

Resolución de la competición estructural DNA cuádruple / dúplex

Joaquim Jaumot ¹, Romà Tauler ², Ramón Eritja ²,
Raimundo Gargallo ¹

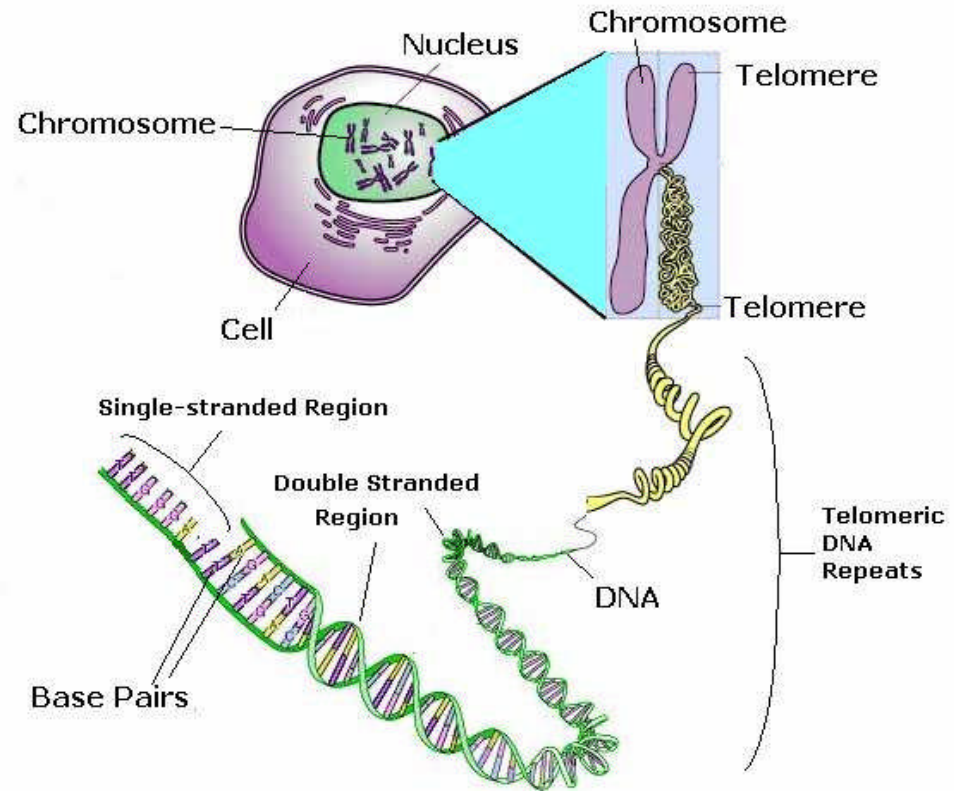
1: Dept. Química Analítica, Universidad de Barcelona

2: Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC,
Barcelona



Introducción: los telómeros

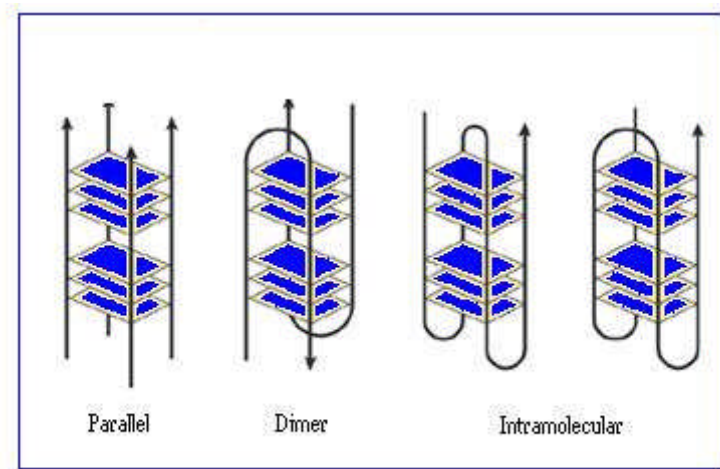
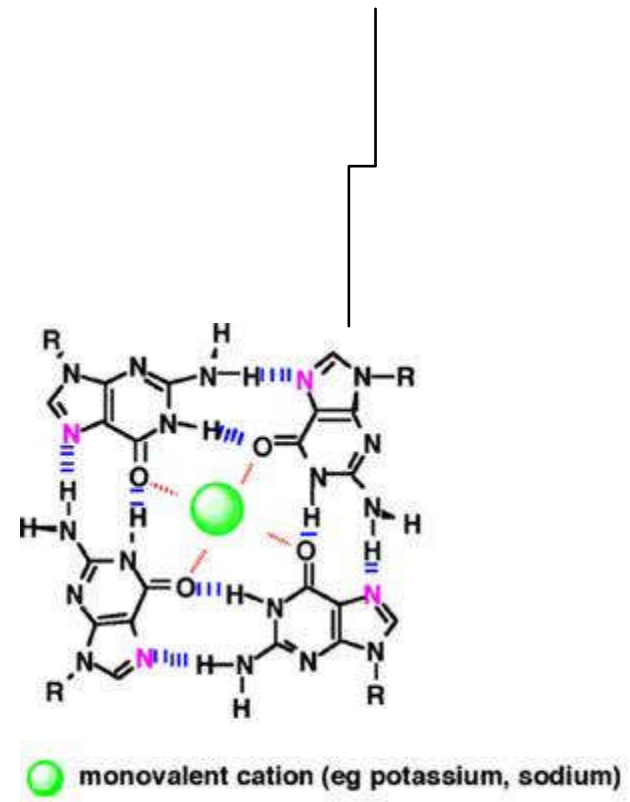
- Extremos físicos de los cromosomas eucariotas
- Secuencia repetida $d(T_2AG_3)_n$
- Creciente estudio por su posible interés en Medicina (cáncer, ...)



