

## ADN G-cuádruple: caracterización inicial de los mecanismos de formación de oligómeros por mecánica molecular

Miguel Angel Méndez<sup>1,2\*</sup> Andrea C. Montero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias de la Salud,  
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup> Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas –GETNano–  
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Universidad San Francisco de Quito.  
E-mail: mmendez@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: F. Javier Torres, Ph.D.

Recibido/Received: 11/15/2011. Aceptado/Accepted: 11/29/2011.

Publicado en línea/Published on Web: 12/20/2011. Impreso/Printed: 12/20/2011.

### Abstract

The fabrication of nanostructures based on DNA as a material to build systems capable of complex functions is a frontier in continuous exploration. In this article it is reported the detailed characterization at atomic level of G-quadruplex units in order to obtain a better comprehension on how these units can self assemble into interlocked G-quadruplexes. The method used is modeling with molecular mechanics. Previously we reported the construction of interlocked G-quadruplexes by a thermal cyclic procedure (similar in implementation as the ones used in the cycling steps in a PCR protocol) parting from the sequence 5'-TGGG-3'. Based on our experimental data reported previously, models were built for the structures, and minimization and analyses via molecular mechanics was carried out in order to understand the factors that determine the more stable structures. It was found that the identity of the 5' and 3' ends of the oligonucleotides is of the uppermost importance in the stability of the DNA assemblies in this study. Furthermore, the presence of cations in the regions of the molecule where the degree of steric hindrance allows more room for the cations could play a significant role in the dynamics of conformation of the supramolecule at those sites and possibly limiting or capping the self assembly of the structure. In summary, the results allow a better comprehension of the system at a molecular scale with the finality of developing more efficient procedures for the controlled fabrication of nanostructures based on G-quadruplex DNA.

**Keywords.** Self-assembly, interlocked G-quadruplex, molecular mechanics, DNA, G-quadruplex oligomers.

### Resumen

La fabricación de nanoestructuras usando ADN como material para construir sistemas capaces de realizar funciones complejas es una frontera en continua exploración. En este artículo se reporta la caracterización detallada a nivel atómico de unidades de G-cuádruple para obtener una mejor comprensión de cómo estas unidades se pueden auto ensamblar en oligómeros tipo G-cuádruple entrelazado (interlocked G-quadruplexes). Para esto se utilizaron métodos de modelación con mecánica molecular. Previamente reportamos la construcción de G-cuádruple entrelazados por un procedimiento térmico cíclico (similar en implementación al usado para el ciclado de un protocolo de PCR) partiendo de la secuencia 5'-TGGG-3'. Basados en nuestros datos experimentales reportados anteriormente se construyeron modelos para las estructuras y se minimizaron y analizaron vía mecánica molecular para entender los factores que determinan la estructura más estable. Se encontró que la identidad de los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos es de importancia fundamental en la estabilidad de los ensambles de ADN en el estudio. Además, los cationes en las regiones donde el grado de impedimento estérico permite más espacio para los mismos, pueden jugar un rol significativo en la dinámica de la conformación de la supramolécula en esos sitios, posiblemente limitando el auto ensamblaje de la estructura. En resumen, los resultados permiten mejorar la comprensión de este sistema a escala molecular permitiendo desarrollar procedimientos más eficientes para el control de la fabricación de nanoestructuras basadas en DNA G-cuádruple.

**Palabras Clave.** Auto ensamblaje, G-cuádruple entrelazado, mecánica molecular, ADN, oligómeros de G-cuádruple.

## Introducción

La fabricación de nanoestructuras usando como material DNA para llevar a cabo funciones complejas en sistemas biológicos y ambientales es una frontera en exploración [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. El éxito de estas aplicaciones depende en la comprensión a nivel práctico de los mecanismos subyacentes que guían el autoensamblaje de estos sistemas. [4, 6, 7] En este trabajo se reporta la caracterización de oligómeros de ADN que contienen entre cuatro a diez cadenas cuya secuencia es rica en guaninas lo que les permite que se autoensamblen a través de la mediación de enlaces de hidrógeno tipo hogsteen; como también se reportan principios que gobiernan este ensamblaje que se pueden generalizar o adaptar para el mejor diseño y fabricación de nanoaplicaciones basadas en ADN y otras biomoléculas.

El ADN G-cuádruple es una molécula de ADN donde participan guaninas (G), que pueden estar en la misma cadena o en distintas cadenas, para formar una estructura estabilizada por enlaces de hidrógeno con cuatro Gs en un mismo plano, una tétrada (Ver Figura 1). Una molécula de ADN G-cuádruple tiene al menos dos de estos planos o tétradas apilados consecutivamente uno sobre el otro. La estructura además de ser estabilizada por los puentes de hidrógeno es estabilizada por cationes como sodio, o potasio que se encuentran alineados con el espacio en el centro de las cuatro guaninas (una especie de canal rodeado de cuatro átomos de oxígeno, uno por cada guanina) y aproximadamente centrado con respecto al eje longitudinal de la molécula entre dos tétradas consecutivas de ADN G-cuádruple.[13]

En la literatura se ha reportado la fabricación de varias nanoestructuras basadas en ADN G-cuádruple.[2] Uno de los posibles mecanismos de construcción es el auto apilamiento de unidades de G-cuádruple para formar estructuras aproximadamente cilíndricas y helicoidales. Se ha observado que oligonucleótidos (especialmente a

altas concentraciones) con varias guaninas consecutivas en su secuencia forman superestructuras donde múltiples bloques de G-cuádruple se auto apilan, ya sea de forma que un bloque se apila sobre el otro, o donde una de las cadenas del G-cuádruple se desalinea o desplaza un “peldaño” dejando una o más guaninas expuestas, permitiéndole ahora a esta subunidad interactuar con la subsiguiente unidad de G-cuádruple.[14, 15, 16] Se ha reportado que la secuencia 5'-GGGT-3'(G3T) forma una estructura denominada G-cuádruple entrelazado [17] (Ver Figura 2); esta nueva estructura se caracterizó en base a resonancia magnética nuclear y espectroscopia de dicroísmo circular.[17] El G-cuádruple entrelazado se forma cuando al oligonucleótido G3T se lo somete a un procesamiento térmico que incluye varios ciclos de incremento y decremento lento y controlado de la temperatura para mover el equilibrio de estructuras favorables (i.e. el monómero de G-cuádruple) a nuevas estructuras que son cinéticamente estables (tal como la estructura G-cuádruple entrelazado). Este sistema es de interés porque demuestra un método reproducible y altamente flexible, usando control térmico, para la formación de una especie dimérica de G-cuádruple. La exploración de sistemas cuyo ensamblaje se pueda guiar por un delicado control de la temperatura permitirá generalizar y ampliar el uso del ADN como material base para nanoestructuras parte de biosensores, nano máquinas y otras aplicaciones.[4] Aquí se reporta el análisis detallado de la estructura de oligómeros de ADN obtenidos usando la secuencia 5'-TGGG-3' (TG3) utilizando un protocolo similar al usado para formar los G-cuádruple entrelazados reportados para la secuencia G3T. [17] Además, se realizó, utilizando mecánica molecular, una exploración de la estabilidad de distintas estructuras tanto para la secuencia G3T como TG3 con el fin de obtener una descripción a nivel atómico de estas estructuras que permita entender el mecanismo de formación de estos oligómeros y poner una base teórica para mejorar el diseño de nanoestructuras basadas en bloques de construcción de ADN y biomoléculas en general.

