

## Interacciones no covalentes con el ADN

Antonio Lorente y María José Fernández

**Resumen:** La unión no covalente de moléculas pequeñas con el ADN puede producirse en los surcos, lo que puede suponer el reconocimiento de determinadas secuencias, por inserción entre los pares de bases (intercalación), o bien mediante la formación de hélices triples o cuádruples. La unión también se puede producir por interacciones electrostáticas con los grupos fosfato. La naturaleza de las especies químicas que interactúan con el ADN varía desde cationes metálicos sencillos hasta un grado elevado de complejidad como el de las entidades supramoleculares que resultan de un proceso de autoensamblaje entre ligandos orgánicos y cationes metálicos. Estas interacciones pueden alterar la estructura y funciones (replicación y/o transcripción) de los ácidos nucleicos lo que constituye la base para el uso de estos compuestos en biología molecular y como fármacos antitumorales.

**Palabras clave:** ADN, interacciones no covalentes, unión al surco, intercalación, interacciones electrostáticas.

**Abstract:** Non-covalent binding of small molecules to DNA can take place in the grooves, which can involve sequence-specific recognition, by insertion between the stacked base-pairs (intercalation) or through the formation of triplexes or quadruplexes structures. In addition, electrostatic interactions with phosphate groups can also occur. DNA binders range from simple metals to supramolecular entities resulting from a self-assembly process between organic ligands and metallic cations. Interactions between DNA and synthetic small molecules can alter the structure and functions (replication and/or transcription) of nucleic acids and constitute the basis for their use as tools in molecular biology and as antitumor drugs.

**Keywords:** DNA, non-covalent interactions, groove binding, intercalation, electrostatic interaction.

### Introducción

La información codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN se expresa por la acción de proteínas que se unen al ADN de forma reversible y no covalente y el control de la expresión de un gen determinado es el resultado de un balance entre factores que activan o desactivan esa expresión. Se conocen algunas enfermedades como, por ejemplo, el cáncer que son el resultado de alteraciones en la expresión génica. La manipulación de la expresión de esos genes ofrece un potencial para controlar la enfermedad que en ocasiones puede ser mucho más eficaz que la actuación sobre las proteínas codificadas por esos genes determinados. Las moléculas de tamaño relativamente pequeño pueden interactuar con los ácidos nucleicos de diferentes maneras:<sup>[1]</sup> unión a los surcos (mayor y/o menor), intercalación entre los pares de bases, unión covalente y unión por fuerzas electrostáticas. Como resultado de estas interacciones se puede alterar tanto la estructura como la actividad de los ácidos nucleicos, y de hecho numerosos compuestos que se unen con el ADN han encontrado aplicación como fármacos antitumorales.<sup>[2]</sup>

Además, los compuestos con afinidad hacia los ácidos nucleicos presentan múltiples aplicaciones como herramientas químicas en Biología Molecular para el reconocimiento, rotura, y marcaje de los mismos. La formación de estructuras triples del ADN puede inhibir la expresión de un gen lo que puede ser de utilidad para el tratamiento de diferentes enfermedades. Debido a que las estructuras tricatenarias son menos estables que las dicatenarias, resulta de gran importancia el

desarrollo de moléculas pequeñas que interactúen con el ADN triple y lo estabilicen. El ADN cuádruple es una estructura de orden superior de particular relevancia, ya que se presenta en regiones del genoma de especial significado como los telómeros y en los promotores de ciertos oncogenes. La telomerasa es una ribonucleoproteína que mantiene la longitud de los telómeros y su actividad es muy significativa en el 85–90% de las células cancerosas impidiendo que éstas alcancen la senescencia o experimenten apoptosis. Los compuestos que estabilizan las estructuras cuádruple-G inhiben la acción de la telomerasa y pueden detener la proliferación de las células tumorales. De lo anterior se deduce el potencial terapéutico de los compuestos que estabilizan la estructura del ADN cuádruple de modo selectivo, con relación al ADN dicatenario, para evitar la toxicidad de estos compuestos en células no cancerosas.

El desarrollo de compuestos que se unen al ADN de manera distinta a los modos clásicos de interacción es importante para evitar la resistencia adquirida a ciertos fármacos y para crear diferentes espectros de actividad. Con relación a este aspecto se han descrito recientemente compuestos que interactúan con estructuras de 3 ó 4 cadenas de ADN que confluyen en un punto (3- ó 4-*way junctions* o *holliday junctions*, en adelante 3WJ ó 4WJ).

### Interacción electrostática externa

La estabilidad de las conformaciones plegadas del ADN precisa de las interacciones con cationes metálicos como Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y estas uniones poseen cinéticas de complejación rápidas ( $k_a = 10^8\text{--}10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) pero son poco selectivas con relación a la secuencia. La interacción de moléculas orgánicas catiónicas con el ADN estabiliza el polímero al evitar las fuerzas repulsivas entre los fosfatos provocando además la liberación de contraiones lo que proporciona una contribución entrópica a la energía libre de enlace. El compuesto trinuclear de Pt(II) mostrado en la figura 1 no posee grupos reactivos Pt-Cl y puede unirse al ADN solamente a través de enlaces de hidrógeno con los oxígenos de los fosfatos y por fuerzas de tipo electrostático.



A. Lorente M. J. Fernández

Dpto. de Química Orgánica, Universidad de Alcalá  
Campus Universitario, 28871-Alcalá de Henares, Madrid.

C-e: [antonio.lorente@uah.es](mailto:antonio.lorente@uah.es)

Recibido: 19/05/2008. Aceptado: 21/10/2008.

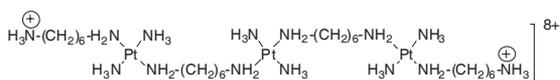


Figura 1. Estructura del complejo de Pt(II) que interactúa con el ADN por enlaces de hidrógeno y por fuerzas electrostáticas.

### Unión al surco

Los surcos mayor y menor difieren en potencial electrostático, en capacidad para establecer enlaces de hidrógeno, en efectos estéricos y en hidratación. Además, la estructura y la conformación del ADN depende de la secuencia. Las fuerzas que intervienen en la unión a los surcos son:

- efectos hidrófobos
- interacciones de van der Waals
- interacciones electrostáticas
- enlaces de hidrógeno

Las aminas policatiónicas se unen externamente al ADN, de hecho algunas, como la espermina, están presentes en las células eucarióticas y es probable que jueguen un papel análogo a las histonas neutralizando las cargas negativas del esqueleto del ADN y facilitando su empaquetamiento.

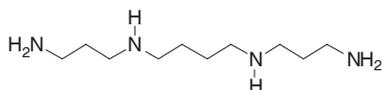


Figura 2. Estructura de la tetraamina espermina.

