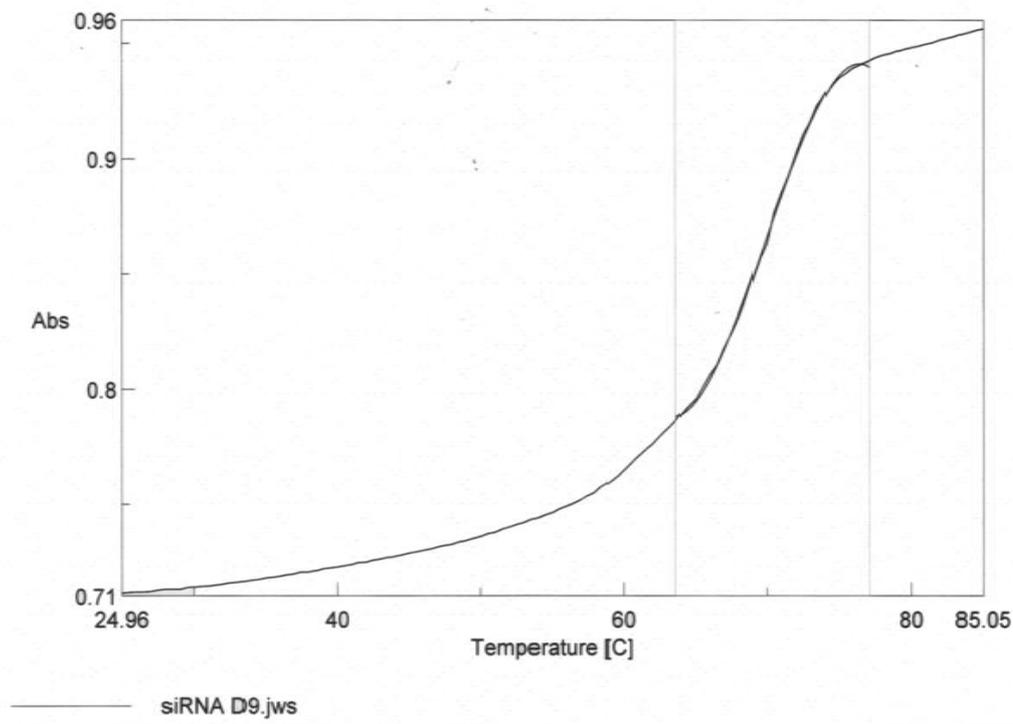
No.	Sample	Melting Temperature	Start	End
1	siRNA D7	67.9394	61.5692	74.3305

Figura 10.43 Curva de fusión del siRNA D7



No.	Sample	Melting Tempera	Start	End
1	siRNA D8	70.5016	64.1867	77.0738

Figura 10.44 Curva de fusión del siRNA D8



No.	Sample	Melting Tempera	Start	End
1	siRNA D9	69.9278	63.6784	77.1703

Figura 10.45 Curva de fusión del siRNA D9

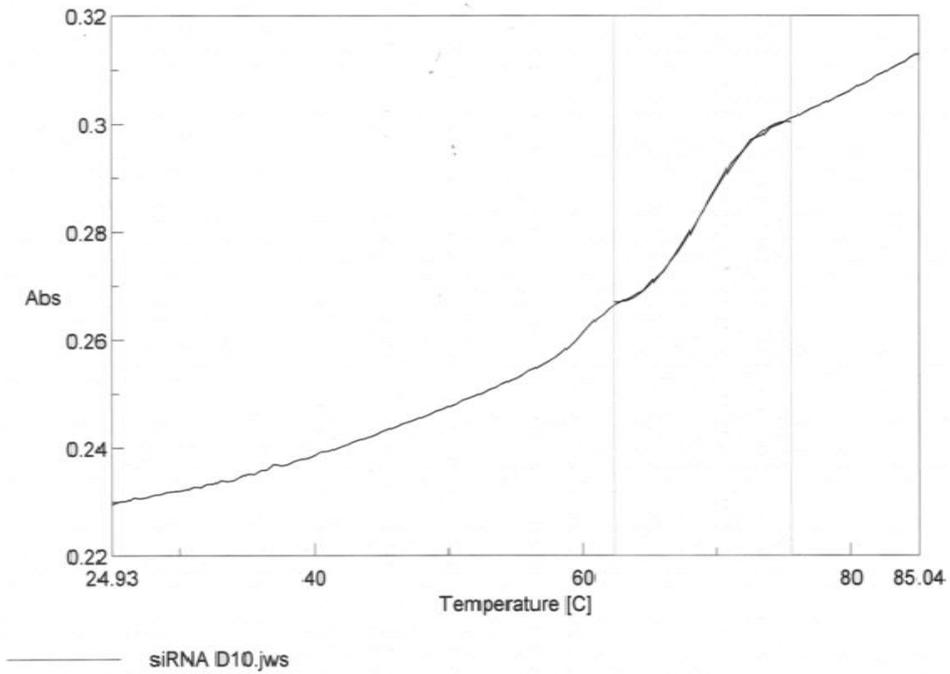


Figura 10.46 Curva de fusión del siRNA D10

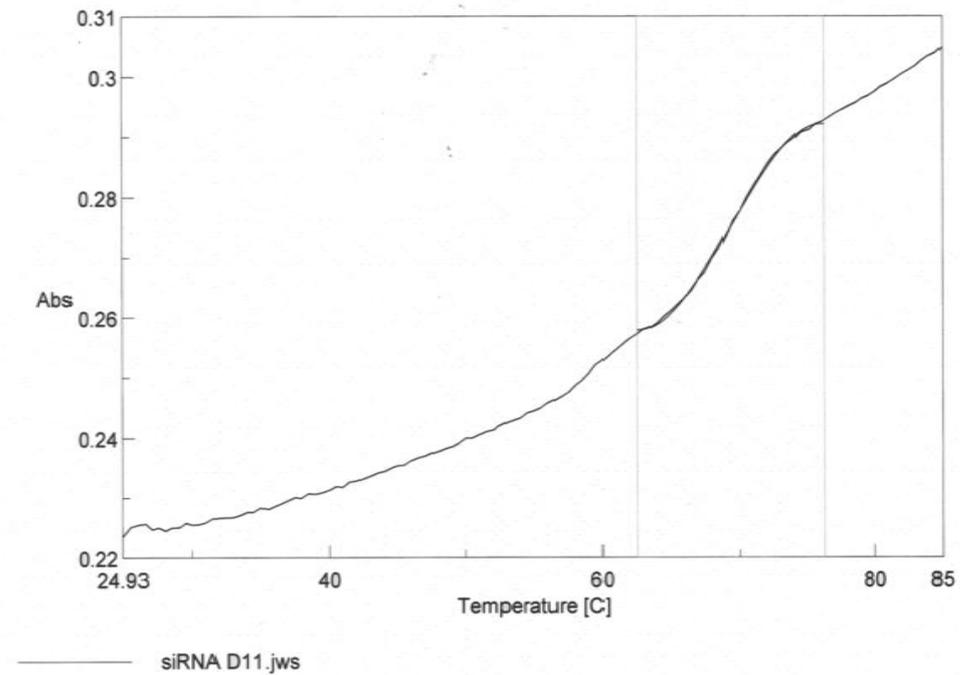


Figura 10.47 Curva de fusión del siRNA D11

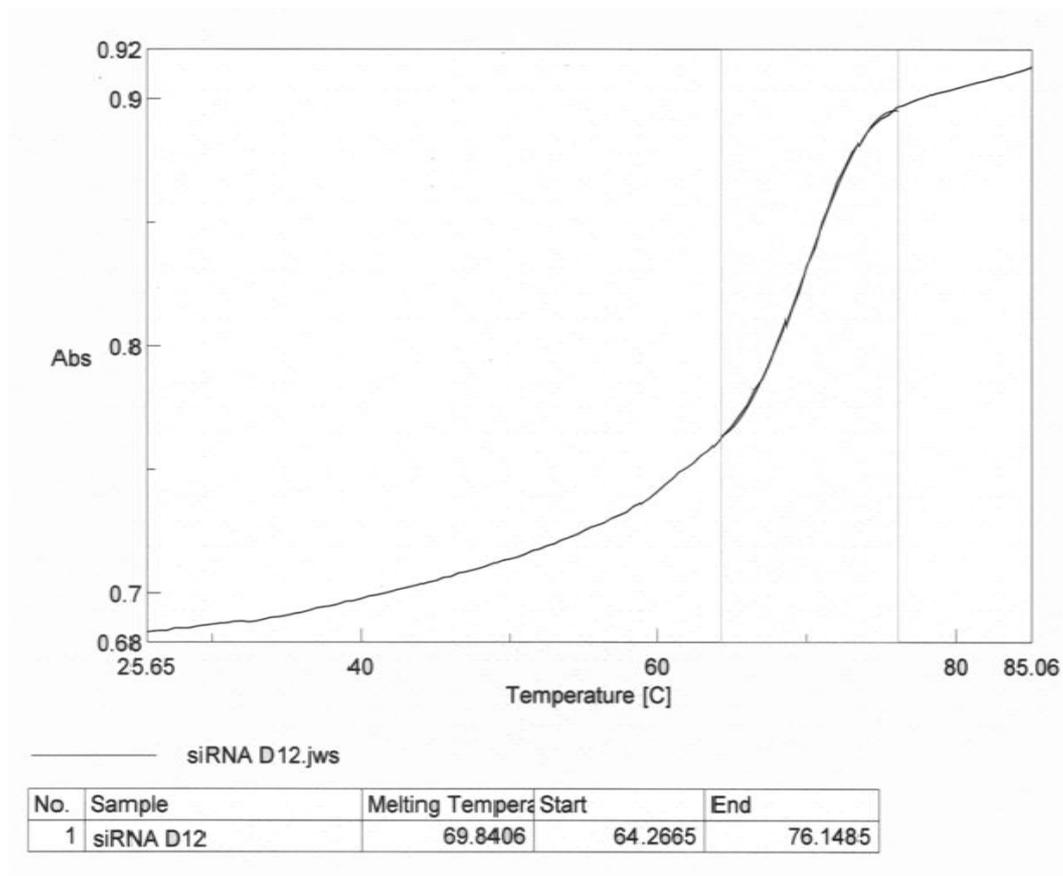


Figura 10.48 Curva de fusión del siRNA D12

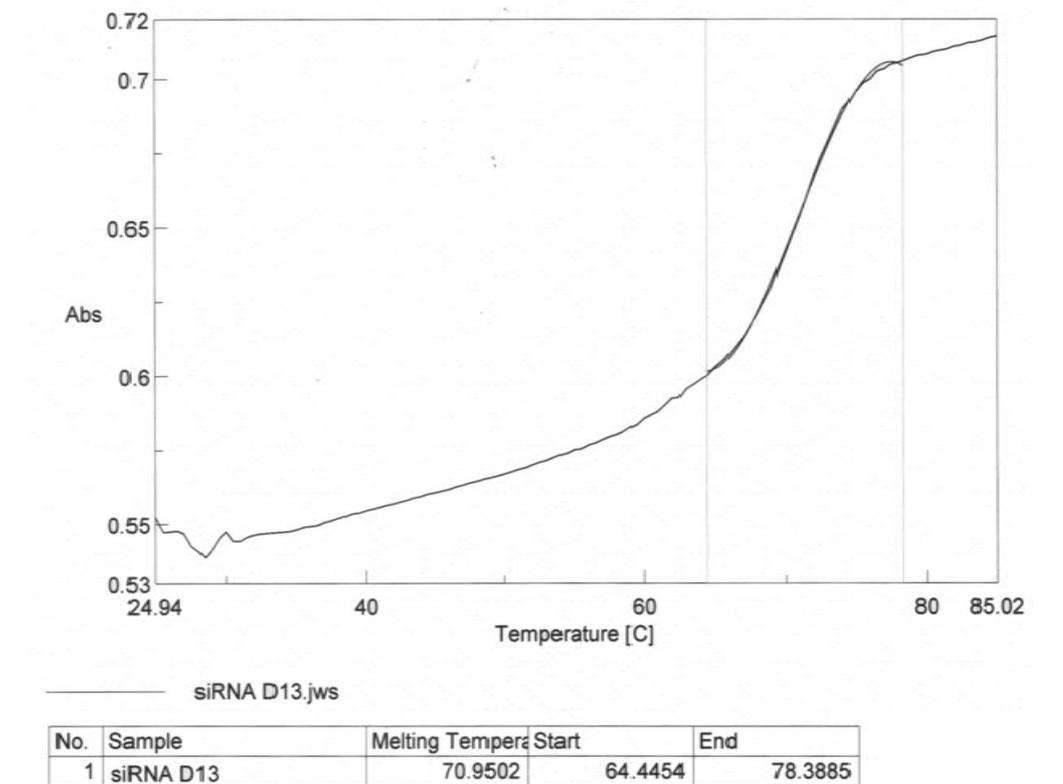
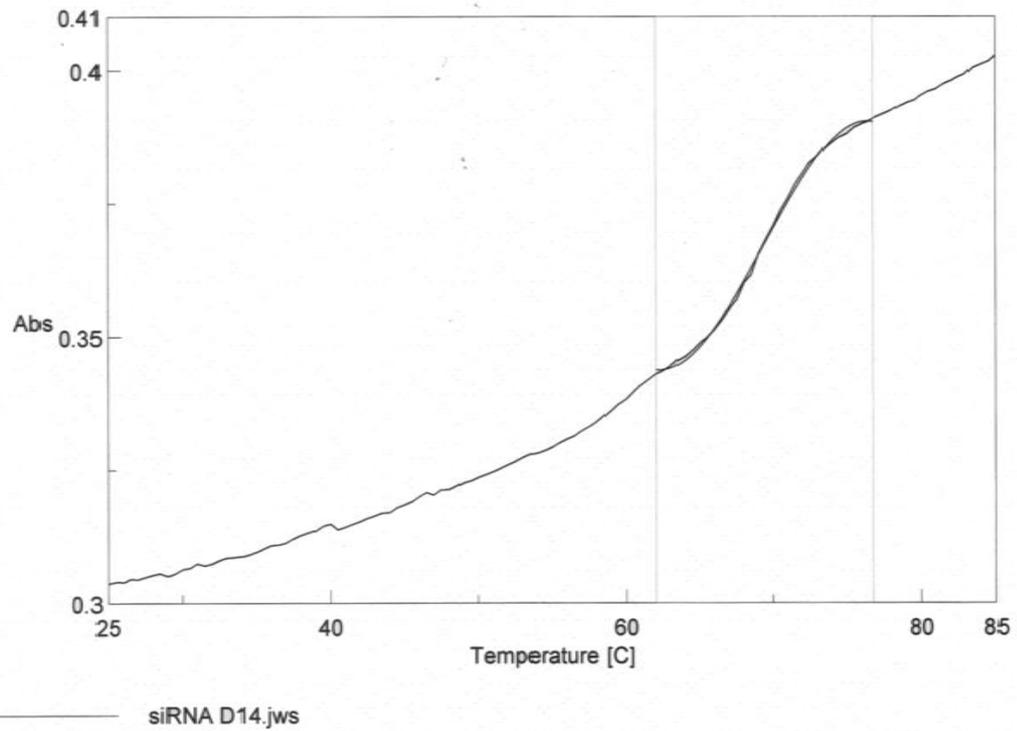
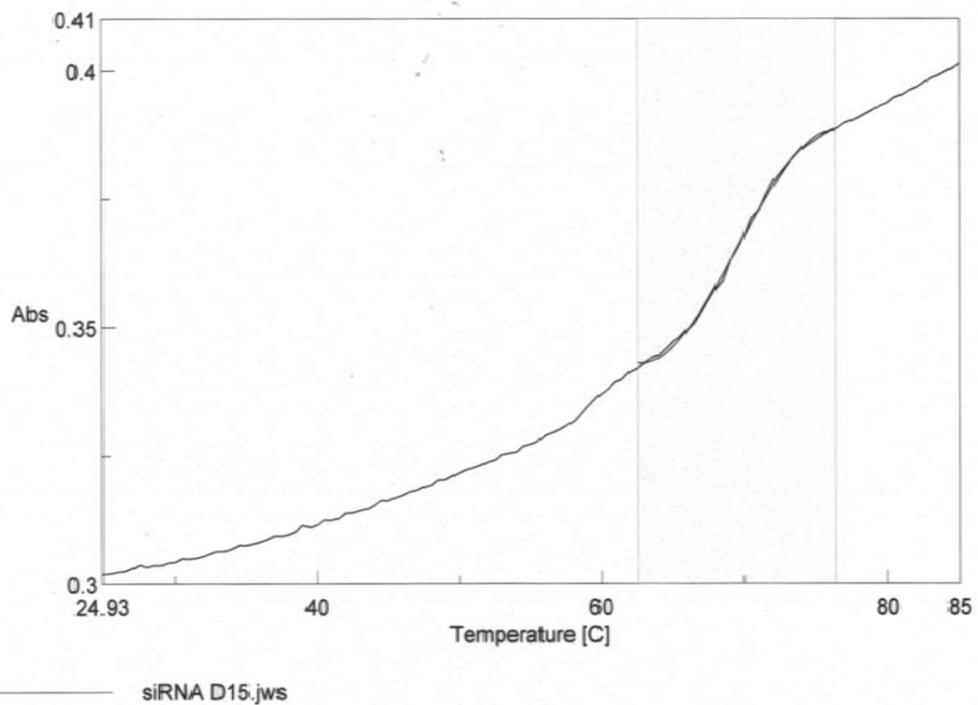


