

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

FACOLTÀ DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XIX CICLO 2003-2006

***SINTESI E ANALISI STRUTTURALE DI OLIGONUCLEOTIDI ED  
ANALOGHI FORMANTI STRUTTURE QUADRUPLEX.***

Coordinatore del corso:

Ch.<sup>mo</sup> Prof. E. Abignente

Docente Tutore:

Ch.<sup>mo</sup> Prof. A. Galeone

Candidata:

Dott.<sup>ssa</sup> Antonella Virgilio

# **INDICE**

## **CAPITOLO 1**

<b>INTRODUZIONE GENERALE</b>	<b>4</b>
<i>Bibliografia</i>	8

## **CAPITOLO 2**

<b>STRUTTURE G-QUADRUPLEX DEL DNA</b>	<b>9</b>
2.1 <i>Variabilità strutturale nelle G-quadruplex.</i>	10
2.2 <i>Stabilizzazione di strutture G-quadruplex: importanza dei cationi e delle interazioni di stacking.</i>	18
2.3 <i>Importanza biologica delle strutture G-quadruplex.</i>	22
2.4 <i>La caratterizzazione strutturale del DNA mediante tecniche spettroscopiche.</i>	36
<i>Bibliografia</i>	44

## **CAPITOLO 3**

<b>STRUTTURE QUADRUPLEX CONTENENTI BASI MODIFICATE</b>	<b>53</b>
3.1 <i>Introduzione</i>	53
3.2 <i>Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina in strutture quadruplex del DNA a filamenti paralleli.</i>	62
3.2.1 <i>Parte sperimentale.</i>	76
3.3 <i>Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-oxo-2'-deossiadenosina in oligonucleotidi formanti strutture quadruplex.</i>	81
3.4 <i>Analisi strutturale di quadruplex a filamenti paralleli contenenti un residuo di 8-bromo-2'-deossiadenosina.</i>	87
3.5 <i>Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-metil-2'-deossiadenosina in oligonucleotidi formanti strutture quadruplex.</i>	93
3.5.1 <i>Parte sperimentale.</i>	109
<i>Bibliografia</i>	113

## **CAPITOLO 4**

<b>ANALOGHI OLIGONUCLEOTIDICI FORMANTI G-QUADRUPLEX</b>	
<b>CONTENENTI MODIFICAZIONI DEL BACKBONE ZUCCHERO-FOSFATO 115</b>	
4.1	<i>Introduzione.</i> 118
4.2	<i>Una nuova classe di quadruplex a DNA formate da oligodeossiribonucleotidi contenenti un sito di inversione di polarità 3'-3' o 5'-5'. 125</i>
4.3	<i>Studi strutturali su quadruplex a LNA. 139</i>
	<i>Bibliografia 147</i>

## **CAPITOLO 5**

<b>MODIFICHE POST-SELEX DELL'APTAMERO ANTI-TROMBINA 153</b>	
5.1	<i>Introduzione 153</i>
5.2	<i>Aptameri e loro applicazioni terapeutiche. 158</i>
5.3	<i>Una mini-library di analoghi del TBA contenenti siti di inversione della polarità 3'-3' e 5'-5'. 161</i>
5.4	<i>Un nuovo aptamero modificato legante la trombina contenente un sito di inversione della polarità 5'-5'. 167</i>
5.4.1	<i>Parte sperimentale. 184</i>
	<i>Bibliografia 190</i>

## **CAPITOLO 6**

<b>CLASSIFICAZIONE TOPOLOGICA DI STRUTTURE QUADRUPLEX 194</b>	
6.1	<i>Introduzione. 194</i>
6.2	<i>Orientamento relativo dei filamenti. 195</i>
6.3	<i>Numero dei loop che connettono i filamenti e loro connettività. 196</i>

## **Capitolo 1: Introduzione generale**

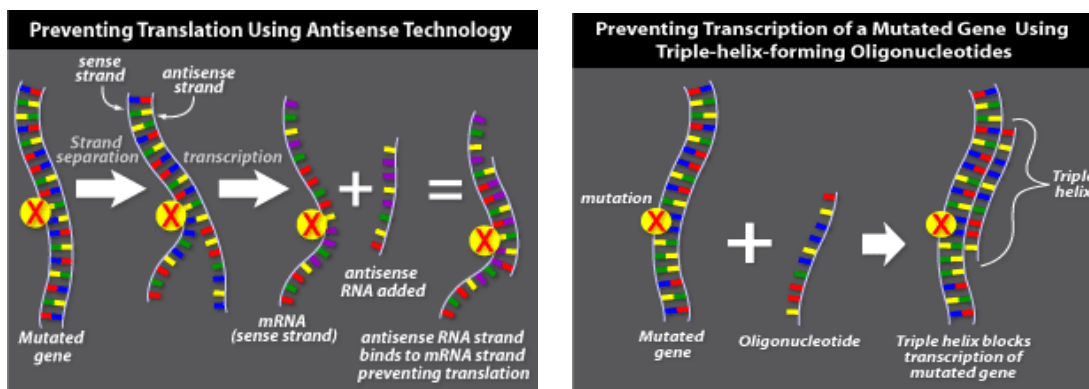
Diverse patologie affondano le loro radici in disordini a livello genico; ciò giustifica l'interesse dei chimici farmaceutici per la progettazione di strategie terapeutiche in grado di interferire sull'espressione genica, processo in cui l'informazione contenuta nel codice genetico è tradotta in complessi macromolecolari di natura proteica. Molte malattie virali (patologie causate da adenovirus, herpes simplex virus, citomegalovirus, HIV) e tumorali (linfomi, leucemie, melanomi)<sup>1</sup> sono provocate dall'alterata produzione di una proteina; gli oligonucleotidi sintetici, naturali ed analoghi, si pongono come valida alternativa alla terapia farmacologica tradizionale basata sull'inibizione dell'attività della proteina anomala, agendo a monte del processo di produzione della proteina stessa attraverso due diverse strategie terapeutiche: strategia antisenso e antigene.

La strategia antisenso impiega un oligonucleotide antisenso capace di appaiarsi con una sequenza ad esso complementare sull'mRNA e impedirne la traduzione in proteine attraverso diversi meccanismi quali inibizione del meccanismo di splicing, interferenza nell'interazione con l'apparato ribosomiale o promozione del processo di degradazione mediante attivazione dell'RNasi H.

La strategia antigene agisce a monte del processo di traduzione impiegando un oligonucleotide (TFO: triplex forming oligonucleotide) in grado di appaiarsi al DNA, principalmente a livello delle sequenze dei promotori,



formando strutture a tripla elica definite triplex. Le triplex determinano blocco della replicazione e della trascrizione del DNA bersaglio del TFO silenziando l'informazione in esso contenuta (**Fig.1**).



**Fig. 1.** Schema dell'approccio antisenso e antigene.

Altro promettente impiego terapeutico degli oligonucleotidi sintetici è come aptameri, molecole selezionate in base alla loro capacità di legare con alta affinità e specificità un dato target, in genere di natura proteica, interferendo con la sua attività.

Se da un punto di vista farmacodinamico gli oligonucleotidi naturali risultano molto interessanti per le loro potenzialità terapeutiche, vista l'alta specificità d'azione, dal punto di vista farmacocinetico presentano grossi limiti di impiego in vivo (difficoltà di attraversamento delle membrane biologiche, rapida degradazione ad opera delle nucleasi). Per ovviare a questi problemi sono stati progettati numerosi analoghi nucleotidici, chimicamente modificati a livello del *backbone* zuccherio-fosfato o a livello delle basi azotate, dotati

della stessa affinità e specificità di legame delle molecole naturali, ma con profili farmacocinetici decisamente migliori.

La forma predominante del DNA nel genoma è la classica struttura a doppia elica di tipo B<sup>2</sup>, tuttavia, in dipendenza della sequenza e delle condizioni ambientali, il DNA può adottare un'incredibile varietà di strutture secondarie quali ad esempio strutture duplex A, Z, cruciformi, *hairpin*, a tripla elica (*triplex*) e a quadrupla elica (*quadruplex*) (Fig.2).

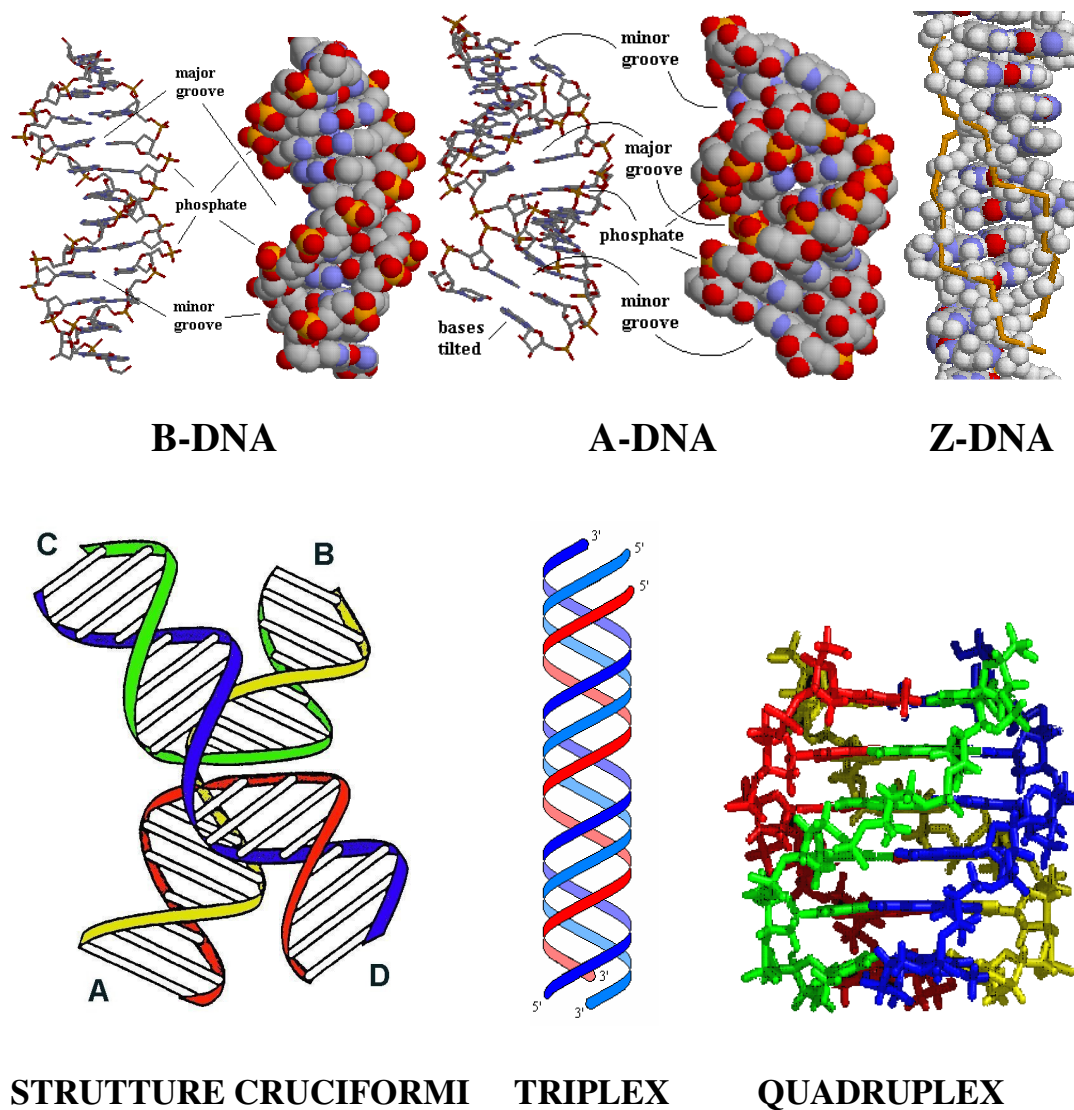
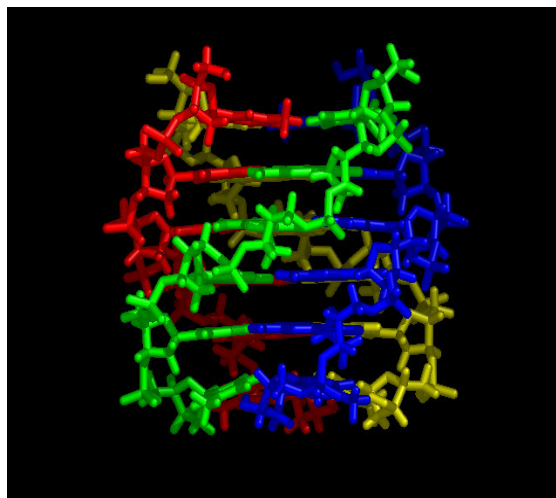


Fig. 2 Strutture secondarie del DNA.

La determinazione del ruolo biologico di strutture non canoniche del DNA è un'area di ricerca molto attiva. Vari problemi ancora devono essere risolti, tra questi l'esistenza ed il ruolo in vivo di queste strutture, la modalità della loro formazione e la regolazione delle informazioni da esse trasportate.

L'interesse verso queste strutture, quindi, deriva da due diverse linee di indagine: il loro potenziale ruolo in vivo<sup>3-4</sup> e la possibilità di usare oligonucleotidi (ODN) capaci di formare strutture secondarie come agenti terapeutici.

Nel corso del mio Dottorato di Ricerca il mio interesse si è rivolto soprattutto verso le strutture G-quadruplex (**Fig.3**), complessi a quadrupla elica adottati da sequenze ricche di guanine, coinvolte in importanti processi biologici, quali la replicazione, la trascrizione, la ricombinazione genica<sup>5</sup> e la funzionalità telomerica.<sup>6</sup>



**Fig. 3** Modello tridimensionale di una G-quadruplex.

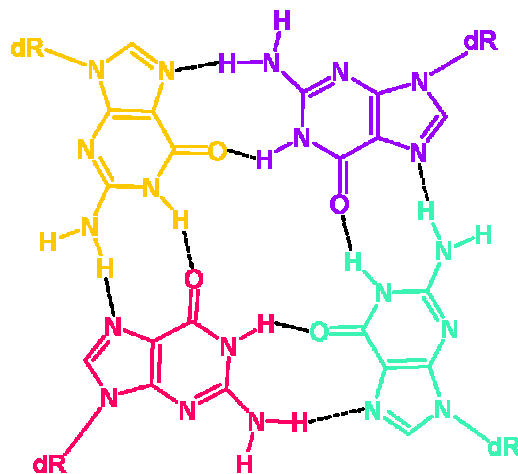
Durante questi tre anni, infatti, mi sono occupata principalmente della sintesi ed analisi strutturale, mediante l'utilizzo di tecniche spettroscopiche NMR, mono e bidimensionali, CD e UV, di oligonucleotidi ed analoghi formanti strutture quadruplex.

### ***Bibliografia***

1. G. He, S.H. Krawczyk, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, 41, 2234-2242.
2. S. Neidle, *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, **1998**, Oxford University Press, New York.
3. M.D. Frank-Kamenetskii, S.M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.*, **1995**, 64, 65-95.
4. V.N. Soyfer, V.N. Potaman, *Triple-Helical Nucleic Acids*, **1996**, Springer-Verlag, New York.
5. H. Arthanari, P.H. Bolton, *Chem. Biol.*, **2001**, 5, 221-230.
6. D. J. Patel, S. Bouaziz, A. Kettani, Y. Wang, S. Neidle, *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, **1998**, Oxford University Press, New York.

## Capitolo 2: Strutture G-Quadruplex del DNA

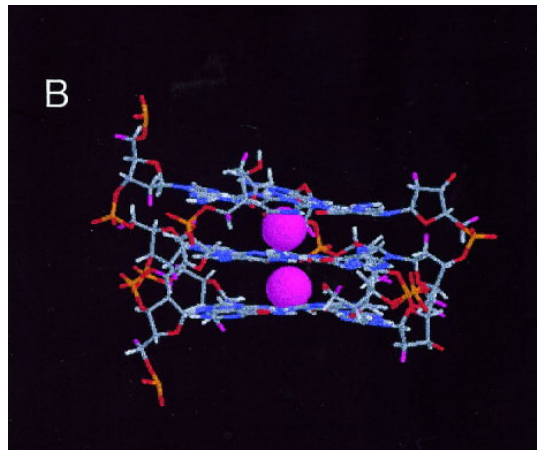
Le quadruplex sono inusuali strutture del DNA a quattro filamenti adottate da sequenze ricche di guanine (G). I “mattoni” alla base della costruzione di queste strutture sono le tetradi di G o quartetti di G (**Fig.4**). La tetrade di G è una struttura macrociclica planare costituita da 4 guanine interagenti tra loro mediante una serie di legami idrogeno. Ciascuna base guaninica si comporta allo stesso tempo da donatore e da accettore di due legami idrogeno<sup>1</sup> (legami di tipo Hoogsteen), che coinvolgono rispettivamente l’N1-H e l’N2-H di una guanina e l’N7 e l’O6 del residuo adiacente. La disposizione quadrata planare crea una cavità centrale.



**Fig. 4** Tetrade di guanine.

Dall’unione di 4 filamenti di DNA ricchi di guanine si ottiene una struttura elicoidale destrorsa<sup>2</sup>, stabilizzata dalla presenza di una serie di tetradi di guanine sovrapposte a una distanza di 3.3 Å l’una dall’altra.<sup>3-4</sup> Al centro dell’elica si crea una cavità cilindrica delimitata dagli ossigeni (O6)

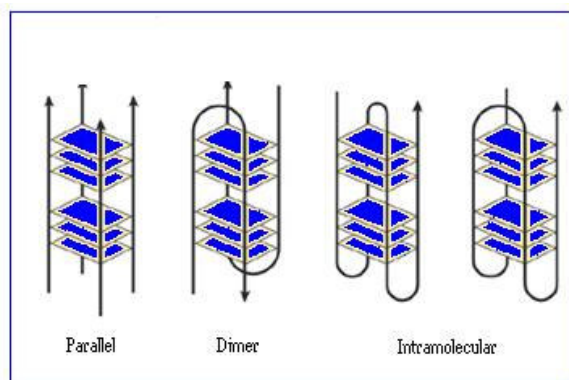
carbonilici delle guanine, che risulta energeticamente sfavorita<sup>5</sup>, rendendo necessaria la presenza di un controione. Tale cavità costituisce uno specifico sito di legame per ioni metallici,<sup>6</sup> essenziali per la formazione e la stabilizzazione di questi complessi macromolecolari. I cationi più efficaci nella stabilizzazione di strutture G-quadruplex sono  $K^+$  e  $Na^+$ ; ciascun controione presenta una precisa geometria di coordinazione, in particolare nel caso di  $K^+$  si osserva una geometria di coordinazione di tipo antiprismatico bipiramidale con il coinvolgimento di due piani di G per un totale di otto ossigeni carbonilici equamente coordinanti il catione centrale.<sup>7</sup> (Fig.5)



**Fig. 5** G-quadruplex con catione.

### ***2.1 Variabilità strutturale nelle G-quadruplex***

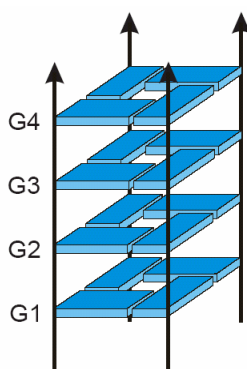
Le G-quadruplex differiscono per la stechiometria dei filamenti (Fig.6), il loro relativo orientamento e la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nelle tetradi.



**Fig. 6** G-quadruplex con differente stechiometria.

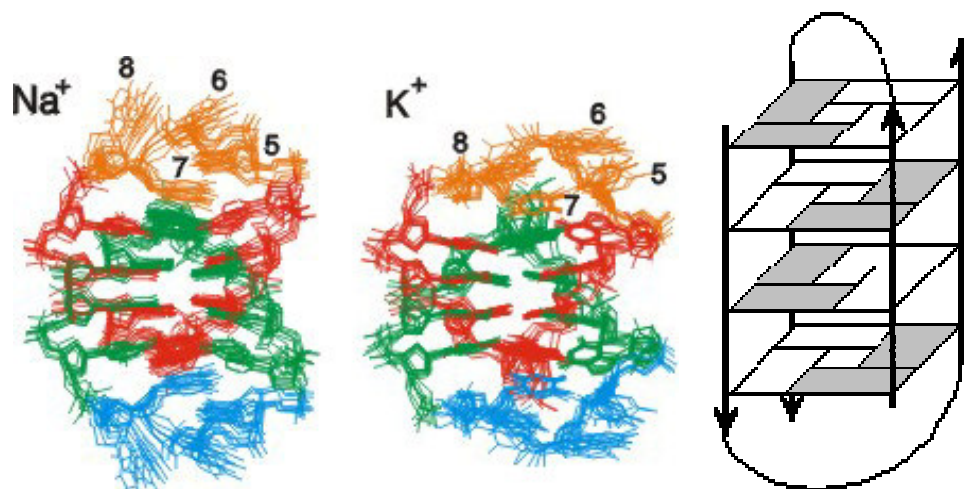
Le strutture quadruplex, infatti, possono derivare o dal ripiegamento di una singola catena oligonucleotidica (*G-quadruplex monomolecolari*)<sup>8</sup> o dall'interazione tra due (*G-quadruplex bimolecolari*)<sup>9</sup> o quattro (*G-quadruplex tetramolecolari*)<sup>10</sup> diversi filamenti oligonucleotidici.

L'analisi spettroscopica NMR ha mostrato che oligonucleotidi con una singola sequenza di G formano quadruplex con quattro filamenti paralleli<sup>11</sup> altamente simmetriche. Esempio di tale tipologia di quadruplex è la struttura del cristallo formato dal complesso [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> (**Fig.7**) con ioni Na<sup>+</sup>, disposti o a sandwich tra i piani di G o coplanari al quartetto.<sup>12</sup>



**Fig. 7** Rappresentazione schematica della struttura a raggi X del cristallo di [d(TGGGGT)]<sub>4</sub>.

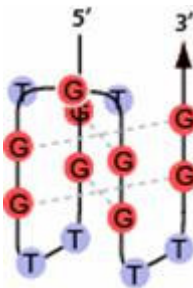
Un oligonucleotide con due regioni ricche di G può ripiegarsi in un *hairpin* grazie alla formazione di appaiamenti di tipo Hoogsteen tra G appartenenti a regioni diverse. La dimerizzazione di un *hairpin* porta alla formazione di una G-quadruplex bimolecolare con due *loop*, che si possono orientare in due modi diversi dando origine a diversi ripiegamenti: *loop* laterali (*edgewise loop*) connettono catene adiacenti antiparallele e *loop* diagonali (*diagonal loop*) che attraversano la struttura G-quadruplex per connettere catene antiparallele. *Loop* laterali nella struttura quadruplex possono fronteggiarsi o disporsi alle estremità opposte dello “scaffold”; *loop* diagonali, invece, devono necessariamente disporsi ai lati opposti della struttura per motivi di ingombro sterico e di repulsione elettrostatica tra i backbone carichi negativamente. Esempio di tale tipologia di quadruplex è fornito dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha*, d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>) (**Fig.8**), che da studi NMR in soluzione con ioni Na<sup>+</sup> ha rivelato la capacità di organizzarsi in una quadruplex bimolecolare con *loop* diagonali.<sup>13-14</sup>



**Fig. 8** Sovrapposizione delle otto migliori strutture a quadrupla elica adottate dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha* in soluzione di ioni Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

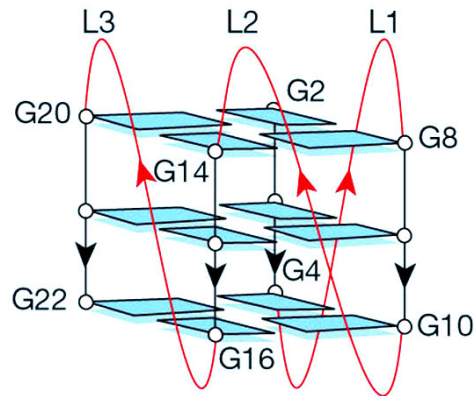


Un singolo filamento oligonucleotidico ricco di guanine può ripiegarsi in modo da formare una struttura G-quadruplex unimolecolare con tre *loop*.<sup>15</sup> I *loop* in genere costringono i filamenti della struttura a disporsi in modo antiparallelo; un esempio indicativo di tale tipologia di struttura è dato dall'aptamero legante la trombina (TBA), un pentadecamero di sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG) (**Fig.9**). Mediante studi di NMR si è visto che in soluzione questo oligonucleotide forma una quadruplex monomolecolare a filamenti adiacenti antiparalleli con due piani di G, connessi tra loro da un *loop* centrale (TGT) e due *loop* laterali (TT).<sup>16-17</sup>



**Fig. 9** Schematizzazione della struttura quadruplex unimolecolare adottata dal TBA.

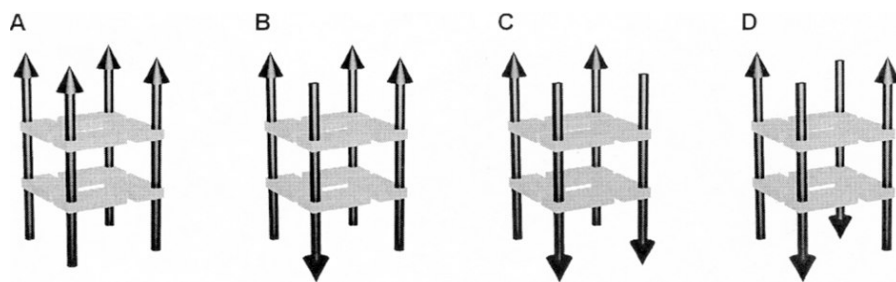
Le strutture dei cristalli di oligonucleotidi contenenti la sequenza telomerica umana d(TTAGGG), in presenza di ioni  $K^+$ , hanno arricchito la famiglia delle G-quadruplex di una nuova geometria di *loop*.<sup>18</sup> Il 22-mer d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] forma, infatti, una quadruplex intramolecolare in cui i tre *loop* TTA si dispongono con geometria “*double-chain-reversal*” per dare una quadruplex unimolecolare con quattro filamenti paralleli; questi *loop* si estendono lontani dal nucleo centrale costituito dai quartetti di G fornendo potenziali siti di riconoscimento per le proteine (**Fig.10**).<sup>19</sup>



**Fig. 10** Rappresentazione schematica della struttura di d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>].

Da studi strutturali di varie G-quadruplex è emerso inoltre che i *loop* non sono completamente liberi e flessibili, ma possono stabilire importanti interazioni di stacking con la tetrate di G più vicina. Ciascuna delle quattro basi, inoltre, in prossimità di tetradi di G ha la possibilità di formare a sua volta strutture planari stabilizzate da interazioni di stacking con i piani di G adiacenti.<sup>20</sup> Accanto a tetradi di G, infatti, sono stati osservati altri tipi di tetradi, quali tetradi U<sub>4</sub>, T<sub>4</sub> e A<sub>4</sub>,<sup>20,21,22</sup> nonché tetradi miste, del tipo G:C:G:C,<sup>23</sup> confermando l'ipotesi secondo cui le forze di stacking possono indirizzare la formazione di tetradi alternative.

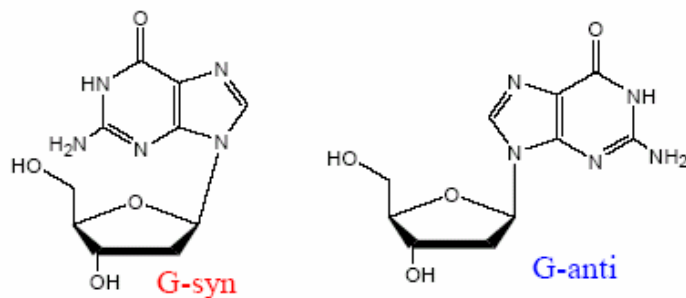
Altra fonte di variazione strutturale nell'ambito delle G-quadruplex è l'orientamento relativo di *backbone* adiacenti, che possono avere diverse polarità. Indipendentemente dal fatto che siano o meno parte della medesima molecola, i filamenti costituenti una quadruplex si possono disporre in quattro modi diversi. Possono essere tutti paralleli, tre paralleli e uno antiparallelo, paralleli adiacenti o antiparalleli alternati (**Fig.11**).



**Fig. 11** G-Quadruplex con diverso orientamento relativo dei filamenti.  
 (A) Tutti i filamenti paralleli. (B) Tre filamenti paralleli e uno antiparallelo. (C) Due coppie di filamenti adiacenti paralleli. (D) Filamenti antiparalleli alternati.

La polarità dei filamenti è stata determinata per diverse sequenze. Brevi sequenze oligonucleotidiche con tratti di G adottano preferenzialmente strutture quadruplex con quattro filamenti paralleli, come dimostrato da studi di NMR<sup>11,24</sup> e di cristallografia.<sup>12</sup> La struttura, determinata con l'impiego della spettroscopia NMR, della sequenza telomerica ripetuta di *Tetrahymena*<sup>25</sup> invece è un esempio di struttura G-quadruplex che ha tre filamenti paralleli e uno antiparallelo. Ci sono poi molti esempi sia di strutture G-quadruplex con due coppie di filamenti adiacenti paralleli<sup>13,15,26</sup> sia con filamenti antiparalleli alternati.<sup>17,27</sup>

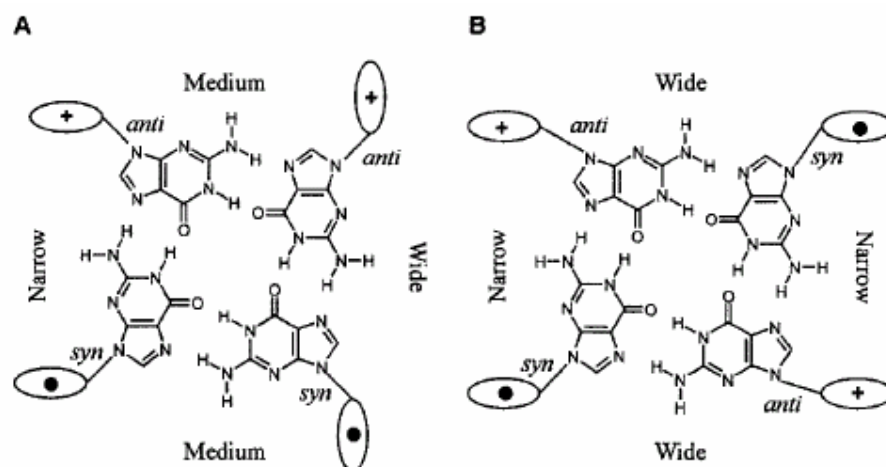
La variabilità strutturale delle quadruplex coinvolge anche la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nella formazione dei quartetti, infatti, mentre nel B-DNA “canonico” le basi adottano esclusivamente la conformazione glicosidica di tipo *anti*, nelle strutture quadruplex del DNA le guanine possono adottare sia la conformazione di tipo *syn*, sia quella di tipo *anti* (**Fig.12**).



**Fig. 12** Orientazione intorno al legame glicosidico

Tuttavia la libertà conformazionale di guanine adiacenti implicate nella medesima tetrade è limitata dall'orientamento relativo dei filamenti. Infatti, nel caso di strutture quadruplex a filamenti paralleli, perché si possano formare i legami idrogeno della tetrade, le guanine del medesimo quartetto devono avere lo stesso angolo torsionale glicosidico, al contrario, nel caso di quadruplex a filamenti antiparalleli devono avere angoli torsionali glicosidici opposti. La conformazione glicosidica delle basi influenza anche l'energia di stacking e l'ampiezza dei solchi tra i filamenti. Mentre il B-DNA canonico ha un solco minore e uno maggiore, lo stacking delle tetradi di G determina la formazione di quattro solchi non necessariamente identici, che possono essere di dimensione ampia, stretta o media. Nel caso di quadruplex con quattro filamenti paralleli tutte le G di una tetrade adottano la medesima conformazione glicosidica, delineando quattro solchi di identica ampiezza di dimensione media.

Nel caso di quadruplex a filamenti antiparalleli, l'ampiezza dei solchi è influenzata dalla polarità dei legami Hoogsteen tra guanine adiacenti. Infatti, il solco formato in presenza di un'interazione tra una guanina donatrice di legami idrogeno con conformazione glicosidica *syn* ed una guanina adiacente accettrice con conformazione *anti* è molto stretto (distanza fosfato-fosfato = 7-9 Å).<sup>8</sup> In caso, invece, di polarità invertita tra guanine adiacenti *syn* e *anti* si forma un solco molto ampio.<sup>28</sup> Infine, quando le guanine adiacenti adottano la stessa conformazione glicosidica si forma un solco di ampiezza intermedia<sup>28</sup> (**Fig.13**).



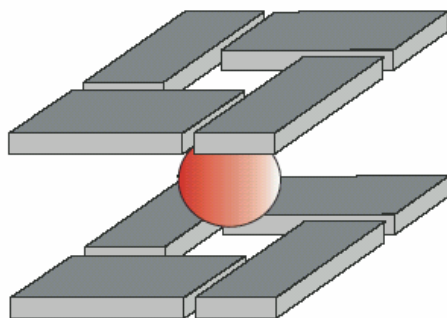
**Fig. 13** Le interazioni tra angoli torsionali glicosidici e polarità dei filamenti danno origine a solchi di ampiezze differenti.

La conformazione glicosidica delle guanine implicate nelle tetradi è spesso strettamente correlata all'orientamento relativo dei filamenti. Per esempio, le guanine coinvolte nelle G-tetradi alla base di quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli adottano preferenzialmente una conformazione glicosidica

di tipo *anti*, mentre in quartetti di G di quadruplex intramolecolari a filamenti antiparalleli si osserva un'alternanza *syn/anti*.<sup>29</sup> In generale strutture quadruplex a filamenti antiparalleli devono avere basi sia in conformazione *syn* che *anti* per garantire il loro appaiamento nelle tetradi. Sono state caratterizzate, infatti, diverse strutture sia con basi completamente in *anti*,<sup>11,24,30</sup> sia con un'alternanza regolare di conformazioni *syn/anti*<sup>13,14,26,31,32</sup> o una miscela di esse tanto in tratti di guanine quanto nell'ambito delle singole tetradi.<sup>8,33,34</sup>

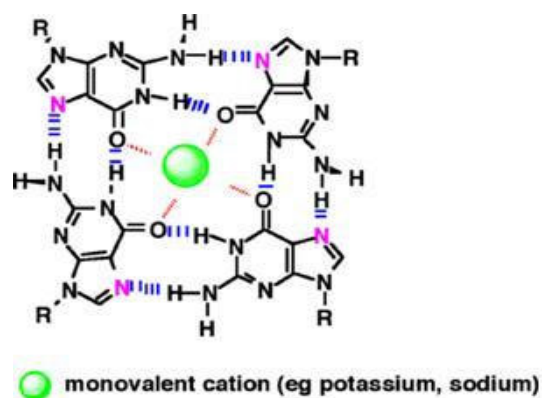
## ***2.2 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex: importanza dei cationi e delle interazioni di stacking.***

Una delle caratteristiche più interessanti delle strutture G-quadruplex è la loro selettiva interazione con determinati cationi, capaci di accomodarsi bene nella cavità formata dalla sovrapposizione di tetradi di guanine (**Fig.14**).



**Fig. 14** Coordinazione di cationi monovalenti tra due quartetti di G.

La cavità centrale tra due piani di G è delimitata dagli otto ossigeni carbonilici (O-6), che possono partecipare a precisi legami di coordinazione di cationi (**Fig.15**). La capacità del potassio di stabilizzare strutture G-quadruplex è correlata alle dimensioni del suo raggio ionico. È ormai ben noto che la coordinazione di ioni potassio,<sup>35</sup> e più raramente ioni sodio<sup>28</sup> e stronzio,<sup>36</sup> aumenta la stabilità di tali strutture sia cineticamente sia termodinamicamente.<sup>37</sup> Potassio e stronzio hanno raggi ionici simili, di circa 1.3 Å, e si adattano perfettamente alle cavità tra tetradi di guanine. In generale il raggio ionico è un parametro atto a descrivere la capacità dei vari cationi di stabilizzare tetradi di G. Nella serie dei metalli alcalini l'ordine di stabilizzazione è  $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+$ , mentre per i metalli alcalino-terrosi è  $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ .<sup>1</sup> Gli ioni litio non favoriscono la formazione di nessun tipo di struttura quadruplex.<sup>38</sup>



**Fig. 15** Tetrade di G con catione.

Fatta eccezione per la serie dei metalli alcalino terrosi, non è ancora nota la

capacità di stabilizzazione di G-quadruplex da parte di cationi multivalenti. Concentrazioni millimolari di cationi di metalli di transizione quali  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  contrastano la formazione di G-quadruplex indotta da ioni  $\text{K}^+$ .<sup>39</sup> Inoltre va tenuto presente che nel nucleo delle cellule viventi i cationi liberi predominanti sono quattro tipi, presenti nelle seguenti concentrazioni approssimative:  $\text{K}^+$  (150 mM),  $\text{Na}^+$  (5 mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5 mM), e  $\text{Ca}^{2+}$  (0.2  $\mu\text{M}$ ). Tutti gli altri cationi hanno concentrazioni fisiologiche nell'ordine sub-nanomolare, quindi le strutture G-quadruplex legano preferenzialmente ioni  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ , forme cationiche che predominano nelle cellule. In generale la selettività delle G-quadruplex verso ioni  $\text{K}^+$  piuttosto che  $\text{Na}^+$  è stata spesso attribuita alla migliore capacità di  $\text{K}^+$  di adattarsi alla cavità centrale delineata dalle tetradi di G. Tuttavia la teoria dell'adattamento ottimale non spiega completamente tale selettività, suggerendo anche l'implicazione di fattori elettronici.<sup>40</sup> Successivamente è stato dimostrato che la scelta di coordinare ioni  $\text{K}^+$  piuttosto che  $\text{Na}^+$  è correlata alle relative energie libere di idratazione.<sup>41</sup> Entrambi i cationi, infatti, ben si adattano alla cavità centrale di strutture quadruplex, ma è più facile deidratare ioni  $\text{K}^+$ .<sup>42</sup> In conclusione, senza un catione legato l'arrangiamento ciclico del quartetto di G risulterebbe elettronicamente sfavorito, per cui un catione ottacoordinato, che instauri interazioni catione-dipolo con otto diverse guanine, è essenziale per la formazione e la stabilizzazione dei quartetti di G, i mattoni alla base delle strutture quadruplex. Ovviamente le repulsioni elettrostatiche che ci si



aspetterebbe tra i cationi nella cavità centrale sono minimizzate dalla presenza degli atomi di ossigeno carbonilici e degli anelli aromatici. Le interazioni catione-dipolo stabilizzano tali strutture più di qualunque altra interazione non covalente presente.

Dati sperimentali e teorici mostrano che le interazioni catione-dipolo sono essenziali per la formazione di legami idrogeno e l'instaurarsi di forze di stacking tra le basi. La coordinazione di cationi, infatti, riducendo la repulsione tra gli ossigeni carbonilici nella cavità centrale, aumenta la forza dei legami idrogeno e promuove lo stacking tra i quartetti di G. Quest'ultimo tipo di interazione garantisce l'impilamento di più quartetti di G, con conseguente formazione di una struttura G-quadruplex. Pertanto le interazioni di stacking sono chiaramente importanti nel definire la struttura e il riconoscimento molecolare di una quadruplex di DNA.

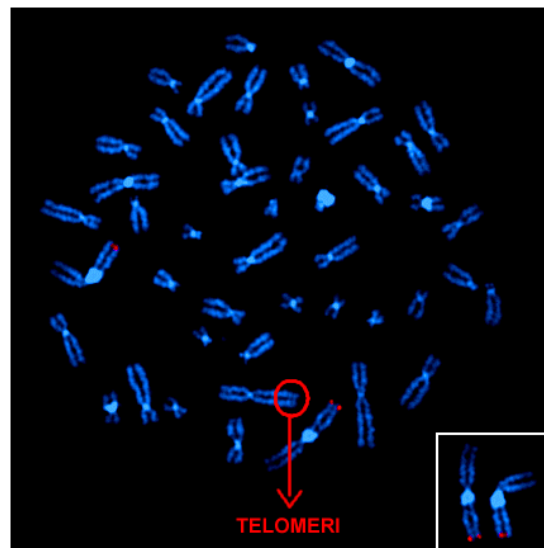
Lo stacking tra le basi è guidato da interazioni elettrostatiche e di van der Waals.<sup>43,44</sup> In realtà c'è un ampio dibattito sull'importanza relativa delle forze che guidano le interazioni di stacking in sistemi aromatici. Tale tipo di interazione è considerata in primo luogo un effetto dipolo, legato alla presenza di un'ampia superficie aromatica polarizzabile; il dipolo si instaura probabilmente per interazione tra atomi parzialmente carichi positivamente, presenti alla periferia di una base, e la nube di elettroni  $\pi$ , localizzata al centro. Le basi azotate danno interazioni di stacking maggiori rispetto ai comuni sistemi aromatici, in quanto i gruppi N-H e C=O, più polarizzati dei

classici legami C-H presenti nei comuni idrocarburi planari, aumentano la densità di carica positiva rispettivamente sull'atomo di idrogeno e sull'atomo di carbonio.

In secondo luogo, calcoli teorici e sperimentali hanno suggerito che in tali interazioni siano coinvolti effetti idrofobici “non classici”.<sup>43,44</sup> Per esempio, Spöner e collaboratori hanno calcolato che le interazioni di van der Waals tra due quartetti di G sono fortemente attrattive, con un  $\Delta H = -49 \text{ kcal mol}^{-1}$ , mentre la componente elettrostatica è repulsiva, con un  $\Delta H = +28 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,<sup>45</sup> con il risultato di un'energia di stacking totale pari a  $\Delta H = -21 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Il contributo entalpico dovuto allo stacking di un quartetto ( $\Delta H = -21 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), dunque, è maggiore di quello calcolato a livello di una doppia elica di DNA ( $\Delta H = -15 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), inoltre anche le interazioni G-quadruplex-ligandi rivelano l'intervento di effetti idrofobici “non classici”.<sup>46</sup> Questi effetti derivano dalla disponibilità di un'ampia superficie di stacking aromatica contenente atomi polarizzabili<sup>44</sup> e dal rilascio di molecole d'acqua, debolmente legate alla superficie aromatica, al momento dell'impilamento. Dunque varie interazioni non covalenti (legami idrogeno, interazioni catione-dipolo e interazioni di van der Waals) collaborano a definire la struttura, la dinamica e la funzione di questi complessi macromolecolari.

