

CAPÍTOL III- RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. FOOTPRINTING

S'han realitzat gels de footprinting per a tots els fàrmacs descrits anteriorment al capítol de Materials i Mètodes exceptuant l'acridina Acr(GR). Els fragments de DNA utilitzats són MS1 i MS2 també descrits prèviament. Per a cada fàrmac s'ha hagut d'optimitzar el rang de concentracions a utilitzar ja que l'aparició d'un footprint depèn de la concentració de fàrmac.

Per estudiar l'efecte del fàrmac s'utilitza un control (el fragment de DNA sense fàrmac) i per analitzar a on apareix el footprint cal un marcador. En aquest, les bandes que es veuen en el gel són les corresponents a les bases G i A, i com que es coneix la seqüència de DNA, podem localitzar en quines bases es troba el footprint. A més, també es pot fer una anàlisi quantitativa del footprint representant la intensitat de banda relativa en front de la concentració de fàrmac, seguint l'equació ja descrita anteriorment: $I/I_0 = C_{50}/(C + C_{50})$.

La majoria de fàrmacs no han donat footprints, és a dir, no són específics per una determinada seqüència de DNA tot i que en general demostren una clara afinitat inespecífica pel DNA. Això es veu perquè a no molt elevades concentracions de fàrmac, l'efecte de l'enzim DNAasa I s'inhibeix totalment, l'enzim no pot tallar els fragments de DNA degut a que el fàrmac hi està unit i per tant, en els carrils del gel que contenen fàrmac no es detecta cap banda.

Algun dels fàrmacs sí que han donat footprints i aquests s'han estudiat més acuradament. Aquests fàrmacs són els següents: **BSU-9022** (derivat d'antraquinona), **Acr(RRRR)**, **AcrK(R)₄** i **AcrK(K)₄** (derivats d'acridina).

A continuació es presenten els resultats obtinguts per aquests fàrmacs:

1.1 BSU-9022

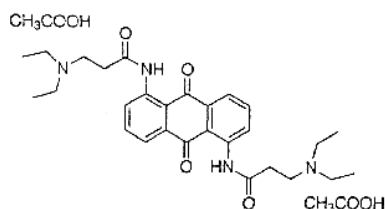


Fig. III-1.1. Estructura química del fàrmac BSU-9022.

Després de fer varies proves, el rang de concentracions de fàrmac en que s'ha treballat és de 15 a 0.1 μ M.

En els gels es detecten footprints tant en el fragment MS1 com en el MS2 (Fig. III-1.3) però només en el primer cas s'ha obtingut un gel prou bo com per fer una anàlisi quantitativa d'aquests.

Anàlisi dels footprints del fragment MS1:

Els footprints trobats en el fragment MS1 amb aquest fàrmac es localitzen a les següents regions de la seqüència:

```

5'-GGATCCATATGCGGCAATACACATGGCAGATTTCCAAGTGCCTAGTCGTAGCGCGA
                                     1
TCAAGGTTAAGCTCCCGTTCTATCCTGGTATAGCAATTAGGGCGTGAAGAGTTATGTA
                                     2   3   4
AAGTACGTCCGGTGGGGTCTGTTTTGTCATCTCAGCCTCGAATGCGGATCC
                                     5
    
```

Representant I/I_0 (intensitat de banda relativa) en front de la concentració de fàrmac per a cada footprint, s'obtenen les gràfiques que es mostren a la figura III-1.2 d'on es troba el valor de C_{50} i el seu error.

A la taula III-1.1 es resumeixen els resultats obtinguts amb aquest fàrmac; es mostra la seqüència de cada footprint i els els seus valors de C_{50} amb els corresponents errors.

Footprint	Seqüència	C ₅₀ (µM)	Error en C ₅₀ (µM)
1	TAGT/ACTA	7.27	±1.71
2	GGTA/TACC	4.04	±0.72
3	TAGC/GCTA	4.37	±1.11
4	TAGG/CCTA	8.89	±3.14
5	CGT/ACG	4.71	±0.99

Taula III-1.1. *Anàlisi dels footprints presents en el fragment MS1 i el fàrmac BSU-9022.*

