

Estudio de la interacción entre cuádruplex teloméricos y ligandos implicados en cáncer por SPR

Belén Chaves Arquero^{1,2*}, Clara M.Santiveri², Ramón Campos Olivas²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Unidad de espectroscopía y RMN, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029, Madrid, España.

Resumen

Los telómeros son considerados dianas terapéuticas ya que el mantenimiento de su secuencia por parte de la telomerasa es lo que caracteriza la inmortalidad de las células cancerígenas. Inicialmente, las estrategias terapéuticas se basaban en la telomerasa. En cambio, actualmente se están desarrollando estrategias centradas en los componentes que forman el telómero (shelterinas), como la proteína TRF1. Ensayos *in vivo* han demostrado que moléculas pequeñas consideradas como inhibidores de TRF1, deslocalizan a esta shelterina de su posición en el telómero, y esto bloquea el crecimiento de las células madre cancerígenas. Este proyecto pretende ir más allá, e intenta conocer el mecanismo de acción de estos compuestos, que podrían interactuar con el ADN telomérico. Para estudiar la interacción, previamente caracterizamos las estructuras adquiridas por el ADN telomérico (G4-cuádruplex) mediante dicroísmo circular (DC) y espectroscopía de UV. En paralelo, verificamos por resonancia magnética nuclear (RMN) la solubilidad y estructura de los compuestos cuyo mecanismo de acción se investiga. Finalmente, determinamos la especificidad de unión y la afinidad de estos compuestos por el ADN telomérico utilizando resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Palabras clave: Resonancia de plasmones superficiales (SPR); TRF1; G4-cuádruplex; telómero; afinidad; mecanismo de acción; diana terapéutica; cáncer

Cita: Belén Chaves Arquero, Ramón Campos Olivas (2015) Estudio de la interacción entre cuádruplex teloméricos y ligandos implicados en cáncer por SPR. *Dianas* 4(1): e20150904. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150904. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 26 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Belén Chaves Arquero et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: chavesarquero@belen@gmail.com



Introducción

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas situadas en los extremos de los cromosomas, compuestos por repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG [1]. Estas estructuras mantienen la integridad del genoma al permitir una replicación sin pérdida de secuencias codificantes y son capaces de registrar el número de divisiones celulares y la fase de senescencia replicativa [1]. El ADN telomérico tiene asociado un complejo de seis proteínas o shelterinas, incluyendo el factor 1 o TRF1, que protegen los extremos de los cromosomas de la degradación y de la reparación del ADN [2].

Durante cada ciclo de división celular, los telómeros se acortan debido a una replicación incompleta del cromosoma por parte de la ADN polimerasa convencional, lo que se conoce como el problema de replicación extrema [3]. La telomerasa es una ribonucleoproteína que alarga los telómeros añadiendo repeticiones teloméricas de *nov*. De esta forma, compensa el acortamiento de los telómeros en aquellas células donde la enzima se expresa: células pluripotenciales, células madre adultas, así como en la mayoría de los cánceres humanos en etapa tardía. La telomerasa se compone de una subunidad catalítica o TERT y de un componente de ARN o Terc que se utiliza como molde para la síntesis de las repeticiones teloméricas [4]. El mantenimiento de una longitud funcional mínima de los telómeros es lo que permite la división celular.

Dado que el 80 - 90 % de los tumores humanos reactivan la telomerasa, en la última década se ha promovido el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en esta enzima para el tratamiento del cáncer. Algunas terapias están actualmente probándose en ensayos clínicos [5]. En cambio, estudios recientes muestran que la inhibición de la telomerasa como estrategia terapéutica no es eficaz [1], y proponen desarrollar estrategias terapéuticas frente a shelterinas como TRF1.

TRF1 es una de las principales shelterinas, y sus niveles se encuentran aumentados en células madre adultas y pluripotenciales, lo que sugiere que su inhibición podría dirigirse a las células madre cancerígenas [6]. En relación a este nuevo enfoque, investigaciones recientes del grupo de Telómeros y Telomerasa del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), muestran *in vivo* que el uso de compuestos inhibidores de TRF1, que *in vitro* deslocalizan esta shelterina de los telómeros, bloquea el crecimiento tumoral. Esto promueve la desprotección del telómero, daño en el ADN y como consecuencia, apoptosis celular que bloquea el crecimiento del tumor [2]. Aún se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos. Por tanto, este proyecto propone estudiar la unión al ADN telomérico (como posible mecanismo de acción) de un compuesto orgánico obtenido en el Programa de Terapias Experimentales del CNIO (ETP-CNIO). El compuesto está caracterizado como inhibidor de TRF1 (hit TRF1) en ensayos celulares de localización de TRF1. Nuestra hipótesis es que un posible mecanismo de acción del hit TRF1 para interferir con la shelterina TRF1 es la unión del compuesto al ADN telomérico, concretamente a regiones de cadena sencilla.

Trabajos anteriores muestran que la secuencia del ADN telomérico y la de promotores de ciertos oncogenes adquieren un plegamiento que da lugar a estructuras conocidas como cuádruplex [7]. El cuádruplex es una estructura constituida por cuatro hebras de ADN, que se forma al unirse cuatro oligonucleótidos de guanina mediante enlaces de hidrógeno tipo Hoogsteen. La unión de cuatro guaninas forma una superficie o unidad plana (tétrada). Los cuádruplex pueden tener apiladas tres tétradas de guanina (secuencia telomérica), o cuatro tétradas como ocurre en la secuencia del oncogen MYC (ver Tabla 1), dependiendo del número de guaninas consecutivas que se repiten al menos cuatro veces en la secuencia del cuádruplex. A su vez, la topología de conexión de las cuatro hebras del cuádruplex da lugar a estructuras paralelas, antiparalelas o a una mezcla de ambas. El tipo de plegamiento depende de la secuencia de los oligonucleótidos y de las condiciones experimentales. Para conocer si el hit TRF1 se une al telómero (cuádruplex) y medir la afinidad de esa unión se utiliza la resonancia de plasmones superficiales (SPR).

El objetivo principal del proyecto se basa en caracterizar *in vitro* la posible interacción del hit TRF1 con ADN telomérico de cadena sencilla en forma de cuádruplex. Para comprobar la especificidad de unión del hit TRF1 por cuádruplex telomérico (tres tétradas) frente a cuádruplex de cuatro tétradas utilizamos la secuencia del promotor del oncogen MYC [7]. Para comprobar si el hit es específico de cuádruplex o se une también a ADN dúplex utilizamos una secuencia rica en guaninas que forma una estructura en horquilla con un tallo de doble hélice. El objetivo final del proyecto es contribuir al estudio del potencial terapéutico de estos compuestos profundizando en su mecanismo de acción.

