

Tesis Doctoral

Síntesis y caracterización de 2'-c-metilnucleósidos en aplicaciones de silenciamiento génico

Pontiggia, Rodrigo Martín

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pontiggia, Rodrigo Martín. (2009). Síntesis y caracterización de 2'-c-metilnucleósidos en aplicaciones de silenciamiento génico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pontiggia, Rodrigo Martín. "Síntesis y caracterización de 2'-c-metilnucleósidos en aplicaciones de silenciamiento génico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 2'-C-METILNUCLEÓSIDOS EN APLICACIONES DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Rodrigo Martín Pontiggia

Director de tesis: Dr. Adolfo Iribarren
Director Asistente: Dr. Javier Montserrat
Consejero de Estudios: Dra. Silvia Moreno

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET),
Laboratorio de Química de los ácidos Nucleicos

Buenos Aires, 2009

Resumen

El presente trabajo se enmarca dentro del campo de los oligonucleótidos, más específicamente los empleados como silenciadores génicos. El uso de ácidos nucleicos en terapia antisentido posee dos limitaciones generales, su baja estabilidad en fluidos biológicos y su pobre biodistribución. Estos problemas pueden ser abordados mediante el uso de modificaciones químicas de los mismos. Según trabajos previos de nuestro laboratorio los 2'-C-metilnucleósidos (2CMNs) producen un aumento de la vida media de ribozimas cabeza de martillo cuando son incorporados en zonas simple cadena manteniendo niveles de actividad *in vitro* aceptables.

En este contexto, el principal objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización de los 2CMNs realizando ensayos en células con la ribozima cabeza de martillo modificada y estudiar la posible utilización de los 2CMN en aplicaciones doble cadena como siRNA.

El primer paso consistió en el diseño de una ruta sintética que permitiera obtener los 2CMNs en forma eficiente y utilizando reactivos más económicos que los empleados en otras estrategias. Para poder preparar los oligonucleótidos a partir de los nucleósidos obtenidos fue necesario resolver problemas asociados a la protección de la posición 2'. Una vez realizado esto, se logró incorporar los 2CMN en oligonucleótidos de 12 monómeros de longitud para el estudio de las propiedades de hibridación y potencial uso en siRNA. Además, estas estructuras fueron modeladas y utilizadas en un estudio computacional que permitió conocer en detalle el impacto de la introducción de los 2CMN en una hélice doble cadena, justificando los resultados experimentales obtenidos.

Para cumplir con el objetivo principal del trabajo, se diseñaron y sintetizaron ribozimas cabeza de martillo para reducir los niveles de expresión del receptor de estrógeno en células de cáncer de mamas, pudiendo cuantificar la relación actividad/resistencia en un contexto celular. La ribozima con 2'-C-metiluridina presentó mayores niveles de actividad que la no modificada, llegándose a observar el efecto en los niveles de receptor hasta 36 hs después de la transfección.

Abstract

The present work can be included in the gene silencing oligonucleotide field. In general, oligonucleotide based technologies suffer two main drawbacks, low stability in biological fluids and bioavailability problems. According to previous research done in our laboratory 2'-C-methylnucleosides (2CMNs) are capable of increasing the half life of ribozymes when they are introduced in certain single chain positions. They have also shown to maintain acceptable activity levels in *in vitro* assays.

These first experiments showed that it was possible to apply 2CMNs in an *in vitro* system. The main objective of this work is to further characterize 2CMNs, carrying out experiments with modified ribozymes in cells and studying their applicability in double stranded systems, with special interest in siRNA. To accomplish the main objective of the thesis different hammerhead ribozymes were designed and synthesized. They were successfully used to reduce the estrogen receptor α transcription levels in breast cancer cells, finding that the ribozyme containing 2'-C-methyluridine showed to be more active than the non modified ones; the activity was detectable up to 36 hours after the transfection. The first step consisted in finding a synthetic route which enabled the possibility of obtaining 2CMNs efficiently and using low price reagents. The synthesis of oligonucleotides using 2CMNs required to find a suitable protecting group for the tertiary 2'-alcohol. After solving these important tasks the building blocks were used to synthesize 12 mer oligonucleotides and used in melting point and circular dichroism experiments. These structures were simulated *in silico* and used to describe their properties.

Agradecimientos

A quienes me acompañaron y apoyaron durante la realización de este trabajo

A Marta por su amor, apoyo y comprensión que fue fundamental durante todos estos años.

A mis viejos, abuelos mis hermanos, especialmente a Ova con quien trabajamos en el sistema celular para probar las ribozimas.

A los Saurí por preocuparse y apoyarme como a un miembro más de su familia.

A Adolfo y Javier por brindarme la posibilidad de realizar el trabajo en su grupo y por guiarme.

A Marisa y Laura con quienes atravesamos el tedioso y complicado camino del doctorado y por ser ante todo dos grandes amigas y a maru por ayudar con los RMN.

A Diego Weinger por su apoyo, amistad y solidaridad.

A todos los integrantes de laboratorio de Dr. Muschiatti y el Dr. Erijman por quienes considero grandes compañeros.

Al resto de mis compañeros del INGEBI, por hacer trabajo diario más ameno.

Al Dr. Torres, la Dr. Flawia, la Dra. Tellez por su buen trato.

A Dr. Mossetti del Hospital Italiano por haber la buena predisposición con su sintetizador.

Al Prof. Joachim Engels y su grupo por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitido realizar todos los experimentos necesarios para completar la tesis.

Al Dr. Darío Estrin y su gente (Pau, Marcelo, Santi) por ayudarme a con las dinámicas moleculares.

A la Dra. Marina Simian por apoyarme y permitirme trabajar junto a mi hermano en el Instituto ángel Roffo.

A Mari, Irma, Alicia, Marta, Mariano(Lenny), Martín (Carl), Dani, Norberto, Gladis , Mari, Leo y Francisco con quienes comparti tantas charlas durante todos estos años.

A todos mis amigos.

INDICE

<u>1 características generales de los ácidos nucleicos</u>	7
1.1- PROPIEDADES ESTRUCTURALES.....	10
1.1.1 RIBOSA.....	10
1.1.2- CONFORMACIONES DE LAS BASES NITROGENADAS	13
ROTACIÓN DE ENLACE GLICOSÍDICO (χ).....	14
ROTACIONES RESPECTO AL ENLACE EXOCÍCLICO C4'-C5'	16
1.1.3 FOSFATO INTERNUCLEOTÍDICO.....	16
1.2 -INTERACCIONES INTRA E INTERMOLECULARES	17
1.2.1 -INTERACCIÓN ENTRE BASES.....	18
1.2.2- INTERACCIONES COMPLEMENTARIAS ENTRE BASES.....	19
1.2.3- INTERACCIONES DE "STACKING"	21
1.3 CONFORMACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS SIMPLE CADENA.	22
1.4 ESTRUCTURA DE OLIGONUCLEÓTIDOS DOBLE CADENA.	24
1.4.1 ESTRUCTURA MACROMOLECULAR DEL ADN Y ARN	25
1.5 Utilización de nucleótidos modificados.....	29
1.5.1 MODIFICACIONES SOBRE EL FOSFATO INTERNUCLEOTÍDICO.....	29
1.5.2- MODIFICACIONES DEL AZÚCAR	30
1.5.3 MODIFICACIONES DE LA BASE.....	32
<u>1.6 - 2'-c-metilnucleósidos</u>	33
ESTRUCTURA DE LOS MONÓMEROS Y PROPIEDADES	33
1.6.1- ANTECEDENTES EN LA SÍNTESIS DE 2'-C-METILNUCLEÓSIDOS	36
<u>1.7 síntesis de oligonucleótidos</u>	43
CARACTERIZACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA MALDI-TOF	47
<u>1.8- aplicaciones de los ácidos nucleicos modificados</u>	48
1.8.1- RIBOZIMAS.....	48
1.8.1.1 UTILIZACIÓN DE RIBOZIMAS COMO HERRAMIENTA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO	51
1.8.1.2-PERSPECTIVAS DE LA RIBOZIMAS	52
1.8.2 SIRNA.....	52
1.8.3- ANTIVIRALES.....	56
1.8.4- OTRAS APLICACIONES	57
<u>1.9- alcances de la tesis</u>	58
<u>2- parte experimental</u>	61
2.1 -MATERIALES	61
2.2 -CROMATOGRAFIA Y MATERIAL PARA PURIFICACIÓN.....	63
2.3 CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIONES.....	63
2.4 MÉTODOS Y EQUIPAMIENTO	64
2.5 METODOLOGÍA	66
2.5.1 SÍNTESIS DE LOS MONÓMEROS.....	66
SÍNTESIS DEL TOM-CL	84
DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS PROTECTORES EN MEDIO ÁCIDO (CICLO DE SÍNTESIS)	85
2.5.2 -SÍNTESIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	86
OLIGONUCLEÓTIDOS ADN.....	86
DESPROTECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE ARN	87
2.5.3 DETERMINACIÓN DEL MELTING POINT Y DICROISMO CIRCULAR.....	89
2.5.4- ESTUDIO COMPUTACIONAL.....	90
2.6 ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE LAS RIBOZIMAS	91
LOS VALORES EXPERESADOS EN LA DISCUSIÓN SON REPRESENTATIVAS DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.	91
WESTERN BLOT.....	92

INMUNOFLUORESCENCIA	92
<u>3- síntesis de los monómeros</u>	<u>95</u>
3.1- OBJETIVO	95
3.2- SÍNTESIS DE 2'-C-METILNUCLEÓSIDOS.....	96
3.3 - BÚSQUEDA DEL GRUPO PROTECTOR PARA LA POSICIÓN 2' DE LAS 2'-C-METIL- FOSFORAMIDITAS.....	107
3.4 - SÍNTESIS DE LAS FOSFORAMIDITAS	112
3.5 - CONCLUSIONES	115
<u>4- síntesis de los oligonucleótidos.....</u>	<u>117</u>
4.1 OBJETIVO	117
4.2 SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.....	118
4.3- DESPROTECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.....	124
4.3.1- UTILIZACIÓN DE ESPECTROMETRÍA MALDI-TOF EN SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS	127
4.4- SÍNTESIS DE LA RIBOZIMAS	128
4.5 CONCLUSIONES	133
<u>5- caracterización de los 2'-c-metilnucleósidos en sistemas doble cadena.....</u>	<u>135</u>
5.1 OBJETIVO	135
5. 2- RESULTADOS	136
5.2.1- ESTUDIOS DE DENATURALIZACIÓN TÉRMICA (TEMPERATURA DE FUSIÓN).....	137
5.3 - EXPERIMENTOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC)	140
5.4 - CONCLUSIONES	142
<u>6- estudio computacional de la influencia del metilo de la posición 2' en la interacción arn-arn doble cadena.....</u>	<u>145</u>
6.1- OBJETIVO:	145
6.1.2- ESTRUCTURA GENERAL	150
6.1.3- PUENTES HIDRÓGENO	155
6.1.4- STACKING.....	157
6.1.5 -PARÁMETROS GENERALES DE HÉLICE.....	162
6.1.6 HIDRATACIÓN.....	164
6.2 CONCLUSIONES	170
<u>7- actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas</u>	<u>171</u>
7.1 OBJETIVO	171
7.2 DISEÑO DE LA RIBOZIMA.....	172
7.3- ACTIVIDAD DE LA RIBOZIMAS EN CÉLULAS	179
CONCLUSIONES.....	183
<u>8 - conclusiones generales</u>	<u>185</u>
<u>Bibliografía.....</u>	<u>189</u>
<u>Anexo</u>	<u>197</u>
ESPECTROS DE RESEÑALIZACIÓN MAGNÉTICA NUCLEAR DEL PRODUCTO DE PARTIDA	197
1- LIBRERÍA DEL MONÓMERO 2'-C-METILURIDINA UTILIZADA EN EXPERIMENTOS DE DINÁMICA MOLECULAR	201
2- INPUT PARA LA DINÁMICA MOLECULAR- TERMALIZACIÓN Y CORRIDA.....	204
3- COMANDO PARA DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO PSEUDOROTACIONAL	206
RMSD OBTENIDO PARA EL OLIGONUCLEÓTIDO CON 2'-C-METILURIDINA.....	209
4 ANÁLISIS DEL ÁNGULO DIHEDRO UTILIZADO PARA EL ANÁLISIS POSICIONAL DEL METILO.....	210
5- SCRIPT PARA EL ANÁLISIS DE LOS PUENTES H	211
6-OUTPUT X3DNA PARA EL OLIGONUCLEÓTIDOS CON UME	211

Introducción
Abreviaturas

2CMNs	2'- <i>C</i> -metilnucleósidos
CALB	<i>Candida antartica</i> lipasa B
CEP-Cl	β -cianoetoxi- <i>N,N</i> -diisopropilaminoclorofosfina
CEE	2 cloro (1-(2-cloroetoxi) etilo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Dicroísmo Circular
DCA	ácido dicloroacético
DHP	dihidropirano
DMAEAO	<i>O</i> -(2-(2-(<i>N,N</i> -dimetilamino)etoxi)etilo
DMT	dimetoxitritilo
MOE	2'- <i>O</i> -((2-metoxi)etil)
ON	oligonucleótido
Py	piridina
RISC	complejo de silenciamiento inducido por ARN
TBDMS	<i>ter</i> -butildimetilsililo
TCA	ácido tricoloroacético
THP	tetrahidropirano
T_m	temperatura de fusión
TOM	Triisopropilsililoximetilo
U*	posición modificada en el oligonucleótido
χ	ángulo del enlace glicosídico
Φ	Coefficiente osmótico
τ^m	amplitud de puckering
P	ángulo de fase o pseudorrotacional
RE α	Receptor de estrógenos alfa

Introducción

1 Características generales de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos consisten de tres elementos estructurales fundamentales, una base nitrogenada, una pentosa y un grupo fosfato. Las distintas combinaciones de azúcares y bases nitrogenadas aportan características estructurales y funcionales a cada tipo de molécula. En este sentido se clasifica a esta familia de compuestos en ácido desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN) según contengan o no un oxhidrilo en la posición 2' de la ribosa. Existen otros que son denominados según el azúcar que poseen como los arabinonucleósidos, los xilonucleósidos entre otros.

En los desoxirribonucleótidos naturales se encuentran mayoritariamente cuatro aminas heterocíclicas como bases, la adenina y guanina son purinas mientras que la citosina y timina son pirimidinas. En el caso del ARN la timina es reemplazada por uracilo, su estructura es idéntica a la de la timina salvo por la ausencia del metilo en el C-5. No obstante, es común encontrar otras bases, especialmente en el RNAt. También es posible encontrar en la naturaleza bases alteradas por modificaciones químicas de las bases naturales, esto aumenta el número de nucleósidos y nucleótidos presentes en la naturaleza (Figura1).

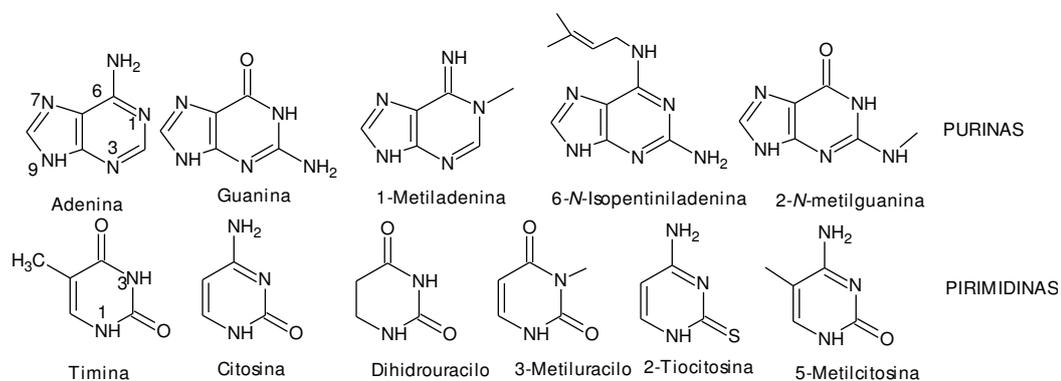


Figura 1- Bases Nitrogenadas más comunes y algunas menos abundantes conocidas como “menores” Los números indican la numeración IUPAC

El tercer elemento de los nucleótidos es el grupo fosfato que se encuentra unido al oxígeno de la posición 5'. Los fosfatos pueden encontrarse como grupos terminales, nucleótidos monofosfato o unidos a otros semejantes como en los difosfato y trifosfato. Además, este grupo es capaz de formar una unión fosfodiéster con el oxígeno de la posición 3' del siguiente nucleótido, este esquema se repite dando lugar a la formación de oligonucleótidos y polinucleótidos (Figura 2).

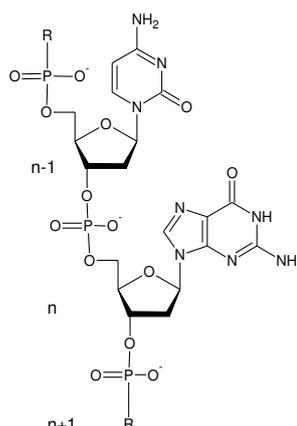


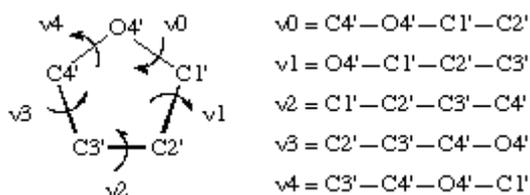
Figura 2-Unión fosfodiéster entre nucleótidos

1.1- Propiedades estructurales

Para comprender las funciones de los ácidos nucleicos es necesario profundizar en sus propiedades. Es posible describir sus elementos estructurales por separado para luego unirlos en un modelo geométrico. El contar con este modelo estructural, permite explicar desde el punto de vista molecular, tanto sus propiedades químicas, como así también algunas funciones biológicas más características.

1.1.1 Ribosa

La conformación del azúcar es uno de los parámetros condicionantes de la estructura de los ácidos nucleicos ya que forma parte tanto del esqueleto fosfato como de la cadena lateral o "side chain". Para poder realizar la descripción de los conformeros es necesario definir una serie de ángulos de torsión endocíclicos (Figura 3).



Figuran 3- Ángulos de torsión endocíclicos de una pentosa

Designar las distintas conformaciones utilizando el valor de cada uno de estos ángulos resultaría complejo, por esta razón se adopta una estrategia más descriptiva:

Los anillos furanósicos no se encuentran en el plano, sino que adoptan conformaciones en las que uno o varios átomos están fuera del plano definido por el

Introducción

resto. Básicamente existen dos tipos de conformaciones, denominada “sobre” (envelope o E), dónde hay un solo átomo fuera del plano definido por los restantes cuatro, y la conformación “torcida” (Twist o T) que presenta dos átomos desplazados fuera del plano definido por los restantes tres. En la Figura 4 pueden observarse ambas conformaciones.

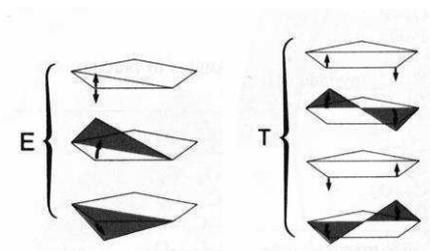


Figura 4 Descripción de conformaciones tipo E (sobre) y T (twist)

Según este modelo podemos definir numéricamente la conformación de un anillo de cinco miembros a partir del ángulo de fase (P) y de la amplitud de puckering (α). El primero nos da información sobre qué átomo o átomos están fuera del plano formado por el resto. Por su parte el segundo parámetro indica que tan fuera del plano están el o los átomos. El cálculo para la determinación de ángulo P (Altona C. 1972) utiliza los ángulos endocíclicos ya presentados (Figuran **3**) y los relaciona a través de la Ecuación 1. El resultado de esta ecuación permite ubicar la conformación de una ribosa dentro del ciclo pseudorrotacional (ver Figura 5). En este ciclo se presentan todas las conformaciones posibles para la pentosa y ordenadas en cuatro zonas diferentes, que se las denomina según los cuatro puntos cardinales. Como se puede apreciar en la Figura 5 la forma de denominarlas es a través de la indicación E o T (designando la conformación envelope o twisted), más un superíndice y un subíndice. El superíndice indica qué átomo es el que está “hacia arriba” del plano, mientras que el subíndice quiere hacer lo propio “hacia abajo”. Así por ejemplo 2_1T será una conformación twisted con el átomo de carbono de la posición -2' hacia arriba y el carbono 1' hacia abajo.

$$P = \frac{(v_4 - v_0) - (v_3 - v_1)}{2 \cdot v_2 \cdot (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}$$

Ecuación 1- Definición del ángulo P

Introducción

Otra forma muy utilizada para designar este tipo de conformaciones es la utilización de los sufijos *endo*, *exo*. En ella se denomina “*endo*” si el átomo que está fuera del plano está “hacia arriba”. Se denomina “*exo*” si dicho átomo se encuentra “hacia abajo” del plano de la pentosa. Por ejemplo, C2’*endo* es una conformación sobre donde el C2’ se encuentra sobre el plano, y C2’*exo*-C3’*endo* es twist con C3’ sobre el plano y C2’ por debajo del mismo.

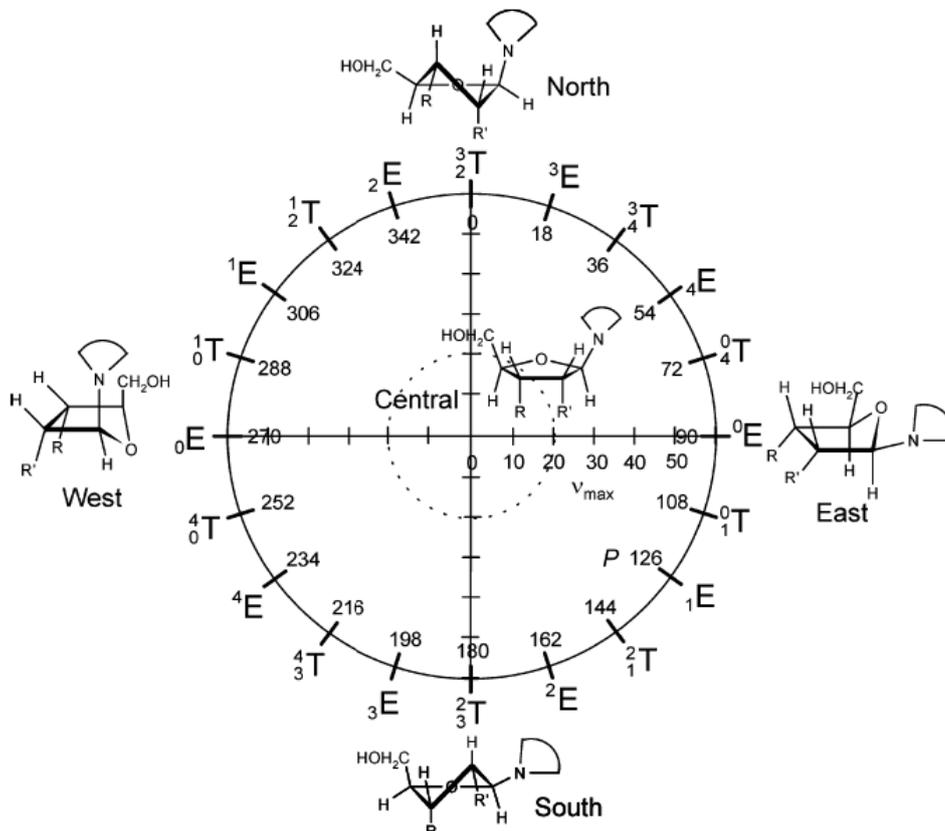


Figura 5- Ciclo Pseudorrotacional P, Se pueden observar todas las conformaciones y puntos cardinales (Sun G. 2004) y las conformaciones intermedias con sus correspondientes valores de P

En líneas generales pueden asumirse algunas simplificaciones en lo que se refiere al equilibrio conformacional de los ácidos nucleicos, en primer lugar las conformaciones N y S son las más estables, siendo la C2’ *endo* y C3’ *endo* las favorecidas. Las barreras energéticas asociadas a los cambios de conformación son bajas por lo que ocurren fácilmente a temperatura ambiente (Bloomfield, 2000). Estas transiciones nunca se dan a través del intermedio plano debido a que este camino corresponde a un máximo energéticamente muy desfavorables. Estas transiciones ocurren siempre vía intermedios ubicados en el sector “Este” del ciclo pseudorrotacional. La causa de este fenómeno es que los conformeros del sector “Oeste” del gráfico son energéticamente desfavorables. También es posible encontrar

Introducción

diferencias energéticas dentro de cada una de las regiones, generalmente los conformeros tipo E son más estables que los T.

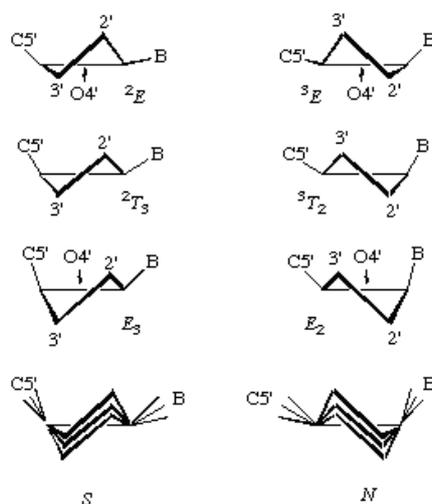


Figura 6- Conformaciones Sur y Norte
Con sus correspondientes valores de P.

Los nucleótidos naturales se encuentran en un equilibrio dinámico entre dos conformaciones mayoritarias ubicadas casi en los extremos Norte y Sur del ciclo (cercano a ³E y ²E), generalmente se las denomina como C2'-endo y C3'-endo. El ADN adopta la C2'-endo mientras que el ARN posee mayoritariamente la C3'-endo. La conformación del azúcar tiene un rol fundamental en la pre organización de estructuras oligoméricas, es así que fuertes alteraciones de los estados conformacionales naturales de los nucleósidos se verán reflejados en importantes efectos estructurales de los oligonucleótidos doble cadena.

1.1.2- Conformaciones de las Bases Nitrogenadas

Las bases nitrogenadas son estructuras planas y por lo tanto con escasa o nula flexibilidad conformacional endocíclica. La flexibilidad conformacional de la base en un nucleósido o nucleótido esta dada por los movimientos de rotación respecto al enlace glicosídico (el que une la base y el azúcar), que a su vez depende de:

- i) La rotación respecto al enlace C4'-C5',
- ii) las rotaciones respecto a los enlaces en el grupo fosfato, y
- iii) los movimientos conformacionales del anillo furanósico.

En las próximas secciones se describen los parámetros estructurales más importantes asociados a la base.

Introducción

Rotación de enlace glicosídico (χ)

El ángulo χ se define como el ángulo diedro entre los átomos O4'-C1'-N9-C4 en las purinas y los átomos O4'-C1'-N1-C2 en los derivados pirimidínicos. Cuando $\chi = 0^\circ$ el enlace O4'-C1' se encuentra eclipsado con el enlace N9-C4 para las purinas y el enlace N1-C2 de la pirimidinas. La nomenclatura más utilizada atribuye los nombres *syn* o *anti* en función del valor del ángulo:

$$\text{syn}, \chi = 0 \pm 90^\circ$$

$$\text{anti}, \chi = 180 \pm 90^\circ.$$

En la Figura 7 se pueden observar los valores típicos de χ con sus respectivas regiones conformacionales, a su vez la Figura 9 esquematiza dos de los conformeros.

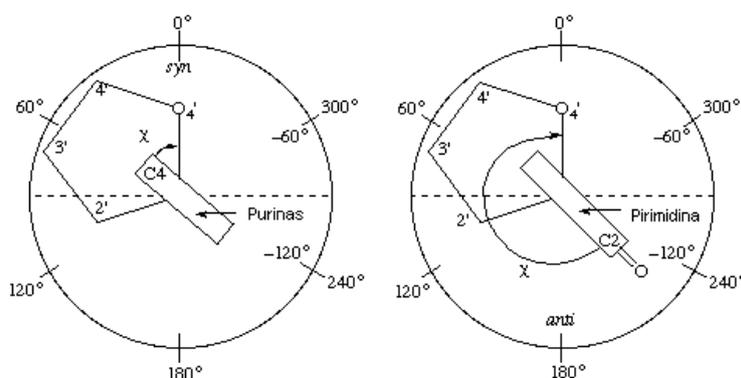


Figura 7- Descripción ángulos de la base con respecto al resto furanósico

El análisis de estructuras cristalinas depositadas en el Cambridge Data Bank (JACS 112, 8291 (1990)) revela que los nucleósidos se agrupan en 2 familias. Los *syn* son minoritarios y presentan el ángulo de torsión glicosídico en torno a $49^\circ (\pm 13)$, los *anti* aparecen en torno a $210^\circ (\pm 23)$ (-140° en la Figura 8). Según estudios teóricos la diferencia energética entre *syn* y *anti* es de alrededor de 1-2 kcal/mol, estos datos concuerdan con las observaciones realizadas por espectroscopia de RMN. Si bien esta diferencia no es tan importante la transición *anti*→*syn* posee una barrera que según datos experimentales es de 6 kcal/mol. Cálculos teóricos sugieren una barrera (localizada en zona *syn*) de unas 4 kcal/mol. En cualquier caso, la barrera es notable pero no impide el cambio conformacional entre *syn* y *anti*.

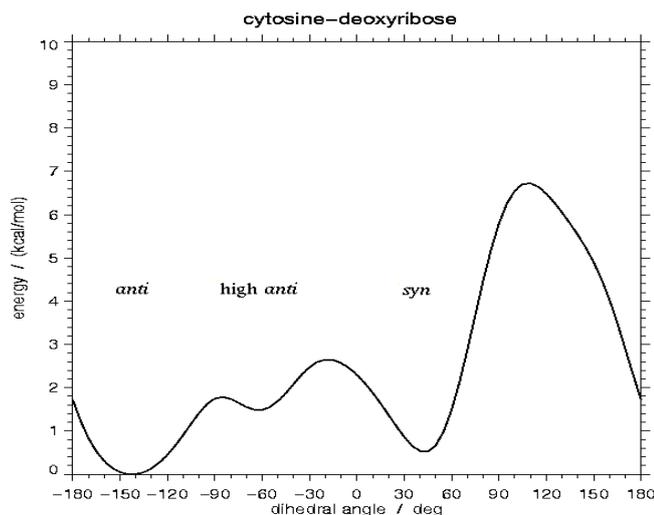


Figura 8 Perfil de Energía de torsión del enlace glicosídico en la desoxicitidina (extraído de **(Cornell W. 1995)**)

La conformación preferida en los nucleósidos naturales suele ser la *anti*. La razón de ello estriba en gran medida a la menor repulsión estérica entre la base y la ribosa. La preferencia por la conformación *anti* puede revertirse añadiendo un grupo voluminoso en posición 8. Por ejemplo adenosina posee su base en *anti*, pero la 8-Br adenosina aparece fundamentalmente en conformación *syn*.

Otros factores que pueden influir en el equilibrio conformacional son los puentes de Hidrógeno intramoleculares, por ejemplo un puente H entre el O5' y los nitrógenos de las bases puede estabilizar mucho la conformación *syn*. Por otro lado, la interacción C (8)-H...OH (5') parece estabilizar en cierta medida la conformación *anti*.

Según datos cristalográficos, cálculos teóricos y datos de RMN existe una correlación entre la conformación adoptada por el enlace glicosídico y la conformación de la ribosa. Los nucleósidos purínicos con conformación 3'endo generalmente poseen su base en conformación *syn*. Por su parte los 2'endo poseen la misma probabilidad de encontrar conformeros *anti* que *syn*. En el caso de los nucleósidos pirimidínicos, la orientación de la base generalmente es *anti*, la relación entre el ángulo χ y la conformación del azúcar es la siguiente:

$$-180^{\circ} \leq \chi \leq -138^{\circ} \text{ para } 2' \text{endo}$$

$$-144^{\circ} \leq \chi \leq -115^{\circ} \text{ para } 3' \text{endo}$$

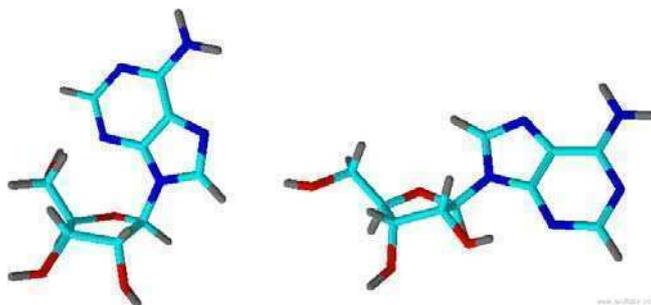


Figura 9 Confórmeros syn (izquierda) y anti (derecha)

Rotaciones respecto al enlace exocíclico C4'-C5'

La nomenclatura utilizada para designar los distintos confórmeros consiste en observar la posición del O5' respecto al O4'. Si el O5' está entre O4' y C3' en una proyección de Newman es *gauche gauche* (gg), si está trans al C3' pero al lado del O4' se denomina *gauche trans* (gt), y si está trans al O4' pero al lado del C3' se denomina *trans gauche* (tg).

Las conformaciones en la serie nucleósido → nucleótido → polinucleótido disminuyen en flexibilidad, lo cual permite formular el concepto de “nucleótido rígido” (Sundarralingam M. 1972). Según el mismo, es posible generalizar que los nucleótidos pueden pertenecer mayoritariamente a dos clases de confórmeros,

C^{2'}-endo, gauche-gauche, anti

C^{3'}-endo, gauche-gauche, anti

Las excepciones a esta regla generalmente se encuentran en polinucleótidos con estructuras inusuales.

1.1.3 Fosfato Internucleotídico

El fosfato internucleotídico constituye un elemento estructural fundamental ya que forma parte del denominado “esqueleto” junto con parte del resto ribosa/desoxirribosa. Los enlaces fosfato diéster unen el oxhidrilo de la posición 3' con el 5' del nucleótido vecino. Muchas de las propiedades químicas y biológicas de los ácidos nucleicos son causa del carácter polianiónico del fosfato. La repulsión entre los

Introducción

grupos cargados negativamente es compensada mediante el apantallamiento con cationes y la red de aguas de hidratación.

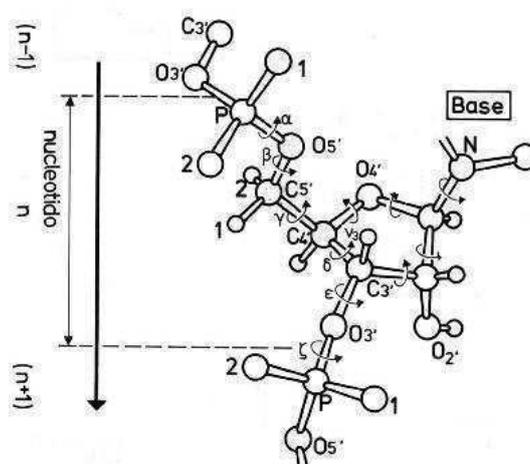


Figura 10 Definición de los ángulos del esqueleto fosfato.

La descripción de los ángulos permite establecer parámetros generales de la hélice, sin embargo el estudio conformacional del esqueleto resulta más complicado que el de la ribosa y la base por la cantidad de ángulos involucrados que generan muchos grados de libertad y su carácter rotamérico (Murray L. 2003). De hecho muchas de las estructuras informadas en literatura por espectroscopia de RMN y rayos X debieron ser revisadas en los últimos años por poseer imprecisiones. Hoy se conocen más de 42 conformeros que se encuentran en base de datos, estos representan la totalidad de los conformeros estables y pueden ser utilizados como punto de partida para el análisis estructural o para la corrección de los ya existentes. De toda manera la determinación de las propiedades más importantes es generalmente inferida a partir de la estructura y posición de la base y la ribosa.

1.2 -Interacciones intra e intermoleculares

Una vez descritos los elementos estructurales de los ácidos nucleicos es posible describir las interacciones que conllevan a la formación de estructuras de carácter terciario que confieren al ADN y al ARN la posibilidad de llevar a cabo diversas funciones biológicas.

Introducción

1.2.1 -Interacción entre bases

La estructura macromolecular de los ácidos nucleicos está determinada básicamente por dos tipos de interacción entre bases más las interacciones con el solvente. La primera es la interacción complementaria entre bases posicionadas en un mismo plano y la segunda ocurre entre bases dispuestas una sobre la otra y es conocida como apilamiento o “stacking”. Las interacciones complementarias se basan en la formación de puentes hidrógeno específicos sumados a fuerzas de Van der Waals-London. La naturaleza del stacking entre bases aún es motivo de discusión.

Es importante recordar que la energía total de las interacciones Van der Waals-London (E_M) es la sumatoria de las energías de interacción entre dipolos ($E_{\mu_1\mu_2}$), los dipolo-dipolo inducido ($E_{\mu\alpha}$) y la energía de dispersión (E_L)

$$E_M = E_{\mu_1\mu_2} + E_{\mu\alpha} + E_L$$

$E_{\mu_1\mu_2} \approx -1/R_{AB}^3 \mu_A \mu_B$, donde $\mu_A \mu_B$ son momentos dipolares R_{AB} es la distancia entre los dipolos.

$E_{\mu\alpha} \approx -1/R_{AB}^6 (\alpha_A \mu_B + \alpha_B \mu_A)$, donde α son polarizabilidades

$E_L = (-3/2 I_A I_B) / I_A + I_B \alpha_A \alpha_B / R_{AB}^6$ donde $I_A I_B$ son los potenciales de ionización.

La magnitud de las polarizabilidades son del orden de 0,010-0,012 nm³ para el uracilo citosina y timina y 0,014 nm³ para la adenina y la guanina. El potencial de ionización se encuentra dentro del rango de (9 – 10 eV).

Si las bases son consideradas como dos dipolos la energía de su interacción no puede ser calculada con precisión, por esta razón se utiliza el método denominado “Aproximación monopolo” para calcular la sumatoria de contribuciones individuales. La energía fue calculada de esta manera considerando las interacciones de átomos individuales de una base con los de otra. La expresión utilizada es la siguiente:

$$E_M = E_{QQ} + E_{Q\alpha} + E_L$$

E_{QQ} es la energía de interacciones coulómbicas entre las cargas atómicas netas de dos bases, $E_{Q\alpha}$ es la energía de interacción entre cargas netas de una base y dipolos inducidos en la otra.

El mayor desafío es calcular las cargas netas de los átomos, para ello se utilizan cálculos de mecánica cuántica que son esencialmente una modificación de la teoría de orbitales moleculares.

Introducción

En las siguientes secciones se detallan los aportes energéticos a cada una de las diferentes interacciones entre bases.

1.2.2- Interacciones complementarias entre bases

Este tipo de interacciones fueron postuladas por Watson y Crick cuando explicaron que las bases del ADN estaban enfrentadas en un mismo plano. Este patrón de organización de las bases constituye uno de los principios fundamentales de la vida, esto incluye a la transferencia de información de una generación a la siguiente, y la biosíntesis y regulación de todos los componentes de un organismo.

Los pares de bases canónicos también llamados de Watson-Crick se dan entre la timidina (uridina en el ARN) y la adenosina, formando dos puentes hidrógeno mientras que la citidina se une con la guanosina y forma tres puentes hidrógenos.

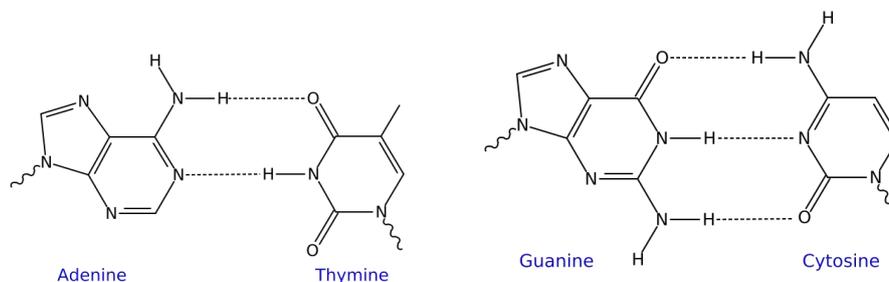


Figura 11 Pares de Bases canónicos o tipo Watson-Crick

Estos pares de bases son responsables de la formación de la típica estructura de doble hélice de los ácidos nucleicos. Sin embargo, esta combinación de pares de bases no es la única, es posible encontrar estructuras que presentan otros pares complementarios distintos a los descritos, que son comúnmente llamados No-Watson-Crick (Figura 12). Algunos de ellos son de gran importancia a nivel biológico como los pares Wooble que ocurren con frecuencia e involucran a la inosina en los anticodones permitiéndole funcionar como “comodín” cuando existe más de un codón para un amino ácido.

Introducción

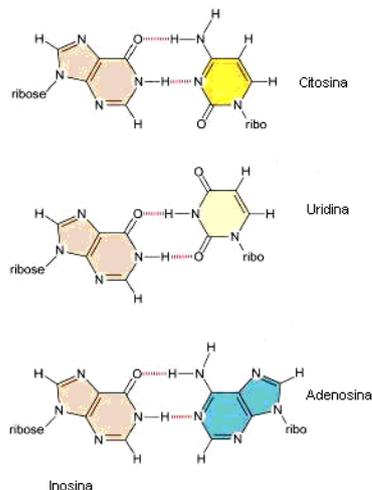


Figura 12 Uniones no Watson y Crick entra la inosina y distintos nucleósidos

Este tipo de apareamiento de bases surgió del mismo Francis Crick quien explicó como 40 tRNA pueden traducir 64 diferentes codones (Crick F. 1966). El primer nucleótido del codón no se encuentra espacialmente restringido por lo que puede formar uniones no canónicas aumentado el número de posibles interacciones.

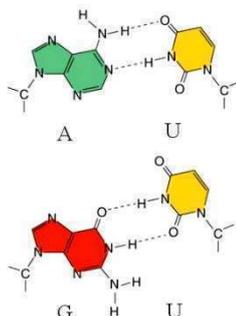


Figura 13 Pares de bases más frecuentes formados por la Uridina

Según datos cristalográficos, IR y RMN de la combinaciones posibles de apareamiento de bases las de A con T (U) y C con G corresponden a las estructuras de menor energía de Van der Waals sin embargo existen uniones como las presentadas en la Figura 13 entre G y U. En la siguiente tabla se muestra la energía total de interacción de algunos pares de bases calculado con las cargas netas de los átomos de las bases.

Pares de Bases	EQQ	EQA	EL	EM
A-T	-5,9	-0,2	-0,9	-7
A-A	-5,2	-0,1	-0,5	-5,8
T-T	-3,6	-0,4	-1,2	-5,2
G-C	-15,9	-2	-1,3	-19,2
G-G	-5,8	-0,7	-0,6	-7,2
C-C	-10,6	-1,1	-1,2	-13

Tabla 1- Energía calculadas para distintos pares bases (Kcal/mol)

De los datos de la tabla también es posible deducir que las interacciones electrostáticas son las que realizan la mayor contribución a la estabilidad entre bases complementarias.

1.2.3- Interacciones de “stacking”

Los compuestos como las bases heterocíclicas, nucleósidos y nucleótidos forman complejos cuando se encuentran en soluciones acuosas. Estos complejos consisten de monómeros dispuestos en planos superpuestos en los cuales las bases hidrofóbicas se acercan evitando el contacto con el agua a su alrededor. Estos complejos constituyen un claro ejemplo de interacción hidrofóbica.

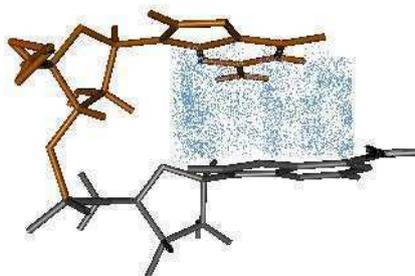


Figura 14 Interacción de stacking entre bases

La estabilidad aportada por este tipo de interacción está definida por la sumatoria de un conjunto de factores. Tal vez el más importante es la reducción de la energía libre causada por la reducción del área de la interfase base-agua.

Esta interacción puede ser cuantificada indirectamente mediante la medición del descenso del coeficiente osmótico Φ en soluciones concentradas. Si Φ desciende al aumentar la concentración de una solución es posible asumir la formación de agregados. De esta manera es posible calcular la constante de asociación aparente:

$$K = (1 - \Phi) / (m \Phi^2) \text{ donde } m \text{ es la concentración molar}$$

La siguiente tabla contiene los valores de Φ , K como también la polarizabilidad α y el momento dipolar μ para algunos nucleósidos.

Nucleósido	K, molal ⁻¹	Φ a		
		25°C	α , Å ³	μ , D
Uridina	0,61	0,943	10,2	3,9
Citidina	0,86	0,935	11	7,2
Desoxicitidina	0,91	0,905	12	3,6
Inosina	-	0,888	13	5,2
2'-O-metiladenosina	5,1	0,723	12,5	4,3
Desoxiadenosina	4,5	0,688	13,9	3

Tabla 2 Parámetros de stacking de nucleósidos en agua extraído de (Shabarova Z. 1994)

Observando los datos de la tabla es posible deducir que:

- El stacking de las bases purínicas es mayor que el de las pirimidinas
- Las interacciones electroestáticas dipolo-dipolo no son esenciales para estabilizar el stacking. , el mismo se ve aumentado al aumentar la polarizabilidad α de las bases. (Shabarova Z. 1994)

Estas conclusiones son válidas tanto para nucleósidos y nucleótidos en solución como en estructuras cristalinas. La mayor diferencia reside en el hecho que en el último caso el plano de la base se acerca a los grupos polares de la base adyacente, desplazando el área de intersección de las bases levemente.

1.3 Conformación de los Oligonucleótidos simple cadena.

La estructura de los oligonucleótidos simple cadena está gobernada por las interacciones de stacking entre las bases. En este tipo de moléculas los monómeros se encuentran unidos a través del fosfato internucleotídico y el efecto de stacking se ve favorecido, debido a esto es posible detectar este fenómeno con mayor facilidad que en soluciones de nucleósidos y nucleótidos monoméricos.

Introducción

La metodología utilizada para estudiar estas interacciones es ampliamente conocida y se basa en la modificación de la absorbancia en la región UV debida a las interacciones de los orbitales π entre dos bases que se encuentran próximas. El resultado final es que la absorbancia a 260nm de un polinucleótido es menor que la sumatoria de los aportes individuales de cada monómero. Este efecto se conoce como Hipocromía. La magnitud de este efecto es generalmente expresado como porcentaje de hipocromicidad h que es calculado de la siguiente forma:

$$h = 100 \cdot \frac{1 - \varepsilon_p(\lambda)}{\varepsilon_m(\lambda)}$$

ε_m y ε_p son los coeficientes de extinción molar del polinucleótido y de los nucleótidos monoméricos a una determinada longitud de onda (λ). A medida que aumentan la cantidad de nucleótidos h se hace más grande hasta que llega a un máximo cuando la cadena consiste entre 7 y 10 nucleótidos.

Otra técnica experimental para el estudio estructural de ácidos nucleicos es el Dicroísmo Circular (DC), si bien esta técnica es explicada más adelante (ver Discusión) es necesario remarcar las conclusiones que de ella se desprenden para comprender las propiedades estructurales de los oligonucleótidos.

Los espectros de DC de los oligonucleótidos de ARN y ADN difieren en amplitud y forma aún cuando las bases son las mismas, lo que indica diferencias estructurales importantes. Al mismo tiempo los 2'-O-metil presentan espectros similares a los oligorribonucleótidos, indicando que la diferencia de las estructuras de ARN y ADN se deben a la conformación del azúcar y no a la intervención del oxhidrilo 2' en puentes hidrógeno inter e intramoleculares.

Las estructuras observadas en DC están determinadas por interacciones de bases adyacentes, las interacciones de larga distancia entre nucleótidos son muy débiles. La falta de cooperatividad en la estructuras simple cadena y el hecho de que la conformación de cualquier par de nucleótidos adyacentes es la misma hace posible determinar el DC a partir de dinucleótidos y extrapolar los resultados a los polinucleótidos.

A medida que la temperatura aumenta la estructura de los oligonucleótidos simple cadena rápidamente se distorsiona. El agregado de solventes orgánicos también desestabiliza las interacciones hidrofóbicas de las bases.

Introducción

Sin embargo hoy en día es posible realizar estudios detallados utilizando métodos computacionales obteniendo resultados que se ajustan a los datos obtenidos empíricamente.

1.4 Estructura de oligonucleótidos doble cadena.

Los oligonucleótidos simple cadena complementarios pueden formar estructuras doble cadena helicoidales. El ejemplo más simple está dado por complejos de homopolímeros, poli A con poli U y Poli G con poli C. Las estructuras de hélice más comunes y conocidas son las dobles cadenas, las mismas están estabilizadas por interacciones de stacking y puentes hidrógenos entre bases complementarias generalmente canónicas. Las secuencias en estas estructuras son antiparalelas.

Una característica importante de las fuerzas intramoleculares que estabilizan las estructuras doble cadena es su cooperatividad, bajo ciertos factores externos los pares de bases se desnaturalizan casi simultáneamente, en un intervalo muy acotado.

Uno de los parámetros más importantes de los oligonucleótidos es la estabilidad de las estructuras doble cadena de la cual dependen muchas de sus funciones biológicas. Por esta razón resulta fundamental comprender los factores que estabilizan o desestabilizan estas estructuras.

El método más usado para estudiar estas estructuras es la desnaturalización térmica, generalmente se monitorea siguiendo los cambios de las propiedades ópticas a medida que se desnaturaliza la estructura. La desnaturalización está acompañada de un efecto hipercrómico. Estas curvas se conocen como curvas de Melting point o de estabilidad térmica. La estabilidad de la doble cadena aumenta proporcionalmente con el número de nucleótidos y es mayor cuanto más rica es en pares C-G, logrando en general, una meseta en la estabilidad a partir de los 20 pares de nucleótidos. Existen varios factores que influyen la estabilidad de un dúplex de oligonucleótidos, uno de los más importantes es la fuerza iónica del medio y la presencia de iones mono o divalentes. Esto se debe a que la repulsión causada por los grupos fosfatos cargados negativamente es disminuida por la presencia de los cationes. La efectividad de los contraiones para apantallar las cargas negativas depende de la constante de disociación de los correspondientes fosfatos metálicos, por esta razón los cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , etc.) estabilizan en forma más eficiente que los univalentes. (Existen algunas excepciones a esta regla como el Cu^{2+}).

Introducción

Un factor importante en la estructura de las biomoléculas es el pH, en este caso no tiene un gran impacto en la estabilidad de los dímeros, dentro del rango de 5,5 a 9, fuera de estos rangos la ionización de las bases comienza a tener efectos desestabilizantes.

Al igual que el resto de las biomoléculas las interacciones con el agua tienen una gran importancia en la estabilidad de las estructuras adoptadas. La capacidad de formar puentes de hidrógeno del agua con los grupos dadores y aceptores de protones de los ácidos nucleicos conlleva a la formación de una red transitoria e imperfecta de moléculas de agua. La formación o disrupción de la misma produce un descenso o aumento de la entropía respectivamente. De hecho el carácter hidrofóbico de las bases de los ácidos nucleicos son la causa de su baja solubilidad y la tendencia a asociarse por medio del stacking.

Una de las diferencias más importantes entre el ADN y el ARN es la presencia del oxhidrilo 2' y su impacto en la red de solvatación. El oxhidrilo de la posición 2' es un donador de hidrógeno; dado que la interacción $\text{OH}\cdots\text{H}$ es direccional permite el acercamiento de aguas a zonas hidrofóbicas cercanas a la base y presenta un brazo direccional donde se pueden construir el resto de la estructura del agua. La presencia del OH en 2' permite la formación de una red de aguas que une las que interactúan con los fosfatos con las que lo hacen con las bases (P. M. Egi M. 1996). Este aumento del número de aguas es consistente con el aumento de la estabilidad respecto a la misma secuencia de ADN $\Delta T_m = 25.5 \text{ }^\circ\text{C}$ $\Delta\Delta G = -7,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ a 37°C . El aporte entálpico es la causa de la estabilización $\Delta\Delta H = -31,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. El factor entrópico por su parte es desfavorable, aunque en principio el ARN es más rígido y parece estar más preorganizado para la formación de la doble hélice. La razón de éste fenómeno es que debe pagar un alto costo entrópico por la mejor hidratación del esqueleto y grutas.

1.4.1 Estructura Macromolecular del ADN y ARN

En 1953 J. Watson y F. Crick publicaron un trabajo corto con la descripción de un modelo para la molécula de ADN, lograron decodificar el patrón de difracción de rayos-X del ADN con 80% de humedad y altas concentraciones de Li^+ . De acuerdo a su trabajo el ADN forma una hélice con un diámetro constante de 1,8 nm. La hélice da una vuelta completa cada 3,37 nm y consiste de 10 pares de bases. Los planos de los azúcares son prácticamente paralelos al eje de la hélice. Los grupos fosfato se orientan hacia fuera de la hélice. Vista desde el exterior es posible encontrar dos

Introducción

ranuras en la superficie de la hélice, una de 2,2 nm llamada gruta mayor y otra de 1,2 nm llamada menor.

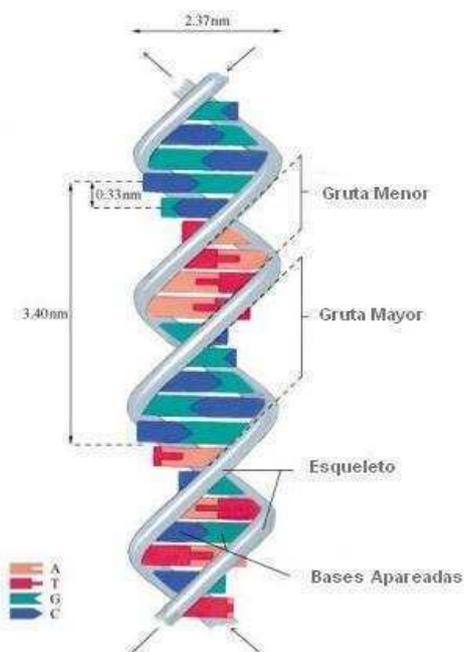


Figura 15 Representación grafica de un doble hélice donde se indican los elementos estructurales más importantes

Esta estructura no es única, tanto el ADN como el ARN puede formar hélices con características distintivas, las más conocidas poseen los nombres de forma A, B y Z aunque existen otras (C, D, C', E etc.). Cada una tiene parámetros estructurales característicos que son fundamentales en funciones biológicas tales como reconocimiento de proteínas. Las características más importantes para cada forma se resumen en la tabla a continuación.

	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido del giro	Derecha	Derecha	Izquierda
Par de bases /giro	11	10	12
Twist (°)	32.7	36	-10 a -50
Enlace Glicosídico	Anti	Anti	Anti, syn
Conformación Azúcar	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo, C2'endo

Tabla 3 Características estructurales más comunes de cada tipo de hélice

Cada uno de los elementos estructurales descritos condicionan en mayor o menor grado la estructura de la hélice. Entre los más importantes se puede destacar la

Introducción

conformación de los azúcares, éstos pre organizan la cadena para la formación de la doble hélice. En el caso del ARN imposibilitan la transición de la forma A a la B, en el ADN la flexibilidad de la desoxirribosa le permite adoptar las formas A, B y Z.

Otro de los factores que determinan la estructura de las hélices es el stacking. La interacción entre los distintos pares de bases produce modificaciones secuencia dependiente con respecto a los valores promedio. Algunas secuencias como d(GGGGGCCCC) y d(GGATGGGAG) (Mc Call M. 1985) que deberían presentar forma B poseen forma A debido al stacking masivo entre las bases.

Existen formas intermedias o de transición con propiedades mixtas, generalmente pueden encontrarse en secuencias que poseen nucleótidos con modificaciones químicas.

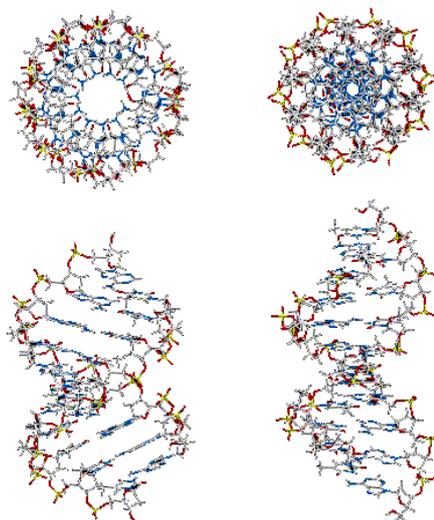


Figura 16 Vista superior y lateral de las estructuras típicas de la forma A (izq.) y B (der)

Las hélices son el arreglo estructural más frecuente. Estas pueden formarse entre secuencias complementarias pertenecientes a zonas distantes de la misma molécula, esto produce el plegamiento de las mismas. De esta manera la formación de pares de bases intramoleculares promueve la formación de estructuras más complejas en las cuales es posible encontrar zonas simple cadena alternadas con dobles hélices. Estas zonas simple cadena son en si mismas elementos estructurales que muchas veces poseen funcionalidad. Las distintas combinaciones de doble hélices con zonas simple cadena dan lugar a estructuras que reciben el nombre de motivos o estructuras secundarias. Algunos de ellos se encuentran en la Figura 17.

Introducción

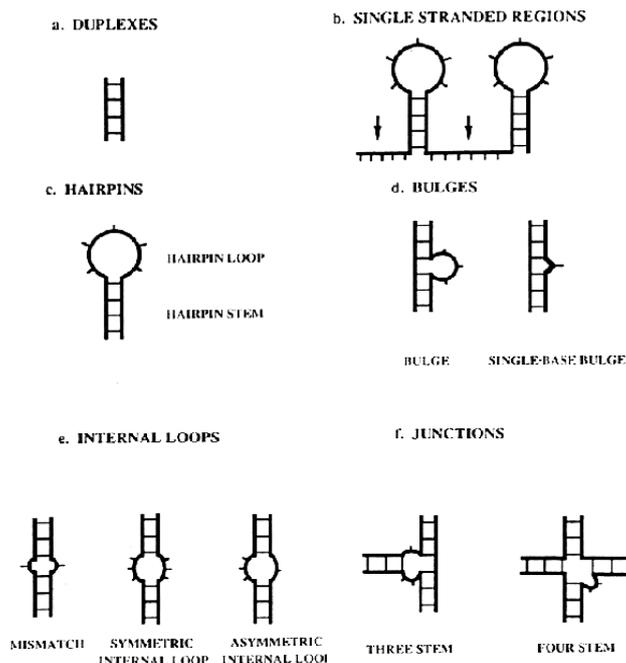


Figura 17 Motivos de estructuras secundarias más comunes, se mantiene el nombre en inglés para evitar traducciones imprecisas

La combinación de los motivos y las interacciones entre los mismos producen la formación de estructuras de carácter terciario. Esto les otorga a los oligonucleótidos la capacidad de interactuar con otras moléculas de la misma forma que lo hacen las proteínas, lo cual permite explicar la gran variedad de funciones que son capaces de realizar.

Las interacciones terciarias entre motivos son básicamente de stacking y apareamiento de bases no Watson-Crick. El stacking es el mayor factor de estabilización, la proporción de bases involucradas por este tipo de interacción puede superar 90 % como en el caso de ARNt de fenilalanina de las levaduras.

Otro factor de gran importancia en la estabilización de las estructuras son la hidratación y la presencia de iones divalentes, estos son parte de redes conformadas por puentes hidrógeno entre el agua y esqueleto fosfato de los loops. Muchas veces poseen sitios de unión altamente específicos, como el ARNt citado anteriormente que posee cuatro iones magnesio en su estructura. La poliaminas presentes en muchos sistemas biológicos también son capaces de estabilizar al ADN y ARN. Esta complejidad estructural es mayor en el ARN que en el ADN debido a que el oxidrilo de 2' aporta un sitio de interacción extra. En la Figura 30 de la página 49 se observan las estructuras secundarias y los contactos terciario entre las mismas en la ribozima cabeza de martillo. La figura permite comprender cómo la combinación de motivos y su interacción puede generar estructuras con funciones altamente específicas.

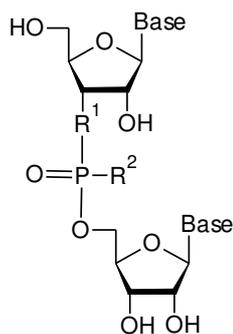
1.5 Utilización de Nucleótidos Modificados

El uso de análogos de nucleósidos surgió de la necesidad de mejorar aspectos funcionales fundamentales de los ácidos nucleicos naturales. En las próximas páginas se resumen algunas tecnologías de gran importancia y cómo los químicos sintéticos han utilizado los conocimientos adquiridos en campos como la biología estructural y físico-química para diseñar moléculas con mayor funcionalidad y/o estabilidad que las naturales.

La gran cantidad de nucleósidos y nucleótidos modificados obligan a restringir la discusión a las relevantes en el campo de los oligonucleótidos con aplicaciones de silenciamiento génico. Los sitios de modificación más habituales cuando la intención es aumentar la estabilidad frente a nucleasas son el fosfato internucleotídico y la posición 2' de la ribosa.

1.5.1 Modificaciones sobre el Fosfato internucleotídico

El esqueleto fosfato es el sitio de hidrólisis de las nucleasas. La reducida vida media de los oligonucleótidos en fluidos biológicos fue el principal problema que enfrentaron las aplicaciones de ADN y ARN durante mucho tiempo. Esto motivó la búsqueda de una modificación sobre el fosfato que permitiera mantener sus características básicas. En la actualidad la más común es el reemplazo de un átomo de Oxígeno por uno de Azufre y recibe el nombre de fosforotioato.



$R_2 = \text{CH}_3$	$R_1 = \text{O}$	Metilfosfonato
$R_2 = \text{NH-Alquil}$	$R_1 = \text{O}$	Fosfaramidato
$R_2 = \text{S}^-$	$R_1 = \text{O}$	Fosforotioato
$R_2 = \text{O}^-$	$R_1 = \text{N}$	(N3' N5')Fosfaramidato

Figura 18 Modificaciones sobre el fosfato internucleotídico

La utilización de oligonucleótidos con fosforotioatos ha demostrado ser útil para la protección ante las exonucleasas y han sido exitosos debido a que pueden ser producidos fácilmente durante la síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos mediante el reemplazo de uno de los reactivos utilizados (ver más adelante). A pesar

Introducción

de reunir dos cualidades de gran importancia el éxito de esta modificación se vio menguado debido a dos causas, la primera es que la afinidad por las cadenas complementarias de ARN es menor que en el caso de los nucleótidos naturales. Esta disminución fue atribuida a que la generación de centros quirales en cada posición modificada da como resultado mezclas disteroisoméricas con afinidad variable por el ARN blanco. A pesar de esta limitación estos análogos de nucleósidos fueron desarrollados al punto que fueron utilizados en pruebas *in vivo* con oligonucleótidos antisentido, los resultados de estos ensayos mostraron efectos adversos causados por una elevada afinidad por proteínas con aminoácidos azufrados (Srinivasan S. 1995).

Los fosforamidatos presentan algunas ventajas dado que su afinidad por el ARN es mayor que la de los nucleótidos naturales y proveen buena resistencia a nucleasas pero no han sido adoptadas masivamente debido a que la tecnología para las cuales fueron diseñados (oligonucleótidos antisentido) fue relegado ante el advenimiento del RNAi.

Un aspecto a mejorar es el carácter aniónico de grupo fosfato, ya que dificulta su paso a través de membranas, provocando problemas en la distribución. Basado en esta observación se han desarrollado compuestos neutros como los alquilfosfonatos y los fosforamidatos.

1.5.2- Modificaciones del azúcar

Las modificaciones sobre la posición 2' del nucleosido son sin lugar a dudas las más abundantes. Existen modificaciones realizadas sobre el Oxígeno del oxhidrilo 2' y sobre el carbono. La importancia de esta posición es que los sustituyentes tienen gran influencia en la conformación del azúcar y la posición de la base. Por ejemplo la introducción de un sustituyente electronegativo en lugar del H del metileno 2' favorece la conformación 3'-endo del nucleósido, preorganizando la molécula para su unión con el hebra complementaria de ARN (Egli M. 1998). Cuanto más electronegativo el átomo en esa posición mayor es la estabilidad de los dúplex formados. Por su parte los 2'-amino desoxinucleótidos desplazan el equilibrio conformacional hacia 2'-endo. Esta modificación ha demostrado aportar una gran resistencia a nucleasas aunque su afinidad por el ARN se ve reducida restringiendo su utilización a aplicaciones que no requieran del apareamiento de bases.

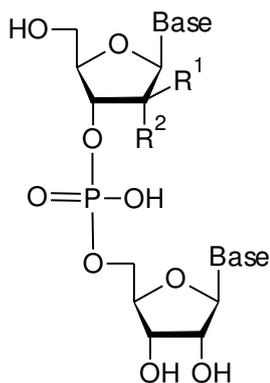
Los análogos de nucleósido más abundantes son los que poseen sustituyentes sobre el oxígeno del oxhidrilo. Los más simples son los 2'-O-alquilynucleósidos, estos son ampliamente utilizados debido a varios factores, entre ellos su fácil preparación partiendo del ARN natural. Además proveen una alta resistencia a nucleasas

Introducción

combinada con una gran afinidad por secuencias de ARN. La estabilidad de los dúplex ARN-2'-O-metilnucleótidos se debe principalmente a que la red de aguas alrededor de la molécula se estabiliza por la presencia del grupo hidrofóbico disminuyendo la entalpía del sistema. Estos nucleósidos son utilizados rutinariamente en aplicaciones donde el OH en 2' no es necesario y se desea proteger la posición del ataque de las nucleasas.

