



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: Università degli Studi di Padova
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE**

CICLO XX

NUOVI AGENTI ANTINEOPLASTICI BASATI SULL' INIBIZIONE SELETTIVA DELLA DNA TELOMERASI

Direttore della scuola: **Ch.mo Prof. Maurizio Casarin**

Supervisore: **Ch.mo Prof. Manlio Palumbo**

Correlatore: **Dott. Claudia Sissi**

Dottoranda: **Claudia Pivetta**

31 Gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	pag. 6
ABSTRACT	pag. 9
<u>1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO</u>	pag. 11
1.1 TELOMERI E TELOMERASI	pag. 13
1.1.1 REPLICAZIONE DEL DNA E “END REPLICATION PROBLEM”	pag. 13
1.1.2 I TELOMERI	pag. 16
1.1.2.1 Accorciamento dei telomeri e senescenza cellulare	pag. 19
1.1.3 LA TELOMERASI	pag. 22
1.1.3.1 Struttura e meccanismo d’azione	pag. 22
1.1.3.2 Telomerasi e cancro	pag. 25
1.1.4 FARMACI ANTI-TELOMERASICI	pag. 29
1.1.4.1 Azione diretta sull’ enzima	pag. 30
1.1.4.1.1 Farmaci attivi sul sito catalitico (hTERT)	pag. 30
1.1.4.1.2 Farmaci attivi sulla subunità ribonucleotidica (hTR)	pag. 32
1.1.4.2 Azione indiretta sul substrato enzimatico	pag. 32
1.1.4.2.1 Farmaci attivi sul telomero	pag. 32
1.1.4.3 Altre strategie anticancro	pag. 34
1.1.4.3.1 Immunoterapia	pag. 34

1.2 STRUTTURE G-QUADRUPLEX	pag. 35
1.2.1 TOPOLOGIA E STRUTTURA.....	pag. 35
1.2.2 CLASSIFICAZIONE DELLE STRUTTURE G-QUADRUPLEX....	pag. 37
1.2.2.1 Orientamento delle catene.....	pag. 37
1.2.2.2 Stechiometria delle catene.....	pag. 37
1.2.2.3 Geometria dei loop.....	pag. 38
1.2.2.4 Conformazione glicosidica.....	pag. 39
1.2.3 G-QUADRUPLEX NEL TELOMERO.....	pag. 41
1.2.4 ALTRE SEQUENZE IN GRADO DI FORMARE STRUTTURE G-QUADRUPLEX.....	pag. 43
1.2.4.1 G-quadruplex nel promotore dell'oncogene <i>c-myc</i>	pag. 44
1.2.5 G-QUADRUPLEX COME BERSAGLIO TERAPEUTICO.....	pag. 47
1.2.6 FARMACI CHE AGISCONO SUL G-QUADRUPLEX.....	pag. 50
1.2.6.1 Acridine.....	pag. 50
1.2.6.2 Antrachinoni.....	pag. 51
1.2.6.3 Fluorenoni.....	pag. 53
1.2.6.4 Perileni.....	pag. 54
1.2.6.5 Porfirine.....	pag. 55
1.2.6.6 Dibenzofenantroline.....	pag. 57
1.2.6.7 Telomestatina.....	pag. 57
1.3 SCOPO DEL LAVORO	pag. 59
2. <u>MATERIALI E METODI</u>	pag. 64
2.1 MATERIALI	pag. 65
2.1.1 STRUMENTAZIONE.....	pag. 65
2.1.2 REAGENTI.....	pag. 66
2.1.3 REAGENTI STANDARD E KIT.....	pag. 66
2.1.4 ENZIMI E PROTEINE.....	pag. 66

2.1.5 ANTICORPI E MATERIALI PER WESTERN BLOTTING.....	pag. 66
2.1.6 MATERIALI PER COLTURE CELLULARI.....	pag. 67
2.1.7 NUCLEOTIDI MARCATI.....	pag. 67
2.1.8 OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI.....	pag. 67
2.1.8.1 Oligonucleotidi usati per saggio inibizione <i>Taq</i>-Polimerasi.....	pag. 67
2.1.8.2 Oligonucleotidi usati per saggio TRAP.....	pag. 67
2.1.8.3 Oligonucleotidi usati per gel shift.....	pag. 68
2.1.8.4 Oligonucleotidi usati negli esperimenti di fluorescence melting.....	pag. 68
2.1.8.5 Oligonucleotidi usati negli esperimenti di dicroismo circolare.....	pag. 68
2.1.8.6 DNA naturali.....	pag. 69
2.1.9 TAMPONI.....	pag. 69
2.2 METODI.....	pag. 70
<i>PARTE MOLECOLARE</i>	
2.2.1 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA <i>TAQ</i>-POLIMERASI.....	pag. 70
2.2.2 SAGGIO TRAP.....	pag. 71
2.2.3 SAGGIO TRAP- EZE.....	pag. 72
2.2.3.1 Trap- eze radioattivo.....	pag. 73
2.2.3.2 Trap- eze con Sybr Green I.....	pag. 75
2.2.4 GEL SHIFT.....	pag. 76
2.2.5 CONVERSIONE DUPLEX- G-QUADRUPLEX.....	pag. 77
2.2.6 FLUORESCENCE MELTING.....	pag. 78
2.2.7 DICROISMO CIRCOLARE.....	pag. 80
2.2.8 SAGGIO DI UNWINDING.....	pag. 80
2.2.9 SPETTROSCOPIA UV- VIS.....	pag. 81
<i>PARTE CELLULARE</i>	
2.2.10 COLTURE CELLULARI.....	pag. 82
2.2.11 PREPARAZIONE DELL' ESTRATTO PROTEICO.....	pag. 82
2.2.12 DOSAGGIO DELLE PROTEINE MEDIANTE SAGGIO BRADFORD.....	pag. 83
2.2.13 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE A BREVE TERMINE.....	pag. 83
2.2.14 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE A MEDIO	

TERMINE	pag. 83
2.2.15 VALUTAZIONE DI MORFOLOGIA APOPTOTICA/ NECROTICA	pag. 84
2.2.16 SAGGIO DELLA β- GALATTOSIDASI	pag. 84
2.2.17 CITOMETRIA DI FLUSSO	pag. 85
2.2.18 WESTERN BLOTTING	pag. 85
3. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	pag. 87
3.1 ANTRACHONI	pag. 89
3.1.1 COMPOSTI ESAMINATI	pag. 89
3.1.2 SAGGI DI INIBIZIONE ENZIMATICA: <i>TAQ</i> POLIMERASI E TELOMERASI	pag. 91
3.1.3 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX E SELETTIVITA' G-QUADRUPLEX- DUPLEX	pag. 97
3.1.3.1 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex	pag. 97
3.1.3.2 Selettività G- quadruplex- duplex	pag. 103
3.1.4 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX	pag. 109
3.1.5 CONCLUSIONI	pag. 113
3.2 PERILENI	pag. 115
3.2.1 COMPOSTI ESAMINATI	pag. 115
3.2.2 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX	pag. 117
3.2.2.1 Studi effettuati sulla sequenza telomerica umana	pag. 117
3.2.2.2 Studi effettuati sulla sequenza del promotore di <i>c-myc</i>	pag. 122
3.2.3 CONVERSIONE DUPLEX-G-QUADRUPLEX	pag. 124
3.2.4 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX: STUDI DI DICROISMO CIRCOLARE	pag. 127
3.2.4.1 Studi effettuati sulla sequenza telomerica umana	pag. 127
3.2.4.2 Studi effettuati sulla sequenza del promotore di <i>c-myc</i>	pag. 130
3.2.5 CONCLUSIONI	pag. 133

3.3 BISANTRENI	pag. 135
3.3.1 COMPOSTI ESAMINATI	pag. 135
3.3.2 SAGGI DI INIBIZIONE ENZIMATICA: TAQ POLIMERASI E TELOMERASI	pag. 137
3.3.3 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX	pag. 139
3.3.4 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX E SELETTIVITA' G-QUADRUPLEX- DUPLEX	pag. 141
3.3.4.1 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex	pag. 141
3.3.4.2 Selettività G-quadruplex- duplex	pag. 144
3.3.5 SAGGIO DI UNWINDING	pag. 148
3.3.6 CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA E MISURE DI DICROISMO CIRCOLARE	pag. 151
3.3.6.1 Interazioni con DNA duplex	pag. 151
3.3.6.2 Interazioni con sequenze in grado di formare strutture G-quadruplex	pag. 153
3.3.6.2.1 Studi condotti su sequenze correlate al DNA telomerico	pag. 153
3.3.6.2.2 Studi condotti sulla sequenza del promotore di <i>c-myc</i>	pag. 156
3.3.8 ATTIVITA' SU LINEE CELLULARI TUMORALI	pag. 159
3.3.8.1 Saggio di proliferazione cellulare a breve termine	pag. 159
3.3.8.2 Saggio TRAP e confronto con l'attività antiproliferativa	pag. 160
3.3.8.3 Saggio di proliferazione cellulare a medio termine sulla linea SKMel5	pag. 163
3.3.8.4 Valutazione della morfologia apoptotica mediante spettroscopia di fluorescenza	pag. 164
3.3.8.5 Citometria di flusso	pag. 165
3.3.8.6 Analisi di senescenza mediante Western Blotting	pag. 166
3.3.9 CONCLUSIONI	pag. 168
 <u>4. CONCLUSIONI</u>	pag. 171
BIBLIOGRAFIA	pag. 179
APPENDICE	pag. 189

RIASSUNTO

L'obiettivo principale della moderna ricerca oncologica si propone di sviluppare strategie terapeutiche sempre più mirate, al fine di eliminare i gravi effetti collaterali che inevitabilmente si manifestano con l'uso dei protocolli tradizionali.

L'enzima telomerasi rappresenta un importante target selettivo in quanto risulta espresso in circa l'80- 90% delle cellule tumorali, mentre risulta silente nelle cellule sane dove la sua espressione è limitata esclusivamente alle cellule staminali e del sistema ematopoietico. L'inibizione di questo enzima è in grado di indurre morte delle cellule cancerose senza produrre effetti tossici sulle cellule somatiche.

Molti sono gli approcci atti ad inibire l'attività telomerasica; è possibile agire direttamente sulle componenti enzimatiche (subunità proteica o ribonucleotidica) o, indirettamente, sul bersaglio dell'enzima, rappresentato dai telomeri, sequenze di DNA alle estremità dei cromosomi

Il DNA telomerico si caratterizza per la presenza di un'elevata ripetizione di sequenze ricche in guanina in grado di ripiegarsi a formare strutture definite G-quadruplex. La formazione di tali strutture del telomero inibisce l'attività telomerasica in quanto l'enzima risulta capace di legarsi al telomero solo quando questo si trova in forma lineare (non ripiegata).

Numerosi composti sono già stati identificati come capaci di indurre e stabilizzare le strutture G-quadruplex, tuttavia non è ancora stato evidenziato un riconoscimento altamente specifico per queste strutture rispetto alla doppia elica.

In questo lavoro di tesi sono state analizzate tre diverse classi di composti quali potenziali stabilizzatori di strutture a quartetti di guanine e, quindi, inibitori indiretti dell'attività telomerasica.

Per ogni composto si è valutata la capacità di interferire con l'enzima telomerasi ma anche la potenziale selettività verso le strutture a quartetti di guanine rispetto al DNA duplex utilizzando varie tecniche elettroforetiche (gel shift, TRAP assay) e spettroscopiche (UV-vis, fluorescenza e dicroismo circolare).

Si sono valutati, inoltre, gli effetti indotti dai derivati a livello cellulare, mediante esperimenti condotti su linee tumorali esprimenti attività telomerasica.

I composti oggetto di studio comprendono una libreria di derivati antracenedionici 2,6 disostituiti, analoghi del bisantrene e derivati perilenici correlati al **PIPER**, noto stabilizzatore di G-quadruplex.

Tutte le strutture sono state disegnate allo scopo di delineare alcune correlazioni struttura-attività. In particolare, l'insieme degli studi effettuati ha permesso di valutare aspetti quali:

- ❖ estensione del sistema aromatico planare
- ❖ numero, natura, lunghezza e collocazione delle catene laterali

I risultati ottenuti hanno evidenziato una buona correlazione tra inibizione dell'attività telomerasica e capacità di stabilizzazione di strutture G-quadruplex. I composti apparsi maggiormente attivi nella stabilizzazione di tali strutture si sono dimostrati anche in grado di indurre la formazione. Inoltre, i dati raccolti dagli esperimenti sulle linee cellulari hanno confermato per buona parte quanto sottolineato dalle misure effettuate a livello molecolare.

Dal punto di vista strutturale, è stato esaminato il ruolo dell'estensione del sistema aromatico planare e della natura dei sostituenti carichi in catena laterale nell'interazione con strutture a quartetti di guanine.

La presenza di un nucleo antracenicico esteso dall'inserimento di gruppi planari in catena laterale è in grado di dare risultati sovrapponibili a quelli riportati per sistemi a maggiore estensione (come ad esempio i perileni).

E' emersa la necessità di introdurre almeno due sostituenti laterali ai fini dell'attività antitelomerasica e di stabilizzazione di strutture G-4; tuttavia, un ulteriore aumento nel numero di sostituenti laterali potrebbe costituire una strategia efficace ai fini di un incremento della selettività G-quadruplex- duplex (se si considera che nel DNA strutturato in G-quadruplex sono presenti 4 solchi, diversamente dal DNA a doppia elica).

Un nuovo elemento generale, emerso dagli studi intrapresi, riguarda l'importanza della distanza tra i residui carichi e il sistema planare. Esistono probabilmente dei requisiti ben definiti, che possono, tuttavia, risultare diversi a seconda del tipo di struttura G-quadruplex bersaglio.

Anche la collocazione dei sostituenti laterali costituisce un fattore in grado di modulare notevolmente l'attività dei derivati testati in termini di attività antitelomerasica, stabilizzazione di strutture G-4, selettività G-quadruplex- duplex e modalità di legame all'acido nucleico.

Lo studio degli analoghi del bisantrene, in particolare, ha suggerito come le posizioni 1,5 risultino ottimali sia in termini di inibizione dell'attività telomerasica che di stabilizzazione di strutture G-quadruplex.

Anche i composti aventi catene situate nelle posizioni 2,6 e 2,7 mostrano una buona attività di inibizione dell'attività telomerasica e di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine, tuttavia, si caratterizzano per un maggiore effetto citotossico stando agli studi preliminari condotti in ambito cellulare.

L'insieme dei dati raccolti ha permesso di acquisire una serie di conoscenze utili nella determinazione di relazioni struttura-attività, applicabili allo sviluppo razionale di nuovi efficaci e selettivi inibitori della telomerasi.

ABSTRACT

In the search for new anticancer drugs a major goal is to devise more efficient and selective strategies to reduce typical side effects of traditional chemotherapy.

Telomerase represents an attractive and selective target. It is expressed in 80-90% of tumor cells whereas its expression in non-malignant cells is limited to stem cells and to hematopoietic system cells. Telomerase inhibition should lead to cancer cells death, with minor side effects on somatic cell lines.

Several strategies were developed in order to interfere with telomerase activity and affect cancer cell death pathways. Among potential targets we considered the substrate of the enzyme, telomeric DNA. It consists in a variable number of tandem repeats of G-rich sequences which can fold into G-quadruplex structures.

G-quadruplex formation inhibits telomerase activity by preventing enzyme- DNA recognition. In addition, it forms telomere uncapping cytotoxic processes.

In this work we examined several new compounds as G-quadruplex stabilizers, hence indirect inhibitors of telomerase activity and telomere damage inducers.

Enzyme inhibition and selective interaction with quadruplex vs. double stranded DNA were assessed by biophysical and biochemical techniques such as electromobility shift assay, TRAP assay, UV spectroscopy, fluorescence and circular dichroism.

Cytotoxic effects were evaluated by cell proliferation assays on different tumor cell lines.

Tested compounds belong to three different classes: a library of 2,6 bis-substituted anthraquinones, a series of compounds related to bisantrene and perylene derivatives structurally related to **PIPER**, a well known G-quadruplex stabilizer.

All compounds were designed to understand SA relationships. In particular the following features were considered:

- ❖ extension of the aromatic surface;
- ❖ number, nature, length and location of side chains.

For all tested compounds we were able to show a satisfactory correlation between telomerase inhibitory properties and ability to stabilize G-quadruplex structures; the most

active binders were also able to induce G-quadruplex from random structures. Finally, data obtained by experiments on cell lines confirmed molecular results.

As far as SA relationships, we highlighted the importance of the extension of the aromatic nucleus and positively charged side chains to obtain a good interaction with G-4 arrangements. We were able to define some structural requirements to improve G-quadruplex stabilization and G-quadruplex-duplex selectivity (based on differences between double stranded and G-quadruplex DNA).

An anthracene nucleus extended by planar groups in the side chains produce similar telomerase inhibitory properties and G-quadruplex stabilization effects if compared to perylene derivatives.

The need for at least two side chains clearly emerged; however an increment in G-quadruplex vs. duplex selectivity could be obtained by incrementing the number of side chains in the aromatic system (based on the different number of grooves in duplex and G-quadruplex DNA structures).

A further point concerns the role of the distance between charged groups in side chains and planar surface of compounds.

Location of side chains substantially affects telomerase inhibitory properties, G-4 stabilization, G-quadruplex-double stranded DNA selectivity and interaction mode with the nucleic acid.

In the study of bisantrene analogues we identified 1,5 positions as the most effective in telomerase inhibition and G-quadruplex stabilization. 2,6 and 2,7 bis- substituted derivatives showed also good anti-telomerase properties but cellular studies suggest a greater cytotoxic effects probably due to a different DNA interaction mode.

SAR data will be used to develop, by rational design, new selective telomerase inhibitors.

1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

1.1 TELOMERI E TELOMERASI

1.2 STRUTTURE G-QUADRUPLEX

1.3 SCOPO DEL LAVORO

1.1 TELOMERI E TELOMERASI

1.1.1 REPLICAZIONE DEL DNA E “END REPLICATION PROBLEM”

Il DNA è una macromolecola costituita da due catene polinucleotidiche avvolte l'una intorno all'altra a formare una doppia elica. I due filamenti sono tenuti insieme per mezzo di legami a idrogeno tra le basi azotate; questi accoppiamenti, definiti anche legami di tipo Watson- Crick, si realizzano tra una purina ed una pirimidina, in particolare tra adenina e timina (due legami a H) e tra guanina e citosina (tre legami a H) (figura 1.1.1).

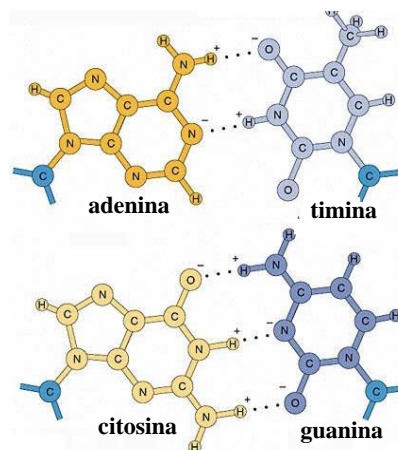


Figura 1.1.1 Accoppiamento Watson- Crick tra le basi azotate del DNA

Il DNA costituisce il materiale genetico della cellula: deve perciò essere accuratamente duplicato prima di ogni divisione cellulare.

Il ciclo di divisione cellulare è il mezzo fondamentale che sta alla base della riproduzione di tutti gli esseri viventi; tradizionalmente è diviso in più fasi: una fase in cui la cellula cresce in modo continuo, detta “interfase”, che comprende le fasi G1 (gap1), S (sintesi) e G2 (gap2); e una fase M (mitosi), in cui la cellula si divide (figura 1.1.2).

Durante la fase S, si ha la replicazione del DNA, operata dall'enzima DNA polimerasi.

Dal momento che l'enzima lavora sempre e solo in direzione 5'→3', la sintesi dei due filamenti deve avvenire con meccanismi diversi. Un filamento, detto filamento veloce ("leading strand"), viene sintetizzato in modo continuo, mentre l'altro, detto filamento lento ("lagging strand") è costituito inizialmente da una serie di brevi sequenze di DNA, chiamate frammenti di Okazaki, che vengono in seguito riuniti per dare una catena di DNA senza soluzione di continuità (figura 1.1.3).

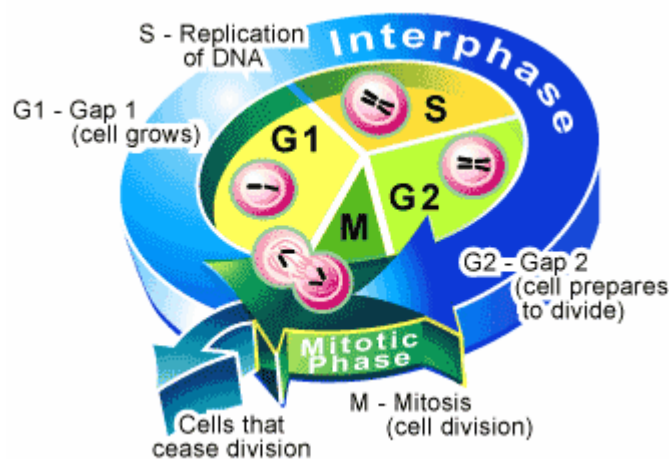


Figura 1.1. 2. Schema del ciclo cellulare. In fase G1 le cellule crescono e si preparano alla successiva fase di sintesi. Affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie il genoma viene duplicato durante la fase S; segue la fase G2 nella quale le cellule si preparano alla fase M, di mitosi, quando i cromosomi vengono segregati nelle due cellule figlie.

La DNA polimerasi non è in grado di iniziare una catena *ex novo*, ma necessita di una breve sequenza di RNA terminante con un gruppo 3'-OH libero a cui legare il primo nucleotide della catena da sintetizzare. Sul filamento veloce ("leading strand") ci sarà un solo "primer" all'inizio della replicazione; sul lagging strand ci saranno una serie di brevi "primer" di RNA per ciascun frammento. Questi iniziatori ribonucleotidici verranno poi rimossi da una nucleasi e le interruzioni riempite per azione della DNA polimerasi.

Tuttavia, il primer iniziale, all'estremità 5' del lagging strand non può essere sostituito da una sequenza corrispondente di DNA poiché manca alla polimerasi (che sintetizza unicamente in direzione 5'→3') il gruppo 3'-OH libero a cui agganciare la breve sequenza di riempimento.

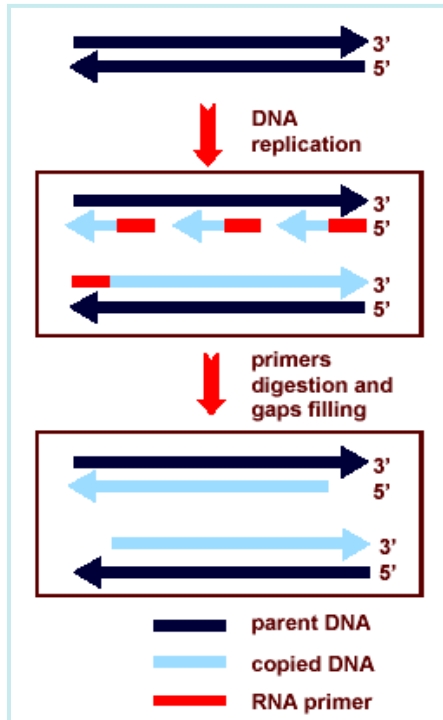


Figura 1.1.3. "End Replication problem". L'incompleta replicazione del DNA terminale all'estremità 5' del lagging strand comporta la sintesi di molecole di DNA progressivamente più corte.

La conseguenza di questo fatto è rappresentata dalla sintesi di un filamento di DNA con un'estremità 5' incompleta, per cui la molecola a doppio filamento avrà l'estremità 3' sporgente rispetto all'estremità 5'. Questo significa che ad ogni ciclo replicativo si ha la perdita di materiale genetico dovuta al cosiddetto "end replication problem"(figura 1.1.3). Si calcola che ad ogni ciclo replicativo vengano perse da 50 a 200 basi (Neidle et al, **2002**). Tale fenomeno non rappresenta di per sé un problema, dal momento che le estremità dei cromosomi sono protette da sequenze non codificanti chiamate telomeri.

1.1.2 I TELOMERI

I telomeri sono complessi nucleoproteici localizzati alle estremità dei cromosomi di tutti gli organismi eucarioti (figura 1.1.4). Furono scoperti 70 anni fa da Hermann Muller in *Drosophila melanogaster*. Egli coniò il termine “telomero” che deriva dal greco *telos* (che significa “fine”) e *meros* (che significa “parte”) (Bailey et al, 2006).

Caratteristica saliente del DNA telomerico è l’essere costituito da brevi sequenze ripetute ricche in guanina, in particolare, nell’uomo, si trova ripetuto l’esanucleotide TTAGGG (Moyzis et al, 1988)

I telomeri sono costituiti da DNA in parte a doppio filamento che si estende per 2-15 kilobasi (McElligott et al, 1997; Wright et al, 1997) con la porzione 3’ terminale che protrude e rimane a singolo filamento.

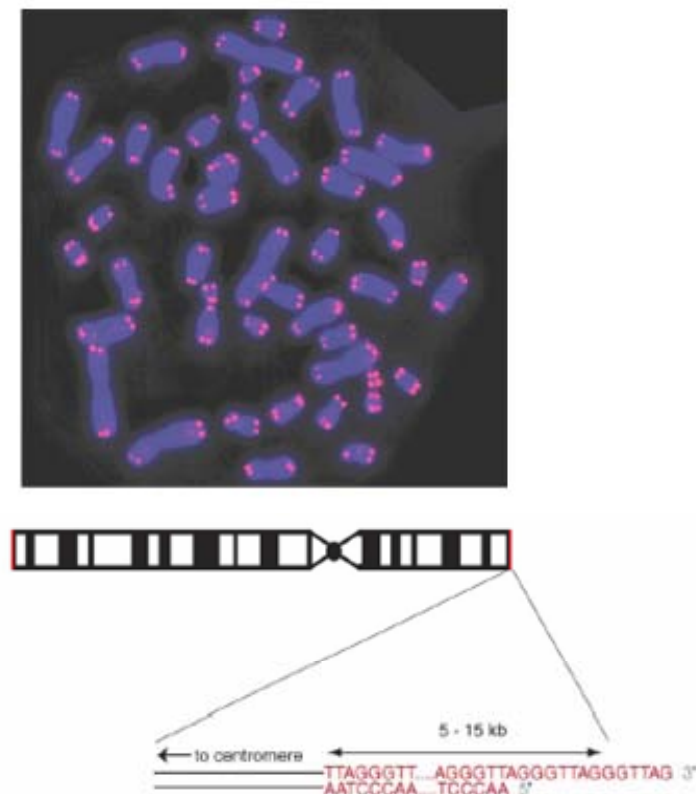


Figura 1.1.4. Struttura e sequenza dei telomeri nell’uomo. I telomeri sono visualizzati mediante ibridizzazione *in situ* con sonde fluorescenti utilizzando uno specifico PNA-probe (colorato in rosso); i cromosomi sono stati colorati in blu con il DAPI.

I telomeri sono costituiti da sequenze TTAGGG che si ripetono; si presentano in parte come DNA a doppio filamento, in parte a singolo filamento (all’estremità 3’).

L'estremità 3', a singolo filamento presenta una lunghezza variabile (50- 400 nucleotidi) (Bailey et al, **2006**) ed è ripiegata a formare una struttura definita "T-loop", stabilizzata da diverse proteine (figura 1.1.5) (Griffith et al, **1999**; Neidle et al, **2003**). Tale struttura sembra avere un ruolo protettivo per l'estremità cromosomica; studi recenti dimostrano, infatti, come una destabilizzazione del T-loop, con conseguente esposizione dell'estremità telomerica 3', viene avvertita dalle cellule come danno al DNA innescando un processo di senescenza e successiva morte per apoptosi (Li et al, **2003**).

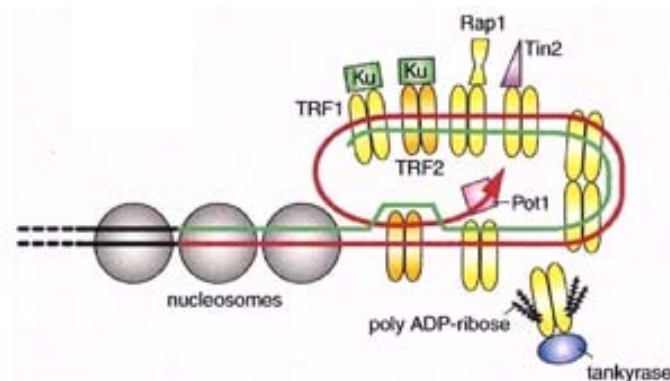


Figura 1.1.5. Rappresentazione schematica della struttura a T-loop caratteristica dei telomeri umani.

Il DNA telomerico e i complessi proteici ad esso associati hanno una funzione di "end capping" e proteggono il cromosoma da fenomeni di degradazione ad opera di esonucleasi cellulari e fusione tra estremità di cromosomi ad opera di ligasi, impedendo fenomeni di ricombinazione che potrebbero portare alla formazione di cromosomi dicentrici; rivestono un ruolo nell'organizzazione spaziale e funzionale dei cromosomi all'interno del nucleo favorendone la separazione durante la divisione cellulare; svolgono, inoltre, una funzione chiave nella determinazione del numero di divisioni cellulari che una cellula può subire.

Alcune proteine si legano direttamente al DNA telomerico (alla porzione a doppio o a singolo filamento), mentre altre sono associate al telomero indirettamente, mediante interazioni proteina-proteina (figura 1.1.6).

Nell'uomo le proteine TRF1 e TRF2 (TTAGGG Repeat Factor 1 e 2) legano specificamente il DNA a doppio filamento (Bilaud et al, **1996**; Olausson et al, **2006**), mentre POT1 (Protection Of Telomeres 1) riconosce l'estremità 3' a singolo filamento (Baumann et al, **2001**; Baumann et al, **2002**).

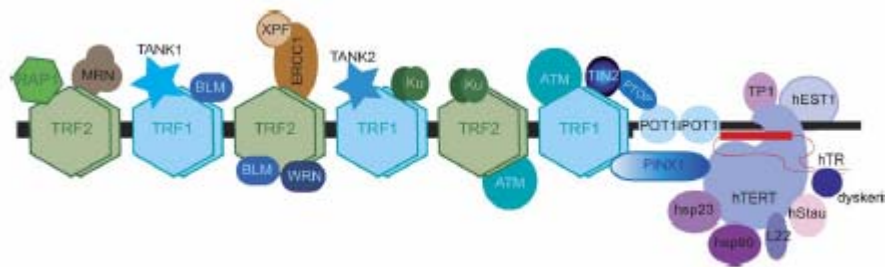


Figura 1.1.6. Proteine associate al telomero nell'uomo. Il DNA telomerico e le proteine ad esso associate svolgono un ruolo essenziale nella stabilizzazione delle estremità cromosomiche formando una struttura a cappuccio ("cap structure") in grado di proteggere i cromosomi da fenomeni di degradazione ad opera di enzimi ad attività esonucleasica e di fusione tra cromosomi.

In tabella 1.1.1 sono riassunte le principali proteine associate al telomero, le loro funzioni e interazioni reciproche.

Proteine che legano direttamente il DNA telomerico		
Nome	Funzione	Interazioni
POT1	Lega l'estremità 3' a singolo filamento	TRF1, TRF2, PTOP, TIN2, TANK 1
TRF1	Lega la porzione a doppio filamento; modulatore negativo della lunghezza telomerica	POT1, TRF2, TIN2, PINX1, TANK ½, Ku, BLM, ATM
TRF2	Lega la porzione a doppio filamento; modulatore negativo della lunghezza telomerica; stabilizzatore della struttura T-loop	POT1, TRF1, hRAP1, PARP2, TIN2, MRN, ERCC1/XPF, WRN, BLM, Ku, ATM
Proteine che legano indirettamente il DNA telomerico		
Nome	Funzione	Interazioni
hRAP1	Modulatore della lunghezza telomerica	TRF2, MRN
TANK1/2	Attività PARP; ribosilazione di TRF1; modulatore positivo della lunghezza telomerica	TRF1
TIN2	Modulatore positivo della lunghezza telomerica	TRF1, TRF2
PINX1	Inibitore della telomerasi	TRF1, TIN2
Altri fattori proteici		
Nome	Funzione	Interazioni
Ku70/Ku86, DNAPKcs, Mre11/Rad50/Nbs1, ERCC1/XPF	Proteine riparatrici del danno al DNA	Telomerasi, TRF1, TRF2
WRN, BLM	Attività elicastica	TRF1, TRF2
ATM	Proteina segnalatrice di danno al DNA	TRF1, TRF2

Tabella 1.1.1. Proteine associate al telomero, interazioni reciproche e loro funzione.

1.1.2.1 Accorciamento dei telomeri e senescenza cellulare

In seguito alla progressiva erosione dei telomeri conseguente al fenomeno precedentemente descritto come “end replication problem” i cromosomi, dopo un certo numero di cicli replicazione cellulare (20- 30), raggiungono una lunghezza critica definita limite di Hayflick.

Quando il limite di Hayflick (o fase M1) viene raggiunto, ci sono ancora diverse centinaia di basi a protezione delle estremità dei cromosomi, ma la cellula cessa comunque di riprodursi ed entra in fase di senescenza (figura 1.1.7). In questo modo la proliferazione cellulare viene arrestata prima della completa erosione dei telomeri

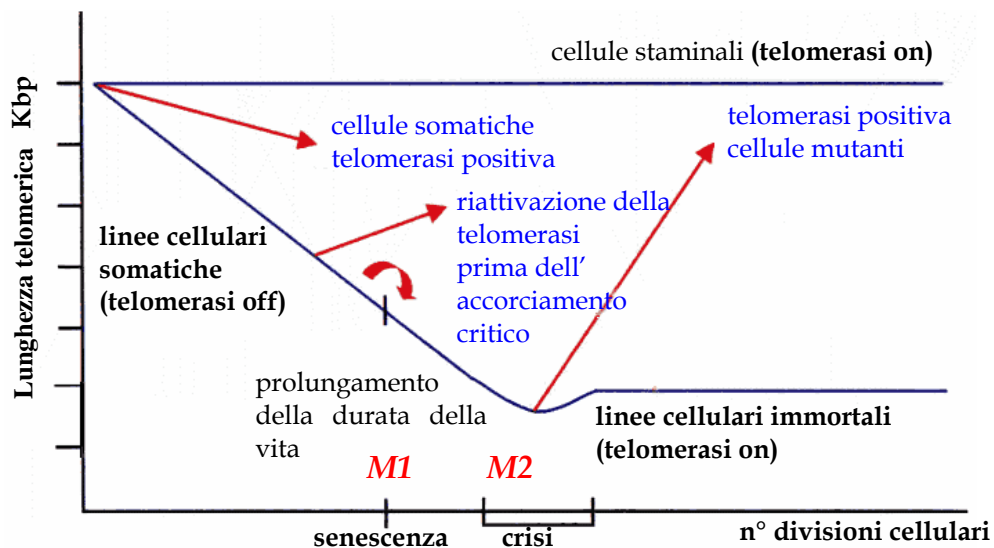


Figura 1.1.7. Senescenza cellulare. La lunghezza dei telomero (Kbp) determina la durata della vita della cellula. Il limite M1 è anche definito limite di Hayflick e corrisponde all' avvio del processo di senescenza.

Se i geni che codificano per proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, come i fattori proapoptotici pRb e p53, subiscono mutazioni che compromettono la loro azione, la cellula può superare questa prima fase e continuare a dividersi. In questo modo i telomeri continuano ad accorciarsi fino al raggiungimento di una seconda fase di crisi, o fase M2. In questa situazione, i telomeri non sono più in grado di proteggere le estremità cromosomiche e di prevenirne la degradazione; questo comporta un' instabilità tale da provocare la morte della cellula per apoptosi.

Se anche questo meccanismo viene inattivato la cellula supera la fase di crisi e può acquisire la capacità di replicarsi indefinitamente, divenendo immortale.

L'evento fondamentale che permette il superamento della fase M2 è la riattivazione dell'enzima telomerasi, silente nelle cellule somatiche (ad eccezione delle cellule aventi un'elevata frequenza replicativa), preposto al mantenimento della lunghezza dei telomeri.

Senescenza cellulare

La senescenza è stata osservata inizialmente utilizzando cellule in cui la telomerasi è silente, quali cellule umane normali in coltura: si è osservato, infatti, che, dopo un certo numero di divisioni cellulari, queste cessano di replicarsi ed entrano in una fase di arresto proliferativo. Questo processo è definito "senescenza replicativa" ed è dovuto principalmente all'accorciamento dei telomeri. Studi recenti dimostrano, tuttavia, come anche una destabilizzazione della struttura a T-loop, con conseguente esposizione dell'estremità 3', sia avvertita dalle cellule come danno al DNA e sia in grado di innescare blocco della proliferazione cellulare (Li et al, **2003**).

I pathway molecolari coinvolti nel processo di senescenza sono principalmente due: il pathway p53-p21-pRb e il pathway p16-pRb, attivati da meccanismi diversi (Zhang, **2007**). Entrambi convergono nella mancata fosforilazione della proteina pRb con conseguente inibizione dell'espressione di geni fondamentali nella sintesi del DNA (figura 1.1.8). Infatti, la progressione del ciclo cellulare è in gran parte controllata dalla fosforilazione di pRb, mediata da Kinasi ciclino-dipendenti (CDK). La fosforilazione di pRb consente di attivare geni fondamentali per la sintesi del DNA (Campisi, **1997**) (figura 1.1.8).

- Pathway p53-p21-pRb: nelle cellule senescenti l'attività di p53 risulta molto elevata. Studi recenti sottolineano come l'intervento di meccanismi di risposta al danno al DNA, in seguito ad accorciamento dei telomeri, portano all'attivazione di fattori i quali, a loro volta, sono responsabili della fosforilazione di p53.

Uno dei bersagli molecolari di p53 è rappresentato dalla proteina p21, la cui sovraespressione è in grado di indurre un arresto del ciclo cellulare.

- Pathway p16-pRb: l'elevata espressione di p16 (e p21) in cellule senescenti, è responsabile dell'inibita fosforilazione di pRb e quindi dell'arresto proliferativo ad essa associato. Tuttavia, l'espressione di p16 non è da ricondurre all'accorciamento telomerico (come per p21) ma, più probabilmente, a fenomeni di stress cellulare.

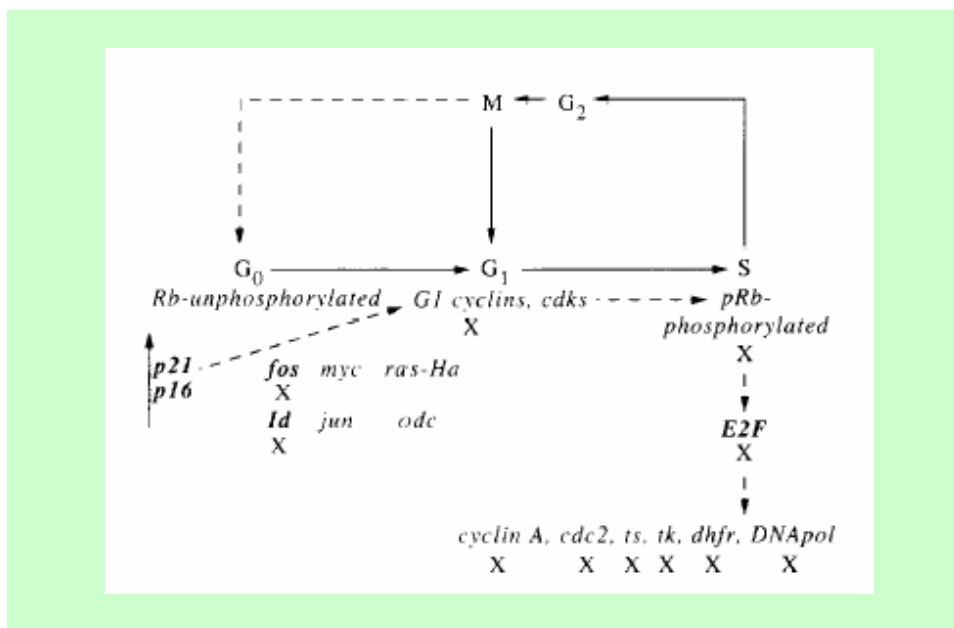


Figura 1.1.8. Elementi di blocco del ciclo cellulare in cellule senescenti. Le X indicano i fattori inibiti durante il processo di senescenza replicativa. Poiché le chinasi ciclino-dipendenti (CDK) sono responsabili della fosforilazione di pRb, l'inibizione di tali enzimi comporta un accumulo di pRb non fosforilato. Questo risulta incapace di attivare E2F (regolatore trascrizionale), fondamentale nel controllo di geni essenziali per la sintesi del DNA. Un aumento dell'espressione delle proteine p16 e p21 porta all'inibizione delle CDK.

1.1.3 LA TELOMERASI

1.1.3.1 Struttura e meccanismo d'azione

La telomerasi è il più importante enzima coinvolto nel mantenimento della lunghezza dei telomeri, identificata per la prima volta nel 1994, nel ciliato *Tetrahymena* (Greider et al, **1985**).

Dal punto di vista strutturale, si tratta di una DNA polimerasi RNA- dipendente, costituita da due subunità principali: la subunità ribonucleotidica (TR) e la subunità proteica (TERT) (figura 1.1.9).

- Subunità proteica umana (hTERT): è un eterodimero costituito da due subunità proteiche, le proteine p123 e p43, che si legano con l'RNA (TR) in rapporto 1: 1: 1.

Possiede carattere basico (pI 11.3) e attività di trascrittasi inversa nel dominio C-terminale (Mergny et al, **2002**). La sequenza di tale subunità è omologa a quella delle trascrittasi inverse virali e presenta una caratteristica triade di residui di acido aspartico in corrispondenza del sito attivo (Meyerson et al, **1997**).

Diversi fattori trascrizionali partecipano all'espressione genica di hTERT; tra questi ricordiamo Myc, Sp1, il recettore per gli estrogeni (Misiti et al, **2000**), E2F-1, WT-1 (Oh et al, **1999**), NF-κB (Yin et al, **2000**) e MZF-2 (Fujimoto et al, **2000**).

- Subunità ribonucleotidica umana (hTR): si tratta di un ampio dominio costituito da una catena di RNA, la cui lunghezza è pari a 451 nucleotidi nell'uomo, mentre varia da 148 a 209 nucleotidi nei ciliati (Chen et al, **2000**). Una piccola porzione di questa catena, pari ad 11 nucleotidi (CUAACCCUAAC nell'uomo), localizzata all'estremità 5' del dominio hTR, costituisce il template di RNA che si ibridizza con la sequenza complementare, presente all'estremità 3' del DNA telomerico, che viene così allungata dall'enzima telomerasi (figura 1.1.9).

Il gene che codifica per hTR è presente nel genoma come singola copia sul cromosoma 3q26. Nell'uomo la trascrizione della subunità ribonucleotidica è operata dall'enzima RNA polimerasi II e la forma matura di hTR presenta all'estremità 5' un elemento di protezione costituito da una molecola di trimetilguanosina (caratteristica delle piccole ribonucleoproteine del nucleo) coinvolta nello splicing dell'RNA (Seto et al, **1999**).

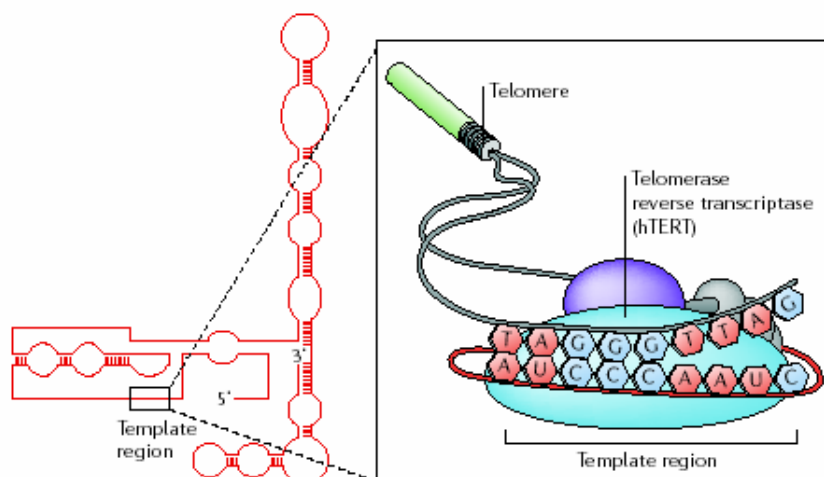


Figura 1.1.9. Struttura dell' enzima telomerasi. Rappresentazione della subunità catalitica (hTERT) e della subunità ribonucleotidica comprendente la regione che funge da template per l'ibridizzazione con il DNA telomerico.

La DNA telomerasi è una polimerasi unica nel suo genere, poiché racchiude entrambe le subunità necessarie alla fase di polimerizzazione: la porzione che funge da stampo (regione template nel dominio ad RNA) e la porzione dotata di attività catalitica (TERT).

Le due subunità si associano a formare una struttura tetramerica complessa alla quale partecipano due domini hTERT e due hTR (Olausson et al, **2006**).

L'allungamento del telomero si realizza in diversi passaggi (Neidle et al, **2002**) (figura 1.1.10). In un primo step il frammento di 11 nucleotidi, appartenente alla subunità hTR dell'enzima, si ibridizza con la sequenza nucleotidica complementare all'estremità 3' del DNA telomerico. Parte del template non risulta accoppiata all'estremità telomerica: la porzione non ibridizzata fa da stampo per l'allungamento dell'estremità 3' del telomero; questo "gap" viene, infatti, riempito grazie all'azione catalitica della subunità hTERT che converte i nucleotidi trifosfato in specie attivate. Viene così aggiunto un segmento esanucleotidico TTAGGG all'estremità 3' del telomero. Il filamento neosintetizzato viene successivamente traslocato in direzione 5' lungo lo stampo di RNA; in questo modo si crea un nuovo spazio sul template di RNA che permette la ripetizione del ciclo con l'aggiunta di ulteriori sequenze telomeriche.

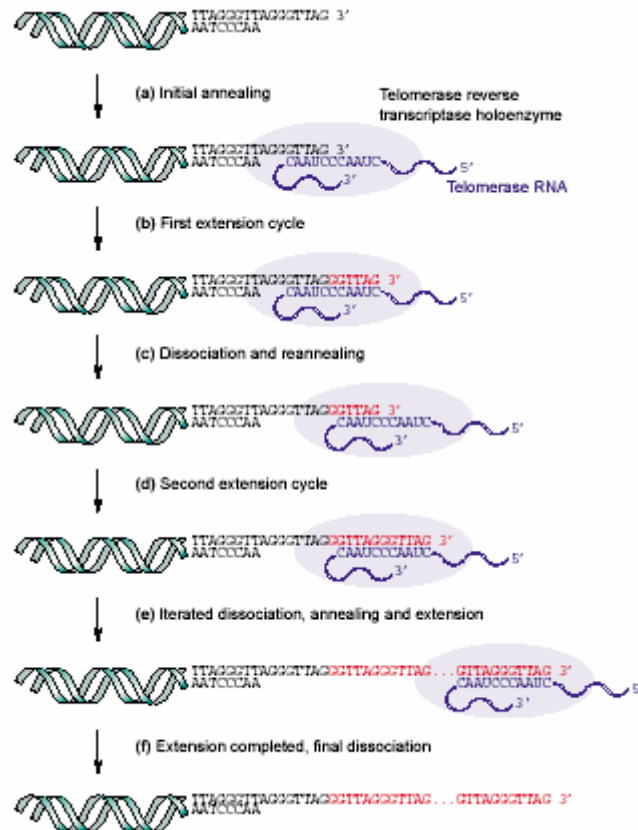


Figura 1.1.10. Meccanismo d'azione della DNA telomerasi. Il processo di allungamento del DNA telomerico si realizza attraverso più passaggi. Il template ad RNA si ibridizza alla sequenza complementare del DNA telomerico a singolo filamento; in presenza di nucleotidi trifosfato la subunità proteica dell'enzima catalizza l'allungamento del telomero. Una volta completato l'allungamento, il filamento si sposta in direzione 5' ed inizia un nuovo ciclo.

L'attività telomerastica è soggetta ad una modulazione a livello fisiologico che si attua con meccanismi diversi. Esiste una regolazione a livello trascrizionale ad opera di numerosi fattori tra i quali diversi oncogeni (comprendenti *c-myc*). E' possibile anche modulare l'enzima agendo sulla fosforilazione della subunità hTERT, necessaria per l'attivazione enzimatica (Mergny et al, 2002). Si può avere, infine, una regolazione a livello di assemblaggio delle componenti enzimatiche; dati di letteratura suggeriscono, infatti, come l'enzima telomerasi esista in forma di complesso dimerico o multimerico (Beattie et al, 2001; Prescott et al, 1997; Keppler et al, 2004).

1.1.3.2 Telomerasi e cancro

Le estremità cromosomiche delle cellule tumorali risultano diverse dal punto di vista morfologico da quelle presenti nelle cellule somatiche normali.

Come descritto in precedenza, i telomeri delle cellule normali sono soggetti ad un progressivo accorciamento dovuto al cosiddetto “end replication problem”, dovuto all’incapacità della DNA polimerasi di replicare completamente il filamento “lagging” del DNA telomerico.

In netto contrasto, le cellule tumorali presentano telomeri generalmente più corti (4-6 kilobasi) ma caratterizzati da una lunghezza costante.

Si è visto che l’espressione della telomerasi nelle cellule somatiche risulta limitata alle linee cellulari caratterizzate da un’elevata frequenza replicativa, quali le cellule della linea germinale e del sistema ematopoietico. Al contrario, l’enzima risulta presente in circa l’80-85% delle cellule tumorali (tabella 1.1.2).

Tipo di tumore	Numero di positività totali	% di positività
Seno	28/33	85
Prostata	24/30	80
Polmone	74/101	73
Colon	22/23	96
Ovaio	13/14	93
Rene	41/55	74
Stomaco	56/66	85
Vescica	39/40	97
Neuroblastoma	53/76	70
Glioma	6/8	75
Testa e collo	14/16	87

Tabella 1.1.2. Telomerasi e cancro. Percentuale di cellule positive alla telomerasi nelle diverse forme tumorali.

Nell’ambito della ricerca di nuovi agenti antitumorali lo scopo è quello di trovare strategie sempre più efficaci e selettive, al fine di eliminare gli effetti collaterali tipici dei chemioterapici tradizionali. In tal senso la telomerasi rappresenta un bersaglio ideale.

L’inibizione della telomerasi comporta un blocco dell’ allungamento dei telomeri; questi subiscono un progressivo accorciamento nei vari cicli cellulari fino a raggiungere una lunghezza critica con successivo arresto della proliferazione cellulare (Hahn et al, 1999). Il numero di nucleotidi che, in una tipica linea cellulare, vengono persi ad ogni replicazione è compreso tra 50 e 200. Questo implica che il raggiungimento della lunghezza critica dei

telomeri si avrà solo dopo un certo numero di cicli replicativi e quindi un tempo relativamente lungo (circa 120 giorni) (Damm et al, 2001).

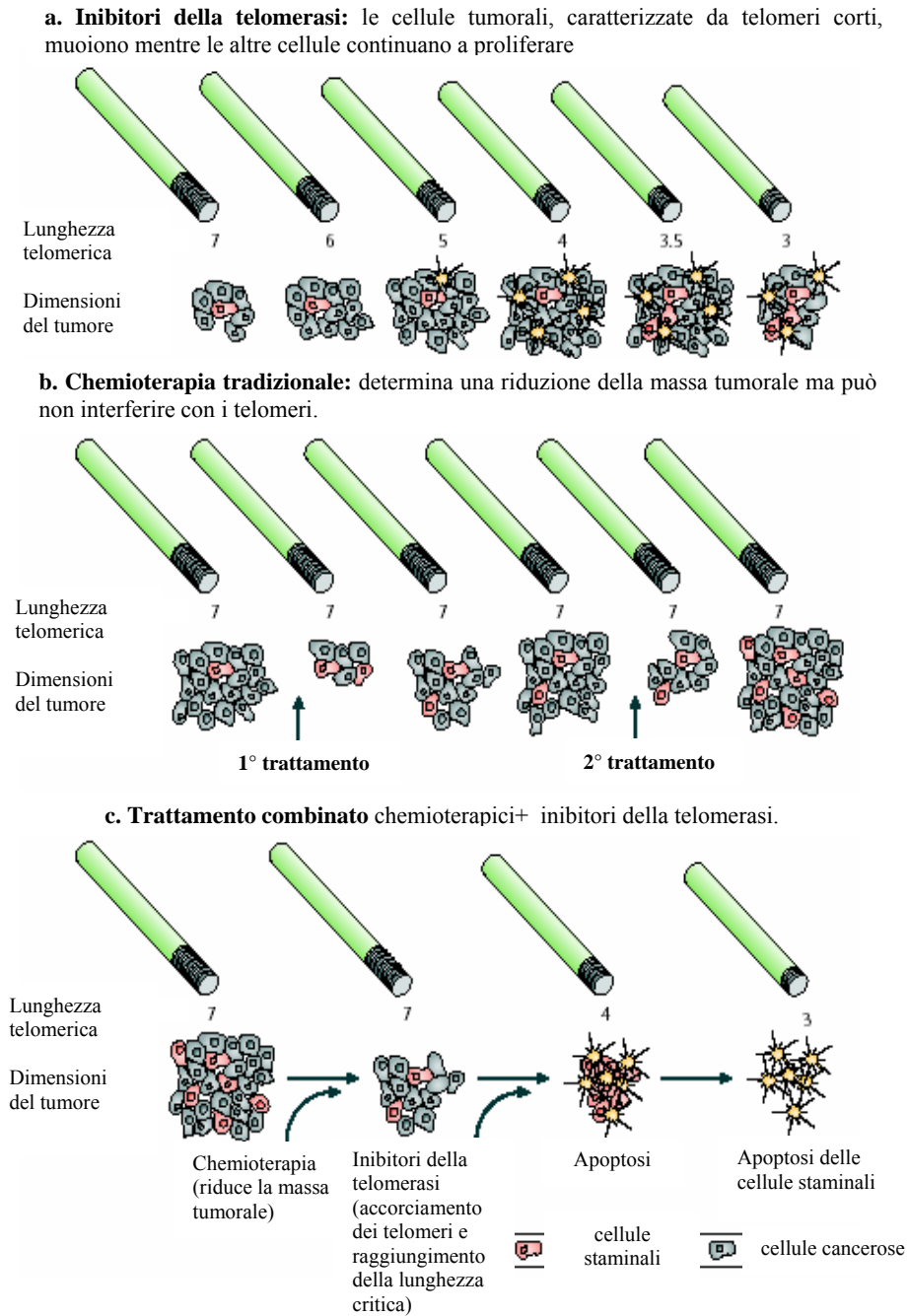


Figura 1.1.11. Effetto della terapia combinata chemioterapici tradizionali+ antitelomerasici.

Questo approccio può quindi essere adottato solo come terapia di supporto a quelle tradizionali, tuttavia, può rivestire un ruolo importante a livello di prevenzione nei primissimi stadi di sviluppo del cancro o come profilassi, in seguito ad un'asportazione chirurgica (Shay, **1995**) (figura 1.1.11).

Un altro aspetto da sottolineare è l'esistenza di cellule non tumorali telomerasi positive presenti nel nostro organismo. Tuttavia, in virtù della diversa lunghezza delle estremità telomeriche e della diversa velocità di replicazione delle cellule tumorali e somatiche, esiste una finestra terapeutica all'interno della quale agenti con attività antitelomerasica risultano efficaci sulle cellule tumorali senza che si osservino alterazioni sulle cellule normali esprimenti l'enzima telomerasi (figura 1.1.12).