Introducción: estructura de G-cuádruple

T T A G G G T T A G G G etc.

- Las guaninas tienden a formar tetradas
- G-cuádruple inter- o intra-molecular
- Paralelo, antiparalelo...





Objetivos

- Una cadena rica en citosinas existe a la vez que la cadena rica en guaninas
- Competición dúplex Watson-Crick vs. G-cuádruple
- Resolver la competición cuádruple / dúplex W-C a lo largo de la fusión de una mezcla de cadenas ricas en guanina y citosina
 - Presencia de cadena rica en G → G- cuádruple
 - Presencia de cadena rica en C → dúplex
- En definitiva:
 - “¿cuánto hay de cada una de estas estructuras?”



Contenidos

- Introducción
- Objetivos
- Procedimiento experimental
- Análisis de los datos espectroscópicos
- Resultados
- Conclusiones



Procedimiento experimental

Secuencia rica en guaninas: **SG: 5' > TAG GGT TAG GGT <3'**

Secuencia rica en citosinas: **SC 5' > ACC CTA ACC CTA <3'**

Fusiones en medio de **pH 7.0** (fosfato), 150 mM (K⁺, Mg²⁺). Muestras calentadas a 90°C durante 5 min y renaturalizadas lentamente

Se realizaron **cuatro experimentos de fusión** de:

- Secuencia SG

- Secuencia SC

- mezcla de secuencias SG y SC (razón 1:1)

- mezcla de secuencias SG y SC (razón 2:1).

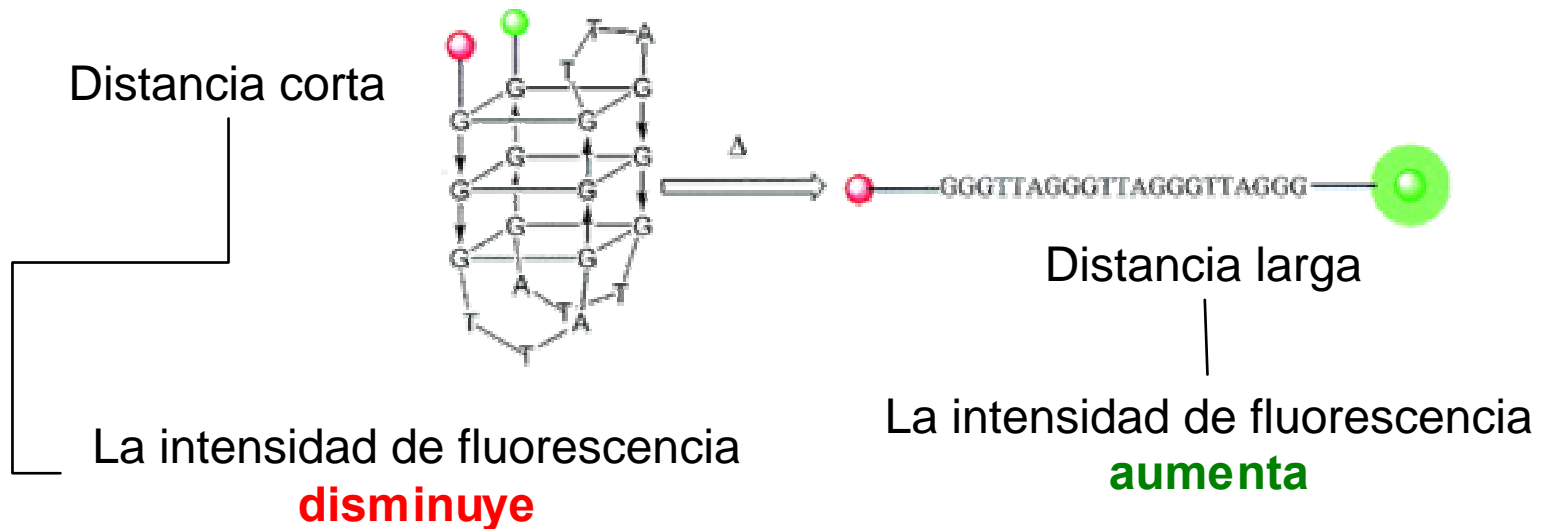
Fusiones seguidas mediante **espectrofotometría de absorción molecular, dicroísmo circular y fluorescencia molecular**.

- Absorción y DC: Jasco J810

- Fluorescencia: AB2 (*molecular beacons* (¿faros o señales moleculares?))

