



Programa de Doctorado en Química

Desarrollo de sondas fluorescentes para ADN telomérico

Ariadna Gil Martínez

2023

Directores:

Dr. Enrique García-España

Dr. Jorge González



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Química
Departamento de Química Inorgánica

**Desarrollo de sondas fluorescentes
para ADN telomérico**

Ariadna Gil Martínez

Memoria para la obtención del título de Doctora en Química por la
Universitat de València

Julio, 2023

Trabajo dirigido por:

Prof. Enrique García-España Monsonís

Dr. Jorge González García



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



PARC CIENTÍFIC
VNIVERSITAT D VALÈNCIA

ICMOL



Prof. D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Dpto. de Química Inorgánica de la Universitat de València, y **Dr. Jorge González García** Investigador distinguido del Instituto de Ciencia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Desarrollo de sondas fluorescentes para ADN telomérico”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **Ariadna Gil Martínez**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Química de la Universitat de València.

Y para que conste, firman el presente certificado ante la Facultad de Química.

En Burjasot, a 10 de Julio de 2023

Fdo.

**Prof. Enrique García-España.
Monsonís**

**Dr. Jorge González
García**



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



PARC CIENTÍFIC
VNIVERSITAT D VALÈNCIA

ICMOL

EXCELENCIA
MARIA
DE MAEZTU

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda del proyecto «Herramientas para visualizar estructuras no-canónicas de ADN/ARN mediante microscopia avanzada. CIDEAGENT/2018/015. CPI-23-2485», a cargo del Programa para el apoyo a personas investigadoras con talent (Plan GenT), de la Conselleria de Educació, Investigació, Cultura y Deporte (actual Conselleria de Innovació, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital).



“Palabras hay escondidas, entre las otras, como guijarros. No se reconocen en especial y después van, sin embargo, y te hacen temblar la vida entera, en su fuerza y en su debilidad... Entonces viene el pánico... Una avalancha... Te quedas ahí, como un ahorcado, por encima de las emociones... Una tormenta que ha llegado, que ha pasado, demasiado fuerte para uno, tan violenta, que nunca lo hubiera imaginado solo con sentimientos... Así, pues, **todas las precauciones son pocas con las palabras**, esa es mi conclusión. Pero, primero, voy a contar cómo fue...”

Louis-Ferdinand Céline

Viaje al fin de la noche

Índice general

Resumen	IX
Glosario de abreviaturas, siglas y símbolos	1
1. Introducción	7
1.1. El almacenamiento de la información genética	9
1.1.1. Contexto histórico previo a los genes	9
1.1.2. Los logros de una hipótesis fallida	12
1.1.3. El principio de transformación del ADN	14
1.1.4. Si las proteínas forman hélices... ¿el ADN también?	16
1.2. Componentes y estructura del ADN de doble hélice	19
1.3. Más allá de lo canónico	28
1.4. G-quadruplex	31
1.5. Localización de las secuencias putativas de formación de G-quadruplex	35
1.6. Funciones de los G-quadruplex	41
1.6.1. G4s en la replicación del ADN	41
1.6.2. Funciones de los G4s en la transcripción	43
1.6.3. G4s en los telómeros	45
1.7. G-quadruplex de mayor orden	52
1.8. G-quadruplex en enfermedades neurodegenerativas	55
1.9. Bibliografía	58

2. Objetivos	83
3. Material y métodos	91
3.1. Metodología general	91
3.1.1. Reactivos y disolventes	91
3.1.2. Análisis elemental	92
3.1.3. Espectrometría de masas	92
3.1.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	92
3.1.5. Espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia	93
3.2. Estudio del comportamiento ácido-base	93
3.2.1. Estudios potenciométricos	94
3.2.2. Estudios espectroscópicos de UV-Vis y fluorescencia	99
3.3. Estudio de la interacción con ADN	100
3.3.1. Preparación de las disoluciones tampón	100
3.3.2. Preparación de las disoluciones de ADN y ARN para los ensayos de UV-Vis y fluorescencia	101
3.3.3. Preparación de las disoluciones de ADN y ARN para el ensayo de desnaturalización térmica	102
3.3.4. Valoraciones espectrofotométricas y espectrofluorimétricas	103
3.3.5. Ensayo de desnaturalización térmica	107
3.3.6. Ensayo de desplazamiento con naranja de tiazol	111

3.3.7. Determinación del modo de unión de los ligandos con G4s mediante secuencias marcadas con 2-Aminopurina	115
3.3.8. Estudios computacionales	119
3.4. Evaluación del oxígeno singlete	121
3.5. Caracterización de la encapsulación con ligandos	122
3.5.1. Estudios espectroscópicos de interacción de la piranina con los ligandos	123
3.6. Estudios biológicos	123
3.6.1. Cultivos celulares y mantenimiento	124
3.6.2. Tinción con azul de tripano	124
3.6.3. Ensayo colorimétrico de MTT para medir la viabilidad celular	126
3.6.4. Determinación del estrés oxidativo intracelular	128
3.6.5. Fototoxicidad en cultivos celulares	130
3.6.6. Visualización de la internalización de los ligandos mediante microscopia confocal	132
3.7. Bibliografía	135
4. Diseño y síntesis de ligandos G-quadruplex	143
4.1. Perspectiva histórica de los ligandos G4s	145
4.2. Ligandos específicos de G-quadruplex telomérico	154
4.3. Diseño de los ligandos G4s monoméricos y multiméricos	161
4.4. Síntesis y caracterización	165

4.4.1.	Procedimiento general de síntesis	168
4.4.2.	Caracterización de los ligandos sintetizados	171
4.5.	Bibliografía	184
5.	Comportamiento ácido – base de los ligandos poliamínicos sintetizados	193
5.1.	Protonación	195
5.1.1.	Familia 22Me	198
5.1.2.	Familia 22H	208
5.1.3.	Familia 33H	213
5.1.4.	Familia 33Me	220
5.1.5.	Familia Cad	227
5.2.	Bibliografía	231
6.	Evaluación de la interacción de los ligandos poliamínicos con ADN G-quadruplex monomérico	233
6.1.	Estructuras G4s del ADN telomérico	235
6.2.	Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante desnaturalización térmica (FRET-Melting)	237
6.2.1.	Familia 22Me	239
6.2.2.	Familia 22H	243
6.2.3.	Familia 33H	245
6.2.4.	Familia 33Me	248
6.2.5.	Familia Cad	251

6.3. Relación entre las cargas positivas y ΔT_m	253
6.4. Ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol	255
6.4.1. Familia 22Me	257
6.4.2. Familia 33Me	258
6.4.3. Familia 33H	259
6.4.4. Familia 22H	260
6.4.5. Familia Cad	261
6.5. Estudio computacional de la interacción de los ligandos de la familia 22Me con ADN G4 telomérico	263
6.5.1. Interacción con el monómero de G4	264
6.5.2. Interacción con la doble hélice	269
6.6. Bibliografía	272
7. Determinación de la interacción de los ligandos poliamínicos con ADN G4 multimérico	275
7.1. Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante desnaturalización térmica (FRET-Melting)	279
7.1.1. Familia 22Me	280
7.1.2. Familia 22H	282
7.1.3. Familia 33H	283
7.1.4. Familia 33Me	284
7.1.5. Familia Cad	286
7.1.6. Determinación de la selectividad de los ligandos por los G4s diméricos	287

7.2. Evaluación del modo de unión de los ligandos de la familia 22Me utilizando estructuras de ADN con la base 2-Aminopurina	289
7.3. Estudio computacional de la interacción de los ligandos de la familia 22Me con ADN G4 dimérico	294
7.3.1. G4 dimérico antiparalelo	295
7.3.2. G4 dimérico híbrido	301
7.4. Bibliografía	308
8. Determinación de la interacción de los ligandos con G4s relevantes en desordenes neuronales	311
8.1. Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante desnaturalización térmica (FRET-Melting).	314
8.1.1. Familia 22Me	314
8.1.2. Familia 33Me	316
8.1.3. Familia 33H	317
8.1.4. Familia 22H	318
8.1.5. Familia Cad	320
8.2. Ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol	322
8.2.1. Familia 22Me	324
8.2.2. Familia 33Me	325
8.2.3. Familia 33H	326
8.2.4. Familia 22H	328
8.2.5. Familia Cad	329

8.2.6. Estudio de la selectividad en el ensayo de desplazamiento	330
8.3. Bibliografía	331
9. Evaluación de la capacidad de encapsulación de los ligandos poliamínicos	333
9.1. Estudio potenciométrico de los compuestos de interés biológico	337
9.1.1. Comportamiento ácido base de 5-Fu y Pyr	339
9.1.2. Estudios de encapsulación	341
9.2. Estudio de la interacción entre los ligandos y la piranina mediante espectroscopia de UV-Vis	355
9.3. Estudio de la interacción entre los ligandos y la piranina mediante emisión de fluorescencia	358
9.4. Estudios computacionales de dinámica molecular	362
9.5. Bibliografía	365
10. Evaluación biológica de los ligandos poliamínicos	371
10.1. Determinación de la viabilidad celular de los ligandos	373
10.1.1. Familia 22Me	374
10.1.2. Familia 33Me	375
10.1.3. Familia 33H	376
10.1.4. Familia 22H	377
10.1.5. Familia Cad	378
10.1.6. Relación entre la citotoxicidad y la carga	379

10.2. Determinación de la viabilidad celular de los complejos ligando – 5-fluorouracilo/piranina	381
10.3. Visualización celular	383
10.4. Bibliografía	385
11. Trabajos publicados en relación con esta tesis	387
12. Conclusiones	415
Anexos	425
Anexo A. Espectros RMN	427
Anexo B. Valores ΔT_m del ensayo de desnaturalización térmica	439
Anexo C. Espectros de emisión de fluorescencia del ensayo de desplazamiento de naranja de tiazol	446
Anexo D. Espectros de emisión de fluorescencia del ensayo con 2-Aminopurina	452
Anexo E. Ensayo viabilidad celular	456
Agradecimientos	465

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula que mediante un código sencillo que consta de cuatro nucleótidos, adenina, guanina, timina y citosina alberga la información genética de todos los seres vivos y de algunos virus. Pese a su sencillez, el ADN es capaz de adoptar diversas conformaciones como la estructura canónica de doble hélice y otras estructuras no canónicas como la triple hélice, el *i*-motif, o el G-quadruplex (G4).

Entre las estructuras no canónicas, los G4s han suscitado un gran interés en las últimas décadas debido a las crecientes evidencias de su papel biológico. Los G4s han sido identificados en secuencias ricas en guaninas y se caracterizan por las unidades cuadrado-planas que los componen, denominadas tétradas de guanina. Las tétradas se generan por la formación de puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen entre cuatro guaninas y se apilan entre sí mediante interacciones de tipo π , estabilizándose adicionalmente mediante interacciones electrostáticas con los cationes presentes en el canal central del G4. Asimismo, dependiendo de la orientación de las hebras de ADN que conforman los G4s, pueden adoptar distintas conformaciones como paralela, híbrida o antiparalela.

Mediante estudios de secuenciación genética se han detectado alrededor de 716.000 secuencias putativas de formación de G4s (PG4s) en el genoma humano, destacando su presencia en regiones promotoras de ciertos oncogenes y en los telómeros.

Los telómeros se encargan de proteger los extremos de los cromosomas y la integridad genética. El extremo 3' monocatenario de los telómeros comprende regiones de ADN no codificante con secuencias

repetitivas ricas en guanina. Los telómeros se acortan con cada división celular, hasta alcanzar el límite de Hayflick en el cual las células dejan de dividirse y en última instancia se desencadena la muerte celular. Sin embargo, existe una enzima denominada telomerasa que mantiene la longitud del telómero y prolonga la actividad replicativa de las células. Esta enzima se encuentra activada en las células madre, embrionarias y en tejidos que necesitan renovarse continuamente. La telomerasa también se encuentra sobreexpresada en el 85% de los cánceres humanos, lo que promueve la longevidad de las células malignas. Por ello, como estrategia para revertir la inmortalización celular en el cáncer, se ha propuesto la inhibición de la telomerasa por pequeñas moléculas que interaccionan con las estructuras G4s presentes en el ADN telomérico. Asimismo, debido a que los G4s en los telómeros son capaces de formar estructuras de mayor orden, conocidas como multímeros de G-quadruplex, se están desarrollando moléculas capaces de interaccionar específicamente con estos multímeros, representando una diana más específica que los G4s monoméricos que se encuentran en otras regiones del genoma.

En resumen, la formación de los G4s está relacionada con la regulación de los procesos de transcripción y expresión génica, así como con la estabilidad genética. Actualmente existe una amplia área de investigación focalizada al diseño de pequeñas moléculas capaces de estabilizar e interaccionar de forma selectiva con las estructuras G4s de las regiones teloméricas.

Los G4s ofrecen distintas regiones para su reconocimiento molecular, como son su extensa superficie aromática con la cual es

posible que se produzcan interacciones de apilamiento π , así como los bucles, los surcos y el canal iónico, con los que se pueden establecer interacciones electrostáticas. Además, los G4s multiméricos presentan el bolsillo multimérico, el cual proporciona un motivo estructural de unión característico. Por ello, las moléculas que han sido identificadas como selectivas para las estructuras G4s suelen presentar una serie de características comunes, como superficies heterocíclicas aromáticas extendidas y grupos que presentan carga positiva a pH fisiológico.

En esta línea, el grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València ha desarrollado numerosos ligandos basados en poliaminas capaces de reconocer estructuras de ADN canónicas y no canónicas. En particular, en esta tesis se ha escogido la trifenilamina (TPA) como unidad aromática para el diseño de ligandos capaces de interactuar con G4s multiméricos. Para ello, se han unido dos unidades de TPA mediante una, dos y tres cadenas poliamínicas, generando topologías de tipo lineal, macrocíclica y criptando, respectivamente.

Otros aspectos relevantes para considerar en el diseño de ligandos de G4s es su captación celular. Generalmente, el tamaño y la carga a pH fisiológico de los ligandos G4s puede dificultar su internalización debido a la hidrofobicidad de la membrana celular, lo cual podría limitar su potencial terapéutico. Algunos de los ligandos de G4s sintetizados en esta tesis presentan una elevada carga positiva a pH fisiológico, de modo que se ha estudiado como la topología y la internalización de pequeñas moléculas de interés biológico pueden influir en su captación celular y su efecto terapéutico.

Glosario de abreviaturas, siglas y símbolos

δ	<i>Desplazamiento químico</i>
ϵ	<i>Coefficiente de extinción molar</i>
λ	<i>Longitud de onda</i>
μg	<i>Microgramo</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Micromolar</i>
μmol	<i>Micromol</i>
2Ap	<i>2-Aminopurina</i>
5-Fu	<i>5-Fluorouracilo</i>
A	<i>Adenina</i>
Å	<i>Ángstrom</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
AIE	<i>Emisión inducida por agregación</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
BG4	<i>Anticuerpo específico de G-quadruplex</i>
C	<i>Citosina</i>
°C	<i>Grados centígrados</i>
CDCl_3	<i>Cloroformo deuterado</i>
C.G.	<i>Cromatografía de gases</i>

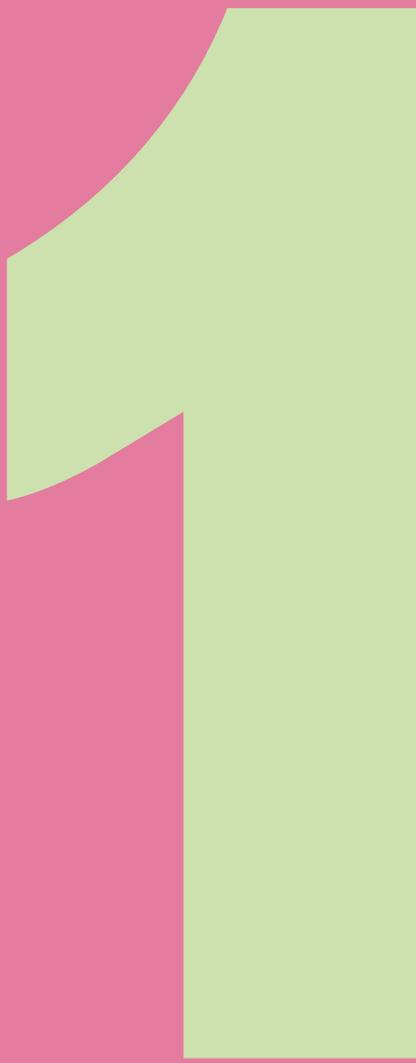
CH ₂ Cl ₂	<i>Diclorometano</i>
ChIP-Seq	<i>Inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación</i>
Cl ⁻	<i>Anión cloruro</i>
cm	<i>Centímetro</i>
COSY	<i>Espectroscopia de correlación homonuclear de resonancia magnética nuclear</i>
d	<i>Doblete</i>
D ₂ O	<i>Agua deuterada</i>
DBB	<i>1,2-dibenzoilbenceno</i>
DCFH-DA	<i>Diacetildiclorofluoresceína</i>
DMEM	<i>Medio Eagle modificado de Dulbecco</i>
DMSO	<i>Dimetil sulfóxido</i>
DMSO	<i>Sulfato de dimetilo</i>
DMSO-d ₆	<i>Dimetil sulfóxido deuterado</i>
DPBF	<i>1,3-difenilisobenzofurano</i>
ds	<i>Hélice de doble cadena</i>
E	<i>Potencial</i>
ELA	<i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>
ESI	<i>Ionización por electroespray</i>
FAM	<i>Fluoresceína</i>
FBS	<i>Suero fetal bovino</i>
FID	<i>Desplazamiento de indicador fluorescente</i>

FRET	<i>Transferencia de energía de resonancia de Förster</i>
FTD	<i>Demencia frontotemporal</i>
FXS	<i>Síndrome X frágil</i>
G	<i>Guanina</i>
G4	<i>G-quadruplex (singular)</i>
G4s	<i>G-quadruplexes (plural)</i>
G4-Seq	<i>Secuenciación de G-quadruplex</i>
h	<i>Hora</i>
H ⁺	<i>Catión hidrógeno</i>
H ₂ O	<i>Agua</i>
HCac	<i>Ácido cacodílico</i>
HCl	<i>Ácido clorhídrico</i>
HPLC	<i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>
HRE	<i>Expansión de repeticiones de hexanucleótidos</i>
HSQC	<i>Experimento de coherencia cuántica única heteronuclear</i>
IC ₅₀	<i>Concentración de ligando necesaria para disminuir un 50% una propiedad de la muestra</i>
J	<i>Constante de acoplamiento</i>
K ⁺	<i>Catión potasio</i>
K _a	<i>Constante de equilibrio</i>

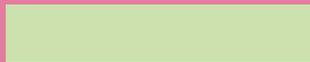
KCl	<i>Cloruro de potasio</i>
K _e	<i>Constante de estabilidad</i>
L	<i>Ligando</i>
LiCac	<i>Cacodilato de litio</i>
LiCl	<i>Cloruro de litio</i>
LiOH	<i>Hidróxido de litio</i>
m/z	<i>Relación masa - carga</i>
m	<i>Multiplete</i>
M	<i>Molar</i>
MD	<i>Dinámica molecular</i>
Me	<i>Grupo metilo</i>
MFC	<i>Microscopia de fluorescencia confocal</i>
mg	<i>Miligramo</i>
MHz	<i>Megahercio</i>
Milli-Q	<i>Agua ultrapura de doble destilación</i>
min	<i>Minuto</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mmol	<i>Milimol</i>
mM	<i>Milimolar</i>
mRNA	<i>ARN mensajero</i>
MTT	<i>Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio</i>
mV	<i>Milivoltio</i>

Na ⁺	<i>Catión sodio</i>
Na ₂ SO ₄	<i>Sulfato de sodio</i>
NaBH ₄	<i>Borohidruro de sodio</i>
NaCl	<i>Cloruro de sodio</i>
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</i>
nm	<i>Nanómetro</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio</i>
¹ O ₂	<i>Oxígeno singlete</i>
OGRE	<i>Regiones ricas en guanina con el potencial de formar estructuras G-quadruplex</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino</i>
PDB	<i>Banco de datos de proteínas</i>
PDS	<i>Piridostatina</i>
PG4S	<i>Secuencias putativas de formación de G-quadruplex</i>
Pyr	<i>Piranina, 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico</i>
R	<i>Rodamina</i>
RMN	<i>Resonancia magnética nuclear</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
RTS	<i>Ensayo de paralización de la transcriptasa inversa</i>
s	<i>Segundo</i>

SCSIE	<i>Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental</i>
sty49	<i>Sonda con fragmentos de anticuerpo específico de G-quadruplex telomérico</i>
t	<i>Triplete</i>
T	<i>Timina</i>
TAMRA	<i>Tetrametilrodamina</i>
T _m	<i>Temperatura de fusión o desnaturalización</i>
TMS	<i>Tetrametilsilano</i>
TO	<i>Naranja de tiazol</i>
TPA	<i>Trifenilamina</i>
TRIS	<i>Tampón tris(hidroximetil)aminoetano</i>
U	<i>Uracilo</i>
UV-Vis	<i>Ultravioleta - Visible</i>
Vide supra	<i>Véase arriba, del latín</i>



Introducción



Desarrollo de sondas
fluorescentes para ADN
telomérico

1.1. El almacenamiento de la información genética

1.1.1. Contexto histórico previo a los genes

Durante la segunda mitad del siglo XIX se descubrieron, aceptaron y consolidaron los conceptos que hoy en día constituyen los campos de la genética y de la biología molecular, entre ellos el traspaso de la información hereditaria. A continuación, presentaré un breve resumen de los principales hallazgos que condujeron a entender este proceso, así como a la molécula que alberga la información genética, el ADN.

En 1828, el botánico Robert Brown a partir de la observación de células vegetales identificó, como rasgo común en todas ellas, un gránulo al que llamó núcleo.^{a,1} Décadas más tarde, Louis Pasteur, Rober Remark y Rudolph Virchow demostraron que la formación de nuevas células solo podía provenir de otras células, *omnis cellula e cellula*, refutando la hipótesis de la generación espontánea vigente desde la Antigüedad.²⁻⁴ Durante el mismo periodo se estaban gestando los principios básicos de la herencia genética y la evolución. Charles Darwin y Alfred Wallace publicaron su teoría de la evolución por selección natural en 1858, y un año después, Darwin publicó su famoso libro *El origen de las especies a través de la selección natural*.^{5,6} En 1866, Gregor Mendel mediante experimentos de cruzamiento con guisantes estableció las leyes de la herencia genética,⁷ postulando que existen entes de naturaleza

^a En latín, *nucleus* significa semilla. A su vez, semilla en griego es *karyon*, por el cual se clasifican las células como células eucariotas, ya que se caracterizan por tener un núcleo rodeado de una membrana.

desconocida e inmutable responsables de la transmisión de los caracteres hereditarios a los que llamó genes. Mendel murió en 1884 sin que su trabajo fuera reconocido por la comunidad científica, sin embargo, Hugo Vries,⁸ Karl Correns⁹ y Tschermak¹⁰ asociaron en 1905 los factores genéticos descritos por Mendel a estructuras visibles dentro del núcleo llamadas cromosomas.

En 1866 Haeckel propuso que el núcleo contiene los factores responsables de la transmisión de los rasgos hereditarios,¹¹ lo que originó el nacimiento de la citogenética, causando un gran interés por este orgánulo. Flemming describió en 1879 por primera vez la mitosis, identificando la cromatina y el comportamiento de los cromosomas en este proceso.¹² Años más tarde, Boveri y Sutton establecieron que los cromosomas no solo albergan la información genética de la célula, sino que cada uno de ellos aporta partes diferentes del material hereditario.¹³

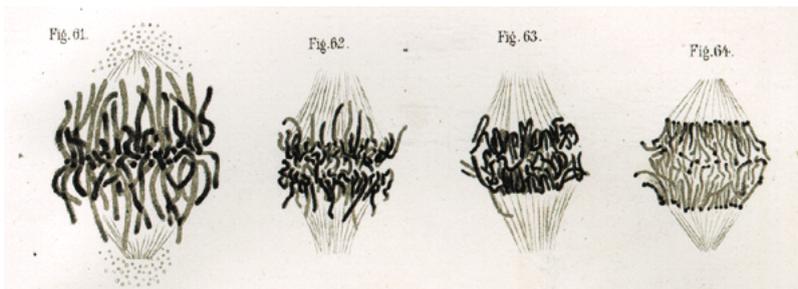


Figura 1.1. Fragmento extraído del dibujo de los cromosomas durante la mitosis, por Walter Flemming.¹⁴

Sin embargo, los citólogos de la época pensaban que los cromosomas no eran “nada más que cromatina”, ignorando la presencia de ADN, ya que se basaban únicamente en los métodos utilizados en aquel momento que

eran la microscopía y la tinción celular, para desentrañar los procesos de las células y, por ende, de la vida.¹⁵

En la segunda parte del siglo XIX, Friederich Miescher pensó que el conocimiento de la composición química de las células podría llegar a desentrañar los principios fundamentales del funcionamiento de los organismos vivos. Miescher, utilizando el pus procedente de vendajes usados en un hospital vecino, aisló una cantidad suficiente de leucocitos para comprobar que estaban formados por una única sustancia muy homogénea que denominó nucleína.¹⁶ Al contrario que las proteínas, esta nueva sustancia contenía fósforo y no azufre. Sin embargo, los resultados publicados por Miescher en 1871 fueron acogidos con cierto escepticismo por la comunidad científica, ya que criticaban que lo que precipitaba podían ser contaminantes proteicos de la célula y no la nucleína, aun cuando Miescher diferenció en sus trabajos claramente la nucleína y la proteína encontrada junto a la nucleína (protamina). Aun así, estos términos no fueron aceptados hasta una década después,¹⁷ cuando su discípulo Zacharias colocalizó la cromatina con la nucleína a través de un método de extracción combinado con tinción, demostrando que los cromosomas estaban formados por la nucleína de Miescher.¹⁸

Unos años más tarde, Albercht Kossel identificó los componentes químicos principales de los ácidos nucleicos, previamente conocidos como nucleína, trabajo por el cual se le concedió el Premio Nobel en Medicina en 1910.^{19,20} Como Miescher había descrito, Kossel observó que los ácidos nucleicos contenían grandes cantidades de ácido fosfórico, bases púricas (guanina y adenina) y pirimidínicas (timina, uracilo y citosina), así como un carbohidrato, al que identificó como pentosa.

1.1.2. Los logros de una hipótesis fallida

En las primeras décadas del siglo XX no se produjeron avances significativos en el conocimiento de los ácidos nucleicos hasta que Phoebus Levene, discípulo de Kossel, identificó y cuantificó a las cuatro bases nitrogenadas (nucleicas) por su fórmula empírica: guanina, adenina, citosina y uracilo, lo que se correspondía con el ácido ribonucleico o ARN. Asimismo, identificó al azúcar como la ribosa y confirmó la presencia de ácido fosfórico.²¹

Años más tarde, Levene investigando el ácido nucleico obtenido de timo de ternera, aisló la timina en lugar del uracilo, encontrando el ácido desoxirribonucleico o ADN.²² En 1921, Levene publicó sus resultados sobre la estructura del ADN y determinó las cuatro bases que lo constituían: guanina, adenina citosina y timina, con sus fórmulas empíricas y estructurales correctas, diferenciando el azúcar del ADN como desoxirribosa. Sin embargo, la estructura que propuso para el ARN no era completamente correcta ya que la unión del ácido fosfórico a la ribosa era errónea.²³

En la figura 1.2 se encuentran las estructuras originales propuestas por Levene y su colaborador Stuart Tipson en 1935,²⁴ para el ADN y el ARN.

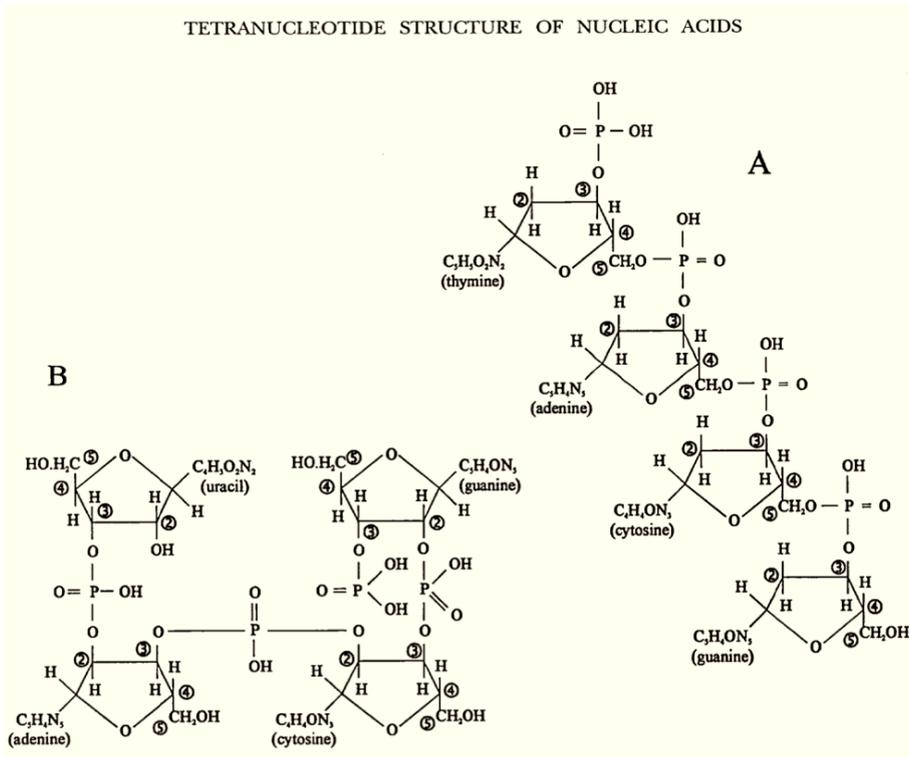


Figura 1.2. Estructuras propuestas por Levene y Tipson de los ácidos nucleicos en forma de tetranucleótidos. A. Ácido desoxirribonucleico. B. Ácido ribonucleico.^b

^b El enlace fosfato es incorrecto: el fosfato se muestra conectando el carbono 3' de una ribosa al carbono 2' de la siguiente ribosa. En realidad, el enlace fosfodiéster en el ARN y en el ADN conecta los carbonos 5' a 3' entre los azúcares.

Como fruto de sus trabajos, Levene propuso que el ADN tenía una estructura regular y se originó la hipótesis del tetranucleótido.²⁵ Esta hipótesis fue el resultado de una conclusión errónea causada por las limitadas técnicas analíticas disponibles en aquel momento. Hasta esa fecha se habían analizado muestras de trigo, levadura, timo de ternera y espermatozoides de pez, y todas ellas contenían aproximadamente la misma relación entre las cuatro bases; por ello se pensó que las bases deberían estar presentes en cantidades iguales en los ácidos nucleicos.²⁶ En esta hipótesis, se proponía que el ADN tenía carácter polimérico constituido por la misma secuencia de cuatro nucleótidos repetida una y otra vez. Esta conjetura llevó a pensar que el ADN no podría desempeñar ningún papel fundamental en la célula. Además, la sencillez de esta hipótesis hizo que los científicos de la época pensaran que la información genética debía de estar almacenada en las proteínas, debido a su mayor complejidad; las proteínas están compuestas por 21 aminoácidos mientras que el ADN, solo de cuatro nucleótidos, demasiados pocos, se pensaba, para almacenar la enorme cantidad de información genética.²⁷

1.1.3. El principio de transformación del ADN

Frederick Griffith en 1928, trabajando en la vacuna contra la neumonía, observó que había un “factor transformador”, que transmitía información entre bacterias muertas virulentas (cepa S) y bacterias vivas no virulentas (cepa R).²⁸ Era la primera vez que, aparte de la fertilización, se observaba la transmisión de información genética de un organismo a

otro, pero todavía no se sabía qué era exactamente lo que se había transmitido.

Esto no se supo hasta que en 1944 Oswald Avery y sus compañeros, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, descubrieron que el principio de transformación de Griffith era en realidad el ácido nucleico. Estos científicos separaron el ADN purificado de la cepa S del neumococo del resto de componentes, mostrando que este ADN era capaz de transformar la cepa bacteriana no virulenta en la virulenta, mientras que esta transmisión no se producía cuando se empleaban enzimas que degradaban el ADN.^{29,30} Con estos descubrimientos se encontró el eslabón perdido que unía el material genético al ADN, pero todavía se desconocía cómo lo hacía.

En la segunda mitad del siglo XX, Erwin Chargaff comenzó a desenmascarar este entresijo, estableciendo la especificidad de las relaciones entre los diferentes nucleótidos de los organismos.^{31,32} Tras analizar los resultados de Avery y sus compañeros, Chargaff demostró en 1950 que el ADN contenía cantidades iguales de las bases adenina y timina, así como de guanina y citosina, lo que significaba que el número de purinas era igual al número de pirimidinas.³³ A diferencia de Levene, la serendipia había jugado a favor de Chargaff, ya que utilizó organismos que contenían diferentes relaciones de nucleótidos en sus ácidos nucleicos. Además, descubrió que las proporciones de los pares de bases de AT-GC variaban entre especies, algunos organismos tenían excesos de AT, mientras que en otras formas de vida predominaban las GC. Es decir, los mismos nucleótidos no se repiten en el mismo orden, como proponía Levene.

1.1.4. Si las proteínas forman hélices... ¿el ADN también?

En la década de 1940 se comenzó a utilizar la difracción de rayos X, para resolver la estructura de cristales de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Linus Pauling y Robert Corey dedujeron en 1951 las dos estructuras principales de las proteínas: la hélice α y la hoja β , conocidas por formar los esqueletos de miles de ellas.³⁴ Se encontró que, al situarse los enlaces de hidrógeno en un mismo plano, los grupos carbonilo de un aminoácido podían actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno del grupo amino de otro residuo. Al construir mediante modelos de hélices estas observaciones, solo había dos posibilidades: la hélice α , levógira y la hélice γ , dextrógira.

Paralelamente, James Watson, biólogo molecular sin ninguna noción de cristalografía y Francis Crick, físico que en aquel momento estaba trabajando con fotografías de rayos X de la hemoglobina para resolver su estructura, se asociaron para desentrañar la estructura del ADN. Inicialmente, concebían la estructura del ADN como una estructura helicoidal similar a las definidas por Pauling.³⁵

Crick colaboraba con Maurice Wilkins, físico que investigaba estructuras de biomoléculas como el ADN mediante rayos X en el Kings College de Londres. En su equipo desarrollaba su investigación la cristalógrafa Rosalind Franklin, quien trataba de establecer la estructura del ADN mediante aproximaciones cristalográficas. Sus ensayos iniciales indicaban que el ácido desoxirribonucleico no era helicoidal, aunque determinó que su esqueleto de azúcar-fosfato se distribuía en el exterior de la molécula.³⁶

Pauling por su parte, tras haber descubierto la estructura de las proteínas se embarcó a su vez en la búsqueda de la estructura del ADN. Basándose en la hélice α , propuso un modelo consistente de una triple hélice con las cadenas fosfatadas orientadas hacia el interior, el cual resultó fallido.³⁷

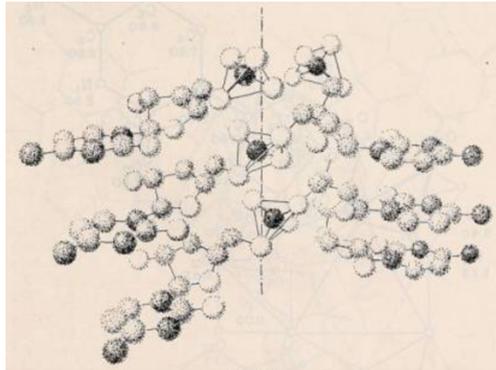


Figura 1.3. Diagrama de la estructura de ADN propuesta por Pauling.³⁷

Tras ver que el reconocido cristalógrafo Pauling se había interesado por el ADN, Watson y Crick se centraron en su investigación para descubrir la estructura del ADN. Se basaron en las reglas de Chargaff para elucidar que las purinas se unían mediante enlaces de hidrogeno a las pirimidinas en el interior de una hélice. Pero esta idea no sólo provenía de las reglas de Chargaff, Wilkins había estado reproduciendo el trabajo de rayos X de Franklin y se lo mostró a Watson. La fotografía de rayos X de Franklin revelaba claramente un patrón helicoidal, pero todavía no tenían una hipótesis que les ayudara a ordenar las bases en su interior.³⁵

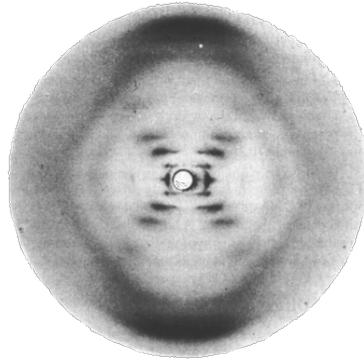


Figura 1.4. Fotografía de rayos X tomada por Franklin.³⁸

Dado que las purinas y las pirimidinas tienen formas distintas, empezaron a conjeturar si cada molécula de ADN estaba formada por dos cadenas de secuencias, ya que eso le aportaría regularidad a la estructura, y ésta era necesaria para explicar la estructura de los cristales analizados. Jerry Donahue, cristalógrafo de CalTech, les ayudó indicando que las formas tautoméricas de las bases que debían utilizar eran cetónicas. Utilizando modelos, Watson se dio cuenta de que un par adenina-timina unido por dos enlaces de hidrogeno, tenía casi una forma idéntica a un par guanina-citosina unido por, al menos, dos enlaces de hidrógeno. En resumen, dos secuencias irregulares de bases nitrogenadas podían estar empaquetadas de forma regular en el centro de una hélice si se mantenía que una adenina siempre se emparejaba con una timina, y una guanina con una citosina. Además, esto significaba que las secuencias de bases de las dos cadenas entrelazadas eran complementarias, sugiriendo que una sola cadena podía ser el molde para la síntesis de la complementaria. Crick comenzó a realizar un modelo en el cual se veía a simple vista que los dos enlaces glicosídicos (unión de la base con el azúcar)

proporcionaba un eje helicoidal a la estructura. La hélice resultante era dextrógira y sus dos cadenas avanzaban en sentidos opuestos. Los dos esqueletos de azúcar y fosfato se enroscaban en el exterior y los pares de bases horizontales unidos por puentes de hidrógeno formaban el centro de la hélice. Para comprobar si la configuración era la correcta, había que probarlo mediante rayos X. Le enseñaron el modelo a Wilkins y tras revisar los datos obtenido por rayos X, tanto Franklin como él respaldaron el modelo de la doble hélice.³⁵

En 1953 Watson y Crick publicaron en Nature el famoso artículo en el que presentaban la doble hélice de ADN, en el que mencionan que sus resultados fueron inspirados por los conocimientos experimentales no publicados de Wilkins y Franklin.³⁹ Ciñéndonos al contenido científico, se descubrió finalmente la estructura del ADN y, además, que el apareamiento específico de las bases sugería que una hebra era la complementaria de la otra, proponiendo el mecanismo de replicación del ADN.

1.2. Componentes y estructura del ADN de doble hélice

Tanto el ADN como el ARN están compuestos por bases nitrogenadas, azúcares y grupos fosfato (ver Figura 1.5).⁴⁰

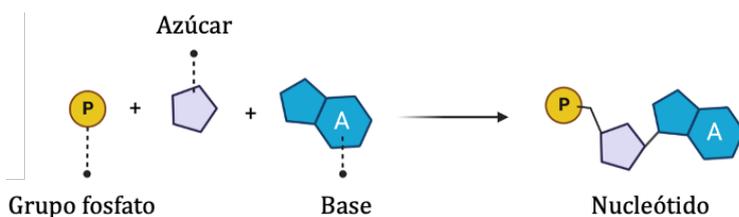


Figura 1.5. Componentes de un nucleótido.

El ADN contiene dos tipos distintos de bases aromáticas heterocíclicas con un anillo de purina: la adenina y la guanina. La adenina tiene un grupo amino en el carbono C6 de la purina, mientras que la guanina presenta un grupo amino en la posición 2 y un grupo carbonilo en la posición 6 (figura 1.6).

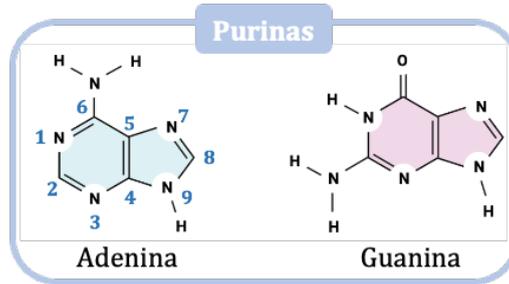


Figura 1.6. Estructuras de las bases purinas.

Las dos bases pirimidínicas del ADN son la timina y la citosina; la timina tiene la posición 5 metilada y grupos carbonilo en las posiciones 4 y 2, mientras que la citosina contiene solo un grupo amino en posición 4.⁴¹ El uracilo es similar a la timina, aunque carece del grupo metilo en posición C5 y no se encuentra en el ADN. Este forma parte del ARN, reemplazando a la timina como base pirimidínica (figura 1.7).

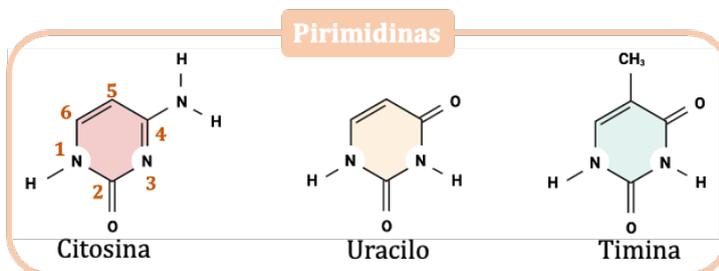
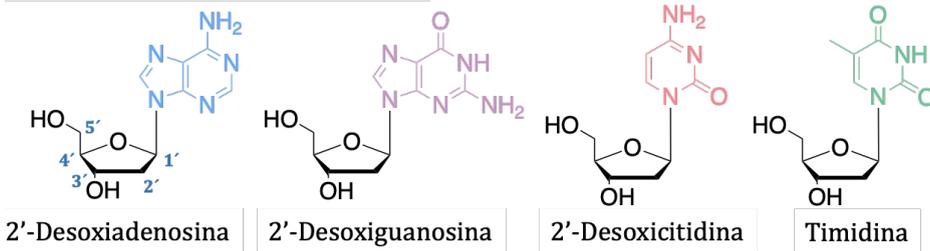


Figura 1.7. Estructuras de las bases pirimidínicas.

Los nucleósidos son constituyentes monoméricos de los ácidos nucleicos formados por la combinación de la base nitrogenada y el azúcar; el enlace entre estos dos componentes se llama enlace glicosídico (figura 1.8).

A. 2'-Desoxirribonucleósidos (ADN)



B. Ribonucleósidos (ARN)

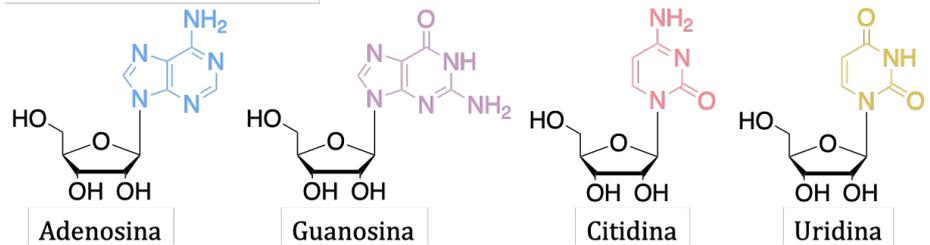


Figura 1.8. Estructuras de los nucleósidos de ADN y ARN.⁴⁰

El grupo *N*-glicosídico está unido al N1 de la base pirimidínica y al N9 de las bases púricas. En los ribonucleósidos (constituyentes del ARN), el grupo *N*-glicosídico es el anillo β -D-ribofuranosilo, y en 2'-desoxirribonucleósidos (constituyentes del ADN) es el 2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosilo. El prefijo “ribo” hace referencia al azúcar que contiene tres centros estereogénicos en adición al carbono anomérico C1'. Las 2-deoxipentosas contienen solo dos centros estereogénicos, por ello su nombre correcto es “eritro”.

El término nucleótido se refiere a la combinación base, azúcar y grupo fosfato. Tanto en el ADN como en el ARN los nucleótidos están unidos entre sí mediante el enlace 3'-5' fosfodiéster (figura 1.9). Un rasgo interesante de la estructura del polinucleótido es que tiene dos extremos química y biológicamente distintos llamados 5' y 3', lo que le confiere a cada hebra de ADN cierta polaridad.³⁷

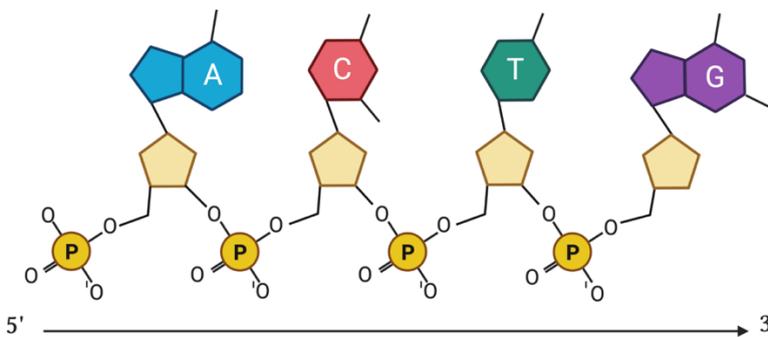


Figura 1.9. Ilustración esquemática de una cadena polinucleótida.

Dos cadenas de polidesoxirribonucleótido forman la estructura más conocida del ADN, la cual corresponde a la doble hélice. Estas dos cadenas parten hacia direcciones opuestas y están unidas mediante puentes de hidrógeno formando los pares de bases AT (adenina y timina) y CG (guanina y citosina). Los grupos NH de las bases sirven como dadores de enlaces de hidrogeno, y el oxígeno del grupo carbonilo y los nitrógenos del anillo actúan como aceptores de enlaces de hidrógeno. El par CG es considerablemente más estable que el par AT, ya que el primero está formado por tres puentes de hidrógeno y el segundo solamente por dos (figura 1.10). Además, los puentes de hidrógeno no son la única interacción responsable de la estructura de doble hélice. Las

interacciones verticales de apilamiento entre los pares de bases llegan a estabilizar la estructura más que las interacciones horizontales por puentes de hidrógeno. En condiciones fisiológicas el ADN es polianiónico y las cargas negativas están neutralizadas por una nube dinámica de especies catiónicas. La representación de la orientación de las dos hebras en el ADN (figura 1.10), indica que avanzan en direcciones opuestas, una en dirección 5' a 3' y la otra de 3' a 5'.⁴²

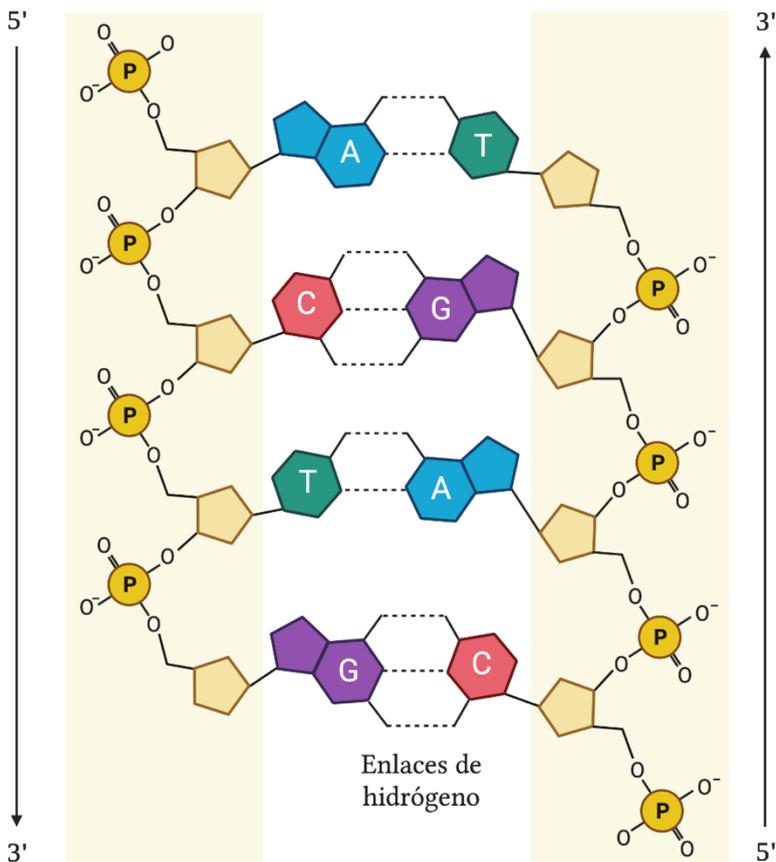


Figura 1.10. Ilustración esquemática de la orientación de las hebras en la doble hélice.

Los pares de bases presentes en la doble hélice se llaman pares de Watson-Crick, son aproximadamente planos y perpendiculares al eje de la doble hélice. Por cada vuelta que da la hélice hay 10.5 pares de bases. Debido a que los pares de bases son asimétricos, se crean dos surcos en la superficie del cilindro que forma la doble hélice (figura 1.11).^{43,44}

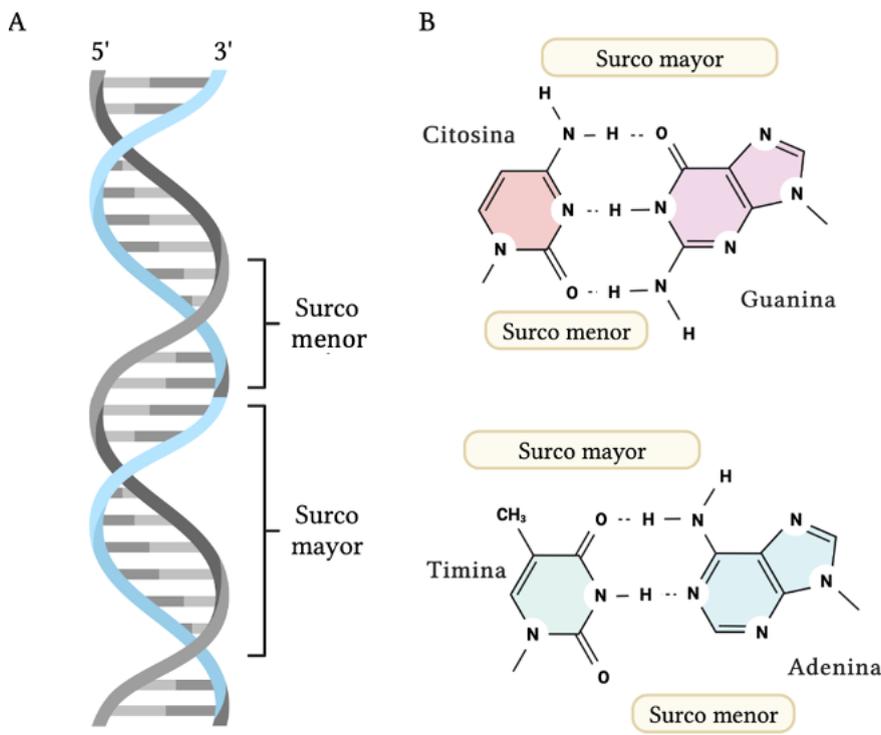


Figura 1.11. (A) Representación esquemática de la doble hélice y (B) pares de bases de Watson-Crick.

La doble hélice de ADN puede generar diferentes topologías como la de tipo A (A-ADN) o la de tipo B (B-ADN), ambas representadas en la figura 1.12. La segunda, la B-ADN representa la estructura común del ADN en disolución acuosa (o en condiciones de alta hidratación) con

concentraciones bajas de sales. Por otro lado, la estructura A-ADN se produce en condiciones de baja hidratación con elevadas concentraciones de sales. Ambas estructuras son dobles hélices dextrógiras. La conformación alrededor del enlace *N*-glicosídico de los nucleósidos es *anti* en ambas hélices. Los grupos fosfato se encuentran localizados en la superficie externa del cilindro que forma la hélice.³⁹

La diferencia entre ambas hélices la encontramos en las distancias entre los pares de bases, que es mayor en B-ADN (0.34 nm) que en A-ADN (0.23 nm). Además, en la B-ADN los pares de bases son perpendiculares al eje de la hélice mientras que en A-DNA se encuentran desviados 20° de la orientación perpendicular. Las bases en A-DNA se encuentran desplazadas del eje de la hélice (4.5 Å), siendo por lo tanto más ancha que B-ADN. Respecto a los surcos, en el dúplex tipo B el surco mayor es amplio, pero poco profundo y en A-ADN es estrecho pero profundo. En los surcos menores la situación es la opuesta, en B-ADN es estrecho y profundo, pero en A-ADN, amplio y poco profundo. A pesar de ser la B-ADN la estructura predominante en disolución acuosa, la A-ADN también ha sido reconocida por ser la estructura del ARN de doble hélice.⁴⁵

Con concentraciones muy elevadas de sales, el ADN adopta la conformación anómala de tipo Z o Z-ADN (Figura 1.12).⁴² Se trata de una doble hélice levógira, en la que normalmente se encuentran las purinas con el enlace *N*-glicosídico en conformación *sin*, en contraste con la configuración normal *anti*. Debido a esto, la cadena adopta una estructura de zigzag.

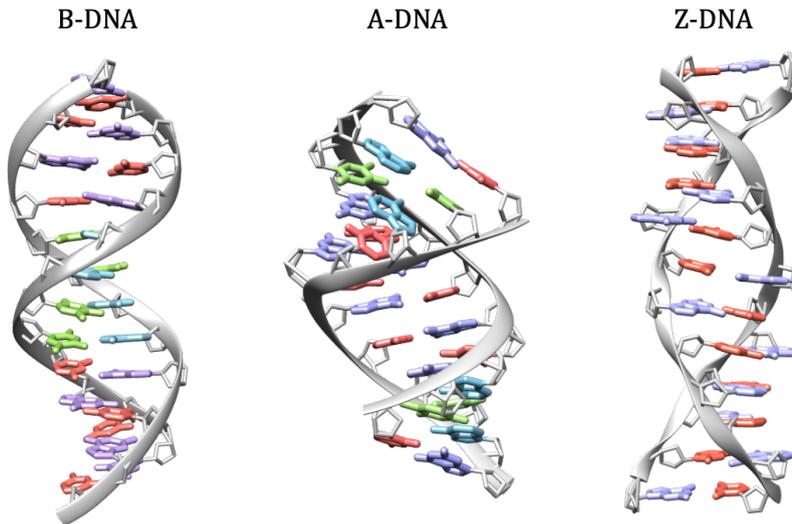


Figura 1.12. Estructuras cristalinas de las formas B, A y Z de la doble hélice. Se ha empleado el programa ChimeraX, representando adeninas en azul, timinas en verde, citosinas en rojo y guaninas en violeta. Los correspondientes PDB son: B-ADN: 1BNA⁴⁶, A-DNA: 5MVK⁴⁷, y Z-DNA: 4OCB⁴⁸.

La naturaleza del ADN de *doble* hélice tiene su significancia biológica. Primero, las dos hebras complementarias proporcionan los moldes a partir de los cuales el ADN puede ser copiado por la ADN polimerasa, produciendo dos copias exactas de la información genética. Segundo, cuando se producen lesiones en cualquiera de las hebras, la hebra complementaria es utilizada como patrón de reparación. Tercero, la estructura de B-ADN protege la identidad química de la información genética; gracias a los puentes de hidrógeno, las interacciones de apilamiento de los pares de bases y la hidratación de la hélice, se estabiliza y se aísla químicamente el código genético del entorno.⁴²

El ADN de las células eucariotas tiene una estructura dinámica en la cual predomina la doble hélice B-ADN.⁴⁹ A su vez, la B-ADN se encuentra empaquetada en estructuras plegadas formando bucles alrededor de clústeres de proteínas que consisten en ocho histonas. Las unidades básicas de empaquetamiento se llaman nucleosomas, los cuales se ordenan entre si formando la cromatina, que se condensa para formar los cromosomas (figura 1.13).⁵⁰

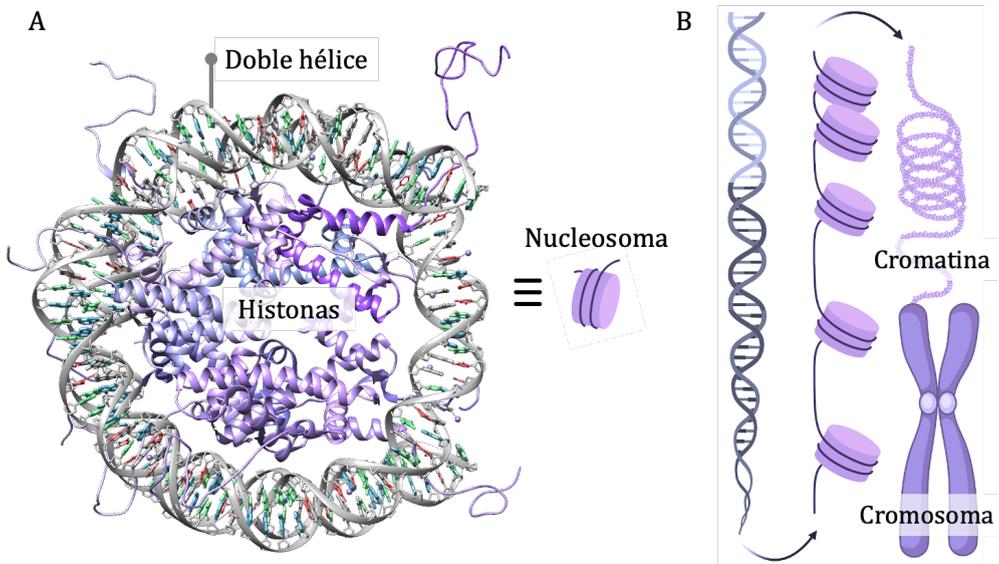
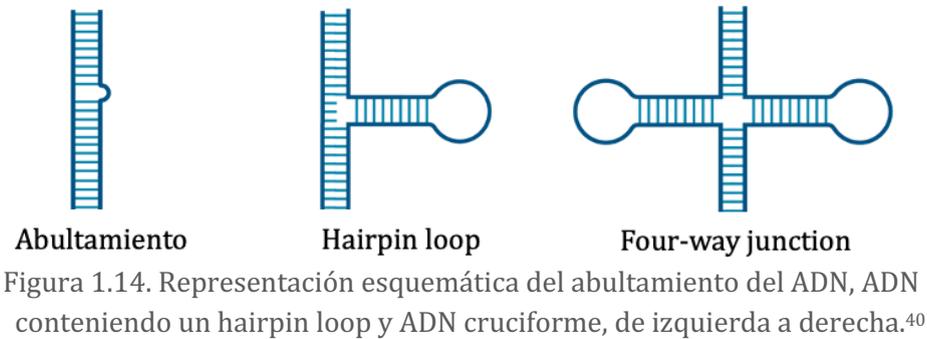


Figura 1.13. (A) estructura de un nucleosoma, representado la doble hélice en gris y las histonas en violeta. PDB 1KX5.⁵¹ (B) Representación esquemática del empaquetamiento del ADN.

Así, la estructura de la doble hélice, al menos temporalmente, es capaz de formar abultamientos,⁵² bucles horquilla conocidos como hairpin loops,⁵³ uniones de tipo de cruciforme también conocidas como four-way junction (figura 1.14).⁵⁴



1.3. Más allá de lo canónico

En 1959, Hoogsteen al analizar co-cristales de 9-metil-adenina y 1-metil-timina, no observó la formación de los pares de bases de tipo Watson-Crick,⁵⁵ sino una organización en que la adenina se asociaba con la timina en posición invertida (A*T, figura 1.15). Este tipo distinto de asociación de bases se conoce como el apareamiento de bases de Hoogsteen. Las estructuras helicoidales que están compuestas por los pares de bases de Watson-Crick se llaman estructuras canónicas, mientras que aquellas que tienen otros apareamientos, como los de tipo Hoogsteen, se llaman no-canónicas.^{40,56}

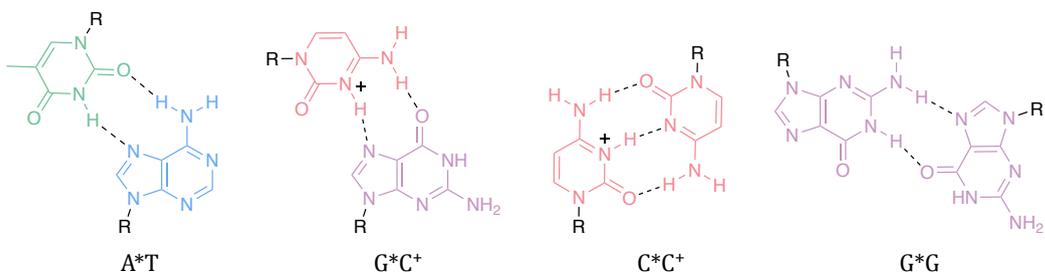


Figura 1.15. Representación de los pares de bases de tipo Hoogsteen.

En 1960, Alexander Rich identificó la estructura de triple hélice (figura 1.16), la cual se forma cuando una tercera hebra de ADN invade el surco mayor de una doble hélice mediante pares de Hoogsteen G^{*}C⁺ (figura 1.15).⁵⁷ Asimismo, en condiciones ácidas en regiones de ADN ricas en citosina, las citosinas hemi-protonadas pueden formar pares de bases C^{*}C⁺ (figura 1.15) que dan lugar a una estructura tetramérica conocida como *i*-motif (ver figura 1.16).⁵⁸ Análogamente en 1962, los análisis de rayos X de geles de ácido poliguanílico sugerían asociaciones de cuatro guaninas mediante enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen G^{*}G (figura 1.15), dando lugar a una conformación plana. Esta asociación estructural se conoce como G-tétrada o *G*-*quartet*. El apilamiento de estas tétradas constituye la estructura no canónica tetramérica G-quadruplex (G4), representada en la figura 1.16, la cual se detallará más adelante.⁵⁹

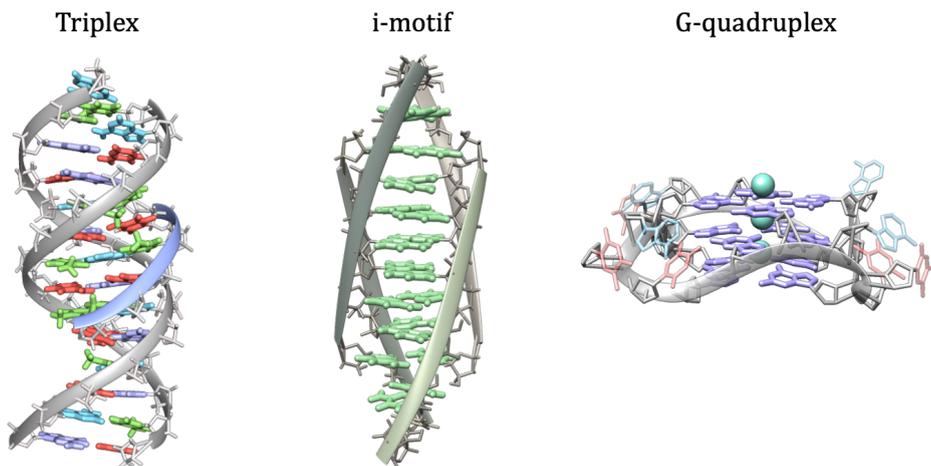


Figura 1.16. Estructuras terciarias no canónicas de tríplex, *i*-motif y g-quadruplex. Representadas con ChimeraX. PDB: tríplex 1BWG⁶⁰, *i*-motif: 1I9K⁶¹, G-quadruplex: 1KF1⁶².

Es ampliamente aceptado que la información genética está exclusivamente determinada por las secuencias de ADN y ARN, concepto acuñado por Crick como “dogma central” de la biología molecular.⁶³ Se considera también que la expresión génica está regulada principalmente por proteínas como factores de transcripción y de traducción. Sin embargo, los propios ácidos nucleicos también pueden ejercer este papel mediante la formación de estructuras no canónicas.⁶⁴ Una ilustración de dicha excepción es la formación de las estructuras de tipo G-quadruplex (G4s), ya que éstas regulan procesos como la replicación, la transcripción y la traducción, sin afectar a la información que contiene la secuencia del ácido nucleico.⁶⁵ De este modo, podemos diferenciar dos niveles de información en el ADN; mientras los pares de bases de Watson-Crick son responsables de la “información genética”, los pares de bases no canónicos generan estructuras que son responsables de la “función epigenética”.

Desde el descubrimiento de estas estructuras no canónicas, se ha ido identificando su función en las células. En particular, las estructuras G4s han suscitado un gran interés ya que existen evidencias crecientes de la formación de estas estructuras en oncogenes y se las ha asociado con la regulación y el desarrollo del cáncer.⁶⁶⁻⁶⁸ Además, se ha asociado la formación de estructuras G4s en el ARN con la aparición de ciertas enfermedades neurodegenerativas.⁶⁹ Debido a ello, se ha impulsado su estudio en los últimos años como diana terapéutica.⁷⁰

A lo largo de este capítulo se describirá la estructura de G-quadruplex, su localización en el genoma y las funciones biológicas que presenta ya que ha sido escogida como diana terapéutica en esta tesis.

1.4. G-quadruplex

El primer indicio de la formación de estructuras de G-quadruplex se le atribuye a Ivar Bang en 1910, quien identificó la formación de un gel utilizando altas concentraciones de ácido guanílico.⁷¹ Cincuenta años después, Gellert y Davies demostraron mediante difracción de rayos X que los ácidos guanílicos adoptan estructuras tetraméricas.⁵⁹ En estas estructuras, cuatro guaninas forman una disposición cuadrado-plana en la cual cada guanina está enlazada mediante dos enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen a las guaninas adyacentes (figura 1.17). Esta disposición se llama G-tétrada o *G-quartet*, y como se indicó anteriormente, el apilamiento de estas tétradas da lugar a la estructura G-quadruplex. Finalmente, la formación de las estructuras G4s fue confirmada en 1974 por estudios de difracción de rayos X de fibras de ácido poliguanílico.^{72,73}

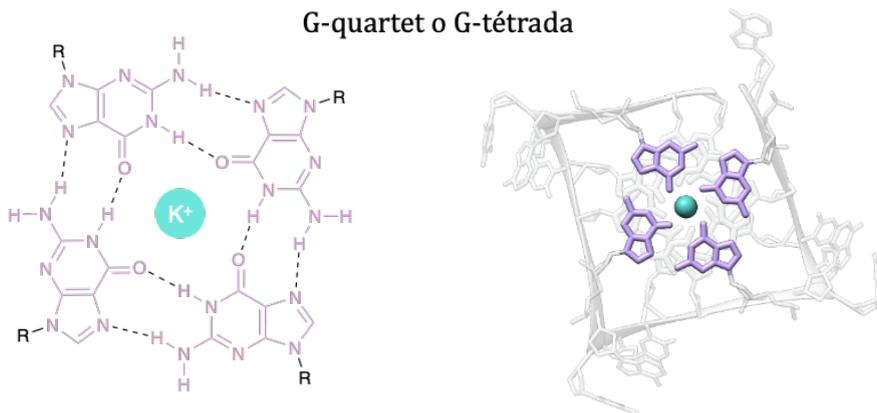


Figura 1.17. Esquema de la estructura del G-quartet o G-tétrada.

Las cargas negativas de las cadenas fosfatadas de las estructuras G4s se compensan principalmente por cationes monovalentes K^+ o Na^+ , muy

abundantes a nivel fisiológico, que interaccionan con los átomos de oxígeno de las guaninas (O6), contribuyendo, por otra parte, a la estabilización de la estructura.^{74,75} Una secuencia rica en guaninas puede formar estructuras G4s diferentes en función de los cationes monovalentes interactuantes. Las estructuras con K^+ están consideradas de mayor relevancia biológica debido a su mayor concentración intracelular (140 mM), en comparación con el Na^+ (5-15 mM). La localización de los cationes entre las tétradas depende de la naturaleza del ion; el Na^+ al ser de menor tamaño se puede encontrar en distintas posiciones: entre dos tétradas, en posición intermedia (menos simétrica) y coplanar a las bases de guanina, siendo esta última la predominante; mientras que el K^+ se encuentra siempre equidistante entre ambas tétradas.^{76,77}

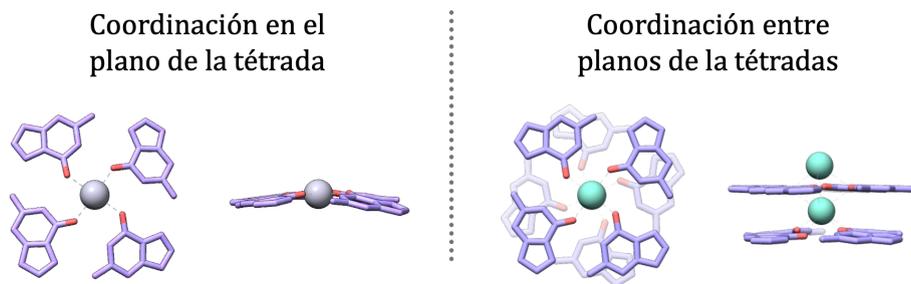


Figura 1.18. Representación de las geometrías de coordinación presentes en los G-quadruplex. Realizadas con ChimeraX, en gris Na^+ y en azul K^+ . PDB izquierda: 352D,⁷⁸ derecha: 1KF1.⁶²

Las guaninas de las tétradas pueden adoptar la conformación glicosídica *anti* o *sin*; las guaninas de hebras con la misma dirección (hebras paralelas) adoptan la misma conformación glicosídica, mientras que

aquellas hebras que van en direcciones opuestas (antiparalelas) adoptan diferentes conformaciones glicosídicas.^{79,80}

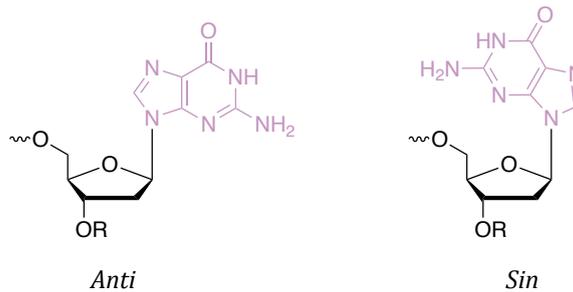


Figura 1.19. Conformaciones anti y sin de la base de guanina relativa al azúcar en los nucleótidos.

Los G-quadruplex pueden ser intramoleculares o intermoleculares, dependiendo de si están formados por una cadena de ADN o varias. En función de la direccionalidad de las hebras, estas estructuras pueden adoptar distintas topologías: paralela, antiparalela o híbrida. Un G-quadruplex es paralelo cuando todas las hebras que componen las tétradas se dirigen en una misma dirección, antiparalelo cuando dos hebras son paralelas y las otras dos se encuentran en dirección opuesta, o híbrido o mixto cuando tres hebras tienen la misma dirección (figura 1.20).

Las hebras en los G4s intramoleculares están conectadas por diferentes tipos de bucles: de tipo hélice para conectar hebras paralelas, laterales para conectar hebras antiparalelas adyacentes, y diagonales para conectar hebras antiparalelas a través de la tétrada.⁸¹

Cabe destacar que, las estructuras de los G4s no solo están definidas por la secuencia primaria de nucleótidos, sino que agentes

externos como cationes, temperatura y biomoléculas también influyen sobre la estructura y/o topología final. Este es el caso de las secuencias presentes en los telómeros, formadas por repeticiones del hexanucleótido $d(\text{TTAGGG})_n$, capaces de plegarse en diferentes estructuras G4s.⁶⁹

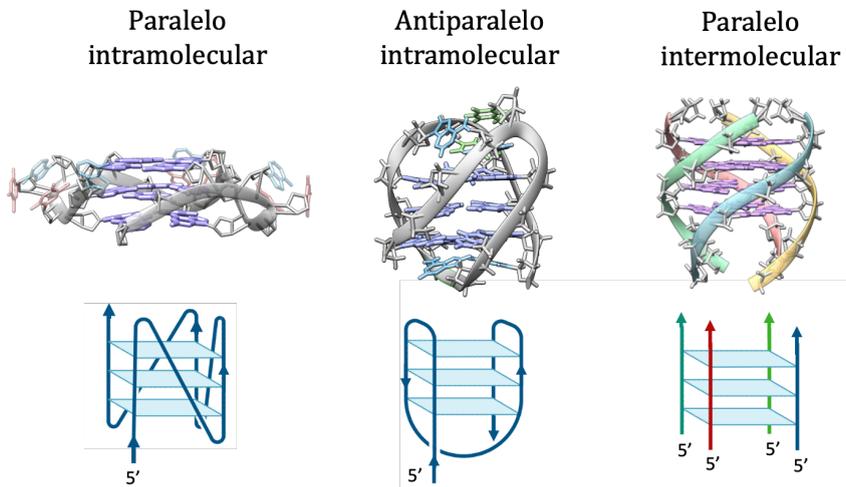


Figura 1.20. Estructuras cristalinas de G-quadruplex intramolecular paralelo y antiparalelo de secuencias teloméricas e intermolecular paralelo. Representadas con Chimera, PDB intramolecular paralelo: 1KF1,⁶² antiparalelo 143D⁸² y paralelo tetramérico 139D⁸³.

1.5. Localización de las secuencias putativas de formación de G-quadruplex

A través de análisis bioinformáticos se han encontrado cerca de 376.000 secuencias de ADN en el genoma humano que potencialmente pueden formar estructuras G-quadruplex. Las secuencias putativas de formación de G4s, del inglés, *Putative G4-Forming Sequences* (PG4s), fueron identificadas utilizando algoritmos que reconocían la secuencia siguiente: $G_{\geq 3}N_{L1}G_{\geq 3}N_{L2}G_{\geq 3}N_{L3}G_{\geq 3}$, donde N_{L1} , N_{L2} y N_{L3} representan las secuencias de los bucles de los G4s, con longitudes entre 1 y 7 nucleótidos.⁸⁴ Sin embargo, debido a su simplicidad, esta secuencia de búsqueda ignora otras posibles estructuras G4s.⁸⁵ La localización de las PG4s en el genoma no es aleatoria; éstas se encuentran en regiones funcionales del genoma y están conservadas en diferentes especies.⁸⁶ Estas regiones se asocian a la regulación del genoma, como los telómeros, regiones promotoras y regiones 5' y 3' no traducidas.⁸⁴ Existen numerosas herramientas y algoritmos de búsqueda de PG4s en secuencias indicadas de ADN o en genomas, como por ejemplo: ImGQfinder⁸⁷ y AllQuads,⁸⁸ herramientas de puntuación y ventana deslizante G4Hunter,^{89,90} pqsfinder⁹¹ y QGRS Mapper,⁹² y la herramienta de aprendizaje Quadron.⁹³

Por otra parte, existen distintas técnicas para identificar tanto la formación como la topología de estructuras G-quadruplex. *In vitro*, estos métodos pueden dividirse en dos categorías: métodos biofísicos y bioquímicos.

Mediante métodos biofísicos, como la espectroscopia de dicroísmo circular, es posible determinar la topología de la estructura G-quadruplex.⁹⁴ Por otro lado, se puede monitorizar la estabilidad termodinámica de estas estructuras observando los cambios de las bandas de UV con la temperatura.⁹⁵ Asimismo, los protones imino de las guaninas implicadas en las G-tétradas presentan valores característicos de desplazamiento químico en RMN.⁹⁶ Otro método es el empleo de sondas fluorescentes que cambian su emisión tras unirse a los G4s.⁹⁷ Algunas de estas técnicas han sido utilizadas en este trabajo y se describirán en el capítulo 3 de *Material y métodos*. Cabe mencionar que estas metodologías están limitadas al estudio de secuencias cortas de oligonucleótidos y, por ello, no tienen en cuenta el efecto de las secuencias colindantes.

Para analizar secuencias más largas se puede hacer uso de las técnicas bioquímicas. En el ensayo de detención de la ADN polimerasa, la formación del G4 en la cadena molde puede obstaculizar a la ADN polimerasa, deteniendo la acción del cebador, identificando que en esa localización había un G4.⁹⁸ Otros ensayos como el de sulfato de dimetilo seguido de la escisión por piperidina, también permiten observar en qué regiones de una secuencia de ADN se forman los G4s. Este ensayo está basado en que los nitrógenos N7 que forman parte de las guaninas están protegidos frente a la metilación. Existen otros métodos bioquímicos desarrollados para estudiar los ARN G4s, como el ensayo de paralización de la transcriptasa inversa (RTS) descrito por Kwok y Balasubramanian, donde ésta se detiene por la formación de la estructura G4 en el ARN durante la transcripción inversa.⁹⁹

Para determinar la distribución y proporción de los G4s en todo el genoma, se utilizan técnicas de secuenciación de alto rendimiento, como G4-seq. Chambers y colaboradores mediante esta técnica obtuvieron la primera prueba experimental que validó la formación de los G-quadruplex predichos en el genoma por algoritmos computacionales.¹⁰⁰ Se trata de una tecnología de secuenciación estándar modificada para mapear G4s a lo largo del genoma. Durante la secuenciación estándar, el genoma de interés se fragmenta en pequeñas secuencias de ADN (300 pares de bases) que se inmovilizan sucesivamente en una superficie. La ADN polimerasa se encarga de la síntesis de la secuencia complementaria a la secuencia inmovilizada en la superficie. El resultado es una secuencia de referencia para cada ADN analizado (lectura 1, figura 1.21). Tras la lectura 1, se secuencian los mismos fragmentos (lectura 2), pero esta vez en presencia de agentes estabilizantes de estructuras G4s como iones o ligandos específicos. Si durante este segundo paso el ADN se pliega en estructuras G4s, la ADN polimerasa se bloquea y no puede procesar la secuencia de ADN (figura 1.21). Al comparar ambas lecturas, el lugar donde hay una mayor probabilidad de encontrar estructuras G4s es donde no hay correspondencia entre ellas.

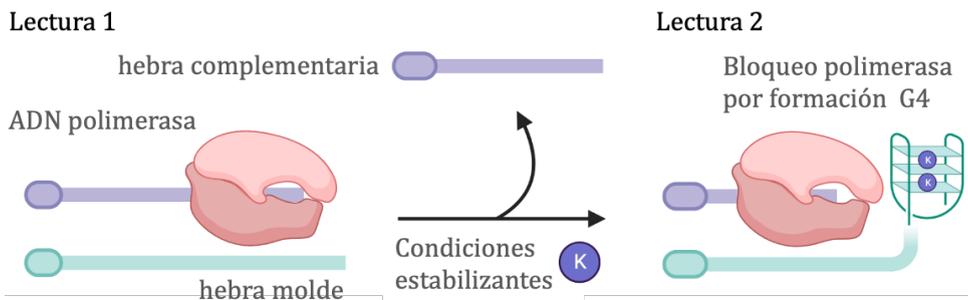


Figura 1.21. Representación esquemática de la técnica G4-seq.

En un estudio de G4-seq se identificaron 716.310 secuencias PG4s, casi más del doble de las predichas por métodos bioinformáticos. Esto es debido a que estas estructuras incluyen G4s con grandes bucles y abultamientos que no se pueden predecir mediante el uso de métodos bioinformáticos.^{101,102} Sin embargo, esta metodología tiene limitaciones puesto que algunas secuencias pueden formarse en células, pero no *in vivo*, así como verse influenciada por el efecto de las proteínas.

Asimismo, es importante considerar los efectos de la arquitectura de la cromatina y sus proteínas en la formación y estabilidad de los G4s. Utilizando la inmunoprecipitación de la cromatina seguida de la secuenciación de alto rendimiento (G4-ChIP-seq) con el anticuerpo específico de G4s BG4, se han detectado 10.000 secuencias de G4s en el ADN de cromatina de células cancerígenas humanas.^{103,104} En este método, se añade el BG4 a la cromatina extraída de células humanas y se fija químicamente con formaldehído. La cromatina se fragmenta mediante sonicación y con inmunoprecipitación se recupera el anticuerpo unido a los G4s de las fracciones de cromatina. Posteriormente, se secuencian estos fragmentos, obteniendo un mapeo de los G4s en el complejo original de cromatina (figura 1.22). Cuando se aplicó el mismo ensayo a células normales epiteliales, solamente se encontraron 1.000 secuencias de G4s, lo que sugiere que en condiciones cancerosas la cromatina contiene un mayor número de estructuras G4s.

Es interesante destacar que solo se obtuvo un solapamiento del 1% entre los datos obtenidos por G4-ChIP-seq y los obtenidos *in vitro* a partir de G4-seq, lo que indica que la cromatina es un factor fundamental

que afecta a la formación de G4s en el genoma. Sin embargo, la especificidad del anticuerpo limita la técnica afectando a la sensibilidad del proceso.¹⁰⁵

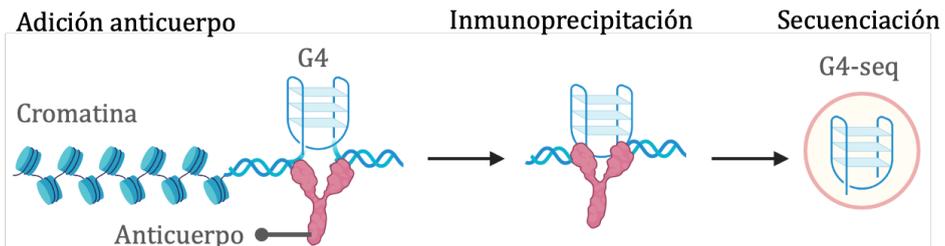


Figura 1.22. Representación esquemática de la técnica G4-ChIP-seq.

La primera vez que se detectaron G4s *in vivo* se utilizó un anticuerpo monocatenario específico (sty49) para teñir las estructuras G4s en los telómeros de los cilios. Se determinó que la formación de los G4s está controlada dinámicamente por interacciones con proteínas teloméricas en una forma dependiente al ciclo celular.¹⁰⁶

Posteriormente, se han identificado G-quadruplex en células humanas y en tejidos cancerígenos.^{66,67,107} Utilizando los anticuerpos BG4 y 1H6 unidos a una molécula fluorescente, se visualizaron G4s tanto en localizaciones teloméricas como no teloméricas, y también se observó que el número de G4s aumentaba tanto cuando se añadían ligandos estabilizadores de G4s, como en ausencia de helicasas específicas de G4s. Entre las limitaciones de la inmunofluorescencia cabe indicar que se deben emplear concentraciones elevadas de los anticuerpos marcados, lo que puede estimular la formación de estructuras G4s, perturbar la dinámica del plegamiento natural de los G4s y generar estrés oxidativo.^{67,108}

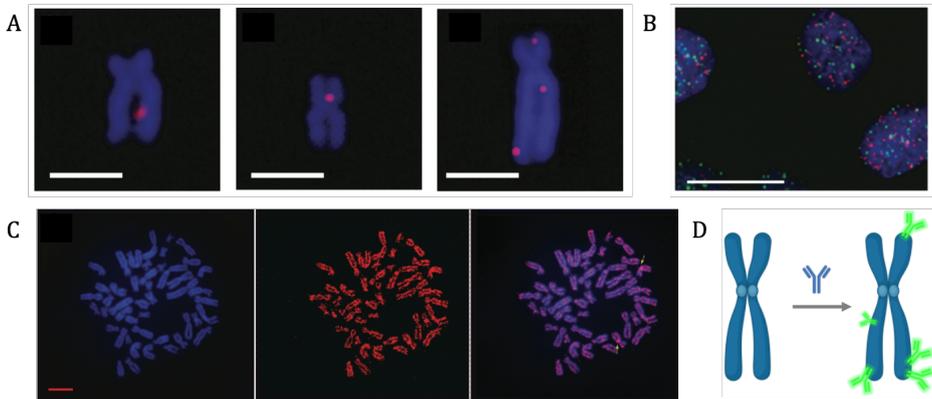


Figura 1.23. Localización de G4s en cromosomas. (A) Inmunofluorescencia de cromosomas de células HeLa con las localizaciones del BG4 en rojo.^{66,107} (B) Ausencia de la co-localización de proteínas teloméricas TRF2 (verde) y G4 (rojo) en células U2OS. (C) Anticuerpo 1H6 (rojo) mostrando numerosas localizaciones de G4s.¹⁰⁷ (D) Representación esquemática de la inmunofluorescencia.

Por otro lado, Di Antonio, Balasubramanian y colaboradores, fueron capaces de visualizar estructuras G4s *in vivo* sin la utilización de anticuerpos. Mediante la sonda fluorescente SiR-PyPDS, una molécula que contiene un derivado fluorescente de rodamina (siR) y un análogo del ligando selectivo de G4s piridostatina (PyPDS), a muy bajas concentraciones. Estos autores mostraron la naturaleza dinámica de los G4s en células así cómo este equilibrio depende del ciclo celular. También determinaron que la presencia de G4s está directamente relacionada con procesos biológicos fundamentales como la transcripción y la replicación activas, ya que la inhibición química de estos procesos provocaba la desaparición de los mismos.¹⁰⁹

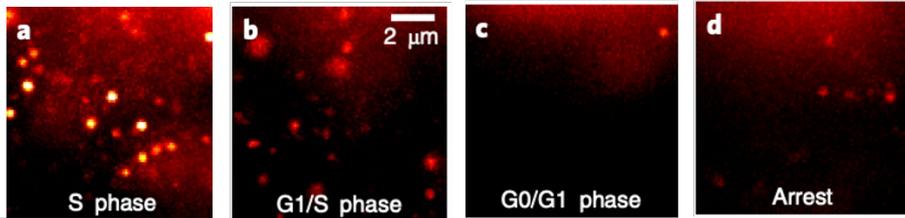


Figura 1.24. Observación de G4s en células vivas según la fase de ciclo celular. (A) Fase S, (B) fase G1/S, (C) fase G0/G1, (D) células tratadas con inhibidores de la transcripción y replicación (d).¹⁰⁹

1.6. Funciones de los G-quadruplex

1.6.1. G4s en la replicación del ADN

Las estructuras G-quadruplex tienen una función doble en el proceso de replicación del ADN, por un lado, generan sitios de unión para las proteínas que originan la replicación y, por otro lado, obstaculizan la acción de las polimerasas.

De entre los 100.000 lugares de origen de replicación identificados hasta la fecha en genomas de mamíferos, el 80–90 % contiene regiones ricas en guanina con el potencial de formar estructuras G4s.¹¹⁰ Estas regiones, denominadas OGRE (*Origin G-rich Repeated Elements*), están separadas a unos 250 pares de bases de los orígenes de replicación. Se ha visto que la eliminación de las OGREs reduce la actividad replicativa en células murinas, mientras que la estabilización de estructuras G4s en OGREs provoca la aparición de nuevos orígenes de replicación.¹¹¹ Se ha sugerido que el mecanismo de iniciación de la replicación es debido al reclutamiento de factores de iniciación por las

estructuras G4s (figura 1.25 A), como por ejemplo la RIF1 (proteína reguladora del tiempo de replicación) o la MTBP (proteína implicada en el origen de la replicación).^{112,113}

Por otro lado, durante el proceso de replicación, la helicasa replicativa separa las dos hebras de ADN de la doble hélice; una hebra sirve como molde para la síntesis de la hebra adelantada, mientras que la otra hebra, la hebra retardada, permanece transitoriamente como monocatenaria. Esta conformación de monohebra es susceptible de formar estructuras G4s, las cuales deben ser desplegadas para completar la replicación del ADN (figura 1.25 B).¹¹⁴ En la bibliografía hay numerosas evidencias del bloqueo de la replicación tras la formación de G4s en las estructuras monocatenarias. Por ejemplo, se identificó un déficit de las helicasas específicas para desplegar G4s (FANCI,¹¹⁵ BLM,¹¹⁶ WRN,¹¹⁷ Pif1¹¹⁸ y DDX11)¹¹⁹ como el causante de la obstrucción del proceso replicativo.

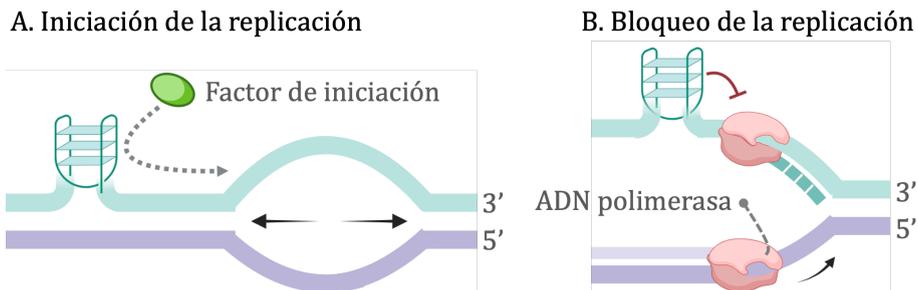


Figura 1.25. Funciones biológicas de ADN G4 en la replicación.¹¹⁴

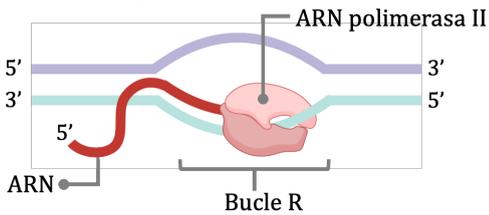
1.6.2. Funciones de los G4s en la transcripción

Las predicciones computacionales han demostrado que las estructuras G-quadruplex son muy comunes en regiones promotoras de genes en humanos, y en particular, en regiones promotoras de ciertos oncogenes como c-MYC, BCL2, KRAS y c-KIT.¹⁰¹

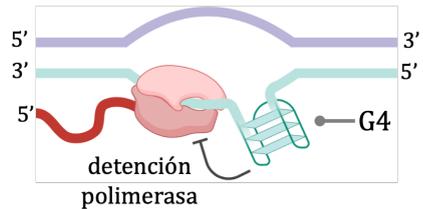
La apertura del ADN en la transcripción genera un bucle-R, que consiste en una estructura de doble hélice híbrida de ADN-ARN formada por el ADN de la hebra molde y el ARN transcrito (ver figura 1.26 A). Esta estructura produce ciertas tensiones en las hebras, lo que puede tener tanto efectos positivos como negativos en el proceso de transcripción. Estudios *in vitro* han demostrado que los G4s compensan las tensiones negativas generadas en el bucle-R, favoreciendo o impidiendo la transcripción.¹²⁰ El efecto de los G-quadruplex en la transcripción depende de múltiples factores, como su orientación en la hebra molde o en la complementaria y su localización respecto al punto origen de la transcripción. Por ejemplo, la formación de G4s en la hebra molde bloquea el movimiento de la ARN polimerasa, deteniendo e incluso finalizando la transcripción, lo que conlleva finalmente una disminución de la expresión de los correspondientes genes (figura 1.26 B).^{114,121} Por otro lado, se ha visto que la formación de G4s en la hebra complementaria puede bloquear el proceso de transcripción, formando un híbrido ARN/ADN inusual entre la secuencia de la hebra complementaria y el ARN creciente (figura 1.26 D).¹²² En contraposición, en estudios recientes se ha identificado que la formación de G4s en la hebra complementaria puede estabilizar el bucle-R,¹²³ facilitando la transcripción (figura 1.26

C).¹²³ Sin embargo, la estabilización sucesiva de estos bucles puede causar la acumulación de roturas en la doble hélice provocando inestabilidad en el genoma.¹²⁴

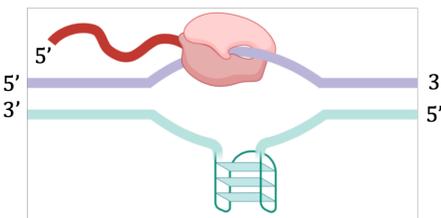
A. Transcripción



B. G4 en hebra molde



C. G4 en hebra complementaria facilitando transcripción



D. G4 híbrido con hebra complementaria

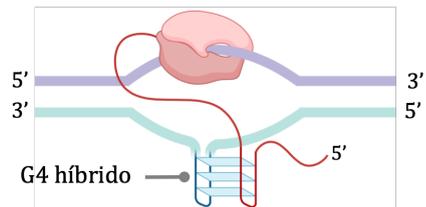


Figura 1.26. Modelos de la implicación de G4 en la transcripción, adaptada.⁶⁵

El factor de transcripción MYC es de los sistemas más representativos para la ilustración de los efectos de los G4s en la transcripción. Su expresión está asociada con la proliferación celular, de hecho, han sido observados niveles altos de su expresión en el 80% de las células cancerígenas humanas.⁴³ La región promotora del MYC, denominada NHE III (*Nuclease Hypersensitive Element*), controla mayoritariamente la transcripción de éste y contiene una secuencia capaz de formar G4s *in vitro*. Se mostró que la formación de G4s en NHE III reprime completamente la transcripción del oncogén en líneas celulares de linfoma a la vez que muestran actividad antitumoral en ratones.^{125,126}

1.6.3. G4s en los telómeros

El nombre de telómero viene del antiguo griego, *telos*, final y *meros*, parte, y como su nombre indica, es la parte final del cromosoma.^{127,128} Los telómeros son los encargados de proteger los extremos de los cromosomas en células eucariotas y son esenciales para la estabilidad del genoma.¹²⁹⁻¹³¹

Hasta 1965 se postulaba que los cultivos de células de los vertebrados eran inmortales, y que la falta de replicación celular de un cultivo se debía a la ignorancia del operario por no suministrarles los nutrientes correctamente.¹³² Sin embargo, Leonard Hayflick al realizar pases de una línea celular de forma continuada, observó que había un límite de divisiones celulares tras el cual las células somáticas entraban en senescencia.^{133,134} Hayflick fue el primer autor en relacionar la vejez con el número de veces que una célula podía dividirse (límite de Hayflick) y realizó la primera distinción entre células normales (mortales) y cancerosas (inmortales).

Casi 30 años después, Alexey Olovnikov relacionó el límite de Hayflick con la longitud de los telómeros, al percatarse de que los cromosomas se acortaban en cada división celular debido a que no podían replicar completamente sus extremos.¹³⁵

Hoy en día sabemos que el límite de Hayflick viene determinado por la longitud de los telómeros, y por ello son concebidos como un reloj biológico interno.

Los telómeros contienen regiones de ADN no codificante altamente repetitivas y ricas en guanina, junto con histonas y proteínas específicas teloméricas. La longitud del ADN telomérico depende de la naturaleza del organismo; así, el ciliado *Oxytricha nova* presenta una longitud de 20 pares de bases de repeticiones T_4G_4 , mientras que la *S. cerevisiae* (levadura de la cerveza) tiene una secuencia compleja de 300 pares de bases que contienen repeticiones $TG_{1-6}TG_{2-3}$.^{136,137} Respecto a los vertebrados, sus telómeros tienen una longitud de 10.000 pares de bases que contienen la repetición de hexanucleótidos TTAGGG cuyo extremo terminal 3' sobresale sobre el 5' entre 35 y 600 bases (figura 1.27). El extremo 5' es rico en citosinas mientras que el extremo monocatenario 3' es rico en guaninas.^{138,139}

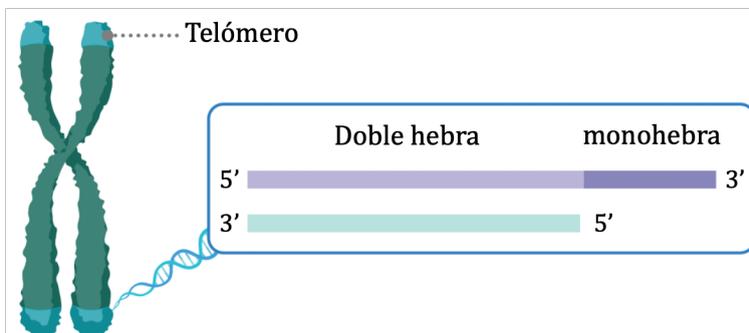


Figura 1.27. Estructura del telómero.

El extremo terminal monocatenario en células eucariotas de organismos grandes es lo suficientemente largo como para plegarse sobre sí mismo e invadir la región telomérica de la doble hélice, formando una estructura llamada bucle-T (bucle telomérico, figura 1.28).^{140,141} La hebra monocatenaria invade entre 100 y 200 bases del extremo 3',

emparejándose con la hebra CCCTAA de la doble cadena, y adopta una configuración de triple hélice que conforma el bucle-D (bucle desplazado, figura 1.28). Esta estructura se encuentra estabilizada por proteínas específicas de los telómeros, principalmente TRF1 y TRF2 (*Telomere Repeat binding Factor*), unidos entre sí por la proteína TIN2 (*Telomere Interacting Nuclear Factor 2*). Estos se unen a la doble cadena telomérica con gran afinidad, a la vez que a la proteína TPP1 (*Telomere Protecting Protein 1*) que se enlaza mediante POT1 (*Protection Of Telomeres 1*) a la monohebra. El ensamblaje de estas proteínas se conoce como complejo de shelterina o telosoma.^{142,143} Esta estructura final protege los extremos de los telómeros impidiendo la acción de las vías de respuesta al daño celular (DDR, *DNA damage response*), que si se activan de una forma no adecuada pueden desencadenar una gran inestabilidad genómica.

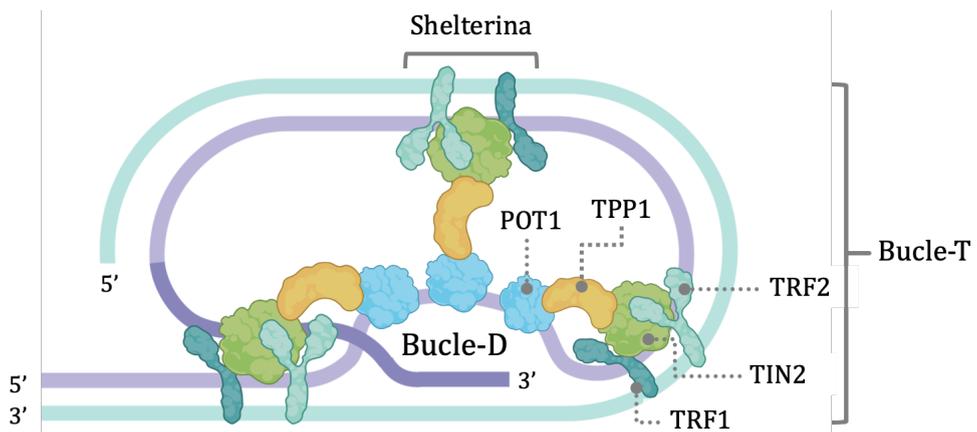


Figura 1.28. Representación esquemática del bucle-T, incluyendo bucle-D y complejo de shelterina asignando sus proteínas asociadas.

Dado que los extremos teloméricos de los cromosomas son monocatenarios, y que son secuencias ricas en guanina, tienen una tendencia inherente a formar estructuras G-quadruplex.¹⁴⁴ Estas estructuras pueden actuar como protectoras rudimentarias de los telómeros cuando el bucle-T está comprometido, evitando la hidrólisis del extremo 3' por las nucleasas. En ciliados se ha visto *in vivo* que los G4s son capaces de proporcionar protección a los telómeros mediante su asociación con proteínas que los estabilizan.¹⁴⁵ En levaduras y vertebrados, se han detectado estructuras G4s junto a proteínas teloméricas como la TRF2, la cual forma parte del complejo de shelterina y la TLS (*Tanslocated in Liposarcoma*), proteína que regula la longitud del telómero.^{146,147} Por otro lado, la formación de estructuras G4s también implica un riesgo para la integridad del telómero, ya que puede impedir la replicación del ADN obstaculizando a la ADN polimerasa, *vide supra*.¹¹⁴

Debido a las propiedades inherentes de las polimerasas del ADN, el último fragmento telomérico no es replicado completamente; este fenómeno es conocido como *end replication problem*.^{148,149}

Durante la replicación, cada una de las hebras del ADN actúa como molde para la formación de la hebra complementaria.¹⁵⁰ La ADN polimerasa Pol α comienza el proceso en dirección 5' a 3' hacia la horquilla de replicación con un único cebador, formando la hebra adelantada.^{151,152} Por otro lado, la síntesis de la hebra retardada avanza en dirección 3' a 5' y necesita fusionar múltiples cebadores que se elongan en fragmentos cortos de Okazaki.¹⁵³ La retirada de los cebadores ocasiona huecos internos, los cuales son ligados por la Pol δ formando una

hebra continua. Cuando se retiran los cebadores, se pierde una cantidad de ADN del tamaño del cebador del ARN en el extremo 5' de la hebra adelantada, lo que conduce a la formación de la monohebra en el extremo 3' (figura 1.29).¹⁵⁰ En las células normales, los telómeros se acortan progresivamente cada vez que se replica el ADN hasta que alcanzan un punto crítico, el llamado límite de Hayflick. En este punto, las células dejan de dividirse y eventualmente mueren.¹⁵⁴

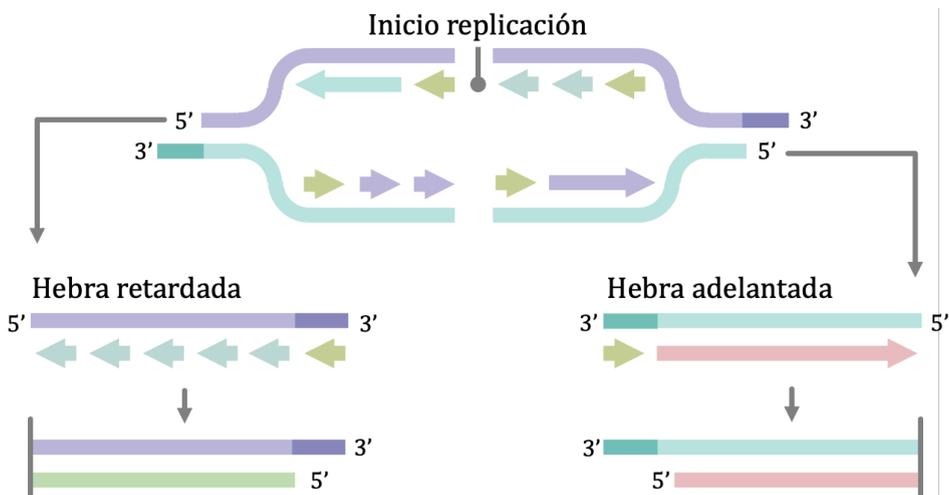


Figura 1.29. Representación esquemática del acortamiento telomérico y formación de la monohebra en el extremo 3'.

Cabe destacar que la creación de la monohebra no implica solo el acortamiento telomérico, sino que proporciona una región adecuada para el anclaje de proteínas, así como le confiere la posibilidad de invadir la doble hélice para formar el bucle-T.¹⁵⁵ Sin embargo, se trata de una solución eventual, pues al acortarse lo suficientemente la monohebra ya

no es capaz de formar el complejo de shelterina, impidiendo la formación del bucle-T, dejando los extremos de los cromosomas desprotegidos.

El acortamiento telomérico no solo viene marcado por la división celular, también se ve influenciado por otros factores como el estrés oxidativo, la inflamación, y el estilo de vida.¹⁵⁶ Una de las causas que más afecta al acortamiento telomérico es el estrés oxidativo. Debido al alto contenido en guanina de los telómeros, éstos son dianas para el daño oxidativo a través de la formación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-oxodG), un importante marcador del estrés oxidativo que acelera el acortamiento telomérico.¹⁵⁷ Otros factores asociados al estilo de vida como el fumar, la obesidad y la falta de ejercicio, aumentan la velocidad del acortamiento telomérico, lo que contribuye a la acumulación de células senescentes, y a su vez conlleva una disminución gradual de la función normal de los tejidos y órganos con el tiempo, también conocido como envejecimiento.¹⁵⁸ En consecuencia, el acortamiento telomérico es un iniciador de la senescencia en células, y está relacionado con la aparición de enfermedades asociadas con la edad, desórdenes neurológicos, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y cáncer.¹⁵⁴

Así pues, la longitud de los telómeros es el mayor factor limitante en la longevidad celular. Pero ¿qué ocurre con las células que necesitan dividirse continuamente para generar nuevos tejidos o reemplazar células dañadas? Existen mecanismos que permiten mantener la longitud del telómero y prolongar la actividad replicativa de las células que se ha perdido con la división celular. La enzima telomerasa es capaz de resintetizar las repeticiones teloméricas añadiendo bases nitrogenadas

en los extremos, manteniendo así su longitud.¹⁵⁹ La telomerasa fue descubierta por primera vez en 1985 en el ciliado *Tetrahymena thermophila*, y fue llamada “transferasa terminal del telómero”.¹⁶⁰ Su estructura consiste en (1) una ribonucleoenzima llamada TERT (*Telomere Reverse Transcriptase*), (2) una subunidad catalítica llamada hTERC (*Telomerase RNA Component*), (3) el ARN empleado como molde para la elongación y (4) una serie de proteínas accesorio específicas (disquerina, GAR, NHP2 y NOP10), que regulan la actividad, biogénesis y localización de la telomerasa (figura 1.30).¹⁶¹

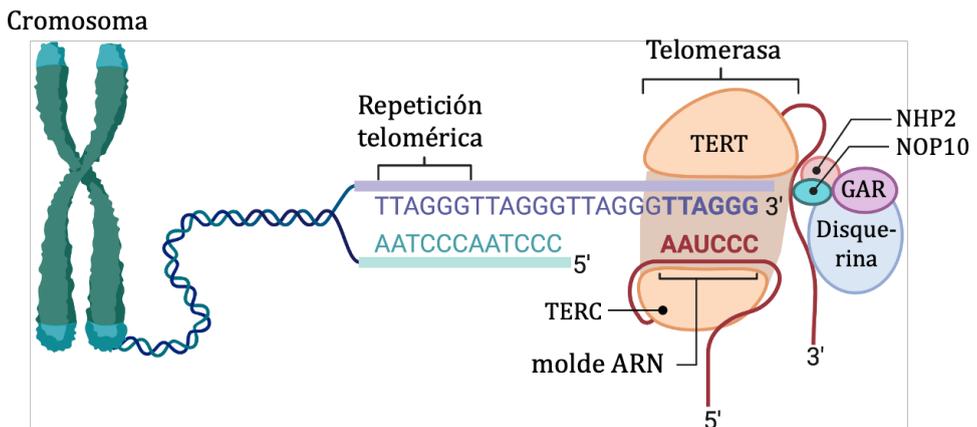


Figura 1.30. Representación esquemática de la telomerasa y sus componentes proteicos.