Materiales y Métodos

En primer lugar los oligonucleótidos de cadena sencilla (Tabla 1) se han de preparar con el plegamiento de cuádruplex deseado. Para ello se ponen a punto las condiciones y procedimientos del protocolo de plegamiento de los nucleótidos a cuádruplex. Se determinan los tipos de cuádruplex formados y se opta por un protocolo/plegamiento de los ADN para su utilización en los ensayos de unión. En paralelo, se verifican las estructuras de los compuestos orgánicos a ensayar y se comprueba su solubilidad para finalmente estudiar la afinidad de unión de los mismos frente a los distintos oligonucleótidos de ADN.

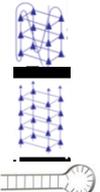
| Plegamiento | Abreviatura | Secuencia (5'-3') | M.M. |
|---|-----------------|--|-------|
|  | HTEL | TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG | 7575 |
| | bHTEL | [Btn]TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG | 8012 |
| | bMYC | [Btn]ACGTACGTGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGGTGGGG | 12913 |
| | bHairpin | [Btn]TTCGCGCGCGTTTTTCGCGCGCG | 7148 |

Tabla 1.- Secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos biotinilados en 5' aparecen identificados con [Btn]. HTEL = secuencia repetida telomérica humana. MYC = secuencia correspondiente al promotor del oncogen MYC. Hairpin = secuencia rica en GC que forma una estructura de horquilla. M.M = masa molecular.

Oligonucleótidos y compuestos

Los oligonucleótidos (tabla 1) se encargan de Sigma-Aldrich. Las secuencias tienen una molécula de biotina en el extremo 5' de la secuencia (bHTEL, bMYC y bHairpin), exceptuando HTEL que se utiliza para pruebas de optimización de condiciones experimentales. La biotina nos permite inmovilizar los oligonucleótidos en el chip SA (estreptavidina) que utilizamos para SPR (ver abajo). El compuesto principal de nuestro estudio es el hit TRF1 (ETP-CNIO). Se utilizan como controles positivos de unión al cuádruplex telomérico los compuestos Symadex [8], RHPS4 [9] y BRACO-19 [10], descritos previamente en la literatura, y el primero de ellos en ensayos clínicos de fase I en cáncer colorrectal.

Estos compuestos se unen al cuádruplex telomérico con afinidades en el rango bajo micromolar. Por otro lado, también se utilizan como controles positivos otros compuestos (hit 5 y hit 8) que se unen tanto al ARN telomérico (TERRA), como al ADN telomérico [11]. En este caso los compuestos presentan afinidades en el rango milimolar a cientos de micromolar. Esto proporciona controles para la puesta a punto de las medidas de SPR en un amplio rango de afinidades.

Preparación de cuádruplex

Los oligonucleótidos (Tabla 1) se cuantifican por espectroscopia de UV. Para ello se utiliza un Nanodrop ND-1000 y el programa ss-DNA33. Se mide la absorbancia a 260 nm utilizando una concentración (nominal) de oligonucleótidos de 2 μM , preparados en tampón a partir de stocks primarios a 200 μM en H_2O . Para determinar las condiciones de formación del cuádruplex, se tienen en cuenta los distintos plegamientos que pueden adquirir [12]. El plegamiento puede dar lugar a una topología de conexión entre hebras paralela (misma dirección de las hebras que forman los cuádruplex), antiparalela (direcciones opuestas), o mezcla (cuádruplex formados por ambos tipos de conexiones).

La naturaleza del catión predominante en la solución tampón del oligonucleótido es determinante para la formación de los distintos tipos de plegamiento. Altos niveles de K^+ promueven la formación de la estructura mezcla, NaCl promueve la estructura antiparalela, y el etanol estabiliza la paralela [12]. Por tanto, independientemente del tipo de oligonucleótido ensayado, se utiliza una solución con 200 mM KCl y 150 mM NaCl en tampón 20 mM fosfato sódico a pH 7,4 para favorecer una topología mezcla. La solución con 150 mM NaCl en tampón 20 mM fosfato sódico a pH 7,4 da lugar a una estructura antiparalela, y el plegamiento paralelo requiere 30 mM KCl en tampón 1 mM fosfato sódico a pH 7,4 siendo el 65 % de la solución etanol. Además de determinar el tampón óptimo para el plegamiento deseado del cuádruplex, se optimiza un protocolo de enfriamiento lento que garantiza el correcto plegamiento de los oligonucleótidos [13]. Así, desde 90 $^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que los oligonucleótidos están desplegados, se enfría hasta 22 $^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de descenso de 0,2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para llevarlo a cabo se utiliza un termociclador Mastercycler gradient $\text{\textcircled{R}}$.

Verificación de la formación del cuádruplex

Tras el proceso de enfriamiento lento o fusión, la formación de los cuádruplex se verifica mediante espectroscopia de UV. Para ello, se miden las diferencias de absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 295 nm, antes y después del proceso de fusión (Figura 1).

Complementariamente, verificamos los tipos de plegamiento que pueden adquirir los G4-cuádruplex por dicroísmo circular (DC). La técnica mide las señales que corresponden a la diferencia de absorción de luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha, que ocurre en una muestra ópticamente activa, en nuestro caso, la solución de cuádruplex. A partir de estas señales obtenemos los espectros característicos para las distintas topologías de cuádruplex (Figura 2) [12]. En el proyecto utilizamos un espectropolarímetro Jasco 815 (Tokyo, Japan) con lámpara de Xe de 150 W, equipado con un portamuestras y sistema de control de temperatura de tipo termoeléctrico Peltier, modelo PTC-423S/L. El instrumento está controlado por el programa Spectra Manager, de Jasco. Los oligonucleótidos se preparan en las soluciones indicadas anteriormente para cada plegamiento. Se utiliza una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0,1 cm, un tiempo de barrido de 0,5 nm/s y una respuesta de 4 segundos. Los experimentos se realizan con el promedio de cuatro barridos a 22 $^{\circ}\text{C}$.