## Métodos

A través un procedimiento térmico cíclico se consiguió que una secuencia de ADN se autoensamblará en un monómero de G-cuádruple paralelo o en un oligómero [14]. El proceso térmico causa una serie de pasos de desnaturalización y renaturalización gradual y controlada de un oligonucleótido de ADN que contiene varias guaninas en la secuencia con la finalidad de que forme estructuras que contengan elementos de G-cuádruple [14]. Este proceso permitió ensamblar a partir de bloques discretos de G-cuádruple, oligómeros de G-cuádruple de forma controlada. Este proceso constituye un nuevo principio de construcción utilizando ADN para la fabricación programada de nanoestructuras. La serie de experimentos aquí descritos tiene como objetivo realizar una primera caracterización a nivel atómico de este sistema

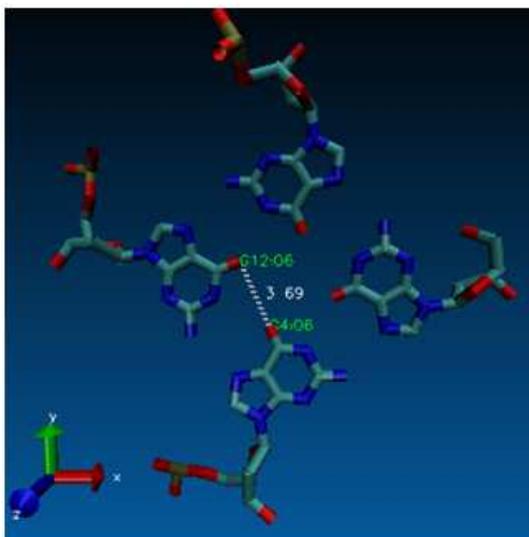


Figura 1: Tétrada G:G:G:G.

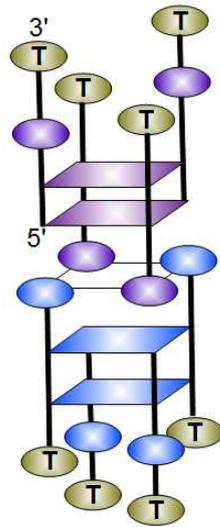


Figura 2: Estructura de G-cuádruple entrelazado de la secuencia 5'-GGGT-3' (G3T).

modelo analizando varias de estas estructuras de autoensamblaje para obtener principios que se puedan aplicar al diseño y fabricación de nanomateriales basados en ADN y otras biomoléculas.

#### Secuencias y preparación de monómeros de G-cuádruple y oligómeros

Las estructuras aquí analizadas por mecánica molecular forman estructuras de G-cuádruple entrelazado y de otros oligómeros cuya estructura es desconocida [14]. (Figura 3). G3T forma un G-cuádruple entrelazado pero la estructura formada por TG3 no ha sido investigada.

#### Preparación del modelo.

Se prepararon modelos de G-cuádruple para 5'-TGGG-3' y 5'-TGGG-3', así como de un posible estructura para el oligómero de 5'-TGGG-3'. Estos modelos fueron preparados utilizando VMD (Visual Molecular Dynamics) para Windows versión 1.9 (Universidad de Illinois-Urbana Champagne) en una laptop personal. Se utilizaron también como parámetros iniciales para los nucleótidos los disponibles en el paquete de 3DNA 2.0 para Windows (Xiang-Jun Lu y Wilma K. Olson) [18]. Se utilizó la base de guanina para B-DNA incluidas en el paquete de 3DNA como punto de inicio. Utilizando VMD se rotaron las moléculas aproximadamente 90 grados entre sí quedando alineadas en un mismo plano y reacomodadas de tal forma que ensamblen el patrón de puentes de hidrógeno tipo Hoogsteen característico de G-cuádruple. (Figura 1) Luego se aseguró que queden a una distancia correspondiente a las distancias de referencia publicadas en estructuras conteniendo tetradas G:G:G:G [19, 20]. Se utilizó la misma estrategia para la tetrada T:T:T:T [21]. Los G-cuádruple G3T y TG3 se construyeron superponiendo las tetradas con una separación entre planos de 3.4 Å y un ángulo de rotación entre planos de 36°. A este primer modelo se lo introduce en una caja de agua de dimensiones que tengan al

menos 12 Å de distancia entre un átomo de la molécula y cualquier cara de la caja. Una vez construida la caja de agua, se procede a añadir los contra iones (potasio). Los cationes fueron añadidos siguiendo el protocolo de autoionización incluido en VMD.

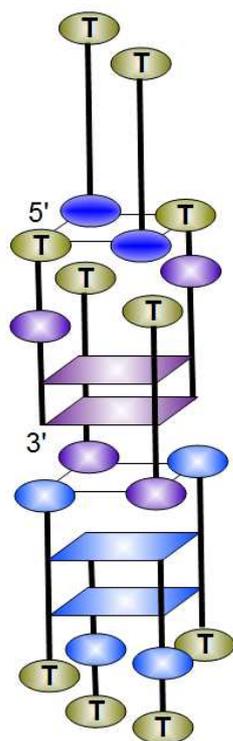
#### Minimización

Las moléculas fueron sometidas a minimización en una serie de etapas. En la primera etapa se minimizó el agua (y cationes, potasio) alrededor de la molécula dejando fijos los átomos del ADN por un total de 3000 pasos. Segundo, en algunos casos se dejaron fijos todos los átomos excepto los del esqueleto para asegurar que los extremos 5' y 3' entre las distintas tetradas estuvieran correctamente alineadas y enlazadas, y se minimizaron por al menos 3000 pasos. Finalmente, se levantó la restricción de movimiento a todos los átomos del sistema, minimizando todo por 15000 pasos. Esto se realizó utilizando NAMD Scalable Molecular Dynamics 2.8 (Universidad de Illinois- Urbana Champagne) para Linux instalado en un clúster de 12 procesadores (Linux distribución Rocks 5.4.3 (viper)). Se utilizó un campo de fuerza CHARMM como está implementado en NAMD 2.8. Se implementó el método de electrostática periódica de sistema completo con el algoritmo Particle Mesh Ewald. Los archivos de topología y parámetros de CHARMM *top\_all27\_prot\_lipid\_na.inp* y *par\_all27\_prot\_lipid\_na.inp* que se utilizaron se pueden encontrar en: <http://code.google.com>

