



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Departamento de Química Analítica

Programa de doctorado:

310E - Técnicas experimentales en química

Tesis doctoral

**INTERACCION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS
Y LIGANDOS DE BAJO PESO MOLECULAR:
MECANISMOS MOLECULARES DE
RECONOCIMIENTO ESPECIFICO**

presentada por **Luis González Bulnes**

dirigida por el **Dr. José Gallego Sala**

Tutor: **Dr. José Vicente Gimeno Adelantado**

Valencia, julio de 2015

El Dr. José Gallego Sala, investigador de la Universidad Católica de Valencia

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada *Interacción entre ácidos nucleicos y ligandos de bajo peso molecular: mecanismos moleculares de reconocimiento específico*, cuyo autor es Luis González Bulnes, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro de Investigación Príncipe Felipe y en la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Valencia, y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, a 22 de junio de 2015.

Fdo. José Gallego Sala

Fdo. José Vicente Gimeno Adelantado
(Tutor)

*La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos,
tarde o temprano, siempre se aplican.*

Severo Ochoa.

A la memoria de mi padre

Agradecimientos

Cuando yo era pequeño, y de eso ya hace un tiempo, mi padre me llevaba de vez en cuando a su lugar de trabajo. Recuerdo que era un lugar extraño, lleno de aparatos que hacían ruido y de cosas que no se podían tocar: un laboratorio de investigación. A pesar de trabajar en un lugar tan inhóspito, lo cierto es que disfrutaba mucho con lo que hacía. Pronto hubo que continuar sin él, pero allí estuvo mi madre entonces para, con inquebrantable ánimo, seguir con la tarea de hacer de mí una persona de bien, capaz de superar metas y llegar lo más lejos posible. Por todo ello, decidí que mi futuro (o al menos parte de él) estaba en la investigación. Lo mismo que mis hermanos, Patricia y Fran, quienes ya han terminado su doctorado hace algún tiempo, y me han aconsejado sabiamente cuando ha hecho falta.

También, y por seguir con el orden cronológico, debo dar las gracias a los profesores que he tenido a lo largo del tiempo, especialmente a los que durante mi licenciatura me animaron a hacer una tesis doctoral y a dedicarme a la investigación, a pesar de advertirme que existía la posibilidad de no hacerse millonario.

A José, el principal responsable de que esta tesis haya podido materializarse, tengo ciertamente muchas cosas que agradecerle. En primer lugar la confianza depositada en mí para acometer proyectos de investigación de alto interés científico, como han demostrado los resultados que, luego del esfuerzo, se han conseguido. Aparte, debo reconocer la buena gestión del tema de mi financiación, ya que yo nunca disfruté de una beca o contrato predoctoral al uso, lo que ocasionó más de un quebradero de cabeza. Bajo su supervisión, he tenido la fortuna de trabajar aprendiendo y disfrutando, con mucho empeño pero poco estrés, cosa que siempre es de agradecer.

Gracias también al Dr. José Vicente Gimeno, por su disponibilidad y amabilidad permanentes cuando he necesitado su ayuda.

Durante todos estos años he estado rodeado, primero en el Príncipe Felipe y después en la Universidad Católica de Valencia, de muchos y buenos compañeros

de trabajo. Cómo no, empezando por David, con quien más risas y buenos momentos he pasado. En más de una ocasión él convirtió una semana aburrida en una semana fantástica. También ha sido un lujo contar con compañeros de grupo como Alí e Isaías; y compañeras como Lorena y Teresa, quienes además me ahorraron muchas horas de trabajo extra gracias a su buen hacer como técnicas de laboratorio. Guardo también un inmejorable recuerdo de los compañeros del I-02 y el I-17, con quienes compartí espacio de trabajo en el Príncipe Felipe.

A mis amigos, tanto los de Valencia como los de Asturias, que no sólo me han ayudado a desconectar, sino que han sido artífices de momentos inolvidables en viajes y quedadas; otras veces en plan más tranquilo, charlando amigablemente y jugando en el chalet de Eurovillas.

A MC, que ha soportado en bastantes ocasiones mis espantadas al laboratorio en horarios extraños, apoyándome cuando esto sucedía en lugar de enviarme al médico. Tampoco debo olvidar el buen trabajo realizado con el diseño de la portada de esta tesis. Pero sobre todo debo agradecerle el que me haya hecho cambiar a mejor en muchos aspectos. Gracias por los buenos momentos vividos y por los que faltan, sin duda muchos.

Pero eso no es todo. Hay muchas otras personas que, en mayor o menor medida, me han ayudado a llegar a donde estoy ahora. Sería imposible nombrarlas una a una, por razones de espacio, pero sirvan estas líneas para reconocer su aportación. A todos vosotros, que me habéis ayudado a llegar a este buen puerto, y sobre todo, que habéis conseguido que estos años hayan sido muy felices. Que es de lo que se trata en la vida.

Resumen

Los ácidos nucleicos desempeñan una gran variedad de funciones bioquímicas y son moléculas básicas para la vida. El estudio de sus complejos con moléculas de bajo peso molecular es esencial para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos basados en la interacción con estas biomoléculas.

Tras analizar la estructura de los ácidos nucleicos y los fundamentos de las técnicas experimentales utilizadas, esta tesis se centra en primer lugar en el estudio de la interacción entre ligandos bisnaftalimídicos antitumorales y diferentes secuencias de ADN, con el objetivo de identificar los mecanismos de reconocimiento específico del ADN por parte de estos compuestos. Utilizando una combinación de técnicas biofísicas, primeramente se evaluó el efecto de modificar las secuencias que flanquean el sitio de unión preferido de la bisnaftalimida de referencia elinafide. Se observaron diferencias significativas, especialmente en el caso de complejos flanqueados por trectos A, que manifestaron una afinidad más baja, interacciones de apilamiento más débiles, y procesos dinámicos más rápidos. Por lo tanto, el reconocimiento del ADN por parte de elinafide está fuertemente modulado por efectos indirectos, dependientes de las preferencias conformacionales de cada secuencia. A continuación se estudió el mecanismo de reconocimiento directo del ADN por parte de ligandos bisnaftalimídicos. Los resultados indicaron que este proceso depende fundamentalmente de los contactos electrostáticos establecidos entre el espaciador aminoalquílico de las bisnaftalimidias y los grupos electronegativos de guanina en el surco mayor, que determinan tanto la especificidad de los ligandos por pasos GpC como el proceso de intercalación de los anillos de naftalimida. Además, se concluyó que la interacción entre el ADN y las bisnaftalimidias tiene lugar a través de dos estados: unión al surco e intercalación. En consonancia con este modelo de dos estados, cambios en distintos factores como el pH, la fuerza iónica o la composición de las bases del ADN o los anillos aromáticos de los compuestos tuvieron efectos diferentes en los parámetros de unión determinados por métodos biofísicos habitualmente utilizados en el estudio de complejos formados por ácidos nucleicos.

El segundo capítulo de resultados de esta tesis describe el diseño *de novo* de moléculas *p*-terfenílicas bilateralmente sustituidas y el estudio de su interacción

con el subdominio IIB del Elemento de Reconocimiento de Rev (RRE) del ARN genómico del VIH-1, con el propósito de bloquear la interacción entre RRE y la α -hélice de unión a ARN de Rev y ejercer un efecto inhibitorio sobre la replicación del virus. Para ello se utilizó una combinación de métodos biofísicos y de técnicas computacionales basadas en estructura. Los resultados demostraron que los sustituyentes bilaterales de estas moléculas se proyectan en un ángulo de 360° , y que estos ligandos actúan como miméticos de Rev en su complejo con RRE, siendo capaces de desplazar la α -hélice del bucle IIB de RRE. Por último, experimentos en cultivo celular pusieron de manifiesto que algunos compuestos *p*-terfenílicos son capaces de bloquear la replicación del VIH-1 sin mostrar una toxicidad celular significativa, actuando además en pasos transcripcionales o post-transcripcionales del ciclo de vida del virus.

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

^1H	protón
^2D	deuterio
^{13}C	carbono-13
^{15}N	nitrógeno-15
^{31}P	fósforo-31
1D	monodimensional
2D	bidimensional
Å	angstrom(s)
A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGCT	tetranucleótido adenina-guanina-citosina-timina
Arg	arginina
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
Asn	asparragina
A · T	par adenina:timina
AZT	azidotimidina
BPN	análogo de elinafide con anillos de bispirazinonaftalimida
C	citocina
COSY	<i>CO</i> related <i>S</i> pectroscopy
Crm1	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
χ^2	chi cuadrado
D	2,6-diaminopurina
D ₂ O	óxido de deuterio
ΔH_b	entalpía de unión
ΔS	entropía
ΔT_m	cambio en la temperatura de fusión
EC ₅₀	concentración para un 50 % de efectividad
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FID	<i>Free Induction Decay</i>

FITC	<i>Fluorescein IsoThyoCianate</i>
FP	<i>Fluorescence Polarization</i>
frevp	péptido FITC-GTRQARRNRRRRWREERQRAAAAR
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
G	guanina
G · C	par guanina:citosina
GG_h	horquilla de ARN control con una oposición GG
GHz	gigahercio(s)
Gln	glutamina
GpC	paso formado por guanina y citosina
HBS-EP	tampón compuesto por HEPES, NaCl, EDTA y p-20
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
I	inosina
IA	subdominio IA de RRE
IIB	subdominio IIB de RRE
IIB_h	horquilla con secuencia análoga al subdominio IIB
IC₅₀	concentración para un 50% de inhibición
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
kb	kilobases
K_d	constante de disociación de equilibrio
k_d^{int}	velocidad de disociación de intercalación
K_i	constante de inhibición de equilibrio
k_{op}	velocidad de apertura del par de bases
k_{rot}	velocidad de rotación de los anillos de elinafide
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LU	elinafide
λ	longitud de onda
MCI	análogo de elinafide con anillos de furonaftalimida
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MHz	megahercio(s)
miRNA	micro ARN
ms	milisegundo(s)
ng	nanogramo(s)
nm	nanometro(s)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ODU(s)	unidad(es) de densidad óptica
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEOE	<i>Partial Equalization of Orbital Electronegativity</i>

pK_a	potencial de disociación
ppm	partes por millón
ps	picosegundo(s)
Rev	proteína Rev
Rev₃₄₋₅₀	α -hélice de unión a ARN de Rev
revp	péptido TRQARRNR ₄ RRRW ₄ RERQRAAAAR
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	revoluciones por minuto
RRE	<i>Rev Response Element</i>
RU	<i>Response Units</i>
RU_{max}	<i>Response Units Maximum</i>
Ser	serina
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
T	timina
T₁	tiempo de relajación longitudinal
TAR	<i>Trans-Activation Response element</i>
TAR_h	horquilla de ARN control con una protuberancia UCU
Tat	<i>TransActivator of Transcription protein</i>
TBE	tampón compuesto por Tris, Borato y EDTA
TGCA	tetranucleótido timina-guanina-citosina-adenina
TGCD	tetranucleótido timina-guanina-citosina-2,6-diaminopurina
Thr	treonina
TICA	tetranucleótido timina-inosina-citosina-adenina
T_m	temperatura de fusión
TOCSY	<i>TOTAL Correlation Spectroscopy</i>
TPCR	timina-guanina/inosina-citosina-adenina/2,6-diaminopurina
U	uracilo
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
UV	ultravioleta
Vh	Voltios hora
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Índice general

Índice de figuras	xxi
Índice de tablas	xxv
1. Introducción general	1
1.1. Estructura de los ácidos nucleicos	3
1.2. El ácido desoxirribonucleico (ADN)	8
1.3. El ácido ribonucleico (ARN)	11
1.4. Fundamentos de las técnicas experimentales aplicadas	14
1.4.1. Purificación de ácidos nucleicos basada en electroforesis en gel	14
1.4.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	16
1.4.3. Resonancia superficial de plasmón (SPR)	21
1.4.4. Espectroscopía de ultravioleta-visible	23
1.4.5. Calorimetría de valoración isotérmica (ITC)	25
1.4.6. Polarización de fluorescencia (FP)	27
2. Interacción entre ADN y ligandos bisnaftalimídicos con actividad antitumoral	31
2.1. Introducción	33
2.1.1. El ADN como diana farmacológica	33
2.1.2. Intercalación	34
2.1.3. Las naftalimidias: una familia de intercalantes de ADN	37
2.1.4. Dos mecanismos de reconocimiento de ADN de doble hélice	40
2.2. Objetivos	42
2.3. Materiales y métodos	43
2.3.1. Preparación de muestras	43
2.3.2. Resonancia magnética nuclear	44
2.3.3. Resonancia superficial de plasmón	50
2.3.4. Experimentos de desnaturalización térmica	51
2.3.5. Calorimetría de valoración isotérmica	53
2.4. Influencia de efectos indirectos en la interacción ADN-elinafide	55
2.4.1. Estrategia de trabajo	55

2.4.2.	Resultados	57
2.4.3.	Discusión	68
2.5.	Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bis-naftalimídicos	73
2.5.1.	Estrategia de trabajo	73
2.5.2.	Resultados	76
2.5.3.	Discusión	88
2.6.	Conclusiones	96
3.	Interacción entre ligandos <i>p</i>-terfenílicos y el elemento de reconocimiento de Rev en el ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1	99
3.1.	Introducción	101
3.1.1.	El ARN como diana farmacológica	101
3.1.2.	El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)	107
3.1.3.	El complejo RRE-Rev	111
3.2.	Objetivos	116
3.3.	Materiales y métodos	117
3.3.1.	Cálculos de <i>docking</i>	117
3.3.2.	Preparación de muestras	118
3.3.3.	Resonancia magnética nuclear	118
3.3.4.	Resonancia de plasmón superficial	119
3.3.5.	Polarización de fluorescencia	120
3.4.	Estrategia de trabajo	122
3.5.	Resultados	124
3.5.1.	Diseño computacional de inhibidores RRE-Rev	124
3.5.2.	Síntesis de <i>p</i> -bifenilos y <i>p</i> -terfenilos sustituidos bilateralmente	126
3.5.3.	Valoraciones de RRE IIB con <i>p</i> -bifenilos y <i>p</i> -terfenilos monitorizadas mediante RMN	127
3.5.4.	Determinación de parámetros de unión por SPR	130
3.5.5.	Ensayos de inhibición RRE IIB-Rev ₃₄₋₅₀ <i>in vitro</i>	131
3.5.6.	Ensayos celulares	134
3.6.	Discusión	137
3.7.	Conclusiones	142
	Bibliografía	145

Índice de figuras

1.1. A) Estructura y numeración de los nucleótidos. B) Principales bases de los ácidos nucleicos.	3
1.2. A) Conformaciones <i>sobre</i> y <i>silla</i> del anillo de ribosa. B) Angulos de torsión del esqueleto azúcar-fosfato. C) Orientaciones <i>anti</i> y <i>sin</i> de la base respecto del azúcar.	5
1.3. Conformaciones del anillo de ribosa en función del ángulo de pseudorrotación P.	6
1.4. A) Esqueleto fosfodiéster de los ácidos nucleicos. B) Modelo de Watson y Crick de la estructura del ADN (conformación B).	7
1.5. Parámetros helicoidales de los ácidos nucleicos.	8
1.6. Formas A, B y Z del ADN.	9
1.7. Apareamientos no canónicos más habituales en el ARN: A) GU <i>wobble</i> ; B) GA <i>sheared</i> ; C) AU Hoogsteen reverso; D) GA imino.	11
1.8. Elementos de la estructura secundaria del ARN.	12
1.9. Estructuras secundaria y terciaria del ARN.	13
1.10. Secuencias de supresión de la señal del agua: <i>watergate</i> (A) y <i>jump-and-return</i> (B).	17
1.11. Secuencias básicas de pulsos de los espectros bidimensionales más habituales.	19
1.12. A) Esquema de los componentes y sistema de detección de un experimento de SPR. B) Etapas de un experimento típico de SPR y su efecto en un sensograma.	22
1.13. Ejemplo de experimento de desnaturalización térmica.	24
1.14. Ejemplo de experimento de ITC. Calor absorbido o cedido tras cada inyección y cálculo de los parámetros de unión.	25
1.15. Esquema de un experimento de polarización de fluorescencia.	28
2.1. Esquema de un proceso de intercalación.	34
2.2. Estructura química de algunos de los compuestos monointercalantes (A) y bisintercalantes (B) más conocidos.	36
2.3. Estructura química de algunos compuestos mononaftalimídicos (A) y bisnaftalimídicos (B).	38

2.4. Representación esquemática de un complejo entre TGCA (naranja) y elinafide (azul).	39
2.5. Estructura química de elinafide y protones aromáticos que intercambian sus posiciones.	45
2.6. Representación (A) y ajuste (B) de la intensidad de la señal en función del tiempo de recuperación en experimentos de recuperación de la inversión.	46
2.7. Superposición de un espectro simulado por Mexico y un espectro experimental.	48
2.8. Complejos ADN-elinafide analizados: seis dúplex autocomplementarios de 16 pares de bases y tres horquillas biotiniladas en posición 5'.	56
2.9. Curvas de fusión de dTATATA ^{TG} y dTTTTTT ^{TG} en ausencia y en presencia de 1,1 y 2,5 equivalentes de elinafide.	58
2.10. Sensogramas y curvas de unión en estado estacionario obtenidos mediante experimentos SPR para la interacción de elinafide con hTA ^{TG} , hATATA ^{TG} y hTTTTT ^{TG}	59
2.11. Comparación entre las gráficas de van't Hoff de hTA ^{TG} y hTTTTT ^{TG} obtenidas por SPR y los termogramas de ITC correspondientes a dTATATA ^{TG} y dTTTTTT ^{TG}	61
2.12. Región aromática-H1' de los espectros NOESY de dTATATA ^{TG} y dTTTTTT ^{TG} a 25 °C y 250 ms de tiempo de mezcla.	63
2.13. Velocidades de rotación de los anillos intercalados de elinafide en función de la temperatura en los complejos dTATATA ^{TG} y dTTTTTT ^{TG}	65
2.14. A) Región imino de los espectros ¹ H ₂ O a 8 °C y pH 8,8 de dTATATA ^{TG} – LU, dTTTTTT ^{TG} – LU y dTTATAT ^{AG} – LU en función de la concentración de NH ₃ . B) Comparación de los tiempos de vida (τ_{ex} a $1 \setminus [\text{NH}_3] = 0$) de distintos pares de bases en los mismos complejos.	67
2.15. Sitio de unión TGCA-elinafide.	70
2.16. Modelo de dos pasos superpuesto para la interacción de elinafide con un tetranucleótido TGCA flanqueado por un tracto A.	72
2.17. Estructuras de elinafide, MCI3335 y BPN.	73
2.18. A) Composición de los dúplex y horquillas utilizados. B) Estructura de las bases naturales y artificiales contenidas en los oligonucleótidos analizados.	74
2.19. Región aromática-H1' de los espectros NOESY de los complejos de dTTATAT ^{TG} con MCI y BPN, adquiridos a 25 °C y 250 ms de tiempo de mezcla.	77
2.20. Curvas de fusión de dTTATAT ^{TG} libre y unido a elinafide (ratio 1,4:1), BPN (2,1:1) y MCI (2,6:1).	78

2.21. Análisis por SPR a 25 °C y pH 6,3 de la interacción entre hATATA ^{TG} y MCI (A), BPN (B) y elinafide (C).	81
2.22. Estabilizaciones térmicas de los complejos frente a los ratios bis-naftalimida:dúplex.	82
2.23. Análisis por SPR de la interacción entre elinafide y las horquillas hATATA ^{TG} (A), hATATA ^{TI} (B) y hATATA ^{T-D} (C).	84
3.1. Antibióticos que se unen a las subunidades 30S (A) y 50S (B) del ribosoma bacteriano, y ubicación de sus sitios de unión (C). . . .	104
3.2. Estructuras de la oxazolidinona linezolid y del antibiótico piritiamina pirofosfato, que actúa sobre el ribointerruptor de TPP. . . .	105
3.3. A) Imagen por microscopía electrónica de un virión del VIH-1. B) Composición de un virión del VIH-1.	108
3.4. Ciclo de vida del VIH-1.	109
3.5. A) Secuencia de nucleótidos del subdominio IIB de RRE. B) Secuencia de aminoácidos de la α -hélice Rev ₃₄₋₅₀	112
3.6. Contactos intermoleculares entre los nucleótidos del subdominio IIB y los aminoácidos de Rev ₃₄₋₅₀	113
3.7. Formación de la ribonucleoproteína RRE-Rev: unión de Rev a los subdominios IIB y IA de RRE, seguida de la incorporación de moléculas adicionales de Rev.	114
3.8. Estructuras químicas de inhibidores de Rev.	115
3.9. Estructuras secundarias de las horquillas de ARN IIB _h , GG _h y TAR _h	122
3.10. Estructura química de los <i>p</i> -bifenilos y <i>p</i> -terfenilos estudiados en este capítulo.	127
3.11. A) Complejo IIB – Rev ₃₄₋₅₀ . B) Superposición de un <i>p</i> -terfenilo bilateralmente sustituido con una α -hélice.	128
3.12. Superposición de espectros TOCSY (región H5-H6) correspondientes a las mezclas 6b :IIB _h (A), 1 :IIB _h (B) y 4b :IIB _h (C) en proporciones molares 0:1, 1:1 y 2:1-6:1.	129
3.13. Análisis por SPR a 25 °C y pH 7,4 de la interacción entre el terfenilo 5c y las horquillas IIB _h , GG _h y TAR _h	132
3.14. Curvas de inhibición de IIB _h – Rev ₃₄₋₅₀ con 6b , 6a y 6d , obtenidas mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia. . .	134
3.15. Resultados de los ensayos celulares para el terfenilo 6b	135
3.16. A) Modelo del complejo IIB- 6b , construido a partir de cálculos de <i>docking</i> restringidos basados en NOEs intermoleculares. B) Superposición de 6b con Rev ₃₄₋₅₀ en el complejo 1ETG.	140

Índice de tablas

1.1. Comparación de las formas A, B y Z del ADN.	10
1.2. Desplazamiento químico de los protones nucleotídicos de dobles hélices canónicas de ADN y ARN.	21
2.1. Efecto de la secuencia flanqueante en la interacción elinafide:ADN.	57
2.2. Análisis mediante SPR de la interacción entre elinafide y las horquillas hTA ^{TG} , hATATA ^{TG} y hTTTTT ^{TG}	60
2.3. Parámetros termodinámicos de la interacción entre elinafide y horquillas y dúplex de ADN, obtenidos por experimentos de SPR e ITC, respectivamente, a 25 °C.	61
2.4. Velocidad de apertura de los pares de bases en los complejos de elinafide con dTATATA ^{TG} , dTTTTTT ^{TG} y dTTATAT ^{AG}	66
2.5. Efecto del anillo intercalante y la composición de bases del ADN en la interacción bisnaftalimida-ADN.	79
2.6. Análisis mediante SPR del efecto del motivo aromático y composición de las bases del ADN en la interacción bisnaftalimida-ADN.	80
2.7. Impacto del pH en la interacción ADN-elinafide, evaluado mediante experimentos de desnaturalización térmica y RMN.	85
2.8. Análisis mediante SPR del efecto del pH en la interacción ADN-elinafide.	86
2.9. Impacto de la fuerza iónica en la interacción ADN-elinafide.	87
3.1. Resultados de <i>docking</i> de bifenilos (BF) y terfenilos (TF) con diferentes patrones de sustitución.	125
3.2. Estudio de la longitud de las cadenas laterales aminoéticas.	125
3.3. Análisis por SPR de la interacción de IIB _h con Rev ₃₄₋₅₀ y ligandos orgánicos.	131
3.4. Inhibición de la interacción IIB _h -Rev ₃₄₋₅₀ por moléculas bifenílicas y terfenílicas y neomicina B, evaluada mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia.	133
3.5. Experimentos de infección, transfección y toxicidad celular.	135

Capítulo 1

Introducción general

1.1. Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos están formados por nucleótidos, constituidos a su vez por tres componentes: una base nitrogenada, un azúcar de tipo furanosa y un grupo fosfato (Figura 1.1 A). La base se encuentra unida covalentemente a través de un enlace N- β -glucosídico con el carbono 1' de la pentosa, mientras que el fosfato está esterificado con el carbono 5'[1].

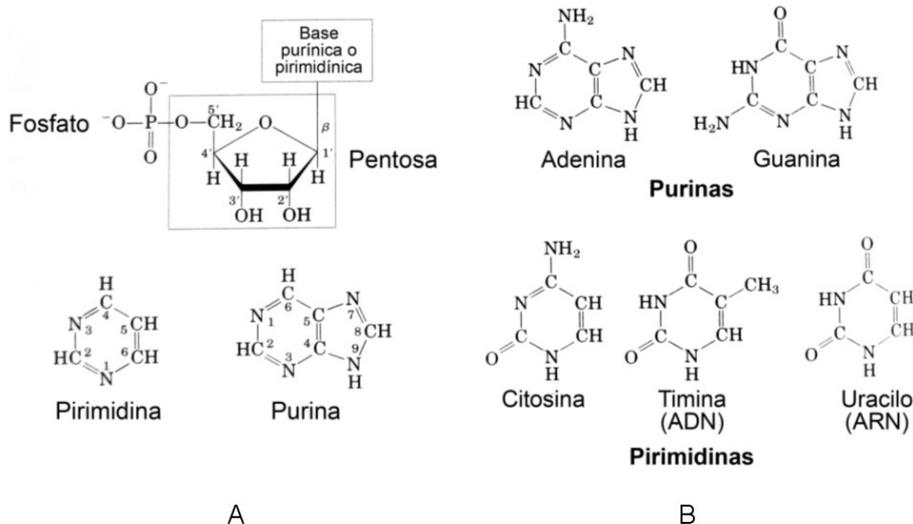


Figura 1.1: A) Estructura y numeración de los nucleótidos. B) Principales bases de los ácidos nucleicos.

Las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos derivados de pirimidina o purina. Tanto el ADN como el ARN contienen dos bases púricas principales: adenina (A) y guanina (G). En el caso de las bases pirimidínicas, la citosina (C) se encuentra en ambos tipos de ácidos nucleicos, mientras que la timina (T) es casi exclusiva del ADN, y el uracilo (U) lo es del ARN (Figura 1.1 B). Tanto el ADN como el ARN contienen también bases cuya estructura química es distinta de las principales, por lo que se las conoce como bases modificadas. En el caso del ADN la base modificada más abundante es la 5-metilcitosina (MeCyt)[2; 3], mientras que en el ARN pueden destacarse la pseudouridina, la dihidrouridina y la queuosina, entre otras muchas[4].

Las bases púricas y pirimidínicas son relativamente insolubles en agua a pH

fisiológico, y este carácter hidrofóbico es responsable de uno de los principales tipos de interacción entre las bases: las interacciones de apilamiento, que sitúan paralelamente los planos de los anillos de dos o más bases. Estas interacciones son de gran importancia en la estabilización de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos[5], y son el resultado de varios efectos. Por un lado, las fuerzas de van der Waals son proporcionales a la superficie de apilamiento, lo que explica que, generalmente, las purinas se apilen más fuertemente que las pirimidinas. Otra consecuencia del apilamiento es que se minimiza el contacto de las bases con el agua, lo cual es entrópicamente favorable. Existe además un componente electrostático que contribuye a que la disposición de las bases apiladas optimice las interacciones entre sus cargas, y que proporciona especificidad al apilamiento[6]. El otro tipo principal de interacciones entre las bases son los enlaces de hidrógeno, que se producen entre un átomo electronegativo (aceptor) y un átomo de hidrógeno unido a otro átomo electronegativo (dador). En los ácidos nucleicos existen dos tipos principales de enlaces de hidrógeno: $N - H \cdots N$ y $N - H \cdots O$, donde $N - H$ puede ser una amina o una imina. La importancia de estas interacciones radica en que permiten la asociación complementaria de dos cadenas de ácido nucleico, a través de la interacción entre grupos funcionales pertenecientes a bases distintas. Los casos más habituales son la asociación de pares G · C (tres enlaces de hidrógeno, con una energía total de estabilización de -27,5 kcal/mol) y pares A · T o A · U (dos enlaces de hidrógeno, energías totales de estabilización de -15,0 y -14,5 kcal/mol, respectivamente)[7].

Los ácidos nucleicos contienen dos tipos de furanosas: β -D-2'-desoxirribosa en el ADN y β -D-ribosa en el ARN, con un grupo OH en 2'. Estos anillos de β -furanosa no son planos, sino que presentan dos conformaciones mayoritarias, denominadas sobre (cuatro átomos del anillo en el plano y el quinto fuera del plano), y silla (tres átomos en el plano y dos fuera, en lados opuestos), como puede verse en la Figura 1.2 A. Estas conformaciones se representan mediante las letras E (*envelope*) y T (*twist*), respectivamente. Los átomos fuera del plano se denominan *endo* o *exo* dependiendo de si están situados en el mismo lado que el átomo C5' o en el opuesto, respectivamente.

En cada nucleótido existen siete ángulos diedros o ángulos de torsión: seis de ellos caracterizan la conformación del esqueleto azúcar-fosfato (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) y el séptimo (χ) define la orientación de la base respecto del azúcar (Figura 1.2 B). La conformación de la pentosa se define asimismo por cinco ángulos de torsión endocíclicos: ν_0 , ν_1 , ν_2 , ν_3 y ν_4 (Figura 1.2 B). Sin embargo, debido a que en el anillo todos los ángulos y longitudes de enlace son similares, esta conformación puede describirse utilizando dos parámetros: el ángulo de pseudorrotación (P) y la amplitud de *puckering* (ν_m)[1].

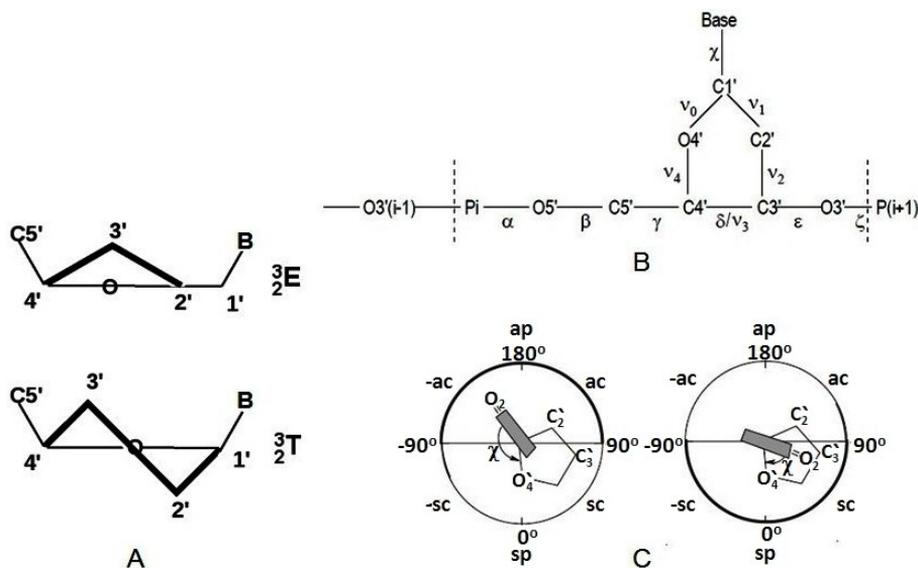


Figura 1.2: A) Conformaciones *sobre* y *silla* del anillo de ribosa. B) Angulos de torsión del esqueleto azúcar-fosfato. C) Orientaciones *anti* y *sin* de la base respecto del azúcar.

El ángulo de pseudorrotación se calcula mediante la siguiente expresión:

$$P = \arctan \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2(\text{sen}36 + \text{sen}72)} \quad (1.1)$$

En función de su valor, indica si la furanosa adopta una forma de *sobre* (E) o *silla* (T), y qué átomos del azúcar están fuera del plano definido por los otros, según se describe en la Figura 1.3. Aunque el valor de este ángulo puede oscilar entre 0 y 360°, en la mayor parte de los casos los valores están entre 0 y 18° (conformación Norte o N, aproximadamente C3'-endo, en el caso de dobles hélices de ARN y ADN en conformación A), o entre 162 y 180° (conformación Sur o S, aproximadamente C2'-endo, en el caso de dobles hélices de ADN en conformación B). Por otro lado, la amplitud de *puckering* indica en qué extensión se desvían los átomos del plano, y se obtiene mediante la ecuación:

$$\nu_m = \frac{\nu_2}{\cos P} \quad (1.2)$$

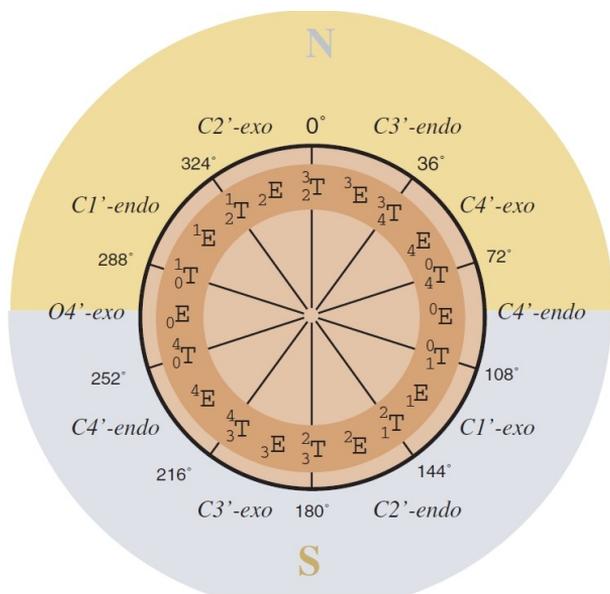


Figura 1.3: Conformaciones del anillo de ribosa en función del ángulo de pseudorrotación P.

Por último, la base nitrogenada puede adoptar dos orientaciones principales en relación con el anillo de ribosa: *sin* ($\chi = 0 \pm 90^\circ$) o *anti* ($\chi = 180 \pm 90^\circ$). (Figura 1.2 C). En la conformación *anti*, el anillo de pirimidina de las purinas y el átomo O2 de las pirimidinas se encuentran en el lado opuesto al anillo de ribosa, mientras que en la conformación *sin* están situados sobre el anillo de ribosa. Por lo tanto, debido a menores impedimentos estéricos, generalmente la conformación preferida por los nucleótidos es *anti*[1].

En el ADN y el ARN el grupo hidroxilo del carbono 5' de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo del carbono 3' del nucleótido siguiente mediante un enlace fosfodiéster (Figura 1.4 A). Por lo tanto, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en grupos alternados de fosfato y azúcar, mientras que las bases nitrogenadas pueden considerarse como grupos laterales unidos a este esqueleto. Las cadenas azúcar-fosfato del ADN y el ARN son hidrofílicas. Los grupos hidroxilo de los azúcares pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, mientras que los grupos fosfato tienen un pK_a cercano a 0 y se encuentran completamente ionizados a pH neutro, por lo que los ácidos nucleicos son moléculas polianiónicas.

Cada cadena de ácido nucleico tiene una polaridad específica y extremos 5' y

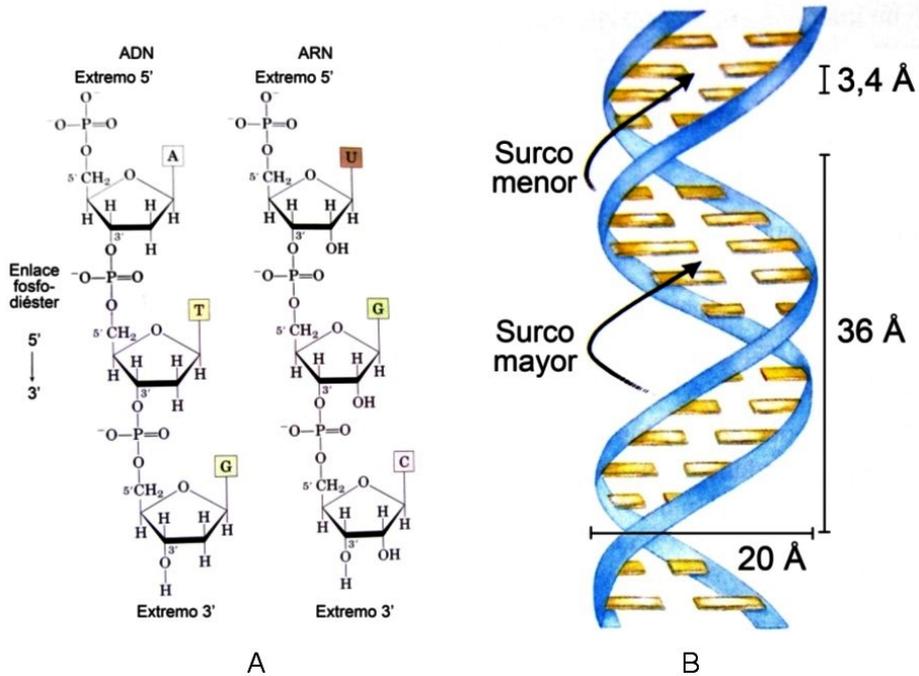


Figura 1.4: A) Esqueleto fosfodiéster de los ácidos nucleicos. B) Modelo de Watson y Crick de la estructura del ADN (conformación B).

3' (Figura 1.4 A). La estructura de una cadena o hebra sencilla de ácido nucleico se escribe siempre, por convenio, con el extremo 5' a la izquierda y el 3' a la derecha; es decir, en la dirección $5' \rightarrow 3'$. La geometría de un determinado par de bases, así como su posición respecto a otros pares y al eje de la molécula de ácido nucleico, están caracterizadas por una serie de parámetros helicoidales, que se describen en la Figura 1.5.

1.2. El ácido desoxirribonucleico (ADN)

La investigación bioquímica del ADN se remonta al siglo XIX, cuando Friedrich Miescher determinó la presencia de una sustancia ácida que contenía fósforo en el núcleo celular, pero no es hasta la década de 1940 cuando se empiezan a producir grandes avances en el conocimiento estructural y funcional del ADN. El experimento de Avery-McLeod-McCarty permitió demostrar que el ADN es portador de la información genética de la célula, mientras que Erwin Chargaff realizó importantes descubrimientos relativos a su composición en bases. A su vez, las investigaciones por difracción de rayos X aportaron los primeros datos sobre su estructura tridimensional.

En 1953 Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la es-

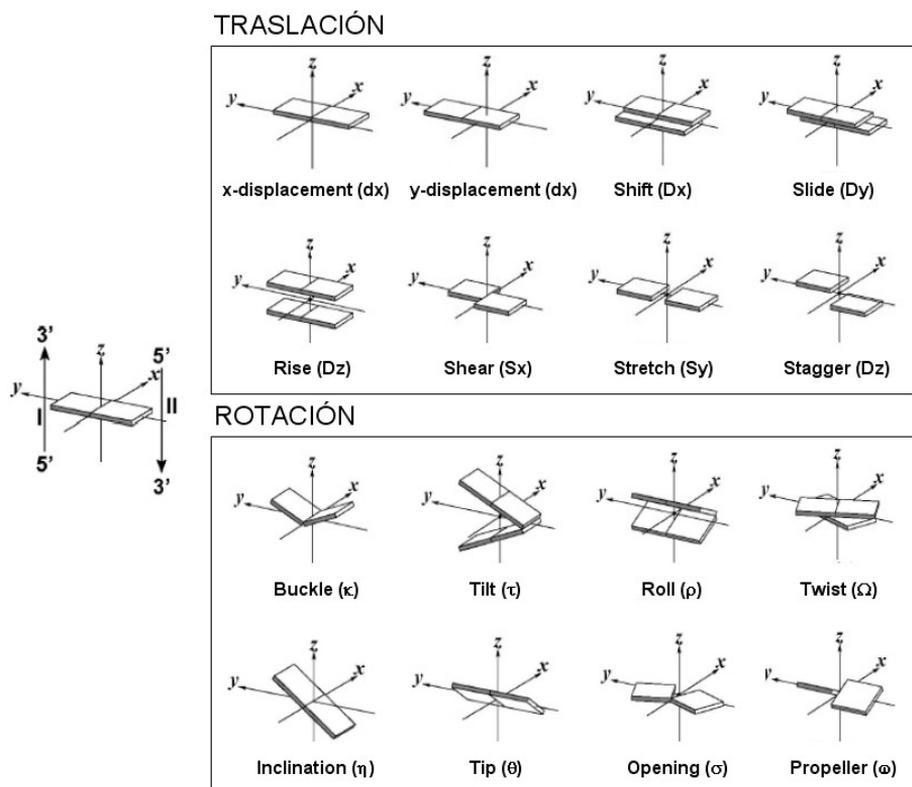


Figura 1.5: Parámetros helicoidales de los ácidos nucleicos.

estructura del ADN que tenía en cuenta todos los datos recopilados hasta ese momento[8]. Este modelo consistía en dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor del mismo eje, formando una doble hélice. La relación espacial de las dos cadenas da lugar a la formación de un surco mayor y un surco menor, y las hebras complementarias de ADN son antiparalelas entre sí; es decir, tienen direcciones $5' \rightarrow 3'$ opuestas. Los esqueletos hidrofílicos formados por las desoxirribosas y los grupos fosfato están en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante, y las bases púricas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior, con sus estructuras en anillo (hidrofóbicas y planas) situadas a muy corta distancia unas de otras y perpendiculares al eje longitudinal de la hélice (Figura 1.4 B). Cada base de una cadena está apareada en el mismo plano con una base de la cadena complementaria. Los apareamientos más habituales son G · C (mediante tres enlaces de hidrógeno) y A · T (dos enlaces de hidrógeno). Estos dos tipos de interacciones específicas (enlaces de hidrógeno y apilamiento de las bases) confieren al ADN su estabilidad estructural.

Debido a la libertad de giro en torno a los enlaces nucleotídicos (torsiones α y ζ), la doble hélice de ADN puede adoptar distintas conformaciones (Tabla 1.1). Las más importantes son la A y la B, y en menor medida, la Z. La forma B es la estructura más estable adoptada por el ADN en condiciones fisiológicas, mientras que las variantes A y Z se han observado en condiciones cristalográficas de deshidratación y alta concentración de iones. El ADN-B se caracteriza por ser una doble hélice dextrógira, con 10 pares de bases por vuelta de hélice, conformación *C2'-endo* en los azúcares y orientación *anti* de las bases respecto del anillo de desoxirribosa. Los pares de bases son casi perpendiculares al eje de la hélice. El ADN-A también es dextrógira; sin embargo, la conformación del azúcar es *C3'-endo*, y los pares de bases no son perpendiculares respecto al eje de la hélice, lo que provoca que su estructura sea más compacta (menor distancia entre pares de bases adyacentes) y los surcos sean diferentes: el surco mayor es más estrecho y el surco menor es más amplio y superficial. El ADN-Z presenta unas diferencias estructurales aún mayores, al tratarse de un dúplex levógira en el que pueden observarse conformaciones *C2'-endo/anti* (citosina y timina) y *C3'-endo/sin* (adenina y guanina), de manera que la identidad repetitiva es un dinucleótido. Es una doble hélice más alargada (12 nucleótidos por vuelta), sin diferencias significativas entre surco mayor y surco menor (Figura

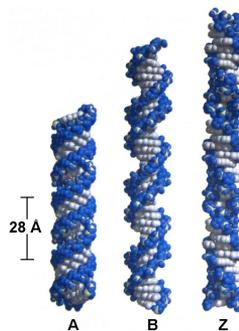


Figura 1.6: Formas A, B y Z del ADN.

1.6)[1].

Tabla 1.1: Comparación de las formas A, B y Z del ADN.

	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Diámetro	~26Å	~20Å	~18Å
Pares de bases por vuelta de hélice	11	10,5	12
Desplazamiento de la hélice por par de bases	2,6Å	3,4Å	3,7Å
Inclinación de la base respecto al eje de la hélice	20°	6°	7°
Conformación del azúcar	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (C,T) C3'-endo (A,G)
Conformación del enlace glucosídico	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> (C,T) <i>sin</i> (A,G)

Algunas secuencias de ADN pueden adoptar estructuras inusuales, distintas de la doble hélice B. Algunas de estas estructuras constan de tres o cuatro hebras. A pesar de ser menos abundantes, tienen importancia biológica porque suelen formarse en lugares donde se regulan importantes procesos del metabolismo del ADN (replicación, recombinación o transcripción). Las bases implicadas en apareamientos Watson-Crick pueden formar enlaces de hidrógeno adicionales a través de grupos funcionales situados en el surco mayor. Estos apareamientos se conocen como apareamientos Hoogsteen y permiten la formación de ADN de triple hebra[9]. También es posible la asociación de cuatro hebras para formar un cuádruplex. Los cuádruplex de guanina[10] pueden formarse en los telómeros y centrómeros de los cromosomas, así como en diversas secuencias promotoras. Los motivos-i[11] también implican la asociación de cuatro hebras de ADN, y están formados por pares C · C en los que una de las bases de citosina está protonada.

1.3. El ácido ribonucleico (ARN)

El ARN está formado, al igual que el ADN, por una secuencia de nucleósidos unidos entre sí mediante grupos fosfato cargados negativamente. Existen tres diferencias principales entre el ADN y el ARN. Dos de ellas tienen que ver con su composición química: el ARN posee un grupo hidroxilo en la posición 2' del anillo de ribosa, y uracilo en lugar de timina. La tercera diferencia estriba en que las moléculas de ARN carecen de una hebra complementaria.

Sin embargo, el ARN utiliza con frecuencia regiones complementarias o pseudocomplementarias para autoaparearse y dar lugar a estructuras de doble hélice. Por tanto, la doble hélice es la unidad estructural fundamental del ARN, al igual que ocurre con el ADN. Las reglas de apareamiento entre bases son similares a las del ADN, por lo que predominan los pares G · C y A · U. Además de estos pares de bases canónicos en el ARN se han detectado un gran número de apareamientos no canónicos (Figura 1.7)[12].

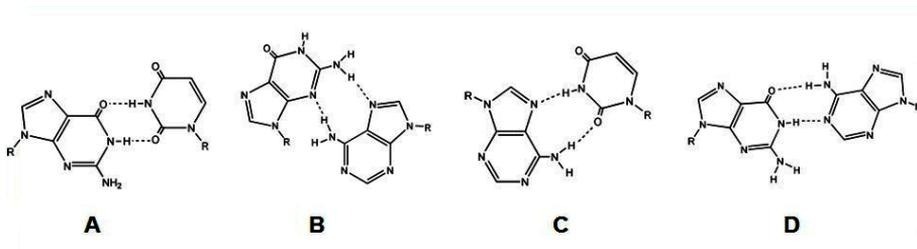


Figura 1.7: Apareamientos no canónicos más habituales en el ARN: A) GU *wobble*; B) GA *sheared*; C) AU Hoogsteen reverso; D) GA imino.

La doble hélice del ARN es de tipo A, en lugar de la conformación B preferida por el ADN. La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2' hace que el anillo de ribosa tenga una conformación C3'-*endo*, ya que la conformación C2'-*endo* está impedida estéricamente. Por tanto, el surco mayor de las dobles hélices de ARN es estrecho y profundo, poco accesible para las proteínas, y el surco menor más amplio pero superficial[1].

Debido a que las dobles hélices de ARN se forman generalmente por el plegamiento de una sola hebra, no existe la regularidad observada en el ADN, y con frecuencia se observan interrupciones en la doble hélice a causa de bases no apareadas o apareadas mediante pares no canónicos, que definen la estructura secundaria propia del ARN (Figura 1.8). Estas discontinuidades dan lugar a la formación de protuberancias (conteniendo bases desapareadas en una única he-

bra), bucles internos (con bases desapareadas o formando pares no canónicos en ambas hebras) e intersecciones entre tres o más hélices. Las horquillas de ARN están formadas por una región de doble hélice (denominada tallo) y un bucle terminal (región desapareada situada en el extremo) (Figura 1.8). La estructura terciaria del ARN es el resultado de la interacción entre elementos de estructura secundaria, a través principalmente de contactos de van der Waals, interacciones de apilamiento y enlaces de hidrógeno, que dan como resultado una estructura tridimensional más o menos compleja[13; 14] (Figura 1.9).

Esta diversidad estructural es la responsable de que el ARN desempeñe un gran número de funciones biológicas, siendo más versátil en este sentido que el ADN, que actúa principalmente como medio de almacenamiento de la información genética. El ARN mensajero contiene la información genética del ADN necesaria para la síntesis de proteínas. En este proceso están también involucrados el ARN ribosómico y el ARN de transferencia. Además de estas funciones características, el ARN participa en numerosos procesos de regulación de la expresión génica. Por ejemplo, los ARN de interferencia son secuencias cortas capaces de suprimir específicamente la expresión de determinados ARNm[15]. Los ribointerruptores son estructuras formadas por ARN mensajero a las que pueden unirse metabolitos; esta interacción induce cambios conformacionales que regulan la expresión del gen codificado por el mensajero[16].

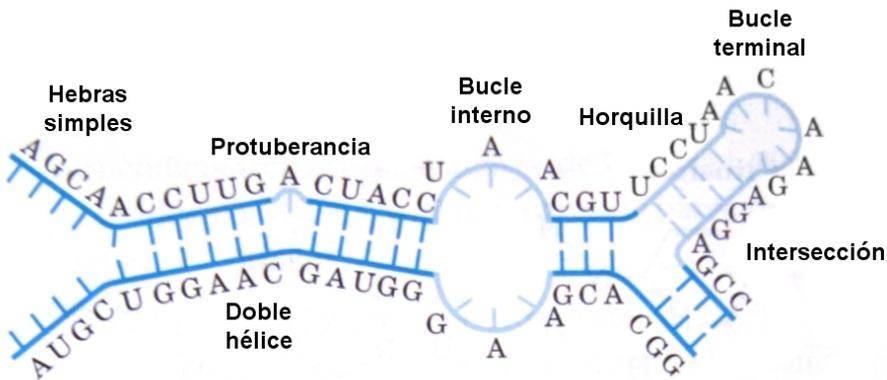


Figura 1.8: Elementos de la estructura secundaria del ARN.

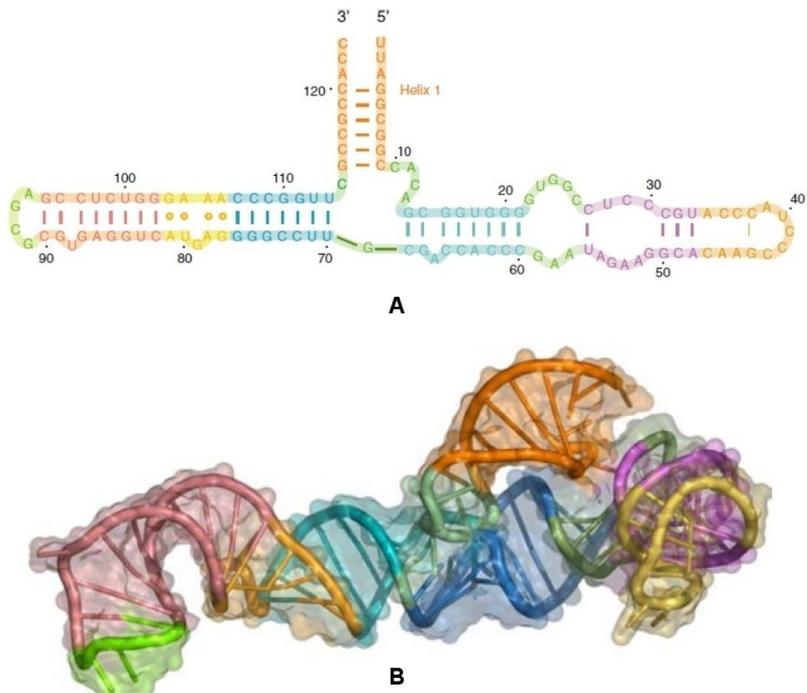


Figura 1.9: Estructuras secundaria y terciaria del ARN.

1.4. Fundamentos de las técnicas experimentales aplicadas

1.4.1. Purificación de ácidos nucleicos basada en electroforesis en gel

La necesidad de un protocolo de purificación de ácidos nucleicos se justifica por el hecho de que tras el proceso de síntesis automática o enzimática, existe una cierta proporción de secuencias secundarias e impurezas que deben ser eliminadas antes de la realización de experimentos. Los pasos del protocolo utilizado en esta tesis se describen a continuación.

1.4.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis es una técnica de separación basada en las diferentes velocidades de migración de los componentes de una mezcla cuando son sometidos a un campo eléctrico. La separación tiene lugar cuando se desplazan través de un medio viscoso apropiado. Dado que los ácidos nucleicos son especies polianiónicas, al existir un campo eléctrico migran hacia el polo positivo a una velocidad dada por la siguiente expresión:

$$v = \frac{qE}{6\pi R\eta} \quad (1.3)$$

donde q es la carga, E es la intensidad del campo eléctrico, η es la viscosidad del medio y R el radio, asumiendo partículas esféricas. Aunque los ácidos nucleicos no son partículas esféricas, se cumple que las secuencias de mayor longitud migran a menor velocidad que las más cortas. La utilización de urea u otros agentes desnaturalizantes asegura la desaparición de las posibles estructuras formadas por el ácido nucleico, de manera que la velocidad de migración sólo depende del tamaño y la carga. Por lo tanto, en este paso de la purificación se separa el ADN o ARN de interés de secuencias más cortas generadas durante el proceso de síntesis automática o enzimática.

1.4.1.2. Electroelución

El propósito de la etapa de electroelución es extraer el ácido nucleico del gel de poliacrilamida en el que se encuentra después de la electroforesis. El mecanismo es similar: se aplica un campo eléctrico entre dos polos, esta vez en un medio acuoso. El ácido nucleico migra hacia el polo positivo, separándose del gel, y atravesando una membrana de nitrocelulosa (permeable al ácido nucleico e impermeable a la poliacrilamida) para almacenarse entre esta membrana y otra impermeable, y poder ser recuperado.

1.4.1.3. Precipitación en etanol

Después de la electroelución, el volumen en el que se encuentra disuelto el ácido nucleico es elevado y contiene una alta concentración de sales. Por lo tanto, el objetivo del paso de precipitación es concentrar el ácido nucleico y reducir la concentración salina. Para realizar este proceso se añaden una sal (generalmente acetato sódico), y etanol. Debido a su esqueleto azúcar-fosfato, el ácido nucleico tiene carácter hidrofílico y se encuentra disuelto en medio acuoso. Los iones Na^+ del acetato sódico neutralizan los grupos fosfato del ácido nucleico y el etanol disminuye la constante dieléctrica del medio ($\epsilon_{EtOH} = 24$), favoreciendo la precipitación del ácido nucleico. Debido a que la solubilidad desciende con la temperatura, este proceso normalmente se lleva a cabo a temperaturas inferiores a 0 °C. Finalmente, el sobrenadante y el precipitado se separan por centrifugación.

1.4.1.4. Desalado y diálisis

Con el fin de eliminar completamente la presencia de sales se utiliza un paso de cromatografía de exclusión, en el que el ácido nucleico se hace pasar por una columna que contiene un gel de dextrano (Sephadex). El tamaño de poro de este gel no permite el paso de las moléculas de ácido nucleico, de elevado peso molecular, pero sí de las sales. Por tanto el ácido nucleico atraviesa más rápidamente la fase estacionaria que las sales, lo que permite su separación.

Las últimas fases de la purificación del ácido nucleico tienen como objetivo ajustar la concentración de sales y el pH del medio. En la etapa de diálisis, el ácido nucleico se introduce en una membrana semipermeable (generalmente de nitrocelulosa, que permite únicamente el paso de iones de pequeño tamaño) y

se sumerge en un tampón. De esta manera, mediante un proceso de difusión la fuerza iónica y el pH de la muestra se equilibran con los del medio.

1.4.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Desde los trabajos iniciales de Richard Ernst (Premio Nobel de Química en 1991), quien propuso y desarrolló las bases teóricas de la RMN bidimensional basada en pulsos electromagnéticos[17], esta técnica ha sido aplicada a numerosos campos. Kurt Wüthrich (Premio Nobel de Química en 2002) estableció las bases metodológicas de la aplicación de esta técnica al estudio de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas[18].

Los datos experimentales extraídos de los experimentos de RMN permiten obtener estructuras tridimensionales con un grado de detalle similar al obtenido mediante difracción de rayos X, proporcionan información sobre procesos dinámicos en un amplio rango de escalas de tiempo (desde ps a ms), y posibilitan caracterizar procesos de reconocimiento molecular. Además, esta técnica examina moléculas en disolución, un entorno similar a su medio natural. La mayor limitación de la espectroscopía de RMN estriba en el tamaño de las moléculas que se pueden analizar. En los últimos años se han producido avances en este aspecto, pudiéndose determinar estructuras formadas por ácidos nucleicos de hasta 100 nucleótidos[19] gracias al empleo de imanes superconductores de alto campo (de más de 20 Tesla, que corresponden a una frecuencia de resonancia de 1 GHz para ^1H), y al marcaje isotópico con ^{15}N , ^{13}C y ^2H de las moléculas de ADN[20] y ARN[21]. En muestras naturales, después del ^1H el segundo núcleo más importante para el estudio de los ácidos nucleicos es el ^{31}P , gracias a sus buenas propiedades espectroscópicas ($I = 1/2$, abundancia natural del 100 % y radio giromagnético elevado (17,23)), ya que proporciona información sobre la conformación del esqueleto azúcar-fosfato[22; 23].

1.4.2.1. Adquisición de espectros

El primer paso en la realización de un estudio estructural por RMN de una molécula de ADN o ARN es la obtención de un espectro monodimensional en agua ligera (90 % H_2O y 10 % D_2O). Aunque insuficientes para asignar los núcleos del sistema, estos espectros proporcionan una primera información útil sobre la estructura secundaria (apareamiento de bases) adoptada por ácido nucleico en

base al desplazamiento químico de los protones intercambiables de las bases. En estos experimentos se utilizan secuencias de supresión de la señal del agua, como *watergate*[24] (*water suppression by gradient-tailored excitation*), que emplea gradientes y pulsos que desenfocan y reenfochan selectivamente las señales de interés a la vez que se desenfoca la señal del agua (Figura 1.10 A); o experimentos de tipo *jump-and-return*[25], basados en el envío de la magnetización del disolvente al eje z mediante un segundo pulso de 90° de tal manera que no sea observable durante la fase de adquisición (Figura 1.10 B).

Para asignar los núcleos del sistema y analizar las propiedades del mismo se utilizan experimentos bidimensionales y multidimensionales. En la Figura 1.11 se muestra el esquema general de un espectro bidimensional. La principal diferencia es la introducción de un pulso de excitación, P_1 , seguido de un tiempo de evolución variable, t_1 . Después, como en cualquier experimento monodimensional, se aplica un pulso de observación, P_2 , seguido de un período de tiempo t_2 en el que se registra la FID. Por lo tanto, la influencia del primer pulso en la FID adquirida depende de la duración del tiempo t_1 que transcurre entre los dos pulsos, lo que permite la generación de una segunda dimensión mediante la repetición del experimento utilizando una serie de incrementos en t_1 [17; 18].

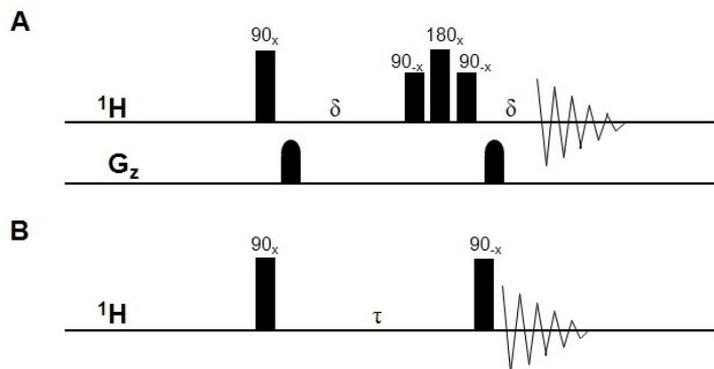


Figura 1.10: Secuencias de supresión de la señal del agua: *watergate* (A) y *jump-and-return* (B).

Además de experimentos bidimensionales homonucleares ($^1\text{H} - ^1\text{H}$), también se utilizan experimentos 2D heteronucleares, en los que la señal medida en la dimensión indirecta corresponde a un núcleo distinto del ^1H , generalmente ^{31}P , ^{13}C o ^{15}N en el campo de la RMN de ácidos nucleicos. Los experimentos en tres dimensiones se obtienen mediante la adición de una segunda dimensión indirecta.

Es decir, la secuencia de pulsos incluye dos tiempos de evolución (t_1 y t_2), y un tiempo t_3 en el que se registra la FID[22; 23].

En la presente tesis se han utilizado principalmente experimentos bidimensionales homonucleares, entre los que cabe destacar los siguientes:

- Experimento COSY (*CO*related *SpectroscopY*)[17]: correlaciona núcleos acoplados escalarmente a través de electrones de enlace y separados por dos o tres enlaces. Consiste en un primer pulso de 90° que genera la magnetización transversal, seguido de un tiempo de evolución t_1 . Mediante un segundo pulso de 90° se transfiere la magnetización entre los espines que están acoplados escalarmente. Existen variantes de este experimento, como el DQF-COSY (*Double Quantum Filtered Cosy*), que elimina las colas dispersivas en torno a la diagonal y posibilita la detección de picos de cruce que de otro modo quedarían enmascarados por estas colas[18].
- Experimento TOCSY (*TO*tal *CO*relation *SpectroscopY*)[26]: correlaciona un protón con todos los pertenecientes a su sistema de espín. Como en el experimento COSY, mediante un pulso de 90° se genera magnetización transversal, que evoluciona durante el tiempo t_1 . Durante el tiempo de mezcla (que tiene lugar a continuación) se ejecuta una serie de pulsos repetitivos que, mediante lo que se conoce como bloqueo de espines o *spinlock*, permite convertir un conjunto de espines débilmente acoplados en un sistema de espines fuertemente acoplados.
- Experimento NOESY (*Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY*)[27; 28; 29]: se basa en el efecto nuclear Overhauser y correlaciona protones cercanos en el espacio. Consiste en un pulso de excitación de 90° seguido de un tiempo t_1 de evolución de la magnetización transversal. Un segundo pulso de 90° genera magnetización longitudinal, diferente para cada espín (dependiendo de la evolución de cada núcleo durante el tiempo t_1). A continuación, durante el tiempo de mezcla t_m , los núcleos se relajan, transfiriendo magnetización longitudinal a otros núcleos próximos en el espacio. Por último, un tercer pulso de 90° transforma esta magnetización en transversal, detectable. La intensidad de un pico NOE es proporcional al tiempo de mezcla (t_m) y decrece con la sexta potencia de la distancia interprotónica. En líneas generales, picos NOE fuertes, intermedios y débiles corresponden a distancias interprotónicas del orden de 2-3,5 Å, 3,5-4,5 Å o superiores a 4,5 Å, respectivamente. El experimento NOESY, a pesar de ser clave para la obtención de información estructural, presenta algunos problemas:

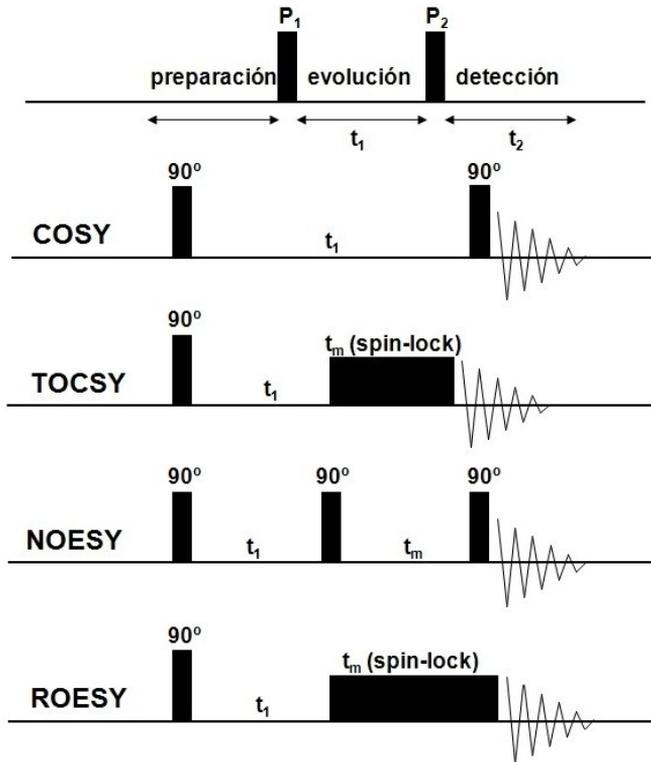


Figura 1.11: Secuencias básicas de pulsos de los espectros bidimensionales más habituales.

- No permite distinguir si los picos de correlación se deben a una interacción dipolar entre dos núcleos próximos en el espacio o al intercambio químico o conformacional (en el que el pico cruzado correlaciona dos protones en intercambio).
 - Puede aparecer el fenómeno de difusión de espín, dando lugar a picos que correlacionan dos núcleos que no están próximos en el espacio pero que se han transferido la magnetización a través de un tercer núcleo que se encuentra próximo a ambos. Esta dificultad puede solucionarse adquiriendo espectros NOESY a distintos tiempos de mezcla (una horquilla razonable para ácidos nucleicos es entre 100 y 400 ms).
- Experimento ROESY (*Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectros-*

copY)[30]: permite distinguir entre picos de correlación dipolar (de signo contrario a los de la diagonal) y los que derivan de un proceso de intercambio químico o conformacional (del mismo signo que los de la diagonal), por lo que suele combinarse con el NOESY para solucionar el problema descrito en el punto anterior. Su programa de pulsos es similar al del experimento TOCSY, aunque en este caso se emplean pulsos de *spinlock* más débiles con el fin de evitar señales de acoplamiento escalar.

1.4.2.2. Asignación de espectros y sistemas de espín

El primer paso para realizar un estudio de una muestra por RMN es la asignación de resonancias a átomos concretos. Este proceso puede ser significativamente complejo en el caso de los ácidos nucleicos, ya que la existencia de sólo cuatro nucleótidos implica abundantes repeticiones y da lugar al solapamiento de las señales. En la Tabla 1.2 se muestran los desplazamientos químicos típicos de los protones de los diferentes nucleótidos, expresados en ppm.

La asignación se realiza con la ayuda de espectros bidimensionales y multidimensionales, siguiendo un procedimiento basado en la combinación de experimentos de correlación escalar (TOCSY, COSY) para la identificación de los diferentes sistemas de espín, y experimentos de correlación dipolar (NOESY), que permiten asignar los diferentes sistemas de espín a residuos específicos de la cadena del ácido nucleico que se está estudiando[18; 22; 23].

Las resonancias correspondientes a los distintos tipos de protones se encuentran en diferentes regiones de desplazamiento químico. Los protones aromáticos resuenan a frecuencias parecidas en ADN y ARN. Sin embargo, en el caso del azúcar, en el ADN los protones H2' y H2'' resuenan a un campo más alto que H3', H4', H5' y H5'', mientras que en el ARN todos los protones del azúcar excepto H1' se encuentran en la misma región de desplazamiento químico, lo que hace más difícil la asignación en este último caso (Tabla 1.2).

La identificación de los diferentes sistemas de espín se lleva a cabo a partir de los picos de correlación escalar en los espectros TOCSY y COSY. Cada ribosa constituye un sistema de espín aislado del resto de la molécula en el que pueden encontrarse picos de correlación COSY H1'-H2'/H2'', H2'-H2'', H2'/H2''-H3', H3'-H4', H4'-H5'/H5'' y H5'-H5''. Respecto a las bases, la citosina, el uracilo y la timina tienen protones acoplados escalarmente que permiten identificarlas fácilmente. En el caso de la citosina y el uracilo se observa un pico de correlación escalar entre los protones H5 y H6, separados por tres enlaces. Para la timina,

Tabla 1.2: Desplazamiento químico de los protones nucleotídicos de dobles hélices canónicas de ADN y ARN.

Protón (ADN)		Adenina	Citosina	Guanina	Timina
azúcar	H1'	5,7-6,4	5,2-6,0	5,3-6,2	5,4-6,2
	H2'	2,3-3,1	1,8-2,4	2,3-3,0	1,8-2,4
	H2''	2,4-3,2	2,1-2,7	2,4-3,1	2,1-2,7
	H3'	4,5-5,2	4,4-5,1	4,5-5,2	4,4-5,1
	H4'	4,0-4,6	3,9-4,5	3,8-4,4	3,9-4,5
	H5'	3,7-4,4	3,9-4,5	3,8-4,3	3,9-4,4
base	H5''	3,6-4,5	3,8-4,3	3,8-4,3	3,8-4,3
	H6/H8	7,6-8,6	6,9-7,8	7,4-8,2	7,0-7,8
	H2/H5/CH3	7,7-8,6	5,0-5,8	-	1,1-1,9
	H1/H3	-	-	11,5-13,5	12,5-14,5
Protón (ARN)		Adenina	Citosina	Guanina	Uracilo
azúcar	H1'	5,6-6,1	5,3-5,8	5,3-6,0	5,3-5,9
	H2'	4,4-5,0	4,1-4,6	4,3-4,8	4,1-4,7
	H3'	4,4-5,0	4,2-4,7	4,3-4,8	4,2-4,7
	H4'	4,2-4,8	4,0-4,8	4,2-4,7	4,1-4,7
	H5'	4,0-4,6	3,8-4,4	4,0-4,5	3,9-4,5
	H5''	4,0-4,6	3,6-4,3	4,0-4,5	3,8-4,4
base	H6/H8	7,6-8,4	7,4-8,0	7,2-8,0	7,4-8,0
	H5/H2	7,1-8,1	5,2-5,8	-	5,2-5,8
	H1/H3	-	-	11,4-13,4	12,1-14,3

se observa la correlación a través de cuatro enlaces entre los protones metílicos y H6. Si sólo se dispone de espectros $^1\text{H} - ^1\text{H}$, la asignación de cada ribosa a su base y la posición de cada nucleótido en la secuencia se realiza a partir de los picos cruzados observados en los espectros NOESY.

Para la asignación secuencial (en dirección $5' \rightarrow 3'$) se emplean picos NOE característicos de hélices dextrógiras estándar: los protones aromáticos (H6 en las pirimidinas y H8 en las purinas) presentan un pico NOE con los protones H1', H2' y H3' de su propio azúcar y con los mismos protones del anillo de ribosa del residuo anterior. Este proceso, aplicado a todos los residuos, y en combinación con la información extraída de los experimentos COSY y TOCSY, permite la asignación inequívoca de la secuencia de nucleótidos bajo análisis[18].