Figura 10.49 Curva de fusión del siRNA D13



No.	Sample	Melting Tempera	Start	End
1	siRNA D14	69.3735	62.0787	76.7978

Figura 10.50 Curva de fusión del siRNA D14



No.	Sample	Melting Tempera	Start	End
1	siRNA D15	69.6286	62.5581	76.3945

Figura 10.51 Curva de fusión del siRNA D15

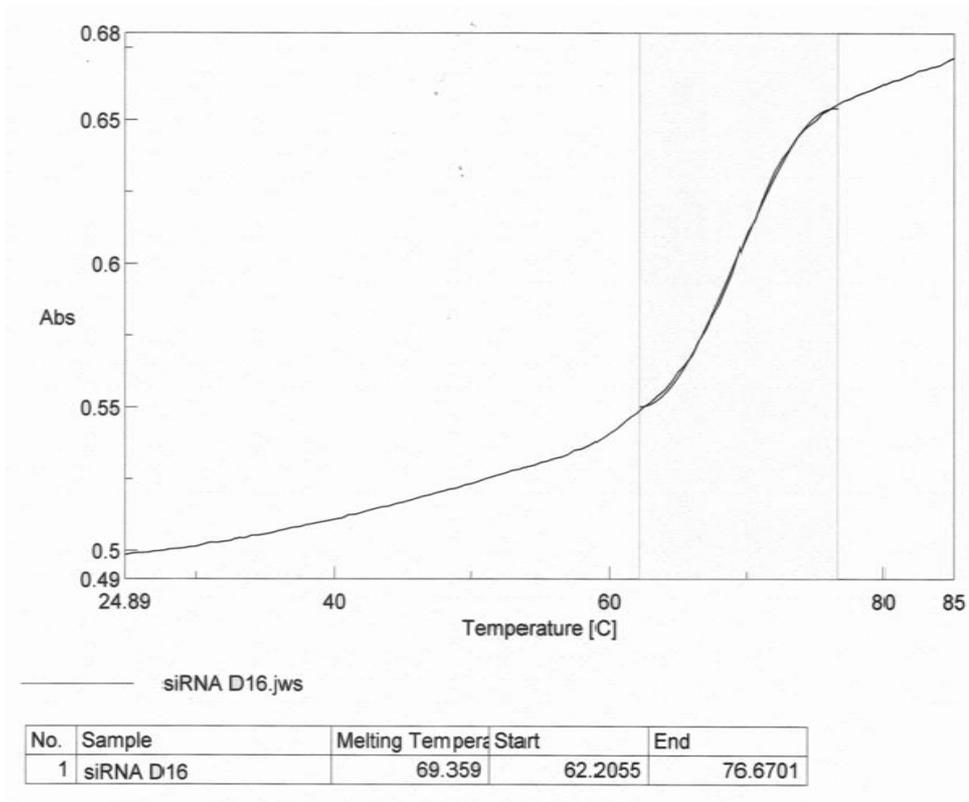


Figura 10.52 Curva de fusión del siRNA D16

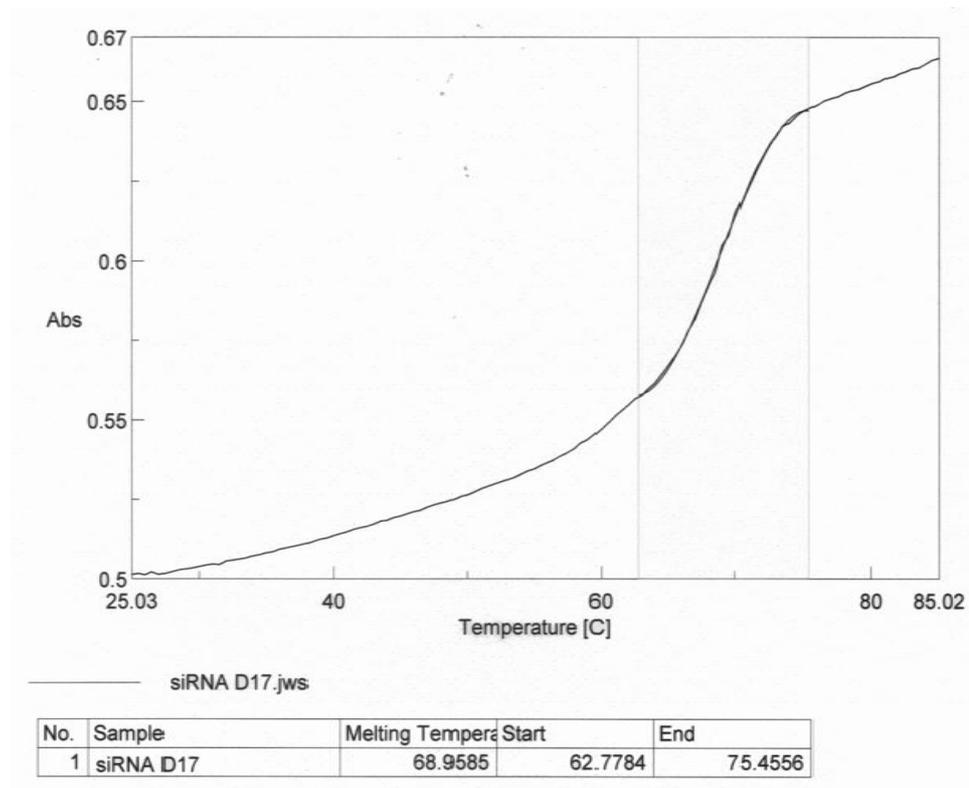


Figura 10.53 Curva de fusión del siRNA D17

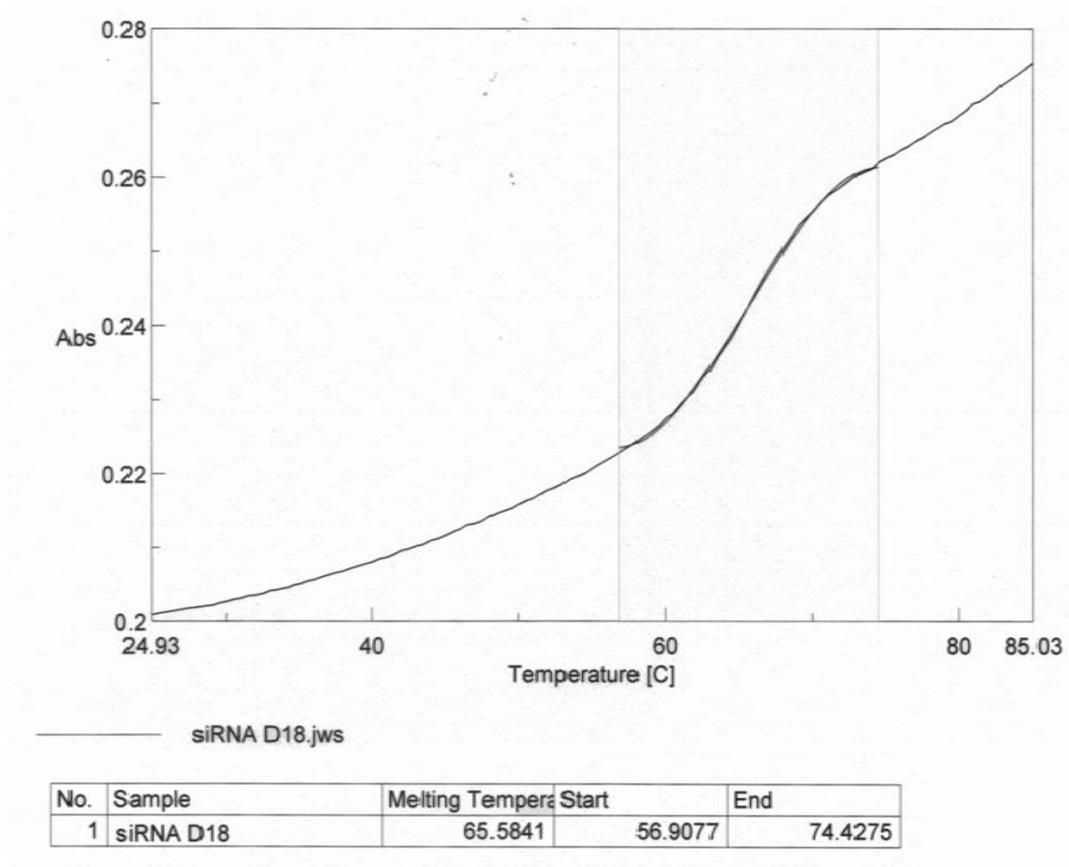


Figura 10.54 Curva de fusión del siRNA D18

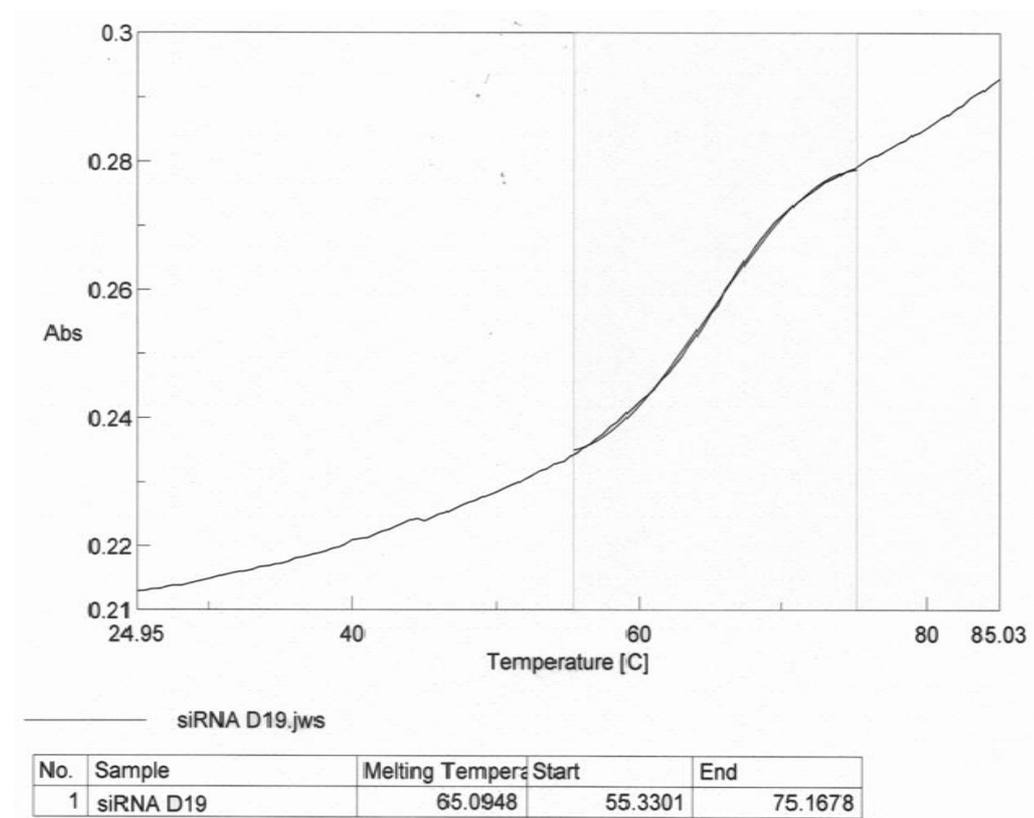


Figura 10.55 Curva de fusión del siRNA D19

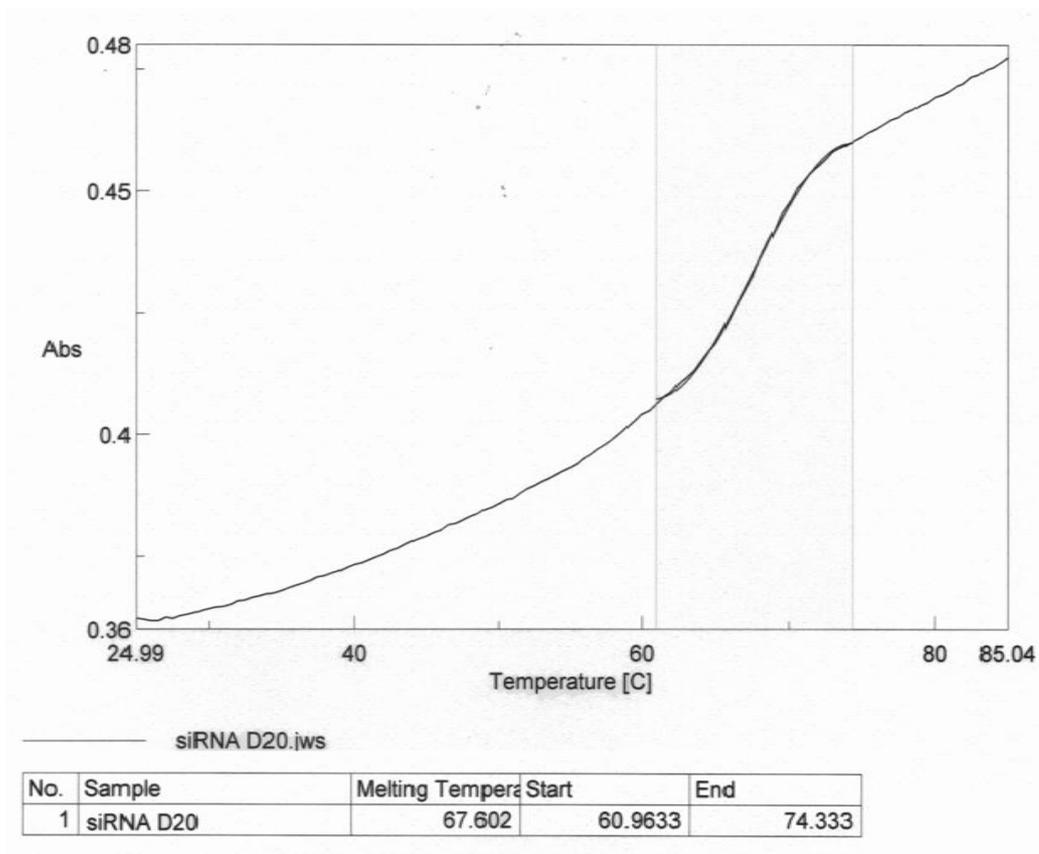


Figura 10.56 Curva de fusión del siRNA D2

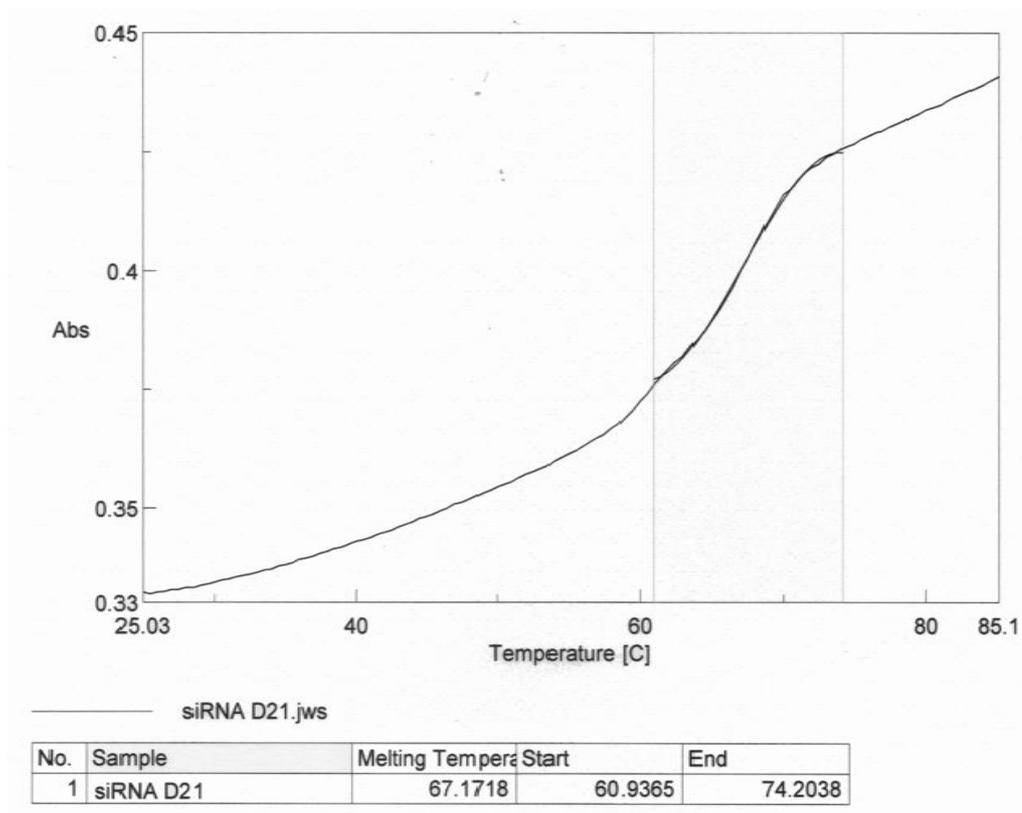


Figura 10.57 Curva de fusión del siRNA D21

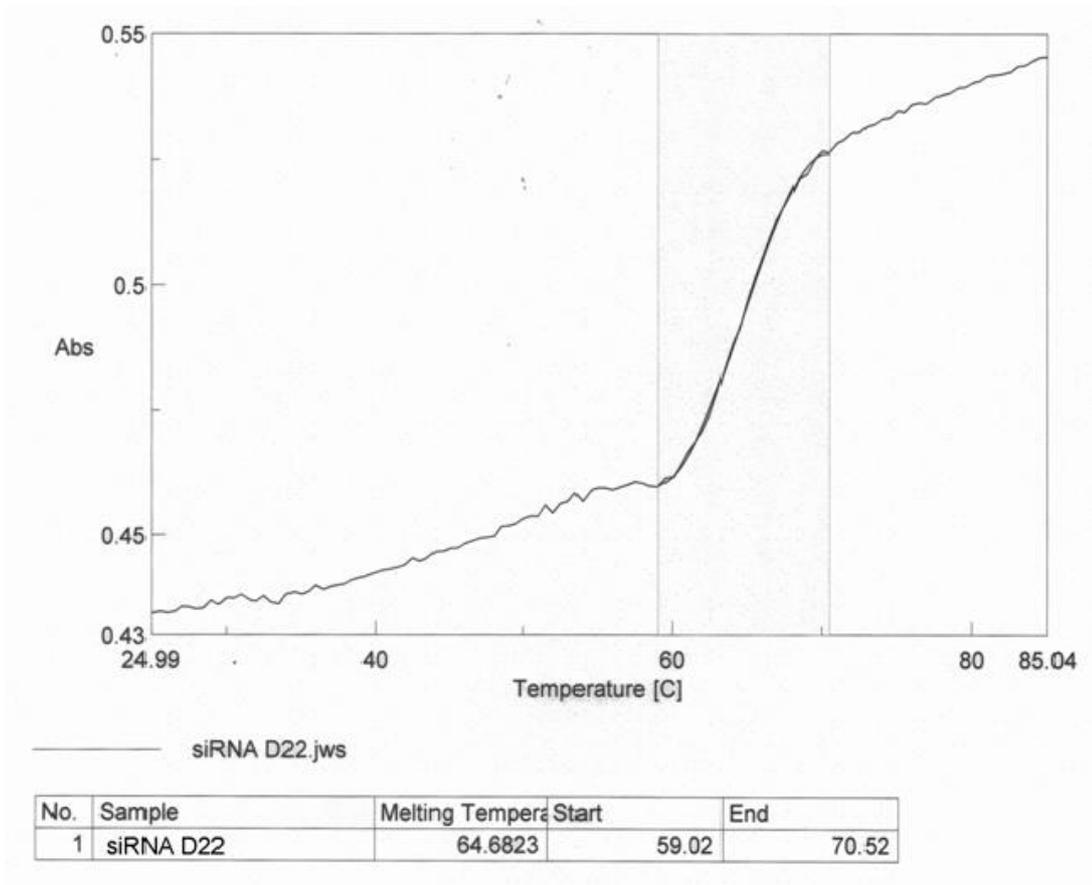


Figura 10.58 Curva de fusión del siRNA D22

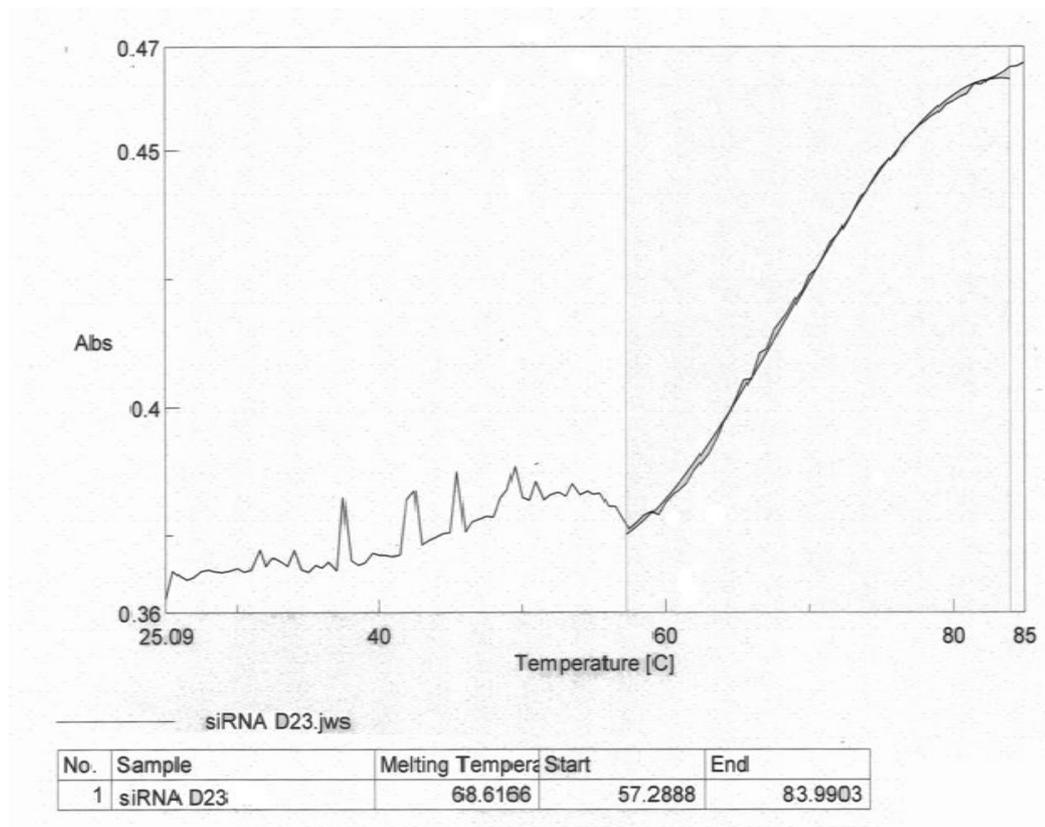
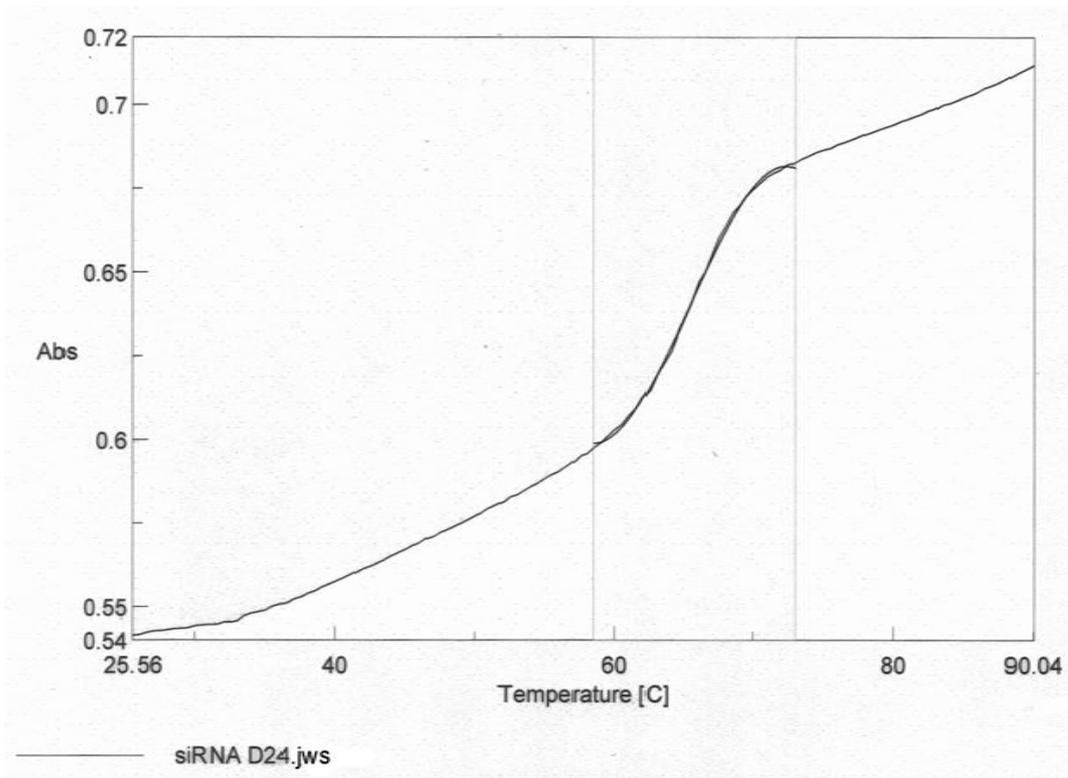


Figura 10.59 Curva de fusión del siRNA D23



No.	Sample	Melting Tempera	Start	End
1	siRNA D24	65.4413	58.4691	73.0075

Figura 10.60 Curva de fusión del siRNA D24

Dúplex	siRNA							
	1 nM		0,3 nM		0,16 nM		0,06 nM	
	%	Error	%	Error	%	Error	%	Error
1	2,3	0,6	2,7	0,4	3,5	0,7	5,9	1,2
2	2,7	0,4	2,9	0,4	3,4	0,7	8,9	1,4
3	1,5	0,2	1,9	0,1	2,7	0,5	5,6	0,6
4	2,8	1,3	5,4	1,1	10,5	0,3	18,8	5,1
5	1,6	0,1	4,0	0,4	6,9	1,1	16,8	2,2
6	2,8	0,3	3,3	0,4	3,9	0,4	7,1	1,5
7	2,2	0,1	4,2	0,6	5,5	0,7	12,2	1,2
8	7,5	2,7	7,5	1,9	7,9	1,8	19,4	5,2
9	5,0	0,6	5,7	0,5	6,8	1,4	23,5	2,7
10	2,4	0,1	4,1	0,3	5,8	0,3	9,1	1,8
11	3,5	0,5	5,2	0,8	13,6	4,5	21,0	5,3
12	3,7	0,3	5,1	0,4	5,1	0,5	9,0	0,8
13	3,3	0,1	3,9	0,3	4,0	0,3	8,4	0,6
14	4,1	0,3	12,7	1,3	22,8	3,9	57,0	4,4
15	3,3	0,3	8,6	1,2	15,0	2,6	44,8	2,7
16	3,6	0,2	3,4	0,2	5,7	0,5	19,6	3,7
17	2,6	0,4	3,6	0,6	4,6	0,7	13,3	2,7
18	2,8	0,3	8,8	1,3	20,1	3,9	54,8	7,8
19	2,3	0,4	6,8	1,3	16,7	2,8	40,9	8,0
20	4,7	1,1	6,1	0,9	8,2	1,3	16,1	1,4
21	2,1	0,4	3,0	0,3	5,7	0,6	19,4	2,6
22	3,0	0,8	7,7	2,0	10,0	2,3	33,4	7,6
23	3,3	1,4	7,0	3,0	14,3	6,7	30,4	13,3
24	5,6	0,5	13,7	0,9	20,4	1,9	47,0	4,1
Dúplex	0,016 nM		0,008 nM		0,002 nM		0 nM	
	%	Error	%	Error	%	Error	%	Error
	Actividad		Actividad		Actividad		Actividad	
1	14,7	2,3	59,2	11,3	94,8	15,1	100,0	20,8
2	27,1	4,6	33,1	5,2	73,6	10,8	100,0	20,3
3	16,8	6,0	35,1	15,1	67,0	12,4	100,0	3,5
4	39,2	3,7	52,3	8,7	83,7	9,7	100,0	4,0

Capítulo 10: Anexo.

5	45,2	4,6	55,7	4,5	85,8	10,7	100,0	10,1
6	30,0	4,0	52,6	5,6	92,5	16,5	100,0	12,1
7	38,8	2,4	55,1	7,8	84,6	8,1	100,0	2,7
8	50,2	11,0	69,9	16,1	89,5	29,9	100,0	30,1
9	52,4	4,8	79,5	19,0	103,2	15,6	100,0	11,9
10	40,9	9,6	54,8	5,7	82,2	12,0	100,0	6,7
11	56,8	10,6	73,2	4,3	80,5	8,0	100,0	3,5
12	31,2	3,1	60,7	5,0	99,8	10,5	100,0	10,8
13	23,7	0,9	49,2	2,2	88,9	4,4	100,0	5,1
14	79,1	6,2	94,2	10,7	97,5	6,0	100,0	7,4
15	70,7	5,6	83,1	5,1	91,1	5,2	100,0	6,5
16	43,1	7,4	58,7	10,3	54,6	4,0	100,0	7,8
17	33,3	5,0	62,2	9,9	71,2	11,6	100,0	21,1
18	68,5	7,8	53,8	5,7	68,5	17,6	100,0	14,0
19	51,7	10,7	70,1	15,3	98,3	21,1	100,0	23,6
20	85,5	8,7	70,1	6,3	100,0	16,1	100,0	11,8
21	35,2	5,1	54,8	8,2	70,5	7,6	100,0	13,2
22	66,5	15,7	72,0	16,9	73,9	26,4	100,0	32,2
23	78,6	34,0	88,7	38,0	98,3	55,1	100,0	59,3
24	91,0	9,4	90,0	11,9	92,8	14,5	100,0	7,4

Tabla 10.14 Porcentaje de actividad de *Renilla luciferasa* normalizado para las distintas concentraciones de siRNA ensayadas.

siRNA 1nM						
ON-target			OFF-target			
Duplex	% Actividad	Error	% Actividad	Error	OFF/ON	Error
1	3,4	0,4	34,4	3,9	10,2	1,7
4	7,6	0,7	42,9	5,9	5,7	0,9
5	2,7	0,4	30,0	4,0	11,3	2,1
6	1,9	0,2	52,9	2,5	27,5	2,6
7	2,8	0,3	38,0	5,5	13,6	2,5
14	5,0	1,0	31,0	2,0	6,2	1,3
15	5,0	1,1	31,3	1,0	6,3	1,4
18	1,8	0,2	87,2	9,0	47,4	6,4
19	1,7	0,2	59,1	2,6	34,2	3,5
20	2,5	0,2	58,0	10,6	22,8	4,5
21	2,7	0,2	53,0	4,6	19,7	2,4
22	2,5	0,2	81,6	3,8	32,8	3,1
23	2,4	0,2	98,7	2,9	41,2	3,4
24	2,4	0,3	74,1	10,0	30,3	5,2
MOCK	100,0	10,8	100,0	2,4	1,0	0,1

siRNA 16 pM						
ON-target			OFF-target			
Duplex	% Actividad	Error	% Actividad	Error	OFF/ON	Error
1	28,2	5,1	97,1	10,7	3,5	0,5
4	15,7	2,8	129,4	11,2	1,4	0,2
5	31,2	6,3	112,3	9,4	3,3	0,5
6	76,1	9,1	149,3	16,1	2,1	0,5
7	37,6	7,4	118,0	15,0	1,7	0,3
14	17,2	3,8	127,3	15,5	1,4	0,2
15	17,5	4,2	115,6	15,6	1,2	0,2
18	131,2	20,2	132,6	17,9	2,2	0,3
19	94,6	12,0	115,8	9,7	2,0	0,4
20	63,2	13,4	117,1	9,1	2,0	0,3
21	54,6	7,8	113,5	23,5	1,9	0,4
22	90,7	11,0	111,1	8,5	1,6	0,2
23	114,0	12,7	124,8	11,2	1,9	0,2
24	83,7	15,7	117,9	24,8	2,0	0,6

MOCK	2,8	0,4	100,0	7,8	1,0	0,1
------	-----	-----	-------	-----	-----	-----

Tabla 10.15 Porcentaje de actividad de *Renilla luciferasa* normalizado para 1 nM y 16 pM de siRNA utilizando el plásmido psiCHECK2-AS (ON-target) o el plásmido psiCHECK2-S (OFF-target).