En forma similar a lo explicado en el párrafo anterior los 2'-O-((2-metoxi)etil) (2'-O-MOE) presentan una afinidad elevada por el ARN combinada con una mejor absorción y biodistribución producto de la mayor afinidad por albúminas del suero.

Otro tipo de sustituyente incorporado sobre el oxígeno 2' apunta a mejorar la permeación de membranas aportando carácter positivo para neutralizar el efecto del fosfato internucleotídico cargado negativamente. Estas modificaciones incluyen al 2'-O-(2-(*N,N*-dimetilamino)etoxi)etilo (2'-O-DMAEO) y otras similares las cuales poseen gran afinidad por el ARN siempre y cuando no se introduzcan masivamente generando repulsión entre los grupos amino.



R ₁ = H	R ₂ = OMe, OP _r
R ₁ = H	R ₂ = ODMAOE
R ₁ = F	R ₂ = H
R ₁ = H	R ₂ = NH ₂
R ₁ = H	R ₂ = MOE

Figura 19 -Modificaciones más comunes sobre la posición 2'

Las modificaciones mencionadas en los párrafos anteriores fueron introducidas años atrás con el objetivo de utilizarlas en oligonucleótidos antisentido y en ribozimas. El impacto causado por los resultados obtenidos con el siRNA ha reavivado el interés por esta tipo de nucleótidos modificados, entre los últimos desarrollos reportados en bibliografía podemos encontrar 2'-O-aminopropil y 2'-O-guanidinoetil Odadzic D. 2008. Estos grupos con elevada afinidad por el ARN complementario demostraron mejorar las propiedades del ARN de interferencia.

Introducción

En los últimos años ha surgido una familia de análogos de nucleósido cuya capacidad de formación de dúplex con ADN y ARN es superior a los mencionados anteriormente, se trata de un nucleósido que posee un puente entre el oxhidrilo 2' y el carbono 4'. Este puente mantiene bloqueada la conformación en C3'-endo de allí su nombre en inglés "Locked Nucleic Acid" (LNA). La conformación en la que está congelado el resto ribosa del LNA favorece la preorganización de la doble hélice con forma A tanto para ADN como para el ARN. La gran variedad de aplicaciones en las que fue utilizado con éxito es resumido en muchos trabajos como el de (Vester B. 2004) y (Grünweller A. 2007). Los LNA presentan características físico químicas que los convierten en los análogos de nucleósido más útiles desarrollados hasta el momento, además han probado poseer una muy baja toxicidad y una elevada vida media en fluidos biológicos.

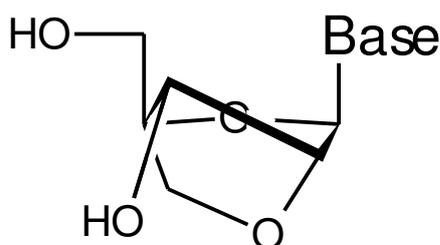


Figura 20 Estructura del β LNA

1.5.3 Modificaciones de la Base

La mayoría de las modificaciones realizadas en las bases nitrogenadas tienen objetivos distintos al aumento de la estabilidad ante nucleasas, sin embargo es preciso mencionar algunas porque han demostrado mejorar propiedades como la estabilidad de las interacciones entre las bases y han sido ensayadas en estrategias de siRNA.

Los nucleósidos halogenados en la posición 5 de las pirimidinas estabilizan las uniones de tipo Watson Crick con moléculas complementarias de ARN y han sido utilizados con éxito en experimentos de silenciamiento utilizando siRNA. En el mismo sentido la incorporación del grupo metilo y propino en la misma posición de la base produce un aumento en la temperatura de melting del dúplex de 0,9°C a 2,6°C por cada nucleótido modificado dado por un aumento en la propensión de stacking (Gyi J. 2003). Además de mejorar la afinidad por el ARN blanco, el impedimento estérico causado por este sustituyente favorece la actividad del complejo involucrado en el mecanismo de siRNA (RISC).

1.6 - 2'-C-metilnucleósidos

Estructura de los monómeros y propiedades

La posibilidad de introducir modificaciones en la posición 2' de los nucleósidos no está limitada únicamente al oxígeno, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos con un análogo de nucleósido que reúne condiciones estructurales para su utilización en oligonucleótidos. Los 2'-C-metilnucleósidos tienen la particularidad de tener un metilo unido al anillo de la furanosa y a la vez mantienen el oxhidrilo. Ésta es una característica distintiva respecto a las modificaciones ya mencionadas.

Para comprender los fundamentos en los que está basada la hipótesis de este trabajo es necesario conocer los resultados de los estudios conformacionales realizados en el laboratorio (Gallo M. 2001) para la 2'-C-metiluridina. Los resultados obtenidos mediante espectroscopia de RMN a través de las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C y experimentos de NOE demuestran con claridad que la conformación de la furanosa es C-3'endo, esta conformación acomoda al metilo en una posición pseudo-equatorial dejando al oxhidrilo en una posición favorable *gauche* con el O4'. La cadena lateral (C5') se encuentra pseudo-equatorial y la base por su parte pseudo-axial y en posición anti. Estos resultados concuerdan con los publicados para estructura de rayos X publicada por Beigelman (Beigelman L. 1987), donde determina que la conformación de los nucleósidos en el cristal es $^3\text{T}_4$. El equilibrio conformacional se encuentra desplazado hacia el conformero norte, la relación N/S para este tipo de nucleósido es $\approx 0,93$ mientras que para la uridina natural es $\approx 0,72$.

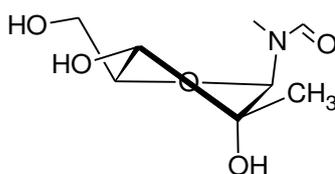


Figura 21 Conformación más abundante de los 2'-C-metilnucleósidos

Los resultados demuestran que los 2'-C-metilnucleósidos mantienen la conformación de los nucleósidos naturales y su equilibrio se encuentra desplazado hacia la conformación "tipo ARN". Esta mayor rigidez se debe a la presencia del voluminoso metilo que es dispuesto en forma pseudo-equatorial, a su vez su presencia modifica el equilibrio de la posición de la base desplazándola hacia la conformación anti. La hipótesis de trabajo es que este análogo es capaz de reproducir las interacciones del ARN natural.

Introducción

El trabajo realizado previamente en el laboratorio no se limitó a la determinación estructural sino que estudió la resistencia a nucleasas del análogo de nucleósido incorporado en una secuencia de 36 monómeros de longitud correspondiente a una Ribozima Cabeza de Martillo modificada con 2'-O-metilnucleótidos en las posiciones indicadas en minúscula de la Figura 22.

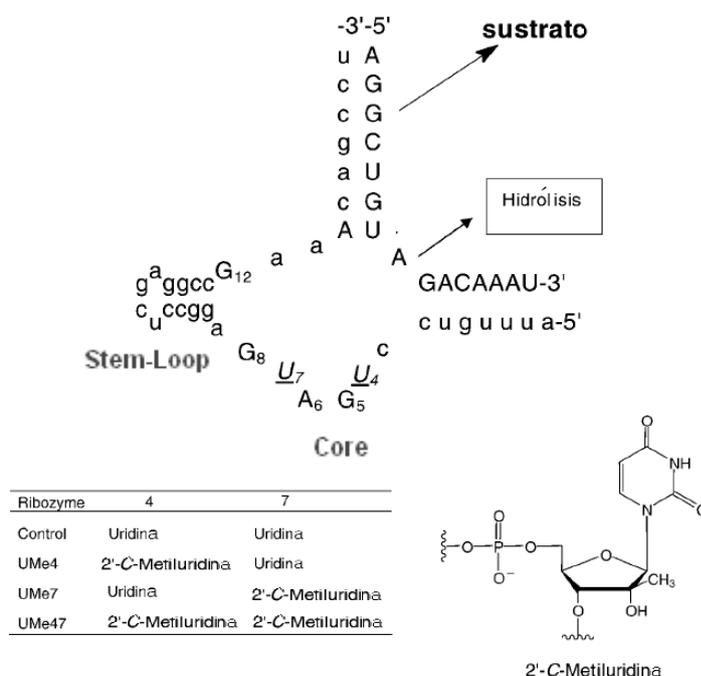


Figura 22 Estructura secundaria de la Ribozima cabeza de martillo y modificaciones realizadas en el laboratorio con 2'-C-metilnucleósidos.-

Los ensayos de vida media fueron realizados en suero fetal bovino (gran actividad de exo-nucleasas) en lisado de células y en medio de cultivo. Los resultados obtenidos están resumidos en la siguiente tabla.

Ribozima	SFB	Lisado de Células	Medio de Cultivo
Natural	< 1min	2 min	4 min
Control	< 1min	10 min	4 min
UMe4	1 min	15 min	5 min
UMe7	10 min	1h	1h
UME4,7	10 min	1 h	1h

Tabla 4 Valores de vida media obtenidos en los experimentos de resistencia a nucleasas con 2'-C-metilnucleótidos

Introducción

La modificación de la posición 7 de la Ribozima produjo un aumento del tiempo de vida media de 15 veces en medio de cultivo, 6 veces en el lisado y 10 veces en el suero fetal bovino (SFB). Este incremento de la estabilidad en los dos primeros demuestra la protección ejercida ante las endonucleasas que se encuentran en mayor proporción en ese medio. En el SFB puede verse que la vida media esta disminuida por la acción de las exonucleasas, esto podría mejorarse con la utilización de grupos fosforotioato en los extremos.

Para corroborar la relación actividad/resistencia se llevaron a cabo estudios de actividad con un sustrato marcado radioactivamente. Estas pruebas consistieron en medir la constante cinética de la reacción de hidrólisis con el complejo Ribozima-sustrato previamente apareado. Estas condiciones permitiran estudiar la constante de la reacción en forma independiente de los demás factores involucrados en el funcionamiento real de las mismas (k_1 o de formación complejo Ribozima –sustrato, k_2 de reacción de hidrólisis, k_3 , k_4 o de disociación de los productos hidrolizados- la estructura y mecanismo de las ribozimas es discutido más adelante). Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla, la modificación de la posición 4 reduce menos las actividad que cuando se modifica la 7, sin embargo esta modificación aporta menor resistencia a nucleasas por lo que la mejor relación actividad/resistencia es obtenida modificando la posición 7.

Ribozima	K_2 (min^{-1})
Natural	0,7
Control	0,7
UMe4	0,4
UMe7	0,1
UMe4,7	0,1

Tabla 5 Resultados obtenidos por Gallo y col. Para la actividad de las ribozimas modificadas con 2'-C-metilnucleósidos

Los estudios presentados demuestran que estos nucleósidos modificados son capaces de mejorar la resistencia ante las nucleasas, desde la publicación de estos resultado no han surgido en bibliografía más datos sobre los 2'-C-metilnucleósidos en el campo de los oligonucleótidos.

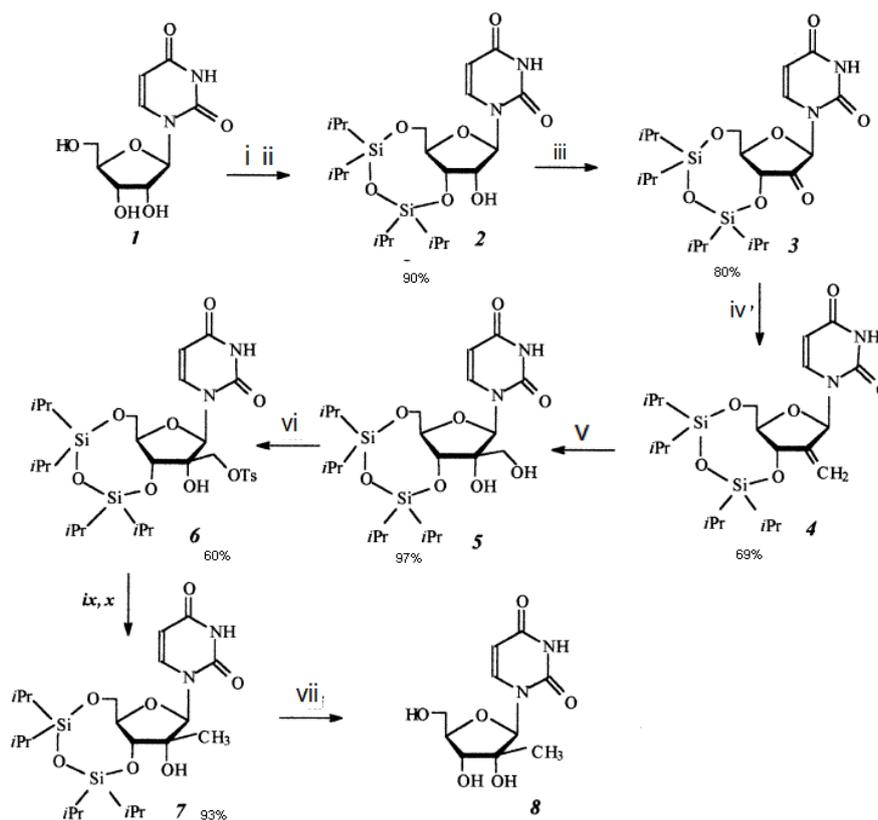
1.6.1- Antecedentes en la síntesis de 2'-C-metilnucleósidos

La síntesis de los 2'-C-metilnucleósidos cobró importancia en los últimos años a raíz del descubrimiento de sus propiedades antivirales, específicamente anti Hepatitis C. Esta enfermedad afecta a más de 170 millones de personas en el mundo y aunque muchas veces es asintomática puede convertirse en crónica llevando en muchos casos a cirrosis y carcinoma hepático. En Estados Unidos es la principal causa de cirrosis crónica causando entre 10000 y 12000 muertes por año en ese país. Los tratamientos con interferón- α y ribavirina no son efectivos en los pacientes infectados con el genotipo 1. En el termino de un año las empresas Merck e Isis Pharmaceuticals publicaron varios trabajos en los que se presentaban los resultados obtenidos contra hepatitis C utilizando 2'-C-metilnucleósidos con bases naturales (Tomassini J. 2005), y con bases modificadas (estudio sistemático), actividad sobre otros virus y docking con la proteína blanco (Colwell L. 2004).

La repercusión de los trabajos publicados reavivó el interés por encontrar rutas eficientes y de bajo costo para estos nucleósidos modificados. Las estrategias para la preparación de estos compuestos pueden dividirse en dos grandes grupos. El primero comprende las rutas que utilizan un nucleósido natural como producto de partida, mientras que las restantes parten de un azúcar y realizan una reacción de glicosilación para incorporar la base.

El antecedente más cercano en nuestro laboratorio es la síntesis de 2'-C-metilrudina partiendo de uridina natural y siguiendo el esquema planteado en la Figura 23.

Introducción



i: a- TIPDSCl₂, Py; ii: MeOH; iii: a- CrO₃, Py, Ac₂O, CH₂Cl₂; b- AcOEt; iv: a- Ph₃P=CH₂, THF; b- Et₂O, NH₄Cl; v: a- OsO₄, MNO, *t*-BuOH, THF; b- NaHSO₃ 1 M, AcOEt; vi: TsCl, Py; vii: a- NaBH₄, DMF; b- NH₄Cl; viii: TBAF, THF.

Figura 23- Ruta sintética desarrollada en el laboratorio partiendo de Uridina.

Esta ruta constituye un ejemplo muy representativo de las síntesis partiendo de un nucleósido entero, en el cual el paso clave es la protección de los oxhidrilos 3' y 5'. Para ello se utiliza 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano o reactivo de Markiewicz (Markiewicz W. 1978). Este grupo protector es muy adecuado porque puede ser introducido con buenos rendimientos y soporta una gran variedad de condiciones, permitiendo trabajar sobre la posición 2' en condiciones ácidas, básicas, reductoras y oxidantes. Luego este grupo puede removerse selectivamente con fluoruro de la misma manera que todos los silil éteres. En el caso de tratarse de un nucleósido distinto a uridina los grupos exocíclicos de la base deben protegerse en un paso previo, se han utilizado grupos benzoílo y derivados mono, di y trisustituídos del mismo. El paso más importante en ésta y las demás rutas sintéticas es la creación del enlace carbono-carbono, en el cual se busca obtener un exceso diastereomérico a favor de la forma ribo frente a la arábino. En el caso particular de la ruta descrita esto se logra a través de una reacción con tetraóxido de osmio que debido al impedimento estérico causado por el puente disiloxano y la base reacciona con el doble enlace por la cara β de la ribosa. La selectividad de esta reacción es del 95%. Esta estrategia resulta conveniente frente a otras como la que se encuentran en la Figura 24.

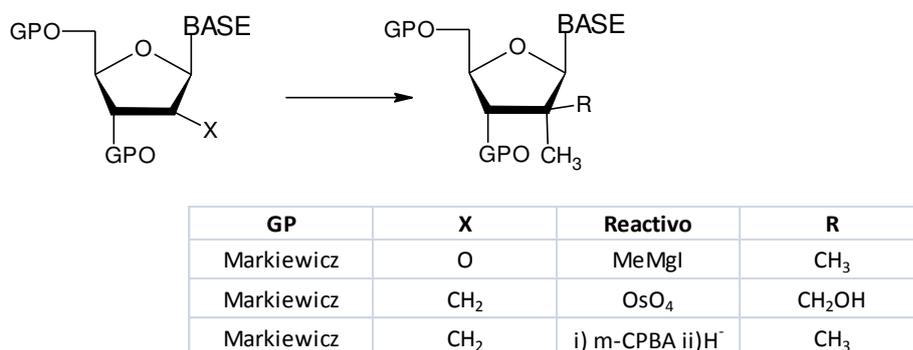


Figura 24 Algunas estrategias para la formación del enlace C-C

La primera reacción de la Figura 24 consiste en la adición de un reactivo organometálico, ésta reacción resulta de limitada utilidad ya que el producto mayoritario posee la configuración arabino, esto es consecuencia de la mayor accesibilidad de la cara α que no se encuentra bloqueada por la base.

Las otras dos alternativas planteadas son superadoras desde el punto de vista de la estereo especificidad, la segunda corresponde al trabajo ya citado de Gallo y col. La tercera opción es la formación de un epóxido y su posterior apertura regioespecífica. Esta fue ensayada durante éste trabajo sin lograr obtener buenos resultados por lo que no representa una alternativa útil.

En líneas generales es posible decir que la preparación de 2'-C-metilnucleósidos a partir de nucleósidos naturales puede ser llevada a cabo con buenos rendimientos y en un número discreto de pasos siguiendo la ruta previamente desarrollada en nuestro laboratorio. Sin embargo, existen algunas desventajas que merecen ser tomadas en cuenta. En primer lugar esta ruta sólo fue aplicada con éxito para la uridina, durante el presente trabajo se llevó a cabo la misma estrategia para la preparación de 2'-C-metilcitidina y 2-C-metiladenosina obteniendo bajos rendimientos (alrededor del 1% desde el producto de partida). El segundo problema asociado a esta ruta es la utilización de reactivos de muy alto costo, principalmente el reactivo de Markiewicz que es utilizado en el primer paso de protección lo cual es ineficiente desde el punto del costo.

Existen otras alternativas para la preparación de 2'-C-metilnucleósidos que utilizan un azúcar natural como producto de partida, luego incorporan el metilo en la posición 2 para finalmente realizar una reacción de glicosilación en la que se incorpora la base. La principal ventaja de este tipo de ruta reside en el hecho que permite sintetizar diversos nucleósidos a partir de un único sintón. La diferencia entre estas

Introducción

Las rutas es la estrategia utilizada para llegar al azúcar con el metilo en la posición 2 y protegida en las posiciones 1,2,3 con grupos acetilo, benzoílo o algún otro grupo que permita realizar una reacción de glicosilación. En el trabajo publicado por Eldrup y col utilizan el compuesto 3,5-bis-*O*-(2,4-diclorofenilmetil)-1-*O*-metil- α -D-ribofuranosa como producto de partida. Luego se oxida la posición 2 con el reactivo de Dess-Martin y se realiza la adición no estereoespecífica sobre el carbono con un reactivo organometálico (MeMgBr). La reacción de glicosilación presentada es realizada vía el 1-bromo ribósido. El producto de partida debe ser preparado a partir de algún azúcar completamente desprotegido que es obtenido en por lo menos 3 pasos de síntesis. La estrategia utilizada es superior a otras reportadas en literatura desde el punto de vista preparativo sin embargo la adición del metilo no es estereoespecífica y la reacción de glicosilación carece del acilo en la posición 2, por lo que la reacción produce mezclas α y β . Las restantes rutas (Beigelman L. 1987) presentan mayor número de pasos o requieren de reacciones menos apropiadas para su utilización en preparaciones a potencialmente escalables.

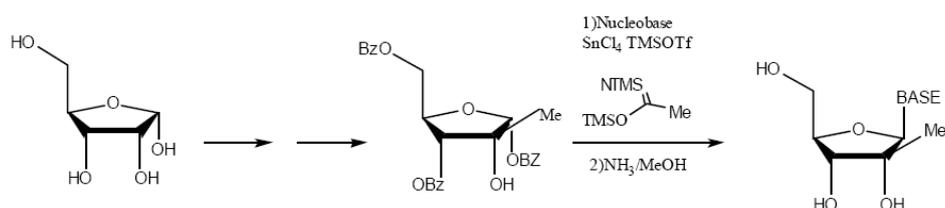


Figura 25 Estrategia general para la preparación de 2'-C-metilnucleósidos a partir de un azúcar. El producto de partida y los reactivos varían pero el esquema general es el mismo

Otra estrategia utilizada en el pasado consiste en la utilización de 2-*C*-metilribo- γ -lactona (o ribonolactona) como producto de partida (Peligot E. 1879). Esta lactona posee un metilo unido al carbono de la posición 2 y resulta adecuada para ser utilizada como producto de partida en la síntesis de 2CMNs. La reacción que permite obtener esta lactona transcurre con bajos rendimientos a partir de la forma abierta de la fructosa, el primer paso es una enolización seguida por una β -eliminación (Figura 26), esto conlleva a un reordenamiento de tipo ácido bencílico en el cual el metilo pasa a la posición 2. Observando las estructuras de los intermediarios es fácil imaginar el gran número de productos de enolización y eliminación posibles.

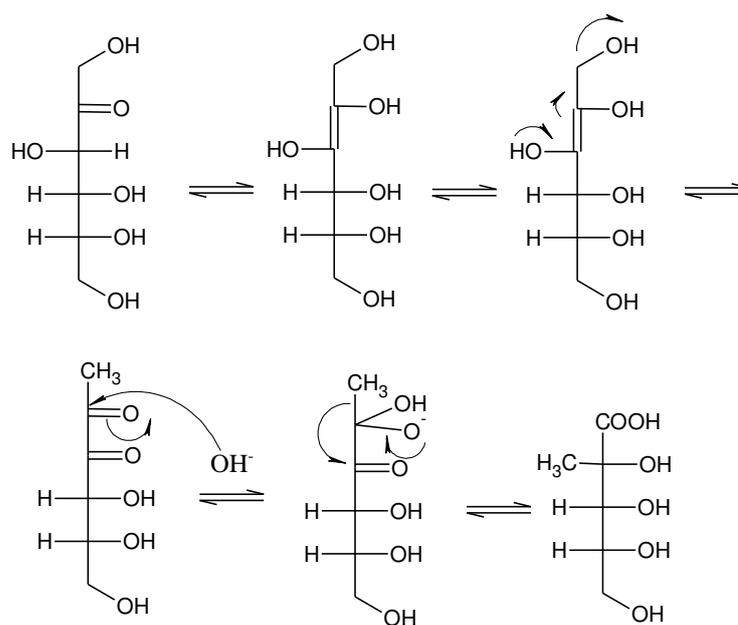


Figura 26 Mecanismo propuesto para la formación de la 2-C-metil-γ-ribonolactona

Entre la enorme cantidad de productos de enolización y reordenamiento es posible aislar el ácido glucosacárico que luego forma la lactona deseada. La cuantificación de los distintos productos de degradación de la fructosa en soluciones saturadas con hidróxido de Calcio fue estudiada por (Byung Yun Yang 1996).

Ácidos Sacarínicos	mmol	%mmol
C2 Acido Etanoico, 2hidroxiglicolico	66	8
C3 Propanoico , 2-hidroxiláctico	317	39
3-hidroxi propanoico , 2,3-dihidroxyglicerico	4	<<1
C4 2-metil-2,3-dihidroxypropanoico	32	4
2-hidroxibutanico	5	1
2,4-dihidroxi butanico	62	8
3,4-dihidroxybutanico	7	1
Eritronico	5	1
Treonico	5	1
C5 2-C-metileritronico	3	<<1
2-C-metiltreonico	2	<<1
Ribonico	25	3
2-desoxi- <i>eritro</i> -pentanoico	4	<1
2-desoxi- <i>treo</i> -pentanoico	7	1
3-desoxi- <i>eritro</i> -pentanoico	17	3
3-desoxi- <i>treo</i> -pentanoico	29	4
3,4-didesoxy pentanóico	7	1

Introducción

3-desoxi-2- <i>C</i> -(hidroximetil)tetrónico	16	2
C6 2- <i>C</i> -metilribonoico	45	6
parasacarinico	3	<<1
3-desoxi- <i>xilo</i> -hexanoico	12	1
3-desoxi- <i>ribo</i> y <i>arabino</i> hexanoico	79	10
3-desoxi 2- <i>C</i> -(hidroximetil- <i>eritro</i> y <i>treo</i> pentanoico	44	6

Tabla 6 Listado de algunos de los productos caracterizados luego de la degradación de Fructosa en medio alcalino a 100°C

A la luz de estos resultados es evidente que el protocolo de purificación es crítico si se desea utilizar esta reacción como punto de partida para la preparación de nucleósidos modificados.

Esta lactona fue utilizada en el pasado para preparar 2'-*C*-metiladenosina (Jenkibsky S. 1968). La estrategia planteada por los autores consiste en proteger los oxhidrilos de la lactona con benzoílos para efectuar una reducción con bis(3-metil-2-butil)borano y luego realizar una reacción de glicosilación vía un intermediario halogenado en la posición 1. Si bien esta estrategia permite obtener el producto, no presenta algunos problemas. En primer lugar la reducción de la lactona con el derivado de boro requiere de un control estricto de las condiciones de reacción para obtener en el mejor de los casos mezclas epiméricas de productos parcialmente desprotegidos y otros subproductos difíciles de separar por cromatografía, llegando a un rendimiento menor al 50%. Por otro lado, la reacción de glicosilación planteada en el trabajo consiste en la reacción entre el 2,3,5-tri-*O*-benzoil-2-*C*-metil-1-β-D-clororibofuranósido y cloromercurio-6-benzamidopurina. La utilización de estos reactivos resulta desfavorable debido a que la obtención del primero requiere de un procedimiento diferencial para cada uno de los epímeros obtenidos en la reducción de la lactona. El rendimiento global de la ruta es menor al 8% y requiere trabajar con mezclas de epímeros e isómeros de posición por lo que fue descartada para este trabajo.

Introducción

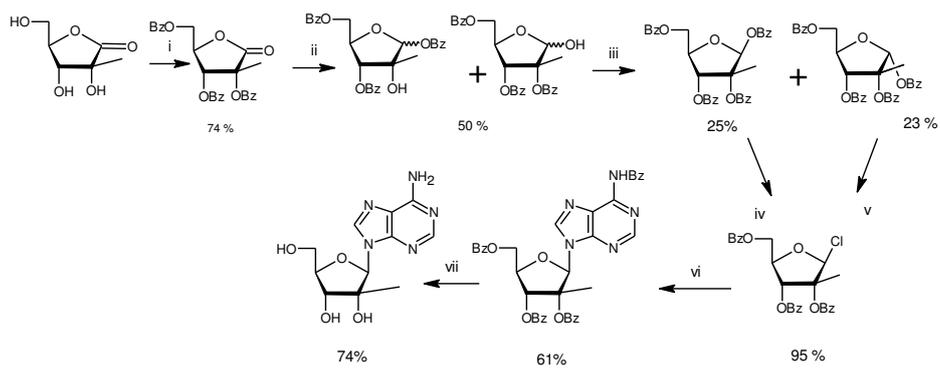


Figura 27 Estrategia llevada a cabo por Jenkibsky y col para la preparación de 2'-C-metiladenosina a partir de 2-C-metilribo- γ -lactona

La utilización de reactivos más modernos y un esquema de protección adecuado permitirían el uso de estrategia basada la utilización de la 2-C-metilribonolactona como producto de partida, evadiendo los problemas antes descritos.

Introducción

1.7 Síntesis de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (ON) pueden ser preparados siguiendo dos estrategias, la primera consiste en la utilización de herramientas comúnmente utilizadas en biología molecular como la transcripción *in vitro*, la segunda es la síntesis química en un sintetizador automático. La elección de una estrategia u otra depende del largo de los oligonucleótidos, la cantidad deseada y la utilización o no de nucleótidos modificados. En general la síntesis en fase sólida es utilizada para preparar oligonucleótidos (ON) con menos de 100 monómeros o cuando es necesario incorporar modificaciones químicas que no sean sustrato de las polimerasas.

Los ON son preparados utilizando un ciclo que permite la desprotección o protección selectiva de los grupos reactivos de los monómeros, que se encuentran debidamente funcionalizados. Los monómeros reciben el nombre de fosoramiditas. Los grupos presentes en estas moléculas permiten la desprotección de las posiciones reactivas en forma específica y eficiente. En el caso del sustituyente de 3' el fósforo está sustituido de forma tal que permanece estable hasta el momento de su activación.

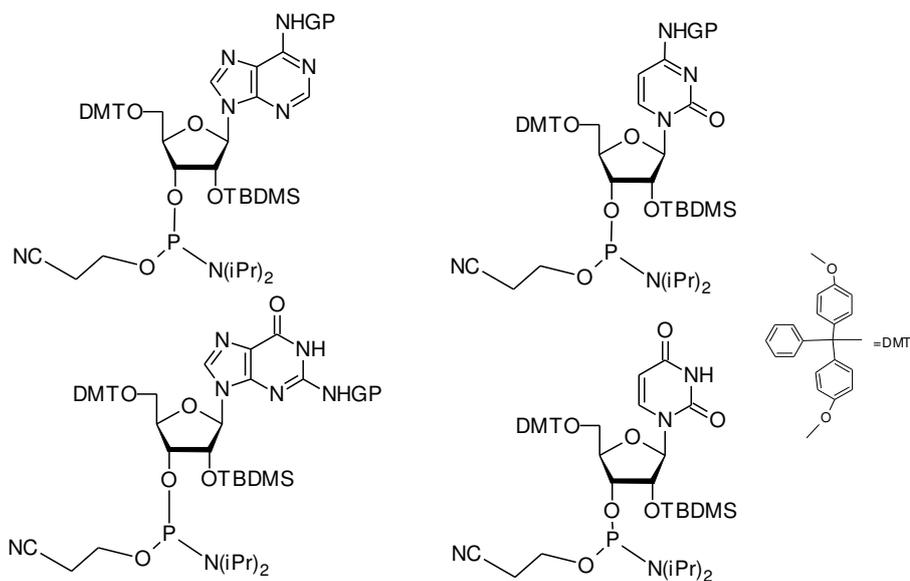


Figura 28 Estructura de los sintones utilizados para la preparación de oligonucleótidos conocidos como Fosoramiditas. Los GP de las bases pueden ser benzoílos, *tert*-butilfenoxiacetil, isobutirilo o acetilo entre otros.

En la Figura 29 se describen los pasos necesarios para llevar a cabo un ciclo de síntesis, Los pasos de un ciclo completo son los siguientes:

- 1- Destritilación
- 2- Acoplamiento

Introducción

3- Enmascaramiento

4- Oxidación

El soporte sólido es el elemento sobre el que se llevan a cabo todas estas reacciones y esta conformado por esferas de vidrio de tamaño de poro controlado (500 Å o 100Å según el largo de los oligos a utilizar) optimizados para una transferencia eficiente del líquido. La fase sólida derivatizada con el primer monómero a través de un conector o "linker" es colocada en una columna encerrada entre dos filtros por la que fluyen los distintos reactivos.

El primer paso necesario para comenzar el ciclo es la desprotección del oxhidrilo de la posición 5' del nucleósido unido a las esferas de vidrio. Esto se lleva a cabo generalmente utilizando ácido tricloroacético o dicloroacético en diclorometano o dicloroetano. Luego de eliminar el grupo DMT se lava la columna con acetonitrilo anhidro y pulsos de argón para eliminar restos del ácido. El color naranja característico del catión DMT⁺ es utilizado para monitorear la síntesis, basado en la premisa que el descenso en la intensidad del color evidencia la reducción de oxhidrilos que liberaron el catión y por ende una disminución del rendimiento.

El segundo paso es la incorporación de la segunda fosforamidita junto con un activante, generalmente se utiliza tetrazol o algún derivado del mismo para protonar el grupo diisopropilamino y convertirlo en un buen grupo saliente. El activante es utilizado en exceso para asegurar un buen rendimiento. Entonces el oxhidrilo libre del monómero inmovilizado ataca al fósforo creando una nueva unión internucleotídica. Por su parte el grupo β-cianoetil unido al fósforo previene reacciones secundarias y aumenta la solubilidad del compuesto, éste es removido al final de la síntesis con un tratamiento básico acuoso que promueve una β eliminación, el producto final reacciona con el amoníaco produciendo 3-aminopropionitrilo que es inerte.

El paso siguiente es proteger los oxhidrilos que no reaccionaron (generalmente alrededor de 0,1- 2%) para evitar que reaccionen en el próximo ciclo produciendo secuencias con un nucleótido menos que serían difíciles de purificar más tarde; este paso es conocido como enmascaramiento o capping. Generalmente se realiza una acetilación con anhídrido acético (o algún otro anhídrido dependiendo de los grupos protectores de la base), *N*-metilimidazol y 2,6-lutidina como base. El acilo es removido durante el tratamiento básico al final de la síntesis.

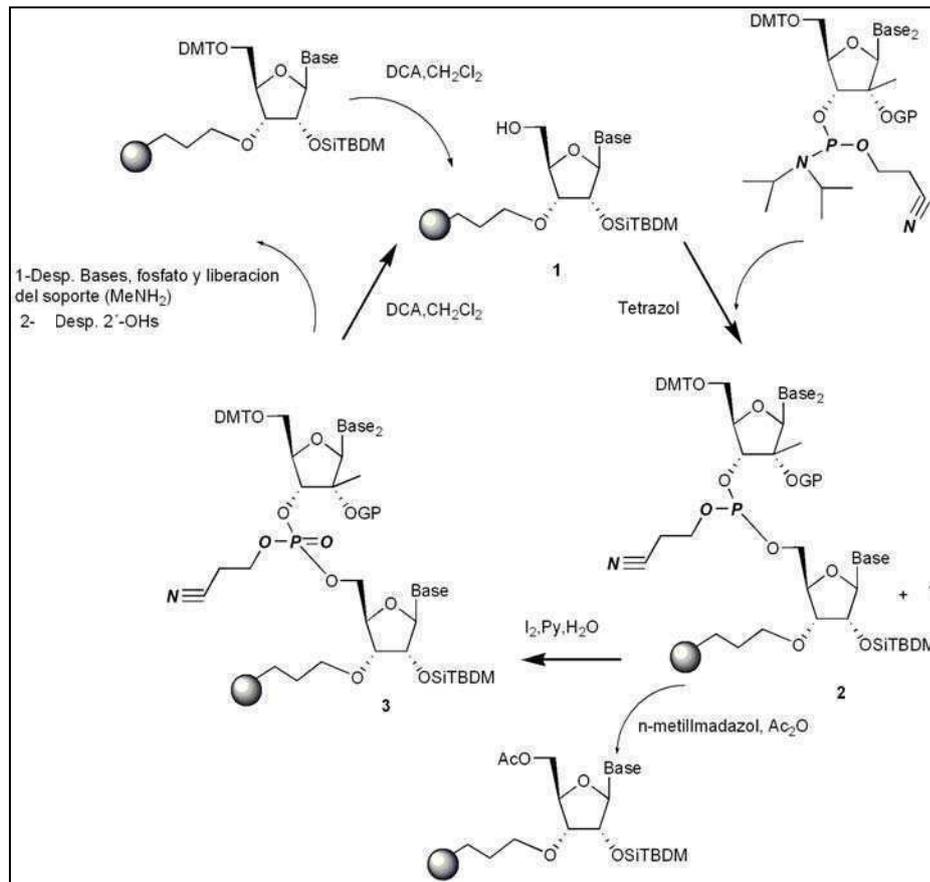


Figura 29 Ciclo de síntesis del sintetizador automático

Una vez bloqueadas las secuencias más cortas (n-1) se lava nuevamente la columna y se realiza la oxidación del P^{III} a P^V con una solución de I₂/Py/THF/H₂O. La oxidación es llevada a cabo por un complejo I₂-piridina que forma un aducto con el fósforo trivalente, el agua presente en la reacción descompone el complejo dando como resultado el fosfato triéster. Luego de lavar la fase fija se comienza con el ciclo nuevamente. Estos pasos se repiten n veces hasta obtener la secuencia deseada.

Al final el ciclo es necesario liberar el oligonucleótido de la fase e hidrolizar los grupos protectores de las bases y los grupos cianoetil de los fosfatos. Eso se realiza mediante un tratamiento básico con una solución de amoníaco concentrado durante 24 hs a temperatura ambiente o con una mezcla de metilamina/amoníaco a 55°C durante 10 minutos. Para poder llevar a cabo este último tratamiento es necesario poseer grupos protectores en las bases conocidos como fast-deprotection debido a que son más lábiles a bases. De esta forma se reduce el tiempo de exposición a medio básico del sílilo evitando la salida prematura del grupo protector de la posición 2'.

Los oligonucleótidos pueden separarse del soporte sólido de dos formas distintas, con el extremo 5' libre (DMT -Off) o protegido con el grupo DMT (DMT-On). Ambas estrategias difieren en la metodología de purificación, la DMT-On es utilizada

Introducción

cuando se dispone de un HPLC con fase C18 o C8 y permite separar con facilidad las secuencias completas de las truncadas ya que éstas últimas poseen oxhidrilo en lugar del DMT. Luego es necesario eliminar el DMT con un tratamiento ácido. La estrategia DMT-off es utilizada con frecuencia y requiere de un paso menos por lo que es utilizado en síntesis rutinarias muy puestas a punto.

Hasta este punto no se realizó una distinción entre la síntesis de oligonucleótidos de ADN y los de ARN sin embargo estos presentan marcadas diferencias. Los oligonucleótidos de ADN fueron masivamente sintetizados mientras que los desarrollos para ARN se vieron postergados. No fue hasta la aparición de los RNAi que se realizaron intentos serios por mejorar las técnicas para la síntesis de ARN (Marshall W. 2004).

La principal diferencia entre ambos esta dada por la presencia de un grupo protector en la posición 2' de las fosforamiditas. Este grupo voluminoso disminuye la reactividad del fósforo por lo que el tiempo de acoplamiento del ciclo debe aumentarse de 1 min a 10 como mínimo. En general el oxhidrilo es protegido con silil éteres que pueden removerse selectivamente al final de proceso de desprotección utilizando fluoruro. En los últimos años se han buscado alternativas para la protección de esta posición con la intención de mejorar el rendimiento del acoplamiento y reducir el tiempo necesario para completar la síntesis. Cualquier candidato que cumplir esta función debe ser capaz de:

- ser introducido con buenos rendimientos
- soportar condiciones ácidas (desprotección 5')
- condiciones oxidantes (oxidación del fósforo)
- condiciones básicas (tratamiento con amoníaco)
- removerse cuantitativamente con reactivos compatibles con las cadenas de ARN.

La dificultad de cumplir con estos requisitos llevó a varios grupos a desarrollar ciclos específicos para la síntesis de ARN utilizando una estrategia completamente nueva. La más prometedora es la conocida como 5'-Silil-2'-ortoester ACE Chemistry (Scaringe S. 2001). Muchos adoptaron esta metodología pero las DMT-fosforamiditas no fueron desplazadas debido a que la implementación de la nueva estrategia requiere de la modificación de componentes mecánicos de los sintetizadores automáticos.

En cuanto a los candidatos más interesantes para reemplazar a los éteres de silicio en la fosforamiditas tradicionales uno de los grupo más ampliamente utilizados es el triisopropiloximetilo (TOM). Utilizando este grupo se obtienen rendimientos de acoplamiento mayores al 99% utilizando tiempos entre 2 y 3 minutos. (W. P. Pitsch S.

Introducción

2001). Un artículo publicado en 2004 cita estas dos metodologías como las más prometedoras en la síntesis de oligorribonucleótidos (Marshall W. 2004).

Caracterización de Oligonucleotidos mediante espectrometría de masa MALDI-TOF

Una de las herramientas más útiles para verificar el resultado de la síntesis y purificación de los ON es la espectroscopía de masa MALDI. La razón por la que la utilización en este campo no se ha extendido tanto como la de los péptidos de debe a varios factores, algunas de las razones son: el menor número de matrices específicas, la formación de iones multicarga y la fragmentación reducen la resolución y la sensibilidad. A pesar de estos problemas es una herramienta muy poderosa si se encuentran las condiciones adecuadas que permiten realizar el análisis en minutos, con cantidades femtomolares de sustrato. Además puede ser automatizado con facilidad. Por esta razón es utilizado rutinariamente para la caracterización de bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos (Altman R. 1999) y para la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (Hartmer R. 2003). El uso del MALDI-TOF para análisis de rutina presupone un nivel de equipamiento y dominio de la técnica no disponible en cualquier grupo de investigación. El rango de masas que se puede analizar aumenta año tras año, sin embargo no puede ser utilizado para secuencias de más de 40 nucleótidos. Por ello es posible concluir que la utilización del MALDI-TOF se justifica cuando se trabaja con oligos de mediano y bajo peso molecular. Esta limitación no resta importancia a la técnica porque una de las aplicaciones más difundidas en la actualidad es la utilización de ARN cortos (ARNi siRNA etc.) que pueden ser analizados sin problemas.

1.8- Aplicaciones de los Ácidos Nucleicos Modificados

Los ácidos nucleicos en la actualidad representan un vasto campo que trasciende las funciones tradicionales de codificación y transcripción de información genética. Han pasado más de 60 años desde los trabajos pioneros sobre actividad biológica del ADN (Avery O. 1944), hoy conocemos en detalle muchos mecanismos en los que están involucrados. La concepción tradicional de las funciones del ADN y ARN fueron desplazadas por descubrimientos como la capacidad del ARN para catalizar su propia hidrólisis que le valió el premio Nobel a T. Cech y S. Altman en 1989. Hoy encontramos desarrollos que van desde el uso de simples monómeros como antivirales hasta el uso de cadenas autoensambladas de ADN para la fabricación de nanocircuitos (LEE J. 2006). El amplio espectro de aplicaciones en las que se utilizan ácidos nucleicos sería difícil de resumir y excede con el objetivo de este trabajo. El objeto de estudio de la tesis aquí presentada es la utilización de nucleósidos y nucleótidos modificados en tecnologías de silenciamiento génico con potencial terapéutico, por ello se resumen las posibles aplicaciones de los nucleósidos sintetizados en esta área.

1.8.1- Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN capaces de ejercer funciones catalíticas, tal y como su nombre lo indica que proviene de una combinación de ácido ribonucleico y enzima. La primera Ribozima descubierta pertenece al precursor del ARNr 26S de *Tetrahymena thermophila* (Kruger K. 1982), en 1983 se reportó otra ribozima la M1 (Guerrier-Takadaa 1983). En condiciones de altas concentraciones de Mg^{++} estas estructuras son capaces de procesar ARN, este descubrimiento revolucionó el concepto que se tenía del ARN y llevó a los investigadores a postular que estas moléculas podrían ser el origen de la vida en nuestro planeta. El avance en el conocimiento de la estructura de estas moléculas y su mecanismo de acción, permitió diseñar secuencias capaces de hidrolizar sustratos externos en forma específica. Esta virtud fue aprovechada para utilizar a las ribozimas como herramienta de silenciamiento génico, utilizando el mismo concepto que las estrategias antisentido con la ventaja que las ribozimas son capaces de realizar múltiples hidrólisis del ARNm. La utilización de las ribozimas en terapia antisentido captó la atención de numerosos grupos de investigación. Una prueba fehaciente del éxito de estas dos estrategias de silenciamiento es su uso en el tratamiento de humanos con distintas afecciones, como el Vitruven utilizado para el tratamiento de Citomegalo virus en pacientes

Introducción

inmunosuprimidos (sitio web FDA 1998) o el GTI-2040 aprobado para el tratamiento de tumores sólidos (Yoon Lee 2003).

La ribozima más ampliamente estudiada es la conocida como “Cabeza de Martillo”. A través del estudio sistemático de sus requerimientos estructurales se llegó a obtener una versión mínima que conserva actividad catalítica, ésta incluye una secuencia consenso o “core catalítico” y dos brazos laterales de unión al sustrato externo. En la Figura 22 se puede observar la estructura básica en la cual se puede ubicar los brazos de reconocimiento (unidos al sustrato) un stem-loop carente de función y el core catalítico.

El mecanismo de la reacción de hidrólisis que permite a la Ribozima Cabeza de Martillo hidrolizar una secuencia de ARNm ha sido motivo de discusión durante años hasta que finalmente (Martick M. 2006) y col publicaron la estructura de rayos X que permitió explicar todos los resultados obtenidos previamente y que se creían contradictorios. En la Figura 30 se puede observar la estructura secundaria y terciaria de la Ribozima. La estructura terciaria activa de la ribozima unida a su sustrato incluye tres sistemas stem-loop indicados en distintos colores en la figura. Estos stem-loops se encuentran ubicados en el espacio según lo detallado en la figura 30B.

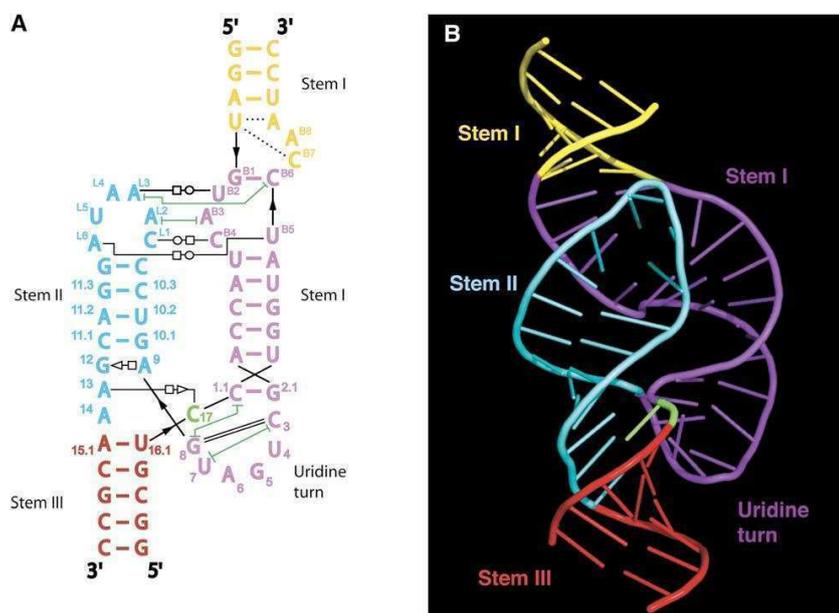


Figura 30 Estructura de la Ribozima cabeza de martillo (La líneas denotan tipo de interacción, líneas coloreadas: Watson-Crick, Circulo junto a cuadrado : Watson-Crick/Hoogsten, circulo junto a triangulo Hoogsten/azúcar, línea punteada puente hidrógeno simple, líneas verdes con extremo T: stacking entre bases no adyacentes. Las flecha negras permiten seguir las secuencias nucleotídicas

Introducción

La modificación de cualquiera de estas interacciones conlleva a una modificación en la actividad de la ribozima. Por esa razón la incorporación de nucleótidos modificados puede realizarse únicamente en posiciones donde no produzca alteraciones masivas ni produzca cambios conformacionales que alteren la estructura, especialmente en el sitio activo. Ésto limita el número de análogos de nucleótidos que pueden utilizarse.

Otro aspecto de la ribozimas que fue materia de discusión es el mecanismo de la reacción de hidrólisis del sustrato. El mismo consiste en un ataque en línea similar a una $SN_2(P)$ sobre el fosfato internucleotídico. La Figura 31 detalla el estado de transición planteado para la reacción y actualmente aceptado. El nucleófilo, el oxhidrilo de 2' de C17 se posiciona casi perfectamente para un ataque en línea. El nitrógeno de G12 se encuentra a una distancia que permite la formación de un puente hidrógeno y podría abstraer el protón del oxígeno de oxhidrilo 2'. El oxhidrilo 2' de G8 forma un puente hidrógeno con el oxígeno del grupo saliente en 5', y potencialmente es capaz de aportar un protón a medida que la carga negativa se acumula en el O5' de C1. Una de las principales diferencias con los mecanismos planteados con anterioridad es que los cationes como el Mg^{++} no intervienen en el mecanismo de reacción. El rol de las cargas positivas es simplemente minimizar densidad de carga negativa pero no tiene sitios específicos de unión en el sitio activo.

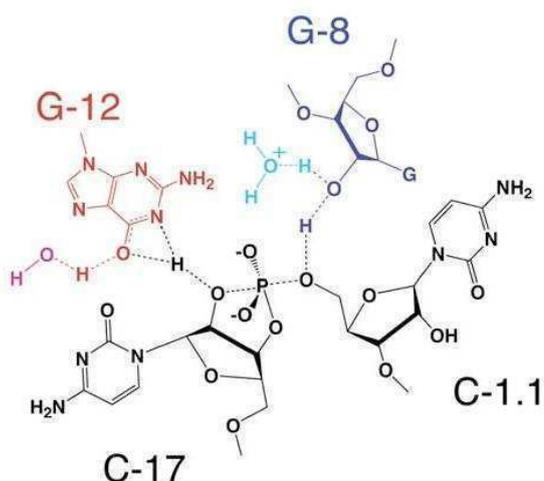


Figura 31 Posible estado de transición postulado a partir de la estructura de rayos X (Martick M. 2006)

1.8.1.1 Utilización de Ribozimas como herramienta de silenciamiento génico

La utilización de ribozimas para el silenciamiento de genes requiere de la modificación completa de su estructura para poder ser aplicada en un contexto celular o fisiológico. Esto se debe a la baja estabilidad química del ARN sumada a la presencia de exo y endo nucleasas que causan que la vida media de estas estructuras en fluidos biológicos sea del orden de los segundos. Como fue mencionado en la sección anterior, el problema puede solucionarse mediante la incorporación de nucleósidos modificados. Dado que los requerimientos estructurales difieren a lo largo de la molécula, es necesario incorporar monómeros con distintas propiedades. El uso de 2'-*O*-metilnucleósidos en todas las posiciones donde los oxhidrilos 2' no son fundamentales para la actividad aportó gran estabilidad frente a las endonucleasas. Estos análogos son generalmente utilizados en los brazos de reconocimiento ya que además de aumentar la resistencia a nucleasas incrementan la estabilidad del dúplex ribozima-blanco.

Por su parte, la acción de las exonucleasas es generalmente disminuída utilizando fosforotioatos en los extremos 3' y 5' de los brazos de reconocimiento. Pese a la mejora en la estabilidad obtenida con estas modificaciones, no son suficientes para obtener estructuras útiles debido a que no pueden ser introducidas en algunas posiciones sin reducir drásticamente la actividad. Estas posiciones son la 4, 5, 6, 7, 8 y 12 (ver figura 30). Los nucleótidos de las posiciones 8 y 12 participan activamente en la catálisis de la reacción de hidrólisis, por esta razón son muy sensibles ante la menor modificación. Las posiciones 4 y 7 del core catalítico constituyen un problema, porque son un blanco usual de la nucleasas por encontrarse expuestas. Ambas posiciones han sido objeto de diversos estudios (M. J.-A. Beigelman L. 1995) en los cuales se introdujeron distintos nucleótidos modificados. En el caso particular de los 2'-*C*-metilnucleósidos los resultados obtenidos en pruebas *in vitro* (únicamente sustrato marcado radioactivamente y buffer) demostraron que es posible obtener estructuras con mayor resistencia a nucleasas sin perder completamente la actividad (ver tabla 5, pág 34). Dada la dificultad de extrapolar resultados obtenidos fuera del contexto celular es necesario continuar estudiando el potencial real de los 2'-*C*-metilnucleótidos en ribozimas llevando a cabo experimentos de actividad en células utilizando estructuras completamente modificadas con 2'-*O*-metilnucleótidos, fosforotioatos en los extremos y 2'-*C*-metilnucleótidos en el core catalítico.

1.8.1.2-Perspectivas de la Ribozimas

Las ribozimas fueron parte de una revolución en la que muchos científicos creyeron que podrían aplicar rápidamente la tecnología de las ribozimas en el campo de la clínica, basados en los conocimientos adquiridos a partir del uso de los oligonucleótidos antisentido. Hoy las ribozimas fueron desplazadas de esa posición principalmente por la aparición de los RNAi, que presentan mayores niveles de inhibición y son más fácilmente sintetizados. A pesar de esto las ribozimas continúan siendo objeto de numerosas investigaciones por ser sistemas complejos estructuralmente capaces de realizar diversas funciones, un claro ejemplo es la Ribozima Diels-Aldersa capaz de catalizar la reacción que lleva ese nombre (Serganov A. 2005). Estas enzimas de ARN pueden ser seleccionadas mediante procedimientos de selección *in vitro*, esto quiere decir que es posible encontrar moléculas capaces de llevar a cabo las más diversas funciones. Muchos de estos experimentos se realizan para encontrar secuencias capaces de activarse en presencia de un efector o activador y reciben el nombre de Ribozimas alostéricas (Roth A. 2004). La capacidad de generar por métodos artificiales ribozimas alostéricas renovó el interés por estas estructuras permitiendo su utilización en nanotecnología, biosensores (de Silva C. 2009) y descubrimiento de genes (Akashi H. 2005).

1.8.2 siRNA

El descubrimiento del mecanismo por el cual secuencias cortas doble cadena de ARN son capaces de silenciar genes (Elbashir, 2001) significó un gran progreso en el conocimiento de la regulación de la expresión de genes y produjo un impacto en el campo de la terapia antisentido. Hoy constituye el sector de mayor crecimiento y gracias al conocimiento adquirido con sus predecesores le brinda la oportunidad ser utilizado muy rápidamente en la clínica (Scanlon K. 2004).

Este nuevo escenario reactivó el interés en la obtención de nucleótidos modificados, igual que en el pasado, el fin fue mejorar distintos aspectos de las aplicaciones previamente desarrolladas con nucleótidos naturales. El siRNA no es la excepción ya que a pesar de ser más estable que un oligonucleótido simple cadena posee problemas asociados a la estabilidad química y biológica. Se han realizado diversos esfuerzos por aplicar las mismas estrategias utilizadas en oligonucleótidos anti-sentido: la modificación del fosfato internucleotídico por grupos fosforotioatos y la

Introducción

incorporación de nucleótidos modificados en la posición 2', es evidente entonces la importancia de ensayar nuevas modificaciones.

Dada la posibilidad de utilizar los 2'-C-metilnucleósidos en este tipo de aproximación resulta importante comprender las características que un nucleótido modificado debe poseer para poder ser utilizado en siRNA.

Los siRNAs son moléculas de ARN doble hebra de 20-21 nucleótidos perfectamente complementarias, éstas se originan a partir de un ARN largo de doble hebra. Los dsRNAs pueden ser de origen endógeno (por ejemplo los transcriptos generados a partir de secuencias de ADN repetidas en tándem), o de origen exógeno (como virus o transgenes).

Este mecanismo puede ser dividido en dos etapas. En la primera una molécula ARN doble cadena es hidrolizada en productos entre 20 y 24 mer (conocida como siRNA) por una endonucleasa de la familia RNAasa III llamada DICER (Zamore P. 2000). Los siRNA resultantes poseen dos nucleótidos desapareados en los extremos 3' con OH terminales y fosfatos en ambos extremos 5'. En el segundo paso los siRNA son incorporados en el complejo proteico denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), una helicasa presente en RISC desaparea al siRNA comenzando por el extremo 5' de la cadena complementaria, este evento activa a RISC quien utiliza la cadena ARN como molde para encontrar el sitio de corte del ARNm. La hidrólisis del ARNm es llevada a cabo por una enzima del complejo RISC, en el caso de los humanos la enzima es la Argonauta 2. Esta hidroliza el fosfato internucleotídico de las posiciones del ARNm enfrentadas con los nucleótidos 10 y 11 del siRNA si se los cuenta a partir del extremo 5' (Figura 32).

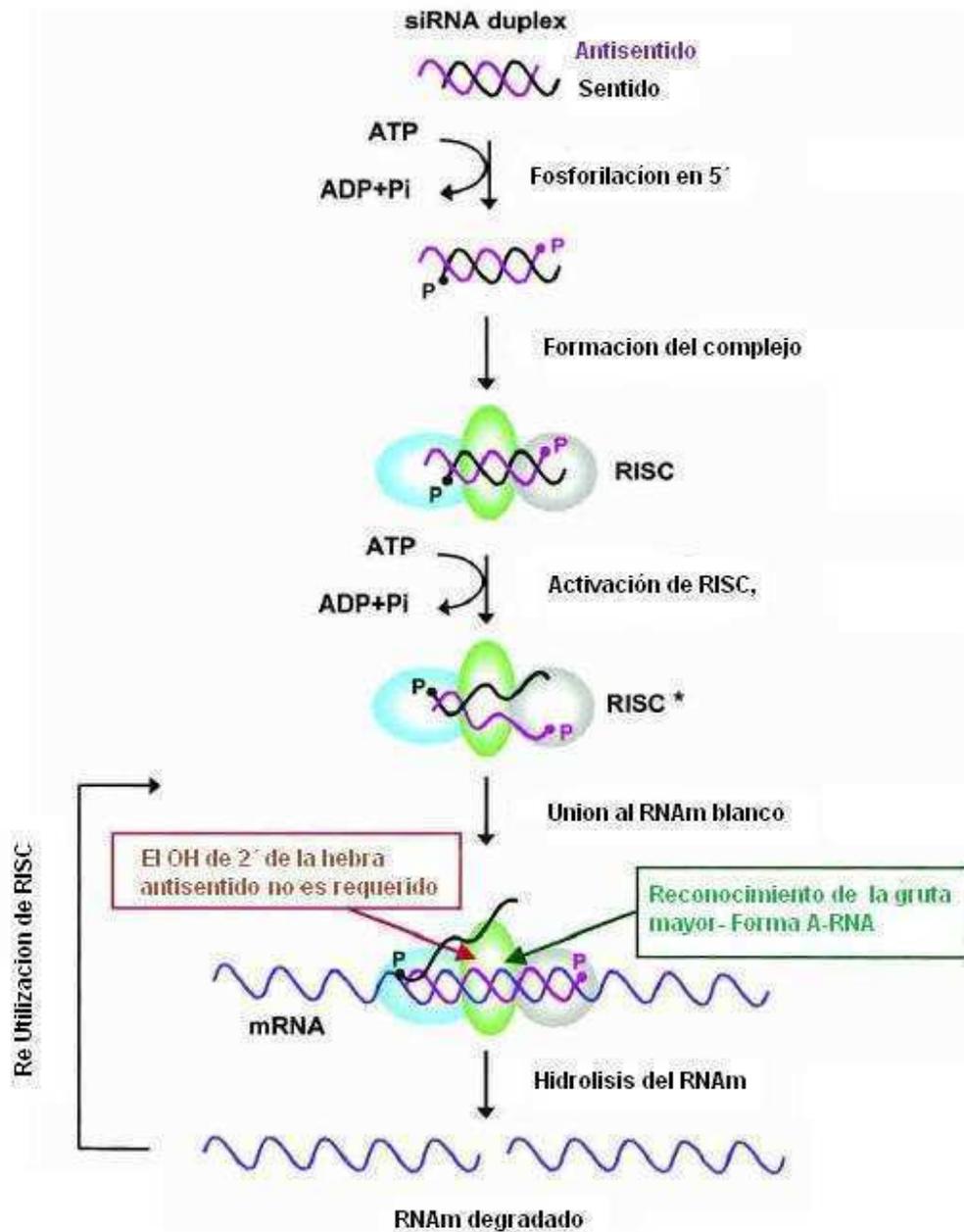


Figura 32 Mecanismo de silenciamiento génico del siRNA.

Para el complejo ARN-RISC pueda formarse correctamente e hidrolizar al ARN mensajero deben reunirse ciertas condiciones estructurales de gran importancia. Una de las más importantes es que el siRNA adopte una forma A-ARN. Esta afirmación se basa en varios hechos experimentales. El complejo RISC no necesita del oxhidrilo 2' para el reconocimiento de la hebra complementaria del ARNm, tampoco es necesario este grupo para llevar a cabo la reacción de hidrólisis como en el caso de la ribozimas. Por esta razón es posible utilizar nucleótidos sin la función alcohol en esa posición sin perder actividad. Esta afirmación es cierta sólo en casos en las cuales la conformación

Introducción

del nucleótido contribuya a la forma A-ARN del dúplex, como en el caso de los 2'-F-nucleósidos. (Cummins L. 1995). Experimentos realizados con quimeras ADN-ARN demostraron no activar el complejo, dado que la forma adoptada por estas moléculas es intermedia entre la forma A y B (Figura 61 de la pagina 142) la disrupción de la gruta mayor de la hélice impide la interacción con RISC.

Otra propiedad estructural de los siRNA es la acción asimétrica de la helicasa del complejo, esta ejerce su acción sobre el extremo 5' del ARN doble cadena, la estabilidad del dúplex de este extremo es necesario para mantener la actividad hidrolítica mientras que la del extremo 3' no es importante. Esto se debe a que no interviene en ninguna fase del mecanismo. Esta asimetría es importante a la hora de diseñar secuencias de siRNA con nucleótidos modificados.

La actividad hidrolasa del complejo se encuentra íntimamente relacionada con la afinidad entre las secuencias de ARNm y siRNA-RISC (Chiu Y. 2003). La estabilidad de ese complejo es vital para la actividad del complejo, siendo ésta la primera característica a tener en cuenta a la hora de utilizar un nucleótido modificado. La reducción de la estabilidad entre los dúplex conlleva a la inactivación del mecanismo. Utilizando el criterio inverso se ha estudiado la actividad de inhibición del siRNA utilizando modificaciones que estabilizan la estructura doble hélice tales como 2,6 diaminopurin nucleósido, 5-Br-uridina, y 2'-F-citidina entre otros. Los resultados demostraron que la actividad aumenta al aumentar la estabilidad hasta un punto umbral en el cual la estabilización desfavorece la acción de la helicasa. (Chiu Y. 2003).

1.8.2. a- Campo de aplicación de los siRNA en terapia

Una posibilidad muy interesante es la utilización del mecanismo de RNAi en terapia especialmente si se incorporan nucleótidos modificados para mejorar su estabilidad o aumentar su funcionalidad. Aunque es difícil introducir dsRNAs largos en células de mamíferos debido a que éstos desencadenan la respuesta de interferón, el uso de siRNAs (sintéticos o shRNAs) ha tenido más éxito. Entre las primeras aplicaciones en llegar a la fase de ensayos clínicos, se encuentra el tratamiento de la degeneración macular y el virus respiratorio sincitial. El RNAi también se ha mostrado efectivo en la reversión de falla hepática inducida en modelos de ratón (Zender L 2003). Otros usos clínicos propuestos se centran en terapias antivirales, incluyendo la inhibición de la expresión génica viral en células cancerosas (Jiang M. 2002) silenciamiento de los receptores y co receptores del HIV en el huésped, el

Introducción

silenciamiento del virus de la hepatitis A y de la hepatitis B (Kusov Y. 2006) y el silenciamiento de la expresión del virus de la gripe entre otros (Li Y. 2005).

También se han propuesto tratamientos potenciales para enfermedades neurodegenerativas, prestando atención particular a las enfermedades de poliglutaminas tales como la enfermedad de Huntington (Raoul C. 2006). La interferencia de ARN también se considera una alternativa prometedora para tratar el cáncer, mediante el silenciamiento diferencial de genes sobre expresados en células tumorales o genes involucrados en la mitosis (Izquierdo M. 2005).

Un área clave de investigación en el uso de RNAi en aplicaciones clínicas es el mejoramiento de las propiedades farmacológicas, desde el aumento de la vida media hasta aspectos referidos a la biodistribución. Para mejorar el persistente problema causado por el ataque de las nucleasas se utilizaron los análogos de nucleósido empleados en los oligonucleótidos anti sentido y ribozimas para mejorar estos aspectos como en el caso de los 2'-*O*-metil y 2'-*F*-nucleisidos (Layzer J. 2004). Esta área sigue requiriendo del desarrollo de nuevos análogos sintéticos diseñados a partir de una profunda comprensión de los aspectos estructurales para el funcionamiento del complejo RISC y de los demás mecanismos involucrados en la vía de los RNAi.

A pesar de la proliferación de estudios en cultivos celulares para drogas basadas en RNAi, existen algunas preocupaciones en relación a la seguridad del RNAi, especialmente debido a los posibles efectos off-target, en los que un gen con una secuencia similar al gen diana es también silenciado. Un estudio de genómica computacional ha estimado que la tasa de error debido a efectos off-target es aproximadamente del 10% (Qiu S. 2005).

