

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO: SCIENZE CHIMICHE
CICLO XXIV

STUDI MODELLO DI INIBITORI DELL'ENZIMA TIOREDROSSINA REDUTTASI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof.

Supervisore: Ch.mo Prof. Alessandro Bagno

Dottoranda : Francesca Di Sarra

Abstract

Human Thioredoxin Reductase (TrxR) is associated with cancer cell growth and anti-apoptosis process. TrxRs employ selenium in the C-terminal redox center -Gly-Cys-Sec-Gly-COOH for reduction of Trx and other substrates.

Gold-containing drugs, widely used in clinical medicine against tumors and other diseases, have been validated as potent TrxR inhibitors in vitro in the nanomolar range: gold is known for its high affinity to thiols and selenols, rendering the nucleophilic selenolate of reduced TrxR the prime target site of modification by this metal.

The reactions between Auranofin (2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosato-S-(triethylphosphine) gold) and models of thiol and selenol nucleophiles present in TrxR have been investigated in chloroform and methanol by means of ^1H , ^{31}P and ^{77}Se NMR spectroscopy. In chloroform, Auranofin undergoes ligand substitution of the tetraacetylthioglucose moiety with a PhS or PhSe group. The reaction is reversible in both cases but characterized by widely different equilibrium constants. In polar solvents like methanol the reaction is more complex, the phosphine also undergoing ligand exchange. Some features have been clarified through the investigation of Et_3PAuCl , that offers the opportunity to follow up the reactions also by ^{35}Cl -NMR.

Replacement of phosphine group with N-heterocyclic carbene ligands gives a more stable Au(I)-Se bond, avoiding the formation of secondary products.

In order to broaden the scope of this reaction, a more realistic model of the TrxR active site, which matches the C-terminal sequence of TrxR (H-Gly-Cys-Cys-Gly-OH) was synthesized and characterized. Its interaction with Au(I) based inhibitors will be further evaluated.

Riassunto

L'enzima Tioredosiina Reduttasi (TrxR) è associato nell'uomo con la crescita di cellule tumorali e processi antiapoptotici. Le TrxRs utilizzano l'atomo di selenio contenuto nel centro redox dell'estremità C-terminale -Gly-Cys-Sec-Gly-COOH per la riduzione della Tioredossina e di altri substrati.

Farmaci a base di oro, già ampiamente impiegati nell'uso clinico per varie patologie, sono stati validati come potenti inibitori della TrxR in vitro a concentrazioni nano molari: l'atomo di Au è infatti noto per la sua elevata affinità nei confronti di tioli e selenoli; il selenolato della TrxR ridotta rappresenta quindi il target primario di interazione di questo metallo.

Le reazioni tra Auranofin (2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosato-S-(trietilfosfina) oro) e nucleofili modello dei tioli e selenoli presenti nella Tioredossina Reduttasi sono state studiate in cloroformio e metanolo attraverso spettroscopia ^1H , ^{31}P e ^{77}Se NMR. In cloroformio, l'Auranofin scambia la funzione tetraacetiltioglucosio con un gruppo PhS o PhSe. La reazione è reversibile in entrambi i casi, anche se caratterizzata da una costante di equilibrio largamente differente. Nei solventi polari come il metanolo la reazione è più complessa, e anche la fosfina è implicata in processi di scambio. Alcune chiarimenti sono stati possibili attraverso lo studio della reattività del composto Et_3PAuCl , che offre inoltre la possibilità di monitorare le reazioni attraverso ^{35}Cl -NMR.

La sostituzione del gruppo fosfinico con leganti come i carbeni N-eterociclici fornisce composti con un legame Au(I)-Se più stabile e risolve il problema della formazione di prodotti secondari.

Con l'intento di allargare lo studio di questa reazione, è stato sintetizzato e caratterizzato un modello più realistico dell'enzima TrxR in grado di mimare la sua sequenza C-terminale (H-Gly-Cys-Cys-Gly-OH). La sua interazione con complessi a base di Au(I), in particolare l'Auranofin, sarà ulteriormente valutata.

INDICE	Pag.
1 Introduzione	1
1.1 Reazioni di scambio tiolico	3
1.2 Il sistema Tioredossina/Tioredossina Reduttasi	4
1.2.1 La Tioredossina (Trx)	4
1.2.2 La Tioredossina Reduttasi (TrxR)	5
1.2.3 Il ruolo del sistema Trx/TrxR nella cancerogenesi e nella progressione del tumore	10
1.3 Inibitori del sistema Trx/TrxR	15
1.3.1 Composti del platino	15
1.3.2 Composti contenenti oro	16
2 Auranofin	
2.1 Introduzione	22
2.2 Risultati e discussione	25
2.2.1 Reazioni tra Auranofin e PhSeH/PhSH in CDCl ₃	25
2.2.2 Reazioni tra Auranofin e PhSeH/PhSH in CD ₃ OD	29
2.2.2.1 PhSH	29
2.2.2.2 PhSeH	31
2.3 Reazione tra Auranofin e PhSH/PhSeH in DMSO	33
2.4 Reazione tra Auranofin e selenocisteina	35

3	Et ₃ PAuCl	37
3.1	Reazioni di Et ₃ PAuCl con PhSH/PhSeH in CD ₃ OD	37
3.1.1	PhSH	37
3.1.2	PhSeH	37
3.2	Reazione di Et ₃ PAuCl con selenocisteina	41
3.3	Conclusioni	42
4	Complessi di Au(I) con carbeni N-eterociclici	43
4.1	Introduzione	43
4.2	Carbeni N-eterociclici di Au(I) come inibitori della TrxR	45
4.2.1	Reazione tra NHC-Au-Cl e PhSeH in CDCl ₃	47
4.2.2	Reazione tra [(NHC) ₂ Au] ⁺ Cl ⁻ e PhSeH in DMSO	48
4.2.3	Reazione tra [(NHC) ₂ Au] ⁺ Cl ⁻ e selenocisteina	49
5	Sintesi del tetrapeptide GCCG	53
5.1	Introduzione	54
5.2	Sintesi del tetrapeptide H-Gly-Cys-Cys-Gly-OH	57
5.3	Sintesi del tetrapeptide Ac-Gly-Cys-Cys-Gly-NH ₂	60
5.4	Sintesi di Fmoc-Sec(pMob)OH	63

1. INTRODUZIONE

Il selenio, scoperto nel 1818 dal chimico svedese Jöns Jacob Berzelius¹ è un microelemento essenziale, la cui più diffusa forma biologica è rappresentata dalla selenocisteina (Sec), analogo dell'aminoacido cisteina (Cys).

Rispetto al gruppo tiolico presente nella Cys, la funzione selenolica nell'aminoacido libero L-selenocisteina è molto instabile e si ossida spontaneamente all'aria per produrre il corrispondente diseleniuro, la selenocistina.

In assenza di agenti riducenti, anche il gruppo selenolico di peptidi contenenti selenio risulta instabile, e la sintesi di peptidi con residui di Sec porta alla formazione di dimeri contenenti un legame covalente Se-Se, intrinsecamente più stabile del legame disolfuro.^{2,3} Nonostante non sia molto chiaro l'esatto ruolo del legame diseleniuro in biologia, la recente identificazione di proteine naturali con legami Se-Se suggerisce la loro implicazione nella regolazione redox nei sistemi biologici.^{4,5} La glutatione perossidasi (GPx), la iodotironina deiodinasi (ID)^{6,7,8,9,10,11,12,13} e la tioredossina reduttasi (TrxR)^{14,15,16,17,18,19}

¹ J. J. Berzelius, *Afh. Fys. Kemi Mineral.*, 1818, **6**, 42

² J. Beld, K. J. Woycechowsky and D. Hilvert, *Biochemistry*, 2007, **46**, 5382

³ V. A. Shchedrina, S. V. Novoselov, M. Y. Malinouski and V. N. Gladyshev, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 13919

⁴ A. Shchedrina, S. V. Novoselov, M. Y. Malinouski and V. N. Gladyshev, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 13919

⁵ A. B'ock, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek and F. Zinoni, *Mol. Microbiol.*, 1991, **5**, 515; T. C. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, **65**, 83

⁶ D. Behne, A. Kyriakopoulos, H. Meinhold and J. K'ohrle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **173**, 1143

⁷ J. R. Arthur, F. Nicol and G. J. Beckett, *Biochem. J.*, 1990, **272**, 537

⁸ J. C. Davey, K. B. Becker, M. J. Schneider, G. L. Germain and V. A. Galton, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 26786

⁹ W. Croteau, S. K. Whittemore, M. J. Schneider and D. L. Germain, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 16569

¹⁰ J. L. Leonard and J. K'ohrle, 'Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism' in *The Thyroid* ed. L. E. Braverman and R.D. Utiger, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, p. 144

¹¹ D. L. St Germain and V. A. Galton, *Thyroid*, 1997, **7**, 655;

¹² A. C. Bianco, D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry and P. R. Larsen, *Endocr. Rev.*, 2002, **23**, 38;

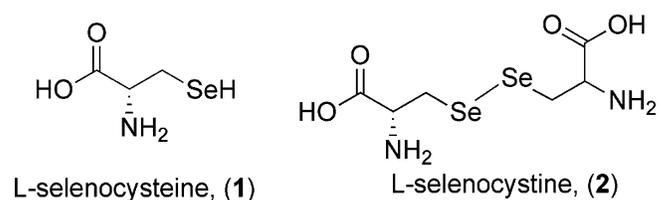
¹³ J. K'ohrle, *Methods Enzymol.*, 2002, **347**, 125.

¹⁴ A. Lescure, D. Gautheret, P. Carbon and A. Krol, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 38147

¹⁵ T. Tamura and T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 1006]

¹⁶ S. R. Lee, J. R. Kim, K. S. Kwon, H. W. Yoon, R. L. Leveine, A. Ginsburg and S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 4722

rappresentano alcuni degli enzimi chiave presenti nei mammiferi in cui le proprietà redox della Sec rivestono un ruolo importante. La presenza di Sec nei siti attivi di queste selenoproteine conferisce un elevato vantaggio catalitico rispetto alla corrispondente Cys. Questo è evidente, ad esempio, dall'osservazione che la sostituzione del residuo di Sec cataliticamente attivo con una Cys nel tipo 1 dell'enzima ID riduce drammaticamente l'attività catalitica dell'enzima nativo,^{20,21} oltre ad una riduzione della sensibilità dell'enzima nei confronti di composti inibitori. La spiegazione è dovuta al più basso valore di pK_a (5.2) del gruppo selenolico nel sito attivo dell'enzima rispetto al tiolo (8.0) che rende il gruppo selenolico della Sec totalmente dissociato a pH fisiologico e quindi molto più nucleofilo del tiolo indissociato. Tali proprietà, insieme al comportamento redox unico del selenio, rendono il residuo di Sec nelle proteine più reattivo della Cys, conferendogli l'appellativo di "cisteina super-reattiva".



Nonostante gli enzimi precedentemente menzionati posseggano tutti una Sec nel loro sito attivo, la loro specificità di substrato, il meccanismo catalitico e i sistemi di cofattori sono enormemente differenti.

¹⁷ S. Watabe, Y. Makino, K. Ogawa, T. Hiroi, Y. Yamamoto and S. Y. Takahashi, *Eur. J. Biochem.*, 1999, **264**, 74;

¹⁸ D. Mustacich and G. Powis, *Biochem. J.*, 2000, **346**, 1

¹⁹ H. Jr. Williams, L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P.-F. Wang, D. M. Veine, K. Becker and R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 6110

²⁰ M. J. Berry, J. D. Kieffer, J. W. Harney and P. R. Larsen, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 14155

²¹ P. R. Larsen and M. J. Berry, *Annu. Rev. Nutr.*, 1995, **15**, 323

1.1 REAZIONI DI SCAMBIO TIOLICO

Le reazioni di scambio tiolico o tiolo-disolfuro sono molto comuni nelle proteine che presentano ponti tra cisteine non adiacenti²² e rappresentano la reazione chiave con cui i legami disolfuro si formano e si riarrangiano.

I processi che avvengono sono in genere reazioni intramolecolari in cui il gruppo tiolato di un residuo di cisteina attacca un legame disolfuro per produrre un nuovo legame S-S, lasciando quindi invariato il numero totale di ponti disolfuro nella proteina. Un secondo tipo di scambio tiolo-disolfuro include l'attacco di un tiolo esterno al legame S-S, determinando la formazione di un disolfuro misto. La sostituzione di uno dei residui di Cys con una Sec porta alla formazione di un selenenil solfuro (-Se-S-) anzichè di un disolfuro (-S-S-), e ciò determina una complicazione nelle reazioni di scambio tiolo-disolfuro.²³

Recenti studi modello su composti a basso peso molecolare contenenti selenio mostrano che la riduzione dei selenenil solfuri a selenoli richiede il superamento di una grande barriera energetica (circa 21.5 kcal mol⁻¹), e quindi l'attacco nucleofilo del tiolo (o tiolato) al centro di selenio nel legame Se-S è cineticamente e termodinamicamente favorito rispetto allo zolfo.²⁴

Nonostante i legami Se-S siano più suscettibili dei legami S-S al clivaggio da parte di tioli nucleofili, le reazioni di scambio tiolico ostacolano la rigenerazione della specie selenolica cataliticamente attiva.²⁵

²² H. F. Gilbert, *Adv. Enzymol.*, 1990, **63**, 69; (b) H. F. Gilbert, *Methods Enzymol.*, 1995, **251**, 8

²³ Bani Kanta Sarma and Govindasamy Mugesh Thiol cofactors for selenoenzymes and their synthetic mimics *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 965-974

²⁴ S. Bachrach, D. W. Demoin, M. Luk and J. V. Miller, Jr., *J. Phys. Chem.*, 2004, **108**, 4040

²⁵ Thiol cofactors for selenoenzymes and their synthetic mimics Bani Kanta Sarma and Govindasamy Mugesh* *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 965-974

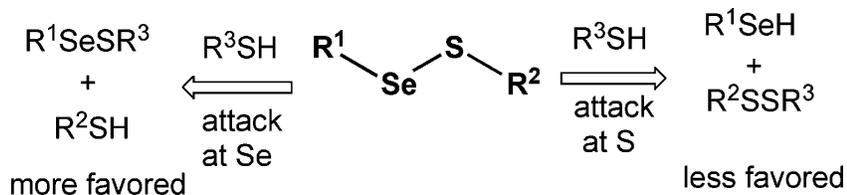


Figura 1. L'attacco nucleofilo del tiolo al selenio del selenenil solfuro è sfavorito rispetto allo zolfo.

Una delle più avanzate strategie utilizzate dai selenoenzimi per superare le reazioni di scambio tiolico è l'utilizzo di un tiolo interno come cofattore al posto di tioli esterni. Come mostrato in seguito, la Tioredossina Reduttasi di mammifero sfrutta efficacemente questa strategia per ridurre il ponte disolfuro del suo substrato tioredossina.

1.2 IL SISTEMA TIOREDOSSINA/TIOREDOSSINA REDUTTASI

1.2.1 LA TIOREDOSSINA

La Trx è una proteina ubiquitaria di 12 kDa scoperta nel 1964 in *Escherichia coli* come fattore ditiolico della ribonucleotide reduttasi nella sintesi di deossiribonucleotidi dai ribonucleotidi^{26, 27}; possiede una sequenza altamente conservata nel sito attivo Cys-Gly-Pro-Cys²⁸ ed è indispensabile al mantenimento dell'ambiente redox cellulare. Batteri, lieviti e piante contengono diverse Trxs citoplasmatiche, ma nei mammiferi la forma maggiormente diffusa è la Trx1 citosolica, che svolge un ruolo importante nella vita, la proliferazione e l'attivazione cellulare. Diversi fattori di trascrizione come NF-κB, AP-1 e p53 sono regolati dalla Trx²⁹. In seguito a stimolazione, ad esempio a causa di radiazioni UV e ossigeno, la Trx trasloca dal citoplasma al nucleo e riduce le cisteine di NF-κB, cruciale per il legame col DNA³⁰.

²⁶ Laurent, Moore et al 1964

²⁷ Holmgren, A. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237-271; Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109

²⁸ Holmgren 1968

²⁹ Hirota, Matsui et al 1997; Jayaraman, Murthy et al 1997; Gaiddon, Moorthy et al 1999

³⁰ Matthews, Wakasugi et al 1992; Mitomo, Nakayama et al 1994; Hirota, Murata et al 1999

1.2.2 LA TIOREDOSSINA REDUTTASI

La TrxR è un membro della famiglia delle piridin nucleotide disolfuro ossido reduttasi.³¹

Gli enzimi di questa famiglia, come la glutatione reduttasi (GR), formano omodimeri e ogni subunità contiene un sito attivo redox disolfuro e una molecola di FAD strettamente legata. La TrxR catalizza la riduzione della Trx attraverso il NADPH. Nei mammiferi la TrxR è una proteina essenziale con un gran numero di funzioni nella crescita cellulare, come il controllo redox dei tioli dei fattori di trascrizione, il trasporto di elettroni alla ribonucleotide reduttasi, la difesa contro lo stress ossidativo e l'apoptosi.³² La Trx e la TrxR sono presenti in tutti i sistemi viventi dagli *Archea* agli umani.³³ Mentre le caratteristiche essenziali della Trx sono state conservate durante l'evoluzione, le TrxRs di mammifero sono molto diverse in struttura e proprietà da enzimi di batteri, funghi e piante;³⁴ esse hanno una più elevata massa molecolare (55kDa) e ampia specificità di substrato rispetto ai più piccoli enzimi di 33 kDa rappresentati dalla TrxR di *Escherichia coli*, la forma maggiormente caratterizzata presente in letteratura.^{35,36} La TrxR di mammifero non solo riduce la Trx di differenti specie ma anche molti substrati non disolfuro come selenito,³⁷ idroperossidi e H₂O₂,³⁸ mentre non è in grado di ridurre il glutatione disolfuro (GSSG). Inoltre gli enzimi umani sono inibiti da un gran numero di farmaci di uso clinico.³⁹

³¹ Williams, C. H., Jr. (1992) in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, ed. Mu"ller, F. (CRC, Boca Raton, FL), Vol. III, pp. 121-211

³² Holmgren, A. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237-271; Arne"r, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109

³³ Arne"r, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109; Luthman, M. & Holmgren, A. (1982) *Biochemistry* **21**, 6628-6633

³⁴ Luthman, M. & Holmgren, A. (1982) *Biochemistry* **21**, 6628-6633; Arne"r, E. S. J., Zhong, L. & Holmgren, A. (1999) *Methods Enzymol.* **300**, 226-239

³⁵ Arne"r, E. S. J., Zhong, L. & Holmgren, A. (1999) *Methods Enzymol.* **300**, 226-239

³⁶ Waksman, G., Krishna, T. S. R., Sweet, R. M., Williams, C. H., Jr. & Kuriyan, J. (1994) *J. Mol. Biol.* **236**, 800-816

³⁷ Kumar, S., Bjo"rnstedt, M. & Holmgren, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 435-439

³⁸ Zhong, L. & Holmgren, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18121-18128

³⁹ Becker, K., Gromer, S., Schirmer, R. H. & Mu"ller, S. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6118-6125