Utilizando la misma técnica, se obtienen curvas de desnaturalización térmica por cada tampón (Figura 3), siguiéndose los cambios en la señal de dicroísmo entre 5 y 90 $^{\circ}\text{C}$ (velocidad de calentamiento de 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) a longitudes de onda características.

Verificación de las estructuras y solubilidad de los compuestos

Se comprueba la estructura de los compuestos teniendo en cuenta los protones (hidrógenos) presentes, utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) de protón. Los compuestos se preparan a una concentración 100 μM en tampón PBS en D_2O , y con 1 % de DMSO deuterado. La muestra de RMN en un tubo de 5 mm de diámetro se somete a un campo magnético constante (en un espectrómetro Bruker 700 MHz) y se excitan todos los protones irradiando la muestra con radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia. La absorción de dicha radiación da lugar a transiciones entre niveles energéticos que originan señales observadas en el detector, que al procesarse con el software TOPSPIN 2.1, da lugar al espectro de RMN (Figura 4).

Mediante RMN determinamos la solubilidad mínima de cada compuesto (Tabla 2). Para ello, se hacen adiciones consecutivas del compuesto (100 μM) y comparamos la intensidad de las señales de los protones de cada compuesto en los distintos espectros. Para cuantificar las señales de los espectros, se integran las señales y se comparan con un patrón añadido de concentración conocida (trimetilsililo propanoico o TMSP).

Estudio de la interacción compuesto-ADN por Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) constituye una técnica que se aplica al estudio molecular de interacciones entre analitos biológicos en solución y ligandos inmovilizados [14]. En este proyecto utilizamos un equipo SPR Biacore X100 (GE Healthcare), adecuado para abordar el estudio de la interacción de cuádruplex de ADN (inmovilizados como ligandos) con los compuestos previamente descritos (que se fluyen como analitos) [15].

Esta técnica se basa en la utilización de un chip, formado por una lámina metálica de oro sobre un sustrato de vidrio en el que se inmovilizará el ligando. Para estudiar la interacción entre el analito y el ligando, se utiliza un haz de luz que incide sobre la superficie del metal. El haz de luz genera un plasmón superficial (PS), que son oscilaciones de electrones libres propagados entre la superficie del metal y el medio del ligando y analito. La técnica nos permite medir los cambios en el índice de refracción entre ligando libre y unido de la superficie del sensor [16]. Utilizamos chips SA que tienen estreptavidina inmovilizada con el objetivo de capturar los distintos ADN biotinilados. La interacción biotina-estreptavidina es lo que permite la inmovilización del oligonucleótido al chip; esta interacción tiene una alta afinidad ($K_D < 10^{-15}$ M), lo que hace que en la práctica la unión sea irreversible [15]. De forma previa a la inmovilización de los oligonucleótidos, los chips SA se acondicionan con 4 o 5 inyecciones de una solución de activación (1 M NaCl en 50 mM NaOH), a un flujo de 5 μ l/min a 25 °C.

La inmovilización de los cuádruplex utiliza el buffer HBS-EP⁺ (10 mM HEPES a pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% v/v polisorbato 20; GE Healthcare Inc), suplementado con 200 mM KCl y 5% DMSO, ya que los stocks primarios de los compuestos se prepararon en DMSO [17]. Se utiliza una concentración de ligando de 20 nM [7]. Después de la inmovilización, se utiliza una solución de lavado (50% de isopropanol y 50% de la solución 1M NaCl en 50 mM NaOH) sobre la flúidica del equipo (pero no sobre el chip), para impedir la adhesión de más moléculas de oligonucleótido. Posteriormente, utilizando el mismo buffer, se fluyen concentraciones crecientes (experimentos de titulación) de los analitos o compuestos del estudio (hit TRF1, Symadex, BRACO-19, RHPS4, hit 5 y hit 8) a un flujo de 15 μ l/min a 25 °C, con un tiempo de asociación de 60 segundos y 120 de disociación. Por cada analito, se obtiene una respuesta a las distintas concentraciones en función del tiempo, lo cual viene representado en sensorgramas (Figura 5).

Resultados

Verificación de la formación del cuádruplex por espectroscopía de UV

La figura 1 representa los espectros de absorbancia de los oligonucleótidos (en cualquiera de sus topologías), antes y después del proceso de fusión (Materiales y Métodos) que garantizan la formación de cuádruplex [18].

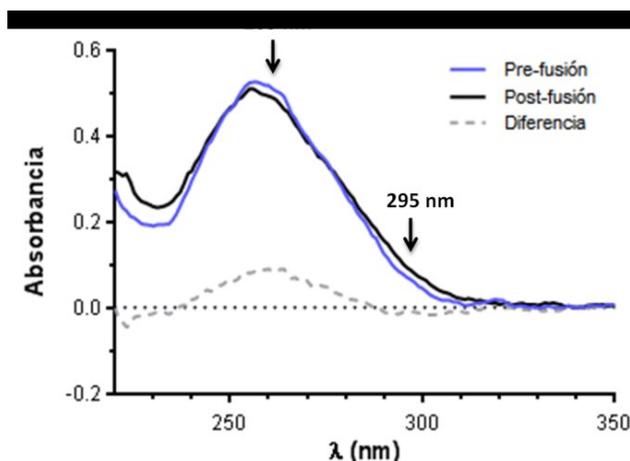


Figura 1.- Espectro de absorbancia UV del oligonucleótido bHTEL en 200 mM KCl y 150 mM NaCl en tampón 20 mM fosfato sódico a pH 7,4. Las flechas indican las longitudes de onda donde la diferencia de absorbancia antes y después del proceso de fusión es máxima cuando los oligonucleótidos se pliegan en forma de cuádruplex.

La absorbancia, A , se define como $A = -\log I / I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$, lo que se conoce como la Ley de Lambert-Beer. Esto nos permite conocer la concentración de un compuesto midiendo la absorbancia, si conocemos su coeficiente de extinción molar, ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), lo que representa a cada longitud de onda la capacidad que tiene una sustancia de absorber la radiación electromagnética. c = concentración molar del soluto. l = paso óptico de la cubeta (1 cm). La absorbancia a 260 nm de los stocks primarios tras disolver los oligonucleótidos secos en agua pura es de: HTEL $A_{260} = 0.454$; MYC $A_{260} = 0.335$; Hairpin $A_{260} = 0.622$, lo que indican concentraciones de 197; 213; 188 μ M, respectivamente.