1.8.3- Antivirales

Los productos con actividad farmacológica son generalmente encontrados mediante aproximaciones de monitoreo (screening) o diseño racional de acuerdo a la cantidad de información disponible. En el caso de los nucleósidos modificados con actividad antiviral es posible encontrar compuestos descubiertos o desarrollados por medio de las dos estrategias, en líneas generales el primer paso es la detección de compuestos activos que luego permiten el estudio de su mecanismo de acción. La mayoría de estos antivirales funciona inhibiendo la polimerasa viral y consecuentemente la biosíntesis de compuestos necesarios para desarrollar su ciclo característico. Existe un importante número de análogos de nucleósidos modificados

Introducción

utilizados para el tratamiento de enfermedades entre ellos es posible mencionar algunos a modo de ejemplo: influencias, flavivirus tratadas con ribarvirina. Herpes simplex, varicella zoster adenovirus, polioma para los cuales se utiliza conbrivudina (Bowman W. 1990). Otro ejemplo es el tratamiento con Cidofovir en pacientes cytomegalovirus (CMV) retinitis y HIV (Figura 33).

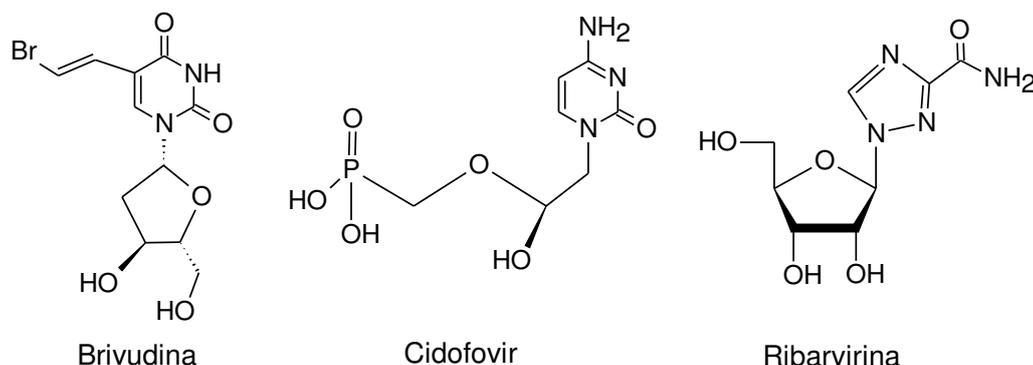


Figura 33 Nucleósidos o análogos de nucleósidos utilizados como antivirales

Entre la gran variedad de nucleósidos modificados con propiedades antivirales podemos ubicar a los 2'-C-metilnucleósidos (Tomassini J. 2005). Esta familia de compuestos es el objeto de estudio de esta tesis. Su utilización para el tratamiento de la Hepatitis C fue reportada en 2004 con una serie de artículos publicados en serio cubriendo cada uno de los aspectos posibles, desde su utilización para el tratamiento de otras enfermedades hasta el mecanismo de acción y docking con la enzima.

1.8.4- Otras Aplicaciones

Existen otras aplicaciones que hacen uso de la complejidad estructural de los oligorribonucleótidos para llevar a cabo tareas como reconocimiento de proteínas y moléculas orgánicas pequeñas para su cuantificación con biosensores, arrays etc. El ARN posee cualidades únicas que lo convierten en uno de los más importantes candidatos para su utilización como "building block" en la fabricación de nanoestructuras, éstas son capaces de autoensamblarse para formar motivos tridimensionales con diferentes funcionalidades (PEIXUAN G. 2005). Existen varios ejemplos en bibliografía, algunos utilizan el ARN para fabricar nanofilamentos con propiedades similares a las proteínas del citoesqueleto (Nasalean L. 2006).

El uso de nucleótidos modificados en aplicaciones relacionados con la nanotecnología-nanoingeniería depende directamente de la información estructural

Introducción

disponible y propiedades termodinámicas de los análogos utilizados. La introducción de distintos grupos químicos abre la puerta para aumentar las funcionalidades del ARN natural.

1.9- Alcances de la Tesis

Los ácidos nucleicos y sus aplicaciones constituyen un fértil campo que se ha expandido enormemente en los últimos años. Hoy incluye áreas que van desde la biología molecular y la medicina hasta la nanoelectrónica. Esta inmensa diversidad se debe a la complejidad estructural que el ADN y el ARN pueden alcanzar simplemente mediante la repetición de 4 monómeros. Estas estructuras se caracterizan por ser modulares siendo posible conectar motivos y estructuras funcionales para obtener otras nuevas.

Muchas aplicaciones que hacen uso del ARN requieren de la utilización de nucleótidos modificados químicamente para superar obstáculos técnicos. Estos obstáculos generalmente están relacionados con problemas en la estabilidad química, especialmente en aplicaciones de entorno biológico. La vasta información obtenida a partir de estudios estructurales, biológicos y teóricos está accesible y puede ser utilizada racionalmente para diseñar nuevas moléculas funcionales o para resolver problemas.

Este trabajo se centra en el desarrollo y estudio de oligorribonucleótidos modificados con 2'-C-metilnucleósidos. Nuestro laboratorio realizó años anteriores experimentos que demostraron que es posible utilizar estos análogos de nucleósido ribozimas cabeza de martillo aportando resistencia frente a nucleasas. Este trabajo fue realizado en un contexto muy distinto al actual. No se conocían las propiedades antivirales de los 2'-C-metilnucleósidos por lo que conseguir nuevas rutas sintéticas con potencial para su escalado no era prioridad. La posibilidad de utilizar ARN doble cadena para silenciar genes no era conocida y las ribozimas prometían ser la mejor forma para reducir niveles de expresión de proteínas virales, oncogénicas etc.

A la luz de las nuevas circunstancias se decidió llevar a cabo este trabajo con la idea de aportar una ruta sintética más versátil que permitiera la preparación de los 2'-C-metilnucleósidos con otras bases, teniendo en consideración que cualquier aporte realizado sería de relevancia en el campo de los antivirales. Se llevó a cabo y escaló una ruta sintética que reúne estas condiciones. Una vez obtenidos los nucleósidos se avanzó en la preparación de las fosforamiditas, en este punto fue necesario encontrar un grupo protector que presentara las condiciones necesarias para ser utilizado

Introducción

exitosamente en la síntesis en fase sólida. Se encontró el grupo adecuado el 2 cloro (1-(2-cloroetoxi) etilo (CEE) y se prepararon las nuevas fosforamiditas.

El objetivo del trabajo una vez obtenidas las fosforamiditas fue completar la caracterización de las propiedades de estas modificaciones. Los trabajos con la Ribozima Cabeza de Martillo de Gallo M. fueron realizados *in vitro* utilizando un sustrato corto de ARN para medir la cinética de la reacción K_2 sin tener en cuenta muchos de los demás presentes en un contexto celular. Además se llevaron pruebas para determinar la estabilidad frente a nucleasas. Para conocer el efecto real de la modificación con 2'-C-metilnucleosidos en la relación actividad-resistencia de las ribozimas es necesario realizar pruebas de actividad en un entorno celular. Parte del presente trabajo realizado consistió en diseñar y sintetizar una ribozima cabeza de martillo para estudiar los niveles de inhibición de expresión de una proteína. Se eligió como blanco el receptor de estrógeno α ya que es un blanco de relevancia en células de cáncer de mamas.

Las ribozimas son moléculas de gran interés sin embargo constituyen un sistema con características únicas y particulares. Para poder caracterizar a los 2'-C-metilnucleósidos en sentido más general se llevaron a cabo estudios de estabilidad térmica o Melting Point y de dicroísmo circular. La elección de estas técnicas se basó en que permiten predecir la utilidad de un análogo de nucleósido en el campo de los siRNA. Dados los resultados obtenidos se reemplazó la idea de realizar ensayos en células con siRNA por un estudio del efecto causado por el metilo utilizando dinámica molecular. Este estudio permitió comprender en profundidad y cuantificar los efectos del metilo en la estructura doble cadena. Los resultados presentados completan la caracterización de los 2'-C-metilnucleótidos en oligonucleótidos sumándola al universo de análogos de nucleósidos útiles para el diseño racional de ácidos nucleicos.

Parte Experimental

2- Parte Experimental

2.1 -Materiales

Reactivos

Acetato de etilo	J.T BAKER, Sintorgan
Acetonitrilo	J.T BAKER
Acido acético	Merck
Acido clorhídrico	Merck
Acido p-toluensulfónico monohidrato	ICN
Acido dicloroacético	Aldrich
Acido tricloroacético	Aldrich
Acido sulfúrico	Merck
Acido oxálico	Anedra
Acrilamida	GIBCO
Benzoiladenina	Aldrich
Agua deuterada	Aldrich
Amoniac	Merck
Anhidrido acético	J. T Baker
Anhidrido 4- <i>ter</i> -butilfenoxiacético/THF	Proligo
Argón 5.0	AGA
Bicarbonato de amonio	Riedel-de-Haën
Bicarbonato de Sodio	Anedra
Bisulfito de Sodio	J.T. Baker
β -cianoetoxi- <i>N,N</i> -diisopropilaminoclorofosfina	Chemgenes
Acetil citosina	Aldrich
Cloroformo deuterado	Aldrich
Cloruro de benzoílo	Merck

Parte Experimental

Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo	ICN
Cloruro de sodio	Merck
Dibenzo-18-corona-6	Aldrich
Diclorometano	J.T: Baker, Sintorgan
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Aldrich
3,4-dihidro-2-H-pirano	Aldrich
<i>N,N</i> -diisopropiletilamina	Aldrich
Dimetilformamida	J.T Baker
Etanol absoluto	Sintorgan
Fase sólida (ADN)	CPG
Fase sólida (ARN)	Proligo
Fase sólida (2'-O-mearn)	Proligo
Fosforamiditas	Proligo, Chemgenes
Hidrógeno	AGA
Hidróxido de Sodio	Anedra
Hidruro de Calcio	Aldrich
Iodo	Merck
2,6-lutidina	Aldrich
Metanol	Sintorgan
Metilamina 41% en agua	Fluka
<i>N,N</i> -metilpirrolidinona	Fluka
<i>N,N</i> -Metilbisacrilamida	GIBCO
<i>N</i> - metilimidazol	ICN
Nitrógeno 4.8	AGA
Pentóxido de fósforo	Aldrich
Magnesio (limaduras)	Aldrich
Piridina	J.T Baker
Sulfato de sodio anhidro	Cicarelli

Parte Experimental

Tetrahidrofurano	J. T Baker, Sintorgan
1-H Tetrazol	Chemgenes
Tolueno	J. T Baker
Trietilamina	Sintorgan
Trihidrofluoruro de trietilamonio	Aldrich
Urea	GIBCO
Uracilo	Pahrma Waldhof

2.2 -Cromatografía y Material Para Purificación

Columna HPLC Kromasil 100 C ₁₈ (5µm 25 X 0.4) Teknokroma	
Columna HPLC-IO	NucleoPac-PA-100
Placas de aluminio de sílica gel 60 F ₂₅₄	Merck
Resina Dowex Ag-50 W-X2	Bio-Rad
Sephadex G-25 (cartuchos)	GE Healthcare
Silicagel 260 F , 230-400	Merck

2.3 Cultivo Celular y transfecciones

Linea Celular MCF-7	
Medio de cultivo D-MEM	GIBCO
Optimem	Invitrogen
Oligofectamina	Sigma
Oligonucleótidos ADN	Sigma
Tamoxifeno	Aldrich
Anticuerpos Primarios	Santa cruz
Anticuerpos Secundarios	Sigma

Parte Experimental

2.4 Métodos y Equipamiento

Las purificaciones de los productos **1** a **20** fueron realizadas utilizando cromatografía en columna de silicagel 60 grano 230 400 MESH. El seguimiento de las reacciones fue llevado a cabo por cromatografía en capa delgada (c.c.d.) utilizando placas de aluminio recubiertas con silicagel comerciales. Los componentes fueron localizados por medio de carbonización con ácido sulfúrico diluido y calor, con luz UV a 254 nm o con una mezcla H₂SO₄/Etanol 2:8 para los productos dimetoxitritilados. Alternativamente se utilizó Iodo como revelador.

Las evaporaciones fueron llevadas a cabo en un evaporador rotatorio marca Büchi con una trampa de frío -100 °C o con una trampa de Nitrógeno Líquido utilizando una bomba de vacío.

Los solventes fueron secados en atmósfera de Ar o N₂. El THF fue reflujo sobre sodio metálico utilizando benzofenona como indicador de humedad. La DMF fue secada por calentamiento con hidruro de calcio y luego destilada a presión reducida. La trietilamina (TEA), la piridina (Py) fueron secadas por calentamiento a reflujo con hidruro de Calcio y destiladas a presión atmosférica.

Los reactivos sensibles a la humedad fueron transferidos vía jeringa bajo presión positiva de nitrógeno o Argón. Las reacciones fueron llevadas a cabo bajo presión positiva de N₂ o Argón.

Las estructuras fueron determinadas utilizando resonancia magnética nuclear de ¹H ¹³C y/o ³¹P en un equipo Bruker de 500 MHz para ¹H. Los espectros fueron realizados utilizando CDCl₃ con 0,1% tetrametilsilano (0,00 ppm, ¹H-RMN) o PyD₆. En algunos casos se utilizó metanol deuterado para aumentar la solubilidad de los compuestos. Los desplazamientos químicos citados como multipletes están referidos al centro aproximado de la señal. Para las asignaciones de las señales ¹³C-RMN se realizaron experimentos de DEPT a 135° para facilitar la asignación. Para las asignaciones de los ¹H se realizaron correlaciones ¹H-¹H y ¹H-¹³C

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador automático ABI 392 (secuencias ADN estudios preliminares) mediante el método de la β cianoetil fosforamidita, utilizando etiltio tetrazol como activador y TCA o DCA como detritilante. Los oligonucleótidos ARN y quimeras ARN, 2'-O-MeARN, 2'-C-metilARN con fosforotioato en los extremos fueron realizados en un equipo Expedite 8909.

Parte Experimental

Las purificaciones por HPLC de fase reversa fueron realizadas en un cromatógrafo Gilson con detector UV-vis, las purificaciones en HPLC –intercambio iónico fueron realizadas en un Equipo Hitachi equipado con una columna NucleoPac-PA-100). En ambos casos se detectaron los compuesto mediante un detector UV a 254 nm. La cuatificación en espectrofotmetrica se llevó a cabo en un equipo Ultraespec 2000 (Farmacia). Los oligonucleótidos se evaporaron en un evaporador centrífugo SAVANT conectado a una trampa refrigerante a -100°C y una bomba de vacío.

Los espectros de masa fueron realizados en un equipo Applied Biosystems Voyager MALDI en modo positivo con un analizador de tiempo de vuelo lineal (TOF) en el grupo del Prof. Dr. Karas en la Universidad J. W. Goëthe, Frankfurt.

Los experimentos de estabilidad térmica o Melting point de los oligonucleótidos fueron realizados en un espectrofotómetro marca Jasco V-650. Las curvas de dicroísmo circular fueron obtenidas en un equipo Jasco j-810.

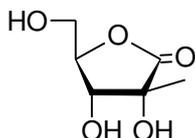
Los estudios computacionales fueron realizados utilizando el programa Amber 9 en paralelo utilizando el campo de fuerzas parmbsc0.

Parte Experimental

2.5 Metodología

2.5.1 Síntesis de los monómeros

2-C-metil-ribo- γ -lactona (1)



Mr 162.1406

Rf: 0,43 AcOEt MeOH 100 : 1

Rendimiento 11 %

2 Kg de β -fructosa fueron disueltos en 20 litros de agua previamente descarbonatada. Se agregaron 200 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y se burbujeó la mezcla con $\text{N}_{2(g)}$ durante 10 minutos. Luego se tapó herméticamente y se mantuvo durante 15 días a temperatura ambiente agitando diariamente. Entonces se agregaron 800 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y se volvió a desplazar el aire con N_2 . La reacción se mantuvo durante 8 semanas a temperatura ambiente y agitada una vez por día. Luego se retiró la fase líquida, se lavó la fase sólida con agua y se juntaron y descartaron los sólidos. Las fracciones líquidas fueron combinadas y burbujeadas con $\text{CO}_{2(g)}$ hasta llegar a $\text{pH} \approx 9$. El CaCO_3 precipitado fue separado de la fase líquida y centrifugado para maximizar la recuperación del líquido, se agregó agua y se repitió el procedimiento. Las fracciones líquidas fueron combinadas. Se agregó lentamente una solución saturada de ácido oxálico hasta que no se formó más precipitado blanco. Se dejó la mezcla en reposo durante 2 días hasta que las fases se separaron por decantación. Se retiró el sobrenadante amarillento por succión utilizando una bomba de vacío, el sólido fue lavado con agua dos veces y centrifugado a 8000 rpm permitiendo recuperar el sobrenadante. Se combinaron las fracciones acuosas y se pasaron por una columna de intercambio catiónico previamente acondicionada con ácido utilizando una resina tamaño de partícula de $600 \pm 50 \mu\text{m}$ con una capacidad de intercambio de 1.5 a 2 eq/l con un caudal de 80 ml/min. l de resina. Se verificó la ausencia de Ca^{2+} en el líquido eluido mediante el método de negro de eriocromo T. Las fracciones eluidas de la columna fueron combinadas y evaporadas con una corriente de aire forzado a 50°C hasta volumen constante. Entonces se agregaron 500 ml de etanol absoluto y se mezcló hasta obtener un jarabe viscoso homogéneo. Se repitió el procedimiento de secado con aire caliente, luego se agregaron 500 ml de AcOEt y 100 g de silicalgel. Se mezcló la suspensión y luego se dejó en un baño ultrasónico durante 2 horas. Se sembró la mezcla en la cabeza de una columna de sílica y se eluyó con AcOEt

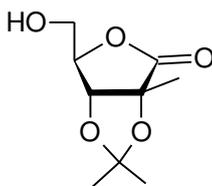
Parte Experimental

caliente. Las fracciones fueron analizadas por ccd, se juntaron las que contenían el producto. Se evaporó el solvente hasta la mitad del volumen y se agregaron 50 ml de hexano y se dejó 2hs a 4 °C. Los cristales formados se filtraron y lavaron con AcOEt frío, a las aguas madres se le agregaron 50 ml más de hexano y se repitieron los pasos de cristalización dos veces. Se obtuvo el producto con un rendimiento del 11% (198g).

Espectro de ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): δ 1.41 (s, 3H, CH_3), 3.94 (dd, $J_1=13.2$ Hz, $J_2=3.9$ Hz, 1H, H-5) 3.98 (dd, $J_1=13.1$ Hz, $J_2=3.9$ Hz, 1H, H-5), 4.00 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-3), 4.51 (m, 1H, H-4).

Espectro de ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz): δ 19.37 (CH_3), 62.49 (C-5), 74.63 (C-3), 75.69 (C-2), 86.19 (C-4), 176.07 (C-1).

2,3-O-isopropiliden-2-C-metilribono- γ -lactona (2)



Mr : 204.2044

Rf 0,3 AcOEt : n-Hex 1:1

Rendimiento 100%

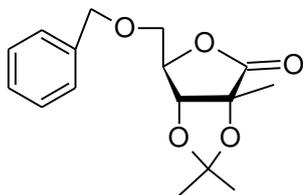
1 g de **1** (6,17 mmol) fue disuelto en 45 ml de acetonitrilo anhidro y se agregaron 0,75 ml de 2,2-dimetoxipropano (6,06 mmol) y 15 mg de ácido p-toluensulfónico. La mezcla fue agitada durante 24 hs a 30 °C . Entonces se agregaron nuevamente 0,1 ml (0,81mmol) de 2,2-dimetoxipropano y 5 mg de ácido p-toluensulfónico (0,025mmol). Luego de agitar durante 36 horas a 30 °C no se observó material de partida por ccd. Se agregaron 30 mg de NaHCO_3 y el producto fue concentrado a presión reducida luego de filtrar el NaHCO_3 . La mezcla fue purificada en una columna de silicagel utilizando una mezcla de n-hex-AcOEt 1:2 obteniéndose **2** (1,25 g 99% de rendimiento).

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 19.59 (CH_3), 26.46 (CH_3 iPr), 26.64 (CH_3 iPr), 61.74 (C-5), 82.40 (C-3), 82.72 (C-2), 83.53 (C-4), 112.66 (C iPr), 176.97 (C-1).

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.42 (s, 3H, CH_3 iPr), 1.44 (s, 3H, CH_3 iPr), 1.64 (s, 3H, CH_3), 4.5 (d, $J=0,6$ Hz, 1H, H-3), 3.81 (dd, $J_1=12.5$ Hz, $J_2=2.9$ Hz, 1H, H-5), 3.70 ($J_1=12.5$ Hz, $J_2=2.9$ Hz, 1H, H-5), 4.50 (m, 1H, H-4).

Parte Experimental

5-O-Bencil-2,3-O-isopropiliden-2-C-metilribono- γ -lactona (3)



Mr Teórico: 292.3207

Rf 0,69 AcOEt : n-Hex 1:1

Rendimiento 80%

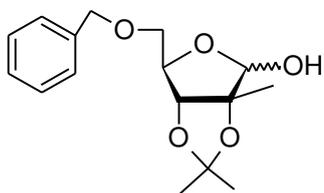
10,1 g de **2** (49,95 mmol) fueron disueltos en 200 ml de tolueno anhidro bajo atmósfera de N₂. Entonces 0,6 g de KI (3,6 mmol) y 13 g de Ag₂O (56,27 mmol) fueron agregados a la mezcla. Luego se agregaron gota a gota 29 ml de bromuro de bencilo (243 mmol). La reacción se calentó a reflujo hasta no apreciar más reactivo de partida por ccd (aprox 15 minutos). Entonces se enfrió la mezcla, se filtró el Ag₂O y se lavó con tolueno y luego con n-hexano. Se combinaron los filtrados y se evaporaron en un evaporador rotatorio a presión reducida. Luego se purificó la mezcla en una columna de sílica gel (n-hexano 100 → n-hexano, AcOEt 4:6). Se obtuvo el producto **3** (11,76 g, 80 % de rendimiento, solido cristalino blanco)

Espectro de ¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 19.42 (CH₃), 26.36 (CH₃ iPr), 26.59 (CH₃iPr), 68.82 (C-5), 73.43 (CH₂Ph), 81.54 (C-3), 82.34 (C-4), 82.50 (C-2), 112.32 (C iPr), 127.79 (Ph), 128.08 (Ph), 128.22 (Ph), 176.03 (C-1).

Espectro de ¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.41 (s, 3H, CH₃ iPr), 1.44 (s, 3H, CH₃iPr), 1.57 (s, 3H, CH₃), 3.70 (dd, J₁=11.0 Hz J₂=3.1 Hz, 1 H H-5) 3.70 (dd, J₁= 11.0Hz, J₂= 3.0 Hz, 1 H, H-5) 4.45-4.6 (m, 4H, H-3, H-4, CH₂Ph), 7.26-7.37 (m, 5H, Ph)

Parte Experimental

α,β 5-O-bencil-2,3-O-isopropiliden-2-C-metilribosa (4)



Mr: 294,3438

Rf 0,47 AcOEt : n-Hex 1:1

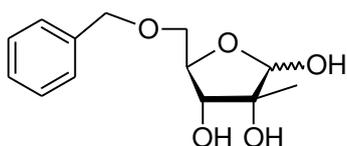
Rendimiento 84%

5,41 g de **3** (18,5 mmol) fueron disueltos en 189 ml de tolueno anhidro bajo atmósfera de Ar. La mezcla se enfrió a -70°C en un baño hielo seco/acetona. Se agregaron 31,7 ml (21,7 mmol) de una solución 1M de DIBAL-H gota a gota con fuerte agitación. Luego de 2 hs a -70°C se agregaron 3 ml de metanol. Luego se permitió a la reacción llegar a temperatura ambiente. El precipitado coloidal de aluminio fue destruido mecánicamente y sembrado en la cabeza de una columna de sílica. Entonces se percoló utilizando acetato de etilo caliente. El percolado fue evaporado en un evaporador rotatorio a presión reducida obteniéndose **4** (3.81 g , 84% de rendimiento, aceite amarillo)

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.00 (CH_3), 21.44 (CH_3), 27.06 (CH_3 iPr), 27.32 (CH_3 iPr), 27.75 (CH_3 iPr), 28.19 (CH_3 iPr), 71.19 (C-5), 71.77 (C-5), 73.77 (CH_2 Ph), 74.19 (CH_2 Ph), 80.76 (C-3), 85.32 (C-3), 87.32 (C-4), 87.07 (C-4), 92.65(C-2), 102.25 (C-1 α), 105.42 (C-1 β), 112.41 (C iPr), 113.24 (C iPr), 127.84 (Ph), 127.90 (Ph), 128.31 (Ph), 128.49 (Ph), 128.59 (Ph), 128.83 (Ph)

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.17-1.43 (m, 15H, CH_3 α,β , CH_3 iPr α,β), 3.54-3.86 (m, 3.3 H, H-5 α,β) 4.08-4.16 (m, 1.7H, H-4 α,β), 4.35-5.13 (m, 6.4 H, H-3 α,β , H-1 α,β , CH_2Bn α,β), 7.23 (m, 8.2 H, Ph α,β).

5-O-bencil-2-C-metilribosa (5)



Mr: 294,348

Rf 0,453 AcOEt

Rendimiento 92%

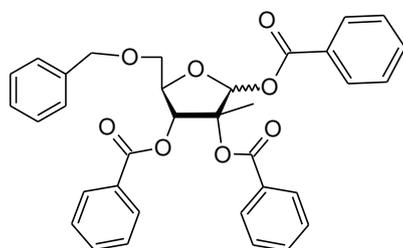
Parte Experimental

5 g de **4** (17 mmol) fueron suspendidos en 5 ml de una mezcla 10:1 de THF:agua. 20 g de resina Dowex AG-50 hidratada y previamente tratada con HCl y lavada con la misma mezcla THF:H₂O fueron agregados a la suspensión. Luego de agitar vigorosamente a reflujo por 3 hs se filtró la reacción y se lavó el sólido con THF: Agua, THF y luego AcOEt. Los líquidos se combinaron y evaporaron. Se purificó el producto en una columna de sílica gel utilizando n-Hexano, AcOEt 1:1 → AcOEt 100% → AcOEt, MeOH 10:2. Se recuperó el producto de partida que no reaccionó y se repitió el procedimiento obteniéndose **5** (4.63 g 92 % rendimiento, solido blanco)

Espectro de ¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 19.05(CH₃), 22.53 (CH₃), 70.99 (C-5), 70.39 (C-5), 73.58 (CH₂ Ph), 73.60 (CH₂ Ph), 75.28 (C-3), 75.42 (C-3), 75.95 (C-2), 79.27 (C-2), 81.05 (C-4), 82.14 (C-4), 100.70 (C-1α), 102.91 (C-1β), 127.80 (Ph), 127.81 (Ph), 127.89 (Ph) 128.03 (Ph), 128.41 (Ph), 128.54 (Ph).

Espectro de ¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.26 (s, 3H, CH₃), 1.29 (s, 1H, CH₃), 3.55-3.62 (m, 1,35 H, H-5), 3.62-3.67 (m, 1.35 H, H-5, H-5), 4.01-4.03 (m, 0,35 H, H-4), 4.05-4.08 (m, 1H, H-4), 4,53 (m, 2,7 H CH₂Ph, H-3), 4.57 (d, J =5.8 Hz, 1H, H-3), 4.63 (dd, J₁=3.7 Hz J₂= 9.0 Hz, 0.35 H, CH₂Ph), 5.02 (sa, 1,35 H, H-1).

5-O-bencil-1,2,3-tri-O-benzoil-2-C-metilribósido (**6**)



Mr 556,597

Rf 0,63 AcOEt : n-Hexano 7:3

Rendimiento 69%

1,65g (6,48 mmol) de **5** fueron disueltos en 33,8 ml de CH₂Cl₂ bajo atmósfera de Ar. 49 ml de Et₃N (31 mmol) y 5 mg de 4-dimetilaminopiridina (0,04 mmol) fueron agregados a la solución. La mezcla se enfrió a 0°C y 4,45 ml (28,3 mmol) de cloruro de benzoílo fueron agregados gota a gota. Luego de agitar 3 hs a temperatura ambiente se agregaron 5 g de hielo. La mezcla fue luego extraída con una solución saturada de NaHCO₃ y luego con una solución saturada de NaCl. La fase orgánica fue secada con Na₂SO_{4(s)} y evaporada a presión reducida. El producto resultante fue purificado en una columna de sílica gel utilizando una mezcla de AcoEt:Hexano 6:4 para obtener **6** (2,5 g 69 % rendimiento, aceite incoloro). El espectro de RMN solo muestra 1 juego de

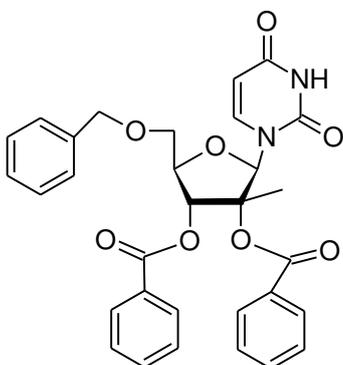
Parte Experimental

señales, indicando que en el equilibrio termodinámico el producto caracterizado es el mayoritario.

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 16.66 (CH_3), 69.57 (C-5), 73.37 (CH_2Ph), 76.14 (C-3), 80.25 (C-4), 86.62 (C-2), 97.78 (C-1), 127.35, 127.42, 128.12, 128.38, 128.42, 128.48, 129.65, 129.79, 129.84, 130.07, 133.26, 133.38, 133.55, 133.58, 137.70 (Ph, Bz), 164.61, 165.72 (CO).

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.90 (s, 3H, CH_3), 3.59 (dd, $J_1 = 3.9$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz, 1H, H-5), 3.63 (dd, $J_1 = 3.9$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz, 1H, H-5), 4.47 (sa, 2 H CH_2Ph), 4.69 (m, 1H, H-4), 6.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3), 7.09 (s, 1H, H-1), 7.14-10.13 (m, 20H, Bz, Ph).

5'-O-bencil-2',3'-di-O-benzoil-2'-C-metiluridina (7)



Mr : 570.561

Rf 0,23 AcOEt : n-Hexano 1:1

Rendimiento 70%

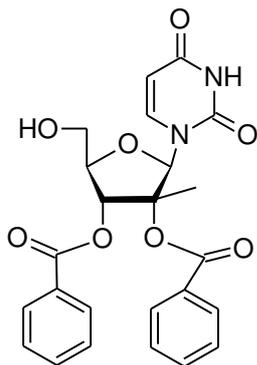
2,8 g de uracilo (24,98 mmol) fueron suspendidos en 22 ml de acetonitrilo seco bajo atmósfera de Ar. 12,4 ml de *N,O*-bis(trimetilsilil) acetamida (50 mmol) fueron agregados a la suspensión agitada magnéticamente. La mezcla se agitó calentando a reflujo durante 30 minutos y la suspensión se convirtió en una solución incolora. Luego de llevar la Mezcla a temperatura ambiente se agregaron 3,5 g de **6** (6,17 mmol). Entonces se adicionaron 26 ml de SnCl_4 (27.8 mmol) gota a gota en el seno de la solución utilizando una cánula metálica. Luego de 3 horas no se detectó producto de partida por ccd. Se agregaron 300 ml de AcOEt y la mezcla se extrajo con una solución saturada de NaHCO_3 . La fase organica fue secada con $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ y evaporada a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica gel usando un gradiente de Hexano 100% \rightarrow Hexano: AcoEt 6:4 obteniendo **7** (2,40g, 70% de rendimiento).

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 17.55(CH_3), 68.35 (C-5'), 73.85 (CH_2Bn), 74.96 (C-2'), 77.01(C-3') , 81.92 (C-4'), 85.41 (C-1'), 101.99 (C-5), 127.91, 128.06, 128.39, 128.42, 128.67, 129.70, 128.53, 129.74, 129.85 , 130.01 (Bz, Bn), 137.30 (C-6), 150.30 (C-2), 163.7 (C-4), 164.87 (CO), 165.29 (CO).

Parte Experimental

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.71 (s, 3 H, CH_3), 3.96 (dd, $J_1 = 2.9$ Hz, $J_2 = 11.0$ Hz, 1 H, H-5'), 3.99 (dd, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 11.0$ Hz, 1 H, H-5'), 4.43-4.49 (m, 1 H, H-4'), 4.62 (sa, 2H, CH_2 Bn), 5.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, H-5), 5.76 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H, H-3'), 6.64 (s, 1 H, H'1), 7.27-7.59 (m, 9 H, Bz, Bn), 7.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, H-6), 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, Bz), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H, Bz), 8.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 2 H, Bn).

2',3'-di-O-benzoil-2'-C-metiluridina (8)



Mr: 466,440

Rf 0,25 AcOEt : n-Hex 7:3

Rendimiento 98%

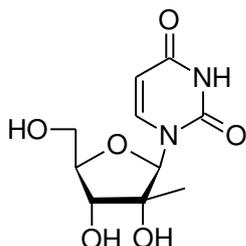
1,35 g de **7** (2,43 mmol) fueron disueltos en 28 ml de AcOEt y 0,3 ml de AcOH. Se agregaron 227 mg de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$. Se purgó el recipiente con H_2 y dos veces retirando el aire con una bomba de vacío. Se llenó el recipiente con H_2 a 1 atm y se agitó mediante un agitador orbital externo a temperatura ambiente hasta observar la desaparición de la mancha correspondiente al producto de partida (24 horas). Luego se filtró la mezcla y se lavó el sólido con MeOH y con CH_2Cl_2 . Se evaporó el solvente a presión reducida en un evaporador rotatorio obteniéndose **8** (1,1g, 98% de rendimiento, sólido blanco).

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 17.00 (CH_3), 60.32 (C-5'), 74.59 (C-3'), 83.05 (C-2'), 84.94 (C-4'), 88.57 (C-1'), 101.68 (C-5), 128.17, 128.25, 129.45, 129.63, 133.31, 133.44 (Bz), 141.26 (C-6), 150.34 (C-2), 164.02 (C-4), 165.08 (CO), 165.45 (CO).

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.82 (s, 3 H, CH_3), 4.08 (dd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 12.6$ Hz, 1 H, H-5'), 4.17 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 12.6$ Hz, 1 H, H-5'), 4.40-4.42 (m, 1 H, H-4'), 5.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, H-5), 5.85 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H, H-3'), 6.71 (s, 1 H, H'1), 7.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H, Bz), 7.40 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H, Bz), 7.47 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, Bz), 7.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, Bz), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H, Bz), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6) 8.09 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Bz).

Parte Experimental

2'-C-metiluridina (9)



Mr: 258,228

Rf 0,40 CH₂Cl₂:MeOH 9:1

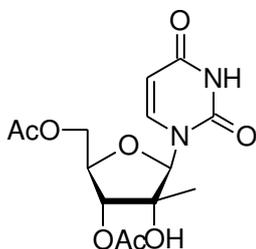
Rendimiento 75%

300 mg (0,643 mmol) de **8** fueron disueltos en 5 ml de etanol y enfriados a 0°C. Una vez enfriada la mezcla se burbujeó NH₃ y durante 15 minutos manteniendo la temperatura baja. Luego se tapó herméticamente el sistema y se agitó durante 48 hs a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo no se detectó el producto de partida por ccd, entonces se evaporaron los solventes en un evaporador rotatorio y se purificó la mezcla en una columna cromatográfica n-Hex → n-Hex: CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂: MeOH 8:2 obteniéndose **9** (124,5 mg, 75% rendimiento).

Espectro de ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 19.3 (CH₃), 59.9 (C-5'), 72.7(C-3'), 79.4 (C-2'), 82.1 (C-4'), 92.0 (C-1'), 102.5 (C-5), 151.0 (C-2), 166.4 (C-4).

Espectro de ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 1.00 (s, 3H, CH₃), 3.79 (dd, 1H, J₁=11.8 Hz, J₂=2 Hz, H5'), 3.84 (d, 1H, J=9.5 Hz, H3'), 3.79 (m, 1 H-4'), 3.98 (m,1H, H-5'), 5.05 (sa, 2H, OH-2'y OH-5'), 5.19 (sa, 1H, OH-5), 5.84 (d, J =8.2 Hz, 1H, H-5), 5.59 (s,1 H, H-1') 7.86 (d, 1 H, J= 8.2 Hz, H-6).

3',5'-di-O-acetil-2'-C-metiluridina (10)



Mr : 342,31

Rf 0,40 CH₂Cl₂:MeOH 95:5

Rendimiento 90%

1,70 g de **9** (6,39 mmol) fueron disueltos en 34 ml de piridina anhidra bajo atmósfera de Ar. 0,6 ml de Ac₂O (6,37 mmol) fueron agregados y la mezcla se agitó durante 16 hs a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 0,6 ml adicionales

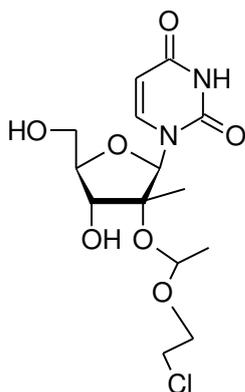
Parte Experimental

de Ac_2O (6,37 mmol). Luego de 15 horas adicionales no se detectó la presencia del producto de partida ni del monoacetilado por ccd. La mezcla fue evaporada a sequedad y el producto fue purificado con una columna de silicagel utilizando como fase móvil una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 98:2 obteniéndose **10** (2,0g 90% de rendimiento, sólido blanco)

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 20.6(- CH_3), 20.7 (CH_3 Ac), 62.5 (C-3'), 78.1(C-2'), 78.3 (C-4') 91.6 (C-1'), 102.7 (C-5), 139.0 (C-6), 151.0 (C-2), 163.3 (C-4), 170.1 (CO), 170.2 (CO).

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.20 (s, 3H, - CH_3), 2.12 (s, 3H, CH_3Ac), 2.17 (s, 3H, CH_3Ac), 4.35-4.45 (m, 3H, H_4' , H_5'), 4.92 (d, 1H, $J=6.7$ Hz, H_3'), 3.79 (m, 1 H_4'), 5.78 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H-5), 6.01 (s, 1H, H_1'), 7.63 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-6), 9.45 (sa, 1 H, NH).

2'-O-(1-(2-cloroetil)etil)-2'-C-metiluridina (11)



Mr : 258,228

Rf 0,15 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 95:5

Rendimiento 62 %

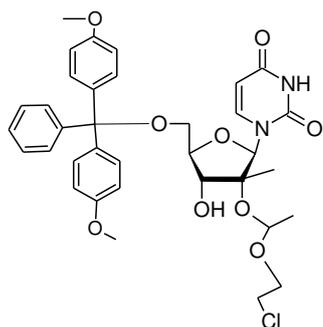
500 mg (1,46 mmol) de **10** fueron disueltos en 5 ml de 2-cloroetilvinileter bajo atmósfera de argón. Se agregaron 10 mg de p-toluensulfonato de piridonio como catalizador. La mezcla se agitó a 70°C durante 15 horas. Luego se agregaron 0,5 ml de 2-cloroetilvinileter adicionales y prosiguió la reacción por 2 horas más hasta detectar por ccd el fin de la reacción. Se evaporaron los solventes a presión reducida y se purificó en una columna de sílica utilizando un gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1, luego se repitió el procedimiento descrito para el compuesto (**9**) y se purificó mediante una columna de sílica gel utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 95: 5 como fase móvil. De esta forma se obtuvo **11** (328mg, 62% de rendimiento, sólido blanco).

Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 16.46, 16.54 (CH_3) 21.00, 21.56 (CH_3CEE), 42.87, 42.96 (CH_2Cl CEE), 59.80 (C-5'), 64.62,65.25 ($\text{CH}_2\text{-OCEE}$), 72.96 (C-3'), 82.40 (C-4'), 83.84,84.68 (C-2'), 89.60 (C-1'), 95.84,96.20 (CH CEE), 102.50, 102.56 (C-5), 140.14, 140.90 (C-6), 150.77, 150.80 (C-2), 163.99, 164.09 (C-4).

Parte Experimental

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.27 (s, 3 H, CH_3), 1.33 (s, 3 H, CH_3), 1.40 (d, $J = 4.2$ Hz, 3 H, CH_3CEE), 1.44 (d, $J = 4.2$ Hz, 3 H, CH_3CEE), 3.63-3.98 (m, 16 H, CH_2CEE , CH_2O CEE, $\text{H}5'$, $\text{H}4'$), 4.09 (sa, 2 H, $\text{H}-3'$), 5.31-5.33 (m, 2 H, CHCEE), 5.74(d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $\text{H}-5$), 5.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $\text{H}-5$), 6.00 (sa, 1 H, $\text{H}-1'$), 6.41 (sa, 1 H, $\text{H}-1'$), 8.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}-6$), 8.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}-6$).

5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(1-(2-cloroetoxi)etil)-2'-C-metiluridina (**12**)



Mr: 667,1451

Rf 0,35

Et Pet :AcOEt:Et₃N 4:3:0,01

Rendimiento 72%

400 mg (1,08 mmol) de **11** fueron disueltos en 8,8 ml de piridina anhidra , 0,25 ml de Et₃N (1,06 mmol) bajo atmósfera de Ar. Entonces 0,526 g de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,56 mmol) y 7,6 mg de 4-(dimetilamino)piridina (0,06 mmol) fueron agregados. La reacción fue agitada durante 15 horas a temperatura ambiente. Al verificar la usencia del producto de partida por ccd se agregó 1 eq de agua. La mezcla fue extraída dos veces con 30 ml de Et₂O. La fase etérea se secó con Na₂SO_{4(s)} y se evaporó el solvente a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica gel utilizando un gradiente de Heanox:Et₃N 100:1:0,1 →Hex: AcOEt: Et₃N 50:50:0,1 obteniendo **12** (518 mg 72 % de rendimiento).

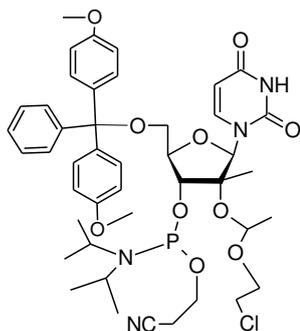
Espectro de ^{13}C RMN (Cl_3CD , 125 MHz): (δ) 14.14 (CH_3), 16.7 (CH_3), 20.9 (CH_3CEE), 21.7 (CH_3CEE), 42.27 (CH_2CCEE), 42.28 ($\text{CH}_2\text{Cl CEE}$), 55.19 (OCH_3DMTr), 60.35 (C-5'), 64.42 (CH_2O , CEE), 64.62 ($\text{CH}_2\text{O CEE}$), 73.88 (C-3'), 73.94 (C-3'), 81.93 (C-4'), 82.05 (C-4'), 84.7 (C-2'), 87.04 (C DMTr) 87.13 (C DMTr), 89.22 (C-1'), 95.15 (CH CEE), 95.81 (CH CEE), 102.39 (C-5), 113.22 (DMTr), 113.25 (Ph DMTr), 127.12, 127.95, 128.14, 130.09, 130.20, 134.92, 135.20, 135.24 (Ph DMTr), 139.90, 140.14 (C-6), 144.32, 144.33 (C-2 DMTr), 150.70, 150.75 (C-2), 158.62, 158.68 (C-OCH₃ DMTr), 163.39, 1 63.46 (C-4).

Espectro de ^1H RMN (Cl_3CD , 500 MHz): (δ , ppm) 1.29 (s, 3H, CH_3), 1.33 (s, 3H, CH_3), 1.40 (d, $J=5.0$ Hz, 3 H, CH_3 CEE), 1.40 (d, $J=5.0$ Hz, 3 H, CH_3 CEE), 3.56-3.77 (m, 14H, CH_2CH_2 CEE, $\text{H}4'$, $\text{H}5'$), 3.80 (s, 6H, OCH_3), 4.12 (d, 1H, $J= 7.2$ Hz, $\text{H}-3'$), 5.20 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, $\text{H}-5$), 5.22 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, $\text{H}-5$), 5.29-5.34 (m, 2H, CH CEE), 6.04 (s, 1H, $\text{H}-1'$), 6.46 (s, 1H, $\text{H}-1'$),

Parte Experimental

6.85 (m, 8H, DMTr), 7.20-7.45 (m, 18H, DMTr), 8.18 (d, 1H, J= 7.9 Hz, H-6) 8.21 (d, 1H, J_{5,6}= 7.9 Hz, H-6).

5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita)-2'-O-(1-(2-cloroetoxi)etil)-2'-C-metiluridina (13)



Mr: 867,363

Rf0,44 Et Pet :AcOEt:Et₃N 4:3:0,01

Rendimiento 78%

560 mg de **12** (0.922 mmol) fueron disueltos en una mezcla de 3,4 ml de CH₂Cl₂ anhidro, 0,7 ml de THF anhidro y 0,92 ml de *N,N*-diisopropiletilamina (5,2 mmol). La mezcla se calentó a reflujo con agitación, se agregaron 0,23 ml de β-cianoetoxi-*N,N*-diisopropilaminoclorofosfina (1,16 mmol) que fueron inyectados en el seno de la solución. Luego de 15 minutos la reacción concluyó y se observó la aparición de un precipitado blanco. La mezcla fue enfriada y se agregaron 0,2 ml de metanol seguido con 25 ml de AcOEt y 1,5 ml de Et₃N. Se extrajo el crudo de reacción dos veces con una solución saturada de NaHCO₃ y luego con una solución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtró el sólido y se evaporaron los solventes. El producto fue purificado en columna de sílica gel eluyendo con una gradiente de CH₂Cl₂: Et₃N 100:1 → CH₂Cl₂:MeOH: Et₃N 95: 5: 0,1 obteniéndose el producto **13**. (78 % de rendimiento, sólido blanco)

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) (δ, ppm) 16.40 (CH₃), 16.89 (CH₃), 20.01 (CH₂CN fosforamidita) 20.07 (CH₂CN fosforamidita), 21.03, 21.46, 21.67 (CH₃ CEE), 22.82, 22.84, 22.91, 22.93 (CH₃ fosforamidita), 42.71 (CHs fosforamidita) 42.81 (CHs fosforamidita), 45.25 (CH₂Cl CEE), 45.30 (CH₂CICEE), 55.15 (OCH₃ DMTr), 55.19 (OCH₃DMTr), 57.61, 58.13, 58.17 (CH₂O fosforamidita), 60.35, 60.40, 60.45, 60.46 (C-5'), 64.54 (CH₂O CEE), 64.29 (CH₂O CEE), 73.85 (C-3'), 73.93 (C-3'), 81.90 (C-4') 82.02 (C-4'), 83.80 (C-2') 84.69 (C-2'), 87.02(C DMTr) 87.09 (C DMTr), 89.21 (C1'), 95.84(CHCEE), 95.17 (CHCEE), 102.43 (C-5), 102.45 (C-5), 113.14, 113.21, 113.24 (Ph, DMTr), 116.81(CN fosforamidita), 117.34 (CN fosforamidita), 127.08, 127.11, 127.94, 127.96, 128.14, 130.08, 130.18, 134.93, 134.98,135.21, 135.25,

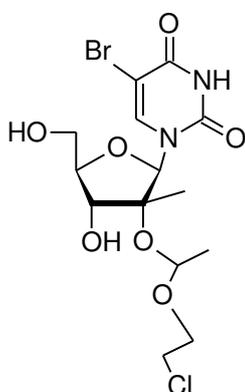
Parte Experimental

135.45 (Ph DMTr), 139.88(C-6), 140.06 (C-6), 144.29 (Ph DMTr), 144.32 (Ph DMTr), 150.64 (C-2) 150.68 (C-2), 158.60, 158.62, 158.65, 158.66 (C-OCH₃ DMTr), 163.26 (C-4), 163.33 (C-4).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃ 500 MHz): (δ, ppm) 0.96-1.14 (m, 72H, CH₃, CH₃ CEE, CH₃s fosforamidita), 2.66 (m, 4H, CH₂CN), 3.56-3.77 (m, 28H, CH₂-CH₂CEE, H4', H5'), 3.79 (m, 24H, OCH₃), 3.80-4.42 (m, 16 H CH fosforamidita CH₂Ofosfarmidita) 5.01-5.03 (m, 4H, H-5), 5.38-5.43 (m, 4H, CHCEE), 6.01 (s, 1H, H-1'), 6.03 (s, 1H, H-1'), 6.31 (s, 1H, H-1'), 6.33 (s, 1H, H-1'), 6.85 (m, 16H, DMTr), 7.20-7.40 (m, 36 H, DMTr), 8.17-8.821 (m, 4H, H-6).

Espectro de ³¹P NMR (CDCl₃): (δ, ppm) 149.46/149.69/150.73/150.84

5-Bromo-2'-O-(1-(2-cloroetoxi)etil)-2'-C-metiluridina (**14**)



Mr : 443,678

Rf 0,15 CH₂Cl₂:MeOH 95:5

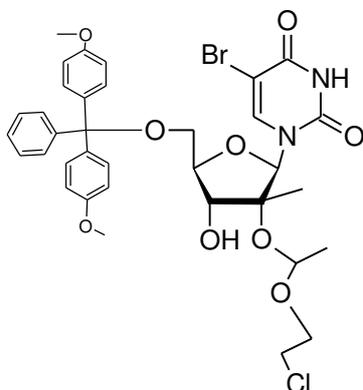
Rendimiento 62 %

171 mg de **11** (0,47 mmol) fueron disueltos en 4,85 ml de ácido acético glacial y 3,46 ml de Py. Luego se agregaron 0,16 ml de una solución de 9% Br₂ en CH₂Cl₂. Tras reaccionar durante toda la noche se evaporaron los solventes y se purificó en una columna de sílica gel utilizando un gradiente de CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂: MeOH 95:5 obteniendo **14** (129 mg ,62% rendimiento sólido blanco) y recuperando producto de partida **11** sin reaccionar.

Espectro de ¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 16.39 (CH₃), 16.45 (CH₃) 20.93 (CH₃CEE), 21.94 (CH₃CEE), 42.68 (CH₂-Cl CEE), 42.75 (CH₂-Cl CEE), 58.42 (C-5'), 63.68, 64.25 (CH₂O CEE), 72.75(C-3'), 83.05 (C-4'), 83.95 (C-2'), 84.74 (C-2'), 89.13 (C-1'), 95.34(CHCEE), 96.20 (CHCEE), 104.00 (C-5), 104.56 (C-5), 139.48 (C-6), 139.98 (C-6), 150.56 (C-2), 150.61 (C-2), 159.73 (C-4).

Espectro de ¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.26 (s, 3 H, CH₃), 1.33 (s, 3 H, CH₃), 1.40 (d, J = 5.2 Hz, 3 H, CH₃CEE), 1.45 (d, J= 4.2 Hz, 3 H, (CH₃CEE), 3.61-3.98 (m, 14 H, CH₂ CEE, OCH₂ CEE, H-5', H-4'), 4.04 (sa, 2 H, H-3'), 5.39-5.46 (m, 2 H, CH CEE), 6.06 (s, 1 H, H-1), 6.47 (s, 1 H, H-1), 8.88 (s, 1H, H-6), 8.95 (s, 1H, H-6).

Parte Experimental

5-Bromo-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-(1-(2-cloroetoxi)etil)-2'-C-metiluridina (15)

Mr Teórico: 667,145

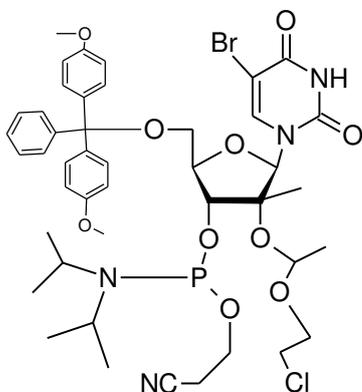
Rf 0,35 EtPet: AcOEt: Et₃N
4:3:0,01

Rendimiento 80%

100 mg (0,225 mmol) de **14** fueron disueltos en 1,8 ml de piridina anhidra y 0,12 ml de Et₃N (0,51 mmol) bajo atmósfera de N₂. Luego 0,29 g de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,86 mmol) y 1,29 mg de 4-dimetilaminopiridina (0,014 mmol) fueron agregados. La reacción fue agitada durante 15 horas a temperatura ambiente. Al verificar la usencia del producto de partida por ccd se agregó 1 eq de agua. La mezcla fue extraída dos veces con 30 ml de Et₂O. La fase etérea se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el solvente a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica Gel utilizando un gradiente de Hex:Et₃N 100:1 → Hex: AcOEt: Et₃N 50:50: obteniendo **15** (120 mg 80 % de rendimiento). El producto no fue caracterizado por RMN, fue utilizado directamente en la siguiente reacción.

Parte Experimental

5-Bromo-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidita)-2'-O-(1-(2-cloroetoxi)etil)-2'-C-metiluridina (**16**)



Mr: 946,259

Rf0,44 Et Pet :AcOEt:Et₃N 4:3:0,01

Rendimiento 77%

120 mg de **15** (0,1680 mmol) fueron disueltos en 0,65 ml de CH₂Cl₂ anhidro, 0,02 ml de THF anhidro y 0,18 ml de *N,N*-diisopropiletilamina (1,01 mmol) . La mezcla se calentó a reflujo con agitación y 0,045 ml de β-cianoetoxi-*N,N*-diisopropilaminoclorofosfina (0,22 mmol) fueron inyectados en el seno de la solución. Luego de 15 minutos la reacción concluyó y se observó la aparición de un precipitado blanco. La mezcla fue enfriada y se agregaron 0,2 ml de metanol seguido con 5 ml de AcOEt y 0,5 ml de Et₃N . Se extrajo el crudo de reacción dos veces con una solución saturada de NaHCO₃ y con una solución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ y se evaporaron los solventes. El producto fue purificado en columna de sílica CH₂Cl₂: Et₃N 100:1 → CH₂Cl₂:MeOH: Et₃N 95: 5: 0,1 obteniendo **16** (122,44 mg , 77% de rendimiento, sólido blanco).

Espectro de ¹³C RMN (Cl₃CD, 125 MHz): (δ, ppm) 16.65 (CH₃), 16.91 (CH₃), 20.0 (CH₂CN fosforamidita), 20.1 (CH₂CN fosforamidita), 21.05 (CH₃CEE), 21.45 (CH₃CEE), 22.80, 22.81, 22.89, 22.91 (CH₃ fosforamidita), 42.70, 42.80 (CH₃fosforamidita), 45.25 (CH₂Cl CEE), 45.29 (CH₂Cl CEE), 55.13 (OCH₃ DMTr), 55.17 (OCH₃ DMTr), 57.61, 58.14, 58.15 (CH₂O fosforamidita), 60.33, 60.37, 60.43, 60.46 (C-5'), 64.34, 64.29 (CH₂O, CEE), 73.78, 73.90 (C-3'), 78.01, 82.56 (C-4'), 83.78, 84.60 (C-2'), 87.00, 87.09 (Ph₃ DMTr), 89.21 (C-1'), 95.78, 95.02 (CH, CEE), 103.03,104.45 (C-5), 113.10,113.18,113.20 (Ph, DMTr), 116.70,117.14 (CN fosforamidita), 127.07, 127.09, 127.89, 127.90,128.12, 130.00,130.18, 134.9,134.96,135.21,135.25,135.45 (Ph DMTr), 139.85,140.06 (C-6), 144.02,144.25 (Ph DMTr), 150.03,150.17 (C-2), 58.21,158.58,158.62,158.66 (OCH₃ DMTr), 162.86,163.23 (C-4).

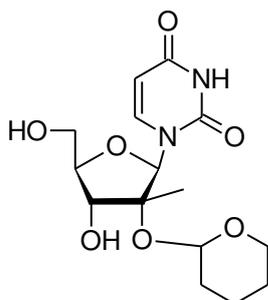
Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 0.93-1.13 (m, 72H, CH₃, CH₃ CEE, CH₃s fosforamidita) 2.62 (m, 8H, CH₂CN), 3.57-3.77 (m, 28H, CH₂-CH₂CEE, H4',H5'), 3.79 (m, 24H, OCH₃), 5.01- (m, 16H CH fosforamidita CH₂O fosforamidita), 5.38-5.43 (m, 4H, CH CEE), 6.01(s, 1H, H-1'),

Parte Experimental

6.03(s, 1H, H-1'), 6.31(s, 1H, H-1'), 6.33 (s, 1H, H-1'), 6.85 (m, 16H, DMTr), 7.20-7.40 (m, 36H, DMTr), 8.17-8.21 (m, 1H, H-6).

Espectro de ^{31}P NMR (CDCl_3): (δ , ppm) 149.93,149.69,150.00,150.08

2'-O-tetrahidropirani-2'-C-metiluridina (17)



Mr: 426,41

Rf : 0,5 CH_2Cl_2 : MeOH 95:5

Rendimiento 55%

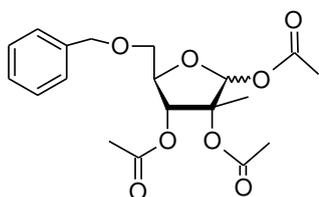
134 mg de del **10** (0,4 mmol) fueron agregados a una solución de 3,4-dihidro-2H-pirano (0,52 ml 5,7 mmol, 1,4 eq.) con 5 mg de p-toluensulfonato de piridinio (0,2 mmol) bajo atmósfera de argón . La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, luego se evaporó y el producto se extrajo con CH_2Cl_2 /agua. La fase orgánica fue secada con $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ anhidro. Se purificó en una columna de sílica gel utilizando CH_2Cl_2 /MeOH 98:2. Se repitió el procedimiento descrito para el compuesto (**9**) obteniendo **17** como una mezcla epimérica (93 mg, 55 % de rendimiento, sólido blanco)

^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 15.7(CH_3), 16.5 (CH_3), 20.4 (C-3 THP), 20.7 (C-3 THP), 24.8 (C-4 THP),25.3 (C-4 THP), 31.8(C-2 THP) ,31.9 (C-2 THP), 61.9 (C-5'), 62.1 (C-5'), 64.1(C-5 THP), 64.6 (C-5 THP), 72.5 (C-3'), 73.1 (C-3'), 82.5 (C4'), 82.7 (C4'), 85.2 (C-2'), 85.4 (C-2'), 90.2(C1'), 95.1 (C-1 THP), 95.5 (C-1 THP), 102.0(C-5), 102.1 (C-5) 140.2 (C-6), 150.8 (C-2), 164.7 (C-4).

^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.28 (m, 2H H-3 THP), 1.27 (s 3H, CH_3), 1.30 (s 3H, CH_3); 1.57 (m, 3H H-3', H-4'THP), 1.85 (m, 1H, H-2, H2'THP), 3.37-4.05 (m, 5H, H-4, H-5', H-5 y H5' THP), 4.07 (m, 1H, H-3'), 4.15 (m, 1H, H-3'), 4.94 (m 1H, H-1 THP), 5.12 (m 1H, H-1, THP), 5.73 (d, 1H, J=9.0 Hz, H-5), 5.74 (d, 1H, J =9.0 Hz, H-5); 6.03 (s, 1H, H-1'), 6.51 (s, 1H, H-1'), 7.93 (d, 1H, J =9.0 Hz H-6), 8.02 (d, 1H, J =9.0 Hz H-6).

Parte Experimental

5-O-Bencil-1,2,3 tri-O-acetil-2-C-metilribosido(18)



Mr: 380,39

Rf 0,69 AcOEt n-Hex 6:4

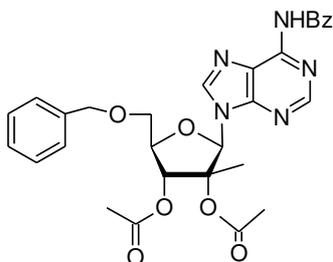
Rendimiento 65%

2 g (7,87 mmol) de **5** fueron disueltos en 40 ml de piridina anhidra bajo atmósfera de N₂. La mezcla se enfrió a 0°C y 3,9 ml de anhídrido acético fueron agregados gota a gota. Luego de agitar 24 hs a temperatura ambiente la mezcla se calentó a 100°C durante 2 hs. Luego se extrajo con una solución saturada de NaHCO₃ y con una solución saturada de NaCl. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y luego evaporada a presión reducida. El producto resultante fue purificado en una columna de sílica gel n-Hex: AcOEt 7:3 para obtener el producto **18** (1,94 g 65 % rendimiento, aceite amarillento).

Espectro de ¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 15.93 (CH₃), 20.49, 20.71, 21.49, 20.54, 20.82, 21.07 (CH₃ Ac), 68.76(C-5), 69.49 (C-5), 73.15 (CH₂ Bn), 73.42 (CH₂ Bn), 74.76 (C-3), 74.95 (C-3), 79.38 (C-4), 85.49 (C-2), 97.021(C-1), 98.31 (C-1), 127.41, 127.51, 128.12, 128.19, 137.75, 137.78 (Bn), 168.70, 169.10, 169.83, 168.92, 169.45, 169.97 (CO Ac)

Espectro de ¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.57 (s, 3H, CH₃), 1.60 (s, 0.8H, CH₃) 1.93 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.06(s, 3H, CH₃ Ac), 2.084 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.00(s, 0.8 H, CH₃ Ac), 2.05 (s, 0.8 H, CH₃ Ac), 3.56 (dd, J₁ = 3.7 Hz, J₂ = 10.2 Hz, 1H, H-5), 3.65 (dd, J₁ = 4.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz, 1H, H-5) Ver H 5 e H aromáticas, 4.20-4.23 (m, 1H, H-4), 4,54 (sa, 2 H CH₂Bn), 4,57 (sa, 0,53 H CH₂Bn), 5.12 (d, J₁= 4.0Hz,H-3), 5.40 (d,J₁=7.8 Hz, 1 H, H-3), 6.35 (s, 0,26H, H-1), 6.45(s, 1H, H-1).7.24-7.28 (m, 1,3 H, Bn), 7.30-7.34 (m, 5H, Bn)

5'-O-bencil-6-N-benzoil-2',3'-di-O-acetil-2'-C-metiladenosina (19)



Mr: 559,56

Rf 0,65 AcOEt

Rendimiento 49%

0,275 g de 6-N-benzoiladenina (0,57mmol) fueron suspendidos en 2,88 ml de acetonitrilo seco bajo atmósfera de N₂. 0,34 ml de N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (1,4

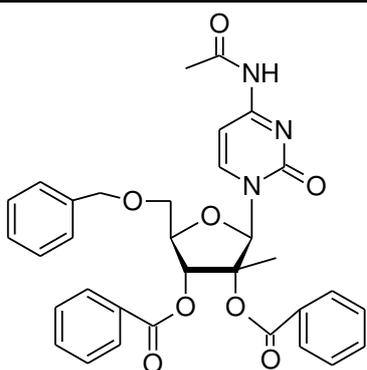
Parte Experimental

mmol) fueron agregados a la suspensión agitada magnéticamente. La mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos y la suspensión se convirtió en una solución incolora. Luego de llevar la mezcla a temperatura ambiente 0,230 g de **18** (0,6 mmol) fueron agregados. Luego se adicionaron gota a gota en el seno de la solución utilizando una cánula metálica 192 mg de trifluorometanosulfato de trimetilsililo (0,85 mmol). Tras 20 horas de agitación a temperatura ambiente no se detectó producto de partida por ccd. Se agregaron 200 ml de AcOEt. La mezcla luego se extrajo con una solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica fue secada con Na₂SO_{4(s)} y evaporada a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de CH₂Cl₂ 100% → CH₂Cl₂: MeOH 95:5 obteniendose **19** (880 mg, 49 % de rendimiento)

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (δ, ppm) 17.23 (CH₃) 20.59 (CH₃ Ac), 21.55 (CH₃ Ac), 67.97 (C-5'), 73.58 (CH₂Ph), 74.02 (C-3'), 80.99(C-2') 85.32 (C-4'), 89.39 (C-1'), 123.10 (C-5), 127.83,127.90, 127.95, 127.97, 132.77, 133.64, 137.38, (Bz, Bn), 141.79 (C-8), 149.7 (C-4), 149.67 (C-2), 152.99 (C-6), 164.68 (COBz), 169.69(COAc),169.75 (CO Ac).

Espectro de ¹H RMN (Cl₃CD, 500 MHz): (δ, ppm) 1.41 (s, 3H, CH₃), 2.12, (s, 3H, CH₃ Ac), 2.14 (s, 3H, CH₃ Ac), 3.80 (dd, 1H, J₁= 10.39 Hz, J₂= 4.6 Hz, H-5), 3.89 (dd, 1H, J₁= 10.4 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-5), 4.32 (m, 1H, H-4), 4.64 (sa, 2H, CH₂Ph) 5.58 (d, J= 6.7 Hz, 1H, H-3'), 6.60 (s, 1H, H-1'), 7.27-7.62 (m, 10 H, Bz, Ph), 8.03(s, 1H, H-2), 8.045 (s, 1H, H-2), 8.43 (s, 1H, H-8), 9.23 (sa, 1H, NH).

