

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco
XIX CICLO

FACOLTA' DI FARMACIA
Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali

*“Sintesi e caratterizzazione strutturale di
oligonucleotidi formanti strutture del DNA in tripla e
quadrupla elica”*

Coordinatore: Prof. Enrico Abignente

Relatore:
Prof.ssa Michela Varra

Candidata:
Dott.ssa Giuliana D'Isa

INDICE

1) Introduzione generale	pag. 1
2) Strutture del DNA a tripla elica	pag. 20
2.1 <i>Strutture triplex</i>	<i>pag. 20</i>
2.2 <i>Principali applicazioni delle strutture triplex</i>	<i>pag. 27</i>
2.3 <i>Problemi e risoluzioni riguardanti la struttura del TFO</i>	<i>pag. 31</i>
2.4 <i>Sintesi e caratterizzazione strutturale di oligonucleotidi formanti triple eliche di DNA e contenenti un sito d'inversione della polarità 3'-3' e 5'-5'</i>	<i>pag. 36</i>
3) Inibizione dell'espressione della telomerasi attraverso l'approccio antigene	pag. 62
3.1 <i>Introduzione</i>	<i>pag. 62</i>
3.2 <i>Formazione di triple eliche di DNA sul promotore del gene hTERT della telomerasi: Stabilizzazione mediante il derivato perilenico DAPER</i>	<i>pag. 68</i>
4) Strutture del DNA a quadrupla elica	pag. 101
4.1 <i>Strutture G-quadruplex in acidi nucleici</i>	<i>pag. 101</i>
4.2 <i>Polimorfismo delle G-quadruplex</i>	<i>pag. 110</i>
4.3 <i>Siti di legame degli ioni nelle G-quadruplex</i>	<i>pag. 123</i>
4.4 <i>Ruolo biologico delle strutture G-quadruplex</i>	<i>pag. 126</i>

5) Studio dell'interazione dell'acroleina sulla quadruplex monomolecolare della sequenza telomerica umana d(TTAGGG)₄	pag. 132
<i>5.1 Introduzione</i>	<i>pag. 132</i>
<i>5.2 Effetto del γ-idrossipropano-2'-deossiguanosina sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica umana d(TTAGGG)₄</i>	<i>pag. 140</i>
<i>5.3 Effetto dell'acroleina sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica umana d(TTAGGG)₄</i>	<i>pag. 168</i>
6) Sintesi e caratterizzazione strutturale di oligonucleotidi modificati analoghi del TBA (<i>thrombin binding aptamer</i>)	pag. 188
<i>6.1 Introduzione</i>	<i>pag. 188</i>
<i>6.2 Effetto dell'introduzione di un nuovo nucleoside aciclico sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dal TBA</i>	<i>pag. 203</i>

1) INTRODUZIONE GENERALE

Negli ultimi anni ha riscosso enorme interesse lo sviluppo di strategie farmacologiche a livello genetico per il trattamento di patologie, quali malattie di origine genetica o auto-immuni, tumori e infezioni virali, per i quali ancora oggi non sono presenti approcci del tutto soddisfacenti. Tali strategie terapeutiche coinvolgono l'utilizzo di oligonucleotidi (ON) sintetici, naturali ed analoghi, come potenziali agenti farmacologici in virtù della loro elevata specificità^{1,2}. Gli oligonucleotidi rappresentano, infatti, potenti strumenti per il controllo dell'espressione genica, in quanto, grazie alle loro peculiari proprietà chimico-fisiche, possono interferire in processi di traduzione (strategia antisenso) e di trascrizione (approccio antigene). La strategia antisenso³ si basa sul riconoscimento da parte dell'oligonucleotide sintetico di uno specifico dominio presente in un mRNA scelto come bersaglio, con conseguente formazione di un'elica ibrida di DNA/RNA che rende l'mRNA inattivo mediante o inibizione del meccanismo di *splicing* o interferenza nell'interazione con l'apparato di traduzione ribosomiale o promozione del processo di degradazione dell'mRNA da parte dell'enzima RNasi H (**Figura 1.1**).

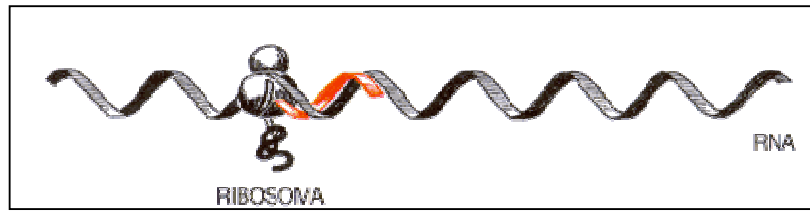


Figura 1.1: *Illustrazione schematica della strategia antisense.*

Nell'approccio antigene⁴, invece, l'oligonucleotide si lega in maniera altamente specifica ai domini omopurinici presenti su regioni di controllo del DNA bersaglio a doppia elica, portando alla formazione di un complesso a tripla elica di DNA. Tale complesso impedisce il legame dell'RNA polimerasi o di altri fattori di trascrizione, inibendo così il processo di trascrizione del gene bersaglio e rendendo silente l'informazione da esso codificata (**Figura 1.2**).

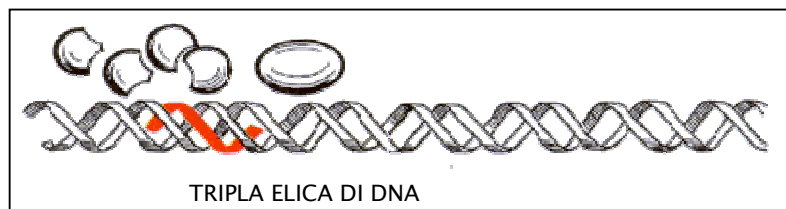


Figura 1.2: *Illustrazione schematica dell'approccio antigene.*

Gli oligonucleotidi vengono inoltre sempre più impiegati per studi di relazione struttura-attività degli acidi nucleici, nella diagnostica medica e nella biologia molecolare per il sequenziamento mediante ibridazione⁵.

L'utilizzo di oligonucleotidi, quali agenti terapeutici e strumenti diagnostici, se da un punto di vista farmacodinamico presenta peculiari ed impareggiabili vantaggi, come la specificità di bersaglio e di meccanismo d'azione, dal punto di vista farmacocinetico riscontra però dei limiti, quali l'attraversamento delle membrane biologiche e la rapida degradazione *in vivo* ad opera delle nucleasi. Infatti, gli oligonucleotidi difficilmente riescono a superare la membrana cellulare a causa della loro natura polianionica; per di più essi sono caratterizzati da scarsa stabilità intracellulare, venendo rapidamente degradati dalle nucleasi presenti nei fluidi biologici.

Tuttavia, viste le innumerevoli e promettenti applicazioni che gli oligonucleotidi possono avere in campo terapeutico, l'attenzione della comunità scientifica si sta incentrando, in misura sempre maggiore negli ultimi anni, sulla ricerca e la sintesi di analoghi oligonucleotidici, chimicamente modificati o nel ponte zuccherofosfato o nelle basi azotate o eventualmente coniugati con molecole, a basso o medio peso molecolare, capaci di conferire al composto ibrido, così ottenuto, una maggiore permeabilità alle barriere biologiche e una maggiore resistenza alle nucleasi cellulari.

Diverse modifiche chimiche sono state quindi apportate con lo scopo di migliorare le proprietà farmacocinetiche degli oligonucleotidi. La permeabilità attraverso la membrana cellulare può essere

migliorata grazie all'aumento della lipofilia degli oligonucleotidi, che può realizzarsi sostituendo il ponte anionico internucleotidico con alternativi motivi neutri. Inoltre, numerose strategie sono frequentemente impiegate per aiutare il passaggio degli ON nelle cellule; queste includono l'uso di liposomi cationici⁶, microiniezioni⁷ e coniugazione a piccoli peptidi⁸.

Per quanto riguarda la suscettibilità alla degradazione enzimatica, diversi studi hanno dimostrato che la sostituzione dell'ossigeno libero del legame fosfodiesterico con un atomo di zolfo migliora la resistenza alle nucleasi biologiche⁹. ON fosfortioati (anche detti ON antisense di prima generazione) legandosi al loro bersaglio, sono per di più in grado di attivare l'RNasi H. Molti derivati di questo tipo sono stati sottoposti a sperimentazione clinica nell'uomo ed uno di essi, il Fomivirsen, è attualmente usato nel trattamento delle retiniti da citomegalovirus (CMV), il principale virus opportunista in pazienti immunodepressi¹⁰.

Per aumentare ulteriormente la resistenza alle nucleasi e nel contempo incrementare l'affinità di legame per l'mRNA bersaglio, sono stati messi appunto oligonucleotidi con gruppi alchilici addizionati al carbonio 2' dello zucchero o al carbonio 5 della base pirimidinica ed ON contenenti uno o più giunzioni internucleotidiche

tipo fosforoammidato o peptidico¹¹ (oligonucleotidi antisenso di seconda e terza generazione).

Oligonucleotidi contenenti giunzioni internucleotidiche di tipo peptidico sono noti come *Peptide Nucleic Acid* (PNA)¹², in cui al posto del ponte naturale desossiribosio-fosfato è presente una catena di natura pseudo-peptidica costituita da unità di N-(2-amminoetil)glicina (**Figura 1.3**).

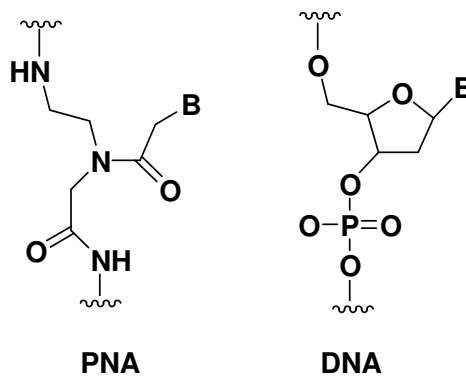


Figura 1.3: Confronto tra lo scheletro del PNA e del DNA.

Il PNA è omomorfo al DNA, con lo stesso numero di legami in ogni unità lungo il ponte internucleotidico, ma esso è una molecola elettricamente neutra ed achirale, mentre il DNA e l'RNA sono carichi negativamente e presentano una chiralità ben precisa. Il PNA può riconoscere una sequenza ad esso complementare in DNA o RNA, seguendo le normali regole di appaiamento di Watson-Crick. Le doppie eliche ibride PNA-DNA risultano considerevolmente più stabili dei corrispondenti duplex DNA-DNA, probabilmente per la

mancanza di repulsione elettrostatica tra i due filamenti. Tali proprietà hanno suggerito potenziali applicazioni del PNA come agente antisenso e antigene, grazie anche alla sua migliore permeabilità cellulare e resistenza alla degradazione enzimatica sia da parte di peptidasi che di nucleasi.

Un altro requisito importante di un ON antisenso o antigene è che esso interagisca con alta affinità e specificità con il filamento bersaglio. Le principali forze stabilizzanti nella formazione di una struttura duplex sono legami ad idrogeno e interazioni idrofobiche tra le basi. Pertanto modifiche della base che aumentano il numero di accettori o donatori di legami ad idrogeno o aumentano l'area π possono migliorare l'affinità di legame⁷.

Le modifiche alla base azotata possono essere di vario tipo e comprendono l'introduzione di sostituenti, l'allargamento o la contrazione degli anelli.

Spesso l'introduzione di basi analoghe in oligonucleotidi può servire ad avere informazioni circa il ruolo dei vari gruppi funzionali nelle basi naturali. Anche una piccola modifica può produrre un effetto drammatico in quanto può variare la dimensione, la distribuzione elettronica, la struttura tautomerica o il valore di pKa dei gruppi funzionali¹³. L'azoto in 7 nelle purine è posizionato nel solco

maggiore del DNA in forma B ed è un potenziale accettore di legami ad idrogeno. I nucleosidi 7-deazapurinici sono stati usati per studiare il ruolo di tale azoto nei processi di riconoscimento. Tali studi hanno evidenziato che oligonucleotidi contenenti 7-deazapurine destabilizzano la doppia elica del DNA¹⁴, poiché alterano le interazioni di tipo *stacking* tra le basi. Inoltre attraverso la 7-deazadenina e la 7-deazaguanina (**Figura 1.4**) è stato chiarito il ruolo dell'azoto nel ripiegamento di sequenze telomeriche ricche di guanosine¹⁵.

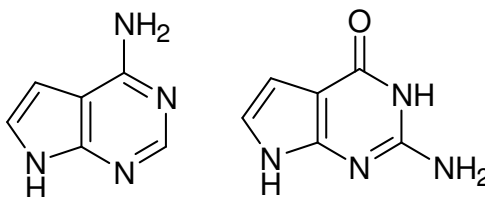


Figura 1.4: (a) 7-deazadenina; (b) 7-deazaguanina.

L'azoto in posizione 3 delle purine è posizionato nel solco minore del DNA e non è direttamente coinvolto nel processo di appaiamento di basi attraverso la formazione di legami ad idrogeno. Tuttavia, è stato dimostrato che l'introduzione della 3-deazadenosina nei ribozimi ne riduce notevolmente la loro efficienza catalitica¹⁶. Analogamente quando la 3-deazadenosina è inserita nella sequenza di riconoscimento della metilasi *EcoRV* viene inibita la reazione

enzimatica, dimostrando il ruolo dell'N-3 nel riconoscimento DNA-proteina¹⁷.

Analoghi purinici come la 2,6-diamminopurina, la 6-tioguanina e l'ipoxantina (**Figura 1.5**) sono stati usati per l'identificazione di nucleosidi purinici essenziali per l'interazione DNA-proteina¹⁸, per la catalisi ad RNA¹⁹ e per stimare il contributo delle interazioni idrofobiche nella stabilità delle strutture duplex²⁰.

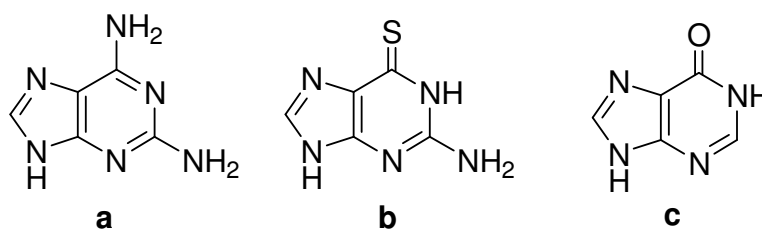


Figura 1.5: (a) 2,6 diamminopurina; (b) 6-tioguanina; (c) ipoxantina.

Basi pirimidiniche modificate, come il 2-pirimidinone o il 4-tiouracile (**Figura 1.6**), sono state usate per studi di relazione struttura-attività nei ribozimi²¹.

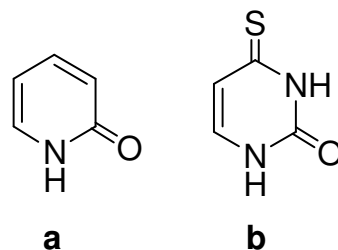


Figura 1.6: (a) 2-pirimidinone; (b) 4-tiouracile.

Come detto in precedenza, un altro importante sito di modifica è il ponte di giunzione internucleotidico fosfodiesterico. Una classe di ON modificati a livello del ponte fosfodiesterico è quella dei fosforotioati²² (**Figura 1.7**) nei quali l'atomo di ossigeno libero nel residuo fosfodiesterico è sostituito con un atomo di zolfo. Questa particolare modifica ha avuto come risultato l'aumento della resistenza alla degradazione enzimatica.

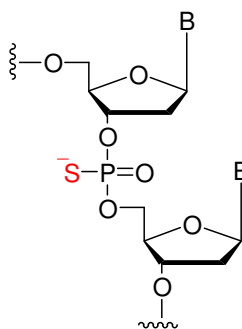


Figura 1.7: Ponte di giunzione di tipo fosforotioato.

Shaw e collaboratori^{23,24} hanno invece sostituito l'atomo di ossigeno non legato del ponte fosfodiesterico con il borano (**Figura 1.8**). I risultanti ON carichi negativamente sono molto solubili in acqua e nel contempo più lipofili di oligonucleotidi naturali. Inoltre studi NMR e CD hanno dimostrato che, in un dinucleotide, la sostituzione di un legame fosfodiesterico con uno del tipo boranofosfato, comporta solo una piccola variazione nelle caratteristiche conformazionali²⁵.

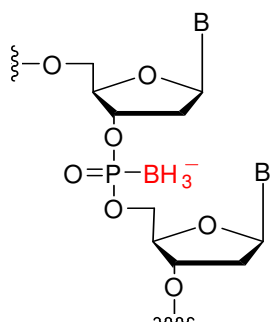


Figura 1.8: Ponte di giunzione di tipo boranofosfato.

In altri derivati l'atomo di ossigeno è stato sostituito con un gruppo metile (**Figura 1.9**). Oligonucleotidi metilfosfonati sono stati tra i primi ad essere testati *in vitro* e *in vivo* come agenti antisense contro bersagli come il virus del herpes simplex (HSV) e il virus *vasicular stomatitis*²⁶. Questo tipo di modifica non ha, però, portato grossi vantaggi, in quanto oligonucleotidi metilfosfonati sono poco solubili in acqua, incapaci di attivare l'RNasi H e mostrano una scarsa affinità per il filamento complementare.

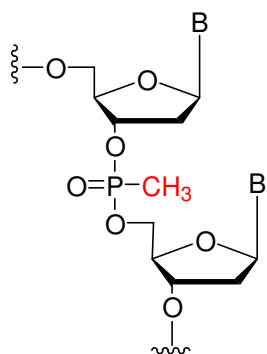


Figura 1.9: Ponte di giunzione di tipo metilfosfato.

Modifiche di tipo diverso riguardano invece la sostituzione dell'intero ponte fosfodiesterico con gruppi ammidici, catene alchiliche o residui guanidinici²⁷.

Un gran numero di ricerche è stato volto all'introduzione di modifiche nell'unità 2'-deossiribosidica o ribosidica. Analoghi con modifiche nella porzione zuccherina sono stati usati per studiare ribozimi ed aptameri ad RNA e valutare l'importanza dell'OH in posizione 2' nella catalisi e nella resistenza alle nucleasi. Le modifiche in posizione 2' comprendono la sostituzione con atomi di idrogeno (deossi)^{28,29}, fluoro, con gruppi amminici^{30,31}, metossilici, allilossi³², alchilici o tiolici (**Figura 1.10**).

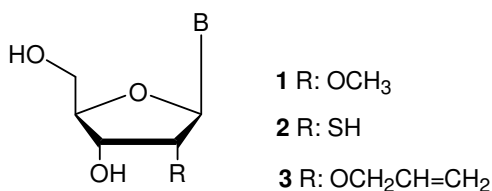


Figura 1.10: Nucleosidi modificati in posizione 2'; (1) 2'-O-Metilnucleosidi; (2) 2'-tionucleosidi; (3) 2'-O-Allilnucleosidi.

Una modifica di tipo diverso ha riguardato invece la sostituzione dell'atomo di ossigeno in posizione 4' dell'anello furanosico con un gruppo metilenico per dare analoghi carbociclici (**Figura 1.11**).

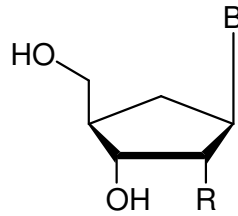


Figura 1.11: *Analogo carbociclico.*

Tali analoghi della timidina e della 5-metil-2'-deossicitidina sono stati incorporati in oligodeossinucleotidi per valutare gli effetti sulla formazione di strutture a doppia e tripla elica del DNA³³.

Lo stesso atomo di ossigeno è stato anche sostituito con un atomo di zolfo (**Figura 1.12**) ed oligonucleotidi contenenti una modifica di questo tipo sono stati usati per studi di interazione DNA-proteina³⁴.

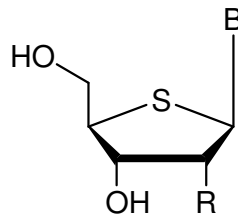


Figura 1.12: *Analogo 4'-tiofuranosio.*

L'anello di tipo furanosico è stato inoltre sostituito con un anello di tipo pirrolidinico; tali analoghi sono stati inseriti in una sequenza di 25 mer per studiare il meccanismo di inibizione di un enzima riparatore di *E.Coli*³⁵.

Infine tra i nucleosidi modificati nello zucchero grande attenzione hanno ricevuto i nucleosidi aciclici. Molti di quelli sintetizzati negli ultimi anni, hanno riportato attività antivirale sia *in vitro* che *in vivo*, ad esempio l'(S)-9-(3-idrossi-2-fosfometossipropil)adenina [(S)HMPA] (**Figura 1.13, a**) si è dimostrato attivo contro molti virus a DNA ed in particolare contro il citomegalovirus; la 9-(2-fosfometossietil)adenina [PMEA] (**Figura 1.13, b**) ha mostrato invece attività contro il virus da immunodeficienza umana (HIV)³⁶.

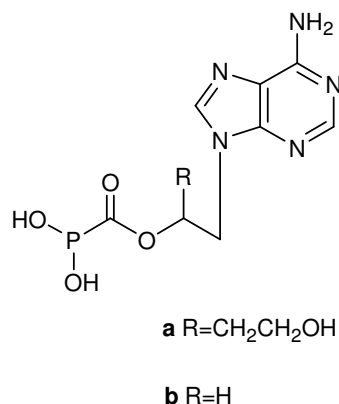


Figura 1.13: (a) [(S)HMPA]; (b) [PMEA].

Oligonucleotidi contenenti sistemi aciclici di questo tipo sono inoltre più resistenti all'attacco delle endonucleasi rispetto agli analoghi con sistemi ciclici. Herdewijn e collaboratori³⁷ hanno sintetizzato oligonucleotidi contenenti zuccheri aciclici e achirali, dimostrando che essi possono dare, con l'opportuno filamento complementare,

strutture in doppia elica stabili e con le basi rivolte all'esterno (Figura 1.14).

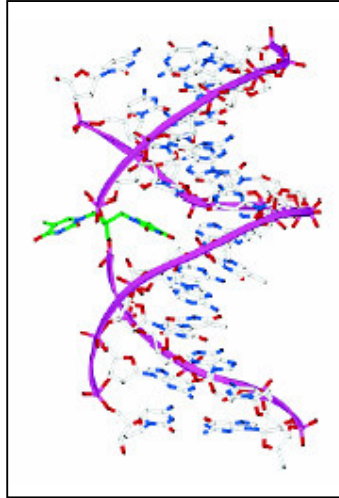


Figura 1.14: *Rappresentazione di una doppia elica di DNA contenente zuccheri aciclici e achirali con basi rivolte all'esterno dell'elica.*

La sequenza di basi costituisce la parte informativa del DNA e, come dimostrato già da Watson e Crick, quest'informazione genetica è rivolta verso l'interno della doppia elica, pertanto il suo svolgimento è essenziale affinché tale informazione possa essere utilizzata per la trascrizione e la replicazione. Un metodo per la costruzione di modelli sintetici semplificati della trasmissione dell'informazione genica può essere ottenuto proprio rivolgendo le coppie di basi verso l'esterno della doppia elica, facendo in modo quindi che l'informazione contenuta nella sequenza sia direttamente accessibile. Per di più sembra finanche plausibile che oligomeri

contenenti glicerolo come unità ripetitiva (nucleotidi flessibili) siano state le prime molecole viventi del mondo prebiotico; sistemi con anelli ribosidici o deossiribosidici sono infatti difficili da sintetizzare da precursori semplici, soprattutto in condizioni abiotiche³⁸.

Una delle più importanti conseguenze dell'inserzione di un nucleoside modificato in una sequenza oligonucleotidica è l'influenza che ne può derivare sulla stabilità della struttura secondaria assunta dall'ON stesso. Per molto tempo il DNA è stato visto come una molecola rigida e passiva con il solo ruolo di conservare e trasmettere l'informazione genetica ma diversi dati sperimentali hanno dimostrato la sua natura estremamente dinamica.

Infatti, oggi è ampiamente riconosciuta la natura polimorfica degli acidi nucleici, in quanto essi per essere funzionali hanno bisogno di adottare strutture tridimensionali ben definite, diverse dalle ben note forme a doppia elica del tipo A, B o Z, quali ad esempio strutture *hairpin*, strutture cruciformi (doppie *hairpin*), strutture *triplex* e *quadruplex*.

Negli ultimi venti anni l'attenzione degli studiosi è stata rivolta all'analisi di tali strutture tridimensionali del DNA al fine di evidenziare eventuali e specifici ruoli funzionali *in vivo*³⁹.

La mia attività di ricerca, svolta durante i tre anni del Dottorato, è

stata indirizzata alla sintesi e alla caratterizzazione strutturale di oligonucleotidi naturali o modificati capaci di formare strutture triplex e quadruplex, al fine di approfondire la conoscenza dei loro aspetti strutturali e in più sono stati effettuati anche studi basati sull'analisi delle interazioni di tali strutture con specifiche molecole.

Bibliografia

1. *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*; Proceedings of the Ciba Foundation Symposium N°209; John Wiley & Sons: Chichester, **1997**.
2. Crooke, S. T. *Therapeutic Applications of Oligonucleotides*; Springer-Verlag: Heidelberg, **1995**.
3. Crooke, S. T. (Ed.) *Handbook of Experimental Pharmacology: Antisense Research and Applications*; Springer-Verlag: Berlin & Heidelberg, vol. 131, **1998**.
4. Antigene: Thuong, N.T.; Hélène, C.; *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*; **1993**, 32, 666.
5. Nielsen, P.E.; *Current Opinion in Biotechnology*; **1999**, 10, 71.
6. Hamilton, S. E.; Simmons, C. G.; Kathiriya, I. S. and Corey, D. R.; *Chem. & Biol.*; **1999**, 6, 343.
7. Flanagan, W. M.; Wagner, R. W.; Grant, D.; Lin, K.Y. and Matteucci, M. D.; *Nat. Biotechnol.*; **1999**, 17, 48.

8. Pooga, M.; Soomets, U.; Hällbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J.X.; Xu, X.J.; Wiesenfeld–Hallin, Z.; Hökfelt, T.; Bartfai, T. and Langel, Ü.; *Nat. Biotechnol.*; **1998**, 16, 857.
9. DeClerq, E.; Eckstein, F. and Merigan, T.C.; *Science*; **1969**, 165, 1137.
10. Micklefield, J.; *Current. Med. Chem.*; **2001**, 8, 1157-79.
11. Kurrek J.; *Eur. J. Biochem.*; **2004**, 270, 1628-44.
12. Nielsen, P.E. and Haaima, G.; *Chem. Soc. Rev.*; **1997**, 26, 73.
13. Verma, S. and Eckstein, F. ; *Annu. Rev. Biochem.*; **1998**, 67, 99-134.
14. Seela F. and Grein T.; *Nucleic Acids Res.*; **1992**, 20, 2297- 2306.
15. Morchie, A.I.H. and Lilley, D.M.J.; *EMBO J.*; **1994**, 13, 993-1001.
16. Bevers, S.; Xiang, G.B. and McLaughlin, L.W.; *Biochemistry* ; **1996**, 35, 6483-90.
17. Newman, P.C.; Nwosu, V.U.; Williams, D.M.; Cosstick, R.; Seela, F. and Connolly, B.A.; *Biochemistry* ; **1990**, 29, 9891-9901.
18. Cal, S. and Connolly, B.A.; *J. Biol. Chem.*; **1997**, 272, 490-496.
19. Tuschl, T.; Ng M.M.P.; Pieken, W.; Benseler, F. and Eckstein, F.; *Biochemistry*; **1993**, 32, 11658-11668.

20. Schweitzer, B.A. and Kool, E.T.; *J. Org. Chem.*; **1994**, 59, 7238-7242.
21. Murray, J.B.; Adams, C.J.; Arnold, J.R.P. and Stockley, P.G.; *Biochem. J.*; **1995**, 311, 487-494.
22. Uhlmann, E. and Peyman, A.; *Chem. Rev.*; **1990**, 90, 543.
23. Sood, A.; Shaw, B.R. and Spielvogel, B.R.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**, 112, 9000.
24. Spielvogel, B.F.; Sood, A.; Shaw, B.R. and Hall, I.H.; *Pure & Appl. Chem.*; **1991**, 63, 415.
25. Li, H.; Huang, F. and Shaw, B.R.; *Bioorg. Med. Chem.*; **1997**, 5, 787.
26. Agris, C.H.; Blake, K.R.; Miller, P.S.; Reddy, M.P. and Ts'o, P.O.P.; *Biochemistry*; **1986**, 25, 6268.
27. De Mesmaeker, A.; Waldner, A.; Wendeborn, S. and Wolf, R.M.; *Pure & Appl. Chem.*; **1997**, 69, 437.
28. Bratty, J.; Chartrand, P.; Ferbeyre, G. and Cedergren, R.; *Biochem. Biophys. Acta.*; **1993**, 1216, 345-359.
29. Yang, J-H; Usman, N.; Chartrand, P. and Cedergren, R.; *Biochemistry*; **1992**, 31, 5005-9.
30. Olsen, D.B.; Benseler, F.; Aurup, H.; Eckstein, F. and Pieken, W.A.; *Biochemistry*; **1991**, 30, 9735-9741.

31. Pieken, W.A.; Olsen, D.B.; Benseler, F.; Aurup, H. and Eckstein, F.; *Science*, **1991**, 253, 314-17.
32. Paoletta, G.; Sproat, B.S. and Lamond, A.I.; *EMBO J.*; **1992**, 11, 1913-1919.
33. Froehler, B.C. and Ricca, D.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, 114, 8320-8322.
34. Hancox, E.L.; Connolly, B.A. and Walker, R.T.; *Nucleic Acids Res.*; **1993**, 21, 3485-3491.
35. Scharer, O.D.; Ortholand, J.-Y.; Ganesan, A.; Ezaz-Nikpay, K. and Verdine, G.L.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1995**, 11, 6623-6624.
36. Harnden, M.R.; Jennings, L.J. and Parkin, A.; *Synthesis*; **1991**, 947.
37. Wu, T.; Froeyen, M.; Schepers, G.; Mullens, K.; Rozenski, J.; Busson, R.; Van Aerschot, A. and Herdewijn, P.; *Organic Letters*; **2004**, 6, 51-54.
38. Schneider, C.K. and Benner, S.A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**, 112, 453-455.
39. Frank-Kamenetskii, M.D. and Mirkin, S.M.; *Annu. Rev. Biochem.*; **1995**, 64, 65-95.

2) STRUTTURE DEL DNA A TRIPLA ELICA

2.1 *Strutture triplex*

La prima descrizione di acidi nucleici a tripla elica (triplex) risale al 1957 ad opera di Felsenfeld e Rich¹. Essi stabilirono che filamenti di acidi poliuridinici [poli(U)] e poliadeninici [poli(A)] erano capaci di formare un complesso stabile a tripla elica in un rapporto 2:1. In seguito, fu evidenziato che anche i filamenti di acidi polipirimidinici (dT, dC) e polipurinici (dA, dG) erano in grado di dar luogo allo stesso tipo di strutture^{2,3}.

Nel 1968, Morgan e Wells misero in evidenza l'importanza biologica delle triplex. Infatti, mediante un esperimento *in vitro* dimostrarono l'inibizione della trascrizione dell'mRNA nell'E.coli attraverso il blocco dell'enzima RNA polimerasi⁴.

Successivamente, diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza di tali strutture a tripla elica nella regolazione e modificazione genomica, grazie alla loro capacità di inibire processi di trascrizione o elongazione⁵.

La formazione di complessi triplex intermolecolari si basa sul riconoscimento di una specifica sequenza di DNA da parte di oligonucleotidi sintetici a singolo filamento, definiti TFO (*“triplex*

forming oligonucleotides”), che si posizionano nel solco maggiore del duplex bersaglio.

In tali strutture, il terzo filamento o TFO riconosce con alta affinità e specificità i tratti polipurinici del DNA bersaglio, a cui si lega mediante legami ad idrogeno di tipo “*Hoogsteen* o *reverse-Hoogsteen*” a seconda del nucleotide che lo forma⁶. L’orientamento parallelo o antiparallelo del TFO e il tipo di legame che permette l’accoppiamento tra le basi conduce ad una classificazione delle strutture a tripla elica intermolecolari in tre diversi tipi principali:

1) Triplex parallele, formate da TFO polipirimidinici che legano, attraverso legami ad idrogeno con un motivo definito “*Hoogsteen*” e con orientazione parallela, il filamento ricco in purine del DNA bersaglio, formando triplette C⁺•GC e T•AT. Le citosine del terzo filamento devono essere protonate in corrispondenza dell’N3 per poter formare due legami idrogeno con le guanine del dsDNA. La stabilità del complesso dipende dal pH con un *optimum* intorno a 6.0. I nucleotidi sono tutti nella conformazione *anti* e le triadi sono perfettamente isomorfe, ovvero sono sovrapponibili e possono susseguirsi all’interno della tripla elica senza arrecare irregolarità alla struttura. (**Figura 2.1.1**).

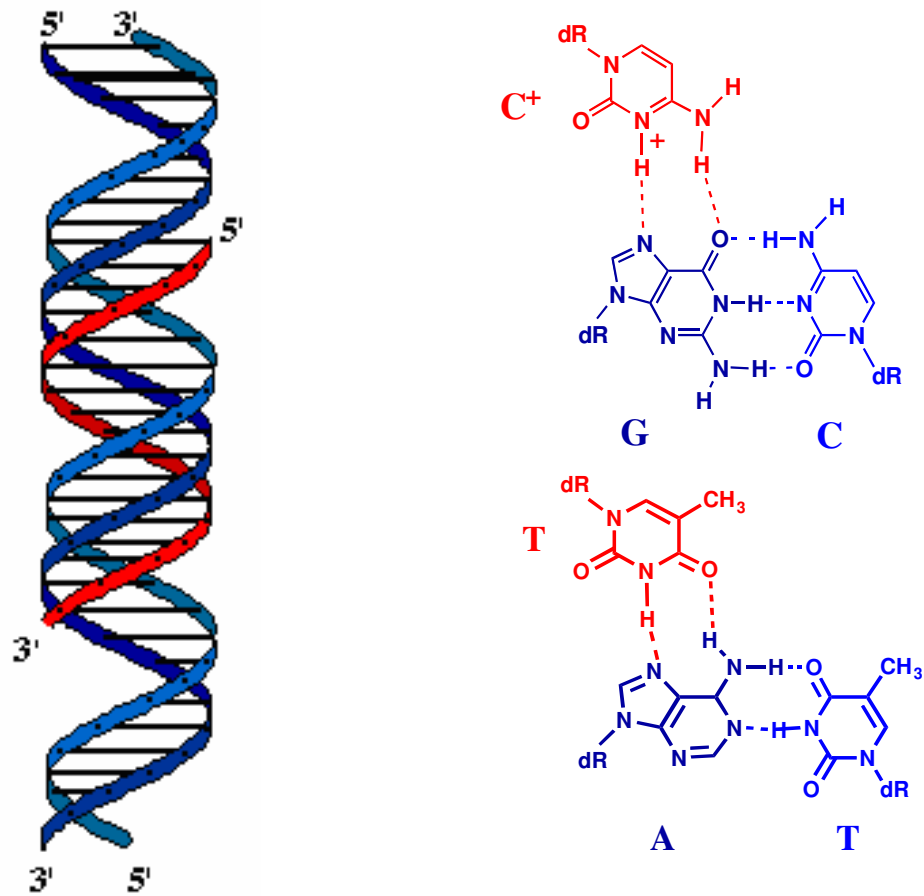


Figura 2.1.1: Rappresentazione di una *triplex* parallela con le corrispondenti triplette di basi C⁺•GC e T•AT.

2) **Triplex antiparallele**, formate da TFO polipurinici che legano, mediante legami ad idrogeno con un motivo definito “*reverse-Hoogsteen*” e con orientazione antiparallela, il filamento purinico del DNA bersaglio formando triplette G•GC e A•AT. La stabilità del complesso non dipende dal pH ma dalla presenza di cationi bivalenti (Mg²⁺). I nucleotidi sono tutti nella conformazione *anti* e le triadi non sono perfettamente isomorfe (**Figura 2.1.2**).

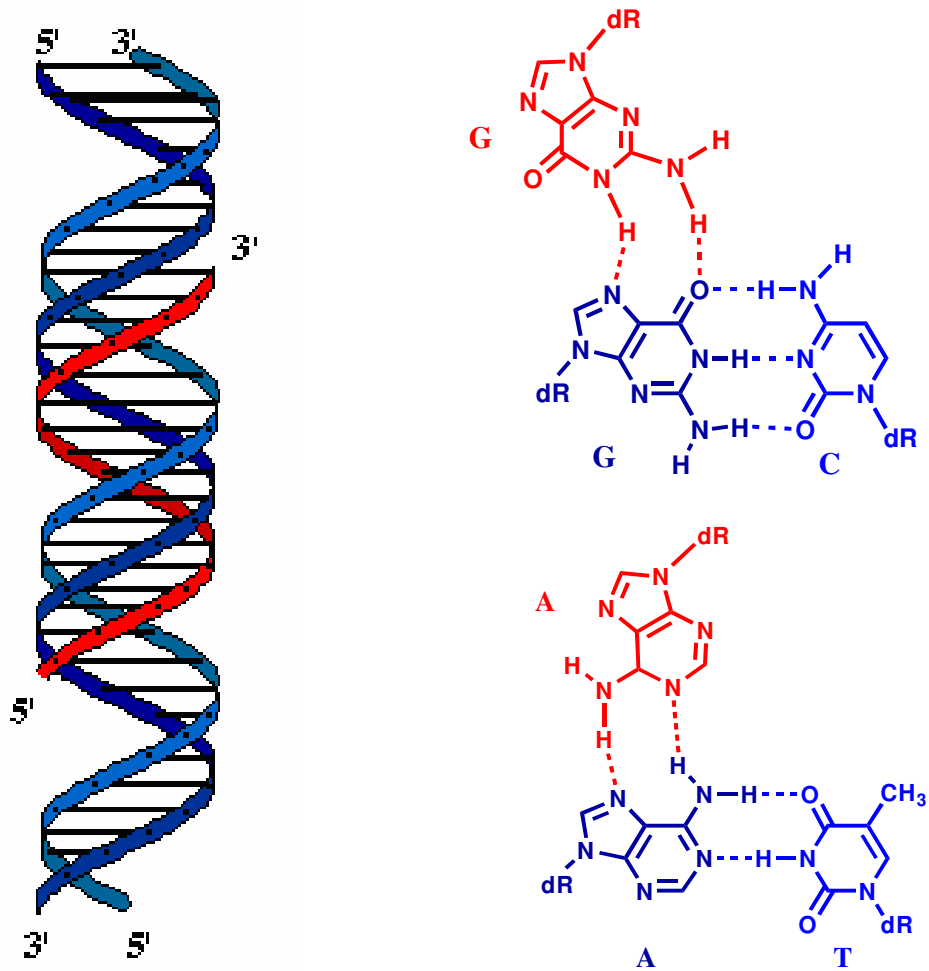


Figura 2.1.2: Rappresentazione di una triplex antiparallela con le corrispondenti triplette di basi G•GC e A•AT.

3) Triplex miste, formate da TFO a sequenza mista GT, che legano il filamento purinico del DNA bersaglio mediante la formazione di legami del tipo “Hoogsteen” o “reverse-Hoogsteen”, portando rispettivamente alla formazione di triplette T•AT e G•GC. Il TFO misto può avere un’orientazione antiparallela o in determinate circostanze parallela al tratto polipurinico del duplex, in dipendenza

del contenuto in basi. Anche in questo caso la stabilità del complesso non dipende dal pH ma dalla presenza di cationi bivalenti (Mg^{2+}). I nucleotidi sono tutti nella conformazione *anti* e le triadi non sono perfettamente isomorfe.

L'interesse verso le strutture a tripla elica è aumentato con la scoperta che triplex intramolecolari potevano formarsi *in vivo* da sequenze oligopirimidine-oligopurine sotto costrizioni topologiche⁷. Esse possono essere divise in due diverse categorie:

- H-DNA, triplex intramolecolari pirimidine-purine-pirimidine, la cui formazione dipende dal pH e dalla presenza di cationi bivalenti (Mg^{2+});
- *H-DNA, triplex intramolecolari pirimidine-purine-purine, la cui formazione dipende dalla presenza di cationi bivalenti (Mg^{2+}) ma è indipendente dal pH.

L'esistenza di triplex intramolecolari H-DNA è stata suggerita da Lyamychev e collaboratori⁸, in seguito all'osservazione dell'ipersensibilità di singoli filamenti, formati da sequenze oligopirimidine-oligopurine, di plasmidi superavvolti verso nucleasi in condizioni acide. La formazione della struttura a tripla elica intramolecolare H-DNA comporta la scissione parziale del DNA duplex nei singoli filamenti, di cui il filamento omopirimidinico si ripiega sulla zona a doppia elica del DNA formando una triplex

intramolecolare parallela con legami “*Hoogsteen*” e lasciando il complementare polipurinico come singolo filamento (**Figura 2.1.3**).

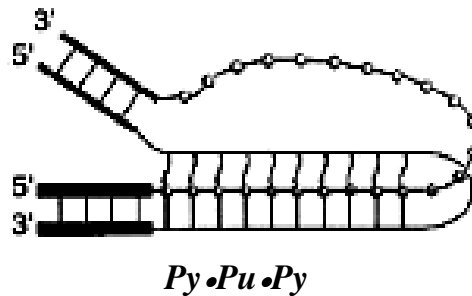


Figura 2.1.3: *H-DNA triplex intramolecolare parallela.*

La presenza del DNA singolo filamento è causa dell’ipersensibilità alle nucleasi a pH acido. Durante la formazione dell’H-DNA, si possono avere due strutture isomere a seconda che la regione a singolo filamento pirimidinico rivolge verso il terminale 5’ o 3’.

La tripla elica intramolecolare *H-DNA costituisce una variante strutturale dell’H-DNA. Tale struttura fu identificata attraverso studi elettroforetici in condizioni di pH neutro ed in presenza di cationi bivalenti (Mg^{2+})⁹. In seguito alla scissione parziale del DNA duplex, il filamento omopurinic ripiega sulla zona a doppia elica del DNA formando una struttura triplex antiparallela con legami “*reverse-Hoogsteen*”. In questo caso il filamento non coinvolto in legami ad idrogeno è quello a sequenza omopirimidinico (**Figura 2.1.4**).

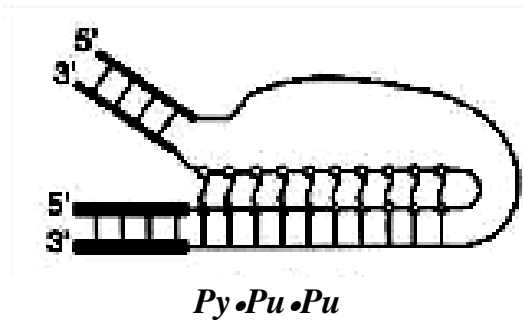


Figura 2.1.4: *H-DNA triplex intramolecolare antiparallela.

Numerosi studi eseguiti su genomi di cellule procariotiche ed eucariotiche hanno permesso di individuare specifici siti atti alla formazione di strutture H-DNA e *H-DNA. Tuttavia, l'identificazione *in vivo* di tali triplex intramolecolari è ancora molto difficile per la mancanza di sonde in grado di accedere al DNA nucleare e di rilevare la loro eventuale presenza.

Mediante studi elettroforetici e di spettrometria di massa, sono state identificate diverse proteine che mostrano particolare affinità per le triplex, tuttavia l'assenza di una netta specificità strutturale non contribuisce ad una prova indiscutibile sulla formazione di queste strutture. Nelson e collaboratori¹⁰ hanno individuato una proteina, codificata dal gene STM1, coinvolta nei processi di mitosi ed avente un'alta affinità di legame per il motivo strutturale pulipurinico a tripla elica. Jimenez-Garcia e collaboratori¹¹ hanno dimostrato che il fattore GAGA di *Drosophila* presenta un'elevata affinità di legame per le strutture a tripla elica *in vitro*. I siti di legame di tale proteina si

trovano in corrispondenza di regioni promotori di diversi geni che contengono sequenze ripetute $d(GA/TC)_n$ in grado quindi di formare strutture a tripla elica.

2.2 Principali applicazioni delle strutture triplex

I TFO adoperati per la formazione di strutture a tripla elica presentano un vasto numero di potenziali applicazioni in campo terapeutico¹².

Essi possono essere usati per inibire processi di trascrizione o elongazione (strategia antigene); infatti, il legame di un terzo filamento può bloccare l'espressione del gene nel duplex originale ed impedire che le proteine di controllo, o enzimi essenziali alla trascrizione, leghino la molecola di DNA. Ne consegue la possibilità di interferire selettivamente sulla sintesi proteica impedendo ad esempio, la sintesi di un filamento di mRNA nella fase di trascrizione del DNA.

Il primo esempio di inibizione della trascrizione di un gene attraverso l'impiego di un TFO è stato dimostrato da Postel e collaboratori¹³ sull'oncogene umano c-myc. Presumibilmente il TFO si lega al suo sito bersaglio sul DNA duplex, formando una struttura a tripla elica di DNA capace di impedire il legame della polimerasi o di altri fattori di

trascrizione oppure la progressione della polimerasi durante il processo di trascrizione.

Col tempo, molti gruppi hanno usato questa strategia per inibire l'espressione di molti geni sia *in vitro* che *in vivo*^{5,14,15}.

TFO più lunghi e, quindi, in grado di formare triplex più stabili, si sono rilevati degli inibitori più efficaci della fase di elongazione nel processo di trascrizione.

I TFO possono essere utilizzati anche come vettori di molecole o complessi ligando-metalli implicati nel *cleavage* di specifiche sequenze di DNA. Esempi di molecole dotate di tali attività sono i TFO coniugati a complessi EDTA-Fe¹⁶ o fenantrolina-Cu¹⁷ che provocano la scissione ossidativa dei legami fosfodiesterici di uno specifico DNA bersaglio.

Diversi studi hanno dimostrato che i TFO possono essere anche adoperati come veicoli di molecole intercalanti del DNA in grado di indurre mutagenesi; un esempio di molecola intercalante è lo psoralene, fotoattivabile e formato da 3 cicli condensati posti sullo stesso piano. Lo psoralene coniugato all'estremità 5' o 3' di un TFO (**Figura 2.2.1**)^{18,19}, avente opportuna sequenza oligonucleotidica, è in grado di indurre mutagenesi nel gene *supF*²⁰.

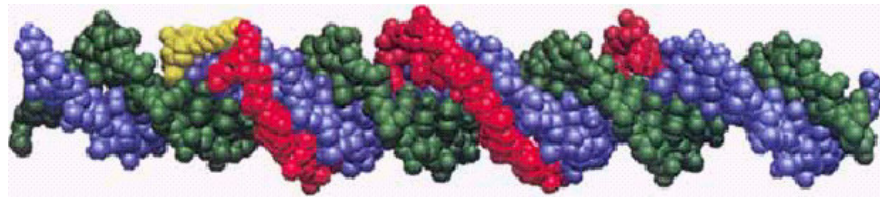


Figura 2.2.1: *Formazione di un complesso triplex tra un TFO (rosso) coniugato al 5' terminale ad una unità di psoralene (giallo) e una specifica sequenza bersaglio.*

Il legame del TFO ad una specifica sequenza, contenuta in un DNA bersaglio, permette allo psoralene di intercalare in una posizione TA ed, in seguito ad eccitazione fotochimica, dar luogo ad un *cross-link* tra due timine presenti sui due filamenti opposti del DNA bersaglio, producendo una mutazione sito specifica con inversione T:A in A:T²¹. Nel tentativo di aumentare il numero di bersagli endogeni si è pensato di veicolare la molecola di psoralene attraverso un TFO formato da basi pirimidiniche modificate. Tali TFO polipirimidinici hanno presentato un'elevata affinità di legame nei confronti del gene bersaglio *Hprt* (ipoxantine fosforibosil transferasi), in cui la molecola di psoralene coniugata a tali oligonucleotidi è in grado di bloccare completamente la sua trascrizione inducendo mutagenesi²².

Inoltre, studi più recenti hanno dimostrato che TFO modificati alla posizione 2' dell'unità di ribosio mediante residui di 2'-amminoetile coniugati allo psoralene mostrano un aumento dell'attività

mutagenica indotta nel gene *Hprt*, risultando più efficaci di 20-30 volte rispetto ai TFO 2'-O-metilderivati²³.

Le strutture a tripla elica possono svolgere un ruolo molto importante anche nel processo di ricombinazione omologa che rappresenta un'altra strategia per modificare genomi in cellule eucariotiche²⁴.

Attraverso tale tecnica è possibile replicare o cancellare sequenze di geni su cromosomi, tuttavia essa è limitata da una frequenza di ricombinazione molto bassa nelle cellule umane (10^{-8} a 10^{-5} eventi di ricombinazione omologa per cellula), anche se è stato dimostrato che può aumentare da 10 a 100 volte nei DNA danneggiati²⁵. Quindi, il danneggiamento sito-specifico del DNA indotto da triplex fornisce un mezzo per aumentare la ricombinazione omologa.