Hay diferentes estudios que muestran una interacción preferente de la espermina en el surco mayor. Marquet y Houssier<sup>[3]</sup> estudiaron por espectroscopia UV y por dicroísmo eléctrico la interacción de la espermina con poli(dG-dC) y poli(dA-dT) encontrando que con el primero predomina la unión de la espermina con el N7 y el O6 de la guanina, mientras que con poli(dA-dT) es más importante la interacción electrostática con los fosfatos. Estudios de difracción de Rayos-X han mostrado que la espermina se une al ADN-B d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> en el surco mayor interaccionando con los fosfatos de hebras opuestas y con una guanina dentro del surco.<sup>[4]</sup> Por otra parte, Feuerstein y col. estudiaron por métodos de mecánica<sup>[5]</sup> y dinámica<sup>[6]</sup> molecular la interacción de la espermina con oligonucleótidos-B de secuencias alternantes (purina-pirimidina)<sub>n</sub> encontrando que es en el surco mayor donde se produce la unión más estable.

Por otra parte, la unión de las proteínas se produce preferentemente en el surco mayor, que es donde hay más posibilidades de establecer enlaces de hidrógeno con grupos como el imidazol de la histidina, el amino de la lisina, el hidroxilo de la serina, el carboxamido de asparragina y glutamina y el carboxilato del glutamato sin que se produzcan interacciones específicas. Las proteínas pueden establecer también interacciones eficientes a través de los residuos catiónicos (de la arginina, por ejemplo) que pueden formar enlaces de hidrógeno con los oxígenos de los fosfatos o enlaces de hidrógeno bifurcados con la guanina, por ejemplo. Se puede conseguir cierto grado de especificidad modificando los residuos de una proteína determinada o sintetizando péptidos que combinan diferentes unidades cuya especificidad es conocida.

Muchas moléculas pequeñas como, por ejemplo, sistemas aromáticos unidos por enlaces sencillos, interaccionan prefe-

rentemente en el surco menor debido a la libertad torsional que permite al ligando adaptar su conformación a la curvatura y al tamaño del surco.

Los enlaces de hidrógeno con el C(2)=O de la timina y el N-3 de la adenina (Figura 3) son determinantes en las interacciones en el surco menor. En los pares G-C, el grupo amino de la guanina dificulta estas interacciones lo que inhibe la penetración de moléculas pequeñas en el surco menor.

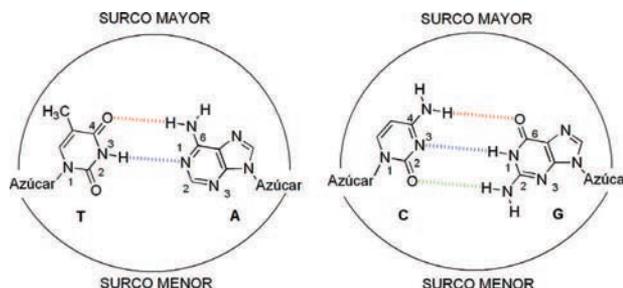


Figura 3. Representación de los pares de bases A-T y G-C y su orientación en los surcos.

Las moléculas que se unen al surco pueden abarcar muchos pares de bases y por lo tanto pueden presentar una alta selectividad de reconocimiento con relación a la secuencia, a diferencia de la mayoría de los intercalantes.<sup>[7,8]</sup>

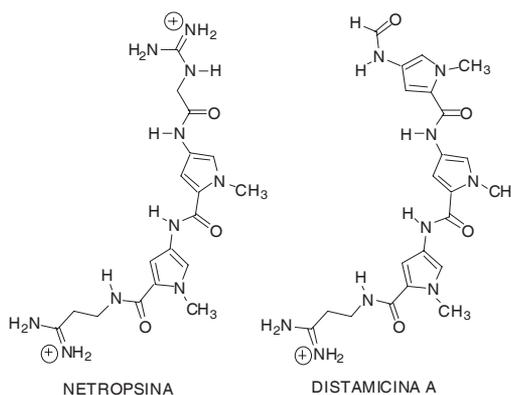


Figura 4. Estructuras de la netropsina y de la distamicina, ligandos específicos del surco menor.

La netropsina y la distamicina A (Figura 4) son ejemplos de lexitropsinas, ligandos específicos del surco menor constituidos por unidades aromáticas unidas por enlaces peptídicos, y se sitúan en el surco menor abarcando 4 y 6 pares de bases A-T contiguas. Además de las fuerzas hidrófobas y los enlaces de hidrógeno, en la netropsina y la distamicina A se producen interacciones entre las cargas positivas terminales y el N-3 de la adenina.

En las lexitropsinas se puede reemplazar uno o más de los anillos pirrólicos por anillos de imidazol que puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno y así establecer una interacción con el grupo amino de la guanina, (Figura 5) lo que facilita la interacción de la lexitropsina con los pares de bases G-C.

En la década de los noventa, el grupo de Peter Dervan describió la síntesis de una poliamida con un anillo de imidazol seguido de dos unidades de pirrol (ImPiPi) y encontró que esta poliamida se une como dímero antiparalelo, a una secuencia de cinco pares de bases del tipo 5'-XGXCX donde X puede ser A o T. Ya que los anillos empleados no discrimi-

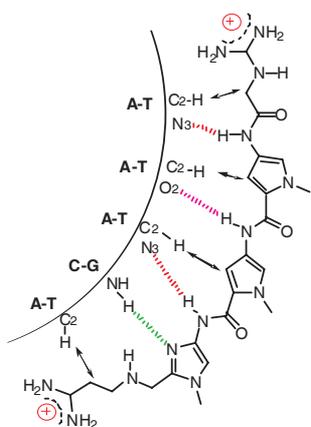


Figura 5. Interacciones de la lexitropsina ImPiPi en el surco menor. La doble flecha representa interacciones de van der Waals.

nan entre los pares de bases A-T y T-A se introdujo un tercer heterociclo, el N-metil-3-hidroxipirrol (Hp) en el que el grupo hidroxilo establece un enlace de hidrógeno selectivo con el carbonilo de la timina. Así pues, tenemos pares de heterociclos que muestran selectividad hacia determinados pares de bases, lo que permite una interacción específica en el surco:

Imidazol / Pirrol	reconoce	G-C
Pirrol / Imidazol	reconoce	C-G
Hidroxipirrol / Pirrol	reconoce	T-A
Pirrol / Hidroxipirrol	reconoce	A-T

Siguiendo estas reglas se pueden diseñar ligandos capaces de reconocer una determinada secuencia de ADN.

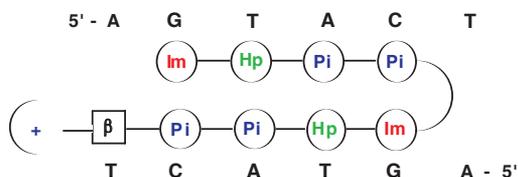


Figura 6. Representación de la interacción de una poliamida en forma de horquilla con una secuencia de ADN 5'-AGTACT.

Los ligandos de poliamida en forma de horquilla (*hairpin polyamide ligands*) presentan una alta afinidad por el ADN, con una elevada especificidad que permite el control de la función génica, y son por ello agentes potenciales para el tratamiento del cáncer.<sup>[9]</sup>

Con relación a la competencia intercalación *versus* unión al surco, es interesante considerar aquellos compuestos que se pueden unir tanto al surco como comportarse como intercalantes. Por ejemplo, el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se une al surco menor del ADN en lugares ricos en secuencias A-T y se une por intercalación en lugares con abundancia de secuencias G-C.<sup>[10]</sup>

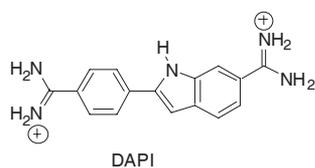


Figura 7. Estructura del DAPI que puede interaccionar con el ADN en el surco menor o por intercalación.