4-*N*-acetil-5'-*O*-bencil-2',3'-*O*-dibenzoil-2'-*C*-metilcitosina (**20**)



Mr 597,614

Rf 0,2 AcOEt : Hex 6:4

Rendimiento 68%

57 mg de 4-*N*-acetilcitosina (0,373 mmol) fueron suspendidos en 1,2 ml de acetonitrilo seco bajo atmósfera de N₂. 0,185 ml de *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (0,74 mmol) fueron agregados a la suspensión agitada magnéticamente. La mezcla se agitó y calentó a reflujo durante 30 minutos, la suspensión se convirtió en una solución incolora. Luego de llevar la mezcla a temperatura ambiente 50 mg de **6** (0,09 mmol) fueron agregados. Entonces se adicionaron 0,05 ml de SnCl₄ (0,05 mmol) gota a gota

Parte Experimental

en el seno de la solución utilizando una cánula metálica y luego de 3 horas no se detectó producto de partida por ccd. Se agregaron 3 ml de AcOEt y la mezcla luego se extrajo con una solución concentrada de NaHCO_3 . La fase orgánica fue secada con $\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{s})$ y evaporada a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica gel utilizando un gradiente de Hex: AcoEt 6:4 \rightarrow 7:2. De esta manera se obtuvo **7** (40,5mg 68,2% de rendimiento).

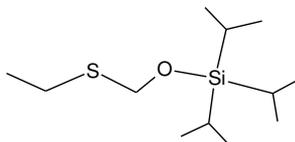
Espectro de ^{13}C NMR (Cl_3CD , 125 MHz): δ 17.66(CH_3), 24.63 (CH_3 Ac), 60.35 (C-5'), 68.36 (CH_2Ph), 73.80 (C-3'), 82.18 (C-2'), 85.59 (C-4'), 96.63 (C-1'), 101.36 (C-5) 127.90, 128.10, 128.27, 128.35, 128.59, 129.69, 129.85, 129.75, 129.95, 133.25, 133.42 (Bz,Bn), 137.30 (C-6), 154.93 (C-2), 163.01 (C-4), 165.01(CO Bz), 165.30 (CO Bz), 171.10 (COAc).

Espectro de ^1H NMR (Cl_3CD , 500 MHz): δ 1.63 (s, 3 H, CH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3Ac) 3.62 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, 1 H, H-5'), 4.00 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, 1 H, H-5'), 4.50 (td, $J = 5.3, 2.6, 2.6$ Hz, 1 H, H-4'), 4.62 (sa, 2 H, CH_2Ph), 5.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, H-5), 5.76 (d, $J = 5.3$ Hz, 1 H, H-3'), 6.79 (s, 1 H, H-1'), 7.27-7.58 (m, 15 H, Bz, Bn), 7.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, H-6),

Parte Experimental

Síntesis del TOM-Cl

Triisopropilsilil(etiltio)metil éter



Mr 248,497

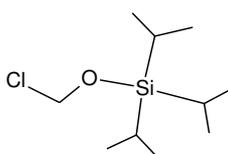
Rendimiento 85%

3,06 g (0,102 mol) de paraformaldehído fueron suspendidos en 7,5 ml de EtSH (0,102 mol) y enfriados a 4 °C. Luego se agregó 1 gota de NaOH 10 M y se permitió que la reacción llegue a T. ambiente, al llegar a los 15 °C aprox. Se observó una reacción exotérmica. Luego de agitar 1 h a 40 °C se llevó la mezcla a temperatura ambiente y se agregaron 100 ml de CH₂Cl₂, 1-H-imidazol (13,8 g, 0,204 mol) y ⁱPrSiCl (20,5 ml, 0,097 mol). La suspensión fue agitada durante 14 hs a temp ambiente. Luego se agregaron 200 ml de n-hexano y se extrajo con una solución 10% de NaH₂PO₄. Se secó la fase orgánica con Na₂SO_{4(s)} anhidro y luego se destiló a presión reducida obteniendo el producto (20,6 g 85 % de rendimiento, líquido incoloro).

¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.08-1.18 (m, 21H, iPrSi); 1.31 (t, J= 7.4 Hz, 3H, MeCH₂); 2.71 (q, J=7.4 Hz, 2H, MeCH₂); 4.88 (s, 2H, SCH₂O).

¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 12.0 (Me₂CH); 15.0 (Me₂CH); 17.9 (MeCH₂); 24,7 (MeCH₃); (76.1 (SCH₂O)

Cloruro (triisopropilsililoxi)metilo



Mr 222,829

Rendimiento 95%

Una solución de triisopropilsilil(etiltio)metil éter a 4°C (17,6 g, 0,07 mol) en CH₂Cl₂ fue tratada con SO₂Cl₂ (5,74 ml, 0,07 mmol) agitando la mezcla durante 1 hora. El líquido amarillo luego fue destilado a presión reducida para dar el producto deseado (14,8 g, 95%)

¹H NMR (Cl₃CD, 500 MHz): δ 1.08-1.10 (m, 21H, iPrSi); 5,66 (s, 2H, ClCH₂O)

¹³C NMR (Cl₃CD, 125 MHz): δ 11,8 (Me₂CH); 17.7 (MeCH₃); (76.6 (ClCH₂O)

Parte Experimental

Determinación de la estabilidad de los grupos protectores en medio ácido (ciclo de síntesis)

Los productos **11** y **17** fueron disueltos en metanol y transvasados en sendos eppendorfs. Luego de liofilizar las muestras se agregó 1 ml de DCA 2% en CH₂Cl₂ a cada eppendorf y se tomaron alícuotas a distintos tiempos que fueron tratadas con Na₂CO_{3(s)} y agitadas en un baño ultrasónico. Luego las muestras fueron evaporadas y resuspendidas en ACN. Tras centrifugar a 13000 rpm se analizó el sobrenadante mediante un HPLC utilizando un gradiente de buffer de acetato de trietilamonio (TEAA) pH7 y ACN indicado en la siguiente tabla.

% ACN	Tiempo (min)
8	0
60	20
8	30

Parte Experimental

2.5.2 -Síntesis de los Oligonucleótidos

La síntesis en fase sólida fue realizada mediante el método de las β -cianoetilfosforamiditas en un sintetizador automático utilizando la escala 1 μ M. Se usó como fase sólida un soporte de vidrio de poro controlado de 500 Å sobre el cual se encuentra unido covalentemente el primer monómero (extremo 3'). Las fosforamiditas fueron analizadas por ^{31}P RMN antes de ser utilizadas para verificar su integridad y luego fueron disueltas en ACN anhidro hasta alcanzar una concentración de 1 mg/ml. Durante el ciclo se utilizó TCA 3% para los oligonucleótidos sin 2'-C-metiluridina, una vez incorporada la modificación se utilizó DCA 2% en CH_2Cl_2 . Se activaron las fosforamiditas con 5-etiltio-1*H*-tetrazol en ACN anhidro. Las líneas que alimentan las fosforamiditas y el activante fueron mezcladas antes de ingresar a la columna. Para el enmascaramiento de los oligonucleótidos que no reaccionaron se utilizó anhídrido *t*-butilfenoxiacético para las secuencias de ARN y anhídrido acético para las ADN, en ambos casos se utilizó *N*-metilimidazol para aumentar la reactividad de los oxhidrilos. Se utilizó yodo en THF para oxidar el fosforo (III) del enlace fosfito triéster a fósforo (V). Para modificar el fosfato y obtener el fosforotioato se utilizó el reactivo de Beaucage (3*H*-1,2-benzoditio-3-ona-1,1-dioxido)(Iyer R. 1990) en lugar de la solución oxidante ya descrita. Se modificó el protocolo del sintetizador editando el archivo de comandos para invertir el orden de los pasos de oxidación y capping. Para incorporar los 2'-C-metilnucleótidos se realizó un procedimiento denominado "doble acoplamiento" que consiste en repetir el paso de acoplamiento antes de enmascarar las posiciones sin reaccionar. Al finalizar los ciclos de síntesis eliminó el paso de dedimetoxitritilación para el ADN, mientras que el ARN fue sintetizado DMT-OFF para su purificación por HPLC de intercambio iónico.

Oligonucleótidos ADN

Las síntesis de oligonucleótidos ADN fueron utilizadas para poner a punto la concentración del ácido del paso de detritilación y fueron sintetizados en un equipo ABI 392. Al finalizar el ciclo se extrajo la fase sólida de la columna sin realizar el último paso de detritilación. Estos Oligos DMT-on fueron suspendidos en $\text{NH}_3(\text{C})$ durante 24hs en un vial cerrado. Luego se evaporó el solvente y se disolvió la muestra en buffer TEAA pH:7. Los productos fueron analizados por HPLC utilizando un gradiente ACN/ buffer TEAA pH 7 como fase móvil en las proporciones indicadas a continuación.

Parte Experimental

% ACN	Tiempo (min)
16	0
22	8
30	28
60	35
60	38
16	50

Desprotección y purificación de Oligonucleótidos de ARN

Los oligonucleótidos de ARN de 12 monómeros de longitud fueron desprotegidos en una mezcla 1:1 de MeNH₂ (55%) y NH₃ saturada durante 10 minutos a 55°C en un recipiente sellado al que previamente se le transfirió la fase sólida (a partir de este punto se utilizó material estéril y agua tratada con DEPC). Luego se tomó el sobrenadante y se enjuagó dos veces la fase sólida con la misma mezcla básica y con etanol. Se juntaron los lavados y se evaporaron en una centrifuga concentradora (SAVANT). Una vez secos se agregó la mezcla desilante (trietilamina trihidrofluoruro, trietilamina y *N*-metilpirrolidinona, 4/3/6, v/v/v) y se trataron por 90 minutos a 65°C. Luego se agregó 1 ml de 1-butanol y se enfrió a -70°C durante 30 minutos y se centrifugó a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a -20°C. Se descartó el sobrenadante y se purificó el precipitado por HPLC-IO utilizando una columna semipreparativa termostatzada a 55°C y un gradiente de agua (DEPC) / LiCl 1M (DEPC) como fase móvil.

Tiempo	caudal	% LiCl 1M
0	5 ml/min	0
28	5 ml/min	49
29	5 ml/min	100

Luego de recolectar las fracciones con tiempo de retención adecuado se evaporó el agua en un concentrador y se desalaron los oligos con una columna de Sephadex G-50, sembrando el total del oligo en 1 ml de agua. Se eluyeron 5 ml de agua y se tomaron fracciones de 1 a 1,5 ml. Luego de identificar las de mayor

Parte Experimental

absorbancia se toma una alícuota para realizar un espectro de masa MALDI y el resto se evaporó a sequedad.

Purificación de las Ribozimas

Los oligonucleótidos más largos y con fosforotiatos en los extremos fueron tratados inicialmente de la misma forma que los descritos anteriormente. Se realizaron purificaciones por HPLC-IO y/o por PAGE de acuerdo al rendimiento obtenido y el perfil de HPLC-IO. Las fracciones luego fueron analizadas por PAGE analítico.

Condiciones del HPLC-Intercambio Inonico

Tiempo	caudal	% LiCl 1M
0	5 ml/min	0
5	5 ml/min	15
50	5 ml /min	80
55	5 ml /min	100

Condiciones del Gel Preparativo:

Se preparó un gel con 16 % acrilamida (19:1), 7M urea en TBE 1X. Las dimensiones del gel fueron de 200 X 250 X 1 mm. Luego de una precorrida de 1 hora con el gel vacío se sembraron entre 400 y 1000 µg de oligonucleotido por calle junto con el buffer de siembra (40 % formamida, 5 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol). Se corrió a 300 V hasta observar la migración del marcador hasta la distancia desada.

Luego se identificaron las bandas a extraer poniendo el gel sobre una placa de sílica con indicador fluorescente e iluminando con luz UV a 254 nm. Se extrajeron las bandas de interés utilizando un bisturí y se transfirieron los fragmentos de gel a tubos libres de RNAasas. Se centrifugaron durante 1 minuto a velocidad máxima (12000 rpm) y se rompió mecánicamente el pellet para maximizar la eficiencia de extracción. Luego se sumergieron en 500 – 1000 µl de buffer 500 nM acetato de sodio (pH 5,2) 1% SDS, 1mM EDTA. Se agitaron los tubos durante 12 horas a temperatura ambiente, luego el sobrenadante se transfirió a una columna con un filtro "Quantum Prep Freeze 'N Squeeze" de Bio-Rad. Se centrifugaron las columnas a 12000 rpm y luego el ARN se precipitó agregando 3 volúmenes de etanol absoluto y dejando en reposo a -70 °C y luego centrifugando a -17°C.

Parte Experimental

El precipitado se desaló en columnas NAP-10 (General Electric) y se evaporaron las fracciones luego de su cuantificación espectrofotométrica.

Gel Analítico

Se preparó un gel con 16 % acrilamida (19:1), 7M urea en TBE 1X. Las dimensiones del gel fueron de 100 X 100 X 0,6 mm. Se sembraron entre 100-2000 ng de oligonucleotido por calle junto con el buffer de siembra (40 % formamida, 5 mM EDTA, 0,05% Azul de Bromofenol). Se corrió a 300 V hasta observar la migración del marcador hasta la distancia deseada.

Luego el gel fue removido de la cuba y separado de los vidrios. Se fijó el gel en una solución 20 % TCA durante 20 minutos o hasta que los marcadores de frente no fueran más visibles. Luego se lavó 3 veces por 5 minutos con agua mQ y se agregó una solución de AgNO_3 0,1%. Se agitó durante 20 minutos. Luego se reveló el gel con la solución reveladora recién preparada y fría (3 % Na_2CO_3 , 0,03 % formaldehído). y se fijó el gel con una solución 10% de ácido acético.

2.5.3 Determinación del Melting Point y Dicroísmo Circular

Para la determinación de la estabilidad térmica se agregaron cantidades equimolares de la hebras sentido y antisentido ($2\mu\text{M}$ de cada hebra). Los experimentos se realizaron en una cubeta de cuarzo de 1 ml con 1 cm de paso óptico previamente lavada en un buffer fosfato pH 7 con 140 nM NaCl tapada con un tapón de Teflón. La mezcla de las hebras se calentó a 80°C y se enfrió lentamente hasta 0°C para permitir la formación del dúplex. Luego se calentó a razón de $0,5^\circ\text{C}$ por minuto registrando la absorbancia a 260 nm. Cada curva se midió dos veces y la temperatura fue extraída utilizando el modelo de dos estados.

Los experimentos de Dicroísmo Circular fueron realizados en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. Las determinaciones fueron llevadas a cabo en buffer fosfato pH 7 con 140 nM NaCl utilizando ambas hebras en la misma concentración que en los experimentos de Melting point. Se recolectó el espectro de los dúplex desde 190 nm hasta 260 nm a 20°C y a 10°C luego de ajustar el blanco. Los espectros resultantes son el promedio de 10 espectros individuales.

Parte Experimental

2.5.4- Estudio Computacional

El estudio computacional fue realizado utilizando el programa Amber 9 en paralelo en un cluster de 64 bits con 224 procesadores con conectividad infiniband.

En primer lugar se generaron las secuencias ARN sin modificar utilizando el modulo nucgen del programa. Esta estructura no modificada fue editada en el programa Leap cargado con el campo de fuerzas parm99.ff00 modificado con parmbscO. En este programa se agregaron los Hidrógenos faltantes, se neutralizaron las cargas con iones Na^+ . Se confinó la molécula y los iones en una caja octaédrica de agua TIP3PBOX. Luego se generaron los archivos de topologías (.prmtop o .top) y los archivos conteniendo las coordenadas de los átomos y las dimensiones de la caja periódica (.inpcrd o .crd)

Para generar las estructuras modificadas se editó la librería de Amber agregando la definición del nucleósido modificado con todos sus átomos, coordenadas y energías. Básicamente se tomó la uridina como molde y se agregaron los átomos del metilo y sus conectividades, se consideró que la carga total de nucleótido debía permanecer en -1. Una vez editada las librerías se realizó una copia del archivo generado en nucgen del dúplex natural y se editó el nombre del nucleósido modificado para que Leap lo encontrara en su biblioteca y agregara el metilo y los demás elementos ya mencionados para el dúplex natural. Se generaron los archivos .top y .crd de la misma manera que con el anteriormente descrito.

Los oligonucleótidos y los monómeros fueron sometidos a 2500 rondas de minimización. Para las primeras 1000 se utilizó "steepest descent minimization" ya que resultó ideal para remover contactos inadecuados en estructuras de elevada energía. Los siguiente 500 pasos se realizaron utilizando algoritmo de gradiente conjugado para obtener el mínimo local. Se utilizó un Cut-off de 10 angstroms.

Una vez minimizadas las estructuras fueron termalizadas de 0K a 325 K utilizando dinámicas de Langevin para controlar la temperatura utilizando una frecuencia de colisión de $1,0 \text{ ps}^{-1}$. Utilizando Particle Mesh Ewald (PME) se corrieron los ns necesarios para realizar el análisis detallado en la sección Resultados.

Los resultados fueron extraídos y analizados utilizando el módulo ptraj y los programa X3DNA y VMD para visualizar la trayectorias y estructuras promedio.

Parte Experimental

2.6 Estudio de actividad de las ribozimas

Los valores expresados en la discusión son representativas de tres experimentos independientes.

Transfección de Células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron incubadas a 37°C en una estufa humedecida con 5% de CO₂, la confluencia el día de la transfección fue del 50 %. Las células se lavaron dos veces con PBS y se agregó la mezcla previamente preparada de Oligofectamina, oligonucleótido y se completó agregando medio sin suero para cubrir la placa en su totalidad (1,5 ml). Las células se incubaron a 37°C durante 4 horas, luego se agregó medio de crecimiento con tres veces la concentración de suero fetal bovino charcoalizado sin remover la mezcla de transfección.

Para preparar el medio de transfección para realizar western blots se utilizaron placas de 60 mm de diámetro. Para microscopia confocal se utilizaron porta objetos compartimentalizados (chambers) con 200µl de capacidad.

Las mezclas de oligonucleótidos y oligofectamina empleadas en las transfecciones fueron preparadas utilizando las proporciones indicadas en el siguiente cuadro. El primer paso se mezcló la oligofectamina con el OptiMEM, se dejó reposar la mezcla 5 minutos y se agregó el oligonucleótido stock previamente diluido en Opti-MEM. La mezcla se agitó en un vortex y luego se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

	Stock Oligo (6,6 µM)	OptiMEM para diluir Stock	Oligofectamina	Opti-MEM para diluir OLigofect.	Medio sin suero	Volumen transfeccion	Volumen de Medio con suero 3X
Placa 60	15µl	262 µl	6 µl	22,5 µl	1200 µl	1500 µl	750 µl
Chamber	2 µl	32 µl	1,6 µl	6 µl	160 µl	200 µl	100 µl

Extracción de proteínas

Una vez finalizados los tratamientos, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato (PBS) y se recolectaron utilizando un scraper. Luego se sedimentaron por centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Se agregó buffer RIPA (50 mM tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5% desoxiglicolato de sodio y 1 % Nonidet P-40) con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Se lisaron durante una hora

Parte Experimental

en agitación con hielo. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido fue utilizado en los estudios de western blot.

Western Blot

Los extractos proteicos de la células en cultivo se diluyeron en buffer de siembra 4X (0,25 mM Tris; 20 % SDS; 4% sacarosa; 1mg/ml azul de bromofenol) con el agregado de 5% β -mercaptoetanol y se calentaron en baño termostatzado a 100°C durante 2 minutos. Se midió la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford. Las muestras se sembraron (50 μ g de proteína por calle) y se corrieron en geles entre 6 y 12 % de SDS-poliacrilamida-bispoliacrilamida (SDS-PAGE). Se transfirieron a membranas de PDVF (Biorad) previamente activadas (10 segundos en metanol), se bloquearon toda la noche a 4°C con una solución 5% leche descremada en PBS-Tween 0,1%, y se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en PBS-Tween 0,1% toda la noche a 4°C. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,1% y se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente y con agitación.

La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por reacción de quimioluminiscencia (ECL GE Healthcare Life Science) y placas fotosensibles (Kodak Biomax Light film). Luego de reveladas, las membranas fueron tratadas con "stripping buffer" (62,5 mM TRIS, 2% SDS, 10mM β -mercaptoetanol, pH 6,7) para ser neutralizadas. Se utilizó un densitómetro (BioRAD) para medir las bandas obtenidas utilizando el programa Molecular Analyst.

Inmunofluorescencia

Las células MCF7 fueron crecidas sobre cubreobjetos con medio DMEM/F12 + 10 % suerofetal bovino durante 48 hs, luego de realizar las transfecciones se fijaron las células con 4% formaldehido en PBS durante 20 minutos. Se lavaron con PBS y luego fueron permeabilizadas con Triton X-100 0,1% en PBS durante 20 minutos. Se bloquearon con SFB 2% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Finalmente se volvieron a lavar con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con FITC (Zymed). Las células se analizaron en un microscopio confocal Nikon.

Parte Experimental

Ensayo de muerte Celular

La determinación de muerte celular fue realizada utilizando el método de yoduro de propidio. Luego de la transfección las células se lavaron con PBS y se tiñeron con yoduro de propidio. Luego las células se fijaron con formaldehído 4% (formol neutro) por 10 minutos y se lavaron con PBS. Más tarde se tiñeron los núcleos con DAPI. Se contabilizaron las células muertas sobre el total de células en tres experimentos independientes. Los valores obtenidos fueron analizados por ANOVA de 1 vía.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

3- Síntesis de los monómeros

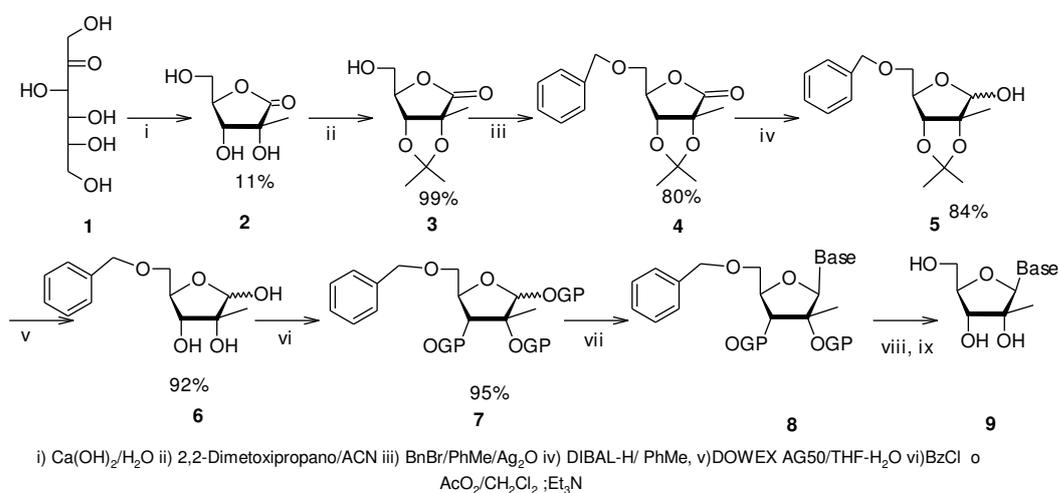
3.1- Objetivo

El presente capítulo pretende describir la ruta sintética desarrollada para la preparación de los 2'-*C*-metilnucleósidos, la búsqueda de un grupo protector adecuado para la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos y la preparación de las correspondientes fosforamiditas. El principal objetivo fue conseguir una metodología adecuada para la preparación de 2'-*C*-metilnucleósidos teniendo en cuenta el costo de los reactivos y la posibilidad de un potencial escalado. Se trabajó para obtener una ruta que permitiera obtener distintos nucleósidos modificados, tanto purínicos como pirimidínicos y las fosforamiditas en cantidades suficientes para realizar la síntesis de los oligonucleótidos necesarios para el resto del trabajo

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

3.2- Síntesis de 2'-C-metilnucleósidos

La ruta desarrollada y llevada a cabo durante este trabajo (Figura 34) consiste en el aprovechamiento de un reordenamiento de la fructosa en una medio básico, más específicamente en una solución saturada de hidróxido de calcio. Esta reacción es conocida hace más de un siglo (Peligot E. 1879) y entre los productos resultantes es posible encontrar la 2-C-metilribono- γ -lactona **2**. Esta lactona posee el metilo en la posición 2 en la configuración adecuada (R) para ser utilizada en la preparación de 2'-C-metilnucleósidos. El resto de la ruta se basa en proteger adecuadamente los grupos reactivos de la molécula para realizar la reducción de la lactona a ribosa y posteriormente realizar la glicosilación química. Antes de analizar en detalle cada reacción es importante remarcar que los rendimientos obtenidos a lo largo de toda ruta y la utilización de reactivos económicos permitió la implementación de la ruta a escala multigramo.



GP	Base	Reactivos	Rendimiento
Bz	U	vii) N,O bistrimetilsililacetamida, SnCl_4 , Uracilo	70%
		viii) $\text{HZ}/\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{AcOEt}/\text{AcOOH}$ ix) NH_3/MeOH	76%
Ac	Bz-A	vii) N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, (Me_3Si) trifluorometanosulfato, N6-benzoladenina	49%
		viii) $\text{HZ}/\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{AcOEt}/\text{AcOOH}$ ix) $\text{CaI B}/\text{Buffer Ph 7}$	
Ac	Ac C	vii) N,O bistrimetilsililacetamida, SnCl_4 , Ac-citosina	68 %

Figura 34- Ruta sintética llevada a cabo para la preparación de 2'-C-metilnucleósidos

La primera reacción de la ruta consiste en la obtención de una 1,4- γ -ribolactona con un grupo metilo unido al carbono de la posición 2. Esta reacción

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

puede realizarse a partir fructosa grado alimenticio mediante el agregado de una solución saturada de hidróxido de calcio grado técnico en agua previamente descarbonatada.

Si bien el rendimiento de la reacción es bajo (11%), el uso de ésta estrategia es conveniente debido al bajo costo de los reactivos involucrados. El primer objetivo de los ensayos efectuados fue reducir los tiempos de reacción que son del orden de 45 a 60 días a temperatura ambiente. Para ello se llevaron a cabo reacciones con distintos hidróxidos (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Pb^{2+}) y se monitorearon las reacciones por ccd. La utilización de hidróxido de plomo permitió obtener el producto **2** con rendimientos similares a los obtenidos con el hidróxido de calcio. Los tiempos de reacción y perfiles de productos resultaron similares en ambos casos, por lo que se abandonó la posibilidad de utilizar el hidróxido de Plomo, especialmente si se tiene en consideración la mayor complejidad a la hora de disponer de los residuos.

Una vez definidos los reactivos se estudiaron distintas condiciones de reacción. Se ensayaron las presentadas en trabajos recientes (Byung Yun Yang 1996) donde se propone que es posible realizar la reacción calentando a reflujo la mezcla durante dos horas utilizando una solución saturada de hidróxido de calcio. Luego de una purificación previa en una columna de sílica no pudo detectarse el producto **2** por ccd.

También se estudió la posibilidad de llevar a cabo la reacción a altas temperaturas utilizando radiación de microondas en lugar de calentamiento convencional. La posibilidad de modificar la cinética de las reacciones por el sobrecalentamiento (Loupy A. 2004) que ocurre bajo estas condiciones podrían favorecer la formación de productos de alto peso molecular en detrimento de los primeros compuestos numerados en la

Tabla 6 de la introducción. Para explorar esta posibilidad se utilizó un microondas multi-modo adaptado con un refrigerante, controlando únicamente el ajuste de la potencia del equipo. Si bien pudo detectarse la presencia del producto **2** por ccd en 4 minutos, se observaron también gran cantidad de subproductos de reacción por lo que se descartó esta posibilidad. Por otra parte la elevada concentración de iones presentes en el medio de reacción produce un calentamiento extremadamente rápido que además de aumentar el número de subproductos produce proyecciones peligrosas. Queda pendiente el ensayo de la reacción en un horno

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

monomodo con control de temperatura y reactores de teflón para estudiar el rendimiento en condiciones de alta presión.

Como fue mencionado anteriormente el punto clave para producir cantidades importantes del producto **2**, fue la puesta a punto de la purificación. En líneas generales este proceso consiste de las siguientes operaciones:

- Precipitación del Ca^{2+} en forma de $\text{CaCO}_{3(s)}$ por agregado de $\text{CO}_2(g)$
- Precipitación del remanente Ca^{2+} por formación de oxalato de calcio insoluble, mediante el agregado de una solución saturada de ácido oxálico
- Intercambio iónico del Ca^{2+} remanente por H^+ en una resina cationica DOWEX AG50 (acondicionada con ácido).
- Evaporación del agua.
- Cromatografía en sílica gel.
- Recristalización.

Debido al volumen utilizado (más 30 litros durante el escaldo) se intentó simplificar cada una de las operaciones. En primer lugar se evitó el filtrado de los precipitados de carbonato de calcio debido a que su tamaño de las partícula y su abundancia la operación de filtración resultaba inadecuada. En su lugar se decantó el precipitado y se separó el sobrenadante, luego el precipitado fue lavado con agua y centrifugado, maximizando la recuperación del crudo de reacción.

En el caso del precipitado de oxalato de calcio se procedió de manera similar. El precipitado se lavó con agua destilada y se permitió que el precipitado decantara nuevamente para poder retirar el sobrenadante. Repitiendo esta operación 2 veces se evitó la centrifugación. Esto es posible debido a que el oxalato en estas condiciones forma un precipitado con tamaño de partícula mayor que el CaCO_3 que resulta más compacto y atrapa menor cantidad de solución.

Una vez eliminada la mayor parte del calcio es necesario eliminar el resto que podría encontrarse como sal del ácido 2-C-metilribónico o incluso complejando los oxhidrilos de la ribosa. Debido al costo que implica realizar la columna de intercambio iónico para reemplazar el Ca^{2+} por H^+ se estudió la posibilidad de eliminar este paso y acidificar la mezcla con ácido clorhídrico diluido. Para ello se trataron en forma

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

diferenciada dos fracciones de producto. La fracción que no fue percolada en una resina de intercambio presentó un rendimiento un 60% menor luego de ser percolada en sílica y recristalizada en relación a la que se sometió a un intercambio exhaustivo. Este dato indica que la remoción completa del calcio es necesaria para obtener el producto en forma eficiente.

Una vez determinada la necesidad de realizar el paso de intercambio iónico se realizó una primera aproximación utilizando resinas de intercambio normalmente utilizadas en laboratorio (Dowex Ag 50 100- 200 mesh). Estas resinas son muy eficientes, sin embargo su alto costo hace imposible el tratamiento de las cantidades necesarias para obtener el producto necesario para el escalado de la síntesis. Por esta razón, se reemplazó la resina por una con mayor tamaño de partícula utilizada a nivel industrial para el acondicionamiento de aguas (DOWEX 600±50µm). Para poder realizar este paso en forma continua se utilizaron dos columnas en paralelo, una vez detectada la presencia de Ca^{2+} con negro de eriocromo T en una de las columnas se utilizó la segunda mientras la primera era tratada con ácido y luego con agua.

Luego de intercambiar el Ca^{2+} por H^+ , se evaporó el agua mediante una corriente de aire a 50 °C. De esta manera se evitó el uso de evaporadores rotatorios y bombas que no resultaron adecuados para la gran cantidad de agua proveniente de la reacción y de la columna de intercambio iónico. Una vez que no se detectó disminución en el volumen de líquido se preparó el producto para la cromatografía en columna. La mezcla obtenida luego del secado resultó inadecuada para ser sembrada en la cabeza de la columna, ya que sin un tratamiento previo forma una fase muy viscosa e inmiscible con el solvente de elución. La realización de la cromatografía en estas condiciones requirió de presiones muy altas de trabajo, arrojando una recuperación muy baja del producto. Este problema fue solucionado mediante la preparación de una pastilla que fue realizada agregando etanol absoluto al crudo de reacción y repitiendo la evaporación con corriente forzada de aire para deshidratar la mezcla. Luego se agregó una mezcla de sílica gel y tierras diatomeas y se homogenizó utilizando como solvente una mezcla etanol acetato de etilo en proporción 3 a 1. Se evaporó nuevamente el solvente y se resuspendió en un volumen adecuado de acetato de etilo utilizando un baño ultrasónico para lograr una suspensión homogénea. La fase móvil de la cromatografía (acetato de etilo) se calentó a 40°C favoreciendo la recuperación del producto. La preparación de la mezcla mediante

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

agregados sucesivos de solventes en combinación con el ultrasonido mejoró la recuperación de la lactona y permitió el escalado a escala multigramo.

La 2-C-metilribono- γ -lactona eluída de la columna fue purificada por Recristalización. Para favorecer este proceso se agregó n-hexano y se enfrió a 4^o C durante 3 horas. Es importante remarcar que es posible realizar una cosecha de los cristales formados y repetir el agregado de hexano, de esta manera se obtuvieron distintas fracciones distinto grado de pureza que fueron recristalizadas sucesivamente hasta obtener el producto puro.

Adicionalmente se hicieron intentos por realizar la formación del cetel cíclico en el paso previo a la recristalización, obtenido el producto **3** a partir del agregado de acetona y ácido p-toluenosulfónico directamente en el crudo de reacción. El principal objetivo era aumentar el R_f de los productos con dos oxhidrilos vecinos orientados en el mismo sentido como es el caso de los ribo derivados. Sin embargo esta idea fue descartada porque los resultados demostraron que la utilización del producto de partida recristalizado permite obtener mejores rendimientos, no obstante esta opción podría utilizarse en una escala semi industrial o industrial ya que evita los pasos de recristalización.

Resulta evidente que el protocolo de purificación requiere de numerosos pasos, sin embargo es importante tener en cuenta que el costo de los reactivos utilizados, la estereoselectividad la reacción y la alta pureza con la es posible obtener el producto permiten compensar estas dificultades.

Una vez purificada la 2-C-metilribono- γ -lactona fue necesario proteger los oxhidrilos para llevar a cabo la reducción a ribosa. Al finalizar la reducción estos grupos protectores deben ser reemplazados por acilos o benzoílos ya que como se explica más adelante son necesarios en la reacción estereoselectiva de glicosilación. El esquema de protección utilizado en este trabajo consiste en la utilización de dos grupos, un acetal para los oxhidrilos de las posiciones 2- y 3- y un grupo bencilo para la posición 5-. Esta combinación de grupos protectores permite remover el acetal sin alterar el bencilo, de esta manera se mantiene bloqueada la posición 5 y se evita la formación de estructuras piranósicas una vez convertida la lactona en ribosa. Por su parte el grupo isopropiliden resulta adecuado ya que puede ser introducido con muy buenos rendimientos utilizando 2,2-dimetoxipropano o acetona en medio ácido como reactivos. La utilización del primero produjo en un ligero aumento del rendimiento pero

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

en un eventual escalado podría ser reemplazado por acetona sin problemas. El ácido utilizado como fuente de protones es el ampliamente utilizado ácido *p*-toluensulfónico. Las observaciones realizadas durante el trabajo permitieron determinar que debe ser realizada a 30°C para evitar la precipitación de la lactona. La cinética y rendimiento de la reacción resultó ser dependiente de este factor. Este efecto fue evidente especialmente durante el escalado, donde se detectaron diferencias entre los distintos reactores utilizados en paralelo para la preparación del producto **3**. Para obtener resultados homogéneos en las reacciones en paralelo fue necesario calentar la mezcla de reacción antes del agregado del ácido y del 2,2-dimetoxipropano para asegurar la ausencia de núcleos de cristalización. Realizando este procedimiento y un agregado adicional de reactivos a las 24 hs se logró desplazar el equilibrio agotando la lactona desprotegida. De esta manera se puede obtener cuantitativamente el producto **3**.

El siguiente paso propuesto en la síntesis es la protección del oxhidrilo de la posición 5. La elección del bencilo como grupo protector esta basada en dos motivos; presenta una gran estabilidad a las condiciones de las reacciones posteriores, y es posible realizar su remoción selectiva una vez incorporada la base. Para lograr su incorporación con buenos rendimientos se ensayaron distintas condiciones. En una primera aproximación se utilizó $\text{KH}_{(\text{s})}$ para generar el alcoholato y PhBr como reactivo, sin embargo el rendimiento no fue el adecuado. Otro activante comúnmente utilizado es el óxido de plata, se llevó a cabo la reacción con éste producto y se determinó que la reacción procedía con buen rendimiento luego de dos horas a reflujo de tolueno.

En un intento por mejorar los resultados obtenidos con óxido de plata se realizaron ensayos agregando KI y $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{I}^-$ en cantidades catalíticas. Estos compuestos fuente de ioduro permiten, en muchos casos, modificar la especie reactiva ya que el ioduro sustituye al bromo, siendo el ioduro de bencilo formado más reactivo. En el caso particular de la reacción con el compuesto **3** el ioduro de potasio demostró ser más adecuado ya que permitió obtener rendimientos del 80%. Persiguiendo el mismo objetivo se llevó a cabo la reacción en un horno de microondas multimodo adaptado con un refrigerante enfriado con hielo seco (transparente a las microondas). Si bien se pudo detectar la aparición de producto por ccd se descartó esta metodología debido a aparición de subproductos con Rf similar al del producto que no habían sido encontrados en las condiciones de calentamiento tradicionales. Esta opción podría ser valida pero requiere una puesta a punto de las condiciones.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

A continuación se procedió a reducir la lactona debidamente protegida con hidruro de diisobutilaluminio (Dibal-H). Este reactivo es ampliamente utilizado en la química de los hidratos de carbono y permite la reducción controlada de ésteres a aldehído y en este caso de lactona a ribosa. Para evitar la reducción de la ribosa es necesario realizar la reacción a -78°C , a esta temperatura el intermediario tetraédrico de la Figura 35 es estable y no reduce la ribosa formada, luego es hidrolizado antes de aumentar la temperatura. La utilización de este reactivo es una de las claves que permitió superar las dificultades planteadas para la ruta de Jenkibsky y col. descrita en la introducción.

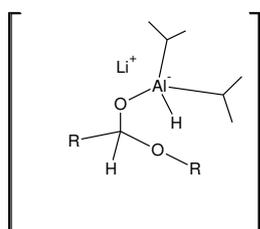


Figura 35 Diagrama del intermediario estable formado por el Dibal-H y un éster una vez concluida la primera reducción.

La reacción con DibalH fue llevada a cabo enfriando con un baño de hielo seco/acetona utilizando tolueno como solvente. El principal problema de esta reacción es la formación de una suspensión coloidal blanquecina. Este coloide se produce luego del agregado del metanol utilizado para quenchar la especie reductora. Este precipitado es muy difícil de filtrar y constituye un inconveniente ya que ocluye a la mezcla de reacción dificultando su purificación y causando mermas importantes en el rendimiento. Luego de ensayar distintas alternativas reducir las pérdidas de masa se encontraron las condiciones de extracción descritas en la parte experimental. Estas consisten en repetir extracciones con THF acelerando la decantación del precipitado insoluble mediante centrifugación. Llevando a cabo estos pasos fue posible obtener el producto deseado con excelente rendimiento.

Una vez reducida la lactona es necesario remover los grupos protectores y reemplazarlos con grupos que permitan la futura incorporación de la base mediante una reacción de glicosilación química. En este punto es muy importante dejar la posición 5 protegida para evitar la formación de productos piranósicos. Esta es la razón principal por la que se utilizan los grupos isopropiliden para la posición 2 y 3 y bencilo para la posición 5.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

Para remover el acetal que protege a los oxhidrilos de las posiciones 2 y 3 es posible utilizar, en principio, una gran variedad de reactivos y condiciones. La más eficiente en este caso consistió en la utilización de una resina de intercambio cationica (DOWEX-AG50) en su forma ácida y una mezcla THF/H₂O como solvente. La elección de esta mezcla de solventes permitió mantener al reactivo y el producto en solución. La clave para obtener buenos rendimientos fue la combinación de una agitación vigorosa y el calor utilizado para mantener el sistema en ebullición. Una vez concluida la reacción sólo fue necesario filtrar la mezcla para separar la resina insoluble. Para evitar la aparición de impurezas provenientes de la resina fue necesario realizar un acondicionamiento previo de la misma. Este pretratamiento consistió en dejar la resina a reflujo en la misma mezcla de solventes de la reacción y luego lavar exhaustivamente con agua a pH 2 seguido por una limpieza con agua calidad mQ a pH7. Con la resina acondicionada de esta manera se obtuvo el producto **6** con un 92% de rendimiento.

El producto obtenido luego de hidrólisis ácida del grupo isopropiliden (5-*O*-bencil-2-*C*-metilribosa (**6**)) es el sintón del cual divergen dos posibles estrategias para la obtención de distintos nucleósidos. Dependiendo del esquema de desprotección a utilizar en los últimos pasos de la ruta, es posible proteger los oxhidrilos de las posiciones 1, 2 y 3 con acetilos o con benzoílos. La elección del éster está relacionada con la estrategia de protección utilizada en los pasos posteriores. Los nucleósidos como la uridina no requieren de grupos protectores en la base durante la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos. Por ello puede utilizarse tanto benzoílos como acetilos para proteger los oxhidrilos del azúcar. La adenosina, en cambio presenta un grupo amino exocíclico que generalmente es protegido con un grupo benzoílo, este debe permanecer hasta el producto final de la ruta ya que es necesario en la síntesis en fase sólida. La dificultad en este caso consiste en que una vez realizada la reacción de glicosilación es necesario desproteger los oxhidrilos esterificados en presencia de la amida exocíclica de la base. Dado que la desprotección selectiva de los ésteres de benzoílos es difícil de realizar químicamente, se intentó modificar el esquema de síntesis. La estrategia (Figura 36) planteada consistió en acetilar los oxhidrilos en lugar de benzoílarlos de forma tal que más tarde pudieran ser desprotegidos selectivamente por una lipasa. Dado que la enzima no reconoce como sustrato la amida bencílica es posible realizar la desprotección quimioselectiva, sin agregar pasos adicionales de síntesis (ej: protección transitoria de los OH del azúcar, protección de la base). Según trabajos previos del laboratorio es posible desproteger la 2'-*C*-metiluridina peracilada

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

utilizando *Candida Antartica* Lipasa B (CAL-B) en buffer a pH7 (Iglesias L. 2000). Esta estrategia no sólo sería útil para la preparación de las fosforamiditas sino que mejoraría los rendimientos reportados en la síntesis de 2'-C-metilpurinas que son de 30%.

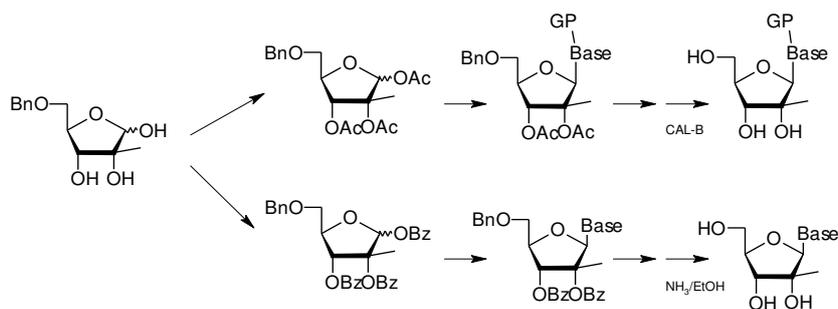


Figura 36 Estrategias de desprotección alternativas

En este trabajo se sintetizaron las ribosas protegidas con benzoílos como también con acetilos. La primera fue utilizada para la síntesis de 2'-C-metilnucleósidos pirimidínicos y el sintón acilado fue utilizado para preparar 2'-C-metilnucleósidos purínicos. Se realizó un ensayo preliminar para la desprotección con CALB determinando que es necesario desproteger la posición 5' del nucleósido para que sea aceptado como sustrato por la enzima.

La siguiente reacción de la ruta es la incorporación de la base mediante un glicosilación química conocida con el nombre de glicosilación de Vörbruggen (U. Niedballa 1970). Esta reacción utiliza un azúcar peracilada, y una base nitrogenada persililada aceptora del azúcar. La reacción es catalizada por un ácido de Lewis y transcurre a través de un intermediario aciloxonio que determina la estereoselectividad del proceso. Por esta razón la presencia del grupo éster en la posición 2' es fundamental (Figura 37) para obtener el nucleósido con la configuración correcta en el C-1'.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

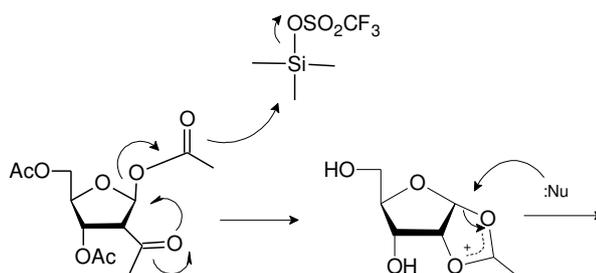


Figura 37 Mecanismo de la formación del intermediario aciloxonio responsable de la estereoselectividad de la reacción de glicosilación

La principal ventaja de esta reacción es que permite la incorporación de distintas bases tanto naturales como modificadas. Esta característica fue determinante para la elección de la estrategia sintética frente a la utilización de un nucleósido entero como producto de partida. Aunque el interés estaba centrado en la preparación de 2'-C-metiluridina y su correspondiente fosforamidita se avanzó en la síntesis de otros 2'-C-metilnucleósidos. De esta manera quedó allanado el camino para estudios posteriores de las propiedades de estos nucleósidos. Se avanzó en la síntesis dos pirimidinas: 2'-C-metiluridina, 4-N-acetil-2'-C-metilcitidina, y una purina: 6-N-benzoil-2'-C-metiladosina, obteniendo los productos de glicosilación indicados en la Figura 34. En todos los casos se optimizaron las relaciones molares de los reactivos, especialmente la cantidad de base y reactivo persililante obteniendo rendimientos entre 49% y 76%.

Una vez obtenidos los correspondientes nucleósidos protegidos se trabajó para encontrar las mejores condiciones para desproteger los oxhidrilos del azúcar. Existiendo dos grupos éster y un bencilo se decidió remover por hidrogenólisis este último en un primer paso. La razón de esta decisión es que los grupos éster proveen el carácter lipofílico necesario para mantener en solución el producto de la reacción. Para la hidrogenólisis de las pirimidinas se estudiaron distintos catalizadores, Pd/C, Pt/C y Pd(OH)₂/C. Este último resultó el más adecuado, además de estar reportado en literatura como un catalizador eficiente que permite evitar la hidrogenación del doble enlace de las pirimidinas.

La reacción de hidrogenólisis se llevó a cabo en forma eficiente a 1 atm de presión de hidrógeno, por lo que no requirió de equipamiento especial para trabajar a altas presiones. Luego de filtrar el catalizador exhaustivamente se evaporó el solvente y se llevó a cabo la hidrólisis de los ésteres de las posiciones 2 y 3 utilizando

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

amoníaco en metanol frío. Luego de 2 días se purificó por columna de sílica el nucleósido desprotegido, como fue mencionado esta reacción solo es útil en el caso de la uridina ya que no hay otros grupos lábiles a medio básico.

De esta forma se obtuvo la 2'-*C*-metiluridina que fue utilizada para preparar 2'-*C*-metilfosforamidita y 5-bromo-2'-*C*-metilfosforamidita.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

3.3 - Búsqueda del grupo protector para la posición 2' de las 2'-C-metil-fosforamiditas

La obtención del derivado de uridina completamente desprotegido mediante una ruta eficiente y que utiliza reactivos de bajo costo significa el cumplimiento del primer objetivo planteado para este trabajo. Este es el punto en el que divergen distintas alternativas de aplicación, la primera es el uso de los monómeros como droga antiviral. Este campo cuenta con un gran potencial y es objeto de numerosos estudios en universidades y laboratorios privados. El segundo campo de aplicación ha sido menos estudiado y es su incorporación en oligonucleótidos. El potencial de esta especialidad de la química aumenta de la mano del desarrollo de la biología molecular. Una de las razones por las cuales los 2'-C-metilribonucleósidos no han sido ensayados en esta área es que requieren de un esfuerzo sintético adicional para la preparación de los análogos utilizados en la síntesis en fase sólida, las fosforamiditas. Dado que estos nucleósidos no son sustrato de las enzimas polimerasas la síntesis química es la única alternativa para su incorporación en oligonucleótidos.

Las fosforamiditas más utilizadas son conocidas como DMT-fosforamiditas y. Deben su nombre a que poseen el grupo protector dimetoxitritilo en la posición 5'. Este grupo es muy voluminoso por lo que reacciona en forma regioselectiva con el oxhidrilo primario del nucleósido. Su baja estabilidad en medio ácido es aprovechada para promover su remoción específica durante el ciclo de síntesis en fase sólida. Estas fosforamiditas son utilizadas tanto para la preparación de oligonucleótidos de ADN como de ARN. En el caso particular de los ribonucleósidos, la posición 2' posee un oxhidrilo que debe permanecer protegido durante todo el ciclo. En el ARN natural esta posición es secundaria pero en los 2'-C-metilnucleósidos el oxhidrilo es terciario, esta diferencia impide el uso de los reactivos empleados habitualmente para proteger esta posición. En este trabajo se buscó un grupo que cumpliera con todos los requisitos necesarios para ser utilizado en la preparación de los oligonucleótidos de interés, para comprender en detalle el problema es necesario revisar las condiciones del ciclo de síntesis detallado en la introducción.

Como fue mencionado con anterioridad, en el caso de oligorribonucleótidos el oxhidrilo de la posición 2' está protegido, generalmente con éteres de silicio como el dimetil-*ter*-butilsilil éter. Los grupos protectores sililados son removidos fácilmente utilizando fluoruro de tetrabutilamonio con *N*-metilmorfolina en un último paso. El orden

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

de las reacciones de desprotección no es arbitrario sino que responde a la necesidad de mantener el oxhidrilo del azúcar bloqueado durante el paso básico, para evitar la degradación química de la cadena de ARN. La baja estabilidad en medio básico del ARN es producto del ataque del oxhidrilo 2' sobre el fosfato y la posterior formación del fosfato cíclico (ver Figura 38). El fosfato cíclico puede ser atacado por un OH⁻ produciendo la mezcla de 3' y 2' nucleótidos fosfato más una porción del nucleósido libre.

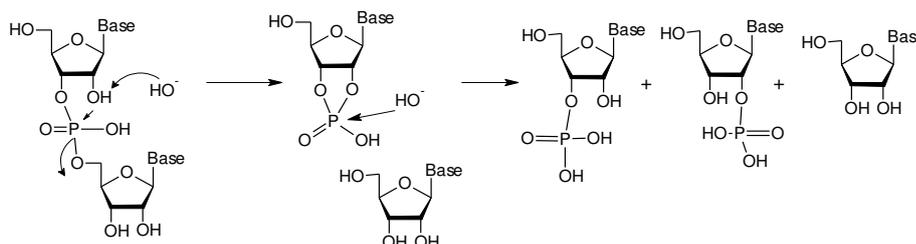


Figura 38 Mecanismo de degradación del ARN en medio básico

La incorporación del grupo metilo en la posición 2' de los 2'-C-metilribonucleósidos impide su protección con los reactivos tradicionalmente utilizados. El carácter de alcohol terciario y el impedimento estérico de la posición 2' dificultan la utilización de estos reactivos aún utilizando condiciones especiales para oxhidrilos muy impedidos (triflato de *ter*-butildimetilsililo, éter corona, hidruro de potasio (Braish T. 1986). Dado que los éteres de silicio menos voluminosos son más lábiles y no soportan las condiciones de síntesis, se utilizó en una primera instancia el grupo tetrahidropiranilo THP (M. Gallo 2001). Este grupo puede ser introducido en condiciones ácidas suaves y removido mediante un tratamiento con una solución de HCl . El principal problema de este grupo es que es hidrolizado parcialmente en los pasos de remoción del DMT realizados con DCA o TCA. La pérdida del grupo protector en 2' conlleva a reacciones de degradación de la cadena oligonucleotídica. Esta reducción del rendimiento final justifica la búsqueda de un grupo protector más estable (Gallo 2002).

El cloruro de (triisopropilsilil)oximetilo (TOM-Cl) (W. P. Pitsch S. 2004) fue el grupo propuesto al comienzo del trabajo debido a la posición más alejada de los sustituyentes isopropilo de la posición reactiva. Este reactivo es utilizado en la síntesis de oligorribonucleótidos naturales con muy buenos resultados y su remoción es cuantitativa utilizando fluoruro de tetrabutylamonio. El primer paso fue sintetizarlo, ya

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

que al momento de realizar el trabajo este reactivo no era comercialmente asequible. Se lo preparó a partir de formaldehído y etanotiol siguiendo el esquema de la Figura 39.

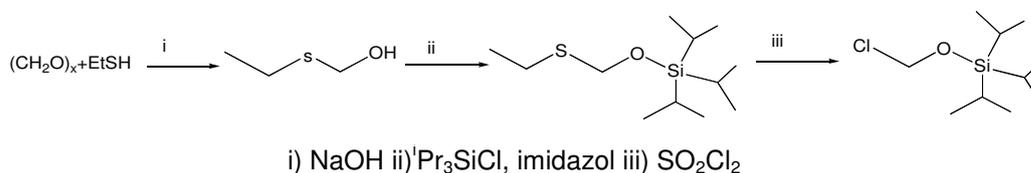


Figura 39 Esquema de síntesis del TOM-Cl

Luego de sintetizarlo y purificarlo se buscaron condiciones alternativas a la planeada por Pitsch para su introducción. Esto se debe a que la estrategia del trabajo original (**Figura 40**) no es aplicable en este caso particular. La idea original consiste en realizar la formación de un derivado dibutilestaniliden con los oxhidrilos 2' y 3' sobre el que reacciona el TOM-Cl, de esta manera se obtiene la mezcla 1:1 de isómeros protegidos en 2' y 3'.

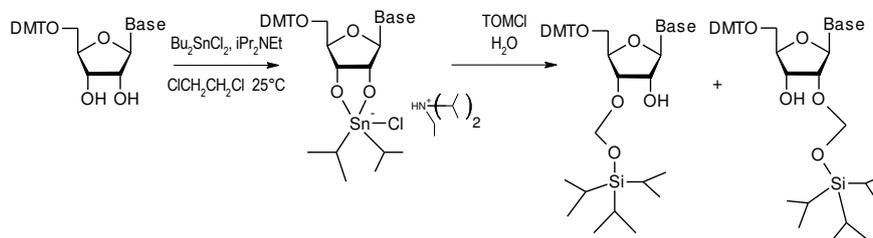


Figura 40- Estrategia reportada para la protección del oxhidrilo 2' con TOM-Cl Pitsch

Esta metodología resulta claramente inapropiada e inaplicable ya que el producto protegido en 3' debe ser desechado perdiendo 50 % de material, es importante tener en consideración que los autores utilizan el TOM-Cl para proteger nucleósidos naturales. En el caso particular de los 2'-C-metilnucleosidos sería esperable obtener mezclas de isómeros enriquecidas en nucleósido protegido en la posición 3'. Por ello fue necesario buscar otra estrategia de protección. El carácter terciario del oxhidrilo 2' brinda la posibilidad de proteger selectivamente los oxhidrilos 5' y 3' con muy buenos rendimientos. Por esta razón se utilizó la 3',5'-di-O-acetil-2'-C-metiluridina para intentar la reacción de sustitución nucleofílica sobre el carbono halogenado del TOMCl. Se realizaron diversos intentos de activación del oxhidrilo,

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

para los primeros se emplearon bases suaves como la *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina. Al encontrar que en esas condiciones la reacción no ocurría se intentó aumentar la reactividad del nucleófilo produciendo el alcoholato con bases más fuertes como la 2-*ter*-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina (BDDDP). También se realizó agregado de hidruro de potasio y 18 éter-corona para secuestrar el catión potasio pero ninguna de estas bases permitió obtener el producto deseado. Otro aspecto que se intentó mejorar es el carácter de grupo saliente del halógeno agregando ioduro de potasio o ioduro de tetrabutilamonio en la mezcla para sustituir el cloruro por ioduro del TOMCl, obteniendo en todos los casos resultados negativos.

Dada la imposibilidad de encontrar condiciones para realizar la protección de la posición 2' con el TOM-Cl se abandonó la idea de utilizar este grupo. Basados en los resultados anteriores con el THP se buscó un grupo que pudiera ser introducido en condiciones similares pero que fuera más resistente al tratamiento ácido del ciclo de síntesis en fase sólida. El grupo encontrado fue el (2-cloroetoxi)etilo o CEE (Yamakage S. 1989). Según el trabajo de estos autores es posible introducir el 2-cloroetoxivinileter en condiciones similares al grupo THP. La razón por la cual el CEE no fue adoptado masivamente se debió a su carácter de acetálico. Esta es una desventaja frente a los silil éteres que son removidos específicamente y soportan las condiciones ácidas del ciclo. Además este grupo genera un centro quiral adicional. Lo que duplica las señales en los espectros RMN. El aumento en la multiplicidad de señales complica su interpretación y la determinación de detalles como las constantes de acoplamiento con el fósforo en las fosforamiditas. A pesar de esto, representa una solución para el caso de oxhidrilos estéricamente impedidos.

Se optimizaron las condiciones de la reacción de formación del acetal con el CEE. En lugar de ácido *p*-toluensulfónico se utilizó *p*-toluensulfonato de piridonio como catalizador. Utilizando el vinileter como reactivo y como solvente de la reacción se obtuvieron rendimientos superiores al 78%, evitando la formación de subproductos y fácilmente de purificable por columna de sílica. Esta es una primer ventaja respecto al uso del THP debido a que la reacción para su formación a partir de DHP acarrea problemas de rendimiento y se debe recuperar el producto de partida sin reaccionar (M. Gallo 2001).

Tras verificar la posibilidad de proteger el oxhidrilo terciario se realizaron ensayos de estabilidad en las condiciones del ciclo de síntesis con el fin de determinar la aplicabilidad de este grupo en la síntesis de oligonucleótidos. Se comparó la

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

estabilidad de los nucleósidos protegidos con THP y con CEE en una solución de ácido dicloroacético (DCA) en diclorometano al 2%. En la Figura 41 se presentan la reacción llevada a cabo y proporción de producto protegido/total durante la cinética para ambos grupos protectores cuantificada por HPLC. La cinética de hidrólisis permite apreciar una marcada diferencia en la estabilidad entre de ambos grupos protectores. Transcurrida 1 hora en DCA 2% la fracción de CEE no hidrolizada es el doble que el THP. Este dato permite presumir que esta protección será más eficiente durante la síntesis en fase sólida del oligonucleótido.

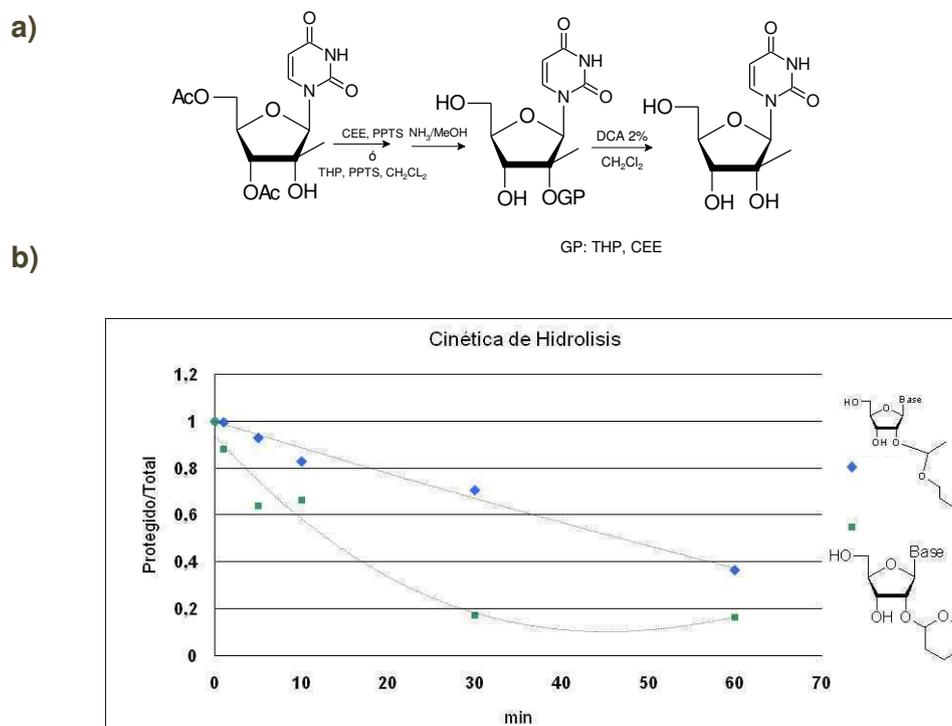


Figura 41 a) Esquema para la preparación y posterior hidrólisis del nucleósido protegido en 2' para el CEE y para el THP b) Cinética de hidrólisis de grupo CEE vs THP

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

Luego de confirmar las propiedades del CEE como grupo protector se estudiaron las condiciones de desprotección para ser utilizadas una vez sintetizados los oligonucleótidos. Para llevar a cabo esta determinación se monitoreó la reacción en HCl 0,01N por ccd (Figura 42). Luego de 20 hs a temperatura ambiente se pudo observar que la reacción prácticamente se completa.

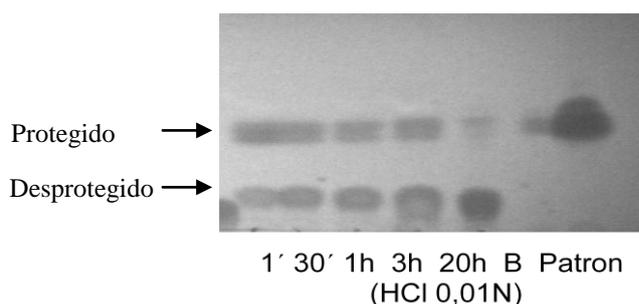


Figura 42 Cromatografía en placa delgada de la cinética de desprotección de CEE (**11**), la mancha superior pertenece al nucleósido protegido en 2' con el CEE, la inferior al nucleósido libre.

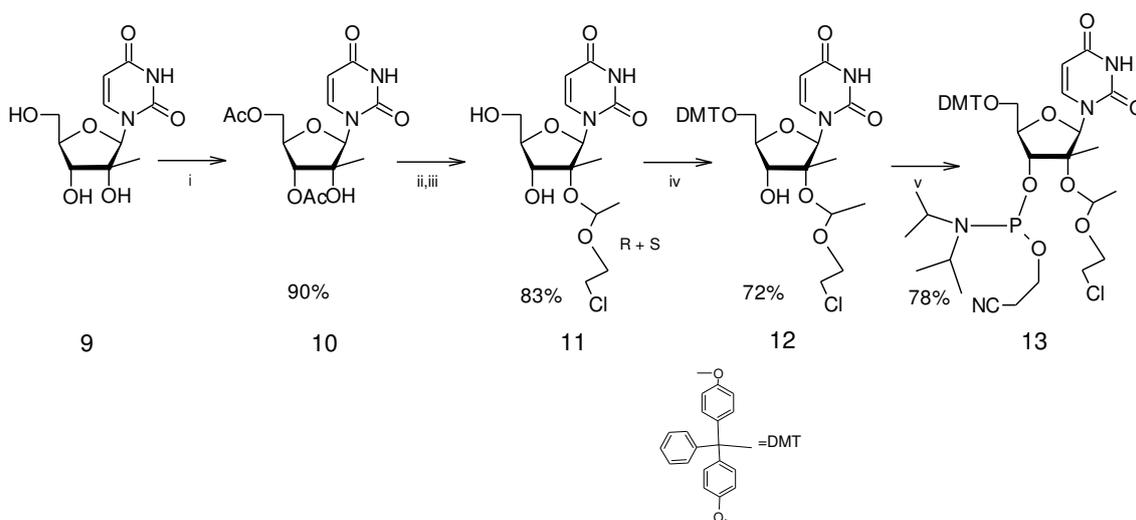
El grupo protector ensayado para el oxhidrilo 2' de los 2'-C-metilnucleósidos es capaz de soportar las condiciones del sintetizador y a diferencia de otros potenciales candidatos puede ser introducido y removido con buenos rendimientos. Este avance permite sortear uno de los problemas por los cuales estos análogos de nucleósidos no han sido caracterizados completamente en el campo de los oligonucleótidos (ribozimas, siRNA, antisentido etc.).

