

Sensores fluorescentes de secuencias específicas de ADN de doble cadena

Mateo I. Sánchez, Adrián Jiménez, José L. Mascareñas y M. Eugenio Vázquez*

Resumen: El descubrimiento del origen genético de múltiples enfermedades, así como la influencia del genotipo en la respuesta a medicamentos hace que la detección de secuencias específicas del ADN tenga un enorme potencial diagnóstico y clínico. Actualmente la mayor parte de los métodos de detección específica de secuencias de ADN se basan en la hibridación de fragmentos de ADN de cadena sencilla utilizando secuencias complementarias apropiadamente modificadas con grupos fluorescentes. Sin embargo, las ventajas que puede proporcionar el análisis directo de secuencias de ADN de doble cadena ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para su detección. En este artículo hacemos una revisión de las estrategias que se ha utilizado para ese fin, la mayor parte de las cuales se basan en la modificación de agentes de reconocimiento específicos de tipo poliamida.

Palabras clave: ADN, sensores, fluorescencia, polipirroles, reconocimiento molecular.

Abstract: The detection of specific DNA sequences has an enormous diagnostic and clinical potential because of the genetic origin of many pathologies, and the influence of particular genotypes in the response to medical treatments. Current methods for the specific detection of DNA sequences are based on hybridization of single-stranded DNA fragments to complementary sequences conveniently conjugated to fluorescent reporters. However, the advantages offered by directly probing double-stranded DNA have encouraged the search for new methods for such direct detection. Herein we review the current developments in this field, most of them based in the modification of known double-stranded DNA-binding agents like hairpin polyamides.

Keywords: DNA, probes, fluorescence, polypyrrole, molecular recognition.

Introducción

Hace unos 700 años la epidemia de la peste asoló Europa. Además de causar miles de muertos, la enfermedad provocó una divergencia genética entre las poblaciones europeas y africanas: como la peste era menos agresiva con aquellos individuos que tenían una mutación en un receptor celular llamado CCR5,[§] aquellos que sobrevivieron a la enfermedad pasaron esta mutación a su descendencia. Como resultado de la presión evolutiva de la epidemia, entre un 10 y un 15% de la población europea actual tiene alguna mutación en el gen correspondiente a ese receptor. En África la población no estuvo sometida a la selección que favorecía dicha mutación en el receptor y sólo la presenta un 2% de la población actual. Se ha encontrado que esa pequeña diferencia genética en el receptor CCR5 es una de las razones por las que el SIDA es mucho más agresivo y se ha extendido tan rápidamente en África comparativamente con Europa: el virus utiliza ese mismo receptor para forzar su entrada en las células y los individuos con mutaciones son también más resistentes a la enfermedad.^[1] El desciframiento del genoma humano ha permitido identificar influencias genéticas similares para otras infecciones como la malaria, ha abierto la puerta al conocimiento de los factores genéticos en multitud de enfermedades como la anemia falciforme o el cáncer y está facilitando el desarrollo de métodos de diagnóstico y nuevas terapias más efectivas.^[2]



M. I. Sánchez



A. Jiménez



J. L. Mascareñas



M. E. Vázquez

Dept. de Química Orgánica. Facultad de Química.
Universidade de Santiago de Compostela.
Avda. de las Ciencias sn, 15782 Santiago de Compostela
C-e: eugenio.vazquez@ucs.es
Recibido: 23/04/2009. Aceptado: 08/06/2009.

El material genético de cada individuo es único y las pequeñas variaciones que nos hacen diferentes se conocen como *polimorfismos genéticos*. Las variaciones en pares de bases concretos entre diferentes individuos se conocen con el nombre de *polimorfismo de un solo nucleótido* o SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*). Se cree que a lo largo del genoma hay aproximadamente unos 1.4 millones de SNPs que contribuyen a las diferencias en el fenotipo e influyen las características propias que diferencian cada individuo. Los SNPs puede permitir conocer qué genes contribuyen al desarrollo de enfermedades, o pueden utilizarse como marcadores para evaluar el riesgo de sufrir una determinada patología (existen varios SNPs descritos para la región promotora del gen CCR5). Incluso permiten predecir la respuesta a un tratamiento médico en lo que se ha dado en llamar "*medicina personalizada*" y ya existen empresas dedicadas al análisis genético individualizado. Por ejemplo, la empresa *23andMe* (<https://www.23andme.com>) ofrece, a través del estudio de SNPs, un perfil genético detallado que cubre más de 100 enfermedades con componentes genéticos reconocidos.

Fluorescencia

Las técnicas de fluorescencia han revolucionado la investigación biomédica permitiendo el análisis de la función y organización celular con una precisión y claridad sin precedentes. En la actualidad existen sensores para detectar iones metálicos, cloruro, fosfatos, citrato, glucosa, etc., que han expandido la aplicabilidad de los métodos fluorescentes.^[3] El enorme éxito de las técnicas fluorescentes es consecuencia de su extraordinaria sensibilidad y selectividad, además de rapidez, flexibilidad y simplicidad experimental. Hay que señalar además, que el estudio de los sistemas biológicos está cada

* Abreviaturas utilizadas en este trabajo: CCR5, receptor de quimiocina 5; ssADN, Acido desoxirribonucleico de cadena simple; PNA, péptido-ácido nucleico; dsADN, Acido desoxirribonucleico de cadena doble; Py, pirrol; Im, imidazol; Hp, hidroxipirrol; TMR, tetrametilrodamina; γ , ácido γ -aminobutírico; TO, naranja de tiazol (thiazole orange); GFP, proteína verde fluorescente (green fluorescent protein).

vez más ligado a la probabilidad de visualizar y cuantificar los procesos con suficiente resolución espacial y temporal en su contexto celular. Las técnicas fluorescentes se han mostrado especialmente adecuadas para esta tarea.^[4] En términos simples, la fluorescencia es la emisión de luz por parte de moléculas en estados electrónicos excitados formados como consecuencia de la absorción de radiación (normalmente UV). La molécula excitada se desprende del exceso energético en su transición al estado fundamental en forma de radiación: la emisión de fluorescencia. En principio, las moléculas fluorescentes (llamadas comúnmente fluoróforos) pueden completar el ciclo de absorción/excitación/emisión indefinidamente, dando lugar en cada ciclo a la emisión de fotones; esta capacidad de amplificar la señal es la base de la extrema sensibilidad que caracteriza a la técnica de fluorescencia.