Material suplementario al Capítulo 6.

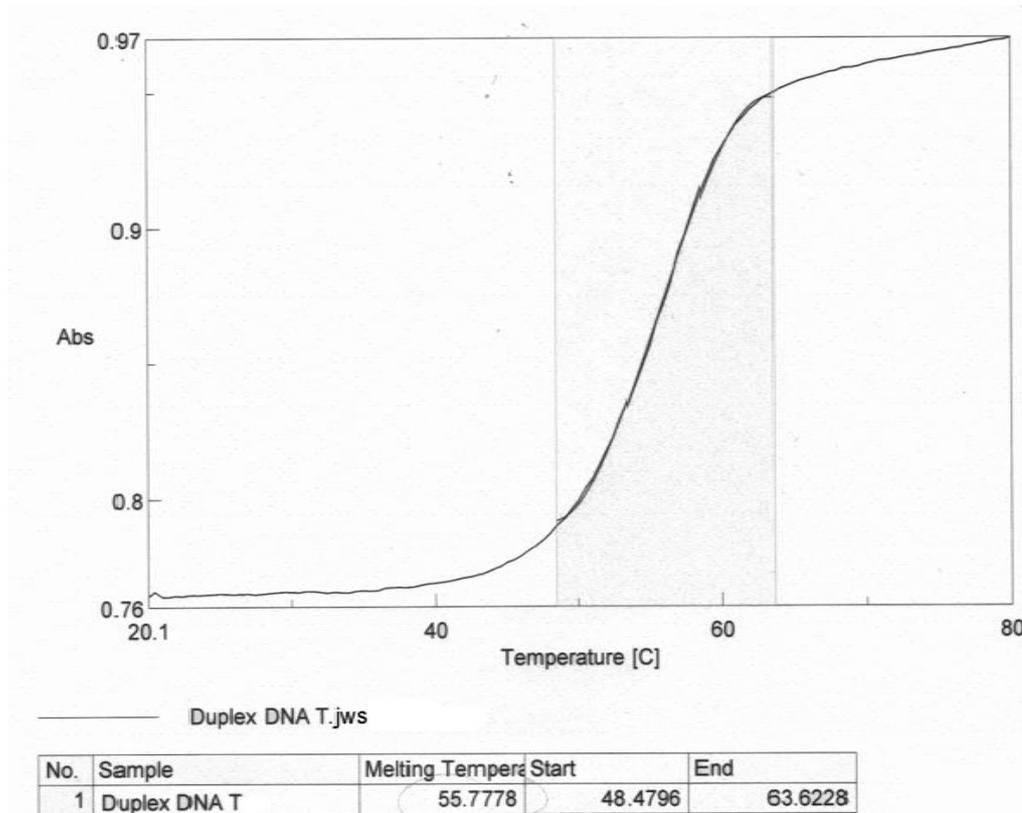


Figura 10.61 Curva de fusión para el dúplex DNA-T

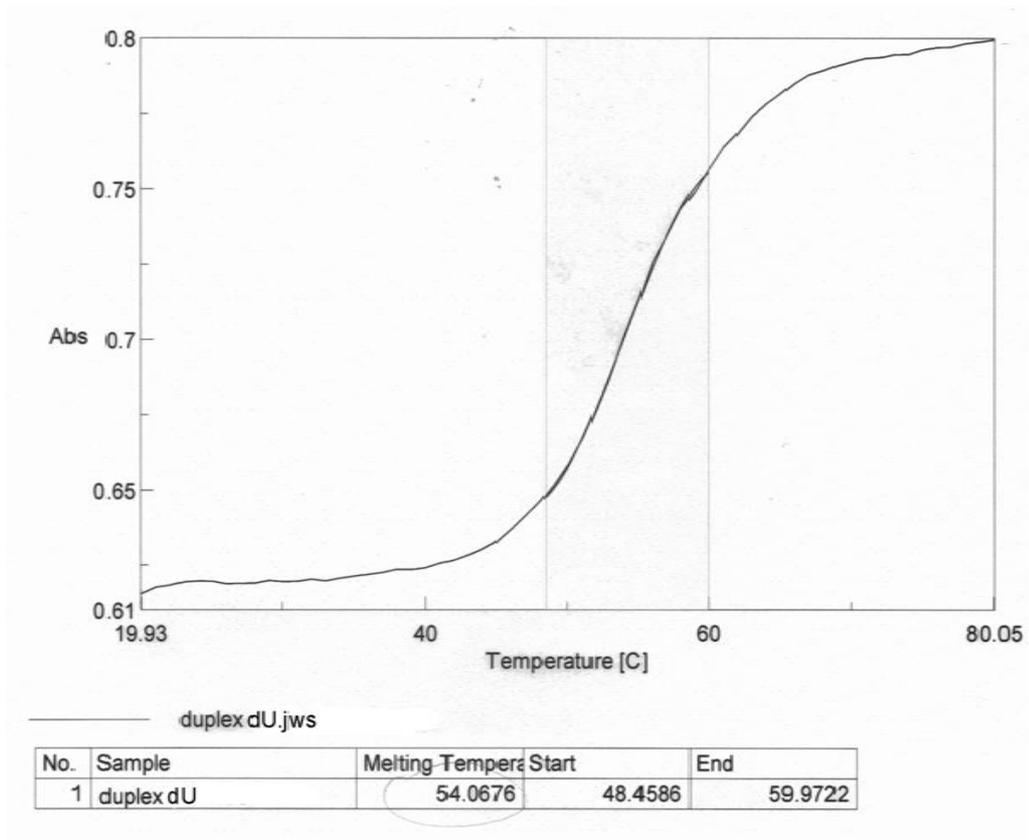


Figura 10.62 Curva de fusión para el dúplex DNA-dU

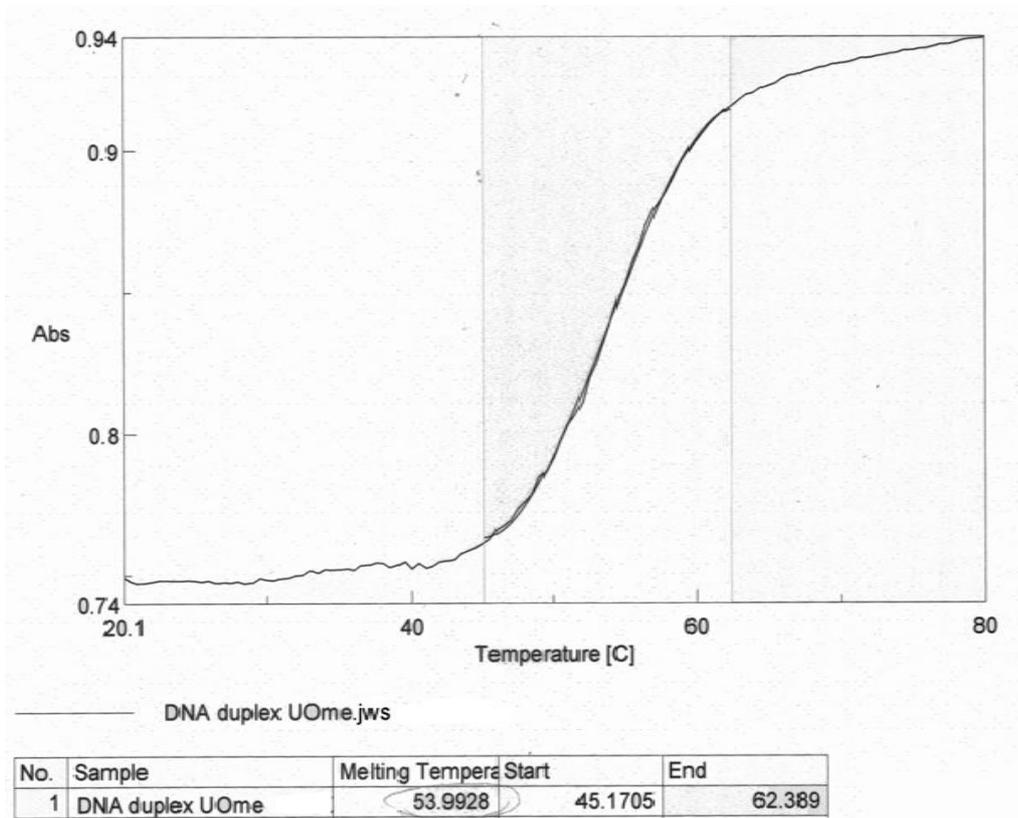


Figura 10.63 Curva de fusión para el dúplex DNA-UOme

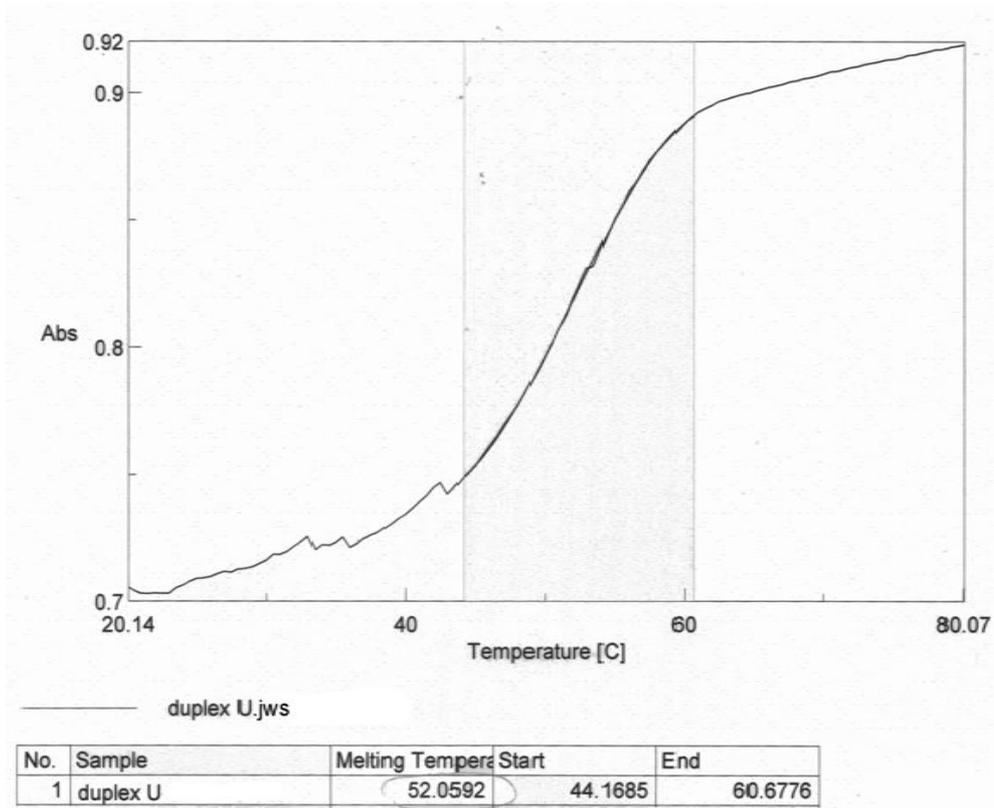


Figura 10.64 Curva de fusión para el dúplex DNA-U

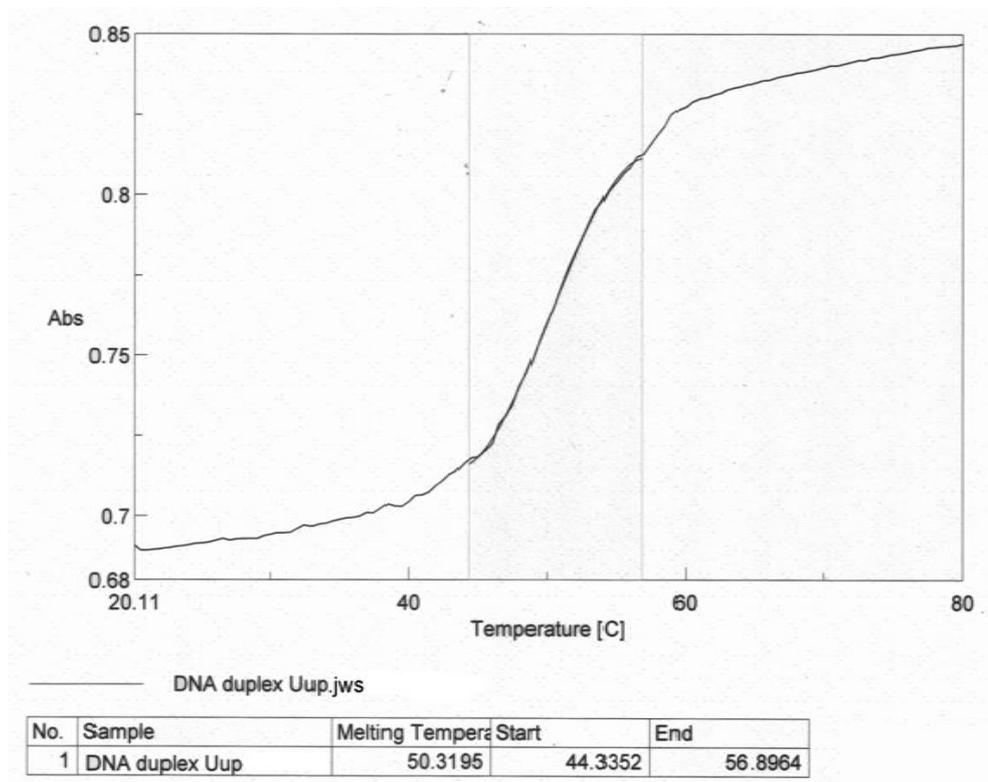


Figura 10.65 Curva de fusión para el dúplex DNA-U(S)

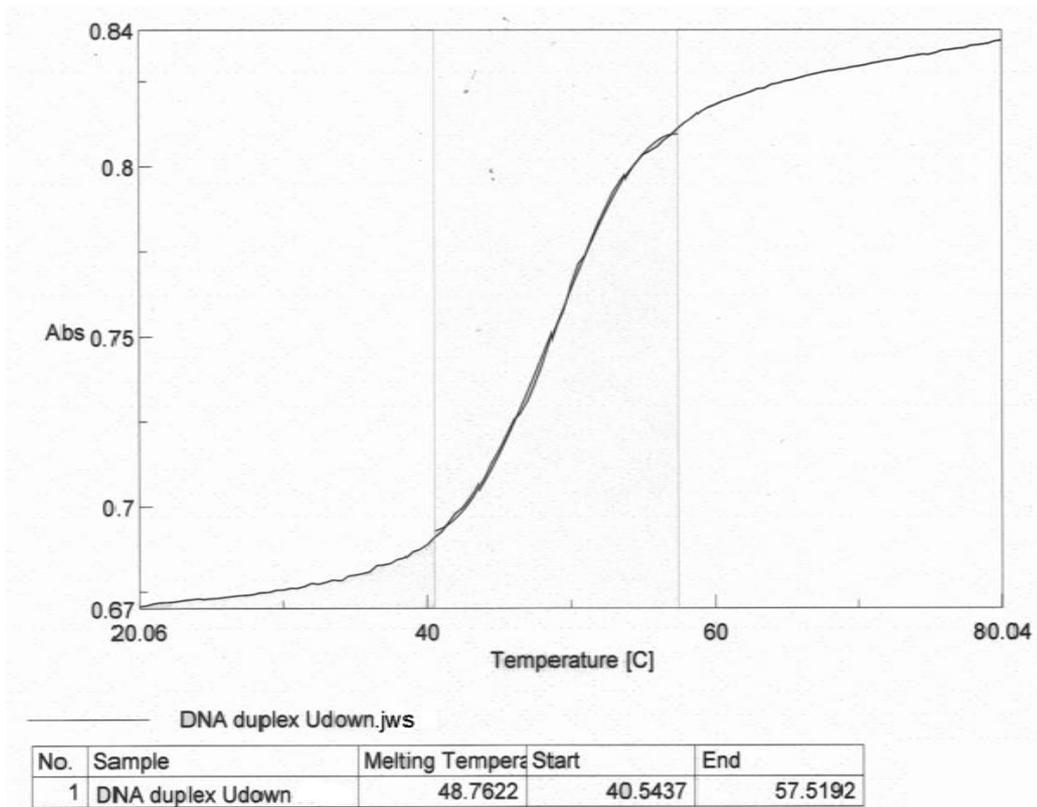


Figura 10.66 Curva de fusión para el dúplex DNA-U(R)

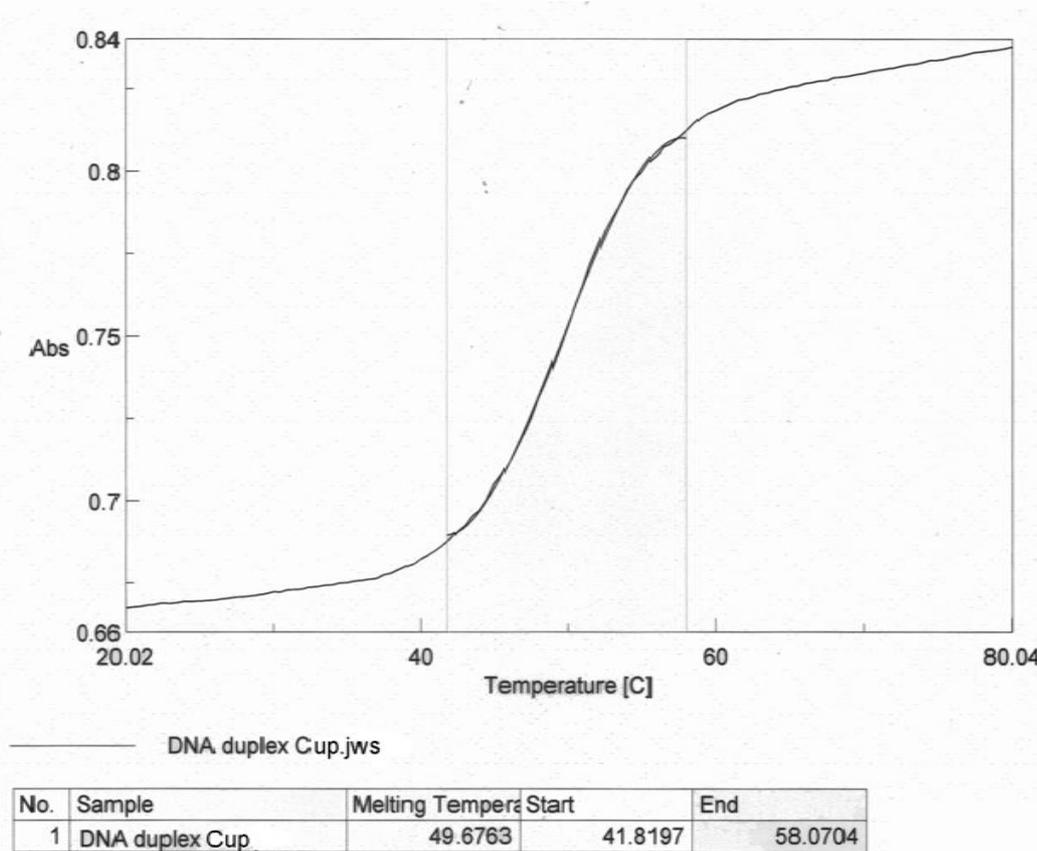


Figura 10.67 Curva de fusión para el dúplex DNA-C(S)

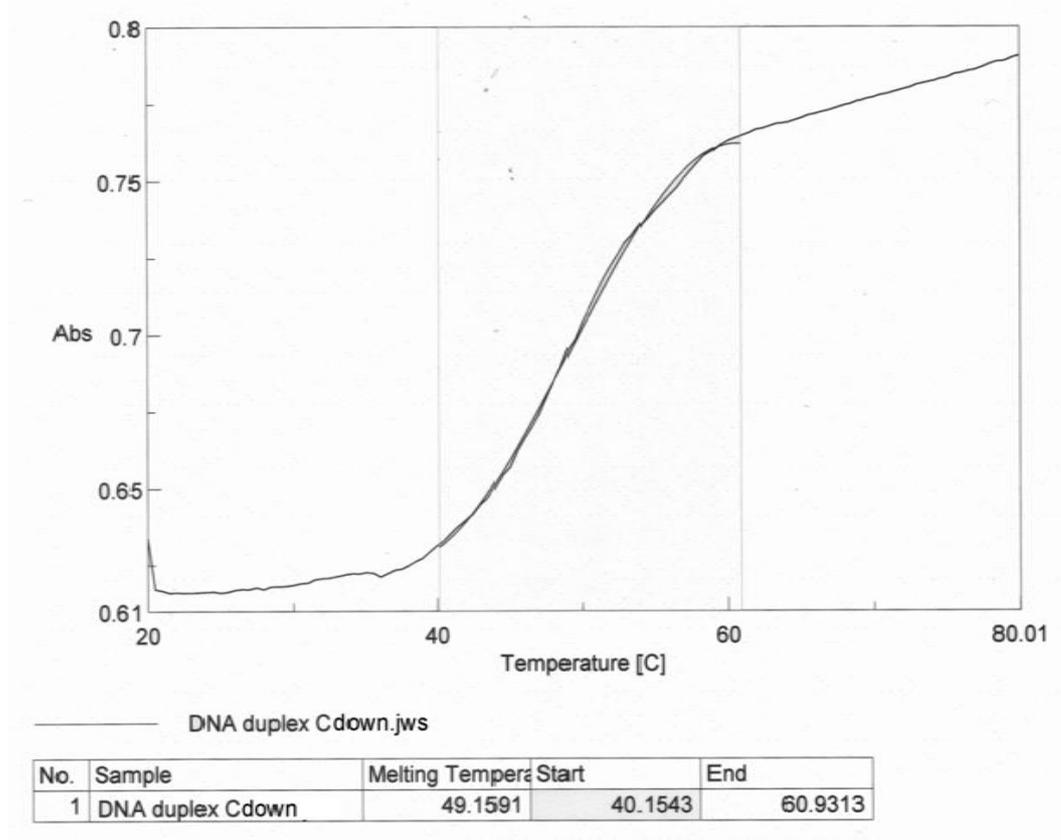


Figura 10.68 Curva de fusión para el dúplex DNA-C(R)

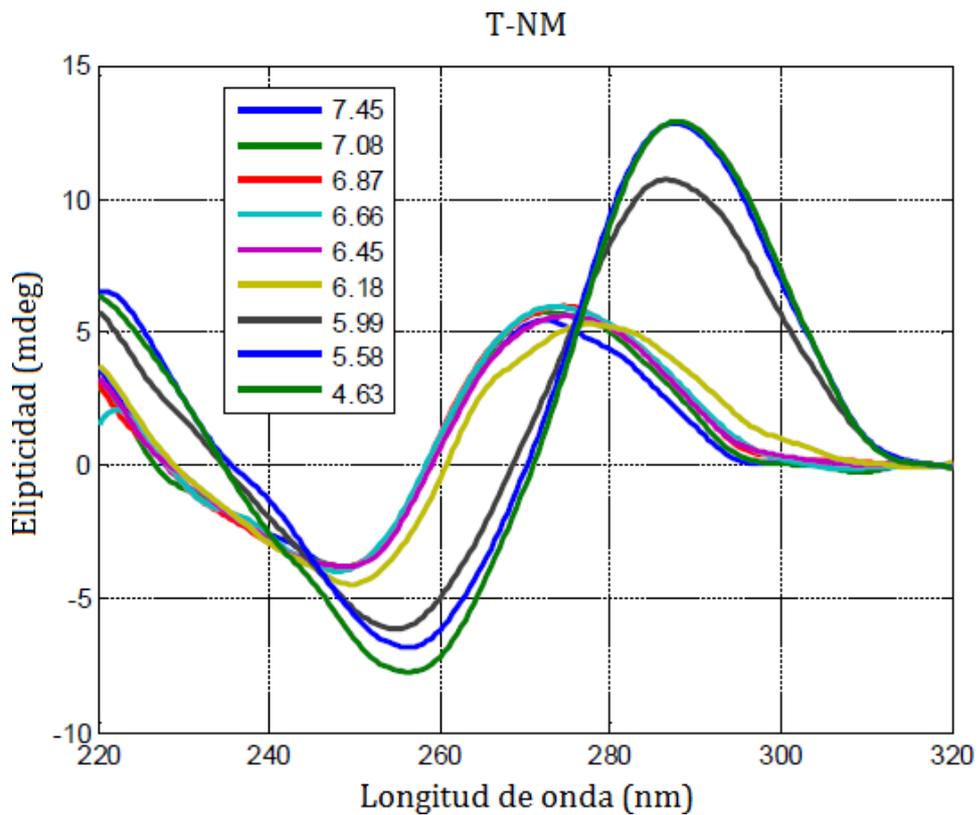


Figura 10.69 Espectro de dicroísmo circular para T-NM a distintos pH.