Fundamento de los *molecular beacons*

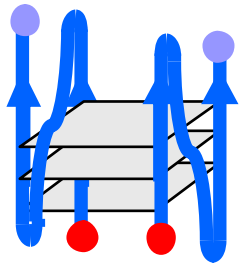
Molecular beacons se basan en la adición de un **fluoroforo** y de un apropiado **quencher** en posiciones estratégicas de una secuencia de DNA



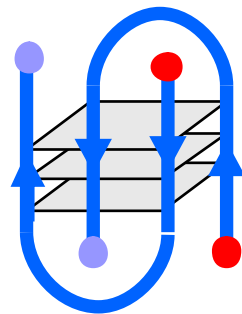
5' > **F** - TAG GGT TAG GGT - **Q** < 3' (SG) marcado:
en el extremo 5' con **fluoreceina** ($\lambda_{exc}=492$ nm., $\lambda_{em}=520$ nm.)
y en el extremo 3' con **dabsyl** (*quencher*).

El problema que se pretende resolver...(1)

Estructuras presentes en el sistema:



SG cuádruple paralelo



SG cuádruple antiparalelo

SG ovillo aleatorio



SC
cadena
sencilla



SG-SC dúplex

Temperatura baja: **mezcla de estructuras ordenadas**

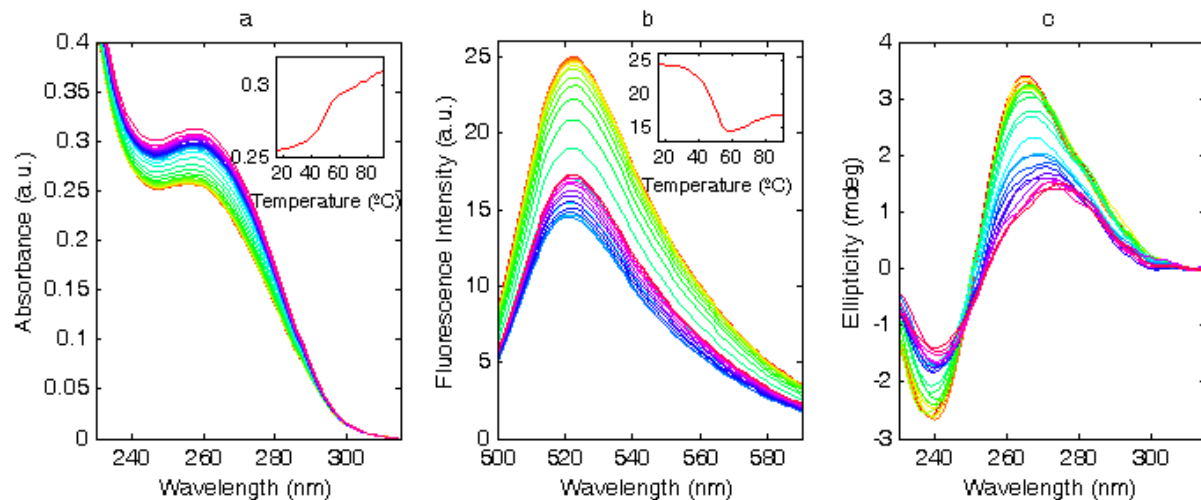
Temperatura alta: **mezcla de estructuras desordenadas de SG y SC**

Temperaturas intermedias: **¡habrá de todo!**

El problema que se pretende resolver...(2)

Señales medidas:

Fusión de la
mezcla SG:SC
1:1



Señal de absorción molecular en el ultravioleta: 260 y 295 nm

Señal de fluorescencia molecular debida al par fluoresceína / dabsyl

Señal de DC: 263 nm (paralelo), 290 nm (antiparalelo)

4 experimentos x 3 técnicas espectroscópicas = 12 conjuntos de datos

→ Necesidad de una herramienta potente de análisis de los datos experimentales



El método MCR-ALS

- *Multivariate Curve Resolution based on Alternating Least Squares optimization*
- Objetivo de su aplicación:
 - *Determinar el número de estructuras ópticamente activas presentes en el sistema (o los sistemas)*
 - *Determinar el diagrama de distribución para cada una de ellas (en función de T)*
 - *Determinar los espectros de absorción, fluorescencia y DC para cada una de estas estructuras*
- Desarrollo: Tauler, R. *Multivariate curve resolution applied to second order data. Chemom. Intel. Lab. Syst.* **1995**, 30, 133 - 146
- Revisión: Jaumot et al. *Application of multivariate resolution methods to the study of biochemical and biophysical processes. Anal. Biochem.* **2004**, 327, 1 - 13
- Web: <http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>