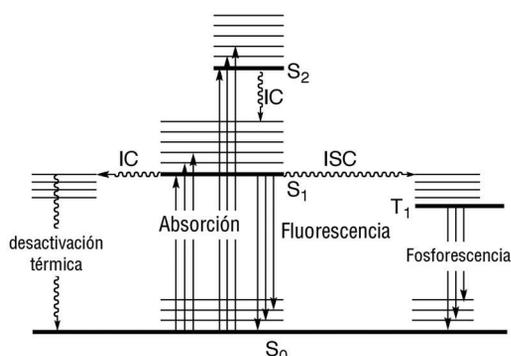


Figura 1. Un diagrama de Jablonski es la forma habitual de representar las transiciones energéticas implicadas en los diversos procesos derivados de la absorción de un fotón y la formación de una especie en su estado electrónico excitado. S_0 es el estado singlete fundamental; S_1, S_2, \dots son estados singletes excitados; T_1, T_2, \dots son estados tripletes. Se representan también los niveles vibracionales de cada estado electrónico como líneas finas. IC: conversión interna (transiciones no radiativas entre estados de la misma multiplicidad de spin); ISC: cruce entre sistemas (transiciones no radiativas entre estados de distinta multiplicidad de spin).

Para el estudio de la fluorescencia hay que tener en cuenta que la vuelta al estado fundamental con emisión de luz es sólo uno de los procesos que pueden sufrir las moléculas en estados excitados y son posibles muchas otras rutas: conversión interna, desactivación térmica o cruce de sistemas seguido de emisión de fosforescencia, además de interacciones con otras moléculas de su entorno dando lugar a procesos de transferencia electrónica, formación de excímeros o exciplejos, etc. Las propiedades fotofísicas (espectroscópicas) de los fluoróforos van a verse afectadas por estos procesos, y de esta forma es posible estudiar sus interacciones con el medio que les rodea, lo cual constituye la base para el desarrollo de sensores fluorescentes.

Reconocimiento de ADN de cadena sencilla

Muchos de los avances en métodos de diagnóstico están basados en la posibilidad de reconocer de forma efectiva secuencias específicas dentro del ADN. Hasta ahora, se han descrito numerosas técnicas, casi todas ellas basadas en la unión específica por emparejamiento de bases de las cadenas sencillas de ADN (ssADN) con su cadena complementaria.^[5] Una de las aproximaciones más conocidas son los *molecular beacons*, en donde un fluoróforo y un *quencher* (molécula

desactivante de la fluorescencia) se conjugan a los extremos de una cadena ADN en forma de horquilla; la unión de este ADN modificado a su secuencia complementaria provoca un cambio conformacional que aleja el fluoróforo del *quencher*, produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia.^[6] Otra estrategia se basa en los llamados sensores "*Light-up*", consistentes en conjugados de PNA con un fluoróforo de tipo cianina, el *thiazole orange* (TO). El PNA dirige el conjugado a un sitio de hibridación específico, donde la emisión del fluoróforo, relativamente débil en medio acuoso, se ve amplificada por su intercalación entre pares de bases consecutivos.^[7] En ambos casos el aumento de la señal fluorescente depende de la formación de los complejos complementarios con cadenas de ADN de cadena sencilla, lo cual requiere condiciones fuertes para la desnaturalización del ADN de doble cadena original. Con el fin de conseguir mayores sensibilidades en algunos casos se recurre a métodos de amplificación que han permitido llegar a límites de detección del orden de zeptomolar (1 a 500 moléculas de ADN por mL de muestra).^[8]

Aunque todavía en sus primeras etapas de desarrollo, los métodos directos de detección de ADN de doble cadena (dsADN) son especialmente atractivos puesto que, a diferen-

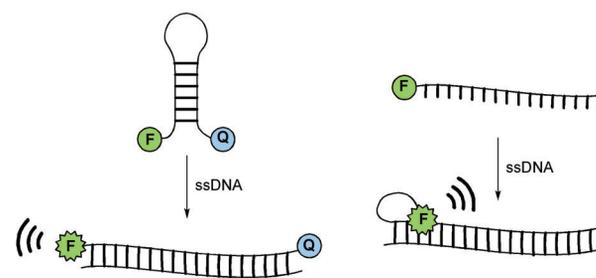


Figura 2. Izquierda. Estrategia de los *molecular beacons* para la detección específica de secuencias de ADN. La estructura plegada de horquilla inicial mantiene el fluoróforo y el *quencher* muy cerca y el sensor no es fluorescente; en presencia de la secuencia complementaria de ADN fluoróforo y *quencher* se separan y se produce un aumento de la emisión de fluorescencia. Derecha. Estrategia de "*Light-up*" que se basa en el aumento de fluorescencia por intercalación de un fluoróforo entre pares de bases consecutivos.

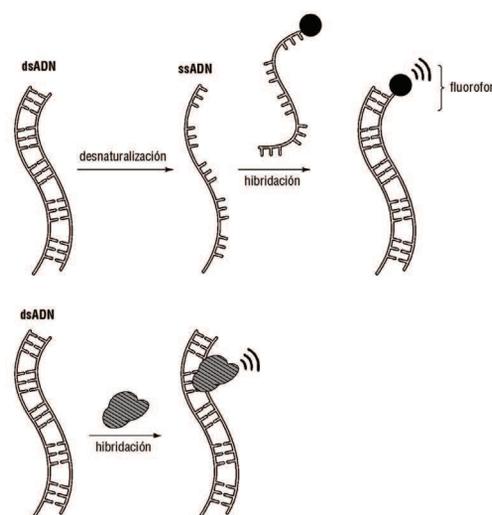


Figura 3. Esquemas generales de las estrategias de reconocimiento específicas de ADN. Arriba: reconocimiento específico a través de la desnaturalización y formación selectiva de dsADN con sensores marcados. Abajo: Detección directa de secuencias de doble cadena de ADN.

cia de los métodos basados en el reconocimiento de ssADN, no requieren las etapas de desnaturalización del dsADN natural. Sin embargo, el desarrollo de agentes de reconocimiento de secuencias específicas de ADN de doble cadena no es sencillo y por eso los avances en este campo han sido lentos.

Características estructurales de dsADN

Con el fin de entender las dificultades asociadas al desarrollo de agentes de reconocimiento específico del ADN es conveniente dar una visión general de la estructura del ADN y de sus implicaciones para el diseño de dichos agentes. Como es bien sabido, el ADN forma una doble hélice en donde las dos cadenas antiparalelas de desoxiribonucleótidos están asociadas a través de enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. La estructura tridimensional del dsADN es consecuencia de la geometría y preferencias conformacionales de las pentosas, así como de la naturaleza hidrofóbica de las bases, que tienden a minimizar su superficie de contacto con el agua.^[9]

La doble hélice del ADN puede adoptar diferentes conformaciones dependiendo de las condiciones (pH, fuerza iónica del medio, disolvente, etc.), sin embargo, la estructura más relevante en condiciones fisiológicas es la forma B, por lo que es pertinente resaltar alguna de sus características estructurales:^[10] La geometría de los azúcares hace que el ADN-B forme una hélice con dos surcos de diferente tamaño y con atributos geométricos diferentes llamados *surco mayor* y *surco menor*. El surco mayor es ancho, y relativamente poco profundo, mientras que el surco menor es más estrecho, (ver Figura 4) con una anchura muy variable que depende de la composición de los pares de bases. En general el surco menor es mucho más estrecho en regiones ricas en pares de bases A/T. Las bases nitrogenadas se disponen perpendiculares al eje de la hélice del ADN, formando pares de bases enfrentadas a través de puentes de hidrógeno complementarios; esto hace que queden expuestos en cada uno de los surcos grupos funcionales diferentes, que son los que permiten el reconocimiento específico de secuencias.