También ocurre en algunos casos que a bajas concentraciones un compuesto se une al ADN por un proceso de intercalación y que a concentraciones más elevadas la interacción se produce en el surco.

## Intercalación

Un intercalante es un compuesto aromático con una superficie óptima aproximada de 39 Å<sup>2</sup> que se puede insertar entre los pares de bases de un ácido nucleico. La superficie mínima corresponde a la del naftaleno y se puede aumentar la interacción si existen anillos bencénicos en las posiciones β del naftaleno que permiten la conjugación con el sistema condensado, ya que en dichas posiciones están ausentes las interacciones de tipo peri. Una característica estructural común de todos los intercalantes es un sistema aromático π-deficiente de dos o más anillos de seis eslabones que corresponde, aproximadamente, a un par de bases nucleicas. La intercalación se puede producir en ambos surcos y las fuerzas que operan son:

- apilamiento (*stacking*)
- interacciones de transferencia de carga
- enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas

Muchos intercalantes son catiónicos a pH 7 y la existencia de cargas positivas en el sistema cíclico o en cadenas unidas a él favorece el proceso de intercalación.

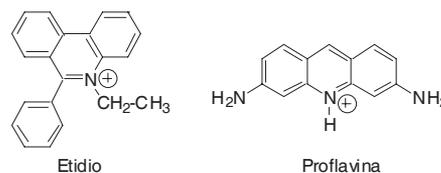


Figura 8. Ejemplos de intercalantes catiónicos.

Estos intercalantes catiónicos interaccionan con el ADN en un proceso en dos etapas: primeramente hay una interacción electrostática con los centros de carga negativa y luego el intercalante se desliza a lo largo de la hélice hasta que encuentra un lugar abierto, provocado por el movimiento térmico de los pares de bases, para que se produzca la intercalación. Las constantes de velocidad para la intercalación son menores que las correspondientes a la unión al surco, y las constantes de velocidad para la disociación son del mismo orden que la de los compuestos que interaccionan en el surco.

Una manera de introducir una carga positiva en un intercalante es incorporar un metal de transición, dando lugar a un metal-intercalante, que se puede emplear para producir la rotura del ADN.

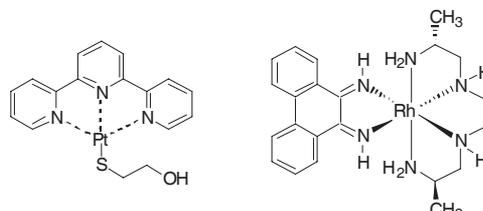


Figura 9. Ejemplos de metal-intercalantes.

Mientras que las unidades plano-aromáticas se insertan en el ADN, el metal y los restantes ligandos permanecen en uno de los surcos, y en algunos casos se establecen enlaces de

hidrógeno entre grupos funcionales del ligando y el carbonilo o el N-3 de la guanina.

Muchos intercalantes poseen sustituyentes, como por ejemplo, carbohidratos (Figura 10) o grupos peptídicos, que juegan un papel importante en a) la especificidad con relación a la secuencia, b) la estabilidad termodinámica y c) la orientación del ligando unido. Esto es debido a la formación de enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes en los surcos.

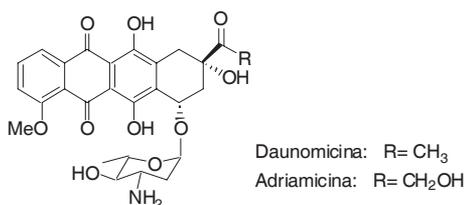


Figura 10. Ejemplos de intercalantes con aminoazúcares como sustituyentes.

Cuando un ligando se intercala en el ADN, las bases deben separar 3.4 Å, para acomodar al ligando, lo que se corresponde con el espesor de van der Waals de un anillo aromático. Esta separación se produce solamente si hay una rotación en torno al esqueleto fosfodiéster, lo que produce un desenrollamiento alrededor del eje de la hélice. Esta modificación estructural interfiere con la acción de las topoisomerasas (alterando el grado de superenrollamiento) y de las polimerasas (inhibiendo la replicación del ADN e impidiendo la corrección de errores).

La intercalación en múltiples lugares de la hélice produce un alargamiento de la misma que origina, a su vez, variaciones en la viscosidad y en el coeficiente de sedimentación del ADN. El incremento de viscosidad asociado con un proceso de intercalación constituye la base de las medidas viscosimétricas como método experimental para poner de manifiesto la existencia de intercalación.

La intercalación es termodinámicamente favorable porque las interacciones pares de bases-intercalante son más fuertes que entre pares de bases. Hay que sumar además el efecto hidrófobo del intercalante en el medio acuoso, es decir, el proceso de intercalación está favorecido por el aumento de entropía que se produce cuando el intercalante pierde la capa de hidratación para alojarse en el lugar hidrófobo de intercalación. El lugar donde se produce la intercalación debe experimentar un cambio conformacional que es entálpicamente desfavorable, compensado porque el desenrollamiento y alargamiento de la hélice provoca un incremento de la distancia de los grupos fosfato y una reducción de la densidad de carga y por lo tanto, una liberación de contraiones que ocasiona un incremento de la entropía del sistema.

Aunque los intercalantes se unen preferentemente a pares G-C y presentan cierta preferencia por los dinucleótidos 5'-pirimidina-purina-3', no presentan generalmente selectividad con relación a la secuencia mientras que los agentes que se unen al surco son más selectivos porque interaccionan con mayor número de pares de bases.

En algunos casos uno de los sustituyentes del intercalante se inserta entre los pares de bases (intercalantes de tipo *threading*). En este tipo de intercalantes se presentan interacciones de apilamiento e interacciones electrostáticas con los fosfatos, y poseen velocidades de asociación y disociación bajas ya que se debe producir la rotura temporal de enlaces de hidrógeno. Medidas cinéticas (*stopped-flow*) permiten poner

de manifiesto si el compuesto que interacciona con el ADN se comporta como un intercalante clásico o de tipo *threading*. Los sustituyentes del cromóforo intercalante se ubican en ambos surcos, donde pueden establecer enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. La nogalamicina y las porfirinas catiónicas, por ejemplo, se comportan como intercalantes de tipo *threading* (Figura 11). En el caso de la nogalamicina la unidad de antraquinona se intercala, quedando el resto de nogalosa en el surco menor y la unidad de aminoazúcar con carga positiva en el surco mayor. Para que se produzca la intercalación uno de los grupos debe insertarse previamente entre los pares de bases.