## Resultados

#### Arquitectura topológica

La determinación de la estructura tridimensional de todas las especies formadas por las secuencias estudiadas aquí está fuera del alcance de este estudio pero constituye un trabajo en progreso a ser reportado en el mediano plazo. Para la construcción de los modelos de la estructura del oligómero 5'-TGGG-3' (TG3) nos basamos en resultados experimentales que reportamos previamente.[14] Brevemente, los datos de diroísmo circular de TG3 indican que tanto el monómero (G-cuádruple) como el oligómero son G-cuádruple paralelos [14]. Los mismos resultados se obtuvieron para el monómero y el G-cuádruple entrelazado de la secuencia 5'-GGGT-3' cuyo espectro de diroísmo circular no había sido reportado antes. Para el caso de nuestra secuencia TG3, electroforesis de gel de poliacrilamida confirmó la formación de tanto el monómero como el oligómero [14]. Basados en la movilidad de la banda del oligómero de TG3, que tiene un desplazamiento más lento que la banda correspondiente al G-cuádruple entrelazado (de 8 cadenas), postulamos que la estructura consta de entre 9 a 11 cadenas. Aquí reportamos un modelo de la estructura conteniendo 10 cadenas que parece ser el número más consistente con la movilidad de las bandas observadas. (Figura 9) Basados en estos resultados experimentales construimos modelos que cumplieran con los siguientes



**Figura 3: Modelo de posible estructura del oligómero de TG3. TGTG tétrada antes de la minimización.**

requisitos a) la estructura dentro de los “monómero” debía ser de un G-cuádruple paralelo, es decir que todas las cuatro cadenas están orientadas en la misma dirección 5’ a 3’. b) El modelo del oligómero debía incorporar diez cadenas de TG3. c) Los pisos de G-cuádruple debían tener estructura similar a estructuras reportadas previamente por resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos x con respecto a distancia y orientación de los residuos de guanina en el mismo piso de G-cuádruple. d) para los pisos de cuartetos no convencionales (GGTT) se buscaron estructuras previamente publicadas para usarlas como referencia [22, 23, 24, 25].

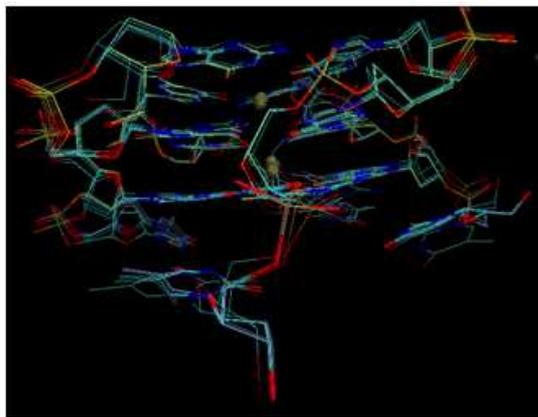
El G-cuádruple entrelazado (Figura 3) tiene cuatro cadenas orientadas 5’ a 3’ y las otras cuatro en la orientación opuesta. Las secuencias en estudio forman diferentes estructuras dependiendo del tratamiento térmico a la que el oligonucleótido fue sometido. Hay dos especies discretas que se forman. A las soluciones conteniendo estas estructuras se las sometió a análisis utilizando dicroísmo circular, una técnica que nos puede dar información sobre la orientación de las cadenas de DNA (paralelas o antiparalelas); así como también si hay diferencias en la estructura tridimensional al comparar dos moléculas de DNA (por ejemplo si es un dúplex o una estructura de G-cuádruple) [26, 27, 28]. La espectroscopia de dicroísmo circular mostró claramente un espectro característico de estructuras de G-cuádruple para todas las secuencias en presencia de potasio (ion necesario para estabilizar estructuras de G-cuádruple) [14]. Observamos que el espectro fue característico de

un G-cuádruple paralelo en todos los casos, [14] aún para el G-cuádruple entrelazado que como se indicó antes tiene una sección con las cadenas orientadas en dirección opuesta. (Figura 3) Por esta observación llegamos a la conclusión que el espectro de dicroísmo circular solo cambia cuando dentro de una sección “G-cuádruple” tenemos cadenas antiparalelas; pero no se observa cambio, en cuanto a los máximos y mínimos característicos de una estructura paralela en el espectro, cuando son distintas secciones de la misma molécula las que están orientadas en direcciones opuestas. Basados en esta conclusión, todos nuestros modelos fueron construidos como G-cuádruple “paralelo” pero sin descartar la posibilidad de incluir segmentos enteros de G-cuádruple que corren en dirección opuesta con respecto a otro segmento. (Figura 4, Figura 5)

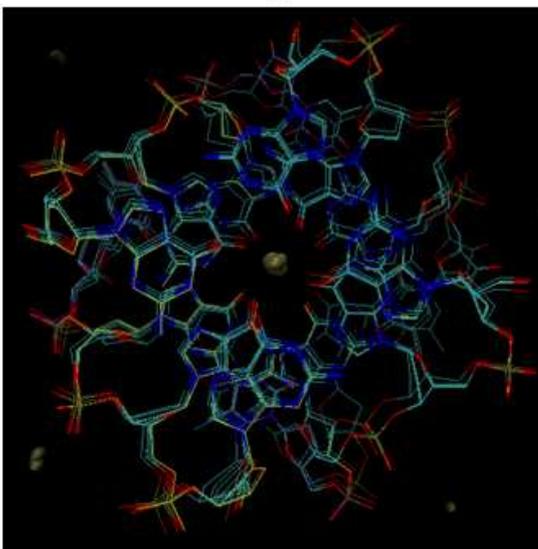
En cuanto a la estructura inicial para cuartetos (cuatro bases en un mismo piso unidas por alguna clase de puentes de hidrógeno) se usaron como modelos iniciales modelos plausibles construidos manualmente cuando las disposiciones estructurales necesarias no habían sido reportadas antes. Por ejemplo, una de las disposiciones (GTGT) al no existir una estructura publicada tuvo que ser construida de novo por lo que se prestó especial atención al producto de la minimización para obtener la disposición más estable. (Figura 6)