### ***2.3 Importanza biologica delle strutture G-quadruplex.***

L'interesse dei ricercatori verso le strutture G-quadruplex è notevolmente aumentato quando si è scoperto il loro potenziale coinvolgimento in importanti processi biologici. Infatti, sequenze in grado di formare strutture G-quadruplex sono ampiamente rappresentate nel genoma di organismi eucarioti, mentre non c'è evidenza della presenza di questo motivo nei genomi procarioti. In particolare sequenze ricche di guanine sono state individuate a livello dei telomeri<sup>47</sup> (**Fig.16**), delle regioni switch di immunoglobuline,<sup>48</sup> nelle regioni promotrici del gene *c-myc* e di altri oncogeni,<sup>49</sup> a livello del gene dell'insulina umana<sup>50</sup> e del gene della suscettibilità al retinoblastoma.<sup>51</sup>



**Fig. 16** Cromosomi e telomeri.

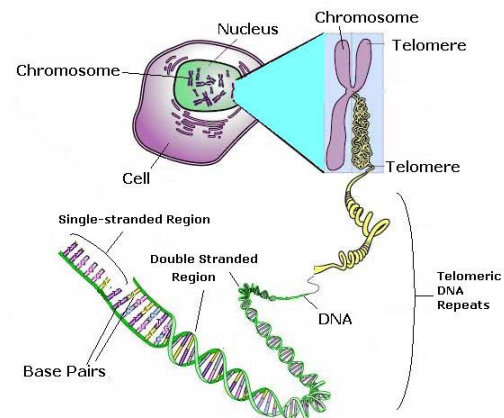
Dato che sequenze ricche di G, in presenza di cationi monovalenti, sono in grado di formare strutture quadruplex, invocate in importanti esperimenti *in vitro*, nell'ambito della letteratura scientifica si è aperto un ampio dibattito sul

loro potenziale ruolo *in vivo*. Diversi studi sembrano suggerire che le strutture G-quadruplex giocano ruoli differenti in sistemi completamente diversi e possono agire da regolatori sia positivi che negativi di eventi funzionali; esperimenti *in vitro*, infatti, hanno individuato un coinvolgimento di tali strutture nella meiosi,<sup>10</sup> in importanti processi biochimici a livello dell'estremità telomerica<sup>9,31</sup> dei cromosomi eucariotici, delle regioni promotrici di geni<sup>49,51</sup> e dei siti di ricombinazione.<sup>52</sup>

La prova dell'importanza biologica delle strutture G-quadruplex è legata alla capacità di tali strutture di interagire con molte proteine umane. La specificità del legame G-quadruplex-proteine è molto elevata, a tal punto che molte proteine riconoscono solo determinate disposizioni spaziali di DNA G-quadruplex. Una delle prime prove *in vivo* della funzionalità biologica di strutture a quadrupla elica è stata fornita da Hurley e collaboratori nel 2002, essendo stata individuata una quadruplex intramolecolare connessa ad una regione di 20-30 coppie di basi in grado di reprimere la trascrizione della proteina oncogenica *c-myc*.<sup>53</sup>

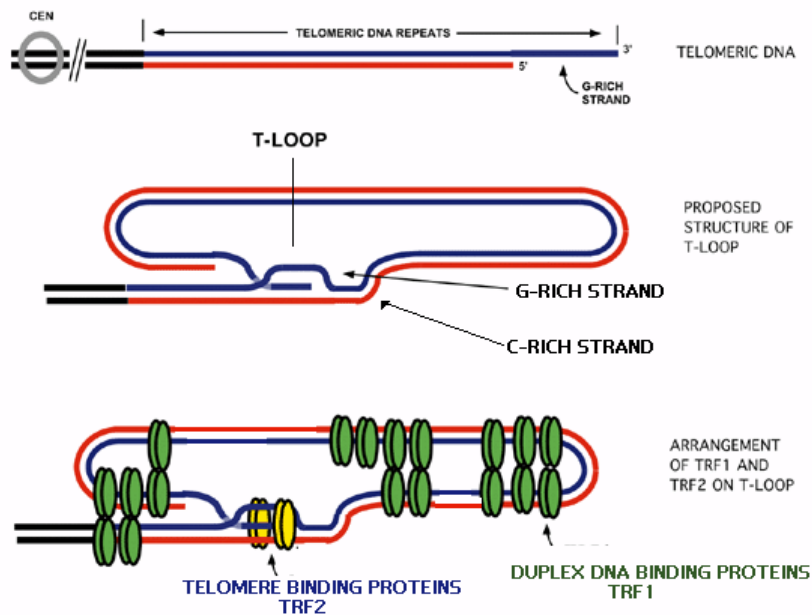
Un importante esempio di interazione G-quadruplex-proteine è rappresentata dall'interazione G-quadruplex-telomerasi. Strutture G-quadruplex, infatti, sono riscontrabili a livello dei telomeri. I telomeri sono estremità dei cromosomi eucariotici (**Fig.17**), composte da DNA e proteine, essenziali per il mantenimento dell'integrità cromosomiale. Senza il DNA telomerico, infatti, i cromosomi umani rischierebbero di dar luogo a fusioni delle

estremità con conseguente formazione di cromosomi dicentrici o multicentrici.<sup>4</sup> Tali cromosomi alterati potrebbero rompersi durante la mitosi con conseguenti danni irreparabili per la cellula, quali senescenza o apoptosi.<sup>54</sup>



**Fig. 17** Localizzazione cellulare dei telomeri.

I telomeri inoltre hanno la funzione di prevenire la perdita di informazione genetica nel corso dei vari cicli di replicazione cellulare. Il DNA telomerico nell'uomo è una sezione di 5000-15000 basi di sequenza ripetuta  $d(\text{TTAGGG})_n$ . In ciascun ciclo di replicazione cellulare si perdono 50-500 unità TTAGGG, per cui la lunghezza del DNA telomerico diminuisce con l'età e può essere presa come parametro dello stato di invecchiamento cellulare (**Fig.18**).



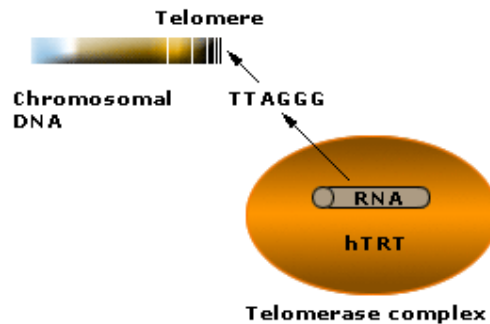
**Fig. 18** Probabile meccanismo di funzionamento delle estremità telomeriche del DNA.

Il progressivo accorciamento dei telomeri in seguito alle divisioni cellulari è il risultato sia della perdita progressiva della porzione di DNA corrispondente alla lunghezza dell'RNA primer rimosso, sia di uno specifico evento esonucleolitico che rimuove una porzione del DNA telomerico a livello del filamento ricco di C liberando le 130-210 basi ricche di G protrudenti all'estremità 3'. La perdita di sequenze ripetute di DNA all'estremità dei cromosomi dovrebbe essere sicuramente meno importante per la cellula rispetto alla perdita di sequenze codificanti geni critici. I telomeri dunque garantiscono la completa replicazione del DNA cromosomiale.

È stato ipotizzato che i telomeri siano coinvolti nelle patologie cancerose, dal momento che l'induzione in vitro della telomerasi permette ad alcune cellule

di sfuggire all'irreversibile processo di invecchiamento cellulare ed acquisire una capacità replicativa pressochè infinita.<sup>55</sup>

La telomerasi è una ribonucleoproteina con attività di trascrittasi inversa, che consiste di una componente ad RNA (TR), una proteina catalitica (hTERT) ed una proteina accessoria (TP1).<sup>56-58</sup> Tale enzima catalizza la sintesi di una serie di unità d(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>) a partire dall'estremità 3' telomerica (che funge da primer) impedendo in definitiva l'accorciamento telomerico<sup>59</sup> (**Fig.19**).



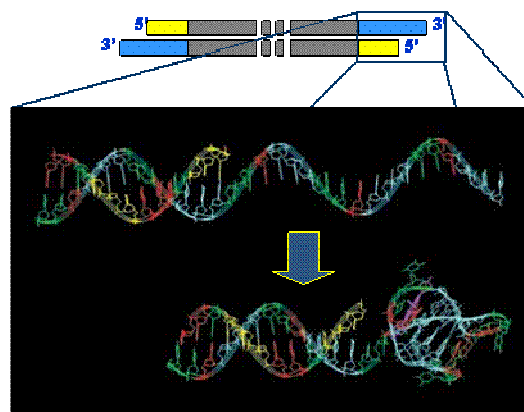
**Fig. 19** Meccanismo d'azione della telomerasi.

La telomerasi è espressa nell'80-90% delle cellule tumorali ed è assente nella maggior parte delle cellule somatiche. La sua attività può essere usata dunque come marker della presenza di cellule tumorali, ossia cellule sfuggite all'evento dell'invecchiamento e capaci di replicarsi in maniera incontrollata.<sup>60-62</sup>

Tale enzima può rappresentare un potenziale bersaglio di farmaci nella chemioterapia antitumorale, con il vantaggio di una scarsa tossicità perché

non è attivo nelle cellule somatiche. L'attività della telomerasi si riscontra anche a livello delle cellule germinali e staminali, ma fortunatamente il presunto stato di quiescenza delle cellule staminali permette di distinguerle da quelle tumorali.<sup>63</sup>

L'attività della telomerasi può essere inibita per esempio impedendo l'interazione enzima-substrato; la telomerasi riconosce come proprio substrato il DNA a singolo filamento, ma non le strutture G-quadruplex. La porzione a singolo filamento protrudente all'estremità 3' del telomero umano, costituita da unità ripetute di sequenza 5'-TTAGGG-3', sembrerebbe in grado di ripiegarsi in una quadruplex intramolecolare (**Fig.20**), inoltre le condizioni ioniche, che stabilizzano le strutture G-quadruplex, sembrerebbero inibire la telomerasi. Secondo Cech e collaboratori l'attività telomerasica di *Oxytricha nova* decade significativamente in presenza di ioni  $K^+$ , inoltre il ripiegamento del DNA telomerico in strutture G-quadruplex sembra influenzare l'allungamento del telomero *in vitro* e pertanto potrebbe fungere da regolatore negativo dell'allungamento telomerico *in vivo*.<sup>64</sup>

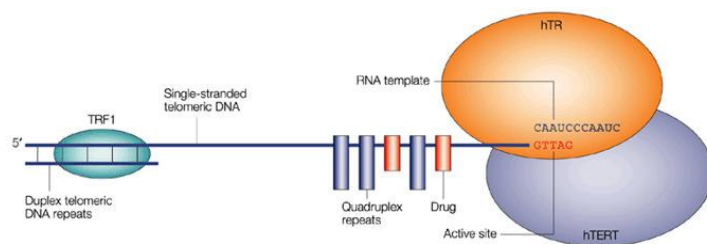


**Fig. 20** Strutture quadruplex presenti alle estremità telomeriche.



L'inibizione della telomerasi dipende dallo spostamento dell'equilibrio singolo filamento/quadruplex verso la forma strutturata, per cui composti capaci di legare e stabilizzare tali strutture a partire dal DNA a singola elica ricco di G delle estremità 3' dei telomeri (**Fig.21**), interferiscono con l'attività della telomerasi e quindi con il mantenimento dei telomeri nelle cellule cancerose, trasformando queste linee cellulari immortali in cellule capaci di subire progressivi accorciamenti dei telomeri e quindi di invecchiare.

La maggior parte degli inibitori della telomerasi sono composti aromatici in grado di stabilizzare le G-quadruplex mediante interazioni di stacking con i quartetti di G. L'etidio bromuro, un ben noto intercalante delle doppie eliche, lega il DNA a quadrupla elica,<sup>65</sup> ma dispone di una ridotta superficie di contatto con i quartetti di G, per cui appare evidente che inibitori migliori sono quei composti dotati di una più ampia superficie aromatica polarizzabile. Nel 1997 si è scoperto che i derivati antrachinonici sono in grado di legare il DNA quadruplex e di inibire l'attività telomerasica.<sup>66</sup> Da allora sono stati scoperti centinaia di inibitori della telomerasi,<sup>67-72</sup> aprendo un dibattito circa le modalità di interazione di inibitori aromatici con il DNA a quadrupla elica. Secondo alcuni tali composti intercalano tra i quartetti di G,<sup>46</sup> secondo altri invece stabiliscono interazioni di stacking solo con i quartetti di G presenti alle estremità terminali delle strutture.<sup>73</sup>



**Fig. 21** Stabilizzazione di strutture quadruplex alle estremità telomeriche per effetto di farmaci intercalanti e di farmaci interagenti con l'estremità terminale della quadruplex con conseguente blocco dell'attività telomerasica .

Le poche strutture note quadruplex-ligandi, ottenute dalla spettroscopia NMR,<sup>74,75</sup> diffrazione di fibre<sup>76</sup> e analisi cristallografica a raggi X di singoli cristalli,<sup>77,78</sup> indicano che gli inibitori della telomerasi stabiliscono interazioni di stacking con i quartetti terminali piuttosto che intercalarsi tra essi. Infatti, l'intercalazione di farmaci tra tetradi di G risulta energeticamente sfavorita rispetto allo stacking terminale in quanto sacrifica l'interazione tra quartetti di G ed altera l'avvolgimento dell'elica.<sup>78</sup> Inoltre lo stacking terminale permetterebbe ai cationi stabilizzanti di conservare la propria posizione di coordinazione nel nucleo centrale della quadruplex. Le G-quadruplex inoltre interagiscono anche con aggregati di ligandi, data l'ampia superficie di contatto fornita dal quartetto di G.<sup>79,80</sup> Infine, il più potente e selettivo inibitore della telomerasi è la telomestatina, un prodotto naturale isolato dallo *Streptomyces anulatus* durante uno screening.<sup>81</sup> Studi NMR e di molecular modeling indicano che la telomestatina stabilisce interazioni di stacking con

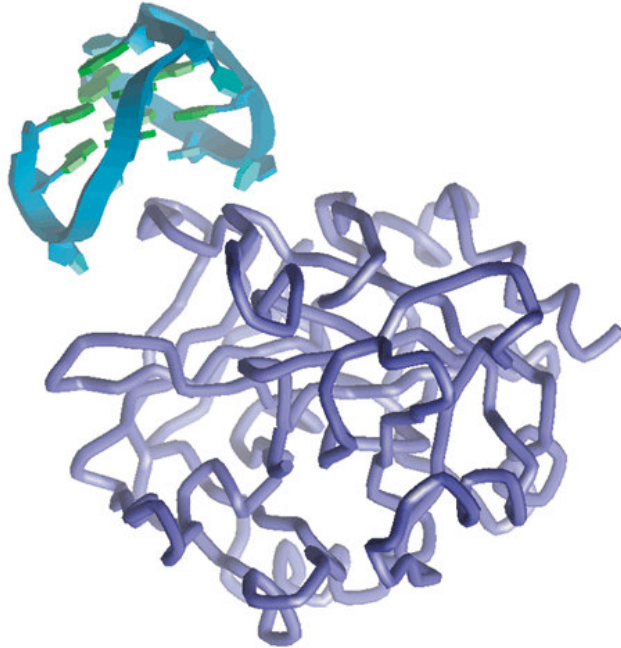
quartetti di G, a conferma del fatto che l'inibizione della telomerasi deriva dalla capacità di stabilizzare il DNA telomerico in forma di quadruplex.<sup>82</sup>

Da queste considerazioni appare chiaro che la stabilità delle strutture quadruplex è fondamentale per la loro attività biologica.

L'interazione G-quadruplex-telomerasi è solo uno dei tanti esempi di interazione G-quadruplex-proteina, generalmente addotto come prova della funzione biologica di tali strutture.

Un altro importante esempio di interazione G-quadruplex-proteina è rappresentato dall'interazione di aptameri con il proprio peptide bersaglio.

Gli aptameri sono macromolecole di natura oligonucleotidica composte in genere da singoli filamenti di RNA o DNA o da filamenti di DNA a doppia elica. Non mancano inoltre esempi di aptameri costituiti da una combinazione di nucleotidi classici con analoghi non naturali. Gli aptameri hanno dimensioni variabili comprese tra i 6 e i 40 kDa. Tali molecole talvolta adottano complesse strutture tridimensionali, risultanti da una combinazione di interazioni intramolecolari di tipo Watson-Crick e interazioni non canoniche. Adottando una particolare conformazione, sono in grado di legarsi selettivamente ad una data proteina-bersaglio (*target*), inibendone la funzione (**Fig.22**). Numerosi aptameri ripiegano in quadruplex la porzione bioattiva della propria struttura, per rendere possibile il legame con la proteina *target*.

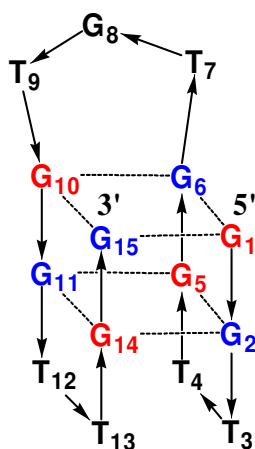


**Fig. 22** Esempio di interazione aptamero-target (in verde).

La SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)<sup>83,84</sup> è una tecnica di selezione *in vitro*, che si avvale della chimica combinatoriale, per produrre aptameri caratterizzati da un'alta specificità e affinità di legame per un'ampia varietà di proteine e di piccole molecole.<sup>85-87</sup> Mimando il processo di selezione naturale, attraverso ripetuti cicli di selezione, finalizzati all'isolamento della specie che lega il target con maggiore affinità, seguiti da amplificazioni tramite PCR, tale tecnica può condurre all'isolamento di oligomeri "evoluti", ossia molecole capaci di legare strettamente e selettivamente il bersaglio scelto. La selezione *in vitro*, a partire da librerie di sequenze inizialmente random di acidi nucleici, ha permesso l'isolamento di

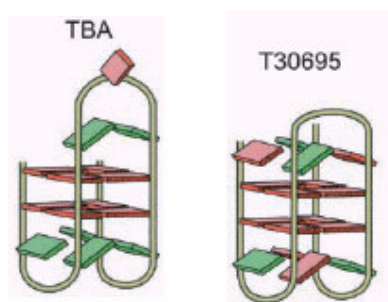
numerosi oligo e polinucleotidi in grado di legare con alta affinità un'ampia varietà di molecole.<sup>85-87</sup>

Le strutture di numerosi aptameri sono state determinate con l'impiego della spettroscopia NMR e della cristallografia a raggi X.<sup>88,89</sup> Uno degli aptameri più noti è il TBA (*thrombin binding aptamer*), (**Fig.23**) un pentadecamero deossiribonucleotidico di sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG),<sup>90</sup> in grado di inibire *in vitro* il processo, catalizzato dalla trombina, che porta alla formazione del coagulo di fibrina.<sup>90</sup> Studi di spettroscopia NMR<sup>16,17,27,91</sup> hanno rivelato che il TBA in soluzione adotta preferenzialmente una struttura quadruplex monomolecolare caratterizzata dalla presenza di due quartetti di G, connessi tra loro da un loop centrale di sequenza TGT e da due loop laterali più corti di sequenza TT. La struttura e l'attività biologica del TBA sono K<sup>+</sup>-dipendenti.



**Fig. 23** *Thrombin Binding Aptamer.*

Successivamente sono stati individuati altri aptameri di natura deossiribonucleotidica, strutturalmente correlati al TBA. Si tratta di inibitori dell'integrasi del virus HIV, estremamente efficaci in quanto caratterizzati da valori di  $IC_{50}$  nell'ordine di grandezza del nanomolare;<sup>92,93</sup> questi si organizzano tendenzialmente in una struttura G-quadruplex monomolecolare molto simile a quella del TBA (**Fig.24**).<sup>94,95</sup>



**Fig. 24** Rappresentazione schematica della struttura del TBA e dell'aptamero per l'integrasi dell'HIV (T30695) in cui si evidenzia la loro netta somiglianza..

Sebbene molte proteine interagenti con aptameri, fattori oncogenici,<sup>96</sup> anticorpi<sup>97</sup> e proteine telomeriche siano in grado di legare stabilmente strutture quadruplex, sono ancora poco noti i dettagli molecolari relativi alle interazioni G-quadruplex-proteine.<sup>52</sup> Parziali chiarimenti in merito sono stati ottenuti dalla risoluzione della struttura del cristallo del TBA con la trombina, rivelando la presenza di interazioni ioniche coinvolgenti i gruppi fosfato presenti nei loop dell'aptamero e le catene laterali di alcuni residui di lisina e arginina della trombina.<sup>98,99</sup> La risoluzione della struttura del cristallo della proteina telomerica di *Oxytricha nova* complessata con  $[d(G_4T_4G_4)]_4$ ,<sup>100</sup> come nel caso della struttura in soluzione, individua una quadruplex bimolecolare

con loop diagonali (**Fig.8**). La maggior parte delle interazioni DNA-proteine, ossia interazioni elettrostatiche, interazioni di van der Waals e legami idrogeno, coinvolgono proprio questi *loop* piuttosto che il nucleo centrale della struttura quadruplex. In entrambi i casi, infatti, in cui sono disponibili le strutture del complesso aptamero-proteina, sia nel caso della trombina sia nel caso del telomero di *Oxytricha*, si evidenziano poche interazioni dirette tra la proteina e il nucleo centrale della quadruplex. Le G-quadruplex dunque sembrano fungere da impalcatura a sostegno dei *loop*, esposti per il riconoscimento molecolare. Infatti, la struttura del cristallo della quadruplex monomolecolare formata dalla sequenza telomerica umana d(TTAGGG) suggerisce che la presenza di *loop* estesi fornisce numerosi siti di legame per le proteine (**Fig.10**).<sup>18</sup>

L'esistenza di proteine, spesso dotate di funzione enzimatica, che riconoscono le strutture quadruplex, suggerisce un ruolo biologico per queste strutture secondarie del DNA. Pertanto ricerche volte principalmente al chiarimento dell'entità delle interazioni G-quadruplex-proteine ci potrebbero aiutare a comprendere i meccanismi alla base del riconoscimento molecolare, agevolando la progettazione di nuovi farmaci.

Il ruolo biologico farmacologicamente più interessante delle G-quadruplex è quello associato alla funzionalità del telomero, cioè all'interazione G-quadruplex-telomerasi. La telomerasi, infatti, è un bersaglio-chiave anticancro

molto interessante per la progettazione di farmaci selettivi per le cellule tumorali e quindi meno tossici.

#### *2.4 La caratterizzazione strutturale del DNA mediante tecniche spettroscopiche.*

La conoscenza dettagliata delle relazioni struttura/attività è essenziale per l'applicazione terapeutica degli acidi nucleici e quindi per la progettazione di nuovi farmaci. Data la stretta correlazione tra struttura e funzione, la maggior parte degli studi sugli acidi nucleici sono mirati alla delucidazione degli aspetti strutturali di tali macromolecole.

La prima tecnica utilizzata in studi sulla struttura del DNA è stata la diffrazione ai raggi X. Tale tecnica ha il grosso vantaggio di fornire strutture con alta risoluzione, ma non risulta applicabile a molecole difficili da cristallizzare, inoltre non permette lo studio di molecole in soluzione, condizione più vicina a quella fisiologica.

Lo studio di oligonucleotidi in soluzione è possibile con l'impiego di due importanti tecniche spettroscopiche, il Dicroismo Circolare (CD) e la Spettroscopia di Assorbimento Ultravioletto (UV).<sup>101,102</sup>

Il dicroismo circolare (CD) si osserva quando molecole otticamente attive assorbono diversamente la luce circolarmente polarizzata a destra e a sinistra, e viene misurato con un spettropolarimetro CD. Gli spettri CD di diversi tipi



di strutture secondarie presenti sono differenti. Quindi l'analisi dei loro spettri CD può dare informazioni utili su porzioni di strutture secondarie presenti nelle macromolecole biologiche.

La Spettroscopia di Assorbimento Ultravioletto è la tecnica più utilizzata per determinare le temperature di melting ( $T_m$ ) degli acidi nucleici. Esperimenti di UV melting forniscono informazioni sulla stabilità degli acidi nucleici. Variazioni della temperatura di melting ( $\Delta T_m$ ) di una data struttura sono spesso conseguenza di variazioni delle condizioni sperimentali, sostituzioni di basi e interazioni con molecole farmacologicamente attive. Una curva di UV melting di una struttura secondaria del DNA si ottiene registrando la variazione di assorbanza a 260 nm in funzione della temperatura; all'aumentare della temperatura, infatti, gli acidi nucleici strutturati fondono, esponendo le basi alla radiazione, con conseguente incremento dell'assorbanza. Tali metodi spettroscopici permettono solo l'osservazione della struttura della molecola nel suo complesso senza fornire informazioni sulla struttura locale.

Recentemente la spettrometria di massa ha visto ampliare il suo campo d'impiego nello studio degli acidi nucleici, grazie allo sviluppo di nuove tecniche di ionizzazione e volatilizzazione. Questa tecnica è largamente impiegata per la determinazione di caratteristiche riguardanti la struttura primaria del DNA.

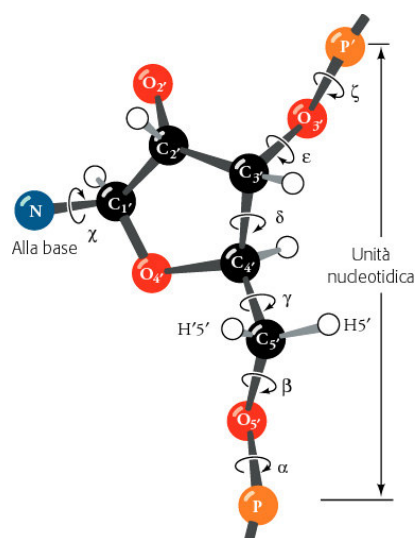
Attualmente la principale tecnica spettroscopica utilizzata per l'analisi

dettagliata della struttura e delle conformazioni, adottate da brevi sequenze oligonucleotidiche, è la Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Le misure NMR forniscono non solo informazioni sulla struttura, ma anche sulle dinamiche, gli equilibri conformazionali, il ripiegamento e le interazioni intra- e intermolecolari in soluzione. Tale tecnica consente l'acquisizione di una serie di dati sperimentali da cui è possibile l'elaborazione di una struttura tridimensionale con l'impiego di appositi programmi informatici. Preparato il campione in soluzione, si effettua l'acquisizione delle misure NMR, segue l'attribuzione dei segnali NMR ai singoli atomi della molecola, l'identificazione delle *constraint* (restrizioni sperimentali) conformazionali che derivano dagli effetti NOE osservati e quindi il calcolo della struttura tridimensionale sulla base delle *constraint* imposte.

Lo studio strutturale di biomolecole mediante la spettroscopia NMR si basa principalmente sull'interazione in presenza di un campo magnetico esterno tra i momenti magnetici dei singoli nuclei coi piccoli campi magnetici creati dagli spin di nuclei vicini. Tale interazione del tipo spin-spin può essere sfruttata per correlare diversi nuclei di una molecola gli uni con gli altri. I nuclei possono interagire sia "direttamente", attraverso lo spazio, che "indirettamente", attraverso i legami. Per nuclei con numero quantico di spin pari ad  $\frac{1}{2}$  l'interazione "indiretta" avviene tramite polarizzazione degli elettroni di legame ed è nota come "accoppiamento spin-spin" o "*J-coupling*",

mentre l'interazione "diretta" è alla base dell'effetto nucleare Overhauser (NOE), che consente la misura delle distanze spaziali tra nuclei di idrogeno. Un'analisi dettagliata dello spettro di un acido nucleico si basa sia sulle correlazioni attraverso lo spazio che attraverso i legami.

Le correlazioni attraverso i legami raggruppano singoli spin in sistemi di spin, che sono usati per l'analisi degli spettri. Negli acidi nucleici le costanti di accoppiamento  $J$  tra due nuclei separati da tre legami sono quelle che forniscono il maggior numero di informazioni per lo studio della loro struttura, poiché il valore della costante di accoppiamento dipende direttamente dall'ampiezza dell'angolo di torsione intorno al legame centrale secondo la nota relazione di Karplus,<sup>103,104</sup> ed è quindi di notevole importanza per stabilire la geometria del legame e l'angolo diedro intorno ad esso. Gli esperimenti NMR che correlano nuclei differenti mediante *J-coupling* sono spesso esperimenti del tipo COSY (CORrelation SpectroscopY).<sup>105-107</sup> Un'unità nucleotidica è caratterizzata da una serie di angoli torsionali che ne definiscono la struttura: angoli di torsione del *backbone* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ), angoli di torsione endociclici, responsabili della conformazione dell'anello furanosico (da  $\nu_0$  a  $\nu_4$ ), e infine l'angolo torsionale glicosidico ( $\chi$ ), tra la base e l'anello zuccherino (**Fig.25**).

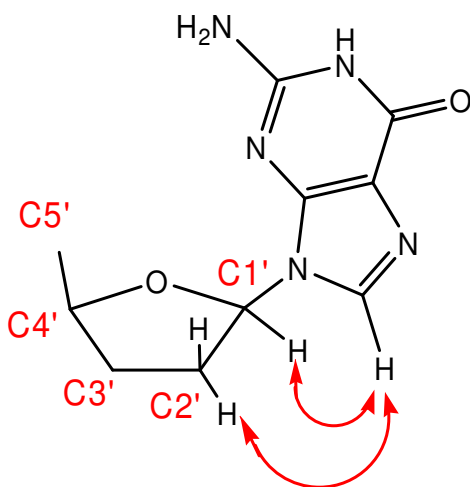


**Fig. 25** Struttura del backbone.

Per la determinazione della struttura di un acido nucleico è essenziale avere a disposizione informazioni sulla conformazione del *backbone* zuccherofosfato. A tal riguardo è importante valutare, oltre alle informazioni che provengono dai protoni, anche quelle da altri nuclei quali il  $^{31}\text{P}$  e il  $^{13}\text{C}$ . Infatti esperimenti di correlazione eteronucleare, quali il  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  COSY,<sup>108</sup> forniscono informazioni aggiuntive sulle costanti di accoppiamento e possono facilitare l'assegnazione dei *chemical shift* dei singoli protoni della molecola.

Per determinare la conformazione glicosidica di un nucleotide, cioè l'orientazione della base rispetto all'anello del deossiribosio, è necessario conoscere il valore dell'angolo torsionale glicosidico  $\chi$ . Esso può essere determinato misurando le distanze tra i protoni dell'anello zuccherino e quelli della base azotata. In particolare mediante l'interpretazione di spettri 2D-NOESY si valuta la distanza tra i protoni aromatici della base, H8 o H6, a

seconda che si tratti di un anello purinico o pirimidinico rispettivamente, e l'H1' dello zucchero (**Fig.26**).



**Fig. 26** Rappresentazione schematica dei NOE coinvolgenti il protone in 8 e rispettivamente H1' e H2'/H2'', diagnostici della conformazione glicosidica adottata.

Le correlazioni attraverso lo spazio forniscono le informazioni necessarie per determinare la struttura di una macromolecola e vengono misurate sfruttando l'effetto nucleare Overhauser (NOE).<sup>106,109</sup> Dall'interpretazione di spettri 2D-NOESY è possibile ricavare le *distance constraint* a partire dai contatti NOE tra atomi di idrogeno vicini nella molecola.<sup>110</sup> I *cross-peak* NOE connettono coppie di atomi di idrogeno separati da una distanza inferiore ai 5 Å. A differenza degli esperimenti di tipo COSY, i nuclei coinvolti nelle correlazioni NOE possono appartenere anche a residui nucleotidici diversi e lontani nella sequenza, ma vicini spazialmente. L'effetto NOE riflette il trasferimento di magnetizzazione tra spin che interagiscono mediante associazione dei propri dipoli. L'intensità di un segnale NOE dipende dall'inverso della sesta potenza della distanza tra i nuclei, per cui diminuisce

drasticamente con l'aumentare delle distanze stesse e generalmente non è possibile osservare NOE tra protoni lontani più di 5 Å. La conoscenza di tali brevi distanze protone-protone internucleotidiche rende possibile l'assegnazione sequenziale dei segnali appartenenti a nucleotidi adiacenti, nell'ambito della stessa molecola. L'analisi conformazionale del DNA e dei suoi complessi prevede la previa attribuzione nello spettro protonico di tutti i segnali scambiabili (in soluzioni di H<sub>2</sub>O) e non scambiabili (in soluzioni di D<sub>2</sub>O), effettuata secondo i ben conosciuti criteri descritti per gli oligonucleotidi in soluzione.<sup>110-112</sup> L'assegnazione dei protoni di ogni base e dei singoli sistemi di spin dei deossiribosi all'interno della sequenza primaria si basa sull'analisi degli effetti NOE esistenti tra i protoni dei residui vicini e sugli accoppiamenti scalari in ogni sistema di spin isolato. Esistono, infatti, delle connettività sequenziali di NOE, tali che (con l'eccezione del protone della base all'estremità 5' di ogni catena, che mostra solo NOE intraresiduo) nelle eliche di DNA destrogire ogni protone H6 pirimidinico o H8 purinico del residuo (i) si trova in prossimità dei protoni H2', H2'' e H1' dello stesso residuo (i) e degli stessi protoni dello zucchero precedente (i-1) verso l'estremità 5'. La stessa connettività di sequenza che coinvolge i protoni aromatici si riscontra anche coi protoni H3' ed in alcuni casi anche con i protoni H4' (in esperimenti NOESY con *mixing time* lunghi, quindi in presenza del fenomeno di diffusione di spin).

L'assegnazione dei protoni degli zuccheri si basa, invece, sull'effetto NOE

presente tra i nuclei di uno stesso anello e fondamentalmente sul loro accoppiamento scalare, per cui mediante esperimenti del tipo TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) è possibile individuare tutti i protoni appartenenti a un singolo sistema di spin, ovvero ai singoli zuccheri di ogni residuo.

Una volta attribuiti tutti i segnali dello spettro ai vari protoni della molecola, dai dati NMR è possibile estrapolare informazioni riguardanti la geometria conformazionale sotto forma di distanze e angoli torsionali. In generale, i dati NMR insieme ad informazioni riguardanti la struttura covalente di un acido nucleico, quali la sequenza nucleotidica, la lunghezza dei legami, gli angoli di legame, le chiralità e i gruppi planari, così come le repulsioni steriche tra coppie di atomi non legati tra loro, sono utilizzati da diversi programmi che permettono di ottenere al computer un insieme di strutture, coerenti con il set di dati a disposizione, e quindi accurate, e che minimizzino le violazioni delle *constraint* imposte, campionando nel contempo l'intero spazio conformazionale da esse consentito. Generalmente le strutture così determinate tendono tuttavia ad avere alti valori di energia, per cui solitamente a tali calcoli di meccanica e dinamica molecolare si fa seguire una fase di minimizzazione dell'energia al fine di rifinire la conformazione ottenuta, nel rispetto delle restrizioni sperimentali, ed avere una struttura della molecola quanto più rappresentativa possibile di quella reale.

## ***Bibliografia***

1. M. Gellert, J. F. Chantot, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1990**, 8, 491-511.
2. M. Gellert, N. .M. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, 48, 2013.
3. S. B. Zimmerman, *Biopolymers*, **1975**, 14, 889-890.
4. S. B. Zimmerman, G. H. Cohen, D. R. Davies, *J. Mol.Biol.*, **1975**, 92, 181-192.
5. J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1356-1359.
6. M. Borzo, C. Detellier, , P. Laszlo, A. J. Paris, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 1124.
7. S. M. Kerwin, *Current Pharmaceutical Design*, **2000**, 6, 441-471.
8. Y. Wang, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 251, 76-94.
9. W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature*, **1989**, 342, 825-829.
10. D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1988**, 334, 364-366.
11. Y. Wang, D. J. Patel, *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112-8119.
12. K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 171-182.
13. F. W. Smith, J. Feigon, *Nature*, **1992**, 356, 164-168.
14. F. W. Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8682-8692.
15. Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1993**, 1, 263-282.



16. K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofberger, S. Swaminathan, P. H. Bolton, *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899-1904.
17. P. Schultze, R. F. Macaya, J. Feigon, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 1532-1547.
18. G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature*, **2002**, 417, 876-880.
19. D. J. Patel, *Nature*, **2002**, 417, 807-808.
20. J. Sühnel, *Biopolymers*, **2001**, 56, 32-51.
21. P. K. Patel, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2457-2464.
22. P. K. Patel, A. S. R. Koti, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3836-3843.
23. A. Kettani, S. Bouaziz, A. Gorin, H. Zhao, R. Jones, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1998**, 282, 619-636.
24. F. Aboul-ela, A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Nature*, **1992**, 360, 280-282.
25. Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1994**, 2, 1141-1156.
26. P. Catasti, X. Chen, R. K. Moyzis, E. M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 264, 534-545.
27. R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 3745-3749.
28. G. Laughl, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *Science*, **1994**, 265, 520-524.
29. D. Mohanty, M. Bansal, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 1767-1774.
30. Y. Wang, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1993**, 234, 1171-1183.

31. E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco, E. H. Blackburn, *Cell*, **1987**, 51, 899-908.
32. K. L. Green, Y. Wang, D. Live, *J. Biomol. NMR*, **1995**, 5, 333-338.
33. F. W. Smith, F. W. Lau, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, 91, 10546-10550.
34. G. D. Strahan, R. H. Shafer, M. A. Keniry, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 5447-5455.
35. T. Simonsson, R. Sjöback, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 17379-17383.
36. F. M. Chen, *Biochemistry*, **1992**, 31, 3769-3776.
37. D. S. Pilch, G. E. Plum, K. J. Breslauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, 5, 334-342.
38. D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.*, **1992**, 211, 191-199.
39. S. W. Blume, V. Guarcello, W. Zacharias, D. M. Miller, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 617-625.
40. W. S. Ross, C. C. Hardin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6070-6080.
41. N. V. Hud, F. W. Smith, F. A. L. Anet, J. Feigon, *Biochemistry*, **1996**, 35, 15383-15390.
42. J. D. Gu, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 529-532.
43. E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2001**, 30, 1-22.
44. E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 1244-1287.

45. N. Spackova, I. Berger, J. Spöner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5519-5534.
46. I. Haq, J. O. Trent, B. Z. Chowdhry, T. C. Jenkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1768-1779.
47. E. H. Blackburn, *Nature*, **1991**, 350, 569-573.
48. D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1990**, 344, 410-414.
49. T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1167-1172.
50. G. I. Bell, M. J. Selby, W. J. Rutter, *Nature*, **1982**, 295, 31-35.
51. A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 49-53.
52. I. Smirnov, R. H. Shaker, *Biopolymers*, **2001**, 56, 209-227.
53. A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 11593-11598.
54. T. De Lange, T. Jacks, *Cell*, **1999**, 98, 273-275.
55. W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg, *Nature*, **1999**, 400, 464-468.
56. J. Feng, W. Funk, S. Wang, S. Weinrich, A. Avilion, C. Chium, R. Adams, E. Chang, R. Allsopp, J. Yu, S. Le, M. West, C. Harley, W. Andrews, C. Greider, B. Villeponteau, *Science*, **1995**, 269, 1236.
57. J. Lingner, T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, T. R. Cech, *Science* **1997**, 276, 561.

58. L. Harrington, T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M.B. Bass, I. Arruda, M. O. Robinson, *Science* **1997**, 275, 973.
59. V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore, *Cell*, **1997**, 88, 657-666.
60. A. M. Burger, M. C. Bibby, J. A. Double, *Brit. J. Cancer*, **1997**, 75, 516.
61. J. C. Soria, P. Vielh, A. K. el-Naggar, *Adv. Anat. Pathol.*, **1998**, 5, 86.
62. V. Urquidi, D. Tarin, S. Goodison, *Annali Med.*, **1998**, 30, 419.
63. S. Sharma, E. Raymond, H. Soda, D. Sun, S. G. Hilsenbeck, A. Sharma, E. Izbicka, B. Windle, D. D. Von Hoff, *Ann. Oncology*, **1997**, 8, 1063.
64. A. m. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature*, **1991**, 350, 718-720.
65. Q. Guo, M. Lu, L. A. Marky, N. R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1992**, 31, 2451-2455.
66. D. Y. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2113-2116.
67. S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 383-393.
68. H. Y. Han, L. H. Hurley, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, 21, 136-142.
69. P. J. Perry, J. R. P. Arnold, T. C. Jenkins, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2001**, 10, 2141-2156.
70. S. M. Kerwin, *Curr. Pharm. Des.*, **2000**, 6, 441-471.

71. L. H. Hurley, R. T. Wheelhouse, D. Sun, S. M. Kerwin, *Pharmacol. Ther.*, **2000**, 85, 141-158.
72. Z. Chen, D. R. Corey, *Adv. Cancer Res.*, **2003**, 87, 31-58.
73. H. Y. Han, D. R. Langley, A. Rangan, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 6485-6495.
74. O. Yu. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V. V. Chemeris, S. M. Kerwin, L. H. Hurley, *Biochemistry*, **1998**, 37, 12367-12374.
75. E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens, M. S. Searle, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 4885-4887; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 4749-4751.
76. M. A. Read, S. Neidle, *Biochemistry*, **2000**, 39, 13422-13432.
77. S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 326, 117-125.
78. G. R. Clark, P. D. Pytel, C. J. Squire, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4066-4067.
79. S. M. Kerwin, G. Chen, J. T. Kern, P. W. Thomas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 447-450.
80. J. T. Kern, P. W. Thomas, S. M. Kerwin, *Biochemistry*, **2002**, 41, 11379-11389.
81. K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1262-1263.

82. M. Y. Kim, H. Vankayalapati, S. Kazuo, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2098-2099.
83. C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **1990**, 249, 505-510.
84. A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature*, **1990**, 818-822.
85. A. D. Ellington, W. Xu, *Biochemistry*, **1996**, 93, 7475-7480.
86. J. Hamm, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 2220-2227.
87. J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 20556-20567.
88. J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chem. Biol.*, **1996**, 3, 611-617.
89. D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1997**, 1, 32-46.
90. L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature*, **1992**, 355, 564-566.
91. J. A. Kelly, J. Feigon, T. O. Yeates, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 256, 417-422.
92. A. Mazumder, N. Neamati, J. O. Ojwang, S. Sunder, R. F. Rando, Y. Pommier, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13762-13771.
93. N. J. Jing, R. F. Rando, Y. Pommier, M. E. Hogan, *Biochemistry*, **1997**, 36, 12498-12505.
94. N. J. Jing, M. E. Hogan, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 34992-34999.
95. N. J. Jing, C. Marchand, J. Liu, R. Mitra, M. E. Hogan, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 21460-21467.