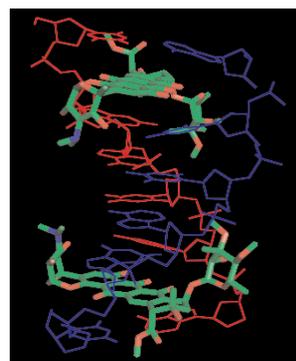
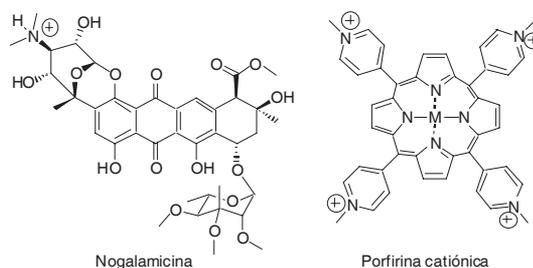


Figura 11. Ejemplos de intercalantes tipo *threading* y estructura de rayos-X del complejo nogalamicina-d(TGATCA)<sub>2</sub> (PDB:182D, C. K. Smith, G. J. Davies, E. J. Dodson, M. H. Moore, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 415).

Se conocen también intercalantes de orden superior como es el caso de los bis-intercalantes que poseen dos unidades intercalantes unidas covalentemente por cadenas de naturaleza y longitud diversas y poseen afinidades significativamente mayores y cinéticas de disociación mucho más lentas que el correspondiente mono-intercalante. Además, debido a que abarcan un mayor número de bases, pueden presentar una selectividad de secuencia mayor. Si se cumple el principio de exclusión de lugares vecinos, que establece que el segundo intercalante no se puede alojar entre los pares de bases adyacentes a las ocupadas por la primera unidad, un bis-intercalante puede abarcar seis pares de bases, del mismo orden que los lugares de reconocimiento de muchas endonucleasas de restricción. La separación ideal de los cromóforos en un bis-intercalante potencial es de 10.5 Å suponiendo que la interacción se produce con exclusión de lugares vecinos. Si no se cumple este principio de exclusión, la bis-intercalación se puede producir entre unidades separadas por, aproximadamente, 7.0 Å.

La bis-antraciclina WP631 que se muestra en la figura 12, contiene dos unidades de daunomicina y se comporta como bis-intercalante con una  $K_{\text{obs}} = 2.7 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , un valor esperado para un bis-intercalante y próximo a los que presentan las proteínas en su interacción con el ADN.

El macrociclo derivado de acridina (SDM) (Figura 13) es un potencial ciclo-bis-intercalante y posee una cadena flexible

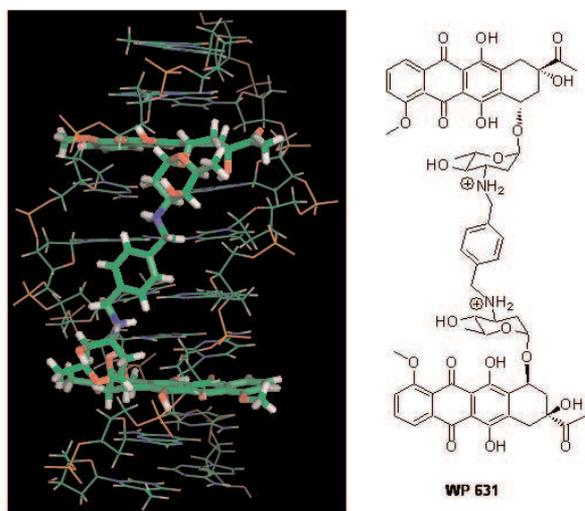


Figura 12. Vista del complejo formado por el bis-intercalante WP631 con  $d(\text{ACGTACGT})_2$  determinada en disolución mediante RMN. (PDB:1AL9, H. Robinson, W. Priebe, J. B. Chaires, A. H. Wang, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 8663).

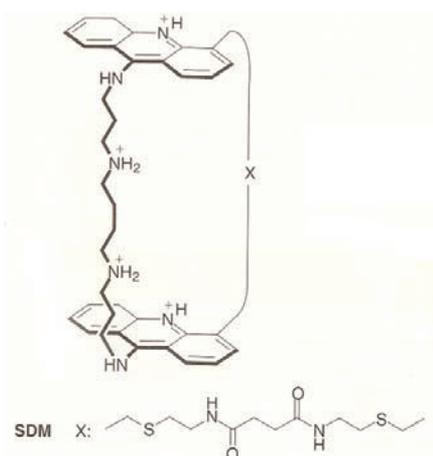


Figura 13. Estructura del ciclo-bis-intercalante SDM.

de aproximadamente 16 Å en la conformación totalmente extendida, que le permite bis-intercalarse en el ADN quedando las dos cadenas alojadas en surcos opuestos.

El macrociclo BisA (Figura 14) que contiene dos unidades de acridina unidas por cadenas de poliamina estabiliza estructuras en horquilla (*hairpin*) conteniendo preferentemente bucles (*loops*) de 3 y 5 adeninas. El BisA estabiliza también undecámeros bicatenarios con un lugar abásico, tal y como se deduce por comparación de la temperatura de desnaturización media ( $T_m$ ) de dicha estructura y la de la doble hebra no modificada. El macrociclo se inserta en el lugar abásico con una acridina reemplazando la base que falta y la otra acridina intercalada entre los pares de bases adyacentes.<sup>[11]</sup>

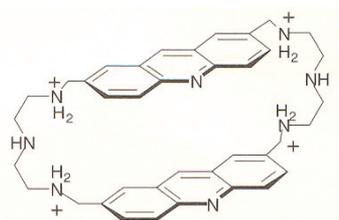


Figura 14. Estructura del ciclo-bis-intercalante BisA.

## Interacciones de moléculas pequeñas con ADN de orden superior

La gran mayoría del ADN del genoma humano es dicatenario y en la conformación B. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que el ADN puede adoptar otras estructuras de orden superior que poseen una importancia biológica notable. Entre ellas se encuentran el ADN de tres o cuatro cadenas o las formas en las que una cadena del ADN adopta una conformación plegada triple o cuádruple.

## Interacción con el ADN triple

Un ADN triple se forma cuando un oligonucleótido monocatenario reconoce específicamente el surco mayor del ADN dicatenario y se forman enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. La formación de estructuras triples por unión a un ADN dicatenario de un oligonucleótido con un número de bases (16–17) que asegure una adecuada selectividad puede inhibir la actividad de un gen determinado, lo que puede tener aplicación, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer y de infecciones víricas. En estas estructuras, una tercera cadena de oligonucleótido se une al ADN en el surco mayor estableciendo contactos específicos con los sustituyentes de los pares de bases y estas triples hélices se forman por apareamientos de bases de tipo Hoogsteen:

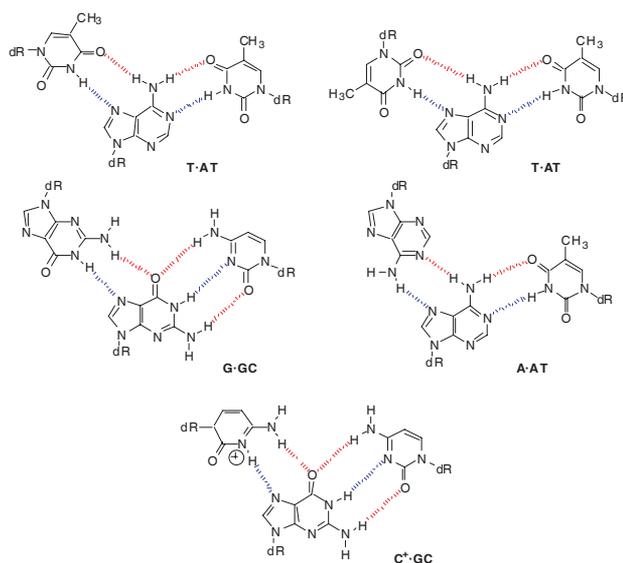


Figura 15. Interacciones entre bases en la formación de triples hélices.