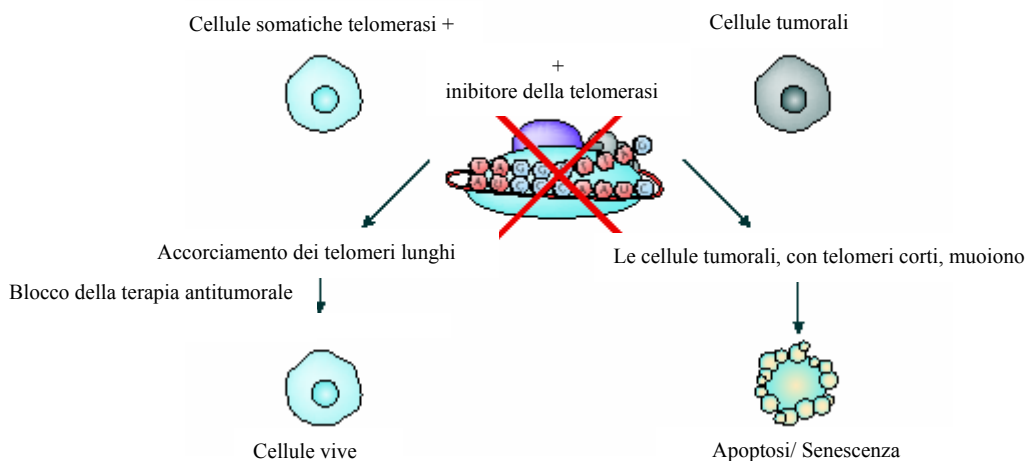


Figura 1.1.12. Effetto differenziale indotto dal trattamento con antitelomerasici su cellule tumorali e su cellule somatiche sane telomerasi positive.

Un ultimo elemento da considerare è rappresentato dal possibile insorgere di fenomeni di farmacoresistenza. Si è riscontrato, infatti, come in una piccola percentuale di tumori la telomerasi non risulti attiva e il mantenimento della lunghezza dei telomeri si realizzi attraverso vie alternative denominate ALT (alternative lengthening of telomere).

L'inibizione della telomerasi potrebbe perciò favorire lo sviluppo di quelle cellule in cui la lunghezza dei telomeri è mantenuta per mezzo di meccanismi che non la coinvolgono, portando così alla selezione di linee cellulari resistenti.

Alcuni studi dimostrano, tuttavia, come in colture di cellule tumorali telomerasi positive trattate con inibitori dell'enzima non si osservi alcuna attivazione di meccanismi ALT ad indicare come tale evento non si verifichi facilmente, anche se il fenomeno potrebbe avere una rilevanza dal punto di vista clinico in tumori di elevate dimensioni (contenenti un numero di cellule intorno a 10^{12}) (Neumann et al, **2002**).

1.1.4 FARMACI ANTI- TELOMERASICI

In base alla struttura ed al ciclo catalitico della telomerasi, sono stati finora presi in considerazione diversi approcci utilizzabili per inibire l'attività dell'enzima; è possibile, infatti, agire in maniera diretta sulle componenti enzimatiche (sito attivo e componente ribonucleotidica) oppure, indirettamente, sul substrato dell'enzima rappresentato dal telomero (Lavelle et al, 2000; Mergny et al, 2002; Zimmermann et al, 2007; Olaussen et al, 2006) (figura 1.1.13).

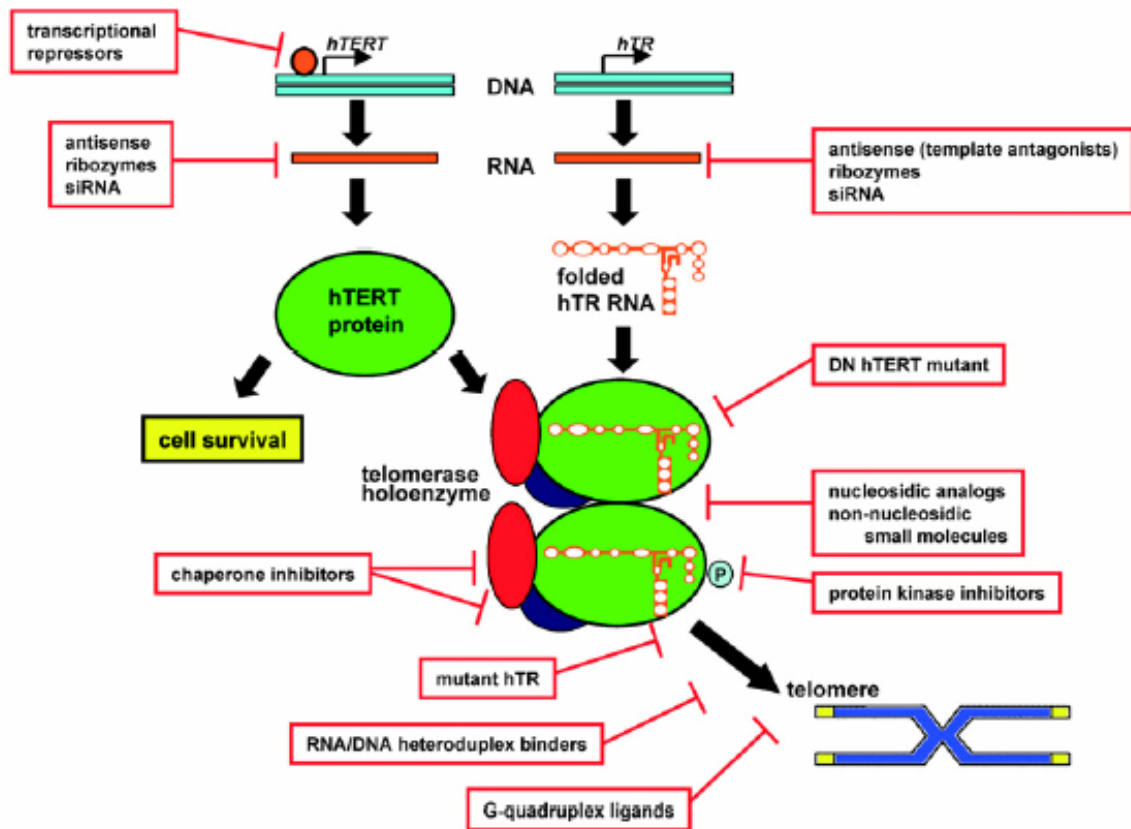


Figura 1.1.13. Possibili modalità di inibizione dell'enzima telomerasi.

1.1.4.1 Azione diretta sull' enzima

1.1.4.1.1 Farmaci attivi sul sito catalitico (hTERT)

Sono stati testati diversi composti in grado di agire sulla subunità catalitica con modalità diverse. Tra questi ricordiamo nucleosidi trifosfato, inibitori di trascrittasi inversa non nucleosidici e oligonucleotidi antisenso diretti contro hTERT.

Inibitori nucleosidici

Gli analoghi nucleosidici, come l'AZT (3'azido-3'deossi-timidina), sono piccole molecole che agiscono bloccando l'incorporazione di desossinucleotidi trifosfato nella catena di DNA in fase di sintesi. Nei primi esperimenti effettuati, l'AZT si è dimostrato in grado di ridurre solo parzialmente l'attività telomerasica nonostante esercitasse un debole effetto antiproliferativo sulle cellule (Olaussen et al, **2006**).

Inibitori non nucleosidici

Gli inibitori non nucleosidici sono composti in grado di inibire la telomerasi legandosi al sito attivo del dominio catalitico avente attività di trascrittasi inversa.

Uno dei composti più promettenti, appartenenti a questa categoria, è senza dubbio il derivato BIBR1532, un inibitore non competitivo dell'enzima telomerasi in grado di agire in maniera altamente specifica senza alcun effetto su altre RNA o DNA polimerasi presenti nell'organismo (Damm et al, **2001**). Studi condotti in diversi tipi di tumore hanno dimostrato come l'utilizzo di BIBR 1532 porti ad un progressivo accorciamento dei telomeri con successivo arresto della crescita delle cellule. Tuttavia, il meccanismo con il quale agisce rimane ancor oggi da chiarire (Olaussen et al, **2006**).

Tecnologia antisenso

Il meccanismo d'azione degli oligodesossinucleotidi antisenso (ODN) consiste nella formazione di un ibrido tra l'ODN e il tratto complementare ad esso presente sull'mRNA scelto come specifico bersaglio.

Il blocco della traduzione avviene con meccanismi diversi, ma due sono quelli più attendibili: impedimento sterico dell'ibrido mRNA e DNA (che si oppone ai processi di maturazione, trasporto e scorrimento sul ribosoma durante la sintesi proteica) e attivazione

dell' Rnasi H, enzima ubiquitario presente nel nucleo e nel citoplasma, che ha la funzione di degradare la componente RNA delle catene ibride DNA/RNA che in natura si formano per innescare la duplicazione del DNA.

Un' altra strategia basata sulla tecnologia antisense riguarda l' utilizzo di siRNA (piccoli RNA ad interferenza). I siRNA sono molecole a doppio filamento in grado di operare il taglio dell' mRNA complementare, in un processo noto come interferenza dell' RNA (RNAi); il taglio è catalizzato dal complesso di silenziamento RNA- indotto (RISC), il quale agisce come un' endonucleasi (Hammond et al, **2000**; Elbashir et al, **2001**).

Sono stati testati siRNA diretti contro componenti telomerasiche in diverse linee tumorali dove si è potuto osservare una ridotta attività enzimatica seppure di breve durata.

Ribozimi

I ribozimi hammerhead sono molecole di RNA dotate di attività endoribonucleasica in grado di catalizzare reazioni di taglio di sequenze di RNA mediante idrolisi di legami fosfodiesterici. Dal punto di vista farmacologico i ribozimi presentano ottime caratteristiche di stabilità, biodisponibilità e specificità. Studi condotti in diverse linee tumorali dimostrano la capacità dei ribozimi di inibire l' attività telomerasica, la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi. Tuttavia, l' accorciamento dei telomeri non è mai stato osservato.

Una problematica riguardante l' utilizzo della strategia antisense è rappresentata dalla presenza di diversi mRNA codificanti per hTERT. Esistono, infatti, almeno sei diverse isoforme di trascritti (varianti di splicing) di hTERT (Kyo et al, **2002**).

Inibitori della fosforilazione di hTERT

E' stato dimostrato come due inibitori della proteina chinasi C (PKC), bis-indolilmaleimide I e H7, siano in grado di produrre una forte inibizione dell' enzima telomerasi nelle cellule trattate (Mergny et al, **2002**). Tuttavia, è difficile immaginare che tali composti siano in grado di bloccare la fosforilazione di hTERT senza interferire con i processi di fosforilazione di altri target fisiologici di PKC.

Inibitori della trascrizione di hTERT

Agire a livello trascrizionale per ottenere un' inibizione specifica rappresenta un approccio interessante. Pochi composti sono stati testati per le loro proprietà anti-trascrizionali. Recentemente è stato dimostrato come l'arsenico sia in grado di inibire la trascrizione del gene di hTERT e il suo effetto può essere in parte attribuibile ad una diminuzione dell'attività dei fattori trascrizionale *c-myc* e *Sp1*(Mergny et al, **2002**).

1.1.4.1.2 Farmaci attivi sulla subunità ribonucleotidica (hTR)

Sono state messe a punto diverse strategie volte all'inibizione della subunità hTR dell'enzima telomerasi. Tra queste ricordiamo l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso e di ribozimi.

Tra gli oligonucleotidi antisenso, GRN163, lungo 13 basi, è un potente antagonista della regione templatato di hTR in grado di inibire l'attività telomerasica mediante accorciamento dei telomeri in diverse linee cellulari (Asai et al, **2003**). Un suo derivato, GRN163L, che differisce da GRN163 per la presenza di una catena lipidica a 16 atomi di carbonio (per facilitarne l'uptake a livello cellulare) è l'unica molecola dotata di attività antitelomerasica testata in fase clinica I.

1.1.4.2 Azione indiretta sul substrato enzimatico

1.1.4.2.1 Farmaci attivi sul telomero

Questo approccio sembra più vantaggioso rispetto ai precedenti in quanto si è visto che una piccola percentuale di tumori impiega un meccanismo alternativo alla telomerasi (ALT) per mantenere costante la lunghezza dei telomeri, di conseguenza l'utilizzo di inibitori diretti contro l'enzima, che agiscono sulla componente proteica o ribonucleotidica, può favorire lo sviluppo di cellule che non necessitano la telomerasi, portando alla selezione di linee cellulari resistenti. L'azione sul telomero non discrimina, invece, tra le cellule che impiegano la telomerasi e quelle che utilizzano meccanismi diversi, dando quindi un effetto generalizzato.

Tre sono le principali categorie di composti attivi a livello telomerico: farmaci citotossici convenzionali, farmaci in grado di interagire con le proteine associate al telomero e farmaci che agiscono stabilizzando strutture G-quadruplex.

Farmaci citotossici convenzionali

Il cisplatino (CDDP) (figura 1.1.14) è un agente alchilante ben noto, utilizzato in numerosi protocolli chemioterapici anticancro. Ponti covalenti intra e inter-filamento bloccano la trascrizione o replicazione del DNA, dando gli effetti citotossici caratteristici del CDDP.

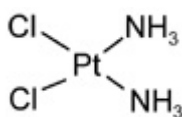


Figura 1.1.14. Formula di struttura del cisplatino.

Il meccanismo attraverso il quale il cisplatino agisce a livello telomerico non è ben chiaro, tuttavia, l'affinità che il composto mostra verso siti nucleofili di nucleotidi adenosina e guanosina fa pensare alla capacità di formare legami covalenti intra o inter-filamento tra due guanosine presenti nella regione (TTAGGG)_n del telomero (Olaussen et al, **2006**).

Farmaci che agiscono sulle proteine associate al telomero

E' noto che la perdita del capping terminale, anche di un solo telomero, comporta l'attivazione di segnali di arresto del ciclo cellulare e induzione senescenza replicativa nelle cellule tumorali (Li et al, **2003**). Sembra che l'accorciamento del telomero, infatti, non sia di per sé un elemento sufficiente ad indurre senescenza ma la destabilizzazione della struttura a T-loop con conseguente esposizione dell'estremità 3' a singolo filamento riveste un ruolo chiave nell'indurre arresto proliferativo e senescenza (Li et al, **2003**).

Le due proteine TRF2 e POT1, coinvolte nel mantenimento del capping terminale e della struttura a T-loop del telomero, sono pertanto considerate dei bersagli potenziali sui quali agire con strategie diverse. Tuttavia, alterare la funzionalità dei telomeri interagendo con le proteine ad essi associate non garantisce un'azione selettiva a livello delle cellule tumorali inoltre, può promuovere fenomeni di instabilità genomica nelle cellule sane contribuendo ad una maggiore incidenza di cancro.

Attualmente non sono presenti molecole testate *in vivo*, aventi come bersagli le proteine associate al telomero.

Stabilizzatori di strutture G-quadruplex

Questa strategia prevede la stabilizzazione del telomero in una conformazione non accessibile all'enzima (Sun et al, **1997**; Zahler et al, **1991**). L'azione della telomerasi è, infatti, fortemente condizionata dalla struttura assunta dal filamento singolo che costituisce l'estremità 3' sporgente del DNA telomerico: affinché si abbia l'ibridizzazione del template di RNA con il filamento di DNA che costituisce l'estremità 3' del telomero è necessario che quest'ultimo sia presente come filamento singolo lineare. Favorire, dunque, il ripiegamento dell'estremità 3' del DNA in una conformazione più strutturata significa impedire l'ibridizzazione con il template di RNA.

1.1.4.3 Altre strategie anticancro

1.1.4.3.1 Immunoterapia

L'idea di una possibile immunoterapia anticancro emerge dalla scoperta che quasi tutti i tumori esprimono antigeni. E' stato dimostrato che gli antigeni associati ai tumori (TAA) sono in grado di attivare specifici linfociti T citotossici (CTLs) in grado di riconoscere peptidi derivanti da tali antigeni e distruggere il tumore corrispondente *in vitro*. Quindi l'immunizzazione con TAA riconosciuti da specifici CTLs, rappresenta una strategia efficace per un' immunoterapia anticancro.

La subunità catalitica dell'enzima telomerasi (hTERT) è considerata un potenziale TAA universale. Alcuni gruppi hanno isolato CTLs specifici per hTERT in grado di distruggere cellule tumorali hTERT positive di diversi tipi di tumori umani (Vonderheide et al, **1999**).

Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi preclinici, alcuni protocolli basati sull'utilizzo di un vaccino contro hTERT per diverse forme tumorali (tumore al seno, sarcomi e cancro al cervello) si trovano ora in fase di sperimentazione clinica I (Olaussen et al, **2006**).

1.2 STRUTTURE G-QUADRUPLEX

1.2.1 TOPOLOGIA E STRUTTURA

La scoperta che sequenze ricche in guanina sono in grado di formare strutture definite G-quadruplex risale ad almeno 50 prima della scoperta della doppia elica (Burge et al, **2006**; Davis, **2004**).

Tali strutture si possono formare da un'unica sequenza ricca in guanine o dall'associazione di più filamenti di DNA.

Esistono diversi tipi di strutture G-quadruplex a seconda dell' orientamento dei filamenti, dalla lunghezza dei loop e dalla sequenza (Burge et al, **2006**). In generale, sono costituite da un nucleo centrale di almeno due tetradi di guanine unite da loop. Le tetradi sono strutture planari derivanti dall'associazione di quattro guanine tenute insieme da legami idrogeno definiti di Hoogsteen (diversi da quelli di tipo Watson- Crick che caratterizzano la doppia elica del DNA) stabilizzate da cationi monovalenti (Na^+ o K^+) che coordinano gli ossigeni carbonilici elettronegativi delle basi guaniniche (figura 1.2.1) (Phan et al, **2006**).

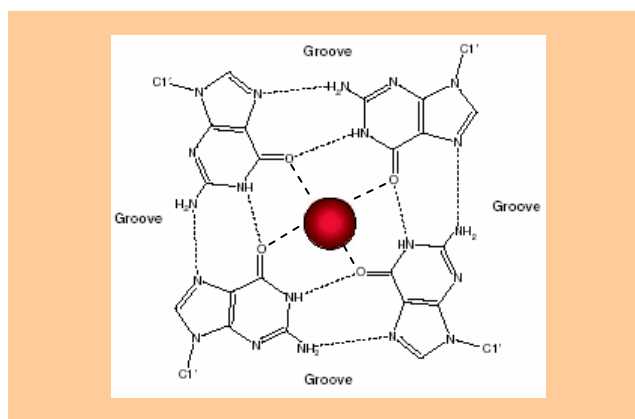


Figura 1.2.1. Struttura di una tetrade guaninica stabilizzata dal catione monovalente (rappresentato in rosso) che coordina gli ossigeni carbonilici

Essendo diverse le dimensioni dei due ioni, anche la loro collocazione risulta differente: ioni Na^+ si dispongono sul piano individuato dalla tetradi di guanine, mentre ioni K^+ , essendo più ingombranti, si posizionano nello spazio tra due tetradi (Phan et al, **2006**). Nelle cellule di mammifero la concentrazione intracellulare di K^+ risulta nettamente superiore rispetto a quella dello ione Na^+ (140mM K^+ , 5-15 mM Na^+) pertanto le strutture G-quadruplex formate sono stabilizzate principalmente dallo ione K^+ (Patel, **2002**).

1.2.2 CLASSIFICAZIONE DELLE STRUTTURE G-QUADRUPLEX

Le strutture G-quadruplex sono caratterizzate da un elevato polimorfismo; infatti, si possono classificare tali tipi di strutture in varie sottoclassi in base ai seguenti parametri:

- ✓ Orientamento e stechiometria delle catene
- ✓ Geometria dei loop
- ✓ Conformazione glicosidica

1.2.2.1 Orientamento delle catene

La catena o le catene che costituiscono la struttura G-quadruplex, indipendentemente dal fatto che queste derivino dalla stessa molecola o da molecole distinte, possono essere disposte, l'una rispetto all'altra, in quattro distinti modi: possono essere tutte parallele, ci possono essere tre catene parallele e una antiparallela, due catene adiacenti parallele e due catene adiacenti antiparallele, oppure ci possono essere due catene parallele e due antiparallele alternate tra loro. Generalmente G-quadruplex derivanti dall'appaiamento di 4 distinti filamenti assumono un orientamento parallelo; negli altri casi, il diverso orientamento delle catene dipende da come si posizionano i loop.

1.2.2.2 Stechiometria delle catene

Un sequenza generica in grado di formare strutture di tipo intramolecolare, coinvolgenti un singolo filamento, è la seguente:

$G_m X_n G_m X_o G_m X_p G_m$, dove m è il numero di residui guaninici presenti in ogni tratto coinvolto direttamente nella formazione delle tetradi; X_n , X_o , X_p possono essere formati da qualsiasi residuo (guanine comprese) e costituiscono i loop di connessione.

G-quadruplex bimolecolari (dimerici) o tetramolecolari (tetramerici) possono essere formati dall'associazione di sequenze non uguali, sebbene strutture di questo tipo non siano ancora state studiate in dettaglio.

Quasi tutte le strutture bimolecolari riportate sono costituite dall'interazione di due sequenze identiche $X_n G_m X_o G_m X_p$ dove n e p possono essere anche pari a zero.

Strutture tetramolecolari risultano dall'associazione di quattro sequenze $X_nG_mX_0$ o $G_mX_nG_m$. Inoltre, a seconda delle condizioni sperimentali, sequenze più complesse, in grado di originare G-quadruplex intra o bimolecolari, possono assumere anche strutture tetrameriche.

In figura 1.2.2 sono riportate schematicamente strutture G-quadruplex mono- bi- e tetramolecolari.

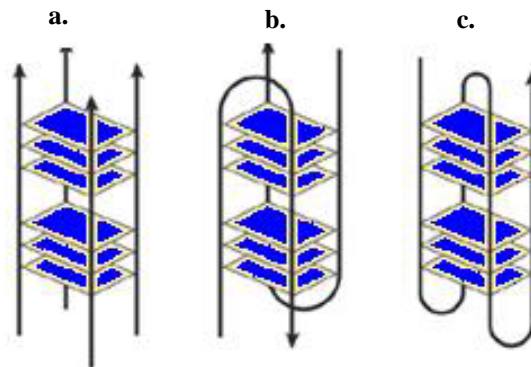


Figura 1.2.2. Possibili strutture G-quadruplex inter e intramolecolari. **a.** Struttura tetramericata data dall'associazione di quattro filamenti aventi orientamento parallelo; **b.** Struttura dimerica derivante dall'associazione di due filamenti hairpin; **c.** Struttura monomerica risultante dal ripiegamento di un unico filamento.

1.2.2.3 Geometria dei loop

I loop di connessione possono essere suddivisi in quattro famiglie principali (figura 1.2.3) (Phan et al, 2006). Si distinguono:

- loop definiti “edgewise” che collegano due filamenti adiacenti antiparalleli;
- loop diagonali che legano due filamenti antiparalleli opposti;
- loop definiti “double chain reversal” che uniscono due filamenti adiacenti paralleli;
- loop “V-shaped” che collegano gli angoli di due tetradi di guanine sovrapposte, in cui manca una connessione.

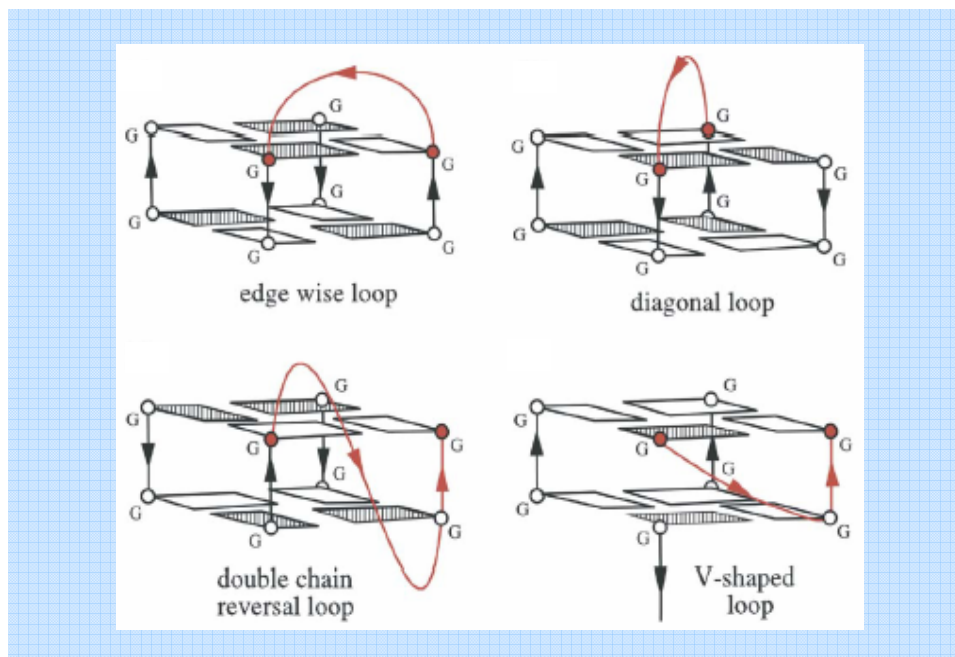


Figura 1.2.3. Possibili loop di connessione di G-quadruplex.

1.2.2.4 Conformazione glicosidica

Le guanosine coinvolte nella formazione della tetradi, diversamente dalle basi presenti nella normale struttura B-DNA, possono presentare lo zucchero in conformazione *sin* o *anti*. Complessivamente si può affermare che nelle strutture G-quadruplex parallele tutte le guanine adottano una conformazione *anti*, mentre nelle strutture intramolecolari antiparallele si ha un alternanza *anti/sin* (figura 1.2.4).

C'è, inoltre, un altro aspetto da considerare: se nella normale struttura B del DNA si possono distinguere i due solchi maggiore e minore, nella struttura G-quadruplex, la sovrapposizione delle tetradi guaniniche produce quattro distinti solchi non necessariamente uguali (Burge et al, **2006**).

In particolare, se tutte e quattro le catene che partecipano alla tetrade guaninica sono parallele (in questa struttura tutte le guanine presentano una conformazione glicosidica *anti*), i quattro solchi sono di media grandezza. Se, invece, sono presenti catene antiparallele i solchi che si vengono a formare possono essere di diverse dimensioni. Quando nella tetrade guaninica ci sono due catene antiparallele e due catene parallele adiacenti tra loro, i residui guaninici che derivano da catene adiacenti e che hanno lo stesso

angolo di torsione glicosidico, producono un solco di media grandezza, mentre le guanine che derivano da catene adiacenti antiparallele e hanno opposti angoli di torsione glicosidica, producono un solco largo e uno stretto.

Se nella tetrade guaninica le catene parallele ed antiparallele sono alternate le une con le altre si formano due solchi larghi e due stretti.

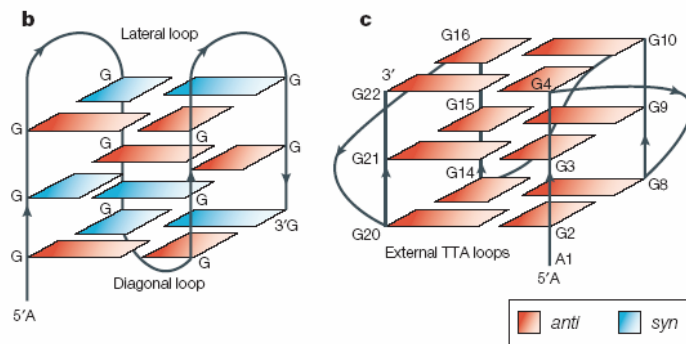


Figura 1.2.4. Strutture G-quadruplex intramolecolari con differente orientamento delle catene. **a.** antiparallelo. **b.** parallelo

1.2.3 G-QUADRUPLIX NEL TELOMERO

Il DNA telomerico nell'uomo è caratterizzato da una sequenza particolarmente ricca in guanine in cui si trova ripetuto l'esanucleotide TTAGGG.

Le strutture G-quadruplex intramolecolari telomeriche derivano dal ripiegamento della parte a singolo filamento che sporge all'estremità 3'.

Studi NMR dimostrano come, in presenza di Na^+ , la struttura G-quadruplex mostri orientamento antiparallelo, in cui le guanine assumono una conformazione *syn-syn-anti-anti*, i loop sono edgewise- diagonale- edgewise, e i filamenti risultano alternativamente paralleli e antiparalleli (Wang et al, 1995).

Dati cristallografici ottenuti in K^+ rivelano che la struttura G-quadruplex presenta orientamento parallelo, con le guanine in conformazione *anti* e tre loop di connessione "double-chain reversal" (figura 1.2.5) (Parkinson et al, 2002; Haider et al, 2002).

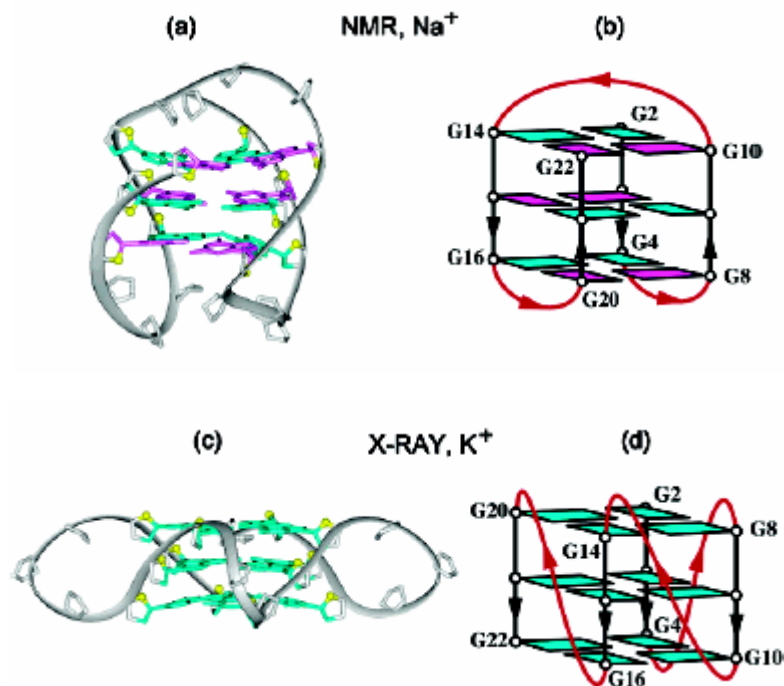


Figura 1.2.5. Strutture G-quadruplex intramolecolari assunte dalla sequenza telomerica umana. (a) e (b) in soluzione contenente Na^+ ; (c) e (d) struttura del cristallo contenente K^+ . In (b) e (d) i loop sono colorati in rosso, le guanine in *anti* e *syn* sono colorate in verde e in rosa rispettivamente.

In soluzione, tuttavia, in presenza di K^+ , la struttura G-quadruplex risulta un ibrido, avente filamenti paralleli e antiparalleli (Ambrus et al, 2006; Luu et al, 2006). Studi NMR dimostrano come la struttura assunta presenti le estremità 3' e 5' posizionate su due lati opposti in modo da consentire una continuità di più "unità" G-quadruplex lungo il telomero (figura 1.2.6); sembra, tuttavia, che la struttura mista (parallela-antiparallela) possa coesistere con un'altra definita G-quadruplex chair-type (antiparallela). Studi effettuati dimostrano come il passaggio da una struttura all'altra sia dato dal cambio di orientamento dell'estremità 5' (figura 1.2.6) (Xu et al, 2006) .

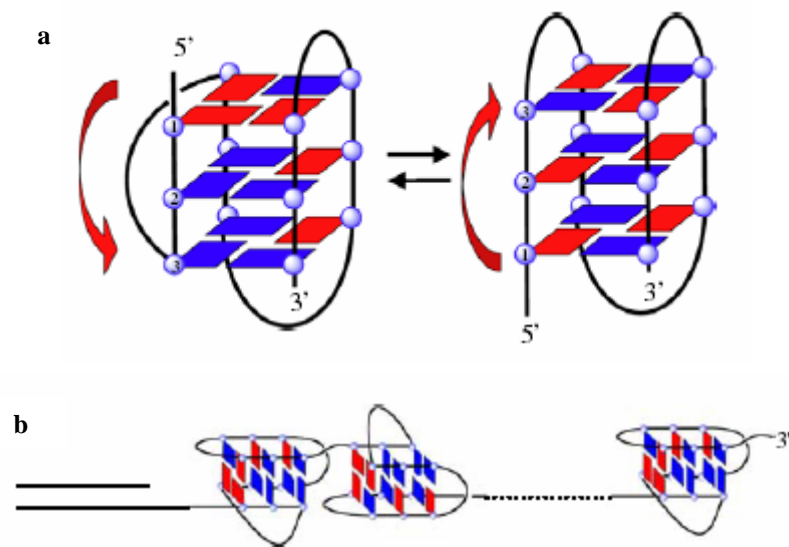


Figura 1.2.6 a. Rappresentazione schematica dell'interconversione tra G-quadruplex misto (a sinistra) e G-quadruplex chair-type (a destra). Le due strutture differiscono per l'orientamento dell'estremità 5'. **b.** Sovrapposizione di più strutture G-quadruplex lungo il telomero.

1.2.4 ALTRE SEQUENZE IN GRADO DI FORMARE STRUTTURE G-QUADRUPLEX

Esistono diverse regioni nel genoma umano (oltre alle estremità telomeriche) caratterizzate da sequenze ricche in guanina, pertanto in grado di formare strutture G-quadruplex.

In particolare, sequenze G-rich si riscontrano a livello dei promotori di diversi oncogeni, quali *c-myc*, *bcl-2*, *c-myb*, *c-Fos*, e *c-ABL*, nell'introne del gene hTERT, nell'rDNA e a livello delle catene pesanti delle immunoglobuline (Lemarteleur et al, **2004**).

In uno studio recente è emerso come le regioni a livello dei promotori di geni (1kb a valle del sito di inizio trascrizione TSS) siano particolarmente ricche di motivi G-quadruplex (più del 40% dei promotori presentano uno o più motivi G-quadruplex). Per le regioni "ipersensibili" alle nucleasi si è visto un incremento di 230 volte nel numero di elementi G-rich presenti, se confrontati con il resto del genoma. Queste osservazioni supportano l'idea secondo la quale i G-quadruplex a livello dei promotori rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica (Huppert et al, **2006**) (figura 1.2.7)

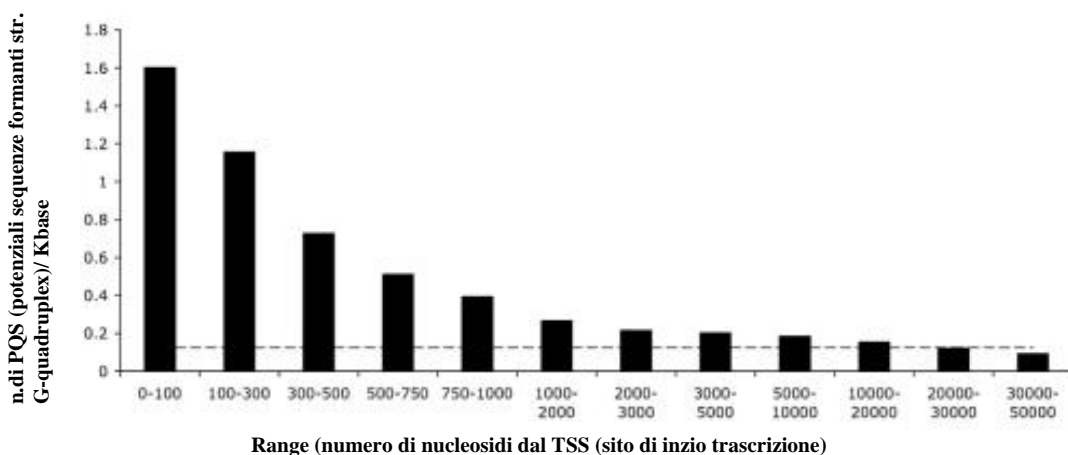


Figura 1.2.7. Incidenza di regioni con alta probabilità di formare struttura G-quadruplex nel genoma umano.

A tale livello, la formazione di strutture G-quadruplex può rivestire una funzione di controllo trascrizionale; in particolare, quando la regione G-rich del promotore si trova in forma strutturata la trascrizione dell'oncogene viene bloccata (figura 1.2.8) (Huppert et al, **2006**; Hurley, **2001**). Tale meccanismo è stato sperimentalmente dimostrato *in vivo* per gli oncogeni *c-myc* e *bcl-2*.

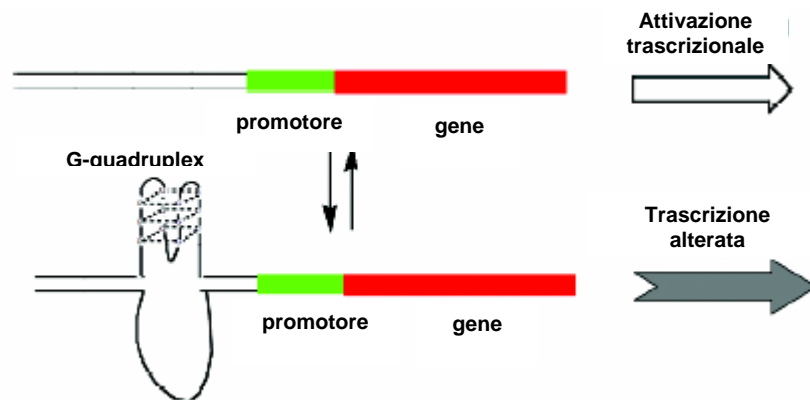


Figura 1.2.8. Modello di controllo trascrizionale basato sulla stabilizzazione di strutture G-quadruplex a livello dei promotori.

Nello studio di composti capaci di stabilizzare strutture G-quadruplex a livello telomerico (con conseguente inibizione dell'attività telomerasica) è fondamentale, quindi, considerare anche gli effetti derivanti da una eventuale stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine di altre sequenze.

1.2.4.1 G-quadruplex nel promotore dell'oncogene *c-myc*

Gli oncogeni della famiglia *myc* codificano per una serie di fosfoproteine che attivano geni in grado di promuovere la crescita cellulare, inducendo l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare quali CAD, CDC25A, ODC e hTERT e inibendo l'espressione di geni coinvolti nell'arresto della crescita quali GADD45; giocano, inoltre, un ruolo fondamentale nel processo apoptotico (Siddiqui-Jain et al, 2002).

Nell'uomo, *c-myc* risulta altamente regolato e alterazioni nella sua trascrizione sono coinvolte spesso nella progressione di diverse forme tumorali maligne quali linfomi, leucemie, tumori al polmone, ovarici, cervicali, tumori allo stomaco e al seno (Simonsson et al, 1998).

Si è visto che *c-myc* è in grado di indurre l'enzima telomerasi in cellule umane epiteliali (HMECs) e in fibroblasti. E' possibile, dunque, che anche la sua capacità di promuovere l'attività telomerasica contribuisca alla sua abilità nel promuovere l'insorgenza di neoplasie (Wang et al, 1998).

Il gene *c-myc* risulta regolato da quattro diversi promotori, tuttavia, esiste un elemento di maggior controllo localizzato sul promotore P1; questo elemento, corrispondente alle basi 2186- 2212 nella sequenza di *c-myc*, viene chiamato elemento “iper-sensibile” alle nucleasi III (NHE III, Nuclease Hypersensitive Element III) e controlla l’ 80-90% della trascrizione di *c-myc* (Simonsson et al, **1998**; Siddiqui-Jain et al, **2002**).

NHE III è una sequenza di 27 paia di basi in cui il filamento ricco in purine è caratterizzato da 6 tratti guaninici, 5 dei quali contenenti 3 o 4 guanine ciascuno (figura 1.2.9).

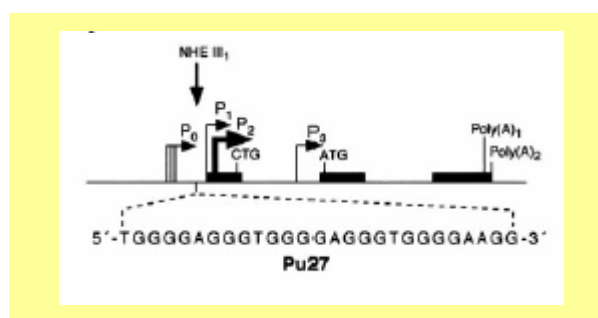
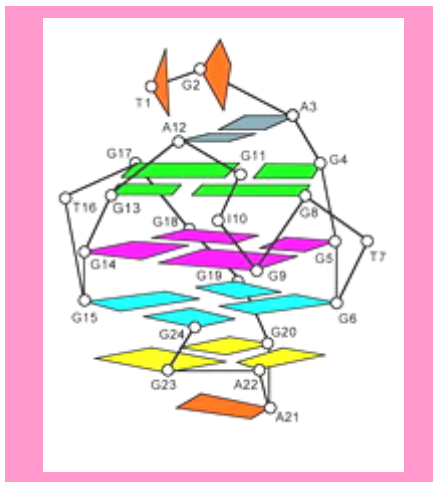


Figura 1.2.9. Localizzazione dell’elemento NHE III sul gene *c-myc*.

Studi NMR condotti sulla sequenza Pu27, in presenza di K^+ , indicano la presenza di più strutture G-quadruplex possibili. Sembra che il primo tratto guaninico non risulti coinvolto nella formazione di tali strutture (Phan et al, **2004**; Phan et al, **2005**). Utilizzando la sequenza Pu24, priva del primo tratto di guanine, si ottiene uno spettro NMR maggiormente risolto, ad indicare la presenza di una conformazione prevalente: una struttura G-quadruplex intramolecolare parallela.

Dal punto di vista strutturale, le tetradi sono costituite dalle guanine G4-G8-G13-G17, G5-G9-G14-G18, G6-G10-G15-G19. I tre loop sono dati dalle basi T7, T16, G20-A21-A22-G23. A livello di quest’ultimo è possibile la formazione di una triade G20-A22-G23. Questa si colloca tra la tetrate inferiore (G6-G10-G15-G19) e il residuo A21, posto più in basso (figura 1.2.10). E’ possibile, tuttavia, che la guanina in posizione 24 (G24) spiazzi la guanina in 10 (G10) sostituendola nella formazione della tetrate. Esiste, infatti, la possibilità di interconversione G10- G24 (figura 1.2.10).



Pu27: TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG
Pu24: TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG
Pu24I: TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAGI

Figura 1.2.10. Struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza G-rich del promotore dell'oncogene *c-myc*. In figura è riportata la struttura assunta dalla sequenza Pu24I, in cui la Guanina in posizione 24 è stata sostituita da una Inosina per impedire lo spiazzamento G24-G10.

Come accennato nella parte introduttiva di questo paragrafo, la stabilizzazione della struttura G-quadruplex a livello della regione NHE III del promotore P1 di *c-myc* comporta un' inibizione della trascrizione dell'oncogene così come di altri geni ad esso correlati quali *hTERT*, *ODC*, *CDC25A*.

E' evidente, pertanto, come composti capaci di stabilizzare la struttura a quartetti di guanine di NHE III possano essere sfruttati come potenziali antitumorali.

1.2.5 G-QUADRUPLIX COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

Come già accennato, una delle modalità di inibizione della telomerasi consiste nel bloccare l'interazione enzima-substrato. I legami presenti nel G-quadruplex sono reversibili pertanto la forma lineare e quella ripiegata del telomero, sono in equilibrio tra loro. Poiché la telomerasi è in grado di interagire solo con il telomero lineare, spostare l'equilibrio verso la forma strutturata, significa renderlo inaccessibile all'enzima (figura 1.2.11).

Tale principio può poi essere esteso ad altre sequenze G-rich.

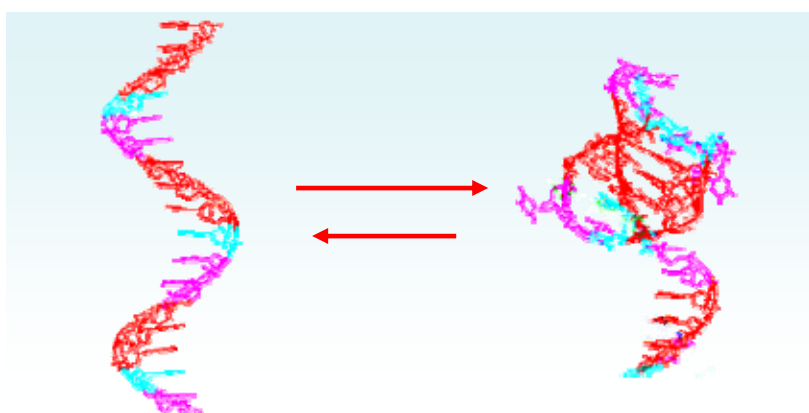


Figura 1.2.11. DNA telomerico in equilibrio tra la forma lineare e la forma a quartetti di guanina

La prima molecola riportata in letteratura (nel 1997) capace di stabilizzare strutture G-quadruplex e dotata di attività antitelomerica è un antrachinone (figura 1.2.12) (Sun et al, **1997**; Perry, Reszka et al, **1998**). Da allora centinaia di molecole sono state valutate per la loro capacità di interagire con strutture a quartetti di guanine in maniera più o meno specifica (Hurley et al, **2000**).

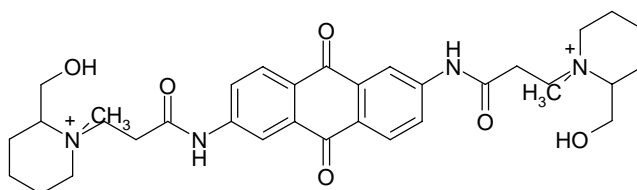


Figura 1.2.12. Struttura chimica di BSU1051, prima molecola individuata come inibitore dell'attività telomerica.

Le modalità con le quali tali composti possono interagire con strutture G-quadruplex sono molteplici (figura 1.2.13) e comprendono:

- a) interazione di tipo “face” mediante stacking terminale o intercalazione vera e propria tra due tetradi di guanine;
- b) riconoscimento “edge” con gli atomi esterni del quartetto di guanine;
- c) interazione con i loop a singolo filamento;
- d) simultanea interazione di tipo “end stacking” e con il loop adiacente o il solco della struttura G-quadruplex.

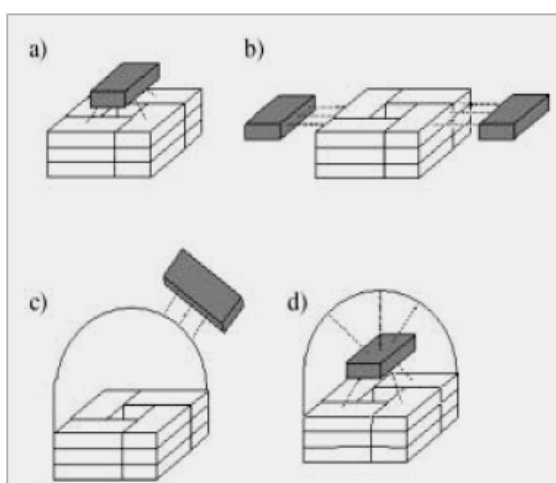


Figura 1.2.13. Rappresentazione schematica delle possibili interazioni tra molecole in grado di riconoscere strutture G-quadruplex bimolecolari. **a)** Riconoscimento di tipo “face” mediante stacking terminale o intercalazione tra due tetradi di guanine; **b)** riconoscimento “edge” con gli atomi esterni del quartetto di guanine; **c)** Legame del legante al loop a singola catena; **d)** Simultanea interazione di tipo “end stacking” e con il loop adiacente o il solco della struttura G-quadruplex.

Un ligando in grado di interagire con la struttura G-quadruplex mediante stacking sembra essere migliore rispetto ad uno che si lega ai solchi del DNA o con i loop; in quest’ultimo caso, infatti, l’interazione con il quartetto di guanine è stabilizzata prevalentemente da legami di tipo ionico tra le cariche negative dei gruppi fosfato nei solchi e le catene laterali cariche positivamente legate al cromoforo mentre un intercalante è in grado di formare un complesso stabilizzato da legami ionici ma anche da interazioni π - π e idrofobiche date dalla parte aromatica della molecola con la struttura planare individuata dalle tetradi guaniniche.

Lo studio di numerosi composti in grado di legarsi al quadruplex, ha permesso di chiarire quali sono le caratteristiche strutturali essenziali per avere attività e selettività nei confronti di tale bersaglio.

Principalmente sono emerse due caratteristiche fondamentali:

1. un esteso cromoforo planare aromatico; questa è una caratteristica in comune con i convenzionali farmaci che si intercalano nel DNA a doppia elica. Tuttavia, poiché la superficie del piano identificato da una coppia di basi è significativamente inferiore a quella di un quartetto di guanine, si è visto che le molecole caratterizzate da un sistema planare più esteso sono in grado di stabilizzare più efficacemente strutture G-quadruplex. Un esempio è costituito dal PIPER, un derivato perilenico la cui porzione planare è costituita dalla condensazione di 7 anelli aromatici. Studi NMR e cristallografici hanno evidenziato come questo derivato faciliti e stabilizzi la formazione dei quartetti di guanina nei telomeri, mediante stacking terminale, che può coinvolgere anche due G-quadruplex distinti (Hurley, **2002**).

2. catene laterali aventi gruppi ionizzabili positivamente poste su anelli diversi del nucleo aromatico.

Tale modello è in accordo con i dati fino ad ora a disposizione i quali indicano come la presenza di due sostituzioni su uno stesso anello aromatico sia in grado di favorire il riconoscimento di strutture di DNA a doppia elica mentre sostituzioni su due anelli distinti rendono il legante maggiormente affine per i quartetti di guanina.

Le due catene così localizzate, infatti, consentono di “abbracciare” la più ampia struttura formata dai quartetti di guanina.

1.2.6 FARMACI CHE AGISCONO SUL G-QUADRUPLEX

Uno dei primi composti di cui si è valutato il potenziale di stabilizzazione di strutture G-quadruplex, è l'etidio bromuro, molecola dalle note proprietà intercalanti (figura 1.2.14). E' riportata, infatti, in letteratura la capacità dell'etidio di interagire, oltre che con il DNA a doppia catena, anche con strutture a triplo e quadruplo filamento (Koeppel et al, **2001**).

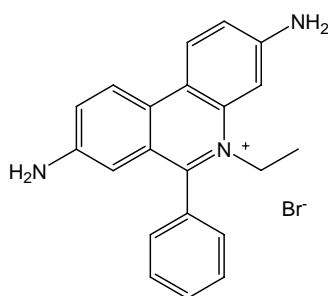


Figura 1.2.14. Struttura chimica dell' etidio bromuro.

Diverse altre classi di molecole sono state valutate per la loro capacità di interagire e stabilizzare strutture a quartetti di guanine. Nei paragrafi successivi verranno brevemente riassunte le loro caratteristiche.

1.2.6.1 Acridine

Le acridine presentano un sistema aromatico costituito da tre anelli con un atomo di azoto nell'anello centrale.

Sono stati sintetizzati diversi analoghi in grado di interagire con il G-quadruplex, in particolare derivati aventi 2 o 3 sostituenti.

Studi di molecular modelling hanno dimostrato, infatti, come l'inserimento di un terzo sostituente nel nucleo aromatico, possa aumentare la selettività per il G-quadruplex e diminuire l'affinità per il DNA duplex: il DNA a doppio filamento, presentando solamente due solchi, non è, infatti, in grado di accogliere una terza catena.

Un esempio è rappresentato dall'acridina trisostituita BRACO 19 (figura 1.2.15), dotata di una potente e selettiva attività antitelomerasica (Burger et al, **2005**). Tale composto è

stato testato anche sulla sequenza NHE III di *c-myc*, dove ha dimostrato buone capacità di stabilizzazione.

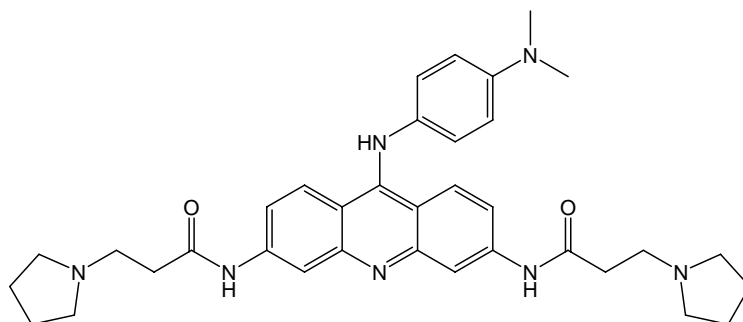


Figura 1.2.15. BRACO-19 una 3,6,9 acridina trisostituita

In alternativa, tale selettività è stata incrementata estendendo il sistema planare come nel caso di RHPS4 (figura 1.2.16), un'acridina pentaciclica, in grado di inibire l'attività telomerasica a livelli submicromolari. (Leonetti et al, **2004**; Gowan et al, **2001**; Heald et al, **2002**).

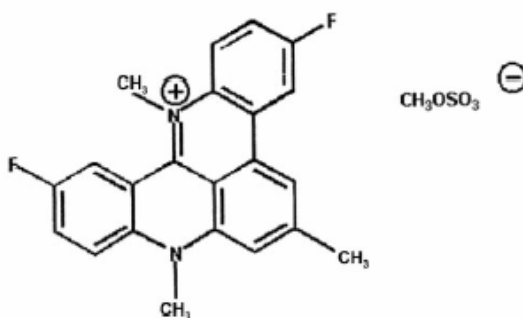


Figura 1.2.16. Struttura chimica dell'acridina pentaciclica RHPS4.

1.2.6.2 Antrachinoni

Un'altra famiglia di molecole ampiamente investigata è quella degli antracene-9,10-dioni meglio conosciuti come antrachinoni (Perry, Gowan et al, **1999**).

Composti a struttura antrachinonica rivestono un ruolo determinante nella terapia anticancro, come dimostrato da molecole quali la doxorubicina e il mitoxantrone, entrambi in uso clinico. Questi e altri derivati simili agiscono a livello della doppia elica del DNA,

mediante stabilizzazione di un complesso ternario farmaco- DNA- topoisomerasi II. Si tratta, però, di composti che dimostrano un'elevata citotossicità e una scarsa selettività per le cellule tumorali (Read et al, **2001**).

In generale il meccanismo d'azione degli antrachinoni è quello classico degli intercalanti: il cromoforo planare si inserisce tra le coppie di basi del DNA mentre eventuali catene laterali si collocano tra i solchi formati dal doppio filamento (figura 1.2.17). Le condizioni migliori per l'interazione si realizzano quando le catene sono funzionalizzate con gruppi protonabili in grado di favorire l'interazione (di tipo elettrostatico) con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA.

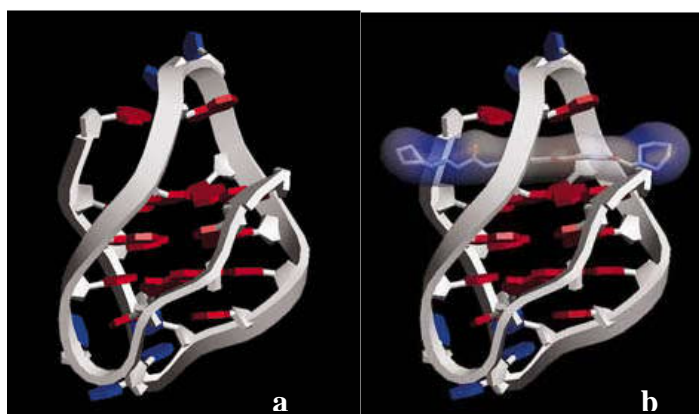


Figura 1.2.17 a. Modello di ripiegamento a quadruplo filamento del telomero umano; e b. Possibile intercalazione di un derivato disostituito 2,7-diammido-antrachinone.

Studi precedenti dimostrano come la posizione dei sostituenti sull' anello aromatico influenzi notevolmente le proprietà di legame al DNA. In particolare, i composti in cui le catene laterali sono localizzate in posizione 1,4 (cioè sullo stesso anello aromatico) sono maggiormente affini al DNA a doppio filamento mentre quelli sostituiti in posizione 2,6 o 2,7 (con catene in entrambi gli anelli aromatici laterali) mostrano una maggiore affinità per il DNA a filamento triplo e quadruplo. Conseguentemente, questi ultimi manifestano anche una minore citotossicità (Perry, Gowan et al, **1998**).

Gli studi effettuati sui derivati antrachinonici hanno permesso di individuare alcune caratteristiche strutturali fondamentali per garantire una significativa attività antitelomerica.

Questi requisiti comprendono:

- Presenza di almeno due catene laterali amminoalchilamidiche;
- Presenza di una carica positiva all'estremità della catena laterale;
- Presenza di almeno due gruppi metilenici tra il gruppo amidico e l'atomo di azoto carico in catena laterale;
- Natura e grandezza dei gruppi terminali: gruppi piperidinici e pirrolidinici sono ottimali.