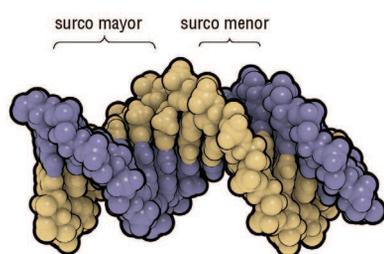


Figura 4. Estructura de una cadena de dsADN en conformación B mostrando los dos surcos que se observan. El surco menor (profundo y estrecho) y el surco mayor (ancho). Cada una de las dos hebras del dsADN están marcadas con distintos colores.

Hasta no hace mucho tiempo se conocía muy poco acerca de los fundamentos estructurales de las interacciones específicas entre proteínas y ADN, sin embargo gracias a técnicas de RMN y difracción de rayos X, hoy en día se dispone de bastante información al respecto. La mayoría de las proteínas que reconocen el ADN no suelen afectar en gran medida a la interacción entre las bases, pues el reconocimiento tiene lugar a través de los grupos funcionales expuestos en los surcos. La

variabilidad funcional presente en el surco mayor es mas grande que en el surco menor. De hecho, mientras que en el surco mayor es posible distinguir patrones de grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno diferenciados para cada una de las combinaciones de pares de bases (A-T, T-A, G-C, C-G), en el surco menor los pares de bases A-T y T-A presentan patrones de formación de puentes de hidrógeno muy similares, lo cual dificulta enormemente su reconocimiento selectivo (ver Figura 5).

La mayor información presente en el surco mayor así como su geometría y tamaños, ideales para la interacción con cadenas peptídicas en forma de hélice α , hacen que el surco mayor sea la posición preferida para el reconocimiento de ADN por parte de las proteínas naturales. Por el contrario, la geometría estrecha del surco menor favorece la interacción con moléculas planas que son capaces de insertarse en el interior del surco,^[11] o la unión con cadenas peptídicas en conformación extendida que en muchos casos se observan como interacciones complementarias al reconocimiento selectivo de secuencia que se lleva a cabo en el surco mayor.^[12]

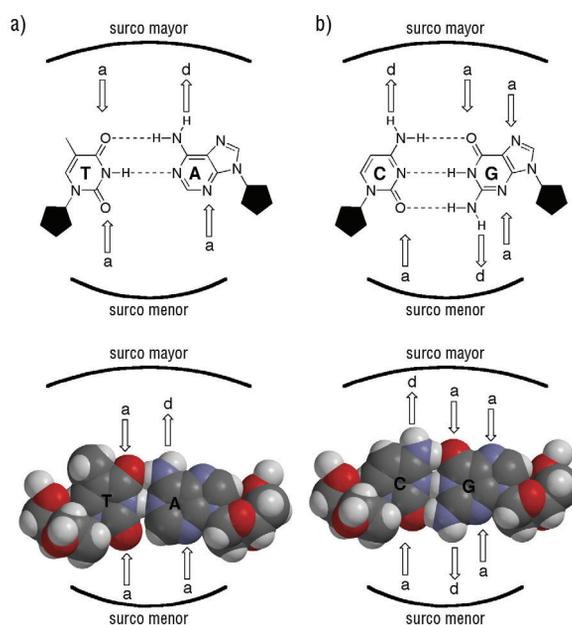


Figura 5. Representación del patrón de dadores y aceptores de puentes de hidrógeno en los pares de bases del ADN mostrando la diferencia en los surcos mayor y menor. Representación de los mismos pares de bases en CPK ilustrando la similitud en el patrón de aceptores en el surco menor de pares A-T.

Interacción de moléculas en el surco menor del ADN

Se conoce un gran número de moléculas de tamaño relativamente pequeño capaces de interactuar con el ADN, sin embargo la mayoría lo hacen con una afinidad y especificidad relativamente baja (comparadas con las de los factores de transcripción y proteínas). Una de las consecuencias de la relativa poca afinidad y especificidad es que su utilización en el tratamiento de enfermedades como el cáncer está muy limitada debido a la toxicidad asociada a su promiscuidad en el reconocimiento de secuencias. Normalmente las moléculas que interactúan con el ADN se clasifican en cuatro grandes grupos:^[13]

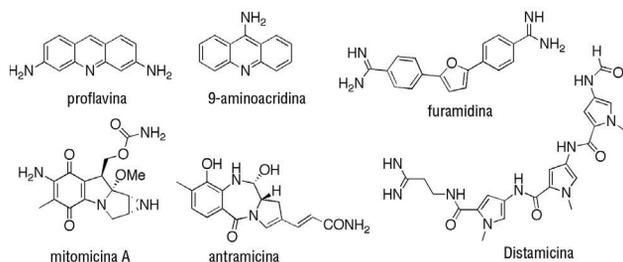


Figura 6. Estructuras de algunos agentes de reconocimiento del ADN: agentes intercalantes como proflavina o 9-aminoacridina, agentes alquilantes como mitomicina A y antramicina, y moléculas como la Distamicina que se insertan en el surco menor del ADN.

a) Moléculas que forman una triple hélice con el ADN: Oligonucleótidos de 10 a 20 pares de bases que son capaces de formar una triple hélice con el ADN reconociendo específicamente una secuencia. Las interacciones se producen en el surco mayor mediante enlaces de hidrógeno entre las bases, formando los emparejamientos conocidos como Hoogsteen.

b) Agentes intercalantes: Es una familia muy grande de compuestos con una gran variedad estructural, desde moléculas planas sencillas como la 9-aminoacridina, o la proflavina a agentes complejos bisintercalantes. Estos compuestos se insertan entre dos pares de bases consecutivos en el ADN como una rebanada de pan en una tostadora. Es un modo de interacción que normalmente no permite mucha selectividad de secuencia.

c) Agentes alquilantes: Moléculas que forman enlaces covalentes con el ADN, tales como la mitomicina, antramicina y CC-1065. Normalmente la alquilación se lleva a cabo en el N7 de las guaninas. En general son moléculas con grupos electrófilos reactivos como epóxidos o ciclopropanos que al complejarse al ADN forman enlaces covalentes.

d) Moléculas que se insertan en el surco menor del ADN: Las moléculas más representativas de este grupo son la Netropsina y la Distamicina A, también conocida simplemente como Distamicina.^[14] Estos compuestos son productos de origen natural que muestran una notable actividad antitumoral y antiviral derivada de su capacidad para interactuar con notable afinidad con el ADN. Desde el punto de vista estructural ambos antibióticos consisten en unidades de N-metilpirrolo-carboxamido conectadas a través de enlaces peptídicos. Además, poseen cadenas terminadas en grupos amidinio o guanidinio que parecen jugar un papel importante en su interacción con el ADN por atracción electrostática.