Se ha visto que la telomerasa se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas, pero su actividad aumenta significativamente alrededor del 80-85% de los cánceres humanos), lo que promueve la longevidad de estas células malignas.¹⁶² Además, se ha demostrado que la formación de estructuras G-quadruplex influye en la actividad de la telomerasa. Al estabilizarse las estructuras G4s en el extremo 3' de la

monohebra, se inhibe la actividad telomerasa, ya que esta requiere que el ADN esté desplegado para así reconocer la subunidad de ARN en su sitio activo.¹⁶³ Por lo tanto, la inhibición de la telomerasa puede revertir la inmortalización celular y tener un efecto anticancerígeno.⁷⁰ Como estrategia para inhibir la enzima telomerasa, se han desarrollado diversas moléculas con capacidad de estabilizar las estructuras G4s en los telómeros. Además, estas moléculas pueden inhibir también la telomerasa de forma indirecta desplazando las proteínas TRF2 y POT1, evitando la formación del complejo de shelterina.¹⁶⁴

1.7. G-quadruplex de mayor orden

Las estructuras G-quadruplex son capaces de adoptar conformaciones multiméricas. Los G4s multiméricos pueden ser intramoleculares si se forman entre los residuos de guanina provenientes de la misma hebra, o intermoleculares si se forman a partir de distintas hebras.⁸¹ La organización de estas estructuras está controlada por la topología de los G4s y la orientación de los bucles. Así, en los G4s paralelos, las hebras se orientan en la misma dirección que los bucles y se favorece la formación de estas estructuras por apilamiento π .^{165,166} Sin embargo, si los G4s presentan topología antiparalela, las hebras se orientan en direcciones opuestas a los bucles, sobresaliendo de la estructura, lo que puede impedir el apilamiento π .¹⁶⁷ Los G4s multiméricos presentan muchas variantes, pueden comprender desde pequeñas asociaciones como

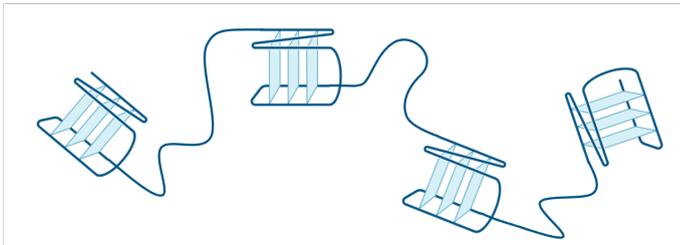
dímeros o tetrameros, hasta filamentos formados por cientos de G4s, llamados en inglés *G-wires*.¹⁶⁸

En la bibliografía se han identificado con secuencias 5'-GCGGXGGY estructuras tetraméricas formadas por dímeros de G4s apilados por las tétradas externas.^c Las constantes de asociación determinadas para estas estructuras alcanzan valores de hasta nueve ordenes de magnitud, presentado una alta estabilidad termodinámica, comparable a la del G4 monomérico formado por la secuencia TG₄T.¹⁶⁹ Se ha postulado que las interacciones hidrofóbicas estabilizan en gran medida la formación de multímeros de G4, proponiendo que el proceso de oligomerización o multimerización de los G4s está impulsado por estas interacciones estabilizantes. Al comparar dos G4s monoméricos y un G4 dimérico, ambos presentan el mismo número de tétradas totales, pero dos G4s aislados presentan un mayor número de tétradas expuestas al disolvente que un G4 dimérico. En las estructuras de mayor orden, el sistema consigue excluir un mayor número de moléculas de disolvente, promoviendo además el apilamiento de las tétradas.¹⁷⁰ En 2005, como se había sugerido previamente, se observó al estudiar secuencias de oligonucleótidos características de los telómeros d(TTAGGG)_n (n = 3, 4 o 5), de que la formación de dímeros intramoleculares de G4s tenía un origen de naturaleza entálpica debido a las interacciones hidrofóbicas.¹⁷¹

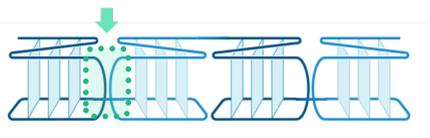
^c X = T, U, TT, UC, TC o A; Y = AT, AU o A.

Un lugar muy favorable para la formación de estructuras multiméricas G4s son los extremos de los telómeros ya que contienen decenas de repeticiones TTAGGG.¹⁷² El grupo de Sugimoto en 2006 fue el primero en identificar la formación de multímeros intramoleculares de G4 en ADN telomérico. Estos autores propusieron el modelo *beads-on-a-string* para describir el modo de unión entre G4s mediante puentes TTA que no interactuaban entre sí (figura 1.31 A).¹⁷³ Más tarde en 2010, mediante ESI-MS se confirmó la formación de un dímero de G4 en la secuencia de ARN telomérica GGG(UUAGGG)₇, donde las unidades G4s estaban conectadas mediante un puente UUA (figura 1.31 B).¹⁷⁴ Por otro lado, también se ha visto que pueden formarse multímeros de ADN G4 telomérico por medio del apilamiento de las tétradas externas (figura 1.31 C).^{175,176}

A) Unidades G4 sin interactuar entre sí – modelo *Beads on a string*



B) Interacción mediada por bucles



C) Interacción mediada por G-tétradas

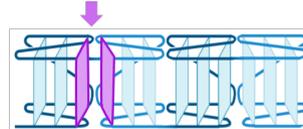


Figura 1.31. Esquema de las posibles estructuras para las secuencias teloméricas largas. (A) Subunidades de G4 sin interactuar, (B) interactuando a través de G-tétradas o (C) bucles.¹⁷²

Las funciones biológicas de las estructuras G4s multiméricas en los telómeros se han asociado con el reconocimiento de determinadas proteínas y el procesamiento de la telomerasa. Sin embargo, estas estructuras multiméricas derivadas de los telómeros podrían representar a nivel terapéutico una diana más específica que los G4s monoméricos, ya que se evitaría la posible interacción con otras estructuras G4s monoméricas presentes en otras localizaciones del genoma.¹⁷⁷ Por ello, actualmente se están desarrollando moléculas capaces de interactuar específicamente con multímeros de G4, como prometedores agentes anticancerígenos con menores efectos adversos.

1.8. G-quadruplex en enfermedades neurodegenerativas

Las estructuras multiméricas de G4s se han asociado con ciertas enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por la presencia de expansiones de secuencias de nucleótidos en los genes responsables de la patología. Estos desórdenes neurológicos comprenden enfermedades como el Alzheimer, el síndrome de X frágil (FXS), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y la demencia frontotemporal (FTD), todas ellas desencadenadas por la expansión de repeticiones cortas de nucleótidos en regiones específicas del genoma. En concreto, estas repeticiones son ricas en guanina y son capaces de formar G4s intramoleculares; debido a su expansión, también pueden formar G4s multiméricos.

Dependiendo de la localización de la expansión repetitiva de nucleótidos, el mecanismo patológico puede producirse a nivel del ADN,

originando una transcripción irregular de éste, o bien al nivel del ARN, pudiendo afectar a la translación, o bien, a nivel proteico, con la generación de polipéptidos. A continuación, se detallan las características de los desórdenes neurológicos utilizados como diana terapéutica en esta tesis y su relación con los G4s multiméricos.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas motoras que controlan los músculos voluntarios. Muy estrechamente relacionada con la ELA, la FTD conlleva el deterioro de los lóbulos frontal y temporal. Ambas enfermedades comparten causas genéticas y analogías patológicas.¹⁷⁸ La causa más común de ELA y FTD es la expansión de repeticiones de hexanucleótidos (HRE, *Hexanucleotide Repeat Expansion*), donde la región no codificante del gen *C9orf72*, situado en el cromosoma 9, está formada por repeticiones (GGGGCC)_n.¹⁷⁹ Las personas que sufren estas enfermedades poseen normalmente miles de repeticiones HRE, mientras que los individuos sanos no presentan más de 25 repeticiones (figura 1.32).

Los mecanismos propuestos de la patogénesis del ELA y FTD incluyen la pérdida de la función de *C9orf72*, toxicidad del ARN transcrito de la HRE y, creación de poli-dipéptidos anómalos como consecuencia de una translación irregular.¹⁸⁰

Se ha visto que las HRE en el *C9orf72* adoptan estructuras estables de G4s, lo que sugiere que la formación de estas estructuras puede estar relacionada con las patologías ELA y FTD. Mediante ensayos de transcripción *in vitro* se ha demostrado que los G4s formados en la HRE

del *C9orf72* bloquean la transcripción de la ARN polimerasa, disminuyendo así la expresión del gen. Dependiendo de la longitud del gen, las HRE adoptan una topología de G4 paralela o antiparalela. Si la longitud es de cuatro hexanucleótidos $d(G_4C_2)_4$, la conformación predominante *in vitro* es la antiparalela. En cambio, se ha observado que otras repeticiones como $d(G_4C_2)_2$, $d(G_4C_2)_3$ y $d(G_4C_2)_5$ forman G4s mixtos con topologías paralelas y antiparalelas.¹⁸¹ Asimismo, las HRE que se transcriben forman ARN que también puede adoptar estructuras G4s muy estables, las cuales han sido identificadas *in vivo* y están relacionadas con la regulación de numerosas funciones del ARN, como son el transporte y la traducción.⁶⁷

Es interesante destacar que en neuronas cultivadas de pacientes que contenían una elevada cantidad de HRE, se ha observado que la adición de moléculas capaces de interactuar con ADN y ARN G4 reduce la patogénesis de las HRE en el *C9orf72* sin causar toxicidad.¹⁸²

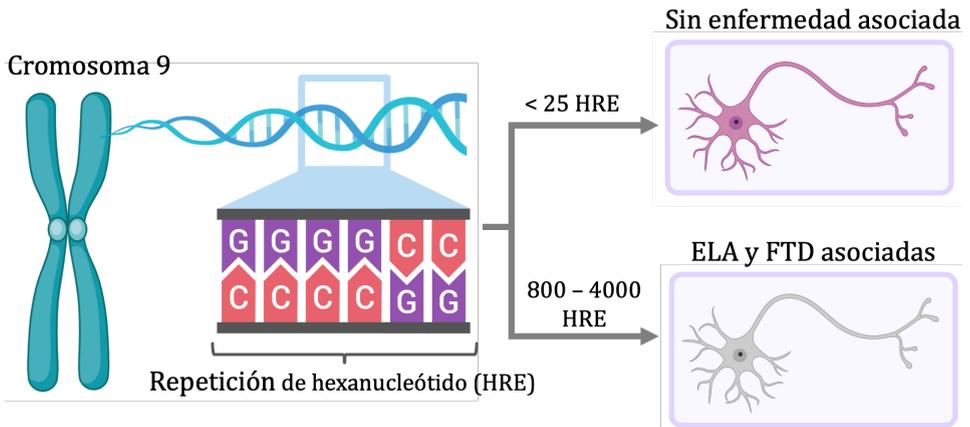


Figura 1.33. Ilustración de la repetición de hexanucleótido en ELA y FTD.

1.9. Bibliografía

1. Brown, R. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philos. Mag.* **4**, 161–173 (1828).
2. Virchow, R. Cellular-Pathologie. *Arc. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **8**, 3–39 (1855).
3. Remak, R. Über extracellulare Entstehung thierischer Zellen und über Vermehrung derselben durch Theilung. *Arc. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **19**, 47–57 (1852).
4. Porter, J. R. Louis Pasteur. Achievements and and disappointments. *Bacteriol Rev.* **25**, 389–403 (1961).
5. Darwin, C., Wallace, A. *On the Tendency of Species to form Varieties; and on the Perpetuation of Varieties and Species by Natural Means of Selection.* *Zool. J. Linn.* **3**, 45-62 (1858).
6. Darwin, C. *On the origin of species by means of natural selection: Or the preservation of the favoured races in the struggle for life.* (John Murray, 1860).
7. Mendel, G. & Punnett, R. C. *Versuche über Pflanzen-Hybriden.* (Im Verlage des Vereines, 1866).

8. Hugo de Vries. Das Spaltungsgesetz der Bastarde (Vorläufige Mitteilung). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**, 83–90 (1900).
9. Correns Carl. Mendels Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**, 158–168 (1900).
10. E.v. Tschermak. Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **18**, 232–239 (1900).
11. Haeckel, E. *Generelle Morphologie der Organismen : allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie*. (Georg Reimer, 1866).
12. Flemming, W. Ueber das Verhalten des Kerns bei der Zelltheilung, und über die Bedeutung mehrkerniger Zellen. *Arc. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, **77**, 1–29 (1879).
13. Boveri, T. *Zellen-Studien*. (G. Fischer, 1887).
14. Flemming, W. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. (F.C.W. Vogel, 1882).
15. Mahadeva, M. & Randerson, S. The Rise and Fall of the gene. *The Science Teacher* **52**, 15-19(1985).

16. Miescher, F. Letter I; to Wilhelm His; Tübingen, February 26th. *W. His, et al. (Eds.), Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher 1, F.C.W. Vogel, Leipzig 33–38 (1869).*
17. Miescher, F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Med. Chem. Unters.* **4**, 441–460 (1871).
18. Zacharias, E. Über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. *Botanische Zeitung* **39**, 169–176 (1881).
19. Kossel, A. The Nobel Prize in Physiology or Medicine. (1910).
20. Kossel, A. Ueber eine neue Base aus dem Pflanzenreich. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **21**, 2164 (1888).
21. Levene, P. A. & Jacobs, W. A. Über die Hefe-Nucleinsäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **42**, 2474–2478 (1909).
22. Levene, P. A. & Jacobs, W. A. On the structure of thymus nucleic acid. *J. Biol. Chem.* **12**, 411–420 (1912).
23. Levene, P. A. & London, E. S. The structure of thymonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **83**, 793–802 (1929).
24. Levene, P. A. & Tipson, R. S. The Ring Structure of Thymidine. *J. Biol. Chem.* **109**, 623–630 (1935).
25. Levene, P. A. & Mandel, J. A. Über die Konstitution der Thymonucleinsäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **41**, 1905–1909 (1908).

26. Hargittai, I. The tetranucleotide hypothesis: A centennial. *Struct. Chem.* **20**, 753–756 (2009).
27. Frixione, E. & Ruiz-Zamarripa, L. The “scientific catastrophe” in nucleic acids research that boosted molecular biology. *J. Biol. Chem.* **294**, 2249–2255 (2019).
28. Griffith, F. The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg.* **27**, 113–159 (1928).
29. McCarty, M. Discovering genes are made of DNA. *Nature* **421**, 406 (2003).
30. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *J. Exp. Med.* **79**, 137-158 (1944).
31. Chargaff E, V. E. D. R. G. C. M. F. The composition of the desoxipentose nucleic acids of thymus and spleen. *J. Biol. Chem.* **177**, 405–416 (1949).
32. Zamenhof, S., Brawerman, G. & Chargaff, E. On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 402–405 (1952).
33. Chargaff, E. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation. *Experientia* **6**, 201–209 (1950).

34. Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 205–211 (1951).
35. Watson, J. D. *The double helix*. (Atheneum, 1968).
36. Kersten T. Hall, *The Man in the Monkeynut Coat: William Astbury and the Forgotten Road to the Double-Helix*. (Oxford University Press, 2014).
37. Pauling, L. & Corey, R. B. Structure of the Nucleic Acids. *Nature* **171**, 346–346 (1953).
38. Franklin, R. E. & Gosling, R. G. The structure of sodium thymonucleate fibres. I. The influence of water content. *Acta Crystallogr.* **6**, 673–677 (1953).
39. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
40. Harri Lönnberg. *Chemistry of Nucleic Acids*. (Gruiter, 2020).
41. *The Chemical Biology of Nucleic Acids*. (Günter Mayer, 2010).
42. Sinden, R. R., Al, A. B., New, S. D. & Boston, Y. *DNA Structure and Function*. (Elsevier, 1994).

43. Bochman, M. L., Paeschke, K. & Zakian, V. A. DNA secondary structures: Stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 770–780 (2012).
44. Wiley Series in Drug Discovery and Development. in *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids*, 429–430 (John Wiley & Sons, Inc., 2011).
45. Neidle, S. Beyond the double helix: DNA structural diversity and the PDB. *J. Biol. Chem.* **296**, 100553 (2021).
46. Drew, H. R. *et al.* Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proceedings of the Nat. Acad. Sci.* **78**, 2179–2183 (1981).
47. Hardwick, J. S. *et al.* 5-Formylcytosine does not change the global structure of DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 544–552 (2017).
48. Luo, Z., Dauter, M. & Dauter, Z. Phosphates in the Z-DNA dodecamer are flexible, but their P-SAD signal is sufficient for structure solution. *Crystallogr. D. Biol. Crystallogr Acta.* **70**, 1790–1800 (2014).
49. Hartmann, B. & Lavery, R. DNA structural forms. *Q. Rev. Biophys.* **29**, 309–368 (1996).
50. Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**, 532–537 (1984).

51. Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W. & Richmond, T. J. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **319**, 1097–1113 (2002).
52. Sinden, R. R. Slipped strand DNA structures. *Front. Biosci.* **12**, 4788 (2007).
53. Xodo, L. E., Manzini, G., Quadrifoglio, F., van der Marel, G. & van Boom, J. DNA hairpin loops in solution. Correlation between primary structure, thermostability and reactivity with single-strand-specific nuclease from mung bean. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1505–1511 (1991).
54. Timsit, Y. & Moras, D. Cruciform structures and functions. *Q. Rev. Biophys.* **29**, 279–307 (1996).
55. Hoogsteen, K. The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.* **12**, 822–823 (1959).
56. Sugimoto, N., Endoh, T., Takahashi, S. & Tateishi-Karimata, H. Chemical biology of double helical and non-double helical nucleic acids: “To B or not to B, that is the question”. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **94**, 1970–1998 (2021).

57. Felsenfeld, G. & Rich, A. Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 457–468 (1957).
58. Gehring, K., Leroy, J.-L. & Guéron, M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **363**, 561–565 (1993).
59. Gellert, M., Lipsett, M. N. & Davies, D. R. Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**, 2013–2018 (1962).
60. Asensio, J. L., Brown, T. & Lane, A. N. Solution conformation of a parallel DNA triple helix with 5' and 3' triplex–duplex junctions. *Structure* **7**, 1–11 (1999).
61. Snoussi, K., Nonin-Lecomte, S. & Leroy, J.-L. The RNA i-motif. *J. Mol. Biol.* **309**, 139–153 (2001).
62. Parkinson, G. N., Lee, M. P. H. & Neidle, S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **417**, 876–880 (2002).
63. Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
64. Takahashi, S. *et al.* Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 16458–16469 (2021).

65. Varshney, D., Spiegel, J., Zyner, K., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 459–474 (2020).
66. Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J. & Balasubramanian, S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.* **5**, 182–186 (2013).
67. Biffi, G., di Antonio, M., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat. Chem.* **6**, 75–80 (2014).
68. Zeraati, M. *et al.* I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat. Chem.* **10**, 631–637 (2018).
69. Haeusler, A. R. *et al.* C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* **507**, 195–200 (2014).
70. Neidle, S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Chem.* **1**, (2017).
71. Bang, I. Untersuchungen über die Guanylsäure. *Biochem. Z.* **26**, 293–231 (1910).
72. Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Marttila, C. M. Structures for Polyinosinic Acid and Polyguanylic Acid. *Biochem. J.* **141**, 537–543 (1974).

73. Zimmerman, S. B., Cohen, G. H. & Davies, D. R. *X-ray Fiber Diffraction and Model-building Study of Polyguanylic Acid and Polyinosinic Acid*. *J. Mol. Biol.* **92**, 181-192 (1975).
74. Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R. & Prescott, D. M. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**, 718–720 (1991).
75. Williamson, J. R., Raghuraman, M. K. & Cech, T. R. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* **59**, 871–880 (1989).
76. *Quadruplex Nucleic Acids*. vol. 330 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
77. Bhattacharyya, D., Mirihana Arachchilage, G. & Basu, S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Front. Chem.* **4**, (2016).
78. Phillips, K., Dauter, Z., Murchie, A. I. H., Lilley, D. M. J. & Luisi, B. The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95Å resolution. *J. Mol. Biol.* **273**, 171–182 (1997).
79. Yang, D. & Okamoto, K. Structural insights into G-quadruplexes: Towards new anticancer drugs. *Future Med. Chem.* **2**, 619–646 (2010).
80. Cang, X., Šponer, J. & Cheatham, T. E. Explaining the varied glycosidic conformational, G-tract length and sequence

- preferences for anti-parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res* **39**, 4499–4512 (2011).
81. Chen, Y. & Yang, D. Sequence, stability, and structure of G-Quadruplexes and their interactions with drugs. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* (2012).
 82. Wang, Y. & Patel, D. J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure* **1**, 263–282 (1993).
 83. Sanchez-Martin, V., Lopez-Pujante, C., Soriano-Rodriguez, M. & Garcia-Salcedo, J. A. An updated focus on quadruplex structures as potential therapeutic targets in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–24 (2020).
 84. Huppert, J. L. & Balasubramanian, S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2908–2916 (2005).
 85. Schiavone, D. *et al.* Determinants of G quadruplex-induced epigenetic instability in REV1-deficient cells. *EMBO J.* **33**, 2507–2520 (2014).
 86. König, S. L. B., Evans, A. C. & Huppert, J. L. Seven essential questions on G-quadruplexes. *Biomol. Concepts* **1**, 197–213 (2010).
 87. Varizhuk, A. *et al.* The expanding repertoire of G4 DNA structures. *Biochimie* **135**, 54–62 (2017).

88. Kudlicki, A. S. G-Quadruplexes Involving Both Strands of Genomic DNA Are Highly Abundant and Colocalize with Functional Sites in the Human Genome. *PLoS One* **11**, 1 (2016).
89. Bedrat, A., Lacroix, L. & Mergny, J.-L. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1746–1759 (2016).
90. Brázda, V. *et al.* G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics* **35**, 3493–3495 (2019).
91. Hon, J., Martínek, T., Zendulka, J. & Lexa, M. pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R. *Bioinformatics* **33**, 3373–3379 (2017).
92. Kikin, O., D'Antonio, L. & Bagga, P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, 676–682 (2006).
93. Sahakyan, A. B. *et al.* Machine learning model for sequence-driven DNA G-quadruplex formation. *Sci. Rep.* **7**, 14535 (2017).
94. Paramasivan, S., Rujan, I. & Bolton, P. H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **43**, 324–331 (2007).
95. Mergny, J.-L., Phan, A.-T. & Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett* **435**, 74–78 (1998).

96. Kreig, A. *et al.* G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence. *Nucleic Acids Res.* **43**, 7961–7970 (2015).
97. Renaud de la Faverie, A., Guédin, A., Bedrat, A., Yatsunyk, L. A. & Mergny, J.-L. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation. *Nucleic Acids Res.* **42**, e65–e65 (2014).
98. Han, H., Hurley, L. H. & Salazar, M. A DNA polymerase stop assay for G-quadruplex-interactive compounds. *Nucleic Acids Res.* **27**, 537–542 (1999).
99. Kwok, C. K. & Balasubramanian, S. Targeted Detection of G-Quadruplexes in Cellular RNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 6751–6754 (2015).
100. Chambers, V. S. *et al.* High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat Biotechnol.* **33**, 877–881 (2015).
101. Huppert, J. L. & Balasubramanian, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **35**, 406–413 (2007).
102. Bugaut, A. & Balasubramanian, S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4727–4741 (2012).

103. Hänsel-Hertsch, R., Spiegel, J., Marsico, G., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. Genome-wide mapping of endogenous G-quadruplex DNA structures by chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing. *Nat. Protoc.* **13**, 551–564 (2018).
104. Hänsel-Hertsch, R. *et al.* G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. *Nat. Genet.* **48**, 1267–1272 (2016).
105. Raguseo, F., Chowdhury, S., Minard, A. & di Antonio, M. Chemical-biology approaches to probe DNA and RNA G-quadruplex structures in the genome. *Chem. Comm.* **56**, 1317–1324 (2020).
106. Schaffitzel, C. *et al.* In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylynychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the Nat. Acad. Sci.* **98**, 8572–8577 (2001).
107. Henderson, A. *et al.* Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **42**, 860–869 (2014).
108. Kwok, C. K. & Merrick, C. J. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends in Biotechnol.* **35**, 997–1013 (2017).
109. di Antonio, M. *et al.* Single-molecule visualization of DNA G-quadruplex formation in live cells. *Nat. Chem.* **12**, 832–837 (2020).

110. Prioleau, M.-N. G-Quadruplexes and DNA Replication Origins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1042**, 273–286 (2017).
111. Prorok, P. *et al.* Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication origin activity. *Nat. Commun.* **10**, 3274 (2019).
112. Alavi, S. *et al.* G-quadruplex binding protein Rif1, a key regulator of replication timing. *J. Biochem.* **169**, 1–14 (2021).
113. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Binding of the Treslin-MTBP Complex to Specific Regions of the Human Genome Promotes the Initiation of DNA Replication. *Cell Rep.* **32**, 108178 (2020).
114. Teng, F. Y. *et al.* G-quadruplex DNA: a novel target for drug design. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 6557–6583 (2021).
115. Castillo Bosch, P. *et al.* FANCI promotes DNA^α synthesis through G-quadruplex structures. *EMBO J.* **33**, 2521–2533 (2014).
116. Drosopoulos, W. C., Kosiyatrakul, S. T. & Schildkraut, C. L. BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. *J. Cell Biol* **210**, 191–208 (2015).
117. Aggarwal, M., Sommers, J. A., Shoemaker, R. H. & Brosh, R. M. Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **108**, 1525–1530 (2011).

118. Kocak, E. *et al.* The *Drosophila melanogaster* PIF1 Helicase Promotes Survival During Replication Stress and Processive DNA Synthesis During Double-Strand Gap Repair. *Genetics* **213**, 835–847 (2019).
119. van Schie, J. J. M. *et al.* Warsaw Breakage Syndrome associated DDX11 helicase resolves G-quadruplex structures to support sister chromatid cohesion. *Nat. Commun.* **11**, 4287 (2020).
120. Sun, D. & Hurley, L. H. The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-Myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression. *J. Med. Chem.* **52**, 2863–2874 (2009).
121. Broxson, C., Beckett, J. & Tornaletti, S. Transcription Arrest by a G Quadruplex Forming-Trinucleotide Repeat Sequence from the Human c-myc Gene. *Biochemistry* **50**, 4162–4172 (2011).
122. Belotserkovskii, B. P. *et al.* Mechanisms and implications of transcription blockage by guanine-rich DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 12816–12821 (2010).
123. Lim, G. & Hohng, S. Single-molecule fluorescence studies on cotranscriptional G-quadruplex formation coupled with R-loop formation. *Nucleic Acids Res.* **48**, 9195–9203 (2020).

124. de Magis, A. *et al.* DNA damage and genome instability by G-quadruplex ligands are mediated by R loops in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 816–825 (2019).
125. Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J. & Hurley, L. H. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11593–11598 (2002).
126. Grand, C. L. *et al.* The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 565–73 (2002).
127. Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**, 181–198 (1938).
128. Muller, H. J. An analysis of the process of structural change in chromosomes of *Drosophila*. *J Genet.* **40**, 1–66 (1940).
129. Blackburn, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53–56 (2000).
130. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* **92**, 401–413 (1998).

131. Hackett, J. A., Feldser, D. M. & Greider, C. W. Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability. *Cell* **106**, 275–286 (2001).
132. Carrel, A. The preservation of tissues and its applications in surgery. *J. Am. Med. Assoc.* **7**, 523–526 (1912).
133. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
134. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
135. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* **41**, 181–190 (1973).
136. Wellinger, R. J. & Zakian, V. A. Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics* **191**, 1073–1105 (2012).
137. Soudet, J., Jolivet, P. & Teixeira, M. T. Elucidation of the DNA End-Replication Problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **53**, 954–964 (2014).
138. Moyzis, R. K. *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl. Acad. Sci.* **85**, 6622–6626 (1988).

139. Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. & Shay, J. W. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* **11**, 2801–2809 (1997).
140. Griffith, J. D. *et al.* Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).
141. de Lange, T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 323–329 (2004).
142. de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100–2110 (2005).
143. de Lange, T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* **52**, 223–247 (2018).
144. Neidle, S. Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. 1–20 (Elsevier, 2012).
145. Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D. & Lipps, H. J. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 847–854 (2005).
146. Biffi, G., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11974–11976 (2012).

147. Takahama, K. *et al.* Regulation of Telomere Length by G-Quadruplex Telomere DNA- and TERRA-Binding Protein TLS/FUS. *Chem. Biol.* **20**, 341–350 (2013).
148. Wellinger, R. J. In the end, what's the problem? *Mol. Cell* **53**, 855–856 (2014).
149. O'Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 171–181 (2010).
150. Pfeiffer, V. & Lingner, J. Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a010405 (2013).
151. Pursell, Z. F., Isoz, I., Lundström, E.-B., Johansson, E. & Kunkel, T. A. Yeast DNA Polymerase ϵ Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science* **317**, 127–130 (2007).
152. Daigaku, Y. *et al.* A global profile of replicative polymerase usage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 192–198 (2015).
153. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K. & Sugino, A. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **59**, 598–605 (1968).
154. Turner, K. J., Vasu, V. & Griffin, D. K. Telomere biology and human phenotype. *Cells* **8**, 73(2019).

155. Srinivas, N., Rachakonda, S. & Kumar, R. Telomeres and telomere length: A general overview. *Cancers* **12**, 558 (2020).
156. Starkweather, A. R. *et al.* An Integrative Review of Factors Associated with Telomere Length and Implications for Biobehavioral Research. *Nurs. Res.* **63**, 36–50 (2014).
157. Barnes, R. P., Fouquerel, E. & Opresko, P. L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech. Ageing Dev.* **177**, 37–45 (2019).
158. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **130**, 223–233 (2007).
159. Vertecchi, E., Rizzo, A. & Salvati, E. Telomere Targeting Approaches in Cancer: Beyond Length Maintenance. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
160. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413 (1985).
161. Podlevsky, J. D. & Chen, J. J.-L. It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat. Res.* **730**, 3–11 (2012).
162. Shay, J. W. & Wright, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 349–353 (2011).

163. Sun, D. *et al.* Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *J. Med. Chem.* **40**, 2113–2116 (1997).
164. Salvati, E. *et al.* Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *J. Clin. Investig.* **117**, 3236–3247 (2007).
165. Lech, C. J., Heddi, B. & Phan, A. T. Guanine base stacking in G-quadruplex nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2034–2046 (2013).
166. Do, N. Q., Lim, K. W., Teo, M. H., Heddi, B. & Phan, A. T. Stacking of G-quadruplexes: NMR structure of a G-rich oligonucleotide with potential anti-HIV and anticancer activity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9448–9457 (2011).
167. Smargiasso, N. *et al.* G-Quadruplex DNA Assemblies: Loop Length, Cation Identity, and Multimer Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10208–10216 (2008).
168. Marsh, T. C. & Henderson, E. G-Wires: Self-Assembly of a Telomeric Oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into Large Superstructures. *Biochemistry* **33**, 10718–10724 (1994).
169. Mergny, J.-L. Kinetics of double-chain reversals bridging contiguous quartets in tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2386–2397 (2006).

170. Krishnan-Ghosh, Y., Liu, D. & Balasubramanian, S. Formation of an Interlocked Quadruplex Dimer by d(GGGT). *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11009–11016 (2004).
171. Kato, Y., Ohyama, T., Mita, H. & Yamamoto, Y. Dynamics and Thermodynamics of Dimerization of Parallel G-Quadruplexed DNA Formed from d(TTAG n) (n = 3–5). *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9980–9981 (2005).
172. Petraccone, L., *Higher-Order Quadruplex Structures, Quadruplex Nucleic Acids. Topics in Current Chemistry* 330 (Springer, 2012).
173. Yu, H.-Q., Miyoshi, D. & Sugimoto, N. Characterization of Structure and Stability of Long Telomeric DNA G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15461–15468 (2006).
174. Collie, G. W. *et al.* Electrospray Mass Spectrometry of Telomeric RNA (TERRA) Reveals the Formation of Stable Multimeric G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9328–9334 (2010).
175. Xu, Y., Ishizuka, T., Kurabayashi, K. & Komiyama, M. Consecutive Formation of G-Quadruplexes in Human Telomeric-Overhang DNA: A Protective Capping Structure for Telomere Ends. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7833–7836 (2009).
176. Haider, S., Parkinson, G. N. & Neidle, S. Molecular Dynamics and Principal Components Analysis of Human Telomeric Quadruplex Multimers. *Biophys. J.* **95**, 296–311 (2008).

177. Frasson, I., Pirota, V., Richter, S. N. & Doria, F. Multimeric G-quadruplexes: A review on their biological roles and targeting. *Int. J. Biol. Macromol.* **204**, 89–102 (2022).
178. Lomen-Hoerth, C., Anderson, T. & Miller, B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* **59**, 1077–1079 (2002).
179. DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of *C9ORF72* Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
180. Gitler, A. D. & Tsuiji, H. There has been an awakening: Emerging mechanisms of *C9orf72* mutations in FTD/ALS. *Brain Res.* **1647**, 19–29 (2016).
181. Zhou, B., Liu, C., Geng, Y. & Zhu, G. Topology of a G-quadruplex DNA formed by *C9orf72* hexanucleotide repeats associated with ALS and FTD. *Sci. Rep.* **5**, 16673 (2015).
182. Simone, R. *et al.* G-quadruplex-binding small molecules ameliorate *C9orf72* FTD / ALS pathology in vitro and *in vivo*. *EMBO Mol. Med.* **10**, 22–31 (2018).



Objetivos



2. Objetivos

La presente tesis doctoral se desarrolla en el marco del proyecto “Herramientas para visualizar estructuras no-canónicas de ADN/ARN mediante microscopía avanzada” [CIDEAGENT/2018/015] en el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de València. Dentro de este contexto, los G-quadruplex (G4s) son estructuras de ácidos nucleicos no-canónicas que se forman a partir de secuencias que se localizan en diversas regiones del genoma, incluyendo los promotores de genes y los telómeros.

Durante las últimas décadas han despertado un gran interés debido a su capacidad para regular varios procesos biológicos esenciales, como la replicación, la transcripción de genes, y la traducción de proteínas. Además, se ha descubierto que los G4s están implicados en varias enfermedades, incluyendo el cáncer y ciertas enfermedades neurodegenerativas. La presencia de secuencias putativas formadoras de G4s en los telómeros, los ha establecido como potenciales dianas terapéuticas en el cáncer debido a su capacidad para inhibir a la enzima telomerasa.

Más recientemente, se han descrito las estructuras multiméricas de G4s en el extremo telomérico monocatenario y, por lo tanto, el desarrollo de ligandos que interaccionen selectivamente con G4s multiméricos es esencial para comprender las funciones de los G4s en los telómeros y su aplicación como fármacos.

Objetivos

Por ello, el objetivo principal de esa tesis es *el desarrollo de ligandos capaces de interactuar con G4s tanto monoméricos como multiméricos y la evaluación de su interacción en función de la topología*. Para lograr este objetivo, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- I. Realizar una revisión exhaustiva de la literatura sobre las estructuras G4s y los ligandos que interactúan selectivamente con ellas, con un enfoque particular en las características estructurales.

- II. Diseñar, sintetizar y caracterizar ligandos específicos para estructuras G4s monoméricas y multiméricas. En este objetivo se abordará la síntesis y caracterización de los ligandos poliamínicos derivados del **TPA**. Estos serán clasificados en función de la longitud y grado de metilación de la cadena poliamínica, así como por la topología que conformen (lineal, macrocíclica o criptando).

- III. Estudio del comportamiento ácido-base de los ligandos sintetizados. Debido a la naturaleza aniónica de la molécula de ADN, es de interés conocer el estado de protonación de los ligandos sintetizados para identificar sus posibles interacciones electrostáticas. Por lo tanto, se evaluará el comportamiento ácido-base mediante medidas potenciométricas y técnicas espectroscópicas. En primer lugar, se calcularán las constantes de protonación de cada compuesto y, posteriormente, se

construirán los correspondientes diagramas de distribución de especies, lo que permitirá determinar la carga neta y las especies predominantes a lo largo del pH.

- IV. Evaluar la afinidad y selectividad de los ligandos diseñados por estructuras de ADN G4s monoméricas y multiméricas. Para este cometido, se evaluará la interacción de los ligandos con G4s relevantes biológicamente (secuencias con estructuras G4s mono- y diméricas de la región telomérica y secuencias asociadas a enfermedades neurodegenerativas) mediante ensayos basados en espectroscopia de emisión de fluorescencia, estudios de desnaturalización térmica (FRET-melting) y modelización molecular.
- V. Estudio de la capacidad de encapsulación de fármacos y sondas fluorescentes por los ligandos. Los compuestos más prometedores serán utilizados como huéspedes para encapsular moléculas de interés terapéutico y de visualización celular, para ello se utilizarán diversas técnicas como potenciometría, UV-Vis y fluorescencia.
- VI. Investigar la citotoxicidad de los ligandos. Una vez estudiada la interacción de los ligandos sintetizados con diferentes estructuras de ADN y ARN G4s, se evaluará su citotoxicidad en diferentes líneas celulares cancerígenas.

Objetivos

- VII. Investigar la capacidad de transporte de los ligandos para traspasar las barreras celulares y localizarse dentro de la célula. En relación con los apartados V y VI, se comparará la citotoxicidad de los ligandos libres y encapsulando el fármaco o la sonda celular. Asimismo, mediante microscopia de fluorescencia confocal se explorará la localización de los ligandos dentro de la célula.

Materiales y métodos



3.1. Metodología general

3.1.1. Reactivos y disolventes

Tanto los reactivos químicos dietilentriamina (111-40-0), 2,2'-diamino-*N*-metildietilamina (4097-88-5), bis(3-aminopropil)amina (56-18-8), 3,3'-diamino-*N*-metildipropilamina (105-83-9) y cadaverina (462-94-2), como los derivados de trietilamina, 4-(difenilamino)benzaldehído (4181-05-09), 4,4'-diformiltriethylamina (53566-95-3) y tris(4-formilfenil)amina (119001-43-3), así como el 5-fluorouracilo (**5-FU**) (51-21-8), se adquirieron en Merck/Sigma Aldrich. Por otro lado, el ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (piranina o **Pyr**) (6358-69-6), se obtuvo de Acros Organics. Todos estos reactivos fueron adquiridos con una pureza mayor al 99.6%.

Los disolventes empleados (acetona, diclorometano, dietil éter, dimetilsulfóxido, dioxano y etanol) fueron adquiridos de Fisher Scientific, VWR Chemicals, Scharlau Chemie y Acros Organics, con un contenido mínimo (C.G.) $\geq 99.8\%$. Algunos disolventes fueron secados utilizando tamices moleculares de deshidratación (4 Å). El agua utilizada fue ultrapura Milli-Q del tipo 1 obtenida de un sistema de producción de agua ultrapura Milli-Q®.

Los oligonucleótidos de ADN y ARN empleados se obtuvieron de IDT DNA Technologies. Los oligonucleótidos no marcados fueron purificados mediante un proceso estándar de desalinización, mientras que los oligonucleótidos doblemente marcados con cromóforos fueron purificados por HPLC.

3.1.2. Análisis Elemental

Los análisis elementales de C, H y N se llevaron a cabo por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, con el equipamiento FlashSmart de TermoFischer. Todos los análisis se realizaron por triplicado, siendo los resultados finales su promedio.

3.1.3. Espectrometría de masas

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados por el SCSIE de la Universidad de Valencia, en un espectrómetro de masas híbrido TRIPLETOFT5600 de alta resolución de Sciex, donde se obtuvieron los espectros ESI/APCI-TOF sin fragmentar.

3.1.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Las muestras se disolvieron en el disolvente deuterado adecuado (CDCl_3 , D_2O y $\text{DMSO-}d_6$) y se caracterizaron por resonancia magnética nuclear en el SCSIE de la Universidad de Valencia, empleando el equipo Bruker Advance DPX300 (300 MHz). Se tomó como referencia la señal del tetrametilsilano (TMS). Se obtuvieron los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C , así como los espectros bidimensionales homonuclear COSY y heteronuclear HSQC. El procesado y visualización de los espectros se llevó a cabo mediante el software MestReNova 14.1.0.

3.1.5. Espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia

Los estudios de espectroscopia de absorción UV-Vis se realizaron empleando los espectrofotómetros de ultravioleta-visible Agilent 8453 y Agilent Cary 100, y los estudios de emisión de fluorescencia con el equipo de fluorescencia modular PTI, ambos disponibles en el laboratorio del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

Para ambos estudios se emplearon cubetas Hellma con campo óptico de 1 cm transparentes en sus 4 lados a la radiación electromagnética. Las medidas fueron realizadas controlando la temperatura a 298 K con un termostato.

3.2. Estudio del comportamiento ácido-base

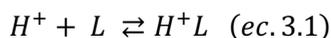
Dado que los compuestos sintetizados contienen grupos amino susceptibles de ser protonados, se estudiaron sus propiedades ácido base utilizando las técnicas de potenciometría y espectroscopia.

3.2.1. Estudios potenciométricos

Fundamento teórico

Las valoraciones potenciométricas permiten determinar las constantes de equilibrio de un sistema en disolución, a través del registro del potencial al añadir un valorante. Midiendo la cantidad de una de las

especies implicadas en el equilibrio, como en nuestro caso el ion H^+ , es posible determinar las constantes de estabilidad correspondientes a los equilibrios de protonación de las especies implicadas. Esto es posible gracias a la ecuación de Nernst, la cual a partir del potencial permite el cálculo de la concentración de protones. Si se tiene un equilibrio ácido-base:



Se define la constante termodinámica de protonación como el coeficiente de actividades termodinámicas entre reactivos y productos:

$$K = \frac{a_{H^+L}}{a_{H^+} \cdot a_L} \quad (ec. 3.2)$$

Teniendo en cuenta que las condiciones de trabajo son temperatura constante y medio acuoso con una alta concentración iónica, 0.15 M NaCl, los coeficientes de actividad se pueden considerar constantes y se pueden utilizar constantes de equilibrio que se mantendrán constantes para una temperatura y una determinada fuerza iónica:

$$K = \frac{[H^+L]}{[H^+][L]} \quad (ec. 3.3)$$

Finalmente, la ecuación de Nernst relaciona la concentración de H^+ con el potencial medido tras cada adición de valorante (ec. 3.4).

$$E = E^\circ + \frac{R T}{n F} \cdot \ln [H^+] \quad (ec. 3.4)$$

El valor del potencial estándar de la disolución, E° , se determina periódicamente (mínimo dos veces antes de llevar a cabo el experimento) valorando disoluciones de concentración conocida de un ácido con una base fuerte. El valor de E° no es constante, sino que comprende varios términos (ec. 3.5), y algunos de ellos dependen de la concentración de H^+ y del tiempo: potencial de unión líquida (E_J) y potencial de asimetría (E_{asim}), respectivamente.

$$E^\circ = E^\circ + E_J + E_{asim} \quad (\text{ec. 3.5})$$

Descripción del sistema potenciométrico

Las medidas potenciométricas se llevaron a cabo empleando un potenciómetro automático Metrohm 905 Titrando, disponible en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. El sistema potenciométrico está compuesto por dos celdas, una para la medida de las muestras y otra utilizada como celda de referencia, conectadas por un puente salino tipo Wilhelm con una disolución en su interior de NaCl 0.5 M. Al final del puente salino se encuentra un regulador que tiene forma de J para evitar fluctuaciones gravitacionales. El electrodo de medida es un electrodo de vidrio Metrohm, mientras que el electrodo de referencia es un electrodo Ag/AgCl en KCl 3 M Metrohm. Además, está equipado con una bureta automática Metrohm 800 Dosino y un agitador magnético Metrohm 801 Stirrer, monitorizado por un ordenador Intel Core i3-201. El software utilizado que permite el control automatizado de la valoración es el Metrohm Tiamo 2.3, adaptado por el Dr. Salvador Blasco para el tipo de medidas que se realizan en el

Material y métodos

laboratorio. El programa monitoriza la adición de valorante (mL) y registra el correspondiente potencial E (mV) asociado a la alícuota de valorante adicionada.

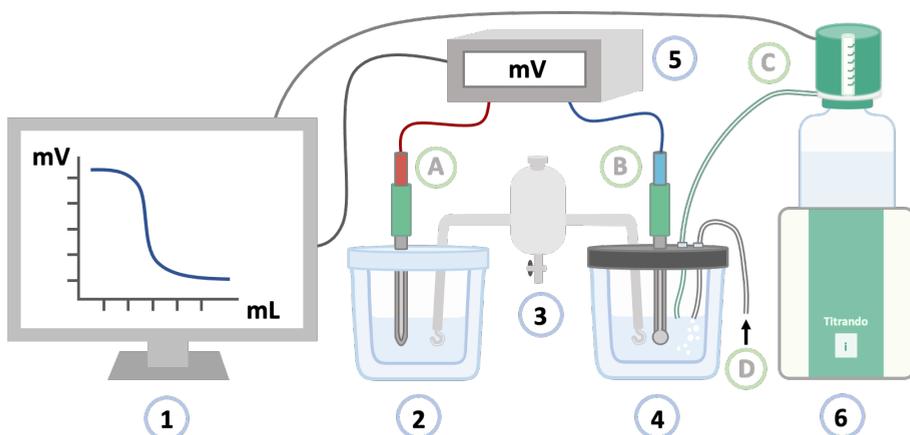


Figura 3.1. Esquema del sistema potenciométrico y sus componentes.

Tabla 3.1. Componentes del sistema potenciométrico.

1 – Sistema informático	A – Electrodo de referencia
2 – Celda de referencia	B – Electrodo de medida
3 – Puente salino Wilhelm	C – Entrada valorante
4 – Celda de medida	D – Entrada argón
5 – pH-metro	
6 – Bureta automática	

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 298.1 ± 0.1 K en atmósfera de argón, utilizando como fuerza iónica NaCl 0.15 M (haciendo uso en todo momento de agua ultrapura Milli-Q) y con agitación constante.

Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, por cada alícuota de valorante adicionada, se realiza un promedio de diez valores de potencial E ; estos valores son solo aceptados por el programa siempre y cuando la desviación estándar y la deriva (diferencia entre el valor más alto y el más bajo) no superen 0.05 mV y 0.1 mV, respectivamente. De no ser así, el sistema continúa midiendo el potencial hasta que los parámetros se encuentren en el intervalo establecido, recalculando la desviación estándar y la deriva de las últimas 10 medidas. Si tras 100 medidas no se han establecido las condiciones satisfactorias, se considera que el sistema no ha llegado al equilibrio y se añade una nueva alícuota de valorante, reiniciando el cálculo.

Al finalizar el experimento, se genera un fichero que contiene el registro de volumen de alícuota de valorante añadida y el potencial E asociado.

Procedimiento

Como se ha mencionado, es necesaria la calibración de los electrodos para determinar el potencial estándar de la disolución E° antes de cada valoración potenciométrica. Este proceso se realiza mediante la valoración de un ácido fuerte (0.1M de HCl) con una base fuerte (0.1 M NaOH). Además, durante esta experiencia el software determina otros parámetros como el producto iónico del agua (pK_w), la concentración exacta del valorante y el grado de carbonatación del valorante, el cual no debe exceder el 1%.^{1,2} Se utilizó como fuerza iónica NaCl 0.15 M, con el objetivo de simular en la medida de lo posible las condiciones fisiológicas,

dado que Na^+ y Cl^- son los electrolitos más abundantes en los fluidos extracelulares.

Tras la calibración, el compuesto a valorar se disuelve en la fuerza iónica seleccionada y se valora con el valorante cuyos parámetros han sido verificados. En el caso de estudiar la interacción entre dos compuestos, se disuelven las cantidades de ambos compuestos necesarias para cubrir el intervalo de relaciones molares escogido para el trabajo, y se aplica el procedimiento descrito anteriormente.

Análisis de los datos

Los datos compilados en un fichero son analizados con el software HYPERQUAD,³ el cual mediante un ajuste por el método de Levenberg-Marquard⁴ (mínimos cuadrados no lineales) ajusta los valores experimentales a un modelo de equilibrio inicial, permitiendo la determinación de las constantes del modelo propuesto, hasta obtener el mejor ajuste de éstos a los valores experimentales. Finalmente, se representa el diagrama de distribución de especies a partir de las constantes de equilibrio obtenidas con el software Hyss.⁵ Cabe destacar que se realizan un mínimo de dos valoraciones potenciométricas por ligando, las cuales son analizadas conjuntamente para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

3.2.2. Estudios espectroscópicos de UV-Vis y fluorescencia

El comportamiento ácido-base se investigó registrando la variación de los espectros de UV-vis y de emisión de fluorescencia en función del pH. La combinación de estas dos técnicas con los estudios potenciométricos permite complementar el estudio ácido-base al permitir la identificación de las especies que experimentan cambios en la absorción o emisión de fluorescencia en disolución en función del pH.

Procedimiento experimental

A partir de disoluciones stock de ligando de concentración 1 mM se prepararon 5 mL de disoluciones de 10 μ M en 0.15 M NaCl. Con un pH-metro Metrohm 713 se realizaron las medidas de pH, ajustando la concentración de iones hidrógeno con alícuotas de disoluciones de NaOH o HCl según fuese necesario. Se registraron los espectros de absorción y emisión de fluorescencia a intervalos crecientes de pH de 0.3 unidades.

3.3. Estudio de la interacción con ADN

En el siguiente apartado se detallan los protocolos y las técnicas experimentales utilizadas para estudiar la interacción de los ligandos con el ADN.^{6,7}

3.3.1. Preparación de las disoluciones tampón

La topología que adquiere un oligonucleótido en disolución depende de la sal empleada en el tampón. Por ello, se han utilizado diferentes disoluciones tampón que contienen diferentes cantidades de sales (KCl, NaCl y LiCl) las cuales se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Disoluciones tampón y sus componentes.

Nombre	KCl (mM)	NaCl (mM)	LiCl (mM)	LiCac (mM)
KCl 1	100	-	10	10
KCl 2	10	-	90	10
NaCl 1	-	100	10	10
NaCl 2	-	10	90	10

Procedimiento experimental

Para preparar 200 mL de la disolución de cacodilato de litio (LiCac) 20 mM se añadieron 0.55 g de ácido cacodílico (HCac) a 190 mL de agua Milli-Q y se adicionaron gota a gota 3.70 mL de una disolución de hidróxido de litio (LiOH) 1 M previamente preparada hasta ajustarse al pH deseado (pH = 7.4).⁸

Las disoluciones 10 mM y 100 mM de KCl, NaCl y 10 mM de LiCl se prepararon a partir de la disolución de la cantidad necesaria de sal en 200 mL de agua Milli-Q.

Las disoluciones tampón finales indicadas en la tabla 3.2 se prepararon a partir de los volúmenes necesarios de las disoluciones de LiCac, KCl, NaCl y LiCl, y se incorporó agua Milli-Q hasta alcanzar 200 mL. Se ajustó el pH a 7.4 mediante la adición de alícuotas de la disolución madre de LiOH 1M.

3.3.2. Preparación de las disoluciones de ADN y ARN para los ensayos de UV-Vis y fluorescencia

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en esta tesis se recopilan en la tabla 3.3 junto con su nombre común y su coeficiente de extinción molar.

Tabla 3.3. Secuencias de ADN y ARN utilizadas.

Nombre	Secuencia	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
HTelo22	AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	215000
G2T1	AGGG(TTA-GGG) ₇	472900
G4C2	(GGGGCC) ₄	217700
rG4C2	r(GGGGCC) ₄	216100
cmyc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	228700
Kit1	AGG-GAG-GGC-GCT-GGG-AGG-AGG-G	226700
Bcl2	GGG-CGC-GGG-AGG-AAT-TGG-GCG-GG	227300
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	253200

El ADN se disuelve en la disolución tampón correspondiente a una concentración estimada de 500 μM y se incuba a 25 °C durante 24 h en el caso de ADN/ARN no marcado y 2-3 h para el ADN marcado. La concentración de cada disolución se determinó mediante espectroscopia UV-Vis utilizando la ley de Lambert-Beer.

Para ello se registran los espectros de absorción de 1 mL de disolución tampón y cantidades crecientes de ADN/ARN (alícuotas de 2 μL x 4). Con la ecuación de Lambert-Beer se calcula la concentración de cada alícuota mediante el coeficiente de extinción molar y se hace un promedio. Posteriormente, las disoluciones de oligonucleótidos se almacenan a -20 °C y se atemperan a 25 °C durante 30 min previamente a su uso.

Finalmente, las disoluciones de ADN/ARN se hibridan para formar la estructura/topología deseada tras calentar a 95 °C durante 10 minutos y dejar enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente (25 °C) durante 6 – 7 horas en el tampón adecuado.

3.3.3. Preparación de las disoluciones de ADN y ARN para el ensayo de desnaturalización térmica

Los oligonucleótidos utilizados para los estudios de desnaturalización térmica (FRET-Melting) se encuentran doblemente marcados. Estos fueron obtenidos de IDT DNA Technologies como sólidos liofilizados, y para su uso, se disolvieron en la cantidad necesaria de tampón correspondiente para obtener una concentración 100 μM . En la tabla 3.3 se describen las secuencias empleadas.

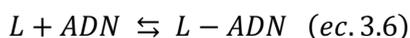
Tabla 3.4. Secuencias de ADN y ARN doblemente marcadas utilizadas.

Nombre	Secuencia	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
HTelo	GG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	284680
G2T1	A-GGG(TTA-GGG) ₇	529080
G4C2	(GGGGCC) ₄	273180
rG4C2	r(GGGGCC) ₄	272280
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	309380
cmyc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	283780
22CTA	AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G	276850
26TTA	TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TT	316980
24TTG	TTG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGA	299380
Kit1	AGG-GAG-GGC-GCT-GGG-AGG-AGG-G	282880
Kit2	CGG-GCG-GGC-GCG-AGG-GAG-GGG	261780
Bcl2	GGG-CGC-GGG-AGG-AAT-TGG-GCG-GG	283480
TBA	GGT-TGG-TGT-GGT-TGG	199480
rHTelo	r(GGG-UUA-GGG-UUA-GGG-UUA-GGG)	280180

3.3.4. Valoraciones espectrofotométricas y espectrofluorimétricas

Se puede evaluar la interacción entre las estructuras de ADN/ARN G-quadruplex y las moléculas fluorescentes mediante la variación de sus espectros de absorción de UV-Vis y de emisión de fluorescencia.⁹ La valoración de algunos ligandos con ADN puede dar lugar a variaciones en la absorción y en la emisión de fluorescencia, con lo cual se puede determinar las constantes de estabilidad (K_e) entre el ligando y la estructura de ADN.

Aplicando el modelo Aldrich-Wright se han determinado las constantes de estabilidad experimentalmente.^{10,11} Brevemente, este método se basa en el ajuste de los datos de emisión de fluorescencia en un modelo de equilibrio simplificado. En este contexto, un equilibrio para la interacción entre ligando y ADN de estequiometría 1:1 se puede definir de acuerdo a la ecuación 3.6:



La correspondiente constante de estabilidad K_e puede calcularse como:

$$K_e = \frac{[L - ADN]}{[L] \cdot [DNA]} \quad (\text{ec. 3.7})$$

Para obtener información sobre las concentraciones de las especies en equilibrio, es necesario recurrir a métodos indirectos de medida. En particular, se puede medir la concentración del complejo formado [L-ADN] utilizando técnicas de valoración espectroscópicas. En una valoración clásica, se mantiene constante la concentración del ligando [L], mientras se agrega el valorante ADN. Durante la valoración, se registra la respuesta fotofísica y se representa en función de la concentración de ADN. Las modificaciones en el perfil de emisión observadas son directamente proporcionales a la concentración del complejo [L-ADN].

Para ajustar los datos obtenidos a un modelo matemático es necesario considerar las concentraciones de las especies inicialmente y en el equilibrio (ec. 3.8 y 3.9), así como también la fracción molar (ec. 3.10):

$$[L]_t = [L] + [L - ADN] \quad (ec. 3.8)$$

$$[ADN]_t = [ADN] + [L - ADN] \quad (ec. 3.9)$$

$$f_{L-ADN} = \frac{[L - ADN]}{[L]_t} \quad (ec. 3.10)$$

Mediante la combinación de las últimas tres ecuaciones junto con la ecuación 3.7 es posible obtener la ecuación 3.11:

$$[L - ADN] = [L]_t \cdot \frac{K_e \cdot [ADN]}{1 + [ADN]} \quad (ec. 3.11)$$

En la ecuación 3.12 se sustituyen las especies de $[L]_t$ y $[ADN]_t$ en función de $[L-ADN]$, quedando K_e como la única incógnita (ec. 3.12).

$$[L - ADN] = \frac{1}{2} \left[[ADN]_t + [L]_t + \frac{1}{k_e} - \sqrt{\left([ADN]_t + [L]_t + \frac{1}{k_e} \right)^2 - 4 \cdot [L]_t \cdot [ADN]_t} \right] \quad (ec. 3.12)$$

La ecuación anterior puede simplificarse como la representación gráfica de los cambios observados de fluorescencia (y) en función de la concentración total de ADN (x) (ec. 3.13).

$$y = \frac{1}{2} \cdot R \left[x + B + A - \sqrt{(x + B + A)^2 - 4 \cdot B \cdot x} \right] \quad (ec. 3.13)$$

El procedimiento del ajuste de los datos se basa en el método de los mínimos cuadrados y en el algoritmo de iteración de Lavenberg-Marquadt. Las variables independientes R, A y B son determinadas por el ajuste, siendo $A = 1/K_e$, $B = [L]_t$ y R hace referencia a la sensibilidad de la respuesta instrumental.¹¹ Finalmente, K_e se obtiene aplicando la relación establecida en la ecuación 3.14:

$$k_e = \frac{B}{A \cdot [L]_t} \quad (\text{ec. 3.14})$$

Procedimiento experimental

En primer lugar, se prepara una disolución de ligando 5 μM (1 mL) en tampón Tris (100 mM KCl, 10 mM Tris pH 7.4) y se registra el espectro de absorción y emisión. Seguidamente, se añaden a la cubeta alícuotas de la disolución de ADN disuelto en tampón Tris ($[\text{ADN}] = 500 \mu\text{M}$), se agita la cubeta, se incuba durante 2 minutos y se registra el espectro.

Para todos los experimentos de emisión de fluorescencia se emplearon aperturas de rendija de 2 nm con un tiempo de integración de 0.1 s. Para los ligandos derivados de ftalocianinas los espectros de emisión se registraron en el intervalo 630 – 900 nm, con una longitud de onda de excitación de 620 nm. Por otro lado, para los ligandos espirobifluorenos se registraron los espectros de emisión de fluorescencia entre 400 y 800 nm, con una longitud de onda de excitación de 380 nm.

3.3.5. Ensayo de desnaturalización térmica

Fundamento teórico

La transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) es una interacción de resonancia dipolar entre dos moléculas, donde la molécula “dadora” transfiere su energía de excitación a la molécula “aceptora”.¹² Theodor Förster en 1948 describió por primera vez el proceso del fenómeno FRET, donde especificó que para que tenga lugar la transferencia energética, las moléculas dadora y aceptora deben estar a una distancia mínima de 10 nm.¹³

En un experimento clásico de desnaturalización térmica, una molécula se encuentra covalentemente enlazada a dos grupos cromóforos, uno dador y otro aceptor en distintas posiciones (normalmente en los extremos). Tras la excitación del dador, este le transfiere su energía del estado excitado al aceptor, de modo que la emisión del dador se ve apagada, mientras que la emisión del aceptor se ve aumentada.

La desnaturalización térmica de ácidos nucleicos es el proceso mediante el cual se rompen las interacciones no covalentes entre las bases que mantienen estabilizada la estructura de ADN o ARN.¹⁴ La desnaturalización puede alcanzarse mediante el aumento de la temperatura, considerando este proceso como un modelo de transición entre la estructura plegada y la estructura desplegada de ADN o ARN, que predominan a baja temperatura y alta temperatura, respectivamente. En base a este proceso entre los dos estados, se puede estudiar la desnaturalización térmica anclando dos cromóforos en los extremos de

la molécula de ADN o ARN. El par de cromóforos más utilizado en este tipo de ensayos es fluoresceína (FAM) como dador, y tetrametilrodamina (TAMRA) como aceptora.¹⁵

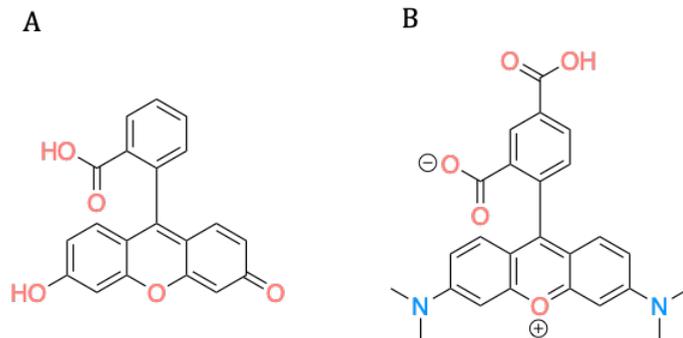


Figura 3.2. Estructuras moleculares del par (A) FAM y (B) TAMRA.

Cuando la estructura del ADN o ARN se encuentra en su forma plegada, los dos cromóforos se encuentran lo suficientemente cercanos en el espacio para producir el fenómeno FRET, de modo que la fluorescencia del dador se ve apagada ya que el dador (FAM) transfiere su energía al aceptor (TAMRA) (figura 3.3, izquierda). Al incrementar la temperatura, la molécula de ADN o ARN comienza a desplegarse, separando al dador del aceptor, con el consiguiente aumento de la fluorescencia del dador (figura 3.3, derecha), alcanzando el máximo de emisión de fluorescencia en el estado completamente desplegado.

La representación de la emisión del dador en función de la temperatura proporciona la temperatura de desnaturalización del ADN o ARN (T_m^θ), la cual corresponde al 50 % del ADN o ARN desplegado (figura-3.4).

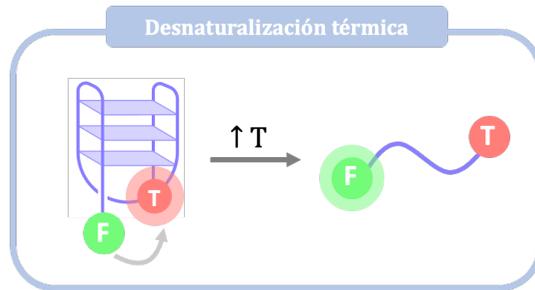


Figura 3.3. Ilustración del principio del ensayo de desnaturalización térmica.

Al evaluar la interacción de un ligando con el ADN o ARN, si se produce un aumento en la temperatura de desnaturalización T_{mL} se le considera estabilizador (figura 3.4). Esta variación se mide como ΔT_m , la cual corresponde a la diferencia entre la T_{mL} en presencia de ligando y en ausencia de este, T_m^0 .¹⁶

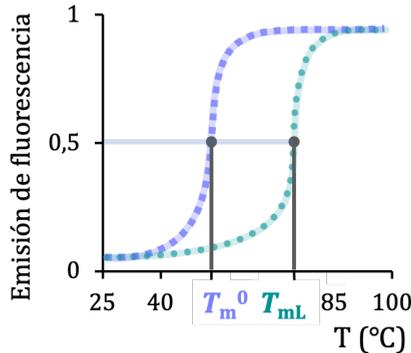


Figura 3.4. Representación gráfica de ΔT_m .

Procedimiento del ensayo de desnaturalización térmica

Se llevaron a cabo los ensayos de desnaturalización térmica siguiendo el protocolo establecido por Mergny y colaboradores.¹⁶ Se empleó el instrumento AriaMx Real-Time PCR (qPCR) utilizando placas de 96

pocillos. Tras una incubación inicial a 25 °C durante 5 min, se incrementó la temperatura 1 °C por min hasta alcanzar 95 °C mientras se monitorizaba la emisión a 520 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 495 nm.

Se prepararon las disoluciones 0.4 μM de los oligonucleótidos (G4 o dúplex) doblemente marcados diluyendo en el tampón correspondiente las disoluciones madre 100 μM . Las disoluciones se hibridaron, para ello se calentaron a 95 °C durante 10 minutos y se dejaron enfriar lentamente durante 6 - 7 horas hasta alcanzar temperatura ambiente. Por otro lado, se preparó una disolución madre de ligando 20 μM en el mismo tampón que el oligonucleótido empleado en el experimento. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones de ligando de concentraciones 0.4, 0.8, 2, 4 y 8 μM .

Finalmente, en cada pocillo de la placa de 96 pocillos se adicionaron y mezclaron 30 μL de disolución de oligonucleótido (0.4 μM) con 30 μL de disolución diluida de ligando, obteniendo relaciones molares finales 0, 1, 2, 5, 10 y 20 (ADN/ARN:L). Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

Análisis de los datos

Se registró la emisión de fluorescencia del dador FAM en función de la temperatura, y los datos obtenidos fueron normalizados y analizados con el software OriginPro. Se calcularon los valores de temperatura de fusión (T_m) mediante el ajuste de los datos a una ecuación *dosis-respuesta*,

determinando la temperatura a la cual la emisión de fluorescencia del FAM alcanzaba su punto medio.

Procedimiento del ensayo de competición

Para el ensayo de competición de desnaturalización térmica, las secuencias de ADN o ARN se prepararon con la metodología descrita en el apartado 3.3.3. Se preparó una disolución que contenía 0.4 μM del ADN o ARN de estudio y 4 μM del ligando a evaluar en el tampón adecuado para la formación de la topología G4 deseada (relación molar G4:L 1:10). A continuación, se preparó una disolución madre 1 mM de timo de ternera en el mismo tampón de ADN, modelo de ADN dúplex no marcado; a partir de ésta, se prepararon disoluciones con 0, 50, 100, 600 y 1200 equivalentes de ADN dúplex. Finalmente, se añadieron y mezclaron en una placa de 96 pocillos 30 μL de la disolución de ADN o ARN G4 con ligando en relación molar 1:10 (G4:L) y 30 μL de la correspondiente dilución de ADN dúplex. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado, siguiendo el análisis de datos previamente descrito.

3.3.6. Ensayo de desplazamiento con naranja de tiazol

Para estimar la afinidad de los ligandos por las estructuras de ADN G4s y dúplex se ha empleado un ensayo de desplazamiento de indicador (FID, *Fluorescence Indicator Displacement Assay*). Se trata de un ensayo ampliamente utilizado en el estudio de la interacción de moléculas con ADN y ARN de tipo G4 y dúplex.¹⁷

Fundamento teórico del ensayo FID

El naranja de tiazol (TO, *Thiazole Orange*) es una molécula altamente fluorescente cuando se encuentra unida al ADN, mientras que prácticamente no presenta fluorescencia en su estado libre sin enlazarse al ADN.¹⁸

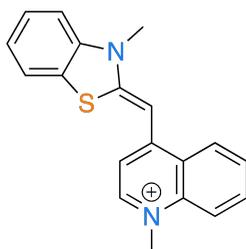


Figura 3.5. Estructura del naranja de tiazol.

Su desplazamiento del ADN puede ser fácilmente monitorizado a través de la disminución de su fluorescencia. De este modo, se puede evaluar la afinidad por el ADN G-quadruplex de un compuesto candidato a través de su capacidad para desplazar el TO del mismo. Además, dado que la interacción del TO con ADN G4 y dúplex presenta una afinidad comparable, se puede obtener información sobre la selectividad del ADN G4 sobre el ADN dúplex para un ligando (figura 3.6).

Procedimiento experimental

Se ha utilizado el protocolo descrito por David Monchaud y Marie-Paule Teulade Fichou.¹⁹ Se prepararon disoluciones 100 μM de ADN (HTelo, G2T1 y ds26) empleando los tampones KCl 1 o NaCl 1, según la topología del G4 a investigar. Se preparó una disolución 250 μM de naranja de tiazol

en el correspondiente tampón a partir de una disolución madre 5 mM en DMSO y una disolución 250 μM del ligando a evaluar en el mismo tampón.

En una cubeta de cuarzo de volumen reducido de 1 mL se añadieron el tampón y el TO, y se registró el espectro del TO (F_{TO}). Dependiendo del ADN que se pretende evaluar se añaden distintos equivalentes de TO: 2 equivalentes respecto al ADN G4 (2 μL de la disolución 250 μM de TO, $[\text{TO}]_{\text{cuv}} = 0.5 \mu\text{M}$) y 3 equivalentes respecto al ADN dúplex (3 μL de la disolución 250 μM de TO, $[\text{TO}]_{\text{cuv}} = 0.75 \mu\text{M}$). Seguidamente, se añadió el ADN de forma que la concentración final en la cubeta sea 0.25 μM (2.5 μL de la disolución 100 μM de ADN). Se agitó y tras 5 minutos se registró su espectro, el cual corresponde a la primera medida sin ligando añadido F_{ADN} . Tras ello, se añadieron concentraciones crecientes de ligando de 0 a 20 equivalentes molares y se registró cada espectro (F_x).

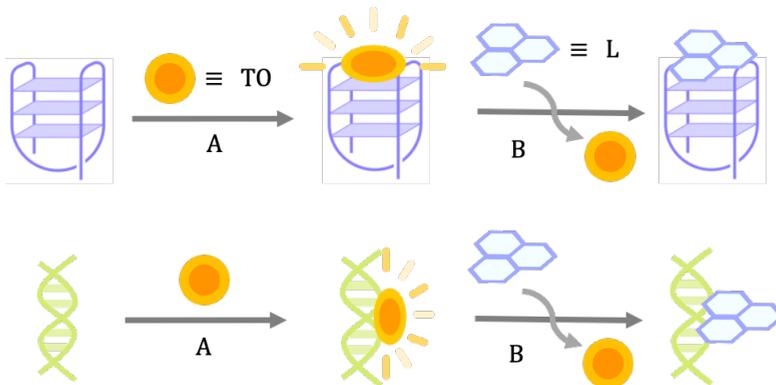


Figura 3.6. Representación esquemática del ensayo de desplazamiento de naranja de tiazol. (A) Interacción del ADN (G4 o dúplex) con el TO y (B) desplazamiento del TO del ADN por la molécula de ligando.

Análisis de los datos

Se evaluó el desplazamiento del naranja de tiazol mediante la variación del área de la emisión de fluorescencia (de 510 a 570 nm) de todos los espectros realizados desde F_{ADN} a F_{20} , habiendo restado a cada uno el área de F_{TO} . El porcentaje de desplazamiento del TO (%TO) es calculado para cada una de las medidas realizadas empleando la siguiente ecuación:

$$\% TO = \frac{\text{Área } F_x - \text{Área } F_{TO}}{F_{ADN}} \cdot 100 \text{ siendo } F_0 < F_x < F_{20} \text{ (ec. 3.15)}$$

El %TO se representa gráficamente en el programa Origin en función de la concentración de ligando añadido, $\%TO = f([L])$.¹⁹

La afinidad por el ADN de la molécula estudiada se cuantifica mediante el parámetro IC_{50} , el cual representa la concentración necesaria para desplazar el 50% del TO del ADN. El valor IC_{50} se calcula para ambos ADN, G4 (${}^{G4}IC_{50}$) y dúplex (${}^{ds}IC_{50}$). Asimismo, se estima la selectividad de ADN G4 sobre dúplex mediante el cálculo de un parámetro S con la ecuación 3.16:

$${}^{G4}S = \frac{{}^{ds}IC_{50}}{{}^{G4}IC_{50}} \text{ (ec. 3.16)}$$

Cuando la interacción con el ADN dúplex es muy débil, no pueden determinarse los valores de ${}^{ds}IC_{50}$. En esta situación particular, la selectividad ${}^{G4}S$ no puede ser calculada, pero se puede realizar una estimación. Para ello, se emplea en el cálculo el %TO obtenido para 10 equivalentes molares de ligando con dúplex y quadruplex.

3.3.7. Determinación del modo de unión de los ligandos con G4s mediante secuencias marcadas con 2-aminopurina

Se usó la espectroscopia de emisión para estudiar el modo de unión de los ligandos con modelos de G-quadruplex dimérico utilizando secuencias cuyas adeninas se habían sustituido por la 2-aminopurina (2Ap).^{20,21}

Fundamento teórico

La 2-aminopurina es un isómero fluorescente de la adenina, en el cual el grupo amino de la posición 6 ha sido desplazado a la posición 2 (figura 3.7). Asimismo, es capaz de formar con la timina el característico par de bases de Watson-Crick AT, proporcionando dos enlaces de hidrógeno.²²

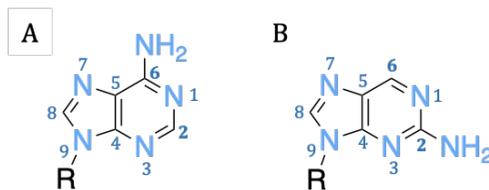


Figura 3.7. Estructura de (A) adenina y (B) 2-aminopurina.

Las propiedades fluorescentes de la 2Ap son altamente sensibles al entorno local (conformación del ácido nucleico); esto es debido a que el estado excitado singlete (¹Ap*) en el ADN está fuertemente influenciado por el proceso de desactivación por transferencia de electrones desde las bases cercanas.²³ Dado que la eficiencia de la transferencia electrónica en el ADN es sensible a los cambios en las interacciones de apilamiento π ,

este análogo de la adenina es considerado un sustituyente idóneo para medir la interacción de estructuras de mayor orden con pequeñas moléculas.²⁴

La 2Ap puede ser incorporada en cualquier oligonucleótido sin modificar la conformación final del G4, afectando solo levemente a su estabilidad. La intensidad de fluorescencia de la 2Ap tiende a aumentar con la mayor exposición al disolvente, y a disminuir con el apilamiento de bases, de modo que la emisión de fluorescencia de la 2Ap en un G4 se verá modificada si una pequeña molécula interacciona en su proximidad.

Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, hay numerosos ligandos de G4 que presentan propiedades fluorescentes, mostrando cambios significativos en su emisión de fluorescencia al interactuar con el ADN. En estos casos, se puede realizar la valoración de fluorescencia siguiendo la variación de la emisión del ligando al aumentar la concentración del ADN, obteniendo una curva en función de la concentración, que puede ajustarse a un modo de unión y a una constante de estabilidad. Este método es factible cuando el ADN G4 utilizado y el ligando no presentan espectros de emisión solapados.

En el caso de que el oligonucleótido presente la banda de emisión solapada con la banda de emisión del ligando, existe otro método que se ha empleado en este apartado. En este ensayo se determina la variación de emisión de ambos, el G4 marcado con 2Ap y el ligando, con el aumento de la concentración del ligando.

La 2Ap presenta una banda de absorción a 310 nm y un máximo de emisión a 370 nm, al igual que los ligandos sintetizados en esta tesis con **TPA**. Dado que la concentración de ADN es constante en la cubeta, los

cambios producidos en la banda de emisión son debidos a (1), la interacción del ADN marcado con 2Ap y el ligando, y a (2), la emisión propia del ligando al ser excitado. Por separado, se registra la variación de emisión de fluorescencia del ligando a 370 nm al aumentar su concentración, si la representación proporciona una recta de calibrado lineal significa que la emisión de fluorescencia de ligando es directamente proporcional a su concentración. Por lo tanto, se puede determinar la variación en la emisión de fluorescencia de la 2Ap en función de la concentración del ligando, dividiendo la emisión registrada de ambos entre la emisión del ligando a una concentración concreta a 370 nm (ec. 3.17).

$$Em.Ap \propto \frac{(Em.Ap + Em.L)}{Em.L} \quad (ec. 3.17)$$

Finalmente, la interacción del ligando con el oligonucleótido se representa como la variación de la emisión de fluorescencia normalizada de 2Ap en función de la concentración de ligando (ec. 3.18).

$$\frac{Em.Ap_i}{Em.Ap_o} = f ([L]) \quad (ec. 3.18)$$

Procedimiento experimental

Se escogieron los modelos de G4 dimérico G2T1 marcados con la 2-Aminopurina en las posiciones 7, 13, 31 y 37, llamados Ap7, Ap13, Ap31 y Ap37, respectivamente. Estas posiciones fueron seleccionadas debido a su localización, cada una se encuentra en una de las cuatro tétradas

Material y métodos

expuestas del oligonucleótido G2T1, siendo Ap7 y Ap31 tétradas externas, mientras que Ap13 y Ap37 son las tétradas expuestas del bolsillo interno. Con el objetivo de profundizar en el estudio de la preferencia de los ligandos por las tétradas externas o internas, se emplearon las secuencias doblemente modificadas con 2Ap, llamadas Ap7+Ap31 y Ap13+Ap37.

Tabla 3.5. Secuencias de ADN utilizadas en este ensayo.

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')
Ap7	AGGGTTApGGG(TTAGGG) ₆
Ap13	AGGGTTAGGGTTApGGG(TTAGGG) ₅
Ap31	AGGG(TTAGGG) ₄ TTApGGG(TTAGGG) ₂
Ap37	AGGG(TTAGGG) ₅ TTApGGGTTAGGG
Ap7+Ap31	AGGGTTApGGG(TTAGGG) ₃ TTApGGG(TTAGGG) ₂
Ap13+Ap37	AGGGTTAGGGTTApGGG(TTAGGG) ₃ TTApGGGTTAGGG

Los oligonucleótidos fueron disueltos en el tampón 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl (pH de 7.4) a una concentración de 2 μ M y se hibridaron. Después, se valoraron con una disolución 250 μ M de ligando, disuelta en el mismo tampón. Se registró la emisión de fluorescencia (320 - 750 nm) con $\lambda_{\text{ex}} = 305$ nm.

3.3.8. Estudios computacionales

Con el objetivo de determinar los factores que gobiernan la interacción de los ligandos sintetizados con el ADN en sus conformaciones de G4 monomérico, G4 dimérico y de doble hélice, y estudiar la encapsulación de moléculas de interés biológico en ellos, se han realizado estudios computacionales de dinámica molecular (MD, *molecular dynamics*) en colaboración con el Dr. Álvar Martínez-Camarena del grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València.

En primer lugar, se realizaron las modelizaciones de los ligandos **22Me-L**, **22Me-M**, **22Me-C** y **22H-C** con el software *xleap* incluidos en el software AMBER16.²⁵ Los ligandos fueron construidos a partir de la estructura de la trifenilamina descrita en la bibliografía por D'Alessandro y colaboradores (código CCDC: 1473613).²⁶ Se consideró el grado de protonación de los ligandos a pH fisiológico a través del análisis de los diagramas de distribución de especies en función del pH, siendo las siguientes especies las empleadas para cada ligando: $H_3(\mathbf{22Me-L})^{3+}$, $H_4(\mathbf{22Me-M})^{4+}$, $H_6(\mathbf{22Me-C})^{6+}$ y $H_6(\mathbf{22H-C})^{6+}$.

Por otro lado, los modelos de polinucleótidos se generaron utilizando distintos enfoques en función de su naturaleza. El sistema de doble hélice se construyó mediante el lenguaje de manipulación molecular NAB incluido en el software AMBER16. El modelo de G4 dimérico antiparalelo se construyó utilizando como punto de partida la estructura monomérica reportada por Y. Wang y D. J. Patel, tomada del *Protein Data Bank* (PDB 143D).²⁷ Para la MD, se eliminó el ligando presente en esta estructura, se duplicó el monómero y se conectaron los dos G4s según la secuencia $AGG(TTAGGG)_3TTAGG(TTAGGG)_3$. En ella, los

dos residuos centrales de timina que conectan ambos G4s se introdujeron con el software LEaP. El modelo del G4 dimérico híbrido-12 se construyó conectando las estructuras PDB 2GKU y 2JSL tomadas del PDB tal y como describieron previamente Trent y colaboradores.²⁸⁻³⁰ A continuación, se aproximaron los ligandos con TPA utilizando el software LEaP.

Una vez construidos los sistemas, se minimizaron energéticamente y, tras una etapa de equilibrio a 300 K, se realizó un total de 10 ns de dinámica molecular. Todos los estudios se han realizado empleando el software AMBER16. Los compuestos orgánicos se han modelado utilizando el campo de fuerza *gaff*,³¹ mientras que para las bases nucleares se ha empleado el ff14SB.³² Del mismo modo, las condiciones ambientales se han simulado utilizando el campo *ionsjc_tip3p*.³³ Finalmente, se seleccionó una serie de 10 conformaciones de mínima energía y se optimizaron energéticamente de nuevo. La trayectoria de la simulación MD se analizó utilizando el módulo *cpptraj*³⁴ dentro de AmberTools17 y se empleó PyMOL³⁵ para la inspección visual y para crear los gráficos moleculares.

3.4. Evaluación del oxígeno singlete

Se evaluó la capacidad de generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) de los ligandos de tipo ftalocianina. Este estudio es fundamental para determinar la capacidad fotosensibilizadora de los ligandos para descomponer estructuras de ADN tras su irradiación.³⁶

Fundamento teórico

El estado electrónico excitado más bajo del oxígeno molecular tiene un carácter de espín singlete y se le conoce como “oxígeno singlete” $^1\text{O}_2$.³⁷ Este estado electrónico tiene una elevada reactividad que lo hace capaz de oxidar a la materia orgánica. Pese a ser una especie tóxica a nivel celular, puede ser utilizado como defensa frente a elementos patógenos; una de sus posibles aplicaciones biomédicas es el daño celular localizado, donde se administra un agente fotosensibilizador capaz de ubicarse en una región específica y producir $^1\text{O}_2$ bajo irradiación de luz.³⁸

Uno de los métodos para detectar $^1\text{O}_2$ más ampliamente utilizado es a través de sondas moleculares cuyas propiedades se modifican al reaccionar con $^1\text{O}_2$, por ejemplo, la variación espectroscópica de absorción en el UV-Vis de la sonda 1,3-difenilisobenzofurano (**DPBF**).³⁹

La reacción de $^1\text{O}_2$ con **DPBF** forma un endoperóxido vía una cicloadición (4+2) (figura 3.8), que produce la pérdida del sistema π -electrónico extendido junto con sus propiedades espectroscópicas características.⁴⁰ El endoperóxido se descompone a 1,2-dibenzoilbenceno (**DBB**), cuya reacción se considera irreversible a temperatura ambiente.⁴¹

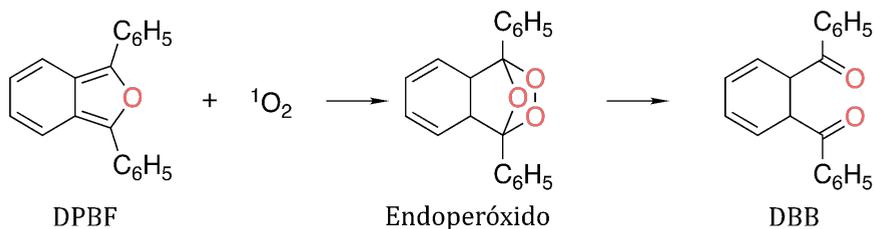


Figura 3.8. Reacción de $^1\text{O}_2$ con DPBF.

Procedimiento general

Para realizar el estudio de la capacidad de generar oxígeno singlete de forma indirecta, se preparó inicialmente una disolución de **DPBF** (5 mM) en DMSO. Por otro lado, a partir de la disolución madre anterior se prepararon disoluciones de los compuestos en DMSO de diferentes concentraciones (1 μM , 10 μM y 50 μM) con una concentración de **DPBF** constante de 30 μM .

Se siguieron las reacciones espectroscópicamente observando la disminución de la absorción de la banda a 417 nm del **DPBF** en función del tiempo de irradiación, en intervalos de 20 minutos hasta 120 minutos. Las muestras se irradiaron a 400 nm con un led M450LP1 (Throlabs).

3.5. Caracterización de la encapsulación con ligandos

La interacción de la piranina (**Pyr**) y del 5-fluorouracilo (**5-Fu**) se ha determinado mediante valoraciones potenciométricas con el procedimiento descrito anteriormente en el *apartado 3.2*, así como con técnicas espectroscópicas de UV-Vis y emisión de fluorescencia.

3.5.1. Estudios espectroscópicos de interacción de la Pyr con los ligandos

Se preparó una disolución madre del fluoróforo **Pyr** 10 mM en DMSO, a partir de la cual se realizó una dilución a 1 mM en disolución tampón Tris (Tris 10 mM con KCl 100 mM, pH = 7.4). Por otro lado, a partir de disoluciones madre 10 mM en agua Milli-Q de los ligandos a evaluar, se prepararon disoluciones 1 y 3 mM en el mismo tampón de Tris.

Se registraron los espectros de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia de una disolución 10 μ M de **Pyr** en 1 mL de tampón Tris en ausencia de ligando y tras añadir alícuotas de la disolución de ligando hasta no observar ningún cambio.

La representación de la emisión de fluorescencia en función de la concentración seguida del ajuste no lineal de los datos permitió la obtención de las constantes de estabilidad ligando-piránina (K_e), de acuerdo con el método descrito en el *apartado 3.3.4*.

3.6. Estudios biológicos

Se evaluó la actividad antitumoral *in vitro* en distintas líneas celulares cancerígenas de los ligandos y de las mezclas con las moléculas **5-Fu** y **Pyr**. Además, se estudió la capacidad de internalización celular de los ligandos por microscopía confocal.

3.6.1. Cultivos celulares y mantenimiento

Los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad se realizaron en las instalaciones del SCSIE de la Universidad de Valencia. Todas las operaciones se llevaron a cabo en una cabina de bioseguridad con un sistema de flujo laminar (TELSTAR 3 BIO-II A).

Las líneas celulares empleadas en el siguiente trabajo derivan de dos tipos de cáncer humanos, HeLa (cáncer de cuello de útero)^{42,43} y LN229 (glioblastoma cerebral)^{44,45}, y una línea celular de ratón RAW 264.7 (macrófago de leucemia murina)^{46,47}. Todas las células fueron cultivadas en monocapa, mantenidas en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de 10% de suero fetal bovino (FBS, neutralizado a 56 °C, 30 min), 100 u/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂. También se comprobó rutinariamente el crecimiento y proliferación de las células mediante el uso del microscopio óptico de las instalaciones (NIKON Eclipse), para cerciorarse de que la morfología celular era la adecuada, así como para comprobar la ausencia de contaminación.

3.6.2 Tinción con azul de tripano

Para garantizar un crecimiento celular adecuado, se realizaron una vez a la semana subcultivos a fin de alcanzar un grado de confluencia adecuado. Es necesario confirmar la viabilidad y funcionalidad celular de la fuente celular madre a partir de la cual se realiza el subcultivo, por ello se lleva a cabo un recuento de células mediante la tinción con azul de tripano.

Fundamento teórico

El azul de tripano no es capaz de penetrar en las células vivas debido a que mantienen su membrana citoplasmática íntegra, mientras que es capaz de penetrar en células muertas con lesiones en la membrana celular, lo cual las tiñe de azul. Así, es posible distinguir las células viables de las células no viables azules, utilizando un contador celular automático.⁴⁸

Procedimiento experimental

Primero, se retiró el medio de la placa de cultivo. Seguidamente se lavaron las células adheridas a la placa con 1 mL de PBS (pH = 7.4) y se eliminó el PBS sobrenadante. Tras esto, se añadió a la placa 1 mL de tripsina-EDTA (25%, pH = 8) y se incubó en condiciones estándar de cultivo durante 5 minutos. Tras la incubación, se añadió 1 mL de medio de cultivo para neutralizar el efecto de la tripsina y se recogieron las células depositándolas en un tubo Falcon de 10 mL. En un eppendorf de 2 mL se añadieron 10 μ L de la disolución celular homogeneizada y 10 μ M de Azul de Tripano (0.4 %, pH = 7.2), una vez mezclados se transfirieron a una cámara Neubauer. Mediante el uso de un contador celular se estimó la densidad y viabilidad celular (ecuación 3.19), y se procedió a la realización del subcultivo si la viabilidad obtenida era superior al 95%.

En una nueva placa de cultivo se añadió el medio celular atemperado a las condiciones de cultivo y el volumen apropiado para alcanzar un nivel de confluencia que resultase adecuado para el crecimiento y proliferación de las células necesario semanalmente.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left(1 - \frac{n^{\circ} \text{ de células azules}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} \right) \cdot 100 \quad (\text{ec. 3.19})$$

3.6.3. Ensayo colorimétrico de MTT para medir la viabilidad celular

Para comprobar el nivel de citotoxicidad de los ligandos se realizó el ensayo de MTT en las distintas líneas tumorales empleadas.^{49,50}

Fundamento teórico

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio soluble en agua (MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)) a cristales morados de formazán. Esta reacción es llevada a cabo por las células metabólicamente activas, que contienen enzimas oxidoreductasas dependientes de NADPH que reducen el MTT a formazán (figura 3.9).⁵¹ La cantidad de cristales morados de formazán formados es directamente proporcional al número de células vivas, por ello, al disolver los cristales en DMSO es posible cuantificarlos mediante la medición de la absorbancia a 500-600 nm utilizando un espectrofotómetro multipocillo.

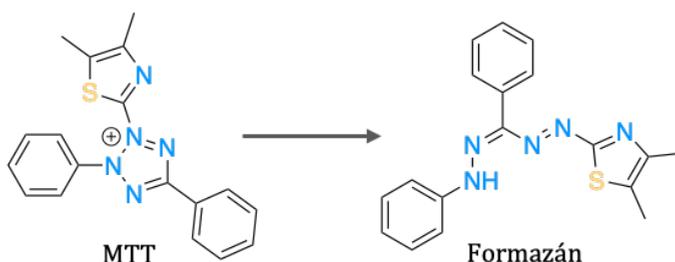


Figura 3.9. Reacción correspondiente a la reducción del MTT.

Procedimiento experimental

A continuación, se detalla el procedimiento del ensayo MTT también ilustrado esquemáticamente en la figura 3.10. En primer lugar, se realizó un sembrado de las células en una microplaca de 96 pocillos en una cantidad aproximada de 4000 células por pocillo, y se dejó incubar durante 24 horas permitiendo la adhesión de las células a la placa.

A las 24 horas se retiró el medio de la microplaca y se sustituyó por 100 μL de disolución del ligando a evaluar a concentraciones crecientes (preparada en el medio celular). Se dejó incubar durante las 24 horas siguientes. Las disoluciones de ligando se prepararon el mismo día del ensayo. Además, en cada placa se dejaron pocillos con 100 μL de medio celular (sin ligando) que se emplearon como control.

Tras 24 horas de incubación, se retiró el medio celular con el ligando y se lavó cada pocillo con 100 μL de medio, retirándolo después. Seguidamente se añadió a cada pocillo 100 μL de una disolución de MTT 1.2 mM en medio de cultivo y se dejó incubar durante 4 horas.

Finalmente, se absorbió el medio de cada pocillo y se añadieron 100 μL de DMSO para solubilizar los cristales de formazán. Tras incubar durante 20 minutos, se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm empleando un espectrofotómetro lector de placas (THERMO FORMA FISHER).

La absorbancia registrada de los pocillos se recopila en un archivo Excel. Los pocillos en los cuales sólo se añadió medio constituyen al 100 % de la viabilidad celular ($\text{Abs}_{\text{control}}$).

Material y métodos

El porcentaje de viabilidad celular del resto de pocillos con concentraciones crecientes de ligando se estima en relación a la absorbancia obtenida ($Abs_{ligando}$) con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{Abs_{ligando}}{Abs_{control}} \cdot 100 \text{ (ec. 3.20)}$$

Finalmente, se calculó el parámetro IC_{50} , el cual corresponde a la concentración de ligando necesaria para disminuir un 50% la viabilidad celular. Se determinó empleando el programa Origin, ajustando los datos obtenidos a una respuesta sigmoideal.



Figura 3.10. Esquema ilustrativo del ensayo MTT.

3.6.4. Determinación del estrés oxidativo intracelular

Se evaluó la capacidad de los ligandos ftalocianina para generar estrés oxidativo en distintas líneas celulares. Este estrés oxidativo se cuantificó como la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) utilizando la sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (**DCFH-DA**).⁵²

Fundamento teórico

Las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por el metabolismo celular de importancia fisiológica son el oxígeno singlete previamente descrito (1O_2), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).⁵³ Estas especies forman parte de procesos fisiológicos esenciales, como la defensa del organismo frente a agentes patógenos o la señalización celular; sin embargo, su desregulación resulta en efectos adversos para células. La acumulación de altos niveles de ROS produce estrés oxidativo en un organismo que provoca un daño irreparable a nivel celular, lo que se suele traducir en la aparición de diversas patologías, como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, ELA y Parkinson, entre otras),⁵⁴ así como también pueden contribuir al proceso de envejecimiento.⁵⁵

Un método ampliamente utilizado para determinar la concentración de ROS en células emplea la sonda **DCFH-DA**. El fundamento del método reside en la oxidación de **DCFH-DA** a 2',7'-diclorofluoresceína (**DCF**), el cual emite fluorescencia de color verde a la longitud de onda de 530 nm tras su excitación a 485 nm. Las células internalizan el **DCFH-DA**, donde las esterasas celulares escindiendo los grupos aceto, dando lugar al **DCFH**, que es oxidado por las ROS convirtiéndolo finalmente en **DCF** (figura 3.11).⁵⁶

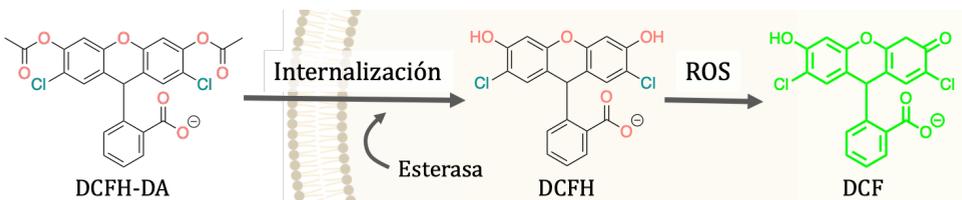


Figura 3.11. Mecanismo de acción celular de la sonda **DCFH-DA**.

Procedimiento experimental

Previamente, se preparó una disolución 25 μM de **DCFHA-DA** en DMEM a partir de una disolución madre 10 mM en DMSO. Del mismo modo, se prepararon disoluciones de ligando a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 μM) en DMEM. Las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos, con una cantidad aproximada de 4000 células por pocillo, y se dejaron incubar durante 24 horas permitiendo la adhesión de las células a la placa.

A las 24 horas se retiró el medio de la placa y se sustituyó por 100 μL de la disolución 25 μM de **DCFHA-DA** en DMEM y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Después, se trataron las células con los ligandos y se dejaron incubar en las mismas condiciones durante 24 horas.

Finalmente, se registró la fluorescencia del **DCF** a la longitud de onda de 528 nm tras excitar a 485 nm, en un lector de placas del SCSIE de la Universidad de Valencia. Las lecturas de la emisión de fluorescencia se realizaron antes y después de irradiar la muestra a la longitud de onda de 730 nm durante 20 minutos (5.2 mW cm^{-2} , 3.1 J cm^{-2}), utilizando un irradiador Atlas Photonics LUMOS BIO.

3.6.5 Fototoxicidad en cultivos celulares

Se evaluó el efecto fototóxico de las ftalocianinas en diferentes líneas celulares. Para este cometido se realizó el ensayo de fototoxicidad basado en la comparación de la citotoxicidad de una sustancia química en ausencia y en presencia de una cantidad no tóxica de rayos UV-Vis. La citotoxicidad se determinó con el ensayo MTT descrito previamente en el *apartado 3.6.3*.⁵⁷

Fundamento teórico

La toxicidad de las moléculas fluorescentes o fotosensibilizadoras puede estar causada por una combinación de (1) citotoxicidad, toxicidad en ausencia de luz, y (2) fototoxicidad, toxicidad producida por irradiación de luz.

Procedimiento experimental

Se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos en una cantidad aproximada de 4000 células por pocillo, y se dejó incubar durante 24 horas permitiendo la adhesión de las células a la placa.

A las 24 horas se retiró el medio de la microplaca y seguidamente se incubaron 24 h con diferentes concentraciones de ligando (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 y 100 μM , 200 μL) Tras este periodo de incubación, se retiró el medio de las células y se añadieron 200 μL de medio en ausencia de rojo fenol. Para estudiar el efecto fototóxico de las células, se expusieron a la longitud de onda 730 nm (20 nm, 10 min, 5.2 mW cm^{-2} , 3.1 J cm^{-2}) empleando el irradiador Atlas Photonics LUMOS BIO. Seguidamente se midió la fototoxicidad celular con el ensayo de MTT. Para estudiar el efecto citotóxico (en ausencia de luz) se procedió del mismo modo, pero sin irradiar las células.

3.6.6. Visualización de la internalización de los ligandos mediante microscopía confocal

Puesto que los ligandos emiten a longitudes de onda muy bajas (< 400 nm), se determinó su internalización utilizando un método indirecto utilizando la emisión de fluorescencia de la piranina (**Pyr**) y su incapacidad de atravesar la membrana celular. Por ello, si los ligandos son capaces de transportar la **Pyr** al interior celular y se visualiza emisión en las células mediante microscopía celular, se puede concluir que tanto los ligandos como la **Pyr** se encuentran en el interior celular. Asimismo, también se evaluó la localización de las ftalocianinas en el interior de las células utilizando la propia emisión de fluorescencia de los ligandos.

La microscopía de fluorescencia confocal (MFC) es una técnica de imagen avanzada que se utiliza para visualizar estructuras biológicas a nivel microscópico en muestras teñidas con fluoróforos. A diferencia de la microscopía convencional, que ilumina toda la muestra, la MFC utiliza un haz de luz láser enfocado que ilumina sólo una pequeña sección de la muestra a la vez, lo que permite obtener imágenes tridimensionales de alta resolución.⁵⁸

El principio básico de la MFC se basa en la emisión de fluorescencia de una muestra que ha sido teñida con un fluoróforo específico. Cuando una muestra se expone a la luz láser, los fluoróforos absorben la luz y emiten fluorescencia a una longitud de onda específica. Esta fluorescencia se puede detectar y se utiliza para generar imágenes de la muestra.

La MFC utiliza un sistema de escaneo láser que recorre la muestra a través de un espejo giratorio, iluminando una sección de la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra se recoge mediante un conjunto de lentes y se enfoca en un detector de fotones, que registra la señal de fluorescencia (figura 3.12). La pequeña abertura circular conocida como *pinhole* se encuentra en el camino del detector de fotones y actúa como una especie de filtro; el cual solo permite que la luz emitida por el punto focal, que está exactamente en el plano de enfoque, pase a través suyo y alcance el detector. La señal se procesa y se utiliza para generar una imagen de la muestra.

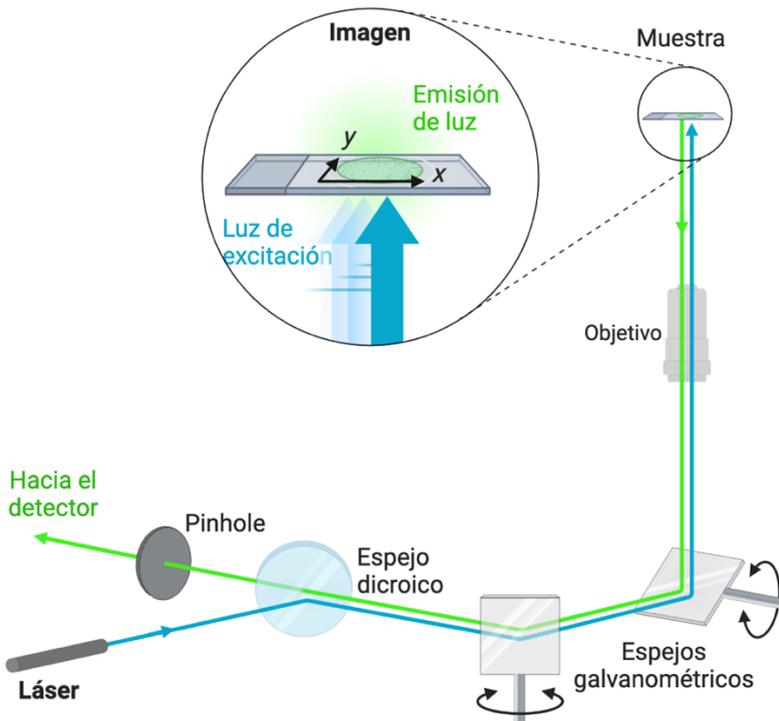


Figura 3.12. Esquema de un microscopio de fluorescencia confocal.

Procedimiento experimental

Se sembraron aproximadamente 20.000 células por pocillo en un cubreobjetos con cámara, y se dejó incubar durante 24 horas permitiendo la adhesión de las células a la placa. Tras este periodo de tiempo, se reemplazó el medio sin rojo fenol (200 μ L) de disolución de ligando (20 μ M), de Pyr (20 μ M) o de la mezcla 1:1 L: **Pyr** ([Ligando] = 20 μ M y [Pyr] = 20 μ M) y se dejaron incubar las células durante 24 horas. Previamente a la lectura de imagen, se realizó un lavado de las células con PBS y se fijaron con formaldehído al 4%. Finalmente, se visualizaron las células empleando un microscopio confocal (FV1000, Olympus).

Se registraron las imágenes de las células en los modos de transmisión y fluorescencia utilizando un objetivo de microscopio de 60 aumentos (inmersión en agua, NA $\frac{1}{4}$ 1,2) y una longitud de onda de excitación de 620 nm para los ligandos ftalocianina y 488 nm para los ligandos y **Pyr**. Para las imágenes de fluorescencia, se recogió la emisión entre 640 – 800 nm para las ftalocianinas y entre 510 – 600 nm para los ligandos y **Pyr**.

3.7. Bibliografía

1. Gran, G. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* **77**, 661 (1952).
2. Rossotti, F. J. C. & Rossotti, H. Potentiometric titrations using Gran plots: A textbook omission. *J. Chem. Educ.* **42**, 375 (1965).
3. Gans, P. S. A. V. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **43**, 1739–1753 (1996).
4. Press, W., Teukolsky, S., Vetterling, W., & Flannery, B. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*. (2007).
5. Alderighi, L. *et al.* Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Rev.* **184**, 311–318 (1999).
6. *G-Quadruplex DNA Methods and Protocols*. vol. 608 (Humana Press, 2010).
7. Santos, T., Salgado, G. F., Cabrita, E. J. & Cruz, C. G-Quadruplexes and Their Ligands: Biophysical Methods to Unravel G-Quadruplex/Ligand Interactions. *Pharmaceuticals* **14**, 769 (2021).
8. Mergny, J. & Lacroix, L. UV Melting of G-Quadruplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **37**, (2009).

9. Manna, S. & Srivatsan, S. G. Fluorescence-based tools to probe G-quadruplexes in cell-free and cellular environments. *RSC Adv.* **8**, 25673–25694 (2018).
10. Thordarson, P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1305–1323 (2011).
11. Stootman, F. H., Fisher, D. M., Rodger, A. & Aldrich-Wright, J. R. Improved curve fitting procedures to determine equilibrium binding constants. *Analyst* **131**, 1145 (2006).
12. Juskowiak, B. & Takenaka, S. Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Studies of Guanine Quadruplexes. *Methods Mol. Biol.* **335**, 311–342 (2006).
13. Förster, Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
14. Vologodskii, A. & Frank-Kamenetskii, M. D. DNA melting and energetics of the double helix. *Phys. Life. Rev.* **25**, 1–21 (2018).
15. Guédin, A., Lacroix, L. & Mergny, J.-L. Thermal Melting Studies of Ligand DNA Interactions. *Methods Mol. Biol.* **613**, 25–35 (2010).
16. De Rache, A. & Mergny, J.-L. Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay. *Biochimie* **115**, 194–202 (2015).

17. Monchaud, D. *et al.* Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: A rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* **90**, 1207–1223 (2008).
18. Nygren, J., Svanvik, N. & Kubista, M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* **46**, 39–51 (1998).
19. Monchaud, D. & Teulade-Fichou, M.-P. G4-FID: A Fluorescent DNA Probe Displacement Assay for Rapid Evaluation of Quadruplex Ligands. *Methods Mol. Biol.* **608**, 257–271 (2010).
20. Kimura, T., Kawai, K., Fujitsuka, M. & Majima, T. Fluorescence properties of 2-aminopurine in human telomeric DNA. *Chem. Commun.* **14**, 1438–1439 (2004).
21. Zhou, C. Q. *et al.* Dinickel-Salphen Complexes as Binders of Human Telomeric Dimeric G-Quadruplexes. *Chemistry* **23**, 4713–4722 (2017).
22. McLaughlin, L. W., Leong, T., Benseler, F. & Piel, N. A new approach to the synthesis of a protected 2-aminopurine derivative and its incorporation into oligodeoxynucleotides containing the Eco RI and Bam HI recognition sites. *Nucleic Acids Res.* **16**, 5631–5644 (1988).
23. Kelley, S. O. & Barton, J. K. Electron Transfer Between Bases in Double Helical DNA. *Science* **283**, 375–381 (1999).
24. Kimura, T., Kawai, K. & Majima, T. Fluorescence properties of 2-aminopurine–cytidine–7-deazaguanine (5'-ApC dz G-3') trimer in B- and Z-DNA. *Chem. Commun.* **3**, 268–269 (2004).

25. Case, D. A. and B. R. and C. D. and C. T. and D. T. and D. R. and G. T. and G. H. and G. A. and H. N. AMBER 2016 reference manual. University of California: San Francisco, CA, USA 1–923 (2016).
26. Hua, C., Baldansuren, A., Tuna, F., Collison, D. & D’Alessandro, D. M. In Situ Spectroelectrochemical Investigations of the Redox-Active Tris[4-(pyridin-4-yl)phenyl]amine Ligand and a Zn²⁺ Coordination Framework. *Inorg. Chem.* **55**, 7270–7280 (2016).
27. Wang, Y. & Patel, D. J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure* **1**, 263–282 (1993).
28. Monsen, R. C., Chakravarthy, S., Dean, W. L., Chaires, J. B. & Trent, J. O. The solution structures of higher-order human telomere G-quadruplex multimers. *Nucleic Acids Res.* **49**, 1749–1768 (2021).
29. Phan, A. T., Luu, K. N. & Patel, D. J. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5715–5719 (2006).
30. Phan, A. T., Kuryavyi, V., Luu, K. N. & Patel, D. J. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6517–6525 (2007).
31. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174 (2004).

32. Maier, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
33. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
34. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
35. Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8 (2015).
36. Pibiri, I., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. & Pace, A. Photochemically Produced Singlet Oxygen: Applications and Perspectives. *Chem. Photo. Chem.* **2**, 535–547 (2018).
37. Wayne, R. P. Singlet Molecular Oxygen, *Environ. Sci. Technol.* **3**, 311–371 (2007).
38. Dougherty, T. J. et al. Photodynamic Therapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889–905 (1998).
39. Wu, H., Song, Q., Ran, G., Lu, X. & Xu, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **30**, 133–141 (2011).

40. Singh, A., McIntyre, N. R. & Koroll, G. W. Photochemical formation of metastable species from 1,3-diphenylisobenzofuran. *Photochem. Photobiol.* **28**, 595–601 (1978).
41. Aubry, J. M., Pierlot, C., Rigaudy, J. & Schmidt, R. Reversible Binding of Oxygen to Aromatic Compounds. *Acc. Chem. Res.* **36**, 668–675 (2003).
42. Gey G.O., C. W. D., K. M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264–265 (1953).
43. Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 315–319 (2002).
44. Ishii, N. *et al.* Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology* **9**, 469–479 (1999).
45. Diserens, A. C. *et al.* Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol.* **53**, 21–28 (1981).
46. Ralph, P. & Nakoinz, I. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.* **119**, 950–54 (1977).
47. Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261–267 (1978).

48. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. in *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
49. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
50. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* **89**, 271–277 (1986).
51. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474–482 (1993).
52. Kim, H. & Xue, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *J. Vis. Exp.* **160**, 1-5 (2020).
53. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* **5**, 9–19 (2012).
54. Thanan, R. *et al.* Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 193–217 (2014).

55. Sohal, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 37–44 (2002).
56. Rajneesh, Pathak, J., Chatterjee, A., Singh, S. & Sinha, R. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). *Bio. Protoc.* **7**, (2017).
57. *Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.* (OECD, 2019).
58. Inoué, S. Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* 1–19 (Springer US, 2006).



Síntesis



Diseño y síntesis de ligandos
G4 y G4 multiméricos

4. Diseño y síntesis de ligandos G-quadruplex

4.1. Perspectiva histórica de los ligandos G4s

En 1991, Zahler y sus compañeros hallaron que el plegamiento del ADN telomérico en una estructura G-quadruplex inhibía la actividad telomerasa, lo cual despertó un gran interés en desarrollar ligandos capaces de estabilizar estas estructuras.

