

CAPÍTOL IV- CONCLUSIONS

Les conclusions generals que s'obtenen dels estudis realitzats en aquesta tesi són les següents:

- ✓ En general, els fàrmacs que s'han utilitzat per la cristal·lització amb oligonucleòtids no s'intercalen específicament a una determinada seqüència de DNA. Només en els cas de l'acridina Acr(RRRR) sembla que té una preferència per les zones riques en les bases adenina i timina. Aquests resultats s'obtenen dels estudis de footprinting.
- ✓ S'ha vist mitjançant els estudis de fluorescència que els fàrmacs que contenen un major nombre d'aminoàcids estableixen més el DNA. Aquesta estabilització es deu a interaccions electrostàtiques entre les càrregues positives dels aminoàcids i els fosfats negatius del DNA.
- ✓ S'han resolt emprant la tècnica de raigs X un total de cinc estructures d'oligonucleòtids amb quatre seqüències diferents: d(CGCAATTGCG), d(GAATTCG), d(CGTACG), d(CAATTAATTG).
- ✓ Tot i que en la majoria de les estructures resoltes els fàrmacs no hi són presents, la seva utilització en les condicions de cristal·lització en general ajuda a obtenir millors cristalls (amb excepció de la seqüència d(GAATTCG)).
- ✓ Totes les estructures han cristal·litzat en presència dels ions Co^{2+} o Ni^{2+} , els quals han ajudat clarament en la seva cristal·lització. En un dels casos (la seqüència d(GAATTCG)) s'ha utilitzat el Ni^{2+} com a àtom pesat per tal de resoldre l'estructura amb el mètode de MAD.

Aquests ions Ni^{2+} i Co^{2+} tenen un paper molt important en l'empaquetament dels cristalls i es troben gairebé sempre interaccionant específicament amb el N7 de guanines a unes distàncies típiques de 2.0 Å. S'han trobat quatre entorns diferents d'aquests ions:

- Interaccionant amb una guanina aparellada amb la seva base complementària i envoltats de cinc aigües de coordinació.
- Interaccionant amb dues guanines de diferents columnes de dúplex actuant així de pont entre dues columnes. Aquestes es poden disposar paral·leles o perpendiculars entre elles.
- Interaccionant amb una guanina d'una columna i un fosfat d'una altra columna sent també el punt d'unió entre dues columnes.
- Interaccionant entre quatre fosfats de quatre dúplex diferents.

S'han detectat altres ions com el Ba^{2+} i el Na^+ importants també en els empaquetaments dels cristalls.

- ✓ La seqüència d(CGTACG) és l'única que s'ha resolt amb fàrmacs intercalats, concretament, amb una acridina i una antraquinona. Segons aquestes dues estructures i altres estructures isomòrfiques ja descrites, es pot concloure que els fàrmacs s'intercalen tots a la mateixa cavitat però presenten tots ells un cert desordre. També s'observa una poca influència dels diferents substituents dels fàrmacs a l'hora d'intercalar-se, sent només important la part aromàtica. D'aquest grup d'estructures s'han trobat unes zones iòniques comuns en totes elles que són rellevants en l'estabilització dels cristalls.
- ✓ Amb la seqüència d(GAATTCG) s'aporta la primera estructura de B-DNA cristal·litzada amb una simetria cúbica. Aquesta alta simetria juntament amb la pròpia conformació que adopten les bases i juntament amb l'ió Ni^{2+} donen una estructura que pot servir de precedent de cara a dissenyar nanoestructures de DNA. A més, les grans cavitats de dissolvent que presenta aquest cristall poden ser una diana d'interacció amb proteïnes o altres molècules.
- ✓ S'ha obtingut la cinquena estructura del decàmer d(CGCAATTGCG), fet que ha permès fer una anàlisi de les cinc estructures existents. D'aquí es conclou que les condicions de cristal·lització (diferents per a totes les estructures)

tenen poca influència sobre la conformació de l'estructura però en canvi afecten d'una manera important a l'empaquetament dels cristalls.

- ✓ Finalment, s'ha treballat amb dues seqüències molt riques en les bases A i T: el decàmer d(CAATTAATTG) i el dodecàmer d(AATTAATTAATT).

La primera ha donat un cristall prou bo com per resoldre'n l'estructura. Aquest cristal·litza en el grup espacial $P3_221$ i encara que es tenia una seqüència diferent ha resultat ser isomòrfica a un grup d'estructures ja resoltes. L'anàlisi dels paràmetres conformacionals de l'estructura demostra un comportament normal de les bases malgrat tenir unes dades a relativament baixa resolució.

El dodecàmer dóna més problemes de cristal·lització; el fet de no contenir cap C ni G dificulta segurament el seu empaquetament. Observant, però, els espectres que s'han obtingut d'aquests cristalls, sembla que l'estructura està formada per oligonucleòtids paral·lels.

- ✓ Algunes de les coordenades i factors d'estructura de les seqüències resoltes han estat dipositats al NDB (Berman *et al.*, 1992) amb els següents codis:

d(CGCAATTGCG): BD0066

d(GAATTCG): BD0069