96. V. Dapic, P. J. Bates, J. O. Trent, A. Rodger, S. D. Thomas, D. M. Miller, *Biochemistry*, **2002**, 41, 3676-3685.
97. C. Shaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 8572-8577.
98. K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, A. Tulinsky, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 17651-17654.
99. K. Padmanabhan, A. Tulinsky, *Acta Crystallogr., Sect. D*, **1996**, 52, 272-282.
100. M. P. Hovarth, S. C. Schultz, *J. Mol. Biol.*, **2001**, 310, 367-377.
101. C. S. M. Olsthoorn, *Ph. D. Thesis*, **1981**, Leiden.
102. C. R. Cantor, P. R. Shimmel, *Biophysical Chemistry*, Vol. II, **1980**, Freeman & Co., San Francisco.
103. F. M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 11-15.
104. C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. De Leeuw, H. P. M. De Leeuw, C. Altona, *Org. Magn. Reson.*, **1981**, 15, 43-52.
105. W. P. Aue, E. Batholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 2229-2246.
106. G. Wider, *Progr. NMR Spectrosc.*, **1998**, 32, 193-275.
107. G. Wider, S. Macura, A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.*, **1984**, 56, 207-234.
108. V. Sklenar, H. Miyashiro, G. Zon, H. T. Miles, A. Bax, *FEBS Lett.*, **1986**, 208, 94-98.

109. I. Solomon, *Phys. Rev.*, **1955**, 99, 559-565.
110. K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, **1986**, Wiley:  
New York.
111. D. J. Patel, L. Shapiro, D. Hare, *Quat. Rev. Biophys.*, **1989**, 20,  
35-112.
112. B. R. Reid, *Quat. Rev. Biophys.*, **1987**, 20, 1-34.



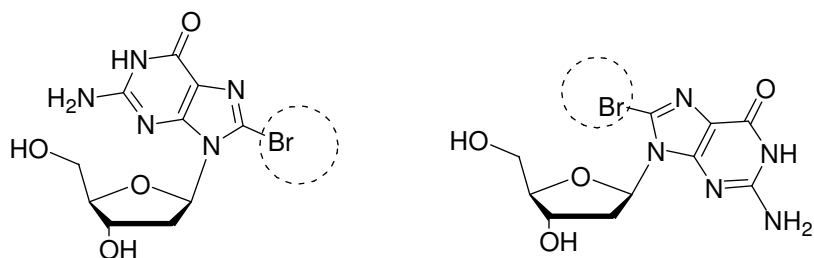
## Capitolo 3: Strutture quadruplex contenenti basi modificate.

### 3.1 Introduzione

Le G-quadruplex sono strutture estremamente polimorfiche, in particolare differiscono per la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nelle tetradi alla base di tali strutture, per la stechiometria e l'orientamento relativo dei filamenti, per la struttura dei loop colleganti i filamenti, ove presenti.

Tali caratteristiche sono spesso correlate tra loro. Per esempio, sequenze oligonucleotidiche contenenti un unico tratto di guanine generalmente formano strutture G-quadruplex tetramolecolari, in cui tutti i filamenti si dispongono parallelamente tra loro e le guanine coinvolte nelle G-tetradi alla base di tali strutture adottano preferenzialmente una conformazione glicosidica di tipo *anti*.<sup>1</sup> Tuttavia recentemente, nell'ambito delle nostre ricerche, sono stati sintetizzati tre oligodeossiribonucleotidi modificati, analoghi della sequenza 5'-d(TGGGT)-3', contenenti ciascuno un residuo di 8-bromo-2'-deossiguanosina ( $G^{8Br}$ ) al posto della 2'-deossiguanosina in tre differenti posizioni (G2, G3, G4).<sup>2</sup> Tali oligomeri modificati sono stati sottoposti a caratterizzazione strutturale mediante esperimenti di risonanza magnetica nucleare, di dicroismo circolare e calcoli di meccanica e dinamica molecolare. Sulla base dei dati sperimentali acquisiti e dei dati riportati in letteratura, si è osservato che gli oligonucleotidi in analisi, pur formando quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli con tre tetradi di G,

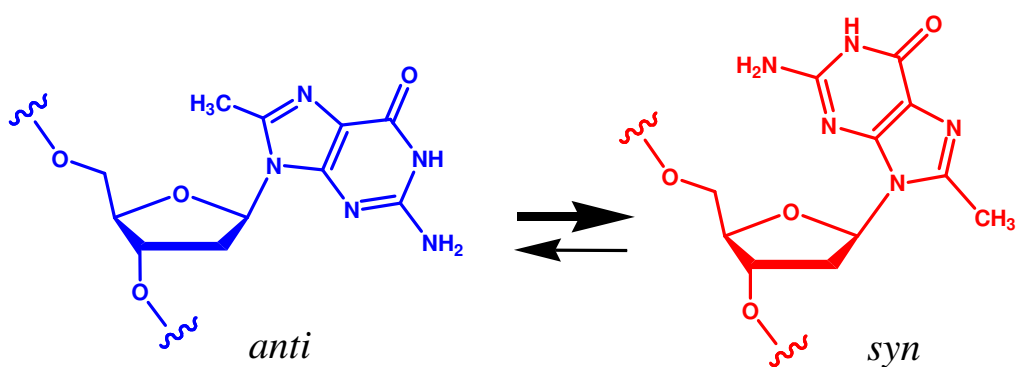
analogamente alla controparte non modificata, sono caratterizzati dalla presenza di una tetrate di G *syn* che coinvolge le guanine modificate. Ciò probabilmente è legato al fatto che l'introduzione di un sostituito ingombrante in 8 sposta l'equilibrio verso una conformazione glicosidica *syn* (**Fig.27**).



**Fig. 27** Conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* dell'8-bromo-2'-deossiguanosina.

Inoltre da esperimenti di dicroismo circolare e di denaturazione termica si è osservato che, a seconda della posizione in cui è introdotto il monomero modificato dG<sup>8Br</sup>, si registrano diversi spettri CD e diverse stabilità termiche. In particolare, si è visto che mentre le quadruplex [d(TG<sup>Br</sup>GGT)]<sub>4</sub> e [d(TGG<sup>Br</sup>GT)]<sub>4</sub> risultano più stabili della controparte naturale, la quadruplex [d(TGGG<sup>Br</sup>T)]<sub>4</sub> ha una temperatura di melting più bassa di quella osservata per l'analogo oligonucleotidico non modificato. Altre interessanti informazioni sono state ottenute dagli spettri CD, dai quali è emerso, che, in contrasto con i dati NMR, la quadruplex [d(TG<sup>Br</sup>GGT)]<sub>4</sub> mostra uno spettro tipico di una G-quadruplex a filamenti antiparalleli.

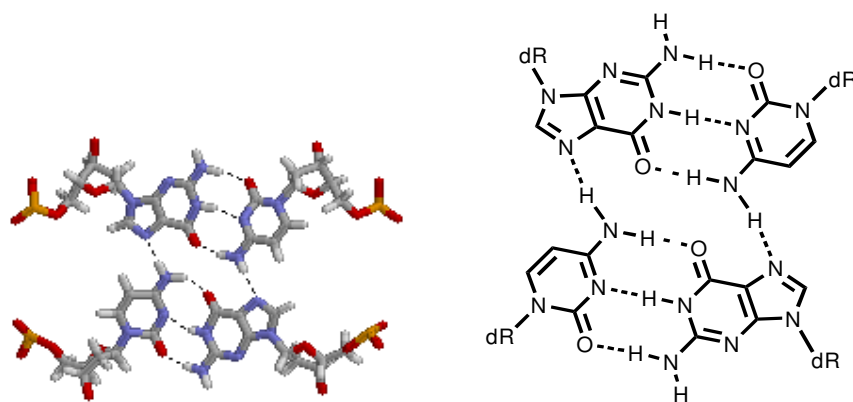
Allo scopo di approfondire le conoscenze relative alla correlazione intercorrente tra conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nelle tetrad di G, orientamento relativo dei filamenti e stabilità termica delle strutture G-quadruplex abbiamo pensato di sintetizzare oligodeossiribonucleotidi contenenti un residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina al posto dei residui di dG<sup>8Br</sup>. La dG<sup>8Br</sup>, infatti, pur presentando il vantaggio di essere disponibile commercialmente come derivato fosforamidito, non è in grado di fornire la prova diretta della conformazione glicosidica adottata dalla guanina modificata, data la mancanza del protone in posizione 8 coinvolto nell'effetto NOE diagnostico con il protone H1' dello zucchero. Il gruppo metile presenta un ingombro sterico simile a quello del bromo, ma in più ha il vantaggio di possedere tre protoni in grado di fornire utili informazioni strutturali (**Fig.28**).



**Fig. 28** Conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* dell'8-metil-2'-deossiguanosina

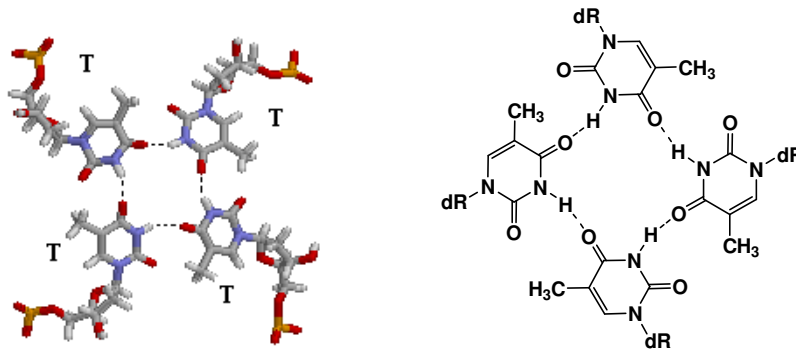
Un ulteriore contributo alla variabilità strutturale delle G-quadruplex deriva dalla scoperta di tetrad inusuali (non-G), che incrementa notevolmente il

numero di sequenze potenzialmente capaci di formare strutture quadruplex. In letteratura sono riportati diversi esempi di complessi stabili a quadrupla elica caratterizzati dalla presenza, accanto a quartetti di G canonici, di tetradi miste<sup>3</sup> del tipo G-C-G-C (**Fig.29**) e A-T-A-T formate da due coppie di basi Watson-Crick, G-C o A-T, interagenti tra loro mediante legame idrogeno; tali tetradi si allineano lungo il solco minore o lungo il solco maggiore della struttura.<sup>4,5</sup>



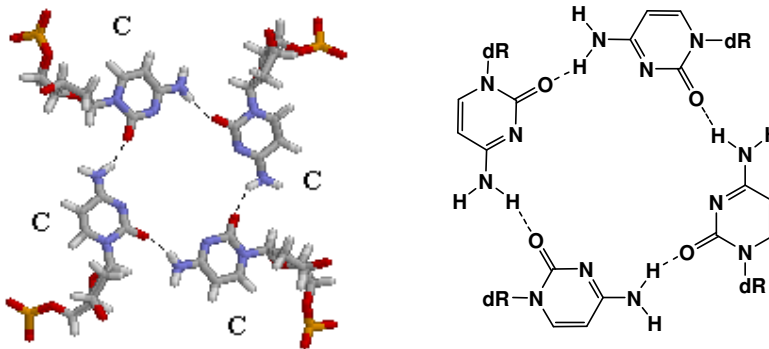
**Fig. 29** Tetrade mista G-C-G-C

Anche le timine sono in grado di associarsi tra loro in una struttura planare, in particolare tetradi del tipo T-T-T-T (**Fig.30**) sono state osservate tra due quartetti di G adiacenti, tipo sandwich, dal momento che le timine poste alle estremità di piani di guanine sono caratterizzate da un'elevata libertà di movimento e quindi tendono a disporsi in maniera disordinata.<sup>6</sup>



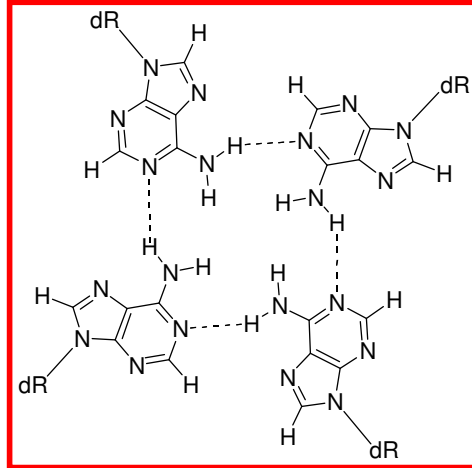
**Fig. 30** Tetrade di T

Sono state osservate inoltre tetradi di C (**Fig.31**), costituite da quattro citosine interagenti tra loro tramite legami idrogeno, in maniera molto simile alle timine.<sup>7</sup>



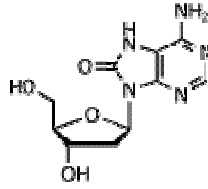
**Fig. 31** Tetrade di C

La nostra attenzione si è focalizzata sulla tetrade di A (**Fig.32**), dal momento che tale tipo di tetrade è stata individuata a livello di diverse sequenze di rilevante interesse biologico in grado di adottare strutture a quadrupla elica, quale la sequenza telomerica umana  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ <sup>8</sup> o l'unità ripetuta di base dell'oncogene *c-myc*, GGAGG.<sup>9</sup>



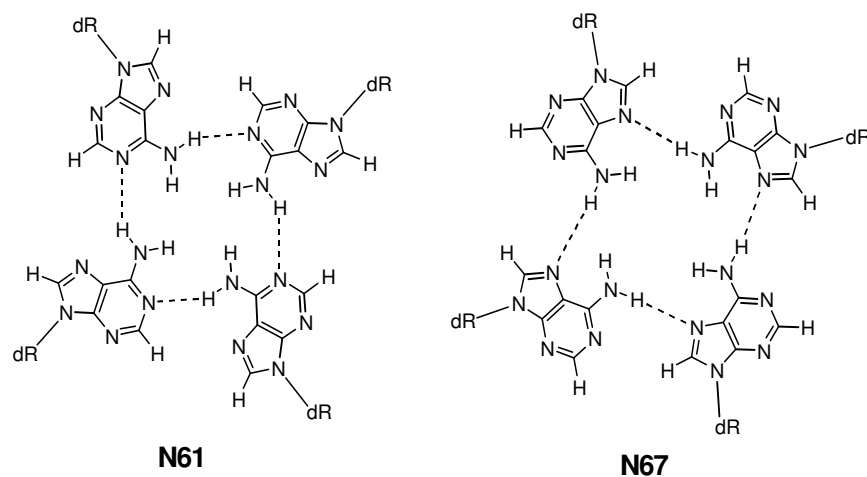
**Fig. 32** Tetrade di A

Alla luce della scoperta che le sequenze che mimano la sequenza telomerica umana possono facilmente assemblarsi in strutture quadruplex a filamenti paralleli formando tetradi di A e di G,<sup>10,11</sup> per approfondirne gli studi strutturali abbiamo iniziato un'indagine per valutare gli effetti dell'incorporazione di residui di 7,8-diidro-8-oxoadenosina (dA<sup>oxo</sup>) (**Fig.33**) sulla possibilità di formazione e stabilizzazione di strutture quadruplex. Interessanti studi biologici, infatti, hanno dimostrato che i danni ossidativi alle basi del DNA comunemente implicano la formazione di purine ossidate come la 7,8-diidro-8-oxoguanina (dG<sup>oxo</sup>) e la 7,8-diidro-8-oxoadenina (dA<sup>oxo</sup>).<sup>12</sup> È stato dimostrato inoltre che la presenza di 8-oxopurine nel DNA è implicata in processi di mutagenesi, carcinogenesi ed invecchiamento cellulare,<sup>13-15</sup> processi biologici che coinvolgono i telomeri, estremità 3' dei cromosomi eucariotici.



**Fig. 33** 8-oxo-2'-deossiadenosina

La formazione di A-tetradi è altamente dipendente dal contesto della sequenza.<sup>10,16,17</sup> Tale quartetto alternativo è stato individuato nella sequenza telomerica troncata d(AG<sub>3</sub>T)<sup>10</sup> e nelle sequenze d(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>T)<sup>16</sup> e d(TG<sub>2</sub>AG<sub>2</sub>C).<sup>18</sup> Mediante calcoli di meccanica e dinamica molecolare Patel e collaboratori<sup>10</sup> hanno individuato due possibili distinti modelli per la tetrate di A: in un caso un protone dell' NH<sub>2</sub> in 6 formerebbe un legame a idrogeno con l'N in 1 (*pattern* N61), nell'altro caso lo stesso protone interagirebbe con l'N in 7 (*pattern* N67). In entrambi i casi si dovrebbe osservare la formazione di una tetrate di A (**Fig.34**).

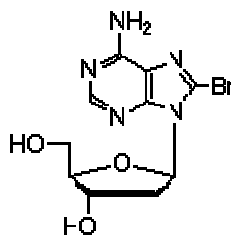


**Fig. 34** Pattern di legami a idrogeno N61 e N67 per la tetrate di A. I legami a idrogeno sono indicati mediante linee tratteggiate.

Se per i quartetti di G è stata individuata, in generale, una certa correlazione tra orientamento relativo dei filamenti coinvolti nella quadruplex e

conformazione glicosidica dei nucleosidi responsabili della formazione della tetrate, nel caso della tetrate di A tale correlazione non è stata ancora chiarita. Nella sequenza telomerica d(AG<sub>3</sub>T), infatti, tutte le basi coinvolte nella A-tetrate presentano una conformazione glicosidica di tipo *syn*,<sup>10</sup> mentre nelle sequenze d(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>T)<sup>16</sup> e d(TG<sub>2</sub>AG<sub>2</sub>C)<sup>18</sup> tutte le adenine implicate nella A-tetrate presentano una conformazione glicosidica *anti*,<sup>16,18</sup> anche se in tutti i casi si osserva la formazione di strutture quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli.

Allo scopo di chiarire questa correlazione e di investigare gli effetti dell'introduzione di un sostituito ingombrante nella posizione 8 di un residuo di adenosina, abbiamo in primo luogo progettato la sintesi e la caratterizzazione strutturale di oligonucleotidi che mimano la sequenza tronca del telomero umano, contenenti al posto delle A canoniche un nucleoside modificato, ossia la 8-bromo-2'-deossiadenosina (A<sup>Br</sup>) (**Fig.35**).



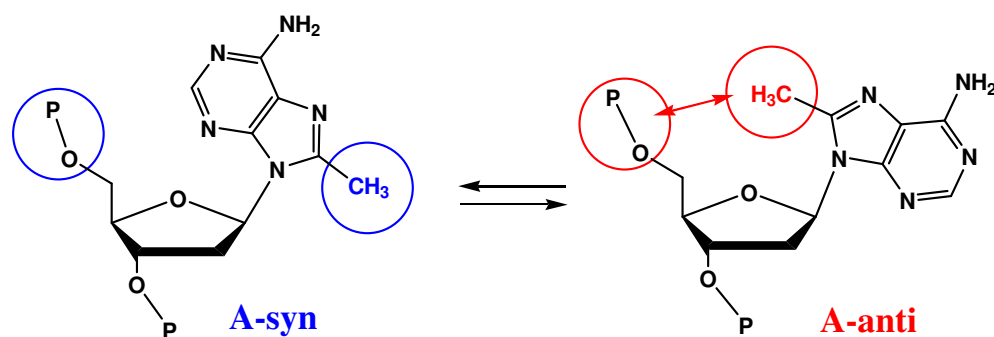
**Fig. 35** 8-bromo-2'-deossiadenosina

Nei nucleosidi di natura purinica, infatti, l'introduzione in 8 di un sostituito ingombrante, come l'atomo di bromo, destabilizzando la conformazione glicosidica *anti* per effetto di interazioni steriche repulsive, favorisce



generalmente l'adozione di un'orientazione *syn*. La sostituzione, però, del protone in 8 con un atomo di bromo implica la perdita di importanti informazioni strutturali desumibili da esperimenti NOESY. Pertanto, allo scopo di chiarire con ulteriori dati sperimentali la correlazione tra orientamento relativo dei filamenti, conformazione glicosidica delle tetrad di A e stabilità termica delle quadruplex osservate, abbiamo progettato la sintesi di un nucleoside modificato, ossia la **8-metil-2'-deossadenosina**, e lo abbiamo inserito nelle stesse sequenze tronche del telomero umano, successivamente sottoposte a caratterizzazione strutturale.

La scelta del sostituito, come già discusso in precedenza, è ricaduta sul metile in quanto, se da un lato promuove l'adozione della conformazione glicosidica *syn*, dall'altro agevola notevolmente gli studi strutturali, grazie alle informazioni desumibili dai contatti NOE stabiliti dai suoi protoni (**Fig.36**).



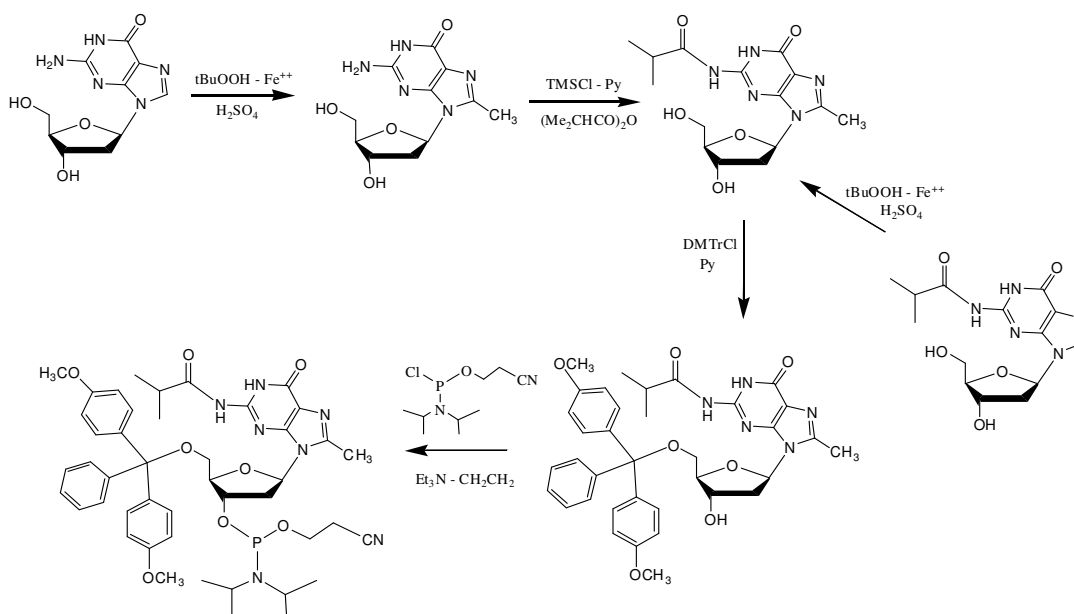
**Fig. 36** Conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* dell'8-metil-2'-deossadenosina.

### ***3.2 Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina in strutture quadruplex del DNA a filamenti paralleli.***

L'oligonucleotide di sequenza d(TGGGT) forma una struttura già ampiamente studiata mediante tecniche spettroscopiche e termodinamiche.<sup>19</sup> Si tratta di una quadruplex a filamenti paralleli caratterizzata dalla presenza di tre tetradi di G in conformazione glicosidica di tipo *anti*. La stretta correlazione, comunemente osservata in G-quadruplex canoniche, tra orientamento relativo dei filamenti e conformazione glicosidica delle basi guaniniche è stata messa in discussione dai dati ottenuti dall'analisi strutturale degli oligomeri modificati, analoghi del d(TGGGT), contenenti al posto di una dG canonica un residuo di dG<sup>8Br</sup>.

Pertanto allo scopo di approfondire le conoscenze relative a tali correlazioni è stata intrapresa la sintesi degli analoghi oligonucleotidici contenenti al posto di una dG canonica residui di **8-metil-2'-deossiguanosina**; il metile, infatti, presentando un ingombro sterico paragonabile al bromo, è similmente incline a promuovere la conformazione glicosidica *syn*,<sup>20</sup> ma allo stesso tempo fornisce importanti informazioni strutturali sulla base dei contatti NOE stabiliti dai suoi protoni.

Il monomero fosforamidato modificato, opportunamente protetto a livello dei gruppi -NH<sub>2</sub> e 5'-OH, essenziale per l'incorporazione in sequenze oligonucleotidiche, è stato ottenuto mediante una procedura sintetica (**Fig.37**) recentemente proposta da K. Kohda e coll.<sup>21</sup>

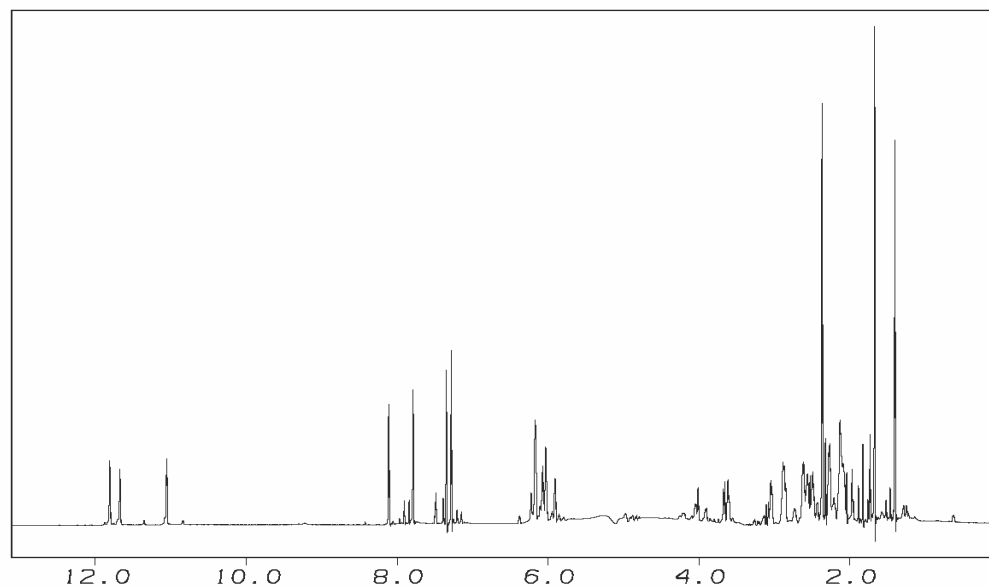


**Fig. 37** Procedura di sintesi della 8-metil-2'-deossiguanosina

In seguito usando i protocolli classici per la sintesi degli oligonucleotidi, abbiamo sintetizzato gli oligomeri modificati 5'-d(TG<sup>Me</sup>GGT)-3' (**Q1**), 5'-d(TGG<sup>Me</sup>GT)-3' (**Q2**) e 5'-d(TGGG<sup>Me</sup>T)-3' (**Q3**), dove G<sup>Me</sup> rappresenta la 8-metil-2'-deossiguanosina. La miscela grezza di sintesi è stata purificata mediante HPLC, gli oligomeri puri isolati sono stati desalificati su Sep-Pak (C18). I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di 3.0 mM (0.6 ml, 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O), in un tampone di composizione 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Sono stati riscaldati a 80°C per 5-10 minuti e lasciati raffreddare lentamente a temperatura ambiente. Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR sono stati registrati usando una sequenza di impulsi di tipo WATERGATE<sup>22</sup> per la soppressione del segnale dell'acqua.

Gli spettri protonici monodimensionali (**Fig.38**) di Q1 e Q2 mostrano la presenza di tre segnali nella regione tra 11-12 ppm, attribuibili ai tre protoni imminici scambiabili delle guanine coinvolti in legami idrogeno di tipo Hoogsteen; nella regione di risonanza dei protoni aromatici, invece, sono riscontrabili quattro segnali attribuibili ai protoni in 8 (H8) delle 2 guanine e ai protoni in 6 (H6) delle 2 timine. Inoltre per entrambi i campioni sono stati osservati tre segnali attribuibili a gruppi metilici, di cui due intorno ad 1.6 ppm, dovuti ai metili delle T, ed uno intorno a 2.4 ppm, dovuto al metile del monomero modificato.

Questi dati sono compatibili con strutture G-quadruplex altamente simmetriche, contenenti tre tetradi di G e dotate di una simmetria quaternaria con i quattro filamenti equivalenti e paralleli tra loro.



**Fig. 38** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di Q2

Lo spettro di Q3, invece, indica che tale oligomero è poco presente sottoforma di quadruplex. I segnali attribuibili ai protoni imminici, infatti, appaiono di scarsa intensità e nella regione di risonanza dei protoni aromatici sono presenti due set di segnali di intensità differente, ciascuno con quattro diverse frequenze di risonanza. Aumentando la temperatura di acquisizione degli spettri a 50°C si osserva l'aumento di intensità di un set di quattro segnali, mentre gli altri quattro, insieme ai protoni imminici, progressivamente scompaiono. Ciò suggerisce che a 50°C l'oligomero Q3 è presente esclusivamente come singolo filamento. Sfortunatamente il rapporto quadruplex/singolo filamento non migliora al diminuire della temperatura al di sotto dei 10°C, tuttavia anche in questo caso il numero di protoni imminici è compatibile con una struttura tetramolecolare a filamenti paralleli.

Le velocità di scambio dei protoni imminici di Q1, Q2 e Q3 con il solvente sono state stimate qualitativamente mediante essiccamento dei campioni e successiva dissoluzione in D<sub>2</sub>O. Successivamente sono stati effettuati controlli periodici dei segnali prodotti dai protoni imminici. I risultati portano alla conclusione che tali protoni scambiano con il solvente molto lentamente, in accordo con l'alta stabilità cinetica e la scarsa accessibilità al solvente dei protoni imminici in strutture quadruplex.<sup>23</sup>

Mentre per Q3 l'eccesso di singolo filamento ha reso non praticabile l'analisi dettagliata della sua struttura quadruplex presente in minima quantità, gli spettri NOESY e TOCSY di Q1 e Q2, mostrando crosspeak ben dispersi,

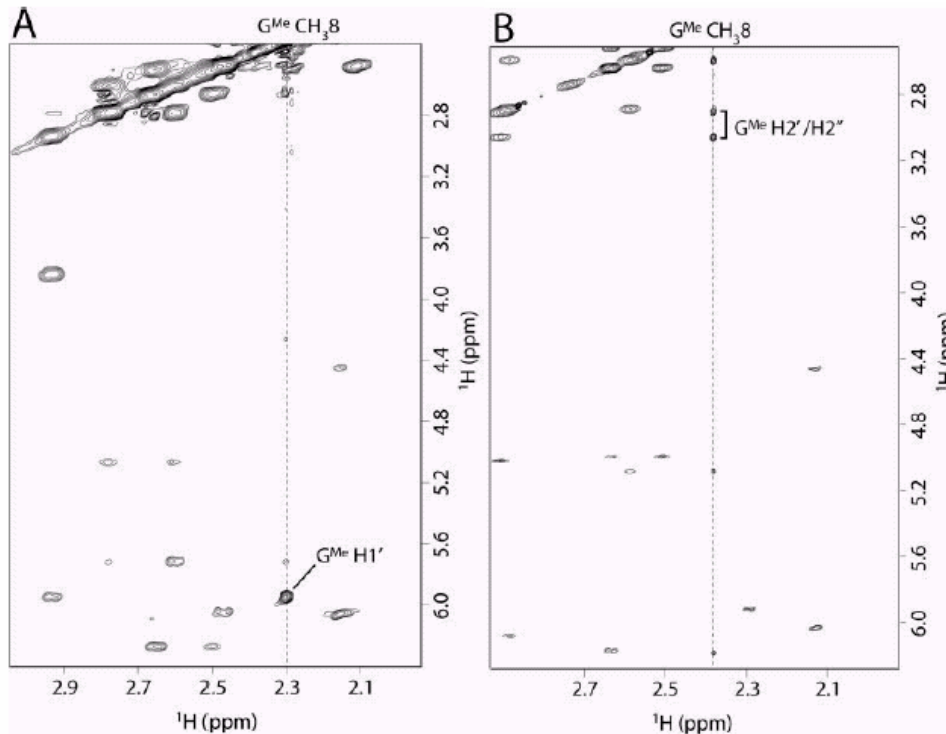
hanno permesso di assegnare quasi completamente i segnali sia dei protoni scambiabili sia dei non scambiabili, secondo le procedure standard<sup>24</sup> (**Tabella 1**). In base a quanto riportato per altre strutture quadruplex a filamenti paralleli,<sup>7,25</sup> la polarità delle connettività NOE (GH8 e TH6 con H1' e H2'/H2'' del proprio anello zuccherino e con H1' e H2'/H2'' dell'anello zuccherino al 5') suggerisce che entrambe le quadruplex adottano una struttura elicoidale destrorsa.

	Base (5' to 3')	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	H2/Me	NH
<b>Q1</b>									
T		7.42	6.05	2.11–2.47	4.81	4.43	3.93		1.61
G <sup>Me</sup>			5.95	2.94	4.95	4.35	3.84	2.29	12.03
G		8.16	6.09	2.60–2.79	3.00	4.46	4.37		11.60
G		7.64	6.27	2.50–2.65	4.85	4.49	4.18		10.93
T		7.36	6.06	2.16	4.46	4.46	4.05–4.19	1.60	
<b>Q2</b>									
T		7.36	5.92	2.10/2.29	4.67	4.03	3.67/3.63	1.41	
G		8.12	6.18	2.91/3.06	5.02	4.41	3.93/4.06		11.82
G <sup>Me</sup>			6.08	2.58/2.88	5.09	4.46	4.22	2.38	11.68
G		7.81	6.17	2.51/2.63	5.00	4.47	4.25/4.03		11.06
T		7.28	6.04	2.14	4.46	4.23	4.02/4.06	1.68	

**Tabella 1.** Chemical shift protonici per le quadruplex Q1 (500 MHz) e Q2 (700 MHz) in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0, T =25°C)

Per quanto concerne, invece, gli angoli torsionali glicosidici, informazioni utili possono essere desunte dall'analisi delle intensità dei *crosspeak* NOE tra il protone GH8 e l'H2' dell'anello zuccherino, confrontati con quelli osservati tra GH8 e H1'.

Nel caso di Q2 la presenza di deboli effetti NOE tra GH8/G<sup>Me</sup>CH<sub>3</sub>8 e H1' dello zucchero e di forti effetti NOE tra GH8/G<sup>Me</sup>CH<sub>3</sub>8 e H2' del deossiribosio indica che tutte le guanine del complesso, sia naturali che modificate, adottano una conformazione glicosidica di tipo *anti* (**Fig.39 B**).



**Fig. 39** Regione espansa di spettri NOESY in cui si evidenziano i picchi di correlazione tra i protoni del gruppo metile in 8 e gli H1' e H2' dello zucchero in Q1 (A) e Q2 (B).

Per quanto riguarda invece Q1, tutte le guanine canoniche adottano una conformazione di tipo *anti*, mentre i residui modificati adottano una conformazione di tipo *syn*, come indicato dalla presenza nello spettro NOESY di un intenso effetto NOE tra il gruppo metilico in 8 e il protone H1' dello zucchero e di *crosspeak* più deboli tra il metile e i protoni H2'/H2'' (**Fig.39 A**). Data la conformazione *syn* dei monomeri modificati, i protoni del gruppo metilico in 8 sono ad una distanza maggiore di 6Å dai protoni dello zucchero adiacente al 5'<sup>26</sup> e ciò determina interruzione del normale pattern di connettività. Dallo spettro NOESY in H<sub>2</sub>O di Q2, invece, si osservano NOE sequenziali immuno-immuno derivanti dai contatti intrastrand tra la tetrate di

$G^{Me}$  e quella di G sottostante. Inoltre la presenza di NOE interstrand tra i protoni del gruppo metilico di un monomero modificato e il protone NH della base modificata sul filamento adiacente, e tra i protoni H8 e i protoni NH della tetrad non modificata sottostante, suggerisce che i residui di  $G^{8Me}$  non sono orientati in maniera casuale, ma si dispongono in modo simmetrico, adattandosi perfettamente al piano delle tetradi di G adiacenti.

Gli spettri 2D NOESY di Q1 e Q2, acquisiti con mixing time di 100 ms, sono stati utilizzati per ricavare le “*distance constraint*”, mediante l’ausilio degli strumenti CALIBA del programma CYANA,<sup>27</sup> allo scopo di determinare la struttura tridimensionale di tali complessi. Gli pseudo atomi sono stati introdotti dove necessario per entrambe le strutture. Inoltre, in accordo con quanto dedotto dagli studi di scambio col deuterio degli NH, le “*distance restraint*” del legame idrogeno relative ai tre piani di G sono state introdotte dopo aver rimosso quelle irrilevanti. A tali distanze, per ciascuno dei due complessi, ne sono state aggiunte altre 48, relative ai 24 legami a idrogeno riscontrabili in base alla presenza di tre tetradi di G (HN1-O6, N1-O6, HN2-N7 and N2-N7). Dall’analisi dei picchi NOE, ai fini della determinazione strutturale della molecola, sono state calcolate 200 *upper distance restraint* per Q1 e 380 per Q2, ridotte rispettivamente a 112 e 124, per eliminazione di quelle irrilevanti.

Per gli angoli di torsione del backbone le *constraint* sono state dedotte dai *chemical shift* di esperimenti  $^{31}P$  e dall’analisi delle costanti di accoppiamento



H1'/H2'. Gli spettri protonici disaccoppiati con il fosforo sia di Q1 sia di Q2 in D<sub>2</sub>O a 25 °C mostrano che tutti i segnali del <sup>31</sup>P cadono nella regione tra 0.8-2.2 ppm, caratteristica di backbone fosfati, non perturbati, di quadruplex a filamenti paralleli.<sup>28-30</sup>

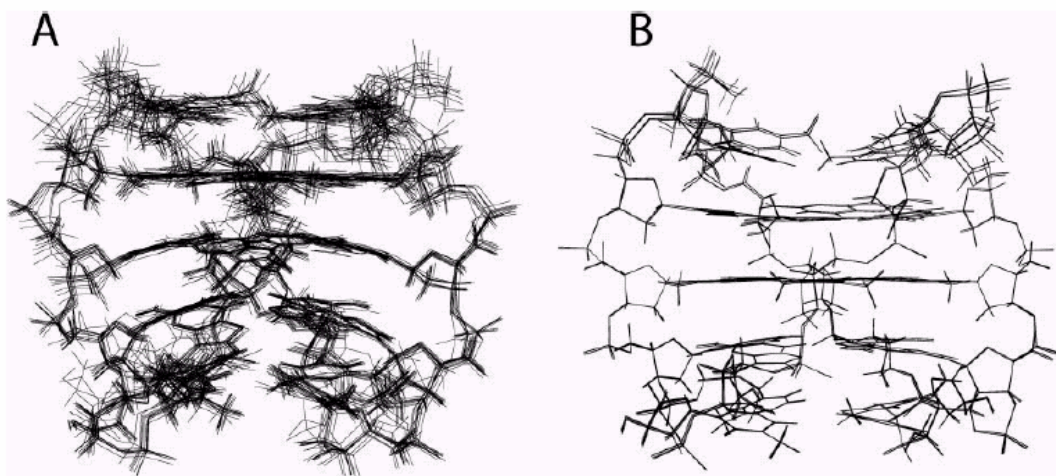
Inoltre gli spettri PE-COSY indicano che le costanti di coupling H1'/H2' sono ragionevolmente ampie. Questo suggerisce che gli zuccheri hanno in prevalenza una geometria S-type e quindi la struttura del filamento deve essere considerata simile alla forma B del DNA piuttosto che alla forma A.

Gli angoli di torsione del backbone sono stati ristretti in un range  $\pm 20^\circ$  dei valori dell'elica della quadruplex naturale [d(TGGGGT)]<sub>4</sub>, eccetto i residui di G<sup>8Me</sup>.

Le migliori 10 strutture (**Fig.40**), cioè quelle caratterizzate dalle minori violazioni delle distanze di van der Waals e delle “*constraint*” sperimentali imposte, sono state sottoposte a minimizzazione di energia usando il campo di forza CVFF nel programma DISCOVER. In particolare, la sovrapposizione di queste 10 strutture è risultata essere caratterizzata da valori di RMSD di  $0.97 \pm 0.40$  e  $0.94 \pm 0.45$ , rispettivamente per il *backbone* e per tutti gli atomi pesanti, nel caso di **Q1**, e valori di RMSD di  $0.17 \pm 0.11$  e  $0.14 \pm 0.09$ , sempre per il *backbone* e per tutti gli atomi pesanti, relativamente a **Q2**.

Come previsto, la struttura ottenuta per **Q1** è costituita da quattro filamenti equivalenti tra loro con una geometria destrorsa del backbone. Tutte le strutture quadruplex risultanti dai calcoli strutturali effettuati mostrano una

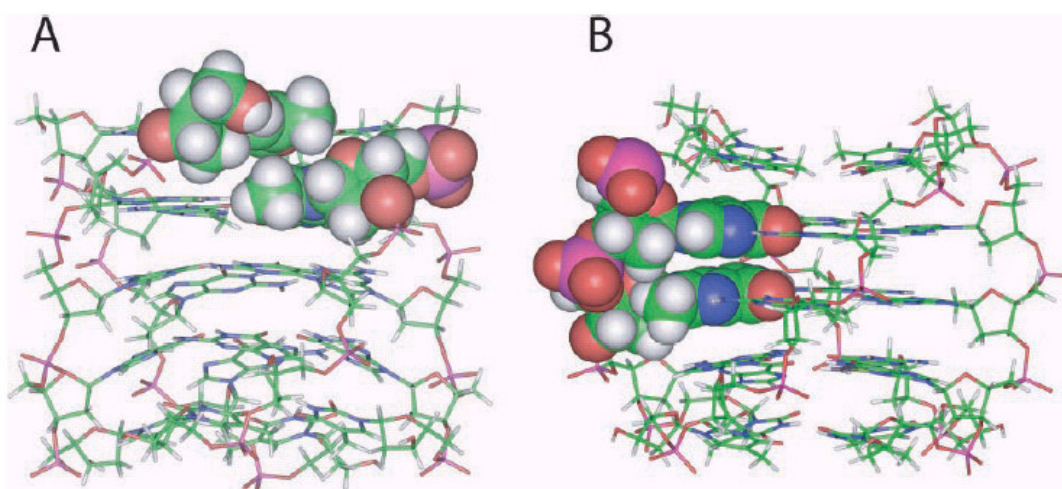
simmetria  $C_4$  con tutti i residui purinici coinvolti nella formazione di tetradi, inclusi i residui modificati di  $G^{8Me}$ , capaci di formare una tetraide *syn* planare e ben definita.



**Fig. 40** Rappresentazione delle migliori 10 strutture sovrapposte di Q1 (A) e Q2 (B).

Contrariamente a quanto osservato per i residui di  $G^{8Br}$  in  $[d(TG^{8Br}GGT)]_4$ ,<sup>2</sup> tale modello molecolare è caratterizzato da una totale mancanza di distorsioni del backbone e da una completa assenza di interazioni steriche sfavorevoli, nonostante tutti i residui di  $G^{8Me}$  adottino una perfetta conformazione glicosidica di tipo *syn* (**Fig.41 A**). Ciò probabilmente è dovuto a differenti interazioni di stacking fra le tetradi modificate e quelle adiacenti. Infatti, mentre nel caso di  $[d(TG^{8Br}GGT)]_4$  si ha sovrapposizione tra le basi modificate e le guanine canoniche sottostanti solo a livello dell'anello a cinque termini, per quanto riguarda  $[d(TG^{8Me}GGT)]_4$  lo stacking tra le prime due tetradi di questa struttura coinvolge entrambi gli anelli, anche se solo parzialmente.