3.4 - Síntesis de las Fosforamiditas

Una vez establecido el grupo protector para la posición 2' de los nucleósidos se continuó con la síntesis de las 2'-C-metilfosforamiditas a partir de los nucleósidos preparados en el laboratorio. En la Figura 41 se pueden observar los pasos llevados a cabo para la obtención de la fosforamidita a partir de la 2'-C-metiluridina. La utilización de la uridina como modelo para la puesta a punto de las condiciones de reacción resulta ventajosa porque no posee grupos protectores en la base. Además de ser el requerido en los experimentos con oligonucleótidos.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

La estrategia utilizada en el laboratorio consiste en aprovechar el hecho de que el oxhidrilo 2' es terciario, de esta manera es posible acetilar regioselectivamente las posiciones 3' y 5' utilizando 2 equivalentes de anhídrido acético a temperatura ambiente. Una vez obtenida la 3',5'-di-*O*-acetil-2'-*C*-metiluridina es posible proteger el oxhidrilo restante utilizando las condiciones encontradas en la etapa de desarrollo del grupo protector. La reacción se realizó utilizando el 2-cloroetilviniléter como solvente y *p*-toulensulfonato de piridonio como catalizador. El producto de esta reacción es la mezcla de estereoisómeros del acetal. Los correspondientes diastereoisómeros pueden ser separados por cromatografía en columna de sílica gel, pero por simplicidad en este trabajo se utilizó la mezcla diastereoisomérica. Una vez purificado el compuesto se realizó una aminólisis de los acetilos a temperatura ambiente, obteniéndose el producto **11** con un 83 % de rendimiento. El producto **9** fue dimetoxitritilado regioselectivamente en la posición 5' utilizando cloruro de dimetoxitritilo y se purificó por cromatografía en columna de sílica gel tomando la precaución de agregar trietilamina para evitar exponer el producto a condiciones ácidas.



i) Ac₂O, py ii) 2-cloroetilviniléter, ppts iii) NH₃/MeOH iv) 4,4'-DMT-Cl, Et₃N, 4-DMAP v) CEP-Cl; N,N-DIEA, CH₂Cl₂, THF

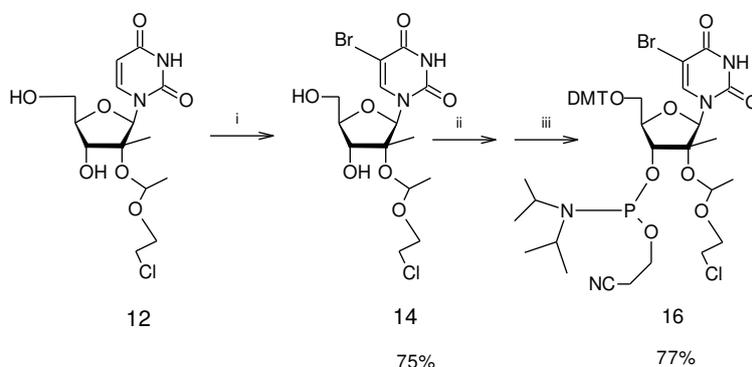
Figura 43 Síntesis de la fosforamidita a partir de 2'-*C*-metiluridina

El producto **12** fue convertido en la correspondiente fosforamidita final por medio de una reacción con β-cianoetoxi-*N,N*-diisopropilaminoclorofosfina en diclorometano con *N,N*-diisopropiletilamina. Generalmente el agregado de la fosfina se realiza sobre la mezcla enfriada a 0°C con baño de hielo. Sorprendentemente en estas

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

condiciones reacción no tuvo lugar. La baja reactividad del oxígeno de la posición 3' podría deberse a la formación de un ciclo a través de un puente hidrógeno con uno de los oxígenos del grupo protector, la formación de este ciclo podría disminuir la reactividad del oxhidrilo por el impedimento causado por el resto del grupo CEE. Esta teoría concuerda con el hecho experimental de que tras calentar a reflujo y agregar THF anhidro la reacción transcurre con un rendimiento del 78% utilizando solo 1,1 eq de clorofosfina. El THF podría aportar oxígenos aceptores de puente hidrógeno y evitar la formación del ciclo intramolecular. De la misma manera el aumento de la temperatura se traduce en un incremento de la reactividad. Utilizando esta metodología fue posible obtener la fosforamidita sin necesidad de aumentar la cantidad de fosfina utilizada. Esto resulta conveniente debido a que evita los problemas causados para purificar los compuestos derivados de la fosfina en exceso.

Adicionalmente, se exploró la posibilidad de utilizar la misma ruta para preparar 2'-C-metilfosforamiditas con modificaciones en las bases. Una de las modificaciones posibles es la halogenación de la posición 5 de la pirimidinas, además de poseer propiedades interesantes en si misma, es el punto de partida para la adición de un gran número de funcionalidades utilizando reacciones como los acoplamiento de Sonogashira (Frolow 2007). De esta manera es posible aumentar el espectro de aplicaciones de los 2'-C-metilnucleósidos. Se realizó entonces la bromación de esa posición partiendo de **12**, agregando Br₂ en cloroformo obteniéndose el producto **14**. Este producto fue convertido en la fosforamidita en las mismas condiciones que el nucleósido con la base no halogenada.



xv) Br₂, CH₂Cl₂ xvi) DMT-Cl, DMAP, Py, Et₃N, xvii) CEP-Cl; N,N-DIEA, CH₂Cl₂

Figura 44 Síntesis útil para la obtención de derivados modificados en la base

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

3.5 - Conclusiones

Se diseñó una ruta para la preparación de 2'-*C*-metilnucleósidos a partir de fructosa comercial aprovechando un reordenamiento que da como resultado una ribono- γ -lactona que posee el metilo en la posición 2' con la configuración adecuada. Se puso a punto el protocolo de purificación de la lactona y se escaló la ruta partiendo de 3Kg de fructosa. El esquema de protección es versátil y permite obtener distintos nucleósidos con muy buenos rendimientos y a un bajo costo potencialmente escalable.

Se prepararon distintos nucleósidos purínicos y pirimidínicos. El desarrollo de esta ruta posee relevancia en la campo de los antivirales anti hepatitis C.

Se avanzó en el mejoramiento de las condiciones de desprotección de las purinas modificando el esquema de protección, para poder realizar futuros intentos con métodos enzimáticos.

Se demostró la imposibilidad de utilizar el TOM-Cl como grupo protector para la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos con 2'-*C*-metilnucleósidos. En su lugar se encontró un grupo que reúne las condiciones necesarias para soportar las condiciones del ciclo de síntesis que puede ser introducido y removido en forma eficiente y limpia el CEE.

Se sintetizaron 2 fosforamiditas a partir de la 2'-*C*-metiluridina para utilizarlas en la síntesis de oligonucleótidos de interés. Se adecuaron las condiciones de reacción obteniendo muy buenos rendimientos y posibilitando el estudio de las propiedades de estos análogos de nucleósido en el campo de los oligonucleótidos modificados.

Resultados y Discusión // Síntesis de los monómeros

4- Síntesis de los Oligonucleótidos

4.1 Objetivo

El primer desafío detallado en éste capítulo es la puesta a punto las condiciones de síntesis , desprotección y purificación de oligonucleótidos utilizando las 2'-C-metilfosforamiditas previamente sintetizadas En una primera etapa fue realizada con secuencias de 12 monómeros de longitud diseñados para ser utilizados en experimentos posteriores. El segundo objetivo fue utilizar estas condiciones adecuándolas para preparar las ribozimas necesarias para llevar a cabo los experimentos detallados más adelante.

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

4.2 Síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos.

La síntesis en fase sólida de oligonucleótidos recibe su nombre porque es llevada a cabo sobre esferas de vidrio de tamaño controlado (CPG) que generalmente poseen entre 500 Å y 1000 Å. Estas poseen grupos silanoles derivatizados con un nucleósido que corresponde al extremo 3' de la secuencia a partir del cual la cadena es elongada. Para llevar a cabo estas reacciones el CPG o fase es confinada en una columna de 5 mm de diámetro cerrada en ambos extremos por filtros de vidrio sinterizado o membranas que permite el paso de los reactivos utilizados para realizar el acoplamiento de los monómeros.

El sintetizador automático consiste de una serie de conductos y válvulas que permiten el paso de los reactivos desde sus reservorios hacia la columna en forma controlada. Todo el sistema se encuentra bajo atmósfera de argón o nitrógeno seco para evitar el contacto con la humedad del ambiente. Los nucleósidos utilizados para elongar la cadena reciben el nombre de fosforamiditas. Las más utilizadas para ARN poseen un grupo DMT en el extremo 5', *ter*-butildimetilsililo (TBDMS) en 2' acilos en los grupos exocíclicos de la base. En este trabajo se utilizaron las fosforamiditas de la

Figura 45 para las posiciones de ARN natural.

La escala de la síntesis es regulada ajustando la cantidad de fase cargada en la columna. Los sintetizadores ajustan las condiciones del ciclo a la escala utilizada mediante el uso de protocolos predefinidos que envían distinta cantidad de cada reactivo a la columna. Las escalas más habituales en equipos de laboratorio de investigación son 200 nmoles; 0,5 μmoles y 1 μmol aunque existen equipos para escala piloto e industrial en los cuales es posible cargar distintas columnas y sintetizar cantidades mayores. En este caso particular se utilizó un sintetizador marca Expedite modelo 8909 cuya escala más pequeña para preparar secuencias de ARN es 1 μM. Esta escala es 5 veces mayor que la escala más pequeña de equipos como el ABI 392.

Debido a las características de construcción del equipo empleado (diámetro de las tuberías, control de caudal etc.) no fue posible realizar un ajuste fino de las condiciones de reacción. Por esta razón el objetivo estuvo centrado en la obtención de los oligonucleótidos y no en el estudio de las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento y reducir al mínimo el consumo de reactivos (especialmente la fosforamidita modificada).

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

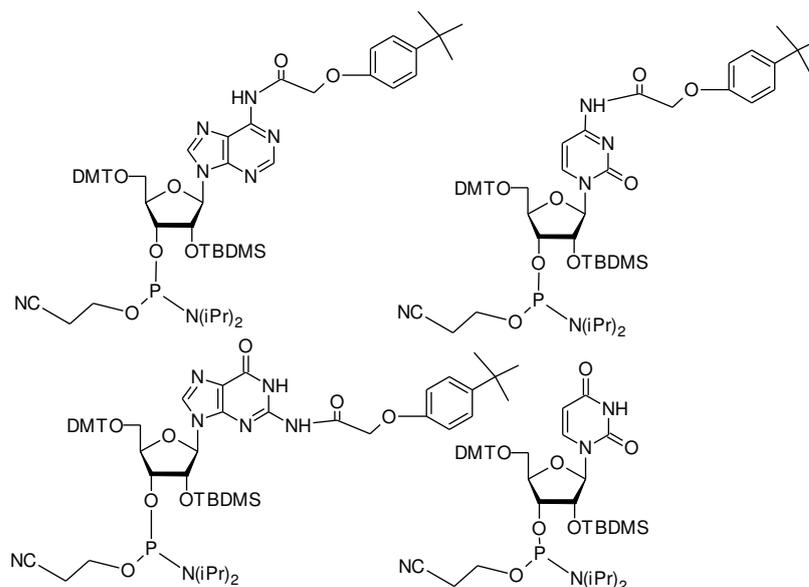


Figura 45 Fosforamiditas Fast deprotection utilizadas en la síntesis de los oligonucleótidos de ARN

Debido a la limitación en las variables operativas impuesta por el equipo se realizaron todos los ajustes posibles desde el punto de vista químico fuera del mismo, de esta manera fue posible asegurar el máximo rendimiento.

Los ensayos de estabilidad realizados sobre el grupo protector (CEE) de la posición 2' de los 2'CMN fueron ya descriptos en el capítulo anterior, la estabilidad de este grupo a lo largo de los ciclos de síntesis es de gran importancia para obtener cantidades suficientes para realizar estudios posteriores.

El siguiente punto crítico a la hora de obtener buenos rendimientos es la optimización del primer paso encargado de remover el grupo protector de la posición 5 a través de una hidrólisis ácida. La concentración del ácido empleado (DCA) para remover el DMT es de especial interés para este trabajo ya que si bien el grupo protector empleado en la posición 2' del nucleósido modificado es más estable que el THP, sigue siendo lábil al medio ácido. La situación presupone un compromiso en el que debe usarse la menor concentración de ácido posible para asegurar la completa remoción del dimetoxitrilo sin afectar al grupo CEE. La bibliografía propone concentraciones mínimas para remover cuantitativamente el DMT que van desde 1,5% (Yamakage S. 1989) a 3 %DCA (M. Gallo 2001). Con el fin de determinar la concentración a utilizar y evacuar todas las dudas al respecto se sintetizaron secuencias de ADN de 10 nucleótidos de largo utilizando diluciones de 1,5% 2% y 3%

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

de DCA y 3% TCA como control que es generalmente utilizado para la síntesis de oligonucleótidos ADN .

Analizando los perfiles de HPLC DMT-ON de los productos fue posible observar que el uso de 1,5% DCA arrojó como resultado una mayor proporción de secuencias más cortas con mayor tiempo de retención. Este aumento evidencia la desprotección incompleta del grupo DMT durante los ciclos de síntesis. El uso de DCA al 2% por su parte presenta el mismo perfil cromatográfico que el correspondiente al TCA 3% en una secuencia de 10 nucleótidos Esta similitud podría no mantenerse en secuencias con mayor números de ciclos. En el caso de las secuencias diseñadas para este trabajo, el número de ciclos luego de la introducción de la modificación no supera los 15, lo cual permite presumir que el uso 2% DCA obteniendo resultados similares que con TCA y evitando la hidrólisis del grupo CEE.

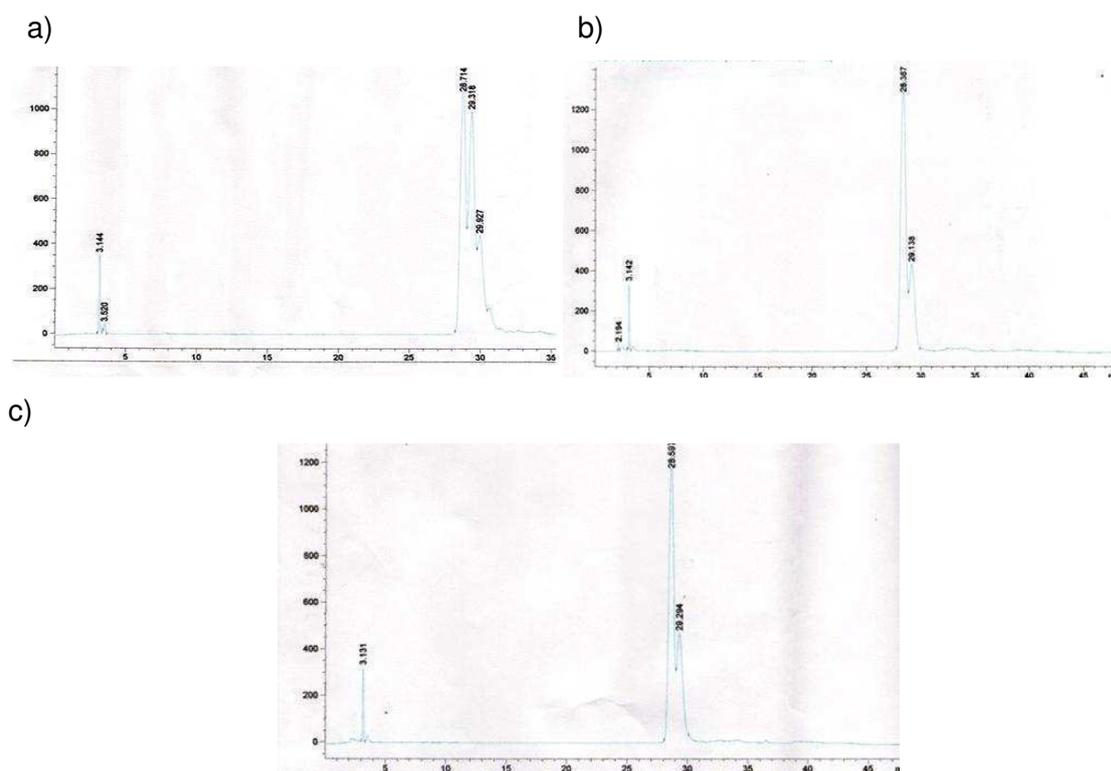


Figura 46 Cromatogramas de los oligonucleótidos de ADN DMT-ON sintetizados con distinta concentración de DCA a) 1,5% b) 2% c) 3% TCA para la secuncia AATTCCGGAA

Los pasos subsiguientes a la desprotección con ácido fueron realizados con reactivos comerciales siguiendo los protocolos preestablecidos para ARN. Estos involucran tiempos de acoplamiento 10 veces mayores que para el ADN. Esta

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

diferencia se debe a que el grupo protector en 2' produce un importante impedimento que desfavorece el ataque del nucleófilo sobre el fósforo.

Siguiendo este procedimiento se sintetizaron secuencias de 12 nucleótidos de longitud diseñadas para llevar a cabo estudios de melting point y dicroísmo circular. La Figura 47 muestra la secuencia sintetizada y los nucleótidos incorporados en la región central. Como se puede apreciar en esta figura la modificación introducida en la secuencia 2'-*C*-metil¹-desoxiuridina (dUme) carece del oxhidrilo en la posición 2', esta diferencia resultó útil para la puesta del protocolo de desprotección y de purificación. Se eligió esta modificación porque la usencia del grupo en 2' mejora el rendimiento en la síntesis y además al no poseer el grupo protector CEE en 2' también se evita trabajar con la mezcla diastereoisomérica. El producto terminado y caracterizado por espectroscopia de masa MALDI-TOF fue usado como patrón para poner a punto la desprotección de la posición 2' en HCl de los oligorribonucleótidos modificados y en los estudios de DC y melting point.

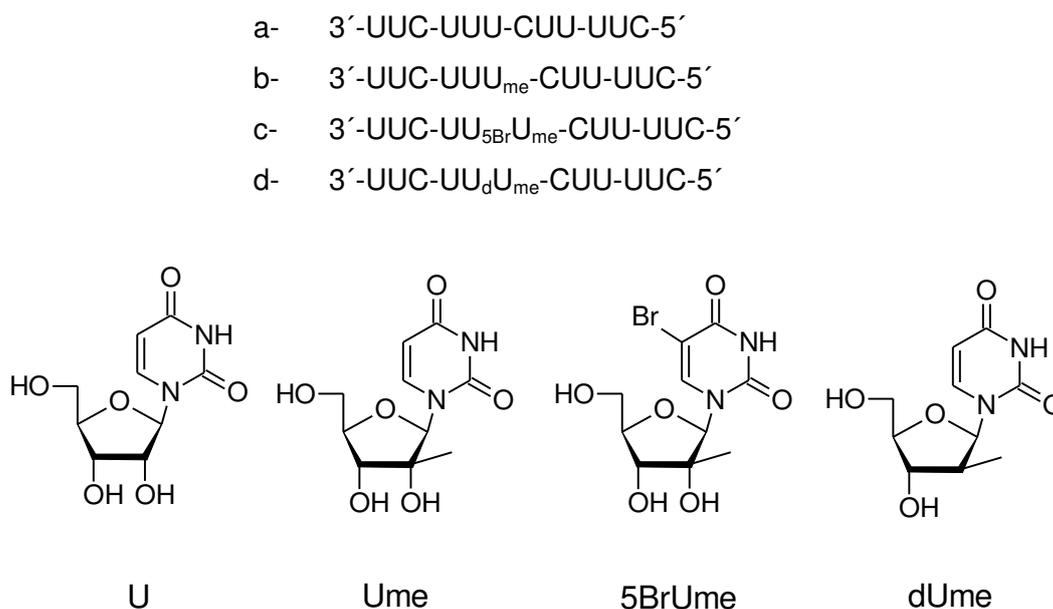


Figura 47 Secuencia sintetizada utilizando fosoramiditas modificadas.

Una de las principales ventajas del uso de la protección de la posición 5' con DMT es que el progreso de la síntesis puede ser monitoreado mediante la cuantificación espectrofotométrica del catión DMT liberado en cada paso. El equipo utilizado posee una celda espectrofotométrica con el cual se monitorean en tiempo real

¹ Monómero sintetizado por la Lic. Laura Robaldo

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

los acoplamientos. En la Figura 48 se puede observar la salida correspondiente a una de la síntesis. A diferencia de otros equipos como el Applied Biosystems 392 o el 394 la sensibilidad y precisión del método de monitoreo no permite realizar una cuantificación precisa del rendimiento puede ser usada como una estimación para encontrar problemas puntuales como la baja eficiencia de acoplamiento en algún paso.

Los perfiles obtenidos durante la síntesis de los primeros oligonucleótidos realizados con las fosforamiditas modificadas pueden observarse en la Figura 48. Más allá de su limitación como herramienta analítica el análisis de los perfiles de DMT permitió anticipar el rendimiento de los acoplamientos con las fosforamiditas modificadas. Los primeros intentos arrojaron rendimientos menores al 50 %. Para descartar que no se trataba de un problema relacionado con la descomposición de la fosforamidita se realizó un experimento de RMN de ^{31}P (ver Figura 49) en el que no se detectaron las señales típicas de los productos de descomposición del grupo reactivo (fosfonatos). Estas señales son utilizadas como parámetro en el análisis de calidad de las fosforamiditas.

Habiendo asegurado la pureza del producto de partida se intentó forzar el aumento del rendimiento, para ello se incrementó el tiempo de reacción entre el nucleósido desprotegido y la fosforamidita un 30%. Adicionalmente, se programó el ciclo de forma tal que se repitiera el agregado de reactivo y activante antes de realizar el enmascaramiento de los oxhidrilos sin reaccionar. En la Figura 48 se muestran los perfiles de DMT obtenidos antes (A) y después (B) de modificar las condiciones de acoplamiento, comparando el alto de las barras al comienzo y final de cada síntesis es fácil apreciar el aumento en el rendimiento. Utilizando esta metodología de doble acoplamiento fue posible sintetizar las secuencias mencionadas anteriormente.

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

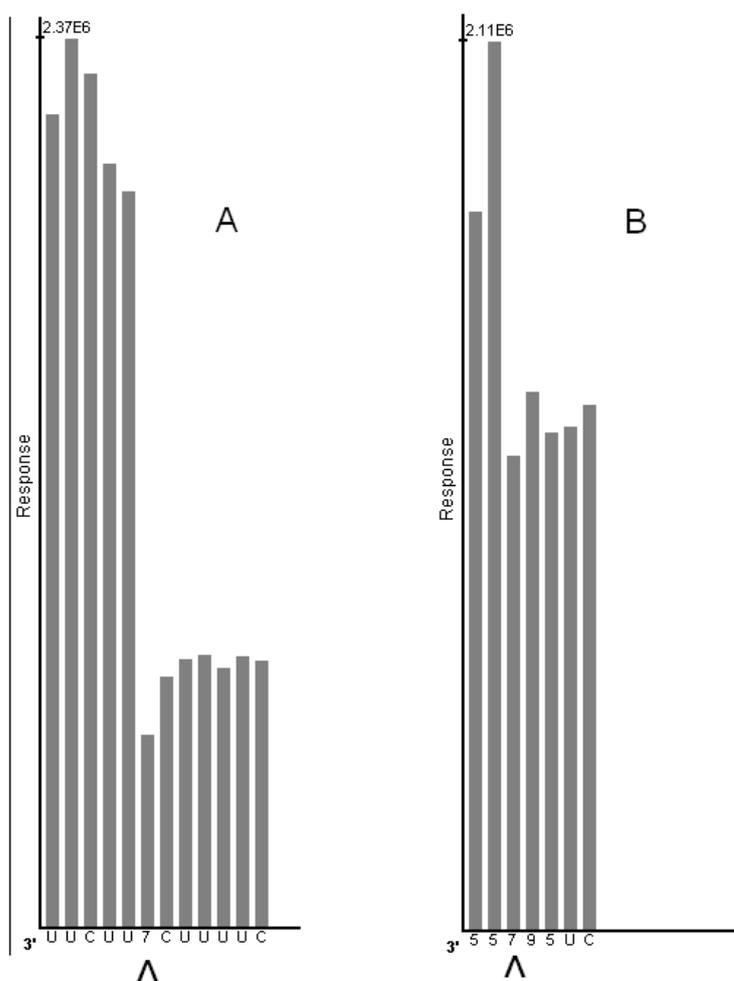


Figura 48 Perfil de DMT producido por el sintetizador automático. A- Acoplamiento normal B- Doble acoplamiento, la flecha indica la incorporación de la 2'-C-metiluridina. Las leyendas del eje X no son las secuencias sino las posiciones del equipo donde fueron conectadas las fosoramiditas.

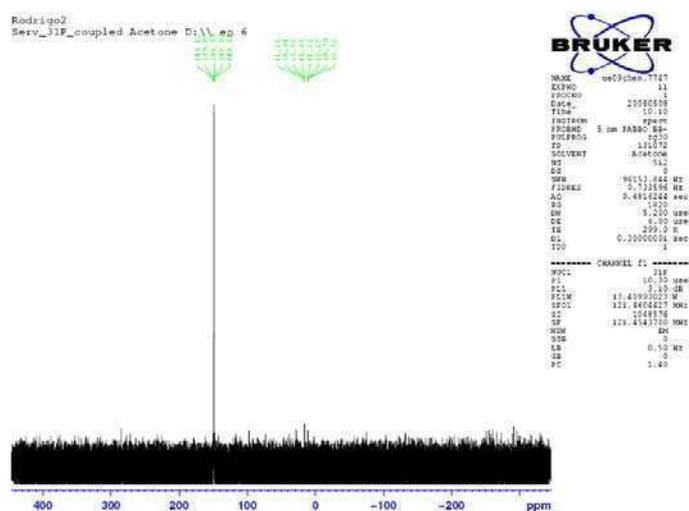


Figura 49 NMR ^{31}P de la 2'-C-metilfosoramidita realizado antes de la síntesis de la figura anterior, indica la presencia de un único compuesto de fósforo correspondiente al fosoramidita

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

4.3- Desprotección y Purificación de los Oligonucleótidos.

La utilización del método de las fosforamiditas para la síntesis de oligonucleótidos brinda la posibilidad de purificar los productos de dos formas distintas ya que es posible mantener el DMT final o retirarlo con un último tratamiento con DCA. La elección de la estrategia esta íntimamente relacionada con el equipamiento del laboratorio, ambas poseen ventajas y desventajas. El DMT es un grupo altamente lipofílico, por esta razón es muy útil para facilitar la purificación de las secuencias por HPLC utilizando columnas fase reversa de C-8 y C-18. Con este grupo en el extremo (DMT-on) resulta muy fácil purificar las secuencias truncadas que fueron enmascaradas. Por otra parte resulta útil para determinar la proporción de secuencias con menor número de nucleótidos (n-1, n-2) ya que el tiempo de retención aumenta al disminuir el largo de la cadena, como en el caso de las secuencias de ADN presentadas en la

Figura 46. La principal desventaja de esta estrategia es que es necesario realizar un paso ácido de hidrólisis luego de la primera purificación y muchas veces es necesario realizar una segunda cromatografía o un gel PAGE con el problema que acarrea la manipulación de ARN.

La segunda alternativa es remover el DMT (DMT-off) antes de separar el oligonucleótido del soporte sólido. En general esta estrategia se utiliza cuando se cuenta con un HPLC capaz de utilizar columnas de intercambio iónico termostatzadas. El método de purificación es más simple pero en casos de bajo rendimiento puede resultar más engorroso debido a que los tiempos de retención de los productos no guardan relación con su longitud, por ende el perfil cromatográfico brinda menos información y es necesario caracterizar por PAGE desnaturalizante o espectrometría de masa todas las fracciones para encontrar el producto.

Para la preparación de las secuencias de ARN de este trabajo se utilizó la segunda estrategia. Una vez finalizada cada síntesis se retiró la columna del equipo y se transvasó el soporte sólido a un recipiente cerrado para realizar un tratamiento con base. Este tratamiento puede ser realizado con amoniaco concentrado durante 24 hs a T° ambiente, o con una mezcla 1:1 de amoniaco/metilamina a 55°C durante 10 minutos. Como fue explicado en el capítulo anterior la exposición del ARN a medios básicos promueve su hidrólisis química. Dada la variedad de fosfoarmiditas disponibles con distintos grupos protectores es necesario ajustar los protocolos de desprotección para maximizar los resultados. Para comprobar cuál de los dos

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

tratamientos resultaba más adecuado para las fosforamiditas utilizadas se sintetizó una secuencia natural de ARN y se sometieron distintas alícuotas a cada tratamiento. En la Figura 50 se observan los cromatogramas de los productos obtenidos en cada caso. La fracción con mayor tiempo de retención corresponde al producto final de 12 nucleótidos. El cromatograma de la derecha presenta una pequeña disminución en la proporción de oligómeros más cortos de menor tiempo de retención. El protocolo rápido representa una ligera mejora en el rendimiento y reduce considerablemente los tiempos por lo que fue implementado para todas las síntesis.

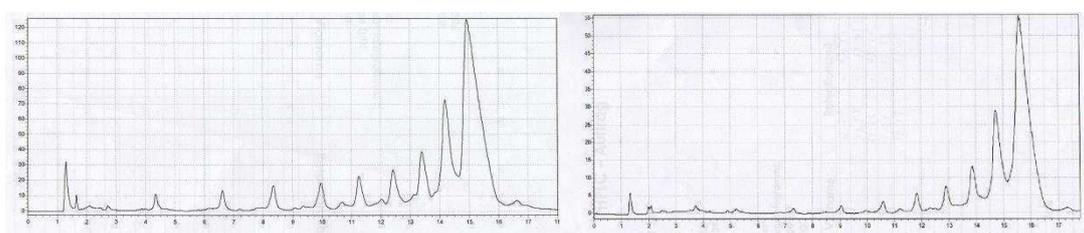


Figura 50 Cromatogramas de HPLC-IO de oligonucleótido de ARN natural tratado con NH_3 (izq.) y con $\text{MeNH}_2/\text{NH}_3$ (der),

Luego de liberar las secuencias sintetizadas del soporte y desproteger las bases con el tratamiento básico es necesario desproteger los oxhidrilos de las posiciones 2'. Para ello se utilizó una mezcla de trihidrofluoruro de trietilamina, *N*-metilpirrolidina y trietilamina (Una vez removidos los grupos protectores de 2' es necesario utilizar material estéril y agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar la degradación de ARN por parte de las omnipresentes nucleasas. Luego de precipitar los crudos con *n*-butanol se separaron los componentes de la mezcla en un HPLC-IO semipreparativo utilizando un gradiente de LiCl como fase móvil a pH7.

Las fracciones de HPLC fueron desaladas utilizando una columna de exclusión con sephadex G-25. Las fracciones se cuantificaron midiendo su absorbancia a 260 nm y luego se analizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF. La Figura 51 muestra el cromatograma y espectro de masa obtenido con el oligonucleótido modificado con 2'-*C*-metildesoxiuridina (dUme), se indica la fracción colectada y desalada. La primera conclusión que se desprende del espectro de masa es que el peso molecular se corresponde con el teórico, un detalle a tener en cuenta es que la formación de aductos con litio proveniente de la fase móvil requiere de un proceso de desalado más cuidadoso, especialmente en la síntesis de secuencias con actividad biológica o estructuras específicas en la que es necesaria la presencia de iones

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

divalentes y el arrastre de gran cantidad de iones litio podría alterar resultados posteriores.

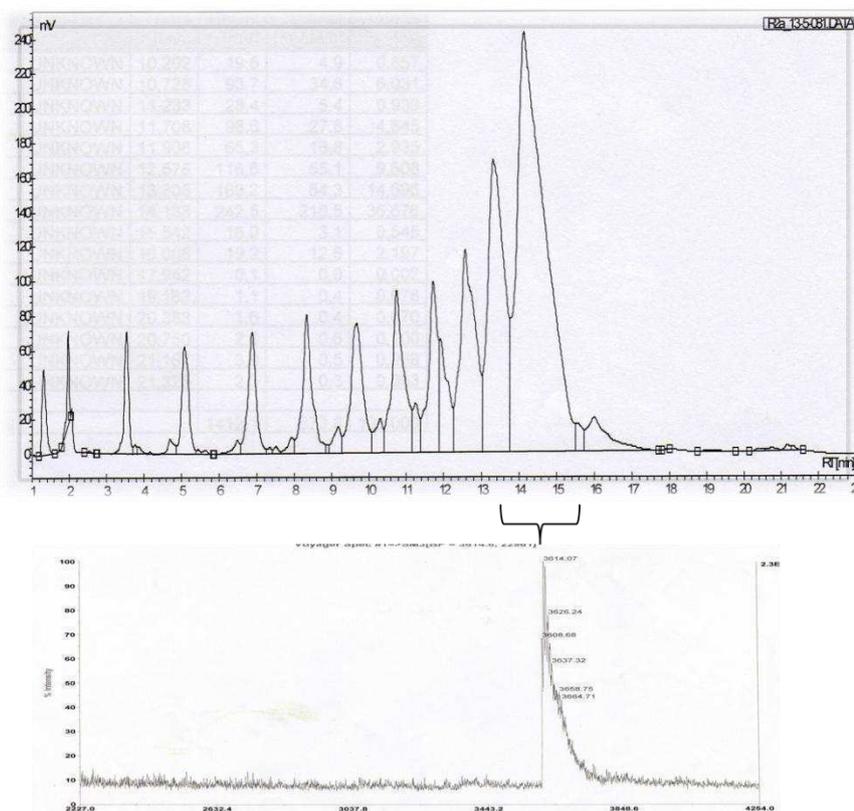


Figura 51 (arriba) Cromatograma del oligonucleótidos 12 mer (**d**) modificado con 2'-C-metildesoxiuridina, se indica la fracción recolectada. (abajo) Espectro de masa MALDI-TOF modo positivo, peso calculado 3607 encontrado m/z 3608,68 $[M+H^+]$, m/z 3617,07 $[M + Li^+]$, el resto de las señales corresponde a aductos con litio.

En el caso de los oligonucleótidos Ume (**b**) y 5Br2me (**c**) fue necesario poner a punto el último paso para realizar la desprotección del grupo CEE. Para llevar a cabo la puesta a punto se realizó una purificación exhaustiva de los oligonucleótidos modificados y protegidos con el grupo CEE por HPLC, en el caso de la Figura 52 se observa el cromatograma obtenido luego de separar la mezcla por segunda vez por HPLC. Las fracciones purificadas fueron sometidas a un tratamiento con HCl 0,01M durante 12 horas, repitiendo las condiciones establecidas con el monómero. Luego se caracterizaron ambas fracciones por espectrometría de masa MALDI-TOF. Como puede observarse en la figura el producto con menor tiempo de retención corresponde al producto con un nucleótido menos. El segundo producto posee el peso molecular correspondiente al producto deseado. Se lo cuantificó para su utilización en ensayos posteriores y se repitió el procedimiento con el oligonucleótido modificado con 5-bromo-2'-C-metiluridina.

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

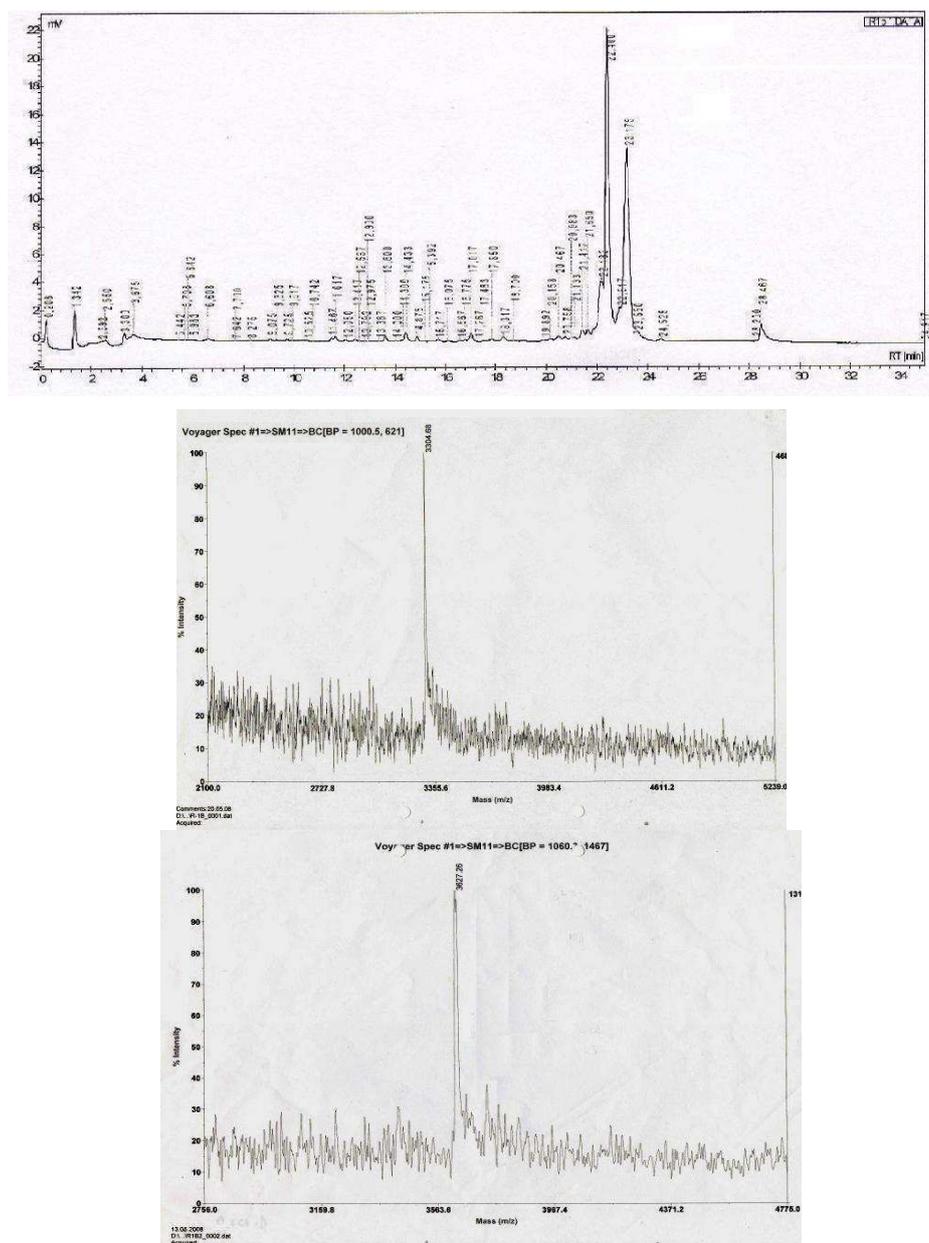


Figura 52 A) Cromatograma HPLC-IO con gradiente de solución LiCl de correspondiente al crudo de la síntesis del oligonucleótido de 12 mer con 2'-C-metiluridina (b) ,B) Espectro MALDI-TOF del pico con menor tiempo de retención, corresponde al 11 mer (n-1) calculado 33001,91 encontrado $m/z= 3304,68 [M +H^+]$ C) Espectro Madi-TOF del pico con mayor tiempo de retención, corresponde al peso molecular calculado 3623 encontrado señal $m/z= 3624 [M +H^+]$ y $m/z =3630 [M +Li^+]$ –el espectro muestra el centro de las dos señales.

4.3.1- Utilización de espectrometría MALDI-TOF en síntesis de oligonucleótidos

En este punto resulta conveniente hacer algunos comentarios sobre el uso de la espectrometría de masa MALDI como herramienta de análisis rutinario ya que difiere bastante de lo tradicionalmente utilizado en el laboratorio. La combinación de HPLC-IO con MALDI es muy ventajosa desde el punto de vista preparativo. Se realiza

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

caracterización sin la necesidad de realizar geles analíticos para determinar el peso molecular de los productos. Esto puede hacerse utilizando cantidades muy pequeñas de muestra y permite discriminar entre oligos con diferencia de masa muy pequeña, esta característica es muy deseable, especialmente en el campo de los oligonucleótidos modificados ya imposible determinar diferencias de masa pequeños cómo el de un metilo u otro átomo por medio de la electroforesis. En este caso fue posible determinar el peso molecular del oligonucleótido modificado con el grupo metilo y se convalidó el trabajo sintético realizado desde la obtención de la ribono- γ -lactona.

4.4- Síntesis de la ribozimas

La síntesis de las ribozimas fue llevada a cabo utilizando las condiciones determinadas durante la preparación de las secuencias dodecaméricas previas. Las ribozimas consisten de secuencias de 36 nucleótidos, por lo tanto resultaron más complejas de preparar, sumado a que se trataba de quimeras de ribonucleótidos naturales, 2'-*O*-metilnucleótidos, 2'-*C*-metilnucleótidos y ribonucleótidos fosforotioatos en los extremos. La

Figura 53 muestra las secuencias sintetizadas, los recuadros corresponden a los segmentos en los que se debió dividir la síntesis para cambiar los reactivos del equipo. Los enlaces internucleotídicos fosforotioato fueron realizados reemplazando el reactivo del paso de oxidación (normalmente iodo,py, THF, agua) por el reactivo de Beaucage (3H-1,2-benzoditio-3-ona1,1-dioxido)(Iyer R. 1990). Este reactivo es inestable en solución por lo que fue necesario retirarlo del equipo y lavar los canales por donde circuló en el menor tiempo posible para evitar obturaciones. En este caso también se utilizó el protocolo de doble acoplamiento para la incorporación de la 2'-*C*-metiluridina.

<p>x: ARN x: 2'-OMe x: 2'-CMe x: fosforotioato</p>	<p>1)5'-ug gug gcu g 2)5'-ug gug gcu g 3)5'-ug gug gcu g</p>	<p>cug aug agu ccg uga gga cga aa cug aug auc cgu gag gac gaa a cug aug agu ccg uga gga cga aa</p>	<p>ca cauaaa -3' ca cauaaa -3' ca cauaaa -3'</p>
---	---	---	---

Figura 53 Secuencias de las ribozimas sintetizadas

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

Las secuencias fueron sintetizadas DMT-off, removidas del soporte y desprotegidas de la misma manera que las anteriores. La principal diferencia en el comportamiento de las quimeras surgió durante los pasos de purificación. El mayor peso molecular de estas estructuras dificulta la separación por HPLC, especialmente en el caso de HPLC-IO donde la formación de estructuras secundarias y terciarias se ven favorecidas por la alta fuerza iónica de la fase móvil. Estas estructuras poseen tiempos de retención muy variable aumentando el número y ancho de los picos. Los cromatogramas se vieron aun más complicados por la presencia de los grupos fosforotioatos, estos grupos quirales son generados mediante una reacción no estereoespecífica de modo que la mezcla contiene la combinatoria de todos los diastereoisómeros posibles. Los perfiles de HPLC obtenidos luego de las reacciones de desprotección y precipitación de las ribozimas no fueron la excepción. En la Figura 54 se observa el cromatograma obtenido con la primera ribozima ensayada (3), donde se puede observar la complejidad del cromatograma. Dado que los perfiles de DMT indicaban que la reacción había procedido con buenos rendimientos, el enorme número de picos del cromatograma debía ser producto de las condiciones del HPLC. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un PAGE analítico en condiciones desnaturalizantes de distintas diluciones de la misma mezcla inyectada en el cromatógrafo. Luego de revelar el gel (ver Figura 54) se pudo observar la presencia de un producto mayoritario con el peso molecular esperado y algunos rastros de productos de menor peso molecular (n-1, n-2). En esta instancia se llevaron a cabo dos procedimientos en paralelo. El primero consistió en mejorar las condiciones de elución del HPLC y el segundo explorar la posibilidad evitar el problema mediante la purificación de las ribozimas mediante un gel preparativo.

Para mejorar la resolución de la corrida cromatográfica se acondicionó la muestra mediante una purificación por cromatografía de exclusión antes de su inyección para eliminar los restos de fluoruro y demás sales provenientes de los pasos de desprotección que pudieran estar favoreciendo la formación de estructuras con distinto tiempo de retención. Además se modificó la temperatura de la columna, ésta es una de las variables más utilizadas para desestabilizar la formación de estructuras secundarias y terciarias, se aumentó 15°C llegando a los 55°C. De esta manera se logró mejorar el perfil de HPLC de la Figura 55. El resultado de estas modificaciones introducidas en el protocolo puede ser observado comparando los cromatogramas de la Figura 54 y la Figura 55.

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

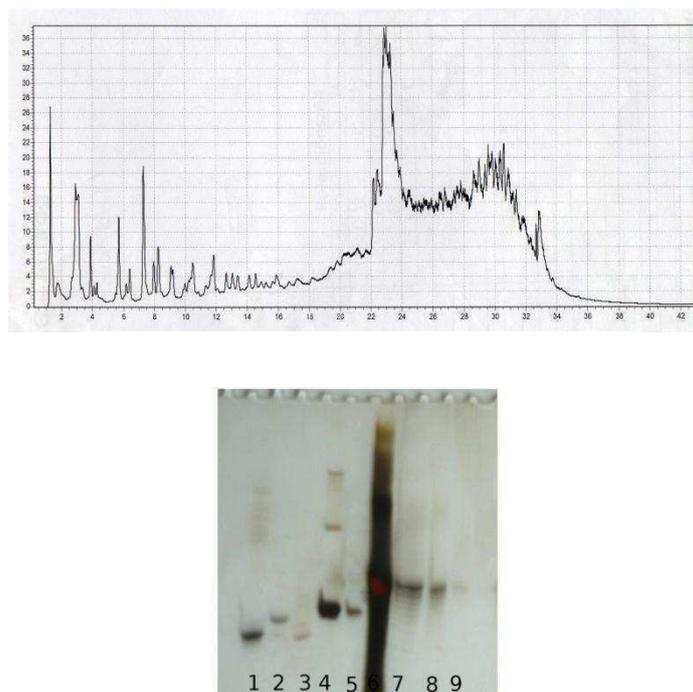


Figura 54 A)-HPLC-IO a 40°C del Ribozima (3) 36mer fosforotioato sin desalar luego de desprotección .B) PAGE del crudo de reacción de la de Ribozima (3) fosforotioato sin desalar luego de desprotección y controles de PM : Calle .1) 33mer ADN 2) 33 mer ARN 3)32 mer ARN 4) 34 mer ARN/ADN 5) 35 mer ADN 6) Ribozima 1X 7) Ribozima 0,1 X 8) Ribozima 0,01 X 9) Ribozima 0,001 X

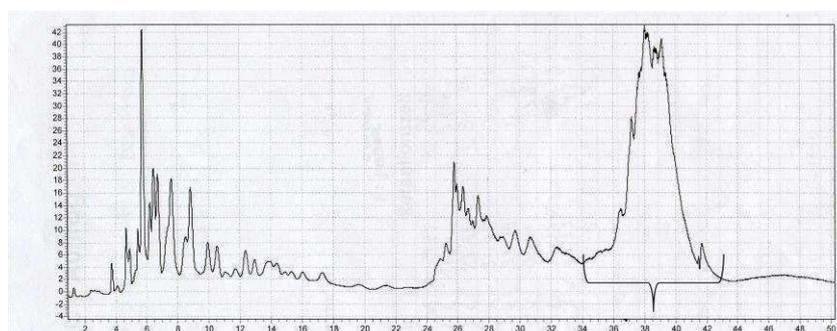


Figura 55- HPLC-IO a 55 °C mezcla desalada, se indica la fracción colectada correspondiente a producto deseado

La segunda opción para la purificación de las secuencias de ARN es la utilización de PAGE preparativo. El gel se realizó en condiciones desnaturizantes para evitar las diferencias en la movilidad electroforética de las distintas estructuras. El gel fue revelado con luz U.V. a 254 nm. La siguiente figura muestra uno de los geles obtenidos y las áreas recortadas, las bandas A de menor peso molecular corresponden a secuencias truncas (en las cuales el acoplamiento de la modificación no fue bueno), las bandas denominadas B corresponden a secuencias truncas

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

causadas en ciclos posteriores a la incorporación del nucleótido modificado. Las bandas denominadas C corresponden a las ribozimas. Es importante remarcar que la escala utilizada es 5 veces mayor a la normalmente utilizada en equipos de investigación, esto permitió obtener material suficiente para la realización de los experimentos posteriores.

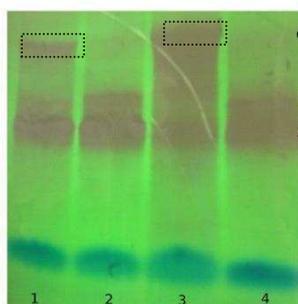


Figura 56 Gel preparativo en el que se purificaron distintas alícuotas de la ribozimas modificadas. Los recuadros muestran las zonas que fueron retiradas y extraídas del gel (C). Las bandas A y B corresponden a secuencias truncas de distinto peso molecular..

Se cortaron las fracciones del peso molecular indicado y luego se extrajeron las secuencias mediante una extracción con un buffer acetato de sodio, EDTA y SDS. Luego de precipitar los productos se cuantificaron espectrofotométricamente y se analizaron las secuencias obtenidas en un PAGE analítico para ser comparadas con las obtenidas por HPLC. Llevando a cabo ambas metodologías de purificación en paralelo fue posible realizar una comparación sobre la eficiencia de cada una. Como se puede apreciar en la densitometría del gel analítico de la Figura 57 las fracciones obtenidas del gel y de la del HPLC presentan patrones similares aunque la fracción purificada por gel no posee la cola que presentan las demás calles. Esto se debe a que en el momento de elegir el lugar de corte del gel preparativo se priorizó la pureza a la recuperación. El uso de la cromatografía o la electroforesis como método de purificación de los oligonucleótidos queda supeditado a la futura utilización de los oligonucleótidos. Para llevar a cabo estudios físico-químicos es recomendable realizar gel preparativo extirpando una sección del gel que permita asegurar la ausencia de secuencias de menor peso molecular. Por su parte el uso de HPLC-IO para la purificación de secuencias DMT-off posee algunas ventajas, en primer lugar es posible purificar mayores cantidades que el PAGE preparativo, la única limitación es el tamaño de la columna. En este caso fue posible purificar el producto de una síntesis escala 1 μ mol mediante una sola inyección, utilizando una columna semi preparativa, mientras que en un gel sólo es posible sembrar entre 25% y 33% del producto como máximo. El

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

segundo argumento a favor de HPLC es que requiere de menos tiempo y es posible automatizarlo. La última ventaja es tal vez la más importante y es que la recuperación del gel preparativo es de alrededor del 50% mientras que el método cromatográfico permite recuperar casi la totalidad del producto.

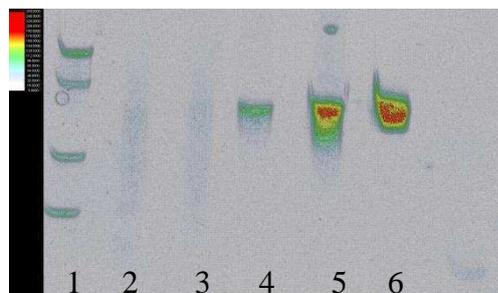


Figura 57 Densitometría del gel analítico 1) marcador 63, 52, 35 y 27 mer ADN 2) ,3) ,4) fracciones purificadas por HPLC sembradas en concentraciones ascendente 5) fracción del HPLC Figura 55 (t retención=26 min) 6) fracción purificada por gel preparativo Figura 56

El método utilizado para la purificar cada una de las secuencias fue elegido para asegurar el máximo rendimiento, cada una de la ribozimas fue sometida a distintas operaciones de purificación dependiendo de las características del crudo de reacción, perfil de HPLC y cantidad de oligonucleótido obtenido. En la siguiente tabla se encuentran las cantidades obtenidas y la forma de purificación utilizada en cada caso.

Secuencia	Método de purificación	ODs obtenidos
1	HPLC, PAGE -Calle 1 Figura 56, HPLC	3
2	HPLC	5
3	HPLC,PAGE preparativo -Figura 55 y calle 3Figura 56 -	11

4.5 Conclusiones

Se sintetizaron secuencias de 12 monómeros de longitud. Se adecuaron los protocolos de desprotección y purificación. Los productos fueron caracterizados por espectrometría de masa MALDI-TOF.

Se prepararon las secuencias de ARN quiméricas correspondientes a las ribozimas y se llevaron a cabo dos métodos distintos de purificación.

La diversidad de nucleótidos necesarios para obtener una ribozima activa y suficientemente resistente a nucleasas (2'-O-metil, fosforotioatos, ribonucleótidos naturales entre otros) es una de las principales dificultades a la hora de preparar las ribozimas. La purificación de estas estructuras puede ser realizada siguiendo dos metodologías (HPLC y PAGE). La decisión de la técnica a emplear esta íntimamente relacionada con el uso posterior. Los rendimientos obtenidos permitieron obtener producto suficiente para llevar a cabo los estudios fisicoquímicos y las pruebas biológicas.

Resultados y Discusión // Síntesis de los oligonucleótidos

5- Caracterización de los 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena.

5.1 Objetivo

El objetivo de esta sección fue llevar adelante experimentos de desnaturalización (Melting Point) de oligonucleótidos de doce nucleótidos modificados con 2'-C-metilnucleósidos. Se compararon los resultados con otras modificaciones en 2'. Esta es la primera oportunidad en la que se miden los parámetros de hibridación de estos análogos de nucleótido con cadenas complementarias de ARN. Adicionalmente se realizaron experimentos de dicroísmo circular (DC) para determinar la conformación global de los dímeros doble cadena sometidos a estudios de Melting.

5. 2- Resultados

La aplicación de nucleótidos modificados en el campo de los oligonucleótidos tiene dos grandes objetivos, el primero es aportar estabilidad química y biológica para evitar la degradación de las moléculas en sistemas biológicos. La segunda es la incorporación de grupos químicos adicionales que aporten funcionalidad, desde la utilización de grupos catiónicos para mejorar el traspaso de membranas lipídicas hasta la derivatización con partículas metálicas para la fabricación de nano cables. En todos los casos es menester conocer las características estructurales y termodinámicas de la modificación para poder aplicarla con éxito.

La mayor parte de las aplicaciones biológicas que involucran oligonucleótidos requieren de la hibridación con cadenas complementarias, el primer paso entonces es estudiar su comportamiento en este contexto. Los experimentos más comúnmente llevados a cabo para caracterizar una modificación son estudios de estabilidad térmica o melting point acompañados por espectros de dicroísmo circular que permite obtener información sobre la conformación de la doble hélice y discriminar entre formas A, B, Z e intermedias..

El diseño de los monómeros para su aplicación en sistemas particulares es muchas veces realizado combinando información obtenida con otras modificaciones y conceptos estructurales básicos. En el caso particular de este trabajo se partió de la hipótesis de que los 2'-C-metilribonucleósidos poseen la conformación adecuada para reproducir las interacciones del ARN natural. A diferencia de otras modificaciones en 2' la presencia del oxhidrilo en esa posición podría aumentar la semejanza con el ARN natural. El grupo metilo por su parte puede aportar el impedimento estérico necesario para evitar la acción de las endonucleasas sobre el fosfato vecino.

5.2.1- Estudios de desnaturalización térmica (Temperatura de Fusión)

El parámetro más adecuado en el sentido estricto para medir la afinidad entre dos hebras complementarias de ADN o ARN es el ΔG_{37}^0 , sin embargo el uso de la expresión de la temperatura de fusión o melting point (T_m) es más ampliamente utilizada en el campo de los ácidos nucleicos. Esto se debe a que existe una correlación entre el $\Delta\Delta G_{37}^0$ y la diferencia entre temperaturas de fusión (ΔT_m), estas últimas son fácil y precisamente determinadas.

Con el fin de estudiar el impacto de la incorporación del grupo metilo en la estructura y estabilidad de una doble hélice con conformación A-ARN, se obtuvieron las curvas de melting de cuatro secuencias de doce nucleótidos de longitud (Figura 58), tres de las mismas con 2'-C-metilnucleótidos en la posición central y una secuencia natural como control. La secuencia nucleotídica utilizada fue elegida por varias razones. En primer lugar el largo de los oligonucleótidos fue establecido en 12 debido a que secuencias de más de diez nucleótidos poseen todas las características estructurales de la doble hélice. La modificación fue introducida en las posiciones centrales de la secuencias ya que allí puede apreciarse el efecto de la modificación sin la interferencia de la flexibilidad que presentan los extremos. Otro aspecto importante en la determinación de las temperaturas de fusión es la secuencia elegida, en este caso se utilizó una secuencia ya empleada en caracterización de otras modificaciones (Odadzic D. 2008) para poder comparar los datos obtenidos. Si bien existen modelos matemáticos que permiten la comparación de datos obtenidos a partir de estudios de melting realizados en distintos laboratorios, la reproducibilidad de la técnica ha demostrado ser pobre (Owczarzy R 2005) y resultados pueden variar desde una fracción de grado hasta más de 3 °C de acuerdo a la fuente y el método utilizado. En este caso la comparación es válida ya que fueron realizadas en el mismo laboratorio con los mismos equipos² y tomando como referencia la secuencia natural.

a)	3'-UUC-UUU-CUU-UUC-5'
b)	3'-UUC-UU U_{Me} -CUU-UUC-5'
c)	3'-UUC-UU $U_{Br}U_{Me}$ -CUU-UUC-5'
d)	3'-UUC-UU dU_{Me} -CUU-UUC-5'
e)	5'-AAG-AAA-GAA-AAG-3'

Figura 58 Secuencias ensayadas en los experimentos de dicroísmo Circular y Melting Point

² Esto fue realizado en una visita al Instituto de Química Orgánica de la Universidad de Frankfurt Alemania.

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

Las determinaciones de estabilidad pueden ser realizadas utilizando distintas metodologías, la más tradicional es la determinación con un espectrofotómetro especialmente acondicionado a 260 nm. Esta técnica hace uso de la hipocromicidad, propiedad por el cual dos hebras de ARN o ADN doble cadena aumentan su absorptividad molar a medida que se desaparean. Esta es la técnica más ampliamente utilizada aunque existen otras que permiten obtener los mismos datos, como la calorimetría y técnicas volumétricas (Chalikian T. 1999) En este caso se realizaron las determinaciones con el método espectrofotométrico utilizando una rampa de 0,5 °C/min. La cámara ventilada con N₂ para evitar la condensación a bajas temperaturas en las paredes e interior de la cuba, que lleva una tapa de teflón para evitar la evaporación de la muestra a altas temperaturas.

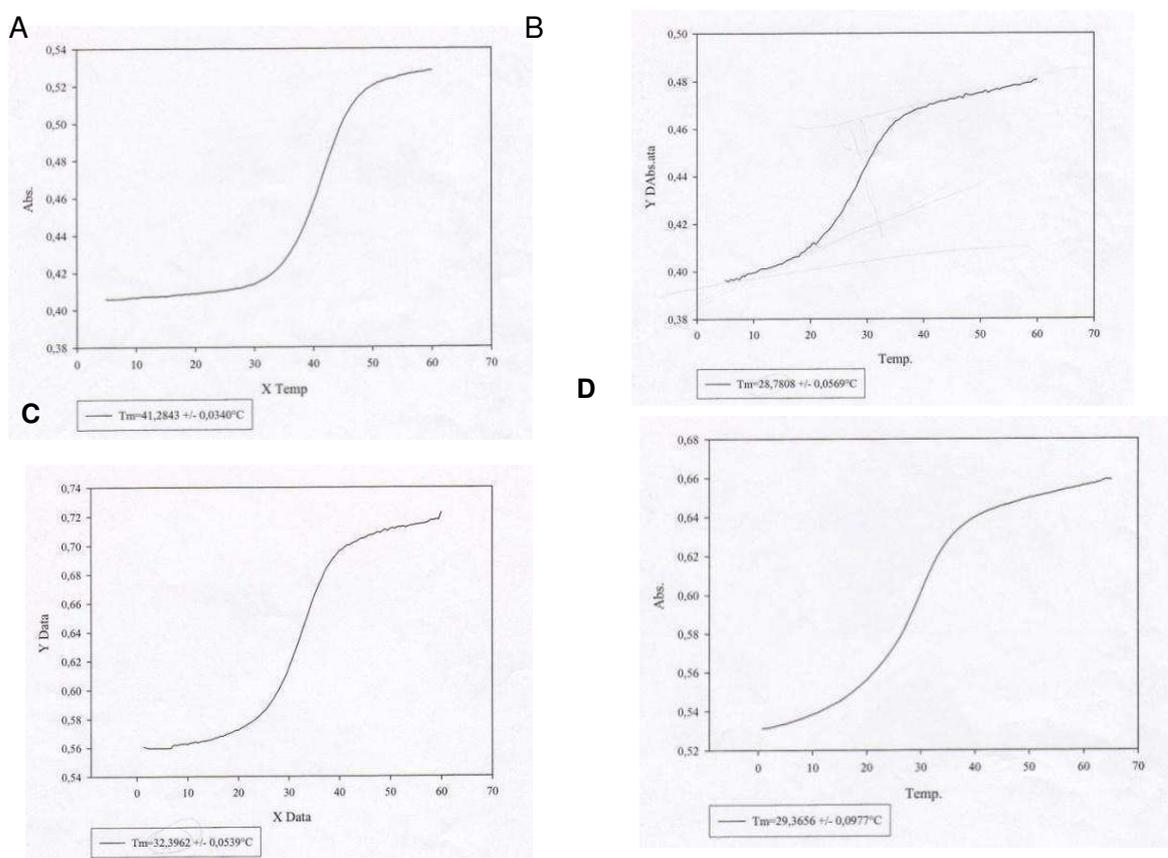


Figura 59 Curvas de absorbancia obtenidas en los estudios de estabilidad térmicas para los dúplex entre la secuencia e y: a) natural b) Ume c) dUme d) 5BrUme

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

En todos los casos se pudo observar una buena hibridación y una transición cooperativa. Las curvas de desnaturalización térmica se muestran en la Figura 59. La determinación de la temperatura de fusión fue realizada utilizando el modelo de transición de dos estados. Los resultados de la Tabla 7 muestran una gran desestabilización de las estructuras por la presencia del grupo metilo en la posición 2'. La magnitud de la perturbación corresponde a valores similares a los que podrían ser obtenidos incorporando una base desapareada. La mutación puntual de un nucleótido central por una citidina o adenosina provocarían un ΔT de $-15,8^{\circ}\text{C}$ para la secuencia ensayada en las mismas condiciones de buffer ($2\mu\text{M}$, 140 mM Na^+) según las estimaciones realizadas con el modelo de dos estados (Markham N. 2005) con el software DINAmelt (Zuker M. s.f.).

Modificación	T_m	ΔT_m
Control (a)	41,28	
Ume (b)	28,78	-12,5
5BrUme (c)	29,4	-11,9
dUMe (d)	32,4	-8,9

Tabla 7 Temperaturas de fusión obtenidas con cada una de las modificaciones ensayadas

El ΔT_m para el oligonucleótido modificado con 5 bromo-2'-C-metiluridina evidencia un ligero incremento en la estabilidad, lo cual era esperable ya que se ha reportado en literatura que la presencia del Br en la posición 5 de la base estabiliza el apareamiento entre las bases y fue ensayado en siRNA en un intento de mejorar la actividad (Chiu Y. 2003). El 2'-C-metil-2'-desoxinucleósido por su parte parece perturbar en menor medida la estabilidad del dúplex. A pesar de que la conformación de la 2'-C-metiluridina en solución es 3'-endo, la misma que la del ARN natural, el puckering del azúcar, en principio, parece no ser determinante para asegurar la complementariedad. Según reportes bibliográficos la incorporación de nucleótidos modificados como el 2'-desoxi-2'-flour y 2'-O-alil aumentan la temperatura de melting por que el equilibrio conformacional de los monómeros se encuentra desplazados hacia la conformación "norte" consistente con la geometría A de los dúplex de ARN (Cummins L. 1995). Esto permitiría la preorganización de las hebras favoreciendo la estabilidad del dúplex. En contraposición con los datos obtenidos en este trabajo las modificaciones sobre el oxígeno 2' presentan temperaturas de fusión similares o en

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

algunos casos superiores que el ARN. En la siguiente (Tabla 8) se observan los datos obtenidos por Odadzic D. y col. para el caso de nucleótidos modificados sobre el oxígeno de la posición 2'. Como puede apreciarse, mas allá de las características químicas del grupo adicionado en todos los casos se produce la estabilización. Esto podría explicarse en un modelo en el cual los sustituyentes del óxígeno se orientan hacia fuera de la doble hélice evitando la interacción con átomos involucrados en interacciones ARN-ARN entre bases. En este modelo el metilo de los 2'-C-metilnucleótidos el metilo podría estar ubicado hacia el interior de la doble hélice con efectos desestabilizantes.

Modificación	ΔT_m
2'-O-aminoetilU	1
2'-O-guanidietilU	3,1
2'-O-alilU	0,4
2'-O-cianoetilU	0,9

Tabla 8 Valores de melting point obtenidos para algunas modificaciones sobre el O 2' obtenidos en las mismas condiciones que para los 2'-C-metilnucleósidos

5.3 - Experimentos de Dicroísmo Circular (DC)

Los datos obtenidos de los experimentos de estabilidad térmica proveen información acerca de la estabilidad de las hélices que si bien es de gran importancia requiere del empleo de técnicas adicionales para poder racionalizar los efectos de la incorporación del nucleótido modificado. Como fue descrito en la introducción los dúplex de ácidos nucleicos pueden adoptar distintas formas o conformaciones. Cada una de ellas posee propiedades características como la conformación de los restos ribosa, las distancias entre los fosfatos internucleotídico, distancias entre las bases y el sentido del giro de la doble hélice, entre otros. Existiendo semejante variabilidad no es posible realizar ninguna predicción estructural del impacto de una modificación sin conocer primero la estructura global de la doble hélice formada. La técnica de dicroísmo circular aporta información en este sentido ya que el uso de la luz polarizada permite estudiar aproximar a que tipo de doble hélice pertenece la estructura.

El dicroísmo circular en los ácidos nucleicos depende de la geometría del apilamiento de la bases, la presencia de distintas bases aumenta la complejidad de los espectros. En el caso particular del ARN, la forma A se caracteriza por poseer un máximo en el entorno de los 270 nm, un mínimo en 210 nm y valores negativos muy

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

pequeños entre 290nm y 300nm. De esta forma es posible apreciar si al introducir una modificación se mantiene la estructura general de la hélice.