La clonazione e il sequenziamento di una TrxR umana⁴⁰ e di isoforme bovine e di ratto⁴¹ hanno rivelato che esse sono maggiormente simili alla GR che non alla TrxR di *Escherichia coli*. Rispetto al GR, la catena polipeptidica della TrxR umana contiene una sequenza C-terminale di 16 aa che presenta una penultima selenocisteina negli ultimi residui conservati Gly-Cys-Sec-Gly.^{42,43} L'amminoacido selenocisteina è essenziale: la sua sostituzione con la cisteina risulta in un enzima mutante di ratto con solo l'1% di attività rispetto alla Trx come substrato e con maggiore perdita in k_{cat} .⁴⁴ A causa dell'alta nucleofilicità del selenolato, esso è più suscettibile ad ossidazione da H₂O₂ rispetto ai tioli, una proprietà che permette di estendere lo spettro di substrati verso gli idroperossidi negli enzimi umani.⁴⁵ L'enzima troncato che ha perso il dipeptide Sec-Cys possiede comunque la sua struttura terziaria e il legame al FAD, ma è inattivo. Recentemente, nel sito attivo della TrxR ossidata di mammifero è stato identificato un legame selenenilsolfuro.^{46,47}

In letteratura sono presenti solo pochi studi cristallografici sulle TrxRs dei mammiferi; Sandalova et al hanno riportato una struttura tridimensionale della TrxR mutante di ratto Sec498Cys complessata con NADP⁺ che rivela l'arrangiamento totale dell'enzima, e permette una comparazione dettagliata ad altri membri della famiglia piridina nucleotide disolfuro ossidoreduttasi.⁴⁸

⁴⁰ Gasdaska, P. Y., Gasdaska, J. R., Cochran, S. & Powis, G. (1995) *FEBS Lett* **373**, 5–9

⁴¹ Zhong, L., Arner, E. S. J., Ljung, J., Åslund, F. & Holmgren, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8581–8591

⁴² Zhong, L., Arner, E. S. J., Ljung, J., Åslund, F. & Holmgren, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8581–8591

⁴³ Gladyshev, V. N., Jeang, K. T. & Stadtman, T. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6146–6151

⁴⁴ Zhong, L. & Holmgren, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128

⁴⁵ Zhong, L. & Holmgren, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128

⁴⁶ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854–5859

⁴⁷ Lee, S. R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R. L., Stadtman, T. C. & Rhee, S. G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2521–2526

⁴⁸ SANDALOVA ET AL PNAS u August 14, 2001 u vol. 98 u no. 17 u 9533–9538

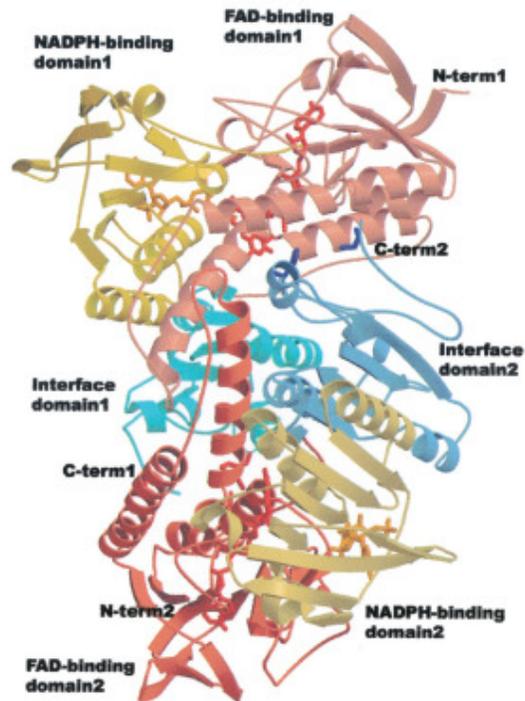


Figura 2. Rappresentazione schematica del dimero della *trxR* di ratto. Le due sub unità sono mostrate in colori chiari e scuri, rispettivamente. Rosso: dominio legante il FAD; giallo: dominio legante il NADP; blu: dominio all'interfaccia

La subunità della *TrxR* di ratto consiste in un dominio di legame del FAD, il dominio di legame del NADP(H) e il dominio all'interfaccia.

L'estensione C-terminale con la sequenza caratteristica Gly-Cys-Sec-Gly che trasporta il residuo di selenocisteina essenziale è unico per le *TrxRs* di mammifero. I residui 470-483, che corrispondono agli ultimi residui del GR, hanno la stessa conformazione che nella GR.

Il sito attivo della *TrxR* è localizzato sul dominio all'interfaccia tra le due subunità, organizzate in un orientamento testa-coda;⁴⁹ il dimero rappresenta quindi l'unità funzionale dell'enzima. Particolarmente interessante è la conservazione nella *TrxR* dei residui del sito attivo che partecipano al legame del substrato con il glutatione nella GR, contrariamente alla differenza nella specificità di substrato. Di oltre 30 residui che formano la regione all'interfaccia della *TrxR* di ratto, 10 sono conservati nella GR.

⁴⁹ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854–5859

La conservazione della struttura tridimensionale nei due enzimi supporta fortemente l'ipotesi che la TrxR di mammifero possa essersi evoluta dalla più recente GR piuttosto che da una TrxR procariotica.^{50,51} L'evoluzione di una nuova TrxR dallo scheletro della GR include l'estensione di una catena di trasferimento di elettroni alla superficie dell'enzima attraverso l'incorporazione di un altro centro redox all'estremità C-terminale della catena. Questa parte della catena funziona come braccio dondolante che trasporta equivalenti redox dal disolfuro catalitico nascosto della TrxR alla proteina substrato, la Trx. Il legame del glutatione alla TrxR non è impedito da una mutazione del residuo legante il substrato, come si potrebbe pensare, ma attraverso ingombro sterico della coda C-terminale, che blocca l'accesso al disolfuro catalitico della TrxR. Ci si potrebbe quindi aspettare che una versione troncata della TrxR di mammifero possa funzionare come GR.

La distanza evolutiva tra TrxR di procarioti e lontani eucarioti da un lato e dell'enzima di più recenti eucarioti dall'altra è ulteriormente enfatizzata dal fatto che la catalisi avviene in modi completamente differenti. La TrxR di E.coli mostra un elevato riarrangiamento dei domini leganti il FAD e il NADPH come parte del ciclo catalitico.⁵² Nella TrxR di mammifero invece l'orientamento di questi domini, come mostrato nella struttura cristallina, permette il trasferimento elettronico dal NADPH al disolfuro senza la necessità di coinvolgere enormi variazioni conformazionali.

Il primo step della catalisi, la riduzione da parte del NADPH e la formazione di un intermedio carico, sono comuni alla GR e alla TrxR di mammifero e non dipendono dalla presenza del peptide Sec-Gly della TrxR di mammifero⁵³ La seconda parte della reazione, tuttavia, è differente. Nell'enzima ossidato, è stato trovato un legame selenenil solfuro tra la Cys 497 e la Sec 498, che può essere

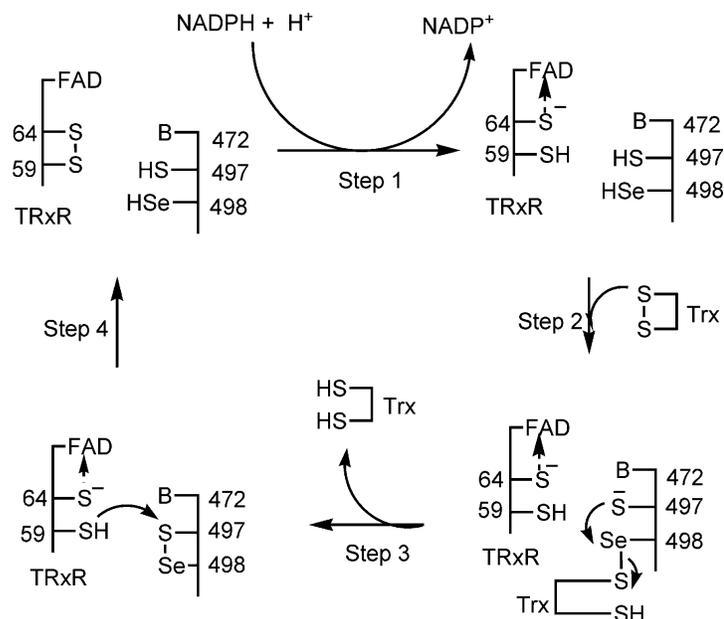
⁵⁰ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854–5859

⁵¹ Williams, C. H., Jr., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P.-F., Veine, D. M., Becker, K. & Schirmer, R. H. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110–6117

⁵² Lennon, B. W., Williams, C.R., Jr. & Ludwig, M. L. (2000) *Science* **289**, 1190–1194

⁵³ Zhong, L. & Holmgren, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128

ridotto dopo l'aggiunta di NADPH.^{54,55,56} È stato quindi proposto che nella TrxR di mammifero la sequenza conservata Cys-497-Sec-498 agisca come secondo centro redox e che gli elettroni siano trasferiti dal disolfuro redox-attivo attraverso il centro redox del C-terminale al substrato Trx.^{57,58,59}



Schema 1 meccanismo d'azione proposto per la TrxR di mammifero.

In questo modello della forma ossidata della sequenza Cys-497-Sec-498, l'atomo di selenio sarà localizzato molto vicino alla catena laterale che presenta il residuo conservato di His-472, e il gruppo imidazolico potrebbe partecipare al trasferimento di protoni alla Cys-497. Dopo la riduzione, la coda C-terminale potrebbe quindi muoversi fuori dal ciclo catalitico in una posizione sulla superficie dell'enzima ed interagire con il substrato legato. Il modello del complesso TrxR-Trx è consistente con uno scenario meccanicistico per la

⁵⁴ Zhong, L., Arner, E. S. J., Ljung, J., Åslund, F. & Holmgren, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8581-8591

⁵⁵ Arscott, L. D., Gromer, S., Schirmer, R. H., Becker, K. & Williams, C. H., Jr. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3621-3626

⁵⁶ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854-5859

⁵⁷ Zhong, L., Arner, E. S. J., Ljung, J., Åslund, F. & Holmgren, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8581-8591

⁵⁸ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854-5859

⁵⁹ Williams, C. H., Jr., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P.-F., Veine, D. M., Becker, K. & Schirmer, R. H. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110-6117

reazione di scambio tiolo-disolfuro proposto precedentemente ⁶⁰In questo step della reazione l'anione selenolato attacca il disolfuro della Trx. L'enzima risultante, Trx-selenenil solfuro misto, è poi attaccato dalla Cys-497 per rigenerare il selenenilsolfuro.

Recentemente, Brandt e Wessjohann hanno mostrato che la triade catalitica tra Sec, His e Glu è essenziale per stabilizzare il selenolato della TrxR.⁶¹

Una tioredossina reduttasi di mammifero 1 è stata purificata per la prima volta da tessuto bovino nel 1977,⁶² ma l'enzima è stato identificato come selenoproteina solo nel 1996.⁶³

1.2.3 RUOLO DEL SISTEMA Trx/TrxR NELLA CANCEROGENESI E NELLA PROGRESSIONE DEL TUMORE

Alti livelli di Trx e TrxR sono presenti in vari tipi di tumori, inclusi tumori solidi, leucemie e linfomi ⁶⁴

La maggior parte delle linee cellulari mutate inoltre esprime alti livelli di Trx e TrxR che sono secreti nel mezzo di coltura.⁶⁵

Risultati di vari studi hanno suggerito che la Trx può avere diverse funzioni nelle cellule cancerose a seconda dello stadio di sviluppo del cancro. In stadi primitivi la Trx può infatti essere di beneficio per la prevenzione del cancro a causa della sua capacità di fronteggiare lo stress ossidativo causato dalla carcinogenesi. Una volta che la cellula ha intrapreso la via del fenotipo canceroso alti livelli di TrxR possono supportare lo sviluppo del tumore dovuto alla promozione della crescita ⁶⁶⁶⁷ .e alle funzioni antiapoptotiche;⁶⁸

⁶⁰ Zhong, L., Arner, E. S. J. & Holmgren, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5854–5859

⁶¹ W. Brandt and L. A. Wessjohann, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 386

⁶² Holmgren 1977

⁶³ Gladyshev, Jeang 1996, Tamura Stadtman 1996

⁶⁴ Shao, L., Diccianni, M. B., Tanaka, T., Gribi, R., et al., Thioredoxin expression in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic implication, *Cancer Res.* 2001, **61**, 7333–7338

⁶⁵ Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J., Gasdaska, P., et al., Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia, *Anticancer Res.* 1996, **16**, 3459–3466. Soderberg, A., Sahaf, B., Rosen, A., Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma, *Cancer Res.* 2000, **60**, 2281–2289

⁶⁶ Powis, G., Oblong, J. E., Gasdaska, P. Y., Berggren, M., et al., The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell growth, *Oncol. Res.* 1994, **6**, 539–544

in uno stadio più avanzato dello sviluppo del tumore la TrxR possiede il ruolo di angiogenesi e metastasi. La TrxR regola l'espressione e la funzione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)⁶⁹ e inoltre modula l'attività di vari membri della famiglia delle metallo proteinasi della matrice.⁷⁰

Elevati livelli di Trx sono inoltre stati associati alla resistenza a farmaci chemioterapici incluso il cisplatino⁷¹ e il docetaxel.⁷²

A causa del ruolo integrale del sistema tioredossinico nella regolazione dell'apoptosi e i suoi elevati livelli di espressione in molte cellule cancerose c'è un interesse nello sviluppo di farmaci che possono interferire con il sistema tioredossinico.

Sono stati caratterizzati tre isoenzimi di mammifero, inclusa la TrxR1 citosolica,^{73,74} la TrxR2 mitocondriale^{75,76} e la tioredossina glutatione reductasi specifica dei testicoli (TrxR3).^{77,78}

⁶⁷ Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., et al., Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 8282 -8286

⁶⁸ Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., et al., Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signalregulating kinase (ASK) 1, EMBO J. 1998, 17, 2596 -2606

⁶⁹ Welsh, S., Bellamy, W., Briehl, M., Powis, G., The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis, Cancer Res. 2002, 62, 5089 -5095

⁷⁰ Farina, A. R., Tacconelli, A., Cappabianca, L., Masciulli, M. P., et al., Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion, Eur. J. Biochem. 2001, 268, 405 -413.

⁷¹ Yamada, M., Tomida, A., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Tsuruo, T., Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines, Clin. Cancer Res. 1996, 2, 427 -432.

⁷² Kim, S. J., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., et al., High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer, Clin. Cancer Res. 2005, 11, 8425-8430.

⁷³ Gasdaska PY, Berggren MM, Berry MJ, Powis G. Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. FEBS Lett 1999;442:105-11

⁷⁴ Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. FEBS Lett 1995;373:5-9

⁷⁵ Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. Eur J Biochem 1999;261:405-12

⁷⁶ Miranda-Vizueté A, Damdimopoulos AE, Spyrou G. The mitochondrial thioredoxin system. Antioxid Redox Signal 2000;2:801-10

⁷⁷ Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, Jeang KT, Lee BJ, Hatfield DL, et al. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. J Biol Chem 1999;274:24522-30

La TrxR1 è quella meglio caratterizzata di questi tre selenoenzimi ed è largamente espressa in molti tessuti.⁷⁹⁸⁰⁸¹⁸²⁸³ Elevati livelli di TrxR1, che causano l'aumento della proteina Trx e dei livelli di attività, sono stati trovati in differenti linee cellulari tumorali e in tumori murini indotti.⁸⁴⁸⁵⁸⁶⁸⁷⁸⁸⁸⁹

La TrxR1 supporta la proliferazione cellulare attraverso il suo contributo alla sintesi del DNA e alla difesa antiossidante. Nelle cellule normali, la TrxR1 è necessaria per l'omeostasi redox e la protezione contro il danno ossidativo e la mutazione; una volta che la trasformazione nelle cellule maligne ha avuto luogo, la TrxR1 supporta la crescita tumorale e la progressione.

Negli ultimi anni sono state identificate forti connessioni tra il sistema della Tioredossina e la proteina p53 regolatrice dell'apoptosi; è stata inoltre

⁷⁸ Miranda-Vizuete A, Sadek CM, Jimenez A, Krause M, Sutovsky P, Oko R. The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:25-40

⁷⁹ Gasdaska JR, Gasdaska PY, Gallegos A, Powis G. Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue. *Genomics* 1996;37:257-9. 462 .

⁸⁰ Rundlof AK, Carlsten M, Giacobini MM, Arner ES. Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5'_untranslated region. *Biochem J* 2000;347(Pt 3):661-8

⁸¹ S. Urig, K. Becker / *Seminars in Cancer Biology* 16 (2006) 452-465

⁸² Rozell B, Holmgren A, Hansson HA. Ultrastructural demonstration of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat hepatocytes. *Eur J Cell Biol* 1988;46:470-7

⁸³ Rozell B, Hansson HA, Luthman M, Holmgren A. Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin reductase in adult rats. *Eur J Cell Biol* 1985;38:79-86.

⁸⁴ Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1006-11

⁸⁵ Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J, Powis G. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res* 1996;16:3459-66

⁸⁶ Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin/thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res* 2003;23:2425-33

⁸⁷ Kahlos K, Soini Y, Saily M, Koistinen P, Kakko S, Paakko P, et al. Upregulation of thioredoxin and thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 2001;95:198-204

⁸⁸ Gladyshev VN, Factor VM, Housseau F, Hatfield DL. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:488-93

⁸⁹ Soini Y, Kahlos K, Napankangas U, Kaarteenaho-Wiik R, Saily M, Koistinen P, et al. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1750-7

dimostrata l'associazione della Trx e della TrxR1 all'espressione della p53 nel cancro alla mammella.⁹⁰

Molti studi sulle differenti isoforme della TrxR e il loro ruolo nello sviluppo dei tumori hanno suscitato negli ultimi anni grande interesse nella ricerca verso il disegno di nuovi farmaci.