Durante los últimos años se han obtenido una gran cantidad de datos sobre las características estructurales y biofísicas de la interacción de los antibióticos polipirrólicos con el ADN. Estos datos confirman que estos compuestos se unen a la forma B del ADN en secuencias ricas en pares A/T. La estructura de rayos X del complejo entre la Distamicina y un ADN de doble cadena conteniendo la secuencia ds(CGCAAATTTGCG) indica que la molécula se inserta en el surco menor ocupando la zona central ds(AATT). La versatilidad de este tipo de estructuras basadas en polipirroles ha permitido por ejemplo la síntesis de híbridos con azúcares para estudiar de forma detallada la interacción de carbohidratos con el ADN demostrando el efecto de la naturaleza del azúcar en la unión selectiva al surco menor del ADN.^[15]

En 1992 el grupo de Wemmer descubrió mediante estudios de RMN que en la secuencia ds(AATTT) es factible la formación de complejos en los que se insertan de forma antiparalela dos moléculas de Distamicina,^[16] habiéndose obtenido

más recientemente una estructura de rayos X que confirma dicho modo de interacción.^[17] La observación del modo de unión 2:1 fue un modelo para que el grupo de Dervan iniciara una investigación muy intensa en el área que le llevó a descubrir que uniendo de forma covalente dos moléculas derivadas de la Distamicina es posible obtener agentes, denominados poliamidas en horquilla, con una afinidad y especificidad mucho mayor que la Distamicina y sus análogos más simples.^[18]

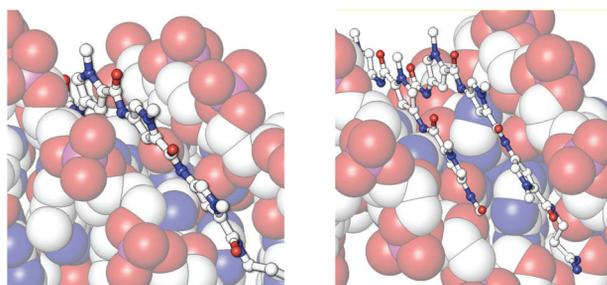
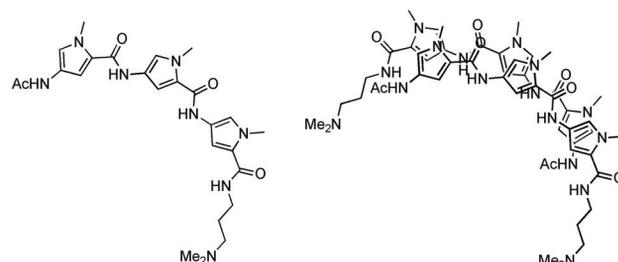


Figura 7. Izquierda: estructura de una poliamida derivada de la Distamicina, y su complejo de rayos-X con el ADN; derecha: la interacción de dos poliamidas da lugar a complejos 2:1 con el ADN. Este modo de unión constituyó la base para el diseño de las poliamidas en horquilla.

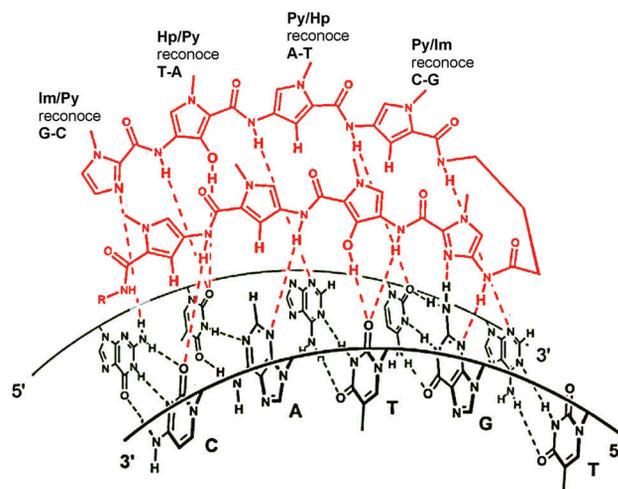


Figura 8. Arriba: Estructura tridimensional de las interacciones que se establecen en el reconocimiento del surco menor del ADN por parte de poliamidas en horquilla derivados de Distamicina (Figura modificada de la ref. 20). Abajo: representación esquemática las interacciones de puentes de hidrógeno responsables de la selectividad

Después de una gran cantidad de estudios en los últimos años, se ha llegado a identificar un código basado en la utilización de unidades de pirrol (Py), imidazol (Im) e hidroxipirrol (Hp) que permite el diseño racional de poliamidas que pueden ser dirigidas a cualquier tipo de secuencia de dsADN en el surco menor. Dicho código predice que los pares Im/Py reconocen pares de bases G-C, Py/Im reconoce C-G, Hp/Im

reconoce T-A e Im/Hp reconoce A-T; el par Py/Py es degenerado para A-T o T-A. Los compuestos así obtenidos son capaces de interactuar con secuencias seleccionadas con afinidades del orden de nanomolar e incluso subnanomolar. Estos trabajos de Dervan han abierto muchas expectativas incluso para su posible utilización en estudios *in vivo*.^[19] La extraordinaria versatilidad de este tipo de poliamidas en horquilla hace que sean soportes ideales para el desarrollo de agentes fluorescentes que pueden permitir la identificación de secuencias selectivas del ADN.

Híbridos poliamida-fluoróforos como sensores específicos de ADN de doble cadena (dsADN)

Las poliamidas en horquilla fueron utilizadas inicialmente para el marcaje *in vivo* de regiones repetitivas en los telómeros. Para el diseño de estos agentes de reconocimiento fluorescentes se utilizaron combinaciones adecuadas de heterociclos (pirrol / imidazol / hidroxipirrol) para dirigir selectivamente los agentes de reconocimiento a la secuencia repetitiva característica de los telómeros de ADN ds(TTAGG).^[20] Como los sistemas poliheterocíclicos derivados de la Distamicina presentan una emisión de fluorescencia intrínseca muy débil, los investigadores modificaron las poliamidas en horquilla derivatizándolas con *Texas Red*, uno de los fluoróforos más comúnmente utilizados en microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. El conjugado resultante de la poliamida en horquilla con el *Texas Red* es un agente con capacidad de reconocimiento selectivo de ADN a través de la poliamida y propiedades fluorescentes derivadas del *Texas Red*. Con este compuesto fue posible estudiar los telómeros en cromosomas de diferentes tipos de células por microscopía de fluorescencia.^[21] Este tipo de moléculas, sin embargo, han de ser consideradas más como marcadores fluorescentes que como sensores, puesto que la señal fluorescente del *Texas Red* no se ve afectada por la unión al ADN. El primer ejemplo de un verdadero sensor basado en poliamidas en horquilla fue publicado por el grupo de Peter Dervan en el año 2003,^[22] y consiste en una poliamida en horquilla a la cual se le une directamente un fluoróforo de *Tetrametil rodamina* (TMR), (Figura 9).