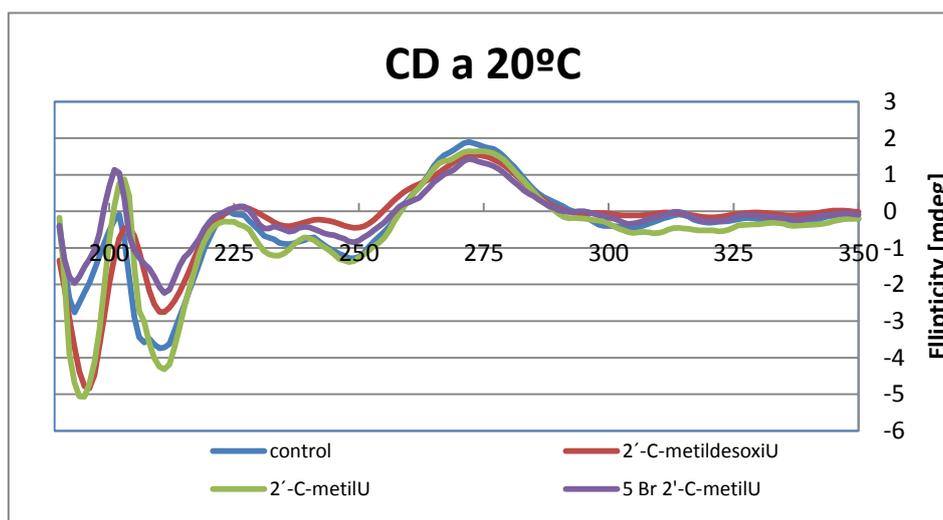


Figura 60 Espectros de dicroísmo circular obtenidos a 20°C para los oligonucleótidos

Los espectros obtenidos para los oligonucleótidos modificados (Figura 60) no muestran cambios globales en la estructura de la hélice, presentando la forma típica de una hélice tipo A-ARN. Este dato es de gran importancia porque permite concluir que la presencia del metilo desestabiliza la cadena en un entorno local pero mantiene valores de hélice similares a ARN natural. Si bien se pueden apreciar diferencias en zonas menores a 200 nm éstas no son utilizadas en el análisis. Las diferencias dentro del rango analizado (200 nm a 350) no pueden ser atribuidas *a priori* a ningún efecto particular.

5.4 - Conclusiones

Los experimentos realizados permitieron conocer las propiedades de los 2'-C-metilnucleósidos en un contexto doble cadena. Esta información es importante porque nunca había sido caracterizada en un sistema ARN-ARN. La mayoría de las aplicaciones doble cadena requieren de la formación de dúplex estables, tal es el caso de las herramientas de silenciamiento génico conocidas como ARNi. La combinación de experimentos de estabilidad térmica y dicroísmo circular es utilizada como un primer diagnóstico para determinar el potencial de distintos nucleótidos modificados en ARNi (Odadzic D. 2008).

Las temperaturas de melting obtenidas para los oligos con los 2'-C-metilnucleósidos evidencian la imposibilidad de utilizar estos análogos de nucleósidos en el campo de los siRNA. En el caso de los 2'-C-metilnucleósidos el impacto en la estructura general de la hélice es local, ya que no existe un corrimiento de los máximos y mínimos como los que se pueden apreciar en los espectros de la figura 61.

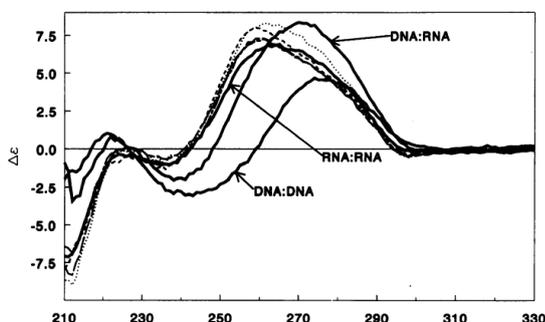


Figura 61 CD de Dúplex ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, estos últimos adoptan una forma intermedia entre las formas puras A y B (extraído de (Cummins L. 1995))

En segundo lugar, la presencia del metilo podría aportar resistencia ante las nucleasas aumentando la vida media en fluidos biológicos. La posibilidad de mejorar este aspecto es de gran importancia en el campo de la medicina. En el caso particular de este trabajo se estudiaron las propiedades de 3 candidatos, la 2'-C-metiluridina y su análoga 5 Br-2'-C-metiluridina y la 2'-C-metildesoxiuridina. Todos presentan el grupo metilo que según datos previos producen un aumento de la resistencia a nucleasas del orden de 7 veces (Gallo M. 2005). La posibilidad de contar con la base normal y la bromada fue llevada a cabo como un intento de mejorar la estabilidad del

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

dúplex, los resultados demostraron que si bien hay una ligera diferencia (0,6°C) ambos nucleótidos tienen efectos muy desestabilizantes. Por su parte la idea de utilizar el desoxiderivado encuentra su fundamento en los experimentos que demuestran que el OH 2' no es necesario, este compuesto parecía poseer todas las características favorables para su utilización en siRNA ya que la conformación del azúcar favorece la estructura tipo A y la presencia del metilo y ausencia del OH podrían aportar una gran estabilidad química y biológica. La evidencia experimental demuestra que existe un efecto no previsto cuya consecuencia más evidente es la marcada desestabilización de la doble hélice.

Los resultados aquí presentados constituyeron una modificación de los objetivos planteados para el trabajo. Se utilizaron los datos obtenidos como punto de partida para un estudio computacional que permitirá comprender el efecto del metilo en la estabilidad de los dúplex. Por un lado permite completar la caracterización de la modificación y conocer sus propiedades funcionales, dejando abierta la posibilidad para su aplicación en futuros desarrollos. Por otra parte la desestabilización causada por el metilo presenta un interrogante muy interesante desde el punto de vista estructural.

Resultados y Discusión// Caracterización 2'-C-metilnucleósidos en sistemas doble cadena

6- Estudio computacional de la influencia del metilo de la posición 2' en la interacción ARN-ARN doble cadena.

6.1- Objetivo:

En el presente capítulo se describen en detalle los resultados obtenidos en la dinámica molecular realizada para estudiar el efecto del grupo metilo de la posición 2' en la interacción entre secuencias complementarias de ARN. La intención del mismo es llegar a un modelo que explique los resultados obtenidos en los estudios de punto de fusión y de dicroísmo circular. La información obtenida en estos experimentos permite, además, conocer el comportamiento de estos análogos de nucleósidos en un contexto de doble cadena ARN y podría ser útil en el diseño racional de oligonucleótidos que contengan 2CMNs

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

Los resultados obtenidos en los experimentos de estabilidad térmica y diroísmo circular para los 2'-C-metilnucleósidos plantean un interrogante, ¿como es posible que la presencia del grupo metil tenga una influencia tan negativa en la estabilidad de los dúplex ARN-ARN sin distorsionar mayormente la estructura tipo A-ARN de la molécula?

Una de las herramientas disponibles para contestar esta pregunta es la utilización de métodos computacionales. La simulación *in silico* permite estudiar aspectos estructurales y termodinámicos con gran detalle pudiendo seguir transiciones conformacionales e interacciones con el solvente que resultan imposible de visualizar de otra manera. En la actualidad es posible realizar simulaciones de oligonucleótidos gracias al avance en algoritmos y parámetros específicos (Norberg J. 2002, Perez A. 2007).

En este trabajo se utilizó el programa AMBER 9 utilizando el campo de fuerzas parmbs0 (Perez A. 2007) que es un refinamiento del campo del AMBER parm99. El mismo fue obtenido a través de cálculos de alto nivel cuántico, y es el campo de fuerza más confiable para ácidos nucleicos en la actualidad.

El primer paso para simular los 2'-C-metilnucleósidos en amber 9 fue incorporar en las bibliotecas del programa la información necesaria para que el programa reconociera estos nucleósidos modificados. La definición de cada uno de los átomos que componen a la molécula y su conectividad fue llevada a cabo modificando los valores de la uridina natural para la 2'-C-metiluridina. El término energético del metilo no fue modificado con respecto al hidrógeno natural en la posición 2'. Para comprobar que esta aproximación era correcta se realizaron dinámicas moleculares con el monómero modificado. El objetivo de este experimento fue verificar si el campo y los parámetros utilizados permitirían simular los equilibrios conformacionales y propiedades obtenidos a partir de los experimentos de espectroscopia de RMN (M. E. Gallo M. 2005) y difracción de rayos X del sólido (Biegelman L. 1987).

Las dinámicas fueron realizadas en una caja octaédrica de agua TIP3PBOX. La utilización de solvente explícito permitió la reproducción de las interacciones y estructuras formadas por las interacciones entre el agua y el nucleósido. Si bien la aplicación de esta estrategia es más costosa desde el punto de vista del tiempo de cálculo, permite reproducir las estructuras descritas en trabajos experimentales (Barbe S. 2008) con mayor certeza que el solvente implícito.

Luego de generar el archivo de topologías y coordenadas del monómero 2'-C-metiluridina se llevó a cabo una dinámica de 11 ns a 298 K. La Figura 62 muestra los

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

valores de la energía total, potencial y cinética del sistema durante toda la corrida. Los datos confirman que el sistema se estabilizó rápidamente después de la minimización y termalización (se lleva al sistema de 0K a 298 K gradualmente). Se realizó el mismo análisis con variables como presión volumen y RMSD entre otras. Todas permanecieron estables durante toda la corrida. La Figura 63 muestra un cuadro de la dinámica en el que se puede observar una de las conformaciones adoptadas, la imagen corresponde a una conformación cercana al promedio.

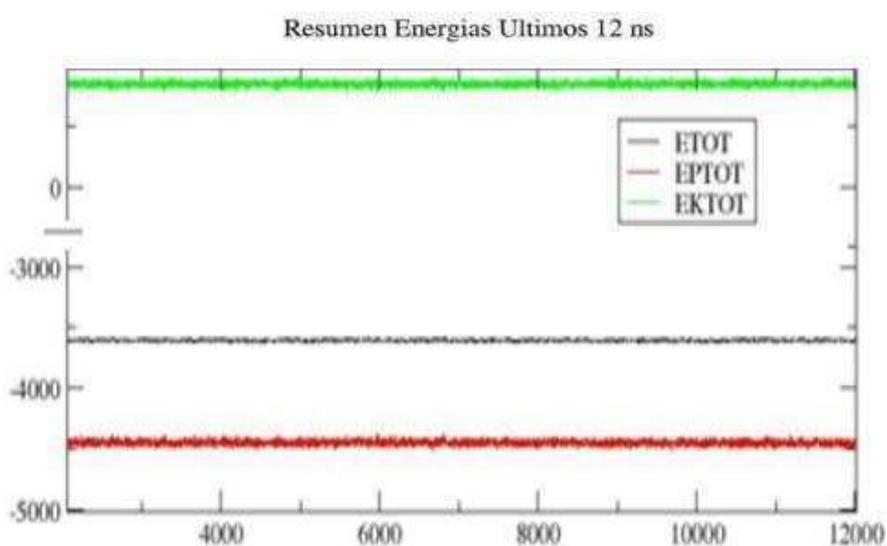


Figura 62 Energía tota ETOT, potencial EPTOT y cinética EKTOT a lo largo de la dinámica, 5000 cuadros= 1ns

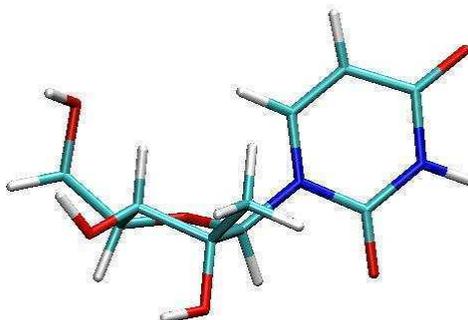


Figura 63 Imagen de un cuadro de la dinámica con 2'-C-metiluridina, la imagen muestra una conformación cercana a 3'-endo de la furanosa con la base en anti

Uno de los aspectos más importantes que el sistema debía ser capaz de simular era el equilibrio conformacional del azúcar nucleosídico ya que éste es

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

determinante para la estructura de los dúplex de ARN que serían simulados más tarde. En la Figura 64 puede observarse el valor del ángulo pseudorrotacional a lo largo de toda la trayectoria. El valor del ángulo varía en torno al promedio en forma constante durante los 10 ns en torno a un valor de $P = 30,9^\circ$, este valor es coincidente con el informado por Gallo y col en experimentos de espectroscopia RMN que corresponde a una conformación 3'-endo de la ribosa.

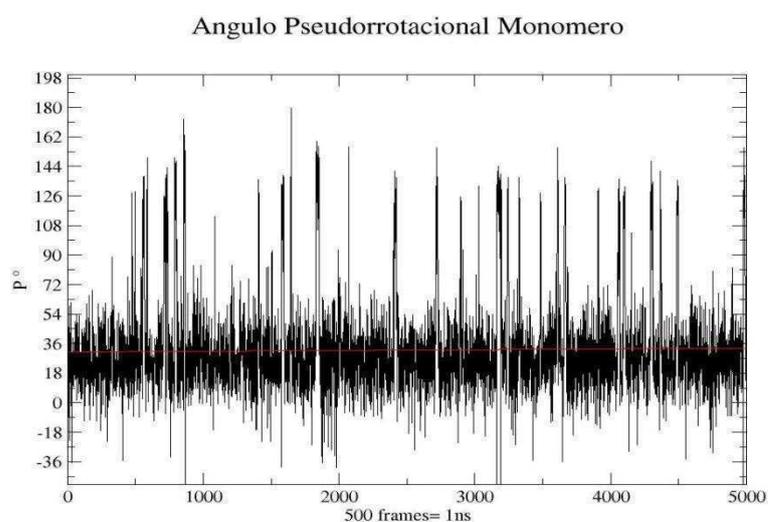


Figura 64 Ángulo pseudorrotacional P a lo largo de la corrida, 5000 cuadros= 1 ns

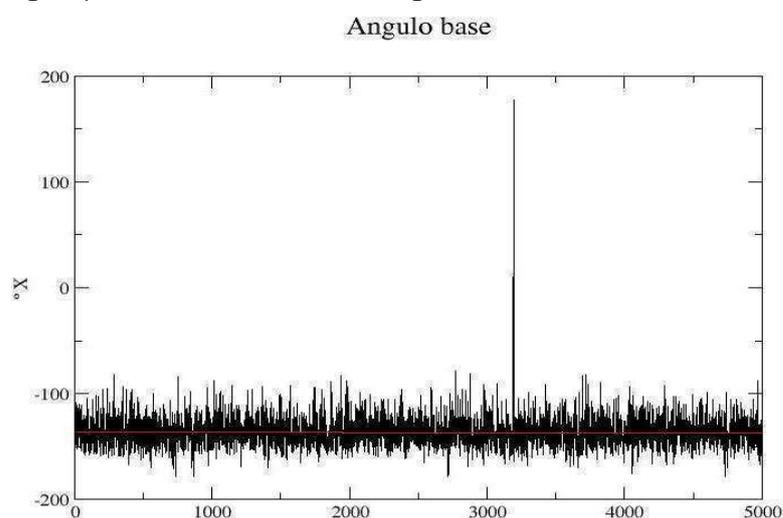


Figura 65 Ángulo de la base a lo largo de la corrida, 5000 cuadros= 1 ns

El valor del ángulo de torsión enlace glicosídico χ por su parte indica la conformación anti de la base, este valor coincide con los valores experimentales, previamente obtenidos, en la

Tabla 9 se presenta un resumen de los mismos.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

	RMN	Rayos X	Amber
P	30	24	30,9 ± 0,85
τ_m	40	33,4	38,8
Conformación Azúcar	3T_4	3T_4	3T_4
χ	Anti	-145,5	-136,41 ± 0,38

Tabla 9 Comparación de los valores característicos de la estructura de la 2'-C-metiluridina

Una vez verificada la validez de la metodología utilizando el monómero se investigó la influencia del metilo en la estructura doble cadena para intentar explicar la causa de la baja afinidad encontrada en los experimentos de temperatura de fusión. Se modeló la secuencia de ARN natural (WT) utilizada en los experimentos detallados en la sección anterior, utilizando esta secuencia fue utilizada como control. A partir de la misma se simuló la correspondiente a la modificada con la 2'-C-metiluridina. Las secuencias fueron confinadas en una caja octaédrica de agua TIP3P, las cargas negativas de los fosfatos fueron neutralizadas con iones Na^+ para evitar efectos de repulsión coulombicas entre los fosfatos. Todas las estructuras fueron minimizadas y termalizadas antes de la dinámica.

Las moléculas fueron sometidas a una dinámica de 14 ns con un termostato a 298 K, se utilizaron los últimos 10 ns para realizar el análisis de los resultados. Durante toda la trayectoria se mantuvieron constantes los principales indicadores del sistema, Temperatura, Energía total (E_{Tot} **Figura 66**), Energía cinética (E_{kTot} **Figura 66**), Energía potencial (E_{Pot} **Figura 66**), presión, volumen. Además se calcularon los RMSD de las estructuras para verificar la integridad de la estructura (anexo)

Una vez concluidas las corridas se generaron las estructuras promedio utilizando el programa ptraj para los dos oligonucleótidos, verificando que las estructuras fueran promediabiles midiendo parámetros característicos de la hélice durante toda la corrida.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

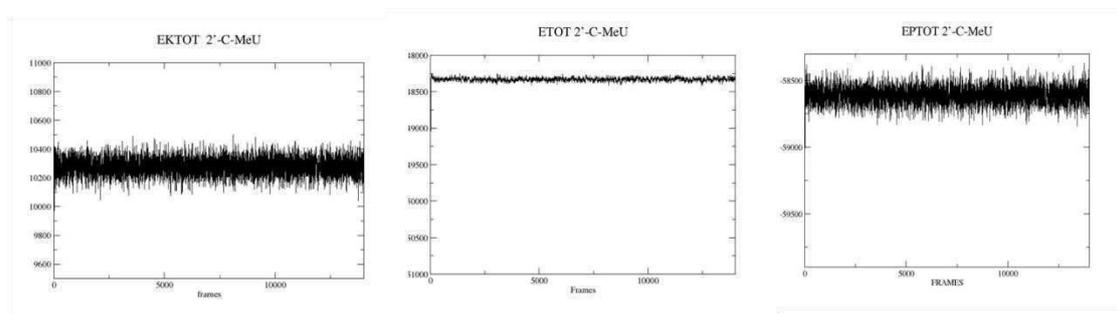


Figura 66 Diagramas de Energía en función del tiempo para la simulación del ON con 2'-C-metiluridina. 500 cuadros=1 ns

Para cuantificar el impacto de la perturbación en las interacciones que estabilizan la estructura de los oligonucleótidos, se estudiaron aspectos estructurales generales y se profundizó en el análisis de los puentes hidrógeno típico de las uniones de tipo Watson-Crick, el stacking entre las bases y la hidratación.

6.1.2- Estructura general

La imagen de la Figura 67 muestra la estructura promedio del oligonucleótido modificado con 2'-C-metiluridina superpuesta con la estructura del oligonucleótido natural (WT). Como puede apreciarse en la imagen, no hay una modificación masiva de la estructura de dúplex. La Tabla 8 muestra los valores obtenidos durante el análisis de la estructura modificada, en términos generales se mantienen las características de las hélices tipo A-ARN, en el entorno de la modificación la estructura se ve afectada y no puede ser considerada tipo A. Esto es consistente con los datos obtenidos en los experimentos de dicroísmo circular.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

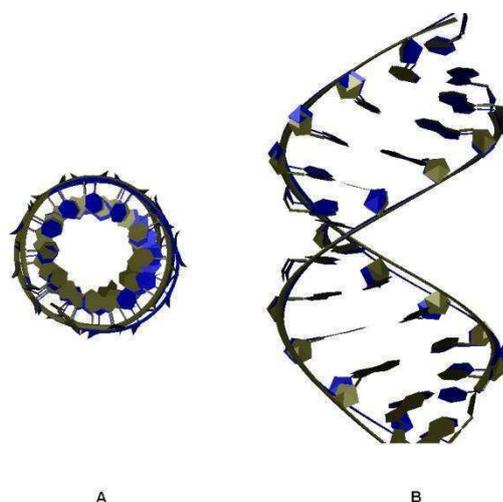


Figura 67 Estructura promedio de los oligonucleótidos wt (gris) y modificado con 2'-C-metiluridina (azul)

step		Xp	Yp	Zp	XpH	YpH	ZpH	Form
1	GA/UC	-1.84	8.53	1.71	-5.78	7.59	4.24	A
2	AA/UU	-2.04	8.61	1.63	-6.79	7.37	4.75	A
3	AA/UU	-1.92	8.64	1.62	-6.65	7.31	4.89	A
4	AA/UU	-1.71	8.69	1.65	-6.37	7.39	4.87	A
5	AG/CU	-1.75	8.81	1.44	-6.79	7.13	5.37	
6	GA/UC	-2.29	8.78	1.36	-5.71	8.53	2.35	
7	AA/UU	-2.35	8.70	1.87	-8.92	6.99	5.52	A
8	AA/UU	-1.94	8.61	1.84	-6.71	7.46	4.67	A
9	AG/CU	-1.82	8.56	1.98	-7.07	7.16	5.09	A
10	GA/UC	-1.90	8.57	1.81	-6.27	7.38	4.72	A
11	AA/UU	-2.03	8.63	1.51	-5.85	7.80	4.01	A

Tabla 10 – Valores calculados para determinar la forma de la hélice en cada par de bases

La conformación de los azúcares es uno de los principales factores que determinan la estructura del esqueleto de los oligonucleótidos. En el caso del ARN, la conformación 3'-endo es la favorecida. Los 2'-C-metilnucleósidos en solución presenta mayoritariamente la conformación 3T_4 , con un ligero exceso poblacional en esta conformación con respecto al equilibrio de los ribonucleósidos naturales. La premisa de este trabajo se basó en que esta conformación sumada a un correcto posicionamiento de la base natural permitiría reproducir las interacciones del ARN aportando estabilidad a nucleasas por la presencia del metilo en el entorno del fosfato internucleotídico. La conformación al inicio de la dinámica para el azúcar del 2'-C-metilribonucleosido fue 3'-endo cambiando luego de 3 ns en un mínimo con conformación C4'exo. La Figura 65 muestra los valores de los ángulos de la furanosa

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

modificada U* y los valores promedios obtenidos para la uridina natural. La modificación del valor del ángulo P de U* corresponde a una transición a valores relativamente cercanos en el ciclo pseudorrotacional hacia la zona Este. La modificación de la conformación del azúcar probablemente sea consecuencia de la necesidad de modificar parámetros estructurales locales para mantener la estructura general de doble hélice, demostrando que si bien la conformación del nucleósido en solución es la correcta no se mantiene al ser incorporado en un oligonucleótido.

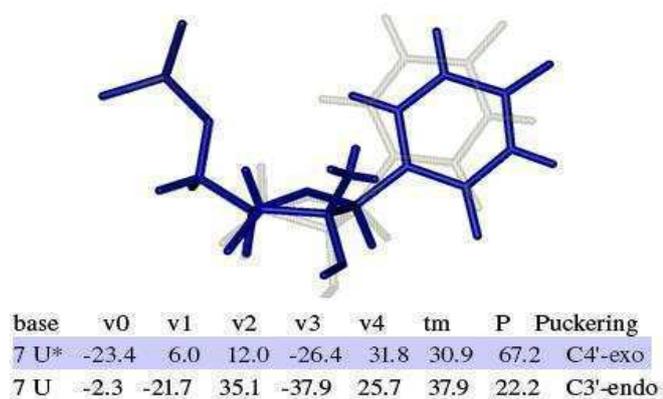
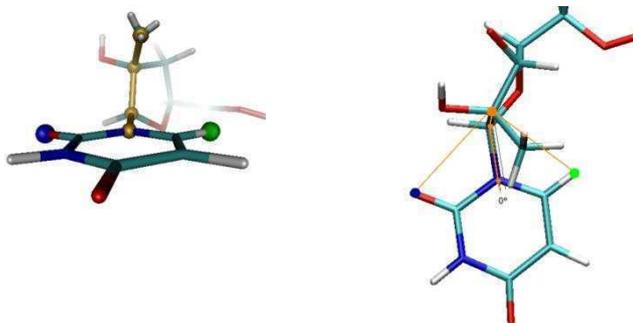


Figura 68 Valores de los ángulos de torsión de la ribosa y conformación del azúcar 2'-C-metilnucleósido promedio vs wt, la leyenda indica los valores de cada ángulo y la conformación correspondiente a esos valores

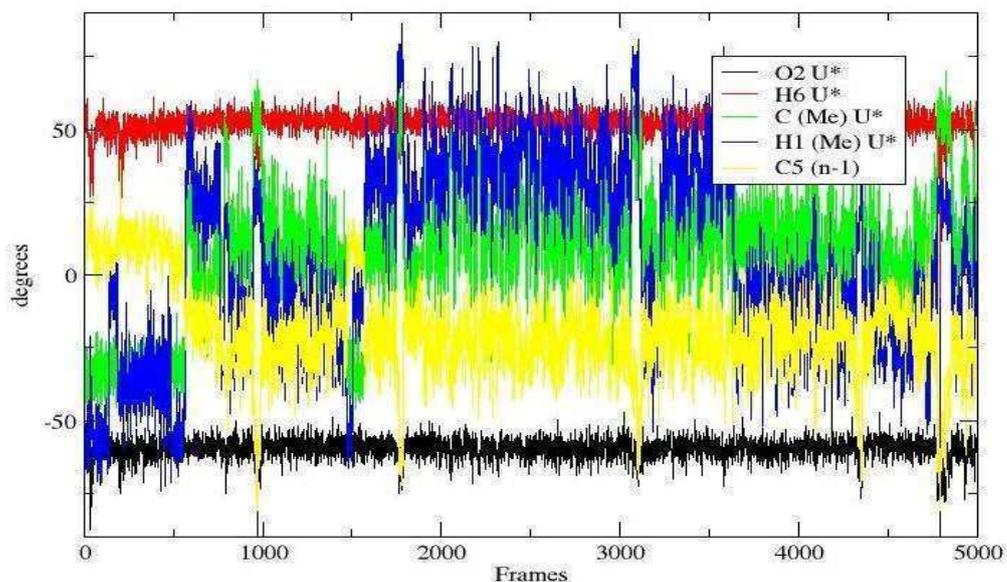
El análisis detallado de la posición del metilo permite verificar que éste es posicionado hacia el interior hidrofóbico de la molécula, intercalando los hidrógenos entre la base de posición modificada U* y la del vecino n-1, la presencia de este grupo voluminoso desplaza a la base de la posición vecina en el sentido 3'.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

A



B



C

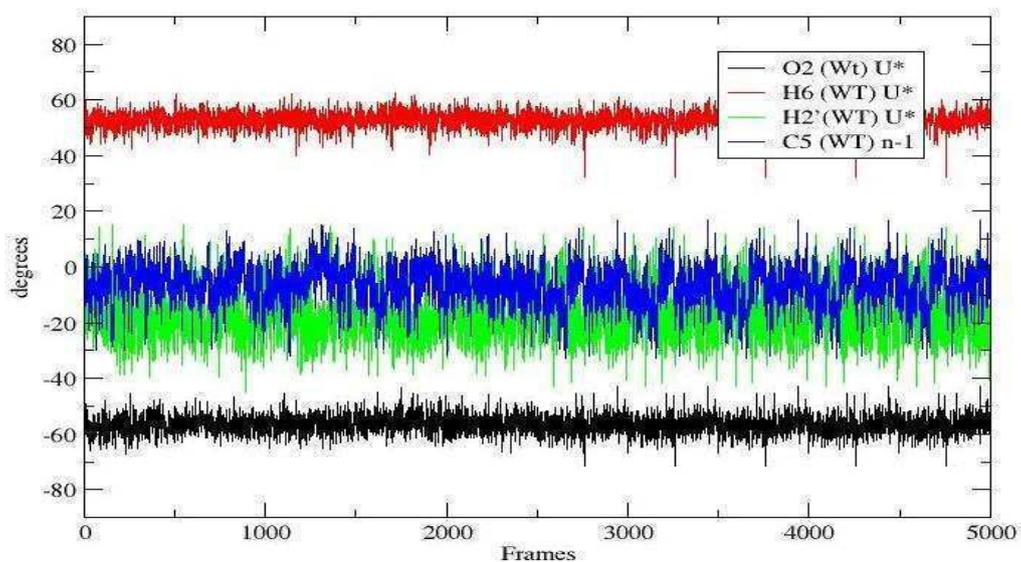


Figura 69 A- Definición del ángulo utilizado para el análisis N1-C1-C2'-X B- Valores de cada uno de los átomos analizados durante 10 ns: X= ; Carbono del Metilo del 2'-C-metilnucleosido (verde), H1 del metilo azul), C5 de base vecina n-1 (amarillo), Limites del área de la base (negro y rojo);C) Valores de átomos en la secuencia no modificada X: H 2'(verde) , C5 de base vecina n-1 (azul),

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

La figura 69 muestra en detalle el sistema utilizado para el análisis posicional del metilo. El gráfico muestra la posición del carbono del metilo y de 1 de los hidrógenos utilizando como parámetro el ángulo diedro N1-C1'-C2'-X. Este ángulo permite ubicar la posición de estos átomos con respecto a la base. Los valores límites de esta área están delimitados por los ángulos diedros formados con los átomos exocíclicos de la base H6 y O2. Este sistema se puede interpretar fácilmente el sistema si se considera al observador en la base siguiente de la cadena y se asume a la base como una superficie delimitada por los planos a 50° y -50° (ver figura 69), éste sistema permite proyectar las posiciones de cada uno de los átomos analizados sobre la superficie de la base.

El análisis de la posición del H2 del nucleósido natural (en el ON no modificado de la Figura 36) demuestra que este se posiciona en el centro de la doble hélice con una ligera tendencia a valores negativos, la base vecina o n-1 se posiciona en valores cercanos a 0° por lo que se puede deducir que se encuentra sobre el H de la posición 2' del nucleósido vecino. Para demostrar que el metilo del nucleósido modificado se ubica en la zona central de la hélice los valores tendrían que estar dentro de este rango (-50° a 0°). Esto puede verificarse observando los valores del carbono del metilo y de uno de los hidrógenos, ambos posicionados toda la dinámica sobre la base. Los Hidrógenos adoptan valores inferiores a 0° durante toda la corrida. Es posible concluir entonces que el metilo se orienta en la zona de apilamiento de las bases produciendo una distorsión en la posición de la base vecina. Tanto el carbono del metilo como sus hidrógenos permanecen en la misma zona que lo hace el H2' del nucleósido natural, si se tiene en cuenta el volumen del grupo es posible explicar el desplazamiento de la base vecina. La primera evidencia de la magnitud de la distorsión queda de manifiesto en la modificación del valor del carbono 5 de la base vecina en el oligonucleótido modificado con respecto al del natural.

Más allá del análisis utilizando una proyección sobre una superficie, el efecto sobre la posición en tres dimensiones de la base es detallado y cuantificado más adelante utilizando una metodología normalizada. A modo de introducción y con fines puramente ilustrativos, se puede ver el efecto del metilo en la posición relativa de las bases (Figura 70). La diferencia en Å entre las bases en las estructuras promedio WT en color gris (5,42 Å) y la que contiene la 2'-C-metiluridina (3,87 Å). Como se explica más tarde esa perturbación modifica las interacciones de puente hidrógeno, stacking y de hidratación.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

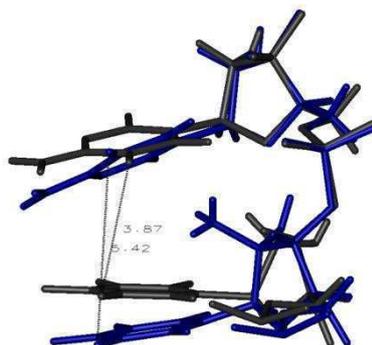


Figura 70 Superposición de las estructuras promedio del ON WT (gris) y el modificado con 2'-C-Metiluridina (Azul) las distancias entre las bases demuestran la perturbación producida por el metilo en las estructuras promedio.

6.1.3- Puentes hidrógeno.

La interacción de tipo puente hidrógeno es uno de los factores de estabilización de la doble hélice. Entre los descriptores que se utilizan habitualmente para cuantificar la intensidad de esta interacción podemos mencionar el tiempo de ocupancia y el tiempo de vida media entre un dador y un aceptor de puente hidrógeno. Según cálculos empíricos cada puente hidrógeno formado entre un par de bases aporta un factor de estabilización de entre -0,5 a -1,5 Kcal/mol. Se ha sugerido que este rango se debe a una competencia secuencia específica entre stacking y puentes H por lo que varía de acuerdo a las bases involucradas. Se ha propuesto también que la modificación del número y características de los puentes hidrógeno tiene influencia directa en las interacciones de stacking causadas por una redistribución electrónica en la base (Turner D. 1987).

La Figura 71 muestra los resultados obtenidos tras analizar la formación de los puentes hidrógeno a lo largo de todas las trayectorias utilizando el programa ptraj. El desplazamiento de las bases producido por el grupo metilo de la posición 2' tiene un impacto negativo en la vida media de los puentes hidrógeno entre las bases vecinas a la perturbación. La ocupancia o porcentaje del tiempo que el puente está formado también está disminuido en una de las bases adyacente a la uridina modificada. La modificación afecta a la molécula en forma direccional hacia el extremo 3' evidenciado en la vida media relativa al control no modificado que presenta valores por debajo de 20 %. Esto parece indicar una movilidad mayor de las bases de la estructura modificada.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

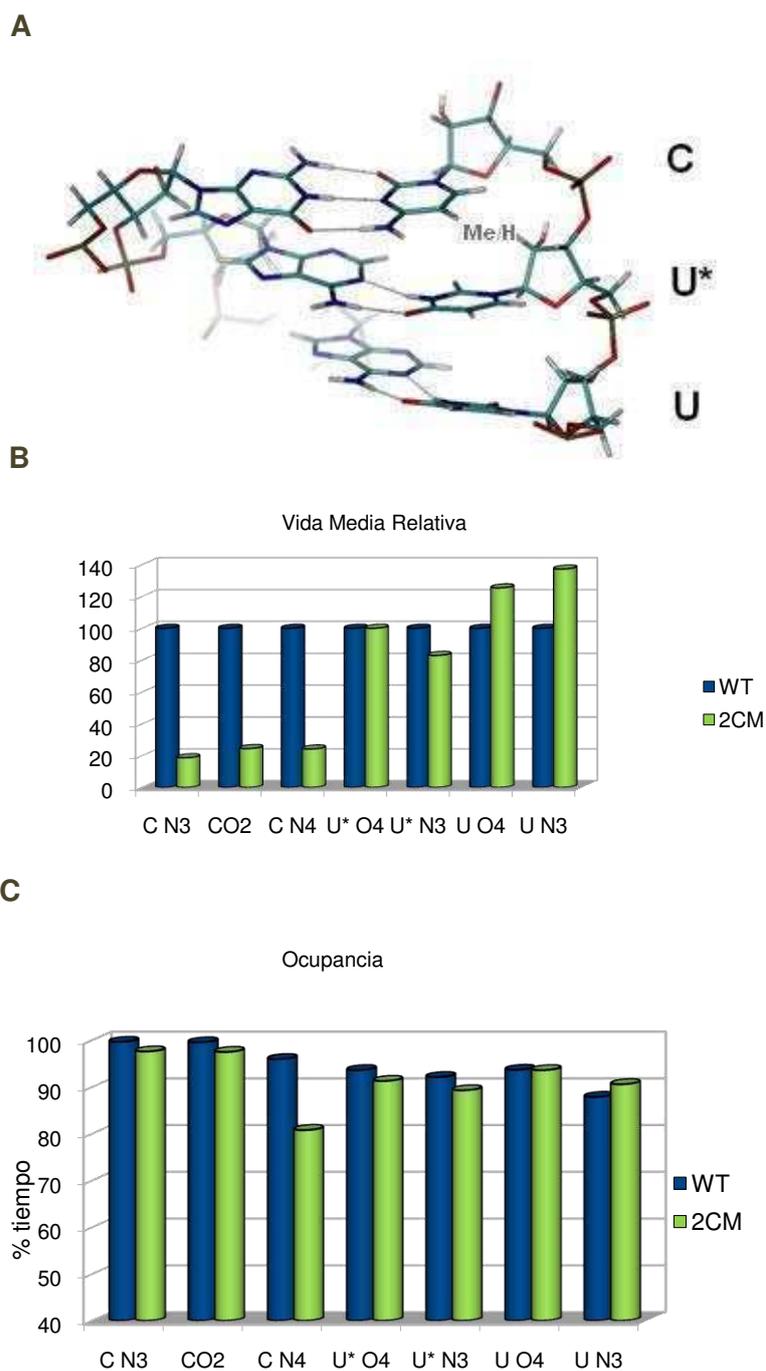


Figura 71 Características de los puentes hidrógenos entre cada uno de los átomos involucrados en las uniones de Watson-Crick para las bases (n-1, AU) (n, AU*) y (n+1 CG) A) Ilustración de los puentes H analizados B) vida media relativizada al wt C) ocupancia.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

6.1.4- Stacking

La interacción hidrofóbica entre las bases es una de más relevantes en los ácidos nucleicos. Junto con los puentes hidrógeno y la interacción con aguas circundantes estabilizan las estructuras tanto del ARN como del ADN. Los principios fundamentales de esta interacción aún se encuentran en discusión, pero en líneas generales se asume que el stacking esta dominado por interacciones no electrostáticas (Luo R. 2001). Este tipo de interacción depende de la estructura electrónica de las bases y de factores geométricos por lo que es secuencia dependiente. Más allá de la discusión sobre el aporte de cada uno de los diferentes tipos de interacción, el stacking es uno de los parámetros a analizar al evaluar el impacto producido por la incorporación de en un nucleótido modificado. El análisis consiste en la cuantificación geométrica de la superposición de la bases la cual fue definida en un grupo de trabajo internacional (Dickerson R. 1989). Utilizado anteriormente para estudiar oligonucleótidos modificados con LNA (Ivanova A. 2007)

Este análisis descompone la distorsión de la estructura en una serie de distancias y ángulos que son comparados con valores de referencia. Estos parámetros son utilizados para describir la estructura de los ácidos nucleicos. En la

Figura 72 se puede observar un diagrama de bloques de las bases generado a partir de la estructura promedio del ON modificado con 2'-C-metiluridina, donde se puede apreciar que la posición de la base que está indicada con la flecha claramente difiere de las demás.

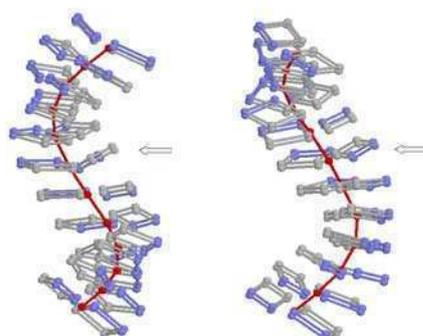
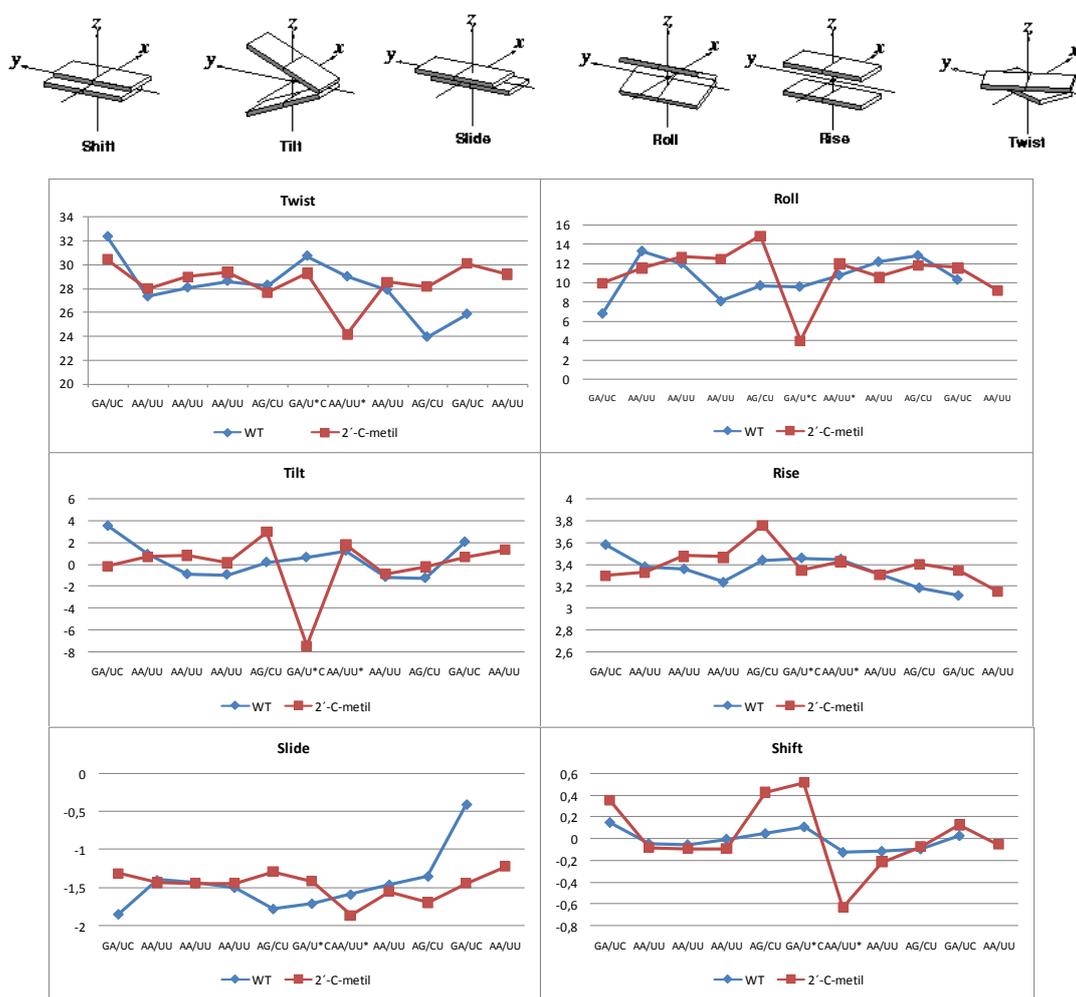


Figura 72 Diagrama de las bases de ON modificado con 2'-C-metiluridina generado con el programa X3DNA, Las flechas indican el sitio de la distorsión causada por el metilo. Ambas imágenes corresponden a distintos punto de vista del ON modificado

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

La Figura 73 muestra los valores obtenidos para los parámetros de stacking entre cada uno de los pares sucesivos para los dos ON aquí estudiados. Los mismos fueron calculados utilizando el software X3DNA (Lu XJ 2008) el cual permite evaluar cada uno de estos parámetros y referirlos a valores establecidos como referencia. Este programa no solo brinda información de las bases sino que también fue utilizado para calcular todos los ángulos y distancias de interés para la descripción de estructuras de ARN y ADN como conformación de los azúcares, distancias entre fosfatos etc.



(Twist, Roll, Tilt expresados en grados Shift, Slide y Rise en Å)

Figura 73 Valores para pares de bases sucesivos para cada uno de los oligonucleótidos analizados

Los parámetros aquí presentados aportan información sobre la posición de un par de bases respecto a su par vecino y son valores geométricos simples referidos a coordenadas internas de cada par de bases. El algoritmo utilizado es preciso y reversible, permite la reconstrucción de la estructura a partir de los valores que da

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

como resultado, por ejemplo la distancia entre el centro de un par de bases respecto al vecino está definida por la ecuación $\sqrt{Shift^2 + Rise^2 + slide^2}$ y el ángulo de inclinación entre dos pares de bases por $\sqrt{Roll^2 + Tilt^2}$. La Figura 73 muestra cada uno de los parámetros y su presentación grafica.

El análisis detallado de los datos obtenidos permite advertir distorsiones importantes en la mayoría de los indicadores estructurales para los pares de bases cercanos al metilo del nucleósido modificado (U*).

El descriptor comúnmente denominado Twist se define como el ángulo que es necesario rotar un par de bases sobre el eje de la hélice para que coincida con el siguiente. En general este parámetro presenta oscilaciones tendientes a aumentar el solapamiento entre pares de bases (Bloomfield 1999), siendo los valores altos en una posición son contrarrestados por valores menores en el paso siguiente. El ON modificado con 2'-C-metiluridina (Ume) presenta un desplazamiento de la base respecto al promedio de $-4,87^\circ$ Å. La siguiente base no tiene la libertad estructural para compensar la perturbación causada por una clara distorsión en el apilamiento de las bases.

El siguiente valor afectado es el Shift, o desplazamiento en el eje x. Este está afectado en forma similar tanto en la posición de la modificación como en las posiciones vecinas (n-1, n+1), En ambos casos se observa un desplazamiento de 0,8 Å sobre el eje x entre las bases separadas por el metilo. Este corrimiento reduce las posibles interacciones de stacking pero permite generar el espacio para albergar al metilo.

Otro valor que permite verificar la influencia del metilo interfiriendo en el stacking es el ángulo entre las bases sobre el eje Z denominado Tilt. La presencia del metilo genera una diferencia de $7,5^\circ$.

Por su parte el valor de Roll indica si la apertura de pares de bases sucesivos esta orientada hacia la gruta mayor o la menor de la hélice. En el caso del Ume este parámetro presenta un valor anómalo. Sin embargo, resulta difícil extraer una conclusión debido a la alta distorsión del valor Propeller Twist (ver más adelante).El valor de rise o distancia entre las bases en el eje Z esta modificado en las bases cercanas a la 2'-C-metiluridina , pudiendo apreciarse un claro un aumento en la distancia en los pares de bases.

La perturbación causada por el metilo de la posición 2' sobre las bases puede ser apreciada mejor observando los parámetros que describen pares de bases

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

individuales. Esto se debe a que la presencia del metilo repercute en mayor medida sobre la base de la cadena que contiene la modificación, las bases de la cadena complementaria a la modificada presentan un menor grado de alteración.

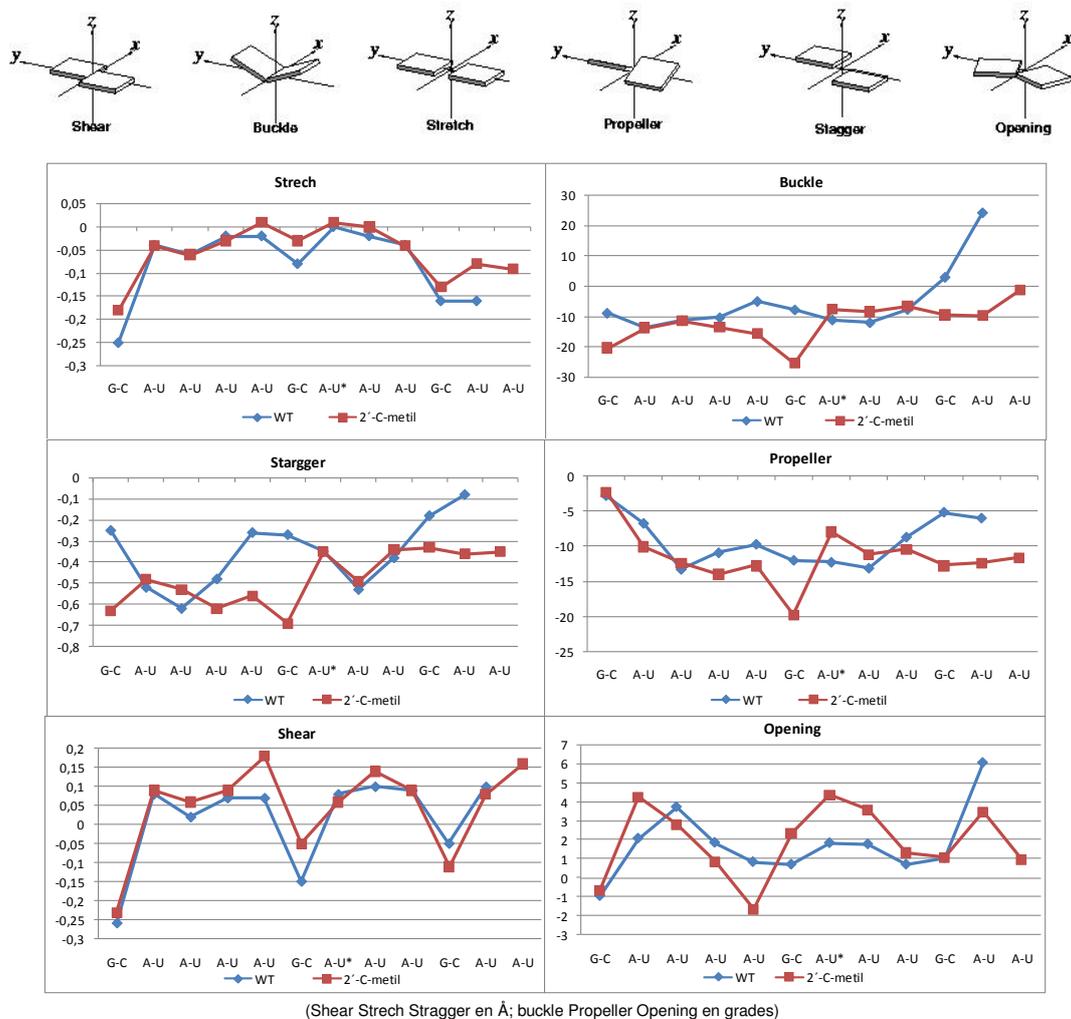


Figura 74 Valores para pares de bases individuales de cada uno de los oligonucleótidos analizados

Los valores de bases individuales permiten identificar con precisión el efecto causado por el metilo. Los parámetros que presentan mayores diferencias con respecto al control son buckle, stragger, propeller y opening (**Figura 74**). Buckle y propeller son las dos componentes mayoritarias del desplazamiento que sufren las bases para acomodar el metilo, dado que el espacio entre las bases o stacking está gobernado por interacciones hidrofóbicas es de esperar que el metilo sea orientado en ese sentido y no hacia el exterior poblado con aguas. El oligonucleótido modificado

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

presenta un alto grado de Buckle en las dos bases hacia el extremo 3' de la modificación, siendo de $17,5^\circ$ para la primera y $10,65^\circ$ para la segunda, esto demuestra que la perturbación afecta en forma direccionada a las bases y que el efecto se propaga a más de un par de bases. Dado que el par de bases afectado en un CG podría esperarse un efecto aún mayor si en su lugar hubiera un par AU que posee menor estabilidad y un puente de hidrógeno menos.

Por su parte, el valor de Propeller está igualmente incrementado. El desplazamiento de una base respecto a la otra evidencia nuevamente el efecto del metilo interponiéndose en el espacio hidrofóbico. La influencia del metilo en la posición de la base vecina también se manifiesta en los valores anómalos del ángulo del enlace glicosídico χ resumidos en la **Figura 75** que justifican los resultados en el parámetro propeller. El gráfico también permite observar que el efecto está direccionado hacia el extremo 3'.

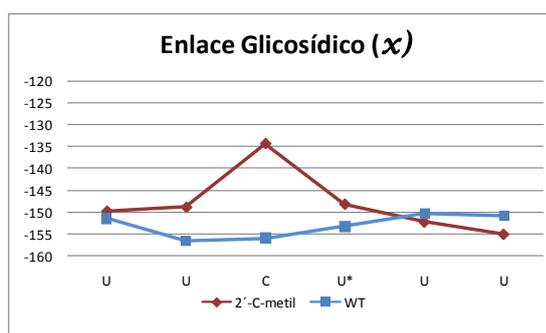


Figura 75 Valores del ángulo de torsión del enlace glicosídico para la cadena correspondiente a la modificación

El valor denominado stragger indica la distancia entre los planos de las bases enfrentadas respecto al eje interno Z. El ON modificado presenta una modificación de aproximadamente $0,6 \text{ \AA}$ con respecto al secuencia natural, se observa nuevamente una propagación de este efecto en las bases más cercanas al extremo 3'.

Los valores de Opening están levemente alterados en la zona cercana a la modificación pero al igual que en los valores de strech no se espera una modificación masiva de estos parámetros como podría encontrarse al sustituir un átomo de la base con un grupo voluminoso.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

6.1.5 -Parámetros Generales de Hélice

De la misma forma que se analizan los pares de bases individualmente y con respecto al par sucesivo, es posible realizar una descripción global de la estructura de la hélice. Para ello es necesario determinar algunos descriptores que están referidos a coordenadas externas a los pares de bases. De esta forma se puede conocer la estructura general, de la misma forma que se podría describir a una escalera por la posición de sus escalones.

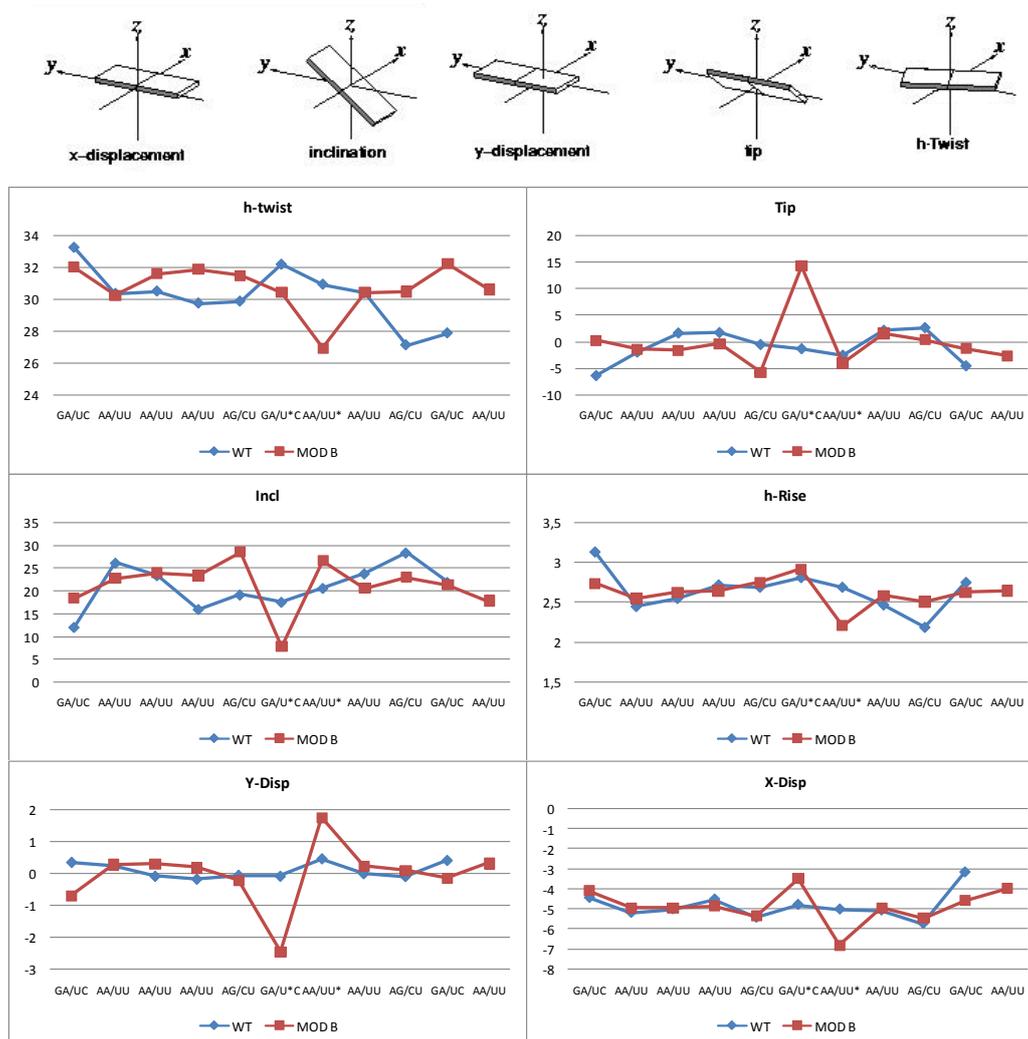


Figura 76 Parámetros generales de la hélice

Los resultados obtenidos para las estructuras promedio de los ON (

Figura 76) permiten apreciar con claridad las desviaciones producidas por la presencia del metilo de la posición 2'. Los valores Tip (inclinación sobre el eje y) , y-

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

disp (desplazamiento en el eje y), x-disp (desplazamiento en el eje X) e incl. (inclinación sobre el eje X) presentan oscilaciones en la zona de la modificación que claramente superan las de la secuencia control. Este efecto es muy importante en las posiciones cercanas a la modificación, las restantes poseen valores muy cercanos a la molécula control, manteniendo la característica principal de la cadena tipo A-ARN. Estos datos concuerdan con los obtenidos experimentalmente mediante Dicroísmo Circular.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

6.1.6 Hidratación

Existen numerosas razones para estudiar las interacciones de los ácidos nucleicos con el agua ya que existe una relación muy estrecha entre el grado de hidratación y su estructura. La modificación de la estructura del ADN a distintos valores de humedad es un claro ejemplo, éste adopta la forma B cuando la humedad relativa es mayor al 85%, por debajo de este valor y hasta un 75% de humedad su forma es A, y si la humedad es aún menor es posible encontrar una estructura desordenada. Existen estudios de espectroscopia infrarroja IR y cristalografía de rayos X en los cuales se identificaron redes de hidratación que resultan fundamentales para mantener la estructura de las hélices. (Water and Biological Macromolecules 1993).

La capacidad de formar puentes Hidrógeno del agua con los grupos dadores y aceptores de protones de los ácidos nucleicos conlleva a la formación de una red transitoria e imperfecta de moléculas de agua. La formación o disrupción de la misma produce un descenso o aumento de la entropía respectivamente. La introducción de grupos hidrofóbicos en un sistema acuoso produce la formación de clusters de agua con un ΔS negativo. De hecho el carácter hidrofóbico de las bases de los ácidos nucleicos son la causa de su baja solubilidad y la tendencia a asociarse por medio del stacking.

Para cuantificar el efecto de la presencia del metilo sobre el grado de hidratación se estudió el patrón de hidratación de los átomos cercanos al metilo, en particular los átomos capaces de formar puente hidrógeno de las bases, la posición 2' de la modificación y el oxígeno 4' de la posición vecina. El análisis fue realizado siguiendo una metodología utilizada para caracterizar las propiedades de solvatación de dominios de proteínas (Di Lella S. 2007). El método consiste en estudiar la función de distribución radial $g(r)$ de las aguas alrededor de un átomo, esto se realiza contabilizando la cantidad de moléculas de agua en un rango diferencial (dr) de alrededor de 1 Å alrededor de la distancia r de un átomo. La información obtenida fue normalizada considerando el volumen accesible para las moléculas de agua alrededor de cada átomo.. Los ángulos Θ y φ fueron definidos de la siguiente forma: Θ es el ángulo formado por el átomo de Oxígeno de las aguas, el átomo aceptor/donor del ácido nucleico y un tercer átomo de referencia. Por su parte el ángulo φ esta definido por el átomo de Oxígeno de las aguas, el átomo donador/aceptor y dos átomos de referencia unidos entre sí, uno del los cuales está unido al donador/aceptor . El volumen accesible fue calculado a partir de las distribuciones de los ángulos translacional $g(\Theta)$

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

y diedro $g(\varphi)$ que se encuentran esquematizados en la Figura 77. Estas distribuciones fueron encontradas contando la cantidad de moléculas de agua en un diferencial ($d\Theta$) alrededor de un ángulo φ y $d\varphi$ alrededor de un ángulo Θ . Para ambas funciones angulares sólo fueron tenidas en cuenta las aguas correspondientes a la primera esfera de solvatación (determina a partir del g_r

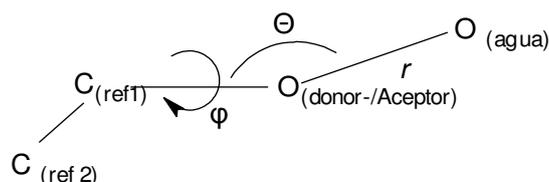


Figura 77 Definición de los ángulos Θ , φ y distancia r

De los valores de $g(\Theta)$ y $g(\varphi)$ obtenidos para cada molécula de agua se realizaron gráficos de dispersión bidimensionales. Estos permiten describir la distribución espacial de las moléculas de agua a lo largo de toda la dinámica determinando los lugares con máxima probabilidad de encontrarlas. De esta manera es posible cuantificar el efecto del metilo en cuanto a cantidad de aguas cercanas a cada átomo y a su distribución espacial.

El primer grupo analizado es el oxhidrilo de la posición 2' del nucleósido modificado ya que es la característica distintiva de esta modificación. A continuación se detallan los resultados obtenidos para el oxhidrilo de la posición 2' en el ON con uridina natural y con 2'-C-metiluridina (Figura 78).. En el gráfico de $g(r)$ vs r se puede observar la presencia de un pico correspondiente al agua unida al oxhidrilo a unos 3 Å del núcleo del oxígeno, luego se ve un descenso típico y a $r \infty$ es esperable encontrar agua con densidad 1. El pico de hidratación encontrado es menor en el Ume que en el wt (ver Figura 78). Esta disminución era esperable dado el mayor volumen del metilo respecto al H2'. Los valores numéricos se encuentran resumidos en el gráfico de barras de la

Figura 79, los datos fueron normalizados por lo que muestra el valor máximo del pico respecto del valor del agua libre. El gráfico de distribución muestra una ligera concentración de la zona accesible al agua que coincide con lo esperado ya que el volumen del metilo reduce la superficie accesible para el agua.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

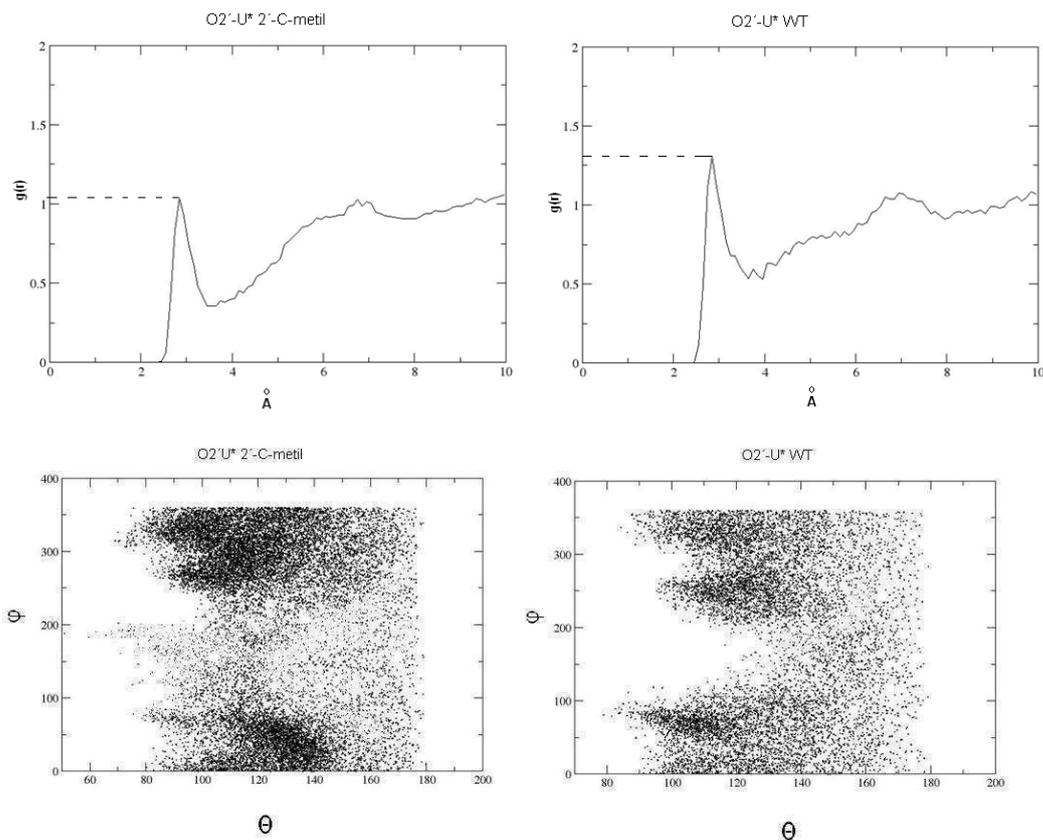


Figura 78 a) Función de Distribución radial del OH 2' para el nucleótido Ume y WT, b) diagrama (histograma) de la distribución de las aguas en función de los ángulos ϕ y θ

De la Figura 79 puede concluirse que si bien hay una reducción de la cantidad de agua en la zona cercana al oxhidrilo 2' para la secuencia modificada, el metilo no produce la pérdida del pico de hidratación y la distribución del agua no se ve muy alterada. Esto puede ser explicado observando las estructuras superpuestas y la zona de accesibilidad de solvente la Ume y el WT (Figura 80 a, b y c), el metilo y el hidrógeno del nucleósido se encuentran en el mismo plano. El oxhidrilo se posiciona hacia fuera de la hélice, de manera que ambas superficies accesibles son similares (ver Figura 80). La imagen también permite ubicar el área de hidratación en un contexto más general.