Composti aventi attività antitumorali esercitano i loro effetti biologici attraverso le conseguenze metaboliche dell'inibizione enzimatica; gli studi di inibizione sono diventati quindi una componente essenziale dell'investigazione sul meccanismo d'azione del farmaco. Alcuni dettagli meccanicistici riguardanti la TrxR - come la dipendenza del movimento dell'estremità C-terminale sullo stato redox dell'enzima - sono ancora sconosciuti. Tuttavia, studi su hTrxR mutanti con composti elettrofilici hanno contribuito alla comprensione delle interazioni degli inibitori con i due siti attivi presenti in entrambi i monomeri di TrxR. Considerando le funzioni precedentemente discusse della TrxR1 nello sviluppo del tumore e nella progressione, è corretto parlare di questo selenoenzima come il maggior target per i farmaci anticancro.^{91,92}

Le ragioni per preferire la TrxR come target molecolare sono tuttavia molteplici. Poiché è una selenoproteina, contenente una selenocisteina sul suo braccio flessibile C-terminale che è molto ben accessibile durante la catalisi,^{93,94,95,96}

⁹⁰ Turunen N, Karihtala P, Mantyniemi A, Sormunen R, Holmgren A, Kinnula VL, et al. Thioredoxin is associated with proliferation, p53 expression and negative estrogen and progesterone receptor status in breast carcinoma. *Apmis* 2004;112:123-32

⁹¹ Smart DK, Ortiz KL, Mattson D, Bradbury CM, Bisht KS, Sieck LK, et al. Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress. *Cancer Res* 2004;64:6716-24

⁹² Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system—from science to clinic. *Med Res Rev* 2004;24:40-89

⁹³ Williams CH, Arscott LD, Muller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, et al. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* 2000;267:6110-7

⁹⁴ Arscott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams Jr CH. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3621-6

⁹⁵ Zhong L, Holmgren A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem* 2000;275:18121-8

⁹⁶ Gromer S, Wissing J, Behne D, Ashman K, Schirmer RH, Flohe L, et al. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J* 1998;332(Pt 2):591-2

molti composti elettrofilici modificano selettivamente e irreversibilmente questo aminoacido nel sito attivo.^{97,98,99}

La TrxR1 possiede un'alta omologia funzionale e strutturale con la Glutazione Reduttasi; il disegno razionale di farmaci è orientato allo sviluppo di nuovi inibitori o analoghi di substrato che si adattano ai siti di legame dell'enzima oppure in grado di promuovere domini di dimerizzazione. Nonostante la struttura tridimensionale della TrxR del ratto e del topo sia stata risolta, ulteriori investigazioni sul meccanismo di reazione e le interazioni dei substrati sono essenziali per comprendere totalmente relazioni evoluzionistiche e funzionali tra le disolfuro reduttasi.¹⁰⁰

Il potenziale cambiamento da una specie antiossidante a una proossidante di TrxR è l'intento di molti inibitori della TrxR. Poiché molti tumori che esprimono elevati livelli di TrxR sono resistenti alla chemioterapia, il targeting di questo enzima può contribuire a prevenire o invertire meccanismi di resistenza. Esiste l'evidenza che l'espressione della TrxR correla con la resistenza apoptotica in vari tipi di cellule cancerose.¹⁰¹

La TrxR è inoltre conosciuta per inibire l'apoptosi riducendo la Trx che conseguentemente inibisce le chinasi che regolano segnali apoptotici.¹⁰²

La TGR(TrxR3) svolge un ruolo nella formazione dei legami disolfuro e nella maturazione dello sperma.¹⁰³

⁹⁷ Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Muller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* 2000;267:6118-25

⁹⁸ Irmeler A, Bechthold A, Davioud-Charvet E, Hofmann V, R'eu R, Gromer S, et al. Disulfide reductases – current development. In: Chapman S, Perham R, Scrutton N, editors. *Flavins and Flavoproteins*. Berlin: Rudolf Weber; 2002. p. 803-15

⁹⁹ Urig S, Ahmadi R, Herold-Mende C, Alber D, Becker K. Platinum(II) complexes: inhibition of thioredoxin reductase in glioblastoma therapy. In: Nishino RMT, Tanokura T, Fukui K, editors. *Flavins and Flavoproteins*. Tokyo: ARchiTect Inc.; 2005. p. 877-82

¹⁰⁰ Brandt W, Wessjohann LA. The functional role of selenocysteine (Sec) in the catalysis mechanism of large thioredoxin reductases: proposition of a swapping catalytic triad including a Sec-His-Glu state. *Chembiochem* 2005;6:386-94

¹⁰¹ Yokomizo A, Ono M, Nanri H, Makino Y, Ohga T, Wada M, et al. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Res* 1995;55: 4293-6

¹⁰² Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:405-14

¹⁰³ Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, et al. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* 2005;280:26491-8

1.3 INIBITORI DEL SISTEMA Trx/TrxR

L'ultimo decennio ha visto un gran numero di reagenti terapeutici che colpiscono il sistema tioredossinico sviluppati come possibili trattamenti antitumorale o come adiuvanti di terapie esistenti. Interferendo con il sistema della Tioredossina si ottiene la modulazione dello stato redox intracellulare, che può favorire eventi apoptotici nelle cellule dovuti all'accumularsi di radicali superossido e l'alterazione dello stato redox intracellulare.

Entrambe Trx e TrxR possono essere target di reagenti chemioterapici finché una TrxR non funzionale risulta in livelli più bassi di Trx ridotta nelle cellule, quindi prevenendo la funzione redox della Trx. Il targeting della TrxR inoltre possiede effetti addizionali poiché l'enzima riduce direttamente i propri substrati senza l'ausilio della Trx. Alcuni farmaci sono poi in grado di convertire la TrxR in un sistema generante Ros, in diretto contrasto con il suo ruolo usuale di enzima difensivo.

In seguito verranno passati quindi in rassegna alcuni tra i più importanti inibitori del sistema tioredossinico che sono considerati terapeutici nel cancro. Questi composti variano ampiamente nella struttura e nel meccanismo ma il goal in ogni caso è la forza di uccidere le cellule cancerose influenzando il processo apoptotico.

1.3.1 COMPOSTI DEL PLATINO

I composti del platino come cisplatino (cis-diamminodichloroplatino(II)), carboplatino e oxaliplatino sono un gruppo di complessi metallici che hanno dimostrato abilità nel causare la morte cellulare in differenti tipi di cellule cancerose, ampiamente usati in terapia da più di 20 anni.^{104,105} Una volta nelle cellule, essi sono in grado di legare il DNA, formando degli addotti irreversibili platino-DNA; in seguito a tale evento, saranno attivati o inattivati segnali di trasduzione per l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA o la morte

¹⁰⁴ Boulikas, T., Vougiouka, M., Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs, *Oncol. Rep.* 2004, 11, 559 -595

¹⁰⁵ Urig, S., Becker, K., On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy, *Semin. Cancer Biol.* 2006, 16, 452-465

cellulare. Alcuni studi hanno dimostrato che i composti del platino possono utilizzare come target anche altri sistemi per effettuare i loro effetti citotossici, tra cui il sistema tioredossinico.¹⁰⁶

In particolare, il cisplatino causa l'inibizione dose e tempo dipendente della TrxR umana in colture cellulari attraverso una reazione di tipo irreversibile.

Cisplatino e oxaliplatino mostrano una reattività simile nei confronti della TrxR, mentre un altro analogo, il carboplatino, non è in grado di indurre l'inibizione dell'enzima, suggerendo una citotossicità più bassa nelle stesse condizioni sperimentali. Nessuno di questi composti è comunque in grado di inibire l'attività della Glutathione Reduttasi, suggerendo che il residuo C-terminale contenente la selenocisteina sia il reale target di questi composti.¹⁰⁷

Nonostante l'efficace e ampio utilizzo di questi farmaci nel trattamento di diverse forme di cancro, incluse forme testicolari, della cervice, del collo, il cisplatino presenta alcuni svantaggi dovuti agli effetti collaterali tossici che includono la nefrotossicità, l'emetogenesi, la neurotossicità e il sopravvento di fenomeni di resistenza nelle cellule tumorali.¹⁰⁸ Nel tentativo di superare questi problemi, sono stati sviluppati complessi di platino (IV) quali nuovi agenti terapeutici, in grado di diminuire gli effetti citotossici più rapidamente del cisplatino.

1.3.2 COMPOSTI CONTENENTI ORO

Composti contenenti oro sono stati ampiamente usati come agenti chemioterapici nel trattamento dell'artrite reumatoide.^{109,110,111} Nonostante

¹⁰⁶ Arner, E. S., Nakamura, H., Sasada, T., Yodoi, J., et al., Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum(II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex, *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 1170 - 1178

¹⁰⁷ Witte, A. B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H., Arner, E. S., Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 39, 696-703

¹⁰⁸ Wang, D., Lippard, S. J., Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 307 -320

¹⁰⁹ Milacic, V., Fregona, D., Dou, Q. P., Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs, *Histol. Histopathol.* 2008, 23, 101-108

l'esatto meccanismo d'azione sia ancora sconosciuto, è stato ipotizzato che questi composti possano esercitare i loro effetti antitumorali attraverso l'interazione di altri target cellulari, come le proteine. L'oro è noto per la sua alta affinità per gruppi tiolici e quindi è possibile che tali gruppi siano il target primario di composti a base di oro.^{112,113,114,115,116,117}

L'Auranofin (S-trietilfosfinaoro(I)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranoside) è un farmaco noto in letteratura come efficace nei confronti dell'artrite reumatoide. Studi dimostrano che in vitro questo composto è in grado di inibire la TrxR a livelli nanomolari ($K_i=4$ nM).¹¹⁸ Concentrazioni molto più elevate, dell'ordine delle micromoli, sono necessarie per inibire la Glutathione Reduttasi, enzima che manca del terminale Cys-Sec, avvalorando quindi l'ipotesi di un coinvolgimento del gruppo selenolico nel meccanismo dell'inibizione enzimatica. Inoltre, l'Auranofin è in grado di promuovere effetti citotossici nelle cellule e di superare i meccanismi di resistenza del cisplatino all'apoptosi, evidenziando il potenziale di questo farmaco nel trattamento di tumori resistenti al cisplatino. La maggiore attività della TrxR è stata osservata

¹¹⁰ Ronconi, L., Giovagnini, L., Marzano, C., Bettio, F., et al., Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity, *Inorg. Chem.* 2005, 44, 1867-1881

¹¹¹ Ronconi, L., Marzano, C., Zanello, P., Corsini, M., et al., Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: Solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties, *J. Med. Chem.* 2006, 49, 1648-1657

¹¹² Gromer, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Jr., Schirmer, R. H., Becker, K., Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 20096-20101

¹¹³ Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., et al., Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 872-881

¹¹⁴ Omata, Y., Folan, M., Shaw, M., Messer, R. L., et al., Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1), *Toxicol. In Vitro* 2006, 20, 882-890

¹¹⁵ Rackham, O., Nichols, S. J., Leedman, P. J., Berners-Price, S. J., Filipovska, A., A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria, *Biochem. Pharmacol.* 2007, 74, 992-1002

¹¹⁶ Rigobello, M. P., Messori, L., Marcon, G., Agostina Cinellu, M. et al., Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: Consequences on mitochondrial functions, *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 1634-1641

¹¹⁷ Rigobello, M. P., Scutari, G., Boscolo, R., Bindoli, A., Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative, *Br. J. Pharmacol.* 2002, 136, 1162-1168

¹¹⁸ Gromer, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Jr., Schirmer, R. H., Becker, K., Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 20096-20101

in cellule resistenti al cisplatino, indicando l'importanza di questo enzima nello sviluppo di meccanismi di resistenza al platino da parte di queste cellule.

Dopo trattamento con Auranofin, sono stati osservati l'aumento della produzione di idroperossido d'idrogeno e il rilascio del citocromo c¹¹⁹. È stato suggerito che l'inibizione della TrxR da Auranofin sia responsabile di un drammatico cambiamento dello stato redox cellulare verso un ambiente ossidato, un aumento di ROS e infine l'apoptosi.

Ulteriori approcci portano allo sviluppo di nuovi oro(III) ditiocarbammati derivati che sono in grado di inibire la sintesi di DNA e l'RNA e sono attivi contro linee cellulari di leucemia resistente al cisplatino. Questi composti rappresentano eccellenti candidati da testare nei futuri studi di inibizione della TrxR.¹²⁰

Complessi organoro(III) si sono già mostrati come efficaci inibitori della TrxR₂ (i_{0,5}= 0.28-1.42 uM) inducendo migliori effetti antiproliferativi e più alti velocità di apoptosi piuttosto di farmaci comuni come cisplatino e oxaliplatino. Inoltre, gli effetti apoptotici sono stati ristretti ai mitocondri perché la distribuzione del ciclo cellulare è stato trovato normale.¹²¹

I complessi di platino appartengono a un gruppo di complessi metallici con buone proprietà di inibizione della TrxR, cisplatino (cis-diamminodichloroplatino(II)) stesso risulta un buon agente terapeutico. Una proprietà comune dei complessi di platino è la loro abilità di intercalare il DNA considerando il maggior modo di azione citostatica.^{122,123,124}

¹¹⁹ Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., et al., Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 872-881

¹²⁰ Ronconi L, Marzano C, Zanello P, Corsini M, Miolo G, Macca C, et al. Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *J Med Chem* 2006;49:1648-57

¹²¹ Coronello M, Mini E, Caciagli B, Cinellu MA, Bindoli A, Gabbiani C, et al. Mechanisms of cytotoxicity of selected organogold(III) compounds. *J Med Chem* 2005;48:6761-5

¹²² Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:307-20

¹²³ Zorbas H, Keppler BK. Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem* 2005;6:1157-66

¹²⁴ Kurosaki H, Yamakawa N, Sumimoto M, Kimura K, Goto M. Interaction of binuclear xylylthiolato(2,2,2-terpyridine)platinum(II) complexes with DNA. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:825-8

Organocalcogeniuri (Se, Te) sono stati sintetizzati e testati per il loro effetto inibitore sulla Tioredossina e la crescita di cellule cancerose in cultura.^{125,126,127}

Diorganil tellururi ciclodestrina-derivati sono stati identificati come nuovi inibitori di Tioredossina Reduttasi con capacità di inibizione della crescita cellulare in range submicromolare. Inoltre, essi sono in grado di mimare la glutatione per ossidasi poiché riducono il perossido d'idrogeno, il tert-butil idroperossido, e il cumene idroperossido in presenza di glutatione.¹²⁸

Tuttavia il meccanismo di inibizione della TrxR non è ancora stato spiegato.

Oltre ai composti organo tellurici, composti organo selenici hanno interessanti proprietà relativamente all'apoptosi guidata da TrxR nelle cellule tumorali.

Inibitori della TrxR per la futura terapia antitumorale possono essere ulteriormente ottimizzati attraverso

- (a) l'aumento della loro biodisponibilità e solubilità,
- (b) l'aumento della loro selettività nei confronti della TrxR come selenoproteina,
- (c) la diminuzione degli effetti collaterali indesiderati (ad esempio pro farmaci con pH acido ottimale)
- (d) diminuzione delle condizioni di resistenza
- (e) ottimizzazione della strategia del doppio ligando per uptake selettivo e
- (f) superamento della resistenza ai farmaci, come terapia di combinazione.

Ulteriori investigazioni sugli aspetti molecolari della TrxR forniscono nuove evidenze nel ciclo catalitico, come la descrizione del triad catalitico favorito

¹²⁵ Engman L, Kandra T, Gallegos A, Williams R, Powis G. Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 2000;15:323-30

¹²⁶ Engman L, Al-Maharik N, McNaughton M, Birmingham A, Powis G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs* 2003;14:153-61

¹²⁷ Engman L, Al-Maharik N, McNaughton M, Birmingham A, Powis G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells *Bioorg Med Chem* 2003;11:5091-100

¹²⁸ McNaughton M, Engman L, Birmingham A, Powis G, Cotgreave IA. Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides as glutathione peroxidase mimics and inhibitors of thioredoxin reductase and cancer cell growth. *J Med Chem* 2004;47:233-9

termodinamicamente tra la selenocisteina, l'istidina e il glutammato per stabilizzare l'anione selenolato ¹²⁹

In questo contesto, deve essere menzionato che il residuo di His472 (His 108) del sito attivo della TrxR potrebbe anche essere target di inibitori a base di oro.

Nuovi principi nella chimica farmaceutica organometallica includono lo sviluppo di mimici organometallici di inibitori enzimatici che potrebbero anche essere un'interessante strategia per l'ottimizzazione degli inibitori della Tioredossina Reduttasi.¹³⁰

¹²⁹ Brandt W, Wessjohann LA. The functional role of selenocysteine (Sec) in the catalysis mechanism of large thioredoxin reductases: proposition of a swapping catalytic triad including a Sec-His-Glu state. *Chembiochem* 2005;6:386-94.

¹³⁰ Schatzschneider U, Metzler-Nolte N. New principles in medicinal organometallic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45:1504-7.

2. AURANOFIN

2.1 INTRODUZIONE

L'Auranofin (AF) è attualmente il più noto inibitore della TrxR, benché il suo meccanismo d'azione sia ancora sconosciuto.^{131,132,133} La sua attività è attribuita al legame dell'Au(I) alla sequenza C-terminale GCUG dell'enzima Tioredossina Reduttasi e alla sua successiva inibizione, con conseguente morte cellulare;^{134, 135, 136,137,138} La presenza del selenio sembra avere una funzione critica per l'attività dell'enzima ed offre quindi una grande opportunità per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Un recente studio FT-IR mostra che l'atomo di Au nell'Auranofin si lega agli atomi di fosforo e di zolfo dei leganti trietilfosfina e tioglucosio con una struttura divalente e lineare.¹³⁹ Lo scambio di legante in questo farmaco potrebbe avvenire come parte del suo metabolismo e probabilmente con la rottura del legame Au-S. Questo, in effetti, crea un gruppo uscente tioglucosio, che rilascia il centro di Au permettendogli di coordinarsi ad un legante biologicamente rilevante come il tiolo di proteine ed enzimi. Tale ipotesi è supportata da studi ¹³C e ³¹P-NMR che dimostrano la minore stabilità del gruppo fosfinico rispetto alla funzione tiolica.¹⁴⁰

Sono stati investigati diversi approcci sperimentali per studiare l'Auranofin e la sua interazione con vari leganti biologici.

¹³¹ Biterova, E. I.; Turanov, A. A.; Gladyshev, V. N.; Barycki, J. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 15018-15023

¹³² Walz, D. T.; Di Martino, M. J.; Griffin, C. L.; Misher, A. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1970**, *85*, 337-343

¹³³ Berners-Price, S. J.; Di Martino, M. J.; Hill, D. T.; Kuroda, R.; Mazid, M. A.; Sadler, P. J. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3425-3434

¹³⁴ S. Gromer, S. Urig, K. Becker, *Med. Res. Rev.* **24** (2004) 40.

¹³⁵ P.J. Barnard, S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **251** (2007) 1889.

¹³⁶ S.J. Berners-Price, P.J. Sadler, *Struct. Bond.* (Berlin) **70** (1988) 27

¹³⁷ J.E.R.T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42** (2002) 225

¹³⁸ . C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, D.T. Hill, L.F. Faucette, G.R. Girard, G.Y. Kuo, C. Sung, S.T. Crooke, *J. Med. Chem.* **29** (1986) 218.

¹³⁹ E.J. Baran, G.E. Toboen-Zapata, S.B. Etcheverry, *Spectrochim. Acta A* **55** (1996) 1569.

¹⁴⁰ M.J. Mckeage, L. Maharaj, S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 127

Estesi studi meccanicistici dimostrano che sia l'Auranofin che il suo analogo Et₃PAuCl influenzano la funzionalità dei mitocondri,¹⁴¹ rivalutando la possibilità di un meccanismo che coinvolge l'induzione dell'apoptosi piuttosto che l'arresto della crescita durante il ciclo cellulare.¹⁴² Uno studio interessante, condotto da Bindoli e i suoi collaboratori, dimostra che l'Auranofin, a concentrazioni nanomolari, induce transizione della permeabilità della membrana mitocondriale (MPT) osservata come rigonfiamento dei mitocondri e perdita del potenziale di membrana.¹⁴³¹⁴⁴ La conferma di questo meccanismo è data dall'evidenza sperimentale che entrambi gli eventi non si verificano in presenza di ciclosporina A, uno specifico inibitore della MPT. I cambiamenti di permeabilità avvengono a concentrazioni associate con l'inibizione selettiva della Tioredossina Reduttasi, e con pochi effetti sulla catena di trasporto degli elettroni e sulla Glutatione Reduttasi. Lo stato redox dei tioli mitocondriali è un fattore chiave nel controllo della MPT e del sistema Tioredossina/Tioredossina Reduttasi presente nei mitocondri.¹⁴⁵ Studi recenti hanno mostrato che l'Auranofin previene la rimozione del perossido d'idrogeno formato dalla catena di trasporto mitocondriale.¹⁴⁶¹⁴⁷ La TrxR inibita dall'Auranofin, infatti, non è più in grado di ridurre la Trx a sua volta ossidata da H₂O₂. La Trx ossidata può agire su target differenti determinando l'apertura dei pori PT o aumentando la permeabilità della membrana esterna, causando quindi il rilascio dei fattori apoptotici. La figura mostra il meccanismo proposto di induzione dell'apoptosi dall'Auranofin, dovuto all'alterazione del bilancio redox nei mitocondri¹⁴⁸

¹⁴¹ M.J. McKeage, L. Maharaj, S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 127.