Infatti, la ricombinazione indotta da triplex è stata dimostrata in un vettore SV40 in cellule eucariotiche, usando TFO coniugati allo psoralene che determinano un danno al DNA, con un aumento della frequenza di ricombinazione fino a 25 volte^{26,27}. TFO coniugati allo psoralene sono stati anche usati per aumentare la frequenza di ricombinazione intracromosomiale su cromosomi di cellule umane²⁸.

2.3 Problemi e risoluzioni riguardanti la struttura del TFO

L'efficacia terapeutica dei TFO è funzione della loro capacità di distribuirsi a livello di cellule e tessuti in quantità sufficienti per ottenere la formazione di triple eliche di DNA. Nonostante le potenzialità dei TFO, la loro applicazione è limitata dai comuni problemi relativi agli ON, ossia la difficoltà di attraversamento delle membrane biologiche e la rapida degradazione *in vivo* ad opera delle nucleasi. Diversi approcci sono stati studiati per migliorare la distribuzione tissutale dei TFO; uno di questi prevede l'utilizzo di lipidi cationici, i quali hanno reso possibile un aumento di circa 25 volte dei tassi di associazione di analoghi oligonucleotidici contenenti legami fosforotioati alle cellule bersaglio²⁹. Analogamente la streptolisina usata ad una concentrazione di 150 unità/ml determina un aumento del 75% della permeabilità alle membrane cellulari (in particolare delle cellule leucemiche) attraverso la formazione di pori. L'attività di tale molecola determina, quindi, un incremento dell'assorbimento cellulare di molecole oligonucleotidiche³⁰.

La distribuzione cellulare dei TFO può essere favorita anche mediante l'utilizzo di *carrier* molecolari. Particolarmente utili a questo scopo si sono rivelate molecole cariche positivamente, quali i

composti poliamminici spermina e spermidina, in grado di compensare le repulsioni tra gli ossigeni carichi negativamente dei legami fosfodiesteri³¹. Queste agiscono, quindi, come i cationi bivalenti che stabilizzano le cariche negative dello scheletro fosfodiesterico. Altri carrier usati sono costituiti da molecole di natura peptidica contenenti un nucleo idrofobico in grado di legare specifiche sequenze oligonucleotidiche e di veicolarle attraverso le membrane cellulari³². Nonostante l'utilizzo di queste strategie, l'emivita di tali molecole rimane in ogni caso breve (12 ore) ed ancora oggi si ricercano sistemi che consentano di aumentarne la resistenza alle nucleasi e contemporaneamente la permeabilità cellulare.

Nelle applicazioni per la strategia antigene esistono, poi, ulteriori limitazioni, dettate da fenomeni di natura strutturale. Nelle triplex generate da TFO pirimidinici, l'N3 delle citosine del terzo filamento deve essere protonato affinché possa garantire la formazione dei legami ad idrogeno tipo "*Hoogsteen*" con le coppie G-C del tratto purinico del DNA bersaglio. Tale protonazione avviene ad un pH più acido rispetto a quello fisiologico. Inoltre, la dipendenza dal pH viene ulteriormente messa in evidenza da TFO a sequenza pirimidinica contenenti due o più citosine consecutive, in quanto dalla protonazione delle stesse si crea una repulsione tra cariche adiacenti.

La dipendenza del TFO pirimidinico dal pH può essere superata mediante l'uso di basi modificate. A tale scopo è stata adoperata la 5-metilcitosina, ottenuta per metilazione in posizione 5 della citosina, permettendo la formazione di strutture a tripla elica ad un pH >6^{33,34}. Tuttavia sequenze di TFO contenenti più di tre-quattro residui di 5-metilcitosine formano strutture a tripla elica poco stabili con il DNA bersaglio, per questo motivo sono stati sintetizzati molti altri analoghi sia purinici che pirimidinici³⁵⁻³⁹.

Sebbene siano stabili a pH fisiologici, i TFO purinici e quelli a sequenza mista, ricchi entrambi di G, presentano come inconveniente la capacità di riarrangiare in strutture secondarie, nelle quali è coinvolta la formazione di tetradi di G. La tetrade di G (come descritto più dettagliatamente nella sezione delle quadruplex) è un riarrangiamento complanare di 4 guanine nel quale ogni base è donatrice ed accettrice di legami ad idrogeno nei confronti della base vicina, tipico delle strutture quadruplex. Quest'ultime sono stabilizzate da un'elevata concentrazione di ioni monovalenti, in particolare da ioni potassio e sodio, presenti in condizioni fisiologiche⁴⁰.

Per ridurre la tendenza dei TFO purinici e misti a formare tali strutture secondarie sono stati sintetizzati nucleosidi contenenti diverse basi puriniche modificate. Una di queste è la 7-deazaguanina

(**Figura 2.3.1, a**) che inibisce la formazione di strutture quadruplex indipendentemente dalle concentrazioni fisiologiche di K^+ , poiché viene eliminato un N accettore di legami ad idrogeno (vedi **Figura tetrade di G, capitolo 4**)⁴¹. Anche la 6-tioguanina (**Figura 2.3.1, b**) previene la formazione dei quartetti di G. Infatti, il più largo raggio dello zolfo e la minore elettronegatività danno luogo ad un ingombro sterico e una più bassa affinità per il K^+ fino a concentrazione pari a 200 nM⁴².

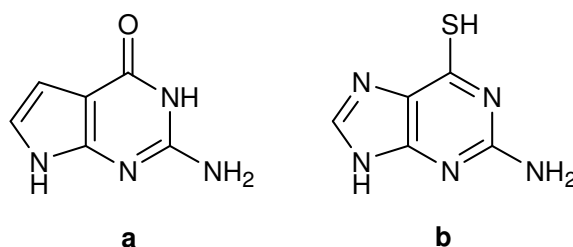


Figura 2.3.1: *Basi puriniche modificate (a) 7-deazaguanina e (b) 6-tioguanina che riducono il numero di strutturazioni secondarie dei TFO polipurinici.*

Inoltre, la formazione delle triplex richiede la presenza di ioni bivalenti (Mg^{2+}), in quanto capaci di neutralizzare la repulsione tra i gruppi fosfato carichi negativamente dei filamenti costituenti il complesso a tripla elica, favorendone così la formazione e la stabilità. Un'altra e forse la più importante limitazione dei TFO, comune ai tre motivi strutturali, è la necessità di individuare un tratto omopurinicamente relativamente lungo (15-17 basi)⁴³ sul gene bersaglio, per poter

formare una struttura a tripla elica sufficientemente stabile in condizioni fisiologiche. Questo requisito non è sempre presente nelle sequenze bersaglio. Per ovviare a tale problema sono state utilizzate diverse strategie tra cui l'introduzione di basi modificate in grado di legarsi al duplex così da formare triple eliche stabili anche in condizioni fisiologiche⁴⁴⁻⁴⁶. Una delle soluzioni più ingegnose riguarda l'uso di TFO contenenti un sito di inversione della polarità 3'-3' e anche siti di inversione di tipo 5'-5', che hanno dimostrato essere meno affini al duplex bersaglio rispetto ai primi. Questi oligonucleotidi modificati sono in grado, attraversando il solco maggiore, di legarsi contemporaneamente a due regioni omopuriniche adiacenti presenti alternate sui due filamenti del DNA bersaglio (Figura 2.3.2)⁴⁷⁻⁵².

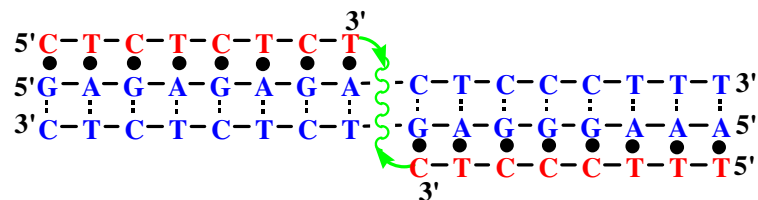


Figura 2.3.2: TFO polipirimidinico contenente un sito di inversione della polarità 3'-3' che riconosce tratti omopurinici adiacenti del DNA bersaglio presenti su filamenti opposti.

In questo modo la sequenza bersaglio di adatta lunghezza potrà essere costituita da un tratto omopurinico ed omopirimidinico sullo stesso

filamento invece di un'unica lunga sequenza omopurinica, aumentando i potenziali bersagli utilizzabili nella strategia antigene. Affinché si verifichi tale possibilità è necessario che l'ON soddisfi due principali condizioni:

- 1) deve essere capace di attraversare il solco maggiore senza causare forti distorsioni della conformazione triplex;
- 2) deve avere un adatto spaziatore che permetta di legare i terminali 3' o 5' per ottenere l'opportuna inversione di polarità.

Sono stati descritti in letteratura molti spaziatori in grado di legare le due estremità e di determinare l'inversione di polarità^{47,52}.

2.4 Sintesi e caratterizzazione strutturale di oligonucleotidi formanti triple eliche di DNA e contenenti un sito d'inversione della polarità 3'-3' e 5'-5'

Al fine di ovviare agli inconvenienti che possono complicare l'uso dei TFO nella strategia antigene verso bersagli contenenti tratti di G consecutive, durante la mia attività di dottorato ho intrapreso uno studio strutturale, operato mediante tecniche spettrofotometriche CD ed elettroforetiche, di triple eliche di DNA formate con TFO ad orientazione mista parallela/antiparallela e contenenti rispettivamente

una porzione omopirimidinica ed una omopurinica congiunte da un sito di inversione della polarità 3'-3' o 5'-5'.

Il sito di inversione della polarità permette il giusto orientamento dei TFO risultanti per formare triple eliche **parallele/antiparallele** con il DNA bersaglio.

Nella **Tabella 2.4.1** sono riportate le sequenze dei due filamenti che costituiscono il bersaglio **I**, scelto per i TFO sintetizzati contenenti il sito di inversione 3'-3', e il bersaglio **II**, scelto per quelli contenenti l'inversione 5'-5'; i filamenti che costituiscono tali bersagli contengono le stesse basi nella medesima successione ma con polarità invertita. Per entrambi i bersagli sono stati sintetizzati i TFO omopirimidinico ed omopurinico, indicati come **a** e **b** (per il bersaglio **I**, **Tabella 2.4.1**) e **a'** e **b'** (per il bersaglio **II**, **Tabella 2.4.1**), che portano rispettivamente alla formazione di triplex parallele ed antiparallele. Tali complessi sono stati utilizzati come sistema di riferimento di stabilità termica, con cui confrontare la stabilità delle triplex formate dai TFO ad orientazione mista parallela/antiparallela sintetizzati, contenenti il sito di inversione della polarità 3'-3', indicati come **c** e **d** (per il bersaglio **I**, **Tabella 2.4.1**) e il sito di inversione della polarità 5'-5', indicati come **c'** e **d'** (per il bersaglio **II**, **Tabella 2.4.1**).

Tabella 2.4.1: Sequenze dei TFO e dei relativi bersagli sintetizzati.

TFO	Sequenza	Bersaglio	Sequenze
a	5' CTCTCTCTCTCCCTTT ^{3'}	I	3' CTCTCTCTCTCCCTTT ^{5'} / 5' GAGAGAGAGAGAGGGGAAA ^{3'}
b	3' GAGAGAGAGAGAGGGGAAA ^{5'}		
c	5' CTCTCTCT ^{3'3'} GAGGGGAAA ^{5'}		
d	5' CTCTCTCT ^{3'3'} GTGGGTTT ^{5'}		
a'	3' CTCTCTCTCTCCCTTT ^{5'}	II	5' CTCTCTCTCTCCCTTT ^{3'} / 3' GAGAGAGAGAGAGGGGAAA ^{5'}
b'	5' GAGAGAGAGAGAGGGGAAA ^{3'}		
c'	3' CTCTCTCT ^{5'5'} GAGGGGAAA ^{3'}		
d'	3' CTCTCTCT ^{5'5'} GTGGGTTT ^{3'}		

L'affinità di legame dei TFO sintetizzati con i rispettivi bersagli e la stabilità dei risultanti complessi a tripla elica sono state esaminate mediante tecniche spettrofotometriche CD ed esperimenti elettroforetici.

Nel caso della triplex parallela i profili CD, registrati a 10°C e a pH 5.5 e 6.6, presentano una caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212 nm che, secondo quanto riportato in letteratura⁵³, dà un'indicazione della presenza della triplex in soluzione (**Figura 2.4.1**). Dall'analisi delle curve CD di denaturazione termica registrate a 212 nm, si è osservato che la triplex parallela a pH 5.5 presenta una T_m (temperatura di *melting*) di 36°C che diminuisce notevolmente all'aumentare del pH ($T_m=24^\circ\text{C}$ a pH 6.6, **Figura 2.4.1**), confermando che la sua stabilità è influenzata dal pH.

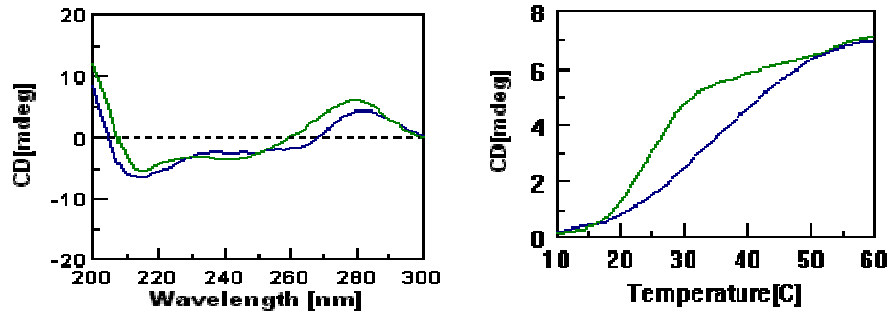


Figura 2.4.1: *Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex parallela a pH 5.5 ($T_m=36^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=24^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .*

Nel caso della triplex antiparallela (pH-indipendente), il profilo CD registrato a 10°C e a pH 6.6 non presenta la caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212nm, ciò dà indicazione dell'assenza di tale complesso in soluzione. Tale assenza è stata confermata sia registrando la curva di CD-melting a 212 nm, in cui non si è osservata alcuna transizione, sia sovrapponendo lo spettro CD della triplex e lo spettro somma del duplex bersaglio e del singolo TFO omopurinico, in cui non sono visibili sensibili variazioni nei profili CD (**Figura 2.4.2**).

Per tale triplex si sono inoltre registrati profili CD utilizzando anche tamponi differenti dal tampone fosfato, quali HEPES e TRIS, ottenendo analoghi risultati.

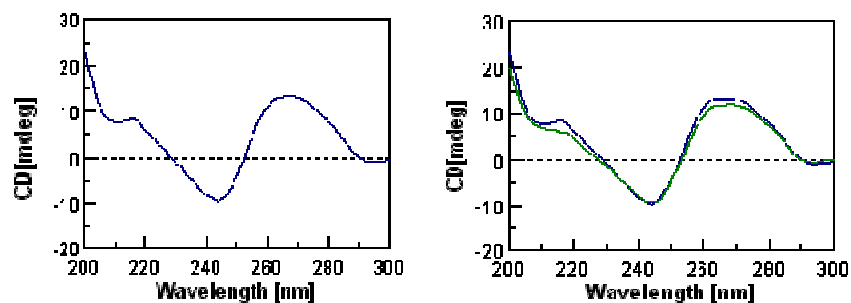


Figura 2.4.2: *Profilo CD della triplex antiparallela a pH=6.6 (in blu) e sua sovrapposizione allo spettro somma duplex-singolo TFO omopurinico (in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂ a 10°C.*

Nel caso delle triplex **C** e **D**, ottenute dall'associazione del bersaglio **I** con i TFO **c** e **d** contenenti il sito di inversione 3'-3', i profili CD presentano la caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212 nm e dalle curve CD di denaturazione termica, registrate a 212 nm, si è osservato in entrambe le triplex una T_m pari a 37°C a pH 5.5, mentre a pH 6.6 si è rilevata una T_m di 35°C per la triplex **C** e di 30°C per quella **D** (**Figure 2.4.3** e **2.4.4**).

In entrambi i casi, la T_m di tali triplex risulta essere meno dipendente dal pH rispetto a quella completamente parallela utilizzata come riferimento.

I profili CD delle triplex **C'** e **D'**, ottenute dall'associazione del bersaglio **II** con i TFO **c'** e **d'** contenenti il sito di inversione 5'-5', presentano la caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212 nm e dalle curve di CD-melting, registrate a 212 nm, si è osservato nel caso della triplex **C'** una T_m pari a 24°C a pH 5.5 e nessuna transizione a pH 6.6, mentre per la triplex **D'** si è ottenuta una T_m di 34°C a pH 5.5 e di 22°C a pH 6.6, dimostrando una dipendenza della sua stabilità dal pH paragonabile alla triplex parallela di riferimento (**Figure 2.4.5 e 2.4.6**).

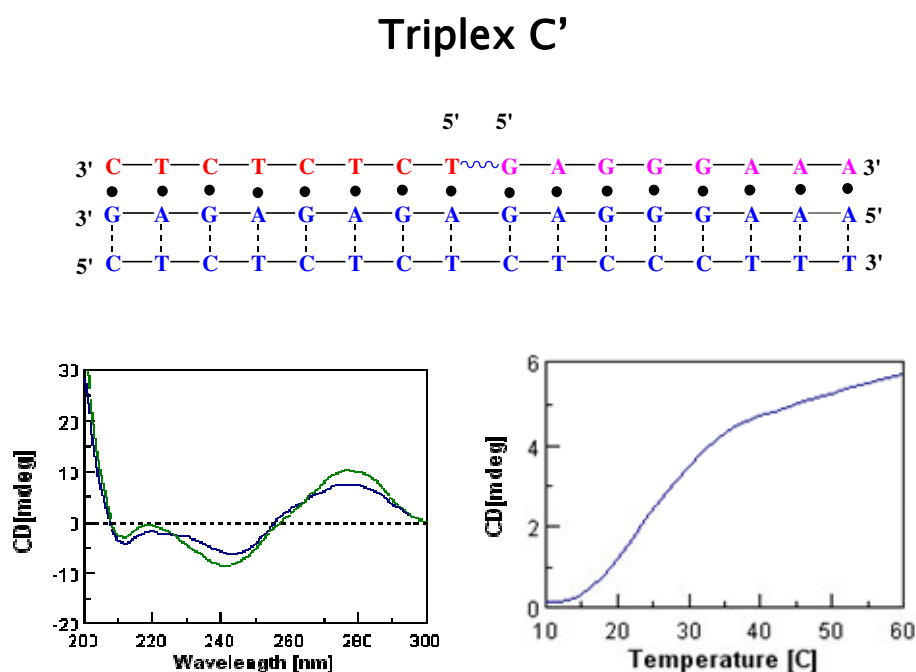


Figura 2.4.5: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex **C'** a pH 5.5 ($T_m=24^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 (in verde, $T_m=nt$) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

Triplex D'

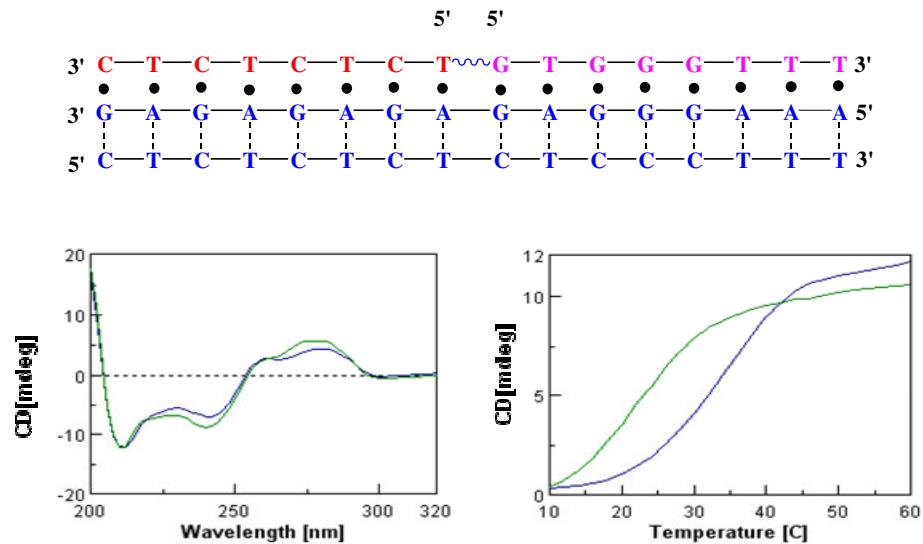


Figura 2.4.6: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex D' a pH 5.5 ($T_m=34^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=22^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

Esperimenti elettroforetici su gel nativo al 15% di poliacrilammide (19:1 acrilammide:N',N'-bis-metilen-acrilammide), condotti a 4°C e a pH 6.6 per 12 ore, hanno evidenziato solo nel caso della triplex C una banda elettroforetica con cammino ritardato rispetto al duplex bersaglio, indice della formazione del complesso a tripla elica (linea 11, **Figura 2.4.7**).

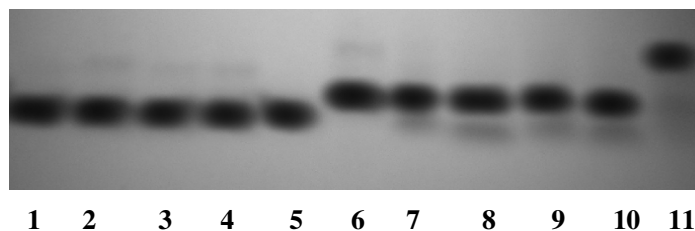


Figura 2.4.7: EMSA su gel nativo al 15%; linea 1: TFO *a*; linea 2: TFO *d'*; linea 3: TFO *d*; linea 4: TFO *c'*; linea 5: TFO *c*; linea 6: duplex bersaglio; linea 7: triplex *parallela*; linea 8: triplex *D'*; linea 9: triplex *D*; linea 10: triplex *C'*; linea 11: triplex *C*.

Tale risultato risulta essere concordante con i dati spettrofotometrici, sopra descritti, confermando la maggiore stabilità e la minore dipendenza dal pH della triplex **C**.

Al fine di valutare l'influenza del tipo di base adiacente al sito di inversione sulla stabilità termica delle triplex, sono stati poi sintetizzati TFO in cui la timidina in prossimità del sito di inversione è stata sostituita con la 2'-deossiuridina.

Questa modifica è stata eseguita in base alla considerazione che il metile in posizione 5 della timina potrebbe interagire stericamente nel sito di inversione della polarità. L'eliminazione del metile potrebbe permettere di eliminare queste interazioni steriche e quindi aumentare la stabilità termica delle triple eliche risultanti. A tale proposito, sono stati sintetizzati i TFO riportati in **Tabella 2.4.2**.

Tabella 2.4.2: Sequenze dei TFO sintetizzati.

TFO	SEQUENZE
e	5'CTCTCTCU ₇ ^{3'3'} GTGGGTTT ^{5'}
f	5'CTCTCTCT ^{3'3'} GU ₉ GGGTTT ^{5'}
e'	3'CTCTCTCU ₇ ^{5'5'} GTGGGTTT ^{3'}
f'	3'CTCTCTCT ^{5'5'} GU ₉ GGGTTT ^{3'}

Nei TFO **e** ed **e'**, si è sostituita la timidina con la 2'-deossiidina in posizione 7, ossia nel sito di inversione; nei TFO **f** e **f'** si è eseguita la stessa sostituzione ma in posizione 9, in prossimità del sito di inversione.

L'affinità di legame dei TFO sintetizzati con i rispettivi bersagli e la stabilità dei risultanti complessi a tripla elica è stata esaminata mediante tecniche spettrofotometriche CD ed esperimenti elettroforetici.

Nel caso delle triplex **E** e **F**, ottenute dall'associazione del bersaglio **I** con i TFO **e** e **f** contenenti il sito di inversione 3'-3', i profili CD presentano la caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212 nm e dalle curve CD di denaturazione termica, registrate a 212 nm, si è osservata in entrambe le triplex una T_m pari a 37°C a pH 5.5, mentre a pH 6.6 si è rilevata una T_m di 28°C per la triplex **E** e di 30°C per quella **F**, (**Figure 2.4.8 e 2.4.9**).

Triplex E

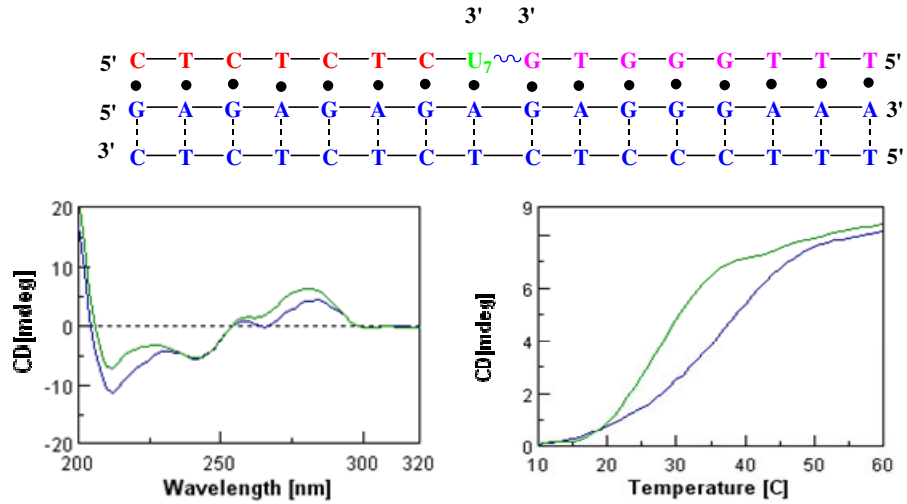


Figura 2.4.8: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex E a pH 5.5 ($T_m=37^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=28^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

Triplex F

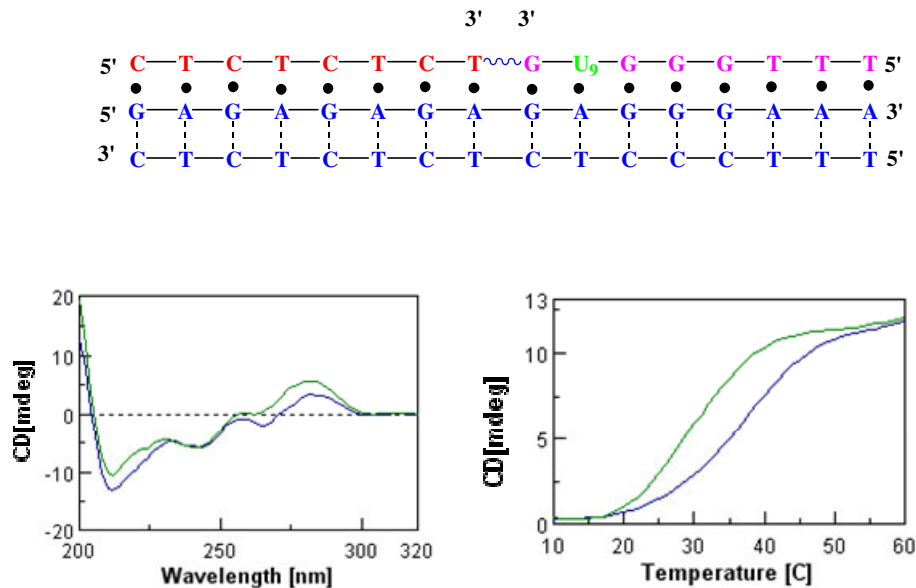


Figura 2.4.9: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex F a pH 5.5 ($T_m=37^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=30^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

Dal confronto dei valori di T_m ottenuti per le triplex **E** e **F**, contenenti la U, con quelle ottenute per la triplex **D** non sono evidenti variazioni significative sia a pH 5.5 che 6.6 (**Tabella 2.4.3**), risultando che la stabilità di tali triplex è comparabile.

Tabella 2.4.3: *Confronto temperature di fusione tra le triplex D, E e F.*

TFO	SEQUENZE	T_m pH 5.5	T_m pH 6.6
d	5' CTCTCTCT ^{3'3'} GTGGGTTT ^{5'}	37	30
e	5' CTCTCTCU ₇ ^{3'3'} GTGGGTTT ^{5'}	37	28
f	5' CTCTCTCT ^{3'3'} GU ₉ GGGTTT ^{5'}	37	30

Nel caso delle triplex **E'** e **F'**, ottenute dall'associazione del bersaglio **II** con i TFO **e'** e **f'**, contenenti il sito di inversione 5'-5', i profili CD presentano la caratteristica banda dicroica con effetto Cotton negativo a 212 nm e dalle curve di CD-melting, registrate a 212 nm, si è osservato nel caso della triplex **E'** una T_m di 41°C a pH 5.5 e di 28°C a pH 6.6, mentre nel caso della triplex **F'** si è rilevata una T_m di 37°C a pH 5.5 e di 23°C a pH 6.6 (**Figure 2.4.10 e 2.4.11**).

Triplex E'

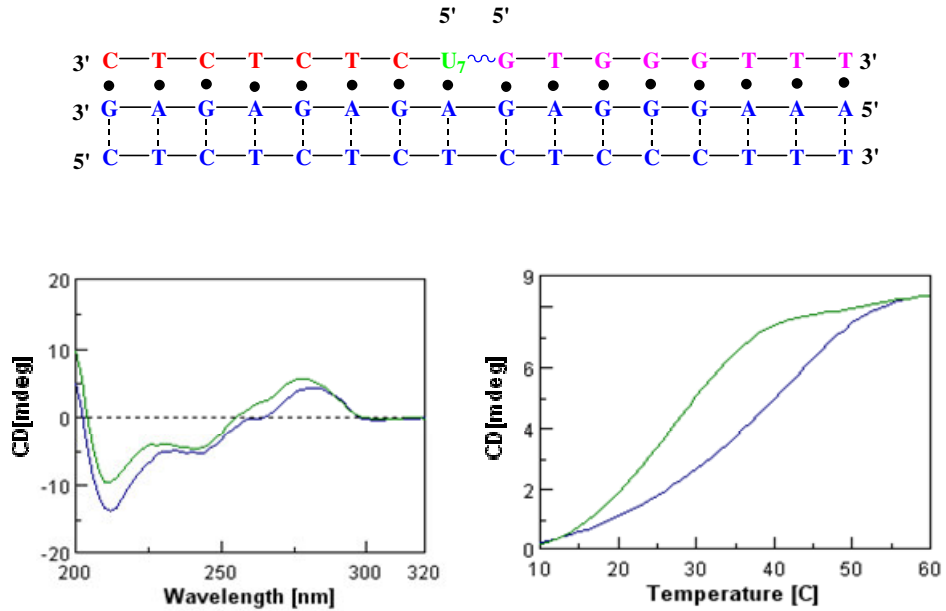


Figura 2.4.10: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex E' a pH 5.5 ($T_m=41^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=28^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

Triplex F'

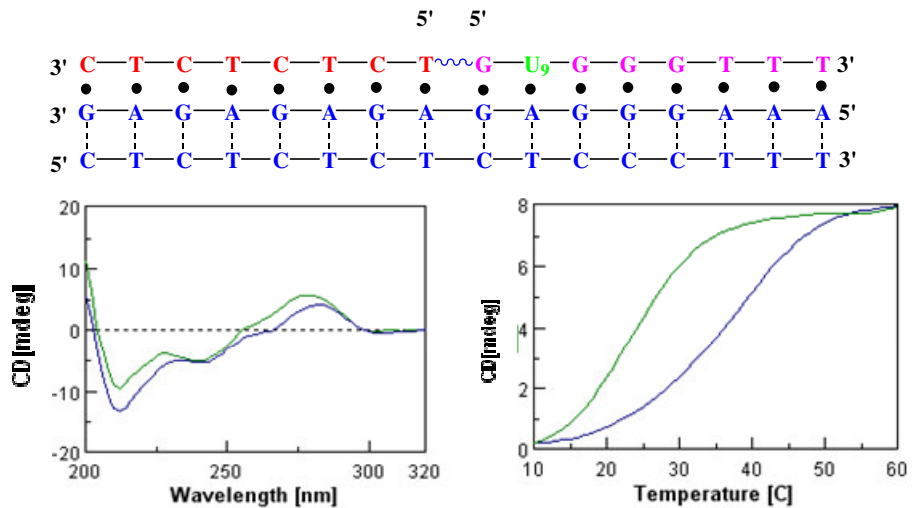


Figura 2.4.11: Profili CD e curve di CD-melting (a 212 nm) della triplex F' a pH 5.5 ($T_m=37^\circ\text{C}$ in blu) e 6.6 ($T_m=23^\circ\text{C}$ in verde) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl_2 a 10°C .

La sostituzione della T con la U operata nell'inversione 5'-5' conduce ad un aumentata stabilità termica delle triplex **E'** e **F'**, sia a pH 5.5 che a pH 6.6, se confrontata con la corrispondente priva di modifica triplex **D'** (Tabella 2.4.4).

Tabella 2.4.4: Confronto temperature di fusione tra le triplex **D'**, **E'** e **F'**.

TFO	SEQUENZE	T _m pH 5.5	T _m pH 6.6
d'	3' CTCTCTCT ^{5'5'} GTGGGTTT ^{3'}	34	22
e'	3' CTCTCTCU ₇ ^{5'5'} GTGGGTTT ^{3'}	41	28
f'	3' CTCTCTCT ^{5'5'} GU ₉ GGGTTT ^{3'}	37	23

La maggiore stabilità della triplex **E'** rispetto la **D'** è stata confermata anche mediante esperimenti elettroforetici eseguiti su gel nativo al 15% di poliacrilammide (19:1 acrilammide:N',N'-bis-metilen-acrilammide), a 4°C e a pH 6.6 per tutta la notte.

Tali esperimenti sono stati condotti titolando il DNA bersaglio, marcato ai terminali 5' con ³²P, utilizzando concentrazioni crescenti di TFO **d'** (Figura 2.4.12) ed **e'** (Figura 2.4.13).

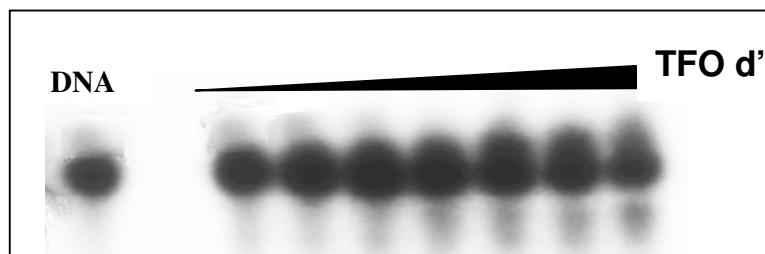


Figura 2.4.12: *Elettroforesi ottenuta titolando il DNA marcato con ^{32}P utilizzando concentrazioni crescenti di TFO d'.*

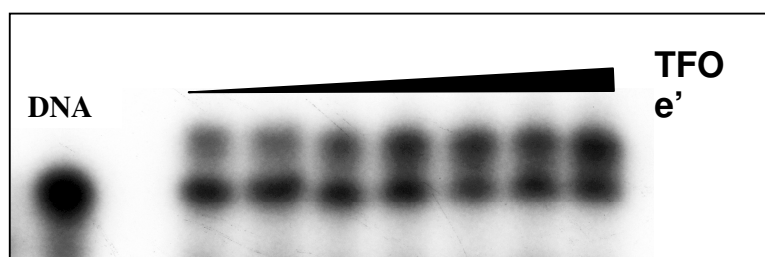


Figura 2.4.13: *Elettroforesi ottenuta titolando il DNA marcato con ^{32}P utilizzando concentrazioni crescenti di TFO e'.*

Nel caso della titolazione del DNA bersaglio con il TFO e' si evidenzia un incremento di intensità della banda con cammino elettroforetico ritardato rispetto al duplex, corrispondente al complesso triplex. Nelle stesse condizioni sperimentali, la titolazione del DNA con il TFO d' è poco significativa, rispecchiando pienamente i dati spettroscopici e confermando la maggiore stabilità della triplex E'.

Conclusioni

In questo lavoro, mediante esperimenti CD ed EMSA, è stata dimostrata la capacità di tutti i TFO sintetizzati di formare strutture a tripla elica, più o meno stabili, con l'opportuno DNA bersaglio. Le triplex **C** e **D**, formate dai TFO con l'inversione 3'-3', sono risultate più stabili rispetto a quelle **C'** e **D'**, contenenti TFO aventi medesima sequenza ma inversione 5'-5'; per di più la loro stabilità è risultata meno influenzata dal pH rispetto alla triplex parallela di riferimento. Inoltre, mediante studi CD ed EMSA, è stato possibile evidenziare l'influenza delle basi in prossimità del sito di inversione della polarità sulla capacità dei TFO di formare triple eliche stabili.

In particolare, è risultato che la sostituzione di una T con una dU in posizione 7 e 9 nel TFO **d**, non comporta cambiamenti significativi in termini di stabilità termica e di dipendenza dal pH per le triplex **E** e **F**. Al contrario, la medesima sostituzione comporta, nel caso di triple eliche formate con TFO contenenti l'inversione 5'-5' (triplex **E'** e **F'**), un incremento non trascurabile della stabilità termica rispetto la triplex **D'**. È importante sottolineare che a pH acidi la triplex **E'** è risultata la più stabile tra quelle sintetizzate, ma rimane una stretta correlazione tra stabilità ed acidità del mezzo. Ulteriori studi sono in corso per valutare l'influenza degli ioni bivalenti Mg^{2+} sulla stabilità

delle triplex **E** ed **E'** rispetto a quelle **D** e **D'**, mediante la registrazione di curve di *melting* CD a differenti concentrazioni di magnesio.

Procedure sperimentali

Sintesi in fase solida del DNA bersaglio I e II e dei TFO polipirimidinici (a e a') e polipurinici (b e b')

Tutti gli ON sono stati sintetizzati mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β -cianoetilfosforamidito secondo il protocollo *standard* fornito dal costruttore. I fosforamiditi delle basi naturali e gli opportuni supporti solidi classici (CPG-5'-ODMT-nucleotide) sono stati acquistati dalla Primm. Dopo la sintesi in fase solida ciascun ON è stato distaccato dal supporto solido mediante trattamento con 3ml di una soluzione acquosa di NH_3 al 33% e lasciata in stufa termostata a 55°C per una notte. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido eseguiti con H_2O bidistillata sono raccolti e seccati sotto vuoto. Il solido ottenuto è ridisciolti in H_2O , filtrato su filtro a membrana con pori da 0.22 μm e purificato mediante cromatografia HPLC utilizzando una colonna Nucleogen SAX a scambio ionico eluita con un gradiente lineare di 20mM di NaH_2PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00 (eluente A) e 20mM di NaH_2PO_4 e 1M

di NaCl, H₂O/CH₃CN 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente. Gli ON purificati sono stati poi desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare usando una colonna impaccata con BIOGEL P2-fine come supporto solido. La purezza di ciascun oligonucleotide è stata controllata mediante HPLC a fase inversa ed elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide al 20% contenente 7M di urea.

La concentrazione degli ON è stata determinata a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare 15400 M⁻¹cm⁻¹ per dA , 11700 M⁻¹cm⁻¹ per dG, 8800 M⁻¹cm⁻¹ per T e 7300 M⁻¹cm⁻¹ per dC. Ciascun oligonucleotide è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Sintesi in fase solida dei TFO misti con inversione 3'-3' (c, d, e, f) e con inversione 5'5' (c', d', e', f')

Tutti i TFO sono stati sintetizzati mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β-cianoetilfosforamidito secondo il protocollo *standard* fornito dal costruttore, impiegando nell'opportuna combinazione i classici 5'-ODMT-3'-fosforamiditi delle basi con gli invertiti 3'-ODMT-5'-fosforamiditi. Il supporto

solido utilizzato differisce a seconda del sito di inversione della polarità. Per introdurre l'inversione 3'-3' è stata utilizzata una resina CPG-3'-O-DMT-nucleotide; per ottenere, invece, l'inversione 5'-5' è stata impiegata una resina classica CPG-5'-O-DMT-nucleotide. Tutti i reattivi sono stati acquistati dalla Primm.

Le successive fasi di distacco dal supporto solido e deprotezione dell'oligonucleotide, purificazione e desalificazione procedono come descritto per i precedenti ON. La concentrazione di ciascun oligonucleotide è stata determinata a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare 15400 M⁻¹cm⁻¹ per dA , 11700 M⁻¹cm⁻¹ per dG, 8800 M⁻¹cm⁻¹ per T e 7300 M⁻¹cm⁻¹ per dC. Ciascun oligonucleotide è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Dicroismo circolare (CD) ed esperimenti di melting CD

La capacità dei TFO misti sintetizzati di formare strutture a tripla elica con l'opportuno bersaglio è stata dedotta dall'analisi dei loro spettri CD.

I campioni triplex per gli esperimenti CD sono stati preparati combinando quantità equimolari dei due filamenti del DNA bersaglio e dell'opportuno TFO, ottenendo una concentrazione di 3×10⁻⁵ M; il tutto è stato liofilizzato e ridisciolti nell'opportuno tampone

contenente 140mM di NaCl, 5mM NaH₂PO₄ e 5mM MgCl₂ a pH 5.5 e 6.6. I campioni così preparati sono stati sottoposti a processo di *annealing* attraverso riscaldamento a 90°C per 15 minuti e lento raffreddamento a temperatura ambiente per una notte.

Gli spettri CD delle triplex e le curve di *CD-melting* sono stati registrati su uno spettropolarimetro JASCO 715, accoppiato a una cella programmabile, termoelettricamente controllata (PTC-348). Nell'acquisizione degli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 200 a 320 nm alla velocità di 5 nm min⁻¹, con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2 nm. Le misure sono state effettuate a 10°C utilizzando *cuvette* in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm, munite di tappo di teflon. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone fosfato sodico. Ogni spettro riportato rappresenta la media di almeno tre scansioni.

Le curve di *CD melting* sono state registrate in funzione della temperatura da 10 a 80°C a 212 nm con una velocità di scansione di 0.5°C/min.

Esperimenti elettroforetici

La capacità di alcuni TFO misti sintetizzati di formare strutture a tripla elica con l'opportuno bersaglio è stata dedotta anche dall'analisi di esperimenti elettroforetici. Per l'EMSA di **Figura 2.4.7**, i campioni sono stati preparati combinando quantità equimolari dei due filamenti

del DNA bersaglio e dell'opportuno TFO (0.1 OD₂₆₀, OD=*optical density*); il tutto è stato liofilizzato e ridisciolto nel tampone fosfato a pH 6.00 contenente 140mM di NaCl, 5mM NaH₂PO₄ e 5mM MgCl₂. I campioni così preparati sono stati sottoposti a processo di *annealing* e successivamente analizzati su gel nativo di poliacrilammide al 15% (19:1 acrilammide: N'N'-bis-metilen-acrilamide) a 4°C per tutta la notte impiegando un voltaggio di 80V fornito da un apparecchio mini-protean III BIORAD munito di POWER PAC 3000 e utilizzando un tampone di corsa TBE 1X contenente 50mM di MgCl₂ e 5mM di NaH₂PO₄ a pH 6.00.

Le titolazioni elettroforetiche, riportate nelle figure **2.4.12** e **2.4.13**, sono state eseguite titolando il DNA (30nM) opportunamente marcato ai terminali 5' con [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol Amersham Pharmacia Biotech) e T4 polinucleotide chinasi (Fermentas), utilizzando concentrazioni crescenti di TFO (da 1 a 10 μ M). Le condizioni di corsa sono le stesse dell'esperimento precedentemente descritto.

Bibliografia

1. Felsenfeld, G., Davies, D.R. and Rich, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2023-24.
2. Howard, F.B and Miles, H.T.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, 15, 18-21.

3. Michelson, A.M. and Monny, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1967**, 149, 107-126.
4. Morgan, A.R. and Wells, R.D.; *J. Mol. Biol.*, **1968**, 37, 63-80.
5. Vasquez, K.M. and Wilson, J.H; *Trends Biochem. Sci.*, **1998**, 23, 4-9.
6. Frank- Kamenetskii, M.D. and Mirkin, S.M.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, 23, 511-576.
7. Olivas, W. M. and Maher, L. J.; *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 1936-41.
8. Lyamichev, V.I.; Mirkin, S.M. and Frank- Kamenetskii, M.D. and Cantor, C.R.; *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 2165-78.
9. Singleton, S. F. and Dervan, P. B.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 13171-79.
10. Nelson, L.D.; Musso, M. and Van Dyke, M.W; *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 5573-81.
11. Jiménez-García, E.; Vaquero, A.; Espinás, M.L.; Soliva, R.; Orozco, M.; Bernués, J. and Azorín, F.; *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 24640-48.
12. Vasquez, K.M. and Glazer, P.M.; *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2002**, 35, 89-107.
13. Postel, E.H.; Flint, S.J.; Kessler, D.J. and Hogan, M.E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 8227-31.

14. Praseuth, D.; Guieysse, A.L. and Hélène, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 181-206.
15. Fox, K.R.; *Curr. Med. Chem.*; **2000**, 7, 17-37.
16. Moser, H.E. and Dervan, P.B.; *Science*, **1987**, 238, 645-650.
17. Francois, J.C.; Saison-Behmoaras, T.; Barbier, C.; Chassignol, M.; Thuong, N.T. and Hélène, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 9702-06.
18. Takasugi, M.; Guendouz, A.; Chassignol, M.; Decout, J.L.; Lhomme, J.; Thuong, N.T. and Helene, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 5602-06.
19. Gasparro, F.P.; Havre, P.A.; Olack, G.A.; Gunther, E.J. and Glazer, P.M.; *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2845-52.
20. Havre, P.A.; Gunther, E.J.; Gasparro, F.P. and Glazer, P.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 7879-83.
21. Wang, G.; Levy, D.D.; Seidman, M.M. and Glazer, P.M.; *Mol. Cell. Biol.*, **1995**, 15, 1759-68.
22. Majumdar, A.; Khorlin, A.; Dyatkina, N.; Lin, F.-L.M.; Powell, J.; Liu, J.; Fei, Z.; Khripine, Y.; Watanabe, K.A.; George, J.; Glazer, P.M. and Seidman, M.M.; *Nature Genetics*, **1998**, 20, 212-214.
23. Puri, N.; Majumdar, A.; Cuenoud, B.; Natt, F.; Martin, P.; Boyd, A.; Miller, P.S. and Seidman, M.M.; *Biochemistry*, **2002**, 41, 7716-7724.

24. Vasquez, K.M.; Marburger, K.; Intody, Z. and Wilson, J.H; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 8403-10.
25. Sargent, R.G; Rolig, R.L.; Kilburn, A.E.; Adair, G.M.; Wilson, J.H. and Nairn, R.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 13122-7.
26. Sandor, Z. and Bredberg, A.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1995**, 1263, 235-240.
27. Faruqi, A.F.; Seidman, M.M; Segal, D.G.; Carroll, D. and Glazer, P.M.; *Molec. Cell. Biol.*; **1996**, 16, 6820-28.
28. Luo, Z.; Macris, M.A.; Faruqi, A.F. and Glazer, P.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 9003-8.
29. Bennett, C.F.; Chiang, M.Y.; Chan, H.; Shoemaker, J.E. and Mirabelli, C.K.; *Mol. Pharm.*, **1992**; 41, 1023-33.
30. Spiller, D.G.; Tidd, D.M.: *Antisense Res. Dev.*, **1995** ; 5, 13-21.
31. Boussif, O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**; 92, 7297-7301.
32. Morris, M.C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F. ; Divita, G. : *Nucleic Acids Res.*, **1997**; 25, 2730-2736.
33. Lee, J.S.; Woodsworth, M.L.; Latimer, L.J.P. and Morgan, A.R.; *Nucleic Acids Res.*, **1984**; 12, 6603-14.
34. Povsic, T.J. and Dervan, P.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3059-61.

35. Kravezyk, S.H.; Milligan, J.F.; Wadwani, S.; Moulds, C.; Froenler, B.C. and Matteucci, M.C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 3761-4.
36. Jetter, M.C. and Hobbs, F.W.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 3249-54.
37. Ono, A.; Chen, C.N. and Kan, L.S.; *Biochemistry*, **1991**, 30, 9914-21.
38. Kon, J.S. and Dervan, P.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1470-78.
39. Iacoin, L.; Lacoste, J.; Reddoch, J.F.; Murgny, J.L.; Levy, D.D.; Seidman, M.M.; Matteucci, M.C. and Glazer, P.M.; *Biochemistry*, **1999**, 38, 1893-01.
40. Cheng, A.J. and Van Dyke, M.W.; *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 5630-35.
41. Milligan, J.F.; Krawczyk, S.H.; Wadwani, S. and Matteucci, M.D.; *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 327-333.
42. Rao, T.S.; Durland, R.H.; Seth, D.M.; Myrick, M.A.; Bodepudi, V. and Revankar, G.R.; *Biochemistry*, **1995**, 34, 765-772.
43. Cheng, A.J. and Van Dyke, M.W.; *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 4742-47.
44. Beal, P.A. and Dervan, P.B.; *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 2773-76.