Verificación de la formación del plegamiento del cuádruplex por DC

Los espectros de la figura 2 son característicos de cada tipo de topología de cuádruplex y se han obtenido utilizando la solución tampón que favorece cada plegamiento. La estructura paralela tiene los máximos de elipticidad a 210 nm y 265 nm, mientras que presenta un mínimo a 240 nm ($-250000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). La estructura antiparalela muestra un mínimo a 265 nm ($-100000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), mientras que la mezcla presenta a 285 nm un máximo de elipticidad y un mínimo a 235 nm. Estos valores están de acuerdo con la literatura [12].

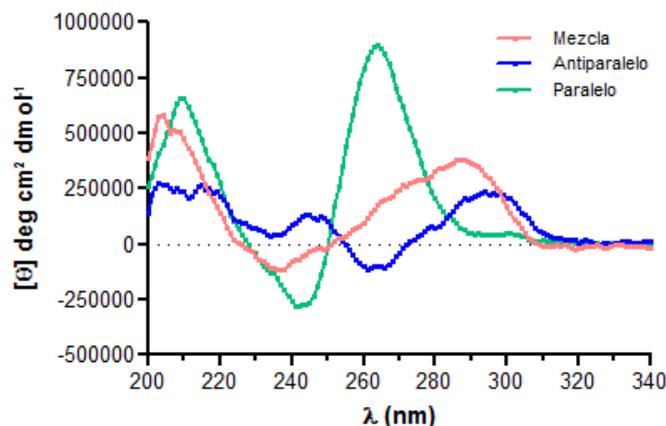


Figura 2.- Espectros de DC de HTEL plegado en distintas condiciones, que dan lugar a los distintos plegamientos cuádruplex característicos (ver Materiales y Métodos). La elipticidad molar $[\theta]$ se obtiene de acuerdo a la relación: $[\theta] = \theta / (10.l.c)$. Donde “ θ ” es la elipticidad observada, “ l ” es el paso óptico por la cubeta en cm y “ c ” es la concentración molar de los oligonucleótidos.

Utilizando la misma técnica se realiza una curva de fusión térmica por cada modelo de plegamiento para determinar el valor de la temperatura de fusión o T_m (temperatura a la cual el 50% de la estructura cuádruplex está plegada y el otro 50% desplegada) (Figura 3). La estructura mezcla tiene un valor de T_m de 68 °C, la estructura antiparalela de 44 °C, y la estructura paralela de 67 °C. Por tanto, las estructuras resultantes del protocolo para cuádruplex mezcla y paralela son las más estables. En cambio, la estabilidad de la estructura paralela requiere etanol en su solución, y este componente no puede ser utilizado en los experimentos de SPR. Por lo que la estructura mezcla, con representación de distintas topologías de conexión de las hebras del cuádruplex, será la utilizada para estudiar la unión de compuestos a los oligonucleótidos (Tabla 1) por SPR.

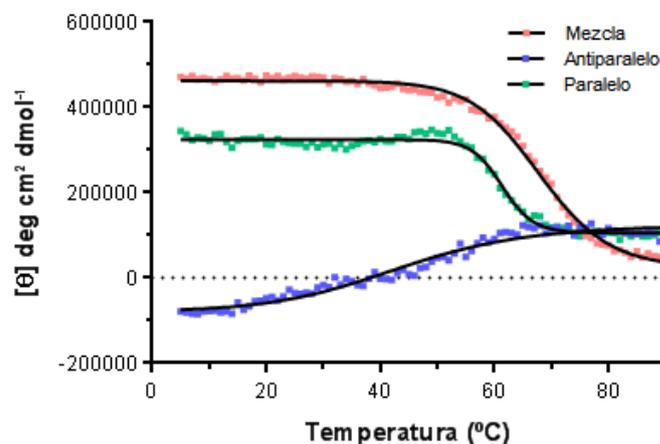


Figura 3.- Curvas de fusión térmica de las estructuras cuádruplex HTEL (mezcla, antiparalelo y paralelo) atendiendo al tipo de solución (ver Materiales y Métodos) por DC a 268 nm para la estructura de mezcla y 265 nm para las estructuras antiparalela y paralela.

Verificación de los compuestos por RMN

La estructura de cada compuesto se verifica teniendo en cuenta el número y naturaleza (aromática/alifática) de los protones que la forman y las señales en el espectro de RMN (Figura 4). Las nubes electrónicas que rodean a cada protón del compuesto son diferentes, esto da lugar a señales a distintas frecuencias y multiplicidades en el espectro que permiten determinar la identidad de la estructura. Para comprobar la solubilidad mínima de los compuestos, se hacen adiciones consecutivas de compuesto (100 μM) a la solución inicial (100 μM), y se comprueba si el incremento de intensidad de las señales obtenidas en el espectro se corresponde con la adición. Si las señales tras la adición (200 μM) son el doble de intensas que las de la solución inicial (100 μM), el compuesto será soluble a 200 μM .