1.2.6.3 Fluorenoni

I fluorenoni presentano una struttura per certi versi ricollegabile a quella degli antrachinoni (figura 1.2.18).

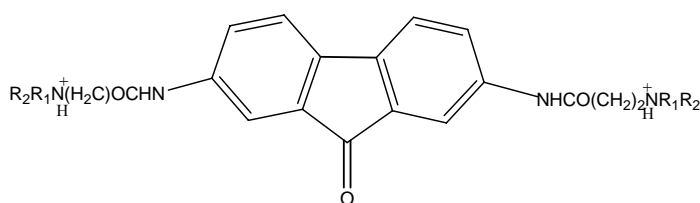


Figura 1.2.18. Struttura di un fluorenone.

L'assenza nei fluorenoni della funzionalità chinonica faceva supporre una ridotta tossicità rispetto a quella osservata con gli antrachinoni.

Lo studio di una serie di fluorenoni 2,7 disostituiti ha evidenziato, infatti, una minore tossicità rispetto ai corrispondenti derivati antrachinonici tuttavia, si è visto anche un calo dell'attività antitelomerasica. Questo minor effetto inibitorio nei confronti della telomerasi può essere spiegato considerando le caratteristiche geometriche della molecola: mentre il sistema ciclico degli antrachinoni presenta un anello centrale a 6 atomi, i fluorenoni presentano un anello a 5 che altera le relative disposizioni angolari delle due catene amminoalchilamidiche. Proprio per questo diverso orientamento delle catene laterali (rispetto al cromoforo), si è visto, tramite molecular modelling, che i fluorenoni 2,7 disostituiti sono in grado di legare efficacemente il G-quadruplex solo operando una distorsione, costosa dal punto di vista energetico, della geometria della struttura.

Le energie di legame tra fluorenoni e strutture G-quadruplex sono pertanto maggiori di quelle osservate con gli antrachinoni (Kim et al, **2002**; Kim, Duan et al, **2003**).

1.2.6.4 Perileni

I perileni sono composti costituiti da un nucleo policiclico, di sette anelli, con due catene laterali. Tali derivati hanno dimostrato un' elevata capacità di interazione con le strutture G-quadruplex.

Sulla base dei dati ottenuti da studi di molecular modelling, Fedoroff e Hurley hanno disegnato e sintetizzato il PIPER, N,N9-bis[2-(1-piperidino)-etil]-3,4,9,10-perilentetracarbossilico diimide, un perilene avente due cariche positive in catena laterale (figura 1.2.19).

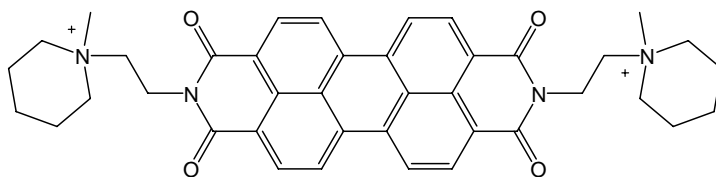


Figura 1.2.19. Struttura chimica del perilene PIPER.

Questo derivato presenta una buona selettività verso il G-quadruplex: interagisce, infatti, in modo specifico con i quartetti di guanina mentre manifesta solo una debole interazione con il DNA a singolo e a doppio filamento. Mediante esperimenti di gel shift è emersa, inoltre, la capacità del PIPER di incrementare di circa 100 volte la formazione del G-quadruplex bimolecolare.

Studi NMR dei complessi tra i derivati perilenici e il G-quadruplex hanno dimostrato come questi cromofori non si intercalino tra i quartetti di guanina ma si leghino tramite interazioni di tipo “end-stacking” alla tetrate terminale della struttura G- quadruplex (figura 1.2.20) (Davis, **2004**; Clark et al, **2003**; Haider et al, **2003**; Fedoroff et al, **1998**; Han, Cliff et al, **1999**).

Diversi studi hanno dimostrato, inoltre, che la selettività di legame al tetraplex da parte dei derivati perilenici aumenta quando i composti sono presenti in forma aggregata (Sissi et al, **2007**; Rossetti et al, **2002**; Kerwin et al, **2002**; Briem et al, **1996**; Han et al, **2000**).

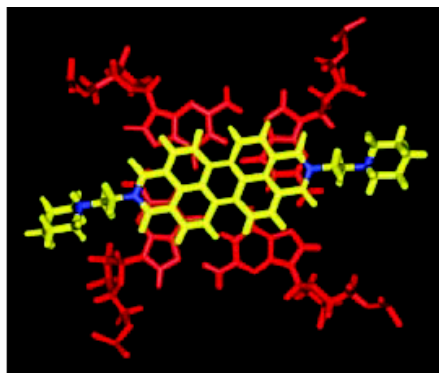


Figura 1.2.20. Interazione G-quadruplex-PIPER (in rosso è rappresentata la struttura a quartetti di guanine, in giallo il perilene).

1.2.6.5 Porfirine

I derivati appartenenti a questa famiglia maggiormente studiati comprendono TMPyP4 e TMPyP2 (figura 1.2.21). Studi comparativi su diverse linee cellulari tumorali, hanno dimostrato come TMPyP4 abbia un maggiore effetto sulla crescita cellulare rispetto al suo analogo TMPyP2 e questo è in accordo con i dati di inibizione della telomerasi. L'interesse per TMPyP4 è dovuta al fatto che è in grado di indurre un blocco della proliferazione in cellule telomerasi positive ma anche in cellule che esprimono meccanismi di mantenimento dei telomeri alternativi (ALT positive) (Kim, Gleason-Guzman et al, **2003**). In base a studi di molecular modelling, sembra che queste molecole leghino le tetradi guaniniche esterne della struttura G-quadruplex (figura 1.2.22): TMPyP4 si colloca, infatti, circa 4.2 Å al di sopra del piano individuato dalla tetradi di guanine mentre lo spazio tra due tetradi successive è di 3.4 Å (Parkinson et al, **2007**).

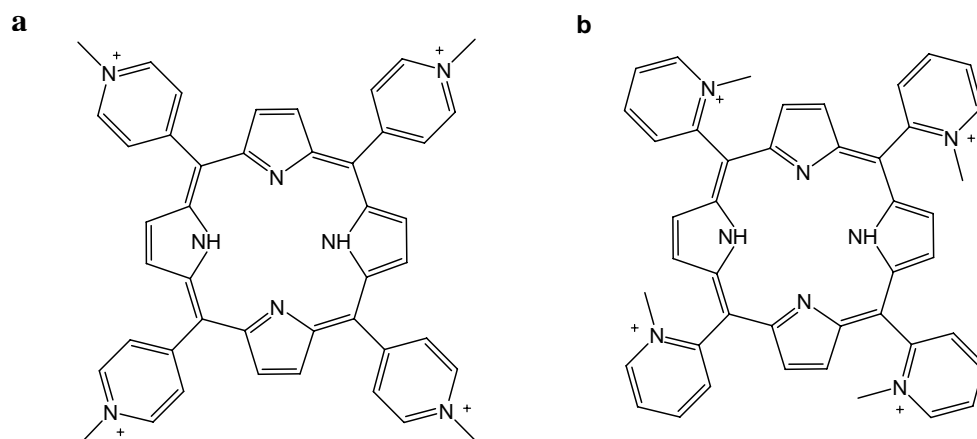


Figura 1.2.21 a. TMPyP4; **b.** TMPyP2.

Più di 150 analoghi porfirinici sono stati analizzati con vari tipi di saggi permettendo di delineare rapporti struttura-attività. Questi dimostrano che i fattori determinanti per l'interazione G-quadruplex- legante sono: il numero di cariche, la lunghezza delle catene laterali delle molecole e i legami idrogeno tra le due specie (Han, Wheelhouse et al, **1999**; Schuitmaker et al, **1996**; Wheelhouse et al, **1998**; Arthanari et al, **1998**.; Li et al, **1996**; Sun et al, **1997**; Han et al, **2001**; Han, Cliff et al, **1999**; Han, Hurley et al, **1999**).



Figura 1.2.22. Modello minimizzato del complesso TMPyP4-G-quadruplex umano d[AGGG(TTAGGG)₃]. La porfirina è rappresentata in viola, le tetradi guaniniche in azzurro, lo scheletro fosfato-zucchero in grigio.

Entrambe le molecole (TMPyP4 e TMPyP2) sono state testate anche sulla sequenza del promotore dell'oncogene *c-myc*, dove hanno mostrato buone capacità di stabilizzazione della struttura G-quadruplex assunta (Siddiqui-Jain et al, **2002**; Seenisamy et al, **2004**).

1.2.6.6 Dibenzofenantroline

Dibenzo [b,j] fenantroline disostituite in (1,10), (1,7), (1,4) e macrocicli derivanti dall'unione di due molecole con catene poliamminoalchiliche sono state sintetizzate inizialmente per il riconoscimento di specifici nucleotidi. In particolare, il derivato macrociclico BOQ1 (figura 1.2.23) è in grado di interagire con le paia di basi GG (Baudoin et al, **1997**; Baudoin et al, **1999**). Il fatto che questi composti ciclici si leghino preferenzialmente agli acidi nucleici aventi basi esposte (come i loops derivanti da hairpins) ha portato a testare molti altri derivati fenantrolinici per la loro capacità di interazione con il G-quadruplex (Mergny et al, **2001**; Baudoin et al, **1997**; Baudoin et al, **1999**).

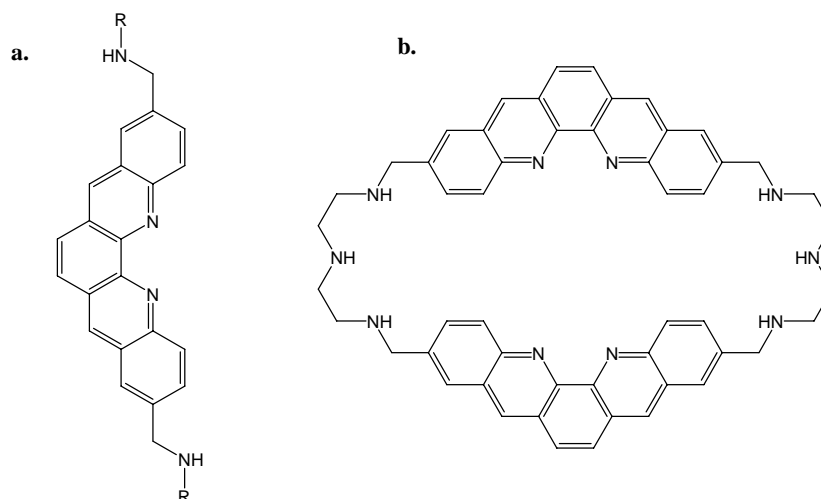


Figura 1.2.23 a. Dibenzo [b,j]-1,10-fenantroline disostituita; **b.** BOQ1.

1.2.6.7 Telomestatina

La telomestatina è un agente naturale isolato da *Streptomyces Anulatus 3533-SV4* (figura 1.2.24). Tale composto risulta un potente inibitore dell'enzima telomerasi (IC₅₀ pari a 5nM) (Kim et al, **2002**). Possiede la capacità di interagire e stabilizzare strutture G-quadruplex intramolecolari sia telomeriche che non telomeriche anche in assenza di cationi monovalenti (Kim, Gleason-Guzman et al, **2003**).

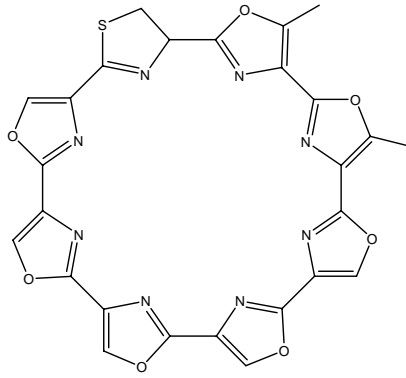


Figura 1.2.24. Struttura chimica della molecola telomestatina.

Trattando cellule tumorali umane con telomestatina si osserva un accorciamento dell'estremità telomerica. In cellule di fibrosarcoma si è vista anche una diminuzione dell'espressione delle proteine POT1 e TRF2, aventi funzione di stabilizzazione della struttura a T-loop e di capping dell'estremità 3' (Gomez, Wenner et al, **2006**; Gomez, O'Donohue et al, **2006**).

1.3 SCOPO DEL LAVORO

La stabilizzazione di strutture G-quadruplex rappresenta un potenziale approccio farmacologico nella terapia antitumorale in quanto consente di bloccare alcuni processi di sopravvivenza delle cellule cancerose.

Molte piccole molecole come porfirine, antrachinoni, acridine, derivati perilenici, sono in grado di indurre la formazione e/o stabilizzare strutture a quartetti di guanine. Tutte sono caratterizzate da un nucleo aromatico che consente interazioni di stacking con i quartetti di guanine, e da catene laterali cariche positivamente in grado di interagire con i solchi del DNA.

Poiché tali caratteristiche sono anche quelle generalmente richieste per rendere possibile, in particolare, il legame al DNA a doppia catena, spesso, i leganti per i quartetti di guanina sono in grado di riconoscere ed interagire anche con la doppia elica. Considerando, inoltre, che il DNA in forma duplex è presente nei cromosomi in largo eccesso rispetto al G-quadruplex, incrementare drasticamente la selettività dei leganti G-quadruplex verso quest'ultima struttura è uno dei principali obiettivi per un loro potenziale uso come farmaci selettivi.

Un altro aspetto da sottolineare è rappresentato dalla potenziale selettività verso diversi arrangiamenti G-quadruplex anche legati al contesto di sequenza dalla quale sono prodotti. Tenendo in mente l'importanza delle relazioni tra sequenza, struttura e selettività come bersaglio farmacologico, in questo lavoro di tesi sono stati analizzati nuovi derivati, potenzialmente in grado di legare e stabilizzare la struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza telomerica, allo scopo di testarne la capacità di inibizione nei confronti dell'enzima telomerasi, e associarne una caratterizzazione più approfondita del meccanismo di interazione con l'acido nucleico.

Tali studi sono stati, per completezza, integrati con l'analisi dell'interazione dei composti esaminati con un'altra sequenza in grado di formare strutture a quartetti di guanine, diversa da quella telomerica, tuttavia rilevante dal punto di vista farmacologico.

In particolare, lo studio è stato esteso alla regione situata a livello del promotore dell'oncogene *c-myc*.

Tre sono le classi di molecole prese in esame: antrachinoni, perileni e analoghi del bisantrene.

Come risulta evidente dalle formule di struttura (figura 1.3.1) e come riportato dai requisiti indicati nell'introduzione tutti i composti analizzati presentano un sistema policiclico aromatico planare in grado di inserirsi o di interagire esternamente con le tetraidi guaniniche costituenti le strutture G-quadruplex. Sono, inoltre, caratterizzati dalla presenza di catene laterali aventi gruppi ionizzabili positivamente.

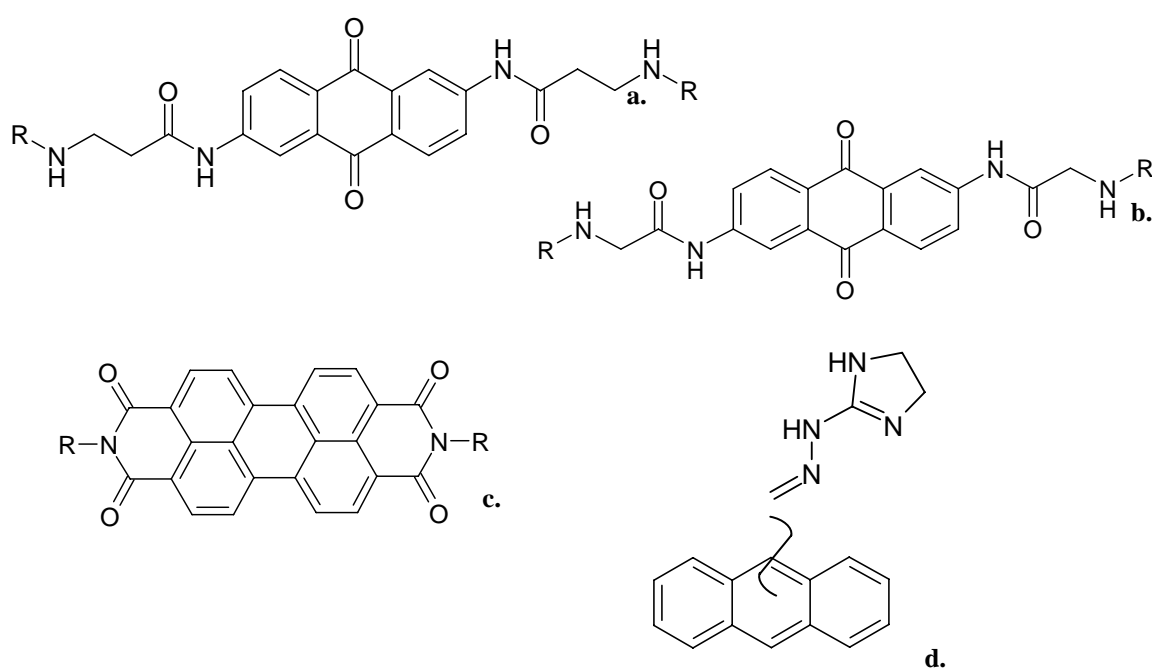


Figura 1.3.1. Strutture dei composti analizzati. **a.** antrachinoni 2,6 disostituiti aventi linker β -Alanina **b.** antrachinoni 2,6 disostituiti aventi linker Glicina. **c.** derivati perilenici. **d.** derivati del bisantrene. R rappresenta i sostituenti laterali.

Sono stati, in particolare, esaminati gli effetti conseguenti al processo di interazione legante- G-quadruplex, quali:

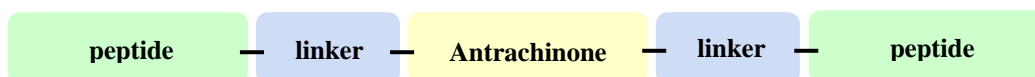
- ❖ estensione del sistema aromatico, intesa come numero di cicli condensati ed eventuale coniugazione con le catene laterali;
- ❖ numero, localizzazione e lunghezza delle catene laterali.

Gli antrachinoni esaminati in questo lavoro di tesi comprendono una piccola libreria di antracene-9,10-dioni sostituiti in posizione 2 e 6 con catene mono, di e tri-peptidiche.

La scelta di utilizzare molecole così sostituite deriva da osservazioni fatte in studi precedenti, nei quali era emerso come la collocazione delle catene laterali fosse in grado di modulare la selettività nel riconoscimento di strutture diverse di DNA. In particolare, molecole aventi catene laterali in posizione 1 e 4, situate sullo stesso anello, avevano presentato una maggiore affinità per il DNA a doppia elica, mentre molecole aventi catene posizionate su anelli diversi, in posizione 2 e 6 oppure 2 e 7 mostravano una maggiore specificità nel riconoscimento e legame di DNA in forma triplex o G-quadruplex (Perry, Gowan, et al, **1998**).

Catene laterali costituite da residui amminoacidici derivano, invece, dalla riconosciuta capacità delle proteine di legare il DNA e, più in generale, gli acidi nucleici con modalità sequenza e/o struttura-specifica.

La struttura generale che rappresenta le molecole testate è schematicamente la seguente:



I derivati esaminati risultano simmetrici; tuttavia, differiscono per la lunghezza del linker tra nucleo antrachinonico e catena laterale, per la polarità e il numero di amminoacidi in catena laterale.

Tutti i derivati testati presentano, inoltre, gruppi amminici protonabili in condizioni fisiologiche. L'introduzione di tali gruppi è intesa a favorire l'interazione con i gruppi fosfato presenti nelle catene del DNA.

I linkers (amminoacidi Glicina o β -Alanina) caratterizzati dalla presenza di uno o due metileni sono, invece, in grado di conferire flessibilità alle molecole favorendo l'interazione delle catene laterali con i solchi delle strutture G-quadruplex.

I perileni oggetto di studio comprendono il **PIPER**, composto con note capacità di inibizione della telomerasi, e un suo derivato (**K5**).

Entrambe le molecole presentano un nucleo centrale aromatico costituito dalla condensazione di sette anelli ma differiscono nella natura delle catene laterali: nel derivato **K5** l'anello piperidinico (presente nelle catene del **PIPER**) è stato, infatti, sostituito da gruppi dimetilamminici.

In studi precedenti era stata già valutata la capacità dei due composti di inibire l'attività telomerasica e da ciò era emerso come piccole modifiche strutturali fossero in grado di produrre notevoli differenze in termini di potenza; in questo lavoro, dunque, si è voluto analizzare in maniera approfondita l'interazione dei due composti con l'acido nucleico e, in particolare, con strutture G-quadruplex.

Gli analoghi del bisantrene presi in considerazione sono molecole in cui il sistema antracenicico è sostituito con una o due catene 4,5-diidro-1*H*-imidazol-2-il-idrazoniche in posizioni diverse.

Il bisantrene è un composto noto da tempo per le sue capacità di intercalazione nel DNA a doppia elica e di inibizione dell'attività dell'enzima topoisomerasi II. Presenta un sistema aromatico planare in grado di inserirsi efficientemente tra le coppie di basi dell'acido nucleico a doppia elica e catene laterali contenenti gruppi ionizzabili in grado di interagire mediante legami di tipo elettrostatico con i gruppi fosfato dell'acido nucleico.

Attualmente non esistono studi riguardanti l'interazione di tale composto con strutture diverse dal duplex. Per questo motivo si è pensato di sintetizzare e analizzare analoghi regioisomeri in modo da poter valutare il ruolo delle sostituzioni laterali in termini di numero e collocazione spaziale ai fini dell'interazione con strutture G-quadruplex.

Per tutte le molecole sopra menzionate in un primo momento sono state valutate le proprietà inibitorie nei confronti della telomerasi mediante saggio TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol).

I composti che hanno dimostrato un'attività interessante sono stati sottoposti ad ulteriori studi, indirizzati a definire le modalità molecolari con le quali interferiscono con l'enzima. In particolare, sono stati messi a punto e utilizzati diversi protocolli sperimentali atti a caratterizzare il processo di interazione delle molecole con strutture G-quadruplex. A tale

scopo sono state impiegate opportune sequenze nucleotidiche disegnate per rappresentare utili modelli del telomero e del promotore dell' oncogene *c-myc*.

Tecniche di spettroscopia (UV-visibile e dicroismo circolare) hanno permesso di individuare le modalità di legame tra le molecole e gli acidi nucleici e di definire il tipo di strutture di acido nucleico coinvolte nelle interazioni.

Con misure di fluorescenza melting è stato possibile misurare la stabilizzazione di strutture G-quadruplex indotta dai diversi composti e di definire un indice di selettività basato sul confronto tra stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine e a doppia elica.

Tecniche elettroforetiche (PAGE) sono state utilizzate per definire le capacità delle molecole di indurre la formazione di strutture G-quadruplex e di riconoscere il tipo di struttura formata in seguito ad incubazione con oligonucleotidi contenenti la sequenza telomerica umana.

Infine, mediante esperimenti condotti su linee cellulari tumorali si è potuto stabilire l'effetto indotto dai composti esaminati sul modello cellulare e riportare i dati ottenuti con le misure effettuate in ambito molecolare.

In questo modo si sono potute fare alcune considerazioni sui rapporti struttura-attività, individuando le caratteristiche strutturali in grado di conferire maggiore affinità e selettività verso le strutture a quartetti di guanine ed, eventualmente, verso una particolare conformazione da queste adottata.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

2.2 METODI

2.1 MATERIALI

2.2.1 STRUMENTAZIONE

Autoclave	International PBI S.p.A, Milano, Italia
Gel Dryer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco
Lastre radioattivo	Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
Lambda 20 Spettrofotometro	Perkin Elmer, Milano, Italia
FL 20 Fluorimetro	Perkin Elmer, Milano, Italia
Spettropolarimetro J-810-150S	Jasco Corporation, Giappone
Termostato RTE-111	Thermo Neslab Instrument, USA
LightCycler	Roche S.p.A, Milano, Italia
Phosphor Imager STORM 840	Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
Termocycler	Perkin Elmer, Milano, Italia
Scintillation counter	Canberra Packard, Milano, Italia
Speed Vac	UniEquip, Milano, Italia
Centrifuga GS-15R	Beckman Analytical S.p.A, Milano, Italia
Incubatore	International PBI S.p.A, Milano, Italia
Lampada per foto gel agarosio	Biorad Laboratories, Milano, Italia
pHmetro 713 metrohm	Metrohm Italiana s.r.l, Varese, Italia
Sviluppatrice Curix 60	Agfa-Gevaert N. V. Belgio
Lettore di piastre Polarstar Optima	International PBI S.p.A, Milano, Italia
Microscopio a fluorescenza	Carl Zeiss S.p.A., Milano, Italia
Microscopio Nikon TMS	Folabo, Milano, Italia
Coulter counter ZM	Coulter Electronics, Luton, United Kingdom
Gene Amp PCR system 9700	Applied Biosystems, USA
Centrifuga Centrifuge 5415R	Beckman Analytical S.p.A, Milano, Italia
Incubatore BBD 6220	Heraeus Instruments, Belgio

2.1.2 REAGENTI

Acrilammide	Bio-Rad, Milano, Italia
Ammonio persolfato (APS)	Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
Bis-Acrlammide	Bio-Rad, Milano, Italia
Acido borico	Sigma, Milano, Italia
EDTA	Fluka, Milano, Italia
Etidio Bromuro	Fluka, Milano, Italia
Litio Idrossido	Sigma, Milano, Italia
Potassio Cloruro	Fluka, Milano, Italia
Sodio Cloruro	Fluka, Milano, Italia
Sodio Idrossido (pellet)	Carlo Erba, Roma, Italia
TRIS base	Sigma, Milano, Italia
TRIS-HCl	Sigma, Milano, Italia
Glicerolo	Sigma, Milano, Italia
DMSO	Fluka, Milano, Italia
Magnesio Cloruro	Sigma, Milano, Italia
DTT	Sigma, Milano, Italia
EGTA	Sigma, Milano, Italia
β Mercaptoetanololo	Sigma, Milano, Italia
CHAPS	Sigma, Milano, Italia
Propidio ioduro	Sigma, Milano, Italia
Xilene cianolo	Sigma, Milano, Italia
Blu di Bromofenolo	Sigma, Milano, Italia
Sybr Green I	Sigma, Milano, Italia

2.1.3 REAGENTI STANDARD E KIT

50,100 bp DNA ladder	Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
Kit TRAP-eze	Chemicon International, Canada
Kit quantificazione proteine	Bio-Rad, Milano, Italia
Cellular Senescence Assay kit	Chemicon International, Canada

2.1.4 ENZIMI E PROTEINE

Taq DNA Polimerasi	Fermentas International Inc. Canada
T4 Polinucleotide Kinasi	M-Medical S.r.l, Milano, Italia
Albumina di siero bovino (BSA)	Sigma, Milano, Italia
Topoisomerasi I	Invitrogen Corporation, California, USA

2.1.5 ANTICORPI E MATERIALE PER WESTERN BLOTTING

Anticorpi monoclonali	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
-----------------------	---

Anticorpi secondari	Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
Kit per chemiluminescenza	Amersham Pharmacia Biotech, Milano, Italia
membrane Hybond- ECL	
Nitrocellulose	GE-Healthcare, Milano, Italia

2.1.6 MATERIALI PER LE COLTURE CELLULARI

Terreno RPMI 1640	Cambrex, Milano, Italia
Terreno DMEM-F12	Cambrex, Milano, Italia
Tripsina-EDTA	Cambrex, Milano, Italia
Vitamine mix	Cambrex, Milano, Italia
PBS	Cambrex, Milano, Italia
Glutammina	Life Technologies, S.r.l, Milano, Italia
FBS	Life Technologies, S.r.l, Milano, Italia
Gentamicina	Life Technologies, S.r.l, Milano, Italia
Linea cellulare JR8	Istituto di Ricerche "G.Ronzoni" Milano, Italia
Linea cellulare SKMe15	ATCC, Milano, Italia
Linea cellulare LOVO	ATCC, Milano, Italia

2.1.7 NUCLEOTIDI MARCATI

[γ - ³² P] dATP	New Life Science, Zaventem, Belgio
------------------------------------	------------------------------------

2.1.8 OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI

Tutti gli oligonucleotidi utilizzati provengono dalla ditta Biosense s.r.l, Milano.

Sono stati forniti in forma liofilizzata e successivamente risospesi in tampone TE pH 8.0; la concentrazione è stata determinata per via spettrofometrica.

2.1.8.1 Oligonucleotidi usati per il saggio inibizione *Taq*-Polimerasi

3'GYRA: 5'-TGAGGATCCGCCTGGACAGCATGG-3'

5'GYRA: 5'-GTCGAATTCTCGGCGAGAAGCAGG-3'

2.1.8.2 Oligonucleotidi usati per il saggio TRAP

TS: 5' AATCCGTCGAGCAGAGTT 3'

ACX: 5' GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC 3'

NT: 5' ATCGCTTCTCGGCCTTTT 3'
TSNT: 5' AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT 3'

2.1.8.3 Oligonucleotidi usati per i gel shift

1GGG: 5'-TAC-AGA-TAG-TTA-GGG-TTA-GAC-TTA-3'
2GGG: 5'- TAC-AGA-TAG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-3'
4GGG: 5'- AGG-GTTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG -3'
4CCC: 5'- CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-CCCT -3'
Pu27 up: 5'- TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'
Pu27 down: 5'- CCT-TCC-CCA-CCC-TCC-CCA-CCC-TCC-CCA-3'
4GGGtail: 5'-TAC-AGA-TAG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'
4GGGtail comp: 5'-CCC-TAA-CCC-TAA-CTA-TCT-GTA-3'

2.1.8.4 Oligonucleotidi usati negli esperimenti di fluorescence melting

4GGG 3'FAM: 5'-Dabcyl-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GT-FAM-3'
4CCC: 5'- ACC-CTA-ACC-CTA-ACC-CTA-ACC-CT-3'
Pu24 FD : 5'-Dabcyl-TGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-FAM-3'
Pu24 down : 5'-CCT-TCC-CCA-CCC-TCC-CCA-CCC-TCA-3'
QMrandom FFAM : 5'-FAM-GTG-AGA-TAC-CGA-CAG-AAG -3'
QMrandom RDC : 5'-CTT-CTG-TCG-GTA-TCT-CAC-Dabcyl -3'

2.1.8.5 Oligonucleotidi usati negli esperimenti di dicroismo circolare

1GGG: 5'-TAC-AGA-TAG-TTA-GGG-TTA-GAC-TTA-3'
2GGG: 5'-TAC-AGA-TAG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-3'
4GGG: 5'-AGG-GTTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'
Pu24 : 5'- TGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'
Pu24 down : 5'-CCT-TCC-CCA-CCC-TCC-CCA-CCC-TCA-3'
2GGG-mut : 5'-TAC- AGA- TAG- TTA- GAC- TTA- ACG- TTA-3'

2.1.8.6 DNA naturali

pBR322: plasmide fornito dalla Gibco, fornito in concentrazione 0.25 µg/µl.

ctDNA: DNA di timo di vitello fornito in forma liofilizzata dalla ditta Sigma. E' stato risospeso in tampone, lasciato rigonfiare overnight a 4°C. Successivamente si è sottoposto ad agitazione meccanica per circa 1 h e filtrato.

2.1.9 TAMPONI

Tutti i tamponi sono stati preparati con acqua milliQ e successivamente filtrati.

TBE 10X: TRIS-Borato 0.89 M, EDTA 20 mM, pH 8.0.

TAE 10X: TRIS-Acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M.

TE: TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.

ETN 0,022M pH 7.0: TRIS 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 6 mM.

TRAP BUFFER 5X: TRIS-HCl 1 M, pH 8.3; KCl 1M; MgCl₂ 1M; EGTA 50 mM; Tween 20 1%.

GEL LOADING BUFFER (6X): glicerolo 50%; EDTA 50 mM; TRIS base 50 mM; blu di bromofenolo 0.05%; xilene cianolo 0.05%.

KINASI BUFFER 10X (STRATAGENE): TRIS-HCl 100 mM (pH 7.5); MgCl₂ 10 mM; DTT 5 mM.

PCR BUFFER 10X (AMERSHAM): TRIS-HCl 10 mM (pH 8.3 a 25°C); KCl 50 mM; gelatina 0.001%; MgCl₂ 1.5 mM; Tween 0.3%.

LP: LiOH 40 mM, portato a pH 7.4 con H₃PO₄.

BUFFER DI LISI: TRIS-HCl 10mM pH 7.5, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, benzamidina 0,1 mM, β-mercaptoetanolo 5mM, CHAPS 0,5%, glicerolo 10%.

I composti utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati dai laboratori di sintesi

- ✓ del Prof. G. Zagotto, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova, Italia;
- ✓ del Dott. A. P. Krapcho, University of Vermont, Burlington, Vermont.

2.2 METODI

- PARTE MOLECOLARE

2.2.1 SAGGIO DI INBIZIONE DELLA *TAQ* POLIMERASI

Per valutare l'attività di inibizione dell'enzima *Taq* polimerasi dei composti in esame, un frammento di DNA plasmidico è stato amplificato tramite PCR (Polimerase Chain Reaction) in presenza di diverse concentrazioni della sostanza da analizzare

Come template è stato utilizzato il plasmide pBR322, come primers i due oligo 3' GYRA e 5' GYRA.

Questi appaiano tra la posizione 1065 e 906 generando un amplificato di 161 paia di basi.

Il saggio prevede 3 passaggi:

- Step I

In ogni tubo di reazione si introduce una miscela, per un volume totale di 50 μ l, così composta:

Composizione	Conc. finali
plasmide pBR322	0.05 ng/ μ l
primer GYRA 3'	0.5 μ M
primer GYRA 5'	0.5 μ M
desossinucleotidi trifosfato	200 μ M
tampone per PCR	1X
<i>Taq</i> polimerasi	2 U
soluzione della molecola in esame alla concentrazione desiderata	0- 40 μ M
acqua	q.b.a 50 μ l

- Step II

La miscela di reazione viene sottoposta a 25 cicli di amplificazione alle seguenti temperature:

94°C per 30 sec. (denaturazione dsDNA)

58°C per 30 sec. (appaiamento dei primers alle sequenze complementari)

72°C per 30 sec. (estensione dei primers)

- Step III

Alla fine della PCR, 10 µl di loading buffer vengono aggiunti in ogni tubo e 20 µl della miscela di reazione vengono caricati in un gel di agarosio al 2% in TBE 0.5 X contenente etidio bromuro 0.5 ng/ µl.

Il gel viene fatto correre a 80 V per circa 1 h e 30 min.

Le bande relative ai prodotti di reazione vengono visualizzate mediante irradiazione con lampada UV a 302 nm, rilevando la fluorescenza emessa dal colorante intercalante a 590 nm.

2.2.2 SAGGIO TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)

Tale saggio permette di valutare l'attività telomerasica di estratti cellulari: in una prima fase l'estratto, contenente l'enzima, viene incubato a temperatura ambiente in presenza di un oligonucleotide (primer TS) in grado di fungere da substrato per l'enzima stesso, che quindi può essere allungato. In un secondo passaggio i prodotti ottenuti vengono amplificati tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) in presenza di uno specifico primer di ritorno (ACX).

Aggiungendo al mix di reazione varie soluzioni a concentrazioni diverse dei composti da esaminare, è possibile valutare se questi presentano o meno attività anti- telomerasica.

Il saggio prevede 3 passaggi:

- Step I

Viene assemblata una miscela di reazione in un volume complessivo di 40 µl, così composta:

Composizione	Conc. finali
TS primer	2,5 ng/µl
BSA	1,25 ng/µl
Desossinucleotidi trifosfato	125 µM
Tampone per saggio TRAP	1X
Estratto proteico contenente la telomerasi	12,5 ng/µl
Soluzione della molecola in esame alla concentrazione desiderata	0- 40 µM
acqua	q.b.a 40 µl

La miscela viene prima incubata per 30 min. a 30°C per favorire l'attività telomerasica. L'enzima viene, poi, inattivato a 92°C per 4 min.

- Step II

Vengono aggiunti in ogni tubo 10 µl di una miscela così composta:

Composizione	Conc. finali
ACX	2 ng/µl
Taq polimerasi	2 U
acqua	q.b.a 10 µl

La miscela di reazione viene sottoposta a 33 cicli di PCR (per permettere l'amplificazione dei prodotti di estensione della telomerasi) alle seguenti temperature:

92° per 30 sec. (denaturazione dsDNA)

58° per 30 sec. (appaiamento dei primers alle sequenze complementari)

72° per 45 sec. (estensione dei primers)

- Step III

Alla fine della PCR, 10 µl di loading buffer vengono aggiunti in ogni tubo e 40 µl della miscela di reazione vengono caricati in un gel di acrilammide al 10%.

Il gel viene fatto correre a 400 V per circa 2 h per permettere la separazione dei prodotti della PCR.

Viene immerso in una soluzione di Sybr Green I, colorante fluorescente, per circa 30 min.

Le bande, relative ai prodotti telomerasici, vengono poi visualizzate tramite phosphor imager utilizzando un raggio laser a 450 nm.

2.2.3 SAGGIO TRAP-EZE

Il saggio consente di avere una maggiore sensibilità rispetto al TRAP classico pertanto è stato effettuato per i composti risultati più attivi .

Il kit utilizzato (Intergen TRAPeze Telomerase Detection Kit) comprende i seguenti reagenti: CHAPS Lysis Buffer 1 X (tampone di lisi utilizzato nella preparazione dell'estratto proteico dal pellet cellulare), TRAP Reaction Buffer 10 X (tampone utilizzato

per il saggio TRAP costituito da Tris-HCl 200 mM pH 8,3, MgCl₂ 15 mM, KCl 630 mM, Tween 20 0,5%, EGTA 10mM), dNTP Mix 50X (miscela di desossinucleotidi trifosfato dATP 2,5 mM, dGTP 2,5 mM, dGTP 2,5 mM, dCTP 2,5 mM), TS Primer, Primer Mix (costituita dal primer di ritorno RP, in grado di appaiarsi ai prodotti di elongazione del TS, e dai primer K1 e TSK1 utilizzati come controllo interno), PCR-Grade-Water (acqua deionizzata e priva di Proteasi, Dnasi e Rnasi), TSR8 (templato di controllo analogo al primer TS esteso di otto ripetizioni telomeriche).

Il saggio si articola in due passaggi: in un primo step avviene l'elongazione di un primer (TS) ad opera dell'enzima telomerasi; nel secondo step si ha l'amplificazione dei prodotti di elongazione dell'enzima mediante PCR, utilizzando un opportuno primer di ritorno (RP).

Ciascun mix di reazione contiene anche un controllo interno standard di 36 paia di basi. L'inserimento di questo controllo permette di quantificare meglio l'attività telomerasica e di identificare eventuali falsi-negativi dovuti alla presenza di inibitori della *Taq* polimerasi. Per ogni saggio effettuato sono stati inseriti nel gel alcuni controlli:

- controllo positivo: al posto della soluzione di composto sono stati aggiunti 2 µl di H₂O. Utilizzo l'estratto proteico ottenuto da una linea cellulare esprime l'enzima telomerasi.
- controllo TRS8: serve da templato di controllo. E' un primer analogo al TS, esteso di otto ripetizioni telomeriche.
- controllo HI (estratto inattivato dal calore): un campione viene trattato 10 min. a 85°C per verificare l'inattivazione dell'enzima da parte del calore.
- controllo negativo: utilizzo un composto in grado di inibire la telomerasi presente nell'estratto. Utilizzo l'estratto proteico ottenuto da una linea cellulare esprime l'enzima telomerasi.

Esistono due diverse modalità per la visualizzazione dei prodotti di reazione: l'utilizzo del radioisotopo radioattivo γ -³²P-ATP o di un colorante fluorescente (etidio bromuro o Sybr Green I)

2.2.3.1 Trap-eze radioattivo

Esecuzione del saggio:

- Step I: Marcatura del primer TS.

E' stata allestita una miscela di reazione così costituita:

composizione	Volume aggiunto
TS primer	10 µl
10X kinasi buffer	2 µl
T4 polinucleotide Kinasi (10u/ µl)	0,5 µl
γ - ³² P- ATP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml)	2,5 µl
H ₂ O	5 µl

La miscela è stata incubata a 37°C per 20 min. per permettere la marcatura del primer ad opera dell'enzima e poi trattata a 85°C per 5 min. per inattivare l'enzima.

• Step II: Allungamento del primer TS ad opera dell'enzima telomerasi

Per ciascun campione è stata preparata una miscela per un volume complessivo di 50 µl così composta:

composizione	volume aggiunto
Tampone per saggio TRAP10X	5 µl
Miscela di desossinucleotidi trifosfato50X	1 µl
³² P-TS primer	2 µl
TRAP primer mix	1 µl
<i>Taq</i> polimerasi (5u/ µl)	0,4 µl
Soluzione di composto da esaminare alla concentrazione voluta	1- 2 µl
Estratto cellulare (500 ng/ µl)	2 µl
H ₂ O	q.b.a 50 µl

La miscela di reazione viene sottoposta a 30 cicli di PCR (per permettere l'amplificazione dei prodotti di estensione della telomerasi) alle seguenti temperature:

94°C per 30 sec.

58°C per 30 sec.

• Step III: Analisi dei prodotti mediante PAGE.

Alla fine della PCR, 10 µl di loading buffer con blu di bromofenolo e xilene cianolo (0,25% di ciascuno in 50% glicerolo/ 50% TE pH 8.00) vengono aggiunti in ogni tubo e 30 µl della miscela di reazione vengono caricati in un gel di acrilammide al 10% (acrilammide/ bisacrilammide (19:1) in TBE 0,5X.

Il gel viene fatto correre a 400 V per circa 2 h per permettere la separazione dei prodotti della PCR.

Al termine della corsa il gel è stato seccato e utilizzato per impressionare una lastra fotografica per permettere la visualizzazione dei risultati.

2.2.3.2 Trap-eze con Sybr Green I

Questo saggio rappresenta una variante del protocollo riportato sopra; in questo caso non vengono utilizzati primer marcati radioattivamente. La visualizzazione dei prodotti di reazione viene fatta immergendo il gel in una soluzione di Sybr Green I, colorante fluorescente.

Per ciascun campione è stata preparata una miscela per un volume complessivo di 50 µl così composta:

composizione	volume aggiunto
Tampone per saggio TRAP10X	5 µl
Miscela di desossinucleotidi trifosfato50X	1 µl
TS primer	1 µl
TRAP primer mix	1 µl
<i>Taq</i> polimerasi (5u/ µl)	0,4 µl
Soluzione di composto da esaminare alla concentrazione voluta	1- 2 µl
Estratto cellulare (500 ng/ µl)	2 µl
H ₂ O	q.b.a 50 µl

La miscela di reazione viene sottoposta a 33 cicli di PCR (per permettere l'amplificazione dei prodotti di estensione della telomerasi) alle seguenti temperature:

94°C per 30 sec.

59°C per 30 sec.

72°C per 1 min.

• Step III

Analisi dei prodotti mediante PAGE e visualizzazione delle bande.

Alla fine della PCR, 10 µl di loading buffer con blu di bromofenolo e xilene cianolo (0,25% di ciascuno in 50% glicerolo/ 50% TE pH 8.00) vengono aggiunti in ogni tubo e 30 µl della miscela di reazione vengono caricati in un gel di acrilammide al 10% (acrilammide/bisacrilammide (19:1) in TBE 0,5X.

Il gel viene fatto correre a 400 V per circa 2 h per permettere la separazione dei prodotti della PCR.

Al termine della corsa il gel viene immerso in una soluzione di Sybr green I (SIGMA) in TBE 1 X

Si lascia agitare la soluzione per circa 1 h al riparo dalla luce e poi si visualizzano le bande al Phosphor Imager utilizzando un raggio laser a 450 nm.

2.2.4 GEL SHIFT

La capacità dei composti esaminati di indurre e/o stabilizzare la formazione di differenti strutture secondarie G-quadruplex (dimeriche e tetrameriche) è stata valutata tramite esperimenti di gel shift.

Sono state utilizzate le sequenze 1GGG, 2GGG, 4GGG e Pu27.

Il saggio prevede 4 step principali:

- Step I: Marcatura dell'oligonucleotide.

L'oligonucleotide è stato prima marcato in 5' con γ -ATP (^{32}P) e T4 Kinasi, assemblando una miscela di reazione corrispondente ad un volume complessivo di 50 μl così composta: oligonucleotide 0.2 μg , polynucleotide kinasi buffer 1 X, enzima T4 polynucleotide kinasi 10 U, γ -ATP (^{32}P) 375 μCi .

La miscela di reazione è stata incubata per 30 minuti a 37°C per permettere la marcatura.

- Step II: Estrazione dell'enzima

L'enzima T4 kinasi è stato estratto utilizzando una miscela costituita da fenolo-cloroformio- alcool isoamilico (25: 24: 1). Il DNA è stato quindi precipitato con 1 volume di acetato di sodio 3 M pH 5.2 e 2 volumi di etanolo assoluto. E' stato, infine, lavato con un volume di EtOH al 70%, seccato e ripreso nel tampone TRIS- HCl 10 mM pH 8.00, EDTA 1 mM pH 8.00.

- Step III: Incubazione dell'oligonucleotide con i composti

1000 cpm di oligonucleotide marcato sono stati aggiunti ad una soluzione 1 μM dello stesso oligonucleotide non marcato in TRIS- HCl 10 mM pH 8.00, EDTA 1 mM pH 8.00, KCl 100 mM, e incubati in presenza di concentrazioni crescenti di composto.

I campioni sono stati caricati in un gel di poliacrilammide al 16% in TBE 0,5 X e KCl 20 mM. Si è impostata la corsa a 200 V per circa 3 h e 30 min.

- Step IV: Visualizzazione bande mediante autoradiografia

Al termine della corsa il gel è stato seccato e utilizzato per impressionare una lastra fotografica per permettere la visualizzazione dei risultati.

2.2.5 CONVERSIONE DUPLEX- G- QUADRUPLEX

Il saggio consente di valutare la capacità dei composti di spostare l'equilibrio duplex- G-quadruplex (figura 2.2.1) verso la formazione della struttura a quartetti di guanine.

Si sono utilizzate le sequenze Pu27 duplex, 4GGG duplex e 4GGG* (parzialmente appaiata).

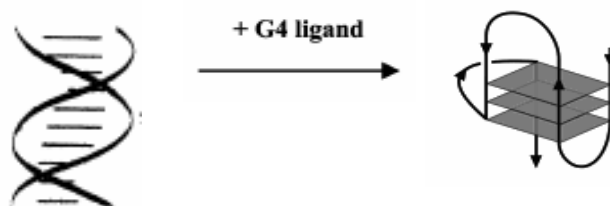


Figura 2.2.1. Equilibrio duplex-G-quadruplex

Dopo aver marcato l'oligonucleotide up in 5' con γ -ATP (^{32}P) e T4 Kinasi, l'enzima è stato rimosso e l'acido nucleico precipitato come precedentemente riportato. Sono stati, quindi, eseguiti altri tre passaggi.

- Step I: Annealing dell' oligonucleotide

E' stata allestita la seguente miscela di reazione per un volume finale di 20 μl in TRIS-HCl 10 mM pH 8.00, EDTA 1 mM pH 8.00: 1000 cpm di oligo c-myc up, oligo c-myc up freddo 1 μM , oligo c-myc down 1 μM .

Tale miscela è stata messa in acqua bollente per 5 min. e lasciata raffreddare lentamente tutta la notte per permettere l'annealing dell' oligo c-myc e del complementare.

La correttezza dell'appaiamento delle due catene è stata verificata tramite elettroforesi.

- Step II: Incubazione del duplex con i composti

In ogni tubo si è aggiunta una soluzione di KCl (concentrazione finale 1 mM) e concentrazioni crescenti di composto. Successivamente i campioni sono stati incubati per 24 h a 37° e caricati in un gel di poliacrilammide al 16% in TBE 0,5 X e KCl 20mM. Si è impostata la corsa a 200 V per circa 3 h e 30 min.

- Step III: Visualizzazione delle bande mediante autoradiografia

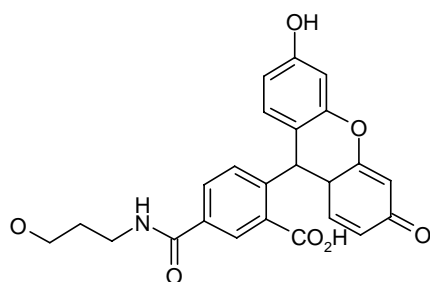
Al termine della corsa il gel è stato seccato e utilizzato per impressionare una lastra fotografica per permettere la visualizzazione dei risultati.

2.2.6 FLUORESCENCE MELTING

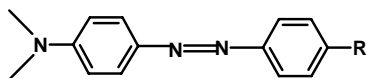
Questa metodica consente di valutare la capacità dei composti di stabilizzare la struttura G-quadruplex osservando la variazione della temperatura di melting (ΔT_m) dell'oligonucleotide utilizzato.

Un fluorimetro permette di seguire la variazione del segnale di fluorescenza di oligonucleotidi, marcati con fluoroforo e quencher, al variare della temperatura. Come fluoroforo si è utilizzata la fluoresceina (FAM) e come quencher il Dabcyl (figura 2.2.2).

Per questi esperimenti si è utilizzato un Light Cycler della Roche impostato alla lunghezza d'onda di eccitazione a 488 nm, mentre la fluorescenza è stata registrata a 520 nm.



FAM: Fluoresceina



Dabcyl



Figura 2.2.2. Strutture chimiche del fluoroforo FAM e del quencher Dabcyl utilizzati per la marcatura degli oligonucleotidi. Nella foto a destra è rappresentato lo strumento Light Cycler della Roche.

In ogni capillare è stata allestita una miscela, in un volume complessivo di 20 μ l, così costituita: oligonucleotide marcato con fluoroforo e quencher 0.25 μ M, soluzione di composto a concentrazioni crescenti (0.5- 20 μ M), tampone di reazione contenente LiOH 10 mM, KCl 50 mM, portato a pH 7.40 con H₃PO₄.

Ove richiesto, 0.25 μ M di catena complementare (4GGG down) sono stati aggiunti.

I capillari sono stati centrifugati per 5 sec alla velocità di 1000 rpm e successivamente introdotti nel rotore dello strumento. Ciascun campione è stato denaturato riscaldando a 95°C alla velocità di 0.1°C/ sec (melting veloce), mantenuto a 95°C per 5 min. prima di essere raffreddato a 30°C alla velocità di 0.1°C/ sec. (annealing veloce). Si è tenuto per 5 min. a 30°C prima di essere riscaldato nuovamente a 95°C alla velocità di 1°C/ min (melting lento) e raffreddato a 30°C a 1°C/min (annealing lento). In figura 2.2.3 è riportato il profilo di denaturazione termica utilizzato negli esperimenti.

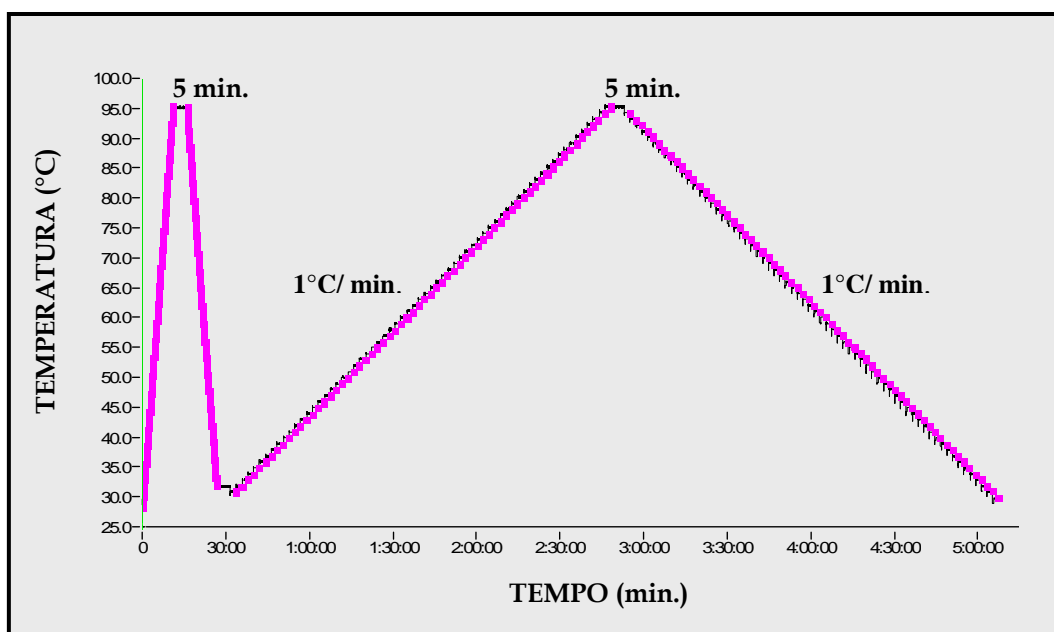


Figura 2.2.3. Esempio di profilo termico utilizzato negli esperimenti di fluorescence melting.

I valori di ΔT_m si sono ottenuti dalle derivate prime delle curve di melting utilizzando il software dello strumento.

2.2.7 DICROISMO CIRCOLARE

Attraverso dicroismo circolare si è potuto valutare il tipo di struttura formata da diverse sequenze oligonucleotidiche e la capacità dei composti di interagire e/o stabilizzare tali strutture.

Quando richiesto l'oligonucleotide in esame è stata preparata una soluzione 4 μ M in TE/KCl 0,1 M pH 8.0 e riscaldata 10 min. a 95°C; si è lasciato raffreddare lentamente a temperatura ambiente per tutta la notte prima dell'utilizzo.

Si sono registrati gli spettri da 230 a 350 nm a 25°C e a 85°C delle soluzioni di oligo alla concentrazione finale di 4 μ M in tampone TRIS- HCl 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM pH 8.00, in presenza e in assenza di composto.

Tutti gli spettri dicroici si sono ottenuti mediante 2 accumuli, utilizzando una velocità di scansione di 20 nm/min e un tempo di risposta di 4 sec.

Si sono registrati anche profili di melting ed annealing, riscaldando da 25°C a 85°C e raffreddando utilizzando un tempo di risposta di 8 sec. Tali profili sono stati acquisiti alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento.

Tutti gli spettri, infine, sono stati corretti sottraendo la linea base data dal solo tampone e i segnali sono stati riportati in ellitticità molare.

2.2.8 SAGGIO DI UNWINDING

Tale saggio consente di valutare lo svolgimento del DNA a doppia elica indotto dai composti testati e di stabilire la capacità delle molecole di intercalare nella doppia elica.

Per ogni campione è stata preparata una miscela di reazione avente un volume finale di 15 μ l contenente: composto in esame a concentrazioni diverse (0,05- 100 μ M), Topoisomerasi I 1U, pBR322 0,15 μ g in buffer 1X (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,05 mM DTT, 0,01 mM EDTA, 3 μ g/ml BSA).

I campioni sono stati incubati a 37°C per 24 h, successivamente l'enzima è stato bloccato aggiungendo alla miscela NaCl alla concentrazione finale di 0,2 M.

E' stata fatta una doppia estrazione utilizzando una miscela di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:24:1) per recuperare il DNA, tralasciando l'enzima.

Il tutto è stato caricato in un gel di agarosio all'1% in TAE 1X. E' stata impostata la corsa a 40 V per 3- 4 h.

Il gel è stato colorato con una soluzione di EtBr (0,5 µg/ml) e le bande di DNA sono state visualizzate mediante irradiazione con lampada UV a 302 nm, rilevando la fluorescenza emessa dal colorante intercalante a 590 nm.

2.2.9 SPETTROFOTOMETRIA UV- VIS

Gli spettri UV sono stati registrati con uno spettrofotometro UV/Vis LAMBDA20 PERKIN ELMER.

Gli spettri UV a 25°C degli analoghi del bisantrene sono stati registrati tampone TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 0,1 M.

- PARTE CELLULARE

2.2.10 COLTURE CELLULARI

Cellule di melanoma umano JR8 sono state seminate in fiasche da 25 cm², in RPMI-1640 con L-glutamina, addizionato di FBS (10%), gentamicina (0,01%) e incubate a 37°C, 5% CO₂ e 95% di umidità. Ogni 48 h è stato rimosso il terreno e sostituito con terreno fresco.

