



Universidad Nacional del Sur

Tesis de Doctor en Química

**Interruptores Moleculares basados en
Azobencenos y Ciclodextrinas.
Aplicación en sistemas miméticos de
Factores de Transcripción.**

Zulma Beatriz Quirolo

Bahía Blanca

Argentina

2017

Prefacio:

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional de Sur y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química, Área II durante el período comprendido entre el 2009 y el 2016, bajo la dirección de la Dra. Verónica I. Dodero, Profesora Adjunto de Química Orgánica.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la calificación de..... (.....)

*“Solo con el corazón se puede ver bien,
lo esencial es invisible a los ojos”.*

Antoine de Saint Exupéry

A mis padres y hermana

Agradecimientos

Luego de un largo camino recorrido, llega el final de una hermosa etapa y no me quedan más que palabras de agradecimientos para todos los que lo hicieron posible. Desde ya me siento orgullosa de haber podido cursar estos estudios en la Universidad Nacional del Sur, y en esta etapa de mi vida, ser parte del Departamento de Química y del INQUISUR, desde ya quiero agradecer a las autoridades, personal académico y no docente.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas de Posgrado tipo I y tipo II que me han permitido realizar mi trabajo y estudios predoctorales. Tuve la gran bendición de poder realizar diversas estancias, en universidades extranjeras, que me han permitido estudiar, aprender y realizar parte de mi trabajo experimental.

Esta tesis representó un gran desafío, que me ha ayudado a formarme como profesional, así como de un gran crecimiento personal que no hubiera sido posible sin la ayuda y la compañía de mi directora, la Dra. Verónica Doderó, la cual me ha brindado grandes consejos y su apoyo incondicional.

Quiero agradecer al Prof. Jose Martins, quien me recibió en la Universidad de Gent (Bélgica) para poder realizar mis estudios y formarme en la técnica del RMN, quien me alentó y ayudó en las dificultades. Al Prof. Norbert Sewald, quien me permitió realizar una estancia en la Universidad de Bielefeld (Alemania), la cual fue muy enriquecedora, con nuevos conocimientos y desafíos en la química de los péptidos. Y por último, al Prof. José Luis Mascareñas de la Universidad de Santiago de Compostela (España), quien me abrió las puertas de su laboratorio para continuar aprendiendo y así desarrollar más de mi trabajo experimental. De cada uno estos lugares, guardo grandes recuerdos, grandes personas, muchos compañeros de laboratorio y amigos, que llevo en mi corazón.

Este transitar me ha permitido conocer compañeros de laboratorio, y muchos de ellos ya son amigos. Gracias Juli, Ale, Georgi, Mary, Cin y Silvi.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de mi familia y amigos, que sin entender muchas veces de que hablaba, me han escuchado, alentado y acompañado.

Resumen

El mecanismo por el cual los sistemas biológicos responden a un estímulo externo es un problema fundamental de la biología moderna. En el caso particular de los factores de transcripción (FT) una señal extracelular conduce a la activación de la expresión de un gen determinado. La motivación de esta tesis surge de la enorme importancia de estas proteínas regulatorias en el funcionamiento celular por lo que es evidente la importancia de comprender las bases moleculares que rigen sus interacciones con el fin último de diseñar estrategias racionales para alterar de forma programable y selectiva la expresión de determinados genes.

En este contexto y a través de la combinación de síntesis orgánica, química supramolecular y biosupramolecular en orden creciente de complejidad, es que nos proponemos obtener sistemas miméticos de FT que interactúen de forma específica con sus ds ADN consenso *in vitro*. Como objetivo general de esta tesis, estamos interesados en avanzar en el entendimiento del proceso de reconocimiento molecular de sistemas sencillos en medio acuoso, para finalmente trasladar estos conocimientos en el diseño de miméticos de FT.

Como objetivos específicos nos propusimos promover la formación de homodímeros no covalentes mediada por un ligando externo y su interacción con secuencias de ds ADN consenso. Pero también estamos interesados en dar los pasos iniciales hacia la heterodimerización de dos fragmentos proteicos a través de la complejación entre ciclodextrinas y azobencenos, así como ciclodextrina y adamantano.