El diseño del conjugado horquilla-TMR es similar al de los marcadores de telómeros, con un módulo de reconocimiento

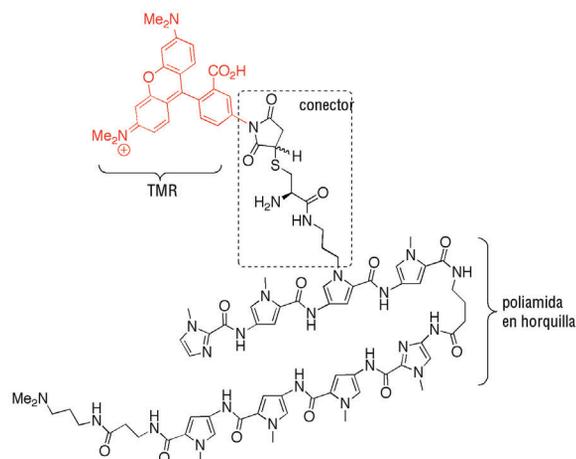


Figura 9. Estructura del conjugado de la poliamida en horquilla ImPyPy(TMR)Py- γ -ImPyPyPy- β mostrando el conector con la tetrametil rodamina (TMR).

consistente en una poliamida en horquilla (con combinaciones de heterociclos concretas para la unión a las secuencias deseadas) conjugado a un grupo fluorescente (TMR) a través de un conector muy corto.

El diseño del conector favorece que, en ausencia de ADN, se establezcan interacciones hidrofóbicas entre la TMR y la horquilla de poliamidas. Esas interacciones favorecen procesos de transferencia electrónica entre una unidad de N-metil pirrol y la TMR excitada, dando lugar a un proceso eficiente de desactivación no radiativa.^[23] La unión específica de la horquilla a la secuencia objetivo en el surco menor del ADN provoca cambios conformacionales en el sensor, que dificultan esas interacciones y provocan la modulación de la emisión de fluorescencia, observándose un aumento de unas 10 veces en la intensidad de emisión de la TMR. Los autores comentan que al probar otros análogos con conectores más largos la fluorescencia de la TMR es más o menos independiente de la interacción con el ADN, debido probablemente a que la flexibilidad del conector dificulta la asociación de la TMR con la horquilla, aislándola electrónicamente.

Como un primer paso en la implementación de un sensor de este tipo para detectar variaciones específicas de secuencia en fragmentos de ADN genómico, los autores estudiaron sistemáticamente el aumento en la señal fluorescente provocado por la interacción del sensor con diferentes secuencias de ADN, encontrándose una buena selectividad de secuencia. El diseño modular de estos sensores híbridos TMR/poliamidas en horquilla permite predecir la selectividad de secuencia; esto unido a la facilidad de síntesis y la especificidad ha permitido su utilización para la validación de ensayos de *high-throughput* para la determinación exhaustiva de perfiles de reconocimiento de secuencias de dsADN.^[24]

Posteriormente se desarrolló otro mecanismo para conseguir la modulación de la señal de emisión. Fetcher *et al.* han uti-

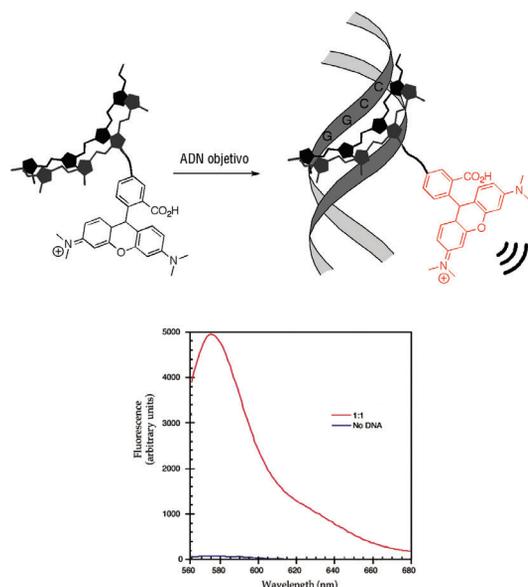


Figura 10. Arriba, Representación esquemática de la poliamida en horquilla modificada con Tetrametil rodamina (TMR) y el cambio de fluorescencia que se observa cuando se produce la unión al surco menor del ADN de doble cadena reconociendo la secuencia para la cual ha sido diseñada ds(GTACA). Abajo, espectro de fluorescencia en ausencia de ADN (línea azul), y en presencia de ADN (línea roja), mostrando el aumento en la señal fluorescente de la TMR (adaptado de la Ref. 22).

lizado conjugados entre horquillas y el agente intercalante *thiazole orange* (TO), que dan lugar a sistemas semejantes a los utilizados en los sensores de tipo "Light-up". En estos sensores el cambio fluorescente es debido a la inserción del TO entre pares de bases consecutivos del ADN. Esto sólo ocurre cuando el módulo de reconocimiento específico (la poliamida en horquilla) se encuentra unida a su secuencia diana.

Las estructura concreta del sensor consiste en una horquilla de tipo ImPyPyPy- γ -ImPyPyPy- β -PEG₂-TO (ver Figura 11). El conector de polietilenglicol (PEG) le da al conjugado la suficiente flexibilidad para que la interacción selectiva en el surco menor de la poliamida con su secuencia objetivo permita la intercalación simultánea del TO entre dos pares de bases consecutivos situados adyacentes. Además de la horquilla indicada, los autores demostraron la generalidad de la estrategia diseñando otras dos horquillas de Py/Im dirigidas a secuencias de dsADN alternativas. A diferencia del modelo previo, en donde la fluorescencia se induce por un efecto de separación entre la poliamida y el fluoróforo que dificulta el proceso de desactivación, en este caso la fluorescencia aumenta como consecuencia de la interacción directa del fluoróforo con las bases del dsADN.[25]

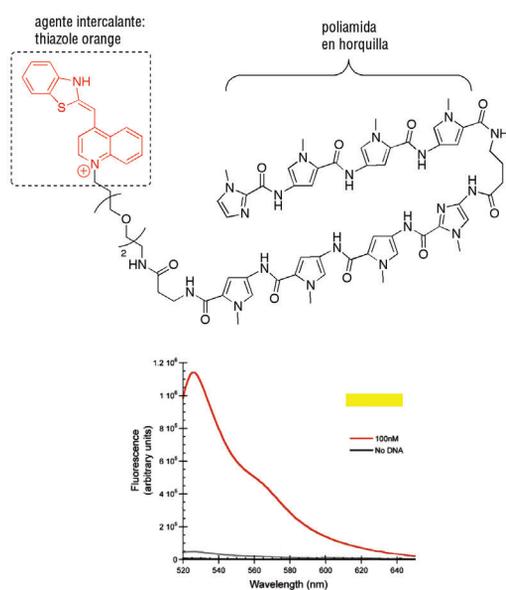


Figura 11. Arriba: Estructura del sensor ImPyPyPy- γ -ImPyPyPy- β -PEG₂-TO mostrando el TO en rojo. El conector β -PEG₂ da flexibilidad al sistema y permite la interacción simultánea de ambos componentes del sensor, el de reconocimiento y el fluorescente; y Abajo: Aumento de la fluorescencia como consecuencia de la intercalación del TO entre bases del ADN consecutivos (modificado de la ref. 25).

