

Tesi Doctoral

**Formació del motiu quàdruplex *bi-loop* amb oligonucleòtids lineals  
i aplicació a la ciclació assistida per motlle**

Júlia Viladoms Claverol



Dept. de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

## CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

- S'ha estudiat la formació del motiu quàdruplex *bi-loop* amb un oligonucleòtid cíclic i un altre lineal, i s'ha conclòs que és possible la formació d'aquests heterodímers. Els estudis mitjançant ressonància magnètica nuclear han permès determinar que els complexos formats per un oligodesoxiribonucleòtid cíclic i un oligodesoxiribonucleòtid lineal tallat pel dinucleòtid que forma el motiu, d<pCCTTCGGT>·d(GTCCCTCA), d<pCCTTCGGT>·d(CTCAGTCC) i d<pCAGTCCCT>·d(GTCCTTCG), formen el *bi-loop* tot i que l'extrem 3' de l'oligonucleòtid lineal és flexible i un dels parells de bases amb el cicle només està parcialment format. Aquests complexos estan estabilitzats per la formació d'una tètrada GCGC desplaçada i la formació parcial d'una tètrada mixta GCAT.
- El complex entre un oligonucleòtid cíclic i un oligonucleòtid lineal tallat pel llaç, d<pCAGTCCCT>·d(CGCTCCTT), també sembla estructurar-se en forma de *bi-loop*, però aquesta estructuració es perd en allargar els extrems de l'oligonucleòtid lineal, com ho demostra la manca d'estructuració de d<pCAGTCCCT>·d(TTTTGGTTCTTTT).
- Per contra, no s'ha aconseguit observar la formació d'un *bi-loop* heterodimèric entre l'oligodesoxiribonucleòtid cíclic d<pCCTTCGGT> i l'oligoribonucleòtid r(GUCCCUCA). Aquest resultat negatiu s'afegeix a altres intents anteriors infructuosos per observar el motiu amb RNA i sembla indicar que la seva formació amb oligoribonucleòtids no és possible.
- Per primera vegada s'ha observat la formació del motiu *bi-loop* estabilitzat per parells no canònics. Els oligonucleòtids cíclics d<pCCTTCGGT> i d<pTCGTATGT> dimeritzen mitjançant la formació de parells G·C i G·T. Els estudis mitjançant dicromisme circular i especialment ressonància magnètica nuclear han permès determinar que d<pCCTTCGGT> forma un *bi-loop* estabilitzat per una tètrada GCGC desplaçada, anteriorment ja observada, i una nova tètrada GTGT directa, formada per dos parells G·T enfrontats pel solc menor i sense enllaços d'hidrogen addicionals. El cicle d<pTCGTATGT> forma dues espècies dimèriques en solució en equilibri lent en l'escala de temps d'RMN: una primera estabilitzada per una tètrada GCGC desplaçada i una GTGT desplaçada, i una segona estabilitzada per dues tètredes GCGT desplaçades. En aquestes tètredes es formen dos enllaços d'hidrogen addicionals entre les guanines enfrontades. Els dímers formats per d<pTCGTATGT> són més estables que el format per d<pCCTTCGGT>, amb una estabilitat de l'ordre de la dels *bi-loops* amb parells G·C anteriorment estudiats.
- A partir dels resultats descrits amb els oligonucleòtids cíclics d<pCCGTCCGT> i d<pCGCTCCGT>, s'han dissenyat cinc oligonucleòtids lineals que podrien formar un *bi-loop* homodimèric en solució però que no poden estructurar-se intramolecularment formant forquetes: d(TCGTTCGT), d(GTTCGTTC), d(TGCTTCGT), d(GTTGCTTC) i d(TCGTTGCT). S'han realitzat estudis mitjançant dicromisme circular per trobar unes condicions que afavoreixin la formació del motiu *bi-loop* en solució i s'ha observat que la concentració d'oligonucleòtid afecta especialment a

l'estructuració, mentre que el tipus de catió monovalent i el tipus i concentració de catió divalent no semblen tenir una contribució particular.

- Els oligonucleòtids lineals d(GTTCGTTC) i d(GTTGCTTC), que provenen de tallar els corresponents cíclics pel dinucleòtid que forma el motiu, no s'estructuren en solució en forma de *bi-loop*, tot i que els resultats preliminars mitjançant dicroisme circular així ho apuntaven, especialment per a d(GTTGCTTC).
- L'oligonucleòtid lineal d(TCGTTCGT), en lloc d'estructurar-se com a *bi-loop*, forma un dímer estabilitzat per dos parells C·C<sup>+</sup>, un parell G·T i un contacte G·G. No se n'ha determinat l'estructura però s'ha proposat un model per a aquest petit *i-motif*.
- S'han resolt mitjançant ressonància magnètica nuclear i dinàmica molecular restringida les estructures en solució dels oligonucleòtids lineals d(TGCTTCGT) i d(TCGTTGCT) i s'han obtingut conjunts d'estructures ben definides. Aquests dos oligonucleòtids dimeritzen en solució formant un *bi-loop* estabilitzat per dues tètades GCCG. Aquestes estructures són molt similars a l'adoptada pel seu anàleg cíclic d<pCGCTCCGT>, tot i que els dímers formats pels oligonucleòtids lineals són força menys estables a causa del cost entròpic per doblegar la cadena. L'observació per primer cop del motiu *bi-loop* amb oligonucleòtids lineals en solució, un dels objectius principals d'aquesta tesi, sustenta la possibilitat que aquest motiu pugui formar-se *in vivo*.
- La recopilació de tota la informació de què es disposa sobre aquest motiu ha permès extreure conclusions respecte a la seva formació i estabilitat, gràcies a les quals s'han proposat noves seqüències potencialment formadores del *bi-loop*. Partint de la constatació que sembla ser un motiu de caràcter general i de la convicció que la natura és oportunista, ens hem permès hipotetitzar sobre la seva possible rellevància biològica.
- De totes les tècniques assajades per estudiar el *bi-loop*, el dicroisme circular resulta força útil ja que permet caracteritzar el tipus de tètada formada segons la posició del màxim: 290 nm per a les tètades directes i 265 nm per a les tètades desplaçades. La metodologia dels espectres de diferència tèrmica també s'ha mostrat com una eina pràctica per a la detecció del *bi-loop* si es disposa d'espectres de referència, però la correcta i inequívoca caracterització del motiu en solució requereix de la ressonància magnètica nuclear.
- S'han preparat els oligonucleòtids lineals fosforilats ens els seus extrems per als posteriors assajos de ciclació assistida per motlle i s'ha observat un fenomen no descrit: la seva desfosforilació. Aquest fenomen es produeix en l'anàlisi per HPLC de fase inversa en el cas dels oligonucleòtids lineals fosforilats en 3' i espontàniament en el cas dels oligonucleòtids lineals fosforilats en 5', ja que es detecta tant per HPLC de fase inversa com per altres tècniques.
- S'ha intentat la ciclació dels oligonucleòtids d(GTCCCTCAp) i d(CCCTCAGTp) assistida pel motlle cíclic d<pCCTTCGGT> mitjançant la formació d'un motiu *bi-loop* heterolineal, sense èxit,

tot i assajar diverses condicions de reacció. Aquest resultat negatiu s'explica tenint en compte la flexibilitat de l'extrem 3' de l'oligonucleòtid lineal i la competència amb l'autoestructuració del cicle.

- S'ha assajat la ciclació dels oligonucleòtids lineals formadors de *bi-loop* d(TGCTTCGTp) i d(TCGTTGCTp) en diverses condicions (EDC, CNBr i imidazole, CNBr i MES) i, tot i els problemes d'anàlisi, s'ha aconseguit observar producte de ciclació amb l'oligonucleòtid d(TCGTTGCTp) una vegada optimitzades les condicions (EDC 2-5 M, 6 dies de reacció o CNBr 1.9 M en MES, 3 dies de reacció). La dificultat d'aquesta ciclació rau segurament en la baixa estabilitat dels homodímers que han de servir per aproximar en l'espai els extrems dels oligonucleòtids.
- S'ha intentat dur a terme la ciclació assistida per motlle tríplex amb el precursor lineal ancorat sobre un suport polimèric. Els resultats negatius s'atribueixen a la dificultat d'activar el fosfat diester, mitjançant el qual s'ancora l'oligonucleòtid a la resina, amb un agent de condensació que no s'hidrolitzi en el medi aquós requerit per a l'estructuració.

**P**ART EXPERIMENTAL



<b>1</b>	<b>Materials i Mètodes</b>	<b>187</b>
1.1	Reactius, dissolvents i solucions amortidores	187
1.1.1	Reactius i dissolvents	187
1.1.2	Solucions amortidores de pH	188
1.2	Instrumentació i tècniques generals	189
1.2.1	Tècniques espectroscòpiques	189
1.2.2	Espectrometria de masses	190
1.2.3	Tècniques cromatogràfiques	190
1.2.4	Electroforesi en gel de poliàcrilamida (PAGE)	191
1.2.5	Altra instrumentació	192
1.2.6	Assajos i funcionalitzacions de resines	193
1.3	Síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida	194
1.3.1	Instrumentació, reactius i dissolvents específics	194
1.3.2	Determinació del rendiment d'acoblament en cada cicle de síntesi	195
1.3.3	Quantificació d'oligonucleòtids per absorció UV	195
1.3.4	Purificació d'oligonucleòtids	197
1.3.5	Dessalatge d'oligonucleòtids	197
1.3.6	Caracterització per espectrometria de masses MALDI-TOF	198
1.3.7	Caracterització per espectrometria de masses electrosprai	199
1.3.8	Composició en nucleòsids dels oligonucleòtids	199
<b>2</b>	<b>Síntesis d'oligonucleòtids lineals</b>	<b>201</b>
2.1	Elongació de la cadena oligonucleotídica	201
2.2	Desprotecció i desancoratge	202
2.3	Síntesi d'oligonucleòtids lineals no fosforilats	202
2.3.1	Síntesis de d(GTCCCTCA), d(CCCTCAGT) i d(CGGTCCTT)	202
2.3.2	Síntesis de d(CTCAGTCC), d(CGGTCCTT) i d(TTTTGGTTCTTTTT)	203
2.3.3	Síntesis de d(TCGTTCGT), d(GTTTCGTC), d(TGCTTCGT), d(GTTGTTC), d(TCGTTGCT) i d(GCATGCT)	203
2.4	Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats	204
2.4.1	Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats en 3'	204
2.4.2	Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats en 5'	204
2.4.3	Síntesi de d(CGTACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> p) i d(ACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> CGTp)	204
2.4.4	Síntesis de d(GTCCCTCAp), d(CCCTCAGTp), d(pGTCCCTCA) i d(pCCCTCAGT)	205
2.4.5	Síntesi de d(TCGTTCGtp), d(TGCTTCGtp) i d(TCGTTCGtp)	205
<b>3</b>	<b>Síntesi d'oligonucleòtids cíclics</b>	<b>207</b>
3.1	Derivatització del suport polimèric	207
3.1.1	Preparació de l'espaiador-resina: ancoratge de l'àcid <i>N</i> -Fmoc-aminohexanoic al suport	207
3.1.2	Obtenció de la nucleotidil-resina	208
3.2	Elongació de la cadena oligonucleotídica lineal	210
3.3	Ciclació	211
3.4	Desprotecció i desancoratge	211
3.4.1	Desprotecció dels grups fosfats internucleosídics	211

3.4.2	Desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic .....	211
3.4.3	Desprotecció de les nucleobases .....	211
3.5	Dessalatge i purificació .....	211
3.6	Resultats de les síntesis.....	212
3.6.1	Síntesi de d<pCAGTCCCT>.....	212
3.6.2	Síntesi de d<pCCTTCGGT>.....	212
3.6.3	Síntesi de d<pTCGTATGT> .....	214
<b>4</b>	<b>Estudis mitjançant UV i CD.....</b>	<b>215</b>
4.1	Preparació de les mostres.....	215
4.2	Realització d'espectres i corbes de fusió per espectroscòpia d'ultraviolat .....	215
4.3	Realització d'espectres i corbes de fusió per dicroisme circular .....	215
4.4	Tractament de les corbes de fusió i extracció dels paràmetres termodinàmics .....	216
4.4.1	Determinació de la temperatura de fusió .....	216
4.4.2	Paràmetres termodinàmics a partir de la variació de la $T_m$ amb la concentració.....	217
4.4.3	Paràmetres termodinàmics a partir de l'ajust d'una corba .....	217
<b>5</b>	<b>Estudis estructurals d'oligonucleòtids per RMN .....</b>	<b>219</b>
5.1	Preparació de les mostres.....	219
5.2	Adquisició d'espectres.....	219
5.3	Processat d'espectres .....	221
5.4	Assignació espectral .....	221
5.5	Càlcul d'estructures.....	221
5.5.1	Obtenció de restriccions de distància .....	221
5.5.2	Determinació de les estructures .....	223
5.5.3	Anàlisi de les estructures.....	226
<b>6</b>	<b>Estudis mitjançant DSC .....</b>	<b>227</b>
6.1	Preparació de les mostres.....	227
6.2	Adquisició de les dades.....	227
6.3	Tractament de les dades.....	228
<b>7</b>	<b>Ciclació d'oligonucleòtids assistida per motlle .....</b>	<b>229</b>
7.1	Reaccions de ciclació amb EDC .....	229
7.2	Reaccions de ciclació amb CNBr i imidazole .....	230
7.3	Reaccions de ciclació amb CNBr i MES.....	231
7.4	Anàlisi dels resultats.....	231
7.5	Intents de ciclació en medi orgànic .....	231



# 1 MATERIALS I MÈTODES

---

## 1.1 Reactius, dissolvents i solucions amortidores de pH

### 1.1.1 Reactius i dissolvents

Acetonitril (ACN) anhidre: és de qualitat HPLC (>99.9 % puresa) de Panreac o sds i es destil·la sobre  $\text{CaH}_2$  en pols. S'utilitza directament o es guarda sobre pedres de  $\text{CaH}_2$  i sota atmosfera d'argó. Alternativament s'ha emprat ACN anhidre de Glen Research per dissoldre els amidits.

Aigua desionitzada ( $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ): s'obté mitjançant sistemes Milli-Q plus o Milli-Q Synthesis A10 de Millipore.

Amoníac: dissolució comercial al 32 % extrapura de Merck o de Scharlau.

Diclorometà (DCM): és de Scharlau (Normasolv) o sds (*pure pour synthesis*) i se n'eliminen les traces d'àcid fent-lo passar per una columna d'alúmina bàsica.

DCM anhidre: es destil·la el DCM sense traces d'àcid sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  i s'utilitza directament o es guarda en una ampolla opaca a la llum sobre pedres de  $\text{CaH}_2$  i sota atmosfera d'argó.

Dioxà: és de Merck, *pro anàlisi*.

Dimetilformamida (DMF): de sds (*for peptide synthesis*), es guarda sobre tamís molecular activat de 4Å. Abans de ser utilitzada s'hi bombolleja  $\text{N}_2$  durant unes hores per tal d'eliminar-ne les impureses volàtils (amines).

Hexà: és de Merck, qualitat LiChrosolv.

Piridina anhidra: de Panreac per a síntesi. Es destil·la sobre ninhidrina i es guarda sobre pedres de  $\text{CaH}_2$  sota atmosfera d'argó. Alternativament s'ha comprat piridina anhidra sobre tamís molecular d'Aldrich o de Fluka.

La dicitclohexilcarbodiimida (DCC) és d'Aldrich o Fluka i l'1-hidroxibenzotriazole (HOBt) és d'Acros. La dietilamina (DIEA) és de Merck o Aldrich per a síntesi i la piperidina és d'Aldrich o sds. L' 1-*H*-tetrazole s'ha adquirit a Peninsula Laboratories i s'ha sublimat abans del seu ús. L'1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) s'adquiria a Peninsula Laboratories i posteriorment a Novabiochem i a Fluka. La *syn*-piridin-2-aldoxima és de Merck o Aldrich, la tetrametilguanidina (TMG) de Fluka o Aldrich. L'hidrur de calci és d'Aldrich (Lumps, Mesh 95 %) o d'Acros (93 %). L'àcid *N*-Fmoc-6-

aminohexanoic és de Neosystem. El bromur de cianogen és de Fluka o Aldrich (sòlid o dissolució 5 M en ACN). Tots els dissolvents emprats en cromatografia líquida analítica són de qualitat HPLC de les cases sds o VWR. Les matrius emprades per a MS-MALDI-TOF són d'Aldrich.

Per a la preparació de dissolucions amortidores i salines s'ha emprat:  $\text{NH}_4\text{OAc}$  de Fluka, àcid morfolinoetansulfònic (MES) de Sigma, 1,4-piperazina-bis(etansulfonat) de sodi ( $\text{Na}_2\text{PIPES}$ ) de Fluka, hidrocloreur de tris(hidroximetil)aminometà (Tris-HCl) d'Acros, NaCl de Fluka,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de Riedel-de Haën, KCl d'Aldrich,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de Fluka,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de Fluka,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de Fluka i  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de Sigma, tots de qualitat "analytical reagents" (>99 %). Per a l'ajust del pH s'ha emprat HCl, solució aquosa al 37% de Scharlau (reagent grade), AcOH glacial extra pure de Scharlau,  $\text{NH}_3$  al 32% de Merck o Scharlau i  $\text{Et}_3\text{N}$  de Panreac o Riede-de Haën (pulum).

### 1.1.2 Solucions amortidores de pH

#### - Solució d'acetat d'amoni ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 2 M pH 7

Per preparar 1 L d'aquesta solució es pesen 154.2 g d'acetat d'amoni, es dissolen amb aigua desionitzada i s'ajusta el pH a 7 amb  $\text{NH}_3$  o AcOH segons convingui. Finalment s'enrasa en un matràs aforat d'1 L. Per utilitzar aquesta solució com a eluent d'HPLC s'ha de filtrar prèviament a través de filtres de 45  $\mu\text{m}$  de mida de porus.

#### - Solució d'acetat de trietilamoni (TEAOAc) 2 M pH 7

Per preparar 500 mL d'aquesta solució s'addicionen 140 mL (1 mol) de trietilamina i 58 mL d'àcid acètic glacial (1 mol) a un erlenmeyer amb 200 mL d'aigua amb agitació magnètica. L'agitació es manté durant una hora, s'ajusta el pH a 7 amb unes gotes de TEA o AcOH i s'enrasa a 500 mL amb aigua en un matràs aforat. Per utilitzar aquesta solució com a eluent d'HPLC s'ha de filtrar prèviament a través de filtres de 45  $\mu\text{m}$  de mida de porus.

#### - Solució de bicarbonat de trietilamoni (TEAB) 2 M pH 8

Per preparar 1 L d'aquesta solució es prepara una dissolució 2 M de TEA (277.6 mL de TEA i  $\text{H}_2\text{O}$  fins a 1 L) i s'hi fa passar un corrent de  $\text{CO}_2$  fins que la dissolució té el pH adequat (8-10 h).