#### **Cationes y solvente**

Se ha reportado que la presencia de cationes es esencial para estabilizar las estructuras de G-cuádruple. En nuestros modelos se colocaron iones de K<sup>+</sup> manualmente en el canal central, que es donde se ha reportado la localización de estos iones, en estudios basados en Resonancia Magnética Nuclear de estructuras de G-cuádruple [29, 30, 31]. En nuestros modelos se observan cómo esferas doradas. (Figura 4 y Figura 5) Durante la minimización los iones se movieron ligeramente de su posición pero en general permanecieron en el centro del canal consistente con las observaciones experimentales. Estos iones son indispensables para la estabilidad de la molécula, modelaciones sin el ion central causaban que la estructura se abra y desestabilice de manera importante. Los modelos de ADN fueron introducidos en una caja de agua (TIP3) de dimensiones tales que al menos existe una distancia de 12 Å entre cualquier átomo de las estructuras y el extremo de la caja de agua. (Figura 7) NAMD, el software de dinámica molecular utilizado en este estudio, realiza una simulación periódica donde la caja de agua y su contenido es la unidad que se repite en todo el espacio. El tamaño de la caja de agua garantiza que no exista interacción entre las estructuras de ADN, y que durante la simulación la molécula no se salga de la caja de solvente. Este sistema fue neutralizado con iones de potasio (K<sup>+</sup>) utilizando la herramienta de autoionización de VMD. (Figura 7) La molécula de DNA es rica en cargas negativas debido a los fosfatos del esqueleto por lo que es de gran importancia la adición de cationes para estabilizar el sistema.



(a)

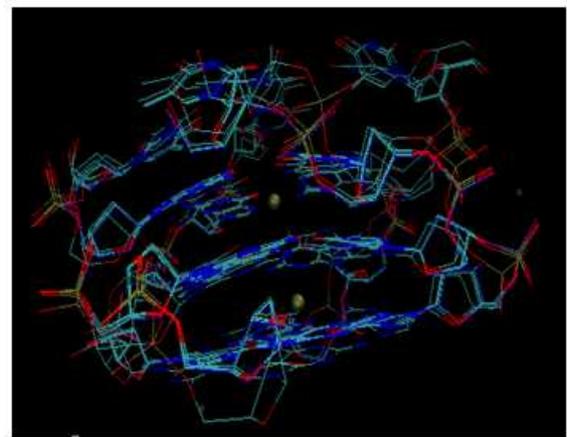


(b)

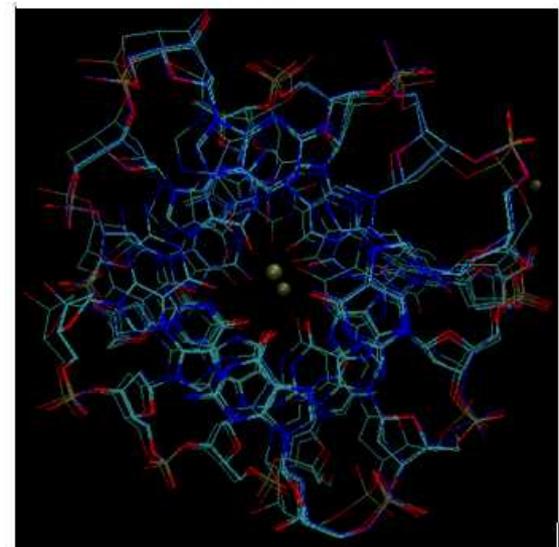
Figura 4: Superposición de estructuras del monómero G-cuádruple de G3T, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Vista lateral (a) y vista superior (b). Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Los residuos de la estructura final se muestran de color distinto al estándar cian (carbonos) y azul (nitrógenos). Regiones donde se pueden distinguir mayor numero de estructuras no perfectamente superpuestas indica regiones que se acomodaron más durante la minimización .

### Minimizaciones

Todas las minimizaciones se realizaron por un total de 15000 pasos que se determinó era suficiente para que la estructura alcanzara el equilibrio. Para determinar si la molécula alcanzó el equilibrio se analizaron varios criterios como el RMSD (root media square displacement), RSMF (root media square fluctuation), y el desplazamiento total tanto de la molécula completa de ADN, cómo de los residuos individuales (los nucleótidos que conforman cada una de las cadenas que se ensamblan en las nanoestructuras) (Figura 8). En ambos casos se busca observar que ya no existan cambios significativos en estos parámetros al incrementar los pasos de minimización. En las matrices en las que se codifican los valores para estos parámetros con colores se observa que ya no



(a)



(b)

Figura 5: Superposición de estructuras del monómero G-cuádruple de TG3, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Vista lateral (a) y vista superior (b). Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Solo la posición final de los iones de potasio (esferas) se muestran. La estructura final se muestra de un color purpura. Regiones donde se pueden distinguir mayor numero de estructuras no perfectamente superpuestas indica regiones que se acomodaron más durante la minimización.

existen cambios al final de la minimización. El sistema de G3T(monomérico) tiene un total de 9306 átomos incluyendo las moléculas de solvente. La energía total del sistema luego de una minimización de 15000 pasos es de -43844.5697 Kcal/mol (esta energía no es una energía absoluta del sistema y por lo tanto sólo se puede utilizar con fines de comparación con sistemas equivalentes). En comparación el sistema de TG3 monomérico que tiene un total de 9306 átomos, tiene una energía total luego de 15000 pasos de -41074.1647 Kcal/mol. Esto indica que el monómero de TG3 es menos estable que G3T, esto coincide con las observaciones experimentales de que TG3 monomérico se forma en menor proporción que TG3 y prefiere en lugar del monómero

formar el oligómero [14]. TG3 es una especie que no se forma en cantidades significativas de G-cuádruple monomérico, pero forma lo que nosotros sospechamos es un G-cuádruple entrelazado bajo las condiciones apropiadas.

También se minimizó un modelo para el oligómero de TG3 que tiene como peculiaridad que, a diferencia del G-cuádruple entrelazado, tiene dos cadenas que quedan sobresaliendo de la estructura. (Figura 2 y Figura 3) Es-