¹⁴² M.J. McKeage, *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 1081.

¹⁴³ M.P. Rigobello, G. Scutari, R. Boscolo, A. Bindoli, *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 1162.

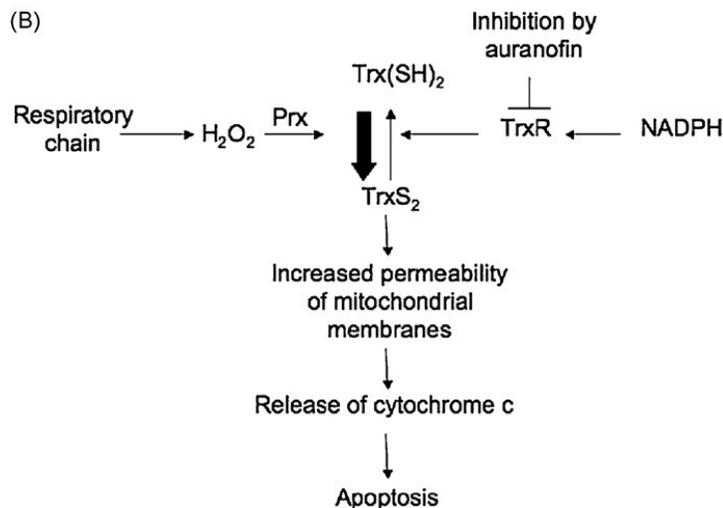
¹⁴⁴ M.P. Rigobello, G. Scutari, A. Folda, A. Bindoli, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 689.

¹⁴⁵ M.P. Rigobello, M.T. Callegaro, E. Barzon, M. Benetti, A. Bindoli, *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 370.

¹⁴⁶ M.P. Rigobello, A. Folda, M.C. Baldoin, G. Scutari, A. Bindoli, *Free Rad. Res.* 39 (2005) 687.

¹⁴⁷] M.P. Rigobello, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, *Arch. Biochem. Biophys.* 441 (2005) 112.

¹⁴⁸ M.P. Rigobello, A. Folda, M.C. Baldoin, G. Scutari, A. Bindoli, *Free Rad. Res.* 39 (2005) 687.



Schema 2 Schema che descrive il meccanismo dell'alterazione causata dall'auranofin del bilanciamento redox dei tioli nei mitocondri portando all'apoptosi, come proposto da Bindoli et al.; Prx, perossiredossina reductasi; TrxR, tioredossina reductasi; Trx(SH)₂, tioredossina ridotta; Trx(S)₂, tioredossina ossidata ¹⁴⁹

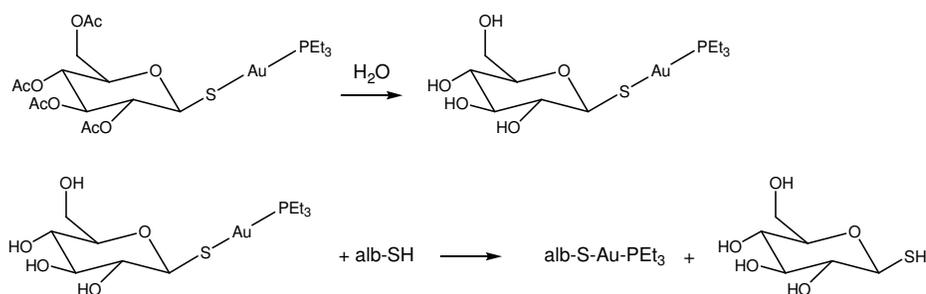
Per comprendere il meccanismo d'azione dell'Auranofin e dei composti analoghi, devono essere considerati due diversi aspetti:

- 1) il direzionamento dell'atomo di Au(I) alla TrxR nelle cellule, che può prevedere anche l'interazione con altre proteine come l'albumina ed enzimi;
- 2) l'interazione dei complessi di Au(I) con l'enzima TrxR.

Lo studio dell'interazione dell'Auranofin con l'albumina sierica, presente in largo eccesso nel sangue, mette in evidenza la rapida perdita del farmaco di tutti i gruppi acetilici; la forma deacetilata reagisce con l'albumina a livello del residuo Cys-34 (alb-SH) attraverso una reazione di scambio di legante, formando un addotto del tipo Et₃P-Au-S-alb con una costante di velocità di $2.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$.¹⁵⁰ L'Auranofin (o il suo metabolita deacetilato) possiede quindi un tempo di emivita molto breve dopo l'ingresso nel flusso ematico.

¹⁴⁹ M.P. Rigobello, A. Folda, M.C. Baldoin, G. Scutari, A. Bindoli, Free Rad. Res. 39 (2005) 687.

¹⁵⁰ Roberts, J. R., Xiao, J., Schliesman, B., Parsons, D. J., Shaw, C. F., " Kinetics and Mechanism of the Reaction between Serum Albumin and Auranofin (and Its Isopropyl Analogue) in Vitro", *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 424.



Schema 3 Schema Reazione proposta per l'Auranofin nel sangue. *Sopra*: deacetilazione. *Sotto*: Scambio di ligando con la Cys-34 dell'albumina sierica dando un complesso oro-tiolato legato all'albumina.

Gli studi riportati sopra indicano che la farmacocinetica dell'Auranofin è fortemente influenzata dalla labilità del legame Au-TATG, suggerendo che la variazione della forza del legame Au-X in una serie di complessi [Et₃P-Au-X] potrebbe causare cambiamenti nel profilo biologico del farmaco.

Sulla base di queste premesse è stata analizzata la reattività dell'Auranofin con benzentiolo (PhSH) e benzenselenolo (PhSeH) come modelli di cisteina (Cys) e selenocisteina (Sec) rispettivamente. Tale scelta è basata principalmente sulla facilità di manipolazione del PhSeH rispetto a selenoli alifatici, che si ossidano rapidamente ai rispettivi diseleniuri anche con blandi ossidanti o per esposizione all'ossigeno atmosferico. Inoltre, i calcoli DFT effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che l'affinità di PhSeH, CH₃SeH e Sec (-CH₂SeH) per l'oro è molto simile, giustificando quindi il suo utilizzo.

Le reazioni sono state monitorate attraverso ¹H, ¹³C, ³¹P, e ⁷⁷Se NMR.

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.2.1 REAZIONI TRA AURANOFIN E PhSeH/PhSH IN CDCl₃

Dopo l'aggiunta di un equivalente di PhSeH o PhSH a una soluzione 0.02 M di Auranofin in CDCl₃ lo spettro ¹H mostra la rapida comparsa di un doppietto a

2.31 ppm dovuto al protone tiolico del tetraacetiltioglucoio libero (TATGH); la reazione raggiunge l'equilibrio in pochi minuti.

La costante di equilibrio della reazione con PhSeH e PhSH può essere stimata integrando i protoni acetilici dell'Auranofin (2.00, 2.03, 2.07 e 2.10 ppm rispettivamente) e quelli del TATGH (2.03, 2.04, 2.10 e 2.11) per differenti rapporti molari dei due reagenti.

K_{eq} è maggiore di 10^3 nel caso del PhSeH e circa 1 nel caso del PhSH.

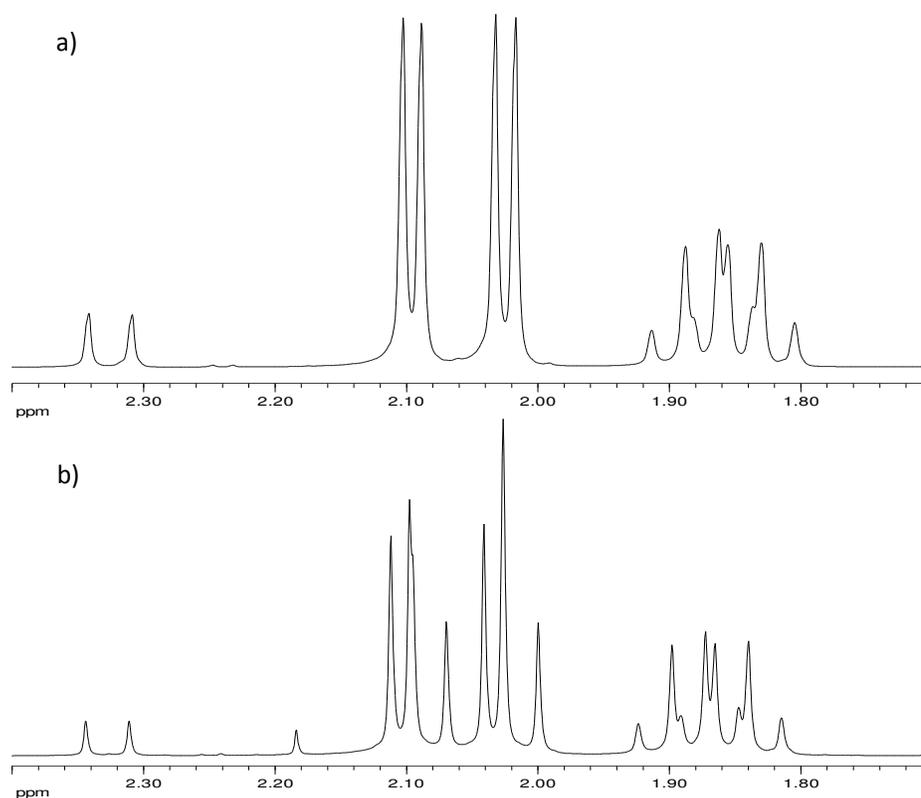


Figura 3. ¹H (300 MHz, 298 K, CDCl₃) spettri della miscela di reazione di Auranofin e una quantità equimolare di PhSeH (a) and PhSH (b).

La reazione con PhSeH è stata investigata in maggior dettaglio. L'andamento è messo in evidenza dallo spettro COSY prima e dopo l'aggiunta del benzenseleolo.

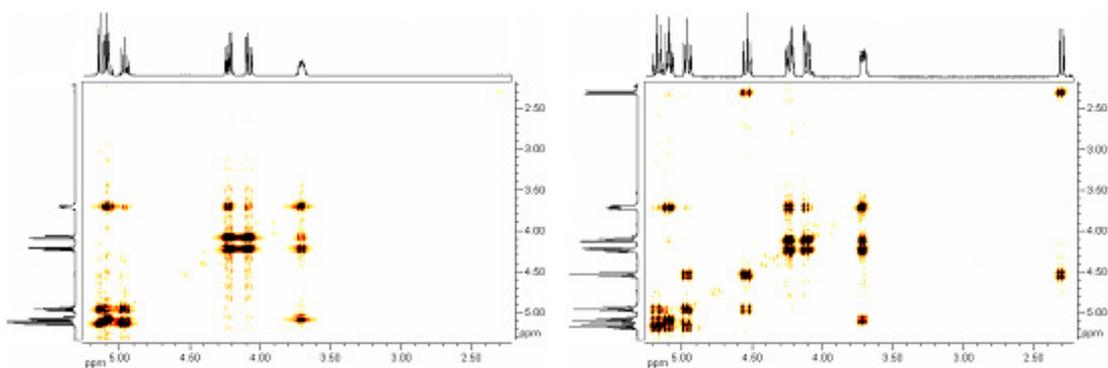


Figura 4. Spettro ^1H - ^1H COSY dell'Auranofin (sinistra) e dell'Auranofin + PhSeH (destra)

Analizzando nello specifico lo spettro DOSY (diffusion-ordered spectrum) della miscela stechiometrica con PhSeH è possibile avere un'ulteriore evidenza della formazione di $\text{Et}_3\text{P-Au-SePh}$ e dello spostamento del TATGH dal selenio. I segnali del legante fosfinico Et_3P e della porzione PhSe hanno lo stesso coefficiente di diffusione $D = 1.3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, mentre per il TATGH si ha una costante $D = 1.1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

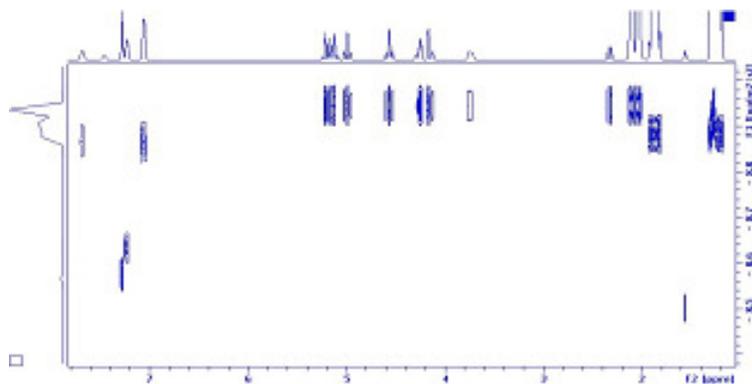


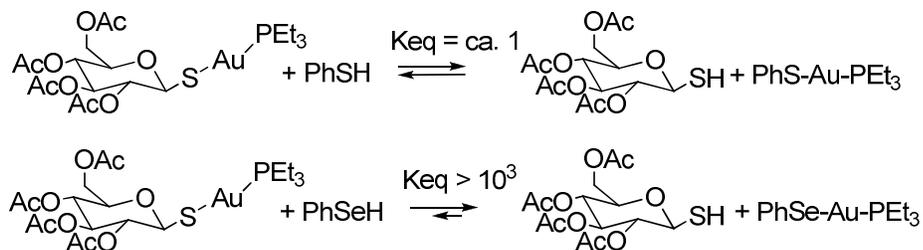
Figura 5. Spettro DOSY di una miscela equimolare di Auranofin e PhSeH in CDCl_3 .

Lo spettro del ^{77}Se (misurato a 77 MHz) dopo l'aggiunta di un equivalente di PhSeH mostra una risonanza a 149.0 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 8 \text{ Hz}$) che può essere attribuita all'addotto $\text{Et}_3\text{P-Au-SePh}$; aggiungendo un equivalente addizionale, la

risonanza ($\Delta\nu_{1/2} \approx 3$ Hz) dell'eccesso di PhSeH appare a 137.6 ppm, mentre l'altro segnale è leggermente spostato a 149.3 ppm e mostra un leggero allargamento ($\Delta\nu_{1/2} \approx 18$ Hz). Poiché questi allargamenti di riga possono indicare fenomeni di scambio, il sistema è stato analizzato a bassa temperatura, nel tentativo di congelare un possibile processo di scambio. In seguito all'abbassamento della temperatura da 25 °C a -60 °C la risonanza del ^{77}Se subisce uno spostamento di circa 15 ppm. A -60 °C il segnale è ulteriormente allargato ($\Delta\nu_{1/2} \approx 70$ Hz). L'allargamento di riga dovuto al rilassamento causato da anisotropia del chemical shift è stato superato attraverso la rotazione del campione a -60 °C e utilizzando un campo magnetico inferiore (57 MHz per il ^{77}Se , ma la larghezza di riga è ancora 70 Hz. Non è possibile quindi escludere la presenza di altre specie in soluzione in rapido scambio oltre all'addotto $\text{Et}_3\text{P-Au-SePh}$ che tuttavia non è stato possibile caratterizzare.

Gli spettri NMR del ^{31}P non sono indicativi, poichè il segnale della fosfina a 40.0 ppm è deschermato di meno di 1 ppm dopo l'aggiunta di due equivalenti di PhSeH.

L'intero quadro descrive quindi che il legante TATG è rapidamente spostato dal nucleofilo SH o SeH (schema). I processi sono entrambi reversibili, ma caratterizzati da una diversa costante di equilibrio.



Schema 4 Equilibrio dello scambio di ligandodi Auranofin in cloroformio

L'Auranofin può quindi reagire con gruppi tiolici disponibili in maniera reversibile, legandosi ad un donatore di tiolo ma scambiando prontamente la funzione Au con una funzionalità selenolica disponibile.¹⁵¹

Tuttavia, non è possibile trarre le stesse conclusioni quando si consideri l'ambiente fisiologico cellulare o lo stesso mezzo acquoso generalmente impiegato negli studi di inibizione enzimatica. A tale scopo, abbiamo esteso gli studi ad un solvente polare e protico come il metanolo poichè l'Auranofin non è solubile in acqua nelle concentrazioni necessarie per gli esperimenti NMR.

2.2.2 REAZIONI TRA AURANOFIN E PhSeH/PhSH IN CD₃OD

2.2.2.1 PhSH

La reazione tra Auranofin e PhSH è stata studiata in MeOD a varie temperature e mostra la presenza di un equilibrio tra le due forme di TATG coordinato e libero. Questo può spiegare la labilità del legame tra farmaco e albumina sierica rispetto al gruppo selenolico maggiormente reattivo della Tioredossina Reduttasi.

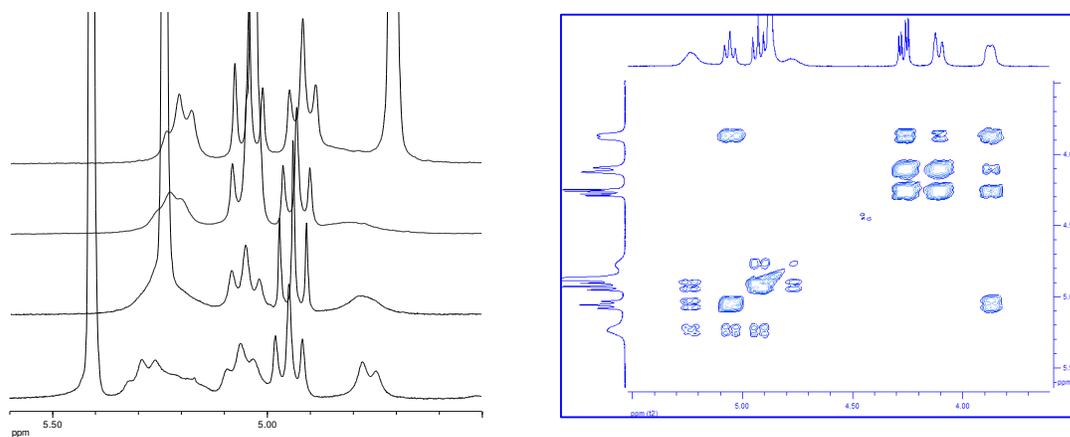


Figura 6. ¹H NMR (300 MHz) della miscela 1:1 di Auranofin and PhSH. Dal basso verso l'alto le temperature sono 243 K, 263 K, 283 K e 313 K. Il picco a maggiore intensità che si sposta con la temperature corrisponde alla risonanza dell'idrossile. Spettro ¹H-¹H COSY di Auranofin + PhSH in MeOD a 301K.