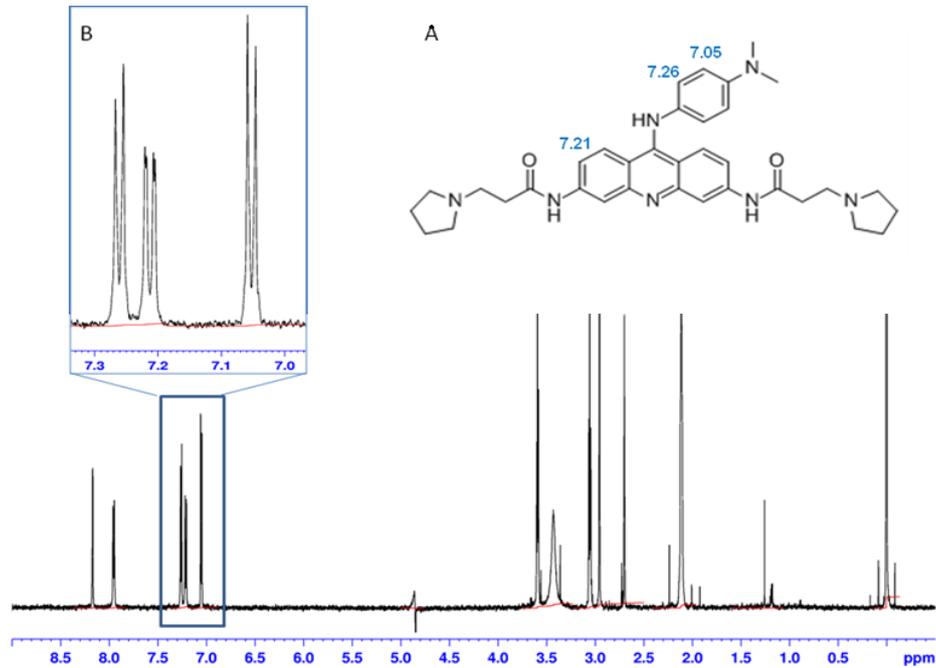


Figura 4.- (A) Estructura de BRACO-19. (B) Espectro de RMN de protón. El compuesto se prepara a una concentración 100 μM en tampón PBS en D_2O y con 1% de DMSO deuterado. El desplazamiento químico se expresa en ppm (partes por millón). La multiplicidad de las señales (singletes, dobletes, tripletes) dependen del efecto que ejercen los protones del entorno, ya que afectan a la frecuencia del protón que se está observando. Se indica la asignación de tres señales aromáticas a protones concretos de la estructura.

Estudio de la interacción ADN-compuesto por Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

La técnica de SPR permite detectar y monitorizar las interacciones en tiempo real mediante sensorgramas (Figura 5A). El sensorgrama muestra una fase de asociación del analito al ligando inmovilizado, una fase de saturación o equilibrio, en la que a una concentración determinada se llega a una máxima respuesta resultante del estado estacionario entre asociación y disociación en el periodo final de la inyección, y una fase de disociación o eliminación del analito de la superficie tras el fin de la inyección. La figura 5B muestra un análisis de equilibrio en el que la K_D se obtiene a partir de la curva de titulación.

Para poder interpretar los datos del análisis de equilibrio, debemos conocer que la K_D es la constante de disociación en equilibrio. Indica la concentración de compuesto necesaria para unirse a la mitad de los cuádruplex inmovilizados. Como su inversa es la constante de afinidad, cuanto menor sea esa concentración, mayor será la afinidad de unión. Mientras que el valor de χ^2 mide la discrepancia entre los puntos de una curva observada y una teórica (bondad de ajuste). Cuanto mayor sea el valor menos verosímil es que el ajuste de la curva de titulación sea correcto. De la misma forma, cuanto más se aproxima a cero el valor de χ^2 mejor es el ajuste.

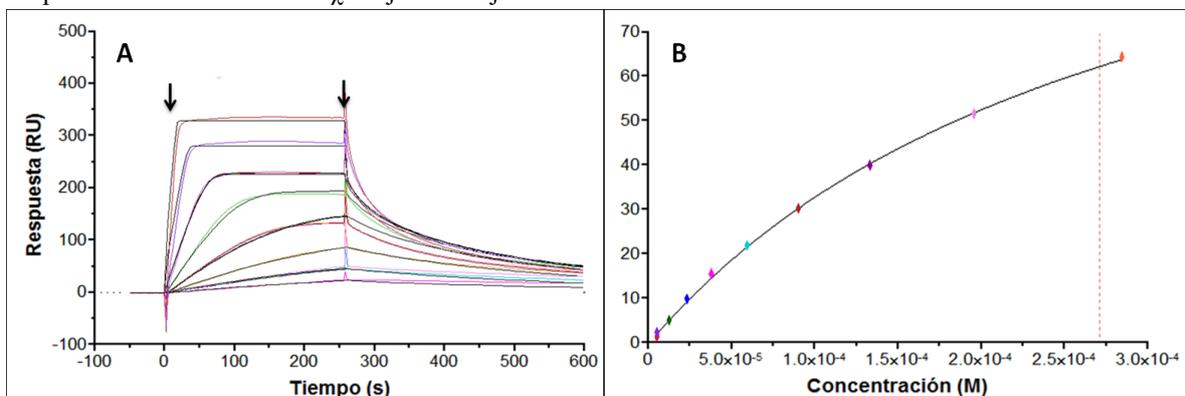


Figura 5.- (A) Sensorgrama del compuesto BRACO-19 al unirse al cuádruplex HTEL que permite el análisis cinético de la interacción. Las concentraciones de analito utilizadas van de 0 a 1 μM (de abajo a arriba). La flecha situada a la izquierda indica el inicio de inyección de analito. A continuación, se da la asociación (k_{ON}) hasta llegar a un estado estacionario dependiente de la concentración del compuesto. La flecha situada a la derecha muestra el final de la inyección y el inicio de la disociación (k_{OFF}), que es independiente a la concentración. (B) Titulación del hit TRF1 (0 a 280 μM) sobre el cuádruplex HTEL. Este caso ilustra el análisis de equilibrio (respuestas en estado estacionario frente a la concentración) del que se obtiene un valor de $K_D = 267 \pm 10 \mu\text{M}$ y χ^2 de 0,24 RUs.

Únicamente el compuesto BRACO-19 presenta una asociación y disociación por el ADN suficientemente lentas para poder ajustar los sensorgramas y obtener las constantes cinéticas (figura 5A); el resto de compuestos se unen y disocian rápidamente a los oligonucleótidos. Para ellos no hacemos un estudio cinético de la unión (ajustando las fases de asociación y disociación para obtener la K_D a través del cociente de las correspondientes constantes cinéticas), sino un análisis de equilibrio en el que la K_D se obtiene de la curva de titulación (respuestas en estado estacionario frente a la concentración). Los valores K_D y χ^2 para los compuestos se muestran en la tabla 2.