1.4.3. Resonancia superficial de plasmón (SPR)

Esta técnica permite obtener información acerca de la interacción entre moléculas de ADN o ARN y distintas especies. Debido a su alta sensibilidad es especialmente útil para estudiar complejos de alta afinidad, ya que permite trabajar a muy bajas concentraciones. La técnica se basa en medir cambios en el

índice de refracción de la superficie del biosensor como consecuencia de la interacción entre dos especies, una de las cuales está fijada a la superficie del chip [31], y permite la determinación de parámetros de interacción tales como velocidades de asociación (v_a) y disociación (v_d), número de moléculas de analito que se unen (n), constante de disociación de equilibrio (K_d) y cambios de entalpía (ΔH).

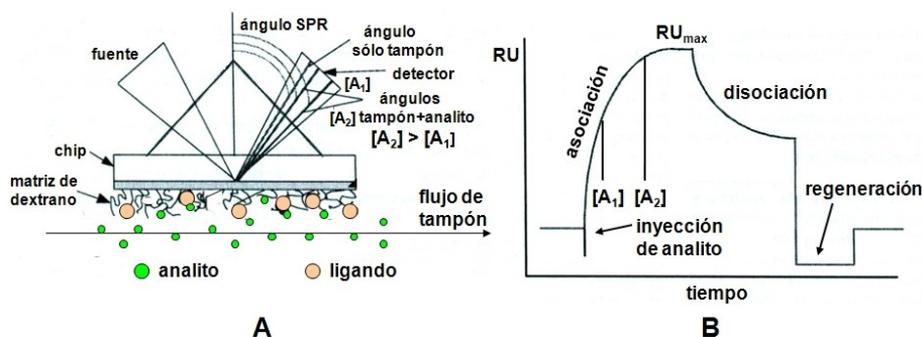


Figura 1.12: A) Esquema de los componentes y sistema de detección de un experimento de SPR. B) Etapas de un experimento típico de SPR y su efecto en un sensograma.

En la Figura 1.12 A pueden observarse los componentes esenciales para llevar a cabo experimentos de unión mediante esta técnica: un haz de luz polarizada incide sobre un chip biosensor provisto de una capa de oro, y es reflejado hacia el sistema de detección. En la otra cara de la capa de oro se sitúan los componentes de la superficie que intervienen en el experimento de unión: una matriz de dextrano sobre la que se inmoviliza el ligando (en el caso de los ácidos nucleicos lo más habitual es biotinilar uno de los extremos del oligonucleótido y emplear un chip provisto de estreptavidina, que aprovecha la fortaleza de la interacción biotina-estreptavidina), y un sistema de flujo que hace pasar durante un tiempo determinado la otra especie (analito) en disolución sobre la molécula inmovilizada.

El ángulo formado por el haz incidente y el haz reflejado (ángulo SPR) es medido por el detector. Este ángulo es sensible al índice de refracción de la superficie, que varía de manera proporcional a su masa, lo que proporciona información sobre el proceso de unión de las dos especies [31]. Los cambios en el valor del ángulo SPR son expresados en unidades de respuesta (RU), siendo una cantidad de 1000 RU s el equivalente a un cambio de masa de 1 ng/mm². La representación del cambio en RU en función del tiempo da lugar a un sensograma (Figura 1.12 B), en el que pueden apreciarse diferentes etapas que dependen de

la composición de la disolución que se está haciendo pasar sobre la superficie del chip[31]:

- Asociación: se hace pasar una disolución de analito a una determinada concentración, lo que provoca un aumento de RU s como consecuencia del cambio de masa, en caso de unión a la macromolécula.
- Disociación: al hacer pasar únicamente tampón, se produce la disociación del complejo macromolécula-analito, lo que supone una disminución de la masa y por lo tanto de RU s.
- Regeneración: su finalidad es eliminar restos de analito y que la superficie del chip presente las condiciones iniciales antes de un nuevo proceso de asociación.

Cuando la concentración de analito es saturante y el tiempo de la fase de asociación es suficientemente largo, el valor de RU alcanza su valor máximo, (RU_{max}). El ajuste de los valores RU_{max} en función de la concentración de analito permite determinar el valor de K_d [32], mientras que la estequiometría de la unión (n) se obtiene también a partir de RU_{max} mediante la siguiente relación:

$$n = \frac{RU_{max}}{RU_{max,pred}} \quad (1.4)$$

El valor teórico de RU_{max} para la unión de un determinado analito ($RU_{max,pred}$) [33; 34] se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$RU_{max,pred} = \frac{RU_i M_a}{M_m} \quad (1.5)$$

donde RU_i es la cantidad de ADN inmovilizado, M_a es el peso molecular del analito y M_m es el peso molecular de la macromolécula de ADN o ARN.

1.4.4. Espectroscopía de ultravioleta-visible

La cantidad de radiación de una determinada longitud de onda que un medio puede absorber depende de la naturaleza de la propia especie y de su concen-

tración y puede determinarse mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc \quad (1.6)$$

donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), b el paso óptico (en cm) y c la concentración (en molL^{-1}). En los ácidos nucleicos los cromóforos por excelencia son las bases nitrogenadas, ya que los grupos fosfato y los anillos de ribosa no presentan absorbancia significativa a longitudes de onda mayores de 220 nm. Las transiciones electrónicas que dan lugar a bandas de absorción más intensas son las $\pi - \pi^*$, que presentan un máximo alrededor de 260 nm, con coeficientes de extinción del orden de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ por nucleótido. En estructuras de doble hélice las nucleobases se apilan cara a cara e interaccionan a través de los electrones π , produciendo una disminución de la intensidad de la absorción en el espectro de ultravioleta, conocida como hipocromicidad[35], que depende de la secuencia de bases y de la estructura tridimensional del oligonucleótido.

Aprovechando estas propiedades, la espectroscopía de UV puede utilizarse para monitorizar el proceso de desnaturalización de los ácidos nucleicos, ya que al aumentar gradualmente la temperatura las estructuras de doble hélice formadas por éstos se rompen y la absorbancia aumenta. Este proceso de desnaturalización es un fenómeno cooperativo que da lugar, al representar la variación de absorbancia con temperatura, a una curva de tipo sigmoideo.

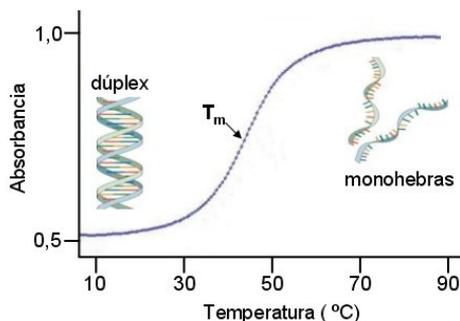


Figura 1.13: Ejemplo de experimento de desnaturalización térmica.

La monitorización de la variación de la absorbancia con la temperatura (Figura 1.13) se puede realizar partiendo de estructuras formadas e incrementando gradualmente la temperatura (curva de fusión), o al revés, comenzando a alta temperatura y disminuyéndola lentamente, permitiendo la renaturalización de las estructuras (curva de hibridación). Teóricamente ambas curvas son idénticas, ya que los procesos de desnaturalización y renaturalización son por lo general reversibles[36]. El punto de inflexión en la variación de la absorbancia con la temperatura se conoce como temperatura de fusión (T_m) y representa la temperatura en la que el 50 % de la muestra está en forma de dúplex y el 50 % en forma de hebra simple, por lo que es un buen parámetro para medir la estabi-

lidad térmica de la estructura bajo estudio. La T_m depende de la secuencia de bases, presencia de fármacos unidos al ácido nucleico y concentración de sales, entre otros factores[36; 37].

1.4.5. Calorimetría de valoración isotérmica (ITC)

La calorimetría de valoración isotérmica permite determinar diferentes magnitudes termodinámicas correspondientes al proceso de unión de un ligando a una macromolécula mediante la medición del calor desprendido o absorbido como consecuencia de este proceso.

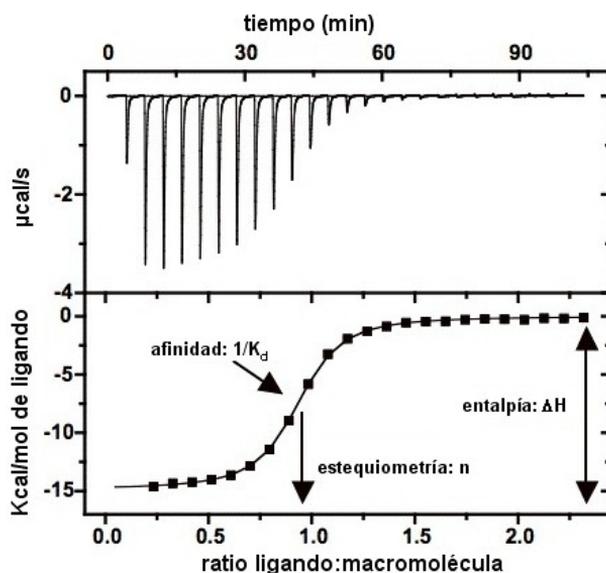


Figura 1.14: Ejemplo de experimento de ITC. En la parte superior se representa el calor absorbido o cedido tras cada inyección, cuya integración permite (en la imagen inferior) el cálculo de los parámetros de unión.

Un calorímetro ITC consiste en dos celdas idénticas (celda de muestra y celda de referencia) compuestas por un material térmicamente conductor, y aisladas del entorno por una cubierta adiabática. El oligonucleótido de ADN o ARN se encuentra disuelto en tampón en la celda de muestra (también puede introducirse el ligando y valorar con ADN o ARN), mientras que la celda de referencia contiene únicamente tampón. La macromolécula es valorada con una disolución de ligando, que por medio de una serie de inyecciones se añade a la celda de

muestra. El calor absorbido o desprendido da lugar a una diferencia de temperatura entre celdas (ΔT), proporcional a la fracción de ligando que se ha unido a la macromolécula[38; 39]. Habitualmente, los datos se recogen en gráficos que representan transferencia de calor ($\mu\text{cal/s}$) frente al tiempo. En el caso de que la formación del complejo macromolécula-ligando sea un proceso exotérmico, la variación de calor será negativa, dando lugar a picos negativos; en un proceso endotérmico se observan, por el contrario, señales positivas. Durante las primeras inyecciones, todo o casi todo el ligando adicionado se une a la macromolécula. Si la concentración de ligando aumenta lo suficiente, la macromolécula puede llegar a saturarse, dando lugar a picos de menor tamaño, al detectarse una menor cantidad de calor absorbido o desprendido. En la Figura 1.14 se muestra una representación típica de un proceso exotérmico con saturación, que permite la determinación de la entalpía de unión (ΔH_b), la estequiometría (n) y la constante de asociación, K_a . El valor de la entalpía de unión puede determinarse fácilmente a partir del área de los picos en la región no saturada, y la estequiometría es el ratio ligando:macromolécula correspondiente al punto de inflexión. Para la obtención de K_a se parte de su definición:

$$K_a = \frac{[M_1M_2]}{[M_1][M_2]} \quad (1.7)$$

donde $[M_1M_2]$, $[M_1]$ y $[M_2]$ son las concentraciones relativas de complejo y especies libres, respectivamente. La dificultad para determinar estos valores durante la valoración obliga a un tratamiento matemático más complejo, en el que K_a pueda relacionarse con concentraciones conocidas. Con este fin, $[M_1]$ y $[M_2]$ pueden expresarse como:

$$[M_1] = [M_1]_T - [M_1M_2] \quad (1.8)$$

$$[M_2] = [M_2]_T - [M_1M_2] \quad (1.9)$$

donde $[M_1]_T$ y $[M_2]_T$ son las concentraciones totales de macromolécula y ligando. Esto permite reescribir la ecuación 1.7 mediante:

$$K_a = \frac{[M_1M_2]}{([M_1]_T - [M_1M_2])([M_2]_T - [M_1M_2])} \quad (1.10)$$

Reordenando esta expresión se llega a una ecuación cuadrática, que se puede escribir como sigue considerando $[M_1 M_2]$ como incógnita:

$$[M_1 M_2] = \frac{1 + K_a[M_1]_T + K_a[M_2]_T - \sqrt{(1 + K_a[M_1]_T + K_a[M_2]_T)^2 - 4[M_1]_T K_a^2 [M_2]_T}}{2K_a} \quad (1.11)$$

En un modelo de unión más general, en el que la macromolécula contiene n sitios de unión que no interactúan entre sí, la concentración total de complejo después de la inyección i puede representarse por[40]:

$$[M_1 M_2]_i = \frac{1 + K_a[M_{1,i}]_T + nK_a[M_{2,i}]_T - \sqrt{(1 + K_a[M_{1,i}]_T + nK_a[M_{2,i}]_T)^2 - 4n[M_{1,i}]_T K_a^2 [M_{2,i}]_T}}{2K_a} \quad (1.12)$$

Por otro lado, el calor medido para cada inyección es proporcional al incremento de la concentración de complejo:

$$Q_i = V_0 \Delta H_b ([M_1 M_2]_i - [M_1 M_2]_{i-1}) \quad (1.13)$$

donde V_0 es el volumen total en la celda de muestra. La combinación de las ecuaciones 1.12 y 1.13 permite determinar los valores de K_a , ΔH_b y n mediante análisis de regresión no lineal, empleando el algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt.

1.4.6. Polarización de fluorescencia (FP)

La anisotropía de fluorescencia se produce cuando la luz emitida por un fluoróforo posee diferentes intensidades en distintos ejes de polarización. Dado que la mayoría de los sistemas biológicos no son fluorescentes, esta técnica tiene el inconveniente de requerir la preparación de muestras marcadas con un agente fluorescente. La probabilidad de que un fluoróforo absorba un fotón será tanto mayor cuanto menor sea el ángulo formado por su momento dipolar de absorción y el vector campo eléctrico de la radiación de excitación. La necesidad de trabajar con luz polarizada viene del hecho de que en la luz natural este vector no es direccional, y si la frecuencia es la adecuada, todas las moléculas tienen la misma

probabilidad de ser excitadas. Sin embargo, si los fluoróforos son excitados con luz polarizada, tendrán mayor probabilidad de ser excitadas las moléculas cuyo dipolo de absorción coincida con la dirección de polarización. Por su parte, la emisión de fluorescencia estará más polarizada si los dipolos emisores presentan una dirección preferencial, lo que depende de su movilidad o velocidad de tambaleo. Esta magnitud depende de la forma y el tamaño de la molécula que se está estudiando[41]. En general, cuanto mayor sea el tamaño de la molécula, menor será su movilidad, y mayor el grado de polarización (anisotropía) de fluorescencia.

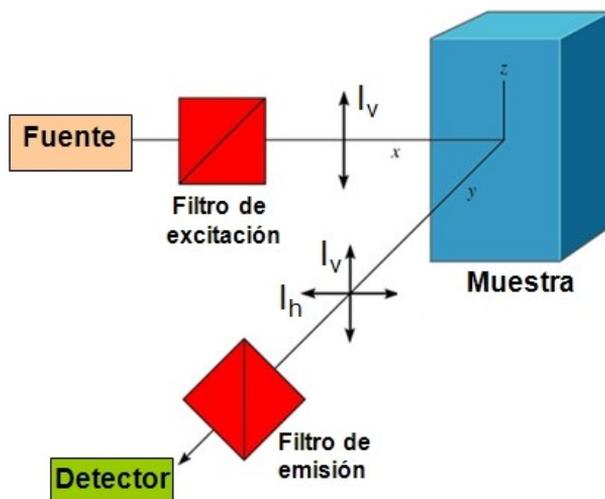


Figura 1.15: Esquema de un experimento de polarización de fluorescencia.

La medida de la polarización de fluorescencia es relativamente sencilla, tal como puede apreciarse en la Figura 1.15. En un experimento típico, la muestra con la sonda fluorescente es excitada con luz linealmente polarizada. A continuación, la luz de emisión pasa a través de dos polarizadores, uno paralelo al plano de la luz incidente (plano S) y otro perpendicular (plano P). La medida de la intensidad de luz emitida tras pasar por estos polarizadores permite calcular el valor de anisotropía (r) mediante la siguiente expresión[42]:

$$r = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h} \quad (1.14)$$

donde I_v e I_h son las intensidades en los planos paralelo y perpendicular,

respectivamente, al plano de excitación. En los ensayos de polarización de fluorescencia se utiliza un parámetro (el factor G) para corregir desviaciones que dependen de la muestra y las condiciones experimentales[43]. Este parámetro suele tener un valor próximo a la unidad. Teniendo en cuenta este factor:

$$r = \frac{I_v - GI_h}{I_v + 2GI_h} \quad (1.15)$$

Esta técnica tiene importantes aplicaciones en el estudio de interacciones macromolécula-ligando. Es posible medir el grado de unión de un ligando marcado con un fluoróforo a una macromolécula, ya que en el complejo macromolécula-ligando el valor de anisotropía será mayor que el del ligando libre. Asimismo, se pueden realizar ensayos de competición, en los que un ligando no marcado desplaza a otro marcado que está formando un complejo con la macromolécula, con la consiguiente disminución del valor de anisotropía. La efectividad del desplazamiento dependerá de las afinidades de los dos ligandos por la macromolécula[44].

Capítulo 2

Interacción entre ADN y ligandos bisnaftalimídicos con actividad antitumoral

2.1. Introducción

2.1.1. El ADN como diana farmacológica

El ADN es una molécula básica para la vida. Por lo tanto, el estudio de sus interacciones con proteínas y ligandos de bajo peso molecular tiene aplicaciones relevantes tanto en el ámbito experimental como en el diagnóstico o terapéutico. Para poder comprender estas interacciones, es necesario conocer los diferentes mecanismos de reconocimiento y modos de unión que pueden existir.

2.1.1.1. Modos de unión al ADN de ligandos de bajo peso molecular

Se pueden considerar dos formas principales de interacción entre ADN y ligandos de bajo peso molecular: covalente (cuando se produce un enlace irreversible entre el compuesto y el ADN) o no covalente (mediada por enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones electrostáticas). Presentan unión covalente los agentes alquilantes y, mediante un mecanismo diferente, los análogos de nucleósidos. Los agentes alquilantes se unen covalentemente a las purinas, habitualmente al átomo N7 de guanina, y fueron los primeros compuestos empleados en la quimioterapia del cáncer. Según el mecanismo de unión al ADN pueden dar lugar a mutaciones, o generar uniones entre las dos cadenas complementarias de ADN (*cross-link*), que entre otras acciones pueden bloquear la replicación. Ejemplos de este grupo son la trabectedina, el cisplatino o la mitomicina C[45]. Por su parte, los análogos de nucleósidos o nucleótidos se incorporan a una cadena de ADN naciente, bloqueando el proceso de síntesis. Pertenecen a este grupo el AZT, o el tenofovir, utilizados como inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH, y la gemcitabina, empleada en el tratamiento del cáncer de páncreas[46].

Respecto a la interacción no covalente o reversible de pequeñas moléculas con ADN, existen dos modos de unión principales: intercalación y unión al surco[47]. La intercalación es un proceso en el que una porción plana y aromática del ligando se inserta entre pares de bases de ADN contiguos, con el consecuente estiramiento y desenrollamiento de la doble hélice. Este tipo de unión fue descrita por primera vez en 1961 por Lerman[48] para describir la unión de acridina y proflavina al ADN, y se tratará más extensamente en el siguiente apartado. Por el contrario, en el modo de unión al surco la estructura de doble hélice de ADN sufre pocos cambios, y el ligando simplemente encaja en uno de los dos surcos. Los compuestos que se unen al surco generalmente lo hacen al surco menor. Ejemplos destacados son los antibióticos distamicina A y netropsina[49],

así como poliamidas aromáticas sintéticas[50].

2.1.2. Intercalación

2.1.2.1. Mecanismo de la intercalación

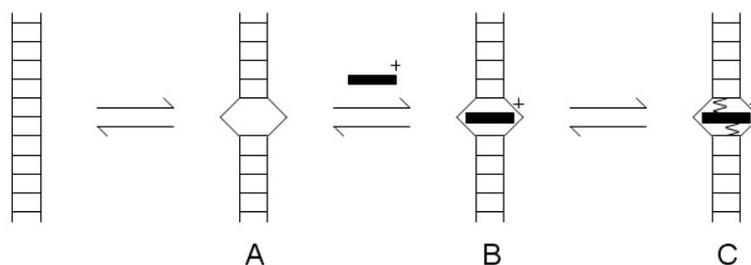


Figura 2.1: Esquema de un proceso de intercalación.

En la Figura 2.1 se muestra un modelo conceptual para el proceso de intercalación, que consta de tres pasos[51]. En el primero, el ADN sufre espontáneamente un cambio conformacional para formar el sitio de intercalación, lo que requiere la separación axial de los pares de bases adyacentes para formar una cavidad en la que el intercalante se aloje. Cuando los pares de bases se separan el ADN se desenrolla. Por otro lado, el espacio entre grupos fosfato es mayor en el sitio de intercalación, lo que reduce la densidad de carga local y provoca un descenso en la concentración de contraiones condensados[52]. En el segundo paso, el intercalante se transfiere desde la disolución al sitio de intercalación (Figura 2.1 B). En este paso se produce una pérdida de contraiones en el ADN si el intercalante está cargado positivamente, de acuerdo con las teorías polielectrolíticas de Manning y Record[52; 53]. En la etapa final (Figura 2.1 C), el agente intercalante se reorienta para optimizar su interacción con el ADN a través de enlaces de hidrógeno, contactos de van der Waals, e interacciones electrostáticas. Cada uno de estos tres pasos contribuye a la energía libre del proceso de unión ADN-intercalante.

2.1.2.2. Tipos de intercalación

Actualmente se conoce un gran número de compuestos capaces de unirse al ADN mediante intercalación. Muchos de ellos se utilizan como fármacos para

el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente como antitumorales. Algunos están presentes en la naturaleza (Figura 2.2 A), como las antraciclinas, la actinomicina D y la elipticina. En el grupo de las antraciclinas[54], la daunomicina se emplea en el tratamiento de enfermedades como la leucemia mieloide aguda, mientras que la doxorubicina se utiliza frente al linfoma de Hodgkin, entre otros tipos de cáncer. La actinomicina D es un antibiótico eficaz frente a varios tipos de tumores, especialmente el tumor de Wilms[55]. Las antraciclinas actúan inhibiendo la enzima topoisomerasa II humana[56], mientras que la actinomicina D bloquea la polimerasa de ARN[57].

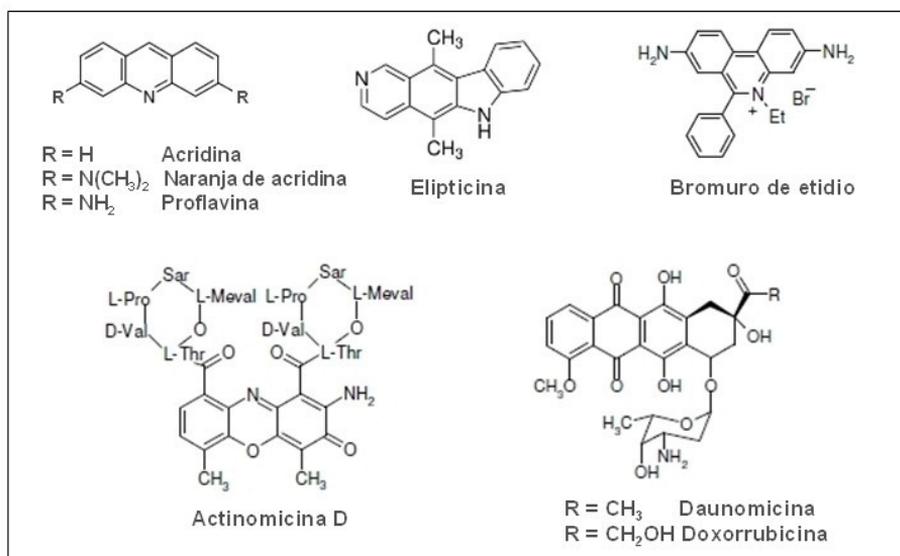
Existen además agentes intercalantes sintéticos (Figura 2.2 A). El grupo más clásico es el de las acridinas, entre las que destacan el naranja de acridina, la proflavina o la amsacrina. El naranja de acridina se utiliza principalmente como colorante de ácidos nucleicos. La amsacrina o *m*-AMSA se ha empleado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica[58]. Otros derivados de la acridina han mostrado recientemente actividad frente a la malaria[59]. Aparte de las acridinas, el bromuro de etidio es uno de los marcadores de ADN más utilizados.

Los compuestos mencionados hasta ahora son agentes monointercalantes; es decir, poseen un solo cromóforo que se intercala entre los pares de bases del ADN. En el caso de la bisintercalación se produce la inserción de dos cromóforos unidos entre sí por un espaciador de longitud apropiada. Aunque la especie que se intercala es el cromóforo, las características del espaciador también influyen en la capacidad de interacción del bisintercalante con el ADN. Dependiendo de su naturaleza química puede establecer enlaces de hidrógeno, contactos de van der Waals e interacciones electrostáticas que aumentan la especificidad y la afinidad de la unión.

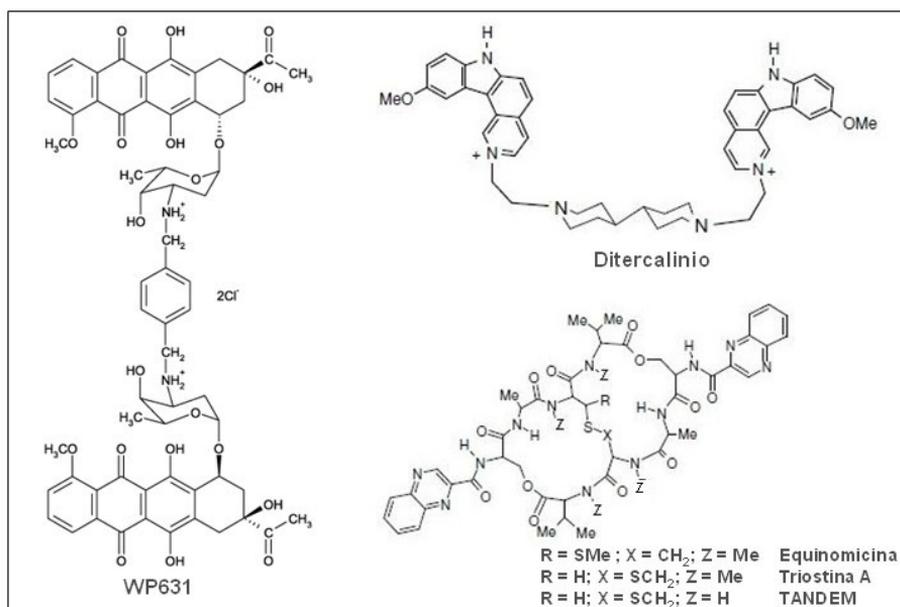
Diversos agentes bisintercalantes (Figura 2.2 B) son de origen natural, como los antibióticos quinoxalínicos equinomicina[60] y triostina A[61], que se unen al ADN por el surco menor. Existen también numerosos bisintercalantes sintéticos. La estrategia de dimerizar monointercalantes se inició a mediados de los años 70 con el desarrollo de bis-acridinas unidas por espaciadores aminoalquílicos[62]. Ditercalinio y flexi-di son dímeros de elipticina que difieren en la composición de su espaciador, y se unen al ADN a través del surco mayor[63].

2.1.2.3. Efectos de la intercalación

En general, por competencia directa o a través de la inducción de cambios conformacionales, la presencia de un ligando intercalante (y en general la de



A



B

Figura 2.2: Estructura química de algunos de los compuestos monointercalantes (A) y bisintercalantes (B) más conocidos.

cualquier ligando no covalente) unido al ADN impide la interacción de otras moléculas con el ADN, como por ejemplo factores de transcripción[64], o enzimas como girasas bacterianas, topoisomerasas humanas[56], y ADN- y ARN-polimerasas[57]. Al interferir con los procesos de replicación y/o transcripción del ADN celular, algunas de estas moléculas tienen buenas propiedades terapéuticas como antitumorales[65; 66], como se ha mencionado anteriormente. También se han descrito actividades antibacteriana[67], antifúngica[68] y antiparasitaria[59]. Los intercalantes con actividad antitumoral suelen tener como principal efecto secundario una baja especificidad de tejido celular, lo que supone una alta toxicidad.

2.1.3. Las naftalimidias: una familia de intercalantes de ADN

2.1.3.1. Antecedentes

El desarrollo de compuestos naftalimídicos comenzó en 1980, cuando M. F. Braña et al. diseñaron una serie de 3-nitronaftalimidias provistas de una cadena lateral a partir de estructuras citotóxicas conocidas, y se evaluó su actividad biológica[69]. En vista de su excelente comportamiento antitumoral, se sintetizaron nuevos compuestos, introduciendo modificaciones tanto en el sustituyente del anillo como en la cadena lateral. Se encontraron dos mononaftalimidias especialmente activas: amonafide y mitonafide (Figura 2.3 A), que alcanzaron la fase II de ensayos clínicos, y cuya actividad probablemente se basa en la inhibición de la topoisomerasa II humana[70; 71].

Los buenos resultados con las mononaftalimidias impulsaron investigaciones encaminadas a incrementar su capacidad antitumoral. La principal vía para conseguir este propósito consistió en desarrollar agentes bisintercalantes. La incorporación de un anillo adicional supone una mayor superficie de intercalación en relación a los análogos monoméricos, lo que hace aumentar su afinidad, mientras que un espaciador adecuado podría contribuir al reconocimiento específico de una determinada secuencia de ADN.

Al igual que con los monómeros, se generó una serie de bisnaftalimidias con diferentes patrones de sustitución en el cromóforo y el espaciador. Se demostró que para tener una actividad citotóxica significativa era necesaria la presencia de grupos amino en el espaciador. Satisfaciendo esta condición, se encontraron dos compuestos especialmente activos (Figura 2.3 B): elinafide, también conocido como LU-79553[72; 73] o LU, y bisnafide (DMP-840)[74]. Ambos fueron

utilizados en ensayos clínicos, y en el caso de elinafide se obtuvieron excelentes resultados para el tratamiento de diversos tumores sólidos[75; 76].

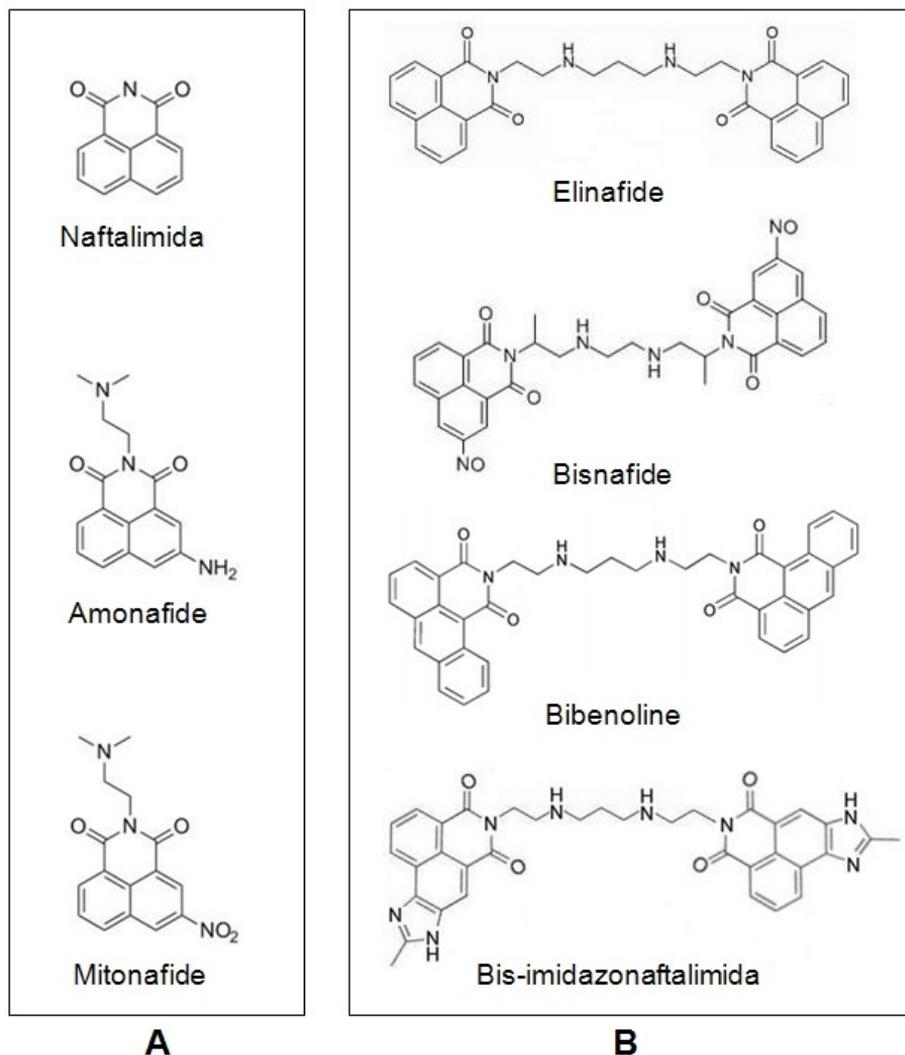


Figura 2.3: Estructura química de algunos compuestos mononaftalimídicos (A) y bisnaftalimídicos (B).

Debido a su actividad antitumoral, otros compuestos bisnaftalimídicos deriva-

dos de elinafide han sido sintetizados y evaluados. La estrategia más empleada ha consistido en aumentar la superficie de intercalación mediante la fusión al sistema naftalimídico de un anillo adicional de benceno[77] o imidazol[78] (Figura 2.3), pirazina[79] o furano[80] (Figura 2.17) o tiofeno[81]. El objetivo perseguido con estos derivados fue aumentar la superficie de apilamiento de los anillos para incrementar la afinidad por el ADN. En estas moléculas la longitud del espaciador aminoalquílico se mantuvo inalterada (Figura 2.3): esta cadena diazanoniánica permite separar los dos cromóforos a una distancia de aproximadamente 12 Å, suficiente para que los anillos intercalen en el ADN dejando entre sí un dinucleótido[82].

2.1.3.2. Características de la interacción ADN-elinafide

La capacidad de elinafide de bisintercalarse en dúplex de ADN se demostró mediante experimentos de viscosimetría[83] y RMN[82]. Los dos grupos amino protonados del espaciador reconocen los grupos electronegativos N7 y O6 de guanina en el surco mayor (en la Figura 2.4 se representa esta interacción mediante líneas discontinuas), y los anillos de naftalimida intercalan preferentemente en pasos TpG (CpA)[82; 83]. En la secuencia de bisintercalación preferida, el espaciador aminoalquílico se une a un dinucleótido GpC, que queda emparejado por los lados interiores de los anillos. Por lo tanto, el sitio de unión preferido por elinafide es el tetranucleótido TGCA[82].

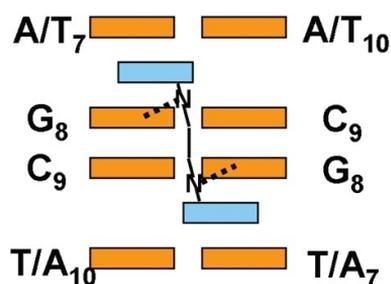


Figura 2.4: Representación esquemática de un complejo entre TGCA (naranja) y elinafide (azul). Las líneas discontinuas representan las interacciones entre los grupos amino del espaciador de elinafide y los átomos O6 y N7 de guanina.

Una de las principales características del elinafide es su capacidad para unirse al ADN a través del surco mayor de la doble hélice, algo poco común (las pequeñas moléculas, al contrario de lo que ocurre con las proteínas, generalmente se unen al ADN por el surco menor, más profundo[84]). Esta característica sólo se ha observado en algunas moléculas polifuncionales como el ditercalinio[85] y diimidias naftalénicas[86] químicamente relacionadas con las bisnaftalimidias. Como ya se ha comentado, elinafide presenta un buen perfil antitumoral, por lo que su capacidad para reconocer el surco mayor del ADN refuerza el interés por

diseñar análogos capaces de interactuar con sitios específicos en el ADN, con el propósito de encontrar compuestos capaces de controlar la actividad de los genes relacionados con el cáncer[66; 73].

2.1.4. Dos mecanismos de reconocimiento de ADN de doble hélice

El reconocimiento específico del ADN depende tanto de contactos directos entre el ligando y grupos funcionales de las bases (efectos directos), como de las características conformacionales de la doble hélice, dependientes de la secuencia (efectos indirectos).

Existen varios tipos de contactos directos entre el ligando y las bases del ADN. Uno de los más importantes son los enlaces de hidrógeno, ya que todas las bases poseen grupos funcionales que pueden actuar como dadores o aceptores y constituyen un factor de especificidad. También se pueden destacar las interacciones electrostáticas y los contactos de van der Waals, teniendo en cuenta que las cuatro bases son sistemas aromáticos fuertemente funcionalizados. El disolvente juega asimismo un papel importante, ya que determina la accesibilidad de las bases. Todos estos factores son los responsables de que un ligando pueda reconocer específicamente una determinada secuencia de ADN por uno de los dos surcos mediante contactos directos.

Por el contrario, el reconocimiento indirecto se basa en los cambios conformacionales que tienen lugar al interactuar el ADN con un ligando. Por ejemplo, si la conformación del complejo es similar a la del ADN libre, es de esperar que el coste energético de la deformación sea pequeño, favoreciéndose el reconocimiento de esa secuencia a través de efectos indirectos. Lo mismo sucede si las fluctuaciones conformacionales de una secuencia dan lugar a estructuras temporales que puedan ser reconocidas específicamente.

Se conocen numerosos casos de reconocimiento indirecto de secuencias de ADN por parte de proteínas, entre las que se pueden destacar los represores de los bacteriófagos 434[87] y P22[88], la proteína de unión a la caja TATA[89] y la proteína E2 del papilomavirus humano[90]. Sin embargo, en comparación con las proteínas, los mecanismos de reconocimiento indirecto del ADN por ligandos pequeños están mucho menos estudiados. Sólo existen unos pocos ejemplos en la literatura[91], como los mecanismos responsables de las diferentes velocidades de disociación de los intercalantes daunomicina y nogalamicina de secuencias de ADN naturales y sintéticas, que sufren grandes cambios conformacionales para

interaccionar con estos ligandos[92], o una descripción del efecto de las secuencias flanqueantes en la interacción de 7-aminoactinomicina D con una serie de dúplex autocomplementarios [93]. A pesar de esto, los efectos indirectos tienen importancia en el campo del diseño de fármacos, ya que podrían aprovecharse para incrementar la especificidad de unión de agentes citotóxicos o antibacterianos al ADN.

Por otro lado, aún no se han aclarado muchos aspectos de la estructura y la dinámica del ADN que son relevantes para su reconocimiento indirecto por proteínas y pequeñas moléculas. Las estructuras de RMN y rayos-X son promedios del tiempo y de las poblaciones, y aunque la RMN es adecuada para proporcionar información dinámica en un amplio rango de escalas de tiempo, los métodos disponibles para estudiar la dinámica de los ácidos nucleicos están menos desarrollados que los de las proteínas, y algunas escalas de tiempo relevantes (particularmente la que va desde microsegundos hasta milisegundos) son poco accesibles experimentalmente. Las deficiencias son especialmente importantes cuando se intentan caracterizar estados de transición o intermedios con tiempos de vida cortos, que pueden tener un papel importante en los procesos de unión o disociación. Las simulaciones de dinámica molecular están empezando a proporcionar algunas respuestas a este respecto, pero el límite de las simulaciones actuales está en aproximadamente un microsegundo[94; 95] y los campos de fuerza que describen el ADN todavía están siendo refinados[94].

2.2. Objetivos

Los objetivos de los trabajos descritos en este capítulo consistieron en:

- Evaluar si el reconocimiento de ADN por parte de elinafide está mediado por efectos indirectos.
- Caracterizar el mecanismo de reconocimiento directo del ADN por parte de fármacos bisnaftalimídicos.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Preparación de muestras

Las muestras de ADN se adquirieron de Microsynth AG, que llevó a cabo una síntesis semisólida empleando química de fosforamiditos, y un primer proceso de desalado. En el laboratorio se sometieron a un protocolo de purificación previo a la realización de experimentos, excepto las horquillas etiquetadas con biotina destinadas a resonancia superficial de plasmón, que se adquirieron ya purificadas por HPLC y únicamente necesitaron una microdiálisis. La cantidad de oligonucleótido se cuantificó mediante la medida de unidades de densidad óptica (ODUs):

$$ODU_{260} = AfV \quad (2.1)$$

donde A es la absorbancia a $\lambda = 260nm$, f es el factor de dilución y V es el volumen de la muestra en mL. Esta medida se repitió después de cada paso de purificación, con la finalidad de monitorizar el correcto desarrollo de la misma.

Como primer paso de purificación se realizó una electroforesis en gel. El gel se preparó a partir de una disolución de acrilamida y bisacrilamida (en proporción 19:1) al 20% con urea 8 M. El disolvente utilizado para la electroforesis fue una disolución de Tris 89 mM, borato 89 mM y EDTA 2 mM (TBE). La electroforesis se ejecutó a potencia constante (20 W por gel), hasta completar los 6000 Vh necesarios para separar las secuencias de 16 nucleótidos utilizadas en este trabajo. Una vez finalizada, se cortaron las bandas de gel bajo luz UV. La etapa de electroelución se llevó a cabo durante 6 horas empleando TBE como disolvente y un voltaje de 200 V.

A continuación se llevaron a cabo dos pasos de precipitación en etanol durante un mínimo de 4 horas, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente las muestras se dializaron durante al menos 4 horas en disoluciones acuosas conteniendo 20 mM de fosfato sódico (pH 6,0), 0,1 mM EDTA y concentraciones decrecientes de NaCl: 1 M, 0,5 M, 0,2 M y 0 M. Tras este paso, las muestras se desalaron mediante una columna NAP-25 de Sephadex, y fueron finalmente microdializadas durante al menos 4 horas en un tampón 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA y 20 mM fosfato sódico (pH 6,9) o bien 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA y 10 mM borato sódico (pH 8,8). El propósito de la microdiálisis es asegurar unas determinadas condiciones de pH y fuerza iónica en los experimentos sucesivos.

2.3.2. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz equipado con una criosonda, y un espectrómetro Bruker de 500 MHz. El *software* de adquisición y procesado fue Topspin (Bruker Biospin, versiones 1.3 a 2.1), mientras que el análisis de datos se realizó con Topspin 1.3 y Sparky 3.110[96]. En el caso de la determinación de las constantes de rotación de los anillos de naftalimida mediante análisis de ancho de líneas, se empleó el programa Mexico 3.0[97].

2.3.2.1. Preparación de complejos

La complejos ADN-bisnaftalimida se prepararon valorando las secuencias de ADN con un *stock* de bisnaftalimida de entre 10 y 20 mM. El proceso se monitorizó mediante espectros 1D realizados en D₂O a 25 °C para diferentes ratios ADN:fármaco, observando la desaparición de resonancias en la región aromática (6-8 ppm) de ADN libre y la aparición de nuevas señales correspondientes al complejo recién formado. En las valoraciones se emplearon muestras con una concentración de ADN entre 0,2 y 0,8 mM. Las valoraciones no se dieron por finalizadas al alcanzar un ratio 1:1, sino al observar la total desaparición de los picos de ADN libre no solapados con otras señales, indicando que el sitio de unión estaba completamente ocupado por moléculas de fármaco.

2.3.2.2. Asignación de espectros

La asignación de espectros se realizó a partir de una combinación de experimentos NOESY (80 y 250 ms de tiempo de mezcla) a 8 y 25 °C, junto con experimentos TOCSY, dqf-COSY y ROESY en D₂O a 25 °C, y Watergate NOESY en H₂O a 8 °C para cada muestra. La asignación y el análisis de las interacciones NOE entre protones aromáticos de las bases nucleotídicas y protones H1', H2', H2'' y H3' presentes en las desoxirribosas de cada nucleótido del ADN permitió comprobar que las secuencias forman dobles hélices autocomplementarias en todos los casos. Posteriormente a la adición de ligando, se realizaron experimentos análogos en los complejos con el propósito de caracterizar el sitio de unión de elinafide, y analizar su efecto en las secuencias de ADN por comparación con los espectros del ADN libre.

2.3.2.3. Determinación de constantes de rotación

Los anillos de elinafide intercalados en el sitio TGCA sufren un proceso de intercambio entre dos conformaciones de intercalación equivalentes mediante movimientos de rotación de 180° [82; 98]. A través de este fenómeno, los protones H4 y H9; H5 y H8; y H6 y H7 de elinafide intercambian sus posiciones (Figura 2.5), lo que permite cuantificar la velocidad de este proceso dinámico. Las constantes de rotación k_{rot} (mostradas en la Tabla 2.1) reflejan la dinámica de los anillos de bisnaftalimida en su sitio de intercalación en la escala de tiempo de los milisegundos[98] y fueron utilizadas para estimar la estabilidad de las interacciones de apilamiento en cada complejo.

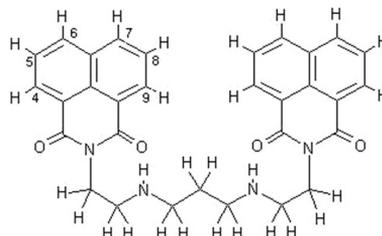


Figura 2.5: Estructura química de elinafide y protones aromáticos que intercambian sus posiciones: H4 y H9; H5 y H8; y H6 y H7.

En cada sistema, se determinaron valores de la constante de rotación de los anillos de naftalimida a seis temperaturas diferentes oscilando entre 8 y 48 °C. Dependiendo de la temperatura, las constantes de rotación se determinaron mediante experimentos de transferencia de magnetización[99], experimentos NOESY o análisis de ancho de líneas[97]. Para la temperatura más baja (8 °C) se utilizó el método de transferencia de magnetización, que consistió en irradiar selectivamente la frecuencia H4 del anillo de naftalimida y medir la magnetización (M) transferida al protón H9. Los protones H4 y H9 están separados por una distancia de más de 6,5 Å. Paralelamente, se adquirió un espectro de referencia en el que se irradió a una frecuencia *contralateral* alejada de cualquier protón del sistema, y se restó del original, obteniéndose un espectro diferencia que permitió determinar la magnetización real transferida a H9. La repetición de este experimento para una serie de tiempos de irradiación (t) en H4 permite calcular la magnetización transferida en función de t mediante la siguiente expresión[99]:

$$M(t) = M_0 \left[\frac{\tau_1}{\tau} e^{(-\frac{t}{\tau_1})} + \frac{\tau_1}{T_1} \right] \quad (2.2)$$

donde M_0 es la magnetización de H9 en el equilibrio. Ajustando las curvas obtenidas de los espectros a esta ecuación se obtiene la constante exponencial

de disminución ($(1/\tau_1)$), que a su vez permite calcular la constante de interconversión k entre H4 y H9 mediante:

$$k = \frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{T_1} \quad (2.3)$$

donde T_1 (tiempo de relajación longitudinal) se calcula a partir de experimentos de recuperación de la inversión. En estos experimentos la magnetización de los protones del sistema se invierte mediante un pulso de excitación de 180° , y posteriormente se deja pasar un tiempo de recuperación en el que los protones excitados retornan al equilibrio. Para determinar el tiempo T_1 se miden las intensidades de los picos en función de una serie de tiempos de recuperación t (Figura 2.6).

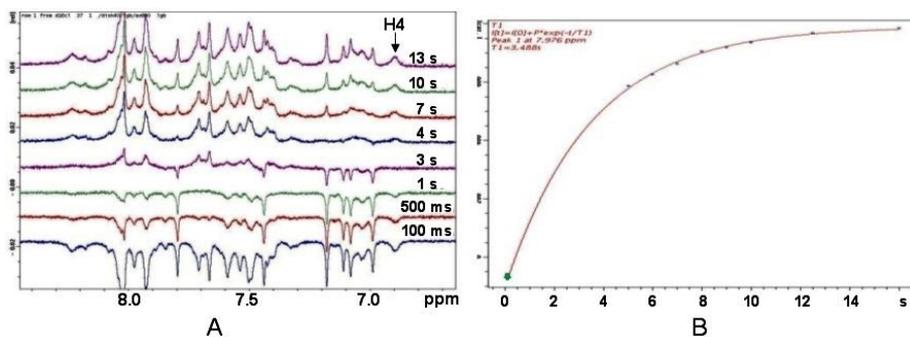


Figura 2.6: Representación (A) y ajuste (B) de la intensidad de la señal en función del tiempo de recuperación en experimentos de recuperación de la inversión.

Estas curvas permiten finalmente determinar T_1 mediante un ajuste no lineal similar al empleado en los experimentos de transferencia de magnetización:

$$I = I_0 + P e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (2.4)$$

donde I es la intensidad de la señal, I_0 es la intensidad en el equilibrio y $P = -2I_0$.

También a bajas temperaturas (entre 8 y 25 °C) se emplearon experimentos NOESY a cuatro tiempos de mezcla cortos (0, 4, 8 y 12 ms), de manera que sólo

se obtuvieran picos de cruce entre protones en intercambio, y no entre aquellos próximos en el espacio. En este caso la constante de rotación se calculó a partir de la siguiente expresión[100]:

$$k = \frac{V}{V_0 t_m} \quad (2.5)$$

donde V/t_m es la pendiente de la variación del volumen del pico cruzado (V) en función del tiempo de mezcla (t_m) y V_0 es el volumen del pico en la diagonal a $t_m=0$ ms.

A temperaturas más altas (entre 30 y 48 °C) los picos son demasiado anchos como para hacer medidas de transferencia de magnetización o experimentos NOESY, por lo que se llevó a cabo un análisis de ancho de líneas en función de la temperatura en espectros monodimensionales. Para ello se utilizó la resonancia del protón H4, por no presentar problemas de solapamiento. La determinación de las constantes de rotación se llevó a cabo con el programa Mexico[97]. Este programa utiliza como entrada un archivo de texto que contiene los datos del sistema de protones en intercambio y un valor estimado para la constante de rotación. Después de procesar los datos, Mexico genera un espectro monodimensional en el que los anchos de línea de estos protones dependen del valor introducido para la constante de rotación. Este valor se considera satisfactorio si los anchos de línea de los espectros real y simulado coinciden cuando son superpuestos (Figura 2.7).

Una vez obtenidos los valores de la constante de rotación k para todas las temperaturas T , se calcularon las magnitudes termodinámicas de activación haciendo uso de la Ecuación de Eyring[82; 98]:

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (2.6)$$

donde R es la constante universal de los gases, k_B la constante de Boltzmann y h la constante de Planck. ΔG^\ddagger se obtiene a partir de:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (2.7)$$

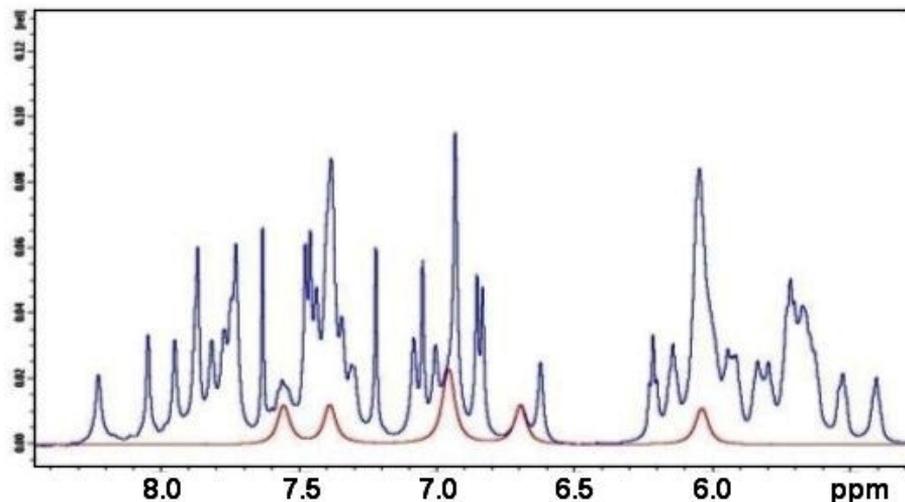


Figura 2.7: Superposición de un espectro simulado por Mexico (rojo) y un espectro experimental (azul), en la que se puede apreciar que los anchos de línea del protón H4 (6,7 ppm) son coincidentes.

2.3.2.4. Determinación de constantes de intercalación

Las constantes de disociación de intercalación, k_d^{int} , se determinaron a partir de experimentos NOESY a tiempos de mezcla cortos, utilizando una metodología similar a la empleada para calcular las constantes de rotación (ecuación 2.5). En este caso, se utilizaron picos de cruce entre resonancias bien resueltas de los protones aromáticos o H1' del complejo intercalado y las respectivas resonancias residuales de ADN sin intercalar[98].

2.3.2.5. Velocidades de apertura de las bases de ADN

Para determinar estas velocidades, se estudió mediante RMN el proceso de intercambio de los protones imino de guanina y timina con el disolvente. Las velocidades de apertura, v_{op} , (en s^{-1}), son inversamente proporcionales al tiempo de vida de las bases, τ_{op} , y la determinación de τ_{op} es posible a partir de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de estos protones. Esta medida se llevó a cabo a 8 °C y pH 8,8 mediante valoraciones de los complejos ADN-elinafide con una disolución de NH_3 1,8 M (también a pH 8,8). Previamente y después de

cada adición de NH_3 se realizaron experimentos de recuperación de inversión, en los cuales se empleó una serie de pulsos selectivos de tipo gaussiano. En primer lugar se utilizó un pulso de 180° de entre 2000 y 2500 ms, centrado en la región de los protones imino y con una anchura espectral de 3000 Hz, con el fin de excitar selectivamente las frecuencias de estos protones. A continuación se dejó pasar un tiempo de recuperación variable, y se ejecutó un segundo pulso de 90° de entre 4500 y 5000 ms (pulso de observación).

La representación gráfica de las áreas de los picos en función del tiempo de recuperación da lugar a una curva, de la cual se extrae el tiempo de relajación longitudinal. Estos tiempos T_1 permiten obtener los tiempos de intercambio (t_{ex}), que dependen del tiempo de vida del par de bases y de la probabilidad de intercambio del protón imino del par abierto con un protón del disolvente. Al aumentar la concentración de catalizador (en este caso NH_3), la probabilidad de intercambio se incrementa y los tiempos de intercambio se reducen, hasta llegar a un punto (concentración infinita de catalizador) en el que el tiempo de intercambio es exactamente el tiempo de vida del par de bases. Puesto que la situación de concentración infinita no es alcanzable experimentalmente, se midieron los tiempos T_1 sin catalizador y a concentraciones crecientes del mismo, y se calcularon los tiempos de intercambio a través de la siguiente expresión:

$$\frac{1}{\tau_{ex}} = \frac{1}{T_{1,ad}} - \frac{1}{T_{1,ac}} \quad (2.8)$$

donde $T_{1,ad}$ es el tiempo T_1 en presencia de cierta concentración de catalizador; y $T_{1,ac}$ el tiempo T_1 en ausencia de catalizador. Representando los tiempos de intercambio (τ_{ex}) en función de la concentración de catalizador ($[cat]$), se obtiene una recta, que permite, por extrapolación a concentración infinita de catalizador (ordenada en el origen), la obtención del tiempo de vida del par de bases (τ_{op}) y la velocidad de apertura ($k_{op} = 1/\tau_{op}$) mediante la siguiente ecuación[101]:

$$\tau_{ex} = \tau_{op} + \frac{1}{\alpha K_d k_i [cat]} \quad (2.9)$$

donde K_d es la constante de disociación del par de bases, k_i es la velocidad de transferencia del protón desde el mononucleósido, y α es un parámetro de accesibilidad.

2.3.3. Resonancia superficial de plasmón

2.3.3.1. Procedimiento experimental

Los experimentos de resonancia superficial de plasmón (SPR) se realizaron utilizando una serie de horquillas de ADN etiquetadas en su extremo 5' con biotina. Estas horquillas fueron microdializadas en un tampón HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, y 0,005 % (v/v) de surfactante P-20) antes de fijarlas en los chips. Los experimentos se ejecutaron en un equipo Biacore T100 (GE Healthcare), empleando chips de cuatro canales conteniendo estreptavidina (tipo SA, serie S) y utilizando como fase móvil tampones MES-15 (10 mM MES, pH 6,25, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 0,005 % P20) o BORATO-15 (10 mM borato sódico pH 8,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0,005 % (v/v) P-20).

Para la inmovilización de las horquillas de ADN, en cada uno de los canales se inyectó manualmente una disolución HBS-EP de cada una de las horquillas biotiniladas a 25 nM, empleando un flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Uno de los canales se dejó libre para ser utilizado como canal de referencia. Se inmovilizaron aproximadamente 300 unidades de respuesta (RU) de cada horquilla. Previamente, los canales fueron acondicionados mediante una serie de inyecciones de una disolución de NaCl 1 M y NaOH 50 mM seguidas de un período de lavado con tampón HBS-EP, con el fin de obtener una línea base estable. En los canales en los que se habían inmovilizado las horquillas de ADN se inyectaron diferentes concentraciones de bisnaftalimida, durante un período de 15 minutos y a un flujo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se utilizó un rango de concentraciones entre 0,1-0,5 nM y 0,15-0,50 μM de bisnaftalimida disuelta en tampón MES-15. El rango de concentraciones de bisnaftalimida en los experimentos realizados a pH 8,8 fue entre 0,1 nM y 50 μM . Tras la inyección de ligando, las superficies conteniendo ADN se regeneraron aplicando un flujo de tampón durante un período de 30 minutos.

2.3.3.2. Determinación de parámetros de interacción y entalpías de unión

Se utilizó el *software* de evaluación Biacore T100 2.0 (GE Healthcare) para analizar los datos experimentales y obtener los parámetros de interacción. Las constantes de disociación en el equilibrio y la estequiometría de los complejos ADN-bisnaftalimida (K_d) se determinaron por ajuste de las curvas de unión a modelos de uno o dos sitios de unión:

$$RU = \frac{RU_{max}C}{1 + K_d C} + RI \text{ (un sitio)} \quad (2.10)$$

$$RU = \frac{RU_{max1}C}{1 + K_{d1}C} + \frac{RU_{max2}C}{1 + K_{d2}C} + RI \text{ (dos sitios)} \quad (2.11)$$

donde C es la concentración de compuesto libre en equilibrio con el complejo, RU_{max} es la respuesta máxima en la zona de estado estacionario, y RI es un parámetro de compensación característico del índice de refracción de la muestra. En estos modelos, K_d , RU_{max} y RI son parámetros ajustables, y la estequiometría de cada sitio de unión se determinó comparando los valores de RU_{max} extraídos del ajuste con los valores teóricos, que fueron calculados a partir de los pesos moleculares de ADN y fármaco, y de la cantidad de ADN presente en la celda de flujo[31] (ecuaciones 1.4 y 1.5). La ecuación de dos sitios de unión solamente fue utilizada en caso de mejorar significativamente el ajuste obtenido con el modelo de un solo sitio, con valores de χ^2 entre 0,80 y 0,02 veces más bajos. Las velocidades de asociación y disociación se obtuvieron utilizando sensores a baja concentración y un modelo de un sitio de unión que incluyó un término de transferencia de masa. Todos los experimentos de SPR fueron doblemente referenciados[102] y realizados un mínimo de dos veces para cada sistema y condición.

Las entalpías de unión se determinaron a partir de constantes de disociación en el equilibrio obtenidas a cinco temperaturas diferentes (10, 18, 25, 32, y 40 °C). La dependencia lineal de $\ln K_d$ con respecto a $1/T$ permitió calcular el valor de la entalpía de unión ΔH_b mediante la ecuación de van't Hoff:

$$\ln K_d = \frac{-\Delta H_b}{RT} + \frac{\Delta S_b}{R} \quad (2.12)$$

2.3.4. Experimentos de desnaturalización térmica

2.3.4.1. Procedimiento experimental

Las temperaturas de fusión de los complejos entre ADN y agentes intercalantes normalmente son más elevadas que las de los dúplex aislados, y esta estabilización térmica es proporcional a la afinidad de la interacción ADN-ligando[37; 103].

Así pues, el propósito de estos experimentos fue obtener información de las estabilizaciones térmicas inducidas por la unión de bisnaftalimida al ADN, a partir de la diferencia entre las temperaturas de fusión del ADN libre (T_m^f) y unido (T_m^b). Para ello, se monitorizó la desnaturalización de los dúplex de ADN libre y los complejos ADN-bisnaftalimida correspondientes midiendo la absorbancia a $\lambda = 260$ nm en función de la temperatura en espectrofotómetros Varian Cary 100 y Varian Cary 300. La concentración en dúplex de las muestras fue de aproximadamente $2 \mu\text{M}$ (unas 0,5 ODU's disueltas en 1 mL), se utilizó un tampón similar al de los experimentos de RMN, y cada muestra se sometió antes de cada experimento de fusión a un proceso de calentamiento rápido y enfriamiento lento (*annealing*). Durante los experimentos, la temperatura se aumentó desde 10 a 90 °C a un gradiente de 0,5 °C por minuto y posteriormente se disminuyó a la misma velocidad para evaluar la reversibilidad del proceso. Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces para cada sistema y condición.

2.3.4.2. Determinación de estabilizaciones térmicas

El valor de estabilización térmica $\Delta T_m = T_m^b - T_m^f$ depende de la afinidad de la interacción dúplex-ligando a la temperatura de fusión de cada complejo, asumiendo que la unión del ligando a las hebras aisladas no es significativa[37; 103; 104]. Para obtener el valor de ΔT_m del complejo, debe emplearse un ratio bisnaftalimida:dúplex que garantice la total ocupación de los sitios de unión en el dúplex, por lo que se evaluaron una serie de ratios entre 0,5:1 y 6:1 para monitorizar la saturación de estos sitios de unión. La proporción máxima (6:1) corresponde a 2,7 pares de bases por molécula de bisnaftalimida para un dúplex de 16 pares de bases. Este valor puede considerarse saturante, ya que estas bisnaftalimidias requerirían 5,3 pares de bases por molécula de ligando si tres moléculas de bisnaftalimida se unieran por bisintercalación a los dúplex de 16 pares de bases analizados (Figuras 2.8 y 2.18)[82]. En la mayoría de casos, las curvas de ΔT_m en función de los ratios bisnaftalimida:dúplex alcanzaron una meseta a los ratios que indujeron la ocupación completa del sitio de unión principal al valorar los complejos por RMN (Figura 2.22). Por tanto, los valores de T_m y ΔT_m que aparecen reflejados en las Tablas 2.1 y 2.5 corresponden a los ratios bisnaftalimida:dúplex de ocupación completa determinados por RMN.

2.3.4.3. Determinación de constantes de disociación

Las constantes de disociación de los complejos ADN-bisnaftalimida pueden determinarse a partir de las temperaturas de fusión del ADN libre y unido y de

las entalpías de fusión de los complejos, mediante la siguiente expresión[37]:

$$\frac{1}{K_d} = K_a = \frac{e^{\frac{\Delta H_m}{nR}(\frac{1}{T_m^f} - \frac{1}{T_m^b})} - 1}{a} \quad (2.13)$$

donde T_m^f y T_m^b son las temperaturas de fusión del ADN libre y complejado, respectivamente (obtenidas según se describe en 2.3.4.2), a es la concentración de bisnaftalimida libre a la temperatura de fusión, n es el número de sitios de unión en cada dúplex (para los dúplex y ratios bisnaftalimida:dúplex empleados en estos experimentos n se puede considerar 1) y ΔH_m la entalpía de fusión del dúplex aislado, obtenida utilizando el servidor web DinaMelt[105].

2.3.5. Calorimetría de valoración isotérmica

Con el fin de obtener información adicional sobre el mecanismo de reconocimiento bisnaftalimida-ADN, también se realizaron experimentos de ITC, empleando para ello un calorímetro Microcal VP-ITC. Estos experimentos se ejecutaron a 25 °C, depositando en la celda de muestra 1,8 mL de dúplex de ADN a 28 μM , y efectuando 14 ó 20 inyecciones de 15 ó 10 μL de una disolución 87 μM de elinafide. Ambas especies se disolvieron en el mismo tampón, conteniendo 5 mM fosfato sódico (pH 6,2), 0,2 mM EDTA y 150 mM NaCl; o 5 mM borato (pH 8,8), 0,2 mM EDTA y 150 mM NaCl. Para las inyecciones se utilizó una jeringa Hamilton de 250 μL rotando a 300 rpm, con tiempos de inyección de 30 ó 20 segundos (15 ó 10 segundos para la primera inyección) y un intervalo de tiempo entre inyecciones de 5 minutos. Los datos se analizaron mediante el *software* Origin 5.0 (Microcal Software Inc, Northhampton, MA, USA).

Como se explicó en el apartado 1.4.5, el calor desprendido o absorbido se determinó mediante la integración de las áreas de los picos obtenidos tras las inyecciones. Debido a que la interacción entre elinafide y el disolvente provoca un pequeño intercambio de calor (calor de dilución), fue necesario realizar experimentos de referencia en los que elinafide se valoró sobre la disolución tampón, en idénticas condiciones a las de los experimentos con ADN. Los picos de los calores de dilución fueron sustraídos a los determinados en las valoraciones, de manera que los picos corregidos correspondieron únicamente al intercambio de calor producido por la interacción entre elinafide y ADN. Dado que los experimentos se realizaron en condiciones no saturantes, el área de cada pico puede considerarse una estimación de la entalpía de unión, ΔH_b , por lo que los valo-

res mostrados en la Tabla 2.3 se determinaron promediando todas las medidas realizadas en cada experimento[51].

2.4. Influencia de efectos indirectos en la interacción ADN-elinafide

2.4.1. Estrategia de trabajo

En esta sección se pretende averiguar si existen efectos indirectos de secuencia, mediados por preferencias estructurales o fluctuaciones conformacionales del ADN, que influyan significativamente en la interacción ADN-elinafide. Para ello se utilizó una combinación de métodos en disolución (RMN, desnaturalización térmica e ITC) y superficie (SPR).

Mediante los experimentos en disolución se estudió una serie de complejos de elinafide con seis dúplex autocomplementarios de ADN formados por 16 pares de bases, con sitios de unión formados por tetranucleótidos TGCA o AGCT (en adelante, estos complejos serán identificados con la secuencia flanqueante de nucleótidos en 5', seguida de TG para sitios TGCA o AG para sitios AGCT). La serie estuvo formada por cuatro complejos con un sitio de unión TGCA flanqueado por pares AT alternantes (dTATATA^{TG}), pares AT mixtos (dTTTATAT^{TG}), trectos A cortos en 3' (dTATATTT^{TG}) y trectos A continuos en 3' (dTTTTTTT^{TG}); y dos complejos con un sitio de unión AGCT flanqueado por pares AT mixtos (dTATATAT^{AG}) y trectos A continuos en 5' (dAAAAAA^{AG}), como puede observarse en la Figura 2.8. Para poder analizar sistemas análogos mediante SPR se estudiaron dos horquillas de 32 nucleótidos conteniendo un sitio de unión TGCA flanqueado por pares AT alternantes, o bien trectos A continuos en 3' (de manera análoga, serán identificados como hATATA^{TG} y hTTTTTT^{TG}, donde *h* indica que se trata de horquillas). Se analizó también como control una tercera horquilla más corta (de 20 nucleótidos) formada por un sitio de unión TGCA flanqueado por sólo dos pares AT (hTA^{TG}), y desprovista por tanto de posibles sitios de unión secundarios en las regiones flanqueantes (Figura 2.8).

En cada serie de complejos estudiados, el tetranucleótido de unión es el mismo y sólo varían las secuencias flanqueantes, que no establecen contactos directos con el elinafide (Figuras 2.4 y 2.8). Por tanto las diferencias observadas entre los distintos sistemas deben estar exclusivamente inducidas por efectos indirectos, promovidos por las características conformacionales o dinámicas de cada secuencia de ADN.

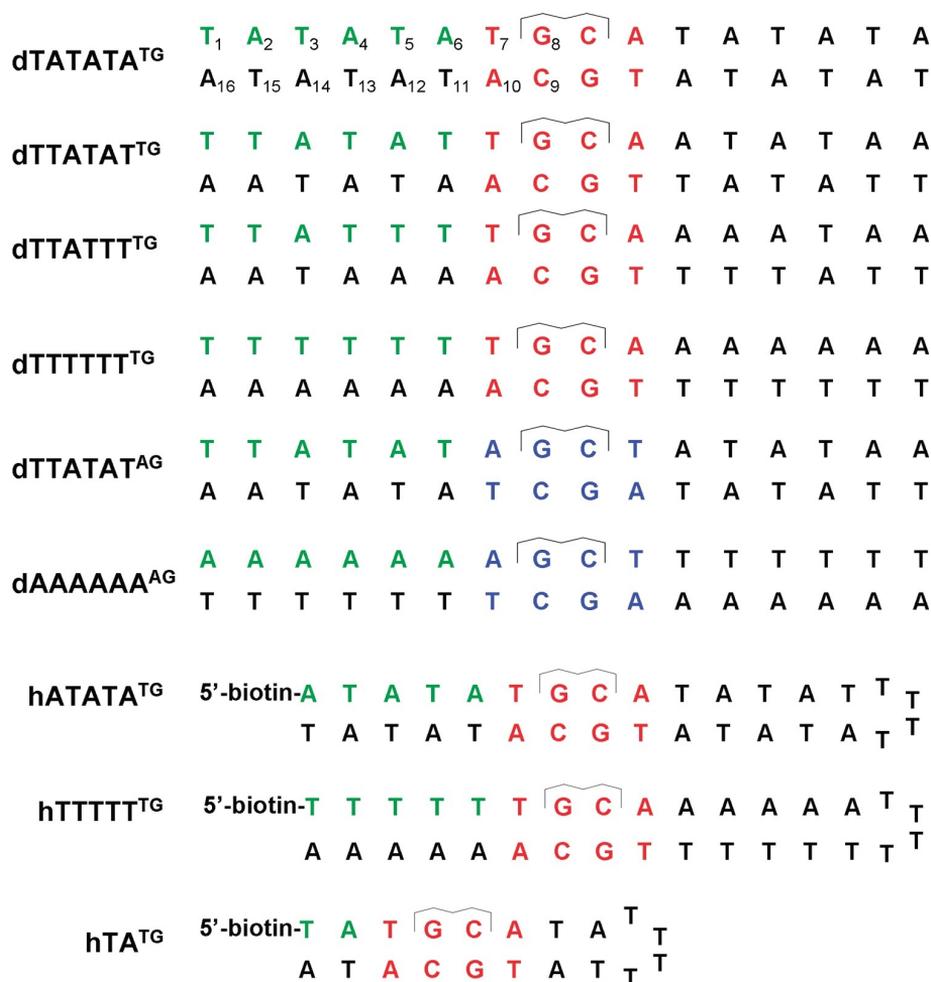


Figura 2.8: Complejos ADN-elinafide analizados: seis dúplex autocomplementarios de 16 pares de bases y tres horquillas biotiniladas en posición 5'. Los sitios de unión TGCA y AGCT se muestran en colores rojo y azul, respectivamente, mientras que las secuencias flanqueantes en 5' están resaltadas en verde. La posición de bisintercalación del elinafide se indica de manera esquemática.