45. Durland, R.H.; Rao, T.S.; Revankar, G.R.; Tinsley, J.H.; Myrick, M.A.; Seth, D.M.; Rayford, J.; Singh, P. and Jayaraman, K.; *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 3233-40.
46. Stilz, H.U. and Dervan, P.B.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 2177-85.
47. Horne, D. A.; Dervan, P. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 2435-37.
48. Ono, A.; Chen, C.-N.; Kan, L.-S.; *Biochemistry*, **1991**, 30, 9914-9921.
49. De Bizemont, T.; Duval-Valentin, G.; Sun, J.-S.; Bisagni, E.; Garestier, T.; Hélène, C.; *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 1136-1143.
50. Zhou, B.-W.; Marchand, C.; Asseline, U.; Thuong, N. T.; Sun, J.-S.; Garestier, T.; Hélène, C.; *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 516-523.
51. Asseline, U. and Thuong, N.T.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 5221-24.
52. Asseline, U. and Thuong, N.T.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 4173-76.
53. Kandimalla, E. R. and Agrawal, S.; *Biochemistry*, **1996**, 35, 15332-39.
54. Guntert, P.; Mumenthaler, C. and Wuthrich, K.; *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 283-298.

3) INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA TELOMERASI ATTRAVERSO L'APPROCCIO ANTIGENE

3.1 Introduzione

I telomeri¹⁻³ sono specifiche sequenze nucleoproteiche situate all'estremità dei cromosomi essenziali per l'integrità del genoma⁴ ed hanno un importante ruolo nell'invecchiamento cellulare e nella carcinogenesi (**Figura 3.1.1**).

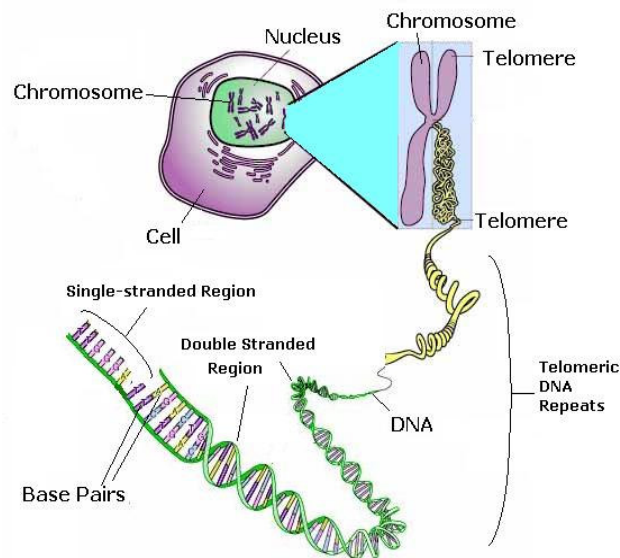


Figura 3.1.1: *Dalla cellula ai telomeri...*

Essi sono costituiti da un lungo tratto a doppia elica di DNA con una sequenza ripetuta in tandem e da un corto singolo filamento ricco di G 3'overhang^{5,6}, la cui presenza è essenziale per la sopravvivenza

cellulare perché la fusione coda-coda dei telomeri e l'erosione provocano instabilità genomica e senescenza della cellula⁷.

Harley definì i telomeri come l'orologio mitotico della cellula umana⁸. Nell'uomo, il DNA telomerico è una sezione di 5000-15000 basi ripetute, di sequenza $5'$ TTAGGG $3'$ legate da una serie di proteine. Circa 50-500 unità di TTAGGG vengono perse con ogni ciclo di replicazione cellulare. Infatti, i telomeri subiscono un progressivo accorciamento, ogni volta che i cromosomi vengono duplicati, fino ad arrivare ad una lunghezza tale da non permettere più altri cicli di divisione cellulare. Raggiunta questa lunghezza viene indotto l'arresto della crescita e la morte della cellula per apoptosi.

L'enzima responsabile dell'allungamento dei telomeri è la telomerasi^{9,10}, una specifica ribonucleoproteina con attività di trascrittasi inversa (DNA polimerasi-RNA dipendente), composta da due componenti fondamentali:

- una subunità catalitica (di 127 kDa), ad attività trascrittasi inversa, definita hTert;
- una subunità a RNA, nota come hTer, che funge da template.

La telomerasi aggiunge piccole sequenze ripetute del tipo $d(\text{TTAGGG})_n$ all'estremità $3'$ del cromosoma usando come stampo sequenze ricche di C contenute nella subunità a RNA (hTer),

catalizzando il processo di elongazione dei telomeri e svolgendo, quindi, un ruolo biologico di primaria importanza (**Figura 3.1.2**)^{9,10}.

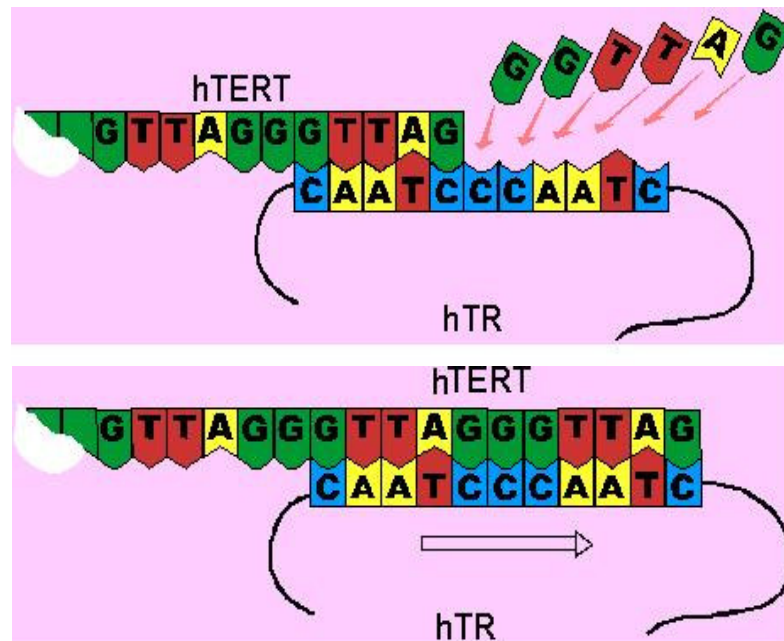


Figura 3.1.2: *Meccanismo d'azione della telomerasi.*

Bisogna, inoltre, tener conto del fatto che la telomerasi catalizza la sintesi delle unità telomeriche ripetute utilizzando il singolo filamento telomericco TTAGGG al 3' come *primer*. Affinché, quindi, la telomerasi possa riconoscere tale *primer*, è necessario che esso sia accessibile sotto forma di singolo filamento non strutturato^{11,12}. Le unità ripetute telomeriche, però, in quanto ricche di G, possono ripiegarsi a formare strutture G-quadruplex intramolecolari con tre

quartetti di G, stabilizzate da cationi monovalenti, quali Na^+ e K^+ (Figura 3.1.3)^{13,14}.

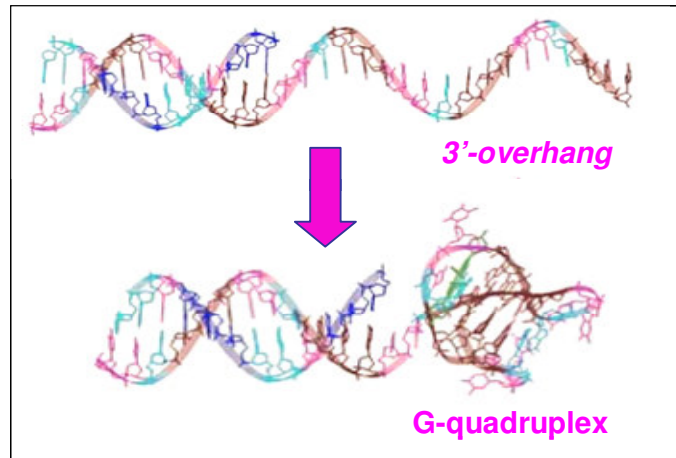


Figura 3.1.3: *Strutture quadruplex all'estremità 3'-overhang del DNA telomerico.*

Si ritiene che tali strutture siano implicate nell'elongazione del DNA telomerico da parte della telomerasi¹⁵. Il meccanismo adottato dalla telomerasi per dirigere l'aggiunta di centinaia di ripetizioni telomeriche all'estremità cromosomiche, usando come stampo una regione lunga solamente una ripetizione e mezzo, non è ancora del tutto chiarito. Il modello più avvalorato propone che la reazione di elongazione della telomerasi comporta uno stadio di translocazione durante il quale il DNA telomerico elongato è soppiantato dall'RNA. Durante la translocazione, una struttura G-quadruplex si forma transitoriamente dal DNA telomerico per fornire la forza di guida per il dislocamento ed aiutare l'appaiamento delle basi tra il substrato di

DNA e lo stampo di RNA per spostare una ripetizione. E' stato anche notato che questa struttura quadruplex deve essere smontata prima che il DNA telomerico possa fungere nuovamente da primer con l'RNA ed essere usato in un altro ciclo di elongazione¹⁵. Questo modello è stato sostenuto dalla scoperta di molecole come K1 e BSU1051 che stabilizzando le G-quadruplex possono inibire la telomerasi causando una pausa periodica ogni quattro ripetizioni¹⁶.

In condizioni normali, la telomerasi è presente ed attiva soltanto nelle cellule germinali e durante lo sviluppo embrionale, garantendo il mantenimento della giusta lunghezza dei telomeri al momento della nascita. Nel corso della vita la telomerasi scompare in quasi tutte le cellule somatiche e pertanto si determina un accorciamento progressivo dei telomeri. La maggior parte delle cellule tumorali (80-90%) invece evadono tale destino e divengono "immortali" mediante l'espressione della telomerasi, la cui attività appare quindi quale *marker* molecolare per una diagnosi di cancro precoce e ottimo bersaglio per terapie antitumorali^{17,18}. Si è visto inoltre che questo enzima viene trasferito dalle cellule tumorali alle cellule dei vasi circostanti, che iniziano a proliferare e a nutrire il cancro; inibire quindi tale enzima potrebbe essere una buona via per bloccare l'angiogenesi del cancro. E' stato sperimentalmente appurato che è possibile utilizzare come target di un'eventuale terapia antitumorale

le strutture quadruplex, stabilizzandole mediante piccole molecole ad alta affinità e selettive, in modo da ridurre i livelli di citotossicità generale e abbattere l'attività della telomerasi, al fine di restituire alle cellule malate il loro normale orologio biologico. Negli ultimi anni hanno avuto grande interesse studi volti alla messa a punto di inibitori della telomerasi, come potenziali farmaci anticancro di nuova generazione ad alta specificità con minimi effetti collaterali (enzima non attivo nelle normali cellule somatiche) e azione farmacologica altamente selettiva¹⁹⁻²¹. In teoria, infatti, l'inibizione della telomerasi dovrebbe riguardare esclusivamente le cellule neoplastiche, lasciando inalterati i tessuti sani. Oltre alle due componenti principali hTERT e hTER, sono essenziali, al fine dell'assemblaggio di una telomerasi attiva nella cellula, diverse proteine accessorie, quali Hsp90, p23 e TP1, quindi l'inibizione di una di esse potrebbe portare a un decremento nell'attività della telomerasi stessa, rendendo così tali fattori dei possibili bersagli molecolari di una terapia antitumorale.

Negli ultimi anni molte sono le strategie terapeutiche emerse che vedono come bersaglio anticancro l'attività telomerasica, regolando l'espressione e/o la funzione dell'enzima mediante oligonucleotidi antisenso, ribozimi e nucleosidi modificati²²⁻²⁴.

3.2 Formazione di triple eliche di DNA sul promotore del gene hTERT della telomerasi: Stabilizzazione mediante il derivato perilenico DAPER

Durante gli ultimi anni sono state ampiamente sviluppate le strategie antisenso²⁵ e antigene^{26,27} che prevedono l'uso di specifiche sequenze oligonucleotidiche per la regolazione dell'espressione dei geni, inibendo rispettivamente i processi di traduzione e trascrizione.

Per quanto riguarda l'uso di oligonucleotidi "anti-telomerasi", sono già stati impiegati ON antisenso complementari a differenti sequenze della componente a RNA (hTer) dell'enzima, i quali sono capaci di legare tali sequenze e di impedire all'hTer di svolgere il suo ruolo di stampo nell'elongazione del telomero²⁸. Al contrario, la possibilità di influenzare la trascrizione del gene hTERT della telomerasi, usando TFO diretti sulla sua regione regolativa, non è stata ancora esaminata.

A tale proposito, ho affrontato studi teorici e sperimentali volti a dimostrare la formazione di triple eliche di DNA sul promotore del gene hTERT della telomerasi, per una loro potenziale applicazione nella strategia antigene, al fine di inibire la trascrizione della sub-unità proteica hTERT della telomerasi umana.

La regione a monte del gene hTert è stata recentemente caratterizzata. Particolari analisi di sequenza hanno rivelato che il promotore di tale gene è ricco in coppie di basi GC, risultando un bersaglio ideale per TFO. Inoltre, il promotore del gene hTert contiene siti di legame di numerosi fattori di trascrizione, suggerendo il suo coinvolgimento in complessi meccanismi di regolazione²⁹. Alcuni di questi fattori sono direttamente implicati nella regolazione positiva dell'espressione dell'hTert come c-myc³⁰, SP1³¹, Ets2³² e recettori di estrogeni³³. In aggiunta, soppressori di tumori sono implicati nella regolazione negativa della trascrizione dell'hTert³⁴.

L'accessibilità dei TFO alle sequenze bersaglio risulta, però, uno dei principali problemi associati al loro utilizzo. Infatti, l'organizzazione del DNA cromosomiale nella cromatina limita la sua accessibilità. L'unità di base della cromatina è il nucleosoma (costituito da 146 bp di DNA avvolto intorno ad un ottamero di istoni) che ostacola il legame del TFO al DNA duplex. Al fine di identificare sequenze omopurinic:omopirimidiniche presenti nel promotore del gene hTERT, accessibili per una potenziale applicazione della strategia antigene, è stata effettuata un'analisi dell'organizzazione della cromatina nella regione di tale promotore e nella prima parte della sequenza codificante (-1000/+200), usufruendo di un metodo teorico sviluppato dal prof. De Santis e collaboratori³⁵. Tale analisi ha

evidenziato una scarsa probabilità di formazione di nucleosomi nella regione (-108/-90) che è stata scelta come bersaglio per l'applicazione di un approccio antigene (**Figura 3.2.1**).

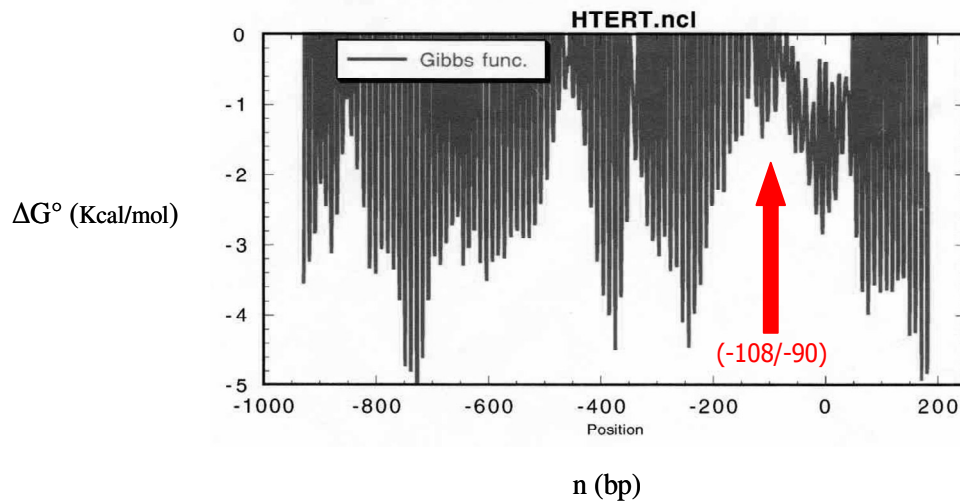


Figura 3.2.1: *Analisi teorica dell'organizzazione della cromatina nella regione del promotore del gene h-TERT e della prima parte della sequenza codificante (-1000/+200).*

Sulla base di queste previsioni teoriche, sono stati sintetizzati due frammenti del gene bersaglio (**DNA₃₀** e **DNA₁₈**, **Tabella 3.2.1**) lunghi rispettivamente 30 e 18 coppie di basi e due TFO di lunghezza differente (**TFO₁₃** e **TFO₁₈**, **Tabella 3.2.1**), capaci di legare parzialmente o completamente la sequenza omopurinica:omopirimidinica (-108/-90), sintetizzata e scelta come bersaglio (**DNA₁₈**, **Tabella 3.2.1**).

Tabella 3.2.1: Sequenze oligonucleotidiche sintetizzate.

ON	SEQUENZE
DNA ₃₀ (-114/-85)	^{5'} TCCCAGCCCCTCCCCTTCCTTTCCGCGGCC ^{3'} ^{3'} AGGGTCGGGGAGGGGAAGGAAAGGCGCCGG ^{5'}
DNA ₁₈ (-108/-90)	^{5'} CCCCTCCCCTTCCTTTCC ^{3'} ^{3'} GGGGAGGGGAAGGAAAGG ^{5'}
TFO ₁₃	^{5'} GGGGAGGGGAAGG ^{3'}
TFO ₁₈	^{5'} GGGGAGGGGAAGGAAAGG ^{3'}
TRIPLEX I	DNA ₁₈ /TFO ₁₃
TRIPLEX II	DNA ₁₈ /TFO ₁₈
TRIPLEX III	DNA ₃₀ /TFO ₁₈

Esperimenti EMSA e di DNasi I “footprinting”

Al fine di valutare l’affinità del TFO₁₃ e TFO₁₈ nei confronti del bersaglio, sono stati effettuati esperimenti EMSA, titolando una quantità costante di un DNA 50mer (30 nm), contenente la sequenza bersaglio selezionata (-108/-90) e opportunamente marcato all’estremità 5’ con ³²P, utilizzando quantità crescenti dei TFO (0.15-5 μM), per ottenere un rapporto TFO/DNA₅₀ che varia da 5 a 170 (Figura 3.2.2).

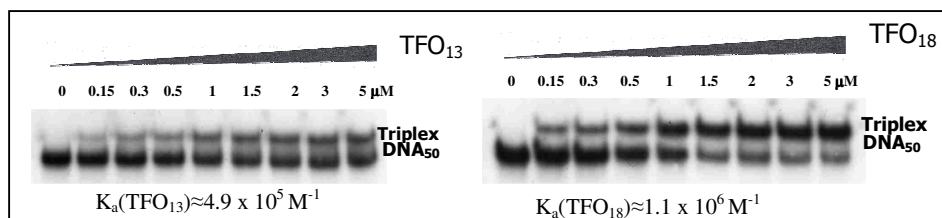


Figura 3.2.2: Esperimenti elettroforetici ottenuti titolando il DNA₅₀ (30 nM), marcato con ³²P, utilizzando concentrazioni crescenti (0.15-5 μM) di TFO₁₃ e TFO₁₈, in tampone Tris-HCl 50 mM pH 7.6, contenente 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂ (standard buffer).

Da tali esperimenti si è visto che sia il TFO₁₃ che il TFO₁₈ ritardano la mobilità del DNA 50mer, indice della formazione del complesso a tripla elica. In entrambi i casi non si arriva mai ad una completa saturazione della triplex, essendo ancora presente la banda relativa al DNA₅₀. Tuttavia, il TFO₁₈ lega più efficacemente il DNA₅₀, come è stato evidenziato dalla determinazione delle costanti di associazione (K_a). I valori ottenuti sono $K_a(\text{TFO}_{13}) \approx 4.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $K_a(\text{TFO}_{18}) \approx 1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Quindi, l'energia libera di formazione della triplex ($\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$) è, rispettivamente, -8.1 e -8.6 Kcal/mol, attestando una stabilità termodinamica più alta per la triplex formata con il TFO₁₈.

La specificità di legame di entrambi i TFO alla sequenza bersaglio è stata valutata mediante esperimenti di DNasi I "*footprinting*", in cui un frammento del gene hTERT di 260 bp (-309/-50), marcato al terminale 5' con ³²P e comprendente la regione scelta come bersaglio, è stato incubato una volta con il TFO₁₃ e una volta con il TFO₁₈ e successivamente sottoposto in entrambi i casi a digestione enzimatica. I prodotti della parziale digestione con DNasi I sono stati separati su un gel denaturante di poliacrilammide e rilevati mediante autoradiografia (**Figura 3.2.3**).

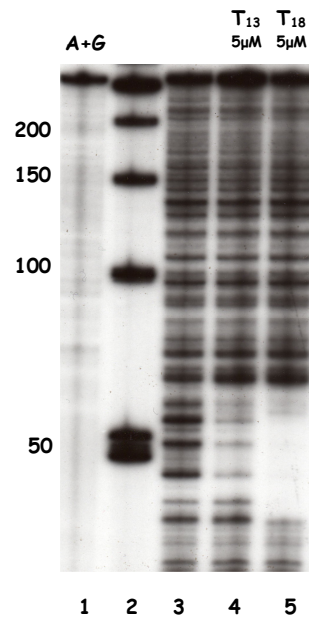


Figura 3.2.3: *Esperimento di DNasi I “footprinting” del frammento duplex di 260 bp, marcato all’estremità 5’. Linea 1: reazione di Maxam e Gilbert delle purine; linea 2: scala di frammenti di 50 bp; linea 3: digestione con DNasi I del frammento duplex di 260 bp; linee 4 e 5: digestione con DNasi I del frammento duplex di 260 bp incubato rispettivamente con 5 μM di TFO₁₃ e 5 μM di TFO₁₈ (in standard buffer).*

In entrambi i casi, si è evidenziata un’unica regione protetta dal taglio nucleotidico, da parte della DNasi, lungo il frammento di 260 bp, corrispondente alla sequenza bersaglio, indice di una buona selettività dei due TFO per tale sequenza.

Dall'autoradiografia risalta, inoltre, una più efficace protezione da parte del TFO₁₈ rispetto al TFO₁₃ e anche l'ampiezza della regione protetta varia nei due casi e corrisponde alle differenti lunghezze dei due TFO. Tali risultati sono concordi con quelli EMSA.

Stabilità termica delle triple eliche di DNA

La stabilità termica delle triplex antiparallele, formate dal TFO₁₃ o dal TFO₁₈ e il bersaglio DNA₃₀ (Tabella 3.2.1), è stata valutata mediante esperimenti di *UV-melting*. I profili di denaturazione termica di entrambe le triplex presentano due flessi, il primo corrisponde alla dissociazione del terzo filamento dal complesso a doppia elica e il secondo alla dissociazione della duplex nei singoli filamenti. Il valore della temperatura di fusione (T_m) corrispondente al primo punto di flesso è pari a 30 e 44°C per le triplex formate rispettivamente con il TFO₁₃ e il TFO₁₈; mentre la T_m corrispondente al secondo flesso è di 72°C pari alla T_m del duplex bersaglio (Figura 3.2.4).

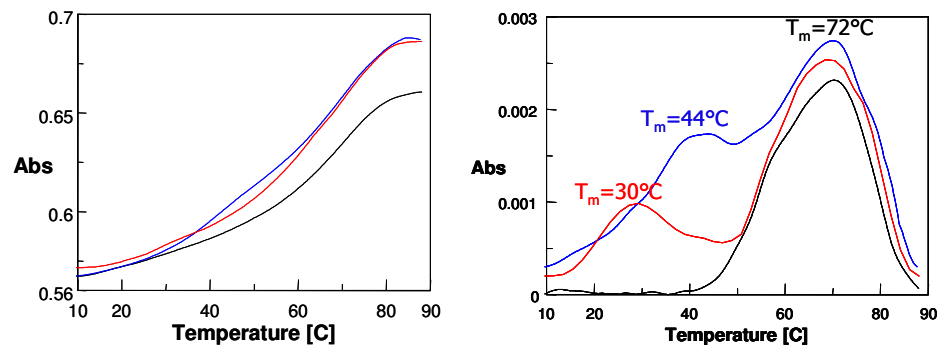


Figura 3.2.4: *Esperimenti UV di denaturazione termica. A destra sono riportati i profili di UV-melting del DNA₃₀ (in nero) e delle triplex formate rispettivamente con il TFO₁₃ (in rosso) e il TFO₁₈ (in blu); a sinistra sono riportate le corrispondenti derivate di primo ordine (in standard buffer).*

Questi dati confermano la maggiore stabilità della triplex formata con il TFO₁₈, in accordo con i valori delle costanti di associazione, determinati mediante gli esperimenti EMSA.

Stabilizzazione delle triple eliche di DNA mediante il derivato perilenico DAPER

Dall'analisi dei dati ottenuti dagli esperimenti di EMSA, di DNAsi I "footprinting" e di UV-melting è stato possibile evidenziare che entrambi i TFO formano triple eliche antiparallele sufficientemente stabili con il DNA bersaglio. Tuttavia, l'associazione di un terzo filamento ad una doppia elica di DNA è un processo termodinamicamente debole e cineticamente più lento del processo di formazione del solo duplex a causa degli effetti destabilizzanti dovuti alla repulsione elettrostatica³⁶ tra i gruppi fosfato del DNA e quelli del TFO. Al fine di migliorare la stabilità dei complessi a tripla elica sono stati individuati diversi tipi di ligandi³⁷ capaci di introdurre interazioni di legame addizionali³⁸. I ligandi possono legarsi alla tripla elica di DNA attraverso differenti meccanismi come intercalazione tra le triplette di basi o *binding* del solco minore mediante interazioni idrofobiche e/o elettrostatiche. Generalmente, una buona molecola stabilizzante triplex è caratterizzata da una estesa area aromatica in modo da impilarsi ottimalmente sulla tripletta di basi terminale e da cariche positive per compensare l'alta densità di

carica negativa della tripla elica. Al fine, quindi, di migliorare la stabilità delle triplex antiparallele³⁹, si è studiato il derivato perilenico^{40,41} N,N'-bis[3,3'-(dimetilammino)propilammina]-3,4,9,10-perilentetracarbossilico diimide (DAPER) per la sua abilità di legare selettivamente e stabilizzare le triplex antiparallele, già noto per la sua capacità di stabilizzare le strutture G-quadruplex e di inibire la telomerasi⁴²⁻⁴⁴ (**Figura 3.2.5**).

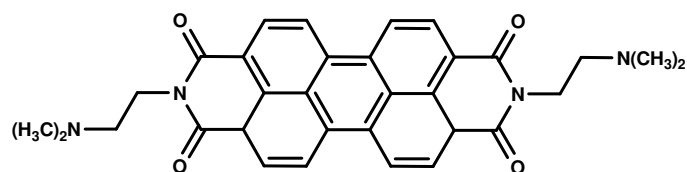


Figura 3.2.5: Struttura del DAPER.

A questo scopo, è stato eseguito un esperimento EMSA titolando un rapporto molare costante di TFO₁₃/DNA₅₀ (pari a 100) con quantità crescenti di DAPER (0.5-5 μ M). Il profilo elettroforetico, riportato in **Figura 3.2.6**, mostra che aumentando la concentrazione di DAPER, l'intensità della banda, corrispondente alla struttura triplex, aumenta, mentre la banda del DNA₅₀ diminuisce fortemente, suggerendo un rilevante ruolo del DAPER nella formazione e/o nella stabilizzazione della triplex.

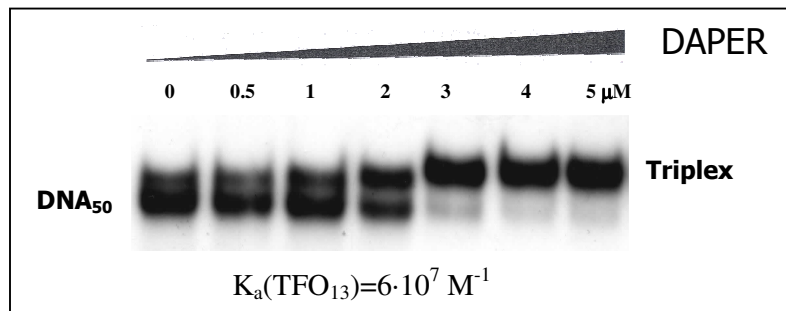


Figura 3.2.6: *Esperimento elettroforetico ottenuto titolando un costante rapporto molare di TFO₁₃/DNA₅₀ (pari a 100) con quantità crescenti di DAPER (0.5-5 μM) in standard buffer.*

Come si può notare, già ad una concentrazione di 3μM di Daper si osserva una completa saturazione della tripla elica di DNA, rivelando una maggiore stabilità di tale complesso in presenza del derivato perilenico.

Risultati simili si sono ottenuti nel caso della triplex con il TFO₁₈, eccetto che la sua formazione è completa già ad una concentrazione di 1μM di Daper. Per ottenere una valutazione quantitativa dell'effetto del DAPER sulla formazione della triplex, è stato eseguito un esperimento EMSA, diminuendo la concentrazione dei TFO (5-50 nM) e, di conseguenza, i rapporti molari TFO/DNA₅₀ (da 0.16 a 1.6) e utilizzando una quantità costante di DAPER (2 μM). Sono state poi calcolate le costanti di associazione dei TFO₁₃ e TFO₁₈, che sono risultate approssimativamente due ordini di grandezza più alte di quelle in assenza di DAPER [$K_a(\text{TFO}_{13})=6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ e $K_a(\text{TFO}_{18})=7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$].

Esperimenti di DNasi I “*footprinting*”, in presenza di DAPER (2 μ M), hanno confermato la formazione della triplex e la sua stabilizzazione, evidenziando una più chiara protezione in corrispondenza della sequenza bersaglio sia per il TFO₁₃ che per il TFO₁₈, anche alla più bassa concentrazione dei TFO (0.5 μ M, **Figura 3.2.7**).

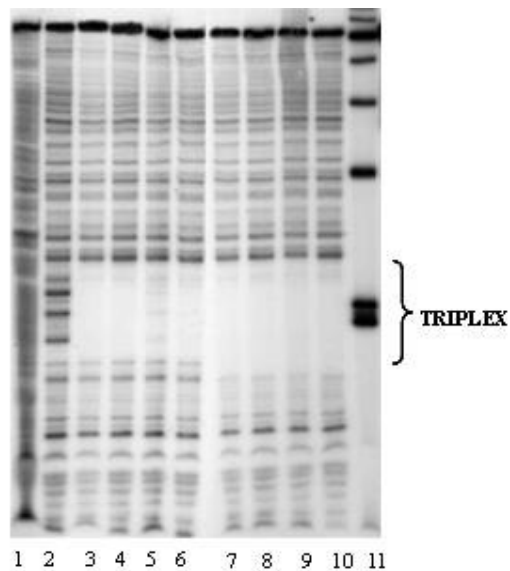


Figura 3.2.7: *Esperimento di DNasi I “footprinting” del frammento duplex di 260 bp, marcato all’estremità 5’, in presenza di DAPER 2 μ M. Linea 1: reazione di Maxam e Gilbert delle purine; linea 2: digestione con DNasi I del frammento duplex di 260 bp; linee 3-6: digestione con DNasi I del frammento duplex di 260 bp incubato rispettivamente con 0.5, 1.2, 3 e 4 μ M di TFO₁₃ in presenza di DAPER 2 μ M; linee 7-10: digestione con DNasi I del frammento duplex di 260 bp incubato rispettivamente con 0.5, 1.2, 3 e 4 μ M di TFO₁₈ in presenza di DAPER 2 μ M; linea 11: scala di frammenti di 50 bp (in standard buffer).*

È noto che la formazione delle triplex richiede la presenza di ioni Mg²⁺ (almeno in concentrazione di 5mM)⁴⁵, i quali mediano la

neutralizzazione delle cariche negative dei gruppi fosfato quando si avvicinano i tre filamenti.

Il DAPER ha permesso di migliorare la stabilità e l'affinità dei complessi triplex anche a concentrazioni fisiologiche di $MgCl_2$ (1 mM invece di 5 mM), come è stato evidenziato mediante l'esperimento EMSA riportato **Figura 3.2.8**.

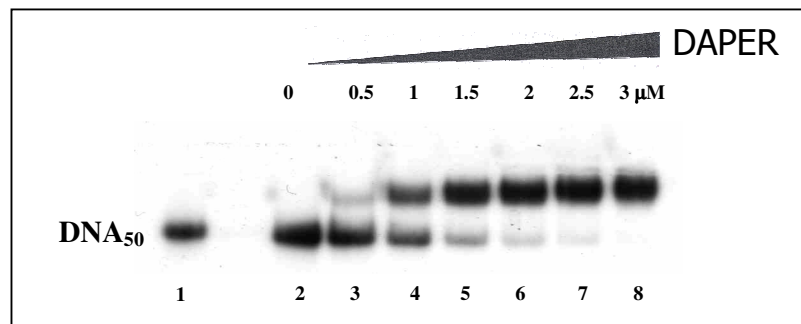


Figura 3.2.8: Esperimento elettroforetico ottenuto titolando un costante rapporto molare di TFO_{18}/DNA_{50} (pari a 67) con quantità crescenti di DAPER (0.5-3 μM) ad una concentrazione fisiologica (1mM) di $MgCl_2$ (in standard buffer contenente 1mM di $MgCl_2$ invece di 5mM).

In questo esperimento è stato usato un rapporto molare costante di TFO_{18}/DNA_{50} pari a 67 e si è aumentata la concentrazione di DAPER da 0.5 a 3 μM . L'esperimento mostra che il TFO_{18} non è capace da solo di formare la triplex a tale concentrazione di Mg^{2+} (linea 2), mentre aumentando la quantità di DAPER si ha un corrispondente incremento della banda relativa al complesso triplex, dimostrando in

tal modo che il ligando può compensare la riduzione della concentrazione di ioni Mg^{2+} . Questo stesso esperimento è stato ripetuto sostituendo il sodio con il potassio, al fine di valutare la sua influenza sulla stabilità del complesso triplex/DAPER. I risultati, riportati in **Figura 3.2.9**, mostrano che aumentando la concentrazione di ligando da 3 a $10\mu M$ si ha un corrispondente incremento della banda relativa alla triplex, che diventa la struttura predominante alle più alte concentrazioni di ligando.

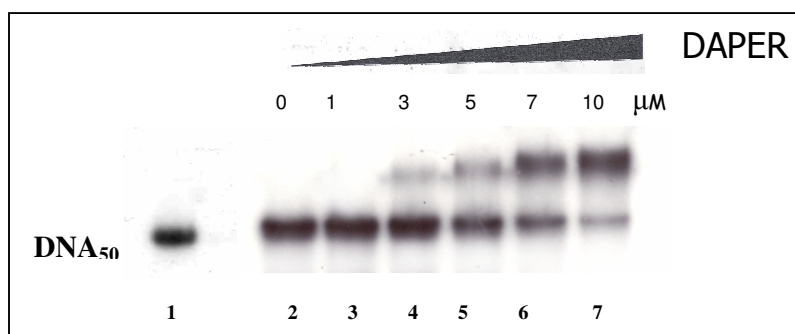


Figura 3.2.9: Esperimento elettroforetico ottenuto titolando un costante rapporto molare di TFO_{18}/DNA_{50} (pari a 67) con quantità crescenti di DAPER (1-10 μM) ad una concentrazione fisiologica (1mM) di $MgCl_2$ (in standard buffer contenente 1mM di $MgCl_2$ invece di 5mM e 50mM di KCl invece di NaCl).

E' stato, però, osservato che in presenza di K^+ la concentrazione di DAPER richiesta per stabilizzare pienamente la triplex è più alta che in presenza di Na^+ . Probabilmente questo risultato è dovuto al fatto

che in potassio parte del TFO, essendo ricco di G, può riarrangiare in strutture secondarie tipo quadruplex.

Studi di spettroscopia UV del DAPER con il DNA a doppia e a tripla elica

Le molecole di DAPER in soluzione acquosa sono caratterizzate da un forte *stacking* dei nuclei perilenici. Lo stesso comportamento è osservato, generalmente, nel caso di tutti i derivati perilenici aventi catene laterali basiche, che li rendono solubili in acqua.

Nella figura **Figura 3.2.10** è riportato lo spettro di assorbimento del DAPER in un solvente organico (il dimetilsolfossido, DMSO) nell'intervallo di lunghezza d'onda da 350 a 650 nm.

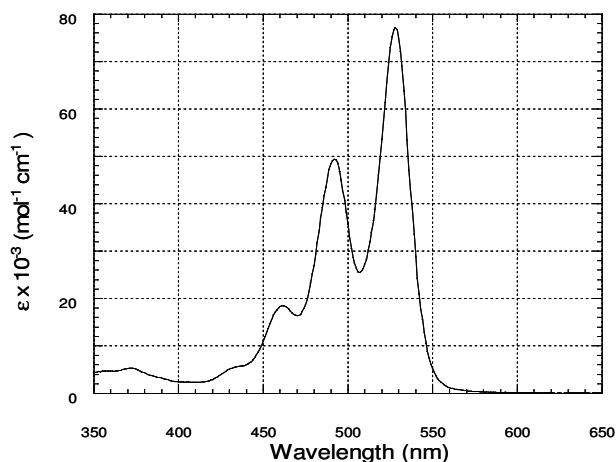


Figura 3.2.10: Spettro UV del DAPER in DMSO.

In queste condizioni sperimentali, lo spettro corrispondente è caratterizzato da tre massimi, a 525, 490 e 460 nm rispettivamente e il DAPER risulta non essere aggregato, infatti il coefficiente di estinzione molare rispetta la legge di Lambert-Beer all'aumento delle concentrazioni di DAPER⁴¹. Lo spettro di assorbimento del DAPER nel tampone *standard* 20 mM Tris-HCl pH 7.3, contenente 50 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂, è fortemente diverso da quello in DMSO (**Figura 3.2.11**).

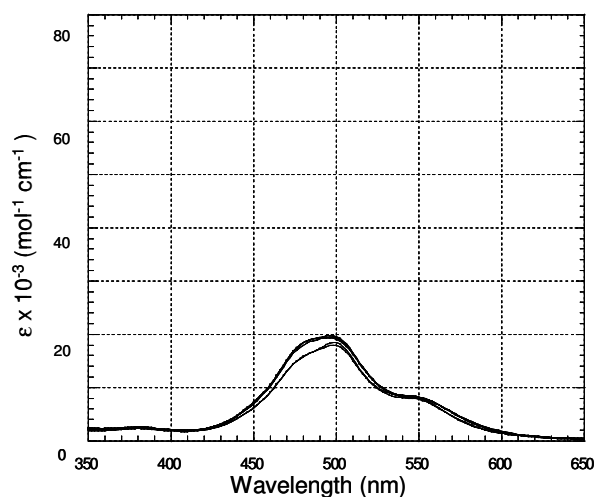


Figura 3.2.11: Spettro UV del DAPER nel tampone *standard* 20 mM Tris-HCl pH 7.3, contenente 50 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂.

Le tre bande ben risolte non sono più presenti e lo spettro di assorbimento è caratterizzato da una spalla a 550nm e da una larga banda centrata a 497nm. Il coefficiente di estinzione molare a 525nm è diminuito fortemente da $8.0 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (in DMSO) a $2.0 \cdot 10^4$

$\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (nel tampone *standard*) ed è fondamentalmente invariato nell'intervallo di concentrazione del DAPER tra 5 e 50 μM (**Figura 3.2.11**). Questi dati suggeriscono la presenza di DAPER aggregato in soluzione e che la sua quantità rimane sostanzialmente immutata in tutte le concentrazioni considerate⁴¹. E' importante notare che quando la temperatura della soluzione di DAPER nel tampone *standard* viene aumentata da 25 a 95°C (**Figura 3.2.12**), lo spettro di assorbimento varia e il coefficiente di estinzione molare a tutte le lunghezze d'onda aumenta significativamente.

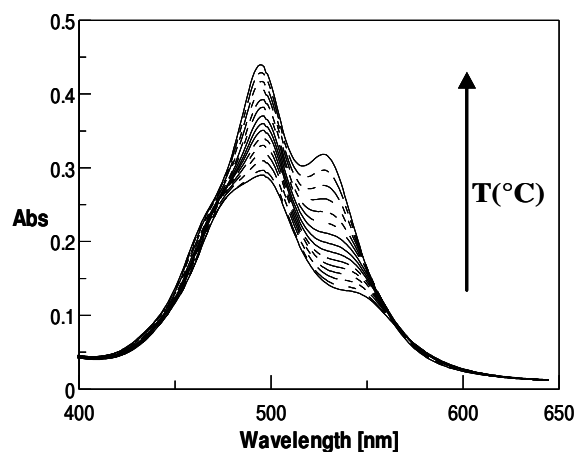


Figura 3.2.12: Profili UV del DAPER nel tampone *standard* all'aumentare della temperatura (da 25 a 95°C).

Tuttavia, anche a basse concentrazioni ed alta temperatura, lo spettro di assorbimento non diventa mai uguale a quello in DMSO, mostrando che in soluzione acquosa lo *stacking* tra i motivi perilenici è sempre presente in tutte le condizioni sperimentali considerate.

Questa caratteristica rende difficile stabilire i siti di legame del DAPER sul DNA a doppia e a tripla elica mediante l'interpretazione degli spettri di titolazione UV.

In questi esperimenti, la concentrazione di farmaco è stata fissata a 20 μM ed il rapporto molare DNA/ligando (R) è stato variato mediante diluizioni con una soluzione tampone contenente 20 μM di Daper. Gli spettri di assorbimento dei complessi DNA/DAPER sono stati eseguiti nell'intervallo di lunghezza d'onda da 400 a 650 nm (**Figura 3.2.13**).

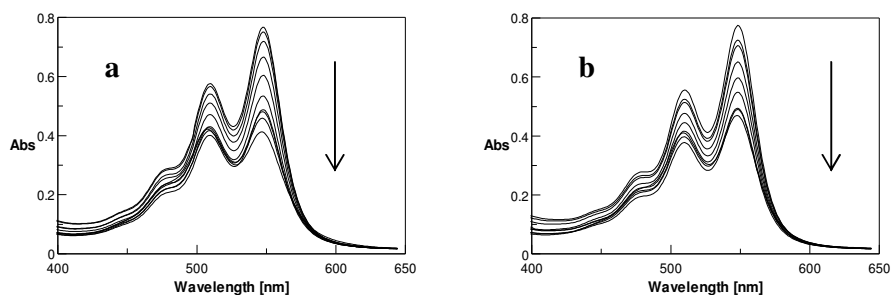


Figura 3.2.13: Titolazione UV del DNA (a) in doppia e (b) in tripla elica con quantità crescenti di DAPER. Sono riportati gli spettri per valori di R da 2.8 a 0.4; le frecce indicano il decremento del rapporto molare DNA/DAPER (R).

Com'è evidente sia per i complessi duplex (DNA_{30} e DNA_{18} , **Tabella 3.2.1**) che triplex (**I**, **II**, e **III**, **Tabella 3.2.1**) si hanno simili profili UV ed aumentando la concentrazione di ligando, tali profili non diventano mai uguali a quelli del solo DAPER in soluzione, indice

che il DNA a doppia e a tripla elica è in grado di diminuire l'*auto-stacking* caratteristico di tale ligando in soluzione acquosa, ma ciò non fornisce alcuna informazione sul tipo di interazione che interviene.

Studi di spettroscopia CD del DAPER con il DNA a doppia e a tripla elica

Considerando la complessità dei possibili equilibri tra le molecole di DAPER libere e quelle legate ai complessi di DNA, in forma *stacked* e *unstacked*, certamente più utile risulta la spettroscopia CD. Infatti, il DAPER è una molecola simmetrica e, quindi, non mostra alcuno spettro dicroico. Tuttavia il DNA mostra uno spettro CD nell'intervallo di lunghezza d'onda dai 220 ai 320 nm, quindi gli spettri dicroici, ottenuti per i complessi DNA/DAPER, nell'intervallo da 400 a 650 nm, sono esclusivamente dovuti al DAPER legato alla struttura di DNA. Sono state eseguite titolazioni CD per tutti i complessi DNA/DAPER, registrando gli spettri dei campioni a differenti rapporti molarari (R), da 2.8 a 0.4. Anche in questo caso, tutti i campioni contengono 20 μ M di DAPER ed i differenti valori di R sono stati ottenuti diminuendo la concentrazione di DNA e mantenendo costante quella del farmaco. Per tutti i complessi triplex,

le titolazioni CD hanno mostrato gli stessi profili sia in presenza di ioni sodio che potassio.

Nella **Figura 3.2.14** è riportata la titolazione CD registrata per il complesso Triplex **II**/DAPER in presenza di ioni sodio.

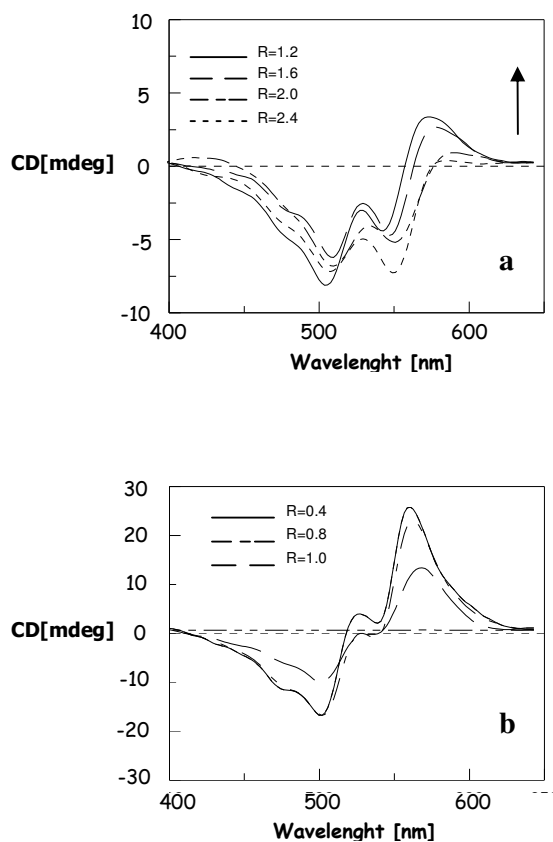


Figura 3.2.14: Titolazione CD della triplex **II** con una soluzione di DAPER $20 \mu\text{M}$ in presenza di controioni Na^+ . Sono riportati gli spettri per valori di **R** (a) da 2.4 a 1.2 e (b) da 1.0 a 0.4.

Gli spettri ottenuti per i valori più alti di **R** sono caratterizzati da due bande negative a 512 e 552 nm ed una modesta banda positiva centrata a 565 nm. Riducendo i valori di **R** (da 2.4 a 1.2) e quindi il numero di siti legame per il daper, l'ellitticità del massimo a 565 nm

aumenta ed i due minimi si spostano rispettivamente a 508 e 548 nm (**Figura 3.2.14, a**).

Le bande negative degli spettri CD, come riportato in letteratura per altri derivati con lo stesso profilo dicroico, denotano un legame del DAPER alla tripla elica di tipo “*threading intercalation*”, ossia mediante uno “*stacking*” del farmaco ai terminali della tripla elica in accordo con Koval e collaboratori⁴⁶. Invece, gli spettri CD ottenuti per i valori più bassi di R mostrano un massimo a 565 nm ed una sovrapposizione (*crossover*) a 550 nm ed un minimo a 512 nm (**Figura 3.2.14, b**). Tale andamento indica l'accoppiamento tra due o più molecole di DAPER, suggerendo che ad alte concentrazioni, quando la stabilizzazione delle triplex risulta più evidente, il DAPER *self-stacked* lega il complesso mediante *binding* dei solchi presumibilmente attraverso un'interazione elettrostatica.

Anche le titolazioni CD eseguite per i complessi duplex (**DNA₃₀** e **DNA₁₈**), hanno mostrato profili dicroici molto simili tra di loro sia in presenza di ioni sodio che potassio. Nella **Figura 3.2.15** è riportata la titolazione CD registrata per il complesso DNA₃₀/DAPER in presenza di ioni sodio.

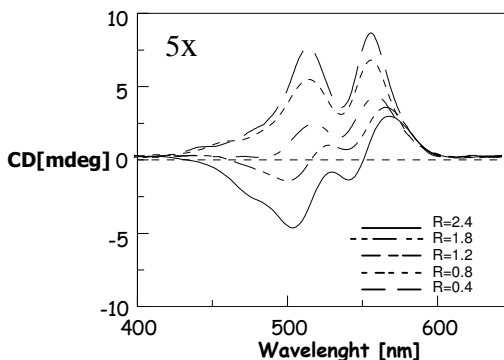


Figura 3.2.15: *Titolazione CD del DNA₃₀ con una soluzione di DAPER 20 μM in presenza di controioni Na⁺. Sono riportati gli spettri per valori di R da 2.4 a 0.4.*

Ad elevati valori di R, lo spettro è caratterizzato da due bande negative a 512 e 552 nm, una spalla negativa a 485 nm e una banda positiva a 565 nm. Al diminuire della concentrazione di duplex, gli spettri CD cambiano, diventando positivi con due bande aventi massimi a 522 e 565 nm.