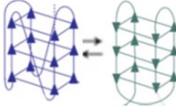
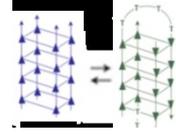
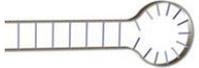
| Compuestos | Solubilidad |  HTEL | |  MYC | |  Hairpin | |
|-----------------|-------------|--|-----------------|--|-----------------|---|-----------------|
| | | $K_D \pm SE$ | $\chi^2 (RU^2)$ | $K_D \pm SE$ | $\chi^2 (RU^2)$ | $K_D \pm SE$ | $\chi^2 (RU^2)$ |
| Symadex | 100 μ M | $5,4 \pm 0,5 \mu$ M | 8,05 | $11 \pm 1 \mu$ M | 5,77 | $23 \pm 2 \mu$ M | 0,62 |
| Hit TRF1 | 400 μ M | $267 \pm 10 \mu$ M | 0,24 | $1,1 \pm 0,2 \text{ mM}^*$ | 0,07 | $4,6 \pm 0,7 \text{ mM}^*$ | 4 |
| RHPS4 | 100 μ M | $0,28 \pm 0,01 \mu$ M | 1,35 | $0,28 \pm 0,03 \mu$ M | 2,4 | $14,8 \pm 0,7 \mu$ M | 0,6 |
| BRACO-19 | 100 μ M | $0,10 \pm 0,01 \mu$ M | 46,7 | $0,13 \pm 0,03 \mu$ M | 57,1 | $12 \pm 1 \mu$ M | 14,2 |
| Hit 5 | 400 μ M | $685 \pm 45 \mu$ M | 0,04 | $670 \pm 100 \mu$ M | 0,064 | $> 31 \text{ mM}^*$ | 0,02 |
| Hit 8 | 200 μ M | $130 \pm 30 \mu$ M | 0,3 | $350 \pm 60 \mu$ M | 0,023 | $> 21 \text{ mM}^*$ | 0,32 |

Tabla 2.- Valores de K_D y χ^2 obtenidos en el análisis de equilibrio de la interacción de los analitos y ligandos por SPR. La tabla muestra la solubilidad mínima en μ M comprobada para cada compuesto por RMN. SE = error estándar. RU = unidades de respuesta. * = imponiendo el valor de R_{max} (respuesta máxima) del compuesto Symadex en el ajuste de la curva de titulación.

Discusión

En la última década se ha considerado al telómero como una posible diana terapéutica en cáncer, enfocándose en la actividad de la telomerasa, y en el desarrollo de moléculas inhibitoras de esta enzima. En cambio, la inhibición de la telomerasa es efectiva únicamente cuando los telómeros se acortan por debajo de una longitud funcional mínima, que es lo que impide la división celular. La actividad de esta enzima es prescindible para el crecimiento de células con telómeros largos y para otras que presentan un mecanismo alternativo de elongación de telómeros. Por ello, se han planteado estrategias alternativas, como las dirigidas contra las shelterinas [2].

La inhibición de las shelterinas desprotege a los telómeros e induce muerte celular independiente de la actividad de la telomerasa y de la longitud telomérica. Así, el déficit de TRF1 desencadena inestabilidad genética y defectos de proliferación que inducen la apoptosis celular. Además, la inhibición de esta shelterina durante un largo periodo de tiempo, en tejidos adultos sanos (de ratón), no compromete la viabilidad del organismo. Sin embargo, se observa una disminución de células en compartimentos proliferativos como el hematopoyético, que se recuperan una vez finalizada la terapia [2]. Estudios recientes han demostrado *in vivo* en modelos animales que el uso de compuestos considerados como inhibidores de TRF1 bloquean el crecimiento tumoral. Estudios *in vitro* han mostrado que estos inhibidores deslocalizan la shelterina TRF1 del telómero. Con el fin de conocer el mecanismo de acción de este tipo de compuestos, concretamente para saber si interactúan con el ADN telomérico, hemos realizado estudios de afinidad mediante SPR, resumidos en la tabla 2.

Los datos de SPR indican que el hit TRF1 se une al cuádruplex del ADN telomérico con una afinidad menor ($K_D = 267 \mu$ M) que los ligandos de cuádruplex descritos en la literatura, Symadex, RHPS4 y BRACO-19 ($K_D = 5,4; 0,28$ y $0,10 \mu$ M, respectivamente), y con una afinidad baja y similar a los hits obtenidos contra TERRA, hit 5 y hit 8, ($K_D = 685$ y 130μ M).

Si contrastamos la afinidad de unión del hit TRF1 por el cuádruplex telomérico frente a la afinidad por el cuádruplex que forma MYC, observamos que el compuesto presenta una selectividad relativa (4 veces más) por el cuádruplex telomérico. Sin embargo, el resto de ligandos de cuádruplex, salvo Symadex y el hit 8, no presentan selectividad por el cuádruplex telomérico, ya que se unen con la misma afinidad a ambos tipos de cuádruplex (telomérico y MYC).

Por otro lado, tanto el hit TRF1 como los ligandos TERRA descritos anteriormente se unen de forma muy débil a la horquilla dúplex que adopta la secuencia rica en guanina ($K_D = 4,6; > 31$ y > 21 mM). Sin embargo, los ligandos Symadex, RHPS4 y BRACO-19 se unen al dúplex con afinidad intermedia, no de forma tan débil como el hit TRF1 y los hits 5 y 8 de TERRA ($K_D = 23,4; 14,8$ y $12,4$ μ M).

Teniendo en cuenta que el efecto celular del compuesto hit TRF1 se observa a una concentración de 10 μ M, observar *in vitro* la unión del compuesto al cuádruplex de ADN telomérico con una $K_D = 267$ μ M nos indica que esta unión no justifica completamente la acción celular que se observa. En cambio, sugiere que la unión del hit TRF1 al cuádruplex telomérico podría contribuir al mecanismo de acción del compuesto, aunque no justifique la actividad celular observada. En este proyecto hemos comprobado que el compuesto hit TRF1 se une con mayor afinidad al cuádruplex telomérico frente al dúplex rico en guanina, cuya unión es muy débil. Sin embargo, no se ha comprobado si el compuesto podría unirse a la región de doble cadena telomérica, que se supone forma estructura de dúplex. Por otro lado, hemos centrado el estudio en un único cuádruplex, pero la cadena sencilla del ADN telomérico puede formar decenas de estructuras cuádruplex en tándem, lo que podría potenciar la interacción del hit TRF1 con el ADN telomérico. Adicionalmente, el hit TRF1 podría interactuar e interferir con el ARN telomérico, TERRA, y éste a su vez afectar la localización de TRF1. Por tanto, quedan por investigar otras posibles dianas del hit TRF1, como las mencionadas anteriormente o la propia proteína TRF1.

En conclusión, haber establecido la unión del hit TRF1 al cuádruplex de ADN telomérico contribuye al conocimiento del posible mecanismo de acción de este compuesto, aunque este hecho no justifique por completo la actividad observada en el ensayo celular y requiera la continuación del estudio de posibles dianas moleculares de este y otros inhibidores de TRF1.