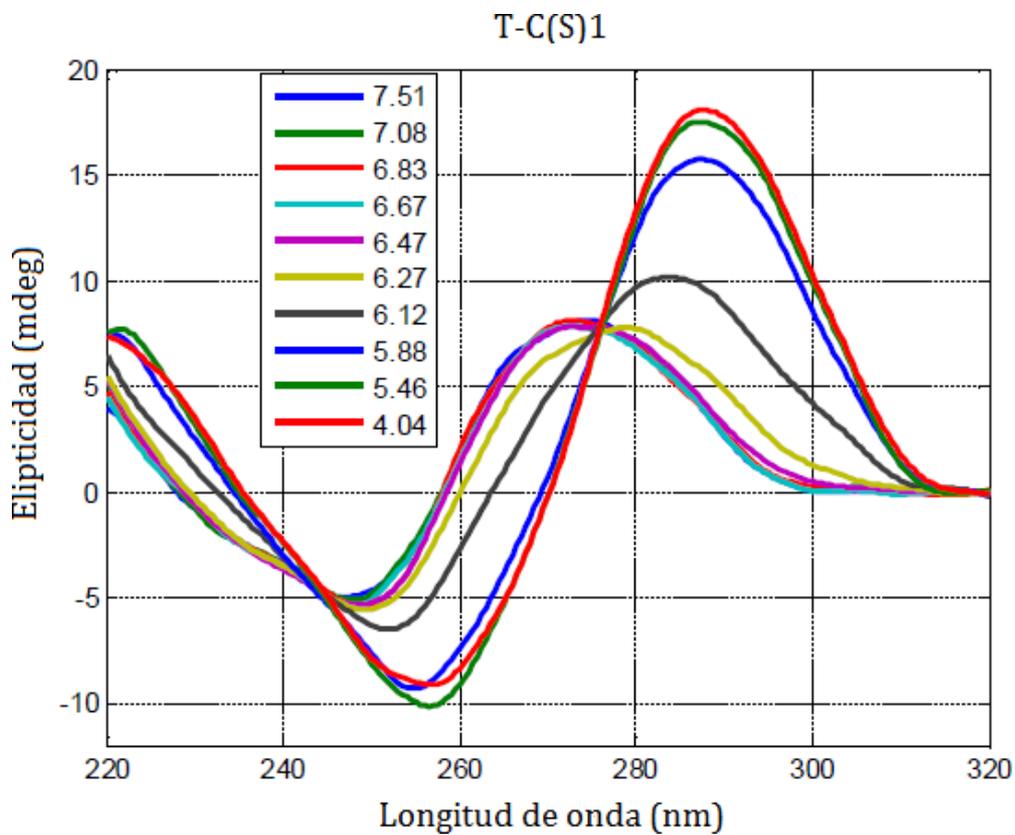


Figura 10.70 Espectro de dicroísmo circular para T-C(S)₁ a distintos pH.

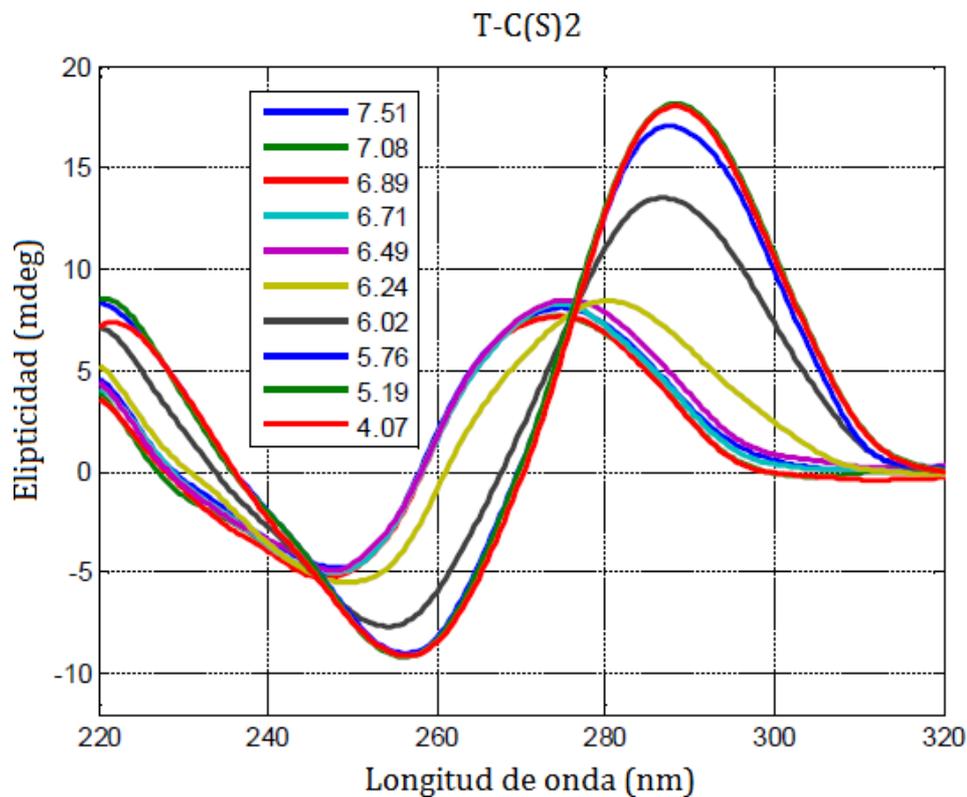


Figura 10.71 Espectro de dicroísmo circular para T-C(S)₂ a distintos pH.

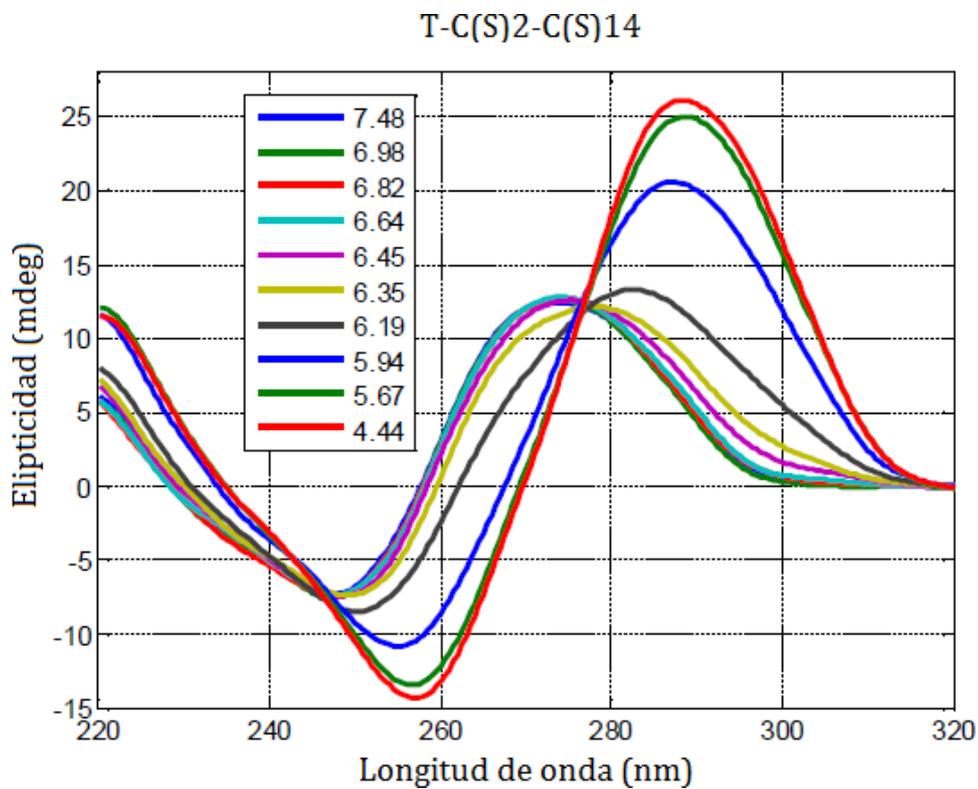


Figura 10.72 Espectro de dicroísmo circular para T-C(S)₂-C(S)₁₄ a distintos pH.

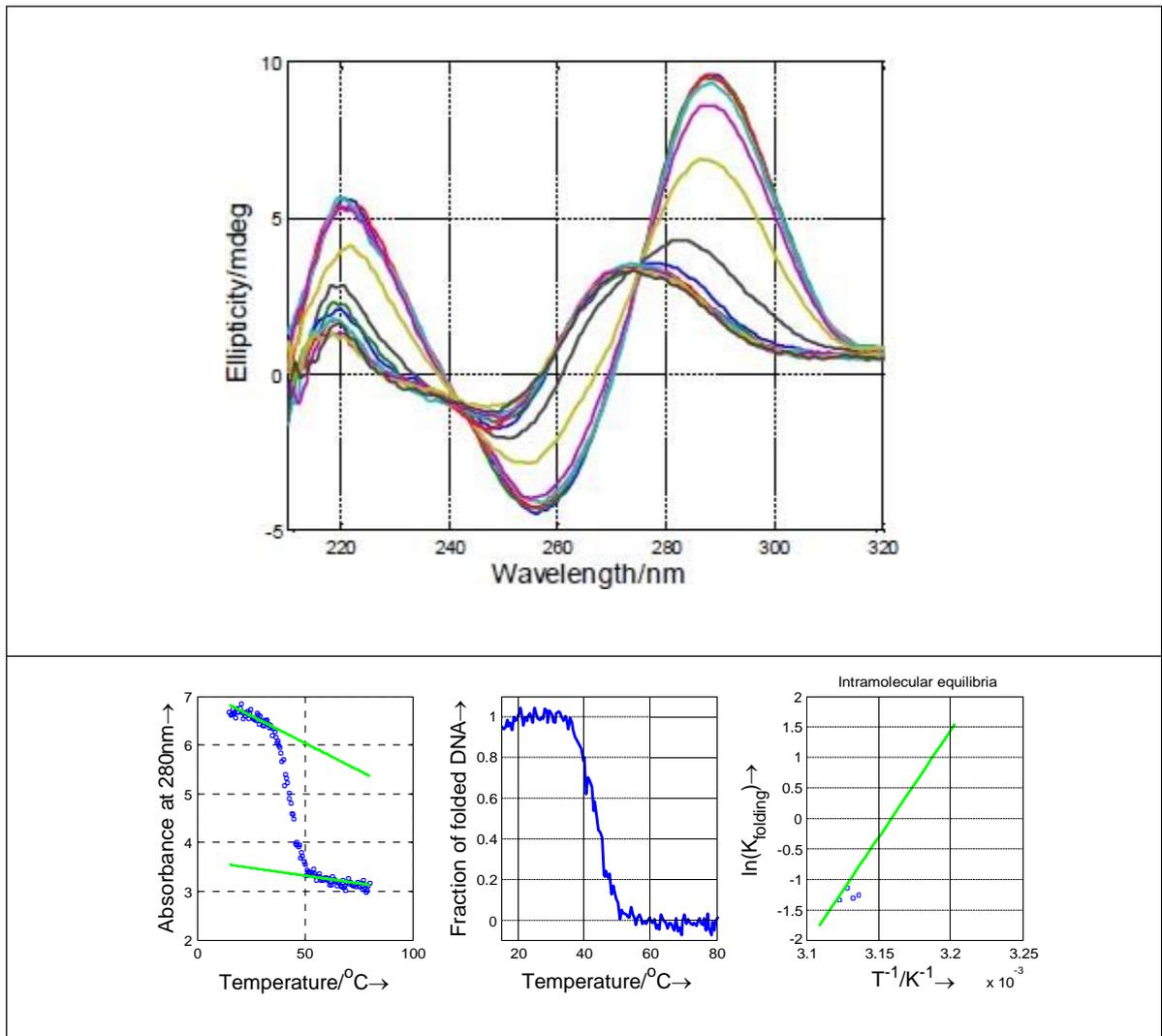


Figura 10.73 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 5,5 para el oligonucleótido formador de i-motif T-NM.

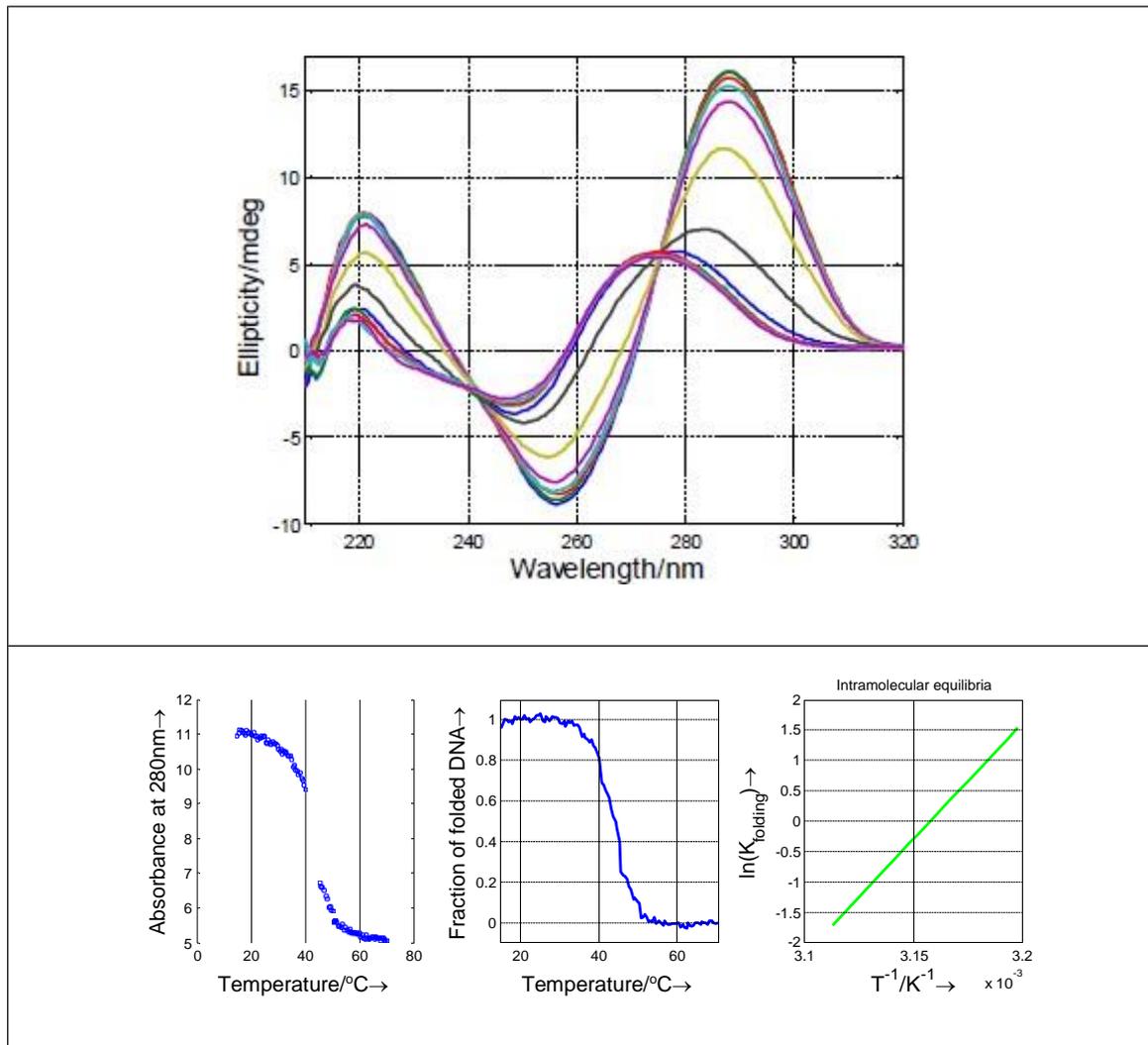


Figura 10.74 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 5,5 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₁.

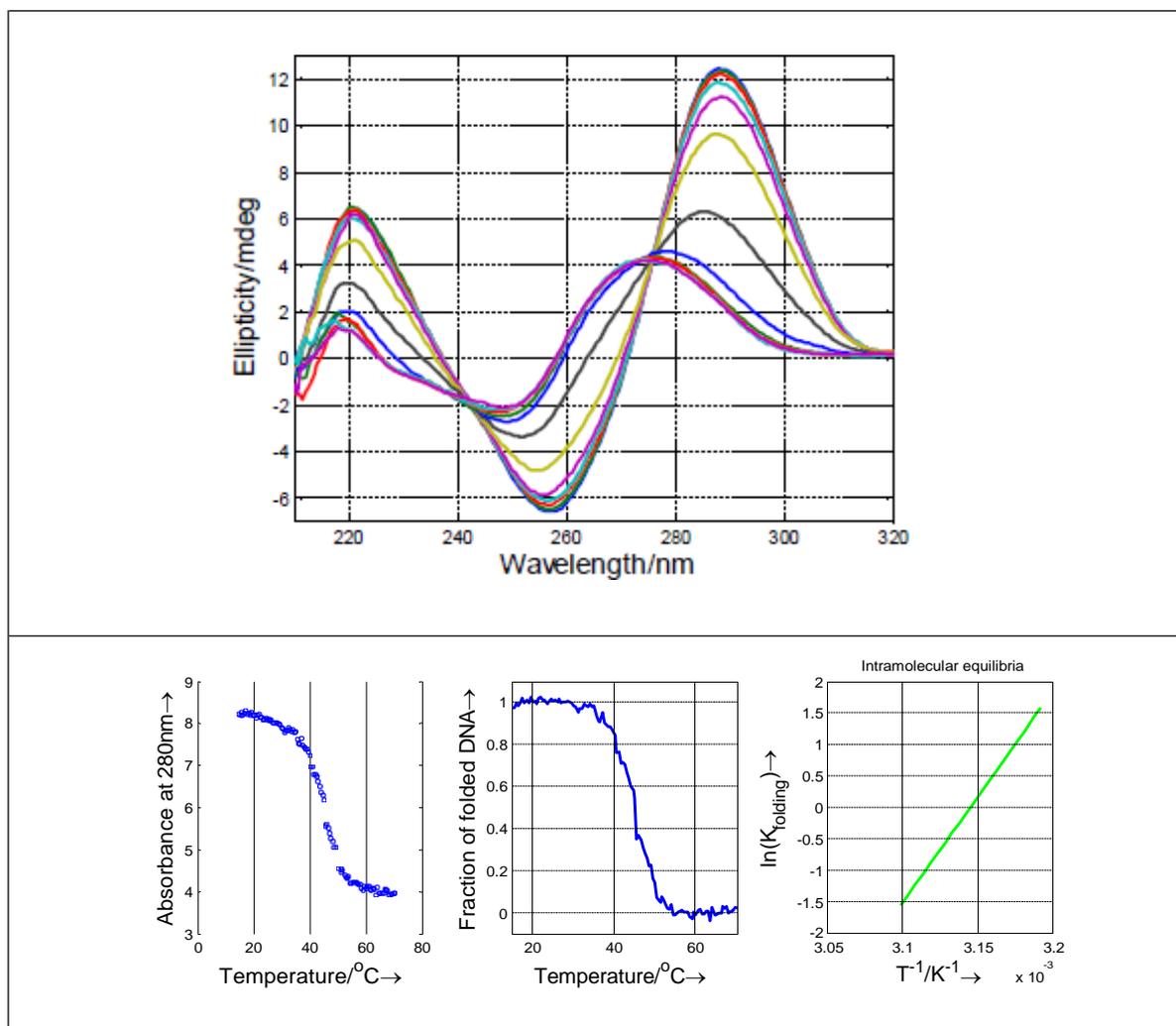


Figura 10.75 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 5,5 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₂.

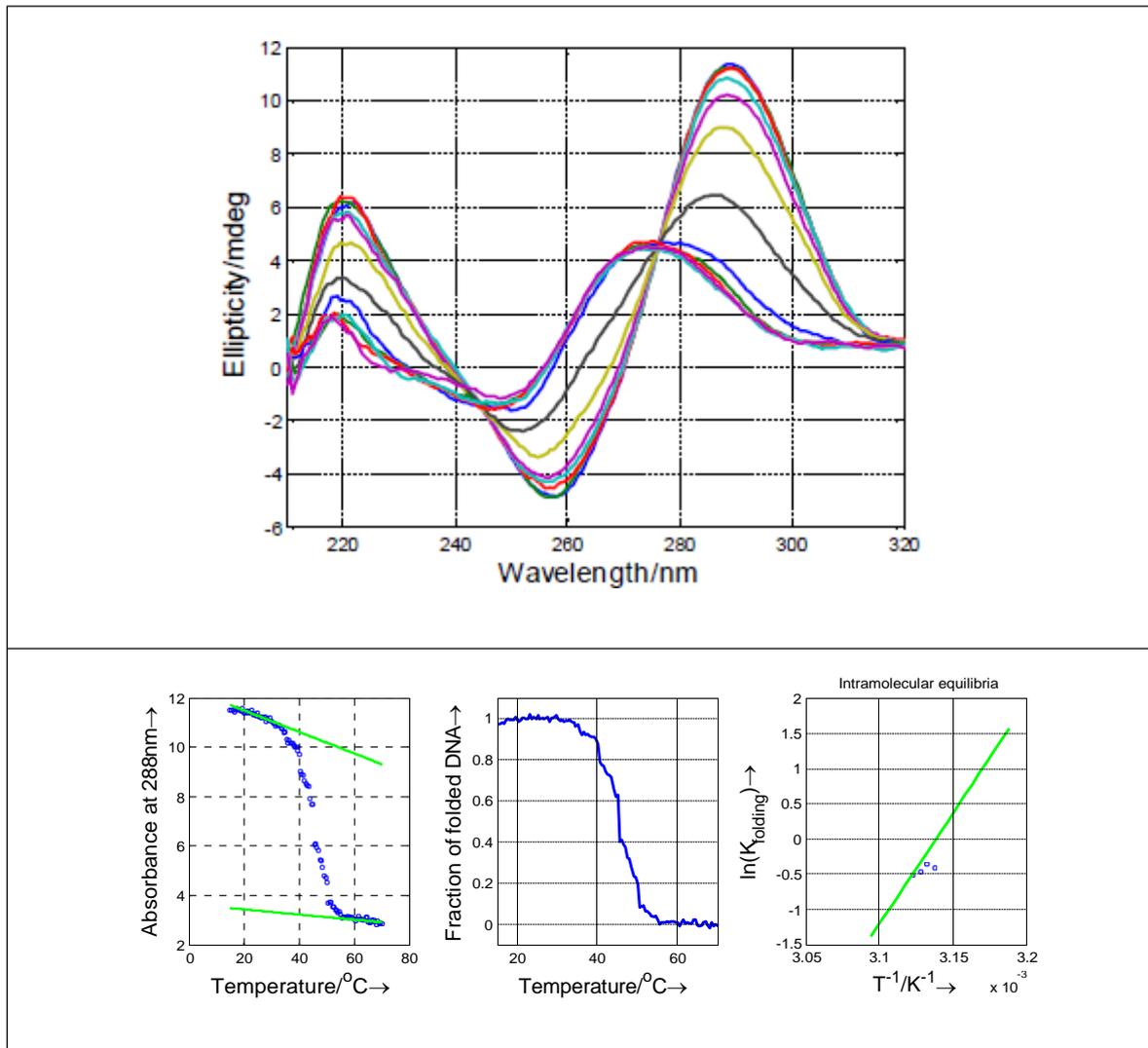


Figura 10.76 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 5,5 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₂-C(S)₁₄.