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

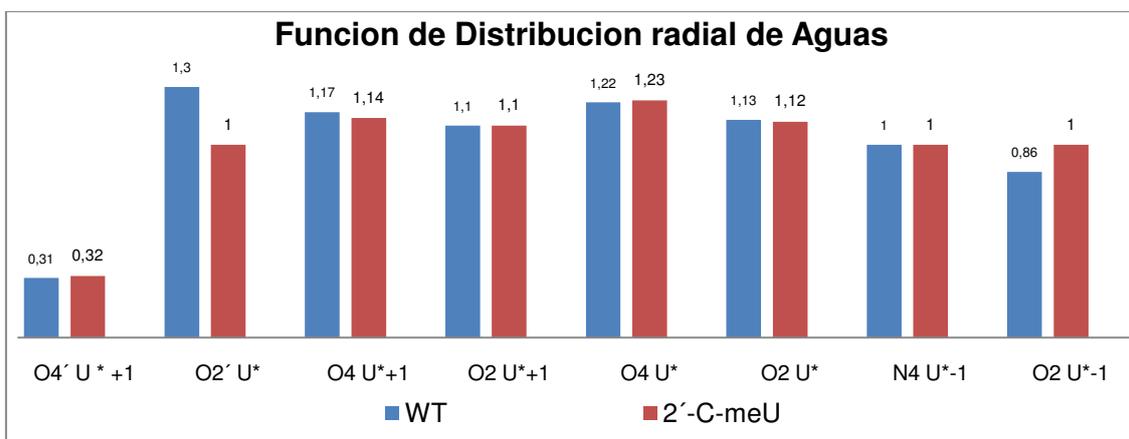


Figura 79 Valores comparativos de los picos de hidratación encontrados en los gder relativizados al agua libre

Los resultados obtenidos en las dinámicas sumados al hecho de que el dúplex modificado con 2'-C-metildesoxiuridina (dUme) posee una temperatura de fusión mayor que el modificado con el Ume demuestra que en este caso la alteración del patrón de hidratación no es la principal causa de la inestabilidad. Es posible que la presencia del oxhidrilo interaccionando con la red de agua fuerce al azúcar a modificar su conformación, llevando el metilo aún más cerca de la cavidad hidrofóbica entre las bases que en el caso del dUme.

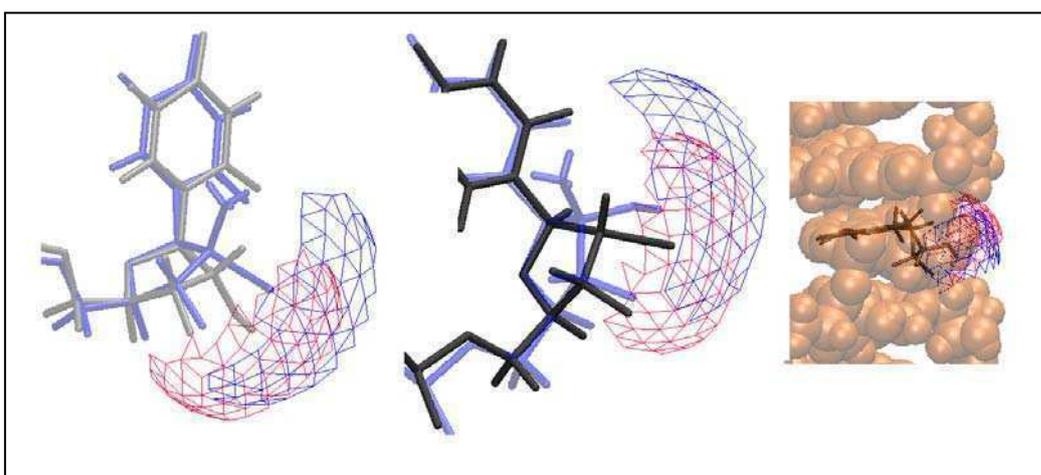


Figura 80 Superficies accesibles para el agua en el ON Ume (azul) y el WT (roja), la tercera figura permite ubicar las zonas accesibles en el contexto general de la molécula.

Por otra parte los grupos donores/aceptores de puente hidrógeno de las bases cercanas ala modificación (n-1, n, n+1) muestran algunas diferencias en los picos de hidratación respecto al agua libre, estas variaciones no son masivas pero van de la

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

mano de los efectos ya mencionados para el stacking y los puentes de hidrógeno. Para comprender la razón por la que la distribución de las aguas no está tan afectada es necesario mencionar algunos aspectos sobre la red formada por las aguas en el ARN. Según datos obtenidos en experimentos de rayos X existen dos redes formadas entre las aguas y átomos del ARN, la primera es horizontal e involucra átomos de la gruta menor y los oxígenos 2'. Esta red cubre el espacio de separación de los O2' de nucleótidos enfrentados utilizando los nitrógenos y oxígenos de las bases como sitios de anclaje. En la Figura 81 pueden observarse diagramas de estas redes (P. M. Egli M. 1996).

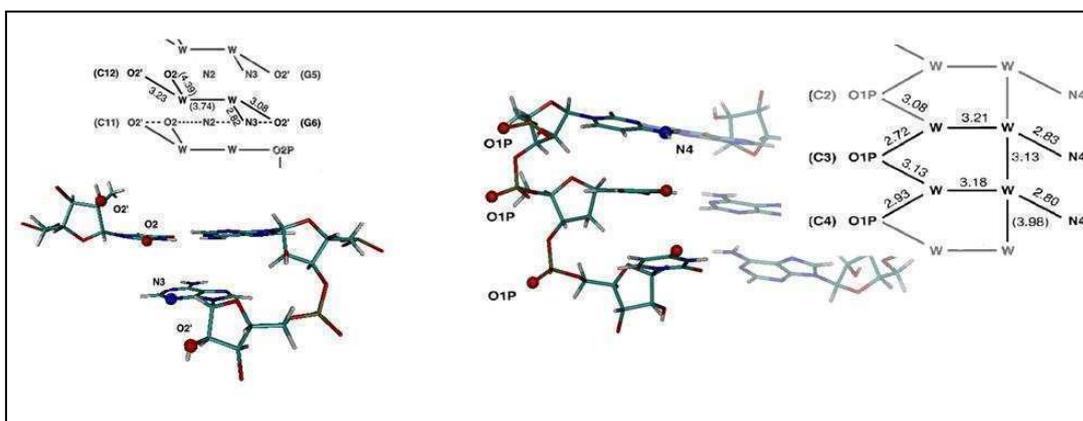


Figura 81 Redes de hidratación horizontal de la gruta menor y vertical de la gruta mayor

La gruta mayor también se encuentra estabilizada por redes de hidratación ordenadas. Esta red vertical une a los Oxígenos de los grupos fosfatos entre sí, con posiciones de la base orientadas hacia la gruta mayor. Estos puntos conforman “celdas unitarias” con geometría pentagonal, siguiendo suavemente la curvatura de la hélice.

Las diferencias en las distancias entre los átomos que forman parte de la red de aguas entre las bases (red horizontal), causadas por la presencia del metilo es cercana a 1 Å en los únicos casos que presentaron variaciones respecto al WT. Figura 82. Podría concluirse que no hay diferencias que permitan adjudicar a la hidratación la baja afinidad encontrada en los experimentos de estabilidad térmica.

Por su parte, las distancias de los átomos involucrados en la red de hidratación vertical (oxígenos de los fosfatos) se encuentran un poco más alejados en la estructura modificada que en la natural. El ligero aumento de la distancia entre el O1P

Resultados y Discusión// Estudio computacional de 2CMNs en dúplex ARN-ARN

del nucleósido modificado con el O4 de la base y de éste con el siguiente fosfato podría tener un pequeño efecto distorsivo, levemente mas marcado que en el caso de la red horizontal.

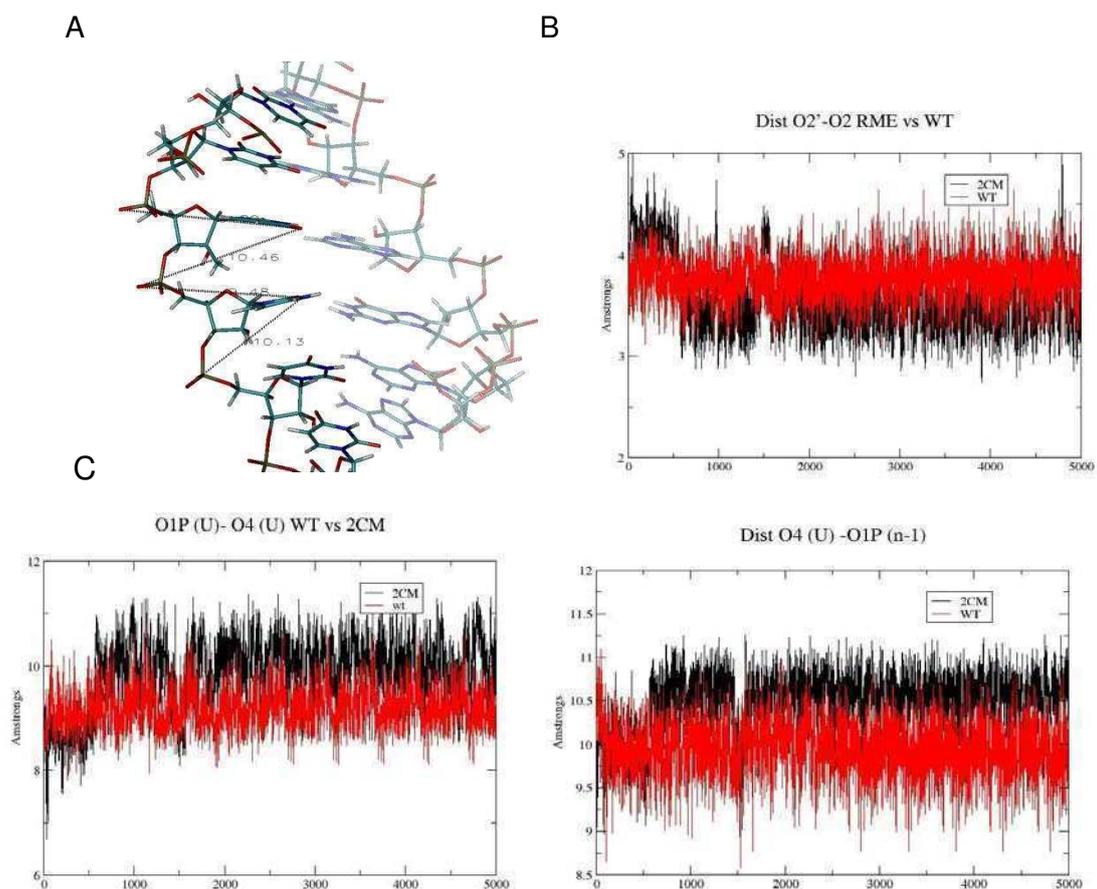


Figura 82 Distancias entre átomos de las redes de agua WT (rojo) Ume (negro) a- Distancias utilizadas para el análisis de la red vertical de aguas, b- Distancia O2' -O2 en el sitio de modificación c y d- distancias alteradas en la red vertical de aguas

6.2 Conclusiones

Los datos aquí presentados muestran claramente que la baja estabilidad térmica de los dúplex formados por oligonuclótidos modificados con 2'-C-metilnucleósidos no se debe a un único factor sino que es el resultado de una sumatoria de alteraciones estructurales. La introducción del metilo en la posición 2' afecta principalmente a las bases y consecuentemente al apilamiento o "stacking".

El segundo factor de estabilización que se ve afectado, en menor medida, es el patrón de puentes hidrógeno. Estos parecen reflejar una mayor movilidad de las bases que en el dúplex natural, que modifica tanto la distancia como el ángulo de los donores y aceptores de puente hidrógeno.

Por su parte, el estudio preliminar del patrón de hidratación de distintos átomos cercanos a la perturbación permite concluir que ésta no se ve mayormente afectada. La distancia entre estos átomos permitiría mantener las redes de hidratación sin alteraciones masivas.

Otro parámetro estructural de interés que fue estudiado es la conformación del azúcar modificado. Dado que la conformación de los 2CMN formaba parte de la hipótesis de este trabajo, se determinó el valor del ángulo pseudorrotacional para la 2'-C-metiluridina en un entorno doble cadena ARN. El mismo se encuentra en valores cercanos al 4'-exo en lugar de 3'-endo presente en los demás nucleósidos, demostrando que la conformación de los 2CMNs en un entorno doble cadena puede diferir del nucleósido en solución. Una posible explicación es que la modificación del valor del ángulo pseudorrotacional permitiría a la molécula acercar el metilo al interior hidrofóbico y minimizar la repulsión con las aguas circundantes. El estudio posicional de los átomos del metilo demostró que éste se intercala entre las bases produciendo un desplazamiento de las mismas. Otra característica observada durante los experimentos es que la distorsión en la geometría de las bases se propaga a lo largo de la cadena en forma unidireccional, en sentido del extremo 3'. Este efecto apreciable únicamente en la cadena que la contiene, siendo muy poco perceptible en la complementaria. Debido a sus características asimétricas ésta modificación podría ser utilizada en alguna aplicación que requiera la desestabilización selectiva de una doble hélice.

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

7- Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas

7.1 Objetivo

El presente capítulo describe los ensayos realizados para estudiar la aplicación de ribozimas modificadas con 2'-C-metilnucleósidos en la reducción de la expresión de genes en células. Los experimentos realizados intentan determinar el impacto de la incorporación del metilo en la actividad de la ribozima, en particular en la relación actividad/resistencia en un sistema celular con relevancia clínica.

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

La utilización de ribozimas como agentes de silenciamiento génico con 2'-C-metilnucleósidos en posiciones lábiles del núcleo catalítico fue estudiada por primera vez por nuestro grupo (Gallo M 2005). En ese trabajo se ensayaron distintas ribozimas para verificar su actividad *in vitro* y su resistencia ante nucleasas en distintos medios. Los resultados demostraron que la introducción de 2'-C-metiluridina en el core catalítico de la ribozima cabeza de martillo produce un descenso en la cinética de hidrólisis del sustrato similar en magnitud al aumento de la resistencia ante nucleasas. Este antecedente fue una primera aproximación en la determinación del potencial de estos análogos de nucleósidos en el campo de las ribozimas. El paso lógico entonces consiste en determinar la influencia de esta modificación en un entorno celular. Este contexto presenta una alta complejidad que no puede ser reproducida en experimentos más simples. Antes de realizar una discusión sobre los resultados obtenidos es importante comprender que los resultados de actividad presentados en el trabajo de la Dra. Gallo fueron realizados midiendo una de las constantes cinéticas involucradas en el proceso completo, la k_2 o cinética de la reacción de hidrólisis. En este trabajo se diseñaron y sintetizaron ribozimas para llevar adelante estudios de actividad en células que permiten cuantificar la relación actividad/estabilidad incluyendo todas las variables presentes en un sistema celular.

7.2 Diseño de la Ribozima

El proceso completo para un ciclo de hidrólisis de una molécula de ARNm consiste en los siguientes pasos: 1- Asociación de la Ribozima con el ARNm, 2- Reacción de hidrólisis, 3- Disociación de la ribozima del extremo 3' del producto y del extremo 5'. Cada uno de estos procesos posee una cinética particular regida por diversos factores que pueden provocar que el paso lento se modifique de acuerdo al caso. Los múltiples factores que pueden afectar estas constantes en un entorno celular incluyen:

1- La accesibilidad de la Ribozima a la secuencia blanco de ARNm que depende de la estructura secundaria y terciaria del mensajero. También es determinante la presencia de proteínas de unión a ARN que pueden competir por el sitio de unión. Otro factor de importancia es la baja concentración de Mg^{++} intracelular en comparación a la utilizada en los experimentos *in vitro* y la presencia de policaciones. (Birikh K. 1997)

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

Como fue mencionado con anterioridad los cationes juegan un rol fundamental en la formación de estructuras doble cadena.

2- La unión entre los brazos de reconocimiento y las secuencias complementarias del sustrato es un punto a tener en cuenta ya que juega un rol de gran importancia. El ΔG de formación del dúplex debe ser menor que el de otras posibles interacciones intramoleculares tanto en la Ribozima como en el ARNm.

3-Una vez que la Ribozima hibridiza sus brazos de reconocimiento con el sustrato, debe ser capaz de adoptar la conformación activa, en este punto la flexibilidad del sitio catalítico resulta fundamental para llegar al estado de transición. Una vez hidrolizado el sustrato es necesario que los fragmentos liberen a los brazos de reconocimiento. Por ello la afinidad de los productos hidrolizados por lo brazos de reconocimiento de la ribozima compromete la actividad catalítica.

Además de estos factores propios de la ribozima y su blanco existen otros condicionantes que pueden resultar determinantes, uno de ellos es la compartimentalización de las ribozimas dentro de la célula y la estabilidad de las mismas (Birikh K. 1997) frente a las nucleasas.

Dada la gran cantidad de variables resulta difícil poder prever la actividad de una Ribozima mediante análisis *in vitro*. Por esta razón se diseñó una Ribozima dirigida contra el ARNm del Recetor de estrógenos α (RE) para intentar reducir su expresión en células de cáncer de mama humano (MCF-7). La elección de este sistema de estudio se basó en la relevancia clínica del mismo ya que es blanco de la drogas como el Tamoxifeno utilizadas para el tratamiento de pacientes con esta dolencia (ER +); tanto en estado temprano como avanzado y como método preventivo en mujeres con alta probabilidad de contraerla. La reducción de los niveles de expresión de este receptor por debajo de un valor crítico podrían prevenir la activación de las vías de transcripción del ER- α y además promover la apoptosis (Hai-Jing Fu. 2006). Resulta de especial interés en casos en los que se genera resistencia al tamoxifeno.

Otra razón que llevó a la elección de esta proteína como blanco es que se conocían los sitios accesibles del ARNm por trabajos anteriores con oligonucleótidos antisentido (Taylor A. 2001) y ribozimas generadas a partir de un vector de ADN (Lavrosky Y. 1999). Esto permitió diseñar una ribozima sin tener que determinar las zonas donde la estructura secundaria del mensajero permite su acceso. Generalmente

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

estas zonas son buscadas mediante el uso de bibliotecas combinatorias que por el gran número de secuencias presentes pueden reconocer cada uno de los sitios de hidrólisis expuestos (Birikh K. 1997). Dado que el objetivo central del trabajo es comparar la actividad de la Ribozima modificada con 2'-C-metilnucleótidos se utilizó un sistema parcialmente caracterizado para evitar los pasos para diseñar una ribozima completamente nueva.

Una vez elegidas las zonas blanco fue necesario verificar la accesibilidad de la secuencia blanco y poner a punto las condiciones de transfección de la células para asegurar un resultado positivo con el cual comparar la actividad de las ribozimas. En este punto se utilizaron secuencias de ADN con actividad RNAasa (conocidas como DNAzimas o enzimas de ADN). Estas moléculas poseen, al igual que las ribozimas, dos sitios de unión a ARN o brazos de reconocimiento y un core catalítico que permite hidrolizar el ARNm en forma específica sobre el fosfato internucleotídico de un par purina-pirimidina (Tong-Hong W. 2008). La principal ventaja del uso de DNAzimas para la puesta a punto es que son más resistentes a nucleasas que las ribozimas de ARN natural y mucho más económicas que las ribozimas con nucleótidos modificados. Esto permitió realizar múltiples experimentos para arribar a las condiciones adecuadas de transfección y cuantificación de los niveles de expresión.

Utilizando tres secuencias descritas en los trabajos citados anteriormente como "molde" se sintetizaron tres DNAzimas de ADN natural. Las zonas blanco del ARNm se detallan en la Figura 83. Dos corresponden a la zona de N-terminal (DNAzimas 2 y 3) que se encuentran indicadas en la figura 83, la restante corresponde a la zona cercana al codón de inicio.

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

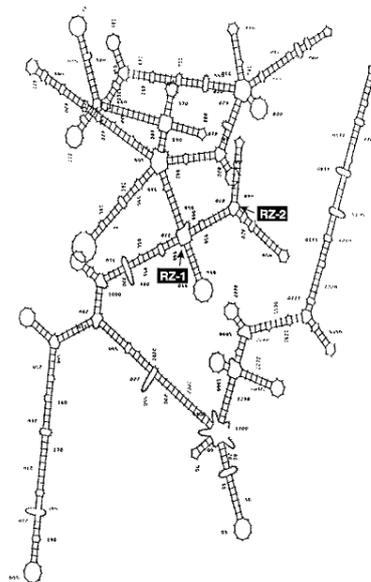


Figura 83 Probable Estructura secundaria más estable para la zona del ARNm codificando el dominio N-terminal, el dominio de unión a ADN, y parte del sitio de unión de esteroides. Los sitios de corte de cada una de las DNAzimas se indican en negro-la ribozima 3 se encuentra en una zona cuya estructura secundaria no fue calculada.

Las transfecciones de las DNAzimas fueron realizadas utilizando un sistema de lípidos o liposomas (DOTAP y Oligofectamina, Invitrogen) (Weisman S. 2004), (Machida K 2006). Luego de realizar ensayos de microscopía confocal en los que no se detectó actividad con preparaciones con DOTAP-nucleósidos se decidió utilizar Oligofectamina.

Para poder cuantificar la actividad de las ribozimas modificadas fue necesario desarrollar un protocolo de transfección que no introdujera efectos inespecíficos y asegurara la viabilidad de las células hasta el momento de determinar los niveles de expresión del receptor. El primer paso entonces fue establecer el límite de toxicidad de la mezcla DNAzima-Oligofectamina para las células MCF-7. Para reproducir el efecto causado por la incorporación de nucleótidos superiores a los niveles fisiológicos se diseñó un oligonucleótido de la misma longitud y composición nucleotídica que una de las DNAzimas. Esta secuencia fue diseñada para que no fuera complementaria a ningún mensajero del genoma humano, lo cual fue verificado utilizando las base de datos nucleotide BLAST (NCBI s.f.). La proporción de oligonucleótido y oligofectamina fue establecida en el límite superior declarado por el fabricante. La toxicidad se determinó mediante el recuento de células teñidas con yoduro de propidio sobre el total

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

de núcleos teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), esta técnica permite cuantificar la cantidad de células en fase de muerte. La concentración máxima de oligofectamina-oligonucleótido que presentó la misma cantidad de células muertas que el control fue determinado como límite máximo. Adicionalmente se realizó un experimento con un oligonucleótido unido a un fluoróforo (fluoresceína) para verificar a través de microscopía confocal que el oligonucleótido estuviera ingresando a las células (Figura 84). Los resultados obtenidos en ambos experimentos demostraron que concentraciones por encima de 100 nM de oligonucleótido produce muerte en las células por efectos inespecíficos por lo que se utilizó una concentración de 66,6 nM para garantizar el rango seguro de uso y el ingreso de las DNAzimas a las células.

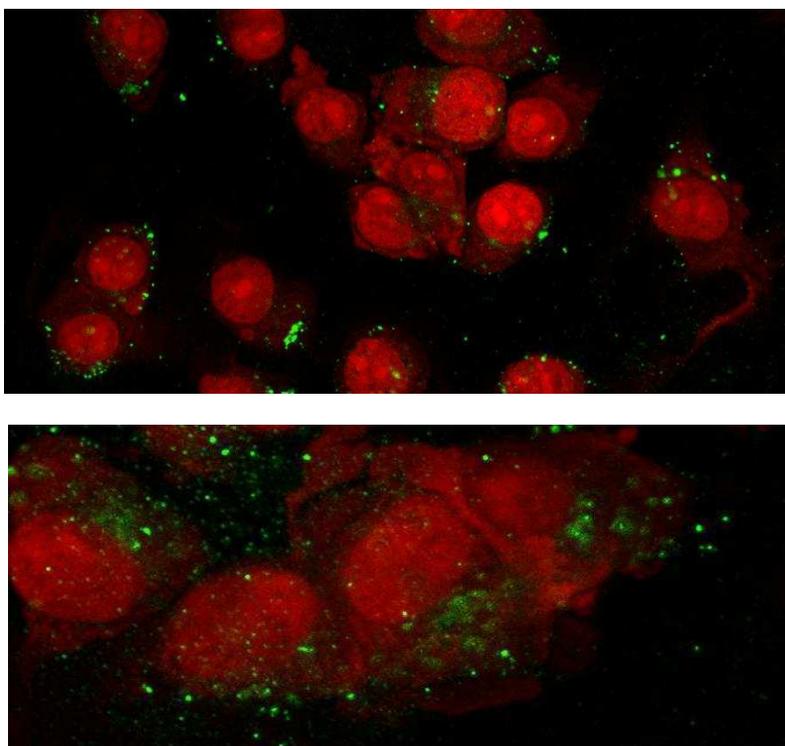


Figura 84 Microscopia Confocal de la Células MCF-7 transfectadas con Oligonucleótidos marcado con fluoresceína

Una vez establecido el protocolo de transfección se llevó a cabo el estudio de actividad de las DNAzimas midiendo la reducción en los niveles de expresión del receptor de estrógeno mediante western Blot. Se utilizó una versión mutada en una posición fundamental para la actividad de la DNAzima 2 con el fin de descontar el efecto “antisentido” o inhibición no producida por la actividad catalítica de la misma. Los resultados de la Figura 85 muestran el mayor poder inhibitorio de la DNAzima 2 luego de 13 horas de transfectadas las células.

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

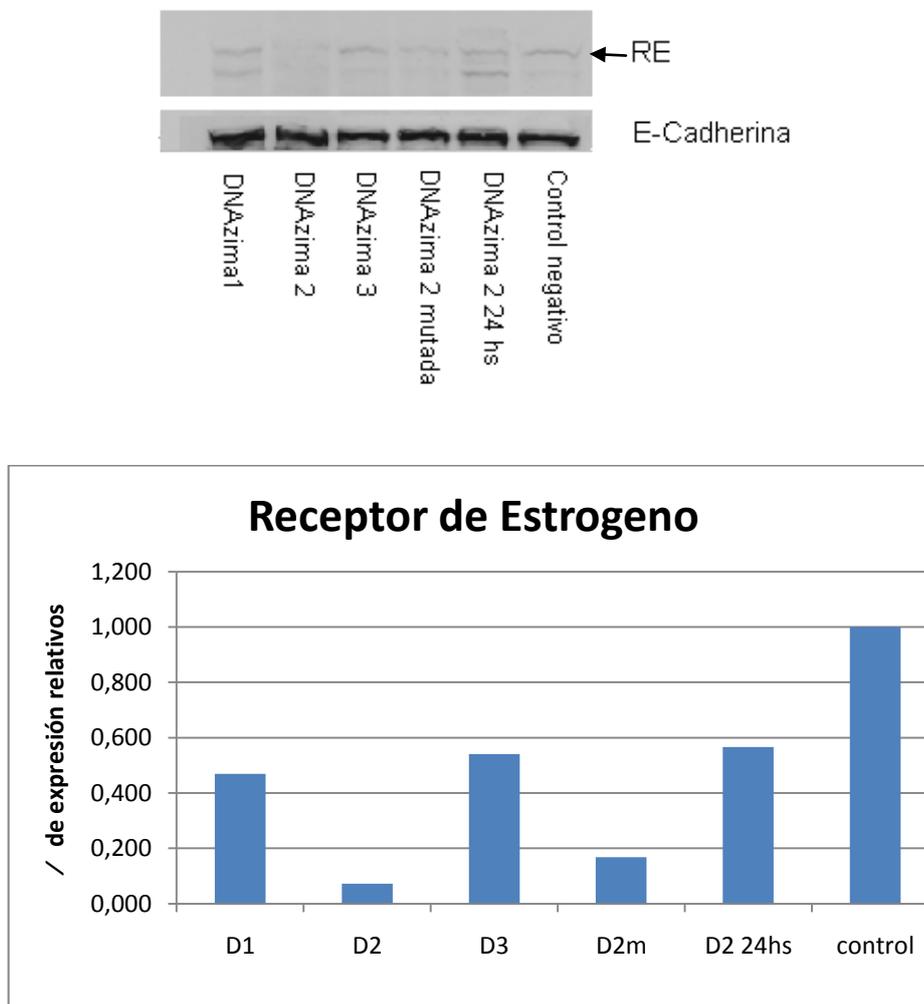


Figura 85 Western Bolt y valores cuantificados de RE normalizados con E-Cadherina como control de carga , los valores son representativos de tres experimentos independientes.

Utilizando estos resultados se diseñó una Ribozima cabeza de Martillo dirigida contra la misma secuencia que del ARNm que la DNAzima 2, esta secuencia se corresponde con la Ribozima 2 reportada en el trabajo de (Lavrosky Y. 1999), indicada en la **Figura 83**. A diferencia del trabajo realizado por estos autores las Ribozimas utilizadas en este trabajo fueron administradas exógenamente y no generadas a partir de un plásmido.

Otra importante diferencia con el trabajo de Lavrosky es que la actividad de las ribozimas fue determinada indirectamente, utilizando como señal el descenso de la señal de luciferasa reportera en la construcción del plásmido mientras que en este caso se cuantificaron directamente los niveles de receptor en células.

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

Uno de los parámetros más importantes en el diseño de una ribozima es el largo de sus brazos de reconocimiento. Estas secuencias complementarias al ARNm pueden tener entre 6 y 20 nucleótidos de longitud y pueden ser simétricas o poseer distinta cantidad de nucleótidos. La elección del largo de los brazos es un compromiso entre la estabilidad con la secuencia blanco, la capacidad de regeneración de la Ribozima y aspectos relacionados con la biodistribución de las estructuras. Generalmente el largo utilizado es de alrededor de 10 nucleótidos. En este caso se utilizaron secuencias de 9 nucleótidos debido al incremento en la estabilidad térmica causado por los 2'-O-metilnucleósidos utilizados en los extremos para evitar la degradación por parte de las nucleasas. Uno de los requerimientos más importantes es la verificación de la ausencia de interacciones intramoleculares en la ribozima que podrían conducir a estructuras secundarias que impedirían la formación de los dúplex con el ARNm. Esta verificación fue realizada utilizando el programa ARN structure que utiliza el algoritmo mfold (M. 2000). En el caso de las ribozimas utilizadas en estos experimentos, el ΔG de las posibles estructuras de la ribozima resultaron mayores a las correspondientes al dúplex con el ARNm del receptor de estrógeno.

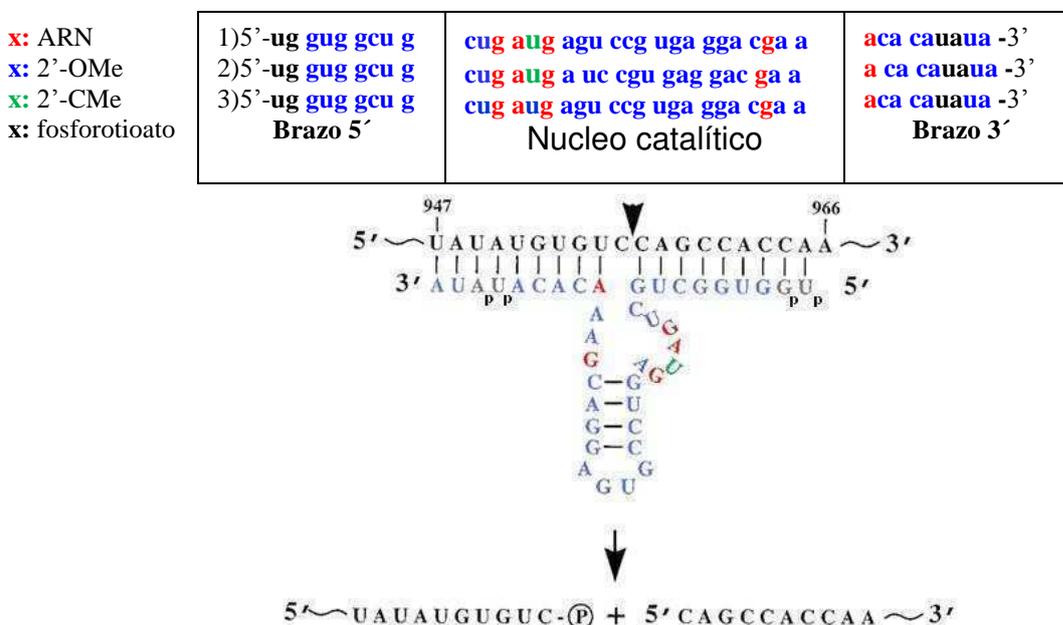


Figura 86 Secuencia de la ribozima cabeza de martillo sintetizadas para los estudios en células MCF7 y la secuencia blanco del ARNm del Receptor de estrógeno α . Azul: 2'-O-metilnucleótido, Gris: 2'-O-metilnucleosido con enlace fosforotioato, Rojo: ARN natural Verde: 2'-C-metilnucleósido. Sec 1) modificada activa 2) modificada inactiva 3) control no modificada

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

Para poder cuantificar el efecto de la incorporación de la 2'-C-metiluridina en la actividad fue necesario proteger el resto de la molécula contra las endonucleasas por medio de la sustitución del ARN natural con 2'-O-metilnucleósidos y de las exonucleasas con fosforotioatos en los extremos 3' y 5' obteniéndose una construcción resistente, donde la variación de la actividad puede ser atribuida a la modificación estudiada. La figura 86 muestra las secuencias de la ribozima cabeza de martillo sintetizada y el fragmento del ARNm blanco. Los extremos protegidos con nucleótidos fosforotioatos evitaron la degradación de las estructuras por parte de las exo nucleasas.

7.3- Actividad de la ribozimas en células

Los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición de la expresión de RE α con las ribozimas modificadas con 2'-C-metiluridina son detallados en la Figura 87. Se transfectaron las células y se cuantificaron los niveles de expresión de RE α a las 10hs. Se utilizaron tres ribozimas, una modificada con 2'-C-metiluridina y el núcleo catalítico completo (Secuencia 1 figura 86). Una secuencia inactiva, carente de una G esencial para la actividad (Secuencia 2 figura 86), ésta es utilizada para descontar el efecto antisentido causado por la unión de los brazos de reconocimiento al ARNm. Esta secuencia posee la 2'-C-metiluridina para asegurar una vida media similar a la ribozima activa. La tercera ribozima fue utilizada como control y posee uridina natural en la posición 7 (no modificada, Secuencia 3 figura 86), todas las ribozimas fueron convenientemente sintetizadas con 2'-O-metilnucleósidos y fosforotioatos en los extremos. Las condiciones de los experimentos fueron las mismas que la de las llevadas a cabo anteriormente para homologar las secuencias blanco de ARNm, además se utilizó la DNAzima 2 como control positivo.

Uno de los aspectos más importantes es el tiempo transcurrido entre la transfección y la medición de la expresión del RE α . La reducción en los niveles de expresión del receptor depende del tiempo requerido para que la ribozima ingrese a las células, en la cinética de la reacción. La ventana de actividad esta comprendida por el final del estímulo (dependiente de la actividad de la ribozima) y el tiempo necesario para restablecer los niveles de proteína (turn over). Esta relación produce una ventana en la cual es preciso detener el experimento para poder cuantificar la actividad. Dado

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

que el sistema fue inicialmente puesto a punto utilizando DNAsimas compuestas de ADN natural, el balance entre actividad y vida media de las estructuras podría diferir del de las ribozimas. Por esta razón se realizó un primer ensayo para cuantificar el efecto a las 10 horas de la transfección, utilizando la DNAsima homóloga de las ribozimas como control. En este experimento además se incluyeron puntos adicionales para verificar la existencia de diferencias a las 24 hs (ribozima 1 vs ribozima 3).

Los resultados de los ensayos de actividad a las 10 horas muestran que si bien hay un descenso en los niveles de expresión del RE α , no hay una reducción de la que pudiera ser atribuida al efecto catalítico de la ribozima. Esta conclusión se desprende del hecho de que no hay una diferencia importante en los tratamientos con la ribozima 2 (sin actividad catalítica) y la ribozima 1. Llama la atención el aumento de los niveles de receptor de estrógeno causados por la ribozimas 3. Más allá de este fenómeno (que es discutido más adelante) este primer resultado resulta de gran relevancia ya que demuestra la existencia de una diferencia entre la ribozima con uridina natural y la modificada con 2CMN. Las células que fueron incubadas 24 hs presentaron un perfil similar al observado a las 10 hs, siendo marcada la diferencia entre las células tratadas con las ribozimas con y sin 2'-C-metiluridina. Dado que el objetivo de estaba centrado en estudiar el efecto a las 10 horas los controles utilizados en este caso no permiten extraer conclusiones de los efectos observados a las 24 horas. Por esta razón se realizaron ensayos en los cuales se incluyeron los controles correspondientes a las 24 hs (Figura 88).

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

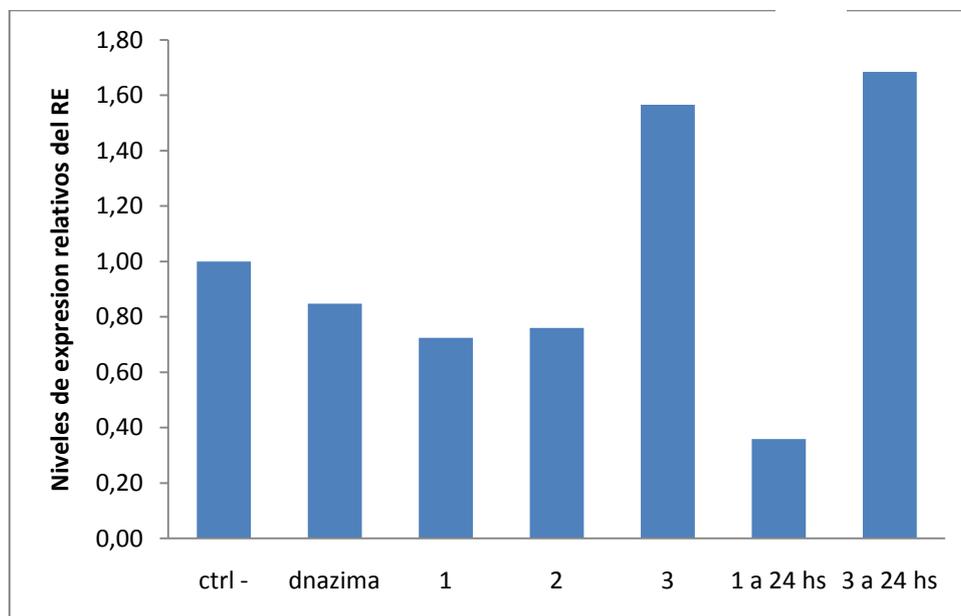


Figura 87 - Cuantificación de los niveles de expresión de RE α relativizadas al control de carga E-Cadherina a las 10 horas para Control negativo DNazima, ribozimas 1, 2 y 3 (10 horas) y a ribozima 1 y 3 a las 24 hs, los valores son representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para cuantificar la actividad de cada ribozima a las 24 hs (figura 87) permiten apreciar una diferencia entre la ribozima 1 y la 2 (inactiva o control antisentido). Esto demuestra que la ribozima presenta un efecto catalítico sostenido tras 24 hs de transfección. El tratamiento con la ribozima no modificada por su parte, provocó el aumento de los niveles de RE repitiendo el perfil de los experimentos anteriores. Este efecto no esperado podría llegar a atribuirse a un mecanismo adaptativo de las células causado por la actividad de esta ribozima, la ribozima sin la modificación podría producir una inhibición “aguda” de la expresión del receptor durante un periodo corto de tiempo. Debido a que las únicas diferencias entre ambas ribozimas son su estabilidad y su constante cinética, el efecto paradójico u “hormesis” (Calabrese E. 2001) podría justificar lo observado si hubiera existido una disminución en los niveles de receptor anteriores a las 10 horas, esto debería ser confirmado en futuros experimentos.

Al igual que en los primeros ensayos, en el estudio de actividad a las 24 horas se incluyeron determinaciones o puntos a tiempos más largos. Dado que el aumento en la expresión del RE α causado por la ribozima 3 se presenta como un efecto anómalo, se

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

llevaron a cabo experimentos comparando la ribozima 1 con la 2 (activa e inactiva) para determinar si a las 36 horas (figura 88) es posible apreciar diferencias que denoten actividad catalítica. Los resultados obtenidos demostraron que aún después de 36 hs de tratamiento existen diferencias a favor de la estructura catalítica, esto permitiría afirmar que ribozima presenta niveles detectables de actividad entre las 10 y 36 hs posteriores a la transfección.

Queda entonces demostrado que la disminución en los niveles de receptor, que reflejan la actividad de la ribozima modificada pueden ser apreciados luego de 10 hs de concluída la transfección. Después de 36 horas es posible apreciar diferencias en los niveles de receptor de estrógeno en la células tratadas con las ribozima activa y la inactiva (o control antisentido), esto evidencia el efecto catalítico de la ribozima a tiempos prolongados. Si bien no es posible hablar de cinética ni de estabilidad en términos estrictos es posible concluir que el aporte en la estabilidad causada por la modificación con 2'-C-metiluridina permite obtener estructuras activas. De no existir la protección a nucleasas causada por esta modificación no podrían verse diferencias entre la ribozimas 1 y 2 a tiempos largos (36 hs) ya que los sitios más lábiles de la ribozimas se encuentran en el núcleo catalítico y su hidrólisis produciría secuencias sin actividad catalítica.

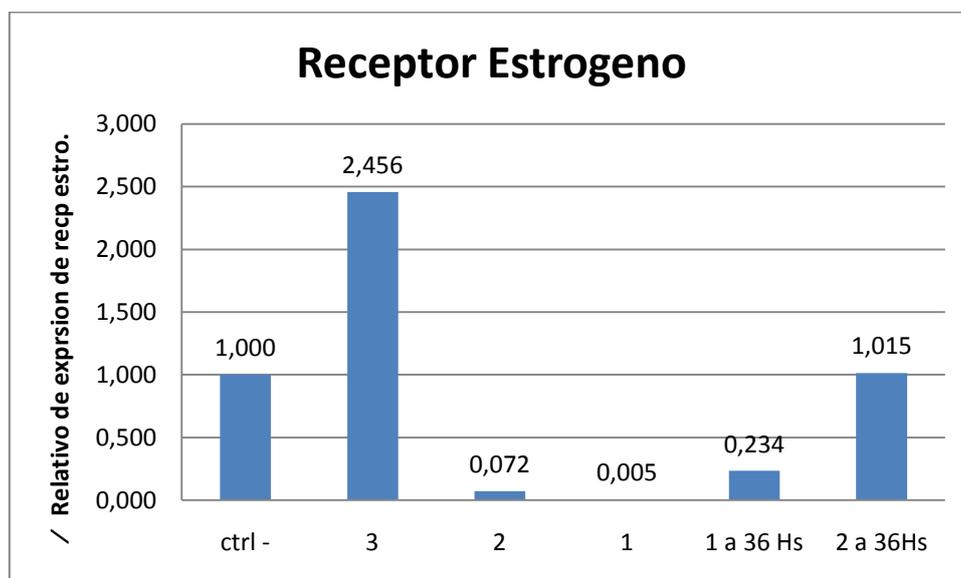


Figura 88- A- Cuantificación de los niveles de expresión de RE α relativizadas al control de carga E-Cadherina a las 24 horas para: control negativo, ribozimas 3, 2, 1 (24 horas) y ribozima 1 y 2 a las 36 hs, los valores son representativos de tres experimentos independientes..

Resultados y Discusión// Actividad de las ribozimas cabeza de martillo modificadas.

La importante reducción de los niveles de expresión de RE α motivó la realización de ensayos de muerte de las células MCF-7. Si bien los resultados no mostraron un incremento en la cantidad de células muertas, el ensayo fue un primer intento y requiere la búsqueda de condiciones óptimas por lo que no es posible descartar el uso de 2'-C-metilnucleótidos en terapias de silenciamiento génico.

Conclusiones

Los resultados obtenidos son alentadores ya que fue posible determinar que la incorporación de 2CMN en el core catalítico de la ribozima cabeza de martillo presenta actividad en células a tiempos largos (>24hs).

La introducción de esta modificación aporta la estabilidad suficiente para contrarrestar el descenso en la constante cinética de hidrólisis determinado en ensayos previos (Gallo M 2005).

El potencial de esta ribozima en el campo de la oncología deberá ser determinado en futuros experimentos. Resulta difícil realizar una apreciación más profunda desde el punto de vista estructural ya que como fue mencionado anteriormente el contexto celular resulta complejo para un análisis con la información disponible. Por ello, el objetivo central fue obtener ribozimas activas y lograr cuantificar el efecto de la mutación con 2'-C-metiluridina en el núcleo catalítico. Haber logrado resultados positivos diseñando una única ribozima constituye un logro destacable.

Conclusiones Generales

8 -Conclusiones Generales

La utilización de 2'-*C*-metilribonucleótidos (2CMN) en el campo de los oligonucleótidos tiene un único antecedente (Gallo M 2005). Este consistió en estudiar las propiedades de una serie de ribozimas cabeza de martillo modificadas con 2 CMN en posiciones específicas. Este trabajo se fundamentó en el hecho de que la 2'-*C*-metiluridina posee la misma conformación que el ARN natural, y a diferencia de otras modificaciones químicas, mantienen el oxhidrilo en la posición 2'. Para comprobar esta hipótesis, Gallo y col estudió la estabilidad de las ribozimas modificadas en fluidos biológicos y se determinó su constante cinética. Los resultados demostraron que era posible extender 15 veces la vida media con una reducción de la actividad de 7 veces. Si bien estos estudios demostraron que, en principio, es posible utilizar los 2'-*C*-metilnucleósidos en estructuras de ARN con funciones catalíticas, resultaba necesario realizar estudios de actividad en un contexto celular.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo es extender la caracterización de los 2CMN. Esta no sólo incluye la realización de ensayos en células con ribozimas modificadas sino que además se intenta ampliar la caracterización de estos análogos para conocer su potencial en otras aplicaciones, especialmente en las que requieren la formación de estructuras doble cadena como es el caso de los siRNA.

Para cumplir con estos dos grandes objetivos fue necesario trabajar en la preparación de los 2'-*C*-metilnucleósidos a través de una ruta sintética que permitiera obtener la cantidad necesaria de nucleósido para llevar a cabo todos los experimentos. Con esta intención se ensayó y escaló una ruta de síntesis a partir de fructosa. Se establecieron protocolos de purificación que facilitaron el trabajo a escala laboratorio, obteniendo cantidades importantes de 2-*C*-metilribono- γ -lactona. A través de una adecuada estrategia de protección fue posible realizar las reacciones necesarias para obtener 2'-*C*-metilnucleósidos. La principal ventaja de esta ruta es que permite preparar nucleósidos con distintas bases a partir de un sintón común, utilizando reactivos que permitirían un futuro escalado. La relevancia de la ruta trasciende los objetivos de este trabajo; porque además de permitir concluir la caracterización de los 2CMN en oligonucleótidos posee un gran potencial para la preparación de estos análogos de nucleósidos con actividad anti Hepatitis C.

Conclusiones Generales

La segunda etapa del trabajo consistió en resolver los problemas causados durante la síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos, por no contar con un grupo adecuado para protección del oxhidrilo de la posición 2'. Debido a las condiciones del ciclo de síntesis y al carácter terciario de esta posición, la tarea de encontrar un candidato adecuado resultó ser un paso crítico en la continuidad del proyecto. El primer candidato sintetizado y ensayado fue el triisopropiloximetilo. Al igual que con los grupos comúnmente utilizados para proteger esta posición no fue posible encontrar condiciones para llevar a cabo la introducción a pesar de haber ensayado diversas estrategias.

Debido a la dificultad de utilizar grupos protectores incorporados a través de una reacción de sustitución nucleofílica, se decidió buscar un grupo que pudiera ser introducido en las mismas condiciones fue el THP, que había sido utilizado en el laboratorio. El grupo finalmente utilizado fue el 1-(2-cloroetoxi)etileter que, a pesar de poseer ciertas desventajas, como aportar un centro quiral adicional y ser parcialmente lábil en medio ácido, resultó ser una alternativa exitosa. Pudo ser acoplado con buen rendimiento y demostró poseer mayor estabilidad a las condiciones del ciclo de síntesis que el THP.

Una vez sintetizadas las fosforamiditas fue posible llevar a cabo las síntesis de los oligonucleótidos. La utilización de fosforamiditas modificadas requirió de esfuerzos adicionales para encontrar las condiciones y los reactivos que permitieran sintetizar y posteriormente purificar los oligonucleótidos diseñados para los experimentos de caracterización. La puesta a punto fue realizada durante la preparación de secuencias de 12 nucleótidos de longitud. Con ellas se estableció un protocolo de purificación y se verificaron los pesos moleculares mediante espectroscopia de masa MALDI-TOF. Una vez establecidas las condiciones de purificación se sintetizaron las ribozimas cabeza de martillo modificadas con 2'-C-metilnucleósidos, 2'-O-metilnucleósidos y nucleótidos con fosforotioatos en los extremos. A diferencia de lo observado durante la síntesis de las secuencias de 12 nucleótidos las ribozimas presentaron un mayor grado de dificultad debido a su carácter quimérico. Por su parte la purificación de las secuencias también presentó un mayor grado de complejidad debido a la formación de estructuras secundarias y terciarias. Además de aumentar el número y estabilidad de estructuras complejas la generación de centros quirales por la modificación del esqueleto fosfato con fosforotioatos aumentó la complejidad de los crudos de reacción. Para superar esta dificultad se pusieron a punto protocolos de purificación adecuados. Ambas estrategias resultaron exitosas y combinadas permitieron obtener las ribozimas con la pureza necesaria para llevar a cabo los estudios de actividad biológica.

Conclusiones Generales

Siendo conscientes de los nuevos avances en herramientas de silenciamiento génico se llevaron a cabo estudios con secuencias cortas (12 nucleótidos) modificadas con 2'-*C*-metilnucleótidos en una posición central. El objetivo perseguido fue evaluar su potencial utilización en aplicaciones doble cadena ARN-ARN. Dadas las características estructurales de los 2CMN su utilización en aplicaciones doble cadena podría mejorar aspectos como la resistencia a nucleasas. Los resultados obtenidos en experimentos de estabilidad térmica o melting point de las estructuras modificadas, demostraron que los 2CMN producen una marcada desestabilización de los dúplex ARN-ARN. Por otro lado, los experimentos de dicroísmo circular permitieron verificar qué forma de estos dúplex se correspondía con la forma A-ARN. La baja estabilidad térmica causada por los 2CMN llevó a descartar la posibilidad de utilizarlos en experimentos de siRNA, sin embargo, los datos obtenidos permitieron realizar una posterior caracterización del impacto causados por los 2'-*C*-metilnucleósidos en estructuras doble cadena tipo A-ARN.

Para completar la caracterización de los 2CMN y dejar abierta la posibilidad de su aplicación en el diseño racional de oligonucleótidos se decidió estudiar el efecto del metilo utilizando las secuencias ensayadas. Para ello se realizaron estudios de dinámica molecular empleando las herramientas informáticas más avanzadas (amber, con campo de fuerza parmbsc0 refinado para ácidos nucleicos). Los resultados obtenidos demostraron que el metilo se posiciona en la zona de apilamiento de las bases, causando una distorsión estructural que afecta principalmente el apilamiento, y en menor medida los puentes hidrógeno de las bases y la hidratación. Una de las conclusiones más relevantes se relaciona con la hipótesis planteada para la conformación del azúcar de los 2CMN. Si bien la conformación de los monómeros de 2'-*C*-metiluridina es la misma que la de la uridina natural ésta no se mantiene cuando es incorporada en un oligonucleótido. Los resultados indican que la distorsión causada por el metilo sobre las bases es parcialmente compensada por un cambio en la conformación hacia la región de confórmeros tipo ARN.

Luego de estudiar el efecto de los 2CMN en un contexto doble cadena se realizaron ensayos para estudiar las propiedades de las ribozimas modificadas con 2CMN en sistemas biológicos. De esta manera se extendieron los resultados obtenidos tiempo atrás en el laboratorio. Para ello se diseñaron ribozimas para determinar el grado de silenciamiento del receptor de estrógenos α en células MCF-7 de cáncer de mama humano. Una vez postulados los sitios de corte del ARNm éstos fueron homologados utilizando DNazimas. De esta forma se determinó la secuencia blanco para las ribozimas. La ribozimas completamente protegidas con 2'-*O*-

Conclusiones Generales

metilnucleósidos y fosforotioatos en los extremos fueron activas y modificaron los niveles de expresión del RE en distinto grado. Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que las ribozimas modificada con 2'-C-metiluridina reducen los niveles de expresión del receptor mediante un mecanismo catalítico. Esto permite concluir que si bien la cinética de la reacción de hidrólisis se ve disminuida (Gallo M 2005), el aumento en la estabilidad producido por la modificación se traduce en un mayor grado de silenciamiento, aún 36 horas después de la transfección. El efecto encontrado superó las expectativas teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Gallo y col. en los estudios *in vitro*.

Adicionalmente se realizaron ensayos preliminares de muerte celular con el objetivo de comenzar a estudiar la aplicabilidad de esta estructura en el tratamiento de cáncer de mamas, especialmente en los casos donde se produce resistencia al tamoxifeno. Si bien no se pudieron detectar mayores niveles de muerte no se puede, al día de hoy descartar esta idea, ya que es necesario realizar pruebas complementarias ensayando distintas condiciones experimentales.

En resumen, el trabajo aquí presentado permitió caracterizar los 2CMN en el campo de los oligonucleótidos para silenciamiento génico. Se completó la caracterización en un sistema simple cadena realizando exitosamente pruebas con ribozimas en un contexto celular, por otro lado se hicieron estudios físico-químicos que demostraron que en principio no serían aplicables en sistemas doble cadena como los siRNA. Por su parte el estudio computacional completó el trabajo, permitiendo caracterizar en forma detallada el efecto de la introducción del metilo en cuanto a los parámetros estructurales más importantes de los ácidos nucleicos.

Bibliografía

Bibliografía

- Akashi H., Matsumoto S., Tair K., «Gene discovery by ribozyme and sirna libraries.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005: 6, 416-422.
- Altman R., Schowope I. Sarracino D., Tetzalff C.- Bleczinski C., Richert C. «Selection of modified oligonucleotides with increased target affinitu vis MALDI-Monitores Nuclease survival.» *J. Comb. Chem.*, 1999: 1 493-508.
- Altona C., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc*, 1972: 96, 8205-8212.
- Avery O., McLeod M., McCarty M., «Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III.» *J. Exp. Med* , 1944: 79, 137-158.
- Barbe S., Le Bret M. «Effect of a Water Molecule on the Sugar Puckering of Uridine,» *J. Phys. Chem. A*, 2008: 5: 989-999.
- Beigelman L., Ermolinsky B., Gurskaya G., Tsapkina E., Karpeisky M., Mikhailov S., «New syntheses of 2'-C-methylnucleosides starting from -glucose and -ribose.» *Carboh. Res.*, 1987: 166, 219-232.
- Beigelman L., McSwiggen J., Draper K., Gonzalez C., Jensen K., Karpeisky A., Modak A., Matulic-Adamic J., Drenzo A., Haeblerli P., Sweedler D., Tracz D., Grimm S., Wincott F., Thackray V., Usman N. «Chemical Modification of Hammerhead Ribozymes.» *J. Biol. Chem.*, 1995: 43, 25702-25708.
- Birikh K., Heaton P., Eckstein F., «The structure, function and application of the hammerhead ribozyme .» *Eur J. Biochem* , 1997: 245, 1-16.
- Bloomfield, V. *Nucleic Acids, structures, properties and functions*. California: University Science Books, 1999.
- Bowman W., Rand M., *Textbook of Pharmacology*. Cambridge, Gran Bretaña: Blackwell Scientific, 1990.
- Braish T., Fuchus L., *Synth. Commun.*, 1986: 16, 11-115.
- Byung Yun Yang, Rex Montgomery. «Alkaline degradation of fructofuranosides.» *Carbo Res*, 1996: 47-57.
- Calabrese E., Baldwin L. «Hormesis: A Generalizable and Unifying Hypothesis.» *Cri Rev in Toxicol*, 2001: 31 (353-424).
- Colwell L., Fay J., Flores O., Getty K., Grobler J., lafemina R., Markel E., Migliaccio G., Prhac M., Stahlhut M., Tomassini J., maccoss M., Hazuda D., Carroll S. «A 7-Deaza-Adenosine Analog Is a Potent and Selective Inhibitor of

Bibliografía

- Hepatitis C Virus Replication with Excellent Pharmacokinetic Properties.» *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2004: 48, 39448-3953.
- Cornell W., Cieplak P., Bayly C., Merz K., Ferguson D., Spellmeyer D., Fox T., Caldwell J., Kollman P., «A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules.» *JACS*, 1995: 117, 5179-5197.
 - Crick F. «Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis.» *J Mol Biol*, 1966: 18, 548-555.
 - De Silva C., Walter N., «Leakage and slow allostery limit performance of single drug-sensing aptazyme molecules based on the hammerhead ribozyme.» *RNA*, 2009: 15, 76-84.
 - Di Lella S., Martí M., Alvarez M., Estrin D., Ricci J., «Characterization of the Galectin 1 Carbohydrate Recognition Domain in Terms of Solvent Occupancy.» *J. Phys Chem B*, 2007: 111, 7360- 7366.
 - Dutartre H, Boretto J, Guillemot JC., Canard B., *JBC*, 2005: 280, 6359-6368.
 - Dykxhoorn DM, Lieberman J. «Knocking down disease with sirnas.» *Cell*, 2006: 126, 231-235.
 - Egli M. «Conformational aspects of nucleic acids analogs and antisense oligonucleotides.» *Antisens. Nucleic Acid Drug Drv.*, 1998: 35, 123-128.
 - Egli M., Portmann M., Usman N. «RNA Hydration: A Detailed Look†.» *Biochemistry*, 1996: 35: 8489-8494.
 - Eldrup A., Prhavc, Brooks j., Bhat B., Prakash P., Song Q., Bera S , Neelima Bhat, Dande P, Dan Cook P., C. Bennett, Carroll S., Ball R., Bosserman M, Burlein C., Colwell F., Fay J., Flores O., Getty K., Lafemina R., Leone J., Ma M. «Structure Activity Relationship of Heterobase-Modified 2'-C-methylribonucleosides as Inhibitors of Hepatitis C virus RNA replication.» *J. Med. Chem*, 2004 : 47, 5284- 5297.
 - Fire A., Xu S., Montgomery MK., Kostas S., Driver S., Mello C., «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.» *Nature*, 1998: 19, 806-811.
 - Frolow, O., Bode, B.E. and Engels, J. W. «The Synthesis of EPR Differentiable Spinlabels and Their Coupling to Uridine".» *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2007: 26 ,655-659.
 - Gallo M, Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G, Iribarren AM. «Activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-C-methyluridine: a new RNA mimic.» *Chem Biodivers.* , 2005: 2, 198-204.

Bibliografía

- Gallo M., Monteagudo E., Cicero D., Torres H., Iribarren M. «2'-C-methyluridine phosphoramidite: a new building block for the preparation of RNA analogues carrying the 2'-hydroxyl group.» *Tet.*, 2001: 57, 5707-5713.
- Gallo, M. Tesis Doctoral. Buenos Aires: FCEN-UBA, 2002.
- Grünweller A., Hartmann RK. «Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents?» *Biodrugs*, 2007: 4, 235-243.
- Guerrier-Takadaa, Gardinerb. K., Marshb T., Norman Paceb N., Altman S.,. «The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme.» *Cell*, 1983: 35, 849-857.
- Gyi J., Gao D., conng.L., Trent J.O., Brown T.Lane A. *Nucl. Ac. Res.*, 2003: 2683-2693.
- Hai-Jing Fu., Lin-Tao Jia, Yan-Ling Meng., Li-Bo Yao, Si-yi Yao, An-gang Yang.,. «Stable knockdown of Estrogen Receptor alpha by vector-based RNA interference Supresses proliferation and ehnhances apoptosis in breast cancer cells.» *Cancer Biol. And Ther.*, 2006: 7, 842-847.
- Hartmer R., Storm N., Boecker S., Rodi. C., Hillenkamp F., Jurnke C., Van Den Boom D. «rnase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throuput comparative sequence analysis.» *Nucl. Ac. Res.*, 2003: 31 47.
- Hough L., Jones J., Mitchell D.,. «The preparation of some derivatives of Dribono-1,4 Lactone abd D-ribitol.» *Can. J. Chem*, 1958: 36, 1720-1728.
- Iglesias L., Zinni M., Gallo M., Iribarren A. «Complete and regioselective deacetylation of peracetylated uridines using a lipase .» *Biotechnology Letters*, 2000: 22, 361-365.
- Ivanova A., Rösh N.,. «The Structure of LNA:DNA Hybrids from Molecular Dynamics Simlulations: Te effect of Locked Nuleotides.» *J. Phys. Chem. A*, 2007: 111: 9307-9319.
- Iyer R., Egan W., Regan J., Beaucage L.,. « H-1, 2-Benzodithiole-3-one 1, 1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase .» *J. Am. Chem. Soc*, 1990: 112 : 1253-1254.
- Izquierdo M. «Short interfering rnas as a tool for cancer gene therapy.» *Cancer Gene Ther*, 2005: 12, 217-227.
- Jenkibsky S., Rison R., Altone E.,. «Branched-Chain Sugar Nucleosides. IV. 2'-C-Methyladenosine.» *JOC*, 1968: 33, 2490-2494.
- Jiang M., Milner J.,. «Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with sirna, a primer of RNA interference.» *Oncogene* , 2002: 39,6041-6048.

Bibliografía

- Kruger K., Grabowski P., Zaug A., Sands J., Gottschinlg D., Cech T., «Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena.» *Cell*, 1982: 31, 147-157.
- Kusov Y., Kanda T., Palmenberg A., Sgro J., Gauss-Müller V., «Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering rnas.» *J Virol*, 2006: 11, 5599-5610.
- Lavrosky Y., Tyagi R., Chen S., Song. C., Chatterjee B., Roy A., «Ribozyme-Mediated cleavage of estrogen receptor messenger RNA and inhibition of receptor function in target cells.» *Mol. Endocrinology*, 1999: 13, 925-934.
- Layzer J., mcaffrey A., Tanner A., Huang Z., Kay M., «In vivo activity of nuclease-resistant sirnas.» *RNA*, 2004: 10, 766-771.
- LEE J. «Polymer Nanoengineering for Biomedical Applications.» *Annals of Biomedical Engineering*,, 2006: 34,75-88.
- Li C, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf J. «Delivery of RNA interference.» *Cell Cycle*, 2006: 5, 2103-2109.
- Li Y., Kong L., Cheng B., Li K., «struction of influenza virus sirna expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus.» *Avian Dis*, 2005: 49, 562-573.
- Loupy A. «Wave-Material Interactions, Microwave Technology and Equipment.» *Microwaves in Organic Synthesis*, 2004.
- Luor ., Gilson H. ,Potter M., Gilson M. «The Physical Basis of Nucleic Acid Base Stacking in Water.» *Biophysical Journal*, 2001: 80 : 140-148.
- M. Gallo, E. Monteagudo, D. Ciccerio, H. Torres, A. Iribarren,. «, 2'-C-methyluridine phosphoramidite: a new building block for the preparation of RNA analogues carrying the 2'-hydroxyl group,» *Tet*, 2001 : 57, 5707-5713.
- M. Gallo, E. Monteagudo, D. Ciccerio, H. Torres, A. Iribarren,. «, 2'-C-methyluridine phosphoramidite: a new building block for the preparation of RNA analogues carrying the 2'-hydroxyl group,» *Tet*, 2001: 57 5707-5713.
- M., Zucker. «Calculating nucleic acid secondary structure.» *Curr Opin Struct Biol.* , 2000: 10, 303-310.
- Machida K, Ohta Y, Osada H,. «Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells.» *J Biol Chem*, 2006: 281,14314-14320.
- Markiewicz W., Wiewiórowski M., «A new type of silyl protecting groups in nucleoside chemistry.» *Nucl Acids Res*, 1978: 1, s185-190.
- Marshall R, W. Kaiser. «Recent advances in the high-speed solid phase synthesis of RNA.» *Curr. Opinion in Chem. Bio.*, 2004: 8 ,222-229.

Bibliografía

- Marshall W., Kaiser R., «Recent Advanced in High-speed solid phase synthesis of RNA.» *Curr. Op. In Chem. Biol.*, 2004: 8,222-229.
- Martick M., Scott W., «Tertiary Contacts Distant from the Active Site Prime a Ribozyme for Catalysis.» *Cell*, 2006: 126, 309-320.
- Mc Call M., Brown T., Kennard O., «The crystal structure of d(GGGGCCCCC)-a model for poly(dg)(dc).» *J. Mol. Biol.*, 1985: 183, 385-396.
- Murray L., Arendall III W., Richardson D., Richardson J., «RNA backbone is rotameric.» *PNAS*, 2003: 100, 13904-13909.
- Nasalean L., Baudrey S., Leontis N., Jaeger L. «Controlling RNA self-assembly to form filaments.» *Nucleic Acids Research* , 2006: 34, 1381-1392.
- NCBI. Basic Local Alignment Search Tool. [Http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (último acceso: 2007).
- Odadzic D., Bramsen J., Smicius R., Bus C., Kjems J., Engels J. «Synthesis of 2'-O-modified adenosine building blocks and application for RNA interference.» *Bioorg. & Med. Chem.*, 2008: 16, 518-529.
- PEIXUAN G. «RNA nanotechnology : Engineering, assembly and applications in detection, gene delivery and therap.» *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2005: 12, 1964-1982.
- Peligot E. «Compt Rend.» *Compt Rend*, 1879: 918.
- Perez A., Marchan I., Svozil A, Spomer J., Cheatham III T., Laughton C., Orozco M., «Refinement of the AMBER Force Field for Nucleic Acids: Improving the.» *Biophysical Journal*, 2007: 92: 3817-3829.
- Pitsch S., Weiss P., Jenny L., Stutz A., Wu X. «Reliable chemical synthesis of oligoribonucleotides (RNA) with 2'-O-[(trisiopropyl)oxy]methyl(2-O-tom)-protected phosphoramidite.» *Helv Chim Acta*, 2001: 84,3773-3795.
- Pitsch S., Weiss P., Luzzi J., Stutz A, Wu X. «Reliable Chemical synthesis of oligoribonucleosides with 2'-O-[(trisiopropylsilyl)oxymethyl]protected phosphoramidites.» *Hel. Chim. Acta*, 2004: 3773.
- Pitsch, S., U. Scheffer, M. Hey, A. Strick, y M. W Göbel. «On Facts and Artefacts: The Difficulty to Evaluate an Artificial Nuclease.» *Helv. Chim. Acta*, 2003,: 6, 3740 - 3752 .
- Qiu S., Adema C., Lane T. ««A computational study of off-target effects of RNA interference.» *Nucleic Acids Res* , 2005: 33, 1835-1847.
- R, Dickerson. «Definitions and Nomenclature of Nucleic Acids Parameters.» *EMBO J*, 1989: 8: 1-4.
- Raoul C., Barker S., Aebischer P .. «Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference.» *Gene Ther*, 2006: 487-495.