Este sensor es especialmente interesante puesto que las propiedades fluorescentes del TO pueden ser modificadas de forma relativamente sencilla para adaptar sus parámetros espectroscópicos a diferentes necesidades experimentales. Además, la fluorescencia de los conjugados en ausencia de ADN es despreciable, sin embargo, en presencia de 100 nM en ADN de doble cadena con la secuencia objetivo de la horquilla, se observa un aumento de más de 1000 veces en la emisión de fluorescencia del TO. Con el fin de comprobar la selectividad se incubaron diferentes horquillas diseñadas para interaccionar con secuencias alternativas de dsADN y con oligonucleótidos control con distintas mutaciones. Se observó en todos los casos una excelente selectividad, de manera que

sólo se producía un aumento significativo de la emisión de fluorescencia cuando cada horquilla se enfrentaba al oligonucleótido que contenía la secuencia para la cual había sido diseñado, sin dar ninguna respuesta ante otras secuencias alternativas. Los estudios de detección fluorescente se llevaron a cabo con concentraciones de dsADN de hasta 1 nM.[25]

Compuestos con fluorescencia intrínseca

Recientemente el grupo de Dervan ha dado un paso más en el desarrollo de los agentes de reconocimiento basados en poliamidas. En un artículo publicado en 2007 dan cuenta de un nuevo tipo de poliamidas en horquilla modificadas que integran los elementos fluorescentes en su propia estructura de reconocimiento selectivo. Estas nuevas horquillas incorporan los fluoróforos de forma intrínseca, y no requieren de su conjugación a ningún fluoróforo para poder actuar como sensores fluorescentes.[26] Para el diseño de estas horquillas los autores recurrieron a varias combinaciones con bencimidazol, hidroximidazol e imidazopiridina, debido a su similitud estructural con las combinaciones de heterociclos presentes en las poliamidas en horquilla estándar, al tiempo que contienen sistemas aromáticos más extendidos que aportan las propiedades de emisión fluorescente.

Las horquillas así sintetizadas (de las cuales se muestra una en la Figura 12) mostraban un aumento significativo de la fluorescencia en presencia de diferentes secuencias de dsADN. Desafortunadamente, la modificación estructural en este tipo de horquillas con respecto a las estructuras estándar basadas en Py/Im/Hp es dramática y la cinética de la unión al dsADN se ve severamente comprometida, hasta el punto de que experimentalmente se ven obligados a alargar los tiempos de incubación con los ADN hasta 12 horas. De la misma forma, la modificación estructural perjudica la capacidad de reconocimiento. Estudios llevados a cabo con secuencias alternativas de dsADN muestran que la selectividad de secuencia no es tan elevada como en el caso de las horquillas clásicas y en algunos casos, estas horquillas modificadas no

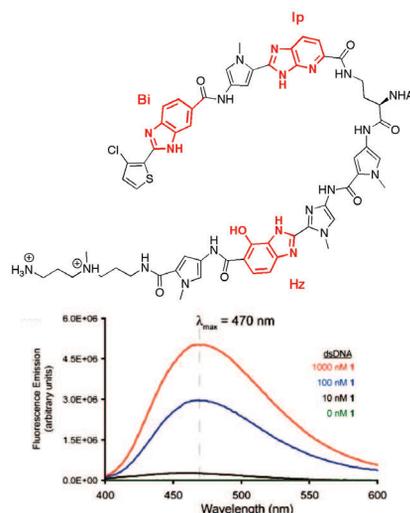


Figura 12. Arriba, estructura de una horquilla fluorescente con unidades de bencimidazol (Bi), imidazopiridina (Ip) e hidroximidazol (Hz). Abajo, espectros de emisión de fluorescencia de la horquilla con cantidades crecientes de ADN después de 12 h de incubación mostrando la dependencia de la fluorescencia de la concentración de ADN (modificada de la referencia 24).

son capaces de distinguir secuencias de ADN en donde hay una mutación. En conjunto la cinética lenta y la menor selectividad de secuencia constituyen una gran desventaja para la aplicación de estas horquillas modificadas como sensores, aunque suponen el primer ejemplo de aumento de fluorescencia debido a la interacción directa de un agente de reconocimiento específico con el ADN.

Además de los ejemplos indicados, existen una serie de compuestos conocidos por sus propiedades fluorogénicas; esto es, compuestos que aumentan su fluorescencia como resultado de la interacción con el dsADN. Compuestos como el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), furamidina, Hoechst 33342 o bromuro de etidio sirven como marcadores fluorescentes de dsADN, actuando tanto por mecanismos de inserción en el surco menor como intercalación. Desafortunadamente la selectividad de secuencia de este tipo de compuestos es normalmente baja o muy baja, por lo que su utilización práctica para la detección específica de secuencias no es posible.

Otros Métodos

Tal y como se indicó en la introducción, el surco mayor del dsADN es más rico en grupos funcionales y permite una mejor discriminación entre secuencias que el surco menor. Sin embargo, a pesar de esa ventaja, hasta ahora no se han desarrollado muchos sensores fluorescentes que actúen reconociendo ese surco por la dificultad para la obtención de agentes sintéticos pequeños con ese modo de unión.

El método más habitual seguido para obtener sensores que actúen a través del dsADN consiste en la utilización de derivados peptídicos de factores de transcripción (proteínas que de forma natural reconocen secuencias específicas para el control de la expresión genética). Un ejemplo sencillo consiste en la modificación con un fluoróforo (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il, o NBD) del fragmento del factor de transcripción GCN4. Se obtiene así un péptido cuya fluorescencia se ve afectada por su interacción con el surco mayor del ADN.^[27] El fluoróforo NBD es extraordinariamente sensible a los cambios de polaridad, hidratación y a la presencia de grupos funcionales próximos. La unión del péptido al surco mayor del ADN provoca un gran cambio conformacional y la modificación del entorno químico alrededor del NBD, lo cual resulta en un aumento de su señal fluorescente.