Análisis de los datos espectroscópicos experimentales

$$A = C \varepsilon \xrightarrow{\text{Aprox. multivariante}} D = C S^T + E$$

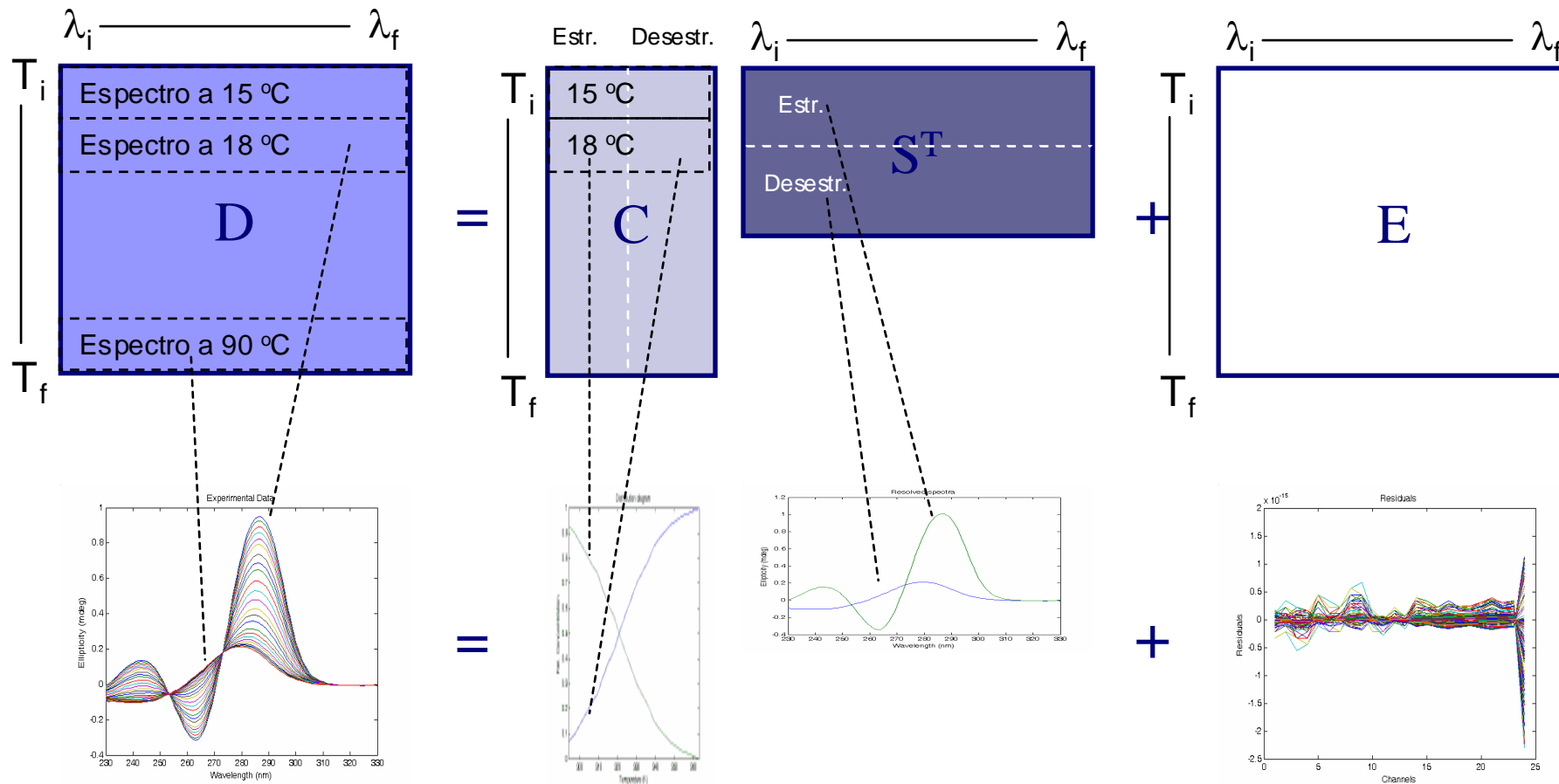
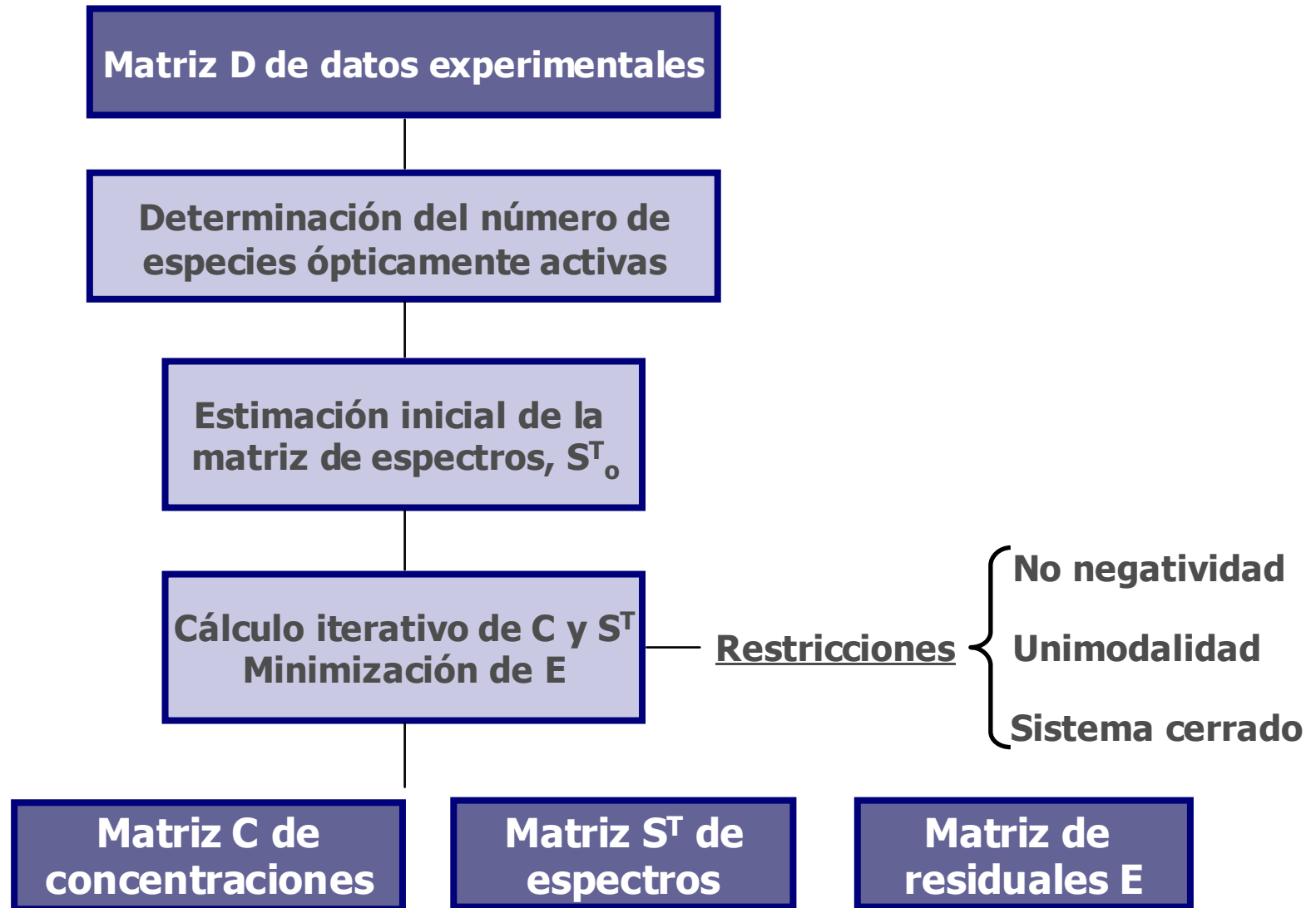