L'analisi strutturale di Q2 ha rivelato anche nella sua struttura, come in Q1, un'avvolgimento destrorso dell'elica del backbone e una simmetria  $C_4$ , ma in questo caso tutti i residui di G modificati e canonici sono implicati nella formazione di tre G-tetradi planari di tipo *anti*. Inoltre, in contrasto con quanto osservato per l'analogo quadruplex bromurata  $[d(TGG^{Br}GT)]_4$ , caratterizzata da una lieve distorsione del legame C8-Br, per effetto di interazioni steriche tra l'atomo di bromo e il gruppo fosfato al 5' della guanosina del filamento adiacente, è interessante notare che le strutture ottenute per Q2 sono prive di qualsiasi interazione sterica repulsiva e destabilizzante (**fig.41 B**). Questi differenti risultati possono essere spiegati tenendo conto delle lievi differenze nel raggio di van der Waals del metile rispetto al bromo.<sup>31,32</sup> In particolare i modelli CPK di Q1 e Q2 dimostrano chiaramente, in entrambi i casi, l'assenza di interazioni steriche coinvolgenti il gruppo metile.



**Fig. 41** Struttura media tra le migliori 10 strutture ottenute per Q1 (A) e Q2 (B). (carbonio, verde; azoto, blu;ossigeno, rosso; idrogeno, bianco); sono riportati in CPK nel pannello A i residui di dGMe e dT adiacenti, nel pannello B i residui di dGMe e dG adiacenti.

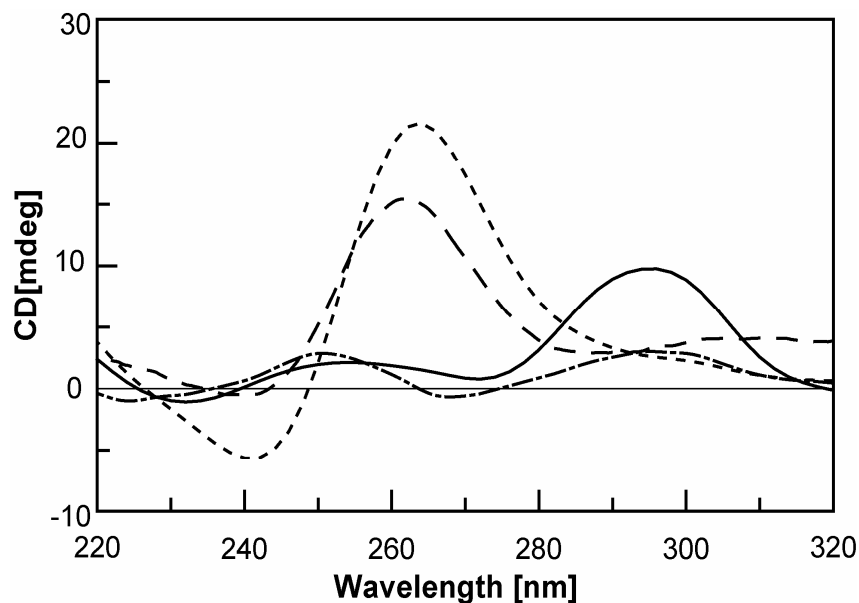
In Q2 le interazioni di stacking tra la tetrate di G modificate e le due tetradi canoniche è minima. Questo è dovuto probabilmente alla conformazione glicosidica *anti* adottata dai residui di G<sup>Me</sup> in [d(TGG<sup>Me</sup>GT)]<sub>4</sub>.

Per testare l'effetto della sostituzione di un residuo di G canonico con uno di G<sup>8Me</sup> sul profilo CD e sulla stabilità termica delle risultanti strutture quadruplex, Q1, Q2 e Q3 sono stati sottoposti ad esperimenti di **dicromismo circolare** e di denaturazione termica.

Gli spettri CD di Q1 e Q2 sono stati acquisiti a 20°C, mentre lo spettro di Q3 è stato registrato a 5°C allo scopo di favorire la formazione della quadruplex. L'introduzione di un residuo di G<sup>8Me</sup> in diverse posizioni della medesima sequenza d(TGGGT) produce spettri CD diversi.

In particolare Q1 mostra lo spettro CD tipico di strutture quadruplex contenenti residui in conformazione glicosidica *syn*, come nel caso di quadruplex a filamenti antiparalleli,<sup>33-35</sup> con due bande positive a 254 e 295 nm e due negative a 232 e 272 nm. Q2, invece, presenta il profilo CD tipico di una quadruplex a filamenti paralleli, con tutti i residui in conformazione *anti*, caratterizzato da un effetto Cotton massimo a 261 nm e minimo a 240 nm.<sup>33-35</sup>

Lo spettro CD di M3 presenta due bande positive a 250 e 295 nm e una negativa a 267 nm, il segnale CD, però, è molto basso, probabilmente a causa della coesistenza del singolo filamento "random coil" con la quadruplex nelle condizioni sperimentali (**Fig.42**).

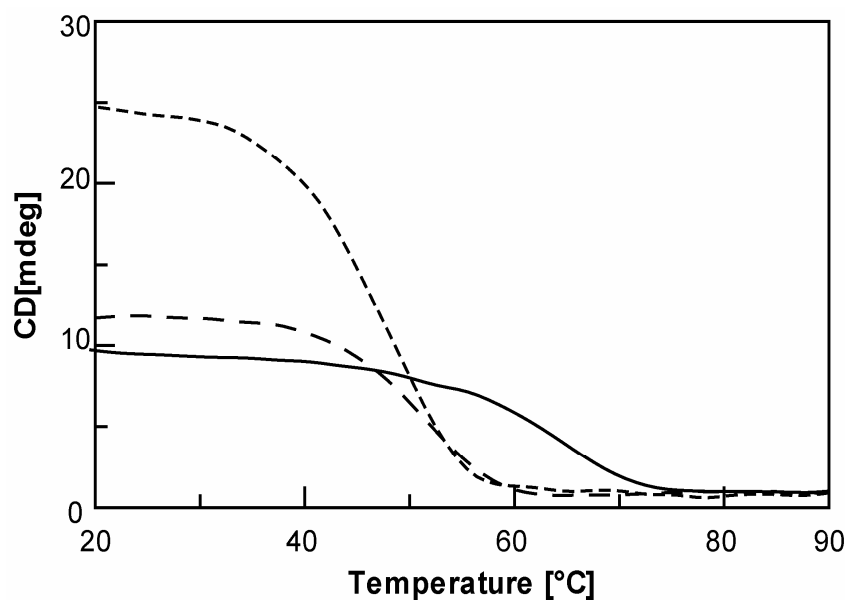


**Fig. 42** Spettri CD di [d(TGGGT)]<sub>4</sub> (-----), [d(TG<sup>Me</sup>GGT)]<sub>4</sub> (—), [d(TGG<sup>Me</sup>GT)]<sub>4</sub> (— — —), [d(TGGG<sup>Me</sup>T)]<sub>4</sub> (- - -).

Allo scopo di valutarne la stabilità termica, Q1, Q2 e Q3 sono stati sottoposti ad esperimenti di CD melting ed annealing, in paragone con [d(TGGGT)]<sub>4</sub>, nelle medesime condizioni sperimentali. Tenendo conto che le cinetiche di formazione/ dissociazione delle quadruplex sono molto lente, le curve sono state acquisite con la velocità di 10°C/h. Sfortunatamente per ciascun oligonucleotide è emersa un notevole grado di isteresi tra le curve di melting ed annealing, indicativa del fatto che i sistemi non erano all'equilibrio durante l'esperimento. Ciononostante il confronto con il profilo di melting della quadruplex [d(TGGGT)]<sub>4</sub> naturale, ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali, permette una valutazione qualitativa delle stabilità termiche relative.

I valori di T<sub>m</sub> registrati per Q1, Q2 e la quadruplex canonica [d(TGGGT)]<sub>4</sub> sono rispettivamente di 66°C, 52°C e 45°C. Non è stato, invece, possibile

ottenere dati significativi relativamente a Q3, in quanto la struttura comincia a fondere ad una temperatura non accessibile sperimentalmente (**Fig.43**). Tali dati, come nel caso degli oligomeri modificati contenenti G<sup>8Br</sup>, dimostrano che le quadruplex formate da Q1 e Q2 sono termicamente più stabili della corrispettiva controparte naturale, mentre, nel caso di Q3, la sostituzione con lo stesso monomero modificato della base dG vicina alla dT in posizione 3' porta a un decremento di stabilità, indicando che la stabilità termica stessa dipende in maniera stringente dalla posizione della base modificata.



**Fig. 43** Profili di CD melting di [d(TGGGT)]<sub>4</sub> (---), [d(TGMeGGT)]<sub>4</sub> (—), [d(TGGMeGT)]<sub>4</sub> (- -).

In conclusione con questo studio abbiamo dimostrato che la sostituzione di un residuo di G canonico con uno di G<sup>8Me</sup>, in tre diverse posizioni nella sequenza d(TGGGT), influenza le strutture quadruplex risultanti in maniera diversa.

È interessante notare che la quadruplex Q1 è caratterizzata dalla presenza di un piano di G<sup>8Me</sup> tutte *syn*, questa rappresenta la prima evidenza diretta della presenza di una tetrate di G *syn* in una quadruplex a filamenti paralleli.

Inoltre, sebbene sia noto che l'introduzione di un sostituito ingombrante, come un bromo o un metile, in posizione 8 favorisce l'equilibrio verso una conformazione glicosidica *syn*,<sup>20,36,37</sup> nella stabile struttura quadruplex Q2 è stato osservato un arrangiamento di tipo *anti* dei quattro residui di G<sup>8Me</sup>.

Di notevole interesse è anche la differenza dei profili CD di Q1 e Q2 (**Fig.42**). Infatti, sebbene i dati NMR indicano chiaramente un arrangiamento parallelo dei filamenti per entrambi i complessi, Q1 a differenza di Q2 mostra lo spettro CD tipico di strutture quadruplex a filamenti antiparalleli. Il complesso Q1 e le quadruplex antiparallele hanno in comune la presenza nella medesima sequenza sia di residui in conformazione *syn* che di residui in conformazione *anti*. Questo dato suggerisce che il profilo CD, generalmente osservato per strutture quadruplex antiparallele, potrebbe essere ascritto alla presenza di residui in conformazione *syn* piuttosto che al relativo orientamento dei filamenti stessi. Dato che gli spettri CD del DNA sono molto sensibili allo stacking tra le basi,<sup>38,39</sup> la concomitante presenza di G *syn* e G *anti* in un tratto di G potrebbe alterare le caratteristiche dello stacking guanina-guanina che, in accordo con gli studi di Kypr e collaboratori,<sup>40,41</sup> è responsabile della forte banda CD intorno a 260 nm. Ulteriori studi serviranno a chiarire tale punto.

Tali risultati dunque forniscono notevoli informazioni sulla correlazione intercorrente tra orientamento relativo dei filamenti, conformazione glicosidica delle guanine e profili CD.

Inoltre la capacità di residui di G<sup>8Me</sup> di stabilizzare strutture quadruplex parallele, quando introdotti in date posizioni, potrebbe contribuire allo sviluppo e alla progettazione di nuovi aptameri, spesso caratterizzati da un nucleo centrale basato su una quadruplex.<sup>42</sup> Infatti, uno sviluppo del processo di SELEX, tecnica di selezione in vitro che utilizza la chimica combinatoriale per produrre aptameri oligonucleotidici con alta affinità e specificità di legame verso una data molecola *target*, consiste nell'introduzione di modifiche sia nel pool iniziale di sequenze random sia nella fase di selezione di un aptamero mediante sintesi chimica.<sup>43</sup> L'incorporazione di questa base modificata nella sequenza potrebbe tornare utile sia nel migliorare la stabilità termica dell'aptamero selezionato sia nell'aumentare l'affinità di legame verso le molecole *target*, grazie alla capacità del gruppo alchilico di stabilire interazioni idrofobiche.

### ***3.2.1 Parte sperimentale.***

#### *Sintesi e purificazione degli oligomeri Q1, Q2 e Q3*

Gli oligonucleotidi modificati 5'-d(TG<sup>Me</sup>GGT)-3' (**Q1**), 5'-d(TGG<sup>Me</sup>GT)-3' (**Q2**) e 5'-d(TGGG<sup>Me</sup>T)-3' (**Q3**) sono stati assemblati mediante l'utilizzo del sintetizzatore automatico Millipore Cyclone Plus DNA, sfruttando la chimica in fase solida dei β-cianoetilfosforamiditi su scala 15 μmol.



Gli oligomeri Q1, Q2 e Q3 sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 55°C per 12 ore. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46). Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare dei buffer A e B ( 100%A; 0% B→0%A; 100%B) in 30 min. a temperatura ambiente ad un flusso di 1.0 ml/min. *Buffer A*: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN; *Buffer B*: 1 M KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN. I tempi di ritenzione per gli oligomeri isolati sono i seguenti: Q1 =18.0 min (come quadruplex); Q2=8.4 min (come singolo filamento) e 17.0 min (come quadruplex); Q3=8.3 min (come singolo filamento) e 16.0 min (come quadruplex). Le diverse frazioni di uno stesso oligomero sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18) mediante eluizione con H<sub>2</sub>O e metanolo.

Tutti gli oligomeri sono risultati puri all'NMR più del 98%.

#### *Risonanza Magnetica Nucleare*

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione approssimativa di 3.0 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA.

Per gli esperimenti in D<sub>2</sub>O, l'H<sub>2</sub>O è stata sostituita con D<sub>2</sub>O per essiccamento del campione, liofilizzazione e ridissoluzione in D<sub>2</sub>O pura.

Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz per Q2 e, per una limitazione di accesso allo strumento, su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz per Q1. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni (<sup>1</sup>H), mentre il segnale del fosforo dell'acido fosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% v/v) lo è stato per i *chemical shift* dei <sup>31</sup>P. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti WATERGATE<sup>22</sup> per la soppressione del segnale dell'acqua. Gli spettri NOESY sono stati acquisiti in modo “*phase sensitive*”<sup>44</sup> con *mixing times* di 100 e 200 ms (T=25°C), per quelli in H<sub>2</sub>O è stata utilizzata la sequenza di gradienti WATERGATE<sup>22</sup> per la soppressione del segnale del solvente.

Gli spettri TOCSY<sup>45</sup> sono stati registrati in D<sub>2</sub>O con *mixing times* di 120 ms. Gli esperimenti NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura TPPI.<sup>46</sup> In tutti gli esperimenti 2D i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t<sub>2</sub> e 400-512 FID nella dimensione t<sub>1</sub>. Il tempo di rilassamento è stato settato ad 1.2 s per tutti gli esperimenti.

I dati NMR sono stati processati su una SGI Octane workstation usando il software FELIX 98 (Byosym, San Diego, CA).

*Calcoli strutturali*

I calcoli strutturali sono stati condotti mediante l'utilizzo del programma CYANA,<sup>27</sup> partendo da 200 conformazioni casuali.

Le distanze limiti fra gli idrogeni, sia scambiabili che non, sono state calcolate secondo quanto previsto dal sistema CALIBA del programma CYANA,<sup>27</sup> sfruttando le intensità dei relativi picchi nello spettro NOESY (mixing time=100ms). Sono state così calcolate 200 e 380 distanze rispettivamente per Q1 e Q2, poi ridotte a 112 e 224 dopo eliminazione di quelle irrilevanti; dove necessario, sono stati introdotti pseudo-atomi.

A queste sono state aggiunte le *constraints* riguardanti i ponti ad idrogeno (16 *upper* and 16 *lower limit constraints* per tetrade di G) con i limiti di *upper* e *lower distance* di 2.0 Å e 1.7 Å per gli accettori di idrogeni e 3.0 Å e 2.7 Å per i donatori-accettori.

Queste *constraints* non hanno portato ad un aumento di violazioni.

Inoltre in accordo con i *chemical shift* osservati negli esperimenti <sup>31</sup>P,<sup>28-30</sup> gli angoli di torsione del *backbone* sono stati ristretti in un intervallo di  $\pm 20^\circ$  intorno ai valori dell'elica delle quadruplex naturali.<sup>10</sup> Gli angoli di torsione glicosidici per tutte le G sono stati mantenuti in un *range* di  $-157^\circ/-97^\circ$  (conformazione *anti*), mentre per i residui modificati di dG<sup>8Me</sup> nella struttura calcolata per Q1, è stato imposto il *range*  $-10^\circ/100^\circ$  (conformazione *syn*), nel caso di Q2, invece, l'angolo di torsione glicosidico per le guanosine modificate è stato fissato nel campo *anti* ( $-167^\circ/-67^\circ$ ). Per finire, sono state aggiunte distanze di restrizione relative alla chiusura degli anelli degli

zuccheri: C4'-O4': 1.41 Å, C4'-C1': 2.40 Å, C5'-C4': 2.39 Å, H4'-O4': 2.12 Å.

Le 10 strutture con i valori più bassi di *target function* di CYANA sono state sottoposte a minimizzazione di energia mediante l'algoritmo "*conjugate gradient*" utilizzando il programma DISCOVER (Molecular Simulations, San Diego, CA, Usa), usando un campo di forza CVFF.

Durante tale processo, le distanze interprotoniche e le restrizioni dei legami a idrogeno delle tetradi di G sono state utilizzate con una costante di forza di 20 e 100 Kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, rispettivamente.

Le illustrazioni delle strutture sono state create con il programma INSIGHT II, versione '98 (Biosym Technologies Inc.).

Tutti i calcoli sono stati svolti su una *workstation* SGI Octane.

#### *Spettroscopia CD.*

I campioni CD relativi a Q1, Q2, Q3 e alla loro controparte naturale [d(TGGGT)]<sub>4</sub> sono stati preparati ad una concentrazione di 1·10<sup>-4</sup> M; gli spettri sono stati acquisiti nello stesso tampone utilizzato per gli esperimenti NMR, sfruttando uno spettrofotometro JASCO 715 CD, accoppiato a una cella programmabile, termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348).

La lunghezza d'onda è stata variata da 220 a 320 nm alla velocità di 100 nm min<sup>-1</sup>. Le misure sono state effettuate a 20°C per Q1 e Q2, e a 5°C per Q3, utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm. Gli spettri

CD sono stati registrati con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2.0 nm. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone.

Le curve di fusione sono state ottenute raccogliendo i dati nel *range* tra 20°C e 90°C per Q1 e Q2, e tra 5°C e 80°C per Q3, alla lunghezza d'onda del loro massimo effetto Cotton. I dati di CD melting sono stati registrati nello stesso tampone degli esperimenti NMR, utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm con una velocità di scansione di 10°C/h.

### ***3.3 Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-oxo-2'deossadenosina in oligonucleotidi formanti strutture quadruplex.***

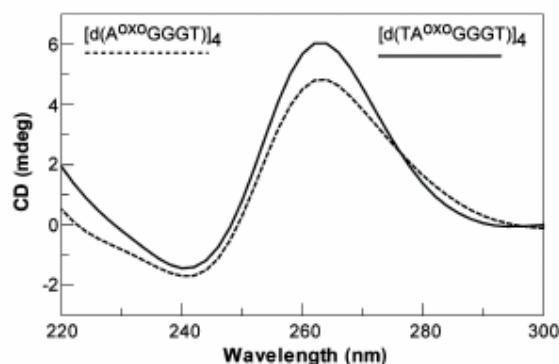
Recentemente le strutture delle sequenze troncate del telomero umano sono state oggetto di grande interesse. In particolare è stato trovato che questi segmenti sono in grado di assemblarsi facilmente per formare quadruplex a filamenti paralleli contenenti, accanto a tetradi di G, tetradi di A.<sup>10</sup>

Dato il crescente interesse suscitato dall'utilizzo di oligonucleotidi contenenti basi modificate, in quanto capaci di indurre utili cambiamenti nelle proprietà fisiche e biologiche dei risultanti frammenti di DNA, il gruppo presso il quale ho svolto l'attività del mio dottorato di ricerca si è interessato allo studio strutturale di sequenze d(AG<sub>3</sub>T) e d(TAG<sub>3</sub>T) modificate, caratterizzate dall'introduzione di un residuo di 8-oxoadenosina (A<sup>oxo</sup>).

Partendo dal monomero modificato, commercialmente disponibile, ed utilizzando i classici protocolli di sintesi degli oligonucleotidi basati sulla chimica del fosforoamidito, sono stati sintetizzati gli oligomeri d(A<sup>oxo</sup>GGGT) (1) e d(TA<sup>oxo</sup>GGGT) (2). Per effettuarne la caratterizzazione strutturale si è ricorso alla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, UV e a tecniche computazionali.

Gli spettri protonici monodimensionali dei complessi (1) e (2) mostrano, nella regione tra 11-12 ppm, entrambi la presenza di tre picchi attribuibili ai protoni amminici. Nella regione tra 7-8.5 ppm, invece, sono presenti, rispettivamente, cinque e sei segnali appartenenti ai tre protoni in 8 delle G, a uno o due protoni in 6 delle T e al protone in 2 del residuo modificato A<sup>oxo</sup>. Tali segnali suggeriscono in entrambi i casi la presenza in soluzione di una singola specie ben definita. Questi dati concordano con la formazione di una struttura G-quadruplex altamente simmetrica caratterizzata dalla presenza di tre tetradi di G, con simmetria C<sub>4</sub> e tutti i filamenti equivalenti tra loro.

Questa ipotesi è stata confermata dai dati ottenuti da esperimenti di dicroismo circolare (**Fig.44**). Entrambe le molecole, infatti, presentano spettri CD tipici di strutture quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli, caratterizzati da un effetto Cotton massimo a 263 nm e minimo a 246 nm.<sup>19</sup>



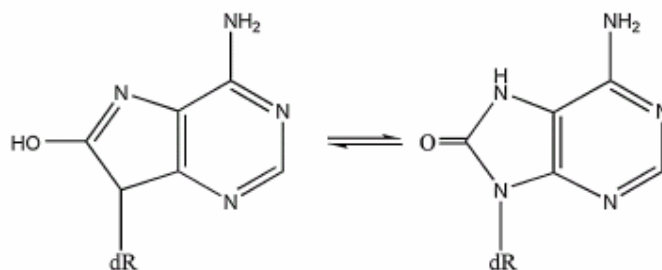
**Fig. 44** Spettri CD di d(A<sup>oxo</sup>GGGT) e d(TA<sup>oxo</sup>GGGT).

I segnali protonici, per entrambe le quadruplex, sono stati solo parzialmente assegnati sulla base dei dati ottenuti da esperimenti NOESY e TOCSY, acquisiti a 500 Mhz (T=300K). Le intensità relative dei NOE osservati tra G H8 e H2' dei residui di deossiribosio, paragonati ai NOE osservati tra G H8/T H6 e H1', dimostrano che tutte le G e le T sono in conformazione glicosidica *anti*. Inoltre la polarità delle connettività NOE (GH8 con H1' e H2'/H2'' del proprio anello zuccherino e con H1' e H2'/H2'' dell'anello zuccherino al 5') è indicativa di una struttura elicoidale destrorsa, come prevista per una quadruplex parallela.<sup>10</sup>

L'analisi degli spettri PE-COSY indica che le costanti di accoppiamento H1'/H2' sono ragionevolmente ampie. Ciò suggerisce che lo zucchero adotta principalmente una geometria S-type e quindi la struttura dei filamenti si avvicina alla forma B del DNA a doppia elica piuttosto che alla forma A.

La 8-oxo-2'deossiadenosina in soluzione può stabilire un equilibrio cheto/enolico (**Fig.45**). Effetti intrinseci di stabilità, come la possibilità di

formazione di un legame idrogeno interno, possono spostare l'equilibrio verso una data forma, per cui gli studi di molecular modelling sono stati effettuati su quadruplex contenenti entrambe le forme tautomeriche.



**Fig. 45** Equilibrio tautomerico tra la forma cheto e la forma enolica della 8-oxo-adenosina

In particolare, per ciascuna delle due molecole sono stati generati otto modelli, tenendo conto di tutte le distanze sperimentali (distanze interprotoniche) estrapolate da spettri NOESY (mixing time=100 ms) e di una serie di informazioni strutturali dedotte da esperimenti NMR (i filamenti sono paralleli tra loro e adottano una geometria elicoidale destrorsa, tutte le G e le T adottano un angolo di torsione glicosidico *anti*, i protoni imminici e amminici delle guanine sono implicati in legami idrogeno responsabili della formazione di G-tetradi, secondo quanto già osservato per altre strutture quadruplex).

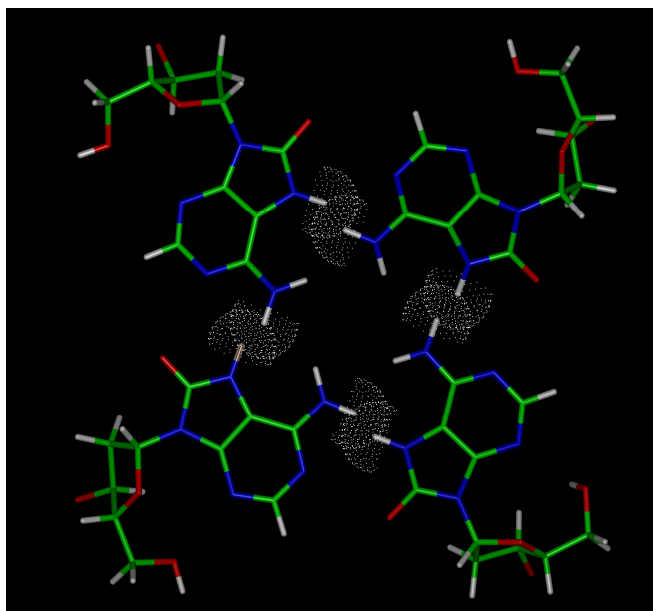
Gli otto modelli ottenuti per le quadruplex formate da (1) e (2) differiscono per il pattern di legami idrogeno, imposto alla tetrate di A modificate (N61 o N67) (**Fig.34**),<sup>10</sup> per la conformazione glicosidica adottata dalle adenosine



modificate (*syn* o *anti*) e per la forma tautomerica selezionata, forma cheto ( $A^{oxo}$ ) o enolica ( $A^{OH}$ ).

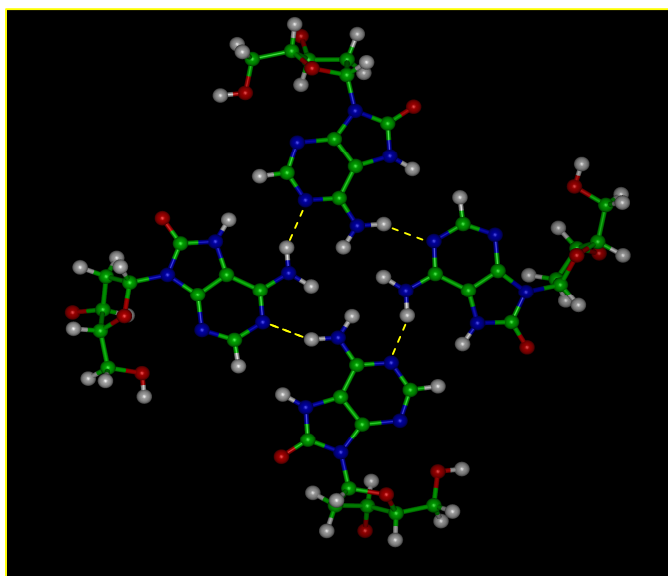
I modelli, in cui i residui di  $A^{oxo}$  e  $A^{OH}$ , adottano una conformazione glicosidica *anti*, presentano forti distorsioni del backbone e lievi discordanze con i dati sperimentali. Pertanto non possono essere considerati modelli rappresentativi delle strutture in soluzione.

I modelli di (1) e (2) contenenti la forma chetonica dei residui di A, in cui è selezionato il pattern di legami idrogeno N67 presentano interazioni steriche tra il gruppo amminico dei residui di  $A^{oxo}$  e il protone sull'azoto in 7 della base modificata adiacente. In tal modo l'interazione tra gli idrogeni H6 e gli azoti N7, necessaria per la formazione dei legami idrogeno previsti dal pattern indicato, è impedita (**Fig.46**).



**Fig. 46** Visione dall'alto del modello di  $d(A^{oxo}GGGT)$  caratterizzato da un pattern N67 di legami idrogeno per la tetrate di  $A^{oxo}$ . Interferenze steriche tra il gruppo amminico di  $A^{oxo}$  e l'idrogeno sull'azoto in 7 impediscono la formazione di legami idrogeno.

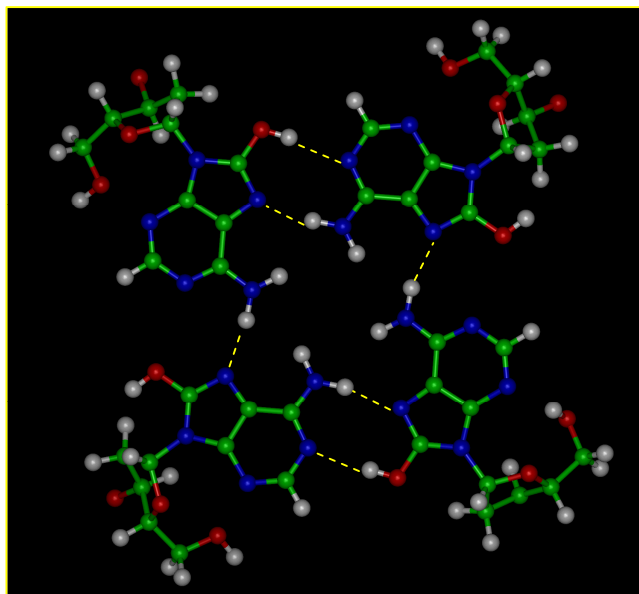
Pertanto l'unico modello capace di formare una tetrate di  $A^{oxo}$  sembra essere quello in cui tutte le adenine adottano una conformazione glicosidica *syn*, selezionando il pattern di legame idrogeno N61 (**Fig.47**).



**Fig. 47** Visione dall'alto del modello di  $d(A^{oxo}GGGT)$  caratterizzato da un pattern N61 di legami idrogeno e conformazione glicosidica *syn* per la tetrate di  $A^{oxo}$ .

In quest'ultima conformazione il modello di  $[d(TA^{oxo}GGGT)]_4$  è caratterizzato, inoltre, dalla presenza di due legami idrogeno aggiuntivi tra il 5'-OH di T1 e il cheto gruppo in 8 del residuo di  $A^{oxo}$  sottostante.

Nei modelli in cui la forma enolica della 8-oxo-2'-deossiadenosina si trova in conformazione *syn*, possono essere selezionati entrambi i pattern di legami idrogeno. Nel caso della tetrate di  $A^{OH}$  N67, la formazione di due legami idrogeno supplementari tra la funzione enolica in 8 di un residuo di  $A^{OH}$  e l'N1 del residuo adiacente sembra essere possibile sia per  $[d(A^{OH}GGGT)]_4$  che per  $[d(TA^{OH}GGGT)]_4$  (**Fig.48**).



**Fig. 48** Visione dall'alto della tetrade di A<sup>OH</sup>, dove la formazione di due legami idrogeno supplementari tra la funzione enolica di un residuo di A<sup>OH</sup> e l'N1 di quello adiacente sembra essere possibile sia per [d(A<sup>OH</sup>GGGT)]<sub>4</sub> che per [d(TA<sup>OH</sup>GGGT)]<sub>4</sub>.

La stabilità termica delle quadruplex formate da (1) e (2) è stata determinata mediante esperimenti di UV melting. Entrambe le molecole mostrano delle curve sigmoidi ben definite, con temperature di melting, rispettivamente, di 54°C e 64°C, che risultano più basse di quelle osservate per le loro controparti naturali, [d(AGGGT)]<sub>4</sub> (68°C) e [d(TAGGGT)]<sub>4</sub> (72°C).

Dato che gli studi di molecular modelling non giustificano la minore stabilità delle quadruplex modificate, ulteriori studi chimico-fisici in merito sono attualmente in corso.

### ***3.4 Analisi strutturale di quadruplex a filamenti paralleli contenenti un residuo di 8-bromo-2'deossiadenosina.***

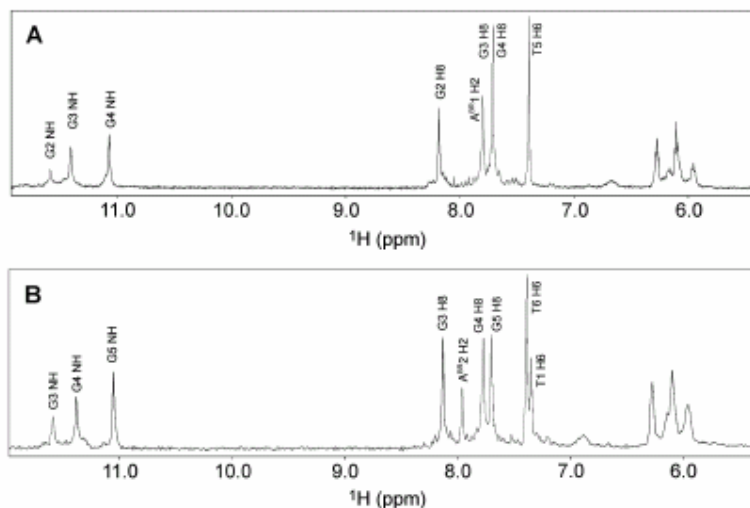
La formazione di una tetrate di A è altamente dipendente dal contesto ed inoltre non è ancora chiara la relazione intercorrente tra formazione della tetrate e l'angolo di torsione glicosidico adottato dai residui coinvolti.<sup>10,16,18</sup>

Allo scopo di chiarire questo punto e investigare gli effetti dell'introduzione di un sostituente ingombrante, come il bromo, nella posizione 8 dei residui di adenosina, abbiamo sintetizzato gli oligomeri modificati d(A<sup>Br</sup>GGGT) e d(TA<sup>Br</sup>GGGT), due differenti sequenze troncate del telomero umano contenenti, al posto di A canoniche, un residuo di 8-bromo-2'deossiadenosina (A<sup>Br</sup>).

Lo spettro protonico monodimensionale di d(A<sup>Br</sup>GGGT) (**Fig.49 A**) mostra la presenza di tre picchi, attribuibili ai protoni imminici, nella regione tra 11-12 ppm. Tali picchi sono indicativi della presenza di legami idrogeno di tipo Hoogsteen, responsabili della formazione di tre quartetti di G. Inoltre nella regione di risonanza dei protoni aromatici, tra 7 e 8.5 ppm, sono presenti cinque segnali attribuibili ai tre protoni in 8 delle G, al protone in 6 della T e al protone in 2 del residuo modificato A<sup>Br</sup>. Questi dati concordano con la formazione di una struttura G-quadruplex caratterizzata dalla presenza di tre tetradi di G e dotata di una simmetria C<sub>4</sub> con tutti i filamenti equivalenti tra loro.

Analogamente lo spettro protonico di d(TA<sup>Br</sup>GGGT) (**Fig.49 B**) mostra la presenza di sei segnali nella regione aromatica e tre segnali nella regione tra

10.5-12 ppm. Questi dati suggeriscono per entrambi gli oligomeri l'assenza di eterogeneità conformazionale.



**Fig. 49** Porzioni degli spettri protonici monodimensionali di d(A<sup>Br</sup>GGGT) (A) e di d(TA<sup>Br</sup>GGGT) (B).

Entrambi i campioni sono stati sottoposti ad esperimenti di tipo NOESY e TOCSY. Per l'assegnazione dei picchi sono stati valutati in primo luogo gli effetti NOE intra-residuo coinvolgenti gli H2'/H2''. L'osservazione di un pattern ininterrotto di connettività lungo i filamenti, in contrasto con quanto osservato per le strutture quadruplex antiparallele,<sup>47</sup> suggerisce che la conformazione del backbone per entrambi gli oligomeri modificati è simile a quella di una quadruplex a filamenti paralleli.

La presenza di deboli effetti NOE tra G H8 e H1' dello zucchero e di forti effetti NOE tra G H8 e H2' del deossiribosio indica che tutte le guanine del complesso adottano una conformazione glicosidica di tipo *anti*, inoltre la polarità delle connettività NOE (GH8 con H1' e H2'/H2'' del proprio anello

zuccherino e con H1' e H2'/H2'' dell'anello zuccherino al 5') è indicativa di una struttura elicoidale destrorsa, come previsto per una quadruplex parallela.<sup>10</sup>

L'analisi degli spettri PE-COSY indica che le costanti di accoppiamento H1'/H2' sono ragionevolmente ampie. Ciò suggerisce che lo zucchero adotta principalmente una geometria S-type e quindi la struttura dei filamenti si avvicina alla forma B del DNA a doppia elica piuttosto che alla forma A.

Gli spettri protonici monodimensionali sia di [d(A<sup>Br</sup>GGGT)]<sub>4</sub> sia di [d(TA<sup>Br</sup>GGGT)]<sub>4</sub>, sono caratterizzati da un lieve slargamento dei segnali appartenenti ai residui modificati e a quelli ad essi adiacenti. Ciò è dovuto, probabilmente, ad una maggiore flessibilità di questa porzione del complesso rispetto alla controparte naturale. Sfortunatamente, per entrambi i complessi, non è stato individuato alcun segnale indicativo della presenza di una A-tetrate.

I calcoli strutturali sulle due molecole sono stati effettuati usando il programma CYANA,<sup>27</sup> per ricavare le *distance constraint*. Le migliori 10 strutture, cioè quelle caratterizzate dalle più basse *target function* di CYANA risultanti dalle minori violazioni delle distanze di van der Waals e delle “*constraint*” sperimentali imposte, sono state sottoposte a minimizzazione di energia, usando il campo di forza CVFF nel programma DISCOVER, e successivamente analizzate. Come atteso, ciascun filamento dei complessi in

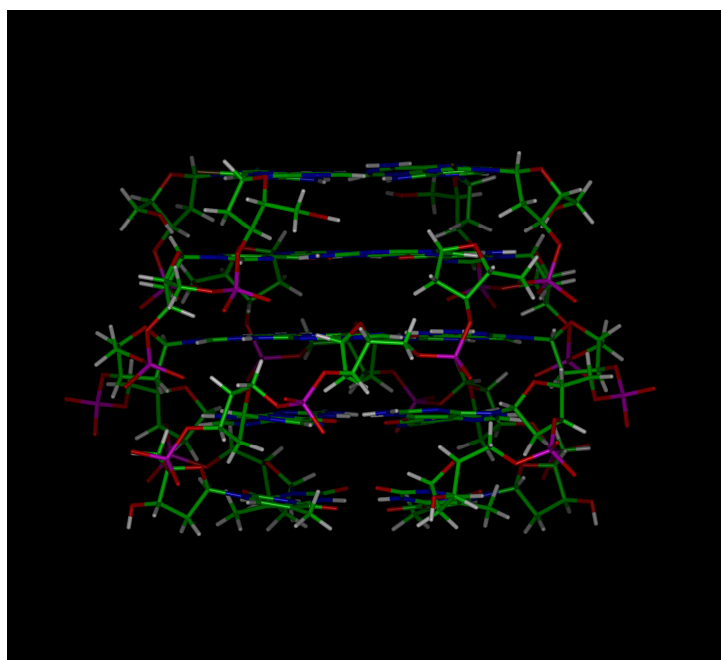
esame possiede una geometria elicoidale destrorsa del backbone e contribuisce con una guanina per formare tre diversi piani di G.

I monomeri modificati A<sup>Br</sup>, invece, adottano una conformazione glicosidica di tipo *syn* e si dispongono in maniera pressochè planare sebbene non siano presenti segnali di protoni coinvolti in legami ad idrogeno. È interessante notare che mentre nell'analogo non modificato [d(AGGGT)]<sub>4</sub><sup>10</sup> la tetrate di A può selezionare due diversi pattern di legami idrogeno, ossia N61 o N67, coinvolgenti rispettivamente un protone dell' -NH<sub>2</sub> in 6 e l'N1 o lo stesso protone e l'N7 (**Fig.34**), i residui modificati, in entrambi i complessi, non sembrano selezionare specificamente alcun pattern.

Allo scopo di chiarire tale punto sono stati effettuati ulteriori studi di *molecular modelling*. In particolare per ciascun complesso sono stati realizzati quattro modelli, tenendo conto di tutti i dati sperimentali ottenuti dagli spettri NMR, quali la simmetria quaternaria, l'elicità destrorsa di tutte le strutture, la conformazione glicosidica *anti* dei residui di G e di T, la presenza di tre quartetti di G.

I quattro modelli differiscono tra loro per la conformazione glicosidica adottata dalle adenosine modificate e per il pattern di legami idrogeno imposti nel calcolo; sono stati elaborati, infatti, due modelli in cui i residui di A<sup>Br</sup> adottano una conformazione di tipo *syn*, selezionando rispettivamente il pattern di legami idrogeno N61 e N67, e due modelli in cui i monomeri

modificati selezionano i due diversi pattern, adottando una conformazione glicosidica *anti*.

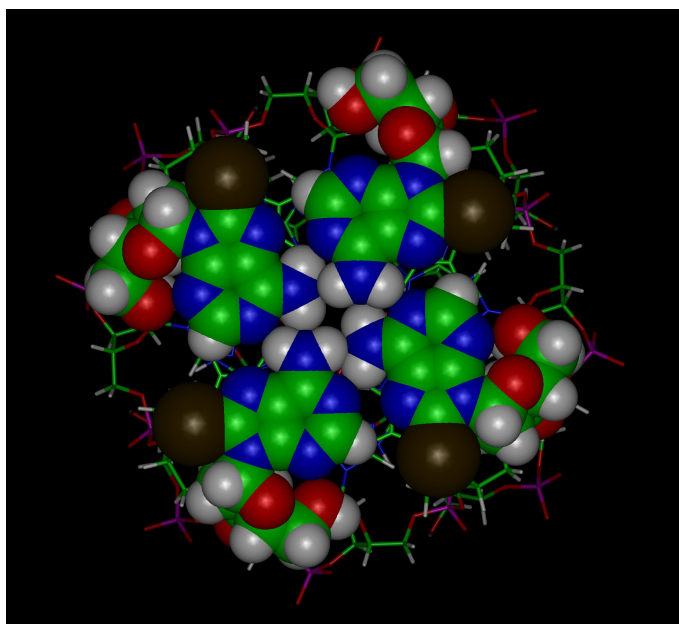


**Fig. 50** Visione laterale del modello di  $[d(A^{Br}GGGT)]_4$  caratterizzato dal pattern N61 e conformazione glicosidica *syn* dei monomeri modificati.