2.4.2. Resultados

2.4.2.1. Valoración de complejos dúplex-elinafide mediante RMN

Los complejos se prepararon valorando las secuencias de ADN con elinafide hasta conseguir la ocupación total del sitio de unión principal. Estas valoraciones se monitorizaron por RMN, observando los cambios progresivos que tenían lugar en las resonancias del ADN con respecto a su forma libre, y que indicaban la intercalación de los anillos de naftalimida en el tetranucleótido de alta afinidad. Estos experimentos revelaron un comportamiento singular del complejo TGCA flanqueado por trectos A en 3' (dTTTTTT^{TG}). Esta secuencia necesitó aproximadamente dos equivalentes de ligando para la intercalación completa de los anillos de naftalimida, mientras que para el resto de secuencias fue suficiente con adicionar aproximadamente un equivalente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Efecto de la secuencia flanqueante en la interacción elinafide:ADN.

complejo	T_m^f (°C)	T_m^b (°C)	ΔT_m (°C)	k_d^{int} (s ⁻¹)	k_{rot} (s ⁻¹)
<i>complejos TGCA</i>					
dTATATA ^{TG}	48	54	6	3,8 ± 0,6	15
dTTATAT ^{TG}	46	52	6	0,9 ± 0,1	13
dTTATTT ^{TG}	48	50	2	-	32
dTTTTTT ^{TG}	54	55	1	2,7 ± 0,9	30
<i>complejos AGCT</i>					
dTTATAT ^{AG}	42	50	8	-	13
dAAAAAA ^{AG}	49	54	5	-	21

Los ratios elinafide:ADN requeridos por las valoraciones monitorizadas por RMN fueron: dTATATA^{TG}, 1.1:1; dTTATAT^{TG}, 1.4:1; dTTATTT^{TG}, 1.6:1; dTTTTTT^{TG}, 2.5:1; dTTATAT^{AG}, 1.5:1; dAAAAAA^{AG}, 1.5:1. Los parámetros representados son las temperaturas de fusión del dúplex libre (T_m^f) y unido (T_m^b), las correspondientes estabilizaciones térmicas (ΔT_m), las velocidades de disociación de intercalación (k_d^{int}), y las velocidades de rotación de los anillos de naftalimida a 25 °C (k_{rot} , extraídas de las representaciones de Eyring.

2.4.2.2. Estabilizaciones térmicas

Mediante experimentos de desnaturalización térmica se midieron las estabilizaciones térmicas inducidas por la unión de elinafide en cada uno de los complejos. El ratio elinafide:dúplex empleado para determinar los valores ΔT_m fue el mismo que el requerido por las valoraciones monitorizadas por RMN, ya que

estas condiciones favorecen la ocupación total del sitio de unión principal por parte de elinafide.

Las secuencias flanqueantes de los sitios TGCA y AGCT tuvieron una influencia muy significativa en la magnitud de las estabilizaciones térmicas inducidas por elinafide (Tabla 2.1 y Figura 2.9). Comparando la serie TGCA, la mayor ΔT_m correspondió al complejo alternante dTATATA^{TG}, decreciendo progresivamente en dTTATAT^{TG} y dTTATTT^{TG}, y volviéndose despreciable en el complejo dTTTTTT^{TG}, flanqueado por un tracto A en 3'. En los complejos AGCT, la secuencia con un tracto A flanqueante en 5' también mostró un efecto desfavorable, aunque en menor medida: el valor de ΔT_m para el complejo dAAAAAA^{AG} se redujo aproximadamente a la mitad respecto a dTTATAT^{AG} (Tabla 2.1). La comparación entre dTTTTTT^{TG} y dAAAAAA^{AG} indica que el efecto indirecto del tracto A depende de su orientación con respecto al complejo, ya que los trectos A situados en 3' (como es el caso de dTTTTTT^{TG}) tuvieron un mayor efecto en ΔT_m que los trectos A localizados en 5' respecto al sitio de bisintercalación.

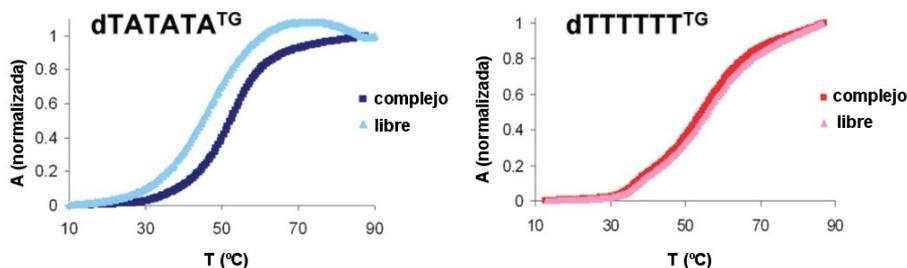


Figura 2.9: Curvas de fusión de dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} en ausencia y en presencia de 1,1 y 2,5 equivalentes de elinafide, respectivamente.

2.4.2.3. Constantes de disociación obtenidas por SPR

Al comparar las afinidades de unión de elinafide por los sitios TGCA de hTA^{TG}, hATATA^{TG}, y hTTTTTT^{TG}, se puede comprobar que, mientras que las constantes de equilibrio de disociación (K_d) de las dos horquillas alternantes hTA^{TG} y hATATA^{TG} son muy similares ($4,2 \cdot 10^{-9}$ M y $2,1 \cdot 10^{-9}$ M, respectivamente), la K_d obtenida para la horquilla conteniendo un tracto A flanqueante en 3', hTTTTTT^{TG}, resultó ser entre 5 y 10 veces más elevada (Tabla 2.2).

La comparación entre las respuestas máximas (RU_{max}) calculadas y las obte-

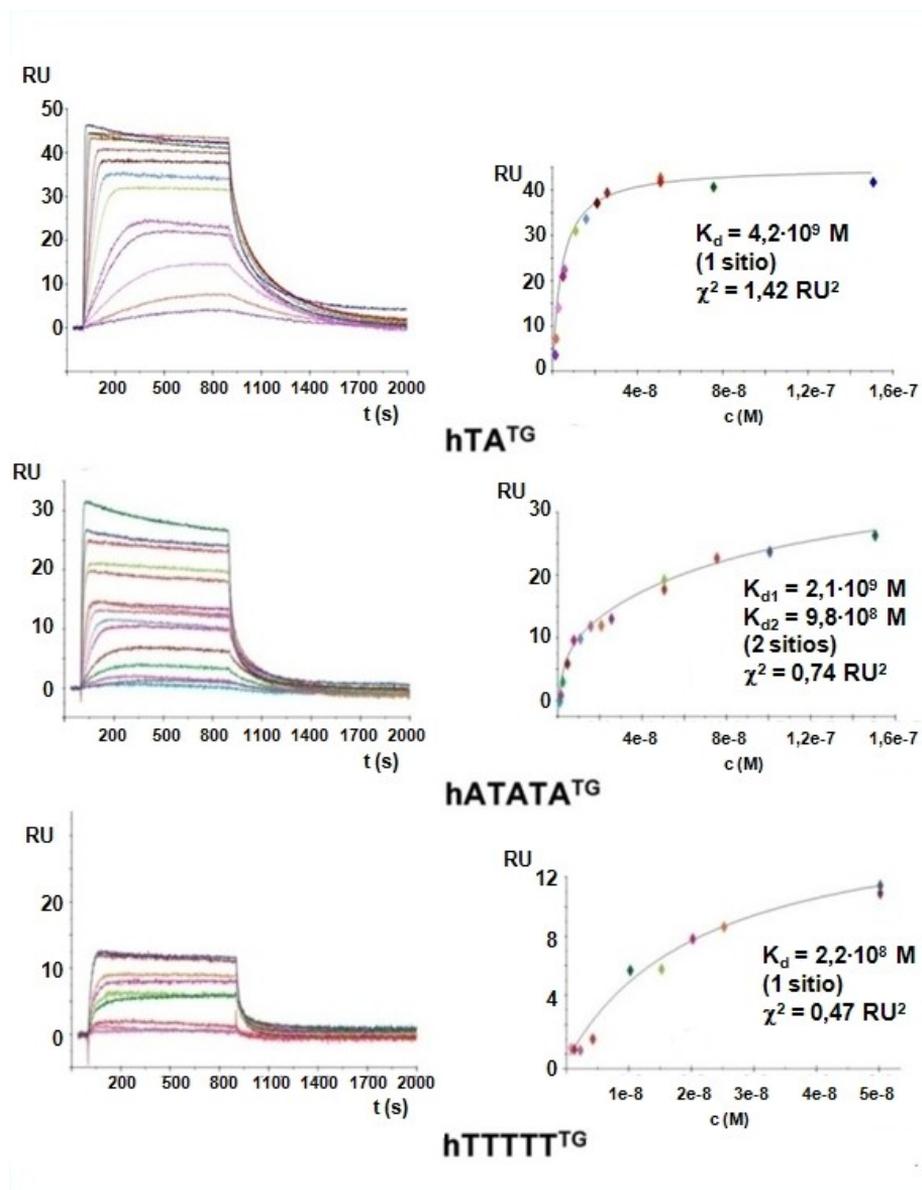


Figura 2.10: Sensogramas (izquierda) a concentraciones desde 0,1 (inferior) hasta 150 nM (superior); y curvas de unión en estado estacionario (derecha) obtenidos mediante experimentos SPR a 25 °C para la interacción de elinafide con hTA^{TG} , $hATATA^{TG}$ y $hTTTTT^{TG}$.

Tabla 2.2: Análisis mediante SPR de la interacción entre elinafide y las horquillas hTA^{TG}, hATATA^{TG} y hTTTTT^{TG}.

complejo	$K_d(M \times 10^{-9})$	$k_a(M^{-1}s^{-1} \times 10^6)$	$k_d(s^{-1} \times 10^{-2})$	$k_d/k_a(M \times 10^{-9})$	s	n
hTA ^{TG} -LU	4,2 ± 0,5	5,5 ± 0,1	2,2 ± 0,0	4,2	1	1,3 ± 0,0
hATATA ^{TG} -LU	2,1 ± 1,8 (98 ± 53)	2,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	3,9	2	0,8 ± 0,1 (1,9 ± 0,3)
hTTTTT ^{TG} -LU	22,0 ± 0,6	0,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	23	1	1,1 ± 0,1

Se midieron las interacciones de elinafide con las horquillas hTA^{TG}, hATATA^{TG} y hTTTTT^{TG} a 25 °C, pH 6,3 y un rango de concentraciones de elinafide entre 0,1 y 150 nM. Los parámetros registrados son las constantes de disociación de equilibrio (K_d), velocidades de asociación (k_a), velocidades de disociación (k_d), número de sitios de unión en cada horquilla (s) y estequiometría de la interacción (n). Todos los valores corresponden al sitio de unión principal, excepto los que aparecen entre paréntesis, que corresponden al sitio de unión secundario de hATATA^{TG}. Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces para cada sistema, y la tabla muestra los parámetros y errores estándar del ajuste de experimentos representativos.

nidas en estos ensayos indicó que una sola molécula de elinafide se unió a hTA^{TG} y hTTTTT^{TG}, mientras que hATATA^{TG} interaccionaba con 3 moléculas de ligando. En consonancia con esta observación, los mejores ajustes a las curvas de unión en estado estacionario se obtuvieron utilizando un modelo de un sitio de unión para hTA^{TG} y hTTTTT^{TG}, y un modelo de dos sitios independientes para hATATA^{TG} (Figura 2.10). Estos datos indican que, una vez que el sitio TGCA de alta afinidad está saturado, dos moléculas adicionales de elinafide se unen a un sitio de baja afinidad formado por las secuencias flanqueantes AT en hATATA^{TG}. Este fenómeno no se observó en estos ensayos en hTTTTT^{TG} ni en hTA^{TG}; en este último caso porque el tallo está acortado respecto a hATATA^{TG}.

2.4.2.4. Perfiles termodinámicos de unión

Tanto la espectroscopia de RMN como los experimentos de desnaturalización térmica y SPR detectaron diferencias significativas entre los complejos TGCA-elinafide flanqueados por pares alternantes A · T y trectos A continuos. Con el propósito de obtener información sobre el mecanismo molecular responsable de estas diferencias, se determinó el perfil termodinámico de la interacción entre elinafide y estas secuencias.

En primer lugar, se obtuvieron los componentes entálpico y entrópico de la interacción entre elinafide y hTA^{TG}, hATATA^{TG} y hTTTTT^{TG} a partir de la dependencia con respecto a la temperatura de las constantes de disociación obtenidas por SPR (Figura 2.11 y Tabla 2.3). Los resultados indicaron que la menor afinidad de elinafide por hTTTTT^{TG} conteniendo un tracto A flanqueante, se debió principalmente a una menor entalpía de unión (−1,4 frente a −6,0 Kcal/mol para hATATA^{TG}, flanqueado por pares A · T alternantes). También

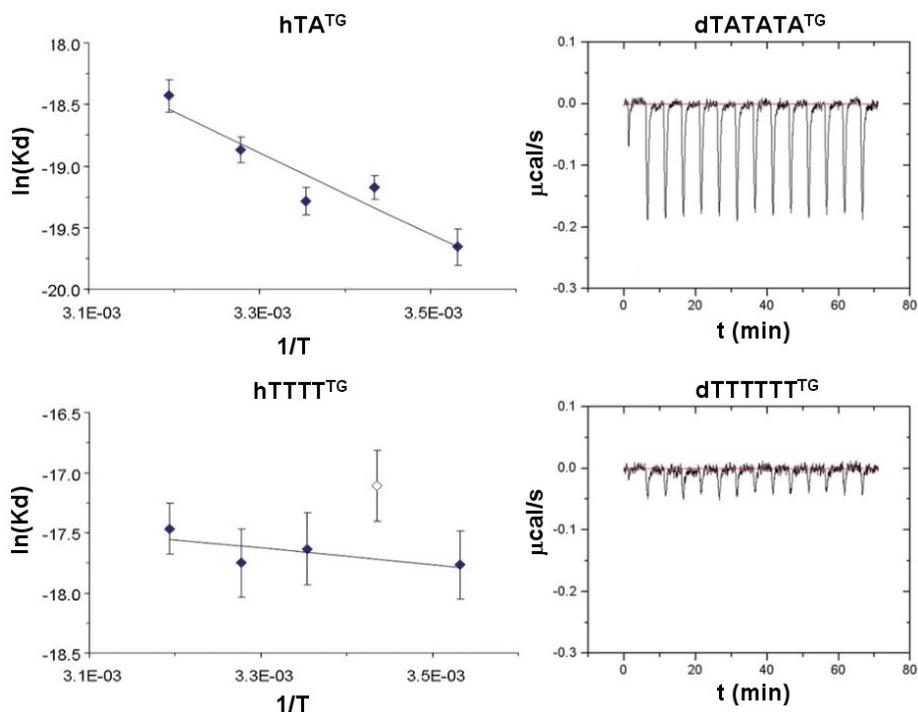


Figura 2.11: Comparación entre las gráficas de van't Hoff de hTA^{TG} y $hTTTT^{TG}$ obtenidas por SPR (izquierda) y los termogramas de ITC correspondientes a $dTATATA^{TG}$ y $dTTTTTT^{TG}$ (derecha).

Tabla 2.3: Parámetros termodinámicos de la interacción entre elinafide y horquillas y dúplex de ADN, obtenidos por experimentos de SPR e ITC, respectivamente, a 25 °C.

complejo TGCA	ΔH (Kcal/mol) (ITC)	ΔH (Kcal/mol) (SPR)	$T\Delta S$ (Kcal/mol) (SPR)
hTA^{TG}	-	$-6,7 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,2$
a	$-4,3 \pm 0,6$	$-6,0 \pm 2,4$	$5,6 \pm 2,4$
b	$-0,0 \pm 0,6$	$-1,4 \pm 1,0$	$9,3 \pm 0,9$

a: $hATATA^{TG}$ (SPR) o $dTATATA^{TG}$ (ITC); b: $hTTTTT^{TG}$ (SPR) o $dTTTTTT^{TG}$ (ITC).

se realizaron experimentos de ITC en disolución para determinar la entalpía de unión (ΔH_b) de elinafide a los dúplex análogos dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG}. En concordancia con los valores determinados por SPR, el valor ΔH_b obtenido para la interacción entre elinafide y dTTTTTT^{TG} resultó ser notablemente menos negativo que el medido para dTATATA^{TG} (0,0 vs -4,3 Kcal/mol, respectivamente, Figura 2.11).

2.4.2.5. Efectos estructurales

Todos los complejos TGCA-elinafide exhibieron NOEs diagnóstico entre LU H9 y C9 H5, LU H7 y A10 H1', LU H5 y A10 H2, LU H4 y G8 H8, y LU H4 y T7 H1' entre otros, indicando bisintercalación de los anillos de naftalimida en los pasos T7 · A10 – G8 · C9 desde el surco mayor, al igual que en tetranucleótidos TGCA estudiados previamente[82; 98] (Figuras 2.4, 2.5 y 2.8). En los complejos AGCT-elinafide se observaron interacciones similares, lo que demostró que también existía bisintercalación de los anillos del fármaco en los pasos A7 · T10 – G8 · C9 desde el surco mayor.

A pesar de que existió bisintercalación en todos los casos, se detectaron diferencias significativas en la estructura de los distintos complejos estudiados. Estas diferencias se aprecian más claramente al comparar dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG}, por lo que se utilizarán estos dos complejos para ilustrarlas.

En la Figura 2.12 se muestran los espectros NOESY de cada complejo a 25 °C y 250 ms de tiempo de mezcla, en presencia de 1,1 y 2,5 equivalentes de elinafide, respectivamente. Los picos de cruce intrarresiduo H1'-H6/H8 están etiquetados con el nombre y número de residuo, y los picos de cruce intrarresiduo H5-H6 de citosina con el número de residuo. Las conectividades entre picos intrarresiduo y picos de cruce secuenciales se indican mediante flechas horizontales. En el caso de los pasos T7 · A10 – G8 · C9 los NOE secuenciales son significativamente más débiles o indetectables (se identifican con una X), debido a la bisintercalación de elinafide. En el caso del complejo dTATATA^{TG}-elinafide (espectro A) los picos de cruce intramoleculares (a-j) corresponden a: a, G8 H8-C9 H5; b, A4 H2-A14 H1'; c, A4 H2-T5 H1'; d, A6 H2-T7 H1'; e, A6 H2-A10 H2; f, A12 H2-A6 H1'; g, A12 H2-T13 H1'; h, A14 H2-A4 H1'; i, A14 H2-T15 H1'; y j, LU H8-H9. Los picos intermoleculares (k-o, etiquetados en azul) se asignan como: k, LU H9-C9 H5; l, LU H7-A10 H1'; m, LU H6-A10 H1'; n, LU H4-T7 H1'; y o, LU H5-A10 H2. El pico de cruce p (coloreado en rojo) se debe al intercambio conformacional de los protones de elinafide LU H5 y LU H8 como consecuencia de la rotación de 180° de los anillos (solapado con LU H7-H8); mientras que q (también en rojo)

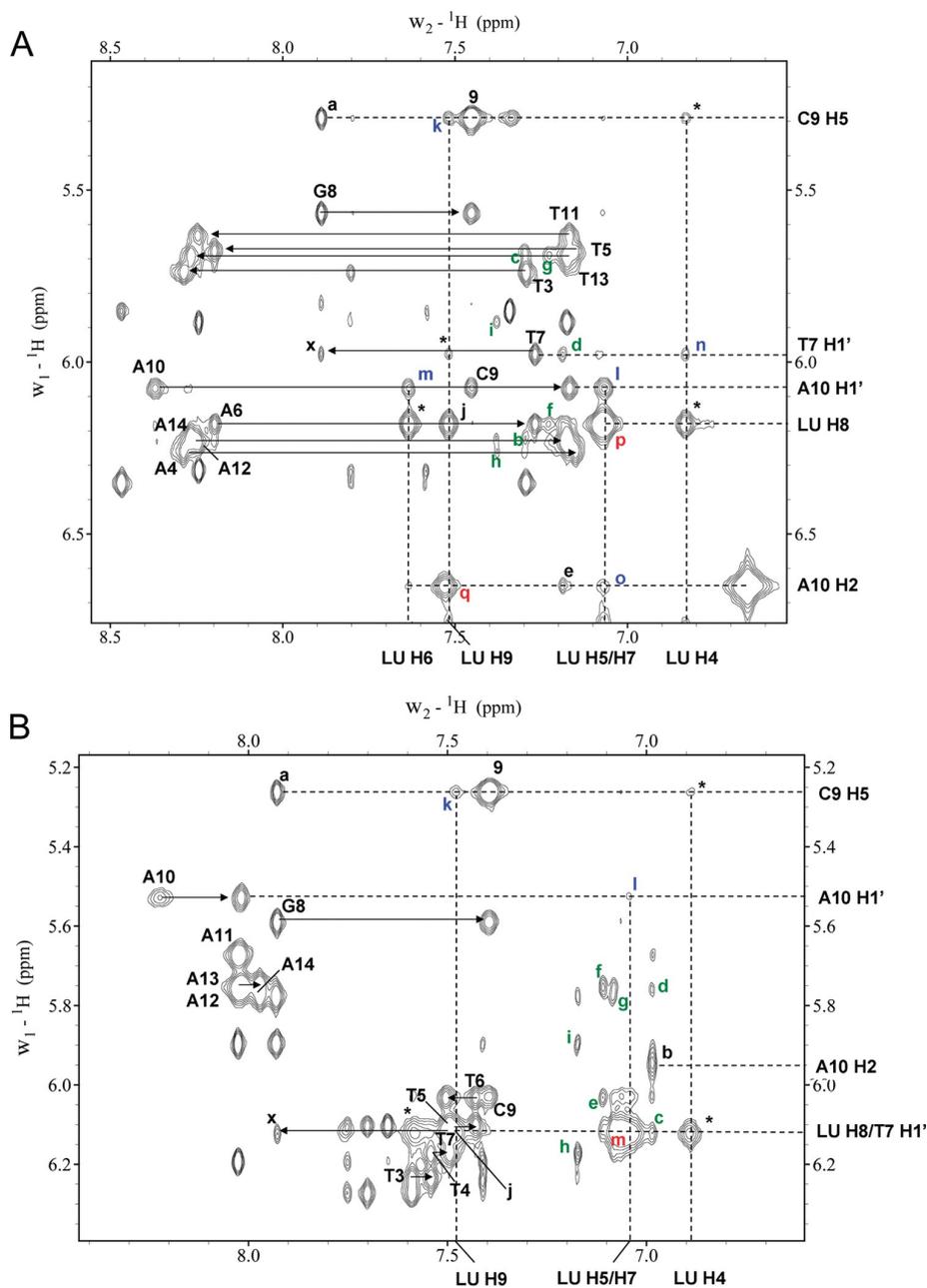


Figura 2.12: Región aromática-H1' de los espectros NOESY de dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} a 25 °C y 250 ms de tiempo de mezcla. Las letras minúsculas indican picos de cruce intramoleculares (negras y verdes) e intermoleculares (azules), y picos de intercambio conformacional (rojas). Todos los NOE aparecen identificados en el texto.

es un pico de intercambio entre las resonancias A10 H2 del dúplex libre y A10 H2 del complejo. En cuanto al complejo dTTTTTT^{TG}-elinafide (espectro B), los picos de cruce intramoleculares (a-j) son: a, G8 H8-C9 H5; b, A10 H2-A11 H2; c, A11 H2-T7 H1'; d, A11 H2-A12 H1'; e, A12 H2-T6 H1'; f, A12 H2-A13 H1'; g, A13 H2-A14 H1'; h, A14 H2-T4 H1'; i, A14 H2-A15 H1'; y j, LU H8-H9. Los picos k y l (en azul) son intermoleculares: k, LU H9-C9 H5; y l, LU H7-A10 H1'. Por último, el pico m (en rojo) se debe al intercambio conformacional entre los protones de LU H5 y H8 como consecuencia del proceso de rotación de los anillos (confirmado mediante experimentos ROESY), y al NOE LU H7-H8. En ambos espectros, los picos NOE influidos por el proceso de intercambio conformacional están etiquetados con asteriscos.

En estos espectros NOESY de estos complejos se observa que mientras los NOEs entre G8 y C9 y los protones de elinafide son similares (compárense los picos de cruce k de ambos espectros), las interacciones entre los protones aromáticos de elinafide y los protones del par exterior T7 · A10 son de intensidad media en dTATATA^{TG} (picos de cruce l y m, espectro A), pero mucho más débiles o indetectables en el complejo dTTTTTT^{TG} (pico de cruce l en el espectro B). Por otro lado, si se comparan las interacciones NOE secuenciales e *interhebra* entre protones H2 de adenina y protones H1' (etiquetadas en verde), se puede apreciar que las pertenecientes a dTTTTTT^{TG} son más fuertes, indicando que la secuencia T1 · A16 – T6 · A11 que flanquea el sitio TGCA en dTTTTTT^{TG} tiene una conformación típica de trectos A, caracterizada por una inclinación negativa de las bases y un surco menor más estrecho[106; 107; 108]. Sin embargo, las resonancias A10 H2 y H8 están ensanchadas en dTTTTTT^{TG}, y A10 H2 da lugar a NOEs más débiles con H2 y H1' de A11. Estas observaciones apuntan a una interrupción de la estructura del tracto A en el paso T7 · A10 – T6 · A11 en este complejo.

Los complejos AGCT-elinafide resultaron tener características semejantes. Los NOEs fuertes LU H4-A7 H1' y LU H5,H6-A7 H2 observados en el complejo dTTATAT^{AG}[109] indicaron la existencia de un apilamiento estable de los anillos de naftalimida sobre A7. Sin embargo, estos NOEs intermoleculares entre los protones aromáticos de elinafide y el par A7 · T10 resultaron ser mucho más débiles en el complejo dAAAAAA^{AG}, como se observó en el complejo dTTTTTT^{TG}. El segmento flanqueante A1 · T16 – A6 · T11 de dAAAAAA^{AG} también resultó poseer una conformación típica de trectos A y, asimismo, la escasa intensidad de los picos cruzados A6 H2-A7 H1' y A7 H2-T11 H1' indicó que el tracto A también se interrumpió en el paso A6 · T11 – A7 · T10 de este complejo[109], como se detectó en dTTTTTT^{TG}.

2.4.2.6. Dinámica de los anillos de naftalimida

Varios trabajos publicados anteriormente demostraron que los anillos de elinafide intercalados en el sitio TGCA sufren un proceso de intercambio conformacional entre dos estados de intercalación equivalentes, a través de un movimiento de rotación de 180° de los anillos intercalados[82; 98]. En todos los complejos estudiados se observaron por RMN picos cruzados de intercambio entre resonancias de protones situados en posiciones simétricas de los anillos intercalados (Figura 2.12), así como un ensanchamiento selectivo de las mismas al incrementar la temperatura. Las velocidades de intercambio se determinaron mediante experimentos de transferencia de magnetización y NOESY a tiempos de mezcla cortos (baja temperatura); y análisis de ancho de líneas utilizando el programa Mexico (ver apartado 2.3.2.3), y oscilaron entre 13 y 32 s^{-1} a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en los diferentes complejos TGCA y AGCT (Tabla 2.1 y Figura 2.13). Estos movimientos de rotación son claramente más rápidos que las velocidades de disociación de intercalación determinadas también por RMN a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (entre 1 y 4 s^{-1} ; k_d^{int} , Tabla 2.1)[98], y mucho más rápidos que las velocidades de disociación ADN-ligando obtenidas por SPR a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (entre $1,1 \cdot 10^{-2}$ y $2,2 \cdot 10^{-2}\text{ s}^{-1}$, Tabla 2.2).

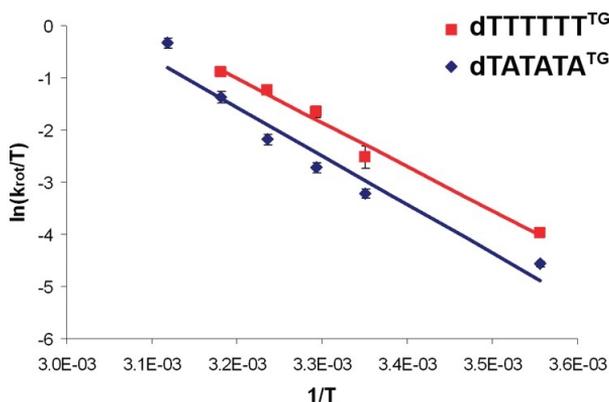


Figura 2.13: Velocidades de rotación de los anillos intercalados de elinafide en función de la temperatura en los complejos dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG}.

Las secuencias flanqueantes influyeron de manera significativa en la velocidad de rotación de los anillos intercalados: en los complejos TGCA flanqueados por trectos A las velocidades fueron aproximadamente dos veces más rápidas que en los mismos complejos flanqueados por pares AT alternantes. En los complejos AGCT se observó una tendencia similar: la velocidad de rotación fue 1,6 veces

más rápida en dAAAAAA^{AG} que en dTTATAT^{AG} (Tabla 2.1).

2.4.2.7. Dinámica de los pares de bases

Estos experimentos tuvieron por finalidad investigar si las diferencias en parámetros de unión, estructura y dinámica observadas previamente estaban correlacionadas con los movimientos de los pares de bases del ADN en los distintos complejos. Para ello se midió la velocidad de apertura de los pares de bases en los complejos dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG}, y dTTATAT^{AG} mediante experimentos de intercambio de los protones imino con el disolvente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.4 y la Figura 2.14. De nuevo, las diferencias más notables se detectaron entre los complejos dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG}, y se describen a continuación.

En cuanto a las velocidades de apertura de los pares centrales G8 · C9 del sitio TGCA, éstas fueron significativamente menores que las determinadas para pares análogos en dúplex aislados de ADN[110], como ya se había observado previamente en otros complejos formados por fármacos bisintercalantes[111]. Estas velocidades fueron significativamente mayores para dTTTTTT^{TG} y resultaron estar en el mismo rango que las velocidades de rotación de los anillos de elinafide (compárense los valores k_{rot} y k_{op} de los complejos dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} en las Tablas 2.1 y 2.4, respectivamente).

Tabla 2.4: Velocidad de apertura de los pares de bases en los complejos de elinafide con dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG} y dTTATAT^{AG}.

complejo	4 · 13	5 · 12	6 · 11	7 · 10	G8 · C9
	<i>complejos TGCA</i>				
dTATATA ^{TG}	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	333(3)	8 ± 2(129 ± 32)
dTTTTTT ^{TG}	33 ± 2(30 ± 2)	<i>b</i>	<i>b</i>	>> 1000(<< 1)	37 ± 19(27 ± 14)
	<i>complejos AGCT</i>				
dTTATAT ^{AG}	<i>c</i>	<i>c</i>	77 ± 6(13 ± 1)	1000(1)	7 ± 3(141 ± 52)

Se muestran las velocidades de apertura (k_{op} , s⁻¹) y tiempos de vida (τ_{op} , ms, en paréntesis) de los pares 4 · 13-8 · 9, a 8 °C y pH 8,8. *a*: Las velocidades de apertura de estos pares A · T flanqueantes no se pudieron determinar en este complejo. *b*: Señales solapadas de T5 · A12 y T6 · T11, con $k_{op} = 38 \pm 4s^{-1}$ ($\tau_{op} = 26 \pm 3$ ms). *c*: Señales solapadas de T4 · A13 y A5 · T12, con $k_{op} = 71 \pm 10s^{-1}$ ($\tau_{op} = 14 \pm 2$ ms).

El segmento T4 · A13 – T6 · A11 del complejo dTTTTTT^{TG} exhibió velocidades de apertura más lentas que las de los otros dos complejos, típicas de tractos A[112] (Tabla 2.4 y Figura 2.14). Sin embargo, la velocidad de apertura del par exterior T7 · A10 del tetranucleótido TGCA de unión fue mucho más rápida en dTTTTTT^{TG}: mientras que en dTATATA^{TG} se observó una velocidad de aproximadamente 333 s⁻¹ para este par, en el caso del complejo dTTTTTT^{TG} esta

velocidad se estimó en más de 1000 s^{-1} (Tabla 2.4). De hecho, la resonancia imino de este par T7 · A10 se ensanchó a pH 8,8, antes de comenzar la adición de base (Figura 2.14).

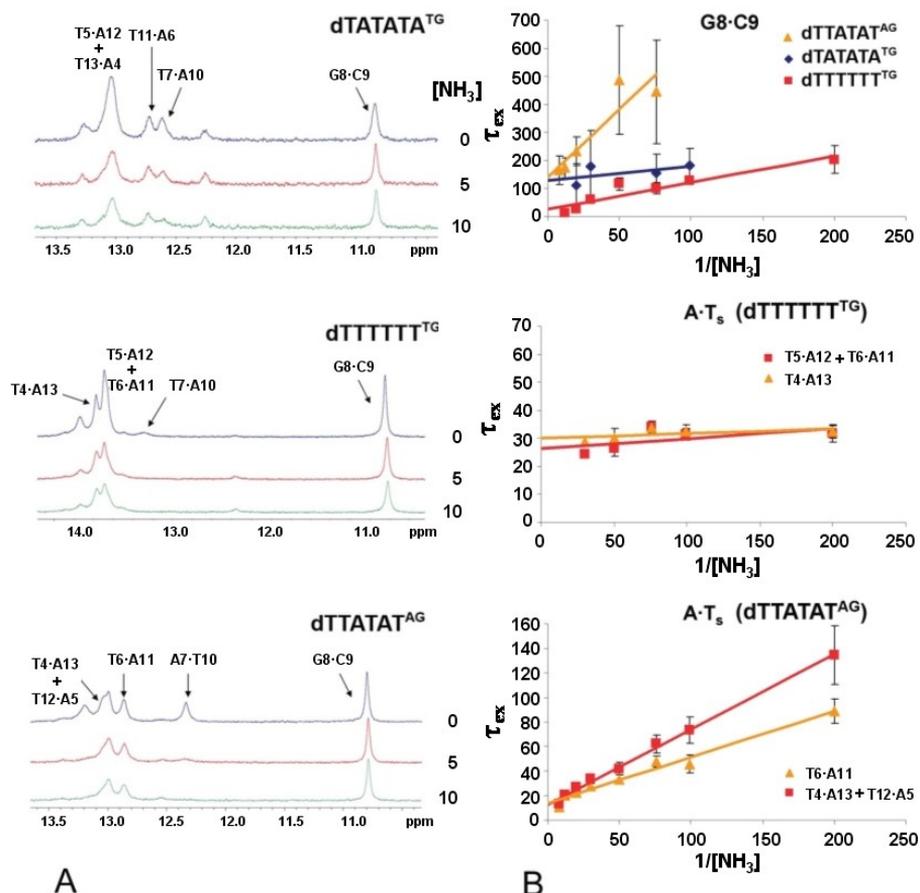


Figura 2.14: A) Región imino de los espectros $^1\text{H}_2\text{O}$ a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 8,8 de $\text{dTATATA}^{\text{TG}} - \text{LU}$, $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}} - \text{LU}$ y $\text{dTTATAT}^{\text{AG}} - \text{LU}$ en función de la concentración de NH_3 . B) Comparación de los tiempos de vida (τ_{ex} a $1 \setminus [\text{NH}_3] = 0$) de distintos pares de bases en los mismos complejos.

2.4.3. Discusión

Puesto que en la serie de complejos estudiados los tetranucleótidos de unión son los mismos y sólo varían las secuencias flanqueantes que no establecen contactos directos con elinafide, las diferencias observadas en las secciones anteriores demuestran inequívocamente que el reconocimiento del ADN por parte de elinafide está fuertemente mediado por efectos indirectos, que dependen de la naturaleza de las secuencias que flanquean el sitio de unión[109]. Las diferencias más apreciables se observaron entre los complejos formados por sitios TGCA flanqueados por pares AT alternantes (dTATATA^{TG}, hATATA^{TG} y hTA^{TG}) y trectos A continuos en 3' (dTTTTTT^{TG} y hTTTTTT^{TG}), por lo que la discusión se centrará en estas secuencias.

Los experimentos de SPR detectaron una diferencia de aproximadamente un orden de magnitud entre las K_d de unión de elinafide a las horquillas hTA^{TG} y hATATA^{TG} y la K_d de unión a la horquilla hTTTTTT^{TG}, flanqueada por un tracto A: $2, 1 - 4, 2 \cdot 10^{-9}$ frente a $2, 2 \cdot 10^{-8}$ (Tabla 2.2). Desde el punto de vista termodinámico, la razón de esta diferencia entre las K_d estriba en los valores de ΔH medidos mediante experimentos SPR, significativamente más negativos en hTA^{TG} y hATATA^{TG} (Tabla 2.3). Estas entalpías de unión negativas son habituales en complejos de intercalación. En cambio, en hTTTTTT^{TG} el valor de ΔH fue menor, y mayor el de ΔS . Esta situación es típica en interacciones que implican unión al surco, que normalmente están controladas por el componente entrópico de la energía libre de unión[113]. Los valores de ΔH obtenidos por ITC para los dúplex análogos dTTTTTTT^{TG} y dTATATA^{TG}, corroboraron estas observaciones (Tabla 2.3 y Figura 2.11).

Analizando los resultados obtenidos por RMN y experimentos de desnaturación térmica para los dúplex dTATATA^{TG} y dTTTTTTT^{TG}, se observó una tendencia similar, pero las diferencias entre ambos complejos fueron sustancialmente mayores. En el caso de dTTTTTTT^{TG}, elinafide no interacciona con el tracto A flanqueante y se estimó por RMN una constante de disociación del tetranucleótido TGCA de aproximadamente $3 \cdot 10^{-4}$ M, cuatro órdenes de magnitud más alta que la determinada por SPR para una secuencia similar. Este valor es una constante de disociación de intercalación, ya que se obtuvo en base a las señales aromáticas de ADN intercalado y no intercalado durante su valoración con elinafide: para este sistema fueron necesarios 2,5 equivalentes de ligando para ocupar totalmente el sitio de intercalación[109] (Tabla 2.1). También se observó una gran diferencia entre dTATATA^{TG} y dTTTTTTT^{TG} en las estabilizaciones térmicas inducidas por la unión de elinafide. El valor de ΔT_m fue de 6 °C para dTATATA^{TG}, pero despreciable en dTTTTTTT^{TG}. Aplicando

la ecuación 2.13, esta diferencia se traduciría en una K_d 10.000 veces más baja en $dTATATA^{TG}$ que en el caso de $dTTTTTT^{TG}$.

Al comparar el resto de los complejos se confirma que las secuencias que flanquean los sitios de unión TGCA y AGCT efectivamente ejercen una influencia importante en los valores de ΔT_m (Tabla 2.1). El factor que más afecta al valor de ΔT_m es la existencia de un tracto A de cuatro o más nucleótidos en el lado 3' de TGCA (presente en las secuencias $dTTTTTT^{TG}$ y $dTTATTT^{TG}$). Si se cumple esta condición, los valores de ΔT_m son siempre muy reducidos: si se comparan $dTTATAT^{TG}$ y $dTTATTT^{TG}$ en la Tabla 2.1 se puede comprobar que el cambio de uno de los nucleótidos flanqueantes provoca una disminución de 4 °C en ΔT_m , ya que esta alteración supone la formación de un tracto A de cuatro nucleótidos. El efecto de los trectos A flanqueantes depende también de su orientación con respecto al sitio de unión: cuando el tracto está en el lado 3' del sitio TGCA (como en $dTTTTTT^{TG}$ y $dTTATTT^{TG}$), la disminución en la afinidad es mucho mayor que en el complejo $dAAAAAA^{AG}$, con un tracto A situado en el lado 5' del sitio AGCT.

Los resultados de RMN aportaron información sobre el mecanismo molecular responsable del efecto indirecto de los trectos A en la interacción ADN-elinafide. La intensidad de los picos NOE indicó que los contactos de apilamiento entre los anillos de naftalimida y los pares adyacentes T7 · A10 (o A7 · T10) eran significativamente más débiles en los complejos $dTTTTTT^{TG}$ y $dAAAAAA^{AG}$, flanqueados por trectos A, que en sitios de unión flanqueados por pares AT alternantes, como $dTATATA^{TG}$ y $dTTATAT^{AG}$. Además, la conformación de tracto A de los pares flanqueantes se interrumpió en los pasos T6 · A11 – T7 · A10 en $dTTTTTT^{TG}$; y A6 · T11 – A7 · T10 en $dAAAAAA^{AG}$ (Figura 2.12). La velocidad de apertura de las bases del par T7 · A10 resultó ser significativamente más elevada en $dTTTTTT^{TG}$ con respecto a $dTATATA^{TG}$ (Tabla 2.4 y Figura 2.14), demostrando una mayor inestabilidad de este par en $dTTTTTT^{TG}$. En concordancia con estos resultados, también se observó una mayor anchura de líneas para las resonancias no intercambiables del par 7 · 10 de $dTTTTTT^{TG}$ y $dAAAAAA^{AG}$ en relación al mismo par en los complejos $dTATATA^{TG}$ y $dTTATAT^{AG}$ (Figura 2.12).

La mayor debilidad de los contactos de apilamiento intra- e intermoleculares en el sistema $dTTTTTT^{TG}$ -elinafide es consistente con el menor valor de ΔH observado para este complejo. El mecanismo de discriminación de trectos A flanqueantes por elinafide se debe probablemente a la dificultad de estos complejos de estabilizar sus contactos de apilamiento, y pone de relieve la importancia de este tipo de interacciones en la estructura del ADN y su reconocimiento por pequeños ligandos. Existen estructuras de RMN y rayos-X de trectos A ais-

lados situados tanto en el lado 3' de pasos GC (como ocurre en la secuencia dTTTTTT^{TG}) como en el lado 5' (dAAAAAA^{AG}) [106; 107; 108; 114; 115]. Estos trectos se caracterizan por poseer dos pilas separadas de bases de adenina y timina fuertemente solapadas entre sí e inclinadas negativamente. En las uniones T_n – GC y A_n – GC, las bases se acomodan doblando el eje longitudinal de los pares de bases y curvando el eje de la hélice hacia el surco mayor (*buckle* y *roll*; Figura 1.5). La intercalación de los anillos de elinafide en un paso T_n – GC (complejo dTTTTTT^{TG}) perturba esta conformación al obligar al último par de bases del tracto A a optimizar su interacción con los anillos del ligando a través de interacciones *interhebra* A10-naftalimida-guanina (Figura 2.15), y debilita los contactos de apilamiento de este par T7 · A10 con el resto del tracto A, como indican los datos de RMN. En el caso de dAAAAAA^{AG} las consideraciones son similares, pero en este caso las interacciones de apilamiento *intrahebra* A7-naftalimida-guanina probablemente son más efectivas, por lo que el coste energético de la intercalación en el tracto A situado en el lado 5' del sitio de unión (A_n – GC) es menor.

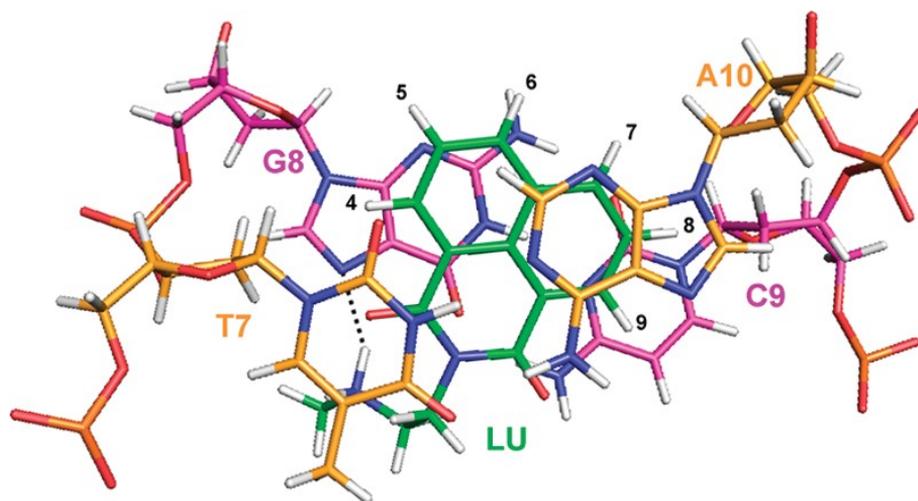


Figura 2.15: Sitio de unión TGCA-elinafide [82]. Los anillos de naftalimida se muestran en verde; los átomos de carbono del ADN en naranja (par T7 · A10) y rosa (par G8 · C9).

En este contexto, es importante señalar que los anillos de naftalimida son más pequeños que los de la mayoría de los intercalantes conocidos (Figura 2.2); las interacciones de apilamiento con las pirimidinas del tetranucleótido de unión TGCA no son eficaces, sobre todo en el caso de las timinas [82] (Figura 2.15). Además, observando la estructura de elinafide bisintercalado puede apreciarse

que los grupos carbonilo de la naftalimida, de carácter electronegativo, se sitúan sobre los átomos O6 y N7 de la guanina, también electronegativos, forzados por los contactos electrostáticos y de enlace de hidrógeno establecidos entre esta base y los grupos amino protonados del espaciador. Estas características explican que la interacción de este fármaco con el ADN sea especialmente sensible a efectos indirectos mediados por las preferencias estructurales de las moléculas de ADN.

Además de los procesos de unión al surco e intercalación, existe un tercer proceso que añade complejidad a la interacción ADN-elinafide. Los anillos de naftalimida sufren movimientos de rotación de 180° entre dos estados intercalados equivalentes en todos los complejos. Este fenómeno tiene lugar a velocidades de entre 13 y 32 s^{-1} , bastante mayores que las velocidades de disociación de intercalación (Tabla 2.1)[98] y mucho mayores que las velocidades de disociación de los complejos ADN-ligando (Tabla 2.2). Dado que este proceso dinámico depende de la secuencia de los pares de bases que flanquean el sitio de unión TGCA[98], estos datos proporcionan información adicional sobre la existencia de efectos indirectos en la interacción ADN-elinafide. Tanto en los complejos TGCA como en los AGCT los mayores valores de velocidad de rotación correspondieron a las secuencias que contenían trectos A flanqueantes. Las velocidades de apertura de los pares G · C y A · T del tetranucleótido TGCA de unión mostraron un comportamiento similar, siendo más elevadas en dTTTTTT^{TG} que en el complejo dTATATA^{TG} flanqueado por una secuencia alternante. Además, las magnitudes de las velocidades de rotación de los anillos de elinafide y las velocidades de apertura de los pares de bases centrales G8 · C9 de dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG}, y dTTATAT^{AG} fueron semejantes (Tablas 2.1 y 2.4), por lo que ambos procesos están posiblemente interrelacionados.

La aparente discrepancia entre los valores de K_d y velocidades de disociación obtenidos mediante experimentos de SPR, y los determinados por RMN y desnaturalización térmica es sorprendente. Sin embargo, este resultado puede explicarse considerando el proceso detectado por cada una de estas técnicas. Los experimentos de espectroscopía de RMN midieron fundamentalmente cambios de desplazamiento químico e interacciones de los protones aromáticos del ADN al producirse el apilamiento de los anillos de naftalimida, es decir, detectaron principalmente intercalación. Lo mismo puede decirse de los experimentos de desnaturalización térmica: como se comprobará en la siguiente sección, cuando el elinafide bisintercala en el tetranucleótido de alta afinidad, el espaciador aminoalquílico interactúa simultáneamente con guaninas de hebras opuestas a través de interacciones electrostáticas, y los anillos del ligando quedan apilados entre las bases G y A, también ubicadas en hebras opuestas[82] (Figuras 2.4 y 2.15). Es decir, el proceso de bisintercalación genera contactos específicos *interhebra* que estabilizan la estructura de doble hélice y contribuyen decisivamente a las

estabilizaciones térmicas observadas. En cambio, SPR mide cambios en el índice de refracción que tienen lugar en la superficie del chip como consecuencia de la unión del elinafide al ADN inmovilizado. Estos cambios no describen necesariamente una situación de intercalación. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la aparente contradicción entre los resultados obtenidos mediante estas técnicas puede explicarse mediante un modelo de dos interacciones superpuestas: un proceso consistente en la unión de ligando al surco del ADN con alta afinidad, con K_d del orden de nanomolar y velocidades de disociación de 10^{-2} s^{-1} ; y un segundo proceso de intercalación de los anillos, de menor afinidad, que se caracteriza por velocidades de disociación más rápidas ($1-4 \text{ s}^{-1}$) y K_d sustancialmente más altas en algunos casos (Figura 2.16). Los efectos indirectos de secuencia pueden observarse en ambos procesos, pero son especialmente importantes en el caso de la intercalación.

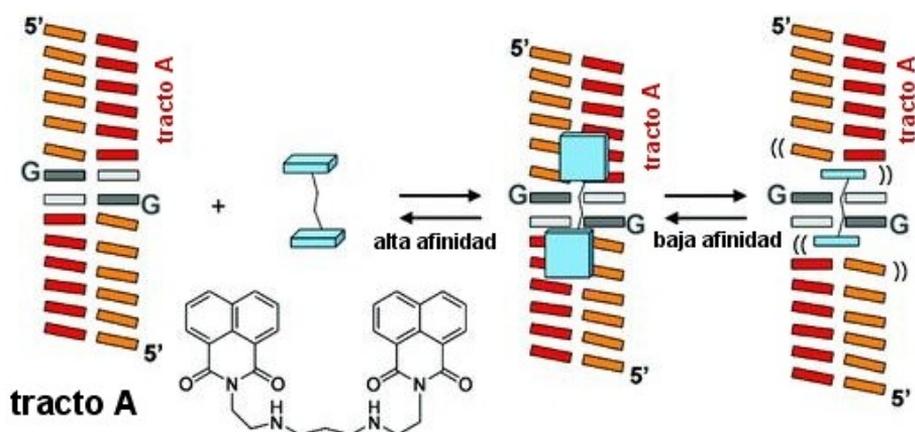


Figura 2.16: Modelo de dos pasos superpuesto para la interacción de elinafide con un tetranucleótido TGCA flanqueado por un tracto A.

2.5. Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

2.5.1. Estrategia de trabajo

En esta sección se analizará el mecanismo por el que los ligandos bisnaftalimídicos reconocen el sitio de unión TGCA en el que bisintercalan. Estudios anteriores indicaron que existen dos componentes principales en la interacción entre el elinafide y el ADN. Uno de ellos es el derivado de los contactos de apilamiento entre los anillos intercalados de naftalimida y los pares de bases adyacentes. El segundo son las interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno establecidas entre el espaciador aminoalquílico del ligando (cargado positivamente) y el surco mayor[82]. Con objeto de evaluar el peso del componente de apilamiento en el reconocimiento del ADN por ligandos bisnaftalimídicos, se estudió una serie de complejos en los que se varió la composición de las bases del sitio de unión principal y la de los anillos aromáticos del fármaco bisintercalante.

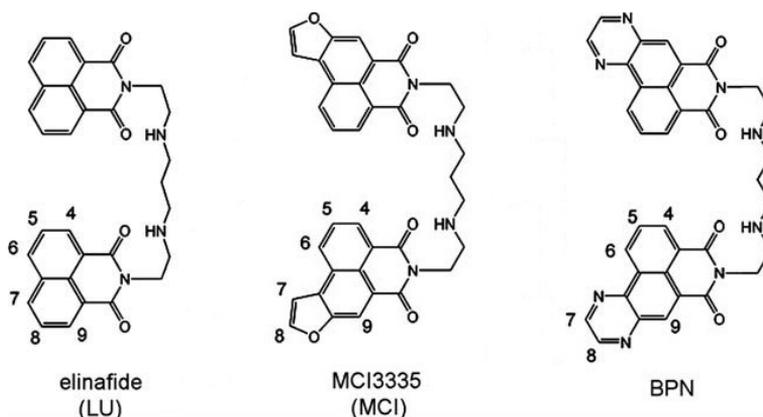


Figura 2.17: Estructuras de elinafide, MCI3335 y BPN.

Así, mediante RMN y experimentos de desnaturalización térmica se evaluó la interacción del dúplex dTTATAT^{TG} con elinafide (que posee dos anillos de naftalimida) y sus análogos MCI3335 (conteniendo anillos de furonafthalimida en lugar de naftalimida; identificado como MCI en lo sucesivo)[80] y BPN (con anillos de pirazinaftalimida)[79] (Figura 2.17). Para analizar el efecto de la composición de las bases, se estudiaron mediante los mismos métodos los complejos formados por elinafide y las secuencias dTTATAT^{TG} (conteniendo un tetranucleótido de

unión TGCA no modificado), dTTATAT^{TI} (conteniendo un tetranucleótido TICA con inosinas en lugar de guaninas) y dTTATAT^{T-D} (con un tetranucleótido TGCD que contiene 2,6-diaminopurinas en lugar de adeninas) (Figura 2.18).

Para los experimentos de SPR se emplearon cuatro horquillas de 32 nucleótidos: dos de ellas con un sitio de unión TGCA inalterado, flanqueado por pares AT alternantes (hATATA^{TG}) o trectos continuos de A en 3' (hTTTTT^{TG}), y otras dos con un sitio de unión modificado: hATATA^{TI} (con inosina en lugar de guanina en el tetranucleótido de unión) y hATATA^{T-D} (2,6-diaminopurina en lugar de adenina) (Figura 2.18).

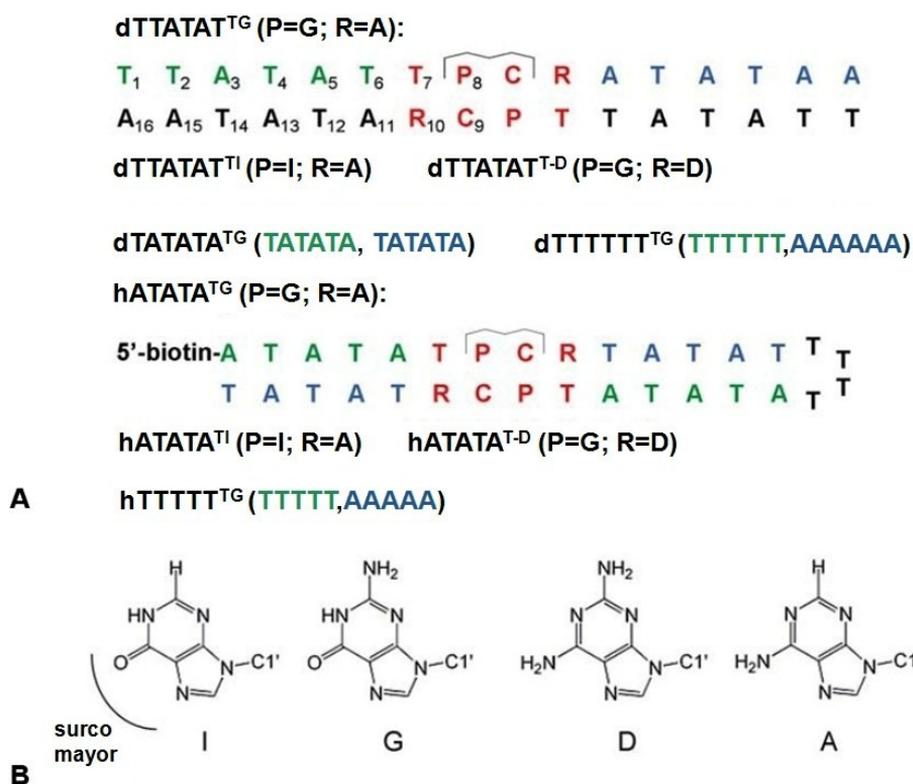


Figura 2.18: A) Composición de los dúplex y horquillas utilizados. Los sitios de unión TPCR se muestran en rojo, mientras que las secuencias flanqueantes en 5' y 3' están resaltadas en verde y azul, respectivamente. B) Estructura de las bases naturales y artificiales contenidas en los oligonucleótidos analizados.

Para examinar la influencia de los contactos electrostáticos del espaciador, se

2.5 Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

analizó el efecto del pH y la fuerza iónica en la estructura, dinámica y parámetros de unión de distintos complejos entre elinafide y ADN. En este caso, mediante RMN y experimentos de desnaturalización térmica se estudiaron los complejos de elinafide con los dúplex dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} a dos condiciones diferentes de pH (6,9 y 8,8) y fuerza iónica (150 mM NaCl y 1 M NaCl). El efecto del pH también se evaluó mediante experimentos SPR analizando las horquillas hATATA^{TG} y hTTTTTT^{TG} a pH 8,8.

2.5.2. Resultados

2.5.2.1. Efecto de la composición del anillo aromático

El efecto de los contactos establecidos por los anillos del ligando se evaluó comparando la interacción de una doble hélice provista de un sitio de unión estándar TGCA (dTTATAT^{TG}) con tres ligandos bisnaftalimídicos dotados de un mismo espaciador diazanonileno pero conteniendo diferentes anillos aromáticos: naftalimida (elinafide), furonaftalimida (MCI) y pirazinonaftalimida (BPN) (Figura 2.17). En sus complejos con dTTATAT^{TG}, estos ligandos deben establecer interacciones similares entre el espaciador y el surco, pero distintos contactos de apilamiento.

Como en el caso de elinafide, los complejos de ADN con MCI y BPN fueron preparados monitorizando mediante RMN la valoración de dTTATAT^{TG} por los ligandos hasta lograr la ocupación total del tetranucleótido de unión. Los ratios ligando: ADN que se necesitaron para completar las valoraciones fueron 1,4:1 (elinafide), 2,1:1 (MCI) y 2,6:1 (BPN). Al igual que en los complejos ADN-elinafide (Figura 2.12), se utilizaron experimentos NOESY bidimensionales para determinar el sitio de unión preferido, así como el modo de unión y la estabilidad de los complejos.

En la Figura 2.19 se muestra la región aromática-H1' de espectros NOESY de los complejos de dTTATAT^{TG} con MCI (A) y BPN (B). Los picos de cruce intrarresiduo H1'-H6/H8 están etiquetados con nombre y número de residuo, mientras que los picos intrarresiduo H5-H6 de citosina se etiquetan con número de residuo. Las conectividades secuenciales se indican mediante flechas horizontales. En el espectro A los picos de cruce intramoleculares (a-h) corresponden a: a, G8 H8-C9 H5; b, A3 H2-A15 H1'; c, A5 H2-T6 H1'; d, A5 H2-A13 H1'; e, A11 H2-A10 H2; f, MCI H5-H7; g, MCI H6-H7; h, MCI H8-H7. Los picos (i-r) etiquetados en azul son intermoleculares: i, MCI H4-T7 H1'; j, MCI H4-G8 H1'; k, MCI H5-T7 H1'; l, MCI H5-G8 H1'; m, MCI H5-A10 H2; n, MCI H6-A10 H2; o, MCI H7-A10 H2; p, MCI H8-C9 H1'; q, MCI H8-A10 H1'; r, MCI H9-C9 H5. El pico etiquetado en rojo con s corresponde a una señal de intercambio del protón H7 de MCI entre sus estados libre y unido. Por su parte, los picos de cruce intramoleculares del espectro B se asignaron como sigue: a, G8 H8-C9 H5; b, A5 H2-T6 H1'; c, A5 H2-A13 H1'; d, A11 H2-T7 H1'; e, A11 H2-A10 H2; f, A11 H2-T12 H1'; g, A13 H2-A5 H1'. Los picos intermoleculares (etiquetados en azul) son: h, BPN H4-T7 H1'; i, BPN H5-T7 H1'; j, BPN H5-G8 H1'; k, BPN H5-A10 H2; l, BPN H6-A10 H2; m, BPN H7-C9 H1'; n, BPN H7-A10 H1'; o, BPN H8-C9 H1'; p, BPN H9-C9 H5.

2.5 Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

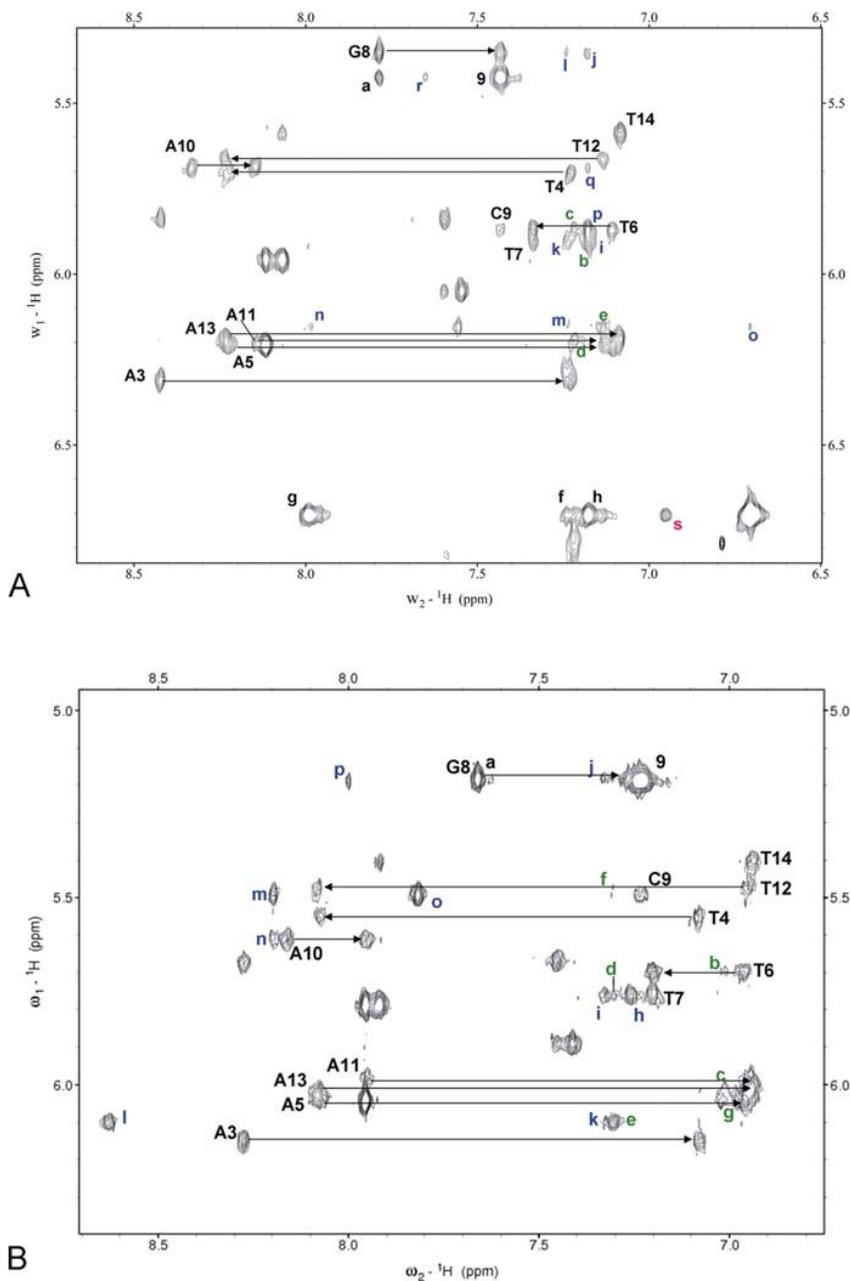


Figura 2.19: Región aromática-H1' de los espectros NOESY de los complejos de dTTATAT^{TG} con MCI y BPN, adquiridos a 25 °C y 250 ms de tiempo de mezcla. Las letras minúsculas indican picos de cruce intramoleculares (negras y verdes) e intermoleculares (azules), y picos de intercambio conformacional (rojas). Todos los NOE aparecen identificados en el texto.

En los espectros de dTTATAT^{TG} con MCI y BPN, los picos secuenciales de los pasos T7-G8 y C9-A10 fueron débiles o indetectables, indicando de que los dos ligandos bisintercalan en el sitio tetranucleotídico TGCA desde el surco mayor, como sucede con elinafide[82; 98] (Figuras 2.12 y 2.19). Sin embargo, en el caso de MCI y BPN se detectaron varios picos NOE intermoleculares adicionales que indicaron que los anillos de estos ligandos exhibían una mayor superficie de apilamiento con los pares de bases adyacentes con respecto a elinafide: los NOEs entre MCI H7 y A10 H2 (pico o, Figura 2.19 A) y entre MCI H8 y C9 H1', H2' y H2'' (p) indicaron que el anillo de furano de MCI se apila entre las bases C9 y A10[116] (Figuras 2.17 y 2.18). En cuanto a BPN, los NOEs entre BPN H7 y C9 H1' (pico m, Figura 2.19 B), BPN H7 y A10 H1' (n) y BPN H8 y C9 H1', H2' y H2'' (o) también indicaron apilamiento de la pirazina entre C9 y A10 H8[116].

Por otro lado, los complejos de MCI y BPN resultaron ser dinámicamente más estables que los de elinafide, ya que en estos casos no se observó la presencia de picos de intercambio entre resonancias de protones naftalimídicos. Esto significa que en estos complejos no tiene lugar el proceso dinámico de rotación de los anillos intercalados detectado en los sistemas ADN-elinafide[82; 98].

También se llevaron a cabo experimentos de fusión para medir las estabilizaciones térmicas inducidas por la unión de elinafide, MCI y BPN al dúplex dTTATAT^{TG}, y comparar los complejos estudiados por RMN mediante este parámetro. Las estabilizaciones térmicas ocasionadas por la bisintercalación de MCI y BPN (13 y 9 °C respectivamente) fueron sensiblemente mayores que la observada para la bisintercalación de elinafide (6 °C) (Figura 2.20 y Tabla 2.5).

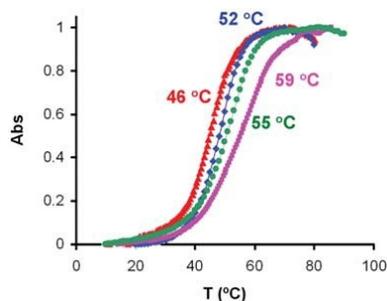


Figura 2.20: Curvas de fusión de dTTATAT^{TG} libre (en rojo), y unido a elinafide (ratio 1,4:1, azul), BPN (2,1:1, verde) y MCI (2,6:1, magenta).

También se realizaron experimentos de SPR para obtener valores cuantitativos de las constantes de disociación de equilibrio, velocidades de asociación y disociación, y número de sitios y estequiometrías de unión, para las interacciones de elinafide, MCI y BPN con la horquilla hATATA^{TG}. En los tres casos, los mejores ajustes de las curvas de unión en estado estacionario se lograron empleando una función de dos sitios, indicando la unión de una sola molécula de ligando a un sitio de alta afinidad, seguida por la asociación de dos o tres moléculas más a un segundo sitio de menor afinidad (Figura 2.21 y Tabla 2.6).

Tabla 2.5: Efecto del anillo intercalante y la composición de bases del ADN en la interacción bisnaftalimida-ADN.

complejo	$T_m^f(^{\circ}C)$	$T_m^b(^{\circ}C)$	$\Delta T_m(^{\circ}C)$	$k_{rot}(s^{-1})$
dTTATAT ^{TG} -LU	46	52	6	15 ± 1
dTTATAT ^{TG} -MCI	46	59	13	0
dTTATAT ^{TG} -BPN	46	55	9	0
dTTATAT ^{TI} -LU	-	50	-	13 ± 1
dTTATAT ^{T-D} -LU	51	54	4	>> 100

Se especifican las temperaturas de fusión de los dúplex libres (T_m^f) y unidos a ligando (T_m^b), las correspondientes estabilizaciones térmicas (ΔT_m), y las velocidades de rotación de los anillos de naftalimida a 25 °C (determinadas mediante experimentos NOESY con tiempos de mezcla muy cortos). T_m^b , ΔT_m y k_{rot} se obtuvieron a los ratios bisnaftalimida:ADN determinados por RMN: dTTATAT^{TG}-LU, 1,4:1; dTTATAT^{TG}-MCI, 2,1:1; dTTATAT^{TG}-BPN, 2,6:1; dTTATAT^{TI}-LU, 1,8:1; dTTATAT^{T-D}-LU, 2,2:1. En el caso de dTTATAT^{TI} no fue posible determinar T_m^f , al presentar este sistema una transición muy lenta de dúplex a hebra simple a baja temperatura.

Estos resultados son consistentes con la unión de una molécula de bisnaftalimida al tetranucleótido TGCA, con una constante de disociación muy baja y similar para los tres ligandos (entre 2 y 5 nM), y un segundo proceso de interacción con valores K_d de entre 96 y 246 nM, consistente en la asociación de dos o tres moléculas más a un sitio de menor afinidad formado por los tractos A · T flanqueantes y el bucle T4 de la horquilla hATATA^{TG} (Figura 2.18). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por RMN para los complejos de elinafide, MCI y BPN con el dúplex dTTATAT^{TG}: los NOEs intermoleculares DNA-bisnaftalimida demostraron que TGCA es el sitio de unión principal en los tres casos, y el ensanchamiento de algunas resonancias de las secuencias A · T flanqueantes evidenció la existencia de los sitios de unión secundarios (Figura 2.19).