¹⁵¹ J. R Roberts, J. Xiao, B. Schliesman, D. J. Parsons, C. F. Shaw, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 424.

A bassa temperatura si vede chiaramente la risonanza del protone H1 del TATGH, il doppietto a 4.76 ppm. Lo stesso segnale nello spettro dell'Auranofin si trova a 5.30 ppm, mentre le altre risonanze non sono influenzate dalla rottura del legame S-Au. Aumentando la temperatura le due risonanze coalescono e, nonostante non sia possibile una precisa determinazione della dinamica della reazione, a livello macroscopico la temperatura di coalescenza è stata stimata intorno a 313 K. Utilizzando l'equazione di Eyring e conoscendo la distanza tra i due segnali che è 162 Hz, si ottiene che la frequenza di scambio k_c è di 360 Hz e l'energia libera di attivazione alla temperatura di 313 K è di 14.7 kcal/mol.

$$\Delta G_c^\ddagger = 19.14T_c \left(10.32 + \log \frac{T_c}{k_c} \right); \quad k_c = \frac{\pi \Delta \nu}{\sqrt{2}}$$

Paragonandola con la stessa reazione in cloroformio si evidenzia che, in quest'ultimo solvente, la barriera di attivazione è più alta; infatti, a temperatura ambiente, entrambi i segnali delle forme TATGH e Auranofin appaiono con risonanze definite indicando che in cloroformio lo scambio è molto più lento rispetto alla scala dei tempi di un esperimento NMR.

2.2.2.2 PhSeH

La stessa reazione dell'Auranofin con PhSeH in MeOD, effettuata a diverse temperature, mostra che subito dopo l'aggiunta del selenolo alla soluzione di Auranofin si ha lo spostamento del TATGH e la comparsa del doppietto a 4.75 ppm del protone H₁, che nell'Auranofin si trova a 5.17 ppm. La variazione di temperatura non influenza i segnali NMR e questo vuol dire che nei tempi dell'esperimento le due specie non scambiano tra loro oppure scambiano ad una velocità così lenta da permettere di vederle sempre come segnali separati.

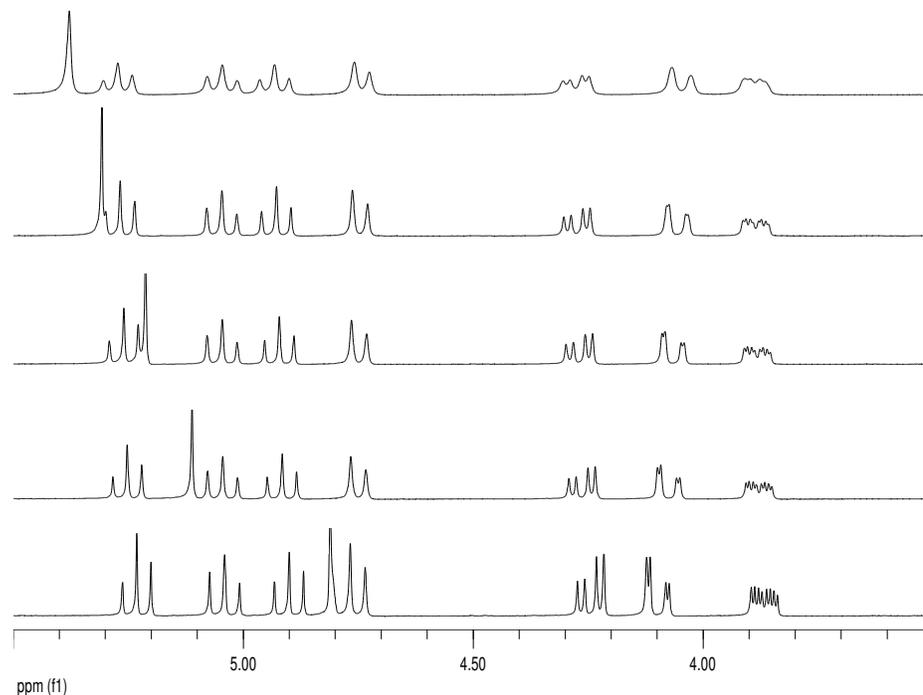


Figura 7 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (dal basso verso l'alto) dell'AuranoFin + PhSeH a 301 K, 273 K, 263 K, 253 K, 243K in MeOD. Il picco a maggiore intensità che si sposta con la temperatura corrisponde alla risonanza dell'idrossile.

Non si notano cambiamenti dello spettro protonico al diminuire della temperatura. Nello spettro del ^{31}P si osserva solo un piccolo spostamento inferiore a 1 ppm, oltre ad un allargamento di riga che suggerisce la presenza di fenomeni di scambio come già osservato per la reazione in cloroformio. Inoltre, lo spettro del ^{77}Se mostra la presenza di solo Ph_2Se_2 . Dopo 12 ore a temperatura ambiente, nella miscela di reazione si nota la presenza di un precipitato giallo, probabilmente un benzenolato di oro polimerico avente struttura generale $(\text{PhSeAu})_n$, come confermato dalle analisi IR e MALDI effettuate.

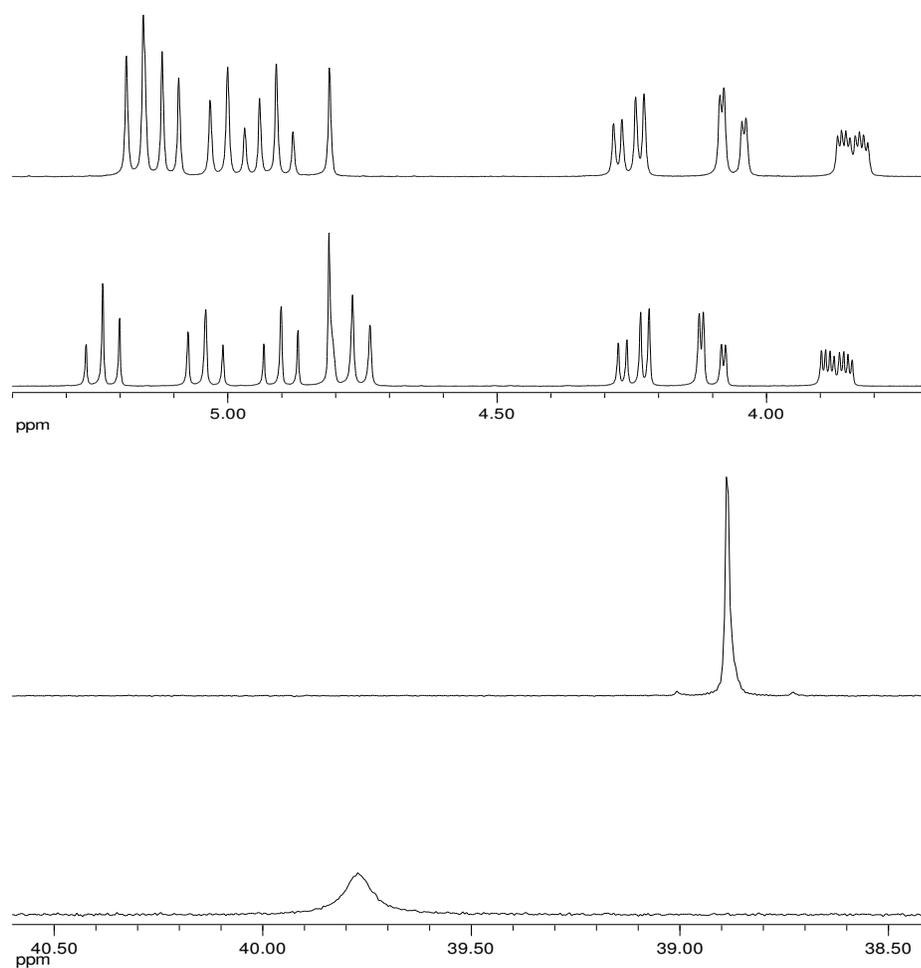
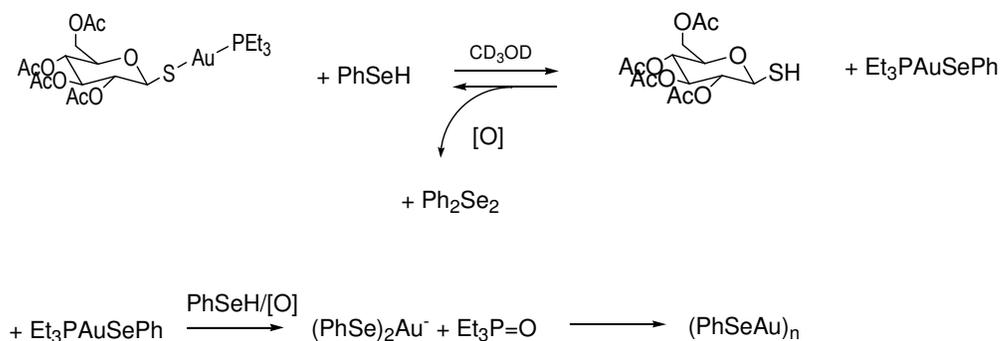


Figura 8 Spettri ^1H (in alto) e ^{31}P (in basso) di Auranofin e Auranofin + PhSeH 1:1 in CD_3OD subito dopo la miscela dei reagenti.

E' interessante notare che dopo un giorno la miscela di reazione si riconverte parzialmente nei reagenti, probabilmente a causa dell'ossidazione del PhSeH a Ph_2Se_2 . Lo spettro ^{31}P -NMR inoltre mostra un nuovo segnale a 59.18 ppm, corrispondente al Et_3PO . La reazione che avviene tra Auranofin e PhSeH in CD_3OD può essere illustrata dallo schema seguente.



Schema 5. Schema proposto per la reazione tra Auranofin e PhSeH in CD₃OD.

La reazione con i tioli in un ambiente polare segue quindi lo stesso decorso della reazione in cloroformio, mentre la reazione con il PhSeH è più complessa: gli addotti formati inizialmente subiscono successive trasformazioni che conducono alla formazione di prodotti secondari ossidati, come Ph₂Se₂ e Et₃PO e alla formazione di un benzenselenolato di oro polimerico. L'importanza di questi prodotti, o la loro presenza nell'ambiente cellulare, restano ancora oggetto di discussione.

2.3 REAZIONE TRA AURANOFIN E PhSeH/PhSH IN DMSO

La reazione dell'Auranofin con PhSeH e PhSH in DMSO avviene più lentamente rispetto alle reazioni mostrate precedentemente in cloroformio e metanolo. Lo spettro del protone evidenzia la presenza contemporanea del prodotto di partenza e delle specie legate all'oro, Et₃PAuSePh e Et₃PAuSPh rispettivamente. Il doppietto dell'SH del TATGH a 3.71 ppm è la conferma dell'avvenuto scambio con il gruppo nucleofilo. Un ulteriore riscontro è dato dallo spettro ³¹P-NMR, in cui i segnali relativi all'addotto don il PhSeH e il PhSH rispettivamente a 40.46 ppm e 39.38 ppm sono ben distinti dalla risonanza dell'Auranofin che non ha reagito a 39.20 ppm. Gli spettri nelle figure XX mostrano la situazione appena descritta. La larghezza di riga dei segnali del

^{31}P è indice anche in questo caso della presenza di processi di scambio tra le forme libera e legata del TATG.

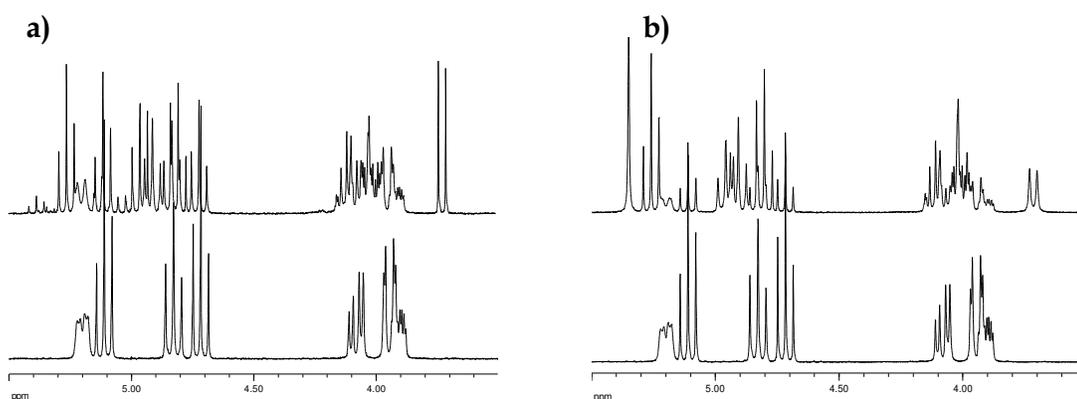


Figura 9 (a): spettro ^1H -NMR (DMSO, 300 MHz, 298 K) dell'Auranoﬂin (in basso) e di Auranoﬂin + PhSeH 1:1 subito dopo l'aggiunta (in alto). (b): ^1H -NMR (DMSO, 300 MHz, 298 K) dell'Auranoﬂin (in basso) e Auranoﬂin + PhSH 1:1 subito dopo l'aggiunta.

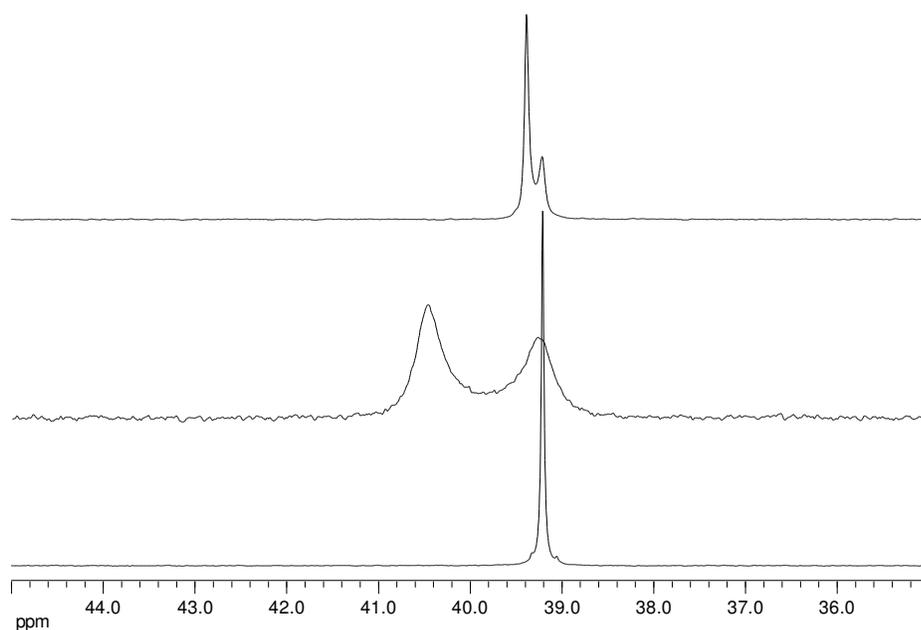


Figura 10. ^{31}P -NMR (DMSO, 122 MHz) di Auranoﬂin (in basso); Auranoﬂin con PhSeH 1:1 (al centro) e Auranoﬂin con PhSH 1:1 (in alto).

Il primo step della reazione è la parziale sostituzione del TATG per mezzo del tiolo/selenolo; in entrambi i casi, dopo un giorno, i due segnali nello spettro del ^{31}P coalescono in una singola risonanza il cui chemical shift varia lentamente nel tempo fino a raggiungere dopo pochi giorni la risonanza dell'Auranoﬂin.

Questo processo probabilmente è promosso dall'ossidazione del PhSeH e del PhSH ai corrispondenti diseleniuro e disolfuro. Infatti, nello spettro del ^{77}Se della miscela con il benzosenolo dopo una settimana si osserva soltanto il segnale del Ph_2Se_2 a 441.6 ppm. Inoltre, sono state osservate altre due risonanze a 55.59 e 50.54 (con PhSeH) e 55.57 e 51.27 (con PhSH), il primo attribuito al Et_3PO e l'ultimo a $(\text{Et}_3\text{P})_2\text{Au}^+$, che confermano la presenza di ulteriori reazioni secondarie.

2.4 REAZIONE TRA AURANOFIN E SELENOCISTEINA

Le reazioni studiate finora hanno permesso di verificare la particolare reattività dell'Auranofin nei confronti dell'atomo di selenio. Essi sono tuttavia molto semplici rispetto alla complessità dell'enzima, non permettendo di stabilire un meccanismo riproducibile in ambiente fisiologico. Si è scelto quindi di utilizzare l'amminoacido selenocisteina (Sec) come modello più realistico del sito catalitico della TrxR.

La selenocisteina non è un prodotto commercialmente disponibile: la sua elevata reattività determina l'immediata ossidazione al corrispondente diseleniuro selenocistina in presenza di ossigeno atmosferico. L'amminoacido è stato pertanto sintetizzato direttamente nell'ambiente di reazione in solvente acquoso, portando tuttavia ad alcuni problemi relativamente alle reazioni con l'Auranofin e analoghi complessi Au(I)-derivati insolubili in acqua e obbligando la scelta di miscele di solventi per lo studio delle reazioni desiderate. Le analisi sono state condotte mediante l'utilizzo di NMR eteronucleare; lo spettro protonico infatti non è utile per comprendere l'andamento della reazione poichè i segnali dell'acetilglucosio risuonano alle stesse frequenze del solvente. A livello macroscopico, comunque, la miscela di reazione mostra lo stesso comportamento delle precedenti reazioni con PhSeH; il precipitato, giallo e polveroso, è stato analizzato attraverso MALDI e IR

confermando la presenza dell'aminoacido e ipotizzando quindi la formazione del polimero $(\text{SecAu})_n$.

3 Et₃PAuCl

3.1 REAZIONI DI Et₃PAuCl CON PhSH E PhSeH in CD₃OD

Con l'intento di avere maggiori informazioni sull'effetto del gruppo uscente dei composti a base di Au(I) analoghi all'Auranofin, sono state studiate le reazioni con PhSeH e PhSH di un-derivato analogo dell'Auranofin in cui il gruppo TATGH è sostituito da un atomo di cloro. Questo composto offre inoltre la possibilità di monitorare lo spostamento del cloruro dal Se o dallo S grazie alla formazione di Cl⁻ rivelato attraverso NMR del ³⁵Cl. Il segnale del Cl legato è troppo largo per essere rivelato, a causa del momento di quadrupolo del nucleo interessato.

In CDCl₃ non avviene alcuna reazione; il processo è stato quindi studiato in metanolo utilizzando quantità stechiometriche dei due reagenti.

3.1.1 PhSH

Nello spettro del ³¹P è possibile osservare lo shift della risonanza da 33.6 a 35.5 ppm, dovuto alla formazione del complesso Et₃PAuSPh.¹⁵² Dopo un giorno si nota la formazione di (Et₃P)₂AuCl come indicato dalla risonanza a 47.4 ppm, confrontabile con i dati presenti in letteratura, oltre alla precipitazione di un solido bianco.