Aunque las estructuras tricatenarias se forman con una especificidad muy elevada, son menos estables que las correspondientes dicatenarias. Una manera de favorecer su formación es emplear ligandos que se unan selectivamente al ADN tricatenario y que desplacen así el equilibrio hacia la formación del mismo. La mayoría de los ligandos que interactúan con el ADN tricatenario poseen, por lo menos, una carga positiva en el cromóforo lo que facilita la interacción por la mayor densidad de carga negativa de la triple hélice. Muchos de estos ligandos poseen además un grupo amino que se protona a pH fisiológico lo que proporciona interacciones electrostáticas favorables con el esqueleto azúcar-fosfato.

El BePI, un benzo[e]piridindol, fue el primer ligando específico del ADN tricatenario descrito en la bibliografía.<sup>[12]</sup>

El BePI (Figura 16) se une al ADN tricatenario por intercalación y este ligando aumenta la velocidad de formación de la triple hélice.

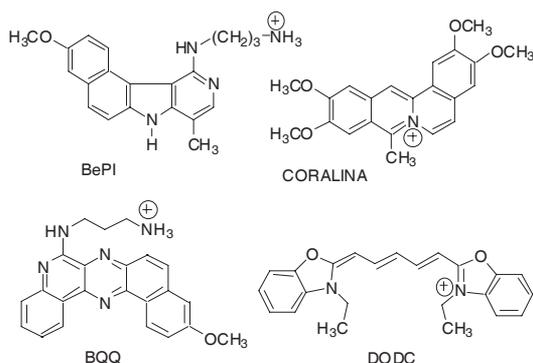


Figura 16. Ejemplos de ligandos que interaccionan selectivamente con ADN tricatenario.

El alcaloide coralina, con cuatro anillos aromáticos fusionados y con un nitrógeno aromático cuaternizado, se une a estructuras triples en posiciones adyacentes a T·AT debido, probablemente, a interacciones desfavorables con el triplete cargado C<sup>+</sup>·GC.

Por el tamaño de sus esqueletos de tipo π los compuestos que se recogen en la figura 16 se pueden insertar en estructuras de doble hebra con su eje mayor perpendicular a los pares de bases. Esto supone que parte de su superficie hidrófoba sobresalga de la doble hélice y quede expuesta al medio acuoso. Por el contrario, en la intercalación en una estructura triple toda la superficie interaccionará con las bases, quedando poco o nada de la misma en contacto con el medio acuoso. La unión covalente del BQQ con la neomicina, que es un ligando que se une al surco, proporciona una unión al ADN tricatenario mucho más fuerte que la de ambos componentes por separado.

Sistemas heterocíclicos condensados menos extensos pueden también interaccionar con el ADN triple. Así por ejemplo, Chaires y Ren<sup>[13]</sup> han comprobado, por diálisis de equilibrio, que la 3,3'-dietiloxadicarbocianina (DODC) interacciona con el ADN triple con una elevada selectividad con relación al ADN cuádruple y mayor que la mostrada por el BePI y la coralina.

Un caso interesante se encuentra con las bis-amidoantraquinonas, que muestran selectividad en función de la posición de sustitución. Los derivados 1,4-disustituidos se unen preferentemente a estructuras dobles mientras que los 2,6-disustituidos son selectivos para el ADN triple.<sup>[14]</sup>

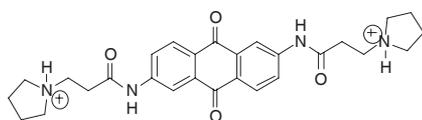


Figura 17. 2,6-Bis-amidoantraquinona que se intercala selectivamente en ADN tricatenario.

Los aminoglicósidos son antibióticos que estabilizan el ADN tricatenario y entre ellos la neomicina (Figura 18) es de los que más estabilizan la estructura triple poli(dA)·2poli(dT) por unión a los surcos.<sup>[15,16]</sup> Además, la neomicina promueve la formación de estructuras triples híbridas ADN/ARN que suelen ser estables a fuerzas iónicas elevadas.<sup>[16]</sup>

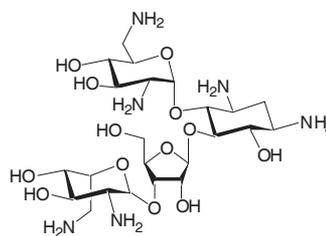


Figura 18. Estructura del aminoglicósido neomicina.

Muchos compuestos diseñados para intercalarse o bien para unirse a los surcos del ADN dicatenario pueden también unirse a estructuras triples del ADN. El compuesto DAPI (Figura 7), que dependiendo de la secuencia se une al surco o se intercala en estructuras dobles, estabiliza por un proceso de intercalación la estructura triple poli(rA)·2poli(dT) que no se forma si no es en presencia del ligando.<sup>[17]</sup> El berenilo (Figura 19) presenta un comportamiento análogo y se une a estructuras triples poli(dA)·2poli(dT) y poli(rA)·2poli(rU) a altas relaciones ligando/ADN presentando mayor afinidad por el ADN triple que por el ARN triple.<sup>[18,19]</sup>

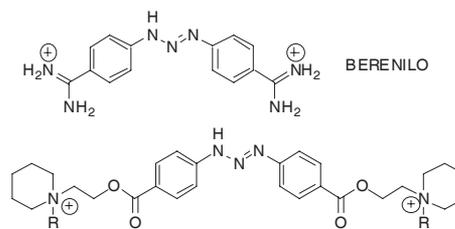


Figura 19. Estructura de 1,3-diariltriazenos que estabilizan selectivamente ADN triple.

Los 1,3-diariltriazenos poseen una superficie cóncava sin interferencias estéricas para que pueda entrar en el surco estrecho de la triple hélice. El ligando posee anillos bencénicos que pueden establecer contactos de van der Waals con las paredes del surco y además tiene grupos que pueden actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno e interaccionar con los grupos dadores de las bases. Las medidas de temperatura de desnaturalización media ponen de manifiesto que los 1,3-diariltriazenos estabilizan el ADN triple en mayor extensión que el doble por unión al surco.

### Interacción de moléculas pequeñas con el ADN cuádruple

Las guaninas se pueden autoasociar formando tetrámeros planos y cíclicos (cuarteto-G o tétrada-G) con enlaces de hidrógeno tipo Hoogsteen. La estabilidad del ADN cuádruple depende del tipo y concentración del contraión presente en la disolución (Figura 20). La mayoría de estas estructuras son estables en disoluciones entre 100 y 200 mM de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. Se cree que estos cationes monovalentes se coordinan a los oxígenos de los ocho grupos carbonilo pertenecientes a dos cuartetos-G consecutivos.