Diagrama de flujo simplificado de MCR-ALS



Opciones de análisis

a)

$$\begin{array}{c} N_1 \\ \vdots \\ N_1 \\ \vdots \\ N_r \end{array} \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_w \\ \hline \boxed{D} \end{array} = \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_s \\ \hline \boxed{C} \\ \vdots \\ N_r \end{array} + \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_w \\ \hline \boxed{S^T} \\ \vdots \\ N_s \end{array} + \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_w \\ \hline \boxed{E} \\ \vdots \\ N_r \end{array}$$

b)

$$\begin{array}{c} N_1 \\ \vdots \\ N_1 \\ \vdots \\ N_r \end{array} \begin{array}{c} N_1^{Abs} \text{---} N_w^{Abs} \quad N_1^F \text{---} N_w^F \quad N_1^{CD} \text{---} N_w^{CD} \\ \hline \boxed{D_{Abs}^{SG}} \quad \boxed{D_F^{SG}} \quad \boxed{D_{CD}^{SG}} \end{array} = \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_s \\ \hline \boxed{C^{SG}} \\ \vdots \\ N_r \end{array} + \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_w \\ \hline \boxed{S_{Abs}^{TSG}} \quad \boxed{S_F^{TSG}} \quad \boxed{S_{CD}^{TSG}} \\ \vdots \\ N_s \end{array} + \begin{array}{c} N_1 \text{---} N_w^{Abs} \quad N_1^F \text{---} N_w^F \quad N_1^{CD} \text{---} N_w^{CD} \\ \hline \boxed{E_{Abs}^{SG}} \quad \boxed{E_F^{SG}} \quad \boxed{E_{CD}^{SG}} \\ \vdots \\ N_r \end{array}$$

c)

	Abs. FI. DC					
N_1^{SC}	D_{Abs}^{SC}	D_F^{SC}	D_{CD}^{SC}	C^{SC}	S_{Abs}^{TSG}	E_{Abs}^{SC}
N_r^{SC}						
N_1^{SG}	D_{Abs}^{SG}	D_F^{SG}	D_{CD}^{SG}	C^{SG}	S_F^{TSG}	E_F^{SG}
N_r^{SG}						
$N_1^{m1:1}$	$D_{Abs}^{m1:1}$	$D_F^{m1:1}$	$D_{CD}^{m1:1}$	$C^{m1:1}$	S_{CD}^{TSG}	$E_{CD}^{m1:1}$
$N_r^{m1:1}$						
$N_1^{m2:1}$	$D_{Abs}^{m2:1}$	$D_F^{m2:1}$	$D_{CD}^{m2:1}$	$C^{m2:1}$		$E_{Abs}^{m2:1}$
$N_r^{m2:1}$						$E_F^{m2:1}$