3.1.2 PhSeH

La reazione dell'Et₃PAuCl con PhSeH porta immediatamente alla formazione del prodotto Et₃PAuSePh, identificato dallo spostamento di chemical shift del segnale del ³¹P di 3.6 ppm, con un picco a 37.2 ppm. Il valore non è corrispondente a quello dello stesso complesso ipotizzato dalla reazione del benzenselenolo con Auranofin; ciò indica la probabile presenza di un processo

¹⁵² Isab, A. A.; Shaw III, C. F.; Hoeschele, J. D.; Lockela, J. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 3588-3592.

di scambio tra $\text{Et}_3\text{PAuSePh}$ e il reagente. Dopo tre giorni, inoltre, è possibile osservare diversi nuovi segnali del ^{31}P . Un debole tripletto di intensità 1:1:1 che risuona a 22.2 ppm è stato assegnato al composto Et_3PD^+ con $^1J(^{31}\text{P},^2\text{H}) = 73$ Hz, una risonanza a 47.1 ppm attribuita a $(\text{Et}_3\text{P})_2\text{AuCl}$ e una risonanza a 59.7 ppm con due satelliti di intensità circa il 3.5% separati da 424 Hz, che suggerisce la presenza nel composto del legame P-Se.¹⁵³ Bisogna notare che la risonanza di Et_3PO è attesa allo stesso valore. Sembra che l'ossigeno abbia un ruolo portante nelle reazioni successive, promuovendo l'ossidazione del Et_3PD^+ a $\text{Et}_3\text{P}=\text{O}$, in accordo con la bassa intensità del segnale dello ione fosfonio deuterato.

Quando la reazione è condotta in atmosfera inerte molti di questi prodotti secondari non si formano e il segnale dell' Et_3PD^+ è più intenso. Tuttavia, sotto flusso d'azoto lo spettro del ^{77}Se mostra tre segnali: Ph_2Se_2 (452.3 ppm), $\text{Et}_3\text{PAuSePh}$ (123.4 ppm, largo) e una risonanza a 185.3 ppm non assegnata. Nessuno di questi segnali è dovuto al PhSeH (106.4 ppm in MeOD). Lo spettro protonico, eccetto per l'evidenza della formazione del Ph_2Se_2 , non è informativo poiché i segnali delle trietilfosfine sono ampiamente sovrapposti.

Lo spostamento del cloruro può essere rivelato attraverso ^{35}Cl -NMR, poiché le linee spettrali in molecole covalenti dove il Cl è monovalente hanno righe large 10kHz e non sono rilevabili, mentre lo spostamento del Cl^- è chiaramente evidente nello spettro NMR del ^{35}Cl , dove è stata osservata una risonanza a -32.7 ppm.

In aggiunta alla reazione appena menzionata, si ha la formazione di un precipitato giallo, che è stato identificato come il polimero $(\text{PhSeAu})_n$.

¹⁵³ Bhabak, K. P.; Mugesh, G. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 2449-2455

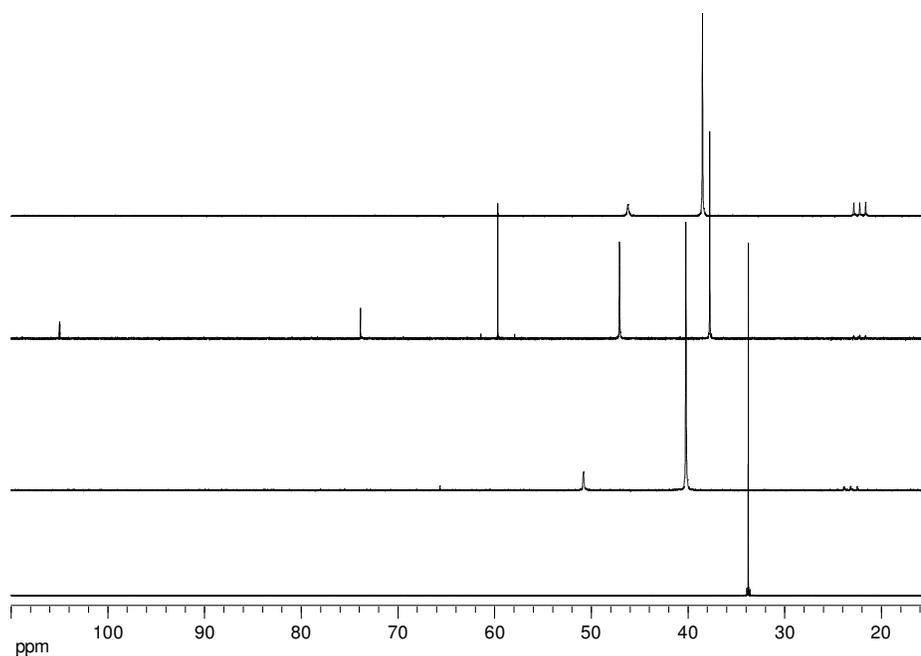


Figura 11. ^{31}P NMR (CD_3OD , 122 MHz) di (dal basso in alto): Et_3PAuCl ; $\text{Et}_3\text{PAuCl} + \text{PhSeH}$ (1:1) subito dopo il mescolamento; $\text{Et}_3\text{PAuCl} + \text{PhSeH}$ (1:1) dopo tre giorni; $\text{Et}_3\text{PAuCl} + \text{PhSeH}$ (1:1) dopo tre giorni sotto atmosfera di N_2 .

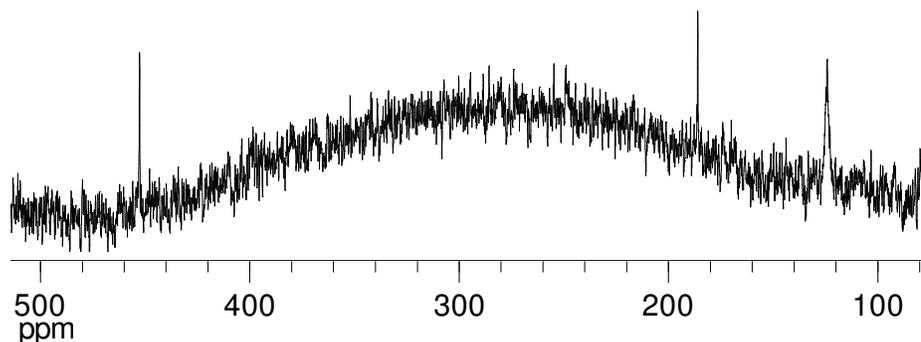
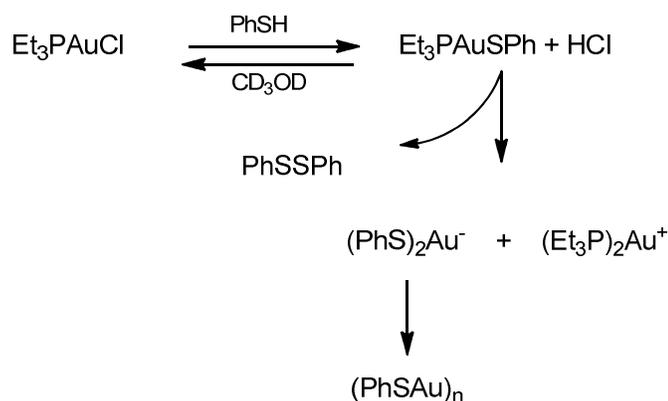
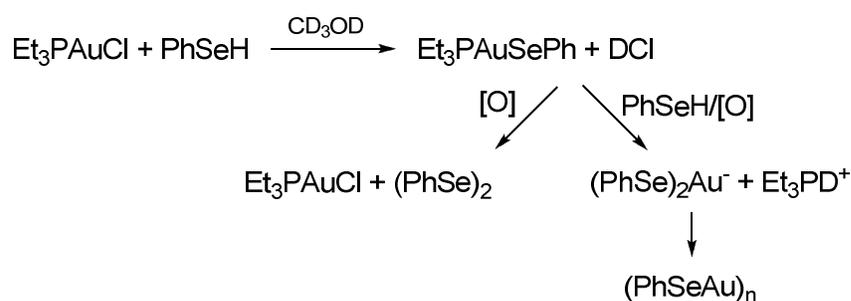


Figura 12 ^{77}Se -NMR della miscela Et_3PAuCl /benzenseleolo sotto N_2 dopo 3 giorni

Il decorso della reazione sia nel caso del PhSH che del PhSeH prevede la coordinazione dello S o Se all' Au seguita dal rilascio dello ione trietilfosfonio (Et_3PH^+) in seguito alla rottura del legame Au-P. Il rimanente benzenseleuriuro (o solfuro) di oro(I) precipita come polimero. L'eccesso di trietilfosfina in parte si coordina all' Et_3PAuCl , portando alla formazione del complesso $(\text{Et}_3\text{P})_2\text{AuCl}$.

Come nel caso dell'Auranofin, il segnale del ^{31}P sia per le reazioni condotte all'aria che per quelle condotte sotto N_2 è deschermato nella prima fase della reazione e torna poi lentamente al valore del reagente. Questo suggerisce il seguente schema:



Scheme 1. Reazione di Et_3PAuCl con a) PhSeH e b) PhSH in solventi polari. Dopo un giorno si ha la formazione di un precipitato giallo nel caso del PhSeH , mentre nella reazione con PhSH si osserva la formazione di un precipitato bianco.

I risultati sperimentali presentati finora indicano che, in generale, lo scambio di legante all'atomo di oro prima avviene sul legante trans alla fosfina (S o Se), come generalmente accettato. Tuttavia, la formazione della trietilfosfina e dei derivati indica che è tuttavia possibile, in determinate condizioni, la rottura del legame Au-P. In ogni caso, il meccanismo per la sostituzione è ancora sconosciuto, ad esempio se le reazioni avvengono per sostituzione oppure

addizione/eliminazione. Questi punti sono stati chiariti attraverso il ricorso al calcolo dell'energia potenziale di superficie di sistemi modello, inclusa la caratterizzazione degli stati di transizione rilevanti.

3.2 REAZIONE DI Et_3PAuCl CON SELENOCISTEINA

Si è scelto quindi di utilizzare la selenocisteina come modello più realistico di selenolo per lo studio del meccanismo di reazione.¹¹ I risultati sono identici a quelli ottenuti con PhSeH anche se lo spettro LDI-MS del precipitato è di più difficile interpretazione; gli spettri IR ottenuti a partire da diversi complessi di Au sono sovrapponibili e mostrano bande che possono essere attribuite ai gruppi amminici e carbossilici dell'aminoacido, fornendo un'ulteriore conferma della formazione del prodotto $(\text{H}_2\text{NCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeAu})_n$. Lo spettro ^{77}Se -NMR mostra un picco a -133 ppm corrispondente all'addotto $\text{Et}_3\text{P-Au-Sec}$ (Figura 8).

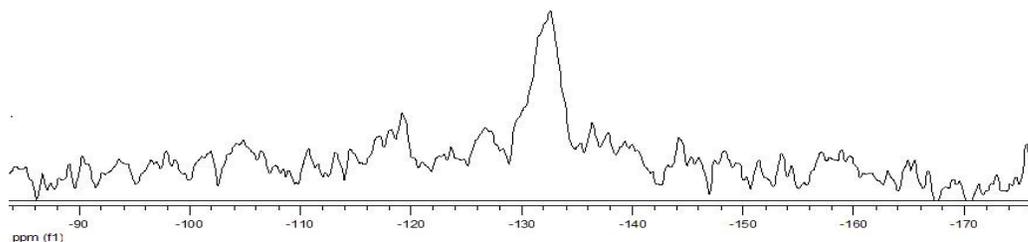


Figura 13. Spettro ^{77}Se -NMR dell'addotto $\text{Et}_3\text{P-Au-Sec}$.

I composti ottenuti dalle reazioni con Sec risultano più stabili rispetto a quelli derivati dalle reazioni con il PhSeH .

La variazione del gruppo X con altri anioni, come Cl, Br, CN, SCN, dedc, xanth non ha mostrato differenze significative della reattività nei confronti dei modelli di enzima utilizzati, come confermato anche dai dati dei test biologici di IC_{50} .

3.3 CONCLUSIONI

Sono state investigate le reazioni di sistemi modello contenenti i gruppi nucleofili selenolo e tiolo con Auranofin e Et_3PAuCl . Abbiamo sottolineato una chiara differenza di stabilità degli addotti formati da zolfo e selenio-derivati, in cui l'ultimo risulta essere più stabile. Tuttavia, i dati NMR suggeriscono che si forma più di una specie, tra cui l'addotto Et_3PAuXPh , particolarmente in metanolo anche a causa dell'ossidazione del benzenselenolo e benzentiolo. Non è stato possibile caratterizzare tutte le specie formate poiché gli equilibri in cui sono coinvolti sono troppo veloci per la scala dei tempi degli esperimenti NMR.

Un risultato importante è la totale reversibilità della reazione con i tioli; questo implica che dopo il legame con l'albumina nel sangue, la funzione Et_3PAu dell'Auranofin può essere facilmente scambiata con siti contenenti selenio come il residuo di selenocisteina nell'enzima TrxR. Tuttavia, lo spostamento della unità trietilfosfina avviene in solventi polari portando ad una complessa miscela di prodotti.

4. COMPLESSI DI Au(I) CON CARBENI N-ETEROCICLICI

4.1 INTRODUZIONE

La scoperta dei carbeni N-eterociclici (NHC) come leganti per metalli di transizione ha attratto molto interesse fin dagli anni '60, ma il loro utilizzo si è maggiormente diffuso in seguito al lavoro pionieristico di Arduengo del 1991 sull'isolamento e la stabilità degli imidazol-2-ilidene,¹⁵⁴ contenenti un anello imidazolico sostituito nelle posizioni 1,3 dei due atomi di azoto e il carbene singoletto localizzato sulla posizione 2.¹⁵⁵

La forza del legame dei carbeni N-eterociclici con il centro metallico è stata confrontata con quella delle fosfine e per questo tali composti sono diventati oggetto di studio di grande interesse.^{156,157,158,159} Il legame NHC ai metalli avviene attraverso una σ -donazione del doppietto solitario del carbene al metallo; tuttavia recenti evidenze suggeriscono la partecipazione di un certo grado di retro-donazione^{160,161} il cui grado dipende dalla natura del metallo.

Diversi studi teorici sono stati condotti coinvolgendo carbeni N-eterociclici dei metalli del gruppo 11. La forza di legame dei carbeni del gruppo 11 segue il pattern Au>Cu>Ag relativamente alla donazione π degli atomi di azoto verso il riempimento dell'orbitale p. Evidenze strutturali inoltre supportano questa visione teorica paragonando le distanze di legame carbene-azoto del complesso rispetto al carbene libero.

Ulteriore stabilizzazione per risonanza è conferita dall'incorporazione del carbene stesso in un eterociclico aromatico (ad es. imidazoli-2-ilidene). Sostituenti ingombranti sull'atomo di azoto sono anche cruciali per la stabilizzazione di carbeni termo dinamicamente meno stabili, per permettere la loro dimerizzazione.

¹⁵⁴ A. J. Arduengo III, R. L. Harlow, M. Kline *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 361.

¹⁵⁵ Arduengo, A. J., III; Dias, H. V. R.; Calabrese, J. C.; Davidson, F. *Organometallics* **1993**, 12, 3405.

¹⁵⁶ Herrmann, W. A.; Köcher, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2162

¹⁵⁷ Herrmann, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1290

¹⁵⁸ Hillier, A. C.; Grasa, G. A.; Viciu, M. S.; Lee, H. M.; Yang, C.; Nolan, S. P. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 653, 69

¹⁵⁹ Jafarpour, L.; Nolan, S. P. *J. Organomet. Chem.* **2001**, 617- 618, 17

¹⁶⁰ Hu, X.; Castro-Rodriguez, I.; Olsen, K.; Meyer, K. *Organometallics* **2004**, 23, 755.

¹⁶¹ Nemcsok, D.; Wichmann, K.; Frenking, G. *Organometallics* **2004**, 23, 3640.

Essi formano robusti legami sigma metallo-carbene con una varietà di metalli di transizione M, portando a complessi metallici M-NHC con una straordinaria stabilità in condizioni di temperatura variabile, ossidazione e idrolisi.^{162,163,164,165} La sintesi dei complessi di NHC e Ag può avvenire a partire dai sali di imidazolo attraverso quattro diverse strategie: (1) la preparazione di carbeni liberi seguita dalla reazione con un sale d'argento, (2) la reazione in situ dei Sali di imidazolo con reagente a base d'Ag, (3) la reazione in-situ dei Sali di imidazolo con una base in presenza di un sale d'argento e (4) transmetallazione da un NHC-tungsteno all'argento.

La deprotonazione attraverso l'uso di una base d'argento è stato un metodo ampiamente usato per la sintesi di complessi di carbeni N-eterociclici con argento. Questa procedura può utilizzare diverse basi d'argento come Ag₂O, AgOAc e Ag₂CO₃. Lin e collaboratori hanno riportato una procedura¹⁶⁶. L'ossido d'argento è la base metallica più comunemente utilizzata. Le reazioni possono essere facilmente monitorate attraverso l'introduzione dell'ossido di argento insolubile. Sono stati utilizzati anche un'ampia varietà di solventi; il fatto che la reazione possa avvenire in acqua significa che il meccanismo è di tipo concertato.

Speciali reagenti di trasferimento di NHC sono i complessi di Ag(I). essi sono formati in un semplice modo dal trattamento dei sali di imidazolo con Ag₂O¹⁶⁷ e trasferiscono il loro legante NHC ad altri metalli, ad esempio il palladio¹⁶⁸ o l'oro.¹⁶⁹

¹⁶² O. Navarro, N. Marion, J. Mei, S. P. Nolan *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5142

¹⁶³ W. A. Herrmann *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1290. b)

d) D. Bourissou, O. Guerret, F. P. Gabbaï, G. Bertrand *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 39. e) K. J. Cavell, D. S. McGuinness *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 671.

¹⁶⁴ O. Schuster, L. Yang, H. G. Raubenheimer, M. Albrecht *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3445.

¹⁶⁵ c) S. Nolan, in *N-Heterocyclic Carbenes in Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Federal Republic of Germany, **2006**.

¹⁶⁶ Wang, H. M. J.; Lin, I. J. B. *Organometallics* **1998**, *17*, 972.

¹⁶⁷ H. M. J. Wang, I. J. B. Lin, *Organometallics* **1998**, *17*, 972.

¹⁶⁸ D. S. McGuinness, K. J. Cavell, *Organometallics* **2000**, *19*, 741.