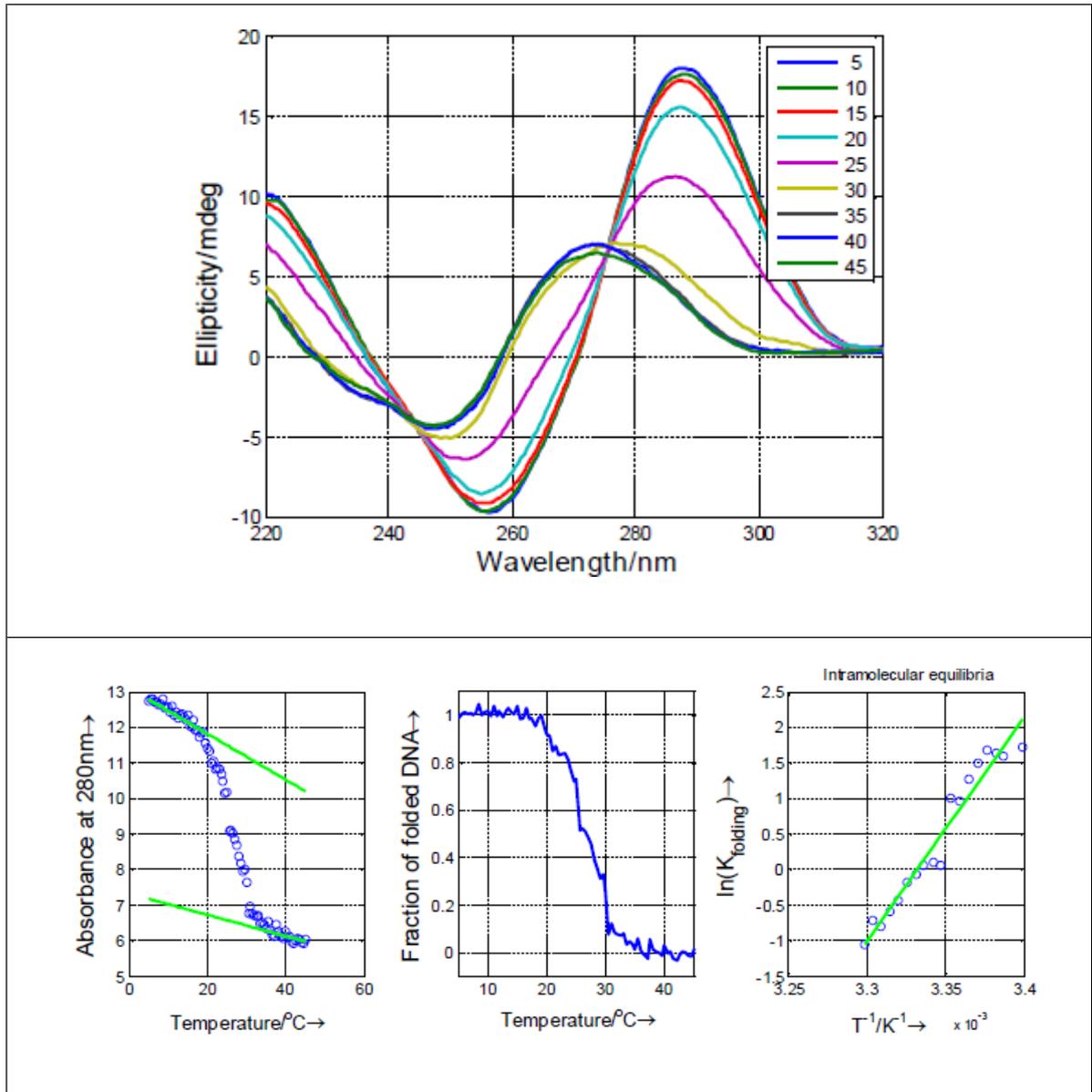


Figura 10.77 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 6 para el oligonucleótido formador de i-motif T-NM.

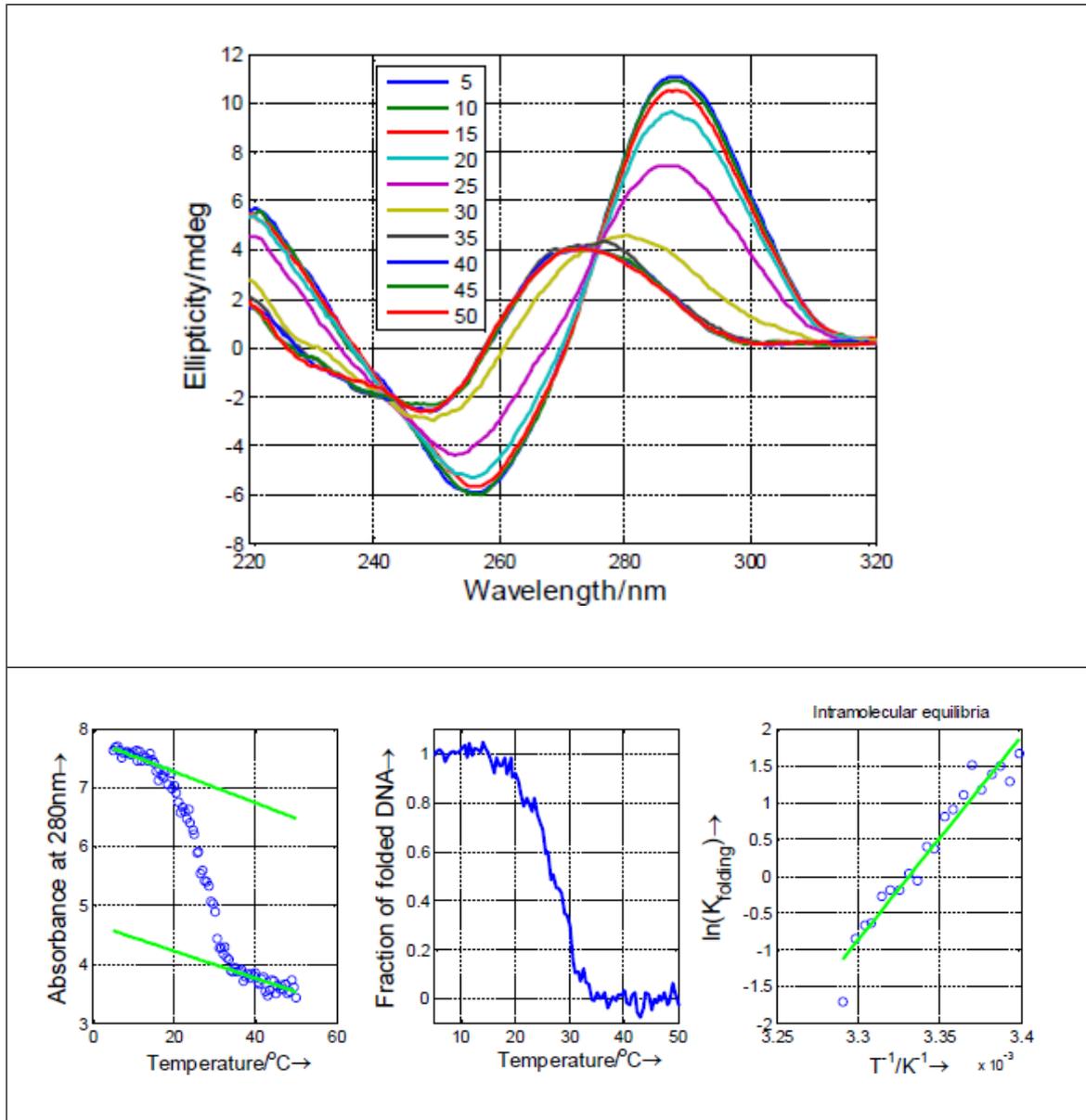


Figura 10.78 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 6 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₁.

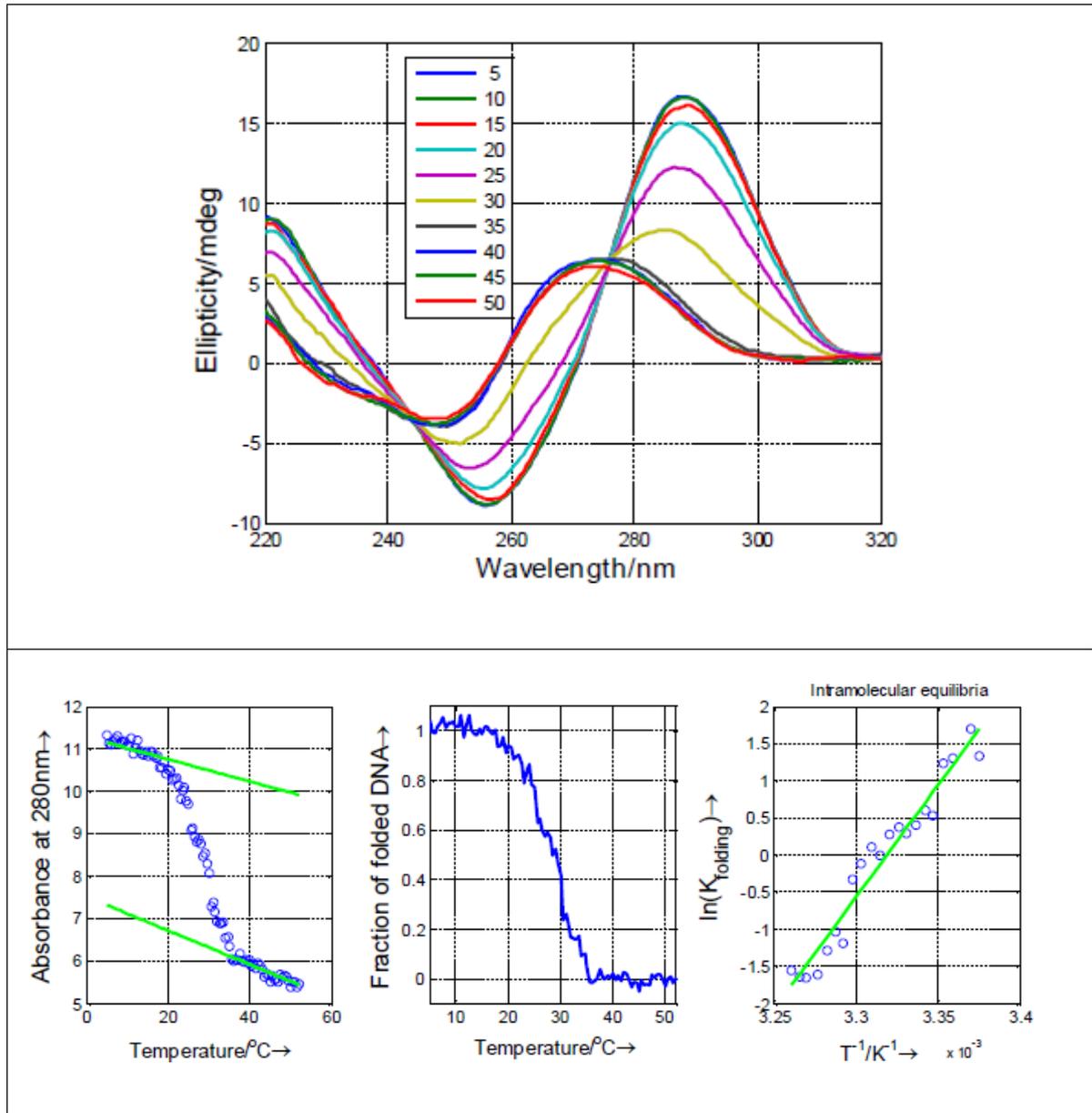


Figura 10.79 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 6 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₂.

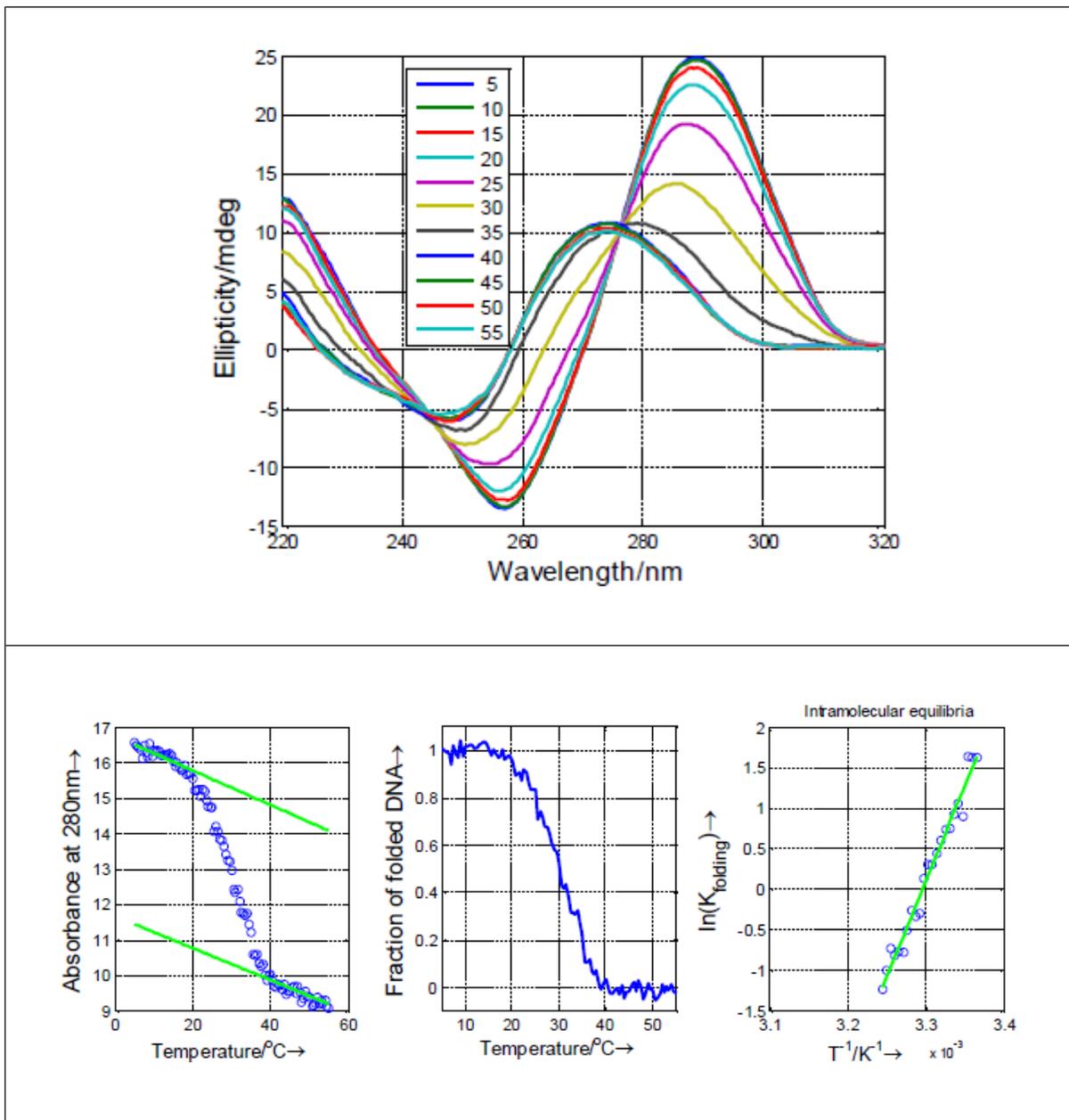


Figura 10.80 Espectro de dicroísmo circular y curva de fusión a pH 6 para el oligonucleótido formador de i-motif T-C(S)₂-C(S)₁₄.

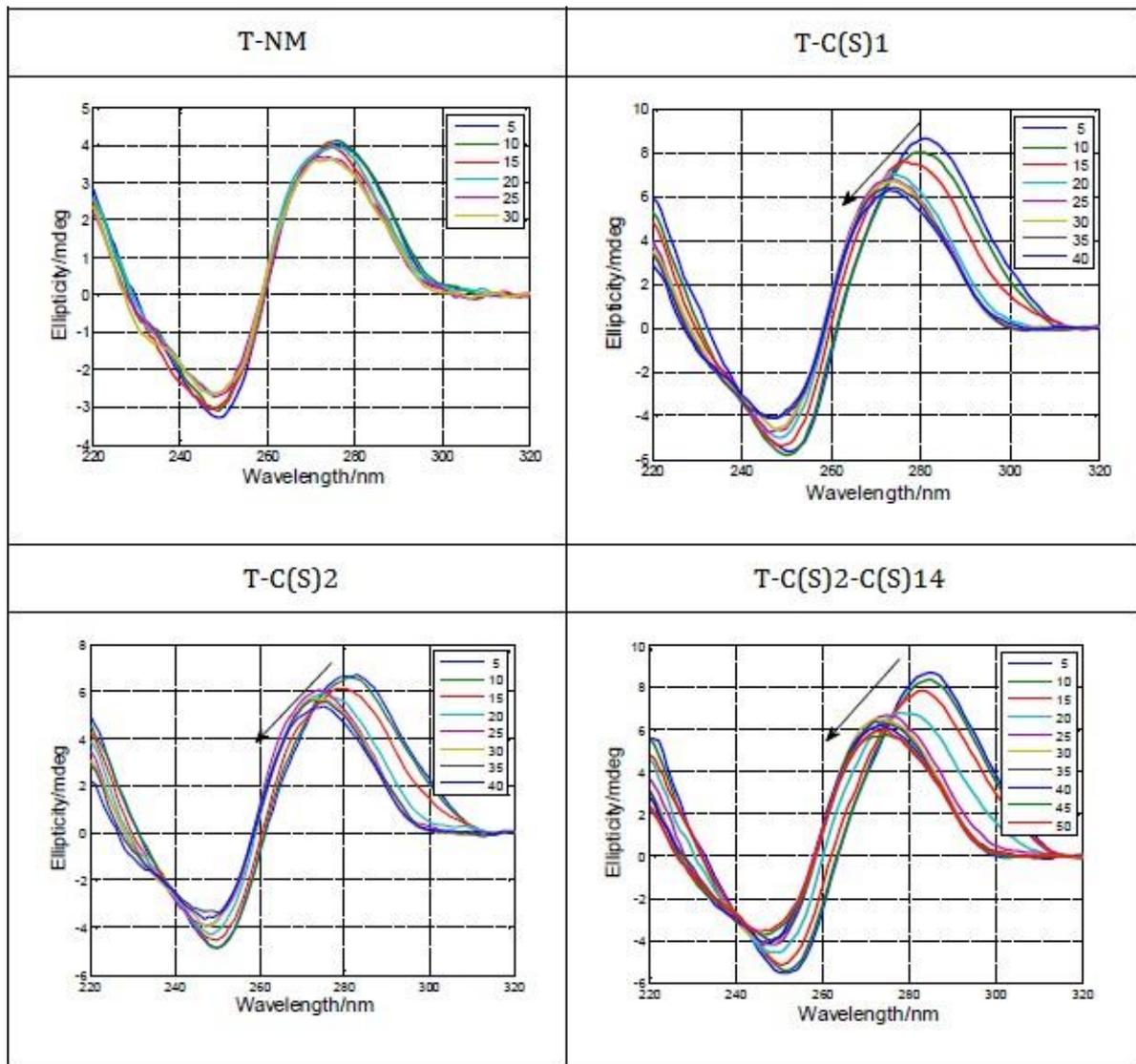


Figura 10.81 Espectros de dicroísmo circular a pH 6,5 a distintas temperaturas para T-NM y las secuencias modificadas.

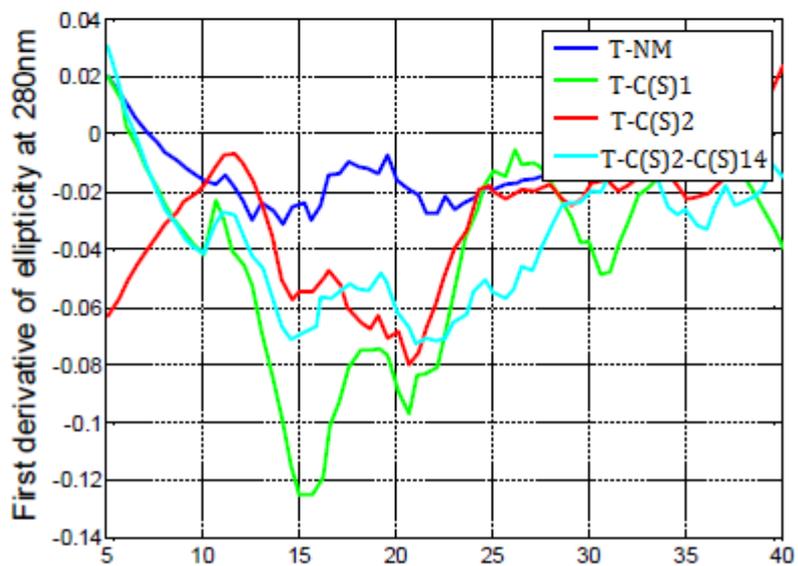
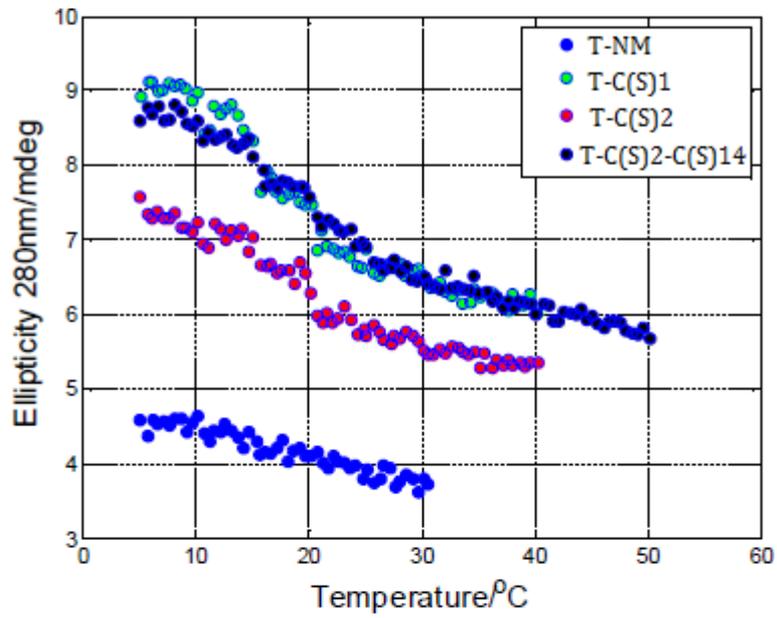


Figura 10.82 Curvas de fusión y primera derivada a pH 6,5 y 280 nm.