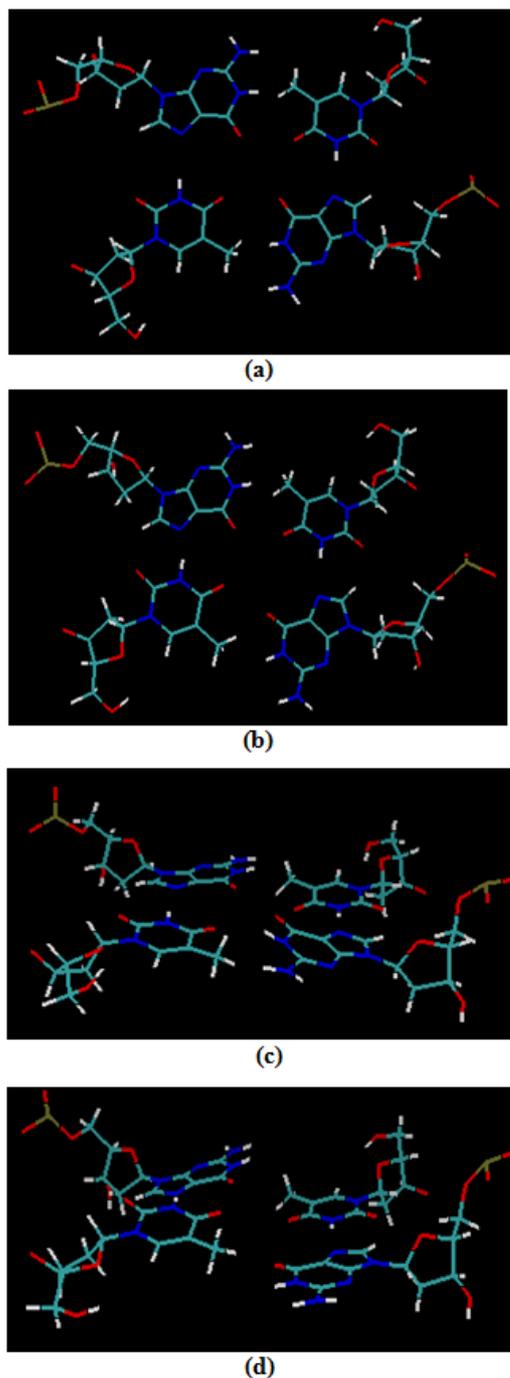
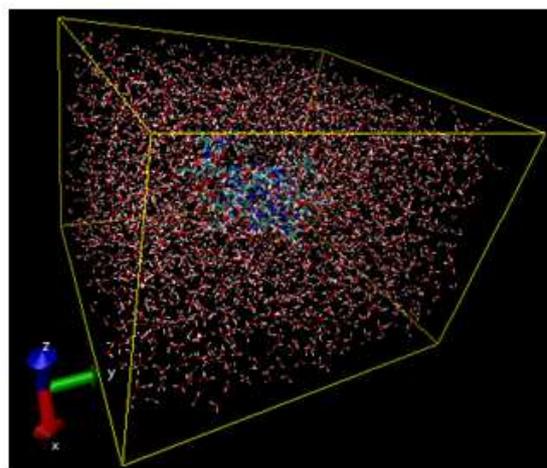
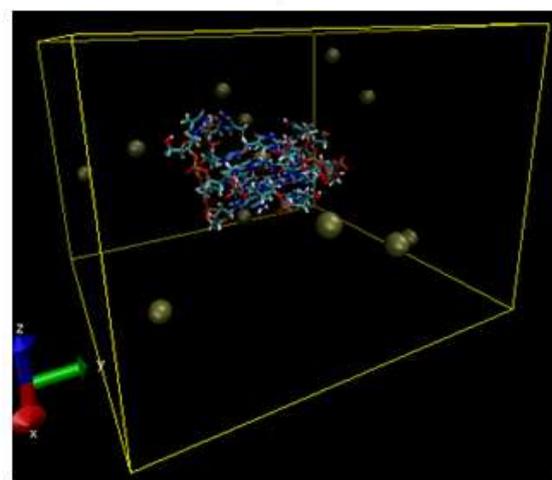


Figura 6: Vista superior de la tetrada GTGT antes (a) y después de 15000 pasos de minimización (b). Vista lateral de la tetrada GTGT antes (c) y después de 15000 pasos de minimización (d).



(a)

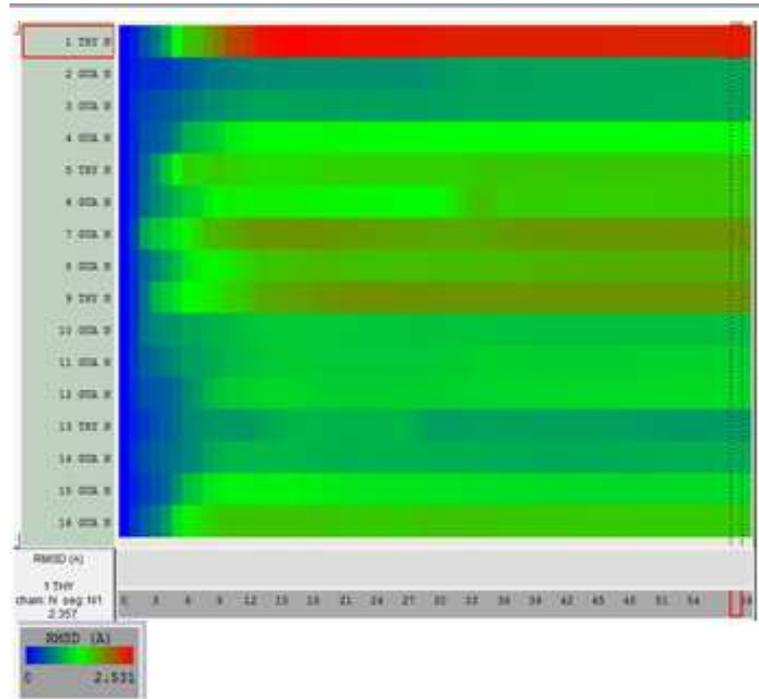


(b)

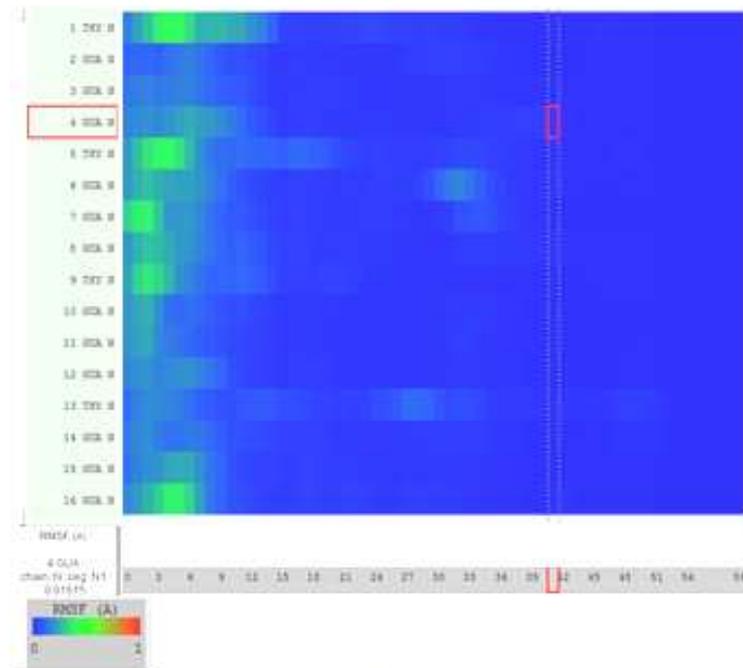
Figura 7: (a) Molécula de 5'-TGGG-3' (TG3) G-cuádruple en una caja de agua. (b) las moléculas de agua están ocultas para facilitar visualizar la ubicación del G-cuádruple y de los átomos de potasio. Obsérvese que están presentes tanto en el interior de la estructura como en el exterior.

to se reconcilia con las observaciones del gel de electroforesis donde este oligómero se desplaza ligeramente más despacio que el G-cuádruple entrelazado. Estas dos cadenas en principio deberían ser mucho más móviles porque no están formando parte de un motivo tan estructurado como el de G-cuádruple. Sin embargo esto no es lo que se observa en los resultados de la minimización reflejando que hay otros factores mucho más importantes a este nivel de teoría.