#### - Solució de Tris – HCl 100 mM pH 8

Per preparar 100 mL d'aquesta solució es dissolen 1.21 g de Tris-HCl en 80-90 mL d'aigua, s'agita vigorosament, s'ajusta el pH a 8 amb una dissolució d'HCl concentrat i s'enrasa a 100 mL en un matràs aforat.

#### - Solució de $\text{Na}_2\text{PIPES}$ 100 mM pH 7

Per preparar 100 mL de solució  $\text{Na}_2\text{PIPES}$  100 mM es dissolen 3.76 g de  $\text{Na}_2\text{PIPES}$  en 80-90 mL d'aigua, s'ajusta el pH amb HCl i s'enrasa a 100 mL en un matràs aforat.

#### - Solució de fosfat sòdic 100 mM pH 7

Per preparar 100 mL de solució  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM pH 7 es mesclen 30.5 mL d'una solució aquosa 0.2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8.8995 g/L de la sal dihidratada) amb 19.5 mL d'una solució aquosa 0.2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (7.8005 g/L de la sal dihidratada) i s'enrasa a 100 mL, comprovant-ne el pH resultant.

- Solució de MES 500 mM (MES-NaOH pH 6 o MES-Et<sub>3</sub>N pH 7.5)

Per preparar 100 mL d'aquesta solució es dissolen 9.76 g de MES en aigua Milli-Q. S'ajusta el pH fins al valor desitjat (amb NaOH o Et<sub>3</sub>N) i s'enrasa en un matràs de 100 mL.

- Solució d'imidazole – HCl 400 mM pH 7

Per preparar 100 mL d'aquesta solució es dissolen 2.72 g d'imidazole en 80-90 mL d'aigua Milli-Q, s'ajusta el pH a 7 amb HCl i s'enrasa a 100 mL en un matràs aforat.

## 1.2 Instrumentació i tècniques generals

### 1.2.1 Tècniques espectroscòpiques

#### 1.2.1.1 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C de molècules petites s'han enregistrat en aparells Varian Gemini-200 MHz, Varian Inova-300MHz i Varian Mercury 400 MHz, de la Unitat d'RMN dels Serveis Científic-Tècnics de la UB. Els desplaçaments químics s'expressen en ppm respecte la referència interna de tetrametilsilà ( $\delta$ : 0 ppm). Els espectres d'RMN de <sup>31</sup>P s'han realitzat en un aparell Varian Unity-300 Plus/Varian Inova 300 i els desplaçaments químics s'expressen en ppm respecte la referència externa d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % en D<sub>2</sub>O ( $\delta$ : 0 ppm) o TMP (fosfit de trimetil) en CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$ : 141.6 ppm). Els espectres en fase gel es realitzen suspentent la resina en CDCl<sub>3</sub> o CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en uns tubs especials de fons pla que, amb l'ajut d'un èmbol, permeten concentrar la mostra en la zona d'irradiació (tubs SHIGEMI Co, LTD, Japan), de manera que només calen quantitats molt petites de mostra (20 a 40 mg de resina).

Els espectres d'RMN d'oligonucleòtids s'han enregistrat en aparells Bruker AV-600 i Bruker AV-800 US2 del departament d'espectroscòpia i estructura molecular de l'Institut de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid (veure capítol 5).

#### 1.2.1.2 Espectroscòpia UV i dicroisme circular

Els espectres d'UV-visible s'han realitzat en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 5 UV-Vis, en un CARY 500 Scan UV-Vis-NIR de Varian o en un Jasco V-550 UV-Vis. Les corbes de fusió per UV s'han realitzat en el CARY 500 Scan UV-Vis-NIR amb els accessoris necessaris i un controlador de temperatura CARY de Varian o en el Jasco V-550 amb controlador de temperatura Peltier Jasco ETC-505T. Les cubetes emprades han estat Hellma de quars d'1 cm o 1 mm de pas de llum.

Els espectres de dicroisme circular s'han realitzat en un espectropolarímetre Jasco J-720, proveït d'un accessori de cubetes termostatitzable connectat a un bany d'aigua Neslab RP-100, o en un espectropolarímetre Jasco J-810 proveït d'un accessori de cubetes cilíndriques termostatitzable connectat a un bany Julabo F25 o d'un accessori Peltier Jasco CDF-4265 per a cubetes quadrades. Les cubetes emprades han estat Hellma de quars (que han passat un test de valoració polarimètrica) quadrades d'1 cm o 1 mm de pas de llum, o cilíndriques d'entre 1 cm i 0.1 mm de pas de llum.

### 1.2.2 Espectrometria de masses

Els espectres de masses per MALDI-TOF s'han obtingut en un aparell PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup>RP, usant THAP o HPA com a matriu, del Servei d'Espectrometria de Masses dels SCT de la UB.

Els espectres de masses per electrosprai (ESI) s'han obtingut en un aparell Micromass ZQ de Waters, amb detector de simple quadrupol, acoblat a un sistema d'HPLC Waters 2695 i amb detector de fotodíodes Waters2996 PDA, del departament de Química Orgànica de la UB.

### 1.2.3 Tècniques cromatogràfiques

#### 1.2.3.1 Cromatografia en capa fina (CCF)

La cromatografia en capa fina s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb indicador de fluorescència a 254 nm sobre suport d'alumini (60 F, 0.2 mm, Merck). El revelat s'ha realitzat per visualització amb làmpada d'ultraviolat a 254 nm.

#### 1.2.3.2 Cromatografia en columna

La purificació per cromatografia en columna s'ha realitzat sobre gel de sílice (Chromatogel 60A CC, 35-70 microns, sds).

#### 1.2.3.3 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

L'anàlisi i purificació per cromatografia líquida d'alta resolució en fase inversa s'ha dut a terme en sistemes Shimadzu (dues bombes LC-10A amb mesclador d'alta pressió, autoinjector SIL-9A, detector UV-Vis SPD-10A i registrador integrat Chromatopac C-R5A) o Waters (Separations Module 2695 i PDA detector 2996).

Condicions analítiques: s'han utilitzat columnes Kromasil 100 C<sub>18</sub> de Teknokroma de 25 × 0.4 cm (mida de partícula 10 µm) o de 10 × 0.4 cm (mida de partícula 5 µm), treballant sempre a un flux d'1 mL/min.

Condicions semipreparatives: per purificació a escala semipreparativa s'ha utilitzat una columna X-Terra<sup>®</sup>MS C<sub>18</sub> de 50 × 10 mm i 2.5 µm de mida de partícula, treballant a un flux de 3 mL/min o una Hamilton PRP-I de poli(estirè-divinilbenzè), 305 × 7 mm i 100 Å de mida de porus, treballant a un flux de 2 mL/min.

Com a sistemes d'elució s'ha utilitzat un gradient de dos dissolvents: A: NH<sub>4</sub>OAc 0.01 M (en algun cas particular TEAOAc 0.01 M) i B: H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) v/v, típicament de 5 a 35 % de B en 30 min en el cas de les columnes llargues (25-30 cm) o en 15 min en el cas de les columnes curtes (5-10 cm). Quan es purifica, aquest gradient s'acostuma a començar a un % més elevat de B i a aplanar per tenir la màxima resolució en el pic que ens interessa col·lectar. Els dissolvents es desgasifiquen en un bany d'ultrasons abans d'utilitzar-los durant 15 minuts.

#### 1.2.3.4 Cromatografia líquida de mitja resolució (MPLC)

La purificació per cromatografia líquida de mitja resolució s'ha realitzat en un sistema format per una

bomba de pistó Duramat de cfg ProMinent, un detector d'UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech, un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 de LKB i un enregistrator REC 101 de Pharmacia Biotech. S'ha emprat una columna de fase inversa de sílice C<sub>18</sub> (Vydac, 20 × 2 cm, 15-20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de mida de porus), eluint a un flux de 2-3 mL/min. Com a eluents s'utilitzen els mateixos que per HPLC i per crear el gradient es fa servir un sistema de vasos comunicants. En un s'hi col·loca una solució de NH<sub>4</sub>OAc 0.05 M (0 % de B) i en l'altre la mescla d'eluents de NH<sub>4</sub>OAc 0.05 M (A) i H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) (B) a la qual es vol arribar.

#### 1.2.3.5 Cromatografia d'exclusió molecular

El dessalatge d'oligonucleòtids s'ha realitzat mitjançant filtració molecular a través de Sephadex G-10, G-15 o G-25, segons la mida de l'oligonucleòtid, (Pharmacia, 80 × 2 cm), en un sistema format per una bomba peristàltica Pharmacia LKB P-1, un detector d'UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech, un col·lector de fraccions automàtic LKB Ultrorac 7000 i enregistrator Pharmacia Biotech REC 101. L'oligonucleòtid es dissol en la mínima quantitat d'aigua i com a eluent s'utilitza també aigua.

#### 1.2.3.6 Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses

L'anàlisi per HPLC-MS s'ha dut a terme en un aparell Micromass ZQ de Waters, acoblat a un sistema d'HPLC Waters 2695 i amb detector de fotodíodes Waters2996 PDA. La columna emprada ha estat una Kromasil 100 C<sub>18</sub> 5 µm de 15 × 0.21cm. Les condicions d'elució varien lleugerament en cada cas, però el gradient estàndard en les columnes llargues de 5 a 35 % B en 30', flux=1 mL/min, es converteix en: 5 a 35 % B en 20', flux=0.250 mL/min.

### 1.2.4 **Electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE)**<sup>285</sup>

Per a l'electroforesi en fase gel s'han utilitzat aparells per a gels verticals de Hoefer Scientific Instruments, models SE 410 o S 660, plaques de vidre (18 × 24.5 cm) i espaiadors i pintes de diferent gruix. La font de voltatge és una LKB Bromma 2197.

Els reactius emprats són: acrilamida (de Serva o Fluka), bisacrilamida (de Pharmacia Biotech o Fluka), urea (de Merck o Fluka), *N,N,N',N'*-tetrametietilendiamina (TEMED, de Serva) i persulfat amònic (de Serva). La solució TBE 10 x (1.3 M Tris, 0.45 M d'àcid bòric, 25 mM EDTA) és de Bio-Rad o de Fluka. La formamida i el "stains all" són de Sigma.

La solució d'acrilamida/bisacrilamida (19/1) al 20 %, 7 M urea, es prepara de la següent manera: 450 g d'urea, 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida, 100 mL TBE 10x, i aigua Milli-Q fins a arribar a un litre. La mescla s'agita de manera vigorosa i es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm de mida de porus.

Els marcadors que s'han fet servir són bromofenol (migració equivalent a un 6 mer) i cianoxilenol (migració equivalent a un 22 mer). La dissolució de marcadors es prepara de la següent manera: 0.25 % de bromofenol, 0.25 % de cianoxilenol, 30 % de glicerol i la resta aigua Milli-Q.

#### 1.2.4.1 Gel de poliacrilamida analític en condicions desnaturalitzants

Per al gel analític s'empen espaiadors i pinta de 0.75 mm, que s'ajusten i es munten en el sistema d'electroforesi. Per prepara el gel es mesuren 30 mL de solució d'acrilamida al 20 % i es barregen

amb 300 µL d'una solució de persulfat amònic en aigua al 10 % i amb 30 µL de TEMED. S'agita la mescla i ràpidament s'aboca entre les dues plaques de vidre, amb la pinta ja col·locada. Es deixa polimeritzar durant 30'. Es retira la pinta i es netegen els pous amb solució de TBE 0.5x. Aquesta mateixa solució de TBE 0.5x (50 mL de TBE 10x en 1 L) és la que s'empra com a solució conductora.

Es dipositen 2 µl de solució de marcadors als pous convenients i es pre-corre el gel a 750 V durant 30' per uniformitzar-lo i comprovar que els marcadors migren correctament.

Les mostres (entre 0.05 i 0.2 OD<sub>260</sub>) es carreguen dissoltes en H<sub>2</sub>O/formamida 1:1 v/v (generalment en 20 µl). Es corre el gel aplicant un voltatge ~750 V durant unes 4h.

S'extreu el gel amb molta cura d'entre els vidres i es diposita en una cubeta amb H<sub>2</sub>O. Es renta per eliminar les restes d'urea i afavorir la tinció posterior. S'elimina l'aigua de la cubeta i s'hi afegeixen 200 mL de la solució de tinció (20 mg de "stains all", 30 mL de formamida i 170 mL d'aigua). Es deixa tenyir durant 30 minuts protegit de la llum. S'elimina la solució de tinció, es renta el gel amb aigua diverses vegades i es deixa destenyir per efecte de la llum fins que queda quasi incolor. Les bandes d'oligonucleòtid presenten una coloració blava. El gel s'asseca col·locant-lo en un suport de paper porós (filter paper backing de Bio-Rad) i cobrint-lo amb una membrana de cel·lofana humida (cellophane membrane backing de Bio-Rad) i sotmetent-lo a un cicle de 2h a 80 °C i al buit (Gel Dryer model 583 de BioRad).

#### 1.2.4.2 Gel de poliacrilamida preparatiu en condicions desnaturalitzants

Per al gel preparatiu s'empren espaiadors i pinta d'1 o 1.5 mm de gruix. Per preparar el gel es necessiten 40 o 60 mL de solució d'acrilamida al 20 %, que es mesclen amb 400/600 µL de solució de persulfat amònic en aigua al 10 % i 40/60 µL de TEMED. La quantitat d'oligonucleòtid a carregar es troba entre 1-2 OD<sub>260</sub> per pou. El voltatge de treball també és 750 V.

Un cop realitzada l'electroforesi el gel no es tenyeix, sinó que es col·loca amb cura sobre un cromatofoli de gel de sílice amb indicador de fluorescència a 254 nm i s'observa sota la làmpada UV. Amb una ganiveta neta i estèril es tallen les bandes desitjades. Es tritura bé amb l'ajuda d'una vareta de vidre, i s'extreu amb 5-10 mL de TEAOAc 2 M. S'agita de manera vigorosa i es congela i descongela dues vegades. Es deixa agitant tota la nit. Es liofililitza i es dessala convenientment.

#### 1.2.5 Altra instrumentació

Les centrifugacions s'han realitzat en una centrífuga termostatitzada Beckman GS-15R. Les liofililitzacions de les dissolucions aquoses s'han dut a terme en un aparell Virtis model Freezemobile 12EL o en un aparell de Labconco model Freezone 6. Els punts de fusió s'han realitzat en un aparell Reichert Thermovar F-05/76. Les mesures de pH s'han dut a terme en un pH-metre Crison micropH Basic 20.

## 1.2.6 Assajos i funcionalitzacions de resines

### 1.2.6.1 Assaig qualitatiu de ninhidrina<sup>286</sup>

L'assaig de ninhidrina permet detectar la presència d'amines primàries lliures sobre suports polimèrics. Es tracta una alíquota de resina neta i seca (0.5-2 mg) amb 6 gotes del reactiu A i 2 gotes del reactiu B i s'escalfa a 110 °C durant 3 min en un bany de sorra. L'aparició d'una coloració blau-violeta indicarà la presència d'amines lliures, mentre que una coloració groga indica un resultat negatiu en l'assaig. L'avaluació del color es realitza per comparació amb un control sense resina sotmès al mateix tractament.

Reactiu A: es prepara una dissolució de 40 g de fenol en 10 mL d'etanol absolut i una altra de 2 mL de KCN 10 mM en 100 mL de piridina anhidra acabada de destil·lar. Ambdues dissolucions s'agiten per separat amb 4 g de resina Amberlite MB-3 (Merck) durant 45 min, es filtren i es mesclen.

Reactiu B: es dissolen 2.5 g de ninhidrina en 50 mL d'etanol absolut. La dissolució obtinguda es conserva en un recipient tancat protegida de la llum.

### 1.2.6.2 Determinació de la funcionalització de Fmoc-resines

Es tracta una alíquota de resina seca i de pes conegut (al voltant de 10 mg) amb piperidina al 20 % en DMF (v/v), seguint les instruccions que es donen a la Taula 1.1. Es recullen els filtrats procedents de les etapes 3, 4 i 5 en un matràs de 25 mL i s'enrasa amb DCM. Es determina l'absorbància a 300 nm de la N-(9-fluorenilmetil)-piperidina formada ( $\epsilon = 7800 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )<sup>287</sup> i es calcula la funcionalització segons la següent fórmula:

$$f = \frac{A_{300} \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

on  $A_{300}$  és l'absorbància mesurada,  $V$  (mL) és el volum total,  $\epsilon_{300}$  ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) és el coeficient d'extinció molar de la N-(9-fluorenilmetil)-piperidina a 300 nm,  $l$  (cm) és el pas de llum de la cubeta i  $m$  (mg) la massa de l'alíquota pesada.

Etapa	Operació	Reactiu	Nº tract.	t (min)/tract
1	rentat	DCM	4	1
2	rentat	DMF	4	1
3	desprotecció	Pip 20 % en DMF	3 (200µl)	3
4	rentat	DMF	1 (100 µl)	1
5	rentat	DCM	n	1

Taula 1.1. Tractament de desprotecció de Fmoc-NH-resines

### 1.2.6.3 Determinació de la funcionalització de DMT-resines

Es tracta una alíquota de resina seca i de pes conegut (al voltat de 10 mg) amb TCA al 2 % en DCM seguint el protocol indicat en la taula 2 i es recullen els filtrats (etapes 2 i 3) en un matràs de 50 mL. S'evapora a sequedat i es redissol amb EtOH/HClO<sub>4</sub> (3:2) en un matràs aforat de volum adequat (càlcul previ aproximat de l'absorbància esperada).

Es mesura l'absorbància del catió dimetoxitritil a 498 nm ( $\epsilon = 71700 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) i es calcula la funcionalització amb la següent fórmula:

$$f = \frac{A_{498} \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

on  $A_{498}$  és l'absorbància mesurada, V (mL) és el volum total,  $\epsilon_{498}$  ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) és el coeficient d'extinció molar del catió 4,4'-dimetoxitritil a 498 nm, l (cm) és el pas de llum de la cubeta i m (mg) la massa de l'aliquota pesada.

Etapa	Operació	Reactiu	Nº tract.	t (min)/tract
1	Rentat	DCM	4	1
2	Desprotecció	TCA 2 % en DCM	2	3
3	Rentat	DCM	4	1

Taula 1.2. Tractament de desprotecció de DMT-O-resines

### 1.3 Síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida

#### 1.3.1 Instrumentació, reactius i dissolvents específics

Les síntesis d'oligonucleòtids s'han realitzat en sintetitzadors automàtics d'Applied Biosystems models 380B, Expedite o 3400. Existeixen diferents programes o cicles de síntesi segons el tipus de suport i l'escala de treball (veure apartats 2.1, 3.2 i Annex).