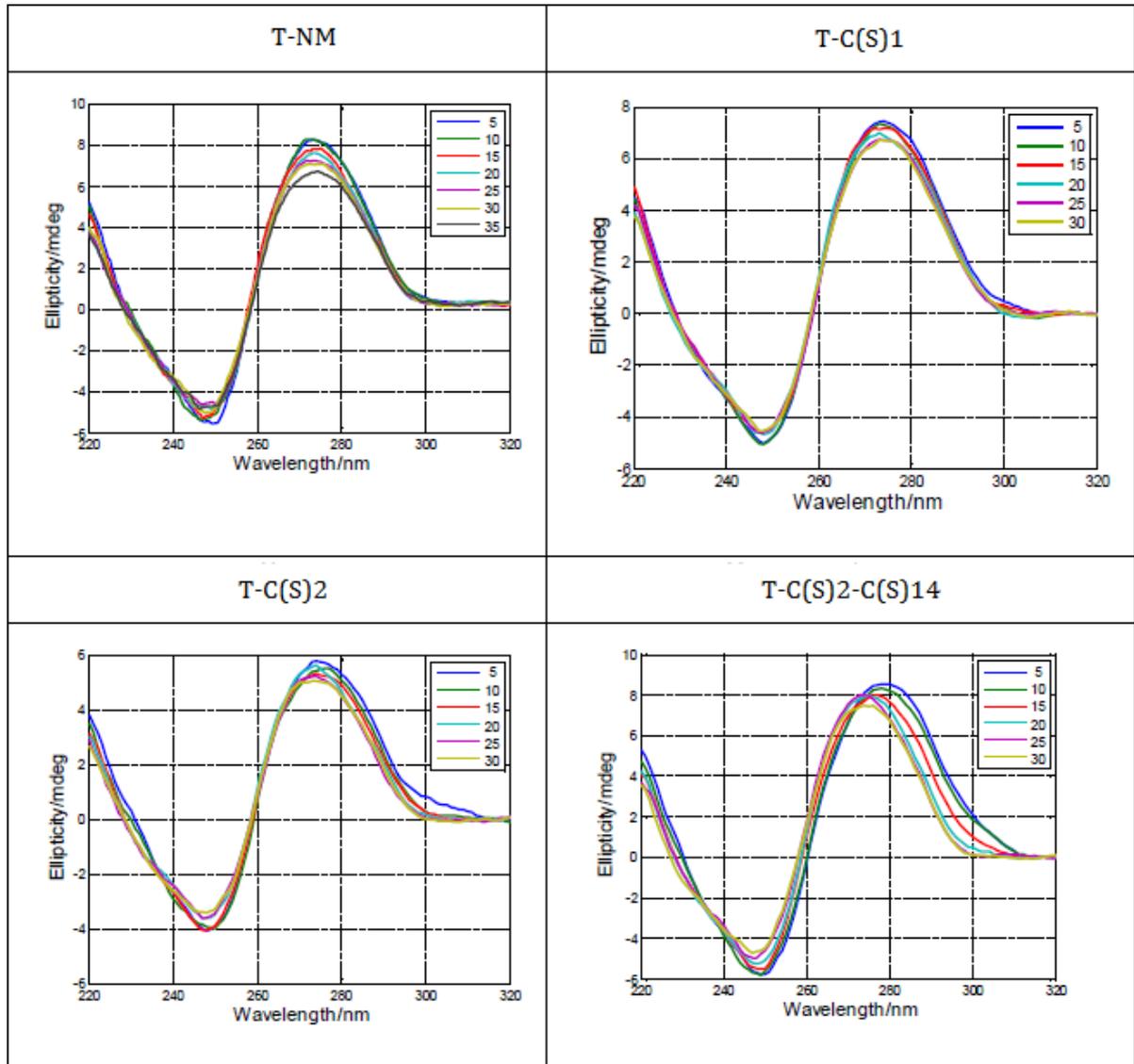


Figura 10.83 Espectros de dicroísmo circular a pH 7 a distintas temperaturas para T-NM y las secuencias modificadas

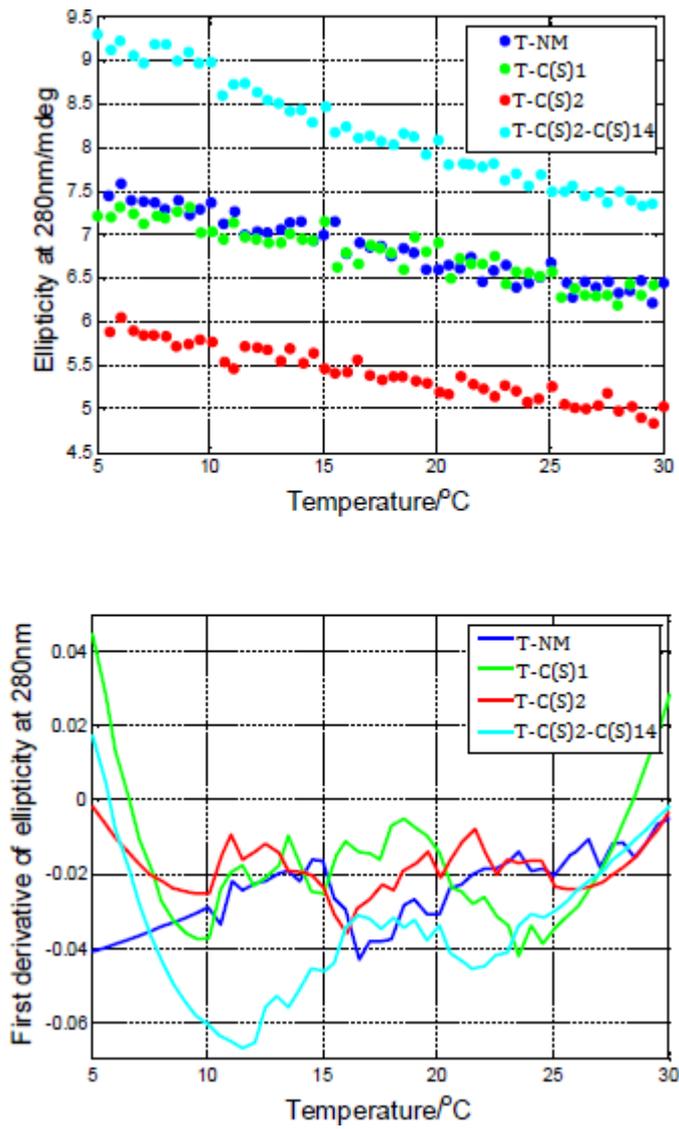


Figura 10.84 Curvas de fusión y primera derivada a pH 7 y 280 nm.

Material suplementario al Capítulo 7.

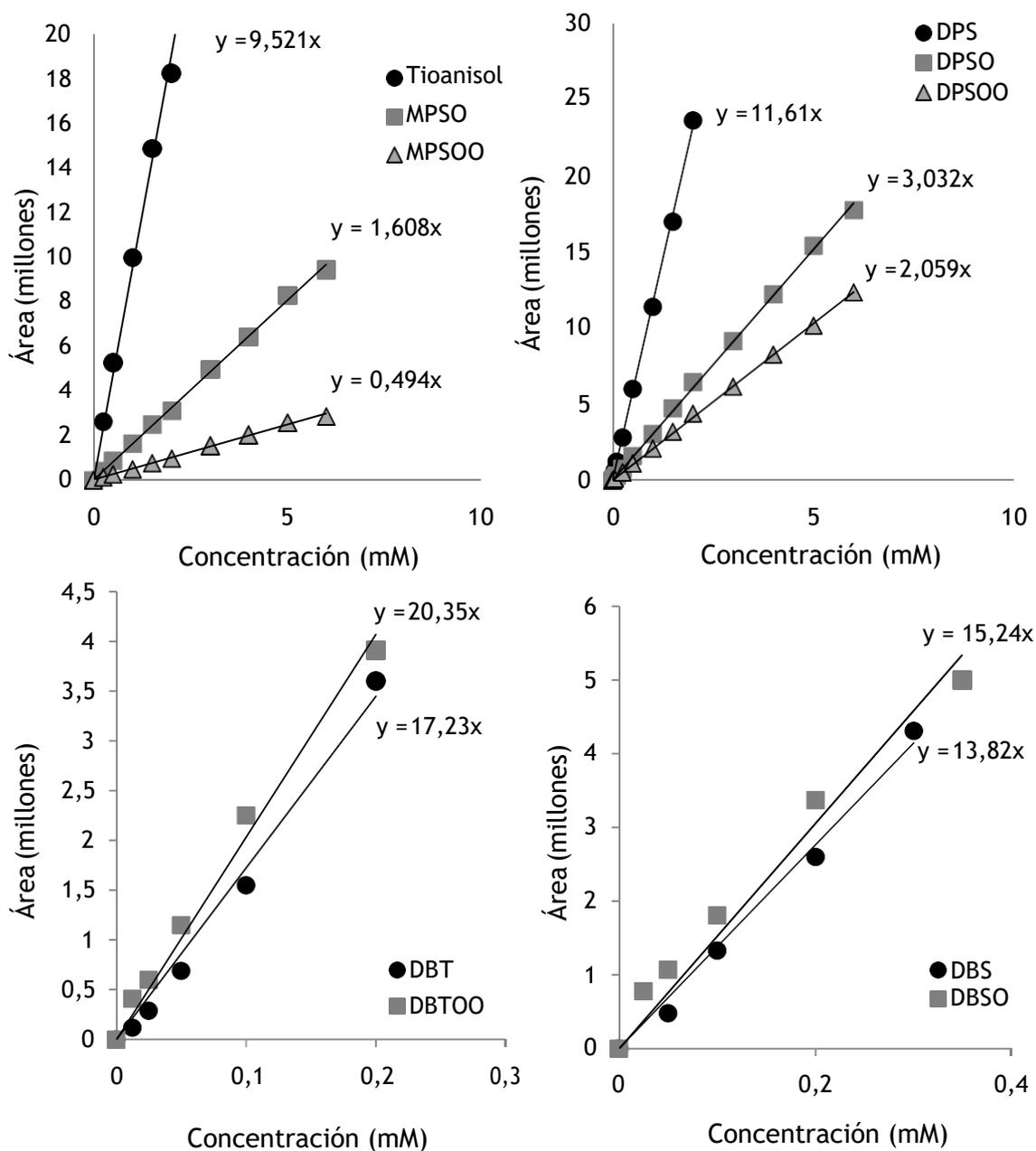


Figura 10.85 Curvas de calibración de sulfuros, sulfóxidos y sulfonas. Área de pico (millones) en función de la concentración (mM) obtenidas a partir de los cromatogramas realizados para los patrones de los compuestos analizados.

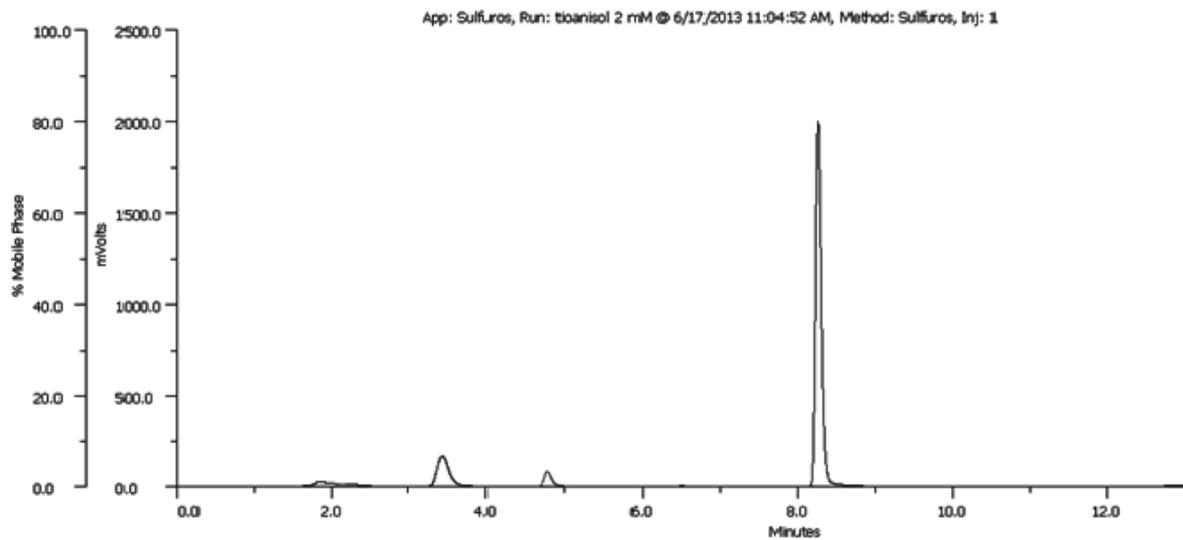


Figura 10.86 Cromatograma de los patrones de tioanisol (tiempo de retención: 8,3 minutos), metilfenil sulfóxido (tiempo de retención: 3,4 minutos) y metilfenil sulfona (tiempo de retención: 4,8 minutos).

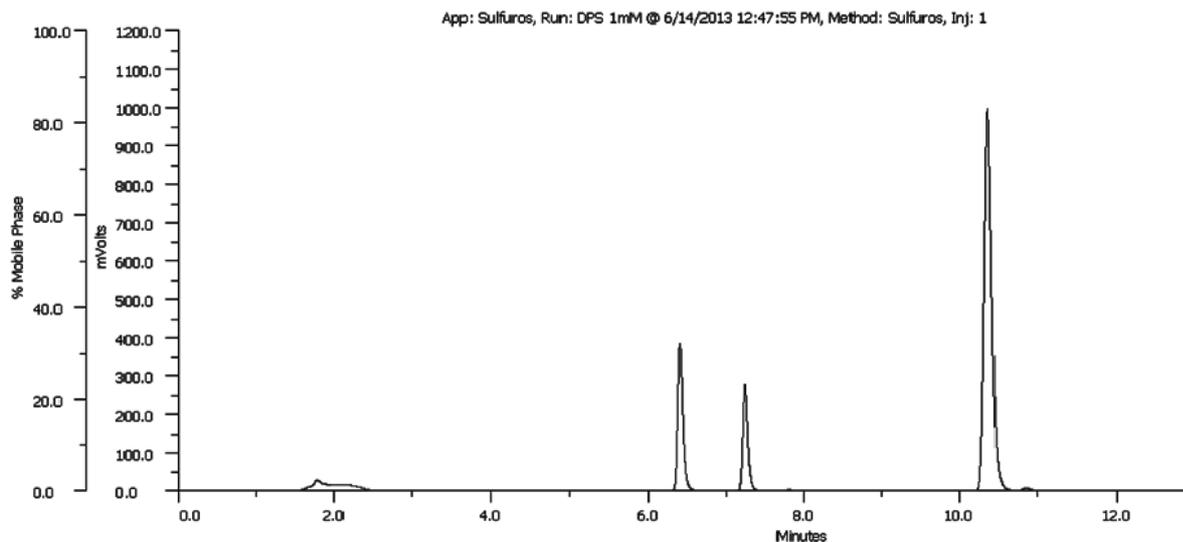


Figura 10.87 Cromatograma de los patrones de difenil sulfuro (tiempo de retención: 10,4 minutos), difenil sulfóxido (tiempo de retención: 6,4 minutos) y difenil sulfona (tiempo de retención: 7,3 minutos).

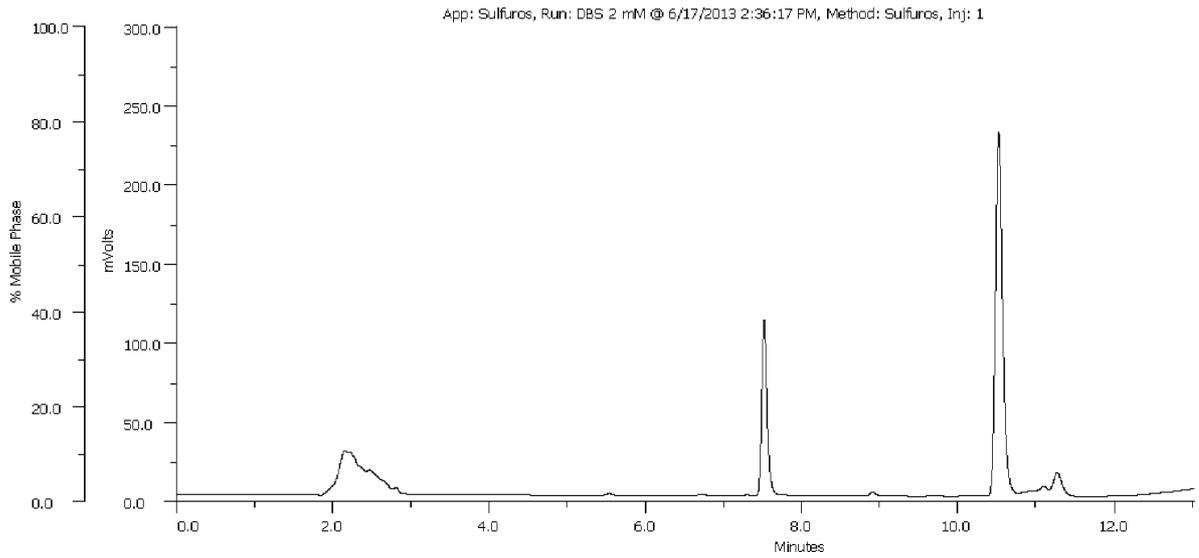


Figura 10.88 Cromatograma de los patrones de dibencil sulfuro (tiempo de retención: 10,5 minutos) y dibencil sulfona (tiempo de retención: 7,5 minutos).

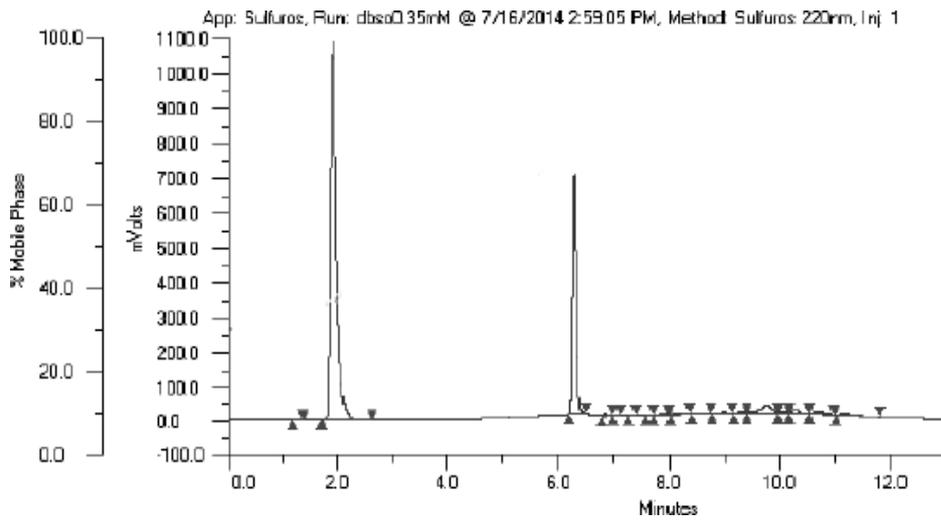


Figura 10.89 Cromatograma del patrón de dibencil sulfóxido (tiempo de retención: 6,3 minutos).

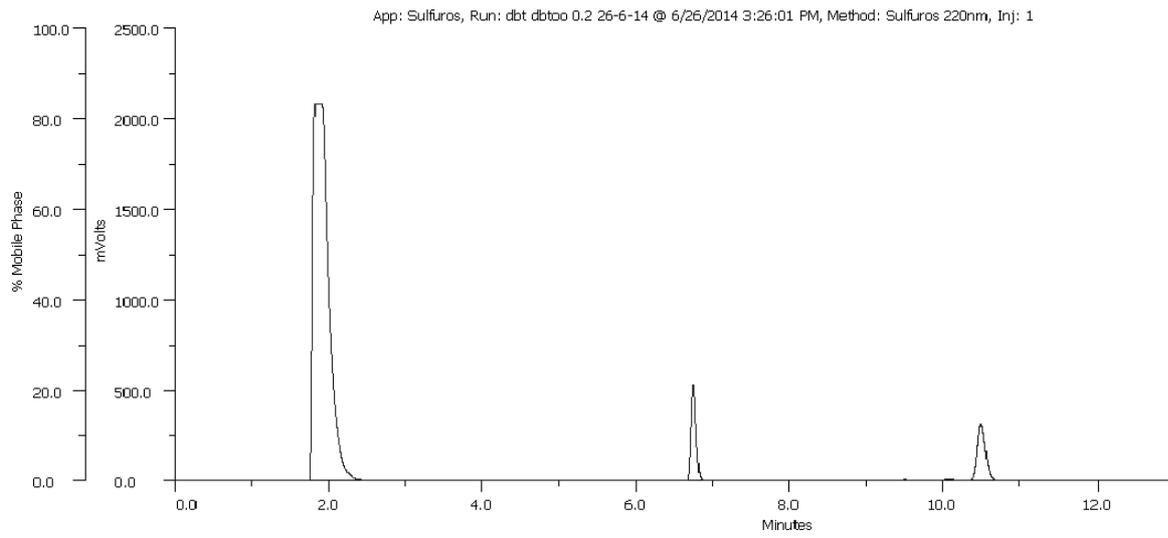


Figura 10.90 Cromatograma de los patrones de dibenzotiofeno (tiempo de retención: 10,5 minutos) y dibenzotiofeno sulfona (tiempo de retención: 6,8 minutos).

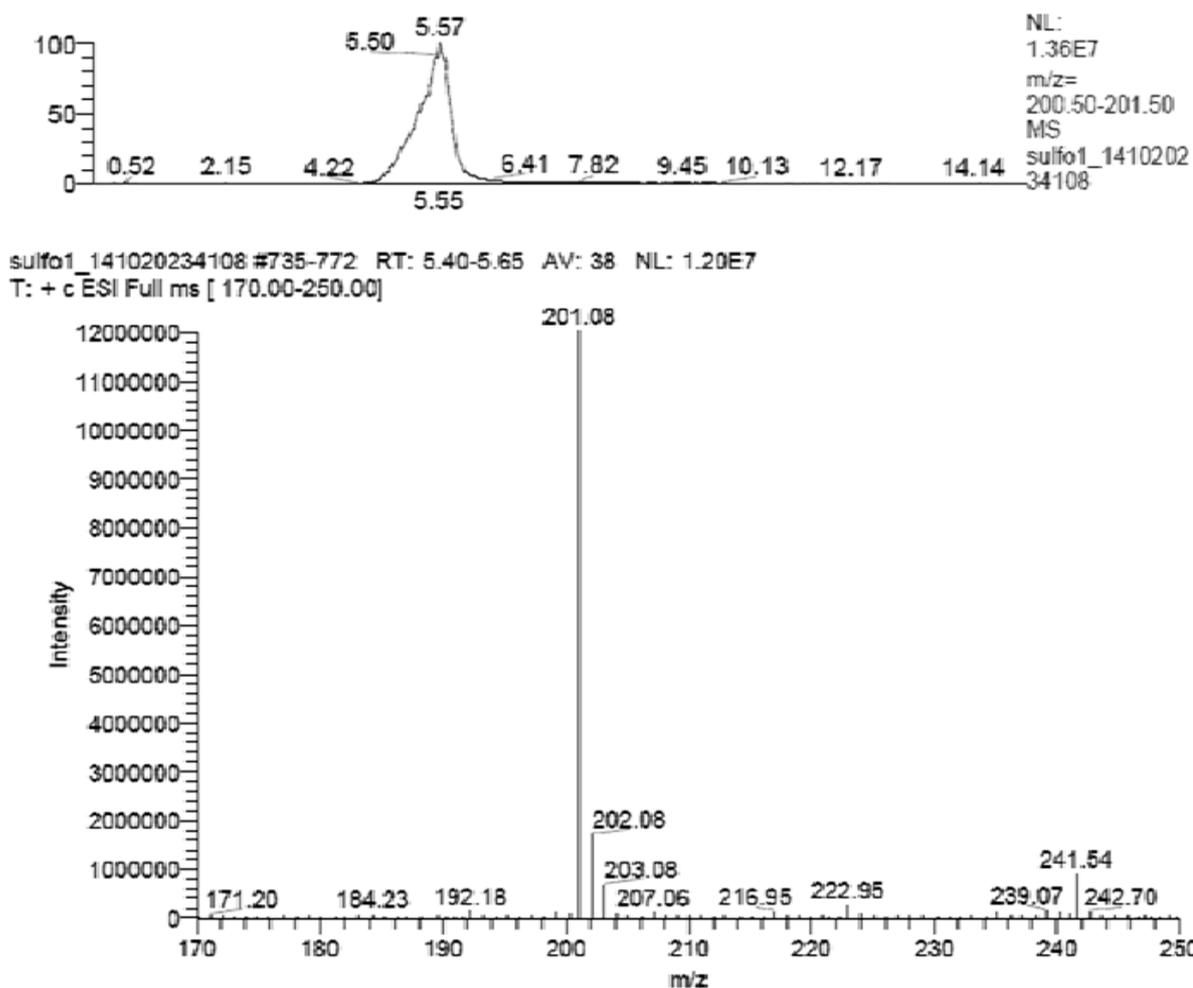


Figura 10.91 Análisis por LC-MS del producto principal de la oxidación de dibenzotiofeno (DBT).

El pico del producto con un tiempo de retención de 5,57 minutos presente en la mezcla de reacción da un espectro de masa con una señal $m/z=201,08$ asignable a la especie dibenzotiofeno sulfóxido protonado $[DBTO+H^+]$.