En realidad tan sólo dos de los residuos que presentan mayor reacomodación (RMSD >1.8) representados con los colores marrón y rojo están en las dos cadenas que sobresalen en el dímero y tan sólo una de las timinas terminales está representada. (Figura 9) Las regiones donde hay mayor reacomodación corresponden a las zonas donde dos cadenas (con respecto al eje longitudinal de la hélice de ADN) se encuentran o en otras palabras el sitio entre donde una cadena inicia y la otra termina.



(a)

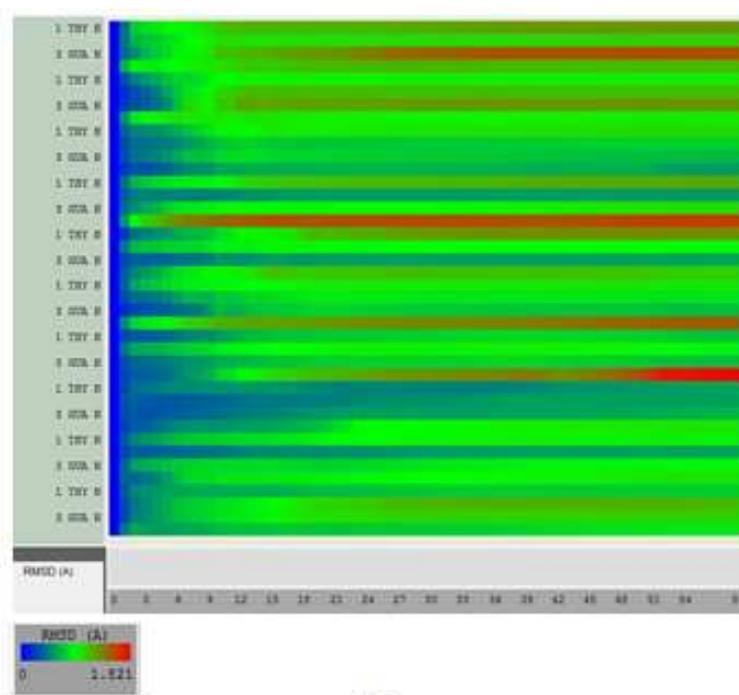


(b)

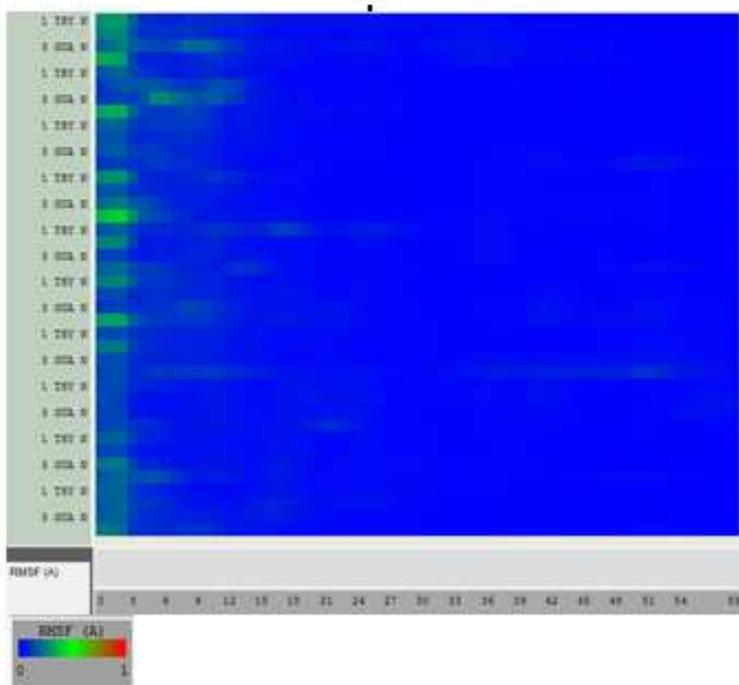
Figura 8: Resultados de la minimización del monómero G-cuádruple de G3T. (a) Root media square displacement (RMSD) de cada residuo con respecto a los pasos de minimización. (b) Root media square fluctuation (RMSF) Eje y corresponde al residuo dentro de la estructura y el eje x corresponde al número del marco de la minimización (1 marco = 250 pasos de minimización). Esta estructura se minimizo por un total de 15000 pasos. Ausencia de cambio de color en los marcos finales indica que la estructura ya no está cambiando y ha llegado a un mínimo .

Esto se podría explicar por dos razones principales. La primera que la geometría inicial de estas regiones estaba arbitrariamente más alejada del mínimo. Estas regiones sin embargo se implementaron de tal forma que exista una continuidad en la hélice del ADN y se modelaron

siguiendo los mismos parámetros que los residuos “internos” y tendrían mucho menos movilidad o espacio para acomodarse que las bases en las cadenas sobresalientes. Por tanto esta razón por sí sola no explica la observación. La segunda perspectiva es que precisamente



(a)

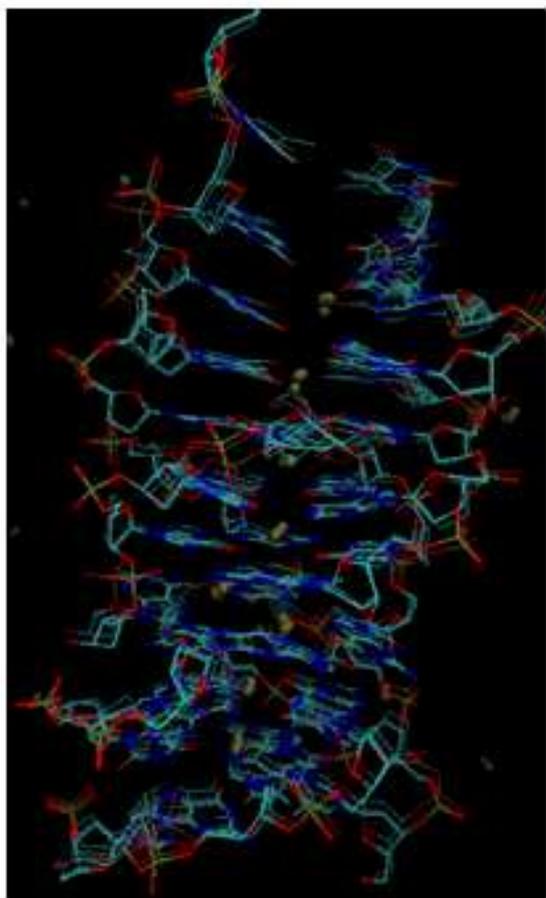


(b)

**Figura 9:** Resultados de la minimización de un modelo para el oligómero de G-cuádruple de TG3. (a) Root media square displacement (RMSD) de cada residuo con respecto a los pasos de minimización. (b) Root media square fluctuation (RMSF) Eje y corresponde al residuo dentro de la estructura y el eje x corresponde al número del marco de la minimización (1 marco = 250 pasos de minimización). Esta estructura se minimizó por un total de 15000 pasos. Ausencia de cambio de color en los marcos finales indica que la estructura ya no está cambiando y ha llegado a un mínimo.