Sono state tenute in coltura per circa tre settimane prima di procedere all'estrazione dell'enzima telomerasi.

Cellule di melanoma umano SKMel5 e di cancro al colon LOVO (entrambe American Type Culture Collection) sono state seminate in fiasche da 25 cm² e incubate a 37°C, 5% CO₂ e 95% di umidità, in DMEM-F12 (Skme15), DMEM-F12 arricchito con vitamine (1%) (LOVO), addizionati di FBS (10%). Ogni 48 h è stato rimosso il terreno e sostituito con terreno fresco.

2.2.11 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO PROTEICO

Per la preparazione dell'estratto proteico utilizzato nel saggio TRAP, le cellule raccolte sono state risospese nel buffer di lisi CHAPS 1X (10mM TRIS-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0,1 mM benzamidina, 5mM β-mercaptoetanolo, 0,5% CHAPS, 10% glicerolo). La sospensione è stata incubata per 30 min. in ghiaccio; successivamente le cellule sono state centrifugate a 25000 rpm a 4° per 30 min. E' stato raccolto il surnatante e l'insieme di tutte le proteine presenti nell'estratto è stato successivamente quantificato e utilizzato per effettuare il saggio TRAP.

Per l'estrazione delle proteine utilizzate nelle misure di western blot procedo si è utilizzato un protocollo diverso: il pellet cellulare è stato risospeso in un buffer di lisi contenente detergenti, inibitori di fosfatasi e inibitori di proteasi (NP40 1%, BSA 1%, leupeptina, 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, AEBSF 1mM, PBS 1X). Si è lasciato incubare in ghiaccio per 40 min. Il tutto è stato centrifugato a 4°C, 12000 rpm per 1 min. Il surnatante è stato, poi recuperato.

2.2.12 DOSAGGIO DELLE PROTEINE MEDIANTE SAGGIO BRADFORD

Il saggio Bradford è un metodo colorimetrico di quantificazione delle proteine basato sull'uso di un colorante, il Comassie Brilliant Blue G-250 (CBBG), in grado di legarsi alle proteine a livello dei residui di Arginina, Triptofano, Tirosina, Istidina e Fenilalanina. CBBG si lega a questi amminoacidi in forma anionica con un'assorbanza massima registrabile a 595 nm (blu). Il saggio viene, dunque, condotto quantificando i complessi formati dal colorante con le proteine a tale lunghezza d'onda.

Per il calcolo della concentrazione proteica è stata realizzata un'opportuna curva di taratura, costruita utilizzando come proteina soluzioni a concentrazione nota di BSA (2- 4- 8-16 µg/µl).

2.2.13 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE A BREVE TERMINE

Sono state seminate 10^5 cellule in fiasche da 25cm² in 5 ml di terreno DMEM-F12 (per SKMe15) e DMEM-F12 arricchito con vitamine (1%) (per LOVO), addizionati di FBS (10%). Dopo 72 h è stato aggiunto il composto (tutti i bisantreni) alle concentrazioni finali di 2,5- 5- 10- 20 µM.

La semina è stata fatta in triplicato in modo da trattare le cellule per 24, 48 e 96 h.

Dopo ciascun tempo di trattamento è stata fatta la conta delle cellule presenti in ogni fiasca separando cellule adese e cellule presenti nel surnatante.

Dopo la conta le cellule adese sono state unite alle corrispondenti cellule del surnatante; infine i pellet sono stati lavati con PBS (Phosphate buffered solution) e congelati per la successiva estrazione delle proteine.

2.2.14 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE A MEDIO TERMINE

Le cellule sono state seminate in fiasche da 25cm² in 5 ml di terreno. Dopo 48 h è stato aggiunto il composto (**Bis 1,5**) alla concentrazione finale di 2,5 µM.

Ogni 48 h è stato rimosso il terreno, sono state recuperate le cellule del surnatante ed è stato reiterato il trattamento.

Dopo ciascun tempo di trattamento è stata fatta la conta delle cellule presenti in ogni fiasca separando cellule adese e cellule presenti nel surnatante.

Dopo la conta le cellule adese sono state raccolte; i pellet sono stati lavati con PBS e congelati per la successiva estrazione delle proteine.

2.2.15 VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA APOPTOTICA/ NECROTICA

Per ogni tempo di trattamento 2×10^5 cellule (del surnatante) sono state lavate con PBS e colorate con una soluzione di ioduro di propidio ($3 \mu\text{M}$).

Le cellule sono state successivamente analizzate mediante un microscopio a fluorescenza (banda di eccitazione 488 nm) utilizzando una lente d'ingrandimento 100 X ad immersione.

La percentuale di cellule apoptotiche è stata calcolata analizzando almeno 100 cellule per campione.

2.2.16 SAGGIO DELLA β - GALATTOSIDASI

Si tratta di un saggio colorimetrico ampiamente utilizzato per individuare le cellule senescenti all'interno di una popolazione cellulare. Si basa sull'espressione dell'enzima β -galattosidasi, un enzima idrolitico che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi tramite la rottura dei legami beta-glicosidici. Tale enzima risulta sovraespresso nelle cellule in fase di senescenza.

Il saggio è stato condotto in piastre da 6 pozzetti; in un primo momento è stato eliminato il terreno e le cellule sono state lavate con una soluzione di PBS 1X. Sono state poi trattate con una soluzione di fissaggio (Fixing Solution fornita dal kit) e lavate successivamente per due volte con PBS 1X. È stata aggiunta la soluzione per la visualizzazione dell'attività β -galattosidasica contenente il substrato per l'enzima X-gal (SA- β -gal-Detection Solution). Le cellule sono state così incubate a 37°C per tutta la notte, lavate con PBS 1X e analizzate al microscopio. Lo sviluppo di una colorazione bluastro, dovuta al prodotto di reazione ottenuto dall'idrolisi di X-gal ad opera dell'enzima β -galattosidasi, è un indice di senescenza.

2.2.17 CITOMETRIA DI FLUSSO

La citometria di flusso è una tecnica che permette lo studio e la caratterizzazione di popolazioni cellulari. Essa consente, in particolare, l'analisi quantitativa del contenuto di DNA e la discriminazione di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

1×10^6 cellule sono state raccolte e fissate in etanolo al 70%. Le cellule sono state trattate con una soluzione contenente ioduro di propidio 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, RNAsi 50 mg/ml e Nonidet P40 (NP40) 0,05 % per 30 min a 4°C. La fluorescenza emessa dalle cellule è stata registrata utilizzando un citometro di flusso Becton Dickinson.

2.2.18 WESTERN BLOTTING

Il western blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina presente in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. In generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliaccrilammide; successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa. Qui si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Negli esperimenti effettuati in questo lavoro, 40 μg di lisato proteico, dissolti in loading buffer 2 X (Tris pH 6.8 100 mM, SDS 4%, blu di bromofenolo 0,2%, glicerolo 20%, β -mercaptoetanolo 10%), sono stati caricati in un gel di poliaccrilammide-SDS al 15% e trasferiti su membrana di nitrocellulosa.

La membrana è stata successivamente saturata in MTP buffer (latte 5%, Tween-20 0,1% in PBS 1 X) e incubata per tutta la notte in presenza di anticorpo primario anti p16 e anti p21 diluito opportunamente in MTP buffer a 4°C. Sono stati effettuati 3 lavaggi in TP buffer (0,1% Tween-20, in PBS 1X). La membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario diluito in MTP buffer per circa 1h. Successivamente sono stati effettuati 3 lavaggi in TP buffer.

Gli anticorpi secondari si legano in modo specifico ai primari e sono coniugati all'enzima HRP (perossidasi di rafano). La presenza della proteina è rilevata in modo indiretto con il

sistema ECL che contiene luminolo (5-ammino, 1,2,3,4-tetraidroftalazin-1,4-dione), il quale è convertito dall'enzima perossidasi, in presenza di H_2O_2 , in un composto luminescente (l'acido 3-aminoftalico). La luminescenza viene rilevata mediante impressione di una lastra fotografica.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 ANTRACHINONI

3.2 PERILENI

3.3 BISANTRENI

3.1 ANTRACHINONI

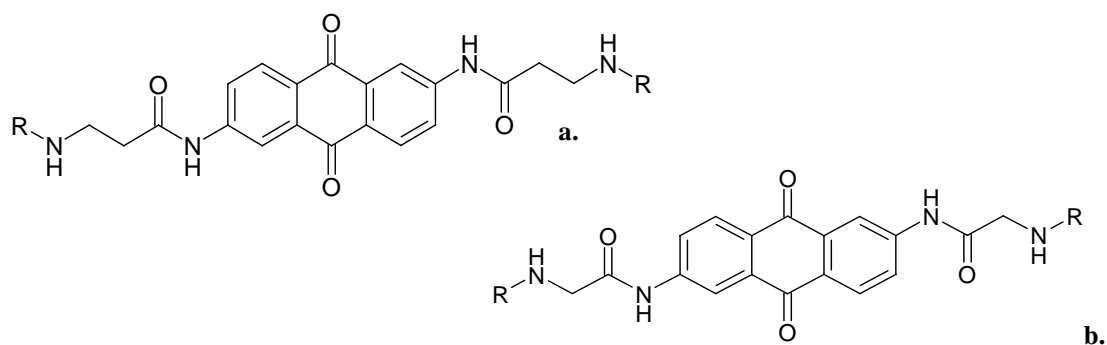
3.1.1 COMPOSTI ESAMINATI

Come riportato nella parte introduttiva di questo lavoro, gli antrachinoni rappresentano una categoria ben nota di composti in grado di stabilizzare strutture a quartetti di guanine. Studi precedenti hanno dimostrato come la posizione delle catene laterali influenzi la selettività nel riconoscimento di strutture diverse di DNA. Derivati aventi catene laterali in posizione 1 e 4, situate sullo stesso anello, presentano una maggiore affinità per il DNA a doppia elica, mentre molecole aventi catene posizionate su anelli diversi, in posizione 2 e 6 oppure 2 e 7 presentano una maggiore specificità nel riconoscimento e legame al DNA in forma triplex o G-quadruplex (Collier et al, **1988**; Agbandje et al, **1992**; Perry, Gowan et al, **1998**; Perry, Reszka et al, **1998**; Perry, Read et al, **1999**). La scelta di utilizzare catene laterali mono-, di- o tri- peptidiche deriva dalla riconosciuta capacità di sequenze proteiche di legare il DNA e, più in generale, gli acidi nucleici con modalità sequenza e/o struttura-specifica.

Si è ritenuto utile, quindi, unire un sistema di riconoscimento potenzialmente selettivo (peptide) ad un elemento in grado di favorire l'interazione con l'acido nucleico tramite un processo non selettivo di intercalazione (antrachinone).

Le catene amminoacidiche sono state unite al nucleo aromatico attraverso un gruppo ammidico $-NHCO-$. In studi precedenti erano state analizzate molecole aventi catene unite al nucleo antracenedionico con gruppi $-CONH-$, meno efficienti nell'inibire l'attività telomerasica e nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex. Questo ha suggerito come il gruppo $-NHCO-$, coplanare con quello antrachinonico (a differenza della forma inversa) fosse in grado di garantire una migliore capacità di interazione con le tetradi guaniniche costituenti i G-quadruplex (Zagotto et al, **2007**).

Tutti i composti analizzati presentano catene in cui l'attacco dei vari amminoacidi lascia il gruppo amminico terminale libero. In figura 3.3.1 sono rappresentate le strutture dei composti testati.



linker β Ala	
composto	R
AQ 1	- H-NH ₂
AQ 2	- Ala- NH ₂
AQ 3	- Lys- NH ₂
AQ 4	- Ala-Lys- NH ₂
AQ 5	- Gly-Lys- NH ₂
AQ 6	- Ala-Gly- NH ₂
AQ 7	- Ala-Ile- NH ₂
AQ 8	- Ala-Ala- NH ₂
AQ 9	- Ala-Leu- NH ₂
AQ 10	- Gly-Leu- NH ₂
AQ 11	- Gly-Val- NH ₂
AQ 12	- Gly-Ile- NH ₂
AQ 13	- Gly-Ala- NH ₂
AQ 14	- Val-Leu- NH ₂
AQ 15	- Val-Gly- NH ₂
AQ 16	- Val-Met- NH ₂

a1.

linker Gly	
composto	R
AQ 17	- H- NH ₂
AQ 18	- Ala- NH ₂
AQ 19	- Gly- NH ₂
AQ 20	- Lys- NH ₂
AQ 21	- Ala-Lys- NH ₂
AQ 22	- Gly-Lys- NH ₂

b1.

Figura 3.1.1 Strutture delle molecole testate. **a.** antrachinoni 2,6 disostituiti aventi linker β -Alanina. **b.** antrachinoni 2,6 disostituiti aventi linker Glicina. Nelle tabelle **a1.** e **b1.** è riportato l'elenco delle molecole esaminate aventi linker β Alanina e Glicina rispettivamente.

In Appendice sono riportate le strutture chimiche di tutti i derivati analizzati. Per semplicità, i composti verranno indicati in seguito con il nome dei residui amminoacidici in catena (senza il gruppo amminico terminale $-\text{NH}_2$).

3.1.2 SAGGI DI INIBIZIONE ENZIMATICA: *TAQ* POLIMERASI E TELOMERASI

Per ogni molecola presa in considerazione si è valutata la capacità di inibire l'attività dell'enzima telomerasi mediante saggio TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) *in vitro*. Tale saggio prevede un passaggio di amplificazione (mediante PCR) dei prodotti telomerasici ottenuti dall'elongazione di un opportuno primer che funge da substrato per l'enzima.

Al fine di valutare se i composti in esame sono in grado di interferire con il processo di amplificazione di un template di DNA, sono state preventivamente eseguite varie PCR in presenza di loro diverse concentrazioni.

Come template di DNA si è usato il plasmide pBR322, costituito da 4361 paia di basi; utilizzando i primer 3'GYRA e 5'GYRA, tramite PCR, ne viene amplificato un frammento di 161 paia di basi.

Nel caso in cui il composto in esame non interferisca con l'attività della *Taq* polimerasi si osserverà una netta banda di amplificato; in caso contrario tale banda non ci sarà o sarà di intensità inferiore rispetto al controllo positivo, in cui il DNA viene amplificato in assenza di composto (figura 3.1.2).

I composti, infatti, possono ostacolare l'attività di polimerizzazione dell'enzima attraverso due possibili meccanismi: andando ad interagire direttamente con l'enzima o mediante interazione con il DNA. Tutti i derivati qui esaminati, infatti, sono dei potenziali intercalanti in grado di legare più o meno efficacemente catene a doppia elica di DNA. Tale evento può ridurre l'accessibilità dell'enzima al substrato e, quindi, causare una marcata riduzione dell'efficienza della reazione di PCR.

Questo saggio non consente di stabilire il meccanismo con cui i composti esaminati interferiscono con l'attività enzimatica ma permette di individuare l'intervallo di concentrazioni in cui lavorare nel saggio TRAP, al fine di evitare falsi positivi.

Come controllo negativo in questo tipo di esperimento è stato utilizzato il mitoxantrone. È noto, infatti, come questo farmaco sia in grado di intercalare efficacemente nel DNA a doppio filamento. Sperimentalmente si osserva come questo comporti un blocco completo della reazione di amplificazione, già alla concentrazione di 10 μ M.

Un esempio di tale saggio enzimatico è riportato in figura 3.1.2.

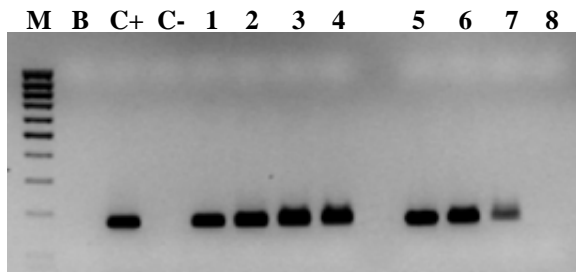


Figura 3.1.2. Gel di agarosio al 2% in TBE 0.5 X. Le bande si riferiscono ai prodotti di amplificazione relativi al saggio di inibizione della *Taq* polimerasi effettuato.

M: marker a basso peso molecolare (50 bp);
B: bianco (in assenza di plasmide);
C+: controllo positivo (in assenza di composto);
C-: controllo negativo (mitoxantrone 10 μ M);
1-2-3-4: composto **AQ18** (5-10-20-40 μ M);
5-6-7-8: composto **AQ21** (5-10-20-40 μ M)

Il gel riportato mette in evidenza come il composto **AQ21** inibisca l'enzima *Taq* polimerasi a partire da una concentrazione di 40 μ M: si può osservare, infatti, come in corrispondenza di tale concentrazione la banda relativa all'amplificato risulti assente. Il composto **AQ18**, invece, non inibisce l'enzima *Taq* polimerasi alle concentrazioni testate.

L'attività di inibizione della telomerasi per ogni derivato è stata verificata a concentrazioni inferiori a quelle che inducono inibizione della *Taq* polimerasi e comunque fino ad un massimo di 40 μ M.

Il protocollo seguito prevede che in una prima fase l'estratto, contenente l'enzima, venga incubato a temperatura ambiente in presenza di un oligonucleotide (primer TS) in grado di fungere da substrato per l'enzima stesso che viene, quindi, allungato. In un secondo passaggio i prodotti ottenuti vengono amplificati tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) in presenza di uno specifico primer di ritorno (ACX) (figura 3.1.3).

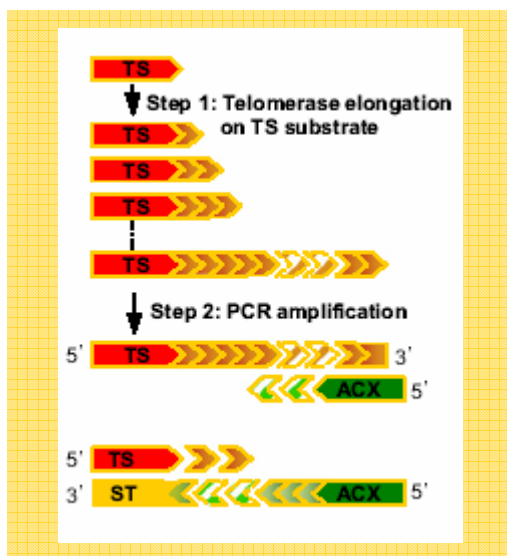


Figura 3.1.3. Schema del saggio TRAP

Aggiungendo alla miscela di reazione, varie soluzioni a concentrazioni diverse dei composti da esaminare, è possibile valutare se questi presentano o meno attività antitelomerasica.

In figura 3.1.4 è riportato il gel relativo ai composti 2,6 β Ala- Gly- Ile (**AQ12**) e 2,6 β Ala- Gly- Lys (**AQ5**).

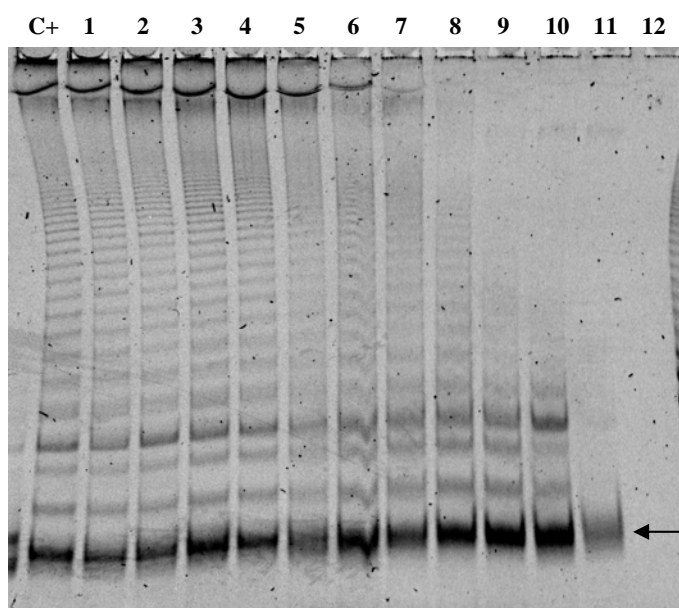


Figura 3.1.4. Gel di acrilammide 10% in TBE 0.5 X. Le bande si riferiscono ai prodotti di elongazione dell'enzima telomerasi, amplificati mediante PCR. La banda a più basso peso molecolare rappresenta il primer TS aggiunto di 4 sequenze telomeriche e quindi ad un frammento di 50 paia di basi.
C+: controllo positivo (senza composto)
1-2-3-4-5-6: composto **AQ12** (1.25-2.5-5-10-20-40 μ M)
7-8-9-10-11-12: composto **AQ5** (1.25-2.5-5-10-20-40 μ M)

← 50 bp

In assenza di inibitore (C+), è possibile osservare nel gel la presenza dei caratteristici “ladders” relativi ai prodotti telomerasici che differiscono tra loro per 6 paia di basi, corrispondenti ad una sequenza telomerica TTAGGG. La banda a più basso peso molecolare rappresenta il primer TS aggiunto di quattro sequenze telomeriche, quindi ad un frammento di 50 paia di basi. L’aggiunta di queste quattro sequenze è la minima richiesta affinché sia possibile il ripiegamento del DNA telomerico a formare i quartetti di guanina e affinché si abbia un efficace appaiamento del primer di ritorno nella reazione di amplificazione dei prodotti telomerasica.

La presenza di un composto in grado di stabilizzare strutture a quartetti di guanina impedisce alla telomerasi di aggiungere ulteriori sequenze telomeriche al primer-substrato, poiché incapace di legarsi; questo si traduce nel gel, nella scomparsa o, comunque, nella diminuzione di intensità del tipico “ladder”.

Nell' esempio riportato si può osservare come per il composto **AQ5** ciò inizi a manifestarsi alla concentrazione di 2,5 μM ; il composto **AQ12**, invece, non sembra in grado di inibire l'attività telomerica fino alla concentrazione di 40 μM .

Nella tabella sottostante sono riportati i valori di IC_{50} per *Taq* polimerasi e telomerasi ottenuti dai saggi enzimatici per ogni molecola testata.

composto	IC_{50} <i>Taq</i> polimerasi (μM)	IC_{50} telomerasi (μM)
AQ 1	>40	1.5 \pm 0.3
AQ 2	>40	n.o
AQ 3	10 \pm 3	0.8 \pm 0.1
AQ 4	>40	10 \pm 3
AQ 5	>40	5 \pm 1
AQ 6	>40	n.o
AQ 7	>40	n.o
AQ 8	>40	n.o
AQ 9	>40	n.o
AQ 10	>40	n.o
AQ 11	>40	n.o
AQ 12	>40	n.o
AQ 13	>40	n.o
AQ 14	>40	n.o
AQ 15	>40	n.o
AQ 16	>40	n.o

a.

composto	IC_{50} <i>Taq</i> polimerasi (μM)	IC_{50} telomerasi (μM)
AQ 17	>40	25 \pm 5
AQ 18	>40	25 \pm 5
AQ 19	>40	5 \pm 1
AQ 20	5 \pm 1	0.8 \pm 1
AQ 21	40 \pm 5	2.5 \pm 0.5
AQ 22	20 \pm 5	1.25 \pm 0.3

b.

Tabella 3.1.1. IC₅₀ per gli enzimi *Taq* polimerasi e telomerasi per le molecole aventi linker βAlanina (a.) e Glicina (b.)

Per quanto riguarda l'inibizione della *Taq* polimerasi si può notare come tutti i derivati in esame non risultino particolarmente attivi alle concentrazioni testate. Fanno eccezione tutti gli antrachinoni funzionalizzati con una Lisina, per i quali si sono ricavati valori di IC₅₀ compresi tra 5 e 10 μM.

Confrontando i derivati aventi catene laterali costituite dal solo linker (**AQ1**, 2,6 βAla e **AQ17**, 2,6 Gly) appare evidente come l'attività di inibizione della telomerasi dei due composti risulti assai diversa: il derivato con linker βAlanina presenta chiaramente una maggiore efficienza nell'inibire la telomerasi (IC₅₀ pari a 1.5 μM).

I composti aventi linker βAlanina presentano catene laterali che differiscono dai derivati con il linker Glicina solo per un gruppo metilenico: sono quindi più lunghe e ciò può favorire l'interazione con il DNA per la loro maggiore flessibilità.

L'aggiunta di alcuni amminoacidi al linker βAla porta sempre, tuttavia, ad una scomparsa di attività nei confronti della telomerasi (composti **AQ6 -16**), tranne nei casi in cui è presente una Lisina terminale (composti **AQ3**, **AQ4**, **AQ5**). In particolare, il derivato **AQ3**, avente l'amminoacido Lisina direttamente legato al linker risulta il più attivo di questa serie con un IC₅₀ di 0.8 μM. L'inserimento di una Glicina tra il linker e l'amminoacido Lisina (composto **AQ5**) determina una diminuzione dell'attività (IC₅₀ pari a 5 μM), che viene ulteriormente ridotta se al posto della Glicina viene inserita una Alanina (composto **AQ4**, IC₅₀ 10 μM). Anche la presenza di amminoacidi ramificati (Val, Leu, Ile) riduce le proprietà inibitorie nei confronti della telomerasi rispetto al derivato antrachinonico con il solo linker (**AQ1**).

L'andamento osservato per le molecole aventi linker Glicina è del tutto analogo a quello riscontrato con gli antrachinoni aventi linker β Alanina (figura 3.1.5). L'unica differenza rilevante si riscontra con il composto di riferimento di questa famiglia (**AQ17**), il quale presenta una debole attività se paragonato all'analogo avente linker βAla.

In conclusione, sebbene i composti di riferimento delle due serie mostrino un comportamento assai diverso, è evidente come i derivati più attivi nell'inibire l'enzima

telomerasi risultino quelli aventi in catena laterale il linker, β Alanina o Glicina, seguito direttamente dall'amminoacido Lisina (composti **AQ3** e **AQ20**) con IC_{50} di $0.8 \mu\text{M}$ (figura 3.1.5).

Tale dato suggerisce come la presenza di gruppi ionizzabili positivamente presenti in catena laterale sia un requisito fondamentale anche per garantire un'efficace attività inibitoria. Visto che l'acido nucleico rappresenta il bersaglio dell'enzima si può ipotizzare l'esistenza di una correlazione tra legame al DNA e attività. Per confermare tale ipotesi, quindi, si è valutata la capacità dei composti di interagire con strutture a quartetti di guanine e di stabilizzarle.

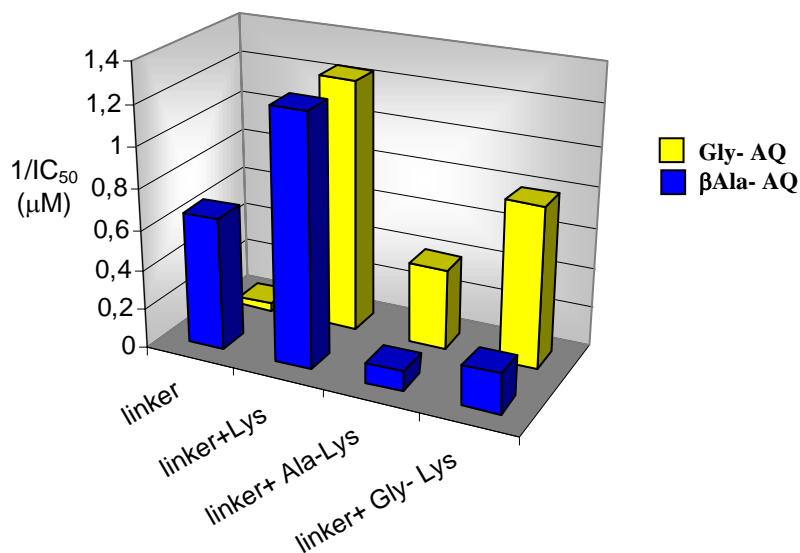


Figura 3.1.5. Nel grafico sono riportati i valori di potenza, in termini di $1/IC_{50}$ per l'enzima telomerasi per le principali molecole testate. In azzurro sono rappresentati gli antrachinoni aventi linker β Alanina, in giallo quelli aventi linker Glicina.

3.1.3 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX E SELETTIVITA' G-QUADRUPLEX- DUPLEX

I dati raccolti dai saggi enzimatici effettuati hanno permesso di delineare alcune correlazioni tra struttura delle catene laterali e inibizione degli enzimi telomerasi e *Taq* polimerasi.

Sono stati, dunque, presi in esame i composti risultati più interessanti ed aventi una maggiore selettività per l'inibizione della telomerasi e si è verificato se l'attività dimostrata fosse effettivamente correlabile alla capacità di stabilizzare la struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza telomerica. Per questo sono stati condotti studi di interazione ligando- DNA utilizzando sequenze correlate a quelle del DNA telomeric.

3.1.3.1 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex

Studi di denaturazione termica vengono spesso utilizzati per esaminare la stabilità delle strutture degli acidi nucleici e le loro interazioni con molecole leganti. Quando una soluzione contenente un acido nucleico in forma strutturata viene riscaldata, si raggiunge ad un certo punto una temperatura alla quale l'acido nucleico si destruttura. La temperatura di melting (T_m) è la temperatura in corrispondenza della quale sono in equilibrio il 50% della forma non strutturata e il 50% della forma strutturata; tale parametro rappresenta un utile indice della stabilità della struttura secondaria assunta da un determinato oligonucleotide e può, quindi, essere utilizzato anche per caratterizzare le strutture G-quadruplex.

Se si confrontano i valori di T_m di un oligonucleotide strutturato, ottenuti in assenza e in presenza di composti in grado di legarsi ad esso, è possibile valutare la stabilizzazione prodotta dal legante.

Per seguire la denaturazione termica del DNA esistono numerose tecniche. In questo lavoro di tesi le curve di melting sono state ottenute utilizzando un oligonucleotide contenente la sequenza telomerica umana marcato in 3' con un fluoroforo (FAM) e in 5' con un quencher (Dabcyl).

Quando l'oligonucleotide è ripiegato a formare una struttura G-quadruplex intramolecolare, fluoroforo e quencher si trovano in stretta vicinanza quindi il segnale di

fluorescenza viene smorzato; quando, per effetto della temperatura, l'oligonucleotide si destruttura, fluoroforo e quencher si allontanano con conseguente incremento della fluorescenza (figura 3.1.6 b).

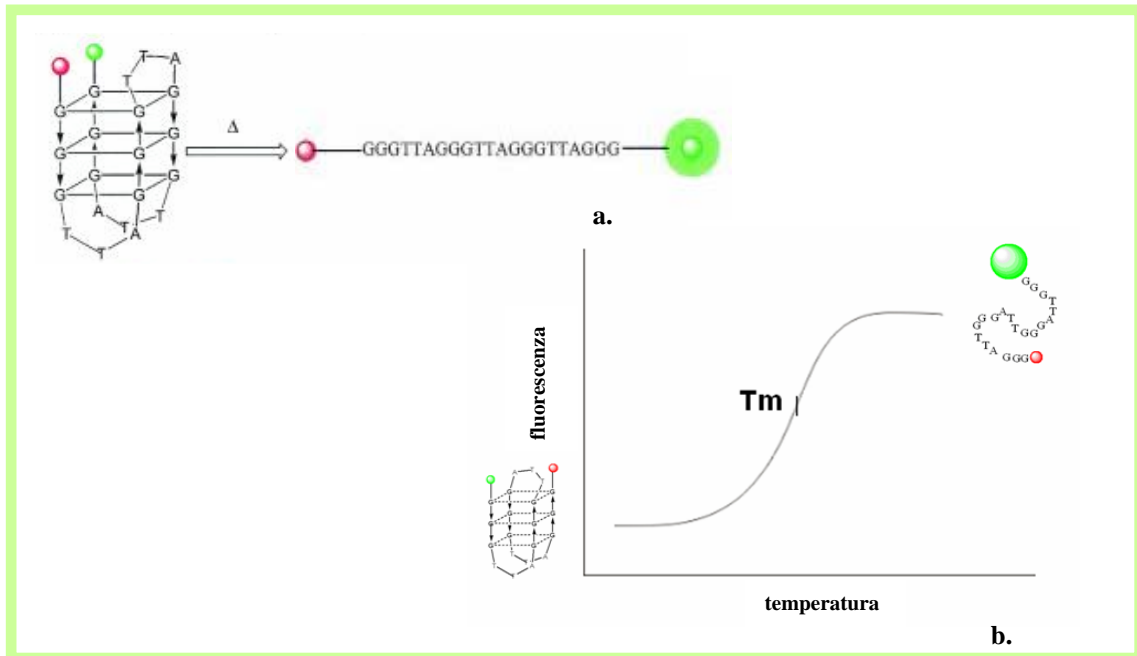


Figura 3.1.6. a. Rappresentazione schematica dell'oligonucleotide, marcato con fluoroforo e quencher, disegnato per studiare la denaturazione termica della struttura G-quadruplex. La struttura G-quadruplex rappresentata è solo una delle possibili conformazioni che la sequenza può adottare. b. Variazione della fluorescenza in funzione della temperatura durante la denaturazione termica della struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide 4GGG.

La presenza di un legante per il G-quadruplex determinerà uno spostamento della curva di denaturazione verso temperature maggiori, indice di stabilizzazione da parte del composto della struttura secondaria assunta dall'oligonucleotide.

Mediante studi di fluorescence melting si è, quindi, valutata la capacità dei derivati antrachinonici di stabilizzare la struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide 4GGG.

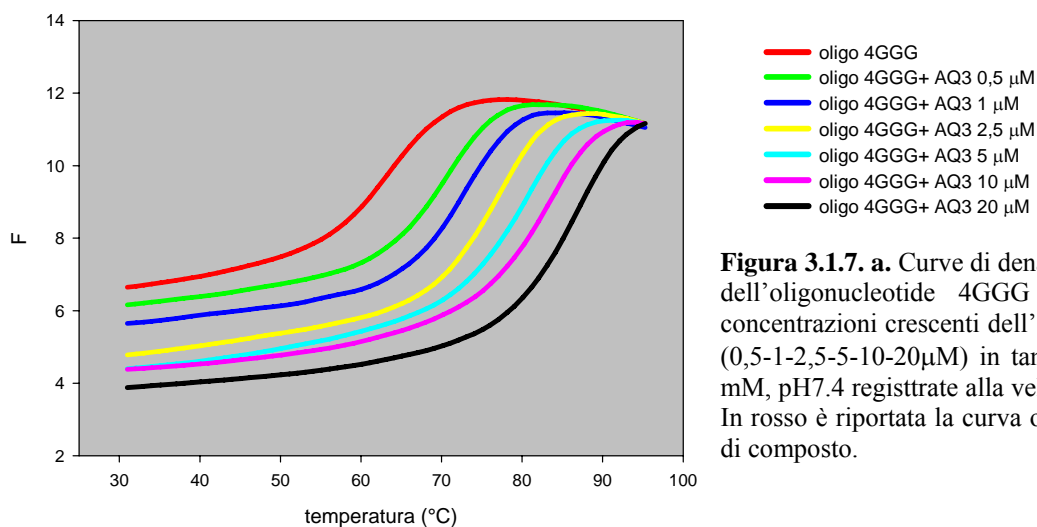


Figura 3.1.7. a. Curve di denaturazione termica dell'oligonucleotide 4GGG in presenza di concentrazioni crescenti dell'antrachinone AQ3 (0,5-1-2,5-5-10-20 μ M) in tampone LP/KCl 50 mM, pH7.4 registrate alla velocità di 1°C/min.. In rosso è riportata la curva ottenuta in assenza di composto.

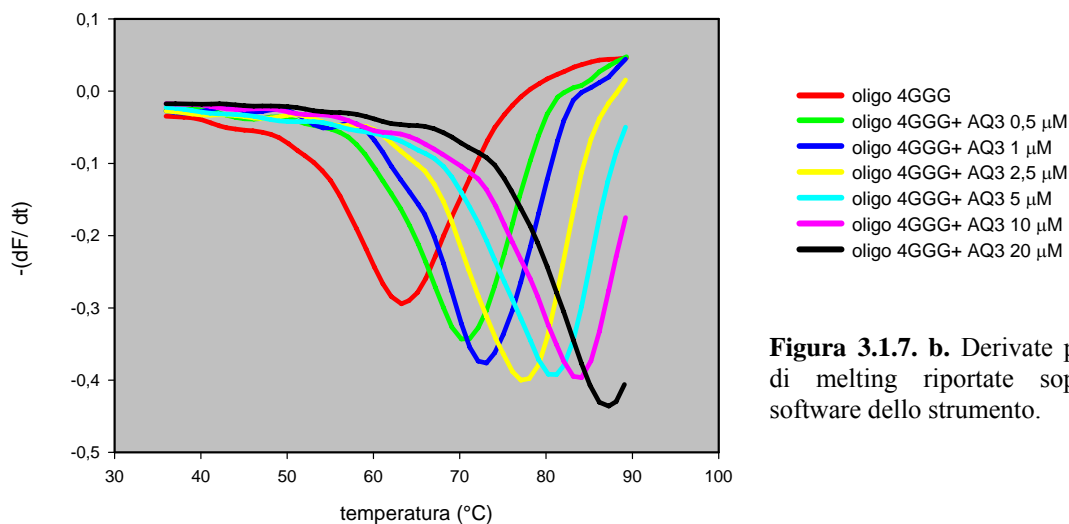


Figura 3.1.7. b. Derivate prime delle curve di melting riportate sopra, fornite dal software dello strumento.

Le misure sono state fatte in un tampone contenente K^+ alla concentrazione di 50 mM. Per poter studiare al meglio l'interazione oligonucleotide- composto e seguire la stabilizzazione della struttura G-quadruplex indotta dalle molecole, è necessario che la temperatura di melting del solo oligonucleotide sia intorno ai 55°. Temperature minori non sarebbero, infatti, in grado di garantire un folding completo dell'oligonucleotide a basse temperature mentre temperature più alte non consentirebbero di avere a disposizione un intervallo di temperature sufficientemente ampio da analizzare sia leganti deboli che leganti molto potenti, in grado di innalzare la temperatura di melting al di sopra di 90°C (De Cian, Guittat et al, 2007).

Utilizzando concentrazioni di K^+ maggiori di 50 mM la temperatura di melting dell'oligonucleotide risulta troppo elevata per consentire un'adeguata analisi delle molecole. Per questo si è scelta la concentrazione di 50 mM, alla quale l'oligonucleotide presenta un valore di T_m di 57,19 °C.

In ogni esperimento eseguito sono state confrontate le curve di melting ottenute in assenza di ligando con quelle ottenute in presenza di concentrazioni crescenti dei diversi composti. Un esempio è riportato in figura 3.1.7 dove sono riportate le curve di denaturazione termica dell'oligonucleotide in presenza del derivato antrachinonico **AQ3** (2,6 β Ala-Lys) e le rispettive derivate prime.

I risultati sono stati poi espressi in termini di ΔT_m , calcolati in base alla T_m dell'oligonucleotide in assenza di composto. Questo parametro permette di definire, da una parte, l'affinità del composto per il G-quadruplex rispetto al DNA non foldato, dall'altra, la stabilità del complesso risultante.

In figura 3.1.8 sono riportati i grafici relativi alle variazioni della temperatura di melting dell'oligo 4GGG in funzione della concentrazione per ogni composto studiato. Le molecole sono state suddivise in base al linker presente in catena laterale.

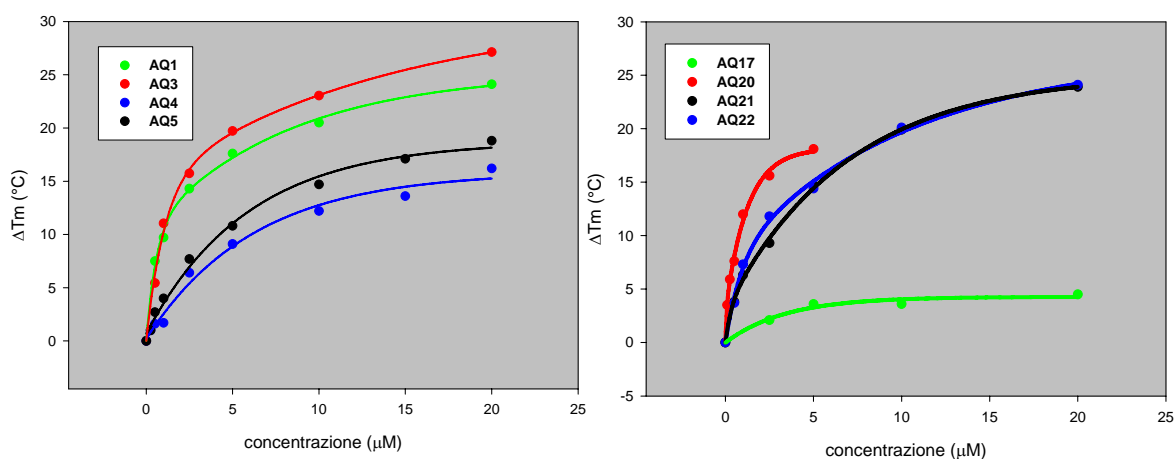


Figura 3.1.8. Effetto della concentrazione di legante sulla variazione della temperatura di melting dell'oligonucleotide 4GGG. Le curve riportate nel grafico a sinistra si riferiscono alle strutture aventi linker β Alanina, le curve riportate nel grafico di destra ai composti aventi linker Glicina. Le misure sono state fatte in tampone LP/KCl 50 mM, pH 7.4.

Se si confrontano i derivati caratterizzati dalla presenza del solo linker in catena laterale, **AQ1** (2,6 βAla) e **AQ17** (2,6 Gly), appare evidente come l'attività risulti molto diversa; **AQ1** presenta una buona efficienza nella stabilizzazione della struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza 4GGG, mentre **AQ17** mostra una debole attività: a 10 μM la variazione della temperatura di melting dell'oligonucleotide indotta dal composto **AQ1** è di 18.1 °C, più di 5 volte quella indotta dall'omologo **AQ17** alla stessa concentrazione. I derivati aventi, oltre al linker, l'amminoacido Lisina in catena (derivati **AQ3** e **AQ20**) mostrano una capacità di stabilizzazione della struttura G-quadruplex piuttosto simile. L'allungamento delle catene laterali attraverso l'inserimento di una Glicina o una Alanina in seconda posizione (derivati **AQ4** e **AQ5**, **AQ21** e **AQ22**), comporta un calo di attività, più marcato per i composti aventi linker β-Alanina (figura 3.1.8).

I risultati raccolti dagli esperimenti di fluorescence melting sembrano confermare quanto osservato dai saggi TRAP effettuati: se si confronta la capacità di inibizione dell'enzima telomerasi dei vari derivati (tabella 3.1.1), si può notare come gli antrachinoni più efficaci siano anche quelli in grado di stabilizzare in maniera più efficace la struttura G-quadruplex.

Si può ipotizzare una relazione tra efficienza di stabilizzazione di strutture G-4 e costante di affinità. Studi termodinamici rivelano come tali parametri siano regolati da questo tipo di relazione (Crothers, **1971**; McGhee, **1976**):

$$\Delta T_m/T_m = T^\circ (R/n\Delta H_{wc})\ln(1+K\alpha)$$

dove, T° rappresenta la temperatura di melting del solo DNA, T_m la temperatura di melting in presenza di ligando in condizioni di saturazione, ΔH_{wc} l'entalpia del processo di melting del DNA, R la costante dei gas, K la costante di binding del ligando alla temperatura di melting e α l'attività libera del farmaco. Nel caso in cui l'inibizione dell'enzima sia dovuta all'interazione con il DNA telomerico, l' IC_{50} per l'enzima telomerasi sarà inversamente correlata alla quantità di G-quadruplex formato, il quale, a sua volta, risulta proporzionale alla costante di legame del ligando; si può ipotizzare che se, come ragionevole, $K \gg 1$ esiste un rapporto di proporzionalità diretta tra $\Delta T_m/T_m$ e IC_{50} .

Ciò risulta valido solo se l'interazione del ligando interessa l'acido nucleico in forma strutturata (non in forma lineare).

Per valutare tale eventualità sono stati rapportati i valori di $\ln(IC_{50})$ ottenuti dai saggi TRAP ai valori di $\Delta T_m/T_m$ estrapolati dalle misure di denaturazione termica mediante fluorescence melting (figura 3.1.9). Come si osserva esiste una buona correlazione tra i due set di dati per tutti i derivati analizzati.

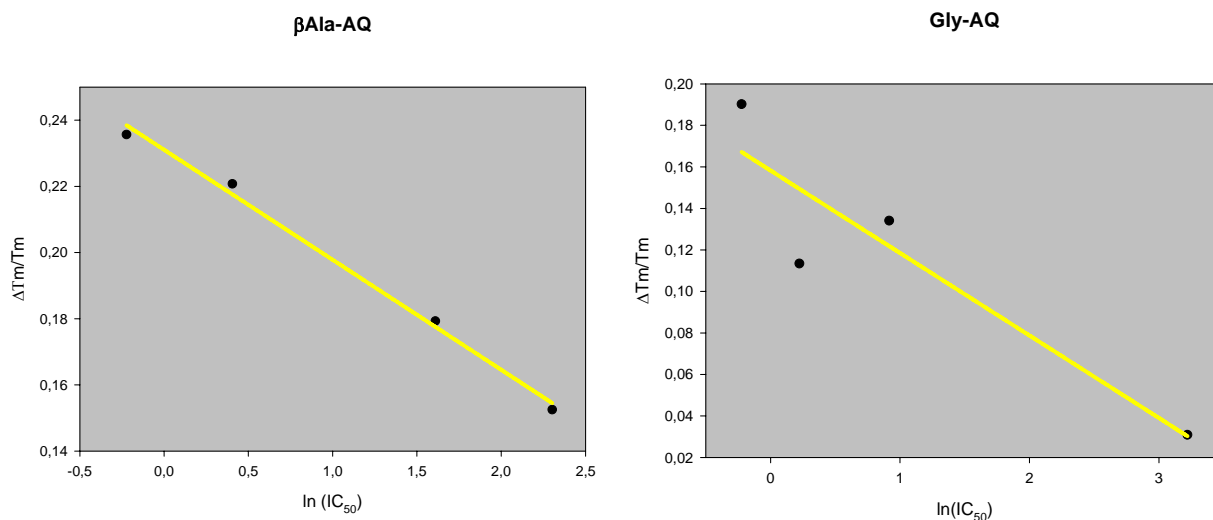


Figura 3.1.9. Correlazione tra i risultati ottenuti dagli esperimenti di fluorescence melting e il saggio TRAP. I valori di $\ln(IC_{50})$ per la telomerasi sono stati confrontati con il rapporto $\Delta T_m/T_m$. Per le molecole aventi linker βAlanina i valori di ΔT_m sono stati calcolati alla concentrazione di 10 μM , per le molecole aventi linker Glicina alla concentrazione di 2,5 μM . Tutte le misure sono state effettuate in tampone LP/KCl 50 mM, pH 7,4.

Questo conferma che l'inibizione della telomerasi osservata è effettivamente correlata alla capacità di stabilizzazione, da parte dei composti, della struttura G-quadruplex.

Nel saggio TRAP, in particolare, la stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine interesserà l'oligonucleotide TS allungato, utilizzato come template. La formazione di strutture G-quadruplex determinerà quindi l'incapacità dell'enzima telomerasi di proseguire nella fase di allungamento della catena di acido nucleico.

Ancora una volta, dall'analisi dei dati emerge come in presenza dell'amminoacido Lisina (in catena laterale) (derivati **AQ3** e **AQ20**) si abbia una maggiore efficacia in termini di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine. Essendo tale amminoacido caratterizzato dalla presenza di due gruppi amminici protonabili, i dati ottenuti suggeriscono come interazioni di tipo elettrostatico contribuiscano alla costante di legame. Tuttavia, ciò

potrebbe essere indipendente dal tipo di struttura assunta dall'acido nucleico. Per questo motivo si è passati all'analisi della selettività di riconoscimento e legame tra strutture G-quadruplex e duplex.

3.1.3.2 Selettività G-quadruplex- duplex

Nonostante le estremità telomeriche siano a singolo filamento, una larga porzione del telomero risulta essere a doppia catena. Nelle cellule, inoltre, sequenze ricche in residui guaninici si presentano in forma duplex, appaiate alle sequenze complementari ricche in citosina. La formazione del G-quadruplex è pertanto in competizione con quella della forma a doppia elica derivante da appaiamenti di tipo Watson-Crick tra le due catene complementari; tale equilibrio risulta regolato dalla stabilità delle rispettive strutture (Risitano et al, 2003).

Per questo, mediante esperimenti di fluorescence melting, si è deciso di comparare la stabilità del DNA a doppia elica e della struttura G-quadruplex intramolecolare in presenza degli antrachinoni in esame. A tal fine è stato ripetuto l'esperimento di melting aggiungendo alla miscela di reazione una quantità stechiometrica del filamento complementare (non marcato) alla sequenza 4GGG (marchata con fluoroforo e quencher). In questo modo vi sarà un equilibrio coinvolgente tre specie diverse: la forma duplex, l'oligonucleotide non strutturato (random coil) e la struttura G-quadruplex (figura 3.1.10).

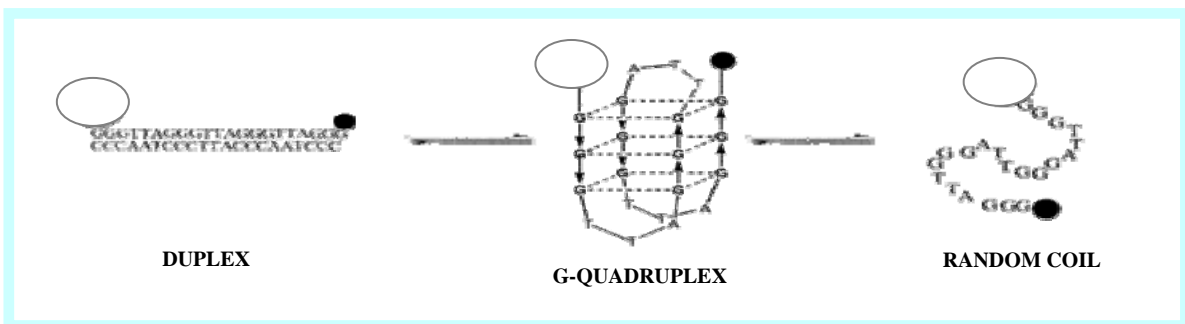


Figura 3.1.10. Rappresentazione schematica del ripiegamento dell'oligonucleotide 4GGG a formare un G-quadruplex intramolecolare e appaiamento con la sequenza complementare. Fluoroforo e quencher sono rappresentati dal pallino bianco e nero rispettivamente. La struttura G-quadruplex indicata è solo una delle possibili strutture che si possono formare.

L'equilibrio presente in soluzione tra le diverse forme può essere modulato sia da un incremento della concentrazione della catena complementare (che sposterà l'equilibrio verso la doppia catena) sia dall'introduzione di composti in grado di interagire con le strutture secondarie a quartetti di guanine, stabilizzandole (spostando in questo caso l'equilibrio verso la forma G-quadruplex).

Analizzando il segnale di fluorescenza dell'oligonucleotide all'aumentare della temperatura si osserverà un elevato valore di fluorescenza iniziale corrispondente all'oligonucleotide in forma duplex; tale valore risulta più elevato rispetto a quello corrispondente al singolo filamento non strutturato poiché la doppia catena presenta una maggiore rigidità, disponendo fluoroforo e quencher alle due estremità opposte della struttura (figura 3.1.11).

Nella struttura G-quadruplex, invece, fluoroforo e quencher dell'oligonucleotide vengono a trovarsi molto vicini tra loro, di conseguenza il segnale di fluorescenza sarà smorzato. La forma random coil presenterà un valore di fluorescenza intermedio alle due forme citate sopra (figura 3.1.11).

I segnali di fluorescenza delle diverse strutture in equilibrio seguiranno quindi il seguente ordine: duplex > DNA random coil >> G-quadruplex (Li et al, 2002; Risitano et al, 2003). Ognuna di queste strutture sarà caratterizzata da una propria T_m .

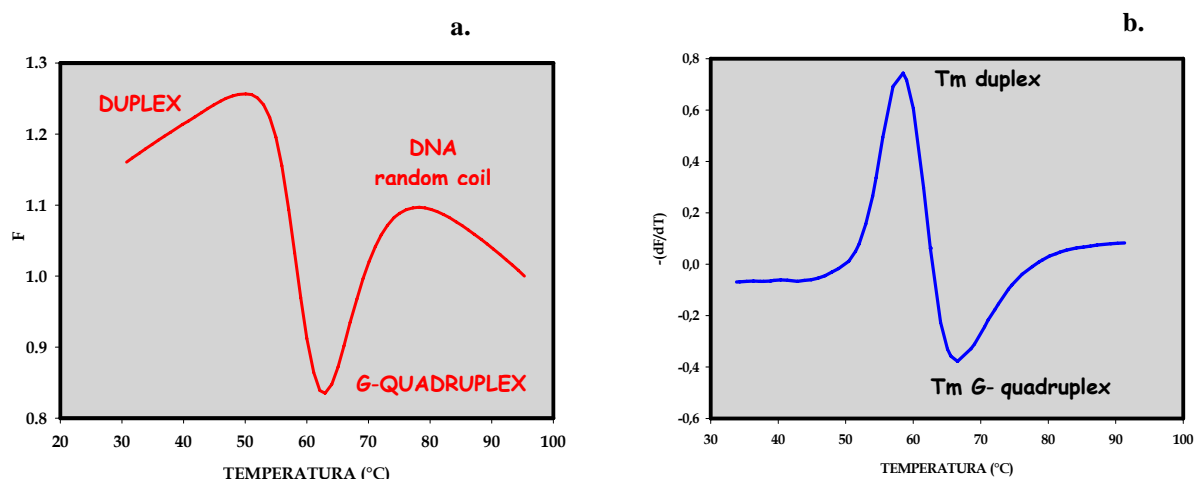
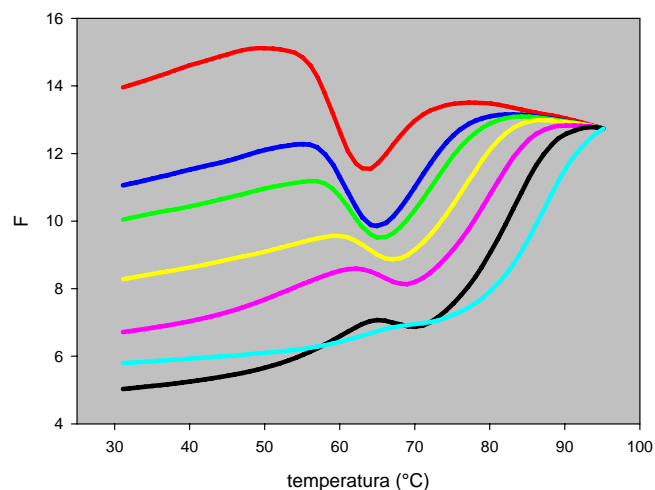


Figura 3.1.11. a. Variazione dell'emissione di fluorescenza in funzione della temperatura nel corso della denaturazione in co- presenza della struttura duplex e quadruplex. **b.** Derivata prima della curva di denaturazione.

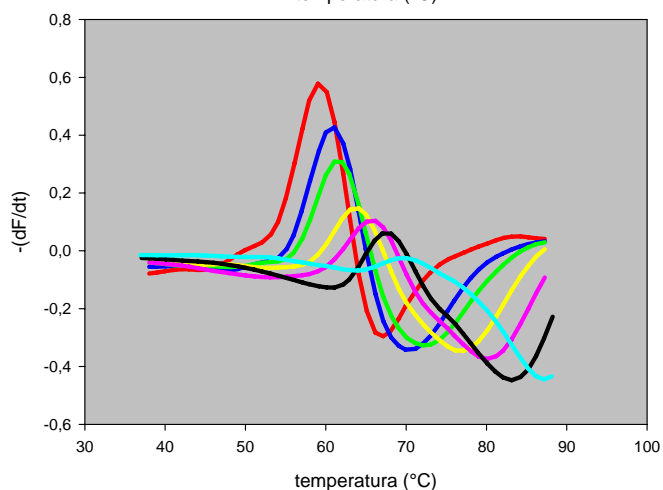
Anche in questo caso, in ogni esperimento eseguito sono state confrontate le curve di melting ottenute in assenza di ligando con quelle ottenute in presenza di concentrazioni

crescenti dei diversi composti. In figura 3.1.12 sono riportate le curve di denaturazione termica e le rispettive derivate relative al composto 2,6 Gly-Ala-Lys (AQ21).