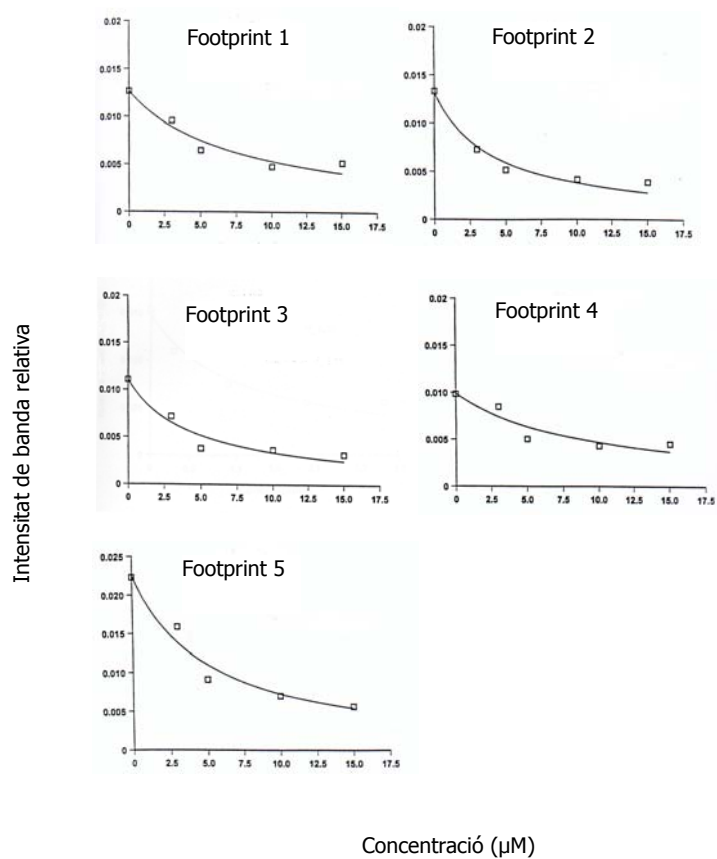


Fig. III-1.2. Representació gràfica dels footprints obtinguts amb el fàrmac BSU-9022 i el fragment MS1. Es representa la intensitat de banda relativa en front de la concentració de fàrmac.

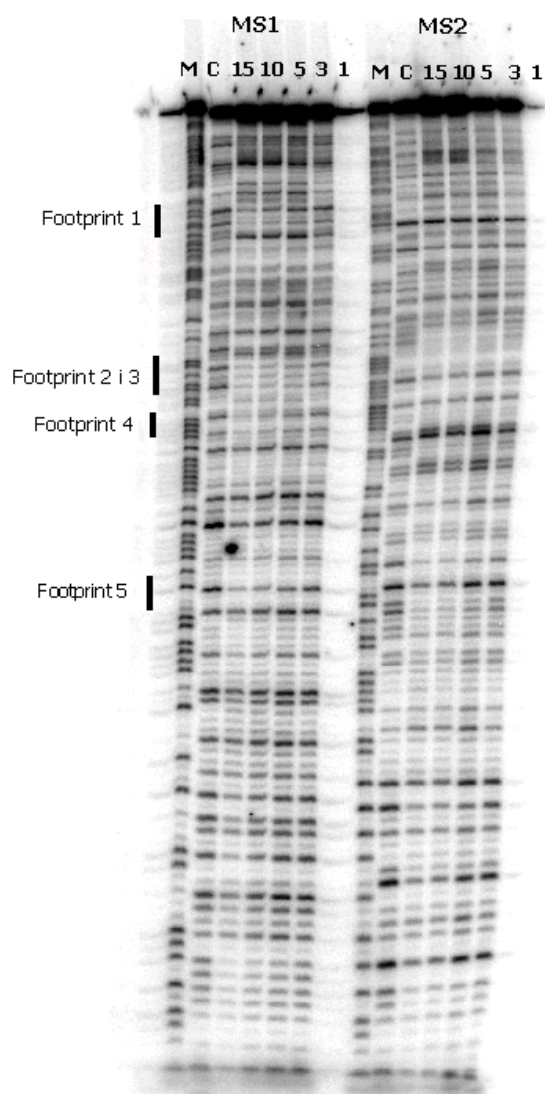


Fig. III-1.3. Gel de footprinting del fàrmac BSU-9022 amb els dos fragments MS1 (esquerra) i MS2 (dreta). Cada fragment té el marcador (M), un control (C) en absència de fàrmac i cinc carrils amb fàrmac a diferents concentracions que es mostren a la part posterior de cada carril (μM). Pel fragment MS1 es mostren els footprints obtinguts.

1.2 Acr(RRRR)

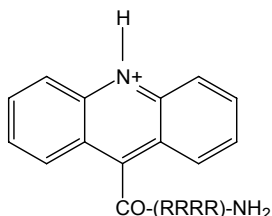


Fig. III-1.4. Estructura química del fàrmac Acr(RRRR).