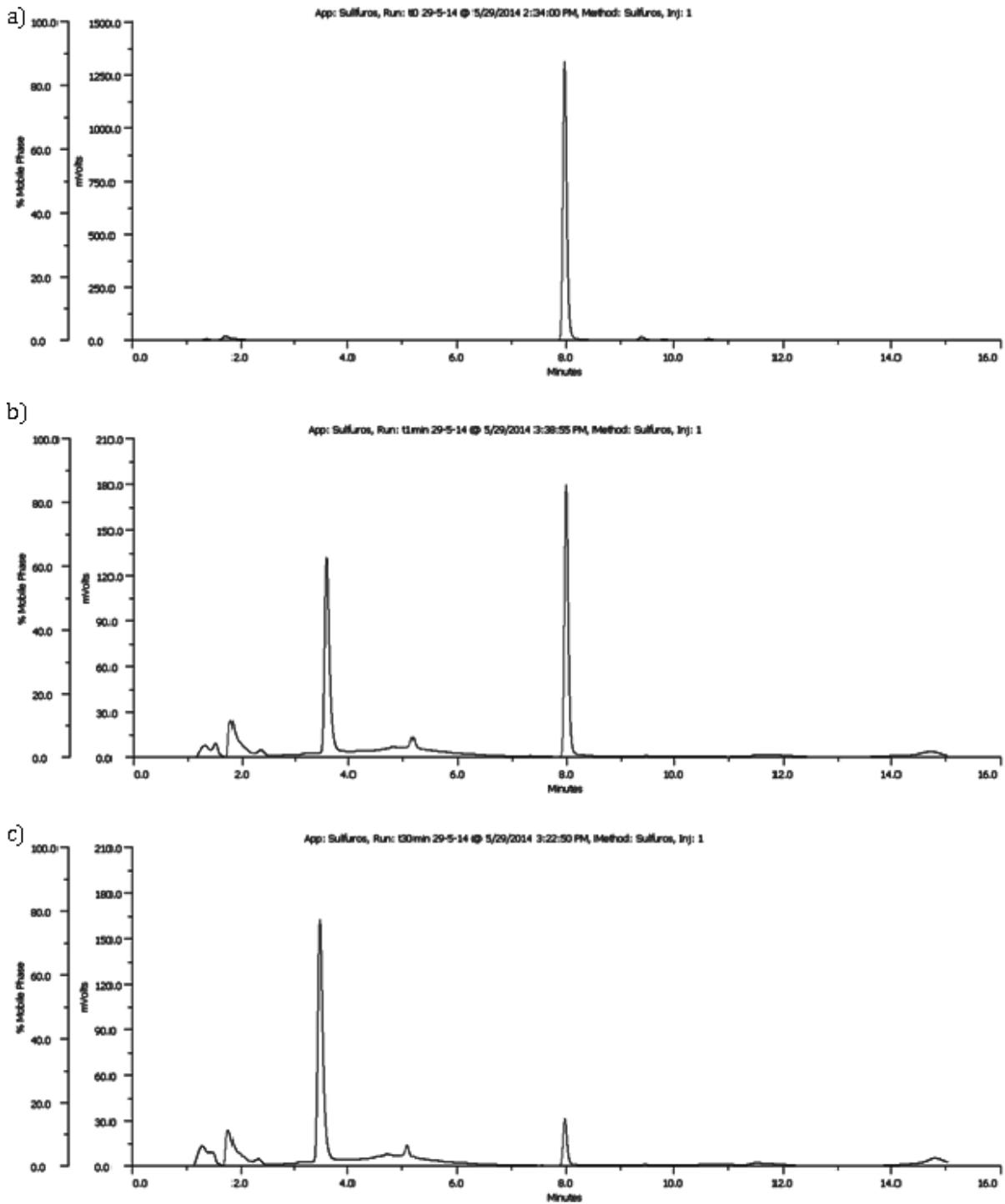


Figura 10.92 Oxidación de tioanisol catalizada por D-DNAzima peroxidasa (D-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

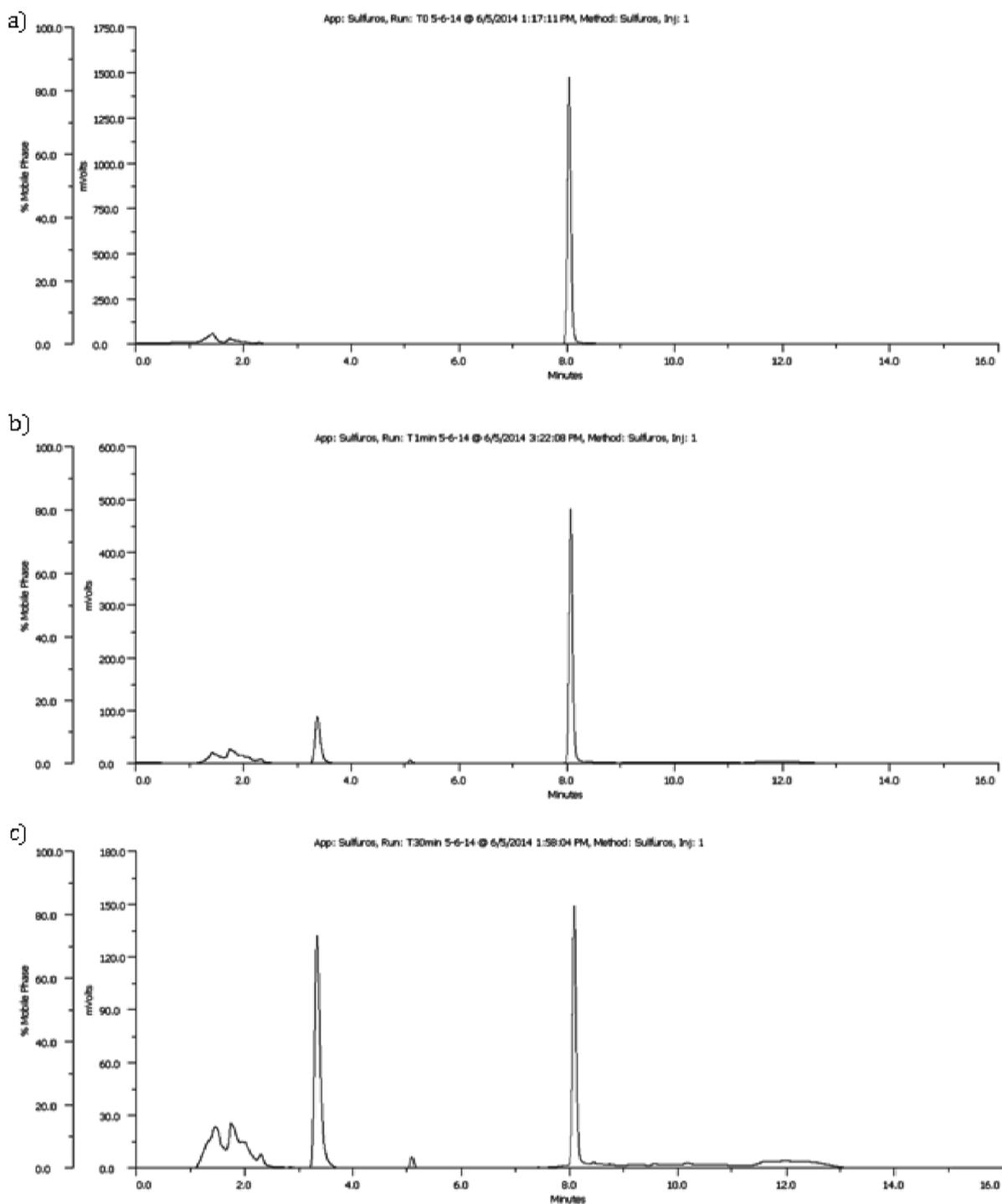


Figura 10.93 Oxidación de tioanisol catalizada por L-DNAzima peroxidasa (L-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

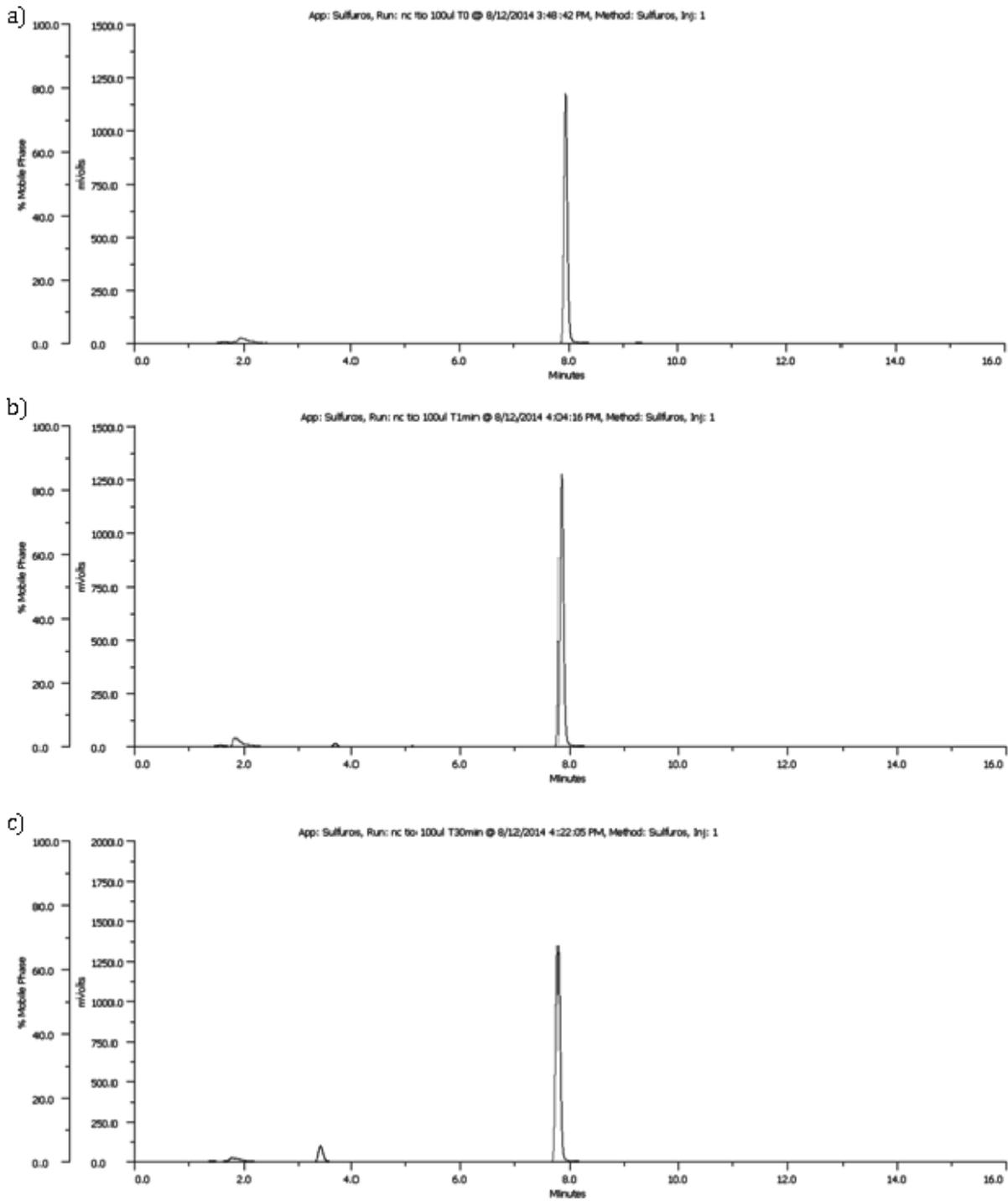
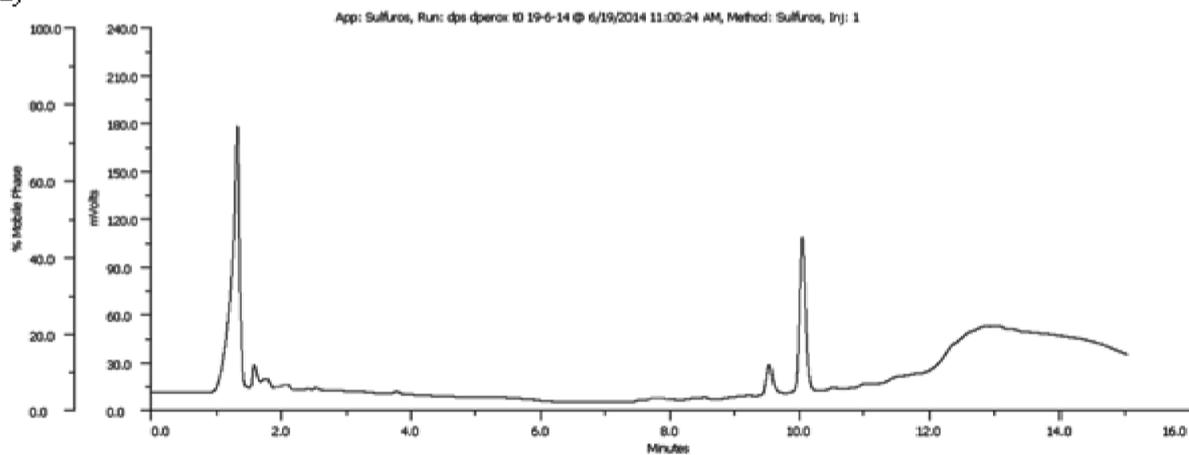


Figura 10.94 Oxidación de tioanisol catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada (I-Dz).

a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c)

Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

a)



b)

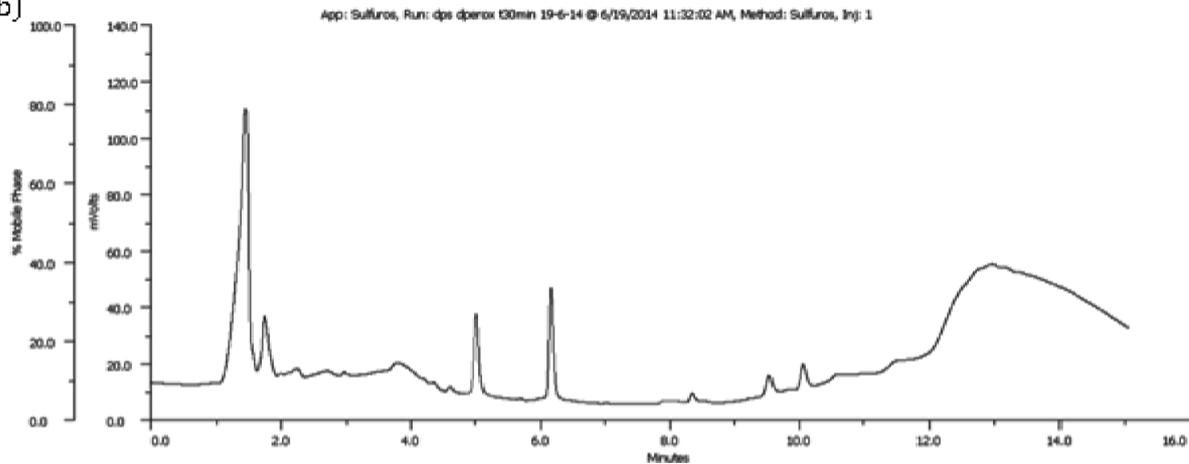


Figura 10.95 Oxidación de difenil sulfuro catalizada por D-DNAzima peroxidasa (D-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

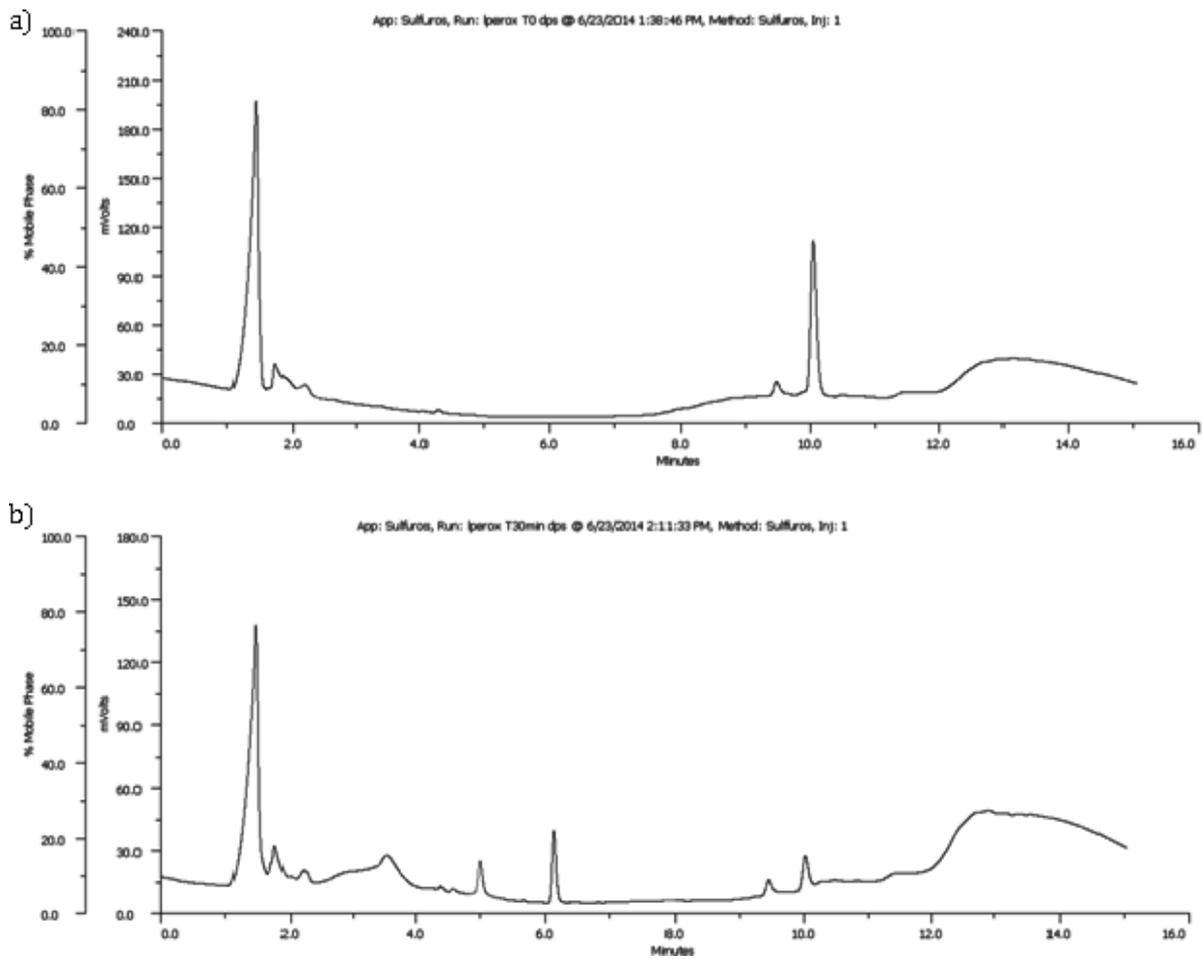


Figura 10.96 Oxidación de difenil sulfuro catalizada por L-DNAzima peroxidasa (L-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

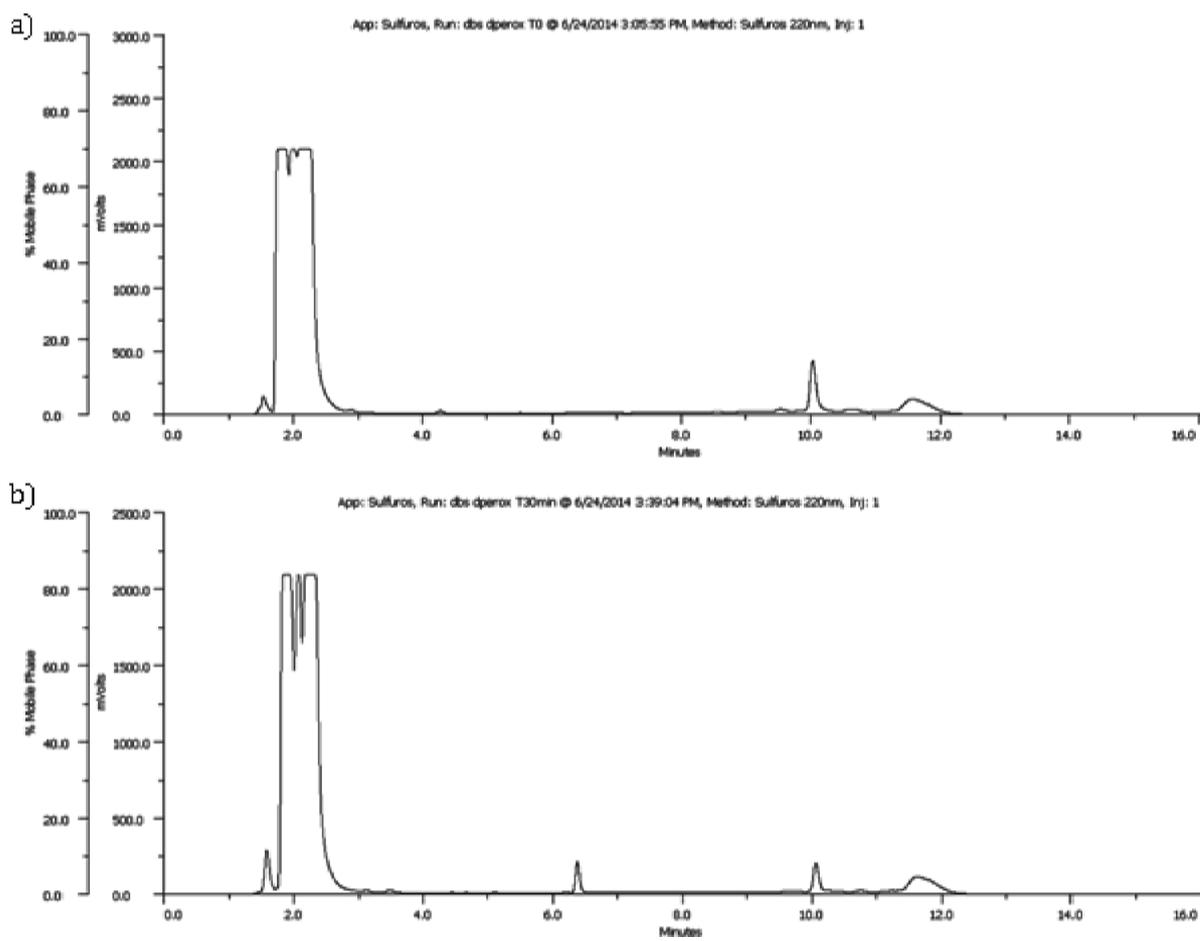


Figura 10.97 Oxidación de dibencil sulfuro catalizada por D-DNAzima peroxidasa (D-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

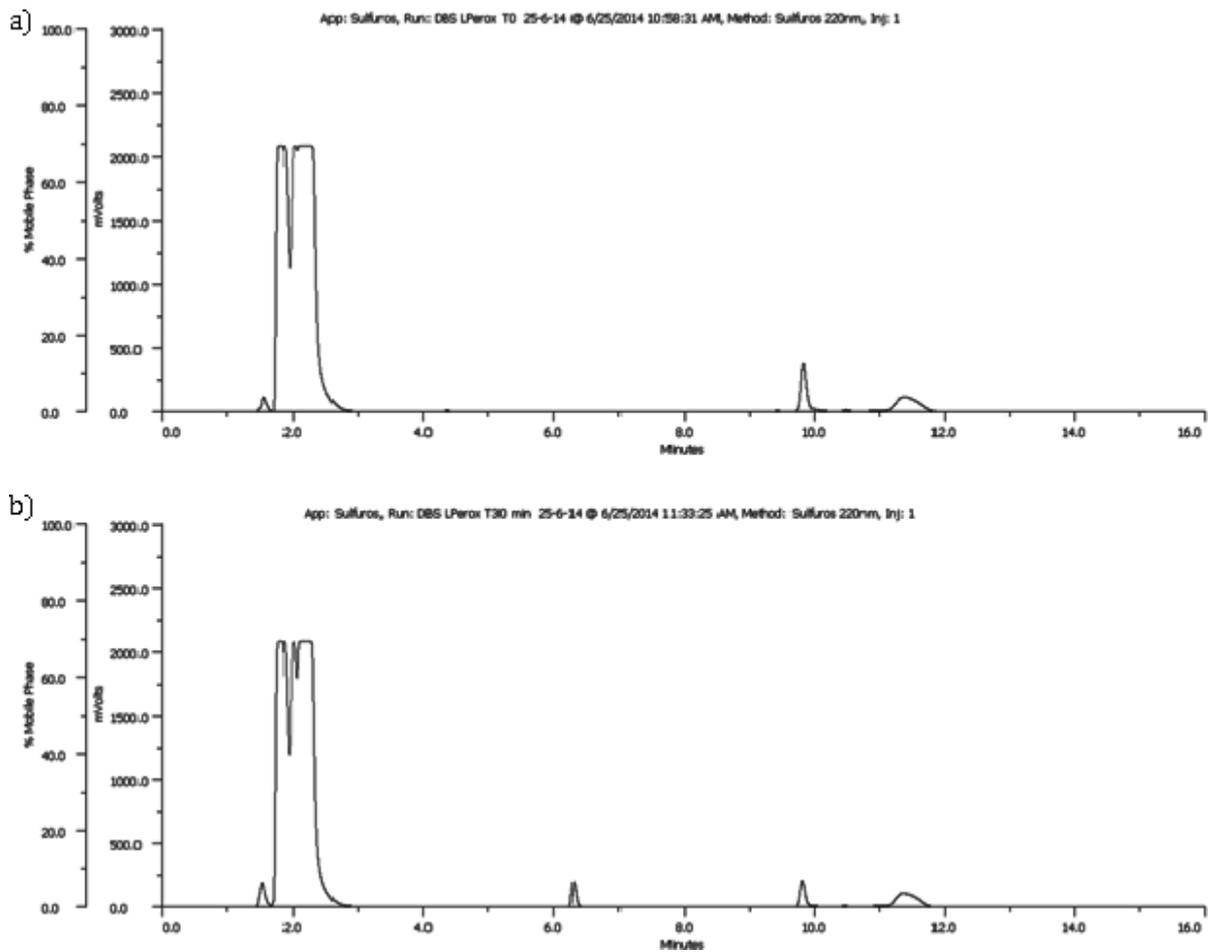


Figura 10.98 Oxidación de dibencil sulfuro catalizada por L-DNAzima peroxidasa (L-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