¹⁶⁹ Jessica Lemke, Antonio Pinto, Philip Niehoff, Vera Vasylyeva and Nils Metzler-Nolte *Dalton Trans.*, **2009**, 7063–7070

È comunemente accettato che la sostituzione di una fosfina con leganti isolobali NHC frequentemente aumenta le proprietà dei nuovi composti per applicazioni pratiche, poiché sono stabili all'aria e all'acqua e facili da manipolare. Inoltre, i sali di imidazolo come precursori dei leganti possono essere funzionalizzati con una varia scelta di sostituenti, che non è invece possibile per le fosfine. In applicazioni mediche il fulcro è concentrato maggiormente sui complessi cationici NHC di oro, che sono noti per possedere attività antitumorale. Carbeni cationici di oro sono composti lipofili che sono in grado di indurre la permeabilizzazione della membrana mitocondriale nei ratti,¹ come riportato dai lavori di Berners-Price et al.^{170,171}

4.2 Carbeni N-Eterociclici (NHC) di oro come inibitori della TrxR

Recenti studi hanno dimostrato che i mitocondri rivestono un ruolo importante nella regolazione della morte programmata delle cellule (apoptosi) e quindi nelle malattie caratterizzate da una risposta apoptotica anormale come il cancro.¹⁷² La permeabilità della membrana mitocondriale sembra essere il punto centrale del processo apoptotico indotto dai mitocondri. Per questo motivo c'è un crescente interesse nel disegno e nella sintesi di composti in grado di colpire selettivamente i mitocondri delle cellule tumorali come nuova strategia chemioterapica. La sostituzione della fosfina in complessi analoghi dell'Auranofin con carbeni N-eterociclici (NHC) ha portato alla sintesi di nuovi composti di Au(I) biologicamente attivi, con dimostrate proprietà antitumorali.¹⁷³ Resta ancora oggetto di discussione la comprensione del ruolo del legante fosfinico e dello ione metallico nel meccanismo d'azione.

¹⁷⁰ P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price and D. A. Day, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1642–1647

¹⁷¹ L. Hickey, R. A. Ruhayel, P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price and A. Filipovska, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12570–12571

¹⁷² Murray V. Baker,* Peter J. Barnard, Susan J. Berners-Price,* Simon K. Brayshaw, James L. Hickey, Brian W. Skelton and Allan H. White *Dalton Trans.*, 2006, 3708–3715

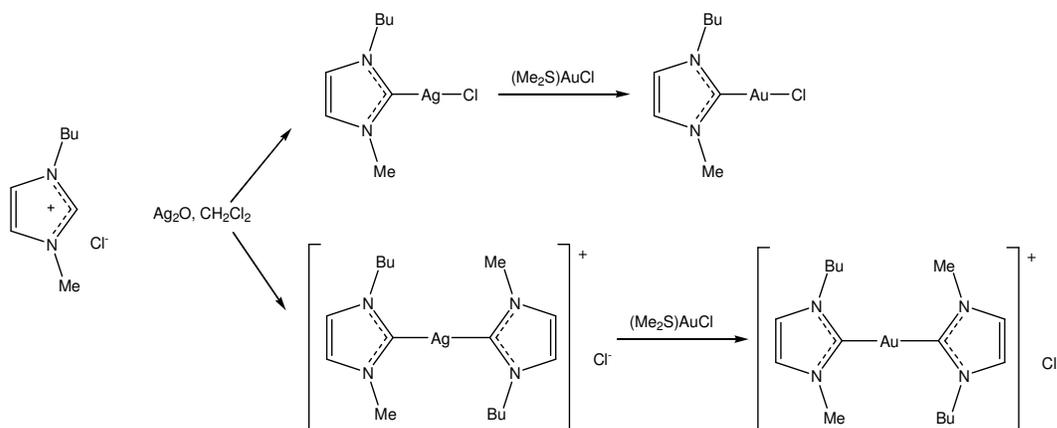
¹⁷³ James L. Hickey,† Rasha A. Ruhayel,† Peter J. Barnard,† Murray V. Baker, Susan J. Berners-Price,*† and Aleksandra Filipovska **J. AM. CHEM. SOC.** 2008, *130*, 12570–12571

I complessi di carbeni N-eterociclici con Au(I) combinano in un unico composto la possibilità di agire a livello dei mitocondri e l'inibizione selettiva della Tioredossina Reduttasi. Una caratteristica attraente della chimica degli NHC è la relativa facilità con cui una serie di complessi strutturalmente simili con diversa lipofilicità possono essere preparati da semplici sali di imidazolo come precursori.

Lo studio è stato rivolto alla comprensione del meccanismo d'azione di complessi NHC-Au(I) con i modelli dell'enzima Tioredossina Reduttasi precedentemente illustrati.

In particolare, sono stati sintetizzati complessi mono e bis-carbeni di Au asimmetrici rispetto ai sostituenti presenti sugli atomi di azoto dell'anello imidazolico. La sintesi, riportata nello schema X, coinvolge dapprima la formazione carbene d'Ag mediante la reazione della base Ag_2O con un sale di imidazolio opportunamente sostituito. E' possibile monitorare l'incorporazione del metallo mediante la scomparsa della base insolubile che porta alla formazione di una soluzione limpida dopo pochi minuti. La successiva transmetallazione direttamente in situ con $(\text{Me}_2\text{S})\text{AuCl}$ in differenti rapporti stechiometrici permette di ottenere sia il mono che il biscarbene di Au(I).¹⁷⁴ Il prodotto ottenuto, in seguito a semplice filtrazione su silice, presenta un elevato grado di purezza, come confermato dalle analisi ESI-MS, ^1H e ^{13}C NMR.

¹⁷⁴ S. Ray, R. Mohan, J.K. Singh, M. K. Samantaray, M. M. Shaikh, D. Panda, P. Gosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15042-15053



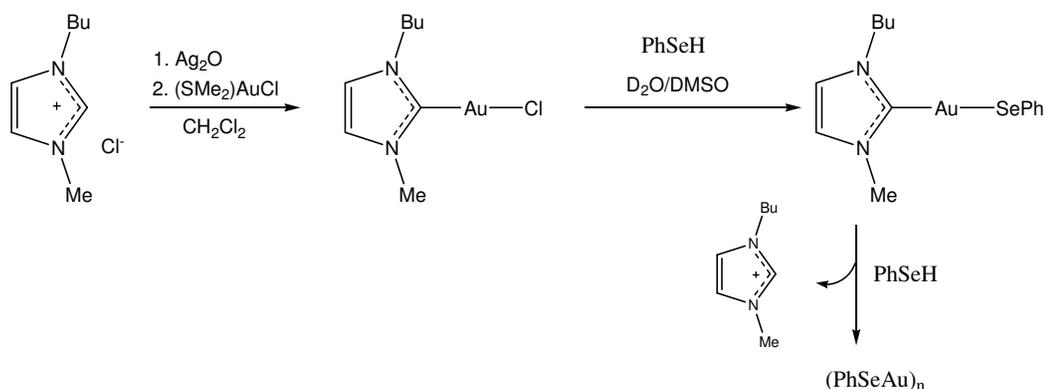
Schema 6. Sintesi dei carbeni di Ag e Au.

L'assenza della risonanza dovuta al protone imidazolico del C₂ ($\delta_{\text{H}} > 9$ ppm) è accompagnata dalla comparsa di un nuovo segnale nello spettro del ¹³C ($\delta_{\text{C}} > 170$ ppm), caratteristico della formazione di un legame oro-carbene.

Nello studio sulla reattività di tali composti nei confronti l'enzima TrxR è stato utilizzato come modello dapprima il PhSeH e successivamente la selenocisteina.

4.2.1 Reazione tra NHC-Au-Cl e PhSeH in CDCl₃

La prima reazione oggetto di studio è stata quella dell'analogo dell'Et₃PAuCl in cui il gruppo fosfinico è stato sostituito con un carbene N-eterociclico. La scelta del solvente è dettata dalla possibilità di valutare un confronto con le reazioni precedentemente analizzate dell'Auranofin e dei composti analoghi. La sostituzione della fosfina con il carbene dovrebbe aumentare la stabilità del legame Au-Se, evitando il distacco del gruppo in trans al Cl con successiva formazione del precipitato polimerico. Il decorso della reazione è illustrato nello schema 7.



Schema 7. Reazione tra NHC-Au-Cl e PhSeH in CDCl₃

Il carbene è stato sintetizzato secondo lo schema illustrato precedentemente; la reazione con PhSeH è molto lenta e solo dopo due giorni è possibile apprezzare la comparsa di un piccolo segnale a 7.03 ppm nello spettro protonico che può essere attribuito alla formazione del legame Au-Se; nello spettro del ⁷⁷Se si ritrovano soltanto i segnali a 456.3 e 136.9, relativi rispettivamente al difenildiseleniuro e al benzenselenolo (Figura 14).

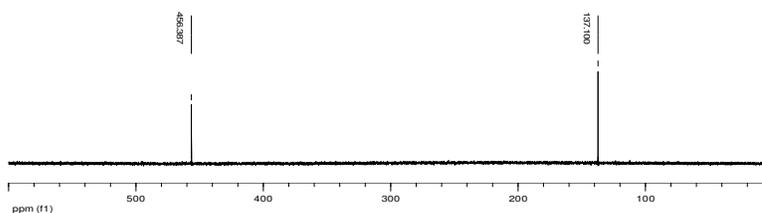


Figura 14. ⁷⁷Se-NMR (77 MHz, CDCl₃) della miscela NHC-Au-Cl + PhSeH

Si evidenzia inoltre la formazione di un precipitato giallo, probabilmente anche in questo caso relativo ad un composto polimerico ottenuto in seguito al distacco dell'anello imidazolico dal complesso, come si nota dalla ricomparsa della risonanza a 10.85 ppm corrispondente al protone H2 (Figura 15).

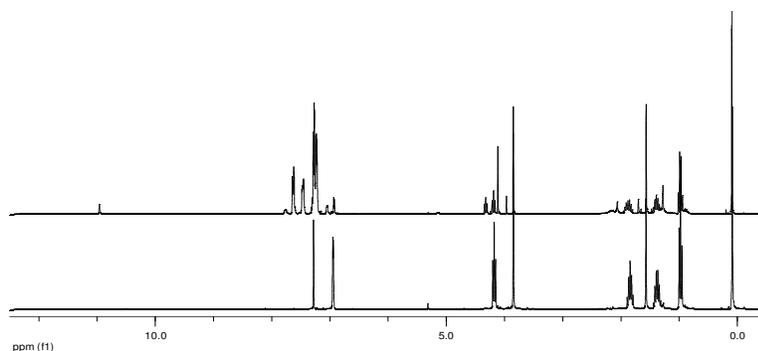


Figura 15. $^1\text{H-NMR}$ del NHC-Au-Cl prima e dopo l'aggiunta di PhSeH .

4.2.2 Reazione tra $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ e PhSeH in DMSO

La reattività del biscarbene di oro è stata esaminata in un solvente polare come il DMSO . La sostituzione di entrambe le funzionalità legate al centro metallico si è resa necessaria per la ricerca di complessi più stabili..... La miscela del complesso carbenico con il benzenselenolo porta alla formazione di un addotto Au-Se , evidenziato dalla risonanza a 7.00 ppm nello spettro protonico (Figura 16), che dopo due giorni si riconverte nel reagente. Probabilmente a causa della bassa concentrazione dell'addotto formato non è possibile registrare segnali nello spettro $^{77}\text{Se-NMR}$ oltre a quello del PhSeSePh avente chemical shift 441.8 ppm. (Figura 17)

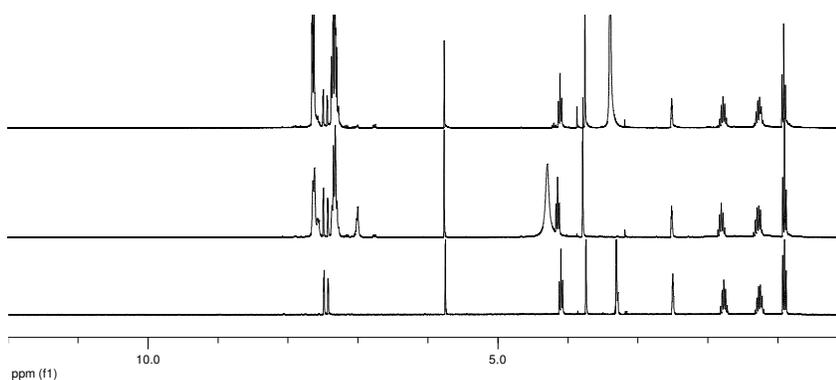


Figura 16. $^1\text{H-NMR}$ del $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ in DMSO e della miscela con PhSeH

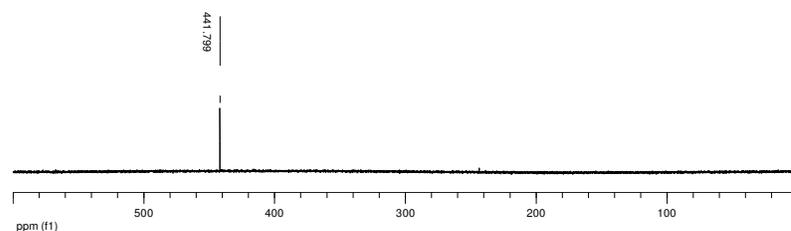
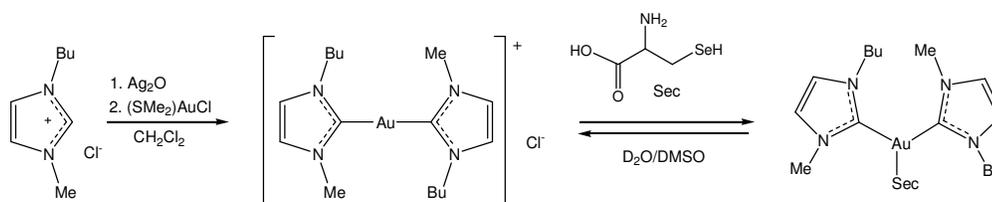


Figura 17. ^{77}Se -NMR (77 MHz, DMSO) dell'addotto NHC-Au-Sec in DMSO

4.2.3 Reazione tra $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ e selenocisteina

Dopo aver avuto la conferma di una maggiore stabilità dei complessi formati a partire da derivati carbenici, il PhSeH è stato sostituito con l'aminoacido selenocisteina per comprendere cosa accade a livello dello stesso residuo presente nella sequenza C-terminale dell'enzima Tioredossina Reduttasi.



Schema 8. Schema proposto per la reazione tra $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ e Sec.

La sintesi della selenocisteina è stata ottimizzata mediante l'utilizzo di ditiotreitolo (DTT) come agente riducente del prodotto commercialmente disponibile, la selenocistina. Il segnale a -248 ppm nello spettro del ^{77}Se conferma la formazione della selenocisteina (Sec) (Figura 18).

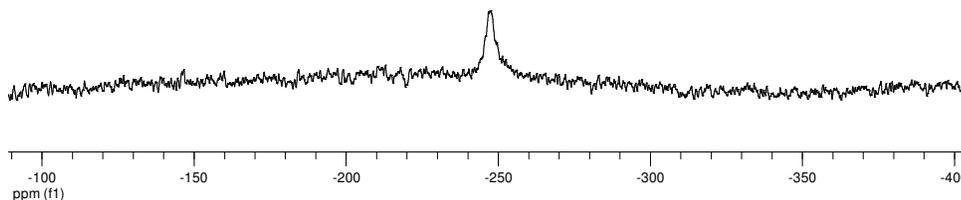


Figura 18. ^{77}Se -NMR (77 MHz, D_2O) della selenocisteina sintetizzata per riduzione della selenocistina con DTT.

E' necessario effettuare la reazione del $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ con la selenocisteina in una miscela di solventi DMSO/ D_2O , a causa della diversa solubilità dei due reagenti. Si evidenzia la formazione di un addotto contenente un legame Au-Se; gli spettri protonici e la risonanza a -108.9 ppm nello spettro del ^{77}Se infatti (Figura 19) suggeriscono la formazione del composto riportato nello schema 8.

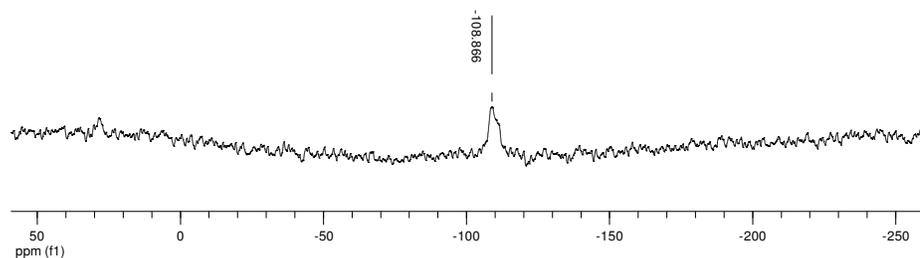


Figura 19. ^{77}Se -NMR (77 MHz, DMSO) dell'addotto ottenuto dalla reazione tra $[(\text{NHC})_2\text{Au}]^+\text{Cl}^-$ e Sec.

Tale risultato è molto interessante, perché in contrapposizione con quanto riportato finora in letteratura. Studi simili su carbeni N-eterociclici di Au(I) condotti dal gruppo di Berners-Price, infatti, propongono la sostituzione di uno dei leganti carbenici con il selenolo della selenocisteina. Nel nostro caso un simile decorso della reazione è da escludere poiché l'uscita dell'anello imidazolico sarebbe accompagnato dalla comparsa nello spettro NMR del segnale relativo al protone legato al C2, che non è invece evidente.

Dopo un giorno il complesso di Au(I) trivalente si riconverte nel reagente, come è confermato dai segnali presenti nello spettro ^1H -NMR. (Figura 20)

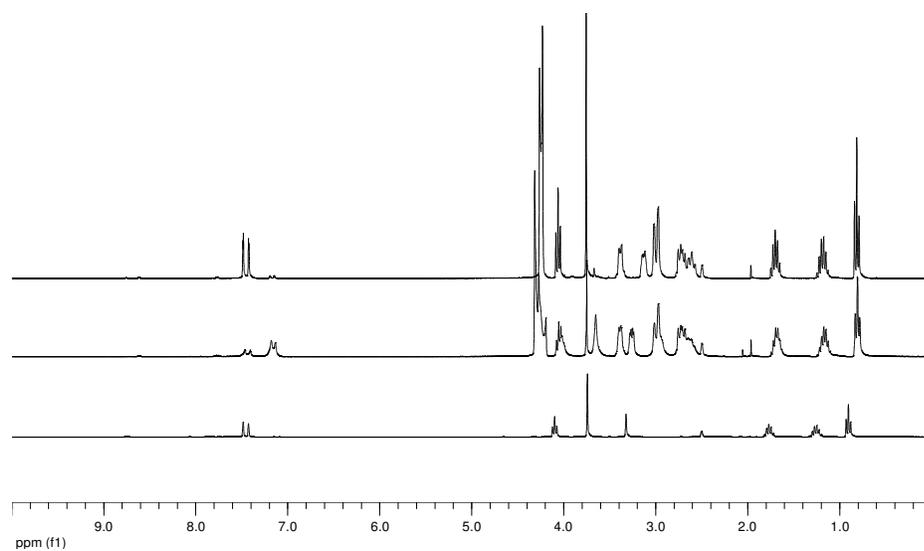


Figura 20. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO) (dal basso verso l'alto) del [(NHC)₂Au]⁺Cl⁻ da solo, subito dopo l'aggiunta di Sec e dopo un giorno.

5. SINTESI DEL TETRAPEPTIDE CGGC

5.1 INTRODUZIONE

La maggior parte degli enzimi appartenenti alla famiglia della Tioredossina Reduttasi contengono un centro redox C-terminale che contiene una sequenza peptidica conservata Xaa-Cys1-Cys2-Xaa (dove Xaa è solitamente una Gly o una Ser) dove Cys1 e Cys2 formano un ponte disolfuro vicinale molto raro che forma un anello a 8 termini durante il ciclo catalitico (Figura 13).¹⁷⁵

Molte TrxRs eucariotiche durante l'evoluzione sono state sostituite nella posizione Cys2 con l'aminoacido selenocisteina (Sec), indispensabile per il funzionamento dell'enzima, come dimostra la perdita di efficienza dell'enzima in seguito a mutazione di Sec in Cys.