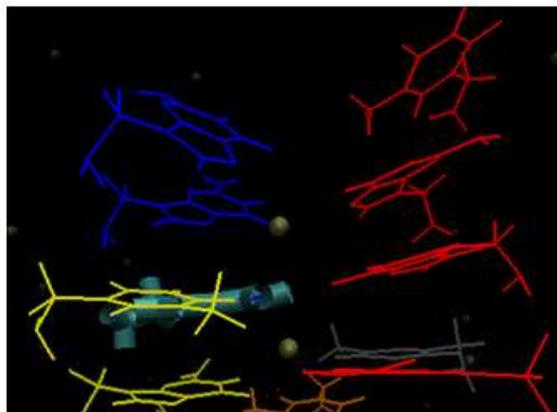
estos residuos, por estar más restringidos por la presencia de residuos vecinos y siendo que estas regiones de interface vienen a representar puntos de corte en la continuidad de lo que en ADN B normal sería una cadena continua, requieren reacomodarse más para adaptarse a

este ambiente. Por tanto a este nivel de teoría, dónde estamos examinando la estabilidad intrínseca de la molécula y no su respuesta a factores externos concluimos que las repulsiones de tipo estérico y electrostático intramolecular e intermolecular (con la cadena inmedia-



**Figura 10:** Superposición de estructuras del modelo para el oligómero de TG3, se muestra una estructura cada 1500 pasos de minimización. Los átomos de hidrogeno no se muestran para facilitar la visualización. Esferas representan iones de potasio.

tamente adyacente) son las fuerzas que determinan la estabilidad de una configuración dada. Por tanto, estos resultados no están en contradicción con observaciones experimentales dónde se ve por ejemplo que los pares de bases más externos presentan mayor movilidad o son los más propensos a “abrirse transitoriamente” [32]. Otro aspecto muy interesante en este modelo de oligómero es el rol del catión. Si se presta especial atención al átomo de potasio colocado exactamente encima de lo que sería la última tétrada GTGT y a la región de las dos cadenas sobresalientes (modelo en Figura 3); se observa que la estructura minimizada se distorsiona para formar una triada GGT. (Figura 11). Esto se debe en parte a que los oxígenos de las guaninas 2 y 3 (contadas desde el extremo 5' correspondiente a la T) en las cadenas sobresalientes (en azul y rojo en la Figura 11) se orientaron apuntando hacia el potasio, causando una reacomodación de toda esa región que se podría resumir en que las cadenas marcadas en rojo y gris se desplazaron el equivalente al espacio de una base hacia abajo (a lo largo del eje longitudinal de la hélice de ADN). Como consecuencia se forman dos triadas GGT. La primera está marcada por la guanina en cian en la Figura 11 y la segunda esta inmediatamente debajo. Este mecanismo tendría un papel fundamental en el autoensamblaje



**Figura 11:** Triada G:G:T (la G esta de color cian y en representación de enlace). Inmediatamente abajo se observa otra triada G:G:T con la contribución de una T (en amarillo) que al inicio de la minimización correspondía a la tétrada G:T:G:T inmediatamente inferior. Cada cadena está representada de un color distinto y parte del esqueleto está omitido para facilitar la visualización.

del sistema porque este catión podría estabilizar conformaciones que limiten la “polimerización” o que el autoensamblaje continúe. Sin embargo, aún se requiere avanzar con el análisis donde el siguiente paso a seguir es repetir la minimización sin este potasio y realizar las simulaciones de dinámica molecular para ver si este potasio se mantiene en este sitio o durante la simulación se pierde hacia el solvente. El rol del catión en este caso es un claro ejemplo de cuanto los cationes pueden influenciar en la estructura dinámica del ADN especialmente en este tipo de regiones más expuestas al solvente.

## Conclusiones

El estudio a nivel atómico de estructuras que se autoensamblan cómo estos oligómeros de G-cuádruple aporta a la comprensión sobre la importancia del rol que juegan los cationes en la solución en la estabilidad de la molécula, así como también qué información importante sobre la estabilidad de la conformación se puede obtener a partir de una minimización donde podemos separar el efecto de factores externos que se introducen durante dinámica molecular. En este caso, las regiones de transición entre una cadena y otra representan los sitios donde mayor reacomodación con respecto a una estructura B-ideal es necesaria. Por tanto, la identidad de las bases terminales (extremos 5'y 3') son de esencial importancia para el producto final de autoensamblaje. Esto explica por qué dos secuencias tan similares como son 5'-GGGT-3' y 5'-TGGG-3' producen dos clases distintas de oligómeros bajo idénticas condiciones y tratamiento. Esta observación es de suma importancia porque significa que se puede introducir un nuevo nivel de control en el autoensamblaje de ADN al controlar la identidad de las bases a extremos 5'y 3' e incluso introducir nucleótidos modificados en estos extremos para obtener mayor variedad en el ensamblaje de nanoestructuras basadas en ADN. Finalmente, también estos resultados tienen implicación directa en el rol de

la introducción de fluoróforos para seguir la estructura de nanoestructuras de ADN a través de técnicas como fluorescence resonance electron transfer (FRET) donde la introducción del fluoróforo podría de manera fundamental cambiar el comportamiento del autoensamblaje del sistema. Este estudio constituye una primera parte de un más profundo entendimiento a nivel atómico de los procesos de autoensamblaje de ADN G-cuádruple. Los modelos minimizados aquí reportados serán usados como estructuras iniciales para simulaciones de dinámica molecular donde se incluirá el efecto del solvente e iones, y que permitirán adicionalmente estudiar cómo el tratamiento térmico afecta la estabilidad relativa de estas estructuras. (Manuscrito en preparación)