El plegamiento de los G4s teloméricos no ocurre naturalmente en las células debido a la asociación de la monohebra telomérica a diversas proteínas, pero se puede inducir mediante la estabilización de los G4s con pequeñas moléculas, las cuales actuarían como inhibidoras indirectas de la telomerasa, tratándose de una nueva estrategia en terapias anticancerígenas.¹ Hasta la fecha, se han identificado una gran cantidad de ligandos capaces de lograr la estabilización de los G4s en los telómeros. El análisis de la relación estructura-actividad de los ligandos G4s nos ha proporcionado unas bases para desarrollar nuevos y más potentes ligandos G4s.

Históricamente, el primer compuesto que se demostró que interaccionaba con las secuencias ricas en guanina fue el bromuro de etidio (figura 4.1), aunque no se investigó su capacidad para inhibir la telomerasa.² Sin embargo, sí que se ha descrito que el bromuro de etidio tiene baja selectividad frente a otras estructuras de ADN, en particular, tanto al ADN dúplex como al tríplex. En el diseño de ligandos de G4s, el bromuro de etidio ejemplifica la necesidad de considerar la selectividad entre las diferentes estructuras de los ácidos nucleicos.³

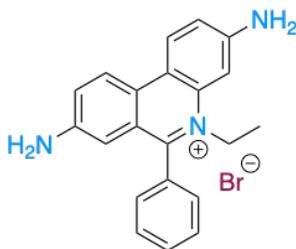


Figura 4.1. Estructura del bromuro de etidio.

Por ello, antes de describir los ligandos capaces de interactuar con estructuras G-quadruplex, es necesario establecer qué componentes estructurales específicos deben reunir. De esta forma se identificarán los potenciales lugares de unión de los G4s, diferentes de otras biomoléculas presentes en la célula como el ADN dúplex, las proteínas o los fosfolípidos.

El principal lugar de unión de las estructuras G4s son las caras externas de las G-tétradas terminales, que proporcionan una superficie aromática extendida, con la cual es posible interactuar mediante apilamiento π . Esta unidad representa un lugar específico de unión para los ligandos de carácter aromático por el G-quadruplex frente a la doble hélice ya que la superficie aromática plana del G4 es más extensa que la que presentan los pares de bases de Watson-Crick, previniendo la interacción con esta última por impedimentos estéricos.⁴ Además, para aumentar la selectividad hacia la estructura G-quadruplex es importante la participación de otro tipo de interacciones con otras regiones de la estructura, ya que ofrece distintos entornos para su reconocimiento molecular, como la formación de puentes de hidrógeno y otras interacciones electrostáticas con los bucles y los surcos del esqueleto azúcar fosfato, así como con el canal iónico (ver figura 4.2).⁵

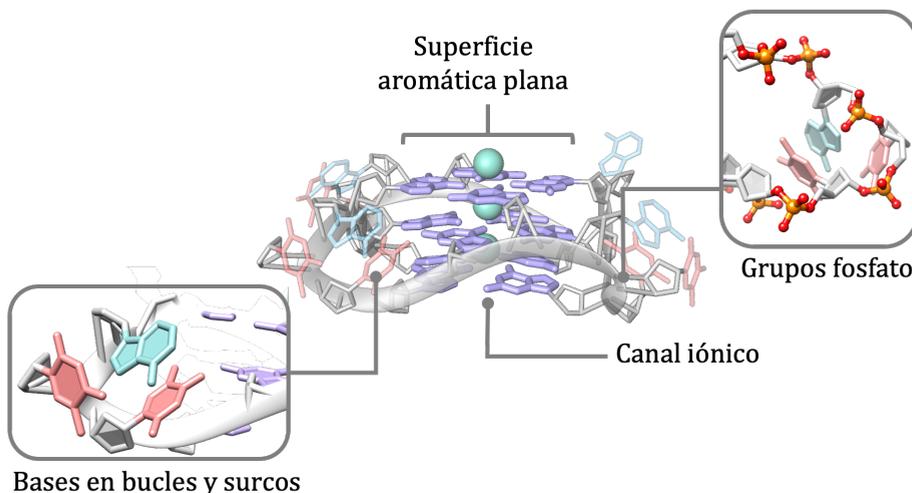


Figura 4.2. Lugares de interés para interactuar con ligandos G4.

Las **amido-antraquinolinas** sustituidas con aminas catiónicas fueron los primeros ligandos utilizados por Zahler que mostraron ser inhibidores de la telomerasa mediante su unión a G4s.¹ Mediante estudios de modelización molecular se propuso por primera vez el mecanismo de apilamiento final como forma de unión, en el cual la molécula del ligando se apila sobre la G-tétrada terminal. Esto es más favorable desde un punto de vista energético que el desapilamiento de las G-tétradas adyacentes requeridas en un modelo de intercalación clásico.⁶

Posteriormente, se desarrollaron **derivados de acridina** con diferentes sustituyentes incluyendo grupos amino catiónicos para mejorar la solubilidad de los análogos con **antraquinolina**. La presencia del átomo de nitrógeno protonado a pH fisiológico en el heterociclo aumenta la deficiencia electrónica en el cromóforo favoreciendo la interacción con el G4 y mejorando la inhibición de la enzima telomerasa.⁷

A partir de los subsiguientes estudios cristalográficos se comprobó que el modo de unión está basado en un apilamiento del núcleo aromático de estos derivados en la tétrada externa, interaccionando a su vez con la timina del bucle diagonal mediante apilamiento π (ver Figura 4.4).⁸

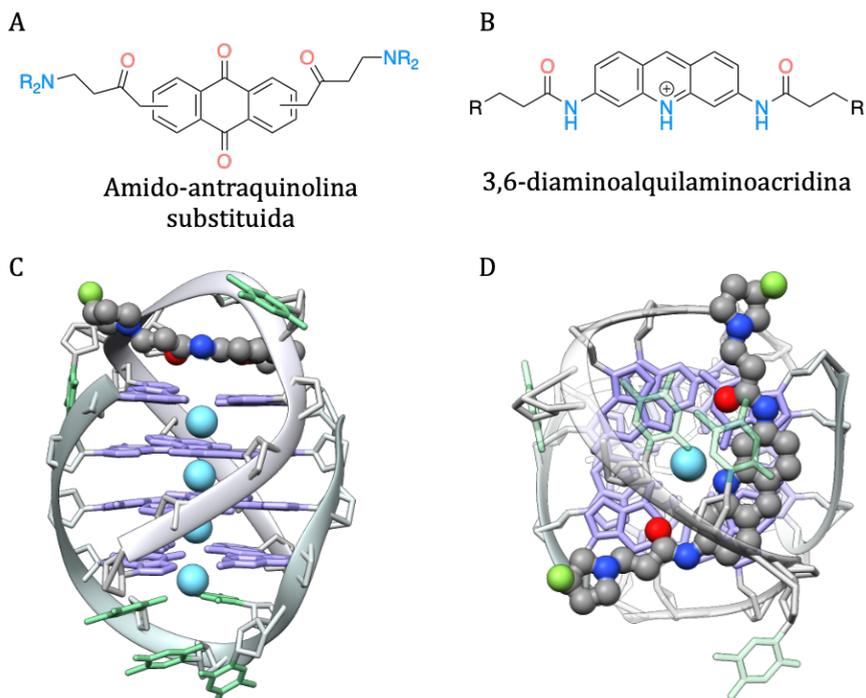


Figura 4.3. (A) Estructuras moleculares de **antraquinolinas** y (B) **aminoacridinas** disustituidas. (C) Vista frontal de la estructura cristalográfica del quadruplex d(G₄T₄G₄) con la **acridina** substituida con bispirrolidino y (D) vista superior. PDB: 3NYP.⁹

Pese a haberse desarrollado ligandos con una alta afinidad por los G-quadruplex, su selectividad frente al ADN dúplex era baja dado que presentaban la misma facilidad para intercalarse entre los pares de bases de la doble hélice que en la tétrada externa de los G4s. Con objeto de

optimizar esta característica se aplicaron métodos computacionales, los cuales indicaban la necesidad de incorporar un tercer sustituyente al anillo de acridina, obteniendo finalmente la molécula llamada **BRACO-19** (figura 4.4), un derivado de acridina sustituido en las posiciones 3, 6 y 9.¹⁰ Esta molécula presenta una mejora en la afinidad por G4s debido a la adición del impedimento estérico desfavorable para la unión al dúplex, menor citotoxicidad en células no cancerígenas, y una mayor inhibición de la actividad telomerasa en células cancerígenas en comparación con su precursor disustituido.¹¹ Pese a las mejoras, **BRACO-19** presenta una baja permeabilidad a la membrana celular lo que implica el empleo altas dosis para mostrar actividad biológica, lo que le confiere un índice terapéutico bajo.¹² Mediante modificaciones de los sustituyentes de la acridina se demostró que la carga en la posición 9 y la longitud de las cadenas en posiciones 3 y 6 afectaban a la actividad inhibitoria telomerasa en células, aumentando ésta cuando el ligando contenía cadenas de longitud etilénicas y cargas positivas.¹³

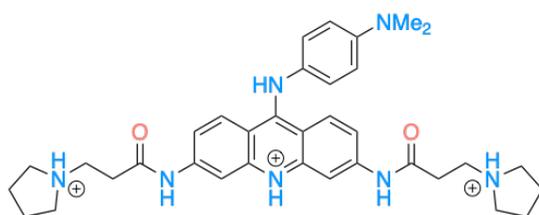


Figura 4.4. Estructura molecular de la acridina trisustituida **BRACO-19**.

La estructura cristalina obtenida del G4 telomérico con **BRACO-19** permitió identificar los modos de unión (figura 4.5). El ligando se encuentra en la interfaz de dos G4s paralelos con los bucles TTA, siendo

estos bucles cruciales para encerrar al ligando en un bolsillo característico, brindando un claro ejemplo de que la tétrada expuesta no es el único elemento estructural del G4 a considerar.¹⁴

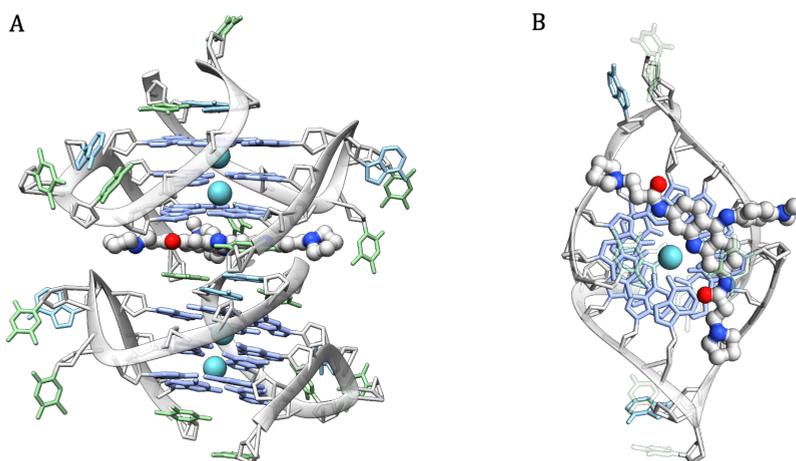


Figura 4.5. (A) Estructura de rayos X en vista frontal del complejo formado por dos G4s teloméricos con **BRACO-19** y (B) vista superior. PDB: 3CE5.¹⁴

Otra estrategia para mejorar la selectividad y potencia inhibitoria de los ligandos G4s se basa en agrandar el tamaño del grupo aromático con el fin de aumentar la superficie solapada entre la G-tétrada y el ligando. Las porfirinas cumplen este diseño con su anillo aromático conjugado y extenso que posee un tamaño óptimo para apilarse con la G-tétrada. En este sentido se observó que el derivado de porfirina **TMPyP4** (figura 7.6), presentaba selectividad por los G4s d(T₄G₄) frente al ADN al ADN dúplex.¹⁵

La molécula **TMPyP4** presenta actividad anticancerígena y afecta a la transcripción de genes que contienen secuencias promotoras de G4 y, además, es capaz de inhibir altamente la telomerasa.^{16,17}

Estudios espectroscópicos de la unión a G4 teloméricos de secuencia $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ del ligando **TMPyP4** determinaron que la estequiometría máxima era 1:4 (G4:L), formando un complejo en el que una molécula de **TMPyP4** se colocaba en una tétrada externa y las otras tres moléculas de ligando en los bucles del G4.¹⁸ En contraste, en la estructura cristalina de **TMPyP4** con un G4 telomérico paralelo bimolecular (figura 4.7), se observa que se forma un complejo de tipo sándwich en el que se produce el apilamiento de la porfirina con la tétrada externa y, adicionalmente, un apilamiento externo con las bases TTA en los bucles salientes.¹⁹

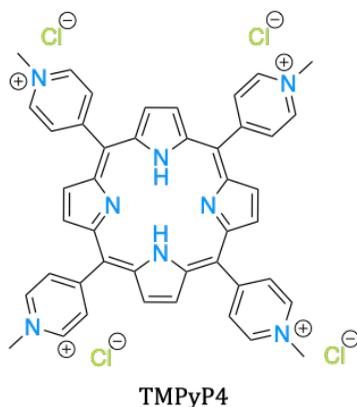


Figura 4.6. Estructura de la molécula de **TMPyP4**.

Al igual que el ligando **BRACO-19**,¹⁴ la porfirina catiónica **TMPyP4** es a rasgos generales un buen estabilizador de G4s en ADN²⁰ y ARN²¹ a la vez que también lo es de *i*-motifs²². De nuevo, queda remarcada la importancia de desarrollar ligandos selectivos de estructuras G4s frente a otras estructuras de ADN.

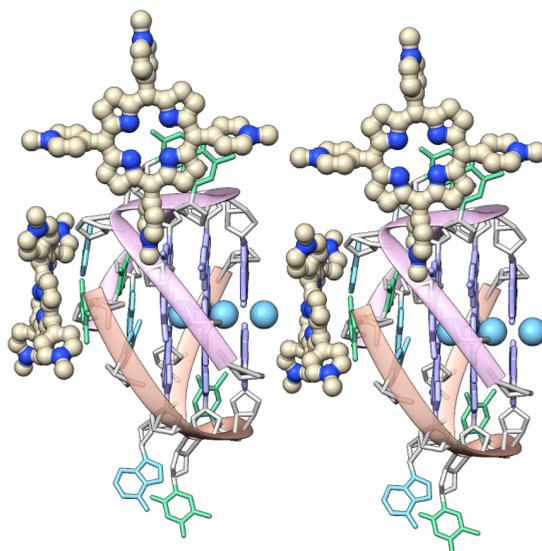


Figura 4.7. Representación de la estructura cristalina del complejo formado por **TMPyP4** y el G4 bimolecular telomérico. PDB: 2HRI.¹⁹

Otro ligando de G4s destacado es la **telomestatina**, un producto natural extraído por primera vez de la bacteria *Streptomyces anulatos* y cuya estructura molecular es cíclica, formada por un anillo de heptaoxazol, el cual contiene un centro asimétrico (ver Figure 4.8).²³

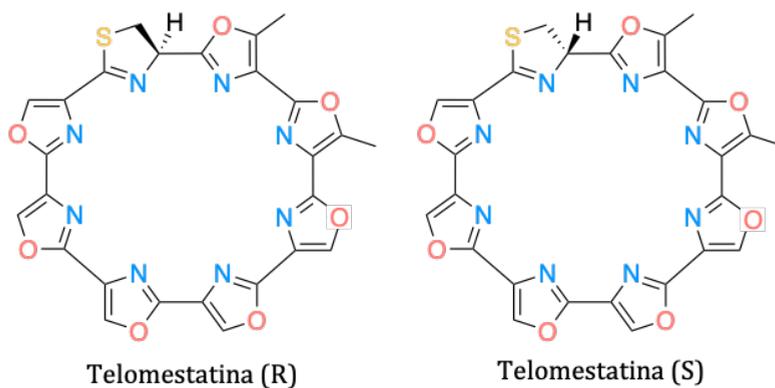
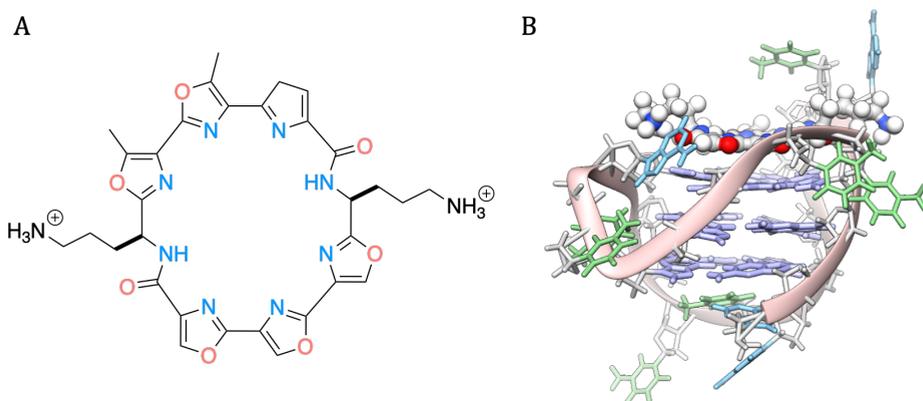


Figura 4.8. Estructuras de **telomestatina** (R) y (S).

La molécula de **telomestatina** es aproximadamente plana, con un tamaño comparable al de la tétrada del G4, pudiendo formar un buen apilamiento π . Es considerada uno de los ligandos de ADN G4 telomérico más potentes estudiados hasta la fecha, ya que muestra una gran afinidad y selectividad por las estructuras G4s, así como propiedades inhibitorias frente a la telomerasa.²⁴ El isómero no natural (S) de la **telomestatina** es significativamente mejor estabilizador de G4s antiparalelos, siendo cuatro veces más potente que el isómero natural (R).²⁵ Como fármaco, hay algunas propiedades que pueden ser mejoradas como su escasa solubilidad en agua que dificulta su administración, y a la dificultad tanto de extracción como de síntesis para obtenerla en grandes cantidades.²⁶

Un análogo de la **telomestatina**, **L2H**, con dos cadenas laterales adicionales de grupos alquilamino, presenta carga neta positiva a pH fisiológico, lo que le hace más soluble que la **telomestatina** con la misma actividad antitelomerasa que ésta.²⁷

Figura 4.9. (A) Estructura molecular telomestatina **L2H** y (B) estructura de RMN en disolución de ADN telomérico con **L2H** (A) vista frontal PDB: 2MB3.²⁸

La estructura de RMN en disolución del G4 telomérico humano con **L2H** (figura 4.9 B), revela que la interacción sucede por apilamiento π e interacciones electrostáticas entre los grupos amino de las cadenas laterales del ligando con grupos fosfato de los bucles de la estructura G4. Además, gracias a la flexibilidad de las cadenas alquilamino, éstas se adaptan a la forma del bucle del G4. Además, el anillo de pentaoxazol del ligando es capaz de albergar otro potasio en su interior, actuando como otra tétrada apilada, lo que aumenta la estabilidad del complejo formado.²⁸ A pesar de la mejora en la solubilidad, este compuesto no ha sido comercializado debido, otra vez, a la falta de rutas sintéticas eficientes y a su alta hidrofobicidad.

4.2. Ligandos específicos de G-quadruplex telomérico

Como se ha descrito en la introducción, la región que comprende el ADN telomérico de los humanos está formada por la repetición del hexanucleótido (ATTGGG)_n y puede formar estructuras G-quadruplex de mayor orden, denominadas multiméricas.

Estas estructuras presentan los motivos estructurales propios de los G-quadruplex monoméricos, como la tétrada externa, los bucles y surcos de la cadena azúcar-fosfato y el canal iónico. Por lo tanto, los ligandos que interaccionen por apilamiento π - π con la tétrada externa y establezcan interacciones electrostáticas con las regiones del monómero de G4 producirán también una fuerte estabilización en los G4s multiméricos. Ahora bien, los multímeros de G4 generan regiones donde

se conectan dos unidades de G4s adyacentes, también conocidas como bolsillos multiméricos. Estos bolsillos proporcionan un lugar de unión característico para diseñar ligandos específicos de G4s multiméricos.²⁹

Cabe resaltar que se han estudiado multitud de ligandos para G4s monoméricos, pero los trabajos enfocados a reconocer G4s multiméricos son escasos.³⁰ La estrategia principal para el desarrollo de ligandos específicos de G4s multiméricos se basa en unir covalentemente ligandos que interaccionan con G4s monoméricos y que, mediante un mecanismo cooperativo, interaccionen cada uno de ellos con cada G4 que constituye el multímero. Además, el espaciador escogido para conectar las unidades del ligando puede presentar algunas características estructurales útiles para potenciar las interacciones electrostáticas tanto en el bolsillo multimérico como en los surcos de las unidades G4s, como una cierta flexibilidad en la cadena y la presencia de grupos cargados positivamente a pH fisiológico.^{31,32}

Los modos de unión de los ligandos descritos para G4s multiméricos se pueden clasificar atendiendo a la estequiometría de interacción (L:G4). En la figura 4.10 se han representado esquemáticamente.

(A) Interacción 1:1, donde cada unidad de ligando interacciona con un monómero de G4 del sistema multimérico.

(B) Interacción 1:2, donde el ligando se intercala entre dos unidades G4 consecutivas estabilizando ambas a la vez.

(C) Interacción 2:1+1, donde una unidad del ligando G4 presenta dos tipos de unión distintos: puede intercalarse en el bolsillo formado entre dos G4 consecutivos y, a su vez, la otra unidad puede estabilizar otro componente del monómero de G4 más cercano.

A continuación, se describen los ligandos de G4s multiméricos más relevantes y sus modos de unión.

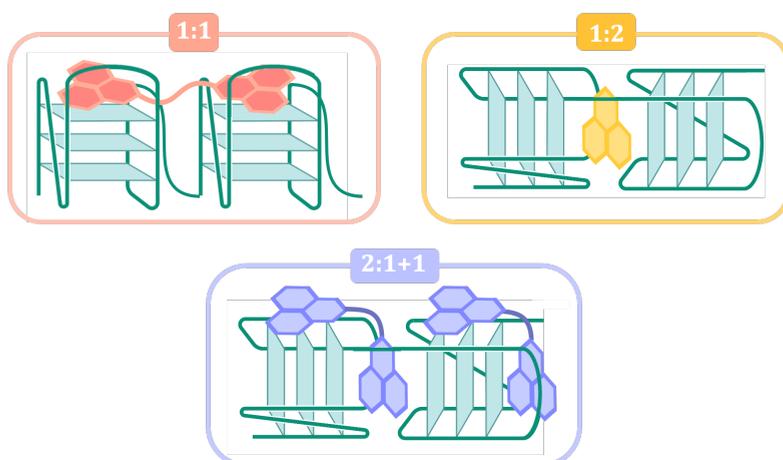


Figura 1.10. Representación esquemática de los posibles modos de interacción de los ligandos de G4 multimérico en relación (L:G4).³³

En 2013 el complejo quiral **Ni-M**, $(Ni_2L_3)^{4+}$, fue el primer compuesto en mostrar especificidad hacia los multímeros de G4 generados en los telómeros frente a G4s monoméricos, presentando una selectividad 200 veces mayor (figura 4.11).³⁴ Se demostró que **Ni-M** interactuaba con la estructura dimérica de G4s uniéndose simultáneamente a las dos tétradas externas contiguas mediante interacciones de apilamiento π , presentando un modo de unión 1:1, mientras que su enantiómero, **Ni-P**,

no mostró esta selectividad frente a monómeros de G4. Probablemente este tipo de unión se favorece por el gran tamaño del ligando, que impide que éste se intercale en el bolsillo multimérico. Recientemente, se demostró que el enantiómero **Ni-M** era capaz de estabilizar el ADN G4 monomérico levógiro, mientras que su enantiómero **Ni-P** no, especulando que la selectividad quiral es debida al entorno quiral proporcionado por los bucles del G4 levógiro.³⁵

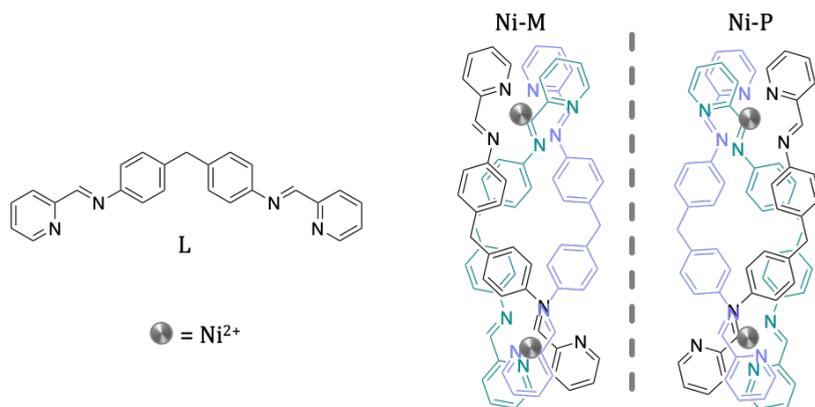


Figura 4.11. Estructura molecular del ligando **Ni-M** y su enantiómero **Ni-P**.

De forma similar, el ligando dimérico **níquel (II) sulfeno** presenta un gran tamaño que le impide invadir el bolsillo multimérico G4. Este ligando está formado por dos unidades de níquel sulfeno conectadas mediante cadenas poliéter de distinta longitud. Los estudios biofísicos revelaron que el complejo con la cadena más larga ($n = 3$, figura 4.12) presentaba la mayor afinidad por G4s diméricos frente a G4s monoméricos. Estudiando secuencias de ADN teloméricas, se obtuvo experimentalmente una relación de dos moléculas de **níquel sulfeno** por

cada cuatro tétradas expuestas en un G4 dimérico, lo que resulta en un modo de interacción 1:1 como en el ejemplo anterior.³⁶

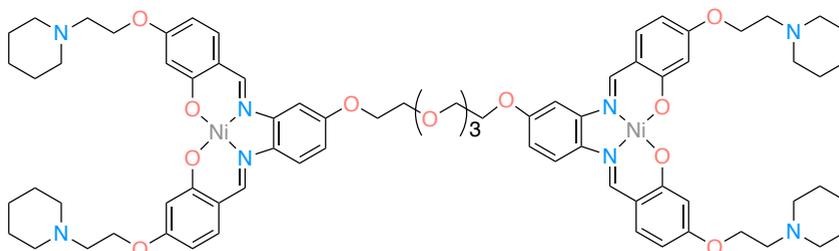


Figura 4.12 Estructura níquel salfeno (n=3).

Considerando la excelente afinidad del derivado de telomestatina **L2H** por las estructuras G4s (figura 4.9), se desarrollaron ligandos que conectaban dos y cuatro unidades de **L2H**. Tanto el ligando **L2H** como el **dimer-L2H** (figura 4.13) son capaces de estabilizar eficientemente estructuras G4s monoméricas, mientras que el ligando **tetramer-L2H** es incapaz de unirse a G4s monoméricos. Sin embargo, sí es capaz de unirse a multímeros de G4, mostrando unas 40 veces más selectividad por estos sistemas que por los formados por secuencias teloméricas cortas. La interacción es cooperativa, y se explica a través de un mecanismo de unión polivalente, aumentando la estabilización a medida que el número de G4s consecutivos aumenta. Pese a la ventajosa selectividad del **tetramer-L2H** por los sistemas G4s, la elevada masa molecular del ligando lo hace inadecuado para aplicaciones biológicas.³⁷

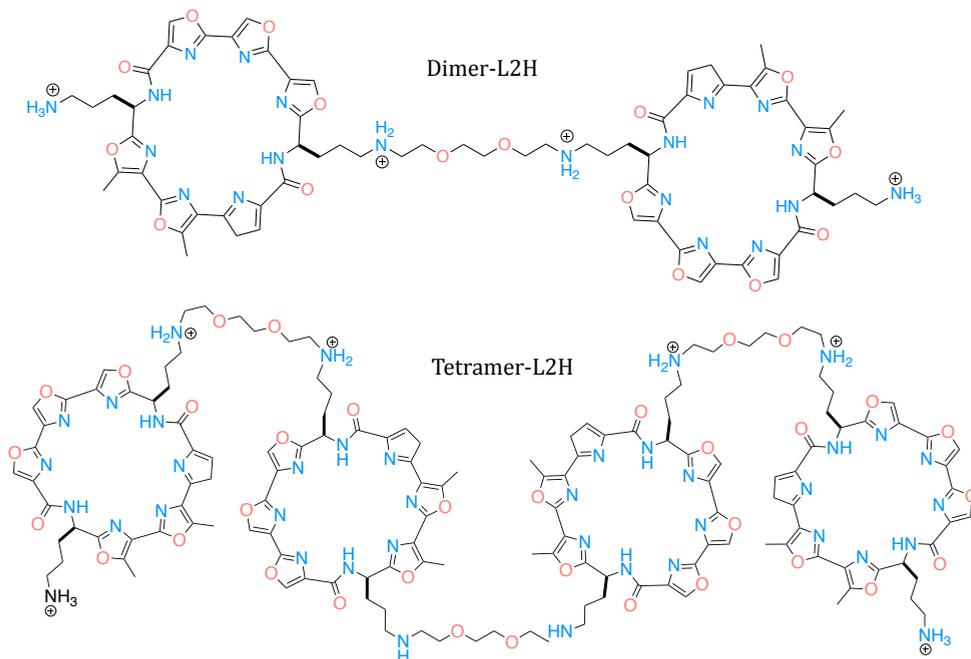


Figura 4.13. Estructura del **dímero** y **tetrámero L2H**.

Se han publicado varios ligandos dirigidos a reconocer el motivo estructural originado entre dos G4s consecutivos, basándose en una estructura aromática plana extendida. El ligando **IZNP-1** mostró una gran afinidad y selectividad por estructuras G4s diméricas frente a G4s monoméricas (figura 4.14). Mediante estudios computacionales se especuló que la unión tenía lugar en el bolsillo G4 multimérico, con una estequiometría 1:2, mientras que la interacción con la tétrada externa resulta impedida por la torsión del ligando **IZNP-1**, explicando así la baja selectividad por la estructura monomérica. Estudios celulares con el anticuerpo BG4 revelaron que **IZNP-1** era capaz de estabilizar en células el ADN G4 telomérico, así como también de inducir el acortamiento telomérico y la senescencia celular. Además, el **IZNP-1** no afecta a los

niveles de transcripción de distintos oncogenes con secuencias putativas de formación de G4s en sus promotores como el c-MYC, HRAS, c-KIT y BCL2.³⁸

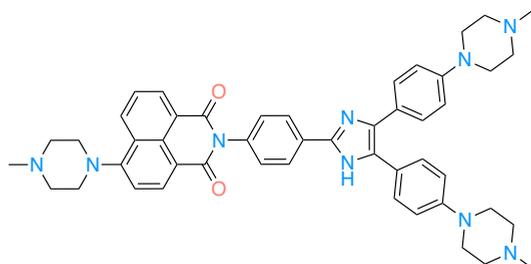


Figura 4.14. Estructura de **IZNP-1**.

Un último compuesto a resaltar es el ligando **dímero NDI** que está formado por dos unidades de naftaleno diimida unidas por un espaciador alquílico (figura 4.15). Una unidad de naftaleno diimida encaja en el bolsillo del G4 dimérico mientras que la otra unidad interacciona con las regiones externas de la estructura dimérica, siendo su modo de unión 2:1+1.³⁹ Las cadenas laterales cargadas positivamente favorecen la interacción con el G4 dimérico, aumentando su afinidad. Los autores especulan que los distintos modos de unión del ligando podrían ser los responsables de su elevada citotoxicidad en líneas celulares tumorales frente a células sanas.⁴⁰

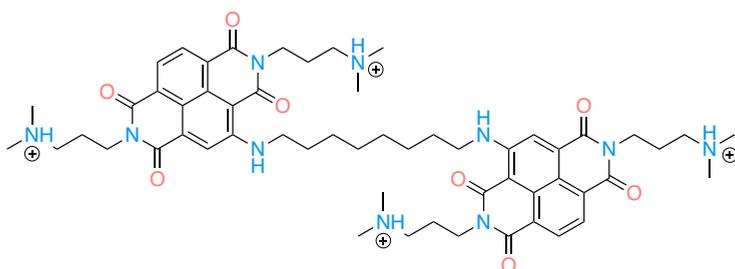


Figura 4.15. Estructuras del ligando dimérico **NDI**.

4.3. Diseño de los ligandos G4s monoméricos y multiméricos

Como se ha analizado en el apartado anterior, el diseño de ligandos para G4s monoméricos y multiméricos está basado en la presencia de superficies heterocíclicas extendidas π deficientes que favorezcan la interacción con las tétradas externas de los G4s. Asimismo, se ha demostrado que la incorporación de cadenas laterales flexibles cargadas positivamente en la estructura de los ligandos G4s es esencial para estabilizar las estructuras G4s monoméricas y multiméricas.

El grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València ha desarrollado ligandos basados en poliaminas para reconocer estructuras canónicas y no canónicas del ADN. En esta línea, la Dra. Isabel Pont durante el transcurso de su tesis doctoral preparó varias librerías de ligandos capaces de interactuar selectivamente con estructuras G-quadruplex monoméricas.^{41,42} Estos ligandos contienen una unidad de trifenilamina (TPA) y una, dos o tres poliaminas como sustituyentes. De entre los ligandos sintetizados, el ligando **TPA3P** (figura 4.16) mostró la mayor afinidad y estabilidad por los G4s monoméricos, siendo selectivo para estas estructuras frente a ADN dúplex.

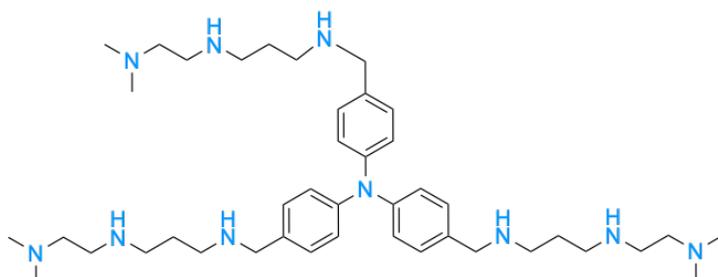


Figura 4.16. Estructura de **TPA3P**.

El diseño racional de esta molécula cumple con las premisas establecidas para la interacción efectiva con los G4s. Las cadenas poliamínicas protonadas pueden establecer interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con las bases y los grupos fosfato del esqueleto externo de los G4s. Asimismo, la flexibilidad de las cadenas permite que se adapten a los bucles y surcos de las distintas topologías de los G4s. Por otro lado, los grupos fenilo del **TPA** pueden propiciar interacciones de apilamiento π con las guaninas de la tétrada, a la vez que el nitrógeno central del **TPA** podría interactuar con el canal iónico mediante interacciones electrostáticas.

La trifenilamina es una unidad estructural conocida por sus propiedades electrón-dadoras que se ha incorporado en sensores fluorescentes y moléculas con capacidad transportadora de electrones a través de la membrana celular.^{43,44} Los primeros sensores selectivos de G4s basados en **TPA** fueron reportados en 2015, el más relevante de ellos, el **TPA2** que contenía un catión quinolinio unido al **TPA** (figura 4.17), mostró un aumento en la fluorescencia en presencia de G4s.⁴⁵

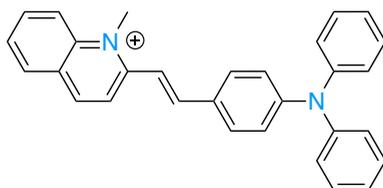


Figura 4.17. Estructura de **TPA2**.

El mecanismo de este aumento de fluorescencia es precisamente una de las propiedades más características del **TPA**, su emisión causada por agregación (AIE).⁴⁶ Cuando se une a los G4s, la interacción con estos da lugar a un proceso similar, ya que el apilamiento con las tétradas del **TPA** restringe las rotaciones intramoleculares de la molécula, resultando en una disminución de la disipación de la energía no radiativa.⁴⁷

Basándose en el trabajo previo del grupo, nos planteamos diseñar ligandos para interactuar con G4s multiméricos. Para ello se diseñaron ligandos con dos unidades **TPA** unidas por uno, dos o tres cadenas poliamínicas. Dependiendo del número de conectores, se originan tres topologías distintas: lineal, macrocíclica y criptando.

En la literatura, al ligando lineal se le define como ligando de tipo *géminis*, donde dos unidades monoméricas de **TPA** están unidas mediante un espaciador poliamínico.⁴⁸ Por otra parte, las topologías macrocíclica y criptando se conocen ya desde hace varias décadas.⁴⁹ El Premio Nobel de Química de 1987, Jean-Marie Lehn, describió estas topologías basándose en la dimensión que ocupan y en la cavidad resultante de las mismas. En particular, los macrociclos de tipo A (ver figura 4.18 A) están definidos por cavidades circulares bidimensionales, mientras que el ligando macrocíclico de mayor orden, conocido como tipo B, presenta cavidades tridimensionales (ver figura 4.18 B). Estos receptores son capaces de formar complejos de inclusión en los que el sustrato se incluye en el interior de la cavidad molecular o *cripta*, lo que da lugar a la etimología del nombre criptando.⁵⁰

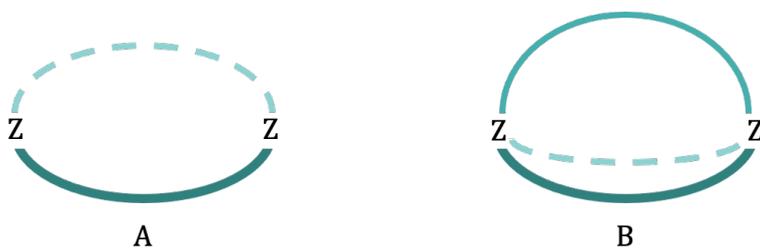


Figura 1.18. Esquema ilustrativo adaptado de la topología de (A) macrociclo y (B) macrobicyclo o criptando.⁵⁰

En el diseño estructural que proponemos para los ligandos de G4s multiméricos se han utilizado cadenas poliamínicas de distinta longitud y grado de metilación. Las cadenas compuestas por dos cadenas etilénicas se han denominado **22**, mientras que las propilénicas se denominaron **33**. Dependiendo de si se ha metilado o no el grupo amino central, se le ha añadido la terminación **Me** o **H**, respectivamente. Por otro lado, la utilización de las cadenas formadas por la poliamina cadaverina en la estructura de los ligandos se ha denominado **Cad**.

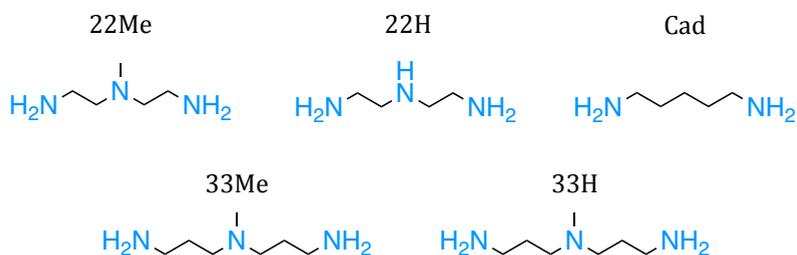


Figura 1.19. Estructuras de las poliaminas utilizadas como espaciadores.

Atendiendo a la topología formada entre el grupo **TPA** y el espaciador poliamínico, se emplearon como sufijos los términos **-L**, **-M** y **-C** para indicar la topología lineal, macrocíclica o criptando, respectivamente (figura 1.20).

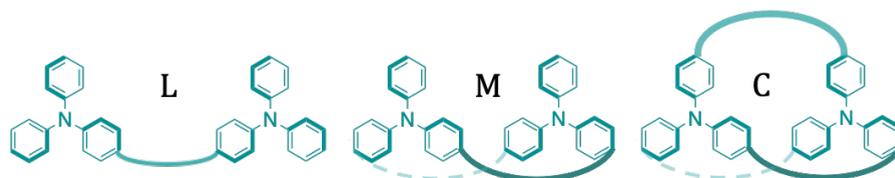


Figura 1.20. Estructuras de las topologías de los ligandos.

En los siguientes apartados se describe la síntesis y caracterización de los ligandos mientras que en los posteriores capítulos se evalúa su interacción con ADN G4 mono- y dimérico y su actividad biológica.

4.4. Síntesis y caracterización

Los ligandos se han agrupado en cinco familias distintas según el tipo de cadena poliamínica que contienen: dietilentriamina (**22H**), 2,2'-diamino-N-methyldiethylamine (**22Me**), bis(3-aminopropil)amina (**33H**), 3,3'-diamino-N-metildipropilamina (**33Me**) y cadaverina (**Cad**). A su vez, dentro de cada familia se distinguen tres topologías: lineal, macrocíclica y tipo criptando, las cuales surgen del número de conexiones de las cadenas poliamínicas con las unidades de trifenilamina. En la figura 4.21 se han esquematizado las diferentes familias de ligandos en función de la cadena poliamínica que los compone y la topología.

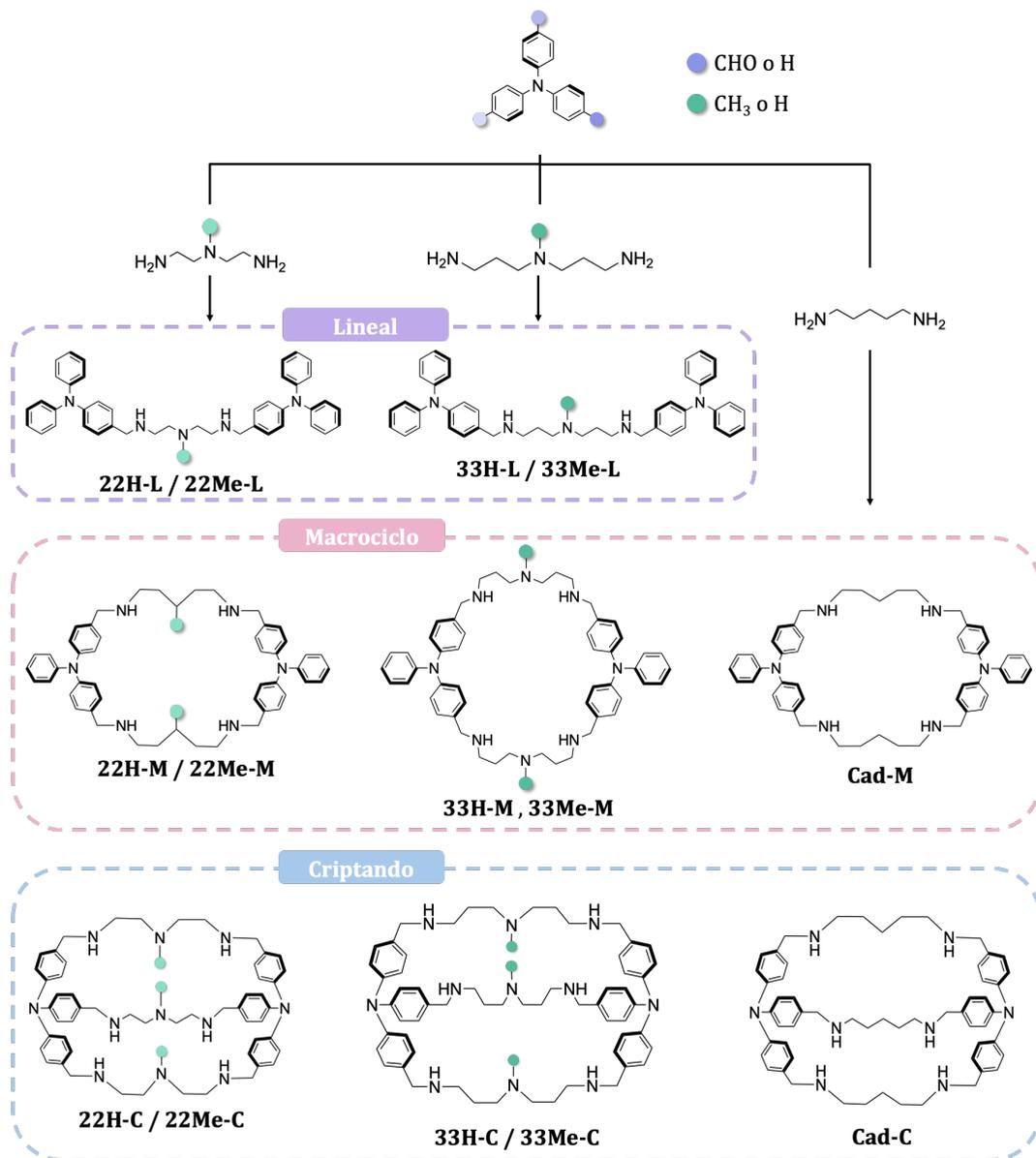


Figura 4.21. Esquema de los ligandos sintetizados en esta tesis clasificados según su estructura molecular.

Desde el punto de vista sintético, la unidad de trifenilamina puede ser considerada como un derivado del amoníaco, en la cual, los tres hidrógenos han sido sustituidos por grupos arilo. Por ello, se trata de una amina terciaria muy poco básica. Para llevar a cabo la síntesis de los ligandos se utilizaron como precursores los derivados de **TPA** 4-(difenilamino)benzaldehído, 4,4'-diformiltrifenilamina y tris(4-formilfenil)amina, todos ellos disponibles comercialmente.

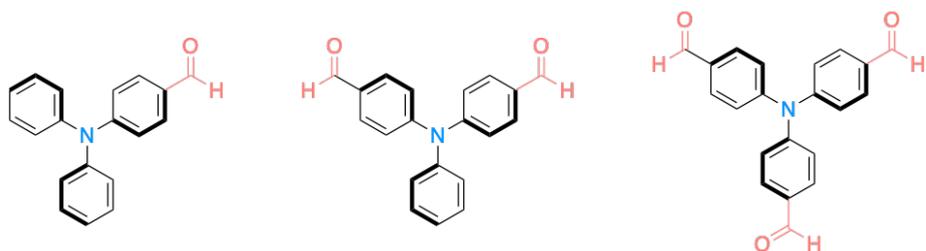


Figura 4.22. Estructura molecular de los precursores derivados de **TPA** mono-, bi- y tri-aldehído, de izquierda a derecha.

La unión de dos precursores **TPA**-mono-aldehído con la correspondiente cadena poliamínica da lugar a la topología lineal. Asimismo, la topología macrocíclica surge tras la unión de dos unidades **TPA**-di-aldehído con dos cadenas poliamínicas. Por último, la topología de tipo criptando se produce al unir dos unidades de **TPA**-tri-aldehído con tres cadenas poliamínicas.

4.4.1. Procedimiento general de síntesis

El procedimiento sintético para la conjugación de las cadenas poliamínicas con las unidades de **TPA** se basó en la conocida reacción de Schiff, en la cual se produce la condensación de una amina primaria con un aldehído para dar lugar a la imina, comúnmente conocida como base de Schiff en honor a su descubridor.⁵¹ En el caso de estas moléculas, el grupo aldehído se encuentra en la unidad de **TPA** en posición *para* al nitrógeno central, por otro lado, las aminas primarias se encuentran en los extremos de las cadenas poliamínicas. Se trata de una reacción sencilla cuyo único requerimiento es la ausencia de agua, ya que esta es un producto de la reacción y al tratarse de un equilibrio reversible, favoreceríamos la formación de la amina frente a la imina.

De este modo, se añade gota a gota una disolución en etanol anhidro (150 mL) del derivado mono-, bi- o tri-aldehído de **TPA** (1.5 mmol) a una disolución etanólica (50 mL) de la correspondiente cadena poliamínica conteniendo 0.5 equivalentes para obtener los compuestos de topología lineal, 1 equivalente para los de topología macrocíclica y 1.5 equivalentes para los criptandos. La mezcla se calienta a 50 °C y se deja agitar bajo atmósfera de nitrógeno durante 12 horas en ausencia de luz, produciéndose la base de Schiff.

La reducción de la imina se realiza añadiendo 10 equivalentes de NaBH_4 por equivalente de imina, dejando en agitación dos horas adicionales la mezcla resultante. Entonces, se evapora el disolvente bajo presión reducida. El residuo obtenido se trata con H_2O (30 mL) y se

extrae con CH_2Cl_2 (3x30 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4 y se evapora obteniendo un aceite amarillento, el cual se redissuelve en etanol anhidro y se precipita con HCl en dioxano (0.4 M) para obtener la sal de clorhidrato del producto.

Mecanismo de la reacción de Schiff:

La formación de la imina es un proceso reversible que comienza con la adición nucleofílica de la amina primaria al grupo carbonilo del aldehído (ver figura 4.23). Seguidamente, se produce una transferencia de protón que da lugar a la formación de un aminoalcohol llamado carbinolamina. La protonación del oxígeno de la carbinolamina lo convierte en un buen grupo saliente, el cual es eliminado consecutivamente como agua formando el ion iminio. La desprotonación del nitrógeno da lugar a la base de Schiff final.

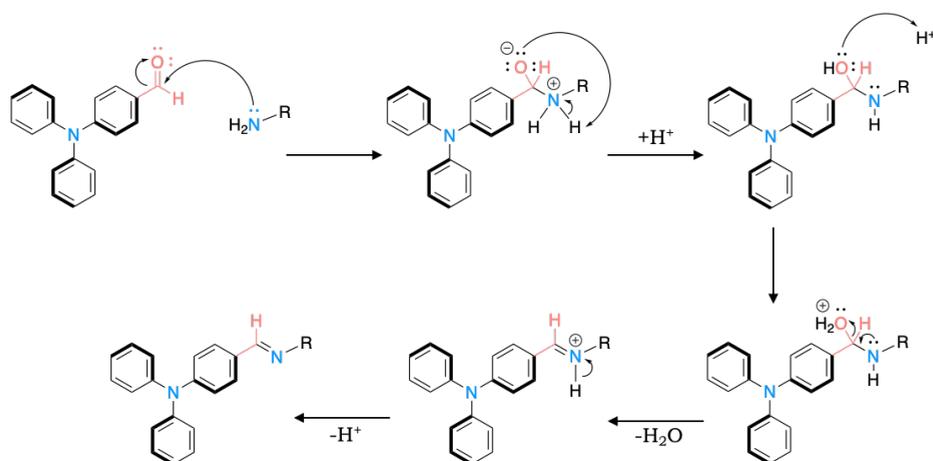


Figura 4.23. Mecanismo general de la síntesis de los compuestos derivados de TPA.

La adición de borohidruro en el mismo balón de reacción reduce la imina a amina, siendo esta el producto final (figura 4.24). La amina final suele ser un aceite que, para facilitar su manipulación, así como para preservar su estabilidad con el tiempo, se precipita en forma de sal de clorhidrato.^{52,53}

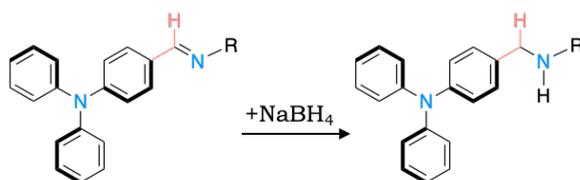
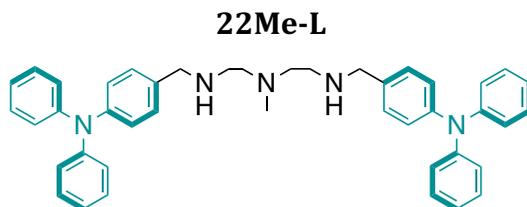


Figura 4.24. Reacción de reducción de la imina a amina.

4.4.2. Caracterización de los ligandos sintetizados



Formula molecular: $C_{43}H_{45}N_5 \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$

Peso molecular: (M) 631,87 g/mol, (M_{sal}) 795,25 g/mol

Rendimiento: 86 %

Análisis elemental: para $C_{43}H_{45}N_5 \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$ (795,25 g/mol)

Teórico: C 64.94, H 6.84, N 8.81

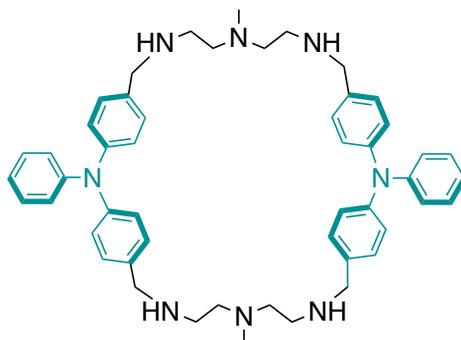
Experimental: C 64.57, H 8.34, N 9.06.

ESI-MS m/z: 632.37 (M+H)⁺

¹H-RMN (300 MHz, DMSO): δ = 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.39 – 7.25 (m, 8H), 7.15 – 6.93 (m, 16H), 4.14 (s, 4H), 3.66 ppm (m, 11H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, DMSO): δ = 149.00, 146.16, 132.47, 130.13, 125.69, 124.77, 123.99, 122.94 ppm.

22Me-M



Formula molecular: $C_{50}H_{60}N_8 \cdot 6HCl \cdot 5H_2O$

Peso molecular: (M) 773,09 g/mol, (M_{sal}) 1082,77 g/mol

Rendimiento: 93 %

Análisis elemental: para $C_{50}H_{60}N_8 \cdot 6HCl \cdot 5H_2O$ (1082.77 g/mol)

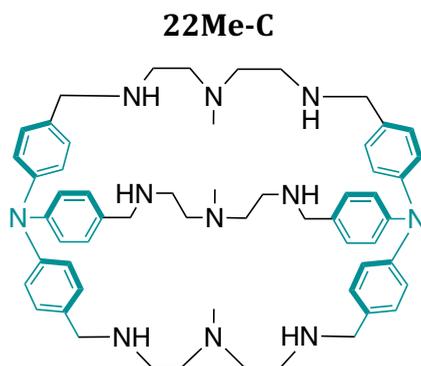
Teórico: C 55.52, H 7.08, N 10.36.

Experimental: C 55.60, H 8.14, N 10.21.

ESI-MS m/z: (773.50 (M+H)⁺ y 387.25 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ = 7.29 (dd, J = 13.2, 8.0 Hz, 12H), 7.17 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.6 Hz, 8H), 6.99 – 6.90 (m, 4H), 4.16 (s, 8H), 3.28 (t, J = 5.8 Hz, 8H), 2.89 (t, J = 5.9 Hz, 8H), 2.26 (s, 6H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): δ = 148.32, 146.53, 131.19, 129.82, 125.22, 124.56, 123.84, 66.54, 52.73, 49.68, 43.49.



Formula molecular: $C_{57}H_{75}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 7H_2O$

Peso molecular: (M) 914,30 g/mol, (Msal) 1368.44 g/mol

Rendimiento: 78 %

Análisis elemental: para $C_{57}H_{75}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 7H_2O$

Teórico: C 50.03, H 7.22, N 11.26

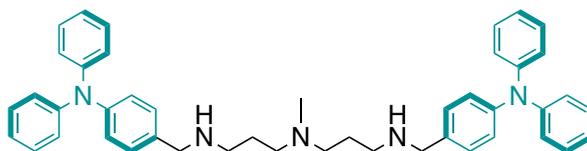
Experimental: C 50.22, H 7.30, N 10.77

ESI-MS m/z: 914.62 (M+H)⁺ y 457.82 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): $\delta = 7.32$ (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 4.21 (s, 12H), 3.36 (t, $J = 5.7$ Hz, 12H), 2.99 (t, $J = 5.9$ Hz, 12H), 2.31 (s, 9H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): $\delta = 147.82, 131.76, 125.89, 124.16, 52.88, 50.09, 43.53, 39.29$.

33Me-L



Formula molecular: $C_{45}H_{49}N_5 \cdot 4HCl \cdot 3H_2O$

Peso molecular: (M) 659,92 g/mol, (M_{sal}) 856,50 g/mol

Rendimiento: 76 %

Análisis elemental: para $C_{45}H_{49}N_5 \cdot 4HCl \cdot 3H_2O$

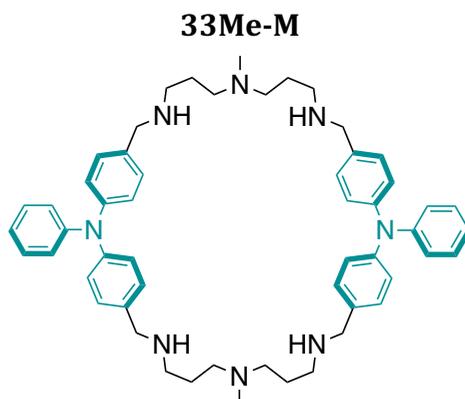
Teórico: C 62.86, H 6.92, N 8.14

Experimental: C 64.71, H 6.86, N 8.18

ESI-MS m/z: 660,40 (M+H)⁺

¹H-RMN (300 MHz, DMSO): δ = 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.35 – 7.22 (m, 8H), 7.04 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 6.97 (d, J = 7.4 Hz, 8H), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 4.05 (s, 4H), 3.40 – 3.08 (m, 2H), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 2.75 (s, 3H), 2.17 (q, J = 7.6 Hz, 4H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, DMSO): δ = 148.40, 147.23, 131.90, 130.16, 125.41, 124.80, 124.09, 122.67, 52.44, 49.96, 43.96, 20.54.



Formula molecular: $C_{54}H_{68}N_8 \cdot 6HCl \cdot 7H_2O$

Peso molecular: (M) 829.19 g/mol, (M_{sal}) 1169.10 g/mol

Rendimiento: 85 %

Análisis elemental: para $C_{54}H_{68}N_8 \cdot 6HCl \cdot 7H_2O$

Teórico: C 55.24, H 7.55, N 9.54

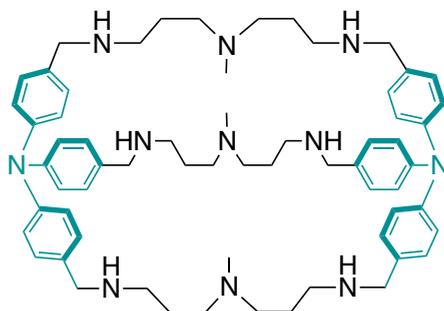
Experimental: C 56.11, H 6.82, N 9.58

ESI-MS m/z: 829.4 (M+H)⁺ y 415.2 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): $\delta = 7.43 - 7.34$ (m, 12H), 7.24 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.19 - 7.12 (m, 12H), 4.25 (s, 8H), 3.30 (m, 8H), 3.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 8H), 2.94 (s, 6H), 2.25 - 2.11 (m, 8H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): $\delta = 148.52, 146.68, 131.35, 129.85, 125.64, 124.65, 124.11, 123.65, 52.51, 50.53, 43.02, 40.10, 20.74.$

33Me-C



Formula molecular: $C_{63}H_{87}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 12H_2O$

Peso molecular: (M) 998.47 g/mol, (M_{sal}) 1537.69 g/mol

Rendimiento: 90 %

Análisis elemental: para $C_{63}H_{87}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 12H_2O$

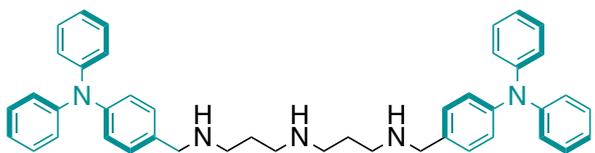
Teórico: C 49.05, H 7.84, N 9.99

Experimental: C 49.38, H 6.75, N 10.0

ESI-MS m/z: 998.5 (M+H)⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ = 7.41 (d, J = 8.7 Hz, 12H), 7.22 (d, J = 8.7 Hz, 12H), 4.27 (s, 12H), 3.36 – 3.25 (m, 12H), 3.14 (t, J = 7.7 Hz, 12H), 2.94 (s, 9H), 2.25 – 2.12 (m, 12H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): δ = 147.99, 131.44, 124.86, 124.44, 52.44, 50.39, 42.85, 40.13, 20.71.

33H-L

Formula molecular: $C_{44}H_{47}N_5 \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$

Peso molecular: (M) 645.90 g/mol, (M_{sal}) 764.02 g/mol

Rendimiento: 67 %

Análisis elemental: para $C_{44}H_{47}N_5 \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$

Teórico: C 66.78, H 6.87, N 8.89

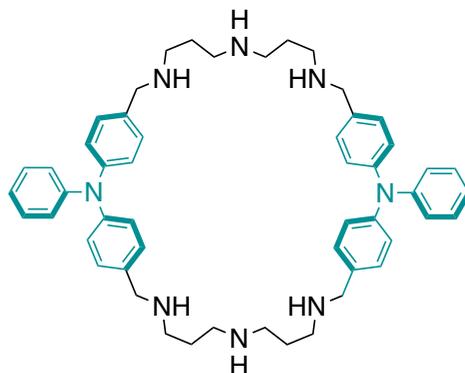
Experimental: C 66.55, H 6.58, N 9.17

ESI-MS m/z: 646.38 (M+H)⁺

¹H-RMN (300 MHz, DMSO): δ = 7.44 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 4H), 7.33 (t, J = 7.7, 8H), 7.09 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 7.00 (t, J = 7.7 Hz, 12H), 4.06 (s, 4H), 3.01 (m, 8H), 2.08 (m, 4H)

¹³C-RMN (75.2 MHz, DMSO): δ = 149.03, 146.64, 131.45, 129.68, 124.30, 122.43, 122.073, 55.26, 44.82, 36.28, 15.62.

33H-M



Formula molecular: $C_{52}H_{64}N_8 \cdot 6HCl \cdot 6H_2O$

Peso molecular: (M) 801.14 g/mol, (M_{sal}) 1128.46 g/mol

Rendimiento: 84 %

Análisis elemental: para $C_{52}H_{64}N_8 \cdot 6HCl \cdot 6H_2O$

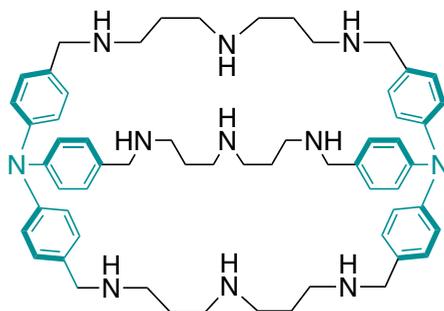
Teórico: C 55.32, H 6.61, N 9.92

Experimental: C 55.36, H 7.32, 9.93

ESI-MS m/z: 801.3(M+H)⁺ y 401.2 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ = 7.40 (d, J = 8.7 Hz, 12H), 7.25 (t, J = 1.2 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 12H), 4.25 (s, 8H), 3.18 (dt, J = 15.7, 7.6 Hz, 16H), 2.22 – 2.06 (m, 8H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): δ = 148.55, 146.72, 131.37, 129.85, 125.63, 124.63, 124.05, 123.67, 50.48, 44.38, 43.07, 22.48.

33H-C

Formula molecular: $C_{60}H_{81}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 7H_2O$

Peso molecular: (M) 956.39 g/mol, (M_{sal}) 1416.74 g/mol

Rendimiento: 81 %

Análisis elemental: para $C_{60}H_{81}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 7H_2O$

Teórico: C 51.08, H 7.43, N 10.92

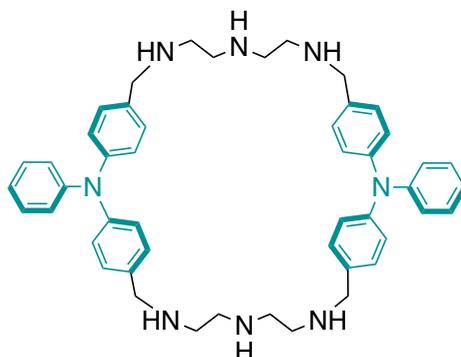
Experimental: C 50.27, H 6.60, N 10.87

ESI-MS m/z: 956.4 $[M+H]^+$ y 478.7 $[M+2H]^{2+}$

1H -RMN (300 MHz, D_2O): δ = 7.42 (d, J = 8.7 Hz, 12H), 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 12H), 4.27 (s, 12H), 3.24 – 3.03 (m, 24H), 2.22 – 2.03 (m, 12H).

^{13}C -RMN (75.2 MHz, D_2O): δ = 148.01, 131.46, 124.79, 124.43, 50.24, 44.32, 42.78, 22.32.

22H-M



Formula molecular: $C_{48}H_{56}N_8 \cdot 6HCl \cdot 5H_2O$

Peso molecular: (M) 745.03 g/mol, (Msal) 1056.10 g/mol

Rendimiento: 62 %

Análisis elemental: para $C_{48}H_{56}N_8 \cdot 6HCl \cdot 5H_2O$

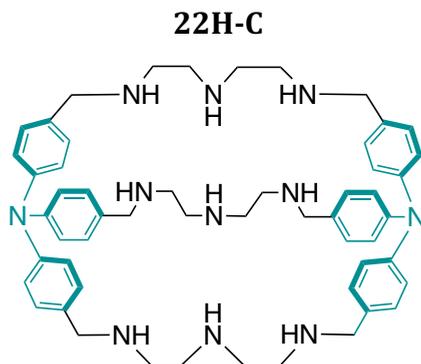
Teórico: C 54.70, H 6.88, N 10.63

Experimental: C 55.01, H 6.38, N 10.60

ESI-MS m/z: 745.46 (M+H]⁺ y 373.23 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): $\delta = 7.40$ (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 7.25 (t, $J = 1.2$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 1.8$ Hz, 12H), 4.29 (s, 8H), 3.46 (h, $J = 3.6$ Hz, 16H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): $\delta = 148.63, 146.60, 131.35, 129.87, 125.78, 124.78, 124.05, 123.69, 123.64, 50.76, 43.50, 42.04$.



Formula molecular: $C_{54}H_{69}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 13H_2O$

Peso molecular: (M) 872.2 g/mol, (Msal) 1433.36 g/mol

Rendimiento: 69 %

Análisis elemental: $C_{54}H_{69}N_{11} \cdot 9HCl \cdot 13H_2O$

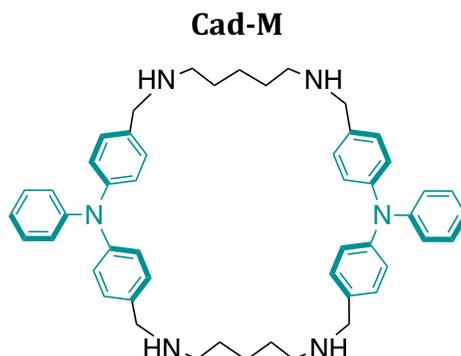
Teórico: C 45.21, H 7.30, N 10.74

Experimental: C 47.30, H 6.05, 10.75

ESI-MS m/z: 436.79 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): $\delta = 7.41$ (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 4.30 (s, 12H), 3.45 (dd, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 24H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): $\delta = 148.11, 131.39, 124.67, 124.53, 50.60, 43.57, 42.48.$



Formula molecular: $C_{50}H_{58}N_6 \cdot 4HCl \cdot 6H_2O$

Peso molecular: (M) 743.06 g/mol, (M_{sal}) 1005.41 g/mol

Rendimiento: 78 %

Análisis elemental: para $C_{50}H_{58}N_6 \cdot 4HCl \cdot 6H_2O$

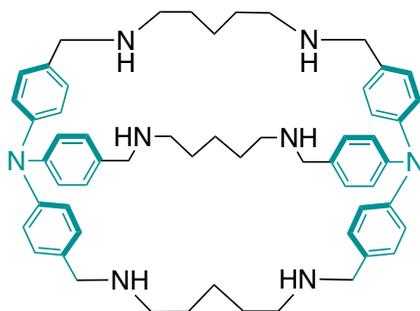
Teórico: C 60.23, H 7.48, N 8.43

Experimental: C 60.80, H 6.35, N 8.42

ESI-MS m/z: 743.48 ($[M+H]^+$) y 372.24 ($[M+2H]^{2+}$)

1H -RMN (300 MHz, D_2O): δ = 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 12H), 7.22 (tt, J = 7.3, 1.2 Hz, 2H), 7.03 (dd, J = 13.9, 7.9 Hz, 12H), 4.18 (s, 8H), 2.90 (t, 8H), 1.65 (p, J = 7.6 Hz, 9H), 1.31 (p, J = 7.5 Hz, 4H).

^{13}C -RMN (75.2 MHz, D_2O): δ = 149.65, 146.05, 132.01, 130.31, 125.69, 125.23, 124.16, 123.39, 50.84, 43.08, 25.43, 21.55.

Cad-C

Formula molecular: $C_{57}H_{72}N_8 \cdot 6HCl \cdot 11H_2O$

Peso molecular: (M) 869.26 g/mol, (Msal) 1287.35 g/mol

Rendimiento: 83 %

Análisis elemental: para $C_{57}H_{72}N_8 \cdot 6HCl \cdot 11H_2O$

Teórico: C 53.23, H 7.83, N 8.71

Experimental: C 54.38, H 6.75, N 8.7

ESI-MS m/z: 869.79 (M+H)⁺ y 435.30 (M+2H)²⁺

¹H-RMN (300 MHz, D₂O): $\delta = 7.37$ (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 7.13 (d, $J = 8.6$ Hz, 12H), 4.20 (s, 12H), 2.98 (t, $J = 7.7$ Hz, 12H), 1.68 (t, $J = 7.8$ Hz, 12H), 1.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 6H).

¹³C-RMN (75.2 MHz, D₂O): $\delta = 147.21, 131.04, 125.78, 123.70, 50.06, 45.10, 23.48, 22.09$.

4.5. Bibliografía

1. Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R. & Prescott, D. M. Inhibition of telomerase by G-quartet DMA structures. *Nature* **350**, 718–720 (1991).
2. Guo, Q., Lu, M., Marky, L. A. & Kallenbach, N. R. Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats. *Biochemistry* **31**, 2451–2455 (1992).
3. Ren, J. & Chaires, J. B. Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands. *Biochemistry* **38**, 16067–16075 (1999).
4. Wiley Series in Drug Discovery and Development. in *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids* 429–430 (John Wiley & Sons, Inc., 2011).
5. Asamitsu, S. Development of Selective DNA-Interacting Ligands Understanding the Function of Non-canonical DNA Structures (*Springer Theses*, 2020).
6. Read, M. A. *et al.* Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **42**, 4538–4546 (1999).

7. Zanker, V. The acridines. Their Preparation, Physical, Chemical, and Biological Properties and Uses. *Angew. Chem.* **79**, 875–875 (1967).
8. Haider, S. M., Parkinson, G. N. & Neidle, S. Structure of a G-quadruplex–Ligand Complex. *J. Mol. Biol.* **326**, 117–125 (2003).
9. Campbell, N. H., Smith, D. L., Reszka, A. P., Neidle, S. & O’Hagan, D. Fluorine in medicinal chemistry: β -fluorination of peripheral pyrrolidines attached to acridine ligands affects their interactions with G-quadruplex DNA. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1328 (2011).
10. Denny, W. A. *et al.* Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents. *J. Med. Chem.* **25**, 276–315 (1982).
11. Incles, C. M. *et al.* A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1201–6 (2004).
12. Taetz, S. *et al.* Biopharmaceutical Characterization of the Telomerase Inhibitor BRACO19. *Pharm. Res.* **23**, 1031–1037 (2006).
13. White, E. W. *et al.* Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: Influence of shape, substituents and charge. *Biophys. Chem.* **126**, 140–153 (2007).

14. Campbell, N. H., Parkinson, G. N., Reszka, A. P. & Neidle, S. Structural Basis of DNA Quadruplex Recognition by an Acridine Drug. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6722–6724 (2008).
15. Anantha, N. V., Azam, M. & Sheardy, R. D. Porphyrin Binding to Quadruplexed T₄G₄. *Biochemistry* **37**, 2709–2714 (1998).
16. Grand, C. L. *et al.* The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 565–73 (2002).
17. Shi, D. F., Wheelhouse, R. T., Sun, D. & Hurley, L. H. Quadruplex-Interactive Agents as Telomerase Inhibitors: Synthesis of Porphyrins and Structure–Activity Relationship for the Inhibition of Telomerase. *J. Med. Chem.* **44**, 4509–4523 (2001).
18. Martino, L., Pagano, B., Fotticchia, I., Neidle, S. & Giancola, C. Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **113**, 14779–14786 (2009).
19. Parkinson, G. N., Ghosh, R. & Neidle, S. Structural Basis for Binding of Porphyrin to Human Telomeres. *Biochemistry* **46**, 2390–2397 (2007).
20. Wheelhouse, R. T., Sun, D., Han, H., Han, F. X. & Hurley, L. H. Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N

- methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3261–3262 (1998).
21. Qi, Q. *et al.* Preferential Binding of π -Ligand Porphyrin Targeting 5'-5' Stacking Interface of Human Telomeric RNA G-Quadruplex Dimer. *J. Phys. Chem. Lett.* **10**, 2143–2150 (2019).
 22. Fedoroff, O. Yu., Rangan, A., Chemeris, V. v. & Hurley, L. H. Cationic Porphyrins Promote the Formation of i-Motif DNA and Bind Peripherally by a Nonintercalative Mechanism. *Biochemistry* **39**, 15083–15090 (2000).
 23. Shin-ya, K. *et al.* Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1262–1263 (2001).
 24. Kim, M. Y., Vankayalapati, H., Shin-ya, K., Wierzba, K. & Hurley, L. H. Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2098–2099 (2002).
 25. Doi, T. *et al.* (S)-Stereoisomer of telomestatin as a potent G-quadruplex binder and telomerase inhibitor. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 387–393 (2011).
 26. Pirota, V., Stasi, M., Benassi, A. & Doria, F. An overview of quadruplex ligands: Their common features and chemotype diversity. *Annu. Rep. Med. Chem.* **54**, 163–196 (2020).

27. Rzuczek, S. G., Pilch, D. S., LaVoie, E. J. & Rice, J. E. Lysinyl macrocyclic hexaoxazoles: Synthesis and selective G-quadruplex stabilizing properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 913–917 (2008).
28. Chung, W. J. *et al.* Solution Structure of an Intramolecular (3 + 1) Human Telomeric G-Quadruplex Bound to a Telomestatin Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13495–13501 (2013).
29. Manoli, F. *et al.* The Binding Pocket at the Interface of Multimeric Telomere G-quadruplexes: Myth or Reality? *Chemistry* **27**, 11707–11720 (2021).
30. Mendes, E., Aljnadi, I. M., Bahls, B., Victor, B. L. & Paulo, A. Major Achievements in the Design of Quadruplex-Interactive Small Molecules. *Pharmaceuticals* **15**, 300 (2020).
31. Kolesnikova, S. & Curtis, E. A. Structure and function of multimeric G-Quadruplexes. *Molecules* **24**, 3074 (2019).
32. Saintomé, C. *et al.* Binding properties of mono- and dimeric pyridine dicarboxamide ligands to human telomeric higher-order G-quadruplex structures. *Chem. Commun.* **54**, 1897–1900 (2018).
33. Frasson, I., Pirota, V., Richter, S. N. & Doria, F. Multimeric G-quadruplexes: A review on their biological roles and targeting. *Int. J. Biol. Macromol.* **204**, 89–102 (2022).

-
34. Zhao, C., Wu, L., Ren, J., Xu, Y. & Qu, X. Targeting Human Telomeric Higher-Order DNA: Dimeric G-Quadruplex Units Serve as Preferred Binding Site. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18786–18789 (2013).
 35. Zhao, A., Zhao, C., Ren, J. & Qu, X. Enantioselective targeting left-handed Z-G-quadruplex. *Chem. Commun.* **52**, 1365–1368 (2016).
 36. Zhou, C.-Q. *et al.* Dinickel-Salphen Complexes as Binders of Human Telomeric Dimeric G-Quadruplexes. *Chemistry* **23**, 4713–4722 (2017).
 37. Abraham Punnoose, J. *et al.* Adaptive and Specific Recognition of Telomeric G-Quadruplexes via Polyvalency Induced Unstacking of Binding Units. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 7476–7484 (2017).
 38. Hu, M.-H. *et al.* Specific targeting of telomeric multimeric G-quadruplexes by a new triaryl-substituted imidazole. *Nucleic Acids Res.* **45**, 1606–1618 (2017).
 39. Doria, F. *et al.* Dyads of G-Quadruplex Ligands Triggering DNA Damage Response and Tumour Cell Growth Inhibition at Subnanomolar Concentration. *Chemistry* **25**, 11085–11097 (2019).
 40. Manoli, F. *et al.* The Binding Pocket at the Interface of Multimeric Telomere G-quadruplexes: Myth or Reality? *Chemistry* **27**, 11707–11720 (2021).

41. Pont, I. *et al.* Aza-Macrocyclic Triphenylamine Ligands for G-Quadruplex Recognition. *Chemistry* **24**, 10850–10858 (2018).
42. Pont, I. *et al.* Development of Polyamine-Substituted Triphenylamine Ligands with High Affinity and Selectivity for G-Quadruplex DNA. *ChemBioChem* **21**, 1167–1177 (2020).
43. Juang, R. S., Wen, H.-W., Chen, M.-T. & Yang, P.-C. Enhanced sensing ability of fluorescent chemosensors with triphenylamine-functionalized conjugated polyfluorene. *Sens. Actuators B. Chem.* **231**, 399–411 (2016).
44. Wang, C. C. *et al.* Triphenylamine pyridine acetonitrile fluorogens with green emission for pH sensing and application in cells. *Chin. Chem. Lett.* **26**, 323–328 (2015).
45. Wang, M.-Q., Zhu, W.-X., Song, Z.-Z., Li, S. & Zhang, Y.-Z. A triphenylamine-based colorimetric and fluorescent probe with donor–bridge–acceptor structure for detection of G-quadruplex DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 5672–5676 (2015).
46. Mei, J., Leung, N. L. C., Kwok, R. T. K., Lam, J. W. Y. & Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* **115**, 11718–11940 (2015).
47. Yu, K. K. *et al.* A label-free fluorescent probe for accurate mitochondrial G-quadruplex structures tracking via assembly

-
- hindered rotation induced emission. *Sens. Actuators. B. Chem.* **321**, 128479 (2020).
48. Paul, A. *et al.* Binding of Gemini Bisbenzimidazole Drugs with Human Telomeric G-Quadruplex Dimers: Effect of the Spacer in the Design of Potent Telomerase Inhibitors. *PLoS One* **7**, (2012).
49. Pedersen, C. J. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 7017–7036 (1967).
50. Lehn, J. M. Cryptates: the chemistry of macropolycyclic inclusion complexes. *Acc. Chem. Res.* **11**, 49–57 (1978).
51. Hugo Schiff. Eine neue Reihe organischer Basen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **131**, 118–119 (1864).
52. Cordes, E. H. & Jencks, W. P. On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 832–837 (1962).
53. Qin, W., Long, S., Panunzio, M. & Biondi, S. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules* **18**, 12264–12289 (2013).

5

Comportamiento ácido - base

Especiación de los ligandos sintetizados mediante potenciometría, UV-Vis y emisión de fluorescencia.



Capítulo 5. Comportamiento ácido – base

5.1. Protonación.

Los efectos biológicos, metabólicos y toxicológicos de un compuesto son consecuencia directa de su perfil fisicoquímico. El perfil fisicoquímico determina la frecuencia y fuerza de las interacciones supramoleculares de un compuesto con una gran cantidad de macromoléculas, así como su acceso a las células u orgánulos donde se encuentra la diana terapéutica.

Las propiedades fisicoquímicas resultantes del diseño y síntesis de un compuesto, como el tamaño, la forma, la capacidad de formar puentes de hidrógeno y la polaridad, deben hacerle biocompatible para así minimizar los efectos indeseados, a la vez que potenciar su efectividad como fármaco. La combinación de estas propiedades determinará la solubilidad del compuesto en medio acuoso, uno de los factores más importantes en la biocompatibilidad. Para potenciar la solubilidad, una posibilidad es la presencia en el compuesto de grupos susceptibles de protonarse o desprotonarse, y que presenten carga positiva o negativa, respectivamente. Una molécula puede comportarse de una forma u otra dependiendo de su estado de protonación. Es decir, dependiendo del equilibrio con el medio donde se encuentre, éste puede cederle o retirarle protones, definiendo así su carga, rigidez molecular, y susceptibilidad frente a otros procesos químicos. Teniendo en cuenta que el ADN es una biomolécula aniónica, es de especial interés conocer el estado de protonación de nuestras moléculas para poder identificar las posibles interacciones electrostáticas.

Según la teoría de Bronsted y Løwry,^{1,2} las bases son compuestos aceptores de protones, y, según la teoría ácido-base de Lewis,³ las bases son clasificadas como dadoras de pares electrónicos. Es por ello por lo que el par solitario del nitrógeno de las aminas las identifica como bases.

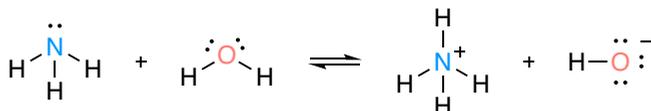


Figura 5.1. Reacción de protonación del amoniaco.

Los ligandos sintetizados presentan centros protonables debido a su naturaleza poliamínica (ver esquema **1**). Estos constan de aminas secundarias y terciarias en las cadenas alifáticas, así como también poseen la amina terciaria aromática del grupo trifenilamina (**TPA**). A la hora de estudiar su estado de protonación, es necesario analizar la basicidad de las distintas aminas presentes.

Debido a que los grupos unidos al nitrógeno afectan a la densidad electrónica de éste, la basicidad de una amina aumenta por la presencia de grupos electrón-dadores, mientras que se reduce con los grupos electrón-atrayentes como consecuencia del efecto inductivo.⁴ Las aminas unidas a grupos arilo son mucho menos básicas que aquellas substituidas con grupos alquilo debido al efecto resonante, ya que la densidad electrónica del átomo de nitrógeno está distribuida a lo largo del anillo aromático.⁵ De hecho, la trifenilamina tiene un pK_a muy bajo ($pK_a \sim -3.7$), por lo que es una base muy débil, de modo que en este trabajo no se ha valorado la posibilidad de su protonación, ya que está fuera del rango de pH en el que se realiza el estudio (pH 2 - 11).⁶

Además de los efectos inductivo y resonante, la basicidad de las aminas se ve afectada por la solvatación; así, en medio acuoso la protonación de las aminas menos sustituidas está favorecida, ya que pueden formar un mayor número de puentes de hidrógeno con el agua. Además, habría que considerar la carga total del compuesto, las repulsiones electrostáticas generadas, que dependerán de la formación de puentes de hidrógeno inter e intra-moleculares y de la topología, entre otros efectos capaces de condicionar la basicidad del compuesto.

Prestando atención a la estructura de los ligandos de este trabajo (ver esquema 1), éstos contienen tantas posiciones susceptibles de protonarse como aminas hay en sus cadenas. Así pues, los ligandos de topología lineal, **22Me-L**, **33Me-L** y **33H-L**, presentan tres centros susceptibles de protonación, y los macrocíclicos **22Me-M**, **33Me-M**, **22H-M** y **33H-M** seis centros protonables. Del mismo modo, los criptandos **22Me-C**, **33Me-C**, **22H-C** y **33H-C** contienen hasta nueve centros protonables, mientras que el macrociclo **Cad-M** y el criptando **Cad-C** exhiben solo cuatro y seis, respectivamente.

Mediante las técnicas potenciométricas y las espectroscopias de UV-Vis y de emisión de fluorescencia se han descrito los comportamientos ácido base de los ligandos desarrolladas en esta tesis. En el siguiente apartado se presentan los resultados del análisis de las valoraciones potenciométricas. Mediante esta técnica es posible obtener las constantes de protonación de los ligandos y, a partir de ellas, construir los diagramas de distribución de especies, los cuales son útiles para analizar qué especies predominan en función del pH.

5.1.1. Familia 22Me

La serie de ligandos que componen la familia **22Me** está compuesta por tres ligandos, los cuales contienen la cadena poliamínica 2,2'-diamino-N-metildietilamina (**22Me**) en su estructura. En la tabla 5.1 se presentan los valores de las constantes de protonación obtenidas en unidades logarítmicas.

Tabla 5.1. Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos determinadas en NaCl 0.15 M a 298.1 K.

Reacción ^a	22Me-L	22Me-M	22Me-C
$H + L \rightleftharpoons HL$	9.70(4) ^b	- ^c	-
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	6.46(7)	-	-
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	2.50(1)	-	-
$3H + L \rightleftharpoons H_3L$	18.66(7) ^d	23.83(2)	26.32(2)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$		7.23(2)	8.57(3)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$		2.97(4)	7.33(1)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$		-	7.21(2)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$			2.51(5)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$			-
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$			-
log β	18.66(7)	34.03(4)	51.94(5)
Carga a pH 7.4	1.10	3.35	5.23

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa indicada entre paréntesis. ^cNo determinada. ^dConstante acumulada.

Para los ligandos **22Me-L** y **22Me-M** se han obtenido tres constantes sucesivas de protonación, mientras que el criptando **22Me-C** muestra cinco constantes en el intervalo de pH 2.5 – 11.0. Es de interés mencionar que a valores de pH elevados se observó precipitación, debido posiblemente a procesos de agregación, lo que dificultó el análisis e impidió la obtención de las primeras dos constantes sucesivas de protonación para **22Me-M** y **22Me-C**. Por lo tanto, en la tabla sólo se incluyen los valores estimativos de las constantes acumuladas (globales) para la tercera protonación.

En primer lugar, se puede observar que a medida que se reduce el número de grupos amino por ligando, su basicidad global disminuye. Además, para cada ligando, las constantes de protonación sucesivas disminuyen a medida que aumenta su grado de protonación. Esto se puede explicar atendiendo a efectos estadísticos y de repulsiones entre cargas positivas.

Por ejemplo, el ligando de topología lineal **22Me-L** presenta una constante de protonación relativamente grande, una intermedia y una tercera mucho más baja. Teniendo en cuenta la estructura del ligando y la diferente basicidad ya comentada de los grupos amino, debido a efectos de solvatación cabe esperar que en la secuencia de protonación sean las aminas secundarias las primeras en protonarse.^{6,7} Así, el primer protón se introducirá en cualquiera de las dos aminas secundarias bencílicas de la cadena poliamínica del ligando, generando una carga positiva en éste. La segunda protonación introduce una carga positiva adicional sobre el ligando, de modo que tendrá lugar de forma mayoritaria en la segunda amina secundaria de la cadena, minimizando

las repulsiones electrostáticas entre ellas. Finalmente, la tercera protonación se debe producir necesariamente en el grupo amino terciario situado entre las dos aminas secundarias ya protonadas, lo que conlleva mayores repulsiones electrostáticas (figura 5.2).

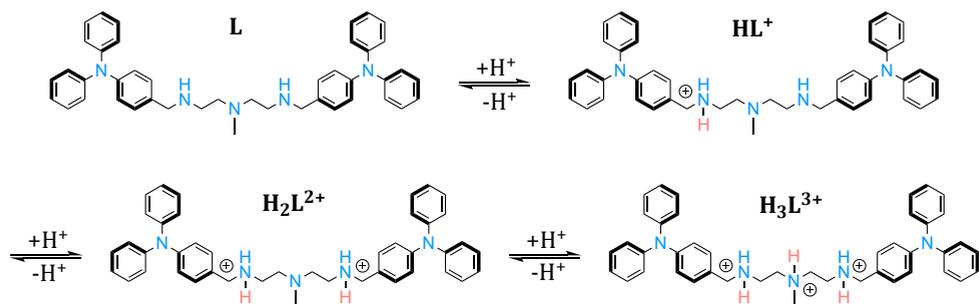


Figura 5.2. Secuencia de protonación de **22Me-L**.

Atendiendo a la secuencia de protonación indicada, las constantes de protonación obtenidas para los tres ligandos pueden ser divididas en dos grupos, uno para las aminas secundarias situadas en las posiciones bencílicas, y otro para las terciarias situadas en el centro de la cadena. Los valores de las constantes sucesivas disminuyen más acusadamente tras la formación de las especies **H₃L³⁺** en **22Me-L**, **H₅L⁵⁺** en **22Me-M** y **H₇L⁷⁺** en **22Me-C**, lo que coincide con la protonación de las aminas terciarias de estas especies.

El espectro UV-Vis de los ligandos muestra una banda centrada entre 300 y 325 nm, que está asociada a la transición π - π^* del grupo **TPA**.^{7,8} Según la bibliografía, el espectro de absorción del **TPA** se ve modificado tras la protonación del nitrógeno, ya que le impide al par de electrones

conjugarse con los grupos fenilo de la estructura, resultando en un espectro de absorción similar al del benceno.⁹

En nuestro caso, la variación de la posición de la banda con el pH es insignificante, lo cual concuerda con que en el intervalo de pH de trabajo no es posible observar la protonación del **TPA** (figura 5.3 izquierda). No obstante, sí que es apreciable una disminución de la banda a medida que aumenta el pH, esto puede ser debido a la protonación de las aminas cercanas a los grupos aromáticos y/o procesos de agregación.

En contraste, los espectros de emisión de fluorescencia sí que presentan cambios significativos (figura 5.3 derecha). En la literatura ha sido descrito que el espectro de emisión del **TPA** presenta un pico a 360 nm con un hombro cerca de 375 nm, lo que se atribuye a la presencia de dos conformeros estables distintos.¹⁰ En la figura 5.3 se ha representado la variación de absorción y emisión de fluorescencia en función del pH para el ligando **22Me-L**.

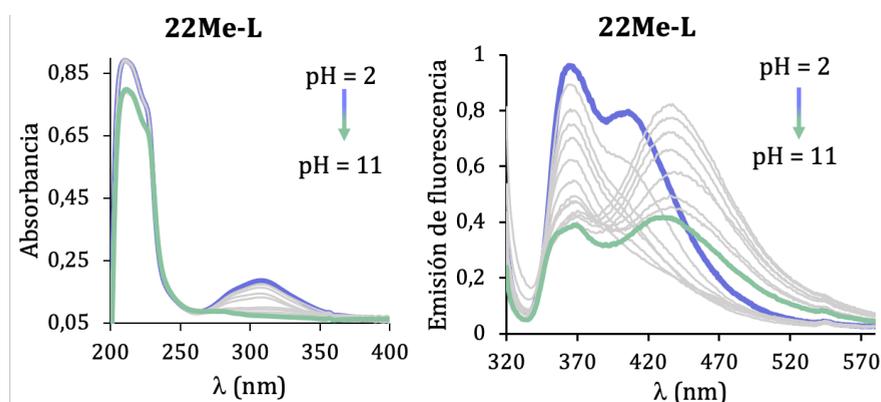


Figura 5.3. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **22Me-L** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

A continuación, se ha representado el diagrama de distribución de especies para **22Me-L**, junto con la variación en los máximos de absorción y emisión normalizados en función del pH (figura 5.4).

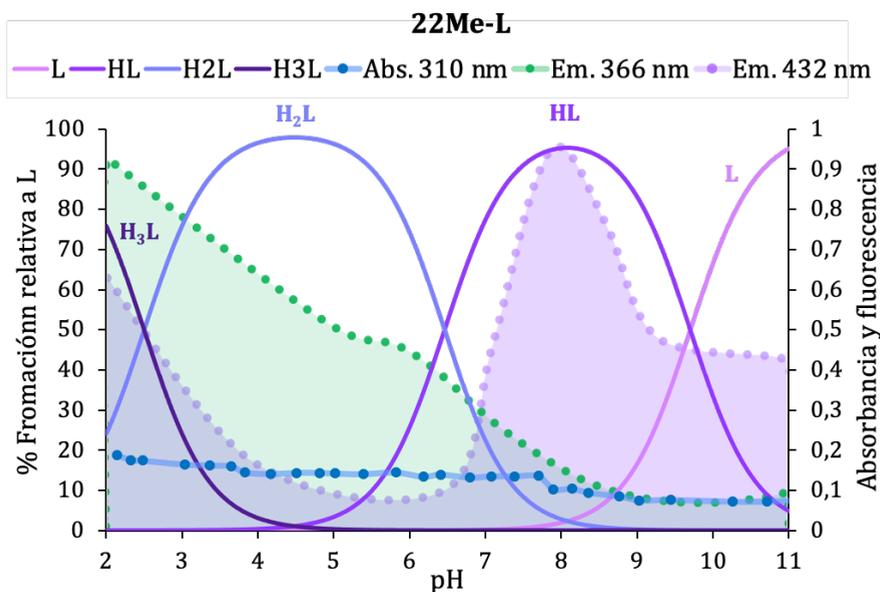


Figura 5.4. Diagrama de distribución de especies de **22Me-L** junto con su variación de absorción y emisión de los máximos.

Como puede observarse en la figura 5.3, a pH ácido el espectro de emisión del ligando **22Me-L** presenta un pico centrado a 360 nm con un hombro aproximadamente a 400 nm. Al aumentar el pH, la emisión de la primera banda (360 nm) comienza a disminuir progresivamente, mientras que la segunda banda (400 nm) aumenta alcanzando su máximo a pH 8, lo que corresponde con la especie **HL⁺** (figura 5.4). Al aumentar el pH hasta 11 la intensidad de fluorescencia de la banda de 400 nm vuelve a disminuir, coincidiendo con la disminución de la especie **HL⁺**. La protonación del

ligando podría afectar a las conformaciones de los grupos fenilo del **TPA**, favoreciendo una u otra según el estado de protonación. Por lo expuesto, podría deducirse que a pH ácido está favorecida la conformación del ligando que presenta la banda a 360 nm, mientras que a pH básico (pH 8) predomina la conformación que tiene su máximo de emisión a 400 nm.

El comportamiento de la segunda banda (400 nm) asociado con la formación de la especie **HL**⁺ puede ser explicado gracias al efecto de emisión inducida por agregación (*Aggregation-induced Emission*, AIE).¹¹ La geometría D₃ del **TPA** favorece las rotaciones intramoleculares que permiten la disipación de energía en disolución y además previene la formación de interacciones π - π en el estado agregado. Así, en disolución los grupos fenilo rotan, anulando el estado excitado mediante relajación no radiativa. En cambio, cuando las moléculas de **TPA** se encuentran en estado agregado, éstas están firmemente empaquetadas y dificultan las rotaciones intramoleculares, restaurando la emisión.

Las cargas positivas del **22Me-L** a pH ácido pueden obstaculizar la formación de interacciones intermoleculares, lo que favorecería la desactivación del estado excitado mediante rotaciones.¹² Al aumentar el pH, la primera desprotonación del ligando permite la formación de interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno o apilamiento π . El ligando **22M-L** en su forma monoprotonada **HL**⁺ puede simultáneamente ceder y aceptar puentes de hidrógeno, favoreciendo la agregación por AIE y el aumento de emisión observado.

Por otro lado, al analizar el ligando **22Me-M** se debe considerar que, al ser un macrociclo, las cadenas poliamínicas se encuentran próximas en el espacio, lo cual podría aumentar las repulsiones

electrostáticas de los centros protonables y, además, proporcionar cierta rigidez a la estructura. Por otra parte, como consecuencia del mayor número de grupos amino, tiene una mayor carga a pH fisiológico (+3.3). En la figura 5.5 se muestran los espectros de absorción y emisión en función del pH para el ligando **22Me-M**, mientras que en la figura 5.6 se representa el diagrama de distribución de especies.

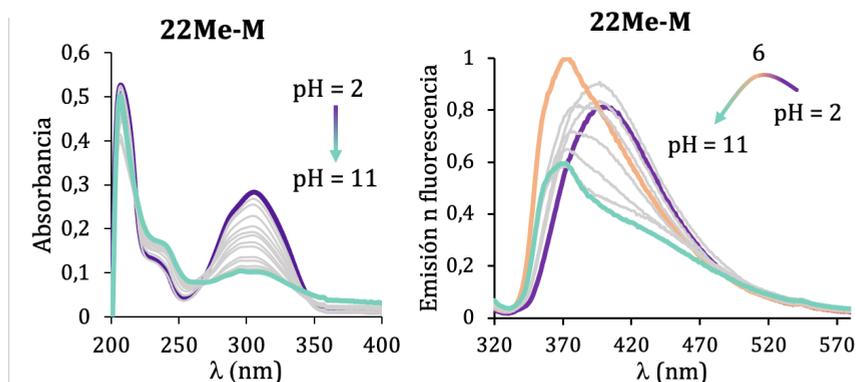


Figura 5.5. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **22Me-M** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

En cuanto a las variaciones en los espectros de absorción y emisión en función del pH, los cambios observados son muy similares a los mostrados por el compuesto **22Me-L**.

La banda de absorción centrada a 305 nm no se ve desplazada, aunque su intensidad sí que disminuye a medida que aumenta el pH, lo cual puede estar asociado a la protonación de las aminas cercanas al **TPA**. Adicionalmente, aparece una banda a 240 nm que presenta el comportamiento opuesto, a medida que aumenta el pH, crece ligeramente. Esta segunda banda podría estar relacionada con la mayor

rigidez de la molécula en el sistema macrociclo en comparación con su análogo lineal.

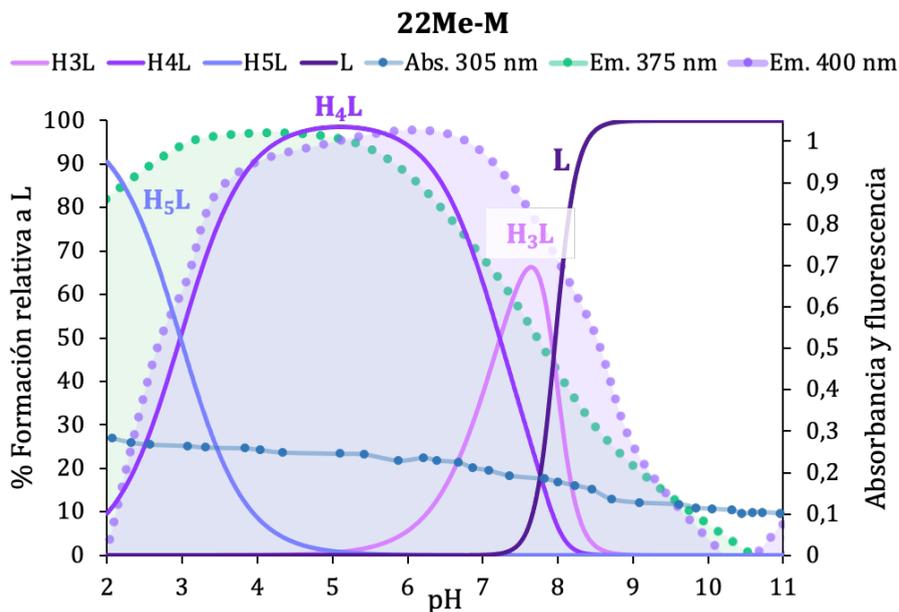


Figura 5.6. Diagrama de distribución de especies de **22Me-M** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

Por otro lado, el espectro de emisión sí que presenta cambios notables. A medida que aumenta el pH, la banda comienza a desplazarse de 400 nm a 375 nm aproximadamente, mientras que, a su vez, aumenta ligeramente su emisión hasta pH 6 - 7, coincidiendo con la formación de la especie H_4L^{4+} (figura 5.6), en la cual todas las aminas secundarias de las posiciones bencílicas estarían protonadas. A partir de este pH, la emisión de fluorescencia vuelve a disminuir hasta pH 11, lo cual sucede paralelamente a la disminución del porcentaje de la especie H_4L^{4+} y a la formación de las sucesivas especies desprotonadas. Este efecto AIE, de nuevo, puede estar relacionado bien con la formación de agregados y/o

con la conformación relativa que adoptan los anillos del grupo trifenilamina entre sí.

Finalmente, el ligando **22Me-C** al tener una cadena poliamínica adicional con respecto al **22Me-M**, presenta mayores restricciones de movimiento. Con el mismo planteamiento que en el ligando anterior, el ligando **22Me-C** presenta unas constantes de protonación más elevadas que su análogo macrocíclico **22Me-M**. El mayor número de centros susceptibles de ser protonados, así como la mayor rigidez de la estructura criptando provocan repulsiones electrostáticas más fuertes entre los centros protonados.

Respecto al espectro de absorción (figura 5.7 izquierda), se observa el mismo comportamiento que el ligando **22Me-M**; a medida que aumenta el pH disminuye la banda a 310 nm, mientras que la banda a 240 nm aumenta. Esta banda es característica de los sistemas macrocíclico y criptando estudiados, asociada a la restricción del movimiento del **TPA** debido a la conformación que adoptan en estos sistemas.

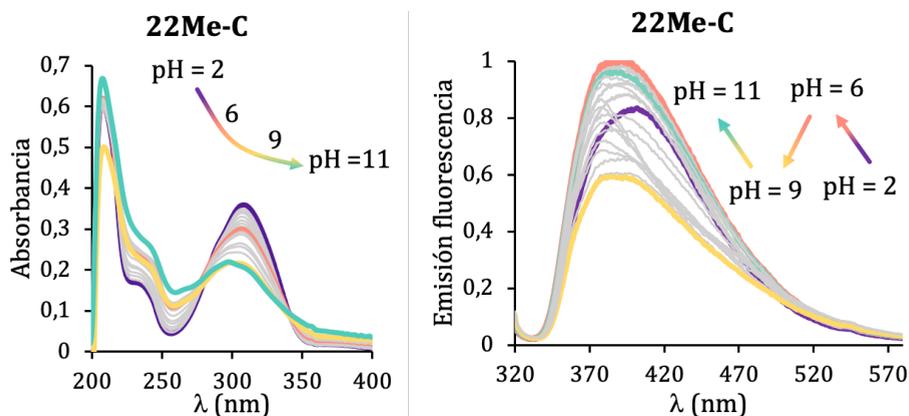


Figura 5.7. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **22Me-C** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

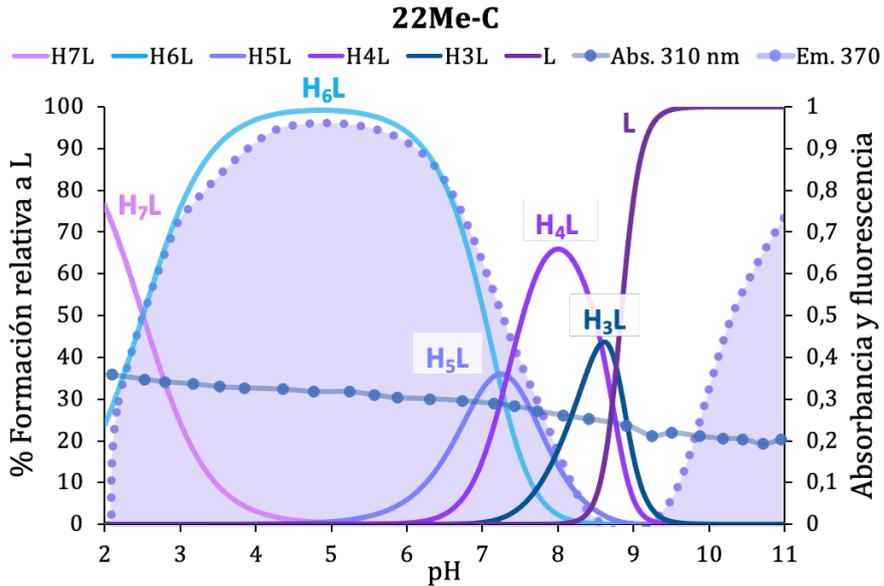


Figura 5.8. Diagrama de distribución de especies de **22Me-C** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

El espectro de emisión presenta también el mismo comportamiento que su análogo macrocíclico (figura 5.7 derecha), un aumento de emisión desplazándose la banda de 370 nm a longitudes de onda menores a medida que aumenta el pH de 3 a 6. Este aumento de emisión de fluorescencia acompaña al porcentaje de formación relativa de $\mathbf{H_6L^{6+}}$, especie con la totalidad de sus aminas secundarias y bencílicas protonadas (figura 5.8). Posteriormente, al llegar a pH 9 la emisión decrece al disminuir el porcentaje relativo de $\mathbf{H_6L^{6+}}$. Después, la intensidad de emisión vuelve a aumentar hasta pH 11 en correspondencia con la formación de la especie totalmente desprotonada, la cual podría agregarse mediante interacciones π del **TPA** y restaurar la emisión por el efecto AIE.

5.1.2. Familia 22H

La siguiente familia está compuesta por dos ligandos, **22H-M** y **22H-C**, que contienen la poliamina dietilentriamina (**22H**). En la tabla 5.2 se encuentran los valores logarítmicos de las constantes de protonación obtenidas.

Tabla 5.2. Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos determinadas en NaCl 0.15 M a 198.1 K.

Reacción ^a	22H-M	22H-C
$H + L \rightleftharpoons HL$	- ^c	-
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	-	18.65(3)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$		8.81(6)
$3H + L \rightleftharpoons H_3L$	24.52(1) ^d	26.91(9)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$	7.08(4)	8.26(9)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$	3.69(8)	8.02(4)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$	3.01(9)	7.47(6)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$		3.79(8)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$		2.54(9)
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$		-
log β	38.3(9)	57.54(9)
Carga a pH 7.4	3.31	5.38

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa indicada entre paréntesis. ^cNo determinada. ^dConstante acumulada.

Se han podido determinar entre cuatro y siete constantes de protonación para los ligandos de la familia **22H** en el intervalo de pH de trabajo (2 – 11). De nuevo, se observó precipitación y/o procesos de agregación en la cubeta, lo que dificultó el análisis de los compuestos.

Esta familia presenta una estructura muy similar a la familia **22Me**, la diferencia fundamental reside en que la amina central de las cadenas no está metilada y por lo tanto los ligandos **22H-M** y **22H-C** tienen una y dos aminas secundarias adicionales en comparación con **22Me-M** y **22Me-C**, cuyas aminas centrales son terciarias, dando lugar a valores en las constantes de basicidad global más elevados. En términos generales, se puede observar como el valor de las constantes sucesivas para un mismo ligando disminuye progresivamente al aumentar su grado de protonación, al igual que en la familia anterior, esto posiblemente sea debido al aumento de cargas y al aumento de repulsiones electrostáticas, las cuales dificultan la entrada del protón siguiente.

Cuando se comparan los valores de protonación entre los criptandos analizados, se observa que el descenso de las constantes es muy similar excepto para **H₇L⁷⁺**, el cual tiene un carácter más básico para **22H-C** (3.79) que para **22Me-C** (2.51). Podría suponerse que esta especie corresponde a la protonación de una de las aminas secundarias para **22H-C** mientras que para **22Me-C** incumbe la protonación de una de las aminas terciarias. Lo mismo sucede en los macrociclos, la constante sucesiva de protonación en **H₅L⁵⁺** es mayor para **22H-M** (3.69) que para **22Me-M** (2.97), la cual correspondería con la protonación de una de las aminas secundarias en **22H-M** mientras que en **22Me-M** supone la protonación de una de las terciarias.

A continuación, se representan las variaciones de absorción y fluorescencia con el pH para el macrociclo **22H-M** (figura 5.9).

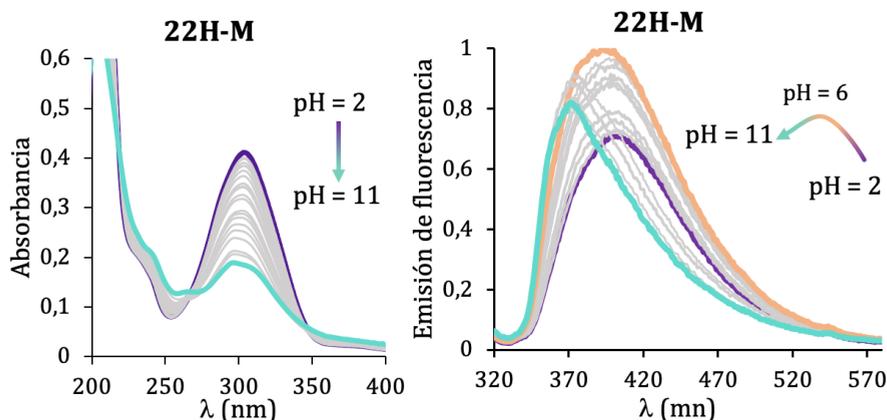


Figura 5.9. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **22H-M** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

El análisis de los espectros de UV-Vis muestra de nuevo la banda de transición π - π^* del **TPA** a 305 nm, que como se ha indicado anteriormente, no presenta ningún desplazamiento asociado a la protonación del **TPA** en el intervalo de pH de trabajo, pero si una disminución a medida que aumenta el pH, atribuible a la desprotonación de las aminas secundarias contiguas a los grupos aromáticos. A continuación, en la figura 5.10 se muestra la representación del diagrama de distribución de especies de **22H-M** junto con la variación de los máximos de absorción y emisión en función del pH.