2.5.2.2. Efecto de la composición de las bases

El efecto de las interacciones de apilamiento también se evaluó modificando la composición de bases del tetranucleótido de unión en lugar de los anillos del ligando. Para ello se comparó la interacción de elinafide con los dúplex dTTATAT^{TG} (conteniendo un tetranucleótido TGCA natural; descrito en la sección anterior), dTTATAT^{TI} (conteniendo inosina -I- en lugar de guanina en el tetranucleótido de unión TICA) y dTTATAT^{T-D} (con 2,6-diaminopurina -D- en lugar de adenina en el tetranucleótido TGCD) (Figura 2.18). Como se demostró previamente, los anillos de elinafide se apilan entre las bases púricas

Tabla 2.6: Análisis mediante SPR del efecto del motivo aromático y composición de las bases del ADN en la interacción bisnaftalimida-ADN.

complejo	$K_d (M \times 10^9)$	$k_a (M^{-1} s^{-1} \times 10^6)$	$k_d (s^{-1} \times 10^2)$	$k_d/k_a (Mx10^9)$	s	n
hATATA ^{TG} -LU	4,7 ± 1,1 (246 ± 55)	1,9 ± 1,0	1,0 ± 0,1	5,9 ± 2,8	2	0,9 ± 0,1 (2,3 ± 0,1)
hATATA ^{TG} -MCI	2,3 ± 0,5 (227 ± 71)	1,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,7 ± 0,6	2	0,8 ± 0,1 (3,1 ± 0,2)
hATATA ^{TG} -BPN	1,9 ± 0,8 (96 ± 57)	1,6 ± 1,1	0,5 ± 0,0	3,9 ± 2,6	2	0,9 ± 0,4 (3,3 ± 0,3)
hATATA ^{TT} -LU	9,4 ± 1,2 (250 ± 14)	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,1	7,1 ± 1,8	2	1,0 ± 0,3 (2,9 ± 0,2)
hATATA ^{T-D} -LU	7,8 ± 2,0 (148 ± 61)	3,6 ± 0,5	1,3 ± 0,8	3,5 ± 1,8	2	1,0 ± 0,0 (2,6 ± 0,0)

Se analizaron las interacciones de elinafide, MCI y BPN con la horquilla natural hATATA^{TG} y las interacciones de elinafide con las horquillas modificadas hATATA^{TT} y hATATA^{T-D}, a 25 °C y pH 6,3, y un rango de concentraciones de ligando entre 0,1 y 500 nM. Los parámetros tabulados son las constantes de disociación de equilibrio (K_d), velocidades de asociación (k_a) y disociación (k_d), número de sitios de unión en cada horquilla (s) y número de moléculas de bisnaftalimida unidas a cada sitio (n). Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces para cada sistema, y la tabla muestra las desviaciones estándar de K_d , k_a , k_d y n (los errores estándar de los ajustes para cada experimento generalmente fueron generalmente más pequeños). La unión entre ligandos y horquillas se describió mediante un modelo de dos sitios de unión (s=2). Los valores de K_d y n correspondientes al sitio de baja afinidad figuran entre paréntesis.

2.5 Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

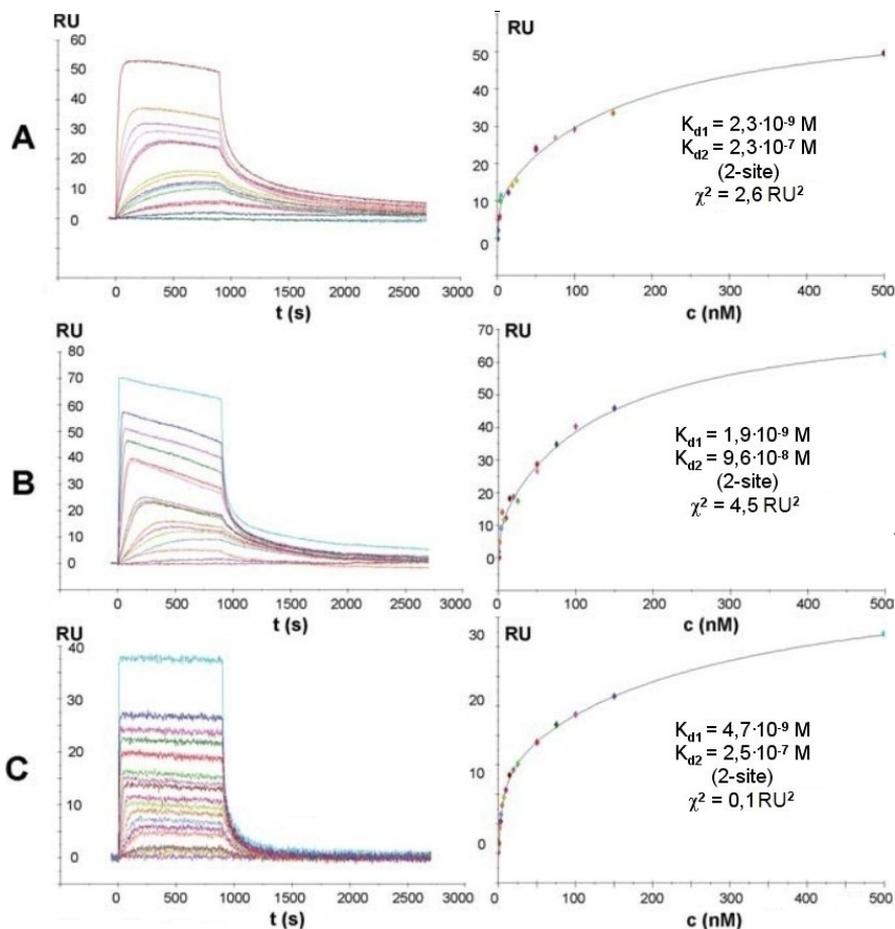


Figura 2.21: Análisis por SPR a 25 °C y pH 6,3 de la interacción entre hATATA^{TG} y MCI (A), BPN (B) y elinafide (C), en el que se muestran a la izquierda los sensogramas obtenidos con concentraciones de ligando entre 0,1 (inferior) y 500 nM (superior); y a la derecha los ajustes de las curvas de unión en estado estacionario, obtenidos mediante un modelo de dos sitios de unión.

G y A del tetranucleótido TGCA desde el surco mayor[82] (Figura 2.15), por lo que la sustitución de guanina por inosina o adenina por 2,6-diaminopurina debe suponer una modificación de las interacciones de apilamiento tanto intermoleculares (con elinafide) como intramoleculares (con las bases adyacentes del ADN). Por otro lado, en la Figura 2.18 B se comparan las estructuras de las

bases G y A con las de sus análogos I y D: en ambos casos, la porción de base orientada hacia el surco mayor permanece inalterada, es decir, las modificaciones elegidas no deberían afectar a los contactos del espaciador aminoalquílico con el surco. Por consiguiente, las variaciones que se observen al substituir G por I y A por D serán fundamentalmente atribuibles a diferencias en interacciones de apilamiento.

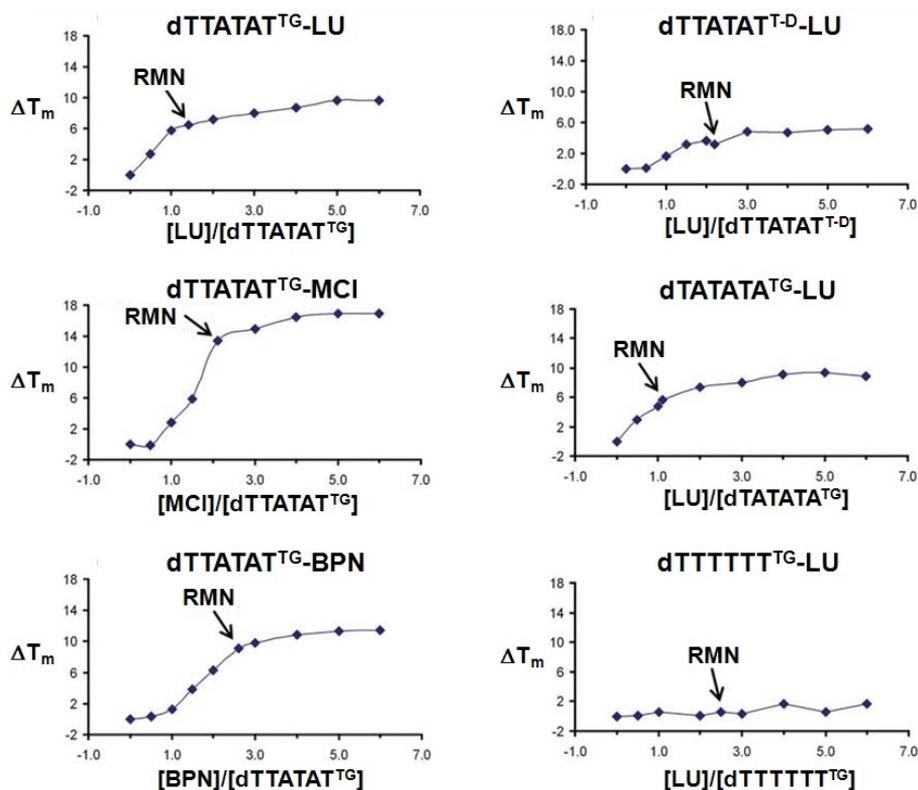


Figura 2.22: Estabilizaciones térmicas de los complejos ADN-bisnaftalimida ($\Delta T_m = T_m^b - T_m^f$) en función del ratio molar bisnaftalimida:dúplex. En todos los casos, se parte de dúplex libre a $2 \mu\text{M}$ ($\Delta T_m = 0$) y se alcanza un ratio saturante de 6:1. Nótese que, aproximadamente, las curvas alcanzan una meseta cuando los ratios molares coinciden con los que se determinaron por RMN para la ocupación completa del sitio de unión de alta afinidad (indicado con flechas).

Los complejos de dTTATAT^{TI} y dTTATAT^{T-D} con elinafide se prepararon mediante valoraciones monitorizadas por RMN similares a las descritas previamente (véase apartado 2.5.2.1). Los ratios elinafide:ADN necesarios para ocupar

completamente los tetranucleótidos de unión fueron 1,8:1 y 2,2:1, respectivamente.

En los espectros de RMN del complejo dTTATAT^{TI}-elinafide las resonancias de naftalimida se ensancharon ligeramente con respecto al complejo dTTATAT^{TG}, pero se detectó claramente la bisintercalación de elinafide en el tetranucleótido TICA desde el surco mayor, de manera similar a lo observado con la secuencia dTTATAT^{TG}: se detectaron NOEs entre LU H5 y T7 H1', LU H5 e I8 H1', LU H5 e I8 H2, LU H6 e I8 H2, y LU H9 y C9 H5[116]. En el caso del complejo dTTATAT^{T-D}-elinafide, la detección de NOEs entre protones del espaciador aminoalquílico y el grupo metilo de T7, junto al debilitamiento de las interacciones secuenciales de los pasos T7-G8 y C9-D10, también evidenciaron la bisintercalación de elinafide en los pasos T7 · D10-G8 · C9 desde el surco mayor[116].

En los espectros ROESY y NOESY a tiempos de mezcla cortos (<12 ms) del complejo dTTATAT^{TI}-elinafide[116], se detectaron además picos de intercambio conectando pares de protones simétricos de naftalimida (Figura 2.5), similares a los observados en el complejo dTTATAT^{TG}, en el que el elinafide está bisintercalado en el sitio TGCA. Estas señales indican que los anillos intercalados de elinafide también realizan movimientos de rotación de 180° cuando se sustituye guanina por inosina. En el sistema dTTATAT^{T-D}-elinafide este efecto dinámico resultó ser mucho más pronunciado, ya que sólo se detectaron tres resonancias ensanchadas correspondientes a los protones aromáticos de la naftalimida bisintercalada, en lugar de las seis resonancias aromáticas esperadas para cualquier complejo DNA-elinafide, tanto aquellos que sufren un proceso de intercambio lento en la escala de tiempo de desplazamiento químico (los complejos de elinafide bisintercalado en TGCA, AGCT y TICA) como los que no presentan este efecto. Además, estas resonancias no generaron NOEs con protones del ADN[116]. La existencia de tres picos ensanchados indica que en el complejo dTTATAT^{T-D}-elinafide el proceso de rotación de los anillos es probablemente muy rápido y ha superado la frecuencia de coalescencia. Estos resultados revelan que la estabilidad de las interacciones de apilamiento en este complejo es significativamente menor que observada en dTTATAT^{TG} y dTTATAT^{TI} (Tabla 2.5).

En cuanto a la estabilización térmica inducida por la unión de elinafide a estos sistemas, la inestabilidad térmica del dúplex dTTATAT^{TI} aislado impidió analizar este parámetro, pero la estabilización inducida por elinafide en dTTATAT^{T-D} (4 °C) resultó ser claramente menor que el valor de ΔT_m observado para el dúplex estándar dTTATAT^{TG} (Figura 2.22 y Tabla 2.5).

Las interacciones entre elinafide y las horquillas hATATA^{TI} y hATATA^{T-D}

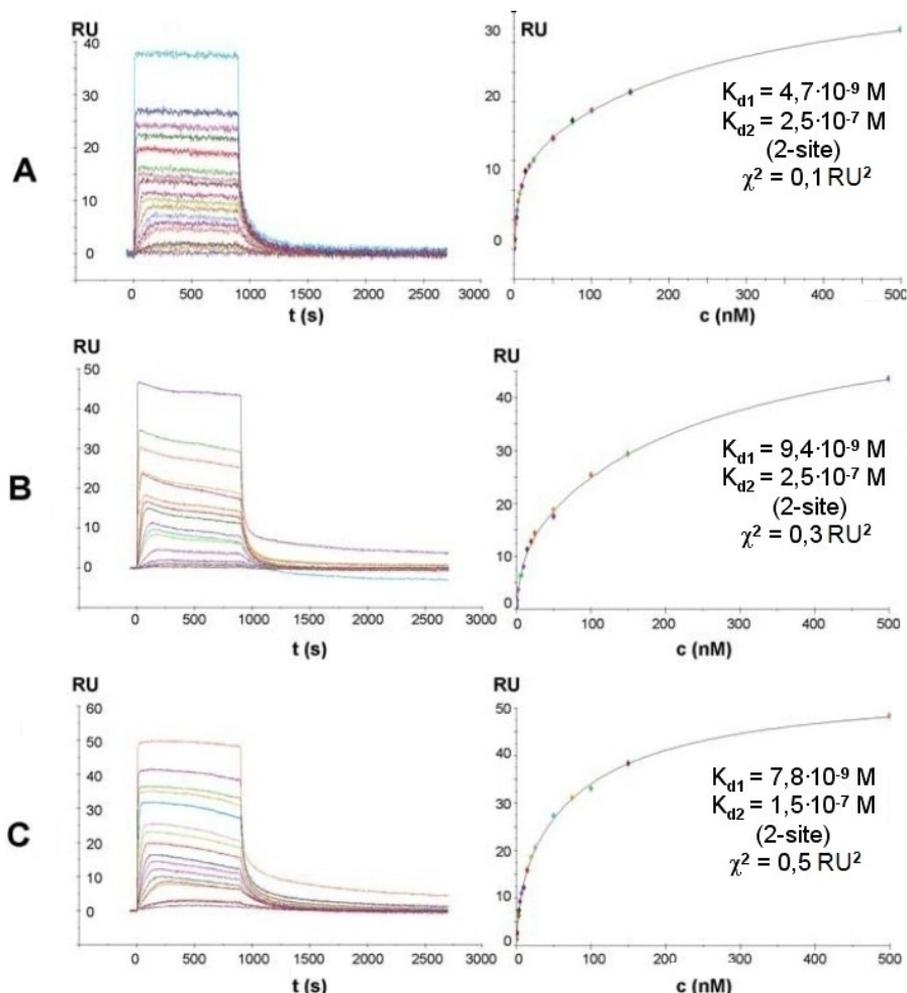


Figura 2.23: Análisis por SPR de la interacción entre elinafide y las horquillas hATATA^{TG} (A), hATATA^{TI} (B) y hATATA^{T-D} (C). A la izquierda se muestran los sensoqramas obtenidos con concentraciones de ligando entre 0,1 (inferior) y 500 nM (superior); y a la derecha los ajustes de las curvas de unión en estado estacionario, obtenidos mediante un modelo de dos sitios de unión.

se analizaron mediante SPR (Figura 2.23), obteniéndose unas K_d de 9 nM para hATATA^{TI} y 8 nM para hATATA^{T-D} (Tabla 2.6). Estos valores fueron de magnitud similar a los obtenidos con la misma técnica para las interacciones de

elinafide, MCI y BPN con la horquilla hATATA^{TG} (Tabla 2.6). En ambos casos, los mejores ajustes de las curvas de unión en estado estacionario se obtuvieron utilizando un modelo de dos sitios, similar al empleado en los análisis de la interacción de hATATA^{TG} con elinafide, MCI y BPN. Como puede apreciarse en la Tabla 2.6, en el sitio de alta afinidad (formado por los tetranucleótidos TICA y TGCD según los datos de RMN) se produjo la asociación de una molécula de elinafide; mientras que al sitio de menor afinidad, formado por los tractos A · T flanqueantes y el bucle T4 de las horquillas, se unieron tres moléculas más.

2.5.2.3. Efecto del pH y fuerza iónica

El análisis por RMN de la estructura del complejo ATGCAT-elinafide demostró que existían fuertes interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno entre los grupos amino protonados del espaciador de elinafide y los grupos electronegativos N7 y O6 de guanina en el surco mayor[82] (Figura 2.15). Estas interacciones pueden ser moduladas por el pH, ya que una variación del mismo es susceptible de modificar el estado de protonación del espaciador, alterando de esta manera sus contactos con las bases de guanina en el surco mayor y afectando a la capacidad de elinafide para reconocer la secuencia de ADN. Para evaluar el peso de estos contactos, se estudió el efecto de un incremento de pH en la interacción de elinafide con los dúplex dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG}, y las horquillas hATATA^{TG} y hTTTTTT^{TG}.

Tabla 2.7: Impacto del pH en la interacción ADN-elinafide, evaluado mediante experimentos de desnaturalización térmica y RMN.

complejo TGCA	pH	$T_m^f(^{\circ}C)$	$T_m^b(^{\circ}C)$	$\Delta T_m(^{\circ}C)$	$k_{rot}(s^{-1})$
dTATATA ^{TG}	6,9	48	54	6	12 ± 1
dTATATA ^{TG}	8,8	47	48	1	23 ± 4
dTTTTTT ^{TG}	6,9	54	55	1	24 ± 5
dTTTTTT ^{TG}	8,8	55	54	-1	58 ± 9

Los ratios elinafide:ADN empleados en los experimentos fueron los determinados en las valoraciones monitorizadas por RMN: 1,1:1 para el complejo con dTATATA^{TG} y 2.5:1 para el sistema dTTTTTT^{TG}. Los parámetros representados son las temperaturas de fusión del dúplex libre (T_m^f) y unido (T_m^b), las correspondientes estabilizaciones térmicas (ΔT_m), y las velocidades de rotación de los anillos de naftalimida (k_{rot}), medidas mediante experimentos NOESY a 25 °C.

A pH 8,8, la velocidad de rotación de los anillos intercalados detectada por RMN en el complejo dTATATA^{TG}-elinafide dobló su magnitud, y la estabilización térmica asociada a la unión del fármaco se redujo notablemente en relación al valor medido a pH neutro, pasando de 6 a 1 °C (Tabla 2.7). En consonan-

Tabla 2.8: Análisis mediante SPR del efecto del pH en la interacción ADN-elinafide.

complejo	pH	$K_d (M \times 10^9)$	$k_a (M^{-1}s^{-1} \times 10^9)$	$k_d (s^{-1} \times 10^2)$	$k_d/k_a (M \times 10^9)$	s	n
hAATATA ^{T_G} -LU	6,2	4,7 ± 1,1 (246 ± 55)	1,9 ± 1,0	1,0 ± 0,1	5,9 ± 2,8	2	0,9 ± 0,1 (2,3 ± 0,1)
hAATATA ^{T_G} -LU	8,8	121,1 ± 86,0 (2192 ± 500)	0,7 ± 0,2	7,1 ± 0,9	112,2 ± 44,8	2	1,0 ± 0,5 (4,6 ± 0,5)
hTTTTTT ^{T_G} -LU	6,2	22,1 ± 2,0 (487 ± 122)	1,4 ± 0,8	2,7 ± 1,3	20,9 ± 3,5	2	0,9 ± 0,1 (1,5 ± 0,2)
hTTTTTT ^{T_G} -LU	8,8	2943,0 ± 160,0	0,4 ± 0,1	14,8 ± 1,7	351,3 ± 19,7	1	4,0 ± 0,1

Se midieron las interacciones de elinafide con las horquillas hAATATA^{T_G} y hTTTTTT^{T_G}, a 25 °C y pH 6,2 y 8,8. Las concentraciones de elinafide oscilaron entre 0,1 y 500 nM (50 μ M a pH 8,8). Los parámetros registrados son las constantes de disociación de equilibrio (K_d), velocidades de asociación (k_a), velocidades de disociación (k_d), número de sitios de unión en cada horquilla (s) y número de moléculas de elinafide unidas a cada sitio (n). Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces para cada sistema y condición, y la tabla muestra las desviaciones estándar de K_d , k_a , k_d y n (los errores estándar de los ajustes para cada experimento generalmente fueron más pequeños). Los valores de K_d y n correspondientes al sitio de baja afinidad figuran entre paréntesis.

2.5 Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

cia con estos resultados, el valor de K_d de la interacción entre elinafide y su sitio de alta afinidad en la horquilla hATATA^{TG} determinado por SPR a pH 8,8 fue de 121 nM, 26 veces mayor que el valor obtenido a pH 6,3. Este cambio se debió fundamentalmente a una velocidad de disociación siete veces superior a pH básico (Tabla 2.8). En el complejo dTTTTTT^{TG}, flanqueado por tractos A, la velocidad de rotación también se duplicó a pH 8,8 (Tabla 2.7). Igualmente, la K_d del sitio de alta afinidad medida por SPR para la horquilla hTTTTT^{TG} aumentó considerablemente en relación al valor determinado a pH 6,3, nuevamente debido a un incremento en la velocidad de disociación, que resultó ser cinco veces superior a la determinada a pH 6,3 (Tabla 2.8).

Además del pH, la fuerza iónica del disolvente también debería modular el peso de las interacciones electrostáticas del espaciador en la interacción ADN-elinafide. En este caso, un aumento en la concentración de iones del disolvente incrementaría el apantallamiento de las interacciones electrostáticas, reduciendo la efectividad de los contactos entre el espaciador aminoalquílico y el surco mayor de los dúplex de ADN. Para comprobarlo se analizaron los complejos de elinafide con dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} en presencia de 1M NaCl (en las condiciones habituales la concentración de NaCl era de 150 mM).

El efecto de apantallamiento de los iones redujo la repulsión entre los grupos fosfato del ADN, por lo que se observaron mayores estabilidades térmicas tanto del ADN libre como del unido a elinafide (Tabla 2.9). Sin embargo, la estabilización térmica inducida por elinafide en dTATATA^{TG} a alta fuerza iónica fue sustancialmente menor, reduciéndose de 6 a 1 °C (Tabla 2.9). En el caso de dTTTTTT^{TG} no fue posible extraer información útil, ya que en ambos casos la estabilización medida fue nula. El resultado obtenido con el complejo dTATATA^{TG} confirma la importancia de las interacciones electrostáticas entre el espaciador de elinafide y los grupos electronegativos de guanina en el reconocimiento de pasos GpC por parte de elinafide.

Tabla 2.9: Impacto de la fuerza iónica en la interacción ADN-elinafide.

complejo TGCA	NaCl (M)	T_m^f (°C)	T_m^b (°C)	ΔT_m (°C)	k_d^{int} (s ⁻¹)	k_{rot} (s ⁻¹)
dTATATA ^{TG}	0,15	48	54	6	3,8 ± 0,6	12 ± 1
dTATATA ^{TG}	1,00	53	54	1	8,2 ± 1,7	11 ± 3
dTTTTTT ^{TG}	0,15	54	55	1	2,7 ± 0,9	24 ± 5
dTTTTTT ^{TG}	1,00	60	60	0	13,6 ± 2,0	30 ± 5

Los ratios elinafide:ADN empleados en los experimentos fueron: dTATATA^{TG}, 1,1:1 y dTTTTTT^{TG}, 2,5:1. Los parámetros representados son las temperaturas de fusión del dúplex libre (T_m^f) y unido (T_m^b), las correspondientes estabilizaciones térmicas (ΔT_m), las velocidades de disociación de intercalación (k_d^{int}), y las velocidades de rotación de los anillos de naftalimida (k_{rot}), extraídas de experimentos NOESY a 25 °C.

2.5.3. Discusión

En la sección anterior se estudió el efecto de la secuencia flanqueante en la interacción entre ADN y elinafide, manteniendo inalterado el sitio de unión[109]. En esta sección se ha analizado el efecto de las interacciones de apilamiento de los cromóforos y de los contactos electrostáticos del espaciador en el reconocimiento directo de la secuencia tetranucleotídica de unión por parte de ligandos bisnaftalimídicos. Para ello se evaluaron dos series de complejos en los que se modificó la composición del sistema aromático del ligando y de las bases que conforman el sitio de unión principal, respectivamente, y se examinó el efecto de modificar el pH y la fuerza iónica del medio[116].

Las interacciones de apilamiento, moduladas por la composición del anillo intercalado y de las bases del ADN, tuvieron un fuerte efecto en las propiedades de los complejos determinadas mediante experimentos de RMN y desnaturalización térmica. En todos los complejos estudiados, elinafide, MCI y BPN bisintercalaron en el tetranucleótido central TPCR ($P = G$ o I ; $R = A$ o D) de los dúplex desde el surco mayor, dejando dos pares de bases $P \cdot C$ (es decir, un paso GpC o IpC) entre los dos anillos de naftalimida (Figura 2.18). Los experimentos NOESY permitieron examinar la extensión y la estabilidad de las interacciones de apilamiento entre el ADN y las bisnaftalimidias en el sitio de unión TPCR, e indicaron la existencia de diferencias significativas entre los distintos complejos. En el caso de dTTATAT^{TG}-MCI y dTTATAT^{TG}-BPN se detectaron contactos de apilamiento más extensos y no se observaron señales indicativas de movimiento de los anillos intercalados (Figura 2.19 y Tabla 2.5). Estos resultados son consistentes con la presencia en estos dos ligandos de anillos de furonaftalimida y pirazinaftalimida respectivamente, susceptibles de establecer una mayor superficie de contacto con los pares de bases del ADN que los anillos de naftalimida de elinafide. Las señales NOE intermoleculares de apilamiento en el complejo dTTATAT^{TI}-elinafide, conteniendo un dinucleótido IpC con inosina en lugar de guanina, fueron similares a las observadas en el complejo equivalente sin bases modificadas, dTTATAT^{TG}-elinafide[116]. La detección de picos de intercambio conformacional entre las señales aromáticas de elinafide demostraron en ambos casos la existencia de un movimiento de rotación de los anillos del ligando en el sitio de intercalación. En cambio, en el complejo dTTATAT^{T-D}-elinafide, conteniendo 2,6-diaminopurina en lugar de adenina, no se detectaron NOEs intermoleculares de apilamiento y la rotación de los anillos del ligando resultó ser mucho más rápida que en los dos complejos anteriores (véase k_{rot} en la Tabla 2.5), a pesar de que, en comparación con adenina, esta base modificada presenta una mayor superficie para el apilamiento de la naftalimida (Figura 2.18 B). Aunque en menor medida, este patrón de dinámica rápida ligado al debilitamiento

de contactos intermoleculares de apilamiento ya se observó anteriormente en el complejo dTTTTTT^{TG}-elinafide (Figura 2.12 B).

Los experimentos de fusión permitieron determinar las estabilizaciones térmicas (ΔT_m) inducidas por la unión de los distintos ligandos a los dúplex de ADN, y comparar los complejos estudiados por RMN mediante este parámetro. Los valores de ΔT_m también resultaron ser sensibles a la modificación del anillo intercalado y las bases del sitio de unión, y reprodujeron las tendencias observadas por RMN (Tabla 2.5). Asumiendo que la unión a monohebras no es significativa, la magnitud de ΔT_m depende de la afinidad de las interacciones dúplex-ligando a la temperatura de fusión de cada complejo, tanto en el sitio principal como en los secundarios. Al representar ΔT_m en función del ratio molar bisnaftalimida:dúplex de cada sistema, los valores alcanzaron aproximadamente su valor máximo en el ratio molar requerido para la bisintercalación completa del sitio de unión principal en las titulaciones monitorizadas por RMN (Figura 2.22). Esta observación indica que las estabilizaciones térmicas observadas se deben principalmente a la intercalación de la bisnaftalimida. Desde el punto de vista molecular, este proceso supone la generación de dos tipos de interacciones: en primer lugar, los grupos aminoalquílicos del espaciador establecen contactos electrostáticos con las guaninas de las dos hebras de dúplex; y en segundo lugar, el apilamiento de los anillos naftalimídicos se produce entre bases de guanina y adenina situadas también en hebras opuestas. Estas interacciones con ambas hebras estabilizan la conformación de dúplex, y se suman al conjunto de interacciones que deben vencerse para que se produzca la transición de doble hélice a monohebra, por lo que los valores de T_m generalmente aumentan en presencia de las bisnaftalimidias. La unión de baja afinidad a los pares A · T flanqueantes también contribuye a incrementar los valores de ΔT_m en algunos complejos, pero a los ratios molares determinados por RMN este efecto es poco significativo.

En concordancia con la tendencia observada por espectroscopia de RMN, los complejos más estables y con contactos de apilamiento más extensos exhibieron valores de ΔT_m más altos, mientras que los complejos más dinámicos y con contactos de apilamiento más débiles presentaron valores de ΔT_m bajos (Tabla 2.5). Los complejos de dTTATAT^{TG} con MCI y BPN dieron lugar a las mayores estabilizaciones térmicas (Figura 2.20). Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que las bisnaftalimidias MCI y BPN contengan anillos tetracíclicos en lugar de tricíclicos (como elinafide), explica estas diferencias, ya que una mayor superficie de apilamiento implica que la intercalación sea más efectiva. En cambio, el complejo dTTATAT^{T-D}-elinafide, que presentó una rotación muy rápida de los anillos intercalados, mostró una ΔT_m menor que la del complejo de referencia dTTATAT^{TG}-elinafide (Tabla 2.5). En el complejo dTTTTTT^{TG}-elinafide flanqueado por trectos A se observaron condiciones parecidas: dinámica

rápida de los anillos y nula estabilización térmica (Figura 2.9 y Tabla 2.1).

La inestabilidad del complejo dTTATAT^{T-D}-elinafide es llamativa, ya que 2,6-diaminopurina presenta una mayor superficie de apilamiento en relación a adenina. Muy probablemente, el motivo subyace en las preferencias conformacionales del ADN. En este sentido, este complejo constituye un ejemplo más sutil de la influencia de efectos indirectos en el reconocimiento del ADN por ligandos bisnaftalimídicos. Al contrario que la unión al surco, que requiere poca adaptación por parte de la molécula de ADN, el proceso de intercalación implica el desenrollamiento y la elongación del dúplex implicado, y por tanto debe estar modulado por la secuencia y la composición de las bases del ADN. En este contexto, la intercalación de elinafide en las secuencias dTTATAT^{T-D} (como también en dTTTTTT^{TG}) es menos favorable porque debe compensar la perturbación de interacciones de apilamiento intramoleculares más fuertes. En ausencia de elinafide, tanto dTTATAT^{T-D} como dTTTTTT^{TG} mostraron una mayor estabilidad térmica que dTTATAT^{TG} y dTATATA^{TG}, como se puede comprobar en la Tablas 2.1 y 2.5. Estas diferencias explican el notable incremento de k_{rot} , la ausencia o debilitamiento de los contactos de apilamiento, y los bajos valores de estabilización térmica observados en los complejos de dTTATAT^{T-D} y dTTTTTT^{TG} con elinafide. Esta tendencia de los dúplex más estables a obstaculizar el proceso de intercalación también fue observada en un análisis sistemático de unión a ADN de análogos del bisintercalante sandramicina[117].

También resulta interesante comparar las cantidades de bisnaftalimida requeridas para completar la bisintercalación en el tetranucleótido de unión (determinadas por RMN) con los datos de ΔT_m y RMN. Si se comparan únicamente los complejos de elinafide, dTTATAT^{TG} y dTATATA^{TG} (que mostraron los valores más altos de ΔT_m y las magnitudes de k_{rot} más bajas, es decir, mayor estabilidad de intercalación) requirieron ratios ligando:ADN próximos a 1 (1,4 y 1,1, respectivamente, Tabla 2.1). En estas condiciones, la unión de ligando al sitio flanqueante de menor afinidad es poco significativa según los datos de RMN, y como máximo de un 10 % en el caso de dTATATA^{TG}. Por el contrario, dTTATAT^{T-D} y dTTTTTT^{TG}, con estabilidades de intercalación y valores de ΔT_m menores, necesitaron unos ratios ligando:ADN sensiblemente más elevados para completar la bisintercalación de elinafide (2,2 y 2,5 respectivamente). El caso de dTTTTTT^{TG} es especialmente llamativo, ya que los datos de RMN y SPR indican que elinafide no interacciona con los trectos A flanqueantes, y por tanto no es posible que el exceso de ligando requerido se deba a su unión a un sitio secundario (aunque los análisis de SPR detectaron un sitio de unión secundario en hTTTTTT^{TG} éste tiene menor afinidad y estequiometría en relación a otros complejos, como se puede comprobar en la Tabla 2.8, y probablemente está formado por el bucle T4 de la horquilla, que no existe en el dúplex). Una

posible explicación a esta aparente contradicción entre ratios de valoración más elevados y sitios secundarios menos ocupados es la existencia de un fenómeno de autoasociación de las moléculas de ligando en disolución, unida a la menor estabilidad del complejo de intercalación dTTTTTT^{TG}-elinafide. Este efecto es especialmente relevante en los experimentos de RMN y UV, que fueron realizados a concentraciones muy superiores a las empleadas en las disoluciones de SPR.

La comparación de MCI y BPN con elinafide apunta a unas conclusiones similares. Los espectros de RMN demostraron que los contactos de apilamiento son más extensos en los complejos de estos dos ligandos, que también presentaron unas ΔT_m más altas (Tabla 2.5). Sin embargo, para completar las valoraciones del dúplex dTTATAT^{TG} se necesitaron 2,1 y 2,6 equivalentes de MCI y BPN, respectivamente, cantidades apreciablemente superiores a los 1,4 equivalentes de elinafide utilizados para formar el mismo complejo. La mayor área de apilamiento de los anillos de estos compuestos con respecto a elinafide probablemente juegue en este caso un doble papel: hace que su intercalación en el ADN sea más eficiente, pero a la vez tiene lugar un proceso más estable de autoasociación de moléculas de ligando a través de interacciones de apilamiento, que se opone a la intercalación en el ADN. Esto explica los elevados ratios requeridos en las valoraciones de BPN y MCI en relación a elinafide. En el caso de elinafide este fenómeno es menos importante, pero sí resultó ser significativo en los complejos dTTATAT^{T-D} y dTTTTTT^{TG}. Como estos dúplex son especialmente estables, la intercalación de elinafide debe romper interacciones de apilamiento intramoleculares particularmente favorables. Esto supone la necesidad de mayores ratios ligando:ADN para que los anillos de elinafide bisintercalen en estas secuencias, compensando las interacciones ligando-ligando en disolución. Estos efectos de autoasociación también fueron observados en la interacción del bisintercalante WP631 con ADN[118].

La interacción entre las bisnaftalimidias y distintas horquillas de ADN con secuencias similares a las de los dúplex estudiados por RMN y UV se analizó por SPR. En la mayoría de los casos, los mejores ajustes se obtuvieron con una función de dos sitios de unión (Figuras 2.21 y 2.23) indicando la unión de una molécula de ligando a un sitio de alta afinidad, seguida de la asociación de dos o tres moléculas más a otro sitio de menor afinidad (Tabla 2.6). Los resultados de RMN demostraron que el sitio de unión principal está formado por el tetranucleótido TPCR, presente en cada uno de los dúplex y horquillas de ADN estudiados. El sitio de unión secundario, por tanto, debe estar formado por los pares A · T flanqueantes y el bucle T4 de las horquillas. La presencia de este sitio de unión secundario se confirmó por RMN en base al ligero ensanchamiento observado en las resonancias de algunos de los pares A · T que flanquean el sitio

de unión principal en varios de los dúplex analizados.

En contraposición a las diferencias observadas por RMN y desnaturalización térmica, en todos los sistemas estudiados las constantes de equilibrio de alta afinidad determinadas por SPR resultaron ser relativamente poco sensibles a cambios en el sistema aromático de los ligandos y a variaciones en la composición de las bases del sitio TPCR (Tabla 2.6). A pH neutro, el valor de K_d determinado por SPR dependió fundamentalmente de la existencia de átomos O6 electronegativos en el surco mayor. Como todas las horquillas estudiadas cumplieron esta condición (estos átomos están presentes en los pasos GpC e IpC de los tetranucleótidos TGCA, TGCD y TICA; Figura 2.18 B), las K_d de equilibrio de SPR estuvieron siempre en el rango de nanomolar bajo, independientemente del tamaño del anillo intercalado o de la naturaleza de las bases que formaban el sitio TPCR. Por ejemplo, los valores de K_d para la interacción de hATATA^{TG} con elinafide, MCI y BPN oscilaron entre 2 y 5 nM, y la K_d para el complejo de elinafide con hATATA^{T-D} fue de 8 nM. En la misma línea, la K_d determinada para la interacción entre elinafide y hATATA^{TI} fue de 9 nM (Tabla 2.6). Un laboratorio diferente analizó mediante SPR la interacción de elinafide, MCI y BPN con secuencias [CG]₄, y también obtuvo unos valores de K_d similares para los tres ligandos, entre 5 y 22 nM[79; 80], apoyando nuestras observaciones. En cambio, en los sitios de unión secundarios (pares A · T flanqueantes y bucle T4) los grupos electronegativos O6 no están presentes, y el valor de las constantes de disociación K_d aumentó en un factor de 50 o superior (Tabla 2.6).

La importancia de los contactos electrostáticos establecidos por el espaciador aminoalquílico de las bisnaftalimidias se evaluó alterando las condiciones de pH y fuerza iónica del medio. Si el pH aumenta en magnitud suficiente, el grado de protonación de los grupos amino del espaciador disminuye, y los contactos con los grupos electronegativos N7 y O6 de guanina en el sitio de unión principal se debilitan. Lo mismo sucede al incrementarse la fuerza iónica, porque la mayor concentración de iones apantalla las interacciones entre estos grupos amino y los grupos electronegativos de guanina. Al contrario que las variaciones en los sistemas aromáticos del ligando y las bases del ADN, el pH sí tuvo un impacto muy significativo en los parámetros de unión determinados por SPR: a pH 9, las constantes de equilibrio de SPR se incrementaron entre 26 y 134 veces (Tabla 2.8), y las velocidades de disociación de elinafide determinadas por SPR también aumentaron ostensiblemente (entre 5 y 7 veces). Estas observaciones confirman la importancia de las interacciones electrostáticas establecidas por el espaciador en el reconocimiento específico de pasos GpC.

En estas condiciones básicas, la velocidad de rotación de los anillos de elinafide

en sus complejos con dTATATA^{TG} y dTTTTTT^{TG} también dobló su magnitud (Tabla 2.7), y la estabilización térmica consecuencia de la bisintercalación de elinafide en dTATATA^{TG} disminuyó de 6 °C a pH neutro, a 1 °C. De igual manera, el incremento de la fuerza iónica ocasionó una disminución idéntica (5 °C) en la estabilización térmica inducida por elinafide en dTATATA^{TG}, así como un aumento significativo en las velocidades de disociación de intercalación determinadas por RMN (Tabla 2.9). Estos resultados son importantes porque indican que los contactos electrostáticos establecidos entre el espaciador aminoalquílico y las guaninas en el surco mayor también influyen en el proceso de bisintercalación.

En conjunto, los datos obtenidos mediante RMN, desnaturalización térmica y SPR demuestran claramente que existe una interacción de alta afinidad de los ligandos bisnaftalimídicos con los sitios TPCR, que comprende unión al surco y bisintercalación; y una interacción más débil con sitios formados por los pares A · T flanqueantes, posiblemente mediada por unión al surco. Los resultados también indican que deben producirse contactos electrostáticos fuertes entre el espaciador aminoalquílico del ligando y los grupos N7 y O6 de guanina para la intercalación específica y de alta afinidad en los pasos GpC del ADN. Si estos grupos no están presentes (como en los pasos que contienen pares A · T) o si estos contactos se debilitan (por ejemplo, incrementando el pH o la fuerza iónica), entonces la estabilidad del apilamiento intermolecular observada por RMN decrece, las estabilizaciones térmicas se reducen y las constantes de disociación de equilibrio determinadas por SPR también se incrementan considerablemente. Esto indica que el proceso de intercalación de las bisnaftalimidias está acoplado a los contactos electrostáticos establecidos por el espaciador.

En contraposición a lo observado al variar el pH, los parámetros de unión determinados por SPR por un lado, y los experimentos de RMN y desnaturalización térmica por otro, respondieron de manera diferente a alteraciones en la composición de los anillos del fármaco o de las bases del sitio de unión principal. En todos los casos, los parámetros medidos por RMN y UV respondieron de manera más ostensible que los determinados por SPR. Como se discutió en la sección anterior, la explicación a este comportamiento probablemente reside en el hecho de que la interacción entre los ligandos bisnaftalimídicos y las secuencias de ADN tiene lugar a través de dos estados: unión al surco e intercalación, ambos significativamente poblados y caracterizados por sus propias velocidades de asociación y disociación (Figura 2.16). Las variaciones de desplazamiento químico monitorizadas por RMN se debieron fundamentalmente al establecimiento de contactos de apilamiento en el sitio de alta afinidad de cada complejo, y los NOEs y las velocidades de rotación y disociación de los anillos intercalados dependieron de la extensión y estabilidad de esos contactos. Asimismo, las estabilizaciones

térmicas medidas por experimentos de fusión en condiciones parecidas a las de RMN fueron consecuencia de los contactos *interhebra* establecidos al producirse la intercalación de las bisnaftalimidias en los sitios TPCR. Los datos recogidos mediante estas técnicas están, por lo tanto, fundamentalmente modulados por el proceso de intercalación. Por el contrario, la técnica de SPR detectó principalmente cambios de masa que dependieron de la asociación y disociación de la bisnaftalimida al surco del dúplex. Por este motivo, las alteraciones en los anillos del fármaco y las bases del ADN, tuvieron menor influencia en las constantes de unión determinadas por SPR. Por el contrario, los cambios en el pH y en la composición del surco afectaron simultáneamente a la unión al surco y a la intercalación, y produjeron variaciones significativas tanto en los parámetros de unión medidos por SPR como en los datos obtenidos por RMN y UV.

Los resultados descritos en esta sección indican que el reconocimiento directo del ADN por parte de ligandos bisnaftalimídicos depende fundamentalmente de los contactos electrostáticos establecidos entre el espaciador aminoalquílico y dos bases de guanina en el surco mayor. La efectividad de la intercalación de los anillos de naftalimida depende del establecimiento de estos contactos, que determinan la especificidad de los ligandos por pasos GpC. El análisis conjunto de los datos de SPR, RMN y UV es asimismo consistente con el modelo de interacción compuesto por dos procesos, unión al surco e intercalación, propuesto en la sección anterior (Figura 2.16). Esta interacción en dos pasos está posiblemente favorecida por la flexibilidad de los enlaces que conectan el espaciador aminoalquílico con los sistemas aromáticos de los ligandos, así como por un encaje favorable de los anillos naftalimídicos en el surco mayor. La existencia de estos dos estados de interacción resultó ser particularmente evidente para elinafide, probablemente debido a la escasa estabilidad de las interacciones de apilamiento establecidas por los anillos de naftalimida, ligada a su pequeño tamaño y a contactos electrostáticos desfavorables con las bases de guanina (Figura 2.15). Las preferencias conformacionales del ADN (efectos indirectos), evidenciadas por la presencia de tractos A flanqueantes y por la introducción de 2,6-diaminopurina en lugar de adenina, afectaron fundamentalmente al proceso de intercalación. Un modelo de varios estados implicando un paso previo de asociación al surco también ha sido propuesto para la interacción entre ADN y el intercalante daunomicina en base a estudios cinéticos[119; 120] y simulaciones de dinámica molecular[121; 122].

Los resultados recopilados en este capítulo proporcionan puntos de partida útiles para modular tanto la especificidad de secuencia como el modo de interacción con el ADN, y por tanto pueden facilitar el diseño racional de nuevos agentes que interaccionen con ácidos nucleicos. Asimismo, el análisis comparativo de los datos obtenidos mediante técnicas comúnmente empleadas para

2.5 Mecanismo de reconocimiento directo del ADN por agentes bisnaftalimídicos

analizar estas interacciones (SPR, RMN y UV) puede resultar útil para analizar la asociación al ADN (o ARN) de otros agentes compuestos por sistemas intercalantes y grupos de unión al surco. En este sentido, numerosos ligandos de ADN y ARN combinan estos dos tipos de entidades (véanse por ejemplo las Figuras 2.2 y 3.8)[60; 61; 63; 123; 124].

2.6. Conclusiones

El reconocimiento directo del ADN por parte de agentes bisnaftalimídicos depende de los contactos electrostáticos establecidos en el surco mayor entre el espaciador aminoalquílico y dos bases de guanina situadas en hebras opuestas. Estos contactos determinan la especificidad de los ligandos por pasos GpC.

El proceso de intercalación de los anillos de naftalimida depende de estos contactos electrostáticos entre los grupos amino del espaciador y los átomos O6 de guanina en el surco mayor.

La interacción entre los ligandos bisnaftalimídicos y el ADN tiene lugar a través de dos estados, unión al surco e intercalación, ambos significativamente poblados y caracterizados por sus propias velocidades de asociación y disociación.

En consonancia con este modelo de dos estados, cambios en el sistema aromático del ligando, así como variaciones en las bases del ADN diseñadas para modular las interacciones de apilamiento sin afectar a la composición del surco mayor, ejercieron un efecto significativo en los parámetros de unión determinados por RMN y experimentos de desnaturalización térmica, dependientes del proceso de intercalación. La acción sobre los parámetros de unión determinados por SPR fue relativamente más modesta.

En cambio, la ausencia de átomos O6 de guanina en el surco mayor, o la atenuación de las interacciones electrostáticas del espaciador a través de un aumento de pH o fuerza iónica, tuvieron una repercusión considerable en los parámetros de unión determinados por RMN, UV y SPR.

El reconocimiento del ADN por elinafide está fuertemente modulado por efectos indirectos, dependientes de las preferencias conformacionales de cada secuencia de bases. La presencia de un tracto A en el lado 3' del sitio de unión principal causó el efecto indirecto más significativo, reduciendo en un orden de magnitud la afinidad de elinafide determinada por SPR. La presencia de 2,6-diamino purina en el tetranucleótido de unión indujo asimismo un efecto indirecto. En general, la magnitud de este fenómeno correlacionó con la estabilidad de las dobles hélices de ADN.

A nivel molecular, estos efectos se transmitieron a través de alteraciones en las interacciones de apilamiento, y afectaron en mayor medida al proceso de intercalación de los anillos de naftalimida, debilitando las interacciones de apilamiento

intramoleculares e intermoleculares de los complejos, y reduciendo tanto el componente entálpico de la interacción como la estabilización térmica inducida por elinafide.

La dinámica de los complejos desfavorecidos también resultó afectada, detectándose una mayor velocidad de apertura de los pares de bases del tetranucleótido de unión, así como una mayor velocidad de rotación de los anillos intercalados de elinafide. Estos dos procesos están posiblemente relacionados entre sí.

Los resultados descritos en este capítulo pueden facilitar el análisis experimental de la interacción de otros ligandos que unan ADN y ARN, así como el diseño de nuevos agentes basados en el reconocimiento específico de estas biomoléculas.

Capítulo 3

Interacción entre ligandos *p*-terfenílicos y el elemento de reconocimiento de Rev en el ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

3.1. Introducción

3.1.1. El ARN como diana farmacológica

El ARN desempeña una gran variedad de roles bioquímicos. Su importancia en el desarrollo de muchas enfermedades, tanto infecciosas como crónicas, hace que tenga un potencial muy significativo como diana farmacológica. El ARN está sobradamente validado como diana para el tratamiento antibacteriano, ya que desde hace décadas se utilizan antibióticos que se unen al ARN ribosómico procariótico. Además, esta biomolécula constituye el material genético de virus patógenos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis C (VHC), y por lo tanto es potencialmente una fuente de oportunidades para el descubrimiento de nuevos fármacos que traten las enfermedades causadas por estos agentes. Por otro lado, la función que desempeña el ARN en el control de la expresión génica en humanos hace que muchas estructuras de ARN cobren interés en el tratamiento de enfermedades crónicas y degenerativas[125]. En este contexto, aparte de las moléculas de ARN clásicas (ARNm, ARNt y ARNr), encargadas de transferir la información genética del ADN a las proteínas, en los últimos años han cobrado protagonismo otros tipos de ARN humanos con roles biológicos muy diversos[126], entre los que destacan los ARNs no codificantes, como los miRNAs o lncRNAs[127].

Los ARNs pueden plegarse en estructuras de complejidad variable: desde simples horquillas o estructuras en Y (intersecciones de tres hélices)[13], encontradas en pequeños ribozimas y ribointerruptores[16; 128], hasta la intrincada estructura del ARN ribosómico o los intrones del grupo II[129; 130]. Esta diversidad estructural supone una ventaja para la búsqueda de pequeñas moléculas que se unan al ARN. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de fármacos está condicionado por el carácter polianiónico del ARN, su limitada diversidad fisicoquímica, y su elevada flexibilidad conformacional[131; 132; 133].

Por estos motivos, y también debido a que los proyectos industriales de descubrimiento de fármacos se aplican principalmente a proteínas, el arsenal de moléculas conocidas capaces de reconocer el ARN todavía es limitado. Actualmente se emplean dos estrategias principales en el reconocimiento del ARN: 1) los oligonucleótidos antisentido o ARN interferentes, que se unen al ARN diana promoviendo su degradación o bloqueando su traducción; y 2) la búsqueda de pequeñas moléculas orgánicas capaces de reconocer específicamente las cavidades que forma el ARN en su plegamiento tridimensional, y de interferir con su función. Ambas estrategias se discuten con más detalle a continuación.

3.1.1.1. Reconocimiento de ARN mediante oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido clásicos son moléculas cortas de ADN monocatenario complementarias a secuencias específicas del ARNm diana (secuencia sentido). La formación de un heterodúplex sentido-antisentido bloquea la traducción del mensaje genético a proteína. El bloqueo de la traducción puede tener lugar por dos mecanismos: obstaculizando la lectura del ARNm o mediante la acción de la enzima ribonucleasa H[134], que degrada y elimina el ARNm que participa en el dúplex, dejando intacta la secuencia antisentido. La capacidad de bloquear la expresión génica hace que estos oligonucleótidos puedan usarse como fármacos, siempre que sean capaces de actuar específicamente sobre un gen asociado a una determinada enfermedad.

El desarrollo de la estrategia antisentido comenzó en los años 70 con el descubrimiento de que la expresión génica podía inhibirse utilizando una secuencia de ADN[135]. En los años 90 se intensificó la investigación de estas moléculas, y en 1998 se aprobó para uso clínico el primer oligonucleótido antisentido, Fomivirsen (Vitravene)[136]. Actualmente existen otras líneas de investigación basadas en el empleo de ácidos nucleicos, que implican el uso de aptámeros, ribozimas y ARN de interferencia (ARNi). El ARNi consiste en una secuencia de ARN bicatenario que actúa sobre secuencias de ARNm complementarias, induciendo su degradación antes de que se produzca su traducción en proteínas[137].

Los ARNi se generan *in vivo* a partir de secuencias largas de ARN de doble hebra, que son procesadas por la endorribonucleasa DICER en pequeños fragmentos, generalmente de algo más de 20 nucleótidos y con extremos despareados en 3'. Estos ARNs cortos se integran en el complejo de inducción de silenciamiento de ARN, RISC, que se encarga de detectar y unir específicamente las secuencias de ARNm complementarias al ARNi[138]. La investigación de los ARNi como agentes terapéuticos está basada en el empleo de dúplex pequeños de interferencia(siRNA) y de horquillas cortas de ARN (shRNA). Ambos tipos de agentes contienen entre 20 y 30 nucleótidos, frecuentemente modificados químicamente para aumentar su biodisponibilidad[139]. A pesar de su reciente descubrimiento, algunos siRNAs han alcanzado la fase clínica para el tratamiento de enfermedades como la degeneración macular o la leucemia mieloide crónica[140].

Pese a su potencial, las estrategias antisentido o de interferencia tienen inconvenientes farmacológicos como su escasa biodisponibilidad y unión inespecífica[141]. Además, muchas secuencias de ARN no pueden abordarse mediante el uso de agentes antisentido porque están altamente estructuradas o unidas a proteínas

celulares.

3.1.1.2. Reconocimiento de ARN mediante pequeñas moléculas

El reconocimiento de ARN mediante pequeñas moléculas orgánicas puede considerarse una estrategia complementaria a la basada en agentes antisentido, ya que los motivos de ARN estructurados no son fácilmente accesibles a estos agentes. Por otro lado, la funcionalidad del ARN está frecuentemente asociada a estructura, y la fuerte conservación, tanto de secuencia como de estructura tridimensional, de estos motivos de ARN funcionales supone una ventaja para el desarrollo de agentes antiinfecciosos que actúen sobre este tipo de dianas.

En relación a las proteínas, la diversidad química del ARN es más limitada, ya que mientras que las primeras están compuestas por 20 aminoácidos, el ARN generalmente contiene 4 tipos de nucleótidos, y siempre está cargado negativamente a pH fisiológico. No obstante, las bases púricas y pirimidínicas de ARN son estructuras químicamente complejas susceptibles de ser reconocidas a través de enlaces de hidrógeno o interacciones de apilamiento. Las preguntas de hasta qué punto los motivos de ARN son estructural y químicamente diversos, y si pueden ser reconocidos por pequeñas moléculas con la misma especificidad que las proteínas, son consideraciones esenciales para el desarrollo de fármacos que actúen sobre ARN. En el ARN ribosómico se han encontrado respuestas positivas a estas cuestiones, pero hasta el momento no ha sido así en otros ARNs que no poseen la elaborada arquitectura tridimensional del ribosoma.

Las estructuras de ARN están rodeadas por un escudo de moléculas de agua bien ordenadas e iones cargados positivamente. Estas interacciones con el disolvente y los iones juegan un importante papel en el plegamiento y la dinámica del ARN[142], e invitan a pensar que se necesitan ligandos fuertemente polares para desplazar esta red iónica. De hecho, muchos de los ligandos que se unen al ARN tienen cargas positivas netas[143], lo que hace aumentar su afinidad por el ARN, pero al mismo tiempo da lugar a interacciones electrostáticas inespecíficas.

La estructura de ARN más estudiada para el desarrollo de fármacos es el ribosoma bacteriano[144; 145; 146], la ribonucleoproteína donde la información genética codificada por el ARNm se traduce en una secuencia de aminoácidos. El ribosoma bacteriano consta de dos subunidades de diferente tamaño llamadas 50S y 30S. Las cavidades existentes en su estructura terciaria forman sitios de unión que pueden ser reconocidos por moléculas pequeñas. La caracterización de estas dos subunidades ribosómicas por cristalografía de rayos-X[129; 130]

fue reconocida con el premio Nobel de Química en 2009, y permitió conocer en trabajos subsiguientes muchos detalles estructurales de la interacción entre ARNr y antibióticos.

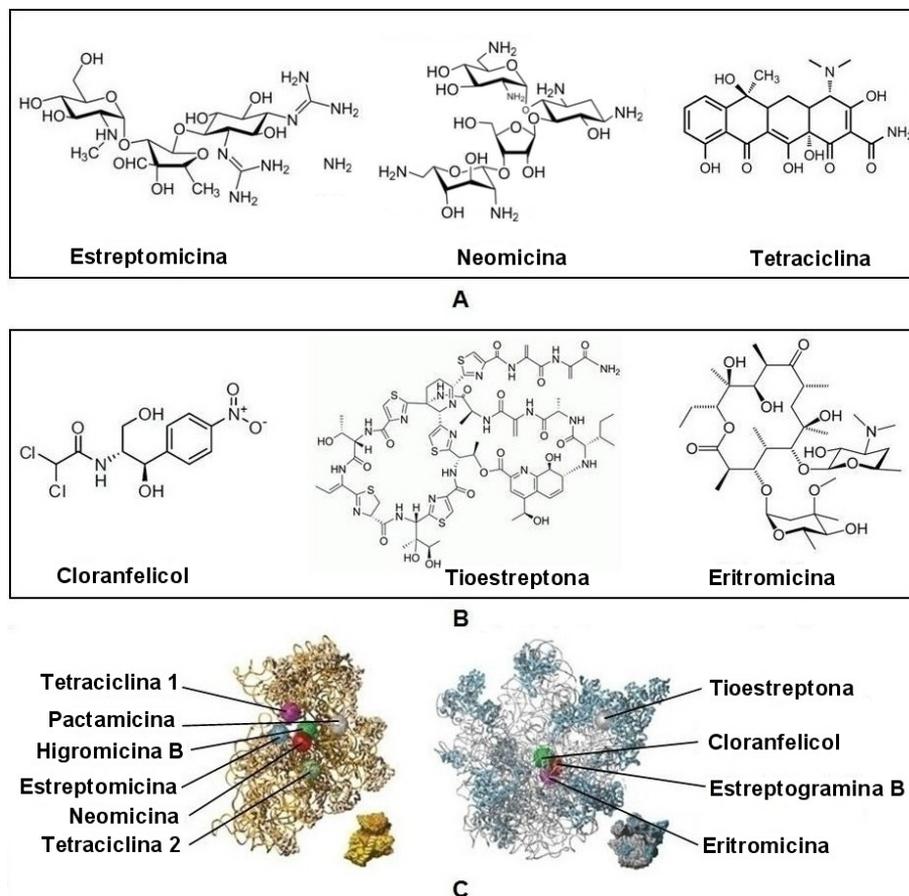


Figura 3.1: Antibióticos que se unen a las subunidades 30S (A) y 50S (B) del ribosoma bacteriano, y ubicación de sus sitios de unión (C).

Los antibióticos aminoglucósidos son moléculas flexibles cargadas positivamente y provistas de varios anillos de azúcar que establecen contactos polares con el esqueleto fosfodiéster y bases del ARNr por el surco mayor. Ejemplos de esta familia son la estreptomicina, paromomicina, pactamicina o higromicina, que forman complejos con el sitio de decodificación de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano[147; 148] (Figura 3.1 A y C). La tetraciclina también es un

producto natural que se une a la subunidad pequeña del ribosoma[148]. A la subunidad grande (50S) se unen antibióticos como cloranfelicol, tioestreptona o macrolidas como la eritromicina (Figura 3.1 B y C)[144]. Todos estos hallazgos han aportado información de gran valor sobre el mecanismo de acción de estos fármacos, que podría facilitar el diseño de nuevos antibacterianos sobre esta diana.

Las oxazolidinonas[149] son antibióticos descubiertos más recientemente que actúan uniéndose al sitio A del centro activo de la subunidad 50S. Estos antibióticos son las únicas moléculas totalmente sintéticas que se unen al ARN y poseen uso clínico, y representan una nueva clase de agentes antibacterianos. La primera oxazolidinona, linezolid, fue aprobada en el año 2000 (Figura 3.2).

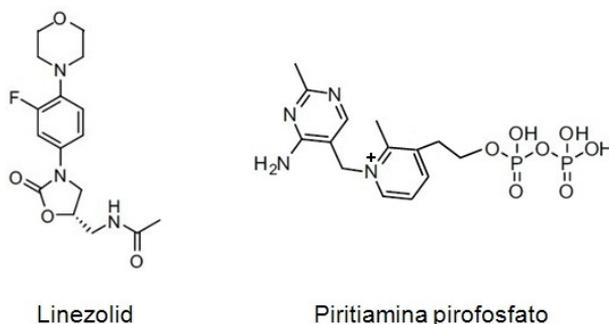


Figura 3.2: Estructuras de la oxazolidinona linezolid y del antibiótico piritiamina pirofosfato, que actúa sobre el ribointerruptor de TPP.

Los ribointerruptores[16; 128] bacterianos son otra diana de ARN sobre la que se han empleado pequeñas moléculas[150]. Consisten en estructuras ubicadas generalmente en las regiones no traducidas (UTR) de ciertos ARN mensajeros, a las que se unen ligandos naturales pequeños. Estos ligandos inducen cambios conformacionales que influyen en la expresión del gen codificado por el ARNm. La roseoflavina[151] y la piritiamina pirofosfato[152] (Figura 3.2) son ejemplos de antibióticos naturales que actúan a través de unión a ribointerruptores bacterianos.

En la terapia contra el cáncer se han propuesto varios ARNs como dianas. Por ejemplo, la enzima telomerasa tiene una actividad reducida en células somáticas y una actividad superior en células tumorales, lo que ha llevado a investigar inhibidores de esta enzima[153]. Los defectos de ajuste alternativo, que resultan en ARNm alterados o no funcionales[154], constituyen también una fuente de investigación de antitumorales.

Las moléculas de ARN de origen vírico, como la que se estudia en la presente tesis, suministran muchos ejemplos de dianas potenciales para el desarrollo de antivirales. El elemento de respuesta de Rev (RRE) y el elemento de respuesta de transactivación (TAR), contenidos en el ARN genómico del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1)[155] (Figura 3.3), son dos de los sistemas mejor estudiados hasta el momento[156]. Otra posibilidad interesante son los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), formados por regiones estructuradas localizadas en el extremo 5' del ARN de virus patógenos como los de la polio, fiebre aftosa y hepatitis C[157]. En estas estructuras de ARN menos complejas que el ARN ribosómico, los sitios de unión de pequeñas moléculas son generalmente más flexibles y están más expuestos al disolvente. Esto supone un inconveniente para el diseño de fármacos basado en estructura, aunque también abre la posibilidad de aprovechar estos efectos dinámicos para reconocer específicamente una estructura de ARN[158; 159]. Exceptuando los antibióticos que actúan sobre el ribosoma o los ribointerruptores bacterianos, actualmente no existen fármacos en uso clínico que se unan a otro tipo de estructuras de ARN.

3.1.1.3. Métodos para la búsqueda de moléculas pequeñas que se unen a ARN

La química médica de fármacos que se unen al ARN todavía es limitada porque, con la excepción del ribosoma bacteriano, el ARN está poco investigado como fuente de dianas farmacológicas. Los antibióticos naturales que se unen al ARN ribosómico son difíciles de modificar, y apenas se han desarrollado nuevos esqueletos químicos sintéticos capaces de reconocer estructuras de ARN.

En los últimos años, numerosos estudios han utilizado antibióticos aminoglucósidos como punto de partida para la obtención de análogos sintéticos[160]. Por ejemplo, estos antibióticos han sido conjugados con acridina[123]; o bien han sido modificados, sustituyendo los anillos de azúcar por análogos más simples y accesibles químicamente, como grupos hidroxiamina[161] y amina[162]. Recientemente se ha aplicado sobre varios ARNs una técnica importante para el descubrimiento de fármacos: el cribado de alto rendimiento de quimiotecas (HTS). Actualmente, el método más habitual de filtrado son las técnicas basadas en fluorescencia, como los ensayos de intensidad de fluorescencia (FI), polarización de fluorescencia (FP), y en menor medida, FRET[163]. Otra técnica importante es la espectrometría de masas, que tiene la ventaja de que no requiere ninguna modificación del ligando o del ARN y puede ser aplicada al análisis de grandes quimiotecas[164]. También se ha utilizado espectroscopía de RMN para monitorizar la unión de ligandos a macromoléculas e identificar sus

sitios de unión[143]. Recientemente se han desarrollado métodos novedosos en la búsqueda de pequeñas moléculas que se unen al ARN, por ejemplo a través de la utilización de *microarrays* de ligandos[165].

Un importante complemento de las técnicas de HTS es el *docking in silico*. Esta técnica permite examinar de manera rápida y a bajo coste la afinidad de grandes colecciones de ligandos virtuales por un sitio activo de estructura tridimensional conocida. Los programas de *docking* predicen la conformación de unión y calculan afinidades de unión teóricas que pueden utilizarse para seleccionar los mejores compuestos para su evaluación experimental. La afinidad se calcula a través de funciones de *scoring*, utilizando parámetros como las interacciones de van der Waals, la cantidad de superficie expuesta al disolvente o el número de enlaces de hidrógeno. Estas búsquedas computacionales se utilizan frecuentemente en el proceso de diseño de fármacos que interactúan con proteínas[166]. Sin embargo, los estudios de *docking* sobre dianas formadas por ARN son mucho más escasos. La estructura TAR perteneciente al VIH-1 ha sido utilizada para este tipo de estudios, obteniéndose varias moléculas con afinidades experimentales en el rango de micromolar[158; 167]. Otra estructura de ARN con la que se ha trabajado ha sido el sitio-A del ribosoma bacteriano[168]. Los programas de *docking* Ribodock[169], Dock[170], Mordor[171] y LigandRNA[172] poseen funciones de *scoring* específicamente desarrolladas para dianas de ARN. A pesar de estos avances, actualmente no se conocen ejemplos de esqueletos sintéticos de uso clínico que actúen sobre el ARN y hayan sido diseñados *de novo*.

3.1.2. El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es un lentivirus de la familia Retroviridae, causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su virión es esférico, dotado de una envuelta lipídica y una cápside proteica (Figura 3.3), y su mecanismo de actuación consiste en invadir células que expresan el receptor CD4, entre las que destacan los linfocitos T CD4+, un subgrupo de linfocitos que tiene un papel muy importante como potenciadores de la capacidad defensiva del sistema inmunitario. Al descender los niveles de linfocitos T CD4+, el organismo no puede hacer frente a virus y bacterias patógenos, produciéndose finalmente la muerte del enfermo.

Los primeros casos de infección por VIH-1 se documentaron en 1981, y desde entonces el SIDA ha causado la muerte de aproximadamente 36 millones de personas. A pesar de que con el paso de los años se ha ido disponiendo de tratamientos más eficaces, que han aumentado la calidad y la esperanza de vida

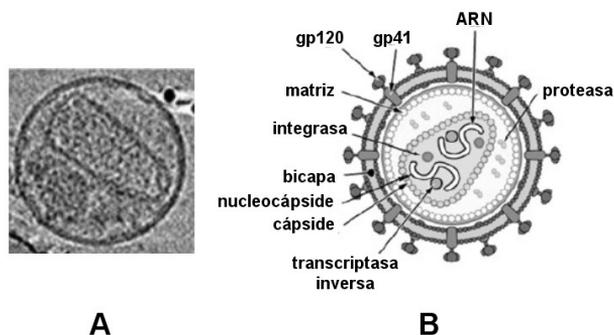


Figura 3.3: A) Imagen por microscopía electrónica de un virión del VIH-1. B) Composición de un virión del VIH-1.

de los enfermos, las cifras relativas a este virus siguen siendo alarmantes, con más de 35 millones de infectados y 1,6 millones de muertes en 2012, según datos de la Organización Mundial de la Salud.

El virus está presente en numerosos fluidos del organismo infectado, en particular la sangre, las secreciones genitales y la leche materna. En la actualidad, el tratamiento de la infección por VIH-1 se basa en combinaciones de tres o cuatro fármacos que inhiben las enzimas proteasa, transcriptasa inversa o integrasa del virus; o bien bloquean su entrada en la célula. Sin embargo, estos tratamientos no eliminan la infección, y requieren un seguimiento muy estricto del régimen de tratamiento durante toda la vida del enfermo. La aparición de resistencias y la falta de una vacuna efectiva refuerzan aún más la necesidad de identificar nuevos fármacos que actúen sobre dianas alternativas del virus.

3.1.2.1. Ciclo de vida del virus VIH-1

Como se ha indicado en el apartado anterior, la principal diana del VIH-1 son los linfocitos T-CD4+; es decir, linfocitos T que tienen en su superficie receptores proteicos de tipo CD4. El VIH-1 es capaz de reconocer estas proteínas y utilizarlas para unirse a la célula y penetrar en ella. Una vez en su interior, utiliza la maquinaria celular para su replicación. Todo este proceso puede resumirse en las siguientes etapas (Figura 3.4) [173]:

- **Fijación:** representa la etapa de invasión de la célula. En la envoltura del virión se encuentran las glucoproteínas Env, que se unen al receptor CD4

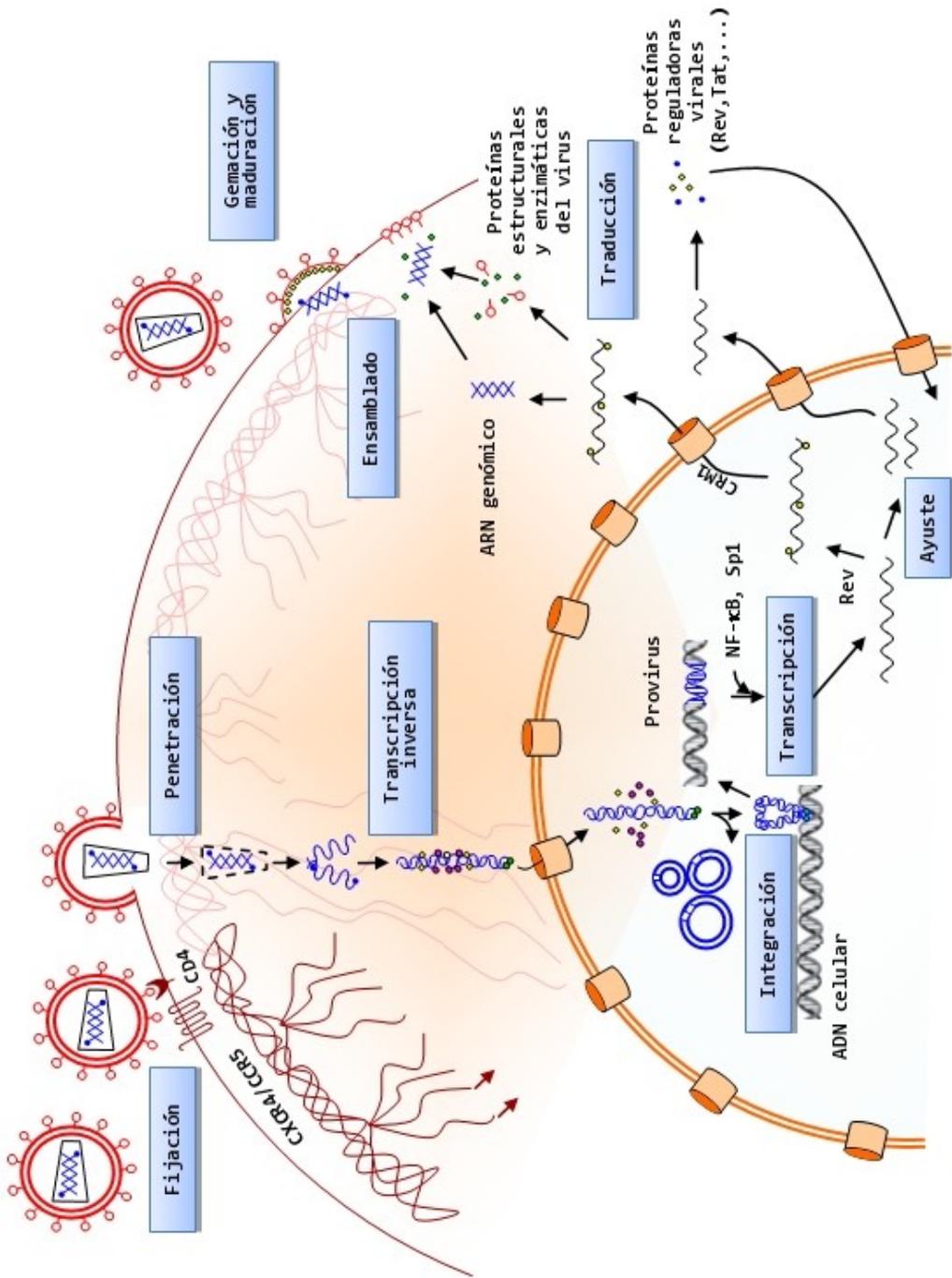


Figura 3.4: Ciclo de vida del VIH-1.

de la célula huésped y a un correceptor, generalmente CCR5 ó CXCR4. Esta interacción induce un cambio conformacional en la glucoproteína Env gp41, desencadenando el paso de penetración.