- oligo 4GGG duplex
- 4GGG duplex + AQ21 0,5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 1 μM
- 4GGG duplex + AQ21 2,5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 10 μM
- 4GGG duplex + AQ21 20 μM

Figura 3.1.12. a. Curve di denaturazione termica dell'oligonucleotide 4GGG duplex in presenza di concentrazioni crescenti dell'antrachinone AQ21 (0,5-1-2,5-5-10-20 μM) in tampone LP/KCl 50 mM, pH7.4. In rosso è riportata la curva ottenuta in assenza di composto.



- oligo 4GGG duplex
- 4GGG duplex + AQ21 0,5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 1 μM
- 4GGG duplex + AQ21 2,5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 5 μM
- 4GGG duplex + AQ21 10 μM
- 4GGG duplex + AQ21 20 μM

Figura 3.1.12. b. Derivate prime delle curve di melting riportate sopra, fornite dal software dello strumento.

Come si osserva dalle curve riportate in figura 3.1.12 a., all'aumentare della concentrazione di composto il valore di fluorescenza iniziale risulta diminuito.

Se si considera che il processo di annealing dei due oligonucleotidi complementari viene fatto in presenza di ligando (per garantire un sistema di equilibrio alle diverse temperature), è possibile che, in presenza di un composto particolarmente affine per le strutture a quartetti di guanine questo si leghi al filamento G-rich stabilizzando la forma G-quadruplex. La formazione di tale struttura comporta un avvicinamento di fluoroforo e quencher legati alla sequenza oligonucleotidica e, quindi, ad una diminuzione dell'emissione di fluorescenza.

Analizzando i dati riguardanti la capacità stabilizzante della struttura G-quadruplex questi risultano confermati per tutti i composti anche se la variazione della temperatura di melting appare inferiore; tale fatto può essere spiegato dalla presenza dell'oligonucleotide complementare che, come accennato sopra, ha l'effetto di spostare l'equilibrio nella miscela di reazione verso la forma duplex, creando una competizione tra duplex e G-quadruplex.

Per quanto riguarda la stabilizzazione della forma duplex si può osservare come gli antrachinoni aventi catene laterali costituite dal solo linker presentino un'attività molto diversa; analogamente a quanto visto sulla sequenza 4GGG a singolo filamento, il derivato con linker β Alanina (**AQ1**) mostra una maggiore capacità di stabilizzare la forma duplex dell'oligonucleotide 4GGG se confrontato con l'analogo avente linker Glicina (**AQ17**).

L'aggiunta di una Lisina in catena laterale comporta sempre un aumento dell'efficienza di stabilizzazione della forma duplex, che viene di poco ridotta se un ulteriore amminoacido viene inserito in seconda posizione.

Comparando la ΔT_m del duplex con la ΔT_m del G-quadruplex indotte dalle molecole, è stato possibile valutare la loro selettività per le diverse strutture nucleiche. Un altro indice di selettività (SI) è stato, inoltre, ricavato utilizzando i risultati ottenuti dai saggi enzimatici dal rapporto IC_{50} *Taq* polimerasi/ IC_{50} telomerasi.

Questi due set di dati dovrebbero essere in accordo se si assume che l'inibizione enzimatica sia principalmente dovuta ad un'interazione diretta del ligando con il DNA. Anche nel saggio di inibizione della *Taq* polimerasi, infatti, l'attività può essere spiegata attraverso un'interazione dei composti con il DNA e non ad una loro azione diretta sull'enzima.

Nel diagramma riportato in figura 3.1.13 sono confrontati gli indici di selettività; i valori di ΔT_m del duplex e del G-quadruplex per tutti i composti analizzati sono stati calcolati alla concentrazione di 5 μ M.

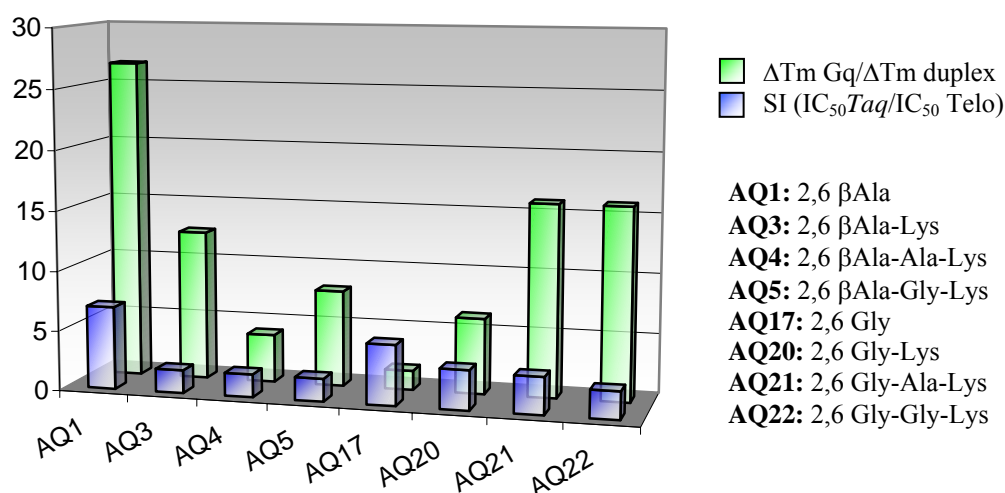


Figura 3.1.13. Confronto tra il rapporto tra ΔTm relativo alla forma G-quadruplex e quello relativo alla forma duplex con l'indice di selettività ottenuto dai saggi enzimatici per ogni antrachinone testato. I valori di ΔTm riportati si riferiscono alla concentrazione di legante di 5 μM . Gli esperimenti di denaturazione termica sono stati effettuati in tampone LP/KCl 50 mM, pH 7,4.

Dal grafico emerge come gli antrachinoni più selettivi risultino essere **AQ1**, **AQ20**, **AQ21**, **AQ22** e **AQ3**, per i quali si può notare un maggior rapporto tra ΔTm del G-quadruplex e ΔTm della forma duplex. Se si confrontano i dati di selettività estrapolati dai saggi enzimatici con quelli ottenuti dagli esperimenti di melting si osserva una buona correlazione per i composti **AQ1**, **AQ21** e **AQ22**; il derivato **AQ20**, invece, risulta molto selettivo negli esperimenti di melting nonostante il basso SI estrapolato dai saggi di inibizione della *Taq* polimerasi e TRAP: l'attività dimostrata nell'inibire l'enzima telomerasi appare elevata (con IC_{50} pari a 0.8 μM), e questo correla con l'attività di stabilizzazione della struttura G-quadruplex. Se paragonato agli altri derivati della serie aventi linker Glicina, risulta anche il più attivo nell'inibire l'enzima *Taq* polimerasi (IC_{50} pari a 5 μM) ma questo dato non viene confermato dagli esperimenti di denaturazione termica sul duplex. E' possibile, dunque, che l'attività di inibizione dell'enzima non sia da ricondurre soltanto alla stabilizzazione del DNA in forma duplex ma ad interazioni di tipo diverso, quali il legame con i primers/templato, con i nucleotidi presenti nel mix di reazione, o con l'enzima. Inoltre, le condizioni termiche alle quali si lavora non sono uguali nei due saggi, per cui è possibile che qualche composto risenta maggiormente degli effetti di temperatura.

AQ3, al contrario, mostra un maggiore selettività nei saggi enzimatici rispetto a quanto si osserva confrontando ΔT_m del duplex e del G-quadruplex, tuttavia, rispetto agli altri derivati **AQ20**, **21** e **22** presenta una maggiore capacità di stabilizzare la struttura duplex confermata dall'inibizione dell'enzima *Taq* polimerasi osservata a basse concentrazioni.

Il derivato **AQ17**, caratterizzato da una scarsa attività sia nella stabilizzazione della forma duplex sia per la struttura a quartetti di guanine conferma gli elevati valori di IC_{50} per *Taq* polimerasi e telomerasi estrapolati dai saggi enzimatici.

3.1.4 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLIX

A livello fisiologico solo alcune regioni ricche in guanina si presentano già organizzate in strutture G-quadruplex. Per questo motivo si è valutata, mediante gel shift, la capacità dei derivati antrachinonici di indurre la formazione strutture G-quadruplex assunte da oligonucleotidi sintetici correlati al telomero umano non preventivamente strutturati. Lo studio è stato effettuato con le sequenze 1GGG e 2GGG, caratterizzate rispettivamente dalla presenza di una e due ripetizioni TTAGGG. Questi frammenti sono in grado, in opportune condizioni, di formare strutture G-quadruplex dimeriche o tetrameriche, coinvolgendo due o quattro filamenti (figura 3.1.14). Ciò comporta una variazione del volume idrodinamico della catena di DNA che si traduce in una mobilità elettroforetica nettamente ridotta rispetto a quella dell'oligonucleotide in forma monomerica.

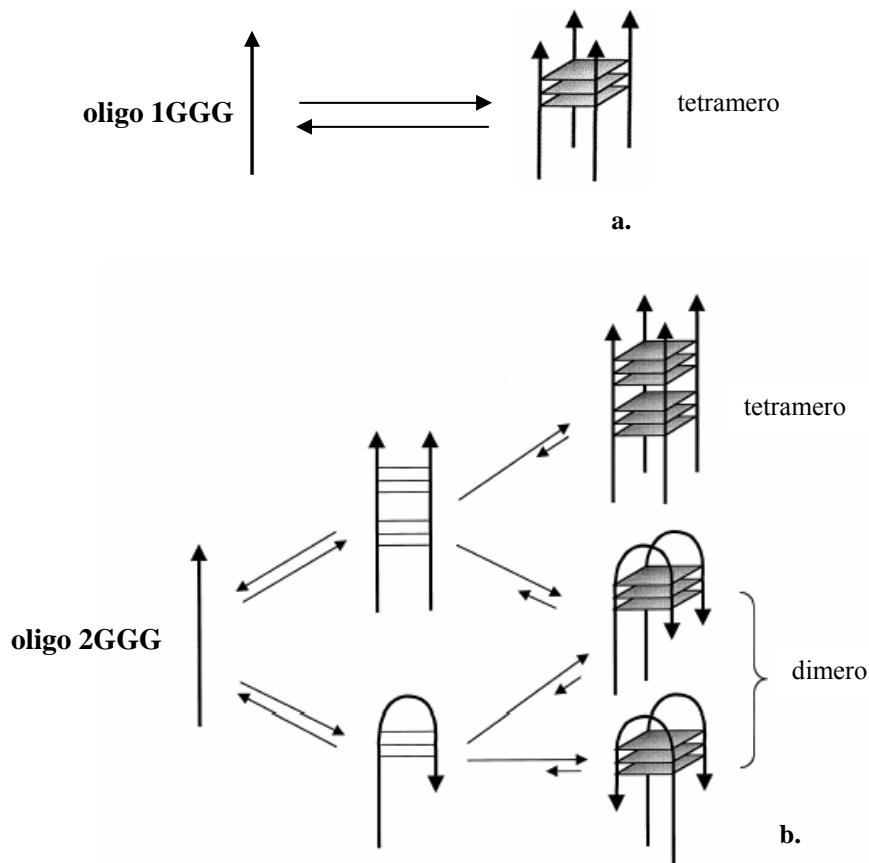


Figura 3.1.14. a. G-quadruplex intermolecolare (tetramolecolare) parallelo formato dalla sequenza 1GGG. b. Strutture intermolecolari, dimeriche (antiparallele) e tetrameriche (parallele), formate dall'oligonucleotide 2GGG.

Tramite PAGE è possibile separare le catene non strutturate da quelle strutturate in G-quadruplex e, quindi, seguire l'equilibrio random coil \leftrightarrow G-quadruplex. Ciò consente di valutare l'influenza dei vari leganti su questo equilibrio.

Un esempio dei risultati ottenuti è riportato nelle figure 3.1.15 e 3.1.16.

Tutte le misure sono state condotte in tampone contenente K^+ alla concentrazione di 100 mM. In queste condizioni, vicine alle concentrazioni intracellulari di K^+ , i due oligonucleotidi 1GGG e 2GGG non si presentano in forma strutturata pertanto è possibile seguire la formazione di strutture G-quadruplex (da esse derivanti) indotta dai composti analizzati.

Negli esperimenti condotti si è visto come non tutti i composti abbiano la capacità di indurre la formazione di strutture G-quadruplex. I derivati più attivi sono gli antrachinoni aventi catene costituite dal linker (β Ala o Gly) seguito dall'amminoacido Lisina (**AQ3** e **AQ20** rispettivamente).

In presenza dell'oligonucleotide 1GGG, questi sono, infatti, gli unici derivati tra quelli testati in grado di indurre e stabilizzare la formazione di strutture tetrameriche.

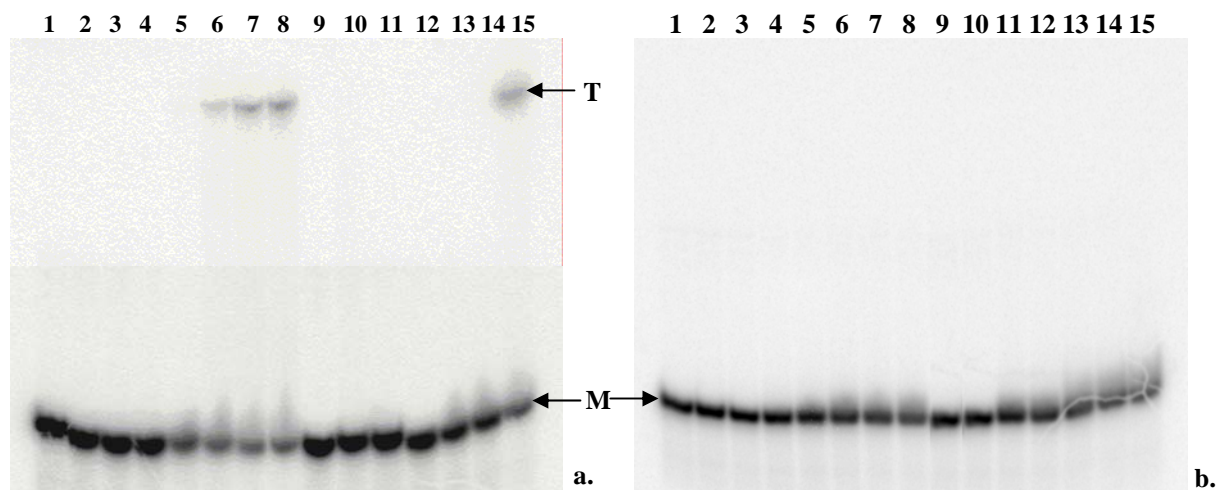


Figura 3.1.15. a. Gel shift per il sistema oligo 1GGG- **AQ20** (2,6Gly-Lys) e **AQ3** (2,6 β Ala-Lys) in TE/KCl 100 mM pH 8.00. 1: bianco (in assenza di composto). 2,3,4,5,6,7,8: derivato **AQ20** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μ M; 9,10,11,12,13,14,15: derivato **AQ3** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μ M. **b.** Gel shift per il sistema oligo 1GGG- **AQ4** (2,6 β Ala-Ala-Lys) e **AQ21** (2,6Gly-Ala-Lys) in TE/KCl 100 mM pH 8.00. 1: bianco (in assenza di composto). 2,3,4,5,6,7,8: derivato **AQ4** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μ M; 9,10,11,12,13,14,15: derivato **AQ21** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μ M. **M**= monomero (oligonucleotide in forma monomerica), **T**= tetramero (G-quadruplex tetrameric).

Come si osserva nel gel di figura 3.1.15 a., all'aumentare della concentrazione di **AQ20** (e in particolare a partire dalla concentrazione di 80 μM), si nota una progressiva diminuzione di intensità della banda relativa al monomero mentre compare una banda, caratterizzata da una mobilità elettroforetica inferiore, corrispondente alla forma tetrameric. Anche **AQ3** è in grado di stabilizzare strutture tetrameriche ma, se confrontato con il derivato **AQ20**, appare meno attivo: la banda relativa al G-quadruplex tetrameric, infatti, compare solo alla concentrazione più alta (150 μM).

L'analisi dei derivati **AQ4** (2,6 β Ala-Ala-Lys) e **AQ21** (2,6Gly-Ala-Lys) ha dimostrato come l'aggiunta di un solo residuo in catena laterale (un' Alanina in seconda posizione), diminuisca drasticamente l'efficacia dei composti nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex. In figura 3.1.15 b non si osserva, infatti, nessuna definita struttura diversa dal monomero (lo smearing della banda che si osserva alle più alte concentrazioni, è probabilmente attribuibile ad un'interazione non selettiva delle molecole con il DNA non foldato). Lo stesso comportamento è stato osservato con i derivati **AQ5** (2,6 β Ala-Gly-Lys) e **AQ22** (2,6Gly-Gly-Lys), aventi una Glicina in seconda posizione.

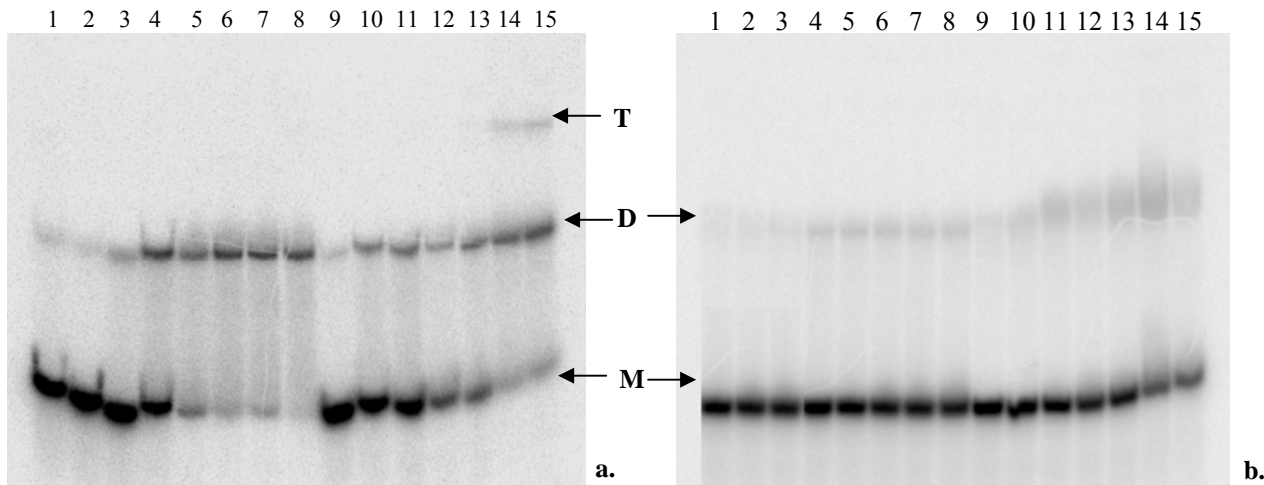


Figura 3.1.16. a. Gel shift per il sistema oligo 2GGG- **AQ20** (2,6Gly-Lys) e **AQ3** (2,6 β Ala-Lys) in TE/KCl 100 mM pH 8.00. 1: bianco (in assenza di composto). 2,3,4,5,6,7,8: derivato **AQ20** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μM ; 9,10,11,12,13,14,15: derivato **AQ3** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μM . **b.** Gel shift per il sistema oligo 2GGG- **AQ4** (2,6 β Ala-Ala-Lys) e **AQ21** (2,6Gly-Ala-Lys) in TE/KCl 100 mM pH 8.00. 1: bianco (in assenza di composto). 2,3,4,5,6,7,8: derivato **AQ4** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μM ; 9,10,11,12,13,14,15: derivato **AQ21** alle concentrazioni 10-20-40-60-80-100-150 μM . **M**= monomero (oligonucleotide in forma monomerica), **D**= dimero (G-quadruplex dimerico), **T**= tetramero (G-quadruplex tetrameric).

AQ3 e **AQ20**, anche con la sequenza 2GGG, mostrano una buona efficienza nell'indurre strutture a quartetti di guanine di tipo intermolecolare (figura 3.1.16). Con **AQ20**, a partire dalla concentrazione di 40 μM , si osserva la comparsa di una banda corrispondente ad un G-quadruplex dimerico. Con il derivato **AQ3**, la stessa banda compare a concentrazioni inferiori (20 μM); inoltre, a concentrazioni elevate (intorno a 100 μM) un'ulteriore banda, corrispondente ad una struttura tetramericata appare evidente.

Analogamente a quanto osservato con la sequenza 1GGG, l'allungamento delle catene laterali, mediante inserimento di un Alanina (derivati **AQ4** e **AQ21**), comporta un calo dell'efficacia dei composti nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex (figura 3.1.16 b).

Le differenze di comportamento tra i derivati **AQ3**, **AQ4**, **AQ20** e **AQ21** con le due sequenze 1GGG e 2GGG sono riassunte in figura 3.1.17 dove è riportata la percentuale di oligonucleotide strutturato in funzione della concentrazione dei composti testati.

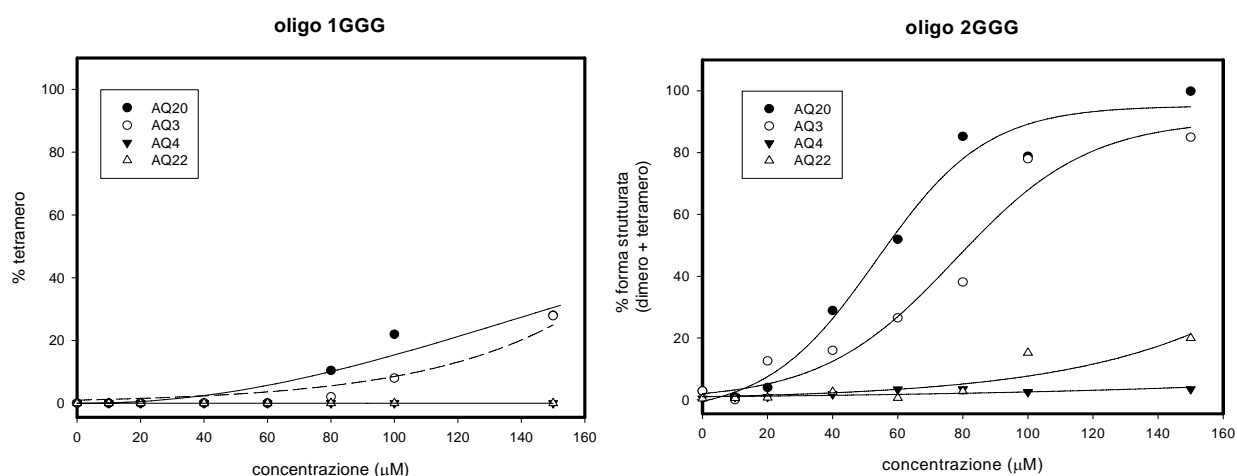


Figura 3.1.17. Effetto della concentrazione sulla percentuale di forma strutturata (tetramero per l'oligo 1GGG, dimero e tetramero per l'oligo 2GGG) per le varie molecole testate. Le condizioni sperimentali sono riportate in figura precedente.

Dai grafici appare evidente come l'allungamento della catena laterale (antrachinoni **AQ4** e **AQ22**) comporti un netto calo dell'attività, confermato dalla diminuzione della percentuale di oligonucleotide strutturato a parità di concentrazione di composto e di acido nucleico. Per gli altri composti testati, aventi catene più corte (composti **AQ1** e **AQ17**) non si è osservata alcuna attività a nessuna delle concentrazioni utilizzate e in presenza di entrambi gli oligonucleotidi esaminati.

3.1.5 CONCLUSIONI

In questo capitolo sono stati analizzati composti costituiti da un nucleo antracenedionico sostituito nelle posizioni 2 e 6 con catene peptidiche.

Il sistema tricyclico che caratterizza tali derivati, consente già una buona stabilizzazione della struttura G-quadruplex. Tuttavia, la componente planare può essere ulteriormente ampliata ottimizzando le catene laterali (direzione del legame ammidico).

Se da una parte il nucleo aromatico centrale del composto rende possibile l'interazione con le strutture G-quadruplex, dall'altra, le catene laterali permettono la stabilizzazione del complesso fungendo da "ganci" che ancorano il sistema aromatico ai solchi della struttura G-quadruplex stessa. Da ciò emerge l'importanza che tali catene presentino opportuni requisiti di flessibilità (legata alla lunghezza) in grado di facilitare questo processo.

Dalle analisi condotte è emerso, infatti, come la natura dei sostituenti laterali sia in grado di modulare notevolmente l'attività delle molecole in termini di inibizione enzimatica ma anche di interazione con gli acidi nucleici.

I saggi TRAP effettuati hanno confermato l'importanza di avere gruppi carichi positivamente in catena laterale. Tra gli antrachinoni testati, quelli dotati di maggiore attività (oltre al derivato costituito dal solo linker β Alanina, **AQ1**) presentano, infatti, residui di Lisina.

Un ulteriore elemento emerso è dato dalla distanza tra i gruppi ionizzabili positivamente e il sistema aromatico: l'allungamento delle catene laterali mediante inserimento di un secondo residuo amminoacidico tra il linker (β Alanina o Glicina) e la Lisina terminale si traduce sempre in un calo dell'efficacia di inibizione dell'attività telomerasica; ciò risulta maggiore quando in seconda posizione viene inserito l'amminoacido Alanina rispetto ad una Glicina. Ciò può essere, dunque, ricondotto ad una diminuzione più marcata della flessibilità delle catene laterali che si traduce in una minore efficienza di ripiegamento nei solchi laterali della struttura G-quadruplex.

L'analisi della capacità delle molecole di interagire e stabilizzare strutture diverse (duplex e G-quadruplex), ha evidenziato una stretta correlazione tra inibizione dell'attività telomerasica ed efficacia di stabilizzazione di strutture G-quadruplex.

Misure di denaturazione termica condotte sull'oligonucleotide 4GGG (simulante la sequenza telomerica umana) hanno pienamente confermato i requisiti strutturali evidenziati dai saggi TRAP. I derivati maggiormente capaci di stabilizzare strutture a quartetti di guanine presentano residui di Lisina in catena laterale; inoltre, la distanza dei gruppi carichi dal sistema antraceno è un elemento in grado di modulare notevolmente l'attività. La flessibilità delle catene regola anch'essa l'efficacia di interazione: la presenza di un residuo di Alanina in seconda posizione comporta un calo di attività più marcato rispetto ad un residuo di Glicina.

Valutando la selettività di interazione e riconoscimento tra strutture G-quadruplex e duplex (estrapolata dai rapporti ΔT_m G-quadruplex/ ΔT_m duplex) si osserva come i composti più attivi abbiano come linker l'amminoacido Glicina a sottolineare, ancora una volta, come la lunghezza (e la flessibilità) delle catene laterali rappresenti un elemento strutturale chiave nel garantire un'efficace e selettiva interazione con l'acido nucleico nelle due diverse forme.

Mediante gel shift è stata valutata, infine, la capacità delle molecole di indurre la formazione di quartetti di guanine a partire da sequenze non strutturate; tali misure hanno evidenziato come solamente i derivati più attivi nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex siano anche in grado di indurre la formazione.

3.2 PERILENI

3.2.1 COMPOSTI ESAMINATI

Un'altra classe di composti esaminati è rappresentata dai perileni. Si tratta di strutture caratterizzate da un'estesa regione planare risultante dalla condensazione di 7 anelli aromatici.

In particolare, sono state analizzate due sostanze, il **PIPER**, composto con note capacità di inibizione della telomerasi, e un suo derivato (**K5**), in cui le piperidine in catena laterale sono state sostituite con gruppi dimetilamminici (figura 3.2.1).

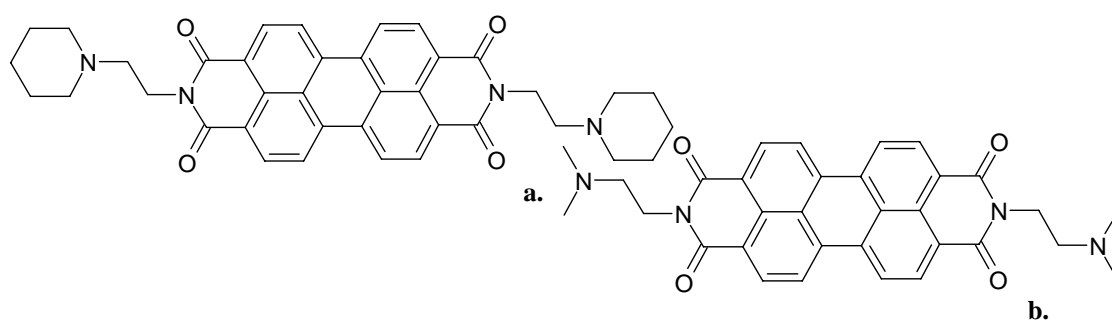


Figura 3.2.1. Strutture chimiche dei perileni studiati. **a. PIPER.** **b. Perilene K5**

Per i due perileni era già stata valutata la capacità di inibire l'attività telomerasica mediante saggio TRAP (Sissi et al. 2007).

L'interesse suscitato dai due composti scelti tra quelli studiati in precedenza è dovuto al fatto che i due perileni mostrano un comportamento nettamente diverso: entrambi appaiono molto attivi nell'inibizione della telomerasi come dimostra il basso valore di IC_{50} ottenuto (0.16 e 0,20 μM), tuttavia, **PIPER** vanta un indice di selettività (dato dal rapporto IC_{50} *Taq* polimerasi/ IC_{50} Telomerasi) superiore di quasi 5 volte (tabella 3.2.1).

Assumendo che l'inibizione dell'enzima *Taq* polimerasi sia da attribuire alla capacità delle molecole di stabilizzare il DNA a doppia elica, una giustificazione del diverso grado di selettività dei due perileni potrebbe risiedere nell'ingombro sterico dell'ammina ciclica

(presente in **PIPER**) in grado di ostacolare l'interazione con la doppia elica del DNA rendendo preferenziale l'interazione con il G-quadruplex.

Composto	IC ₅₀ <i>Taq</i> polimerasi (μM)	IC ₅₀ Telomerasi (μM)	SI (IC ₅₀ <i>Taq</i> polimerasi/ IC ₅₀ Telomerasi)
PIPER	5 ± 2	0.20 ± 0.02	25
K5	0.9 ± 2	0.16 ± 0.02	5.6

Tabella 3.2.1. IC₅₀ per *Taq* polimerasi, Telomerasi e indice di selettività (SI) determinato dal loro rapporto.

Sulla base dei dati raccolti dai saggi enzimatici si è ritenuto, quindi, utile approfondire la caratterizzazione dei due derivati ed esaminare l'interazione con il DNA. In aggiunta, si è valutata la capacità dei perileni di indurre la formazione di strutture a quartetti di guanine originate da sequenze diverse.

3.2.2 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX

3.2.2.1 Studi sulla sequenza telomerica umana

Analogamente a quanto descritto per i derivati antrachinonici si è verificato se l'attività antitelomerica evidenziata fosse correlabile alla capacità dei composti di indurre la formazione di strutture G-quadruplex e di stabilizzarle.

Per questo motivo sono stati condotti esperimenti di gel shift utilizzando sequenze diverse, correlate al telomero umano.

Le sequenze analizzate comprendono gli oligonucleotidi 1GGG e 2GGG (già utilizzati nei gel shift con gli antrachinoni) e l'oligonucleotide 4GGG, in grado di formare anche strutture G-quadruplex intramolecolari.

Come si osserva dai gel riportati in figura 3.2.2, in presenza di K^+ 100 mM gli oligonucleotidi 1GGG e 2GGG sono presenti in gran parte come monomeri lineari. In queste condizioni sperimentali l'oligo 4GGG presenta, invece, una mobilità elettroforetica particolarmente elevata se si considera la sua lunghezza in basi. Ciò è riconducibile ad una struttura a quartetti di guanine intramolecolare, derivante dal ripiegamento di una singola catena.

Questo dato viene confermato dai gel shift effettuati in presenza di Li^+ 100 mM. Tale ione risulta incapace di stabilizzare strutture G-quadruplex ed utilizzandolo si osserva, infatti, una banda di ridotta mobilità elettroforetica (se confrontata con la corrispondente sequenza in K^+) riferibile all'oligonucleotide in forma monomerica non strutturata (figura 3.2.2).

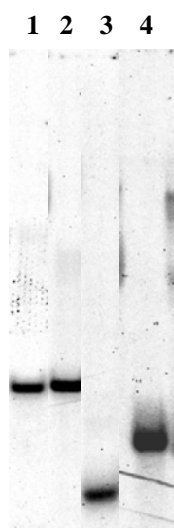


Figura 3.2.2. Gel shift degli oligo 1GGG, 2GGG e 4GGG in TE pH 8.0 in presenza di K^+ 100mM o Li^+ 100 mM.

- 1:** oligo **1GGG** (24 residui) in K^+ 100mM;
- 2:** oligo **2GGG** (24 residui) in K^+ 100mM;
- 3:** oligo **4GGG** (22 residui) in K^+ 100mM;
- 4:** oligo **4GGG** (22 residui) in Li^+ 100mM.

Con le sequenze utilizzate, entrambi i perileni si sono dimostrati capaci di indurre la formazione di strutture G-quadruplex. In particolare, è emerso come in presenza dell'oligonucleotide 2GGG, **PIPER** e **K5** siano capaci di formare esclusivamente strutture di tipo tetrameriche, derivanti dall'associazione di 4 distinti filamenti. In figura 3.2.3 è riportato il gel shift effettuato con la sequenza 1GGG in presenza del perilene **K5**; come si osserva, alle più elevate concentrazioni compare una banda riconducibile alla formazione di una struttura G-quadruplex di tipo tetrameriche.

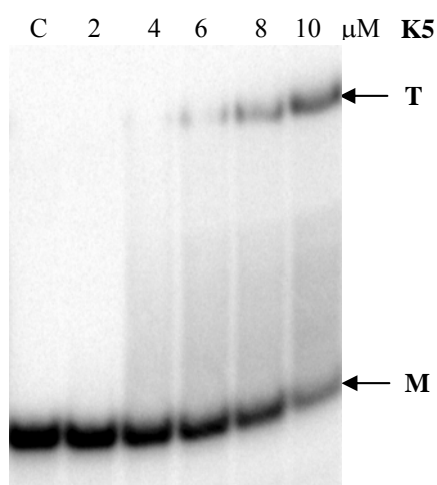


Figura 3.2.3. Gel shift effettuato con la sequenza 1GGG in presenza del perilene **K5** in TE/KCl 0,1 M pH 8.0. **M**= oligonucleotide in forma monomerica, **T**= struttura G-quadruplex tetrameriche.

Sulla sequenza 4GGG, già organizzata in struttura a quartetti di guanine, l'aggiunta dei due perileni induce la comparsa di una banda, caratterizzata da una velocità di migrazione inferiore, corrispondente alla formazione del complesso ligando- G-quadruplex. Non compaiono, invece, strutture multimeriche.

In tabella 3.2.2 sono riportati i valori di EC_{50} relativi alla capacità dei due perileni di indurre la formazione di strutture G-quadruplex con le sequenze 1GGG e 2GGG.

perilene	EC_{50}	
	1GGG	2GGG
PIPER	>100	90
K5	8.7±0.9	4.0

Tabella 3.2.2. Valori di EC_{50} relativi alla stabilizzazione di strutture G-quadruplex di tipo tetrameriche ottenuti dalle misure di gel shift effettuate con le sequenze 1GGG e 2GGG in presenza dei due perileni **PIPER** e **K5**.

Sulla base dei dati relativi all'inibizione dell'attività telomerastica ci si aspettava una capacità di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine piuttosto simile tra i due leganti.

Tuttavia, dal confronto dei due perileni emerge come **K5** sia molto più efficiente, rispetto al **PIPER**, nell'indurre la formazione di strutture G-quadruplex.

E' ampiamente riportato come le diverse strutture G-4 siano caratterizzate da proprietà differenti sia dal punto di vista termodinamico che cinetico; tali parametri risultano chiaramente influenzati dall'interazione con ligandi. Per questo si è pensato di monitorare gli effetti sulla strutturazione dell'oligonucleotide utilizzando tempi e temperature di incubazione diversi.

I due perileni sono stati, quindi, incubati con i vari oligonucleotidi durante il processo di folding (10' a 95°C) o in seguito per 30' a 25°C.

Dai gel effettuati emerge come, sulla sequenza 1GGG, tempo e temperatura di incubazione non modifichino il tipo di struttura stabilizzata; questo può essere spiegato dal fatto che con tale sequenza le strutture G-quadruplex che si possono formare derivano esclusivamente dall'associazione di 4 distinti filamenti con orientamento parallelo.

Al contrario, l' oligonucleotide 2GGG può formare diverse strutture G-quadruplex, derivanti dall'associazione di due (strutture dimeriche) o quattro (strutture tetrameriche) distinti filamenti; dati di letteratura suggeriscono come le prime risultino favorite dal punto di vista cinetico, le seconde dal punto di vista termodinamico.

Negli esperimenti condotti sulla sequenza 2GGG si osserva come l'attività risulti diversa a seconda del tipo di incubazione. Dai gel riportati in figura 3.2.4 a, relativi al perilene **K5**, appare evidente come la forma dimerica compaia solo se il folding dell' oligonucleotide avviene in presenza di composto (incubazione 10' a 95°C); a partire dalla concentrazione 6 μM , infatti, si possono distinguere delle bande, caratterizzate da una mobilità elettroforetica intermedia, che aumentano d'intensità all'aumentare della concentrazione di perilene.

Considerando che il tipo di interazione più probabile con le strutture G-quadruplex è riconducibile ad uno "stacking" alle tetradi terminali (Davis, **2004**; Gavathioitis et al, **2003**; Fedoroff et al, **1998**), a parità di concentrazione di DNA, una riduzione nel numero di catene coinvolte nella formazione di strutture a quartetti di guanine si traduce in un

incremento del numero di siti di interazione con il ligando. Per la legge dell'azione di massa si osserva, quindi, all'aumentare della concentrazione del perilene, la conversione della forma tetramericata nella forma dimerica (di per sè termodinamicamente meno stabile). Quando, invece, **K5** viene aggiunto dopo il folding dell'oligonucleotide (incubando a 25°C), l'unico tipo di struttura evidente è rappresentato da un G-quadruplex tetramericato, indipendentemente dal tempo di incubazione (30 min o 24h).

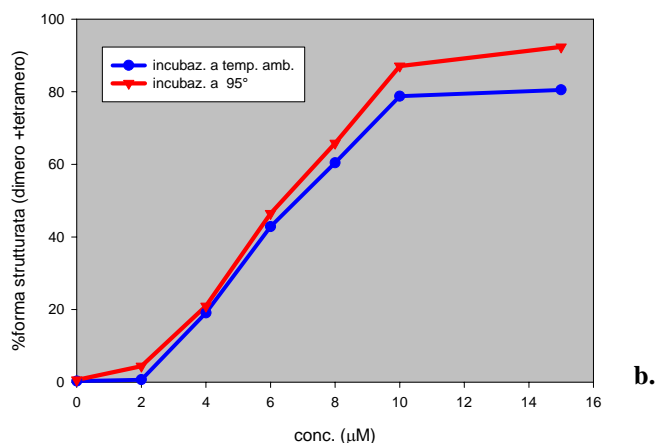
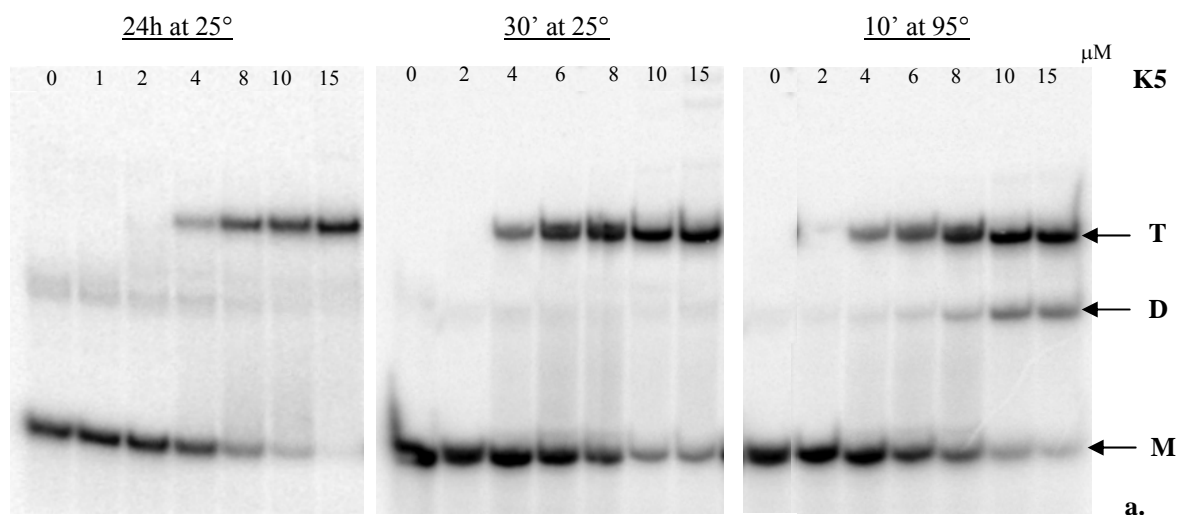


Figura 3.2.4. a. Gel shift effettuati con la sequenza 2GGG in presenza del perilene **K5** in TE/KCl 0,1 M pH 8.0 in diverse condizioni di incubazione (24h a 25°C, 30' a 25°C, 10' a 95°C). **M**= oligonucleotide in forma monomericata, **D**= struttura G-quadruplex dimerica, **T**= struttura G-quadruplex tetramericata. **b.** Quantificazione relativa alla percentuale di oligonucleotide in forma strutturata (dimer + tetramero) ottenuta aggiungendo **K5** prima (in rosso) o dopo (in blu) la fase di ripiegamento del DNA a 95°C.

E' da notare, tuttavia, come la percentuale di oligonucleotide strutturato in G-quadruplex (dimero più tetramero) non risulti condizionata dalle modalità di incubazione (figura 3.2.4 b.).

Con la sequenza 4GGG, in presenza del perilene **K5** si assiste alla conversione del G-quadruplex intramolecolare in G-quadruplex tetramerico solo quando l'incubazione viene fatta durante la fase di folding; tale fenomeno non si osserva, invece, con **PIPER** (figura 3.2.5).

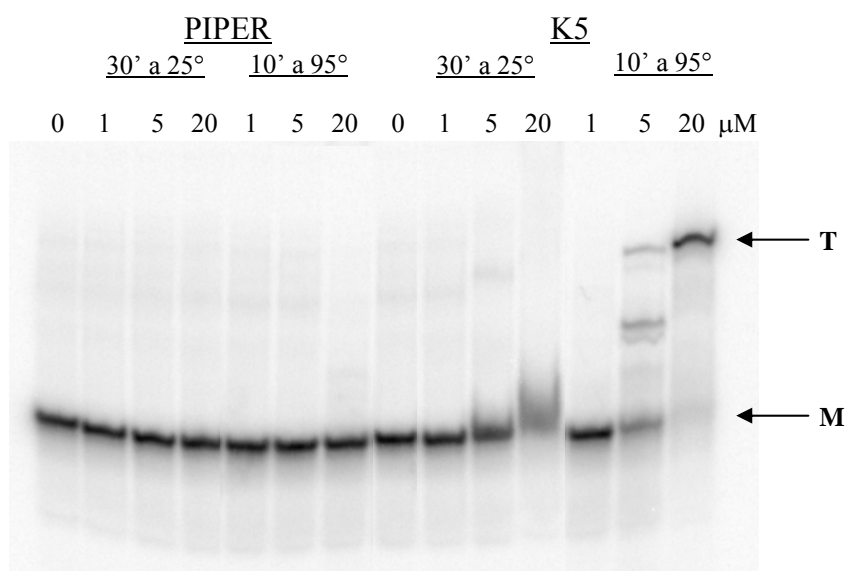


Figura 3.2.5. Gel shift effettuati con la sequenza 4GGG in presenza dei due perileni **PIPER** e **K5** in diverse condizioni di incubazione. **M**= oligonucleotide in forma monomerica, **T**= struttura G-quadruplex tetrameric.

Lo studio sulle sequenze correlate al telomero ha permesso di evidenziare come i due perileni, similmente attivi nell'inibire l'attività telomerasica, siano in grado di indurre la formazione di strutture G-quadruplex con diversa efficienza. In particolare, è emerso come **K5** sia più attivo nella stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine se confrontato con **PIPER**.

Sulla sequenza 4GGG, **K5**, a differenza di **PIPER**, appare, inoltre capace di convertire la forma intramolecolare antiparallela in una conformazione tetrameric, avente orientamento parallelo.

Si è deciso, quindi, di approfondire l'interazione dei due perileni con altre sequenze in grado di formare strutture G-quadruplex, prevalentemente di tipo parallelo.

3.2.2.2 Studi effettuati sulla sequenza del promotore di *c-myc*

Come già accennato nella parte introduttiva di questa tesi, esistono numerose regioni del genoma, diverse dai telomeri, caratterizzate da sequenze ricche in guanina, in grado di dare origine a strutture G-quadruplex. Tra queste, un interesse particolare è stato rivolto alla sequenza situata a livello del promotore P1 dell'oncogene *c-myc*.

Si è utilizzata la sequenza Pu27, di 27 basi, che rappresenta il filamento ricco in purine del promotore e contiene 6 tratti guaninici. Tale filamento è in grado di originare strutture G-quadruplex intramolecolari, derivanti dal ripiegamento dello stesso. Il processo risulta particolarmente efficiente: in K^+ 100 mM tutto l'acido nucleico è, infatti, presente come G-quadruplex.

Anche in questo caso esperimenti di gel shift sono stati condotti incubando con modalità diverse l'oligonucleotide con le due molecole.

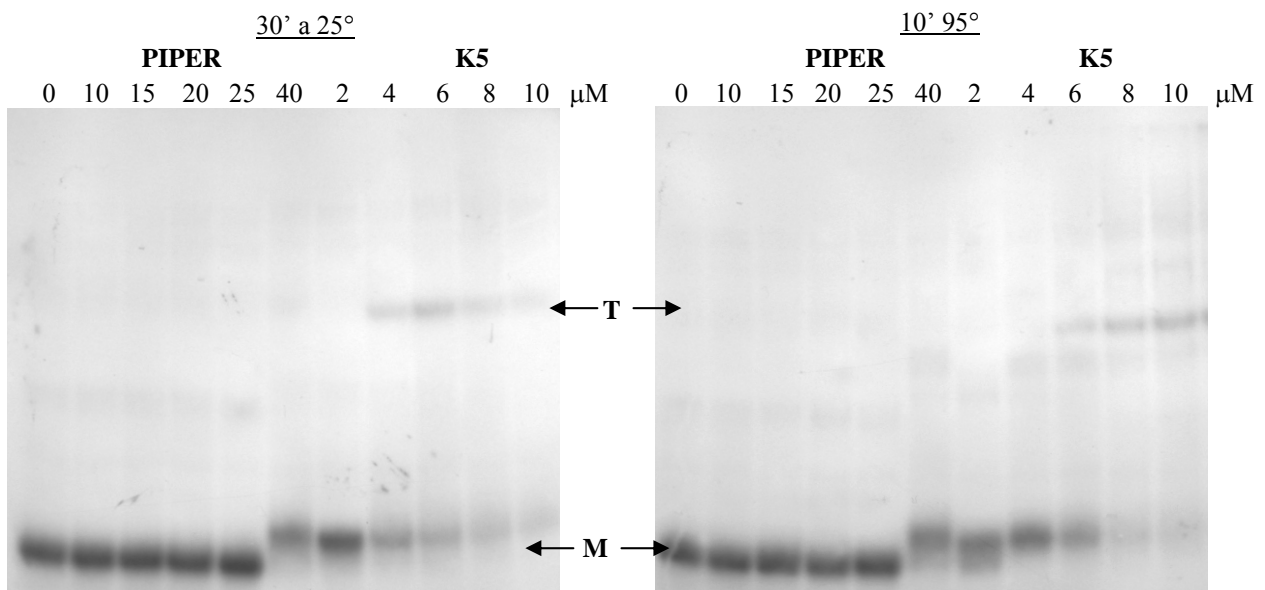


Figura 3.2.6. Gel shift effettuati con la sequenza Pu27 in presenza dei due perileni **PIPER** e **K5** in TE/KCl 0,1 M pH 8.0 in diverse condizioni di incubazione (30' a 25°C, 10' a 95°C). **M**= oligonucleotide in forma monomeric, **T**= struttura G-quadruplex tetrameric.

Come si osserva nei gel riportati in figura 3.2.6, **PIPER** non dimostra particolare affinità per queste strutture G-quadruplex: solo alla concentrazione di 40 μM si osserva un rallentamento della banda dell'acido nucleico, indice dell'interazione del perilene con l'oligonucleotide. Con **K5**, invece, già alla più bassa concentrazione si evidenzia una

banda rallentata, indice di interazione con Pu27; inoltre, aumentando la concentrazione, si ha la comparsa di una banda a più elevato peso molecolare, corrispondente alla formazione di un G-quadruplex tetrameric, sia nel caso in cui l'incubazione venga fatta durante il processo di folding, sia in seguito.

Anche in questo caso, solo con il derivato **K5** si osserva la formazione di strutture intermolecolari; tuttavia, non si assiste ad un cambio conformazionale mediato dalla temperatura di incubazione (come con la sequenza 4GGG). Ciò può essere ricondotto al fatto che il G-quadruplex intramolecolare formato da Pu27 presenta già orientamento parallelo.

Dato che la sequenza Pu27 di *c-myc* è presente nel genoma in forma duplex (appaiata al filamento complementare C-rich), si è ritenuto utile analizzare la capacità dei due perileni di spostare l'equilibrio duplex-G-quadruplex verso la formazione di quest'ultimo.

3.2.3 CONVERSIONE DUPLEX- G-QUADRUPLEX

Mediante elettroforesi è stata valutata la capacità dei due perileni di convertire la forma duplex del promotore di *c-myc* in struttura G-quadruplex. Tale esperimento è stato condotto incubando **PIPER** e **K5** con l'oligo Pu27 appaiato al suo complementare Pu27 down.

Nei gel riportati in figura 3.2.7 e 3.2.8 sono stati inseriti tre controlli: uno rappresentato dalla forma duplex, il secondo costituito dal duplex incubato nelle stesse condizioni in cui sono stati trattati i campioni nei quali è stato aggiunto il composto (24h a 37°C), il terzo rappresentato dal filamento ricco in guanine (Pu27) foldato in G-quadruplex (in presenza di K^+ 100 mM).

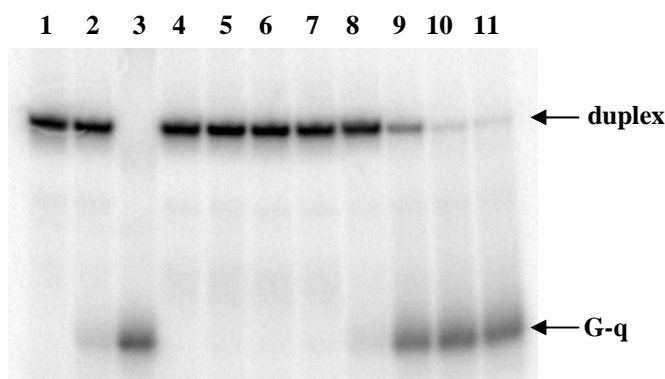


Figura 3.2.7. Conversione duplex-G-quadruplex dell'oligo Pu27 in presenza del perilene **PIPER**.

1: duplex (Pu27 + complementare);
2: duplex in TE/KCl 0.1M pH8.0, incubato 24h a 37°;
3: singolo filamento (Pu27) in TE/KCl 0.1M pH8.0;
4-11: duplex in TE/KCl 0.1M pH 8.0 in presenza del perilene **PIPER** alle concentrazioni 0,1- 0,25-0,5- 1- 2- 4- 8- 10 μ M, incubato 24h a 37°

Come risulta evidente, **PIPER** è in grado di convertire la forma duplex dell'oligo in struttura G-quadruplex a partire dalla concentrazione di 4 μ M; si nota, infatti, una progressiva diminuzione dell'intensità della banda a più elevato peso molecolare corrispondente alla forma duplex e un parallelo aumento di intensità della banda relativa alla struttura G-quadruplex (avente maggiore mobilità elettroforetica) (figura 3.2.7).

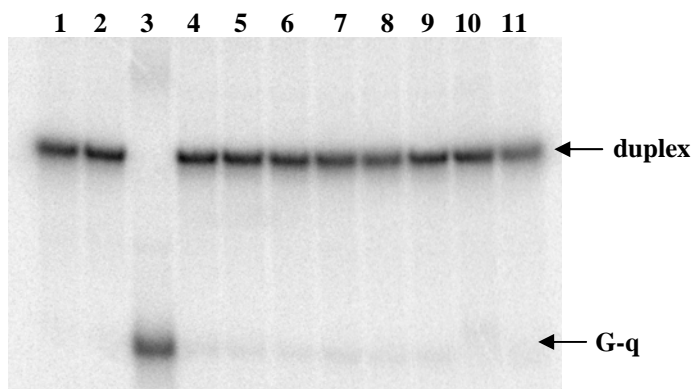


Figura 3.2.8. Conversione duplex-G-quadruplex dell'oligo Pu27 in presenza del perilene **K5**.

1: duplex (Pu27 + complementare);
2: duplex in TE/KCl 0.1M pH8.0, incubato 24h a 37°;
3: singolo filamento (Pu27) in TE/KCl 0.1M pH8.0;
4-11: duplex in TE/KCl 0.1M pH8.0 in presenza del perilene **K5** alle concentrazioni 0,1- 0,25-0,5- 1- 2- 4- 8- 10 μ M, incubato 24h a 37°

Per il composto **K5**, invece, non si osserva alcuna capacità di conversione duplex-G-quadruplex fino alle più alte concentrazioni testate (figura 3.2.8).

Lo stesso esperimento è stato eseguito utilizzando la sequenza telomerica umana (oligo 4GGG appaiato al suo complementare 4CCC).

In questo caso entrambi i perileni sono risultati incapaci di convertire la forma duplex in struttura a quartetti di guanine.

Tuttavia, considerando che nel telomero solo una parte della sequenza ricca in guanine si presenta in forma duplex (anche se non ripiegata nel T-loop) si è pensato di utilizzare un oligonucleotide appaiato solo parzialmente con la catena complementare (ds4GGG*, figura 3.2.9). Tale doppia elica si caratterizza per una minore stabilità rispetto alla corrispondente ds4GGG, totalmente appaiata al filamento complementare; dovrebbe risultare, quindi, favorita la conversione in struttura a quartetti di guanine.

ds4GGG: 5'- AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G- 3'
3'- TCC CAA TCC CAA TCC CAA TCC C- 5'

ds4GGG*: 5'- TAC AGA TAG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG- 3'
3'- ATG TCT ATC AAT CCC AAT CCC- 5'

dsPu27: 5'- TGG GGA GGG TGG GGA GGG TGG GGA AGG-3'
3'- ACC CCT CCC ACC CCT CCC ACC CCT TCC-5'

Negli esperimenti condotti, **PIPER** si è rivelato in grado di convertire la forma parzialmente duplex in struttura G-quadruplex intramolecolare. **K5**, invece, è apparso meno efficiente nell'indurre la separazione dei due filamenti; inoltre, ha dimostrato una certa preferenzialità nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex di tipo multimerico (coinvolgenti più filamenti).

In figura 3.2.10 sono riportate le quantificazioni relative a **PIPER** incubato con le tre sequenze dsPu27, ds4GGG e ds4GGG*. Come si osserva la percentuale di forma G-quadruplex indotta dal perilene risulta particolarmente elevata sulla sequenza del promotore di *c-myc*; partendo dalla forma duplex dell'oligonucleotide 4GGG, invece, la percentuale risulta intorno al 10%, tuttavia, utilizzando tale sequenza in forma

parzialmente appaiata il valore di tale percentuale risulta notevolmente incrementato (intorno al 60%).