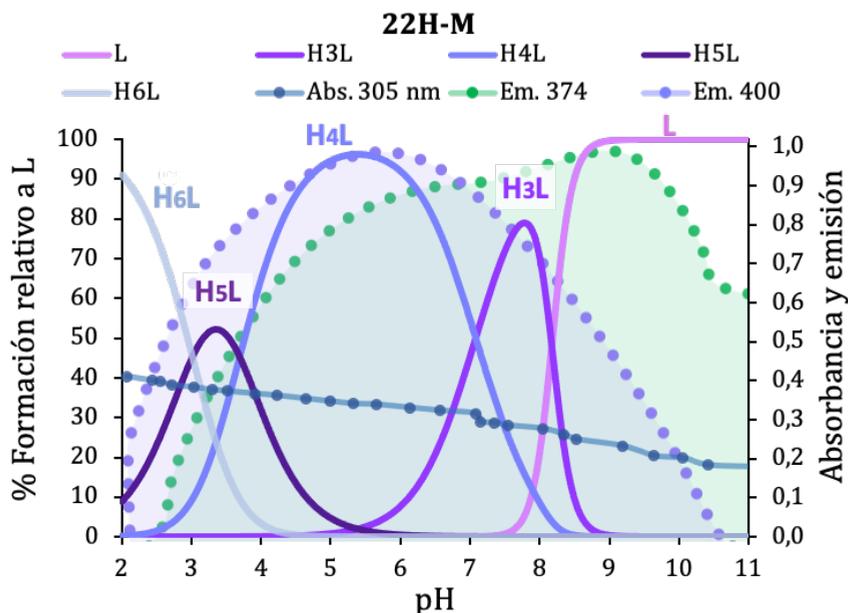


Figura 5.10. Diagrama de distribución de especies de **22H-M** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

La emisión de fluorescencia manifiesta un acusado aumento a 400 nm al aumentar el pH hasta 6, lo que ocurre simultáneamente a la formación de la especie H_4L^{4+} (figura 5.10). Al continuar aumentando el pH, la banda de emisión se desplaza ligeramente de 400 a 374 nm, disminuyendo su intensidad. Ambas variaciones ya se observaban en el macrociclo **22Me-M**, asociándose el aumento y descenso de la emisión de fluorescencia con la protonación y desprotonación de las aminas secundarias bencílicas.

A continuación, en la figura 5.11 se representan los espectros de absorción y emisión en función del pH para el ligando **22H-C**, y en la figura 5.12 el diagrama de distribución de especies solapado a la variación de los máximos de absorción y emisión con el pH.

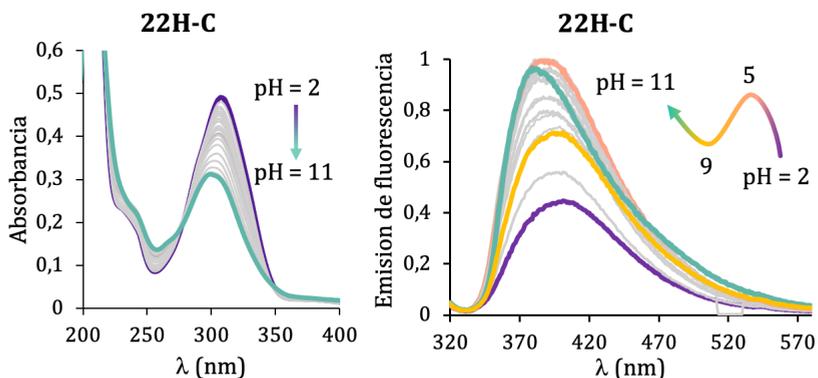


Figura 5.11. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **22H-C** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

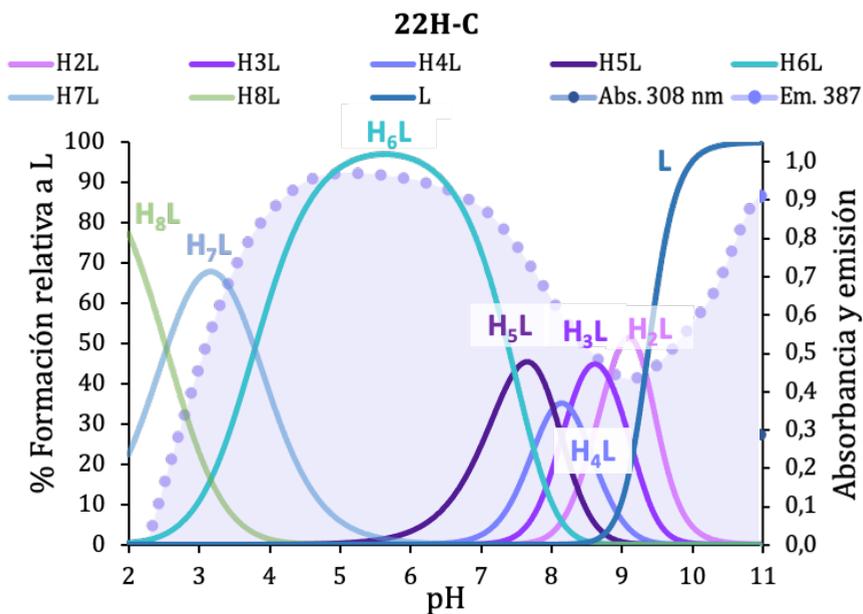


Figura 5.12. Diagrama de distribución de especies de **22H-M** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

En primer lugar, en el espectro de absorción se observa la disminución de la banda a 308 nm a medida que aumenta el pH. En segundo lugar, pese a que no fue posible la determinación de las dos últimas constantes de estabilidad (para este sistema **HL⁺** y **L**), el resto de las especies determinadas presenta un comportamiento en su formación muy similar a **22Me-C**.

Asimismo, la formación de la especie **H₆L⁶⁺** (especie con las aminas bencílicas protonadas) lleva consigo un aumento en la emisión de fluorescencia de la banda situada a 387 nm, desplazándose ligeramente a longitudes de onda menores. A su vez, al continuar incrementando el pH se observa que esta banda disminuye hasta pH 9 para volver a aumentar hasta pH 11, posiblemente siguiendo la formación de la especie totalmente desprotonada **L** la cual podría agregarse mediante interacciones π - π de los grupos **TPA** y restaurar la emisión (AIE).

5.1.3. Familia 33H

La siguiente familia la comprenden tres ligandos, **33H-L**, **33H-M** y **33H-C** (ver esquema 1), formados por la cadena poliamínica bis(3-aminopropil) amina (**33H**). Se trata de una familia muy similar a la **22H**, pero en lugar de presentar cadenas etilénicas, estas son propilénicas. En la tabla 5.3 se presentan los valores de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales de los ligandos.

Tabla 5.3. Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos determinadas en NaCl 0.15 M a 198.1 K.

Reacción^a	33H-L	33H-M	33H-C
$H + L \rightleftharpoons HL$	9.96(3)	10.38(7)	10.38(5)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	8.31(4)	9.38(8)	10.14(3)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	6.58(5)	8.19(8)	9.74(4)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$		7.62 ^c	9.06(3)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$		7.09(10)	8.32(4)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$		6.89(9)	7.88(3)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$			7.14(4)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$			6.71(4)
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$			6.41(3)
$\log \beta$	34.81(5)	45.55(10)	75.78(5)
Carga a pH 7.4	2.02	4.35	6.19

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa indicada entre paréntesis. ^cConstante estimada.

En este caso fue posible determinar todas las constantes de protonación de los tres ligandos, a excepción de la cuarta protonación del **33H-M**, que únicamente pudo ser estimada. Así, el **33H-L** presenta tres constantes de protonación, el macrociclo **33H-M** presenta seis y el criptando **33H-C**, nueve. Se observa una disminución en el valor de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas a medida que aumenta el número de aminas protonadas, como consecuencia del aumento de las repulsiones electrostáticas y del efecto estadístico previamente mencionados.

Los sistemas macrocíclico y criptando de esta familia **33H** presentan unas constantes de protonación más altas que las de la familia **22H**. Este aumento en la basicidad es debido a la mayor longitud de las cadenas, ya que producen una mayor separación entre grupos amonio protonados, lo que resulta en una minimización más efectiva de las repulsiones electrostáticas. Asimismo, el efecto inductivo contribuye a este aumento de basicidad, dada la mayor densidad electrónica que aportan las cadenas propilénicas.

A continuación, se discuten los espectros de absorción y emisión de fluorescencia del ligando **33H-L** en función del pH (figura 5.13). Además, se ha superpuesto la variación de los máximos de absorción y emisión en el correspondiente diagrama de distribución de especies (figura 5.14).

El espectro de absorción presenta una banda centrada a 300 nm, que al igual que los compuestos analizados previamente, disminuye en intensidad a media que aumenta el pH.

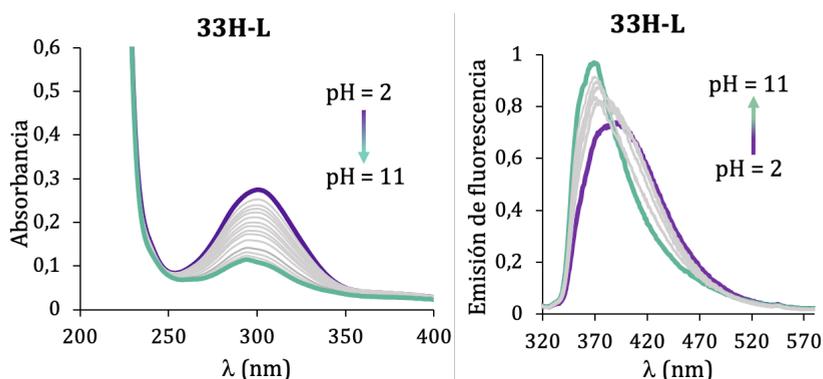


Figura 5.13. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **33H-L** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

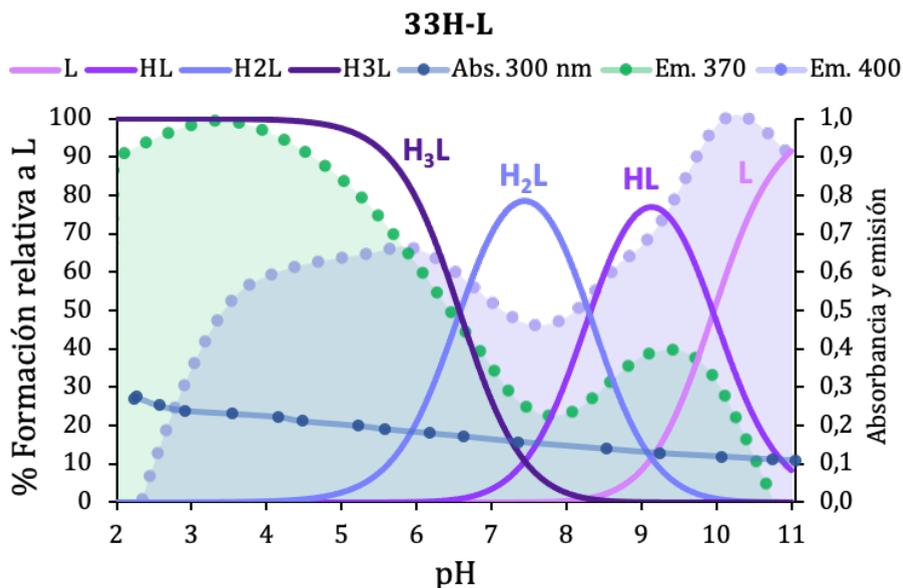


Figura 5.14. Diagrama de distribución de especies de **33H-L** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

Por otro lado, el espectro de emisión de fluorescencia presenta cambios destacables con la variación del pH: la banda observada a pH ácido a 400 nm aumenta su intensidad de emisión a la vez que se desplaza ligeramente a longitudes de onda menores (~ 370 nm) al aumentar el pH hasta 6, donde predomina la especie triprotonada H_3L^{3+} . Al desprotonarse esta especie se observa una disminución en la emisión, que se vuelve a restaurar al formarse la especie monoprotonada HL^+ . Con la formación de la especie **L** totalmente desprotonada, se observa un aumento en el máximo de emisión de fluorescencia de la segunda banda centrada a 370 nm. Como se mencionó anteriormente en el estudio de **22Me-L**, esta especie desprotonada ya no posee cargas positivas que puedan generar repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, dificultar la

formación de interacciones intermoleculares. En consecuencia, es posible la agregación de moléculas sin carga formal mediante interacciones π - π , lo que puede reestablecer la emisión de fluorescencia por AIE.

El compuesto macrocíclico **33H-M** tiene un comportamiento muy similar al de los macrociclos discutidos anteriormente. La banda de absorción situada a 305 nm disminuye su intensidad progresivamente al incrementar el pH, mientras que la banda de emisión de fluorescencia a 400 nm aumenta a la vez que se desplazada a longitudes de onda menores. El aumento de emisión de fluorescencia ocurre simultáneamente con la primera desprotonación de la especie H_6L^{6+} , alcanzando el máximo de emisión a pH 7, en correspondencia con la formación de la especie H_4L^{4+} . Posteriormente, al aumentar el pH la emisión disminuye ligeramente al desprotonarse la amina bencílica y formarse la especie H_3L^{3+} .

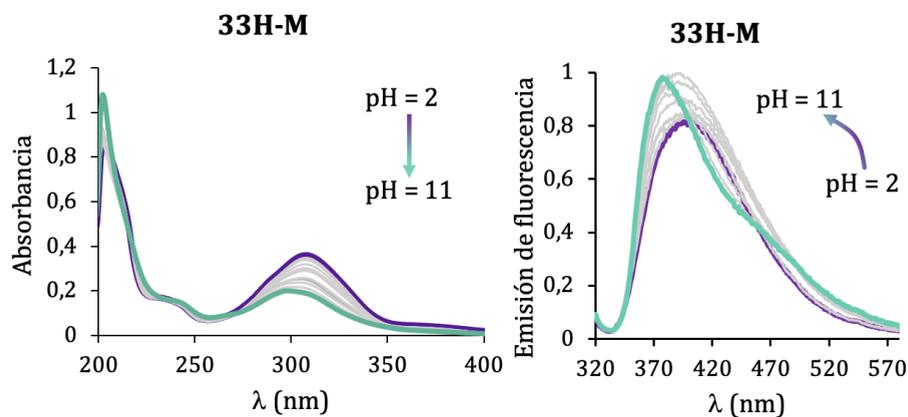


Figura 5.15. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **33H-M** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

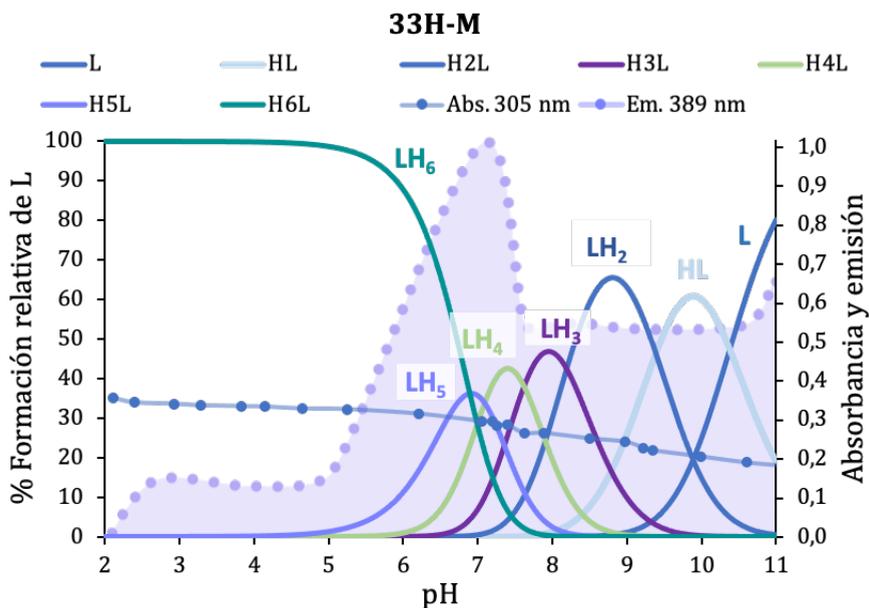


Figura 5.16. Diagrama de distribución de especies de **33H-M** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

Respecto al ligando **33H-C**, en su espectro de absorción UV-Vis se observa la característica disminución en la absorbancia al aumentar el pH (figura 5.17).

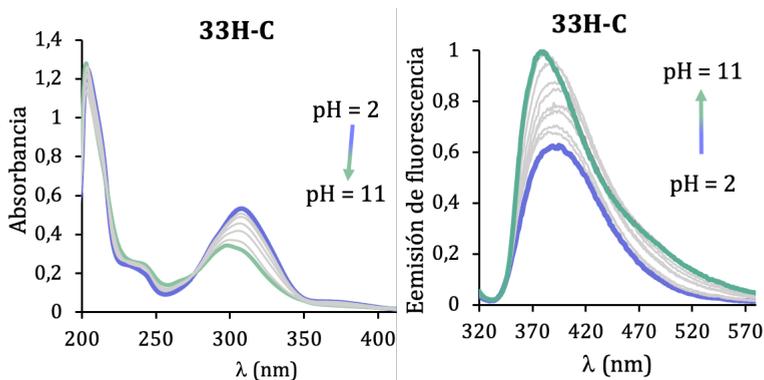


Figura 5.17. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **33H-C** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

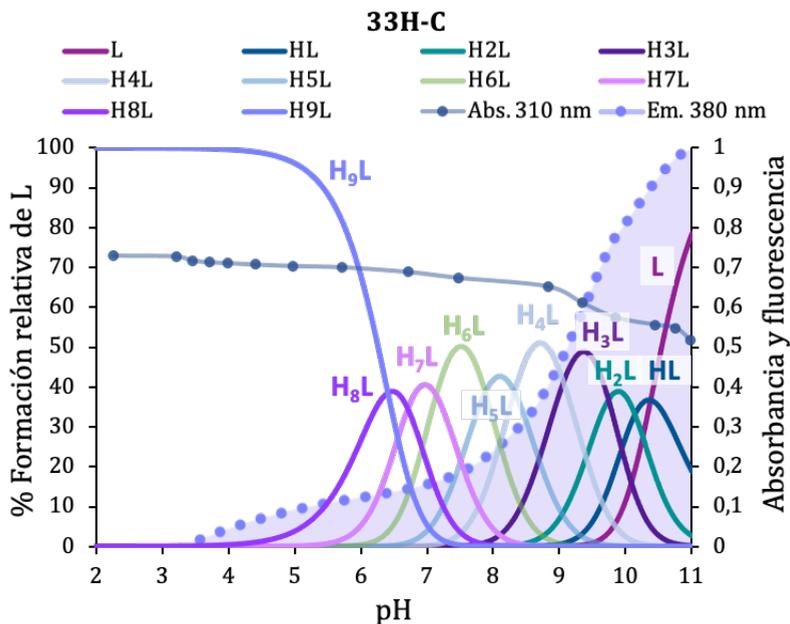


Figura 5.18. Diagrama de distribución de especies de **33H-C** junto con su variación de absorción y emisión de los máximos.

Como puede observarse en el diagrama de distribución de especies (figura 5.18), el ligando **33H-C** presenta un comportamiento distinto a los criptandos mostrados anteriormente. En ellos, la especie **H₆L⁶⁺** predominaba de pH 3 a 7, mientras que en el criptando **33H-C** la especie completamente protonada **H₉L⁹⁺** predomina en disolución acuosa desde pH ácido hasta pH 6, para dar paso a una zona en la que coexisten las distintas especies protonadas hasta pH 11. Este aumento en la basicidad es debido al aumento en la longitud de las cadenas alquílicas, que minimiza las repulsiones electrostáticas de los grupos amino protonados a la vez que acrecienta el efecto inductivo. Además, en los criptandos de cadenas etilénicas se observaba un máximo de emisión de fluorescencia con la formación de la especie **H₆L⁶⁺**, mientras que para **33H-C** el

aumento de emisión no es atribuible a ninguna especie específica, alcanzando el máximo de emisión con la especie totalmente desprotonada **L**. Esto podría ser debido a que, tras la protonación, las cargas positivas resultantes no están únicamente en posiciones bencílicas para minimizar las repulsiones, sino que la amina secundaria situada en el centro de la cadena también puede contribuir a la estabilización de éstas. En consecuencia, se observa un aumento de emisión de fluorescencia gradual al aumentar el pH progresivamente hasta alcanzar el máximo con la especie totalmente desprotonada **L**, debido la agregación mediante interacciones tipo π - π (efecto AIE).

5.1.4. Familia **33Me**

La siguiente familia analizada la componen los ligandos **33Me-L**, **33Me-M** y **33Me-C**, formados por la cadena poliamínica 3,3'-diamino-*N*-metildipropilamina (**33Me**). La principal diferencia de esta familia respecto a la anterior **33H**, es que los ligandos de esta serie tienen la amina central metilada, lo que permite una distinción dentro de los grupos amino en secundarios y terciarios. A su vez, las cadenas hidrocarbonadas son propilénicas, lo que también la distingue del resto de ligandos estudiados. En la tabla 5.4 se muestran los valores de las constantes de protonación sucesivas y globales obtenidas para los ligandos **33Me**.

Tabla 5.4. Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos determinadas en NaCl 0.15 M a 298.1 K.

Reacción ^a	33Me-L	33Me-M	33Me-C
H + L \rightleftharpoons HL	9.88(2) ^b	- ^c	10.19(1)
H + HL \rightleftharpoons H ₂ L	7.80(4)	-	10.14 (1)
H + H ₂ L \rightleftharpoons H ₃ L	6.04(6)	-	8.98(9)
H + H ₃ L \rightleftharpoons H ₄ L		-	8.57(2)
3H + L \rightleftharpoons H ₄ L		24.33(4) ^d	37.88(9)
H + H ₄ L \rightleftharpoons H ₅ L		6.63(2)	8.38(5)
H + H ₅ L \rightleftharpoons H ₆ L		6.31(3)	7.50(4)
H + H ₆ L \rightleftharpoons H ₇ L			6.97(4)
H + H ₇ L \rightleftharpoons H ₈ L			6.76(4)
H + H ₈ L \rightleftharpoons H ₉ L			5.34(9)
log β	23.72(6)	37.27(6)	72.83(9)
Carga a pH 7.4	2.64	4.15	5.76

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa indicada entre paréntesis. ^cNo determinada. ^dConstante acumulada.

Se determinaron las tres constantes de protonación para el ligando **33Me-L**, las tres últimas constantes del macrociclo **33Me-M** debido a que el sistema precipitaba y se redisolvió en el intervalo de trabajo de pH-, y para el criptando **33Me-C** fue posible determinar las nueve constantes de protonación.

Se puede observar como el valor de las constantes sucesivas para un mismo ligando disminuye progresivamente al protonarse, lo que al

igual que en los compuestos anteriores, puede explicarse por el incremento de las repulsiones electrostáticas que se produce al aumentar el número de centros protonados en la molécula. Al comparar los valores de las constantes de la familia análoga metilada **22Me**, puede observarse como los de la familia **33Me** son más elevados, particularmente en las últimas constantes de protonación. Este hecho es debido a la mayor longitud de las cadenas hidrocarbonadas que conectan los grupos amino, lo que permite una mejor estabilización de las cargas positivas dado que se encuentran más alejadas en el espacio, lo que también contribuye al aumento de la basicidad en los ligandos. Respecto a la comparación con la familia no metilada **33H**, los ligandos de la serie **33Me** presentan constantes de protonación sucesivas similares, lo que sugiere que, en cadenas más alargadas, la metilación del grupo amino central no afecta tanto a la basicidad de los compuestos como la longitud de las cadenas poliamínicas.

A continuación, se analizarán los diagramas de distribución junto con las variaciones de absorción y emisión en función del pH de los ligandos **33Me**, comenzando por **33Me-L**.

El perfil de los espectros de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia del ligando **33Me-L** es muy parecido al de su análogo lineal **33H-L** estudiado previamente (figura 5.19). El espectro de absorción presenta una banda centrada a 300 nm, cuya absorbancia al igual que los compuestos analizados anteriormente, disminuye progresivamente al aumentar el pH. Asimismo, a pH ácido el espectro de emisión presenta

una banda a 390 nm que aumenta su intensidad a la vez que se desplazada hasta 370 nm al incrementar el pH.

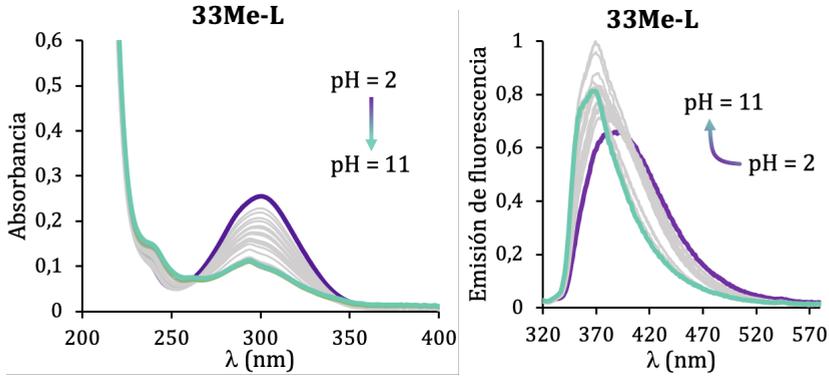


Figura 5.19. A la izquierda, espectro de UV/Vis de **33Me-L** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

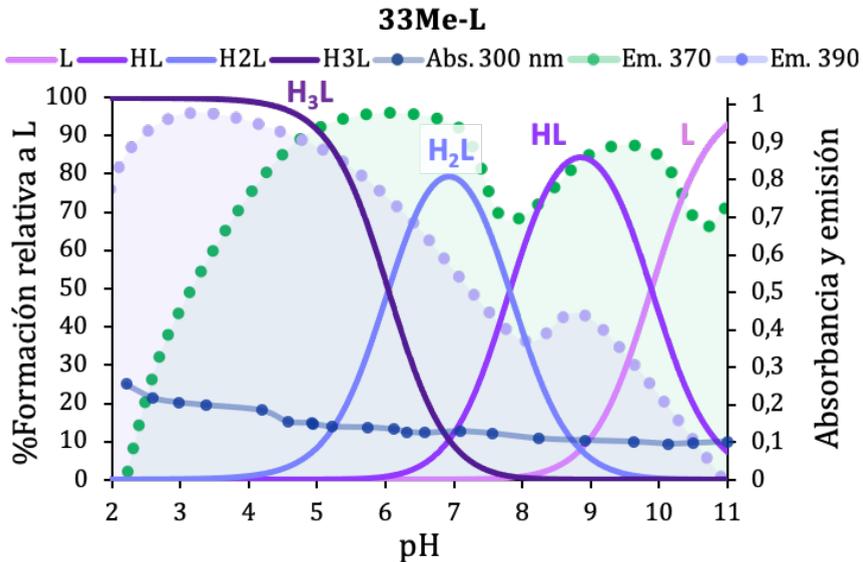


Figura 5.20. Diagrama de distribución de especies de **33Me-L** junto con su variación de absorción y emisión de los máximos.

El aumento de la banda de emisión y el desplazamiento de esta a 370 nm tiene lugar con la primera desprotonación (figura 5.20). Por otra parte, la disminución de las cargas sobre la molécula puede favorecer las interacciones de tipo π dando lugar a un aumento de emisión por AIE.

El compuesto **33Me-M** guarda similitudes con los otros macrociclos **22Me-M**, **22H-M** y **33H-M**. El espectro de absorción presenta una banda centrada sobre 305 nm cuya intensidad disminuye a medida que aumenta el pH, hecho ya observado en los compuestos anteriores (figura 5.21 izquierda). Por otro lado, el espectro de emisión de fluorescencia presenta una banda centrada a 400 nm que se desplaza a 373 nm aumentando su intensidad conforme se incrementa el pH (figura 5.21 derecha).

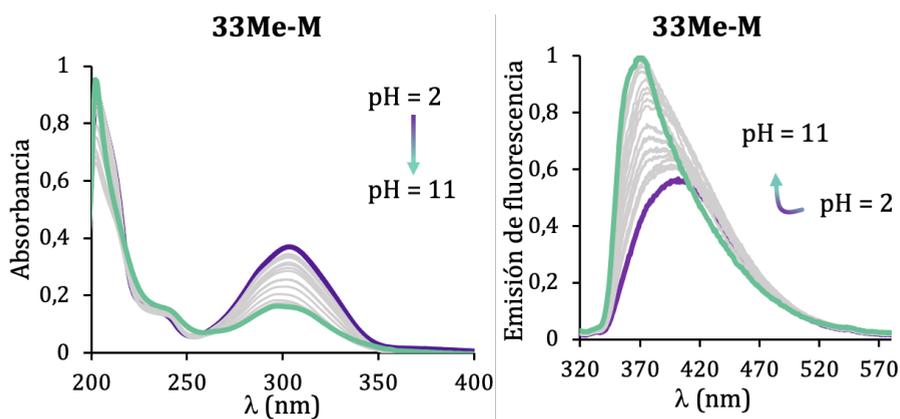


Figura 5.21. A la izquierda, espectro de UV/Vis de **33Me-M** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

Pese a que no fue posible la determinación de las constantes de protonación de las especies H_3L^{3+} y H_2L^{2+} , y por lo tanto su campo de existencia, se puede aventurar que al igual que ocurre **22Me-M**, **22H-M**

y **33H-M**, el aumento de la emisión más acusado se produce con la especie **H₄L⁴⁺** que tiene las aminas bencílicas secundarias protonadas, al igual que ocurre en los sistemas macrocíclicos estudiados.

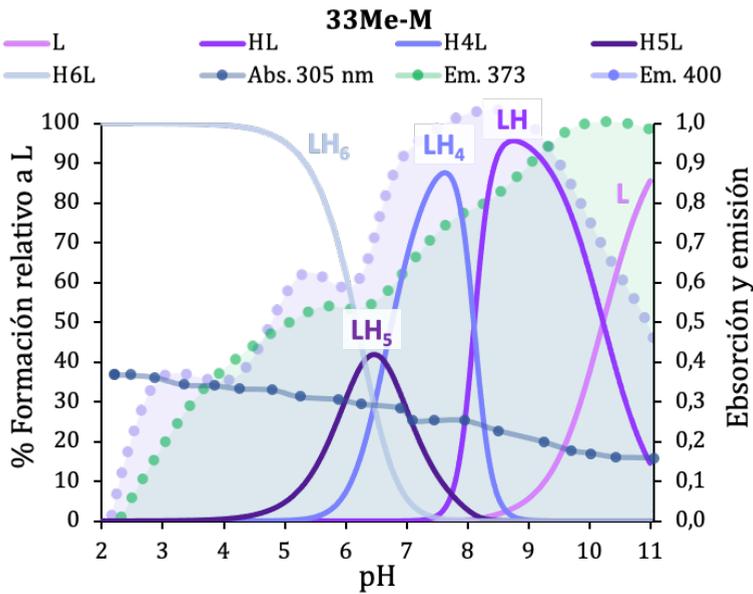


Figura 5.22. Diagrama de distribución de especies de **33Me-M** junto con su variación de absorción y emisión de los máximos.

Por último, el criptando **33Me-C** presenta un comportamiento híbrido entre los mostrados por los criptandos de cadenas etilénicas **22Me-C** y **22H-C**, y el de cadenas propilénicas **33H-C**. En las etilénicas, se ve un aumento de emisión de fluorescencia muy destacable cerca de 380 nm, en correspondencia con la formación de la especie **H₆L⁶⁺**, en la que la totalidad de las aminas secundarias y bencílicas estarían protonadas. En cambio, **33Me-C** presenta un aumento progresivo en la emisión de fluorescencia hasta alcanzar pH básico al igual que **33H-C**, aunque con la aparición de un pico de emisión relativo en el intervalo de pH 7 – 8 que

coincide con la formación de la especie H_6L^{6+} . Al igual que se ha explicado previamente, el aumento de la emisión que se observa al formarse la especie totalmente desprotonada L es atribuible a la agregación del ligando mediante interacciones tipo $\pi-\pi$ (efecto AIE).

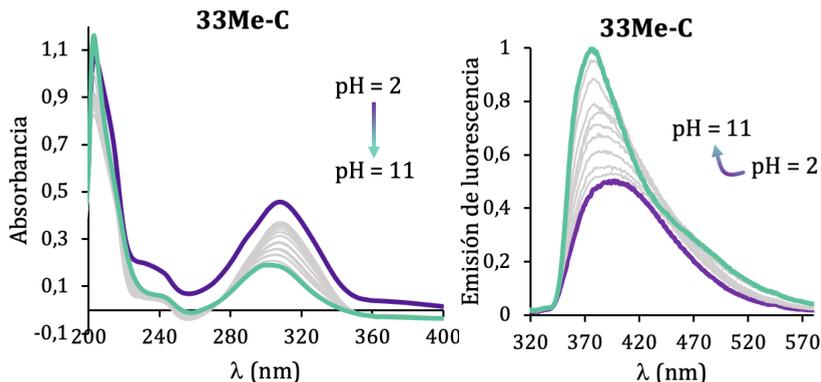


Figura 5.23. A la izquierda, espectro de UV/Vis de **33Me-C** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

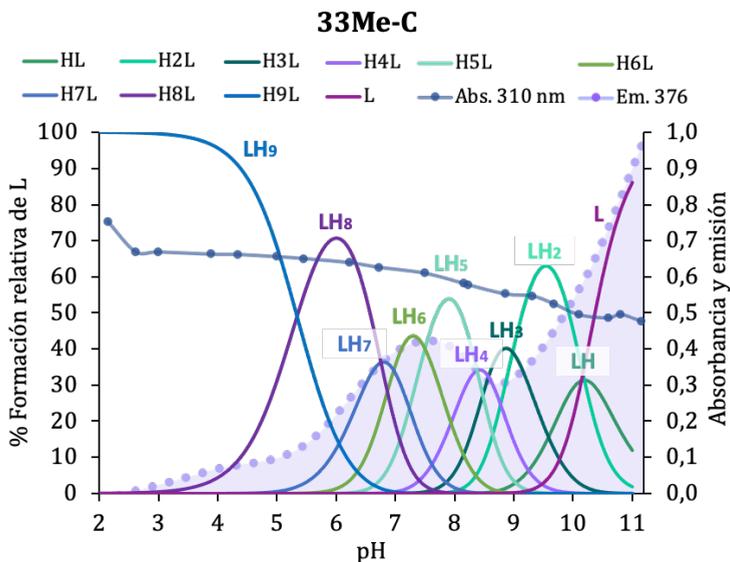


Figura 5.24. Diagrama de distribución de especies de **33Me-C** junto con su variación de absorción y emisión de los máximos.

5.1.5. Familia Cad

El último compuesto estudiado mediante valoraciones potenciométricas fue el **Cad-C** (ver esquema 1), en el que las cadenas poliamínicas están compuestas por la cadaverina. En la tabla 5.5 se presentan los valores de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales del criptando **Cad-C**. No fue posible la determinación de las constantes de protonación para el ligando **Cad-M** debido a problemas de solubilización del sistema en las concentraciones de trabajo necesarias.

Tabla 5.5. Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para **Cad-C** determinadas en NaCl 0.15 M a 298.1 K.

Reacción ^a	Cad-C
$H + L \rightleftharpoons HL$	-
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	-
$3H + L \rightleftharpoons H_3L$	26.90 (3) ^c
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$	8.59(5) ^b
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$	8.35(5)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$	7.74(5)
$\log \beta$	51.58(5)
Carga a pH 7.4	5.62

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa indicada entre paréntesis. ^cConstante acumulada.

Al no tener grupos amino centrales, el criptando **Cad-C** presenta seis centros protonables, de los cuales solo fue posible la determinación de

las cuatro primeras constantes de protonación. Tras la formación de la especie H_3L^{3+} el sistema se vuelve turbio e insoluble debido a procesos de precipitación y/o agregación.

Al comparar los valores de las constantes obtenidas con los de las etapas de protonación correspondientes al criptando de cadenas etilénicas **22H-C**, se pueden observar valores muy similares entre sí, lo que apoyaría el hecho de que en el compuesto criptando anterior **22H-C** se protonan primero las aminas más próximas a la unidad aromática. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos con los del criptando **33H-C**, estos son más elevados debido al efecto inductivo producido por las cadenas propilénicas y a la menor repulsión electrostática.

A continuación, se analizarán los diagramas de distribución junto con las variaciones de absorción y emisión en función del pH del ligando **Cad-C** (figuras 5.25 y 5.26).

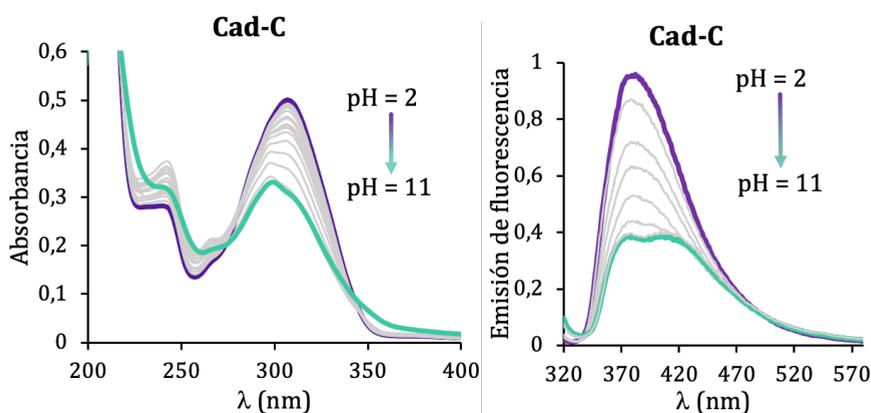


Figura 5.25. A la izquierda, espectro de UV-Vis de **Cad-C** en función del pH. A la derecha, emisión de fluorescencia normalizada en función del pH.

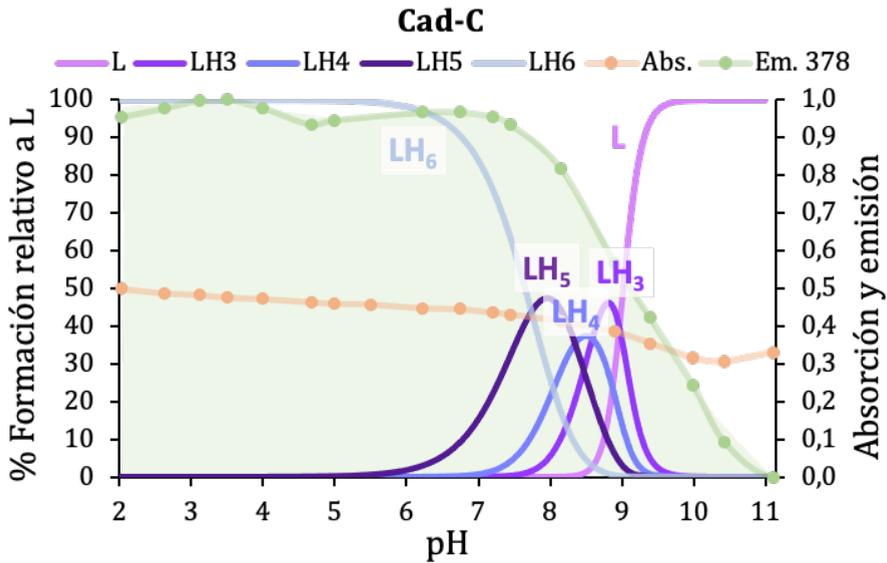


Figura 5.26. Diagrama de distribución de especies de **Cad-C** junto con la variación de absorción y emisión de sus máximos.

Mientras que el espectro de UV-Vis es muy similar al de los sistemas estudiados anteriormente, el espectro de emisión de fluorescencia tiene diferencias destacables (figura 5.25).

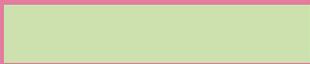
A pH ácido presenta una banda a 378 nm que disminuye progresivamente al aumentar el pH, dividiéndose en dos bandas de menor intensidad, una a 400 nm y otra a 378 nm. Esta disminución de fluorescencia en el máximo de emisión es similar al que se producía en el sistema **22H-C**. Teniendo presente el sistema **22H-C**, este sufría una disminución de emisión de fluorescencia en el máximo de la banda a 378 nm al reducirse la formación de la especie H_6L^{6+} . Al analizar el diagrama de distribución de especies de **Cad-C** en función del pH junto con el cambio del máximo de emisión de fluorescencia (figura 5.26), se observa una disminución de fluorescencia gradual a medida que se desprotonan

las especies, comenzando por la especie $\mathbf{H_6L^{6+}}$. Sin embargo, a medida que aumenta el pH se alcanza el mínimo de emisión con la especie \mathbf{L} . Este hecho es contrario a lo observado en los anteriores criptandos, donde aumentaba la emisión de fluorescencia con la formación de la especie \mathbf{L} , lo que sugiere que las aminas centrales de las cadenas juegan un papel fundamental en la organización de la molécula a pH básico, dado que es la única diferencia estructural entre estos sistemas.

5.2. Bibliografía

1. Lowry, T. M. The uniqueness of hydrogen. *J. Soc. Chem. Ind.* **42**, 43–47 (1923).
2. Brönsted, J. N. Einige Bemerkungen über den Begriff der Säuren und Basen. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **42**, 718–728 (1923).
3. Lewis, G. N. The atom and the molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 762–785 (1916).
4. Stock, L. M. The origin of the inductive effect. *J. Chem. Educ.* **49**, 400 (1972).
5. Murrell, J. N. The Electronic Spectrum of Aromatic Molecules VI: The Resonance Effect. *Proc. Phys. Soc. Section A* **68**, 969–975 (1955).
6. Van Der Krogt, S. H. *et al.* Substituent Effects. 8.1 Basic Strength of Azatriptycene, Triphenylamine, and Some Related Amines The pK_a values used by Kreil and Sandel give for eq. *B. M. Reel. Trav. Chim. Pays-Bas* **46**, 1260 (1981).
7. Xu, B. *et al.* High-performance two-photon absorption luminophores: large action cross sections, free from fluorescence quenching and tunable emission of efficient non-doped organic light-emitting diodes. *J. Mater. Chem. C. Mater.* **2**, 3416–3428 (2014).
8. Aydemir, M. *et al.* Synthesis and investigation of intra-molecular charge transfer state properties of novel donor-acceptor-donor

- pyridine derivatives: The effects of temperature and environment on molecular configurations and the origin of delayed fluorescence. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 25572–25582 (2015).
9. Janic, I. & Kakas, M. Electronic configuration and spectra of the neutral and protonated forms of triphenylamine. *J. Mol. Struct.* **114**, 249–252 (1984).
 10. Chen, G. *et al.* Conjugation-Induced Rigidity in Twisting Molecules: Filling the Gap between Aggregation-Caused Quenching and Aggregation-Induced Emission. *Adv. Mater.* **27**, 4496–4501 (2015).
 11. Yang, W. *et al.* Aggregation-induced emission and intermolecular charge transfer effect in triphenylamine fluorophores containing diphenylhydrazone structures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 28052–28060 (2016).
 12. Li, C. *et al.* Branching effect for aggregation-induced emission in fluorophores containing imine and triphenylamine structures. *New J. Chem.* **40**, 8837–8845 (2016).



Interacción con estructuras de ADN G4

Evaluación de la interacción
de los ligandos poliamínicos
con ADN G-quadruplex

Capítulo 6. Evaluación de la interacción de los ligandos poliamínicos con ADN G-quadruplex monomérico

6.1. Estructuras G4s del ADN telomérico

Tras determinar el comportamiento ácido - base en disolución acuosa de los ligandos (*capítulo 5*), procedimos a evaluar su interacción con ADN G-quadruplex representativo de estructuras monoméricas. En estos estudios se utilizaron las estructuras de G4s con topologías híbrida (denominada HTelo(K⁺)) y antiparalela (denominada HTelo(Na⁺)) formadas por las secuencias características de los telómeros. Para examinar la selectividad de los ligandos por las estructuras G4s frente a la estructura de ADN más abundante a nivel celular, la doble hélice, se completó el estudio con el ADN dúplex (ds26). Las secuencias de ADN utilizadas se encuentran detalladas en la tabla 6.1 junto con su nombre abreviado, su estructura y su topología.

Tabla 6.1. Secuencias de ADN empleadas en el presente capítulo.

Nombre	Secuencia	Modelo	Topología	PDB
HTelo(K ⁺)	AGG-GTT-AGG-GTT- AGG-GTT-AGG-G	G4 telomérico	Híbrida	1KF1
HTelo(Na ⁺)	AGG-GTT-AGG-GTT- AGG-GTT-AGG-G	G4 telomérico	Antiparalela	143D
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA- ATT-CGA-TCC-GAT-TG	Dúplex	B-ADN	1BNA

Como se expuso en el apartado 3 del capítulo 1 de la introducción, el ADN telomérico presenta un alto polimorfismo estructural, lo que significa que una misma secuencia puede adoptar distintas estructuras de G-quadruplex. Las estructuras G4s procedentes de las secuencias de los telómeros generan diferentes topologías dependiendo del metal empleado en su preparación. Así, en presencia de sodio las estructuras G4s adoptan la topología antiparalela (figura 6.1 C), mientras que con potasio generan las topologías híbridas 1 y 2 (figura 6.1 A y B, respectivamente).¹

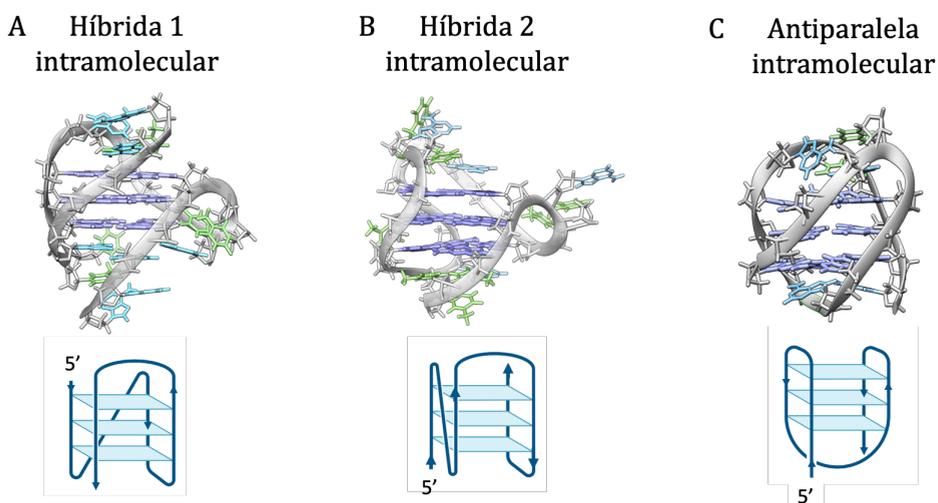


Figura 6.1. (A) Estructuras de G4 intramolecular híbrida 1 y (B) híbrida 2 y (C) antiparalelo de secuencias teloméricas. PDB: 2HY9², 2JSL³ y 143D⁴, respectivamente.

En disolución de K⁺, la estructura híbrida se encuentra en un equilibrio dinámico donde coexisten dos estructuras denominadas híbrida 1 (H1) e híbrida 2 (H2);⁵ la primera presenta una disposición de las tétradas *anti·syn·syn·syn* y la segunda *syn·anti·anti·anti*.⁶ La distinta disposición de

las tétradas genera diferencias estructurales entre ellas, específicamente, en la topología H2 el bucle TTA formado por el extremo 3' tiene una estructura que tapa la tétrada inferior externa (*capping structure*), mediante una conformación de enlaces de hidrógeno T:A:T. Sin embargo, en la estructura híbrida H1 la tétrada inferior externa sí que se encuentra expuesta ya que no presenta esta estructura (figura 6.2).⁷

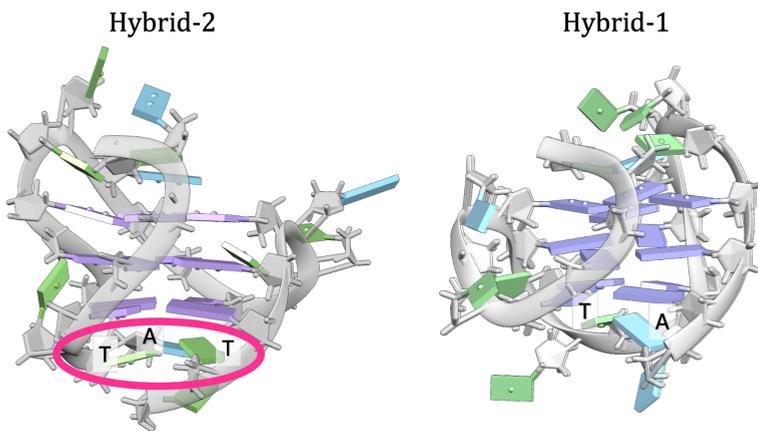


Figura 5.2. Estructuras G4 de las topologías H2 (PDB: 2JSL) y H1 (PDB: 2GKU), se ha destacado la *capping structure* T:A:T en H2.

6.2. Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante desnaturalización térmica (FRET-Melting)

En primer lugar, se utilizó el ensayo de desnaturalización térmica - FRET para determinar la interacción de los ligandos con las distintas estructuras de ADN. Este estudio proporciona un análisis cuantitativo de la estabilidad de las estructuras de ADN en presencia de los ligandos, permitiendo la identificación de los ligandos con mayor interacción con

estas estructuras. Los fundamentos de este ensayo están descritos en el capítulo 3 de *Material y Métodos*.

Brevemente, el ensayo se basa en el fenómeno FRET (*Foster Resonance Energy Transfer*) que ocurre entre dos cromóforos unidos a los extremos de una secuencia de oligonucleótido (FAM y TAMRA). Cuando el oligonucleótido tiene estructura de G4 o dúplex, los cromóforos se encuentran cercanos en el espacio y al excitar el grupo dador, éste le transfiere su energía al grupo aceptor mediante el fenómeno FRET, lo que conduce a la desactivación de la fluorescencia del dador. El incremento de la temperatura despliega la estructura, lo que resulta en un distanciamiento de los grupos cromóforos dificultando la transferencia electrónica FRET, restaurando por tanto la fluorescencia del dador. El registro de la emisión de fluorescencia del dador frente al aumento de temperatura nos proporciona la temperatura de fusión (T_m), temperatura a la cual el 50% de la estructura del ADN se encuentra desplegada. La variación de las temperaturas de fusión del ADN libre (T_m^0) y del ADN en presencia de ligando (T_{mL}) proporciona un valor cuantitativo de la estabilización de la estructura de ADN en presencia del ligando (ΔT_m).

Para comparar los resultados obtenidos para los diferentes ligandos evaluados, M.P. Teulade-Fichou y colaboradores asignaron una escala de valores de ΔT_m . Se considera que un ligando estabiliza fuertemente estructuras G4s cuando proporciona un aumento de entre 10 - 20 °C en la temperatura de desnaturalización, mientras que se considera un estabilizador débil si produce un aumento de entre 2.5 - 5 °C (evaluaciones realizadas en una relación molar de ADN:L 1:5).⁸

Los valores de las variaciones de temperatura de desnaturalización (ΔT_m) de las estructuras de ADN tras la adición de los ligandos sintetizados a distintas relaciones molares se encuentran en los *Anexos*. Para facilitar la visualización de estos resultados se han representado los valores de ΔT_m en diagramas de barras en el texto principal.

6.2.1. Familia 22Me

En primer lugar, se analizaron los ligandos de la familia **22Me**. Se observa un aumento de la temperatura de desnaturalización del ADN al incrementar la cantidad de ligando (figura 6.3). También se observan diferencias dependiendo del ligando, siendo mayor la estabilización del ADN G4 al aumentar el número de cadenas poliamínicas del ligando, lo cual es una consecuencia del aumento del número de grupos amonio con carga positiva. Así pues, la carga positiva a pH 7.4 determinada a partir de los ensayos potenciométricos es de +1.1 para el ligando lineal **22Me-L**, +3.4 para el ligando macrocíclico **22Me-M** y +5.2 para el criptando **22Me-C**. Un mayor número de grupos amonio en el ligando implica un aumento de las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN, este efecto será estudiado con más detalle en el *apartado 6.3*. A su vez, un mayor número de cadenas en los ligandos también conlleva mayor restricción en su movilidad, así como una mayor deficiencia π en el sistema aromático **TPA**.^{9,10}

A continuación, se discutirán los valores de ΔT_m obtenidos para la relación molar ADN:L de 1:10. Los valores de ΔT_m son mayores en el caso del ADN G4 de topología antiparalela HTelo(Na), llegando a alcanzar

valores de 33.2 °C para **22Me-C** y 8.7 °C para **22Me-M**. No obstante, el ligando **22Me-C** también presenta una afinidad significativa por la estructura G4 híbrida HTelo(K), ΔT_m de 11.5 °C, mientras que el ligando macrocíclico **22Me-M** no produce estabilización alguna, $\Delta T_m \sim 0$ °C. Esta observación indica que se produce una interacción más fuerte de los ligandos con la topología de G4 antiparalela que con la topología híbrida, lo que podría estar relacionado con la inaccesibilidad de una de las tétradas terminales en esta última topología por el bucle TTA descrito anteriormente.

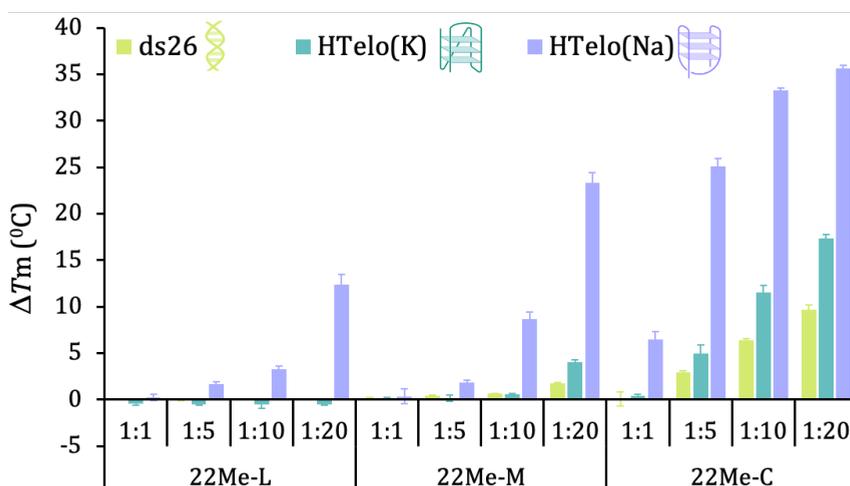


Figura 6.3. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **22Me**.

Otro de los aspectos más relevantes es que estos ligandos presentan un efecto estabilizador muy reducido en su interacción con el ADN dúplex ds26 en comparación con las estructuras G4s. Esto es así incluso para el ligando **22Me-C**, el cual muestra la mayor estabilización para el dúplex

dentro de la serie de ligandos. Para presentar de forma más clara los resultados obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica con ADN G4, se definió el valor de *selectividad* (G^4S) como el cociente entre ΔT_{G4} y ΔT_{ds} para relaciones molares ADN:L de 1:10. Así, cuanto mayor sea valor de G^4S , mayor será la selectividad del ligando por las estructuras G4s. Los valores obtenidos para G^4S se han representado en la figura 6.4.

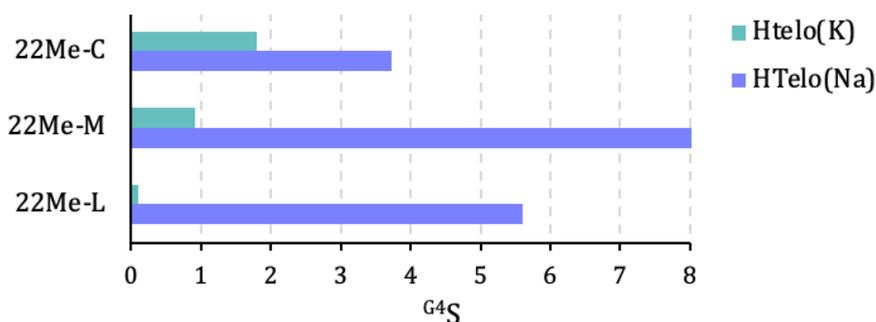


Figura 6.4. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

Los valores de G^4S obtenidos muestran selectividades muy altas para la estructura HTelo(Na), exhibiendo valores de G^4S comprendidos entre 3.8 y 9 para los tres ligandos **22Me**, mientras que los valores para HTelo(K) son bajos, observando que solo el ligando **22Me-C** presenta selectividad por esta estructura ($G^4S = 1.8$). Estos resultados demuestran que nuestro diseño estructural de ligandos es efectivo ya que, a pesar de la elevada carga positiva de los ligandos, la interacción con el ADN dúplex es débil en comparación con la del ADN G4 antiparalelo, y en menor medida para el ADN G4 híbrido.

Con el objetivo de evaluar la selectividad de la familia **22Me**, se realizaron estudios de competición de FRET-Melting, escogiendo el ligando que mostró la mayor ΔT_m , **22Me-C**. El ensayo, detallado en el *capítulo 3 de material y métodos*, consiste en preparar una disolución de ADN G4 marcado en presencia del ligando a una relación molar determinada, e ir aumentando las cantidades del competidor (ADN dúplex no marcado). Aquellos ligandos que sean selectivos para G4s no interaccionarán de forma significativa con el ADN dúplex, de modo que no se modificará la temperatura de desnaturalización del G4. Sin embargo, un ligando que no sea selectivo sí que reducirá la temperatura de desnaturalización del G4 en presencia de dúplex.

En la figura 6.5 se representan los valores de ΔT_m obtenidos para la interacción de HTelo(K) con **22Me-C** en relación molar de 1:10 (G4:L) en presencia de concentraciones crecientes de ADN dúplex.

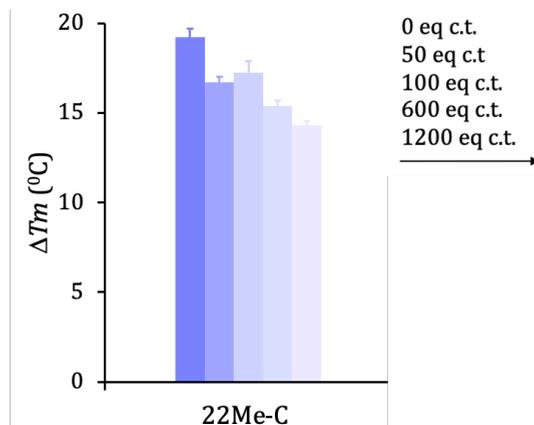


Figura 6.5. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para HTelo(K) con **22Me-C** tras la adición de distintos equivalentes de ADN dúplex.

La adición del competidor dúplex no produce un efecto significativo en la temperatura de desnaturalización del ADN G4 HTelo(K). De hecho, al adicionar 1.200 equivalentes de competidor, el valor de ΔT_m sólo experimenta una disminución de 4 °C, lo que confirma la selectividad de los ligandos sintetizados por el ADN G4 sobre el ADN dúplex.

6.2.2. Familia 22H

La segunda familia en evaluar su interacción con G4s fue la **22H**, en la que no está metilada la amina central de las cadenas poliamínicas.

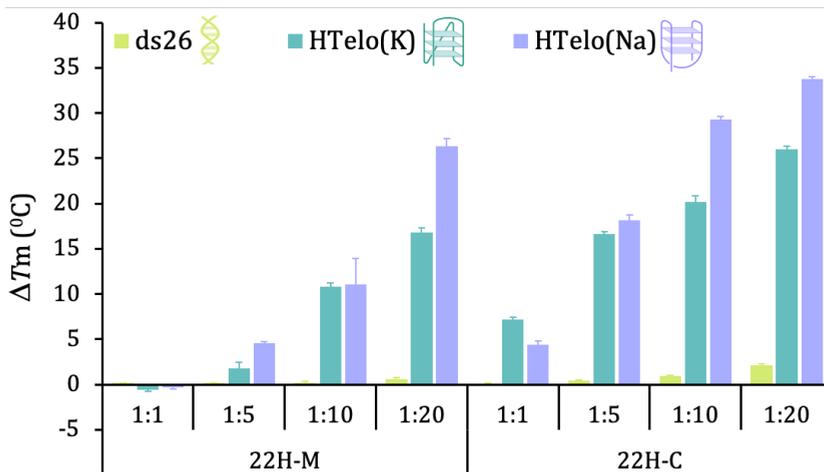


Figura 6.6. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **22H**.

Como en la sección anterior, el criptando **22H-C** muestra valores de ΔT_m más elevados que su análogo macrocíclico **22H-M** (figura 6.6), lo que se puede justificar con el mayor número de cargas positivas sobre el ligando

debido a que contiene una cadena poliamínica adicional. Para la interacción de los ligandos criptando y macrocíclico con el G4 antiparalelo HTelo(Na), se obtuvieron valores de ΔT_m de 29.3 y 11.1 °C, respectivamente (relación molar G4:L de 1:10), estos valores son muy similares a los obtenidos para los análogos metilados **22Me**.

Cabe destacar que los ligandos **22H** tienen un mayor efecto estabilizador que los **22Me** en las estructuras G4s híbridas (HTelo(K)). Así, para los ligandos **22H-C** y **22H-M** se obtuvieron valores de ΔT_m de 20.2 y 10.8 °C, respectivamente. Esto podría ser debido a que los ligandos con el grupo metilo son capaces de distinguir entre ambas topologías híbrida y antiparalela, y que con la pérdida de este grupo se pierde esta diferenciación estructural. Por lo tanto, podría considerarse que los ligandos metilados de la familia **22Me** son selectivos para la topología antiparalela HTelo(Na), mientras que los ligandos de la familia **22H** sólo muestran esta característica a elevadas relaciones G4:L.

Por otro lado, cabe resaltar que en comparación con la familia **22Me**, se produce un aumento de la preferencia de los ligandos por las estructuras de ADN G4 frente al dúplex. Los valores G^4S calculados muestran que la selectividad del ligando **22H-M** es aproximadamente 7 veces mayor que la de su análogo metilado **22Me-M**, y que para **22H-C** es alrededor de 6 veces superior en comparación al presentado por **22Me-C** (figura 6.7). Esto puede ser debido bien a la ausencia del grupo metilo en la amina central de las cadenas, lo que favorecería la formación de puentes de hidrógeno adicionales con lo G4s, o bien, a la pérdida de impedimentos estéricos que favorecería una mejor conformación del ligando para interactuar con G4s.

Adicionalmente, cabe destacar que el ligando macrocíclico presenta mayor selectividad en comparación con el criptando **22H-C**.

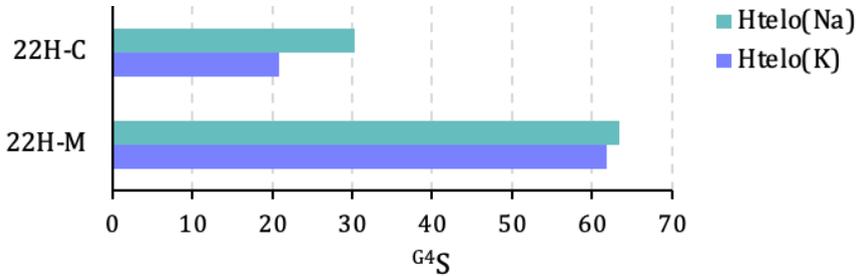


Figura 6.7. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

6.2.3. Familia 33H

A continuación, se determinaron las variaciones de temperatura ΔT_m de los ligandos **33H-L**, **33H-M** y **33H-C** (figura 6.8).

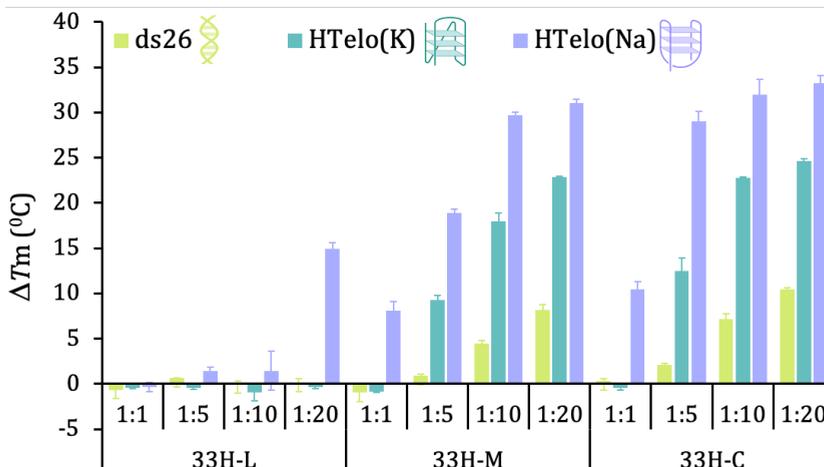


Figura 6.8. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **33H**.

Al igual que en las anteriores familias de ligandos, los ligandos **33H** presentan una mayor capacidad estabilizadora de los G4s a medida que aumenta el número de cadenas poliamínicas sobre estos, siguiendo el orden **33H-C** > **33H-M** > **33H-L**. Cabe destacar que los ligandos de la familia **33H** presentan un mayor grado de protonación que los ligandos discutidos anteriormente, siendo las cargas netas de +6.2, +3.3 y +2.0 para los ligandos **33H-C**, **33H-M** y **33H-L**, respectivamente.

Al comparar el efecto producido por el cambio de conectores etilénicos (**22H**) a propilénicos (**33H**), se observa un ligero incremento en los valores obtenidos de ΔT_m para el ligando macrocíclico **33H-M**. En el caso del ADN G4 HTelo(Na), los ligandos **33H-C** y **33H-M** exhiben valores próximos entre sí, 32.0 y 29.7 °C, respectivamente (a relación molar 1:10 G4:L). Por otra parte, para la interacción del ADN G4 HTelo(K), el ligando **33H-C** obtuvo valores de ΔT_m de 22.8 °C, y **33H-M** presentó 18.0 °C. Como es posible observar, se obtuvieron temperaturas de desnaturalización térmica mayores para el ADN G4 HTelo(Na) que para el HTelo(K), con una diferencia aproximada de 10 °C entre ambas topologías; esta preferencia se mantiene para todas las relaciones molares estudiadas.

Respecto al ligando lineal **33H-L**, al igual que **22Me-L**, solo estabiliza significativamente la secuencia HTelo(Na) para altas relaciones molares G4:L (14.9 °C relación molar 1:20), mientras que no muestra ninguna estabilización destacable para el modelo HTelo(K) ni para el dúplex ds26 ($\Delta T_m \sim 0$ °C).

Por otro lado, los valores de estabilización registrados para el ds26 son muy inferiores a los obtenidos para los G4s, observando de nuevo una marcada selectividad de los ligandos hacia las topologías G4s.

En la figura 6.9 se han representado los valores calculados de G^4S para la relación molar G4:L de 1:10. Como es posible observar en la gráfica, se obtuvieron valores de G^4S moderadamente altos para los ligandos macrocíclico y criptando, siendo el ligando macrocíclico **33H-M** el que presentó un mayor nivel de selectividad hacia las estructuras G4s en comparación con el criptando **33H-C**, en línea con el comportamiento de la familia **22H**. Sin embargo, el ligando lineal no mostró selectividad alguna por las estructuras G4s frente a la doble hélice.

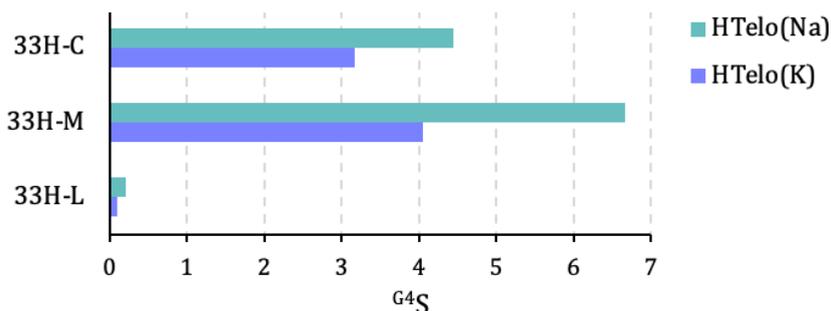


Figura 6.9. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

Para confirmar esta selectividad, se realizaron estudios de competición utilizando HTelo(K) doblemente marcado con los ligandos que mostraron una mayor interacción, **33H-M** y **33H-C**. En la figura 6.10 se muestran los valores de ΔT_m obtenidos. La adición de la estructura dúplex no modifica significativamente la temperatura de desnaturalización ΔT_m

del modelo de G4 HTelo(K) en presencia de ambos ligandos, ya que continúa siendo relativamente alta tras la adición de 1.200 equivalentes de competidor, 13.2 °C para **33H-C** y 9.5 °C para **33H-M**.

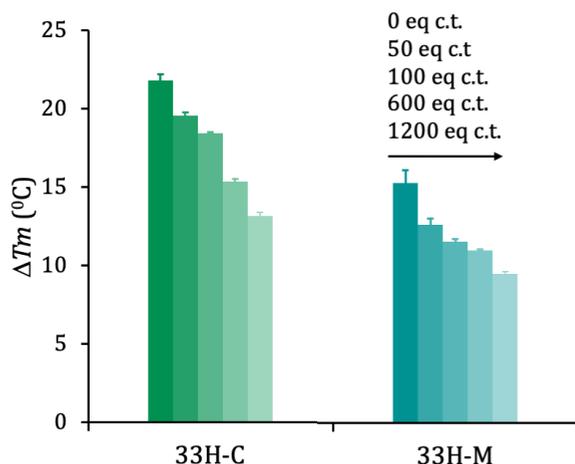


Figura 6.10. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para HTelo(K) con **33H-C** y **33H-M** tras la adición de distintos equivalentes de ADN dúplex.

6.2.4. Familia 33Me

A continuación, se estudió la familia de ligandos con cadenas propilénicas que contienen la amina central metilada, **33Me**.

De nuevo, la capacidad estabilizadora de los ligandos para las estructuras G4s aumenta notoriamente a medida que se añaden cadenas poliamínicas en ellos (figura 6.11), siguiendo el orden **33Me-L** < **33Me-M** < **33Me-C**.

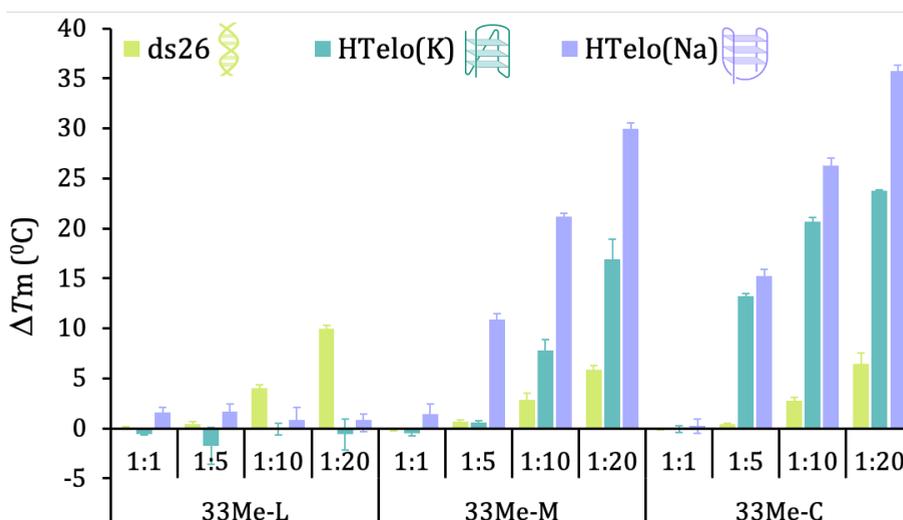


Figura 6.11. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **33Me**.

Los resultados obtenidos muestran valores de ΔT_m para HTelo(K) inferiores a los determinados en la familia **33H**, exhibiendo un descenso aproximado de 10 °C en el macrociclo **33Me-M** (7.8 °C) con respecto a **33H-M** (18.0 °C), y algo menos acusado para el criptando **33Me-C** (20.7 °C) respecto a **33H-C** (22.8 °C), en la relación molar 1:10 (G4:L). Este comportamiento ya fue observado entre la familia metilada **22Me** y la no metilada **22H**.

Además, al igual que sucedía con los ligandos criptando y macrocíclico análogos de las familias **22Me**, **22H** y **33H**, los ligandos **33Me** exhiben una elevada estabilización térmica para HTelo(Na), con valores ΔT_m de 26.3 y 21.2 °C para **33Me-C** y **33Me-M**, respectivamente. Por otro lado, el ligando lineal **33Me-L** pese a no mostrar valores de ΔT_m destacables para las estructuras G4s ($\Delta T_m < 2$ °C), sí que muestra cierta

estabilización para el modelo dúplex ds26 a elevadas relaciones molares ($\Delta T_m = 10.0$ °C G4:L de 1:20).

Asimismo, los ligandos macrocíclico y criptando son selectivos para los G4s frente al ADN dúplex. En la figura 6.12 se observa una elevada selectividad de los ligandos **33Me-C** y **33Me-M** hacia la topología G4 antiparalela HTelo(Na), así como una moderada selectividad para la híbrida HTelo(K). Por otro lado, el ligando lineal **33Me-L** exhibe cierta preferencia por la doble hélice frente a las estructuras G4s ($G^4S < 1$).

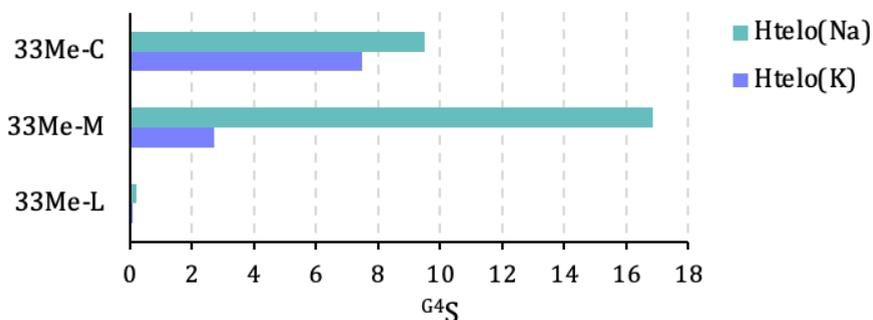


Figura 6.11. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

Una vez más, con el objetivo de establecer la selectividad de los ligandos por las estructuras G4s frente al ADN dúplex, se llevaron a cabo estudios de competición para el ligando **33Me-C**. Los resultados se presentan en la figura 6.12, donde el descenso de la temperatura de desnaturalización de HTelo(K) es de aproximadamente 5 °C tras añadir 1.200 equivalentes del competidor dúplex. Pese a ello, ΔT_m continúa siendo relativamente alta para el ligando criptando **33Me-C** (7.1 °C).

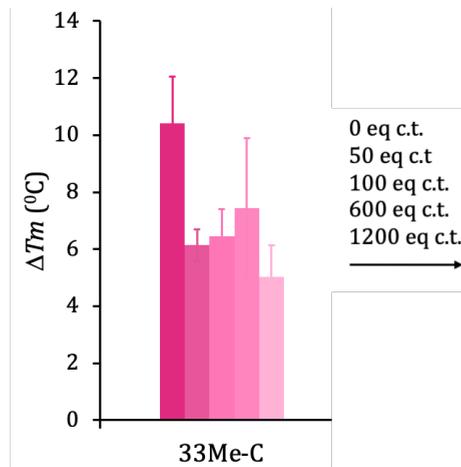


Figura 6.13. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para HTelo(K) con **33Me-C** tras la adición de distintos equivalentes de ADN dúplex.

6.2.5. Familia Cadaverina

A diferencia de los anteriores ligandos analizados, los compuestos pertenecientes a la familia **Cad** están formados por la poliamina lineal cadaverina, y por ello no presentan la amina central en la cadena poliamínica.

Los valores de ΔT_m para el criptando **Cad-C** son mayores que los obtenidos con los ligandos análogos que presentaban el grupo amino en el centro de la cadena (figura 6.14). Para la relación molar 1:10 de G4:L se obtuvieron valores de 24.1 °C para HTelo(K) y 37.6 °C para HTelo(Na), siendo este último el mayor valor ΔT_m obtenido en esta tesis. Estos resultados indican una mayor capacidad estabilizadora de la topología antiparalela HTelo(Na) del criptando que carece del grupo amino central. Esto puede ser atribuido a interacciones hidrófobas con las estructuras G4s.

Por otro lado, para la misma relación molar (G4:L) el ligando macrocíclico **Cad-M** no presenta una variación destacable en la temperatura de desnaturalización (4.0 °C) del HTelo(K), aunque sí en la del HTelo(Na) (10.7 °C). Además, cabe destacar que aunque el ligando macrociclo **Cad-M** no estabiliza significativamente el modelo de ADN de doble hélice en ninguna de las relaciones molares empleadas, el ligando **Cad-C** sí que aparenta estabilizar el dúplex con ΔT_m de 9.2 °C y 12.4 °C a altas relaciones molares (ds:L), 1:10 y 1:20 respectivamente.

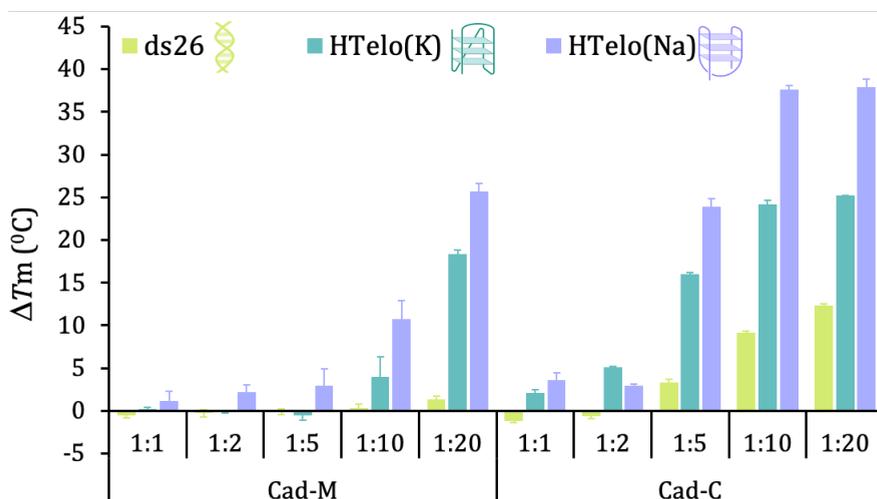


Figura 6.14. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **Cad**.

Para ilustrar mejor la selectividad de los ligandos por las estructuras G4s frente a la doble hélice, se calcularon los valores de G^4S de la misma forma que en los apartados anteriores (figura 6.15). Como puede observarse, para el ligando **Cad-C** se obtuvieron valores de selectividad moderadamente bajos para las dos topologías G4 estudiadas ($2 < G^4S < 4$),

muy similares a los resultados obtenidos para el criptando **22Me-C**. En contraste, el ligando **Cad-M** presenta valores elevados de G^4S , en especial para la topología antiparalela HTelo(Na) ($G^4S = 30$).

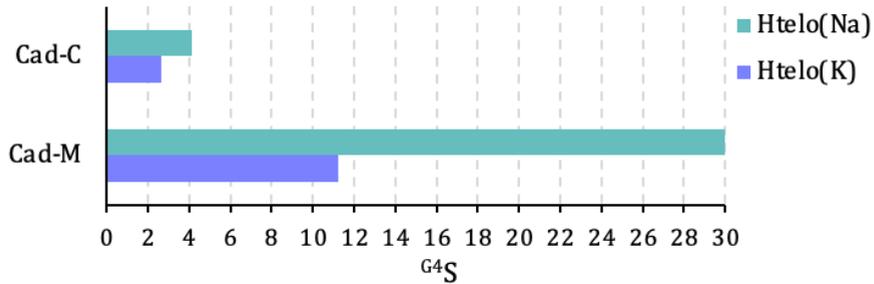


Figura 6.15. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

6.3. Relación entre las cargas positivas y ΔT_m

A medida que aumenta el número de cadenas poliamínicas en los ligandos, se incrementan las variaciones de temperatura de desnaturalización. Como se ha discutido previamente, esto podría ser debido al aumento de cargas positivas sobre los ligandos, las cuales favorecerían las interacciones electrostáticas con las estructuras G4s. Para comprobar este comportamiento se ha presentado la carga positiva de los ligandos a pH 7.4^a frente a los valores de ΔT_m obtenidos (figura 6.16).

^aSe trata del pH en el cual se realizaron los experimentos gracias al empleo del tampón 100 mM KCl / 10 mM LiCac o 100 mM NaCl / 10 mM NaCac según los respectivos oligonucleótidos.

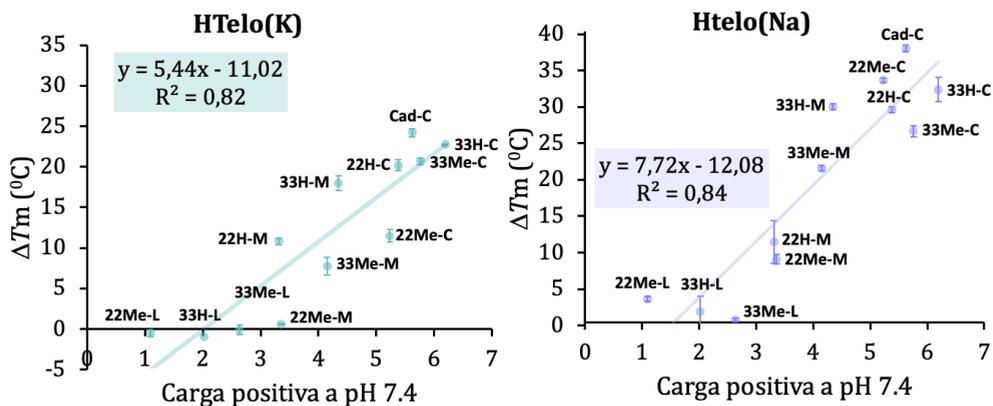


Figura 6.16. Representaciones gráficas de ΔT_m (°C) de HTelo(K) y HTelo(K) en presencia de los ligandos estudiados a relación molar 1:10 (G4:L) frente a la carga neta positiva a pH 7.4, calculada a partir del diagrama de especies.

Independientemente de la cadena poliamínica incluida en los ligandos, los mayores valores de ΔT_m obtenidos corresponden a los compuestos de topología criptando, seguidamente a los macrocíclicos y finalmente, los valores más bajos de ΔT_m corresponden a los ligandos lineales. Estos resultados enfatizan la relación existente entre el número de cargas positivas en los ligandos y su capacidad de estabilizar las estructuras G4s. Esta perspectiva constituye una herramienta en la optimización del diseño de nuevos ligandos G4s.

Asimismo, se representaron los valores de ΔT_m para el modelo de ADN dúplex frente a la carga neta positiva de los ligandos a pH 7.4 (figura 6.17). La pendiente de la recta (1.27) indica que no hay una gran diferencia entre la baja estabilización proporcionada por los diversos ligandos, haciendo referencia de nuevo a la mayor preferencia de los ligandos por estabilizar estructuras G4s.

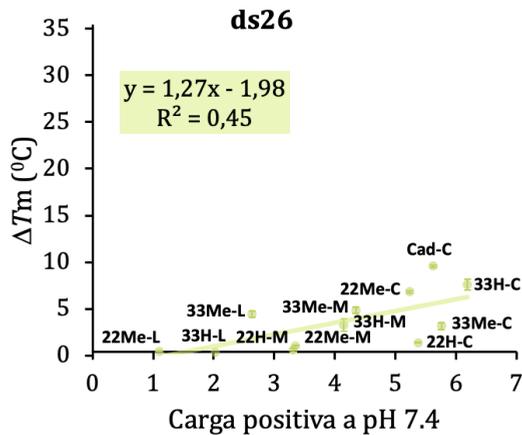


Figura 6.17. Representación gráfica de ΔT_m (°C) de ds26 en presencia de los ligandos estudiados a relación molar 1:10 (ds:L) frente a la carga neta positiva a pH 7.4, calculada a partir del diagrama de especies.

6.4. Ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol

A continuación, se estudió la afinidad de los ligandos sintetizados hacia las estructuras de G-quadruplex teloméricas HTelo(Na) y HTelo(K), mediante los ensayos de desplazamiento del naranja de tiazol. Se analizó también la estructura del ADN dúplex (ds26) para evaluar la selectividad de los ligandos por las estructuras G4s.

En el capítulo 3 de *Material y Métodos* se describió el fundamento teórico y la metodología de este ensayo, no obstante, brevemente, se trata de un método de desplazamiento con un indicador fluorescente. El indicador seleccionado es el naranja de tiazol (TO, *Thiazole Orange*), una molécula capaz de interactuar con el ADN G4 y el dúplex con una afinidad similar. La afinidad por el ADN de la molécula estudiada se cuantifica mediante el parámetro IC_{50} , que es la concentración necesaria para desplazar el 50% del TO en el ADN.

Interacción con G4s monoméricos

Las valoraciones de emisión de fluorescencia del desplazamiento del naranja de tiazol con los ligandos se han representado gráficamente en el apartado de *Anexos*, y los valores de IC₅₀ calculados a partir de ellas han sido recogidos en la tabla 6.2. Asimismo, en la discusión de los resultados también se ha representado el porcentaje de naranja de tiazol desplazado (%TO) para cada ADN en función de la concentración de ligando añadido.

Tabla 6.2. Valores de IC₅₀ (μM) determinados.

Ligando	ds26	HTelo(Na)	HTelo(K)	G⁴S Na	G⁴S K
22Me-C	>5	0.83	1.00	4.5	3.8
22Me-M	4.97	1.56	1.14	3.2	4.3
22Me-L	>5	>5	>5	0.4*	1.1*
33Me-C	2.41	0.31	0.53	7.7	4.5
33Me-M	3.71	1.22	0.92	3.0	4.0
33Me-L	>5	>5	>5	0.1*	1.0*
33H-C	0.81	0.28	0.28	2.9	2.9
33H-M	3.10	0.34	0.51	9.0	6.1
33H-L	>5	>5	>5	0.4	0.8
22H-C	3.30	0.45	1.00	7.4	3.3
22H-M	4.97	1.60	1.13	3.1	4.4
Cad-C	1.67	0.51	0.29	3.3	5.8
Cad-M	3.43	2.80	1.40	1.2	2.4

*Valores de G⁴S estimados debido a la débil interacción con el ADN dúplex.

6.4.1. Familia **22Me**

Cuando se analiza la interacción de los ligandos macrocíclico y criptando de la familia **22Me** con las estructuras G4s teloméricas (tabla 6.2.), se observa que el criptando **22Me-C** exhibe una gran capacidad para interaccionar con estas estructuras (IC_{50} de 0.83 y 1.00 μM en Na^+ y K^+ , respectivamente), seguido por el ligando macrocíclico **22Me-M** (IC_{50} de 1.56 y 1.14 μM en Na^+ y K^+ , respectivamente). En cambio, con estos ligandos se obtienen valores de IC_{50} elevados para la estructura de doble hélice ($IC_{50} > 5 \mu\text{M}$), lo que indica una clara preferencia por las estructuras G4s. Todos estos resultados están de acuerdo con los hechos experimentales observados en el ensayo anterior de desnaturalización térmica. Por otro lado, en el intervalo de concentraciones de ligando utilizado (0 – 5 μM), el ligando lineal **22Me-L** no fue capaz de desplazar el 50% del TO en ninguna de las estructuras de ADN.

Al examinar las representaciones gráficas del %TO desplazado (figura 6.18), se observa como el TO es desplazado en menor medida del ADN de doble hélice por los ligandos **22Me-C** y **22Me-M** que en el caso de las estructuras G4s, lo que indica una mayor preferencia por estas últimas. En contraste, el ligando lineal **22Me-L** presenta unas curvas de desplazamiento del %TO muy distintas a las obtenidas por **22Me-C** y **22Me-M**, siendo la variación del %TO para las tres estructuras de ADN prácticamente despreciable con la adición sucesiva de ligando, lo que sugiere una menor interacción de éste.

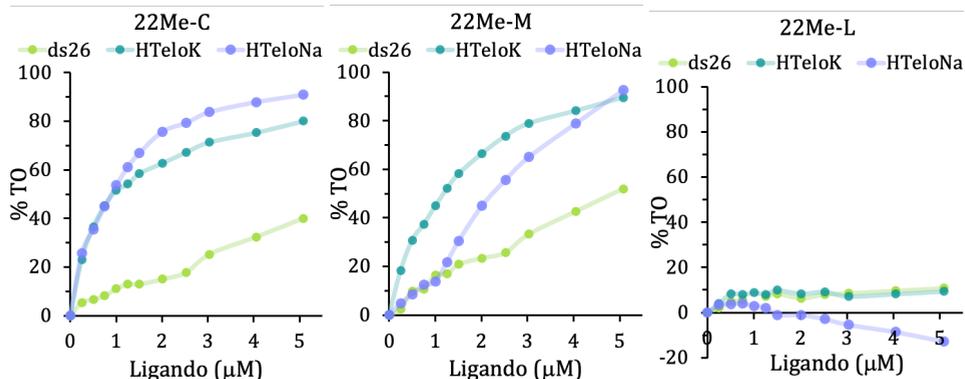


Figura 6.18. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de HTelo(Na), HTelo(K) y ds26 para los ligandos **22Me**.

6.4.2. Familia 33Me

Como se puede ver en las curvas de desplazamiento del %TO representadas en la figura 6.19, los ligandos de cadenas propilénicas metiladas **33Me** macrocíclico y criptando muestran una gran capacidad para desplazar el TO de las estructuras G4s, en especial el ligando criptando **33Me-C**, que exhibe valores de IC_{50} para HTelo(Na) y HTelo(K) de 0.31 y 0.43 μM , respectivamente. El ligando **33Me-M** presenta valores de IC_{50} de 1.22 y 0.92 μM para HTelo(Na) y HTelo(K), similares a los obtenidos para su análogo **22Me-M**.

Asimismo, estos ligandos mostraron menor capacidad para desplazar el TO en la estructura ds26, con valores de IC_{50} más elevados (2.41 y 3.71 μM , respectivamente). En contraste, el ligando lineal **33Me-L** no fue capaz de desplazar el TO eficazmente en las estructuras G4s ni en la doble hélice ($IC_{50} > 5 \mu\text{M}$).

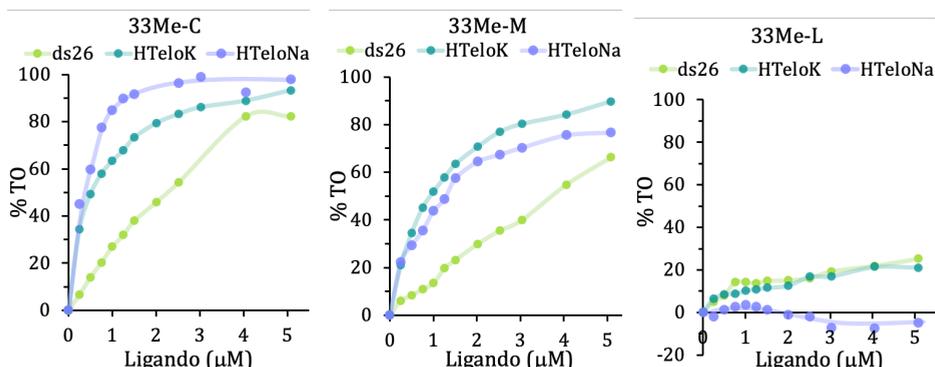


Figura 6.19. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de HTelo(Na), HTelo(K) y ds26 para los ligandos **33Me**.

6.4.3. Familia 33H

Como se puede ver en la figura 6.20, los ligandos **33H-C** y **33H-M** también muestran una gran capacidad para desplazar el TO de las estructuras G4s teloméricas; de hecho, tanto el criptando **33H-C** como el macrociclo **33H-M** presentan los valores de IC_{50} más bajos de todos los ligandos estudiados. El ligando **33H-C** exhibe IC_{50} de $0.28 \mu\text{M}$ para ambas topologías HTelo(Na) y HTelo(K), y el ligando **33H-M** exhibe IC_{50} de 0.34 y $0.51 \mu\text{M}$ en Na^+ y K^+ , respectivamente. Estos resultados respaldan los ensayos de desnaturalización térmica, donde ya se observó que los ligandos **33H-C** y **33H-M** tenían una elevada capacidad de estabilización de las estructuras G4s teloméricas.

Asimismo, cabe indicar que estos ligandos también desplazan el TO de la estructura de doble hélice, aunque en menor medida (IC_{50} 0.81 y $3.10 \mu\text{M}$ para **33H-C** y **33H-M**, respectivamente), lo que sugiere una selectividad por las estructuras G4s algo más baja que el resto de los

ligandos analizados. Por otro lado, el ligando lineal **33H-L** no interacciona significativamente con ninguna de las estructuras de ADN estudiadas ($IC_{50} < 5 \mu M$).

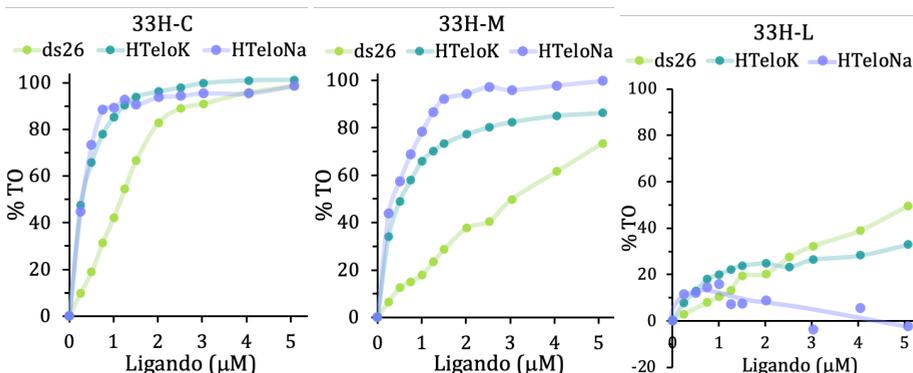


Figura 6.20. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de HTelo(Na), HTelo(K) y ds26 para los ligandos **33H**.

6.4.4. Familia 22H

La familia de ligandos **22H** muestra también una gran capacidad para interactuar con las estructuras G4s teloméricas (figura 6.21); en particular, el criptando **22H-C** presenta para las estructuras G4s HTelo(Na) y HTelo(K) valores IC_{50} de 0.50 y 1.00 μM , respectivamente. El ligando macrocíclico **22H-M** muestra para HTelo valores más elevados de IC_{50} (1.6 y 1.13 μM en Na^+ y K^+ , respectivamente), muy similares a los de su análogo **22Me-M**.

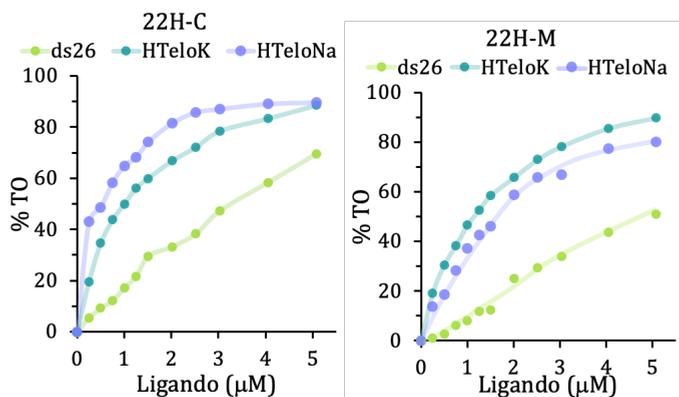


Figura 6.21. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de HTelo(Na⁺), HTelo(K⁺) y ds26 para los ligandos **22H**.

6.4.5. Familia Cad

Por último, el ligando criptando **Cad-C** muestra una gran capacidad para interactuar con las estructuras G4s teloméricas (figura 6.22), obteniéndose valores IC₅₀ de 0.51 y 0.29 μM para las topologías en Na⁺ y K⁺, respectivamente. El ligando macrocíclico **Cad-M** presenta una interacción más débil con estas estructuras, presentando valores IC₅₀ de 2.80 y 1.4 μM para los G4s en Na⁺ y K⁺, respectivamente. Además, los ligandos **Cad-C** y **Cad-M** presentan cierta preferencia por las estructuras G4s, ya que los IC₅₀ obtenidos para la doble hélice son más elevados que los obtenidos por las estructuras G4s, siendo 1.67 y 3.43 μM, respectivamente.

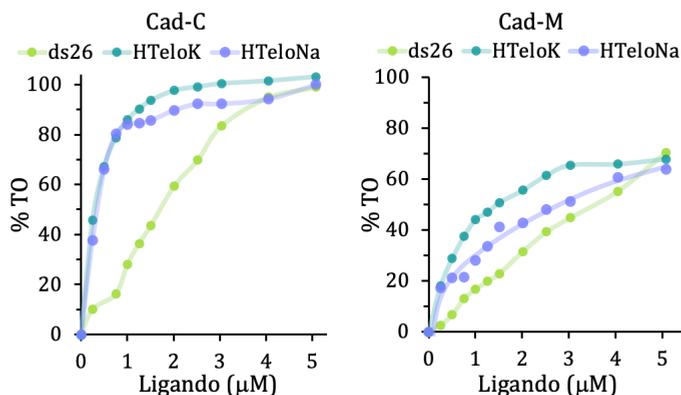


Figura 6.22. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de HTelo(Na), HTelo(K) y ds26 para los ligandos **Cad**.

En la tabla 6.2 se han recogido también los valores calculados de selectividad de los ligandos para las estructuras G4s estudiadas (G^4S). Como se detalló en el apartado de *Material y métodos*, G^4S se calcula a partir del cociente de los valores de IC_{50} obtenidos para HTelo(Na) y HTelo(K) entre los del dúplex. De esta manera los ligandos pueden ser clasificados en selectivos, aquellos que presentan valores de $G^4S > 1$, y no selectivos, con $G^4S \sim 1$.

Así, los ligandos que presentaron mayor selectividad frente a la doble hélice son **33Me-C**, **33H-M** y **22H-C** para la topología HTelo(Na⁺), y para la topología HTelo(K⁺) **33Me-C**, **33H-M** y **Cad-C**. A su vez, estos ligandos mostraron elevadas capacidades de estabilización térmica para las estructuras G4s teloméricas estudiadas, de forma que puede afirmarse que los ligandos sintetizados son capaces de estabilizar e interactuar con las estructuras G4s de forma efectiva.

6.5. Estudio computacional de la interacción de los ligandos de la familia 22Me con ADN G4 telomérico

Con el objetivo de determinar los factores que gobiernan la interacción de los ligandos con el ADN G4 monomérico de los telómeros, así como analizar la selectividad de los ligandos por las estructuras G4s frente al ADN de doble hélice, se han realizado estudios computacionales de dinámica (MD, *molecular dynamics*).

El sistema de doble hélice ds26 se construyó mediante el software AMBER16, mientras que la estructura del monómero de G4 fue construida a partir de la estructura de la secuencia telomérica d[AGGG(TTAGGG)₃] determinada por RMN con la conformación híbrida 1 (PDB: 2GKU)¹¹ en presencia de potasio. De ahora en adelante en el texto esta última estructura será denominada 1hG4.

Asimismo, se construyeron los ligandos a partir de la estructura de la trifenilamina descrita en la bibliografía,¹² y se consideró el grado de protonación de los ligandos a pH fisiológico a través del análisis de los diagramas de distribución de especies en función del pH, siendo las siguientes especies las empleadas para cada ligando: **H₃(22Me-L)³⁺**, **H₄(22Me-M)⁴⁺** y **H₆(22Me-C)⁶⁺**.

En el *capítulo 3 de Material y métodos* se encuentra la información detallada acerca de la realización de estos estudios.

6.5.1. Interacción con el monómero de G4

En las figuras 6.23 – 6.28 se han representado las conformaciones de mínima energía obtenidas para las interacciones entre la estructura de G4 híbrida 1 y los ligandos de la familia **22Me**. Todas las representaciones se han realizado utilizando el programa ChimeraX.

En primer lugar, se ha analizado el sistema del criptando **22Me-C** con la estructura 1hG4 (figura 6.23). El ligando interactúa con el G4 a través de la tétrada externa superior expuesta, basándose esta interacción en diversas interacciones supramoleculares.

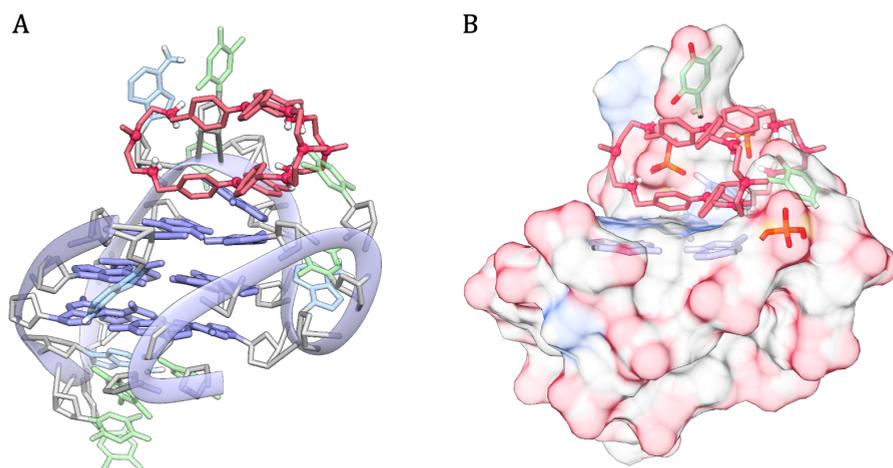


Figura 6.23. Representación de la interacción entre **22Me-C** y la estructura 1hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie coloreada en rojo regiones con cargas negativas y en azul aromáticas.

Para analizar más detalladamente las posibles interacciones, en la figura 6.24 se muestra una ampliación de la figura anterior. En ella se observa la formación de hasta siete puentes salinos entre los grupos amonio

cargados positivamente del ligando y los grupos fosfato del esqueleto de 1hG4, así como con los grupos carbonilo de las timinas cercanas, con una distancia promedio $d_{O\dots+H-N} \approx 1.97 \text{ \AA}$. Además, se observa el apilamiento π entre las guaninas de la tétrada externa superior y los grupos fenilo de una unidad de **TPA**, a la vez que la segunda unidad de **TPA** se encuentra apilada sobre ésta con una disposición de los planos paralela, proporcionando un reforzamiento en la estabilidad como se había especulado anteriormente. La distancia promedio entre los planos de la tétrada y la unidad de **TPA** es de 3.75 \AA y la distancia entre ambos planos de **TPA** es de 4.35 \AA .

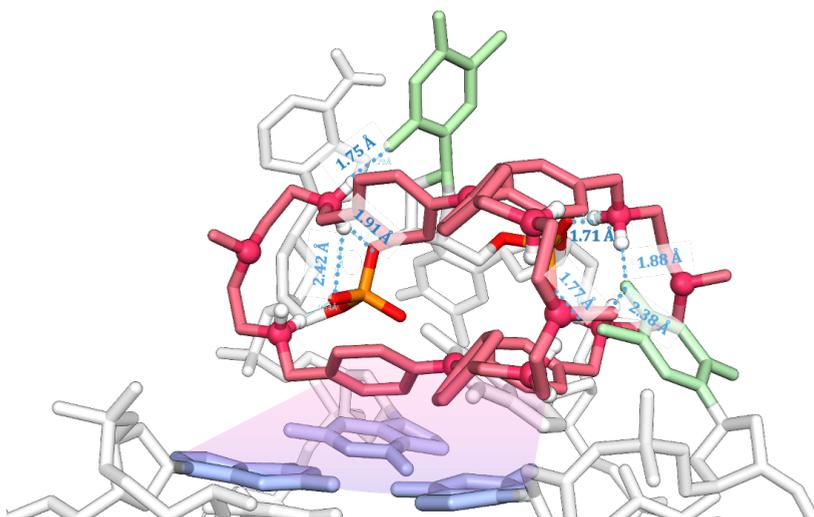


Figura 6.24. Visualización de las distancias de enlace en \AA de las interacciones entre **22Me-C** y 1hG4.

La conformación obtenida para el sistema formado entre 1hG4 y el ligando macrocíclico **22Me-M** (figura 6.25) sugiere que la interacción se produce de forma similar al caso anterior del criptando **22Me-C**.

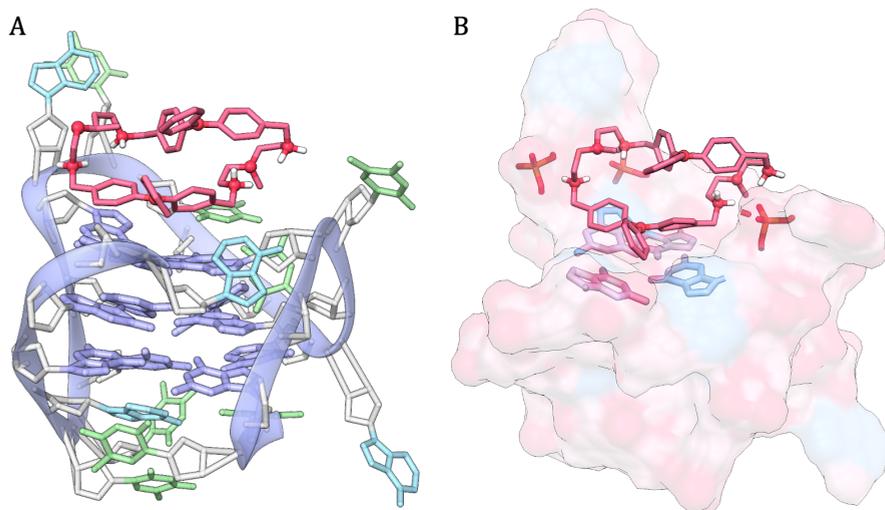


Figura 6.25. Representación de la interacción entre **22Me-M** y la estructura 1hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie coloreada en rojo regiones con cargas negativas y en azul aromáticas.

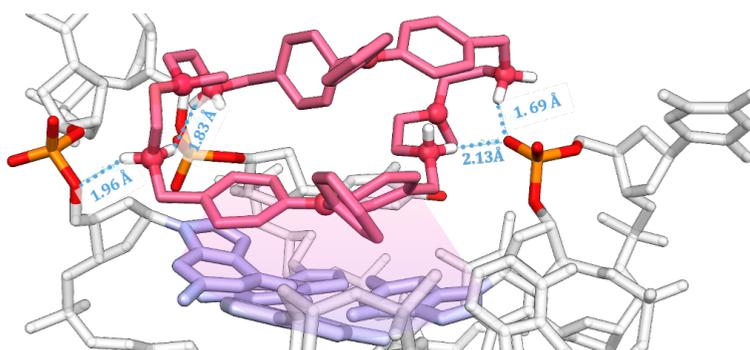


Figura 6.26. Visualización de las distancias de enlace en Å de las interacciones entre **22Me-M** y 1hG4.