Agradecimientos

A todos los componentes de la Unidad de Espectroscopía y RMN, dirigida por el Dr. Ramón Campos Olivás del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, en especial al Dr. Ramón Campos y Dra. Clara M. Santiveri por toda la ayuda brindada para la realización de este proyecto. Al igual que al Programa de Terapias Experimentales del CNIO (ETP-CNIO), dirigido por el Dr. Joaquin Pastor, por proporcionarnos el material necesario, así como al grupo Telómeros y Telomerasa del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), dirigido por la Dra. María Blasco.

Referencias

1. Perera, S.A., R.S. Maser, H. Xia, K. McNamara, A. Protopopov, L. Chen, A.F. Hezel, C.F. Kim, R.T. Bronson, D.H. Castrillon, L. Chin, N. Bardeesy, R.A. Depinho and K.K. Wong. 2008. Telomere dysfunction promotes genome instability and metastatic potential in a K-ras p53 mouse model of lung cancer. *Carcinogenesis*. 29:747-753.
2. Garcia-Beccaria, M., P. Martinez, M. Mendez-Pertuz, S. Martinez, C. Blanco-Aparicio, M. Canamero, F. Mulero, C. Ambrogio, J.M. Flores, D. Megias, M. Barbarid, J. Pastor and M.A. Blasco. 2015. Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage. *EMBO Mol Med*. (doi: 10.15252/emmm.201404497)
3. Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. 239:197-201.
4. Shay, J.W. and W.E. Wright. 2010. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett*. 584:3819-3825.
5. Buseman, C.M., W.E. Wright and J.W. Shay. 2012. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res*. 730:90-97.
6. Schneider, R.P., I. Garrobo, M. Foronda, J.A. Palacios, R.M. Marion, I. Flores, S. Ortega and M.A. Blasco. 2013. TRF1 is a stem cell marker and is essential for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 4:1946.
7. Redman, J.E. 2007. Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods*. 43:302-312.
8. Hyzy, M., P. Bozko, J. Konopa and A. Skladanowski. 2005. Antitumour imidazoacridone C-1311 induces cell death by mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 69:801-809.
9. Gavathiotis, E., R.A. Heald, M.F. Stevens and M.S. Searle. 2003. Drug recognition and stabilisation of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat. *J Mol Biol*. 334:25-36.

10. Bidzinska, J., M. Baginski and A. Skladanowski. 2014. Novel anticancer strategy aimed at targeting shelterin complexes by the induction of structural changes in telomeric DNA: hitting two birds with one stone. *Curr Cancer Drug Targets*. 14:201-216.
11. Garavis, M., B. Lopez-Mendez, A. Somoza, J. Oyarzabal, C. Dalvit, A. Villasante, R. Campos-Olivas and C. Gonzalez. 2014. Discovery of selective ligands for telomeric RNA G-quadruplexes (TERRA) through ¹⁹F-NMR based fragment screening. *ACS Chem Biol*. 9:1559-1566.
12. Kypr, J., I. Kejnovska, D. Renciuik and M. Vorlickova. 2009. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*. 37:1713-1725.
13. Rachwal, P.A. and K.R. Fox. 2007. Quadruplex melting. *Methods*. 43:291-301.
14. Malmqvist, M. 1993. Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. *Curr Opin Immunol*. 5:282-286.
15. Rich, R.L. and D.G. Myszka. 2005. Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*. 18:431-478.
16. Ramachandran, N., D.N. Larson, P.R. Stark, E. Hainsworth and J. LaBaer. 2005. Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays. *Febs J*. 272:5412-5425.
17. Liu, Y. and W.D. Wilson. 2010. Quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions with a biosensor surface and surface plasmon resonance detection. *Methods Mol Biol*. 613:1-23.
18. Mergny, J.L., A.T. Phan and L. Lacroix. 1998. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett*. 435:74-78.

Material suplementario

En el análisis de equilibrio realizado por SPR el valor de K_D (Tabla 2) se obtiene a partir de las curvas de titulación (respuestas en estado estacionario frente a la concentración) de cada uno de los compuestos, como muestran las figuras suplementarias 1 y 2.