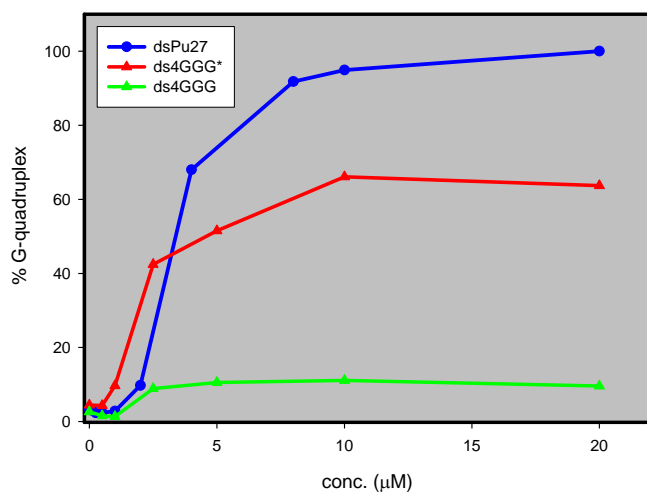


Figura 3.2.10. Quantificazioni relative alla formazione di strutture G-quadruplex ad opera del perilene **PIPER** con diverse sequenze in forma duplex. Le curve si riferiscono ai gel shift effettuati in TE/KCl 0,1 M pH 8.0.

3.2.4 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX: STUDI DI DICROISMO CIRCOLARE

3.2.4.1 Studi effettuati sulla sequenza telomerica umana

I perileni sono composti fluorescenti i cui spettri di assorbimento e di emissione interferiscono con quelli dei fluorofori utilizzati per marcare gli oligonucleotidi. Non è stato possibile, quindi, analizzare la capacità di **PIPER** e **K5** di stabilizzare strutture a quartetti di guanine mediante fluorescenza melting. Per questo motivo, per valutare l'attività di stabilizzazione dei due composti, si è utilizzata la tecnica del dicroismo circolare. In questo modo si è potuto, inoltre, caratterizzare in dettaglio i diversi arrangiamenti strutturali delle catene polinucleotidiche analizzate. Il dicroismo circolare è una tecnica che permette, infatti, di distinguere le strutture G-quadruplex antiparallele da quelle parallele.

In letteratura è riportato come strutture a quartetti di guanine, con orientamento parallelo, diano origine a spettri con un picco positivo a 260–265 nm e un picco negativo attorno a 240 nm. I G-quadruplex antiparalleli, che si possono formare da un folding intramolecolare o da una dimerizzazione di “hairpins” presentano, invece, un picco positivo a 290–295 nm e un picco negativo a 260–265 nm (Miyoshi et al, **2001**).

Nelle misure effettuate sono state utilizzate le sequenze 1GGG, 2GGG e 4GGG (impiegate anche negli esperimenti di gel shift).

Sono stati innanzitutto registrati gli spetti CD dei soli oligonucleotidi in TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 0.1 M pH 8.00 al fine di caratterizzare la struttura G-quadruplex da essi formata (figura 3.2.11).

In accordo con quanto visto negli esperimenti di gel elettroforesi, le sequenze 1GGG e 2GGG, in tampone contenente K^+ 100 mM, si presentano prevalentemente in forma non strutturata; mostrano, pertanto, una modesta attività ottica. Gli spettri si caratterizzano per la presenza di due picchi (uno positivo a circa 260 e uno negativo a 245 nm) tipici di strutture G-quadruplex con orientamento parallelo.

L'oligonucleotide 4GGG dà origine a spettri risultanti dalla somma di più strutture G-quadruplex (in presenza di K^+); tra queste, vi è una conformazione mista parallela/antiparallela, maggiormente rilevante, caratterizzata da un intenso picco positivo a 295 nm, una spalla a 265 nm e un debole picco negativo a 235 nm.

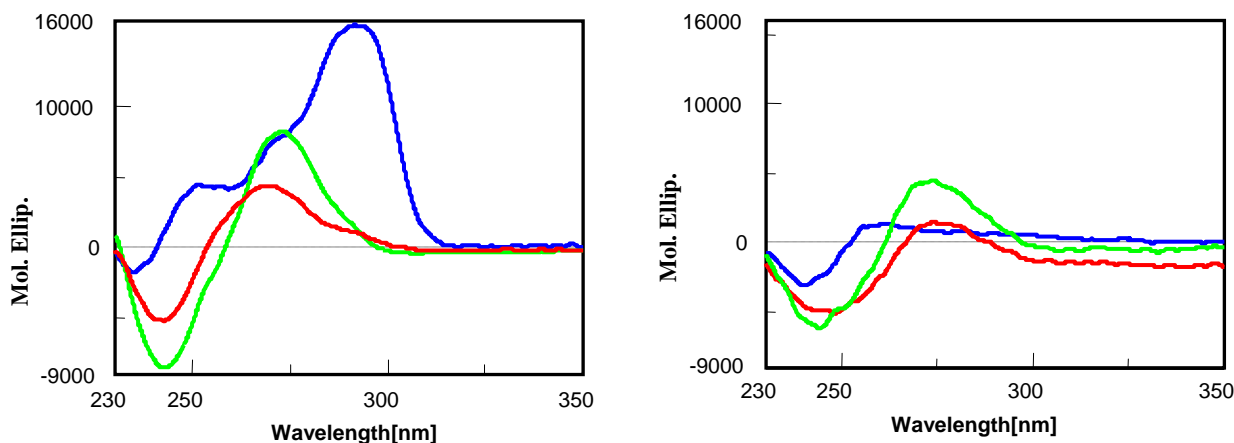


Figura 3.2.11. Spettri dicroici degli oligonucleotidi 1GGG (in rosso), 2GGG (in verde) e 4GGG (in blu) 4 μ M in tampone TE/KCl 0.1 M pH 8.0 a 25°C (a sinistra) e a 85°C (a destra).

In un secondo momento si sono registrati gli spettri dicroici dei tre oligonucleotidi in presenza di concentrazioni crescenti dei due perilene.

L'aggiunta del perilene **K5** comporta un aumento del segnale dicroico dato dalle sequenze 1GGG e 2GGG, indice dell'induzione e stabilizzazione di strutture G-quadruplex prodotte dal perilene (figura 3.1.12 a e b). **PIPER**, al contrario, non incrementa molto il segnale dato dai due oligonucleotidi (figura 3.2.13 a e b). Questo è in accordo con i risultati ottenuti dalle misure di gel shift dove era emersa una maggiore capacità stabilizzante della struttura G-quadruplex da parte di **K5** rispetto a **PIPER**.

Sulla sequenza 4GGG l'incremento del segnale non risulta particolarmente marcato, ragionevolmente perché l'oligonucleotide nelle condizioni utilizzate si trova già in gran parte strutturato in G-quadruplex. Tuttavia si osserva come, riscaldando (a 85°C) l'oligo 4GGG in presenza di perilene, si registri uno spettro avente picchi a 260 e 240 nm, tipico di una struttura G-quadruplex con orientamento parallelo (figura 3.2.12 c e 3.2.13 c).

Il ciclo termico in presenza dei ligandi comporta, quindi, un cambio di conformazione della sequenza 4GGG che passa da struttura prevalentemente antiparallela a quella parallela. Tuttavia, la stabilizzazione data dai due perilene di tale forma risulta diversa; in seguito a raffreddamento si osserva, infatti, come con **PIPER** si abbia una completa reversibilità e un ritorno alla conformazione antiparallela; con **K5**, invece, viene mantenuta la forma parallela.

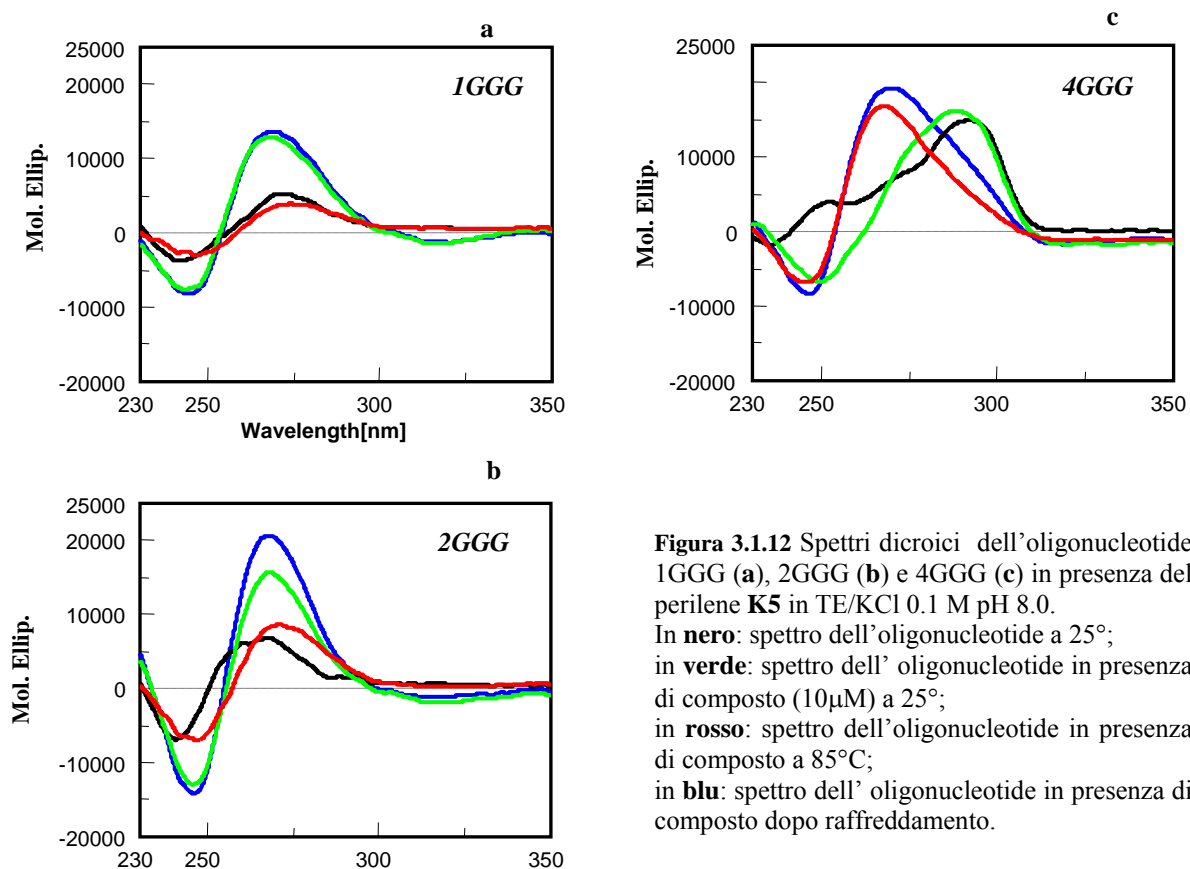


Figura 3.1.12 Spettri dicroici dell'oligonucleotide 1GGG (a), 2GGG (b) e 4GGG (c) in presenza del perilene **K5** in TE/KCl 0.1 M pH 8.0.

In **nero**: spettro dell'oligonucleotide a 25°;
 in **verde**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (10μM) a 25°;
 in **rosso**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto a 85°C;
 in **blu**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto dopo raffreddamento.

Anche in questo caso i dati raccolti sembrano correlare con quanto emerso dalle misure di gel shift. L'incubazione del perilene **K5** con l'oligonucleotide 4GGG a 95°C era in grado di portare alla formazione di strutture tetrameriche aventi orientamento parallelo, mentre tale fenomeno non veniva osservato con **PIPER**.

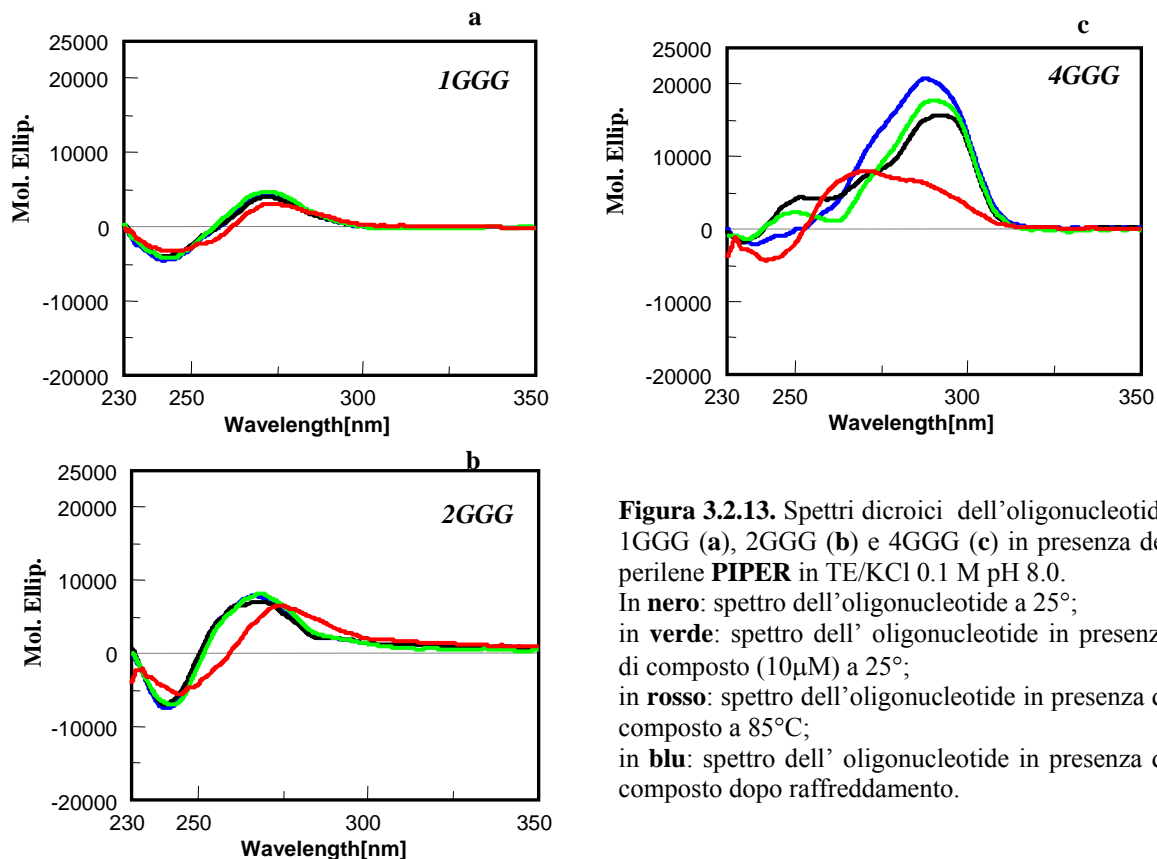


Figura 3.2.13. Spettri dicroici dell'oligonucleotide 1GGG (a), 2GGG (b) e 4GGG (c) in presenza del perilene **PIPER** in TE/KCl 0.1 M pH 8.0. In **nero**: spettro dell'oligonucleotide a 25°; in **verde**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (10 μ M) a 25°; in **rosso**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto a 85°C; in **blu**: spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto dopo raffreddamento.

L'analisi della capacità dei perilene di stabilizzare strutture G-quadruplex mediante dicroismo circolare è stata estesa anche alla sequenza del promotore di *c-myc*, già analizzata negli esperimenti di gel shift.

3.2.4.2 Studi effettuati sulla sequenza del promotore di *c-myc*

Si è valutata la capacità di **PIPER** e il suo derivato **K5** di interagire con la struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza Pu27.

In tampone contenente K⁺ alla concentrazione di 100 mM (analogo a quello utilizzato per le sequenze correlate al telomero), Pu27 mostra uno spettro dicroico di intensità elevata e caratterizzato da picchi a 240 nm e 260 nm, riconducibili ad un G-quadruplex con orientamento parallelo.

La temperatura di melting di tale struttura è di 83°C, ben più elevata di quella ricavata con l'oligonucleotide 4GGG (di 64°C). Questo suggerisce come, in tali condizioni, la sequenza Pu27 risulti foldata in G-quadruplex e come tale struttura sia notevolmente stabile. Per questo motivo, in seguito all'aggiunta delle due molecole (**PIPER** e **K5**), non si è osservato alcun incremento del segnale dicroico.

Sostituendo al K⁺ lo ione Li⁺, il tipo di struttura G-quadruplex rimane invariato, tuttavia, il segnale presenta un'intensità minore e la temperatura di melting si abbassa.

In assenza di ioni monovalenti aggiunti, si assiste ad un netto calo del segnale dicroico (figura 3.2.14) e della temperatura di melting (43,6°C).

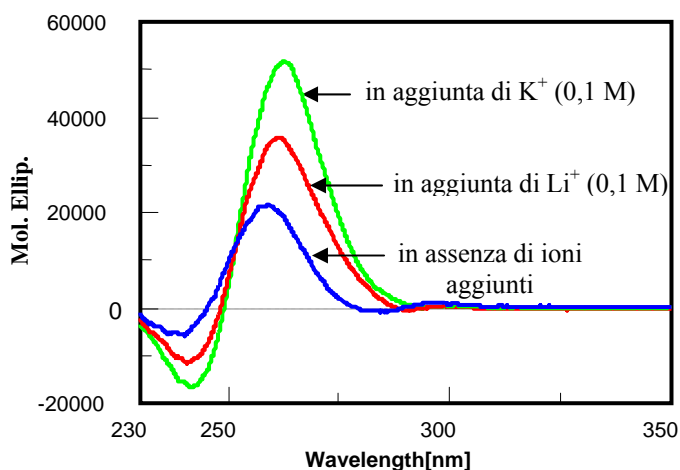


Figura 3.2.14. Spettri dicroici dell'oligonucleotide Pu27(4µM) in tamponi diversi.

In **blu**: spettro ottenuto in 10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0 a 25°C.

In **verde**: spettro ottenuto in 10mM TRIS, 1mM EDTA, 100 mM KCl pH 8.0 a 25°C.

In **rosso**: spettro ottenuto in 10mM TRIS, 1mM EDTA, 100 mM LiCl pH 8.0 a 25°C.

E' importante sottolineare, quindi, come la sequenza del promotore di *c-myc* sia in grado di originare una struttura G-quadruplex altamente stabile che si mantiene anche in assenza di ioni K⁺ e Li⁺ aggiunti. Gli esperimenti sono stati, pertanto, condotti in queste condizioni al fine di evidenziare un eventuale effetto di stabilizzazione indotto dalle molecole testate.

L'aggiunta del perilene **K5**, come si osserva in figura 3.2.15, induce un significativo aumento del segnale con un lieve spostamento del picco di massimo verso lunghezze d'onda maggiori. Ciò si osserva incubando il perilene sia durante il processo di folding dell'oligonucleotide, sia dopo tale processo (figura 3.2.15).

PIPER, invece, ha dimostrato modeste variazioni nelle proprietà dicroiche dell'oligonucleotide suggerendo, quindi, una minor capacità di interazione (figura 3.2.16).

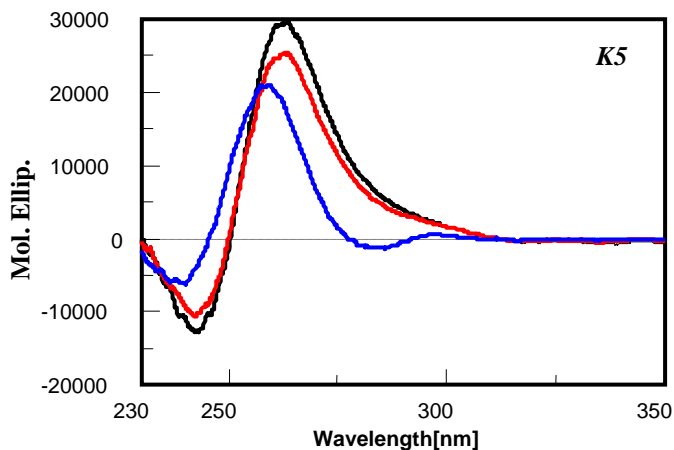


Figura 3.2.15. Spettri dicroici dell'oligonucleotide Pu27 (4 μ M) in presenza del perilene **K5** in 10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0 a 25°C.

In **blu**: spettro del solo oligonucleotide

In **nero**: spettro di Pu27 in presenza di **K5** (14 μ M) aggiunto dopo il processo di folding dell'oligonucleotide

In **rosso**: spettro di Pu27 in presenza di **K5** (14 μ M) aggiunto durante il processo di folding dell'oligonucleotide

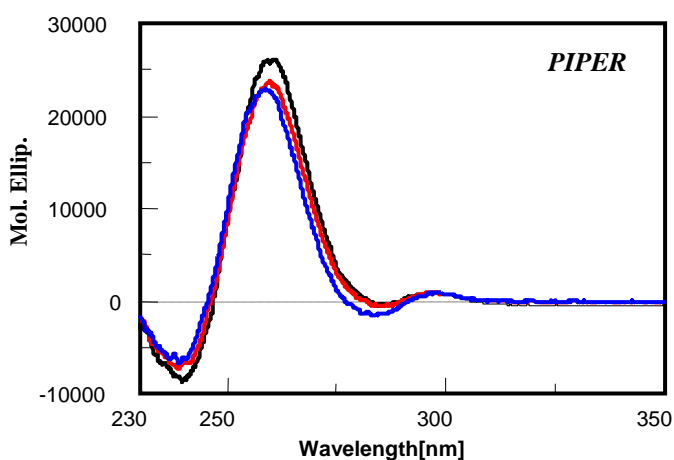


Figura 3.2.16. Spettri dicroici dell'oligonucleotide Pu27 (4 μ M) in presenza del perilene **PIPER** in 10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0 a 25°C.

In **blu**: spettro del solo oligonucleotide

In **nero**: spettro di Pu27 in presenza di **PIPER** (14 μ M) aggiunto dopo il processo di folding dell'oligonucleotide

In **rosso**: spettro di Pu27 in presenza di **PIPER** (14 μ M) aggiunto durante il processo di folding dell'oligonucleotide

Risulta interessante osservare come sulla sequenza Pu27, non si osservi alcun cambiamento conformazionale in seguito all'aggiunta del perilene **K5**, probabilmente perché tale sequenza si trova già in forma parallela.

3.2.5 CONCLUSIONI

L'analisi delle proprietà inibitorie dei due perileni per l'enzima telomerasi ha evidenziato un'attività paragonabile per le due molecole. Tuttavia, lo studio dell'interazione con sequenze in grado di originare strutture G-quadruplex ha sottolineato come fra i due composti, esista una diversa capacità di interazione e stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine.

In particolare, **PIPER**, avente catene laterali recanti ammine cicliche, ha dimostrato una minore affinità per strutture G-4 se confrontato con il derivato **K5**, in cui le ammine cicliche in catena sono state sostituite da gruppi dimetilamminici.

Tale comportamento è stato osservato con diverse tecniche sperimentali (gel elettroforesi e dicroismo circolare) e con sequenze diverse (telomerica e *c-myc*).

Confrontando, inoltre, la capacità dei due perileni di convertire la forma duplex in struttura G-quadruplex risulta, inaspettatamente, come il derivato meno efficiente nella stabilizzazione di strutture G-4 (**PIPER**) appaia il più efficace.

Studi precedenti suggerivano come un possibile fattore discriminante tra questi due composti fosse da ricondurre alla loro tendenza ad aggregare (Sissi et al, 2007); era stato osservato, infatti, come la natura delle catene laterali fosse in grado di condizionare il grado di aggregazione.

In particolare, la variazione del grado di aggregazione influenza la capacità dei perileni di interagire con DNA a doppia elica; **K5**, infatti, largamente presente in soluzione come monomero, è in grado di intercalarsi nella doppia elica con maggiore efficienza rispetto a **PIPER** che, largamente aggregato, risulta troppo ingombrante per collocarsi tra due coppie di basi del DNA. Inoltre, la presenza di ammine cicliche in catena laterale, ingombranti dal punto di vista sterico, può ulteriormente ostacolare l'interazione con la doppia elica dell'acido nucleico, spostando la preferenzialità verso il G-quadruplex che permette un processo di "stacking" senza intercalazione.

Per questo motivo quando il filamento G-rich risulta appaiato al suo complementare l'interazione con **K5** produce un'elevata stabilizzazione della forma duplex impedendo la sua conversione in struttura G-quadruplex.

Il diverso grado di aggregazione che caratterizza i due perileni potrebbe favorire non solo la selettività verso il G-quadruplex rispetto alla doppia catena, ma anche verso una particolare conformazione della struttura a quartetti di guanine (parallela o antiparallela). Ciò sembra in accordo con dati di letteratura dove si riporta come il pH, influenzando il grado di aggregazione di derivati perilenici, sia in grado di modulare selettività di riconoscimento verso specifiche strutture (Tuntiwechapikul et al, **2006**).

I dati raccolti dalle misure di dicroismo circolare suggeriscono come **PIPER**, caratterizzato da un più elevato stato di aggregazione, sia in grado di interagire preferenzialmente con strutture G-quadruplex aventi orientamento antiparallelo mentre **K5**, avente una minore tendenza all'aggregazione, mostra una certa preferenzialità per la conformazione parallela.

In presenza di potassio, l'oligonucleotide 4GGG forma una struttura antiparallela che viene stabilizzata da entrambi i perileni. Il riscaldamento, tuttavia, permette solo a **K5** di stabilizzare permanentemente la forma parallela. Tale fenomeno non si osserva con **PIPER**; probabilmente le ammine cicliche in catena laterale, oltre a favorire l'aggregazione, rendono possibile un'efficace interazione prevalentemente con strutture G-quadruplex aventi orientamento antiparallelo. Si ricordi che i diversi orientamenti collocano i loops di connessione in posizioni relativamente diverse rispetto ai quartetti di guanine, con la possibilità di instaurare interazioni diverse tra un sistema non aggregato ed un sistema aggregato, che presenta almeno 4 catene laterali protonate, a due a due sfalsate.

L'insieme dei dati raccolti conferma come piccole variazioni strutturali si traducano, in realtà, in sostanziali differenze in termini di riconoscimento di strutture G-quadruplex. Se la presenza di un esteso cromoforo planare è un elemento indispensabile per garantire un'efficace interazione con sequenze formanti strutture a quartetti di guanine, la natura dei sostituenti laterali risulta chiave nel modulare il riconoscimento e la stabilizzazione di specifici arrangiamenti.

3.3 BISANTRENI

3.3.1 COMPOSTI ESAMINATI

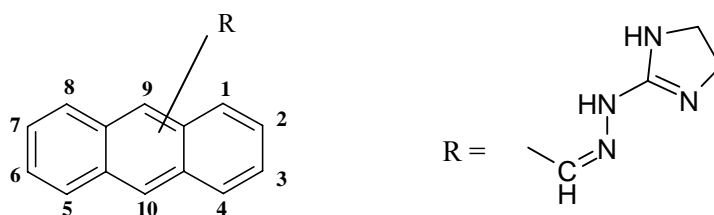
La terza classe di composti testati in questo lavoro di tesi riguarda derivati del bisantrene.

Il bisantrene ha una struttura costituita da un anello antracenicico disostituito in posizione 9 e 10 con catene 4,5-diidro-1*H*-imidazol-2-il-idrazoniche (figura 3.3.1)

Tale composto è noto da tempo per le sue capacità di formare complessi reversibili con il DNA a doppia elica. Questi interferiscono con i processi di rottura-ricongiunzione del DNA mediati della topoisomerasi II e favoriscono la frammentazione dell'acido nucleico (Capranico et al, **1998**).

Nonostante un'ampia caratterizzazione del processo di legame tra il bisantrene ed il DNA sia da tempo disponibile in letteratura, nulla è noto riguardo il riconoscimento di strutture diverse dalla doppia elica. E' stata, quindi, analizzata la capacità del bisantrene e dei suoi derivati di stabilizzare strutture G-quadruplex a livello telomerico e derivanti dalla sequenza G-rich del promotore di *c-myc*.

Sono state esaminati derivati regioisomeri del bisantrene, con catene collocate in posizioni diverse sull'anello antracenicico, ed analoghi aventi una singola catena (figura 3.3.1).



composto	n. catene	posizioni
Bis 1	1	1
Bis 2	1	2
Bis 9	1	9
Bis 9,10	2	9,10
Bis 1,5	2	1,5
Bis 1,8	2	1,8
Bis 2,6	2	2,6
Bis 2,7	2	2,7

Figura 3.3.1. Strutture chimiche delle molecole testate.

In questo modo si intendono delineare appropriate correlazioni struttura-attività, valutando il ruolo delle catene laterali, in termini di numero e collocazione spaziale.

Gli studi biofisici e biochimici sono stati, infine, associati a studi su linee cellulari tumorali, al fine di valutare anche l'effetto farmacologico dei vari derivati testati.

3.3.2 SAGGI DI INIBIZIONE ENZIMATICA: *TAQ* POLIMERASI E TELOMERASI

Per ogni composto preso in considerazione è stata valutata la capacità di inibire l'attività dell'enzima telomerasi mediante saggio TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Anche in questo caso sono state preventivamente eseguite varie esperienze di PCR in presenza di diverse concentrazioni dei derivati in esame (saggio di inibizione della *Taq* polimerasi).

L'attività di inibizione della telomerasi per ogni derivato è stata verificata a concentrazioni inferiori a quelle che inducono inibizione della *Taq* polimerasi e comunque fino ad un massimo di 40 μM .

In tabella 3.3.1 sono riportati i valori di IC_{50} per *Taq* polimerasi e telomerasi ottenuti dai saggi enzimatici per ogni composto esaminato.

composto	IC_{50} <i>Taq</i> polimerasi (μM)	IC_{50} telomerasi (μM)	SI (IC_{50} <i>Taq</i> polimerasi/ IC_{50} telomerasi)
Bis 1	>40	n.o.	-
Bis 1,5	30 \pm 5	0.9 \pm 0.2	33
Bis 1,8	30 \pm 5	7.5 \pm 2	4
Bis 2	>40	n.o.	-
Bis 2,6	30 \pm 5	1.9 \pm 0.5	16
Bis 2,7	7.5 \pm 2	1.9 \pm 0.5	4
Bis 9	>40	n.o.	-
Bis 9,10	15 \pm 3	3.8 \pm 1	4

Tabella 3.3.1. IC_{50} per gli enzimi *Taq* polimerasi e telomerasi per ciascun composto testato.

Come è possibile notare, i prodotti aventi una sola catena laterale (**Bis 1**, **Bis 2**, **Bis 9**) non mostrano alcuna attività di inibizione per entrambi gli enzimi utilizzati.

Sull'enzima *Taq* polimerasi, tra i composti bisostituiti, quelli che si dimostrano maggiormente attivi sono il **Bis 9,10** e l'analogo **Bis 2,7**; tutti gli altri presentano valori di IC_{50} comparabili.

Sull'attività telomerasica, i derivati a due catene mostrano tutti una certa attività, in particolare il **Bis 1,5**, il **Bis 2,6** e il **Bis 2,7** (con IC_{50} rispettivamente di 0.9 e 1.9 μM). Il **Bis 1,8**, l'unico ad avere due catene direzionate sullo stesso lato della molecola, risulta il meno efficace (IC_{50} pari a 7,5 μM).

Dai risultati ottenuti è stato ricavato un' indice di selettività, estrapolato dal rapporto tra IC_{50} per la *Taq* polimerasi e l' IC_{50} per la telomerasi, come già discusso in precedenza. Dall'analisi dei valori trovati, si osserva come la struttura più selettiva presenti le catene situate in posizione 1 e 5, con SI superiore a 30. I derivati bisostituiti in posizione 2,6 e 2,7, tra i più attivi nell'inibire la telomerasi, mostrano, tuttavia, un indice di selettività inferiore rispetto al derivato **Bis 1,5**.

Dai dati raccolti appare evidente come il numero di catene laterali rappresenti un elemento fondamentale per garantire l'attività di inibizione di entrambe le attività enzimatiche qui analizzate: solo i derivati aventi due sostituzioni si sono dimostrati in grado di interferire con l'attività di *Taq* polimerasi e telomerasi. La posizione delle catene, invece, appare cruciale nel determinare un'inibizione selettiva della telomerasi: se si confrontano i vari derivati bisostituiti, si osserva come lo spostamento delle catene sia in grado di modulare l'efficacia di inibizione di entrambi gli enzimi con diversa efficienza risultando, quindi, in selettività ampiamente modificate.

3.3.3 INDUZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX

Esperimenti di gel shift sono stati condotti al fine di valutare la capacità degli analoghi del bisantrene di indurre la formazione di diverse strutture G-quadruplex assunte da oligonucleotidi sintetici correlati al telomero umano.

Lo studio è stato effettuato con le sequenze 1GGG e 2GGG.

In figura 3.3.2 è riportato il gel shift effettuato sulla sequenza 2GGG in presenza di concentrazioni crescenti di **Bis 1,5**. Si osserva come, all'aumentare della concentrazione di composto diminuisca l'intensità della banda relativa all'oligonucleotide in forma monomerica mentre compare una banda, a più elevato peso molecolare (avente una minore velocità di migrazione), relativa alla forma dimerica (strutturata in G-quadruplex).

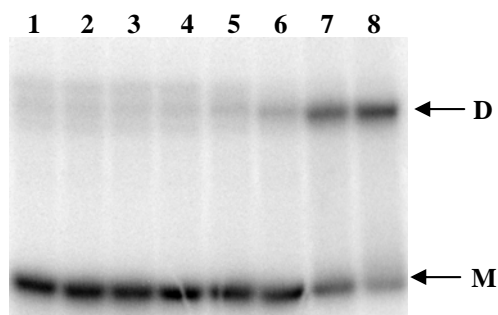


Figura 3.3.2. a. Gel shift per il sistema oligo 2GGG- **Bis 1,5** in TE/KCl 100 mM pH 8.0. 1: bianco (in assenza di composto). 2-3-4-5-6-7-8: derivato **Bis 1,5** alle concentrazioni 0,5-1-2,5-5-10-25-50 μM; Incubazione 24h a 37°C. **M**= monomero (oligonucleotide in forma monomerica), **D**= dimero (G-quadruplex dimerico).

Negli esperimenti condotti si è visto come non tutti i composti mostrino la capacità di indurre la formazione di strutture G-quadruplex.

Utilizzando la sequenza 1GGG nessun composto si è dimostrato in grado di formare strutture a quartetti di guanine. Diversamente, in presenza dell'oligonucleotide 2GGG, tutti i derivati aventi due catene laterali sono capaci di indurre la formazione di strutture G-quadruplex, tuttavia, la disposizione delle catene laterali sull'anello antracenicico è in grado di modulare notevolmente tale capacità.

Se si osservano i valori di % di oligonucleotide strutturato in forma G-quadruplex riportati nelle quantificazioni in figura 3.3.3 appare evidente come la molecola che si dimostra maggiormente attiva sia il bisantrene avente le due catene collocate sul nucleo aromatico nelle posizioni 1 e 5.

Seguono i composti **Bis 2,6** e **Bis 2,7**, mentre **Bis 9,10** e **Bis 1,8** risultano i meno attivi. Tale ordine riflette esattamente quanto osservato nelle misure di inibizione dell'attività telomerasica (saggio TRAP).

Esiste, quindi, una evidente correlazione tra attività antitelomerasica e capacità di indurre il ripiegamento in G-quadruplex di sequenze correlate al DNA telomeric.

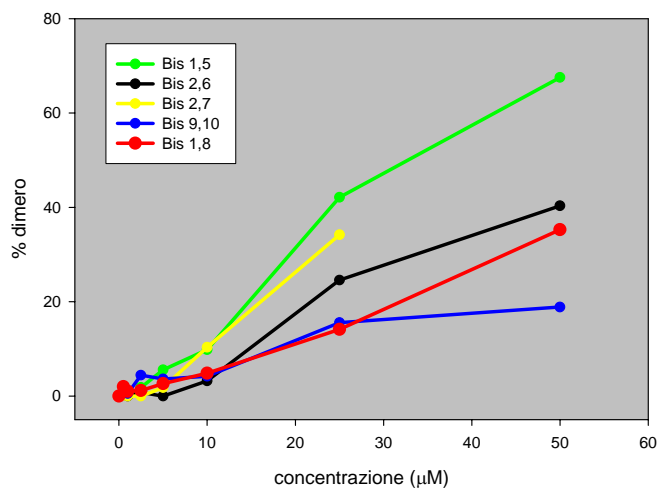


Figura 3.3.3. Quantificazioni relative ai gel shift effettuati sulla sequenza 2GGG. Effetto della concentrazione dei composti testati sulla percentuale di forma strutturata (G-quadruplex dimerico). I valori si riferiscono ai gel shift effettuati in TE/KCl 0,1 M pH 8.0.

Si è pensato, quindi, di approfondire la capacità dei composti di stabilizzare strutture a quartetti di guanine attraverso misure di denaturazione termica, estendendo tale indagine anche alla selettività G-quadruplex- duplex.

3.3.4 STABILIZZAZIONE DI STRUTTURE G-QUADRUPLEX E SELETTIVITA' G-QUADRUPLEX- DUPLEX

3.3.4.1 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex

Mediante esperimenti di fluorescence melting è stato possibile valutare la capacità dei derivati di stabilizzare la struttura G-quadruplex formata dall'oligonucleotide 4GGG, correlato alla sequenza telomerica umana.

In figura 3.3.4 sono riportati i grafici che rapportano le variazioni della temperatura di melting (ΔT_m) dell'oligo 4GGG in funzione della concentrazione, per ogni composto studiato. Le molecole sono state suddivise in base al numero di sostituzioni laterali.

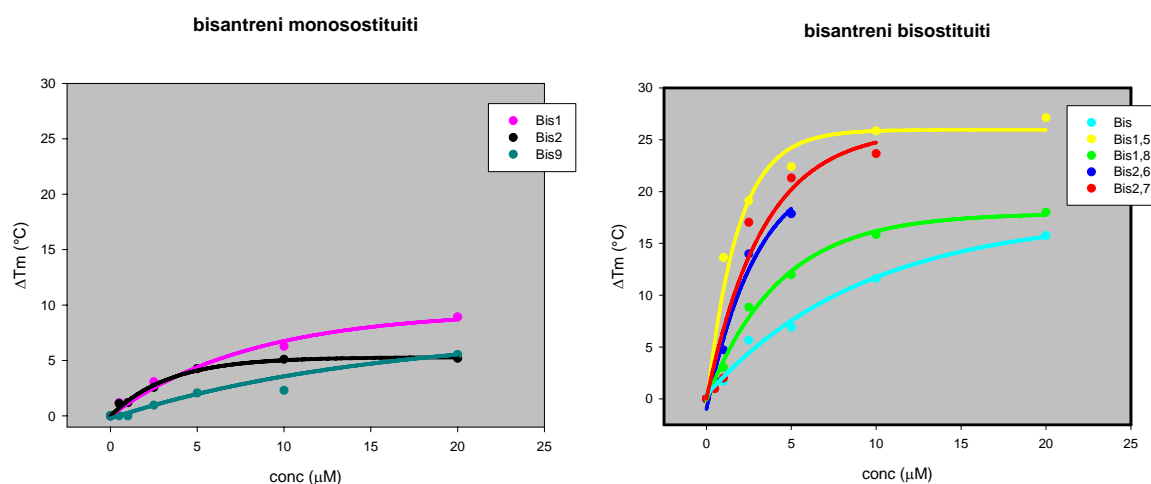


Figura 3.3.4. Effetto della concentrazione sulla variazione della temperatura di melting dell'oligonucleotide 4GGG per ogni molecola testata.

I risultati ottenuti confermano ampiamente quelli ricavati dai saggi enzimatici. Esiste, infatti, una evidente correlazione tra IC_{50} per la telomerasi e ΔT_m dell'oligonucleotide 4GGG. Infatti, i derivati che si dimostrano più attivi nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex presentano due catene laterali. I composti aventi una sola catena laterale (**Bis 1**, **Bis 2**, **Bis 9**), incapaci di interferire con l'attività telomerasica, non mostrano significative capacità di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine. Per quanto riguarda i derivati bisostituiti, **Bis 1,5**, avente un valore di IC_{50} per la telomerasi più basso rispetto ai congeneri, è in grado di indurre un'elevata variazione della temperatura di melting (22.4°C); anche i derivati **Bis 2,6** e **Bis 2,7**, aventi una buona capacità di inibizione delle

telomerasi, mostrano una efficienza simile nella stabilizzazione della struttura G-quadruplex.

Bis 9,10 e **Bis 1,8**, a conferma del dato enzimatico, si dimostrano poco efficaci nella stabilizzazione della struttura G-quadruplex.

Misure di fluorescence melting sono state utilizzate anche per definire la capacità delle molecole di stabilizzare strutture G-quadruplex assunte da sequenze diverse da quella telomerica. In particolare, è stata esaminata la sequenza situata nel promotore P1 dell'oncogene *c-myc*. Negli esperimenti effettuati si è utilizzato l'oligonucleotide Pu24 (5'-TGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3') marcato con fluoroforo e quencher nelle posizioni 3' e 5' rispettivamente.

Si è pensato di utilizzare tale sequenza dopo aver confrontato le curve di denaturazione termica ottenute con i due oligonucleotidi, Pu27 e Pu24, in presenza di diverse concentrazioni di K^+ . Studi NMR dimostrano, infatti, come la sequenza Pu27 sia in grado di originare più strutture G-quadruplex. Utilizzando la sequenza Pu24, priva del primo tratto di guanine, si ottiene uno spettro NMR maggiormente risolto, ad indicare la presenza di una conformazione prevalente: una struttura G-quadruplex intramolecolare parallela.

Come si osserva, in particolare, dalle curve relative alle derivate prime ottenute con le due sequenze (figura 3.3.5), con Pu27 sono evidenti più equilibri riconducibili alle diverse strutture che si possono formare.

Gli esperimenti sono stati condotti in un tampone analogo a quello utilizzato per la sequenza 4GGG (LP) ma a concentrazioni di K^+ inferiori (5mM anziché 50 mM). Si ricordi che la struttura G-quadruplex formata da Pu24 risulta troppo stabile utilizzando concentrazioni di K^+ più elevate (in presenza di K^+ 5 mM la temperatura di melting risulta, infatti, pari a 64°C).

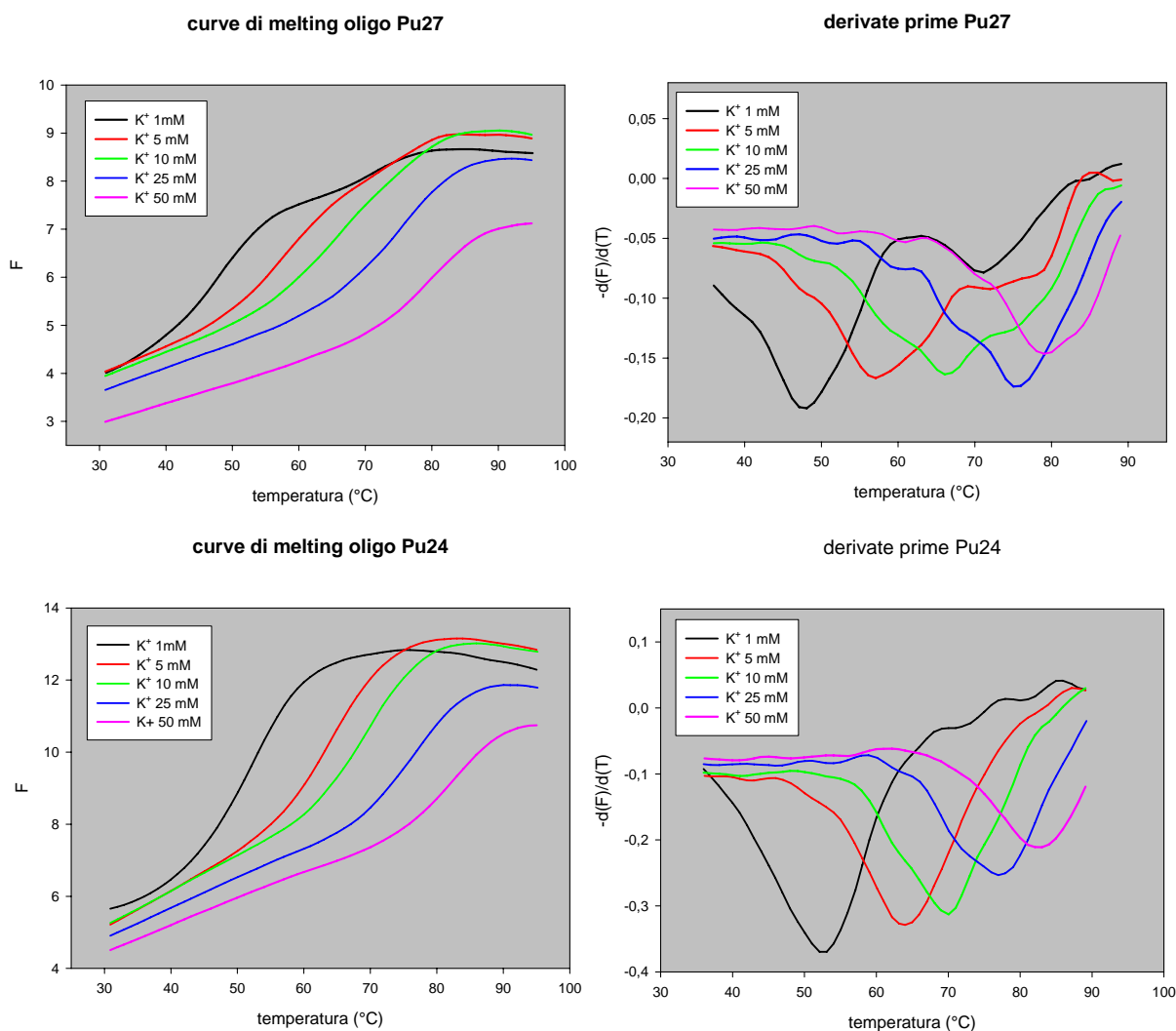


Figura 3.3.5. Curve di denaturazione termica e derivate prime relative alle sequenze oligonucleotidiche Pu27 e Pu24. Le curve sono state registrate in presenza di concentrazioni di K^+ comprese tra 1 e 50 mM.

I dati raccolti sono riassunti in figura 3.3.6 dove sono riportati i valori di ΔT_m di Pu24 calcolati alla concentrazione di 1 μM per ogni molecola. Tali valori sono stati, inoltre, confrontati con quelli relativi alla stabilizzazione della struttura G-quadruplex assunta dalla sequenza 4GGG (correlata al DNA telomerico).

Si è deciso di riportare un solo bisantrene monosostituito (**Bis 9**) come elemento di confronto.

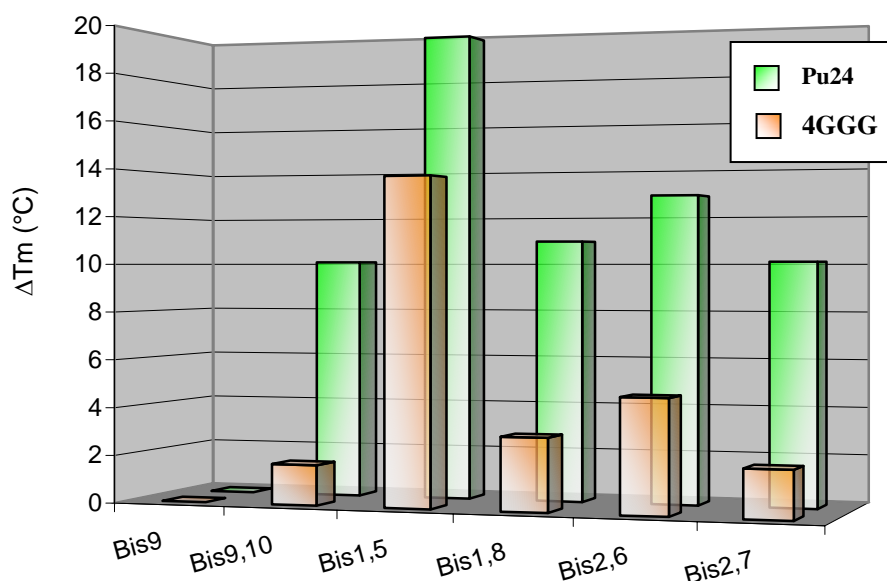


Figura 3.3.6. Confronto tra stabilizzazione delle strutture G-quadruplex assunte dalle sequenze 4GGG e Pu24. I valori di ΔT_m riportati sono stati calcolati per tutti i composti alla concentrazione di 1 μM . In verde è rappresentato l'oligonucleotide Pu24, in arancio l'oligo 4GGG. Tutte le misure sono state fatte in tampone LP/KCl 5 mM pH 7.4 con Pu24 e LP/KCl 50 mM pH 7.4 con la sequenza 4GGG.

Come si osserva dal grafico, nonostante vi sia una differenza in termini di valore assoluto nei valori di ΔT_m relativi ai due oligo Pu24 e 4GGG (si ricordi che la concentrazione dello ione K^+ varia nelle due condizioni), la scala di attività dei vari bisantreni si mantiene del tutto analoga.

Considerando, tuttavia, che le due sequenze, nelle condizioni testate, sono in grado di originare strutture a quartetti di guanine aventi orientamento diverso (4GGG, strutture miste, Pu24, strutture parallele) i risultati ottenuti sottolineano l'assenza di una selettività di riconoscimento verso specifici arrangiamenti.

3.3.4.2 Selettività G-quadruplex- duplex

Per comparare la stabilizzazione del DNA a doppia elica e della struttura G-quadruplex intramolecolare in presenza delle molecole in esame, è stato ripetuto l'esperimento di melting aggiungendo alla miscela di reazione una quantità stechiometrica dell'oligonucleotide complementare (non marcato) alle due sequenze 4GGG e Pu24 (marcate con fluoroforo e quencher).

In ogni esperimento eseguito sono state confrontate le curve di melting ottenute in assenza di ligando con quelle ottenute in presenza di concentrazioni crescenti dei diversi composti.

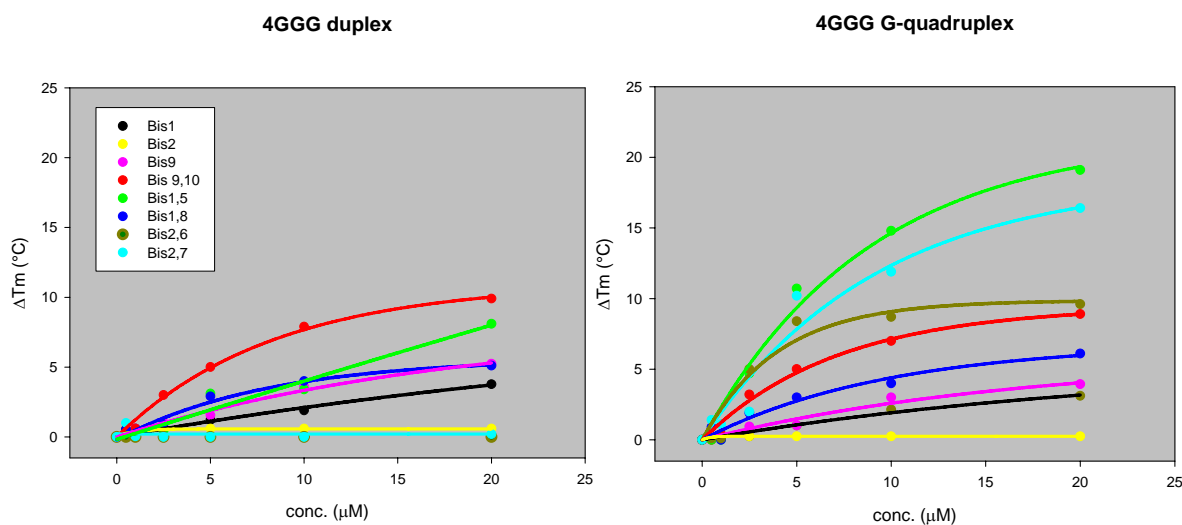


Figura 3.3.7. Effetto della concentrazione sulla variazione della temperatura di melting dell'oligonucleotide 4GGG in forma duplex e G-quadruplex per ogni molecola testata. Le misure sono state effettuate in LP/KCl 50 mM pH 7.4.

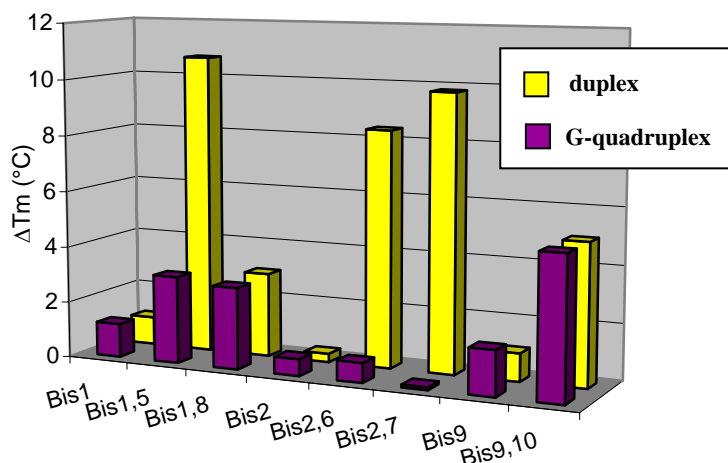


Figura 3.3.8. ΔT_m dell'oligo 4GGG in forma duplex e in forma G-quadruplex calcolate alla concentrazione di 5 μM . Le condizioni sperimentali utilizzate sono riportate in figura precedente.

Come si osserva dalle curve relative alla stabilizzazione della forma duplex dell'oligo 4GGG riportate in figura 3.3.7 i derivati monosostituiti (**Bis 1**, **Bis 2**, **Bis 9**) mostrano una scarsa capacità di interazione con il DNA sia in forma duplex che G-quadruplex.

I composti che stabilizzano maggiormente la struttura G-4 si confermano **Bis 1,5** seguito da **Bis 2,7** e **Bis 2,6**.

E' interessante il fatto che **Bis 9,10** e **Bis 1,8** inducano effetti assolutamente confrontabili nei due arrangiamenti strutturali dell'acido nucleico. In figura 3.3.8 sono riportati i valori

di ΔT_m per la forma duplex e G-quadruplex della sequenza 4GGG per ogni molecola testata (calcolati alla concentrazione di 5 μM).

La selettività di riconoscimento G-quadruplex/ duplex ottenuta da questi studi di denaturazione termica sulla sequenza telomerica è stata, quindi, confrontata con i valori di SI ($\text{IC}_{50} \text{ Taq polimerasi} / \text{IC}_{50} \text{ telomerasi}$) estrapolati dai saggi enzimatici. In tabella 3.3.2 sono riassunti gli indici di selettività ottenuti dalle misure enzimatiche e di denaturazione termica.

composto	SI ($\Delta T_m \text{ Gq} / \Delta T_m \text{ duplex}$)	SI ($\text{IC}_{50} \text{ Taq pol} / \text{IC}_{50} \text{ Telo}$)
Bis 1	0.8	-
Bis 1,5	3.4	33.3
Bis 1,8	1	4
Bis 2	0.5	-
Bis 2,6	12	16
Bis 2,7	98	4
Bis 9	0.6	-
Bis 9,10	1	4

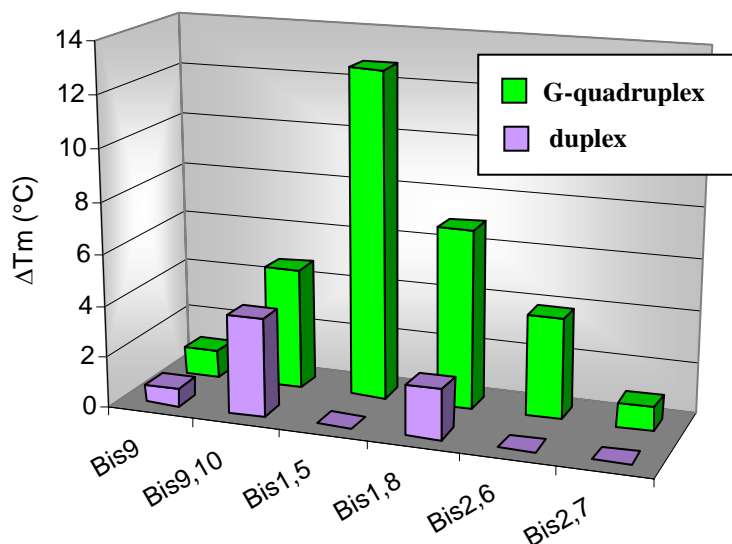
Tabella 3.3.2. Indici di selettività ottenuti dalle misure enzimatiche (inibizione *Taq* polimerasi e telomerasi) e di denaturazione termica relative alla stabilizzazione della sequenza 4GGG in forma duplex e G-quadruplex. I valori di ΔT_m riportati sono stati calcolati alla concentrazione di 5 μM .