E' importante notare che i profili ottenuti per i complessi duplex sono molto simili a quelli triplex, suggerendo un ugual modo d'interazione col DAPER. Tuttavia, i valori di elleticità, ottenuti per le duplex, sono ridotti di circa cinque volte, evidenziando che il ligando interagisce meglio con le triplex nelle condizioni sperimentali adottate, mostrando una sua maggiore selettività per il DNA a tripla elica.

D'altra parte, le titolazioni CD dei due TFO con il DAPER hanno mostrato un comportamento differente rispetto le triplex e le duplex, evidenziando che, nelle soluzioni contenenti un'alta concentrazione di DAPER e solo i filamenti polipurinici, potrebbero formarsi altre strutture (presumibilmente quadruplex), come evidenziato dalla presenza, per $R < 0.8$, di un'intensa banda CD negativa centrata a 502 nm (**Figura 3.2.15**).

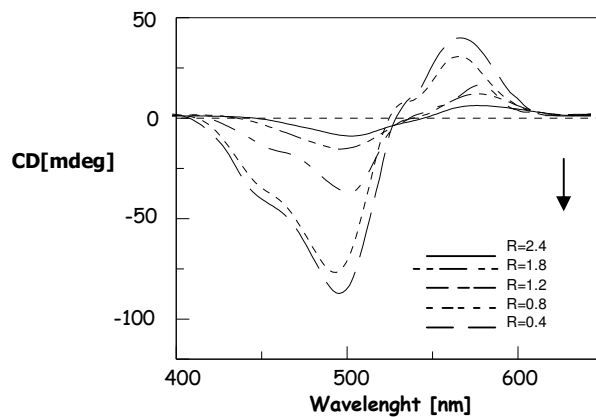


Figura 3.2.15: Titolazione CD del TFO_{18} con una soluzione di DAPER $20 \mu M$ in presenza di controioni Na^+ . Sono riportati gli spettri per valori di R da 2.4 a 0.4.

Conclusioni

Nel presente lavoro è stato dimostrato che la sequenza omopurinica:omopirimidinica, scelta sul promotore del gene hTERT (-108/-90), è un bersaglio ottimale per l'applicazione della strategia antigene. Studi teorici eseguiti hanno evidenziato un basso grado di organizzazione della cromatina in tale tratto di DNA, che di

conseguenza è stato selezionato come bersaglio sul promotore del gene hTERT. Grazie ad esperimenti elettroforetici e di DNasi I “*Footprinting*” è stata dimostrata rispettivamente l’affinità e la selettività dei TFO₁₃ e TFO₁₈ nei confronti della sequenza bersaglio, i quali portano alla formazione di triplex antiparallele relativamente stabili, come rilevato da esperimenti UV di denaturazione termica. La stabilità di tali complessi è stata incrementata mediante l’impiego del derivato perilenico DAPER, come dimostrato anche da esperimenti di DNasi I “*Footprinting*” ed elettroforetici condotti a concentrazioni fisiologiche di MgCl₂. Dall’analisi dei dati spettroscopici, è stato possibile dedurre che a basse concentrazioni di farmaco, il DAPER interagisce con la triplex mediante “*threading intercalation*”, ossia mediante uno “*stacking*” del farmaco ai terminali della tripla elica. Ad alte concentrazioni, presumibilmente, il DAPER *self-stacked* lega il complesso triplex mediante *binding* dei solchi attraverso interazioni elettrostatiche. Ulteriori studi sono certamente necessari per ottenere un modello molecolare del complesso triplex/DAPER.

In conclusione, i risultati riportati suggeriscono che i derivati perilenici, solubili in acqua, possono essere utilizzati per stabilizzare le triplex antiparallele sul promotore del gene hTERT, anche in presenza di ioni di K⁺ ed a concentrazioni fisiologiche di Mg²⁺.

Procedure sperimentali

Materiali

Gli oligonucleotidi costituenti il DNA₅₀, comprendente la regione bersaglio -108/-90 e usati per gli esperimenti EMSA, sono stati acquistati dalla MWG-Biotech.

Il Daper è stato acquistato da Pierce come soluzione 1mM in tampone MES⁴¹.

Sintesi in fase solida dei bersagli DNA₃₀ e DNA₁₈ e dei TFO polipurinici (13 e 18 mer)

Tutti gli ON sono stati sintetizzati mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β -cianoetilfosforamidito secondo il protocollo *standard* fornito dal costruttore. I fosforamiditi delle basi naturali e gli opportuni supporti solidi classici (CPG-5'-ODMT-nucleotide) sono stati acquistati dalla Primm. Dopo la sintesi in fase solida ciascun ON è stato distaccato dal supporto solido mediante trattamento con 3 ml di una soluzione acquosa di NH₃ al 33% e lasciata in stufa termostata a 55°C per una notte. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido eseguiti con H₂O bidistillata sono raccolti e seccati sotto vuoto. Il solido ottenuto è ridisciolto in H₂O, filtrato su filtro a membrana con pori da 0.22 μ m e purificato mediante

cromatografia HPLC utilizzando una colonna Nucleogen SAX a scambio ionico eluita con un gradiente lineare di 20mM di NaH_2PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00, (eluente A) e 20mM di NaH_2PO_4 e 1M di NaCl , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente. Gli ON purificati sono stati poi desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare usando una colonna impaccata con BIOGEL P2-fine come supporto solido. La purezza degli ON è stata controllata mediante HPLC a fase inversa ed elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide al 20% contenente 7M di urea. La concentrazione di ciascun ON è stata determinata a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare $15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dA, $11700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dG, $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per T e $7300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dC. Ciascun oligonucleotide è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Esperimenti elettroforetici

Gli esperimenti elettroforetici sono stati effettuati utilizzando come bersaglio un duplex di 50 mer (DNA_{50}) corrispondente alla regione del promotore hTERT da -124 a -74 contenente la sequenza omopurinica:omopirimidinica localizzata nella regione -108/-90.

Il filamento polipurinico è stato marcato al terminale 5' con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3000 Ci/mmol Amersham Pharmacia Biotech) e T4

polinucleotide chinasi (Fermentas); questo filamento è stato poi annilato con il complementare polipirimidinico, mediante riscaldamento a 95°C per 10 minuti e poi raffreddato lentamente a 0°C. Una quantità fissa del bersaglio marcato DNA₅₀ (30 nM) è stato mescolato con differenti porzioni dei due TFO (riscaldato a 95°C per 5 minuti per ridurre l'auto-aggregazione) nel tampone *standard* 50 mM Tris-HCl pH 7.3, contenente 50 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂ (STD buffer) e incubato tutta la notte a 37°C. I campioni sono stati successivamente analizzati su gel nativo di poliacrilammide al 15% (19:1 acrilammide: N'N'-bis-metilen-acrilamide), a 4°C per 18 ore con un voltaggio costante di 200 V, utilizzando STD buffer per la corsa. I gel sono stati esaminati usando l'Instant Imager Packard e le quantità di triplex ottenute sono state quantificate valutando l'intensità delle bande duplex e triplex.

Gli esperimenti in presenza di DAPER sono stati effettuati nelle stesse condizioni sperimentali, venendo aggiunto, ad opportuna concentrazione, al DNA come ultimo componente. Per valutare l'influenza degli ioni K⁺ rispetto a quelli Na⁺, sono state adottate le stesse procedure, sostituendo NaCl con KCl, nel STD buffer. Inoltre, alcuni esperimenti EMSA sono stati effettuati cambiando la concentrazione di MgCl₂ da 5 mM a 1 mM nel STD buffer.

Esperimenti di DNasi I “*footprinting*”

Un frammento del promotore del gene hTERT di 260 bp contenente la sequenza -108/-90 è stato tagliato dal plasmide p1009 contenente 1009 bp del promotore del gene hTERT²⁰.

Il plasmide è stato digerito con Eco47III e marcato al terminale 5' con [γ -³²P]ATP mediante T4 polinucleotide chinasi, in modo da avere il filamento polipurinico marcato radioattivamente. Il plasmide è stato poi digerito con PvuII. Il risultante frammento di 260 bp è stato successivamente purificato mediante elettroforesi su gel al 5% di poliacrilammide, utilizzando TBE 1X (90 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8.3) come tampone di corsa. Per ottenere lo stesso frammento di DNA con il filamento polipirimidinico marcato, si è invertito l'ordine della digestione. I frammenti sono stati poi addizionati al TFO (13mer o 18mer) e la miscela è stata incubata tutta la notte a 37°C in STD buffer. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati digeriti con DNasi I, 0.2 U, per 1 minuto a 37°C e la reazione è stata stoppata per aggiunta di 5 μ l di una soluzione 50 mM di EDTA, pH 8. I campioni sono stati poi immediatamente caricati su *sequencing* gel al 6% e le elettroforesi sono state eseguite a 60 W per 2 ore. I gel sono stati essiccati ed esposti ad esame radiografico; le autoradiografie sono state esaminate mediante analisi

densitometriche. Gli esperimenti, in presenza di DAPER, sono state effettuate utilizzando le stesse condizioni sperimentali.

Esperimenti UV di denaturazione termica

Gli esperimenti UV di denaturazione termica sono stati effettuati utilizzando uno spettrofotometro JASCO 530 equipaggiato con un dispositivo di controllo della temperatura (ETC-505T). Per i complessi triplex, ogni campione contiene una miscela 1:1 di TFO e DNA₃₀ alla concentrazione di $3.0 \cdot 10^{-5}$ M, nel tampone 20 mM Tris·HCl pH 7.3, contenente 50 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂. I campioni sono stati sottoposti a processo di *annealing* mediante riscaldamento a 90°C per 20 minuti, lento raffreddamento a temperatura ambiente e poi stabilizzati per 30 minuti a 10°C. Le curve di CD *melting* sono state registrate in funzione della temperatura da 10 a 90°C a 260 nm con una velocità di scansione di 0.5°C/min.

Studi di spettroscopia UV e CD

Gli spettri UV sono stati acquisiti mediante uno spettrofotometro JASCO 530 equipaggiato con un dispositivo di controllo della temperatura (ETC-505T). Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO 715 equipaggiato con un dispositivo di controllo della temperatura (PTC-348). La titolazione dei complessi di DNA a doppia e tripla elica con il DAPER sono state effettuate per

diluizione di campioni iniziali contenenti 56mM di ciascun oligonucleotide in 3 ml di tampone 20mM Tris·HCl pH 7.3, contenente o 50mM di NaCl o 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ e 20 μM DAPER. Il rapporto molare iniziale (R) DNA/DAPER è stato fissato a 2.8 e, poi, ridotto mediante diluizione con una soluzione contenente solo 20 μM DAPER, in modo da diminuire la quantità di DNA e mantenere costante quella di ligando durante la titolazione. I campioni sono stati equilibrati a 25°C per 30 minuti prima di ogni scansione. Nell'acquisizione degli spettri, la lunghezza d'onda è stata variata da 400 a 650 nm alla velocità di 200 e 2 nm min⁻¹ rispettivamente per le misure UV e CD. Le misure sono state effettuate a 25°C utilizzando *cuvette* in quarzo con un cammino ottico di 1 cm, munite di tappo di teflon. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone. Ogni spettro riportato rappresenta la media di almeno tre scansioni.

Bibliografia

1. Mc Eachern, M.J., Krauskopf, A. and Blackburn, E.H.; *Ann. Rev. Genet.*, **2000**, 34, 331-358.
2. Wright, W. E. and Shay, J.W.; *Nature Genetics*, **2005**, 37, 116-118.
3. Neidle, S. and Parkinson, G.N.; *Curr. Op. Structural Biology*, **2003**, 13, 275-283.

4. Blackburn, E. H.; *Cell*, **2001**, 106, 661 -673.
5. Zakian, V.A.; *Science*, **1995**, 270, 1601-1607.
6. Price, C. and Jacob, N.K.; *Molecular Cell*, **2005**, 18, 147-148.
7. Sandell, L.L. and Zakian, V.A.; *Cell*, **1993**, 75, 729-739.
8. Harley, C.B.; *Mutant. Res.*, **1991**, 256, 271-282.
9. Blackburn, E.H.; *FEBS Lett.*, **2005**, 579, 859-862.
10. Shay, J.W. and Wright, W.E.; *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 867-874.
11. Nakamura, T.M.; Morin, G.B.; Chapman, K.B.; Weinrich, S.L.; Andrews, W.H.; Lingner, J.; Harley, C.B. and Cech, T.R.; *Science*, **1997**, 277, 955-959.
12. Lingner, J.; Hughes, T.R.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Lundblad, V. and Cech, T.R.; *Science*, **1997**, 276, 561-567.
13. Williamson, J. R.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, 3, 357-362.
14. Feigon, J.; Koshlap, K. M. and Feigon, F. W.; *Nucl. Magn. Reson. Nucl. Acids*, **1995**, 261, 225-255.
15. Salazar, M. *et al.*; *Biochemistry* **1996**, 35, 16110-15.
16. Sun, D. *et al.* ; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2113–2116.
17. Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W.; *Science*, **1994**, 266, 2011-15.
18. Gilley, D., Tanaka, H. and Herbert, B.-S.; *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2005**, 37, 1000-13.

19. Guittat, L., Alberti, P., Gomez, D., De Cian, A., Pennarun, G., Lemarteleur, T., Belmokhtar, C., Paterski, R., Morjani, H., Trentesaux, C., Mandine, E., Boussin, F., Mailliet, P., Lacroix, L., Riou, J.-F., and Mergny, J.-L.; *Cytotechnology*, **2004**, 45, 75-90.
20. Kelland, L.R.; *European Journal of Cancer*, **2005**, 41, 971-979.
21. Mergny, J-L., Riou, J.-F., Mailliet, P., Teulade-Richou, M.-P. and Gilson, E.; *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 839-865.
22. Guittat, L., Alberti, P., Gomez, D., De Cian, A., Pennarun, G., Lemarteleur, T., Belmokhtar, C., Paterski, R., Morjani, H., Trentesaux, C., Mandine, E., Boussin, F., Mailliet, P., Lacroix, L., Riou, J.-F., and Mergny, J.-L.; *Cytotechnology*, **2004**, 45, 75-90.
23. Kelland, L.R.; *European Journal of Cancer*, **2005**, 41, 971-979.
24. Mergny, J-L., Riou, J.-F., Mailliet, P., Teulade-Richou, M.-P. and Gilson, E.; *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 839-865.
25. Galderisi, U., Cascino, A. and Giordano, A.; *J. of Cell. Phys.*, **1999**, 181, 251-257.
26. Karympalis, V., Kalopita, K., Zarros, A. and Carageorgiou, H.; *Biochemistry (Moscow, Russian Federation)*, **2004**, 69, 855-860.
27. Seidman M.M. and Glazer, P.M.; *J. Clin. Inv.*, **2003**, 112, 487-494.
28. Glukhov, A.I.; Zimnik, O.V.; Gordeev, S.A. and Severin, S.E.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; **1998**, 248, 368-371.

29. Cong, Y.S., Wen, J. and Bacchetti S.; *Hum. Mol. Gen.*, **1999**, 8, 137-142.
30. Wu, K.J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J. and Dalla-Favera, R.; *Nature Genet.*, **1999**, 21, 220-224.
31. Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H. and Inoue, M.; *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 669-677.
32. Xiao, X., Athanasiou, M., Sidorov, I.A., Horikawa, I., Cremona, G., Blair, D., Barret, J.C. and Dimitrov, D.S.; *Exp. and Mol. Pathol.*, **2003**, 75, 238-247.
33. Nanni, S., Narducci, M., Della Pietra, L., Moretti, F., Grasselli, A., De Carli, P., Sacchi, A., Pontecorvi, A. and Farsetti, A.; *J. Clin. Inv.*, **2002**, 110, 219-227.
34. Xu, D.; Wang, Q.; Gruber, A.; Bjorkholm, M; Chen, Z.; Zaid, A.; Selivanova, G.; Peterson, C.; Wiman, K.G. and Pisa, P.; *Oncogene*, **2000**, 19, 5123-33.
35. Anselmi, C., Bocchinfuso, G., De Santis, P., Savino, M. and Scipioni, A.; *J. Mol. Biol.*, **1999**, 286, 1293-1301.
36. Volker, J. and Klump, H.H.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 13502-13508.
37. Besch, R., Giovannangeli, C., and Degitz, K.; *Current Drug Targets*, **2004**, 5, 691-703.

38. Bevers, S.; Schutte, S. and McLaughlin, L.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5905-15.
39. Keppler, M.D., James, P.L., Neidle, S. Brown, T. and Fox ,K.R.; *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270, 4982-4992.
40. Rill, R. and Liu, Z-R.; *PCT Int. Appl.*, **1997**, 556115.
41. Liu, Z.-R. and Rill, R.L.; *Anal. Biochem.*, **1996**, 236, 139-145.
42. Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., Chemeris, V.V., Kerwin, S.M. and Hurley, L. H.; *Biochemistry*, **1998**, 37, 12367-74.
43. Rossetti, L., Franceschin, M., Bianco, A., Ortaggi, G. and Savino, M.; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2527-33.
44. Rossetti, L., Franceschin, M., Schirripa, S., Bianco, A., Ortaggi, G. and Savino, M.; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 413-420.
45. Blume, S.W., Lebowitz, J., Zacharias, W., Guarcello, V., Mayfield, C.A., Ebbinghaus, S.W., Bates, P., Jones, D.E. Jr, Trent, J., Vigneswaran, N., Miller, D.M.; *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 695-702.
46. Koval, V.V., Pyshnyi, D.V. and Fedorova, O.S.; *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, **2001**, 19, 515-526.

4) STRUTTURE DEL DNA A QUADRUPLA ELICA

4.1 Strutture G-quadruplex in acidi nucleici

Gli acidi nucleici, per essere funzionali, hanno bisogno di adottare strutture tridimensionali ben definite. Tra queste strutture particolare interesse ha avuto quella nota come G-quadruplex, caratterizzata dall'impilamento di molteplici tetradi di G. Gli oligonucleotidi, infatti, con sequenze ricche di guanosine (GROs) hanno la capacità di formare tali strutture grazie alla propensione delle guanine ad associarsi in tetradi mediante la formazione di legami ad idrogeno tipo *Hoogsteen*¹. Più precisamente la tetradè di G deriva dall'associazione di quattro guanine in un arrangiamento ciclico complanare con legami ad idrogeno di tipo *Hoogsteen* che riguardano l' N_1 , N_7 , O_6 e N_2H amminico di ogni guanina (**Figura 4.1.1**).

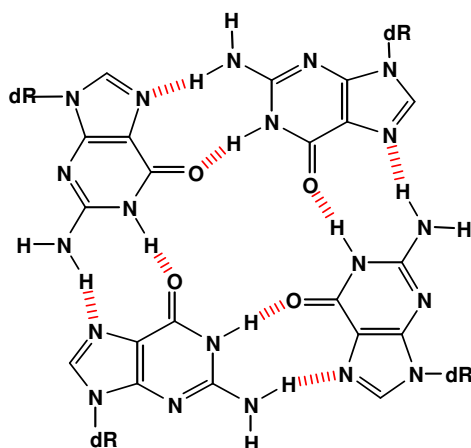


Figura 4.1.1: I quartetti di G espongono un alto grado di planarità e le basi sono associate mediante legami idrogeno tra il protone N_1H imminico e il carbonile $C_6=O$ e tra il protone N_2H amminico e l' N_7 .

Per gli omopolimeri poli(dG) e poli(G) sono state, infatti, descritte particolari proprietà quali la difficoltà nella purificazione HPLC e nell'identificazione dei picchi cromatografici e la presenza di bande di migrazione anomale nel gel elettroforetico. Tali osservazioni evidenziano la capacità di queste molecole di dare facilmente strutturazioni secondarie.

La dimostrazione che omopolimeri poli(dG) e poli(G) possono assumere particolari strutture tridimensionali, mediante la formazione di tetradi di G, si è avuta mediante lo studio di strutture assunte da più di 60 sequenze contenenti un numero variabile di guanine consecutive. E' stato quindi dimostrato che nel DNA due o più tetradi di G possono unirsi per formare una struttura tridimensionale a quadrupla elica. Queste strutture sono collettivamente chiamate G-quadruplex riferendosi con questo termine ad ogni forma di DNA a quadrupla elica contenenti tetradi di G. Rispetto alla loro origine comune, l'aspetto più interessante delle strutture G-quadruplex è il loro esteso polimorfismo.

Tecniche NMR e di cristallografia a Raggi X hanno permesso di determinare con alta precisione le caratteristiche strutturali del DNA in quadrupla elica, evidenziando la possibilità di formare un gran numero di strutture. I risultati ottenuti mediante l'uso dei Raggi X

sono molto precisi, in particolare hanno permesso di localizzare direttamente la posizione degli ioni di coordinazione, ma spesso sono affetti da errori legati all'esistenza delle forze di coesione tra i cristalli; mentre i risultati ottenuti mediante le tecniche NMR sono di più scarsa precisione ma rispecchiano meglio le caratteristiche della struttura in soluzione. Sulla base dei risultati ottenuti, le G-quadruplex si sono classificate principalmente in base al numero di filamenti che si associano a formare la struttura (uno^{2,4}, due^{5,6}, o quattro filamenti^{7,8}) ottenendo rispettivamente quadruplex monomolecolari (**Figura 4.1.2, A**), bimolecolari (**Figura 4.1.2, B**), o tetramolecolari (**Figura 4.1.2, C**).

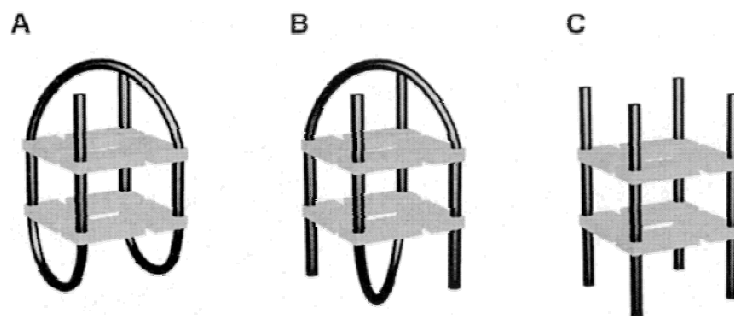


Figura 4.1.2: *Variazioni stechiometriche di strutture G-quadruplex. (A) Struttura G-quadruplex monomolecolare formata da un singolo filamento ripiegato; (B) Struttura G-quadruplex bimolecolare formata da due filamenti ripiegati; (C) Struttura G-quadruplex tetramolecolare formata da quattro filamenti.*

Ciò che determina a priori quale di queste strutture si forma dipende dalla sequenza e dalla concentrazione dei filamenti.

Nell'ambito di ciascuna di queste famiglie ulteriori distinzioni possono ottenersi in base alla sequenza, all'orientamento dei filamenti (parallelo o antiparallelo), alla conformazione delle basi guaniniche (*syn* o *anti*) rispetto al legame N-glicosidico e all'orientamento dei "loop" (laterale o diagonale)⁹.

Per quanto riguarda l'orientamento dei filamenti, essi possono essere tutti paralleli (**Figura 4.1.3, A**), tre paralleli e un antiparallelo (**Figura 4.1.3, B**), paralleli adiacentemente (**Figura 4.1.3, C**) o antiparalleli alternativamente (**Figura 4.1.3, D**).

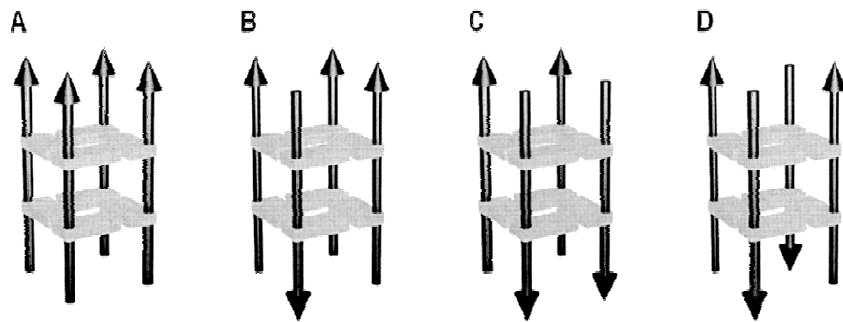


Figura 4.1.3: *Diversa polarità dei filamenti formanti la struttura G-quadruplex. (A) Tutti i filamenti paralleli; (B) Tre filamenti paralleli e uno antiparallelo; (C) Due filamenti paralleli adiacenti; (D) Due filamenti paralleli alternati.*

Riguardo alla conformazione delle basi guaniniche (*syn* o *anti*) rispetto al legame N-glicosidico, mentre nel B-DNA la conformazione assunta da ciascun nucleotide è sempre *anti*, la conformazione assunta dalle G coinvolte nella formazione di tetradi può essere sia *syn* che *anti* (**Figura 4.1.4**).

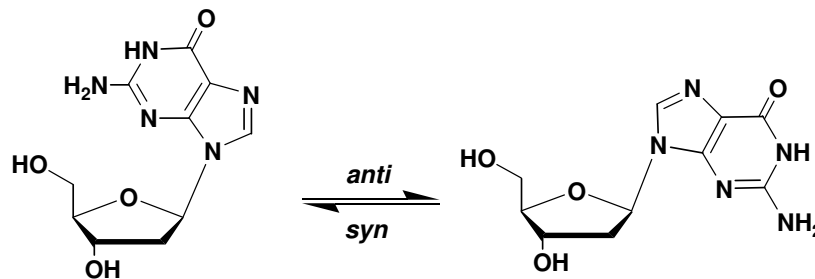


Figura 4.1.4: Rotazione intorno al legame N-glicosidico per l'interconversione tra le conformazioni *syn* e *anti*.

Alcune restrizioni sono applicate a guanine adiacenti coinvolte nella stessa tetradе di G. Se esse sono su filamenti paralleli devono avere lo stesso angolo di torsione glicosidico e al contrario, se sono su filamenti antiparalleli devono avere angolo di torsione glicosidico opposto. La conformazione glicosidica cambia, infatti, l'orientazione delle basi nelle tetradi di G adiacenti e modifica l'energia di legame. Mentre il B-DNA normale ha un solco minore ed uno maggiore, l'unione di tetradi di G produce quattro solchi non necessariamente uguali che possono essere larghi, medi e stretti. Se i quattro filamenti che formano la tetradе di G sono paralleli, i quattro solchi sono tutti

medi e tipicamente, le basi guaniniche hanno conformazione *anti*. Se la tetrate di G ha due filamenti paralleli e due antiparalleli, essa può avere solchi larghi, medi e stretti; infatti le G disposte sui filamenti adiacenti e paralleli ed aventi lo stesso angolo di torsione intorno al legame N-glicosidico producono solchi medi, mentre le G disposte sui filamenti adiacenti e antiparalleli ed aventi angolo di torsione opposto attorno al legame N-glicosidico producono un solco largo ed uno stretto (**Figura 4.1.5, A**). Infine, nel caso in cui la struttura quadruplex si formi con i filamenti a polarità alternata (di modo che ciascun filamento giaccia tra filamenti a polarità opposta) l'elica conterrà due solchi larghi e due stretti (**Figura 4.1.5, B**).

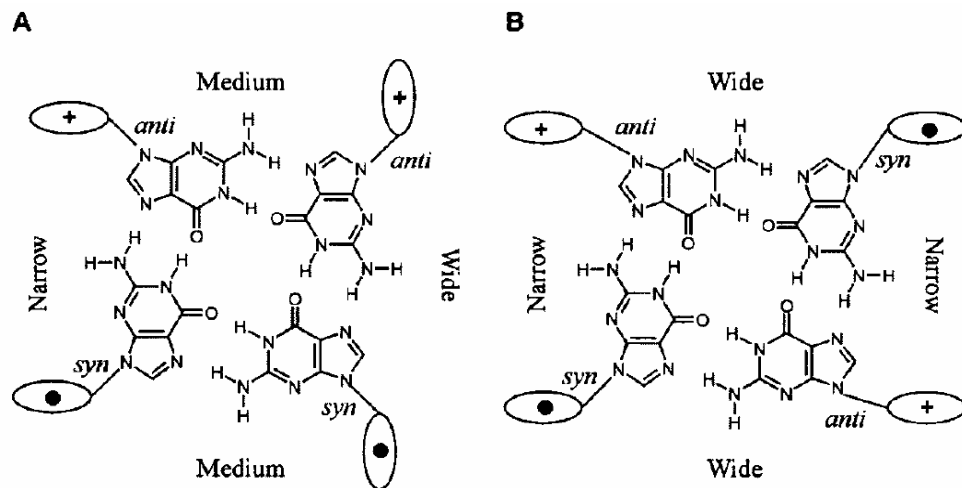


Figura 4.1.5: Relazione tra angoli di torsione glicosidici e polarità dei filamenti, indicate con (+) e (•) che genera solchi di diversa larghezza. (A) Solchi medi: G disposte su filamenti adiacenti e paralleli con lo stesso angolo di torsione intorno al legame N-glicosidico; (B) Un solco largo ed uno stretto: G disposte su filamenti adiacenti antiparalleli con angolo di torsione opposto attorno al legame N-glicosidico.

Questo fenomeno estende ulteriormente il poliformismo delle quadruplex dato che la differente disposizione dei *loop* che connettono filamenti adiacenti può produrre solchi di qualsiasi dimensione.

In base a calcoli teorici è stato dimostrato che lunghi tratti di G favoriscono la formazione di quadruplex con quattro filamenti paralleli in cui tutte le G si dispongono nella conformazione *anti* e che disposizioni alternate *syn/anti* sono confinate alle G-quadruplex intramolecolari con filamenti antiparalleli.

E' evidente che ogni struttura quadruplex che contiene filamenti antiparalleli deve avere G sia nella conformazione *syn* che *anti* per conservare lo schema dell'appaiamento delle basi.

Per quanto concerne i *loop*, i quali uniscono i tratti di guanine che partecipano alla formazione di quadruplex uni e bi-molecolari, essi possono essere disposti in diversi modi. I due filamenti coinvolti nelle quadruplex bimolecolari possono avere *loop* che uniscono tratti di guanine o diagonalmente o lateralmente.

I *loop* diagonali sono portati a protrarsi all'estremità opposte rispetto al centro della tetrate di G¹⁰ (**Figura 4.1.6, A**).

Anche se le quadruplex bimolecolari con due *loop* diagonali dallo stesso lato sono possibili da progettare, la loro formazione è

altamente improbabile a causa sia dell'ingombro sterico sia della repulsione elettrostatica tra le due catene negative dei legami fosfodiesterici. Invece, i due *loop*, che uniscono due tratti di guanine lateralmente, possono protrarsi o dallo stesso lato o dal lato opposto rispetto al centro della tetrade. I *loop* che si protraggono dallo stesso lato della tetrade possono essere sia paralleli (**Figura 4.1.6, B**) che antiparalleli (**Figura 4.1.6, C**). I *loop* che si protraggono dal lato opposto della tetrade possono assumere due diverse direzioni (**Figura 4.1.6, D ed E**).

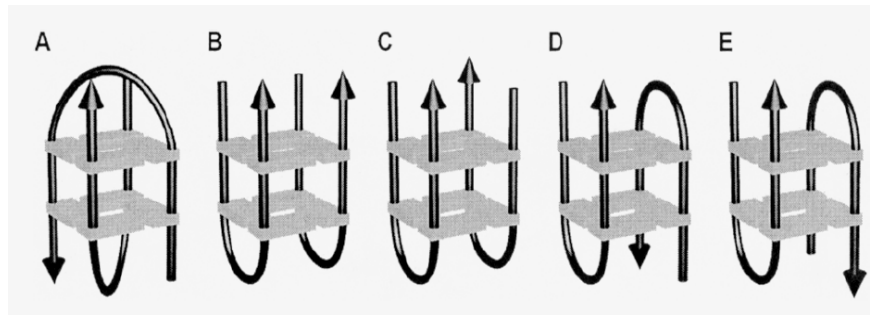


Figura 4.1.6: *Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex bimolecolari.*

Per quadruplex monomolecolari il numero delle possibili orientazioni dei *loop* è ridotto. I tre *loop* possono unirsi tutti e tre lateralmente (adiacente-adiacente-adiacente) (**Figura 4.1.7, A**) oppure due laterali e uno diagonale (adiacente-diagonale-adiacente) (**Figura 4.1.7, B**). D'altra parte c'è almeno un esempio di filamenti paralleli connessi via *loop* che si estendono al di fuori del centro della tetrade di G^{11}

(Figura 4.1.7, C), ciò indica che lo spettro delle strutture monomolecolari può essere più complesso di quanto finora ritrovato.

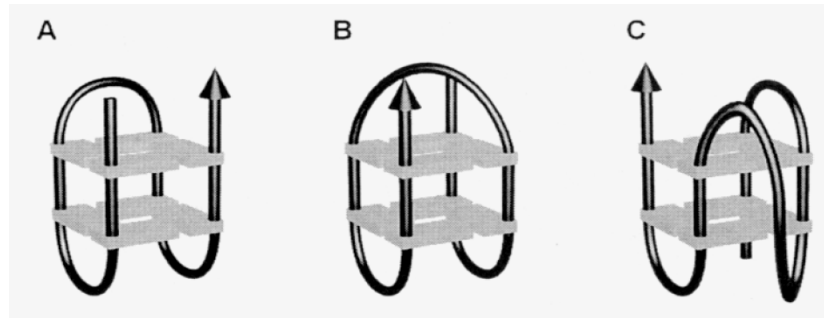


Figura 4.1.7: *Disposizione dei loop che tengono uniti tratti di G che partecipano alla formazione di strutture G-quadruplex monomolecolari.*

Da studi strutturali di varie quadruplex, appare che la maggior parte dei *loop* non sono liberi e flessibili; infatti per basi non appaiate, sono importanti le interazioni di *stacking* con la tetrade di G adiacente al *loop*. Ogni base, presente nella linea di confine con la tetrade di G, può partecipare alla formazione di strutture planari che si sistemano mediante interazioni π sul centro della tetrade. Un esempio è la sequenza tronca d(TAGG) della ripetizione telomerica *Bombyx mori* d(TTAGG)_n, che forma una G-quadruplex a quattro filamenti nella quale il centro della tetrade di G è racchiuso tra due triadi TAA¹² (Figura 4.1.8, A). Ancora, strutture G-quadruplex monomolecolari possono racchiudere insieme basi diverse dalla G che sono collocate sullo stesso filamento. Se due basi complementari si trovano in direzione antiparallela, il centro della tetrade di G può essere coperto

da coppie di basi appaiate secondo Watson-Crick^(9,13) con le basi appartenenti allo stesso filamento ripiegato (**Figura 4.1.8, B**).

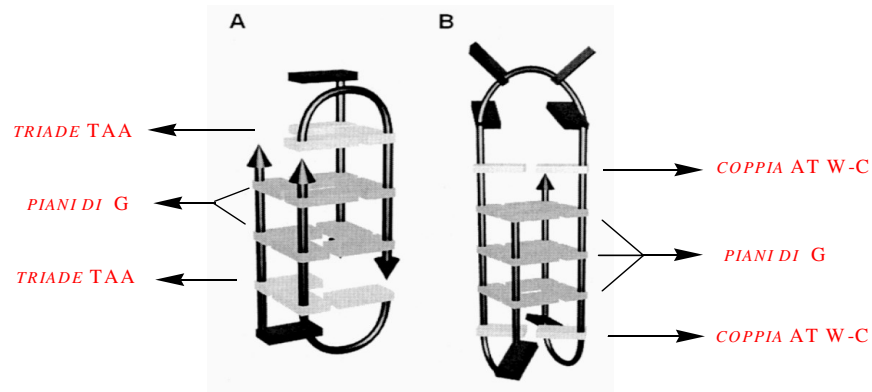


Figura 4.1.8: Centro delle strutture G-quadruplex racchiuso da: (A) due triadi TAA e (B) due coppie di basi AT. I quadrati in nero rappresentano basi proiettate all'esterno della struttura.

4.2 Polimorfismo delle G-quadruplex

Lo straordinario polimorfismo delle quadruplex di acidi nucleici è il risultato dell'equilibrio sottile tra molte forze. La struttura di una G-quadruplex è determinata primariamente dalla condensazione dei residui di guanina intorno a un catione monovalente, ma effetti secondari come forze di impilamento tra le basi (*stacking*), legami idrogeno ed effetti idrofobici determinano la struttura finale.

Oligonucleotidi contenenti tratti di guanine sono associati a formare quasi sempre strutture a quattro filamenti paralleli; doppie ripetizioni di guanine, separate da due o più basi, hanno la tendenza a ripiegarsi in strutture dimeriche; quadruple ripetizioni di guanine, separate da

due o più basi, nella sequenza oligonucleotidica hanno la tendenza a ripiegarsi intramolecolarmente.

Molti fattori influenzano l'orientamento dei filamenti e delle basi guaniniche e la conformazione del *loop*. Questi fattori includono la grandezza del catione di coordinazione, la concentrazione dello ione, la lunghezza e il numero di segmenti ricchi di guanine, la lunghezza e la sequenza dei segmenti spaziatori (*loop*) ed eventualmente, la possibilità di accoppiamenti Watson-Crick tra basi non adiacenti nella sequenza¹⁵. C'è un'interessante caratteristica che si nota nella maggior parte delle quadruplex di DNA: la guanina adiacente all'estremità 5' di un *loop* è quasi sempre nella conformazione *syn* e la guanina adiacente all'estremità 3' del *loop* è nella conformazione *anti*.

Strutture G-quadruplex a quattro filamenti

Le quadruple eliche tetramolecolari si originano da singoli filamenti oligonucleotidici contenenti tratti dG_n , questi formano quasi sempre strutture parallele destrorse che contengono tutte le basi nella conformazione *anti* e i 4 filamenti orientati parallelamente generano 4 identici solchi medi. Eccezioni alla regola che singoli filamenti con tratti dG_n formano quasi sempre strutture parallele con tutte le basi in una conformazione *anti* riguarda filamenti contenenti adenina o

timina; infatti sequenze come d(TAG₂) e d(T₂AG₂) formano, in presenza di ioni sodio, strutture simmetriche a quattro filamenti, contenenti due quartetti di G con filamenti paralleli e antiparalleli e guanine alternate *syn-anti*¹² (**Figura 4.1.8, A**).

Strutture G-quadruplex a due filamenti

Oligonucleotidi contenenti tratti (dG_n)₂, tendono ad assemblarsi in strutture dimeriche. Molte di queste strutture sono state esaminate mediante raggi X e NMR e l'elevato polimorfismo di questa famiglia di quadruplex dimostra come il tipo di struttura quadruplex dipende dal contenuto in basi e dalla sequenza dell'oligonucleotide.

La **Figura 4.2.1** mostra alcune quadruplex bimolecolari. In particolare la struttura della quadruplex [d(G₄T₄G₄)]₂ (**Figura 4.2.1, A**), ottenuta mediante i Raggi X¹⁵, è coordinata allo ione potassio ed ha *loop* laterali ed opposti al centro della tetrade di G. Le 4 guanine consecutive di ciascun filamento presentano una orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con le due guanine all'estremità 5' in conformazione *syn*. Le guanine in ciascun quartetto presentano un'orientazione del tipo *G1-syn-G4-anti-G9-syn-G12-anti*.

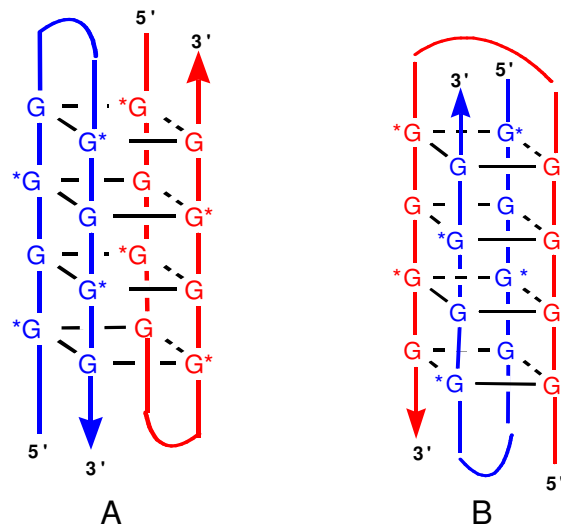


FIGURA 4.2.1: *Quadruplex bimolecolari $[d(G_4T_4G_4)]_2$ con **A** è indicata la struttura ottenuta mediante Raggi X mentre con **B** la struttura risolta mediante NMR. Le linee curve indicano i loop T₄. Le G* sono in conformazione syn mentre le G sono in conformazione anti.*

La struttura quadruplex della stessa sequenza $[d(G_4T_4G_4)]_2$ ottenuta mediante NMR in presenza di Na⁺ o K⁺ (**Figura 4.2.1, B**), piuttosto differente dalla struttura cristallina^(10,16), presenta *loop* diagonali e opposti al centro della tetrate di G. Le 4 guanine consecutive di ciascun filamento presentano ancora un'orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con le due guanine all'estremità 5' in conformazione *syn*, ma le guanine in ciascun quartetto presentano un'orientazione del tipo *G1-syn-G9-syn-G12-anti-G4-anti* a causa della presenza di un *loop* diagonale. In entrambe le strutture, sia quella esaminata mediante Raggi X sia quella esaminata mediante NMR, c'è un cambiamento nella direzione del legame idrogeno

donatore e accettore tra i quartetti adiacenti. Queste caratteristiche sono mostrate schematicamente nelle **Figure 4.2.2 e 4.2.3**.

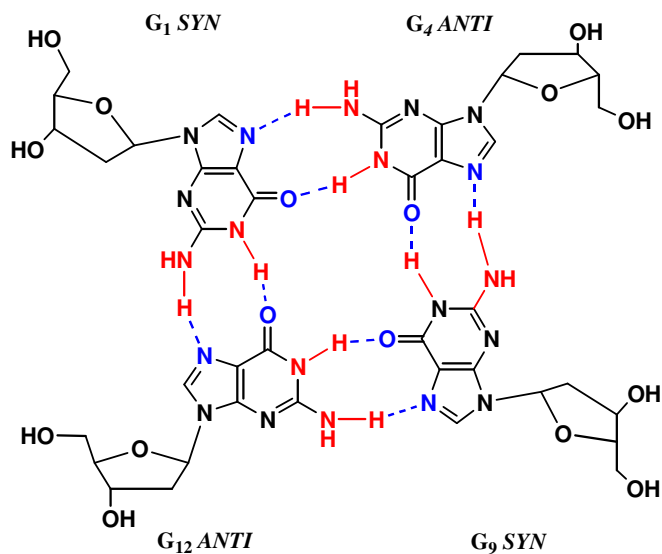


FIGURA 4.2.2: Quartetto di G nella struttura a RAGGI X della quadruplex bimolecolare $[d(G_4T_4G_4)]_2$.

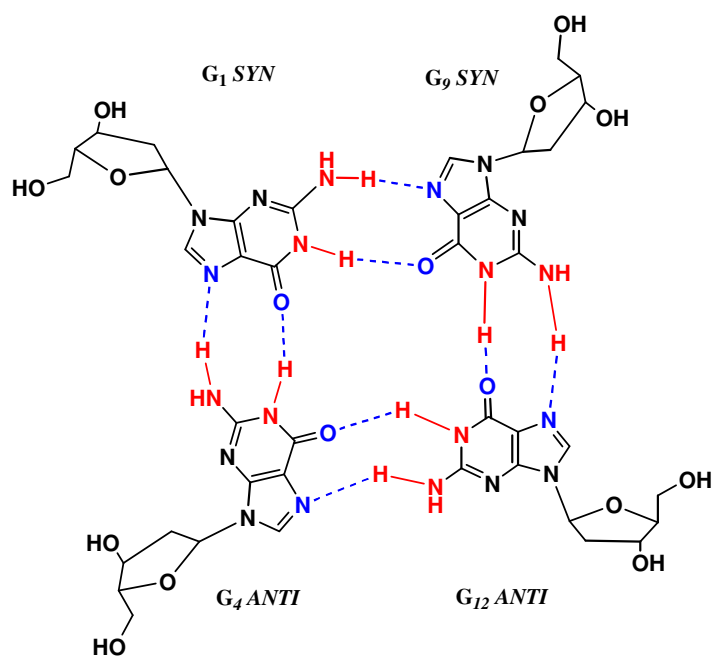


FIGURA 4.2.3: Quartetto di G nella struttura NMR della quadruplex bimolecolare $[d(G_4T_4G_4)]_2$.

La quadruplex dimerica a forcina, $[d(G_3T_4G_3)]_2$, ha un quartetto in meno e altre differenti caratteristiche^(6,17,18). La struttura in soluzione, in presenza di ioni Na^+ o K^+ , ha *loop* diagonali alle estremità opposte della quadruplex come quella assunta dalla sequenza $[d(G_4T_4G_4)]_2$ (**Figura 4.2.1, B**) e l'allineamento dei filamenti è identico. Comunque la quadruplex è asimmetrica e le prime tre guanine consecutive di un filamento presentano una orientazione del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-anti* mentre le successive tre guanine dello stesso filamento presentano una orientazione del tipo *G8-syn-G9-syn-G10-anti* e l'orientazione sul filamento opposto è invertita. Nonostante ciò, la guanina 5' in ciascun filamento è sempre nella conformazione *syn* e la guanina 3' è nella conformazione *anti*. La somiglianza delle strutture di $[d(G_3T_4G_3)]_2$ e $[d(G_4T_4G_4)]_2$ suggerisce un comune ripiegamento che è determinato dalla conformazione del *loop* e la sola differenza significativa tra le due strutture consiste nella delezione di uno dei quartetti interni nel $[d(G_3T_4G_3)]_2$.

Numerosi studi riportati in letteratura hanno evidenziato la possibilità di formare strutture a quadrupla elica in presenza di basi quali adenina e citosina. L'effetto della presenza di citosina, che può potenzialmente formare quartetti di basi con legami ad idrogeno di tipo Watson-Crick con la guanina, è stato visto in diverse strutture

quadruplex: $[d(G_3CT_4G_3C)]_2$, $[d(GCG_2T_3GCG_2)]_2$, $[d(GCATGCT)]_2$.

Il quartetto di basi G-C-G-C è mostrato in **Figura 4.2.4**.

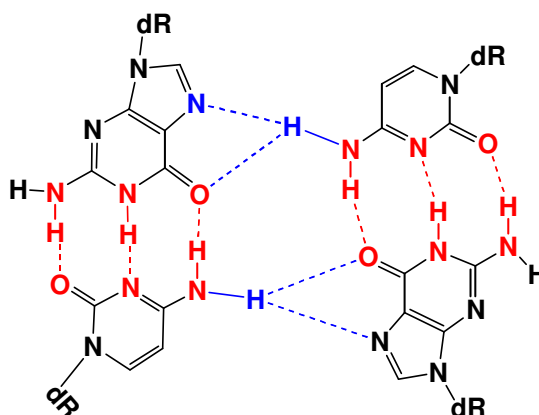


Figura 4.2.4: *Quartetto di basi G-C-G-C delle quadruplex $[d(G_3CT_4G_3C)]_2$ e $[d(GCG_2T_3GCG_2)]_2$. In rosso sono indicati gli accoppiamenti che avvengono secondo la direzione normale W-C.*

Le quadruplex bimolecolari con loop diagonali sono generalmente favorite ad alte concentrazioni del filamento o dei filamenti che la compongono. In soluzioni diluite ciascun filamento ripiega prima su se stesso per poi associarsi a dimero con l'altro filamento ripiegato (**caso A, Figura 4.2.5**). In soluzioni concentrate si possono formare preferenzialmente accoppiamenti tra due filamenti differenti i quali poi ripiegano l'uno sull'altro per formare la struttura finale (**caso B, Figura 4.2.5**).

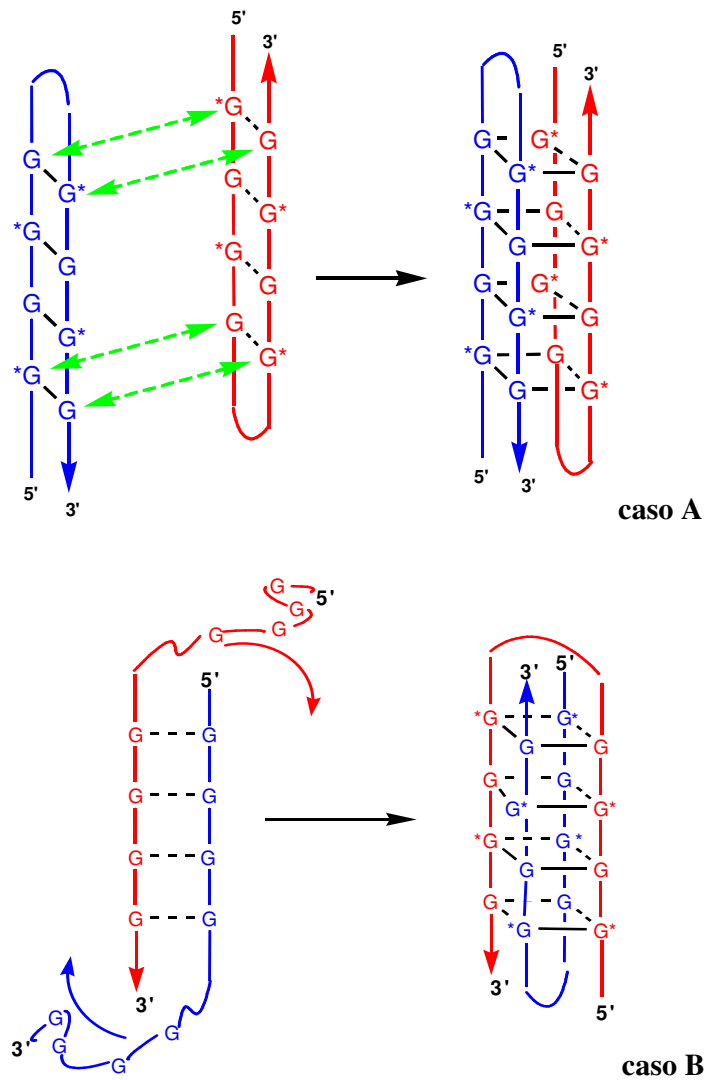


Figura 4.2.5: Formazione di differenti quadruplex bimolecolari a seconda delle concentrazioni.