El ligando se aloja en la tétrada superior externa del 1hG4, quedando una unidad del **TPA** sobre el plano de la tétrada y la segunda unidad de **TPA** apilada sobre la primera. De nuevo, se ha representado una imagen más detallada de este sistema (figura 6.26), donde se observan las

interacciones de apilamiento π entre los grupos fenilo de una unidad de **TPA** con las guaninas de la tétrada externa con distancia promedio de 3.96 Å, y una distancia entre ambos planos de **TPA** de 4.39 Å. Además, estas interacciones se encuentran reforzadas por la formación de numerosos puentes salinos entre los grupos amonio protonados de las cadenas poliamínicas del ligando y los grupos fosfato del esqueleto de ADN. En total se observan cuatro puentes salinos con una distancia promedio de enlace $d_{O/N...+H-N} \approx 1.90$ Å.

Finalmente, en la figura 6.27 se muestra el conformero de mínima energía del sistema formado entre el ligando lineal **22Me-L** y el 1hG4. A diferencia de los ligandos macrocíclico y criptando, el **22Me-L** interactúa con la estructura G4 de forma más externa, sin observarse el apilamiento ninguna de las unidades de **TPA** a la tétrada externa. Al examinar la unión entre el **22Me-L** y el 1hG4 más detalladamente (figura 6.28), se observa la formación de tres puentes salinos entre los grupos amonio del ligando y los grupos fosfatos del ADN con una distancia promedio de 1.88 Å.

El análisis de la interacción entre los ligandos de la familia **22Me** y 1hG4 revela una mayor interacción a medida que aumenta el número de cadenas poliamínicas sobre el ligando, debido a que se producirán un mayor número de interacciones electrostáticas. Esto se evidenció mediante las técnicas espectroscópicas de desnaturalización térmica y desplazamiento de indicador fluorescente, que mostraron la mayor estabilización e interacción del ligando criptando con las estructuras G4s teloméricas.

Asimismo, estos resultados indican que los ligandos macrocíclico y criptando poseen una mayor capacidad para establecer apilamiento π con la tétrada externa del G4 que el ligando lineal. Esto puede estar relacionado con la mayor rigidez del sistema, resultado del incremento en el número de cadenas poliamínicas que restringen el movimiento de las unidades de **TPA**, haciendo que se encuentren en una conformación más plana. Esta restricción, a su vez, favorecería el apilamiento de la segunda unidad de **TPA** sobre la primera. Por otro lado, el ligando lineal no interacciona ni estabiliza de forma significativa ninguna de las estructuras de ADN estudiadas, lo cual podría deberse a una interacción más débil y deslocalizada con el esqueleto de azúcar fosfato del ADN y no con las regiones características de las estructuras G4s, como han sugerido los resultados de dinámica molecular.

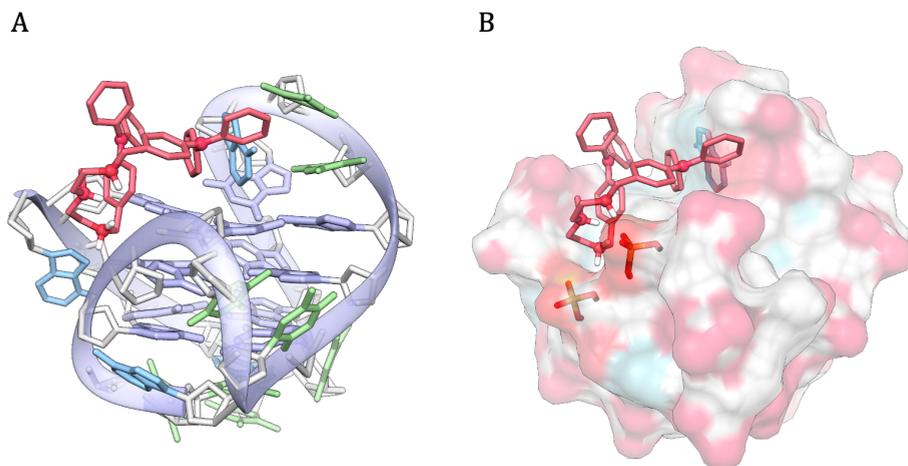


Figura 6.27. Representación de la interacción entre **22Me-L** y la estructura 1hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie coloreada en rojo regiones con cargas negativas y en azul aromáticas.

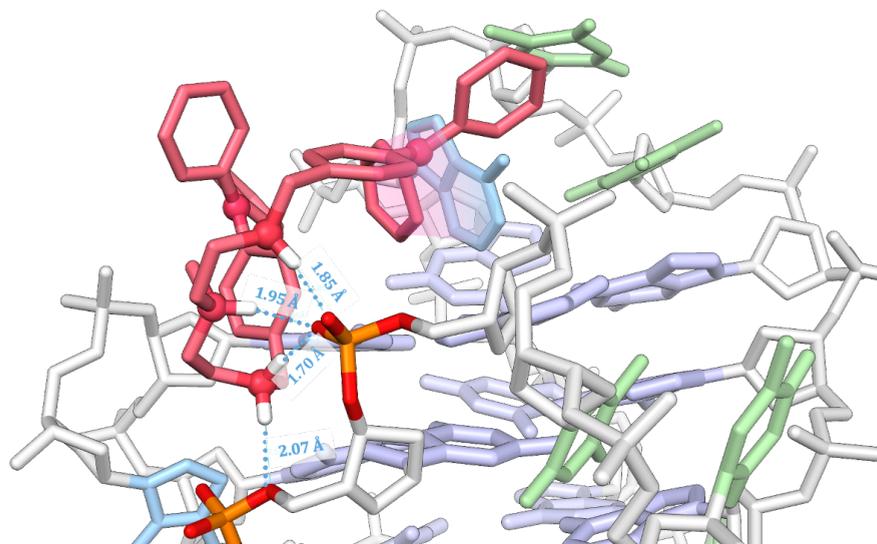


Figura 6.28. Visualización de las distancias de enlace en Å de las interacciones entre **22Me-M** y 1hG4.

6.5.2. Interacción con la doble hélice

Respecto a los estudios computacionales realizados con el ADN de doble hélice, se analizaron de nuevo los ligandos pertenecientes a la familia **22Me**. En las siguientes figuras (6.29, -30 y -31) se han representado las conformaciones de mínima energía para la interacción de los ligandos con el surco mayor y el surco menor de la estructura de doble hélice.

En los tres ligandos **22Me**, lineal, macrocíclico y criptando, la interacción fundamental es de tipo electrostático, y está basada en la formación de puentes de hidrógeno entre sus grupos amonio y el esqueleto azúcar-fosfato del ADN cargado negativamente. Sin embargo, mientras que el ligando lineal muestra una preferencia mayor por el surco menor que por el mayor (36 kcal/mol de diferencia), los ligandos

macrociclo y criptando muestran preferencia por el surco mayor frente al menor (diferencia de energía de 13 y 17 kcal/mol, respectivamente).

Estos resultados pueden asociarse a la topología lineal del ligando, ya que puede acoplarse perfectamente a lo largo del surco menor desplegando la cadena poliamínica. En contraste, el mayor tamaño de los ligandos macrocíclico y criptando hace que se dispongan de forma más adecuada en el surco mayor ya que tiene unas dimensiones más amplias con las bases expuestas al exterior.

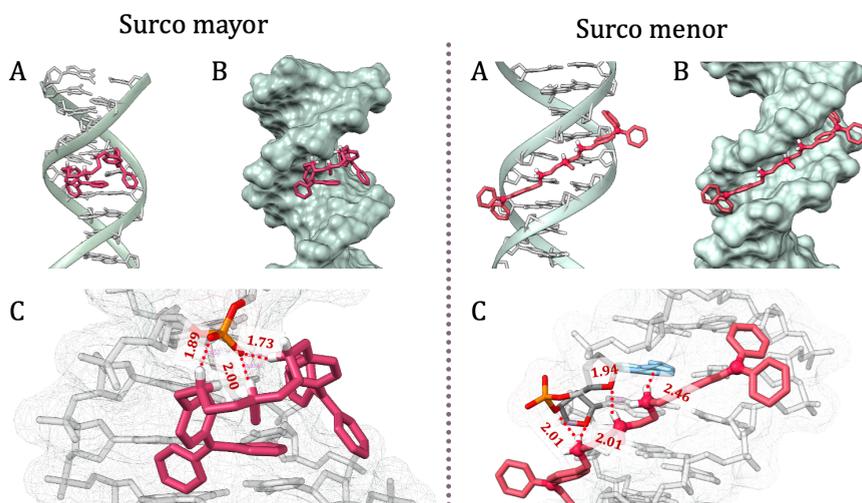


Figura 6.29. Ilustración de la interacción entre **22Me-L** y el modelo de doble hélice representado en (A) modelo molecular, (B) superficie y (C) vista detallada.

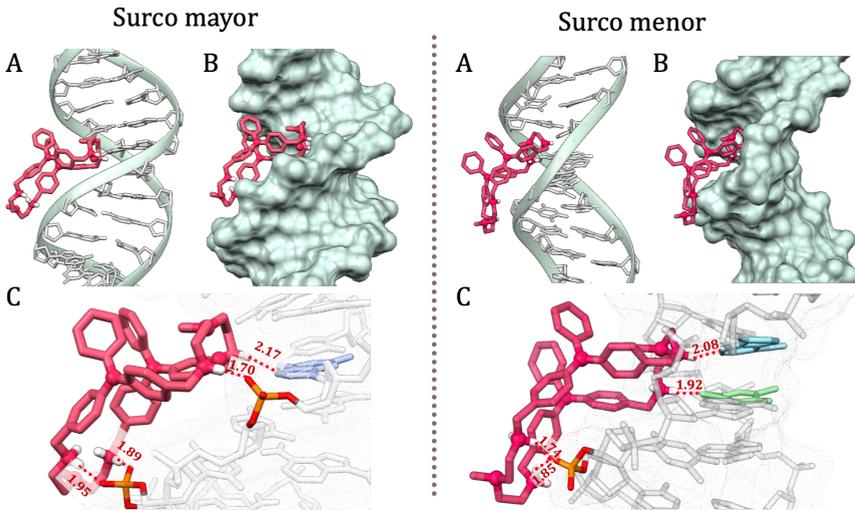


Figura 6.30. Ilustración de la interacción entre **22Me-M** y el modelo de doble hélice representado en (A) modelo molecular, (B) superficie y (C) vista detallada.

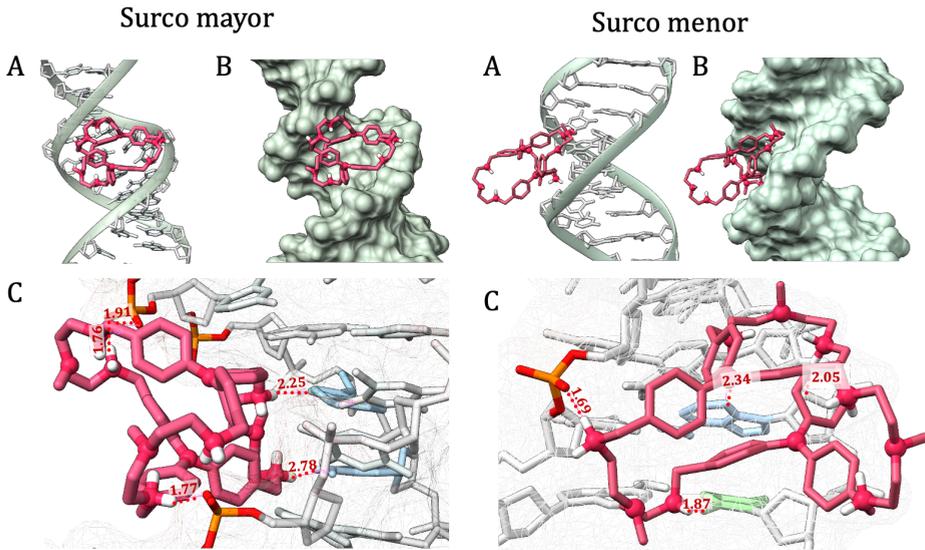


Figura 6.31. Ilustración de la interacción entre **22Me-C** y el modelo de doble hélice representado en (A) modelo molecular, (B) superficie y (C) vista detallada.

6.6. Bibliografía

1. Dai, J., Carver, M. & Yang, D. Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **90**, 1172–83 (2008).
2. Dai, J. *et al.* Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2440–2450 (2007).
3. Phan, A. T., Kuryavyi, V., Luu, K. N. & Patel, D. J. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6517–6525 (2007).
4. Wang, Y. & Patel, D. J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure* **1**, 263–282 (1993).
5. Dai, J., Carver, M., Punchihewa, C., Jones, R. A. & Yang, D. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4927–4940 (2007).
6. Phan, A. T., Luu, K. N. & Patel, D. J. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5715–5719 (2006).
7. Lin, C. & Yang, D. Human Telomeric G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex-Interactive Compounds, *Methods Mol. Biol.* **1587**, 171–196 (2017).

8. Mergny, J.-L. *et al.* Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3062–3067 (2001).
9. Andréasson, M., Bhuma, N., Pemberton, N. & Chorell, E. Using Macrocyclic G-Quadruplex Ligands to Decipher the Interactions Between Small Molecules and G-Quadruplex DNA. *Chemistry* **28**, (2022).
10. Cockroft, S. L. *et al.* Substituent effects on aromatic stacking interactions. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 1062 (2007).
11. Luu, K. N., Phan, A. T., Kuryavyi, V., Lacroix, L. & Patel, D. J. Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9963–9970 (2006).
12. Hua, C., Baldansuren, A., Tuna, F., Collison, D. & D'Alessandro, D. M. In Situ Spectroelectrochemical Investigations of the Redox-Active Tris[4-(pyridin-4-yl)phenyl]amine Ligand and a Zn²⁺ Coordination Framework. *Inorg. Chem.* **55**, 7270–7280 (2016).



Interacción con G4 multimérico



Determinación de la
interacción de los ligandos
poliamínicos sintetizados con
ADN G4 multimérico

Capítulo 7. Determinación de la interacción de los ligandos poliamínicos con ADN G4 multimérico

Tras estudiar la interacción de los ligandos sintetizados con estructuras G-quadruplex monoméricas, se continuó con el estudio de estructuras G4s de orden superior, también conocidas como multímeros de G4. Con este propósito, se utilizó un modelo de G4 multimérico derivado de los telómeros, que como ya se detalló en la introducción, es de gran interés debido a su función como regulador de la estabilidad de los telómeros, y a su potencial como diana terapéutica en terapias anticancerígenas.^{1,2}

Inicialmente, se utilizó el ensayo de desnaturalización térmica por FRET para determinar la interacción ligando-ADN. Además, esta técnica nos permite comparar los resultados con los obtenidos para los G4s monoméricos. El oligonucleótido empleado se abrevia como G2T1, cuya secuencia es [AGGG(TTA-GGG)₇].³ Este modelo G2T1 genera una superestructura de ADN G4 dimérica que consta de dos unidades G4 unidas entre sí por el bucle TTA (figura 7.1). Además, al igual que los G4s monoméricos estudiados, el G2T1 presenta polimorfismo estructural en presencia de diferentes cationes.

La estabilización del G2T1 en presencia de K⁺ da lugar a una estructura G4 dimérica mixta formada por las topologías híbrida 1 e híbrida 2. Según estudios de modelización computacional, la combinación de la topología mixta híbrida 1-2 (formada por un G4 híbrido 1 en el extremo 5' y un G4 híbrido 2 en el extremo 3') junto con la topología mixta híbrida 2-1 (formada por un G4 híbrido 2 en el extremo

5' y un G4 híbrido 1 en el extremo 3'), presentan interacciones óptimas y estructuras más estables que las otras posibles combinaciones de topologías mixtas, híbrida 1-1 (formada por dos G4 híbrido 1) e híbrida 2-2 (formada por dos G4 híbrido 2).^{4,5} Por otro lado, se ha demostrado que las cadenas largas de ADN telomérico G2T1 adoptan preferentemente la topología de G4 antiparalela en presencia de Na⁺.^{6,7}

Hasta el momento, no ha podido identificarse por técnicas de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución la estructura precisa del G-quadruplex formado por una única hebra telomérica debido a las limitaciones inherentes en el trabajo con secuencias largas de ADN. No obstante, se ha logrado simular estructuras de orden superior basándose en las estructuras de alta resolución de G4s monoméricos.⁸ Del mismo modo, en el presente trabajo se emplearon métodos computacionales para generar modelos de G4 diméricos a partir de estructuras G4s monoméricas, y se investigó el mecanismo de unión de los ligandos sintetizados a dichos modelos de ADN G4 dimérico.

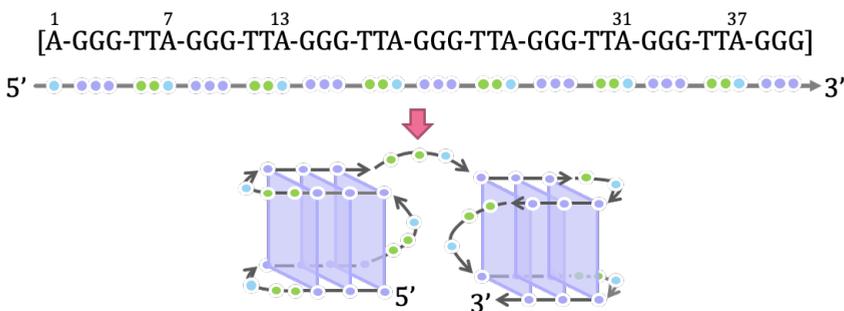


Figura 7.1. Esquema ilustrativo de la secuencia G2T1 y representación del dímero de G4 que forma.

7.1. Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante ensayos de desnaturalización térmica (FRET-Melting)

Como se ha explicado anteriormente, el ensayo de desnaturalización térmica proporciona un análisis cuantitativo de la estabilización de las estructuras de ADN en presencia de los ligandos, lo que permite identificar a aquellos más efectivos para estabilizar las estructuras de ADN G4.

En los siguientes apartados se han dividido los estudios de desnaturalización térmica en función de las familias de ligandos. Los valores de la variación de temperatura de desnaturalización (ΔT_m) de las secuencias G2T1 (dimer) tras la adición de los ligandos a distintas relaciones molares se encuentran en el apartado de *Anexos*. Para facilitar la visualización de estos resultados se han representado los valores de ΔT_m en diagramas de barras.

Las estructuras se han referenciado atendiendo a su nombre, siendo ds26 el dúplex, HTelo el G4 monomérico y Dimer el G4 dimérico. Se ha incluido el catión utilizado en el nombre (Na⁺ o K⁺) para hacer referencia a la topología adoptada por el G4 en disolución.

7.1.1. Familia 22Me

Al igual que en los estudios de desnaturalización térmica con modelos de G4 monomérico, las temperaturas de desnaturalización aumentan al incrementar el número de cadenas poliamínicas en el ligando (figura 7.2). Esta observación puede estar ligada al aumento del número de cargas positivas de los ligandos, lo que puede reforzar las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato cargados negativamente en los surcos y los bucles del ADN G4 dimérico. Además, como se comentó anteriormente, el aumento del número de cadenas poliamínicas sobre el ligando restringe la movilidad de los grupos benceno del **TPA** e incrementa su deficiencia aromática π , lo que favorecería las interacciones por apilamiento π - π .^{9,10}

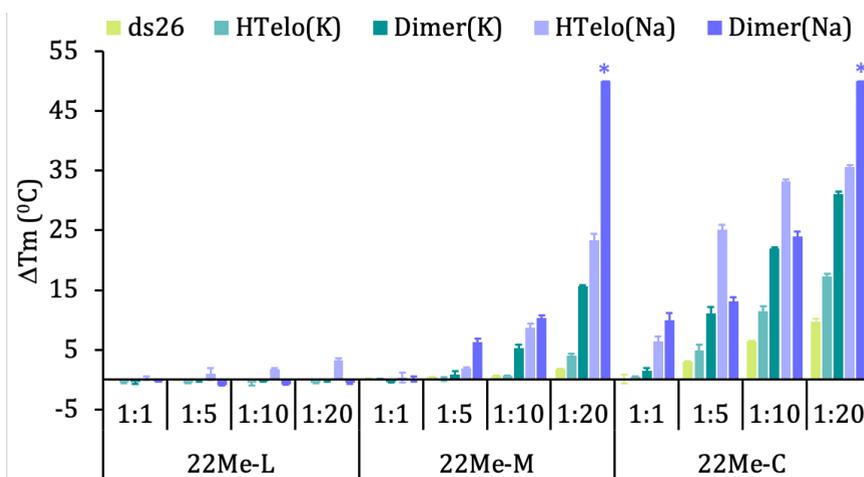


Figura 7.2. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **22Me**.

El ligando **22Me-M** muestra una preferencia destacable por la estabilización del modelo dimer(Na) a medida que aumenta la relación molar ADN:L. Cabe destacar que para relación molar 1:20 no fue posible determinar ΔT_m , pues la temperatura alcanzaba el límite permitido por la técnica. Por ello, se le asignó el valor más elevado posible, el cual corresponde a la temperatura de ebullición del agua menos la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido, señalado con un asterisco en el gráfico.^a Este ligando también presenta una mayor estabilización del modelo dimer(K) (5.3 °C), en comparación al modelo monómero HTelo(K) (0.6 °C), relación molar ADN:L 1:10.

En cambio, en el caso del ligando **22Me-C**, aunque se observa una elevada estabilización frente a la estructura antiparalela dimérica dimer(Na) con ΔT_m de 23.9 °C, la estabilización para el modelo G4 monomérico antiparalelo HTelo(Na) es mayor (33.2 °C). Por el contrario, la estabilización para la estructura híbrida dimérica dimer(K) con ΔT_m de 21.9 °C es más elevada que para el G4 híbrido monómero HTelo(K) (11.5 °C). Todos estos valores se refieren a una relación molar ADN:L de 1:10, la cual utilizaremos para comparar el resto de ligandos con las estructuras de ADN.

Los valores mayores de ΔT_m obtenidos para los modelos de G4 dimérico sugieren que se producen modos de unión adicionales al de los G4s monoméricos, en los que predomina su interacción de apilamiento π con las tétradas externas. En el siguiente apartado de *Estudios de modelización molecular* se abordará esta hipótesis.

^a T_m dimer(Na) = 44.4 °C.

7.1.2. Familia 22H

En la figura 7.3 se representan los valores de ΔT_m obtenidos para los compuestos **22H-M** y **22H-C**.

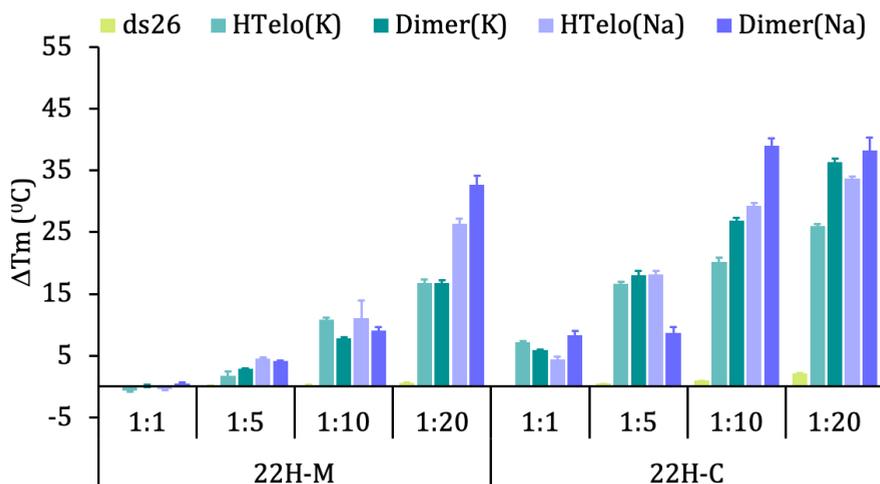


Figura 7.3. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **22H**.

Estos ligandos muestran una mayor estabilización de los G4s que sus análogos metilados **22Me** analizados anteriormente. Asimismo, también muestran una mayor selectividad hacia las estructuras G4s frente al modelo de ADN dúplex; en ambos ligandos **22H** la variación térmica es insignificante para el ADN canónico ($\Delta T_m \sim 0$ °C).

El ligando **22H-C** exhibe una ligera preferencia por la estructura dimérica antiparalela dimer(Na) (39.0 °C) frente al resto de topologías G4 estudiadas, mostrando aproximadamente 10 °C menos para HTelo(Na) (29.3 °C). Asimismo, también muestra una mayor estabilización termal para dimer(K) (26.9 °C) que para el G4 monomérico

HTelo(K) (20.2 °C). Sin embargo, el ligando **22H-M** no muestra distinción entre las estructuras antiparalelas (Na⁺, 11.1 °C monomérico y 9.0 °C dimérico) y las híbridas (K⁺, 10.8 °C monomérico y 7.8 °C dimérico).

Estos resultados indican una mayor capacidad de estabilización del criptando para las estructuras G4s diméricas. Además, a partir de los resultados obtenidos para la familia **22Me**, se puede deducir que en presencia de K⁺, la metilación del grupo amino central de la cadena poliamínica de los ligandos favorece la estabilización de la estructura híbrida de G4 dimérica frente a la monomérica.

7.1.3. Familia 33H

Los resultados del ensayo de desnaturalización térmica de los ligandos pertenecientes a la familia **33H** se han representado en la figura 7.4.

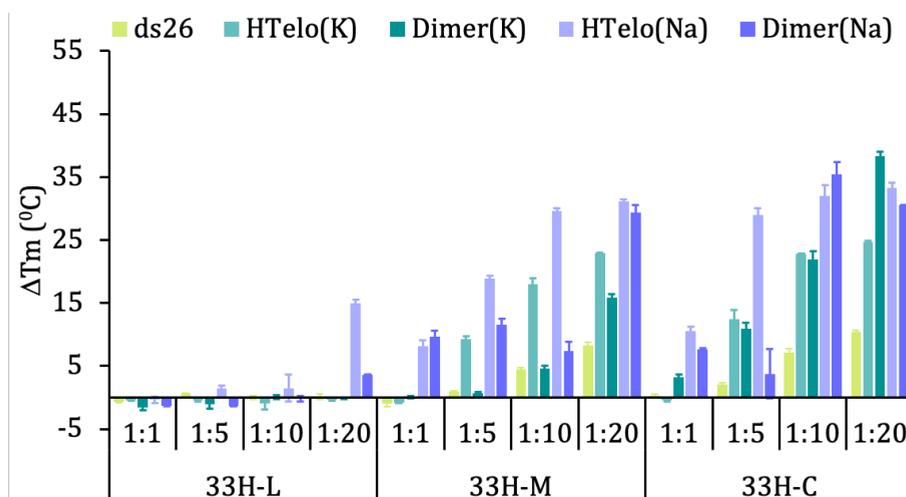


Figura 7.4. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **33H**.

En comparación con la familia **22H** anterior, al sustituir las cadenas etilénicas por propilénicas se ha observado una mayor estabilización térmica para el ADN G4 monomérico frente al dimérico. El ligando **33H-M** estabiliza preferentemente las estructuras G4 monoméricas tanto de topología antiparalela (Na^+ , 29.7 °C monomérico y 7.4 °C dimérico) como de topología híbrida (K^+ , 18.0 °C monomérico y 4.6 °C dimérico). Por otro lado, el ligando criptando **33H-C** no diferencia entre G4 monomérico y dimérico, sin embargo, sí que muestra mayores valores de ΔT_m para las topologías antiparalelas (Na^+ , 32.0 °C monomérico y 35.5 °C dimérico) que con las híbridas (K^+ , 22.8 °C monomérico - 21.9 °C dimérico). Por otro lado, no se observó que el ligando lineal **33H-L** estabilizara de forma significativa ninguna estructura G4 dimérica ($\Delta T_m \sim 0$ °C).

7.1.4. Familia 33Me

A continuación, se estudiaron los ligandos de la familia **33Me**. Como se puede observar en la figura 7.5, con la metilación del grupo amino central de las cadenas poliamínicas se recupera la preferencia de los ligandos macrocíclico y criptando por el ADN G4 dimérico frente al monomérico, tanto para la topología antiparalela como para la híbrida. Cabe destacar que no fue posible la determinación del valor de ΔT_m para la estructura dimérica antiparalela debido a la alta estabilización producida por ambos ligandos ($\Delta T_m \sim 50$ °C), mientras que los valores para la estructura antiparalela monomérica HTelo(Na) son inferiores, observándose ΔT_m de 21.2 °C y 26.3 °C para los ligandos **33Me-M** y **33Me-C**, respectivamente.

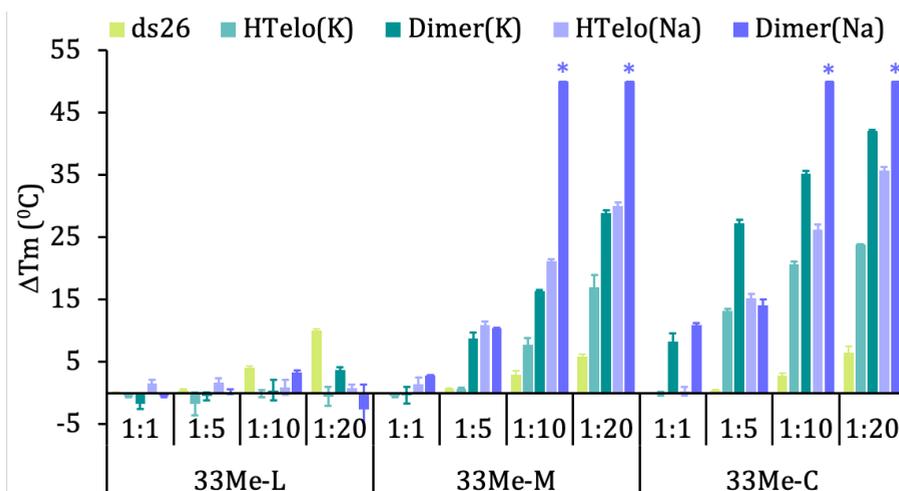


Figura 7.5. Variación de la temperatura de desnaturación ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$) para las secuencias de ADN con los ligandos **33Me**.

Por otro lado, aunque los valores de ΔT_m para la topología híbrida son más bajos que los de la topología antiparalela, estos son relativamente altos. Así, para el ADN dimer(K) se obtuvieron valores de ΔT_m de 16.3°C y 35.2°C para **33Me-M** y **33Me-C**, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, estos ligandos estabilizan en menor medida la estructura monomérica híbrida en K^+ , obteniendo valores de ΔT_m de 7.8°C y 20.7°C para **33Me-M** y **33Me-C**, respectivamente.

Al igual que ocurre con sus análogos lineales discutidos anteriormente, el ligando **33Me-L**, no produjo ningún tipo de estabilización termal sobre las estructuras diméricas ($\Delta T_m \sim 0^{\circ}\text{C}$).

En consecuencia, estos resultados señalan el papel fundamental que juega el número de cadenas poliamínicas, su longitud y su grado de metilación en la estabilización selectiva de las estructuras G4 diméricas.

7.1.5. Familia Cad

La última familia en ser estudiada por desnaturalización térmica fue la compuesta por los ligandos con cadaverina, **Cad-M** y **Cad-C**.

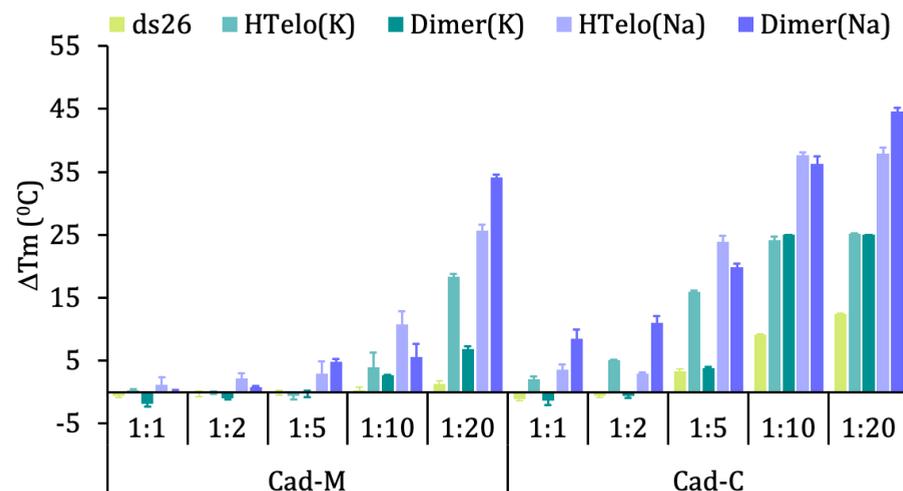


Figura 7.6. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN con los ligandos **Cad**.

Los ligandos de cadaverina son análogos a los de la familia **22H** en la distancia de separación de los nitrógenos terminales, ya que se ha reemplazado el nitrógeno central por un carbono. Como puede apreciarse en la figura 7.6, al igual que en los ligandos no metilados discutidos anteriormente, la ausencia de los grupos metilo produce la pérdida de selectividad por las estructuras G4 diméricas frente a las monoméricas. El ligando **Cad-M** muestra una mayor estabilización térmica del monómero HTelo(Na) (10.7 °C) frente al G4 dimer(Na) (5.6 °C). Del mismo modo, se observa estabilización de la estructura

monomérica (4.0 °C) frente a la dimérica (2.7 °C) para las topologías híbridas.

Asimismo, el criptando **Cad-C** no diferencia entre las estructuras monoméricas y diméricas, exhibiendo valores de ΔT_m muy similares para las topologías antiparalelas en Na⁺ (37.6 °C monomérico y 36.3 °C dimérico) y en K⁺ (24.2 °C monomérico y 25.0 °C dimérico).

7.1.6. Selectividad de los ligandos para G4s diméricos.

Para analizar con mayor claridad la selectividad de los ligandos hacia las estructuras G4s diméricas, utilizando los resultados obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica se definió el valor de *selectividad* ($^{\text{DS}}$) como el cociente entre ΔT_{Dimer} y ΔT_{mono} . El cálculo de la selectividad nos permite seleccionar aquellos ligandos que estabilizan preferentemente las estructuras G-quadruplex diméricas frente a las estructuras G4 monoméricas ($^{\text{DS}} > 1$).

En las siguientes figuras (7.7 y 7.8) se han representado los valores obtenidos de $^{\text{DS}}$ para los ligandos a las distintas relaciones molares ADN:L estudiadas.

Se observa que los ligandos de topología criptando y macrocíclica de las familias **22Me** y **33Me** presentan selectividad hacia las estructuras de G4 diméricas. Como se había indicado anteriormente, la metilación del grupo amino de la cadena central favorece la estabilización de los ligandos con las estructuras G4 diméricas frente a las monoméricas.

Cabe destacar que la topología dimérica antiparalela se ve preferentemente estabilizada por los ligandos **33Me-C** y **33Me-M**, mientras que la topología dimérica híbrida se estabiliza tanto por los ligandos macrocíclico y criptando de la familia **33Me** como por los de la familia **22Me**.

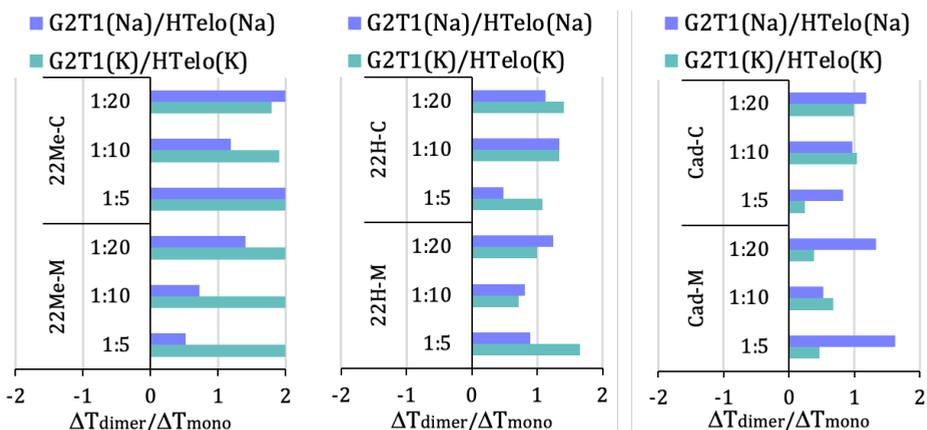


Figura 7.7. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

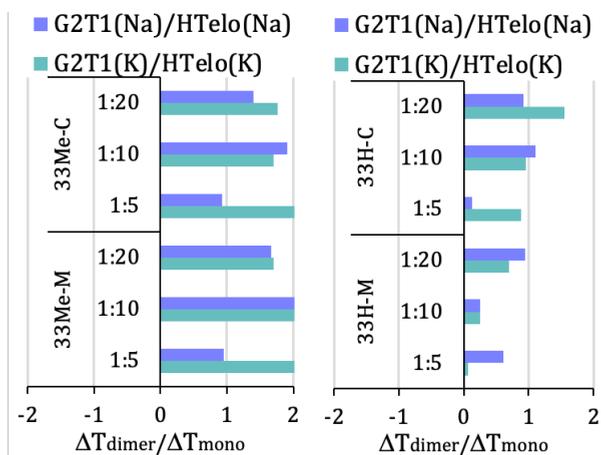


Figura 7.8. Representación gráfica de los valores de selectividad obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica.

7.2. Evaluación del modo de unión utilizando estructuras de ADN con la base 2-Aminopurina

Para determinar el modo de unión entre los ligandos y las estructuras G4s diméricas, se ha estudiado la variación de la emisión de fluorescencia de la secuencia G2T1, donde se ha sustituido la adenina por la 2-Aminopurina (2Ap) en distintas posiciones de interés, como son las tétradas externas o internas. Los cambios en la emisión de la 2Ap provocados por la interacción con los ligandos indican el lugar de unión de estos al G4 dimérico.

Se utilizaron varios modelos de G4 dimérico G2T1, donde se sustituyeron las adeninas en posiciones 7, 13, 31 y 37 (figura 7.9), denominando a cada secuencia en función de la de la posición sustituida como Ap7, Ap13, Ap31 y Ap37, respectivamente. Las sustituciones en las posiciones 7 y 31 (Ap7 y Ap31) se localizan en las tétradas externas del G4 dimérico, mientras que las sustituciones de las adeninas en 13 y 37 (Ap13 y Ap37) se producen en las tétradas del bolsillo interno (figura 7.8). Además, se han utilizado dos secuencias doblemente marcadas Ap7+Ap31 y Ap13+Ap37. Los ligandos seleccionados para esta experiencia fueron el macrociclo **22Me-M** y el criptando **22Me-C**, dada su gran interacción con el ADN G4 dimérico.

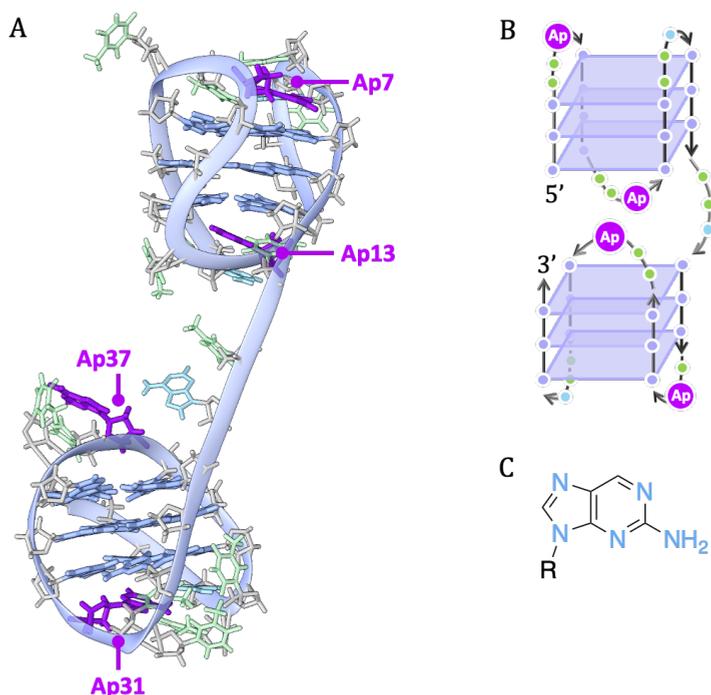


Figura 7.9. (A) Estructura modelizada del ADN G4 dimérico antiparalelo obtenida a partir de la estructura cristalográfica PDB: 143D. (B) Ilustración esquemática de la misma. En morado se indican las posiciones de la 2Ap en G2T1. (C) Estructura de la 2-Aminopurina.

En la figura 7.10 se han representado los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de la 2Ap y de los ligandos. Como se observa en la figura, la banda de absorción de la 2Ap se solapa parcialmente con las bandas de absorción de los ligandos. Como consecuencia, el espectro de emisión de la 2Ap coincide en gran parte con la banda de emisión **22Me-C**; mientras que la emisión de **22Me-M** se encuentra desplazado ligeramente a longitudes de onda mayores.

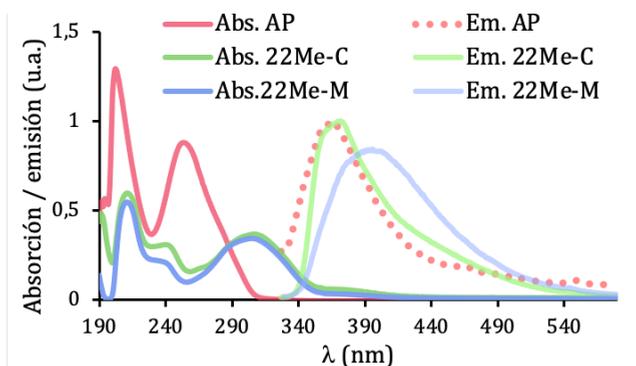


Figura 7.10. Espectros de absorción y emisión de 2Ap, 22Me-M y 22Me-C.

En las figuras 7.11 y 7.12 se ha representado la variación del máximo de emisión de la 2Ap en función de la relación molar L:ADN. Las representaciones gráficas completas de las valoraciones de fluorescencia de los G4s diméricos marcados se han incluido en el apartado de *Anexos*.

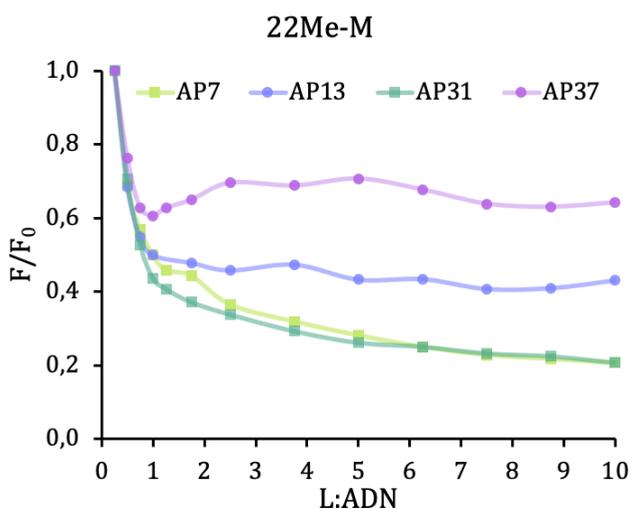


Figura 7.11. Representación gráfica de la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada a 370 nm de G2T1 marcado con 2Ap (Ap7, Ap13, Ap31 y Ap37, respectivamente) frente al relación molar L:ADN.

El incremento de la concentración de **22Me-M** produce una disminución de la emisión de la fluorescencia en los cuatro modelos G2T1 marcados (Ap7, Ap13, Ap31, Ap37). Este descenso resulta mayor para los G4s diméricos Ap7 y Ap31, donde las unidades 2Ap se encuentran en las tétradas más externas del dímero. Asimismo, el Ap13, que contiene la 2Ap en una de las tétradas del bolsillo interno, también presenta una notable disminución en la emisión de fluorescencia, mientras que el Ap37, que presenta la 2Ap en la segunda tétrada del bolsillo interno, no exhibe esta disminución tan acusada. Estos resultados indican que tras la unión con G2T1, el ligando **22Me-M** tiene un contacto considerable con ambas tétradas externas, y en menor medida, con las tétradas del bolsillo interno, en particular con el Ap37.

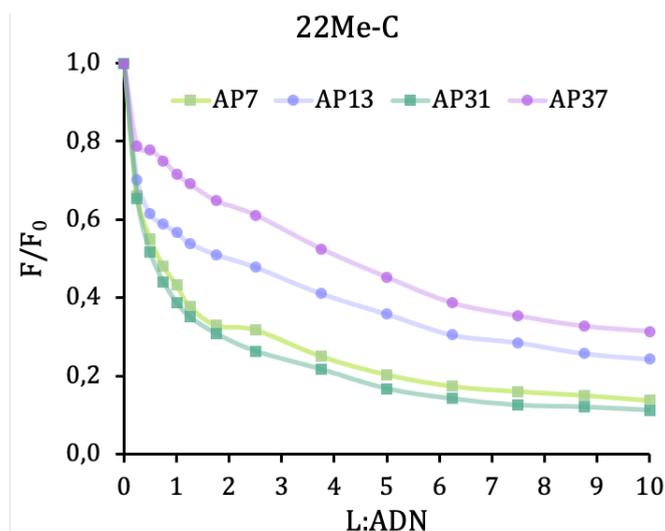


Figura 7.12. Representación gráfica de la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada a 370 nm de G2T1 marcado con 2-Ap (Ap7, Ap13, Ap31 y 37, respectivamente) frente a la relación molar L:ADN.

La adición del ligando **22Me-C** produce un efecto muy similar, disminuyendo notablemente la emisión de fluorescencia en Ap7 y Ap31. De una forma menos pronunciada disminuye la emisión de Ap13, y algo menos la marcada en Ap37. Todo ello indica que el ligando **22Me-C** interacciona preferentemente con las tétradas externas, al igual que **22Me**.

Sin embargo, para comprobar estos resultados, se estudiaron los G4s diméricos doblemente marcados Ap7+Ap31 (tétradas externas) y Ap13+Ap37 (tétradas internas). Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa en la emisión de fluorescencia de las dos secuencias, lo que sugiere que ambos ligandos, **22Me-M** y **22Me-C**, interaccionan con las tétradas internas y externas del G4 multimérico G2T1 en una proporción similar, indicando que el bolsillo interno deber ser tenido en cuenta tanto como las tétradas externas para la interacción con el G4 dimérico.

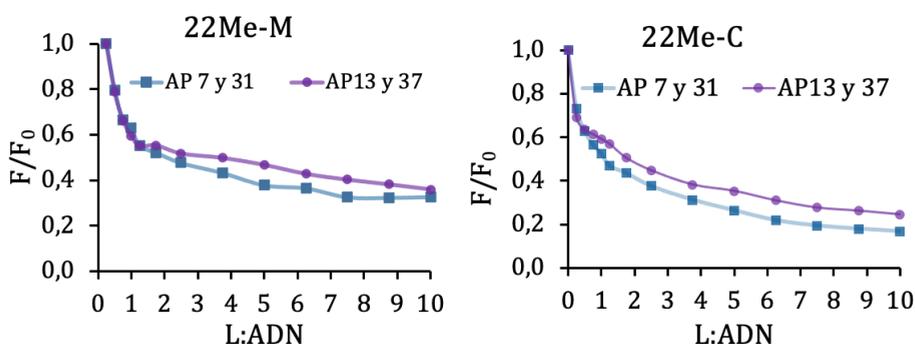


Figura 7.13. Representación gráfica de la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada a 370 nm de G2T1 doblemente marcado con 2-Ap (Ap7 y 31, y Ap13 y 37) frente al relación molar L:ADN.

7.3. Estudio computacional de la interacción de los ligandos de la familia 22Me con ADN G4 dimérico

Adicionalmente a los estudios computacionales de dinámica (MD, *molecular dynamics*) realizados en el capítulo 6 donde se evaluó la interacción de los ligandos con el ADN G4 monomérico, en este apartado se ha estudiado la interacción de los mismos con el ADN G4 dimérico.

Las estructuras diméricas de G4 fueron construidas a partir de las estructuras G4s monoméricas. Se utilizó la estructura monomérica antiparalela de G4 (PDB: 143D)¹¹ como plantilla para construir el dímero de G4 antiparalelo. Este proceso implicó la replicación del monómero y la unión de ambos dominios mediante la introducción de dos residuos de timina. Por otro lado, el modelo de G4 dimérico híbrido 1-2 se construyó conectando las estructuras híbridas 1 (PDB: 2GKU) y 2 (2JSL), siguiendo el método descrito por Trent y colaboradores.^{5,12,13}

Asimismo, se construyeron los ligandos a partir de la estructura de la unidad de trifenilamina descrita en la bibliografía,¹¹ y se consideró el grado de protonación de los ligandos a pH fisiológico a través del análisis de los diagramas de distribución de especies en función del pH, siendo las siguientes especies las empleadas para cada ligando: **H₃(22Me-L)³⁺**, **H₄(22Me-M)⁴⁺** y **H₆(22Me-C)⁶⁺**. En el *capítulo 3 de Material y métodos* se encuentra la información detallada acerca de la realización de estos estudios.

7.3.1. G4 dimérico antiparalelo

En la figura 7.14 se ha representado la estructura G4 dimérica antiparalela, denominada de ahora en adelante 2aG4 en el texto, correspondiente a la estructura adoptada por la secuencia de ADN telomérico ((TTA**GGG**)_n) en presencia de Na⁺. Todas las representaciones se han realizado utilizando el programa ChimeraX.

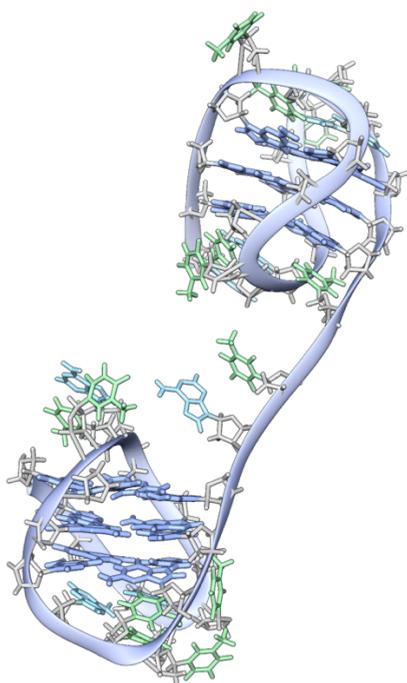


Figura 7.14. Estructura de ADN G4 dimérica antiparalela.

Asimismo, se obtuvieron las conformaciones de mínima energía para las interacciones entre la estructura 2aG4 y los ligandos de la serie **22Me**. En primer lugar, se ha analizado el sistema 2aG4 con el criptando **22Me-C** (figura 7.15).

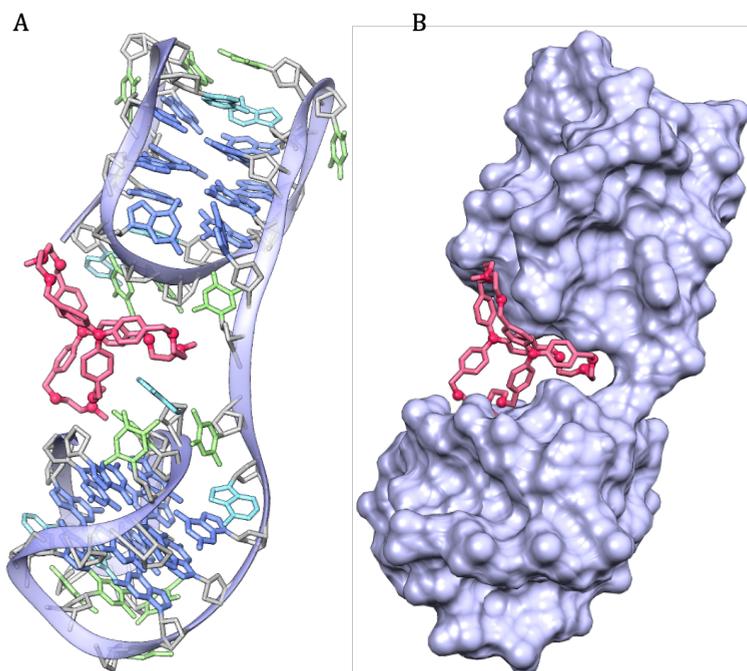


Figura 7.15. Representación de la interacción entre **22Me-C** y el modelo 2aG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

Se analizaron las conformaciones en las que el ligando se aloja en el bolsillo multimérico, la región que se forma entre los dos monómeros de G4. Como se puede observar en la figura 7.15, el ligando **22Me-C** se ajusta a la cavidad eficientemente, orientándose hacia el interior una de las cadenas poliamínicas.

La figura 7.16 muestra una ampliación de la figura anterior, donde se muestran los posibles contactos del ligando **22Me-C** con la estructura 2aG4. El criptando y el 2aG4 interactúan mediante interacciones electrostáticas entre los grupos amonio y los grupos fosfato del esqueleto 2ag4, observándose la formación de hasta siete puentes salinos con una distancia promedio $d_{O\cdots H-N} \approx 1.92 \text{ \AA}$. Además, se ha

observado la formación de un enlace de hidrógeno adicional entre el grupo carbonilo de la timina T23 y un grupo amonio del ligando ($d_{O\dots+H-N} \approx 2.19 \text{ \AA}$).

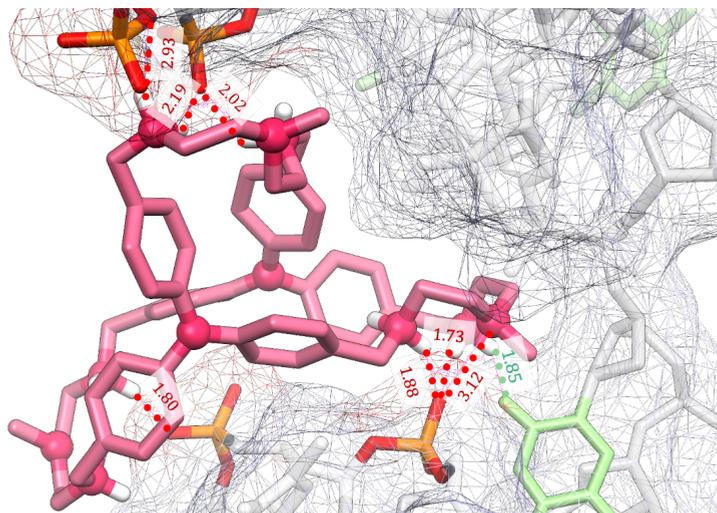


Figura 7.16. Visualización de las distancias de enlace en Å de los enlaces de hidrógeno formados en la interacción **22Me-C** y 2aG4.

Al igual que en el caso del ligando **22Me-C**, cuando se analiza la interacción con el 2aG4 se observa que la estructura más estable es la formada por el ligando **22Me-M** situado en el bolsillo multimérico (figura 7.17). En este caso, a diferencia del ejemplo anterior, los anillos fenilo del **TPA** se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad. Cuando se examina más detalladamente la unión (figura 7.18), se observa la formación de seis puentes salinos entre los grupos fosfato y los grupos amino con una distancia promedio $d_{O\dots+H-N} \approx 1.97 \text{ \AA}$, y adicionalmente, una interacción de apilamiento π entre la adenina A25 del ADN y uno de los anillos del **TPA** con una distancia entre ambos planos de 3.62 \AA .

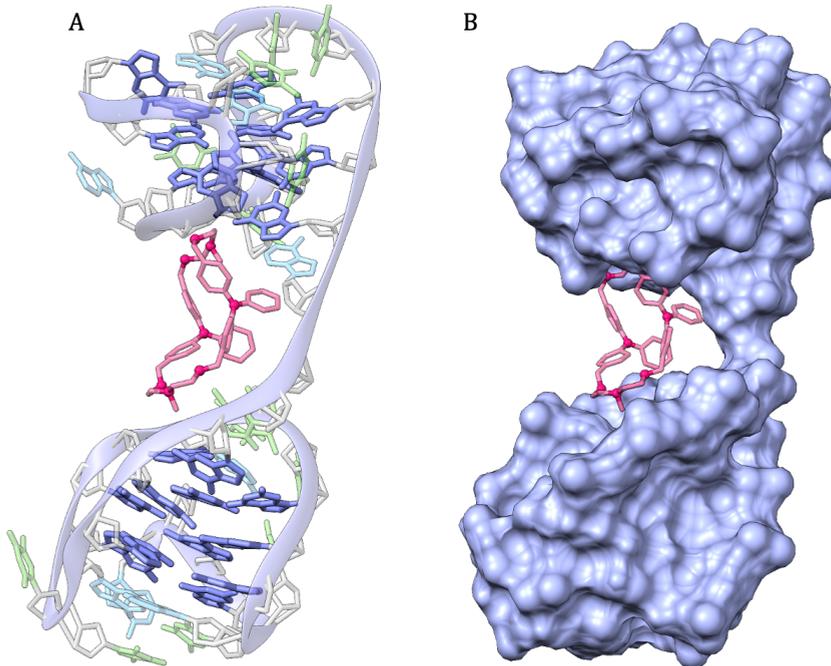


Figura 7.17. Representación de la interacción entre **22Me-M** y el modelo 2aG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

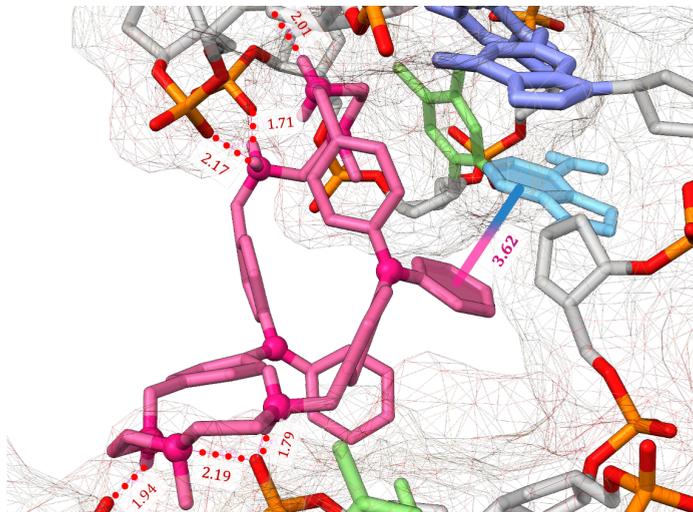


Figura 7.18. Visualización de las distancias de enlace en Å de las interacciones formadas entre **22Me-M** y 2aG4.

Finalmente, se analizó la interacción entre la estructura 2aG4 con el ligando lineal **22Me-L**. El confórmero de mínima energía para la interacción entre ambos se ha representado en la figura 7.19. El ligando también se sitúa **22Me-L** en el bolsillo multimérico, pero en este caso, solo una de las unidades de **TPA** se aloja en el interior de la cavidad y la otra unidad encaja en el surco formado entre las hebras del ADN del monómero de G4 inferior.

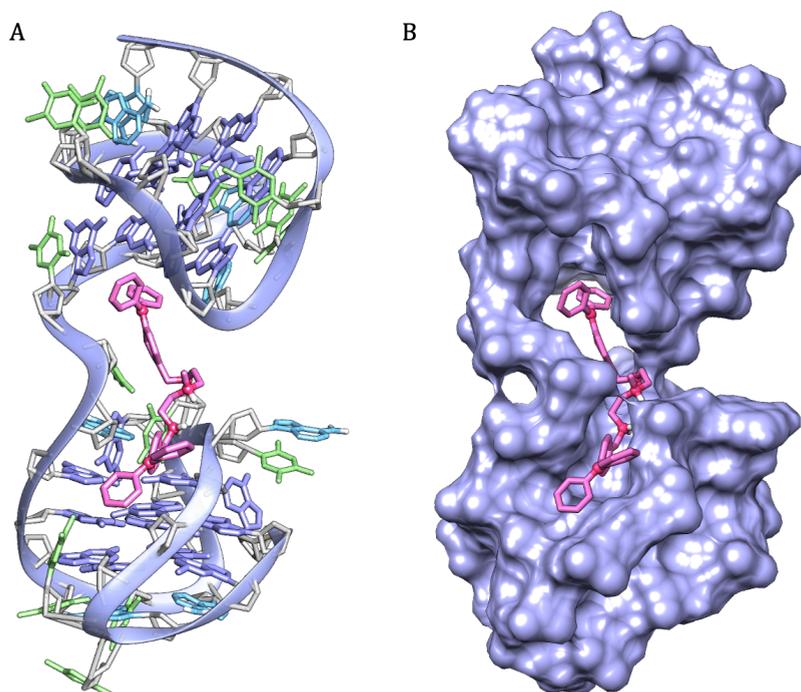


Figura 7.19. Representación de la interacción entre **22Me-L** y el modelo 2aG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

Al analizar más detalladamente esta interacción (figura. 7.19), se puede observar la formación cuatro puentes salinos entre los grupos amonio de del ligando y los grupos fosfato del esqueleto del ADN, con una distancia

promedio $d_{O\dots+H-N} \approx 1.94 \text{ \AA}$. Por otro lado, se observa que se produce un apilamiento π entre un grupo fenilo del **TPA** incluido en interior de le bolsillo y la timina T24 del ADN, con una distancia promedio entre ambos planos con orientación paralela de 3.60 \AA .

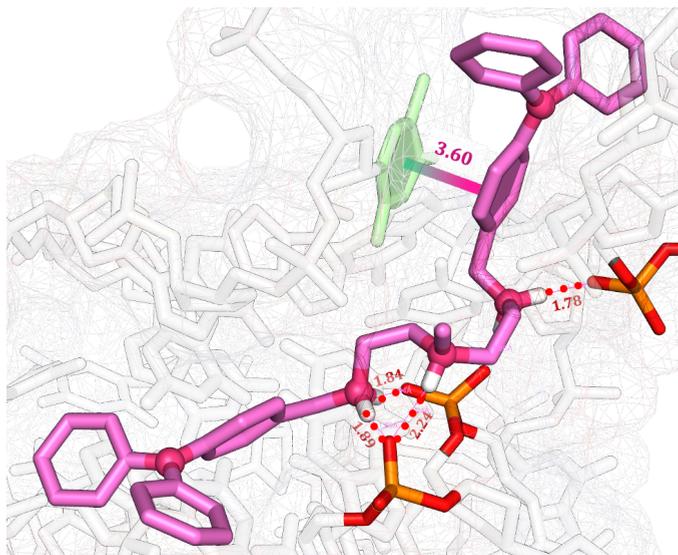


Figura 7.20. Visualización de las distancias de enlace en \AA de las interacciones formadas entre **22Me-L** y **2aG4**.

De acuerdo con los resultados espectroscópicos obtenidos experimentalmente en los apartados anteriores, el análisis computacional sugiere que la unión entre los ligandos y la estructura **2aG4** está regido mayoritariamente por interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados de las cadenas poliamínicas y los grupos fosfato del ADN. Los resultados sugieren que la interacción es más fuerte a medida que aumenta el número de cadenas poliamínicas en los ligandos, lo que justificaría la mayor estabilización térmica observada para **22Me-C** en el sistema dimérico dimer(Na).

7.3.2. G4 dimérico híbrido

La estructura dimérica híbrida 1-2 de G4 (2hG4) que se forma en el ADN telomérico en presencia de K^+ se ha representado en la figura 7.21.

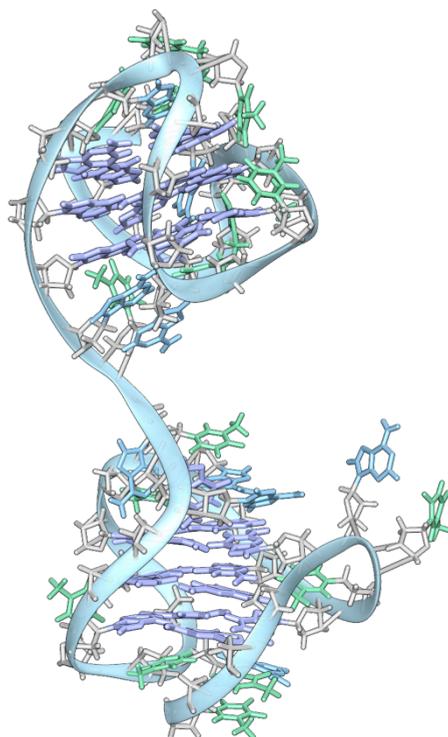


Figura 7.21. Estructura de ADN G4 dimérica antiparalela.

En comparación con el sistema 2aG4 antiparalelo, el modelo de la estructura 2hG4 tiene una cavidad más cerrada entre los monómeros de G4. Este resultado es posiblemente debido a dos motivos: (1) la orientación de los bucles TTA crea un bolsillo más profundo y (2) los bucles orientados hacia el bolsillo exponen las nucleobases hacia el

interior, creando un entorno más apolar y favorable para las interacciones aromáticas.

Se han realizado los cálculos de dinámica molecular para el sistema 2hG4 y los ligandos pertenecientes a la familia **22Me**. En la siguiente figura 7.22 se encuentran las representaciones del conformero de mínima para el sistema **22Me-C** con 2hG4.

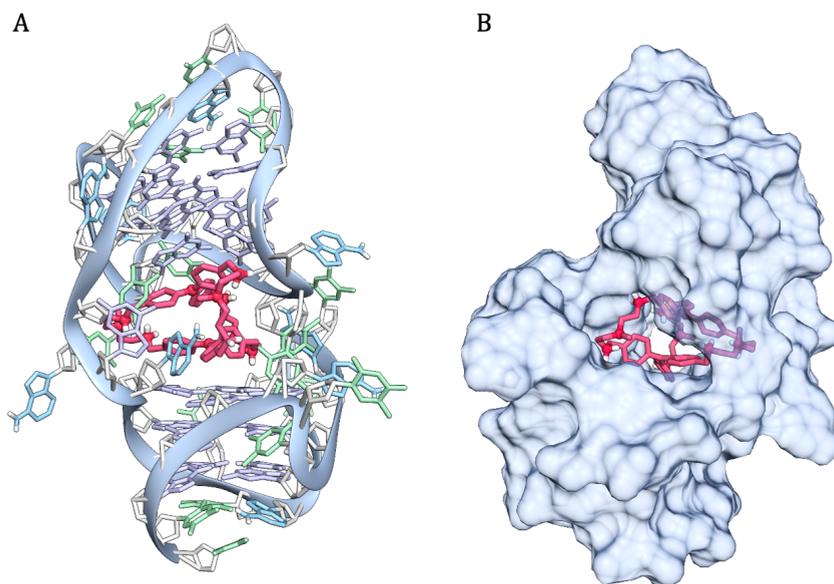


Figura 7.22. Representación de la interacción entre **22Me-C** y el modelo 2hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

Como es posible observar en la figura 7.22, el ligando **22Me-C** se encuentra alojado en el interior de la cavidad entre ambas unidades G4 de forma compacta. Al analizar más detalladamente la unión (figura 7.23) se observa el apilamiento π entre dos guaninas de la tétrada externa

superior y dos grupos fenilo de una unidad **TPA**, a la vez que dos guaninas de la tétrada externa inferior interaccionan con otros dos grupos fenilo de la segunda unidad de **TPA**. Cabe destacar que la distancia promedio entre los planos de guanina y del grupo fenilo está comprendida entre 3.90 y 4.56 Å. Así, teniendo en cuenta que la distancia máxima establecida para que se produzca un apilamiento π entre dos unidades aromáticas es de 4.53 Å, una de las interacciones π se encuentra en el límite de lo que se puede considerar un apilamiento de tipo π .^{14,15}

Además, los grupos amino protonados del ligando cooperan en la interacción con la formación seis puentes de hidrógeno con la cadena fosfatada y, adicionalmente, otro enlace con el grupo carbonilo de la timina T13, observándose la formación de hasta siete puentes de hidrógeno con una distancia promedio $d_{O\cdots H-N} \approx 1.96$ Å.

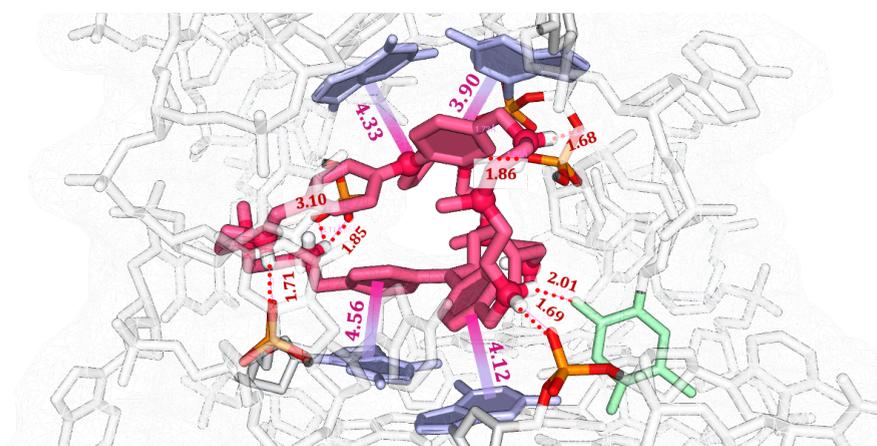


Figura 7.23. Visualización de las distancias de enlace en Å de las interacciones entre **22Me-C** y 2hG4.

Continuando con el análisis de los resultados, se ha representado el cónformero de menor energía para la interacción entre la estructura 2hG4 y el ligando **22Me-M** (figura 7.24).

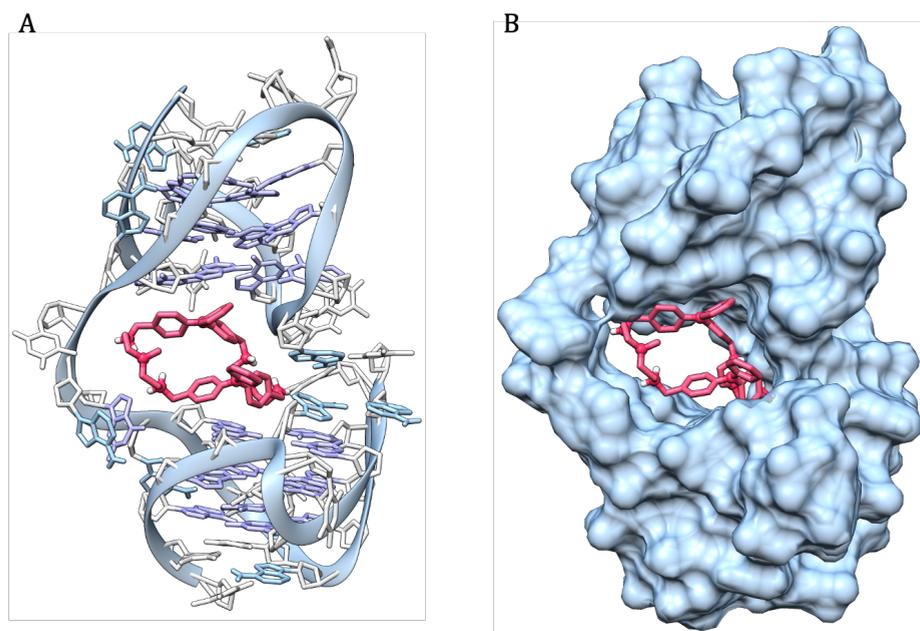


Figura 7.24. Representación de la interacción entre **22Me-M** y el modelo 2hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

La conformación obtenida para el sistema formado entre 2hG4 y el ligando **22Me-M** (figura 7.24), sugiere modos de interacción similares a los obtenidos en el caso del sistema anterior del criptando **22Me-C**. El ligando se aloja en el interior del bolsillo creado entre los dos monómeros de G4. De nuevo, se ha representado una imagen más detallada de este sistema (figura 7.25), donde se observan las interacciones de apilamiento π entre dos grupos fenilo de una unidad de **TPA** con dos guaninas pertenecientes a la tétrada superior del dímero 2hG4, con distancias

entre los planos de los anillos aromáticos de 3.90 y 3.95 Å. Además, se ha observado la formación de hasta cuatro enlaces de hidrógeno entre los grupos amino protonados del ligando y las nucleobases guanina G27 y timina T37, así como con grupos fosfato de la cadena de ADN, con distancia promedio $d_{O/N\dots+H-N} \approx 1.87$ Å.

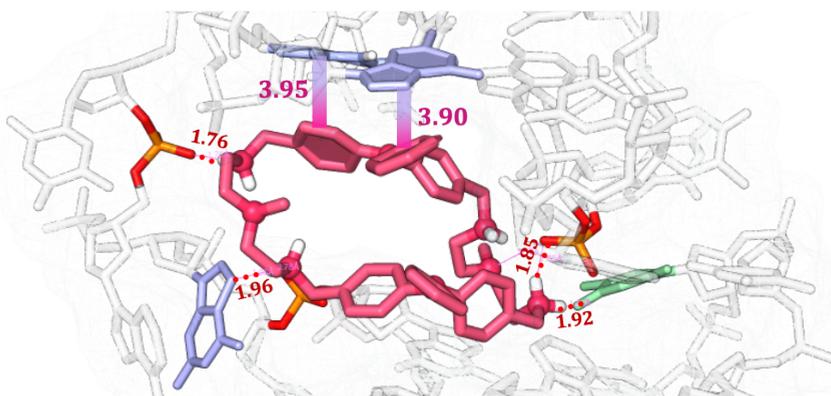


Figura 7.25. Visualización de las distancias de enlace en Å de las interacciones entre **22Me-M** y 2hG4.

Finalmente, en la figura 7.26 se muestra el conformero de mínima energía del sistema formado entre el ligando 2hG4 y el ligando lineal **22Me-L**. Al igual que en el sistema 2aG4, el modo de unión del ligando **22Me-L** está basado en la inserción de una unidad de **TPA** en el interior del bolsillo dimérico, mientras que la cadena poliamínica se encuentra desplegada hacia el exterior con la segunda unidad **TPA** alojada en el surco formado entre dos hebras del ADN. Al examinar la unión entre 2hG4 y **22Me-L** (figura 7.27), es posible observar que se produce un apilamiento π entre la guanina 23 de la tétrada del G4 superior y un grupo fenilo del **TPA**. Asimismo, también se observa la formación de tres puentes de hidrógeno entre grupos amino protonados de la cadena poliamínica y grupos

fosfato, así como con la nucleobase adenina 28, con una distancia promedio $d_{O/N...+H-N} \approx 1.88 \text{ \AA}$.

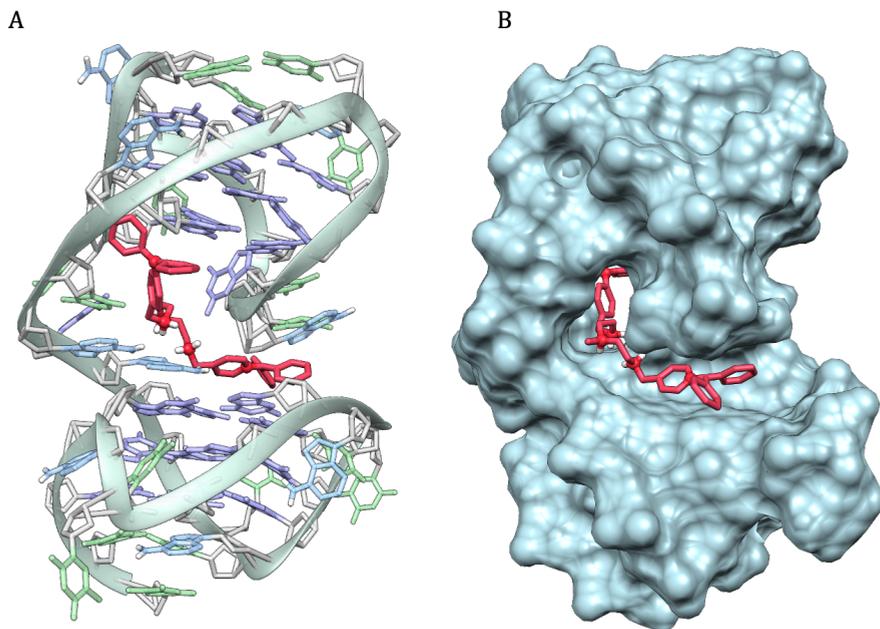


Figura 7.26. Representación de la interacción entre **22Me-L** y el modelo 2hG4 en (A) modelo molecular y (B) superficie.

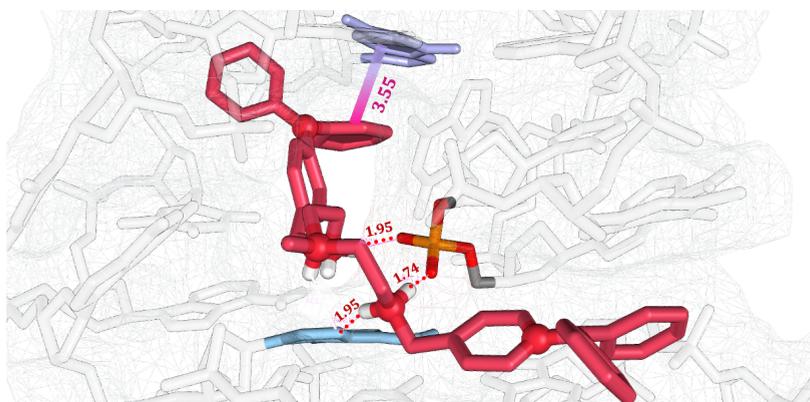


Figura 7.27. Visualización de las distancias de enlace en Å de los enlaces de hidrógeno formados en la interacción **22Me-C** y 2hG4.

Los resultados obtenidos de los estudios computacionales respaldan la mayor estabilización térmica que se produce para 2aG4 que para 2hG4. En todos los estudios de dinámica molecular se observa un mayor número de enlaces de hidrógeno para los sistemas formados entre 2aG4 y los ligandos que para los sistemas con 2hG4. Esto puede ser atribuido a la diferente naturaleza del bolsillo multimérico entre ambas estructuras, siendo en 2aG4 de carácter más polar que en 2hG4.

Asimismo, estos resultados arrojan luz sobre la mayor afinidad de los ligandos **22Me** hacia los G4s diméricos, ya que tienen la capacidad de interactuar tanto con el bolsillo multimérico como con las tétradas externas de las unidades de G4.

7.4. Bibliografía

1. Kolesnikova, S. & Curtis, E. A. Structure and function of multimeric G-Quadruplexes. *Molecules* **24**, (2019).
2. Frasson, I., Pirota, V., Richter, S. N. & Doria, F. Multimeric G-quadruplexes: A review on their biological roles and targeting. *Int. J. Biol. Macromol.* **204**, 89–102 (2022).
3. Zhou, C. Q. *et al.* Dinickel-Salphen Complexes as Binders of Human Telomeric Dimeric G-Quadruplexes. *Chemistry* **23**, 4713–4722 (2017).
4. Petraccone, L., Trent, J. O. & Chaires, J. B. The tail of the telomere. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16530–16532 (2008).
5. Monsen, R. C., Chakravarthy, S., Dean, W. L., Chaires, J. B. & Trent, J. O. The solution structures of higher-order human telomere G-quadruplex multimers. *Nucleic Acids Res.* **49**, 1749–1768 (2021).
6. Yu, H., Gu, X., Nakano, S., Miyoshi, D. & Sugimoto, N. Beads-on-a-String Structure of Long Telomeric DNAs under Molecular Crowding Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20060–20069 (2012).
7. Ma, T. Z. *et al.* Dimers formed with the mixed-type G-quadruplex binder pyridostatin specifically recognize human telomere G-quadruplex dimers. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 920–930 (2020).

8. Petraccone, L. *et al.* Structure and Stability of Higher-Order Human Telomeric Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 20951–20961 (2011).
9. Andréasson, M., Bhuma, N., Pemberton, N. & Chorell, E. Using Macrocyclic G-Quadruplex Ligands to Decipher the Interactions Between Small Molecules and G-Quadruplex DNA. *Chemistry* **28**, (2022).
10. Cockroft, S. L. *et al.* Substituent effects on aromatic stacking interactions. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 1062 (2007).
11. Hua, C., Baldansuren, A., Tuna, F., Collison, D. & D'Alessandro, D. M. In Situ Spectroelectrochemical Investigations of the Redox-Active Tris[4-(pyridin-4-yl)phenyl]amine Ligand and a Zn²⁺ Coordination Framework. *Inorg. Chem.* **55**, 7270–7280 (2016).
13. Phan, A. T., Luu, K. N. & Patel, D. J. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5715–5719 (2006).
14. Chakrabarti, P. & Bhattacharyya, R. Geometry of nonbonded interactions involving planar groups in proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **95**, 83–137 (2007).

15. Ninković, D. B., Janjić, G. V., Veljković, D. Ž., Sredojević, D. N. & Zarić, S. D. What Are the Preferred Horizontal Displacements in Parallel Aromatic-Aromatic Interactions? Significant Interactions at Large Displacements. *ChemPhysChem* **12**, 3511–3514 (2011).

G4s en desordenes neuronales



Evaluación de la interacción
de los ligandos sintetizados
con ADN y ARN G4
asociado con enfermedades
neurodegenerativas

Capítulo 8. Determinación de la interacción de los ligandos con G4s relevantes en desordenes neuronales

Recientemente los G-quadruplex han sido relacionados con distintas enfermedades neurológicas.¹ En el capítulo 1 de *Introducción* se han expuesto algunos de los desórdenes neurológicos más relevantes asociados a los G4s, destacando la esclerosis lateral amiotrófica o ELA (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*) y la demencia frontotemporal (FTD, *frontotemporal dementia*). La causa común de ambas enfermedades es la expansión de la repetición de hexanucleótidos (HRE, *Hexanucleotide Repeat Expansion*) (GGGGCC)_n en la región no codificante del gen *C9orf72* del cromosoma 9. Se ha visto que tanto el ADN como el ARN transcrito de estos hexanucleótidos forman estructuras G-quadruplex.^{2,3} Estos G4s desarrollados a partir de las HRE (G₄C₂)_n son capaces de formar estructuras G4 monoméricas y multiméricas de ADN y ARN, así como estructuras G4s híbridas de ADN:ARN.^{4,5} Se ha hipotetizado que la generación de G4s multimoleculares podría ser el origen de la muerte neuronal en la ELA y en la FTD.⁶ Recientemente se ha demostrado que la estabilización de las estructuras G4s de las HRE por pequeñas moléculas puede reducir las acciones patógenas de estas enfermedades.⁷

Por ello, en este capítulo se ha estudiado la interacción de los ligandos sintetizados con los G4s formados por la secuencia de oligonucleótido de ADN (G₄C₂)₄ y ARN r(G₄C₂)₄, relacionadas con la ELA y la FTD.^{8,9} El ADN (G₄C₂)₄ forma la estructura G4 antiparalela, mientras que el ARN r(G₄C₂)₄ presenta preferentemente la estructura G4 de topología paralela.⁴

8.1. Evaluación de la estabilidad térmica producida por los ligandos mediante desnaturalización térmica (FRET-Melting)

En las siguientes secciones se discute la estabilización térmica producida por los ligandos en las estructuras G4s formadas por las secuencias de ADN $(G_4C_2)_4$ y ARN $r(G_4C_2)_4$, determinada por estudios de desnaturalización térmica de FRET-Melting.

Los valores de la variación de temperatura de desnaturalización (ΔT_m) del ADN y del ARN G4 tras la adición de los ligandos a distintas relaciones molares se encuentran recopilados en el apartado de *Anexos*. Para facilitar la visualización de estos resultados, en las siguientes figuras se han representado los valores de ΔT_m en diagramas de barras.

8.1.1. Familia 22Me

Como es posible observar en la figura 8.1, los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** estabilizan las estructuras G4s $(G_4C_2)_4$ y $r(G_4C_2)_4$, obteniéndose mayores temperaturas de estabilización a medida que se aumenta la relación molar G4:L. El criptando **22Me-C** muestra la mayor capacidad de estabilización de esta serie de ligandos, efecto que está correlacionado con su mayor número de centros protonables, consecuencia del mayor número de cadenas poliamínicas en su estructura. Asimismo, como se ha indicado anteriormente, el aumento del número de cadenas poliamínicas en las estructuras de los ligandos restringe la movilidad de las cadenas poliamínicas, así como también el de los grupos fenilo del **TPA**, lo que puede favorecer las interacciones por apilamiento π . Para comparar las

estabilizaciones obtenidas para las distintas estructuras de ADN y ARN se ha escogido la relación molar G4:L de 1:10.

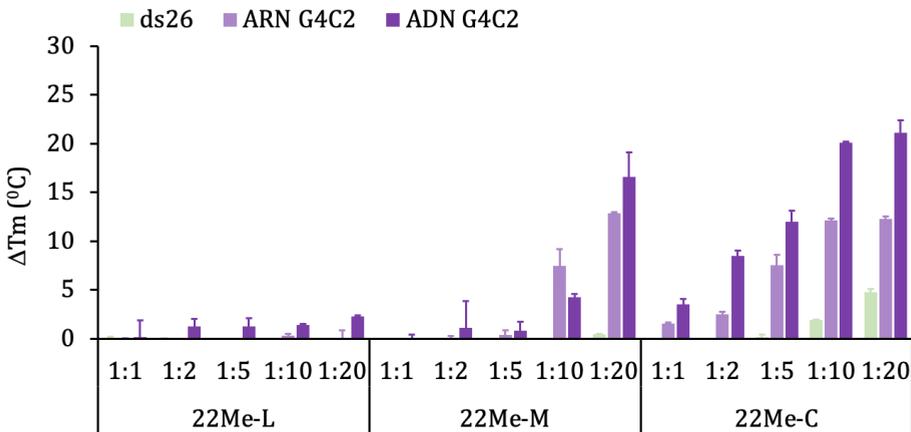


Figura 8.1. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos **22Me**.

El ligando **22Me-C** estabiliza el ADN $(G_4C_2)_4$ con una ΔT_m de 20.1 °C, mientras que en la estructura de ARN $r(G_4C_2)_4$ produce una estabilización de 12.2 °C, indicando que **22Me-C** tiene una mayor preferencia por el ADN antiparalelo $(G_4C_2)_4$ frente al ARN $r(G_4C_2)_4$ de topología paralela. En cambio, para el macrociclo **22Me-M** esta preferencia no es tan acusada, obteniéndose una ΔT_m de 7.5 °C para $r(G_4C_2)_4$ y de 4.3 °C para $(G_4C_2)_4$.

Es importante señalar que ninguno de los ligandos **22Me** estabiliza de manera significativa la estructura de doble hélice ds26. Estos resultados indican que los ligandos **22Me-C** y **22Me-M** presentan una mayor afinidad por las estructuras G4s $(G_4C_2)_4$ y $r(G_4C_2)_4$ en comparación con la estructura dúplex. Por otro lado, para el ligando lineal **22Me-L** no se observó una estabilización térmica significativa para las estructuras G4s de ADN/ARN G_4C_2 .

8.1.2. Familia 33Me

Las variaciones de las temperaturas de desnaturalización obtenidas para los ligandos de cadenas propilénicas **33Me** son similares a las obtenidas para los ligandos de cadenas etilénicas **22Me**. El criptando **33Me-C** produce valores de ΔT_m de 11.7 y 20.3 °C para $r(G_4C_2)_4$ y $(G_4C_2)_4$, respectivamente. De igual forma, el macrociclo **33Me-M** presenta valores de ΔT_m de 10.8 °C y 9.1 °C para $r(G_4C_2)_4$ y $(G_4C_2)_4$, respectivamente. Al igual que en la familia **22Me**, el criptando **33Me-C** muestra preferencia por la estructura G4 de ADN sobre la de ARN, mientras que el macrociclo **33Me-C** solo exhibe esta preferencia a relaciones molares elevadas (G4:L de 1:20). Cabe destacar la nula estabilización de ambos ligandos por la estructura de doble hélice, indicando una vez más la selectividad de los ligandos macrocíclico y criptando por las estructuras G4s.

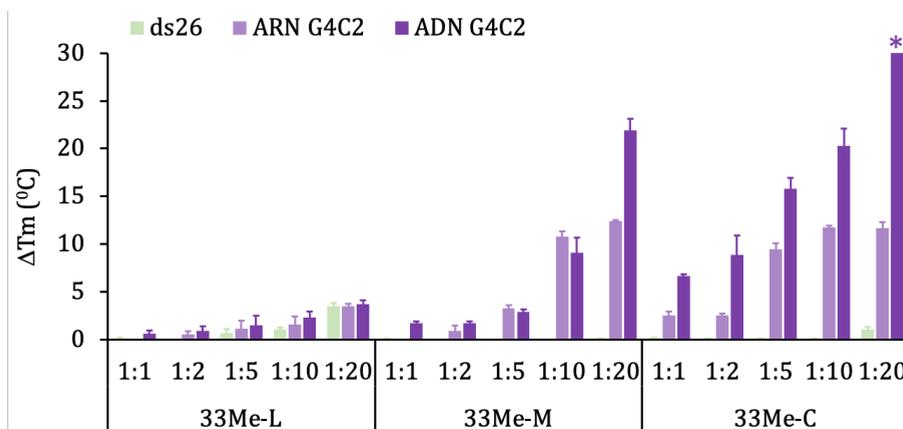


Figura 8.2. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos **33Me**.

Asimismo, el ligando **33Me-L** no diferencia entre las estructuras G4s de ADN/ARN G₄C₂ y el ADN dúplex. A medida que se incrementa la relación molar (ADN/ARN:L) la ΔT_m aumenta ligeramente, aunque en ningún caso alcanza los 4 °C.

8.1.3. Familia 33H

Los resultados obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica para familia **33H** se han representado gráficamente en la figura 8.3.

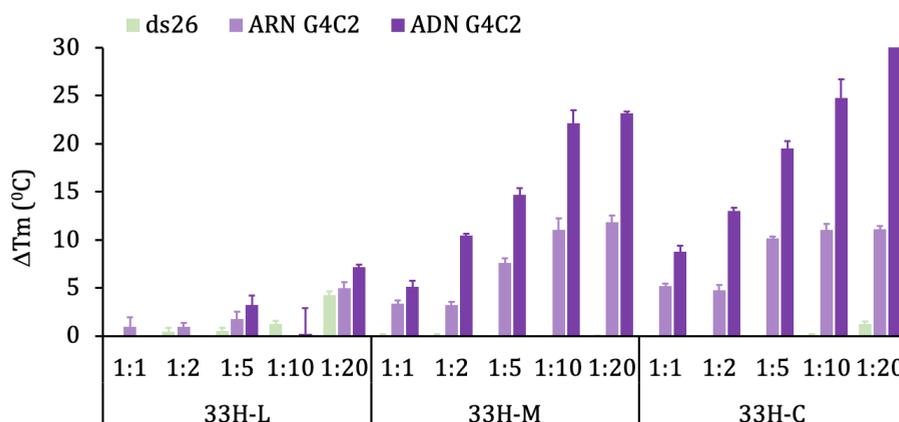


Figura 8.3. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos **33H**.

Con la eliminación de los grupos metilo de las cadenas poliamínicas se observa un ligero aumento en los valores de ΔT_m para la estructura de ADN (G₄C₂)₄, alcanzando para el ligando **33H-C** un valor de 24.8 °C; para el macrociclo **33H-M** el incremento de ΔT_m alcanza los 22.2 °C, siendo aún más grande la diferencia con respecto a su análogo metilado **33Me-M**.

Estos resultados indican una marcada preferencia de los ligandos de la familia **33H** por la estructura de G4 $(G_4C_2)_4$ frente a la $r(G_4C_2)_4$, mostrando en esta última tanto el ligando criptando como el macrociclo un valor de ΔT_m de 11.0 °C.

Es importante señalar de nuevo que **33H-C** y **33H-M** no mostraron estabilizar significativamente la estructura de doble hélice, lo que incide nuevamente en la selectividad de los ligandos macrocíclico y criptando por las estructuras G4s sobre la estructura de doble hélice.

Por último, el ligando lineal **33H-L** no estabiliza de forma significativa ninguna de las estructuras de ADN y ARN estudiadas, exhibiendo solo una cierta estabilización a relación molar elevada por las estructuras G4s y dúplex (1:20 de ADN/ARN:L), obteniéndose valores de ΔT_m de 5.0 °C para $r(G_4C_2)_4$, 7.1 °C para $(G_4C_2)_4$ y 4.2 °C para ds26.

8.1.4. Familia 22H

En la figura 8.4 se han representado gráficamente los valores de ΔT_m obtenidos para los ligandos **22H-M** y **22H-C**. Al igual que en la familia **33H** analizada anteriormente, al eliminar el grupo metilo de las cadenas poliamínicas se observa un aumento destacable de ΔT_m para la estructura de ADN $(G_4C_2)_4$ con el ligando macrocíclico **22H-M**, para el que se obtiene un valor de 19.2 °C. Para la estructura de ARN $r(G_4C_2)_4$ se obtuvo una ΔT_m de 9.1 °C, que es ligeramente superior a la de su análogo metilado **22Me-M**.

Respecto al criptando **22H-C**, los valores de ΔT_m son similares a los obtenidos para el **22Me-C** con una ΔT_m para $(G_4C_2)_4$ de 20.6 °C y para $r(G_4C_2)_4$ de 11.1 °C. Con todo ello, se observa de nuevo una clara preferencia por el ADN G_4C_2 frente al ARN. Cabe destacar que ninguno de los ligandos estabiliza de forma significativa la estructura de doble hélice.

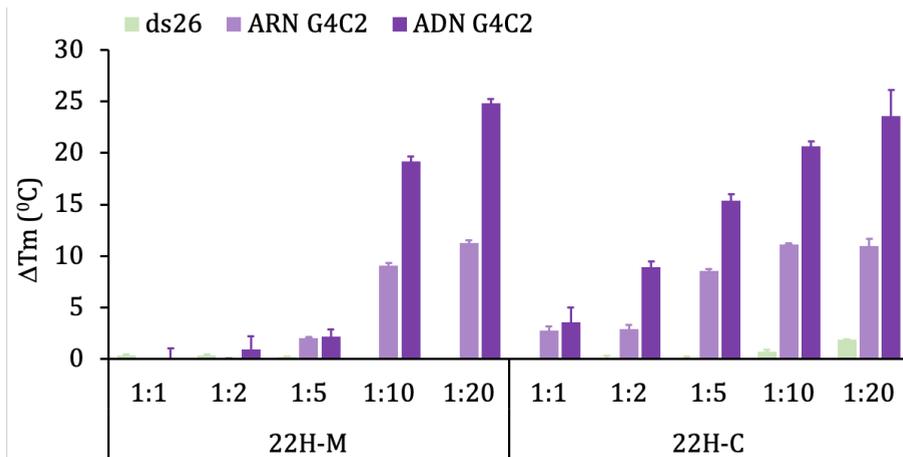


Figura 8.4. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos **22H**.

8.1.5. Familia Cad

Para concluir los estudios de desnaturalización térmica, se analizaron los compuestos de cadaverina **Cad-M** y **Cad-C**. En la figura 8.5 se encuentran representados gráficamente los valores de ΔT_m obtenidos.

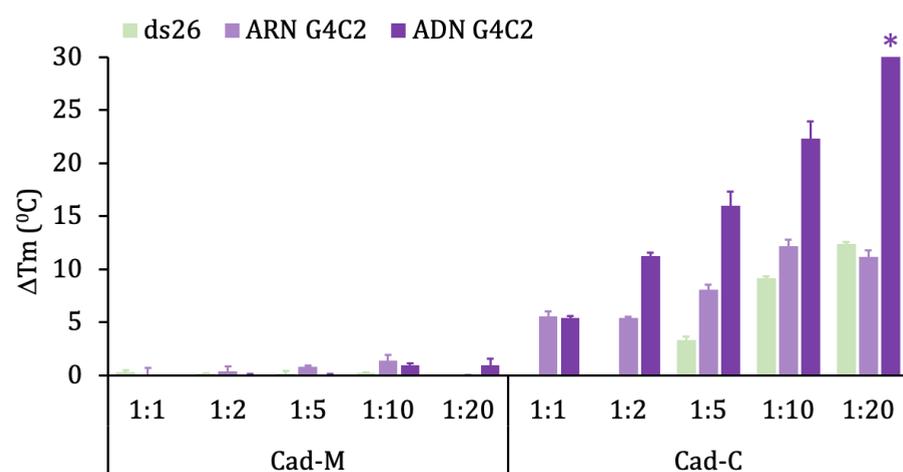


Figura 8.5. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos **22H**.

Al suprimir el grupo amino central de las cadenas poliaminicas, no se observa estabilización térmica significativa en el caso del macrociclo **Cad-M**, sugiriendo que la amina central es clave en la interacción con las estructuras G_4C_2 , ya que sus análogos **22Me-M** y **22H-M** sí que estabilizaban térmicamente las estructuras G_4C_2 de ADN y ARN. Sin embargo, el criptando **Cad-C**, sí que estabiliza las estructuras G4s G_4C_2 , en especial el ADN $(G_4C_2)_4$, exhibiendo un valor de ΔT_m de 22.3 °C. Las estabilizaciones observadas para el ARN $r(G_4C_2)_4$ y para la estructura dúplex fueron de 12.2 °C y 9.2 °C, respectivamente. Estos resultados

sugieren que los ligandos con los puentes cadaverina presentan una menor selectividad por las estructuras G4s frente a la doble hélice que los ligandos poliaminicos analizados anteriormente.

Para visualizar la distinta preferencia de los ligandos por las estructuras de ADN y ARN de forma más clara, se han representado graficamente en la figura 8.6 los valores de ΔT_m obtenidos para todos los ligandos estudiados en relación molar 1:10 (ADN/ARN:L).

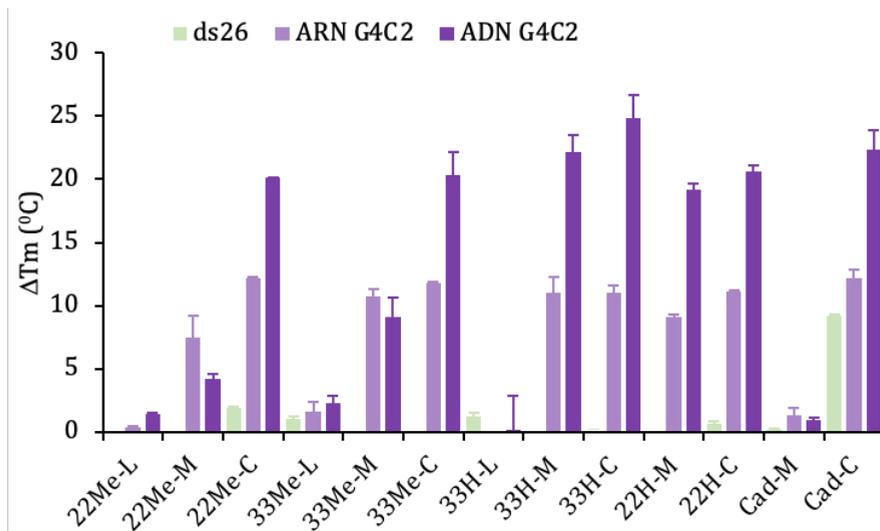


Figura 8.6. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de ADN y ARN con los ligandos estudiados en la relación molar ADN/ARN:L de 1:10.

Al igual que en los resultados obtenidos para las estructuras G4s monoméricas y multiméricas de los telómeros, la topología criptando exhibe los valores más elevados de ΔT_m para las estructuras G_4C_2 , seguido por la macrocíclica, mientras que la topología lineal no estabiliza significativamente ninguna estructura de ADN o ARN. Asimismo, cabe

destacar que todos los ligandos de cadenas poliamínicas con amina central de topología macrocíclica y criptando muestran una elevada preferencia por las estructuras G4s de ADN y ARN G_4C_2 frente a la doble hélice ds26. Además, como se puede observar en los ligandos de las familias **33H-M** y **22H-M**, la topología macrocíclica incrementa su capacidad de estabilización del ADN G_4C_2 al suprimir el grupo metilo de la amina central de las cadenas, lo que sugiere que este grupo amino central favorece la interacción con la estructura antiparalela de G4 mediante la formación de puentes salinos.

Asimismo, cabe resaltar que los ligandos macrocíclico y criptando han demostrado una mayor capacidad de estabilización térmica para el ADN G_4C_2 de topología antiparalela en comparación al ARN de topología paralela. Teniendo en cuenta que en el *capítulo 6* los ligandos proporcionaron una estabilización térmica significativamente mayor para HTelo(Na) de topología antiparalela que para HTelo(K) de topología híbrida, estos resultados indican una clara preferencia de los ligandos por la topología de G4 antiparalela frente al resto de topologías.

8.2. Ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol

A continuación, se estudió la afinidad de los ligandos sintetizados hacia la estructura de G-quadruplex G_4C_2 ($GGGGCC$)₄, mediante los ensayos de desplazamiento del naranja de tiazol. También se analizó la estructura de ADN dúplex (ds26) para evaluar la selectividad de los ligandos por la estructura de ADN G4 G_4C_2 frente a la estructura de doble hélice.

En el capítulo 3 de *Material y Métodos* se describe el fundamento teórico y la metodología de este ensayo, no obstante, se trata del mismo método de desplazamiento de indicador fluorescente ya utilizado en el capítulo 6 de *Interacción con G4s monoméricos*.

Los valores de IC₅₀ determinados se han recogido en la tabla 8.1 para comparar los resultados obtenidos con los diferentes ligandos. Asimismo, en el apartado de *Anexos* se muestran las representaciones gráficas de las valoraciones de fluorescencia realizadas, así como el ajuste del %TO calculado con el programa Origin.

Tabla 8.1. Valores de IC₅₀ determinados por el desplazamiento de TO.

Ligando	ds26	(G₄C₂)₄	G⁴S
22Me-C	>5	1.52	3.5*
22Me-M	4.97	1.00	5.0
22Me-L	>5	>5	3.5*
33Me-C	2.41	1.82	3.9
33Me-M	3.71	1.88	2.0
33Me-L	>5	>5	1.2*
33H-C	0.81	0.98	0.8
33H-M	3.10	1.09	2.8
33H-L	>5	>5	1.0*
22H-C	3.30	1.14	2.9
22H-M	4.97	0.91	5.5
Cad-C	1.67	1.89	0.9
Cad-M	3.43	1.90	1.8

* Valores de G⁴S estimados debido a la débil interacción con el ADN dúplex.

8.2.1. Familia 22Me

Al analizar las curvas del desplazamiento del %TO de la figura 8.7, se observa que los ligandos macrocíclico y criptando presentan una gran capacidad para interactuar con las estructuras de ADN $(G_4C_2)_4$. Así, los valores de IC_{50} obtenidos para los ligandos **22Me-C** y **22Me-M** con $(G_4C_2)_4$ son 1.0 y 1.5 μM , respectivamente, mientras que para la doble hélice muestran valores mayores a 5 μM . Cabe destacar que en este caso se observa una mayor interacción con las estructuras G4s $(G_4C_2)_4$ para el ligando macrocíclico que para el criptando, en contraste a los resultados observados en el ensayo de desnaturalización térmica.

Por otro lado, para el ligando **22Me-L** los valores de IC_{50} obtenidos tanto para la estructura de ADN G4 como para el dúplex son mayores a 5 μM ; no se alcanzó en ninguna de las dos estructuras de ADN el 50% del desplazamiento de TO en el intervalo de concentración de ligando empleado en el estudio (0-5 μM), indicando que no es un buen desplazador para las estructuras G4s G_4C_2 .

Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica donde los ligandos macrocíclico y criptando obtuvieron una mayor capacidad para estabilizar las estructuras G4s $(G_4C_2)_4$, mientras que el ligando lineal no estabilizó de forma significativa estas estructuras.

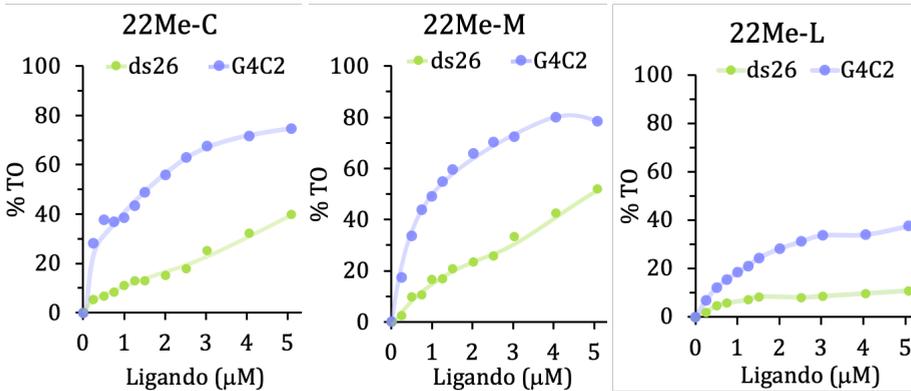


Figura 8.7. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de los ADN $(G_4C_2)_4$ y ds26 para los ligandos **22Me**.

8.2.2. Familia 33Me

Las curvas de desplazamiento del %TO en función de la concentración de ligando se han representado en la figura 8.8. Como se puede observar, los ligandos propilénicos **33Me-C** y **33Me-M**, al igual que sus análogos etilénicos de la familia **22Me**, son capaces de desplazar el indicador naranja de tiazol de la estructura $G_4 G_4C_2$.

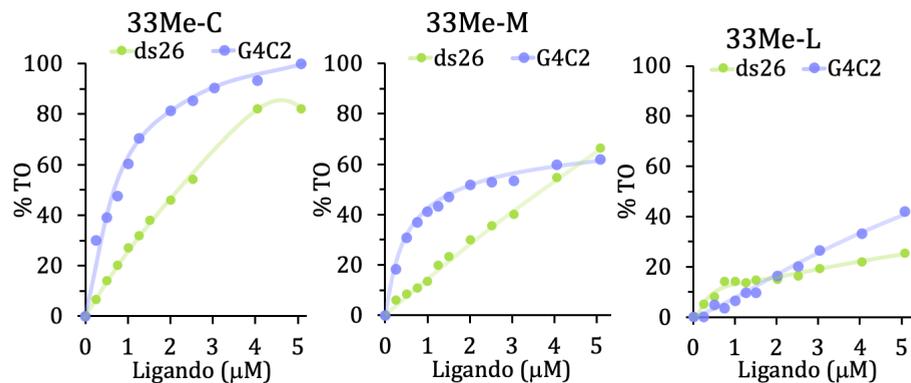


Figura 8.8. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de los ADN $(G_4C_2)_4$ y ds26 para los ligandos **33Me**.

Pese a que en el ensayo de desnaturalización térmica el criptando **33Me-C** exhibe una mayor capacidad de estabilización térmica para el G_4C_2 que el ligando macrocíclico **33Me-M**, el desplazamiento del TO da valores de IC_{50} muy similares, del orden de $1.8 \mu M$ para $(G_4C_2)_4$ (tabla 6.2). En el caso del ADN ds26 se obtuvieron valores de 2.4 y $3.7 \mu M$ para **33Me-C** y **33Me-M**, respectivamente. Asimismo, el ligando **33Me-L** no presentó ningún desplazamiento destacable de TO sobre ninguno de los ADN estudiados.

Cabe destacar que los valores de IC_{50} obtenidos para los ligandos de cadenas propilénicas **33Me-C** y **33Me-M** son mayores que los de sus análogos de cadenas etilénicas, lo que sugiere que la interacción con la estructura $G_4 (G_4C_2)_4$ se encuentra favorecida con las cadenas poliamínicas más cortas **22Me**.