- **Penetración:** una vez reconocido el virión por los receptores de superficie, se produce la fusión de la envoltura lipídica del virión con la membrana celular. Esto permite que las dos copias de ARN genómico viral y varias enzimas penetren en el citoplasma de la célula huésped.
- **Transcripción inversa:** después de eliminarse la cápside, el ARN viral es liberado en el citoplasma, y se transforma en ADN complementario de doble cadena mediante la acción de la enzima transcriptasa inversa, procedente del virión.
- **Integración:** el ADN del virus forma un complejo con proteínas virales y de la célula huésped llamado complejo de preintegración, que penetra en el núcleo. Ya dentro del núcleo se produce la integración, mediada por la enzima integrasa, también procedente del virión. Esta enzima permite que el ADN viral se inserte en el ADN de la célula huésped. A continuación, el provirus resultante es transcrito, o bien puede tener lugar un período reversible de latencia.
- **Transcripción y traducción:** el ADN vírico se transcribe mediante los mecanismos normales de la célula. En este proceso participan factores de transcripción celulares como NF- κ B o SP1. La proteína transactivadora de la transcripción (Tat), codificada por el virus, forma un complejo con el elemento de respuesta de la transactivación (TAR, presente en el ARN viral nascente), que incrementa significativamente los niveles de transcripción. A continuación tiene lugar el ajuste del ARN, existiendo después de este paso tres tipos de ARN viral: sin ajustar (9 kb), parcialmente ajustado (4-5 kb) o totalmente ajustado (2 kb). El ARN de este último tipo codifica Rev y Tat, entre otras proteínas. La formación del complejo entre Rev y el Elemento de Respuesta de Rev (RRE), una estructura de aproximadamente 350 nucleótidos formada por el ARN viral, permite la exportación del núcleo al citoplasma del ARN no ajustado o parcialmente ajustado en la fase tardía del ciclo de vida del virus. Una vez allí, el ARN no ajustado sirve como ARN genómico para las nuevas partículas virales, o bien se traduce en las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Por su parte, el ARN parcialmente ajustado se traduce en la proteína Env entre otras.
- **Ensamblado, gemación y maduración:** las poliproteínas Gag y Gag-Pol se ensamblan con un dímero de moléculas de ARN genómico viral, y

establecen interacciones con la membrana plasmática, creándose un nuevo virión por gemación. Este virión no tiene capacidad infectiva, siendo necesaria una etapa de maduración proteolítica. En este último paso se activa la proteasa viral, que actúa sobre Gag y la divide en sus dominios MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6; y se produce un reordenamiento molecular, que incluye la formación de la cápside y da lugar a un virión preparado para iniciar un nuevo ciclo infectivo.

3.1.3. El complejo RRE-Rev

El Elemento de Respuesta de Rev (RRE) está localizado en el gen *env* del ARN del virus VIH-1, y constituye una estructura fuertemente conservada formada por 350 nucleótidos organizados en cinco dominios de estructura secundaria. Dentro del subdominio IIB, el surco mayor anormalmente ensanchado del bucle interno GGCG:ACGGUA (Figura 3.5 A) forma un complejo de alta afinidad con la α -hélice de unión a ARN de Rev (Rev₃₄₋₅₀, Figura 3.5 B)[174]. Rev es una proteína de tipo hélice-vuelta-hélice[175; 176] formada por 116 aminoácidos y codificada por el virus[177]. La interacción entre el bucle interno IIB y la α -hélice Rev₃₄₋₅₀ es esencial para la replicación del virus, ya que dispara una cadena de eventos que permite el transporte del ARN parcialmente ajustado o no ajustado al citoplasma de la célula infectada en la fase tardía del ciclo viral[177].

Las proteínas que se unen al ADN reconocen frecuentemente las bases por el surco mayor mediante α -hélices[178]. Sin embargo, el surco mayor de una hélice de ARN de tipo A es profundo y demasiado estrecho para acomodar una hélice α , por lo que se necesitan pares de bases no canónicos que lo ensanchen[179]. En la Figura 3.5 A se muestra la secuencia de nucleótidos del bucle IIB y su numeración. En el complejo que forma con Rev, el nucleótido G22 (G71 siguiendo la numeración de residuos del RRE completo) adopta una conformación *anti* y los pares de bases purina-purina G6:G22 y G5:A24 ensanchan localmente el surco mayor en unos 5 Å (Figura 3.5 A). La presencia de dos nucleótidos extrahelicoidales (A19 y U23) y de una vuelta S[180] en el tracto G21-A24 también contribuyen a la deformación del esqueleto del ARN y al ensanchamiento del surco[174]. La existencia de estos pares no canónicos y la vuelta S es importante para la unión de Rev porque permiten la formación de un sitio de unión ensanchado y profundo que Rev₃₄₋₅₀ es capaz de reconocer específicamente.

En contraposición al surco mayor poco profundo de un ADN en conformación B, el bucle interno de IIB conserva la profundidad de surco característica del

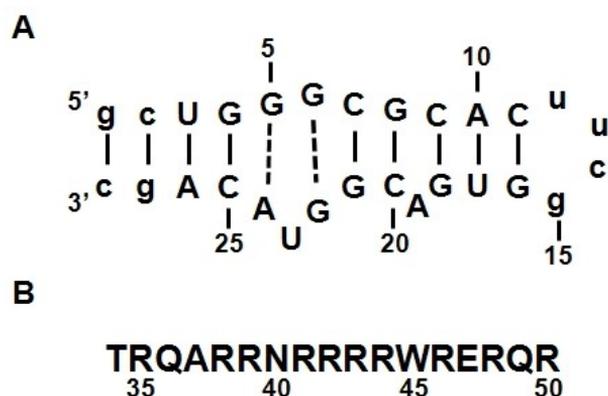


Figura 3.5: A) Secuencia de nucleótidos del subdominio IIB de RRE. La numeración empleada considera únicamente los nucleótidos de este subdominio. Los nucleótidos añadidos que no están presentes en la secuencia natural se representan en minúscula. B) Secuencia de aminoácidos de la α -hélice Rev_{34–50}.

ARN en conformación A, lo que obliga a la α -hélice de Rev a penetrar considerablemente en el surco para permitir que las cadenas laterales contacten con las bases. En comparación con la hélice GCN4[181], representativa de la mayor parte de hélices que reconocen el surco mayor del ADN, Rev penetra en el surco a una profundidad 3 Å mayor[174]. Además, la α -hélice de Rev_{34–50} interactúa con IIB a lo largo de entre 3 y 4 vueltas, lo que implica una gran superficie de contacto con el ARN. Como consecuencia, se establecen numerosas interacciones entre las bases del ARN y los aminoácidos de la α -hélice, que aparecen esquematizadas en la Figura 3.6. Los contactos más importantes con el ARN son establecidos por el segmento N-terminal de la α -hélice (Arg35-Arg46)[174; 182; 183]. Existen contactos específicos entre cuatro aminoácidos y bases ubicadas en la región ensanchada del surco. Los residuos Arg35 y Arg39 interactúan con las bases U17-G18 y G21, respectivamente, en un lado del surco, mientras que Asn40 y Arg44 establecen contactos con U3 y G5 en la hebra opuesta. Además de las interacciones específicas con las bases, existen numerosos contactos entre el esqueleto azúcar-fosfato del ARN y los aminoácidos Thr34, Arg38, Arg41, Arg42, Arg43, Arg46 y Arg48. Por ejemplo, Arg38 establece enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato de U17 y G18, y Arg46 estabiliza las interacciones electrostáticas desfavorables entre los grupos fosfato de G21 y U23, que se encuentran anormalmente próximos entre sí[174].

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos que demuestran que la interacción entre RRE y Rev es significativamente compleja. La formación del

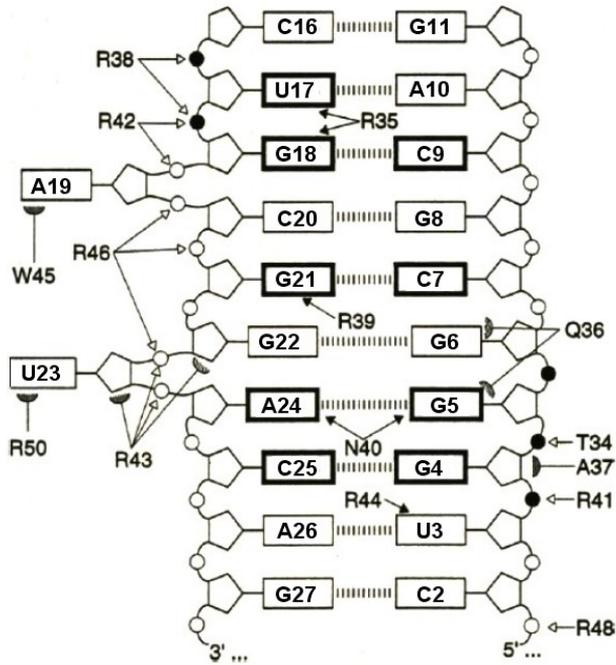


Figura 3.6: Contactos intermoleculares entre los nucleótidos del subdominio IIB y los aminoácidos de Rev₃₄₋₅₀.

complejo de alta afinidad entre el dominio IIB y Rev promueve la incorporación cooperativa de moléculas adicionales de proteína en otros sitios de unión de RRE (Figura 3.7), formándose una ribonucleoproteína compuesta por RRE y entre seis y ocho moléculas de Rev [184; 185] que se une al factor de transporte celular Crm1. Las interacciones RRE-Rev están a su vez estabilizadas por interacciones Rev-Rev. Recientemente se ha resuelto mediante rayos-X la estructura tridimensional de dímeros Rev-Rev [175; 176]. Estos estudios, junto a la determinación de una estructura de baja resolución del sistema RRE mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) [186] han sido decisivos para explicar el conjunto de interacciones entre RRE y Rev.

Diversos trabajos indican que Rev tiene efectos pleiotrópicos [187]. Además de su función en el transporte del ARN viral al citoplasma, Rev promueve la traducción y el empaquetamiento del ARN viral [188] y controla el transporte nucleocitoplasmático de la integrasa del virus [189]. Claramente, Rev constituye una diana potencialmente importante en la terapia anti-VIH-1.

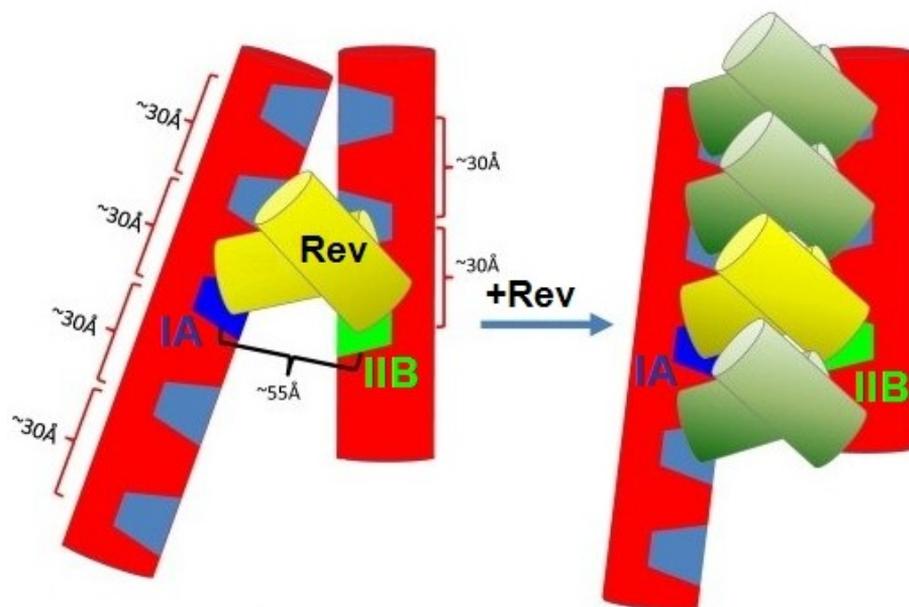


Figura 3.7: Formación de la ribonucleoproteína RRE-Rev: unión de Rev (en amarillo) a los subdominios IIB y IA de RRE (en rojo), seguida de la incorporación de moléculas adicionales de Rev (en verde).

3.1.3.1. Desarrollo de inhibidores RRE-Rev

La investigación de inhibidores de Rev es importante, ya que se trata de una diana distinta a las utilizadas por los actuales antirretrovirales, por lo que su bloqueo podría suponer una menor aparición de resistencias al tratamiento de la enfermedad con terapias de combinación.

Algunos aminoglucósidos como la neomicina inhiben la formación del complejo RRE-Rev *in vitro* pero poseen escasa actividad antiviral[190]. La afinidad por RRE de estas moléculas se consiguió mejorar significativamente con un conjugado neomicina-acridina[123] (Figura 3.8 A). También se han sintetizado difenilfuranos capaces de bloquear la interacción RRE-Rev a concentraciones inferiores a 1 μ M[191] (Figura 3.8 B). Alternativamente a la estrategia sintética, el cribado de quimiotecas utilizando experimentos de fluorescencia u otros métodos, o bien ensayos celulares, ha permitido hallar moléculas de pequeño tamaño con actividad inhibitoria *in vitro*[192; 193] (Figura 3.8 C) y en cultivo celular[194]

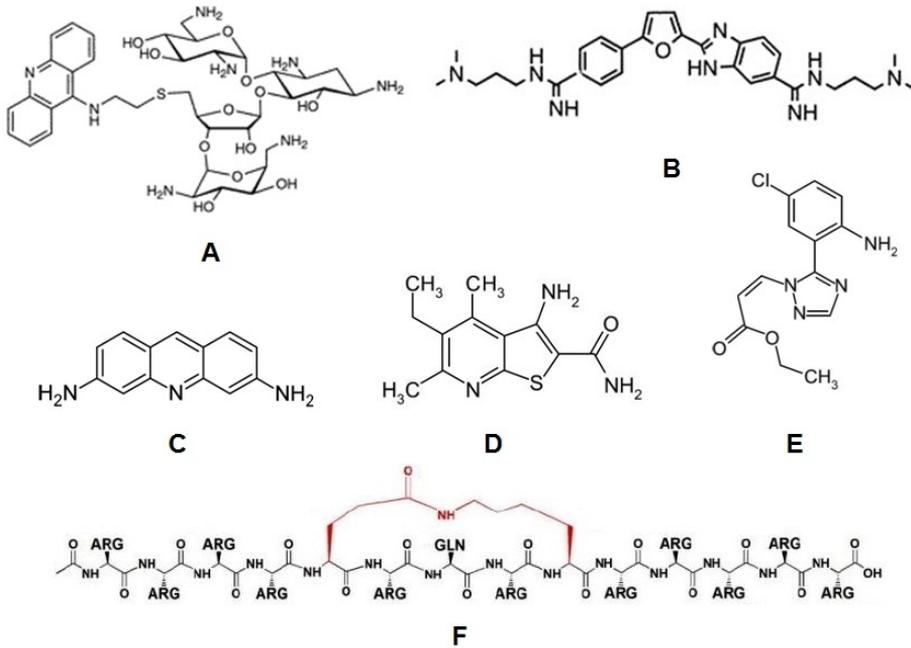


Figura 3.8: Estructuras químicas de inhibidores de Rev: conjugado neomicina-acridina (A), difenilfurano DB340 (B), proflavina (C), tienopiridina 103833 (D), triazol PKF050-638 (E), y peptidomimético R6QR7-8 (F).

(Figura 3.8 D) en el rango de micromolar bajo. Otras maneras de abordar este objetivo han consistido en la utilización de peptidomiméticos[195; 196] (Figura 3.8 F) y oligonucleótidos antisentido[197]. Algunos trabajos también han descrito procedimientos para suprimir la función de Rev, al margen de inhibir su interacción con RRE. Por ejemplo, se han identificado pequeñas moléculas capaces de impedir la formación del complejo Crm1-Rev, y por tanto de obstaculizar la exportación de ARN mediada por Rev[198] (Figura 3.8 E); o de reducir los niveles de Rev en el núcleo, dificultando el paso al citoplasma del ARN sin ayustar o parcialmente ayustado[199].

A pesar de estos trabajos y del potencial del sistema RRE-Rev para el desarrollo de nuevos agentes antivirales, la búsqueda de inhibidores de Rev ha dado pocos resultados, ya que ninguna de las moléculas identificadas hasta el momento ha alcanzado la fase de ensayos clínicos.

3.2. Objetivos

El objetivo del proyecto descrito en este capítulo es el diseño *de novo* de pequeñas moléculas orgánicas capaces de unirse específicamente al bucle interno IIB del RRE del virus VIH-1, bloquear la interacción entre RRE y Rev, y ejercer un efecto inhibitorio sobre la replicación del virus.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Cálculos de *docking*

Como paso previo a los cálculos de *docking*, se prepararon por ordenador las estructuras de ARN y ligandos utilizando el programa MOE (Chemical Computing Group Inc.). La conformación de cada uno de los ligandos se examinó variando sistemáticamente las torsiones benceno-benceno en intervalos de 30°. Se minimizó la energía de cada confórmero y se seleccionó el de energía más baja para los cálculos de *docking*. Al confórmero seleccionado se le asignaron cargas parciales PEOE[200], y se minimizó su energía nuevamente mediante el campo de fuerzas Merck MMFF94[201]. Respecto al receptor, se utilizó el bucle IIB perteneciente a la estructura 1ETF del PDB[174] y se le incrementó en una unidad la carga de cada átomo de fósforo. Este es un procedimiento habitual[202] que tiene como objetivo evitar que el componente electrostático en los cálculos de *docking* sea demasiado elevado. A continuación, se asignaron cargas parciales Kollman '94[203] y se minimizó la estructura con el campo de fuerzas AMBER[203].

Una vez preparadas las estructuras a utilizar, se empleó el programa Dock 5.0[204] para los cálculos de *docking*. Utilizando como centro las coordenadas de Rev en su complejo con el dominio IIB, se generó un *grid* (o caja) de 10 Å en cada dirección con un espaciado de 0,3 Å entre puntos consecutivos[205], y a continuación se realizaron los cálculos de *docking*. En la configuración utilizada no se permitieron choques estéricos (*max bumps*=0), se calculó un máximo de 5000 orientaciones, se permitió flexibilidad conformacional para los ligandos, y para cada ligando se obtuvieron 10 soluciones. La energía se determinó mediante la siguiente función de *scoring*, que utiliza parámetros extraídos del campo de fuerzas de AMBER[206]:

$$E = \sum_i^{lig} \left[\sqrt{A_{ii}} \sum_j^{rec} \frac{\sqrt{A_{jj}}}{r_{ij}^{12}} - \sqrt{B_{ii}} \sum_j^{rec} \frac{\sqrt{B_{jj}}}{r_{ij}^6} + 332q_i \sum_j^{rec} \frac{q_j}{\epsilon r_{ij}} \right] \quad (3.1)$$

donde A_{ij} y B_{ij} son los parámetros de van der Waals, q_i y q_j las cargas atómicas, ϵ es la constante dieléctrica y r_{ij} es la distancia entre los átomos i y j del ligando y el receptor, respectivamente.

3.3.2. Preparación de muestras

Los oligonucleótidos de ARN utilizados en los experimentos de espectroscopia de RMN y polarización de fluorescencia (FP) consistieron en una horquilla de ARN conteniendo el bucle IIB de RRE (IIB_h), y dos horquillas de ARN control: la horquilla GG_h, que contiene una oposición G:G en lugar del bucle interno IIB; y TAR_h, en la que el bucle interno IIB se sustituye por la protuberancia UCU [207] (Figura 3.9). Se adquirieron de Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc.) y, tras eliminar los grupos protectores 2'-acetoxi etil ortoéster (2'-ACE), se purificaron siguiendo un protocolo basado en electroforesis en gel y diálisis. Para los experimentos de SPR se adquirieron de Microsynth las mismas horquillas biotiniladas en 5' y ya purificadas por HPLC. Estas horquillas biotiniladas se microdializaron en un tampón HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,005 % (v/v) de surfactante P-20) antes de su inmovilización en chips de estreptavidina.

Los péptidos empleados en los experimentos de polarización de fluorescencia y SPR fueron suministrados por Genscript Inc. Se adquirió un péptido con secuencia FITC-GTRQARRNRRRRWRERQRAAAAAR (denominado en lo sucesivo frevp) marcado con el fluoróforo FITC (unido a la glicina N-terminal) y un péptido similar TRQARRNRRRRWRERQRAAAAAR (revp) sin etiquetar. Los antibióticos neomicina B, kanamicina A, kanamicina B y tobramicina proviieron de Sigma. Tanto los péptidos como los antibióticos no necesitaron ningún tratamiento adicional previo a los experimentos.

3.3.3. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando espectrómetros Bruker Avance 500 MHz y Bruker Avance 600 MHz equipado con criosonda, y se analizaron mediante Topspin 1.3 (Bruker Biospin) y Sparky 3.110[96]. Las horquillas de ARN fueron previamente microdializadas en una disolución acuosa compuesta por 10 mM fosfato sódico (pH 6,0) y 0,1 mM EDTA. La concentración de las muestras de ARN fue de entre 45 y 61 μ M, y su interacción con los compuestos bifenílicos y terfenílicos y el antibiótico neomicina B (utilizado como referencia) se monitorizó a través de experimentos monodimensionales y bidimensionales (TOCSY) realizados en D₂O a 27 °C. Partiendo de IIB_h aislado, el ARN se valoró progresivamente con ligando hasta obtener una proporción molar ligando:ARN entre 2:1 y 6:1, dependiendo de los cambios observados en los espectros. Para cuantificar la afinidad de la unión y la estequiometría, se realizaron nuevas

valoraciones mediante experimentos monodimensionales a baja concentración de la horquilla IIB_h (19 μ M) con los terfenilos más potentes, a proporciones molares ligando:ARN desde 0,1:1 hasta 6:1, a 38 °C, y se llevaron a cabo análisis de ancho de líneas de las señales del ARN con el programa Lineshapekin[208].

Los complejos de IIB_h con los mejores ligandos terfenílicos se estudiaron a una mayor concentración de ARN (entre 0,12 y 0,18 mM) y proporciones molares ligando:ARN 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1. Estos sistemas fueron examinados con más detalle mediante series de experimentos dqf-COSY, TOCSY y NOESY (con tiempos de mezcla entre 120 y 800 ms). Todos estos experimentos fueron obtenidos en D₂O a varias temperaturas (entre 2 y 46 °C) para facilitar la asignación de las resonancias del ARN.

Una muestra de IIB_h aislado (0,39 mM), previamente microdializada en una disolución acuosa compuesta por 10 mM fosfato sódico (pH 6,0) 50 mM NaCl y 0,1 mM EDTA, también se estudió mediante experimentos bidimensionales TOCSY, dqf-COSY y NOESY (con tiempos de mezcla de 80 y 250 ms) obtenidos a tres temperaturas diferentes (13, 27 y 38 °C) en D₂O, así como experimentos TOCSY y NOESY (250 ms) a 17 °C en H₂O. Estos espectros se usaron para identificar la mayor parte de los protones de IIB_h, utilizando como apoyo análisis previos con muestras de ARN similares[174; 209; 210].

3.3.4. Resonancia de plasmón superficial

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevaron a cabo a 25 °C en un equipo Biacore T100 (GE Healthcare), empleando chips de cuatro canales derivatizados con estreptavidina (tipo SA, serie S), y una de las siguientes disoluciones acuosas como fase móvil: 10 mM MES (pH 6,2), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0,005 % P20, o bien 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,005 % P20. Después de inmovilizar aproximadamente 300 unidades de respuesta (RU) de las horquillas de ARN en los chips, los compuestos se inyectaron durante períodos de 10 minutos a concentraciones entre 0,01 o 0,1 μ M y 100 o 200 μ M, permitiendo a continuación un período de disociación de 10 minutos. La velocidad de flujo empleada en los experimentos fue 20 μ L/min. Las superficies con ARN inmovilizado se regeneraron con disoluciones acuosas compuestas por 0,5-1,0 M NaCl y 10-100 mM NaOH, dependiendo del ligando.

Las constantes de disociación en el equilibrio de los complejos ARN-ligando (K_d) se calcularon ajustando las curvas de unión a las ecuaciones de uno (2.10) o dos sitios (2.11), descritas anteriormente. La ecuación de dos sitios de unión

únicamente se empleó en caso de mejorar significativamente el ajuste obtenido con el modelo de un solo sitio. Los experimentos se pusieron a punto analizando la interacción de IIB_h con péptido Rev_{34–50} y neomicina B. Con el péptido se empleó un rango de concentraciones de entre 0,1 y 500 nM, y en el caso de neomicina B, entre 0,01 y 200 μM. Todos los experimentos de SPR fueron doblemente referenciados[102], y se inyectaron muestras control de neomicina B (normalmente a una concentración de 25 μM) o péptido (normalmente a 50 nM) después de cada experimento, con el fin de comprobar el estado de los ARN unidos a la superficie del chip.

3.3.5. Polarización de fluorescencia

Los experimentos se realizaron a 25 °C utilizando un lector de placas Víctor X5 (Perkin Elmer Inc.) provisto de filtros de excitación y emisión de 480 y 535 nm, respectivamente, placas de 96 pocillos, y un tampón acuoso compuesto por 30 mM HEPES (pH 6,8), 100 mM KCl, 10 mM fosfato sódico, 10 mM acetato amónico, 10 mM cloruro de guanidinio, 2 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 0,5 mM EDTA y 0,001 % (v/v) Triton X-100[211]. Los datos se analizaron mediante el *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

Se incubaron IIB_h (a una concentración de 60 nM) y el péptido Rev marcado con FITC (frevp, a 10 nM) en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor durante 5 minutos. Los datos de anisotropía se midieron a continuación cada 5 minutos durante un total de 15 minutos, para comprobar que se alcanzaba un estado de equilibrio. En cada experimento se utilizaron aproximadamente 20 concentraciones diferentes de ligando entre 0,001 y 10000 μM. Para determinar la capacidad inhibitoria del péptido, también se llevaron a cabo experimentos con IIB_h a 2 nM y frevp a 10 nM. En cada experimento se incluyó un control negativo (una mezcla de IIB_h y frevp, equivalente a un 0 % de inhibición) y dos controles positivos (frevp aislado y una mezcla de IIB_h, frevp y neomicina B), y únicamente se consideraron válidos aquellos experimentos en los que la anisotropía alcanzó el valor mínimo esperado a las concentraciones más altas de inhibidor. Para descartar solapamiento espectral con FITC se registró el valor de anisotropía, y en algunos casos un espectro ultravioleta, de cada molécula examinada. Los valores de IC₅₀ se calcularon ajustando mediante el *software* Prism 6 la anisotropía observada (A_{obs}) a la siguiente ecuación:

$$A = A_f + \frac{(A_b - A_f)}{1 + \left(\frac{C}{IC_{50}}\right)^m} \quad (3.2)$$

donde A_f y A_b son los valores de anisotropía medidos para frevp aislado y unido a IIB_h, respectivamente, C es la concentración total de inhibidor, IC_{50} es la concentración de inhibidor necesaria para producir una inhibición del 50 %, y m es la pendiente de la parte lineal de la curva sigmoidea. Cada experimento de FP se repitió al menos dos veces. Las constantes de inhibición (K_i) se determinaron a partir de los valores de IC_{50} utilizando la siguiente ecuación:

$$\log(IC_{50}) = \log(10^{\log(K_i)}(1 + \frac{[frevp]_t}{K_d})) \quad (3.3)$$

donde $[frevp]_t$ es la concentración total de frevp (10 nM), y K_d es la constante de disociación de equilibrio de la interacción IIB_h-frevp. Este valor fue obtenido a través de dos experimentos de unión directa entre IIB_h y frevp, donde A se midió (a una concentración fija de frevp de 10 nM) en función de la concentración de IIB_h (0,1-300 nM).

3.4. Estrategia de trabajo

Para alcanzar los objetivos planteados en este capítulo se emplearon métodos computacionales basados en la estructura tridimensional de Rev_{34–50} y su complejo con el bucle interno IIB del RRE para diseñar miméticos orgánicos de Rev conteniendo un esqueleto *p*-terfenílico bilateralmente sustituido. En base a este estudio computacional, las siguientes moléculas fueron sintetizadas en el laboratorio de química orgánica de S. Fustero (CIPF/Universidad de Valencia): tres bifenilos sustituidos con cadenas 2-aminoetílicas en las posiciones 3,5 y 2',6' (**1**), 3,5 y 3',5' (**2**) y 2,6 y 2',6' (**3**); y once terfenilos, sustituidos con cadenas 2-aminoetílicas en las posiciones 3,5 y 2'',6'', y con diferentes patrones de sustitución en el anillo central y el carbono 4 del anillo I (Figura 3.10).

La interacción entre estos compuestos y una horquilla de ARN conteniendo el bucle IIB de RRE (IIB_h) se evaluó mediante experimentos de RMN y SPR. Los experimentos de RMN permitieron obtener información sobre la afinidad de la interacción y el sitio de unión de los ligandos, mientras que los ensayos de SPR sirvieron para cuantificar los parámetros de unión a IIB_h. Para evaluar la especificidad de la interacción se utilizaron dos horquillas de ARN control: la horquilla GG_h, que contiene una oposición G:G en lugar del bucle interno IIB que forma el sitio de alta afinidad de Rev_{34–50}; y TAR_h, en la que el bucle interno IIB se sustituye por la protuberancia UCU, reconocida por la proteína Tat del virus VIH-1[207] (Figura 3.9). La capacidad de estas moléculas de inhibir la asociación entre el subdominio IIB y la hélice Rev_{34–50} se analizó mediante un ensayo basado en polarización de fluorescencia.

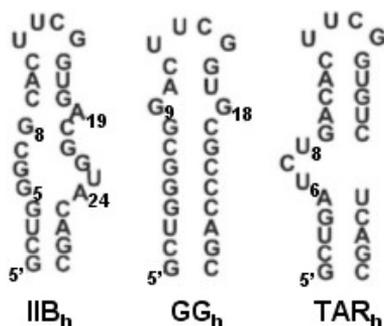


Figura 3.9: Estructuras secundarias de las horquillas de ARN utilizadas en este estudio. La horquilla IIB_h contiene el bucle interno IIB del RRE, mientras que en GG_h y TAR_h este bucle se sustituye por una oposición GG y una protuberancia UCU, respectivamente.

Finalmente, diversos ensayos celulares permitieron obtener información sobre la actividad antiviral de los compuestos, su toxicidad y su mecanismo de acción. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de J. Alcamí en el ISCIII de Madrid.

3.5. Resultados

3.5.1. Diseño computacional de inhibidores RRE-Rev

Previamente a la realización de este trabajo, algunos autores demostraron que moléculas *p*-terfenílicas tris-sustituidas en las posiciones 3,2' y 2'' podían mimetizar la estructura de una cara de una α -hélice, adoptando una conformación escalonada que reproduce la orientación angular de tres cadenas laterales aminoácídicas en las posiciones i , $i+4$ e $i+7$ de la hélice. Algunas de esas moléculas resultaron capaces de inhibir interacciones proteína-proteína[212]. Partiendo de estos resultados, se diseñaron ligandos *p*-terfenílicos con una distribución bilateral de sustituyentes en cada uno de los anillos de benceno, de manera que proyectaran estos sustituyentes en un ángulo espacial de 360° y mimetizaran la distribución tridimensional e interacciones de las cadenas laterales de la α -hélice Rev_{34–50} unida al bucle interno IIB de RRE[174]. En este complejo, Rev_{34–50} penetra profundamente en el bucle de ARN y utiliza sus tres caras para interactuar con el mismo (Figura 3.11 A).

En primer lugar se llevaron a cabo cálculos de *docking* con bifenilos tetraquis-sustituidos y terfenilos tris- y hexaquis-sustituidos sobre la estructura del subdominio IIB de RRE extraída del PDB (código 1ETF[174]). En el caso de los bifenilos tetraquis-sustituidos, se consideraron siete isómeros de posición y se combinaron los aminoácidos arginina (Arg), asparragina (Asn) y serina (Ser) en la composición de las cadenas laterales, con la restricción de que ningún aminoácido debía aparecer más de dos veces en cada estructura. En total, se trabajó con una quimioteca de 144 bifenilos. En general, la orientación calculada de los bifenilos dentro del sitio de unión del complejo IIB-Rev_{34–50} no fue uniforme, si bien se consiguió un alto grado de convergencia entre las repeticiones calculadas para cada isómero. Respecto a las cadenas laterales, las estructuras de más baja energía se consiguieron siempre con una combinación de dos Arg, una Asn y una Ser (Tabla 3.1).

En el caso de los terfenilos, en primer lugar se evaluó un conjunto de terfenilos tris-sustituidos unilateralmente. De nuevo se combinaron los aminoácidos Arg, Asn y Ser en las cadenas laterales, con un máximo de dos aminoácidos iguales por estructura, lo que dio lugar a una quimioteca de 96 terfenilos. Se observó una orientación de los terfenilos dentro del sitio de unión más parecida a la del péptido Rev, y de nuevo los valores de energía más bajos se obtuvieron con una combinación de dos Arg, una Asn y una Ser.

Tabla 3.1: Resultados de *docking* de bifenilos (BF) y terfenilos (TF) con diferentes patrones de sustitución.

Conjunto	Mejor combinación	Orientación	Convergencia	Angulo 360°
BF tetraquis-sustituídos	2 Arg, 1 Ser, 1 Asn	No	78%	No
TF tris-sustituídos	2 Arg, 1 Ser, 1 Asn	Sí	64%	No
TF hexaquis-sustituídos	3 Arg, 2 Ser, 1 Asn	Sí	64%	Sí

A continuación se llevó a cabo el *docking* de terfenilos sustituidos a ambos lados del esqueleto *p*-terfenílico. Estas estructuras fueron de mayor interés, ya que se esperaba que las cadenas laterales se proyectaran espacialmente en un ángulo de 360°, similar al observado en el complejo IIB-Rev₃₄₋₅₀, en el que dos terceras partes de la α -hélice están rodeadas de ARN (Figura 3.11 A). Ya que en este caso las posibilidades combinatorias de las cadenas laterales eran muy elevadas, se limitaron los cálculos a 16 estructuras. En base a lo observado en los cálculos con bifenilos y terfenilos tris-sustituídos, se optó por un único isómero sustituido en las posiciones bilaterales 3,5,2',6',2'' y 6'', y una combinación de aminoácidos con predominio de argininas: tres Arg, dos Ser y una Asn. Para cada estructura se calcularon 10 soluciones, obteniéndose un alto grado de convergencia entre las de más baja energía (Tabla 3.1). La orientación de los terfenilos dentro del sitio de unión reprodujo con bastante fidelidad la que adopta el péptido Rev en el complejo IIB-Rev₃₄₋₅₀.

Tabla 3.2: Estudio de la longitud de las cadenas laterales aminoetílicas.

n	Orientación	Convergencia
2	Sí	70 %
3	No	40 %
4	No	50 %
5	Sí	100 %

Por último, se realizó una serie de cálculos con el propósito de determinar la composición y longitud óptima de las cadenas laterales de un conjunto sintéticamente accesible de bifenilos tetraquis-sustituídos y terfenilos hexaquis-sustituídos. Dado que la hélice Rev₃₄₋₅₀ es rica en argininas, y Arg fue el aminoácido más habitual en las mejores soluciones de los cálculos descritos hasta ahora, los motivos elegidos fueron cadenas aminoalquílicas, con una longitud de 2 a 5 carbonos y un grupo amino terminal. En el caso de los bifenilos se observó que sus orientaciones dentro del sitio de unión IIB-Rev₃₄₋₅₀ no reproducían la del péptido Rev, por lo que no se pudo extraer información útil. Sin embargo, en el caso de los terfenilos se observó una orientación adecuada dentro del sitio

de unión, sobre todo para las cadenas aminoetílicas y aminopentílicas, que además mostraron un grado de convergencia mayor que las compuestas por 3 ó 4 carbonos (Tabla 3.2).

3.5.2. Síntesis de *p*-bifenilos y *p*-terfenilos sustituidos bilateralmente

El trabajo de síntesis fue realizado por Ignacio Ibáñez, Silvia Catalán y Santos Fustero (Universidad de Valencia y Centro de Investigación Príncipe Felipe)[213]. En primer lugar se sintetizaron una serie de bifenilos tetraquis-sustituidos mediante acoplamientos de Suzuki catalizados por paladio[214] entre bromuros de arilo y ésteres borónicos. Las posiciones de las cadenas 2-aminoetílicas fueron las siguientes: 3,5 y 2',6' (**1**), 3,5 y 3',5' (**2**) y 2,6 y 2',6' (**3**) (Figura 3.10). Las cadenas 2-aminoetílicas (*orto*) 2' y 6' en **1** inducen la adopción de una conformación escalonada por parte de este bifenilo, similar a la adoptada por los *p*-terfenilos 3,2',2'' tris-sustituidos que se comportan como miméticos de α -hélice. En el caso de **3** estos impedimentos estéricos se maximizan, ya que las cuatro cadenas 2-aminoetílicas ocupan posiciones *orto* en relación a los carbonos que unen los dos anillos aromáticos. Sin embargo, las cadenas 2-aminoetílicas de **2** están en *meta* respecto a los mismos carbonos, de manera que esta molécula debe adoptar una conformación plana.

Los terfenilos se sintetizaron mediante dos acoplamientos de Suzuki catalizados por paladio: el primero entre un bromuro de arilo y un éster borónico, y el segundo entre el triflato del bifenilo resultante y un nuevo éster borónico. La primera molécula que se preparó fue **4b**, provista de cuatro cadenas laterales 2-aminoetílicas en las posiciones 3,5,2'' y 6'' de los dos anillos bencénicos terminales, y sin sustituyentes en el anillo central. En este caso, cabe esperar una conformación escalonada para el enlace 4'-1'' que une el segundo y el tercer anillo de benceno, pero no para el enlace entre el primero y el segundo (Figura 3.10). La segunda serie de terfenilos estuvo formada por compuestos tetraquis-sustituidos con cadenas 2-aminoetílicas en las posiciones 3,5,2'',6'', y un único sustituyente en la posición 2' del anillo central: metoxi (**5a**, **5b**, **5c** y **5d**) o etilo (**5e** y **5f**). Por último se sintetizó una tercera serie de terfenilos similares a los anteriores, pero provistos de dos grupos metilo (**6a** y **6b**) o etilo (**6c** y **6d**) en las posiciones bilaterales 2' y 6' del anillo central (Figura 3.10). Estas moléculas contienen grupos bilaterales en los tres anillos, y según las predicciones deberían ser los mejores miméticos de Rev₃₄₋₅₀.

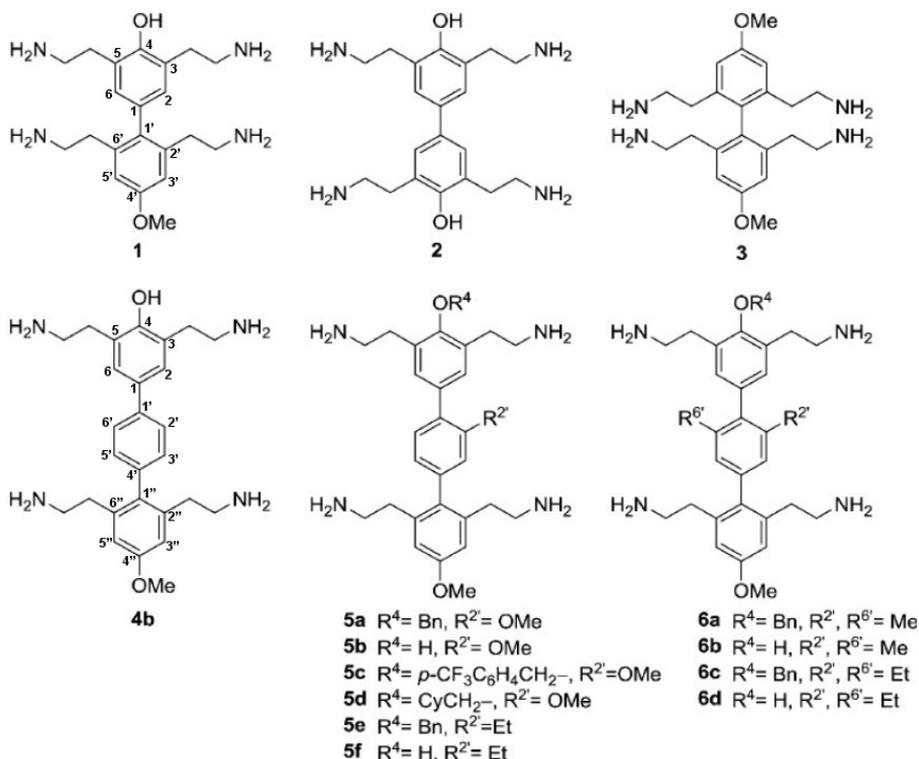


Figura 3.10: Estructura química de los *p*-bifenilos y *p*-terfenilos estudiados en este capítulo.

3.5.3. Valoraciones de RRE IIB con *p*-bifenilos y *p*-terfenilos monitorizadas mediante RMN

Mediante experimentos de RMN bidimensional, se monitorizó la interacción entre la horquilla IIB_h (Figura 3.9) y moléculas bifenílicas y terfenílicas y el antibiótico de unión a RRE neomicina B (Figura 3.1), que se utilizó como referencia[190; 215]. Estos experimentos fueron útiles para examinar la afinidad de las interacciones y la ubicación de los sitios de unión, y se encontraron diferencias significativas entre los distintos ligandos. El bifenilo **1** necesitó un ratio molar ligando:IIB_h muy elevado (6:1) para producir cambios detectables en el espectro TOCSY de IIB_h (Figura 3.12 B), mientras que **2**, **3** y neomicina B provocaron variaciones de desplazamiento químico en nucleótidos de los tallos, fuera del bucle interno. Estas observaciones son indicativas de una unión débil

(1) o bien inespecífica (**2**, **3** y neomicina).

Por el contrario, en los compuestos de la serie terfenílica únicamente se apreciaron cambios de desplazamiento químico en nucleótidos del bucle interno o inmediatamente adyacentes, concretamente C20, U23 y C25. **4b**, que carece de sustituyentes en el anillo central, sólo indujo cambios a ratios molares **4b**:IIB_h elevados (5:1, Figura 3.12 C). **5b**, y en mayor medida **5f**, con sólo un sustituyente en el anillo central (2'-metoxi y 2'-etil, respectivamente), provocaron cambios significativamente mayores en los desplazamientos químicos, apreciables a ratios más bajos. Sin embargo, los terfenilos que dieron lugar a las mayores variaciones de desplazamiento químico y a picos de complejo más estrechos fueron **6b** y **6d**, provistos de dos grupos hidrofóbicos (metilo y etilo, respectivamente) en las posiciones 2' y 6' del anillo central. IIB_h fue valorado con dos equivalentes molares de estos ligandos, y sólo el bucle interno y los nucleótidos adyacentes resultaron afectados por la interacción (Figura 3.12 A). La sustitución del grupo 4-OH del primer anillo bencénico por otros grupos (Figura 3.10) generalmente resultó en cambios de desplazamientos químicos del ARN menos acusados y resonancias de complejo más anchas, indicando una unión más débil. No obstante, todas las moléculas terfenílicas indujeron cambios similares en el espectro de IIB_h, lo que

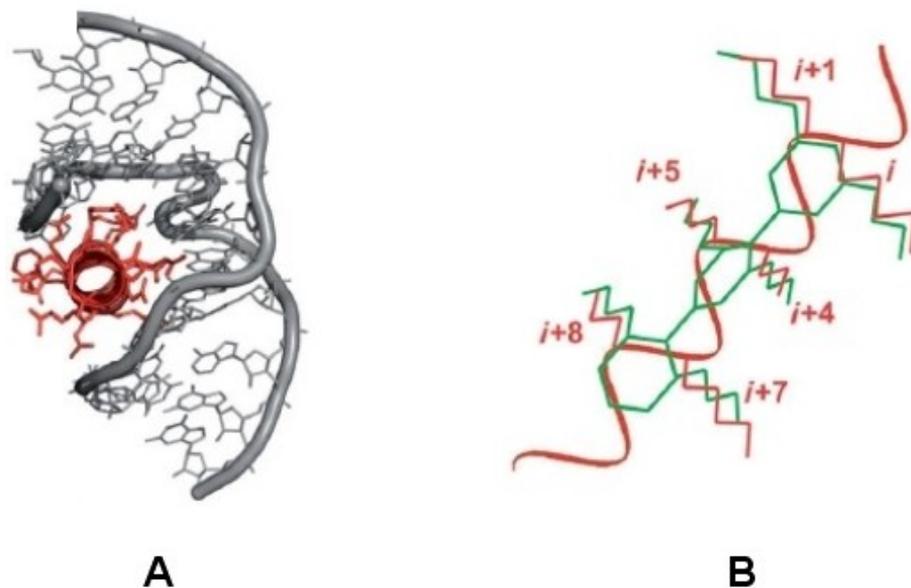


Figura 3.11: A) Complejo IIB – Rev_{34–50} (PDB 1ETF)[174]. B) Superposición de un *p*-terfenilo bilateralmente sustituido (en verde) con una α -hélice (en rojo).

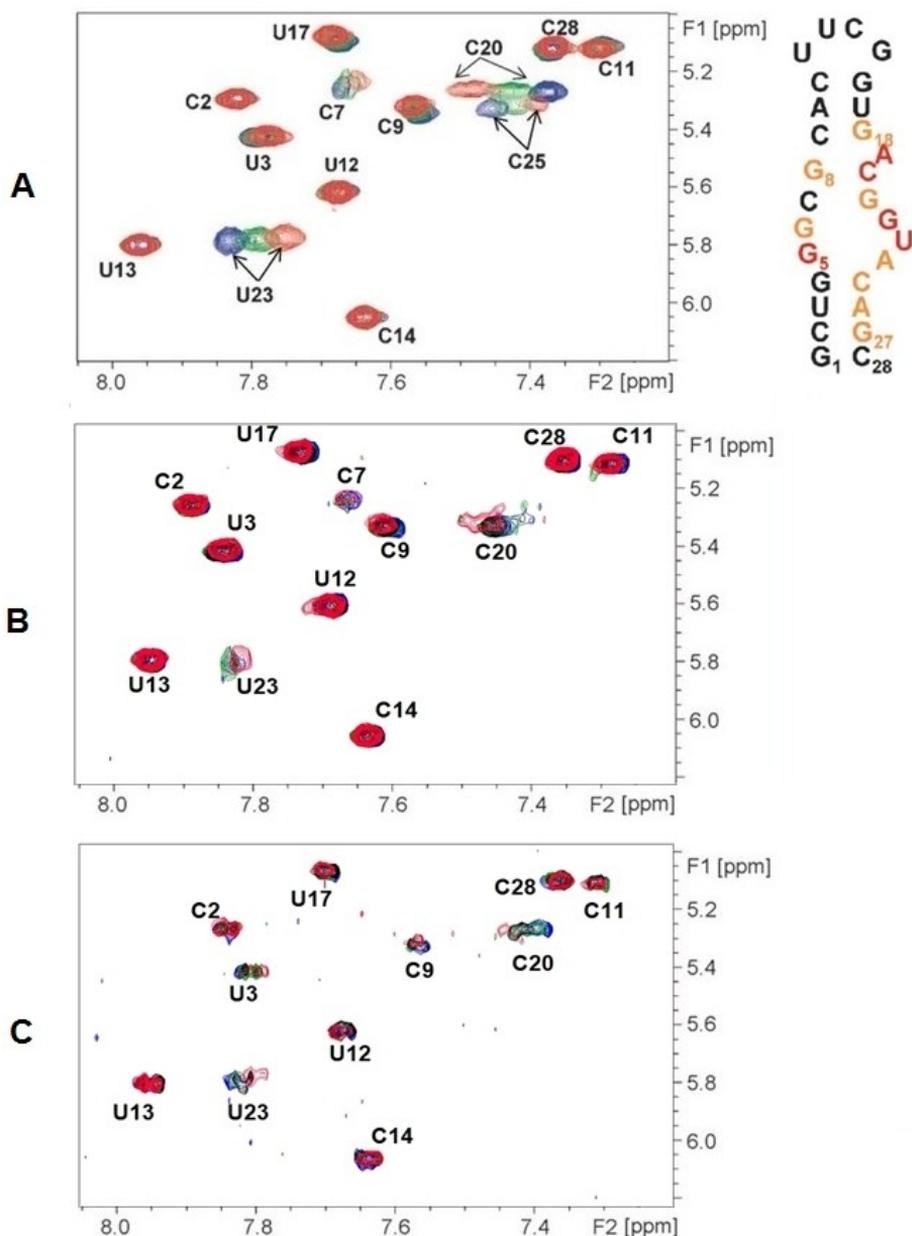


Figura 3.12: Superposición de espectros TOCSY (región H5-H6) correspondientes a las mezclas **6b**:IIB_h (A), **1**:IIB_h (B) y **4b**:IIB_h (C) en proporciones molares 0:1 (azul), 1:1 (verde) y 2:1 (A), 6:1 (B) y 5:1 (C) (rojo). En (A) puede observarse también un mapa del sitio de unión de **6b** en la horquilla IIB_h. Los nucleótidos cuyos protones aromáticos o H1' sufrieron cambios de desplazamiento químico tras la adición de dos equivalentes de **6b** se resaltan en naranja ($\Delta\delta \geq 0,05ppm$) y rojo ($\Delta\delta \geq 0,10ppm$).

demonstró que tienen un modo de unión común.

Con el fin de cuantificar afinidades y estequiometrías de unión, se realizaron valoraciones por RMN de una muestra de IIB_h a baja concentración (19 μ M) con **5b**, **6b** y **6d** a ratios ligando:ARN desde 0,1:1 hasta 6:1. Los análisis de anchos de línea[208] de las resonancias de ARN A26 H2 y G27 H8 fueron consistentes con la unión de dos moléculas de **6b** al bucle interno de IIB_h, con constantes de disociación de equilibrio de 11 y 25 μ M, y de dos moléculas de **5b** con unas K_d de 25 y 33 μ M. También se examinó por RMN la interacción de **6b** y **5b** con la horquilla control GG_h, en la que un par G:G reemplaza al bucle IIB (Figura 3.9). Ambos compuestos ocasionaron cambios en los desplazamientos químicos a ratios molares ligando:GG_h significativamente mayores (5:1) con respecto a IIB_h (2:1)[213]. Esto confirmó la especificidad de estas moléculas por el bucle IIB observada en los experimentos TOCSY con IIB_h.

3.5.4. Determinación de parámetros de unión por SPR

3.5.4.1. Validación con revp y neomicina B

En primer lugar se analizó mediante SPR la interacción entre IIB_h y el péptido revp. Esta secuencia está formada por el tracto Rev_{34–50} que interacciona con IIB (Figura 3.5 B)[182], más un segmento adicional AAAAR en el extremo C-terminal que estabiliza la conformación de α -hélice[183]. Las curvas se ajustaron con un modelo de un sitio de unión, obteniéndose una constante de disociación de $4,2 \pm 3,4$ nM y una estequiometría de unión 1:1, lo que indicó la asociación de una sola molécula de revp al sitio de alta afinidad de la horquilla IIB_h. Estos datos concordaron muy bien con los publicados para la interacción entre secuencias IIB y péptidos similares[183; 216]. Para evaluar la especificidad de la interacción se fijaron en el chip las horquillas GG_h y TAR_h además de IIB_h (Figura 3.9). Para la interacción IIB_h-revp se obtuvieron ratios de especificidad $K_d(\text{GG}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ y $K_d(\text{TAR}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ de 14,5 y 4,4, respectivamente (Tabla 3.3). Para el antibiótico de referencia neomicina B, las curvas se ajustaron mejor con un modelo de dos sitios de unión, obteniéndose una K_d de $2,4 \pm 1,1$ μ M para la interacción con el sitio de unión de mayor afinidad, y relaciones de especificidad $K_d(\text{GG}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ y $K_d(\text{TAR}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ pobres, de 0,9 y 2,3, respectivamente (Tabla 3.3). Estos valores de afinidad de neomicina por IIB_h y su limitada especificidad también se observaron en trabajos anteriores[215] y corroboraron los datos obtenidos por RMN.

Tabla 3.3: Análisis por SPR de la interacción de IIB_h con Rev₃₄₋₅₀ y ligandos orgánicos.

compuesto	$K_d(IIB_h)(M \times 10^6)$	$n^s(IIB_h)$	$\frac{K_d(GG_h)}{K_d(IIB_h)}$	$\frac{K_d(TAR_h)}{K_d(IIB_h)}$
1	$31,1 \pm 5,0$	$4,3^1 \pm 0,3$	-	3,7
3	> 100	-	-	-
5a	$9,4 \pm 5,7$	$1,3^2 \pm 0,6$	4,9	3,2
5b	$13,0 \pm 9,0$	$1,1^2 \pm 1,0$	1,9	6,0
5c	$14,0 \pm 5,1$	$1,4^2 \pm 0,4$	10,3	9,6
5d	$46,2 \pm 32,0$	$2,5^1 \pm 1,1$	1,3	4,0
revp	$0,0042 \pm 0,0034$	$0,7^1 \pm 0,2$	14,5	4,4
neomicina B	$2,4 \pm 1,1$	$3,2^2 \pm 0,6$	0,9	2,3

Parámetros de interacción entre IIB_h y moléculas bifenílicas y terfenílicas, hélice Rev₃₄₋₅₀ (revp) y neomicina B, medidos a 25 °C. Los compuestos terfenílicos con grupos hidrofóbicos (metilo y etilo) en el anillo central sólo se pudieron estudiar hasta una concentración de 25 μM de ligando, debido a un fenómeno de unión al canal de referencia que imposibilitó extraer valores fiables de K_d y especificidad mediante SPR. Los ajustes se obtuvieron mediante un modelo de uno (s=1) o dos (s=2) sitios de unión.

3.5.4.2. Experimentos con bifenilos y terfenilos

La técnica de SPR permitió estudiar el subconjunto de terfenilos 2¹-metoxi, relativamente polares, así como los bifenilos **1** y **3** (Tabla 3.3). Se obtuvo una K_d de 13,0 μM para la interacción entre IIB_h y **5b**, y unas relaciones de especificidad $K_d(GG_h)/K_d(IIB_h)$ y $K_d(TAR_h)/K_d(IIB_h)$ de 1,9 y 6,0, respectivamente. Las K_d de **5a** y **5c** (con sustituyentes 4-benciloxi y 4-trifluorometilbenciloxi, respectivamente) fueron similares a la de **5b**, pero la especificidad por IIB_h mejoró significativamente en el caso de **5c**, con unos ratios $K_d(GG_h)/K_d(IIB_h)$ y $K_d(TAR_h)/K_d(IIB_h)$ de 10,3 y 9,6, respectivamente (Figura 3.13), comparables a los observados para revp (14,5 y 4,4, Tabla 3.3). **5d** y los bifenilos **1** y **3** se unieron a IIB_h con valores de K_d más elevados (Tabla 3.3), de acuerdo con las observaciones de RMN.

3.5.5. Ensayos de inhibición RRE IIB-Rev₃₄₋₅₀ *in vitro*

3.5.5.1. Validación con Rev₃₄₋₅₀ y antibióticos

La capacidad de los ligandos bifenílicos y terfenílicos de inhibir la interacción entre IIB_h y Rev₃₄₋₅₀ se evaluó mediante un ensayo de desplazamiento basado en anisotropía de fluorescencia (Tabla 3.4 y Figura 3.14). Para este experimento se empleó el péptido frevp, conteniendo una secuencia similar a revp y marcado con el fluoróforo FITC.

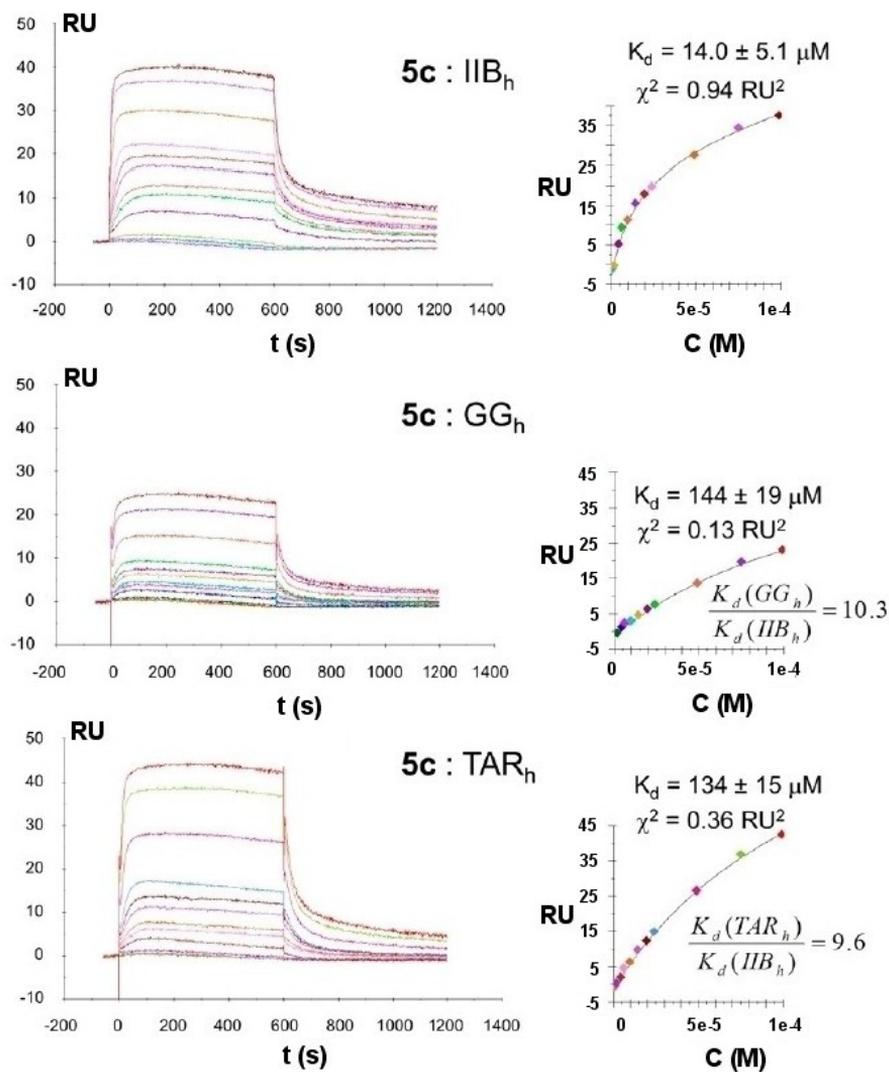


Figura 3.13: Análisis por SPR a 25 °C y pH 7,4 de la interacción entre el terfenilo **5c** y las horquillas IIB_h, GG_h y TAR_h, en el que se muestran a la izquierda los sensoqramas con las curvas desde 0,1 (inferior) hasta 100 μM (superior) de concentración de ligando; y a la derecha los ajustes de las curvas de unión en estado estacionario, parámetros de unión y valores de χ^2 .

La técnica fue validada midiendo la actividad inhibitoria de revp y varios antibióticos previamente estudiados mediante este ensayo[211] (Tabla 3.4). La constante de inhibición, K_i , obtenida para revp ($4,1 \pm 0,8 \text{ nM}$) se ajustó muy

bien a la K_d determinada por SPR ($4,2 \pm 3,4$ nM). El valor de K_i de neomicina ($2,0 \pm 0,2$ μ M, obtenido suponiendo que una molécula de ligando provoca el desplazamiento de frevp), también fue similar a la K_d obtenida mediante SPR, y a los valores publicados previamente para este antibiótico[216]. En el experimento de unión directa entre la horquilla IIB_h y frevp también se determinó una K_d de $4,6 \pm 1,3$ nM, un valor muy próximo al obtenido por SPR.

Tabla 3.4: Inhibición de la interacción IIB_h-Rev₃₄₋₅₀ por moléculas bifenílicas y terfenílicas y neomicina B, evaluada mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia.

compuesto	$IC_{50}(M \times 10^6)$
1	$22,1 \pm 5,8$
2	$7,7 \pm 0,8$
3	$308,7 \pm 68,9$
4b	$23,4 \pm 3,6$
5a	$162,2 \pm 117,6$
5b	$808,0 \pm 461,7$
5c	$232,0 \pm 32,7$
5d	$75,5 \pm 39,9$
5e	$78,1 \pm 6,5$
5f	$93,6 \pm 24,4$
6a	$32,2 \pm 2,3$
6b	$6,8 \pm 0,5$
6c	$77,2 \pm 15,5$
6d	$56,4 \pm 13,5$
revp	$0,0132 \pm 0,0027$
neomicina B	$6,4 \pm 0,8$
kanamicina A	$686,0 \pm 121,5$
kanamicina B	$243,3 \pm 20,8$
tobramicina	$283,8 \pm 32,2$

Las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) se midieron a 25 °C empleando IIB_h a 60 nM y frevp a 10 nM. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y las desviaciones estándar corresponden a experimentos independientes, excepto en el caso de **5a**, **5b** y **5d**, en los que se indica el error del ajuste no lineal.

3.5.5.2. Experimentos con bifenilos y terfenilos

Varios de estos compuestos resultaron ser capaces de inhibir la interacción entre el subdominio IIB y Rev₃₄₋₅₀. De manera análoga a lo observado por SPR y RMN para la interacción IIB_h-ligando, la composición de los sustituyentes

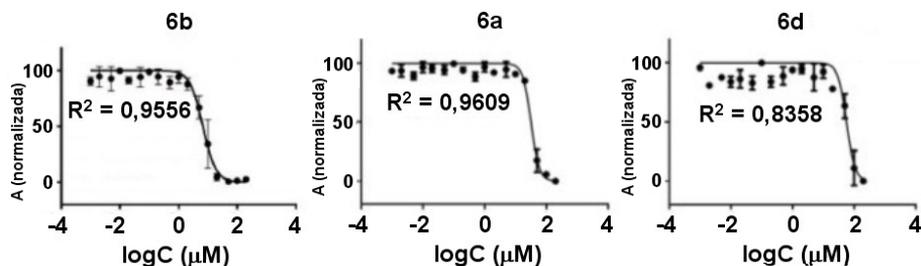


Figura 3.14: Curvas de inhibición de IIB_h – Rev_{34–50} con los terfenilos **6b**, **6a** y **6d**, obtenidas mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia a 25 °C. Se representa la anisotropía normalizada en función del logaritmo de la concentración.

unidos al anillo central tuvo un gran impacto en la actividad inhibitoria de los compuestos terfenílicos. Los mejores resultados se obtuvieron nuevamente con los compuestos provistos de grupos hidrofóbicos en el anillo central. **6b**, con dos grupos metilo unidos a los carbonos 2' y 6' de este anillo, fue el terfenilo que inhibió de manera más efectiva la interacción, con un valor de IC_{50} de 6,8 μM . **4b**, **6a**, **6d** y otros terfenilos etil-sustituídos resultaron ser también activos, con valores de IC_{50} entre 23 y 94 μM (Tabla 3.4 y Figura 3.14). El conjunto de terfenilos 2'-metoxi, más polar, mostró valores más altos de IC_{50} , en concordancia con la menor afinidad por IIB_h detectada por RMN. El bifenilo **2**, con una IC_{50} de 7,7 μM , resultó ser sorprendentemente eficaz en este ensayo. Sin embargo, los datos de RMN de este compuesto indicaron un modo de unión a IIB_h diferente, sin especificidad por el bucle de unión de Rev, por lo que probablemente **2** inhibe la interacción IIB_h-frevp a través de un mecanismo diferente.

3.5.6. Ensayos celulares

3.5.6.1. Determinación de actividad antiviral y toxicidad

Con el fin de determinar el nivel de actividad antiviral de los bifenilos y terfenilos, Luis Miguel Bedoya, Manuela Beltrán y José Alcamí (ISCIII Madrid) realizaron ensayos de infección y transfección en cultivos celulares[213]. Todos los terfenilos conteniendo grupos hidrofóbicos (etilo o metilo) en el anillo central resultaron ser activos. El compuesto más potente fue nuevamente el terfenilo **6b**, con un valor EC_{50} de 3,4 μM . Los terfenilos **4b** y 2'-metoxi (**5a-d**), los bifenilos **1**, **2** y **3**, y el antibiótico control neomicina B fueron significativamente menos

activos o bien inactivos (Tabla 3.5). Por otro lado, todos los bifenílos y terfenilos carecieron de toxicidad a las concentraciones estudiadas, hasta un máximo de 100 μM (Figura 3.15 A y Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Experimentos de infección, transfección y toxicidad celular.

compuesto	EC_{50in} ($M \times 10^6$)	EC_{50tr} ($M \times 10^6$)	CC_{50} ($M \times 10^6$)
6a	24,8 (18,7-32,8)	21,4 (15,3-29,9)	>100
6b	3,4 (1,7-6,9)	5,0 (0,7-34,0)	>100
6c	42,6 (32,3-56,1)	>100	>100
6d	64,1 (49,2-83,5)	-	>100
5e	32,3 (20,6-50,5)	17,0 (3,6-80,7)	>100
5f	46,3 (35,0-61,2)	-	>100
2	>50<100	>100	>100
3	>50<100	-	>100
1,4,5a,5b,5c,5d	>100	-	>100
neomicina B	>100	-	>100

Medidas de actividad anti-VIH en experimentos de infección (EC_{50in}) y transfección (EC_{50tr}), y toxicidad celular (CC_{50}) de bifenílos, terfenilos y neomicina B (José Alcamí et al., ISCH, Madrid). Los intervalos de confianza figuran entre paréntesis.

También se llevaron a cabo ensayos de transfección para evaluar únicamente las etapas transcripcionales y post-transcripcionales del ciclo de vida del virus. Los valores de EC_{50} obtenidos en este ensayo para los terfenilos **6a**, **6b** y **5e** fueron similares a los del experimento de infección (Figura 3.15 A y B, y Tabla 3.5), indicando que la diana de estos compuestos debe encontrarse en etapas posteriores a la integración del virus en el ADN de la célula hospedadora, como es el caso del sistema RRE-Rev.

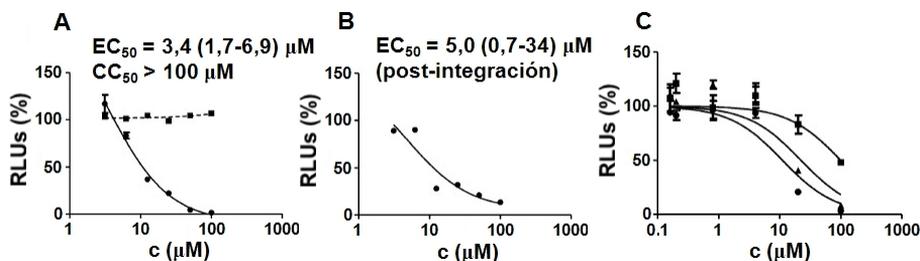


Figura 3.15: Resultados de los ensayos celulares para el terfenilo **6b**, en los que se representa el porcentaje relativo de unidades de luminiscencia en función de la concentración (100 % corresponde al nivel de replicación obtenido con el disolvente utilizado para vehicular los compuestos). A) Actividad antiviral en el ensayo de infección por VIH-1 (EC_{50}) y toxicidad celular (CC_{50}). B) Actividad antiviral en el ensayo de transfección con VIH-1. C) Inhibición del transporte al citoplasma de RRE mediado por Rev, a tres concentraciones diferentes de plásmido codificante de Rev (pCMV-Rev): 500 (cuadrados), 200 (triángulos) y 20 (círculos) ng/pocillo.

3.5.6.2. Inhibición celular de la interacción RRE-Rev

Se realizó también un ensayo de transfección con plásmidos que codifican Rev y un sistema RRE-luciferasa, obteniéndose unos valores IC_{50} para **6b** de ~ 75 , $21,4 \pm 6,3$ y $10,4 \pm 2,4 \mu\text{M}$ para concentraciones de plásmido pCMV-Rev de 500 200 y 20 ng por pocillo, respectivamente. Estos resultados indicaron que el terfenilo más potente (**6b**) inhibe el transporte al citoplasma mediado por Rev de ARN que contiene RRE; es decir, bloquea el sistema RRE-Rev completo a nivel celular[213] (Figura 3.15 C).

3.6. Discusión

Los datos obtenidos[213] indican que se ha logrado diseñar *de novo* un nuevo esqueleto químico *p*-terfenílico bilateralmente sustituido que mimetiza la α -hélice de unión a ARN de la proteína Rev del VIH-1, y es capaz de inhibir la función de la ribonucleoproteína RRE-Rev y la replicación del VIH-1. Estos resultados son importantes, ya que casi todas las moléculas de bajo peso molecular conocidas que se unen al ARN son péptidos o antibióticos, o se descubrieron mediante el cribado de quimiotecas[131; 132; 133].

El diseño de estos compuestos se basó en la estructura del complejo IIB-Rev_{34–50}. Si los sustituyentes de un terfenilo hexaquis-sustituido se sitúan en las posiciones bilaterales 3,5,2',6',2'' y 6'', fuerzan al mismo a adoptar una conformación escalonada, y se proyectan en un amplio ángulo espacial, mimetizando la posición de las cadenas laterales i , $i+1$, $i+4$, $i+5$, $i+7$ e $i+8$ de una α -hélice, como se puede apreciar en la Figura 3.11 B. Esta condición es necesaria para mimetizar la interacción entre el bucle IIB y Rev, porque en este complejo dos tercios de la α -hélice Rev_{34–50} están rodeados de ARN (Figura 3.11 A).