Bibliografía

- Roth A., Breaker R. «Selection in vitro of allosteric ribozymes.» *Methods Mol Biol*, 2004: 252, 145-164.
- Scaringe S. «RNA Oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester Chemistry.» *methods*, 2001: 23, 206-217.
- Serganov A., Keiper S., Malinina L., Tereshko L., Kripkin E., Höbartner C., Polonskaia A., Tuân Phan A., Wombacherr., Micura R., Dauter Z., Jäschke A., Patel D., «Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation.» *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005: 12, 218 - 224.
- Shabarova Z., Bogdanov A., «Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids.» De Bogdanov A., Shabarova Z. John Wiley & Sons, 1994.
- Srinivasan S., Tewary H., Iversen P., «Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin.» *Antisense Res. Dev.*, 1995: 5, 131-139.
- Sun G., Voigt J., Filippov I., Marquez V., Nicklaus M. *Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2004: 44, 1752-1762.
- Sundarralingam M. «Conformation of Biological Molecules and Polymers.» *Proceedings of the 5th Jerusalem Symposium*. Nueva York: Academic Press, 1972. 417.
- T. Iino, S. Shuto, A. Matsuda. «Stereoselective Synthesis of (2'S)-2'-C-Alkyl-2'-deoxyuridines .» *Tet*, 1996: 169-181.
- Taylor A., Pringle H., Vell S., Al-Azzawi F., «Specific Inhibition of estrogen receptor alpha function by antisense oligonucleotides.» *Antise. & Nucl. Ac. Drug. Deve.*, 2001: 11, 219-231.
- Tomassini J., Getty K., Stahlhut M., Sung Shim, Balkrishen Bhat, Eldrup A., Prakash T., Carroll S., Flores O., Maccoss M., McMasters D., Migliaccio G., Olsen D., «Inhibitory Effect of 2'-Substituted Nucleosides on Hepatitis C Virus Replication Correlates with Metabolic Properties in Replicon Cells.» *Antimicrob Agents Chemothe*, 2005: 49, 2050-2058.
- Tong-Hong W., Wan-Ting Li, Szu-Hsien Yu, Lo-Chun A. «The Use of 10-23 dnzyme to Selectively Destroy the Allele of mrna with a Unique Purine-Pyrimidine Dinucleotide.» *Oligonucleotides*, 2008: 18, 295-300.
- Turner D., Sugimoto H., Dreiker S., «Free Energy Increments for Hydrogen Bonds in Nucleic Acids Base Pairs.» *J.Chem.Am. Soc.*, 1987: 109 : 3783-3785.
- U. Niedballa, H. Vorbruggen. *Angew, Chem. Int.*, 1970: 1970.
- Vester B., Wengel J. «LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA.» *Biochemistry*, 2004: 42, 13233-41.

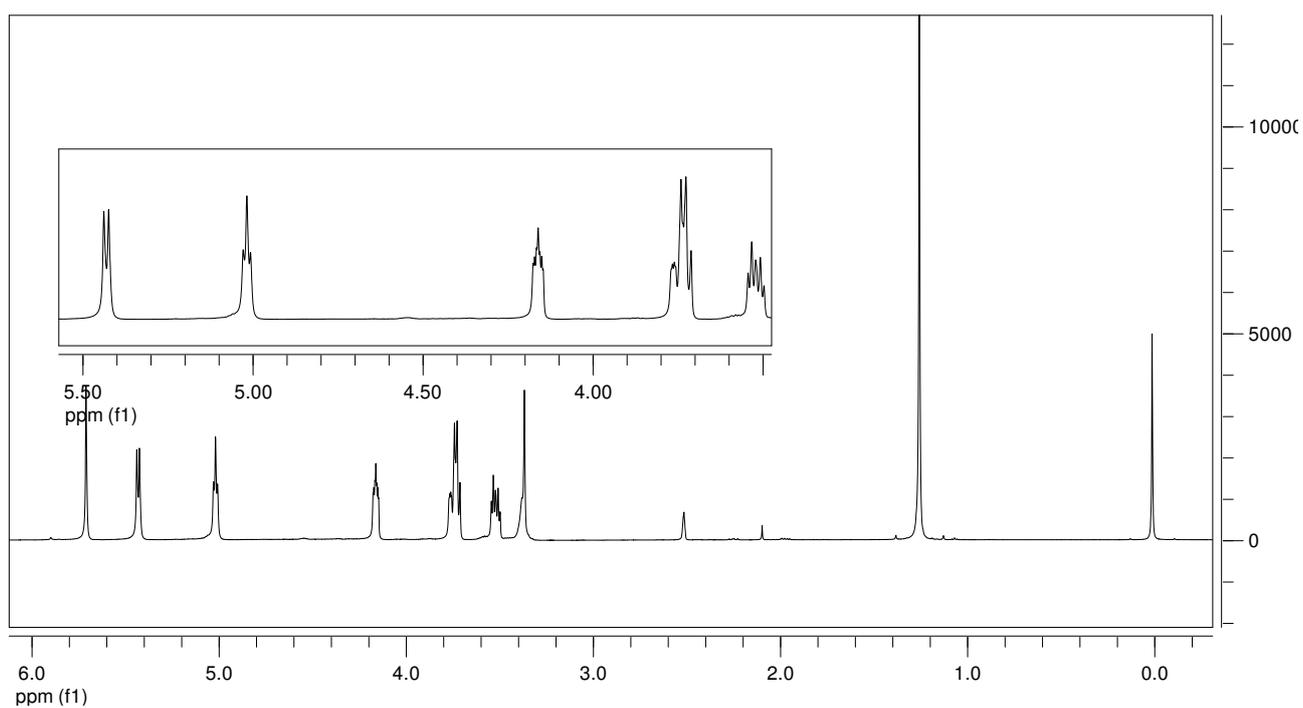
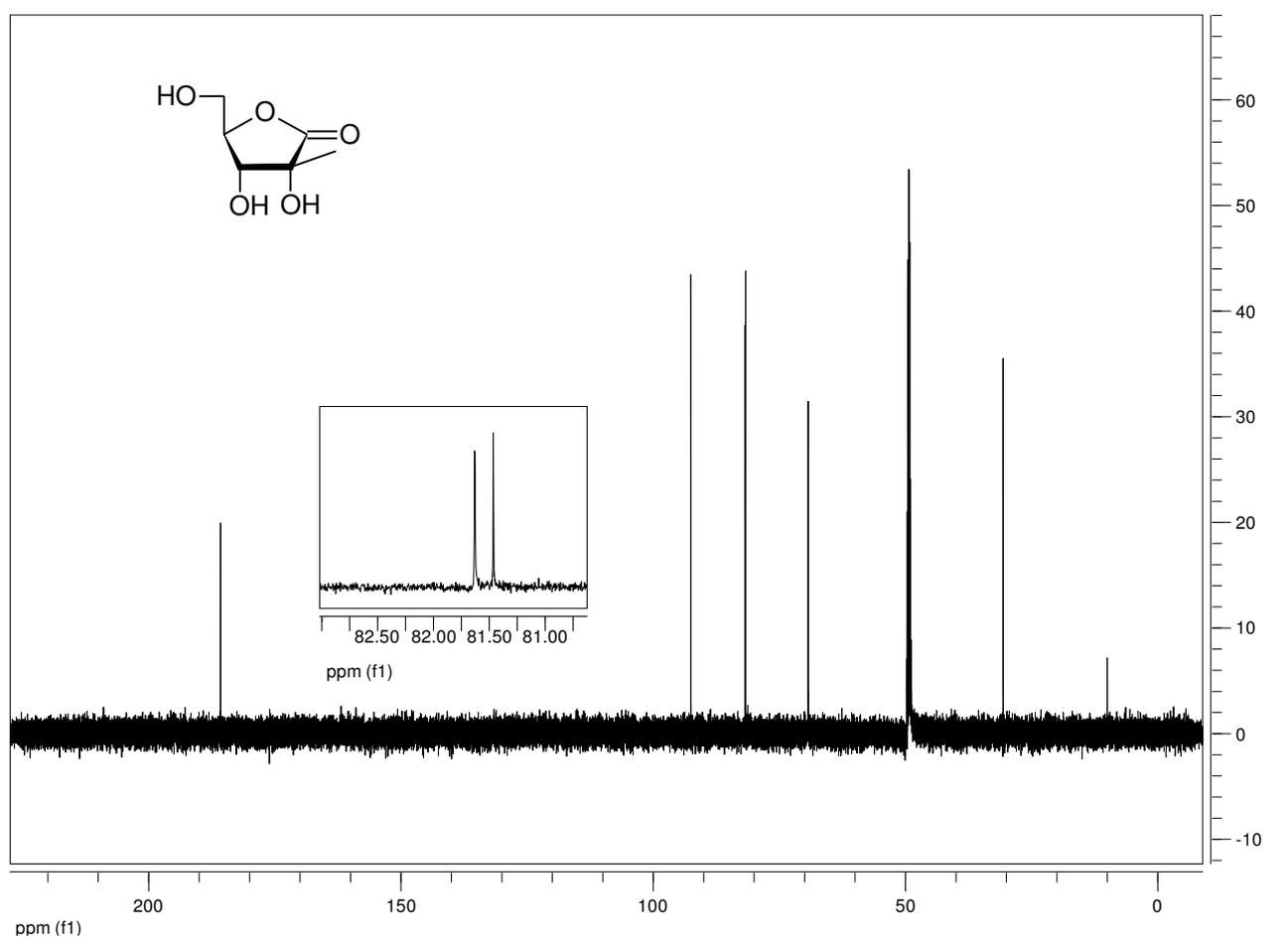
Bibliografía

- Weisman S., Hirsch-Lerner D., Barenholz Y., Talmon Y. «Nanostructure of Cationic Lipid-Oligonucleotide Complexes.» *Biophys J*, 2004: 87(1): 609–614.
- Westhof E. *Water and Biological Macromolecules*. Florida: CRC Press, 1993.
- Yamakage S., Sakatsume O., Furuyama E., Takaku H. «I-(2-chloroethoxy)ethyl group for the protection of 2'-hydroxyl group in the synthesis of oligoribonucleotides.» *tetrahedron letters*, , 1989 : vol 30 6361-6364,.
- Zamore P., Tuschl T., Sharp P., Bartel D. *Cell*, 2000: 101, 25-33.
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann H, Zender S, Mundt B, Waltemathe M., Gosling T., Flemming P., Malek N., Trautwein C., Manns M., Kuhnel F., Kubicka S.,. «Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice.» *Proc Natl Acad Sci*, 2003: 100, 7797-77802.

Anexo

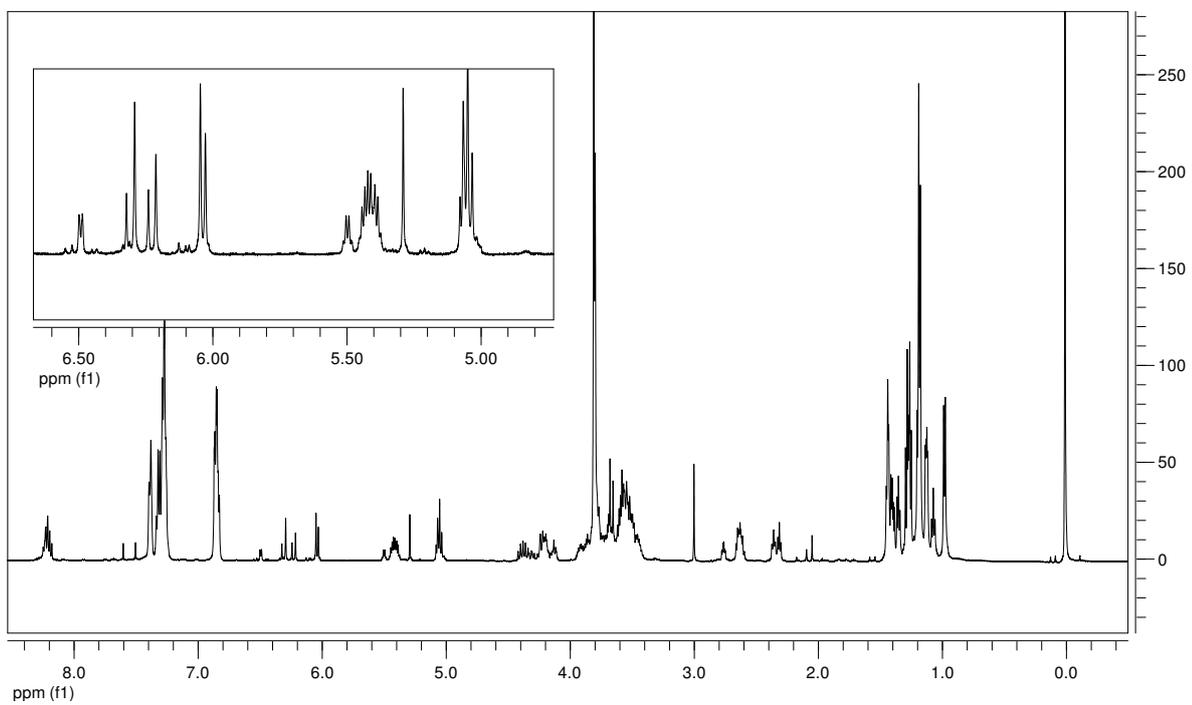
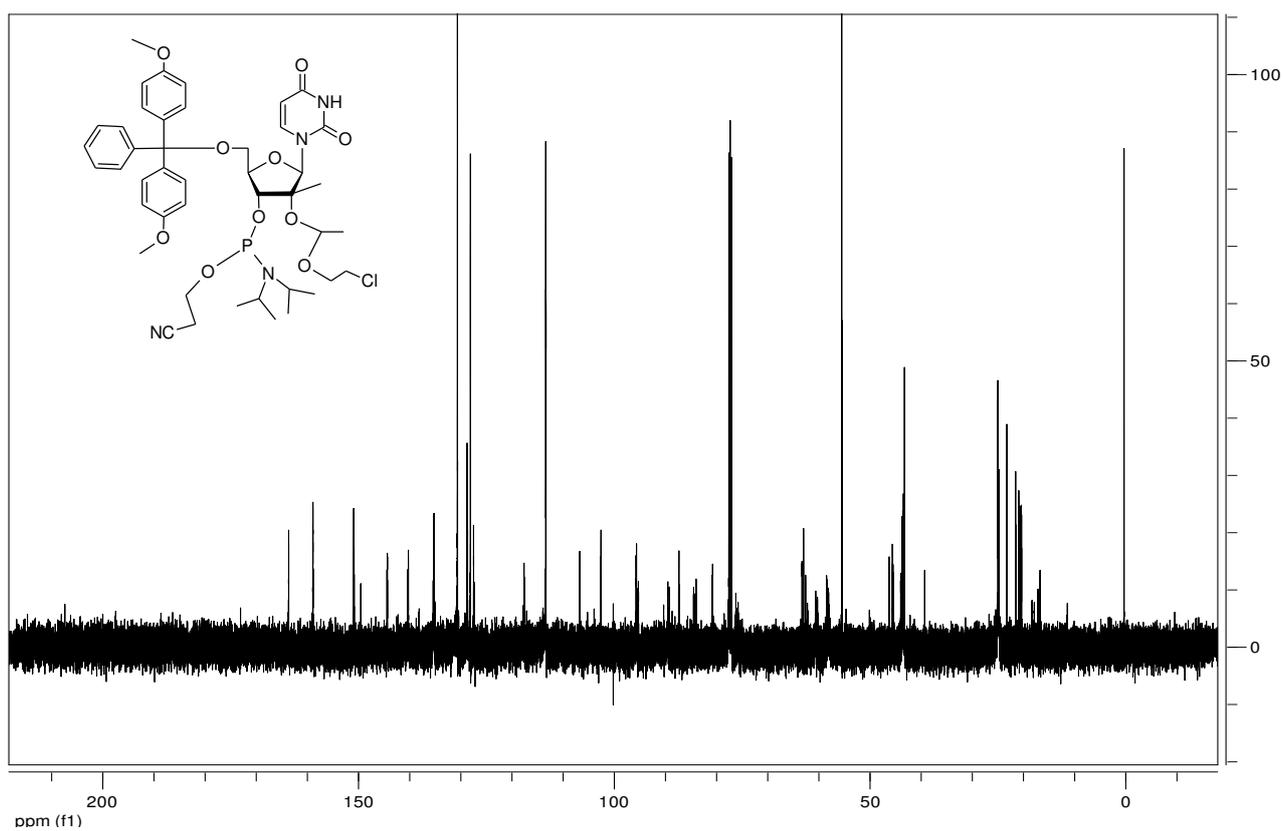
ANEXO

Espectros de Resonancia Magnetica Nuclear del producto de partida

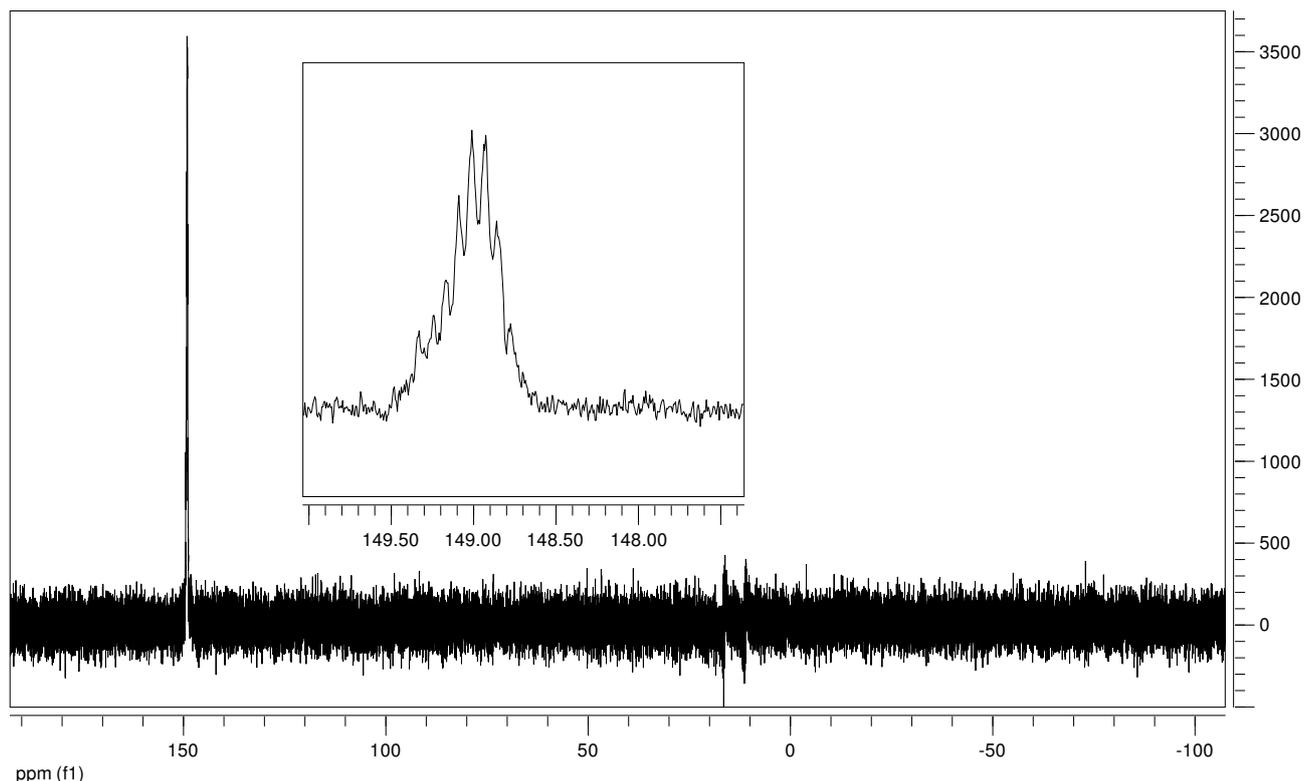


Espectros de Resonancia Magnetica Nuclear de la 2'-C-metilfosforamidita

Anexo

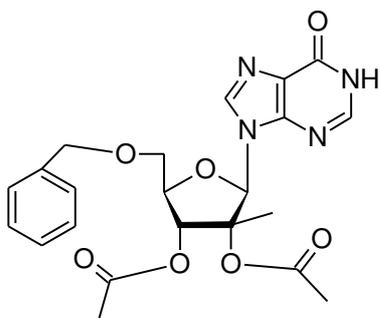


Anexo



Síntesis de 2'-C-metilinosina

5'-O-bencil-2',3'-O-dibenzoil-2'-C-metilinosina (17)



Mr Teórico: 426,41

Rf 0,5 CH₂Cl₂:MeOH 95:5

Rendimiento 73%

0,620 g de hipoxantina (4,88 mmol) fueron suspendidos en 9 ml de acetonitrilo seco bajo atmósfera de Ph. Entonces 2,36 ml de *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (9,16 mmol) fueron agregados a la suspensión agitada magnéticamente. La mezcla se agitó calentando a reflujo durante 30 minutos y la suspensión se convirtió en una solución incolora. Luego de llevar la mezcla a temperatura ambiente 1 g de **6** (1,76 mmol) fue agregado. Se adicionaron gota a gota en el seno de la solución utilizando una cánula metálica 586 mg de trifluorometanosulfato de trimetilsililo (2,6 mmol). Luego de 20 horas no se detectó producto de partida por ccd. Se agregaron entonces 300 ml de AcOEt y la mezcla luego se extrajo con una solución concentrada

Anexo

de NaHCO_3 . La fase orgánica fue secada con $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ y evaporada a presión reducida. Luego se purificó en una columna de sílica gel eluyendo con CH_2Cl_2 100% \rightarrow CH_2Cl_2 : MeOH 95:5 obteniendo **17** (750 mg , 73 % de rendimiento).

Anexo

1- Librería del Monómero 2'-C-metiluridina Utilizada en experimentos de Dinámica Molecular

```

!!index array str
"RME"
!entry.RME.unit.atoms table str name str type int typex int resx int flags int seq int elmnt dbl chg
"H5T" "HO" 0 1 131072 1 1 0.429500
"O5'" "OH" 0 1 131072 2 8 -0.622300
"C5'" "CT" 0 1 131073 3 6 0.055800
"H5'1" "H1" 0 1 131073 4 1 0.067900
"H5'2" "H1" 0 1 131073 5 1 0.067900
"C4'" "CT" 0 1 131073 6 6 0.106500
"H4'" "H1" 0 1 131073 7 1 0.117400
"O4'" "OS" 0 1 131073 8 8 -0.354800
"C1'" "CT" 0 1 131073 9 6 0.067400
"H1'" "H2" 0 1 131073 10 1 0.182400
"N1" "N*" 0 1 131073 11 7 0.041800
"C6" "CM" 0 1 131073 12 6 -0.112600
"H6" "H4" 0 1 131073 13 1 0.218800
"C5" "CM" 0 1 131073 14 6 -0.363500
"H5" "HA" 0 1 131073 15 1 0.181100
"C4" "C" 0 1 131073 16 6 0.595200
"O4" "O" 0 1 131073 17 8 -0.576100
"N3" "NA" 0 1 131073 18 7 -0.354900
"H3" "H" 0 1 131073 19 1 0.315400
"C2" "C" 0 1 131073 20 6 0.468700
"O2" "O" 0 1 131073 21 8 -0.547700
"C3'" "CT" 0 1 131073 22 6 0.202200
"H3'" "H1" 0 1 131073 23 1 0.061500
"C2'" "CT" 0 1 131073 24 6 0.067000
"CM" "CT" 0 1 131073 25 6 0.0243
"HM1" "HC" 0 1 131073 26 1 0.0243
"HM2" "HC" 0 1 131073 27 1 0.0243
"HM3" "HC" 0 1 131073 28 1 0.0243
"O2'" "OH" 0 1 131073 29 8 -0.613900
"HO'2" "HO" 0 1 131073 30 1 0.418600
"O3'" "OH" 0 1 131072 31 8 -0.654100
"H3T" "HO" 0 1 131072 32 1 0.437600
!entry.RME.unit.atomsptinfo table str pname str ptype int ptypex int pelmnt dbl pchg
"H5T" "HO" 0 -1 0.0
"O5'" "OH" 0 -1 0.0
"C5'" "CT" 0 -1 0.0
"H5'1" "H1" 0 -1 0.0
"H5'2" "H1" 0 -1 0.0
"C4'" "CT" 0 -1 0.0
"H4'" "H1" 0 -1 0.0
"O4'" "OS" 0 -1 0.0
"C1'" "CT" 0 -1 0.0
"H1'" "H2" 0 -1 0.0
"N1" "N*" 0 -1 0.0
"C6" "CM" 0 -1 0.0
"H6" "H4" 0 -1 0.0
"C5" "CM" 0 -1 0.0
"H5" "HA" 0 -1 0.0
"C4" "C" 0 -1 0.0
"O4" "O" 0 -1 0.0
"N3" "NA" 0 -1 0.0
"H3" "H" 0 -1 0.0
"C2" "C" 0 -1 0.0
"O2" "O" 0 -1 0.0
"C3'" "CT" 0 -1 0.0

```

Anexo

```

"H3" "H1" 0 -1 0.0
"C2" "CT" 0 -1 0.0
"CM" "CT" 0 -1 0.0
"HM1" "HC" 0 -1 0.0
"HM2" "HC" 0 -1 0.0
"HM3" "HC" 0 -1 0.0
"O2" "OH" 0 -1 0.0
"HO'2" "HO" 0 -1 0.0
"O3" "OH" 0 -1 0.0
"H3T" "HO" 0 -1 0.0
!entry.RME.unit.boundbox array dbl
-1.000000
0.0
0.0
0.0
0.0
!entry.RME.unit.childsequence single int
0
!entry.RME.unit.connect array int
0
0
!entry.RME.unit.connectivity table int atom1x int atom2x int flags
1 2 1
2 3 1
3 4 1
3 5 1
3 6 1
6 7 1
6 8 1
6 22 1
8 9 1
9 10 1
9 11 1
9 24 1
11 12 1
11 20 1
12 13 1
12 14 1
14 15 1
14 16 1
16 17 1
16 18 1
18 19 1
18 20 1
20 21 1
22 23 1
22 24 1
22 31 1
24 25 1
24 29 1
25 26 1
25 27 1
25 28 1
29 30 1
31 32 1
!entry.RME.unit.hierarchy table str abovetype int abovex str belowtype int belowx
"U" 0 "R" 1
"R" 1 "A" 1
"R" 1 "A" 2
"R" 1 "A" 3
"R" 1 "A" 4

```

Anexo

```
"R" 1 "A" 5
"R" 1 "A" 6
"R" 1 "A" 7
"R" 1 "A" 8
"R" 1 "A" 9
"R" 1 "A" 10
"R" 1 "A" 11
"R" 1 "A" 12
"R" 1 "A" 13
"R" 1 "A" 14
"R" 1 "A" 15
"R" 1 "A" 16
"R" 1 "A" 17
"R" 1 "A" 18
"R" 1 "A" 19
"R" 1 "A" 20
"R" 1 "A" 21
"R" 1 "A" 22
"R" 1 "A" 23
"R" 1 "A" 24
"R" 1 "A" 25
"R" 1 "A" 26
"R" 1 "A" 27
"R" 1 "A" 28
"R" 1 "A" 29
"R" 1 "A" 30
"R" 1 "A" 31
"R" 1 "A" 32
!entry.RME.unit.name single str
"RME"
!entry.RME.unit.positions table dbl x dbl y dbl z
3.166026 2.040000 -1.56025E-06
3.258076 2.241055 2.039655
2.156035 2.551837 2.019887
1.452687 1.753841 2.257803
1.604968 3.450028 1.741178
3.008252 2.847921 3.243186
2.447118 3.477373 3.933851
3.228121 1.605168 3.977231
4.558614 1.150950 3.777548
5.072002 1.095281 4.737461
4.538757 -0.306565 3.312624
4.316907 -0.672508 2.011175
4.145435 0.083636 1.259348
4.360319 -1.957589 1.633974
4.180695 -2.226406 0.593026
4.642747 -2.996990 2.589735
4.702951 -4.199184 2.336743
4.852825 -2.538493 3.874277
5.070434 -3.289149 4.634055
4.814724 -1.223882 4.292304
5.014668 -0.915001 5.455495
4.415606 3.377827 2.961306
4.412072 3.941489 2.028369
5.230443 2.095696 2.779425
5.668211 2.081313 1.781301
6.668211 2.081313 1.781301
5.668211 3.081313 1.781301
5.668211 2.081313 2.781301
6.272982 2.049941 3.757136
6.759278 1.235228 3.610987
```


Anexo

```

cut = 10,
ntr = 1,
ntc = 2,
ntf = 2,
tempi = 0.0,
temp0 = 300.0,
ntt = 3,
gamma_ln = 1.0,
nstlim = 100000, dt = 0.0001
ntpr = 100, ntwx = 100, ntwr = 1000
/
Keep ARN fixed with weak restraints
10.0
RES 1
END
END

```

```

cut=5
&end

```

```

&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /

```

```

DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT

```

```

eof

```

```

sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene

```

```

mv mdout RR_mon_term.mdout
mv x.tra RR_mon_term.tra
mv x.rst RR_mon_term.rst
cp RR_mon_term.rst x.crd
mv x.ene RR_mon_term.ene

```

```

rm -f mdin
cat <<eof >mdin

```

```

&cntrl

```

```

imin=0,irest=1,ntx=7,

```

```

ntb=2,ntp=1,

```

```

NSTLIM= 5000000, DT=.002,
NTC=2,NTF=2,nrespa=1,

```

```

ntt=1,temp0=300.0,tautp=2.0,tempi=300,
ntpr=1000,ntwx=1000,ntwv=0,ntwe=100,
nmropt=0,jar=0,

```

Anexo

```
cut=5
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene
```

3- Comando para determinación del angulo pseudorotacional

```
#***** ptraj center
```

```
rm -f ptraj.in
```

```
cat <<eof > ptraj.in
```

```
trajin RR_mon_12ns.tra
```

```
pucker RME @C1' @C2' @C3' @C4' @O4' out RME altona
```

```
eof
```

```
ptraj ./x.top <ptraj.in >ptraj.out
```

4.- INPUT MINIMIZACION

```
rm -f mdin
```

```
cat <<eof > mdin
```

```
rm -f mdin
```

```
cat <<eof > mdin
```

```
&cntrl
```

```
imin = 1,
```

```
maxcyc = 1000,
```

```
ncyc = 5000,
```

```
ntb = 1,
```

```
ntr = 1,
```

```
cut = 2
```

```
/
```

```
Hold the ARN fixed
```

Anexo

```
500.0
RES 1 20
END
END
```

```
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref
```

5- INPUT DINÁMICA

```
#!/bin/bash -l
#
#$ -cwd
#$ -j y
#$ -S /bin/bash
#
```

```
rm -f mdin
cat <<eof >mdin
```

```
&cntrl
imin=0,irest=0,ntx=1,
```

```
ntb=2,ntp=1,
```

```
NSTLIM= 100000, DT=.0001,
NTC=2,NTF=2,nrespa=1,
```

```
ntt=1,temp0=300.0,tautp=2.0,tempi=0,
ntpr=1000,ntwx=1000,ntwv=0,ntwe=100,
nmropt=0,jar=0,
```

```
cut = 12
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene
```

Anexo

```
mv mdout RR_mod_term.mdout
mv x.tra RR_mod_term.tra
mv x.rst RR_mod_term.rst
cp RR_mod_term.rst x.crd
mv x.ene RR_mod_term.ene
```

```
rm -f mdin
cat <<eof>mdin
```

```
&cntrl
imin=0,irest=1,ntx=7,
```

```
ntb=2,ntp=1,
```

```
NSTLIM= 500000, DT=,002,
NTC=2,NTF=2,nrespa=1,
```

```
ntt=1,temp0=300.0,tautp=2.0,tempi=300,
ntpr=1000,ntwx=1000,ntwv=0,ntwe=100,
nmropt=0,jar=0,
```

```
cut = 12
&end
```

```
&wt type='DUMPFREQ', istep1=10 /
&wt type='END' /
```

```
DISANG=jarFijo.RST
DUMPAVE=x.dat
LISTIN=POUT
LISTOUT=POUT
```

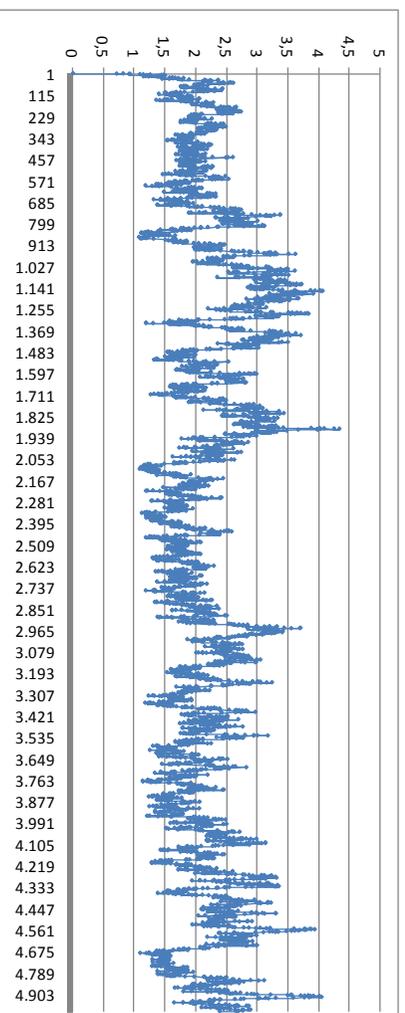
```
eof
```

```
sander -O -i mdin -o mdout -p x.top -c x.crd -r x.rst -ref x.ref -x x.tra -v x.vel -e x.ene
```

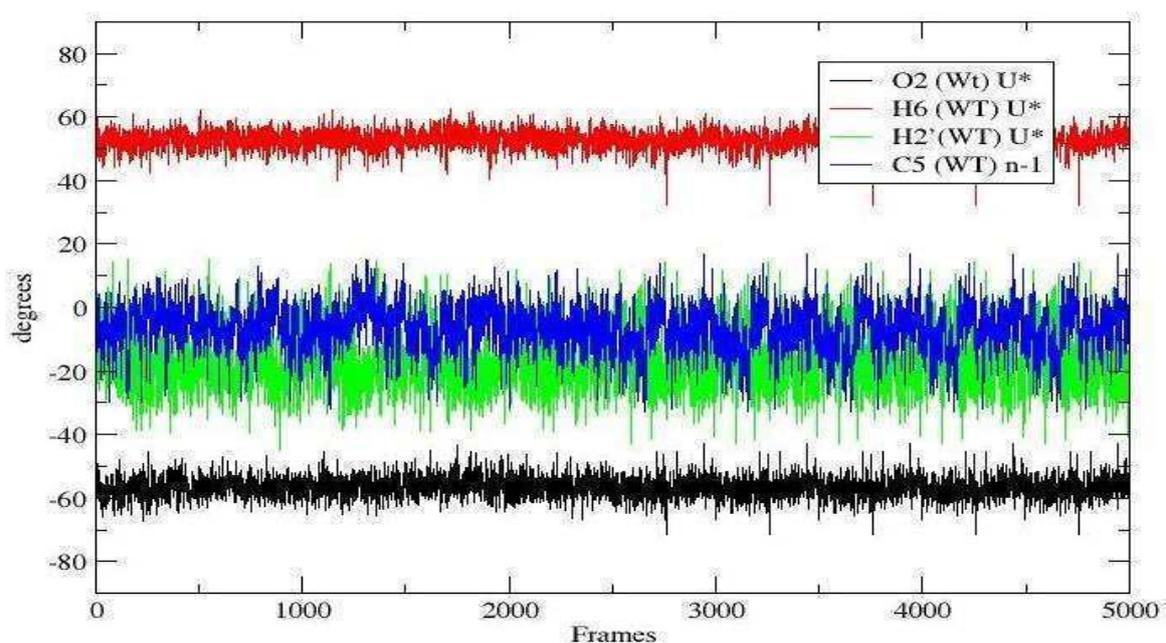
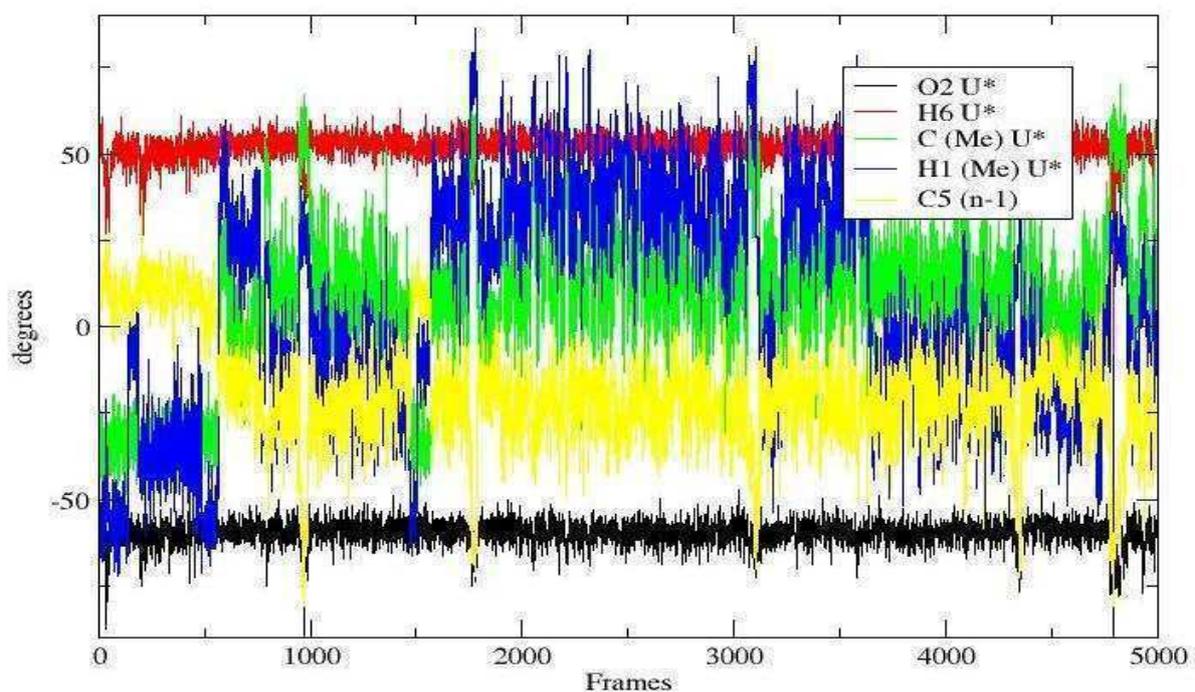
Anexo

RMSD obtenido para el Oligonucleotido con 2'-C-metiluridina

Amstrongs vs Frames



4 Analisis del Angulo dihedro utilizado para el analisis posicional del metilo



Graficos de la posición de distintos átomos en función de la posición de la base en los oligonucleótidos modificado (1) y natural (2). La línea C5 muestra la posición de la base n-1 en el oligonucleótido natural, como puede observarse esta alterada en el oligonucleótido 2CMN.

Anexo

5- Script para el análisis de los Puente H

```
rm -f ptraj.in
```

```
cat <<eof > ptraj.in
trajin ../RR_mod_4ns.tra
trajin ../RR_mod_5ns.tra
trajin ../RR_mod_6ns.tra
trajin ../RR_mod_7ns.tra
trajin ../RR_mod_8ns.tra
trajin ../RR_mod_9ns.tra
trajin ../RR_mod_10ns.tra
trajin ../RR_mod_11ns.tra
trajin ../RR_mod_12ns.tra
trajin ../RR_mod_13ns.tra
trajin ../RR_mod_14ns.tra
```

```
#puente H entre resid 17 y 8- natural
donor mask :17@O4
donor mask :8@N1
```

```
acceptor mask :17@N3 :17@H3
acceptor mask :8@N6 :8@H61
acceptor mask :8@N6 :8@H62
```

```
hbond distance 3.5 angle 140.0 print .001 series hbt
```

```
eof
```

```
ptraj ../x.top < ptraj.in > HB.out
```

```
cp HB.out H_17-8FIN.out
```

6-Output X3DNA para el oligonucleótidos con Ume

```
*****
*****
3DNA (v1.5, Nov. 2002) by Xiang-Jun Lu at Wilma K. Olson's Lab.
*****
```

1. The list of the parameters given below correspond to the 5' to 3' direction of strand I and 3' to 5' direction of strand II.

2. All angular parameters, except for the phase angle of sugar pseudo-rotation, are measured in degrees in the range of [-180, +180], and all displacements are measured in Angstrom units.

```
*****
```

File name: avgmodB.pdb

Date and time: Tue Jan 13 17:59:46 2009

Number of base-pairs: 12

Number of atoms: 763

```
*****
```

Anexo

 RMSD of the bases (---- for WC bp, + for isolated bp, x for helix change)

```

Strand I  Strand II  Helix
1 (0.035) -:...1_: [RG5]G----C[RC3]:..24_- (0.042) |
2 (0.037) -:...2_: [RA]A----U[RU]:..23_- (0.032) |
3 (0.034) -:...3_: [RA]A----U[RU]:..22_- (0.031) |
4 (0.032) -:...4_: [RA]A----U[RU]:..21_- (0.032) |
5 (0.029) -:...5_: [RA]A----U[RU]:..20_- (0.032) |
6 (0.024) -:...6_: [RG]G----C[RC]:..19_- (0.040) |
7 (0.029) -:...7_: [RA]A----U[RME]:..18_- (0.032) |
8 (0.032) -:...8_: [RA]A----U[RU]:..17_- (0.032) |
9 (0.034) -:...9_: [RA]A----U[RU]:..16_- (0.032) |
10 (0.030) -:...10_: [RG]G----C[RC]:..15_- (0.032) |
11 (0.041) -:...11_: [RA]A----U[RU]:..14_- (0.040) |
12 (0.056) -:...12_: [RA3]A----U[RU5]:..13_- (0.060) |

```

 Detailed H-bond information: atom-name pair and length [ON]

```

1 G----C [3] O6 - N4 2.86 N1 - N3 2.90 N2 - O2 2.81
2 A----U [2] N6 - O4 3.03 N1 - N3 2.90
3 A----U [2] N6 - O4 2.98 N1 - N3 2.91
4 A----U [2] N6 - O4 2.94 N1 - N3 2.95
5 A----U [2] N6 - O4 2.89 N1 - N3 2.96
6 G----C [3] O6 - N4 2.95 N1 - N3 2.93 N2 - O2 2.85
7 A----U [2] N6 - O4 3.05 N1 - N3 2.92
8 A----U [2] N6 - O4 3.03 N1 - N3 2.94
9 A----U [2] N6 - O4 2.96 N1 - N3 2.92
10 G----C [3] O6 - N4 2.91 N1 - N3 2.91 N2 - O2 2.80
11 A----U [2] N6 - O4 3.00 N1 - N3 2.89
12 A----U [2] N6 - O4 2.95 N1 - N3 2.96

```

 Overlap area in Angstrom² between polygons defined by atoms on successive bases. Polygons projected in the mean plane of the designed base-pair step.

Values in parentheses measure the overlap of base ring atoms only. Those outside parentheses include exocyclic atoms on the ring. Intra- and inter-strand overlap is designated according to the following diagram:

```

i2 3' 5' j2
 / \ |
 | |
 | |
 Strand I | | II
 | |
 | |
 | \ |
i1 5' 3' j1

```

```

step i1-i2 i1-j2 j1-i2 j1-j2 sum
1 GA/UC 4.00( 2.80) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.70( 0.00) 4.71( 2.81)
2 AA/UU 2.02( 1.87) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.79( 0.03) 2.81( 1.90)
3 AA/UU 2.02( 1.86) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.70( 0.02) 2.72( 1.87)
4 AA/UU 2.13( 1.95) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.68( 0.02) 2.80( 1.98)
5 AG/CU 2.93( 2.59) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.83( 0.00) 3.75( 2.60)
6 GA/UC 4.16( 3.12) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.11( 0.00) 4.28( 3.12)
7 AA/UU 1.13( 1.13) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.62( 0.16) 1.75( 1.30)
8 AA/UU 1.67( 1.59) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.60( 0.02) 2.28( 1.61)
9 AG/CU 1.67( 1.64) 0.00( 0.00) 0.14( 0.00) 0.41( 0.00) 2.22( 1.64)
10 GA/UC 3.54( 2.27) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.60( 0.00) 4.13( 2.27)
11 AA/UU 2.51( 2.21) 0.00( 0.00) 0.00( 0.00) 0.95( 0.04) 3.46( 2.25)

```

 Origin (Ox, Oy, Oz) and mean normal vector (Nx, Ny, Nz) of each base-pair in

Anexo

the coordinate system of the given structure

bp	Ox	Oy	Oz	Nx	Ny	Nz
1 G-C	1.01	10.27	-11.04	-0.36	-0.26	0.90
2 A-U	-1.46	9.11	-8.73	-0.37	-0.42	0.83
3 A-U	-3.80	7.15	-6.77	-0.29	-0.59	0.75
4 A-U	-5.30	4.11	-5.15	-0.12	-0.71	0.70
5 A-U	-5.43	0.62	-3.74	0.10	-0.71	0.70
6 G-C	-3.61	-2.41	-1.88	0.35	-0.62	0.71
7 A-U	-1.15	-4.28	0.10	0.28	-0.53	0.80
8 A-U	1.63	-6.13	2.21	0.32	-0.34	0.89
9 A-U	3.94	-6.38	5.05	0.22	-0.19	0.96
10 G-C	5.34	-5.47	8.47	0.04	-0.09	0.99
11 A-U	5.08	-4.29	11.92	-0.16	-0.07	0.99
12 A-U	3.84	-3.48	14.96	-0.31	-0.12	0.94

Local base-pair parameters

bp	Shear	Stretch	Stagger	Buckle	Propeller	Opening
1 G-C	-0.23	-0.18	-0.63	-20.29	-2.28	-0.66
2 A-U	0.09	-0.04	-0.48	-13.64	-10.06	4.26
3 A-U	0.06	-0.06	-0.53	-11.24	-12.42	2.82
4 A-U	0.09	-0.03	-0.62	-13.46	-13.99	0.86
5 A-U	0.18	0.01	-0.56	-15.56	-12.75	-1.66
6 G-C	-0.05	-0.03	-0.69	-25.26	-19.76	2.36
7 A-U	0.06	0.01	-0.35	-7.49	-7.94	4.36
8 A-U	0.14	-0.00	-0.49	-8.36	-11.15	3.57
9 A-U	0.09	-0.04	-0.34	-6.42	-10.45	1.32
10 G-C	-0.11	-0.13	-0.33	-9.45	-12.75	1.08
11 A-U	0.08	-0.08	-0.36	-9.60	-12.41	3.48
12 A-U	0.16	-0.09	-0.35	-1.29	-11.67	0.95

~~~~~

ave. 0.05 -0.06 -0.48 -11.84 -11.47 1.89

s.d. 0.12 0.06 0.13 6.42 4.05 1.91

\*\*\*\*\*

#### Local base-pair step parameters

| step     | Shift | Slide | Rise | Tilt  | Roll  | Twist |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 GA/UC  | 0.36  | -1.31 | 3.30 | -0.16 | 10.04 | 30.45 |
| 2 AA/UU  | -0.08 | -1.43 | 3.33 | 0.70  | 11.59 | 28.00 |
| 3 AA/UU  | -0.09 | -1.44 | 3.48 | 0.83  | 12.69 | 28.99 |
| 4 AA/UU  | -0.09 | -1.44 | 3.47 | 0.17  | 12.54 | 29.37 |
| 5 AG/CU  | 0.43  | -1.29 | 3.76 | 2.94  | 14.90 | 27.68 |
| 6 GA/UC  | 0.52  | -1.41 | 3.35 | -7.38 | 4.08  | 29.28 |
| 7 AA/UU  | -0.63 | -1.86 | 3.43 | 1.77  | 12.03 | 24.15 |
| 8 AA/UU  | -0.21 | -1.55 | 3.31 | -0.85 | 10.63 | 28.55 |
| 9 AG/CU  | -0.07 | -1.69 | 3.41 | -0.23 | 11.86 | 28.15 |
| 10 GA/UC | 0.13  | -1.44 | 3.35 | 0.66  | 11.61 | 30.10 |
| 11 AA/UU | -0.05 | -1.22 | 3.16 | 1.34  | 9.29  | 29.20 |

~~~~~

ave. 0.02 -1.46 3.40 -0.02 11.02 28.54

s.d. 0.33 0.18 0.15 2.66 2.74 1.69

Local base-pair helical parameters

step	X-disp	Y-disp	h-Rise	Incl.	Tip	h-Twist
1 GA/UC	-4.09	-0.68	2.74	18.50	0.29	32.02
2 AA/UU	-4.93	0.29	2.55	22.75	-1.38	30.26
3 AA/UU	-4.93	0.31	2.63	23.95	-1.56	31.61
4 AA/UU	-4.85	0.19	2.65	23.43	-0.31	31.88
5 AG/CU	-5.33	-0.21	2.75	28.59	-5.65	31.50
6 GA/UC	-3.49	-2.44	2.92	7.87	14.24	30.45
7 AA/UU	-6.78	1.75	2.21	26.70	-3.92	26.99
8 AA/UU	-4.94	0.24	2.59	20.66	1.65	30.44

Anexo

9 AG/CU -5.44 0.10 2.51 23.12 0.45 30.50
 10 GA/UC -4.56 -0.13 2.63 21.37 -1.21 32.22
 11 AA/UU -3.98 0.33 2.65 17.85 -2.57 30.64

~~~~~  
 ave. -4.85 -0.02 2.62 21.34 0.00 30.77  
 s.d. 0.87 1.00 0.18 5.48 5.15 1.45

\*\*\*\*\*

Structure classification:

This is a right-handed nucleic acid structure

\*\*\*\*\*

lambda: virtual angle between C1'-YN1 or C1'-RN9 glycosidic bonds and the  
 base-pair C1'-C1' line

C1'-C1': distance between C1' atoms for each base-pair

RN9-YN1: distance between RN9-YN1 atoms for each base-pair

RC8-YC6: distance between RC8-YC6 atoms for each base-pair

bp lambda(I) lambda(II) C1'-C1' RN9-YN1 RC8-YC6

1 G-C 54.2 57.4 10.4 8.8 9.6  
 2 A-U 59.6 57.9 10.3 8.8 9.8  
 3 A-U 58.5 56.8 10.4 8.9 9.8  
 4 A-U 57.5 55.3 10.6 8.9 9.9  
 5 A-U 56.8 53.5 10.7 9.0 9.9  
 6 G-C 57.6 54.3 10.5 8.9 9.7  
 7 A-U 59.3 59.4 10.4 8.9 9.9  
 8 A-U 59.2 56.7 10.5 8.9 9.9  
 9 A-U 57.9 55.9 10.5 8.9 9.9  
 10 G-C 56.2 55.6 10.6 8.9 9.8  
 11 A-U 59.2 57.0 10.3 8.8 9.8  
 12 A-U 58.1 55.5 10.4 8.8 9.8

\*\*\*\*\*

Classification of each dinucleotide step in a right-handed nucleic acid

structure: A-like; B-like; TA-like; intermediate of A and B, or other cases

step Xp Yp Zp XpH YpH ZpH Form

1 GA/UC -1.84 8.53 1.71 -5.78 7.59 4.24 A  
 2 AA/UU -2.04 8.61 1.63 -6.79 7.37 4.75 A  
 3 AA/UU -1.92 8.64 1.62 -6.65 7.31 4.89 A  
 4 AA/UU -1.71 8.69 1.65 -6.37 7.39 4.87 A  
 5 AG/CU -1.75 8.81 1.44 -6.79 7.13 5.37  
 6 GA/UC -2.29 8.78 1.36 -5.71 8.53 2.35  
 7 AA/UU -2.35 8.70 1.87 -8.92 6.99 5.52 A  
 8 AA/UU -1.94 8.61 1.84 -6.71 7.46 4.67 A  
 9 AG/CU -1.82 8.56 1.98 -7.07 7.16 5.09 A  
 10 GA/UC -1.90 8.57 1.81 -6.27 7.38 4.72 A  
 11 AA/UU -2.03 8.63 1.51 -5.85 7.80 4.01 A

\*\*\*\*\*

Minor and major groove widths: direct P-P distances and refined P-P distances  
 which take into account the directions of the sugar-phosphate backbones

(Subtract 5.8 Angstrom from the values to take account of the vdw radii  
 of the phosphate groups, and for comparison with FreeHelix and Curves.)

Ref: M. A. El Hassan and C. R. Calladine (1998). ``Two Distinct Modes of  
 Protein-induced Bending in ADN." J. Mol. Biol., v282, pp331-343.

Minor Groove Major Groove  
 P-P Refined P-P Refined

1 GA/UC --- --- --- ---  
 2 AA/UU --- --- --- ---

## Anexo

```

3 AA/UU 17.5 --- 18.3 ---
4 AA/UU 17.5 15.9 18.8 17.2
5 AG/CU 17.6 16.0 20.0 18.5
6 GA/UC 17.6 15.8 20.5 18.8
7 AA/UU 17.5 15.7 20.4 18.7
8 AA/UU 17.4 15.7 19.8 18.0
9 AG/CU 17.3 --- 18.9 ---
10 GA/UC --- --- --- ---
11 AA/UU --- --- --- ---

```

\*\*\*\*\*

Global linear helical axis defined by equivalent C1' and RN9/YN1 atom pairs

Deviation from regular linear helix: 2.74(0.17)

Helix: -0.021 -0.414 0.910

HETATM 9998 XS X X 999 0.317 6.489 -13.816

HETATM 9999 XE X X 999 -0.310 -6.039 13.754

Average and standard deviation of helix radius:

P: 10.26(0.46), O4': 9.85(0.51), C1': 9.22(0.51)

Global parameters based on C1'-C1' vectors:

disp.: displacement of the middle C1'-C1' point from the helix

angle: inclination between C1'-C1' vector and helix (subtracted from 90)

twist: helical twist angle between consecutive C1'-C1' vectors

rise: helical rise by projection of the vector connecting consecutive

C1'-C1' middle points onto the helical axis

```

bp disp. angle twist rise
1 G-C 7.00 17.99 30.33 2.89
2 A-U 7.42 15.38 30.10 2.81
3 A-U 7.90 14.29 30.88 2.75
4 A-U 8.14 14.31 31.08 2.69
5 A-U 8.07 15.87 31.28 2.65
6 G-C 7.48 17.84 31.07 2.73
7 A-U 6.86 16.88 25.04 2.89
8 A-U 7.78 14.07 30.64 2.75
9 A-U 8.20 14.13 30.89 2.67
10 G-C 8.33 14.44 30.88 2.68
11 A-U 8.06 15.90 31.25 2.79
12 A-U 7.49 19.20 --- ---

```

\*\*\*\*\*

Main chain and chi torsion angles:

Note: alpha: O3'(i-1)-P-O5'-C5'

beta: P-O5'-C5'-C4'

gamma: O5'-C5'-C4'-C3'

delta: C5'-C4'-C3'-O3'

epsilon: C4'-C3'-O3'-P(i+1)

zeta: C3'-O3'-P(i+1)-O5'(i+1)

chi for pyrimidines(Y): O4'-C1'-N1-C2

chi for purines(R): O4'-C1'-N9-C4

Strand I

```

base alpha beta gamma delta epsilon zeta chi
1 G --- --- 59.7 80.5 -154.2 -65.7 -168.9
2 A -75.7 175.2 62.1 78.5 -158.8 -68.9 -160.8
3 A -75.8 173.6 63.6 78.0 -159.3 -68.5 -159.5
4 A -76.2 174.4 63.3 77.3 -158.5 -67.7 -160.2
5 A -76.4 175.1 62.5 77.0 -156.4 -67.3 -160.7
6 G -74.8 171.6 64.5 77.4 -158.5 -65.8 -163.5
7 A -77.5 174.2 67.9 77.2 -160.1 -71.3 -162.3

```

## Anexo

8 A -75.8 175.4 63.4 77.0 -159.6 -70.1 -160.3  
 9 A -77.0 174.5 63.1 77.4 -159.2 -69.0 -160.5  
 10 G -76.1 174.8 63.5 77.7 -157.5 -67.8 -162.7  
 11 A -75.2 176.2 63.1 79.3 -157.0 -70.0 -159.0  
 12 A -75.5 176.9 63.5 92.9 --- --- -145.4

## Strand II

base alpha beta gamma delta epsilon zeta chi  
 1 C -80.2 178.2 62.7 94.9 --- --- -138.2  
 2 U -79.4 174.1 63.9 80.7 -160.4 -73.2 -147.7  
 3 U -78.0 173.8 63.5 80.2 -157.8 -69.5 -149.7  
 4 U -78.4 174.1 64.0 79.7 -157.2 -68.9 -149.8  
 5 U -82.0 174.0 64.7 79.4 -159.8 -68.0 -148.9  
 6 C -89.6 172.0 73.1 79.6 -165.8 -69.9 -134.3  
 7 U -74.3 170.8 68.8 89.3 -163.0 -86.2 -148.2  
 8 U -77.4 173.7 64.3 80.1 -152.2 -64.8 -152.3  
 9 U -78.4 174.4 64.2 78.2 -159.4 -68.0 -155.1  
 10 C -78.9 172.4 64.3 79.1 -160.3 -68.1 -152.6  
 11 U -80.4 173.5 63.7 79.7 -160.6 -69.8 -149.4  
 12 U --- --- 64.4 78.1 -159.1 -69.1 -154.2

\*\*\*\*\*

## Sugar conformational parameters:

Note: v0: C4'-O4'-C1'-C2'

v1: O4'-C1'-C2'-C3'

v2: C1'-C2'-C3'-C4'

v3: C2'-C3'-C4'-O4'

v4: C3'-C4'-O4'-C1'

tm: amplitude of pseudorotation of the sugar ring

P: phase angle of pseudorotation of the sugar ring

## Strand I

base v0 v1 v2 v3 v4 tm P Puckering  
 1 G 6.3 -28.4 37.6 -35.7 18.7 38.1 9.7 C3'-endo  
 2 A 3.9 -27.3 38.1 -37.6 21.5 39.2 13.4 C3'-endo  
 3 A 2.3 -26.3 38.1 -38.5 23.0 39.5 15.7 C3'-endo  
 4 A 2.4 -26.4 38.3 -38.5 23.0 39.7 15.5 C3'-endo  
 5 A 2.5 -26.8 38.7 -39.0 23.3 40.2 15.5 C3'-endo  
 6 G 3.1 -27.2 38.7 -38.6 22.7 40.0 14.6 C3'-endo  
 7 A 1.7 -25.4 37.3 -37.9 23.1 38.9 16.5 C3'-endo  
 8 A 0.5 -24.6 37.2 -38.5 24.2 39.2 18.2 C3'-endo  
 9 A 2.7 -26.4 38.1 -38.3 22.7 39.5 15.2 C3'-endo  
 10 G 3.0 -26.7 38.4 -38.3 22.5 39.7 14.7 C3'-endo  
 11 A 2.8 -25.5 36.7 -36.6 21.6 37.9 14.8 C3'-endo  
 12 A -3.9 -12.6 22.6 -25.0 17.8 25.2 26.1 C3'-endo

## Strand II

base v0 v1 v2 v3 v4 tm P Puckering  
 1 C -8.1 -7.2 18.3 -23.4 19.3 23.2 37.8 C4'-exo  
 2 U -5.6 -16.9 30.9 -35.5 26.1 35.0 27.8 C3'-endo  
 3 U -3.7 -19.4 33.0 -36.6 25.6 36.3 24.6 C3'-endo  
 4 U -2.7 -20.4 33.7 -36.6 25.1 36.6 23.0 C3'-endo  
 5 U -2.6 -20.8 34.2 -37.0 25.3 37.1 22.8 C3'-endo  
 6 C -8.5 -15.4 31.1 -37.1 29.4 36.6 31.9 C3'-endo  
 7 U -23.4 6.0 12.0 -26.4 31.8 30.9 67.2 C4'-exo  
 8 U -2.6 -21.0 34.2 -37.1 25.3 37.1 22.7 C3'-endo  
 9 U -1.7 -22.3 35.5 -38.0 25.3 38.2 21.3 C3'-endo  
 10 C -2.8 -21.3 34.8 -37.9 26.0 37.8 23.0 C3'-endo  
 11 U -3.3 -20.3 33.9 -37.3 25.9 37.1 23.9 C3'-endo  
 12 U -5.8 -18.1 32.4 -37.6 27.6 36.7 28.0 C3'-endo

## Anexo

\*\*\*\*\*

Same strand P--P and C1'--C1' virtual bond distances

| Strand I |      |          | Strand II |        |          |     |
|----------|------|----------|-----------|--------|----------|-----|
| base     | P--P | C1'--C1' | base      | P--P   | C1'--C1' |     |
| 1        | G/A  | ---      | 5.5       | 1 C/U  | 5.9 5.6  |     |
| 2        | A/A  | 5.8      | 5.5       | 2 U/U  | 5.9 5.5  |     |
| 3        | A/A  | 5.9      | 5.5       | 3 U/U  | 5.9 5.5  |     |
| 4        | A/A  | 5.9      | 5.5       | 4 U/U  | 6.0 5.5  |     |
| 5        | A/G  | 5.8      | 5.4       | 5 U/C  | 6.3 5.4  |     |
| 6        | G/A  | 6.0      | 5.5       | 6 C/U  | 6.3 5.9  |     |
| 7        | A/A  | 6.0      | 5.7       | 7 U/U  | 5.9 5.5  |     |
| 8        | A/A  | 5.9      | 5.6       | 8 U/U  | 5.9 5.5  |     |
| 9        | A/G  | 5.9      | 5.5       | 9 U/C  | 6.0 5.5  |     |
| 10       | G/A  | 5.9      | 5.5       | 10 C/U | 5.9 5.4  |     |
| 11       | A/A  | 5.8      | 5.5       | 11 U/U | ---      | 5.4 |

\*\*\*\*\*

Helix radius (radial displacement of P, O4', and C1' atoms in local helix frame of each dimer)

| Strand I |       |      | Strand II |      |      |          |
|----------|-------|------|-----------|------|------|----------|
| step     | P     | O4'  | C1'       | P    | O4'  | C1'      |
| 1        | GA/UC | 9.1  | 8.7       | 8.1  | 10.0 | 9.4 8.6  |
| 2        | AA/UU | 10.2 | 10.0      | 9.3  | 9.8  | 9.5 8.8  |
| 3        | AA/UU | 10.2 | 9.9       | 9.3  | 9.6  | 9.4 8.8  |
| 4        | AA/UU | 10.0 | 9.7       | 9.1  | 9.6  | 9.4 8.8  |
| 5        | AG/CU | 10.1 | 9.8       | 9.3  | 9.6  | 9.7 9.1  |
| 6        | GA/UC | 7.7  | 7.4       | 6.8  | 12.8 | 10.8 9.9 |
| 7        | AA/UU | 12.3 | 12.3      | 11.6 | 10.6 | 10.3 9.9 |
| 8        | AA/UU | 10.0 | 9.9       | 9.2  | 10.0 | 9.6 9.0  |
| 9        | AG/CU | 10.0 | 10.1      | 9.5  | 10.1 | 9.9 9.3  |
| 10       | GA/UC | 9.6  | 9.4       | 8.7  | 9.8  | 9.4 8.7  |
| 11       | AA/UU | 9.9  | 9.2       | 8.5  | 9.6  | 8.8 8.1  |

\*\*\*\*\*

Position (Px, Py, Pz) and local helical axis vector (Hx, Hy, Hz)  
for each dinucleotide step

| bp | Px    | Py    | Pz    | Hx     | Hy    | Hz         |
|----|-------|-------|-------|--------|-------|------------|
| 1  | GA/UC | 0.10  | 6.01  | -11.39 | -0.07 | -0.38 0.92 |
| 2  | AA/UU | -0.73 | 4.11  | -9.50  | 0.01  | -0.40 0.92 |
| 3  | AA/UU | -0.70 | 3.09  | -7.14  | 0.03  | -0.39 0.92 |
| 4  | AA/UU | -0.71 | 2.15  | -4.56  | 0.00  | -0.39 0.92 |
| 5  | AG/CU | -0.30 | 1.97  | -2.26  | 0.07  | -0.28 0.96 |
| 6  | GA/UC | -2.52 | -0.44 | 2.01   | 0.08  | -0.70 0.71 |
| 7  | AA/UU | 2.08  | 0.74  | 3.93   | -0.15 | -0.38 0.91 |
| 8  | AA/UU | 0.86  | -2.33 | 5.54   | -0.03 | -0.45 0.89 |
| 9  | AG/CU | 0.28  | -3.20 | 7.82   | -0.07 | -0.46 0.89 |
| 10 | GA/UC | 0.85  | -4.75 | 9.83   | -0.09 | -0.42 0.90 |
| 11 | AA/UU | 1.02  | -5.26 | 12.40  | -0.13 | -0.37 0.92 |