In questo caso, il filamento deve necessariamente ripiegarsi in diagonale per generare una quadruplex dando luogo ad un'inversione di polarità, inoltre alcune basi devono assumere una conformazione *syn* per poter formare il quartetto; in genere la formazione dei quartetti segue appaiamenti 5'-G(*syn*)-G(*anti*)-3' piuttosto che

appaiamenti 5'-G(anti)-G(sin)-3'. L'atomo di ossigeno in posizione due della prima timina del *loop* può anche avere una debole coordinazione con lo ione Na^+ che è localizzato tra i due quartetti più vicini di guanine. Sostituendo Na^+ con K^+ si destabilizza la quadruplex dimerica a forcina, infatti, a causa dell'aumentata dimensione del K^+ quest'ultimo non può penetrare nel piano del quartetto esterno e la sua coordinazione agli ossigeni delle timine del *loop* ne risulta indebolita. Dall'insieme di queste considerazioni è evidente che esiste un delicato bilancio tra forze steriche, legami idrogeno, impilamento di basi e ioni di coordinazione nel determinare la struttura finale della quadruplex.

Strutture G-quadruplex a singolo filamento

Strutture a quadrupla elica monomolecolari possono ottenersi per ripiegamento di un singolo filamento costituito da quattro tratti dG_n e in presenza di ioni Na^+ o K^+ . Appartenenti a questa famiglia sono state individuate quattro principali strutture.

L'aptamero legante la trombina, $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$ si ripiega in una quadruplex contenente due quartetti di G con le basi in una orientazione del tipo *syn-anti-syn-anti* e tre *loop* laterali^{19,20} (**Figura 4.2.6**).

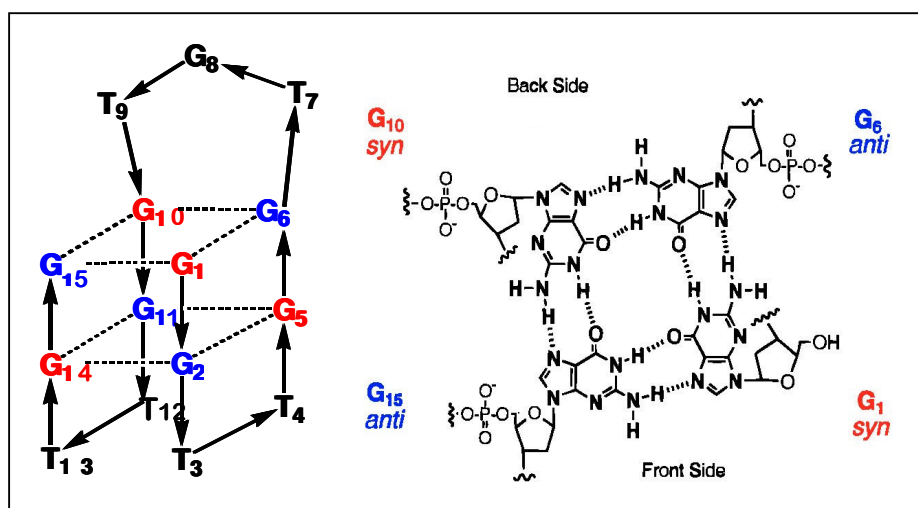


Figura 4.2.6: *Quadruplex monomolecolare della sequenza dell'aptamero antitrombinico $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$.*

Le quadruplex intramolecolari con tre *loop* laterali sono frequentemente definite strutture a sedia. Ciascun tratto G_2 ripetuto è 5'-*syn-anti-3'* e tutte le timine sono in una conformazione *anti*. La quadrupla elica è caratterizzata da due solchi larghi e due stretti. Le timine dei *loop* corti T_2 (T_4 e T_{13}) sono impilate su quartetti di G vicini e formano un legame a idrogeno, mentre le timine T_3 e T_{12} presentano una maggiore flessibilità. La timina T_7 del più lungo *loop* laterale T-G-T è collocata nel solco maggiore mentre le altre due basi del *loop*, G_8 e T_9 , sono più o meno impilate sui quartetti di G.

La sequenza del telomero umano, $[AG_3(T_2AG_3)_3]$, si ripiega in una quadruplex composta da tre quartetti di G in una orientazione del tipo *syn-syn-anti-anti*, due *loop* TTA laterali e un *loop* TTA diagonale²¹ schematicamente illustrata in **Figura 4.2.7**.

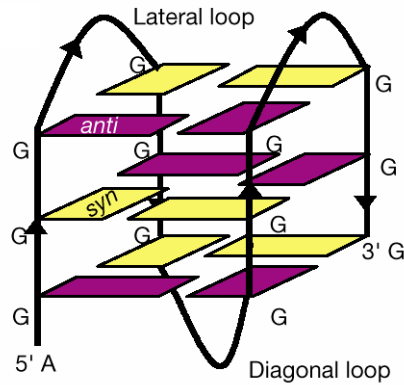


Figura 4.2.7: *Quadruplex monomolecolare della sequenza telomerica d[AG₃(T₂AG₃)₃] in soluzione in presenza di ioni sodio.*

Diversamente dalla sequenza $[d(G_3T_4G_3)]_2$, le tre guanine consecutive a partire dal terminale 5', adottano conformazioni del tipo *anti-syn-anti* e *syn-anti-syn* alternate. Le adenine dei *loop* si ripiegano sui quartetti di guanine per dare interazioni tipo *stacking*. Quadruplex intramolecolari aventi un *loop* diagonale e due *loop* laterali sono comunemente definite come strutture a cesto e si formano in presenza di cationi monovalenti differenti (sodio o potassio).

Tuttavia un recente studio cristallografico ha mostrato che la sequenza del telomero umano in presenza di K^+ adotta una struttura radicalmente diversa con tutti i filamenti paralleli, le G assumono tutte una conformazione *anti* ed i risultanti *loop* diagonali d(TTA) orientati lontano dai quartetti di G²² (**Figura 4.2.8**).

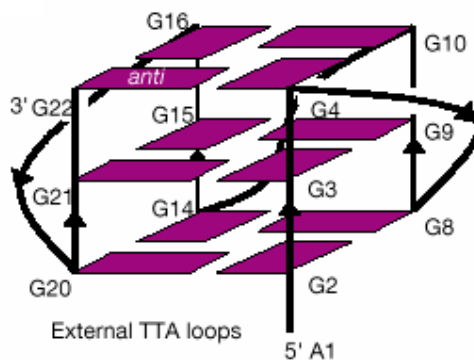


Figura 4.2.8: *Quadruplex monomolecolare della sequenza telomerica d[AG₃(T₂AG₃)₃] ottenuta mediante Raggi X in presenza di ioni potassio.*

La sequenza telomerica in *Oxytricha*, d[G₄(T₄G₄)₃], forma una struttura^{23,24} che possiede molte delle caratteristiche proprie della quadruplex dimerica a forcina [d(G₄T₄G₄)₂]. Infatti, i quattro quartetti di G sono nella stessa orientazione *syn-syn-anti-anti*. Nella struttura è presente un *loop* T₄ diagonale, che possiede una conformazione simile ai *loop* diagonali osservati nelle sequenze [d(G₄T₄G₄)₂] e [d(G₃T₄G₃)₂] e due *loop* T₄ laterali. Lungo i filamenti, i tratti G₄ ripetuti presentano un'orientazione alternata del tipo *G1-syn-G2-anti-G3-syn-G4-anti* con la guanina 5' terminale sempre nella conformazione *syn* e quella 3' terminale sempre nella conformazione *anti*. Ogni sequenza G₄ ha vicino una sequenza G₄ parallela ed una antiparallela originando tre solchi di dimensioni differenti. Queste caratteristiche sono illustrate schematicamente in **Figura 4.2.9**.

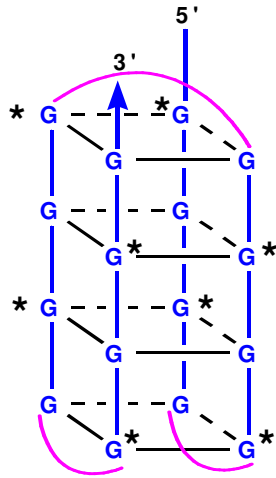


Figura 4.2.9: *Quadruplex monomolecolare della sequenza $d[G_4(T_4G_4)_3]$. Le linee curve indicano i loop T_4 . Le G^* sono in conformazione syn mentre le G sono in conformazione anti.*

La sequenza telomerica in *Tetrahymena*, $[d(T_2G_4)_4]$, assume una struttura quadruplex che possiede alcune caratteristiche insolite (**Figura 4.2.10**).

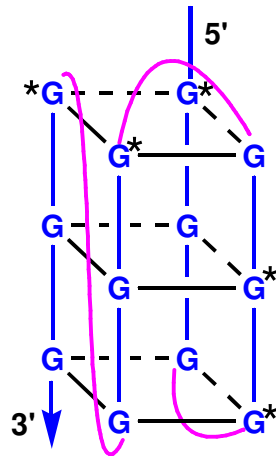


Figura 4.2.10: *Quadruplex monomolecolare della sequenza, $[d(T_2G_4)_4]$.*

Tale struttura presenta tre quartetti¹¹, in due dei quali le guanine sono in un'orientazione *syn-anti-anti-anti* e nel terzo le guanine assumono un orientazione *syn-syn-syn-anti*. Ci sono due *loop* laterali, GT₂G e T₂G, e un *loop* corto T₂ che attraversa uno dei solchi. In tre tratti G₃, le guanine possiedono conformazioni *syn-anti-anti* ed in un solo tratto G₃, le guanine assumono conformazioni *syn-syn-anti*. Le guanine 5' dei *loop* sono tutte in una conformazione *anti* e quelle 3' dei *loop* in conformazione *syn*.

4.3 Siti di legame degli ioni nelle G-quadruplex

La formazione di G-quadruplex richiede la presenza di cationi metallici. Bolton e collaboratori²⁵ hanno studiato in maniera approfondita gli effetti degli ioni Na⁺ e K⁺ sulle strutture G-quadruplex, evidenziando che esse possono suddividersi in tre distinte categorie. La prima categoria include le sequenze di DNA che non formano strutture ben definite nelle soluzioni di Na⁺ e K⁺. Queste sequenze hanno segmenti spaziatori tra le ripetizioni di guanine troppo corti per formare *loop*. La seconda categoria include strutture a quattro filamenti paralleli e quadruplex dimeriche con *loop* diagonali, le quali possono formarsi in presenza di entrambi gli ioni Na⁺ o K⁺. Questo tipo di strutture quadruplex non è influenzato dalla natura del catione. Ci sono probabilmente solo piccoli cambiamenti nella

dimensione del quartetto di G tra il Na^+ e il K^+ per le quadruplex generate da filamenti paralleli. Nel caso di quadruplex dimeriche con *loop* diagonali, possono essere osservati cambiamenti significativi nella struttura e nei *loop* formati da tratti ricchi di timine ma rimane altamente conservata l'architettura generale della quadruplex dimerica. In Na^+ le strutture $[\text{d}(\text{G}_3\text{T}_4\text{G}_3)]_2$ e $[\text{d}(\text{G}_4\text{T}_4\text{G}_4)]_2$ originano un solo tipo di quadruplex (dimerica a forcina) anche in soluzioni concentrate^{26,27}. In presenza dello ione K^+ c'è una miscela di quadruplex dimeriche a forcine e lineari. C'è anche un evidente moto nei *loop* delle forme dimeriche. In **Figura 4.3.1** è mostrata la disposizione dello ione K^+ tra i due piani di G della quadruplex dimerica $[\text{d}(\text{G}_3\text{T}_4\text{G}_3)]_2$, dimostrando la coordinazione ottaedrica con gli ossigeni in posizione 6 delle guanine.

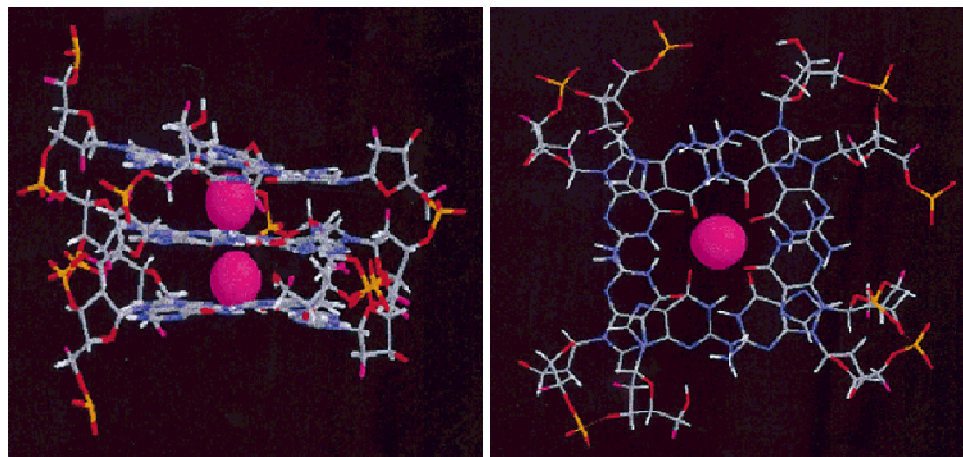


Figura 4.3.1: *Disposizione dello ione K^+ tra i due piani di G della quadruplex dimerica $[\text{d}(\text{G}_3\text{T}_4\text{G}_3)]_2$ e coordinazione ottaedrica con gli ossigeni in posizione 6 delle guanine.*

La terza categoria include quadruplex ripiegate intramolecolarmente che hanno tutti i *loop* laterali e si formano in presenza di K^+ ma non di Na^+ . Queste quadruplex a sedia sono favorite quando i *loop* sono corti e ci sono pochi quartetti di G. L'aptamero legante la trombina è un esempio di quadruplex a sedia che si forma in presenza del K^+ ²⁸ (Figura 4.3.2).

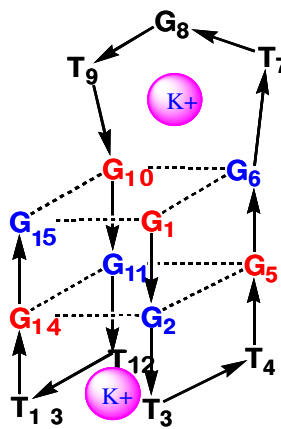


Figura 4.3.2: Siti di legame del potassio nell' aptamero antitrombinico.

La presenza di purine nei *loop* laterali anticipa la formazione di una struttura quadruplex a sedia a causa degli effetti sterici e della mancanza di un gruppo carbonilico coordinante.

Comunque ci sono alcune sequenze nucleotidiche che non rientrano in nessuna di queste categorie e tutte contengono citosina o adenina o entrambe. Per queste sequenze si osserva un grande cambiamento conformazionale indotto dal tipo di catione presente in soluzione.

4.4 Ruolo biologico delle strutture G-quadruplex

Le strutture G-quadruplex sono implicate in importanti processi biologici e, pertanto, rappresentano un potenziale bersaglio per il progetto di nuovi farmaci²⁹; infatti sequenze ricche di G sono state ritrovate in regioni biologicamente interessanti del genoma come nei telomeri³⁰, in regioni promotori di geni^{31,32}, in siti di *binding* con proteine specifiche^{33,34}, nelle regioni di "switch" delle immunoglobuline, nei domini di dimerizzazione dell'RNA e in sequenze implicate in disordini genetici³⁵, oltre che in sequenze associate con patologie umane. Sono state, inoltre, identificate diverse proteine in grado di legarsi a G-quadruplex e, alcune, ne promuovono anche la formazione.

Sebbene regioni del DNA ricche di G possono formare in *vitro* strutture quadruplex in presenza di concentrazioni fisiologiche di Na⁺ e K⁺, la formazione di tali strutture in *vivo* risulta più complessa perché influenzata da molteplici fattori: (i) la maggior parte delle regioni ricche di G sul genoma formano una stabile duplex Watson-Crick durante tutto il ciclo cellulare; (ii) il DNA genomico è legato a proteine sia non specifiche (es. istone strutturale H1) sia specifiche (fattori trascrizionali e altre proteine enzimatiche e regolatrici).

Tuttavia, sebbene la formazione *in vitro* di G-quadruplex richiede alte concentrazioni di DNA, ciò potrebbe non essere necessario *in vivo*.

Comunque, queste incertezze sono state attenuate dalla scoperta di varie proteine capaci di interagire con le G-quadruplex. Sono state ritrovate molte proteine, provenienti soprattutto da ciliati e lievito³⁶, capaci di legarsi a tali strutture. Fra queste, la proteina RAP1 del lievito e la β -subunità della proteina legante il telomero *Oxytricha* sono le più interessanti, perché non solo legano G-quadruplex ma ne facilitano anche la formazione³⁷. Queste scoperte, insieme all'osservazione che il B-DNA può interconvertirsi in G-quadruplex intramolecolari in determinate concentrazioni di cationi $\{[Na^+ + K^+] \sim = 150 \text{ mM}\}$, suggerisce che le G-quadruplex potrebbero formarsi dal DNA duplex nelle cellule³⁸.

Recentemente, quattro elicasi, il *Simian virus* (SV) 40 T-antigene³⁹, l'elicasi della sindrome di Bloom (BLM)⁴⁰, l'elicasi Sgs1 (*Saccharomyces cerevisiae* omologo di BLM) da lievito⁴¹ e l'elicasi della sindrome di Werner da uomo⁴², sono state ritrovate implicate nello svolgimento di G-quadruplex di DNA. Questo indica che probabilmente le cellule avrebbero un meccanismo per la rimozione di tali strutture e, più importante, che le G-quadruplex sarebbero normali strutture che solitamente si assemblano e si smontano

all'interno delle cellule. Molti eventi cellulari incluso la replicazione, la ricombinazione, la trascrizione e l'allungamento del DNA telomerico implicano stadi nei quali i due filamenti del DNA possono essere separati localmente e transitoriamente, offrendo così un'opportunità al filamento ricco di G di formare strutture G-quadruplex.

Bibliografia

1. Gellert, M.; Lipsett, M. N. and Davies, D.R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, 48, 2013-18.
2. Henderson, E.; Hardin, C.C.; Walk, S.K.; Tinoco, I. and Blackburn, E.H.; *Cell*, **1987**, 51, 899-908.
3. Macaya, R.F.; Schultze, P.; Smith, F.W.; Roe, J.A. and Feigon, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 3745-49.
4. Wang, Y. and Patel, D.J.; *J. Mol. Biol.*, **1995**, 251, 76-94.
5. Sundquist, W.I. and Klug, A.; *Nature*, **1989**, 342, 825-829.
6. Keniry, M.A.; Strahan, G.D.; Owen, E.A. and Shafer, R.H.; *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, 631-643.
7. Sen, D. and Gilbert, W.; *Nature*, **1988**, 334,364-366.
8. Laughlan, G.; Murchie, A.E.; Norman, D.G.; Moore, M.H.; Moody, P.C.; Lilley, D.M. and Luisi, B.; *Scienze*, **1994**, 265, 520-524.

9. Simonsson, T.; Pecinka, P. and Kubista, M.; *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1167-72.
10. Schultze, P.; Smith, F.W. and Feigon, J.; *Structure*, **1994**, 2, 221-233.
11. Wang, Y. and Patel, D.J.; *Structure*, **1994**, 2, 1141-1156.
12. Kettani, A.; Bouaziz, S.; Wang, W.; Jones, R.A. and Patel, D.J.; *Nature Struct. Biol.*, **1997**, 4, 382-389.
13. Simonsson, T. and Sjoback, R.; *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 17379-17383.
14. Hilbers, C.W.; Heus, H.A.; Van Dongen, M.J.P. and Wijrnenga, S.S.; *Nucleic Acids in Molecular Biology*, **1994**, 8, 56-104.
15. Kang, C.; Zhang, X.; Ratliff, R.; Moyzis, R. and Rich, A.; *Nature*, **1992**, 356, 126-131.
16. Smith, F. W. and Feigon, J.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 8682-8692.
17. Smith, F.W.; Lau, F.W. and Feigon, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 10546-50.
18. Strahan, G. D.; Keniry, M.A. and Shafer, R.H.; *Biophys. J.*, **1998**, 75, 968-981.
19. Schultze, P.; Macaya, R.F. and Feigon, J.; *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 1532-47.
20. Wang, K.Y.; Krawczyk, S.H.; Bischoberger, N.; Swaminathan, S. and Bolton, P.H.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 11285-92.

21. Wang, Y. and Patel, D.J.; *Structure*, **1993**, 1, 263-282.
22. Parkinson, G.N., Lee, M. and Neidle, S.; *Nature*, **2002**, 417, 876-880.
23. Wang, Y. and Patel, D.J.; *J. Mol. Biol.*; **1995**, 251, 76-94.
24. Smith, F.W.; Schultze, P. and Feigon, J.; *Structure*, **1995**, 3, 997-1008.
25. Marathias, V.M. and Bolton, P.H.; *Biochemistry*, **1999**, 38, 4355-4364.
26. Keniry, M.A.; Owen, E.A. and Shafer, R.H.; *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 4389-92.
27. Schultze, P.; Hud, N.V.; Smith, F.W. and Feigon, J.; *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3018-28.
28. Marathias, V.M. and Bolton, P.H.; *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 1969-77.
29. Cuesta, J.; Read, M.A. and Neidle, S.; *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2003**, 3, 11-21.
30. Blackburn, E.H.; *Cell*, **1994**, 77, 621-623.
31. Evans, T.; Schon, E.; Gora-Maslak, G.; Petterson, J. and Efstratiadis, A.; *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 8043-58.
32. Kilpatrick, M.W.; Torri, A.; Kang, D.S.; Engler, J.A. and Wells, R.D.; *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 11350-54.
33. Erlitzki, R and Fry, M.; *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 15881-90.

34. Fang, G. and Cech, T.R.; *Cell*, **1993**, 74, 875-885.
35. Fry, M. and Loeb, L.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 4950-54.
36. Giraldo, R. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 7658-62.
37. Fang, G. and Cech, T.R.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 11646-57.
38. Deng, H. and Braunlin, W.H.; *Biopolymers*, **1995**, 35, 677-681.
39. Baran, N. et al.; *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 297-303.
40. Sun, H. et al.; *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 27587-27592.
41. Sun, H. et al.; *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 27, 1978-84.
42. Fry, M. and Loeb, L.A.; *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 12797-02.

5) STUDIO DELL'INTERAZIONE DELL'ACROLEINA SULLA QUADRUPLEX MONOMOLECOLARE DELLA SEQUENZA TELOMERICA UMANA d(TTAGGG)₄

5.1 Introduzione

L'acroleina è una molecola fortemente elettrofila. È l'aldeide α,β -insatura più semplice (**Figura 5.1.1**) e ad essa siamo esposti in vari contesti ambientali. Ad esempio la possiamo ritrovare come componente del fumo di sigaretta¹ o come metabolita della ciclofosfamide² (farmaco antitumorale).

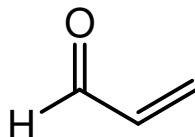


Figura 5.1.1: *Acroleina.*

A livello industriale l'acroleina è usata come erbicida, come materiale di partenza per polimeri acrilici e nella produzione di acido acrilico³; essa è presente anche naturalmente nei cibi e può generarsi durante la combustione di materiali organici e nei vapori dell'olio da cucina surriscaldato⁴.

Si stima che tra gli inquinanti atmosferici l'acroleina rappresenti il 5% circa delle aldeidi. Molte industrie usano impianti appositi atti a

diminuire la liberazione di questa molecola nell'atmosfera ma, anche a causa della sua notevole volatilità, questi provvedimenti non sono del tutto efficaci.

In vivo l'acroleina, oltre ad essere formata come già detto dal metabolismo della ciclofosfamida nei pazienti trattati con questo farmaco, è stata identificata come iniziatore e prodotto della perossidazione dei lipidi⁵ e viene inoltre formata a partire dalla treonina nei siti d'inflammazione dalle neutrofil-mieloperossidasi⁶.

L'acroleina provoca cistite vescicale, leucemia terapia-indotta ed è genotossica e mutagenica⁷, in quanto reagisce con i gruppi amminici ed imminici delle basi azotate del DNA quali la guanina ed in misura minore con l'adenina e la citosina⁸.

Il residuo di 2'-deossiguanosina (dG) in strutture DNA duplex risulta essere quello maggiormente interessato. La dG, infatti, è la molecola più nucleofila tra quelle sopraccitate. Il tipico ordine di reattività degli elettrofili con le basi azotate è il seguente: deossiguanosina > deossiadenosina >> deossicitidina > timidina (la quale ha una reattività prossima allo zero). L'acroleina, in particolare, reagisce con la 2'-deossiguanosina formando due regioisomeri: l'8-idrossipropano-2'-deossiguanosina (8-OHPdG o γ -OHPdG) e il 6-idrossipropano-2'-deossiguanosina (6-OHPdG o α -OHPdG) mostrati in **Figura 5.1.2**.

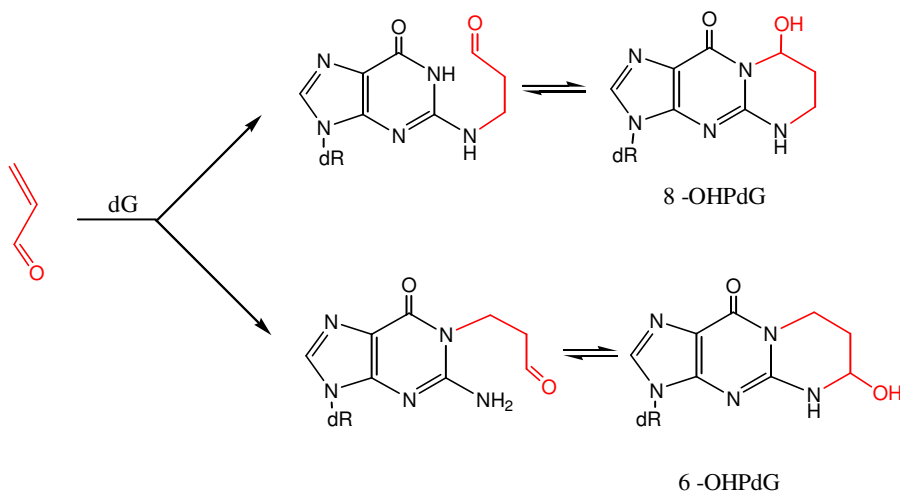


Figura 5.1.2: Addotti formati tra acroleina e 2'-deossiguanosina.

Questi addotti in soluzione si trovano in equilibrio con le corrispondenti forme aldeidiche aperte⁹⁻¹¹. L'addotto ciclico 8-OHPdG si forma grazie ad un'addizione di Michael dell'NH₂ esociclico della guanina sul carbonio olefinico dell'aldeide α,β -insatura, seguita da chiusura dell'anello per addizione 1,2 dell'N-1 al gruppo aldeidico.

Per quanto riguarda l'addotto ciclico 6-OHPdG è l'N-1 della guanina che si addiziona al carbonio olefinico dell'aldeide α,β -insatura, in seguito si ha chiusura dell'anello per addizione 1,2 dell'NH₂ esociclico della guanina al carbonio aldeidico. Analogamente, diversi studi^{12,13} hanno reso evidente che anche la 2'-deossiadenosina reagisce con l'acroleina, ma gli addotti ciclici, anch'essi in equilibrio con la corrispondente forma aperta, sono presenti in misura minore nel DNA (**Figura 5.1.3**).

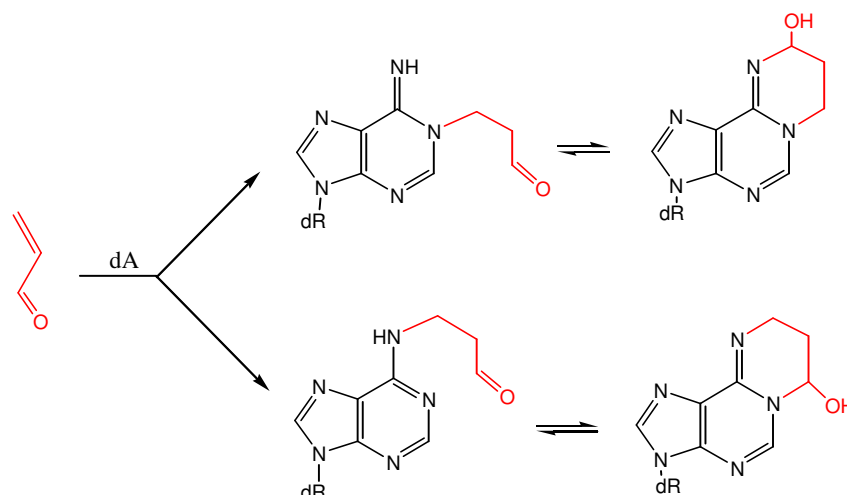


Figura 5.1.3: Addotti formati tra acroleina e 2'-deossiadenosina.

Esistono poche evidenze sperimentali circa la reattività delle aldeidi α,β -insature nei confronti della 2'-deossicitidina¹³.

Gli addotti che si formano tra l'acroleina e le basi nucleotidiche alterano profondamente la struttura del DNA.

Analizzando gli addotti ciclici dG-acroleina, che sono i più frequenti, è possibile notare che questi impediscono alle posizioni N-1 e $-NH_2$ della base di instaurare legami ad idrogeno con la complementare 2'-deossicitidina presente sul filamento opposto del DNA, ostacolando la formazione della struttura ad α -elica. Di conseguenza si ha il blocco della replicazione e ciò può provocare lesioni potenzialmente mutageniche. Anche la forma aperta di tali addotti ha la capacità di modificare il DNA; infatti, essi possono subire un'addizione al gruppo aldeidico libero da parte di un'altra base, di solito una 2'-

deossiguanosina, presente sullo stesso filamento o sul filamento opposto del DNA, dando luogo ad un *cross-link* intra o inter-catena di tipo carbinolamminico. Quest'ultimo può deidratare ad un forma imminica e ciclizzare per formare un pirimidopurinone¹⁴ (**Figura 5.1.4**).

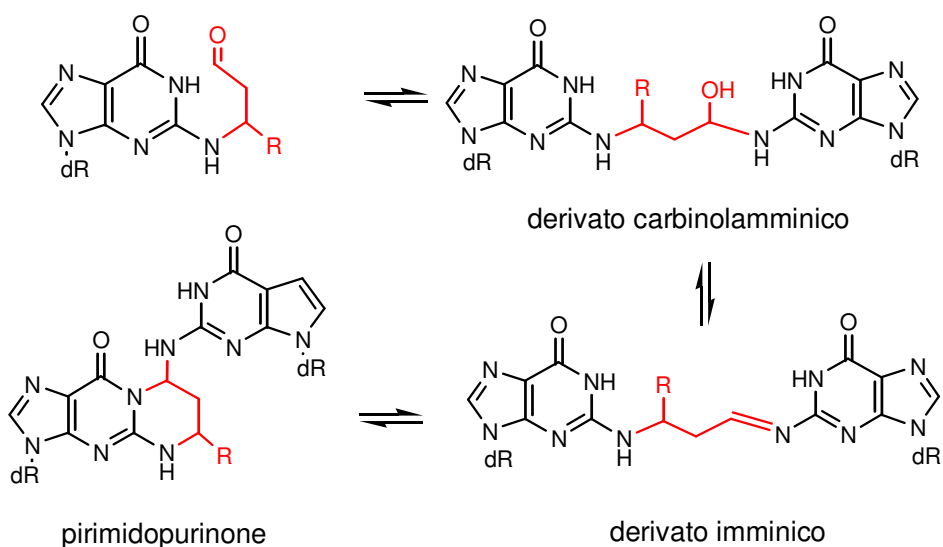


Figura 5.1.4: Possibili *cross-link* tra 2'-deossiguanosine.

Alcuni studi hanno dimostrato che in un DNA a singolo filamento l'8-OHPdG esiste in maniera predominante nella forma ciclica; l'esistenza della forma aciclica è stata dimostrata dall'isolamento dell'addotto N²-3-idrossipropil-dG in presenza di agenti riducenti¹⁵ (**Figura 5.1.5**).

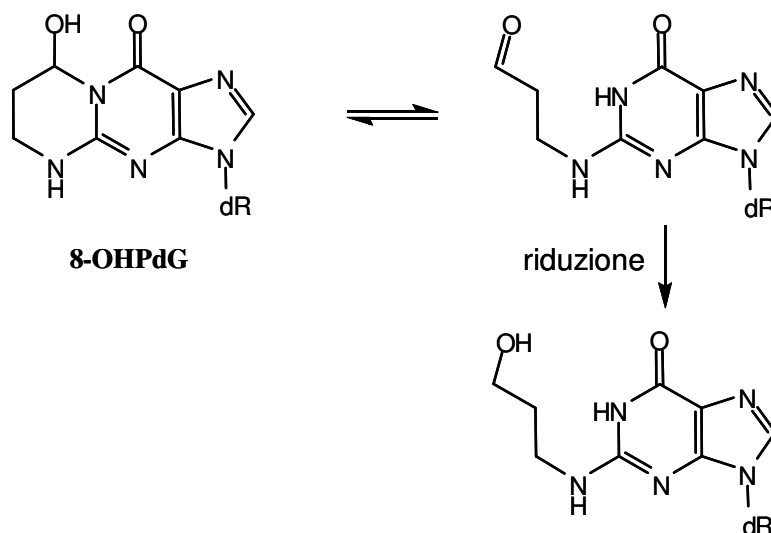


Figura 5.1.5: Riduzione dell'8-OHPdG.

In vivo sono stati condotti studi di replicazione usando i vettori pMS2 e cellule COS-7 che confermano che le DNA polimerasi nella maggior parte dei casi inseriscono la dC appaiandola con l'8-OHPdG e che l'introduzione di questa base modificata, quindi, non blocca la replicazione in maniera significativa (anche se può avere un effetto pro-mutagenico).

La bassa mutagenicità dell'8-OHPdG è ben differente da altri derivati esociclici della guanina quando inseriti in una stessa sequenza. Il PdG (1,*N*²-propano-2'-deossiguanosina) e l'M₁G (pirimido[1,2- α]purin-10(3*H*)-one), uno dei prodotti di alchilazione sulla dG di un'altra aldeide α,β -insatura molto reattiva, la malonaldeide¹⁶ (**Figura 5.1.6**), inducono sostituzioni nell'accoppiamento tra le basi e mutazioni sia *in vivo* che *in vitro*¹⁷.

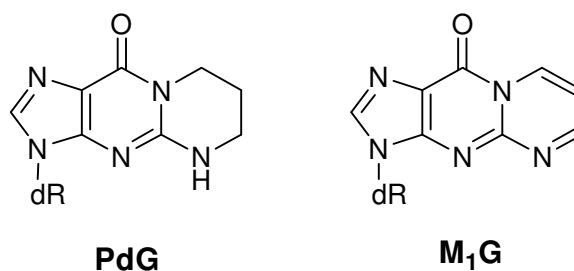


Figura 5.1.6: *Struttura del PdG e dell'M₁G.*

La differenza strutturale tra il PdG e l'OHPdG è l'assenza di un gruppo ossidrilico nel primo addotto, mentre l'M₁G differisce dall'HOPdG per il carattere π dell'anello esociclico che gli conferisce fluorescenza e idrofobicità, oltre alla mancanza del gruppo ossidrilico. Una possibile spiegazione della minore mutagenicità dell'8-OHPdG è che la sua forma aperta può conservare il normale appaiamento con la dC. Il PdG, invece, non essendo in equilibrio con una forma aperta è risultato essere decisamente più dannoso e quindi più mutagenico. Da ciò si può dedurre che la forma aperta di queste molecole è meno mutagenica di quella chiusa. Studi NMR più recenti, effettuati da *de los Santos e collaboratori*¹⁸, hanno dimostrato che anche l'8-HOPdG può esistere nella forma aperta e che in questo stato in un DNA a doppia elica *in vivo* la molecola si appaia effettivamente con la dC mediante interazioni di tipo Watson-Crick adottando un'orientazione *anti* attorno all'angolo torsionale formato con la porzione glicosidica (**Figura 5.1.7**).

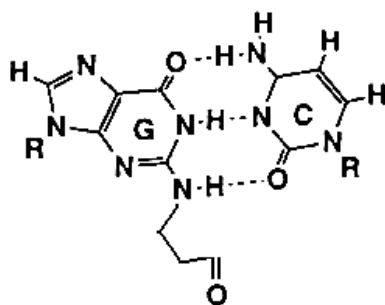


Figura 5.1.7: *Formazione della coppia C-G Watson-Crick tra la 2'-deossicitidina e l'8-OHPdG.*

Questo appaiamento non induce una distorsione nel DNA e potrebbe essere il motivo della minore induzione del blocco della sintesi del DNA da parte di tale addotto rispetto al PdG, che, non essendo in equilibrio con una forma aperta, induce maggiormente errori nella sintesi del DNA¹⁹. La mutagenicità dell'acroleina è attribuita principalmente all'addotto 6-HOPdG, che mostra, infatti, una mutagenicità superiore rispetto al suo regioisomero. La spiegazione può essere attribuita al fatto che anche in forma aperta questa molecola presenta l' N^1 bloccato, il che ostacola l'appaiamento corretto con la dC (**Figura 5.1.8**).

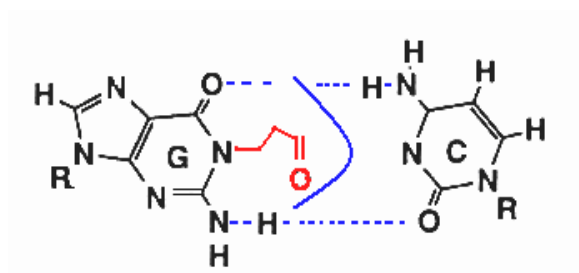


Figura 5.1.8: *Il legame dell'acroleina in posizione N^1 della dG nell'addotto 6-OHPdG impedisce l'appaiamento secondo Watson Crick nella doppia elica di DNA.*

5.2 Effetto del γ idrossipropano-2'-deossiguanosina sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica umana d(TTAGGG)₄

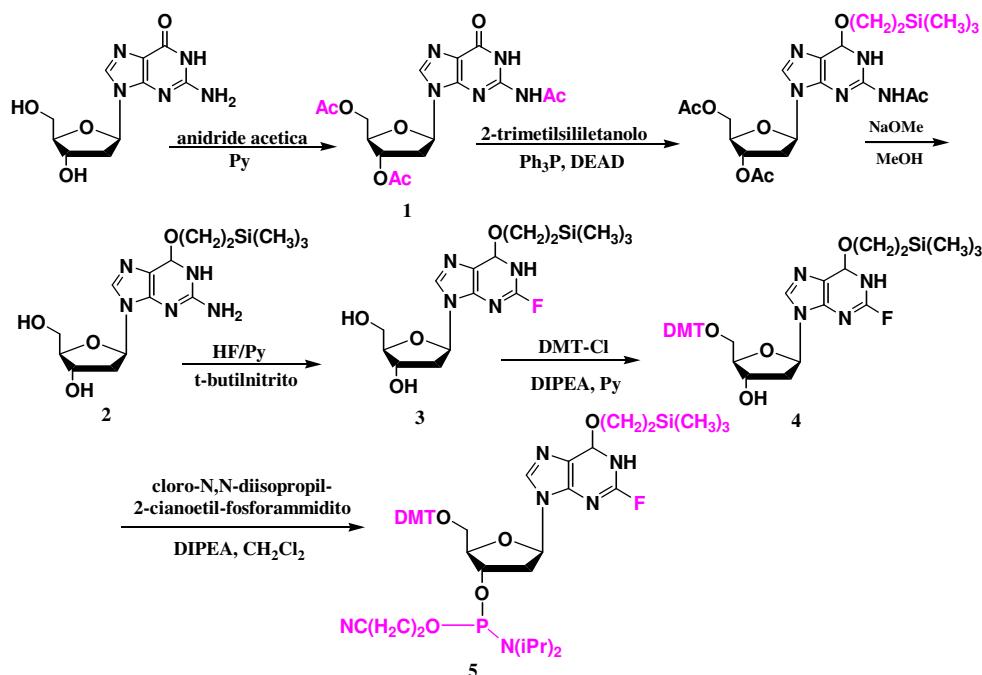
Il mio lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca atto a determinare la possibile influenza dell'acroleina sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica umana d(TTAGGG)₄.

In principio ho intrapreso un preliminare studio strutturale concernente gli effetti prodotti sulla conformazione quadruplex monomolecolare assunta da oligonucleotidi a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ contenenti un derivato γ -OHPdG. A tale proposito sono stati sintetizzati tre oligonucleotidi modificati, **a**, **b** e **c** (**Tabella 5.2.1**), aventi la sequenza della ripetizione telomerica 5'TTAG_aG_bG_cTTAGGGTTAGGGTTAGGG^{3'}, nella quale il derivato modificato della dG, il γ -OHPdG, è stato introdotto in differenti posizioni. L'oligonucleotide **d** corrisponde alla sequenza del telomero umano non modificata, capace di formare strutture quadruplex monomolecolari, come mostrato da tecniche spettroscopiche²⁰ e cristallografiche²¹.

Tabella 5.2.1: Posizione specifica del γ -OHPdG nella sequenza telomerica
 $5'$ TTAG_aG_bG_cTTAGGGTTAGGGTTAGGG $3'$

ON	G _a	G _b	G _c	T _m (Na ⁺)	T _m (K ⁺)
a	γ -OHPdG	dG	dG	65	71
b	dG	γ -OHPdG	dG	54	73
c	dG	dG	γ -OHPdG	63	72
d	dG	dG	dG	67	72

La procedura sintetica per l'ottenimento dei tre ON modificati **a-c** ha previsto in primo luogo la sintesi del derivato 2-fluoro- O^6 (trimetilsililetil)-2'-deossinosina secondo lo **schema 5.2.1**.

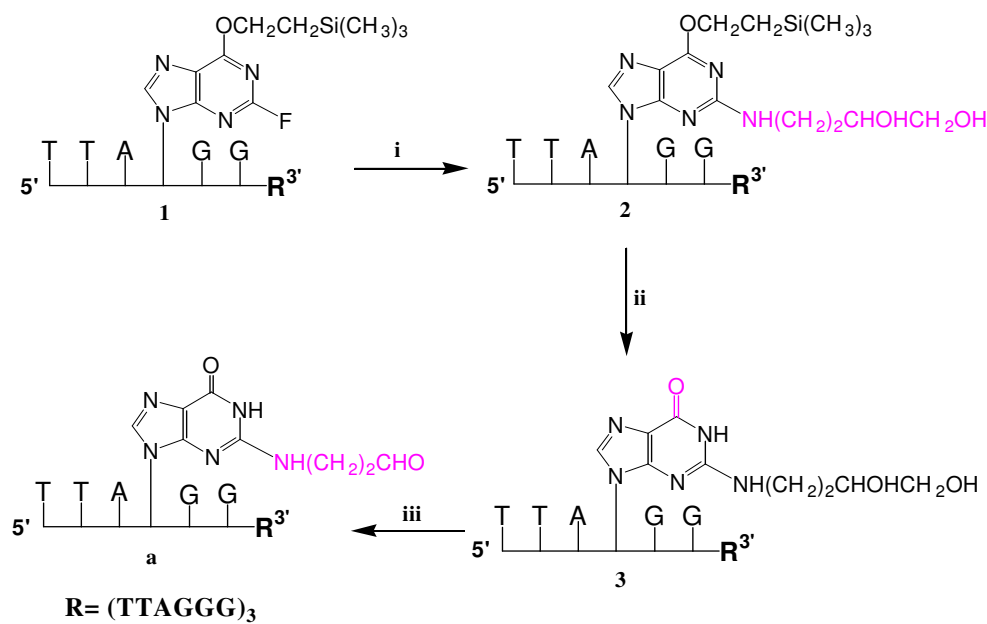


Schema 5.2.1: Procedura sintetica per l'ottenimento del derivato 2-fluoro- O^6 (trimetilsililetil)-2'-deossinosina e successiva derivatizzazione come 5'- O -DMT e 3'-fosforammidito.

Tale fluoro-derivato è stato successivamente derivatizzato come 5'-O-DMT e 3'-fosforammidito e inserito nelle tre sequenze oligonucleotidiche, nelle posizioni desiderate, mediante sintesi in fase solida utilizzando il protocollo classico del fosforammidito.

Gli oligonucleotidi sono stati preparati attraverso la procedura sintetica scoperta da Harris e collaboratori^{15,22} con piccole modificazioni. La procedura generale, riportata nello **schema 5.2.2** per **a**, è basata sulla sintesi in fase solida (usando N-PAC fosforamiditi) dell'oligonucleotide **1**, contenente il residuo 2-fluoro-O⁶(trimetilsililetil)-2'-deossinosina opportunamente funzionalizzato, che è stato convertito nell'oligonucleotide **3** mediante trattamento con 4-ammino-1,2-butandiolo e successiva rimozione del gruppo O⁶-TMSE dal residuo dG modificato. La reazione di ossidazione sull'oligonucleotide **3** con NaIO₄ ha condotto in definitiva al desiderato oligonucleotide **a**.

Analoga procedura si eseguita per l'ottenimento degli altri due ON modificati **b** e **c**.



Schema 5.2.2: Modificazione post-sintetica dell'oligonucleotide **1** contenente un residuo di 2-fluoro-2'-deossiosina. Reagenti e condizioni: (i) 4-ammino-1,2-butandiolo in DMSO, 50°C, 5h; (ii) acido acetico 0.1M, T_{amb} , 2.5h; (iii) NaIO_4 , T_{amb} , 10 min.

In particolare, dopo la sintesi in fase solida, l'oligonucleotide **1** contenente un residuo di 2-fluoro-2'-deossiosina è stato prima staccato dal supporto solido e deprotetto mediante trattamento con NaOH (0.1M, T_{amb} , 12h) e poi purificato mediante HPLC usando una colonna a scambio ionico. L'oligonucleotide **1** purificato è stato fatto di seguito reagire con 4-ammino-1,2-butandiolo²³ (DMSO, 50°C, 5h) ed isolato mediante precipitazione in etere dietilico. Il residuo solido anidrificato è stato sciolto in acqua e ulteriormente deprotetto alla funzione O^6 mediante trattamento con

acido acetico (0.1M, T_{amb} , 2.5h) per ottenere l'oligonucleotide **3**. Il pH della soluzione è stato portato a 7.0 e la miscela è stata purificata mediante HPLC a fase inversa usando una colonna RP18. Quest'ulteriore stadio di purificazione è stato necessario perché la reazione dell'oligonucleotide **1** con l'ammina causa una parziale degradazione di **2**, generando prodotti secondari a sequenza più corta, la cui presenza può essere ridotta usando un minore eccesso di ammina rispetto a quella riportata in letteratura²⁴ (ON/4-ammino-1,2-butandiolo 1:8).

In definitiva, l'oligonucleotide **3** è stato convertito nel desiderato prodotto **a** mediante ossidazione con NaIO_4 (tampone fosfato, T_{amb} , 10 min) seguita da purificazione *standard*. Usando la descritta procedura sono state ottenute 15 OD_{260} (*optical density*) del prodotto finale **a** partendo da 30 OD_{260} dell'oligonucleotide **1**. L'introduzione del residuo di dG modificato negli oligonucleotidi **a-c** è stato confermato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (in positivo). Per gli oligonucleotidi **a-c** è stata calcolata una massa di 7627.3 e i valori di massa trovati sono per l'ON **a** ($\text{M}+\text{Na}^+$) 7650.9; per l'ON **b** ($\text{M}+\text{Na}^+$) 7651.3; per l'ON **c** ($\text{M}+\text{Na}^+$) 7649.7 . Per l'ON **d** la massa calcolata è di 7571.3, quella trovata ($\text{M}+\text{Na}^+$) è pari a 7594.8 .

Studi strutturali mediante spettroscopia CD ed esperimenti elettroforetici

La capacità degli oligonucleotidi **a-c** di ripiegarsi in una struttura quadruplex monomolecolare, in tampone Na^+ , è stata valutata mediante spettroscopia CD ed esperimenti elettroforetici. La **Figura 5.2.1** mostra gli spettri CD degli oligonucleotidi **a-d** (registrati dai 200 ai 320 nm a 20°C e in tampone Na^+ a pH neutro) caratterizzati da un effetto Cotton positivo e negativo rispettivamente a 295 e 265 nm.