Els suports polimèrics emprats són:

- TentaGel N  $\text{NH}_2$  ( $f = 240 \mu\text{mol/g}$ ), copolímer de polietilenglicol-poliestirè, de RAPP POLYMERE, per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics.
- CPG comercial funcionalitzada amb un dels nucleòsids ja incorporats (DMT-dN-succinil-*lcaa*-CPG) ( $f = 40\text{-}50 \mu\text{mol/g}$ ) de Glen Research, Applied Biosystems o PE Biosystems, per a la síntesi d'oligonucleòtids lineals.
- CPG comercial funcionalitzada amb 2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil (*3'-Phosphate CPG*,  $f = 40\text{-}50 \mu\text{mol/g}$ ), de Glen Research, per a la síntesi de oligonucleòtids lineals fosforilats en 3'.

Els 3'-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropil-fosforamidits de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-desoxinucleòsids (DMT-dA<sup>Bz</sup>, DMT-dC<sup>Bz</sup>, DMT-dG<sup>iBu</sup>, DMT-dT) són de Glen Research.

Els reactius habituals per a la síntesi d'oligonucleòtids també s'han adquirit a Glen Research:

- solució activadora: tetrazole sublimat 0.5 M en ACN anhidre
- solucions de bloqueig:  $\text{Ac}_2\text{O}$ / 2,6-lutidina/ THF (1:1:8) (Cap Mix A), 1-metilimidazole 10 % en THF (Cap Mix B)
- solució destrilitant: TCA en DCM al 3 %
- solució oxidant:  $\text{I}_2$  (0.02 M en THF/pir/ $\text{H}_2\text{O}$ )

Alternativament, com a dissolució oxidant s'ha preparat <sup>t</sup>BuOOH 1 M en DCM partint de solucions 5-6 M en decà/hexà (Fluka o Aldrich), que es filtra prèviament amb filtres Pro-X de niló, de 25 mm de



diàmetre i 45 µm de porus (Teknokroma).

Els derivats fosforamidit dels nucleòsids (assecats durant una nit al dessecador de buit amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i KOH) s'han dissolt en ACN anhidre en el cas de síntesis sobre CPG o en DCM anhidre o ACN/DCM 1:1 en el cas de síntesi sobre TentaGel a una concentració de 0.1 M (sintetitzador ABI380 i ABI3400) o 0.05M (Expedite) i treballant sota atmosfera d'argó. Tot el material de vidre o metàl·lic que s'utilitza ha d'haver estat assecat a l'estufa de 110 °C i temperat en un dessecador de buit. L'ACN en l'etapa prèvia a l'acoblament és anhidre i filtrat (filtres Pro-X) o d'elevada qualitat (*for DNA/RNA synthesis 'Baker bio-analyzed'*, 15 ppm H<sub>2</sub>O, de J.T.Baker). L'argó que s'utilitza és de qualitat 5.0, amb menys de 3 ppm/v d'H<sub>2</sub>O.

### 1.3.2 Determinació del rendiment d'acoblament en cada cicle de síntesi

El càlcul del rendiment d'acoblament dels nucleòtids es realitza a partir de la quantificació per ultraviolat dels cations 4,4'-dimetoxitritil (DMT) alliberats en la desprotecció del grup hidroxil en 5' del nucleòtid incorporat. Aquesta quantificació s'ha realitzat de dues formes diferents:

1. S'evapora a sequedat la dissolució de DMT i es redissol amb EtOH/HClO<sub>4</sub> (3:2) enrasant al volum adequat perquè l'absorbància no superi la unitat. Es mesura l'absorbància a 498 nm ( $\epsilon_{\text{DMT}^{+}} = 71700 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) i es pot calcular la funcionalització després de cada acoblament (apartat 1.2.6.3). Normalment es trien tres acoblament per determinar la funcionalització: el primer, un central i el darrer. D'aquesta manera coneixem el valor absolut de l'absorbància dels cations DMT alliberats.

2. Es porten tots els tubs en els quals s'han recollit les dissolucions de DMT a un mateix volum (generalment en el mateix tub i enrasant a vista) amb una dissolució d'àcid *p*-toluensulfònic 0.1 M en ACN. S'enregistra l'espectre d'absorbància entre 400 i 600 nm del primer tub (normalment el del primer acoblament; en general es descarta el tub dels cations DMT provinent de la desprotecció del nucleòtid ja incorporat a la resina perquè es poc fiable ja que pot haver patit destrilitació) i es fixa una longitud d'ona en què l'absorbància sigui 1. Es mesura l'absorbància de la resta dels tubs a aquesta  $\lambda$ , relacionant-se directament el valor d'aquesta amb el rendiment acumulat al llarg dels acoblaments (en tant per u). Es tracta d'un valor relatiu al primer dels acoblaments i d'una quantificació molt menys exacta que l'anterior, però que, per la seva major senzillesa, permet la determinació de l'absorbància de cadascun dels tubs de cations DMT i així veure'n l'evolució al llarg de tota la síntesi.

Els sintetitzadors Expedite i ABI 3400 incorporen espectrofotòmetres a la sortida de les columnes per a la quantificació qualitativa dels DMTs i en presenten els resultats amb l'informe de la síntesi.

### 1.3.3 Quantificació d'oligonucleòtids per absorció UV<sup>288</sup>

La quantificació dels oligonucleòtids es realitza mesurant la seva absorbància a 260 nm, longitud d'ona al voltant de la qual presenten un màxim d'absorció. La quantitat d'oligonucleòtid s'indica en mesures d'absorbància: OD<sub>260</sub>.

Una OD<sub>260</sub> (densitat òptica a 260 nm) es defineix com la quantitat d'oligonucleòtid que continguda en un volum d'1 mL en una cubeta d'1 cm de pas de llum dona una absorbància de valor unitat. Per tant,

el nombre d'OD<sub>260</sub> es calcula com:  $OD_{260} = A \cdot V(\text{mL})$

L'equivalència molar o màssica d'aquesta unitat es pot calcular tenint en compte que l'absorció de l'oligonucleòtid es deu a les contribucions individuals dels diferents nucleòsids (veure Taula 1.3), corregit per un factor relacionat amb el fenomen d'apilament o *stacking* ( $f_a = 0.9$  per ssDNA i  $f_a = 0.8$  per dsDNA):

$$\epsilon_{\text{oligonucleòtid}} = \sum(\epsilon_{\text{bases}}) \cdot f_a$$

Nucleòsid	dA	dG	T	dC
$\epsilon_{260} (\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1})$	15400	11700	8800	7700

Taula 1.3. Coeficients d'extinció molar dels nucleòsids mesurats a pH 7, 25 °C, 260nm.

Segons la llei de Lambert-Beer, essent  $l=1\text{cm}$  i aplicant la definició d'OD, obtenim la següent relació, on  $\epsilon$  és el coeficient d'extinció milimolar ( $\mu\text{mol}^{-1}\text{mLcm}^{-1}$ ):  $OD_{260} = \epsilon(\mu\text{mol}^{-1}\text{mLcm}^{-1}) \cdot n(\mu\text{mol})$

El coeficient d'extinció molar es pot calcular de forma més precisa emprant el mètode del veí pròxim (*nearest-neighbour method*), que té en compte l'efecte dels nucleòtids veïns per calcular qualsevol propietat<sup>289</sup> (Taula 1.4). El coeficient d'extinció molar a 260nm, 25 °C i pH neutre per una cadena de DNA es pot calcular de la següent manera.

Per una molècula lineal, ex. d(GTCCCTCA)

$$\epsilon = \epsilon_{dGpdT} + \epsilon_{dTpdC} + \epsilon_{dCpdC} + \epsilon_{dCpdC} + \epsilon_{dCpdT} + \epsilon_{dTpdC} + \epsilon_{dCpdA} - \epsilon_{pdT} - \epsilon_{pdC} - \epsilon_{pdC} - \epsilon_{pdC} - \epsilon_{pdT} - \epsilon_{pdC}$$

Per una molècula cíclica, ex. d<pCAGTCCCT>

$$\epsilon = (\epsilon_{dCpdA} + \epsilon_{dApdG} + \epsilon_{dGpdT} + \epsilon_{dTpdC} + \epsilon_{dCpdC} + \epsilon_{dCpdC} + \epsilon_{dCpdT} + \epsilon_{dTpdC}) / 2$$

Monòmer	Coeficient d'extinció	Monòmer	Coeficient d'extinció
pdA	15400	dCpdG	18000
pdC	7400	dCpdT	15200
pdG	11500	dGpdA	25200
pdT	8700	dGpdC	17600
dApdA	27400	dGpdG	21600
dApdC	21200	dGpdT	20000
dApdG	25000	dTpdA	23400
dApdT	22800	dTpdC	16200
dCpdA	21200	dTpdG	19000
dCpdC	14600	dTpdT	16800

Taula 1.4. Coeficients d'extinció molar per a desoxiribonucleòtids mesurats a pH 7, 25 °C, 260 nm ( $\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ )<sup>290</sup>

Seguint aquesta metodologia, els coeficients d'extinció molar dels oligonucleòtids sintetitzats o emprats(\*) en aquesta tesi són els mostrats en la Taula 1.5. Els oligonucleòtids fosforilats en algun dels seus extrems tenen el mateix coeficient d'extinció molar que el seu anàleg no fosforilat i no es mostren la taula.

Seqüència	$\epsilon$ ( $\mu\text{mol}^{-1}\text{mLcm}^{-1}$ )	Seqüència	$\epsilon$ ( $\mu\text{mol}^{-1}\text{mLcm}^{-1}$ )
d<pCAGTCCCT>	71.5	d(GTCCTTCG)	68.7
d<pCCTTCGGT>	69.3	d(TTTTGGTTCTTTTT)	117.7
d<pTCGTATGT>	78.1	d(TCGTTCGT)	70.0
d<pCACATACT>*	81.2	d(GTTCGTTC)	70.3
d<pCGCTCCGT>*	67.9	d(TGCTTCGT)	67.6
d(GTCCCTCA)	71.0	d(GTTGCTTC)	67.9
r(GUCCCUCA)*	72.6	d(TCGTTGCT)	67.6
d(CCCTCAGT)	69.3	d(GCATGCT)	63.0
d(CTCAGTCC)	69.0	d(CGTACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> p)	113.9
d(CGGTCCTT)	67.2	d(ACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> CGTp)	113.3

Taula 1.5. Valors dels coeficients d'extinció milimolar ( $\mu\text{mol}^{-1}\text{mLcm}^{-1}$ ) a 260 nm i 25 °C per a tots els oligonucleòtids preparats en aquesta tesi

### 1.3.4 Purificació d'oligonucleòtids

La purificació dels oligonucleòtids es realitza emprant tècniques de cromatografia líquida, bàsicament HPLC de fase inversa i MPLC. En cada cas s'especificaran els eluents i les condicions emprades. Les fraccions corresponents al producte pur s'uneixen i es liofilitzen per a la posterior quantificació i caracterització.

### 1.3.5 Dessalatge d'oligonucleòtids

#### 1.3.5.1 Dessalatge amb columnes Sep-Pak C18

Les columnes Sep-Pak C<sub>18</sub> (Classic-short body, Waters) s'han emprat per dessalar productes per a estudis posteriors mitjançant DC o RMN. El protocol seguit és el que es descriu:

- i) rentat: 10 mL ACN
- ii) equilibrat: 10 mL H<sub>2</sub>O
- iii) 2 mL NH<sub>4</sub>AcO 2 M
- iv) càrrega de la mostra dissolta en 2 mL H<sub>2</sub>O
- v) rentat: 30 mL H<sub>2</sub>O
- vi) elució del producte amb aproximadament 5 mL ACN:H<sub>2</sub>O 1:1, fins que ja no absorbeixi a 260 nm.

#### 1.3.5.2 Dessalatge amb columnes NAP

Per a l'eliminació de sals o de productes orgànics de baix pes molecular s'han utilitzat unes petites columnes comercials farcides amb Sephadex G-25 DNA Grade (Pharmacia NAP 10), amb unes dimensions de llit de gel: 1.3 x 2.6 cm. El procediment a seguir és el que es descriu a continuació.

- i) eliminar l'excés de líquid sobrenedant
- ii) equilibrar amb 15 mL de solució 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc
- iii) carregar la mostra dissolta en 1 mL de solució 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc
- iv) afegir 1.5 mL de solució 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc, recollir el volum en un tub de centrífuga i liofilitzar, ja que és on es troba el producte

- v) rentar la resina amb aigua per eluir les impureses retingudes a la columna

#### 1.3.5.3 Dessalatge mitjançant exclusió molecular

En altres casos, per al dessalatge d'oligonucleòtids provinents de la purificació mitjançant HPLC de fase inversa, s'ha emprat una filtració de gel sobre Sephadex G-10, G-15 o G-25, segons la mida de l'oligonucleòtid en el sistema descrit en l'apartat 1.2.3.5.

#### 1.3.5.4 Bescanvi catiònic

En els casos en què la purificació s'ha realitzat mitjançant HPLC de fase inversa emprant TEAOAc com a solució amortidora, els cations trietilamoni s'han bescanviat per cations  $\text{Na}^+$  sobre una resina Dowex 50Wx4 (200-400 mesh, 4.8 meq.  $\text{Na}^+$ /g resina seca, de Sigma-Aldrich). La resina es diposita sobre una xeringa de polipropilè, proveïda d'un disc filtrant de polietilè porós, i es segueix el protocol descrit a continuació:

- i) rentar la resina amb aigua
- ii) passar per la columna 200 mL de solució d'HCl al 10% a flux lent
- iii) rentar la resina amb aigua fins a pH neutre (fins al pH de l'aigua entrant)
- iv) passar per la columna 200 mL de solució de NaOH 1 M a flux lent
- v) repetir el pas iii
- vi) carregar l'oligonucleòtid en la columna, dissolt en la mínima quantitat d'aigua (1-2 mL)
- vii) eluir el producte amb aigua, col·lectant fraccions de 0.5 mL i analitzant-les per UV per veure si contenen producte.

Les fraccions amb producte s'uneixen i es liofilitzen. La resina s'ha de regenerar realitzant els passos i a iii.

### 1.3.6 **Caracterització per espectrometria de masses MALDI-TOF<sup>291</sup>**

#### 1.3.6.1 Preparació de les mostres

La mostra es prepara mesclant 1  $\mu\text{L}$  de dissolució d'oligonucleòtid dessalat en  $\text{H}_2\text{O}$  (100-500  $\mu\text{M}$ ) amb 1  $\mu\text{L}$  de solució de citrat amònic (CA) i després s'hi afegeix 1  $\mu\text{L}$  de matriu. De la mescla se n'agafa 1  $\mu\text{L}$  que es diposita sobre la placa de MALDI.

Les matrius i el CA (Aldrich >98 %, 50 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}$ ) es preparen al moment o es conserven al congelador. Les matrius utilitzades han estat:

- 2,4,6-trihidroxiacetofenona<sup>292</sup> (THAP, Aldrich, 98 %): 10 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1:1)
- àcid 3-hidroxipicolínic<sup>293</sup> (HPA, Aldrich 98 %): 50 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1:1)

Principalment s'ha emprat THAP ja que per oligonucleòtids de petita grandària (fins 15 mer) funciona millor tot i que pot donar lloc a major fragmentació.

#### 1.3.6.2 Condicions experimentals

Els espectres de masses s'han enregistrat en un aparell PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup>RP amb làser de  $\text{N}_2$  de 337 nm i polsos de 3ns, treballant en diferents condicions experimentals, en

funció de la naturalesa de la mostra a analitzar i la massa esperada. S'ha emprat el mode reflector, per a oligonucleòtids de massa inferior a 3500 uma, o lineal, per a oligonucleòtids de major massa o en casos de difícil observació. El mode lineal és més sensible però menys precís i dona valors de  $m/z$  menys exactes, tot i aplicar el calibratge corresponent. Els paràmetres habituals de treball són: voltatge d'acceleració=20kV, grid voltage=62 a 73 %, mirror voltage=1.06-1.12, intensitat del làser=2700-3000.

#### 1.3.6.3 Dessalatge amb puntes Zip-Tip

Per a mostres amb elevat contingut en sals, com les mostres de les reaccions de ciclació o mostres provinents de l'anàlisi per HPLC en condicions de bescanvi aniònic, s'han utilitzat les puntes de pipeta comercials Zip-Tip C<sub>18</sub> de Millipore per dessalar de manera ràpida, prèviament a l'anàlisi mitjançant MS-MALDI-TOF per determinar-ne la massa. La punta s'adapta a una micropipeta P-10 (que permet aspirar volums de 10 µL) i se segueix el procediment següent:

- i) tres rentats amb 10 µL d'una solució de ACN/H<sub>2</sub>O 1:1
- ii) tres equilibrats amb 10 µL d'una solució de TEAOAc 0.1 M, pH 7
- iii) unió de l'oligonucleòtid al rebliment de C<sub>18</sub> de la punta, realitzant uns 8-10 cicles d'aspiració i expulsió de la mostra (prèviament dissolta o ressuspesa en 10 µL de TEAOAc 0.1 M, pH 7)
- iv) tres rentats amb 10 µL de TEAOAc 0.1 M pH 7
- v) tres rentats amb 10 µL d'aigua Milli-Q
- vi) elució de la mostra en 1-5 µL de ACN:H<sub>2</sub>O 1:1

Seguidament, es pot analitzar la mostra dessalada mitjançant MS-MALDI-TOF, preparant la mostra tal i com s'ha indicat anteriorment.

#### 1.3.7 **Caracterització per espectrometria de masses electrospai**<sup>294</sup>

Els oligonucleòtids, prèviament dessalats, es dissolen en aigua o solució d'acetat d'amoni 10 mM (conc. aprox. 300-1000 µM) i s'injecten directament al detector de masses a través d'un injector Reodyne. La mostra s'elueix amb H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) a flux entre 50 i 200 µL/min. Es treballa amb polaritat negativa i es realitzen scans des de 400 a 1400 uma en 0.5-1 s. Els paràmetres habituals de treball són:  $V_{\text{conus}}=25\text{V}$ ,  $V_{\text{electrocapil-lar}}=-2.5\text{kV}$ ,  $T_{\text{font}}=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{des}}=250\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.3.8 **Composició en nucleòsids dels oligonucleòtids**<sup>295</sup>

La determinació de la proporció de nucleòsids es realitza per digestió enzimàtica total dels oligonucleòtids. Els enzims utilitzats han estat<sup>296</sup>:

- Fosfodiesterasa I de verí de serp (SVPD, EC 3.1.4.1): degrada l'oligonucleòtid començant per l'extrem 3'-terminal, que ha de ser un OH lliure, generant nucleòsids 5'-fosfat. S'ha utilitzat fosfodiesterasa de *Crotalus adamanteus*, de Sigma (1.5 U/500 µL).
- Fosfatasa alcalina (AP, EC 3.1.3.1): hidrolitza els nucleòsids 3' o 5'-fosfat generant els nucleòsids lliures. S'ha utilitzat fosfatasa alcalina de Boehringer Mannheim (1 U/µL).