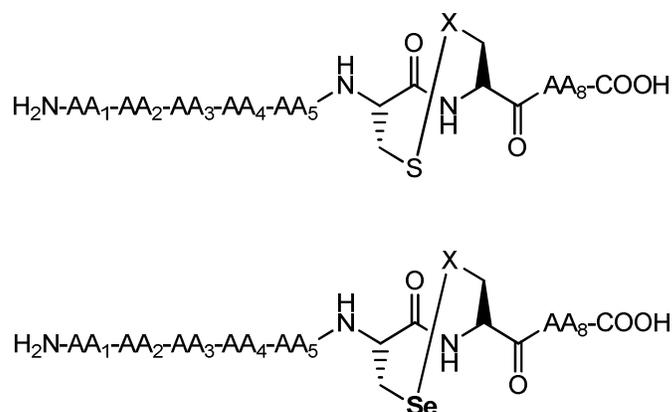


Figura 21. Struttura ciclica a 8 termini di proteine contenenti un ponte disolfuro o selenenilsolfuro vicinale.

Per investigare il meccanismo di riduzione è stato studiato l'enzima troncato che ha perso la struttura ad anello C-terminale (Figura 14).¹⁷⁶

¹⁷⁵ Zhong, L.; Arner, E. S. J.; Holmgren, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 5854-5859.

¹⁷⁶ Lacey, B. M.; Eckenroth, B. E.; Flemer Jr, S.; Hondal, R. J. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12810-12821.

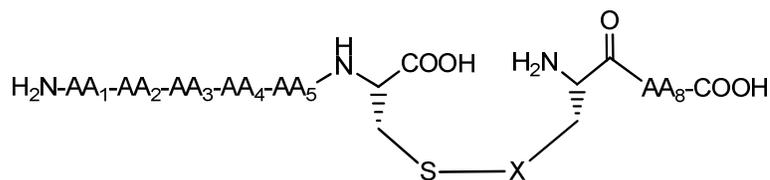


Figura 22. Enzima troncato: il ponte non è coinvolto in una struttura ciclica.

I substrati peptidici sono identici nella sequenza alla parte mancante dell'enzima, contenente entrambi i collegamenti disolfuro e selenenilsolfuro, ma si differenziano per la presenza o l'assenza della struttura ciclica. Il rapporto delle loro velocità di turnover evidenzia che la struttura ad anello è solo di modesta importanza per la Sec-TrxR mitocondriale troncata del topo, mentre essa risulta molto importante per quella contenente la Cys.

Proseguendo negli studi di inibizione della TrxR da parte di complessi di Au(I), è emersa l'opportunità di estendere le reazioni finora studiate (limitate a modelli molto semplici quali PhSH, PhSeH, cisteina, selenocisteina) ad un modello più realistico del peptide. Alla luce di queste evidenze, ho quindi pensato di sviluppare un modello dell'enzima che includesse anche la formazione del ponte disolfuro o selenenilsolfuro per valutarne la reattività nei confronti dei complessi di Au(I).

5.2 SINTESI DEL TETRAPEPTIDE H-Gly-Cys-Cys-Gly-OH

Il sito catalitico dell'enzima Tioredossina Reduttasi è localizzato in una porzione C-terminale, costituita da 16 aminoacidi, che termina nella sua forma eucariotica con la sequenza -Gly-Cys-Sec-Gly, mentre nella forma procariotica presenta la sostituzione del penultimo aminoacido, Sec, con una cisteina (Cys).^{177,178} L'interesse quindi si è focalizzato inizialmente sulla sintesi della

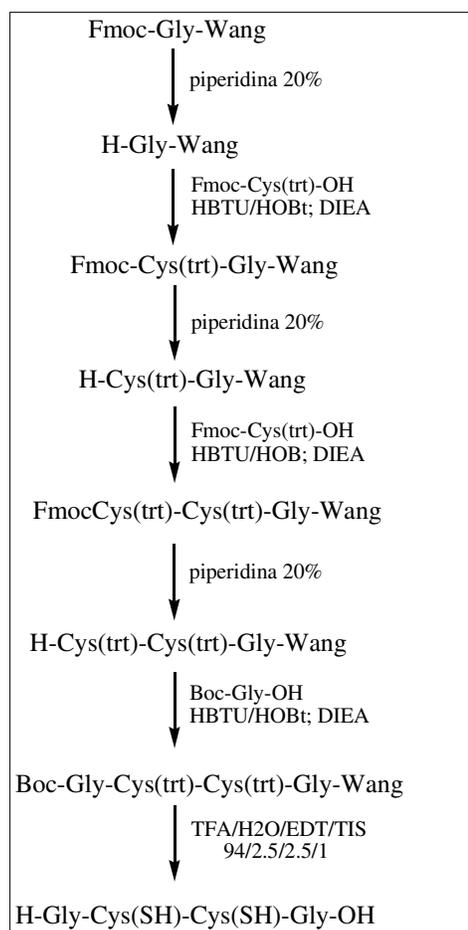
¹⁷⁷ Biterova, E. I.; Turanov, A. A.; Gladyshev, V. N.; Barycki, J. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 15018-15023

¹⁷⁸ Sandalova, T.; Zhong, L.; Lindqvist, Y.; Holmgren, A.; Schneider, G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 9533-9538

sequenza Gly-Cys-Cys-Gly, che mostra la presenza di un disolfuro vicinale quando i due tioli non sono protetti.

La sintesi è stata effettuata manualmente su fase solida, a causa della difficoltà di automatizzazione per concentrazioni necessarie ad effettuare analisi NMR.

Lo schema di sintesi è il seguente:



Schema 9. Sintesi del tetrapeptide in fase solida.

Sono stati utilizzati 214 mg di resina (0.15 mmol, grado di sostituzione della resina 0.7 mmol/g).

La sintesi peptidica è stata eseguita in fase eterogenea con il reagente solubile in fase liquida ed il peptide in crescita in fase solida, su resina. Tale tipo di tecnica presenta numerosi vantaggi rispetto alla sintesi in soluzione. Innanzitutto, permette di superare i problemi derivanti dalla possibile insolubilità degli intermedi peptidici nei comuni solventi organici utilizzati. Inoltre permette una facile rimozione dell'eccesso di reagenti e dei sottoprodotti attraverso semplici operazioni di lavaggio e filtrazione, dopo il completamento di ciascuna reazione, in quanto il peptide è completamente insolubile in tutti gli stadi della sintesi.

La sintesi è eseguita in un unico reattore e ciò consente di evitare perdite di materiali e di ottenere rese elevate dei prodotti finali, potendo utilizzare larghi eccessi di reagenti per spingere le reazioni a completezza. Il tetrapeptide è stato assemblato su supporto solido usando la classica procedura peptidica *via-Fmoc* (*N*-Fluorenilmetossi-carbonile), utilizzando una resina Wang già funzionalizzata con il primo aminoacido Fmoc-Gly-OH. Gli altri aminoacidi sono stati accoppiati seguendo i protocolli standard della sintesi peptidica in fase solida; gli agenti accoppianti utilizzati sono stati sali di uronio quali HBTU/HOBt in presenza di una base terziaria, DIEA. Il gruppo $N\alpha$ -Fmoc di ogni aminoacido è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento. L'ultimo aa inserito è stato protetto con Boc per ottenere la posizione carbossiterminale libera in seguito a totale deprotezione della resina. Le cisteine utilizzate nei processi di coupling presentano la funzione tiolica protetta con tritile (trt), opportunamente liberata nelle condizioni di sbloccaggio. Il distacco del peptide finale dalla resina e la contemporanea rimozione degli altri gruppi protettori in catena laterale sono stati effettuati utilizzando una miscela costituita da TFA (acido trifluoroacetico), EDT (etanditiolo), TIS (triisopropilsilano) ed H₂O nei rapporti 94:1:2.5:2.5.

In seguito a rimozione della fase solida dalla soluzione mediante filtrazione il peptide non è precipitato da etere etilico, quindi è stato nuovamente solubilizzato in una soluzione di HCl diluito e liofilizzato. In seguito a filtrazione la resina è stata rimossa dalla soluzione e si è tentato di precipitare il tetrapeptide con etere etilico freddo. Non si ottiene un precipitato, ma un composto di consistenza oleosa, nonostante la dissoluzione in soluzione acquosa di HCl e due cicli di liofilizzazione. Il peptide ottenuto è stato caratterizzato mediante RP-HPLC analitico e ESI-MS: l'analisi in modalità positiva mostra un segnale centrato a $m/z = 339.07$, corrispondente al tetrapeptide desiderato. Lo spettro ^1H - ^1H COSY (Figura 23) è stato eseguito solubilizzando il composto in una miscela $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ al 10%, per evitare lo scambio del protone tiolico con il solvente deuterato. È stato possibile quindi assegnare i segnali relativi ai protoni NH di ogni aminoacido e i corrispondenti carboni α e β . Il campione presenta diverse impurezze che rendono difficile l'identificazione di eventuali SH presenti nella loro forma ridotta. Sono stati effettuati inoltre esperimenti HMQC e HMBC.

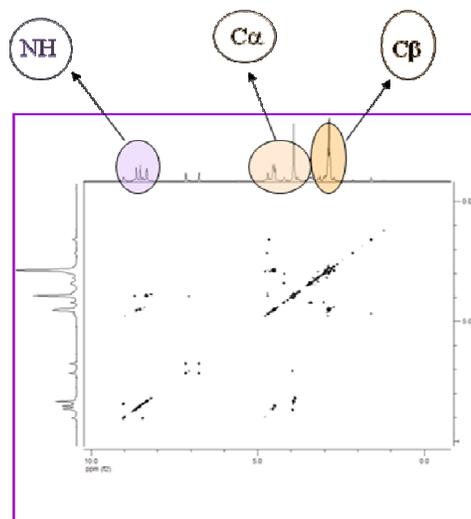
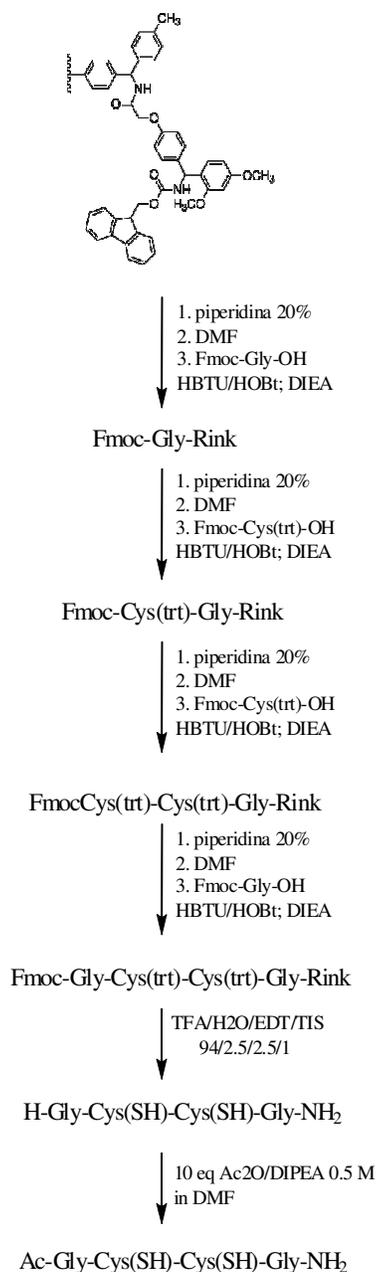


Figura 23. ^1H - ^1H COSY del tetrapeptide H-Gly-Cys-Cys-Gly-OH

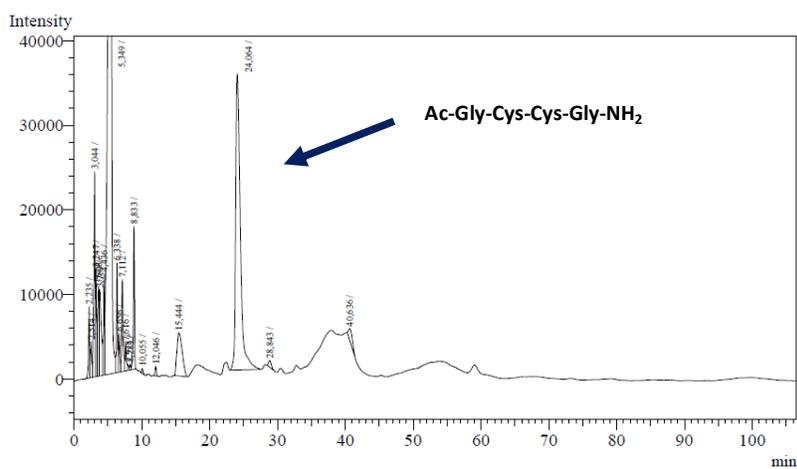
5.3 SINTESI DEL TETRAPEPTIDE Ac-Gly-Cys-Cys-Gly-NH₂

Con l'intento di ottenere un prodotto solido è stata eseguita la sintesi del tetrapeptide con le estremità N- e C-terminali protette. La resina utilizzata è una Rink 4-metilbenzidrilamina Fmoc-protetta avente un grado di sostituzione 1,1 mmol/g. La procedura seguita è riportata nello schema 1.



Schema 10 Sintesi del tetrapeptide con le estremità N- e C-terminali protette

Dopo i cicli di coupling l'oligopeptide è stato sottoposto a uno step acetilante, utilizzando una soluzione di Ac_2O /DIEA 0.5 M in DMF. La fase solida è stata lavata più volte con DMF e DCM ed è stata aggiunta la miscela di sblocco per liberare il tetrapeptide dalla resina; per aggiunta di etere etilico freddo si ottiene la formazione di un precipitato che è stato analizzato mediante HPLC utilizzando una colonna C-18 a fase inversa ed eluita con un gradiente lineare di acetonitrile/acqua (Figura 24).



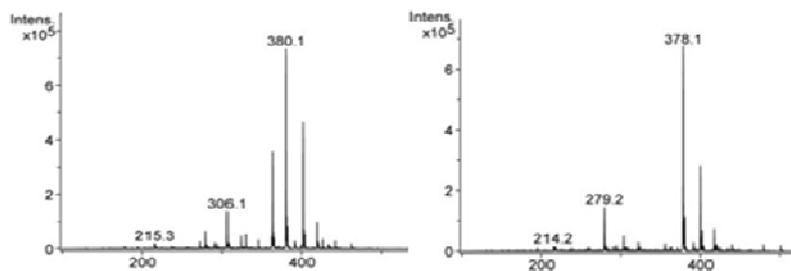


Figura 25 ESI-MS del tetrapeptide ridotto (sinistra) e ossidato (destra).

Il tetrapeptide nella forma ridotta è stato purificato per HPLC (Figura 5) e caratterizzato mediante ESI-MS.

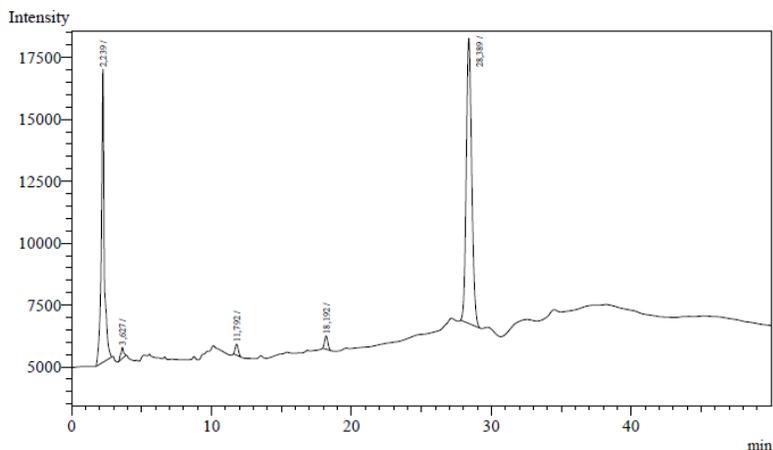


Figura 26. Analisi HPLC del tetrapeptide purificato.

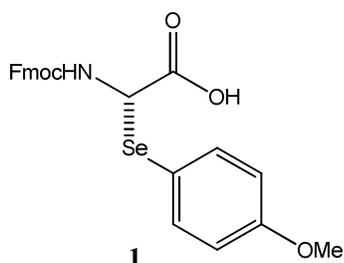
5.4 SINTESI DI Fmoc-Sec(pMob)OH

La sintesi di peptidi contenenti selenocisteina (Sec) sta rapidamente accrescendo interesse con la scoperta di un numero sempre maggiore di proteine contenenti questo aminoacido.^{179,180} La selenocisteina Fmoc-protetta **1** è stata utilizzata da Koide et al. come precursore per la sintesi in fase solida di peptidi contenenti

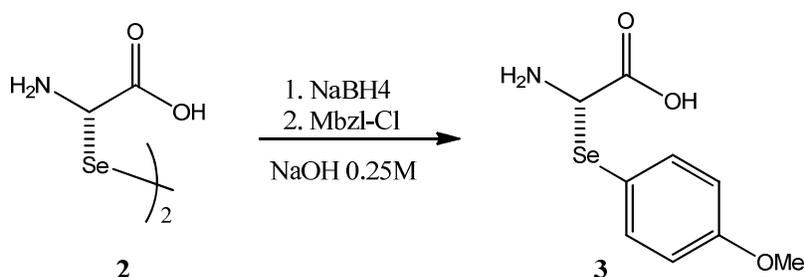
¹⁷⁹ Stadtman, T. C. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 16257-16260.

¹⁸⁰ Stadtman, T. C. In *Annual Review of Biochemistry* 1996; Vol. 65, p 83-100.

Sec;^{181,182,183} in letteratura si ritrova la sintesi a partire da Boc-Serina in otto step, con una resa totale del 24%.¹⁸⁴



Lo schema di sintesi che ho utilizzato per la selenocisteina protetta al Se con p-metossibenzile prevede la riduzione della selenocistina commerciale con sodio boroidruro in una soluzione di NaOH 0.25 M; tutte le soluzioni utilizzate sono state degassate con il metodo del *freeze and pump*. La Se-4-metossibenzilazione è stata effettuata direttamente nella soluzione di selenocisteina, in modo da evitare la sua ossidazione a dimero (Schema 12)



Schema 11. Sintesi della selenocisteina con il gruppo selenolico protetto da p-metossibenzile.

Dopo protezione con Fmoc l'aminoacido sintetizzato sarà impiegato nella sintesi in fase solida del tetrapeptide Gly-Cys-Sec-Gly.

¹⁸¹ Koide, T.; Itoh, H.; Otaka, A.; Yasui, H.; Kuroda, M.; Esaki, N.; Soda, K.; Fujii, N. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1993**, *41*, 502-506

¹⁸² Koide, T.; Otaka, A.; Fujii, N. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1993**, *41*, 1030-1034

¹⁸³ Moroder, L.; Besse, D.; Musiol, H. J.; Rudolph-Bohner, S.; Siedler, F. *Biopolymers* **1996**, *40*, 207-234

¹⁸⁴ Stocking, E. M.; Schwarz, J. N.; Senn, H.; Salzmann, M.; Silks, L. A. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* **1997**, 2443-2447