Come previsto, sia per  $[d(A^{Br}GGGT)]_4$  che per  $[d(TA^{Br}GGGT)]_4$ , i modelli in cui i monomeri modificati adottano la conformazione glicosidica *anti* presentano interazioni steriche tra l'atomo di bromo e il backbone.

I modelli caratterizzati da residui di  $A^{Br}$  in *syn*, interagenti tra loro mediante legami del tipo N67, presentano un lieve effetto sterico per interazione con la base adiacente. Pertanto sia per il pentamero che per l'esamero, l'unico modello in cui si può osservare la formazione di una tetrate di  $A^{Br}$ , senza che si verifichino distorsioni, sembra essere quello in cui i residui modificati adottano una conformazione glicosidica di tipo *syn*, interagendo tra loro mediante il pattern di legami idrogeno N61 (**Fig. 50 e 51**).





**Fig. 51** Visione dall'alto del modello di  $[d(A^{Br}GGGT)]_4$  caratterizzato dal pattern N61 e conformazione glicosidica *syn* dei monomeri modificati.

Sulla base di questi dati possiamo concludere che l'introduzione di residui di  $A^{Br}$  nelle sequenze troncate del telomero umano disturba significativamente la formazione di una tetraide di A.

### *3.5 Effetto dell'introduzione di un residuo di 8-metil-2'-deossiadenosina in oligonucleotidi formanti strutture quadruplex.*

La sintesi del nucleoside modificato, **8-metil-2'-deossiadenosina**, è stata progettata allo scopo di chiarire la correlazione tra orientamento relativo dei filamenti, conformazioni glicosidiche nelle A-tetradi e stabilità termica delle strutture quadruplex. Un gruppo metilico in posizione 8, infatti, per effetto del suo ingombro sterico, spinge il nucleoside ad adottare la conformazione

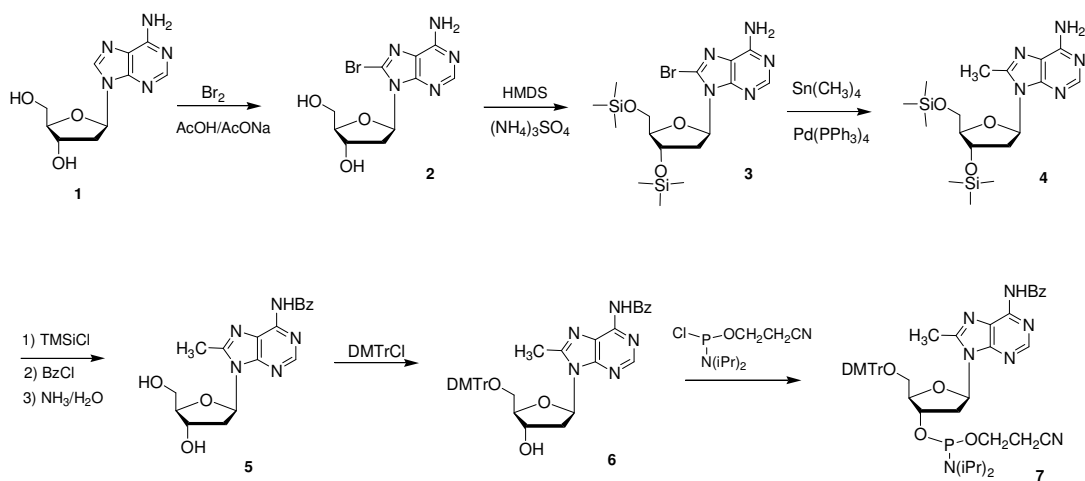
glicosidica *syn*, per evitare interazioni repulsive destabilizzanti. Tale gruppo funzionale, rispetto al bromo precedentemente analizzato, presenta il vantaggio di agevolare l'analisi strutturale grazie alle informazioni desumibili dai contatti NOE, stabiliti dai suoi protoni.

Il monomero fosforamidito modificato è stato inserito in due sequenze troncate del telomero umano, capaci di formare stabili strutture quadruplex. Gli oligomeri **d(A<sup>8Me</sup>GGGT) (I)** e **d(TA<sup>8Me</sup>GGGT) (II)**, dove A<sup>8Me</sup> rappresenta la 8-metil-2'-deossiadenosina, sono stati sintetizzati e sottoposti a studi strutturali mediante spettroscopia NMR, dicroismo circolare e molecular modelling.

La preparazione del monomero fosforamidito (**Fig.52**), opportunamente protetto, di A<sup>8Me</sup> rappresenta il passaggio fondamentale per la sintesi di tali oligonucleotidi.

Il primo step sintetico prevede la reazione di bromurazione della 2'-deossiadenosina mediante trattamento con Br<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, in un buffer acquoso di CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, secondo la procedura riportata da Eason e coll.,<sup>48</sup> per ottenere la 8-bromo-2'-deossiadenosina (2). Nel secondo step, il composto 2 è sottoposto a reazione di metilazione, secondo la procedura di Van Aershot e coll.<sup>49</sup>, previa protezione transiente delle funzioni ossidriliche in 5' e in 3' per reazione con esametildisilazano. Successivamente si effettua la protezione del gruppo -NH<sub>2</sub> esociclico con cloruro di benzoile.<sup>50</sup> La N-benzoil-2'-deossi-8-metiladenosina così prodotta è poi trattata con 5,5'-dimetossitritilcloruro in

piridina dry<sup>17</sup> per la protezione finale del gruppo 5'-OH. Nell'ultimo step il 3'-OH è attivato per reazione con 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidito.<sup>51</sup>



HMDS = esametildisilazano  
Ph = fenil  
TMSi = trimetilsilil  
Bz = benzoil  
DMTr = dimetossitriifenilmetil

**Fig. 52** Sintesi del derivato fosforamidito

Le sequenze **d(A<sup>8Me</sup>GGGT) (I)** e **d(TA<sup>8Me</sup>GGGT) (II)** sono state assemblate mediante utilizzo del sintetizzatore automatico di oligonucleotidi secondo il protocollo standard dei fosforamiditi.

I prodotti grezzi di sintesi sono stati purificati mediante HPLC e desalificati, per poi essere caratterizzati ed analizzati mediante spettroscopia <sup>1</sup>H NMR.

I campioni NMR sono stati preparati in un opportuno tampone (vedi parte sperimentale) e sottoposti ad annealing mediante riscaldamento alla

temperatura di 80°C per 5-10 minuti e successivo lento raffreddamento a temperatura ambiente.

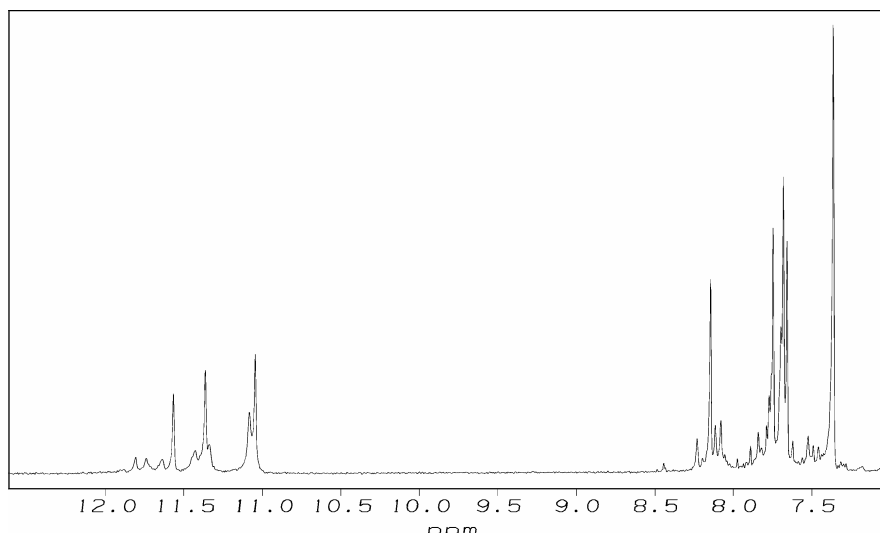
Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati registrati usando una sequenza di impulsi di tipo WATERGATE<sup>53</sup> per la soppressione del segnale dell'acqua.

L'aspetto relativamente semplice degli spettri protonici monodimensionali di I e II indica che, nelle condizioni usate, entrambi gli oligomeri adottano principalmente una singola conformazione, identificabile con una struttura quadruplex. Inoltre segnali di minore intensità, il cui aspetto non cambia al variare della concentrazione del buffer e della temperatura di acquisizione, sono attribuibili a conformazioni secondarie, identificate come conformazioni quadruplex minori, dato che alcuni di questi segnali cadono nella regione tra 11-12 ppm, diagnostica per l'individuazione di una struttura quadruplex.

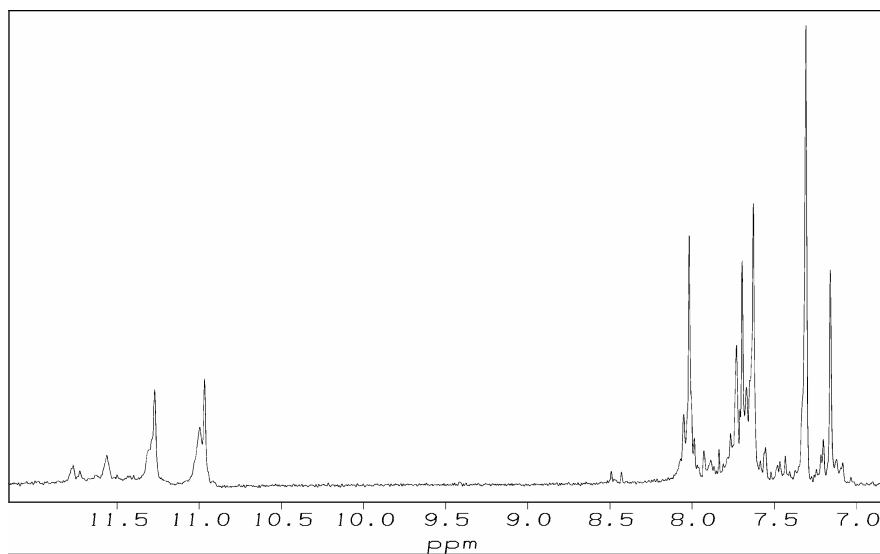
Alla temperatura di 80°C sono individuabili unicamente i segnali attribuibili al singolo filamento, per cui gli oligomeri risultano completamente destrutturati.

Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  (**Fig.53**) di I rivela cinque segnali appartenenti ai protoni H8 delle tre G, al protone H6 della T e al protone H2 del residuo modificato A<sup>8Me</sup>, nella regione di risonanza dei protoni aromatici, e due segnali attribuibili a gruppi metilici, uno dovuto al metile della T intorno ad 1.6 ppm ed l'altro al metile del monomero modificato intorno a 2.3 ppm. Analogamente nel caso dello spettro protonico di II (**Fig.54**) si osservano sei segnali nella regione di risonanza dei protoni aromatici e, come previsto, tre

segnali attribuibili a gruppi metilici nella regione tra 1.5 e 2.5 ppm, in cui il segnale dovuto al metile del monomero modificato è spostato di circa 0.7 ppm a campi più bassi rispetto ai segnali delle timine.



**Fig. 53** Spettro <sup>1</sup>H-NMR di A<sup>8Me</sup>GGGT



**Fig. 54** Spettro <sup>1</sup>H-NMR di TA<sup>8Me</sup>GGGT

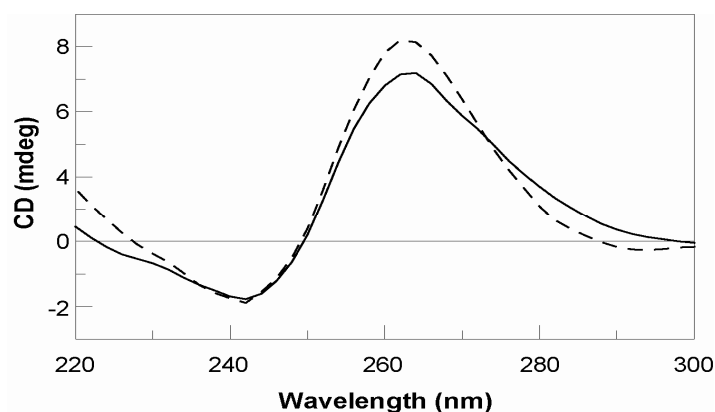
Dato che per entrambe le molecole sono osservabili solo i segnali attribuibili ad un unico filamento, se gli oligonucleotidi sono strutturati in complessi multifilamento, questi complessi devono essere altamente simmetrici. Inoltre

gli spettri protonici di I e II acquisiti in una soluzione acquosa contenente  $K^+$  (vedi parte sperimentale) alla temperatura di  $30^\circ\text{C}$  mostrano anche tre segnali nella regione tra 10.5-12 ppm, attribuibili ai protoni imminici scambiabili delle guanine. Questi segnali persistono a temperature superiori a  $40^\circ\text{C}$  e scambiano lentamente dopo dissoluzione del campione in  $\text{D}_2\text{O}$ , in accordo con l'alta stabilità cinetica e la bassa accessibilità al solvente delle strutture quadruplex.<sup>23</sup>

Questi dati confermano la capacità da parte di questi oligonucleotidi di ripiegarsi in strutture G-quadruplex altamente simmetriche, contenenti tre tetrad di G e dotate di una simmetria quaternaria con i quattro filamenti equivalenti tra loro.

Gli spettri  $^{31}\text{P}$  disaccoppiati con i protoni, sia di I che di II, in  $\text{D}_2\text{O}$  a  $30^\circ\text{C}$  mostrano che tutti i segnali del cadono nella regione tra 0.8-2.2 ppm, caratteristica di backbone fosfati non perturbati di quadruplex a filamenti paralleli.<sup>28-30</sup>

Un ulteriore conferma della formazione di quadruplex a filamenti paralleli deriva dai dati acquisiti con esperimenti di dicroismo circolare (**Fig.55**), a  $30^\circ\text{C}$ , infatti, entrambi i campioni presentano un profilo CD caratterizzato da un effetto Cotton massimo intorno a 262-264 nm e un effetto Cotton minimo intorno a 243 nm.<sup>19</sup>



**Fig. 55** Spettri CD di A<sup>8Me</sup>GGGT (linea continua) e di TA<sup>8Me</sup>GGGT (linea tratteggiata)

Tenendo conto della minima eterogeneità strutturale osservata per i due complessi, è stato possibile effettuare studi strutturali delle specie predominanti presenti in soluzione. In particolare, gli spettri NOESY e TOCSY di I e II, ottenuti a 500 MHz alla temperatura di 30°C, mostrando crosspeak ben dispersi, hanno permesso di assegnare quasi completamente, secondo le procedure standard,<sup>24</sup> i segnali sia dei protoni scambiabili sia di quelli non scambiabili (**Tabella 2**).

**Table 1.** Nonexchangeable and imino protons chemical shifts (500 MHz) for [d(A<sup>8Me</sup>GGGT)]<sub>4</sub> and [d(TA<sup>8Me</sup>GGGT)]<sub>4</sub> quadruplexes in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA (pH 7.0, T = 30 °C)

Base (5'-3')	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	H2/Me	NH
A <sup>8Me</sup>		6.09	2.42-2.54	4.89	4.21	3.58-3.73	7.65-2.28	
G	8.13	6.02	2.81-3.03	5.04	4.47	4.14		11.57
G	7.74	5.95	2.64	4.98	4.50	4.32		11.36
G	7.67	6.25	2.51-2.66	4.88	4.49	4.26		11.05
T	7.35	6.08	2.17	4.47	4.06	4.22	1.61	
T	7.20	5.88	1.75-2.22	4.60	3.94	3.48	1.65	
A <sup>8Me</sup>		6.03	2.55	4.90	4.51	3.93	7.78-2.45	
G	8.05	6.01	2.49-2.77	5.03	4.45	4.17		11.56
G	7.72	5.95	2.64	4.99	4.46	4.28		11.27
G	7.67	6.24	2.52-2.67	4.90	4.49	4.26		10.97
T	7.35	6.07	2.16	4.46	4.04	4.20	1.60	

**Tabella 2** Chemical shift protonici per le quadruplex formate da I e II in 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0, T =25°C)

In base a quanto riportato per altre strutture quadruplex a filamenti paralleli,<sup>25</sup> la polarità delle connettività NOE (GH8 e TH6 con H1' e H2'/H2'' del proprio anello zuccherino e con H1' e H2'/H2'' dell'anello zuccherino al 5') (Fig.56) suggerisce che entrambe le quadruplex adottano una struttura elicoidale destrorsa.

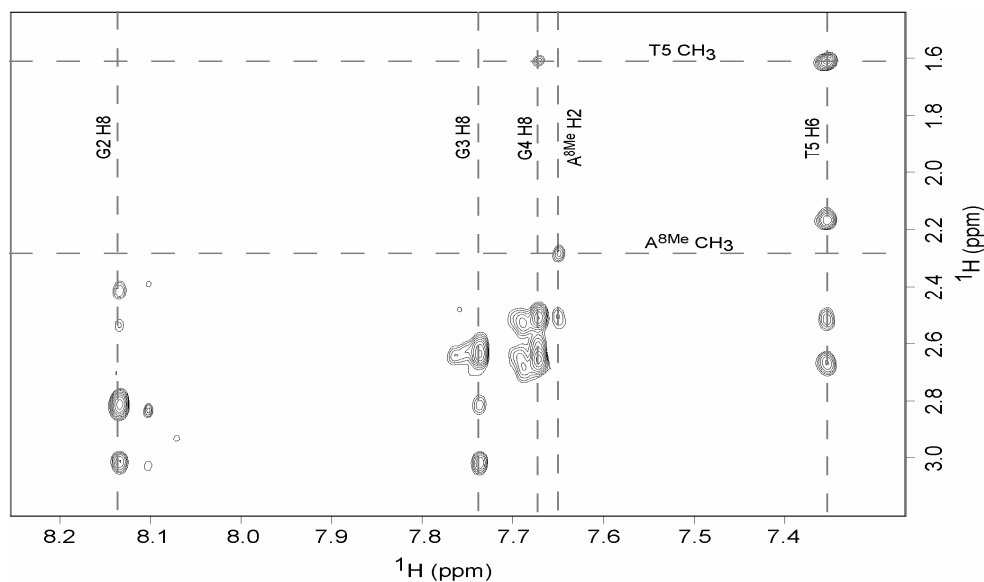
L'analisi degli spettri PE-COSY indica che le costanti di accoppiamento H1'/H2' sono ragionevolmente ampie. Ciò suggerisce che lo zucchero adotta principalmente una geometria S-type e quindi la struttura dei filamenti si avvicina alla forma B del DNA a doppia elica piuttosto che alla forma A.

Informazioni utili per la definizione degli angoli torsionali glicosidici possono essere desunte inoltre dall'analisi delle intensità dei crosspeak NOE tra il protone G H8 e l'H2' dello stesso zucchero, confrontati con quelli tra lo stesso protone G H8 e il corrispondente H1'. Tutte le guanine e le timine dei complessi adottano una conformazione glicosidica di tipo *anti*. I residui modificati, invece, (A<sup>8Me</sup>) adottano una conformazione di tipo *syn*, come indicato dalla presenza nello spettro NOESY di un intenso effetto NOE tra il gruppo metilico in 8 e i protoni H1' dello zucchero. Data la conformazione *syn* dei monomeri modificati, i protoni del gruppo metilico in 8 sono ad una distanza maggiore di 6Å dai protoni dello zucchero adiacente al 5'<sup>26</sup> e ciò determina interruzione del normale pattern di connettività. Inoltre, i dati NMR di 1 e 2 rivelano diverse connettività NOE coinvolgenti le basi modificate. In particolare, la presenza di un NOE interstrand fra il gruppo metilico di un



residuo di A<sup>8Me</sup> e il protone H2 della base modificata presente sul filamento adiacente, (Fig 2) e di un effetto NOE intrastrand tra i protoni H2 dei residui di A<sup>8Me</sup> e i protoni H2'/H2'' delle G adiacenti sul medesimo filamento, suggerisce che i residui di A<sup>8Me</sup> non sono orientati casualmente ma si trovano vicini tra loro, disposti in maniera simmetrica e impilati sulle tetrad di G sottostanti sia in d(A<sup>8Me</sup>GGGT)<sub>4</sub> sia in [d(TA<sup>8Me</sup>GGGT)]<sub>4</sub>.

Sebbene non siano presenti segnali chiaramente risolti attribuibili al gruppo –NH<sub>2</sub> in 6 dei residui di A<sup>8Me</sup>, indicativi della formazione di legami idrogeno.



**Fig. 56** Regione espansa dello spettro NOESY (mt=180ms, T=30°C) di I contenente i crosspeak sequenziali tra gli aromatici e H2'/H2'' e i NOE coinvolgenti il gruppo metile.

Gli spettri 2D NOESY di I e II, acquisiti con mixing time di 180 ms, sono stati utilizzati per ricavare le *distance constraint*, mediante l'ausilio degli strumenti CALIBA del programma CYANA,<sup>27</sup> allo scopo di determinare la struttura tridimensionale di tali complessi. Durante i calcoli sono state introdotte *distance restraint* dei legami idrogeno, relative alle tre tetrad di G,

in particolare, dall'analisi dei picchi NOE sono state calcolate 336 *distance restraint* per I e 320 per II, ridotte rispettivamente a 206 e 160, per eliminazione di quelle irrilevanti ai fini della determinazione strutturale. A tali distanze per ognuno dei due complessi ne sono state aggiunte altre 48, relative ai 24 legami a idrogeno delle tre tetradi di G (HN1-O6, N1-O6, HN2-N7 e N2-N7).

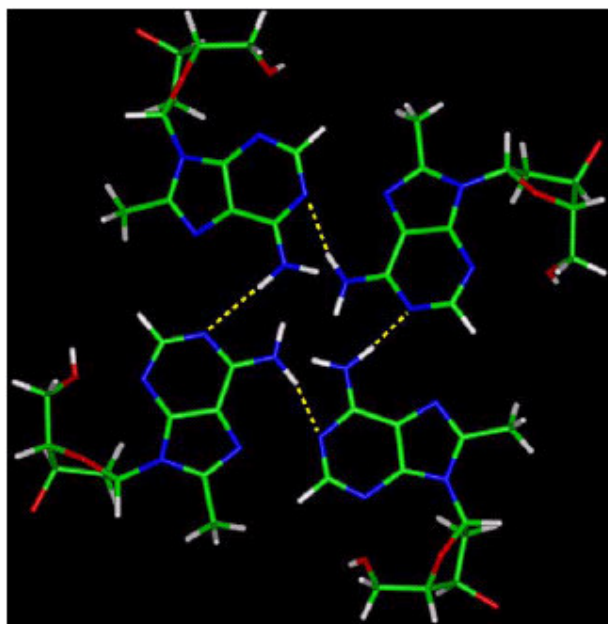
*Constraint* per gli angoli di torsione del backbone sono state dedotte dai chemical shift di esperimenti  $^{31}\text{P}$ , restringendole in un range di  $\pm 20^\circ$  intorno ai valori riportati per le quadruplex naturali [d(AGGGT)]<sub>4</sub> e [d(TAGGGT)]<sub>4</sub>.<sup>10</sup>

In accordo con i dati NMR, gli angoli di torsione glicosidici per tutte le G sono stati fissati in un *range* di  $-157^\circ/-117^\circ$ , corrispondente cioè alla conformazione *anti*, mentre per i residui di A<sup>8Me</sup> è stato usato un range di  $0^\circ/90^\circ$ , corrispondente alla conformazione *syn*.

Con l'utilizzo del programma CYANA<sup>27</sup> sono stati eseguiti calcoli di meccanica e dinamica molecolare, al fine di determinare la struttura tridimensionale delle due molecole.

Le 10 migliori strutture ottenute, quelle cioè con le minori violazioni dei raggi di van der Waals e delle distanze imposte, sono state analizzate in entrambi i casi e sottoposte a minimizzazione di energia utilizzando il campo di forza CVFF. In particolare, la sovrapposizione delle 10 strutture minimizzate ottenute per I è risultata essere caratterizzata da valori di RMSD di  $1.30 \pm 0.43$  e  $1.35 \pm 0.37$ , rispettivamente per il *backbone* e per tutti gli atomi

pesanti, mentre per II sono stati calcolati valori di RMSD di  $1.96 \pm 0.50$  e  $2.14 \pm 0.46$ , indicando la presenza di un buon grado di confidenza tra le strutture determinate e le *constraint* sperimentali imposte per entrambi i complessi.



**Fig. 57** Tetrade di  $A^{8Me}$  osservata nella struttura principale di I. (carbonio in verde, azoto in blu, ossigeno in rosso, idrogeno in bianco) Le linee tratteggiate gialle rappresentano i legami idrogeno.

Nelle strutture ottenute per I ciascun filamento del complesso possiede una geometria elicoidale destrorsa del backbone e contribuisce con una guanina alla formazione di tre piani di G. I residui di  $A^{8Me}$  si trovano vicini tra loro, disposti in maniera simmetrica e impilati sulle tetradi di G sottostanti, adottando una conformazione glicosidica di tipo *syn*. È interessante notare che mentre nella quadruplex  $[d(AGGGT)]_4^{10}$  le A canoniche sono in grado di selezionare due diversi *pattern* di legame idrogeno (*pattern* N61 o N67) (**Fig.34**), in questo caso i residui di  $A^{8Me}$  sembrano non selezionare alcun

*pattern*, sebbene la struttura più significativa suggerisca la formazione del *pattern* N61 (**Fig.57**).

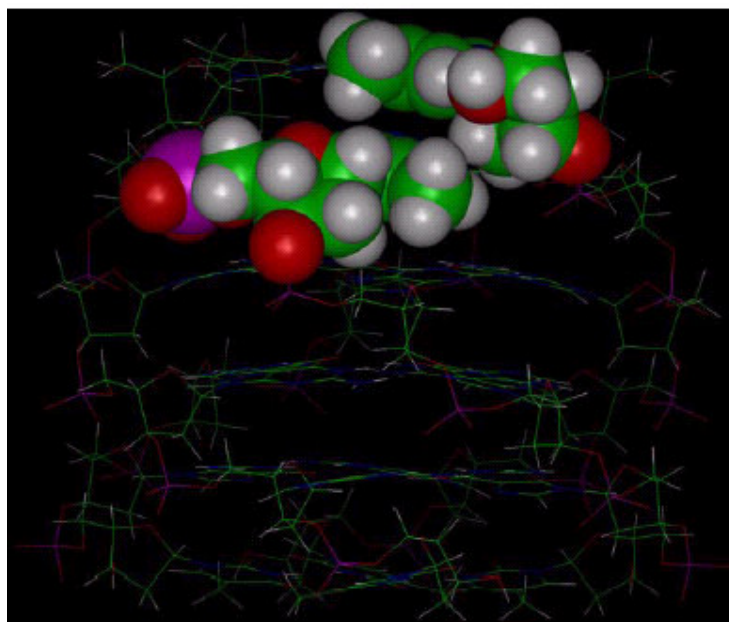
Tenendo conto di vincoli sperimentali ed informazioni dedotte dagli spettri NMR (simmetria a quattro filamenti, elicità destrorsa di tutte le strutture, conformazione glicosidica *anti* di tutte le G, angolo torsionale glicosidico *syn* dei residui di A<sup>8Me</sup>, presenza di tre tetradi di G) per I è stato possibile costruire due modelli che differiscono solo per il *pattern* di legami idrogeno selezionati (N61 e N67), dimostrando che entrambe le disposizioni sono ugualmente probabili.

Tuttavia è ragionevole supporre che lo slargamento dei segnali relativi ai protoni della base modificata e la mancanza di un sufficiente numero di informazioni relative all'estremità 5' della molecola potrebbe aver ostacolato una corretta determinazione della struttura.

Nel caso di II, invece, le varie strutture sono caratterizzate da un notevole disordine conformazionale all'estremità 5'. La struttura più significativa è compatibile con la formazione di una tetraide di A<sup>8Me</sup>, in cui tutti i residui sono in conformazione *syn* e interagiscono tramite legami idrogeno fra l'idrogeno amminico di una base modificata e l'azoto in 6 di quella adiacente.

Nelle singole strutture i residui modificati deviano molto dalla planarità, per cui lo stacking con il quartetto di G sottostante è notevolmente ridotto. In contrasto il segmento -GGGT-3' è essenzialmente simile nella conformazione al corrispondente segmento della quadruplex canonica e di [d(A<sup>8Me</sup>GGGT)]<sub>4</sub>.

Allo scopo di approfondire i motivi del disordine presente all'estremità 5' di II, sono stati effettuati studi di molecular modelling. Come per I, sono stati costruiti due modelli, tenendo conto dei dati strutturali dedotti dagli studi di NMR e imponendo al calcolo sia il *pattern* N61 che quello N67. I due modelli generati rivelano la presenza di interazioni steriche tra il metile dei monomeri modificati e gli zuccheri delle T adiacenti. Tali interazioni repulsive sono più evidenti nel modello in cui è selezionato il pattern N61 (**Fig.58**). Nel caso del pattern N67, invece, la formazione dei legami idrogeno è possibile solo allontanando i residui di A<sup>8Me</sup> dalla disposizione planare, presente nel pentamero.



**Fig. 58** Visione laterale del modello di II (carbonio in verde, azoto in blu, ossigeno in rosso, idrogeno in bianco). Un residuo di A<sup>8Me</sup> e il residuo di dT del medesimo filamento sono riportati in CPK per mettere in evidenza l'interazione sterica presente.

Da questi dati sembrerebbe che una T terminale eserciti una notevole influenza sull'arrangiamento dei residui adiacenti, perturbando la planarità

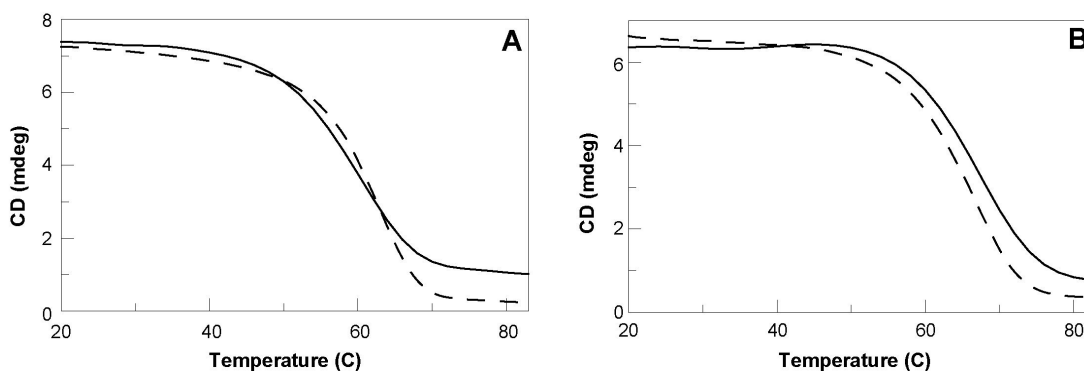
delle adenine modificate e impedendo l'assunzione di un'organizzazione ben definita della struttura del complesso a livello dell'estremità 5'.

Al fine di valutare l'effetto della sostituzione di un residuo di A canonico con un residuo di A<sup>8Me</sup> sulla stabilità termica delle risultanti strutture quadruplex sono stati effettuati esperimenti di CD melting. I profili di melting degli oligomeri I, II e delle rispettive controparti naturali rivelano un andamento sigmoide ben definito (**Fig.59**). I valori di T<sub>m</sub> sono elencati nella **Tabella 2**.

Table 2. Melting temperature of I, II and their natural counterparts	
	T <sub>m</sub> (°C)
[d(AGGGT)] <sub>4</sub>	63
[d(A <sup>8Me</sup> GGGT)] <sub>4</sub> (I)	61
[d(TAGGGT)] <sub>4</sub>	67
[d(TA <sup>8Me</sup> GGGT)] <sub>4</sub> (II)	68

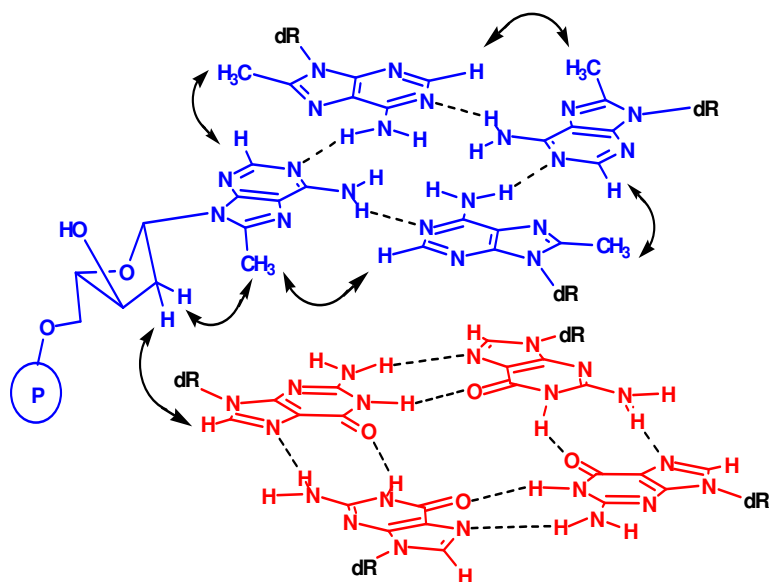
**Tabella 2**

Da questi dati si evince che entrambi gli oligomeri modificati presentano una stabilità termica paragonabile a quella osservata per le rispettive controparti naturali, per cui l'incorporazione di un residuo di A<sup>8Me</sup> non altera significativamente la stabilità della quadruplex.



**Fig. 59** Profili di CD-melting di: A) A<sup>8Me</sup>GGGT (linea continua) e suo analogo naturale (linea tratteggiata); B) TA<sup>8Me</sup>GGGT e suo analogo naturale (linea tratteggiata).

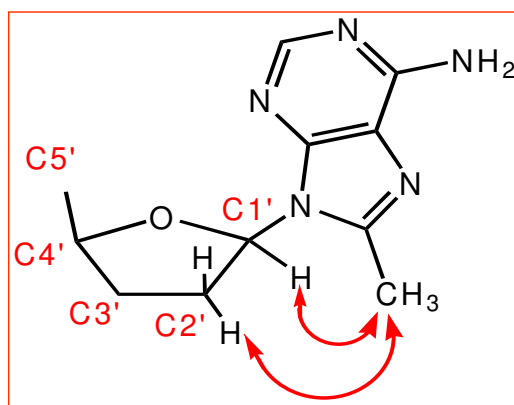
In conclusione i risultati di tale ricerca indicano che gli oligonucleotidi I e II, in soluzione, sono in grado di formare una quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli. L'organizzazione strutturale dell'estremità 5' dei complessi in analisi, come previsto, è stata definita sulla base dei pattern di NOE coinvolgenti il gruppo metilico in 8. In particolare, NOE inter- e intra-strand rivelano, per entrambe le quadruplex, una conformazione glicosidica *syn* e una disposizione simmetrica dei residui di A<sup>8Me</sup>, che stabiliscono con il piano di G sottostante interazioni di stacking (**Fig.60**).



**Fig. 60** Rappresentazione schematica dei NOE inter e intra-strand che si stabiliscono tra i residui di A<sup>8Me</sup> e la tetrate di G sottostante.

Dall'analisi degli spettri NMR non sono stati individuati segnali attribuibili a legami idrogeno dei gruppi  $-NH_2$  in 6 dei residui di A<sup>8Me</sup>, osservati, invece, da Patel<sup>10</sup> nel caso dell'analogo naturale di I. Tuttavia, come suggerito da Searle<sup>18</sup> in uno studio relativo alla quadruplex a filamenti paralleli [d(TGGAGGC)]<sub>4</sub>, l'assenza di tale segnale non necessariamente è indicativa

dell'assenza di una A-tetrate stabile. Inoltre nell'oligonucleotide II i residui di A<sup>8Me</sup> sembrano adottare una conformazione glicosidica di tipo *syn*, contrariamente a quanto precedentemente riscontrato nell'analogo naturale,<sup>10</sup> in cui le A canoniche adottano una conformazione *anti*. Pertanto A<sup>8Me</sup> può essere utilizzata come sonda per favorire la scelta di una data conformazione glicosidica (**Fig.61**).



**Fig. 61** Rappresentazione schematica dei NOE coinvolgenti i protoni del gruppo metilico e rispettivamente H1' e H2'/H2'', diagnostici della conformazione glicosidica adottata.

Dato che gli oligomeri non canonici presentano una stabilità termica paragonabile alle rispettive controparti naturali, l'introduzione di un residuo di A<sup>8Me</sup> non ha effetti destabilizzanti sulle quadruplex, per cui potrebbe essere sfruttato nella progettazione di oligonucleotidi sintetici con potenziali applicazioni terapeutiche. Tra questi particolarmente interessanti sono gli aptameri, dal momento che, attraverso tecniche di selezione in vitro (SELEX),<sup>54</sup> possono essere generati contro un'ampia varietà di importanti *target* biologici (proteine e piccole molecole). Strutture G-quadruplex costituiscono lo "scaffold" di diversi aptameri e la presenza di basi modificate



potrebbe migliorarne l'attività; residui di A<sup>8Me</sup> potrebbero fungere, infatti, da veicoli per l'introduzione nelle strutture aptameriche di un gruppo alchilico, potenzialmente capace di stabilire contatti idrofobici con la molecola *target*, migliorando l'interazione.

Attualmente stiamo valutando la possibilità di introdurre residui di A<sup>8Me</sup> in altre sequenze potenzialmente capaci di formare A-tetrad in strutture quadruplex sia parallele sia antiparallele.

### ***3.5.1 Parte sperimentale.***

#### *Sintesi e purificazione degli oligomeri I e II.*

Gli oligonucleotidi I e II e le rispettive controparti naturali sono stati assemblati mediante l'utilizzo di un sintetizzatore automatico Millipore Cyclone Plus DNA, sfruttando la chimica in fase solida dei  $\beta$ -cianoetilfosforamiditi su scala 15  $\mu$ mol.

Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 55°C per 12 ore. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata per HPLC. È stata usata una colonna Nucleogel SAX (Macherey-Nagel, 1000-8/46) con gli eluenti: *buffer* A, una soluzione acquosa 20 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.0, contenente il 20% (v/v) di CH<sub>3</sub>CN, e *buffer* B, una soluzione acquosa 20 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 M di KCl a pH 7.0, contenente il 20% (v/v) di CH<sub>3</sub>CN.

È stato usato un gradiente lineare dallo 0 al 100% di B in 30 minuti e una velocità di flusso di 1 mL/min.

Tutti gli oligomeri isolati hanno mostrato una purezza maggiore del 98% (NMR).

### *Risonanza Magnetica Nucleare*

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione approssimativa di 5.0 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA.

Per gli esperimenti in D<sub>2</sub>O, l'H<sub>2</sub>O è stata sostituita con D<sub>2</sub>O per essiccamento del campione, liofilizzazione e ridissoluzione in D<sub>2</sub>O sola.

Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz a 30°C. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni (<sup>1</sup>H), mentre il segnale del fosforo dell'acido fosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% v/v) lo è stato per i *chemical shift* dei <sup>31</sup>P. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti WATERGATE<sup>22</sup> per la soppressione del segnale dell'acqua. Gli spettri NOESY sono stati acquisiti in modo “*phase sensitive*”<sup>44</sup> con *mixing times* di 100 e 180 ms (T=30°C) e per quelli in H<sub>2</sub>O è stata utilizzata la sequenza di gradienti WATERGATE per la soppressione del segnale del solvente.

Gli spettri TOCSY<sup>45</sup> sono stati registrati in D<sub>2</sub>O con *mixing times* di 120 ms. gli esperimenti NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura TPPI.<sup>46</sup> In tutti gli esperimenti 2D i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t<sub>2</sub> e 400-512 FID nella dimensione t<sub>1</sub>. Il tempo di rilassamento è stato settato ad 1.2 s per tutti gli esperimenti.

I dati NMR sono stati processati su una SGI Octane workstation usando il software FELIX 98 (Byosym, San Diego, CA).

### *Calcoli strutturali*

I calcoli strutturali sono stati condotti mediante l'utilizzo del programma CYANA,<sup>21</sup> partendo da 200 conformazioni casuali.

Le distanze limiti fra gli idrogeni, sia scambiabili che non, sono state calcolate secondo quanto previsto dal sistema CALIBA del programma CYANA,<sup>21</sup> sfruttando le intensità dei relativi picchi nello spettro NOESY (mt = 180ms).

Dove necessario, sono stati introdotti pseudo-atomi.

Sono state così calcolate 336 e 320 distanze rispettivamente per I e II, poi ridotte a 206 e 160 dopo eliminazione di quelle irrilevanti; a queste sono state aggiunte le *constraints* riguardanti i ponti ad idrogeno (16 *upper* e 16 *lower limit constraints* per tetrade di G: HN1–O6, N1–O6, HN2–N7, N2–N7) con i limiti di *upper* e *lower distance* di 2.0 Å e 1.7 Å per le distanze degli accettori di idrogeni e 3.0 Å e 2.7 Å per le distanze dei donatori-accettori.

Queste *constraints* non hanno portato ad un aumento di violazioni.

Inoltre in accordo con i *chemical shift* osservati negli esperimenti <sup>31</sup>P,<sup>28-30</sup> gli

angoli di torsione del *backbone* sono stati ristretti in un intervallo di  $\pm 20^\circ$  intorno ai valori dell'elica delle quadruplex naturali.<sup>10</sup> Gli angoli di torsione glicosidici per tutte le G sono stati mantenuti in un *range* di  $-190^\circ/-140^\circ$  (conformazione *anti*), mentre per i residui di timine è stato imposto il *range*  $-157^\circ/-117^\circ$  (conformazione *anti*).

Le 10 strutture con i valori più bassi di CYANA *target function* sono state sottoposte a minimizzazione di energia mediante l'algoritmo "*conjugate gradient*" utilizzando il programma DISCOVER (Molecular Simulations, San Diego, CA, Usa), usando un campo di forza CVFF.

Durante la minimizzazione dell'energia, le distanze interprotoniche e le restrizioni dei legami a idrogeno delle tetradi di G sono state utilizzate con una costante di forza di 20 e 100 Kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, rispettivamente.

Le illustrazioni delle strutture sono state create con il programma INSIGHT II, versione '98 (Biosym Technologies Inc.).

Tutti i calcoli sono stati svolti su una *workstation* SGI Octane.