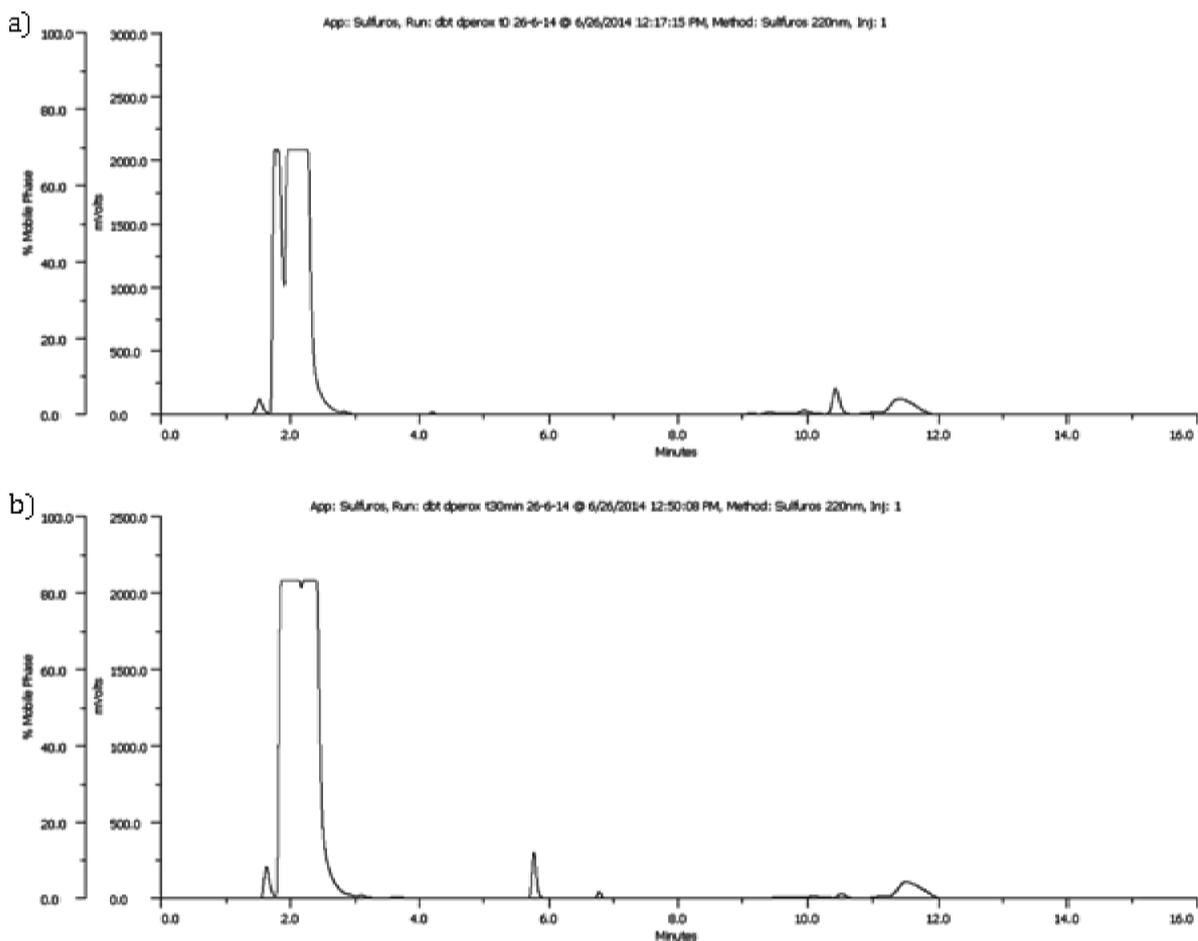


Figura 10.99 Oxidación de dibenzotiofeno catalizada por D-DNAzima peroxidasa (D-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

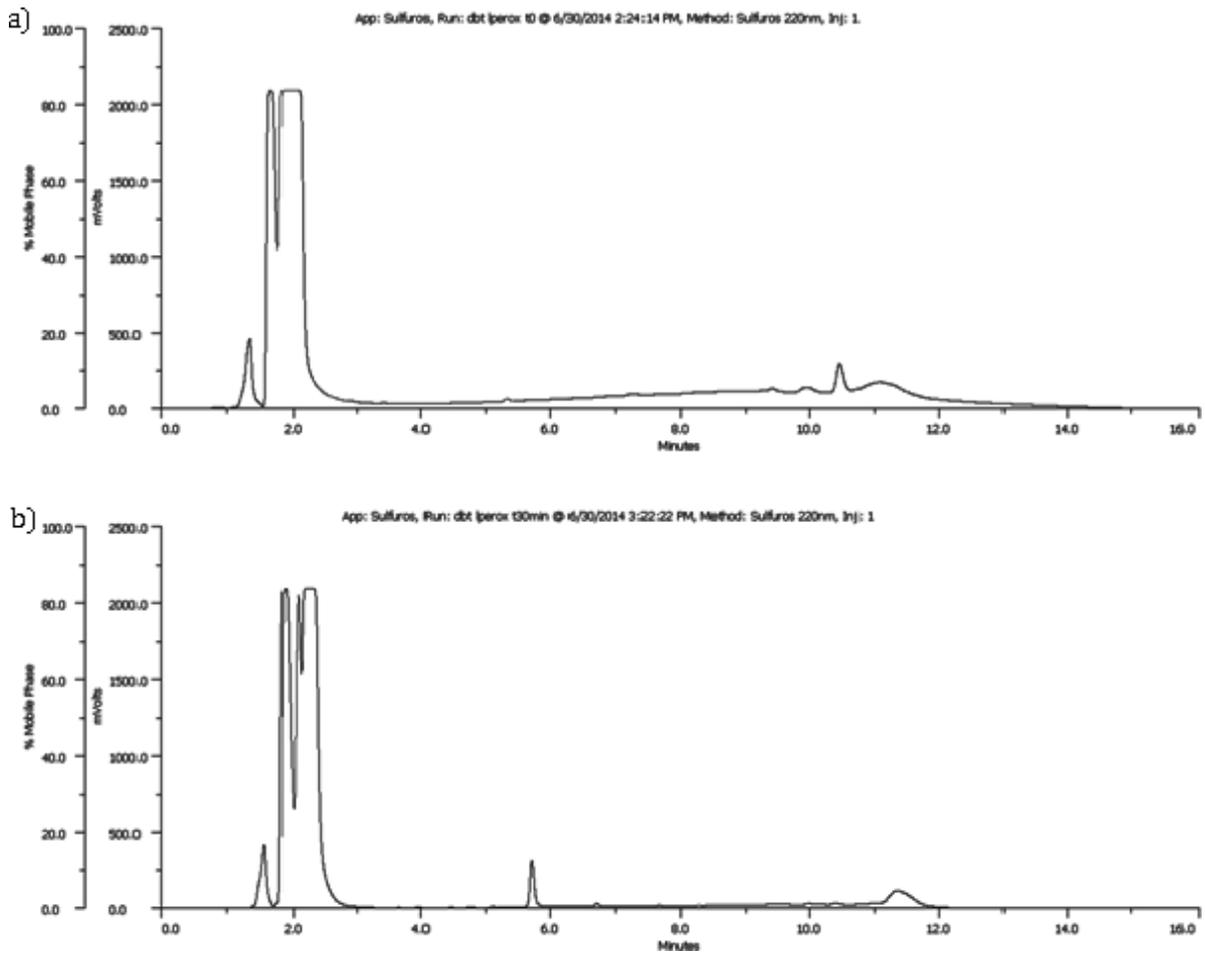


Figura 10.100 Oxidación de dibenzotiofeno catalizada por L-DNAzima peroxidasa (L-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

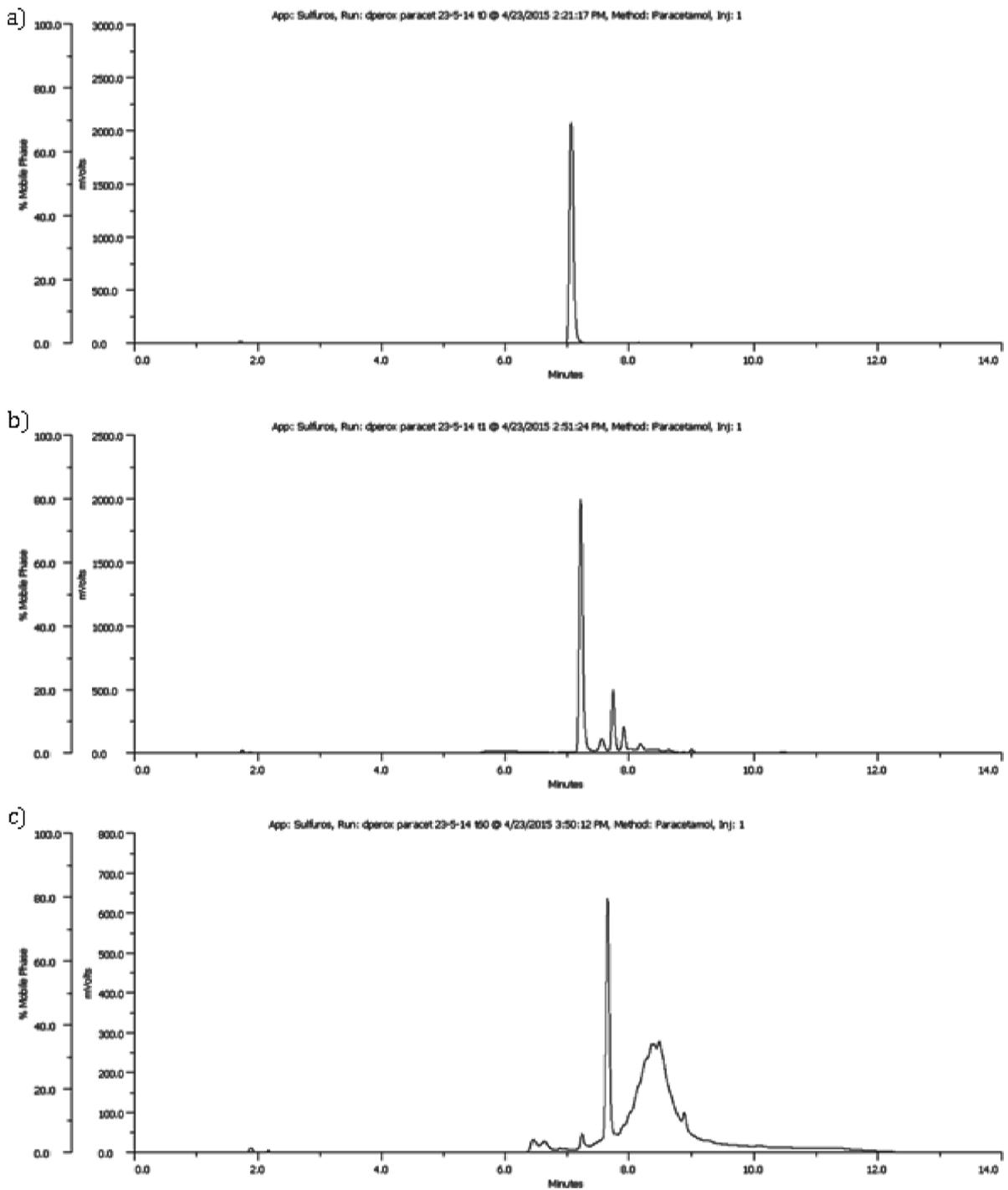


Figura 10.101 Oxidación de paracetamol catalizada por D-DNAzima peroxidasa (D-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

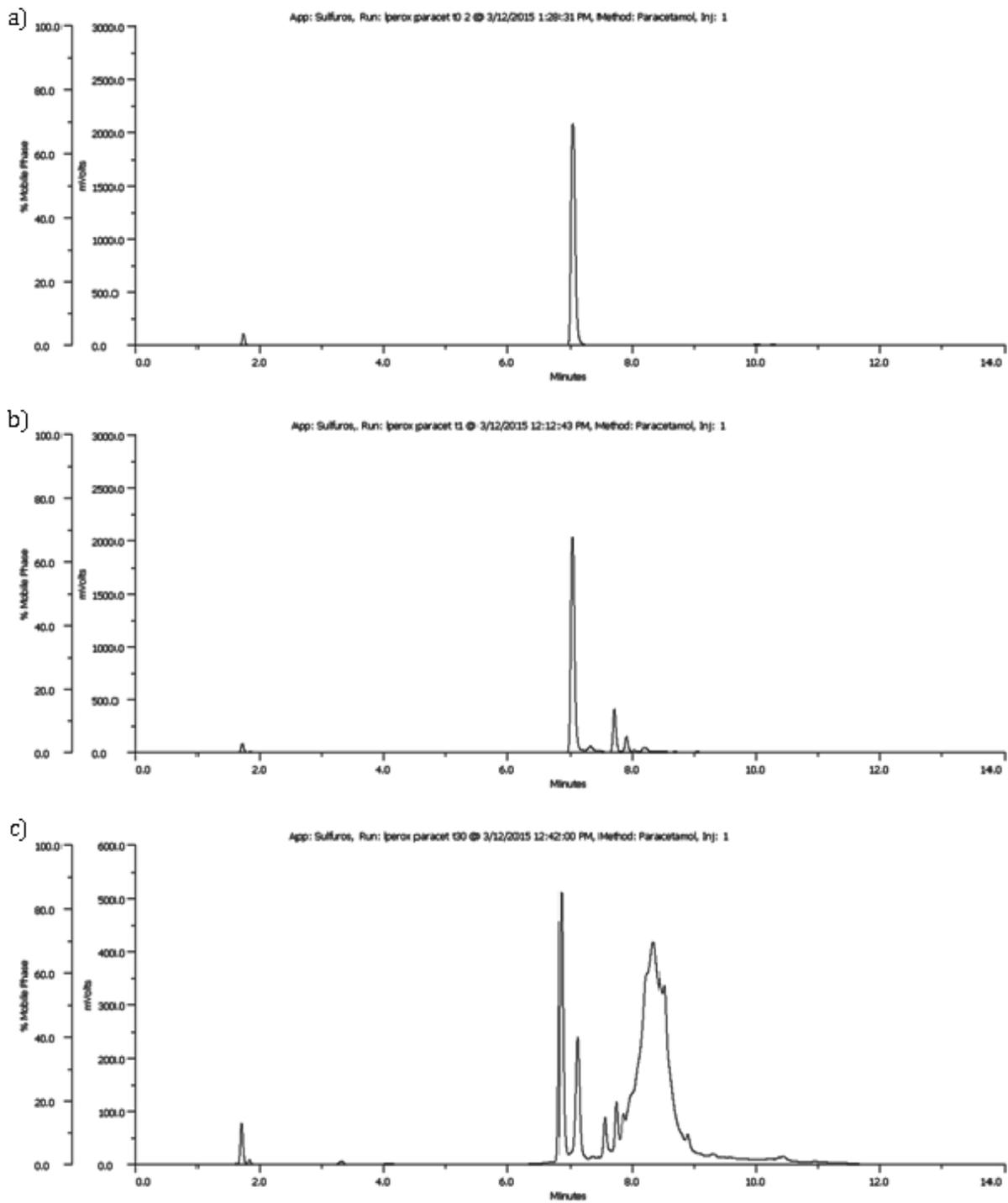


Figura 10.102 Oxidación de tioanisol catalizada por L-DNAzima peroxidasa (L-Dz). a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c) Cromatograma a los 30 minutos de reacción.

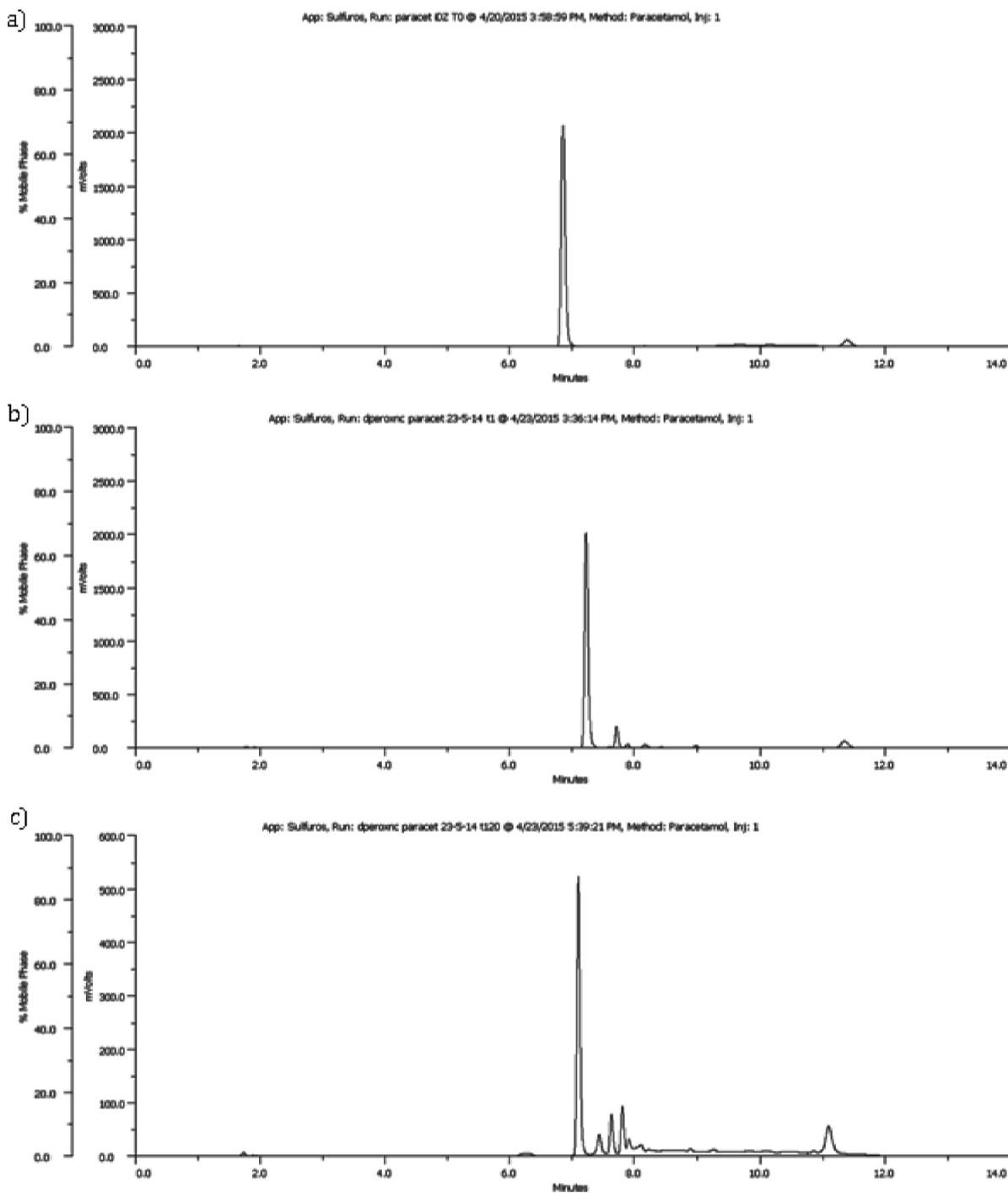


Figura 10.103 Oxidación de tioanisol catalizada por la DNAzima peroxidasa inmovilizada (I-Dz).

- a) Cromatograma a tiempo cero de reacción. b) Cromatograma al minuto de reacción. c) Cromatograma a los 120 minutos de reacción.

Abreviaciones

A: Adenina o Adenosina
ABTS: ácido 2,2-acino-di-(3-etil)benzotiazolina-6-sulfónico
Ac₂O: Anhídrido acético
ACN: Acetonitrilo
AcOEt: Acetato de etilo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
Ago2: endonucleasa Argonauta2
AMP: Adenosín monofosfato
ANA: Ácido arabinonucleico
ANP: Ácido nucleico peptídico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosín trifosfato
BSA: Seroalbúmina bovina
BuLi: Butil litio
Bz: Benzoilo
C: Citosina o citidina
C(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina
C(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metilcitidina
ClPTS: Cloruro de p-toluensulfonilo
CPG: Sílice de poro controlado
DAB: 3,3'-diaminobencidina
DABCO: 1,4-diazobiciclo-(2,2,2)-octano
DBS: Dibencil sulfuro
DBSO: Dibencil sulfóxido
DBSOO: Dibencil sulfona
DBT: Dibenzotiofeno
DBTO: Dibenzotiofeno sulfóxido
DBTOO: Dibenzotiofeno sulfona
DC: Dicroísmo circular
DIPEA: N,N-diisopropiletilamina
DMAP: 4-dimetilaminopiridina
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMT: Dimetoxitritilo

DMTCl: Cloruro de dimetoxitritilo
DPS: Difetil sulfuro
DPSO: Difetil sulfóxido
DPSOO: Difetil sulfona
dU: Desoxiuridina
DZ: DNazima
EDTA: Ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetracético
EpCAM: molécula de adhesión celular epitelial
ETT: 5-(etiltio)-1H-tetrazol
F-ANA: Ácido fluoroarabinonucleico
FBS: Suero fetal bovino
FDA: Food and drug administration
G: Guanina o guanosina
HEPES: Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HIV: Virus de inmunodeficiencia humana
HPLC: Cromatografía líquida de alta performance
HRP: Horseradish peroxidasa o peroxidasa de rábano picante
IAA: Ácido indolacético
LNA: Locked nucleic acid
MeOH: Metanol
miRNA: Ácido ribonucleico micro
MPS: Tioanisol o metil fenil sulfuro
MPSO: Metil fenil sulfóxido
MPSOO: Metil fenil sulfona
Mr: Masa molecular relativa
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: Buffer fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PSA: Antígeno prostático específico ó Persulfato de amonio
Py: Piridina
Rf: Factor de retención
RISC: Complejo silenciador inducido por ARN
RMN: Resonancia magnética nuclear
RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta performance en fase reversa
SD: Desvío estándar
SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*

siRNA: Ácido ribonucleico de interferencia corto
STAT 3: Factor transductor de señal y activador de la transcripción 3
T: Timina o timidina
TBAF: Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMS: ter-butildimetilsilil eter
TBE: Buffer TRIS-Ácido bórico-EDTA
TCA: Ácido tricloroacético
TEA: Trietilamina
TEAA: Acetato de trietilamonio
TEMED: Tetrametiletilendiamina
THAP: 2'-4'-6'-trihidroxiacetofenona
THF: Tetrahidrofurano
TIPDSCl₂: 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano
TLC: Cromatografía de capa delgada
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
U: Uracilo o uridina
U(R): (2'R)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina
U(S): (2'S)-2'-desoxi-2'-C-metiluridina
UOMe: 2'-O-metiluridina
UTR: Región no traducible
VEGFR: Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

Publicaciones relacionadas a este trabajo.

Artículos

Aviñó A, Dellafiore M, Gargallo R, González C, Iribarren AM, Montserrat J, Eritja R. Stabilization of telomeric i-motif structures by (2'S)-2'-deoxy-2'-C-methylcytidine residues. *Chembiochem*. 2017, 18, 1-7.

Dellafiore MA, Iribarren AM, and Montserrat JM. Modified Nucleoside Triphosphates for in-vitro Selection Techniques. *Front. Chem*. 2016, 4:18.

Dellafiore MA, Montserrat JM, Iribarren AM. Exploring the Use of a Guanine-Rich Catalytic DNA for Sulfoxide Preparation. *PLoS ONE* 2015, 10(6): e0129695.

Presentaciones a congresos

“Properties of i-motifs carrying modified nucleosides”

Anna Aviñó, Maria Dellafiore, Sónia Pérez-Rentero, Raimundo Gargallo, Carlos González, Adolfo Iribarren, Javier Montserrat y Ramon Eritja. XXII IRT, París, Francia, 2016.

“Uso de la DNAzima Peroxidasa como catalizador de reacciones de oxidación”. María A. Dellafiore, Javier M. Montserrat y Adolfo M. Iribarren. XX SINAQO, Mar del Plata, Argentina, 2015.

“DNAzymes with Peroxidase and Nuclease Activities.” María Dellafiore, Laura Robaldo, Javier Montserrat and Adolfo Iribarren. XXI IRT, Poznan, Polonia, 2014.

“DNAzimas 8-17 modificadas con 2'-desoxi-2'-C-metil pirimidinas”. María Dellafiore, Javier M. Montserrat, Adolfo M. Iribarren. XIX SINAQO, Mar del Plata, Argentina, 2013.