8.2.3. Familia 33H

En el caso de la familia de ligandos de cadenas propilénicas no metiladas **33H**, aunque el criptando **33H-C** exhibe una gran capacidad de desplazamiento del %TO para la estructura de $G_4 (G_4C_2)_4$ como se puede ver en la tabla 8.1 y en la figura 8.9, también presenta una elevada capacidad para interactuar con la doble hélice, lo que da lugar a un valor de selectividad bajo.

La pérdida del grupo metilo en la amina central parece influenciar positivamente en la capacidad de interactuar con el $(G_4C_2)_4$ y desplazar el TO, ya que los ligandos **33H** exhiben valores de IC_{50} inferiores a los de sus análogos metilados **33Me**, si bien también desplaza el TO en la

estructura dúplex ds26. De nuevo, el ligando lineal no parece desplazar significativamente el TO en ninguna estructura de ADN estudiada.

Aunque en los ensayos de desnaturalización térmica se observa una capacidad elevada de estabilización térmica de los ligandos criptando y macrocíclico **33H** con el ADN $(G_4C_2)_4$, y una nula estabilización térmica con el ADN dúplex, en el ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol se ha obtenido una interacción similar entre ambas estructuras de ADN. De todas formas, cabe indicar que una variación grande en la temperatura de fusión no está implícitamente relacionada con un elevado desplazamiento de TO, ya que el ligando puede estar interaccionando y estabilizando la estructura G4 con un modo de unión distinto al TO.

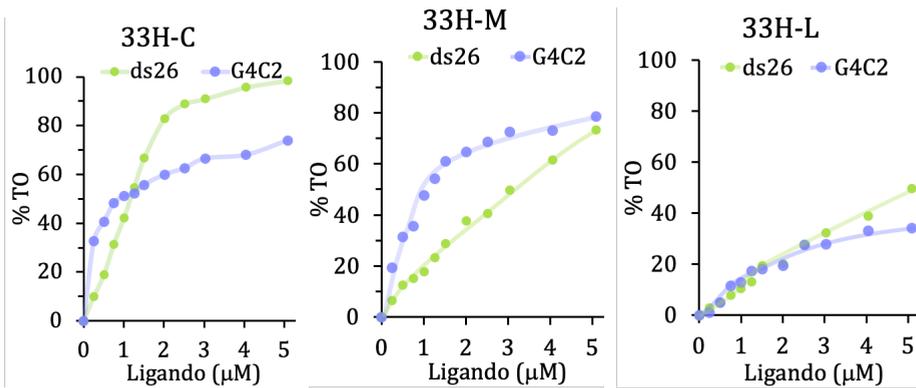


Figura 8.9. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de los ADN $(G_4C_2)_4$ y ds26 para los ligandos **33H**.

8.2.4. Familia 22H

Los resultados obtenidos para la familia **22H** son muy similares a la de su análoga metilada **22Me**, presentando el criptando **22H-C** y el macrociclo **22H-M** valores de IC_{50} para la estructura G4 (G_4C_2)₄ de 1.1 μM y 0.9 μM , respectivamente. Además, al igual que la familia **22Me**, el macrociclo **22H-M** presenta una interacción con la estructura (G_4C_2)₄ similar o superior a la del criptando (figura 8.10). Estos resultados ya se evidenciaron en los ensayos de desnaturalización térmica, donde ambos ligandos presentaron variaciones de temperatura de fusión muy similares.

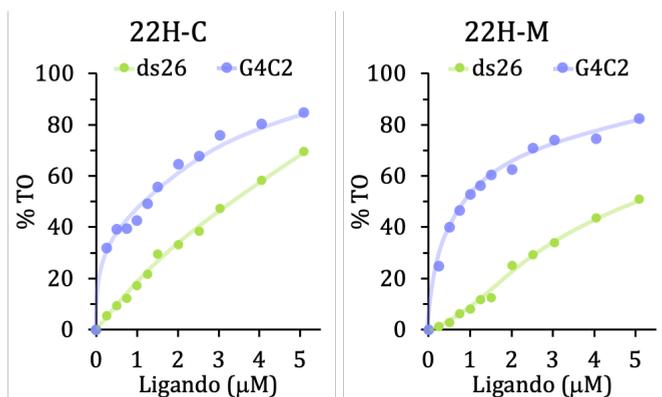


Figura 8.10. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de los ADN (G_4C_2)₄ y ds26 para los ligandos **22H**.

8.2.5. Familia Cad

Finalmente, los ligandos compuestos por la poliamina cadaverina, **Cad-C** y **Cad-M**, muestran valores de IC_{50} para el ADN $(G_4C_2)_4$ del orden de 1.9 μ M. A su vez, los ligandos exhibieron para el ADN dúplex valores de IC_{50} de 1.7 y 3.4 μ M, respectivamente.

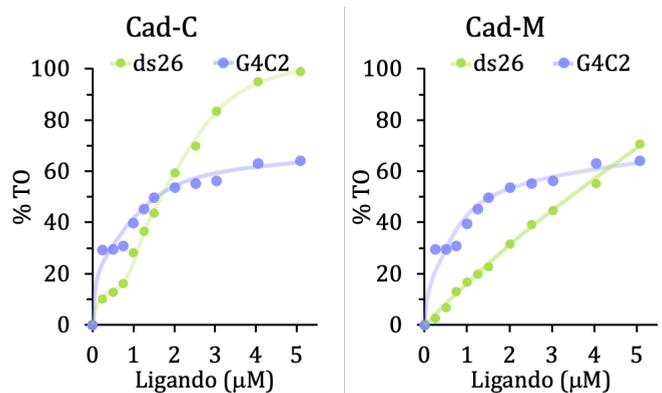


Figura 8.11. Representación gráfica del porcentaje de TO desplazado de los ADN $(G_4C_2)_4$ y ds26 para los ligandos **Cad**.

En este caso con la familia **Cad**, los resultados obtenidos sobre su interacción con la estructura G4 $(G_4C_2)_4$ tienen una tendencia similar a los de la familia **33H**. Como se puede observar, el criptando **Cad-C** al igual que el **33H-C**, desplaza el TO en mayor medida de la doble hélice. Como resultado, se obtiene para el criptando **Cad-C** una baja selectividad por la estructura (G_4C_2) frente a la doble hélice, como ya se indicó en los resultados en el ensayo de desnaturalización térmica.

8.2.6. Estudio de la selectividad en el ensayo de desplazamiento

Para visualizar de forma más clara la selectividad de los ligandos por el ADN G-quadruplex frente al dúplex, se calculó el valor de selectividad (G^4S) a partir del cociente entre los valores de IC_{50} obtenidos para G_4C_2 y los del dúplex (tabla 8.1). De este modo, se han clasificado los ligandos en selectivos ($S > 1$) y no selectivos ($S \sim 1$).

Los valores de selectividad obtenidos para $(G_4C_2)_4$ revelan que los ligandos de cadenas etilénicas **22Me-C**, **22Me-M**, **22H-C** y **22H-M** son selectivos hacia la estructura de ADN G4 $(G_4C_2)_4$ frente al ADN dúplex.

Por otro lado, el ligando criptando de cadenas propilénicas metiladas **33Me-C** muestra un valor de G^4S moderadamente selectivo frente al criptando propilénico no metilado **33H-C**, el cual exhibió un valor de IC_{50} más bajo para $(G_4C_2)_4$ ($G^4S < 1$). En contraste, los ligandos de topología macrociclo de cadenas propilénicas metiladas **33Me-M** y no metiladas **33H-M**, exhibieron una interacción fuerte con la estructura G4 $(G_4C_2)_4$ frente a la doble hélice, exhibiendo valores de $G^4S \geq 2$.

8.3. Bibliografía

1. Wang, E., Thombre, R., Shah, Y., Latanich, R. & Wang, J. G-Quadruplexes as pathogenic drivers in neurodegenerative disorders. *Nucleic Acids Res.* **49**, 4816–4830 (2021).
2. Wang, Z.-F. *et al.* The Hairpin Form of r(G₄C₂) in c9ALS/FTD Is Repeat-Associated Non-ATG Translated and a Target for Bioactive Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* **26**, 179-190 (2019).
3. Taylor, J. P. G-quadruplex poses quadruple threat. *Nature* **507**, 175–177 (2014).
4. Haeusler, A. R. *et al.* C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* **507**, 195–200 (2014).
5. Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S. Y. R., Macgregor, R. B. & Pearson, C. E. The Disease-associated r(GGGGCC) Repeat from the C9orf72 Gene Forms Tract Length-dependent Uni- and Multimolecular RNA G-quadruplex Structures. *J. Biol. Chem.* **288**, 9860–9866 (2013).
6. Simone, R., Fratta, P., Neidle, S., Parkinson, G. N. & Isaacs, A. M. G-quadruplexes: Emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome. *FEBS Lett.* **589**, 1653–1668 (2015).

7. Simone, R. *et al.* G-quadruplex-binding small molecules ameliorate C9orf72 FTD / ALS pathology in vitro and in vivo. *EMBO Mol. Med.* **10**, 22–31 (2018).
8. Wang, Z.-F. *et al.* The Hairpin Form of r(G4C2)_{exp} in c9ALS/FTD Is Repeat-Associated Non-ATG Translated and a Target for Bioactive Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* **26**, 179-190.e12 (2019).
9. Su, Z. *et al.* Discovery of a Biomarker and Lead Small Molecules to Target r(GGGGCC)-Associated Defects in c9FTD/ALS. *Neuron* **83**, 1043–1050 (2014).



G4s en desordenes neuronales



Evaluación de la capacidad
de encapsulación de los
ligandos poliamínicos

Capítulo 9. Evaluación de la capacidad de encapsulación de los ligandos poliamínicos

Tras demostrar que algunos de los ligandos sintetizados interaccionan y estabilizan estructuras G-quadruplex, nos centramos en la posibilidad de acomodar y transportar pequeñas moléculas, como fármacos, en su interior para su aplicación terapéutica.

La encapsulación con criptandos y macrociclos resulta una estrategia alternativa para introducir como “caballo de Troya” fármacos y/o otras sondas moleculares dentro de la célula. Esta idea ya fue reconocida en 1977 con los criptandos sintetizados por Lehn, capaces de transportar metales alcalinos a través de membranas lipídicas.^{1,2} Lehn destaca la capacidad de diseñar receptores moleculares con una forma y carga complementarias a sustratos específicos, de forma que permita su reconocimiento molecular. Estos complejos receptor - sustrato pueden ser utilizados en la creación de sistemas de liberación de fármacos más efectivos y específicos, lo que permite una administración más controlada y dirigida de los fármacos a su diana terapéutica.³

En la literatura se han descrito numerosos criptandos capaces de actuar como huéspedes de especies aniónicas. Existen distintos tipos de interacciones que se pueden utilizar para reconocer especies aniónicas, de entre ellas, las interacciones más relevantes son las fuerzas coulombianas y la formación de puentes de hidrógeno.⁴ Los criptandos y macrociclos con puentes amino, amida, y separadores heterocíclicos como pirrol, imidazol y piridina entre otros, pueden encapsular huéspedes aniónicos mediante interacciones electrostáticas, y puentes

de hidrógeno. La protonación de las aminas les confiere carga positiva, lo que facilita su solubilidad en agua y les permite interactuar electrostáticamente con especies aniónicas, así como formar puentes salinos en un amplio intervalo de pH. Asimismo, el reconocimiento molecular también depende de la acción cooperativa de otras fuerzas intermoleculares más débiles como interacciones de apilamiento π y efectos hidrofóbicos.

En el grupo de Química Supramolecular del Prof. Enrique García-España de la Universidad de Valencia se han descrito numerosos ligandos de topología macrocíclica y criptando con unidades heterocíclicas, activos frente a distintas enfermedades neurodegenerativas y/o con capacidad antiparasitaria.^{5,6} Más recientemente, en el mismo grupo la Dra. Teresa Albelda diseñó liposomas con propiedades teranósticas que, en la Tesis de la Dra. Isabel Pont, se utilizaron para encapsular e internalizar ligandos que a pesar de tener una gran afinidad por el ADN G4, presentaban baja captación celular. La estrategia formulada permitía también la utilización de los liposomas como agentes de contraste y/o sensores fluorescentes.^{7,8}

En este capítulo se describe la encapsulación de moléculas de interés biológico, como el fluoróforo piranina (**Pyr**),¹⁰ y el fármaco anticancerígeno 5-Fluorouracilo (**5-Fu**).

9.1. Estudio potenciométrico de los compuestos de interés biológico

En primer lugar, se estudió el comportamiento ácido-base de las moléculas escogidas para su encapsulación. Ambas especies, **5-Fu** y **Pyr**, son solubles en disolución acuosa.^{9,10}

El **5-Fu** es un derivado del uracilo en el que se ha sustituido el protón en la posición 5 por un átomo de flúor (Figura 9.1). El **5-Fu** se utiliza en terapias combinatorias para el tratamiento del cáncer mostrando actividad sinérgica con algunos fármacos de segunda línea, como el Resveratrol.¹¹ Más del 80% del **5-Fu** administrado es catabolizado a su metabolito inactivo **DHFU** (5,6-dihidro-5-fluorouracil), y como consecuencia, una menor cantidad del fármaco es capaz de llegar a su diana tumoral.¹² En este sentido, se han diseñado varias estrategias para optimizar la biodistribución del **5-Fu** y su efecto antitumoral, de entre ellas cabe destacar la encapsulación del fármaco en nanocapsulas, lo que conlleva un aumento de la citotoxicidad del **5-Fu** en diversas líneas celulares cancerígenas, así como un incremento de su eficiencia terapéutica.^{13,14} En este trabajo, como estrategia alternativa, nos planteamos la internalización del fármaco en los ligandos sintetizados.

El comportamiento del **5-Fu** en disolución acuosa proporciona información sobre cómo el pH influye en la captación del fármaco anticancerígeno. Esta información puede ser utilizada para mejorar su actividad anticancerígena y selectividad.¹⁵ Los mecanismos de desprotonación del **5-Fu** son en principio difíciles de establecer debido a que esta molécula tiene distintos grupos capaces de participar en

equilibrios acido-base. Las formas aniónicas más probables son **AN1** (desprotonación en el N1) y **AN3** (desprotonación en el N3), mostradas en la figura 9.1.¹⁶

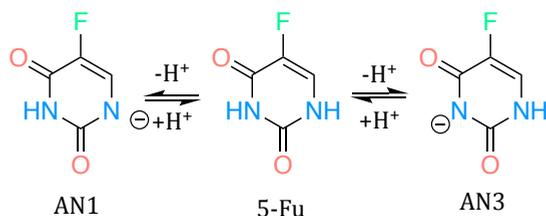


Figura 9.1. Posibles aniones del 5-Fu (AN1 y AN3).

La **Pyr** es una molécula orgánica pequeña cargada negativamente, la cual posee un grupo hidroxilo que puede desprotonarse en medio acuoso (figura 9.2). Ambas formas son fluorescentes, con máximos de absorción a 405 nm para la forma protonada y a 460 nm para la forma desprotonada.¹⁷

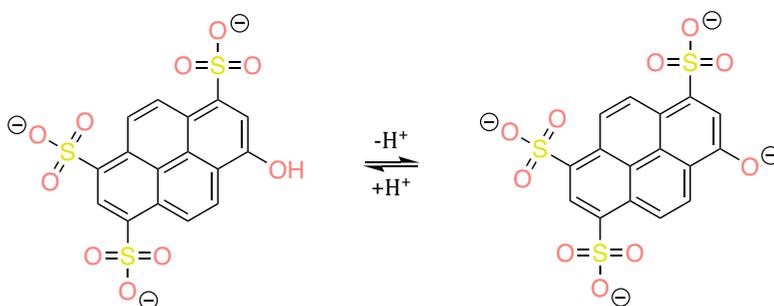


Figura 9.2. Estructura molecular de la piranina y su forma desprotonada.

Gracias a sus propiedades fluorescentes, a su solubilidad en agua y a su elevada sensibilidad al pH, la piranina ha sido ampliamente utilizada como indicador de pH; sin embargo, es una molécula incapaz de atravesar

la membrana celular debido a su carácter hidrófilo.¹⁸ Por ello, el uso de la **Pyr** en la medición del pH en entornos celulares requiere la utilización de métodos de internalización, la mayoría de ellos basados en endocitosis, como por ejemplo, en el interior y en la superficie de los liposomas,¹⁹ en vesículas endocíticas,²⁰ y en orgánulos endocíticos de neuronas.²¹ Recientemente se ha descrito en la bibliografía un criptando con conectores tris-bipiridina capaz de encapsular la **Pyr** con una afinidad elevada en disolución acuosa, sin embargo, su captación celular es baja. La incorporación de cadenas peptídicas en el criptando permite la internalización de **Pyr** en el citosol y en el núcleo de diversas líneas celulares.^{22,23}

En este sentido, nos propusimos la encapsulación de la **Pyr** en los ligandos sintetizados con el objetivo de desarrollar un sistema capaz de estabilizar los G4s que, a su vez, actúe como sonda para detectarlos dentro de la célula.

9.1.1. Comportamiento ácido-base de 5-Fu y Pyr

Mediante potenciometría se determinaron las constantes de protonación del **5-Fu** y de la **Pyr**. Esta técnica se describe en el *capítulo 3 de Material y Métodos* y se utilizó en el *capítulo 5 de Comportamiento Ácido-Base* para describir el comportamiento ácido-base de los ligandos. En la tabla 9.1 se presentan las constantes de protonación de **5-Fu y Pyr** obtenidas en NaCl 0.15 M a 298.1 K y, seguidamente, en la figura 9.3 se representan los diagramas de distribución.

Tabla 9.1. Logaritmos de las constantes de protonación (K_a) de **5-Fu** y **Pyr** en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

Reacción ^a	Log K_a
$H + \text{Fu} \rightleftharpoons \text{HFu}$	7.80(5) ^b
$H + \text{Pyr} \rightleftharpoons \text{HPyr}$	7.17(8)

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa entre paréntesis.

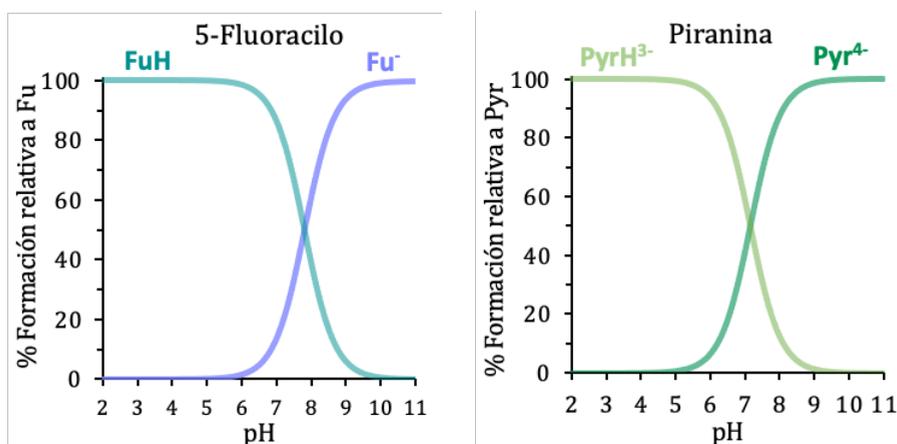


Figura 9.3. Diagramas de distribución de especies obtenidos a partir de las constantes de protonación para **5-Fu** y **Pyr**.

En los diagramas de distribución se observan dos especies tanto para **5-Fu** como para **Pyr** en el intervalo de pH de trabajo (2 – 11).

El único equilibrio ácido-base determinado para **5-Fu** ($pK_a = 7.8$) se debe producir en el nitrógeno N1, como se corroboró en un estudio de mecánica cuántica DFT (*Density Functional Theory*), donde se calculó un valor pK_a de 7.76 para la desprotonación del nitrógeno N1 del **5-Fu**, que es prácticamente el mismo valor que el obtenido experimentalmente.²⁴

Respecto a **Pyr**, se determinó un único equilibrio de protonación ($pK_a = 7.17$). Este equilibrio debe tener lugar en el grupo hidroxilo, ya que no es posible observar la protonación de los sulfonatos de la piranina debido a que los ácidos sulfónicos son ácidos muy fuertes en disolución acuosa (pK_a 1-2).²⁵

Como puede observarse en los diagramas de distribución de **5-Fu** y **Pyr** (figura 9.3), a pH fisiológico coexisten ambas formas: protonada y desprotonada. Las cargas promedio calculadas a pH fisiológico para **5-Fu** y **Pyr** son -0.29 y -3.63, respectivamente.

9.1.2. Estudios de encapsulación

Tras determinar las constantes de protonación de las moléculas **5-Fu** y **Pyr**, y las de los ligandos **22Me-L**, **22Me-M**, **22Me-C**, **22H-C** y **Cad-C**, se ha estudiado su interacción mediante valoraciones potenciométricas. Se estudió la interacción del **5-Fu** y de la **Pyr** con los ligandos de distinta topología de la familia **22Me**. Además, para la molécula de **Pyr** se evaluaron también los ligandos **22H-C** y **Cad-C**, para analizar el efecto que producía la modificación de la cadena poliamínica en la interacción del sistema criptando.

En la tabla 9.2 se presentan los logaritmos de las constantes de asociación determinadas en disolución acuosa 0.15 M de NaCl a temperatura de 298.1 K.

Tabla 9.2. Logaritmos de las constantes globales (β) para la formación de los complejos binarios de **5-Fu** con los ligandos **22Me** en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

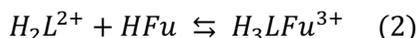
Reacción ^a	22Me-L	22Me-M	22Me-C
$H + L + Fu \rightleftharpoons HLFu$	13.88(4) ^b	-	-
$2H + L + Fu \rightleftharpoons H_2LFu$	21.43(1)	-	-
$3H + L + Fu \rightleftharpoons H_3LFu$	29.33(4)	-	-
$4H + L + Fu \rightleftharpoons H_4LFu$	32.79(8)	35.79(5)	37.80(1)
$5H + L + Fu \rightleftharpoons H_5LFu$		42.96(8)	46.30(3)
$6H + L + Fu \rightleftharpoons H_6LFu$		46,84(9)	53.93(9)
$7H + L + Fu \rightleftharpoons H_7LFu$			61.82(3)

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa entre paréntesis.

Como es posible observar en la tabla 9.2, los complejos binarios formados son especies mononucleares, en los cuales se forman especies de estequiometría H_xLFu , donde el grado de protonación x varía desde 1 hasta 4 para **22Me-L**, desde 4 hasta 6 para **22Me-M** y desde 4 hasta 7 para los complejos con **22Me-C**. Cabe destacar que no fue posible obtener las primeras constantes de protonación para los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, debido a que a pH básico precipitaban.

Teniendo en cuenta la basicidad intrínseca de los ligandos sintetizados y del **5-Fu**, éstos pueden participar en varios equilibrios de protonación que se solapan con frecuencia. Por ello, es necesario tener cuidado a la hora de decidir cuáles son los equilibrios correctos representativos de la formación de los distintos aductos. Por ejemplo, en el caso del ligando **22Me-L**, la especie H_3LFu^{3+} se forma en una región de pH donde se produce un solapamiento de especies, pudiendo formarse a

través de los equilibrios (1) y (2) con constantes de equilibrio 10.67 y 5.37, respectivamente. La constante de formación del equilibrio (1) es demasiado elevada considerando las constantes de estabilidad efectivas (K_{ef}) calculadas más adelante, mientras que la constante del equilibrio (2) sí se encuentra en concordancia.²⁶



Mediante este tipo de análisis, se han estimado a partir de las constantes de basicidad globales las constantes sucesivas de formación de los aductos (Tabla 9.3).

Tabla 9.3. Logaritmos de las constantes sucesivas (K_α) para la formación de los complejos binarios de **5-Fu** con los ligandos **22Me** en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

Reacción ^a	22Me-L	22Me-M	22Me-C
Fu + HL \rightleftharpoons HLFu	4.18(4)	-	-
Fu + H₂L \rightleftharpoons H₂LFu	5.27(7)	-	-
HFu + H₂L \rightleftharpoons H₃LFu	5.37(7)	-	-
HFu + H₃L \rightleftharpoons H₄LFu	6.33(8)	-	-
Fu + H₄L \rightleftharpoons H₄LFu		4.73(5)	4.14(1)
HFu + H₄L \rightleftharpoons H₅LFu		4.10(8)	-
Fu + H₅L \rightleftharpoons H₅LFu		-	4.08(3)
HFu + H₅L \rightleftharpoons H₆LFu		5.01(9)	-
Fu + H₆L \rightleftharpoons H₆LFu		-	5.50(9)
HFu + H₆L \rightleftharpoons H₇LFu			4.59(5)

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa entre paréntesis.

Con los datos obtenidos, se han representado los diagramas de distribución de especies mostrados en las figuras 9.4 - 9.6. Debido a la precipitación de los sistemas **22Me-M** y **22Me-C** a pH básico, solo han sido representados hasta pH 9.

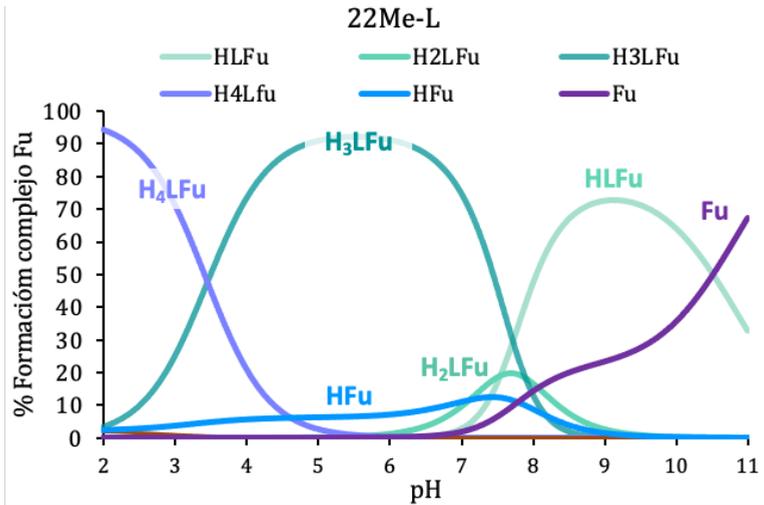


Figura 9.4. Diagramas de distribución de especies para **5-Fu** con **22Me-L**.

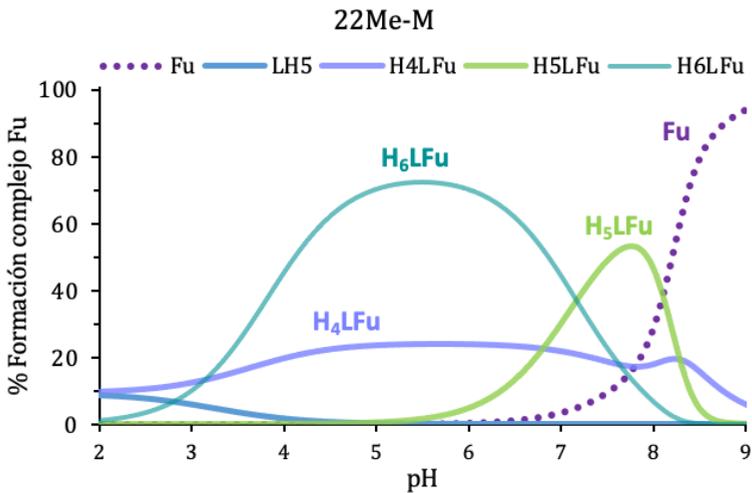


Figura 9.5. Diagrama de distribución de especies para **5-Fu** con **22Me-M**.

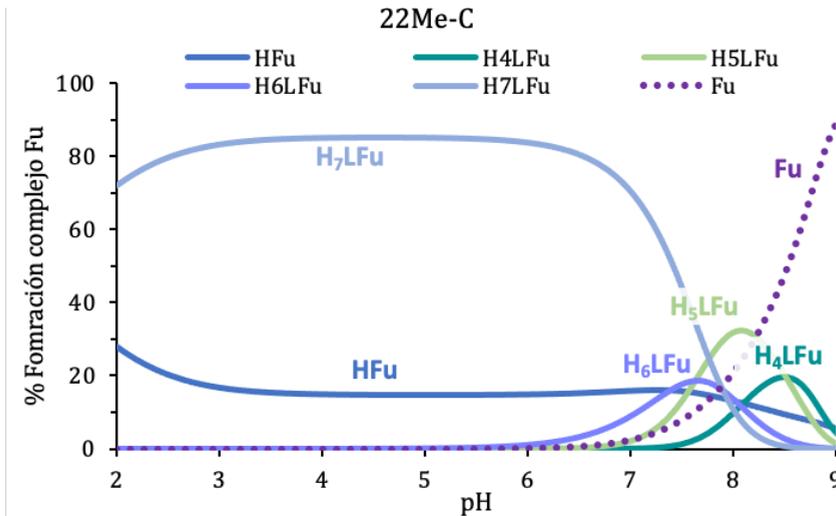


Figura 9.6. Diagrama de distribución de especies para 5-Fu con 22Me-C.

El diagrama de distribución para el ligando **22Me-L** indica que predominan las especies binarias **Fu-L** en un amplio intervalo de pH (2 - 11); mientras, para los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** las especies resultantes de su interacción con **5-Fu** predominan solo desde pH ácido hasta pH ligeramente básico (2 - 8), ya que, como se indicó anteriormente, por encima de estos valores de pH se observa precipitación, lo que impide realizar el estudio.

Para cuantificar la interacción de las especies binarias formadas a los distintos valores de pH estudiados, independientemente del grado de protonación de receptor y sustrato, se pueden definir las constantes efectivas mediante la ecuación siguiente:

$$K_{ef} = \frac{\sum[H_{i+j} L Fu]}{(\sum[H_i Fu] \cdot \sum[H_i L])} \quad (\text{ec. 9.1})$$

Donde el término $\Sigma[\text{HiFu}]$ representa la cantidad total del **5-Fu** libre, $\Sigma[\text{HiL}]$ representa la cantidad total del ligando libre y el término $\Sigma[\text{Hi}_i\text{+jLFu}]$ hace referencia a la cantidad de complejo formado a un determinado pH. Con el fin de facilitar su interpretación, se emplea la representación del logaritmo de K_{ef} en función del pH, mostrada en la figura 9.7. Además, en la tabla 9.4 se han recogido los valores de las constantes efectivas a pH fisiológico (7.4), pH de interés para los futuros estudios biológicos.

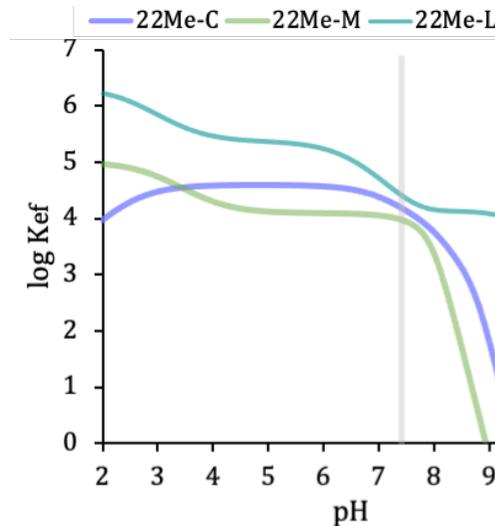


Figura 9.7. Representación de la constante efectiva frente al pH para los sistemas binarios entre **22Me-L**, **22Me-M** y **22Me-C** con **5-Fu**.

Tabla 9.4. Logaritmos de las constantes efectivas (K_{ef}) calculadas a pH 7.4 a partir de las representaciones gráficas para la interacción con **5-Fu** determinadas en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

	22Me-L	22Me-M	22Me-C
Log K_{ef}	4.42	3.99	4.19

Se observa que las constantes efectivas en los sistemas binarios ligando-Fu alcanzan un máximo en el intervalo de pH de ácido a neutro, donde los ligandos se encuentran con un mayor número de cargas positivas. Esto sugiere que las interacciones electrostáticas deben ser la fuerza principal en la formación de los complejos. A medida que aumenta el pH, disminuye la carga positiva en los ligandos, lo que a su vez hace que la interacción disminuya, a pesar de que el **5-Fu** adquiera carga negativa a valores de pH básicos ($pK_a = 7.80$).

Al analizar las constantes efectivas calculadas de los sistemas binarios se observa que las constantes de **22Me-L** son superiores a las del resto de ligandos. Este hecho podría corresponder con la optimización de las diferentes fuerzas que actúan en la unión entre el **5-Fu** y el ligando, incluyendo las interacciones electrostáticas, de apilamiento entre las unidades aromáticas del **TPA** y el **5-Fu**, y de solvatación, entre otras.

No obstante, a pH fisiológico las constantes efectivas muestran una gran similitud entre ellas, lo que indica una fuerza de unión notablemente similar entre los ligandos y el **5-Fu**, lo que sugiere que la interacción entre los diferentes ligandos de la familia **22Me** con el huésped **5-Fu** es muy similar.

A continuación, en la tabla 9.4. se encuentran los logaritmos de las constantes de asociación de los complejos formados por los ligandos de la familia **22Me** junto con las de los criptandos **22H-C** y **Cad-C** con **Pyr**.

Encapsulación con ligandos

Tabla 9.4. Logaritmos de las constantes globales (K_{β}) para la formación de los complejos binarios de **Pyr** con los ligandos **22Me** en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

Reacción ^a	22Me-L	22Me-M	22Me-C	22H-C	Cad-C
$H + L + Pyr \rightleftharpoons HL\text{Pyr}$	13.1(1) ^b	-	-	-	-
$2H + L + Pyr \rightleftharpoons H_2L\text{Pyr}$	21.19(9)	-	-	-	-
$3H + L + Pyr \rightleftharpoons H_3L\text{Pyr}$	38.51(7)	29.46(3)	-	33.4(2)	-
$4H + L + Pyr \rightleftharpoons H_4L\text{Pyr}$	31.60(1)	36.32(8)	-	42.57(2)	41.92(6)
$5H + L + Pyr \rightleftharpoons H_5L\text{Pyr}$		42.2(1)	48.27(7)	51.48(2)	51.86(2)
$6H + L + Pyr \rightleftharpoons H_6L\text{Pyr}$		-	56.42(5)	59.32(2)	60.49(3)
$7H + L + Pyr \rightleftharpoons H_7L\text{Pyr}$		-	63.52(7)	65.73(3)	66.36(8)
$8H + L + Pyr \rightleftharpoons H_8L\text{Pyr}$			68.67(8)	70.32(4)	-
$9H + L + Pyr \rightleftharpoons H_9L\text{Pyr}$			-	73.7(4)	-

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa entre paréntesis.

Al igual que con el **5-Fu**, los ligandos forman especies mononucleares con la **Pyr**. En los sistemas binarios ligando-**Pyr** se forman especies de estequiometría $H_xL\text{Pyr}$, donde x varía desde 1 hasta 4 para **22Me-L**, desde 3 hasta 5 para **22Me-M**, y desde 5 hasta 8 para **22Me-C**. Es interesante destacar que para el ligando **22H-C** fue posible determinar un mayor número de especies que para el ligando **22Me-C** (x varía desde 3 a 9). Este hecho puede deberse a la mayor solubilidad del ligando **22H-C** debido a la ausencia de grupos metilo en la amina central de la cadena poliamínica. Finalmente, el sistema del criptando **Cad-C** con **Pyr** proporcionó especies $H_xL\text{Pyr}$ donde x varía de 4 a 7.

Teniendo en cuenta las constantes de basicidad de los ligandos y de la piranina, las constantes de formación globales obtenidas para los aductos se pueden descomponer en constante sucesivas. Así, en la siguiente tabla se han recogido los logaritmos de las constantes sucesivas de formación para los aductos con **Pyr**.

Tabla 9.5. Logaritmos de las constantes globales (β) para la formación de los complejos binarios de **Pyr** con los ligandos **22Me** en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

Reacción ^a	22Me-L	22Me-M	22Me-C	22H-C	Cad-C
$\text{Pyr} + \text{HL} \rightleftharpoons \text{HLPyr}$	3.40(4)	-	-	-	-
$\text{HPyr} + \text{HL} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{LPyr}$	4.28(8)	-	-	-	-
$\text{HPyr} + \text{H}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{LPyr}$	5.15(7)	-	-	-	-
$\text{Pyr} + \text{H}_3\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{LPyr}$		5.63(3)	-	6.53(2)	-
$\text{HPyr} + \text{H}_3\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_4\text{LPyr}$	5.74(7)	5.32(8)	-	-	-
$\text{Pyr} + \text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_4\text{LPyr}$		5.26(2)	-	6.85(2)	6.43(6)
$\text{HPyr} + \text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{LPyr}$		3.98(8)	-	-	-
$\text{Pyr} + \text{H}_5\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{LPyr}$		-	6.06(2)	7.74(2)	8.02(2)
$\text{HPyr} + \text{H}_5\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_6\text{LPyr}$		-	7.05(8)	-	-
$\text{Pyr} + \text{H}_6\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_6\text{PyrL}$		-	6.99(7)	8.11(2)	8.91(3)
$\text{HPyr} + \text{H}_6\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_7\text{LPyr}$		-	6.94(8)	7.35(8)	7.60(8)
$\text{HPyr} + \text{H}_7\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_8\text{LPyr}$			9.53(8)	8.16(8)	-
$\text{HPyr} + \text{H}_8\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_9\text{LPyr}$			-	8.99(8)	-

^aSe han omitido las cargas. ^bValor de la desviación estándar de la última cifra significativa entre paréntesis.

A partir de los datos obtenidos, con el programa Hyss se calcularon los diagramas de distribución presentados en las figuras 9.9 - 9.13. Para los ligandos **22Me-M**, **22Me-C**, y **Cad-C** no fue posible medir a pH básico el potencial ya que se producía precipitación, de este modo solo se han representado hasta pH 9 sus diagramas de distribución.

En un primer análisis de los diagramas de distribución, se puede observar como las especies binarias H_xLPyr se forman de forma cuantitativa en un amplio intervalo de pH para **22Me-M**, y particularmente para los ligandos criptando **22Me-C**, **22H-C** y **Cad-C**. La única diferencia destacable entre los ligandos estudiados aparece para el **22Me-L**, donde las especies binarias H_2LPyr^{2+} y $HLPy^+$ coexisten junto a la especie de ligando protonada HL^+ en el rango de pH 7 - 9. Esta observación podría deberse a la menor estabilidad de los complejos formados por el ligando **22Me-L** y la molécula de piranina.

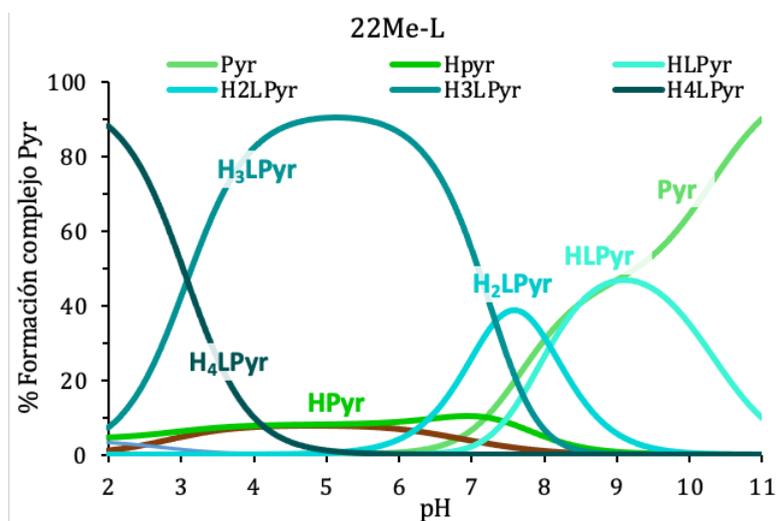


Figura 9.9. Diagrama de distribución de especies para Pyr con **22Me-L**.

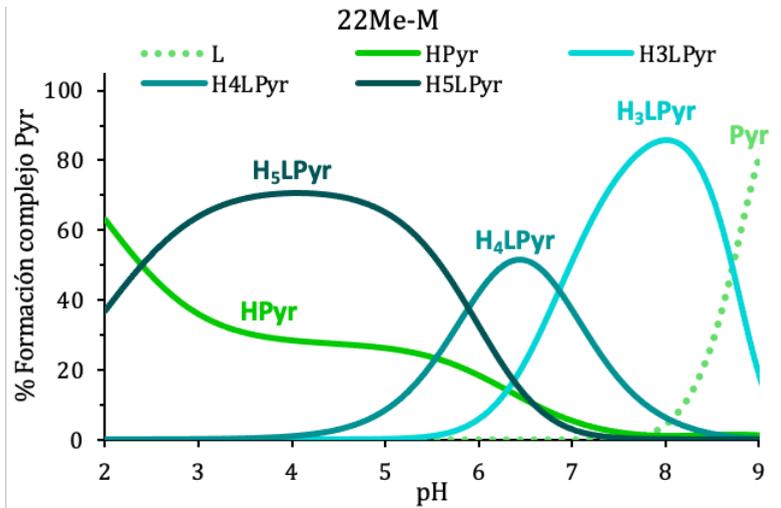


Figura 9.10. Diagrama de distribución de especies para **Pyr** con 22Me-M.

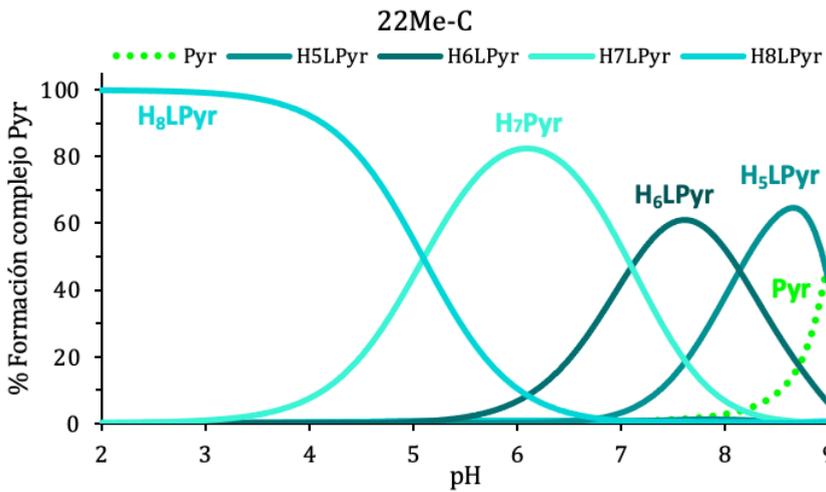


Figura 9.11. Diagrama de distribución de especies para **Pyr** con 22Me-C.

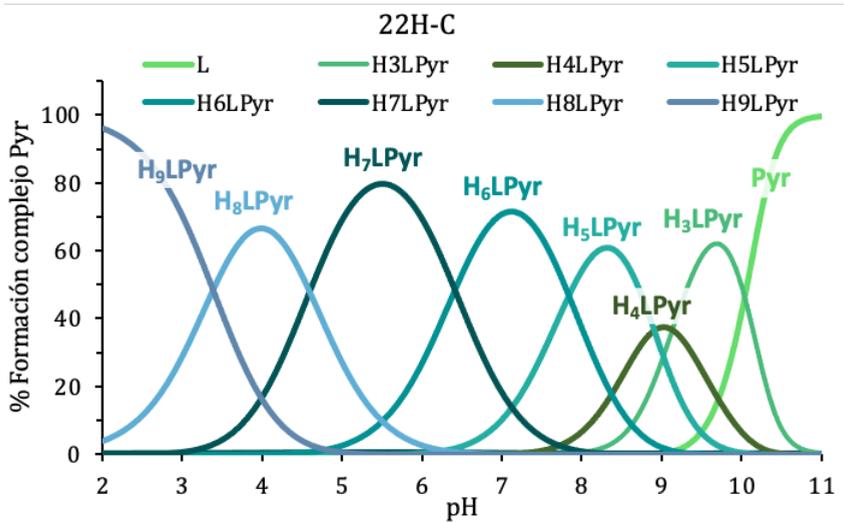


Figura 9.12. Diagrama de distribución de especies para Pyr con 22H-C.

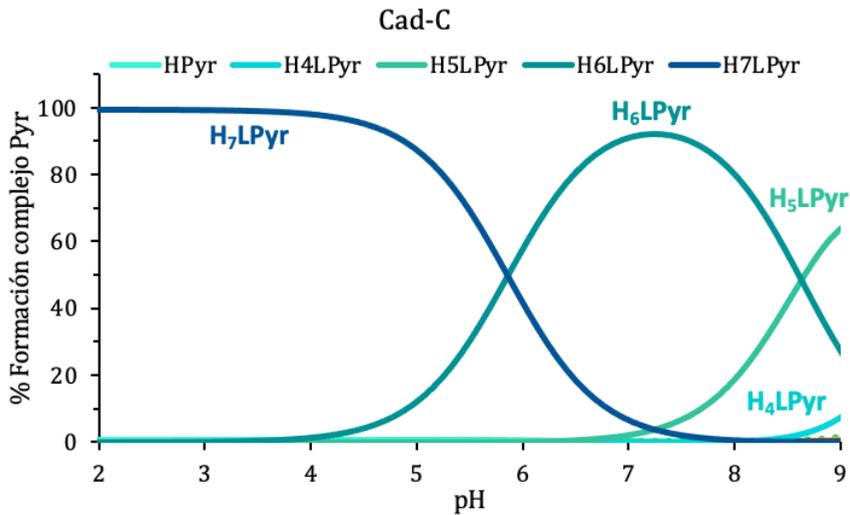


Figura 9.13. Diagrama de distribución de especies para Pyr con Cad-C.

Para continuar con el análisis, se calcularon las constantes efectivas de los sistemas binarios a pH fisiológico (7.4), recogidas en la tabla 9.6 para comparar sus estabildades relativas. Además, en la figura 9.14 se encuentra representada la variación de las constantes efectivas en función del pH para cada sistema binario ligando–piranina.

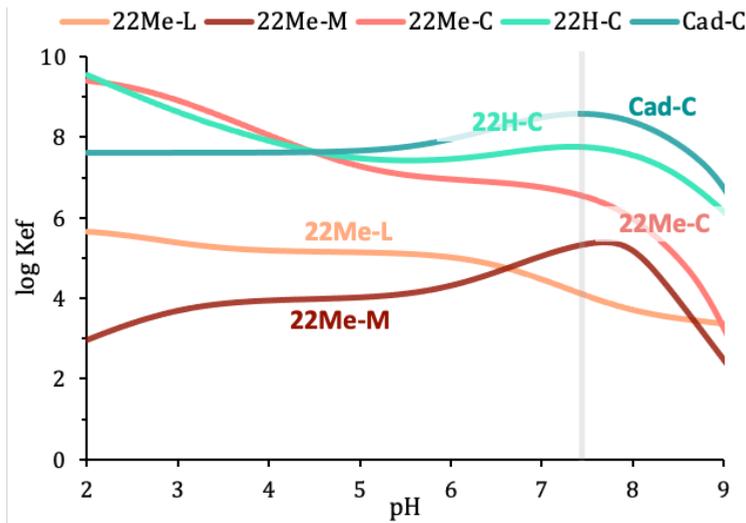


Figura 9.14. Representación de la constante efectiva en función del pH para los sistemas binarios de **22Me-L**, **22Me-M**, **22Me-C**, **22H-C** y **Cad-C** con **5-Fu**.

Tabla 9.6. Logaritmos de las constantes efectivas calculadas a pH 7.4 a partir de las representaciones gráficas para la interacción con **Pyr** determinadas en 0.15 M NaCl a 298.1 K.

	22Me-L	22Me-M	22Me-C	22H-C	Cad-C
Log K_{ef}	4.13	5.31	6.58	7.76	8.57

Los sistemas formados por los ligandos criptando **Cad-C** y **22H-C** con piranina exhiben los valores de K_{ef} más elevados a pH fisiológico (8.57 y 7.76, respectivamente), seguidos por una unidad logarítmica inferior por

el ligando **22Me-C** (6.58). La mayor diferencia en los valores de las constantes efectivas se observa en los ligandos **22Me-M** y **22Me-L**, donde los complejos presentan valores de constantes efectivas inferiores a los criptandos (5.31 y 4.13, respectivamente). En términos de selectividad, al calcular el cociente de las constantes efectivas, los criptandos son aproximadamente entre 300 y 30.000 veces más selectivos que el ligando lineal **22Me-L**.

Al analizar la variación de las constantes efectivas en función del pH, se observa un máximo de interacción para los criptandos en el intervalo de pH de ácido a neutro - ligeramente básico. Estos resultados indican que las interacciones electrostáticas son la principal fuerza impulsora en la formación de los complejos criptando con piranina, ya que en el intervalo de pH 2 - 9 los criptandos se encuentran cargados positivamente debido a su estado de protonación, a la vez que la piranina se encuentra cargada negativamente, lo cual maximiza la interacción entre el anfitrión y el huésped. Al aumentar el pH por encima de 9 la constante efectiva disminuye drásticamente, lo que indica una disminución en la interacción debido a que las aminas de los ligandos ya no se encuentran protonadas. En términos análogos se podría describir la variación de la K_{ef} para el sistema del macrociclo **22Me-M**, enfatizando un máximo de interacción en el intervalo de pH 7.0 - 8.5, atribuible a la formación del sistema H_3LPyr^{3+} con una conformación óptima donde se han maximizado las interacciones entre ligando y piranina.

Respecto al ligando lineal **22Me-L**, al aumentar el pH de 2 a 11 (intervalo de pH de trabajo) se observa como progresivamente disminuye el valor de K_{ef} de 5.6 a 2.0.

9.2. Espectroscopia UV-Vis

Dadas las propiedades espectroscópicas de la piranina, se evaluó su interacción con los ligandos a pH fisiológico por espectroscopia de UV-Vis. Se seleccionaron los tres ligandos de la familia **22Me**: **22Me-L**, **22Me-M** y **22Me-C**. Asimismo, se estudiaron los ligandos **33Me-C**, **22H-C** y **Cad-C** debido a su gran capacidad de interacción y estabilización de las estructuras G4.

El espectro de absorción de la piranina presenta una banda característica a 405 nm correspondiente a la forma protonada de la piranina, así como una segunda banda a 460 nm asociada con la forma desprotonada (figura 9.15).²⁷ Asimismo, la variación de la banda a 460 nm a pH fisiológico puede ser empleada para medir la interacción de la piranina con otras moléculas.²⁸

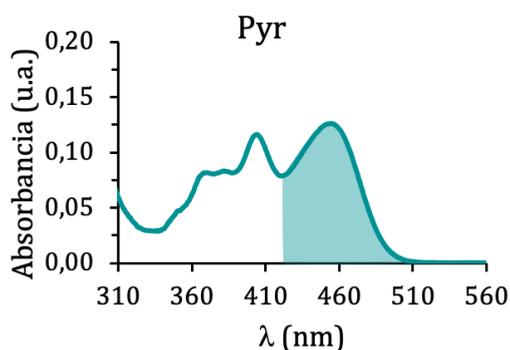


Figura 9.15. Espectros de absorción UV-Vis de **Pyr** a 10 μM (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

En la valoración de la piranina con el compuesto **22Me-L** no fue posible identificar ninguna banda característica de la interacción ya que se producía la agregación del ligando, ocasionando un aumento de la línea base (figura 9.16). Sin embargo, en las valoraciones realizadas con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** sí fue posible observar la banda a 460 nm característica de la interacción con la piranina.

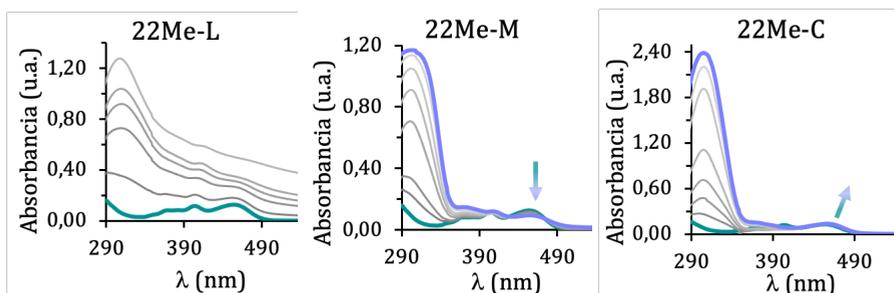


Figura 9.16. Espectros de absorción UV-Vis de **Pyr** 10 μM tras la adición de **22Me-L**, **22Me-M** y **22Me-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

A continuación, en la figura 9.17 se representa la ampliación de las gráficas de la absorbancia de la piranina tras la adición de los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**.

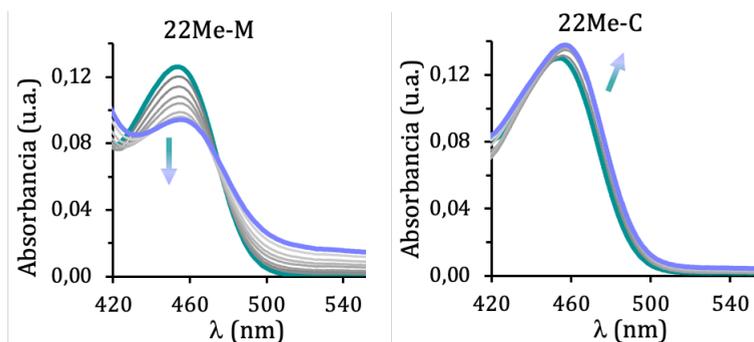


Figura 9.17. Ampliación de los espectros de absorción UV-Vis de **Pyr** 10 μM con **22Me-M** y **22Me-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

La adición del ligando **22Me-M** provoca una disminución de la absorción de la banda a 460 nm acompañada de un ligero aumento de la línea base posiblemente debido a procesos de agregación; mientras, la adición de **22Me-C** produce un ligero aumento de la banda a 460 nm de **Pyr**. Para entender bien estos procesos se han realizado estudios de modelización molecular que se analizarán más adelante. Del mismo modo, en la figura 9.18 se han representado las gráficas ampliadas de las valoraciones de piranina correspondientes a los ligandos **33Me-C**, **22H-C** y **Cad-C**.

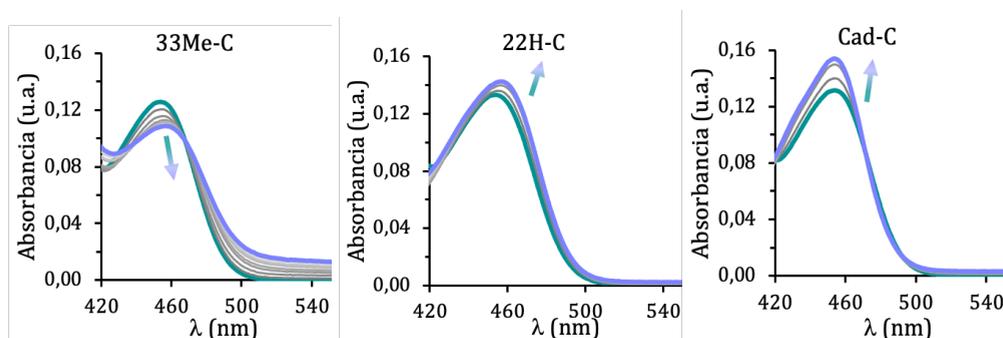


Figura 9.18. Espectros de absorción UV-Vis de **Pyr** 10 μM tras la adición de **33Me-C**, **33H-C** y **Cad-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

Como se puede observar en la figura 9.18, a medida que se adiciona el ligando **33Me-C**, la banda a 460 nm de la piranina disminuye en su absorción a la vez que aumenta ligeramente la línea base del espectro, lo cual es posible asociar de nuevo con procesos de agregación. Por otro lado, los ligandos **22H-C** y **Cad-C** producen un ligero aumento en la banda de la piranina a 460 nm.

9.3. Estudio de la interacción entre ligandos y piranina mediante emisión de fluorescencia

Tras los resultados obtenidos, se seleccionaron los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** para profundizar en el estudio del efecto de la topología del ligando (macrociclo y criptando) en la interacción con la piranina. Por otra parte, se escogieron los ligandos **22H-C** y **Cad-C** para evaluar como la naturaleza de la cadena poliamínica afecta a la capacidad de encapsulación de la molécula de piranina. En las figuras 9.19 - 9.22 se han representado gráficamente los espectros de las valoraciones de emisión de fluorescencia de los ligandos con la piranina, así como la variación del máximo de emisión a 516 nm.

El espectro de emisión de fluorescencia de la **Pyr** exhibe un máximo de emisión de fluorescencia a 516 nm, que con el aumento del pH aumenta su emisión al formarse la especie desprotonada.^{17,29} Tras la adición de los ligandos **22Me-C**, **22Me-M**, **22H-C** y **Cad-C**, la intensidad de la banda de la **Pyr** aumenta su emisión de fluorescencia, indicando un cambio en la configuración electrónica de la misma. Como se ha descrito en la bibliografía, este cambio es debido a la complejación de la **Pyr** con el ligando, que estabiliza la forma desprotonada mediante la aceptación de puentes de hidrógeno.^{30,31} En nuestro caso, la complejación puede estar mediada por la formación de puentes de hidrogeno por parte de los grupos amino de los ligandos con los grupos sulfonato e hidroxilo de la **Pyr** encapsulada, así como también puede verse estabilizada al interaccionar por apilamiento π con el **TPA**.

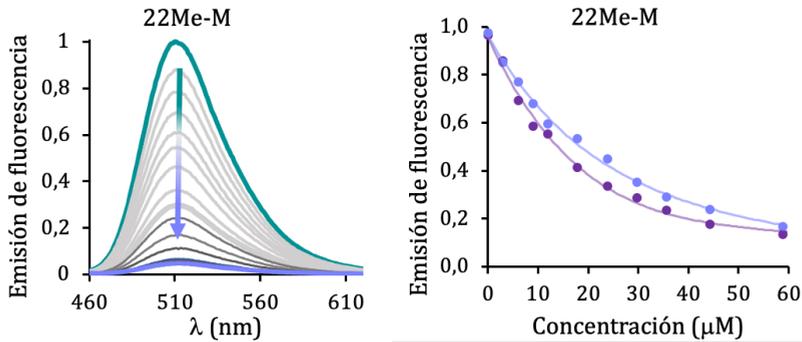


Figura 9.19. Espectros de emisión de fluorescencia de **Pyr** ($10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) tras la adición de **22Me-M** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

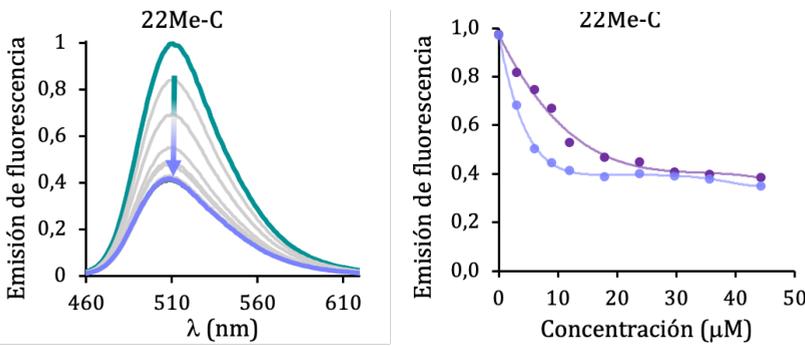


Figura 9.20. Espectros de emisión de fluorescencia de **Pyr** ($10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) tras la adición de **22Me-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

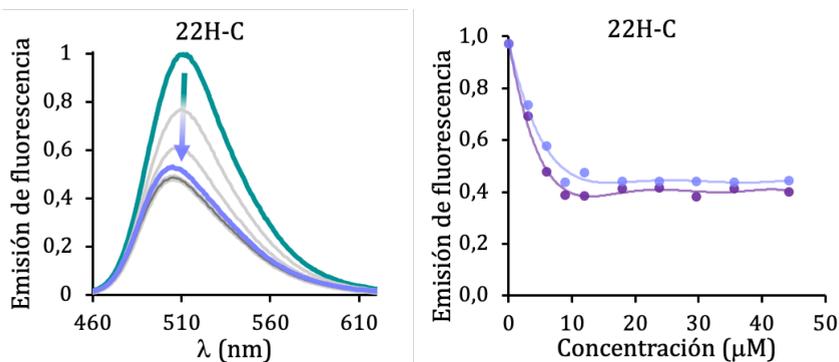


Figura 9.21. Espectros de emisión de fluorescencia de **Pyr** ($10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) tras la adición de **22H-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

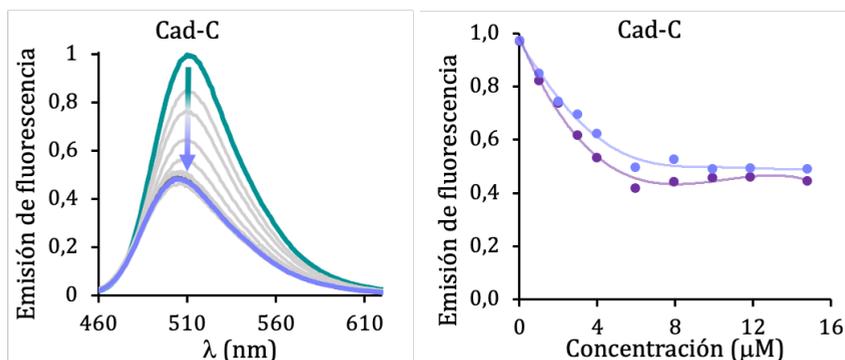


Figura 9.22. Espectros de emisión de fluorescencia de **Pyr** (10 μM, $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm) tras la adición de **Cad-C** (en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, pH 7.4).

Seguidamente se calcularon las constantes de estabilidad ligando-piránina (K_e) (recogidas en la tabla 9.7) mediante el ajuste no lineal de los datos de emisión de fluorescencia a 516 nm en función de la concentración.

Para todos los ligandos estudiados se obtuvieron valores de K_e considerablemente altos, indicando una elevada afinidad por la **Pyr**. No obstante, los valores correspondientes a los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** ($4.6 \cdot 10^4$ y $5.1 \cdot 10^4$, respectivamente) son menores a los obtenidos para **22H-C** y **Cad-C** ($24.4 \cdot 10^4$ y $17.5 \cdot 10^4$, respectivamente), exhibiendo estos últimos una interacción más fuerte. Cabe destacar la similitud de los valores de K_e entre **22Me-M** y **22Me-C**, lo que sugiere que el número de contactos entre receptor y sustrato es similar entre ambas topologías macrocíclica y criptando.

Tabla 9.7. Valores de las constantes de estabilidad K_e de **Pyr** ($10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) con los ligandos estudiados en tampón 10 mM Tris, 100 mM KCl, $\text{pH } 7.4$.

Ligando	K_e (10^4 M^{-1}) ^a
22Me-M	4.61 (1)
22Me-C	5.09 (5)
22H-C	24.43 (6)
Cad-C	17.48 (7)

^(a) Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar en la última cifra significativa.

Por otro lado, en los criptandos **22Me-C**, **22H-C** y **Cad-C**, el orden en la fuerza de interacción puede ser relacionado con las posiciones disponibles de cada ligando para establecer puentes de hidrógeno. Los ligandos **22H-C** y **22Me-C** presentan un grupo amino central en la cadena poliamínica, sin embargo, la metilación de éste puede obstaculizar la formación de puentes de hidrógeno, así como generar impedimentos estéricos entre el ligando y la molécula que se pretende encapsular en su cavidad. En el apartado de estudios de dinámica molecular se abordará esta hipótesis. No obstante, si comparamos los valores de las constantes para **22H-C**, **22Me-C** y **Cad-C**, los resultados sugieren que la interacción con la molécula de piranina se ve influenciada en mayor medida por la presencia de un grupo metilo más que por la ausencia del grupo amino central en la cadena poliamínica del ligando, lo cual puede ser asociado a la generación de impedimentos estéricos por parte del grupo metilo.

9.4. Estudios computacionales de dinámica molecular

Se realizaron estudios de dinámica molecular (MD, *molecular dynamics*), sobre la interacción de la piranina con los ligandos macrocíclico y criptando **22Me-M** y **22Me-C**, así como también se analizó el criptando **22H-C** dada la elevada afinidad que indicaban los estudios espectroscópicos anteriores. Los conformeros de mínima energía se han representado con el programa ChimeraX en las figuras 9.23 – 9.25.

Como es posible observar, los tres ligandos encapsulan la molécula de piranina, alojándose ésta en el interior de la cavidad macrocíclica o criptando, en una conformación de tipo “sándwich” con las unidades de **TPA**. La superficie aromática de la piranina presenta interacciones de apilamiento π con las unidades de trifenilamina del ligando, con distancias promedio entre los planos de 3.93 Å para **22Me-M**, 4.32 Å para **22Me-C** y 3.70 Å para **22H-C**. Asimismo, la encapsulación de la **Pyr** también se encuentra mediada por la formación de puentes salinos entre los grupos amonio protonados de los ligandos y los oxígenos de los grupos sulfonato de la **Pyr**, así como también con el grupo hidroxilo desprotonado de la misma. Se forman cuatro puentes salinos con **22Me-M**, con una distancia promedio de $d_{O\dots H-N} \approx 1.91$ Å, mientras que para el criptando **22Me-C** se forman seis, con una distancia promedio de 2.00 Å.

Según lo expuesto anteriormente, el ligando criptando **22Me-C** presenta una mayor interacción con la piranina que el macrociclo **22Me-M** ya que puede formar un mayor número de interacciones electrostáticas.

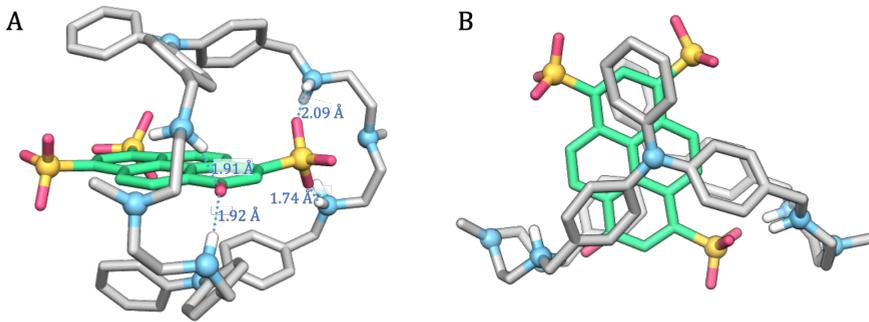


Figura 9.23. Representación de la interacción de 22Me-M con Pyr.

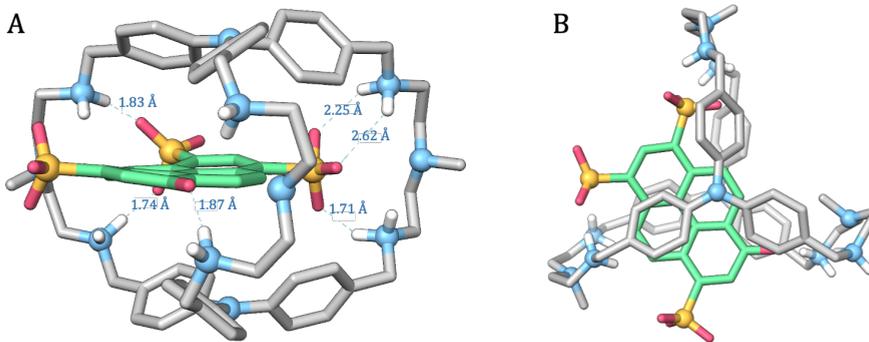


Figura 9.24. Representación de la interacción de 22Me-C con Pyr.

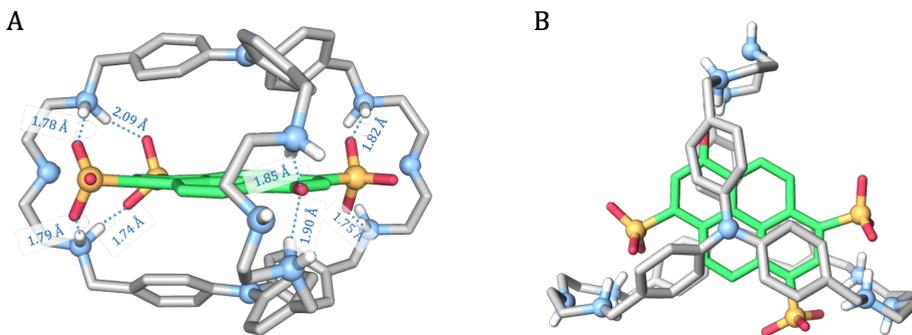


Figura 9.25. Representación de la interacción de 22H-C con Pyr.

Por otro lado, el criptando **22H-C**, presenta un mayor número de átomos dadores de puentes de hidrógeno en comparación a su análogo metilado **22Me-C**, observándose la formación de hasta ocho puentes salinos de distancia promedio 1.84 Å. Como se había sugerido anteriormente, la ausencia de metilación en el grupo amino central da lugar a una interacción más fuerte debido a la disminución de impedimentos estéricos, formando una estructura más compacta.

Estos resultados corroboran los estudios espectroscópicos analizados en el apartado anterior, donde el criptando no metilado **22H-C** presentaba una mayor interacción con la **Pyr** que el criptando metilado **22Me-C**.

9.5. Bibliografía

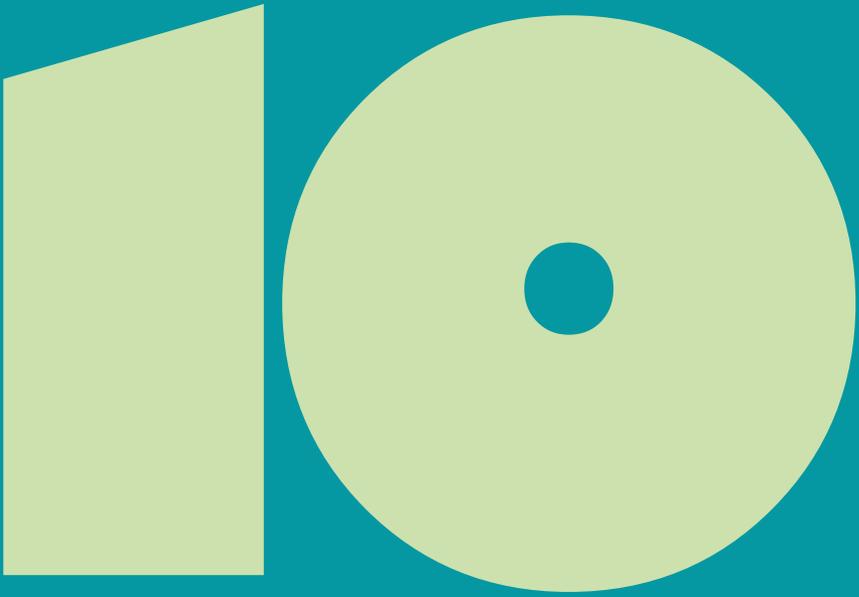
1. Webber, M. J. & Langer, R. Drug delivery by supramolecular design. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 6600–6620 (2017).
2. Lehn, J. M. Cryptates: macropolycyclic inclusion complexes. *Pure Appl. Chem.* **49**, 857–870 (1977).
3. Menger, F. M. Supramolecular chemistry and self-assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**, 4818–4822 (2002).
4. Kristin Bowman-James, Antonio Bianchi & Enrique García-España. *Anion Coordination Chemistry*. (Wiley, 2011).
5. Sánchez-Moreno, M. *et al.* In Vitro and in Vivo Trypanosomicidal Activity of Pyrazole-Containing Macrocyclic and Macrobicyclic Polyamines: Their Action on Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. *J. Med. Chem.* **55**, 4231–4243 (2012).
6. Martínez-Camarena, Á. *et al.* An antioxidant boehmite amino-nanozyme able to disaggregate Huntington's inclusion bodies. *Chem. Commun.* **58**, 5021–5024 (2022).
7. Pont, I. *et al.* Development of potent tripodal G-quadruplex DNA binders and their efficient delivery to cancer cells by aptamer functionalised liposomes. *Org. Biomol. Chem.* **21**, 1000–1007 (2023).

8. Lipinski, M. J. *et al.* Multimodality imaging demonstrates trafficking of liposomes preferentially to ischemic myocardium. *Cardiovasc. Revasc. Med.* **17**, 106–112 (2016).
9. Buur, A. Prodrugs of 5-fluorouracil. III. Hydrolysis kinetics in aqueous solution and biological media, lipophilicity and solubility of various 1-carbamoyl derivatives of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **23**, 209–222 (1985).
10. Wong, F. H. C. & Fradin, C. Simultaneous pH and Temperature Measurements Using Pyranine as a Molecular Probe. *J. Fluoresc.* **21**, 299–312 (2011).
11. Dun, J. *et al.* Resveratrol synergistically augments anti-tumor effect of 5-FU in vitro and in vivo by increasing S-phase arrest and tumor apoptosis. *Exp. Biol. Med.* **240**, 1672–1681 (2015).
12. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Canc.* **3**, 330–338 (2003).
13. Patel, M. N. *et al.* Characterization and Evaluation of 5-Fluorouracil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Prepared via a Temperature-Modulated Solidification Technique. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **15**, 1498–1508 (2014).

14. Lollo, G. *et al.* Enhanced in vivo therapeutic efficacy of plitidepsin-loaded nanocapsules decorated with a new poly-aminoacid-PEG derivative. *Int. J. Pharm.* **483**, 212–219 (2015).
15. Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. Observations in simultaneous microencapsulation of 5-fluorouracil and leucovorin for combined pH-dependent release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**, 367–371 (2005).
16. Markova, N., Enchev, V. & Ivanova, G. Tautomeric Equilibria of 5-Fluorouracil Anionic Species in Water. *J. Phys. Chem. A.* **114**, 13154–13162 (2010).
17. Wolfbeis, O. S., Furlinger, E., Kroneis, H. & Marsoner, H. Fluorimetric analysis. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **314**, 119–124 (1983).
18. Overly, C. C., Lee, K. D., Berthiaume, E. & Hollenbeck, P. J. Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3156–3160 (1995).
19. Kano, K. & Fendler, J. H. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. et Biophys. Acta* **509**, 289–299 (1978).

20. Straubinger, R. M., Papahadjopoulos, D. & Hong, K. Endocytosis and intracellular fate of liposomes using pyranine as a probe. *Biochemistry* **29**, 4929–4939 (1990).
21. Overly, C. C., Lee, K. D., Berthiaume, E. & Hollenbeck, P. J. Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3156–3160 (1995).
22. Mosquera, J., Zarra, S. & Nitschke, J. R. Aqueous Anion Receptors through Reduction of Subcomponent Self-Assembled Structures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1556–1559 (2014).
23. Fernández-Caro, H. *et al.* Supramolecular caging for cytosolic delivery of anionic probes. *Chem. Sci.* **10**, 8930–8938 (2019).
24. Wielińska, J., Nowacki, A. & Liberek, B. 5-Fluorouracil Complete Insight into Its Neutral and Ionised Forms. *Molecules* **24**, 3683 (2019).
25. Guthrie, J. P. Hydrolysis of esters of oxy acids: pK_a values for strong acids; Brønsted relationship for attack of water at methyl; free energies of hydrolysis of esters of oxy acids; and a linear relationship between free energy of hydrolysis and pK_a holding over a range of 20 pK units. *Can. J. Chem.* **56**, 2342–2354 (1978).

26. Albelda, M. T. *et al.* Thermodynamics and fluorescence emission studies on potential molecular chemosensors for ATP recognition in aqueous solution. *J. Chem. Soc.* **2**, 2545–2549 (1999).
27. Liu, W., Han, F., Smith, C. & Fang, C. Ultrafast Conformational Dynamics of Pyranine during Excited State Proton Transfer in Aqueous Solution Revealed by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **116**, 10535–10550 (2012).
28. Pino, E., Campos, A. M. & Lissi, E. Changes in pyranine absorption and emission spectra arising from its complexation to 2,2'-azobis(2-amidinopropane). *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **155**, 63–68 (2003).
29. Hille, C. *et al.* Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1871–1879 (2008).
30. Wang, Q. & Berglund, K. A. Pyranine Fluorescence Quenching for the Characterization of Solutions. *Am. J. Analyt. Chem.* **07**, 43–56 (2016).
31. Neelakandan, P. P., Hariharan, M. & Ramaiah, D. A Supramolecular ON–OFF–ON Fluorescence Assay for Selective Recognition of GTP. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11334–11335 (2006).



Estudios biológicos



Evaluación biológica de los
ligandos poliamínicos

Capítulo 10. Evaluación biológica de los ligandos poliamínicos

En los capítulos anteriores se ha demostrado el potente efecto estabilizador y la elevada interacción de algunos de los ligandos desarrollados en esta tesis con G4s relevantes a nivel terapéutico. Por ello, se ha estudiado a continuación su citotoxicidad en varias líneas celulares cancerígenas para evaluar su efecto como agentes terapéuticos.

10.1. Determinación de la viabilidad celular de los ligandos

Se ha empleado el método del MTT para evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad de los ligandos. Este método ha sido descrito en *el Capítulo 3 de Material y Métodos*. En la bibliografía, un valor de IC_{50} inferior a 10 μM está asociado comúnmente con una alta citotoxicidad; por ejemplo, el cisplatino, fármaco alquilante ampliamente utilizado en terapias contra el cáncer, es altamente citotóxico ya que presenta valores de IC_{50} alrededor de 5 - 6 μM , mientras que la citotoxicidad del 5-fluorouracilo (**5-Fu**) es mucho más baja, con valores IC_{50} de 185 μM (estos valores corresponden a los IC_{50} tras 24 horas de exposición a los fármacos en líneas celulares tumorales).^{1,2} Respecto a los fármacos anticancerígenos cuya diana terapéutica son las estructuras G-quadruplex, la piridostatina (PDS), exhibe valores IC_{50} de 81 μM tras 24 horas de dosis.^{3,4} Por otro lado, el conocido Quarfloxin (CX-3543), que interacciona con G4s de ADN ribosómico, tiene una citotoxicidad muy elevada con un valor IC_{50} de 0.4 μM .⁵

10.1.1. Familia 22Me

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los ligandos pertenecientes a la familia **22Me** con dos líneas celulares humanas (A549 y Hela) y una murina (RAW264.7). Todas ellas, como se indicó en el *Capítulo 3 de Material y Métodos*, corresponden a tres tipos de cáncer: cáncer de pulmón humano (A549), cáncer de cuello de útero humano (Hela) y macrófago transformado por leucemia murina (RAW264.7).

Los valores de IC_{50} obtenidos se han representado en un diagrama de barras en la figura 10.1. Asimismo, en el apartado de *Anexos* se encuentran las representaciones gráficas correspondientes al ajuste del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de ligando.

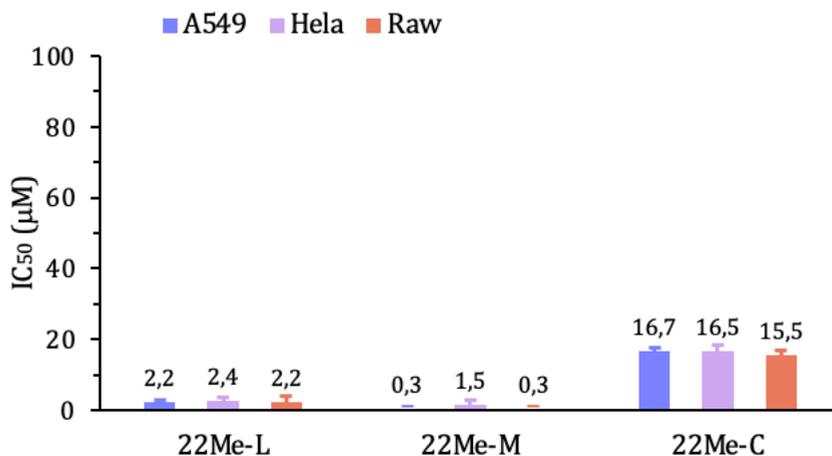


Figura 10.1. Representación gráfica de los valores de IC_{50} correspondientes a los ligandos **22Me** evaluados en distintas líneas celulares.

Los valores IC_{50} obtenidos para las líneas celulares investigadas denotan una alta citotoxicidad para los ligandos **22Me-L** y **22Me-M** ($IC_{50} = 0.3 - 2.0 \mu M$) y una menor citotoxicidad para el ligando criptando **22Me-C** ($IC_{50} = 15 - 17 \mu M$). El criptando **22Me-C** además de mostrar la afinidad más alta hacia las estructuras de ADN G4s entre el resto de las topologías de la familia **22Me**, también exhibe unos valores de citotoxicidad remarcablemente inferiores. Esta observación puede estar relacionada con una menor captación celular debido a (1): al aumentar el número de cadenas poliamínicas del ligando, su carga neta positiva aumenta, lo que puede resultar en una captación celular poco eficaz y un menor efecto terapéutico, y a (2): el efecto de la topología. La internalización celular menos eficiente de los ligandos con mayor carga se fundamenta en la naturaleza hidrofóbica de la membrana celular y en la repulsión generada por los ligandos altamente polares. Más adelante, en el apartado 10.1.6 se analiza la relación entre la carga y la topología en la citotoxicidad de los ligandos.

10.1.2. Familia 33Me

Como puede observarse en la figura 10.2, los resultados obtenidos para la familia **33Me** se encuentran en correlación con los anteriormente presentados de la familia **22Me**.

En general, los ligandos **33Me-L** y **33Me-M** presentan una elevada citotoxicidad, similar a la de sus análogos lineal y macrocíclico **22Me** ($IC_{50} 0.6 - 6.6 \mu M$). Sin embargo, el criptando **33Me-C** exhibe una

citotoxicidad muy reducida (IC_{50} 58 – 84 μM). Como se señaló en el *Capítulo 5 de Comportamiento Ácido y Base*, al aumentar la longitud de las cadenas etilénicas a propilénicas, la carga positiva sobre el ligando aumenta ligeramente; concretamente, el ligando **22Me-C** a pH fisiológico presenta una carga de +5.2 mientras que el ligando **33Me-C** presenta +5.8. Como se ha comentado anteriormente, éste aumento de la carga positiva podría dificultar su captación celular.

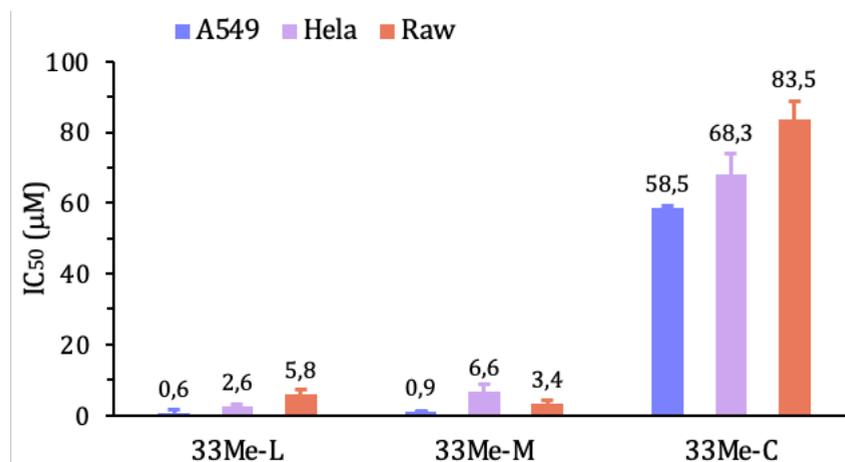


Figura 10.2. Representación gráfica de los valores de IC_{50} correspondientes a los ligandos **33Me** evaluados en distintas líneas celulares.

10.1.3 Familia 33H

El comportamiento de los ligandos de la familia **33H** es similar a los de la familia **33Me** (figura 10.3). Se han obtenido valores de citotoxicidad elevada para los ligandos lineal **33H-L** y macrocíclico **33H-M** (IC_{50} 2 – 6 μM), si bien la toxicidad del criptando **33H-C** es mucho más baja (IC_{50} 67–

100 μM). Específicamente, para la línea celular A549 no llegó a alcanzarse la concentración de ligando necesaria para lograr una disminución del 50 % de viabilidad celular en el rango de concentración utilizado en el ensayo (0 – 100 μM), señalado con un asterisco en la figura 10.4.

Analizando de nuevo el papel de la carga, a pH fisiológico el ligando **33H-C** presenta una carga de +6.2, la más alta de los compuestos analizados. Consecuentemente, esta elevada carga positiva en el ligando criptando puede ser la responsable de su baja citotoxicidad celular.

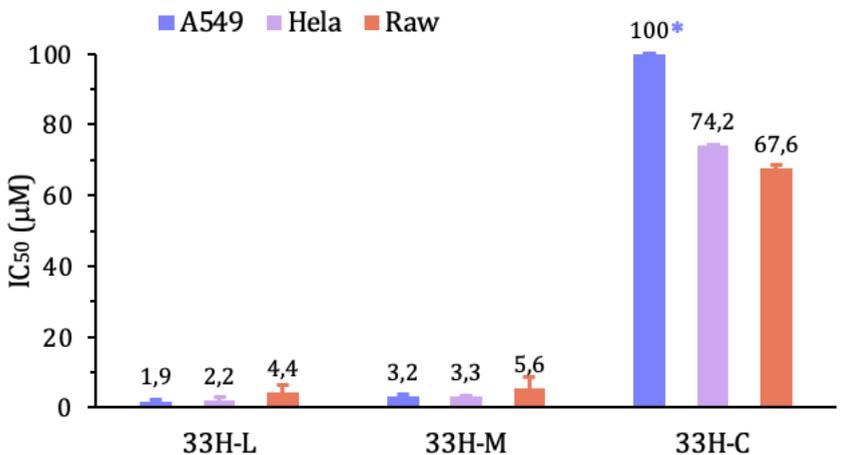


Figura 10.3. Representación gráfica de los valores de IC₅₀ correspondientes a los ligandos **33H** evaluados en distintas líneas celulares.

9.1.4. Familia 22H

Los ligandos correspondientes a la familia **22H** presentan un comportamiento análogo al de los ligandos mostrados anteriormente. Como puede observarse en la figura 10.4, el ligando macrocíclico **22H-M**

tiene una elevada citotoxicidad (IC_{50} 1.8 – 5.6 μM), a diferencia del ligando criptando **22H-C**, que presenta una citotoxicidad baja (IC_{50} 77 – 100 μM). De hecho, para el criptando **22H-C** no se alcanzó la disminución del 50 % de la viabilidad celular en las líneas A549 y RAW en el intervalo de concentración utilizado en el ensayo (0 – 100 μM). Al considerar la elevada carga positiva a pH fisiológico del ligando **22H-C** (carga neta +5.4), esta podría ser la causante de su baja citotoxicidad celular.

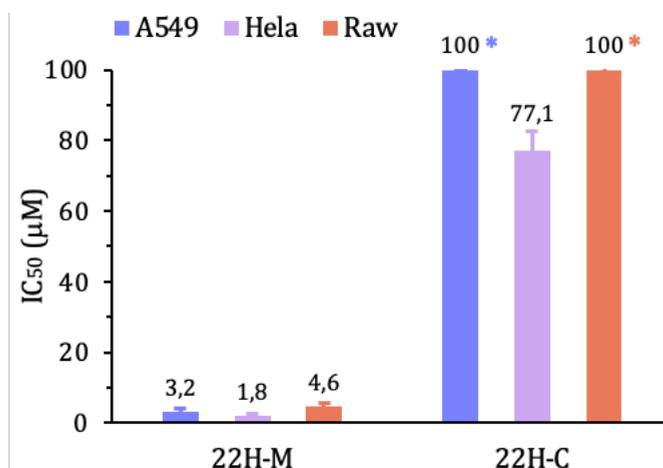


Figura 10.4. Representación gráfica de los valores de IC_{50} correspondientes a los ligandos **33H** evaluados en distintas líneas celulares.

9.1.5. Familia Cad

En la figura 10.5 se encuentran representados los valores de IC_{50} obtenidos para los ligandos pertenecientes a la familia **Cad** con conectores pentametilénicos, **Cad-M** y **Cad-C**. Ambos ligandos macrociclo y criptando presentan una citotoxicidad muy elevada (IC_{50} 0.4 – 3.9 μM).

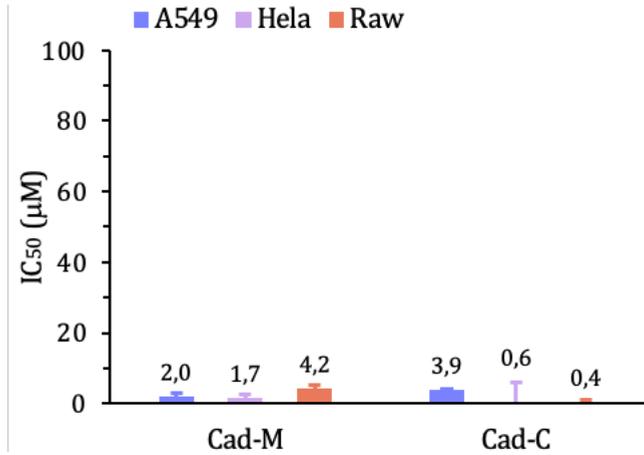


Figura 10.5. Representación gráfica de los valores de IC₅₀ correspondientes a los ligandos **Cad** evaluados en distintas líneas celulares.

10.1.6. Relación entre la citotoxicidad y la carga

Como se ha discutido anteriormente, el número de cadenas poliamínicas sobre los ligandos sintetizados puede modular su afinidad por las estructuras G4s, mostrando los criptandos en general una mayor estabilización e interacción con éstas, seguido por los ligandos macrocíclicos y finalmente por los lineales. Sin embargo, el mayor número de cadenas poliamínicas también incrementa la carga positiva sobre los ligandos, lo cual puede interferir en la captación celular de los mismos, resultando en una citotoxicidad baja.

Los valores IC₅₀ obtenidos en la línea tumoral HeLa han sido representados gráficamente en función de la carga positiva de los ligandos a pH 7.4 (figura 10.6). En general, los valores de menor citotoxicidad corresponden a los ligandos de topología criptando, a

excepción del **Cad-C**. Pese a que el criptando **Cad-C** presenta una carga a pH fisiológico de +5.6, su citotoxicidad ha aumentado drásticamente en comparación con el resto de criptandos estudiados. La diferencia principal entre el ligando **Cad-C** respecto a los criptandos anteriores reside en su distribución de cargas más dispersa. Esta característica podría contribuir a una densidad de carga más baja, y, en consecuencia, aumentar su carácter hidrófobo. Esto le permite colocar las cargas positivas en una distribución más alejada, lo cual puede contribuir favorablemente a su internalización en la célula.

Asimismo, los ligandos macrocíclicos y lineales presentan una elevada citotoxicidad, variando sus cargas positivas desde +1.1 a +4.35.

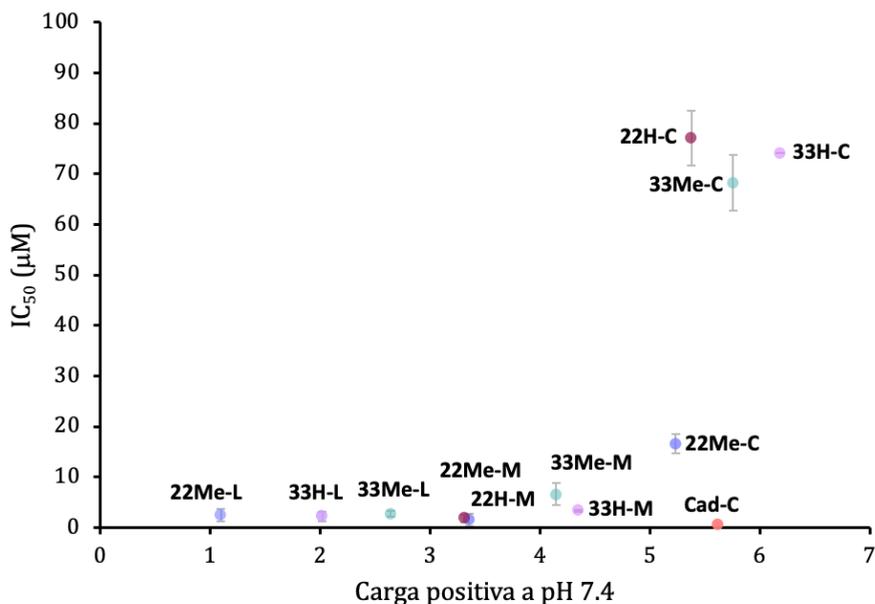


Figura 10.6. Representación gráfica de los valores de IC₅₀ obtenidos para la línea celular HeLa en función de la carga neta positiva a pH 7.4.

10.2. Determinación de la viabilidad celular de los complejos ligando - 5-fluorouracilo/piránina

Como se describió en el capítulo anterior, los ligandos de la familia **22Me** fueron utilizados para encapsular el fármaco anticancerígeno **5-Fu** y la sonda fluorescente **Pyr**. De nuevo, utilizando el ensayo MTT se estudió la citotoxicidad de los complejos formados por los ligandos sintetizados y las moléculas de interés biológico en relación 1:1 ([L]:[**5-Fu/Pyr**]) en las líneas celulares tumorales A549 y HeLa. En la figura 10.8 se representan gráficamente los valores de IC_{50} obtenidos para la encapsulación del **5-Fu**.

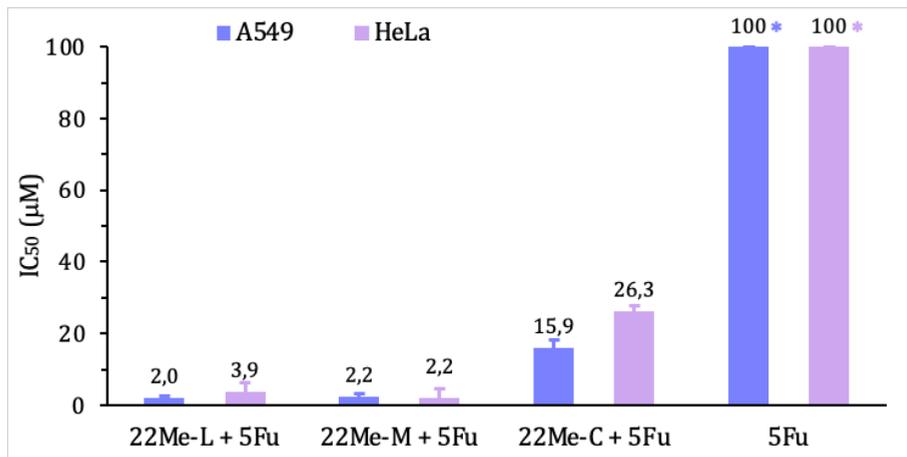


Figura 10.7. Representación gráfica de los valores de IC_{50} correspondientes a los ligandos **22Me** con **5-Fu** evaluados en distintas líneas celulares.

Como puede observarse, la citotoxicidad de los ligandos **22Me-L** y **22Me-M** no se ha modificado tras la internalización del ligando **5-Fu**, aunque sí que ha disminuido ligeramente para el criptando **22Me-C** en la línea

celular HeLa. Teniendo en cuenta que la citotoxicidad del **5-Fu** es baja, su encapsulación en los ligandos sintetizados puede brindar la oportunidad de optimizar su eficiencia terapéutica.

En la figura 10.9 se han representado gráficamente los valores de IC_{50} obtenidos para los complejos de **Pyr** con los ligandos de topología macrocíclica y criptando. La citotoxicidad de los ligandos de las familias **22Me** y **22H** no ha variado significativamente al encapsular la **Pyr**, obteniéndose valores de IC_{50} muy similares para los complejos y los de los ligandos libres. Sin embargo, cabe destacar el descenso en la citotoxicidad del criptando **Cad-C**, el cual en su estado libre presentaba el IC_{50} más bajo de todos los criptandos. De estos resultados es posible deducir que la citotoxicidad de la **Pyr** disminuye notablemente al encapsularla dentro del ligando de carácter más hidrófobo.

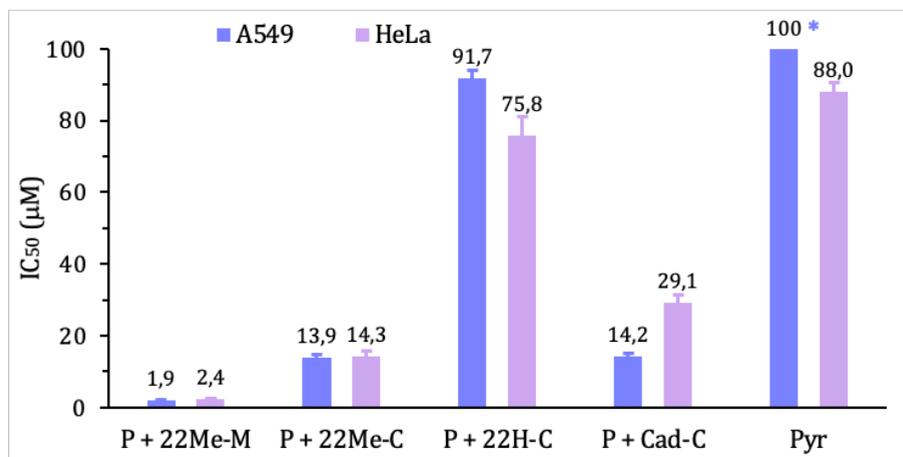


Figura 10.8. Representación gráfica de los valores de IC_{50} correspondientes a los ligandos **22Me** con **Pyr** (P en el gráfico) evaluados en distintas líneas celulares.

10.3. Visualización celular

Gracias a las propiedades fluorescentes de la **Pyr**, se evaluó mediante microscopía de fluorescencia confocal su internalización en la línea celular HeLa (figura 10.10).

Como puede observarse en la imagen correspondiente a las células tratadas con **Pyr** en ausencia de ligando (figura 10.9.A), la piranina no es capaz de atravesar la membrana celular, no observándose su característica fluorescencia verde en el interior de las células. Sin embargo, al encapsular **Pyr** en los ligandos (figura 10.9B - D) sí es posible observar en el interior celular su fluorescencia verde, confirmando su paso a través de la membrana celular. Estos resultados a su vez confirman que los ligandos estudiados son potencialmente capaces de internalizarse en células, incluso los ligandos criptando que presentaban una citotoxicidad reducida.

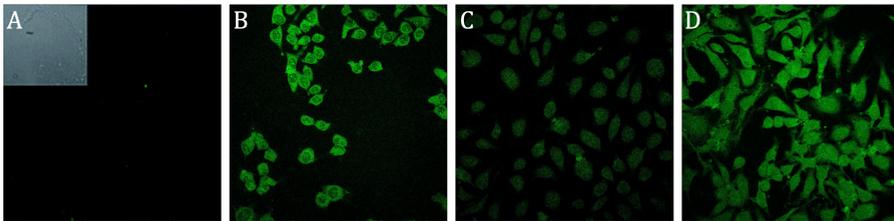


Figura 10.9. Imágenes celulares de Pyr (A) libre y con los ligandos (B) 22Me-M, (C) 22Me-C, (D) 22H-C en células tumorales HeLa.

Estos resultados pueden ser explicados en base a que la elevada carga positiva de los ligandos de topología criptando es contrarrestada por la carga negativa de la **Pyr**, lo que disminuye la carga total del complejo en

comparación con la de los ligandos y, por lo tanto, les permite atravesar más eficientemente la membrana celular, resultando en un aumento de la captación celular.

Por lo tanto, queda comprobado que los ligandos son capaces de internalizarse en la célula y, por consiguiente, alcanzar su diana terapéutica dentro de ella, el ADN G4.

10.4. Bibliografía

1. Sharma, R. I. & Smith, T. A. D. Colorectal Tumor Cells Treated with 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, and Cetuximab Exhibit Changes in 18 F-FDG Incorporation Corresponding to Hexokinase Activity and Glucose Transport. *J. Nucl. Med.* **49**, 1386–1394 (2008).
2. Tawfik, E., Ahamed, M., Almalik, A., Alfaqeeh, M. & Alshamsan, A. Prolonged exposure of colon cancer cells to 5-fluorouracil nanoparticles improves its anticancer activity. *Saudi Pharm. J.* **25**, 206–213 (2017).
3. Miglietta, G., Russo, M., Duardo, R. C. & Capranico, G. G-quadruplex binders as cytostatic modulators of innate immune genes in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **49**, 6673–6686 (2021).
4. Rodriguez, R. *et al.* Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 301–310 (2012).
5. Drygin, D. *et al.* Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of rRNA Biogenesis. *Cancer Res.* **69**, 7653–7661 (2009).



Trabajos publicados

Artículos científicos
publicados en relacion con
esta tesis.

11. Trabajos publicados en relación con esta tesis

Durante la realización de esta tesis doctoral se ha colaborado con varios grupos de investigación para desarrollar nuevos ligandos de G-quadruplex, en concreto se ha evaluado la interacción de varios ligandos sintetizados con las estructuras de ADN no canónicas de G-Quadruplex. Los trabajos se publicaron en dos artículos científicos y se describen brevemente a continuación.

En colaboración con el grupo de Diseño y Síntesis Molecular (DYSMOL) de la Prof. Ángela Sastre-Santos de la Universidad Miguel Hernández de Elche, se estudió la interacción de dos metalo-ftalocianinas, una de Zinc (ZnPc) y otra de níquel (NiPC), con ADN G4. Se emplearon técnicas de espectroscopia de UV/Vis, emisión de fluorescencia y desnaturalización térmica, ya descritas en el *capítulo 3 de Material y métodos*.

Gracias al diseño molecular de las ftalocianinas, con un núcleo central aromático extenso y a las cuatro cadenas laterales de alquil amonio, ambos complejos se unen fuertemente a las estructuras G4s y son capaces de estabilizarlas, en especial cabe destacar la molécula NiPc debido a la estructura cuadrado-plana que adopta el núcleo del níquel de la metalo-ftalocianina y que se enlaza más eficientemente con las tétradas externas de los G4s.

Además, debido a las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las ftalocianinas, se estudió la capacidad fotosensibilizante de los dos complejos metálicos, ZnPc y NiPC. Se evaluó la generación de oxígeno singlete y su fotoactivación en varias líneas celulares. Como resultado, el complejo de ZnPc generara elevadas cantidades de oxígeno singlete, disminuyendo dos órdenes de magnitud la viabilidad celular tras su fotoactivación; asimismo, fue posible localizar el complejo en el citoplasma mediante microscopia confocal de fluorescencia.



Development and application of metallo-phthalocyanines as potent G-quadruplex DNA binders and photosensitizers

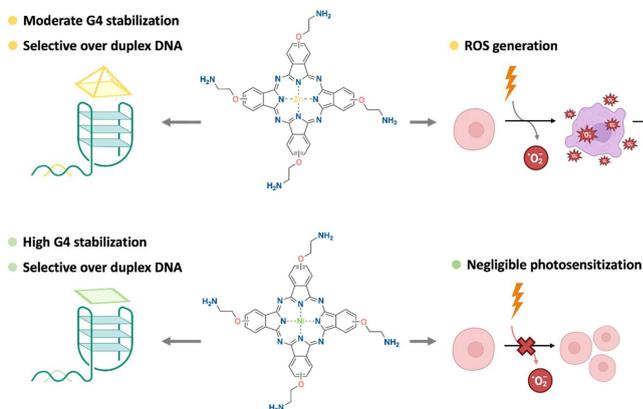
Ariadna Gil-Martínez¹ · Adrián Hernández² · Cristina Galiana-Roselló¹ · Sònia López-Molina¹ · Javier Ortiz² · Ángela Sastre-Santos² · Enrique García-España¹ · Jorge González-García¹

Received: 20 December 2022 / Accepted: 27 April 2023 / Published online: 14 July 2023
 © The Author(s) 2023

Abstract

Metallo-phthalocyanines (MPc) are common photosensitizers with ideal photophysical and photochemical properties. Also, these molecules have shown to interact with non-canonical nucleic acid structures, such as G-quadruplexes, and modulate oncogenic expression in cancer cells. Herein, we report the synthesis and characterisation of two metallo-phthalocyanines containing either zinc (ZnPc) or nickel (NiPc) in the central aromatic core and four alkyl ammonium lateral chains. The interaction of both molecules with G-quadruplex DNA was assessed by UV–Vis, fluorescence and FRET melting experiments. Both molecules bind strongly to G-quadruplexes and stabilise these structures, being NiPc the most notable G-quadruplex stabiliser. In addition, the photosensitizing ability of both metal complexes was explored by the evaluation of the singlet oxygen generation and their photoactivation in cells. Only ZnPc showed a high singlet oxygen generation either by direct observation or by indirect evaluation using a DPBF dye. The cellular evaluation showed mainly cytoplasmic localization of ZnPc and a decrease of the IC₅₀ values of the cell viability of ZnPc upon light activation of two orders of magnitude.

Graphical abstract



Extended author information available on the last page of the article

Two metallo-phthalocyanines containing zinc and nickel within the aromatic core have been investigated as G-quadruplex stabilizers and photosensitizers. NiPc shows a high G4 binding but negligible photosensitizing ability while ZnPc exhibits a moderate binding to G-quadruplex together with a high potency to generate singlet oxygen and photocytotoxicity. The interaction with G4s and capacity to be photosensitized is associated with the geometry adopted by the central metal core of the phthalocyanine scaffold.

Keywords G-Quadruplex DNA · Nickel phthalocyanine · Photosensitizer · Zinc phthalocyanine · Metallo-phthalocyanines

Abbreviations

Pc	Phthalocyanine
MPc	Metallo-phthalocyanine
G4	G-quadruplex
Quad	Quadruplet
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene
DMAE	Dimethylaminoethanol
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
ROS	Reactive Oxygen Species
Zn-PS	Zinc 2,9,16,23-tetra-tert-butyl-29H,31H-phthalocyanine
RB	Rose Bengal

Introduction

Modern medicinal chemistry covers the discovery and targeting of novel disease modulators, such as histone modifications, nucleosome remodellers, modified DNA/RNA bases and a variety of non-coding mediating elements [1]. One of the most attractive non-coding targets in cancer and neurodegenerative disorders is G-quadruplex (G4s) nucleic acid structure. [2–4] G4s are non-canonical DNA or RNA structures formed by guanine-rich sequences, which form planar rearrangements of four guanine bases termed as G-quartets [5, 6]. These guanine quads result from the hydrogen bonding association between the Hoogsteen and Watson–Crick faces of the guanines and the metal coordination of potassium and sodium to the guanine oxygens. [5, 6] Next-generation sequencing and bioinformatic analysis have located putative G4s forming sequences in telomeres, oncogene promoter regions, replication initiation sites and untranslated regions in human genomes [7]. Of utmost importance is the evidence of G4s formation under physiological conditions in cells and its key role in regulating biological processes, such as oncogene expression, telomere maintenance and chromosome stability, [8] which highlight the potential of using G4s as anticancer targets by small molecules [9–19]. In this regard, G4 binders Quarfloxin and CX-5461 have reached clinical trial stages for the treatment of cancers, and other drugs, allegedly targeting G4s, are currently under the pre-clinical scope [20, 21]. Quarfloxin inhibits the RNA polymerase through the interaction with ribosomal G4s in the nucleolus, resulting in a reduction of the tumour volume in

pancreatic cancer xenograft models, but advanced clinical studies have withdrawn it due to bioavailability issues [22]. CX-5461 has a complex mechanism involving the stabilisation of the promoters of *cMyc*, *cKit* proto-oncogenes and telomere G4s in addition to the blockage of the replication forks, which results in the induction of DNA damage and inhibition of ribosomal RNA biogenesis [23]. Currently, it is evaluated in phase I clinical trials for patients with BRCA1/2 deficient tumours [24].