*Dicroismo circolare ed esperimenti di CD melting.*

I campioni CD di I, II e dei rispettivi analoghi naturali [d(AGGGT)]<sub>4</sub> e [d(TAGGGT)]<sub>4</sub> sono stati preparati ad una concentrazione di  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M e registrati nello stesso tampone utilizzato per gli esperimenti NMR: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0. Gli spettri di tutte le quadruplex e le curve di CD-melting sono stati registrati su uno spettrofotometro JASCO 715 CD, accoppiato a una cella programmabile,

termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348). Per gli spettri CD, la lunghezza d'onda è stata variata da 220 a 340 nm alla velocità di 5 nm min<sup>-1</sup>. Gli spettri sono stati registrati con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2.0 nm e normalizzati per sottrazione dello spettro del tampone. Le misure sono state effettuate a 20°C.

Le curve di fusione sono state ottenute raccogliendo i dati nel *range* tra 20 °C e 90 °C a 264 nm, per tutte le quadruplex. I dati CD sono stati registrati nello stesso tampone usato per gli esperimenti NMR, utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm con una velocità di scansione di 1°C/min.

## ***Bibliografia***

1. T.D. Jeffery, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 668–698.
2. V. Esposito, A. Randazzo, G. Piccialli, L. Petraccone, C. Giancola, L. Mayol, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 313–318.
3. M. Meyer, C. Schneider, M. Brandl, J. Suehnel, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 11560–11573.
4. N. Zhang, A. Gorin, A. Majumdar, A. Kettani, N. Chernichenko, E. Skripkin, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **2001**, 312, 1073.
5. A. Kettani, A. Kumar, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 254, 638.

6. P. K. Patel, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2457.
7. P. K. Patel, N. S. Bhavesh, R. V. Hosur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 270, 967–971.
8. Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1993**, 1, 263-282.
9. A. Rangan, O. Y. Federoff, L. H. Hurley, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 4640.
10. P.K. Patel, A.S.R. Koti, R.V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3836 – 3843.
11. F. Aboul-ela, A.I.H. Murchie, D.G. Norman, D.M.J. Lilley, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 243, 458 – 471.
12. A.P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 18, 1033–1077.
13. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Methods Enzymol.*, **1990**, 186, 1–85.
14. R. Teoule, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1987**, 51, 573 – 589.
15. M. Dizdaroglu, *Mutat. Res.*, **1992**, 275, 331 – 342.
16. E. Gavathiotis, M. S. Searle, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 1650-1656.
17. A. I. M. Murchie, D. J. M. Lilley, *EMBO J.*, **1994**, 13, 993.
18. M. S. Searle, H. E. L. Williams, C. T. Gallagher, R. J. Grant, M. F. G. Stevens, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 810–812.
19. J. Renzhe, L. B. L. Gaffney, C. Wang, R. A. Jones, K. J. Breslauer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 8832-8836.

20. Y. Xu, R. Ikeda, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13519–13524.
21. K. Kohda, H. Tsunomoto, Y. Minoura, K. Tanabe, S. Shibutani, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 1278–1284.
22. M. Piotto, V. Saudek, V. J. Sklenar, *J. Biomol. NMR*, **1992**, 2, 661–665.
23. K.Y. Wang, S. McCurdy, R.G. Shea, S. Swaminathan, P.H. Bolton, *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899–1904.
24. K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*. **1986**, Wiley, NY.
25. P.K. Patel, R.V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2457–2464.
26. F.W. Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8683–8692.
27. P. Guntert, C. Mumenthaler, K. Wuthrich, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 283–298.
28. S.S. Wijmenga, B.N.M. van Buuren, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1998**, 32, 287–387.
29. D.G. Gorenstein, *Phosphorus-31 NMR: principles and applications*. **1984**, Academic Press, NY.
30. V.A. Roongta, C.R. Jones, D.G. Gorenstein, *Biochemistry*, **1990**, 29, 5245–5258.
31. F. Imashiro, K. Takegoshi, K. Hirayama, T. Terao, A. Saika, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 1401–1404.
32. S.C. Nyburg, C.H. Faerman, *Acta Crystallogr. B*, **1985**, B41, 274–279.
33. M. Lu, Q. Guo, N.R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 598–601.

- 34.M. Lu, Q. Guo, N.R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 3596–3603.
- 35.I. Smirnov, R.H. Shafer, *Biochemistry*, **2000**, 39, 1462–1468.
- 36.C. Fàbrega, M.J. Macías, R. Eritja, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids.*, **2001**, 20, 251–260.
- 37.A. Virgilio, V. Esposito, A. Randazzo, L. Mayol, A. Galeone, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 13, 1037–1044.
- 38.J. Kypr, M. Fialová, J. Chládková, M. Tůmová, M. Vorlíčková, *Eur. Biophys. J.*, **2001**, 30, 555–558.
- 39.J. Kypr, M. Vorlíčková, *Biopolymers*, **2002**, 67, 275–277.
- 40.D.M. Gray, I., Jr Tinoco, *Biopolymers*, **1970**, 9, 223–244.
- 41.W.C Johnson, *VCH, NY*, **1994**, pp. 523–540.
- 42.S.H. Krawczyk, N. Bischofberger, L.C. Griffin, V.S. Law, R.G. Shea, S. Swaminathan, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, 14, 1109–1116.
- 43.Kusser, W. *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2000**, 74, 27–38.
- 44.J. Jeener, B. Meier, H.P. Bachmann, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546–4553.
- 45.L. Braunschweiler, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1983, 53, 521–528.
- 46.D. Marion, K. Wuthrich, *Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 113, 967–974.
- 47.P. Schultze, W.S. Flint, J. Feigon, *Structure*, **1994**, 2, 221–233.
- 48.R. G. Eason, D. M. Burkhardt, S. J. Phillips, D. P. Smith, S. S. David, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 890–897.



49. A. A. Van Aerschot, P. Mamos, N. J. Weyns, S. Ikeda, E. De Clercq, P. A. Herdewijn, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 2938–2942.
50. M. J. Gait, *In Oligonucleotide Synthesis*; IRL: Oxford, **1984**; pp 25–27.
51. M. J. Gait, *In Oligonucleotide Synthesis*; IRL: Oxford, **1984**; pp 27–28.
52. M. J. Gait, *In Oligonucleotide Synthesis*; IRL: Oxford, **1984**; pp 41–45.
53. V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson.*, **1993**, 102, 241–245.
54. M. Rimmele, *Chem. Bio. Chem.*, **2003**, 4, 963–971.

## Capitolo 4: Analoghi oligonucleotidici formanti G-quadruplex contenenti modificazioni del *backbone* zuccherio-fosfato.

### 4.1 Introduzione

Numerose patologie sono caratterizzate da alterazioni del codice genetico; queste possono essere ereditarie o acquisite in seguito all'esposizione dell'organismo ad agenti cancerogeni, come sostanze chimiche, o radiazioni, che provocano alterazioni nell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.

Pertanto negli ultimi anni la ricerca scientifica in questo campo si è focalizzata principalmente sui depositari dell'informazione genetica: **gli acidi nucleici**, ossia il DNA e l'RNA.

Con l'approfondirsi delle conoscenze sul genoma, il tradizionale approccio terapeutico, che considerava le proteine come principale target farmacologico, è stato ampliato dalle strategie antisense ed antigene, che agiscono a monte, inibendo i processi che determinano l'espressione delle proteine.

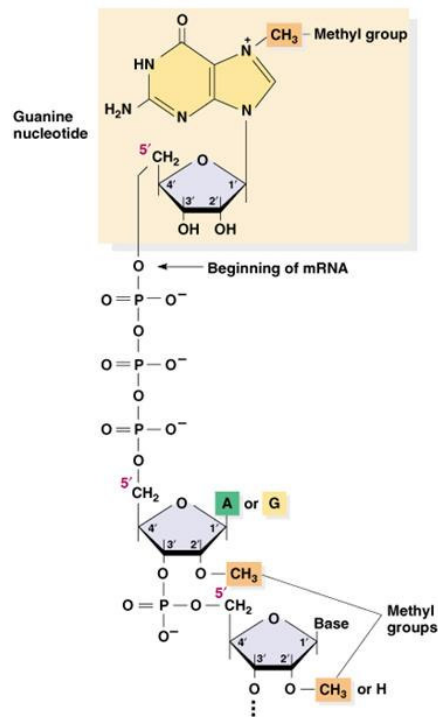
L'interferenza con l'espressione di un gene può essere realizzata mediante il legame all'RNA o al DNA di un oligonucleotide, o di un analogo oligonucleotidico. Gli oligonucleotidi naturali posseggono sia proprietà antisense sia proprietà antigene *in vitro*,<sup>1-3</sup> tuttavia, sia il DNA che l'RNA vengono rapidamente degradati dalle nucleasi *in vivo*. Al fine di superare questo serio ostacolo, è stato sintetizzato un numero considerevole di analoghi

oligonucleotidici. Per l'applicazione farmacologica di un oligonucleotide è necessario che esso presenti un'incrementata stabilità in condizioni fisiologiche, inclusa la stabilità verso le nucleasi cellulari, che venga effettivamente trasportato all'interno delle cellule, che abbia una bassa tossicità ed un'elevata affinità e selettività di legame nei confronti del target.

Una modificazione chimica può in genere migliorare le caratteristiche farmacocinetiche e la stabilità biologica degli oligonucleotidi, a patto che gli analoghi sintetizzati mantengano la specificità e l'affinità di legame del DNA e dell'RNA. Se modifiche delle basi possono aumentare la selettività di legame di analoghi oligonucleotidici fornendo ulteriori contatti con il target, modifiche del backbone zucchero-fosfato possono aumentare la loro resistenza all'attacco da parte delle nucleasi.

Gli acidi nucleici consistono in uno scheletro zucchero-fosfato costituito da una serie di monomeri, i nucleotidi, uniti tra loro attraverso legami covalenti (**legami fosfodiesterici**), che si instaurano tra il 3'-OH di un nucleotide e il 5'-OH del nucleotide successivo. Il legame fosfodiesterico 3'-5' caratterizza tutti gli acidi nucleici, ma non è l'unica tipologia di legame consentita tra i nucleotidi. In natura, infatti, esiste un acido nucleico in cui è presente un sito d'inversione della polarità 5'-5'; si tratta dell'**RNA messaggero**, che nella forma matura post-trascrizionale mostra una struttura, definita *cappuccio* o *cap*, costituita da una guanosina trifosfato coinvolta in un insolito legame

fosfodiesterico tra la sua estremità 5'-OH e l'estremità 5'-OH del trascritto (Fig.62).<sup>4</sup>

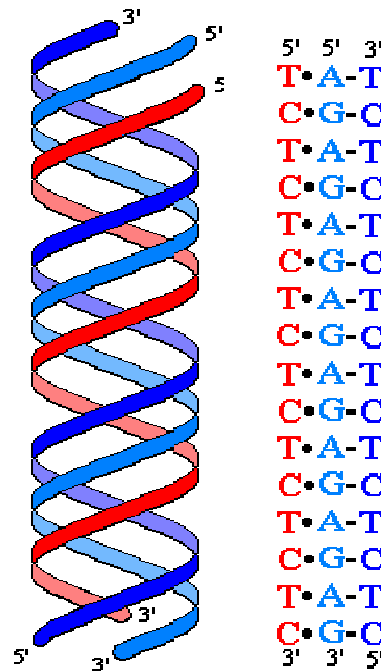


**Fig. 62** Inversione di polarità 5'-5' nell'RNA messaggero.

Data la presenza in natura, l'uso di oligonucleotidi modificati contenenti un'inversione di polarità è stato proposto nella strategia antigènica. Tale strategia consiste nell'impiego di oligonucleotidi sintetici aventi come target il DNA a doppia elica presente nel nucleo, con conseguente formazione di una struttura a **tripla elica**, definita *triplex* (Fig.63), che può impedire il legame di fattori trascrizionali sul DNA.

Premesso che il filamento centrale della triplex deve essere ricco in purine, sono state individuate due classi di triplex differenti nella composizione dell'oligonucleotide formante la triplex (TFO), nella sua orientazione rispetto al duplex bersaglio e nella tripletta implicata:

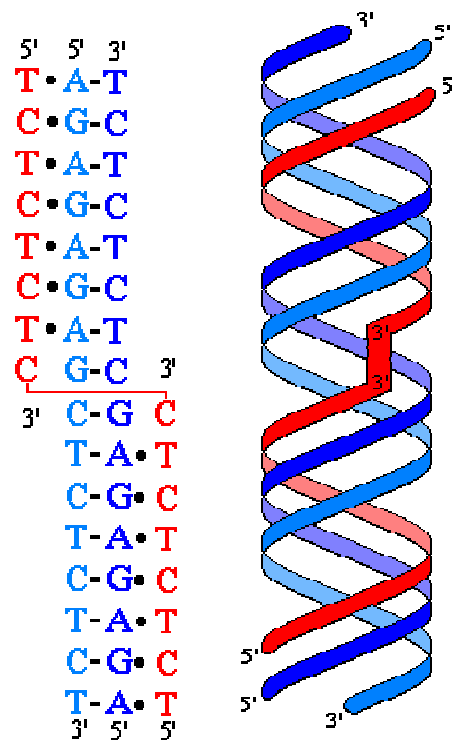
- Triplex a filamenti paralleli basate su triplette del tipo TAT o C<sup>+</sup>GC.
- Triplex a filamenti antiparalleli basate su triplette del tipo AAT o GGC.



**Fig. 63** Triplex canonica a filamenti paralleli

In ogni caso un limite alle possibilità di applicazioni farmaceutiche e diagnostiche (individuazione di tratti coinvolti nella regolazione dell'espressione genica, nell'interazione DNA-proteine) di oligonucleotidi sintetici formanti triplex (TFO) è rappresentato dal fatto che, perché il TFO si possa legare selettivamente e stabilmente in un complesso a tripla elica, deve essere dotato di almeno 15-17 basi. Di conseguenza una tripla elica con oligonucleotidi sintetici si può formare solo in presenza di tratti omopurinici relativamente lunghi nel medesimo filamento di DNA a doppia elica, requisito quest'ultimo, non sempre riscontrabile in bersagli biologicamente importanti.

Per esplorare un numero più ampio di sequenze di DNA rilevanti dal punto di vista biologico è stato recentemente proposto l'uso di TFO capaci di ibridizzare con blocchi di purine adiacenti su filamenti alternati, grazie alla presenza nel TFO di linker, che consentono di legare le estremità 3' dei due filamenti, generando oligonucleotidi con inversione di polarità 3'-3' (**Fig.64**), oppure le estremità 5', generando l'inversione 5'-5'. Tali linker dunque permettono di saltare da un filamento all'altro del duplex complementare nella regione di giunzione tra dominio omopurinico e omopirimidinico, mantenendo un corretto orientamento.



**Fig. 64** Tripla elica con TFO contenente inversione 3'-3'.

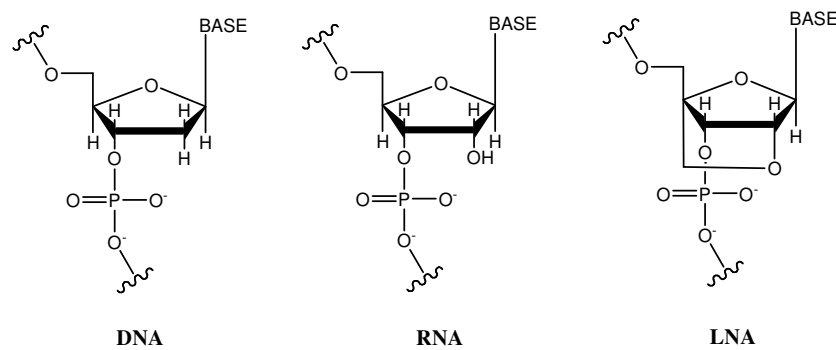
Siti di inversione della polarità sono stati introdotti anche in oligodeossiribonucleotidi antisenso ed aptameri,<sup>5,6</sup> allo scopo di aumentarne la resistenza all'attacco delle nucleasi e favorirne l'applicazione terapeutica.

Tuttavia non sono mai state riportate strutture G-quadruplex contenenti un sito di inversione di polarità nel tratto di guanine. Pertanto, nell'ambito delle nostre ricerche, allo scopo di verificare l'effetto dell'introduzione di un'inversione di polarità sulla capacità di formare stabili strutture quadruplex, sono stati sintetizzati e sottoposti ad una dettagliata analisi strutturale gli oligodeossiribonucleotidi  $5'\text{TGG}^{3'}\text{-}3'\text{GGT}^{5'}$  e  $3'\text{TGG}^{5'}\text{-}5'\text{GGT}^{3'}$ , analoghi modificati della sequenza d(5'-TGGGGT-3') ampiamente studiata, contenenti un sito di inversione 5'-5' o 3'-3' nel tratto di G.

Un'altra importante classe di analoghi degli acidi nucleici, di recente introduzione, è rappresentata dagli LNA (*locked nucleic acid*). Un nucleotide LNA possiede un ponte metilenico che connette l'ossigeno in posizione 2' dell'anello zuccherino con il carbonio in 4' (**Fig.65**).<sup>7,8</sup> La presenza di tale ponte blocca lo zucchero in una conformazione del tipo *C3'-endo (N-type)*, come nell'RNA, riducendo la libertà conformazionale del ribosio stesso e i gradi di libertà relativi all'organizzazione locale del *backbone* zucchero-fosfato.

Tale restrizione entropica comporta un incremento di affinità nei confronti di target a DNA e RNA complementari, con aumenti nella stabilità termica dei risultanti eteroduplex pari a valori dai 4.0 ai 9.3°C per monomero di LNA

introdotto.<sup>9</sup> Le capacità di ibridazione degli oligonucleotidi a LNA non hanno pari,<sup>10</sup> probabilmente a causa della loro peculiare restrizione conformazionale, che conferisce loro anche una notevole biostabilità.<sup>11</sup> Tali proprietà, insieme al fatto che hanno una solubilità simile al DNA e all'RNA fanno degli LNA dei potenziali potenti agenti terapeutici e diagnostici.<sup>12-14</sup>



**Fig. 65** Scheletro zucchero-fosfato di DNA, RNA e LNA a confronto.

Per quanto riguarda le **applicazioni antisense** degli oligonucleotidi a LNA, è importante notare che l'introduzione di appena due o tre monomeri di LNA in un filamento di DNA o l'uso di chimere LNA/DNA enfatizza l'attività dell'RNasi H:<sup>15</sup> le basi a LNA permettono un'interazione più specifica e salda con l'mRNA target, mentre le basi a DNA creano un ibrido RNA-DNA, che viene riconosciuto come target dall'enzima deputato normalmente alla degradazione del filamento di RNA di tali ibridi durante la sintesi del filamento ritardato.



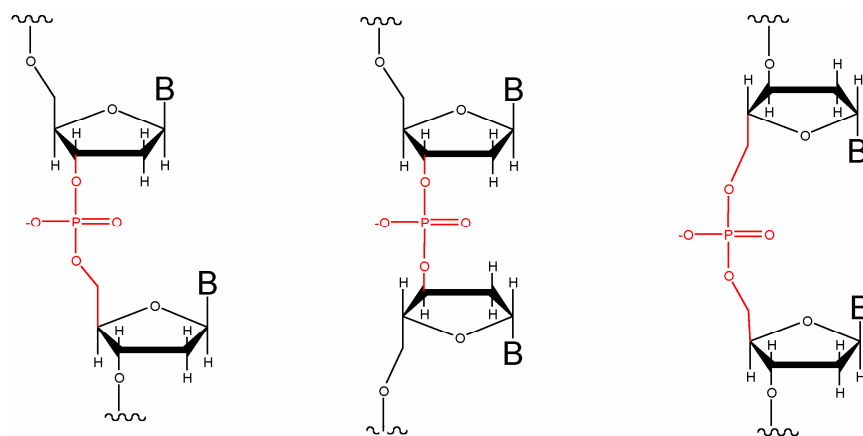
Filamenti di LNA omopirimidinici inoltre possono legarsi a doppie eliche di DNA in modo da formare strutture **triplex**.<sup>16,17</sup>

In virtù della capacità di piccoli frammenti di LNA di legare stabilmente sequenze complementari, è possibile pensare ad essi come agenti per un blocco competitivo della componente a RNA della telomerasi umana, che funge da template. Tale dominio a RNA contiene una sequenza di 11 basi, che lega il DNA telomerico e guida l'aggiunta delle unità ripetute telomeriche, costituendo un target molto allettante per un'inibizione indotta da oligonucleotidi. Elayadi e collaboratori<sup>18</sup> hanno sintetizzato e analizzato degli oligonucleotidi a LNA che hanno come bersaglio il template della telomerasi, scoprendo una potente e selettiva capacità inibitoria.

Alla luce, quindi, degli incoraggianti risultati sulle proprietà e sulle potenzialità applicative di tali molecole, essendo già stata valutata la loro capacità di adottare stabili strutture a quadrupla elica a filamenti paralleli,<sup>19</sup> si è pensato di approfondire le loro effettive potenzialità nel campo delle G-quadruplex e i risvolti strutturali e di stabilità eventualmente associati.

*4.2 Una nuova classe di quadruplex a DNA formate da oligodeossiribonucleotidi contenenti un sito di inversione di polarità 3'-3' o 5'-5'.*

Il backbone zucchero-fosfato di oligonucleotidi in grado di formare strutture quadruplex è stato sottoposto a diverse modifiche strutturali.<sup>19,20</sup> Tuttavia non sono mai state descritte strutture G-quadruplex contenenti un sito di inversione di polarità 5'-5' o 3'-3' (**Fig.66**), sebbene sia ben noto che queste modifiche del backbone incrementano la resistenza all'attacco delle nucleasi in oligodeossiribonucleotidi (ODN) terapeutici, quali ODN antisenso<sup>21</sup> ed aptameri.<sup>6</sup>

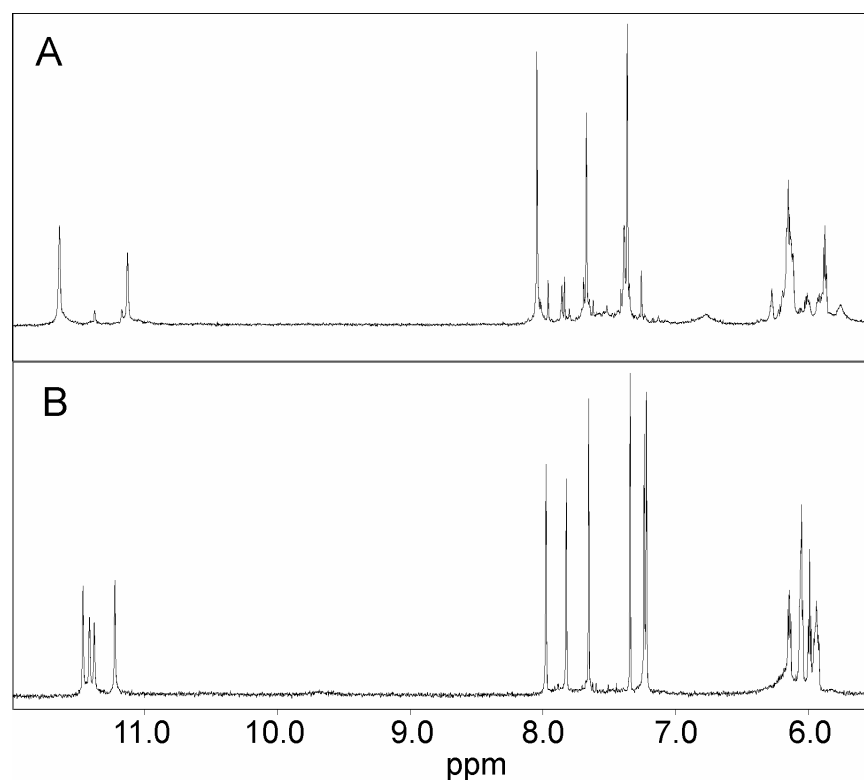


**Fig. 66** Scheletro zucchero-fosfato con giunzione 3'-5', 3'-3' e 5'-5' a confronto.

Pertanto la nostra ricerca si è focalizzata sugli studi di risonanza magnetica nucleare, dicroismo circolare e molecular modelling di due strutture quadruplex, indicate come **Q33** e **Q55**, formate rispettivamente dagli ODN  $5'TGG^{3'-3'}GGT^{5'}$  e  $3'TGG^{5'-5'}GGT^{3'}$ , in cui i quattro filamenti sono caratterizzati dalla presenza di un sito di inversione di polarità 3'-3' e 5'-5' nel tratto di guanine.

Gli ODN  $5'TGG^{3'-3'}GGT^{5'}$  e  $3'TGG^{5'-5'}GGT^{3'}$  sono stati sintetizzati seguendo le procedure standard relativamente ai tratti 3'-5', per i tratti 5'-3', invece,

sono stati utilizzati 5'-fosforamiditi. Per il primo oligomero inoltre è stata impiegata una resina CPG funzionalizzata con un residuo di timidina legato mediante il suo gruppo 5'-OH. I campioni NMR di **Q33** e **Q55** sono stati preparati ad una concentrazione di circa 2.0 mM (0.6 ml, 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O) e sono stati studiati in due differenti soluzioni tampone: a) 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA (pH 7.0); b) 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM NaCl, 0.2 mM EDTA (pH 7.0). Per entrambi i campioni gli spettri protonici monodimensionali, acquisiti nelle due diverse soluzioni tampone, sono piuttosto sovrapponibili.



Selected regions of 1D <sup>1</sup>H-NMR spectra (700 MHz) of Q33 (A) and Q55 (B) 2 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1) buffer solution having 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0 at 25°C. The guanine imino protons involved in G-tetrad formation resonate between 11.0 and 12.0 ppm. The narrow non-exchangeable base protons resonate between 7.0 and 8.0 ppm.

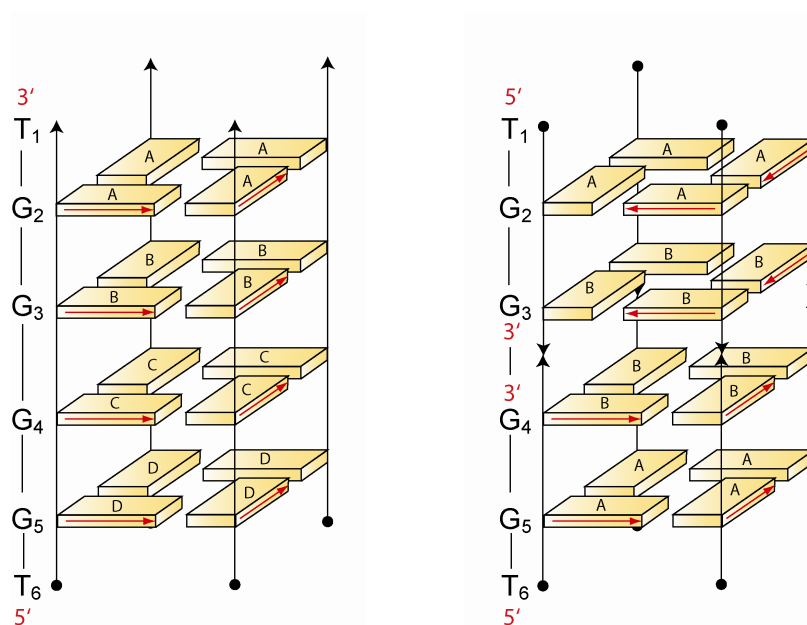
**Fig. 67** Spettroscopia NMR monodimensionale di **Q33** (A) e **Q55** (B).

Esclusi alcuni deboli segnali, dovuti a conformazioni minori presenti in soluzione (le cui intensità relative non risentono dei cambi di temperatura), lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  di **Q33** (Fig.67 A) presenta picchi ben delineati, suggerendo che, nelle condizioni sperimentali usate, l'ODN modificato adotta principalmente una singola conformazione, ben definita da legami idrogeno. Tale conformazione è, con un certo grado di sicurezza, una struttura quadruplex. In particolare, dall'analisi di tale spettro si evince la presenza di due picchi di risonanza, nella regione corrispondente ai protoni imminici coinvolti in legami idrogeno di tipo Hoogsteen, un unico segnale attribuibile ai protoni del gruppo metilico e tre segnali nella regione dei protoni aromatici. Dal confronto dello spettro protonico monodimensionale di **Q33** con quello dell'analogo non modificato  $[\text{d}(\text{TGGGGT})]_4$ ,<sup>22</sup> si desume che la specie in investigazione è una struttura quadruplex, inoltre il dimezzamento dei suoi segnali indica chiaramente che tale struttura, oltre alla simmetria quaternaria, possiede ulteriori elementi di simmetria.

Il pattern di NOE, osservato per **Q33**, è simile a quello osservato per altre strutture quadruplex a filamenti paralleli.<sup>22,23</sup> In particolare, dall'analisi del suo spettro **2D-NOESY**, tra i protoni H8/H6 delle basi azotate e i protoni del residuo di deossiribosio del nucleoside adiacente al lato 5', si osserva chiaramente la presenza di un pattern ininterrotto di connettività NOE, tipico di strutture elicoidali destrorse.<sup>22,23</sup> Inoltre l'assenza di intensi *crosspeak* tra il protone H8 di qualche G e il protone H1' del medesimo residuo, rispetto

all'intensità di quelli osservati tra ciascun G H8 e i protoni H2'/H2'' del proprio residuo di deossiribosio, suggerisce che tutti i monomeri adottano la conformazione glicosidica *anti*.<sup>22,23</sup>

Essendo stato individuato, oltre alla simmetria  $C_4$ , un ulteriore elemento di simmetria sulla base del dimezzamento dei segnali, **Q33** si può considerare costituito da due subunità strutturali equivalenti tra loro. Dato che tutti i residui sono in conformazione glicosidica *anti*, tutte le basi appartenenti alla medesima subunità del filamento risultano orientate nella medesima direzione rispetto all'orientamento del filamento stesso. Pertanto le due tetradi fiancheggianti il sito di inversione della polarità, presentano opposta disposizione spaziale (disposizione in senso orario e disposizione in senso antiorario), ciò implica, in ciascun filamento, uno stacking meno efficiente tra una coppia di guanine (**Fig.68**).



**Fig. 68** Rappresentazione schematica della struttura adottata da  $[d(TGGGGT)]_4$  e da **Q33**.

Dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  di **Q55** (Fig.67 B) si evince chiaramente la sua capacità di selezionare in soluzione un'unica struttura secondaria, molto simile ad una struttura quadruplex, data la presenza di quattro picchi nella regione di risonanza dei protoni imminici coinvolti in legami idrogeno di tipo Hoogsteen. Sorprendentemente, nello spettro di **Q55** il numero di segnali concorda con quello di  $[\text{d}(\text{TGGGGT})]_4$ , piuttosto che con quello di **Q33**. Questi dati suggeriscono, per i due nuovi complessi, un differente grado di simmetria.

Notevoli informazioni sulla struttura di **Q55** sono stati desunti dall'analisi dei dati ottenuti dalla spettroscopia  $^{31}\text{P-NMR}$ .

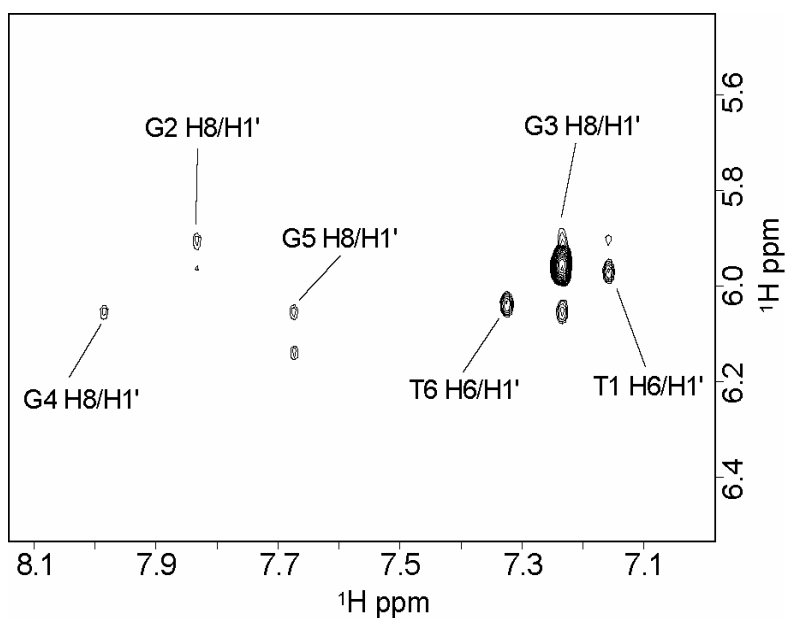
In primo luogo, lo spettro del fosforo disaccoppiato con il protone di **Q55** mostra la presenza di cinque segnali attribuibili a  $^{31}\text{P}$ .

Successivamente, effettuata la completa assegnazione dei picchi di risonanza protonici di ciascun residuo di deossiribosio, mediante esperimenti di spettroscopia NMR bidimensionale **TOCSY**, l'esperimento bidimensionale eteronucleare  $^1\text{H-}^{31}\text{P-COSY}$  ci ha permesso di correlare ciascun picco di risonanza del fosforo con il protone ad esso pertinente. Sulla base di tale procedura, sono stati assegnati in maniera inequivocabile i protoni dei sei anelli di deossiribosio e i cinque atomi di fosforo.

Partendo da tali risultati si è giunti alla conclusione che in **Q55** i quattro filamenti sono equivalenti tra loro, dunque è presente una simmetria

quaternaria, ma, a differenza di quanto osservato per **Q33**, non sono presenti ulteriori elementi di simmetria.

Una dettagliata analisi degli spettri NOESY di **Q55** ha fornito evidenze sperimentali di tali conclusioni. In particolare, per un residuo di G è stato individuato un intenso *crosspeak* NOE H8/H1' (**Fig.69**), diagnostico di una conformazione glicosidica *syn*. In accordo con i dati riportati in letteratura,<sup>24</sup> il *chemical shift* del protone in 8 di questo residuo di G *syn*, è spostato a campi più alti rispetto agli H8 delle G *anti*.



**Fig. 69** Porzione dello spettro 2D NOESY di Q55 in si evidenzia la presenza di un picco di correlazione tra il protone H8 della base e il protone H1' dello zucchero.

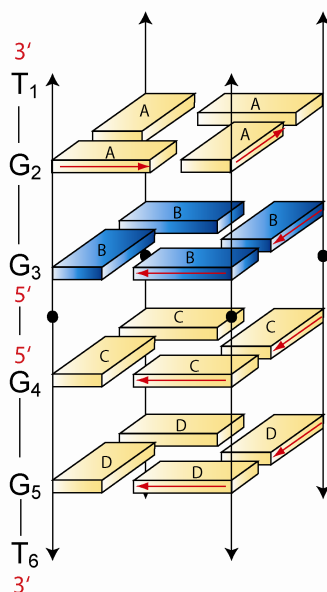
Dall'esame del pattern di sequenzialità NOE si evince che il monomero in conformazione *syn* risulta sequenzialmente connesso esclusivamente con un altro residuo di G, a sua volta connesso con un residuo di T. Inoltre, per la restante porzione del filamento, costituita da due G e una T, si possono

osservare chiaramente connettività sequenziali tra i protoni H8/H6 delle basi e i protoni del deossiribosio del nucleoside adiacente al lato 5'.

Sulla base di questi dati si potrebbe assumere che il residuo di G *syn* fiancheggia il sito di inversione di polarità (**Fig.70**), interrompendo il pattern di connettività NOE. D'altra parte, la presenza di connettività sequenziali NOE nell'ambito delle due subunità del filamento suggerisce che il backbone di tale struttura adotta una conformazione elicoidale destrorsa.<sup>22,23</sup>

Nello spettro NOESY di **Q55** registrato in H<sub>2</sub>O, sono stati osservati NOE sequenziali tra protoni imminici, derivanti da contatti intra-filamento, e connettività NOE coinvolgenti rispettivamente i protoni imminici dei nucleotidi G2, G5 e i gruppi metilici degli adiacenti residui di timina (T1, T6). Inoltre, come ulteriore conferma della simmetria quaternaria del complesso, sono state individuate in ciascuna tetrate connettività NOE G3-H8/G3-NH, G3-NH<sub>2</sub> e G4-H8/G4-NH, G4-NH<sub>2</sub>, ascritte a contatti tra protoni che appartengono a basi distinte ma equivalenti tra loro.





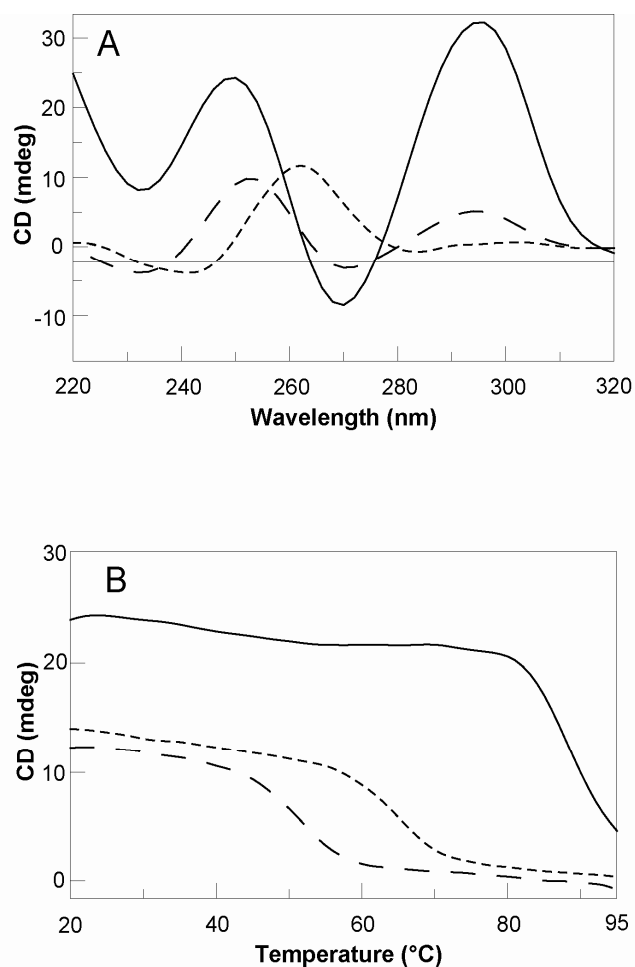
**Fig. 70** Rappresentazione schematica della struttura adottata da **Q55**.

Gli spettri CD dei complessi **Q33**, **Q55** e relativo analogo naturale [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> (**Fig.71**) sono stati acquisiti a 20°C. Tutte le misure sono state effettuate ad una concentrazione di  $1 \cdot 10^{-4}$  M, nelle soluzioni tampone usate per gli esperimenti NMR.

Lo spettro CD di [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> è caratterizzato da una banda positiva a 263 nm e una banda negativa a 243 nm. **Q33**, invece, mostra un profilo CD mai osservato prima per strutture quadruplex, essendo caratterizzato da due bande positive rispettivamente a 253 e 294 nm e due bande negative a 232 e 270 nm. Lo spettro CD di **Q55**, invece, presenta due effetti Cotton massimi rispettivamente a 250 e 295 nm e un effetto Cotton minimo a 270 nm, mostrando dunque il profilo CD tipico di strutture quadruplex a filamenti antiparalleli, coinvolgenti sia *G syn* che *G anti*.<sup>25</sup>

I profili CD di **Q33** e **Q55** non concordano con i dati precedentemente riportati in letteratura sulle strutture quadruplex a filamenti paralleli e antiparalleli. Ciò non sorprende, data la presenza, nei complessi in questione, di un motivo strutturale completamente nuovo. Attualmente la nostra ricerca è impegnata in studi su molecole simili, allo scopo di approfondire la correlazione tra struttura e profilo CD.

Per valutare l'effetto dell'introduzione di un sito di inversione di polarità sulla stabilità termica delle strutture quadruplex formate, **Q33** e **Q55** sono stati sottoposti ad esperimenti di CD melting (**Fig.67**) ed annealing, in confronto con  $[d(\text{TGGGGT})]_4$ , nelle medesime condizioni sperimentali. Tutte le misure sono state effettuate ad una concentrazione di  $1 \cdot 10^{-4}$  M, usando soluzioni tampone contenenti sia  $\text{Na}^+$  che di  $\text{K}^+$ . Dato che la velocità di formazione delle strutture quadruplex è molto lenta, le curve sono state registrate con variazione di temperatura di  $10^\circ\text{C}/\text{h}$ . **Q55** e  $[d(\text{TGGGGT})]_4$ , alla temperatura di  $95^\circ\text{C}$  nel buffer di  $\text{K}^+$ , sono per la maggior parte ancora strutturati; usando un tampone  $\text{Na}^+$ , invece, sono state ottenute curve di fusione nette per tutti i campioni. Nonostante la bassa velocità di scansione usata, tra le curve di formazione e di dissociazione si osserva un fenomeno di isteresi, in particolare, i profili di annealing registrati non presentano un andamento sigmoide ben definito, indicando che i sistemi, nelle condizioni sperimentali usate, non erano all'equilibrio.



**Fig. 71** Profili CD e curve di denaturazione termica di 5'-TGGGGT-3' (- - -), 5'-TGG-3'-3'-GGT-5' (— —) e 3'-TGG-5'-5'-GGT-3' (——).

Dalle curve di fusione sono state misurate temperature di melting apparenti ( $T_m$ ) di 65°C, 52°C e 90°C rispettivamente per [d(TGGGGT)]<sub>4</sub>, **Q33** e **Q55**. Rispetto alla controparte naturale, dunque, per **Q55** si riscontra un considerevole incremento (25°C) della temperatura di melting apparente, mentre **Q33** rappresenta il complesso meno stabile.

Alla luce dei risultati preliminari ottenuti, si è ipotizzato che all'origine della diversa stabilità termica vi fosse la maggiore flessibilità della giunzione 5'-5', rispetto ad una giunzione classica 3'-5', che, tra l'altro, potrebbe favorire la

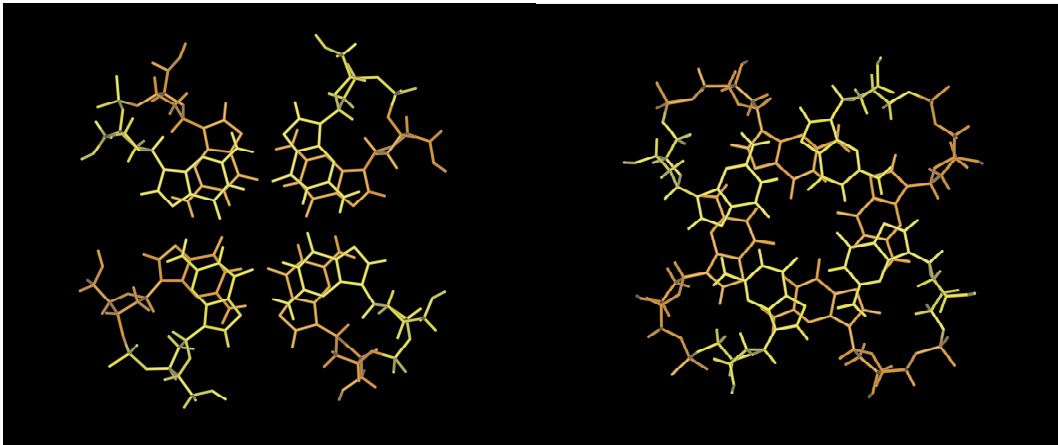
complessazione con il catione del tampone Na<sup>+</sup>, con conseguente notevole incremento della T<sub>m</sub> rispetto a [d(TGGGGT)]<sub>4</sub>.