En aquest cas, el rang de concentracions de fàrmac estudiat és de 10 a 0.1 μM , però a concentracions superiors a 3 μM , l'efecte de l'enzim queda totalment inhibit. Per tant, s'ha treballat més detalladament amb concentracions inferiors a 3 μM , a on sí que s'han trobat footprints. Un altre cop només s'han pogut detectar footprints d'una manera fiable amb el fragment MS1.

Anàlisi dels footprints del fragment MS1:

Els footprints trobats en el fragment MS1 amb aquest fàrmac es localitzen a les següents regions de la seqüència:

```

5'-GGATCCATATGCGGCAATACACATGGCAGATTTCCAAGTGCCTAGTCGTAGCGCGA
TCAAGGTTAAGCTCCCGTTCTATCCTGGTATAGCAATTAGGGCGTGAAGAGTTATGTA
AAGTACGTCCGGTGGGGTCTGTTTTGTCATCTCAGCCTCGAATGCGGATCC

```

1 2 3
4

Analitzant quantitativament el gel que es mostra a la figura III-1.6, s'obtenen les gràfiques per a cada footprint presents en el fragment MS1 (Fig. III-1.5) i es resumeixen els resultats a la taula III-1.2:

Footprint	Seqüència	C ₅₀ (μM)	Error en C ₅₀ (μM)
1	TAGC/GCTA	2.79	±0.79
2	TTAG/CTAA	1.27	±0.51
3	TGT/ACA	1.33	±0.25
4	AATG/CATT	1.07	±0.37

Taula III-1.2. Anàlisi dels footprints presents en el fragment MS1 i el fàrmac Acr(RRRR).

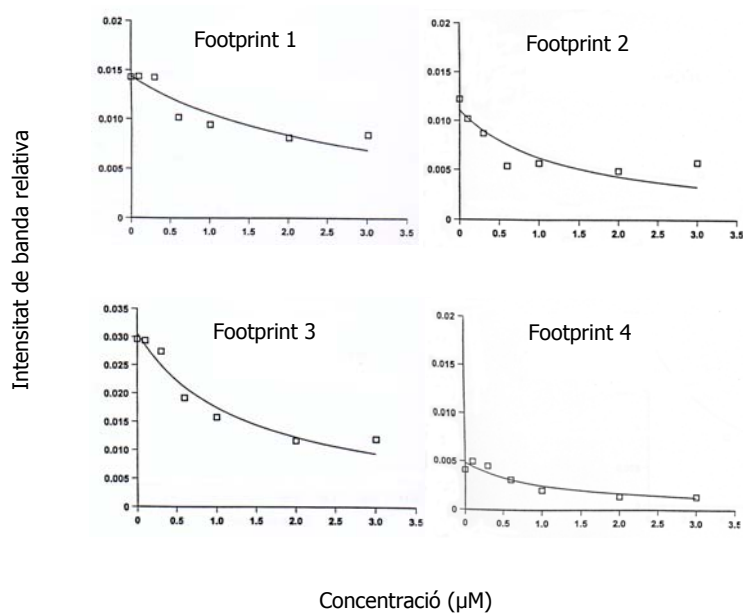


Fig. III-1.5. Representació gràfica dels footprints obtinguts amb el fàrmac Acr(RRRR) i el fragment MS1. Es representa la intensitat de banda relativa en front de la concentració de fàrmac.