Per calcular la proporció de nucleòsids es realitza una digestió total amb fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina. Es liofilitzen 0.05-0.2 OD<sub>260</sub> d'oligonucleòtid en un eppendorf i es tracten amb 50 µL de solució enzimàtica durant 6 h a 37 °C. Preparació de 100 µL de mescla enzimàtica: 50 µL de Tris-HCl 0.1 M pH 8, 10 µL de solució MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, 1 µL de SVPD (1.5 U/500 µL; 0.003 U), 1.5 µL AP (1 U/µL; 1.5 U) i 38.5 µL d'H<sub>2</sub>O.

Els productes de les digestions enzimàtiques s'analitzen per HPLC de fase inversa utilitzant NH<sub>4</sub>OAc 0.01 M com a eluent A i H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) com a eluent B i realitzant el gradient: t=0' 10% B, t=5' 10% B, t=20' 30 % B, t=25' 100 % B.

Els diferents nucleòsids s'identifiquen per comparació amb els temps de retenció dels nucleòsids naturals analitzats en el mateix sistema: t<sub>R</sub> dC: 3.0 min, dG: 4.7 min, dT: 6.7 min i dA: 9.4 min. Les corresponents proporcions es calculen mitjançant els coeficients d'extinció molar coneguts a 260 nm, tal i com s'indica a continuació:

- Càlcul del valor mitjà de la relació àrea/coeficient d'extinció molar:

$$X = \frac{\sum_i \left( \frac{\text{àrea}}{\epsilon} \right)_i}{N}$$

on i és cada nucleòsid, àrea és l'àrea del pic corresponent al nucleòsid i, ε, el seu coeficient d'extinció molar (Taula 1.3, apartat 1.3.3) i N, el número de nucleòsids teòrics.

- Càlcul de la proporció de nucleòsids:

$$n_i = \frac{\left( \frac{\text{àrea}}{\epsilon} \right)_i}{X}$$

on n<sub>i</sub> és el valor experimental calculat per al nucleòsid i.

## 2 SÍNTESIS D'OLIGONUCLEÒTIDS LINEALS

### 2.1 Elongació de la cadena oligonucleotídica

S'ha treballat a escales de síntesi de 0.2  $\mu\text{mol}$ , 1  $\mu\text{mol}$  o 2  $\mu\text{mol}$ , en reactors de tefló de 400  $\mu\text{L}$  de capacitat, on es pesa la quantitat de CPG necessària per a l'escala de treball, es tanquen amb filtres de tefló i els seus taps i es segellen amb anelles d'alumini. Alternativament, s'han emprat reactors comercials ja preparats (per a escales de 0.2  $\mu\text{mol}$  o 1  $\mu\text{mol}$ ) d'Applied Biosystems o Glenn Research. Es preparen els reactius que han d'anar a les diferents posicions, en el cas que no siguin comercials, i es dissolen els derivats fosforamidits dels nucleòsids en ACN anh. i sota atmosfera d'argó, a concentració 0.1 M o 0.05 M segons el sintetitzador.

Els cicles de síntesi varien segons l'escala de treball i el sintetitzador. A la Taula 2.1 es resumeixen els cicles de síntesi estàndard a escala 1  $\mu\text{mol}$  sobre suport CPG per als sintetitzadors ABI380B (cicle ce102a de l'annex), Expedite (cicle DNA 1  $\mu\text{mol}$ ) i ABI3400 (1 $\mu\text{m}$ -PO). Els sintetitzadors ABI380B i ABI3400 treballen amb fluxos continus de reactiu (aprox. 25  $\mu\text{L/s}$ ), mentre que el sintetitzador Expedite treballa amb polsos (cada pols envia 16  $\mu\text{mol}$  de reactiu a la columna). Aquests cicles es poden modificar per adaptar-los a diverses escales de treball (p.ex. 2  $\mu\text{mol}$ ).

Etapa	Operació	Reactiu o dissolvent	ABI380B temps (s)*	ABI3400 temps (s)	Expedite polsos/temps(s)
1	Rentat	ACN	20	10	30 / 0**
2	Destrilitació	TCA 3 % en DCM	5x10	DCM 25s TCA 110s	60 / 50
3	Rentat	ACN/ACN anh	3x60	4x15	2x 40 / 0
4	Assecat	Argó	20	10	--
5	Acoblament	0.1 M fosforamidit (0.05 M Expedite) 0.5 M tetrazole en ACN	10+30	10+60	7 / 40
6	Acetilació	AC <sub>2</sub> O/NMI	20	12+16	14 / 15
7	Oxidació	<sup>t</sup> BuOOH 1M en DCM (ABI380B) I <sub>2</sub> 0.1M H <sub>2</sub> O/pir/THF (Expedite/ ABI3400)	23+30	12+20	15 / 0
8	Rentat	ACN	5x10	4x15	7 / 0

\* temps d'entrada continua del reactiu/dissolvent o temps d'entrada + temps d'espera  
\*\* indica que l'entrada de reactiu és realitzada amb el mínim temps possible

Taula 2.1. Cicle de síntesi estàndard a escala 1  $\mu\text{mol}$  sobre CPG en sintetitzador ABI380B o ABI3400

Els oligonucleòtids es poden sintetitzar amb l'extrem hidroxil 5' desprotegit (*DMT off*), si es realitza un últim tractament amb TCA, o sense desprotegir (*DMT on*), per facilitar la posterior purificació mitjançant HPLC de fase inversa. Si no s'especifica el contrari, els oligonucleòtids han estat sintetitzats *DMT off*.

## 2.2 Desprotecció i desancoratge

Després de la síntesi, les resines s'assequen bé i es transvasen en un vial especial per realitzar el tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat a 55 °C durant 10-12 h (aproximadament 1 mL de dissolució d' $\text{NH}_3$  al 33% per  $\mu\text{mol}$  de síntesi). Posteriorment es deixa temperar, es filtra la solució d'amoniac i s'elimina el dissolvent sota pressió reduïda.

En el cas d'oligonucleòtids sintetitzats *DMT on*, cal treballar amb cura una vegada s'ha escindit l'oligonucleòtid del suport polimèric. Després de l'evaporació de l'amoniac s'afegeixen unes gotes de trietialmina per evitar la desprotecció accidental ja que el grup DMT és molt làbil als àcids. Després de la purificació mitjançant HPLC, en què l'oligonucleòtid protegit queda molt més retingut que les seqüències truncades o de deleció, es procedeix a la desprotecció del grup DMT. El producte liofilitzat es tracta amb 1-5 mL d'AcOH aquós al 80% en un bany a 0 °C durant 30 min. Es dilueix amb aigua fins a 10-20 mL i s'extreu amb èter (3x10 mL). Posteriorment es liofilitza.

## 2.3 Síntesi d'oligonucleòtids lineals no fosforilats

Per a la síntesi d'oligonucleòtids lineals no fosforilats no es requereix cap producte ni tractament especial. A continuació es descriuen els resultats de les diferents síntesis realitzades, així com la caracterització dels productes.

### 2.3.1 Síntesis de d(GTCCCTCA), d(CCCTCAGT) i d(CGGTCCTT)

Es van realitzar 2 síntesis a escala 1  $\mu\text{mol}$  per cada seqüència, per tal de poder utilitzar un cicle de síntesi d'escala mitjana estàndard (cicle ce102a, ABI380B).

Seqüència	Síntesi	Rend. etapa	Rend. total cru	Rend. prod. pur	Caracterització MS (uma)	
					M teòrica	m/z exp
d(GTCCCTCA)	1 <sup>a</sup>	94.4 %	66.7 %	7.9 OD (10.8 %)	2344.43	2342.88
	2 <sup>a</sup>	92.4 %	57.4 %	9.7 OD (13.2 %)		
	3 <sup>a</sup>	92.7 %	58.7 %	44.5 OD (31.3 %)		
d(CCCTCAGT)	1 <sup>a</sup>	97.4 %	81.5 %	15.1 OD (20.6 %)	2344.43	2342.93
	2 <sup>a</sup>	97.5 %	84.2 %	26.1 OD (35.6 %)		
d(CGGTCCTT)	1 <sup>a</sup>	96.8 %	81.5 %	17.4 OD (22.5 %)	2375.13	2373.99
	2 <sup>a</sup>	96.6 %	82.4 %	29.4 OD (39.7 %)		

Taula 2.2. Resultats de les síntesis i caracterització dels oligonucleòtids

Es van determinar els rendiments d'acoblament dels nucleòtids a partir de la quantificació dels cations DMT (mètode 2, apartat 1.3.2 de Materials i Mètodes) i es van quantificar els crus abans de la seva purificació mitjançant HPLC amb la columna X-Terra semipreparativa. En la Taula 2.2 es resumeixen els resultats d'aquestes síntesis. També s'hi inclou el resultat d'una síntesi posterior que es va fer de



d(GTCCCTCA) a escala 2x1  $\mu\text{mol}$  al sintetitzador Expedite (3<sup>a</sup>).

### 2.3.2 Síntesis de d(CTCAGTCC), d(CGGTCCTT) i d(TTTTGGTTCTTTTT)

Aquestes síntesis es van realitzar en el sintetitzador automàtic Expedite emprant el cicle de síntesi estàndard a escala 1  $\mu\text{mol}$  i reactors comercials. Els crus es van purificar mitjançant cromatografia de mitja resolució (MPLC, gradient tipus 0 a 40 % B, A:  $\text{NH}_4\text{OAc}$  50 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1) i es van caracteritzar mitjançant espectrometria de masses (MALDI-TOF o ESI). Els resultats d'aquestes síntesis i la caracterització dels productes es mostra en la Taula 2.3.

Seqüència	Síntesi	Rend. cru	Rend. prod. pur	Caracterització MS (uma)	
				M teòrica	m/z exp
d(CTCAGTCC)	3x1 $\mu\text{mol}$	--	35 OD (19 %)	2344.43	2345.19
	2x1 $\mu\text{mol}$	--	35 OD (25 %)		
d(CGGTCCTT)	2x1 $\mu\text{mol}$	--	85 OD (55 %)	2375.16	2376.64
d(TTTTGGTTCTTTTT)	3x1 $\mu\text{mol}$	224 OD (63 %)	166 OD (33%)	2375.16	2376.64

Taula 2.3. Resultats de les síntesis i caracterització dels oligonucleòtids

### 2.3.3 Síntesis de d(TCGTTCGT), d(GTTCGTTC), d(TGCTTCGT), d(GTTGTTC), d(TCGTTGCT) i d(GCATGCT)

Aquestes síntesis es van realitzar en el sintetitzador automàtic Expedite a escala 1  $\mu\text{mol}$  en diversos lots. La purificació es va realitzar mitjançant MPLC o no va ser necessària atesa la gran puresa dels crus. Els oligonucleòtids es van caracteritzar mitjançant espectrometria de masses. Els resultats d'aquestes síntesis es mostren en la Taula 2.4.

Seqüència	Síntesi	Rend. total cru	Rend. prod. pur	Caracterització MS (uma)	
				M teòrica	m/z exp
d(TCGTTCGT)	2x1 $\mu\text{mol}$	53 % (74 OD)	18 % (25 OD)	2390.37	2388.67
	1 $\mu\text{mol}$	81 % (57 OD)	19 % (13 OD)		
	2x1 $\mu\text{mol}$	--	39 % (55 OD)		
d(GTTCGTTC)	2x1 $\mu\text{mol}$	56 % (79 OD)	18 % (26 OD)	2390.37	2388.85
	1 $\mu\text{mol}$	95 % (67 OD)	47 % (33 OD)		
	1 $\mu\text{mol}$	--	31 % (22 OD)		
d(TGCTTCGT)	2x1 $\mu\text{mol}$	44 % (60 OD)	20 % (27 OD)	2390.37	2388.86
	1 $\mu\text{mol}$	65 % (44 OD)	25 % (17 OD)		
	2x1 $\mu\text{mol}$	--	29 % (35 OD)		
	2x1 $\mu\text{mol}$	58 % (78 OD)*			
	2x1 $\mu\text{mol}$	76 % (103 OD)	35 % (47 OD)		
d(GTTGTTC)	2x1 $\mu\text{mol}$	63 % (85 OD)	33 % (45 OD)	2390.37	2389.89
	2x1 $\mu\text{mol}$	--	40 % (54 OD)		
d(TCGTTGCT)	3x1 $\mu\text{mol}$	64 % (129 OD)	54 % (104 OD)	2390.37	2390.66
	2x1 $\mu\text{mol}$	77 % (104 OD)*			
d(GCATGCT)	2x1 $\mu\text{mol}$	53 % (67 OD)	13 % (17 OD)	2095.39	2093.97

\*productes no purificats

Taula 2.4. Resultats de les síntesis i caracterització dels oligonucleòtids

## 2.4 Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats

Les síntesis d'oligonucleòtids lineals fosforilats també es realitzen al sintetitzador automàtic amb cicles estàndards, emprant una resina especial per fosforilar en 3' i un fosforamidit especial per fosforilar en 5', assequibles comercialment. El posterior desancoratge i desprotecció és l'estàndard.

### 2.4.1 Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats en 3'

Per a la síntesi d'oligonucleòtids fosforilats en 3' s'ha emprat una resina especial adquirida a Glen Research (2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-2-succinil-*lcaa*-CPG; 3'-Phosphate CPG) que no porta cap nucleòsid incorporat. Cal tenir en compte aquest fet ja que a l'hora d'escriure la seqüència al sintetitzador hi haurem d'incorporar un nucleòtid de més a l'extrem 3' perquè sempre dona per suposat que la resina porta el primer dels nucleòsids de la seqüència incorporats. Les columnes s'han preparat pesant la quantitat de resina necessària ( $f = 58 \mu\text{mol/g}$ ). Aquesta resina permet treballar en les mateixes condicions que una resina CPG estàndard.

### 2.4.2 Síntesi d'oligonucleòtids lineals fosforilats en 5'

Per a la fosforilació en 5' s'ha emprat un fosforamidit desenvolupat per Horn i Urdea<sup>261</sup> adquirit a Glen Research (2-[2'-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-2-cianoetil-*N,N*-diisopropil-fosforamidit; *Chemical Phosphorylation Reagent I*) que s'utilitza en les mateixes condicions que un fosforamidit normal (sintetitzador ABI380B, 0.1 M en ACN, 10 eq. d'excés). En les primeres síntesis el rendiment d'acoblament d'aquest fosforamidit va ser molt dolent i el <sup>31</sup>P RMN va demostrar que no estava pur; en repetir-les es va doblar la concentració i triplicar el temps d'espera en l'acoblament.

### 2.4.3 Síntesi de d(CGTACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>p) i d(ACGeg<sub>6</sub>CGTACGeg<sub>6</sub>CGTp)

Les síntesis es van realitzar seguint la metodologia estàndard i emprant un fosforamidit especial per a la introducció de l'hexaetilenglicol i la resina especial per a fosforilar en 3'. El fosforamidit d'hexaetilenglicol es va preparar més concentrat (0.75 M d'amidit "real" segons determinació de la proporció d'amidit i hidrogenfosfonat a partir de l'espectre de <sup>31</sup>P-RMN). Les síntesis es van realitzar al sintetitzador Expedite deixant el darrer hidroxil en 5' protegit (*DMT on*). La purificació es va dur a terme mitjançant HPLC de fase inversa amb una columna analítica Kromasil C<sub>18</sub>, emprant un gradient de 15 a 65 % B en 10' (A: NH<sub>4</sub>OAc 50 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1). El producte purificat es va liofilitzar i se'n va eliminar el DMT, tal i com ja s'ha explicat (apartat 2.2). L'oligonucleòtid sense DMT es va quantificar i analitzar per HPLC i MS-MALDI-TOF. Els resultats es mostren en la Taula 2.5.

Seqüència	Síntesi	Rend. total cru	Rend. prod. pur	Caracterització	
				M teòrica	m/z exp
d(CGTACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> p)	2x1 $\mu\text{mol}$	--	32.6 OD (14 %)	4412.86	4409.55
d(ACGeg <sub>6</sub> CGTACGeg <sub>6</sub> CGTp)	2x1 $\mu\text{mol}$	--	15.1 OD (7 %)	4412.86	4409.94

Taula 2.5. Resultats de les síntesis dels precursors lineals de les reaccions models

#### 2.4.4 Síntesis de d(GTCCCTCAp), d(CCCTCAGTp), d(pGTCCCTCA) i d(pCCCTCAGT)

Les síntesis d'aquests oligonucleòtids es van dur a terme al sintetitzador ABI380B. Per a la fosforilació en 3' o en 5' es van utilitzar els reactius descrits anteriorment. En la Taula 2.6 es resumeixen els resultats de les diverses síntesis. Els oligonucleòtids fosforilats en 3' van ser purificats per HPLC de fase inversa. En les primeres síntesis dels productes fosforilats en 5' no es va obtenir el producte desitjat sinó l'oligonucleòtid sense fosforilar i per això no s'indica el rendiment de producte pur. Quan es van obtenir els productes fosforilats desitjats, aquests no es van purificar sinó que senzillament es van dessalar mitjançant Sephadex G-10.

Seqüència	Síntesi	Rend. total cru	Rend. prod. pur	Caracterització		
				M teòrica	m/z exp	Proporció dC:dG:dT:dA
d(GTCCCTCAp)	2 µmol	46 % (64 OD)	4.4 OD (3 %)	2424.39	2423.07	4.3:1.1:1.9:0.7
	2 µmol	58 % (82 OD)	57.9 OD (41%)			
d(CCCTCAGTp)	2 µmol	47 % (65 OD)	2.0 OD (1 %)	2424.39	2423.08	4.4:0.9:1.8:0.6
	2 µmol	60 % (82 OD)	48.9 OD (35%)			
d(pGTCCCTCA)	2 µmol	58 % (83 OD)	--*	2424.39	2425.39	--
	1 µmol	52 % (37 OD)	--*			
	2 µmol	67% (95 OD)	64 % (91 OD)*			
d(pCCCTCAGT)	2 µmol	60 % (83 OD)	--*	2424.39	2425.57	--
	1 µmol	36 % (25 OD)	--*			
	2 µmol	85 % (117 OD)	80% (110 OD)*			

\* no es va obtenir el producte desitjat. \* producte només dessalat

Taula 2.6. Resum de les síntesis dels productes fosforilats

#### 2.4.5 Síntesi de d(TCGTTCGTP), d(TGCTTCGTP) i d(TCGTTGCTp)

Les síntesis d'aquests oligonucleòtids lineals fosforilats en 3' es va dur a terme al sintetitzador automàtic ABI3400, emprant la metodologia estàndard i la resina especial per fosforilar en 3'. Els resultats de les síntesis es mostren en la Taula 2.7. Els oligonucleòtids es van purificar mitjançant MPLC emprant un gradient de 5 a 40 % B (A: NH<sub>4</sub>OAc 50 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1) i es van dessalar mitjançant Sephadex G-10. Si la puresa ja era suficient, només es va realitzar el dessalatge. Els oligonucleòtids es van caracteritzar mitjançant MS-MALDI-TOF.