Fusión de SC

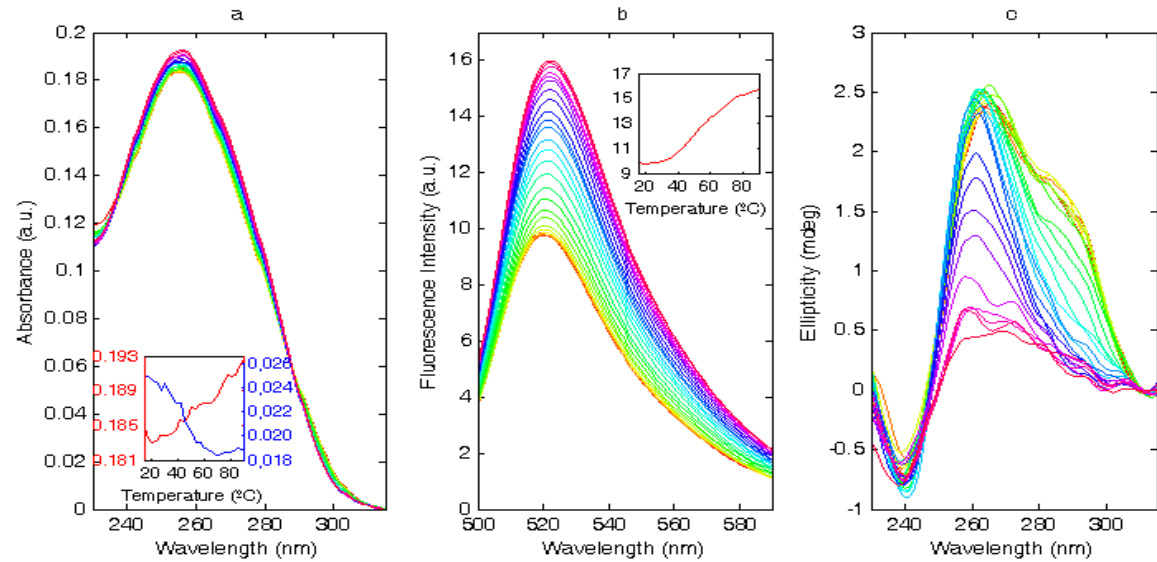
Fusión de SG

Fusión mezcla 1:1

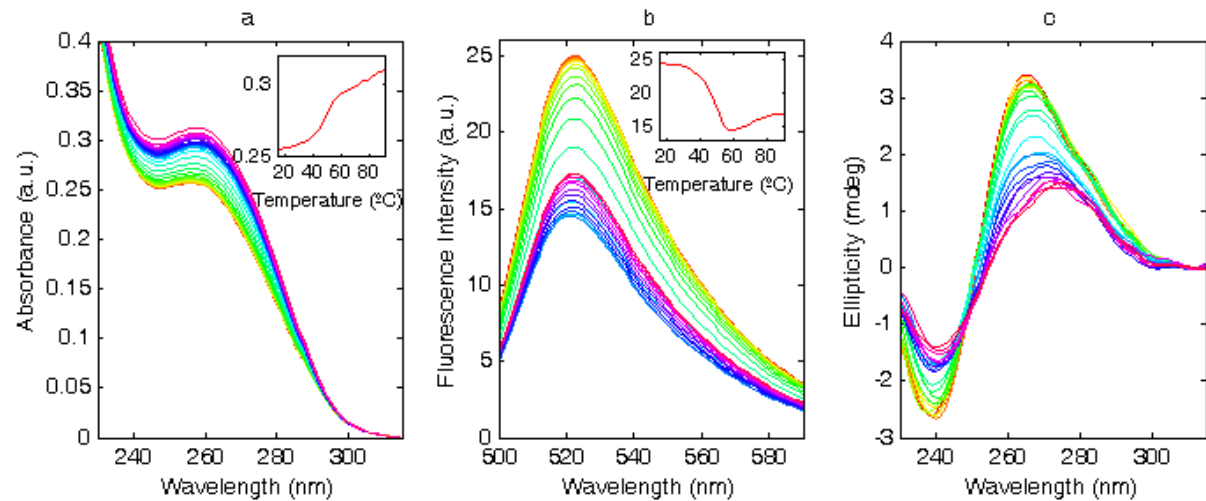
Fusión mezcla 2:1

Datos experimentales

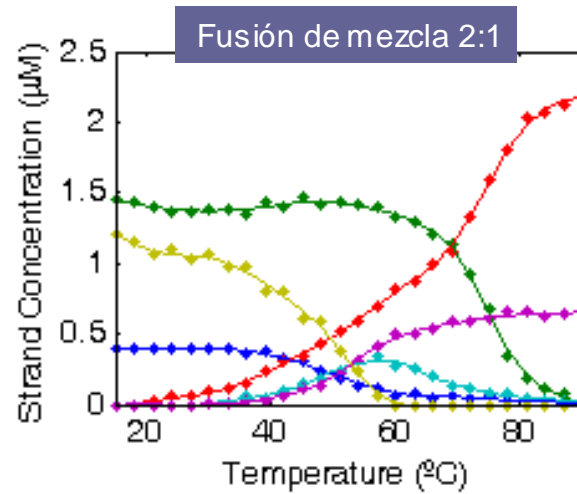