En un diseño similar a los híbridos de poliamidas en horquilla con TO, se describió la síntesis de un conjugado

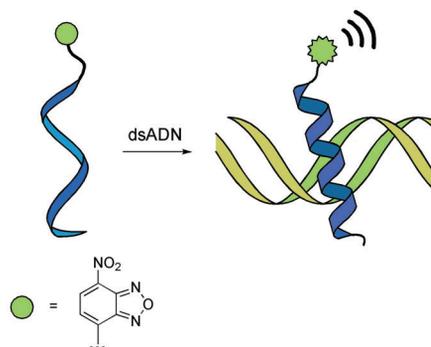


Figura 13. Sensor fluorescente que reconoce el surco mayor del dsADN. El grupo fluorescente NBD cambia su emisión de fluorescencia como consecuencia del cambio conformacional en la cadena peptídica que tiene lugar al unirse el péptido al dsADN.

entre el dominio de reconocimiento del factor de transcripción *Hin-recombinasa* con el agente intercalante *oxazole yellow*. En este caso los conjugados se sintetizaron por modificación de la estrategia normal de síntesis en fase sólida y acoplamiento del fluoróforo a una cadena lateral de Lys selectivamente desprotegida. Los estudios espectroscópicos demostraron que los conjugados presentan una capacidad de discriminación de secuencias similar a la del factor de transcripción natural y que eran útiles para la detección selectiva de las secuencias diana de la proteína (HIN¹, HIN², HIN³ y HIN⁴), aún en presencia de ADN no específico.^[28] Otro ejemplo similar se basa en la modificación del enzima de restricción *EcoRI* con nanopartículas fluorescentes. En este caso los investigadores estaban interesados en el marcaje selectivo de secuencias diana de la *EcoRI* en cadenas largas de dsADN.

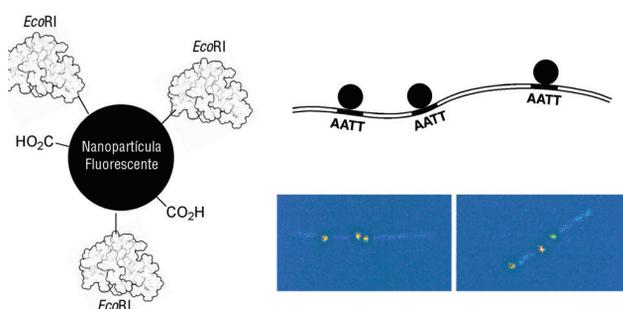


Figura 14. Izquierda: estructura de las nanopartículas modificadas con el enzima *EcoRI*. Derecha: esquema de una cadena de dsADN con nanopartículas modificadas unidas en los sitios reconocidos por el enzima y debajo, imagen de fluorescencia mostrando la unión específica de múltiples nanopartículas modificadas a cadenas de ADN en posiciones definidas por la secuencia de reconocimiento del enzima.

Probablemente la aproximación más exitosa basada en el uso de factores de transcripción consiste en la modificación de los dominios de reconocimiento de proteínas llamadas *dedos de zinc*. Los dominios de reconocimiento de estas proteínas se caracterizan por unidades de unos 30 amino ácidos cuya estructura con dos láminas β y una hélice α ($\beta\beta\alpha$) está estabilizada por la formación de complejos entre iones de Zn^{+2} con cadenas laterales de residuos de His y Cys. Cada una de estas unidades $\beta\beta\alpha$ reconoce una secuencia de unas 3 ó 4 pares de bases, según la naturaleza de los amino ácidos en la hélice α de reconocimiento.^[29]

La aplicación de técnicas combinatorias ha permitido obtener mutantes de estos dominios de unión para reconocer una gran variedad de secuencias de dsADN cortas, que al encadenarse entre sí permiten dirigir los oligómeros resultantes a secuencias específicas más largas. La conjugación de un oligómero con GFP permite el marcaje altamente selectivo de la secuencia diana de un dedo de zinc, pero para conseguir un sensor es necesario modificar este sistema sencillo para que se produzca un cambio selectivo en la señal de fluorescente como consecuencia del reconocimiento específico de secuencias de dsADN.

Una de las aproximaciones más originales y efectivas para la obtención de sensores fluorescentes basados en el reconocimiento de dedos de zinc consiste en la aplicación del ensamblaje de fragmentos proteicos dependiente del reconocimiento del dsADN. En esta aproximación se utilizan dos péptidos, cada uno de los cuales contiene un oligómero de

dedos de zinc para dirigir el reconocimiento, y un fragmento de una proteína GFP. Cuando los dos péptidos se unen a secuencias de dsADN consecutivas (determinadas por los dedos de zinc), los fragmentos complementarios de la GFP se unen, formando una estructura nativa fluorescente. Esta técnica es altamente selectiva, puesto que la GFP fluorescente sólo se ensambla como consecuencia del reconocimiento selectivo del dsADN.^[30]

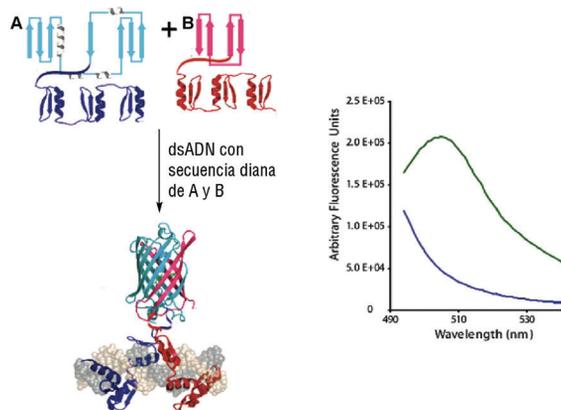


Figura 15. Izquierda: estrategia de ensamblaje de fragmentos de GFP como consecuencia del reconocimiento de secuencias vecinas de dsADN. Derecha: espectros de fluorescencia de la mezcla de los péptidos complementarios A y B en ausencia (azul) y en presencia (verde) de la secuencia diana compuesta por los sitios de unión de A y B.

Una estrategia alternativa para la detección de secuencias específicas de dsADN consiste en el uso de enzimas de restricción y nanoporos sintéticos. En esta estrategia el dsADN (polianiónico) se hace difundir por efecto del campo eléctrico aplicado en una disolución con un electrolito atravesando la membrana que contiene los poros. La permeabilidad de la membrana es diferente cuando el ADN está unido a un enzima de restricción *EcoRI*, debido a que el complejo es mucho más grande, y es muy difícil que atravesase el poro sintético, por lo que el voltaje necesario para que el ADN atraviese la membrana también es distinto en cada caso; en el caso de que el dsADN tenga alguna mutación en la secuencia diana del enzima de restricción (un SNP), el enzima no se une a ese ADN y no se produce esa variación en el voltaje.^[31]

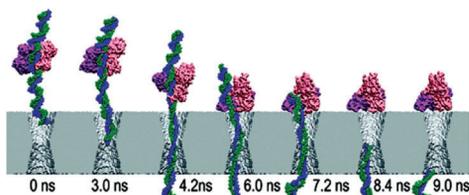


Figura 16. Simulación del complejo de una cadena de dsADN con el enzima de restricción *EcoRI* atravesando un nanoporo en una membrana, mostrando la disociación como consecuencia del campo eléctrico que arrastra la cadena de ADN a través del poro (figura tomada de la ref. 31)