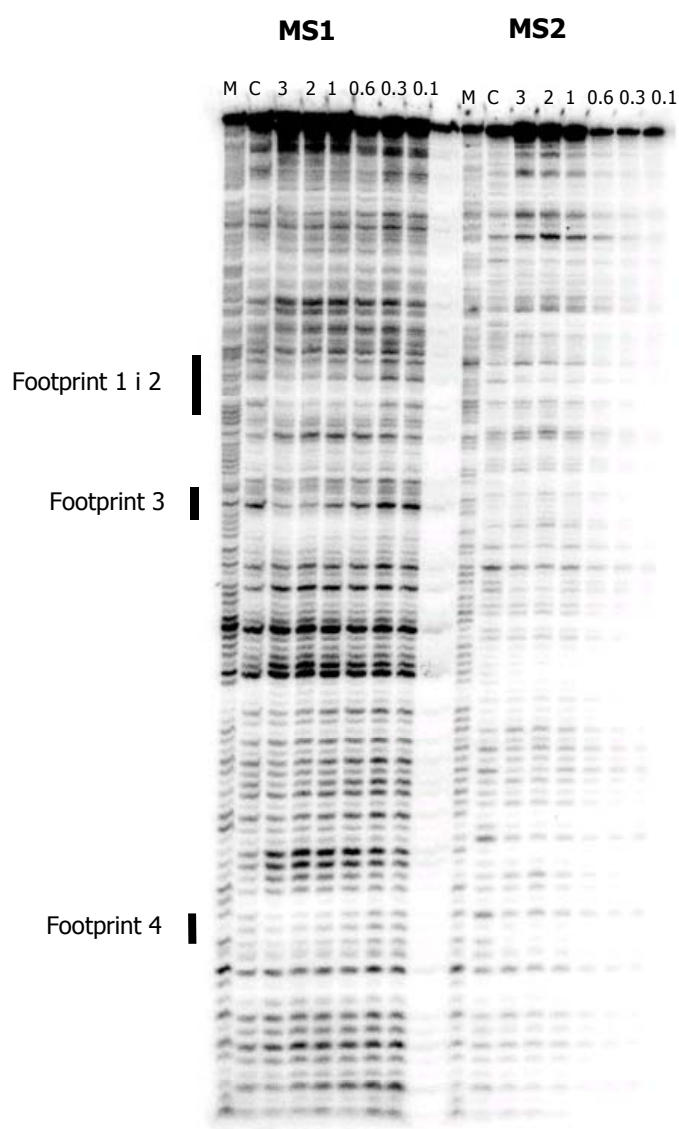


Fig. III-1.6 Gel de footprinting del fàrmac Acr(RRRR) amb els dos fragments MS1 (esquerra) i MS2 (dreta). Cada fragment té el marcador (M), un control (C) en absència de fàrmac i sis carrils amb fàrmac a diferents concentracions que es mostren a la part posterior de cada carril (μM). Pel fragment MS1 es mostren els footprints obtinguts.

1.3 AcrK(R)₄

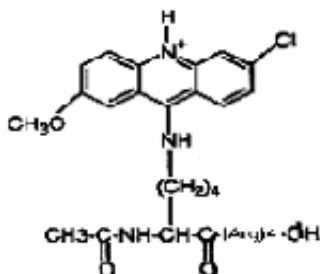


Fig. III-1.7. Estructura química del fàrmac AcrK(R)₄.

Com en el fàrmac anterior, s'ha hagut de treballar amb concentracions per sota de 3 μM de fàrmac. Amb aquest fàrmac sí que s'han pogut estudiar els footprints dels dos fragments MS1 i MS2. A la figura III-1.10 es mostra el gel obtingut a partir del qual s'han analitzat els footprints.

Anàlisi dels footprints del fragment MS1:

Els footprints trobats en el fragment MS1 amb aquest fàrmac es localitzen a les següents regions de la seqüència:

```

5'-GGATCCATATGCGGCAATACACATGGCAGATTTCCAAGTGCCTAGTCGTAGCGCGA
TCAAGGTTAAGCTCCCGTTCTATCCTGGTATAGCAATTAGGGCGTGAAGAGTTATGTA
                                1 i 2
AAGTAGTCCGGTGGGGTCTGTTTTGTCATCTCAGCCTCGAATGCGGATCC
  
```

Amb aquest fragment s'observen dos footprints molt propers les gràfiques dels quals es mostren a la figura III-1.8.

A la taula III-1.3 es resumeixen els resultats obtinguts:

Footprint	Seqüència	C50 (μM)	Error en C50 (μM)
1 i 2	GGTATAGC/GCTATACC	1.20 i 3.15	±0.25 i ±1.82

Taula III-1.3. Anàlisi dels footprints presents en el fragment MS1 i el fàrmac AcrK(R)₄.

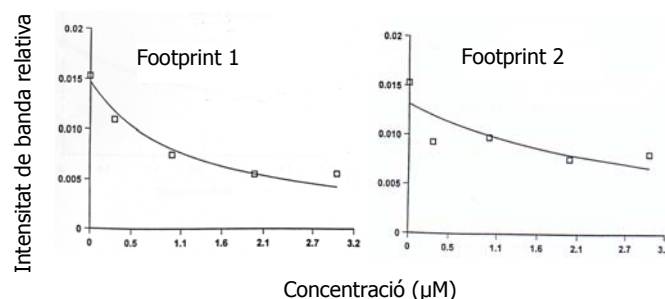


Fig. III-1.8. Representació gràfica dels footprints obtinguts amb el fàrmac AcrK(R)₄ i el fragment MS1. Es representa la intensitat de banda relativa en front de la concentració de fàrmac.