Recently, an interesting approach to tackle cancer has emerged combining G4 binding and the photosensitization of the G4 ligand, which can then generate reactive oxygen species (ROS) and the resulting breakage of the G4 DNA/RNA structures and other nearby biomolecules. In this line, a family of porphyrins was photosensitized to cleave G4 RNAs from the Rat sarcoma virus (*ras*) oncogenes, which then reduced the tumour growth in pancreatic xenograft models [25]. In most of the works, porphyrins have been selected as G4 ligands with photosensitizing properties [26–29], but the large efforts in the last years to apply photodynamic therapy into the clinics have generated novel molecules which overcome the limitations of traditional photosensitizers (poor aqueous solubility, poor photostability...) [30–35]. The main attention has focussed on the incorporation of a metal ion into an aromatic core. In this regard, metallo-phthalocyanines are a promising family scarcely explored as dual G4 binders / photosensitizers. MPcs harbour the large π -planar structure able to interact via π - π stacking with the external tetrads of G4s and the appropriate photophysical properties to act as photosensitizer in photodynamic therapy (i.e. Q band in the visible range for irradiation, high quantum yield and lifetime, etc.). [36, 37] Their capacities for G4 binding and photosensitizing strongly depend on the coordinated metal. Zinc(II) phthalocyanines promote significant photosensitivity although adopt a non-planar metal coordination that hampers G4 interaction in contrast to Ni(II) square planar metallo-phthalocyanines which have more idoneous structures for G-tetrad stacking but promote low photosensitivity [38, 39]. Several important G4 ligands are described by Luedtke et al. based on guanidinium and amide-modified zinc phthalocyanines. [40–42]. Amongst them, the zinc phthalocyanine Zn-DIGP, substituted with isopropylguanidines showed excellent affinity and stabilisation effect towards G4 DNAs from *cMyc*,

cKit, *KRAS* and *HTelo* with high selectivity for G4s over double- and single-stranded DNA. Strikingly, Zn-DIGP exhibited both turn-on luminescence upon G4 binding and down-regulation of *c-myc* and *KRAS* expression in cancer cell lines, suggesting a G4-mediated promoter inhibition [40, 41]. Several nickel and zinc metallo-phthalocyanines containing eight quaternary ammonium groups have shown large HTelo G4stabilisation effect and potent inhibition of the telomerase [43, 44]. Other phthalocyanines containing copper or gallium have demonstrated the G4 binding [45, 46] with a concomitant suppression of the photo-generation of ROS [47]. Miyoshi group evaluated the G4 binding and the photo-irradiation consequences of several metallo-phthalocyanines, suggesting that the down-regulation of *ras* expression is due to the G4 binding in the oncogene promoter with the concomitant selective photocleavage [48].

Herein, we report the preparation of two metallo-phthalocyanines incorporating zinc (**ZnPc**) and nickel (**NiPc**) within the aromatic core and containing four ethylammonium trifluoroacetate (TFA) substituents in the non-peripheral positions (Fig. 1). The photo-physical properties and the aggregation behaviour of these molecules have been studied by UV–Vis/fluorescence emission experiments. Their interaction with G4s and duplex DNAs has been assessed using FRET melting assays and UV–Vis and fluorescence emission spectroscopies. Then, the singlet oxygen generation has been studied in vitro by means of different biophysical methods. Lastly, the viability in several cell lines has been evaluated in the dark and using red light.

Experimental methods

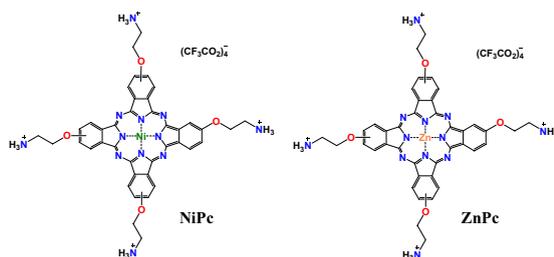
All solvents and reagents were purchased from commercial sources and used as received. ^1H / ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 400 spectrometer, using tetra-methyl-silane as a reference. The solvent for spectroscopic studies was of spectroscopic grade and used

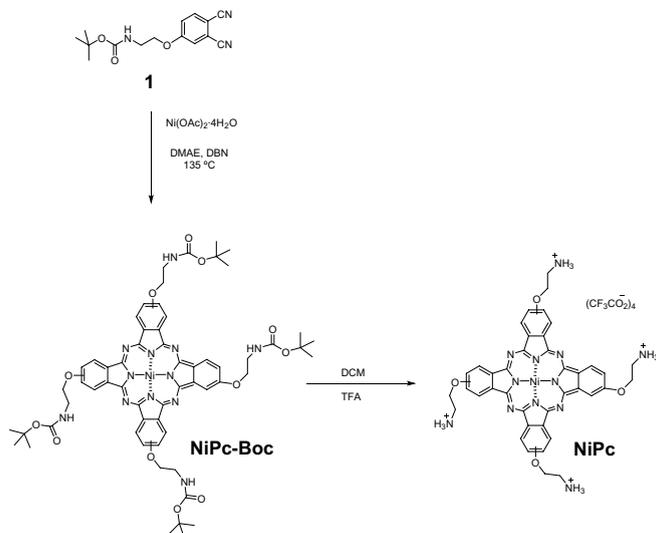
as received. UV–Vis spectra were measured with Helios Gamma and Cary 100 UV–Vis spectrophotometers. Fluorescence spectra were recorded with HORIBA scientific SAS and PTI spectrophotometers. High-resolution mass spectra were obtained from a Bruker Microflex LRF20 matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF). IR spectra were measured with Nicolet Impact 400D spectrophotometer. The unlabelled and labelled DNA oligonucleotides (see Table S1) were purchased from IDT DNA purified in HPLC grade, and the labelling dyes were 5'-FAM (FAM: 6-carboxyfluorescein) and 3'-TAMRA (TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine). All concentrations of oligonucleotides were estimated by UV absorption using the extinction coefficients and expressed in strand molarity. Ligands were dissolved in DMSO to give 5 mM stock solutions. All solutions were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and defrosted and diluted immediately before use in the suitable buffer to the appropriate concentrations.

Synthesis of NiPc-Boc

300 mg (1.04 mmol) of 4-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)phthalonitrile (**1**, see Scheme 1), 129.91 mg (0.52 mmol) of $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and DBN, 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN, 3 drops) in di-methyl-amino-ethanol (DMAE, 600 μL) were stirred at $135\text{ }^\circ\text{C}$ for 7 h under an inert atmosphere. The blue mixture was cooled at room temperature, concentrated under vacuum and purified by column chromatography (DCM:MeOH 94:6) yielding 50 mg (24%) of **NiPc-Boc**. HR-MALDI-TOF (dithranol): m/z for $\text{C}_{60}\text{H}_{68}\text{N}_{12}\text{NiO}_{12}$: calcd. 1206.4433 [M^+]; found, 1206.4589. UV–Vis (DMF) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ (log ϵ): 382 (4.37), 613 (4.53), 674 (4.92). IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3370, 2976, 2933, 2877, 1704, 1612, 1531, 1462, 1419, 1393, 1366, 1351, 1272, 1242, 1171, 1129, 1096, 1070, 963, 894, 868, 823, 782, 752, 651, 582.

Fig. 1 Metallo-phthalocyanines studied in this work





Scheme 1 Synthetic route of NiPc

Synthesis of NiPc

50 mg (0.04 mmol) of NiPc-Boc was dissolved in a mixture of DCM (1 ml) and TFA (1 ml) and stirred for 2 h at 0°C. The blue mixture was heated at room temperature and concentrated under vacuum, yielding NiPc quantitatively. HR-MALDI-TOF (dithranol): m/z for $C_{40}H_{26}N_{12}NiO_4$; calcd. 806.2336 [M^+]; found, 806.2322. UV-Vis (H_2O) λ_{max}/nm ($\log \epsilon$): 370 (4.03), 625 (4.40). IR (ν_{max}/cm^{-1}): 3294, 2929, 2879, 1729, 1655, 1608, 1531, 1456, 1394, 1336, 1280, 122, 1123, 1091, 1062, 1014, 960, 837, 749, 700, 622. 1H NMR (TFA- d_4): δ = 4.13 (br s, 8H, CH_2O), 5.04 (br s, 8H, CH_2N), 8.01 (br s, 4H, ArH), 9.11 (br s, 4H, ArH) 9.48 (br s, 4H, ArH).

FRET melting assay

Labelled DNA was dissolved as a 20 μM stock solution in MilliQ water and then a solution of 400 nM concentration was prepared in cacodylate buffer (pH 7.3) supplemented with potassium or sodium. The solutions were annealed at 95 °C for 10 min, and allowed to cool slowly to room temperature overnight. The buffer used for the antiparallel G4 HTelo was 100 mM NaCl, 10 mM LiCac, whilst for the rest of G4s and duplex was 100 mM KCl, 10 mM LiCac. Ligand solutions were diluted from stock solutions (see above) to a final concentration of 20 μM in the buffer. Each well of a 96-well plate (Applied Biosystem) was prepared with 60 μl , with a final 200 nM DNA concentration and increasing concentration of tested ligands (0–4 μM). Measurements were performed on a PCR AriaMx (Agilent Technologies) with excitation at 450–495 nm and detection at 515–545 nm. Readings were taken from 25 to 95 °C at interval of 0.5 °C

maintaining a constant temperature for 30 s before each reading. Each measurement was done in triplicate. The normalised fluorescence signal was plotted against the compound concentration and the ΔT_m values were determined.

Spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations

The DNA oligonucleotides were dissolved in Tris buffer (100 mM KCl, 10 mM Tris pH 7.4) and annealed at 95 °C for 10 min before cooling to room temperature overnight. The concentration of DNA was confirmed using the molar extinction coefficients provided by the manufacturer. Annealing concentrations were approximately 500 μM . Absorption spectra were recorded with a Cary 100 UV–Vis Spectrometer (Agilent) in quartz cells (path length 1 cm) using scan rates of 300 nm min^{-1} . Fluorescence spectra were recorded with a PTI Spectrofluorimeter in quartz cells with a cross-section of 1×0.5 cm, using slit widths of 2 nm and an integration time of 0.1 s. The fluorescence emission spectra were recorded between 630 and 900 nm with an excitation wavelength of 620 nm. UV–Vis titrations were conducted with a concentration of **MPc** of 5 μM whilst fluorescence titrations used 2 μM . The absorption/emission maxima data were analysed according to the independent-site model by means of a Levenberg–Marquardt fitting routine and equations reported previously by Thordarson. [49]

Singlet oxygen evaluation

Indirect evaluation: Singlet oxygen generation was evaluated in air using the indirect method with di-phenyl-isobenzofuran (DPBF) acting as a singlet oxygen chemical quencher in DMSO. To avoid chain reactions of the quencher in the presence of singlet oxygen, the concentration of DPBF was kept at $\sim 3 \times 10^{-5}$ M. Solutions of the **MPc** with an absorbance of ~ 0.5 at the irradiation wavelength were prepared in the dark and irradiated at 730 nm with a LED array lamp in the presence of DPBF. Then, the reactions were followed spectrophotometrically by observing the decrease in the 417 nm absorption peak of DPBF as a function of irradiation time. *Direct evaluation:* The sample was prepared in an air-saturated acetonitrile or deuterated water solution with an absorption of 0.2 at 400 nm. The sample was irradiated at 400 nm with a mounted M450LP1 LED (Thorlabs). To cut off light at wavelengths shorter than 850 nm, a long-pass glass filter was placed in front of the monochromator entrance slit. The signal was detected with an EO-817L IR-sensitive liquid-nitrogen cooled germanium diode detector (North Coast Scientific Corp.). The luminescence signal, centred at 1270 nm, was measured from 1100 to 1400 nm.

Cell culture

HeLa Human cervical and A549 lung cancer cells and RAW 264.7 macrophages were grown in low glucose Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% foetal bovine serum at 37 °C with 10% CO_2 in humidified air. Cells were kept continuously under confluence before split twice a week and the possibility of contamination was excluded by performing regularly mycoplasma tests.

Cellular imaging

Cells were seeded on chambered cover glass (*ca.* 2×10^4 , 300 μl , 0.8 cm^2) for 24 h, then the medium was replaced with fresh phenol red-free medium containing **ZnPc** (20 μM , 200 μl) for 2 h. Prior to imaging, the cells were washed with PBS and replaced with fresh growth medium. Cells were imaged using a confocal fluorescence microscope (FV1000, Olympus). Using a 60 \times magnification microscope objective (water immersion, NA $\frac{1}{4}$ 1.2) and an excitation wavelength of 620 nm for **MPc**, images of the cells were recorded in both transmission and fluorescence modes. For the fluorescence images, the detection band was 640–800 nm which covered the emission range of the metal complexes.

Intracellular oxidative stress

The measurement of the broad spectrum of intracellular ROS gave an indicative assessment of the oxidative stress using the specific oxidation-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Cells were loaded with DCFH-DA (25 μM) diluted in serum-free medium and incubated at 37 °C for 60 min. Then, they were treated with 10, 50 and 100 μM solutions of **MPc** for 24 h. The fluorescence of the probe was registered in a multi-mode microplate reader with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm before and after irradiation at 730 nm during 20 min (5.2 mW cm^{-2} , 3.1 J cm^{-2}) light using an Atlas Photonics LUMOS BIO irradiator.

Phototoxicity on cell cultures

A total of 5×10^3 HeLa, A549 and RAW 264.7 cells were seeded on 96-well plates and allowed to adhere for 24 h. The cells were treated with increasing concentrations of the **MPc** diluted in cell medium achieving a total volume of 200 μl . The cells were incubated with the **MPc** for 24 h and, then the medium was refreshed with phenol red-free medium. To study the phototoxic effect of the **MPc**, the cells were exposed to 730 nm (spectral half-width: 20 nm, 10 min, 5.2 mW cm^{-2} , 3.1 J cm^{-2}) light using an Atlas Photonics LUMOS BIO

irradiator. To study the dark cytotoxicity of the **MPc**, the cells were not irradiated and the medium exchanged. The cells were grown for an additional 24 h period at 37 °C. After this time, the medium was replaced with fresh medium containing MTT with a final concentration of 0.5 mg mL⁻¹. The cells were incubated for 4 h and the generated formazan crystals were solubilised in 100 µl DMSO. The absorbance was registered with a SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices). The obtained data was analysed with the GraphPad Prism software.

Results and discussion

Design, synthesis and photophysical characterisation of the metallo-phthalocyanines

Attending to the two main structural characteristics of potent G4 binders, comprising a planar polycyclic π -deficient core and one or several charged side chains, we prepared two metallo-phthalocyanines differentiated by the metal within the macrocyclic isoindole core, either nickel or zinc. In the nickel phthalocyanine, the metal coordinates four nitrogen atoms of the macrocycle adopting a square planar geometry whilst zinc generates a pyramidal geometry by coordinating an additional solvent molecule in addition to the nitrogen atoms of the macrocycle. The different arrangement will allegedly impact the binding to G4s through the most common binding mode of π - π stacking on the top of the G-quartets. The metal complexes were also designed with four side chains with pH-dependent protonable groups to enhance the aqueous solubility and hamper the self-aggregation. [43, 50, 51] Moreover, these moieties can improve the interaction with DNA by binding to the phosphates and the nucleobases.

ZnPc was synthesised according to the literature, with a minor modification on the procedure to obtain the TFA salt instead of the HCl one [52]. **NiPc-Boc** was obtained upon the cyclo-tetramerization of the precursor phthalonitrile **1** in the presence of Ni(OAc)₂ (see Scheme 1) and further purification by chromatography (yield: 24%). The ¹H NMR spectra registered in different deuterated solvents (data not shown) showed no well-defined signals due to aggregation of the phthalocyanine core. Then, **NiPc** was obtained in quantitative yield by treatment of **NiPc-Boc** with TFA (see Scheme 1). **NiPc** was characterised by ¹H NMR and FT-IR spectroscopies and HR-MALDI-TOF spectrometry. The ¹H NMR spectrum in TFA-*d*₄ showed well-defined aromatic and aliphatic signals: three signals from the isoindole units can be found at 9.48, 9.11 and 8.01 ppm integrating for 12 hydrogen atoms, and from the aminoethoxy chain two signals can be observed, one at 5.04 corresponding to

the 8 protons closer to the amine group and the second one at 4.13 ppm corresponding to the 8 protons closer to the oxygen (Figure S1). Additionally, HR-MALDI-TOF assays, performed at positive mode confirmed the obtention of both, **NiPc-Boc** and **NiPc**, with isotopic distributions that match the simulated isotope patterns. Furthermore, in the FT-IR spectrum of **NiPc**, the band at 1704 cm⁻¹ corresponding to the carbonyl group (C=O) of the **NiPc-Boc** is missing, as well as the apparition of a broad band of the ammonium groups centred at 3294 cm⁻¹ (Figures S3 and S4).

Both **MPc** show the typical UV-Vis bands of metallo-phthalocyanines with a band at lower wavelength and centred at 350 nm, which is assigned to the Soret band of the phthalocyanine scaffold (see Table 1). A second band located within the visible region and centred at 680 nm is ascribed to the Q band. The linearity of the absorption versus the concentration of the metal complexes indicates the absence of aggregation in aqueous solution up to 100 µM for **ZnPc** and 50 µM for **NiPc** (Figure S5). Similar to other metallo-phthalocyanines, only the zinc phthalocyanine presents a fluorescence emission band at 705 nm in H₂O (see Table 1).

Interaction of the metallo-phthalocyanines with DNAs

We initially evaluated the stabilisation of DNA induced by the ligands by FRET melting experiments. We included G4s of different topology (parallel, antiparallel and mixed/hybrid) and number of G-tetrads (e.g. 2 and 3 tetrads), as well as a duplex model (see Table S1). **NiPc** induced a larger stabilisation effect for all G4s than **ZnPc** (i.e. ΔT_m values in F21T-K G4 are 33.1 and 25.7 for **NiPc** and **ZnPc**, respectively at ratio [DNA]:[MPc] of 1:10). The larger stabilisation produced by **NiPc** can be ascribed to the square planar geometry of the nickel core, which can stack more efficiently on the top of the external G-tetrads in comparison with the pyramidal geometry of the zinc site with less efficient stacking. Both ligands do not stabilise the duplex model (dark brown bar in Fig. 2), indicating a high degree of selectivity for G4 over duplex DNA. The low interaction of the **MPc** towards double-stranded DNA structures has already been observed and associated to the large aromatic core, which

Table 1 Photophysical data of the two metallo-phthalocyanines (**MPc**) in different solvents

MPc	Solvent	λ_{abs} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	λ_{em} (nm)
NiPc	H ₂ O	625	25,370	
NiPc	CH ₃ CN	600	21,978	
ZnPc	H ₂ O	637	8083	705
ZnPc	CH ₃ CN	627	6186	

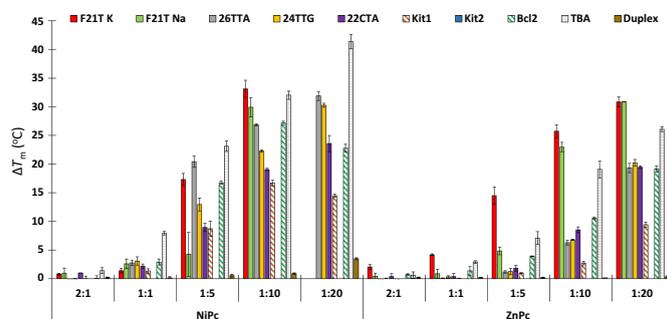


Fig. 2 Representation of ΔT_m values obtained from the FRET melting studies for the interaction of the metallo-phthalocyanines with several G4/duplex DNA structures. The concentration of DNA was $0.2 \mu\text{M}$, whereas the concentration of the MPc was increased and the

[DNA]:[MPc] ratios showed in the bottom part (2:1, 1:1, 1:5, 1:10 and 1:20). Errors denote the standard deviations of at least three independent experiments

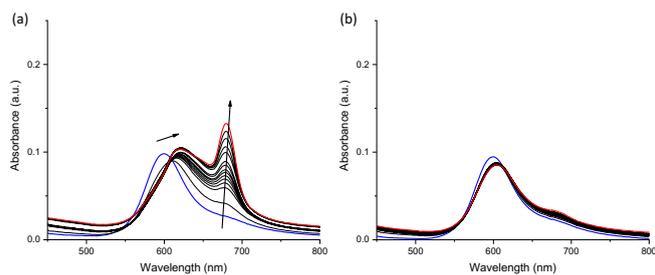


Fig. 3 UV-Vis titrations of NiPc with cMyc G4 **a**, and ds26 **b**. Blue spectrum corresponds to the initial titration and red spectrum to last one

hampers the base pair intercalation and the groove binding to the double helix [40, 41, 50, 51, 53]. Strikingly, NiPc induces a high stabilisation effect on the *bitetrad* thrombin G4 TBA (light grey bar in Fig. 2).

Once assessed the stabilisation effect, we performed UV-Vis titrations with HTelo G4 (telomeric region), cMyc G4 (oncogene promoter) and a duplex DNA (ds26) to evaluate the affinity for DNAs. NiPc and ZnPc present in aqueous solution an absorption band at 600 and 625 nm, respectively, assigned to the Q band (Fig. 3).

Table 2 Binding constants ($\log K_b$) determined from the UV-Vis and fluorescence titration experiments of MPc with G4 and duplex DNAs in Tris buffer (100 mM KCl, 10 mM Tris pH 7.4).

	HTelo	cMyc	ds26
NiPc	$5.2 (\pm 0.1)^1$	$6.3 (\pm 0.2)^1$	n.d
ZnPc	$6.7 (\pm 0.4)^1$	$6.3 (\pm 0.7)^1$	n.d
	$5.2 (\pm 0.1)^2$	$6.3 (\pm 0.2)^2$	$4.6 (\pm 0.4)^2$

nd no determined

¹Obtained by UV-Vis titrations. ²Obtained by fluorescence titrations

Addition of DNA to **ZnPc** yields a decrease in the band and the appearance of a new Vis band at 690 nm (Figures S6–S11). The intensity of this band depends on the structure studied, being G4s the structures that show the largest enhancement of the intensity. **NiPc** shows a decrease and a red shift of the visible band in addition to the apparition of a new band centred at 720 nm when bound to G4s (Fig. 3). UV–Vis titrations with duplex DNA afforded minimal change in these bands, indicating a soft interaction for double-stranded DNA in concordance with the FRET melting results. The affinity constants calculated from the titrations are collected in Table 2, which indicate the high affinity for G4s of both **MPc** ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$). In contrast, both complexes show low affinity for the duplex DNA ($K_a < 10^3 \text{ M}^{-1}$), confirming the selectivity observed by the FRET melting assays.

Fluorescence emission titrations were carried out to determine the binding affinity of **ZnPc** for different DNAs. **ZnPc** shows a low fluorescent emission in aqueous-buffered conditions, and the addition of DNAs yields the apparition of a fluorescent emission band centred at 702 nm (see Fig. 4 and S12–S16 in ESI). The intensity changes of the fluorescence emission are different depending on the nucleic acid structure, being larger for G4s (G4-DNA yields a 60-fold increase whilst duplex DNA experiences a 20-fold increase, see Fig. 4). The binding constants afforded values within the micromolar range for G4s structures (see Table 2) whilst the duplex model presents affinity constants of two orders of magnitude lower, which agrees with the UV–Vis and FRET melting experiments.

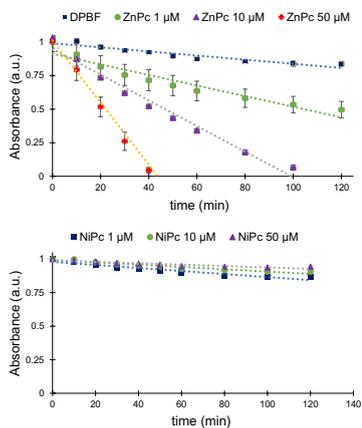


Fig. 5 Comparison of the decay rate of DPBF in DMSO induced by **ZnPc** (top panel) and **NiPc** (bottom panel) under red light irradiation

Assessment of the ROS generation

Following our initial hypothesis, the capacity to regulate gene expression of G4 ligands can be tightly associated to the photosensitizing capacity which breaks down the G4 structures upon binding. Therefore, we assessed the

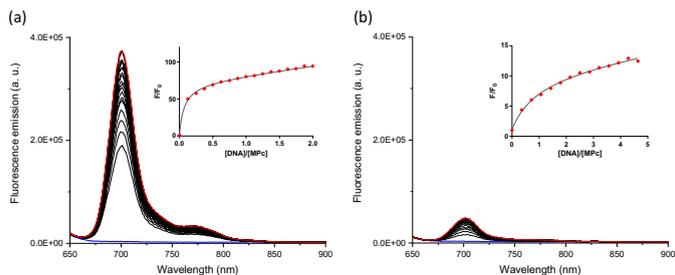


Fig. 4 Fluorescence titrations of **ZnPc** with G4 HTelo **a** and ds26 **b** in Tris 10 mM, KCl 100 mM, pH 7.4, $\lambda_{exc} = 620 \text{ nm}$. Inset: Plot of the F/F_0 vs. ratio $[DNA]/[MPc]$. Blue spectrum corresponds to the initial titration and red spectrum to last one

capability to induce singlet oxygen under irradiation of both metallo-phthalocyanines and well-known photosensitizers, Zinc 2,9,16,23-tetra-*tert*-butyl-29*H*,31*H*-phthalocyanine (**Zn-PS**) and Rose Bengal (**RB**). We studied the DPBF quenching upon irradiation of the **MPC** at different concentrations and irradiation times. DPBF traps selectively singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and arises a decrease in the band at 460 nm, whose intensity is directly associated to the $^1\text{O}_2$ generation. As it can be observed in Fig. 5, **ZnPc** generates singlet oxygen even at the lowest concentration studied (1 μM), being the generation of $^1\text{O}_2$ dependent on the concentration of the metallo-phthalocyanine. In contrast, the **NiPc** barely generates $^1\text{O}_2$ species indicating that the metal core is fundamental for the activation of oxygen radicals upon irradiation. Interestingly, the quenching rates of DPBF are higher for **ZnPc** than for **Zn-PS** (Figure S17) indicating that **ZnPc** is a more efficient photosensitizer than the reference photosensitizer **Zn-PS**.

An additional assessment was conducted by measuring the phosphorescent spectra of the singlet oxygen generated by the **MPC** and **RB** upon irradiation. We could only observe phosphorescence for **ZnPc** and **RB** in acetonitrile solution (Figure S18), suggesting that they can act as photosensitizers in contrast to **NiPc** which is unable to generate $^1\text{O}_2$. The intensity of the spectrum of **ZnPc** is higher than that of **RB**, indicating a qualitative estimation of the higher oxygen sensitizing effect of **ZnPc**.

Fig. 6 Confocal fluorescence images of HeLa cells incubated with **ZnPc** (20 μM , 2 h). Left panel is the fluorescence emission of **ZnPc**, central panel is bright field and right panel is the image emerged from the fluorescence and bright field. Scale bar: 20 μm

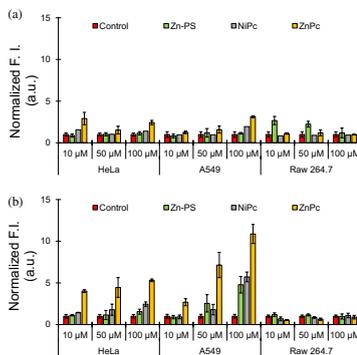
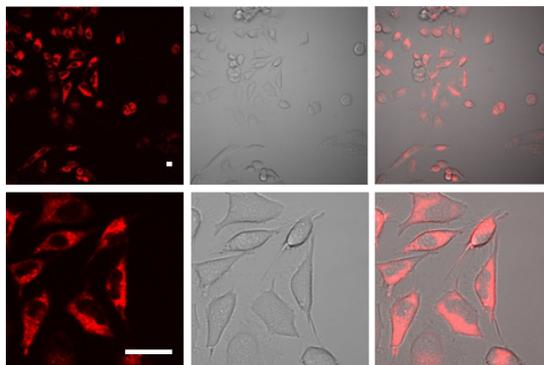


Fig. 7 ROS levels in HeLa, A549 and Raw 264.7 cells treated with **NiPc**, **ZnPc** and **Zn-PS** at different concentrations (10, 50 and 100 μM). Top panel in the dark and bottom panel irradiated at 730 nm

Cellular experiments using the metallo-phthalocyanines

Initially, we investigated the cell localization of **ZnPc** by confocal fluorescence microscopy using its intrinsic fluorescence emission. The metal complex was rapidly taken

up into human cervical cancer cells (HeLa) as a bright red emission was detected in the cytoplasm of the cells (Fig. 6).

Once confirmed that **ZnPc** enters into the cells, we assessed the oxidative stress generated on HeLa, lung cancer cells (A549) and macrophages (Raw 264.7) by both **MPc** in the dark and upon the irradiation at 730 nm. The quantification of the ROS was evaluated by monitoring the cleavage of the intracellular fluorescence probe DCFH-DA (see Experimental Methods). We included the broadly used **Zn-PS** as a positive control of photosensitizer and H_2O_2 . The incubation of the **MPc** with cells in the dark has not significant increase of the ROS except for the **ZnPc** at the highest concentration (100 μM , 24 h), with an enhancement to 3.5- and 2.2-fold of the initial cellular ROS (Fig. 7, top).

In contrast, cells treated with both **MPc** and irradiated at 730 nm during 20 min generated a significant amount of ROS. Cells treated with **NiPc** increased up to 2.4- and 5.7-fold ROS depending on the cell line. The zinc phthalocyanine treatment yielded over 2.5-fold increase of ROS for the lowest concentration, reaching to 100-fold ROS increase using the largest concentration. **Zn-PS** showed a similar trend than **ZnPc** although with lower quantity of ROS generated, suggesting that **ZnPc** has higher capacity to generate ROS than reference metallo-phthalocyanine photosensitizer.

Then, the photocytotoxic potential of the **MPc** was evaluated on the same cell lines. **Zn-PS** was also included as a control in our experiments. The results are summarised in Table 3 and representative dose–response plots are shown in Figs. 8 and S19–S22. The cells were incubated with increasing concentrations of compounds for 24 h, irradiated at 730 nm for 20 min or maintained in the dark and then, incubated for an additional 24 h, before determining the cytotoxicity. As shown in Table 3, very low toxicity (IC_{50} values > 50 μM) was obtained for **NiPc** as well as for **ZnPc** in the dark. In contrast, **ZnPc** shows high toxicity when irradiated with IC_{50} values ranging from 0.04 μM to 0.89 μM depending on the cell line. These results confirm the capacity of **ZnPc** to exert photocytotoxicity under red light irradiation.

Table 3 Values of IC_{50} assessed by MTT of the **MPc** in the dark and under irradiation

Cell line	NiPc		ZnPc		Zn-PS	
	Dark	Irrad	Dark	Irrad	Dark	Irrad
HeLa	> 100	> 100	> 100	0.039	> 100	> 100
A549	> 100	> 100	> 100	0.89	> 100	> 100
Raw264.7	> 100	> 100	58.7	0.37	22.9	42.4

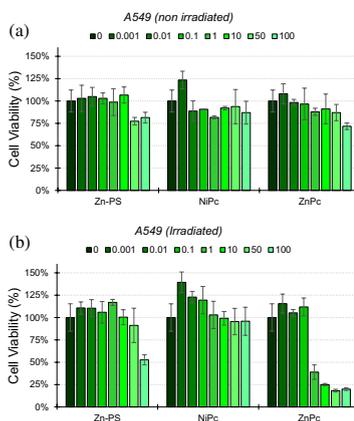


Fig. 8 Cell viability on A549 cell line of **Zn-PS**, **NiPc** and **ZnPc** in the dark **a** and under irradiation **b**. Colours and numbering in the legend refer to the compound concentrations (μM)

Conclusions

Two metallo-phthalocyanines have been obtained in good yield, which incorporate zinc and nickel within the aromatic core and containing four trifluoroacetate ethylammonium substituents in the non-peripheral positions, termed as **ZnPc** and **NiPc** respectively. The photophysical properties and the aggregation behaviour of the molecules show no aggregation of both molecules in water, indicating that the positively charged ammonium groups at physiological pH increase the aqueous solubility and helping to disrupt the molecule inter-aggregation. Both metallo-phthalocyanines show affinity constants in the micromolar range for G4s by means of UV–Vis and fluorescence emission experiments, whereas the interaction to duplex DNA is lower, *ca.* $K_a = 10^{-3}$ M.

In line with photophysical studies, FRET melting assays show a large stabilisation effect on G4s of **NiPc** and moderate stabilisation effect of **ZnPc**, suggesting that the central metal core is important for G4 binding and that the square planar geometry of nickel has a better π - π overlapping with the G-quartets than that of the pyramidal geometry of zinc complex. In addition, no one stabilises the duplex DNA, in agreement with UV-Vis and fluorescence titrations.

As photosensitizers, **ZnPc** exhibits a higher singlet oxygen generation upon red light activation in vitro and in cellular assays in contrast to **NiPc** which shows negligible photosensitization. Strikingly, the ROS generation of **ZnPc** is comparable to photosensitizers, such as **RB** and **Zn-PS**. Finally, the treatment of the HeLa, A549 and Raw 264.7 cells with **MPc** shows a strong photocytotoxic effect for **ZnPc**, having IC_{50} values five orders of magnitude lower than in the dark. The results herein described give new insights into the development of novel anticancer drugs operating via a dual mechanism involving G4 binding and photokilling of the cancer cells.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00775-023-02003-3>.

Author contributions AG-M, L-M and JG-G. conducted the experimental work with DNAs. CG-R, and JG-G. conducted the cellular experiments. AH, and JO. performed the synthesis and characterisation of the molecules. AS-S, EG-E, and JG-G. designed the project, obtained the funding and wrote the manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This research was funded by the Spanish Ministry for Science and Innovation, The National Research Agency and FEDER funds from the EU (grants PID2019-110751RB-I00, PID2019-108643GA-I00, PID2020-117855RB-I00, RED2018-102331-T, CEX2019-000919, MFA/2022/014 and MFA/2022/028) and the Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital of the Generalitat Valenciana (CIDEGENT/2018/015 y PRO-METEO Grant CIPROM/2021/030). This contribution is also based upon work from COST Action CA18202, NECTAR—Network for Equilibria and Chemical Thermodynamics Advanced Research, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). This study forms part of the Advanced Materials programme and was supported by MCIN with funding from European Union NextGenerationEU (PRTR-C17.11) and by Generalitat Valenciana.

Data availability Data will be made available on request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in

the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA (2010) Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 28:1069–1078
- Neidde S (2016) Quadruplex nucleic acids as novel therapeutic targets. *J Med Chem* 59:5987–6011
- Palma E, Carvalho J, Cruz C, Paulo A (2021) Metal-based G-Quadruplex binders for cancer therapeutics. *Pharmaceuticals* 14:605
- Kosiol N, Juranek S, Brossart P, Heine A, Paeschke K (2021) G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy. *Mol Cancer* 20:40
- Neidde S, Balasubramanian S (2006) Quadruplex Nucleic Acids. In: Balasubramanian S (eds) RSC Cambridge, UK
- Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S (2020) The structure and function of DNA G-Quadruplexes. *Trends Chem* 2(2):123–136
- Chambers VS, Marsico G, Boutell JM, Di Antonio M, Smith GP, Balasubramanian S (2015) High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat Biotechnol* 33:877–881
- Rhodes D, Lipps HJ (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res* 43:8627–8637
- Varshney D, Spiegel J, Zyner K, Tannahill D, Balasubramanian S (2020) The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:459–474
- Collie GW, Parkinson GN (2011) The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem Soc Rev* 40:5867–5892
- Islam MK, Jackson PJM, Rahman KM, Thurston DE (2016) Recent advances in targeting the telomeric G-quadruplex DNA sequence with small molecules as a strategy for anticancer therapies. *Future Med Chem* 8(11):1259–1290
- Neidde S (2017) Quadruplex nucleic acids as targets in cancer drug discovery. *Nat Rev Chem* 1(5):0041
- Carvalho J, Mergny J-L, Salgado GF, Queiroz JA, Cruz C (2020) G-quadruplex, friend or foe: the role of the G-quartet in anticancer strategies. *Trends Mol Med* 26(9):848–861
- Cao Q, Li Y, Freisinger E, Qin PZ, Sigel RKO, Mao Z-W (2017) G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs. *Inorg Chem Front* 4(1):10–32
- Chaudhuri R, Bhattacharya S, Dash J, Bhattacharya S (2021) Recent update on targeting ϵ -MYC G-Quadruplexes by small molecules for anticancer therapeutics. *J Med Chem* 64(1):42–70
- Xu J, Huang H, Zhou X (2021) G-Quadruplexes in neurobiology and virology: functional roles and potential therapeutic approaches. *JACS Au* 1(12):2146–2161
- Ruggiero E, Richter SN (2018) G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Res* 46(7):3270–3283
- Plavec J (2020) Quadruplex targets in neurodegenerative diseases. *Annu Rep Med Chem* 54:441–483
- Wang E, Thombre R, Shah Y, Latanich R, Wang J (2021) G-Quadruplexes as pathogenic drivers in neurodegenerative disorders. *Nucleic Acids Res* 49(9):4816–4830
- Balaratnam S, Schneekloth JS Jr (2020) Transcriptional regulation of MYC through G-quadruplex structures. *Annu Rep Med Chem* 54:361–407

21. Mendes E, Aljnadi IM, Bahls B, Victor BL, Paulo A (2022) Major achievements in the design of Quadruplex-Interactive Small Molecules. *Pharmaceuticals* 15(3):300
22. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwabe M, Lin A, Bliesath J, Ho CB, Proffitt C, Trent K, Whitten JP, Lim JKC, Von Hoff D, Anderes K, Rice WG (2009) Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* 69:7653–7661
23. Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, Omori M, Haddach M, Schwabe MK, Siddiqui-Jain A, Streiner N, Quin JE, Sanji E, Bywater MJ, Hannan RD, Ryckman D, Anderes K, Rice WG (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* 71:1418–1430
24. Xu H, Di Antonio M, McKinney S, Mathew V, Ho B, O'Neil NJ, Santos ND, Silvester J, Wei V, Garcia J, Kabeer F, Lai D, Soriano P, Banath J, Chiu DS, Yap D, Le DD, Ye FB, Zhang A, Thu K, Soong J, Lin S-C, Tsai AHC, Osako T, Algara T, Saunders DN, Wong J, Xian J, Bally MB, Brenton JD, Brown GW, Shah SP, Cescon D, Mak TW, Caldas C, Stirling PC, Hieter P, Balasubramanian S, Aparicio S (2017) CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat Commun* 8:14432
25. Ferino A, Nicoletto G, D'Este F, Zorzet S, Lago S, Richter SN, Tikhomirov A, Shechekotikhin A, Xodo LE (2020) Photodynamic therapy for ras-driven cancers: targeting G-Quadruplex RNA structures with bifunctional Alkyl-modified porphyrins. *J Med Chem* 63(3):1245–1260
26. Cogo S, Xodo LE (2006) G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res* 34(9):2536–2549
27. Wheelhouse RT, Sun D, Haiyong H, Frank X, Hurley LH (1998) Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine with Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* 120(13):3261–3262
28. Zheng X-H, Nie X, Liu H-Y, Fang Y-M, Zhao Y, Xia L-X (2016) TMPyP4 promotes cancer cell migration at low doses, but induces cell death at high doses. *Sci Rep* 6:26592
29. Caterino M, D'Arria F, Kustov AV, Belykh DV, Khudyaeva IS, Starceva OM, Berezin DB, Pylyna YI, Usacheva T, Amato J, Giancola C (2020) Selective binding of a bioactive porphyrin-based photosensitizer to the G-quadruplex from the KRAS oncogene promoter. *Int J Biol Macromol* 145:244–251
30. McKenzie LK, Bryant HE, Weinstein JA (2019) Transition metal complexes as photosensitizers in one- and two-photon photodynamic therapy. *Coord Chem Rev* 379:2–29
31. Imberti C, Zhang P, Huang H, Sadler PJ (2020) New Designs for Phototherapeutic Transition Metal Complexes. *Angew Chem Int Ed* 59:61–73
32. Monto S, Colón KL, Yin H, Roque J III, Konda P, Gujar S, Thummel RP, Lilge L, Cameron CG, McFarland SA (2019) Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. *Chem Rev* 119:797–828
33. McFarland SA, Mandel A, Dumoulin-White R, Gasser G (2020) Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Curr Op Chem Biol* 56:23–27
34. Karges J (2022) Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Angew Chem Int Ed* 61(5):202112236
35. Li X, Lee S, Yoon J (2018) Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 47(4):1174–1188
36. Yaku H, Fujimoto T, Murashima T, Miyoshi D, Sugimoto N (2012) Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem Commun* 48:6203–6216
37. Yaku H, Murashima T, Miyoshi D, Sugimoto N (2012) Specific binding of anionic porphyrin and phthalocyanine to the G-quadruplex with a variety of in vitro and in vivo applications. *Molecules* 17:10586–10613
38. Lo P-C, Rodríguez-Morgade MS, Pandey RK, Ng DKP, Torres T, Dumoulin F (2020) The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Chem Soc Rev* 49(4):1041–1056
39. Li X, Zheng B-D, Peng X-H, Li S-Z, Ying J-W, Zhao Y, Huang J-D, Yoon J (2019) Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coord Chem Rev* 379:147–160
40. Alzeer J, Vammidi BR, Roth PIC, Luedtke NW (2009) Guanidium-modified phthalocyanines as high-affinity G-quadruplex fluorescent probes and transcriptional regulators. *Angew Chem Int Ed* 48(49):9362–9365
41. Membrino A, Paramasivam M, Cogo S, Alzeer J, Luedtke NW, Xodo LE (2010) Cellular uptake and binding of guanidine-modified phthalocyanines to KRAS/HRAS G-quadruplexes. *Chem Commun* 46(4):625–627
42. Alzeer J, Luedtke NW (2010) pH-Mediated fluorescence and G-quadruplex binding of amido phthalocyanines. *Biochemistry* 49:4339–4348
43. Ren L, Zhang A, Huang J, Wang P, Weng X, Zhang L, Liang F, Zhou X (2007) Quaternary ammonium zinc phthalocyanine: inhibiting telomerase by stabilizing G quadruplexes and inducing G-quadruplex structure transition and formation. *ChemBioChem* 8:775–780
44. Zhang L, Huang J, Ren L, Bai M, Wu L, Zhai B, Zhou X (2008) Synthesis and evaluation of cationic phthalocyanine derivatives as potential inhibitors of telomerase. *Bioorg Med Chem* 16:303–312
45. Macii F, Perez-Arnaiz C, Arrico L, Busto N, Garcia B, Biver T (2020) Alcian blue pyridine variant interaction with DNA and RNA polynucleotides and G-quadruplexes: changes in the binding features for different bisubstrates. *J Inorg Biochem* 212:111199
46. Yilmaz HE, Bagda E, Bagda E (2021) Interaction of water soluble cationic gallium(III) phthalocyanines with different G-quadruplex DNAs. *Polyhedron* 208:115404
47. Uchiyama M, Momotake A, Ikeue T, Yamamoto Y (2020) Photogeneration of reactive oxygen species from water-soluble phthalocyanine derivatives bound to a G-Quadruplex DNA. *Bull Chem Soc Jpn* 93:1504–1508
48. Kawauchi K, Sugimoto W, Yasui T, Murata K, Itoh K, Takagi K, Tsuruoka T, Akamatsu K, Tateishi-Karimata H, Sugimoto N,

- Miyoshi D (2018) An anionic phthalocyanine decreases NRAS expression by breaking down its RNA G-quadruplex. *Nat Commun* 9:2271
49. Thordarson P (2011) Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev* 40:1305–1323
50. Ramos CIV, Almeida SP, Lourenço LMO, Pereira PMR, Fernandes R, Faustino MAF, Tomé JPC, Carvalho J, Cruz C, Neves MGPMS (2019) Multicharged Phthalocyanines as Selective Ligands for G-Quadruplex DNA Structures. *Molecules* 24(4):733
51. Lopes-Nunes J, Carvalho J, Figueiredo J, Ramos CIV, Lourenço LMO, Tomé JPC, Neves MGPMS, Mergny J-M, Queiroz JA, Salgado GF, Cruz C (2020) Phthalocyanines for G-quadruplex aptamers binding. *Bioorg Chem* 100:103920
52. Sibrían-Vázquez M, Ortiz J, Nesterova IV, Fernández-Lázaro F, Sastre-Santos Á, Soper SA, Vicente MGH (2007) Synthesis and properties of cell-targeted Zn(II)-phthalocyanine-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem* 18(2):410–420
53. Yaku H, Murashima T, Miyoshi D, Sugimoto N (2010) Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes. *Chem Commun* 46:5740–5742

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Ariadna Gil-Martínez¹  · Adrián Hernández² · Cristina Galiana-Roselló¹  · Sònia López-Molina¹  · Javier Ortiz²  · Ángela Sastre-Santos²  · Enrique García-España¹  · Jorge González-García¹ 

✉ Jorge González-García
jorge.gonzalez@uv.es

² Área de Química Orgánica, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain

¹ Institute of Molecular Science (ICMol) and Department of Inorganic Chemistry, University of Valencia, C/ Jose Beltran 2, 46980 Paterna, Spain

Asimismo, se realizó en colaboración con el Dr. Fabio Rizzo del centro de investigación Soft Nanoscience (SoN) de la Universidad de Münster, Alemania. En este trabajo se estudió la afinidad y selectividad de dos espirobifluorenos con estructuras de ADN de doble hélice y G-quadruplex. Ambas moléculas de espirobifluoreno, Spiro-NMe₃ y Spiro-SO₃, son altamente fluorescentes y presentan en disolución acuosa cargas positivas y negativas, respectivamente.

Mediante ensayos de desnaturalización térmica y valoraciones de emisión de fluorescencia, ya descritas en el *capítulo 3 de Material y métodos*, se determinó que la molécula Spiro-NMe₃ con sustituyentes alquil amonio es capaz de estabilizar e interactuar preferentemente con las estructuras G4s frente a la estructura de doble hélice. Por otro lado, el ligando Spiro-SO₃ presentó una menor unión a las estructuras G4s, mientras que mostró una mayor afinidad hacia la doble hélice. Estos resultados indican que los sustituyentes de las cadenas laterales cargados positivamente de Spiro-NMe₃ juegan un papel fundamental en la interacción con los G4s.

Los estudios celulares confirmaron la internalización de ambas moléculas de espirobifluoreno, con una mayor acumulación en los lisosomas. Además, se comprobó que ninguna de las dos moléculas presentaba toxicidad celular (IC₅₀ > 100 μM).

Modulating the G-Quadruplex and Duplex DNA Binding by Controlling the Charge of Fluorescent Molecules

Ariadna Gil-Martínez,^[a] Sònia López-Molina,^[a] Cristina Galiana-Roselló,^[a]
Andrea Lázaro-Gómez,^[a] Friederike Schlüter,^[b] Fabio Rizzo,^{*,[b, c]} and Jorge González-García^{*,[a]}

Abstract: Two fluorescent and non-toxic spirofluorene molecules bearing either positive (Spiro-NMe3) or negative (Spiro-SO3) charged moieties attached to the same aromatic structure have been investigated as binders for DNA. The novel Spiro-NMe3 containing four alkylammonium substituents interacts with G-quadruplex (G4) DNA structures and shows preference for G4s over duplex by means of FRET melting and fluorescence experiments. The interaction is

governed by the charged substituents of the ligands as deduced from the lower binding of the sulfonate analogue (Spiro-SO3). On the contrary, Spiro-SO3 exhibits higher binding affinity to duplex DNA structure than to G4. Both molecules show a moderate quenching of the fluorescence upon DNA binding. The confocal microscopy evaluation shows the internalization of both molecules in HeLa cells and their lysosomal accumulation.

Introduction

Organisms store the genetic information in polymeric molecules of nucleotides either as DNA or RNA. In particular, DNA has been associated to the structure determination by Watson and Crick of the double-stranded helix with the essential crystallographic assistance of Wilkins, Franklin and many others in the 1950s. Nevertheless, DNA can adopt transient and permanent alternative conformations such as triplexes, Holliday junctions, *i*-motifs and G-quadruplexes (G4s) assisted by the capability of nucleobases to form different hydrogen bond patterns from the Watson-Crick base pairing.^[1] G4s are tetra-stranded structures formed from both DNA and RNA guanine-rich sequences. These

structures are built from two or more guanine-quartet units stacked with each other. G-quartets or G-tetrads are planar rearrangements of four guanine bases held together by a hydrogen bonding network between the Hoogsteen and Watson-Crick faces of the guanines (Figure 1).^[2] G-quadruplex frameworks retain cationic ions in a central core channel, being sodium and potassium ions the most relevant from the biological point of view. Striking, next generation sequencing and bioinformatic analysis identified putative G-quadruplex forming sequences (ca. > 700 000) in human telomeres, oncogene-promoter regions, replication initiation sites and untranslated regions in the human genome.^[3] The accumulating evidences highlight the essential role of G-quadruplexes in gene expression, telomere maintenance and chromosome stability.^[4] In consequence, G4s have been proposed as potential targets for the therapeutic intervention in cancer, aging and neurodegenerative diseases,^[5] and a large number of small molecules have been described to exert a therapeutic benefit.^[6] In this line, some G4 binders have progressed to clinical trials for the treatment of carcinoid, neuroendocrine and BRCA1/2-deficient tumors.^[7] In parallel to the therapeutical intervention, many biological tools have been developed to investigate G4s *in vitro* and *in vivo*.^[8] Among them, optical probes are of utmost importance to track the G4 formation and to understand their regulatory roles in the biological processes. The chimeric fluorescent probe shall own several features, (i) high-to-moderate affinity for G4s, (ii) selectivity for G4s over other DNA/RNA structures and proteins present in the cells, (iii) large variation of the fluorescence upon G4 binding, (iv) negligible change in fluorescence upon interaction with other biomolecules except for G4s, (v) permeable to cells and (vi) to not be toxic.^[9] Therefore, the chemical biologist community is seeking for optical probes to interrogate the G-quadruplex formation in the biological processes of living systems. Some examples of optical probes are collected in recent reviews and include both organic molecules and metal

[a] A. Gil-Martínez, Dr. S. López-Molina, Dr. C. Galiana-Roselló, A. Lázaro-Gómez, Dr. J. González-García
Institute of Molecular Science (ICMol)
Department of Inorganic Chemistry
University of Valencia
Catedrático José Beltrán 2, 46100, Paterna (Spain)
E-mail: jorge.gonzalez@uv.es
Homepage: <https://www.uv.es/jorgons/>

[b] Dr. F. Schlüter, Dr. F. Rizzo
Center for Soft Nanoscience (SoN)
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Busso-Peuss-Str. 10, 48149 Münster (Germany)

[c] Dr. F. Rizzo
Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche (SCITEC)
Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) via G. Fantoli 16/15, 20138 Milano (Italy)
E-mail: fabio.rizzo@cnr.it
Homepage: <https://www.uni-muenster.de/SON/en/aboutus/nachwuchsforscherguppen/fabiorizzo.html>

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/chem.202203094>

© 2022 The Authors. Chemistry – A European Journal published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

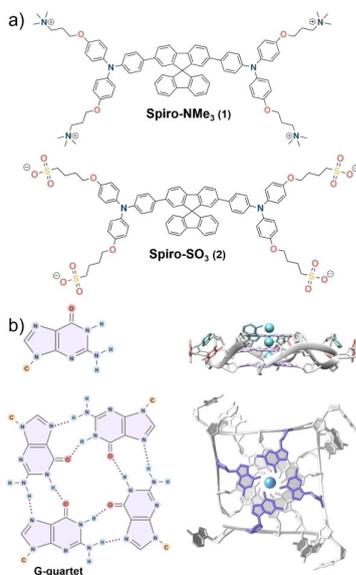


Figure 1. (a) Ligands studied in this work. (b) Structure of guanine, schematic illustration of a G-tetrad and schematic illustration of typical intramolecular G4 structure (PDB code: 1KF1). PDB: Protein Data Bank.

complexes.^[10] In the pursuit to find new scaffolds to detect G4s, triphenylamine derivatives have been developed to detect G4s based on an aggregation process between the molecules and the tetrameric G4 structures, generating an aggregation induced emission band.^[11] Moreover, G4s detection has been achieved by using probes based on the change in the fluorescence lifetime upon binding to different DNA structures.^[12]

However, many fluorescent probes exhibiting selectivity towards either G4 or duplex DNA structures require different molecular design, which results in a remarkable synthetic effort.^[13] Indeed, the probes reported in literature are designed to show exclusive binding affinity, while examples of emitting aromatic systems that can be employed to discern between G-quadruplex and duplex structures by means of an easy chemical modification are scarcely reported.

In this work, we propose an easy synthetic approach to obtain water soluble fluorophores able to distinguish between G4 and duplex DNA by modulating the charge introduced as lateral substituents in an aromatic core. In particular, we have

focused on the tetragonal-shaped scaffold, namely the spirobifluorene, as a potential unit to bind G4s, which is unexplored as nucleic acids binder. Spirobifluorene has shown potential for optoelectronic devices because of its unique conjugated cross-shape structure that hampers the aggregation, thus reducing the quenching of the emission from a non-radiative decay pathway.^[14] The chemical versatility of the spirobifluorene core allows modifying the photophysical properties, resulting in many different applications.^[15] Recently, we reported on the synthesis of the first highly water soluble spirobifluorene derivative Spiro-SO3 (2, see Figure 1)^[16] showing very low cytotoxicity and cellular uptake.

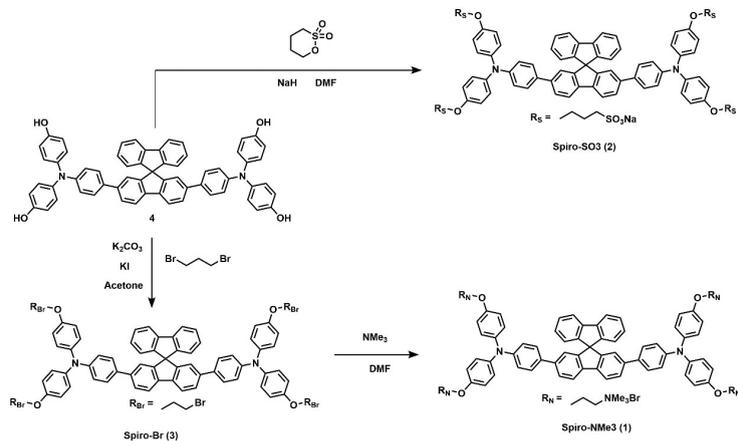
Herein, we designed and synthesized a new spirobifluorene derivative (Spiro-NMe3 (1), Figure 1) containing four trimethylamine pendant substituents and unambiguously characterized the structure by NMR and mass spectrometry. The photophysical properties of the Spiro-NMe3 (1) and the sulfonate analogue, Spiro-SO3 (2), were investigated. Moreover, we assessed the interaction of both ligands towards a panel of G4 and duplex structures by using FRET melting and fluorescence studies. Furthermore, the selectivity of Spiro-NMe3 (1) towards G4 s over duplex was investigated via FRET melting competition assays and molecular docking. To assess the potential sensing application of the ligands in cells, we determined the viability in HeLa cells and monitored the luminescence of the ligands in the cells in tandem with co-localization probes to get insights in which cellular compartment the ligands are accumulated.

Results and Discussion

Design, synthesis and photophysical properties of spirobifluorene molecules

We initially selected the spirobifluorene core in our G4-ligand design because it adopts a rigid tetragonal-shaped aromatic conformation, which presumably impacts in the ability to stack on the G-tetrads and/or fit into the grooves. We conjugated this core to two triphenylamine units at the 2,7 positions of the spirobifluorene ring in order to increase the π - π stacking interactions as well as allow these units to aggregate, which can cause a change in the fluorescence emission. Finally, we envisaged that four pendant arms in the structural design with ionizable groups will increase the aqueous solubility and can form electrostatic interactions with the DNA backbone or bases. We selected either the sulfonate and the tetraalkylammonium groups as anionic and cationic moieties to investigate the net charge of the molecules in the interaction, -4 and $+4$ respectively.

The preparation of the organic dyes is carried out by following the same approach, that is, firstly by preparing the aromatic core^[17] followed by the introduction of the lateral alkyl chains (see Scheme 1). By starting from the aromatic intermediate bearing four hydroxy groups (4 in Scheme 1), it was possible to introduce directly the chain ending with sulfonate by reaction with 1,4-butanediol in presence of sodium hydride to afford the Spiro-SO3 (2).^[16] Spiro-NMe3 (1) was obtained



Scheme 1. Synthetic route of spirobifluorene ligands studied in this work.

through two synthetic steps, that is, firstly introducing the alkyl chain by reaction with 1,3-dibromopropane in presence of K₂CO₃ as base and a catalytic amount of KI to give the intermediate **3** (Scheme 1 and Figures S1–S3 in Supporting Information), followed by the reaction with an excess of trimethylamine to give the tetraalkylammonium bromide salt (see Figures S4–S8 for NMR and mass spectra). Our synthetic strategy allows modulating easily the electrostatic interactions between the dye and the DNA by keeping the same aromatic core.

Both molecules contain the same spirobifluorene unit as aromatic scaffold, which results in similar absorption spectra with the maxima of the π - π^* band around 380 nm (see Table S1 in Supporting Information) and a second absorption band centered at 290 nm attributed to n - π^* transitions derived from the triphenylamine units.¹⁸ In contrast, the photoluminescence in water (PL) is slightly different among the molecules, showing a band centered at 480 nm for SpiroSO₃ (**2**) while the maxima of the emission band for the cationic dye is red-shifted up to 505 nm (see Figures S9 and S10). The wavelength variation could likely arise from the different ligand solvation as consequence of the different molecular net charge and the different length of the alkyl chains.¹⁹

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) melting assays

We initially evaluated the interaction of both ligands with nucleic acids by means of FRET melting experiments. The nucleic acid sequences, topology and genome localization are listed in Table S2 and cover parallel (cMyc, Kit1 and Kit2), antiparallel (HTelo-Na, 22CTA and TBA), mixed (HTelo-K and Bcl2), hybrid 1 (24TTG) and hybrid 2 (26TTA) conformations of G4s. We included in the study one RNA G4 structure (F21T-RNA) showing a parallel conformation, and a double-stranded DNA (ds26) showing a B-type duplex conformation, to assess the selectivity of the ligands for G4 vs. duplex DNA. The sequences termed HTelo, 26TTA and 24TTG are derived from telomeric regions, while cMyc, Kit1, Kit2 and Bcl2 are sequences from oncogene promoter regions. Interestingly, the pendant arms are key to stabilize the DNAs, being Spiro-NMe₃ (**1**) a strong stabilizing agent for both DNA and RNA G4s ($\Delta T_m = 10$ – 35 °C at ratio 1:10), in contrast to Spiro-SO₃ (**2**), which lacks of any stabilization effect (Figure 2).

Of outmost importance is the negligible stabilization effect of Spiro-NMe₃ (**1**) for the duplex ds26, indicating selectivity for G-quadruplex over duplex DNA. By taking into account the ratio 1:10, Spiro-NMe₃ (**1**) stabilizes largely the telomeric G4 HTelo both in potassium ($\Delta T_m > 35$ °C, mixed topology) and sodium ($\Delta T_m = 24.8$ °C, antiparallel topology) conditions as well as the G4s derived from Kit and Bcl oncogenes ($\Delta T_m > 35$ °C for Kit1, 27.9 °C for Kit2 and 30.5 °C for Bcl2). Both hybrid conformations

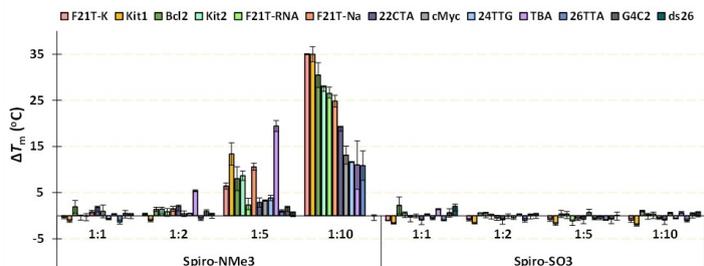


Figure 2. Representation of FRET melting values (ΔT_m) for the interaction between spirobifluorenes and various G4s and a duplex. The concentration of DNA was $0.2 \mu\text{M}$ and the [DNA]:[Ligand] ratios were presented in the bottom part (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10). Errors denote the standard deviations of at least three independent experiments.

adopted by 24TTG and 26TTA G4s are less stabilized ($\Delta T_m < 12^\circ\text{C}$) than other conformations. With regards to RNA, Spiro-NMe3 (1) strongly stabilizes this G4 ($\Delta T_m > 26.5^\circ\text{C}$ for F21T-RNA) indicating a large interaction for both DNA and RNA G4 structures. Strikingly, Spiro-NMe3 (1) induces a moderate stabilization effect on the bitetrad G4 TBA at low molar ratio ($\Delta T_m = 19.4^\circ\text{C}$ at $[\text{L}]:[\text{DNA}] = 1:5$).

To assess the G-quadruplex versus duplex selectivity of Spiro-NMe3 (1), we carried out competition FRET melting assays with F21T and Kit1 because of the larger stabilization effect observed on these G4s (Figure S11). The addition of 50 equivalents of calf thymus DNA (concentration in base pair) reduces the stabilization of G4 structures formed by F21T-K/Na to a sixth of the ΔT_m values (from $\Delta T_m \approx 30^\circ\text{C}$ to $\approx 5^\circ\text{C}$, Figure S11) suggesting a moderate selectivity for G4 over duplex. With regards to Kit1, the stabilization decreases from 11.5°C to 6.0°C . These assays suggest a higher interaction of Spiro-NMe3 (1) for G4s and a moderate selectivity for G4 over duplex structures.

Fluorescence emission assays

Having assessed the stabilization effect, we evaluated the fluorescence emission variation of the spirobifluorenes (1 and 2) upon interaction with different G-quadruplex and duplex structures. We used the non-labeled telomeric G4 HTelo and the promoter G4s from cMyc, Kit1 and Bcl2 (see Table S2). In addition, we included in the study two different polymeric duplexes of DNA, the calf thymus DNA and the ds26 with B-type duplex conformation, and the polymeric RNA poly A-poly U with an A-type duplex conformation. To assess the binding to proteins, we evaluated the binding to human serum albumin (HSA). Both spirobifluorenes show a fluorescence emission band upon excitation at 380 nm in buffered conditions (Tris 10 mM, KCl 100 mM, pH 7.4) centered at 505 nm (Figure 3). The bands

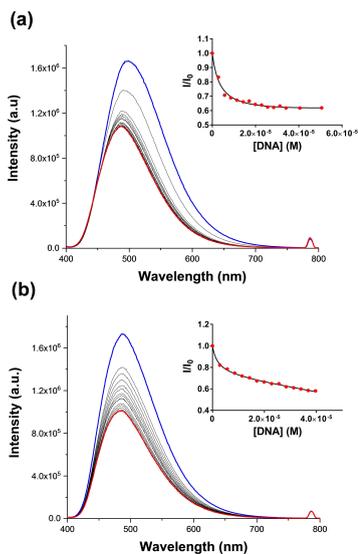


Figure 3. Fluorimetric titrations of (a) Spiro-NMe3 (1) and (b) Spiro-SO3 (2) with cMyc in Tris 10 mM, KCl 100 mM, pH = 7.4, [Ligand] = $3 \mu\text{M}$. Insets: Plot of I/I_0 vs. [DNA].

of both ligands show a decrease in emission intensity upon addition of DNA and RNA although the variation depends on the nucleic acid structure (Figure 3 and Figures S12–S18).

The stability constant values (K_s) were calculated from the titrations and are gathered in Table 1. For G4 s, the values are higher for the Spiro-NMe3 ligand than the Spiro-SO3, being one order of magnitude higher for the cationic spirobifluorene (1). Taking into account the identical central core of the spirobifluorene unit of the ligands, the stronger interaction shall be rationalized considering the net charge of the molecules. Ligand 1 can form electrostatic interactions between the tetraalkylammonium moieties and the negative charged backbone of the G-quadruplexes, which cannot be formed by the sulfonate derivative 2. Interestingly, the binding of the Spiro-NMe3 (1) towards telomeric G4 (HTelo) is very high, suggesting a certain selectivity for this structure. With regards to the duplexes, Spiro-NMe3 (1) shows high interaction to B-type DNA (ctDNA and ds26) whereas no interaction was detected for RNA polymer with A-type conformation. In contrast, Spiro-SO3 (2) shows only a considerable binding towards calf thymus DNA. Finally, no binding was observed between Spiro-NM3 (1) and the human serum albumin, while Spiro-SO3 (2) shows a blue shifted and an enhancement of the emission as observed previously with bovine serum albumin (BSA),¹⁹ suggesting a similar interaction between the negative charged Spiro-SO3 and HSA.

Fluorescent Intercalator Displacement (FID) assays

In order to support the findings from the FRET-melting and fluorescence titrations results, Fluorescence Indicator Displacement (FID) assays were performed to investigate the binding of

Table 1. Values of the stability constants (K_s , M^{-1}) obtained from the fluorimetric titrations of 1 and 2 with DNA, RNA and HSA.

	Spiro-NMe3 (1)	Spiro-SO3 (2)
HTelo	$> 10^5$	$7.2(2) \times 10^4$ ^[a]
cMyc	$4.5(0.8) \times 10^5$	$5.6(0.1) \times 10^4$
Kit1	$4.0(0.4) \times 10^5$	$< 10^4$
Bc12	$5.4(0.5) \times 10^5$	$5.5(0.3) \times 10^4$
ds26	$3.5(0.5) \times 10^5$	$< 10^4$
ctDNA	$2.8(0.5) \times 10^5$	$1.4(0.5) \times 10^5$
pAU	$< 10^4$	
HSA	$< 10^4$	$< 10^4$

[a] Values in parenthesis are standard deviation of at least three independent experiments.

Table 2. DC_{50} values (μM) calculated from the titration of spirobifluorenes to solutions of three different G4s (HTelo, cMyc and kit1) and duplex DNA (ds26). All values are average from three independent experiments with consistent results throughout.

	Spiro-NMe3 (1)	Spiro-SO3 (2)
HTelo	> 5	> 5
cMyc	2.84	> 5
Kit1	3.00	> 5
ds26	> 5	3.52

1 and 2 towards G4s (HTelo, cMyc and kit1) and a duplex (ds26). The FID assays follow the decrease in the fluorescence emission of the thiazole orange (TO) upon the ligand-induced displacement of TO from the DNA-TO adduct. A value of the displacement effect is represented by the value of DC_{50} obtained from the plot of the percentage of displacement against the concentration of the ligand.¹⁹

Spiro-NM3 (1) shows a larger displacement of TO from G4s than duplex, showing DC_{50} values of 2.84 and $3 \mu M$ for cMyc and Kit1 G4 structures (Table 2 and Figure 4) while TO is barely displaced from the duplex structure (ds26, Figure 4). On the other hand, Spiro-SO3 (2) exhibits a stronger interaction for duplex as shown in Figure 4, being the duplex structure the only DNA with a DC_{50} value below $5 \mu M$. These FID assays confirm the selectivity of the ligands towards the two different DNA structures mainly depending on the tetraalkylammonium or sulfonate moieties attached to the spirobifluorene scaffold.

Molecular modelling of 1 with G4 and duplex structures

Having established the interaction of Spiro-NMe3 (1) for DNA structures, we were interested in gaining further insights into the binding mode of the ligand to explain the selectivity for G4s over duplex. Molecular docking studies were conducted using Autodock 4.2.²⁰ The energy minimum conformers obtained from the docking of Spiro-NMe3 (1) and the G-quadruplex structure (see Materials and Methods for details) positioned the ligand on the top of the G-quadruplex with the

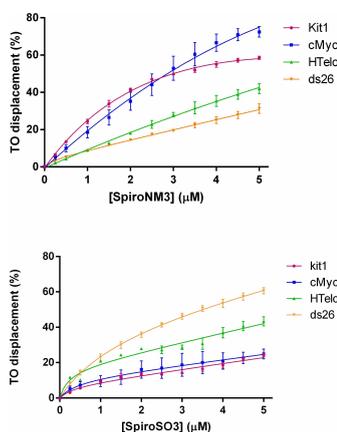


Figure 4. FID titration curves of DNA G4 (Kit1, cMyc and HTelo) and duplex ds26 with Spiro-NMe3 (1, top panel) and Spiro-SO3 (2, bottom panel).

spirobifluorene unit bended with regards to the external G-quartet (Figure 5 and Figures S19–S20), preventing efficient π - π interactions among these fragments. Nevertheless, one of the triphenylamine units is oriented towards the groove while the other triphenyl moiety is wrapping the adenine base formed in the loop. The conformer generates multiple binding contacts between the positive charged tetraalkylammonium groups and the phosphate backbone of the DNA structure (Figure S19). Then, we studied the double stranded DNA model by docking analysis. Spiro-NMe3 (1) interacts through the minor groove of the B-type duplex (Figure 5 and Figures S21–S22), in which one of the fluorene moieties is located externally to the groove and the pendant arms are pointing out the helical structure forming weak interactions (Figure S21). Overall, the docking studies point that the main driving forces of the interaction are the formed between the pendant arms while the rigid orthogonal spirobifluorene moiety has not the adequate binding pocket G4 and, in particular, for duplex structures, in contrast with ligands containing flat aromatic core such as naphthalene diimides.^[21]

Cellular localization studies

Upon assessing the interaction with nucleic acids, we performed experiments using confocal fluorescence microscopy to assess the cell localization of ligands. Initially, we evaluated the cellular viability using the MTT assay in the HeLa cancer cell line and no toxicity was observed at 24 h even at the high concentration used of 100 μ M (see Figure S23). Then, HeLa cells were incubated with the ligands during 2 h (20 μ M) and visualized by fluorescence confocal microscopy (see Figure 6), confirming the cellular uptake of the spirobifluorenes in this cell line.

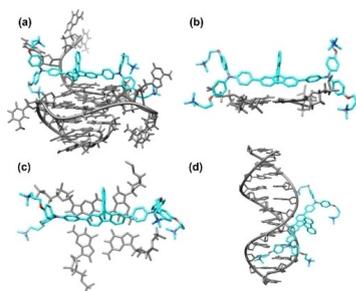


Figure 5. (a) Full structure of the Spiro-NMe3 (1) with antiparallel G4 (PDB: 2MGN). (b) Side view showing the positioning of the Spiro-NMe3 (1) with the top G-tetrad. (c) Simplified top view of the interactions between the Spiro-NMe3 (1) and G4. (d) Full structure of the Spiro-NMe3 (1) with duplex G4 structure obtained from PDB: 2MGN and duplex from PDB: 296D.

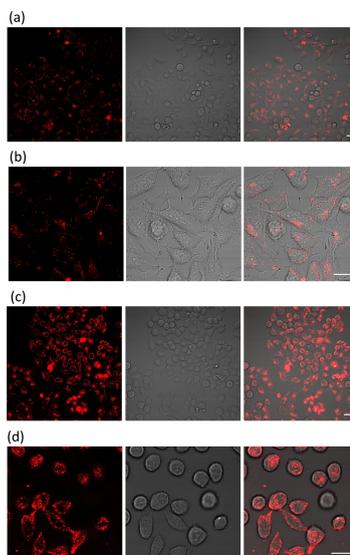


Figure 6. Confocal fluorescence images of HeLa cells incubated with Spiro-NMe3 (a and b) and Spiro-SO3 (c and d) (20 μ M, 2 h). Left panel is the fluorescence emission of the ligands ($\lambda_{exc} = 420$ nm), central panel is bright field and right panel is the merged images from fluorescence and bright field. Bar, 20 μ m.

To further explore the cellular compartment accumulation of the ligands, we used co-localization dyes, such as Mitotracker Deep Red (DR) and LysoTracker DR, to determine in which cytoplasmic organelle are accumulated the ligands. It is worth to note that the high aqueous solubility of the dyes allows carrying out the localization experiments without the addition of organic co-solvents, like DMSO, thus preserving the cellular integrity. Both ligands show accumulation in the lysosomes rather than the mitochondria because of the larger overlapping of fluorescence emission between the spiro derivatives and the lysotracker dye (Figure 7, Figures S24–S26). The Pearson's Correlation Coefficients calculated from different images for Spiro-NMe3 (1) and Spiro-SO3 (2) in the lysosomes were 0.58 and 0.59 respectively, while the values for the ligands in the mitochondria were 0.43 and 0.32, confirming the lysosome targeting. The ability of both ligands to accumulate into lysosomes can be attributed to the presence of two triphenylamine moieties that have been shown to target lysosomes.^[22] Never-

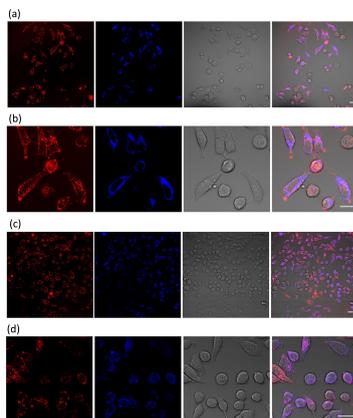


Figure 7. Confocal fluorescence images of HeLa cells incubated with Spiro-NMe3 (20 μM , 2 h) and Mitotracker DR (a and b) or LysoTracker DR (c and d). Extreme left panel is the fluorescence emission of the ligands ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$), central left panel is fluorescence emission of DR dyes ($\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$), central right panel is bright field and extreme right panel is the merged images from fluorescence and bright field. Bar, 20 μm .

theless, both ligands show other localization in the cells that need to be further explored with other co-localization dyes.

Conclusion

In this work, we have synthesized and characterized two fluorescent spirobifluorene ligands bearing either positive (Spiro-NMe3, **1**) or negative charge (Spiro-SO3, **2**) attached to the same spirobifluorene core, which provide high solubility in water and buffered solutions. Spiro-NMe3 contains four alkylammonium substituents while Spiro-SO3 presents four sulfonate groups, resulting in a change of the overall net charge of the ligands from positive (+4) for **1** to negative (−4) for **2**. Here we demonstrated that this feature is pivotal on the binding towards different DNA structures. Spiro-NMe3 interacts with G4s structures and shows preference for G4s over duplex by means of FRET melting, fluorescence and FID experiments, while Spiro-SO3 exhibits higher binding affinity to duplex DNA than to G4s. This series of spirobifluorene molecules represents an example of DNA-ligand interaction governed by the side arms of the ligands as well as the DNA conformation. The cell assays confirm the lower toxicity together with the internalization of both ligands, which showed higher accumulation in the lysosomes.

Chem. Eur. J. 2023, 29, e202203094 (7 of 10)

The moderate quenching of the fluorescence emission from both molecules upon DNA binding, suggest that they can be applied for imaging nucleic acids in cells, which we are currently exploring. These results open a novel scenario for the design of fluorescent molecules for selective DNA binding, which can impact in the field of detection assays and bioimaging.

Experimental Section

General: All reagents were obtained from commercial sources and used without further purification, unless otherwise noted. All dry reactions were performed under argon atmosphere using glassware that was flamed under high-vacuum and backfilled with argon. Organic solvents were dried by keeping them over molecular sieves 4 Å. Column chromatography was carried out on silica gel Si60, mesh size 0.040–0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany). Flash chromatography was carried out on silica gel mesh size 230–400 (J. T. Baker) and thin layer chromatography on aluminum sheets pre-coated with silica gel 60 F254 (E. Merck). ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (101 MHz) spectra were obtained with a Bruker Neo 400 spectrometers. Chemical shifts (δ) are given as part per million (ppm) downfield from tetramethylsilane. The solvent signals of DMSO (^1H : 2.5 ppm, ^{13}C : 39.52 ppm) and CD_2Cl_2 (^1H : 5.32 ppm, ^{13}C : 53.84 ppm) chemical shifts were used as secondary chemical shift reference. The assignment of protons and carbon atoms was carried out by bidimensional NMR experiments (COSY, heterocorrelate ^1H – ^{13}C) (see Supporting Information). The unlabeled and labeled DNA oligonucleotides were purchased from IDT DNA as HPLC grade and the labeling dyes were 5'-FAM and 3'-TAMRA. Ligands were dissolved in milliQ water to give 5 mM stock solutions. All solutions were stored at -20°C and defrosted and diluted immediately before use using suitable buffer to the appropriate concentrations.

Synthesis

Spiro-Br (3): A dried three-neck flask equipped with condenser and magnetic stir bar was charged with **4** [**16**] (200 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.), K_2CO_3 (anhydrous, 508 mg, 3.68 mmol, 16.0 equiv.) and KI (cat.). The mixture was stirred in acetone (dry, 20 mL) for 30 min. Afterwards, 1,3-dibromopropane (1 mL, 9.81 mmol, 42.7 equiv.) was added and the reaction mixture was refluxed at 80°C overnight. The reaction mixture was filtered over celite and washed with EtOAc, acetone, MeOH and DCM. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica column chromatography (eluent, DCM/EtOAc = 8/1). Molecular formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$. Yield: 75% (234 mg, 0.17 mmol). ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 7.88$ (t, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 4H), 7.59 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2H), 7.37 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.27–7.20 (m, 4H), 7.12 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.02–6.94 (m, 8H), 6.89–6.75 (m, 16H), 4.05 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 8H), 3.61 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 8H), 2.29 (q, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 8H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 155.44$, 150.18, 149.24, 148.42, 142.26, 141.36, 140.70, 140.50, $\delta = 133.11$, 128.23, 128.14, 127.66, 126.81, 126.46, 124.32, 122.03, 121.13, 120.70, 120.50, 115.67, 66.46, 66.03, 32.83, 30.71 ppm. MALDI $^-$ MS: m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}_2$: 1350.14; found = 1350.15.

Spiro-NMe3 (1). In a Schlenk-tube under Ar, Spiro-Br (**3**) (57 mg, 0.042 mmol, 1.0 equiv.) was diluted in DMF (dry, 5 mL) and NMe_3 (2 M in THF, 2.0 mL, 4.00 mmol, 100 equiv.) was added. The mixture was heated to 50°C and stirred at that temperature overnight. The solvent and residual NMe_3 were removed in vacuum to give the desired compound as light green solid. Molecular formula: $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_2$. Yield: 95% (63 mg, 0.040 mmol). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.08$ –8.02 (m, 4H, H7, H1), 7.65 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H6),

© 2022 The Authors. Chemistry – A European Journal published by Wiley-VCH GmbH

7.41 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, H2), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 4H, H8), 7.15 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, H3), 6.97–6.88 (m, 16H, H10, H11), 6.74–6.69 (m, 8H, HA₄H₅H₉), 4.00 (t, $J=5.6$ Hz, 8H, H12), 3.48 (t, $J=8.0$ Hz, 8H, H14), 3.10 (s, 36H, H15), 2.16 (br s, 8H, H13) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta=154.61, 149.31, 148.24, 147.62, 141.30, 140.29, 139.51, 131.56, 128.02$ (C2,C3), 127.18 (C8), 126.40 (C10), 126.01 (C6), 123.58 (C5), 121.09 (C7), 120.62 (C1), 120.44 (C4), 120.13 (C9), 115.59 (C11), 65.54 (Cspiro), 64.98 (C12), 63.01 (C14), 52.29 (C15), 22.62 (C13) ppm (see Figure 8 for the labeling of 1).ESI⁺-MS: m/z calcd for C₅₂H₄₆N₄O₂⁺: 316.69069; found=316.69092; m/z calcd for C₅₂H₄₆BrN₄O₂⁺: 449.22744; found=449.22694; m/z calcd for C₅₂H₄₆Br₂N₄O₂⁺: 713.30005; found=713.29951 (Figure 8).

FRET melting assay: Labeled DNA was dissolved as a 20 μ M stock solution in MilliQ water, then annealed as a 400 nM concentration in potassium/sodium cacodylate buffer (pH 7.3) depending on the G4 at 95 °C for 5 min, and allowed to cool slowly to room temperature overnight. The buffer used for the antiparallel G4 HTelo Na was 100 mM NaCl, 10 mM LiCac, for the rest of G4s and duplex was 100 mM KCl, 10 mM LiCac. Ligands were dissolved from stock solutions (see above) to final concentrations in the buffer. Each well of a 96-well plate (Applied Biosystem) was prepared with 60 μ L with a final 200 nM DNA concentration and increasing concentration of tested ligands (0–4 μ M). Measurements were performed on a PCR AriaMx (Agilent Technologies) with excitation at 450–495 nm and detection at 515–545 nm. Readings were taken from 25 °C to 95 °C at interval of 0.5 °C maintaining a constant temperature for 30 seconds before each reading. Each measurement was done in triplicate. The normalized fluorescence signal was plotted against the compound concentration and the ΔT_m values were determined.

FRET competition assay: Labelled oligonucleotides were annealed as a 400 nM concentration in potassium cacodylate buffer (10 mM KCl, 90 mM LiCl, 10 mM LiCac pH 7.3 for F21T-K/Na and kit1) at 95 °C for 5 min, and allowed to cool slowly to room temperature overnight. Ligands were dissolved in stock solutions to final concentrations in the buffer. Each well of a 96-well plate was prepared with a final 200 nM oligo concentration, 2 μ M ligand concentration and cDNA concentration to test (0 to 500 μ M). Measurements were performed under the same conditions as those used in the FRET melting assay.

Fluorescence emission titrations: The DNA was dissolved in Tris buffer (100 mM KCl, 10 mM Tris pH 7.4) and annealed at 95 °C for 10 min before cooling to room temperature overnight. The concentration of DNA was checked using the molar extinction coefficients provided by the manufacturer. Annealing concentrations were approximately 500 μ M. For emission titrations, ligands (5 μ M) in the same buffer were titrated with the corresponding DNA until saturation of fluorescence. The emission spectra were recorded between 390 and 680 nm with an excitation wavelength

of 380 nm in 1 cm path-length quartz cuvettes. The emission spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse Spectrometer. Spectra were smoothed using the Savitzky-Golay algorithm and emission maxima were fitted to 1:1 binding model using the Levenberg–Marquardt algorithm and equations previously reported.²³

Fluorescent intercalator displacement (FID) assay: Measurements were performed on a Varian Cary Eclipse Spectrometer following the protocol reported by Teulade-Fichou's team.¹⁹ Oligonucleotides (quadruplexes and duplex) were prepared by heating the corresponding oligonucleotides at 90 °C in LiCaco buffer (100 mM KCl, 10 mM LiCaco pH 7.2) then slowly cooling to room temperature overnight. Oligonucleotide structures were formed at 250 μ M strand concentration. The test is designed as follows: onto a mixture of prefolded quadruplex or duplex (1 μ M) and TO (2 μ M for G4s and 3 μ M for ds26), in LiCaco buffer (100 mM KCl, 10 mM LiCaco pH 7.2), addition of increasing amount of ligand (from 0.25 to 5 equiv.) is followed by a 2 min equilibration period before the fluorescence spectrum is recorded. The fluorescence area (FA, 510–850 nm), converted in percentage displacement (PD, with PD=100-[(FA/FA₀)-100], FA₀ being FA before addition of ligand), is then plotted versus the concentration of added ligand. To quantify the affinity of the ligands to different DNAs, DC_{50} values (i.e., the concentration needed to displace 50% of TO from the DNA) were calculated and compared for the different compounds and DNAs used.

Molecular docking studies: Molecular docking studies were performed using Autodock 4.2.6 with the Lamarckian genetic algorithm. The ligand structure was minimized in Avogadro at the GAFF Force Field and then docked with G-quadruplex (PDB: 2MGN) and duplex (PDB: 296D). In each case the structures were stripped of any existing counteranions, water molecules or ligands using Chimera 1.16. The structures were then imported into AutoDockTools-1.5.6 and hydrogen atoms were added. A grid box encompassing the entire quadruplex and duplex was used in order to blind docking to be carried out. In each case, the lowest energy solution was taken. The docked structures were visualized and hydrogen bond distances measured using Chimera.

Cell culture: HeLa cells were grown in low glucose phenol red-free Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin at 37 °C with 10% CO₂ in humidified air. Cells were kept continuously under confluence before split twice a week and the possibility of contamination was excluded by regularly performing mycoplasma tests.

Cell Viability (MTT) Assay: The cytotoxic effects of ligands toward HeLa cells were assessed by MTT assay for cell viability. The cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/mL (if we consider 5000 cells in 100 μ L of culture media per well in 96-well plates). The culture medium was removed after the cells adhered to the wall, and they were treated with ligands at serial concentrations for 24 h. Then, the medium was removed, and the cells were washed with PBS. Finally, 90 μ L of serum-free without red-phenol culture media and 10 μ L MTT solution (5 mg/mL) were added to each well. After incubation for 4 h, the supernatant was removed and 100 μ L DMSO was added to each well. The trays were then vigorously shaken to solubilize the formazan product and the absorbance at a wavelength of 490 nm was read on a microplate reader (MTX Labsystems, Vantaa, Finland) and analyzed. All MTT assays were performed three times in duplicate. A negative control was also performed by exposing cells only to culture medium and a positive control was conducted by using 0.1% Triton X-100.

Cellular imaging: Cells were seeded on chambered coverglass (ca. 2×10^5 , 300 μ L, 0.8 cm²) for 6–24 h, then the media was replaced

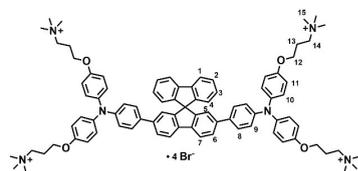


Figure 8. Assignment of atoms of Spiro-NMe3 (1) for NMR analysis.

with fresh media phenol red-free containing Spiro-NM3 (1) or Spiro-SO3 (2) (20 μ M, 300 μ L) for 2 h. Prior to imaging, the cells were washed with PBS and replaced with fresh growth media. Cells were imaged using a confocal fluorescence microscope (TCS SP5 Confocal, Leica Microsystems GmbH, Germany). Using a 63x magnification microscope objective (water immersion, NA $\frac{1}{4}$, 1.2) and an excitation wavelength of 420 nm for Spiro derivatives, images of the cells were recorded in both transmission and fluorescence modes. For the fluorescence images, the detection band was 430–500 nm which covered the emission range of the ligands. For co-localization experiments, cells were washed with PBS and then incubated with Mitotracker Deep Red in PBS (400 nM, 300 μ L, 15 min) or LysoTracker Deep Red in PBS (50 nM, 300 μ L, 30 min). Mitotracker and LysoTracker Deep Red dyes were excited at 640 nm and the emission collected from 660–750 nm. Cells were then washed with PBS and fresh media added before imaging. ImageJ software was used to calculate the Pearson's correlation coefficients for the co-localization of the ligands and the corresponding organelle-targeting dyes^[24]

Acknowledgements

This research was funded by the Spanish Ministry for Science and Innovation, The National Research Agency and FEDER funds from the EU (grants PID2019-108643GA-I00 and CEX2019-000919) and the Conselleria de Innovaci3n, Universidades, Ci3ncia y Sociedad Digital of the Generalitat Valenciana (CIDEGENT/2018/015). This contribution is also based upon work from COST Action CA18202, NECTAR – Network for Equilibria and Chemical Thermodynamics Advanced Research, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). The Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant n. RI 2635/6-1, project number: 464509280) and Westf3lische Wilhelms-Universit3t M3nster are also acknowledged for financial support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: duplex DNA · fluorescence · G-quadruplex · spirofluorene · triphenylamine

- [1] a) N. Sugimoto (Ed.), *Chemistry and Biology of Non-Canonical Nucleic Acids*, Wiley-VCH, 2021; b) J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem.* **2020**, *2*, 123–136.
- [2] a) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415; b) A. I. Karsisiotis, C. O'Kane, M. Webba da Silva, *Methods* **2013**, *64*, 28–35.
- [3] V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. D. Antonio, G. P. Smith, S. Balasubramanian, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *33*, 877–881.

- [4] a) D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8627–8637; b) N. Maizels, L. T. Gray, *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003468.
- [5] a) S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 261–275; b) E. Palma, J. Carvalho, C. Cruz, A. Paulo, *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 605; c) N. Kosiol, S. Juranek, P. Brossart, A. Heine, K. Paeschke, *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 40.
- [6] a) D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyrner, D. Tannahl, S. Balasubramanian, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 459–474; b) S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5987–6011; c) G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867–5892.
- [7] a) The Canadian Cancer Trials Group, A Phase I Study of CX5461. **2020**. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02719977> (accessed on 21 September 2022); b) M. Haddach, M. K. Schwaebe, J. Michaux, J. Nagasawa, S. E. O'Brien, J. P. Whitten, F. Pierre, P. Kerdoncuff, L. Darjania, R. Stansfield, D. Drygin, K. Anderes, C. Proffitt, J. Blissath, A. Siddiqui-Jain, M. Omori, N. Huser, W. G. Rice, D. M. Byckman, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 602–606; c) H. Xu, M. D. Antonio, S. McKinney, V. Mathew, B. Ho, N. J. O'Neil, N. D. Santos, J. Silvester, V. Wei, J. Garcia, F. Kabeer, D. Lai, P. Soriano, J. Ban3th, D. S. Chiu, D. Yap, D. D. Le, F. B. Ye, A. Zhang, K. Thu, J. Soong, S.-C. Lin, A. H. C. Tsai, T. Osako, T. Algar, D. N. Saunders, J. Wong, J. Xian, M. B. Bally, J. D. Brenton, G. W. Brown, S. P. Shah, D. Cescon, T. W. Mak, C. Caldas, P. C. Stirling, P. Hieter, S. Balasubramanian, S. Aparicio, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14432; d) Quarfloxin in Patients with Low to Intermediate Grade Neuroendocrine Carcinoma. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00780663> (accessed on 21 September 2022).
- [8] a) F. Raguseo, S. Chowdhury, A. Minard, M. Di Antonio, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1317–1324; b) P. Murat, Y. Singh, E. Defranco, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293–5307; c) D. Monchaud, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2020**, *54*, 113–140; d) I. Renard, M. Grandmougin, A. Roux, S. Y. Yang, P. Lejault, M. Pirrotta, J. M. Y. Wong, D. Monchaud, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 5502–5510; e) Y. Kang, C. He, *Chem. Biodiversity* **2022**, *19*, e202101030.
- [9] a) B. R. Vummidi, J. Alzeer, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 540–55; b) A. C. Bhasikuttan, J. Mohanty, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7581–7597; c) Y. V. Suseela, N. Narayanaswamy, S. Prathar, T. Govindaraju, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1098–1131.
- [10] a) J.-H. Yuan, W. Shao, S.-B. Chen, Z.-S. Huang, J.-H. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *531*, 18–24; b) D.-L. Ma, Z. Zhang, M. Wang, L. Liu, H.-J. Zhong, C.-H. Leung, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 812.
- [11] a) I. Pont, J. Gonz3lez-Garc3a, M. Incl3n, M. Reynolds, E. Delgado-Pinar, M. T. Albelda, R. Vilar, E. Garcia-Espa3a, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10850–10858; b) I. Pont, A. Mart3nez-Camarena, C. Galiana-Rosell3, R. Tejero, M. Teresa Albelda, J. Gonz3lez-Garc3a, R. Vilar, E. Garcia-Espa3a, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1167–1177.
- [12] a) P. A. Summers, B. Lewis, J. Gonz3lez-Garc3a, A. H. M. Lim, P. Cadiuu, R. M. Porrea, N. Martin-Pintado, D. Mann, J. B. Edsel, J. B. Vannier, M. K. Kulkarni, R. Vilar, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 162; b) A. Shivalingham, M. A. Izquierdo, A. L. Marois, A. Vy3niauskas, K. Suhling, M. K. Kulkarni, R. Vilar, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8178; c) L.-Y. Liu, W. Liu, K.-N. Wang, B.-C. Zhu, X.-Y. Xia, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9719–9726; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 9806–9813.
- [13] a) A. Laguerre, L. Stefan, M. Larrouy, D. Genest, J. Novotna, M. Pirrotta, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12406–12414; b) V. Grande, F. Doria, M. Freccero, F. Wuertthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7520–7524; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7628–7632; c) F. Doria, M. Nadal, M. Zuffo, R. Perrone, M. Freccero, S. N. Richter, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2268–2271; d) J.-W. Yan, S.-B. Chen, H.-Y. Liu, W.-J. Ye, T.-M. Ou, J.-H. Tan, D. Li, L.-Q. Gu, Z.-S. Huang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6927–6930; M. Zuffo, A. Guedin, E.-D. Leriche, F. Doria, V. Pirota, V. Gabelica, J.-L. Mergny, M. Freccero, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, e115.
- [14] a) C. Portel, J. Rault-Berthelot, *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5*, 3869–3897; b) C. Portel, L. Sicard, J. Rault-Berthelot, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14238–14254; c) T. P. I. Saragi, T. Spehr, A. Siebert, T. Fuhrmann-Lieker, J. Salbeck, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1011–1065.
- [15] a) S. Liu, D. Xia, M. Baumgarten, *ChemPlusChem* **2021**, *86*, 36–48; b) S. Gangala, R. Misra, *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6*, 18750–18765; c) G. Bottaro, F. Rizzo, M. Cavazzini, L. Armelao, S. Quici, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4598–4607.
- [16] F. Schl3tter, K. Riehemann, N. S. Kehr, S. Quici, C. G. Daniliuc, F. Rizzo, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 642–645.
- [17] F. Rizzo, F. Polo, G. Bottaro, S. Fantacci, S. Antonello, L. Armelao, S. Quici, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2060–2069.
- [18] a) F. Polo, F. Rizzo, M. Veiga-Gutierrez, E. De Cola, S. Quici, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15402–15409; b) H. Yin, H. Xiao, L. Ding, C. Zhang, A. Ren, B. Li, *Mater. Chem. Phys.* **2015**, *151*, 181–186; c) S.-Y. Ku, W.-Y.

- Hung, C.-W. Chen, S.-W. Yang, E. Mondal, Y. Chi, K.-T. Wong, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 133–142; d) Y. J. Cho, O. Y. Kim, J. Y. Lee, *Org. Electron.* **2012**, *13*, 351–355.
- [19] P. L. T. Tran, E. Largy, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2011**, *93*, 1288–1296.
- [20] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- [21] a) M. Micco, G. W. Collie, A. G. Dale, S. A. Ohnmacht, I. Pasitna, M. Gunaratnam, A. P. Reszka, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2959–2974; b) G. W. Collie, R. Promontorio, S. M. Hampel, M. Micco, S. Neidle, G. N. Parkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2723–2731.
- [22] S. Chen, X. Liu, X. Ge, Q. Wang, Y. Xie, Y. Hao, Y. Zhang, L. Zhang, W. Shanga, Z. Liu, *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7*, 91–100.
- [23] a) F. H. Stootman, D. M. Fisher, A. Rodger, J. R. Aldrich-Wright, *Analyst* **2006**, *131*, 1145–1151; b) P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.
- [24] S. Bolte, F. P. Cordelieres, *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232.

Manuscript received: October 4, 2022
Accepted manuscript online: November 1, 2022
Version of record online: December 8, 2022

12

Conclusiones



12. Conclusiones

Conclusión 1. *Síntesis y caracterización de los ligandos.*

Se han sintetizado y caracterizado trece derivados del grupo TPA incorporando poliaminas en sus estructuras. El procedimiento sintético fue sencillo, obteniéndose los ligandos en una única etapa sintética mediante una reacción de adición nucleofílica seguida de la reducción de la base de Schiff. Se han obtenido ligandos con diversas estructuras moleculares con diferente número de cadenas poliamínicas, variable longitud y, por tanto, dimensión y diferente tipo de aminas (terciarias o secundarias). De esta forma, los compuestos han sido clasificados en cinco familias: 22Me, 22H, 33Me, 33H y Cad, donde el prefijo numérico hace referencia al número de carbonos en las cadenas, y el sufijo -Me o -H hace referencia a si la amina central se encuentra metilada o no, respectivamente. La abreviatura "Cad" se asignó a la familia formada por los ligandos que contenían alguna cadena análoga a la cadaverina. Atendiendo al número de cadenas poliamínicas que unen las unidades de TPA en los ligandos, dentro de cada familia es posible distinguir tres topologías: lineal (L, una cadena), macrocíclica (M, dos cadenas) y criptando (C, tres cadenas).

Cabe destacar que, pese a que los productos resultaron ser accesibles sintéticamente, los compuestos lineales ofrecieron mayores dificultades sintéticas debido a su baja solubilidad en los disolventes empleados. Sin embargo, se obtuvieron todos los ligandos con unos rendimientos sintéticos elevados.

Conclusión 2. *Caracterización del comportamiento ácido – base de los ligandos.*

Se ha estudiado el comportamiento ácido-base de los ligandos sintetizados mediante métodos potenciométricos y espectroscópicos, ya que influye directamente en las propiedades fotofísicas de los ligandos y en su interacción con el ADN. Se han utilizado técnicas potenciométricas para obtener las constantes de protonación de las aminas terciarias y secundarias de los ligandos, mientras que no fue posible calcular la constante de protonación del grupo amino del TPA dada su baja basicidad. Asimismo, la representación de los diagramas de distribución de especies en función del pH ha permitido estimar la carga neta a pH fisiológico (7.4), la cual es un factor importante que considerar en los estudios a nivel celular. En general, se ha observado una tendencia entre la carga y la topología de los ligandos; a medida que se incrementa el número de cadenas poliaminas sobre el ligando, la carga aumenta en el orden lineal, macrocíclico y criptando.

Además, se ha evaluado el comportamiento fotofísico utilizando técnicas de espectroscopia UV-Vis y de emisión de fluorescencia. En general no se observan cambios significativos al aumentar el pH en los espectros de absorción, sin embargo, se producen modificaciones notables en los espectros de emisión. Específicamente, cuando los ligandos se encuentran con la totalidad de sus aminas secundarias protonadas, se observa un aumento considerable en la emisión de fluorescencia, el cual puede ser atribuido al efecto AIE (*Aggregation-induced Emission*, emisión

inducida por agregación) debido a la distinta disposición que adoptan los anillos del grupo TPA.

Conclusión 3. *Evaluación de la interacción de los ligandos con estructuras G4s monoméricas y diméricas características de los telómeros.*

A través del análisis de los resultados del ensayo de desnaturalización térmica se ha demostrado el papel crucial de las fuerzas electrostáticas en la interacción de los ligandos con el ADN G4, donde se observa que a medida que aumenta la carga positiva del ligando, aumenta la interacción con el ADN G4. Como resultado, los ligandos de tipo criptando (22Me-C, 22H-C, 33Me-C, 33H-C y Cad-C) han exhibido una elevada afinidad hacia las estructuras de ADN G4s teloméricas. En particular, los ligandos 22Me-C y 33Me-C muestran una gran interacción con estructuras diméricas de G4s de topologías híbrida y antiparalela, estando esta última estabilizada en mayor medida por el ligando de cadenas propilénicas 33Me-C.

Asimismo, se ha comprobado que tanto los ligandos de topología macrocíclica como los de tipo criptando son selectivos para las estructuras G4s en comparación con el ADN de doble hélice, lo cual es una característica atractiva considerando que la doble hélice es más común en el entorno celular.

Los estudios de desplazamiento de indicador fluorescente respaldan los resultados obtenidos en el ensayo de desnaturalización térmica, al proporcionar índices de desplazamiento (IC_{50}) acordes a estos. En concreto, el ligando 33Me-C mostró una gran capacidad para interactuar con las estructuras G4s, y cabe destacar el elevado

desplazamiento del TO en las estructuras G4s respecto a la doble hélice, lo que confirma nuevamente su selectividad hacia estas estructuras.

En base a la estructura de los ligandos de topología criptando se plantea que sus dimensiones se adaptan de forma óptima a las tétradas externas y bolsillos multiméricos de los multiG4s, ya que las interacciones de apilamiento π entre las unidades de TPA y las tétradas se pueden ver reforzadas por la formación de un mayor número de puentes salinos entre los grupos amonio de los ligandos y el esqueleto azúcar fosfato del ADN G4. Además, el grado de metilación y longitud de las cadenas poliamínicas puede proporcionar un aumento en la estabilidad de los complejos formados gracias a interacciones de carácter hidrofóbico con los surcos y bucles de las estructuras G4s. Esta hipótesis proporciona una base sólida para el diseño de ligandos G4s multiméricos más eficientes y selectivos, destacando el papel fundamental que desempeñan las interacciones específicas y favorables.

Conclusión 4. *Evaluación del modo de unión de los ligandos a los G4s diméricos.*

Mediante los estudios de fluorescencia con las secuencias diméricas G2T1 modificadas con 2-aminopurina fue posible identificar que los ligandos sintetizados interaccionaban tanto con las tétradas externas como con las tétradas internas del bolsillo multimérico.

El análisis las conformaciones generadas con los estudios de dinámica molecular pone de manifiesto que la unión en el bolsillo multimérico está basada principalmente en interacciones electrostáticas

de los grupos aminorio de los ligandos con el esqueleto azúcar-fosfato del ADN, así como en interacciones de apilamiento π de los grupos TPA con los anillos aromáticos de las bases nucleicas. Además, se evaluó la interacción de los ligandos con la doble hélice, donde se observó que el gran tamaño de los ligandos macrocíclico y criptando les impedía interactuar con los surcos. Estos hallazgos respaldan de manera concluyente la importancia de las fuerzas electrostáticas en la unión a los G4s, demostrando el destacado potencial de los criptandos como agentes selectivos para ADN G4 dimérico.

Conclusión 5. *Interacción de los ligandos con G4s asociados a enfermedades neurodegenerativas.*

Se ha determinado mediante ensayos de desnaturalización térmica que los ligandos sintetizados de topología criptando y macrocíclica muestran una elevada capacidad para estabilizar las estructuras G4s formadas por las secuencias de ADN y ARN G₄C₂. En especial, cabe destacar que los ligandos de las familias 33H y 22H proporcionan una elevada estabilización, lo que sugiere que la ausencia de metilación en el grupo amino central favorece la estabilización térmica de las estructuras G4s G₄C₂. Asimismo, en comparación con la estabilización térmica producida en la doble hélice, los ligandos exhiben una elevada selectividad hacia las estructuras de ADN y ARN G₄C₂.

Estos resultados han sido respaldados por el ensayo de desplazamiento de naranja de tiazol, donde la afinidad de los ligandos sintetizados hacia la estructura de ADN G₄C₂ era mayor en comparación

con la estructura de doble hélice. En concreto, los ligandos de cadenas etilénicas 22Me y 22H presentan los mayores valores de selectividad.

En términos de perspectivas futuras, la capacidad de los ligandos para interactuar y estabilizar tanto las estructuras G4s de ADN como de ARN G_4C_2 sugiere un amplio espectro de aplicaciones terapéuticas de las enfermedades neurodegenerativas ELA y DFT. Bien la interacción con el ADN G_4C_2 puede regular la expresión génica de estas enfermedades, si bien la interacción de los ligandos con el ARN G_4C_2 los convierte en candidatos prometedores para la inhibición de los agregados tóxicos de proteínas a través de la modulación de los procesos de transcripción y traducción.

Conclusión 6. *Encapsulación de compuestos de interés biológico.*

Se ha observado que los criptandos presentan una elevada afinidad hacia el ADN G-quadruplex, lo que les convierte en posibles agentes terapéuticos antitumorales. Se estudio la internalización del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en los ligandos como posible terapia sinérgica, así como la encapsulación de la sonda fluorescente piranina dirigida a la obtención de complejos teranósticos, que integren las funcionalidades terapéuticas de los ligandos sintetizados y diagnosticas de la piranina que permitiría su visualización mediante microscopia confocal.

Se estudio el comportamiento ácido-base de los complejos formados entre los sistemas 5-fluorouracilo y piranina con los ligandos de distinta topología de la familia 22Me, y adicionalmente para la piranina

se estudió el efecto de la distinta naturaleza poliamínica con los criptandos 22H-C y Cad-C. La afinidad de los ligandos hacia el 5-Fu es relativamente alta, como así lo confirman las constantes efectivas determinadas a pH fisiológico; la elevada similitud entre ellas sugiere que la interacción entre los ligandos y el 5-Fu corresponde a un modo de unión similar. En contraposición, los ligandos mostraron una remarcable interacción con la sonda fluorescente piranina, la cual se ve influenciada por el número de cadenas poliamínicas sobre el ligando y por la metilación del grupo amino central. Estos resultados indican que las interacciones electrostáticas son la principal fuerza impulsora en la formación de los complejos con la piranina.

Además, estos estudios fueron completados con valoraciones UV-Vis y de emisión de fluorescencia, donde se obtuvieron constantes de estabilidad para los sistemas ligando – piranina en concordancia con las obtenidas por potenciometría previamente.

Mediante estudios de dinámica molecular se determinó que la encapsulación de la piranina se hallaba promovida por la formación de interacciones electrostáticas entre los grupos amonio de los ligandos y los sulfonatos e hidroxilo de la piranina, y por apilamiento de tipo π - π entre las unidades de TPA y la superficie aromática de la piranina.

Conclusión 7. *Evaluación biológica de los ligandos.*

La evaluación de la citotoxicidad se ha realizado en tres líneas celulares tumorales diferentes mediante ensayos de viabilidad celular con el reactivo de MTT, tanto para los trece ligandos poliamínicos derivados de

TPA como para sus complejos formados con 5-fluorouracilo y piranina. En general se ha observado que la citotoxicidad de los compuestos disminuye al aumentar el número de cadenas poliamínicas sobre el ligando. Como resultado, los ligandos de topología criptando que presentan una alta afinidad hacia el ADN G4 telomérico han mostrado un menor efecto citotóxico, a excepción de los criptandos 22Me-C y Cad-C debido a su menor carácter hidrófobo.

La encapsulación del 5-Fu en los ligandos de distinta topología de la familia 22Me no ha modificado la citotoxicidad de los ligandos macrocíclico y lineal, sin embargo, sí que ha aumentado ligeramente la del criptando 22Me-C, mejorando significativamente la citotoxicidad del fármaco 5-Fu.

Por otro lado, la encapsulación de la Pyr en los ligandos de topología macrociclo 22Me-M y criptando 22Me-C, 22H-C y Cad-C. La citotoxicidad de los complejos formados es muy similar a la obtenida por los ligandos en su estado libre, a excepción de Cad-C que al encapsular la molécula de Pyr ha aumentado significativamente.

Asimismo, se ha explorado la localización de los complejos ligando-Pyr mediante microscopia confocal de fluorescencia, donde se ha observado que la Pyr únicamente se internalizaba en las células si ésta estaba encapsulada en los ligandos. Estos resultados confirman que los ligandos son capaces de atravesar la membrana celular, y a su vez, internalizar celularmente la Pyr, comprobando que los ligandos son capaces de alcanzar su diana terapéutica, el ADN G4, y su posible uso como sonda fluorescente.