Conclusiones

El campo de la detección específica de secuencias de ADN está dominado por los métodos basados en la hibridación de cadenas sencillas de ADN con secuencias complementarias, pero se están dando los primeros pasos para el desarrollo de

técnicas que permitan estudiar directamente secuencias de ADN en forma de doble cadena. La mayor parte de las técnicas desarrolladas hasta el momento se basan en la utilización de agentes de tipo poliamida en horquillas modificados convenientemente, pero sin duda queda mucho camino por recorrer hasta que estos sistemas sintéticos pequeños puedan dar lugar a métodos generales, versátiles y prácticos con posible aplicación biomédica. Los sistemas basados en proteínas, aunque presentan normalmente mejores especificidades, no están exentos de problemas técnicos asociados al uso de proteínas; además, todavía es imposible seleccionar proteínas que permitan dirigir sensores a cualquier tipo de secuencia deseada. El impulso que está recibiendo este campo debería permitir en un futuro próximo ver el desarrollo comercial de sensores de dsADN.

Bibliografía

- [1] a) S. K. Cohn, L. T. Weaver, *Q. J. Med.* **2006**, *99*, 497–503; b) J. Meccas, G. Franklin, W. A. Kuziel, R. R. Brubaker, S. Falkow, D.E. Mosier, *Nature* **2004**, *427*, 606.
- [2] a) J. G. Hacia, *Nature Genetics Suppl.* **1999**, *21*, 42–47; b) T. Ihara, Y. Chikaura, S. Tanaka, A. Jyo, *Chem. Commun.* **2002**, 2152–2153; c) A. G. Frutos, S. Pal, M. Quesada, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2396–2397.
- [3] a) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*; 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999; b) Y. Yan, G. Marriott, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 635–640; c) D. M. Jameson, J. C. Croney, P. D. Moens, *Methods Enzymol.* **2003**, *360*, 1–43; d) F. Pinaud, X. Michalet, L. A. Bentolilla, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Iyer, S. Weiss, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1679–1687; e) J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, *300*, 87–91.
- [4] a) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999; b) B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002; c) W. T. Mason, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity – A practical guide to technology for quantitative real-time analysis*; Academic Press, San Diego, 1999.
- [5] a) P. E. Nielsen, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 545–550; b) J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833–2838; c) L. Bissonnette, M. G. Bergeron, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 433–450; d) K. K. Jain, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2003**, *3*, 153–161; e) R. Zhao, *Clin. Lab. Sci.* **2005**, *18*, 254–262.
- [6] a) S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53; b) S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [7] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26–35.
- [8] I. Ghosh, C. I. Stains, D. J. Segal, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 551–560.
- [9] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, *Nucleic Acids: structures, properties and functions*, University Science Books, Sausalito, 2000.
- [10] R. Lavery, C. Zardecki, J. Westbrook, *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. S. Neidle, Ed. Oxford Science Pub. Oxford, 1999.
- [11] a) Y. Choo, A. Klug, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 117–125; b) N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Bereman, J. M. Thornton, *Genome Biology* **2000**, *1*, 1–10.

- [12] D. Bosch, M. Campillo, L. Pardo, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 682–691; b) C. Crane-Robinson, A. I. Dragan, P. L. Privalov, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 548–552.
- [13] a) D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 439–461; b) J. B. Chaires, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314–320; c) A. Lorente, M. J. Fernández, *An. Quím.* **2008**, *104*, 280–289; d) S. Neidle, *Biopolymers* **1997**, *44*, 105–121; e) S. Neidle, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291–309.
- [14] a) B. S. P. Reddy, S. M. Sondhi, J. W. Lown, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84*, 1–111; b) P. B. Dervan, R. W. Bürlí, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688–693.
- [15] a) J. N. Martin, E. N. Muñoz, C. Schwergold, F. Souard, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. Cañada, C. Vicent, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518–9533; b) F. Souard, E. Muñoz, P. Peñalver, C. Badía, R. del Villar-Guerra, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, C. Vicent, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435–2442.
- [16] P. Fagan, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1080–1081.
- [17] S. N. Mitra, M. C. Wahl, M. Sundaralingam, *Acta Cryst.* **1999**, *55*, 602–609.
- [18] M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983–7988.
- [19] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Tranger, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12890–12895.
- [20] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284–299.
- [21] K. Maeshima, S. Janssen, U. K. Laemmli, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3218–3228.
- [22] V. C. Rucker, S. Foister, C. Melander, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1195–1202.
- [23] V. C. Rucker, A. R. Dunn, S. Sharma, P. B. Dervan, H. B. Gray, *H. B. J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7490–7494.
- [24] C. L. Warren, N. C. S. Kratochvil, K. E. Hauschild, S. Foister, M. L. Brezinski, P. B. Dervan, G. N. Phillips, A. Z. Ansari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 867–872.
- [25] E. J. Fechter, B. Olenyuk, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16685–16691.
- [26] D. M. Chenoweth, A. Viger, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2216–2217.
- [27] M. Zhang, B. Wu, H. Zhao, J. W. Taylor, *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 125–136.
- [28] M. Thompson, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 507–513.
- [29] S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2009**, *29*, 183–212.
- [30] C. I. Stains, J. R. Porter, A. T. Ooi, D. J. Seal, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10782–10783.
- [31] Q. Zhao, G. Sigalov, V. Dimitrov, B. Dorvel, U. Mirsaidov, S. Sligar, A. Aksimentiev, G. Timp, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1680–1685.



IONER
ION Explorer by Ramem

Electrómetros de ultrabaja corriente (1-10,000fA)



EL-5010: Electrómetro de uso general.



EL-5020: Electrómetro compacto, alimentado por batería y comunicado por protocolo inalámbrico Zig-Bee para medidas de corrientes ultra-bajas sobre altas tensiones. Bias interno $\pm 24V$

Fuente de Electrospray ES-3020



Generación de nanopartículas e iones moleculares a partir de dispersiones y soluciones.

Depósitos de nanopartículas

Fuente de biomoléculas (proteínas, ADN) para espectrómetros de masas

Estudios fundamentales de electro-fluidodinámica

Fuentes de alta tensión AC/DC



HV-7010
•Fuente DC de $\pm 10KV$
•Rizado: 0.001% pp
•Programable
•Salida USB/RS485/Zig-bee



HV-7030
•Fuente AC
•Salida senoidal pura
•Rango de frecuencia: 10kHz-1MHz
•Amplitud 300Vpp
•Salida DC auxiliar DC hasta 50V

Ramem, SA C/ Sambara 33 28027 Madrid Tel: 91 404 45 75 Fax: 91 403 45 96 Email: ioner@ioner.eu Web: www.ioner.eu