En el Capítulo 3, hemos investigado una estrategia de *dimerización no covalente* de *homodímeros* de miniproteínas del factor de transcripción GCN4 mediada por el agregado de un receptor alostérico y evaluado la interacción con diferentes ds ADN. Inicialmente, para este fin se sintetizó y caracterizó exhaustivamente un dímero fotomodulable de azo β -ciclodextrina (**4**), el mismo se encuentra en dos estados fotoestacionarios, el primero estable termodinámicamente de cuya relación de isómeros *E:Z* es de 95:5 (**azoCyD(E)**) y un segundo obtenido luego de irradiar con luz ultravioleta en la una relación *E:Z* 60:40 (**azoCyD(Z)**). El dímero **4** fue usado con el fin promover la dimerización de dos monómeros de la región básica del GCN4 provistos de un grupo adamantano en el extremo C-terminal, llamados **Ad26** y **Ad30** ya que difieren solo en 4 a.a (Capítulo 5). Mientras el péptido **Ad26** no presenta unión a ninguna secuencia, en ausencia o presencia de **4**; el péptido **Ad30**, es capaz de unir a los ADN consenso luego del agregado de **azoCyD(E)** a la concentración de 200 nM de monómero. Tanto los experimentos de retardo en gel como los de difracción circular muestran que el sistema **Ad30-azoCyD(E)-Ad30** reconoce específicamente la secuencia consenso 2/2C (CRE, 5'-ATGAcgTCAT-3'), mientras que el sistema **Ad30-azoCyD(Z)-Ad30** no es capaz de hacerlo. En el caso de Ad30, es posible establecer

un reconocimiento secuencial al ds CRE, donde dímero azoCyD (**4**) en configuración *E* mejora la unión promoviendo la dimerización y aumentando así la afinidad del reconociendo. A pesar que estos resultados en cuanto a afinidad son moderados es el primer ejemplo de un mimético del GCN4 que forma un sistema tetra-componente en la interacción con su ds ADN consenso.

En cuanto a la estrategia de *heterodimerización no covalente*, hipotetizamos que el grupo azobenceno podría ser usado como huésped en la complejación de la cavidad de la ciclodextrina y así aprovechar la diferencia de afinidad de ambos isómeros *E* y *Z* por la cavidad. Sin embargo como es necesario controlar no solo la organización de los FT en tiempo y espacio y de manera reversible; sino también con una elevada afinidad, es que primero trabajamos con sistemas modelos. Para ello, evaluamos la formación de complejos de α - y β - ciclodextrinas con derivados funcionalizados de forma diferente en las posiciones 4 y 4' de azobencenos, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, por RMN. Esta técnica nos permitió determinar no solo las constantes de afinidad sino también la geometría de los complejos por experimentos Off ROESY, como se describe en el Capítulo 4. Así determinamos, que el grupo $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$ tiene una afinidad adecuada (K_a de 3000 M^{-1}) por la cavidad de β -ciclodextrina, y una posible fotoisomerización eficiente en agua.

Con esta información en el Capítulo 6 hemos sintetizado un nuevo mimético fotomodulable del GCN4 con un grupo azobenceno sustituido con un grupo $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$, **AZO26**. Finalmente, y con motivo de extender la química de miméticos de Ft, hemos sintetizado en fase sólida dos fragmentos de la proteína Id1, que es inhibidor transcripcional del FT MyOD. Luego del corte de la resina y de una laboriosa purificación hemos obtenido dos fragmentos del Id1, **H1** (extremo N-terminal) y **H2** (extremo C-terminal) puros. Hemos intentado, acoplar a estos fragmentos diferentes moléculas como β -ciclodextrina, azobenceno o adamantano, pero solo hemos sido exitosos en la síntesis y aislamiento del péptido **H2Ad**, que es una miniproteína mutada de **H2** en el extremo N-terminal con el grupo adamantano.

Mientras que **AZO26** es un candidato mejorado para formar heterodímeros con otro monómero del GCN4 con un grupo β -Ciclodextrina **CyD26**; todos, los fragmentos de la proteína Id1 podrían ser potenciales inhibidores de la proteína MyoD. Estas moléculas serán probadas en trabajos posteriores.

Desde el punto de vista de la ciencia básica esperamos con esta tesis contribuir al avance en el desarrollo de estrategias de diseño, síntesis química y de reconociendo molecular con el objetivo final de obtener miniproteínas controlables a través de estímulos externos.

Abstract

The mechanism by which biological systems respond to an external stimulus is a fundamental problem of modern biology. In the particular case of transcription factors (FT) an extracellular signal leads to the activation of the expression of a given gene. The motivation of this thesis arises from the enormous importance of these regulatory proteins in the cellular behavior so it is evident the importance of understanding the molecular basis governing their interactions with the ultimate goal of designing rational strategies to programmatically and selectively alter the expression of certain genes.