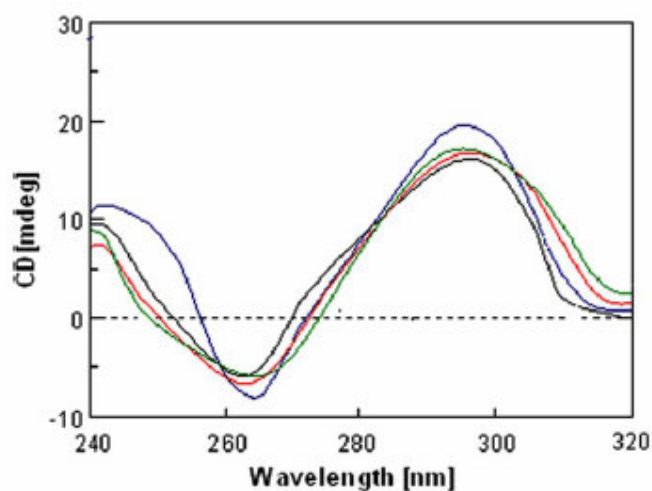


Figura 5.2.1: *Profili CD degli oligonucleotidi a-d, a (rosso); b (blu); c (verde) e d (nero) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di NaCl e 5 mM di MgCl₂ a 20°C.*

Com'è evidente, i profili CD degli ON modificati **a-c** sono analoghi a quello registrato per la controparte naturale **d**.

Questi dati indicano che gli oligonucleotidi **a-d** assumono una struttura quadruplex monomolecolare molto simile e ciò è stato anche supportato da esperimenti elettroforetici eseguiti in condizioni non denaturanti, che hanno mostrato per gli oligonucleotidi **a-d** una mobilità elettroforetica pressoché simile (**Figura 5.2.2**).

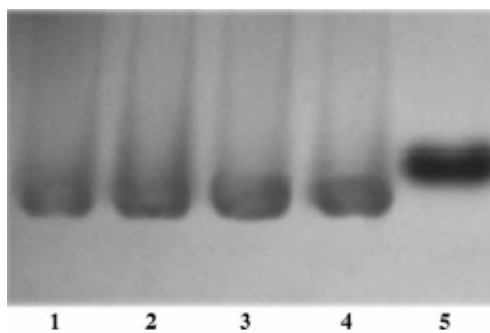


Figura 5.2.2: EMSA su gel nativo al 12% contenente 70 mM di NaCl a 25°C: linea 1 ON **d**; linea 2 ON **a**; linea 3 ON **b**; linea 3 ON **c** e linea 5 ON 12 mer con sequenza $d(T)_{12}$.

Infatti, come mostrato in figura, gli oligonucleotidi **a-d**, essendo ripiegati in una struttura quadruplex monomolecolare, migrano più velocemente di un ON più corto, $(dT)_{12}$, usato come riferimento²⁵.

La stabilità termica degli oligonucleotidi **a-d** è stata valutata mediante esperimenti CD di denaturazione termica a 295 nm, registrati incrementando la temperatura con un intervallo di 0.5°C/min (**Figura 5.2.3**).

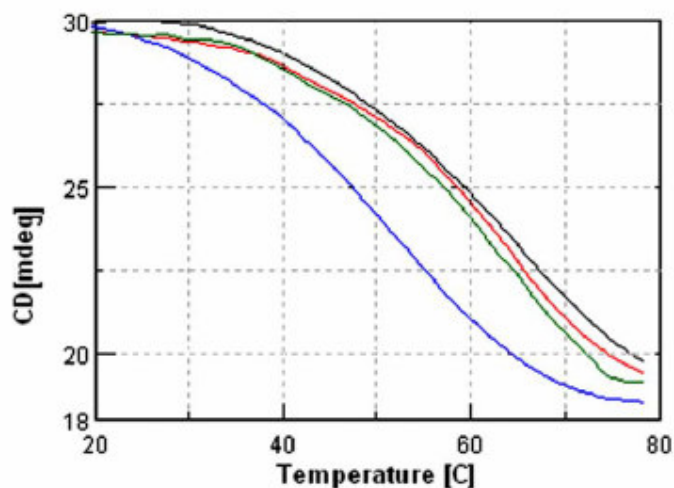


Figura 5.2.3: Profili CD melting degli ON **a-d** in Na^+ ; **a** (rosso) $T_m=65^\circ\text{C}$; **b** (blu) $T_m=54^\circ\text{C}$; **c** (verde) $T_m=63^\circ\text{C}$ e **d** (nero) $T_m=67^\circ\text{C}$.

Le temperature di *melting* (T_m) trovate per gli ON **a** e **c** sono risultate pressoché simili a quella dell'ON **d** non modificato, con valore pari a 67°C , mentre per l'ON **c** è stata osservata una significativa diminuzione della T_m pari a 54°C .

Questi risultati possono essere spiegati assumendo che gli ON **a-c** adottano, in tampone Na^+ , una struttura quadruplex monomolecolare molto simile (**Figura 5.2.4**), descritta per la sequenza telomerica umana $[\text{d}(\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3)]^{20}$, con quattro segmenti GGG coinvolti nella formazione di tre tetradi di G e di tre segmenti TTA che formano tre *loop*, due laterali ed uno diagonale.

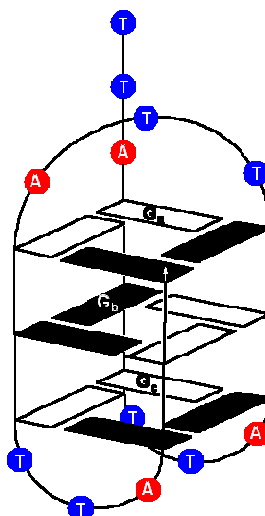


Figura 5.2.4: Rappresentazione schematica della struttura quadruplex; i rettangoli neri e bianchi rappresentano rispettivamente G-syn e G-anti. Le posizioni della dG modificata negli ON sono indicati con G_a , G_b e G_c .

In tale struttura i filamenti adiacenti risultano essere antiparalleli fra loro e i residui dG in ciascuna tetradde assumono un orientazione *syn-syn-anti-anti*. Di conseguenza, i residui dG_a , dG_b e dG_c dovrebbero adottare rispettivamente conformazioni *anti-syn-anti*. D'altra parte, è ragionevole supporre che la presenza di un gruppo ingombrante nella posizione N^2 del residuo dG modificato, potrebbe favorire un orientazione *anti* rispetto al legame N-glicosidico (**Figura 5.2.5**).

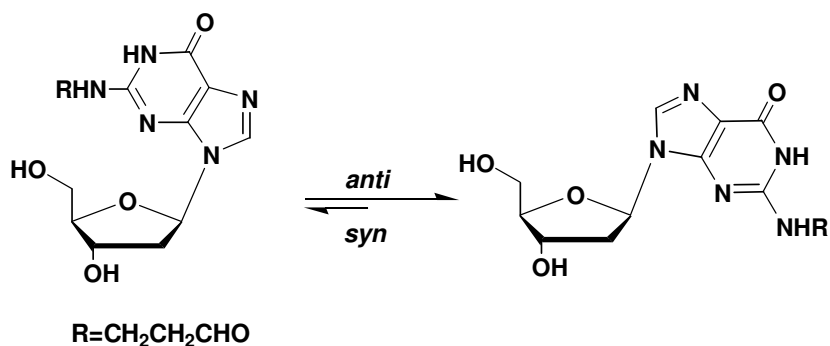


Figura 5.2.5: Conformazioni *syn* e *anti* del derivato N^2 -acroleina- dG.

Quindi, mentre negli ON **a** e **c**, per cui ci si aspetta che il residuo dG modificato adotti una conformazione *anti*, la presenza del gruppo propanale in posizione N² non produce cambiamenti della stabilità della struttura quadruplex, nel caso dell'ON **b** ciò porta a una destabilizzazione della conformazione, poiché la dG modificata deve assumere un'orientazione *syn*.

Un rilevante studio fisiologico della sequenza telomerica umana [d(AGGG(TTAGGG)₃)] ha dimostrato l'assenza di una sua predominante conformazione definita in presenza di ioni K⁺. Infatti, una struttura quadruplex parallela¹³, trovata in un cristallo contenente K⁺, coesiste probabilmente con forme addizionali, inclusa la struttura ritrovata in tampone Na⁺, come suggerito da Phan e Patel²⁶.

Tuttavia, commenti di natura puramente qualitativa possono essere tracciati dagli studi di spettroscopia CD degli oligonucleotidi **a-d**, eseguiti in tampone K⁺.

Innanzitutto, i profili CD degli ON **a-c** sono pressoché sovrapponibili a quello ottenuto per **d**, indicando che probabilmente anche per gli ON modificati ci potrebbe essere un equilibrio tra più conformazioni in presenza di ioni K⁺ (**Figura 5.2.6**).

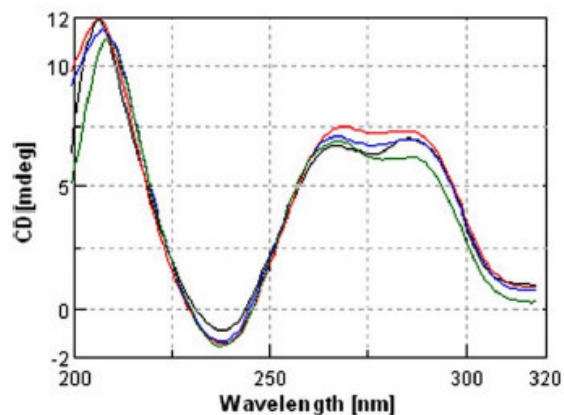


Figura 5.2.6: Profili CD degli oligonucleotidi **a-d**, **a** (rosso); **b** (blu); **c** (verde) e **d** (nero) in tampone fosfato 5 mM contenente 140 mM di KCl e 5 mM di MgCl₂ a 20°C.

In secondo luogo, i valori di T_m degli ON **a-c** sono molto vicini a quello trovato per **d** ($T_m=72^\circ\text{C}$) com'è evidente dalla **Figura 5.2.7**.

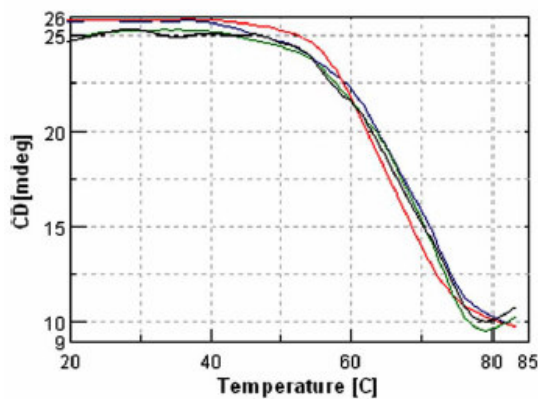


Figura 5.2.7: Profili CD melting degli ON **a-d** in K^+ ; **a** (rosso); **b** (blu); **c** (verde) e **d** (nero); tutti i valori di T_m sono circa di 72°C .

Questi risultati, sebbene non conclusivi, sono coerenti con la precedente ipotesi fatta riguardo le strutture in Na^+ , considerando il fatto che la struttura nel cristallo, presente in K^+ , è caratterizzata da

tutte le guanosine in una conformazione *anti* (**vedi sezione quadruplex**).

Conclusioni

Dagli studi eseguiti mediante tecniche spettroscopiche CD ed elettroforetiche su gel nativo, è stato possibile evidenziare la capacità degli oligonucleotide modificati **a-c** di conservare la struttura quadruplex monomolecolare. La modifica introdotta non induce variazioni di rilievo da un punto di vista strutturale. Tuttavia i reali effetti prodotti a livello biologico potrebbero interessare il riconoscimento specifico da parte di importanti proteine. Dall'uso della strategia di sintesi che prevede una modificazione post-sintetica è stato possibile evidenziare che questa strategia non è del tutto opportuna per sequenze telomeriche, infatti dalla reazione con 4-ammino-1,2-butandiolo si ottengono corti oligonucleotidi corrispondenti a scissioni della catena 24mer in corrispondenza della prima timina della ripetizione TTAGGG. Diminuzioni delle concentrazioni di ammina utilizzate per la reazione non hanno prodotto esiti positivi poiché la reazione non decorre a concentrazioni di ammina inferiori a 5mg/ml in DMSO utilizzato come solvente.

Studi più accurati sulla disposizione dell'unità di acroleina all'interno della quadruplex e della sua influenza su tali strutture possono

ottenersi mediante l'applicazione di tecniche NMR ma ciò necessita l'ottenimento di quantità maggiori di oligonucleotide modificato che potrà ottenersi mediante una modifica al protocollo utilizzato per questi studi.

Procedure sperimentali

Sintesi del derivato N²,3',5'-Triacetil-2'-deossiguanosina (1)

5 grammi di 2'-deossiguanosina sono sciolti in 30 ml di piridina anidra e alla sospensione sono aggiunti, sotto agitazione, 5 ml di anidride acetica. La miscela di reazione è posta sotto agitazione magnetica a 100 °C per circa 4 h. Il controllo TLC in CHCl₃:CH₃OH 85:15 v/v mostra la completa conversione del substrato in un prodotto ad R_f 0.75. Si aggiungono 5 ml di metanolo per distruggere l'eccesso di anidride acetica. La miscela risultante è seccata sotto vuoto e cromatografata mediante colonna impaccata con gel di silice sospeso in CHCl₃:CH₃OH 94:6 v/v ed eluita con un gradiente di CH₃OH in CHCl₃. Le frazioni eluite con 9:1 CHCl₃:CH₃OH, concentrate sotto vuoto, danno 7.1 g del prodotto triacelitato **1**. I dati spettroscopici e di massa coincidono con quelli riportati in letteratura¹⁹.

Sintesi del derivato O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossiguanosina (2)

La N²,3',5'-Triacetil-2'-deossiguanosina (5.11g, 13mmol) è stata anidrificata sotto vuoto per 24 h a 78°C. In un pallone a tre colli,

collegato ad un condensatore a reflusso, sono stati caricati **1**, trifenilfosfina (6.82 g, 26.0 mmol) e diossano anidro (430 ml). La sospensione è stata mantenuta sotto atmosfera di argon e riscaldata a 100°C con bagno ad olio. La soluzione di colore arancio pallido è stata tenuta sotto agitazione magnetica per 5 minuti e ad essa sono stati aggiunti contemporaneamente il 2-trimetilsililetanolo (3.08g, 26.0 mmol) e il dietilazodicarbossilato (4.1ml, 26.0 mmol). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 15 min a 100°C e lasciata raffreddare a temperatura ambiente per 2 h. La miscela di colore arancio è stata concentrata sotto vuoto per ottenere un olio rosso viscoso. Il residuo oleoso è stato dissolto in metanolo anidro (120 ml) e trasferito in una soluzione di metossido di sodio in metanolo (0.35 M, 200 ml). La soluzione è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e sotto atmosfera di argon per 7 h. E' stato aggiunto acido acetico glaciale (6.23 ml, 109 mmol) dissolto in acqua (30 ml), e la miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto per dare una sospensione rossa. Il residuo è stato sospeso in diclorometano (100 ml) e lavato con acqua (40 ml). La fase acquosa è stata estratta con CH₂Cl₂ (5x100ml) e le fasi organiche sono state unite e concentrate sotto vuoto. L'olio rosso ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice usando un gradiente di CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (da 97.8:2:0.2 a

94.8:5.0:0.2) e ottenendo **2** come una polvere di colore giallo pallido (4.23 g, 89%): mp 66-68 °C, TLC R_f 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1).

¹H NMR (MeOH-*d*₄) δ 8.00 (s, 1H, H8), 6.30 (dd, 1H, H1'), 4.61-4.53 (m, 3H, OCH₂CH₂Si, H3'), 4.03 (q, 1H, H4'), 3.83 (dd, 1H, H5'), 3.73 (dd, 1H, H5''), 2.76 (m, 1H, H2'), 2.34 (m, 1H, H2''), 1.21 (m, 2H, CH₂Si), 0.08 (s, 9H, Me₃Si). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.64 (s, 1H, H8), 6.16 (dd, 1H, H1'), 5.04 (s, 2H, NH₂), 4.56 (d, 1H, H3'), 4.39 (t, 2H, OCH₂CH₂Si), 4.07 (br, 1H, H4'), 3.70 (m, 2H, H5' e H5''), 2.73 (m, 1H, H2'), 2.21 (m, 1H, H2''), 1.02 (t, 2H, CH₂Si), -0.10 (s, 9H, Me₃Si). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 161.18 (C aromatico), 158.46 (C aromatico), 151.86 (C aromatico), 138.49 (C aromatico), 116.23 (C aromatico), 88.71 (C4'), 86.58 (C1'), 72.15 (C3'), 64.62 (OCH₂CH₂Si), 62.90 (C5'), 39.85 (C2'), 17.09 (CH₂Si), -1.83 (Me₃Si). (M+H⁺) trovato 368.17.

Sintesi del derivato 2-Fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (3)

Il derivato O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossiguanosina (0.53 g, 1.44 mmol), anidrificato sotto vuoto a 64°C per 20h, è stata trasferita in un tubo conico di polipropilene (50 ml) munito di sistema di agitazione e di un setto di gomma posti sotto atmosfera di argon. Ad un secondo tubo conico di polipropilene (50 ml), munito di sistema di agitazione e di setto, sotto atmosfera di argon, è stata aggiunta la piridina anidra

(5.42 ml). Entrambi i tubi sono stati posti in un bagno raffreddante (ghiaccio secco-acetone), e la temperatura è stata abbassata ad un valore compreso tra -35 e -40°C. La soluzione di acido fluoridrico e piridina (soluzione al 70%, 9.65 ml, Aldrich Chemical Co.) è stata aggiunta, in 3 minuti, al tubo contenente la piridina in modo da formare una soluzione HF-piridina al 45%. Questa soluzione è stata posta sotto agitazione magnetica e sotto atmosfera di argon per 15 minuti ad una temperatura tra -35 e -40 °C. La soluzione limpida ottenuta è stata aggiunta lentamente a **2** e mantenuta sotto agitazione tra -35 e -40 °C per 5 minuti. Alla miscela di reazione è stato aggiunto, in 5 minuti, il *t*-Butilnitrito (0.43 ml, 36 mmol) mantenendo la temperatura del bagnetto a -35 °C. La miscela di reazione rossa è stata sottoposta ad agitazione magnetica per 25 minuti, sotto flusso d'argon. La soluzione è stata cautamente trasferita, in 2 minuti, in una soluzione di K₂CO₃ (23 g in 34 ml di H₂O) mantenuta a 0°C ed è stata estratta con acetato di etile (5x40 ml). Le fasi organiche, riunite, sono state concentrate sotto vuoto ed il residuo oleoso rosso è stato posto sotto vuoto spinto per tutta la notte. La cromatografia su colonna impaccata con gel di silice, usando un gradiente di CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (da 95:4:1 a 90:9:1), ha fornito la 2-Fluoro-O⁶(Trimetilsililetil)-2'-deossiinosina (0.51g, 95%): mp 120-122 °C, TLC R_f 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1). ¹HNMR (MeOH-*d*₄) δ 8.46

(s,1H, H8), 6.41 (t, 1H, H1'), 4.67-4.72 (m, 2H, OCH₂CH₂Si), 4.56 (m, 1H, H3'), 4.02 (q, 1H, H4'), 3.81 (dd, 1H, H5''), 3.73 (dd, 1H, H5'), 2.77 (m, 1H, H2''), 2.44 (m, 1H, H2'), 1.26 (m, 2H, CH₂Si), 0.1 (s,9H, Me₃Si). **¹H NMR (CDCl₃)** δ 8.56 (s,1H, H8), 6.31 (t, 1H, H1') 5.35 (d, 1H, CHOH), 4.94 (t, 1H, CH₂OH), 4.64 (t, 2H, OCH₂CH₂Si), 4.40 (m, 1H, H3'), 3.87 (q, 1H, H4'), 3.55 (m, 2H, H5' e H5''), 2.68 (m, 1H, H2'), 2.32 (m, 1H, H2''), 1.20 (t, 2H, CH₂Si), 0.08 (s, 9H, Me₃Si). **¹³C NMR (CDCl₃)** δ 161.8 (C4), 142.4 (C8), 119.5 (C5), 88.0 (C4'), 83.8 (C1'), 70.5 (C3'), 66.1 (OCH₂CH₂Si), 61.4 (C5'), 39.3 (C2'), 16.9 (CH₂Si), -1.4 (Me₃Si). **¹⁹F NMR (MeOH-*d*₄)** δ-51.55. **¹⁹F NMR (CDCl₃)** δ-0.40. (M+H⁺) trovato 371.15.

Sintesi del derivato 5'-O-4,4'(Dimetossitritil)-2-fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (4)

La protezione dell'OH in 5' di **3** con 4,4'-dimetossitritile è stato condotta secondo le procedure *standard*. La 2-Fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (**3**) (200 mg, 0.54 mmol) è stata anidrificata mediante trattamento con piridina anidra (3x10 ml) e posta sotto vuoto per 90 min. La piridina anidra (20 ml) e diisopropiletilammina (DIPEA) (0.56 ml, 3.24 mmol) sono state aggiunte al pallone contenente **3** e la miscela è stata mantenuta sotto

agitazione magnetica in atmosfera di argon. La soluzione è stata raffreddata a 10°C, ed è stato aggiunto 4,4'-dimetossitritil-cloruro (728 mg, 2.15 mmol). La miscela di reazione è stata portata lentamente a temperatura ambiente e l'andamento della reazione è stato controllato mediante TLC. Dopo 15 h la miscela di reazione è stata trattata con metanolo anidro (0.052 ml, 1.3 mmol) e mantenuta sotto agitazione per 10 min per distruggere il dimetossitritil-cloruro non reagito. La miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto e il composto arancione ottenuto è stato ripreso con CH₂Cl₂ ed estratto con una soluzione acquosa al 10% di K₂CO₃ (2x50 mL). Le frazioni organiche, riunite, sono concentrate sotto vuoto e purificate mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice, usando un gradiente di CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (da 98:1.5:0.5 a 94.5:5.0:0.5), ottenendo il 5'-O-4,4'(Dimetossitritil)-2-fluoro-(O⁶-Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (305mg, 84%): TLC R_f 0.29 (CH₂Cl₂/MeOH, 9.8:0.2). ¹HNMR (MeOH-d₄) δ 8.29 (s, 1H, H8), 7.34-7.31 (m, 2H, aromatico), 7.22-7.12 (m, 7H, aromatico), 6.75-6.69 (m, 4H, aromatico), 6.38 (t, 1H, H1'), 4.69-4.61 (m, 3H, OCH₂CH₂Si e H3'), 4.13 (m, 1H, H4'), 3.73 (s, 3H, CH₃O), 3.72 (s, 3H, CH₃O), 3.41-3.37 (m, 1H, H5''), 3.27-3.24 (m, 1H, H5'), 2.97-2.92 (m, 1H, H2''), 2.50-2.45 (m, 1H, H2'), 1.28-1.24 (m, 2H, CH₂Si), 0.08 (s, 9H, Me₃Si). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 162.52 (C6), 158.45 (C aromatico), 157.87 (C2),

152.4 (C4), 144.60 (C aromatico), 140.83 (C8), 135.61 e 135.55 (C aromatico), 129.92 (C aromatico), 127.99 e 127.74 (C aromatico), 126.79 (C aromatico), 120.11 (C5), 113.06 (C aromatico), 86.46 (C4'), 86.40 [PhC(PhOMe)₂], 84.57 (C1'), 72.00 (C3'), 66.68 (OCH₂CH₂Si), 63.77 (C5'), 55.05 [(CH₃O)₂], 40.15 (C2'), 17.46 (CH₂Si), -1.55 (Me₃Si). ¹⁹F NMR (MeOH-*d*₄) δ -51.13. ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ -50.40. (M+H⁺) trovato 673.28.

Sintesi del derivato 3'-O-[(N,N-diisopropilammino)-(2-cianoetil) fosfinil]-5'-O-4,4'(Dimetossitritil)-2-fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (5)

Il 5'-O-4,4'-(Dimetossitritil)-2-fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (180 mg, 0.26mmol) è stato anidrificato mediante trattamento con piridina anidra (2x10 ml) e posta sotto vuoto per 3 h. A una soluzione del derivato **4** in CH₂Cl₂ anidro (5ml) e DIPEA (1.04mmol, 4eq) è stata aggiunta nel pallone di reazione il cloro-N,N-diisopropil-2-ciano-etilfosforammidito (125 mg, 0.39 mmol, 1.5 eq). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione, in atmosfera di argon ed a temperatura ambiente, per 2 h, è stata successivamente trasferita in una soluzione satura di NaHCO₃ (30 ml) e, infine, estratta con CH₂Cl₂ (5x40 ml). La porzione organica è stata concentrata sotto vuoto e il residuo giallo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice

(CH₂Cl₂/EtOAc/piridina, 69:30:1) per dare il derivato **5** (200 mg, 88%): TLC R_f 0.88 (CH₂Cl₂/MeOH. 9.8:0.2). **¹H NMR (MeOH-d₄)** δ 8.09 (s, 1H, H8), 7.36-7.32 (m, 2H, H aromatico), 7.27-7.16 (m, 7H, H aromatico), 6.79-6.73 (m, 4H, H aromatico), 6.32 (m, 1H, H1'), 4.82 (m, 1H, H3'); 4.65 (m, 2H, OCH₂CH₂Si); 4.18 (m, 1H, H4'), 3.72 (m, 8H, (CH₃O)₂ e H5', H5''), 3.63-3.56 (m, 2H, N[CH(CH₃)₂]₂), 3.31-3.27 (m, 2H, POCH₂), 2.97-2.92 (m, 1H, H2'), 2.63 (t, 1H, CH₂CN), 2.58 (m, 1H, H2''), 2.53 (t, 1H, CH₂CN), 1.23 (m, 2H, CH₂Si), 1.16 (m, 12H, N[CH(CH₃)₂]₂), 0.09 (s, 9H, Me₃Si). **¹H NMR (CDCl₃)** δ 7.98 e 7.96 (s, 1H, H8), 6.60 (t, 1H, H1'), 5.35 (m, 1H, H3'), 4.48 (t, 2H, OCH₂CH₂Si), 4.20 (m, 1H, H4'), 3.75 e 3.60 (m, 2H, H5' e H5''), 3.67 e 3.66 (s, 6H, (CH₃O)₂), 3.55 (m, 2H, N[(CHMe₂)]₂), 3.50 e 3.30 (m, 2H, POCH₂), 2.76 e 2.53 (m, 2H, H2' e H2''), 2.37 (t, 2H, CH₂CN), 1.18 (t, 2H, CH₂Si), 1.06 (m, 12H, N[CH(CH₃)₂]₂), 0.04 (s, 9H, Me₃Si). **¹³C NMR (CDCl₃)** δ 162.40 (C6), 158.30 (C aromatico), 157.71 (C2), 152.34 (C4), 144.31 (C aromatico), 140.74 (C8), 135.42 e 135.37 (C aromatico), 129.85 e 129.81 (C aromatico), 127.92 e 127.87 (C aromatico), 127.61 (C aromatico), 126.67 e 126.62 (C aromatico), 120.10 (C5), 117.39 e 117.25 (CN), 112.89 (C aromatico), 86.27 [PhC(PhOMe)₂], 85.80 (C4'), 85.58 (C4'), 84.47 (C1'), 73.79 (C3') e 73.33 (C3'), 66.50 (OCH₂CH₂Si), 63.28 e 63.13 (C5'), 58.18 e 58.09 (POCH₂), 54.97 e

54.94 [(CH₃O)₂], 43.05 e 42.73 (N[CH(CH₃)₂]₂), 39.17 e 39.15 (C2'), 24.50 e 24.25 (N[CH(CH₃)₂]₂), 20.19 e 20.01 (CH₂CN), 17.32 (CH₂Si), -1.64 (Me₃Si). ¹⁹F NMR (CH₃CN-*d*₃) δ -51.13 e -51.17. ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ -50.0 e -50.1. ³¹P NMR (CH₃CN-*d*₃) δ 149.96 e 149.82. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 146.6 e 146.5.

(M+H⁺) trovato 873.39.

Sintesi in fase solida del 24 mer a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄

L'ON a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ è stato sintetizzato mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β-cianoetilfosforamidito secondo il protocollo fornito dal costruttore. I fosforamiditi delle basi naturali e gli opportuni supporti solidi classici (CPG-5'-ODMT-nucleotide) sono stati acquistati dalla Primm. Dopo la sintesi in fase solida l'ON è stato distaccato dal supporto solido mediante trattamento con 3 ml di una soluzione acquosa di NH₃ al 33% e lasciata in stufa termostata a 55°C per una notte. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido eseguiti con H₂O bidistillata sono raccolti e seccati sotto vuoto. Il solido ottenuto è ridisciolti in H₂O, filtrato su filtro a membrana con pori da 0.22μm e purificato mediante cromatografia HPLC utilizzando una colonna

Nucleogen SAX a scambio ionico eluita con un gradiente lineare di 20mM di NaH_2PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00, (eluente A) e 20mM di NaH_2PO_4 e 1M di NaCl , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente. L'ON purificati è stato poi desalificato mediante cromatografia ad esclusione molecolare usando una colonna impaccata con BIOGEL P2-fine come supporto solido. La purezza dell'ON è stata controllata mediante HPLC a fase inversa ed elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide al 20% contenente 7M di urea. La concentrazione dell'oligonucleotide è stata determinata a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare $15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dA, $11700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per dG e $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per T. L'ON è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (in positivo) la massa calcolata è di 7571.3, quella trovata ($\text{M}+\text{Na}^+$) è pari a 7594.8 .

Sintesi in fase solida dei 24 mer a sequenza telomerica $\text{d}(\text{TTAGGG})_4$ contenenti il derivato 2-Fluoro- O^6 -(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina (1, 1' e 1'')

Sono stati sintetizzati tre ON modificati (1, 1' e 1'') a sequenza telomerica $\text{d}(\text{TTAGGG})_4$ contenenti un derivato 2-Fluoro- O^6 -(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina rispettivamente in posizione 4, 5 o 6 mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE

Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β -cianoetilfosforamidito secondo il protocollo classico fornito dal costruttore. I fosforamiditi delle basi naturali e gli N-PAC fosforamiditi sono stati acquistati dalla Primm, mentre il derivato 3'-O-[(N,N-diisopropilammino)-(2-cianotil)fosfinil]-5'-O-4,4'-(Dimetossitritil)-2-fluoro-O⁶-(Trimetil sililetil)-2'-deossinosina è stato opportunamente sintetizzato come precedentemente descritto. Per ciascuno dei tre oligonucleotidi sono stati utilizzati 40 mg di supporto solido CPG *high load* dG e 400 mg di fosforoamidito T *standard*, 550 mg di fosforoamidito N-PAC-G, 200 mg di fosforoamidito t-PAC-A e 50 mg del monomero sintetizzato (**5**) sciolti rispettivamente in 8, 11, 4 e 1 ml di acetonitrile anidro. Il protocollo standard del fosforoamidito è variato nello stadio di *capping*, per il quale è usato anidride tert-butilfenossiacetica/THF anziché anidride acetica/THF.

Terminata la sintesi, per effettuare il distacco dell'ON, la resina è stata trasferita in una *vial*, trattata con una soluzione di NaOH 0.1M per 12 h a temperatura ambiente. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido eseguiti con H₂O bidistillata sono raccolti, neutralizzati con una soluzione di acido acetico 0.1M e seccati sotto vuoto. Il solido ottenuto è ridisciolti in H₂O, filtrato su filtro a membrana con pori da 0.22 μ m e purificato mediante cromatografia

HPLC utilizzando una colonna Nucleogen SAX a scambio ionico eluita con un gradiente lineare di 20mM NaH₂PO₄, H₂O/CH₃CN 80:20, pH 7.00, (eluente A) e 20mM NaH₂PO₄ e 1M di NaCl, H₂O/CH₃CN 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente. Gli ON modificati sono stati eluiti tutti ad un tempo di ritenzione di 23', al 74% di B.

Gli ON purificati sono stati poi desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare usando una colonna impaccata con BIOGEL P2-fine come supporto solido. La concentrazione degli oligonucleotide sono state determinate a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare 11700 M⁻¹cm⁻¹ per dG, 8800 M⁻¹cm⁻¹ per T e 15400 M⁻¹cm⁻¹ per dA.

Reazione degli ON contenenti il derivato 2-Fluoro-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossinosina con 4-ammino-1,2-butandiolo e successiva rimozione del gruppo O⁶-TMSE (3, 3' e 3'')

Ciascuno dei tre ON modificati (1, 1' e 1'') è stato sciolto in 50 µl di diisopropilammina a cui sono stati aggiunti 100 µl di DMSO e 0.5 mg di 4-ammino-1,2-butandiolo. La reazione è tenuta sotto agitazione magnetica per 5 h a 50°C. La miscela di reazione viene diluita (1:200) aggiungendo etere dietilico, l'ON modificato viene così recuperato come precipitato, lavato sempre con etere dietilico e

seccato sottovuoto. Tale procedura ha portato all'ottenimento di tre ON modificati (2, 2' e 2'') a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ contenenti un derivato N²-3,4-diidrossibutil-O⁶-(Trimetilsililetil)-2'-deossiguanosina rispettivamente in posizione 4, 5 o 6. Il residuo viene sciolto in 500 µl di una soluzione di acido acetico 0.1M e lasciato per 2,5 h a temperatura ambiente per rimuovere il gruppo O⁶-TMSE. La miscela di reazione è stata poi neutralizzata con una soluzione di NaOH 0.1M e seccata sottovuoto. Tale procedura ha portato all'ottenimento dei tre ON modificati (3, 3' e 3'') a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ contenenti un derivato N²-3,4-diidrossibutil-2'-deossiguanosina rispettivamente in posizione 4, 5 o 6. Il solido ottenuto per ciascun oligonucleotide è ridisciolti in H₂O, filtrato su filtro a membrana con pori da 0.22µm e purificato mediante cromatografia HPLC utilizzando una colonna a fase inversa RP18 eluita con un gradiente di trietilammonio acetato 0.1M a pH 7.00 (A) e acetonitrile (B). Il programma di eluizione delle soluzioni utilizzato è riportato nella tabella seguente:

Programma di eluizione

Tempo	Soluzione A	Soluzione B
0 min	100%	0%
10 min	90%	10%
35 min	80%	20%
40 min	0%	100%
50 min	100%	0%

I tempi di ritenzione degli oligonucleotidi modificati **3**, **3'** e **3''** sono rispettivamente di 18,5, 18,1 e 17,9 minuti.

Reazione degli ON contenenti il derivato N²-3,4-diidrossibutil-2'-deossiguanosina con periodato di sodio per l'ottenimento degli ON a-c

1 mg (la concentrazione degli oligonucleotidi è stata calcolata mediante assorbimento UV a 260 nm utilizzando i coefficienti di estinzione molare 11700 M⁻¹ cm⁻¹ dG, 8800 M⁻¹ cm⁻¹ T, 15400 M⁻¹ cm⁻¹ dA) di ciascun oligonucleotide **3**, **3'**, e **3''** è stato disciolto in un ml di tampone fosfato a pH 7 (MgCl₂ 5mM, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ 30mM) a cui sono aggiunti 50µl di una soluzione 20 mM di NaIO₄ nello stesso tampone fosfato a pH 7. La miscela di reazione è stata fatta reagire a temperatura ambiente per 10 minuti. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia HPLC utilizzando una colonna a fase inversa RP18 eluita con un gradiente di trietilammonio acetato 0.1M a pH 7 (A) e acetonitrile (B), usando lo stesso programma di eluizione precedente. I tempi di ritenzione degli oligonucleotidi **a-c** di tabella **5.2.1** sono rispettivamente di 18,2, 17,9 e 17,2 minuti. Tale procedura ha portato all'ottenimento dei tre ON modificati (**a**, **b** e **c**) a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ contenenti un residuo γ-HOPdG rispettivamente in posizione 4, 5 o 6.

Gli ON **a**, **b** e **c** sono stati poi caratterizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (in positivo). Per gli oligonucleotidi **a-c** è stata calcolata una massa di 7627.3 e i valori di massa trovati sono per l'ON **a** ($M+Na^+$) 7650.9; per l'ON **b** ($M+Na^+$) 7651.3; per l'ON **c** ($M+Na^+$) 7649.7 .

Dicroismo circolare (CD) ed esperimenti di melting CD

La capacità degli oligonucleotidi **a-c** di ripiegarsi in una struttura quadruplex monomolecolare, in tampone Na^+ o K^+ , è stata dedotta dall'analisi dei loro spettri CD. I campioni per gli esperimenti CD degli oligonucleotidi modificati **a**, **b** e **c** e della controparte naturale, ON **d**, sono stati preparati alla concentrazione di 3×10^{-5} M, usando un tampone fosfato a pH 7.00 contenente 140mM di NaCl, 5mM NaH_2PO_4 e 5mM $MgCl_2$ per gli esperimenti in Na^+ , o 140mM di KCl, 5mM KH_2PO_4 e 5mM $MgCl_2$ per gli esperimenti in K^+ . I campioni così preparati sono stati sottoposti a processo di *annealing* attraverso riscaldamento a 90° C per 15 minuti e lento raffreddamento a temperatura ambiente per una notte.

Gli spettri CD delle quadruplex e le curve di *melting* sono stati registrati su uno spettropolarimetro JASCO 715, accoppiato a una cella programmabile, termoelettricamente controllata (PTC-348). Nell'acquisizione degli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 240 a 320 nm alla velocità di 5 nm min^{-1} , con una risposta di 16 s e

un'ampiezza di banda di 2 nm. Le misure sono state effettuate a 20°C utilizzando *cuvette* in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm, munite di tappo di teflon. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone fosfato in Na⁺ o K⁺. Ogni spettro riportato rappresenta la media di almeno tre scansioni.

Le curve di CD *melting* sono state registrate in funzione della temperatura da 20 a 80°C a 295 nm con una velocità di scansione di 0.5°C/min.

Esperimenti elettroforetici

La capacità degli oligonucleotidi **a-c** di ripiegarsi in una struttura quadruplex monomolecolare, in tampone Na⁺ o K⁺, è stata dedotta anche dall'analisi di esperimenti elettroforetici. I campioni sono stati preparati sciogliendo 0.1 OD₂₆₀ di ciascun oligonucleotide modificato **a**, **b** e **c** e di quello naturale **d** in 5 µl di tampone fosfato a pH 7.00 contenente 140mM di NaCl, 5mM NaH₂PO₄ e 5mM MgCl₂ per gli esperimenti in Na⁺, o 140mM di KCl, 5mM KH₂PO₄ e 5mM MgCl₂ per gli esperimenti in K⁺. I campioni così preparati sono stati sottoposti a processo di *annealing* attraverso riscaldamento a 90° C per 15 minuti e lento raffreddamento a temperatura ambiente per una notte. I campioni sono stati esaminati su gel nativo al 12% di poliacrilammide (19:1 acrilammide/N'N'-bis-metilen-acrilammide) contenente 70 mM di NaCl o KCl. La corsa elettroforetica è stata

eseguita a temperatura ambiente per tre ore utilizzando un voltaggio di 45V fornito da un apparecchio mini-protean III BIORAD munito di POWER PAC 3000, utilizzando come buffer di corsa TBE 1X (89mM di TRIS, 89mM di acido borico e 2mM di EDTA, pH 8.3) contenente 70 mM di NaCl o KCl.

5.3 Effetto dell'acroleina sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica d(TTAGGG)₄

Dallo studio precedente è stato dimostrato che il derivato N²-dG-acroleina, inserito in posizione 5 della sequenza telomerica d(TTAGGG)₄, induce una destabilizzazione della struttura quadruplex monomolecolare assunta dal telomero in presenza di ioni sodio. La conseguenza della destabilizzazione della struttura assunta dalla sequenza telomerica potrebbe avere un effetto rilevante circa la funzionalità e l'integrità del telomero *in vivo*. Alla luce di tale risultato, ho intrapreso uno studio successivo volto a verificare quali fossero i prodotti di alchilazione in seguito alla reazione dell'acroleina direttamente con la struttura quadruplex monomolecolare assunta dalla sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ in soluzione di ioni sodio.

Come riportato da Marnett e collaboratori²⁷, la formazione degli addotti tra la deossiguanosina ed aldeidi α - β insature è influenzata dalla struttura secondaria assunta dal DNA, cioè se esso è presente come singolo filamento, in doppia elica, in forma superavvolta, o in forma di plasmide linearizzato. Questo risultato è un'ovvia conseguenza dell'accessibilità dei siti di reazione presenti.

Come chiarito precedentemente, il terminale telomerico esiste *in vivo* sotto forma di complesso DNA-proteine che assicura la sua integrità e previene eventuali fenomeni di ricombinazione e di mutagenesi.

D'altra parte, studi recenti hanno dimostrato che i telomeri esistono *in vivo* in due differenti architetture, chiamate forma aperta e forma chiusa a seconda della fase del ciclo cellulare²⁸⁻³³. Il passaggio dall'uno all'altro stadio, il cui meccanismo non è stato ancora del tutto chiarito, produce un temporaneo incremento dell'esposizione della regione telomerica, ed è in questo stadio che i siti nucleofili presenti sulle basi puriniche potrebbero essere esposti per dare la reazione di alchilazione con elettrofili, quali le aldeidi α , β -insature. L'interazione di questi elettrofili con segmenti telomerici può essere utile per chiarire i meccanismi coinvolti nei processi di carcinogenesi indotti dall'acroleina.

Reazione dell'acroleina con la sequenza telomerica d(TTAGGG)₄

Al fine di valutare l'eventuale differenza in reattività tra la sequenza oligonucleotidica d(TTAGGG)₄ strutturata in quadruplex monomolecolare in soluzione di sodio e la stessa sequenza presente in forma *random coil*, l'oligonucleotide è stato fatto reagire con l'acroleina in due condizioni:

- in un caso l'oligonucleotide è stato disciolto in una soluzione tampone fosfato contenente NaCl e MgCl₂, la soluzione ottenuta è stata riscaldata a 80° per 15 minuti e, poi, lasciata raffreddare lentamente fino al raggiungimento della temperatura ambiente, per ottenere il ripiegamento dell'ON in quadrupla elica ed, infine, sottoposto a reazione con acroleina;
- nel secondo caso l'oligonucleotide è stato disciolto in acqua e direttamente sottoposto a reazione con acroleina.

I grezzi di reazione così ottenuti sono stati sottoposti a digestione enzimatica per trattamento con fosfodiesterasi I e fosfatasi alcalina, allo scopo di ottenere i singoli nucleosidi ed identificare gli eventuali addotti nucleoside-acroleina. L'idrolizzato enzimatico è stato quindi analizzato mediante cromatografia HPLC eseguita utilizzando una colonna a fase inversa RP-18 eluita con un gradiente acqua/acetonitrile (H₂O/ACN).

Nella **Figura 5.3.1** è riportato il cromatogramma corrispondente ai prodotti ottenuti dall'idrolisi enzimatica della sequenza $d(\text{T TAGGG})_4$ non trattata con acroleina utilizzato come cromatogramma di riferimento.

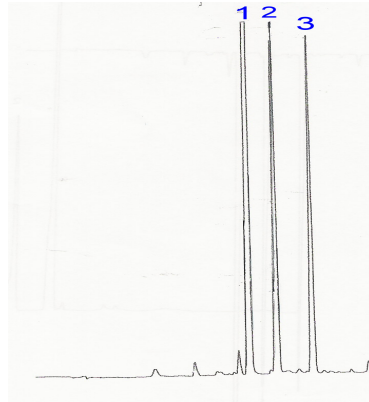


Figura 5.3.1: *Profilo cromatografico del prodotto della digestione enzimatica della sequenza $d(\text{T TAGGG})_4$.*

In esso sono presenti tre picchi principali:

- il picco 1 corrisponde alla 2'-deossiguanosina con un tempo di ritenzione (t_r) di 11.8 minuti, eluito al 8% di ACN;
- il picco 2 corrisponde alla timidina con un tempo di ritenzione (t_r) di 13 minuti, eluito al 9% di ACN;
- il picco 3 corrisponde alla 2'-deossiadenosina con un tempo di ritenzione (t_r) di 15 minuti, eluito al 10% di ACN.

Nella **Figura 5.3.2** è riportato il cromatogramma finale corrispondente ai prodotti ottenuti dall'idrolisi enzimatica della sequenza telomerica strutturata in quadruplex monomolecolare dopo

il trattamento con acroleina e una tabella dove sono riportati i diversi picchi cromatografici con i relativi valori di massa (MH^+ o MNa^+) trovati.

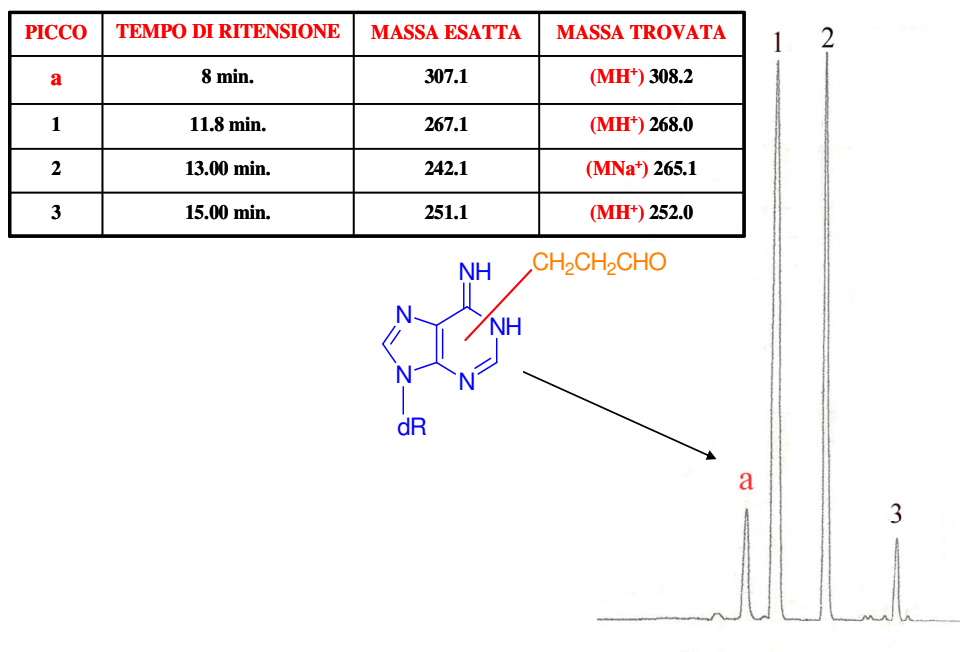


Figura 5.3.2: *Profilo cromatografico dei prodotti della reazione di idrolisi enzimatica del filamento $d(TTAGGG)_4$ folded in quadruplex monomolecolare reagito con l'acroleina e relativi valori di massa.*

Come si può osservare, sono presenti i picchi 1, 2 e 3 corrispondenti a dG, T e dA, aventi gli stessi tempi di ritenzione del cromatogramma di riferimento precedente. Ciò è stato confermato anche dall'analisi di spettrometria di massa.

In più nel cromatogramma si può notare un ulteriore picco, **a**, eluito ad un tempo di ritenzione di 8 minuti, al 6% di ACN.

Nella **Figura 5.3.3** è riportato il cromatogramma finale corrispondente ai prodotti ottenuti dall'idrolisi enzimatica della sequenza telomerica *unfolded* dopo il trattamento con acroleina e una tabella dove sono riportati i diversi picchi cromatografici con i relativi tempi di ritenzione e valori di massa (MH^+ o MNa^+) trovati.