Anàlisi dels footprints del fragment MS2:

Els footprints trobats en el fragment MS2 amb aquest fàrmac es localitzen a les següents regions de la seqüència:

```

5'-GGATCCGCATTCGAGGCTGAGATGACAAACCAGACCCCACCGGACGTA CTTTACATA
ACTCTT CACGCC CTAATTG CTATACCAGGATAGAACGGGAGCTTAACCTTGATCGCGC
    1 i 2              3 i 4
TACGACTAGTGCA GTTGGAAATCGGCCATGTGTATTGCCGCATATGGATCC
    5           6 i 7
    
```

Els footprints número 1 i 2 d'aquest fragment no s'han pogut analitzar quantitativament però es mostra la seva localització a la taula III-1.4. Les gràfiques dels altres footprints que sí que s'han analitzat es mostren a la figura III-1.9.

Footprint	Seqüència	C ₅₀ (μM)	Error en C ₅₀ (μM)
1 i 2	CACGCC/GGCGTG	/	/
3 i 4	CTATAC/GTATAG	2.41 i 1.84	±0.49 i ±0.46
5	CGA/TCG	4.38	±1.26
6 i 7	AGTGC/GCACT	2.31 i 3.10	±0.60 i ±0.57

Taula III-1.4. Anàlisi dels footprints presents en el fragment MS2 i el fàrmac AcrK(R)₄.

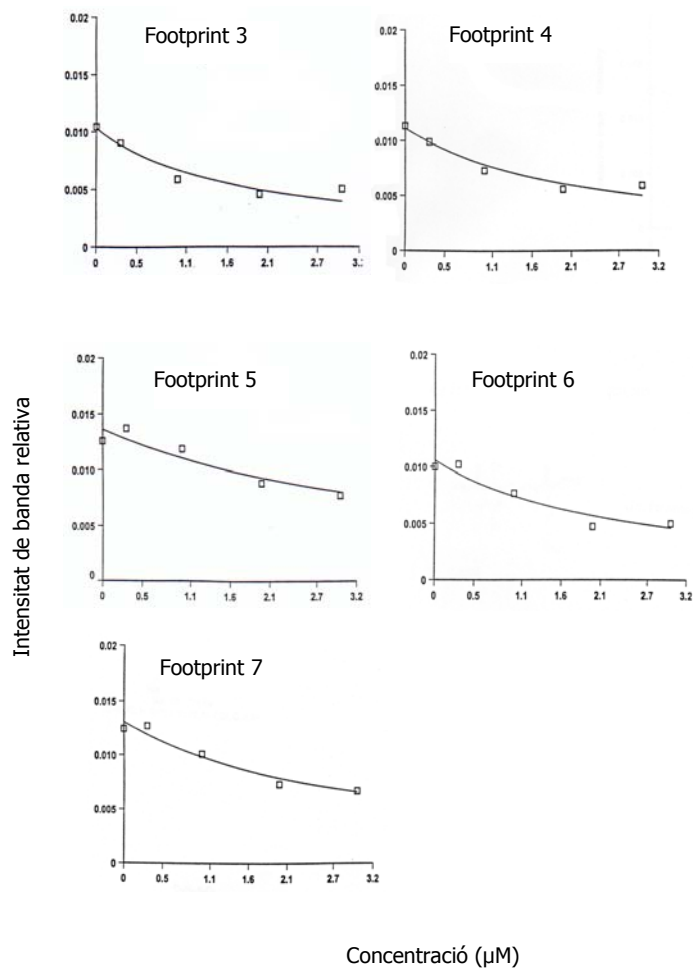


Fig. III-1.9. Representació gràfica dels footprints 3-7 obtinguts amb el fàrmac AcrK(R)₄ i el fragment MS2. Es representa la intensitat de banda relativa en front de la concentració de fàrmac.