### Agradecimientos

Los investigadores quieren agradecer a las siguientes personas: Bernardo Gutiérrez, Gabriela Méndez, Francisco Yanqui, Ana Samaniego y Denisse Vallejo quienes trabajaron en parte del proyecto, la mayoría de su trabajo será reportado en subsecuentes publicaciones. También se agradece a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo del Internet Avanzado (CEDIA) quién parcialmente financia al grupo GETNano (Grupo Ecuatoriano para el Estudio Experimental y Teórico de Nanosistemas) sin cuyo soporte, y apoyo, este trabajo no habría sido posible. Se agradece especialmente a F. Javier Torres, director del grupo de Química Computacional y Teórica de la USFQ (QCT-USFQ) por todo el apoyo logístico, revisión y discusión del proyecto. A Veronika A. Szalai investigador principal del laboratorio donde todos los experimentos fueron hechos y cuyos resultados fueron usados para este estudio teórico

### Referencias

- [1] Seeman, N. 2007. An overview of structural DNA nanotechnology. *Molecular Biotechnology*. 37 (3), 246-257.
- [2] Dutta, K.; Fujimoto, T. 2010. Development of New Functional Nanostructures Consisting of Both DNA Duplex and Quadruplex. *Chem. Commun.* 46 (41), 7772-7774.
- [3] Pal, S.; Deng, Z. 2010. DNA-Origami-Directed Self-Assembly of Discrete Silver-Nanoparticle Architectures. *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (15), 2700-2704.
- [4] Sadhasivam, S.; Yun, K. 2010. DNA Self-Assembly: Prospectus and Its Future Application. *Journal of Materials Science*. 45 (10), 2543-2552.
- [5] Wilner, O. I.; Henning, A. 2010. Covalently Linked DNA Nanotubes. *10 (4)*, 1458-1465.
- [6] Andersen, E. S.; Dong, M. 2009. Self-Assembly of a Nanoscale DNA Box with a Controllable Lid. *Nature*. 459 (7243), 73-76.
- [7] Dietz, H.; Douglas, S. 2009. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science*. 325 (5941), 725-730.
- [8] Ke, Y.; Sharma, J. 2009. Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Letters*. 9 (6), 2445-2447.
- [9] Pisano, S.; Varra, M. 2008. Superstructural Self-Assembly of the G-quadruplex Structure Formed by the Homopurine Strand in a DNA Tract of Human Telomerase Gene Promoter. *Biophys. Chem.* 136 (2-3), 159-163.
- [10] Bath, J.; Turberfield, A.J. 2007. DNA Nanomachines. *Nature Nanotechnology*. 2 (5), 275-284.
- [11] Lin, C.; Liu, Y. 2006. DNA Tile Based Self-assembly: Building Complex Nanoarchitectures. *ChemPhysChem*. 7 (8), 1641-1647.
- [12] Niemeyer, C. M.; Simon, U. 2005. DNA-Based Assembly of Metal Nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2005 (18), 3641-3655.
- [13] Bates, P.; Mergny, J. 2007. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *In EMBO Rep, England*. Vol. 8, pp 1003-10.
- [14] Mendez, M. A.; Szalai, V.A. 2009. Fluorescence of Unmodified Oligonucleotides: A Tool to Probe G-quadruplex DNA Structure. *Biopolymers*. 91 (10), 841-850.
- [15] Miyoshi, D.; Karimata, H. 2007. Artificial G-wire Switches with 2,2'-Bipyridine Units Responsive to Divalent Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5919 - 5925.
- [16] Alberti, P.; Bourdoncle, A. 2006. DNA Nanomachines and Nanostructures Involving Quadruplexes. *Org. Biomol. Chem.* 4, 3383-3391.
- [17] Krishnan-Ghosh, Y.; Liu, D. 2004. Formation of an Interlocked Quadruplex Dimer by D(GGGT). *J Am Chem Soc.* 126, 11009-11016.
- [18] Lu, X.-J.; Olson, W.K. 2008. 3dna: A Versatile, Integrated Software System for the Analysis, Rebuilding and Visualization of Three-Dimensional Nucleic-Acid Structures. *3 (7)*, 1213-1227.
- [19] Parkinson, G. N.; Lee, M. 2002. Crystal Structure of Parallel Quadruplexes from Human Telomeric DNA. *Nature*. 417, 876-880.
- [20] Haider, S.; Parkinson, G. 2002. Crystal Structure of the Potassium Form of an Oxytricha Nova G-quadruplex. *J. Mol. Biol.* 320, 189-200.
- [21] Lim, K. W.; Alberti, P. 2009. Sequence Variant (CTAGGG)<sub>n</sub> in the Human Telomere Favors a G-quadruplex Structure containing a G:C:G:C Tetrad. *Nucleic Acids Research*. 37 (18), 6239-6248.
- [22] Viladoms, J.; Escaja, N. 2010. Self-Association of Cyclic Oligonucleotides through G:T:G:T Minor Groove Tetrads. *Tetrahedron Young Investigator Award 2010: Professor Seeberger, Tetrahedron*. 2010, 18 (11), 4067-4073.
- [23] Webba daSilva, M. 2003. Association of DNA Quadruplexes through G:C:G:C Tetrads. Solution Structure of D(GCGGTGGAT). *Biochemistry*. 42 (49), 14356-14365.
- [24] Escaja, N.; Pedroso, E. 2000. Dimeric Solution Structure of Two Cyclic Octamers: Four-stranded DNA Structures Stabilized by A:T:A:T and G:C:G:C Tetrads. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12732-12742.
- [25] Gu, J.; Leszczynski, J. 2000. Structures and Properties of the Planar G:C:G:C Tetrads: Ab initio HF and DFT Studies. *J. Phys. Chem. A*, 104, 7353-7358.

- [26] Gray, D. M.; Wen, J. 2007. Measured and Calculated CD Spectra of G-quartets Stacked with the Same or Opposite Polarities. *Chirality*.
- [27] Nagatoishi, S.; Tanaka, Y. 2007. Circular Dichroism Spectra Demonstrate Formation of the Thrombin-binding DNA Aptamer G-quadruplex under Stabilizing-Cation-Deficient Conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 352 (3), 812-7.
- [28] Fasman, G. D. 1996. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. *Plenum Press: New York.* p ix, 738 p.
- [29] Hud, N. V.; Schultze, P. 1999. Binding Sites and Dynamics of Ammonium Ions in a Telomere Repeat DNA Quadruplex. *J. Mol. Biol.* 285, 233-243.
- [30] Hud, N. V.; Schultze, P. 1998. Ammonium Ion as an NMR Probe for Monovalent Cation Coordination Sites of DNA Quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society.* 120 (25), 6403-6404..
- [31] vanMourik, T.; Dingley, A.J. 2005. Characterization of the Monovalent Ion Position and Hydrogen-bond Network in Guanine Quartets by DFT Calculations of NMR Parameters. *Chemistry.* 11 (20), 6064-79.
- [32] Andreatta, D.; Sen, S. 2006. Ultrafast Dynamics in DNA: "Fraying" at the End of the Helix. *128 (21), 6885-6892.*