Sobre la base de estos cálculos, se sintetizó un conjunto de moléculas bifenílicas y terfenílicas, todas con dos parejas de grupos 2-aminoetilo a ambos lados de los anillos (Figura 3.10). Los experimentos de RMN y SPR demostraron que la afinidad y la especificidad por el bucle IIB se maximizaron en los terfenilos provistos de uno o dos sustituyentes en el anillo central, en relación a los bifenilos **1**, **2** y **3** y al terfenilo **4b** que carece de sustituyentes en dicho anillo (Figura 3.12). Estos resultados indicaron que para optimizar la interacción con el bucle IIB se requiere una conformación escalonada y un espaciado adecuado de los dos pares de cadenas 2-aminoetílicas.

Los terfenilos con mayor afinidad por IIB_h fueron **6b** y **6d**, provistos de dos grupos metilo y etilo, respectivamente, en las posiciones 2' y 6' del benceno central, y un grupo 4-OH en el benceno I. El subconjunto de terfenilos con un único grupo 2'-metoxi en el anillo central evidenció menor afinidad por IIB_h. Además, la sustitución del 4-OH del primer anillo bencénico por grupos más voluminosos generalmente redujo las afinidades de unión a IIB_h[213]. Las valoraciones monitorizadas mediante experimentos TOCSY demostraron claramente el reconocimiento específico del bucle IIB por parte de todas las moléculas terfenílicas (Figura 3.12). Esta especificidad fue evaluada con más detalle por SPR y RMN utilizando las horquillas GG_h y TAR_h como controles, en las que el bucle IIB fue reemplazado por un apareamiento G:G y la protuberancia UCU de la estructura TAR[207], respectivamente (Figura 3.9). Las especificidades de los terfenilos por

el sitio de unión de Rev se cuantificaron mediante los ratios $K_d(\text{GG}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ y $K_d(\text{TAR}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$, obteniéndose valores entre 1,3 y 10,3 para los terfenilos sustituidos con un grupo 2'-metoxi. La especificidad del terfenilo **5c** (conteniendo grupos 2'-metoxi y 4-trifluorometilbencilo), con ratios $K_d(\text{GG}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ y $K_d(\text{TAR}_h)/K_d(\text{IIB}_h)$ de 10,3 y 9,6, respectivamente, resultó ser particularmente destacable, ya que igualó o incluso mejoró los ratios obtenidos para Rev_{34–50} con la misma metodología (Tabla 3.3 y Figura 3.13). Este resultado indica que la especificidad de estos ligandos se puede modular variando la composición del grupo unido al carbono 4 de uno de los anillos terminales del esqueleto *p*-terfenílico.

Los datos de RMN y SPR indicaron que la interacción entre la horquilla IIB_h y los compuestos terfenílicos implica una asociación con alta afinidad de dos moléculas de ligando al bucle interno IIB, seguida de una unión con menor afinidad de más moléculas a la horquilla, probablemente mediada por interacciones electrostáticas inespecíficas: los análisis de ancho de líneas de RMN concordaron con la unión de dos moléculas de terfenilo al bucle IIB, con K_d microscópicas de 11 y 25 μM para **6b**. Asimismo, los mejores ajustes de los datos de SPR se obtuvieron con un modelo de dos sitios, que comprende un paso de unión de alta afinidad de una o dos moléculas de terfenilo (con K_d en el rango de μM bajo) seguida de una asociación con menor afinidad de moléculas adicionales (Tabla 3.3 y Figura 3.13).

El estudio detallado de los complejos de IIB_h con los terfenilos **6b** y **6d** por espectroscopía de RMN[213] indicó que los residuos de ARN afectados por la unión de terfenilo abarcaban principalmente el bucle interno IIB. En ambos complejos, G22 adoptó una conformación *anti*, y los NOEs observados apuntaron a una inversión local de este nucleótido. En el bucle IIB aislado[210; 217; 218; 219] G22 es *sin*, y también se invierte y cambia a *anti* tras la unión de Rev_{34–50}, formando una vuelta S con G21, U23 y A24, y un par localmente paralelo con G6 en la hebra opuesta[174; 210; 219]. Este cambio conformacional es importante, ya que ocasiona un ensanchamiento del surco mayor de aproximadamente 5 Å con respecto al bucle aislado[174]. Por otro lado, la unión de **6b** y **6d** también estabilizó la conformación extrahelicoidal del nucleótido A19, tal como se observó en el complejo IIB-Rev_{34–50}[209; 210]. Por lo tanto, la asociación de los terfenilos **6b** y **6d** al bucle IIB induce cambios conformacionales en el ARN muy similares a los producidos por la unión de Rev_{34–50}.

Los NOEs intermoleculares IIB_h-ligando[213] indicaron que una de las dos moléculas de terfenilo que forman el complejo yace diagonalmente a lo largo del surco mayor del bucle, con el primer benceno situado cerca de G6 en la hebra GGCG, y el tercer benceno próximo a A19 en la hebra opuesta del bucle, A19CGGUA24 (Figura 3.16 A). No se detectaron NOEs intermoleculares que

permitiesen definir la posición de la segunda molécula de terfenilo. Los modelos de los complejos de IIB_h con **6b** y **6d** construidos mediante cálculos de *docking* restringido basados en NOEs intermoleculares fueron muy similares[213]. En la Figura 3.16 A se muestra el modelo IIB-**6b**. En él puede apreciarse que la molécula de terfenilo se sitúa en la parte superior del bucle IIB. Los grupos 3,5-aminoetilo del primer anillo de benceno establecen interacciones con los grupos fosfato de G6 en una hebra del bucle, y U17 o G18 en la hebra opuesta, mientras que el tercer benceno se inserta en la cavidad formada por la vuelta S y el nucleótido extrahelicoidal A19.

La posición de los terfenilos coincide con la de la región N-terminal de la α -hélice Rev₃₄₋₅₀ unida a IIB (Figura 3.16 B). De hecho, la doble interacción con hebras opuestas observada para **6b** y **6d** también existe en el caso de Rev: en el complejo IIB-Rev₃₄₋₅₀, G5 y G6 tienen contactos con Thr34 y Gln36; y U17 y G18 con Arg35 y Arg38, respectivamente[174]. La etilación de los fosfatos de U17 y G18 en una hebra, y G4, G5 y G6 en la opuesta, interfiere con la unión de Rev[182] y Thr34, Arg35 y Arg38 son esenciales para el reconocimiento de IIB por parte de Rev[183]. Al superponer los complejos de IIB con Rev₃₄₋₅₀ y **6b** o **6d**, los grupos 3,5-aminoetilo de los terfenilos coinciden con las posiciones de Arg35 y Gln36.

Los 2'',6''-aminoetilo unidos al tercer benceno interactúan con el esqueleto azúcar-fosfato que forma la vuelta S en la hebra A19CGGU23 del bucle. En este sitio se encuentran varios grupos fosfato muy próximos en el espacio debido a la propia vuelta S y a la conformación extrahelicoidal de los nucleótidos A19 y U23, y la presencia de grupos cargados positivamente ayuda a su estabilización. Una de las cadenas 2'',6''-aminoetílicas contacta con O4' y el grupo fosfato de A19, superponiéndose con Arg42 de Rev, mientras que la otra interactúa con el 2'-OH del residuo invertido G22 y con el grupo fosfato de G21, y se superpone con Arg39, otro residuo de Rev esencial para el reconocimiento del subdominio IIB[183]. Casi todos los residuos de proteína y ARN que son esenciales para el reconocimiento del bucle IIB por parte de Rev se encuentran en la región del complejo más próxima a la región N-terminal de la α -hélice[174; 182; 183], donde se unen los terfenilos (Figura 3.16 B).

En el reconocimiento del subdominio IIB por parte de Rev tienen más importancia los contactos con la conformación alterada del esqueleto azúcar-fosfato del bucle que los enlaces de hidrógeno específicos con las bases del ARN[174; 220]. Aunque con menos interacciones, los datos disponibles sugieren que los terfenilos sustituidos bilateralmente reconocen el bucle IIB a través de un mecanismo similar.

En concordancia con la ocupación del sitio de Rev en el bucle IIB, los terfenilos inhibieron la interacción IIB_h-Rev₃₄₋₅₀ *in vitro*. El compuesto más potente resultó ser **6b**, con un valor IC_{50} de 6,8 μ M (Figura 3.14). **4b** y otros terfenilos provistos de uno o dos metilos o etilos unidos al benceno central también resultaron activos en estos experimentos, mientras que el conjunto de moléculas 2'-metoxi mostró valores IC_{50} sustancialmente mayores (Tabla 3.4).

De acuerdo con las diferencias de actividad detectadas *in vitro*, los resultados de los ensayos en cultivos celulares indicaron que los terfenilos con grupos metilo o etilo en el anillo central eran capaces de bloquear la replicación del VIH-1. De nuevo, el compuesto más activo fue el terfenilo **6b** ($EC_{50} = 3,4 \mu$ M). El resto de los compuestos estudiados, incluido el ligando de referencia neomicina B, no fueron activos o exhibieron una actividad mucho menor a las concentraciones de los ensayos (Tabla 3.5). Ninguno de los compuestos estudiados presentó una toxicidad celular significativa a las concentraciones evaluadas ($\geq 100 \mu$ M). Los valores de EC_{50} obtenidos en los ensayos de transfección fueron similares a los determinados en el experimento de infección (Tabla 3.5). En el ensayo de transfección se evitan las etapas iniciales de la infección, y sólo tienen lugar los pasos posteriores al de integración. Por lo tanto, la coincidencia de los EC_{50} revela que los terfenilos actúan en procesos transcripcionales o post-transcripcionales del ciclo de vida de virus, como es el caso de la interacción RRE-Rev.

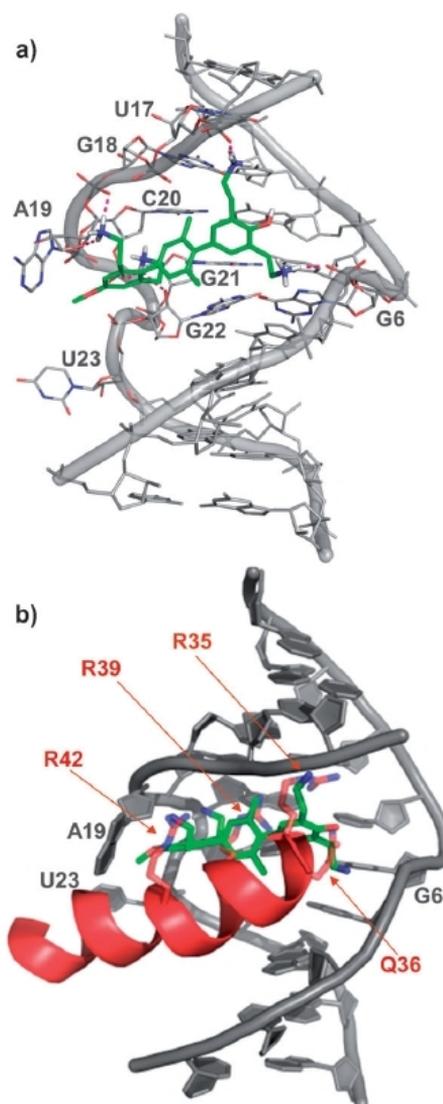


Figura 3.16: A) Modelo del complejo IIB-**6b**, construido a partir de cálculos de *docking* restringidos basados en NOEs intermoleculares[213]. B) Superposición de **6b** con Rev₃₄₋₅₀ en el complejo 1ETG.

Para evaluar si el terfenilo más potente (**6b**) actuaba sobre el sistema RRE-Rev completo en células, se llevó a cabo un ensayo de transfección con plásmidos que codifican Rev y un sistema RRE-luciferasa. Este experimento reveló que **6b** inhibe el transporte de ARN del núcleo al citoplasma mediado por la interacción RRE-Rev. La dependencia de los valores de EC_{50} con la concentración de Rev empleada en el ensayo indicó que existe una inhibición de la función de la ribonucleoproteína RRE-Rev por parte del terfenilo **6b** a nivel celular [213].

En conclusión, el conjunto de datos obtenido demuestra que las moléculas *p*-terfenílicas analizadas son capaces de mimetizar la α -hélice de unión a ARN de Rev, inhibir la función de la ribonucleoproteína RRE-Rev, y bloquear la replicación del VIH-1. La actividad antiviral de estos compuestos probablemente se debe a que la especificidad determinada para el conjunto de terfenilos estudiados está en un rango similar a la medida para la propia α -hélice de Rev. Esta hélice no es particularmente específica, como demuestra el hecho de que varios monómeros de Rev se unen a diferentes sitios en la estructura de 350 nucleótidos que conforma el RRE. Esta multiplicidad de sitios unión en el ARN permite que una proteína formada por sólo 116 aminoácidos pueda formar una ribonucleoproteína compleja que posibilita el transporte del ARN viral al citoplasma de la célula infectada[184]. Al mimetizar la α -hélice de Rev y presentar también unas especificidades moderadas, los terfenilos posiblemente actúan de manera similar a la proteína, uniéndose a varios sitios en el RRE además del bucle IIB[213] e interfiriendo con la formación de la ribonucleoproteína RRE-Rev. Otras posibilidades a tener en cuenta incluyen una alteración de la conformación global de RRE. Asimismo, la actividad antiviral de estas moléculas también está posiblemente condicionada por una actuación simultánea sobre el proceso de transcripción viral, relacionada con su asociación a ADN[213; 221].

Como se detalla en la sección 3.1.3.1, todos los inhibidores de Rev descritos en la bibliografía se han identificado mediante métodos de cribado, o bien son de naturaleza peptídica o antibiótica. En esta tesis se ha utilizado una estrategia diferente, consistente en el diseño *de novo* de un esqueleto orgánico que mimetiza las interacciones establecidas por la α -hélice de Rev. Actualmente no hay ningún inhibidor de Rev en fase de ensayos clínicos, a pesar de su potencial como diana alternativa para el desarrollo de nuevos antirretrovirales. La actividad anti-VIH-1 detectada en esta nueva clase de moléculas abre la posibilidad de que puedan utilizarse como punto de partida para alcanzar estos objetivos[222; 223].

3.7. Conclusiones

Utilizando métodos computacionales basados en estructura, se ha diseñado *de novo* un esqueleto *p*-terfenílico capaz de reconocer el sitio de unión de alta afinidad de la α -hélice de unión a ARN de Rev, formado por el bucle interno IIB del RRE. Los sustituyentes bilaterales de este esqueleto se proyectan en un ángulo espacial de 360° , y mimetizan la estructura, composición e interacciones de Rev en su complejo con el ARN viral.

Los experimentos *in vitro* demuestran que estos ligandos se unen al bucle IIB con afinidades en el rango de micromolar bajo y especificidades moderadas, y son capaces de desplazar la α -hélice Rev_{34–50} del bucle IIB de RRE.

Los experimentos en cultivos celulares demuestran que los terfenilos con mayor afinidad por IIB_h y mayor actividad inhibitoria IIB_h-Rev_{34–50} *in vitro* bloquean la replicación del VIH-1, sin mostrar toxicidad celular apreciable y actuando en pasos transcripcionales o post-transcripcionales del ciclo de vida del virus.

Por primera vez, se han diseñado *de novo* moléculas biológicamente activas que actúan sobre ARN y no están relacionadas con péptidos o antibióticos, ni proceden del cribado masivo de quimiotecas. Estas moléculas podrían servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales.

Bibliografía

- [1] W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, 1984.
- [2] G. R. Wyatt. Occurrence of 5-methyl-cytosine in nucleic acids. *Nature*, 166:237–238, 1950.
- [3] A. Jeltsch. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem*, 3(4):274–293, 2002.
- [4] K. Phelps, A. Morris, and P. A. Beal. Novel modifications in RNA. *ACS Chem. Biol.*, 7(1):100–109, 2012.
- [5] V. R. Cooper, T. Thonhauser, A. Puzder, E. Schröder, B. I. Lundqvist, and D. C. Langreth. Stacking interactions and the twist of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(4):1304–1308, 2008.
- [6] F. Gago. Stacking interactions and intercalative DNA binding. *Methods*, 14(3):277–292, 1998.
- [7] J. Sponer, P. Jurecka, and P. Hobza. Accurate interaction energies of hydrogen bonded nucleic acid base pairs. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(32):10142–10151, 2004.
- [8] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [9] A. Jain, G. Wang, and K. M. Vasquez. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie*, 90(8):1117–1130, 2008.
- [10] S. Zhang, Y. Wu, and W. Zhang. G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands. *ChemMedChem*, 9(5):899–911, 2014.
- [11] H. A. Day, P. Pavlou, and Z. A. Waller. i-motif DNA: structure, stability and targeting with ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, 22(16):4407–4418, 2014.
- [12] U. Nagaswamy, M. Larios-Sanz, J. Hury, S. Collins, Z. Zhang, Q. Zhao, and G. E. Fox. NCIR: a database of non-canonical interactions in known RNA structures. *Nucleic Acids Res.*, 30(1):395–397, 2002.

- [13] M. de la Peña, D. Dufour, and J. Gallego. Three-way RNA junctions with remote tertiary contacts: a recurrent and highly versatile fold. *RNA*, 15(11):1949–1964, 2009.
- [14] S. E. Butcher and A. M. Pyle. The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks. *Acc. Chem. Res.*, 44(12):1302–1311, 2011.
- [15] H. Grosshans and W. Filipowicz. The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451:414–416, 2008.
- [16] A. Serganov and E. Nudler. A decade of riboswitches. *Cell*, 152:17–24, 2013.
- [17] W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, 64(5):2229–2246, 1976.
- [18] K. Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley-Interscience, New York, 1986.
- [19] A. G. Tzakos, C. R. Grace, P. J. Lukavsky, and R. Riek. NMR techniques for very large proteins and RNAs in solution. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35(1):319–342, 2006.
- [20] B. René, G. Masliah, L. Zargarian, O. Mauffret, and S. Fermandjian. General method of preparation of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled DNA fragments for NMR analysis of DNA structures. *J. Biomol. NMR*, 36(3):137–146, 2006.
- [21] K. Lu, Y. Miyazaki, and M. F. Summers. Isotope labeling strategies for NMR studies of RNA. *J. Biomol. NMR*, 46(1):113–125, 2010.
- [22] G. Varani, F. Aboul-ela, and F. H.-T. Allain. NMR investigation of RNA structure. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 29(1-2):51–127, 1996.
- [23] B. Fürtig, C. Richter, J. Wöhnert, and H. Schwalbe. NMR spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*, 4(10):936–962, 2003.
- [24] M. Piotto, V. Saudek, and V. Sklenár. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, 2(6):661–665, 1992.
- [25] P. Plateau and M. Gueron. Exchangeable proton NMR without baseline distortion, using new strong-pulse sequences. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(25):7310–7311, 1982.

-
- [26] L. Braunschweiler and R. R. Ernst. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 53(3):521–528, 1983.
- [27] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 71(11):4546–4553, 1979.
- [28] A. Kumar, R. R. Ernst, and K. Wüthrich. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95(1):1–6, 1980.
- [29] S. Macura and R. R. Ernst. Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR spectroscopy. *Mol. Phys.*, 41:95–117, 1980.
- [30] A. Bax and D. G. Davis. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 63:207–213, 1985.
- [31] B. Nguyen, F. A. Tanius, and W. D. Wilson. Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. *Methods*, 42(2):150–161, 2007.
- [32] D. G. Myszka. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with Biacore. *Methods Enzymol.*, 323:325–340, 2000.
- [33] T. M. Davis and W. D. Wilson. Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal. Biochem.*, 284(2):348–353, 2000.
- [34] T. M. Davis and W. D. Wilson. Surface plasmon resonance biosensor analysis of RNA-small molecule interactions. *Methods Enzymol.*, 340:22–51, 2001.
- [35] H. DeVoe and I. Tinoco. The hypochromism of helical polynucleotides. *J. Mol. Biol.*, 4(6):518–527, 1962.
- [36] L. A. Marky and K. J. Breslauer. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, 26(9):1601–1620, 1987.
- [37] W. D. Wilson, F. A. Tanius, M. Fernández-Saiz, and C. T. Rigl. Evaluation of drug-nucleic acid interactions by thermal melting curves. *Methods Mol. Biol.*, 90:219–240, 1997.

- [38] H. F. Fisher and N. Singh. Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol.*, 259:194–221, 1995.
- [39] L. Indyk and H. F. Fisher. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.*, 295:350–364, 1998.
- [40] A. Velázquez-Campoy, S. A. Leavitt, and E. Freire. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.*, 261:35–54, 2004.
- [41] K. L. Bentley, L. K. Thompson, R. J. Klebe, and P. M. Horowitz. Fluorescence polarization: a general method for measuring ligand binding and membrane microviscosity. *Biotechniques*, 3:356–365, 1985.
- [42] G. E. Tranter. Fluorescence polarization and anisotropy. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pages 625–627. Academic Press, Oxford, 2010.
- [43] D. M. Jameson, J. C. Croney, and P. D. Moens. Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods Enzymol.*, 360:1–43, 2003.
- [44] A. M. Rossi and C. W. Taylor. Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nat. Protoc.*, 6:365–387, 2011.
- [45] K. D. Tew and M. Colvin. *Alkylating agents: in cancer chemotherapy and biotherapy*. Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- [46] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, and C. Dumontet. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 12:447–464, 2013.
- [47] W. D. Wilson. *Nucleic acids in chemistry and biology*. Royal Society of Chemistry, 1990.
- [48] L. S. Lerman. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, 3(1):18–30, 1961.
- [49] G. S. Khan, A. Shah, Z. Rehman, and D. Barker. Chemistry of DNA minor groove binding agents. *J. Photochem. Photobiol. B*, 115:105–118, 2012.
- [50] P. B. Dervan and B. S. Edelson. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13(3):284–299, 2003.

-
- [51] I. Haq, T. C. Jenkins, B. Z. Chowdhry, J. Ren, and J. B. Chaires. Parsing free energies of drug-DNA interactions. *Methods Enzymol.*, 323:373–405, 2000.
- [52] R. A. Friedman and G. S. Manning. Polyelectrolyte effects on site-binding equilibria with application to the intercalation of drugs into DNA. *Biopolymers*, 23(12):2671–2714, 1984.
- [53] M. T. Record, C. F. Anderson, and T. M. Lohman. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.*, 11:103–178, 1978.
- [54] R. Kizek, V. Adam, Hrabeta J., T. Eckschlager, S. Smutny, J. V. Burda, E. Frei, and M. Stiborova. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol. Ther.*, 133(1):26–39, 2012.
- [55] M. Malogolowkin et al. Treatment of Wilms tumor relapsing after initial treatment with vincristine, actinomycin D, and doxorubicin. a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Pediatr. Blood Cancer*, 50(2):236–241, 2008.
- [56] A. K. Larsen, A. E Escargueil, and A. Skladanowski. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.*, 99(2):167–181, 2003.
- [57] O. Bensaude. Inhibiting eukaryotic transcription. *Transcription*, 2(3):103–108, 2011.
- [58] M. A. Horstmann, W. A. Hassenpflug, U. zur Stadt, G. Escherich, G. Janaka, and H. Kabisch. Amsacrine combined with etoposide and high-dose methylprednisolone as salvage therapy in acute lymphoblastic leukemia in children. *Haematologica*, 90(12):1701–1703, 2005.
- [59] A. F. Valdés. Acridine and acridinones: old and new structures with anti-malarial activity. *Open Med. Chem. J.*, 5:11–20, 2011.
- [60] M. J. Waring and L. P. Wakelin. Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic. *Nature*, 252:653–657, 1974.
- [61] A. H. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich. The molecular structure of a DNA-triostin A complex. *Science*, 225(4667):1115–1121, 1984.

- [62] J. B. Le Pecq, M. Le Bret, J. Barbet, and B. Roques. DNA polyintercalating drugs: DNA binding of diacridine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72(8):2915–2919, 1975.
- [63] C. Garbay-Jaureguiberry, Laugâa P., M. Delepierre, S. Laalami, G. Muzard, J. B. Le Pecq, and B. P. Roques. DNA bis-intercalators as new anti-tumour agents: modulation of the anti-tumour activity by the linking chain rigidity in the ditercalinium series. *Anti-cancer Drug Des.*, 1(4):323–335, 1987.
- [64] M. Gniazdowski, W. A. Denny, S. M. Nelson, and M. Czyz. Effects of anticancer drugs on transcription factor-DNA interactions. *Expert Opin. Ther. Targets*, 9:471–489, 2005.
- [65] R. Martínez and L. Chacon-García. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Curr. Med. Chem.*, 12:127–151, 2005.
- [66] M. F. Braña, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa, and A. Ramos. Intercalators as anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.*, 7:1745–1780, 2001.
- [67] L. L. Shen. Quinolone interactions with DNA and DNA gyrase. *Methods Mol. Biol.*, 95:171–184, 2001.
- [68] F. Arjmand, B. Mohani, and S. Ahmad. Synthesis, antibacterial, antifungal activity and interaction of CT-DNA with a new benzimidazole derived Cu(II) complex. *Eur. J. Med. Chem*, 40(11):1103–1110, 2005.
- [69] M. F. Braña, J. M. Castellano, C. M. Roldán, A. Santos, D. Vázquez, and A. Jiménez. Synthesis and mode(s) of action of a new series of imide derivatives of 3-nitro-1,8 naphthalic acid. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 4:61–66, 1980.
- [70] R. S. Witte, P. Hsieh, P. Elson, M. M. Oken, and D. L. Trump. A phase II trial of amonafide, caracemide, and homoharringtonine in the treatment of patients with advanced renal cell cancer. *Invest. New Drugs*, 14(4):409–413, 1996.
- [71] A. Casado, R. Rosell, R. García-Gómez, E. Díaz-Rubio, G. Pérez-Manga, A. Font, A. Benavides, and M. Martín. Phase II study of mitonafide in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Invest. New Drugs*, 14(4):415–417, 1996.
- [72] M. F. Braña, J. M. Castellano, M. Morán, M. J. Pérez de Vega, D. Perron, D. Conlon, P. F. Bousquet, C. A. Romerdahl, and S. P. Robinson.

- Bis-naphthalimides 3: synthesis and antitumor activity of N,N'-bis[2-(1,8-naphthalimido)-ethyl] alkanediamines. *Anti-cancer Drug Des.*, 11:297–309, 1996.
- [73] M. F. Braña, J. M. Castellano, M. Morán, M. J. Pérez de Vega, C. R. Romerdahl, X.-D. Qian, P. Bousquet, F. Emling, E. Schlick, , and Keilhauer. Bis-naphthalimides: a new class of antitumor agents. *Anti-cancer Drug Des.*, 8:257–268, 1993.
- [74] R. J. McRipley, P. E. Burns-Horwitz, P. M. Czerniak, R. J. Diamond, M. A. Diamond, J. L. D. Miller, R. J. Page, D. L. Dexter, S. F. Chen, J. H. Sun, C. H. Behrens, S. P. Seitz, and J. L. Gross. Efficacy of DMP 840: a novel bis-naphthalimide cytotoxic agent with human solid tumor xenograft selectivity. *Cancer Res.*, 54(1):159–164, 1994.
- [75] M. A. Villalona-Calero, J. P. Eder, D. L. Toppmeyer, L. F. Allen, R. Fram, R. Velagapudi, M. Myers, A. Amato, K. Kagen-Hallet, B. Razvillas, D. W. Kufe, D. D. Von Hoff, and E. K. Rowinsky. Phase I and pharmacokinetic study of LU79553, a DNA intercalating bisnaphthalimide, in patients with solid malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 19(3):857–869, 2001.
- [76] P. F. Bousquet, M. F. Braña, D. Conlon, K. M. Fitzgerald, D. Perron, C. Cocchiaro, R. Miller, M. Moran, J. George, X. Qian, G. Keilhauer, and C. A. Romerdahl. Preclinical evaluation of LU 79553: a novel bis-naphthalimide with potent antitumor activity. *Cancer Res.*, 55(5):1176–1180, 1995.
- [77] M. F. Braña, J. M. Castellano, D. Perron, C. Maher, D. Conlon, P. F. Bousquet, J. George, X.-D. Qian, and S. P. Robinson. Chromophore-modified bis-naphthalimides: synthesis and antitumor activity of bis-dibenz[de,h]isoquinoline-1,3-diones. *J. Med. Chem.*, 40(4):449–454, 1997.
- [78] M. F. Braña, M. Cacho, M. A. García, B. de Pascual-Teresa, A. Ramos, N. Acero, F. Llinares, D. Muñoz-Mingarro, C. Abradelo, M. F. Rey-Stolle, and M. Yuste. Synthesis, antitumor activity, molecular modeling, and DNA binding properties of a new series of imidazonaphthalimides. *J. Med. Chem.*, 45(26):5813–5816, 2002.
- [79] C. Carrasco, A. Joubert, C. Tardy, N. Maestre, M. Cacho, M. F. Braña, and C. Bailly. DNA sequence recognition by bispyrazinonaphthalimides antitumor agents. *Biochemistry*, 42(40):11751–11761, 2003.
- [80] C. Bailly, C. Carrasco, A. Joubert, C. Bal, N. Wattez, M. Hildebrand, A. Lansiaux, P. Colson, C. Houssier, M. Cacho, A. Ramos, and M. F.

- Braña. Chromophore-modified bisnaphthalimides: DNA recognition, topoisomerase inhibition, and cytotoxic properties of two mono- and bisfuronaphthalimides. *Biochemistry*, 42(14):4136–4150, 2003.
- [81] M. F. Braña, M. Cacho, M. A. García, B. de Pascual-Teresa, A. Ramos, M. T. Domínguez, J. M. Pozuelo, C. Abradelo, M. F. Rey-Stolle, M. Yuste, M. Báñez-Coronel, and J. C. Lacal. New analogues of amonafide and elinafide, containing aromatic heterocycles: synthesis, antitumor activity, molecular modeling, and DNA binding properties. *J. Med. Chem.*, 47(6):1391–1399, 2004.
- [82] J. Gallego and B. R. Reid. Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor bisnaphthalimide LU-79553: intercalated ring flipping on the millisecond time scale. *Biochemistry*, 38(46):15104–15115, 1999.
- [83] C. Bailly, M. Braña, and M. J. Waring. Sequence-selective intercalation of antitumour bis-naphthalimides into DNA. Evidence for an approach via the major groove. *Eur. J. Biochem.*, 240:195–208, 1996.
- [84] S. Neidle. DNA minor-groove recognition by small molecules. *Nat. Prod. Rep.*, 18:291–309, 2001.
- [85] Q. Gao, L. D. Williams, M. Egli, D. Rabinovich, S. L. Chen, G. J. Quigley, and A. Rich. Drug-induced DNA repair: X-ray structure of a DNA-ditercalinium complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(6):2422–2426, 1991.
- [86] V. Guelev, J. Lee, J. Ward, S. Sorey, D. W. Hoffman, and B. L. Iverson. Peptide bis-intercalator binds DNA via threading mode with sequence specific contacts in the major groove. *Chem. Biol.*, 8(5):415–425, 2001.
- [87] G. B. Koudelka, S. A. Mauro, and M. Ciubotaru. Indirect readout of DNA sequence by proteins: the roles of DNA sequence-dependent intrinsic and extrinsic forces. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 81:143–177, 2006.
- [88] L. Harris, D. Watkins, L. Dean Williams, and G. B. Koudelka. Indirect readout of DNA sequence by P22 repressor: roles of DNA and protein functional groups in modulating DNA conformation. *J. Mol. Biol.*, 425(1):133–143, 2013.
- [89] H. Faiger, M. Ivanchenko, I. Cohen, and T. E. Haran. TBP flanking sequences: asymmetry of binding, long-range effects and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.*, 34:104–119, 2006.

-
- [90] Y. Zhang, Z. Xi, R. S. Hedge, Z. Shakked, and D. M. Crothers. Predicting indirect readout effects in protein-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:8337–8341, 2004.
- [91] M. J. Araúzo-Bravo and A. Sarai. Indirect readout in drug-DNA recognition: role of sequence-dependent DNA conformation. *Nucleic Acids Res.*, 36(2):376–386, 2008.
- [92] K. R. Fox, C. Brassett, and M. J. Waring. Kinetics of dissociation of nogalamycin from DNA: comparison with other anthracycline antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, 840:383–392, 1985.
- [93] X. Qu, J. Ren, P. V. Riccelli, A. S. Benight, and J. B. Chaires. Enthalpy/entropy compensation: influence of DNA flanking sequence on the binding of 7-amino actinomycin D to its primary binding site in short DNA duplexes. *Biochemistry*, 42(41):11960–11967, 2003.
- [94] A. Pérez, F. J. Luque, and M. Orozco. Dynamics of B-DNA on the microsecond time scale. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(47):14739–14745, 2007.
- [95] N. Foloppe, M. Guérout, and B. Hartmann. Simulating DNA by Molecular Dynamics: aims, methods, and validation. *Methods Mol. Biol.*, 924:445–468, 2013.
- [96] T. D. Goddard and D. G. Kneller. *Sparky 3*. University of California, San Francisco, CA.
- [97] A. D. Bain and G. J. Duns. A new approach to the calculation of NMR lineshapes of exchanging systems. *J. Magn. Reson.*, 112:258–260, 1995.
- [98] J. Gallego. Sequence-dependent nucleotide dynamics revealed by intercalated ring rotation in DNA-bisnaphthalimide complexes. *Nucleic Acids Res.*, 32(12):3607–3614, 2004.
- [99] S. Forsén and R. A. Hoffman. Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance. *J. Chem. Phys.*, 39:2892–2901, 1963.
- [100] C. L. Perrin and T. J. Dwyer. Application of two-dimensional NMR to kinetics of chemical exchange. *Chem. Rev.*, 90(6):935–967, 1990.
- [101] M. Guéron and J.-L. Leroy. Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Methods Enzymol.*, 261:383–413, 1995.
- [102] D. G. Myszka. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recogn.*, 12(5):279–284, 1999.

- [103] D. M. Crothers. Statistical thermodynamics of nucleic acid melting transitions with coupled binding equilibria. *Biopolymers*, 10(11):2147–2160, 1971.
- [104] J. D. McGhee. Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large, cooperatively binding ligands. *Biopolymers*, 15(7):1345–1375, 1976.
- [105] N. R. Markham and M. Zuker. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33(suppl 2):W577–W581, 2005.
- [106] H. C. Nelson, J. T. Finch, B. F. Luisi, and A. Klug. The structure of an oligo(dA)oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature*, 330:221–226, 1987.
- [107] A. Barbic, D. P. Zimmer, and D. M. Crothers. Structural origins of adenine-tract bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(5):2369–2373, 2003.
- [108] R. Steff, H. Wu, S. Ravindranathan, V. Sklenár, and J. Feigon. DNA A-tract bending in three dimensions: solving the dA4T4 vs. dT4A4 co-nundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(5):1177–1182, 2004.
- [109] L. González-Bulnes and J. Gallego. Indirect effects modulating the interaction between DNA and a cytotoxic bisnaphthalimide reveal a two-step binding process. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(22):7781–7791, 2009.
- [110] M. Kochoyan, G. Lancelot, and J. L. Leroy. Study of structure, base-pair opening kinetics and proton exchange mechanism of the d-(AATTGCAATT) self-complementary oligodeoxynucleotide in solution. *Nucleic Acids Res.*, 16(15):7685–7702, 1988.
- [111] J. L. Leroy, X. Gao, V. Misra, M. Guéron, and D. J. Patel. Proton exchange in DNA-luzopeptin and DNA-echinomycin bisintercalation complexes: rates and processes of base-pair opening. *Biochemistry*, 31(5):1407–1415, 1992.
- [112] K. Snoussi and J. L. Leroy. Alteration of A:T base-pair opening kinetics by the ammonium cation in DNA A-tracts. *Biochemistry*, 41(41):12467–12474, 2002.
- [113] J. B. Chaires. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Arch. Biochem. Biophys.*, 453(1):26–31, 2006.

-
- [114] Douglas MacDonald, Kristina Herbert, Xiaolin Zhang, Thomas Polgruto, and Ponzy Lu. Solution structure of an A-tract DNA bend. *J. Mol. Biol.*, 306(5):1081–1098, 2001.
- [115] Kristen Kruger Woods, Tatsuya Maehigashi, Shelley B. Howerton, Chad C. Sines, Sarah Tannenbaum, and Loren Dean Williams. High-resolution structure of an extended A-Tract: [d(CGCAAATTTGCG)]₂. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(47):15330–15331, 2004.
- [116] L. González-Bulnes and J. Gallego. Analysis of mixed DNA-bisnaphthalimide interactions involving groove association and intercalation with surface-based and solution methodologies. *Biopolymers*, 97(12):974–987, 2012.
- [117] D. L. Boger and K. W. Saionz. DNA binding properties of key sandramycin analogues: systematic examination of the intercalation chromophore. *Bioorg. Med. Chem.*, 7:315–321, 1999.
- [118] F. Leng, W. Priebe, and J. B. Chaires. Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Biochemistry*, 37(7):1743–1753, 1998.
- [119] J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers. Kinetics of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry*, 24(2):260–267, 1985.
- [120] V. Rizzo, N. Sacchi, and M. Menozzi. Kinetic studies of anthracycline-DNA interaction by fluorescence stopped flow confirm a complex association mechanism. *Biochemistry*, 28(1):274–282, 1989.
- [121] A. Mukherjee, R. Lavery, B. Bagchi, and J. T. Hynes. On the molecular mechanism of drug intercalation into DNA: a simulation study of the intercalation pathway, free energy, and DNA structural changes. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(30):9747–9755, 2008.
- [122] M. Wilhelm, A. Mukherjee, B. Bouvier, K. Zakrzewska, J. T. Hynes, and R. Lavery. Multistep drug intercalation: molecular dynamics and free energy studies of the binding of daunomycin to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(20):8588–8596, 2012.
- [123] S. R. Kirk, N. W. Luedtke, and Y. Tor. Neomycin-acridine conjugate: a potent inhibitor of Rev-RRE binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(5):980–981, 2000.
- [124] F. Hamy, V. Brondani, A. Flörsheimer, W. Stark, M. J. Blommers, and T. Klimkait. A new class of HIV-1 Tat antagonist acting through Tat-TAR inhibition. *Biochemistry*, 37(15):5086–5095, 1998.

- [125] D. J. Ecker and R. H. Griffey. RNA as a small-molecule drug target: doubling the value of genomics. *Drug Discov. Today*, 4(9):420–429, 1999.
- [126] P. A. Sharp. The centrality of RNA. *Cell*, 136(4):577–580, 2009.
- [127] F. F. Costa. Non-coding RNAs: meet thy masters. *Bioessays*, 32(7):599–608, 2010.
- [128] A. Serganov and D. J. Patel. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat. Rev. Genet.*, 8(10):776–790, 2007.
- [129] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481):905–920, 2000.
- [130] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802):327–339, 2000.
- [131] J. Gallego and G. Varani. Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic promise and chemical challenges. *Acc. Chem. Res.*, 34(10):836–843, 2001.
- [132] L. Guan and M. D. Disney. Recent advances in developing small molecules targeting RNA. *ACS Chem. Biol.*, 7(1):73–86, 2012.
- [133] J. R. Thomas and P. J. Hergenrother. Targeting RNA with small molecules. *Chem. Rev.*, 108(4):1171–1224, 2008.
- [134] J. Kurreck. Antisense technologies. *Eur. J. Biochem.*, 270(8):1628–1644, 2003.
- [135] P. C. Zamecnik and M. L. Stephenson. Inhibition of Rous Sarcoma Virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75(1):280–284, 1978.
- [136] S. T. Crooke. Vitravene-another piece in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 8(4):7–8, 1998.
- [137] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [138] M. Sioud. RNA interference: mechanisms, technical challenges, and therapeutic opportunities. *Methods Mol. Biol.*, 1218:1–15, 2015.

-
- [139] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, and D. W. Sah. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.*, 2(12):711–719, 2006.
- [140] A. de Fougerolles, H. P. Vornlocher, J. Maraganore, and J. Lieberman. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6(6):443–453, 2007.
- [141] E. R. Rayburn and R. Zhang. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov. Today*, 13(11-12):513–521, 2008.
- [142] D. E. Draper, D. Grilley, and A. M. Soto. Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34(1):221–243, 2005.
- [143] K. Bodoor, V. Boyapati, V. Gopu, M. Boisdore, K. Allam, J. Miller, W. D. Treleaven, T. Weldeghiorghis, and F. Aboul-ela. Design and implementation of a ribonucleic acid (RNA) directed fragment library. *J. Med. Chem.*, 52(12):3753–3761, 2009.
- [144] T. Hermann. Drugs targeting the ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15(3):355–366, 2005.
- [145] R. P. Lange, H. H. Locher, P. C. Wyss, and R. L. Then. The targets of currently used antibacterial agents: lessons for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.*, 13(30):3140–3154, 2007.
- [146] F. Franceschi and E. M. Duffy. Structure-based drug design meets the ribosome. *Biochem. Pharmacol.*, 71(7):1016–1025, 2006.
- [147] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802):340–348, 2000.
- [148] D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103(7):1143–1154, 2000.
- [149] K. J. Shaw and M. R. Barbachyn. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1241:48–70, 2011.
- [150] K. F. Blount and R. R. Breaker. Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.*, 24(12):1558–1564, 2006.

- [151] E. R. Lee, K. F. Blount, and R. R. Breaker. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biol.*, 6(2):187–194, 2009.
- [152] N. Sudarsan, S. Cohen-Chalamish, S. Nakamura, G. Mitchell Emilsson, and R. R. Breaker. Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine. *Chem. Biol.*, 12(12):1325–1335, 2005.
- [153] J. W. Shay and W. E. Wright. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 5(7):577–584, 2006.
- [154] J. Tazi, N. Bakkour, and S. Stamm. Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1792(1):14–26, 2009.
- [155] M. J. Gait and J. Karn. RNA recognition by the Human Immunodeficiency Virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 18(7):255–259, 1993.
- [156] M. J. Gait and J. Karn. Progress in anti-HIV structure-based drug design. *Trends Biotechnol.*, 13(10):430–438, 1995.
- [157] J. Gallego. Internal initiation of translation by viral and cellular IRESs—a new avenue for specific inhibition of protein synthesis? *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 5(5):777–784, 2002.
- [158] A. C. Stelzer, A. T. Frank, J. D. Kratz, M. D. Swanson, M. J. González-Hernández, J. Lee, I. Andricioaei, D. M. Markovitz, and H. M. Al-Hashimi. Discovery of selective bioactive small molecules by targeting an RNA dynamic ensemble. *Nat. Chem. Biol.*, 7(8):553–559, 2011.
- [159] A. I. Murchie, B. Davis, C. Isel, M. Afshar, M. J. Drysdale, J. Bower, A. J. Potter, I. D. Starkey, T. M. Swarbrick, S. Mirza, C. D. Prescott, P. Vaglio, F. Aboul-ela, and J. Karn. Structure-based drug design targeting an inactive RNA conformation: exploiting the flexibility of HIV-1 TAR RNA. *J. Mol. Biol.*, 336(3):625–638, 2004.
- [160] J. Zhou, G. Wang, L. Zhang, and X. Ye. Modifications of aminoglycoside antibiotics targeting RNA. *Med. Res. Rev.*, 27(3):279–316, 2007.
- [161] C. Wong, M. Hendrix, D. D. Manning, C. Rosenbohm, and W. A. Greenberg. A library approach to the discovery of small molecules that recognize RNA: use of a 1,3-hydroxyamine motif as core. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(33):8319–8327, 1998.

-
- [162] J. B. Tok and R. R. Rando. Simple aminols as aminoglycoside surrogates. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(32):8279–8280, 1998.
- [163] S. G. Srivatsan and M. Famulok. Functional nucleic acids in high throughput screening and drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 10(8):698–705, 2007.
- [164] R. H. Griffey, S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, D. J. Ecker, and S. T. Crooke. Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(18):10129–10133, 1999.
- [165] J. Sztuba-Solinska, S. R. Shenoy, P. Gareiss, L. R. Krumpke, S. F. Le Grice, B. R. O’Keefe, and J. S. Schneekloth. Identification of biologically active, HIV TAR RNA-binding small molecules using small molecule microarrays. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(23):8402–8410, 2014.
- [166] P. J. Gane and P. M. Dean. Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10(4):401–404, 2000.
- [167] K. E. Lind, Z. Du, K. Fujinaga, B. M. Peterlin, and T. L. James. Structure-based computational database screening, in vitro assay, and NMR assessment of compounds that target TAR RNA. *Chem. Biol.*, 9(2):185–193, 2002.
- [168] N. Foloppe, I-J. Chen, B. Davis, A. Hold, D. Morley, and R. Howes. A structure-based strategy to identify new molecular scaffolds targeting the bacterial ribosomal A-site. *Bioorg. Med. Chem.*, 12(5):935–947, 2004.
- [169] S. D. Morley and M. Afshar. Validation of an empirical RNA-ligand scoring function for fast flexible docking using RiboDock. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 18(3):189–208, 2004.
- [170] P. T. Lang, S. R. Brozell, S. Mukherjee, E. F. Pettersen, E. C. Meng, V. Thomas, R. C. Rizzo, D. A. Case, T. L. James, and I. D. Kuntz. DOCK 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes. *RNA*, 15(6):1219–1230, 2009.
- [171] C. Guilbert and T. L. James. Docking to RNA via root-mean-square-deviation-driven energy minimization with flexible ligands and flexible targets. *J. Chem. Inf. Model.*, 48(6):1257–1268, 2008.
- [172] A. Philips, K. Milanowska, G. Lach, and J. M. Bujnicki. LigandRNA: computational predictor of RNA-ligand interactions. *RNA*, 19(12):1605–1616, 2013.

- [173] J. A. Moss. HIV/AIDS review. *Radiol. Technol.*, 84(3):247–267, 2013.
- [174] J. L. Battiste, H. Mao, N. S. Rao, R. Tan, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A. D. Frankel, and J. R. Williamson. Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 Rev peptide-RRE RNA complex. *Science*, 273(5281):1547–1551, 1996.
- [175] M. A. DiMattia, N. R. Watts, S. J. Stahl, C. Rader, P. T. Wingfield, D. I. Stuart, A. C. Steven, and J. M. Grimes. Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev Response Element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(13):5810–5814, 2010.
- [176] M. D. Daugherty, B. Liu, and A. D. Frankel. Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(11):1337–1342, 2010.
- [177] V. W. Pollard and M. H. Malim. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52(1):491–532, 1998.
- [178] C. O. Pabo and R. T. Sauer. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, 61(1):1053–1095, 1992.
- [179] K. M. Weeks and D. M. Crothers. Major groove accessibility of RNA. *Science*, 261(5128):1574–1577, 1993.
- [180] A. J. Collier, J. Gallego, R. Klinck, P. T. Cole, S. J. Harris, G. P. Harrison, F. Aboul-ela, G. Varani, and S. Walker. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat. Struct. Biol.*, 9:375–380, 2002.
- [181] M. G. Oakley and P. B. Dervan. Structural motif of the GCN4 DNA binding domain characterized by affinity cleaving. *Science*, 248(4957):847–850, 1990.
- [182] J. Kjems, B. J. Calnan, A. D. Frankel, and P. A. Sharp. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J.*, 11(3):1119–1129, 1992.
- [183] R. Tan, L. Chen, J. A. Buettner, D. Hudson, and A. D. Frankel. RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell*, 73(5):1031–1040, 1993.
- [184] M. D. Daugherty, I. D’Orso, and A. D. Frankel. A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol. Cell*, 31(6):824–834, 2008.

-
- [185] S. J. Pond, W. K. Ridgeway, R. Robertson, J. Wang, and D. P. Millar. HIV-1 Rev protein assembles on viral RNA one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(5):1404–1408, 2009.
- [186] X. Fang, J. Wang, I. P. O’Carroll, M. Mitchell, X. Zuo, Y. Wang, P. Yu, Y. Liu, J. W. Rausch, M. A. Dyba, J. Kjems, C. D. Schwieters, S. Seifert, R. E. Winans, N. R. Watts, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, R. A. Byrd, S. F. Le Grice, A. Rein, and Y. X. Wang. An unusual topological structure of the HIV-1 Rev Response Element. *Cell*, 155(3):594–605, 2013.
- [187] H. C. Groom, E. C. Anderson, and A. M. Lever. Rev: beyond nuclear export. *J. Gen. Virol.*, 90(6):1303–1318, 2009.
- [188] M. Blissenbach, B. Grewe, B. Hoffmann, S. Brandt, and K. Überla. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. *J. Virol.*, 84(13):6598–6604, 2010.
- [189] A. Levin, Z. Hayouka, A. Friedler, and A. Loyter. Nucleocytoplasmic shuttling of HIV-1 integrase is controlled by the viral Rev protein. *Nucleus*, 1(2):190–201, 2010.
- [190] M. L. Zapp, S. Stern, and M. R. Green. Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell*, 74(6):969–978, 1993.
- [191] G. Xiao, A. Kumar, K. Li, C.T. Rigl, M. Bajic, T. M. Davis, D. W. Boykin, and W. D. Wilson. Inhibition of the HIV-1 Rev-RRE complex formation by unfused aromatic cations. *Bioorg. Med. Chem.*, 9(5):1097–1113, 2001.
- [192] R. L. Chapman, T. B. Stanley, R. Hazen, and E. P. Garvey. Small molecule modulators of HIV Rev/Rev Response Element interaction identified by random screening. *Antivir. Res.*, 54(3):149–162, 2002.
- [193] E. S. DeJong, C. Chang, M. K. Gilson, and J. P. Marino. Proflavine acts as a Rev inhibitor by targeting the high-affinity Rev binding site of the Rev Responsive Element of HIV-1. *Biochemistry*, 42(26):8035–8046, 2003.
- [194] D. Shuck-Lee, F. F. Chen, R. Willard, S. Raman, R. Ptak, M. L. Hammar-skjold, and D. Rekosh. Heterocyclic compounds that inhibit Rev-RRE function and Human Immunodeficiency Virus type 1 replication. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(9):3169–3179, 2008.
- [195] N. L. Mills, M. D. Daugherty, A. D. Frankel, and R. K. Guy. An alpha-helical peptidomimetic inhibitor of the HIV-1 Rev-RRE interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(11):3496–3497, 2006.

- [196] K. Moehle, Z. Athanassiou, K. Patora, A. Davidson, G. Varani, and J. A. Robinson. Design of beta-hairpin peptidomimetics that inhibit binding of alpha-helical HIV-1 Rev protein to the Rev Response Element RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46(47):9101–9104, 2007.
- [197] C. E. Prater, A. D. Saleh, M. P. Wear, and P. S. Miller. Allosteric inhibition of the HIV-1 Rev/RRE interaction by a 3'-methylphosphonate modified antisense oligo-2'-O-methylribonucleotide. *Oligonucleotides*, 17(3):275–290, 2007.
- [198] D. Daelemans, E. Afonina, J. Nilsson, G. Werner, J. Kjems, E. De Clercq, G. N. Pavlakis, and A.-M. Vandamme. A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(22):14440–14445, 2002.
- [199] R. W. Wong, A. Balachandran, M. Haaland, P. Stoilov, and A. Cochrane. Characterization of novel inhibitors of HIV-1 replication that function via alteration of viral RNA processing and Rev function. *Nucleic Acids Res.*, 41(20):9471–9483, 2013.
- [200] J. Gasteiger and M. Marsili. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22):3219–3228, 1980.
- [201] T. A. Halgren. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.*, 17(5-6):490–519, 1996.
- [202] C. Detering and G. Varani. Validation of automated docking programs for docking and database screening against RNA drug targets. *J. Med. Chem.*, 47(17):4188–4201, 2004.
- [203] R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, and R. C. Walker. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 3(2):198–210, 2013.
- [204] D. T. Moustakas, P. T. Lang, S. Pegg, E. Pettersen, I. D. Kuntz, N. Brooijmans, and R. C. Rizzo. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 20(10-11):601–619, 2006.
- [205] R. L. DesJarlais, R. P. Sheridan, J. S. Dixon, I. D. Kuntz, and R. Venkataraghavan. Docking flexible ligands to macromolecular receptors by molecular shape. *J. Med. Chem.*, 29(11):2149–2153, 1986.

-
- [206] E. C. Meng, B. K. Shoichet, and I. D. Kuntz. Automated docking with grid-based energy evaluation. *J. Comput. Chem.*, 13(4):505–524, 1992.
- [207] C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, and M. A. Skinner. HIV-1 Tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J.*, 9(12):4145–4153, 1990.
- [208] E. L. Kovrigin. NMR line shapes and multi-state binding equilibria. *J. Biomol. NMR*, 53(3):257–270, 2012.
- [209] R. D. Peterson, D. P. Bartel, J. W. Szostak, S. J. Horvath, and J. Feigon. 1H NMR studies of the high-affinity Rev binding site of the Rev Responsive Element of HIV-1 mRNA: base pairing in the core binding element. *Biochemistry*, 33(18):5357–5366, 1994.
- [210] J. L. Battiste, R. Tan, A. D. Frankel, and J. R. Williamson. Binding of an HIV Rev peptide to Rev Responsive Element RNA induces formation of purine-purine base pairs. *Biochemistry*, 33(10):2741–2747, 1994.
- [211] N. W. Luedtke and Y. Tor. Fluorescence-based methods for evaluating the RNA affinity and specificity of HIV-1 Rev-RRE inhibitors. *Biopolymers*, 70(1):103–119, 2003.
- [212] H. Yin, G. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodríguez, S. M. Sebtí, and A. D. Hamilton. Terphenyl-based helical mimetics that disrupt the p53/HDM2 interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44(18):2704–2707, 2005.
- [213] L. González-Bulnes, I. Ibáñez, L. M. Bedoya, M. Beltrán, S. Catalán, J. Alcamí, S. Fustero, and J. Gallego. Structure-based design of an RNA-binding p-terphenylene scaffold that inhibits HIV-1 Rev protein function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52(50):13405–13409, 2013.
- [214] A. Suzuki. Carbon-carbon bonding made easy. *Chem. Commun.*, 2005(38):4759–4763, 2005.
- [215] M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, and C. Wong. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(16):3641–3648, 1997.
- [216] K. A. Lacourciere, J. T. Stivers, and J. P. Marino. Mechanism of neomycin and Rev peptide binding to the Rev Responsive Element of HIV-1 as determined by fluorescence and NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 39(19):5630–5641, 2000.

- [217] J. A. Ippolito and T. A. Steitz. The structure of the HIV-1 RRE high affinity Rev binding site at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 295(4):711–717, 2000.
- [218] L. Hung, E. L. Holbrook, and S. R. Holbrook. The crystal structure of the Rev binding element of HIV-1 reveals novel base pairing and conformational variability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(10):5107–5112, 2000.
- [219] R. D. Peterson and J. Feigon. Structural change in Rev Responsive Element RNA of HIV-1 on binding Rev peptide. *J. Mol. Biol.*, 264(5):863–877, 1996.
- [220] L. A. Michael, J. A. Chenault, B. R. Miller, A. M. Knolhoff, and M. C. Nagan. Water, shape recognition, salt bridges, and cation- π interactions differentiate peptide recognition of the HIV Rev Responsive Element. *J. Mol. Biol.*, 392(3):774–786, 2009.
- [221] A. Cantero-Camacho, L. M. Bedoya, M. Beltrán, P. Barrio, S. Fustero, J. Alcamí, and J. Gallego. Inhibition of HIV-1 LTR-dependent transcription by a p-terphenylene agent. *Manuscrito en preparación*.
- [222] J. Gallego, S. Fustero, J. Alcamí, L. González-Bulnes, I. Ibáñez, S. Catalán, S. Prado, A. Cantero, and P. Barrios. New bilaterally-substituted tricyclic compounds for the treatment of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection and other diseases. Patent Application PCT/EP2014/053294, 2014.
- [223] J. Gallego, S. Fustero, J. Alcamí, L. González-Bulnes, I. Ibáñez, S. Catalán, S. Prado, A. Cantero, and P. Barrios. Nuevos p-terfenilos hexakis-sustituidos con grupos bilaterales para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y otras enfermedades. Solicitud de patente P20130030235, 2013.

Anexo: artículos publicados

L. González-Bulnes and J. Gallego. Indirect effects modulating the interaction between DNA and a cytotoxic bisnaphthalimide reveal a two-step binding process. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(22):77817791, 2009.

Material suplementario:

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/ja901505p>

L. González-Bulnes and J. Gallego. Analysis of mixed DNAbisnaphthalimide interactions involving groove association and intercalation with surface-based and solution methodologies. *Biopolymers*, 97(12):974987, 2012.

Material suplementario:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bip.22114/supinfo>

L. González-Bulnes, I. Ibáñez, L. M. Bedoya, M. Beltrán, S. Catalán, J. Alcamí, S. Fustero, and J. Gallego. Structure-based design of an RNA-binding p-terphenylene scaffold that inhibits HIV-1 Rev protein function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52(50):1340513409, 2013.

Material suplementario:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201306665/supinfo>

Indirect Effects Modulating the Interaction between DNA and a Cytotoxic Bisnaphthalimide Reveal a Two-Step Binding Process

Luis González-Bulnes and José Gallego*

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Avda. Autopista del Saler 16, 46012 Valencia, Spain

Received February 26, 2009; E-mail: jgallego@cipf.es

Abstract: The sequence-specific structural and dynamic properties of double-helical DNA play important roles in many biological processes involving DNA recognition. Using a combination of NMR spectroscopy, surface plasmon resonance, and UV thermal denaturation experiments, we have investigated how sequences not making direct contact with the drug modulate the interaction between the cytotoxic agent elinafide and its preferred bisintercalation sites on double-helical DNA. Our combined data are consistent with two superposed interactions, one process involving ligand binding to the DNA duplex with nanomolar dissociation constants and another process of ring intercalation characterized by faster dissociation rates and substantially higher dissociation constants in some cases. The sequence of the base pairs flanking the bisnaphthalimide binding tetranucleotides influence both events through indirect readout effects, but these effects appear to be particularly relevant for the second (intercalation) process. The most unfavorable sequences contain specifically oriented A-tracts that oppose DNA intercalation of the naphthalimide rings, as reflected by strikingly different thermal stability and thermodynamic binding profiles. The complexes of elinafide with these sequences are characterized by poor DNA–naphthalimide and DNA–DNA stacking interactions and by enhanced dynamics of the ligand's intercalated rings and of the base pairs forming the tetranucleotide binding site.

Introduction

The binding of proteins and small molecules to their target sites in double-helical DNA is often dictated by the sequence-dependent structural and dynamic properties of this polymer. In studies of DNA–protein interactions, this recognition mechanism is termed indirect readout, as opposed to the direct interactions of the protein side chains with specific DNA functional groups.¹ The indirect recognition of DNA has both structural and dynamic origins. If the bound DNA conformation is close to the intrinsic shape of the free DNA, the energetic cost of DNA deformation will be smaller and that sequence will be favored for binding. In addition, the conformational dynamics of a target sequence may facilitate (or preclude) the trapping by the ligand of a short-lived conformation necessary to initiate the binding process. These effects have been shown to determine the sequence-specific binding to DNA of many proteins including bacteriophage 434 repressor,² TATA box binding protein,³ and human papillomavirus E2,⁴ among others.

Indirect sequence effects are also important for drug–DNA recognition, particularly when binding involves selecting a DNA conformation that is far from the ground state(s) of the polymer, such as those induced by threading agents (requiring large

conformational changes for binding and dissociation^{5–7}), intercalators,⁸ and, to a lesser extent, groove-binding agents.⁹ Indirect effects are potentially relevant for drug design, because they could be exploited to increase the binding specificity of cytotoxic or antibacterial agents, a question of paramount importance in this area. DNA deformation energies have recently been estimated for a set of DNA-binding drugs,¹⁰ but reports studying the mechanisms of indirect sequence effects on drug–DNA interactions are much scarcer relative to those focused on protein–DNA complexes.

In fact, many aspects of DNA structure and dynamics that are relevant for the indirect recognition of DNA sequence by both proteins and small molecules remain unclear. NMR and X-ray structures are time- and population-averaged, and although NMR spectroscopy is well suited to provide dynamic information over a broad range of time scales, the methods available to study nucleic acid dynamics are less well developed than those for proteins, and some relevant time scales (particularly the microsecond to millisecond range) remain difficult to study. The shortcomings are particularly acute when trying to char-

- (1) Drew, H. R.; Travers, A. A. *Cell* **1984**, *37*, 491–502.
- (2) Koudelka, G. B.; Mauro, S. A.; Ciubotaru, M. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **2006**, *81*, 143–77.
- (3) Faiger, H.; Ivanchenko, M.; Cohen, I.; Haran, T. E. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 104–19.
- (4) Zhang, Y.; Xi, Z.; Hegde, R. S.; Shakked, Z.; Crothers, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8337–41.

- (5) Fox, K. R.; Brassett, C.; Waring, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *840*, 383–92.
- (6) Tanius, F. A.; Yen, S. F.; Wilson, W. D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1813–9.
- (7) Onfelt, B.; Lincoln, P.; Norden, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3630–7.
- (8) Qu, X.; Ren, J.; Riccelli, P. V.; Benight, A. S.; Chaires, J. B. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11960–7.
- (9) Degtyareva, N. N.; Fresia, M. J.; Petty, J. T. *Biochemistry* **2007**, *46*, 15136–43.
- (10) Arauzo-Bravo, M. J.; Sarai, A. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 376–86.

acterize transient, short-lived intermediates that may be needed for binding or dissociation. Molecular dynamics simulations are beginning to provide some answers in this respect, but the current simulation limit is approximately 1 μ s,^{11,12} and DNA force field descriptions are still being refined.¹¹

The naphthalimides¹³ are a family of DNA intercalators that raise sustained interest due to their antitumor properties.^{14–16} Elinafide (abbreviated as LU)¹⁷ is a member of this family that contains two unsubstituted naphthalimide rings joined together by a flexible aminoalkyl chain (Figure 1A). The two protonated amino groups of the linker recognize the electronegative N7 and O6 groups of guanine in the major groove, and the naphthalimide rings preferentially intercalate into mixed TpG (CpA) steps.^{18,19} In the resulting TGCA binding tetranucleotide, the two A·T pairs flank the outer side of the drug rings, and the GpC dinucleotide interacting with the aminoalkyl linker is sandwiched by the inner side of the rings¹⁹ (Figure 1B).

Despite the small size of its aromatic rings, elinafide, like other intercalating agents, induces groove widening and unwinding of the base pairs,¹⁹ making its interaction with DNA susceptible to being modulated by indirect effects. In addition, the TGCA-intercalated rings of elinafide have previously been found to exchange between two intercalated conformations via 180° rotating motions that do not affect the aminoalkyl linker atoms bound to the major groove.¹⁰ Since these ring flipping motions depend on the sequence of the base pairs flanking the TGCA binding site,²⁰ they can provide additional information on the mechanism of indirect effects on the DNA–elinafide interaction.

In the present study, we have used a combination of NMR spectroscopy, surface plasmon resonance (SPR), and UV thermal denaturation experiments to study the binding parameters, structure, and dynamics of a series of DNA–elinafide complexes flanked by different sequences. Our data reveal that the sequence of the base pairs flanking the bisnaphthalimide binding sites can cause 10-fold variations of the DNA–elinafide dissociation constants through indirect readout effects. The most unfavorable flanking sequences oppose intercalation of the naphthalimide rings, and the complexes of the drug with these sequences exhibit weaker intra- and intermolecular stacking interactions and increased DNA and ligand dynamics.

Materials and Methods

Sample Preparation. After purification of the DNA oligonucleotides using a methodology based on gel electrophoresis, ethanol precipitation, and dialysis, six self-complementary DNA duplexes

(Figure 1C) were titrated with elinafide by 1D NMR spectroscopy using the slowly exchanging free and bound DNA aromatic resonances (Figure S1, Supporting Information). The final NMR samples contained 0.2–0.8 mM complex and were microdialyzed in 20 mM sodium phosphate, pH 6.9, 0.2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), and 150 or 1000 mM NaCl aqueous solutions. The samples for UV thermal denaturation experiments contained 0.5 ODU mL⁻¹ (approximately 2 μ M) of free duplex or NMR complex and were dissolved in similar solutions. For the SPR experiments, three 5'-biotin-labeled hairpins (Figure 1C) were purchased HPLC-purified from Microsynth AG and microdialyzed in HBS-EP buffer (10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% (v/v) surfactant P20) prior to immobilization.

NMR Spectroscopy. NMR spectra were acquired on a temperature-calibrated Bruker 600 MHz spectrometer equipped with a TCI HCN cryoprobe, processed with Topspin 1.3 (Bruker Biospin) and analyzed using Topspin 1.3 or Sparky 3.110.²¹ Each DNA–bisnaphthalimide complex was analyzed using ¹H₂O WATERGATE NOESY at 8 °C and series of ²H₂O NOESYs (at 8 and 25 °C) collected without interruption at several mixing times (typically 0, 4, 8, 12, 20, 80, and 250 ms), together with ROESY, and dqf-COSY or TOCSY experiments, all with recycle delays of 2 s. Imino proton longitudinal relaxation times, *T*₁, were determined at 8 °C from inversion recovery experiments comprising a selective 2000–2500 ms 180° Gaussian pulse for inversion, followed by a variable delay and a 4500–5000 ms 90° Gaussian observe pulse. The carrier frequency was centered on the imino proton region, and the spectral width was set to 3000 Hz. All elinafide resonances and all of the aromatic, H1', H3', H2', and H2'' DNA resonances were assigned in each of the complexes studied. All sequences formed the self-complementary duplexes shown in Figure 1C.

Bisnaphthalimide Ring Rotation Rates, *k*_{rot}, and Activation Parameters. Values of *k*_{rot} were determined by NMR spectroscopy at an average of six different temperatures per complex, ranging from 8 to 48 °C, using a combination of NOESY data at low mixing times and line shape analyses.²⁰ Values of ΔH_{rot}^\ddagger , ΔS_{rot}^\ddagger and ΔG_{rot}^\ddagger were obtained from the Eyring dependence of the rate constants with temperature.²⁰

Intercalation Dissociation Rates, *k*_d^{int}. These rates were determined from NOESY experiments at low mixing times using well-resolved aromatic or H1' DNA resonances of intercalated complexes and their cross-peaks to residual unstacked DNA.²⁰

Base-Pair Lifetimes, τ_{op} , and Opening Rates, *k*_{op}. These were obtained by measuring the exchange times of G and T imino protons with solvent as a function of base concentration, [B],²² and extrapolating to infinite [B]:

$$\tau_{ex} = \tau_{op} + \frac{1}{\alpha K_d k_i [B]}$$

A plot of τ_{ex} versus 1/[B] yields a straight line where the y-intercept is $\tau_{op} = 1/k_{op}$ and the slope is $1/(\alpha K_d k_i)$, where *K*_d is the dissociation constant for the base pair, *k*_i is the proton transfer rate from the mononucleoside, and α is an accessibility parameter. For these experiments the DNA–elinafide complexes were microdialyzed in aqueous buffers containing 3 mM sodium borate, pH 8.8, 150 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA and were titrated with a 1.8 M pH 8.8 stock solution of ammonia as the base catalyst, keeping the sample pH at approximately 8.8 after each base addition. The imino proton exchange times at different ammonia concentrations, τ_{ex} , were obtained from the longitudinal relaxation times, *T*₁, determined by inversion recovery experiments (described above), after subtracting the effect of longitudinal relaxation in the absence of added catalyst, *T*₁⁰:

- (11) Perez, A.; Luque, F. J.; Orozco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14739–45.
- (12) Mura, C.; McCammon, J. A. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4941–55.
- (13) Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Roldan, C. M.; Santos, A.; Vazquez, D.; Jimenez, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1980**, *4*, 61–6.
- (14) Bailly, C.; Carrasco, C.; Joubert, A.; Bal, C.; Wattez, N.; Hildebrand, M. P.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Houssier, C.; Cacho, M.; Ramos, A.; Braña, M. F. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4136–50.
- (15) Carrasco, C.; Joubert, A.; Tardy, C.; Maestre, N.; Cacho, M.; Braña, M. F.; Bailly, C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11751–61.
- (16) Van Quaquebeke, E.; Mahieu, T.; Dumont, P.; Dewelle, J.; Ribaucour, F.; Simon, G.; Sauvage, S.; Gaussin, J. F.; Tuti, J.; El Yazidi, M.; Van Vynckt, F.; Mijatovic, T.; Lefranc, F.; Darro, F.; Kiss, R. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4122–34.
- (17) Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Moran, M.; Perez de Vega, M. J.; Perron, D.; Conlon, D.; Bousquet, P. F.; Romerdahl, C. A.; Robinson, S. P. *Anti-Cancer Drug Des.* **1996**, *11*, 297–309.
- (18) Bailly, C.; Brana, M.; Waring, M. J. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 195–208.
- (19) Gallego, J.; Reid, B. R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15104–15.
- (20) Gallego, J. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3607–14.

(21) Goddard, T. D.; Kneller, D. G. University of California, San Francisco, CA.

(22) Géron, M.; Leroy, J.-L. *Methods Enzymol.* **1995**, *261*, 383–413.

$$\frac{1}{\tau_{\text{ex}}} = \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_1^{\circ}}$$

UV Thermal Denaturation Experiments. The thermal denaturation of the unbound DNA duplexes and DNA–bisnaphthalimide complexes was monitored by measuring the UV absorbance at 260 nm as a function of temperature in a Varian Cary 300 spectrophotometer. The temperature was raised from 10 to 90 °C at a gradient

of 0.5 °C min⁻¹ and subsequently decreased at the same rate to evaluate the reversibility of the process.