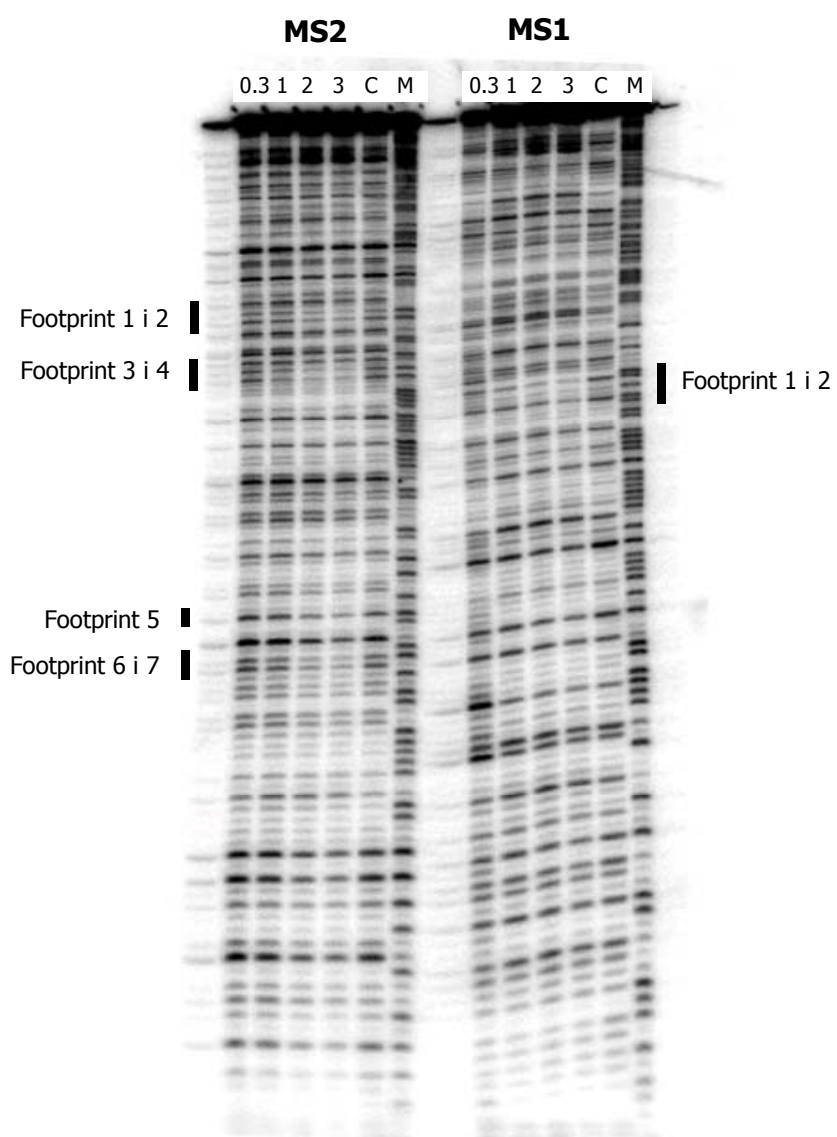


Fig. III-1.10. Gel de footprinting del fàrmac Acrk(R)₄ amb els dos fragments MS1 (dreta) i MS2 (esquerra). Cada fragment té el marcador (M), un control (C) en absència de fàrmac i quatre carrils amb fàrmac a diferents concentracions que es mostren a la part posterior de cada carril (μM). Es mostren els footprints obtinguts amb els dos fragments.

1.4 AcrK(K)₄

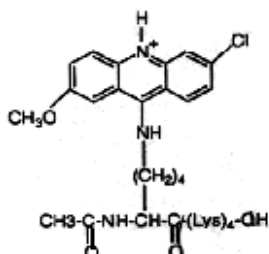


Fig. III-1.11. Estructura química del fàrmac AcrK(K)₄.

Aquest fàrmac també sembla que dóna footprints però no s'ha obtingut un gel suficientment bo com per ser analitzat. Qualitativament es pot dir que s'obtenen footprints en les mateixes regions que amb el fàrmac AcrK(R)₄.

1.5 DISCUSSIÓ

Com s'ha dit prèviament, la majoria dels fàrmacs que s'han analitzat no han presentat footprints en el rang de concentracions provat i amb els fragments utilitzats. Només en quatre d'ells s'ha pogut detectar footprints. Aquests són un derivat de l'antraquinona i tres derivats de l'acridina.

Si s'analitzen les seqüències de bases en que apareixen els footprints per a cada fàrmac, en general, no es troba una repetitivitat. És a dir, els fàrmacs no s'intercalen sempre entre les mateixes bases. Només en el cas de l'acridina Acr(RRRR) sembla que té tendència a interaccionar en zones riques en A i T. Aquest fàrmac és el primer intercalant que ha estat cristal·litzat en un pas AA/TT en la seqüència d(CGCGAATTCGCG) (Malinina *et al.*, 2002). Els estudis de footprinting comproven que aquesta intercalació no va ser aleatòria, sinó que el fàrmac té una preferència per aquestes bases.