I composti monosostituiti mostrano un indice di selettività ($\Delta T_m \text{ duplex} / \Delta T_m \text{ G-quadruplex}$) inferiore a 1, a confermare la bassa capacità di interazione con gli acidi nucleici, in generale. **Bis 9,10** e **Bis 1,8** si dimostrano poco selettivi, con valori di SI appena superiori a quelli riportati per i bisantreni monocatena.

Bis 1,5 vanta un buon indice di selettività, tuttavia, i valori ottenuti per le molecole **Bis 2,6** e in particolare con **Bis 2,7** risultano molto più elevati, a causa del basso valore di ΔT_m della forma duplex. Questo, apparentemente, non correla con i dati enzimatici, dove era stata osservata inibizione dell'attività dell'enzima *Taq* polimerasi a concentrazioni relativamente basse in particolare con **Bis 2,7**; ciò può essere giustificato dal fatto che l'inibizione dell'attività enzimatica osservata può essere attribuita ad interazioni diverse da quelle con il DNA. E' da sottolineare, tuttavia, come modalità di interazione con la doppia elica diverse dall'intercalazione, difficilmente inducono larghe variazioni della temperatura di melting dell'acido nucleico.

Studi di selettività G-quadruplex- duplex sono stati estesi anche alla sequenza del promotore di *c-myc*. Nel grafico riportato in figura 3.3.9 sono stati confrontati i valori di ΔT_m calcolati con l'oligonucleotide Pu24 in forma duplex e G-quadruplex. E' stato riportato un solo bisantrene monosostituito (**Bis 9**) come elemento di riferimento.

Figura 3.3.9. Valori di ΔT_m calcolati con la sequenza Pu24 in forma duplex e G-quadruplex per ogni molecola testata alla concentrazione di 0,5 μ M. Le misure sono state eseguite in tampone LP/KCl 5 mM pH 7.4.



Si può osservare come il comportamento dei vari derivati sia parallelo a quanto visto per la sequenza telomerica umana. L'analogo del bisantrene avente catene situate in posizione 1 e 5 conferma il suo carattere selettivo, già evidenziato sulla sequenza 4GGG. Una buona selettività si osserva anche con **Bis 1,8** nonostante tale molecola mostri una discreta affinità per la forma duplex (se confrontata con **Bis 1,5**). Analogamente a quanto visto con la sequenza telomerica, **Bis 2,6** e **Bis 2,7** non mostrano alcuna capacità di stabilizzazione della forma duplex e questo si traduce in un'elevata selettività.

Per indagare, quindi, l'esistenza e il tipo di interazione data dai derivati **Bis 2,6** e **Bis 2,7** con il DNA a doppio filamento si sono utilizzate misure di dicroismo circolare e saggi di unwinding.

3.3.5 SAGGIO DI UNWINDING

Per verificare se **Bis 2,6** e **Bis 2,7** fossero in grado di intercalarsi tra le coppie di basi presenti nel DNA a doppia elica, sono stati eseguiti saggi di unwinding. Il comportamento osservato è stato poi confrontato con quello del **bisantrene (Bis 9,10)**, noto per la sua capacità di intercalazione.

Il saggio di unwinding prevede l'incubazione di un plasmide superavvolto con l'enzima Topoisomerasi I e contemporaneamente con le molecole da testare.

Ogni DNA circolare è caratterizzato da un preciso *numero di legame (Lk)*, definito come il numero di volte che un filamento di DNA si avvolge in direzione destrorsa attorno all'asse dell'elica. Molecole che differiscono soltanto nel numero di legame vengono dette isomeri topologici (topoisomeri) l'una dell'altra. I topoisomeri si distinguono per la diversa mobilità elettroforetica e possono interconvertirsi solo tagliando uno o entrambi i filamenti del DNA e poi ricongiungendoli.

La capacità dei derivati **Bis 2,6** e **Bis 2,7** di interagire con la doppia elica attraverso un meccanismo di tipo intercalativo è stata esaminata con il saggio di unwinding tramite l'impiego di topoisomerasi I.

Le varie forme topologiche possono essere risolte tramite gel elettroforesi su gel di agarosio. Queste sono, infatti, caratterizzate da una mobilità elettroforetica che dipende dall'entità di rilassamento del DNA: più il DNA è rilassato meno compatta risulta la molecola e, conseguentemente, minore sarà la sua velocità di migrazione. L'identificazione nel gel di una banda relativa al DNA in forma superavvolta è indice della presenza di composti in grado di legare la doppia elica, intercalandosi.

Nei gel riportati sono stati inseriti due controlli: il DNA plasmidico presente in forma superavvolta (lane1), caratterizzato da una elevata mobilità elettroforetica, e il plasmide incubato con l'enzima Topoisomerasi I (lane2). Come si osserva, l'azione della Topoisomerasi I causa il rilassamento del DNA plasmidico.

Con il **bisantrene** (figura 3.3.10 a.) il ritorno alla forma superavvolta appare evidente già alla concentrazione di 2,5 μM .

Aggiungendo, invece, alla miscela plasmide + Topo I concentrazioni crescenti di **Bis 2,6** e **Bis 2,7** (figura 3.3.10 b.), si nota come l'andamento non sia quello tipico di un composto intercalante: nonostante si osservi la comparsa della forma superavvolta del DNA, la banda relativa alla forma rilassata rimane fino alle più alte concentrazioni testate (100 μ M). Tale effetto può essere giustificato dal fatto che **Bis 2,6** e **Bis 2,7** sono in grado di intercalare solo parzialmente nel DNA a doppia elica, oppure, ad elevate concentrazioni, rendono la molecola di DNA inaccessibile all'enzima, inibendone l'attività.

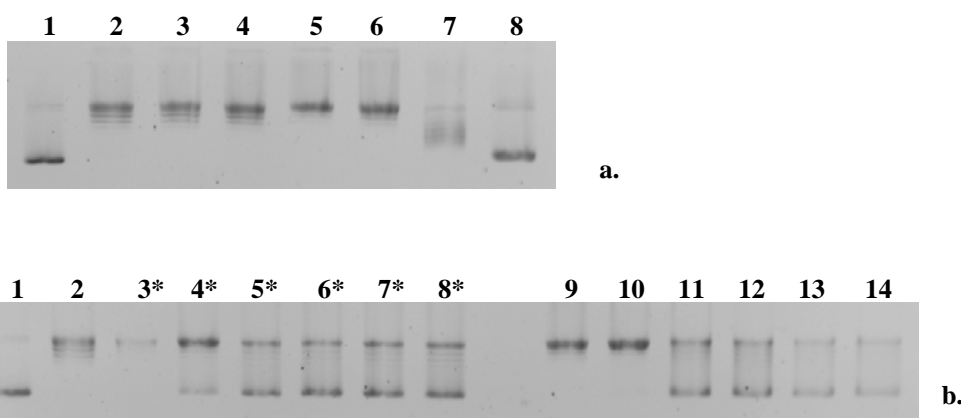


Figura 3.3.10. Gel di agarosio all' 1% in TAE 1X relativi al saggio di unwinding per i composti **Bis 9,10** (a) e **Bis 2,6** e **Bis 2,7** (b). **1.** pBR322 superavvolto. **2.** pBR322 rilassato dall'enzima Topoisomerasi I. **3- 8.** pBR322+Topo I in presenza di **Bis 9,10** 0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1- 2,5 μ M; **3*- 8*.** pBR322+Topo I in presenza di **Bis 2,6** 2,5- 5- 10- 20- 50- 100 μ M; **9- 14** pBR322+ TopoI in presenza di **Bis 2,7** 2,5- 5- 10- 20- 50- 100 μ M.

Un' ulteriore possibilità è che i due composti agiscano come veleni per la Topoisomerasi I; in quest'ultimo caso la banda a più elevato peso molecolare presente nel gel non rappresenta il DNA in forma rilassata ma in forma open circular (nicked DNA). In un gel di agarosio, infatti, in assenza di agenti intercalanti, non risulta possibile discriminare le due forme.

Per valutare tale ipotesi è stato ripetuto l'esperimento caricando gli stessi campioni in un gel di agarosio contenente etidio bromuro (noto intercalante), presente anche nel tampone di corsa.

Dalle bande presenti nel gel (figura 3.3.11) si conferma come i due derivati non agiscano da veleni per l'enzima in quanto a tutte le concentrazioni testate si osserva una banda corrispondente a forme circolarmente chiuse.

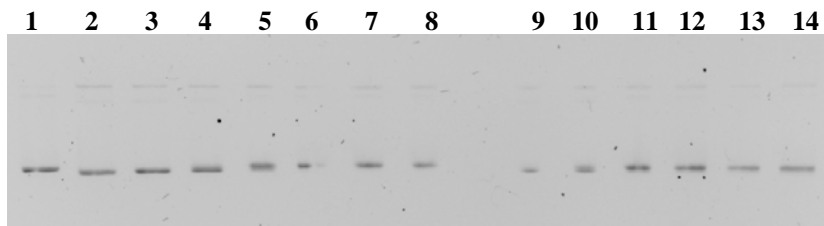


Figura 3.3.11. Gel di agarosio all'1% in TAE 1X + EtBr 0,5 ng/μl relativo al saggio di unwinding per le molecole **Bis 2,6** e **Bis 2,7**. **1.** pBR322 superavvolto. **2.** pBR322 rilassato dall'enzima Topoisomerasi I. **3- 8.** pBR322+Topo I in presenza di **Bis 2,6** 2,5- 5- 10- 20- 50- 100μM; **9- 14** pBR322+ TopoI in presenza di **Bis 2,7** 2,5- 5- 10- 20- 50- 100μM.

Anche in questo caso, quindi, è stato confermato il legame di **Bis 2,6** e **Bis 2,7** al DNA a doppia elica; le modalità di interazione delle due molecole con l'acido nucleico non prevedono esclusivamente un meccanismo di tipo di intercalativo. Ciò potrebbe, quindi, giustificare l'assenza di stabilizzazione osservata negli esperimenti di fluorescence melting.

3.3.6 CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA E MISURE DI DICROISMO CIRCOLARE

In un primo momento tutti i composti bisostituiti sono stati caratterizzati per via spettrofotometrica. Tra i derivati monocatena si riporta **Bis 9** come composto di riferimento. Gli spettri sono stati registrati nell'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra 235 e 500 nm (figura 3.3.12).

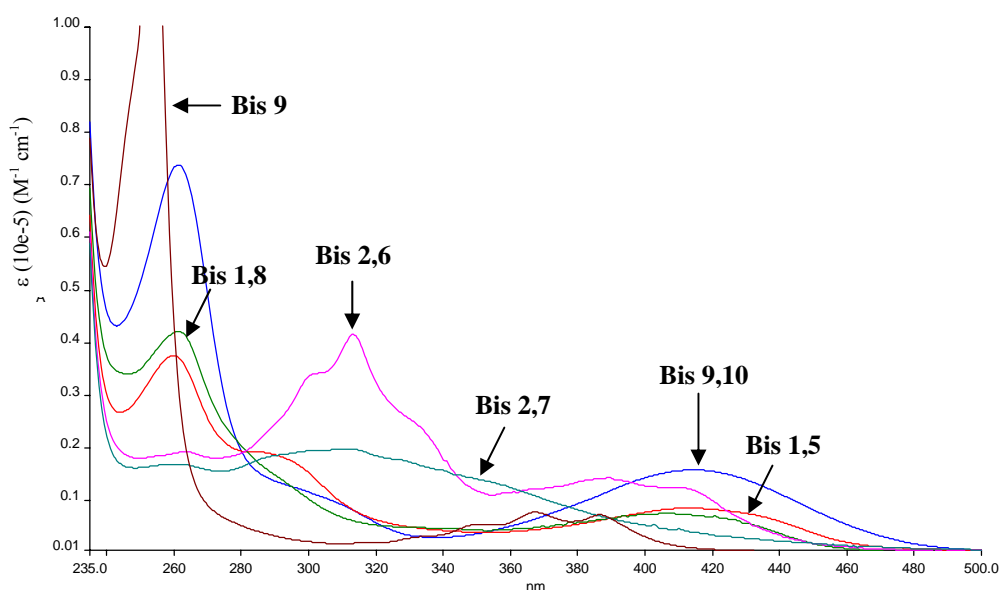


Figura 3.3.12. Spettri UV registrati in TE/KCl 0,1 M pH 8.0 nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 235 e 500 nm.

3.3.6.1 Interazioni con DNA duplex

Le modalità di interazione di **Bis 2,6** e **Bis 2,7** con il DNA a doppia elica sono state ulteriormente investigate mediante dicromismo circolare.

Gli spettri dicromici sono stati confrontati con quelli ottenuti dagli studi di interazione condotti in presenza di **Bis 9,10**.

In figura 3.3.13, sono riportati gli spettri relativi all'interazione di **Bis 9,10**, **Bis 2,6**, **Bis 2,7** e **Bis 1,5** con ctDNA in TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.00.

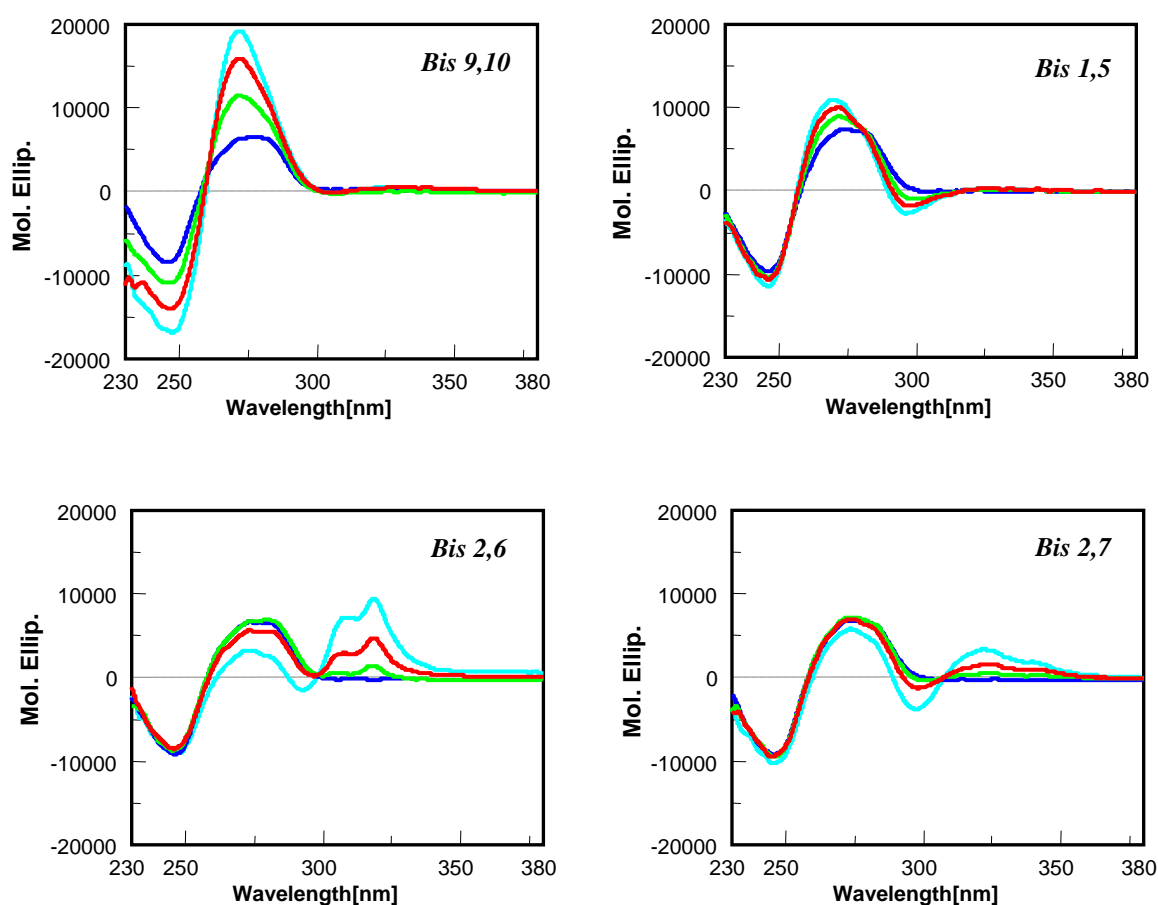


Figura 3.3.13. Spettri di ctDNA in tampone TE/KCl 0,1 M pH 8.0 in assenza e in presenza dei composti **Bis 9,10**, **Bis1,5**, **Bis2,6**, **Bis2,7**. In **blu**: spettro solo ctDNA (96 μ M per residui); in **verde**: ctDNA in presenza di composto (4 μ M); in **rosso**: ctDNA in presenza di composto (8 μ M); in **azzurro**: ctDNA in presenza di composto (12 μ M).

Il segnale dicroico risulta dalla combinazione dello spettro intrinseco riconducibile alle transizioni della struttura polinucleotidica asimmetrica e dal contributo derivante dall'induzione di ellitticit  nelle transizioni del legante complessato al sistema chirale.

Dagli spettri riportati appare evidente come in presenza di **Bis 9,10**, all'aumentare della concentrazione si abbia un notevole incremento del segnale dicroico, ad indicare la capacit  della molecola di interagire con la struttura a doppia elica del DNA, intercalandosi.

Se si analizzano, invece, gli spettri registrati in presenza degli analoghi **Bis 2,6** e **Bis 2,7** non si osserva alcun incremento del segnale dell'acido nucleico, tuttavia, all'aumentare della concentrazione si assiste ad un notevole incremento del segnale dicroico indotto.

Studi di letteratura dimostrano come la presenza di un segnale dicroico indotto positivo sia da attribuire ad un legame delle molecole a livello dei solchi del DNA (White et al, 2007). Tale misura confermerebbe, quindi, quanto ipotizzato: i derivati aventi catene in posizione 2,6 e 2,7 legano il DNA in forma duplex principalmente con modalità diverse dall'intercalazione.

Per quanto riguarda il derivato **Bis1,5** si osserva un comportamento intermedio: è evidente all'aumentare della concentrazione un incremento del segnale dicroico dato dall'acido nucleico; tuttavia, è presente anche un segnale dicroico indotto nella regione intorno ai 300 nm. E' possibile, dunque, che l'interazione con il DNA a doppia elica data da tale derivato preveda sia processo di intercalazione (anche se con minore efficienza se confrontato con il capostipite **Bis 9,10**) sia un legame esterno, a livello dei solchi.

3.3.6.2 Interazioni con sequenze in grado di formare strutture G-quadruplex

3.3.6.2.1 Studi condotti su sequenze correlate al DNA telomerico

Le misure effettuate sulla sequenza 2GGG non hanno permesso di operare un'adeguata caratterizzazione delle interazioni date dai composti analizzati con tale sequenza; ciò dovuto, in modo particolare, alla presenza di forti segnali di dicroismo indotto.

Come già riportato nel capitolo dei perileni, l'oligonucleotide 2GGG nelle condizioni ioniche utilizzate si presenta solo parzialmente strutturato. Risulta, pertanto, difficile differenziare l'interazione dei composti con l'oligonucleotide come singolo filamento dallo stesso organizzato in G-quadruplex.

In figura 3.3.14 sono riportati gli spettri registrati con la sequenza 2GGG in presenza dei composti **Bis 9,10**, **Bis 1,5** e **Bis 2,6**.

Nelle stesse condizioni si sono registrati gli spettri utilizzando anche la sequenza 2GGG-mut (figura 3.3.15), incapace di formare strutture a quartetti di guanine; si tratta, infatti, di una sequenza analoga all'oligonucleotide 2GGG in cui sono state sostituite le due triplette GGG.

Dal confronto degli spettri ottenuti con 2GGG e 2GGG-mut appare evidente come il comportamento dei tre composti sia piuttosto paragonabile. In entrambi i casi si osserva con **Bis 9,10** un notevole incremento del segnale, con **Bis 1,5** si ha la comparsa di un

segnale dicroico indotto positivo nella regione intorno ai 330 nm; con **Bis2,6** si osserva, invece, un forte segnale indotto di segno negativo.

Per quanto riguarda gli altri derivati si è visto come **Bis 1,8** presenti un comportamento analogo al **Bis 9,10**, mentre **Bis 2,7** risulta paragonabile al derivato **Bis 2,6**. **Bis 9** non ha, invece, dimostrato grandi capacità di interazione, in accordo con i dati enzimatici e di denaturazione termica.

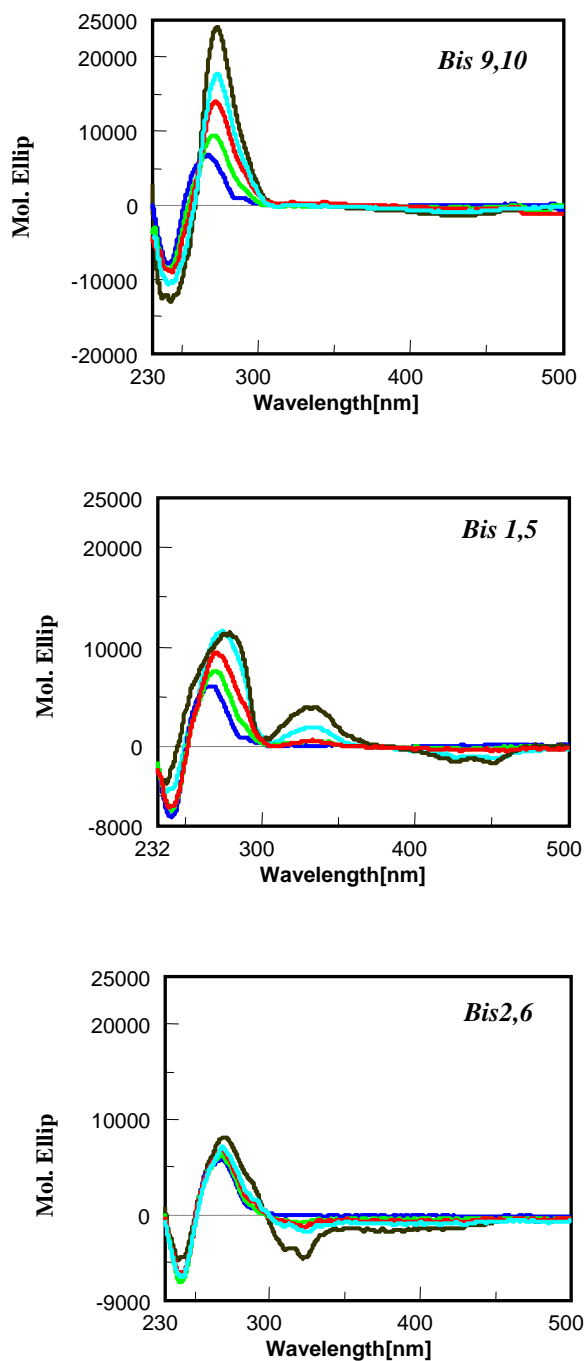


Figura 3.3.14. Spettri dicroici relativi all'oligonucleotide **2GGG** in presenza dei composti **Bis 9,10**, **Bis 1,5** e **Bis 2,6** in TE/KCl 0,1 M pH 8.0.

In **blu** è riportato lo spettro del solo oligonucleotide (96 μM per residui);

in **verde** lo spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (4 μM);

in **rosso** lo spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (8 μM);

in **azzurro** lo spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (12 μM);

in **nero** lo spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (24 μM).

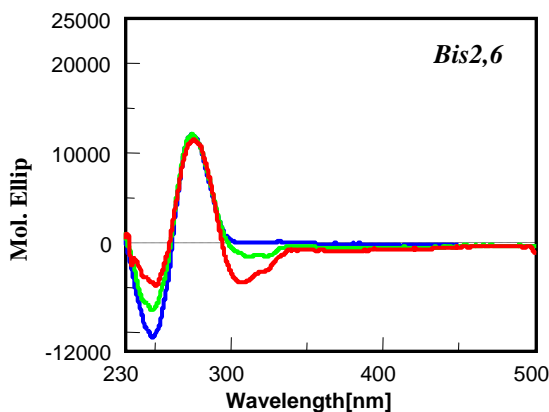
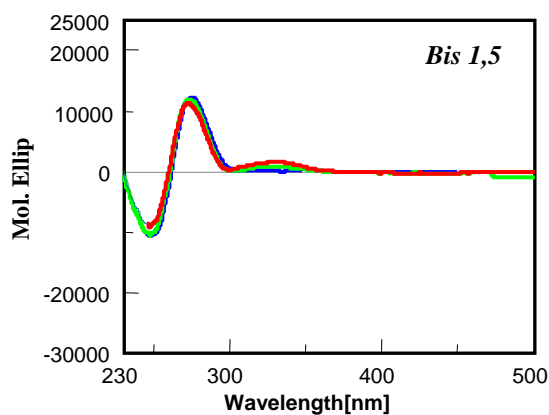
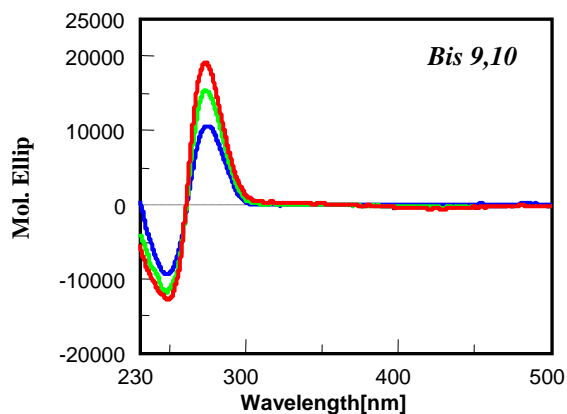


Figura 3.3.15. Spettri dicroici relativi all'oligonucleotide **2GGG-mut** in presenza dei composti **Bis 9,10**, **Bis 1,5** e **Bis 2,6** in TE/KCl 0,1 M pH 8,0.

In **blu** è riportato lo spettro del solo oligonucleotide (96 μ M per residui);
 in **verde** lo spettro oligo in presenza di composto (8 μ M);
 in **rosso** lo spettro dell'oligonucleotide in presenza di composto (16 μ M).

Dalle misure effettuate sulla sequenze 2GGG non è stato, dunque, possibile definire l'effetto indotto dai composti testati sulla stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine. Date le problematiche riscontrate sulla sequenza 2GGG si è pensato di non estendere lo studio all'oligonucleotide 4GGG. La coesistenza di più strutture date da tale sequenza, rende, infatti, ancor più difficile tale indagine.

3.3.6.2 Studi condotti sulla sequenza del promotore di *c-myc*

Misure di dicroismo circolare sono state utilizzate per studiare l'interazione di alcuni analoghi del bisantrene con la sequenza situata a livello del promotore dell'oncogene *c-myc*.

Nelle condizioni ioniche utilizzate tale sequenza si presenta stabilmente strutturata in G-quadruplex; ciò dovrebbe consentire di evitare la possibile interazione con l'oligonucleotide a singolo filamento, non organizzato, osservata con le sequenze 2GGG e 2GGG-mut.

Le misure sono state fatte con **Bis 1,5** e confrontate con quelle ottenute in presenza dell'analogo monosostituito **Bis 9**.

Nelle figure 3.3.16 e 3.3.17 sono riportati gli spettri registrati con l'oligo Pu24 (simulante la regione G-rich del promotore di *c-myc*) in presenza dei due composti.

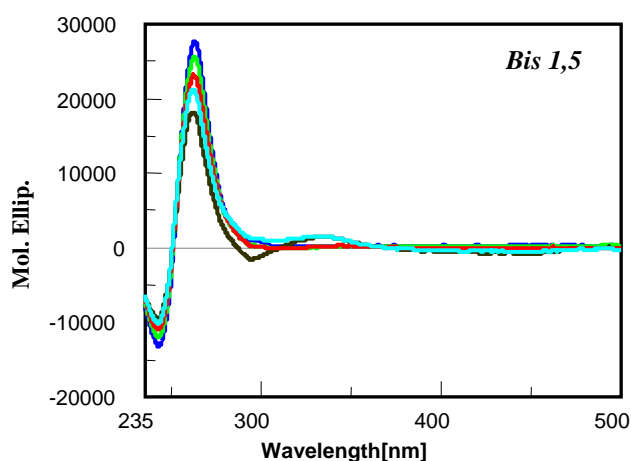


Figura 3.3.16. Spettri dell'oligonucleotide **Pu24ss** in tampone TE/KCl 0,1 M, pH 8,00, in assenza e in presenza del composto **Bis 1,5**:
In blu: Spettro solo oligo (96 μ M per residui)
In verde: Pu24 in presenza di **Bis 1,5** (5 μ M);
In rosso: Pu24 in presenza di **Bis 1,5** (9 μ M);
In azzurro: Pu24 in presenza di **Bis 1,5** (18 μ M);
In nero: Pu24 in presenza di **Bis 1,5** (27 μ M).

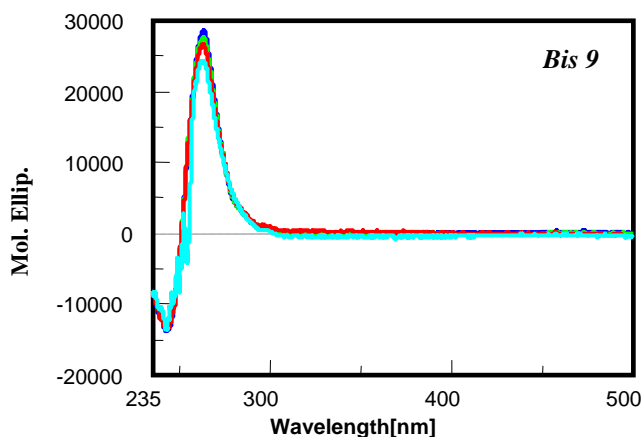


Figura 3.3.17. Spettri dell'oligonucleotide **Pu24ss** in tampone TE/KCl 0,1 M, pH 8,00, in assenza e in presenza del composto **Bis 9**:
In blu: Spettro solo oligo (96 μ M per residui)
In verde: Pu24 in presenza di **Bis 9** (4 μ M);
In rosso: Pu24 in presenza di **Bis 9** (8 μ M);
In azzurro: Pu24 in presenza di **Bis 9** (26 μ M).

Dall'analisi degli spettri ottenuti si può osservare come la struttura assunta dalla sequenza Pu24 in tampone contenente K^+ 100 mM sia riconducibile ad un G-quadruplex con orientamento parallelo (con i caratteristici picchi a 240 e 260 nm).

Nelle condizioni sperimentali utilizzate tale struttura risulta particolarmente stabile, con T_m pari a 80°C.

Per quanto riguarda la titolazione effettuata in presenza della molecola **Bis 1,5**, appare evidente come ad ogni aggiunta di composto non si osservi un aumento del segnale caratteristico della struttura assunta dall'oligonucleotide, tuttavia, si osserva la presenza di un segnale dicroico indotto nella regione di assorbimento di **Bis 1,5** dovuto alla formazione di un complesso tra il legante e l'acido nucleico.

In presenza dell'analogo monosostituito **Bis 9**, tale effetto non si verifica. Ciò conferma la bassa affinità di questo composto per le strutture G-quadruplex, già osservata negli esperimenti di dicroismo circolare e di fluorescence melting condotti con la sequenza telomerica (4GGG).

Le stesse molecole sono state analizzate anche con la sequenza Pu24 presente in forma duplex. In questo modo si è potuto valutare la capacità dei due derivati di disappaiare i due filamenti (oligo Pu24+ complementare) e di spostare l'equilibrio verso la formazione di strutture G-quadruplex.

Dagli spettri riportati nelle figure 3.3.18 e 3.3.19 si può notare come con i due composti testati non si abbia la conversione della forma duplex in forma G-quadruplex. L'assenza segnali dicroici indotti, inoltre, suggerisce una loro modesta interazione con la doppia elica.

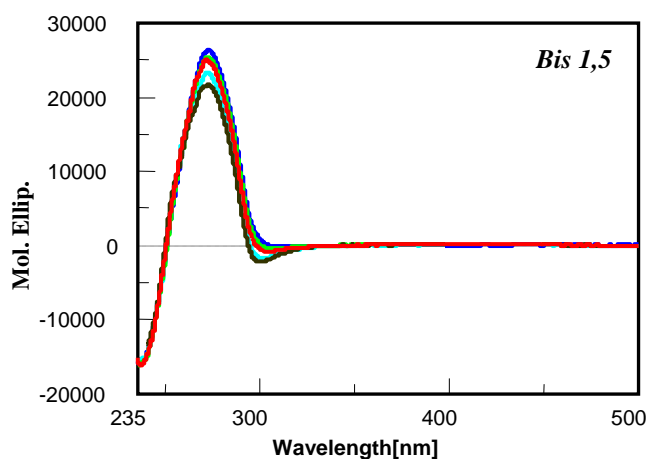


Figura 3.3.18. Spettri dell'oligonucleotide **Pu24 duplex (dsPu24)** in tampone TE/KCl 0,1 M, pH 8,0, in assenza e in presenza del composto **Bis 1,5**:
In blu: Spettro solo oligo (96 µM per residui)
In verde: dsPu24 in presenza di **Bis 1,5** (5 µM);
In rosso: dsPu24 in presenza di **Bis 1,5** (9 µM);
In azzurro: dsPu24 in presenza di **Bis 1,5** (18 µM);
In nero: dsPu24 in presenza di **Bis 1,5** (27 µM).

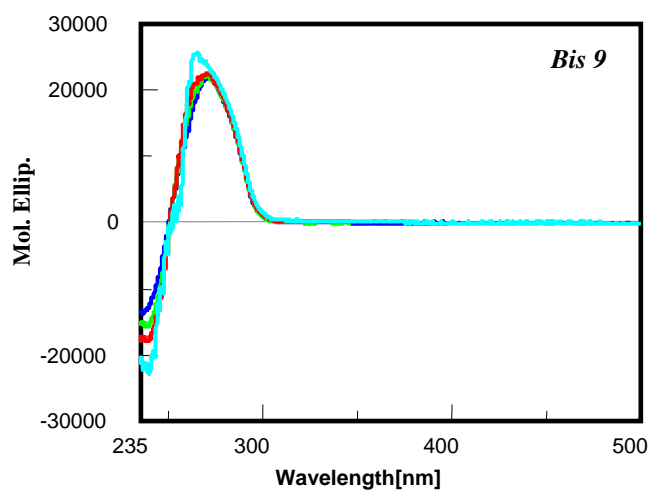


Figura 3.3.19. Spettri dell'oligonucleotide **Pu24 duplex (dsPu24)** in tampone TE/KCl 0,1 M, pH 8,0, in assenza e in presenza del composto **Bis 9**:
In blu: Spettro solo oligo (96 µM per residui)
In verde: dsPu24 in presenza di **Bis 9** (4 µM);
In rosso: dsPu24 in presenza di **Bis 9** (8 µM);
In azzurro: dsPu24 in presenza di **Bis 9** (26 µM).

Per questa classe di composti si è pensato di completare le analisi effettuate in ambito molecolare con uno studio a livello biologico. Si è passati, quindi, a studiare gli effetti indotti dai derivati del bisantrene su linee cellulari tumorali al fine di individuare un'eventuale correlazione con quanto osservato *in vitro*.

3.3.8 ATTIVITA' SU LINEE CELLULARI TUMORALI

3.3.8.1 Saggio di proliferazione cellulare a breve termine

Si sono utilizzate due diverse linee cellulari, telomerasi positive:

- SKMel5, una linea di melanoma umano, caratterizzata da telomeri di lunghezza pari a 14.6 kb;
- LOVO, cellule di carcinoma del colon, aventi telomeri di lunghezza intorno a 6.2 kb.

Su queste cellule si è osservato l'effetto indotto sulla proliferazione cellulare e parallelamente sulla telomerasi in seguito ad un trattamento prolungato per 24-48-96h con concentrazioni crescenti dei composti in esame.

In tabella 3.3.3 sono riportati i valori di IC_{50} ottenuti dagli studi effettuati sulle due linee cellulari. E' stato riportato un solo derivato monosostituito (**Bis 9**) come composto di riferimento.

composto	IC_{50} (μ M)			
	SKMel5		LOVO	
	24h	96h	24h	96h
Bis 9	5,4 \pm 1,5	4,9 \pm 1,2	4 \pm 1	1,5 \pm 0,8
Bis 9,10	1,5 \pm 0,8	1,4 \pm 0,8	4,8 \pm 1	1,4 \pm 0,8
Bis 1,5	12,6 \pm 3	13 \pm 4	>20	>20
Bis 1,8	3,7 \pm 1	6,8 \pm 2	10,8 \pm 3	6,4 \pm 2
Bis 2,6	1,8 \pm 0,9	1,4 \pm 0,8	2,2 \pm 0,9	1,3 \pm 0,8
Bis 2,7	9 \pm 3	7,4 \pm 2	14,3 \pm 4	5,9 \pm 2

Tabella 3.3.3. Citotossicità sulle linee cellulari LOVO e SKMel5: IC_{50} per ogni composto testato, calcolati dopo 24 h e 96 h di trattamento.

Dai valori di IC_{50} riportati, emerge come il **Bis 9,10**, capostipite della famiglia, eserciti una notevole citotossicità, già a tempi brevi (24h), in particolare sulla linea SKMel5. Tale comportamento è condiviso in particolare da **Bis 2,6** avente, anch'esso, un elevato potere citotossico. Tutti gli altri derivati testati risultano meno citotossici, in particolare **Bis 1,5**; sulla linea SKMel5 presenta i più elevati valori di IC_{50} ; sulla linea LOVO è incapace di indurre una riduzione della popolazione cellulare del 50%, anche dopo 96h di trattamento, fino alla più alta concentrazione testata (20 μ M).

In generale, per tutti i composti, l'effetto citotossico a 24h esercitato sulla linea LOVO sembra minore, se confrontato con la linea SKMel5; inoltre, è interessante notare come, sulla linea SKMel5, non sempre si abbia un chiaro aumento dell' effetto citotossico con l'incremento del tempo di trattamento. Si ricordi che tali dati sono stati acquisiti valutando le cellule nel tempo dopo un unico trattamento iniziale.

Tale comportamento può essere, quindi, attribuito a degradazione metabolica nel tempo (con conseguente diminuzione dell'attività esercitata), oppure all'intervento di meccanismi di espulsione da parte della cellula.

I dati raccolti suggeriscono un ruolo attivo della cellula in tale processo visto che la tossicità risulta differenziata per le due linee esaminate.

3.3.8.2 Saggio TRAP e confronto con l'attività antiproliferativa

Gli estratti proteici, derivanti dai pellet cellulari raccolti, sono stati utilizzati per effettuare il saggio TRAP.

Per ogni derivato è stata valutata l'attività telomerasica dopo 24-48 e 96 h di trattamento. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3.3.4.

composto	IC ₅₀ telomerasi (μM)		
	24 h	48 h	96 h
Bis 9	2,1± 0,9	9,8±	1,5± 0,9
Bis 9,10	1,5± 0,8	1,2± 0,8	1,3± 0,8
Bis 1,5	1,5± 0,7	2± 0,9	4,5± 1,7
Bis 1,8	3,7± 1,2	3,2± 1,1	3,5± 1,2
Bis 2,6	1,5± 0,8	1,6± 0,9	1,6± 0,7
Bis 2,7	2,9± 0,9	5,8± 1,8	2± 0,8

Tabella 3.3.4. IC₅₀ relativi all'enzima telomerasi per ciascuna molecola testata. Le misure si riferiscono alla linea cellulare SKMel5.

Dall'analisi dei valori riportati emerge come tutti i derivati testati mostrino una certa attività antitelomerasica. Ciò in alcuni casi non accorda con i risultati ottenuti dal saggio TRAP cell-free (vedi tabella 3.3.1). Tuttavia, confrontando gli effetti indotti da ciascun composto sulla proliferazione cellulare e sull'attività telomerasica è possibile stabilire per quali composti l'effetto di inibizione della telomerasi risulta indipendente dalla tossicità cellulare; si osserva, infatti, come per molti bisantreni il calo dell'attività enzimatica rifletta

esattamente la progressiva induzione di morte cellulare. L'inibizione dell'attività telomerastica, in questo caso, risulta del tutto conseguente all'effetto citotossico: in caso di morte cellulare tutto il metabolismo cellulare apparirà alterato con effetti anche sulla componente enzimatica cellulare (comprendente l'enzima telomerasi).

Nelle figure 3.3.20 e 3.3.21 sono riportati i grafici che correlano l'attività sull'enzima telomerasi e sulla proliferazione cellulare in funzione della concentrazione per **Bis 2,6** e **Bis 1,5** dopo 24, 48 e 96h di trattamento sulla linea cellulare SKMe15.

Per quanto riguarda il derivato **Bis 2,6**, si può osservare come l'andamento della curva relativa all'attività telomerastica sia praticamente sovrapponibile a quello della curva riguardante l'effetto esercitato sulla proliferazione cellulare (figura 3.3.20). Questo conferma che l'inibizione dell'enzima telomerasi è da ricondurre essenzialmente all'effetto citotossico del composto.

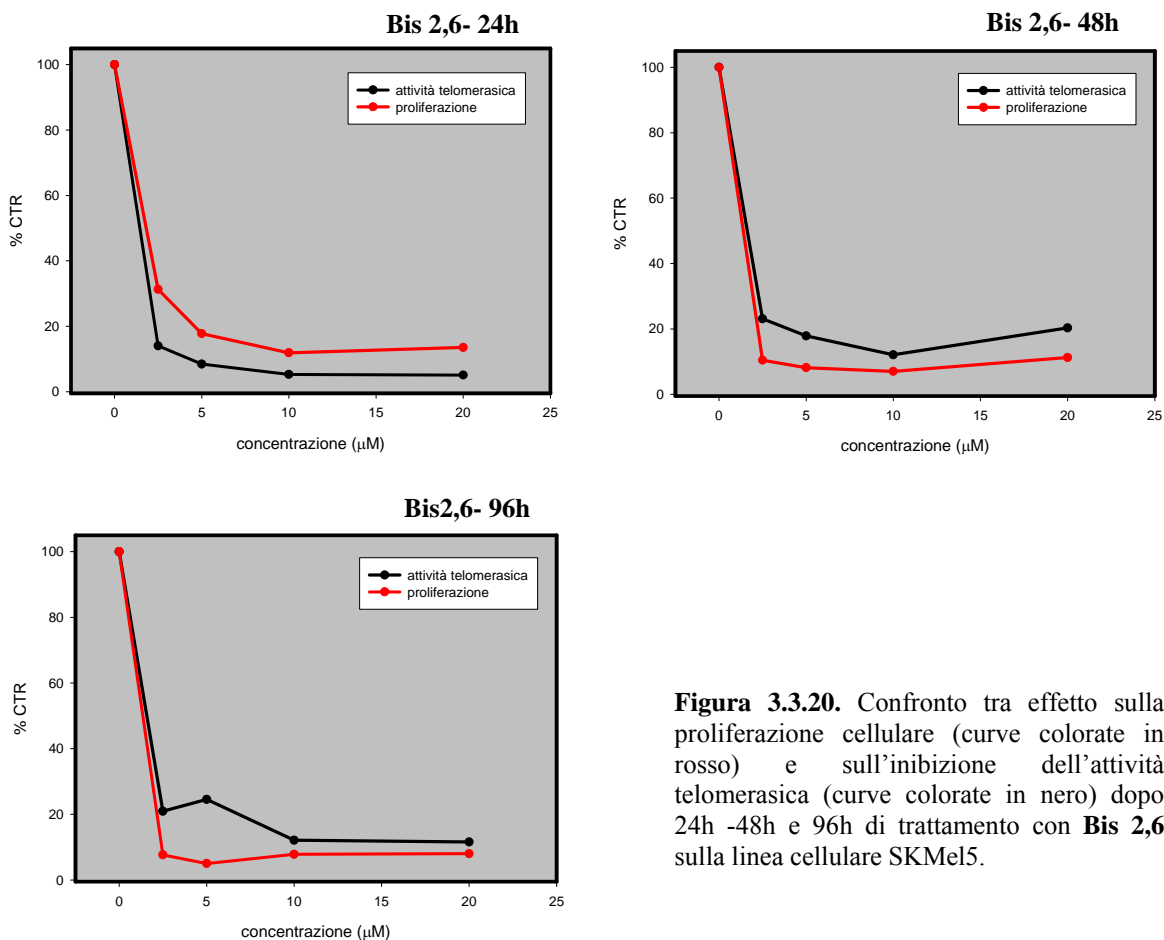


Figura 3.3.20. Confronto tra effetto sulla proliferazione cellulare (curve colorate in rosso) e sull'inibizione dell'attività telomerastica (curve colorate in nero) dopo 24h -48h e 96h di trattamento con **Bis 2,6** sulla linea cellulare SKMe15.

Con il composto **Bis 1,5** si osserva, invece, un comportamento diverso: la diminuzione dell'attività telomerasica, anche a tempi precoci (24h), appare molto più rapida rispetto all'azione citotossica (soprattutto a basse concentrazioni): è possibile, dunque, che la citotossicità sia un fenomeno conseguente all'inibizione dell'enzima e non, viceversa, come nel caso del derivato **Bis 2,6**. Il confronto è stato fatto per tutti i composti, tuttavia, solo con **Bis1,5** si è evidenziata una buona finestra tra attività antitelomerasica ed effetto citotossico.

E' fondamentale notare, comunque, come all'aumentare del tempo di trattamento la capacità del composto **Bis 1,5** di inibire l'enzima telomerasi diminuisca. Questo riflette quanto già osservato negli studi sulla proliferazione di questa linea cellulare: all'aumentare del tempo di esposizione, infatti, non era stato osservato un aumento dell'effetto citotossico.

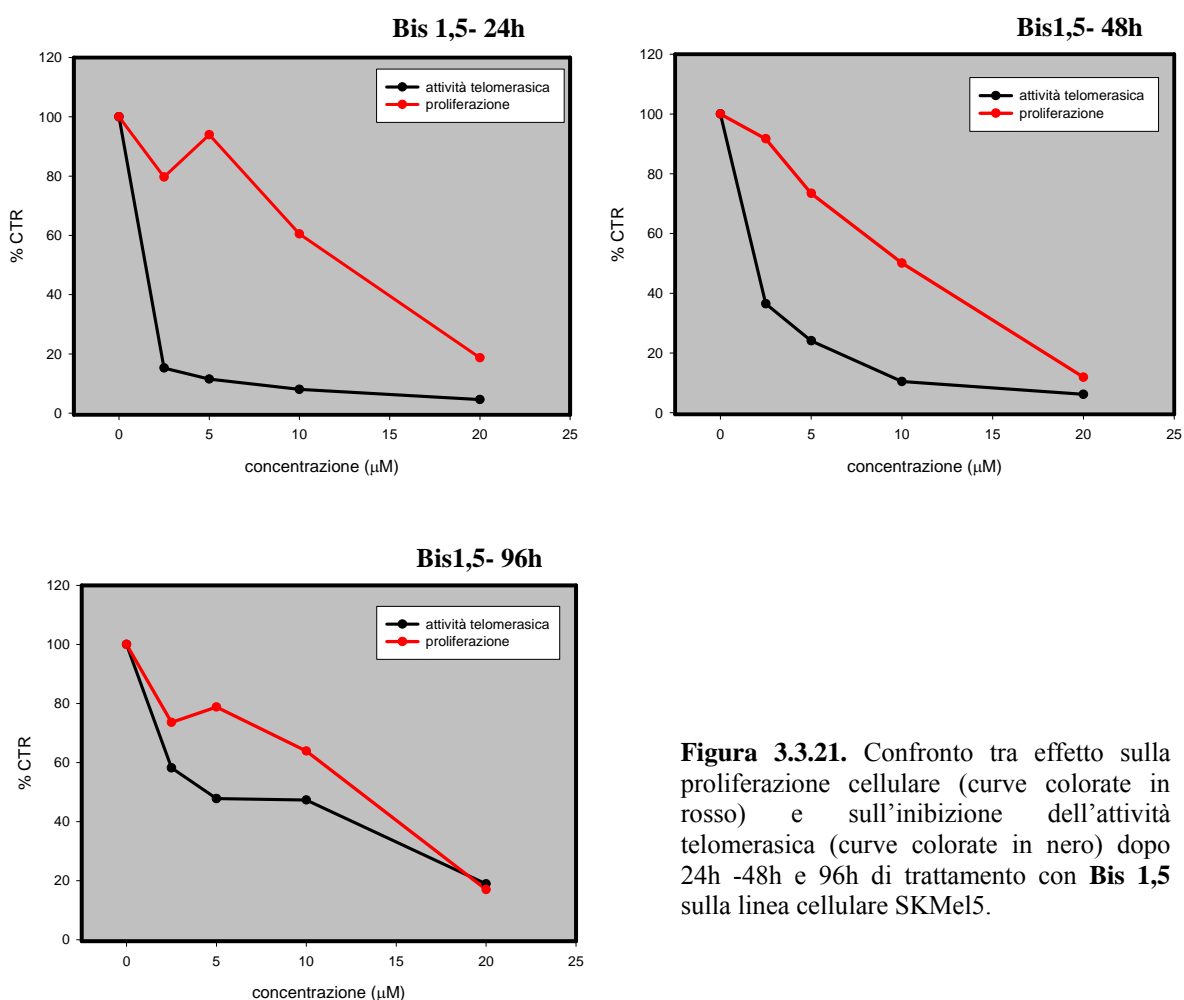


Figura 3.3.21. Confronto tra effetto sulla proliferazione cellulare (curve colorate in rosso) e sull'inibizione dell'attività telomerasica (curve colorate in nero) dopo 24h -48h e 96h di trattamento con **Bis 1,5** sulla linea cellulare SKMe15.

3.3.8.3 Saggio di proliferazione cellulare a medio termine sulla linea SKMe15

Per stabilire gli effetti sulla proliferazione cellulare indotti da **Bis 1,5** a tempi lunghi è stato protratto il trattamento fino a 240 h. In questo caso il saggio è stato condotto utilizzando una concentrazione fissa, 2,5 μM , alla quale era stata osservata una buona finestra tra attività antitelomerasica e citotossicità.

Sulla base dei dati ottenuti dagli studi precedenti e, in particolare, in riferimento al calo di attività osservato all'aumentare del tempo, si è pensato anche di reiterare il trattamento ogni 48h.

I risultati ottenuti sono riportati in figura 3.3.22 a., dove sono espresse le percentuali di cellule vitali presenti nei trattati, in riferimento ai controlli, per ogni tempo di trattamento. All'aumentare del tempo si assiste ad un incremento dell'effetto citotossico. Ciò suggerisce come il calo di attività precedentemente osservato sia ascrivibile ad una degradazione del composto in esame: reiterando il trattamento ogni 48h, infatti, viene addizionato nuovo farmaco, con conseguente aumento della concentrazione di molecole attive e quindi dell'effetto.

Tuttavia, se si considera il numero di cellule totali (adese + surnatanti) presenti nei trattati e nei controlli (3.3.22 b) si osserva come nei controlli si verifichi nel tempo una crescita esponenziale mentre in seguito all'aggiunta di bisantrene (**Bis 1,5**) il numero di cellule si mantenga pressoché costante, ad indicare un arresto della proliferazione. Data la diminuzione del numero di cellule adese (figura 3.3.22 a) si verifica, quindi, un aumento delle cellule nel surnatante.

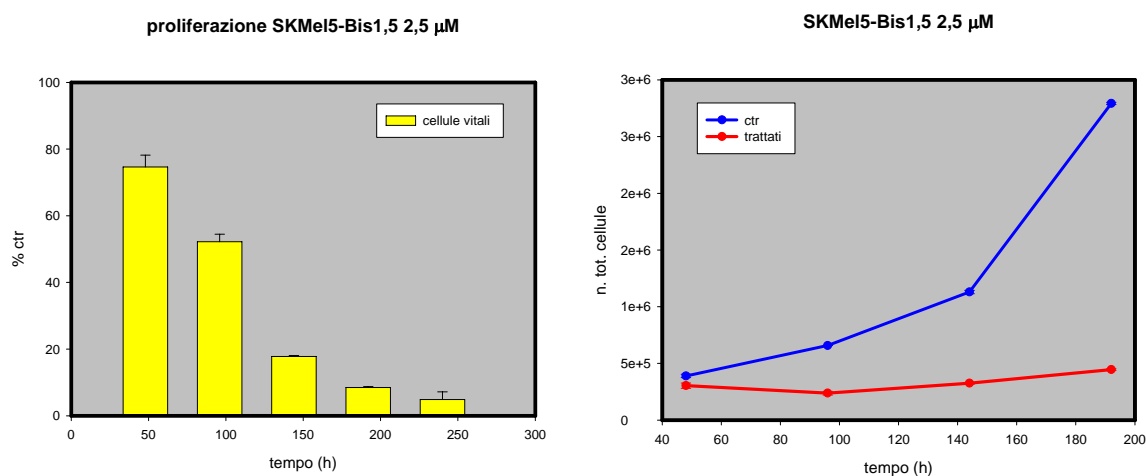


Figura 3.3.22. a. % di cellule vitali (solo adese), calcolate in riferimento ai corrispettivi controlli, per ogni tempo di trattamento. **b.** Crescita cellulare nei controlli (in blu) e nei trattati (in rosso). I valori numerici si riferiscono alla somma di cellule adese e di cellule presenti nel surnatante in ogni fiasca.

Tale effetto può essere attribuito o ad una citotossicità tale da far mantenere costante il numero di cellule totali (dove il numero di cellule morte corrisponde al numero di cellule in fase di replicazione), oppure, più probabilmente, ad una variazione dell'adesività delle cellule associata ad un effetto citostatico.

3.3.8.4 Valutazione della morfologia apoptotica mediante spettroscopia di fluorescenza

Per chiarire i meccanismi alla base degli effetti sopra riportati, si è esaminato il tipo di morte cellulare indotto dal trattamento con **Bis 1,5**.

A tale scopo le cellule del surnatante raccolte ad ogni tempo di trattamento, sono state trattate con ioduro di propidio, colorante fluorescente, capace di intercalare nel DNA a doppia elica, formando un complesso stabile; l'interazione con l'acido nucleico determina un incremento del segnale di fluorescenza del colorante di 20-30 volte (Arndt-Jovin et al, **1989**).

Osservando le cellule (così colorate) al microscopio a fluorescenza è possibile discriminare le cellule vive dalle morte e, in quest'ultimo caso, individuare il tipo di morte cellulare coinvolto (necrosi o apoptosi).

Le cellule apoptotiche, infatti, presentano una morfologia caratteristica: la cromatina appare degradata e condensata in corpi rotondeggianti addossati alla membrana nucleare; negli stadi più avanzati, si assiste, inoltre, alla rottura del nucleolemma con fuoriuscita degli ammassi di cromatina (Arndt-Jovin et al, **1989**). Le cellule necrotiche, invece, appaiono sfaldate, con bordi non ben definiti.

In tabella 3.3.5 sono riportate le % di cellule apoptotiche osservate nei surnatanti. Come si può notare, la % di cellule in apoptosi risulta assai limitata (si raggiunge al massimo un valore pari al 5% dopo 8 giorni di trattamento). Neppure la necrosi è apparsa rilevante.

tempo	fiasca	% cellule apoptotiche
48 h	ctr	2.4± 0.6
	trattato	3.0± 1.6
96 h	ctr	1.3± 1.3
	trattato	0.7± 0.1
144 h	ctr	3.0± 0.3
	trattato	3.1± 1
192 h	ctr	1.1± 0.1
	trattato	5.0± 1.5

Tabella 3.3.5. Percentuale di cellule apoptotiche calcolate sul totale (adeso + surnatante) ad ogni tempo di trattamento con **Bis 1,5**.

Questo dato suggerisce, quindi, la presenza di un fenomeno di senescenza più che un processo di morte cellulare vera e propria.

3.3.8.5 Citometria di flusso

La citometria di flusso consente l'analisi quantitativa del contenuto di DNA e la discriminazione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

L'analisi dell'istogramma di DNA consente, infatti, di definire la percentuale di cellule in una data fase del ciclo cellulare sfruttando il diverso contenuto di DNA delle cellule nelle fasi G1, S e G2/M.