Inoltre, in un primo momento, si è pensato che in **Q55** la conformazione glicosidica *syn* di una delle due tetradì fiancheggianti l'inversione garantisca maggiori interazioni di stacking tra le tetradì presso il sito di inversione 5'-5'. Infatti, poichè le due subunità di ciascun filamento hanno polarità opposta, le due tetradì adiacenti l'inversione hanno la medesima orientazione, come nel caso di una quadruplex canonica a filamenti paralleli,<sup>22,23</sup> suggerendo così uno stacking maggiore tra i residui dei due quartetti di G.

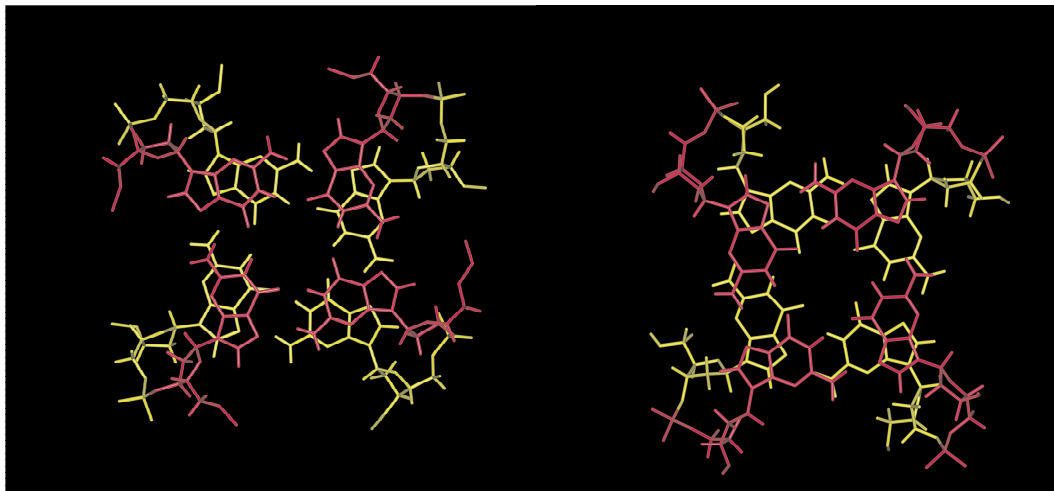
Si è ipotizzato tra l'altro che l'incremento di stabilità derivante dal più efficiente stacking nella parte centrale della quadruplex **Q55** compensasse sia l'effetto destabilizzante dovuto all'adozione della conformazione glicosidica *syn*, meno favorevole, da parte dei residui G3 sia lo stacking meno efficiente tra le tetradì G2 e G3 all'estremità del complesso.

Successivamente, nel tentativo di chiarire la struttura adottata da **Q33** e **Q55** e di trovare eventualmente conferma alle ipotesi formulate, sono stati effettuati accurati calcoli di meccanica e dinamica molecolare.

Le strutture ottenute rivelano che **Q33** e **Q55** posseggono effettivamente uno stacking differente (**Fig.72-73**) e un diverso angolo di twist a livello del sito di inversione della polarità (**Fig.74**). La diversità dell'angolo di twist tra le due strutture implica un diverso avvolgimento dell'elica.

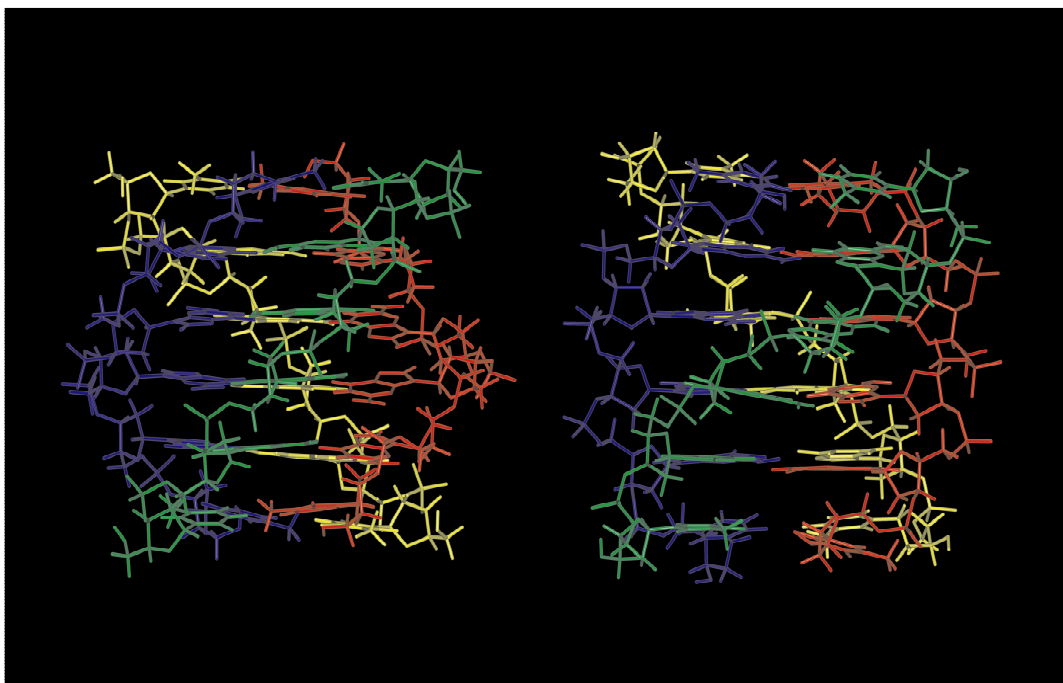


**Fig. 72** Visione dall'alto dello stacking osservato tra le tetradi G3 e G4 comprendenti il sito di inversione in **Q33** (immagine a destra) e **Q55** (immagine a sinistra).



**Fig. 73** Visione dall'alto dello stacking osservato tra le tetradi G2 e G3 in **Q33** (immagine a destra) e **Q55** (immagine a sinistra).

Sorprendentemente, a differenza di quanto precedentemente ipotizzato, **Q33** mostra uno stacking più efficiente tra le due tetradi adiacenti il sito di inversione di polarità.



**Fig.74** Visione laterale della struttura media tra le 10 migliori strutture di **Q33** (immagine a sinistra) e **Q55** (immagine a destra). Ciascun filamento è riportato con colori diversi.

Pertanto, la maggiore stabilità termica di **Q55** potrebbe essere ascritta ad interazioni di stacking più efficienti tra le tetradi G2 e G3. Inoltre è ipotizzabile che i differenti profili di fusione risentano anche dell'influenza di contributi entropici. Poiché la diversa stabilità dei tre complessi risulta particolarmente interessante, sono in programma studi termodinamici più accurati.

In conclusione, tali risultati potrebbero contribuire a chiarire i vari fattori coinvolti nella formazione e nella stabilizzazione di strutture quadruplex.

Inoltre il nuovo motivo strutturale presente nei complessi **Q33** e **Q55** potrebbe essere utile nella progettazione di aptameri con capacità di

ricoscimento delle molecole target diversa rispetto alle relative sequenze naturali di DNA o RNA.<sup>26</sup>

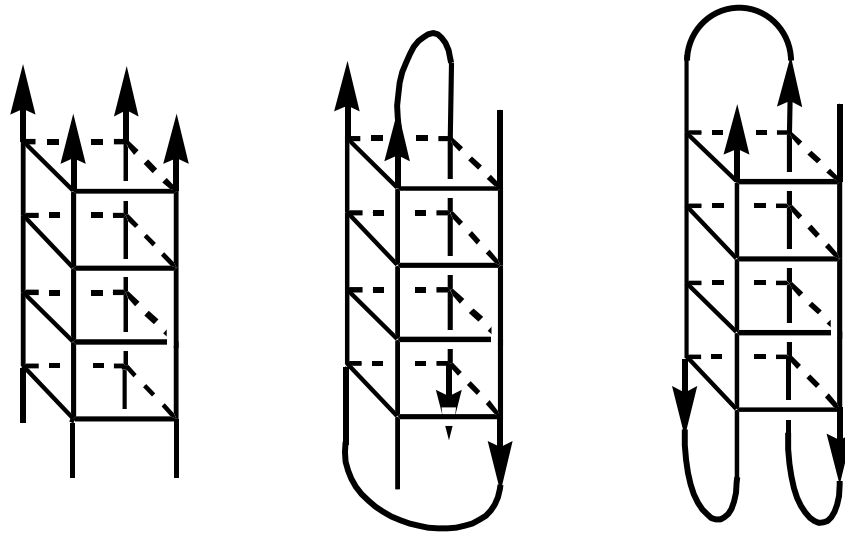
### ***4.3 Studi strutturali su quadruplex a LNA.***

La variabilità strutturale delle G-quadruplex dipende da diversi fattori, tra cui la stechiometria e l'orientamento relativo dei filamenti. In base alla stechiometria dei filamenti si distinguono quadruplex monomolecolari, bimolecolari e tetramolecolari, derivanti rispettivamente dal ripiegamento intramolecolare di un unico filamento,<sup>27-29</sup> dalla dimerizzazione di una struttura ad *hairpin*,<sup>30,31</sup> dall'interazione di quattro filamenti diversi (**Fig.75**).<sup>22,23</sup>

Mediante esperimenti di footprinting e cross-linking,<sup>32-34</sup> in accordo con i dati ottenuti dalla spettroscopia NMR e dalla cristallografia a raggi X,<sup>22,35,36</sup> è stato dimostrato che singoli tratti di G, in soluzioni contenenti cationi monovalenti, possono formare complessi tetramolecolari, in cui tutte le basi adottano la conformazione glicosidica *anti* e tutti i filamenti si dispongono parallelamente tra loro.

Invece, la quadruplex formata per interazione dimerica tra due *hairpin* presenta, nell'ambito di ciascun filamento, un'alternanza regolare di G *syn* e G *anti* e due coppie di filamenti adiacenti paralleli.<sup>24,30,31,37</sup>

Gli oligonucleotidi in grado di ripiegarsi in una G-quadruplex monomolecolare, come l'aptamero anti-trombina (TBA) di sequenza 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', invece, sono caratterizzati da un'alternanza di residui in conformazione *anti-syn-anti-syn*, nell'ambito di ciascuna tetrate, e da filamenti antiparalleli alternati.<sup>24,38,39</sup>



**Fig. 75** Variabilità strutturale delle G-quadruplex.

Sequenze ripetute di guanine sono presenti a livello di diverse porzioni del genoma umano come i telomeri, i centromeri e le regioni promotrici di vari geni. Ciò implica un probabile coinvolgimento delle strutture G-quadruplex in processi di regolare invecchiamento cellulare,<sup>40,41</sup> di ricombinazione e mutazione del DNA,<sup>42-46</sup> di regolazione dell'espressione genica,<sup>47</sup> e in varie patologie.<sup>48,49</sup>

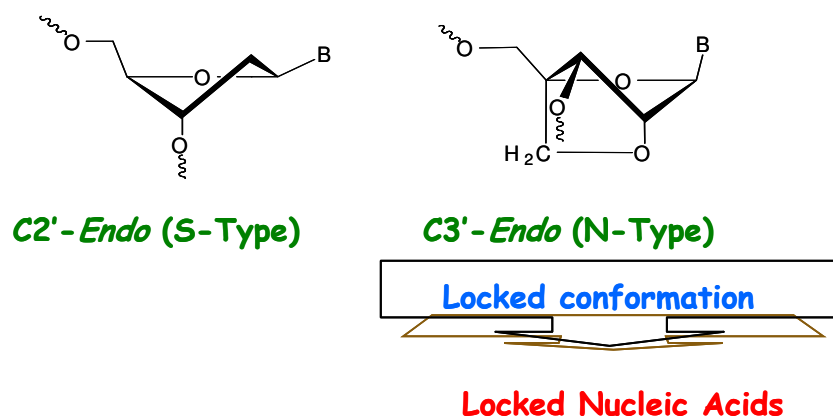
Data la rilevante importanza biologica che stanno assumendo le quadruplex di DNA, considerato che le unità base di tali strutture, ossia le tetradi di G,



tollerano un ampio range di variazioni strutturali, negli ultimi anni la ricerca scientifica in tale settore, si è focalizzata sull'investigazione degli effetti di modifiche chimiche nelle relazioni struttura-attività. Nell'ambito delle modifiche chimiche a livello del backbone di DNA, il gruppo presso il quale ho svolto l'attività di ricerca relativa al mio dottorato, ha intrapreso uno studio sulla capacità di sequenze di LNA (Locked Nucleic Acid) di formare strutture G-quadruplex.

I monomeri di LNA, che rappresenta una nuova classe di analoghi del DNA, sono caratterizzati da un ponte metilenico tra l'ossigeno legato al carbonio 2' e il carbonio 4' (**Fig.65**). Tale ponte è il principale responsabile della notevole capacità di ibridizzazione<sup>10</sup> e dell'eccezionale biostabilità di questi analoghi oligonucleotidici.<sup>11</sup>

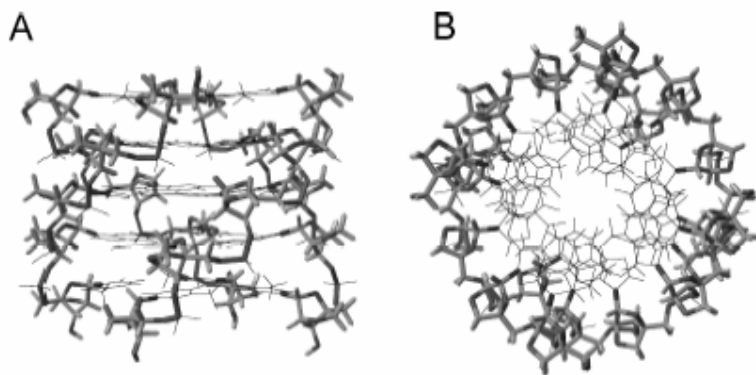
La presenza del ponte metilenico, inoltre, conferisce all'unità zuccherina del nucleotide modificato una conformazione C3'-endo (*N-type*) (**Fig.76**) simile a quella dell'RNA e riduce la sua flessibilità conformazionale, incrementando il grado di organizzazione locale del backbone fosfato.



**Fig. 76** Confronto tra la conformazione adottata dallo zucchero in DNA e LNA.

La notevole capacità di ibridizzazione suggerisce un possibile impiego farmacologico dei monomeri di LNA per la fine regolazione altamente specifica di potenziali *target*.<sup>12-14</sup>

Recentemente, nell'ambito delle nostre ricerche, è stata riportata la struttura in soluzione di una quadruplex di LNA, formata dall'oligomero 5'-tgggt-3', dove le lettere minuscole rappresentano i monomeri di LNA.<sup>19</sup> La caratterizzazione strutturale del complesso è stata effettuata con l'impiego della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, dicroismo circolare e calcoli di meccanica e dinamica molecolare. Tale molecola adotta una struttura a filamenti paralleli con simmetria rotazionale quaternaria, che presenta un'elicità destrorsa e i residui di guanina disposti planarmente, coinvolti nella formazione di tre tetradi di G ben definite (**Fig.77**).



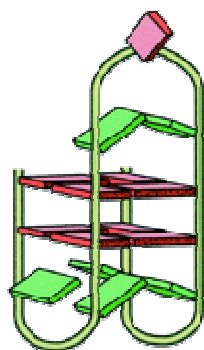
**Fig. 77** Visione laterale e dall'alto della migliore struttura NMR della quadruplex di LNA tetramolecolare formata dall'oligomero 5'-tgggt-3'.

Tale struttura modificata, inoltre, ha rivelato una notevole stabilità termica, essendo stato osservato un incremento della temperatura di fusione di 20 °C rispetto all'analogo naturale [d(TGGGT)]<sub>4</sub>.

Gli interessanti risultati ottenuti con quadruplex di LNA a filamenti paralleli, ci hanno incoraggiato ad estendere la ricerca in questo campo, effettuando studi preliminari su quadruplex di LNA a filamenti antiparalleli.

La nostra attenzione si è focalizzata in primo luogo sulle quadruplex monomolecolari. In particolare, è stato sottoposto ad analisi strutturale l'analogo ad LNA della ben nota sequenza aptamerica 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (TBA), dato che, in saggi *in vitro* di aggregazione del fibrinogeno, il TBA si è rivelato un potente inibitore della trombina,<sup>50</sup> sebbene la sua applicazione *in vivo* sia fortemente limitata dalla scarsa stabilità biologica.

Il TBA in soluzione adotta preferenzialmente una struttura quadruplex monomolecolare caratterizzata dalla presenza di due quartetti di G, connessi tra loro da un *loop* centrale di sequenza TGT e da due *loop* laterali più corti di sequenza TT (**Fig.78**).



**Fig. 78** Rappresentazione schematica della struttura adottata in soluzione dal TBA.

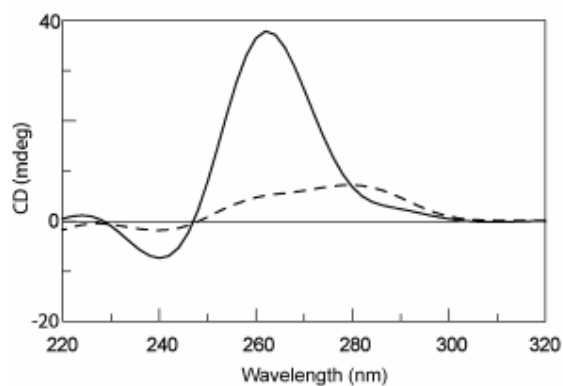
Purtroppo la sequenza 5'-ggttggtgtggttg-3', analogo modificato del TBA in cui ciascun monomero di DNA è stato sostituito dal corrispondente

monomero ad LNA, non è in grado di adottare una struttura quadruplex ben definita. Molto probabilmente tale incapacità dipende dalla scarsa flessibilità dei *loop*.

Pertanto abbiamo progettato la sintesi di una molecola chimerica DNA/LNA, in modo da garantire la flessibilità dei *loop* con i residui di DNA e aumentarne la biostabilità con i residui di LNA.

La chimera 5'-ggTTggTGTggTTgg-3', dove le lettere maiuscole e minuscole rappresentano rispettivamente residui di DNA e di LNA, è stata sottoposta a studi di stabilità strutturale con l'impiego della spettroscopia di dicroismo circolare.

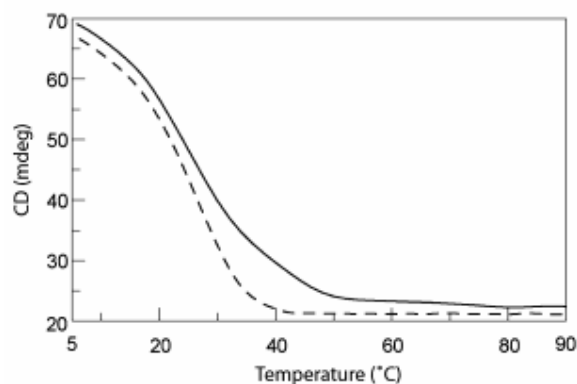
In primo luogo, sono stati acquisiti gli spettri CD di 5'-ggTTggTGTggTTgg-3' a 20°C e 75 °C (**Fig.79**). In particolare, mentre lo spettro a 75 °C è tipico di una molecola non strutturata, lo spettro a 20 °C mostra un effetto Cotton massimo a 262 nm e un effetto Cotton minimo a 241 nm, indicativi della presenza di una struttura quadruplex in soluzione.<sup>51,52</sup>



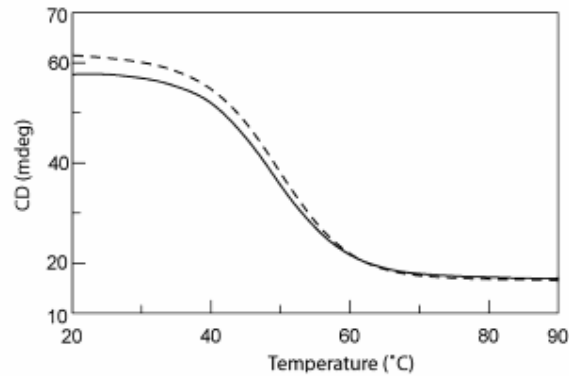
**Fig. 79** Spettri CD di 5'-ggTTggTGTggTTgg-3' a 20°C (—) e a 75°C (-----).

Allo scopo di chiarire gli effetti di tale modifica strutturale sulla stabilità termica della quadruplex formata da 5'-ggTTggTGTggTTgg-3', sono stati successivamente effettuati esperimenti di CD melting ed annealing. Tutte le misure sono state acquisite ad una concentrazione di  $5 \cdot 10^{-5}$ . Tenendo conto che la velocità di formazione delle strutture quadruplex è estremamente lenta, per evitare un'influenza di fattori cinetici sui dati raccolti, tutti gli esperimenti sono stati acquisiti con una velocità di scansione molto bassa ( $10^\circ\text{C}/\text{h}$ ).

Le curve di fusione e di raffreddamento sia per 5'-ggTTggTGTggTTgg-3' (**Fig.80**) sia per il suo analogo naturale 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (**Fig.81**) sono state ottenute registrando le variazioni del segnale CD alla lunghezza d'onda massima, rispettivamente 262 nm per 5'-ggTTggTGTggTTgg-3' e 293 nm per 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', nell'intervallo di temperatura da 5 a  $90^\circ\text{C}$ .



**Fig. 80** Esperimenti di CD melting (—) ed annealing (-----) per 5'-ggTTggTGTggTTgg-3'.



**Fig. 81** Esperimenti di CD melting (—) ed annealing (-----) per 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'.

La minima isteresi osservata nel caso di 5'-ggTTggTGTggTTgg-3' indica che, nonostante la bassissima velocità di scansione usata negli esperimenti, le curve di raffreddamento e di fusione non sono completamente in equilibrio termodinamico, ossia la temperatura cambia più velocemente della velocità con cui i processi di strutturazione/destrutturazione raggiungano un nuovo equilibrio. D'altronde, l'isteresi riflette differenze nella cinetica di associazione rispetto a quella di dissociazione, osservate in genere per strutture di acidi nucleici multifilamento.

Sebbene non sia stato ancora effettuato un dettagliato studio fisico-chimico, è ragionevole ipotizzare una cinetica di associazione considerevolmente più lenta a fronte di quella di dissociazione. Pertanto si pensa che i profili di melting descrivano meglio delle curve di annealing la situazione all'equilibrio.

Dagli esperimenti di CD melting risulta che 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' è caratterizzato da maggiore stabilità termica rispetto a 5'-ggTTggTGTggTTgg-3', essendo stato osservato un  $\Delta T_m$  di 20°C.

La capacità di sequenze caratterizzate dalla presenza di “*locked nucleic acid*” di ripiegarsi in strutture a quadrupla elica, dotate del vantaggio della resistenza alle nucleasi data la notevole biostabilità dei monomeri di LNA, rendono ipotizzabile, in conclusione, un impiego futuro di tali analoghi oligonucleotidici in terapia, quali *building block* di aptameri adottanti strutture quadruplex.

### ***Bibliografia***

1. J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1923.
2. C. Helene, *Anti-Cancer Drug Design*, **1991**, 6, 569.
3. E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 544.
4. B. Lewin, *Il gene VI*, Zanichelli.
5. P. E. Vorobjev, I. A. Pyshnaya, D. V. Pyshnyi, A. G. Venyaminova, E. M. Ivanova, V. F. Zarytova, G. M. Bonora, C. Scalfi-Happ, H. Seliger, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2001**, 11, 77.

6. C. S. Hilger, M. C. Willis, M. Wolters and W. A. Pieken, *Nucleosides Nucleotides*, **1999**, 18, 1479.
7. A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, and J. Wengel, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 4381-4384.
8. S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5401-5404.
9. D. A. Braasch, D. R. Corey, *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 1-7.
10. J. Wengel, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, 32, 301-310.
11. S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.*, **1998**, 4, 455-456.
12. E. Koller, W. A. Gaarde, B. P. Monia, *Trends in Pharm. Sci.*, **2000**, 21, 142-148.
13. D. A. Braasch, D. R. Corey, *Biochemistry*, **2002**, 41, 4503-4510.
14. J. B. Opalinska, A. M. Gewirtz, *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, 1, 503-514.
15. K. Fluiter, A. L. M. A. Ten Asbroek, M. B. De Wissel, M. E. Jacobs, M. Wissenbach, H. Olsson, O. Olsen, H. Oerum, F. Baas, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 953-962.
16. S. Obika, Y. Hari, M. Ken-Ichiro, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 221-224.
17. H. Torigoe, Y. Hari, M. Sekiguchi, S. Obika, T. Imanishi, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 2354-2360.



- 18.A. N. Elayadi, D. A. Braasch, D. R. Corey, *Biochemistry*, **2002**, 41, 9973-9981.
- 19.Randazzo, V. Esposito, O. Ohlenschlager, R. Ramachandran, L. Mayol *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32, 3083-3092
- 20.B. Datta, C. Schmitt, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4111; (b) B. Datta, M. E. Bier, S. Roy, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 4199; (c) V. Esposito, A. Randazzo, A. Messere, A. Galeone, L. Petraccone, C. Giancola, G. Piccialli and L. Mayol, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 17, 3364; (d) Y. Krishnan-Ghosh, E. Stephens, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 5944.
- 21.P. E. Vorobjev, I. A. Pyshnaya, D. V. Pyshnyi, A. G. Venyaminova, E. M. Ivanova, V. F. Zarytova, G. M. Bonora, C. Scalfi-Happ, H. Seliger, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2001**, 11, 77.
- 22.F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, D. G. Norman, D. M. J. Lilley, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 243, 458.
- 23.(a) P. K. Patel, A. S. R. Koti, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3836; (b) C. Cheong, P. B. Moore, *Biochemistry*, **1992**, 31, 8406; (c) R. Jin, B. L. Gaffney, C. Wang, R. A. Jones, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 8832; (d) Y. Wang, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1993**, 234, 1171; (e) P. K. Patel, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2457.

24. (a) F. W. Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8683; (b) K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea, S. Swaminathan, P. H. Bolton, *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899; (c) Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1993**, 1, 263.
25. (a) M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 598; (b) Q. Guo, M. Lu, N.R.Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 3596; (c) I. Smirnov, R. H. Shafer, *Biochemistry*, **2000**, 39, 1462.
- 26.S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1997**, 1, 5.
- 27.E. Henderson, C.C. Hardin, S.K. Walk, I., Jr. Tinoco, Blackburn, E.H. *Cell* **1987**, 51, 899 – 908.
- 28.R.F. Macaya, P. Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 334, 3745 – 3749.
- 29.Y. Wang, D.J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 251, 76 – 94.
- 30.P. Schultze, W.S. Flint, J. Feigon, *Structure*, **1994**, 2, 221 – 233.
- 31.F.W. Smith, J. Feigon, *Nature*, **1992**, 356, 164 – 168.
- 32.D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1988**, 334, 364 – 366.
- 33.D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1990**, 334, 410 – 414.
- 34.D. Sen, W. Gilbert, *Biochemistry*, **1992**, 31, 65 – 70.
- 35.G. Laughlan, A.I. Murchie, D.G. Norman, M.H. Moore, P.C.E. Moody, D.M.J. Lilley, B. Luisi, *Science*, **1994**, 265, 520 – 524.

- 36.K. Phillips, Z. Dauter, A.I. Murchie, D.M.J. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 171 – 182.
- 37.P. Catasti, X. Chen, R.K. Moyzis, E.M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 264, 534 – 545.
- 38.C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, A. Rich, *Nature*, **1992**, 356, 126 – 131.
- 39.P. Schultze, R.F. Macaya, J. Feigon, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 1532 – 1547.
- 40.E.R. Henderson, E.H. Blackburn, *Mol. Cell. Biol.*, **1989**, 9, 345 – 348.
- 41.E.H. Blackburn, *Nature*, **1991**, 350, 569 – 573.
- 42.T. Nikaido, Y. Yamawaki-Kataoka, T. J. Honjo, *Biol. Chem.*, **1982**, 257, 7322 – 7329.
- 43.A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, *Nature*, **1985**, 314, 67 – 73.
- 44.D.A. Collier, J.A. Griffin, R.D. J. Wells, *Biol. Chem.*, **1988**, 263, 7397–7405.
- 45.Hastie, N.D., Allshire, R.C., *Trends Genet.*, **1989**, 5, 326 – 331.
- 46.S.A. Akman, R.G. Lingeman, J.H. Doroshov, S.S. Smith, *Biochemistry*, **1991**, 30, 8648–8653.
- 47.J.M. Nickol, G. Felsenfeld, *Cell*, **1983**, 35, 467 – 477.
- 48.T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1167–1172.

- 49.M.C. Hammond-Kosack, M.W. Kilpatrick, K. Docherty, *J. Mol. Endocrinol.*, **1992**, 9, 221 – 225.
- 50.L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, *Nature*, **1992**, 355, 564 – 566.
- 51.V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 2097 – 2107.
- 52.N. Jing, W. Xiong, Y. Guan, L. Pallansch, S. Wang, *Biochemistry*, **2002**, 41(17), 5397–5403.

## **Capitolo 5: Modifiche post-SELEX dell'aptamero anti-trombina.**

### ***5.1 Introduzione***

Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse tecniche per la sintesi e lo screening funzionale di molecole organiche di varia natura. Librerie di peptidi, di anticorpi o di proteine parzialmente randomizzate possono essere espresse sulla superficie di batteriofagi o di cellule, e le varianti dotate di specifiche capacità catalitiche o di notevoli affinità di legame possono essere selezionate e amplificate ripetutamente.<sup>1,2</sup> Similmente, composti funzionali possono essere selezionati da *pool* di sequenze casuali di acidi nucleici, mediante un processo noto come SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment).<sup>3</sup> Tale tecnica, infatti, permette di selezionare aptameri, ossia oligonucleotidi in grado di legare selettivamente molecole d'interesse terapeutico.<sup>4,5</sup>

I vari metodi di selezione di aptameri si basano su tre fasi principali comuni: generazione di un *pool* di sequenze diverse, selezione di una specifica struttura funzionale (o di più strutture) e amplificazione.

In primo luogo, mediante sintesi chimica, si genera un ampio *pool* di sequenze diverse. Ciascuna sequenza adotta una distinta struttura tridimensionale. L'enorme variabilità del *pool* iniziale permette agli acidi nucleici di selezionare forme strutturali complementari alla

superficie di una data molecola bersaglio. Le strutture G-quadruplex figurano tra le strutture secondarie adottate da diversi acidi nucleici funzionali.

Nel metodo di selezione utilizzato attualmente, l'insieme di sequenze di acidi nucleici, variamente strutturati, è incubato con la molecola *target*, in seguito, mediante cromatografia di affinità o elettroforesi su gel, dagli altri ODN che non interagiscono con il *target* si isolano esclusivamente i complessi acido nucleico-*target*. Gli oligonucleotidi che si sono legati al bersaglio sono successivamente eluiti e sottoposti ad amplificazione mediante un primo ciclo di PCR. Ripetuti cicli di incubazione-selezione in condizioni sempre più stringenti, cioè in condizioni che sfavoriscono il legame con il *target*, permettono di isolare i composti in grado di interagire con più alta affinità e specificità con il *target*.<sup>6-9</sup>

Il *pool* iniziale di sequenze casuali, in genere, è prodotto mediante sintesi chimica del DNA. Ciascuna sequenza del *pool* presenta una regione centrale variabile costituita da nucleotidi inseriti in maniera casuale, fiancheggiata da regioni costanti, necessarie per l'amplificazione enzimatica. È possibile condurre le reazioni di polimerizzazione di DNA o RNA in presenza di nucleotidi modificati, al posto di quelli naturali, in modo da generare *pool* di acidi nucleici con caratteristiche chimiche completamente diverse.

Un *pool* di sequenze casuali mostra nella regione variabile da 30 a 200 residui *random* e può essere costituito da  $10^{13}$ - $10^{17}$  differenti specie di acidi nucleici.

L'efficacia degli esperimenti di selezione può essere controllata o regolando

la stringenza dei singoli cicli di selezione o variando il numero di cicli. Cicli ripetuti consentono un incremento effettivo dell'affinità di legame degli aptameri per il proprio *target*.

Gli aptameri hanno caratteristiche ottimali. Infatti, presentano un'elevata variabilità strutturale che permette loro di interagire con un ampio range di *target*, si legano al proprio bersaglio con elevata specificità riuscendo a discriminare anche tra bersagli strettamente correlati tra loro, inoltre possono fungere da veicolanti, in particolari siti, di piccole molecole organiche ad essi legate. Oltre che a scopo terapeutico aptameri opportunamente marcati possono essere utilizzati a scopo diagnostico per valutare l'espressione o la localizzazione cellulare o sub-cellulare di una data proteina.

Il potenziale terapeutico degli aptameri si evince sia dalla loro capacità di inibire rilevanti molecole *target*, sia dalla capacità di modulare funzioni fisiologiche.

Gli aptameri, infatti, oltre all'attività inibente proteine, sono in grado di modulare la fisiologia della cellula e dell'organismo in generale. Infatti gli aptameri che hanno come bersaglio proteine extracellulari influenzano la crescita e la differenziazione cellulare. Gli aptameri anti-trombina possono potenzialmente essere usati per prevenire la formazione del coagulo di fibrina, per esempio, ostacolando in maniera transiente la riocclusione di vasi sanguigni a seguito di un intervento di angioplastica.

L'elevata affinità e specificità di legame degli aptameri, insieme alle note

capacità di inibire la funzione di proteine e quindi di modulare la fisiologia cellulare, suggeriscono fortemente l'uso di tali composti come agenti terapeutici. Le applicazioni terapeutiche di tali oligonucleotidi sintetici tuttavia sono limitate dal costo elevato di sintesi, dalla loro scarsa biodisponibilità e quindi dalle loro sfavorevoli caratteristiche farmacocinetiche. Da qui è nata la necessità di sottoporre tali molecole a modifiche volte a migliorarne la stabilità e le proprietà farmacocinetiche.

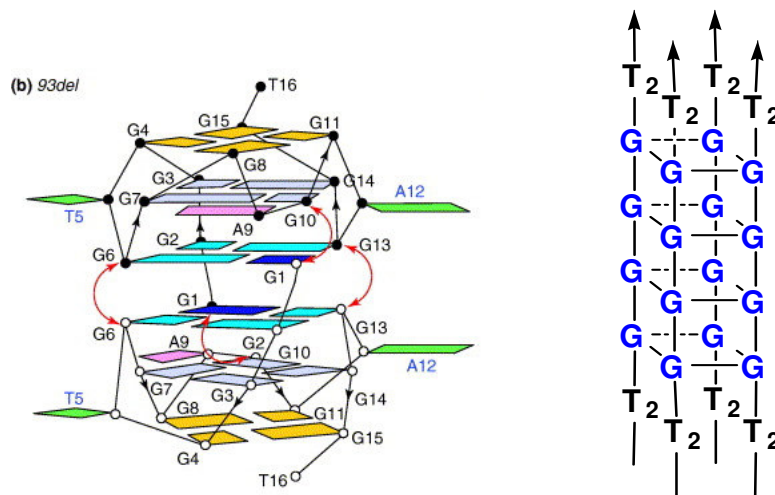
Per incrementare la stabilità di acidi nucleici di interesse terapeutico sono state proposte diverse strategie, ma quella che ha avuto maggior successo prevede l'utilizzo di nucleotidi modificati nelle procedure di selezione. I nucleotidi modificati, utilizzati al posto dei naturali, devono conservare la capacità di stabilire interazioni Watson-Crick, in modo da garantire all'analogo oligonucleotidico la possibilità di essere amplificato nella fase di PCR.

L'affinità di questi oligonucleotidi sintetici verso un dato bersaglio, infatti, deriva in genere dalla particolare forma tridimensionale adottata, ossia dalla struttura secondaria che, nel caso di aptameri a DNA, prevede spesso strutture quadruplex come unità fondamentali.<sup>10-13</sup>

Tra gli aptameri che adottano la forma tridimensionale delle strutture quadruplex come unità fondamentale della propria struttura secondaria vi è l'aptamero 93del (**Fig.82**) che ha come bersaglio l'integrasi del virus HIV ed è caratterizzato da un inusuale arrangiamento topologico dei filamenti. Si

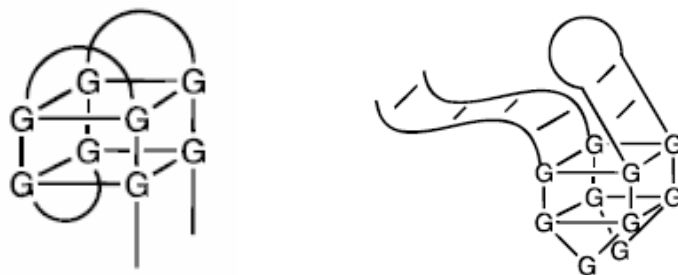


tratta, infatti, di una quadruplex dimerica formata da sei quartetti di G. I due quartetti centrali sono interconnessi tra loro, in quanto per ciascun quartetto, tre residui di G appartengono ad un filamento mentre il quarto residuo di G appartiene all'altro filamento. L' ISIS 5320 (**Fig.82**), invece, è un aptamero fosforotioato che ha come *target* la glicoproteina *envelop* gp 120 del virus HIV. Questo aptamero forma una struttura quadruplex a quattro filamenti, disposti parallelamente tra loro.



**Fig. 82** Aptameri formanti quadruplex aventi come bersaglio proteine.

In letteratura inoltre non mancano esempi di aptameri formanti quadruplex diretti contro piccole molecole, quali l'ATP o la riboflavina, piuttosto che contro proteine (**Fig.83**).



**Fig. 83** Aptameri formanti quadruplex aventi come bersaglio piccole molecole, quali riboflavina (a sinistra) e ATP (a destra).

### ***5.2 Aptameri e loro applicazioni terapeutiche***

Le potenzialità terapeutiche degli aptameri dipendono dalla loro capacità di interagire con il proprio *target* con elevata selettività ed affinità. Le elevate dimensioni e quindi l'ampia superficie di contatto degli acidi nucleici garantiscono maggiori interazioni con i bersagli terapeutici rispetto alle molecole più piccole e permettono loro di discriminare tra proteine strettamente correlate tra loro come le isoforme della protein-chinasi C (PKC) che posseggono un grado di similitudine del 96%.<sup>14</sup>

Grossi limiti alle applicazioni terapeutiche degli aptameri sono rappresentati dall'instabilità delle molecole di DNA o di RNA nel siero o nel citoplasma, data l'elevata suscettibilità all'attacco da parte delle nucleasi; dalle difficoltà di trasporto e di biodisponibilità (problemi farmaco-cinetici); dagli elevati costi di produzione.

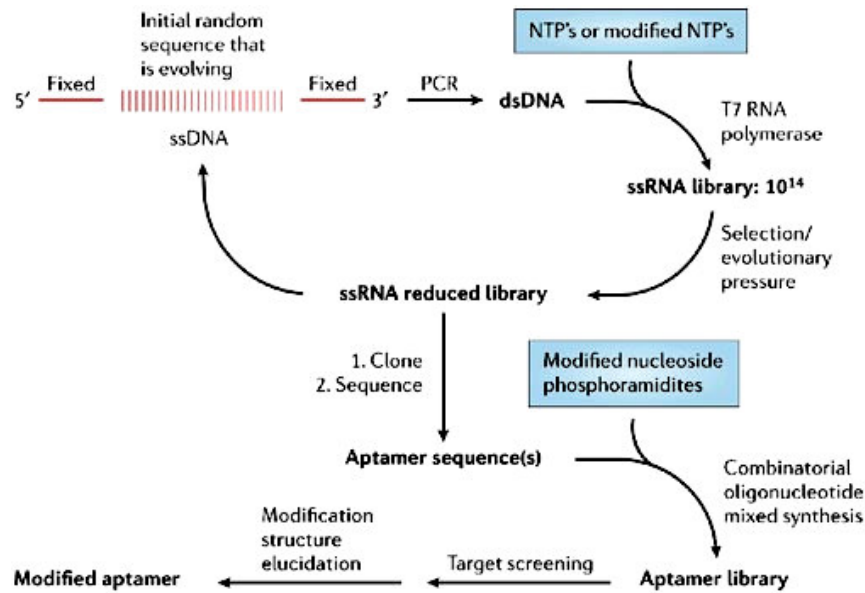
Per l'applicazione in vivo degli aptameri essi devono possedere le seguenti caratteristiche:

- mantenere una specifica conformazione tridimensionale in grado di garantire il legame specifico ed altamente affine con il target;
- avere una ragionevole stabilità nell'ambiente fisiologico di interesse;
- essere assimilati in quantità sufficienti;
- avere efficienza terapeutica in dosi consentite senza effetti indesiderati;
- essere facilmente sintetizzati in quantità sufficienti per l'uso clinico.

Allo scopo di potenziare le applicazioni terapeutiche degli oligonucleotidi sintetizzati ed isolati mediante la tecnologia SELEX, sono state progettate e realizzate una serie di modifiche sintetiche pre- e post-SELEX mirate al miglioramento della stabilità e delle proprietà farmaco-cinetiche.

Modifiche pre-SELEX (**Fig.84**) si basano sull'utilizzo di nucleotidi trifosfato modificati a patto che essi vengano riconosciuti dagli enzimi utilizzati per l'amplificazione.

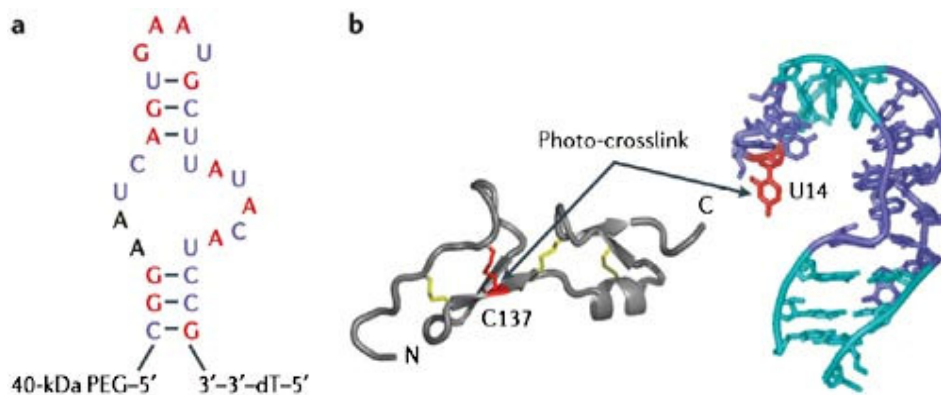
Modifiche post-SELEX (**Fig.84**), invece, prevedono l'utilizzo di nucleosidi fosforamiditi modificati per la sintesi di librerie di aptameri, a partire dalle sequenze più promettenti già selezionate. Le nuove "library" sono poi sottoposte ad ulteriore screening per la valutazione dell'affinità verso il medesimo *target*. Successivamente, dopo eventuali indagini strutturali, si perviene all'aptamero finale modificato.