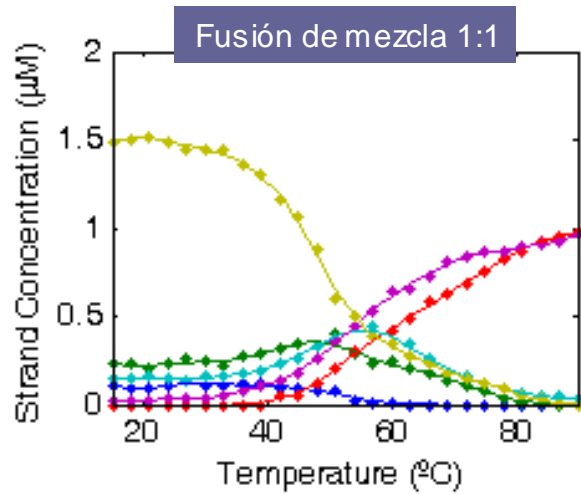
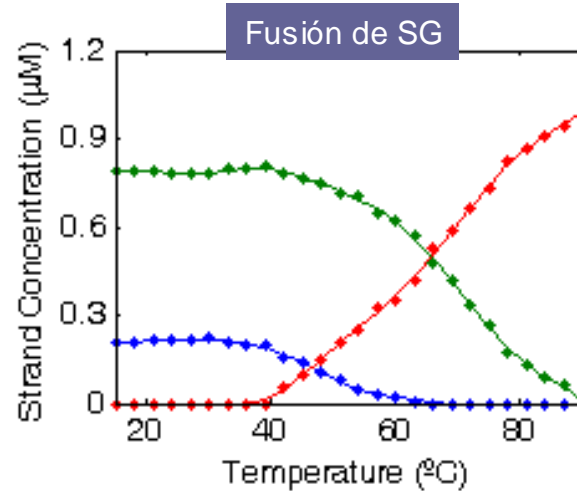
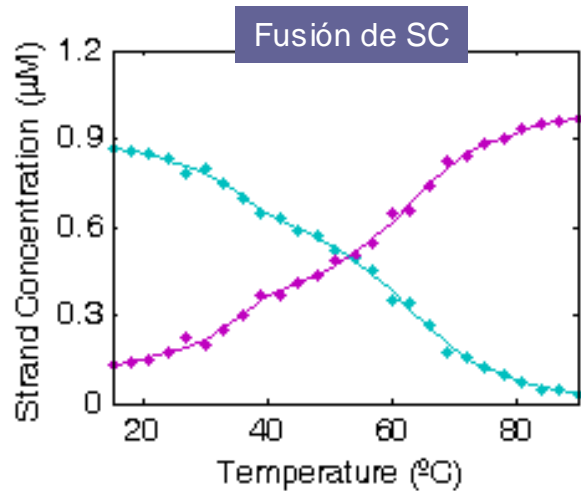
Fusión de SG



Fusión de la mezcla
SG:SC 1:1



Resultados (I). Perfiles de concentración



Identificación:

SC “ordenada”
SC desordenada

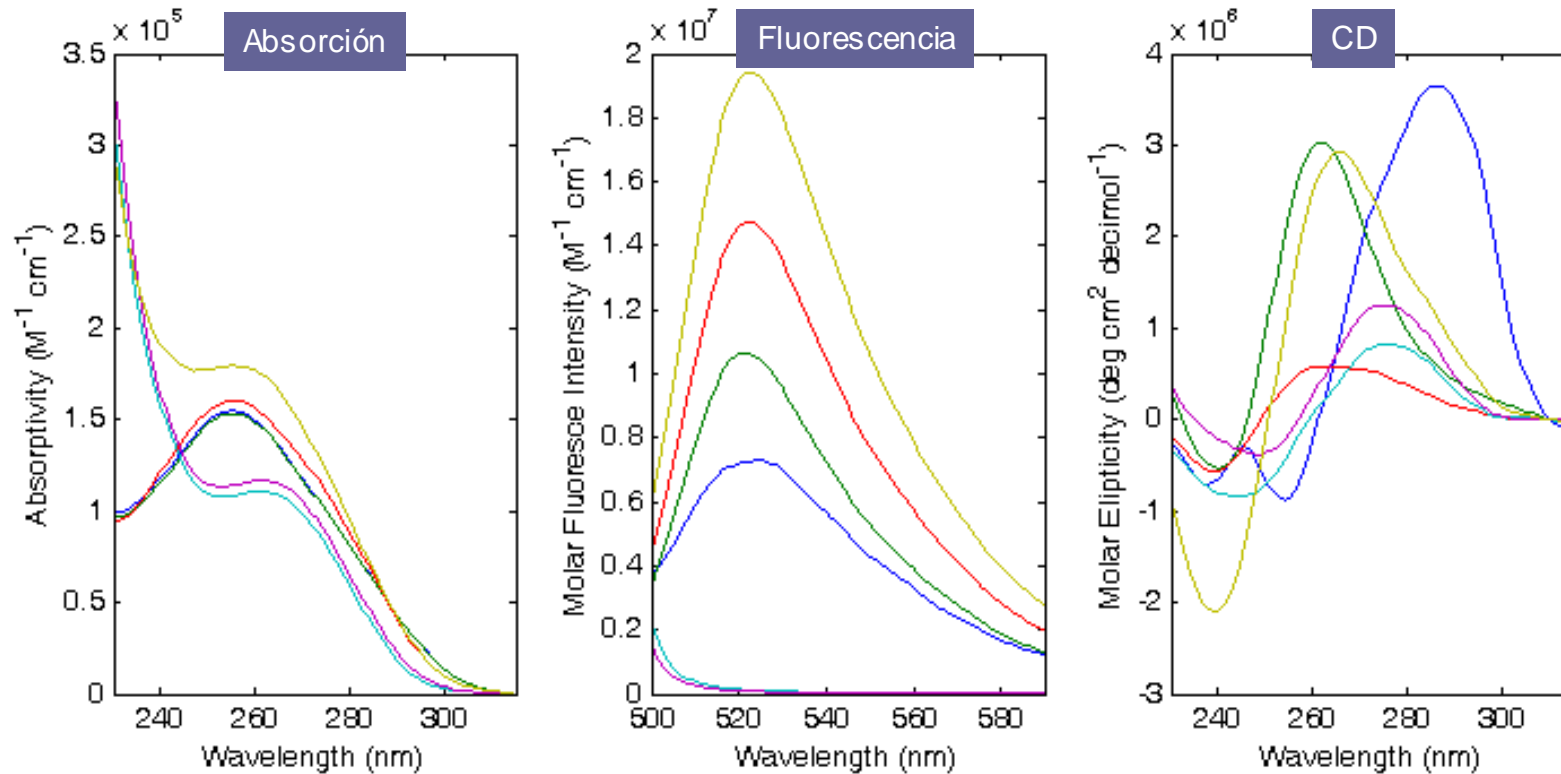
SG cuádruple
paralelo

SG cuádruple
antiparalelo

SG desordenada

SG-SC dúplex

Resultados (II). Espectros resueltos



SC "ordenada" SC desordenada

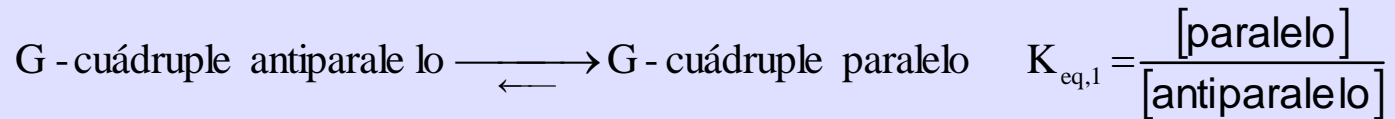
SG cuádruple paralelo

SG cuádruple antiparalelo

SG desordenada

SG-SC dúplex

Resultados (III). Valores termodinámicos



$$K_{\text{eq},1} = 3.7 \pm 0.2 (n = 7), \Delta G^\circ = -3.1 \pm 0.1 \text{ kJ/mol (25 }^\circ\text{C)}$$



$$K_{\text{eq},2} = 7.4 (\text{a } 25^\circ\text{C}), \Delta G^\circ = -42 \text{ kJ/mol (a } 25^\circ\text{C)}$$

T_m SG antiparalelo: 47 ± 1 °C

T_m SG paralelo: 69 ± 2 °C

T_m SG·SC duplex: 49 ± 1 °C

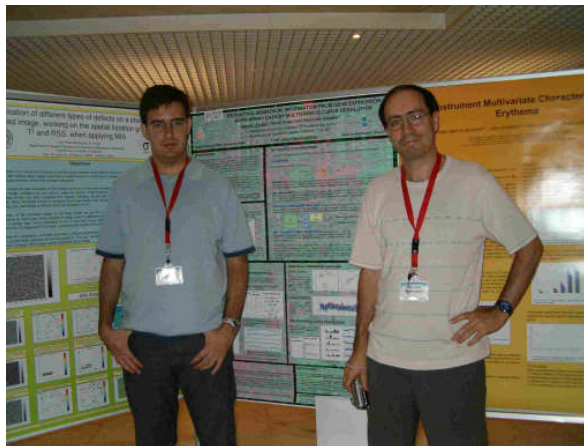


Conclusiones

- Una resolución completa del sistema sólo se consigue cuando se analizan datos de diferentes espectroscopías, debido al solapamiento de los perfiles de concentración y espectrales.
- En los experimentos en que SC está presente, se observa y se ha cuantificado la competición entre las estructuras cuádruples y dúplex.
- Los espectros puros resueltos proporcionan información estructural sobre el oligonucleótido

Agradecimientos

- J.Jaumot agradece al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca FPI.



- Trabajo financiado por el MEC (BQU2003-00191) y por la *Generalitat de Catalunya* (2003SGR00056)

Resolución de la competición estructural DNA cuádruple / dúplex

Joaquim Jaumot ¹, Romà Tauler ², Ramón Eritja ²,
Raimundo Gargallo ¹

1: Dept. Química Analítica, Universidad de Barcelona

2: Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC,
Barcelona