Surface Plasmon Resonance (SPR). These experiments were carried out using a Biacore T100 optical biosensor system and a four-channel streptavidin-derivatized Series S SA chip. *DNA immobilization.* A 25 nM HBS-EP solution of each of the three 5' biotin-labeled hairpins was manually injected at 1 μL/min into one flow cell of the chip, leaving the remaining cell blank for

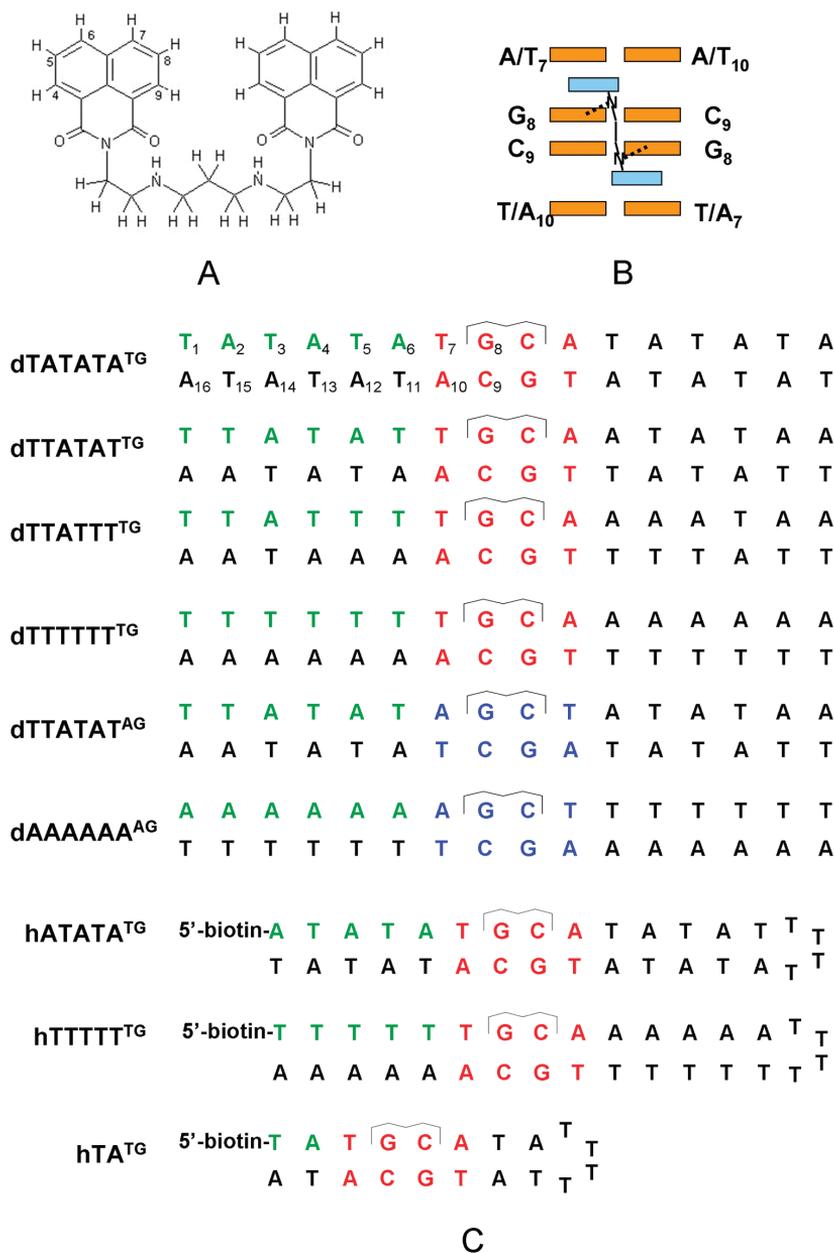


Figure 1. Elinafide and DNA–elinafide complexes. (A) Chemical structure of elinafide. (B) Schematic representation of a DNA–elinafide complex. The interactions between the amino groups of the elinafide linker and the O6 and N7 atoms of guanine in the major groove are represented with dashed lines. (C) DNA–elinafide complexes analyzed in this study: six self-complementary 16 base-pair duplexes and three 5'-biotinylated hairpins. The invariant bisnaphthalimide TGCA and AGCT binding sites are indicated with red and blue colors, respectively, whereas the 5' flanking sequences are highlighted in green.

Table 1. Effect of Flanking Sequence on the Affinity, Kinetics and Dynamics of the Interaction between Elinafide and Self-Complementary DNA Duplexes: Free (T_m^f) and Bound (T_m^b) DNA Melting Temperatures, Elinafide-Induced DNA Thermal Stabilizations (ΔT_m), DNA–Naphthalimide Intercalation Dissociation Rates ($k_{\text{off}}^{\text{int}}$) and Naphthalimide Ring Rotation Rates (k_{rot}) at 25 °C

complex ^a	T_m^f (°C)	T_m^b (°C)	ΔT_m (°C)	$k_{\text{off}}^{\text{int}}$ (s ⁻¹)	k_{rot} (s ⁻¹)
TGCA Complexes					
dTATATA ^{TG}	46	52	6	3.8 ± 0.6	15
dTTATAT ^{TG}	45	50	5	0.9 ± 0.1	13
dTTATTT ^{TG}	48	50	2	<i>b</i>	32
dTTTTTT ^{TG}	55	55	0	2.7 ± 0.9	30
AGCT Complexes					
dTTATAT ^{AG}	42	50	8	<i>b</i>	13
dAAAAAA ^{AG}	49	54	5	<i>b</i>	21

^a The sequences of the complexes are shown in Figure 1C, and the DNA:elinafide equivalent ratios are (as required by NMR titrations): dTATATA^{TG}, 1:1.1; dTTATAT^{TG}, 1:1.4; dTTATTT^{TG}, 1:1.6; dTTTTTT^{TG}, 1:2.5; dTTATAT^{AG}, 1:1.5; dAAAAAA^{AG}, 1:1.5. The thermal denaturation experiments were repeated at least two times for each system, and the average standard error for T_m and ΔT_m values is 1 °C. ^b Not measured due to lack of appropriate peaks. ^c Calculated from the Eyring plots at $T = 25$ °C (Figure 5A and Figure S4, Supporting Information). The average error for experimental k_{rot} measurements is 10% (Figure 5A and Figure S4, Supporting Information). The $\Delta G_{\text{rot}}^{\ddagger}$ values obtained from the Eyring plots range from 15.4 (dTTATTT^{TG}) to 16.0 (dTTATAT^{AG}) kcal mol⁻¹.

referencing. We immobilized approximately 300 response units (RU) of 32-nucleotide hairpins and 400 RUs of 20-nucleotide hairpin (Figure 1C). The flow cells were previously conditioned by applying several consecutive injections of a 1 M NaCl, 50 mM NaOH solution until a stable baseline was observed, followed by extensive washing with HBS-EP buffer. *SPR Experiments.* We carried out steady-state binding analyses at five different temperatures (10, 18, 25, 32, and 40 °C) by injecting different elinafide concentrations over the immobilized DNA surfaces for a 15 min period at a flow rate of 20 μ L/min. The elinafide concentrations ranged from 0.5 nM to 0.15 μ M in MES-15 solutions (10 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 6.25, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.005% P20). The DNA surface was regenerated by buffer flow over a 30 min period.

Determination of DNA–Elinafide Dissociation Constants. The instrument response (RU) in the steady-state region is proportional to the amount of bound elinafide and was determined for each drug concentration injected. The dissociation constants, K_d , were determined by fitting the sensorgrams to one-site or two-site equations, using the Biacore T100 evaluation software:

$$RU = \frac{RU_{\text{max}}C}{1 + K_dC} + RI \quad (\text{one-site})$$

$$RU = \frac{RU_{\text{max}1}C}{1 + K_{d1}C} + \frac{RU_{\text{max}2}C}{1 + K_{d2}C} + RI \quad (\text{two-site})$$

where C is the concentration of free elinafide in equilibrium with the complex (which equals the elinafide concentration in the flow solution), RU_{max} is the maximum response in the steady-state region, and RI is an offset term accounting for the bulk refractive index contribution of the sample. In these models, K_d , RU_{max} , and RI are adjustable parameters, and the stoichiometry of each binding site was determined by comparing the fitted RU_{max} values with the predicted ones, calculated from the molecular weights of DNA and elinafide and the amount of DNA in the flow cell.²³ Association and dissociation rate constants were obtained from global kinetic fits, using low concentration sensorgrams and a one-site model including a mass transfer term.

Results

We studied by NMR spectroscopy and UV thermal denaturation experiments complexes of elinafide with six 16-base-pair self-complementary duplexes containing TGCA and AGCT binding sites (these complexes will be hereafter identified with

the sequence flanking the 5' side of the binding tetranucleotide followed by TG or AG superscripts designating TGCA and AGCT binding sites, respectively). The series included four complexes containing a TGCA binding site flanked by alternating AT pairs (dTATATA^{TG}), mixed AT pairs (dTTATAT^{TG}), short A-tracts on 3' (dTTATTT^{TG}), and continuous A-tracts on 3' (dTTTTTT^{TG}) and two complexes containing an AGCT binding site flanked by mixed AT pairs (dTTATAT^{AG}) and continuous A-tracts on 5' (dAAAAAA^{AG}) (Figure 1C).

Analysis of the NMR data confirmed that the two rings of elinafide bisintercalate into TGCA and AGCT from the major groove in all complexes, as observed previously for TGCA sites.^{19,20} Since the chemical environment of the naphthalimide rings and linker is the same within the TGCA and AGCT series (see Figure 1C), the observed differences must be due to indirect effects linked to the structural preferences or conformational fluctuations of the DNA molecules.

Intercalation Constants. DNA–elinafide titrations were carried out by NMR spectroscopy using the slowly exchanging free and bound DNA aromatic resonances indicating intercalation of the naphthalimide rings. These initial experiments revealed a significant difference for the TGCA complex flanked by continuous A-tracts on 3' (dTTTTTT^{TG}). This sequence required approximately 2 equiv of ligand for full intercalation of the naphthalimide rings at NMR concentrations, whereas the other sequences required approximately one (Table 1 and Figure S1, Supporting Information). Analysis of the NMR and SPR data (see below) indicates that there are no interactions of elinafide with the flanking A-tracts of dTTTTTT^{TG}. Based on these results (Figure S1, Supporting Information), we estimate an *intercalation* dissociation constant of approximately 3×10^{-4} M for dTTTTTT^{TG}, significantly higher than the intercalation constants of the other complexes.

UV Thermal Stabilizations. The UV melting temperatures of complexes between DNA and intercalative agents are usually higher relative to the isolated duplexes, and this stabilization has been proposed to be proportional to the affinity of the DNA–ligand interaction.^{24,25} The sequences flanking the TGCA and AGCT sites have a large impact on the duplex thermal stabilizations induced by elinafide (Table 1 and Figure 2A). If we compare the TGCA series first, ΔT_m is highest (6 °C) for the alternating dTATATA^{TG} complex, decreases progressively

(24) Crothers, D. M. *Biopolymers* **1971**, *10*, 2147–60.

(25) Wilson, W. D.; Taniou, F. A.; Fernandez-Saiz, M.; Rigl, C. T. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *90*, 219–40.

(23) Nguyen, B.; Taniou, F. A.; Wilson, W. D. *Methods* **2007**, *42*, 150–61.

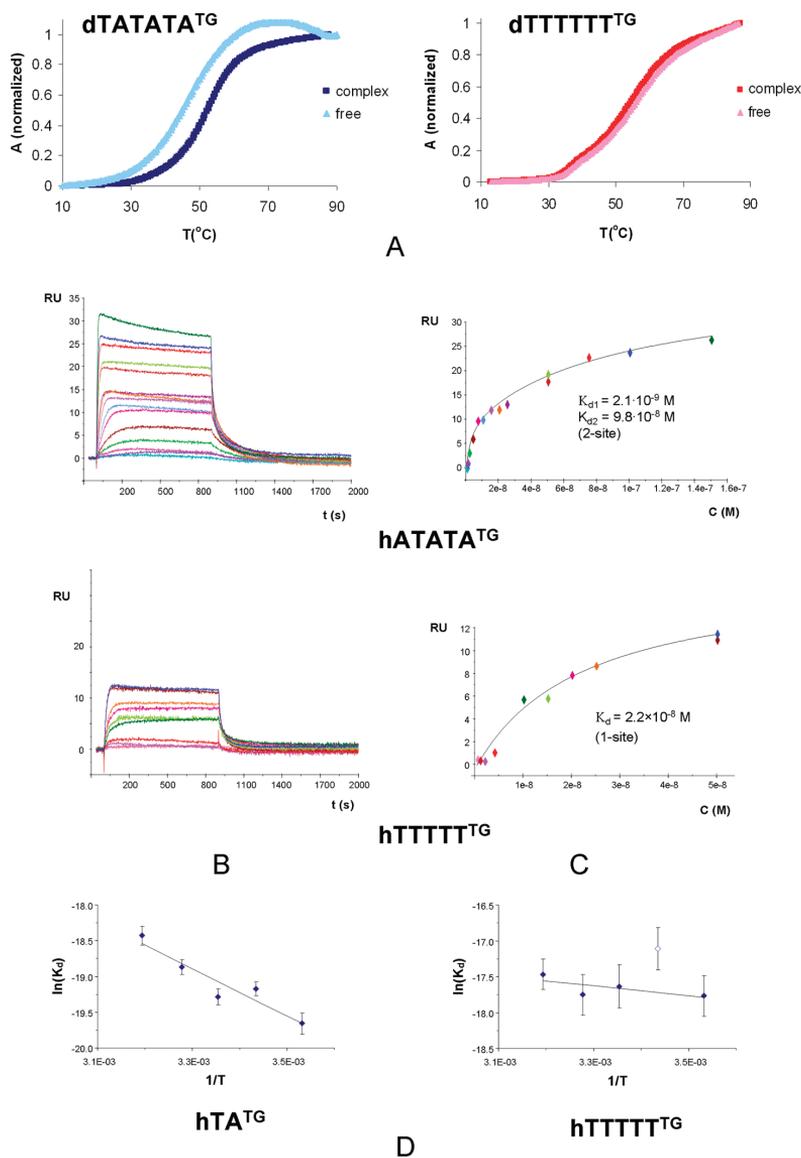


Figure 2. UV thermal denaturation and SPR experiments. (A) UV melting curves of dTATATAT^{TG} and dTTTTTTT^{TG} in the absence and presence of 1.1 and 2.5 equiv of elinafide, respectively. All samples contained 2 μ M DNA. (B) SPR sensorgrams for the interaction of elinafide with hATATAT^{TG} and hTTTTTTT^{TG} at 25 °C. For both systems, the elinafide concentrations range from 0.5×10^{-9} (lowest curve) to 1.5×10^{-7} M (highest curve). Similar quantities of hairpin (approximately 300 RUs) were immobilized on the SPR chip. (C) Steady-state binding analyses for hATATAT^{TG} and hTTTTTTT^{TG}. The RU values from the steady-state regions of the sensorgrams are plotted against the concentration of free elinafide (C, M). The data were adjusted with a two-site binding function for hATATAT^{TG} and a one-site function for hTTTTTTT^{TG} (see Materials and Methods). (D) van't Hoff plots comparing the hATATAT^{TG} and hTTTTTTT^{TG} SPR dissociation constants (K_d 's, M) as a function of temperature (T , K). Both sets of constants were determined using a one-site model.

in dTTATAT^{TG} and dTTATTT^{TG}, and becomes negligible for the dTTTTTT^{TG} complex flanked by continuous A-tracts on 3' (see Table 1 and Figure 2A). The observed difference in ΔT_m would translate into an approximately 10 000-fold difference between the dTATATAT^{TG}- and dTTTTTTT^{TG}-elinafide binding affinities calculated using this parameter (Table S1, Supporting Information).

A-tracts flanking AGCT complexes on 5' also have unfavorable effects, although to a lesser extent: ΔT_m halves for the dAAAAA^{AG} complex relative to dTTATAT^{AG} (Table 1).

Comparison of dTTTTTT^{TG} and dAAAAA^{AG} indicates that the indirect effect of the A-tract depends on its orientation with respect to the complex: A-tracts located on the 3' side of the complexes (as in dTTTTTT^{TG}) have a more pronounced effect on ΔT_m than A-tracts located on the other side.

DNA–Elinafide Dissociation Constants. In order to obtain additional binding data, we carried out SPR experiments with two 32-nucleotide hairpins containing a TGCA site flanked by alternating AT pairs or continuous A-tracts on 3' (these will be identified as explained above as hATATAT^{TG} and hTTTTTT^{TG},

Table 2. SPR Analysis of the Interaction between Elinafide and the DNA Hairpins hTA^{TG}, hATATA^{TG}, and hTTTTT^{TG}

(A) Equilibrium Dissociation Constants (K_d), Association (k_a) and Dissociation (k_d) Rates, and Binding Stoichiometries at 25 °C						
TGCA complex ^a	K_d (M) ^b	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	k_d/k_a (M)	n^c	m^c
hTA ^{TG}	4.2×10^{-9}	5.5×10^6	2.2×10^{-2}	4.2×10^{-9}	1	1
hATATA ^{TGd}	2.1×10^{-9} (9.8×10^{-8})	2.7×10^6	1.1×10^{-2}	3.9×10^{-9}	2	3
hTTTTT ^{TG}	2.2×10^{-8}	7.6×10^5	1.8×10^{-2}	2.3×10^{-8}	1	1

(B) Thermodynamic Parameters at 25 °C ^e		
TGCA complex ^a	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
hTA ^{TG}	-6.7 ± 1.3	4.7 ± 1.2
hATATA ^{TGd}	-6.0 ± 2.4	5.6 ± 2.4
hTTTTT ^{TG}	-1.4 ± 1.0	9.3 ± 0.9

^a The hairpin sequences are shown in Figure 1C. ^b The standard errors of the K_d 's are shown in Figure 2 and Figure S2, Supporting Information. ^c Parameters n and m indicate the number of binding sites per hairpin and the total number of elinafide molecules binding to each hairpin, respectively. ^d For hATATA^{TG}, the equilibrium K_{d1} and K_{d2} dissociation constants were determined using a two-site model, and the second-site K_{d2} is indicated in parentheses; k_a , k_d , and k_d/k_a were calculated at low elinafide concentrations using a one-site kinetic model; ΔH and $T\Delta S$ were calculated from the temperature-dependence of the first-site equilibrium K_{d1} 's. ^e Calculated from the temperature dependence of the SPR equilibrium K_d values.

where h designates a hairpin). A third 20-nucleotide alternating AT hairpin (hTA^{TG}) lacking possible secondary binding sites in the flanking regions was also analyzed as a control (Figure 1C). Indeed, comparison of the experimental and predicted maximum responses (RU_{max}) indicated binding of one drug molecule to hTA^{TG} and hTTTTT^{TG} and of three drug molecules to hATATA^{TG}, and the best steady-state fits were obtained using a one-site binding model for hTA^{TG} and hTTTTT^{TG}, and an independent two-site model for hATATA^{TG} (Figure 2B and Figure S2, Supporting Information). These data indicate that elinafide binds to two equivalent low-affinity sites in the flanking AT sequences of hATATA^{TG} after the high-affinity TGCA site is saturated. This effect is not seen in hTTTTT^{TG} nor in hTA^{TG} due to the shortened stem.

A comparison of the elinafide binding affinities for the TGCA sites of hTA^{TG}, hATATA^{TG}, and hTTTTT^{TG} reveals that whereas the equilibrium dissociation constants (K_d) of the alternating hTA^{TG} and hATATA^{TG} hairpins are as expected very similar (4.2×10^{-9} and 2.1×10^{-9} M, respectively), the K_d for the A-tract-flanked TGCA hTTTTT^{TG} hairpin is approximately 10-fold higher (Table 2A). Note that these DNA–elinafide K_d values are substantially lower than the dissociation constants calculated from the ΔT_m values of equivalent duplexes (Table S1, Supporting Information) and the NMR intercalation dissociation constant estimated for dTTTTT^{TG}. In particular, the discrepancy between the SPR-determined DNA–elinafide K_d values and the NMR (intercalation) and ΔT_m dissociation constants is approximately 10 000-fold for the dTTTTT^{TG} and hTTTTT^{TG} TGCA complexes flanked by continuous A-tracts on 3' (Table 2A and Figure S1 and Table S1, Supporting Information).

Thermodynamic Binding Profiles. The enthalpy and entropy components of the interaction between elinafide and hTA^{TG}, hATATA^{TG}, and hTTTTT^{TG} were obtained from the temperature-dependence of the SPR equilibrium K_d values (Figure 2C, Figure S2, Supporting Information, and Table 2B). The results indicate that the lower affinity of elinafide for hTTTTT^{TG} is mainly due to a reduced binding enthalpy. This term is five-times less negative in hTTTTT^{TG}, containing a TGCA site flanked by A-tracts, relative to the hTA^{TG} and hATATA^{TG} hairpins containing TGCA sites flanked by alternating AT sequences.

Structural Effects. As previously determined,¹⁹ the TGCA–elinafide complexes exhibit diagnostic NOEs between LU H9 and C9 H5, LU H7 and A10 H1', LU H5 and A10 H2, LU H4

and G8 H8, and LU H4 and T7 H1' among others, indicating bisintercalation of the naphthalimide rings into the T7•A10–G8•C9 steps from the major groove (Figures 3 and 4). Comparison of the NOESY spectra of dTATATA^{TG} and dTTTTT^{TG} reveals that whereas the NOEs involving G8 and C9 are approximately similar in both complexes (e.g., cross-peak k in Figure 3A,B), the NOEs with the H1' and H2 protons of the outer T7•A10 pair are substantially weaker or nondetectable in dTTTTT^{TG} (Figure 3B, cross-peak l). This is in contrast to dTATATA^{TG}, which is characterized by medium-intensity LU H6, H7–A10 H1' NOEs (Figure 3A, cross-peaks l and m) indicating stacking of the naphthalimide on A10¹⁹ (Figure 4). The intramolecular NOEs between the adenine H2 protons and the H1' protons of sequential and cross-strand nucleotides are stronger in dTTTTT^{TG} relative to dTATATA^{TG} (compare the green-labeled cross-peaks in Figure 3A,B), indicating that the T1•A16–T6•A11 segment flanking the TGCA site in dTTTTT^{TG} retains the conformation typical of A-tracts characterized by negative base inclination and a compressed minor groove.^{26–31} However, A10 H2 and H8 of dTTTTT^{TG} are broadened (Figure 3B), and A10 H2 gives rise to weaker NOEs with the H2 and H1' protons of A11, pointing to a disruption of the A-tract structure of this complex at the T7•A10–T6•A11 step.

The AGCT–elinafide complexes exhibit equivalent interactions with the aromatic and sugar protons of the tetranucleotide binding site, indicating similar bisintercalation of the drug rings into the A7•T10–G8•C9 steps from the major groove (Figure S3, Supporting Information). The strong LU H4–A7 H1' and LU H5, H6–A7 H2 NOEs observed in the dTTATAT^{AG} complex reflect stacking of the naphthalimide rings on A7. In contrast, the NOEs with the A7•T10 pair are much weaker in dAAAAAA^{AG}, as observed in dTTTTT^{TG}. The flanking A1•T16–A6•T11 segment of dAAAAAA^{AG} also retains an

- (26) Nelson, H. C. M.; Finch, J. T.; Luisi, B. F.; Klug, A. *Nature* **1987**, *330*, 221–6.
 (27) Nadeau, J. G.; Crothers, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 2622–6.
 (28) MacDonald, D.; Herbert, K.; Zhang, X.; Pologruto, T.; Lu, P. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1081–98.
 (29) Barbic, A.; Zimmer, D. P.; Crothers, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 2369–73.
 (30) Steffl, R.; Wu, H.; Ravindranathan, S.; Sklenar, V.; Feigon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 1177–82.
 (31) Woods, K. K.; Maehigashi, T.; Howerton, S. B.; Sines, C. C.; Tannenbaum, S.; Williams, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15330–1.

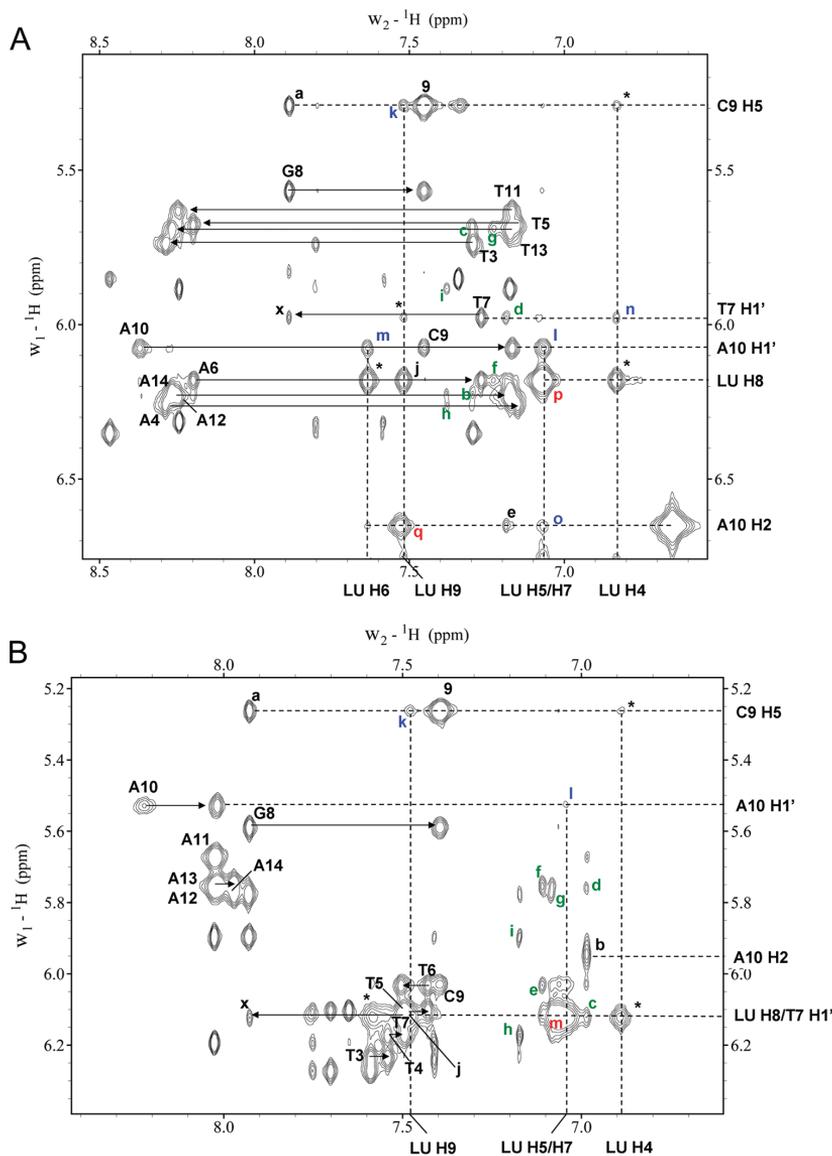


Figure 3. NMR spectra of the dTATATA^{TG}- and dTTTTT^{TG}-elinafide complexes. Assignment of the aromatic and H1' NOESY regions (250 ms; mixing time, 25 °C) of dTATATA^{TG} (A) and dTTTTT^{TG} (B) in the presence of 1.1 and 2.5 equiv of elinafide, respectively. DNA intraresidue H1'–H6/H8 cross-peaks are labeled with residue name and number, intraresidue H5–H6 cross-peaks are labeled with residue number, and sequential NOE connectivities are indicated with horizontal arrows. These connectivities are weaker (marked with ×) or nondetectable for the T7·A10–G8·C9 steps due to LU bisintercalation. In panel A, intramolecular cross-peaks a–j are assigned as follows: a, G8 H8–C9 H5; b, A4 H2–A14 H1'; c, A4 H2–T5 H1'; d, A6 H2–T7 H1'; e, A6 H2–A10 H2; f, A12 H2–A6 H1'; g, A12 H2–T13 H1'; h, A14 H2–A4 H1'; i, A14 H2–T15 H1'; j, LU H8–H9. The blue-labeled k–o cross-peaks are intermolecular: k, LU H9–C9 H5; l, LU H7–A10 H1'; m, LU H6–A10 H1'; n, LU H4–T7 H1'; o, LU H5–A10 H2. The red-labeled p and q cross-peaks are exchange signals, confirmed by ROESY experiments: p, LU H5–H8 (due to ring rotation; overlapped with the LU H7–H8 NOE); q, A10 (bound) H2–A10 (free) H2. In B, intramolecular cross-peaks a–j are assigned as follows: a, G8 H8–C9 H5; b, A10 H2–A11 H2; c, A11 H2–T7 H1'; d, A11 H2–A12 H1'; e, A12 H2–T6 H1'; f, A12 H2–A13 H1'; g, A13 H2–A14 H1'; h, A14 H2–T4 H1'; i, A14 H2–A15 H1'; j, LU H8–H9. The blue-labeled k and l cross-peaks are intermolecular: k, LU H9–C9 H5; l, LU H7–A10 H1'. The red-labeled m cross-peak is an exchange signal due to ring rotation, confirmed by ROESY experiments: LU H5–H8 (overlapped with the LU H7–H8 NOE). In panels A and B, LU–LU and DNA–LU NOE cross-peaks mostly mediated by naphthalimide exchange¹⁹ are labeled with asterisks, the NOEs between adenine H2s and H1' protons are green-labeled, the interactions of important DNA and LU protons are highlighted with dashed lines, and the assignments of the two terminal 1·16 and 2·15 base pairs have been omitted for clarity.

A-tract conformation, but the substantially weaker A6 H2–A7 H1' (Figure S3, cross-peak g, Supporting Information) and A7 H2–T11 H1' interactions indicate a disruption of the A-tract structure at the A6·T11–A7·T10 step. Severe broadening is observed for the A7 H2 and H8 aromatic resonances in both

dTTATAT^{AG} and dAAAAA^{AG}. This broadening also affects the aromatic resonances of the neighboring A5, A6, T10, and T11 residues in dAAAAA^{AG}, suggesting enhanced dynamics of the flanking pairs in this complex (Figure S3, Supporting Information).

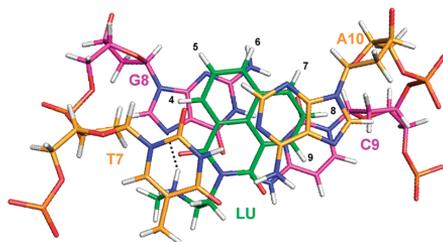


Figure 4. View of an elinafide TGCA binding site. Projection down the helix axis of a TGCA–elinafide complex (PDB 1CX3¹⁹), showing the naphthalimide ring (with green carbon atoms) intercalated between the T7•A10 base pair (orange carbons) and the G8•C9 base pair (pink carbons). As indicated by NOE contacts¹⁹ (Figure 3), the small naphthalimide rings mostly stack between G8 and A10, showing little overlap with the adjacent pyrimidines. This *interstrand* A10–naphthalimide–G8 stack is substituted with an *intrastrand* A7–naphthalimide–G8 stack in AGCT complexes, as indicated by the dTTATATA^{AG} and dAAAAAA^{AG} NMR analyses (Figure S3, Supporting Information). In both TGCA and ACGT complexes, one of the electronegative imide carbonyls of the drug is brought into unfavorable proximity of the electronegative N7 and O6 atoms of G8 by the strong interactions established by the amino groups of the linker (represented with a black dash line).

Dynamic Effects: Naphthalimide Ring Motion. NMR exchange cross-peaks are observed in all complexes between symmetric and intercalated naphthalimide proton resonances (Figure 3 and Figure S3, Supporting Information), which selectively broaden with increasing temperatures.^{19,20} These data are indicative of an unusual process involving 180° rotating motions of the naphthalimide rings,^{19,20} which exchange between two equivalent intercalated states at rates ranging from 13 to 32 s⁻¹ at 25 °C in the different TGCA and ACGT complexes (Table 1, Figure 5A, and Figure S4, Supporting Information). These ring motions are significantly faster than the 1–4 s⁻¹ intercalation dissociation rates measured by NMR spectroscopy at 25 °C (k_d^{int} , Table 1),²⁰ and much faster than the DNA–ligand dissociation rates obtained by SPR at 25 °C (Table 2A).

The sequences flanking the TGCA and AGCT sites have a significant effect on the rates of intercalated naphthalimide ring rotation. The rotation rates are 2-fold faster in the lower affinity TGCA dTTTTTT^{TG} and dTTATTT^{TG} complexes flanked by A-tracts relative to the dTATATA^{TG} and dTTATAT^{TG} complexes flanked by mostly alternating AT pairs. A similar trend is observed for the AGCT complexes, with dAAAAAA^{AG} having a faster rotation rate than dTTATAT^{AG}, but in this case the differences are smaller (Table 1, Figure 5A, and Figure S4, Supporting Information).

Base-Pair Opening Rates. In order to find out whether the observed trends in binding affinity and naphthalimide ring dynamics are correlated with local and/or cooperative DNA motions, we measured base-pair opening rates in the dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG}, and dTTATAT^{AG} complexes using imino proton exchange experiments, which are a well-established method for analyzing nucleic acid base dynamics on the millisecond time scale.²² Several observations can be made on the basis of the data shown in Table 3 and Figure 5B,C. First, the opening rates of the TGCA and AGCT central G8•C9 pairs are significantly slower relative to similar base pairs in free DNA duplexes,³² as previously observed in other

bisintercalation complexes.³³ In addition, these G8•C9 opening rates are in the same range as the naphthalimide ring rotation rates measured in these complexes (compare the k_{rot} and k_{op} values of dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG}, and dTTATAT^{AG} in Tables 1 and 3, respectively). Second, the T4•A13–T6•A11 segment of dTTTTTT^{TG} exhibits slow opening rates typical of A-tracts³⁴ (Table 3 and Figure 5C). Third, the opening rates of the 7•10 A•T pairs of the dTTTTTT^{TG} TGCA and dTTATAT^{AG} AGCT binding sites (adjacent to the drug rings) are very fast. In particular, the T7•A10 imino resonance of dTTTTTT^{TG} already broadens out at pH 8.8 without adding any base. In contrast, this pair is more stable in the dTATATA^{TG} complex (Figure 5B). Together with the observation of unusual, non-sequential NOEs involving the dTTTTTT^{TG} T7 and dTTATAT^{AG} and dAAAAAA^{AG} T10 methyl groups (not shown), these data indicate that T7 and T10 expend a considerable amount of time in an opened (extrahelical) conformation in these complexes.

Effect of Ionic Strength. The NMR structure of an ATG-CAT–elinafide complex revealed strong hydrogen bonding and electrostatic interactions between the protonated amino groups of the linker and the electronegative groups of guanine in the major groove¹⁹ (Figure 4). These contacts are important for the sequence-specific binding of elinafide to DNA, which preferentially binds guanine-containing sequences as shown above and in previous work.²⁰ We have further explored the role of the linker interactions by measuring UV thermal stabilizations and ring dynamics in TGCA dTATATA^{TG} and dTTTTTT^{TG} complexes in the presence of 1 M NaCl. The screening effect of the ions reduces the repulsion between DNA phosphate groups, so higher thermal stabilities are observed for both free and bound DNA duplexes (Table 4). However, this effect also reduces the attractive interactions between the aminoalkyl groups of elinafide and the DNA duplexes, so that a substantially lower elinafide-induced thermal stabilization is observed for dTATATA^{TG} (Table 4). This result confirms the importance of the electrostatic interactions established by the elinafide linker. Regarding ligand dynamics, the small effect of the ionic strength on the ring rotation rates indicates that low ΔT_m values are not always accompanied by increased ring dynamics.

Discussion

Elinafide has been shown to be a DNA bisintercalating agent^{18,19} with topoisomerase II inhibitory activity and potent cytotoxic properties.¹⁷ However, the structure of its complexes with DNA is not optimal. The drug rings are smaller than those of typical intercalators, and the stacking interactions with the adjacent base pairs of a typical TGCA binding site leave out the pyrimidines, specially the outer T's¹⁹ (Figure 4). Furthermore, the electronic structure of the elinafide rings does not seem to be well-suited for stacking on the G•C pair, because one of the electronegative naphthalimide carbonyls is forced to sit on top of the electronegative O6 and N7 atoms of G by the strong interactions established by the protonated amino groups of the drug linker with this base (Figure 4). These features probably make the DNA interactions of this drug particularly sensitive to indirect readout effects arising from the structural preferences or conformational fluctuations of the bound DNA sequences, as we have shown above.

(32) Kochoyan, M.; Lancelot, G.; Leroy, J. L. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7685–702.

(33) Leroy, J. L.; Gao, X. L.; Misra, V.; Gueron, M.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1407–15.

(34) Snoussi, K.; Leroy, J. L. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12467–74.

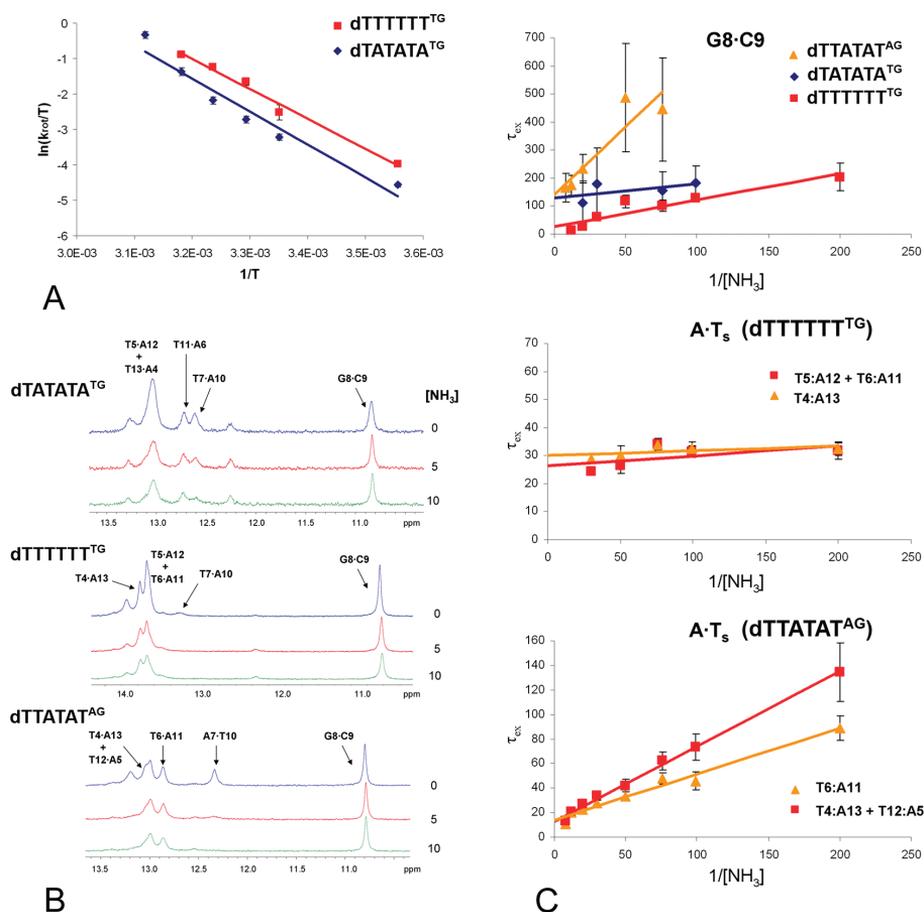


Figure 5. Naphthalimide ring rotation rates and base-pair opening rates. (A) Eyring plots comparing the naphthalimide ring rotation rates (k_{rot} , s^{-1}) as a function of temperature (T , K) in $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$ and $\text{dTATATA}^{\text{TG}}$. (B) Imino proton region of the $^1\text{H}_2\text{O}$ ^1H NMR spectra (600 MHz) of the $\text{dTATATA}^{\text{TG}}$ –, $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$ –, and $\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$ –elinafide complexes at pH 8.8 and 8 °C with no NH_3 added (top) and in the presence of 5 mM (middle) and 10 mM (bottom) NH_3 . The assignments of the G8·C9 and flanking T·A iminos are labeled over the resonances. (C) Variation of the imino proton exchange times (τ_{ex} , ms) as a function of the inverse of the ammonia base concentration ($1/[\text{NH}_3]$, M^{-1}); the y -intercepts of the linear fits are the base-pair lifetimes ($\tau_{\text{op}} = 1/k_{\text{op}}$). Top, comparison of the $\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$, $\text{dTATATA}^{\text{TG}}$, and $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$ G8·C9 base pairs; middle, $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$ flanking T·A base pairs; bottom, $\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$ flanking T·A base pairs.

Table 3. Base-Pair Opening Rates in DNA–Elinafide Complexes^a

complex ^b	4·13	5·12	6·11	7·10	G8·C9
			TGCA Complexes		
$\text{dTATATA}^{\text{TG}}$	^c	^c	^c	~ 333 (~ 3) ^c	8 ± 2 (129 ± 32)
$\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$	33 ± 2 (30 ± 2)	^d	^d	$\gg 1000$ ($\ll 1$)	37 ± 19 (27 ± 14)
			AGCT Complex		
$\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$	^e	^e	77 ± 6 (13 ± 1)	~ 1000 (~ 1)	7 ± 3 (141 ± 52)

^a Opening rates (k_{op} , s^{-1}) and lifetimes (τ_{op} , ms; in parentheses) of the 4·13–8·9 base pairs in the $\text{dTATATA}^{\text{TG}}$, $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$, and $\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$ complexes at 8 °C and pH 8.8. ^b The sequences of the complexes are shown in Figure 1C, and the DNA:elinafide equivalent ratios are (as required by NMR titrations) as follows: $\text{dTATATA}^{\text{TG}}$, 1:1.1; $\text{dTTTTTT}^{\text{TG}}$, 1:2.5; $\text{dTTATAT}^{\text{AG}}$, 1:1.5. ^c The flanking A·T opening rates could not be accurately determined in this complex. ^d Overlapped T5·A12 + T6·A11 iminos (Figure 5B) with $k_{\text{op}} = 38 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ and $\tau_{\text{op}} = 26 \pm 3 \text{ ms}$. ^e Overlapped T4·A13 + A5·T12 iminos (Figure 5B) with $k_{\text{op}} = 71 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ and $\tau_{\text{op}} = 14 \pm 2 \text{ ms}$.

Our results underline the fact that the interaction of this simple molecule with DNA is in fact substantially complex. Overall, the data are consistent with two superposed interactions, one process involving ligand binding to the DNA systems with nanomolar K_d 's and 10^{-2} s^{-1} dissociation rates (Figure 2B and Table 2A) and another process of ring intercalation characterized

by faster ($1\text{--}4 \text{ s}^{-1}$) dissociation rates (Table 1)²⁰ and substantially higher K_d 's in some cases (Figure S1, Supporting Information). The DNA sequences influence both events through indirect readout effects, but these effects appear to be particularly relevant for the second (intercalation) process. Because the clearest example is provided by TGCA sites flanked by

Table 4. Impact of Ionic Strength on DNA–Elinafide Interactions: Free (T_m^f) and Bound (T_m^b) DNA Melting Temperatures, Elinafide-Induced Thermal Stabilizations (ΔT_m), DNA–Naphthalimide Intercalation Dissociation Rates (k_{off}^b), and Naphthalimide Ring Rotation Rates (k_{rot}) at 25 °C for the dTATATA^{TG} and dTTTTTT^{TG} Complexes at 1 M NaCl Concentration

TGCA complex ^a	T_m^f (°C)	T_m^b (°C)	ΔT_m (°C)	k_{off}^b (s ⁻¹)	k_{rot} (s ⁻¹)
dTATATA ^{TG}	53	54	1	8.2 ± 1.7	11 ± 3
dTTTTTT ^{TG}	60	60	0	13.6 ± 2.0	30 ± 5

^a The sequences of the complexes are shown in Figure 1C, and the DNA:elinafide equivalent ratios are (as required by NMR titrations) as follows: dTATATA^{TG}, 1:1.1; dTTTTTT^{TG}, 1:2.5. The thermal denaturation experiments were repeated at least two times for each system, and the average standard deviation for T_m and ΔT_m values is 1 °C. ^b Calculated from NOESY experiments at 25 °C.

alternating AT pairs (dTATATA^{TG}, hATATA^{TG} and hTA^{TG}) or continuous A-tracts on 3' (dTTTTTT^{TG} and hTTTTTT^{TG}), the discussion will focus on these complexes first.

The SPR experiments detect a 10-fold difference between the K_d 's of elinafide binding to the higher affinity hTA^{TG} and hATATA^{TG} hairpins and the K_d of the lower affinity hTTTTTT^{TG} hairpin flanked by an A-tract: $(2-4) \times 10^{-9}$ versus 2×10^{-8} M (Table 2A). A 5-fold difference in ΔH disfavoring hTTTTTT^{TG} is the factor mainly responsible for this K_d difference (Table 2B). If we now analyze the results obtained for equivalent dTATATA^{TG} and dTTTTTT^{TG} duplexes using NMR and UV thermal denaturation experiments, the differences are substantially larger. The intercalation dissociation constant estimated by NMR spectroscopy for dTTTTTT^{TG} using the slowly exchanging free and bound aromatic DNA resonances is $\sim 3 \times 10^{-4}$ M, higher relative to dTATATA^{TG} (Figure S1, Supporting Information), and approximately 10 000-fold higher than the K_d measured by SPR for hTTTTTT^{TG} (Table 2A). A large difference between dTATATA^{TG} and dTTTTTT^{TG} is also reflected in the UV thermal stabilizations induced by elinafide binding to these duplexes. The ΔT_m value is 6 °C for dTATATA^{TG}, the highest within the TGCA series, but becomes negligible for dTTTTTT^{TG}. This would translate into at least a 10 000-fold difference between the dTATATA^{TG}– and dTTTTTT^{TG}–elinafide binding affinities calculated from the ΔT_m values (Table S1, Supporting Information).

The apparent discrepancies in the K_d values determined by SPR experiments and UV thermal and NMR experiments are explained by the fact that the two sets of techniques detect two different phases of the interaction: high affinity binding to the double-helical stems and lower affinity (in some sequences) naphthalimide bisintercalation. SPR primarily detects the first process, because this technique is insensitive to the interaction mode and measures changes in the refractive index of the surface as a consequence of the initial elinafide binding to the groove. NMR spectroscopy (and probably UV thermal experiments as well) predominantly detect ring intercalation: the DNA chemical shifts mainly change upon naphthalimide stacking (see Figure 3 and Figures S1 and S3, Supporting Information), and ring intercalation increases the melting temperature of most sequences because the stacking of the naphthalimide system is more stable in a double-helical environment relative to a single-stranded one, as is often the case for intercalative drugs.²⁵ These conclusions are supported by the fact that, relative to elinafide, the bisfuronaphthalimide MCI3335, containing tetracyclic rather than tricyclic rings, gives rise to very stable NMR intercalation complexes with considerably higher UV ΔT_m values (14 °C; González-Bulnes and Gallego, unpublished results) yet similar 5×10^{-9} M K_d 's determined by SPR.¹⁴

A comparison of the rest of the complexes confirms that the sequences flanking the TGCA and AGCT binding sites have a large impact on ΔT_m values (Table 1 and Table S1, Supporting Information). The most important factor governing the ΔT_m 's

appears to be the formation of an A-tract of at least four nucleotides on the 3' side of TGCA (as in dTTTTTT^{TG} and dTTATTT^{TG}). If this condition is fulfilled, then ΔT_m becomes very low. Even changes in one flanking nucleotide can cause drops of 3 °C in ΔT_m if they are conducive to the formation of this four-nucleotide tract (compare dTTATAT^{TG} and dTTATTT^{TG} in Table 1). The effect of the flanking A-tracts also depends on their orientation with respect to the binding site. When the A-tract is on the 3' side of the GC site (as in dTTTTTT^{TG} and dTTATTT^{TG}) the deleterious effects on affinity are much stronger than for complexes with A-tracts neighboring the 5' side of the GC site (as in dAAAAAA^{AG}) (Table 1).

A particularly interesting question concerns the molecular mechanism of A-tract indirect discrimination, because this is relevant to the sequence-specific binding of other small molecules and proteins to DNA. The stacking contacts between the naphthalimide rings and the adjacent T7·A10 and A7·T10 pairs are weaker in the dTTTTTT^{TG} and dAAAAAA^{AG} complexes flanked by A-tracts, respectively, relative to complexes flanked by alternating AT pairs such as dTATATA^{TG} and dTTATAT^{AG}. In addition, the A-tract conformation of the flanking pairs is interrupted at the dTTTTTT^{TG} T6·A11–T7·A10 and dAAAAAA^{AG} A6·T11–A7·T10 steps (Figure 3 and Figure S3, Supporting Information). The base-pair opening rate of the T7·A10 pair is anomalously fast in dTTTTTT^{TG}, significantly faster relative to the same pair in dTATATA^{TG} (Table 3 and Figure 5B). Increased broadening is also observed for the nonexchangeable resonances of the 7·10 pair in dTTTTTT^{TG} and dAAAAAA^{AG} relative to dTATATA^{TG} and dTTATAT^{AG} (Figure 3 and Figure S3, Supporting Information). Together with the unusual, nonsequential NOEs detected for the T7 methyl group of dTTTTTT^{TG}, these data suggest that T7 frequently adopts an opened (extrahelical) location in this complex.

The weaker intra- and intermolecular stacking contacts observed in dTTTTTT^{TG} and dAAAAAA^{AG} are consistent with the lower ΔH value measured by SPR for the hTTTTTT^{TG} hairpin relative to hATATA^{TG} and hTA^{TG} and are probably the basis for flanking A-tract discrimination by elinafide, highlighting the importance of stacking interactions for DNA stability. There are NMR and X-ray structures of A-tracts located on both the 3' side of unbound GC steps (as in dTTTTTT^{TG}) and the 5' side (as in dAAAAAA^{AG}).^{26,28–31} A-tracts contain separate stacks of negatively inclined and maximally overlapped adenine and thymine bases that are accommodated at the T_nG and A_nG junctions through base-pair buckling. In addition, the helix axis bends toward the major groove via positive roll angles at these junctions, which are precisely the steps where the naphthalimides rings of elinafide need to intercalate. In dTTTTTT^{TG}, the naphthalimide rings try to stack between G8 and the A10 base of the *opposite* strand (Figure 4), but this leads to loss of stacking contacts between T7·A10 and the adjacent A-tract (Figure 3) and to very fast T7·A10 opening rates (Figure 5B). Better A_n–A7 and A7–naphthalimide–guanine *intrastrand* stacking

interactions probably explain the smaller deleterious effect of the A-tract located on the 5' side of the dAAAAAA^{AG} GC binding site (Figure 3 and Figure S3, Supporting Information). In either case, the elinafide rings need to disrupt a stable structure with slow base-pair opening rates in order to bisintercalate at the A-tract–GC junctions. Since the intercalation dissociation rates are not particularly sensitive to the flanking sequences (Table 1),²⁰ the ring association rate appears as a likely important factor modulating the efficiency of naphthalimide intercalation, at least in TGCA sites (Table 2A).

Superposed with the DNA duplex-binding and ring intercalation processes described above is a third, unusual dynamic process that adds further complexity to the DNA–elinafide interaction. The naphthalimide rings exchange via 180° rotating motions between two equivalent intercalated states in all complexes. This process occurs at rates (13–32 s⁻¹) significantly faster than intercalation dissociation rates (Table 1)²⁰ and much faster than DNA–ligand dissociation rates (Table 2A) and is also modulated by the sequence of the flanking base pairs (Table 1). Sequences containing flanking A-tracts give rise to less stable complexes, enhanced DNA dynamics, and faster naphthalimide ring rotation rates. The correlation between ΔT_m and ring rotation rates is not always applicable (e.g., dTATATA^{TG} can exhibit low k_{rot} 's and ΔT_m 's, Table 4), indicating that intrinsic factors related to DNA dynamics or stability are involved in the mechanism of naphthalimide ring flipping, as proposed previously.²⁰ In fact, the rates of intercalated ring rotation are in the same range as the opening rates of the central G8•C9

pairs of dTATATA^{TG}, dTTTTTT^{TG}, and dTTATAT^{AG} (Tables 1 and 3), suggesting that both processes may be coupled.

The findings described in this paper may have pharmacological implications. The small and electronically flawed structure of the naphthalimide rings of elinafide translates into very fast opening rates of the outer A•T pairs of TGCA and AGCT binding sites together with ring flipping dynamics. In addition, the intercalation of the drug rings is unstable in sites flanked by A-tracts. The conformational fluctuations of the DNA (probably associated with pyrimidine unstacking) or the transient presence of one or two hydrophobic rings of the drug in the major groove may be an advantage for antitumor drug design if they are recognized by effector proteins or enzymes acting on DNA. Further work will be needed to test this hypothesis.

Acknowledgment. This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Ramón y Cajal contract and Grant SAF2007-60243 to J.G.) and the CIPF. We thank Lorena Pérez for excellent technical assistance and Federico Gago for critical reading of the manuscript.

Supporting Information Available: dTATATA^{TG} and dTTTTTT^{TG} NMR spectroscopy titrations, hTA^{TG} and hATATA^{TG} SPR experiments, dTTATAT^{AG} and dAAAAAA^{AG} NOESY spectra, dTTATAT^{TG}, dTTTTTT^{TG}, dTTATAT^{AG}, and dAAAAAA^{AG} Eyring plots, and UV-determined DNA–elinafide dissociation constants. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA901505P

Analysis of Mixed DNA–Bisnaphthalimide Interactions Involving Groove Association and Intercalation with Surface–Based and Solution Methodologies

Luis González-Bulnes, José Gallego

Instituto de Investigación Viña Giner, Universidad Católica de Valencia, C/Quevedo 2, 46001 Valencia, Spain

Received 9 March 2012; revised 18 June 2012; accepted 19 June 2012

Published online 27 June 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22114

ABSTRACT:

The bisnaphthalimide cytotoxic agent elinafide exhibits a mixed DNA binding mode including groove-association and intercalation. We have compared the interaction of elinafide and two bisnaphthalimide analogues with various natural and modified DNA sequences using solution NMR and UV-melting methods and surface plasmon resonance (SPR) experiments at different pH conditions. The combined data obtained with these techniques established a high-affinity binding mode comprising intercalation and strong electrostatic contacts with guanine bases in the major groove, and a weaker interaction with A · T pairs likely involving groove association. However, the SPR binding constants and the NMR and UV-melting binding parameters responded differently to variations in DNA bases and ligand intercalating moieties. The rates and equilibrium constants determined by SPR clearly responded to changes in pH and DNA groove composition, but were rather insensitive to alterations in drug rings and DNA bases affecting the intercalation process. Conversely, the intermolecular stacking interactions detected by NMR and the ligand-induced thermal stabilizations measured by UV depended on both sets of factors and were

controlled by the sequence-dependent properties of the DNA helices, indicating that these data were modulated by naphthalimide stacking in addition to groove association. A two-step binding process where a groove-bound state is required prior to intercalation is proposed as an explanation for these observations. These findings may be useful for studying other classes of DNA- and RNA-binding drugs, which frequently combine groove-binding and stacking moieties. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 97: 974–987, 2012.

Keywords: DNA; bisnaphthalimide; intercalation; groove binding; SPR; NMR; UV melting; ITC

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at biopolymers@wiley.com

INTRODUCTION

The bisnaphthalimide cytotoxic drugs contain two naphthalimide rings joined together by a flexible aminoalkyl chain (Figure 1) and have unique DNA-binding properties^{1–3} and strong antitumor activity.^{4–7} The lead compound, elinafide, exhibits a mixed binding mode: while the aminoalkyl linker binds to preferred GpC steps via favorable electrostatic contacts between its amino groups and the O6/N7 atoms of G in the major groove, the two naphthalimide rings sandwich these dinucleotides by bisintercalation,^{2,8} as depicted schematically in Figure 2. By studying the indirect effect of flanking sequences not making direct contacts with the drug, we previously detected two superposed processes associated to the

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: José Gallego; e-mail: jose.gallego@ucv.es

Contract grant sponsor: Universidad Católica de Valencia

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

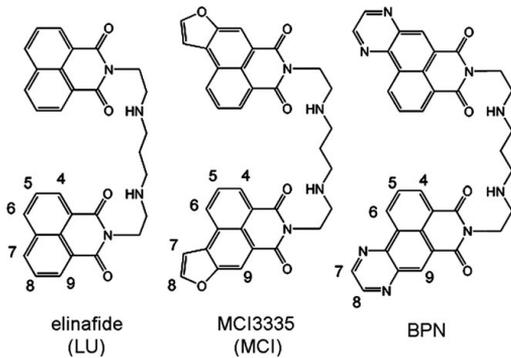
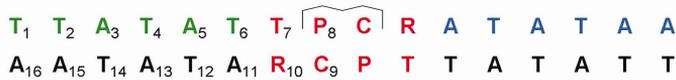


FIGURE 1 Chemical structure of the bisnaphthalimides elinafide (LU), MCI3335 (MCI), and BPN.

interaction between elinafide and DNA. One process involved ligand binding to the DNA duplex with nanomolar dissociation constants and slow dissociation rates, and the second process was intercalation of the naphthalimide rings, which occurred with faster dissociation rates.⁸ Here we have assessed the effect of changing the structure of the intercalating moiety and varying the composition of the DNA binding site by comparing the association of elinafide and two analogues containing furonaphthalimide and pyrazinonaphthalimide rings to various natural and modified DNA sequences at different pH conditions. These interactions were studied by techniques commonly utilized to analyze DNA-drug complexes: surface plasmon resonance (SPR) experiments and solution NMR spectroscopy, UV-melting, and isothermal titration calorimetry (ITC) methods. A comparative analysis of the set of bisnaphthalimide interactions and conditions

dTGCA (P=G; R=A):



dTICA (P=I; R=A) dTGCD (P=G; R=D)

dTGCA_a (TATATA, TATATA) dTGCA_c (TTTTTT, AAAAAA)

hTGCA (P=G; R=A):



hTICA (P=I; R=A) hTGCD (P=G; R=D)

hTGCA_c (TTTTT, AAAAA)

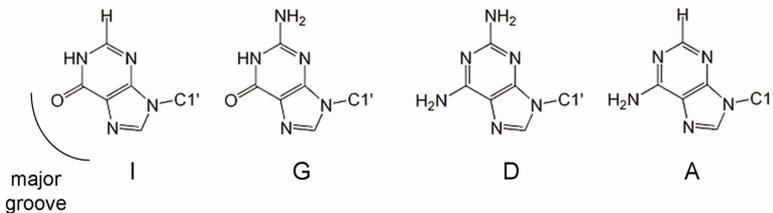


FIGURE 2 DNA sequences and purine bases analyzed in this study. Top: Natural and modified 16 base-pair self-complementary duplexes and 32-nucleotide 5'-biotinylated hairpins. The duplexes were utilized for solution NMR, UV-melting, and ITC experiments, whereas the hairpins were employed for SPR measurements. A naphthalimide ligand bisintercalated in the TPCR tetranucleotide sites is represented schematically. Bottom: Chemical structure of modified bases inosine (I) and 2,6-diaminopurine (D) compared with that of guanine and adenine, respectively.

indicated that while the SPR results mainly depended on pH and DNA groove composition, the NMR and UV-melting data were additionally dominated by naphthalimide ring stacking interactions.

RESULTS

NMR Spectroscopy

Two-dimensional NOESY experiments were used to determine the preferred binding site as well as the binding mode and intercalation stability of the bisnaphthalimide ligands. All complexes were previously prepared by NMR-monitored titration, starting from 0.2 to 0.8 mM free DNA duplex and adding drug from concentrated stocks while examining the slowly exchanging free and bound aromatic DNA resonances. The process stopped when no further changes were observed, i.e. the preferred binding site in each duplex was fully populated by the drug via bisintercalation² (see scheme in Figure 2). The ligand:duplex equivalent ratios required for each NMR titration are specified in Table I.

We first assessed the effect of aromatic moiety composition by comparing the interaction of a double-helix containing a standard TGCA binding site (dTGCA; Figure 2) with three bisnaphthalimide ligands having different naphthalimide (elinafide, designated LU), furonaphthalimide (MCI3335; named MCI)⁷ and pyrazinonaphthalimide (BPN)³ rings but the same diazanylene linker (Figure 1). Analysis of the MCI and BPN complexes established bisintercalation of both ligands into the TGCA tetranucleotide site from the major groove, as observed for elinafide.^{2,8,9} In the dTGCA-MCI complex, this was demonstrated by NOE crosspeaks between MCI H4 and T7 H1', H2', and H2'' (crosspeak i, Figure 3A), MCI H4 and G8 H1' (j), MCI H5 and T7 H1' (k), MCI H5 and G8 H1' (l), MCI H5 and A10 H2 (m), MCI H6 and A10 H2 (n), and MCI H9 and C9 H5 (r). Similar NOEs were detected in the dTGCA-BPN complex between BPN H4 and T7 H1', H2' and H2'' (crosspeak h, Figure 3B), BPN H5 and T7 H1' (i), BPN H5 and G8 H1' (j), BPN H5 and A10 H2 (k), BPN H6 and A10 H2 (l), and BPN H9 and C9 H5 (p). The NMR experiments also showed that, as predicted previously,¹⁰ the larger aromatic rings of MCI and BPN overlap more base-pair surface than elinafide: in addition to the previous interactions, NOEs between MCI H7 and A10 H2 (crosspeak o, Figure 3A) and between MCI H8 and C9 H1', H2' and H2'' (p) indicated that the furan ring of MCI stacks between the C9 and A10 bases, and a similar location for the pyrazine ring of BPN was demonstrated by NOEs between BPN H7 and C9 H1' (crosspeak m, Figure 3B), BPN H7 and A10 H1' (n), and BPN H8 and C9 H1', H2'

Table I Effect of Intercalating Moiety Structure, DNA Base Composition, and pH on DNA-Bisnaphthalimide Interaction Parameters Measured by Solution UV Thermal Denaturation and NMR Spectroscopy Experiments

Complex	pH	T_m^o ^a (°C)	$T_m^{a,b}$ (°C)	ΔT_m^b (°C)	k_{rot}^{NMR} (s ⁻¹)
dTGCA-LU	6.9	46	52	6	15 ± 1
dTGCA-MCI	6.9	46	59	13	0
dTGCA-BPN	6.9	46	55	9	0
dTICA-LU	6.9	n.d. ^c	50	n.d. ^c	13 ± 1
dTGCD-LU	6.9	51	54	4	>>100
dTGCA _a -LU	6.9	48	54	6	12 ± 1
dTGCA _c -LU	6.9	54	55	1	24 ± 5
dTGCA _b -LU	8.8	47	48	1	23 ± 4
dTGCA _c -LU	8.8	55	54	-1	58 ± 9

UV melting temperatures of free DNA duplexes (T_m^o) and DNA-ligand complexes (T_m), ligand-induced thermal stabilizations ($\Delta T_m = T_m - T_m^o$), and NMR-determined naphthalimide ring rotation rates at 25°C (k_{rot}^{NMR}). The data correspond to the complexes of elinafide, MCI, and BPN with natural (dTGCA, dTGCA_a, and dTGCA_c) and modified (dTICA and dTGCD) duplexes at pH 6.9 or 8.8.

^a The thermal denaturation experiments were repeated at least two times for each system and condition. The average standard error for T_m^o and T_m values was 1°C.

^b Measured at bisnaphthalimide:duplex equivalent ratios required by the NMR titrations for full population of the preferred tetranucleotide sites by bisintercalation: dTGCA-LU, 1.4:1; dTGCA-MCI, 2.1:1; dTGCA-BPN, 2.6:1; dTICA-LU, 1.8:1; dTGCD-LU, 2.2:1; dTGCA_a-LU, 1.1:1; dTGCA_c-LU, 2.5:1.

^c ΔT_m of this complex was not determined because free dTICA exhibited a broad transition at low temperature that impeded determination of an exact T_m^o value.

and H2'' (o). The intercalation complexes of MCI and BPN are more stable than that of elinafide: in addition to the extended stacking interactions, the ring rotation dynamics typically detected in DNA-elinafide intercalation systems^{2,8,9} were not observed in these complexes. This was demonstrated by the absence of exchange crosspeaks between equivalent naphthalimide proton resonances (Figure 3). NMR-supported models of the TGCA intercalation complexes of MCI and BPN are compared with the TGCA-elinafide 1CX3 PDB structure² in Figure S1 (Supporting Information).

We next studied the effect of DNA base composition by comparing the interaction between the parent compound elinafide and two DNA helices where the G and A bases of the TGCA site were substituted with inosine (I) and 2,6-diaminopurine (D), respectively (Figure 2). The naphthalimide rings of elinafide stack between the TGCA G and A purine bases^{2,8} (Supporting Information Figure S1). Since G and I have the same groups facing the major groove and the same is true for A and D (Figure 2), these modifications were expected to modulate the DNA-drug stacking interactions without directly influencing the binding of the aminoalkyl linker to the groove.

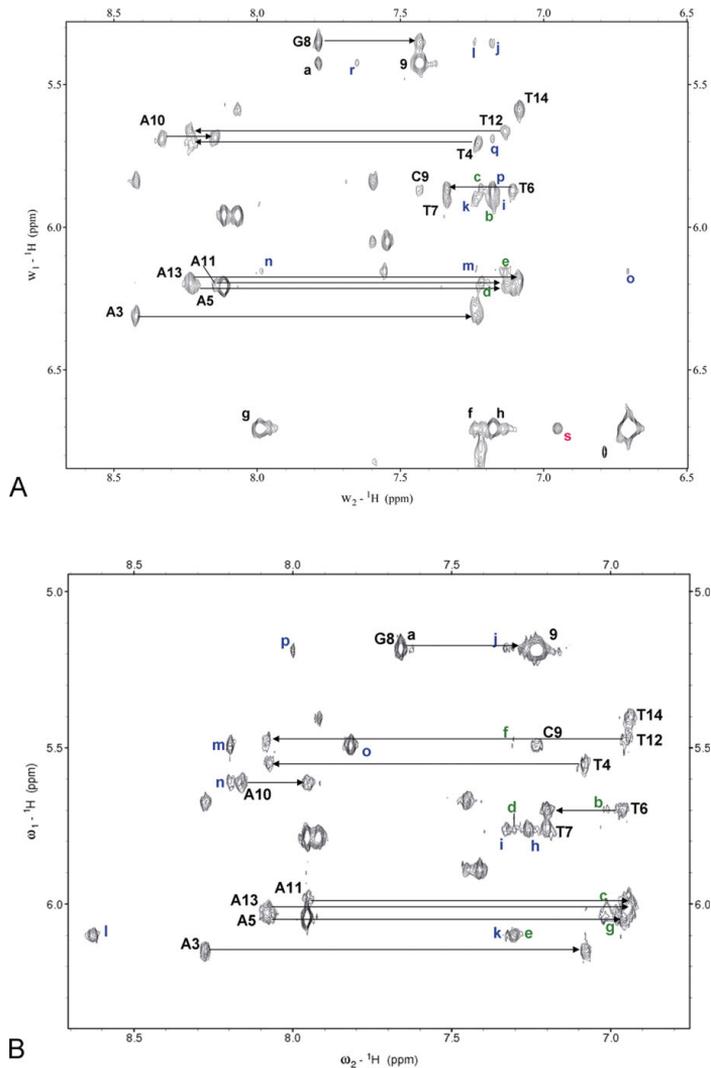


FIGURE 3 NMR spectra of the complexes of dTGCA with the bisnaphthalimides MCI and BPN. Assignment of the aromatic and H1' NOESY regions (250 ms mixing time, 25°C) of dTGCA-MCI (A) and dTGCA-BPN (B). DNA intraresidue H1'-H6/H8 crosspeaks are labeled with residue name and number, intraresidue H5-H6 crosspeaks are labeled with residue number, and sequential NOE connectivities are indicated with horizontal arrows. These connectivities are weaker or non-detectable for the T7 · A10 · G8 · C9 steps due to naphthalimide ring intercalation. In (A), intramolecular crosspeaks (a) to (j) are assigned as follows: a, G8 H8-C9 H5; b, A3 H2-A15 H1'; c, A5 H2-T6 H1'; d, A5 H2-A13 H1'; e, A11 H2-A10 H2; f, MCI H5-H7; g, MCI H6-H7; h, MCI H8-H7. The blue-labeled (i)-(r) crosspeaks are intermolecular: i, MCI H4-T7 H1'; j, MCI H4-G8 H1'; k, MCI H5-T7 H1'; l, MCI H5-G8 H1'; m, MCI H5-A10 H2; n, MCI H6-A10 H2; o, MCI H7-A10 H2; p, MCI H8-C9 H1'; q, MCI H8-A10 H1'; r, MCI H9-C9 H5. The red-labeled (s) crosspeak is an exchange signal, confirmed by ROESY experiments: MCI H7 (free)-H7 (bound). In (B), intramolecular crosspeaks (a) to (g) are assigned as follows: a, G8 H8-C9 H5; b, A5 H2-T6 H1'; c, A5 H2-A13 H1'; d, A11 H2-T7 H1'; e, A11 H2-A10 H2; f, A11 H2-T12 H1'; g, A13 H2-A5 H1'. The blue-labeled (h)-(p) crosspeaks are intermolecular: h, BPN H4-T7 H1'; i, BPN H5-T7 H1'; j, BPN H5-G8 H1'; k, BPN H5-A10 H2; l, BPN H6-A10 H2; m, BPN H7-C9 H1'; n, BPN H7-A10 H1'; o, BPN H8-C9 H1'; p, BPN H9-C9 H5. In both spectra, the NOEs between adenine H2s and H1' protons are green-labeled, and the assignments of the terminal 1 · 16 and 2 · 15 base pairs have been omitted for clarity.

Table II Effect of Intercalating Moiety Structure, DNA Base Composition, and pH on DNA-Bisnaphthalimide Interaction Parameters Measured by SPR Experiments

Complex ^{a,b}	pH	K_d ($M \cdot 10^9$)	k_a ($M^{-1} s^{-1} \cdot 10^{-6}$)	k_d ($s^{-1} \cdot 10^2$)	k_d/k_a ($M \cdot 10^9$)	s^c	n^c
hTGCA-LU	6.3	4.7 ± 1.1 (245.6 ± 55.2)	1.9 ± 1.0	1.0 ± 0.1	5.9 ± 2.8	2	0.9 ± 0.1 (2.3 ± 0.1)
hTGCA-MCI	6.3	2.3 ± 0.5 (226.9 ± 71.2)	1.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.7 ± 0.6	2	0.8 ± 0.1 (3.1 ± 0.2)
hTGCA-BPN	6.3	1.9 ± 0.8 (96.0 ± 56.7)	1.6 ± 1.1	0.5 ± 0.02	3.9 ± 2.6	2	0.9 ± 0.4 (3.3 ± 0.3)
hTICA-LU	6.3	9.4 ± 1.2 (250.4 ± 14.0)	1.6 ± 0.5	1.1 ± 0.1	7.1 ± 1.8	2	1.0 ± 0.3 (2.9 ± 0.2)
hTGCD-LU	6.3	7.8 ± 2.0 (148.5 ± 61.2)	3.6 ± 0.5	1.3 ± 0.8	3.5 ± 1.8	2	1.0 ± 0.04 (2.6 ± 0.03)
hTGCA _c -LU	6.3	22.1 ± 2.0 (487.4 ± 121.8)	1.4 ± 0.8	2.7 ± 1.3	20.9 ± 3.5	2	0.9 ± 0.1 (1.5 ± 0.2)
hTGCA-LU	8.8	121.1 ± 86.0 (2192.0 ± 500.0)	0.7 ± 0.2	7.1 ± 0.9	112.2 ± 44.8	2	1.0 ± 0.5 (4.6 ± 0.5)
hTGCA _c -LU	8.8	2943.0 ± 160.0	0.4 ± 0.1	14.8 ± 1.7	351.3 ± 19.7	1	4.0 ± 0.1

Equilibrium dissociation constants (K_d), association rates (k_a), dissociation rates (k_d), binding sites (s), and stoichiometries (n) for the interaction of elinafide, MCI, and BPN with natural (hTGCA and hTGCA_c) and modified (hTICA and hTGCD) DNA hairpins at 25 °C and pH 6.3 or 8.8.