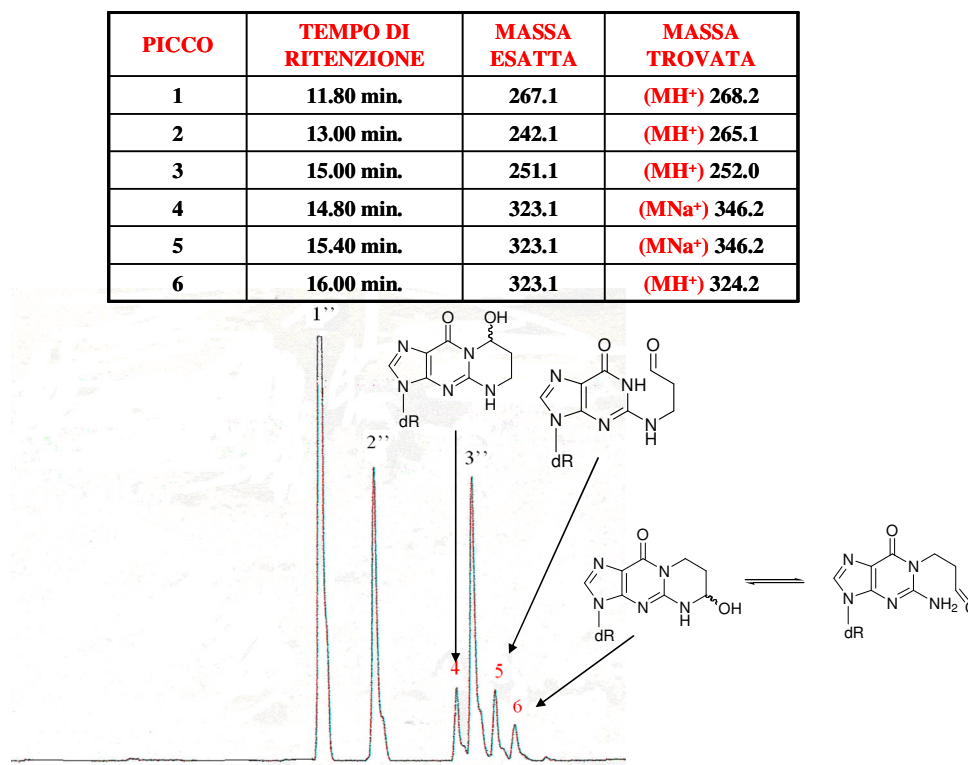


Figura 5.3.3: Profilo cromatografico dei prodotti della reazione di idrolisi enzimatica del filamento $d(TTAGGG)_4$ *unfolded* reagito con l'acroleina e relativi valori di massa.

Come si può notare oltre ai picchi principali corrispondenti ai nucleosidi non modificati dG, T e dA (picco 1, 2, 3) che compongono l'ON sono presenti tre picchi secondari (picco 4, 5 e 6) a tempi di ritenzione diversi dal caso precedente.

Secondo i cromatogrammi riportati in letteratura ed ottenuti nelle stesse condizioni descritte precedentemente, i picchi 4 e 5 corrispondono all'addotto N²-idrossipropano-2'-deossiguanosina rispettivamente in forma chiusa e aperta. Il picco 6 corrisponde all'addotto N¹-idrossipropano-2'-deossiguanosina. Inoltre, è anche evidente che l'abbondanza relativa dei due derivati (75% dell'addotto N² e del 25% di quello N¹) è la stessa ottenuta per la reazione dei residui di dG presenti in doppie eliche di DNA. Anche i risultati ottenuti mediante spettrometria di massa hanno confermato questi dati.

Nella reazione della forma ripiegata in quadrupla elica dello stesso ON con acroleina, invece, i picchi cromatografici ai tempi di ritenzione corrispondenti agli addotti N¹ e N² idrossipropano-2'-deossiguanosina sono presenti in quantità esigue e l'unico picco diverso dai nucleosidi naturali (il picco **a**) non corrisponde per analisi di spettrometria di massa ad un addotto dell'acroleina con la dG.

Dal valore della massa risulta che il picco **a** del cromatogramma mostrato in **Figura 5.3.2** corrisponde ad un derivato dA-acroleina (**Figura 5.3.4**) per il quale, a causa delle esigue quantità ottenute dall'idrolizzato enzimatico, non si è potuto definire esattamente la posizione di alchilazione.

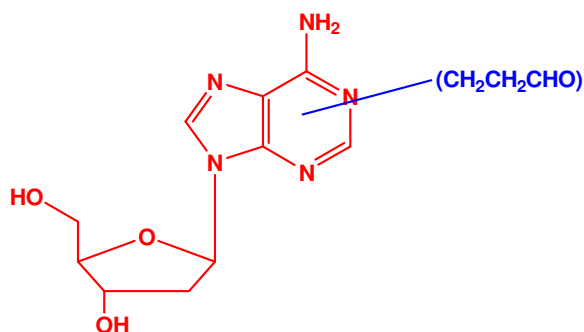


Figura 5.3.4: Rappresentazione schematica dell'addotto dA-acroleina. La posizione di legame non è stata esattamente definita, a tale livello.

Reazioni successive, in cui l'agente alchilante era presente in forte eccesso stechiometrico rispetto all'ON avente sequenza telomerica umana $d(\text{TTAGGG})_4$, strutturata in forma quadruplex, non hanno prodotto addotti dG-acroleina. Tuttavia oltre al prodotto **a**, precedentemente descritto avente massa 307.1, sono stati isolati altri due derivati **b** e **c** (**Tabella 5.3.1**) di massa rispettivamente 345.1 e 395.2, le cui esigue quantità, isolate dall'idrolizzato enzimatico, non hanno permesso un'accurata caratterizzazione strutturale mediante studi NMR.

Tabella 5.3.1: Derivati isolati dalla reazione della sequenza telomerica umana $d(\text{TTAGGG})_4$ folded con maggiori quantità di acroleina.

PICCO	TEMPO DI RITENZIONE	MASSA ESATTA	MASSA TROVATA
a	8 min.	307.1	(MH⁺) 308.2
b	16.9 min.	345.1	(MH⁺) 346.1
c	23 min.	395.3	(MH⁺) 396.2

Al fine di identificare tali addotti, si è eseguita una reazione dell'acroleina direttamente con la 2'-deossiadenosina che ha permesso di isolare gli stessi derivati in quantità opportune per effettuare un'indagine strutturale più dettagliata mediante spettroscopia NMR e analisi MS/MS.

Dall'analisi dei dati spettroscopici e spettrometrici è stato possibile identificare la struttura degli addotti **a** e **b**. Il primo corrisponde al derivato già riportato in letteratura N²-idrossipropano-2'-deossiadenosina^{12,13}.

Il derivato **b**, di massa pari a 345.1, deriva dall'addizione di due unità di acroleina al nucleoside e successiva disidratazione, la cui struttura è riportata in **Figura 5.3.5**.

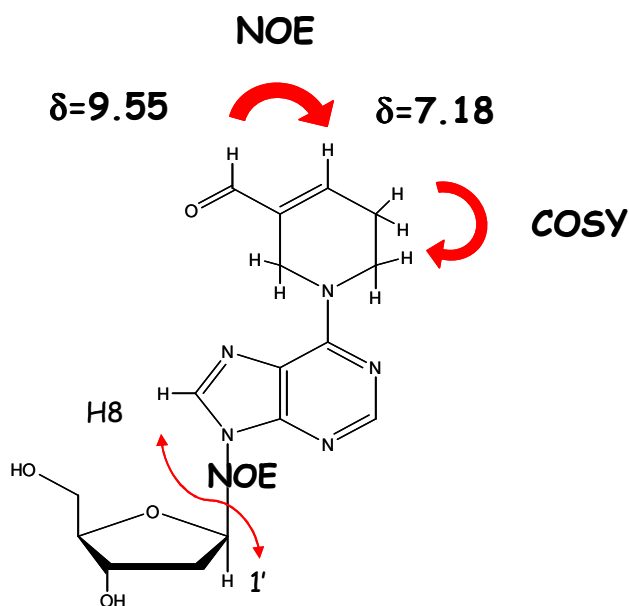


Figura 5.3.5: Struttura attribuita all'addotto **b**.

Sono state proposte due ipotesi di meccanismo di reazione per la formazione di questo addotto. Nell'**ipotesi A (Figura 5.3.6)**, dopo l'attacco della prima molecola di acroleina alla dA, una seconda aldeide reagisce con la sua forma enolica; segue l'attacco del doppietto elettronico dell'azoto esociclico della dA al carbonile per formare un nuovo ciclo a sei termini che successivamente disidrata.

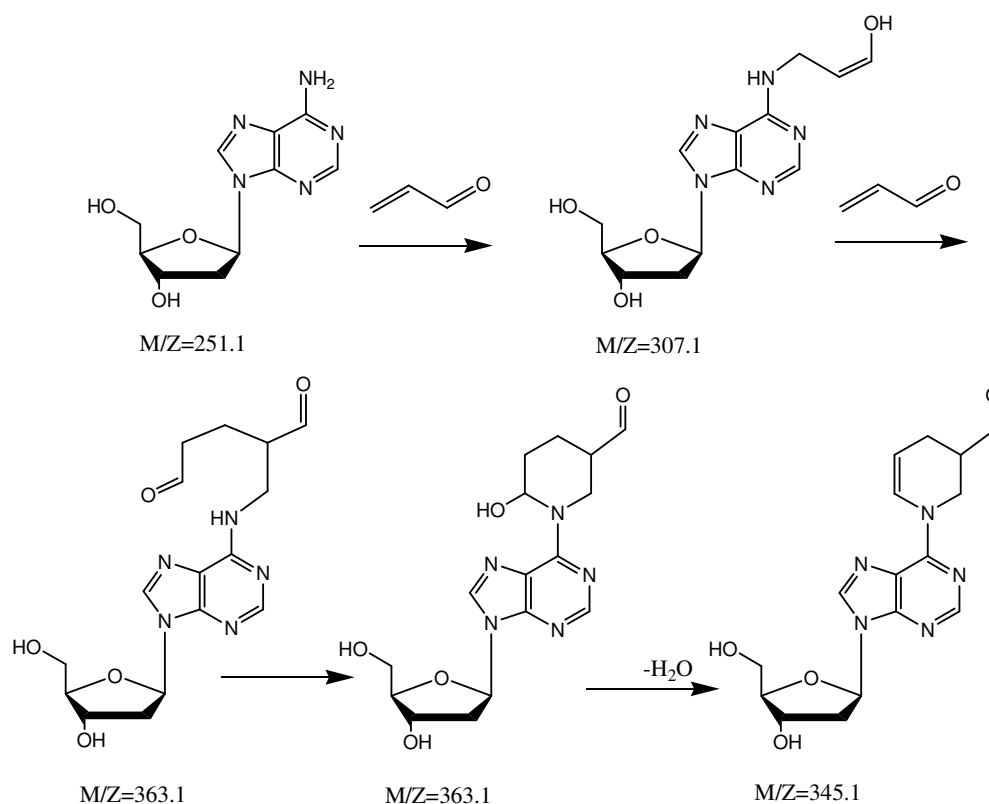


Figura 5.3.6: *Ipotesi A per la formazione dell'addotto **b** avente $M/Z=345.1$.*

L'**ipotesi B (Figura 5.3.7)** prevede l'attacco sequenziale delle due molecole di acroleina all'N esociclico, la condensazione tra le due aldeidi e la disidratazione finale della molecola.

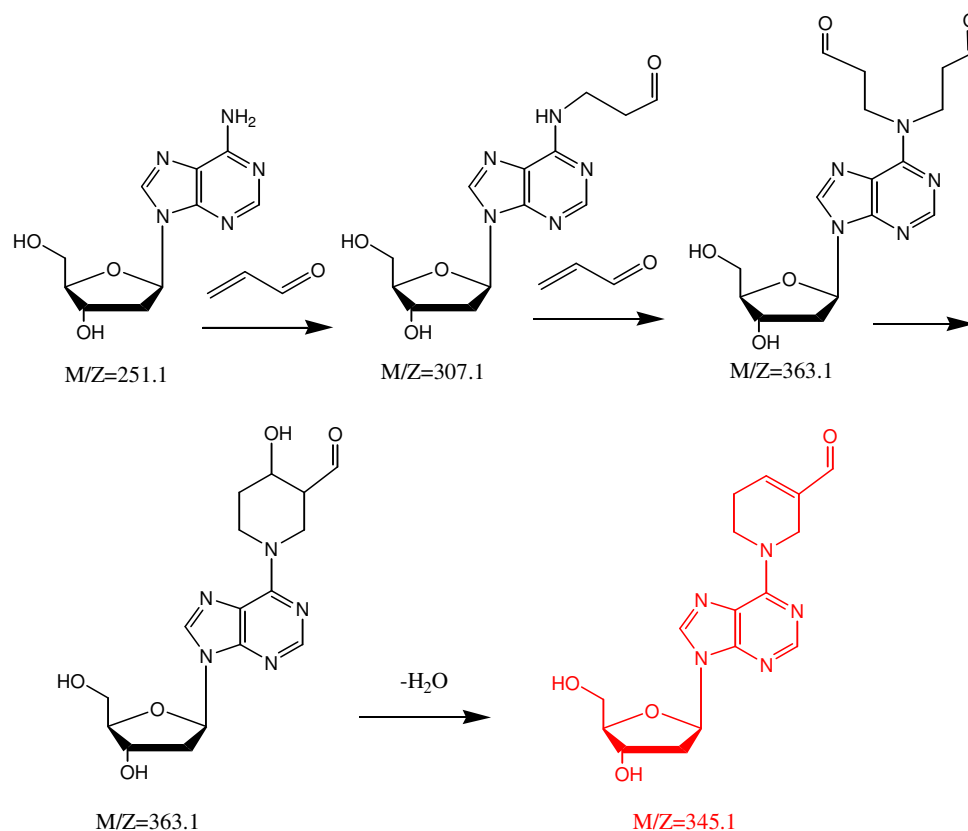


Figura 5.3.7: *Ipotesi B per la formazione dell'addotto b avente M/Z=345.1.*

Tutti i dati raccolti sembrerebbero avvalorare l'ipotesi **B** ed in particolare la formazione del prodotto α,β -insaturo (evidenziato in rosso).

Dallo spettro ¹H-NMR si osserva un segnale singoletto a *chemical shift* (δ) 9.55 che è tipico delle aldeidi. Il segnale a $\delta=7.18$ è stato assegnato al protone legato al carbonio insaturo in β all'aldeide. Nello spettro ¹³C-NMR è presente un segnale a $\delta=192.5$ corrispondente al carbonio carbonilico α,β -insaturo. I protoni metilenici adiacenti all'azoto hanno valori di δ pari a 4.45 e 4.85 ed appaiono come singoletti slargati. Ai carboni metilenici corrispondono i segnali ¹³C-

NMR a δ pari a 42.5 e 43.4. A causa del *broadening* dei segnali dei protoni non è però stata osservata la correlazione ^{13}C - ^1H . Dallo spettro 2D-NOESY è risultato presente un effetto nucleare *Overhauser* (NOE) tra il protone aldeidico a $\delta=9.55$ e il protone sul sistema insaturo in β all'aldeide a $\delta=7.18$ e un altro effetto NOE tra l'H8 dell'adenina e l'H1' dello zucchero.

Per quanto concerne l'addotto **c**, a cui corrisponde un valore di massa pari a 395.3, si è ipotizzato che derivi dalla reazione della dA con 2 unità di acroleina e due molecole di acqua (**Figura 5.3.8**), ma non è stato possibile assegnare in maniera definitiva la sua struttura a causa della complessità dei segnali NMR, dovuti alla presenza di più equilibri in soluzione (forma aperta, due forme chiuse emiacetaliche e anche forme mono- e di-idrate).

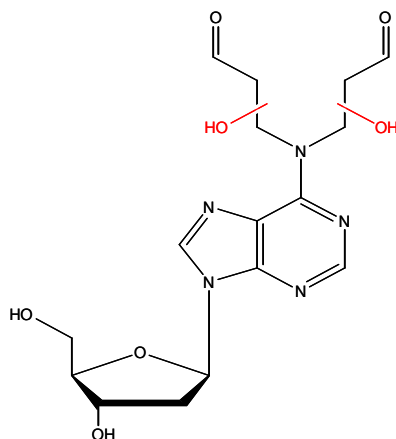


Figura 5.3.8: *Ipotesi di struttura dell'addotto c avente M/Z pari a 395.3.*

Attualmente è in corso la caratterizzazione dei prodotti ottenuti dalla reazione di riduzione delle funzioni aldeidiche dell'addotto **c** mediante $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Infatti, la trasformazione delle aldeidi in alcoli può ridurre la complessità degli spettri NMR.

Conclusioni

I risultati ottenuti dalla reazione dell'acroleina con la sequenza telomerica umana $\text{d}(\text{TAGGG})_4$ *folded* e *unfolded* hanno dimostrato una stretta correlazione tra sito di alchilazione e struttura dell'ON. Contrariamente a quanto avviene per la doppia elica di DNA, per il quale il sito di alchilazione preferenziale è la dG, il telomero in forma di quadruplex monomolecolare tende a dare prodotti di alchilazione della 2'-deossiadenosina. Una spiegazione dei risultati ottenuti è basata su considerazioni di tipo strutturale. Infatti, le guanine, i cui atomi di azoto sono coinvolti nella formazione dei legami ad idrogeno di tipo *Hoogsteen*, diventano meno reattive perchè protette all'interno della quadruplex; mentre l'adenina, che si trova nei *loop* proiettati all'esterno della quadruplex, risulta maggiormente esposta all'ambiente circostante divenendo quindi più reattiva verso le alchilazioni. Al fine di caratterizzare gli addotti dA-acroleina, isolati dalla reazione dell'acroleina con la sequenza telomerica umana $\text{d}(\text{TAGGG})_4$ ripiegata in quadruplex, è stata eseguita una reazione diretta della acroleina con tale nucleoside che ha permesso di isolare e

caratterizzare strutturalmente addotti di mono- e di-alchilazione della dA.

Procedure sperimentali

Sintesi in fase solida del 24 mer a sequenza telomerica d(TTAGGG)₄

Riportata già nelle procedure sperimentali del paragrafo 5.2.

Reazione dell'acroleina con la sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ strutturata in quaruplex e successiva idrolisi enzimatica

50 OD₂₆₀ (*Optical density*) dell'ON 24 mer sono stati sciolti in 500µl di una soluzione tampone contenente 140 mM di NaCl, 5mM di MgCl₂ e 5mM di NaH₂PO₄ e sottoposti a processo di *annealig* (riscaldamento ad 90°C per 15 min e lento raffreddamento a temperatura ambiente per una notte). Dopo 24 h a temperatura ambiente, al campione si sono aggiunte 1x10⁻³ mmol (0.1 µl) di acroleina. La reazione è stata condotta sotto lieve agitazione in un bagno termostato a 37°C per una notte. L'eccesso di acroleina è stato rimosso mediante estrazione con cloroformio. La fase acquosa della reazione è stata liofilizzata, sciolta in 1,5 ml di tampone 20mM Tris HCl e 10 mM MgCl₂ a pH 8 e sottoposta a reazione di idrolisi enzimatica per trattamento con 1u/ml di fosfatasi alcalina e 34u/mg di fosfodiesterasi I a 37°C sotto lieve agitazione per 72h. I prodotti della digestione enzimatica sono stati purificati mediante cromatografia

HPLC utilizzando una colonna a fase inversa RP-18 eluita con gradiente di acqua (A) e acetonitrile (B). Il programma di eluizione delle soluzioni utilizzato è riportato nella tabella seguente:

Programma di eluizione

Tempo	Soluzione A	Soluzione B
0 min	100%	0%
15 min	90%	10%
20 min	80%	20%
23 min	100%	0%
33 min	100%	0%

I prodotti così purificati sono stati poi caratterizzati mediante spettrometria di massa elettrospray a quadrupolo (API).

Reazione dell'acroleina con la sequenza telomerica d(TTAGGG)₄ non strutturata in quaruplex e successiva idrolisi enzimatica

A 50 OD₂₆₀ dell'ON 24 mer sciolti in 500µl di H₂O sterile sono state aggiunte 1x10⁻³ mmol (0.1 µl) di acroleina. La reazione è stata condotta sotto agitazione in un bagno termostato a 37°C per una notte. L'eccesso di acroleina è stato rimosso mediante estrazione con cloroformio e la fase acquosa della reazione è stata liofilizzata e sottoposta a digestione enzimatica seguendo la stessa procedura adottata per la sequenza strutturata. Allo stesso modo i prodotti di idrolisi enzimatica sono stati purificati e caratterizzati mediante spettrometria di massa.

Reazione della 2'-deossiadenosina con acroleina

La dA, anidrificata alla pompa in un bagnetto ad olio a 80°C per circa 15h, è stata fatta reagire con l'acroleina (1000µl) utilizzando come solvente 4ml di H₂O, il tutto è stato posto sotto agitazione magnetica a 80°C in un bagnetto ad olio per circa dieci ore.

Il grezzo è stato portato a secco sotto vuoto e poi sciolto in H₂O e controllato mediante TLC in una camera 9:1 CHCl₃:MeOH.

La fase acquosa è stata prima purificata su Sep-Pak al fine di separare i prodotti della reazione dai derivati dell'idrochinone e successivamente purificata mediante cromatografia HPLC su colonna Hypersil HS C-18 Thermo utilizzando un gradiente di H₂O (A) e ACN (B) come fase mobile. Il programma di eluizione delle soluzioni utilizzato è riportato nella tabella seguente:

Programma di eluizione

Tempo	Soluzione A	Soluzione B
0 min	90%	10%
15 min	70%	30%
45 min	70%	30%
55 min	90%	10%

I prodotti isolati sono stati analizzati mediante spettrometria di massa e analisi NMR.

Caratterizzazione dell'addotto b:

$MH^+ = 346.1$

$MNa^+ = 368.1$

1H -NMR (D_2O): $\delta = 9.55$ (s, 1H, CHO); $\delta = 8.25$ (s, 1H, H8); $\delta = 8.18$ (s, 1H, H2); $\delta = 7.18$ (m, 1H, CH); $\delta = 6.38$ (m, 1H, H1'); $\delta = 5.35$ (m, 1H, H3'); $\delta = 4.85$ (s, 2H, CH_2); $\delta = 4.45$ (s, 2H, CH_2); $\delta = 4.11$ (m, 2H, H5'); $\delta = 3.91$ (m, 1H, H4'); $\delta = 2.95-2.71$ (m, 2H, 2H' e 2H''); $\delta = 2.61$ (m, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (D_2O): $\delta = 192.5$ (C carbonilico); $\delta = 156.1$ (C in 6); $\delta = 153.2$ (CH in 2); $\delta = 150.1$ (CH in 8); $\delta = 148.1$ (C in 4); $\delta = 147.8$ (C α); $\delta = 140.5$ (C β); $\delta = 120.2$ (C in 5); $\delta = 86.1$ (CH 4'); $\delta = 83.2$ (CH 1'); $\delta = 70.1$ (CH 3'); $\delta = 62.3$ (CH_2 5'); $\delta = 43.4$ (CH_2 adiacente all'N); $\delta = 42.5$ (CH_2 adiacente all'N); $\delta = 40.3$ (CH_2 2'); $\delta = 28.2$ (CH_2 in γ).

Caratterizzazione dell'addotto c:

$MH^+ = 396.3$

$MNa^+ = 418.3$

L'interpretazione degli spettri NMR di tale addotto è risultata complicata a causa della complessità dei segnali dovuti alla presenza di più equilibri in soluzione.

Bibliografia

1. Nath, R. G., Ocando, J. E. Guttenplan, J. B., and Chung, F. L.; *Cancer Res.*, **1998**, 58, 581-584.
2. Ludeman, S.M.; *Curr. Pharm. Des.*, **1999** 5, 627-643.
3. Kehrer, J.P. and Biswall, S.S.; *Toxicol. Sc.*; 2000, 57, 6-15.
4. Beauchamp, R. O., Jr., Andjelkovich, D. A., Kligerman, A.D., Morgan, K. T. and Heck, H. D.; *Crit. Rev. Toxicol.*, **1985**, 14, 309-80.
5. Chung, F.L., Chen, H.J. and Nath, R.G.; *Carcinogenesis*, **1996** 17, 2105-11.
6. Anderson, M. M., Hazen, S., L., Hsu, F., F. and Heinecke, J. W.; *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99, 424-432.
7. Kawanishi, M.; Matsuda, T., Nakayama, A.; Takebe, H.; Matsui, S. and Yagi, T. *Mutat. Res.*, **1998**, 417, 65-67.
8. Nechev, L.V.; Kozekov, I.D.; Brock, A.K.; Rizzo, C.J. and Harris, T. M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, 15, 607-613.
9. Chung, F.L.; Young, R. and Hecht, S.S.; *Cancer Res.*, **1984**, 17, 2105-11.
10. Galliani, G. and Pantarotto, C.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 4491-92.
11. VanderVeen, L.A.; Hashim, M.F.; Nechev, L.V.; Harris, T.M.; Harris, C.M. and Marnett, L.J.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 9066-70.

12. Smith, R.A.; Williamson, D.S.; Cerny, R.L. and Cohen, S.M.; *Cancer Res.*, **1990**, 30, 3005-3012.
13. Sodum, R.S. and Shapiro, R.; *Bioorg. Chem.*, **1988**, 16, 272-282.
14. Kozekov, I.D.; Nechev, L.V.; Sanckez, A.; Harris, C.M.; Lloyd, R.S. and Harris, T.M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 1482-85.
15. Nechev, L.V.; Harris, C.M. and Harris, T.M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 421-429.
16. Stone, K.; Kasebati, M.B. and Marnett, L.J.; *Chem. Res. Toxicol.*, **1990**, 3, 33-38.
17. Burcham, P.C. and Marnett, L.J.; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 28844-50.
18. de los Santos, C.; Zaliznyak, T. and Johnson, F.; *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 9077-82.
19. Yang, I.Y.; Johnson, F.; Grollman, A.P. and Moriya, M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, 15, 100-164.
20. Wang, Y. and Patel, D. J.; *Structure*, **1993**, 1, 263.
21. Parkinson, G.N.; Lee, M.P.H. and Neidle, S.; *Nature*, **2002**, 417, 876.
22. DeCorte, B.L.; Tsarouhtsis, D.; Kuchimanchi, S.; Cooper, M.D.; Horton, P.; Harris, C.M. and Harris, T. M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 630.

23. 4-ammino-1,2-butandiolo è stato sintetizzato usando la procedura descritta da Khullar, S.; Varaprasad, C. V. and Johnson, F.; *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 947.
24. Rapporto molare usato: ON/4-ammino-1,2-butandiolo 1:8.
25. Balagurumoorthy, P. and Brahmachari, S. K.; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 21858.
26. Phan, A. T. and Patel, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15021.
27. Plastaras, J.P.; Dedon, P.C. and Marnett, L.J.; *Biochemistry*, **2002**, 41, 5033.
28. Mergny, J.-L.; Ri u, J.-F.; Mailliet, P. and Teulade-Fichou, M.-P.; Gilson, E.; *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 839.
29. Cohen, H. and Sinclair, D.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 3174.
30. Kim, S.-H.; Kaminker, P. and Campisi, J.; *Nat. Genet.*, **1999**, 23, 405.
31. Lin, Y.-C.; Shih, J.-W.; Hsu, C.-L. and Lin, J.-J.; *J. Biol.Chem.*, **2001**, 276, 47671.
32. Evans, S. K. and Lundblad, V.J. *Cell Sci.*, **2000**, 113, 3357.
33. Chandra, A.; Hughes, T.R.; Nugent, C.I. and Lundblad, V.; *Genes Dev.*, **2001**, 15, 404.

6) SINTESI E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI OLIGONUCLEOTIDI MODIFICATI ANALOGHI DEL TBA (*thrombin binding aptamer*)

6.1 Introduzione

Negli ultimi anni, contemporaneamente ai notevoli progressi che sono stati fatti per ottenere oligonucleotidi modificati sfruttabili nella terapia antisenso e antigene, l'attenzione si è rivolta anche verso oligonucleotidi che agiscono con meccanismi differenti. Sono stati ad esempio valutati gli effetti prodotti da modifiche chimiche sull'attività degli aptameri.

Gli aptameri sono piccole sequenze di DNA o RNA a singolo filamento, capaci di riconoscere e legare molecole specifiche¹. Essi hanno una notevole propensione ad assumere diversi motivi secondari e terziari con differenti conformazioni. Per tale ragione non esistono restrizioni riguardo al tipo di molecola che un aptamero può riconoscere. Essi possono, infatti, riconoscere e legare sia piccoli bersagli quali ioni metallici², amminoacidi³, farmaci⁴ e antibiotici⁵ sia macromolecole biologiche come enzimi⁶, fattori di crescita⁷, anticorpi⁸ e fattori di regolazione genica⁹.

L'impiego degli aptameri in campo terapeutico è subordinato ad alcuni requisiti essenziali. In primo luogo, essi devono interagire

saldamente e specificamente con le molecole bersaglio. L'elevata grandezza ed estensione superficiale degli acidi nucleici rappresenta un vantaggio notevole, in quanto essi possono dar luogo ad un numero elevato di interazioni con il bersaglio rispetto a molecole di piccole dimensioni e, di conseguenza, è richiesta una concentrazione più bassa per un'efficiente inibizione rispetto ad esempio ai farmaci tradizionali. Inoltre l'estensione superficiale conferisce agli aptameri la capacità di discriminare tra macromolecole strutturalmente molto simili tra di loro¹⁰. In secondo luogo il riconoscimento specifico deve essere accompagnato dall'inibizione della funzione biologica della molecola bersaglio; in tal senso sono stati descritti aptameri, formati da oligonucleotidi fosforotioati (17mer), in grado di inibire *in vitro* la trascrittasi inversa del virus HIV¹¹ ed anche aptameri a RNA in grado di riconoscere ed inibire il recettore di un fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)¹². In terzo luogo gli aptameri devono essere anche in grado di modulare il metabolismo cellulare associato al bersaglio; al tal proposito sono stati selezionati aptameri in grado di inibire il rilascio di serotonina mediato dalle IgE da parte di cellule in colture tissutali¹³.

Aptamero antitrombinico

Moltissimi studi sono tutt'oggi condotti sugli aptameri per valutare il loro possibile impiego in terapia. Grande interesse è stato rivolto verso l'aptamero legante la trombina, il TBA (*thrombin binding aptamer*).

Il TBA è un oligodeossinucleotide costituito da 15 nucleotidi (15mer) avente sequenza $5'd(\text{GGTTGGTGTGGTTGG})^{3'}$. È stato identificato, per la prima volta nel 1990, mediante un processo di SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), ossia un metodo di selezione *in vitro* che prevede uno *screening* di grandi librerie combinatoriali di composti oligonucleotidici^{14,15}.

Studi *in vitro* hanno evidenziato che il TBA è un potente inibitore della trombina (EC_{50} di 20 nM)¹⁶. Successivi esperimenti *in vivo*, effettuati su scimmie *cynomolgus*, hanno evidenziato che il TBA è dotato di una potente e rapida insorgenza d'azione con un'emivita di 2 minuti¹⁷. Ulteriori studi *in vivo* hanno dimostrato che l'aptamero antitrombinico ha anche la capacità di inibire la trombina legata al coagulo, laddove l'eparina (farmaco anticoagulante) risulta inefficace¹⁸. La rapida insorgenza d'azione, la breve emivita *in vivo* e l'attività inibitoria nei confronti della trombina legata al coagulo,

suggeriscono che il TBA possa essere utilizzato come potente anticoagulante nel trattamento delle trombosi.

La trombina è una serina proteasi che svolge molteplici funzioni nell'ambito della coagulazione del sangue. Essa è, infatti, responsabile della conversione del fibrinogeno in fibrina, dell'attivazione delle piastrine e della scissione dei fattori V, VII, XI, XIII della cascata coagulativa¹⁹. Una caratteristica della struttura della trombina è la presenza di due regioni, altamente basiche, distinte dal sito catalitico, localizzate sulla superficie della molecola. Tali regioni costituiscono dei siti secondari di legame importanti per la specificità d'interazione dell'enzima con macromolecole e recettori.

Una di queste regioni, definita *fibrinogen exosite* (o anche *anion-binding exosite I*), è formata da residui amminoacidici basici (lisina ed arginina) carichi positivamente a pH fisiologico, determinanti per l'interazione con il fibrinogeno, con il recettore delle piastrine e con l'irudina^{20,21}. L'altra regione, definita *putative heparin exosite* (o anche *anion-binding exosite II*), è anch'essa formata da residui amminoacidici basici carichi positivamente a pH fisiologico, determinanti per l'interazione con l'eparina²².

Viceversa, il sito di legame per la trombina nella maggior parte di queste macromolecole è localizzato in regioni ricche di amminoacidi a carattere acido (acido aspartico e glutammico) carichi negativamente^{22,23}.

Studi di biologia molecolare, condotti utilizzando mutanti trombinici ricombinanti e sequenze oligonucleotidiche di 15mer, hanno dimostrato che il TBA non si lega al sito catalitico dell'enzima ma a livello dei due *anion-binding exosite*. Infatti, l'aptamero non è in grado di inibire l'idrolisi di piccoli substrati ammidici²⁴, come fanno l'irudina o altri inibitori della trombina, suggerendo che esso non si lega direttamente al sito attivo dell'enzima. Il legame dell'aptamero-trombina, invece, impedisce l'interazione dell'enzima con il fibrinogeno, con la trombomodulina e con il recettore piastrinico²⁴, indicando che esso è garantito da interazioni di natura elettrostatica tra le cariche negative dei gruppi fosfato del polianione TBA e le cariche positive degli amminoacidi basici degli *anion-binding exosite*. L'esame della struttura cristallina del complesso aptamero-trombina, effettuato da Padmanabhan e collaboratori²⁵, mostra che il TBA interagisce con due distinte regioni di due molecole di trombina: il *fibrinogen exosite* di una molecola e il *putative heparin exosite* di un'altra molecola vicina. In particolare, il *loop* centrale TGT interagisce con il sito di riconoscimento del fibrinogeno e i due *loop*

laterali TT sono coinvolti nell'interazione con il sito di legame dell'eparina di un'altra molecola di trombina vicina (**Figura 6.1.1**).

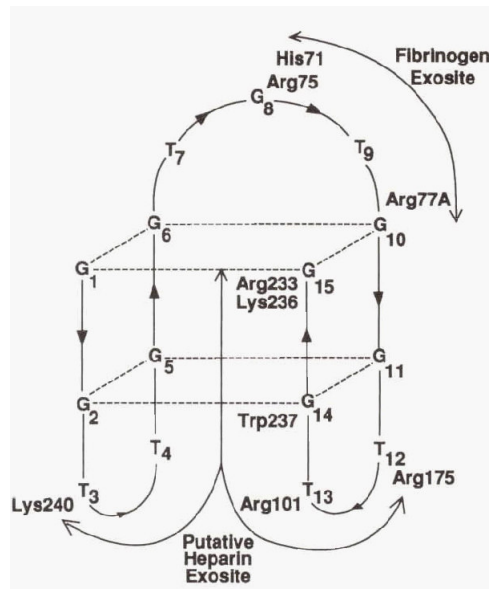


Figura 6.1.1: Rappresentazione schematica dell'interazione dell'aptamero folded con la trombina.

Gli autori, inoltre, hanno evidenziato che gli amminoacidi essenziali per l'interazione sono i seguenti:

- residuo di Arg-75, Arg-77A e His-71 del *fibrinogen exosite*;
- residuo di Lis-240, Arg-101 e Arg-175 del *putative heparin exosite*²⁶.

Per di più, i residui nucleotidici T₇ e T₉ sono coinvolti in una regione idrofobica vicino il *fibrinogen exosite* (Ile-24, His-71, Ile-79, Tyr-117), mentre T₁₃ è interessato in una regione idrofobica vicino il *putative heparin exosite* (His-91, Pro-92, Trp-237) di una molecola di

trombina vicina²⁶. Contrariamente, i dati raccolti mediante studi NMR riportano interazioni opposte a quelle ottenute dall'analisi cristallografica. In particolare, il *loop* centrale TGT interagisce con il sito di riconoscimento dell'eparina e i due *loop* laterali TT sono coinvolti nell'interazione con il sito di legame del fibrinogeno di un'altra molecola di trombina vicina, in cui è interessato principalmente il residuo nucleotidico T₁₂ in una regione idrofobica (Ile-24, His-71, Ile-79, Tyr-117)²⁵.

Struttura e stabilità dell'aptamero antitrombinico

La struttura tridimensionale in soluzione del TBA è stata determinata mediante tecniche NMR^{27,28} e mediante studi di cristallografia effettuati su complessi TBA-trombina^{25,26}. Entrambi sono concordi nel sostenere che l'aptamero antitrombinico forma una struttura quadruplex monomolecolare costituita da due tetradi di guanine unite da due *loop* laterali a sequenza TT e da un singolo *loop* centrale a sequenza TGT (**Figura 6.1.2**).

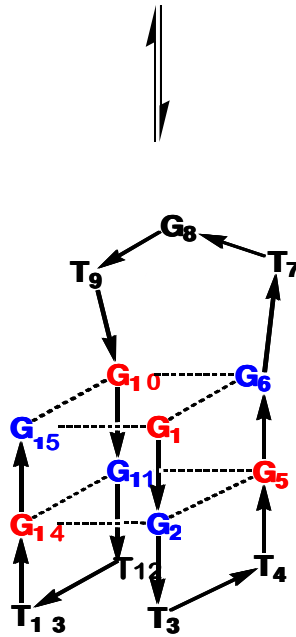
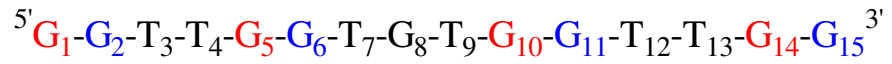


Figura 6.1.2: Ripiegamento del TBA in quadruplex monomolecolare, in rosso sono indicate le guanine in conformazione *syn* e in blu quelle *anti*.

In ciascun piano di G, ogni base ha la capacità di formare due legami ad idrogeno di tipo *Hoogsteen* con i due residui diametralmente opposti. È importante notare, inoltre, che in ogni piano di guanine due residui diagonalmente opposti assumono una conformazione *syn* (G_1 , G_{10} e G_5 , G_{14} in rosso) e gli altri due (G_2 , G_{11} e G_6 , G_{15} in blu) una conformazione *anti* rispetto al legame N-glicosidico (**Figura 6.1.3**).

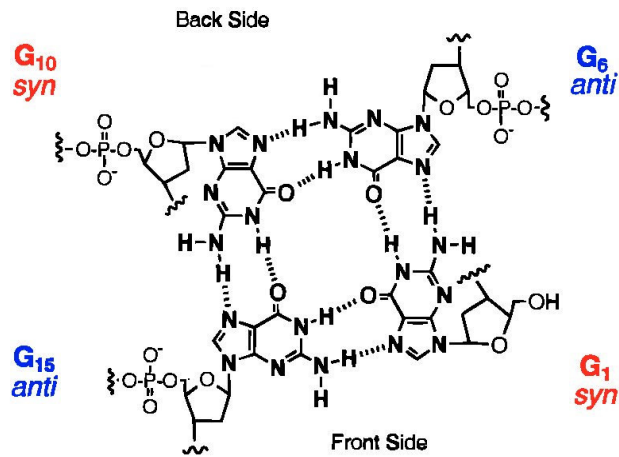


Figura 6.1.3: *Conformazione dei residui di guanina rispetto al legame N-glicosidico nella tetrate di G.*

Tuttavia, alcune differenze sono riscontrabili dall'analisi dei dati raccolti nei due studi²⁵. In particolare:

- nel modello NMR, i due *loop* TT e il *loop* TGT attraversano rispettivamente i solchi stretti e il solco largo della quadruplex, mentre l'opposto avviene nel cristallo;
- nel cristallo, T₃ e T₁₂ dei *loop* laterali non hanno un ruolo significativo in quanto non interagiscono ne' intramolecolarmente ne' con la trombina. Il cristallo mostra questi due residui proiettati all'esterno dell'asse dell'elica. I dati NMR riportano T₃ e T₁₂ paralleli all'asse dell'elica, con T₁₂ interessato in una regione idrofobica vicino il *fibrinogen exosite* (Ile-24, His-71, Ile79, Tyr-117);

- nel cristallo, T₄ e T₁₃ interagiscono tra loro mediante un legame ad idrogeno e formano un'interazione π con il quartetto inferiore, lo stesso si è riscontrato nel modello NMR;
- nel cristallo, T₁₃ si posiziona in una porzione idrofobica del sito dell'eparina di una molecola di trombina che si trova nelle immediate vicinanze, coinvolgendo gli AA Trp-237, His-91, Pro-92. I dati NMR sono in questo caso concordi;
- G₈ sia nel modello del cristallo che in quello NMR forma un'interazione π con la tetrate superiore.
- nel cristallo, T₇ si posiziona in una regione idrofobica del *fibrinogen exosite* coinvolgendo gli AA Ile-24, His-71, Ile79, Tyr-117, secondo gli studi NMR in tale interazione è interessato il residuo T₁₂.
- T₉ è vicino ai residui idrofobici del *fibrinogen exosite* anche se non è coinvolto nello *stacking* con il quartetto superiore. Gli studi NMR mostrano il contrario.

Le ambiguità incontrate nell'analisi strutturale del TBA sono dovute principalmente alla struttura quadruplex che presenta una simmetria localizzata solo a livello dei quartetti di G mentre per il resto è asimmetrica; ciò determina un'orientazione dei filamenti non ben definita. Feigon e collaboratori²⁹ hanno osservato le otto possibili

orientazioni assunte dall'aptamero in soluzione ed hanno evidenziato che un'unica orientazione corrisponde a quella del complesso cristallografico TBA-trombina in modo da riconciliare i due studi.

Il ripiegamento del TBA in quadruplex monomolecolare è essenziale per la formazione del complesso aptamero-trombina in quanto permette il corretto orientamento delle cariche negative dei gruppi fosfato dell'ON per l'interazione con l'enzima.

Inoltre, diversi studi spettroscopici hanno evidenziato che la struttura, la stabilità e l'attività biologica del TBA sono catione-dipendente²⁸. Cationi monovalenti quali Na^+ e K^+ e cationi bivalenti quali Pb^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} hanno la capacità di interagire con la quadruplex^{30,31}. Negli ultimi anni, in particolare, molta attenzione è stata rivolta al ruolo del potassio nell'assemblaggio e nella stabilizzazione delle strutture quadruplex in quanto rispetto agli altri ioni conferisce maggiore stabilità. In particolare, studi NMR e di dinamica molecolare³² hanno evidenziato che la strutturazione completa della quadruplex da parte del TBA avviene in presenza di due ioni potassio per ogni molecola di DNA (**Figura 6.1.4**).

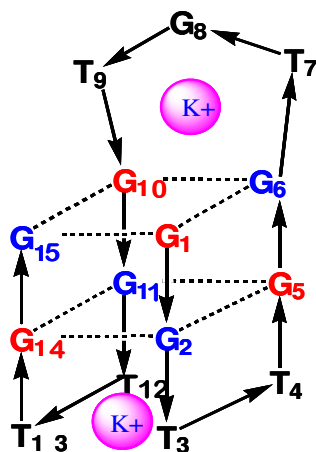


Figura 6.1.4: *Complesso TBA-potassio.*

La formazione del complesso K^+/TBA 2:1 avviene attraverso un processo a due stadi consequenziali. Nel primo stadio un singolo ione K^+ si posiziona tra i due *loop* laterali interagendo con gli ossigeni carbonilici delle timine e con quelli delle guanine del quartetto inferiore, portando alla formazione della struttura quadruplex. Nel secondo stadio un altro ione K^+ si posiziona nel *loop* centrale interagendo con gli ossigeni carbonilici delle timine e con quelli delle guanine del quartetto superiore, stabilizzando ulteriormente la struttura quadruplex.

Tuttavia da recenti studi è stato osservato che il TBA anche in assenza di cationi può assumere la struttura quadruplex in quanto è la trombina che ha la capacità di indurre una riorganizzazione strutturale

nell'aptamero; quest'ultimo, grazie ad essa è in grado di raggiungere la conformazione biologicamente attiva³³.

Diverse modifiche sono state apportate alla struttura del TBA sia al fine di identificare i principali siti coinvolti nell'interazione con l'enzima (relazioni struttura-attività) sia per migliorare le sue caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche. Tali modificazioni hanno riguardato sia i quartetti di G sia i *loop laterali*. Nel primo caso è stato osservato che la delezione di una base o la sostituzione con un residuo abasico conduce ad una drastica perdita dell'attività biologica come risultato della distruzione della struttura quadruplex piuttosto che della perdita di una specifica interazione con la proteina³⁴. Questo conferma l'importanza dei due quartetti nel mantenere attivo il TBA. Ciò è stato confermato dalla delezione di una 2'-deossiguanosina al 3' che ha portato ad una riduzione dell'attività di ~500 volte e dalla sostituzione di uno degli otto residui dei due quartetti con un residuo 7-deaza-2'-deossiguanosina che riduce l'attività in quanto si riduce il numero di legami ad idrogeno. La sostituzione delle posizioni N² e C⁸ di un residuo di guanina formante la tetrate di G determina un minimo incremento dell'attività antitrombinica del TBA; ciò suggerisce che tali posizioni causano una limitata perturbazione della struttura a sedia formata dall'ON³⁵. Introducendo, infatti, un metile o un propile sul C⁸ di un residuo di

guanina in conformazione *syn* si ha un incremento dell'attività in quanto stabilizzando la conformazione *syn* aumenta la stabilità del quartetto e quindi della struttura quadruplex. Al contrario la sostituzione del C⁸ di un residuo di guanina in conformazione *anti* determina un decremento dell'attività in quanto destabilizza la struttura inducendo la transizione G-*anti* in G-*syn*³⁶. Tuttavia è stato osservato che tale effetto viene a cadere quando si inserisce un gruppo più grande a causa dell'elevato ingombro sterico. Per quanto riguarda la posizione N² è stato analizzato che l'introduzione di un sostituito *naftil-metil* sul residuo G₆ e G₁₁ della sequenza del TBA determina un aumento dell'attività antitrombinica del 60% e 40% rispettivamente poiché tali residui sono localizzati nella parte posteriore della struttura quadruplex permettendo una maggiore interazione con la proteina. Tuttavia la sostituzione di entrambi i residui comporta una riduzione dell'effetto biologico dovuto probabilmente ad un elevato ingombro sterico. Diverse modifiche hanno riguardato anche i gruppi fosfato, come ad esempio la loro sostituzione con un gruppo in forma acetalica (O-CH₂-O) ha permesso di identificare i gruppi fosfato responsabili dell'interazione con la trombina. La strategia adottata dagli autori³⁷ ha previsto la singola sostituzione di ogni gruppo fosfato con un gruppo neutro e la valutazione del relativo PT (tempo di protrombina). Da questa analisi

risulta che i gruppi fosfodiesteri tra T₄-G₅, T₁₃-G₁₄, T₇-G₆ e G₈-T₉ sono fondamentali ai fini dell'interazione. Questo dato conferma che il complesso aptamero-trombina si realizza in seguito ad interazioni elettrostatiche multiple tra le cariche negative dei gruppi fosfodiesteri e le cariche positive presenti sulla proteina. A questo punto poiché gli altri gruppi fosfodiesteri non sono implicati nel contatto diretto con la proteina potrebbero essere modificati al fine di migliorare la farmacocinetica tenendo conto che la degradazione enzimatica, ad opera delle nucleasi, avviene proprio a livello dei ponti fosfodiesteri. Quindi se si vuole ottenere un effetto anticoagulante rapido ed un rapido ripristino della coagulazione ai valori normali (esempio negli interventi di bypass cardio-polmonare) si potrebbe utilizzare il TBA-naturale; nel caso in cui occorre una rapida insorgenza d'azione ed un effetto prolungato nel tempo (esempio nella trombosi delle vene profonde) si potrebbero utilizzare analoghi del TBA in forma acetica³⁸.

Ulteriori modifiche sono state apportate sul *loop* centrale e su quello laterale. Nel primo caso sono stati eseguiti due esperimenti che prevedevano una volta l'eliminazione del residuo T₇ ottenendo una sequenza 14-mer con spiccata attività antitrombinica; e poi eliminando il residuo G₈ e T₉, ottenendo invece un aptamero con attività 10 volte inferiore rispetto a quello naturale. Nel secondo caso

sono stati eliminati i residui nucleotidici T₃ e T₁₂ senza avere effetti significativi sull'attività antitrombinica³⁹.

6.2 Effetto dell'introduzione di un nuovo nucleoside aciclico sulla struttura quadruplex monomolecolare assunta dal TBA

Una parte del mio lavoro di dottorato di ricerca è incentrata sulla sintesi e sulla caratterizzazione strutturale di analoghi sintetici del TBA contenenti un nucleoside aciclico, analogo della timidina, l'1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione (**Figura 6.2.1**).

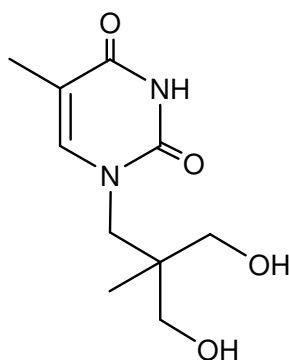


Figura 6.2.1: *1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione.*

Tale monomero è stato inserito in posizioni specifiche della sequenza del TBA al fine di modificare sia i due *loop* laterali TT che il *loop*

centrale TGT, in quanto a questo livello si verificano importanti interazioni sia di natura ionica che idrofobica con la trombina (**vedi paragrafo 6.1**). La modifica apportata ha riguardato la porzione zuccherina, in particolare il suddetto monomero aciclico presenta in posizione 1 un gruppo metilenico che fornisce alla timina una maggiore libertà conformazionale; ciò potrebbe facilitare le interazioni di questa base con la proteina.