In this context and through the combination of organic synthesis, supramolecular and biosupramolecular chemistry in increasing order of complexity, we propose to obtain mimetic systems of FTs that interact specifically with their ds DNA consensus in vitro. As a general objective of this thesis, we are interested to advance in the understanding of the process of molecular recognition of simple systems in aqueous medium, to finally transfer this knowledge in the design of FTs mimetics.

As specific objectives, we aimed to promote the formation of non-covalent homodimers mediated by an external ligand and its interaction with ds DNA consensus sequences. But we are also interested in taking the initial steps towards the heterodimerization of two protein fragments through the complexation between cyclodextrins and azobenzenes, as well as cyclodextrin and adamantane.

In Chapter 3, we investigated a non-covalent dimerization strategy of miniprotein homodimers of transcription factor-mediated GCN4 by the addition of an allosteric receptor and evaluated the interaction with different ds DNA. Initially, for this purpose a photomodulable dimer of azo β -cyclodextrin (4) has been synthesized and characterized. It is found in two photostates, the first thermodynamically stable with an *E*: *Z* isomer ratio of 95: 5 (azoCyD (*E*)) and a second obtained after irradiating with ultraviolet light, *E*: *Z* ratio 60:40 (azoCyD (*Z*)). Dimer 4 was used to promote the dimerization of two monomers of the GCN4 base region bearing an adamantane group at the C-terminus, called Ad26 and Ad30, as they differ only in 4 a.a (Chapter 5). While the Ad26 peptide does not exhibit binding to any sequence, in the absence or presence of 4; the Ad30 peptide, is capable of binding consensus DNAs following the addition of azoCyD (*E*) to the concentration of 200 nM monomer. Both Emsa experiments and circular dichroism experiments show that the Ad30-azoCyD (*E*) -Ad30 system specifically recognizes the consensus sequence 2 / 2C (CRE, 5'-ATGAcgTCAT-3'), while the Ad30- AzoCyD (*Z*) -Ad30 is not capable of doing so. In the case of Ad30, it is possible to establish a sequential recognition to the ds CRE, where dimer azoCyD (4) in *E* configuration improves the binding promoting dimerization and thus increasing the recognition affinity. Although the observed affinity is moderate, it is the first

example of a GCN4 mimetic which forms a tetra-component system in the interaction with its ds DNA consensus.

As for the non-covalent heterodimerization strategy, we hypothesized that the azobenzene group could be used as a host in the complexation of the cyclodextrin cavity and thus take advantage of the difference in affinity of both isomers *E* and *Z* through the cavity to promote a differential DNA binding. However, it is not only necessary to control the organization of the FT in time and space and in a reversible way; but the interaction must have a high affinity. For this purpose, we first worked with model systems. For this, we evaluated the formation of α - and β -cyclodextrin complexes with differently functionalized derivatives at the 4 and / or 4' positions of azobenzenes, 14,15,16,17,18 by NMR. This technique allowed us to determine not only the affinity constants but also the geometry of the complexes by Off-ROESY experiments, as described in Chapter 4. Thus, we determined that the $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$ group has a suitable affinity (K_a of 3000 M^{-1}) by the cavity of β -cyclodextrin, and it has possible efficient photoisomerization in water, too.

With this information in Chapter 6, we have synthesized a new photomodulable mimetic of GCN4 with an azobenzene group substituted with an $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$ group, AZO26. Finally, and in order to extend the chemistry of Ft mimetics, we have synthesized in solid phase two fragments of the Id1 protein, which is transcriptional inhibitor of FT MyOD. After cutting the resin and following laborious purification we obtained two fragments of the pure Id1, H1 (N-terminal) and H2 (C-terminal) fragments. We have attempted to couple to these fragments different molecules with potential use as β -cyclodextrin, azobenzene or adamantane, but we have only been successful in the synthesis and isolation of peptide H2Ad, which is a mutated miniprotein of H2 at the N-terminal end with the adamantane group.

Whereas **AZO26** is an improved candidate for forming heterodimers with another GCN4 monomer with a β -Cyclodextrin **CyD26** group; all new fragments of the Id1 protein could be potential inhibitors of the MyoD FT. These molecules will be tested in later works.

From the point of view of basic science with this thesis we hope to contribute to the advancement in the development of strategies of design, chemical synthesis and molecular recognition with the goal of obtaining miniproteins controllable through external stimuli.