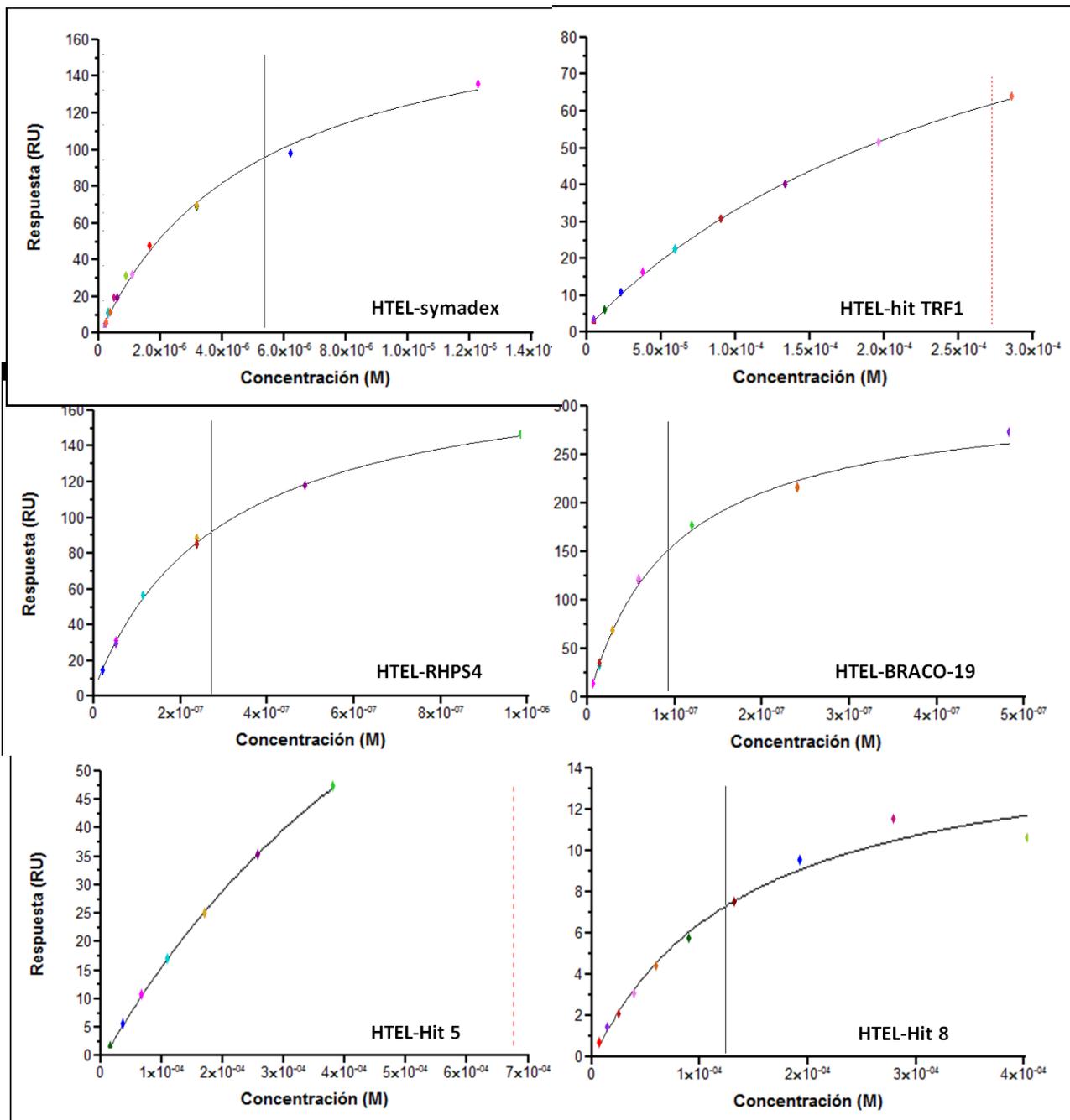


Figura suplementaria 1.- Titulaciones de los distintos compuestos sobre el oligonucleótido cuádruplex HTEL. Las concentraciones para cada compuesto son: Symadex (0 a 12,5 μ M), hit TRF1 (0 a 280 μ M), RHPS4 (0 a 1 μ M), BRACO-19 (0 a 500 nM), hit 5 (0 a 400 μ M) y hit 8 (0 a 400 μ M).

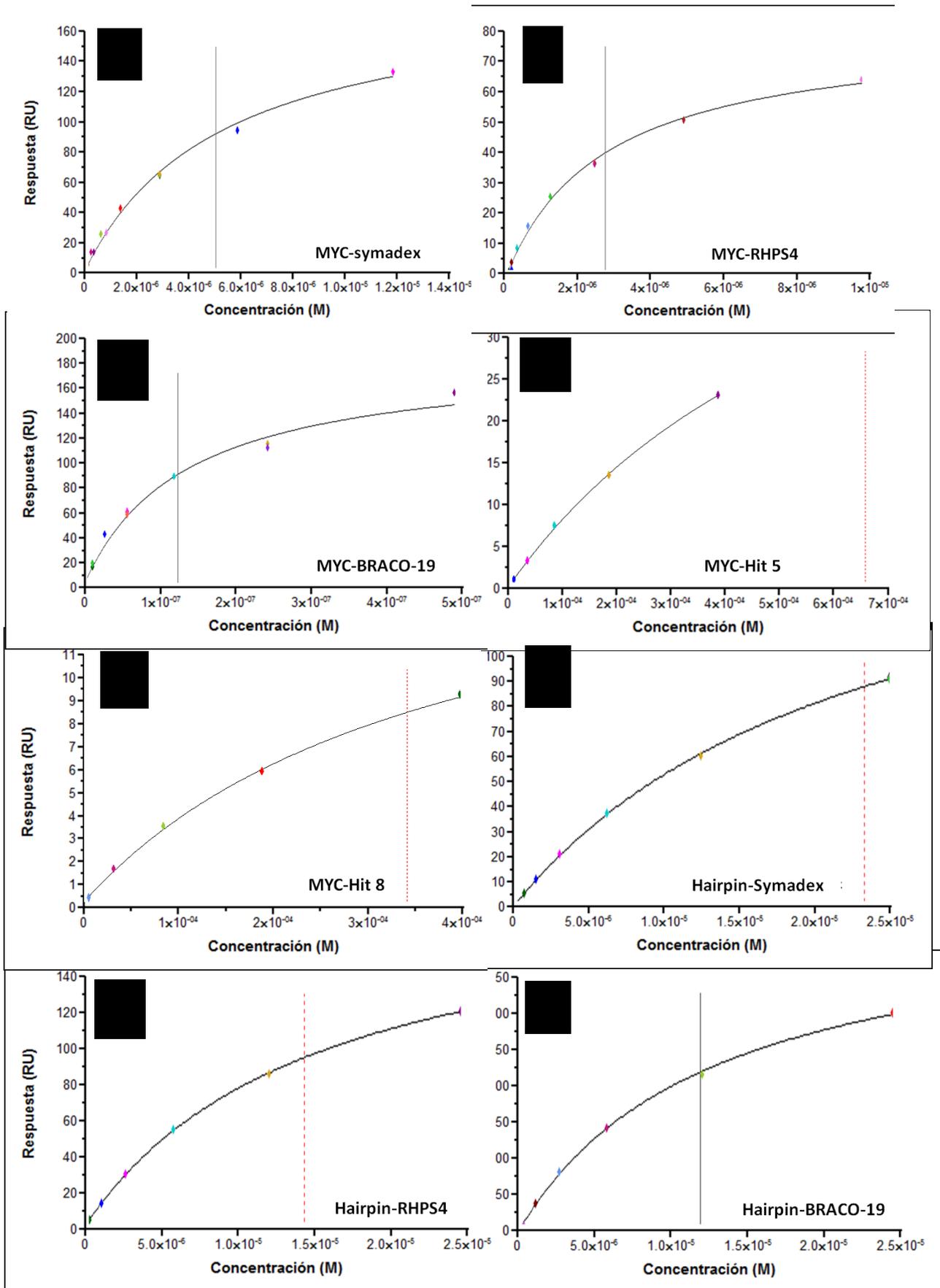


Figura suplementaria 2.- (A-E) Titulaciones de los distintos compuestos sobre el oligonucleótido MYC utilizando las mismas concentraciones que para el cuádruplex HTEL. (F-H) Titulaciones de los compuestos sobre el oligonucleótido Hairpin (horquilla dúplex rica en guanina). Las concentraciones utilizadas son: Symadex (0 a 25 μ M), RHPS4 (0 a 1 μ M) y BRACO-19 (0 a 1 μ M). No aparecen las titulaciones de los compuestos a las que se les ha impuesto el valor de Rmax (respuesta máxima) de Symadex en el ajuste de la curva de titulación.