Sintesi dell' 1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione

Per l'ottenimento di tale nucleoside aciclico, la timina è stata condensata con un triolo, l'1,1,1-tris-idrossimetiletano. Lo schema di sintesi inizialmente utilizzato prevedeva come primo stadio la protezione di due dei tre ossidrili del 1,1,1-trisidrossimetiletano. Poiché il monomero finale deve contenere un gruppo 4,4'-dimetossitritilico come protettore di una funzione ossidrilica, lo schema di sintesi iniziale riportato in **Figura 6.2.2** utilizzava quest'ultimo *ab-initio*.

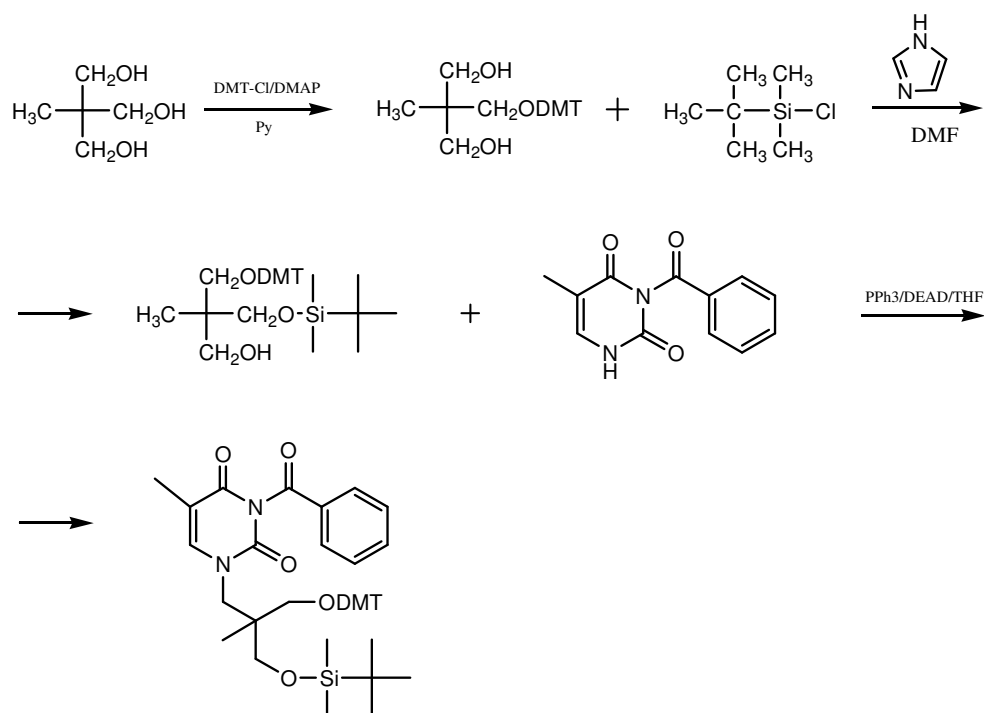


Figura 6.2.2: Schema di sintesi che prevede l'utilizzo del gruppo protettore 4,4'-dimetossitritile ab-initio.

Un secondo ossidrile veniva poi protetto mediante conversione in tert-butil-dimetilsilile derivato. La presenza di due gruppi protettori notevolmente ingombrati stericamente produsse, nella successiva reazione di condensazione con la base, scarsi risultati in termini di resa di reazione. Al fine di migliorare le rese in prodotto condensato, gli ossidrili del trisidrossimetilano sono stati efficacemente protetti mediante conversione in acetone derivato⁴⁰. La reazione è stata condotta utilizzando il 2,2-dimetossipropano come agente cicizzante e piridinio-para-toluensolfonato (PPTS) come catalizzatore per

ottenere il (2,2,5-trimetil-1,3-diossan-5-yl)-metanolo (**A** nello schema di sintesi riportato in **Figura 6.2.3** con una resa del 67%.

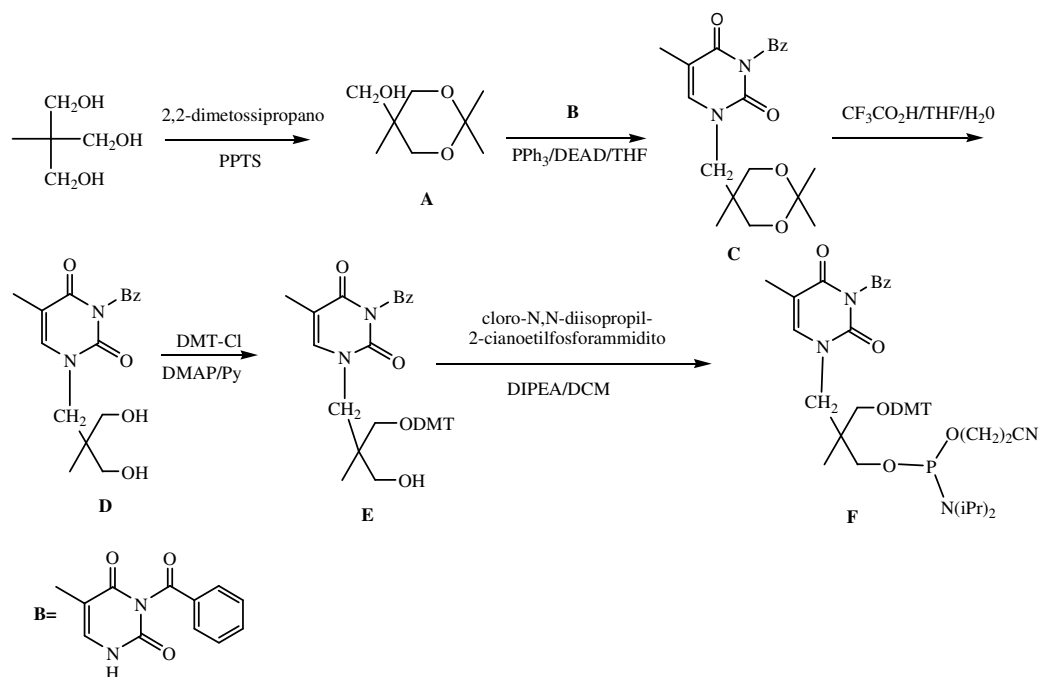


Figura 6.2.3: Schema di sintesi per l'ottenimento del nucleoside aciclico mediante protezione dei due ossidrilici del 1,1,1-trisidrossimetiletano come acetone derivato.

Tale prodotto (**A**) è stato condensato con la timina opportunamente protetta in posizione N-3. La protezione dell'N-3 della timina è stata realizzata mediante reazione con cloruro di benzoile in una miscela di piridina e acetonitrile anidri come solvente⁴¹. La reazione della timina con cloruro di benzoile dopo 16 ore conduce al prodotto disostituito nelle posizioni N1 e N3. Tale prodotto disostituito è stato successivamente trattato con una soluzione basica di acqua e diossano ottenendo l'idrolisi del gruppo benzoile in N1 e il desiderato derivato

contenente il gruppo protettore nella sola posizione N3 (**B** in **Figura 6.2.3**). La soluzione acquosa è stata neutralizzata con acido acetico ed estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica è stata seccata per dare l'N3-benzoiltimina in resa dell'85%.

La reazione tra l'N3-benzoil-timina (**B**) e il (2,2,5-trimetil-1,3-diossan-5-yl)-metanolo (**A**) per l'ottenimento del corrispondente derivato 3-Benzoil-5-metil-1-[(2,2,5-trimetil-1,3-diossan-5-yl)metil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-dione (**C**) è stata realizzata utilizzando le condizioni di Mitsunobu⁴² che prevedono l'uso del complesso trifenilfosfina-DEAD (dietilazodicarbossilato) come agente condensante. Il meccanismo di reazione è illustrato in **Figura 6.2.4**.

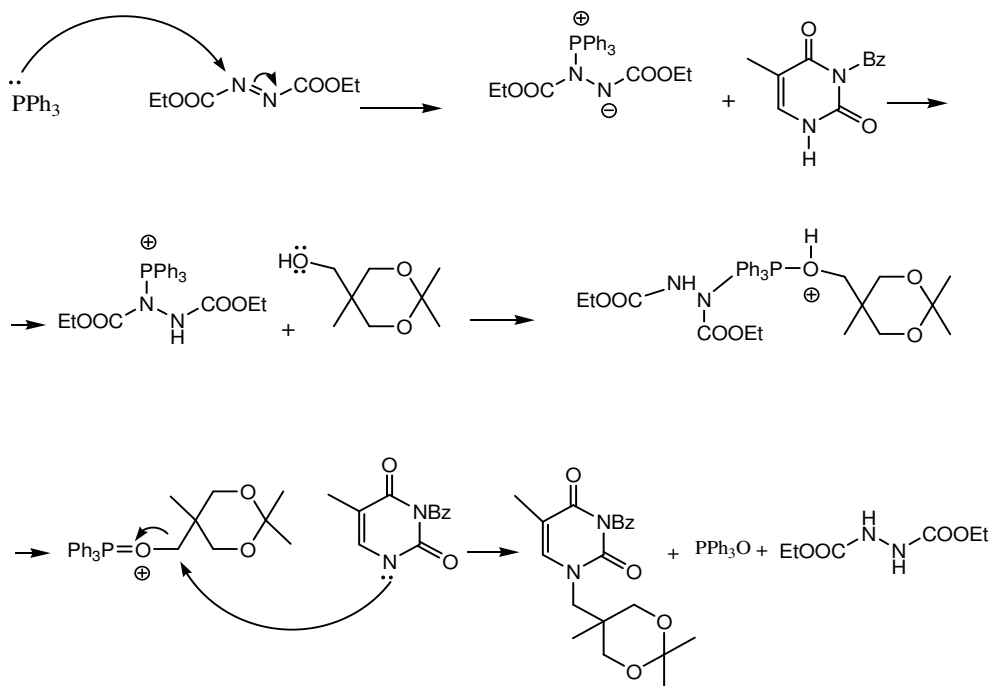


Figura 6.2.4: Meccanismo della reazione di Mitsunobu.

La reazione di condensazione è stata condotta in tetraidrofurano (THF) anidro e sotto flusso di argon. Il prodotto di condensazione (**C** in **Figura 6.2.3**) è stato ottenuto con una resa del 75%.

Tale prodotto è stato poi trattato con acido trifluoroacetico in una soluzione 4:1 THF/H₂O per avere la riapertura dell'anello che proteggeva le due funzioni ossidriliche del linker⁴³ ottenendo in tal modo il 3-Benzoil-1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione (**D** in **Figura 6.2.3**).

Questo secondo protocollo di sintesi, contrariamente al primo, ha condotto a rese elevate in prodotto finale. Poiché i gruppi protettori rappresentano l'unica variazione introdotta, l'uso di un sistema ciclico per bloccare le posizioni ossidriliche si è rivelato un efficiente metodo di protezione per evitare l'eccesso di ingombro sterico nel corso della condensazione della base con il linker. Le successive reazioni sono state condotte per ottenere l'opportuna derivatizzazione del nucleoside aciclico sintetizzato con l'obiettivo di poterlo utilizzare nella sintesi in fase solida degli analoghi del TBA. Per il conseguimento di questo obiettivo il prodotto **D** è stato protetto ad una delle due funzioni ossidriliche primarie mediante reazione con 4,4'-dimetossitritilcloruro (DMT-Cl) utilizzando la piridina come solvente e la 4-N,N-dimetilamminopiridina (DMAP) quale

catalizzatore. Il prodotto 3-Benzoil-1-[3-metossi(4,4'-dimetossitritil)-2-idrossimetil-2-metilpropil]-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione (**E** in **Figura 6.2.3**) è stato ottenuto con una resa del 50%.

La seconda funzione ossidrilica è stata funzionalizzata come fosforammidito⁴⁴ mediante reazione con cloro-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforammidito condotta in DCM anidro in presenza di diisopropil-etil-ammina (DIPEA), ottenendo il derivato 3-[3-benzoil-5-metil-2,4-diosso-3,4-diidropirimidin-1(2H)-yl]-2-metossi-(4,4'-dimetossitritil)-2-metilpropil-2-cianoetildiisopropilfosforammidito (**F**, **Figura 6.2.3**) con una resa dell' 82% in prodotto finito. Infine, mediante sintetizzatore automatico utilizzando il protocollo classico del fosforammidito, il monomero aciclico opportunamente funzionalizzato è stato inserito in specifiche posizioni della sequenza del TBA, ottenendo i relativi analoghi riportati in **Tabella 6.2.1**.

Tabella 6.2.1: Sequenza del TBA (a) e degli analoghi sintetizzati (b-f); con **T*** è indicato il nucleoside aciclico sintetizzato.

ON	SEQUENZA
a	5'GGT TGG TGT GGT TGG3'
b	5'GGT* T*GGTGTGGTTGG3'
c	5'GGT TGG T*GTGGTTGG3'
d	5'GGT TGG TGT*GGTTGG3'
e	5'GGT TGGT*GT*GGTTGG3'
f	5'GGT TGGTGTGGT*T*GG3'

Delle sequenze sintetizzate è stata determinata:

1. la capacità di assumere una conformazione quadruplex mediante la registrazione di spettri $^1\text{H-NMR}$ e CD;
2. la stabilità termica attraverso la registrazione di curve di fusione CD;
3. la determinazione del tempo di protrombina (PT) attraverso saggi farmacologici su plasma umano;

con l'obiettivo di valutare gli effetti della modifica sulla stabilità della struttura quadruplex assunta dal TBA e sulla sua affinità di legame per la trombina, con la conseguente ripercussione sulla sua attività anticoagulante.

Studi strutturali mediante spettroscopia NMR e CD

La caratterizzazione strutturale degli analoghi del TBA sintetizzati (**a-f**, **Tabella 6.2.1**) è stata effettuata registrando spettri $^1\text{H-NMR}$ dei campioni in un tampone fosfato 10 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, 110 mM KCl, pH 7, 9:1 $\text{H}_2\text{O-D}_2\text{O}$, dopo opportuno processo di *annealing*, mediante una sequenza di impulsi WATERGATE⁴⁵ per l'abbattimento del segnale dell'acqua. In **Figura 6.2.5** è riportato lo spettro protonico dell'analogo **c** che mostra chiaramente la presenza in soluzione di una singola specie ben definita, dal momento che nella regione aromatica sono presenti unicamente quindici segnali,

appartenenti ai nove protoni G-H8 ed ai sei T-H6. Inoltre, la presenza di otto picchi, attribuibili a protoni imminici, che risuonano tra 11.9 e 12.4 ppm, indica la formazione di una struttura G-quadruplex, caratterizzata da due tetradi di G. Analogamente, gli spettri protonici ottenuti per gli altri analoghi sintetizzati presentano i segnali relativi agli otto protoni imminici, confermando il loro ripiegamento in quadrupla elica. Tuttavia gli spettri protonici ottenuti per quest'ultimi mostrano una maggiore complessità di segnali, attribuibile alla presenza in soluzione di equilibri tra più strutture quadruplex; probabilmente in questi casi si ottengono anche specie intermolecolari. Ulteriori studi NMR sono necessari per caratterizzare completamente le diverse forme quadruplex presenti in questi casi.

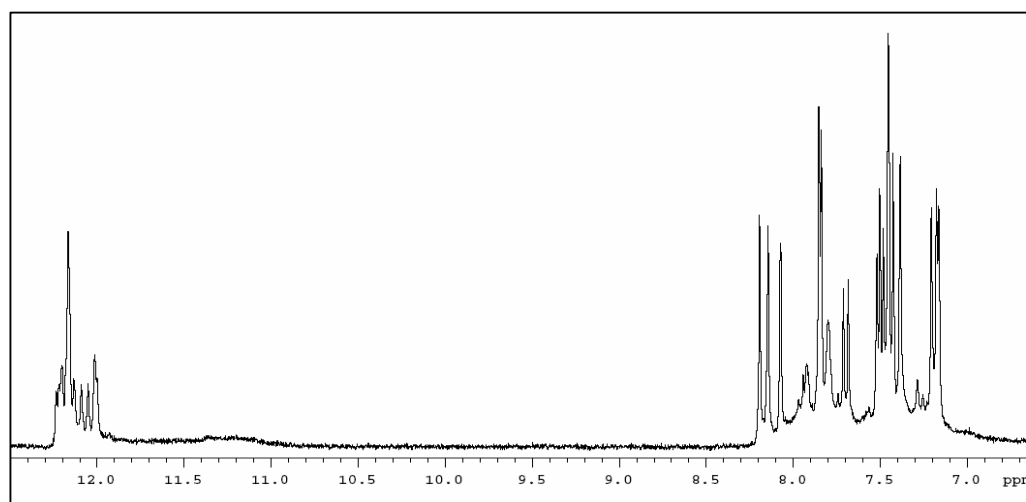


Figura 6.2.5: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'analogo **c** (Tabella 6.2.1) in tampone fosfato 10 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, 70 mM KCl, pH 7, 9:1 $\text{H}_2\text{O-D}_2\text{O}$.

La registrazione di spettri CD ha confermato la capacità degli oligonucleotidi **b-f** (Tabella 6.2.1) di assumere una conformazione quadruplex. Infatti, i profili CD, analoghi a quelli del TBA naturale, presentano un effetto Cotton positivo e negativo rispettivamente a 295 e 265 nm (Figura 6.2.6), caratteristici di una struttura quadruplex antiparallela. Questo risultato è in linea con i dati riportati in letteratura^{46,47}.

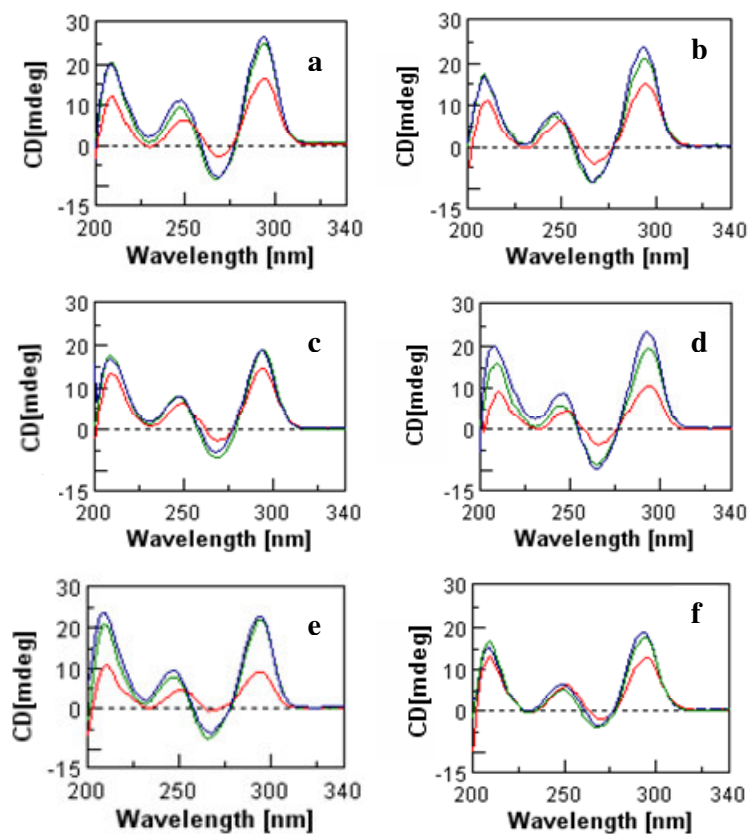


Figura 6.2.6: Profili CD degli oligonucleotidi **a-f** in 140 mM di Na⁺ (rosso); in 120 mM di K⁺ (blu); in 50 % di etanolo (verde).

Gli spettri CD di tutti gli oligonucleotidi mostrano in K^+ una maggiore ampiezza delle bande dicroiche rispetto a quelli registrati in Na^+ , indice di un incremento della popolazione quadruplex. Tale risultato conferma l'importante ruolo del potassio nell'assemblaggio e nella stabilizzazione delle strutture quadruplex, in quanto rispetto agli altri ioni conferisce maggiore stabilità³². Analoghi sono i profili CD registrati in etanolo⁴⁸, indice che anch'esso è in grado di stabilizzare strutture quadruplex, anche se in misura minore rispetto al potassio.

La stabilità termica degli oligonucleotidi **a-f** è stata valutata mediante esperimenti CD di denaturazione termica a 295 nm, registrati incrementando la temperatura da 10 a 80°C con un intervallo di 0.5°C/min. Tutti i profili di CD *melting* presentano un andamento sigmoidale con valori decrescenti di assorbanza all'aumentare della temperatura. I valori delle temperature di *melting* (T_m) trovate per gli ON **b-f** sono risultate pressoché simili a quella del TBA naturale (**Tabella 6.2.2**).

Tabella 6.2.2: Confronto dei valori di T_m del TBA naturale (**a**) e degli analoghi sintetizzati (**b-f**).

ON	SEQUENZA	T_m (Na ⁺)	T_m (K ⁺)	T_m (EtOH)
a	5'GGT TGG TGT GGT TGG3'	22°C	51°C	39°C
b	5'GGT* T*GGTGTGGTTGG3'	23°C	49°C	39°C
c	5'GGT TGG T*GTGGTTGG3'	24.5°C	54°C	41°C
d	5'GGT TGG TGT*GGTTGG3'	22°C	43°C	38°C
e	5'GGT TGGT*GT*GGTTGG3'	21.5°C	43°C	35.5°C
f	5'GGT TGGTGTGGT*T*GG3'	22°C	48°C	40°C

In particolare, per l'analogo **c** si è ottenuta una T_m maggiore rispetto al TBA naturale, indice che la struttura quadruplex adottata da tale oligonucleotide presenta una maggiore stabilità termica. Per quest'ultimo oligonucleotide preliminari saggi farmacologici su plasma umano, basati sulla determinazione del PT (tempo di protrombina), hanno mostrato una promettente attività antitrombinica. Attualmente tali esperimenti sono ancora in corso per tutti gli analoghi del TBA sintetizzati.

Conclusioni

Dagli studi eseguiti mediante spettroscopia NMR e CD, è stato possibile evidenziare la capacità degli analoghi del TBA sintetizzati (**b-f**) di conservare il ripiegamento in quadrupla elica. La stabilità di tali complessi è risultata pressoché simile a quella dell'aptamero naturale e nel caso dell'analogo **c** di alcuni gradi superiore. La

modifica introdotta, quindi, non induce variazioni di rilievo da un punto di vista strutturale. Ulteriori studi strutturali e conformazionali degli analoghi sintetizzati sono ancora in corso mediante l'acquisizione e l'interpretazione di spettri NMR bidimensionali.

Procedure sperimentali

Sintesi del 2-metossi-(4,4'-dimetossitritil)-3-(tert-butil-dimetil-silanilossi)-2-metil-propan-1-olo

All' 1,1,1-trisidrossimetiletano (1.87 mmol) sono stati aggiunti il DMT-Cl (1.50 mmol, 0.8 eq) e la DMAP come catalizzatore (0.094 mmol, 0.05 eq). I tre reagenti solidi sono stati solubilizzati a 0°C con 5 ml di piridina anidra. La miscela di reazione è stata lasciata a freddo e sotto agitazione elettromagnetica per 1 h. Il grezzo di reazione è stato cromatografato su colonna impaccata con gel di silice sospeso in una miscela 9:1 n-esano/acetato di etile (contenente lo 0,5% di TEA) ed eluita in gradiente.

Il prodotto monotritilato (0.201 mmol) è stato solubilizzato in 4 ml di dimetilformammide (DMF) anidra e ad esso sono stati aggiunti il t-butildimetilclorosilano (0.141 mmol, 0.7 eq) e l'imidazolo (0.141 mmol, 0.7 eq). La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione elettromagnetica per 1 h a temperatura ambiente dopodiché è stata seccata sottovuoto e cromatografata. La colonna è stata impaccata

con gel di silice sospeso in n-esano ed eluita in gradiente n-esano/acetato di etile.

¹H-NMR (CDCl₃): δ=7.22 (d, 2H, H aromatico); δ=7.18 (t, 2H, H aromatico); δ=7.13 (d, 4H, H aromatico); δ=7.11 (t, 1H, H aromatico); δ=6.81 (d, 4H); δ=3.80 (s, 6H); δ=3.60 (s, 2H); δ=3.58 (d, 2H); δ=3.10-3 (dd, 2H); δ=2.80 (t, 1H); δ=0.85 (s, 3H); δ=0.82 (s, 9H); δ=0.1 (s, 6H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ=158.8 (C aromatico); δ=143.6 (C aromatico); δ=135.6 (C aromatico); δ=129.5 (C aromatico); δ=129.0 (C aromatico); δ=128.4 (C aromatico); δ=126.7 (C aromatico); δ=113.4 (C aromatico); δ=94.5 [PhC(PhOMe)₂]; δ=71.8 (CH₂ODMT); δ=68.7 (CH₂OSi); δ=65.9 (CH₂OH); δ=55.4 [(CH₃O)₂]; δ=38.3 (CCH₃); δ=20.7 [(CH₃)₃CSi]; δ=14.7 [(CH₃)₃C₃Si]; δ=13.3 (CCH₃); δ=-6.5 [(CH₃)₂Si].

(MH⁺) trovato 537.3.

Sintesi del (2,2,5-trimetil-1,3-diossan-5-yl)-metanolo (A)

All' 1,1,1-Trisidrossimetilano (41,6 mmol) sono stati aggiunti 50 ml di 2,2-dimetossipropano distillato e il piridinio para-toluensolfonato (PPTS) come catalizzatore (8.32 mmol, 0.2 eq). La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per 24 h. Il grezzo di reazione è

stato seccato e purificato mediante cromatografia su colonna impaccata con gel di silice ed eluita con una miscela isocratica 1:1 n-esano/acetato di etile che ha portato al prodotto **A** con una resa del 67%.

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta=3.58-3.62$ (m, 4H, CH₂); $\delta=3.50$ (s, 2H, CH₂); $\delta=2.11$ (br, 1H, OH); $\delta= 1.41$ (s, 3H, CH₃); $\delta=1.39$ (s, 3H, CH₃); $\delta=0.83$ (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta=90.1$ [C(CH₃)₂]; $\delta=68.2$ (CH₂); $\delta=65.9$ (CH₂OH); $\delta=37.0$ (CCH₃); $\delta=28.3$ [C(CH₃)₂]; $\delta=13.3$ (CCH₃).

(**MH**⁺) trovato 161.1; (**MNa**⁺) trovato 183.1.

Sintesi N3-benzoil-timina (B)

Alla timina (8,55 mmol), solubilizzata in 15 ml di una miscela acetonitrile/piridina 5:2, è stato aggiunto a 0°C il cloruro di benzoile (19.1 mmol, 2.24 eq). La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per 16 ore e monitorata mediante TLC in camera 9:1 cloroformio/metanolo. Il grezzo di reazione è stato seccato sottovuoto e ridisciolto in 20 ml di una soluzione 0,1 M di K₂CO₃ 1:1 diossano/acqua al fine di ottenere l'idrolisi del gruppo benzoile dalla posizione N1. La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica e dopo 30' la reazione è stata interrotta portando la

soluzione acquosa basica a pH neutro. La fase acquosa è stata estratta per due volte con CH_2Cl_2 per recuperare l'N3-benzoil-timina. Le fasi organiche sono state riunite e seccate sottovuoto, ottenendo il prodotto **B** con una resa del 85%.

$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 : $\delta=9.55$ (NH immidico); $\delta=7.95$ (d, 2H, H aromatico); $\delta=7.68$ (t, 1H, H aromatico); $\delta=7.50$ (t, 2H, H aromatico); $\delta=7.12$ (s, 1H, H6); $\delta=1.95$ (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta=167.7$ (CO benzoile); $\delta=162.1$ (CO in 4); $\delta=151.1$ (CO in 2); $\delta=142.1$ (C aromatico); $\delta=135.8$ (C aromatico); $\delta=132.1$ (C6); $\delta=131.0$ (C aromatico); $\delta=129.9$ (C aromatico); $\delta=110.2$ (C5); $\delta=18.7$ (CH_3).

NOESY-NMR (CDCl_3): la presenza di effetto NOE tra H6 a $\delta=7.12$ e NH1 a $\delta=9.55$, ha confermato la protezione dell'N3 della timina.

(MH^+) trovato 231.11; (MNa^+) 253.11.

Sintesi del 3-Benzoil-5-metil-1-[(2,2,5-trimetil-1,3-diossan-5-yl)metil]-pirimidina-2,4(1H,3H)-dione (C)

L'N3-benzoil-timina anidrificata (4.01 mmol) e la trifenilfosfina (6.01 mmol, 1.5 eq) sono stati sciolti in 25 ml di THF anidro. A circa -20°C sono stati aggiunti 1.5 eq di dietilazodicarbossilato (DEAD) e dopo pochi minuti 1 eq di acetonide derivato (**A**) sciolto in 1 ml di

THF. La reazione è stata lasciata per 16 ore sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon a temperatura ambiente. Il grezzo di reazione è stato cromatografato con una colonna impaccata con gel di silice sospeso in etere dietilico/diclorometano 92:8 ed eluita in isocratica che ha portato al prodotto **C** con una resa del 72%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ=7.92 (d, 2H, H aromatico); δ=7.62 (t, 1H, H aromatico); δ=7.43 (t, 2H, H aromatico); δ=7.12 (s, 1H, H6); δ=4.02 (s, 2H, CH₂N); δ=3.65-3.55 (dd, 4H, CH₂); δ=1.95 (s, 3H, CH₃); δ=1.41 (s, 3H, CH₃); δ=1.39 (s, 3H, CH₃); δ=0.83 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ=167.7 (CO benzoile); δ=162.1 (CO in 4); δ=151.1 (CO in 2); δ=142.1 (C aromatico); δ=135.8 (C aromatico); δ=132.1 (C6); δ=131.0 (C aromatico); δ=129.9 (C aromatico); δ=110.2 (C5); δ=90.1 [C(CH₃)₂]; δ=67.0 (CH₂); δ=51.9 (CH₂N); δ=37.0 (CCH₃); δ=28.3 [C(CH₃)₂]; δ=18.7 (CH₃); δ=13.3 (CCH₃).

(MH⁺) trovato 373.2; (MNa⁺) trovato 395.2.

Sintesi 3-Benzoil-1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione (D)

Il prodotto **C** (2,83 mmol) è stato solubilizzato in 13 ml di una soluzione 4:1 THF/H₂O ed ad esso sono stati aggiunti 0,5 ml di acido trifluoroacetico. La soluzione è stata lasciata per circa 16 ore a temperatura ambiente, dopodiché è stata neutralizzata con idrossido

di ammonio concentrato. Il THF è stato allontanato sottovuoto ed il restante residuo è stato diluito con altra acqua e lavato per due volte con DCM. La fase acquosa è stata seccata sottovuoto, ottenendo il prodotto **D** con una resa del 95%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ=7.98 (d, 2H, H aromatico); δ=7.70 (t, 1H, H aromatico); δ=7.60 (s, 1H, H6); δ=7.57 (t, 2 H, H aromatico); δ=3.80 (s, 2H, CH₂N); δ=3.20 (m, 4H, CH₂); δ=1.95 (s, 3H, CH₃); δ=0.89 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ=167.7 (CO benzoile); δ=162.1 (CO in 4); δ=151.1 (CO in 2); δ=142.1 (C aromatico); δ=135.8 (C aromatico); δ=132.1 (C6); δ=131.0 (C aromatico); δ=129.9 (C aromatico); δ=110.2 (C5); δ=65.8 (CH₂OH); δ=51.9 (CH₂N); δ=42.0 (CCH₃); δ=18.7 (CH₃); δ=13.3 (CCH₃).

(MH⁺) trovato 333.1; (MNa⁺) trovato 355.1.

Sintesi 3-Benzoil-1-[3-metossi(4,4'-dimetossitritil)-2-idrossimetil-2-metilpropil]-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-dione (E)

Il prodotto **D** della reazione precedente (1.38 mmol) è stato anidrificato con tre coevaporazioni sotto vuoto con acetonitrile anidro. Ad esso sono stati aggiunti il DMT-Cl (1.11 mmol, 0.8 eq) e la DMAP (0.069 mmol, 0.05 eq). I reattivi sono stati solubilizzati in 13 ml di piridina/acetonitrile 2:1. La miscela di reazione è stata posta

sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon a temperatura ambiente. Dopo circa 20 minuti la reazione è stata interrotta per aggiunta di metanolo anidro. Il grezzo è stato seccato sotto vuoto e purificato mediante colonna cromatografica impaccata con gel di silice sospeso in una miscela 1:1 n-esano/acetato di etile contenente lo 0,5% di trietilammina che ha portato al prodotto **E** con una resa del 50%.

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta=7.90$ (d, 2H, H aromatico); $\delta=7.65$ (t, 1H, H aromatico); $\delta=7.48$ (t, 2H, H aromatico); $\delta=7.40$ (d, 2H, H aromatico); $\delta=7.38$ (m, 3H, H aromatico); $\delta=7.35$ (d, 4H, H aromatico); $\delta=7.12$ (s, 1H, H₆); $\delta=6.85$ (d, 4H, H aromatico); $\delta=3.95$ - 3.75 (dd, 2H, CH₂N); $\delta=3.80$ (s, 6H, CH₃O); $\delta=3.38$ - 3.21 (m, 2H, CH₂ODMT); $\delta=2.95$ - 3.10 (m, 2H, CH₂OH); $\delta=1.80$ (s, 3H, CH₃); $\delta=1.05$ (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta=167.7$ (CO benzoile); $\delta=162.1$ (CO in 4); $\delta=158.8$ (C aromatico); $\delta=151.1$ (CO in 2); $\delta=143.6$ (C aromatico); $\delta=142.1$ (C aromatico); $\delta=135.8$ (C aromatico); $\delta=135.5$ (C aromatico); $\delta=132.1$ (C₆); $\delta=131.0$ (C aromatico); $\delta=129.9$ (C aromatico); $\delta=129.5$ (C aromatico); $\delta=129.2$ (C aromatico); $\delta=128.4$ (C aromatico); $\delta=126.7$ (C aromatico); $\delta=113.4$ (C aromatico); $\delta=110.2$ (C₅); $\delta=94.5$ [PhC(PhOMe)₃]; $\delta=71.8$ (CH₂ODMT); $\delta=65.9$

(CH₂OH); δ =55.4 [(CH₃O)₂]; δ =51.2 (CH₂N); δ =42.0 (CCH₃); δ =18.7 (CH₃); δ =13.3 (CCH₃).

(MH⁺) trovato 635.4; (MNa⁺) trovato 657.7.

Sintesi del 3-[3-benzoil-5-metil-2,4-diosso-3,4-diidropirimidin-1(2H)-yl]-2-metossi-(4,4'-dimetossitriti1)-2-metilpropil-2-cianoetil-diisopropilfosforammidito (F)

Il prodotto **E** della reazione precedente (0.334 mmol) è stato anidrificato alla pompa ad olio per diverse ore e mediante coevaporazioni con etere dietilico anidro. Ad esso sono stati aggiunti 233 μ l di DIPEA (1.33 mmol, 4eq), 119 μ l di 2-cianoetil-N,N-diisopropil-clorofosforoammidito (0.50 mmol, 1,5 eq) e 3,3 ml di DCM dry. La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica e flusso di argon per 20 minuti ed interrotta con metanolo anidro. Il monitoraggio è stato effettuato mediante TLC in camera 8:1:1 diclorometano/acetato di etile/trietilammina. La miscela di reazione è stata diluita con acetato di etile e lavata prima con circa 20 ml di una soluzione al 10% di Na₂CO₃ e poi con 20 ml di una soluzione di NaCl. La fase organica è stata anidrificata su solfato di magnesio, essiccata sottovuoto e cromatografata. La colonna è stata impaccata con gel di silice sospeso con una soluzione 8:1:1 diclorometano/acetato di etile/trietilammina ed eluita in isocratica che ha portato al prodotto **F** con una resa del 82%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ=7.90 (d, 2H, H aromatico); δ=7.65 (t, 1H, H aromatico); δ=7.48 (t, 2H, H aromatico); δ=7.40 (d, 2H, H aromatico); δ=7.38 (m, 3H, H aromatico); δ=7.35 (d, 4H, H aromatico); δ=7.12 (s, 1H, H6); δ=6.85 (d, 4H, H aromatico); δ=3.95-3.80 (m, 2H, CH₂N); δ=3.75 (s, 6H, CH₃O); δ=3.70 (m, 2H, CH₂ODMT); δ=3.60 (m, 2H, CH₂OP); δ=3.55 (m, 2H, N(CHMe₂)₂); δ=3.39-3.02 (m, 2H, CH₂CH₂CN); δ=2.60-2.45 (t, 2H, CH₂CN); δ=1.80 (s, 3H, CH₃); δ=1.09 (s, 12H, N(CHMe₂)₂); δ=1.05 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ=167.7 (CO benzoile); δ=162.1 (CO in 4); δ=158.8 (C aromatico); δ=151.1 (CO in 2); δ=143.6 (C aromatico); δ=142.1 (C aromatico); δ=135.8 (C aromatico); δ=135.5 (C aromatico); δ=132.1 (C6); δ=131.0 (C aromatico); δ=129.9 (C aromatico); δ=129.5 (C aromatico); δ=129.2 (C aromatico); δ=128.4 (C aromatico); δ=126.7 (C aromatico); δ=117.7 (CN); δ=113.4 (C aromatico); δ=110.2 (C5); δ=94.5 [PhC(PhOMe)₃]; δ=71.8 (CH₂ODMT); δ=66.1 (CH₂OP); δ=58.1 (CH₂CH₂CN); δ=55.4 [(CH₃O)₂]; δ=51.2 (CH₂N); δ=43.3 N(CHMe₂)₂; δ=42.0 (CCH₃); δ=24.7 [N(CHCH₃)₂]; δ=20.7 (CH₂CN); δ=18.7 (CH₃); δ=13.3 (CCH₃).

(MH⁺) trovato 835.7; (MNa⁺) trovato 857.7.

Sintesi in fase solida degli analoghi del TBA contenenti il nucleoside aciclico 1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-dione.

La sintesi degli analoghi del TBA contenenti il nucleoside aciclico 1-(3-idrossi-2-idrossimetil-2-metilpropil)-5-metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-dione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico PERSEPTIVE Biosystems, utilizzando la tecnica in fase solida del β -cianoetilfosforamidito secondo il protocollo fornito dal costruttore. I fosforamiditi delle basi naturali sono stati acquistati dalla Primm, mentre il derivato 3-[3-benzoil-5-metil-2,4-diosso-3,4-diidropirimidin-1(2H)-yl]-2-metossi-(4,4'-dimetossitriti)-2-metilpropil-2-cianoetildiisopropilfosforammidito (F) è stato opportunamente sintetizzato come precedentemente descritto. Dopo la sintesi in fase solida ciascun ON è stato distaccato dal supporto solido mediante trattamento con una soluzione acquosa di NH_3 al 33% e lasciata in stufa termostata a 55°C per una notte. Il surnatante ed i lavaggi del supporto solido eseguiti con H_2O bidistillata sono raccolti e seccati sotto vuoto. Il solido ottenuto è ridisciolto in H_2O , filtrato su filtro a membrana con pori da $0.22\mu\text{m}$ e purificato mediante cromatografia HPLC utilizzando una colonna Nucleogen SAX a scambio ionico eluita con un gradiente lineare di 20mM NaH_2PO_4 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 80:20, pH 7.00, (eluente A) e 20mM

NaH₂PO₄ e 1M di NaCl, H₂O/CH₃CN 80:20, pH 7.00 (eluente B), dallo 0% al 100% di B in 30', a temperatura ambiente. Dopo purificazione HPLC, gli oligonucleotide sono stati desalificati mediante cromatografia ad esclusione molecolare usando una colonna impaccata con BIOGEL P2-fine come supporto solido. La purezza degli ON è stata controllata mediante HPLC a fase inversa ed elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide al 20% contenente 7M di urea. La concentrazione dell'oligonucleotide è stata determinata a 90°C mediante assorbimento UV a 260nm, usando rispettivamente i coefficienti di estinzione molare 11700 M⁻¹cm⁻¹ per dG e 8800 M⁻¹cm⁻¹ per T. Ciascun oligonucleotide è stato poi caratterizzato mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

Esperimenti NMR

I campioni NMR sono stati preparati sciogliendo 100 OD₂₆₀ (*Optical Density*) in 0.6 ml (H₂O/D₂O 9:1) di una soluzione tampone a pH 7.0, 10 mM di KH₂PO₄, 110 mM di KCl, 0.2 mM di EDTA e sottoposti a processo di *annealing*. Gli spettri protonici monodimensionali sono stati registrati su uno spettrometro Varian 500 MHz a 10°C usando la sequenza di gradienti WATERGATE⁴⁵ per l'abbattimento del segnale dell'H₂O.

Dicroismo circolare (CD) ed esperimenti di melting CD

La capacità degli oligonucleotidi **b-f** di ripiegarsi in una struttura quadruplex monomolecolare, in tampone Na⁺ o K⁺ o in EtOH 50%, è stata dedotta dall'analisi dei loro spettri CD.

I campioni per gli esperimenti CD degli oligonucleotidi modificati **b-f** e della controparte naturale, ON **a**, sono stati preparati alla concentrazione di 1×10^{-5} M, usando un tampone fosfato a pH 7.00 contenente 130mM di NaCl e 10mM NaH₂PO₄ per gli esperimenti in Na⁺, o 110mM di KCl e 10mM KH₂PO₄ per gli esperimenti in K⁺, o 1mM di NaH₂PO₄ al 50% di EtOH per gli esperimenti in etanolo. I campioni così preparati sono stati sottoposti a processo di *annealing* attraverso riscaldamento a 90° C per 15 minuti e lento raffreddamento a temperatura ambiente per una notte.

Gli spettri CD delle quadruplex e le curve di *melting* sono stati registrati su uno spettropolarimetro JASCO 715, accoppiato a una cella programmabile, termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Nell'acquisizione degli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 200 a 340 nm alla velocità di 5 nm min⁻¹, con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2 nm. Le misure sono state effettuate a 10°C utilizzando *cuvette* in quarzo con un cammino ottico di 0.5 cm, munite di tappo di teflon. Agli spettri dei campioni è stato

sottratto lo spettro del tampone fosfato. Ogni spettro riportato rappresenta la media di almeno tre scansioni.

Le curve di CD *melting* sono state registrate in funzione della temperatura da 10 a 80°C a 295 nm con una velocità di scansione di 0.5°C/min.

Bibliografia

1. He, G.-X.; Williams, J.P.; Postich, M.J.; Swaminathan, S.; Shea, R.G.; Terhorst, T.; Law, V.S.; Mao, C.T.; Sueoka, C.; Coutrè, S. and Bischofberger, N.; *J. Med. Chem.*; **1998**, 41, 4224.
2. Ciesiolka, J. and Yarus, M.; *RNA*, **1996**, 2, 758-93.
3. Connel, G.J.; Illangesekare, M. and Yarus, M.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 5497-02.
4. Jenison, R.D.; Gill, S.C.; Pardi, A. and Polisky, B.; *Science*, **1994**, 263, 1425-29.
5. Wallace, S.T. and Schroeder, R.; *RNA*, **1998**; 4,112-23.
6. Lin Y, Qiu Q., Gill, S.C., Jayasena, S.D.; *Nucleic Acids Res.*, **1994**; 22, 5229-34.
7. Wiegand, T.W.; Williams, P.B.; Dreskin, S.C.; Jouvin, M-H; Kinet, J-P and Tasset, D.; *J. immunology* **1996**;157, 231-8.
8. Pagratis, N.C.; Chang, Y-F; Jennings., Fitzwater, T. and Jellinek, D.; *Nat. Biotechnology*, **1997**, 15, 68-72.

9. Jensen, K.B.; Green, L.; Mac Dougal-Waugh, S. and Tuerk, C.; *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 237-47.
10. Conrad, R.; Keranen, L.M.; Ellington, A.D. and Newton, A.C.; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 32051-54.
11. Schneider, D.J.; Feigon, J.; Hostomskj, Z. and Gold, L.; *Biochemistry*, **1995**, 34, 9599-610.
12. Jelinek, D.; Green, L.S.; Bell, C. and Janjic, N.; *Biochemistry*, **1994**, 33, 10450-56.
13. Wiegand, T.W.; Williams, P.W.; Dreskin, S.C.; Jouvin, M.H.; Kinet, J.P. and Tasset, D.; *J. immunol.*, **1996**, 157, 221-230.
14. Tuerk, C. and Gold, L.; *Science*, **1990**, 249, 505-10.
15. Ellington, A. and Szostak, J.; *Nature*, **1990**, 346, 818-22.
16. Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H. and Toole, J.J.; *Nature*, **1992**, 355, 564-566.
17. Griffin, L.C.; Tidmarsh, G.F.; Bock L.C.; Toole J.J. and Leung, L.L.K.; *Blood*, **1993**, 81, 3271-76.
18. Li, W.X.; Kaplan, A.V.; Grant, G.W.; Toole, J. and Leung, L.K.; *Blood*, **1994**, 83, 677-682.
19. Fenton, J.W; *Ann. N.Y. Acad. Sci*, **1981**, 370, 468-495.
20. Rogers, S. J.; Pratt, C.W.; Whinna, H.C. and Church, F.C.; *J. Biol. Chem.*; **1992**, 267, 3613-17.

21. Sheehan, J.P.; Wu, Q. and Sadler, J.E.; *Blood* 78 Suppl 1, **1991**, 277a.
22. Bode, W.; Turk, D. and Karshikov, A.; *Protein Science*, **1992**, 1, 426-471.
22. Grutter, M.G.; Priestle, J.P.; Rahuel, J.; Grossenbacher, H.; Bode, W.; Hofsteenge, J. and Stone, S.R; *EMBO*, **1990**, J9, 2361-65.
23. Rydel, T.J.; Ravichandran, K.G.; Tulinsky, A.; Bode, W. ; Huber, R.; Roitsch, C. and Fenton, J.W.; *Science*, **1990**, 249, 277-80.
24. Wu, Q.; Tsiang, M. and Sadler, J. E.; *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 24408-12.
25. Padmanabhan, K. and Tulinsky, A.; *Acta Cryst.*, **1996**, D52, 272-282.
26. Padmanabhan, K.; Padmanabhan, K.P.; Ferrara, J.D.; Sadler, J.E. and Tulinsky, A.; *J.Biol.Chem.*, **1993**, 268, 17651-54.
27. Wang, K.Y.; Mc Curdy, S.; Shea, R.G.; Swaminathan, S. and Bolton, P.H.; *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899-1904.
28. Macaya, R.F.; Schultze, P.; Smith, F.W.; Roe, J.A. and Feigon J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **1993**, 90, 3745-49.
29. Kelly, J.A.; Feigon, J. and Yeates, T.O.; *J. Mol. Biol.*, **1996**, 256, 417-422.
30. Baldrich, E. and O'Sullivan, C.K.; *Analytical Biochemisrty*, **2005**, 341, 194-197.

31. Smirnov, I. and Shafer, R.H. ; *Biochemistry*, **2000**, 39, 1462-68.
32. Marathias, V.M. and Bolton, P.H.; *Nucleic Acids Res.*, **2000**; 28, 1969-77.
33. Vairamani, M. and Gross, M.L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 42-43.
34. Tapparelli, C.; Metternich, R.; Ehrhardt, C. and Cook, N.S.; *Trends Pharm. Sci.*, **1993**, 14, 336-376.
35. He, G-X.; Krawczyk, S.H.; Swaminathan, S. and Regan, G.; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2234-2242.
36. Krawczyk, S.H.; Bischofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G. and Swaminathan, S.; *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, 14, 1109-16.
37. He, G-X.; Williams, J. P., Postich, M. J.; Swaminathan, S.; Regan, G. S.; Law, V. S.; Mao, C. T.; Sueoka, C.; Coutrè, S. and Bischofberger, N.; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4224-31.
38. Shaw, J.P.; Pishback, I.A.; Cundy, K.C. and Lee, W.A.; *Pharm. Res.*, **1995**, 12 1912-37.
39. krawczyk, S.H.; Bishofberger, N.; Griffin, L.C.; Law, V.S.; Shea, R.G. and Swaminathan, S.; *Nucleosides and Nucleotides*, **1995**, 14, 1109-116.
40. Harnden, M.R.; Jarvest. L.; Bacon T.H. and Boyol, R.; *J. Med. Chem.*, **1987**, 1632-42.

41. Kenneth, A.; Cruickhank, J. J. and Colin, B.R.; *Tetraedron Letters*, **1984**, 25, 681-684.
42. Mitsunobu, O.; *Synthesis*, **1981**, 1, 28.
43. Leblanc, Y.; Fitzsimmons, B.J.; Adams, J.; Perez, F. and RoKach, J.; *J.Org.Chem*, **1986**, 51, 789-793.
44. Holmes, S.C. and Gant, M.J.; *Eur J.Org.Chem.*, **2005**, 5171-83.
45. Piotto, M.; Saudek, V. and Sklenar, V.J.; *J. Biol. NMR*, **1992**, 2, 661-665.
46. Williamson, J. R.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*; **1994**, 23, 703-730.
47. Smirnov, I. and Shaker, R.H.; *Biochemistry*, **2000**, 39, 1462-68.
48. Vorlykova, M.; Bednarova, K. and Kypr, J.; *Biopolymers*, **2006**, 82, 253–260.