Seqüència	Síntesi	Rend. total cru	Rend. prod. pur	Caracterització	
				M teòrica	m/z exp
d(TCGTTCGTP)	2x1 µmol	104.3 OD (75 %)	34.3 OD (25 %)	2471.59	2470.41
d(TGCTTCGTP)	3x1 µmol	166.3 OD (82 %)	69.2 OD(34 %)	2471.59	2470.06
d(TCGTTGCTp)	3x1 µmol	165.8 OD (82 %)*		2471.59	2470.26

\*producte no purificat

Taula 2.7. Resum de les síntesis dels precursors lineals

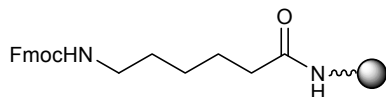


## 3 SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

### 3.1 Derivatització del suport polimèric

#### 3.1.1 Preparació de l'espaiador-resina: ancoratge de l'àcid *N*-Fmoc-aminohexanoic al suport polimèric

La quantitat necessària de resina TentaGel-NH<sub>2</sub> es disposa en una xeringa de polipropilè proveïda de disc filtrant de polietilè i es sotmet al pretractament descrit a la Taula 3.1.



Etapa	Reactiu	Nº tractaments	t (min)/tract
1	DCM	3	1
2	TCA 20 % en DCM	2	7
3	DCM	4	1
4	Piperidina 20 % en DMF	2	2
5	DMF	3	1
6	DCM	4	1

Taula 3.1. Protocol de pretractament de la resina

Es dissolen 64 mg de l'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanoic (0.18 mmol, 1 eq.), 40 mg de DCC (0.18 mmol, 1 eq.) i 25 mg d'HOBt (0.18 mmol, 1 eq.) en la mínima quantitat de DCM/DMF i s'afegeixen sobre 750 mg de la resina pretractada (0.18 mmol de grups amino sobre resina, 1 eq.). S'afegeix dissolvent fins a la consistència pastosa idònia i es deixa reaccionar amb agitació mecànica tota la nit. A continuació es renta bé la resina amb DMF (4 × 1'), DCM (4 × 1') i finalment amb MeOH (1 × 1') per assecar-la bé. Se n'agafa una petita alíquota i es realitza l'assaig de ninhidrina, que ha de donar negatiu o lleugerament positiu. En el cas que l'acoblament no hagués anat bé (coloració blava molt intensa en l'assaig de ninhidrina) es podria repetir; altrament es passa a determinar la funcionalització per desprotecció del grup amino d'una petita alíquota i quantificació de *N*-(9-fluorenilmetil)piperidina tal i

com s'ha descrit a Materials i Mètodes (apartat 1.2.6.2). És normal i desitjable que la funcionalització hagi disminuït una mica respecte a la de la resina inicial fins a valors de 170-180  $\mu\text{mol/g}$ . En el nostre cas, la funcionalització va donar un valor de 175  $\mu\text{mol/g}$ .

Després cal acetilar els grups amino lliures que no han reaccionat amb un excés de 50 eq. d' $\text{Ac}_2\text{O}$  respecte les amines lliures en resina (que es calculen coneixent la disminució de la funcionalització) i 1 eq. de DIEA, seguint el tractament que es descriu a la Taula 3.2 i repetint-se si és necessari fins que l'assaig de ninhidrina dóna completament negatiu.

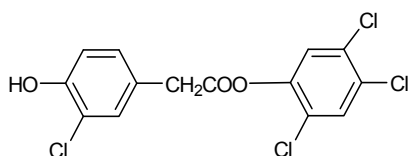
Etapa	Operació	Reactiu	Nº tractaments	temps / tract
1	Inflar	DMF	2	1 min
2	Acetilar	$\text{Ac}_2\text{O}$ en DMF, DIEA	1	1 h
		DMF	3	1 min
3	Rentar	DCM	3	1 min
		MeOH	2	1 min

Taula 3.2. Procediment d'acetilació dels grups amino lliures

### 3.1.2 Obtenció de la nucleotidil-resina

#### 3.1.2.1 Obtenció del Linker bifuncional (3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil)

En un matràs de fons rodó de 100 mL es pesen 795 mg de 2,4,5-triclorofenol (4.0 mmol, 3 eq.) i 272 mg de DCC (1.3 mmol, 1 eq.) i es dissolen en 20 mL de DCM. Sota agitació magnètica constant s'afegeix gota a gota amb l'ajuda d'un embut d'addició una solució de 250 mg d'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic (1.3 mmol, 1 eq.) en 50 mL d'EtOAc (temps d'addició aproximat 1 h). Es deixa reaccionar a temperatura ambient amb agitació magnètica durant 12 h i s'observa la precipitació de la *N,N'*-diciclohexilurea. Es refreda en un bany de gel per forçar al màxim la precipitació i es separa per filtració. Es renta la fase orgànica amb una solució saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  50 mL) i després amb una solució saturada de  $\text{NaCl}$  (1  $\times$  50 mL) i s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda fins que s'obté un oli taronjós. El producte es purifica per cromatografia en gel de sílice, per eliminar el 2,4,5-triclorofenol de partida que estava en excés (hexà/DCM començant 80:20 i fins 50:50). El producte s'obté per evaporació de les fraccions corresponents i posterior precipitació sobre hexà fred. El rendiment és del 61 %.



#### Caracterització:

Sòlid Blanc

$P_f$ : 72.8-74.6 °C.

**CCF:** hexà/DCM (70:30)  $R_f$  = 0.37

DCM/MeOH (95:5)  $R_f$  = 0.75

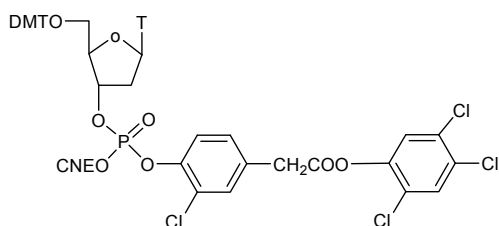
**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm): 7.53 (1H, s, Ar); 7.36 (1H, d,  $J=2.2\text{Hz}$ , Ar); 7.26 (1H, s, Ar); 7.19 (1H, Dxd,  $J=8.4\text{ Hz i } 2.2\text{ Hz}$ ); 7.04 (1H, d,  $J=8.4\text{Hz}$ , Ar); 5.60 (1H, s ample, OH); 3.82 (2H, s,  $\text{CH}_2$ )

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm): 168.2 (CO); 150.8 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 145.6 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 131.4 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 131.0 (Ar, CH); 130.7 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 129.8 (Ar, CH); 129.5 (Ar, CH); 126.0 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 125.5 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 125.1 (Ar, CH); 120.0 (Ar,  $\text{C}_q$ ); 116.4 (Ar, CH); 39.6 ( $\text{CH}_2$ ).

### 3.1.2.2 Obtenció del nucleotidil-Linker (fosfat de 3'-(5'-O-DMT-timidinil), 2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxicarbonilmetil)fenil i 2-cianoetil)

Tot el material amb què es treballa ha estat prèviament assecat a l'estufa a 110 °C durant la nit i temperat al dessecador de buit amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i KOH.

En un matràs de fons rodó de 10 mL es pesen 120 mg de 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil (0.33 mmol, 1 eq.) i 300 mg de 3'-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit de 5'-O-DMT-timidina (0.40 mmol, 1.2 eq.) i s'assequen al dessecador de buit (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KOH) durant una nit; posteriorment es dissolen en 1.6 mL de DCM anhidre sota atmosfera d'argó. En un altre matràs de 10 mL es pesen 30 mg de tetrazole sublimat (0.41 mmol, 1.2 eq.), s'assequen al dessecador de buit per eliminar-ne la humitat i es dissolen en 0.8 mL de ACN anhidre sota atmosfera d'argó. El tetrazole dissolt s'addiciona sobre els altres reactius mitjançant una cànula i es deixa reaccionar a temperatura ambient. La reacció es segueix per CCF (DCM/MeOH 95:5) i en una hora ja és completa. S'afegeixen 0.8 mL d'una solució anhidra de <sup>1</sup>BuOOH 5 M en decà (10 eq.) i es deixa reaccionar 10 min. Tot seguit s'augmenta el volum de la solució amb DCM i es fan rentats de la fase orgànica amb aigua (2 × 15 mL) i amb una solució saturada de NaCl (3 × 15 mL). S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a sequedat. Es purifica per precipitació sobre hexà fred. El rendiment és del 98 %, però no tot és producte pur sinó que també tenim hidrogenfosfonat que prové de la hidròlisi del fosforamidit.



#### Caracterització:

Sòlid Blanc

CCF: DCM/MeOH 95:5 R<sub>f</sub>=0.44

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz) δ (ppm): -7.8 i -7.9 (fosfat, 2 diastereoisòmers), 8.4 (H-fosfonat, impuresa)

### 3.1.2.3 Ancoratge del nucleotidil-linker al suport polimèric

Abans de procedir a l'ancoratge del nucleotidil-linker sobre el suport polimèric cal eliminar els grups Fmoc protectors de la funció amino, procés que es realitza tal i com s'indica a la Taula 3.3.

Etapa	Reactiu	Nº tractaments	t (min) / tract
1	DCM	1	2
2	DMF	1	2
3	Pip 20 % en DMF	2	7
4	DMF	1	2
5	DCM	1	2

Taula 3.3. Eliminació dels grups Fmoc

Seguidament es realitza la reacció d'ancoratge: s'afegeixen a 400 mg d'espaiador resina (f~175 μmol/g, 70 μmol, 1 eq.), 225 mg de timidinil-linker (puresa ~50 %, ~140 μmol, 2 eq.) dissolts en DCM, 35 mg de DCC (170 μmol, 2.4 eq.) dissolts en DCM i 25 mg d'HOBt (185 μmol, 2.6 eq.) dissolts en DMF. S'afegeix dissolvent, si cal, fins a la consistència idònia i es deixa reaccionar 12 h amb agitació

mecànica. A continuació es renta la resina amb DMF (2 × 1') i DCM (3 × 1') i es realitza un assaig de ninhidrina. Si aquest dóna positiu caldrà repetir l'acoblament; si dóna negatiu se'n separa una alíquota per determinar-ne la funcionalització, tal i com es descriu a Materials i Mètodes (1.2.6.3), i s'acetilen els grups amino que no hagin reaccionat amb Ac<sub>2</sub>O i DIEA, tal i com s'ha descrit ja a la Taula 3.2. S'han preparat 400 mg de timidinil-resina amb una funcionalització de 130 μmol/g.

**Caracterització:** <sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz) δ : -10.9 ppm

#### 3.1.2.4 Desprotecció del grup fosfat de l'extrem 3'-terminal

La resina s'infla amb DMF i es realitzen tres tractaments d'1 hora amb 1 mL de TEA/pir (1:1) amb agitació mecànica. Es renta bé amb DMF (3 × 1') i DCM (3 × 1') i s'asseca bé. Per <sup>31</sup>P-RMN es comprova que la desprotecció ha estat completa. Ara la resina ja està preparada per a la síntesi automàtica en fase sòlida de l'oligonucleòtid.

**Caracterització:** <sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz) δ : -9.1 ppm

### 3.2 Elongació de La cadena oligonucleotídica Lineal

S'ha treballat a diferents escales (1, 2 o 5 μmol) en reactors de tefló de 400 μL de capacitat (columnes OPC). En els reactors es pesa la quantitat de resina necessària per a l'escala de treball i es tanquen amb filtres de tefló (Applied Biosystems) i taps i es segellen amb anelles d'alumini. Es preparen els reactius que han d'anar a les diferents posicions del sintetitzador (veure Materials i Mètodes 1.3.1) i es dissolen els fosforamidits en DCM anhidre o una mescla ACN/DCM anhidre i sota atmosfera d'argó. Tot el material ha estat assecat a l'estufa a 110 °C i temperat al dessecador (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i KOH).

El programa seguit per escales 2-5 μmol (escala mitjana) conté les etapes que s'indiquen a la taula 1.4 i es pot trobar a l'annex (MSPEGSPM per ABI380B o DNA 5 μmol TentaGel per Expedite).

Etapa	Operació	Reactiu o dissolvent	ABI380B Temps (s)*	Expedite Polsos/temps(s)
1	Rentat	ACN	20	240 / 0**
2	Destritilació	TCA 2 % en DCM	120	175 / 120
3	Rentats	ACN	200	120 / 0
		DMF	30	60 / 0
		ACN anh	65	160 / 0
4	Assecat	Argó	45	--
5	Acoblament	0.1 M amidit en DCM 0.5 M tetrazole en ACN	25 + 900	35 / 700
6	Rentat	ACN	30	60 / 0
7	Acetilació	AC <sub>2</sub> O/NMI	30 + 120	65 / 120
8	Rentat	ACN	45	80 / 0
9	Oxidació	<sup>t</sup> BuOOH 1M en DCM	30 + 60	65 / 60
10	Rentats	DCM / DMF	60 / 60	--
		ACN	30	240 / 0

\* temps d'entrada continua del reactiu/dissolvent o temps d'entrada + temps d'espera

\*\*indica que l'entrada de reactiu és realitza amb el mínim temps possible

Taula 3.4. Cicle de síntesi estàndard a escala mitjana sobre resina TentaGel



### 3.3 Cicllació

La reacció de ciclació es realitza sobre el precursor lineal unit a la fase sòlida en el mateix reactor i en el sintetitzador automàtic. S'utilitza MSNT 0.15M en piridina anhidra (20-30 eq. respecte l'escala de treball) i es realitzen tres tractaments amb el reactiu acabat de preparar (2 × 4h i 1 × 12h en el cas del sintetitzador ABI380B o 3 × 3h renovant reactiu per a l'Expedite). És molt important que les condicions siguin totalment anhidres (material assecat a l'estufa i MSNT al dessecador) i que el reactiu es trobi en bon estat i per això se'n comprova el punt de fusió ( $P_f = 136.8 - 138.3$  °C). En el cas del sintetitzador ABI380B el protocol s'introdueix manualment (Taula 3.5), mentre que en el cas del sintetitzador Expedite es disposa d'un cicle que s'ha preparat per dur a terme la ciclació automàticament (veure Annex cicle MSNT 5  $\mu$ mol).

Etapa	Operació	Reactiu o dissolvent	Nº tractaments	Temps/tract
1	Assecat	ACN anh i argó	2	60''+ 60''
2	Rentat	Pir anh	3	60''
		ACN anh	3	80''
3	Assecat	Argó	1	60''
4	Cicllació	MSNT 0.15 M en pir anh.	3	2x4h + 12h*

\* Per cada tractament de ciclació es repeteixen totes les operacions anteriors.

Taula 3.5. Protocol de ciclació manual amb MSNT

### 3.4 Desprotecció i desancoratge

#### 3.4.1 Desprotecció dels grups fosfats internucleosídics

Es transvasa la resina a una xeringa proveïda de disc filtrant. S'infla amb DMF i es realitzen tres tractaments d'1 h amb 1 mL de TEA/pir (1:1) per desprotegir els grups fosfats. Es renta bé amb DMF (3 × 1') i DCM (3 × 1') i s'asseca bé.

#### 3.4.2 Desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic

Per tal de desancorar l'oligonucleòtid cíclic del suport polimèric es realitzen tres tractaments de 4 h, o alternativament 2 × 4h + 12h, amb una dissolució 0.2 M de *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini en H<sub>2</sub>O/dioxà (1:1). Després de cada tractament es renta la resina amb H<sub>2</sub>O/dioxà (1:1) i H<sub>2</sub>O. Es recullen els filtrats i rentats dels tres tractaments en un matràs de 25 mL i s'elimina el dissolvent a sequedat.

#### 3.4.3 Desprotecció de les nucleobases

El residu procedent del tractament de desancoratge es tracta amb 2-3 mL de solució d'NH<sub>3</sub> al 33 % a 55 °C durant 12 h. Es deixa temperar i s'elimina el dissolvent sota pressió reduïda.

### 3.5 Dessalatge i purificació

El cru de síntesi es redissol en 2-3 mL d'H<sub>2</sub>O i es dessala per filtració molecular a través d'una

columna Sephadex G-10 eluint amb TEAB 0.05 M (pH 8) o només amb aigua Milli-Q a 2 mL/min. L'oligonucleòtid és el que elueix primer (després del volum mort de la columna). S'analitzen per HPLC les fraccions que contenen l'oligonucleòtid i en cas que la seva puresa sigui equivalent s'ajunten i es liofilitzen. Després es quantifica el cru per conèixer el rendiment de síntesi, se n'analitza la puresa per HPLC i se'n determina la massa mitjançant MS-MALDI-TOF.

### 3.6 Resultats de Les síntesis

#### 3.6.1 Síntesi de d<pCAGTCCCT>

Primerament es van realitzar unes síntesis a escala 2.2  $\mu\text{mol}$  en el sintetitzador ABI380B, sobre 17 mg de resina timidinil-*linker*-espaiador-TentaGel ( $f= 130 \mu\text{mol/g}$ ). Després de la ciclació, desancoratge i filtració molecular es van obtenir 21.4 OD<sub>260</sub> (17 % rendiment, 95 % puresa). La purificació es va realitzar mitjançant HPLC amb una columna analítica Kromasil C<sub>18</sub> 0.4 × 25 cm amb un gradient de 10 a 25 % de B en 20 min (A: NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1), requerint-se 15 injeccions per a la purificació. Es van recuperar 4.3 OD<sub>260</sub> de producte pur, de manera que el rendiment de purificació va ser del 20 % i el rendiment total de producte pur del 2.7 %.

Posteriorment es van repetir les síntesis a escala gran (2×5  $\mu\text{mol}$ ) en el mateix sintetitzador. Cada síntesi automàtica va tenir lloc sobre 39 mg de timidinil-*linker*-espaiador-TentaGel (escala 5.1  $\mu\text{mol}$ ). Els rendiments de les dues síntesis del precursor lineal d(CAGTCCCT) van ser del 72.3 i 89.3 % i el rendiment promig per etapa, del 95.5 i 98.4 %, respectivament. La ciclació es va realitzar a escala 10.2  $\mu\text{mol}$  unint les resines de les dues síntesis. Després de la ciclació, desancoratge i filtració molecular es van recuperar ~141 OD<sub>260</sub> amb una puresa per HPLC del 72 %, que corresponen a un rendiment del cru del 19 %. La purificació es va dur a terme mitjançant HPLC a escala semipreparativa amb la columna X-Terra C<sub>18</sub> de 50 × 10 mm, realitzant-se 15 injeccions amb un gradient de 7 a 25 % de B en 12 min (A: NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1) i una recuperació del 69 %. El rendiment total de producte pur va ser del 13.3 % (96.8 OD<sub>260</sub>).

L'oligonucleòtid es va caracteritzar mitjançant:

- MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2407.39, m/z exp= 2406.78 uma
- digestió total amb SVPD i AP: proporció experimental dC:dG:dT:dA = 4.0 : 1.0 : 2.1 : 0.8.