2. FLUORESCÈNCIA

Aquests assajos tenen com a objectiu estudiar l'estabilització de la formació de dúplex d'uns oligonucleòtids determinats gràcies a la seva interacció amb un fàrmac. Els fàrmacs utilitzats són els mateixos que els analitzats per footprinting i descrits en el capítol de Materials i Mètodes. Els oligos utilitzats (descrits també prèviament i anomenats oligo 1 i oligo 2) contenen un donador i un acceptor de fluorescència i són susceptibles a la formació de dúplex. Els dos oligos presenten unes diferències considerables en quant a la seva seqüència: l'oligo 1 està format bàsicament per les bases G i A alternades mentre que l'oligo 2 conté una llarga seqüència d'adenines. L'experiment permet trobar la temperatura de fusió dels oligos amb i sense fàrmac a partir de mesures de fluorescència i determinar així la seva estabilització.

El primer assaig va ser fer un mostreig de tots els fàrmacs a dues concentracions diferents i amb els dos oligonucleòtids. D'aquí es troba la temperatura de fusió de l'oligo en unir-se al fàrmac i es compara amb la de l'oligo sol. Els resultats es mostren a la taula III-2.1.

Amb aquests resultats es veu clarament quins dels fàrmacs estabilitzen d'una manera considerable tant l'oligo 1 com l'oligo 2, tot i sent seqüències de característiques diferents. Aquests són tres derivats de l'acridina: AcrK(R)₄, AcrK(K)₄ i Acr(RRRR). En els tres casos (i per als dos oligos), en utilitzar una concentració de fàrmac de 5 µM la temperatura de fusió (T_f) augmenta molt per tant, s'estabilitza la formació del dúplex.

Per aquests tres fàrmacs que estabilitzen més els oligos s'ha estudiat aquesta estabilització en funció de la concentració de fàrmac. Així, s'han fet mesures de les temperatures de fusió a un rang de concentració de fàrmac entre 0.5 i 10 µM (veure taules III-2.2, III-2.3 i III-2.4 i Fig. III-2.1).

Dels resultats de fluorescència podem concloure que hi ha tres fàrmacs que estabilitzen especialment els dúplex utilitzats. Tots els fàrmacs són anells aromàtics d'acridina i d'antraquinona que tenen unitats diferents substituents. La diferència dels tres fàrmacs que més estabilitzen els oligos respecte els altres està en els substituents. Aquests tenen més aminoàcids units i per tant més càrregues

positives. Així doncs, l'estabilització del dúplex no és degut a l'anell aromàtic que és el causant de la intercalació sinó que depèn d'interaccions electrostàtiques que es poden produir entre els fosfats dels oligos i els aminoàcids dels fàrmacs.

En quant a la concentració de fàrmac es veu clarament com en augmentar, la temperatura de fusió també augmenta. Per a tots els fàrmacs i pels dos oligos, el canvi més important en la temperatura de fusió que es pot detectar es dona entre 3 i 4 μM de fàrmac.

Fàrmac	Conc. de fàrmac (μM)	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo1	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo2
/	/	67.73	62.65
AQK	1	68.52	62.55
	5	71.81	65.64
BSU-1073	1	68.22	62.15
	5	68.22	62.55
BSU-9010	1	67.73	61.95
	5	68.92	63.64
BSU-9022	1	68.22	62.45
	5	68.22	64.24
BSU-9042	1	68.22	62.55
	5	68.22	63.94
Proflavina	1	69.72	64.64
	5	70.02	64.64
AcrK(R) ₄	1	68.52	63.74
	5	>90	>90
AcrK(K) ₄	1	67.92	62.75
	5	>90	>90
Acr(RRRR)	1	67.92	62.45
	5	>90	>90
Acr(RSR)	1	68.62	62.45
	5	70.91	66.13
Acr(RGR)	1	68.62	63.35
	5	71.21	66.13

Taula III-2.1. *Temperatures de fusió (Tf) dels dos oligos sols i units amb fàrmac. Degut a les limitacions de l'aparell que s'utilitza no es poden mesurar temperatures majors de 95°C.*

Conc. fàrmac (μM)	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 1	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 2
0	68.82	62.15
0.5	68.22	62.75
1	68.82	62.85
2	70.31	66.63
3	70.89	73.4-77.22
4	>90	>90
5	>90	>90
10	>90	>90

Taula III-2.2. *Temperatures de fusió dels dos oligos a diferents concentracions del fàrmac AcrK(R)₄.*

Conc. fàrmac (μM)	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 1	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 2
0	68.82	62.15
0.5	68.22	62.85
1	68.92	63.15
2	70.02	67.33
3	76.11-80.63	73.2-76.92
4	>90	>90
5	>90	>90
10	>90	>90