Cuando dos o más guaninas se sitúan en posiciones contiguas en la secuencia de un ácido nucleico, el ADN se puede plegar para formar estructuras cuádruples (*quadruplex* o *tetraplex*). Estas estructuras cuádruples se pueden formar con dos hebras que están dobladas sobre sí mismas o bien por una hebra que se dobla tres veces sobre sí misma (cuádruple

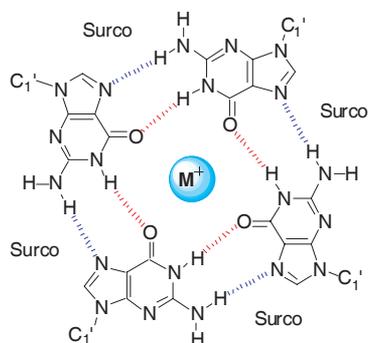


Figura 20. Asociación por enlaces de hidrógeno de cuatro guaninas con la estabilización adicional por interacción con el catión metálico.

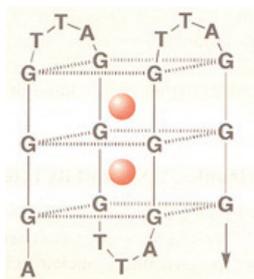


Figura 21. Topología adoptada por un oligonucleótido de telómero humano que contiene repetida la unidad TTAGGG, que se dobla tres veces sobre sí misma en presencia de iones  $\text{Na}^+$ .

intramolecular), o por la asociación de cuatro hebras (cuádruple intermolecular) (Figura 21).

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas situadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos con secuencias altamente repetitivas y enriquecidas en guaninas. La secuencia de bases de los telómeros  $d(\text{T}_{1-3}(\text{T/A})\text{G}_{3-4})$  se repite hasta un número de miles de pares de bases y la cadena rica en guaninas se alarga más allá de la región dicatenaria para formar una hebra sencilla de unos cientos de nucleótidos de largo.

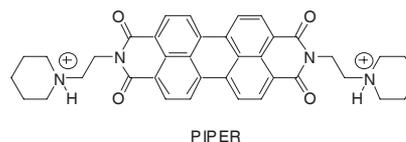
En la mayoría de células cancerosas (85–90% de los casos) los telómeros se alargan por la acción de la telomerasa confiriendo *inmortalidad* a estas células. La estructura de hebra simple es la más adecuada para la actividad óptima de la telomerasa mientras que si los telómeros presentan la conformación plegada cuádruple, se inhibe la acción de la misma.<sup>[20]</sup> Por otra parte, la naturaleza del catión predominante en el medio determina la topología de plegamiento de las estructuras cuádruples y las diferentes formas de plegamiento se encuentran en equilibrio. Las características que debe poseer un compuesto que pueda estabilizar una estructura cuádruple-G son: a) un sistema  $\pi$  deslocalizado con un tamaño adecuado para estabilizar el cuarteto-G por interacciones de apilamiento; b) una carga positiva que se pueda situar en el centro del cuarteto-G que pueda sustituir al  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  que normalmente ocupan este lugar aumentando así la estabilización; c) sustituyentes con carga positiva que puedan interaccionar en los surcos y en los bucles (*loops*) y con los aniones fosfato del esqueleto.

Por ello, el diseño de moléculas pequeñas que estabilicen la estructura cuádruple no es una tarea sencilla pero, a pesar de ello, se han descrito compuestos que estabilizan la estructura cuádruple-G presentando una inhibición de la telomerasa con unos valores de  $\text{IC}_{50}$  en el rango micromolar. Por ejemplo, el macrociclo BisA (Figura 14) es un inhibidor potente de la telomerasa porque estabiliza la estructura G4.<sup>[21]</sup>

La estructura de la porfirina TMPyP4 (tetra-(N-metil-4-piridil)porfirina), posee una disposición coplanar de los anillos aromáticos y unas dimensiones similares al lugar de intercalación del cuarteto-G. Aunque no se conoce con certeza el modo de interacción, se produce en primer lugar, probablemente, un apilamiento externo en el extremo del ADN cuádruple seguido de un proceso de intercalación. El compuesto TMPyP4 estabiliza el ADN cuádruple (espectroscopia UV, dicroísmo circular, RMN) e inhibe la acción de la telomerasa. Varios oncogenes poseen regiones ricas en guanina que pueden formar estructuras cuádruples. La estabilización de estas estructuras con la porfirina TMPyP4 inhibe la transcripción del gen *c-Myc*.<sup>[22]</sup>

Por otra parte, se ha descrito la síntesis<sup>[23]</sup> de un complejo de porfirina-Mn(III) que se une con una gran selectividad a estructuras cuádruple-G y que inhibe la acción de la telomerasa.

El compuesto dicatiónico denominado PIPER (Figura 22) es un derivado del perileno que se une específicamente al ADN cuádruple con una selectividad de 10 a 1, con relación al ADN dicatenario, a pH 7. El PIPER presenta una inhibición de la actividad de la telomerasa ya que favorece el plegamiento del telómero y los estudios de RMN muestran que se une al ADN por apilamiento externo en el extremo formándose un complejo 2:1 en el que el ligando se sitúa entre dos unidades de ADN cuádruple.<sup>[24]</sup>

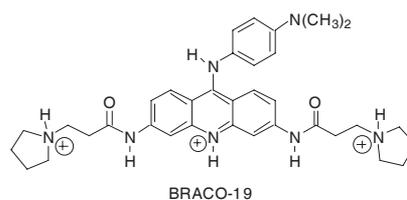


PIPER

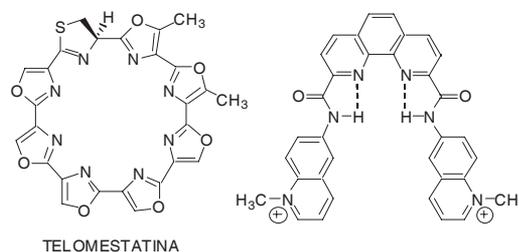
Figura 22. Estructura de un derivado del perileno que se une específicamente al ADN cuádruple.

Hay un gran número de compuestos aromáticos  $\pi$ -deficientes con cadenas cargadas positivamente que estabilizan estructuras cuádruples e inhiben la acción de las telomerasas. El compuesto denominado BRACO-19 (Figura 23) posee una constante de asociación con el ADN cuádruple treinta veces superior que con el ADN dicatenario y su capacidad para inhibir la telomerasa es diez veces mayor que la acridina disustituida más potente.<sup>[25]</sup>

El derivado de 1,10-fenantrolina de la figura 23 estabiliza las estructuras cuádruples del ADN con una gran selectividad en



BRACO-19



TELOMESTATINA

Figura 23. Ligandos representativos que interaccionan con una alta selectividad con ADN cuádruple.

relación con el ADN dicatenario y se comporta de un modo similar al producto natural telomestatina en las mismas condiciones.<sup>[26]</sup>

Se ha descrito también que macrociclos como el trimero con unidades de quinolina mostrado en la figura 24, estabiliza los cuartetos-G en mayor extensión que la telomestatina sin que se produzca una estabilización apreciable de la forma dicatenaria.<sup>[27]</sup>

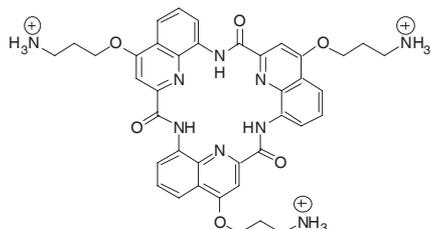


Figura 24. Macrociclo con unidades de quinolina que estabiliza cuartetos-G.