#### 3.6.2 Síntesi de d<pCCTTCGGT>

Primerament es van realitzar unes síntesis a escala 2.2  $\mu\text{mol}$  en el sintetitzador ABI380B, sobre 17 mg de resina timidinil-*linker*-espaiador-TentaGel ( $f= 130 \mu\text{mol/g}$ ). Després de la ciclació, desancoratge i filtració molecular es van recuperar 25.7 OD<sub>260</sub> (20 % rendiment, 90 % puresa). La purificació es va realitzar mitjançant HPLC amb una columna analítica Kromasil C<sub>18</sub> 0.4 × 25 cm, gradient de 10 a 25 % de B en 20 min (A: NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1), requerint-se 12 injeccions. Es van recuperar 4.4 OD<sub>260</sub> de producte pur, de manera que el rendiment de purificació ha estat del 17 % i el rendiment total de producte pur del 3.4 %.

Posteriorment es van repetir les síntesis a escala gran ( $2 \times 5 \mu\text{mol}$ ). Cada síntesi automàtica va tenir lloc sobre 39 mg de timidinil-*linker*-espaiador-TentaGel (escala  $5.1 \mu\text{mol}$ ). Els rendiments de les síntesis de d(CCTTCGGT) van ser del 77.1 i 76.0 %, que corresponen a uns rendiments promig per etapa del 96.4 % i 96.2 %, respectivament. Les resines de les dues síntesis es van unir i es van ciclar conjuntament. Del producte cíclic desprotegit, desancorat i dessalat es van obtenir  $\sim 108 \text{ OD}_{260}$  (15 % rendiment) d'una puresa del 80 % per HPLC. La purificació es va realitzar a escala semipreparativa amb una columna Hamilton PRP-I, gradient de 8 a 25 % de B en 20 min (A:  $\text{NH}_4\text{OAc}$  150 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1), realitzant-se 10 injeccions i obtenint una recuperació del 90 %. De producte pur es van obtenir  $98.4 \text{ OD}_{260}$ , essent el rendiment total del 13.9 %.

L'oligonucleòtid es va caracteritzar mitjançant:

- MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2438.38, m/z exp= 2437.92 uma

- digestió total amb SVPD i AP: proporció experimental dC:dG:dT:dA = 3.0 : 2.1 : 3.0 : 0.0.

Més endavant, per tenir prou producte per als estudis d'RMN de l'autoestructuració del cicle mitjançant parells GT (capítol 3 del bloc 1) es van haver de realitzar noves síntesis en el sintetitzador Expedite. Primer de tot es van realitzar dues síntesis a petita escala:  $1.76 \mu\text{mol}$  (13 mg de resina) i  $2.0 \mu\text{mol}$  (15 mg de resina), amb la posterior ciclació implementada al sintetitzador. Després de les desproteccions, desancoratge i dessalatge es van recuperar  $23.9 \text{ OD}_{260}$  (20%) i  $40.3 \text{ OD}_{260}$  (29%) de producte. La purificació es va dur a terme mitjançant HPLC amb una columna analítica Kromasil  $\text{C}_{18}$   $0.4 \times 25 \text{ cm}$  amb un gradient de 6 a 23 % de B en 25 min (A:  $\text{NH}_4\text{OAc}$  50 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1), requerint-se 5 injeccions per a cada síntesi. Les fraccions pures es van ajuntar, recuperant-se  $5.1 \text{ OD}_{260}$ , que corresponen a un rendiment de purificació del 8% i un rendiment total del 2%. El producte es va caracteritzar mitjançant MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2438.38, m/z exp= 2437.37 uma.

Donada la poca quantitat de producte recuperada, es van realitzar dues síntesis més a escala  $5.1 \mu\text{mol}$  ( $2 \times 40 \text{ mg}$  de resina). Els rendiments d'aquestes síntesis van ser del 12 % ( $41.0 \text{ OD}_{260}$ ) i 10 % ( $35.2 \text{ OD}_{260}$ ), respectivament. La purificació es va dur a terme, en el cas de la primera d'aquestes síntesis, mitjançant HPLC de fase inversa, amb una columna analítica Kromasil  $\text{C}_{18}$   $0.4 \times 25 \text{ cm}$  amb un gradient de 10 a 25 % de B en 25 min (A:  $\text{TEAOAc}$  50 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1), requerint-se 5 injeccions i obtenint-se  $5.1 \text{ OD}_{260}$  de producte pur (12 % rend. purificació, 1.5 % rend. total). Per a la segona d'aquestes síntesis la purificació es va dur a terme mitjançant HPLC de fase inversa amb una columna Hamilton PRP-I, gradient de 10 a 20 % B (A:  $\text{TEAOAc}$  50 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1), obtenint-se  $9.0 \text{ OD}_{260}$  de producte pur (12 % rend. purificació, 2.5 % rend. total). El producte es va caracteritzar mitjançant MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2438.38, m/z exp= 2435.67 uma i 2451.55 uma. Aquest producte de m+16 no es va poder separar del producte desitjat i es va haver de descartar. Posteriorment es va intentar caracteritzar-lo (veure apartat 3.6.2.1).

Finalment es va realitzar una darrera síntesi a escala  $3 \times 5 \mu\text{mol}$ . Les ciclacions es van dur a terme sobre cada síntesi per separat amb el cicle de síntesi preparat per a Expedite a escala  $5 \mu\text{mol}$ , realitzant-se 3 tractaments de 2.5 h (35 eq. de MSNT en cada tractament). Es van obtenir  $108 \text{ OD}_{260}$  de cru (9 % rend.), que es van purificar mitjançant HPLC de fase inversa semipreparatiu amb la columna PRP-I (15 a 21 % B en 15', A:  $\text{TEAOAc}$  50 mM, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1), per obtenir  $40.9 \text{ OD}_{260}$  de

producte pur (38 % rend. purificació i 3.5 % rend. total). El producte es va caracteritzar mitjançant MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2438.38, m/z exp= 2435.59 uma.

#### 3.6.2.1 Caracterització del producte de massa m+16

Per a la caracterització del producte de m+16, primer va caldre aïllar-lo. Això es va aconseguir mitjançant HPLC de bescanvi aniònic amb una columna NucleoPac Pax100 de Dionex (25x0.4 cm) i les condicions d'elució: 25 mM NH<sub>4</sub>OAc, 10 % ACN, 175 a 250 mM NaCl en 30'. Es van col·lectar els 4 pics d'elució ( $t_R$ = 20.1, 21.3, 23.0 i 24.1 min) i es van analitzar mitjançant MS-MALDI-TOF i també mitjançant digestions enzimàtiques, tal i com s'ha explicat a l'apartat 1.3.8 de Materials i Mètodes. Els crús de digestió enzimàtica, a més d'analitzar-se mitjançant HPLC com s'ha descrit, es van analitzar mitjançant HPLC-MS (A: NH<sub>4</sub>OAc 0.01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN (1:1), gradient: t=0' 10% B, t=2' 10% B, t=10' 30 % B, t=13' 100 % B, flux 0.25 mL/min, columna Kromasil 100 C<sub>18</sub> 5 µm de 15x0.21cm) seguint les masses dels nucleòsids naturals i oxidats (dT: 243.2 uma, dT<sup>ox</sup>: 259.2 uma, dC: 228.10 uma, dC<sup>ox</sup>: 244.10 uma, dG: 269.2, dG<sup>ox</sup>: 284.2) per poder identificar cada pic extra del cromatograma. Els temps de retenció obtinguts en aquestes condicions són:  $t_R$  dC: 2.3 min, dG: 3.0 min, dT: 4.1 min, dC<sup>ox</sup>: 3.2 min, dG<sup>ox</sup>: 4.6 min, dT<sup>ox</sup>: 5.4 min

#### 3.6.3 Síntesi de d<pTCGTATGT>

De l'oligonucleòtid d<pTCGTATGT> es van realitzar 3 síntesis a escales 5.6, 5.7 i 5.2 µmol. Les ciclacions es van dur a terme sobre cada síntesi per separat amb el cicle de síntesi preparat per a Expedite a escala 5 µmol, realitzant-se 3 tractaments de 2.5 h (35 eq. de MSNT en cada tractament). Les tres síntesis es van unir per a la posterior desprotecció dels fosfats, desancoratge i amonòlisi. Es van obtenir 139 OD<sub>260</sub> de cru (11 % rend), que es van purificar mitjançant HPLC de fase inversa semipreparatiu amb la columna PRP-I (15 a 21 % B en 15', A: TEAOAc 50 mM, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1), per obtenir 62.2 OD<sub>260</sub> de producte pur (45 % rend. purificació i 5.8 % rend. total). El producte es va caracteritzar mitjançant MS-MALDI-TOF: M teòrica= 2473.38, m/z exp= 2476.4 uma.

## 4 ESTUDIS MITJANÇANT UV I CD

---

### ***4.1 Preparació de Les mostres***

Les mostres s'han preparat partint de solucions més concentrades tant de les solucions salines com de la solució d'oligonucleòtid de manera que el volum final sigui l'adequat per a cada tipus de cubeta i les concentracions, les indicades en cada cas. Alternativament, les mostres es preparen liofilitzant la quantitat d'oligonucleòtid necessària i dissolent-la en la solució salina adequada.

Abans d'enregistrar els espectres, les mostres han estat escalfades a 90 °C i deixades refredar lentament fins a 4-5 °C durant varies hores.

### ***4.2 Realització d'espectres i corbes de fusió per espectroscòpia d'ultraviolat***

Els espectres i corbes de fusió per absorció UV s'han realitzat en un espectrofotòmetre CARY 500 Scan UV-Vis-NIR de Varian o en un Jasco V-550 UV-Vis. Pels espectres s'ha realitzat un escombrat de 200/220 a 320 nm.

Les corbes de fusió s'han realitzat mesurant l'absorbància a 260 nm, variant la temperatura a 0.5 °C/min i enregistrant cada 0.5 min. Es treballa amb flux de N<sub>2</sub> al compartiment de les mostres a T<15 °C per evitar la condensació i amb flux a l'instrument a T>50 °C pel manteniment de l'aparell.

La temperatura de fusió s'ha extret a partir del màxim de la primera derivada o a partir del mètode de la mediana (veure apartat 4.4.1).

### ***4.3 Realització d'espectres i corbes de fusió per dicroisme circular***

Els espectres de dicroisme circular s'han enregistrat en un espectropolarímetre Jasco J-720, proveït d'un accessori de cubetes termostatitzable connectat a un bany Neslab RP-100, o en un Jasco J-810 proveït d'un accessori de cubetes cilíndriques termostatitzable connectat a un bany Julabo F25 o d'un

accessori Peltier Jasco CDF-4265 per a cubetes quadrades.

Els espectres s'han realitzat a 5 o 10 °C passant flux de N<sub>2</sub> a 3-5 mL/min i escanejant de 220 a 320 nm. Cada espectre és el resultat de dues acumulacions i la subtracció de la línia de base del blanc. Per a la seva representació, en alguns casos els espectres s'han afinat lleugerament. Les corbes de fusió mitjançant dicroisme circular s'han realitzat mesurant la variació de l'el·lipticitat en la longitud d'ona del màxim de l'espectre a baixa temperatura a una velocitat de 30-40 °C/h. Sovint s'han enregistrat també espectre a diverses temperatures en el curs de la fusió. Els paràmetres amb els quals s'han enregistrat els espectres varien segons si es tracta d'escombratges (*scans*) lents per als espectres a baixa temperatura o de *scans* realitzats a major velocitat quan ens trobem en el curs d'una corba de fusió (Taula 4.1).

Paràmetre	Scan lent	Scan ràpid
Banda espectral	220 a 320 nm	220 a 320 nm
Resolució	0.2 nm	0.2 nm
Velocitat	20 nm/min	100 nm/min
Acumulacions	2	2
Resposta	4 s	1 s
Amplada de banda	1.0 nm	2.0 nm
Sensibilitat	100 mdeg	100 mdeg

Taula 4.1. Paràmetres per a la realització d'espectres de DC

En la Taula 4.2 s'intenta resumir, de forma general, les condicions en què es van realitzar els diferents experiments.

Experiments	Aparell	Concentració mostres	Medi salí	Cubetes
Bi-loops heterolíneals (Bloc 1. Cap. 3)	J-720 amb bany	10 µM cada oligonucleòtid	10 mM Na <sub>2</sub> PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	1 cm pas cilíndriques
d<pCCTTCGGT> (Bloc 1. Cap. 4)	J-820 amb Peltier	100 a 500 µM	fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl sense i amb MgCl <sub>2</sub>	1 mm pas quadrada
d<pTCGTATGT> (Bloc 1. Cap. 4)	J-820 amb Peltier	330 µM	fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mm pas quadrada
Bi-loops homolíneals (Bloc 1. Cap. 5)	J-820 amb bany	de 10 µM a 1 mM	10 mM Na <sub>2</sub> PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> i variacions	d'1 cm a 0.1 mm de pas cilíndr.
Estudi termodinàmic (Bloc 1. Cap. 5)	J-820 amb bany	de 10 µM a 11 mM	fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>	d'1 cm a 0.1 mm de pas cilíndr.

Taula 4.2. Resum dels diferents experiments realitzats mitjançant DC

## 4.4 Tractament de Les corbes de fusió i extracció dels paràmetres termodinàmics

### 4.4.1 Determinació de la temperatura de fusió

La temperatura de fusió s'ha determinat a partir de l'extrem de la primera derivada de la corba de

fusió (realitzada amb el programa OriginPro 7.5), o s'ha determinat a partir del creuament de la mediana de les rectes d'absorció de l'espècie estructurada i desestructurada, amb la corba de fusió. Les rectes d'absorció de les espècie estructurada i desestructurada s'han determinat a partir de la zona lineal de la corba de fusió a baixa i alta temperatura, respectivament, prenent-se el major nombre de punts que donaven lloc a un ajust prou bo ( $R^2$  molt variable depenent de la fluctuació de les dades experimentals) i seguien la inclinació natural del plafo de la corba. Aquests ajustos i càlculs s'han realitzat amb Microsoft Office Excel 2003.

#### 4.4.2 Paràmetres termodinàmics a partir de la variació de la $T_m$ amb la concentració

S'han determinat les temperatures de fusió per a mostres a diferent concentració i s'ha representat la inversa de la  $T_m$  (en K) enfront del logaritme neperià de la concentració (en unitats M), determinada a partir de l'absorbància de la pròpia mostra a alta temperatura. Les dades s'han ajustat mitjançant una regressió lineal de mínims quadrats, obtenint-se els valors del pendent i l'ordenada a l'origen amb la seva desviació estàndard, amb el programa OriginPro 7.5. Les desviacions dels paràmetres extrets s'han calculat aplicant el mètode de propagació d'errors, tal i com s'explica a continuació. Per a la representació lineal ( $y=b+mx$ ) de  $1/T_m$  enfront  $\ln c$ , podem calcular  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  i  $\Delta G^0_{298}$  com:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{\Delta S^0}{\Delta H^0} + \frac{R}{\Delta H^0} \cdot \ln c \quad \Delta H^0 = \frac{R}{m} \quad \Delta S^0 = \frac{bR}{m} \quad \Delta G^0_{298} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = \frac{R}{m} - \frac{bRT}{m}$$

on  $R$  és la constant dels gasos ( $R=8.32 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ ).

Per al càlcul de les variàncies, s'han aplicat les fórmules:

$$\begin{aligned} (\sigma_{\Delta H^0})^2 &= \sigma_m^2 \cdot \left(-\frac{R}{m^2}\right)^2 \\ (\sigma_{\Delta S^0})^2 &= \sigma_b^2 \cdot \left(\frac{R}{m}\right)^2 + \sigma_m^2 \cdot \left(-\frac{bR}{m^2}\right)^2 + 2\sigma_{bm}^2 \cdot \left(\frac{R}{m}\right) \cdot \left(-\frac{bR}{m^2}\right) \\ (\sigma_{\Delta G^0})^2 &= \sigma_b^2 \cdot \left(\frac{RT}{m}\right)^2 + \sigma_m^2 \cdot \left(-\frac{R}{m^2} + \frac{bRT}{m^2}\right)^2 + 2\sigma_{bm}^2 \cdot \left(-\frac{RT}{m}\right) \cdot \left(-\frac{R}{m^2} + \frac{bRT}{m^2}\right) \end{aligned}$$

on la covariància del pendent i la intersecció es calcula com:  $(\sigma_{bm})^2 = \sqrt{\sigma_b^2 \cdot \sigma_m^2}$

#### 4.4.3 Paràmetres termodinàmics a partir de l'ajust d'una corba

Per extreure els paràmetres termodinàmics a partir d'una sola corba, primer cal convertir la corba de fusió en una corba que representi la fracció molar d'espècie estructurada ( $x$ ) enfront de la temperatura. Per això ens cal traçar les rectes d'absorció per a l'espècie estructurada i desestructurada tal i com s'ha explicat i calcular  $x$  com:

$$x(t) = \frac{A(t) - A_{des}(t)}{A_{es}(t) - A_{des}(t)}$$

D'aquí podem calcular la constant d'associació per un equilibri bimolecular autoassociatiu a partir de

la fórmula: 
$$K_a = \frac{x}{2c_0(1-x)^2}$$

on  $c_0$  és la concentració total d'oligonucleòtid (M).

De la representació lineal de  $\ln K$  enfront de l'inversa de la temperatura (en K), podem obtenir els paràmetres termodinàmics (*Van't Hoff plot*). Aquesta representació s'ha realitzat per als valor de K corresponents a valors de fracció molar entre 0.15 i 0.85. Els càlculs de  $x$  i  $K$  s'han realitzat amb Microsoft Office Excel 2003, i els ajustos lineals amb OriginPro 7.5.

$$\ln K = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \Delta H^0 = -mR \quad \Delta S^0 = bR \quad \Delta G_{298}^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -mR - bRT$$

Per al càlcul de les variàncies, s'ha aplicat les fórmules:

$$(\sigma_{\Delta H^0})^2 = \sigma_m^2 \cdot (-R)^2$$

$$(\sigma_{\Delta S^0})^2 = \sigma_b^2 \cdot (R)^2$$

$$(\sigma_{\Delta G^0})^2 = \sigma_b^2 \cdot (-TR)^2 + \sigma_m^2 \cdot (-R)^2 + 2\sigma_{bm}^2 \cdot (-TR) \cdot (-R)$$



## 5 ESTUDIS ESTRUCTURALS D'OLIGONUCLEÒTIDS PER RMN

---

### 5.1 Preparació de Les mostres

Els oligonucleòtids, prèviament dessalats, s'han dissolt en el volum adequat de la solució triada en D<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1. Els volums de dissolució necessaris són 500 µl per tubs normals de 5 mm de diàmetre, 300 µl per tubs estrets de 3 mm de diàmetre i 250 µl per tubs SHIGEMI.