^a All SPR experiments were repeated at least two times for each system and condition, and the table shows the standard deviation of the K_d , k_a , k_d , and n parameters. The K_d , k_a , k_d , and n standard fit errors of individual experiments were generally smaller.

^b The binding of bisnaphthalimide ligands to all DNA hairpins except hTGCA_c was best described using a two-site binding affinity model ($s = 2$). The equilibrium dissociation constant and the number of ligand molecules associated to the lower affinity site are shown in parenthesis.

^c s indicates the number of binding sites per hairpin, and n the number of elinafide molecules binding to each site.

In the dTICA-elinafide complex the naphthalimide resonances were slightly broadened, but the NMR data clearly established bisintercalation into the TICA tetranucleotide from the major groove, as observed in a standard TGCA site. This was demonstrated by NOEs between LU H5 and T7 H1' (crosspeak h, Supporting Information Figure S2A), LU H5 and I8 H1' (i), LU H5 and I8 H2, LU H6 and I8 H2, and LU H9 and C9 H5 (j). In addition, slow-exchange crosspeaks between symmetric and intercalated naphthalimide resonances (crosspeaks k and l, Figure S2A) were detected in ROESY and short-mixing time (<12 ms) NOESY experiments, indicating that the elinafide rings underwent 180° rotating motions in this complex as observed in TGCA and other natural sites.^{2,8,9} This dynamic effect was more pronounced in the dTGCD-elinafide system. In this case, NOEs between the aminoalkyl linker protons of elinafide and the methyl group of T7 (data not shown) together with weaker or nondetectable T7-G8 and C9-D10 sequential interactions (Supporting Information Figure S2B) demonstrated elinafide intercalation into the T7·D10-G8·C9 steps from the major groove. However, three broad naphthalimide aromatic proton resonances were detected instead of the six signals expected in any DNA-elinafide intercalated complex (either in slow exchange due to ring rotation or not undergoing any dynamic process); these resonances did not exhibit any intermolecular NOEs with the DNA protons (Figure S2B). These data point towards an abnormally fast ring rotation process where the naphthalimide lines are likely above coalescence, and indicate decreased intercalation stability relative to the dTGCA and dTICA complexes (Table I).

In addition to the bases forming the tetranucleotide binding site, we previously demonstrated that the sequence of flanking bases not making direct contact with the drug also had a significant effect on DNA-elinafide interactions.⁸ In agreement with those observations, the TGCA-elinafide complex flanked by two A-tracts (dTGCA_c; Figure 2) exhibited faster naphthalimide ring dynamics relative to the two TGCA-elinafide complexes flanked by mostly alternating A·T pairs, dTGCA and dTGCA_a (Table I and Ref. 8). These increased dynamics detected in the TGCA-elinafide complex flanked by A-tracts were formerly observed to be accompanied by changes in the intensity of intermolecular NOE stacking contacts, which were substantially weaker relative to complexes flanked by alternating A·T pairs.⁸

Surface Plasmon Resonance

This technique was used to obtain quantitative values of equilibrium dissociation constants, association and dissociation rates, binding sites and stoichiometries for the interaction of elinafide, MCI and BPN with four DNA hairpins (Figure 2 and Table II). In all experiments, similar quantities of biotinylated hairpin (~300 RUs) were immobilized on the SPR chips, and the ligands were injected at concentrations ranging from 0.1 to 500 nM at neutral pH (Figure 4).

As with NMR spectroscopy, we first used this methodology to compare the interaction of elinafide, MCI and BPN with a DNA hairpin containing a standard TGCA binding site (hTGCA; Figure 2). In all cases, the best fits for the steady-state (equilibrium) binding curves were obtained with

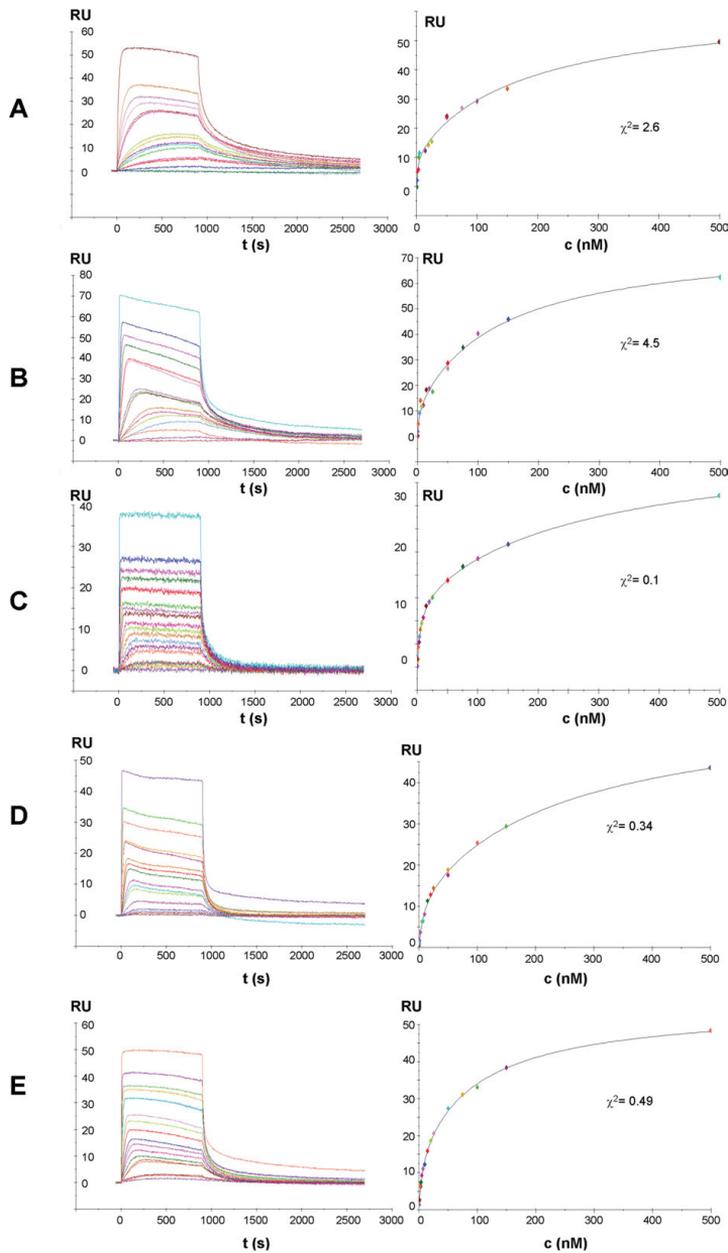


FIGURE 4 SPR analysis of the interaction between DNA hairpins and bisnaphthalimides. SPR sensorgrams (left) and steady-state equilibrium binding curves (right) for the hTGCA-MCI (A), hTGCA-BPN (B), hTGCA-elinafide (C), hTICA-elinafide (D), and hTGCD-elinafide (E) interactions. These measurements were carried out at 25°C and pH 6.3. The plotted ligand concentrations are color-coded and range from 0.1 (lowest curve) to 500 nM (highest curve). Similar quantities of DNA hairpin (~300 RUs) were immobilized on the SPR chips. In all of these cases, the best fits (χ^2 values are indicated on the curves) were obtained with a two-site binding function.

a two-site binding function, which indicated binding of one ligand molecule to a high affinity site followed by association of two or three more molecules to a lower affinity site (Figure 4 and Table II). This two-site binding process had already been observed for the interaction of elinafide with hairpins containing TGCA tetranucleotides flanked by sufficiently long and alternating A·T sequences.⁸ It is also consistent with the NMR spectroscopy results for dTGCA, which clearly established that TGCA is the high affinity site, and the two flanking A·T tracts form the lower affinity site (this was indicated by a slight broadening of some of these nucleotide resonances at the ligand:duplex ratios employed by the NMR experiments) (Figure 3). All three SPR steady-state curves (Figures 4A–4C) comprised a TGCA-binding event with 1:1 stoichiometry and very low and rather similar equilibrium dissociation constants for the three ligands (between 2 and 5 nM), together with a second binding event with dissociation constants ranging from 96 to 246 nM and involving the association of two or three molecules (Table II). This lower affinity site is likely formed by the flanking A·T tracts and T₄ loop of the hTGCA hairpin (Figure 2).

When the association of elinafide with hTICA and hTGCD hairpins (Figure 2) was compared using SPR experiments (Table II and Figures 4D and 4E), the best steady-state fits were again obtained with the two-site binding model employed for hTGCA, indicating binding of one elinafide molecule to the high affinity TICA or TGCD sites (as established by the NMR data) followed by association of three more molecules to a lower affinity site formed by the flanking A·T tracts and T₄ loop (Table II). Both steady-state curves (Figures 4D and 4E) comprised high-affinity, TICA- and TGCD-binding events with 1:1 stoichiometry and approximately similar equilibrium dissociation constants (9 and 8 nM for TICA and TGCD, respectively). These constants are comparable to those determined for the interaction of hTGCA with elinafide, MCI and BPN (Table II).

We also utilized SPR to assess the effect on elinafide binding parameters of flanking bases that are not part of the high-affinity TGCA tetranucleotide making direct contact with the drug. As reported previously, the SPR experiments detected a moderate increase in the high-affinity elinafide equilibrium dissociation constant for the hTGCA_c hairpin containing a TGCA site flanked by A-tracts (22 nM), relative to the hTGCA hairpin flanked by alternating A·T pairs (5 nM) (Ref. 8 and Table II).

UV-Thermal Denaturation

Assuming that binding to single strands is not significant, the increase in DNA duplex melting temperature induced by

ligand binding has been shown to be proportional to the affinity of the duplex-ligand interactions at the melting temperature of the complex.^{11,12} We used UV-melting experiments to measure thermal stabilizations induced by bisnaphthalimide binding, and perform a comparison of the duplex-ligand complexes studied by NMR spectroscopy using this parameter. To obtain thermal stabilization values ($\Delta T_m = T_m - T_m^0$), we plotted ΔT_m against increasing bisnaphthalimide:duplex ratios, starting from 2 μM free DNA duplex (with T_m^0 melting temperature) and progressively adding drug until obtaining a saturating 6:1 ratio. In most cases, the ΔT_m curves approximately reached a plateau at the bisnaphthalimide:duplex ratios found by NMR spectroscopy to be required for bisintercalation at the high-affinity site (Figure 5). Therefore, the ΔT_m values compared below and specified in Table I are those obtained at these NMR bisnaphthalimide:duplex ratios, i.e. in conditions favoring full occupation of the preferred TPCR (P = G or I, R = A or D) tetranucleotide sites by bisintercalation (Figure 2).

If we first compare the interaction of elinafide, MCI, and BPN with the dTGCA duplex containing a standard TGCA binding site, the thermal stabilizations induced by MCI and BPN bisintercalation (13 and 9°C, respectively) are both significantly greater than that observed upon elinafide bisintercalation (6°C) (Figure 5 and Table I). The effect of elinafide association to dTICA and dTGCD duplexes containing modified bases was also studied using UV melting experiments. The thermal instability of the free dTICA duplex prevented us from analyzing this complex, but the thermal stabilization induced by elinafide binding to dTGCD (4°C) was smaller than the T_m increment observed for the standard dTGCA duplex (Figure 5 and Table I).

As reported previously, the UV-melting experiments also detected an important difference in the magnitude of the thermal stabilization induced by elinafide association to duplexes containing different sequences flanking the high-affinity TGCA tetranucleotide. In contrast to the ΔT_m values measured in dTGCA and dTGCA_a duplexes having a TGCA site flanked by mostly alternating A·T pairs (6°C in both cases), elinafide did not significantly stabilize the dTGCA_c duplex containing flanking A-tracts at any ligand:duplex ratio (Figure 5, Table I and Ref. 8).

Isothermal Titration Calorimetry

Since both NMR spectroscopy and UV-melting experiments detected significant differences between TGCA-elinafide complexes flanked by alternating A·T pairs and continuous A-tracts, we used this methodology to determine the enthalpy (ΔH) of elinafide binding to the dTGCA_a and dTGCA_c

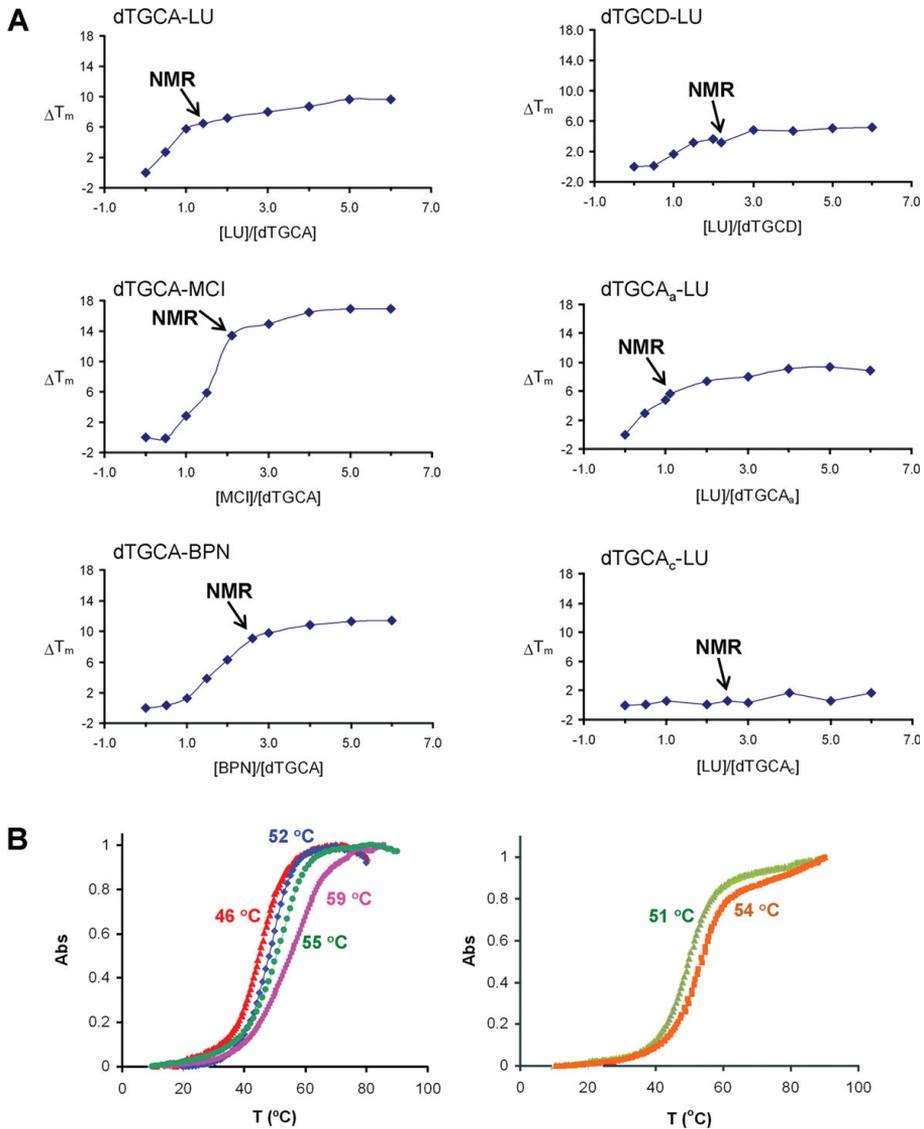


FIGURE 5 UV-melting analysis of the interaction between DNA duplexes and bisnaphthalimides. **A:** Plots of ligand-induced thermal stabilizations ($\Delta T_m = T_m - T_m^p$) against bisnaphthalimide:duplex ratios. Starting from $2 \mu\text{M}$ free DNA duplex (with T_m^p melting temperature, $\Delta T_m = 0$), the bisnaphthalimide:duplex ratios increase until a saturating 6:1 value. In most complexes, the ΔT_m curves approximately reach a plateau at the bisnaphthalimide:duplex ratios found by NMR spectroscopy to be required for full population of the high-affinity site by bisintercalation (indicated with black arrows). **B:** Left, representative UV melting curves of dTGCA in the absence (red) and presence of 1.4 equivalents of elinafide (blue), 2.1 equivalents of MCI (magenta), and 2.6 equivalents of BPN (green) (right), representative UV melting curves of dTGCD in the absence (light green) and presence (orange) of 2.2 equivalents of elinafide. All samples contained $2 \mu\text{M}$ DNA, and the complexes are at NMR bisnaphthalimide:duplex ratios. The absorbance values were normalized, and average T_m values ($^{\circ}\text{C}$) are indicated on the curves.

duplexes (Figure 2). ΔH for the dTGCA_c complex flanked by A-tracts, was significantly less negative than for dTGCA_a, flanked by alternating A·T pairs (0.0 versus -4.3 Kcal mol⁻¹; Figure 6). These ΔH values measured by ITC were in very good agreement with those previously determined from the dependence of the high-affinity site SPR equilibrium dissociation constants with temperature for the hTGCA_c and hTGCA hairpins (-1.4 ± 1.0 and -6.0 ± 2.4 Kcal mol⁻¹, respectively)⁸, and confirm the strong indirect effect exerted by flanking sequences on the TGCA-elinafide interaction.⁸

Effect of pH

So far, we have evaluated the effect of naphthalimide ring and DNA base composition on binding parameters measured by SPR, NMR, UV-melting, and ITC experiments at neutral pH. The three-dimensional structure of a TGCA-elinafide complex revealed strong hydrogen bonding and electrostatic interactions between the amino groups of the linker and the electronegative N7 and O6 groups of G in the major groove.² Subsequent work showed that these contacts were important for the sequence-specific recognition of DNA by elinafide, which preferentially binds GpC dinucleotides.^{8,9} In this report, the SPR and NMR data have clearly indicated that elinafide, MCI and BPN bind with high affinity to TGCA sites and with at least 50-fold lower affinity to secondary sites formed by A·T pairs (see Table II and Figure 3). A pH variation would modify the protonation state of the bisnaphthalimide compounds, modulating in this way the contacts between the diazanonylene linker and the guanine bases in the major groove and, likely, the groove-association component of the interaction. We therefore decided to assess the effect of a pH increment on the interaction of elinafide with dTGCA_a and dTGCA_c duplexes, and hTGCA and hTGCA_c hairpins.

At pH 9, the intercalated ring dynamics detected by NMR in the dTGCA_a-elinafide complex doubled their magnitude (Table I), and the thermal stabilization associated to drug binding was significantly reduced relative to the value measured at neutral pH (1 versus 6°C; Table I). In these basic conditions, the variations detected by NMR and UV experiments were accompanied by significantly augmented SPR-determined affinities. The high-affinity equilibrium dissociation constant for the hTGCA-elinafide interaction, for example, was 26-fold higher than the value determined at pH 6.3 (121 versus 5 nM). This was mainly caused by a 7-fold faster elinafide dissociation rate (Table II). In the dTGCA_c complex flanked by A-tracts, the intercalated ring dynamics detected by NMR likewise increased 2-fold at pH 9 (Table I), and the high-affinity equilibrium dissociation constant measured by

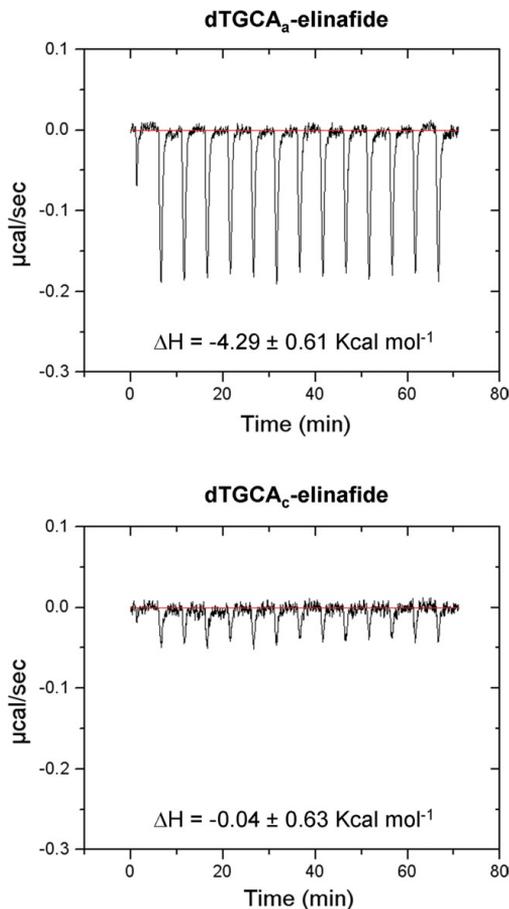


FIGURE 6 Representative raw ITC data for elinafide binding to dTGCA_a (top) and dTGCA_c (bottom) DNA duplexes at 25°C, reflecting the instrument response for each injection. These data were corrected for the dilution of elinafide prior to fitting. The resulting binding enthalpies (ΔH) are indicated on the thermograms.

SPR for hTGCA_c also augmented considerably relative to the value determined at pH 6.3, similarly due to a 5-fold faster ligand dissociation rate (Table II).

DISCUSSION

Using two-dimensional NMR spectroscopy experiments, we have determined the preferred binding sites of three bisnaphthalimide ligands in five DNA duplexes (Figures 1 and 2), and assessed their binding mode in these sites. In all cases, elinafide, MCI and BPN bisintercalated into the central

TPCR (P = G or I, R = A or D) tetranucleotide of the duplexes from the major groove, sandwiching the PpC step (GpC or IpC) between their naphthalimide rings (Figures 2, 3, Supporting Information S1 and S2).

All duplexes were previously titrated by examining the slowly exchanging free and bound aromatic DNA resonances with one-dimensional NMR experiments, adding drug until the preferred binding site was fully populated.

NOESY experiments allowed us to examine the extent and stability of the DNA-bisnaphthalimide stacking interactions in these TPCR sites (Table I and Figures 3, S1 and S2). Significant differences were found in this respect among the seven complexes studied. Increased stacking contacts and enhanced intercalation stability were observed in the complexes of dTGCA with MCI and BPN, containing larger furanophthalimide and pyrazinophthalimide intercalating rings, respectively, relative to the parent compound elinafide (Figures 3 and S1, Table I and Refs. 2 and 8). The stacking interactions in the dTICA-elinafide complex containing a modified IpC step were approximately similar to those observed in the natural dTGCA complex, but abnormally fast dynamics of the intercalated rings and no intermolecular stacking NOEs were detected in dTGCD-elinafide (see Figure S2 and $k_{\text{rot}}^{\text{NMR}}$ in Table I). The dTGCA_c-elinafide complex flanked by A-tracts also exhibited faster ring dynamics relative to the dTGCA- and dTGCA_a-elinafide complexes flanked by alternating A·T pairs (Table I and Ref. 8). As in the TGCD-elinafide interaction, these increased dynamics were accompanied by significantly weaker intermolecular NOE stacking contacts.⁸

In contrast to groove association, requiring little adaptation on the part of the DNA molecule, the intercalation process implies duplex unwinding and elongation and is expected to be significantly modulated by the base- and sequence-dependent properties of the DNA helix. These facts likely explain the drastic $k_{\text{rot}}^{\text{NMR}}$ increment observed when substituting the TGCA_as with Ds, in spite of D providing more surface area for naphthalimide stacking than A (Figure 2), as well as the increased ring dynamics and weaker DNA-ligand stacking contacts detected in the dTGCA_c-elinafide complex flanked by A-tracts. Intercalation of elinafide into the dTGCD and dTGCA_c sequences is likely opposed by these helices due to the disruption of intramolecular stacking interactions associated to drug intercalation and/or base-pair unwinding.⁸ In this respect, both the dTGCD and dTGCA_c free duplexes exhibit greater thermal stability than dTGCA or dTGCA_a (Table I). This tendency of the most stable duplexes being the worst sites for bisintercalation was also observed during a systematic analysis of the DNA-binding properties of chemical analogues of the bisintercalator sandramycin.¹³

Utilizing SPR experiments, we quantitatively analyzed the interaction between the same bisnaphthalimides and equivalent DNA hairpins (Figure 2). In most cases, the best fits for the steady-state binding curves (Figure 4) were obtained with a two-site binding function, which indicated binding of one ligand molecule to a high-affinity site followed by association of two or three more molecules to a lower affinity site (Table II). The NMR results clearly established that the high-affinity site accepting one ligand molecule is formed by the TPCR tetranucleotide contained in each of the DNA duplexes and hairpins, where the drug bisintercalates. The lower affinity site must be formed by the flanking A·T pairs and T₄ loop of the DNA hairpins. In solution, this was suggested by a slight broadening of some flanking A·T nucleotide resonances detected in the NMR spectra of several of the duplex complexes.

In contrast to the variations observed by NMR spectroscopy, the results compiled in Table II indicate that, for the set of bisnaphthalimides and sequences studied in this report, the high-affinity equilibrium K_{dS} determined by SPR were rather insensitive to changes in the intercalating moiety of the ligands or to variations in the composition or sequence of the bases flanking the preferred GpC steps (Table II). At neutral pH and as long as the two guanine O6 groups were present in the major groove, the high-affinity SPR equilibrium K_{dS} were always in the low nanomolar range no matter the size of the intercalating ring or the nature of the flanking bases. For example, the K_{dS} for the interaction of hTGCA with elinafide, MCI and BPN were between 2 and 5 nM, and the K_{dS} for the complexes of elinafide with hTGCD and hTGCA_c were 8 and 22 nM, respectively. The K_{d} for the interaction between elinafide and hTICA, also containing the required O6 groups in the IpC dinucleotide, was 9 nM (Figure 4 and Table II). A different laboratory also reported similar SPR equilibrium K_{dS} (between 5 and 22 nM) for the interaction of elinafide, MCI and BPN with (CG)₄ sequences (Refs. 3 and 7; C. Bailly, personal communication), providing further support to these observations. The SPR equilibrium dissociation constants did increase at least 50-fold when these O6 groups were not present in the groove, as in the flanking A·T pairs and T₄ loop of the hairpins (see second-site K_{dS} in Table II).

UV-melting experiments were also carried out to obtain duplex thermal stabilizations induced by ligand binding (ΔT_{m}) and compare the complexes studied by NMR spectroscopy using this parameter. Assuming that binding to single strands is not significant, the magnitude of ΔT_{m} depends on the affinity of all duplex-ligand interactions (including second site) at the melting temperature of each complex.^{11,12} Since in most complexes the plots of ΔT_{m} reached a plateau

at the bisnaphthalimide:duplex ratios found by NMR spectroscopy to be required for full population of the high-affinity TPCR sites (Figure 5 and Table I), the ΔT_m values specified in Table I and discussed below were measured in these NMR conditions.

The fact that the NMR and ΔT_m titrations paralleled each other in most complexes (Figure 5) indicates that bisnaphthalimide association to the TPCR tetranucleotides was responsible for most of the observed thermal stabilizations. This is not surprising: upon bisnaphthalimide binding to a high-affinity TGCA site, the amino-alkyl linker bridges G bases from opposite strands through important electrostatic interactions, and the ligand rings mostly stack between G and A, also located in opposite strands^{2,8} (see Supporting Information Figure S1). These two types of specific interstrand contacts will likely contribute to thermally stabilize the DNA duplexes by favoring a double-helical environment over a single-stranded one. Low-affinity binding to flanking A·T pairs also contributes to the ΔT_m s of some complexes, but this effect is comparatively smaller at NMR ratios (Figure 5).

The ΔT_m values were quite sensitive to changes in the nature of the intercalating moiety and to variations in the composition and sequence of the bases flanking the GpC steps. They followed the trend observed by NMR spectroscopy, with complexes having enhanced stacking contacts and/or stability giving rise to larger ΔT_m values, and vice-versa (Figure 5 and Table I). Thus, the complexes of dTGCA with MCI and BPN yielded significantly larger thermal stabilizations relative to elinafide, whereas the dTGCD-elinafide complex, with abnormally fast dynamics of the intercalated rings, exhibited a reduced ΔT_m relative to the natural dTGCA complex. No thermal stabilization was observed for the dTGCA_c-elinafide complex flanked by A-tracts at any ligand:duplex ratio (Figure 5 and Table I); this complex also had faster ring dynamics and weaker stacking interactions.⁸

It is also informative to examine the ΔT_m and NMR titrations shown in Figure 5. In spite of giving rise to increased stacking contacts and larger ΔT_m s upon binding to DNA, 2.1 and 2.6 equivalents of MCI and BPN, respectively, were required to titrate the dTGCA duplex, as opposed to 1.4 equivalents of elinafide (Figure 5 and Table I). If we now compare the elinafide systems, the dTGCA and dTGCA_a complexes, exhibiting enhanced intercalation stabilities and ΔT_m values, were titrated at ligand:duplex ratios close to 1 (1.4 and 1.1, respectively). In these conditions, ligand binding to the flanking, low-affinity sites is minimal (a maximum of ~10% for dTGCA_a), and this was confirmed by NMR spectroscopy. In contrast, dTGCD and dTGCA_c, with poorer stacking stabilities and ΔT_m s, required significantly higher ratios (2.2 and 2.5, respectively) (Figure 5 and Table I).

dTGCA_c is particularly significant in this respect, as no ligand binding to the flanking A-tracts was detected by NMR spectroscopy⁸ (the second site detected by SPR in hTGCA_c has lower affinity and stoichiometry relative to other complexes—see Table II—and is likely formed by the T₄ loop of the hairpin, which is absent in the duplex). These results suggest that, at the concentrations required by these NMR and UV solution techniques (significantly higher than those used for SPR), bisnaphthalimide self-association is probably significant. The increased stacking areas of the furonaphthalimide and pyrazinonaphthalimide analogues will likely favor self-association via stacking interactions and may explain the increased NMR and UV titration ratios observed for these ligands. Elinafide self-association is probably weaker, but may contribute to explain the increased ligand:duplex ratios required to titrate the stable (Table I) dTGCD and dTGCA_c duplexes, which likely oppose intercalation to minimize disruption of intramolecular DNA stacking interactions.⁸ These self-association effects were also found to be important when studying the binding of the bisintercalator WP631 to DNA with UV-melting techniques.¹⁴

Since the ΔT_m values depend on the affinity of the duplex-ligand interactions at the melting temperature of each complex, we determined the enthalpy of elinafide association to the dTGCA_c and dTGCA_a duplexes using ITC experiments (Figure 6). As explained above, elinafide binding to flanking A·T pairs was minimal or absent in these two complexes. While ΔH for dTGCA_a was $-4.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$, ΔH for dTGCA_c was close to zero. These values are in very good agreement with those previously determined from the dependence of the hTGCA and hTGCA_c high-affinity site SPR equilibrium dissociation constants with temperature.⁸ The negative ΔH measured for the dTGCA_a-elinafide interaction lies within the range of negative values normally observed for interactions between intercalating agents and DNA. In contrast, the close to zero ΔH of the dTGCA_c-elinafide complex is typical of groove-binding interactions, which are usually driven by entropy.¹⁵ This result is consistent with the weaker intermolecular stacking interactions⁸ and the absence of thermal stabilization upon ligand binding (Figure 5 and Table I) observed for this complex.

The important electrostatic contacts between the amino groups of the bisnaphthalimides' linker and the electronegative N7/O6 groups of G in the major groove² would be hampered by a pH increment decreasing the protonation of the linker amino groups. At pH 9, the intercalated ring dynamics detected in the complexes of elinafide with dTGCA_a and dTGCA_c doubled their magnitude (Table I), and the thermal stabilization induced by elinafide binding to dTGCA_a was drastically reduced (1 versus 6 °C at neutral pH). This indi-

cates that stable TGCA-elinafide bisintercalation is coupled to strong electrostatic contacts between the amino-alkyl linker and the Gs in the major groove. Interestingly, a significant increase in the high-affinity TGCA SPR equilibrium dissociation constants was also observed in these basic pH conditions. These constants augmented 26-fold relative to the values determined at pH 6.3, mainly due to considerably faster elinafide dissociation rates (Table II).

Altogether, the SPR and solution data compiled in this report clearly establish a high-affinity interaction of the bisnaphthalimide ligands with the TPCR sites involving groove-binding and bisintercalation, and a weaker interaction with sites formed by A·T pairs through groove association. The results obtained with all methods also indicate that strong electrostatic contacts between the amino-alkyl linker of the ligand and the O6 groups of guanine are required for specific, high-affinity bisintercalation of elinafide on GpC steps of DNA helices. If these O6 groups are absent (as in steps containing A·T pairs) or if these contacts are hampered (e.g., by a pH increment), then the intermolecular stacking stabilities decrease, the ligand-induced thermal stabilizations are reduced, and the SPR-determined equilibrium dissociation constants increase 25- to 50-fold.

In contrast, the SPR constants and the NMR and UV-melting binding parameters responded differently to alterations in drug rings and DNA bases affecting the intercalation process. Thus, changes in the composition or sequence of the bases flanking the GpC steps gave rise to significant variations in stacking stabilities and thermal stabilizations measured by NMR and UV-melting experiments, respectively, but produced smaller differences in the equilibrium dissociation constants measured by SPR. The same effect was observed when examining the interaction of elinafide analogues containing larger intercalating moieties but the same amino-alkyl linker.

A possible explanation for this apparent discrepancy is that the interaction between bisnaphthalimide ligands and DNA occurs through two steps, one involving groove association and the other intercalation. Each of these steps proceeds with its own association and dissociation rates, as proposed previously.⁸ The chemical shift variations monitored during the NMR titrations clearly depend on the establishment of intermolecular stacking contacts, and the NOEs and intercalated ring dynamics detected by NMR spectroscopy are a function of the extent and stability of the DNA-bisnaphthalimide stacking interactions occurring in the high-affinity site of each complex. Therefore, these data must be strongly modulated by naphthalimide ring stacking and unstacking in addition to groove association and dissociation. Likewise, under NMR conditions the thermal stabilizations measured by UV-melting were dominated by TPCR intercalative binding (Figure 5) and

paralleled the NMR observations, with complexes having enhanced stacking contacts and/or stability giving rise to larger ΔT_m values. The sequence-dependent properties of the DNA helices appeared to control these NMR and ΔT_m data, with the most stable duplexes giving rise to poor intermolecular stacking and low thermal stabilizations, as would be expected given the significant helical disruption associated to intercalation as opposed to groove binding.

Since the SPR methodology is based on the detection of changes in the refractive index of a surface as a consequence of ligand association to (or dissociation from) the surface-linked DNA helices, the SPR equilibrium constants will mainly depend on duplex association and dissociation. In our two-step binding model, bisnaphthalimide TPCR intercalation requires a previous groove-association step, and a TPCR-intercalated ligand dissociates from the duplex through this TPCR groove-bound intermediate. Moreover, exchange events between this TPCR groove-binding site and weaker groove-binding sites formed by the flanking A·T pairs are also possible when a ligand molecule associates to or dissociates from the DNA duplexes. Since the SPR experiment does not directly detect the intercalation step of the interaction, alterations in drug rings and DNA bases primarily affecting intercalation give rise to smaller changes in the SPR binding constants. These constants respond much more clearly to changes in pH and DNA groove composition simultaneously affecting groove-binding and intercalation.

In conclusion, a comparative analysis of a set of bisnaphthalimide complexes and conditions with surface-based and solution techniques clearly established high-affinity binding to GpC sites by bisintercalation, as well as weaker binding to sites formed by A·T pairs through groove-association. Strong electrostatic contacts between the amino-alkyl linker of the ligand and the O6 groups of G were found to be required for high-affinity bisintercalation. Under NMR conditions, the NMR and UV-melting data were dominated by naphthalimide stacking interactions in addition to groove association. The SPR binding constants responded to changes in groove composition and pH, but were rather insensitive to alterations in drug rings and DNA bases primarily affecting intercalation. These results are consistent with a two-step interaction involving groove association and intercalation processes. This two-step interaction is likely favored by the flexible bonds linking the aminoalkyl linker and intercalating moieties of the bisnaphthalimides, and was most evident for the lead compound, elinafide, probably due to the poor DNA stacking properties of the unsubstituted naphthalimide rings.⁸ These findings may be useful for studying other DNA- or RNA-binding drugs, which frequently combine groove-binding and stacking groups.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

The self-complementary DNA oligonucleotides (Figure 2) used for NMR, UV and ITC experiments were purified as described previously.⁸ The complexes studied by NMR spectroscopy were obtained by NMR-monitored titration of the DNAs with the bisnaphthalimide ligands using the slowly exchanging free and bound DNA aromatic resonances. These samples contained 0.2–0.8 mM complex, and were microdialyzed in 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and 20 mM sodium phosphate (pH 6.9) or 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and 10 mM sodium borate (pH 8.8) aqueous solutions. The DNA samples for UV thermal denaturation and ITC experiments were microdialyzed in similar solutions. For the SPR experiments, 5'-biotin-labeled hairpins (Figure 2) were purchased HPLC-purified from Microsynth AG and microdialyzed in HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% (v/v) surfactant P20) prior to immobilization.

NMR Spectroscopy

NMR spectra were acquired on temperature-calibrated Bruker 600 (equipped with a cryoprobe) and 500 MHz spectrometers and analyzed using Topspin 1.3 (Bruker Biospin) and Sparky 3.110.¹⁶ Each DNA-bisnaphthalimide complex was studied using series of ²H₂O NOESYs at 25°C uninterruptedly collected at short (0–12 ms) and long (80–250 ms) mixing times, together with ROESY, dqf-COSY, and/or TOCSY experiments, all with recycle delays of 2 s. All bisnaphthalimide resonances and all of the aromatic, H1', H2', H2'', and H3' DNA resonances were assigned in each of the complexes studied. All sequences formed the self-complementary duplexes shown in Figure 2. We analyzed the number and intensity of DNA-bisnaphthalimide stacking NOEs (Figure 3 and Supporting Information Figure S2) to determine the extent of the intercalation contacts in each complex.

Bisnaphthalimide Ring Rotation Rates

The $k_{\text{rot}}^{\text{NMR}}$ rate constants shown in Table I were measured by NMR spectroscopy at 25°C using NOESY experiments at very short mixing times (0–12 ms), as described previously.⁹ These rates reflect the dynamics of the bisnaphthalimides' rings at their intercalation site on the millisecond time scale,^{8,9} and were used to estimate the stability of the intercalation contacts in each complex.

Surface Plasmon Resonance

These experiments were carried out at 25°C with a Biacore T100 optical biosensor system, 4-channel streptavidin-derivatized Series S SA chips, and 10 mM MES pH 6.3, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.005% P20 or 10 mM sodium borate pH 8.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.005% P20 aqueous solutions as mobile phases. After immobilizing 300 response units (RU) of each DNA hairpin on the chips, the bisnaphthalimides were injected during 15-min periods at a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ and at concentrations ranging from 0.1 nM to 500 nM (at pH 6.3) or 0.1 nM to 50.0 μM (pH 8.8). The DNA surfaces were regenerated by buffer flow over 30-min periods. DNA-bisnaphthalimide SPR equilibrium dissociation con-

stants (K_d) were determined by fitting the sensorgrams to one-site or two-site equations:

$$\text{RU} = \frac{\text{RU}_{\text{max}} \cdot C}{1 + K_d \cdot C} + \text{RI}$$

$$\text{RU} = \frac{\text{RU}_{\text{max}1} \cdot C}{1 + K_{d1} \cdot C} + \frac{\text{RU}_{\text{max}2} \cdot C}{1 + K_{d2} \cdot C} + \text{RI}$$

where C is the concentration of free bisnaphthalimide in equilibrium with the complex, RU_{max} is the maximum response in the steady-state region, and RI is an offset term accounting for the bulk refractive index contribution of the sample. In these models, K_d , RU_{max} , and RI are adjustable parameters, and the stoichiometry of each binding site was determined by comparing the fitted RU_{max} values with the predicted ones, calculated from the molecular weights of DNA and bisnaphthalimide and the amount of DNA in the flow cell.¹⁷ The two-site equation was only utilized when it provided a clear curve-fitting improvement over the one-site model (between 0.8- and 0.02-fold lower χ^2 values). Association and dissociation rate constants were obtained from global kinetic fits, using low concentration sensorgrams and a one-site model including a mass transfer term. All SPR experiments were double-referenced¹⁸ and carried out at least two times for each system and condition.

UV Thermal Denaturation

The melting of the unbound DNA duplexes and DNA-bisnaphthalimide complexes was monitored by measuring the UV absorbance at 260 nm as a function of temperature in a Varian Cary 100 spectrophotometer. All samples contained 2 μM (~0.5 ODs) DNA duplex and were annealed prior to the experiments. The temperature was raised from 10 to 90°C at a gradient of 0.5°C min^{-1} and subsequently decreased at the same rate to evaluate the reversibility of the process. Assuming that binding to single strands is not significant, the thermal stabilization values ($\Delta T_m = T_m - T_m^0$) depend on the affinity of the duplex-ligand interactions at the melting temperature of each complex.^{11,12} To obtain a ΔT_m value for each complex, we plotted ΔT_m against increasing bisnaphthalimide:duplex ratios, starting from free DNA duplex (with T_m^0 melting temperature) (Figure 5). The sampled ratios were 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, and 20:1 for all complexes, plus the ratio found by NMR spectroscopy to be required for full occupation of the high-affinity site in each complex. The maximum 6:1 ratio plotted in Figure 5 corresponds to 2.7 base pairs per bisnaphthalimide molecule for our 16-base pair duplexes. This value can be considered saturating for these ligands, which would require 5.3 base pairs per molecule if three ligand molecules bisintercalated into each duplex² (Figure 2). In most cases, the ΔT_m curves approximately reached a plateau at NMR bisnaphthalimide:duplex ratios (Figure 5). The T_m and ΔT_m values specified in Table I are those obtained in these NMR conditions. All thermal denaturation experiments were repeated at least two times for each system and condition.

Isothermal Titration Calorimetry

These experiments were performed at 25°C using a Microcal VP-ITC calorimeter, and involved filling the sample cell with 1.8 mL of 28 μM dTGCA₃ or dTGCA₆ duplex, and performing 14 or 20 injections of 15 or 10 μL of a 87 μM elinafide solution in the same buffer, using a 250

μL Hamilton syringe rotating at 300 r.p.m. The injection time was 30 or 20 s (15 or 10s for the first injection) and the delay between injections was 5 min. The thermograms (Figure 6) were analyzed with Origin 5.0 (Microcal Software), and heats per mol of elinafide injected were obtained by peak integration. After subtracting the dilution heats obtained by injecting elinafide solution in the same conditions into buffer alone, the binding enthalpy (ΔH) was determined from the heats of reaction obtained for each injection. The above conditions ensured that all titrated drug was bound after each addition, as indicated by the Gaussian distribution of the reaction heats (not shown). This protocol provides multiple estimates of ΔH without assuming any binding model or applying any curve-fitting procedure.¹⁹ Two replicate measurements were made for each system, and the ΔH values shown in Figure 6 are the average of all accumulated estimations.

The IATA (CSIC) research centre of Valencia allowed us to use a Biacore T100 instrument. We thank Jakub Ciepielski, Beatriz de Pascual-Teresa and Ana Ramos (Universidad San Pablo CEU, Madrid) for providing elinafide, MCI and BPN.

REFERENCES

- Bailly, C.; Braña, M.; Waring, M. J. *Eur J Biochem* 1996, 240, 195–208.
- Gallego, J.; Reid, B. R. *Biochemistry* 1999, 38, 15104–15115.
- Carrasco, C.; Joubert, A.; Tardy, C.; Maestre, N.; Cacho, M.; Braña, M. F.; Bailly, C. *Biochemistry* 2003, 42, 11751–11761.
- Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Morán, M.; Pérez de Vega, M. J.; Romerdahl, C. R.; Qian, X. D.; Bousquet, P.; Emling, F.; Schlick, E.; Keilhauer, G. *Anticancer Drug Des* 1993, 8, 257–268.
- Bousquet, P. F.; Braña, M. F.; Conlon, D.; Fitzgerald, K. M.; Perron, D.; Cocchiaro, C.; Miller, R.; Moran, M.; George, J.; Qian, X. D. et al. *Cancer Res* 1995, 55, 1176–1180.
- Nitiss, J. L.; Zhou, J.; Rose, A.; Hsiung, Y.; Gale, K. C.; Osheroff, N. *Biochemistry* 1998, 37, 3078–3085.
- Bailly, C.; Carrasco, C.; Joubert, A.; Bal, C.; Watzet, N.; Hildebrand, M. P.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Houssier, C.; Cacho, M.; Ramos, A.; Braña, M. F. *Biochemistry* 2003, 42, 4136–4150.
- González-Bulnes, L.; Gallego, J. *J Am Chem Soc* 2009, 131, 7781–7791.
- Gallego, J. *Nucleic Acids Res* 2004, 32, 3607–3614.
- Braña, M. F.; Cacho, M.; García, M. A.; de Pascual-Teresa, B.; Ramos, A.; Domínguez, M. T.; Pozuelo, J. M.; Abradelo, C.; Rey-Stolle, M. F.; Yuste, M.; Bañez-Coronel, M.; Lacal, J. C. *J Med Chem* 2004, 47, 1391–1399.
- Crothers, D. M. *Biopolymers* 1971, 10, 2147–2160.
- McGhee, J. D. *Biopolymers* 1976, 15, 1345–1375.
- Boger, D. L.; Saionz, K. W. *Bioorg Med Chem* 1999, 7, 315–321.
- Leng, F.; Priebe, W.; Chaires, J. B. *Biochemistry* 1998, 37, 1743–1753.
- Chaires, J. B. *Arch Biochem Biophys* 2006, 453, 26–31.
- Goddard, T. D.; Kneller, D. G. *Sparky 3.110*. University of California: San Francisco, USA.
- Nguyen, B.; Tanius, F. A.; Wilson, W. D. *Methods* 2007, 42, 150–161.
- Myszka, D. G. *J Mol Recogn* 1999, 12, 279–284.
- Haq, I.; Jenkins, T. C.; Chowdhry, B. Z.; Ren, J.; Chaires, J. B. *Methods Enzymol* 2000, 323, 373–405.

Reviewing Editor: Kenneth J. Breslauer

Structure-Based Design of an RNA-Binding *p*-Terphenylene Scaffold that Inhibits HIV-1 Rev Protein Function**

Luis González-Bulnes, Ignacio Ibáñez, Luis M. Bedoya, Manuela Beltrán, Silvia Catalán, José Alcamí,* Santos Fustero,* and José Gallego*

Numerous antibiotics bind to ribosomal RNA, and many functional RNA motifs have considerable therapeutic potential. However, the development of small RNA-binding agents has been hampered by the difficulties posed by these structures, which have limited physicochemical diversity and are often flexible.^[1] In order for this approach to be successful, it is essential to identify new chemical scaffolds recognizing RNA.

The Rev response element (RRE) is a strongly conserved 350-nucleotide structure located in the *env* gene of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNA. Within sub-domain IIB of the RRE, the unusually widened major groove of a 4:6 internal loop forms a high-affinity complex^[2] with the arginine-rich α -helix of Rev, a virally encoded 116 amino acid protein that adopts a helix-turn-helix conformation^[3] (Figure 1). This interaction between internal loop IIB and the RNA-binding α -helix of Rev (Rev₃₄₋₅₀) is essential for virus viability because it triggers a cascade of events that allow the transport of unspliced or incompletely spliced viral RNA molecules into the cytoplasm of the infected cell in the late phase of the viral infectious cycle. These events include the cooperative incorporation of additional Rev molecules into the complex through interactions with further sites on the RRE and protein–protein contacts,^[4] and the tethering of the RRE–Rev ribonucleoprotein to the Crm1 host export factor. In addition to RNA nuclear export, Rev has been shown to

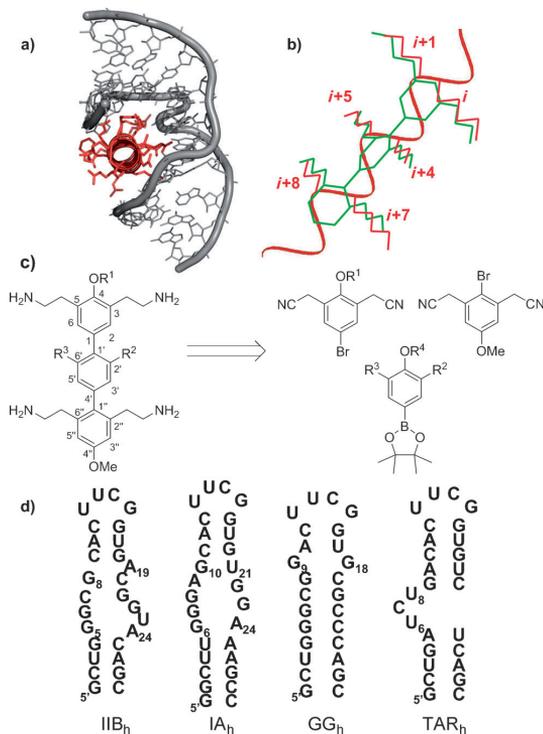


Figure 1. Structure-based design of RNA-binding *p*-terphenyls. a) View of the complex formed by internal loop IIB of the RRE and Rev₃₄₋₅₀. The α -helix (red) is deeply embedded in its RNA receptor (gray). b) Representation of a bilaterally substituted *p*-terphenyl molecule (green) superposed on an α -helix (red). c) Chemical structure and synthesis strategy of a 3,5,2',6',2'',6''-substituted *p*-terphenyl molecule. d) Secondary structures of the RNA oligonucleotides utilized in this study: hairpins IIB_h and IA_h, containing internal loops IIB and IA of the RRE, and control hairpins GG_h and TAR_h.

enhance translation and packaging^[5] and to control the nucleocytoplasmic shuttling of the HIV-1 integrase.^[6] Clearly, this protein represents a pivotal target for HIV-1 therapy, but to date, the development of Rev-based inhibitors has remained an elusive goal. Herein we report the structure-based design of new RNA-binding *p*-terphenyl Rev mimics that inhibit RRE–Rev function and HIV-1 replication.

We aimed to generate organic ligands that mimic the three-dimensional distribution of the side chains of Rev₃₄₋₅₀ complexed with internal loop IIB of the RRE^[2] (Figure 1a). Some reports had shown that tris-3,2',2''-substituted *p*-ter-

[*] L. González-Bulnes,^[†] Dr. J. Gallego
Universidad Católica de Valencia
C/Quevedo 2, 46001 Valencia (Spain)
E-mail: jose.gallego@ucv.es

I. Ibáñez,^[†] Dr. S. Catalán, Prof. S. Fustero
Universidad de Valencia
Avda. V. A. Estellés s/n, 46100 Burjassot (Spain)
and

Centro de Investigación Príncipe Felipe
Avda. Autopista del Saler 16, 46012 Valencia (Spain)
E-mail: santos.fustero@uv.es

Dr. L. M. Bedoya, M. Beltrán, Dr. J. Alcamí
Instituto de Salud Carlos III
Carretera Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda (Spain)
E-mail: ppalcami@isciii.es

[*†] These authors contributed equally to this work.

[**] We received support from MEC (BFU2012-30770, CTQ2010-19774) and ISCIII (RD12/0017, PI 12/0506) of Spain, Generalitat Valenciana (PROMETEO 2010/061, AP-225/2011), and Universidad Católica de Valencia, and thank A. Velázquez for help with ITC, and C. Cabrera for providing plasmids.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201306665>.

phenyl molecules could mimic one face of an α -helical peptide by adopting a staggered conformation that reproduces the angular orientation of three α -helix side chains.^[7] We envisioned that the introduction of substituents on both sides of a *p*-terphenyl scaffold would ensure a 360° side-chain projection in space similar to that observed in the IIB–Rev_{34–50} complex, where two thirds of the α -helix are surrounded by RNA. After docking different biphenyl and terphenyl ligands into the IIB structure, the best results were obtained for 3,5,2',6',2'',6''-substituted *p*-terphenyls (Figure 1), the binding poses of which approximately reproduced the orientation of Rev_{34–50} in its complex with IIB. Subsequent calculations indicated that synthetically accessible 2-aminoethyl lateral substituents would be well suited to interact with the RNA sugar–phosphate backbone.

The syntheses were based on sequential palladium-based Suzuki couplings^[8] of aryl halides and aryl triflates with aryl boronic esters (Figure 1c). We first generated a group of tetrakis(2-aminoethyl) biphenyls where the side chains occupied bilateral 3,5 and 2',6' (**1**); 3,5 and 3',5' (**2**); or 2,6 and 2',6' (**3**) positions. Our first terphenyl molecule (**4b**) contained four bilateral 2-aminoethyl side chains in positions 3,5,2'',6'' but lacked substituents in the central ring. Subsequent 3,5,2'',6'' tetrakis(2-aminoethyl) terphenyls contained a single methoxy (**5a**, **5b**, **5c**, and **5d**) or ethyl (**5e** and **5f**) group in the 2' position of the central benzene. The last terphenyl series contained two methyl (**6a** and **6b**) or ethyl (**6c** and **6d**) groups in positions 2' and 6' (Figure 2). These molecules had bilateral groups in all three rings and were predicted to be the best Rev_{34–50} mimics.

To examine the strength of the interactions and the location of the binding sites, we used NMR spectroscopy to monitor the titration of an RNA hairpin containing internal loop IIB (IIB_h; Figure 1d) with the biphenyl and terphenyl molecules or the RRE-binding antibiotic neomycin B, which was used as a reference.^[9] The biphenyl **1** required a high ligand/IIB_h molar ratio (6:1) to produce detectable changes in

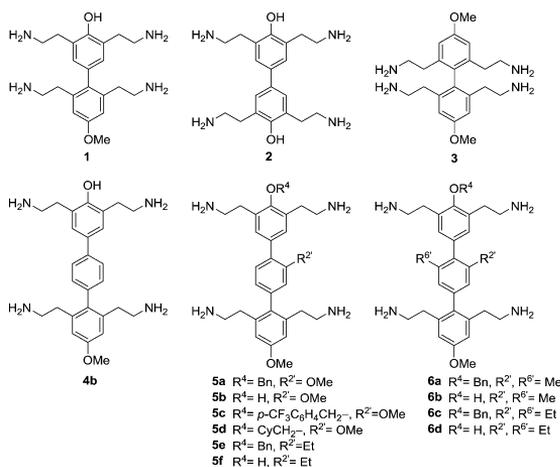


Figure 2. Chemical structures of the bilaterally substituted *p*-biphenyl and *p*-terphenyl compounds.

the IIB_h TOCSY spectrum, whereas **2**, **3**, and neomycin B induced chemical shift perturbations in stem nucleotides outside the loop (Figure S1 in the Supporting Information). By contrast, terphenyl molecules containing substituents in the central benzene induced chemical shift changes in the internal loop and adjacent nucleotides only, and these shifts were apparent at lower ratios (1:1 and 2:1; Figure 3a and Figure S1 in the Supporting Information). The terphenyls that

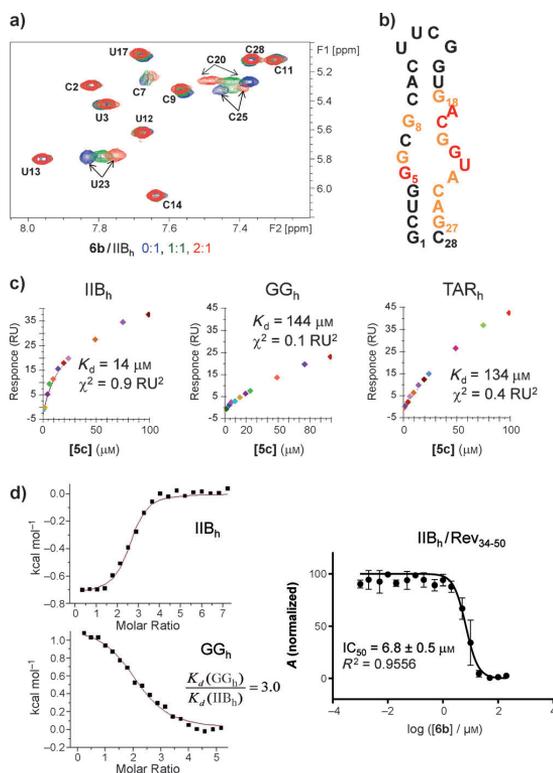


Figure 3. Loop IIB recognition and inhibition of the IIB–Rev_{34–50} interaction by terphenyl compounds. a) Titration of IIB_h with **6b** monitored by NMR spectroscopy. The H5–H6 region of the TOCSY spectrum of unbound IIB_h (blue) is superposed on the spectra of complexes with increasing **6b**/IIB_h molar ratios. b) Map of the **6b** binding site in the IIB_h hairpin. The nucleotides with aromatic or H1' protons undergoing chemical shift variations upon the addition of two equivalents of **6b** are highlighted in orange and red ($\Delta\delta \geq 0.05$ and 0.1 ppm, respectively). c) SPR steady-state equilibrium binding curves for the interaction between **5c** and IIB_h, GG_h, and TAR_h. d) Titration curves of IIB_h and GG_h with **6b**, as monitored by ITC. e) Inhibition of the IIB_h–Rev_{34–50} interaction by **6b**, as measured by FP.

gave rise to the greatest RNA chemical shift variations and sharper complex resonances were **6b** and **6d**, which contain two bilateral methyl or ethyl groups, respectively, in positions 2' and 6'. Spectral line shape analyses of the complexes of IIB_h with **6b** and **5b** indicated binding of two ligand molecules to internal loop IIB, with equilibrium dissociation constants K_d of 11 and 25 μM for **6b**, and 25 and 33 μM for **5b** (Figure S2).

The biphenyl and terphenyl interactions were further characterized with surface plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC). To evaluate specificity, the SPR experiments employed two control GG_h and TAR_h hairpins, in which the IIB loops are substituted with a G:C opposition and the HIV-1 Tat-binding UCU bulge,^[10] respectively (Figure 1 d). The SPR methodology allowed us to study the 2'-methoxy terphenyl subset as well as **1** and **3**. The IIB_h -terphenyl binding curves were best fit with a two-site model, comprising a higher-affinity event involving the binding of one or two ligand molecules to loop IIB (see below), and lower-affinity association of additional molecules to the hairpin. We obtained a K_d of 13.0 μM for the higher-affinity interaction between IIB_h and **5b**, together with $K_d(GG_h)/K_d(IIB_h)$ and $K_d(TAR_h)/K_d(IIB_h)$ specificities of 1.9 and 6.0, respectively. **5c** had specificity ratios of 10.3 and 9.6, respectively, comparable to those observed for Rev_{34-50} with the same methodology (14.5 and 4.4; Figure 3 c, and Figure S3 and Table S1). **5d**, **1**, and **3** bound to IIB_h with higher K_d values.

ITC analyses of IIB_h -terphenyl interactions also revealed a higher-affinity transition followed by lower-affinity binding at high ligand/ IIB_h ratios. The titrations focused on the higher-affinity transition, which involved the association of approximately two terphenyl molecules with loop IIB. The K_d values obtained with this approximation were useful for qualitatively ranking the ligands and evaluating specificities (Figure 3 d, and Figure S4 and Table S2). The compounds with the greatest IIB_h affinities were **6b** and **6d**, which had $K_d(GG_h)/K_d(IIB_h)$ specificities of 3.0 and 4.4, respectively. The affinities were lower for **5b** and **6a**. Compound **2** interacted with IIB_h with lower affinity, no specificity and higher stoichiometry. All of these results are consistent with the NMR observations described above.

The complexes of IIB_h with **6b** and **6d** were further studied by NMR spectroscopy, and were very similar. Examination of the IIB_h chemical shift perturbations allowed us to map the residues forming the binding site of the ligands. These spanned all of the GGCG:ACGGUA loop and several adjacent residues in the lower stem (Figure 3 b). The spectra for both the isolated and ligand-bound IIB_h showed that G22 and A24 were stacked on top of each other and U23 had an extrahelical location. However, the intensity of the intra-residue H8-H1' NOE of G22 was significantly reduced upon **6b** and **6d** association (Figure S5a), thus indicating a switch from the *syn* conformation adopted by this nucleotide in the unbound loop^[11] to an *anti* conformation. The binding of **6b** and **6d** weakened the sequential connectivities of A19 (Figure S5a), thus favoring an extrahelical conformation for this nucleotide. These conformational changes involving G22 and A19 were also observed upon Rev_{34-50} binding to subdomain IIB .^[11]

Intermolecular RNA-terphenyl NOEs (described in Figure S5b) demonstrated that one of the two terphenyl molecules forming the complex lies diagonally across the major groove of the IIB loop, with its first benzene ring located close to G6 in the GGCG strand of the loop and its third benzene ring located in proximity to A19 in the opposite $A_{19}CGGUA_{24}$ loop strand (Figure 4 a).

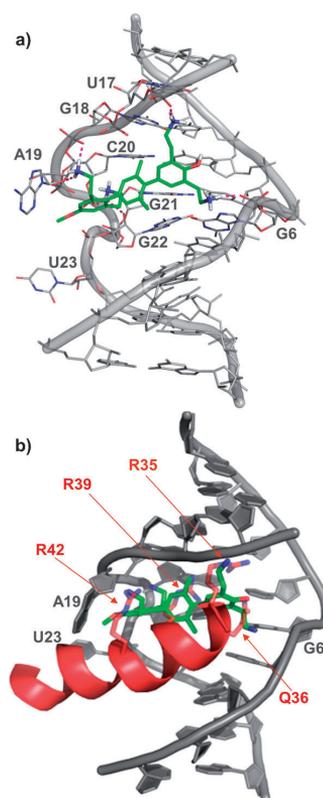


Figure 4. Structure of the loop IIB -terphenyl complexes. a) View of the best-scored complex between loop IIB and **6b**, built by NOE-restrained docking from the structure of the RRE-Rev complex (PDB ID:1ETG).^[2] b) Overlay of this model with the Rev_{34-50} helix (red ribbon representation) present in the 1ETG structure. The amino acids matching the position of the terphenyl 2-aminoethyl substituents are explicitly represented.

We next tested whether the biphenyl and terphenyl compounds inhibited the IIB_h - Rev_{34-50} interaction by using an assay based on fluorescence polarization (FP). **6b** turned out to be the most potent inhibitor, with an IC_{50} value of 6.8 μM , followed by **4b** and other terphenyl molecules containing methyl or ethyl groups in the central benzene ring (Figure 3 e, and Figure S6 and Table S3). The 2'-methoxy terphenyl subset exhibited higher IC_{50} values consistent with the detection of lower IIB_h affinity by ITC and NMR.

When we checked whether the compounds were able to block HIV-1 replication in cell cultures, all terphenyls containing methyl or ethyl groups in the central benzene ring were active and **6b**, with an EC_{50} value of 3.4 μM , was the most potent inhibitor. The remaining ligands and neomycin B were not active or exhibited much weaker activities at the assay concentrations, and none of the compounds showed cellular toxicity. We also carried out an assay based on transfecting a full-length replication-competent HIV-1 clone, whereby early steps of infection are bypassed and only post-integration events of the viral infectious cycle occur. **6b** was

again the most potent inhibitor, followed by **5e** and **6a** (Figure 5, and Figure S7 and Table S4). The EC_{50} values of these terphenyls were similar to those obtained from the infection experiment, thus indicating that their main target was contained in the transcriptional or post-transcriptional steps of the viral infectious cycle, as is the case for the RRE–Rev system.

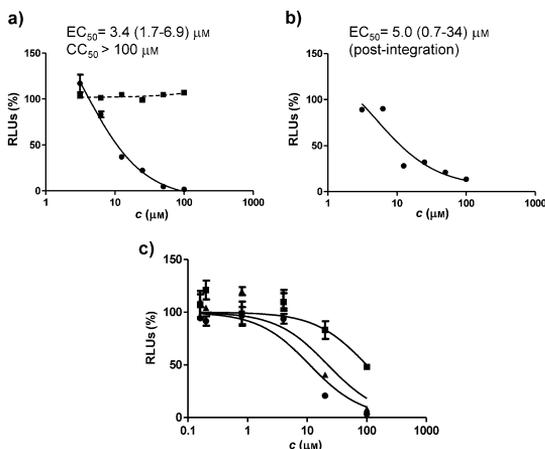


Figure 5. Results of cellular assays with terphenyl **6b**. In all cases, results are expressed as percentage of relative luminescence units (RLUs), where 100% is the level of viral replication obtained in the presence of the vehicle used to dissolve the compounds. a) Antiviral activity in HIV-1 infection assays (EC_{50}) and cellular toxicity (CC_{50}). -----■----- viability; —●— infection. b) Antiviral activity in HIV-1 transfection assays. c) Inhibition of Rev-mediated transport of RRE-containing RNA into the cytoplasm. Inhibition by **6b** was tested at three different concentrations of the plasmid encoding Rev (pCMV-Rev): —■— 500 ng/well ($50 < IC_{50} < 100$ μM); —▲— 200 ng/well ($IC_{50} = 21.4 (\pm 6.3)$ μM); —●— 20 ng/well ($IC_{50} = 10.4 (\pm 2.4)$ μM).

To test whether **6b** acted on the complete RRE–Rev system in cells, we used an assay based on transfecting plasmids encoding Rev and an RRE–luciferase reporter system. The results indicated that **6b** inhibited Rev-mediated transport of RRE-containing RNA from the nucleus to the cytoplasm. The IC_{50} values ranged from 10.4 to 21.4 μM and depended on the concentration of Rev-encoding plasmid used in the assay (Figure 5c). This clearly established cellular inhibition of RRE–Rev ribonucleoprotein function. In this context, additional Rev monomers bind to different sites in the 350-nucleotide RRE structure in addition to loop IIB. One of the additional Rev binding sites in the RRE, a purine-rich internal loop located in subdomain IA (Figure 1d), has recently been identified.^[4] By using NMR spectroscopy, we found that **6b** specifically recognized internal loop nucleotides of the IA_h hairpin at low ligand/RNA ratios (Figure S8).

Since an effect on HIV-1 transcription is also possible, we studied the interaction between the terphenyl molecules and DNA. SPR and NMR experiments detected DNA association through the minor groove (Figure S9). DNA binding may

contribute to the observed antiviral activity, but the available data are consistent with an effect based on RRE–Rev inhibition, as explained in Figure S9.

In conclusion, the data obtained after synthesis and evaluation of a set of biphenyl and terphenyl molecules indicate that we have rationally designed a novel RNA-binding bilaterally substituted *p*-terphenylene scaffold that mimics the Rev_{34–50} helix of Rev and is able to inhibit RRE–Rev function and HIV-1 replication. This is important, as most of the small RNA-binding agents described to date are related to peptides or antibiotics, or were discovered by screening.^[1]

In agreement with the computational predictions, NMR analyses indicated that **6b** and **6d** bound to the major groove of loop IIB with their side chains projected in a wide spatial angle, thus occupying the binding site of the N-terminal segment of Rev_{34–50} (Figure 4). The 3,5-ethylene amino groups of the first benzene ring of the ligands contact the phosphate groups of G6 in one strand and U17 or G18 in the opposite strand. This same two-strand interaction is established by Rev.^[2] The third benzene is inserted deep into the pocket formed by the S-turn G21 and G22 residues and extrahelical A19, and its 2',6'-ethylene amino groups contact the unusually bent sugar–phosphate backbone of these nucleotides, where several phosphates are close to each other and are therefore stabilized by the positively charged amino groups of the ligands. In this respect, both terphenyls induced conformational changes in the A19 and G22 nucleotides strikingly similar to those brought about by Rev binding.

In agreement with the models, loop IIB affinity and specificity increased for 2'- and 2',6'-substituted terphenyls relative to **1**, **2**, **3**, and **4b**, thus indicating that both an appropriately staggered terphenyl conformation and an adequate spacing of the two pairs of 2-aminoethyls were important for the interaction with loop IIB. The terphenyl **6b**, together with its 2',6'-diethyl analogue **6d**, exhibited the greatest affinity for IIB_h. FP experiments indicated that terphenyls containing 2'- or 2',6'-methyl or ethyl groups displaced Rev_{34–50} from the IIB loop more efficiently than those with a 2'-methoxy group, and **6b** was the most potent inhibitor. In agreement with these data, methyl- and ethyl-substituted terphenyls were able to inhibit HIV-1 replication at post-integration steps of the viral infectious cycle, and **6b** was the most active molecule. In a cellular assay, this terphenyl was able to block the complete RRE–Rev system with low micromolar IC_{50} values similar to those measured for HIV-1 inhibition and Rev_{34–50} displacement from loop IIB.

Altogether, the compiled data provide strong evidence that bilaterally substituted terphenyls efficiently mimic the RNA-binding α -helix of Rev and provide clues on how these small molecules may accomplish the blocking of RRE–Rev function and HIV-1 replication in a cellular context. The RNA specificity of the terphenyls is in the same range as that measured for Rev_{34–50} itself, and the compounds bind to at least two specific Rev sites within the RRE; loops IIB and IA. By mimicking Rev, the compounds likely compete with the protein by binding to several sites in the RRE, thereby interfering with the assembly of Rev monomers on the RRE. In addition, we have detected an interaction with the DNA

minor groove that may contribute to the observed antiviral effect. The *p*-terphenylene scaffold offers many opportunities for improvement, and all of these issues are under investigation.

Received: July 30, 2013

Revised: September 25, 2013

Published online: November 8, 2013

Keywords: drug design · HIV · RNA · small-molecule inhibitors · terphenyls

-
- [1] M. Mayer, T. L. James, *Methods Enzymol.* **2005**, *394*, 571–587; J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1171–1224; L. Guan, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 73–86.
- [2] J. L. Battiste, H. Mao, N. S. Rao, R. Tan, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1996**, *273*, 1547–1551.
- [3] M. D. Daugherty, B. Liu, A. D. Frankel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1337–1342; M. A. DiMattia, N. R. Watts, S. J. Stahl, C. Rader, P. T. Wingfield, D. I. Stuart, A. C. Steven, J. M. Grimes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5810–5814.
- [4] M. D. Daugherty, I. D’Orso, A. D. Frankel, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 824–834.
- [5] H. C. Groom, E. C. Anderson, A. M. Lever, *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1303–1318; M. Blissenbach, B. Grewe, B. Hoffmann, S. Brandt, K. Uberla, *J. Virol.* **2010**, *84*, 6598–6604.
- [6] A. Levin, Z. Hayouka, A. Friedler, A. Loyter, *Nucleus* **2010**, *1*, 190–201.
- [7] B. P. Orner, J. T. Ernst, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382–5383; H. Yin, G. I. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodriguez, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2764–2767; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2704–2707.
- [8] A. Suzuki, *Chem. Commun.* **2005**, 4759–4763.
- [9] M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, *74*, 969–978; M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3641–3648.
- [10] C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner, *EMBO J.* **1990**, *9*, 4145–4153.
- [11] R. D. Peterson, J. Feigon, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 863–877.
-