An

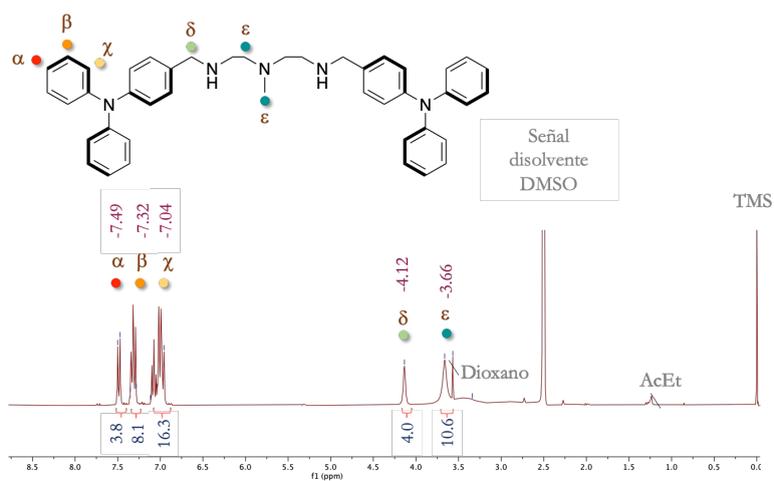
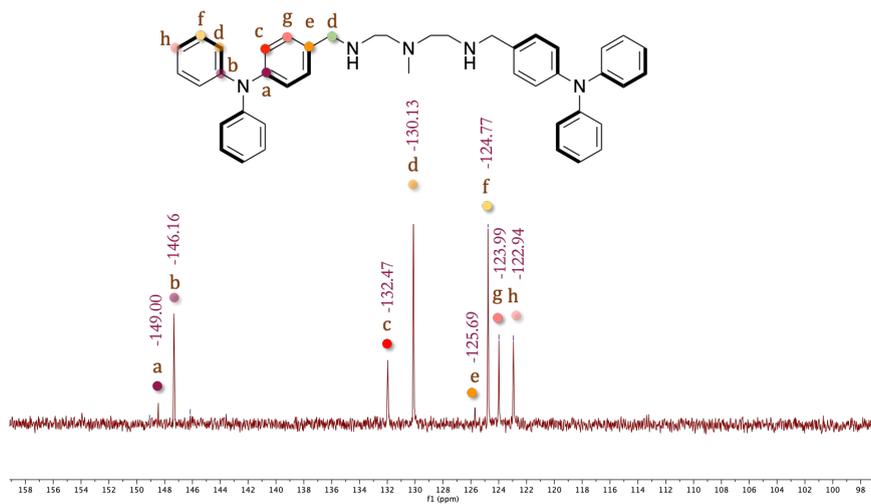
Anexos



ANEXO A

Espectros de RMN

Caracterización por RMN de los ligandos sintetizados

Figura A.1. Espectro ^1H RMN de 22Me-L en d_6 -DMSO a 298 K.Figura A.2. Espectro ^{13}C RMN de 22Me-L en d_6 -DMSO a 298 K.

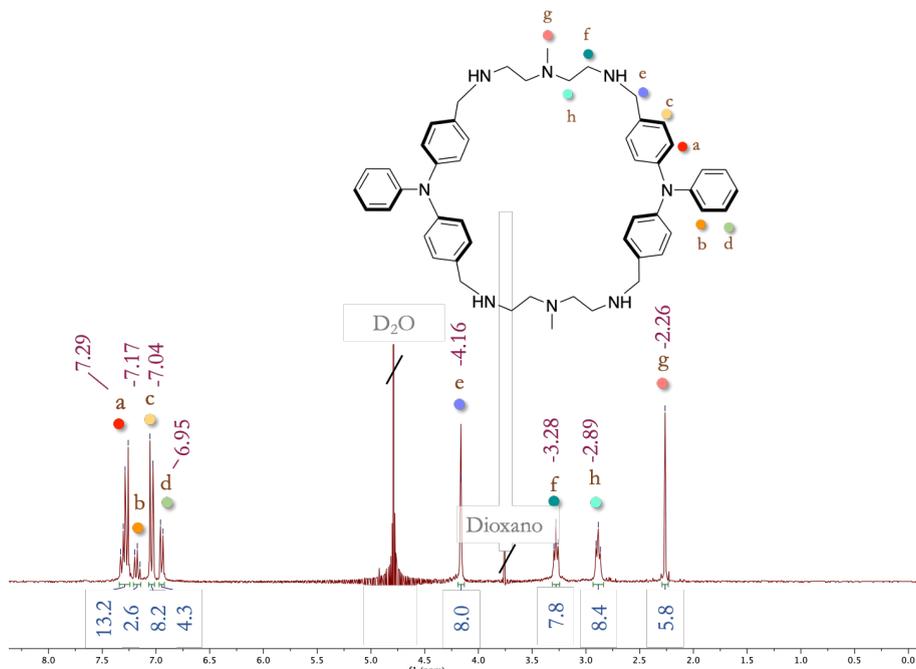


Figura A.3. Espectro ^1H RMN de 22Me-M en D_2O a 298 K.

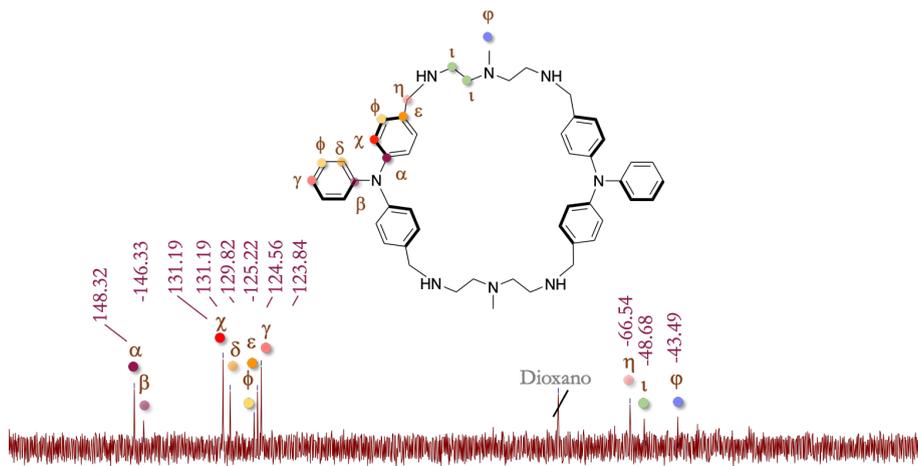


Figura A.4. Espectro ^{13}C RMN de 22Me-M en D_2O a 298 K.

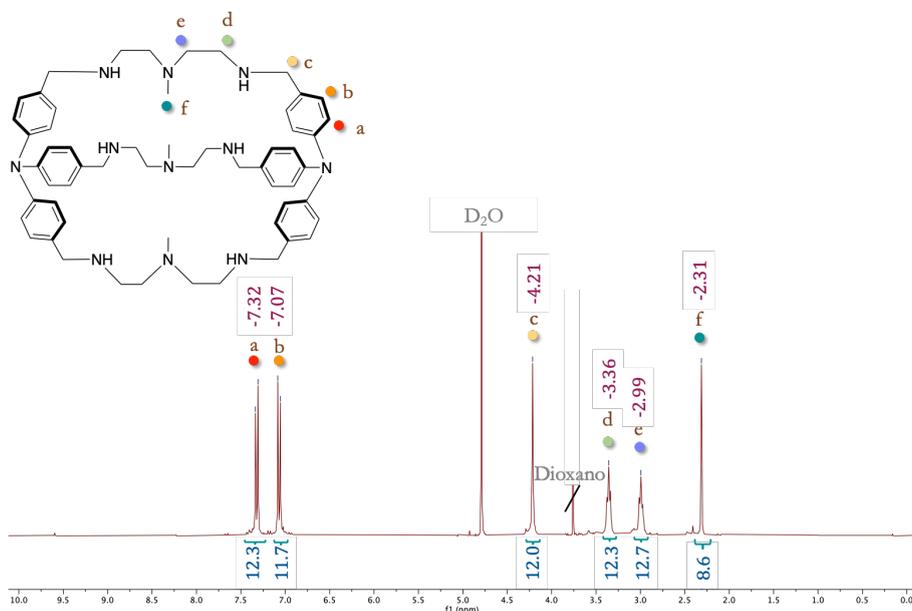


Figura A.5. Espectro ^1H RMN de 22Me-C en D_2O a 298 K.

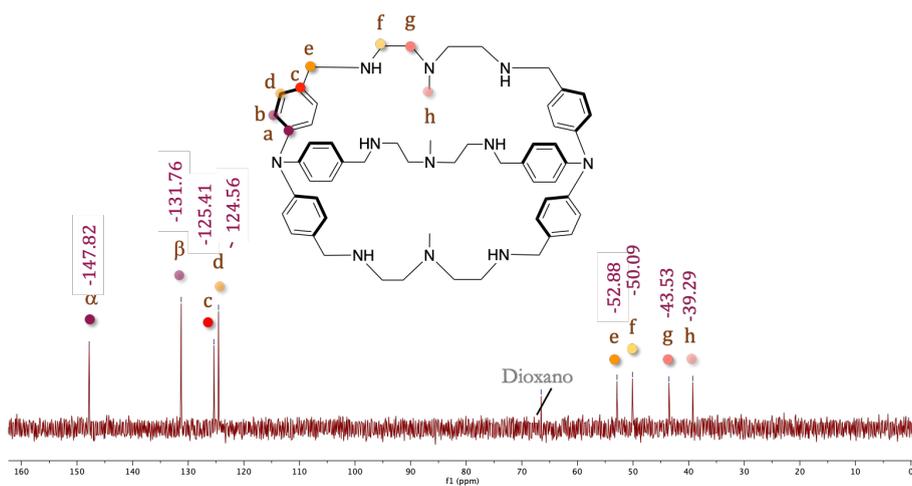


Figura A.6. Espectro ^{13}C RMN de 22Me-C en D_2O a 298 K.

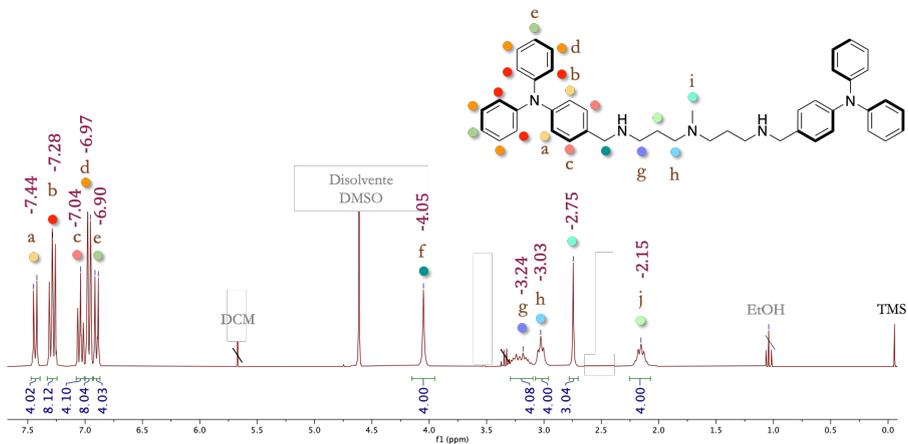


Figura A.7. Espectro ^1H RMN de 33Me-L en DMSO a 298 K.

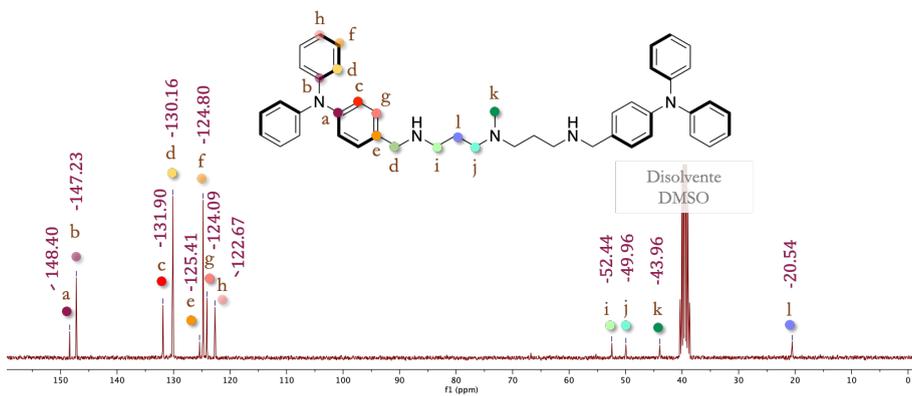


Figura A.8. Espectro ^{13}C RMN de 33Me-L en DMSO a 298 K.

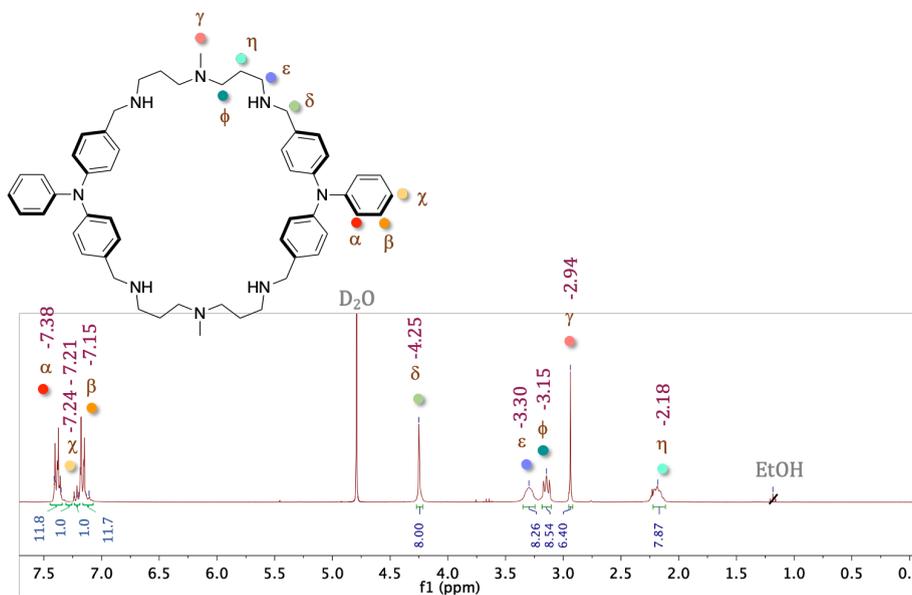


Figura A.9. Espectro ^1H RMN de 33Me-M en D_2O a 298 K.

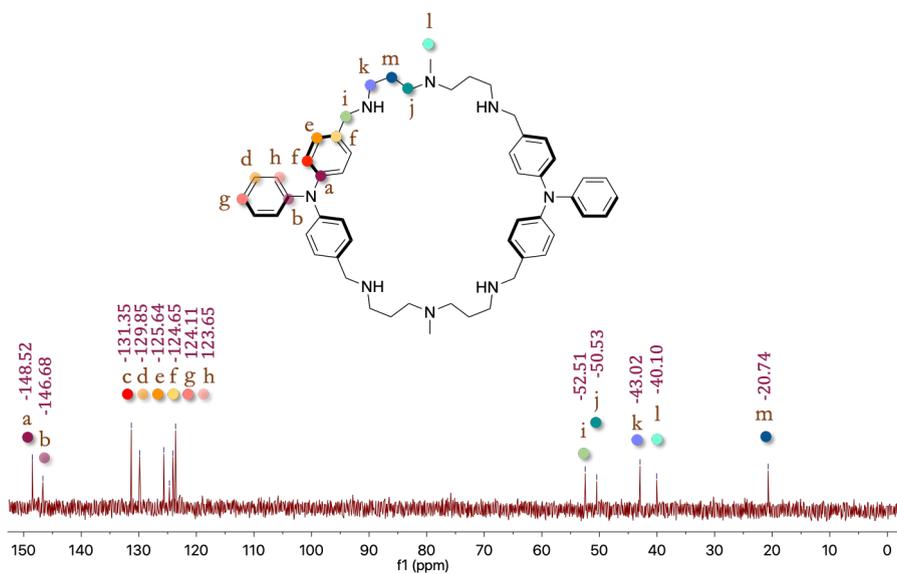


Figura A.10. Espectro ^{13}C RMN de 33Me-M en D_2O a 298 K.

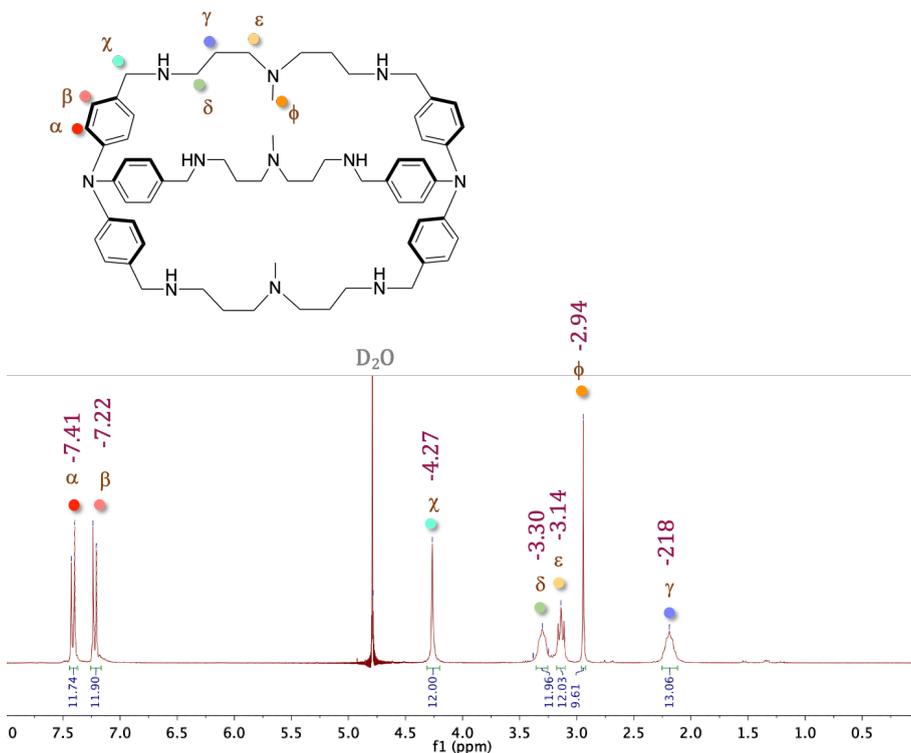


Figura A.11. Espectro ^1H RMN de 33Me-C en D_2O a 298 K.

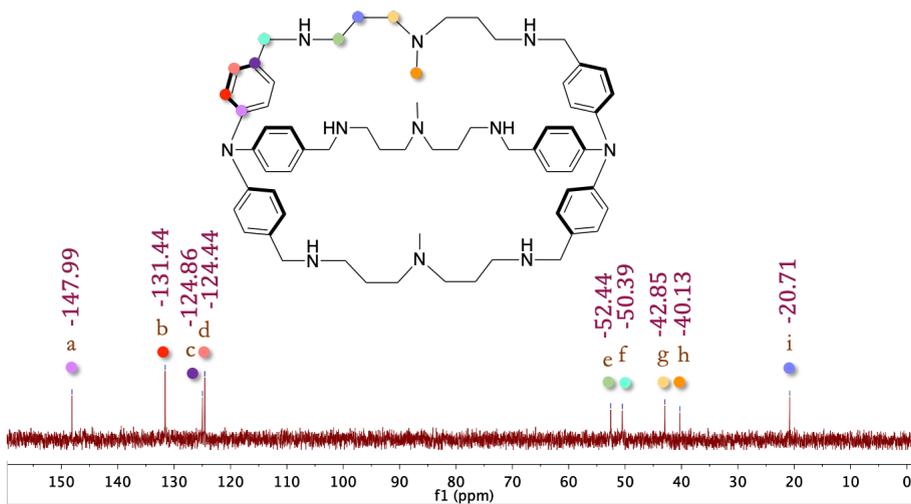


Figura A.12. Espectro ^{13}C RMN de 33Me-C en D_2O a 298 K.

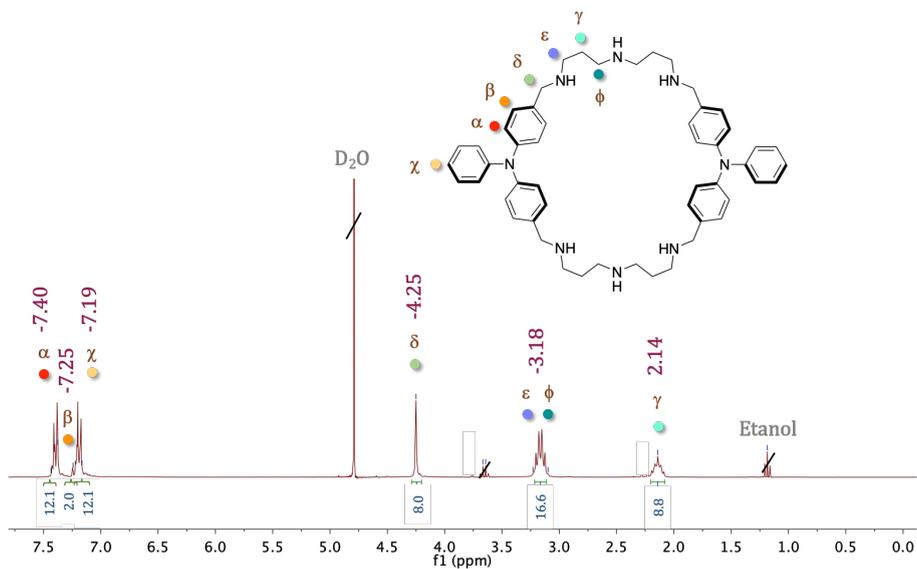


Figura A.13. Espectro ^1H RMN de 33H-M en D_2O a 298 K.

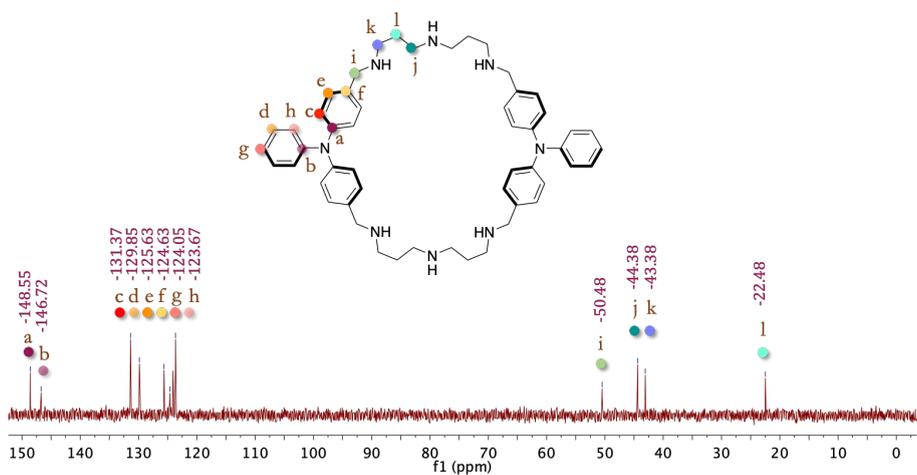
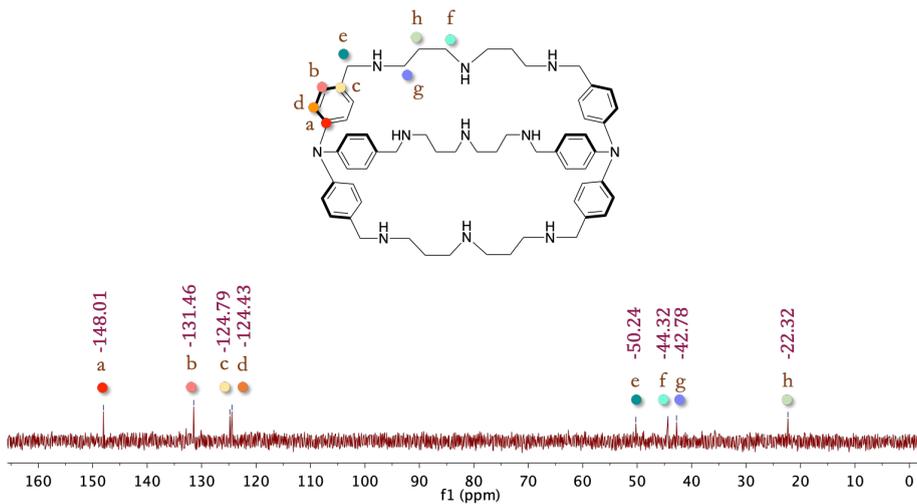
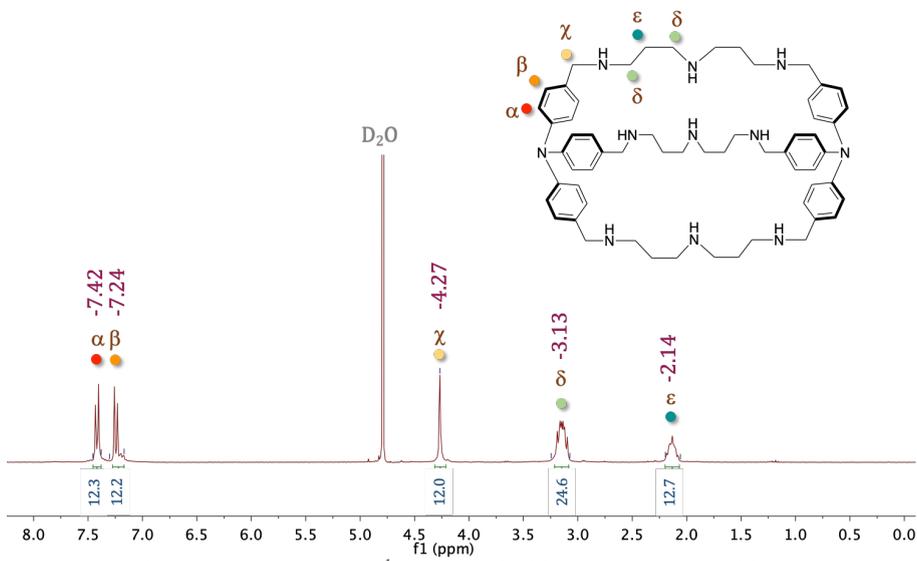
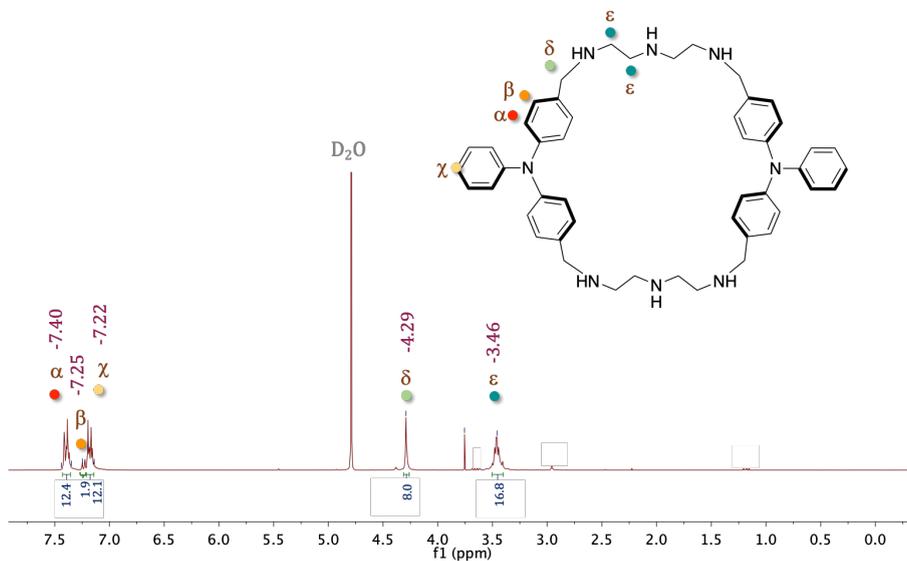
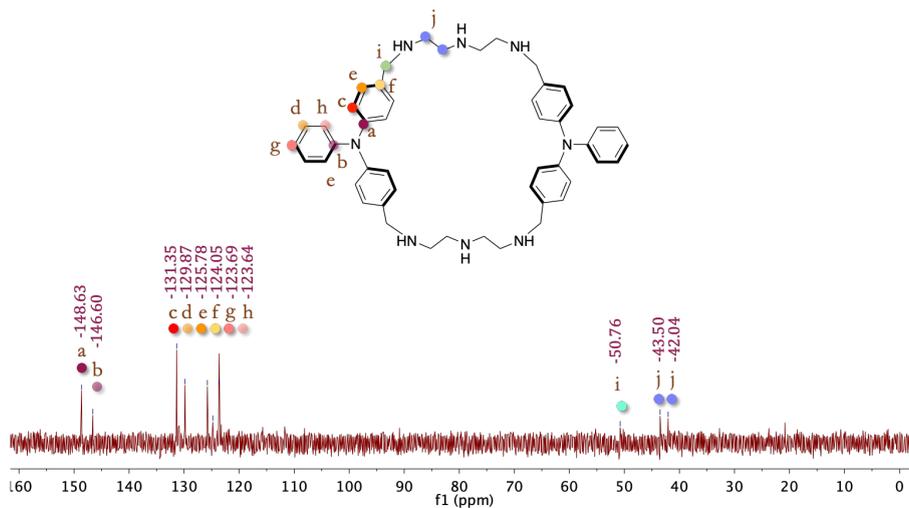
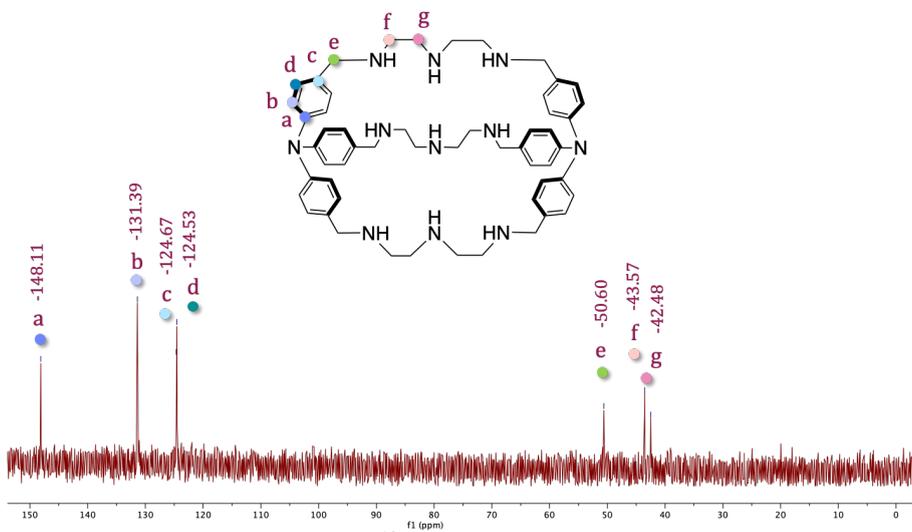
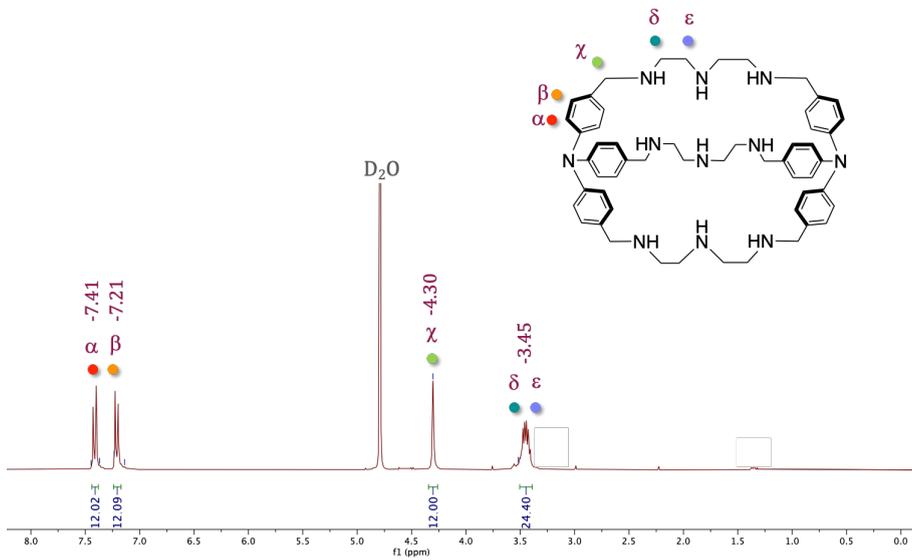
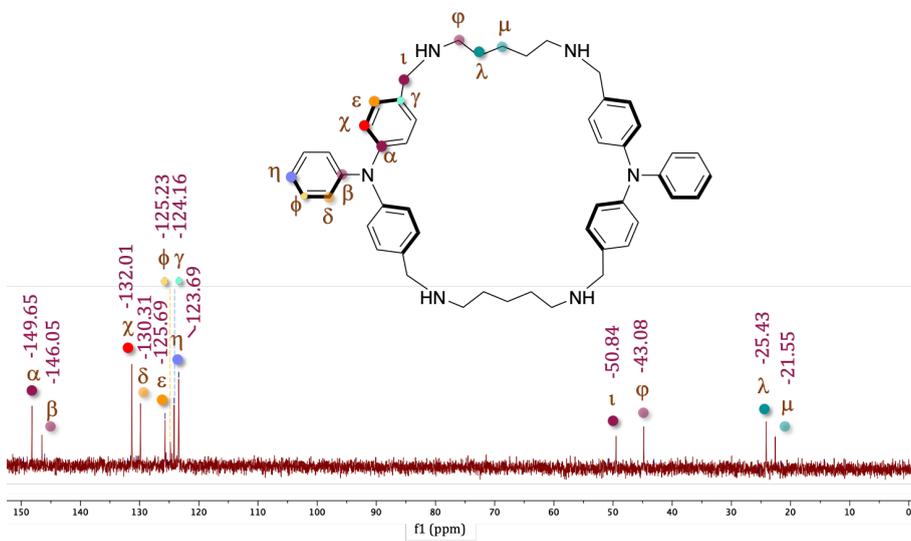
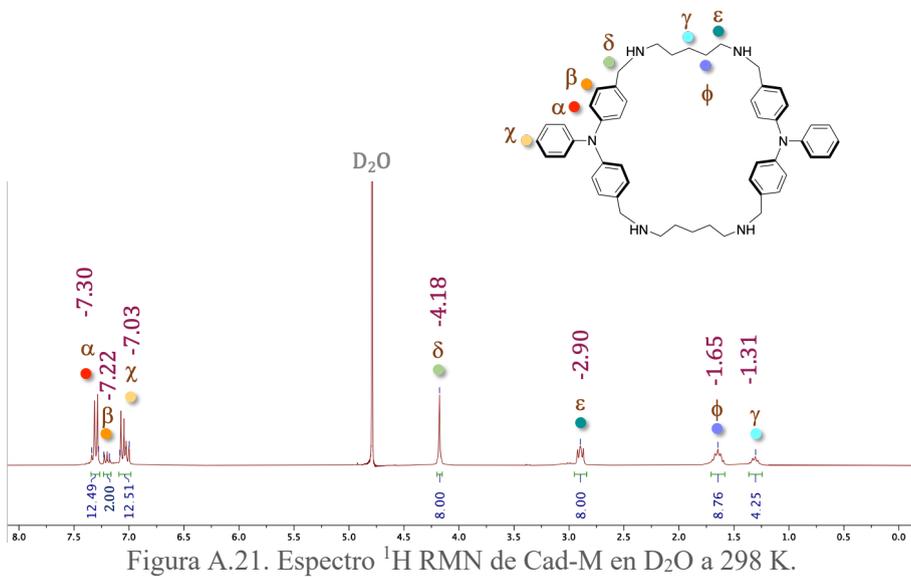


Figura A.14. Espectro ^{13}C RMN de 33H-M en D_2O a 298 K.



Figura A.17. Espectro ^1H RMN de 22H-M en D_2O a 298 K.Figura A.18. Espectro ^{13}C RMN de 22H-M en D_2O a 298 K.





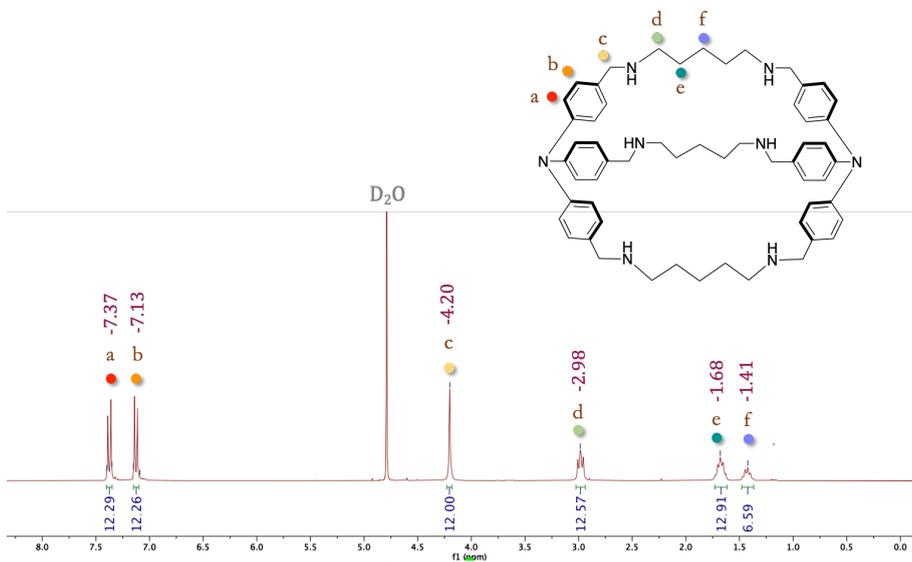


Figura A.23. Espectro ^1H RMN de Cad-C en D_2O a 298 K.

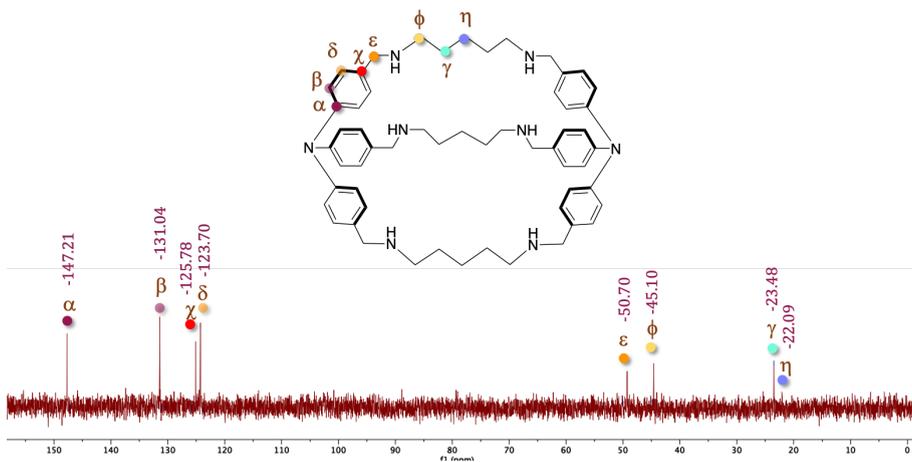


Figura A.24. Espectro ^{13}C RMN de Cad-C en D_2O a 298 K.

ANEXO B

Valores ΔT_m *Desnaturalización térmica por FRET Melting***Tabla B.1.** Valores de ΔT_m (°C) para las distintas topologías de ADN y ligandos sintetizados en tampón 100 mM KCl y 10 mM LiCac.

		ΔT_m		
T_m^0		66.74 ± 0.21	47.26 ± 0.15	79.46 ± 0.13
Ligando	Ratio	HTelo	G2T1	ds26
22Me-L	1:1	-0,44 ± 0,14	-0,35 ± 0,34	-0,01 ± 0,05
	1:5	-0,54 ± 0,06	-0,20 ± 0,18	-0,06 ± 0,07
	1:10	-0,51 ± 0,42	-0,29 ± 0,10	0,05 ± 0,04
	1:20	-0,49 ± 0,14	-0,17 ± 0,14	0,07 ± 0,03
22Me-M	1:1	0,15 ± 0,08	-0,35 ± 0,17	0,09 ± 0,13
	1:5	0,15 ± 0,30	0,82 ± 0,64	0,43 ± 0,06
	1:10	0,60 ± 0,08	5,31 ± 0,61	0,66 ± 0,02
	1:20	4,01 ± 0,27	15,58 ± 0,26	1,75 ± 0,07
22Me-C	1:1	0,44 ± 0,16	1,47 ± 0,52	0,05 ± 0,75
	1:5	4,93 ± 0,96	11,12 ± 1,02	2,97 ± 0,15
	1:10	11,51 ± 0,77	21,93 ± 0,20	6,43 ± 0,12
	1:20	17,30 ± 0,43	31,11 ± 0,40	9,66 ± 0,55
33Me-L	1:1	-0,55 ± 0,14	-1,73 ± 0,81	0,11 ± 0,05
	1:5	-1,76 ± 1,81	-0,52 ± 0,63	0,40 ± 0,24
	1:10	-0,08 ± 0,57	0,44 ± 1,68	4,02 ± 0,35
	1:20	-0,62 ± 1,52	3,63 ± 0,51	9,97 ± 0,34
33Me-M	1:1	-0,50 ± 0,22	-0,41 ± 1,32	-0,16 ± 0,12
	1:5	0,61 ± 0,19	8,74 ± 0,96	0,64 ± 0,18
	1:10	7,80 ± 1,06	16,3 ± 0,18	2,88 ± 0,66
	1:20	16,92 ± 2,03	28,85 ± 0,43	5,86 ± 0,41
33Me-C	1:1	-0,10 ± 0,34	8,21 ± 1,33	-0,08 ± 0,06
	1:5	13,20 ± 0,30	27,29 ± 0,54	0,42 ± 0,05
	1:10	20,7 ± 0,38	35,2 ± 0,50	2,77 ± 0,38

	1:20	23,80 ± 0,06	42,11 ± 0,19	6,44 ± 1,07
33H-L	1:1	-0,41 ± 0,11	-1,60 ± 0,37	-0,64 ± 0,16
	1:5	-0,41 ± 0,21	-1,02 ± 0,72	0,64 ± 0,04
	1:10	-0,95 ± 0,95	0,08 ± 0,33	-0,02 ± 0,34
	1:20	-0,37 ± 0,11	-0,11 ± 0,17	0,15 ± 0,47
	1:1	-0,82 ± 0,11	0,05 ± 0,16	-0,92 ± 0,58
33H-M	1:5	9,27 ± 0,49	0,64 ± 0,26	0,89 ± 0,17
	1:10	18,01 ± 0,90	4,62 ± 0,48	4,46 ± 0,32
	1:20	22,86 ± 0,10	15,85 ± 0,58	8,21 ± 0,57
	1:1	-0,46 ± 0,19	3,17 ± 0,50	0,30 ± 0,28
33H-C	1:5	12,46 ± 1,45	10,96 ± 0,89	2,10 ± 0,20
	1:10	22,80 ± 0,02	21,89 ± 1,32	7,19 ± 0,55
	1:20	24,68 ± 0,19	38,35 ± 0,67	10,45 ± 0,22
	1:1	-0,60 ± 0,18	0,12 ± 0,21	0,14 ± 0,01
22H-M	1:5	1,77 ± 0,68	2,92 ± 0,06	0,17 ± 0,04
	1:10	10,81 ± 0,40	7,79 ± 0,15	0,17 ± 0,22
	1:20	16,80 ± 0,53	16,77 ± 0,48	0,64 ± 0,14
	1:1	7,20 ± 0,20	5,89 ± 0,10	0,10 ± 0,06
22H-C	1:5	16,67 ± 0,25	18,10 ± 0,63	0,45 ± 0,07
	1:10	20,19 ± 0,66	26,93 ± 0,39	0,96 ± 0,03
	1:20	25,96 ± 0,37	36,41 ± 0,56	2,15 ± 0,12
	1:1	0,25 ± 0,18	-1,79 ± 0,51	-0,54 ± 0,30
Cad-M	1:2	-0,10 ± 0,14	-0,93 ± 0,28	-0,27 ± 0,43
	1:5	-0,57 ± 0,55	-0,26 ± 0,49	-0,08 ± 0,35
	1:10	4,02 ± 2,30	2,68 ± 0,11	0,36 ± 0,39
	1:20	18,34 ± 0,47	6,88 ± 0,38	1,35 ± 0,42
	1:1	2,12 ± 0,39	-1,37 ± 0,73	-1,15 ± 0,19
Cad-C	1:2	5,09 ± 0,08	-0,64 ± 0,26	-0,65 ± 0,21
	1:5	15,97 ± 0,18	3,81 ± 0,20	3,36 ± 0,32
	1:10	24,21 ± 0,47	25,00 ± 0,00	9,16 ± 0,15
	1:20	25,19 ± 0,02	25,00 ± 0,00	12,38 ± 0,17

Tabla B.2. Valores de ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$) para las distintas topologías de ADN y ligandos sintetizados en tampón 100 mM NaCl y 10 mM LiCl.

		ΔT_m		
T_m^0		48.88 \pm 0.62	46.35 \pm 0.04	76.18 \pm 0.17
Ligando	Ratio	HTelo	G2T1	ds26
22Me-L	1:1	0,25 \pm 0,36	-0,30 \pm 0,06	-0,07 \pm 0,21
	1:5	0,98 \pm 1,00	-0,94 \pm 0,03	0,32 \pm 0,19
	1:10	1,71 \pm 0,25	-0,73 \pm 0,08	0,58 \pm 0,12
	1:20	3,23 \pm 0,38	-0,52 \pm 0,16	0,24 \pm 0,97
22Me-M	1:1	0,34 \pm 0,81	0,12 \pm 0,44	0,50 \pm 0,80
	1:5	1,87 \pm 0,18	6,32 \pm 0,49	0,72 \pm 0,06
	1:10	8,69 \pm 0,69	10,32 \pm 0,50	1,04 \pm 0,07
	1:20	23,34 \pm 1,08	50,00 \pm 0,00	3,86 \pm 0,25
22Me-C	1:1	6,47 \pm 0,81	9,92 \pm 1,24	2,40 \pm 4,27
	1:5	25,13 \pm 0,81	13,09 \pm 0,71	10,12 \pm 1,83
	1:10	33,23 \pm 0,30	23,93 \pm 0,83	8,92 \pm 1,48
	1:20	35,60 \pm 0,36	50,00 \pm 0,00	8,18 \pm 0,96
33Me-L	1:1	1,56 \pm 0,51	-0,46 \pm 0,18	0,10 \pm 0,05
	1:5	1,71 \pm 0,69	0,16 \pm 0,40	0,10 \pm 0,05
	1:10	0,87 \pm 1,23	3,35 \pm 0,25	0,05 \pm 0,12
	1:20	0,83 \pm 0,57	-2,59 \pm 3,93	-0,04 \pm 0,10
33Me-M	1:1	1,40 \pm 1,05	2,77 \pm 0,03	-0,43 \pm 1,16
	1:5	10,87 \pm 0,59	10,34 \pm 0,13	-0,25 \pm 1,55
	1:10	21,18 \pm 0,35	50,00 \pm 0,00	-2,68 \pm 0,54
	1:20	30,00 \pm 0,54	50,00 \pm 0,00	-0,46 \pm 2,31
33Me-C	1:1	0,28 \pm 0,69	10,94 \pm 0,26	-0,24 \pm 0,01
	1:5	15,23 \pm 0,70	14,10 \pm 0,98	-1,37 \pm 1,76
	1:10	26,3 \pm 0,75	50,00 \pm 0,00	-0,84 \pm 1,54
	1:20	35,77 \pm 0,56	50,00 \pm 0,00	0,27 \pm 0,53
33H-L	1:1	-0,35 \pm 0,52	-1,30 \pm 0,11	-0,02 \pm 0,06
	1:5	1,43 \pm 0,46	-1,34 \pm 0,07	0,19 \pm 0,16
	1:10	1,47 \pm 2,16	-0,18 \pm 0,42	0,12 \pm 0,22

Anexos

	1:20	14,93 ± 0,64	3,58 ± 0,09	0,26 ± 0,17
	1:1	1,40 ± 1,05	2,77 ± 0,03	-0,43 ± 1,16
	1:2	3,85 ± 0,84	8,64 ± 0,04	0,12 ± 0,16
33Me-M	1:5	10,87 ± 0,59	10,34 ± 0,13	-0,32 ± 0,24
	1:10	21,18 ± 0,35	50,00 ± 0,00	-0,07 ± 0,08
	1:20	30,00 ± 0,54	50,00 ± 0,00	0,04 ± 0,12
	1:1	0,28 ± 0,69	10,94 ± 0,26	0,19 ± 0,03
	1:2	5,73 ± 0,75	12,08 ± 0,53	0,11 ± 0,05
33Me-C	1:5	15,23 ± 0,70	14,10 ± 0,98	0,02 ± 0,07
	1:10	26,25 ± 0,75	50,00 ± 0,00	0,03 ± 0,10
	1:20	35,77 ± 0,56	50,00 ± 0,00	1,04 ± 0,29
	1:1	-0,35 ± 0,52	-1,30 ± 0,11	-0,02 ± 0,06
	1:2	0,00 ± 0,38	-1,28 ± 0,23	-0,24 ± 0,37
33H-L	1:5	1,43 ± 0,46	-1,34 ± 0,07	0,19 ± 0,16
	1:10	1,47 ± 2,16	-0,18 ± 0,42	0,12 ± 0,22
	1:20	14,93 ± 0,64	3,58 ± 0,09	0,26 ± 0,17
	1:1	8,10 ± 1,05	9,60 ± 1,00	-0,44 ± 0,18
	1:2	12,85 ± 0,93	10,92 ± 0,31	-0,78 ± 0,47
33H-M	1:5	18,87 ± 0,42	11,51 ± 0,95	-0,05 ± 0,00
	1:10	29,66 ± 0,40	7,38 ± 1,52	-0,07 ± 0,06
	1:20	31,07 ± 0,42	29,38 ± 1,23	-0,55 ± 0,59
	1:1	10,49 ± 0,78	7,64 ± 0,25	-0,12 ± 0,17
	1:2	16,50 ± 0,38	10,89 ± 0,81	-1,35 ± 0,61
33H-C	1:5	29,01 ± 1,08	3,76 ± 3,90	-0,48 ± 0,31
	1:10	31,97 ± 1,68	35,47 ± 1,93	-0,19 ± 0,37
	1:20	33,23 ± 0,82	30,52 ± 0,08	1,24 ± 0,29
	1:1	-0,37 ± 0,16	0,47 ± 0,16	0,33 ± 0,10
	1:2	1,10 ± 0,49	1,98 ± 0,53	0,24 ± 0,10
22H-M	1:5	4,59 ± 0,15	4,10 ± 0,15	0,11 ± 0,18
	1:10	11,08 ± 2,90	9,02 ± 0,63	0,24 ± 0,02
	1:20	26,35 ± 0,80	32,65 ± 1,55	0,66 ± 0,31
	1:1	4,37 ± 0,45	8,35 ± 0,68	0,28 ± 0,19
22H-C	1:2	9,03 ± 0,13	9,01 ± 0,79	0,41 ± 0,45

	1:5	18,19 ± 0,55	8,74 ± 0,93	0,63 ± 0,35
	1:10	29,26 ± 0,40	38,96 ± 1,22	0,66 ± 0,18
	1:20	33,74 ± 0,29	38,19 ± 2,10	1,83 ± 0,06
Cad-M	1:1	1,21 ± 1,12	0,19 ± 0,15	0,30 ± 0,22
	1:2	2,19 ± 0,82	0,86 ± 0,17	0,12 ± 0,09
	1:5	2,99 ± 1,97	4,84 ± 0,47	0,13 ± 0,26
	1:10	10,71 ± 2,19	5,61 ± 2,02	0,22 ± 0,06
	1:20	25,73 ± 0,94	34,19 ± 0,34	1,35 ± 0,42
Cad-C	1:1	3,6 ± 0,8	8,5 ± 1,37	-0,13 ± 0,10
	1:2	2,9 ± 0,2	11,1 ± 1,01	-0,69 ± 0,20
	1:5	23,9 ± 0,9	19,8 ± 0,58	3,36 ± 0,32
	1:10	37,6 ± 0,5	36,3 ± 1,17	9,16 ± 0,15
	1:20	37,9 ± 1,0	44,6 ± 0,61	12,38 ± 0,17

Tabla B.3. Valores de ΔT_m (°C) para los G4s de ADN y ARN relacionados con enfermedades neurodegenerativas y los ligandos sintetizados en tampón 10 mM KCl y 100 mM LiCl.

		ΔT_m		
T_m^0		66.15 ± 0.70	78.10 ± 0.30	63.99 ± 0.09
Ligando	Ratio	ADN G4C2	ARN G4C2	ds26
22Me-L	1:1	0,19 ± 1,72	0,01 ± 0,07	0,05 ± 0,16
	1:2	1,27 ± 0,76	-0,46 ± 0,19	0,06 ± 0,02
	1:5	1,24 ± 0,89	-0,44 ± 0,24	-0,03 ± 0,01
	1:10	1,44 ± 0,08	0,34 ± 0,16	-0,09 ± 0,06
	1:20	2,27 ± 0,14	-0,37 ± 1,24	-0,11 ± 0,04
22Me-M	1:1	-1,03 ± 1,44	-0,86 ± 0,20	-0,27 ± 0,25
	1:2	1,10 ± 2,75	0,08 ± 0,20	-0,57 ± 0,59
	1:5	0,82 ± 0,94	0,39 ± 0,48	-0,14 ± 0,11
	1:10	4,25 ± 0,37	7,47 ± 1,76	-0,08 ± 0,12
	1:20	16,56 ± 2,58	12,86 ± 0,14	0,46 ± 0,05

22Me-C	<i>1:1</i>	3,55 ± 0,52	1,57 ± 0,11	-0,47 ± 0,42
	<i>1:2</i>	8,50 ± 0,56	2,52 ± 0,26	-0,09 ± 0,03
	<i>1:5</i>	12,00 ± 1,15	7,56 ± 1,05	0,18 ± 0,27
	<i>1:10</i>	20,11 ± 0,06	12,17 ± 0,12	1,93 ± 0,06
	<i>1:20</i>	21,14 ± 1,27	12,26 ± 0,26	4,74 ± 0,38
22H-M	<i>1:1</i>	-0,55 ± 1,56	-0,49 ± 0,26	0,34 ± 0,12
	<i>1:2</i>	0,88 ± 1,34	-0,21 ± 0,29	0,31 ± 0,13
	<i>1:5</i>	2,19 ± 0,64	2,04 ± 0,10	0,15 ± 0,05
	<i>1:10</i>	19,20 ± 0,44	9,09 ± 0,20	-0,05 ± 0,04
	<i>1:20</i>	24,85 ± 0,36	11,23 ± 0,31	-0,06 ± 0,05
22H-C	<i>1:1</i>	3,54 ± 1,47	2,77 ± 0,37	-0,82 ± 0,74
	<i>1:2</i>	8,95 ± 0,52	2,85 ± 0,46	-0,21 ± 0,51
	<i>1:5</i>	15,36 ± 0,63	8,55 ± 0,14	0,04 ± 0,16
	<i>1:10</i>	20,65 ± 0,47	11,14 ± 0,05	0,66 ± 0,18
	<i>1:20</i>	23,60 ± 2,52	10,94 ± 0,76	1,83 ± 0,06
Cad-C	<i>1:1</i>	5,39 ± 0,19	5,56 ± 0,46	-1,15 ± 0,19
	<i>1:2</i>	11,26 ± 0,34	5,40 ± 0,10	-0,65 ± 0,21
	<i>1:5</i>	16,01 ± 1,34	8,07 ± 0,49	3,36 ± 0,32
	<i>1:10</i>	22,34 ± 1,58	12,18 ± 0,63	9,16 ± 0,15
	<i>1:20</i>	30,00 ± 00,00	11,17 ± 0,58	12,38 ± 0,17
Cad-M	<i>1:1</i>	-1,05 ± 0,10	-0,18 ± 0,88	0,30 ± 0,22
	<i>1:2</i>	-0,17 ± 0,29	0,37 ± 0,49	0,12 ± 0,09
	<i>1:5</i>	0,07 ± 0,08	0,81 ± 0,08	0,13 ± 0,26
	<i>1:10</i>	0,99 ± 0,18	1,36 ± 0,53	0,22 ± 0,06
	<i>1:20</i>	0,94 ± 0,60	-0,07 ± 0,12	-
33Me-L	<i>1:1</i>	0,57 ± 0,34	-0,42 ± 0,25	-0,05 ± 0,24
	<i>1:2</i>	0,92 ± 0,47	0,51 ± 0,38	-0,72 ± 0,15
	<i>1:5</i>	1,52 ± 0,94	1,13 ± 0,82	0,70 ± 0,42
	<i>1:10</i>	2,31 ± 0,60	1,58 ± 0,86	1,04 ± 0,21
	<i>1:20</i>	3,69 ± 0,45	3,46 ± 0,28	3,51 ± 0,34
33Me-M	<i>1:1</i>	1,69 ± 0,20	-0,16 ± 0,17	0,00 ± 0,09
	<i>1:2</i>	1,72 ± 0,21	0,92 ± 0,51	-0,36 ± 0,14
	<i>1:5</i>	2,93 ± 0,22	3,23 ± 0,34	-0,32 ± 0,24

	<i>1:10</i>	9,09 ± 1,59	10,78 ± 0,58	-0,07 ± 0,08
	<i>1:20</i>	21,92 ± 1,24	12,37 ± 0,12	0,04 ± 0,12
33Me-C	<i>1:1</i>	6,64 ± 0,17	2,50 ± 0,42	0,19 ± 0,03
	<i>1:2</i>	8,88 ± 2,00	2,55 ± 0,15	0,11 ± 0,05
	<i>1:5</i>	15,77 ± 1,14	9,45 ± 0,61	0,02 ± 0,07
	<i>1:10</i>	20,30 ± 1,83	11,75 ± 0,16	0,03 ± 0,10
	<i>1:20</i>	30,00 ± 0,00	11,68 ± 0,57	1,04 ± 0,29
33H-L	<i>1:1</i>	-0,67 ± 0,58	0,94 ± 0,99	-0,16 ± 0,12
	<i>1:2</i>	-0,76 ± 0,64	0,94 ± 0,44	0,42 ± 0,44
	<i>1:5</i>	3,23 ± 0,94	1,75 ± 0,74	0,54 ± 0,26
	<i>1:10</i>	0,21 ± 2,66	-	1,28 ± 0,28
	<i>1:20</i>	7,14 ± 0,27	4,94 ± 0,69	4,22 ± 0,46
33H-M	<i>1:1</i>	5,15 ± 0,63	3,38 ± 0,32	0,07 ± 0,09
	<i>1:2</i>	10,48 ± 0,18	3,25 ± 0,27	0,03 ± 0,18
	<i>1:5</i>	14,66 ± 0,74	7,63 ± 0,41	-0,05 ± 0,00
	<i>1:10</i>	22,16 ± 1,30	11,00 ± 1,25	-0,07 ± 0,06
	<i>1:20</i>	23,16 ± 0,20	11,84 ± 0,65	-0,55 ± 0,59
33H-C	<i>1:1</i>	8,79 ± 0,59	5,16 ± 0,26	-0,31 ± 0,14
	<i>1:2</i>	12,99 ± 0,33	4,72 ± 0,55	-0,25 ± 0,05
	<i>1:5</i>	19,52 ± 0,73	10,12 ± 0,19	-0,48 ± 0,31
	<i>1:10</i>	24,79 ± 1,89	11,04 ± 0,59	-0,19 ± 0,37
	<i>1:20</i>	30,00 ± 00,00	11,13 ± 0,28	1,24 ± 0,29

ANEXO C

Ensayo de desplazamiento con naranja de tiazol

Espectros registrados en el ensayo de desplazamiento del naranja de tiazol para los distintos ligandos sintetizados con las secuencias de oligonucleótidos HTelo, ds26 y G₄C₂.

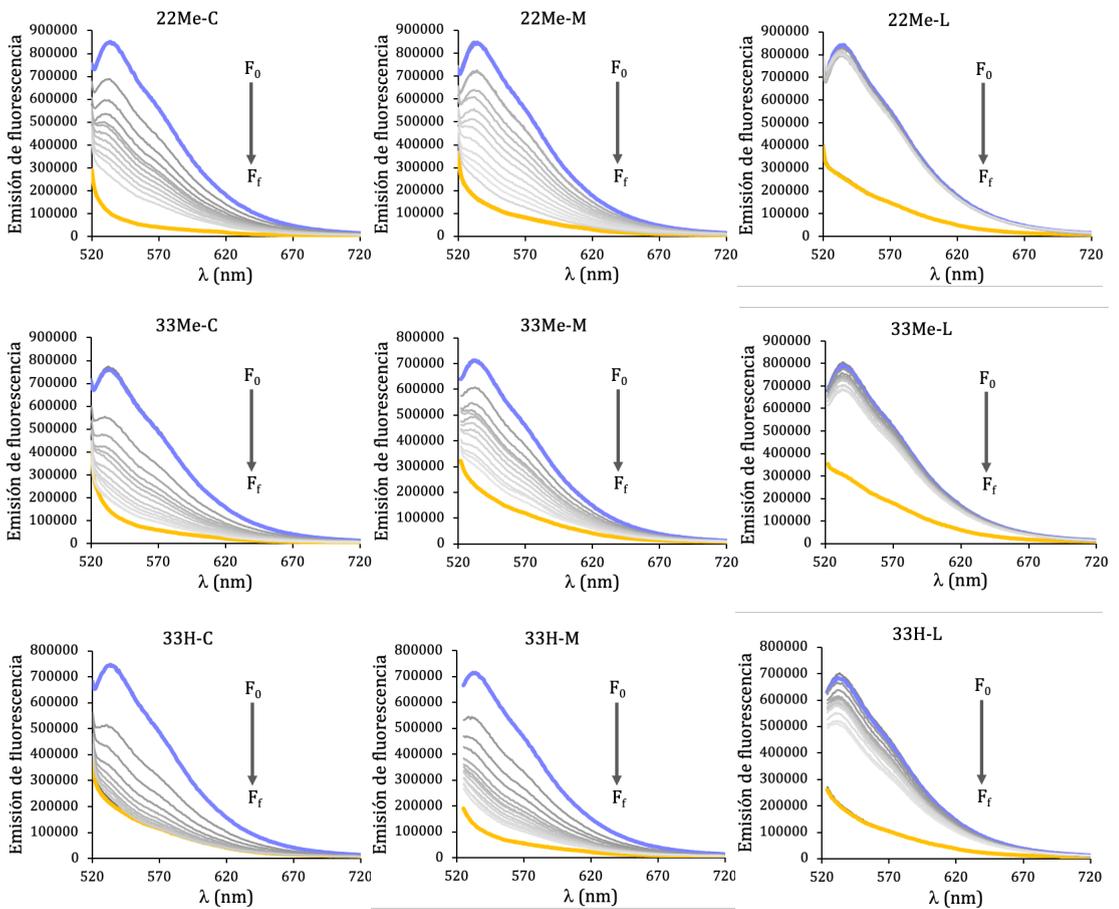


Figura C.1. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de HTelo (K⁺).

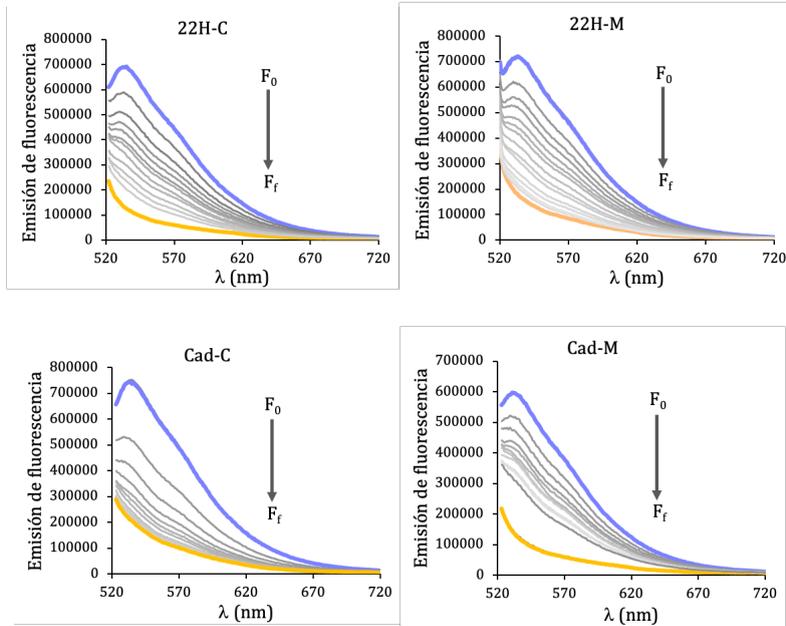


Figura C.2. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de HTelo (K^+).

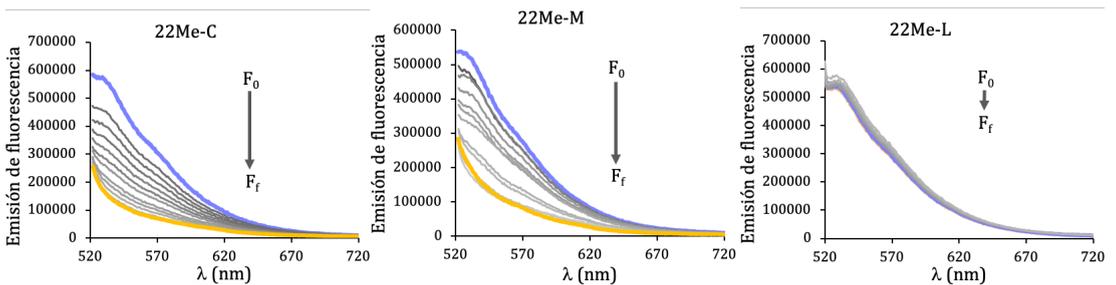


Figura C.3. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de HTelo (Na^+).

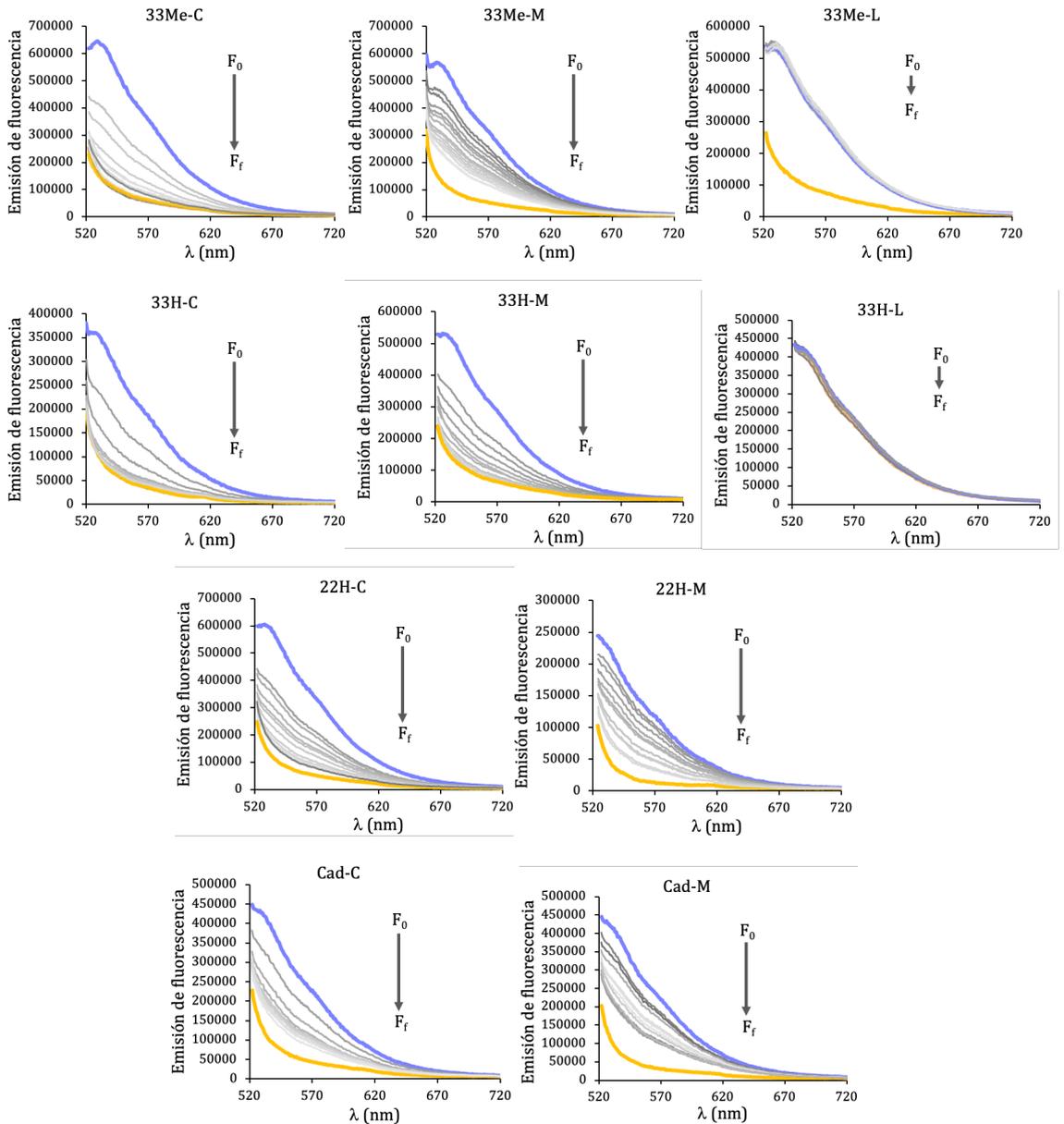


Figura C.4. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de HTelo (Na^+).

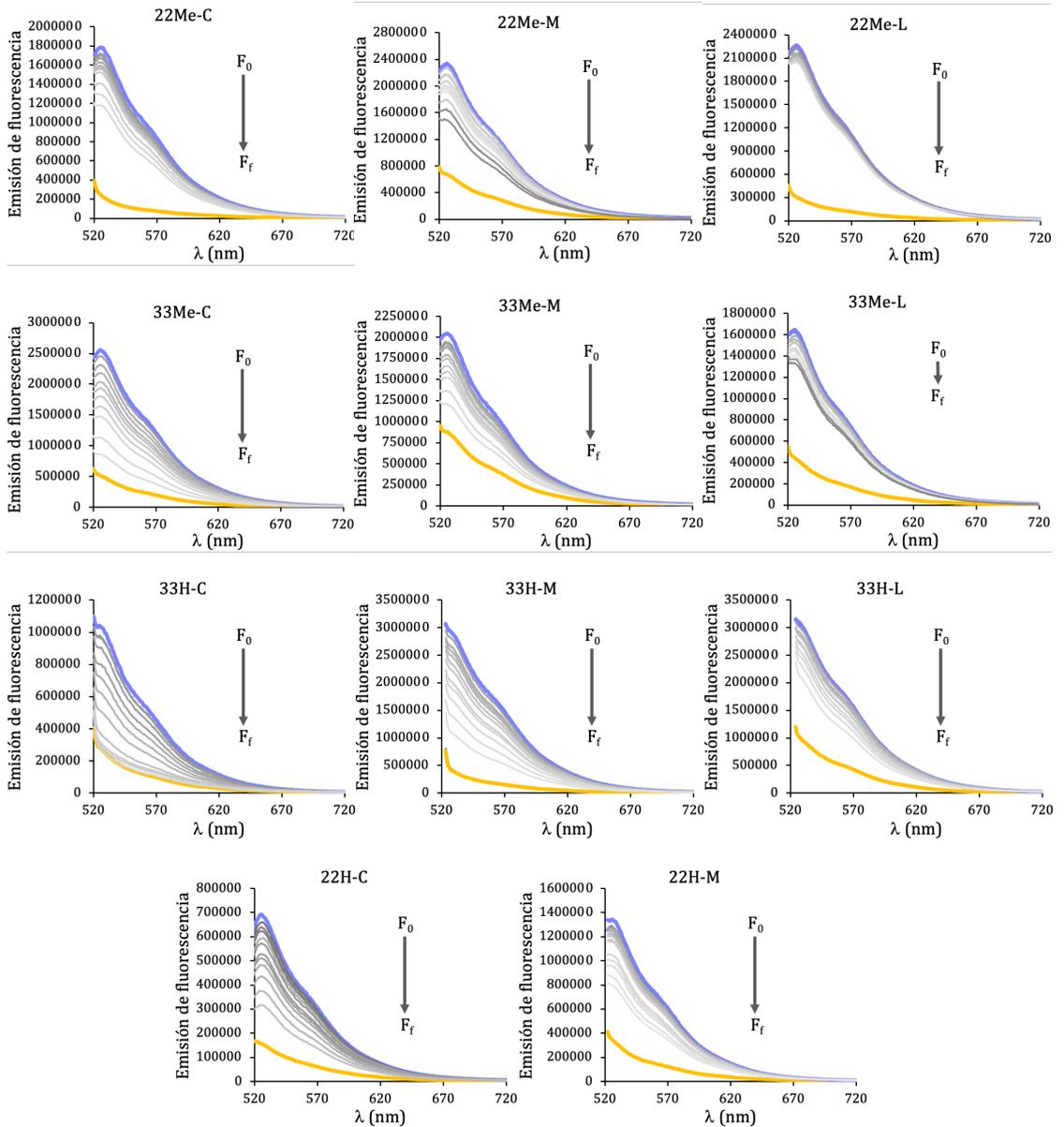


Figura C.5. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de ds26.

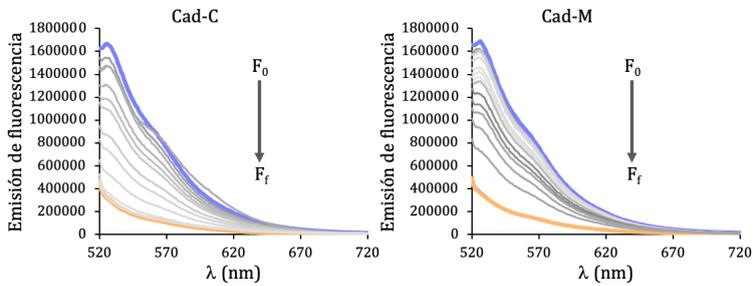


Figura C.6. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias de ds26.

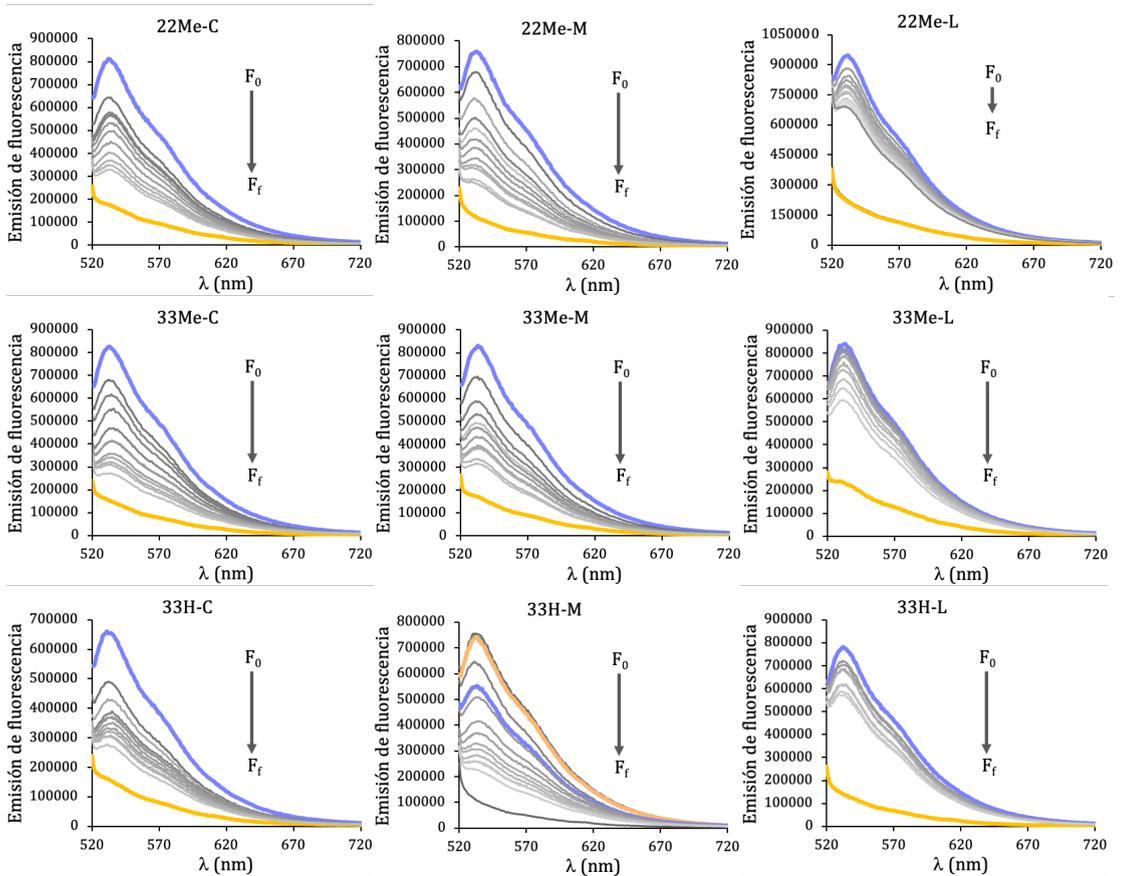


Figura C.7. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias G₄C₂.

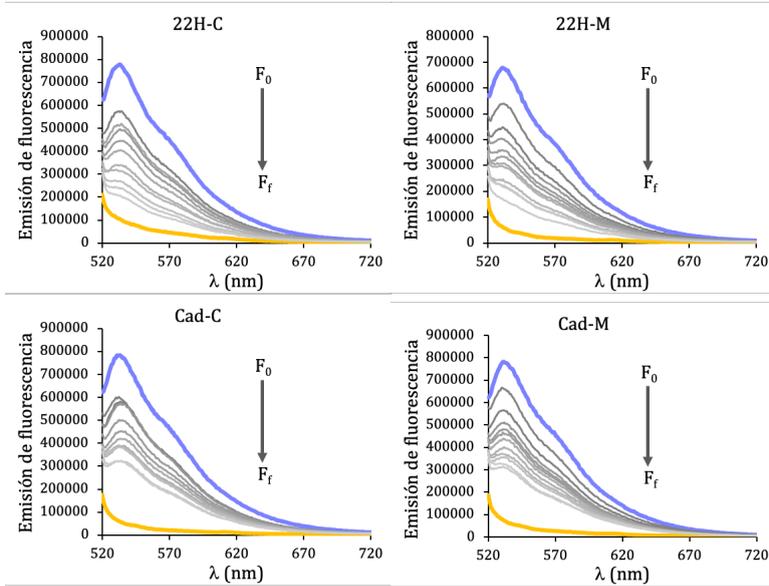


Figura C.8. Espectros de emisión de fluorescencia para las valoraciones de desplazamiento de naranja de tiazol en las secuencias G_4C_2 .

ANEXO D

Ensayo 2-Aminopurina

Espectros registrados de 22Me-M y 22Me-C: estudios de agregación.

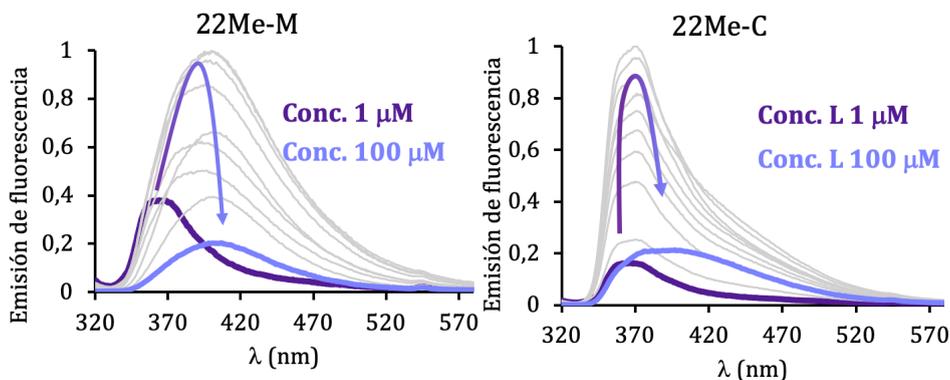


Figura D.1. Espectros de emisión de fluorescencia de los ligandos **22Me-M** y **22Me-C** en el rango de concentración 1 – 100 μM . $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$.

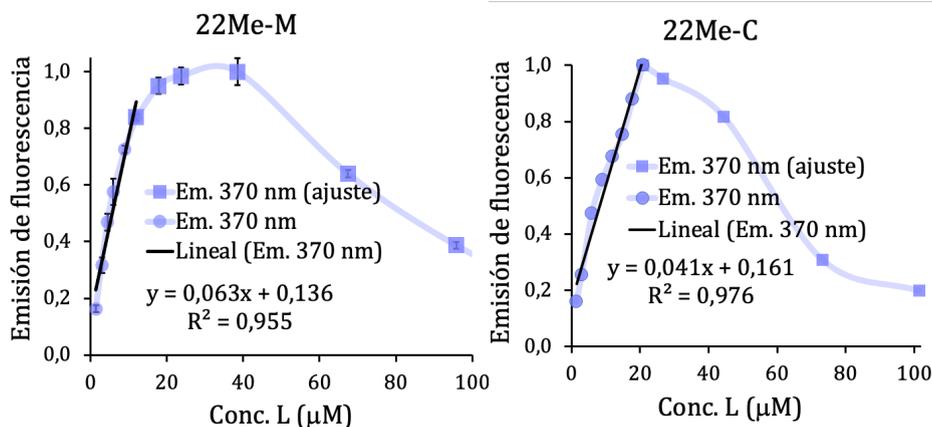


Figura D.2. Variación de la emisión de fluorescencia en función de la concentración de ligando añadido. $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

Espectros registrados en el ensayo 2-Aminopurina para los distintos ligandos sintetizados con la secuencia de oligonucleótido G2T1.

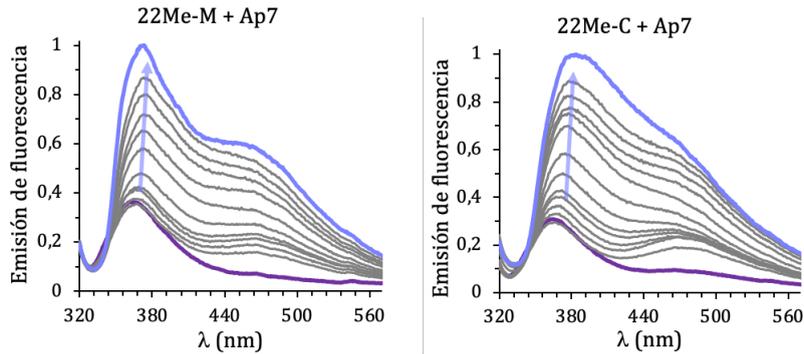


Figura D.3. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap7** ($2 \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

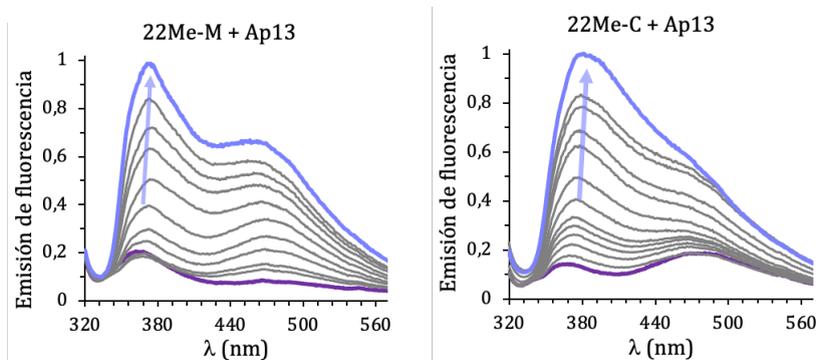


Figura D.4. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap13** ($2 \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

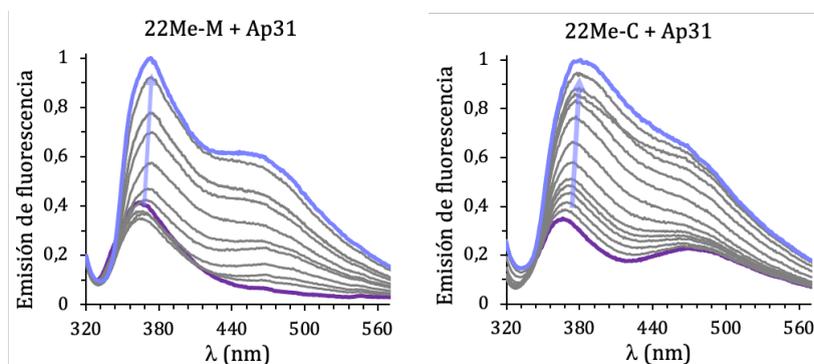


Figura D.5. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap31** ($2 \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

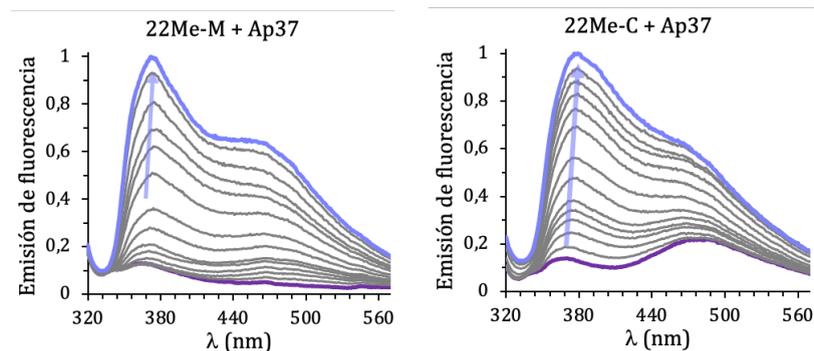


Figura D.6. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap37** ($2 \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

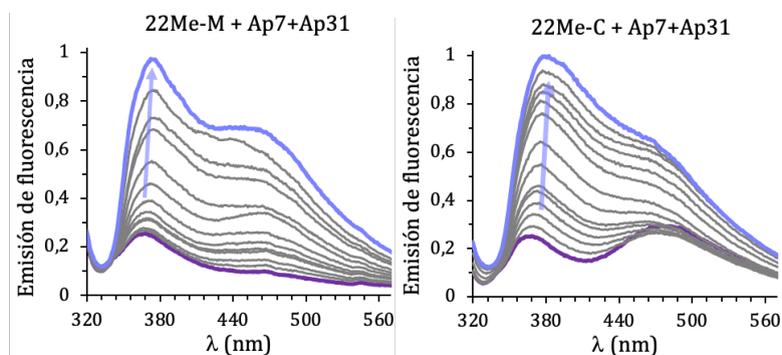


Figura D.7. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap7+Ap31** ($2 \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

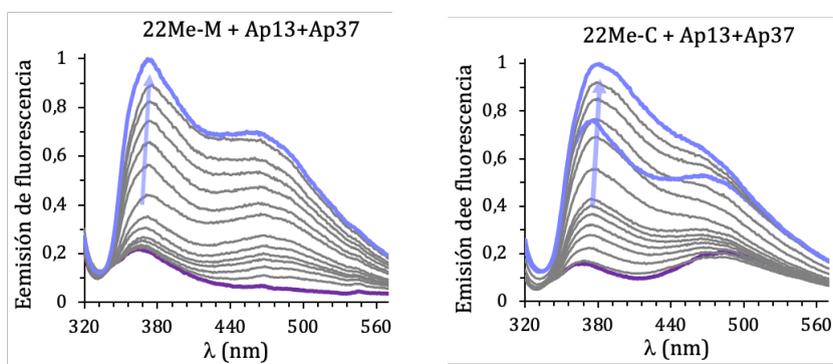


Figura D.7. Espectros de emisión de fluorescencia de **Ap13+Ap37** ($2\ \mu\text{M}$) valorado con los ligandos **22Me-M** y **22Me-C**, a pH de 7.4 en 10 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl.

ANEXO E

Ensayo MTT

Ajuste de los porcentajes de viabilidad celular en función de la concentración de ligando para el cálculo del IC₅₀.

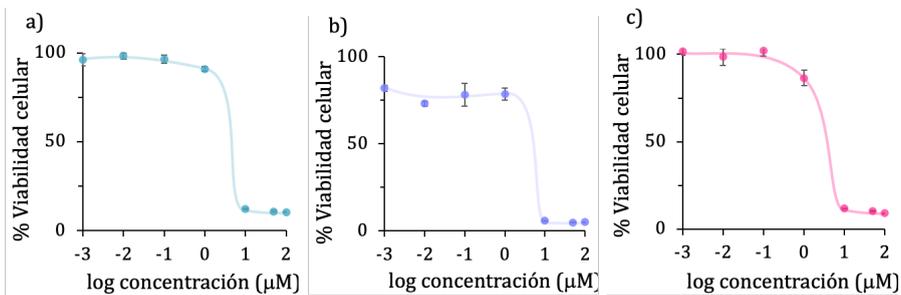


Figura E.1. Porcentaje de viabilidad celular de **22Me-L** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC₅₀ es calculado a partir del ajuste.

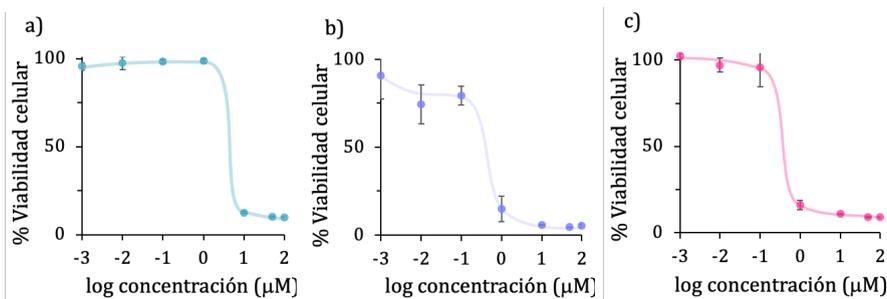


Figura E.2. Porcentaje de viabilidad celular de **22Me-M** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC₅₀ es calculado a partir del ajuste.

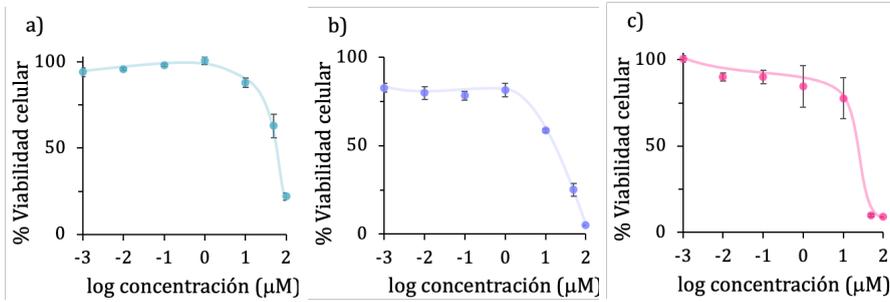


Figura E.3. Porcentaje de viabilidad celular de **22Me-C** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

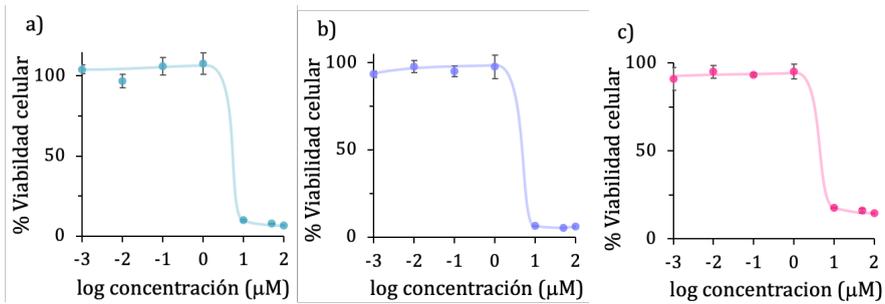


Figura E.4. Porcentaje de viabilidad celular de **33Me-L** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

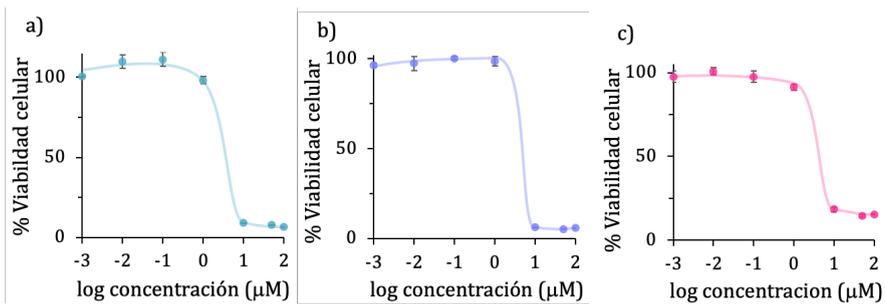


Figura E.5. Porcentaje de viabilidad celular de **33Me-M** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

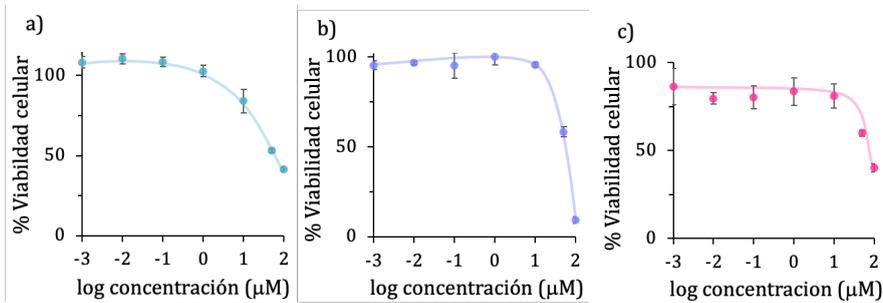


Figura E.6. Porcentaje de viabilidad celular de **33Me-C** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC₅₀ es calculado a partir del ajuste.

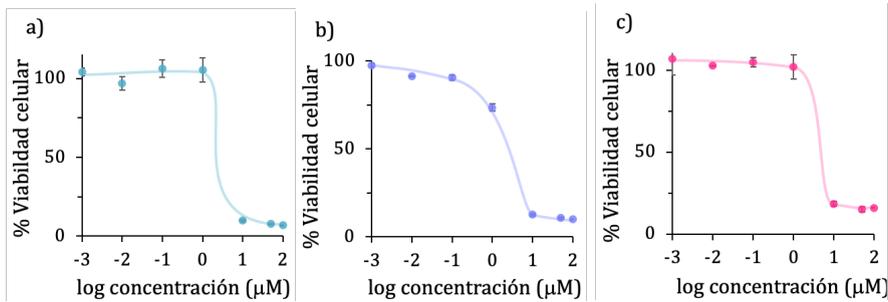


Figura E.7. Porcentaje de viabilidad celular de **33H-L** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC₅₀ es calculado a partir del ajuste.

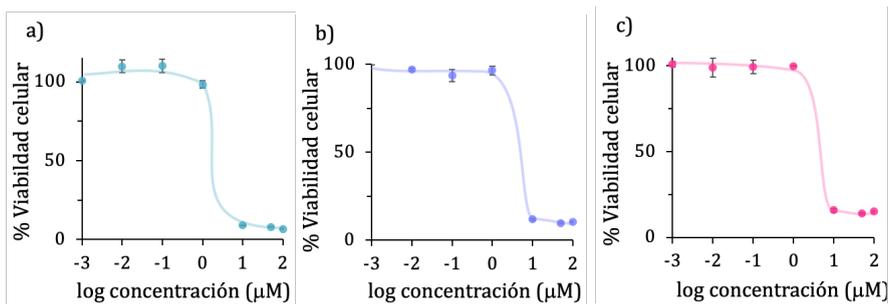


Figura E.8. Porcentaje de viabilidad celular de **33H-M** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC₅₀ es calculado a partir del ajuste.

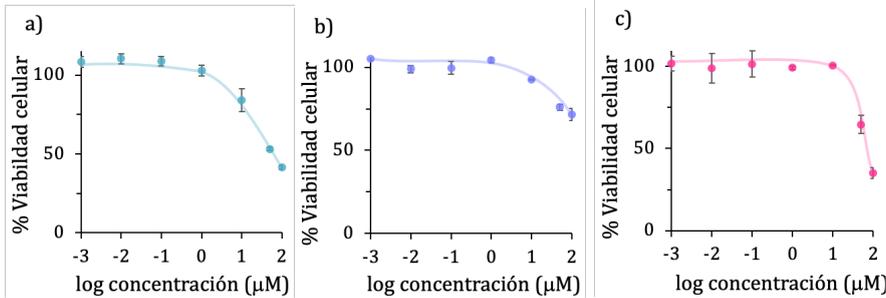


Figura E.9. Porcentaje de viabilidad celular de **33H-C** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

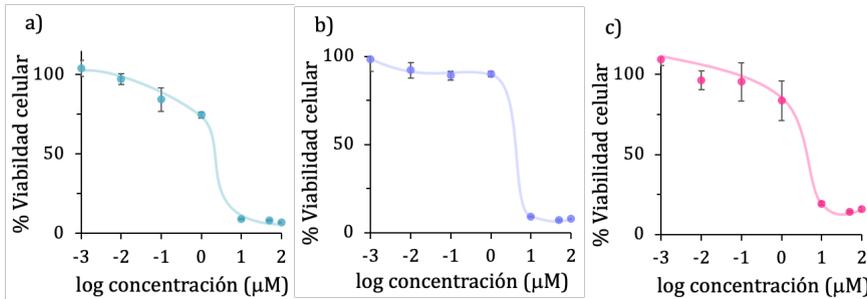


Figura E.10. Porcentaje de viabilidad celular de **22H-M** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

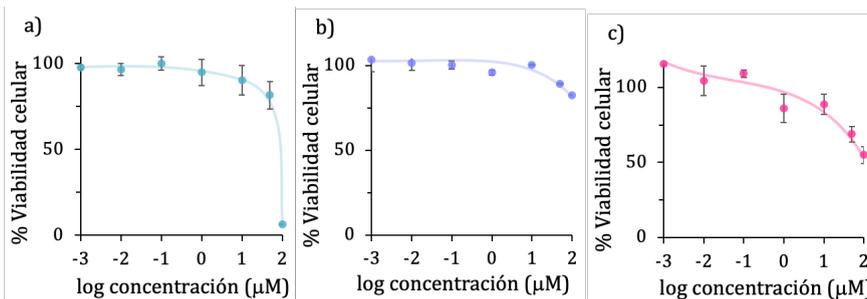


Figura E.11. Porcentaje de viabilidad celular de **22H-C** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

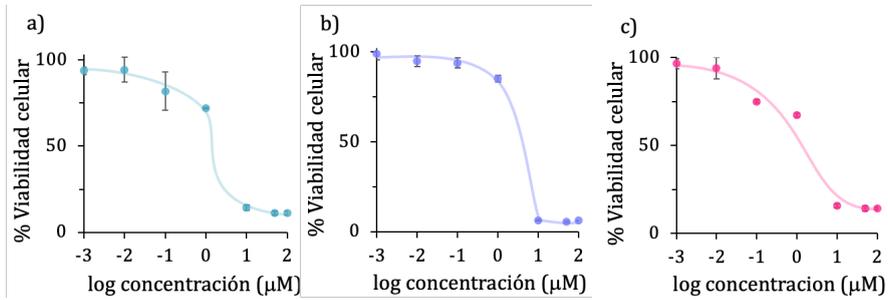


Figura E.12. Porcentaje de viabilidad celular de **Cad-M** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

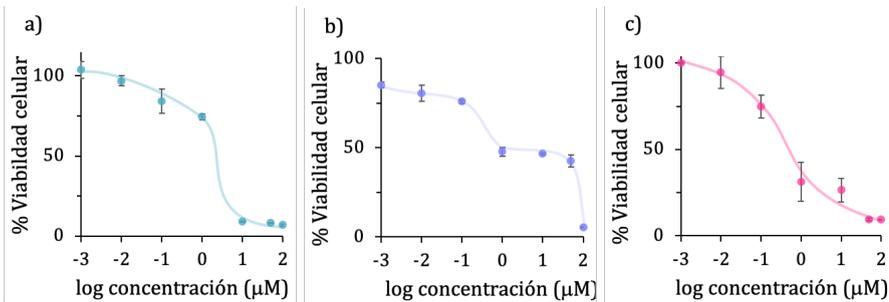


Figura E.13. Porcentaje de viabilidad celular de **Cad-C** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

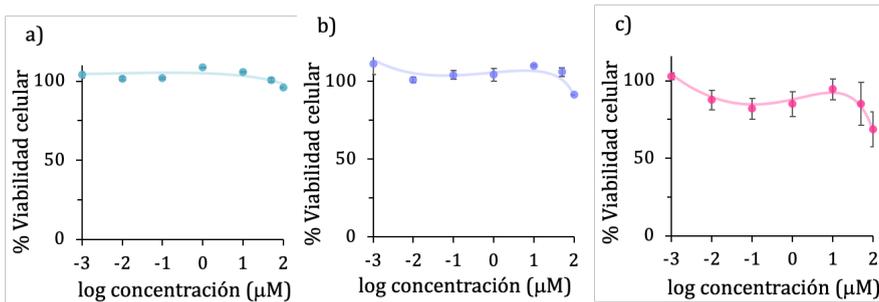


Figura E.14. Porcentaje de viabilidad celular de **Pyr** con las líneas celulares (a) HeLa, (b) A549 y (c) RAW. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

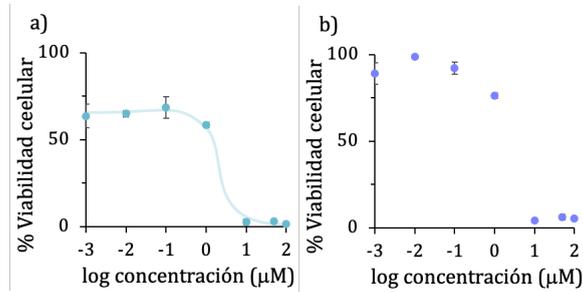


Figura E.15. Porcentaje de viabilidad celular de **Pyr + 22Me-M** con las líneas celulares (a) HeLa y (b) A549. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

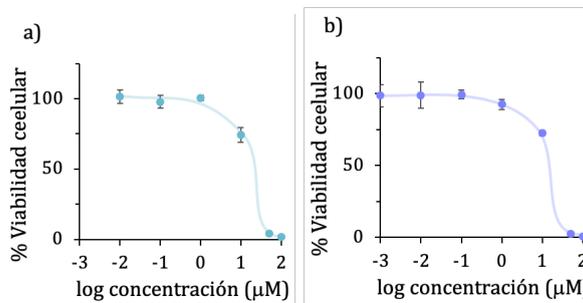


Figura E.16. Porcentaje de viabilidad celular de **Pyr + 22Me-C** con las líneas celulares (a) HeLa y (b) A549. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

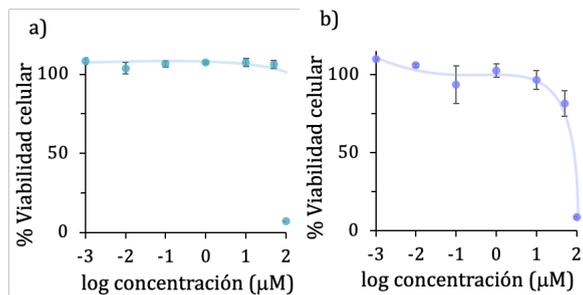


Figura E.17. Porcentaje de viabilidad celular de **Pyr + 22H-C** con las líneas celulares (a) HeLa y (b) A549. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

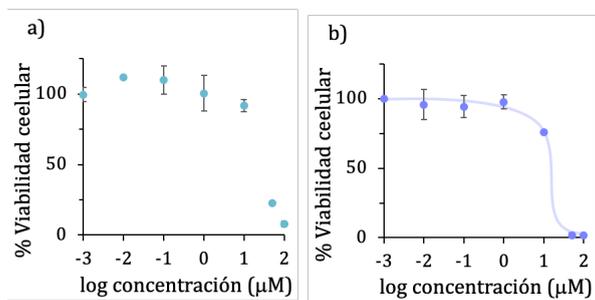


Figura E.18. Porcentaje de viabilidad celular de **Pyr + Cad-C** con las líneas celulares (a) HeLa y (b) A549. El valor IC_{50} es calculado a partir del ajuste.

Agradecimientos

Hoy, he finalizado el viaje que ha sido la escritura de esta tesis. Al igual que en el “*Viaje al fin de la noche*” de Céline, me he enfrentado a las incertidumbres y abrazado la complejidad del camino. En este punto, me es necesario expresar mi gratitud a aquellos que han sido mis guías y quienes hicieron posible esta expedición académica.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis, Enrique, quién no solo me ha guiado en cada paso de la tesis con paciencia, sino que ya marcó el curso de este viaje antes de emprenderlo cuando le conocí hace varios años en una clase de Química Inorgánica III.

También deseo expresar mi sincero agradecimiento a mi segundo director, Jorge. Tu experiencia y dedicación han sido fundamentales, gracias por estar en el campo de batalla del laboratorio a mi lado, has sido una fuente inagotable de aprendizaje y motivación.

Asimismo, no puedo olvidar mencionar al resto de personas (y personajes) que me han acompañado en el grupo de Química Supramolecular. A los doctores, doctorandos y estudiantes que habéis atravesado conmigo todas las etapas, habéis sido testigos de mi camino, así como yo del vuestro. Àlvar, Isabel y Alberto, fuisteis los primeros. Fue una suerte compartir pecera con vosotros, de cada uno de vosotros me llevo una valiosa lección. Irene, Mireia y Laura, más que compañeras sois mis amigas. Gracias por hacerme de los días de *lab* los mejores, darme refugio en los días duros, y, sobre todo, gracias por las risas contagiosas que han iluminado el camino. Y por supuesto, quiero hacer mención también al resto de compañeros del grupo, Cristina, Sònia, Mario, Salva, Bego, M. Paz, Fany, José Miguel, Natalia y Alexander, Andrea, Jesús, Esther, Mercy y Pablo, vuestra ayuda y colaboración han enriquecido este viaje. Y a José, breve pero intenso.

Además, me gustaría extender mi gratitud a aquellas personas que están más allá del grupo, más concretamente, en el piso de arriba. María y Marta, sois las siguientes, os deseo lo mejor, la cuesta de la tesis se os hará menos que la subida al ibón de Bachimaña. A Edu, gracias por haber contado conmigo, y por compartir el entusiasmo por la divulgación científica. Y a Pau, las conversaciones con un café (o una cerveza) han sido una brisa fresca en mitad de la rutina.

A Inés, mi *nakama*. Valioso es el poder de la nominación. Ahí estaba yo en la vitrina de las balanzas, enteramente ignorante de la transcendencia de aquel momento. Desde ese día te convertiste en mi compañera de aventuras, gracias por tu apoyo incondicional, tu energía y tu amistad. Gracias por empujarme a dar lo mejor de mí y por celebrar mis logros como si fueran tuyos. A ti te llevo para siempre.

A la meua Aspes del Xúquer, gràcies per obrir-me les portes de la teua casa, no hi ha res que no arregle una migdiada i un putxero amb tu.

A mis queridísimas *amigues* de Chestre. Habéis contribuido a este trabajo más de lo que os podéis imaginar. Sois el recordatorio constante de que este viaje no solo consiste en alcanzar metas académicas, sino de disfrutar y saborear los momentos compartidos con las personas que nos importan. Noeslia, Lala, María la polilla, Eva, Zamo, Estela, Olga, Moni, Carlos y mi prima, Andrea. No puedo expresar lo agradecida que estoy de teneros.

A Luis, te conocí a mitad de esta travesía, en medio del caos y de un monte. Gracias por atreverte a vivir la vida conmigo. Has estado a mi lado en cada página escrita, apoyándome y recordándome de lo que soy capaz.

Y en especial, a mis abuelos. *Yayo*, tres cosas hay en la vida: salud, dinero y amor. Y sin tu amor, yo no habría sido la misma. A la persona que olvida, toda una vida me estaría contigo, te estaría cuidando, como cuidó mi vida, que la vivo por ti, *yaya*. Con la B se escribe beso y sin palabras una sonrisa.

Realizada en el grupo de
Química Supramolecular en el
Instituto de Ciencia Molecular ICMol