Las cadenas catiónicas confieren solubilidad en agua al compuesto macrocíclico y pueden favorecer la interacción con el ADN por fuerzas electrostáticas o por formación de enlaces de hidrógeno.

El derivado de antraceno mostrado en la figura 25 induce el plegamiento del ADN para formar estructuras cuádruple-G paralelas. El anillo de antraceno se intercala entre los cuartetos-G y la cadena de triamina, protonada a pH fisiológico, se inserta en la estructura supliendo la función de los cationes metálicos.<sup>[28]</sup>

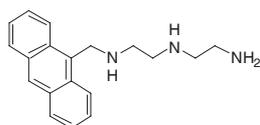


Figura 25. Derivado de antraceno con una cadena de poliamina en posición 9.

En relación con lo anterior y teniendo en cuenta que la porfirina de la figura 26 favorece la estructura cuádruple-G antiparalela, la adición de este ligando desplaza el equilibrio hacia esa estructura tal y como se esquematiza en la figura 27.

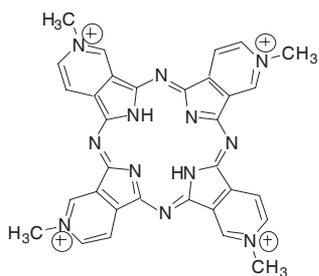


Figura 26. Tetraazaporfirina condensada con anillos de piridinio que estabiliza la estructura cuádruple-G antiparalela.

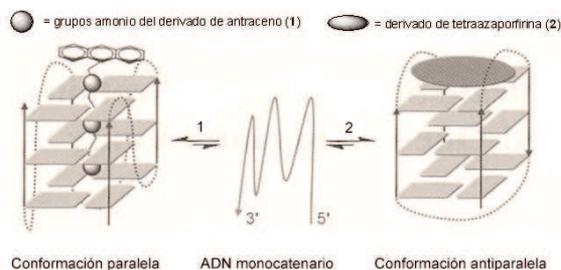


Figura 27. Representación del equilibrio conformacional del ADN cuádruple-G. Reproducido de *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 5405.

### Interacciones con estructuras de cadenas que confluyen en un punto

La falta de especificidad de algunos fármacos que interactúan con el ADN se podría resolver cambiando selectividad de secuencia por selectividad con relación a una estructura singular del ADN, como es el caso de las estructuras ramificadas (3- ó 4-way junctions, 3WJ ó 4WJ) que se esquematizan en la figura 26.

Estas estructuras ramificadas (DNA-junctions) suponen el entrecruzamiento de varias cadenas de ADN de doble hebra que convergen en un punto.

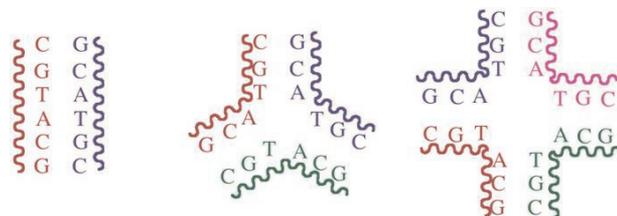


Figura 28. Representación de como un ADN complementario puede formar un ADN de doble hebra, o estructuras de 3 ó 4 dobles hebras que confluyen en un punto 3-way junction (3WJ) ó 4-way junction (4WJ).

La bis-acridina representada en la figura 29 se comporta como un bis-intercalante tipo *threading* con ADN circular, produciéndose la interacción de las cadenas catiónicas con el O-6 y el N-7 de la guanina. Sin embargo la estructura cristalina del complejo de la bis-acridina con d(CGTCAG)<sub>2</sub> en presencia de Co(II) muestra que ambos cromóforos se unen a estructuras 4WJ.<sup>[29]</sup>

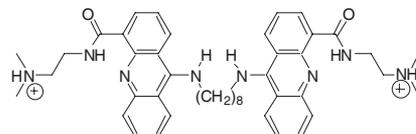


Figura 29. Bis-acridina que interacciona con estructuras 4WJ.

Se ha descrito la síntesis<sup>[30]</sup> de un agregado supramolecular (Figura 30) constituido por tres cadenas de piridilimina que se ensamblan en presencia de Fe(II) y que interacciona con el ADN en el surco mayor.<sup>[31]</sup>

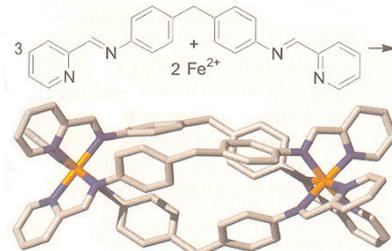


Figura 30. Formación de un agregado supramolecular constituido por tres cadenas de piridilimina que se ensamblan en presencia de Fe(II). Reproducido de *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2503.

Esta especie supramolecular tetracatiónica de forma cilíndrica posee superficies hidrófobas debido a la presencia de doce anillos aromáticos y es similar, en forma y tamaño, a las proteínas que reconocen el ADN e interactúan con el mismo en el surco mayor abarcando cinco o más pares de bases e inducen un enrollamiento del ADN. Su estructura

cilíndrica (Figura 30) encaja perfectamente en la cavidad hidrófoba trigonal existente en el lugar de unión de tres hebras (Figura 31), produciéndose interacciones de apilamiento entre los anillos aromáticos de una cadena del agregado supramolecular y pares de bases A-T del lugar de unión. Además, el hidrógeno de la imina forma enlaces de hidrógeno con el N-3 de la adenina.<sup>[32]</sup>

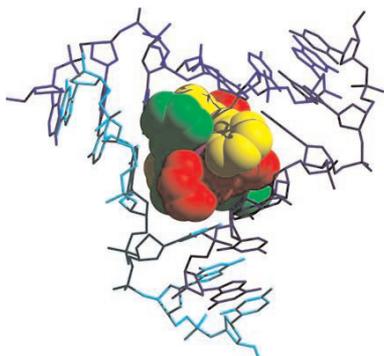


Figura 31. Estructura del complejo cilíndrico de Fe(II) en la cavidad hidrófoba trigonal existente en el lugar de unión de tres dobles hebras. Reproducido de <http://www.chem2.bham.ac.uk/labs/hannon/3wayjunction.htm>.

## Hacia el futuro

La interacción de moléculas pequeñas con el ADN puede utilizarse con el propósito de modificar la regulación de la expresión génica, por lo que es prioritario el desarrollo de intercalantes o de compuestos que interaccionan en los surcos de manera específica, preferentemente con una selectividad de secuencia de al menos 16–17 pares de bases. La posibilidad de regular la expresión génica y la de desarrollar fármacos específicos, está estrechamente relacionada con el reconocimiento de secuencias determinadas del ADN o bien con el reconocimiento de una estructura inusual del mismo. En un futuro próximo los esfuerzos se dirigirán preferentemente hacia el reconocimiento de los surcos y de las superficies aromáticas de estructuras triples o cuádruples de ADN o de estructuras ramificadas de tres o cuatro cadenas de ADN que confluyen en un punto (3WJ ó 4WJ).