Taula III-2.3. *Temperatures de fusió dels dos oligos a diferents concentracions del fàrmac AcrK(K)₄.*

Conc. fàrmac (μM)	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 1	Tf ($^{\circ}\text{C}$) oligo 2
0	68.82	62.15
0.5	68.62	62.45
1	68.62	62.75
2	72.50	67.03
3	76.92	82.14
4	>90	88.53
5	>90	>90
10	>90	>90

Taula III-2.4. *Temperatures de fusió dels dos oligos a diferents concentracions del fàrmac Acr(RRRR).*

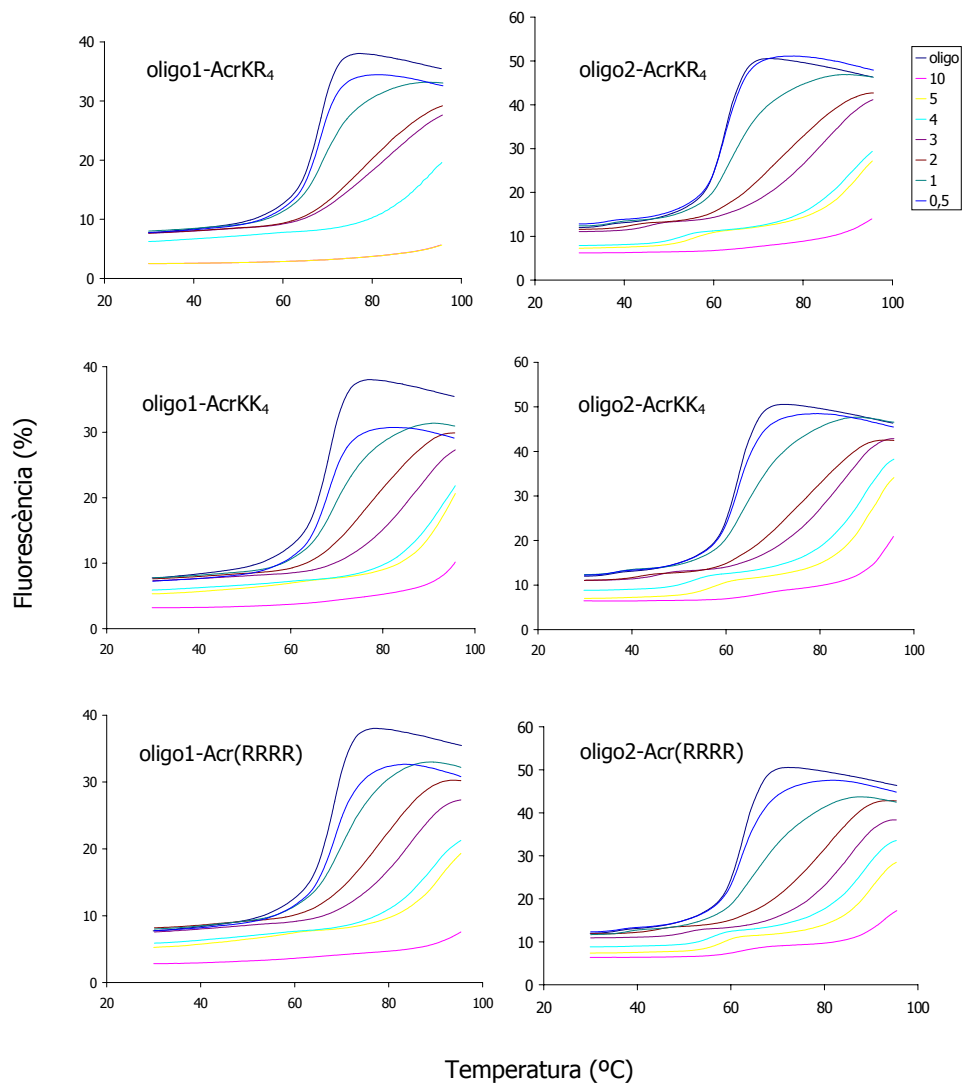


Fig. III-2.1. Corbes de fusió dels oligos 1 i 2 amb diferents fàrmacs. Es representa la fluorescència en funció de la temperatura. L'oligo i el fàrmac utilitzat es mostren a la part superior de cada gràfica. Cada gràfica conté la corba de fusió de l'oligo sol i set corbes més de l'oligo unit amb fàrmac a diferents concentracions. Les concentracions (en μM) així com el color de cada corba es mostren a la part superior-dreta de la figura.