La solució amortidora emprada ha estat 25 mM fosfat sòdic pH 7, 100 mM NaCl amb o sense MgCl<sub>2</sub>, o l'indicat en cada cas. Com a referència interna s'utilitza DSS (sal sòdica de l'àcid 2,2-dimetil-2-silapentà-5-sulfònic perdeuterat) o TSP (sal sòdica de l'àcid 3-(trimetilsilil)-propioníc perdeuterat), al qual se li assigna el valor de 0.0 ppm.

### 5.2 Adquisició d'espectres

Els espectres d'RMN de <sup>1</sup>H d'alt camp s'han realitzat en un espectròmetre Bruker AV-600 i Bruker AV-800 US2, ubicats a l'Institut de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid.

#### Espectres en D<sub>2</sub>O

Els espectres bidimensionals en D<sub>2</sub>O s'han adquirit majoritàriament amb 2k en la dimensió t<sub>2</sub> i 400 o 12 increments de t<sub>1</sub>. Per eliminar la senyal d'aigua residual s'ha utilitzat la presaturació<sup>88</sup>. L'amplada espectral ha estat de 13 ppm. El número d'acumulacions s'ha variat en cada cas depenent del tipus d'experiment i de la concentració d'oligonucleòtid. Tots els espectres s'han adquirit en un mode sensible a la fase segons el mètode TPPI (*Time Proportional Phase Incrementation*)<sup>297</sup>.

Els espectres TOCSY i ROESY s'han registrat utilitzant la seqüència de bloqueig de spin estàndard MLEV-17<sup>95b</sup>. El temps de mescla utilitzat per als experiments TOCSY ha estat de 80 ms.

Els espectres NOESY en D<sub>2</sub>O, s'han realitzat amb temps de mescla de 100, 200 i 300 ms. El temps de repetició entre acumulacions ha estat d'entre 1s i 3s, per tal de permetre la relaxació del sistema.

#### Espectres en H<sub>2</sub>O

Els espectres monodimensionals s'han enregistrat utilitzant un mòdul *watergate* per suprimir l'aigua o

una seqüència de polsos tipus *jump and return* (p1331), que permet observar protons que bescanvien molt ràpidament amb el dissolvent. L'amplada espectral ha estat de 20 ppm.

En els experiments NOESY en H<sub>2</sub>O, la supressió del senyal del dissolvent s'ha aconseguit incorporant un mòdul WATERGATE<sup>89</sup> en la seqüència de polsos abans de l'adquisició. El temps de mescla ha variat entre 50 i 300 ms.

En la Taula 5.1 es mostra un resum dels espectres bidimensionals adquirits per a les diferents mostres. Els espectres han estat enregistrats a 5 °C, excepte en els casos en què s'indica el contrari.

Mostra	Concentració	Medi salí	Experiments 1D	Experiments 2D
d<pCCGTCCGT> + d(GTCCCTCA)	0.75 mM cada 1:1	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 1 a 50 °C	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy300 D <sub>2</sub> O: noesy100, noesy300, tocsy
	0.75 mM cicle 1:5	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: valoració amb oligonucleòtid lineal	H <sub>2</sub> O: noesy150
d<pCCGTCCGT> + d(CTCAGTCC)	0.25 mM cada 1:1	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331	H <sub>2</sub> O: noesy200 D <sub>2</sub> O: noesy150, tocsy
	0.25 mM cicle 1:5	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: valoració amb oligonucleòtid lineal	H <sub>2</sub> O: noesy75, noesy200
d<pCCGTCCGT> + r(GUCCCUCA)	0.4 mM cada	100 mM NaCl	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 i fusió de 5 a 65 °C	H <sub>2</sub> O: noesy150
	0.7 mM cada	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 i valoració fins a 1:3	H <sub>2</sub> O: noesy200 D <sub>2</sub> O: noesy300, tocsy
d<pCAGTCCCT> + d(CGGTCCCT)	0.5 mM cicle 1:1	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331, fusió 5 a 60 °C	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy250
d<pCAGTCCCT> + d(GTCCCTCG)	0.5 mM cicle 1:1	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331	H <sub>2</sub> O: noesy150T1
d<pCAGTCCCT> + d(TTTTGGTTCTTTT)	0.5 mM cicle 1:1	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 a 1°C	--
d<pCCTTCGGT>	0.25 mM	100 mM NaCl	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 60 °C	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy200 D <sub>2</sub> O: noesy100, noesy200, tocsy
	1.0 mM	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 70 °C	H <sub>2</sub> O: noesy150, noesy300, roesy D <sub>2</sub> O: noesy100, noesy300, tocsy, cosy
d<pTCGTATGT>	0.25 mM	100 mM NaCl	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 60 °C	H <sub>2</sub> O: noesy100, noesy200 D <sub>2</sub> O: noesy300, tocsy
	2.0 mM	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 70 °C H <sub>2</sub> O: wg	H <sub>2</sub> O: noesy150 D <sub>2</sub> O: noesy300, tocsy H <sub>2</sub> O: noesy150
d<pTCGTATCGT>+ d<pCACATACT>	0.11 mM cada	100 mM NaCl	H <sub>2</sub> O: wg	--
d(TCGTTCGT)	1 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O pH 7: wg, p1331 H <sub>2</sub> O pH 5: wg, p1331	H <sub>2</sub> O pH 7: noesy50, noesy300 H <sub>2</sub> O pH 5: noesy50, noesy200
d(GTTCGTTC)	1 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy300
d(TGCTTCGT)	0.8 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331, dilució x10 i x10	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy300 D <sub>2</sub> O: noesy250, tocsy
	2.3 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 60 °C	H <sub>2</sub> O: noesy50, noesy300 D <sub>2</sub> O: noesy50, noesy150, noesy250, tocsy, dqfcoesy, roesy
	4 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 D <sub>2</sub> O: fusió 5 a 60 °C	H <sub>2</sub> O: noe75T1, noe250T1, roesy D <sub>2</sub> O: noesy150T1, noesy300T1, noesy300T20, tocsy, cosy
d(GTTGCTTC)	1 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg 1 i 5 °C	--
d(TCGTTGCT)	0.3 mM	100 mM NaCl	H <sub>2</sub> O: wg, p1331, fusió 1 a 40 °C	H <sub>2</sub> O: noesy75T1, noesy150T1
	1.2 mM	100 mM NaCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O: wg, p1331 1 °C, dilució x10, fusió D <sub>2</sub> O: fusió 1 a 40 °C	H <sub>2</sub> O: noesy75T1, noesy150T1 D <sub>2</sub> O: noesy75, noesy150, noesy250, tocsyT1

Taula 5.1. Taula resum de tots els espectres enregistrats

### 5.3 Processat d'espectres

Per al processat d'espectres s'ha utilitzat el programa TopSpin (versió 1.3) de Bruker, paquet de software que s'utilitza tant per a l'adquisició com per al processat i anàlisi dels espectres. La matriu de dades s'omple amb zeros fins a obtenir, després de la doble transformada de Fourier, matrius de  $2k \times 2k$ . Segons el tipus d'experiment, s'han emprat diferents funcions d'apodització, però generalment han estat del tipus sinus quadrat. En els experiments en  $H_2O$ , la senyal residual de l'aigua ha estat eliminada mitjançant el processat d'espectres amb el mètode de Marion et al<sup>298</sup>. En tots els casos s'ha realitzat un ajust de la fase i una correcció de la línia de base. Aquesta correcció ha consistit en l'ajust a un polinomi de potència 5 o en un ajust manual. En espectres amb una senyal d'aigua residual important, aquest ajust s'ha realitzat per zones: de 20 ppm fins al senyal d' $H_2O$  i del senyal d' $H_2O$  a 0 ppm.

### 5.4 Assignació espectral

L'assignació dels espectres s'ha realitzat utilitzant la metodologia descrita en l'apartat 1.4.2 de fonaments del bloc 1. Aquesta assignació s'ha dut a terme amb el programa SPARKY<sup>299</sup>, que permet l'assignació semiautomàtica dels pics de correlació. La integració dels pics NOE s'ha dut a terme amb la rutina d'integració inclosa en aquest programa, amb la qual s'ajusten els pics a una funció gaussiana i el volum es calcula a partir de l'ajust. Si existeixen grups de pics solapats, s'ajusten a la vegada o es selecciona la regió d'integració manualment. D'aquí es van obtenir llistes de pics amb les corresponents integracions per a cada temps de mescla. Per a d(TGCTTCGT) es van integrar els espectres NOESY de 75 i 250 ms de temps de mescla, enregistrats en  $H_2O$ , i de 150 ms de temps de mescla, enregistrat en  $D_2O$ . Per a d(TCGTTGCT) els espectres de seleccionats van ser: 75 i 150 ms de temps de mescla (en  $H_2O$ ) i 250 ms (en  $D_2O$ ).

### 5.5 Càlcul d'estructures

#### 5.5.1 Obtenció de restriccions de distància

##### 5.5.1.1 Obtenció de distàncies qualitatives

Les restriccions de distància qualitatives es van obtenir de les integracions dels espectres NOESY i es van calcular a partir de les llistes de pics integrades procedents de SPARKY amb la rutina CALIBA<sup>300</sup> de DYANA. Aquest programa utilitza l'aproximació de dos spins i calcula les distàncies a partir d'expressions del tipus  $NOE \propto \tau m/r^6$  (o  $NOE \propto \tau m/r^3$  pels metils) on la constant de proporcionalitat es calcula a partir de les intensitats NOE entre protons separats per una distància coneguda (H5-H6 de C o Me-H6 de T).

Les llistes de pics obtingudes van ser manipulades de la següent manera:

1) De les distàncies obtingudes per integració del mateix pic NOE a una banda o altra de la diagonal, varem quedar-nos amb la distància més curta. Dels experiments a diferents temps de mescla varem

quedar-nos amb els de majors temps de mescla en H<sub>2</sub>O.

2) Es va assignar cada restricció a un contacte intra o intersubunitat a partir de la inspecció de l'estructura de d<pCGCTCCGT>.

3) Es van duplicar tots els NOEs tenint en compte la simetria del dímer, obtenint-se dues restriccions de distància per a cada pic NOE integrat.

4) En les restriccions en què estan involucrats protons H5'/H5" o H2'/H2" que no s'han pogut assignar estereoespecíficament, es van substituir aquests àtoms pel pseudoàtom corresponent (Q5' o Q2') afegint-se una correcció de 0.9 Å a la cota superior.

5) Es van realitzar càlculs amb DYANA (veure apartat 5.5.2.1) i, en el cas de distàncies molt violades, aquestes es van arrodonir a un valor superior de 3.0, 4.0 o 5.0 Å.

#### 5.5.1.2 Obtenció de distàncies precises

Per obtenir restriccions de distàncies precises es van emprar les intensitats dels pics NOE obtingudes amb SPARKY en els càlculs amb MARDIGRAS<sup>101</sup>, que empra la matriu completa de relaxació. Abans d'introduir les intensitats experimentals en el càlcul, les distàncies es van assignar a contactes intra o intersubunitat i es van duplicar convenientment. Amb aquestes llistes es van dur a terme els càlculs de la matriu completa de relaxació. En els càlculs amb MARDIGRAS no es van tenir en compte els moviments interns, excepte en el cas dels grups metil, per als quals es va emprar un model de *three-state jump*<sup>301</sup>. Es van dur a terme 27 càlculs per a cada oligonucleòtid: 3 models inicials diferents (obtinguts dels càlculs amb DYANA) × 3 llistes d'intensitats provinents de diferents temps de mescla × 3 temps de correlació assumint un moviment isòtrop (1, 2 i 4 ns). Les distàncies finals es van obtenir promitjant les 27 llistes de sortida de MARDIGRAS. Les cotes superior i inferior per a cada distància es van calcular a partir del valor mig de cada distància sumant-li o restant-li la desviació quadràtica mitjana. En els casos en què aquesta desviació era massa petita, es va emprar un valor ± 0.25Å com a desviació mínima.

Com que els dímers estudiats són simètrics, les restriccions de distància per als parells de protons equivalents haurien de ser idèntiques. En les llistes resultants de MARDIGRAS aquestes restriccions són semblants, però no iguals. Ens varem quedar amb les distàncies més restrictives i aquestes restriccions es van duplicar perquè fossin iguals per a les parelles de protons. Per als protons bescanviables aquestes restriccions són qualitatives ja que no tenim en compte l'efecte de bescanvi amb el solvent i s'introdueixen només com a cotes superiors.

El tractament dels protons que no van ser assignats estereoespecíficament es va realitzar de manera anàloga al realitzat en el cas de les restriccions qualitatives.

#### 5.5.1.3 Restriccions de ponts d'hidrogen

Tant en els càlculs amb restriccions qualitatives com quantitatives, a part de les restriccions experimentals, s'hi van introduir restriccions de distància per als ponts d'hidrogen característics dels aparellaments WC. Els valors d'aquestes restriccions per als parells G·C es mostren a la Taula 5.2:

Distància	Valor	Distància	Valor
H22G-O2C	1.60 - 1.80 Å	N3G-C2C	5.40 - 5.60 Å
N2G-O2C	2.70-2.90Å	O6G-N4C	2.80-3.00 Å
H1G-N3C	1.60 - 1.80 Å	O6G-H42C	1.60 - 1.80 Å
N1G-N3C	2.70 - 2.90 Å	C2G-C2C	4.20 - 4.40 Å
C6G-C4C	4.00 - 4.20 Å	C4G-C4C	6.40 - 6.60 Å
C5G-C5C	7.00 - 7.20 Å	C4G-N1C	7.60 - 7.80 Å

Taula 5.2. Valors de les restriccions de distància per als parells GC

## 5.5.2 Determinació de les estructures

### 5.5.2.1 Càlculs d'estructura amb DYANA

Els models inicials de les estructures es van calcular amb el programa DYANA<sup>102</sup> (versió 1.5). En el càlcul de les estructures dimèriques es van introduir 50 residus ficticis o *linkers* entre les dues subunitats per tal de mantenir-les unides. A part de les restriccions experimentals i les restriccions de pont d'hidrogen es van introduir restriccions entre C4' i O4' per tancar els anells de desoxiribosa (restricció superior de 1.80 Å). En tots els càlculs es va utilitzar la llibreria de residus estàndard del programa: "dyana.lib". Per a aquests càlculs s'utilitza la llista de restricció de distàncies de cota superior (.upl) i una llista de restricció de distància de cota inferior (.lol) que només inclou les restriccions de pont d'hidrogen.

En cada càlcul es generen 100 estructures a l'atzar i es sotmeten a 6000 passos de dinàmica molecular restringida en l'espai d'angles de torsió. La dinàmica es porta a terme amb un protocol anomenat "*anneal*" implementat en el programa amb lleugeres modificacions: la temperatura s'augmenta paulatinament de 0 a 4 durant els primers 1200 passos per disminuir després fins a 0 de nou durant els 4800 passos restants. Els valors de la temperatura corresponen a unitats de funció blanc per grau de llibertat de la molècula (la funció blanc té unitats arbitràries i el número de graus de llibertat de la molècula és el número d'angles de torsió). Al final de la dinàmica, les estructures es sotmeten a 2000 passos de minimització. De les estructures finals, s'escullen les 10 estructures amb valors més petits de la funció blanc com a estructures resultants. Amb aquestes estructures podem realitzar els càlculs de la matriu completa de relaxació per obtenir distàncies més precises. Les llistes de distància obtingudes amb MARDIGRAS (cotes superiors i inferiors per a totes les restriccions experimentals), s'empren per a uns nous càlculs amb DYANA per obtenir unes noves estructures abans de procedir al seu refinament.

### 5.5.2.2 Refinament de l'estructura amb AMBER

Les estructures calculades amb DYANA van ser posteriorment refinades mitjançant càlculs de dinàmica molecular restringida en l'espai de coordenades cartesianes amb mòdul SANDER (*Simulated Annealing with NMR Derived Energy Restraints*) del paquet de dinàmica molecular AMBER<sup>152</sup> (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) (versió 7.0)<sup>302</sup>. Al potencial habitual del programa (camp de forces descrit per Cornell *et al.*<sup>303</sup>) se li afegeix un terme corresponent a les

restriccions de distància experimentals de la forma:

$$E_{\text{NOE}} = \begin{cases} = 2k_{\text{NOE}}(r_2-r_1)(r_1-r) + k_{\text{NOE}}(r_2-r_1)^2 & \text{si } r < r_1 \\ = k_{\text{NOE}}(r_2-r)^2 & \text{si } r_1 < r < r_2 \\ = 0 & \text{si } r_2 < r < r_3 \\ = k_{\text{NOE}}(r-r_3)^2 & \text{si } r_3 < r < r_4 \\ = 2k_{\text{NOE}}(r_4-r_3)(r-r_4) + k_{\text{NOE}}(r_4-r_3)^2 & \text{si } r_4 < r \end{cases}$$

on  $r_3$  i  $r_2$  són les cotes superior i inferior de restricció de distància, respectivament. La forma d'aquesta funció de penalització és parabòlica entre  $r_1$  i  $r_2$  i entre  $r_3$  i  $r_4$ . Quan la distància és menor de  $r_1$  ( $r_1=r_2 - 1 \text{ \AA}$ ) o major de  $r_4$  ( $r_4=r_3 + 1 \text{ \AA}$ ), la funció de penalització és lineal.

Es van realitzar dos càlculs diferents i consecutius: un primer càlcul al buit i un segon càlcul introduint el dissolvent de manera explícita.

a) Càlcul al buit: els càlculs al buit es van realitzar considerant tots els àtoms de la molècula (no es va utilitzar l'aproximació d'àtom unit). Es van dur a terme en fase gas introduint ions  $\text{Na}^+$  hexahidratats a una distància de  $5 \text{ \AA}$  de tots els àtoms de fòsfor per tal de neutralitzar les càrregues negatives dels grups fosfat. Els paràmetres utilitzats per al camp de forces van ser els corresponents a la parametrització de 1994 ("parm94.dat")<sup>303</sup>. El terme electrostàtic es va calcular emprant una constant dielèctrica depenent de la distància. El valor de tall per a les interaccions no enllaçants es va fixar en  $10 \text{ \AA}$ . Es van assignar velocitats aleatòries per a una temperatura inicial de  $300\text{K}$ .

Cadascuna de les 10 estructures de partida, va ser primer minimitzada i després es va sotmetre a una dinàmica molecular de  $100 \text{ ps}$  a  $300\text{K}$ . Per últim, les 10 estructures finals es van minimitzar en  $1000$  passos. Totes les simulacions es van dur a terme emprant l'algoritme SHAKE<sup>304</sup> per tal de mantenir fixes les longituds d'enllaç, fet que permet emprar una constant de temps de  $2 \text{ fs}$  per a la integració de les equacions de moviment ja que eliminem el moviment d'*stretching* dels enllaços, que és el més ràpid del sistema.

b) Càlcul en aigua: les 10 estructures obtingudes després del refinament al buit van se refinades amb simulacions de dinàmica molecular a pressió ( $1 \text{ atm}$ ) i temperatura constants ( $300\text{K}$ ) considerant el dissolvent de manera explícita. La simulació es va realitzar en una caixa amb unes  $2500$  molècules d'aigua explícites i els contraions necessaris per neutralitzar els fosfats. En les simulacions anteriors s'havia utilitzat una distància de tall de  $10 \text{ \AA}$  per truncar les interaccions electrostàtiques, fet que produeix distorsions locals en les estructures finals. En aquesta dinàmica en aigua introduïrem el mètode PME (*Particle Mesh Ewald Method*)<sup>305</sup>, que minimitza les distorsions locals i és considerat el mètode més rigorós per tractar les interaccions de llarg abast.