L'analisi viene effettuata con l'ausilio di un software che permette di dividere l'insieme dei segnali in tre parti fondamentali: due gaussiane, G1 e G2/M, e una regione intermedia, di forma rettangolare o trapezoidale, costituente la fase S.

Negli studi effettuati si sono analizzate le cellule raccolte dopo 92 e 144 h di trattamento al fine di valutarne la distribuzione all'interno del ciclo cellulare e di chiarire gli effetti esercitati da **Bis 1,5**.

In figura 3.3.23 sono riportati gli istogrammi relativi ai due tempi di trattamento 92 e 144h, ciascuno confrontato con il corrispondente controllo. Chiaramente il trattamento con **Bis 1,5** non comporta alcuna variazione della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. Ciò conferma, quindi, l'assenza di apoptosi, già evidenziata mediante microscopia di fluorescenza.

Tuttavia, anche il blocco in fase G1, che caratterizza molto spesso il processo di senescenza non appare evidente; sembra, dunque, che l'effetto indotto da **Bis 1,5** non comporti un arresto della proliferazione cellulare in una particolare fase del ciclo cellulare.

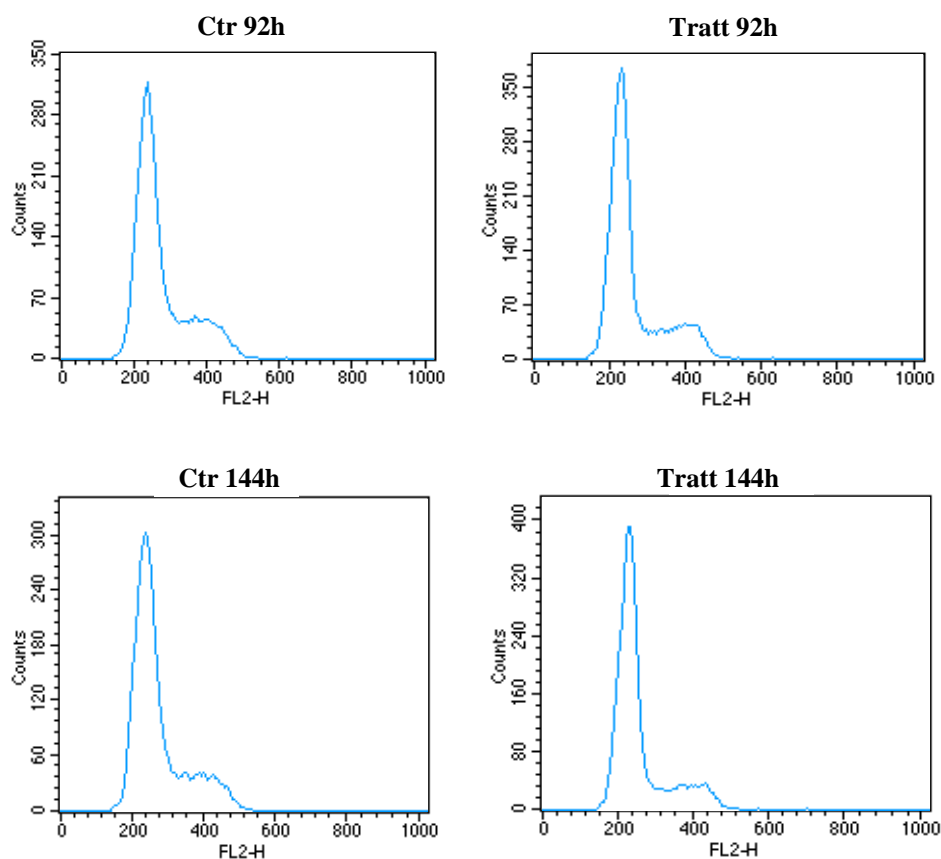


Figura 3.3.23. Istogrammi ottenuti dall'analisi citometrica delle cellule SKMe15 raccolte dopo 92 e 144 h di trattamento (reiterato ogni 48h) con **Bis 1,5**.

3.3.8.6 Analisi di senescenza mediante Western blotting

Il processo di senescenza si caratterizza per una serie di modificazioni a livello morfologico (le cellule appaiono più grandi, hanno un aspetto granuloso, il citoplasma appare vacuolato) e biochimico (Schmitt, **2007**). Esistono diversi saggi utili per l'identificazione di questo stadio tra cui la valutazione di attività β -galattosidasi (Kurz et al, **2000**), l'induzione di alcune proteine (come p16 e p21) (Zhang, **2007**; Campisi, **1997**), il blocco in fase G1 del ciclo cellulare.

In questo lavoro non si è potuto effettuare il saggio della β -galattosidasi in quanto la linea cellulare utilizzata risulta positiva a tale marker anche in condizioni basali. Si è passati, quindi, all'analisi dell'espressione delle proteine p16 e p21.

Come accennato nella parte introduttiva di questa tesi, l'instaurarsi di un fenomeno di senescenza dipendente dall'accorciamento telomerico, porta generalmente all'induzione di p21, attraverso meccanismi che possono essere p53 dipendenti o non (Zhang, 2007). La sovraespressione della proteina p16 è legata, invece, ad un processo di senescenza derivante da fenomeni di stress (Zhang, 2007).

Mediante western blotting è stata valutata l'espressione delle due proteine, al fine di individuare eventuali induzioni in seguito al trattamento con **Bis 1,5**.

Sono stati analizzati i tempi 96 e 144 h, in quanto a tempi precoci risulta difficile individuare un'induzione dell'espressione proteica.

Nella linea cellulare esaminata (SKMel5) la proteina p16 non risulta espressa: si nota, infatti, come la banda corrispondente al peso molecolare della proteina non sia presente nei campioni analizzati mentre appare nel controllo positivo inserito (figura 3.3.24). Per quanto riguarda l'espressione della proteina p21, si assiste ad un'induzione della sua espressione nelle cellule trattate: è evidente, infatti, come la banda relativa a p21, assente o modestamente espressa nei controlli, sia visibile (o di intensità nettamente maggiore) nei corrispondenti sistemi trattati.

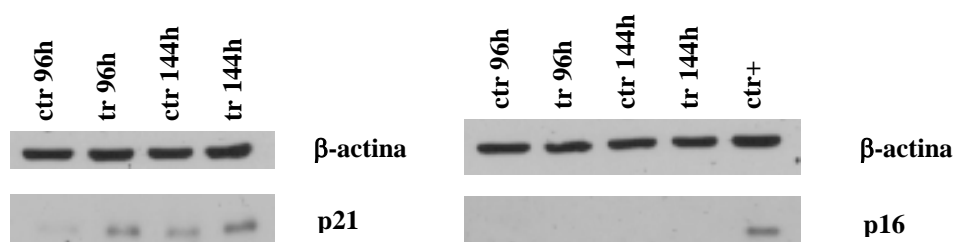


Figura 3.3.24. Espressione di p21 e p16 valutata mediante western blotting dopo 96 e 144h di trattamento. Come controllo di caricamento è stata utilizzata la proteina del citoscheletro β -actina. Per ogni campione sono stati caricati 40 μ g di lisato proteico. ctr= controllo, tr= trattato.

3.3.9 CONCLUSIONI

In questo capitolo si sono esaminati analoghi del bisantrene, caratterizzati da un sistema aromatico tricyclico con una o due sostituzioni laterali.

Tutti i composti presentano catene uguali ma differiscono nel numero delle stesse e nella loro collocazione spaziale. In questo modo si è potuto stabilire il ruolo dato dal numero di sostituzioni e dalla loro disposizione.

Dai saggi preliminari condotti *in vitro* è emerso come tutti i derivati aventi una sola catena laterale non siano efficaci nell'inibire l'attività telomerasica e nell'interazione con il DNA. Sono, pertanto, necessarie due ramificazioni (in grado di collocarsi lungo i solchi) per garantire un'interazione più stabile data da interazioni di stacking del nucleo aromatico con i piani individuati dalle tetradi guaniniche ed elettrostatiche tra le cariche positive presenti in catena laterale e i gruppi fosfato del DNA.

Tra i derivati bisostituiti, invece, si sono evidenziate importanti differenze in termini di attività. In particolare, il derivato più interessante è apparso l'analogo del bisantrene avente due catene laterali situate in posizione 1 e 5.

Tale composto si è dimostrato il più efficace nell'inibire l'enzima telomerasi ma anche capace di stabilizzare la struttura G-quadruplex in misura maggiore rispetto a tutti gli altri derivati. L'attività è stata valutata non solo su sequenze correlate al telomero umano ma anche sulla regione G-rich situata a livello del promotore dell'oncogene *c-myc*.

Bis 1,5 è apparso in grado di indurre la formazione di strutture a quartetti di guanine a partire da oligonucleotidi non strutturati; ha dimostrato, inoltre una buona selettività G-quadruplex- duplex.

L'analogo **Bis 1,8**, avente sempre una sostituzione in posizione 1 è risultato poco attivo e, soprattutto, non selettivo nell'interazione duplex-G-quadruplex. Questo suggerisce come sia necessario che le due catene laterali si dispongano su lati opposti della molecola per garantire un'efficace e selettiva interazione con strutture a quartetti di guanine.

Analizzando gli analoghi aventi catene situate in posizione 2, 6 e 2, 7 si osserva sempre una buona attività antitelomerasica. Esperimenti di denaturazione termica hanno

evidenziato, inoltre, un'elevata selettività G-quadruplex- duplex, data la modesta stabilizzazione del DNA in forma duplex data dalle due molecole.

Analizzando più in dettaglio il tipo di interazione dato da **Bis 2,6** e **Bis 2,7** con il DNA a doppia elica risulta, tuttavia, evidente come la mancata stabilizzazione sia da attribuire al fatto che il legame con l'acido nucleico non si realizza principalmente attraverso un processo di tipo intercalativo ma, più probabilmente, mediante un' interazione con il solco minore della doppia elica.

Passando agli effetti in ambito cellulare di tali composti si osserva come il derivato **Bis1,5** presenti uno scarso effetto citotossico se paragonato agli analoghi 2,6 e 2,7 bisostituiti. Ciò potrebbe essere collegato alle differenti modalità di interazione dei tre composti con l'acido nucleico.

Tra tutte le strutture esaminate sulla linea SKMe15, **Bis 1,5** si è dimostrato, inoltre, l'unico composto in grado di indurre un notevole effetto antitelomerasico a tempi precoci rispetto all'azione sulla proliferazione cellulare.

Gli studi effettuati hanno permesso ad ogni buon conto di iniziare a delineare gli effetti indotti dalle molecole sul modello cellulare.

E' necessario, tuttavia, sottolineare come il blocco della proliferazione cellulare osservato non si possa giustificare esclusivamente con la stabilizzazione di strutture G-quadruplex a livello telomerico (e quindi al progressivo accorciamento dei telomeri) dal momento che il raggiungimento della lunghezza critica si avrebbe solo dopo un certo numero di replicazioni cellulari e non a tempi brevi (48-96h).

Tuttavia, è possibile che l'interazione di **Bis 1,5** con le estremità telomeriche, con eventuale stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine, possa essere avvertita dalla cellula come danno al DNA, innescando un processo di senescenza, definita "accelerata", che si traduce in un arresto della proliferazione cellulare (Roninson, **2003**).

Per chiarire ulteriormente questo aspetto sarà necessario analizzare in maniera più approfondita la possibile destabilizzazione dell'estremità 3' del telomero e/o l'interazione con altre sequenze G-rich coinvolte nell'espressione di geni che regolano il ciclo cellulare. Sarà interessante investigare anche l'eventuale accorciamento telomerico indotto da trattamenti prolungati con **Bis 1,5** e verificare, inoltre, se tale comportamento si evidenzia anche in altre linee cellulari.

Dal punto di vista strutturale, lo studio di analoghi mono e bisostituiti del bisantrene ha suggerito come la collocazione delle catene laterali possa influenzare diversi parametri quali:

- ✓ capacità di inibizione dell'attività telomerasica;
- ✓ grado di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine;
- ✓ selettività G-quadruplex- duplex;
- ✓ modalità di legame all'acido nucleico.

4. CONCLUSIONI

Gli studi condotti in questo lavoro di tesi hanno permesso di valutare la capacità di composti, appartenenti a tre distinte classi, di interagire selettivamente con strutture G-quadruplex degli acidi nucleici, in previsione di un approccio chemioterapico che sfrutti tale selettività.

L'efficienza di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine è stata analizzata mediante misure chimico- fisiche diverse ed è stata successivamente confrontata con le proprietà inibitorie nei confronti dell'enzima telomerasi, coinvolto nel meccanismo di immortalizzazione delle cellule cancerose.

Per tutti i derivati analizzati è stata osservata una diretta correlazione tra le misure biofisiche e quelle enzimatiche a conferma di come strutture G-quadruplex possano rappresentare un valido bersaglio per i composti analizzati.

Data la complessità del sistema in esame (polimorfismo delle strutture G-quadruplex, influenza di parametri cinetici e termodinamici, co- presenza di più specie in soluzione e competizione tra queste per il legame al farmaco) solo l'associazione di più metodologie sperimentali complementari tra loro (studi biochimici, di stabilità termica e spettroscopici) ha consentito un'adeguata caratterizzazione dell'interazione dei composti in esame con strutture G- quadruplex.

Si è potuto, inoltre, definire alcune possibili strategie per incrementare la selettività G-quadruplex- duplex ma anche per un riconoscimento differenziato di diverse strutture G-quadruplex.

Di seguito vengono evidenziati i principali risultati:

❖ Ruolo del sistema aromatico

L'area definita da un quartetto di guanine risulta più estesa rispetto a quella individuata da una coppia di basi. E' evidente, pertanto, come l'estensione del sistema planare sia un elemento fondamentale nel garantire un efficace processo di stacking a livello delle tetradi guaniniche e, allo stesso tempo, un certo grado di selettività nel riconoscimento G-quadruplex- duplex.

Con composti caratterizzati da sistemi aromatici policondensati a diversa estensione (perilene a 7 anelli, antrachinoni e analoghi del bisantrene a 3 anelli), si è evidenziato come l'estensione del nucleo planare sia fondamentale per una buona attività di inibizione nei confronti della telomerasi ma anche come diverse strutture presentino requisiti minimi diversi per garantire l'efficacia del processo di "stacking".

Dal confronto dei valori di IC_{50} per l'enzima appare evidente come l'attività inibitoria risulti più elevata nel caso dei perilene, rispetto a quella osservata per i derivati antrachinonici e i bisantreni.

D'altro canto confrontando l'efficienza nell'induzione di strutture G-quadruplex tra le diverse classi di molecole, l'estensione del sistema aromatico non sembra indurre grosse variazioni: i valori di EC_{50} relativi alla formazione di strutture a quartetti di guanine (estrapolati dalle misure di gel shift) nei sistemi triciclici ed eptaciclici risultano, infatti, confrontabili.

Combinando tutti i composti esaminati non si verifica, dunque, la correlazione esistente tra inibizione dell'attività telomerasica ed efficienza di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine dimostrate all'interno di ciascuna famiglia; è possibile, infatti, che l'inibizione dell'attività telomerasica osservata nei saggi TRAP non sia semplicemente attribuibile alla stabilizzazione di strutture G-quadruplex. Ciò è stato sottolineato anche in studi molto recenti nei quali vengono messi in evidenza i limiti dell'efficacia del saggio TRAP nella valutazione di composti quali potenziali stabilizzatori di strutture G-4 (De Cian, Cristofari et al, **2007**). È stato dimostrato, infatti, come l'effetto di inibizione osservabile in tale saggio, in alcuni casi, possa essere indotto dall'inibizione dell'attività della *Taq* polimerasi, utilizzata nell'amplificazione di prodotti di elongazione della telomerasi e non all'inibizione di quest'ultimo enzima. Si consideri che, in quest'eventualità si è comunque di fronte a composti quali potenziali agenti antitumorali ad azione antiproliferativa (in grado di agire sui processi di replicazione del DNA) caratterizzati, però, da una scarsa selettività: l'attività polimerasica risulta, infatti, espressa in tutte le cellule (neoplastiche e sane) diversamente da quella telomerasica.

Il ruolo dell'estensione del sistema aromatico era emerso, in studi precedenti, anche con i derivati antrachinonici (Zagotto et al, **2007**): l'orientazione del legame ammidico che collega la porzione antrachinonica alle catene laterali è in grado di modulare notevolmente l'attività dei composti.

Gli analoghi del bisantrene oggetto di studio, presentano anch'essi un sistema aromatico a tre anelli, tuttavia, la superficie planare risulta estesa dai gruppi sostituenti in catena laterale.

La simile attività di induzione di strutture G-quadruplex osservata tra perileni e derivati antracenicici suggerisce come il sistema planare non risulti l'unico elemento in grado di conferire attività. Si è valutato, pertanto, il ruolo delle sostituzioni laterali in termini di numero, collocazione spaziale, lunghezza e natura.

❖ Ruolo delle catene laterali

Se da una parte il nucleo aromatico centrale del composto rende possibile l'interazione con le strutture G-quadruplex mediante interazioni di stacking con le tetradi guaniniche, dall'altro, le catene laterali permettono la stabilizzazione del complesso fungendo da "ganci" che ancorano il sistema aromatico ai solchi della struttura G-quadruplex stessa. L'analisi delle strutture oggetto di studio ha confermato innanzitutto il ruolo di gruppi ionizzabili positivamente in condizioni fisiologiche. Nell'ambito dei derivati antrachinonici sono stati testati derivati aventi uno o più gruppi protonati per ogni catena laterale; passando da uno a due cariche positive in catena si è assistito ad un netto aumento dell'attività in termini di inibizione enzimatica e di stabilizzazione di strutture G-4.

Ciò risulta ragionevole se si considera che il bersaglio di tali composti è un polianione: la presenza di cariche positive in catena laterale garantisce, infatti, una buona affinità di legame tra composto e acido nucleico senza, però, discriminare le diverse forme di DNA (a doppia elica, G-quadruplex).

Dagli studi condotti, tuttavia, è emerso come la distanza delle cariche dal nucleo aromatico sia in grado di modulare la selettività d'interazione G-quadruplex- duplex; in particolare, nell'ambito dei derivati antrachinonici, si è visto come l'allungamento delle catene laterali, dato dall'inserimento di un secondo amminoacido tra il linker e la Lisina terminale, induca sempre un netto calo dell'attività.

Ciò suggerisce che esistano, probabilmente, dei requisiti di collocazione relativa tra cariche e sistema planare che dipenderanno anche dal tipo di arrangiamento della struttura G-quadruplex bersaglio.

Per quanto riguarda il riconoscimento di strutture a quartetti di guanine a diversa conformazione risulta di fondamentale importanza anche la posizione delle catene laterali presenti sul nucleo aromatico.

Il ruolo della localizzazione delle sostituzioni laterali nei derivati antrachinonici ai fini della stabilizzazione di G-4 è stato oggetto di numerosi studi: in questi si riporta come strutture caratterizzate dalla presenza di sostituenti laterali sullo stesso anello mostrino una preferenziale interazione con DNA duplex; l'inserimento di catene laterali in anelli diversi produce, invece, una maggiore affinità per strutture a quartetti di guanine (Collier et al, **1988**; Agbandje et al, **1992**; Perry, Gowan et al, **1998**; Perry, Reszka et al, **1998**; Perry, Read et al, **1999**).

Nel caso dei derivati del bisantrene (dove tutti i bicatena presentano sostituenti su anelli diversi) emerge chiaramente come le sostituzioni ottimali ai fini dell'attività antitelomerasica e di stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine siano nelle posizioni 1,5. I derivati aventi catene in posizione 2,6 e 2,7 mostrano comunque una buona attività di inibizione dell'attività antitelomerasica; tuttavia, considerando gli effetti indotti dai due composti sulle linee cellulari analizzate essi dimostrano un'elevata citotossicità se confrontati con l'analogo **Bis1,5**. Metodiche diverse hanno evidenziato, infatti, come le modalità di legame al DNA di **Bis1,5** rispetto a **Bis2,6** e **Bis2,7** risultino diverse. Ciò potrebbe essere alla base del diverso effetto osservato negli studi su cellule.

I perileni discussi non presentano differenze nel numero di cariche presenti in catena laterale (si tratta in entrambi i casi di ammine terziarie), tuttavia, **PIPER** e **K5** si differenziano per l'idrofobicità e l'ingombro dell'intorno.

Lavori precedenti hanno dimostrato come la natura delle catene laterali sia in grado di modulare il grado di aggregazione dei derivati perilenici: le ammine cicliche presenti in **PIPER** promuovono più efficacemente tale processo (Sissi et al, **2007**).

Lo stato di aggregazione è a sua volta in grado di influenzare il riconoscimento di specifici arrangiamenti: **PIPER**, presente in soluzione come aggregato, dimostra un'efficace interazione solo con strutture G-quadruplex aventi orientamento antiparallelo.

E' interessante notare, inoltre, come la tendenza all'aggregazione sia in grado di sfavorire l'intercalazione nella doppia elica mentre viene mantenuta la capacità di interazione con strutture a quartetti di guanine (mediante stacking terminale) (Tuntiwechapikul et al, **2006**). L'aggregato derivante dalla sovrapposizione di due molecole porta ad una struttura caratterizzata da 4 ramificazioni, in grado di interagire preferenzialmente con strutture a quartetti di guanine. Si ricordi che un importante elemento che differenzia il DNA in forma duplex dall'acido nucleico strutturato in G-quadruplex riguarda il numero di solchi presenti nelle due strutture: se nel DNA a doppia elica si possono distinguere due solchi, maggiore e minore, nella struttura G-quadruplex, la sovrapposizione delle tetradi guaniniche produce quattro distinti solchi, non necessariamente uguali (Burge et al, **2006**).

I composti capaci di intercalare nella doppia elica si caratterizzano generalmente per la presenza di un nucleo centrale planare e di due catene (contenenti gruppi ionizzabili positivamente) in grado di interagire con i solchi dell'acido nucleico.

E' ipotizzabile, pertanto, come un aumento del numero di sostituenti possa rendere più efficace e preferenziale l'interazione con strutture G-quadruplex. E' in quest'ottica la progettazione dell'acridina trisostituita BRACO19 (Burger et al, **2005**).

Il ruolo del numero di sostituenti laterali è stato confermato anche dallo studio degli analoghi del bisantrene. Molecole caratterizzate dalla presenza di un'unica catena laterale (**Bis 1**, **Bis 2** e **Bis 9**) non hanno dimostrato alcuna attività di inibizione dell'enzima telomerasi. Non è stata evidenziata, inoltre, alcuna capacità di stabilizzazione di strutture G-quadruplex.

Accanto alla selettività G-quadruplex- duplex riveste fondamentale importanza anche la selettività di riconoscimento tra strutture G-4 diverse.

E' noto come le dimensioni dei solchi delle strutture G-4 risultino differenti a seconda del tipo di struttura; in particolare, se tutte e quattro le catene che partecipano alla tetraide guaninica sono parallele, i quattro solchi sono di media grandezza, se, invece, sono presenti catene antiparallele i solchi che si vengono a formare possono essere di diverse dimensioni (Burge et al, **2006**).

E' presumibile che l'aumento del numero di sostituenti, anche diversi tra loro, possa, quindi, produrre un incremento del grado di selettività G-quadruplex- duplex ma anche indirizzare il riconoscimento verso specifici arrangiamenti.

Date le problematiche associate alla sintesi di composti aventi tali caratteristiche si è ritenuto utile in questo lavoro studiare ed ottimizzare il modello a due sostituenti per poi indirizzare, in maniera più specifica, la sintesi di molecole più complesse. Si tenga comunque presente la necessità di ottimizzare il numero di cariche per unità di farmaco anche nei confronti di possibili processi di condensazione degli acidi nucleici, che porterebbero a forme ψ e conseguente separazione di fase.

Poiché lo scopo nella progettazione di nuovi farmaci ad attività antitelomerasica è quello di aumentare l'affinità verso le strutture G-quadruplex ma anche (e inderogabilmente) il grado di selettività G-quadruplex- duplex, emerge la necessità di individuare un giusto equilibrio strutturale che permetta di ridurre la tossicità dei derivati mantenendo, però, una buona capacità di interferire a livello telomerico.

Dal lavoro svolto emerge, dunque, la necessità di utilizzare strutture caratterizzate dalla presenza di un cromoforo planare funzionalizzato con gruppi laterali, ionizzabili positivamente, ingombranti. In questo modo è possibile favorire l'interazione con strutture a quartetti di guanine rendendo più difficile, per ingombro sterico, l'inserimento, mediante intercalazione, nella doppia elica del DNA. Ciò è emerso, in particolare, dallo studio di **PIPER**, che presenta ammine cicliche in catena laterale.

Per incrementare l'interazione con strutture G-quadruplex un ulteriore passo consiste nell'inserimento di un terzo sostituito laterale; ciò produrrebbe una maggiore capacità di interazione elettrostatica con i solchi delle strutture G-4, rendendo meno stabile il legame al DNA a doppio filamento. Anche in questo caso si deve tener conto delle problematiche di carattere farmacocinetico e strutturale connesse alla potenziale condensazione del DNA.

L'insieme dei dati raccolti ha permesso di acquisire una serie di conoscenze utili nella determinazione di relazioni struttura-attività, applicabili allo sviluppo razionale di nuovi efficaci e selettivi inibitori della telomerasi.

Resta, tuttavia, da considerare la necessità di accompagnare la ricerca di nuovi stabilizzatori di strutture G-4 con uno studio approfondito del ruolo biologico delle diverse conformazioni G-quadruplex.

L'approccio antitelomerasico basato sulla stabilizzazione di strutture a quartetti di guanine si differenzia dall'inibizione diretta dell'attività enzimatica per la potenziale efficacia nelle cellule tumorali telomerasi negative, dove risultano espressi meccanismi di mantenimento dei telomeri alternativi (ALT). Tuttavia, si deve considerare che i telomeri sono presenti in tutte le cellule, pertanto, l'indagine completa del ruolo in ambito cellulare delle strutture G-quadruplex appare basilare nell'ottica di un possibile utilizzo di stabilizzatori di G-4 nella terapia antitumorale.

L'approfondimento della funzione di conformazioni diverse può essere utile anche nel discriminare tra composti dotati di potenziale attività farmacologica e composti capaci di stabilizzare strutture non rilevanti alle finalità terapeutiche. Ciò appare anche importante nel valutare possibili effetti collaterali generati da processi di legame non desiderati.

Il DNA telomerico si caratterizza, infatti, da un elevato polimorfismo (Maizels, **2006**); in letteratura è riportata la conformazione prevalente in condizioni fisiologiche, tuttavia, si deve considerare anche la possibilità che potenti stabilizzatori possano spostare l'equilibrio da una conformazione ad un'altra, in virtù di una loro preferenzialità di legame.

Accanto a questo, appare rilevante anche lo studio dell'effetto di potenziali stabilizzatori di quartetti di guanine sull'espressione di proteine correlate al DNA telomerico.

E' riportato, in studi riguardanti l'acridina RHPS4, come la sovraespressione di proteine, quali TRF2 e POT1 (associate rispettivamente al DNA telomerico a doppio e a singolo filamento), agisca da meccanismo di resistenza nei confronti del danno indotto da tale composto. In particolare, le due proteine agiscono stabilizzando la struttura a T-loop del telomero, in competizione con la forma G-quadruplex (Salvati et al, **2007**)

L'elevata espressione di tali proteine deve essere dunque tenuta in considerazione come eventuale meccanismo di resistenza in seguito a trattamento con stabilizzatori di quartetti di guanine. D'altro canto, si può pensare alla destabilizzazione dei T-loops, già parzialmente destrutturati nelle cellule cancerose nelle quali si assiste ad estesi fenomeni di instabilità genomica.

Infine, è da sottolineare come nel genoma umano esistano numerose sequenze a doppia elica in grado di formare strutture a quartetti di guanine; queste sono localizzate prevalentemente a livello di promotori di oncogeni. Nello studio di stabilizzatori di G-4 selettivi a livello telomerico è possibile selezionare i composti incapaci di convertire la forma duplex in G-quadruplex, dal momento che a livello telomerico tale struttura interessa prevalentemente (ma non esclusivamente) l'estremità 3' a singolo filamento.

In conclusione, l'insieme dei dati raccolti appare di sicuro interesse per la comprensione dei processi di riconoscimento molecolare che riguardano strutture fisiologiche degli acidi nucleici e per la progettazione razionale di potenziali farmaci in grado di agire con meccanismi innovativi indirizzati ad un'efficace e sicura terapia antineoplastica mirata.

BIBLIOGRAFIA

- Agbandje M, Jenkins TC, McKenna R, Reszka AP, Neidle S, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 1418-1429;
- Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 2723- 2735;
- Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. *Methods Cell Biol*, **1989**, 30, 417- 448;
- Arthanari H, Basu S, Kawano TL, Bolton PH. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3724-3788;
- Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, Ouchi TA, Kusaka H, Akinaga S, Yamashita Y, Pongracz K, Pruzan R, Wunder E, Piatyszek M, Li S, Chin AC, Harley CB, Gryaznov S. *Cancer Res.*, **2003**, 63, 3931- 3939;
- Bailey SM, Murnane JP., *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 2408- 2417;
- Baudoin O, Gonnet F, Teulade-Fichou MP, Vigneron JP, Tabet JC, Lehn JM. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2762- 2771;
- Baudoin O, Teulade-Fichou MP, Vigneron JP, Lehn JM. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5458- 5470;
- Baumann P, Cech TR. *Science* **2001**, 292, 1171- 1175;
- Baumann P, Podell E, Cech TR. *Mol Cell Biol*, **2002**, 22, 8079- 8087;
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L, *Mol. Cell. Biol.*, **2001**, 21, 6151-6160;
- Billaud T, Koering CE, Binet-Brasselet E, Ancelin K, Pollice A, Gasser SM, Gilson E., *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 1294- 1303;
- Briem H, Kuntz ID. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3401- 3408;

- Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*, 5402- 5415;
- Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 1489- 1496;
- Campisi J. *Eur. J. Cancer*, **1997**, *33*, 703- 709;
- Capranico G, Guano F, Moro S, Zagotto G, Sissi C, Gatto B, Zunino F, Menta E, Palumbo M, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 12732-12739;
- Chen JL, Blasco MA, Greider CW. *Cell*, **2000**, *100*, 503- 514;
- Clark GR, Pytel PD, Squire CJ, Neidle S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4066-4067;
- Collier DA, Neidle S, *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 847-857;
- Crothers DM, *Biopolymers*, **1971**, *10*, 2147-2160;
- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Pripke H, Niestroj C, Daiber C, Enenkel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A *EMBO J.* **2001**, *20*, 6958- 6968;
- Davis JT. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668- 698;
- De Cian A, Cristofari G, Reichenbach P, De Lemos E, Monchaud D, Teulade-Fichou MP, Shin-ya K, Lacroix L, Lingner J, Mergny JL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17347- 17352;
- De Cian A, Guittat L, Kaiser M, Saccà B, Amrane S, Bourdoncle A, Alberti P, Teulade-Fichou MP, Lacroix L, Mergny JL, *Methods*, **2007**, *42*, 183- 195;
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T., *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188- 200;

- Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeres VV, Kerwin S.M. *Biochemistry* **1998**, 37, 12367- 12374;
- Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, Takahashi M, Inoue M. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 2557- 2562;
- Gavathioitis E, Heald RA, Stevens MFG, Searle MS, *J. Mol. Biol.* , **2003**, 334, 25-36
- Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadrè J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes A, Shin-ya K, Riou JF, *Cancer Res*, **2006**, 66, 6908-6912;
- Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-Ya K, Morjani H, Trentesaux C, Riou JF. *J. Biol. Chem.* **2006**, 28, 38721-38729;
- Gowan SM, Heald R, Stevens MF, Kelland LR. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, 60, 981-988;
- Greider CW, Blackburn EH, *Cell*, **1985**, 43, 405-413
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T., *Cell*, **1999**, 97, 503- 514;
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijesbergen RL, Knoll JHM, Meyerson M, Weinberg RA, *Nat. Med.*, **1999**, 5, 1164-1170;
- Haider S, Parkinson GN, Neidle S. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 320, 189- 200;
- Haider SM, Parkinson GN, Neidle S. *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 117- 125;
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. *Nature*, **2000** 404, 293- 296;
- Han H, Bennett RJ, Hurley LH. *Biochemistry* **2000**, 39, 9311- 9316;
- Han H, Cliff CL, Hurley LH. *Biochemistry* **1999**, 38, 6981- 6986;
- Han H, Hurley LH, Salazar M. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 537- 542;

- Han H, Langley DR, Rangan A, Hurley LH. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8902-8913;
- Han FX, Wheelhouse RT, Hurley LH. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3561- 3570;
- Heald RA, Modi C, Cookson JC, Hutchinson I, Laughton CA, Gowan SM, Kelland LR, Stevens MF. *J. Med. Chem.* , **2002**, *45*, 590- 597;
- Huppert JL, Balasubramanian S. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *35*, 406- 413;
- Hurley LH. *Bioch. Soc. Trans.*, **2001**, *29*, 692- 696;
- Hurley LH. *Nature Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 188- 200;
- Hurley HL, Wheelhouse RT, Sun D, Kerwin SM, Salazar M, Federhoff OY, Han FX, Han H, Izbicka E, Von Hoff DD. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *85*, 141- 158;
- Kerwin SM, Kern JT, Thomas PW. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 447-450;
- Kim M, Duan W, Guzman MG, Hurley LH. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 571- 583;
- Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 3247- 3256;
- Kim MY, Hariprasad V, Shin-ya K, Wierzba K, Hurley LH. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2098- 2099;
- Koepfel F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P, Arimondo PB, Labit D, Petitgenet O, Melene C, Mergny JL, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 1087-1096;
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3613-3622;
- Kyo S, Inoue M. *Oncogene*, **2002**, *21*, 688- 697;
- Lavelle F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, **2000**, *34*, 111-126;

- Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **2004**, 323, 802- 808;
- Leonetti C, Amodei S, D'Angelo C, RizzoA, Benassi B, antonelli A, Elli R, Stevens MF, D'Incalci M, Zupi G, Biroccio A. *Mol. Pharmacol*, **2004**, 66, 1138-1146;
- Li GZ, Eller MS, Firoozabadi R, Gilchrest BA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 527- 531;
- Li Y, Geyer CN, Sen D. *Biochemistry* **1996**, 35, 6911- 6922;
- Li W, Wu P, Ohmichi T, Sugimoto N. *FEBS Lett*, **2002**, 526, 77- 81;
- Luu KN, Phan AT, Kuryavyi V, Lacroix L, Patel DJ, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9963- 9970;
- Maizels N, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **2006**, 13, 1055- 1059;
- McElligott R, Wellinger RJ, *EMBO J.*, **1997**, 16, 3705-3714;
- McGhee JD, *Biopolymers*, **1976**, 15, 1345-1375;
- Mergny JL, Lacroix L, Teulade-Fichou MP, Hounsou C, Guittat L, Hoarau M, Arimondo PB, Vigneron JP, Lehn JM, Riou JF, Garestier T, Hélène C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2001**, 98, 3062- 3067;
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 839- 865;
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen SW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. *Cell*. **1997**, 90, 785- 795 ;
- Miyoshi D, Nakao A, Sugimoto N, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 1, 259,260;

- Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, *20*, 3764-3771;
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 6622-6626
- Neidle S, Parkinson G. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 383- 393;
- Neidle S, Parkinson GN, *Curr. Opin. Struct. Biol*, **2003**, *13*, 275- 283;
- Neumann AA, Reddel RR. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 879- 884;
- Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37473- 37478;
- Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. *Crit. Rev. Oncol. Hemat*, **2006**, *57*, 191- 214;
- Parkinson GN, Ghosh R, Neidle S. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 2390- 2397;
- Parkinson GN, Lee MPH, Neidle S. *Nature*, **2002**, *417*, 876- 880;
- Patel DJ. *Nature*, **2002**, *417*, 807- 808;
- Perry PJ, Gowan SM, Reszka AP, Polucci P, Jenkins TC, Kelland LR, Neidle S. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3253- 3260;
- Perry PJ, Gowan SM, Read MA, Kelland LR, Neidle S. *Anti Cancer Drug Des.* **1999**, *14*, 373- 382;
- Perry PJ, Read MA, Davies RT, Gowan SM, Reszka AP, Wood AA, Kelland LR, Neidle S, *J. Med. Chem.* , **1999**, *42*, 2679-2684;
- Perry PJ, Reszka AP, Wood AA, Read MA, Gowan SM, Dosanjh HS, Trent JO, Jenkins TC, Kelland LR, Neidle S. *J. Med. Chem*, **1998**, *41*, 4873- 4884;
- Phan AT, Kuryavyi V, Patel DJ. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, *16*, 288- 298;
- Phan AT, Kuryavyi V, Gaw HY, Patel DJ. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 167- 173;

- Phan AT, Modi YS, Patel DJ. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8710- 8716;
- Prescott J, Blackburn EH, *Genes Dev.*, **1997**, *11*, 2790-2800;
- Keppler BR, Jarstfer MB, *Biochemistry*, **2004**, *43*, 334-343
- Read M, Harrison RJ, Romagnoli B, Tanious FA, Gowan SM, Reszka AP, Wilson WD, Kelland LR, Neidle S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4844-4849;
- Risitano A, Fox KR. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6507- 6513;
- Roninson IB. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2705- 2715 ;
- Rossetti L, Franceschin M, Bianco A, Ortaggi G, Savino M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2527- 2533;
- Salvati E, Leonetti C, Rizzo A, Mottolese M, Galati R, Sperduti I, Stevens MFG, D'Incalci M, Blasco M, Chiorino G, Bauwens S, Horad B, Gilson E, Stopacciaro A, Zupi G, Biroccio A, *J. Clin. Invest.*, **2007**, *117*, 3236- 3247
- Schmitt CA. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1775*, 5- 20;
- Schuitmaker JJ, Baas P, van Leengoed HL, van der Meulen FW, Star WM, van Zandwijk N. *J. Photochem. Photobiol.* **1996**, *34*, 3- 12;
- Seenisamy J, Rezler EM, Powell TJ, Tye D, Gokhale V, Joshi CS, Siddiqui-Jain A, Hurley LH, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8702- 8709;
- Seto AG, Zaug AJ, Sobel SG, Wolin SL, Cech TR. *Nature*, **1999**, *401*, 177- 180;
- Shay, JW. *Mol. Med. Today*, **1995**, *1*, 378-384;
- Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 11593-11598;
- Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 1167-1172;

- Sissi C, Lucatello L, Krapcho AP, Maloney DJ, Boxer MB, Camarasa MV, Pezzoni G, Menta E, Palumbo M, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 555- 562;
- Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin, SM, Trent JO, Jenkins JC, Neidle S, Hurley LH. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113- 2116;
- Tuntiwechapikul W, Taka T, Bethencourt M, Makonkawkeyoon L, Lee TR, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4120-4126;
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM, *Immunity*, **1999**, *10*, 673-679;
- Wang Y, Patel DJ, **1995**, *J. Mol. Biol.*, *251*, 76- 94;
- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. *Genes & dev.*, **1998**, *12*, 1769-1774;
- Wheelhouse RT, Sun D, Han FX, Hurley LH. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3261-3262;
- White EW, Tanious F, Ismail MA, Reszka Ap, Neidle S, Boykin DW, Wilson WD, *Bioph. Chem.*, **2007**, *126*, 140-153;
- Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW, *Genes Dev.*, **1997**, *11*, 2801-2809
- Xu Y, Noguki Y, Sugiyama H. *Bioorg. & med. Chem.* **2006**, *14*, 5584- 5591;
- Yin L, Hubbard AK, Giardina C. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 36671- 36675;
- Zagotto G, Sissi C, Moro S, Dal Ben D, Parkinson GN, Fox KR, Neidle S, Palumbo M, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *16*, 354-361;
- Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM, *Nature*, **1991**, *350*, 718-720;
- Zhang H. *J. of Cell. Phys.*, **2007**, *210*, 567- 574;

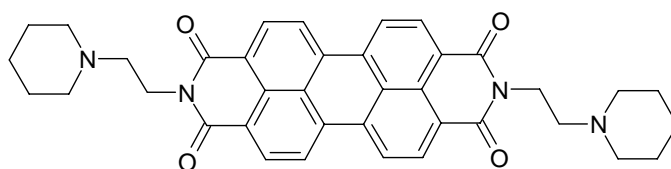
- Zimmermann S, Martens UM., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, 7, 906- 921.

APPENDICE

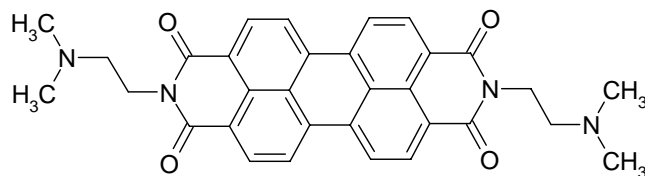
Strutture Chimiche

PERILENI

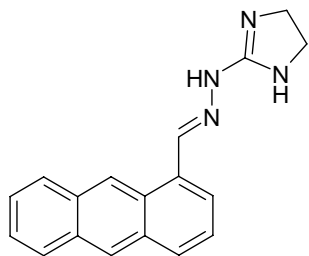
PIPER



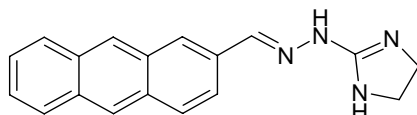
K5



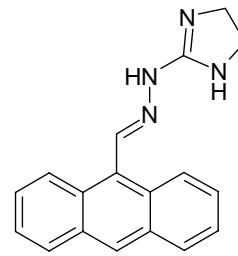
BISANTRENI



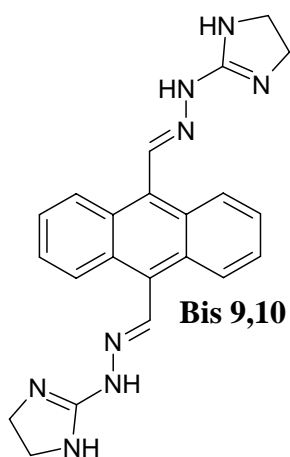
Bis 1



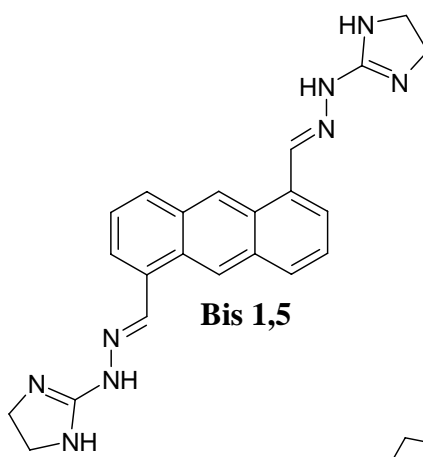
Bis 2



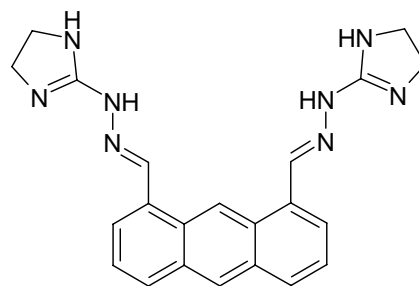
Bis 9



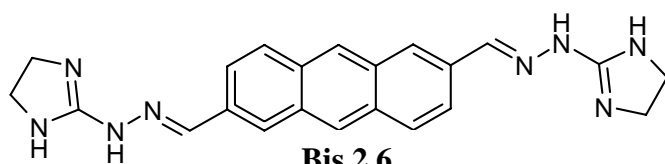
Bis 9,10



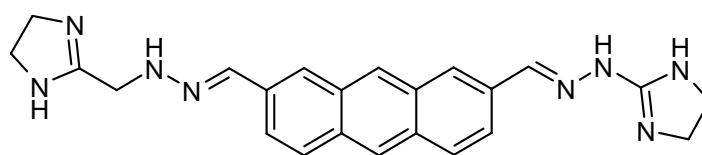
Bis 1,5



Bis 1,8



Bis 2,6

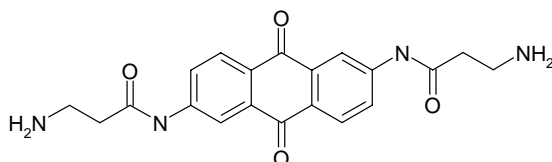


BBis 2,7

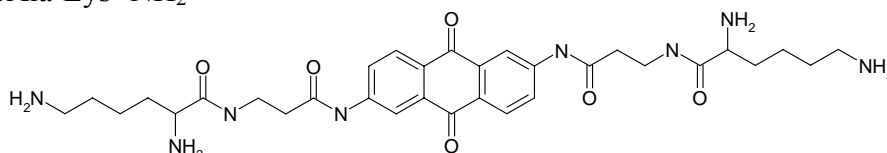
ANTRACHINONI

- **Linker β -Alanina**

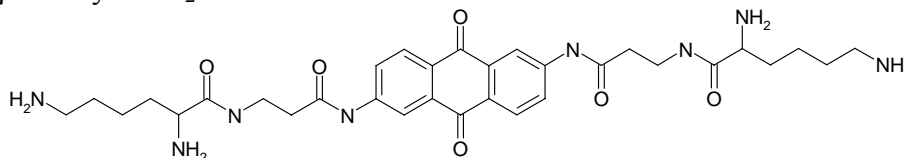
AQ1: 2,6 β Ala- NH₂



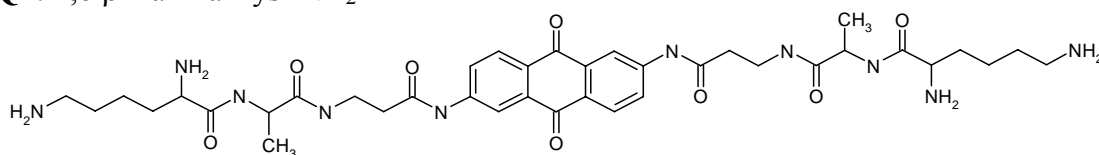
AQ2: 2,6 β Ala-Lys- NH₂



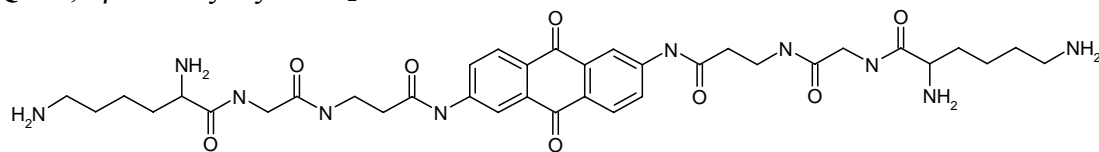
AQ3: 2,6 β Ala-Lys- NH₂



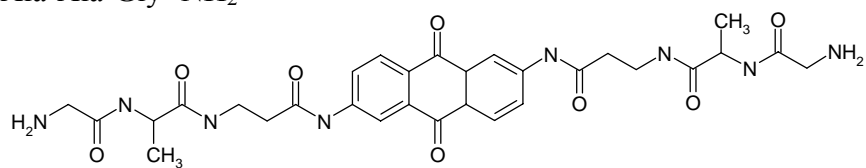
AQ4: 2,6 β Ala-Ala-Lys- NH₂



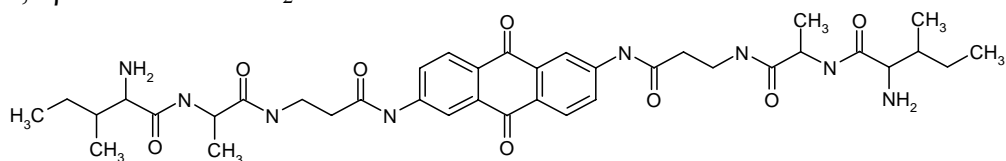
AQ5: 2,6 β Ala-Gly-Lys- NH₂



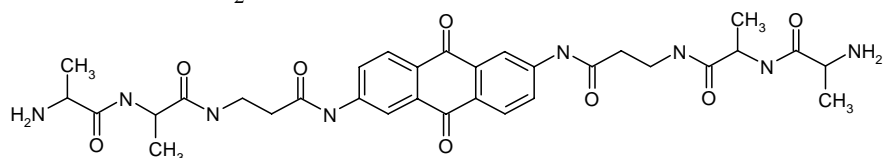
AQ6: 2,6 βAla-Ala-Gly- NH₂



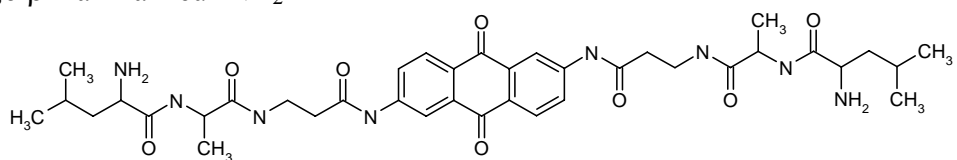
AQ7: 2,6 βAla-Ala-Ile- NH₂



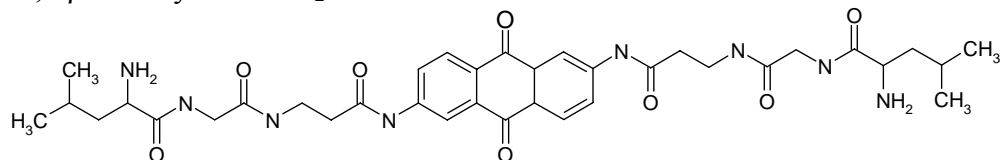
AQ8: 2,6 βAla-Ala-Ala- NH₂



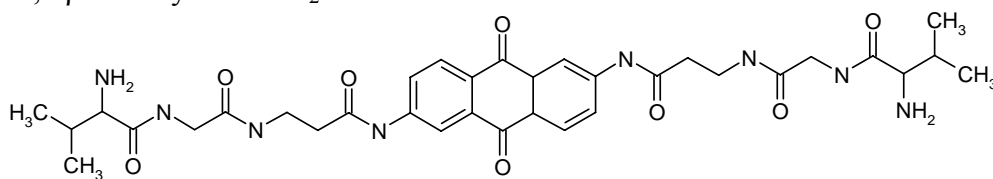
AQ9: 2,6 βAla-Ala-Leu- NH₂



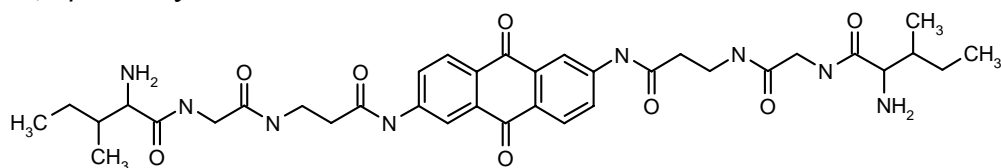
AQ10: 2,6 βAla-Gly-Leu- NH₂



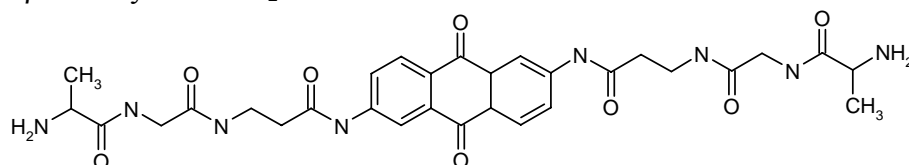
AQ11: 2,6 βAla-Gly-Val- NH₂



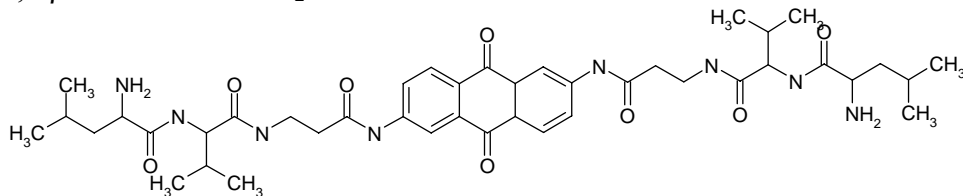
AQ12: 2,6 βAla-Gly-Ile- NH₂



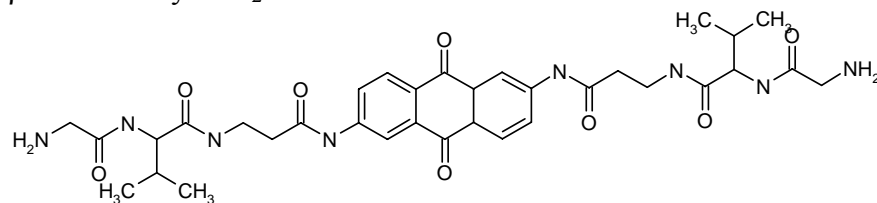
AQ13: 2,6 βAla-Gly-Ala- NH₂



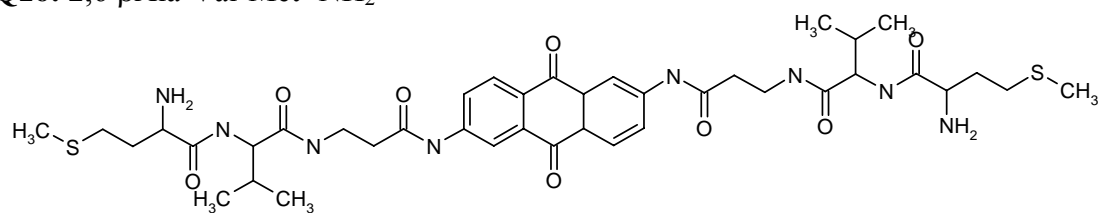
AQ14: 2,6 βAla-Val-Leu- NH₂



AQ15: 2,6 βAla-Val-Gly- NH₂

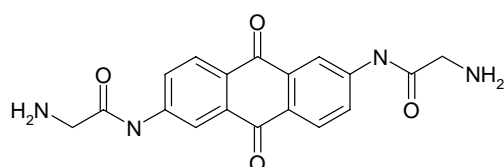


AQ16: 2,6 βAla-Val-Met- NH₂

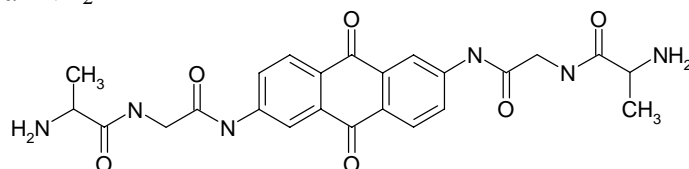


- **Linker Glicina**

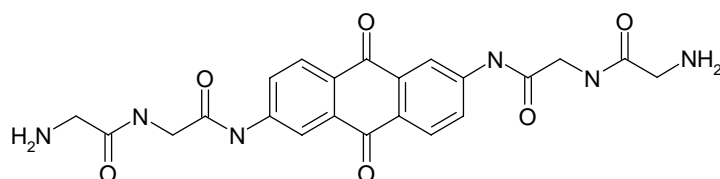
AQ17: 2,6Gly- NH₂



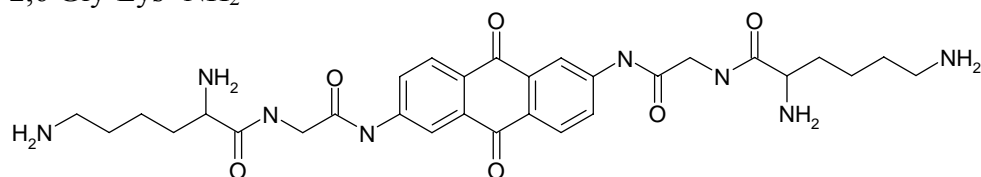
AQ18: 2,6 Gly-Ala- NH₂



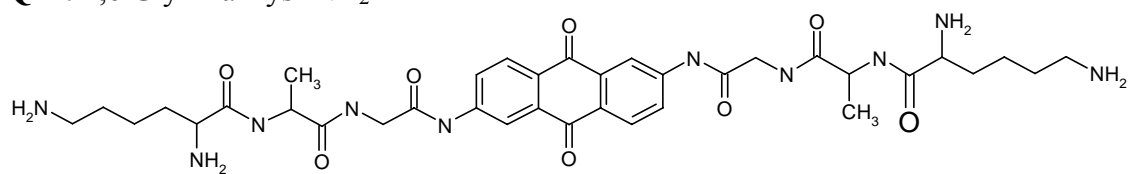
AQ19: 2,6 Gly-Gly- NH₂



AQ20: 2,6 Gly-Lys- NH₂



AQ21: 2,6 Gly-Ala-Lys- NH₂



AQ22: 2,6 Gly-Gly-Lys- NH₂