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los Drs. Ángel Herráez y Federico Gago profesores titulares de los departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y de Farmacología de la Universidad de Alcalá, respectivamente, por sus comentarios y correcciones que tanto han mejorado el manuscrito original. A la Dra. Lourdes Gude actualmente en el Departamento de Química y Química Biológica de la Universidad de Harvard (EE. UU.) por sus valiosas aportaciones a este trabajo. A la Universidad de Alcalá y a la Comunidad Autónoma de Madrid (proyecto CCG7-UAH/PPQ-1885) por la subvención concedida.

## Bibliografía

- [1] a) M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280–295; b) L. Streckowski, B. Wilson, *Mutat. Res.* **2007**, *623*, 3–13; c) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Eds.: G. M.

- Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams RSC Publishing Cambridge **2006**; d) *Sequence-specific DNA Binding Agents*, Ed.: M. J. Waring, RSC Publishing Cambridge **2006**; e) *DNA and RNA Binders*, (2 vols.) Eds.: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, Wiley-VCH, Weinheim **2003**; f) W. D. Wilson en *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 7 Ed.: E. T. Kool, pp. 427–476, Elsevier, Amsterdam, **1999**; g) *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Ed.: S. M. Hecht. Oxford University Press, Oxford **1996**; h) *Nucleic Acid Targeted Drug Design*, Eds.: C. L. Propst y T. J. Perun, Marcel Dekker, **1992**.
- [2] M. J. Waring, *Ann. Rev. Biochem.*, **1981**, *50*, 152.  
[3] R. Marquet, C. Houssier, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1988**, *6*, 235.  
[4] M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, **1983**, *163*, 129.  
[5] B. G. Feuerstein, N. Pattabiraman, L. J. Marton, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 1271.  
[6] B. G. Feuerstein, N. Pattabiraman, L. J. Marton, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 6883.  
[7] a) C. Zimmer, U. Wähnert, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **1986**, *47*, 31–112; b) B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1995**, *24*, 463.  
[8] P. R. Turner, W. A. Denny, *Curr. Drug Targets*, **2000**, *1*, 1–14.  
[9] a) P. B. Dervan, A. T. Poulin-Kerstien, E. J. Fechter, B. S. Edelson, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, *253*, 1–31; b) P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2215; c) S. White, J. W. Szweczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1998**, *391*, 468; d) J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature*, **1997**, *387*, 202.  
[10] T. A. Larsen, D. S. Goodsell, D. Cascio, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, *7*, 477.  
[11] a) N. Berthet, J. Michon, J. Lhomme, M. P. Teulade-Fichou, J. -P. Vigneron, J. -M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 3625; b) M. Jourdan, J. Garcia, J. Lhomme, M. P. Teulade-Fichou, J. -P. Vigneron, J. -M. Lehn, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 14205.  
[12] J. -L. Mergny, G. Duval-Valentin, C. H. Nguyen, *Science*, **1992**, *266*, 5417.  
[13] J. Ren, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 424.  
[14] K. R. Fox, P. Polucci, T. C. Jenkins, S. Neidle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 7887.  
[15] D. P. Arya, R. L. Coffee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1897.  
[16] D. P. Arya, R. L. Coffee, B. Willis, A. I. Abramovitch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5385.  
[17] Z. Xu, D. S. Pilch, A. R. Srinivasan, W. K. Olson, N. E. Geacintov, K. J. Breslauer, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1137.  
[18] M. Durand, T. N. Thuong, J. C. Maurizot, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1994**, *11*, 1191.  
[19] D. S. Pilch, M. A. Kirolos, K. J. Breslauer, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16107.  
[20] A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature*, **1991**, *350*, 718.  
[21] P. Alberti, L. Guittat, J. -F. Riou, J. B. Chaires, C. Hélène, J. -P. Vigneron, J. -M. Lehn, J. -L. Mergny, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2001**, *19*, 505.  
[22] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2002**, *99*, 11593.  
[23] I. M. Dixon, F. Lopez, J. -P. Estève, A. M. Tejera, M. A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1502.  
[24] O. Y. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V. V. Chemeris, S. M. Kerwin, L. H. Hurley, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12367.  
[25] M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. A. Tanius, S.

- M. Gowan, A. P. Reszka, W. D. Wilson, L. R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 2463.
- [26] A. De Cian, E. DeLemos, J. -L. Mergny, M. -P. Teulade-Fichou, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1856.
- [27] P. S. Shirude, E. R. Gillies, S. Ladame, F. Godde, K. Shin-ya, I. Huc, S. Balusabramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 11890.
- [28] R. Rodriguez, G. Dan Pantos, D. P. N. Gonçalves, J. K. M. Sanders, S. Balusabramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 5405.
- [29] S. C. M. Teixeira, J. H. Thorpe, A. K. Todd, H. R. Powell, A. Adams, L. P. G. Wakelin, W. A. Denny, C. J. Cardin, *J. Mol. Biol.*, **2002**, 323, 167.
- [30] a) M. J. Hannon, C. L. Painting, A. Jackson, J. Hamblin, W. Errington, *Chem. Comm.*, **1997**, 1807; b) M. J. Hannon, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Molderheim, E. Sletten, I. Meistermann, C. J. Isaac, K. J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 880.
- [31] I. Meistermann, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, S. Khalid, P. M. Rodger, J. C. Peberdy, C. J. Isaac, A. Rodger, M. J. Hannon, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **2002**, 99, 5069.
- [32] A. Oleksy, A. G. Blanco, R. Boer, I. Usón, J. Aymami, A. Rodger, M. J. Hannon, M. Coll, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 1227.



The poster for the ICIQ Summer School 2009 features a blue and white color scheme with molecular structures. It includes the ICIQ logo, contact information, and a list of speakers and directors. The background shows a photograph of the ICIQ building.

**ICIQ**  
**summer school**  
Tarragona, July 20-24, 2009  
contact information:  
[iciqsummerschool@iciq.es](mailto:iciqsummerschool@iciq.es)

**Speakers:**

- Prof. Alexandre Alexakis**  
*Université de Genève*
- Prof. Phil Baran**  
*The Scripps Research Institute*
- Prof. Carsten Bolm**  
*RWTH Aachen University*
- Prof. Juan Carlos Carretero**  
*Universidad Autónoma de Madrid*
- Prof. Robert H. Grubbs**  
*California Institute of Technology*
- Prof. Michael J. Krische**  
*University of Texas*
- Prof. Christina Moberg**  
*KTH School of Chemical Science and Engineering*
- Prof. Jay S. Siegel**  
*University of Zurich*
- Prof. M. Christina White**  
*University of Illinois at Urbana-Champaign*

**Directors:**

- Prof. Miguel Ángel Sierra**  
*Universidad Complutense de Madrid*
- Prof. Antonio M. Echavarren**  
*Institut Català d'Investigació Química (ICIQ)*

**intecat**  
**ICIQ**  
Institut Català d'Investigació Química  
Av. Països Catalans 15  
43007 Tarragona (Spain)  
Phone: +34 977 920 200  
Fax: +34 977 920 225  
[www.iciq.es](http://www.iciq.es)