Primer es duu a terme una minimització, seguida d'una dinàmica molecular restringida en què es mantene fixos el solut i els contraions i es dóna llibertat de moviment a l'aigua, amb la finalitat d'equilibrar el sistema. Després el sistema es torna a sotmetre a una RMD, amb llibertat de moviment

de l'aigua i els contraions, però introduint el mètode PME per aconseguir un millor tractament de les interaccions electrostàtiques de llarg abast. A continuació es duen a terme una sèrie de dinàmiques curtes en què s'augmenta gradualment la temperatura, i després una altra sèrie en les que es redueixen gradualment les restriccions imposades al solut fins a deixar-lo lliure. Posteriorment es sotmet el sistema a una RMD llarga de 500 ps, guardant els valors d'energia i coordenades cada ps. Finalment s'agafen les estructures promitjades dels 10 últims ps de la dinàmica i es minimitzen al buit. L'anàlisi de les trajectòries en dissolució es va dur a terme amb els mòduls d'anàlisi inclosos en el paquet d'AMBER.

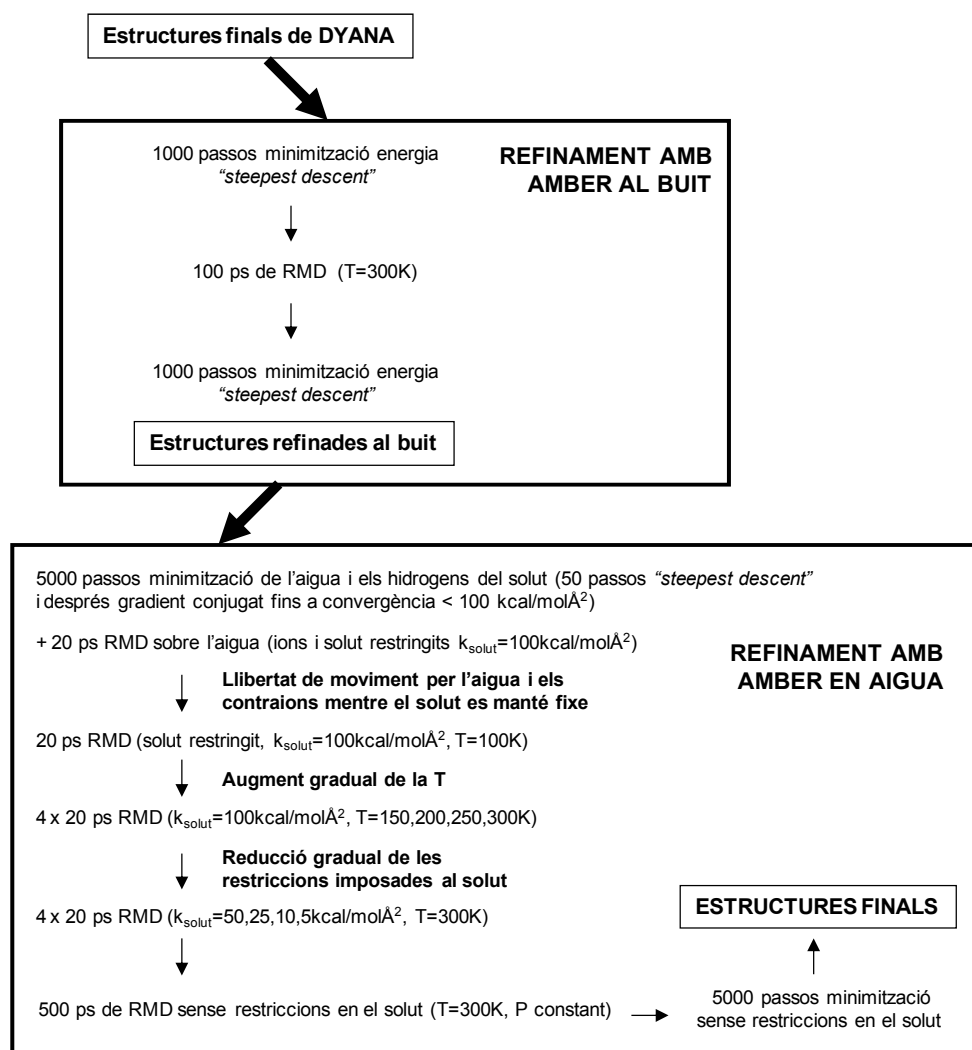


Figura 5.1. Protocol del refinament de les estructures amb AMBER

### 5.5.3 Anàlisi de les estructures

L'anàlisi de les estructures finals es va realitzar amb el programa CURVES<sup>105</sup>, per al càlcul dels paràmetres helicoidals, i amb MOLMOL<sup>153</sup> (versió 2K.2) per al càlcul dels angles de torsió i pseudorotació de l'anell de ribosa. Les figures de les estructures s'han realitzat amb MOLMOL.

El paràmetre d'ordre per als angles de torsió s'ha calculat com<sup>154</sup>:

$$S(\alpha_i) = \frac{1}{N} \left\| \left( \sum_{j=1}^N \alpha_i^j \right) \right\|$$

on N és el nombre total d'estructures i  $\alpha_i^j$  ( $j=1, \dots, N$ ) és un vector 2D amb fase igual a l'angle diedre  $\alpha_i$  ( $i$  representa el número de residu  $i$   $j$  el número d'estructura)



## 6 ESTUDIS MITJANÇANT DSC

---

### 6.1 Preparació de Les mostres

Les mostres s'han preparat a partir de solucions d'oligonucleòtid dessalat, que s'han quantificat i liofilitzat. Totes les mostres s'han dissolt en exactament la mateixa solució amortidora: fosfat sòdic 25 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> i posteriorment s'han requantificat a partir de l'absorbància a alta temperatura, ja que és de vital importància conèixer la concentració exacta. Les concentracions d'oligonucleòtid han estat de 200 µM per d<pCGCTCCGT> (realment 273 µM) i 1 mM per d(TGCTTCGT) (realment 0.860 mM) i d(TCGTTGCT) (realment 1.082 mM).

### 6.2 Adquisició de Les dades

Els experiments s'han realitzat en un aparell MicroCal VP-DSC de la Unitat de Química Fina dels SCT. Els paràmetres que cal especificar són: rang i velocitat d'escombratge, temps de pre-scan i resposta de l'aparell respecte a l'amplificació del senyal que mesura. A la Taula 6.1 es resumeixen els diferents scans realitzats amb els paràmetres corresponents.

Nº de SCANS	MOSTRA	Rang T (°C)	Rate (°C/h)	PreScan (min)	Feed Back
26 scans	Solució amortidora blanc	3 65	30	10	low
5 scans	d(TCGTTGCT) 1 mM	3 65	30	180	low
6 scans	Solució amortidora blanc	3 80	30	15	none
11 scans	Solució amortidora blanc	3 80	60	15	none
3 scans	d<pCGCTCCGT> 200 µM	3 80	60	90	none
3 scans	d<pCGCTCCGT> 200 µM	3 80	30	180	none
24 scans	Solució amortidora blanc	3 65	30	180	none
6 scans	d(TGCTTCGT) 1 mM	3 65	30	180	none

Taula 6.1. Taula resum dels diferents experiments realitzats mitjançant DSC

### **6.3 Tractament de Les dades**

Les dades obtingudes (escombrats o *scans*) cal tractar-les de la següent manera:

- promitgem els *scans* de la mostra (generalment se'n promitgen 3),
- li restem la referència (promig dels 3 últims *scans* del blanc, l'instrument ja estabilitzat),
- normalitzem les dades segons la concentració i el volum de la cel·la,
- tracem la línia de base i la restem,
- integrem l'àrea sota la corba per obtenir l'entalpia del procés o ajustem la corba a l'equació d'un determinat equilibri.

## 7 CICLACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS ASSISTIDA PER MOTLLE

---

En tots els casos el procediment és el mateix: es quantifica mitjançant espectroscòpia UV l'oligonucleòtid fosforilat que es vol ciclar i se n'agafen les OD<sub>260</sub> necessàries per a l'experiment en funció de la concentració d'oligonucleòtid i el volum de treball (de 50 a 1000 µl). Si es requereix un motlle extern, també es quantifica i se n'agafa la quantitat necessària. L'oligonucleòtid o els oligonucleòtids es liofilitza/en i es dissol/en en el medi adequat segons la reacció. La solució s'escalfa a 80 °C durant 5 minuts i es deixa refredar lentament fins a temperatura ambient i posteriorment a la nevera o en bany de gel fins a la temperatura desitjada (5-10 °C). Es manté a aquesta temperatura durant 12h i després s'hi afegeix el reactiu de ciclació. Es deixa reaccionant en les condicions indicades. Si es realitzen anàlisis mentre dura la reacció, se n'agafen alíquotes i s'analitzen directament, a no ser que s'indiqui el contrari. Per aturar la reacció s'augmenta el volum amb aigua i es congela immediatament a -196 °C amb N<sub>2</sub> líquid. Les reaccions es mantenen congelades fins al moment de la seva anàlisi. En alguns casos les reaccions es dessalen (Sep-Pak o Sephadex G-10) abans de la seva anàlisi definitiva.

El seguiment de les reaccions es realitza principalment mitjançant MS-MALDI-TOF. L'anàlisi final de les reaccions es realitza també mitjançant MS-MALDI-TOF, així com HPLC de fase inversa i PAGE. Per a la caracterització dels pics del cromatograma d'HPLC, aquests s'analitzen posteriorment per MS-MALDI-TOF o s'empra un sistema acoblat HPLC-MS. Veure apartat 7.4 per a les condicions específiques d'anàlisi.

### 7.1 Reaccions de ciclació amb EDC

El medi de reacció amb EDC és: 50 mM MES-NaOH pH 6, 20 mM MgCl<sub>2</sub><sup>54</sup>. Les reaccions es duen a terme en absència de llum. Les condicions estàndard acostumen a ser 50 µM de precursor lineal, 55 µM del motlle (1.1 eq., en el cas de motlle extern) i 250 mM d'EDC, que s'afegeix en sòlid. Però en els assajos de ciclació dels *bi-loops* homolíneals es va treballar a una concentració d'oligonucleòtid 1 mM i es van emprar quantitats majors de EDC, fins a 5 M. En aquests casos va ser necessari un dessalatge previ a l'anàlisi mitjançant MS-MALDI-TOF emprant Zip-Tips. La temperatura de treball

sempre va ser de 4 a 10 °C. A la Taula 7.1 es resumeixen les condicions i els resultats obtinguts.

Assaig		V (µl)	Conc. precursor lineal (µM)	Conc. motlle (µM)	Conc. EDC (mM)	T (°C)	temps (h)	Rend. producte cíclic (%)
<i>Bi-loop</i> heterolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d<pCCTTCGGT>+ d(GTCCCTCA)	500-1000	50	55	250	5	21 / 120	--
	d<pCCTTCGGT>+ d(CCCTCAGT)	500-1000	50	55	250	5	21 / 120	--
<i>Bi-loop</i> homolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d(TCGTTCGT)	50	1000	--	1000	10	20	--
	d(TGCTTCGT)	50	1000	--	1000	10	20	--
	d(TCGTTGCT)	50	1000	--	1000-5000	10	20-144	~ 50 % (PAGE, 5M EDC, 144h)
Ciclació en fase sòlida (Bloc 2. Cap. 5)	Assaig en solució fosfat diester	150	100	110	200	4	24 - 132	--

Taula 7.1. Resum dels diferents assajos de ciclació amb EDC

## 7.2 Reaccions de ciclació amb CNBr i imidazole

ATENCIÓ: El CNBr és molt tòxic i volàtil i s'ha de manipular amb cura i sempre en una vitrina ben ventilada. Tot el material que ha estat en contacte amb el CNBr es renta amb una solució de NaOH i NaClO.

El medi de reacció amb CNBr i imidazole és: 200 mM imidazole-HCl pH 7, 100 mM NiCl<sub>2</sub><sup>208</sup>. El CNBr s'afegeix dissolt en ACN (5M, solució comercial o preparada per nosaltres amb ACN anhidre) fins a la concentració desitjada. En la següent taula es resumeixen els diferents assajos realitzats.

Assaig		V (µl)	Conc. precursor lineal (µM)	Conc. motlle (µM)	Conc. CNBr (mM)	T (°C)	temps (h)	Rend. producte cíclic
Reaccions dúplex model (Bloc 2. Cap. 3)	d(CGTACGeg <sub>6</sub> -CGTACGeg <sub>6</sub> p)	250	50	--	100	10	12.5	~ 30 % (HPLC)
	d(ACGeg <sub>6</sub> CGT-ACGeg <sub>6</sub> CGTp)	250	50	--	100	10	12.5	~ 60 % (HPLC)
<i>Bi-loop</i> heterolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d<pCCTTCGGT>+ d(GTCCCTCA)	250	50	55	100	10	12.5	--
	d<pCCTTCGGT>+ d(CCCTCAGT)	250	50	55	100	10	12.5	--
<i>Bi-loop</i> homolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d(TCGTTCGT)	50	1000	--	100	5	12	--
	d(TGCTTCGT)	50	1000	--	100	5	12	--
	d(TCGTTGCT)	50	1000	--	1500	5	48	--
Ciclació en fase sòlida (Bloc 2. Cap. 5)	Assaig en solució fosfat monoester	250	50	55	125	T <sub>amb</sub>	12	> 50 % (PAGE)
	Assaig sobre resina	250	100	110	125 + 125	T <sub>amb</sub>	12	--
	Assaig en solució fosfat diester	250	50	55	125	T <sub>amb</sub>	12/24/48	--

Taula 7.2. Resum dels assajos de ciclació amb CNBr i imidazole

### 7.3 Reaccions de ciclació amb CNBr i MES

El medi de reacció amb CNBr i MES és: 250 mM MES-Et<sub>3</sub>N pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub><sup>207</sup>. El CNBr s'afegeix dissolt en ACN (solució comercial 5 M o solució preparada per nosaltres 10 M per a les reaccions en què s'arriba a conc. 1.88 M).

Assaig	V (μl)	Conc. precursor lineal (μM)	Conc CNBr (mM)	T (°C)	temps (min)	Rend. producte cíclic (%)	
<i>Bi-loop</i> heterolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d<pCCTTCGGT>+d(GTCCCTCA)	100	50	500	5	5 / 30	--
	d<pCCTTCGGT>+d(CCCTCAGT)	100	50	500	5	5 / 30	--
<i>Bi-loop</i> homolineal (Bloc 2. Cap. 4)	d(TCGTTCGT)	50	1000	500	5	5	--
	d(TGCTTCGT)	50	1000	500-1880	5	5	--
	d(TCGTTGCT)	50	1000	1880	5	94 h	< 30 % (PAGE)
Ciclació en fase sòlida (Bloc 2. Cap. 5)	Assaig en solució fosfat diester	125	50	500	0	4	--

Taula 7.3. Resum dels assajos de ciclació amb CNBr i medi MES

### 7.4 Anàlisi de les reaccions

Anàlisi per MS-MALDI-TOF: en mode lineal negatiu per facilitar la observació. Sovint ha calgut dessalar mitjançant Zip-Tips si la presència de sals era massa elevada i dificultava l'anàlisi.

Anàlisi per PAGE: electroforesi en gel de poliàcrilamida analític i en alguns casos preparatiu per aïllar-ne les bandes i determinar-ne les masses per MS-MALDI-TOF.

Anàlisi per HPLC de fase inversa: estàndard. Per a la caracterització dels pics que apareixen en el cromatograma d'HPLC, aquests es col·lecten, es liofilitzen i s'analitzen posteriorment per MS-MALDI-TOF.

Anàlisi per HPLC-MS:

Condicions d'elució: 5 a 35 % B en 20' (A: NH<sub>4</sub>OAc 0.01 M i B: H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) v/v) f=0.25 mL/min

Anàlisi rang masses: 400 a 1400 uma, v = 2000 uma/s

Seguiment de la massa del producte fosforilat de partida: m/z=616.60, 822.50, 1234.20, 2469.40

Seguiment de la massa del producte cíclic desitjat: m/z=612.10, 816.50, 1225.20, 2451.40

Anàlisi per HPLC de bescanvi aniònic: gradient de 0.2 a 0.6 M de NH<sub>4</sub>OAc en 30' en un 10% d'ACN, flux=1 mL/min (A: NH<sub>4</sub>OAc 1M, 10 % ACN; B: 10 % ACN, 80 a 40 % B en 30').

### 7.5 Intents de ciclació en medi orgànic<sup>280</sup>

Primer de tot es realitza la hibridació del precursor lineal i la seqüència motlle en medi aquós: 2 nmol del precursor lineal i 2.2 nmol de la seqüència motlle es dissolen en 15 μl d'una solució aquosa 100 mM de NaCl i 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, s'escalfa durant 5 min a 90 °C i es deixa refredar lentament fins a

temperatura ambient. Seguidament s'afegeix el reactiu acoblant en el medi orgànic i es deixa reaccionar a  $T_{amb}$  durant el temps indicat. El cru de reacció es dessala mitjançant Sephadex G-25 i s'analitza posteriorment mitjançant PAGE desnaturalitzant analític. A la següent taula es resumeixen els diferents assajos realitzats. En cap cas es va observar la formació de producte cíclic.

Assaig	1	2	3	4	5	6
Precursor	2 nmol	2 nmol	2 nmol	2 nmol	2 nmol	2 nmol
Seq. motlle	2.2 nmol	2.2 nmol	2.2 nmol	2.2 nmol	2.2 nmol	2.2 nmol
Medi aquós (15 $\mu$ l)	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM MES 100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Agent acoblant	200 mM MSNT (30.000 eq)	200 mM MSNT (30.000 eq)	2.2 M MSNT (300.000 eq) x 2	2.2 M MSNT (300.000 eq) x 2	900 mM EDC (125.000 eq)	10 M EDC (500.000 eq)
Dt. orgànic	265 $\mu$ l de pir	15 $\mu$ l de pir + 240 $\mu$ l ACN	300 $\mu$ l de pir x 2	300 $\mu$ l de pir x 2	ACN d'300 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
T i temps	$T_{amb}$ , 12h	$T_{amb}$ , 12h	10 °C a $T_{amb}$ , 48h	10 °C a $T_{amb}$ , 48h	10 °C a $T_{amb}$ , 48h	10 °C a $T_{amb}$ , 48h

Taula 7.4. Assajos de ciclació en medi orgànic