**Fig. 84** Modifiche pre- e post-SELEX.

L'utilizzo della tecnica appena descritta ha permesso la produzione del Macugen<sup>15</sup> (pegaptanib sale sodico), il primo aptamero approvato a scopo terapeutico dall'FDA, nel dicembre del 2005 (**Fig.85**). Il Macugen è impiegato per il trattamento di una grave patologia a carico della retina, la degenerazione maculare neovascolare legata all'età, che si manifesta con progressiva riduzione della vista fino alla cecità. Tale patologia insorge per ipossia dei vasi retinici, che determina una sovra-espressione di VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), che di risposta provoca angiogenesi. I nuovi vasi prodotti determinano il distacco della retina e lesioni endoteliali con fuoriuscita di sangue. Il Macugen è un antagonista selettivo di VEGF. Tale macromolecola è un coniugato covalente di un oligonucleotide (costituito da 28 monomeri), che presenta al 5' un gruppo pentilamminico al

quale sono legati covalentemente due complessi monometossi-polietilenglicole (PEG) tramite due gruppi amminici di un residuo di lisina. L'alta stabilità di tale aptamero e quindi il suo possibile utilizzo in terapia dipendono dalla presenza all'estremità 3'-OH di un sito di inversione di polarità 3'-3'. Questa modifica, infatti, lo rende resistente all'attacco delle 3'-esonucleasi.



**Fig. 85** Pegaptanib, il primo aptamero approvato dall'FDA (in rosso sono riportate le purine 2'-OMe, in blu le pirimidine 2'-F) e il suo *target*, VEGF.

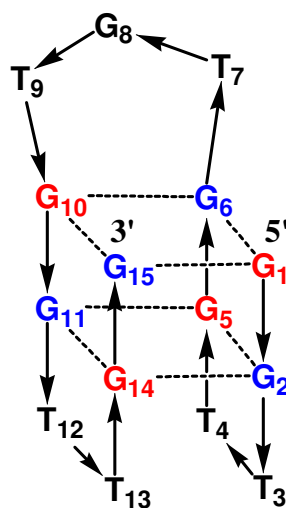
Sebbene questo importante aptamero non è caratterizzato da una struttura quadruplex, queste strutture secondarie del DNA, come detto in precedenza, rappresentano l'impalcatura di molti interessanti e promettenti aptameri.

### ***5.3 Una mini-library di analoghi del TBA contenenti siti di inversione della polarità 3'-3' e 5'-5'.***

Uno degli aptameri formanti quadruplex più noti è l'aptamero che lega la

trombina, noto come TBA (*Thrombin Binding Aptamer*), identificato a partire da una “library” casuale di  $10^{13}$  oligonucleotidi di 96-mer quale ligando ad alta affinità per la proteina coinvolta nel processo di formazione del coagulo di fibrina.<sup>16</sup>

La struttura del TBA, un pentadecamero deossiribonucleotidico di sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG), è stata determinata in soluzione con l’impiego della spettroscopia NMR<sup>17,18</sup> e, complessato con la trombina, mediante cristallografia a raggi X. Il TBA in soluzione adotta preferenzialmente una struttura quadruplex monomolecolare caratterizzata dalla presenza di due quartetti di G, connessi tra loro da un *loop* centrale di sequenza TGT e da due *loop* laterali più corti di sequenza TT. Ciascuna tetrate è caratterizzata da un’alternanza regolare di G *syn* e G *anti* (**Fig.86**).



**Fig. 86** Rappresentazione schematica della struttura adottata in soluzione dal TBA.

Dai risultati ottenuti in vitro mediante un saggio relativo alla coagulazione utilizzando fibrinogeno purificato, è emerso che il TBA è un potente inibitore

della trombina con un  $EC_{50}$  di 20 nM.<sup>4,5</sup>

La maggior parte dei contatti DNA-proteina ha luogo a livello dei *loop* piuttosto che con il corpo centrale della struttura stessa; sembra, infatti, che la struttura a quadrupla elica funga da impalcatura dalla quale si protendono i *loop* per il riconoscimento molecolare. Come suggerito da altri autori,<sup>19</sup> il TBA lega l'esosito anionico I della trombina, adottando una conformazione che non differisce molto da quella adottata dalla forma libera.

L'infusione endovenosa di tale aptamero ha dimostrato una potente e rapida attività anticoagulante anche *in vivo*, rivelando un'emivita di circa 2 minuti. Data la rapidità d'azione e la breve emivita *in vivo* il TBA potrebbe essere un utile anticoagulante nella chirurgia dei bypass cardiopolmonari. Tuttavia dettagliati studi farmaco-cinetici, condotti sulle scimmie, hanno mostrato che il TBA è rapidamente rimosso dal plasma perché sequestrato dai tessuti e degradato dalle nucleasi.<sup>20-22</sup>

Allo scopo di incrementare le proprietà del TBA, sono state effettuate diverse ricerche<sup>6,23,24</sup> sull'effetto di modifiche post-SELEX sulla sua relazione struttura/attività. Per esempio, He e coll.<sup>6</sup> hanno sintetizzato numerosi analoghi del TBA contenenti guanosine modificate recanti diversi sostituenti alla posizione 8 o al gruppo amminico esociclico. In un altro lavoro,<sup>24</sup> gli stessi autori hanno riportato la sintesi e le proprietà inibenti la trombina di diversi oligonucleotidi analoghi del TBA contenenti un legame neutro formacetaleico. Tuttavia non è mai stato valutato l'effetto dell'introduzione di

un sito di inversione di polarità a livello del backbone del TBA, sebbene tale interessante modifica strutturale sia stata già utilizzata in altri aptameri, come il Macugen.<sup>11</sup>

Pertanto con l'impiego di monomeri modificati protetti in 5' con il gruppo fosforamidito, disponibili commercialmente, abbiamo progettato e sintetizzato una "mini-library" di analoghi del TBA, costituita da due serie di analoghi oligonucleotidici caratterizzate dalla presenza di un'inversione di polarità 5'-5' o 3'-3' in diversi punti della sequenza. Le sequenze dei quattordici oligonucleotidi ottenuti sono riportate nella **Tabella 1**.

Tutti gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati mediante sintesi in fase solida basata sulla chimica del fosforamidito, successivamente sono stati purificati secondo le procedure standard e sottoposti ad un'analisi preliminare mediante spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR e spettroscopia di **dicroismo circolare**.

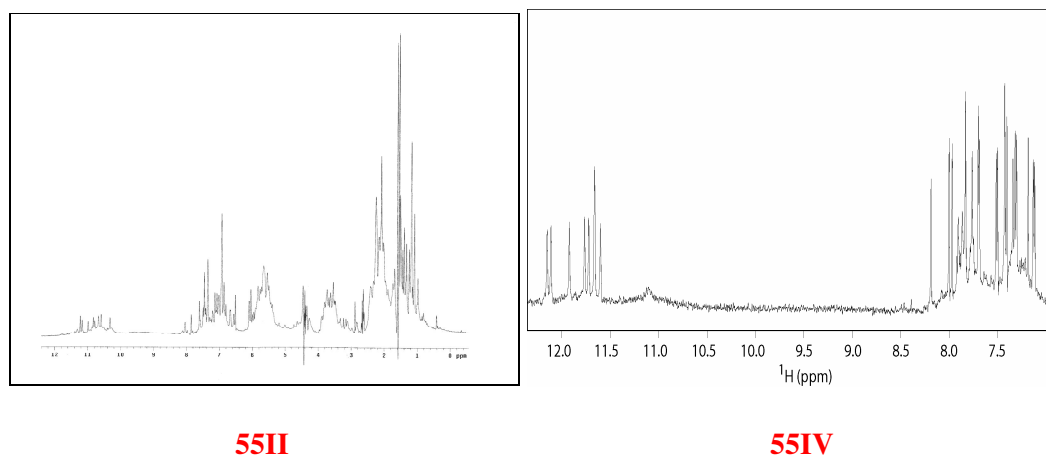
5'-5' series		3'-3' series	
<sup>3</sup> G <sup>b</sup> - <sup>b</sup> GTTGGTGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55 I</b>	<sup>5</sup> G <sup>3</sup> - <sup>3</sup> GTTGGTGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 I</b>
<sup>3</sup> GG <sup>5</sup> - <sup>5</sup> TTGGTGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55 II</b>	<sup>5</sup> GG <sup>3</sup> - <sup>3</sup> TTGGTGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 II</b>
<sup>3</sup> GGT <sup>5</sup> - <sup>5</sup> TGGTGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55 III</b>	<sup>5</sup> GGT <sup>3</sup> - <sup>3</sup> TGGTGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 III</b>
<sup>3</sup> GGTT <sup>b</sup> - <sup>b</sup> GGTGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55 IV</b>	<sup>5</sup> GGTT <sup>3</sup> - <sup>3</sup> GGTGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 IV</b>
<sup>3</sup> GGTTG <sup>b</sup> - <sup>b</sup> GTGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55 V</b>	<sup>5</sup> GGTTG <sup>3</sup> - <sup>3</sup> GTGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 V</b>
<sup>3</sup> GGTTGG <sup>5</sup> - <sup>5</sup> TGTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55VI</b>	<sup>5</sup> GGTTGG <sup>3</sup> - <sup>3</sup> TGTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 VI</b>
<sup>3</sup> GGTTGGT <sup>5</sup> - <sup>5</sup> GTGGTTGG <sup>3</sup>	<b>55VII</b>	<sup>5</sup> GGTTGGT <sup>3</sup> - <sup>3</sup> GTGGTTGG <sup>5</sup>	<b>33 VII</b>

**Tabella 1**

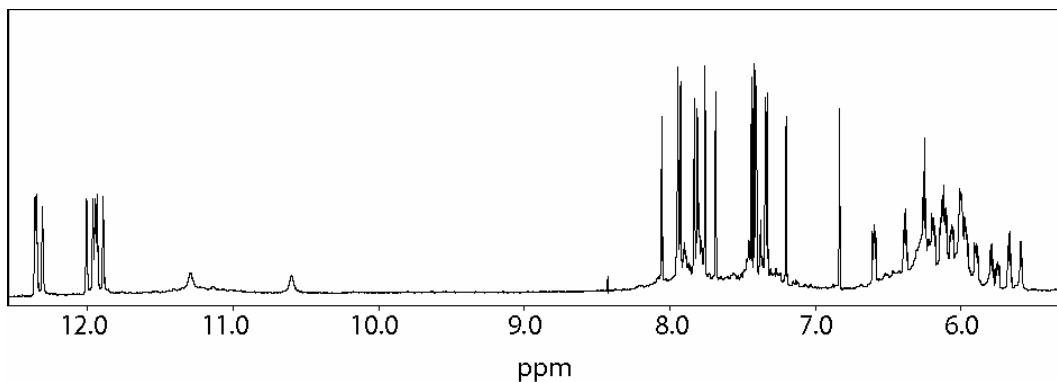


Le sequenze apparse più promettenti sono state selezionate per una più dettagliata analisi. L'aspetto relativamente semplice degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  degli oligonucleotidi **55 II**, **55 III** e **55 IV** (Fig.87) indica che nelle condizioni usate, questi oligomeri modificati adottano principalmente una singola conformazione ben definita da legami idrogeno. Gli spettri protonici monodimensionali degli altri ODN presentano più di un set di segnali, suggerendo la presenza in soluzione di diverse specie. In alcuni casi un notevole allargamento dei segnali ci ha impedito di ottenere informazioni sul numero di specie effettivamente presenti in soluzione.

Allo scopo di valutare l'effetto dell'introduzione di un sito di inversione di polarità sul profilo strutturale dei complessi risultanti, per gli ODN **55 II**, **55 III**, **55 IV** e per la loro controparte naturale sono stati acquisiti gli spettri CD.



**Fig. 87** Spettri  $^1\text{H-NMR}$ .



**55III**

**Fig. 87 bis** Spettro  $^1\text{H-NMR}$ .

Tutti gli spettri di dicroismo circolare mostrano due bande positive intorno a 248 e 294 nm e una banda negativa intorno a 267 nm. In particolare, gli spettri CD di **55III** e del TBA, acquisiti a 20°C, sono tra loro sovrapponibili. Ciò suggerisce per **55III** la formazione di una struttura quadruplex a filamenti anti-paralleli.<sup>25-27</sup> Esperimenti di CD melting, effettuati utilizzando una velocità di scansione di 10°C/h, hanno fornito temperature di fusione di 50°C, 58°C, 61°C e 54°C per i complessi **55 II**, **55 III**, **55 IV** e TBA, rispettivamente. Sulla base di questi risultati si è pensato di sottoporre i complessi che hanno rivelato una stabilità termica superiore a quella del TBA ad una più dettagliata analisi strutturale e ad una valutazione dell'attività anti-trombina. In particolare, allo scopo di chiarire la natura delle interazioni tra trombina e TBA, critiche per l'attività biologica, l'oligodeossiribonucleotide di sequenza  $3'\text{GGT}^{5'}\text{-}5'\text{TGGTGTGGTTGG}^{3'}$  (**1**), precedentemente indicato come **55III**, è stato sottoposto ad un dettagliato studio strutturale.

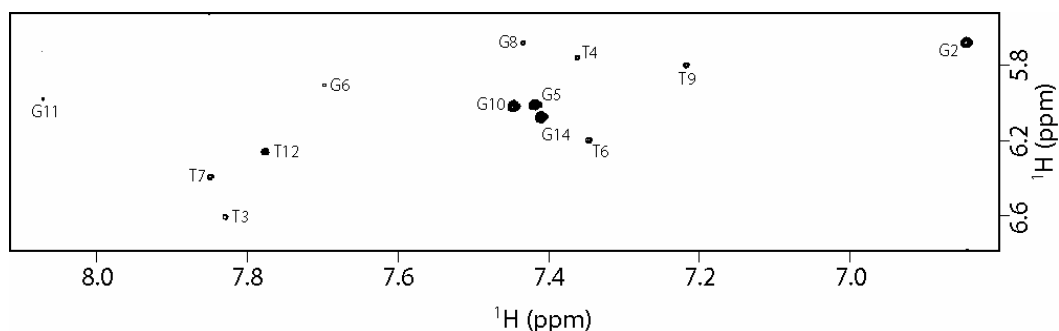
***5.4 Un nuovo aptamero modificato legante la trombina contenente un sito di inversione della polarità 5'-5'.***

Il campione NMR di  ${}^3\text{GGT}^{5'}\text{-}{}^{5'}\text{TGGTGTGGTTGG}^3$  (**1**) è stato riscaldato per 10 minuti a 80°C e lentamente raffreddato a temperatura ambiente, successivamente è stato acquisito il suo spettro  ${}^1\text{H-NMR}$  usando una sequenza di impulsi di tipo WATERGATE<sup>28</sup> per la soppressione del segnale dell'acqua (**Fig.87 bis**). Escludendo alcuni deboli segnali (la cui intensità relativa non varia al variare della temperatura) dovuti alla presenza in soluzione di conformazioni minori, l'aspetto semplice dello spettro protonico monodimensionale di **1** indica che nelle condizioni sperimentali usate, l'oligomero modificato adotta principalmente una singola conformazione ben definita da legami idrogeno. Infatti, lo spettro  ${}^1\text{H-NMR}$  di **1** (700 MHz, T = 25°C) mostra nella regione tra 11.5-12.5 ppm, la presenza di otto segnali ben definiti attribuibili a protoni imminici coinvolti in legami idrogeno di tipo Hoogsteen responsabili della formazione di due quartetti di G. A campi leggermente più alti, rispettivamente a 10.6 e 11.29 ppm, si osservano due singoletti meno intensi, appartenenti probabilmente a due protoni imminici di due timine coinvolte reciprocamente in un legame idrogeno. Nella regione di risonanza dei protoni aromatici, invece, sono chiaramente osservabili quindici segnali dovuti ai nove protoni H8 delle guanine e sei protoni H6 delle timine. Un'analisi combinata degli spettri 2D NOESY (700 MHz, T = 25°C), TOCSY (700 MHz, T = 25°C), e di spettroscopia  ${}^{31}\text{P-NMR}$  (202 MHz, T = 25 °C) ha

consentito un'assegnazione completa dei segnali dovuti ai protoni scambiabili e non scambiabili e ai gruppi fosfato presenti in **1**. In particolare, lo spettro  $^{31}\text{P}$  disaccoppiato con i protoni mostra la presenza di quattordici segnali attribuibili ad altrettanti gruppi fosfato presenti.

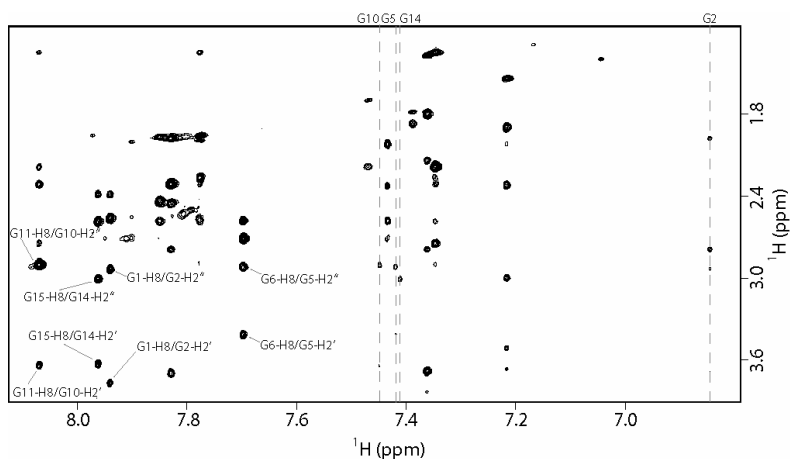
Successivamente, effettuata la completa assegnazione dei picchi di risonanza protonici di ciascun residuo di deossiribosio, mediante esperimenti di spettroscopia NMR bidimensionale **TOCSY**, l'esperimento bidimensionale eteronucleare  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -**COSY** ci ha permesso di assegnare i segnali dell'intero scheletro, correlando ciascun picco di risonanza del fosforo con il rispettivo protone H3' accoppiato dal lato 5' e con i protoni H5'/H5'' accoppiati dal lato 3' dei residui di deossiribosio adiacenti. Inoltre, i picchi di correlazione NOE tra i protoni delle basi e i protoni H1', H2' e H2'' hanno consentito l'assegnazione alla relativa base azotata di tutti i protoni aromatici presenti.

La presenza nello spettro 2D-NOESY (700 MHz, T=25 °C, mixing time 100 ms) di *crosspeak* piuttosto intensi coinvolgenti il protone H8 di alcuni residui di G e l'H1' dello zucchero, nell'ambito dello stesso monomero, indica che quattro (G2, G5, G10, G14) delle nove guanine adottano una conformazione glicosidica *syn* (**Fig.88**). I segnali attribuibili alle G *syn* sono spostati a campi più alti rispetto a quelli delle G *anti*.<sup>17,29,30</sup>



**Fig. 88** Regione espansa dello spettro NOESY di **1** in cui si evincono i picchi di correlazione G-H8/H1'.

Inoltre, quattro *G anti* (G1, G6, G11, G15) presentano il classico pattern di connettività sequenziali H8/H2'-H2'' con le *G syn* adiacenti al 5'(G2, G5, G10 e G14, rispettivamente), indicando che le subunità G1-G2, G5-G6, G10-G11 e G14-G15 sono coinvolte nella formazione di una struttura elicoidale a quattro filamenti (i residui sottolineati adottano una conformazione glicosidica *syn*) (**Fig.89**). L'intero pattern di NOE osservato per tutti i residui di G indicati rivela che le conformazioni del backbone di questi tratti ricalcano quelle del TBA non modificato, presentando una struttura elicoidale destrorsa.

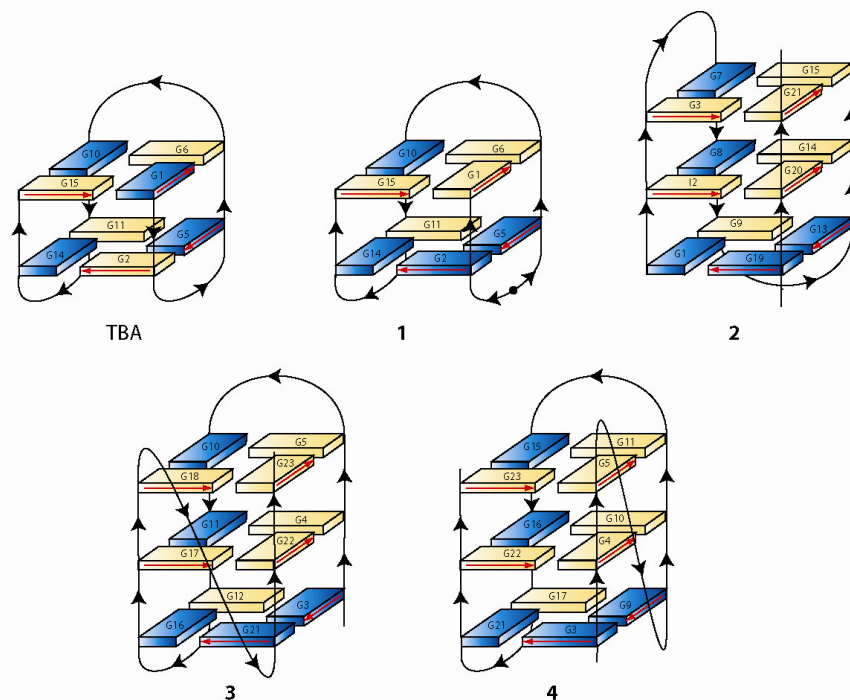


**Fig. 89** Regione espansa dello spettro NOESY di **1** in cui si evincono i picchi di correlazione GH8/H2'-H2''.

L'alternanza di G *syn* e G *anti* in ciascun filamento suggerisce che, come il TBA, **1** si ripiega in una struttura quadruplex monomolecolare, caratterizzata dalla presenza di due tetradi di G. Inoltre, tra G *syn* e residui di timina sono state osservate inusuali connettività NOE, che indicano che i tratti  $5'TG^{3'}$  e  $5'GT^{3'}$  non adottano un ripiegamento elicoidale, per cui, molto probabilmente, i tratti TT e TGT sono responsabili della formazione di *loop*.

Allo scopo di assegnare i protoni scambiabili ai rispettivi residui di G o di T è stato acquisito un esperimento  $^1H-^{15}N$  HSQC (700 MHz, T= 5°C). Nello spettro risultante si osserva che otto protoni scambiabili (quelli presenti a campi più bassi) correlano con  $^{15}N$  nella regione tra 143 e 147 ppm, per cui questi segnali sono attribuibili ai protoni imminici dei residui di G,<sup>31</sup> mentre i segnali a 10.65 e a 11.35 ppm correlano rispettivamente con gli azoti a 155.7 e a 155.6 ppm, per cui tali segnali appartengono a residui di T.<sup>31</sup> Questi due segnali, inoltre, mostrano tra loro forti effetti NOE. Ciò suggerisce che le due timine sono spazialmente vicine e, verosimilmente, interagiscono reciprocamente mediante un legame idrogeno, esattamente come osservato nel TBA naturale. Inoltre, la presenza di picchi di correlazione NOE tra il protone H1' di G8, i protoni metilici di T9 e tre protoni imminici di residui di G ( $\delta_H$  12.03, 11.97 e 11.91 ppm), e di *crosspeak* NOE fra altri quattro protoni imminici ( $\delta_H$  12.37, 12.35, 12.30 e 11.95 ppm) e i protoni H6, i protoni metilici e i protoni H1' e H3' di T4 e H3', H2', H4' e H1' di T13, hanno reso possibile l'assegnazione dei protoni scambiabili delle due tetradi.

Tali dati indicano che **1** adotta una struttura quadruplex caratterizzata da due tetrad formate rispettivamente dai residui G1, G6, G10, G15 e G2, G5, G11, G14, dove i residui sottolineati presentano una conformazione glucosidica *syn*. È interessante notare che le due tetrad presentano una disposizione delle basi *anti-anti-anti-syn* e *syn-syn-syn-anti*. Inoltre, i protoni imminici delle T ( $\delta_H$  10.65 e 11.35 ppm, T=5°C) presentano diverse connettività NOE con un set di protoni imminici appartenenti ad una sola tetrad ( $\delta_H$  11.95, 12.80, 12.35 e 12.37 ppm). Il pattern di NOE attribuibili ai loop T12-T13 e T3-T4 ci ha permesso di identificare i residui T4 e T13 come quelli reciprocamente coinvolti in un legame idrogeno. È interessante notare che T13 e T4 sono reciprocamente coinvolti in un legame idrogeno anche nel TBA. La presenza di effetti NOE tra i residui del *loop* TGT e i protoni imminici delle G di una tetrad e tra i due *loop* TT e gli imminici dei residui di G dell'altra tetrad indica che nessun *loop* adotta una conformazione *dog-eared*. Tutto ciò implica che **1** si ripiega in una struttura quadruplex a sedia che possiede tre filamenti paralleli tra loro ed un solo filamento orientato in modo opposto (**Fig.90**).



**Fig. 90** Rappresentazione schematica delle strutture adottate dal TBA, dal TBA modificato (1), dalle tre unità ripetute della sequenza telomerica umana, ripiegate in una quadruplex dimerica<sup>22</sup> (2), dalla sequenza di *Tetrahymena*  $d(T_2G_4)_4$ <sup>23</sup> (3), e dalle quattro unità ripetute della sequenza telomerica umana  $d[TAGGG(TTAGGG)_3]$  in una soluzione di  $K^+$ .<sup>24,25</sup> Le frecce nere indicano la polarità dei filamenti 5'-3'. Il punto nero in 1 rappresenta il sito di inversione di polarità 5'-5'. Le guanine *anti* e *syn* sono rappresentate rispettivamente dai piani gialli e blu. Le frecce rosse indicano la direzione dei donatori ed accettori di protoni in legami idrogeno di tipo Hoogsteen.

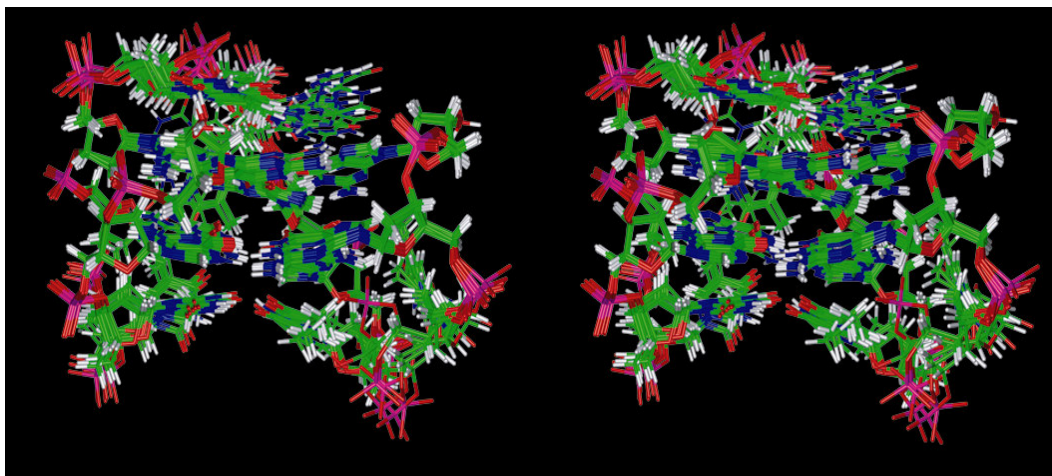
Allo scopo di chiarire la struttura tridimensionale di 1 a livello atomico, è stata effettuata una stima delle distanze protone-protone sulla base dell'intensità dei picchi di correlazione negli esperimenti 2D NOESY acquisiti a 700 MHz, sia a  $T=25^\circ\text{C}$  sia a  $T=5^\circ\text{C}$  (mixing time 100 ms per gli esperimenti acquisiti in  $D_2O$  e 200 ms per gli esperimenti acquisiti in  $H_2O$ ). Pseudo-atomi sono stati introdotti dove necessario. Per i calcoli sono state utilizzate 198 distanze e, come suggerito dalla presenza di 8 protoni imminici



di G e 2 di T nello spettro protonico monodimensionale, ne sono state aggiunte altre 32, relative ai 16 legami a idrogeno riscontrabili in base alla presenza di due tetradi di G (HN1-O6, N1-O6, HN2-N7 and N2-N7), e altre 4 (HN3-O4, N3-O4) relative ai 2 legami a idrogeno fra T13 e T4 (**Tabella 1**).

Gli angoli di torsione del backbone  $\beta$  ed  $\varepsilon$  sono stati stimati dall'accoppiamento scalare misurato negli esperimenti  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  COSY utilizzando l'equazione semi-empirica di Karplus.<sup>32</sup> Dato che per tutti gli zuccheri di **1** tutte le  $J_{\text{P,H5}}$  e  $J_{\text{P,H5}'}$  erano  $< 8$  Hz, gli angoli di torsione del backbone  $\beta$  sono stati ristretti in un range di  $180 \pm 30^\circ$ .<sup>32</sup> Per i residui 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 11, la  $J_{\text{P,H3}}$  era maggiore di 8 Hz, e i corrispondenti angoli  $\varepsilon$  sono stati ristretti nel range di  $-120 \pm 30^\circ$ .<sup>32</sup> Le conformazioni dell'anello zuccherino sono state ottenute dall'analisi dello spettro PE-COSY. Dalla stima della  $\Sigma J_{\text{H4}}$  ( $< 10\text{Hz}$ ), ai quattro residui di G in conformazione glicosidica *syn* non sono state applicate restrizioni per  $\gamma$ , mentre per i residui G6 e G11 (che posseggono una conformazione *anti*) gli angoli di torsione del backbone  $\gamma$  sono stati ristretti a  $60 \pm 30^\circ$ .<sup>32</sup> Tutte le  $J_{\text{H1},\text{H2}}$  misurabili sono ragionevolmente ampie, indicando una predominante natura *S-type* della conformazione dell'anello zuccherino. Inoltre in accordo con i dati NMR, gli angoli di torsione glicosidici per quattro delle otto guanine coinvolte nella formazione delle due tetradi di G sono stati fissati nel dominio *anti* ( $-160^\circ/-70^\circ$ ), mentre l'angolo  $\chi$  è stato tenuto in un range di  $10^\circ/100^\circ$  (conformazione *syn*) per i restanti quattro residui di G.

Mediante calcoli di annealing simulato (SA) sono state costruite strutture tridimensionali che concordano con i dati NMR. Inizialmente è stata costruita una struttura dell'oligonucleotide con una conformazione casuale e minimizzata, allo scopo di eliminare qualsiasi forzatura iniziale nelle modalità di ripiegamento strutturale. Utilizzando un campo di forza CVFF sono state effettuate simulazioni di strutturazioni in 500 ps. I calcoli SA sono partiti alla temperatura di 1000 K, che, successivamente, attraverso passaggi progressivi è stata portata a 273 K. Il gradino principale è stato quello di minimizzazione dell'energia e di affinamento della struttura. Sono state prodotte in tutto 20 strutture. La sovrapposizione delle migliori 7 strutture è risultata essere caratterizzata da valori di RMSD di  $0.75 \pm 0.27 \text{ \AA}$  e  $0.90 \pm 0.31 \text{ \AA}$ , rispettivamente per il *backbone* e per tutti gli atomi pesanti (**Fig.91**). Questi dati, visto l'assenza di significative violazioni delle “*constraint*” sperimentali (vedere **Tabella 2**), suggeriscono che le strutture ottenute sono rappresentative della struttura adottata in soluzione da **1**.



**Fig. 91** Rappresentazione della sovrapposizione delle migliori 7 strutture di **1**. I backbone e le basi sono rappresentati da stick colorati (carboni in verde, azoti in blu, ossigeno in rosso e idrogeni in bianco).

<b>Experimental constraints</b>	
Total NOEs	198
NOEs from non-exchangeable protons	185
NOEs from exchangeable protons	13
Hydrogen bonds constraints	36
Dihedral angle constraints	62
<b>CVFF energy (kcal mol<sup>-1</sup>) of the minimized structures</b>	
Total	370.158±4.529
nonbond	40.783±5.145
restraint	13.213±1.417
<b>NOEs violations</b>	
Number > 0.2 Å	3.40±1.63
Maximum (Å)	0.560±0.263
Sum (Å)	3.821±0.693
Average violation (Å)	0.016
<b>r.m.s. deviations from the mean structure (Å)</b>	
All backbone heavy atoms	0.75±0.27
All heavy atoms	0.90±0.31

**Tabella 2**

Come previsto, **1** mostra una geometria elicoidale destrorsa del backbone e tre loop *edge-wise* TT, TGT e TT. Come il TBA naturale, **1** presenta due tetradi

di G, ma differisce nella distribuzione *syn/anti* delle guanine nell'ambito di ciascuna tetrad, essendo caratterizzato da un inusuale disposizione *anti-anti-anti-syn* e *syn-syn-syn-anti* rispettivamente nell'uno e nell'altro quartetto, e ancora, differisce nell'orientamento relativo dei filamenti, con tre filamenti paralleli tra loro e un solo filamento orientato in modo opposto.

Un simile orientamento dei filamenti e una simile distribuzione delle conformazioni glicosidiche delle G, nell'ambito di ciascun quartetto, sono stati osservati in precedenza nella quadruplex dimerica formata dalla sequenza costituita da tre unità ripetute della sequenza telomerica umana<sup>33</sup> **(2)**, nella sequenza di *Tetrahymena*  $d(T_2G_4)_4$ <sup>34</sup> **(3)**, e nella sequenza telomerica umana  $d(TAGGG(TTAGGG)_3)$ <sup>35,36</sup> in soluzione di  $K^+$  **(4)** **(Fig.90)**. Sebbene le sequenze **2-4** differiscano tra loro sia nella molecolarità sia nella topologia, nella rappresentazione schematica **(Fig.90)** si nota chiaramente una certa somiglianza tra tali strutture. Orientando i quattro filamenti allo stesso modo in ogni struttura, infatti, tutte le guanine corrispondenti rivelano la medesima conformazione glicosidica. In particolare, le due tetradi presenti nel TBA modificato **1** presentano la medesima distribuzione di conformazioni glicosidiche osservata nei due piani inferiori delle strutture **2-4**. Ulteriore novità strutturale, tipica dei quattro complessi in questione, è la presenza accanto a due solchi di ampiezza media, di un solco più stretto e un solco più ampio.

	Rise	Tilt	Roll	Twist	
<b>TBA</b>					<b>1</b>
<b>G1/G2</b>	3.44	-10.60	-179.75	50.93	
	3.25	7.84	160.55	-45.79	<b>G1/G2</b>
<b>G5/G6</b>	2.67	6.22	-161.77	48.90	
	3.64	-1.25	-178.12	-49.88	<b>G5/G6</b>
<b>G10/G11</b>	2.80	10.45	-178.83	48.50	
	3.92	-4.04	151.25	-52.77	<b>G10/G11</b>
<b>G14/G15</b>	4.67	-17.19	-177.35	55.65	
	3.24	-12.25	-156.98	-49.22	<b>G14/G15</b>

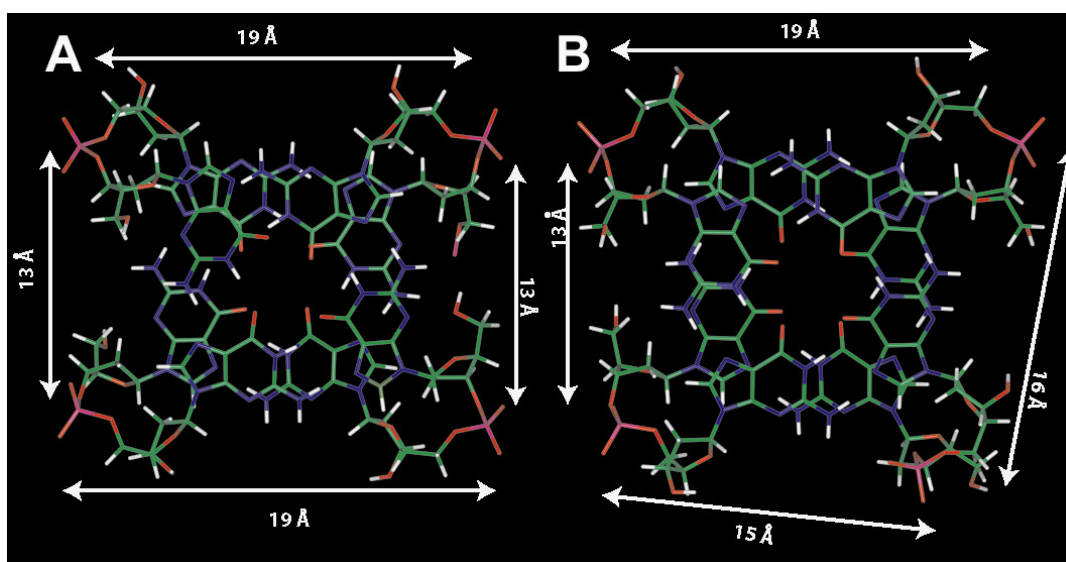
**Tabella 3** Rise, tilt, roll e twist del TBA e della migliore struttura minimizzata di **1**.

Il confronto tra la struttura più rappresentativa di **1** (quella a minor energia, dopo minimizzazione) e la struttura NMR, già riportata in letteratura, del TBA naturale è stato accompagnato da un'analisi dettagliata dei parametri dell'elica con l'impiego di CURVES<sup>37,38</sup> (**Table 3 e 4**).

	Shear	Stretch	Stagger	Buckle	Propeller	Opening	
<b>TBA</b>							<b>1</b>
<b>G1/G6</b>	-6.15	1.72	-0.88	11.32	176.45	-89.48	
	-6.67	2.57	-0.38	3.51	174.13	91.17	<b>G1/G6</b>
<b>G1/G10</b>	4.82	2.32	-2.69	3.47	-176.25	-0.95	
	-6.59	2.09	-0.71	38.43	164.49	6.02	<b>G1/G10</b>
<b>G1/G15</b>	-6.02	1.87	-0.59	-5.12	-162.35	86.32	
	-6.95	2.01	-0.37	28.42	-172.46	-86.37	<b>G1/G15</b>
<b>G2/G5</b>	6.42	2.77	-0.11	-5.50	157.97	-91.51	
	6.23	2.08	0.02	-5.58	-168.29	87.08	<b>G2/G5</b>
<b>G2/G11</b>	-6.04	1.75	-2.05	24.52	-177.68	-3.39	
	7.00	2.51	-0.04	26.55	-147.31	-0.96	<b>G2/G11</b>
<b>G2/G14</b>	5.41	2.07	-1.82	-5.12	-162.35	86.32	
	6.59	1.88	-0.37	8.34	-176.04	-89.79	<b>G2/G14</b>

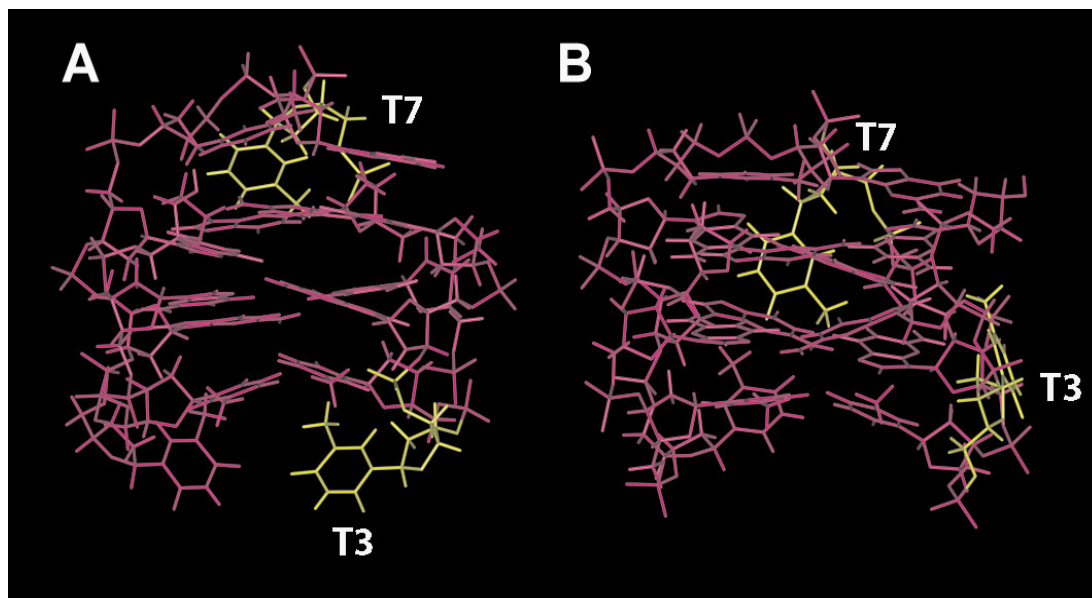
**Tabella 4** Shear, stretch, stagger, buckle, propeller, opening del TBA e della migliore struttura minimizzata di **1**.

Questi dati indicano chiaramente che la struttura adottata da **1** è simile a quella del TBA. Lo stacking tra le basi nelle due quadruplex è molto simile, dato che in entrambi i casi si osserva una sovrapposizione tra l'anello a cinque termini delle guanine del piano superiore quello delle guanine sottostanti (Fig. 6). Anzi, come suggerito dai valori di *Tilt* e *Stagger*, lo stacking tra coppie di G adiacenti dello stesso filamento è leggermente superiore in **1** rispetto al TBA. **1**, inoltre, presenta solchi di ampiezza leggermente diversa rispetto alla controparte naturale. In particolare, il TBA è caratterizzato da due solchi di ampiezza maggiore (ca. 19 Å) rispettivamente tra i filamenti G5-G6 e G10-G11 e tra i filamenti G1-G2 e G14-G15 e due solchi di ampiezza minore (ca. 13 Å). Invece, **1** possiede il solco tra i filamenti G1-G2 e G5-G6 appena un po' più ampio (ca. 16 Å) e il solco tra i filamenti G1-G2 e G14-G15 appena un po' più stretto (ca. 15 Å) (**Fig.92**).



**Fig. 92** Visione dall'alto delle due tetradi di G del TBA (A) e di **1** (B). I backbone e le basi sono rappresentati da stick colorati (carboni in verde, azoti in blu, ossigeno in rosso e idrogeni in bianco).

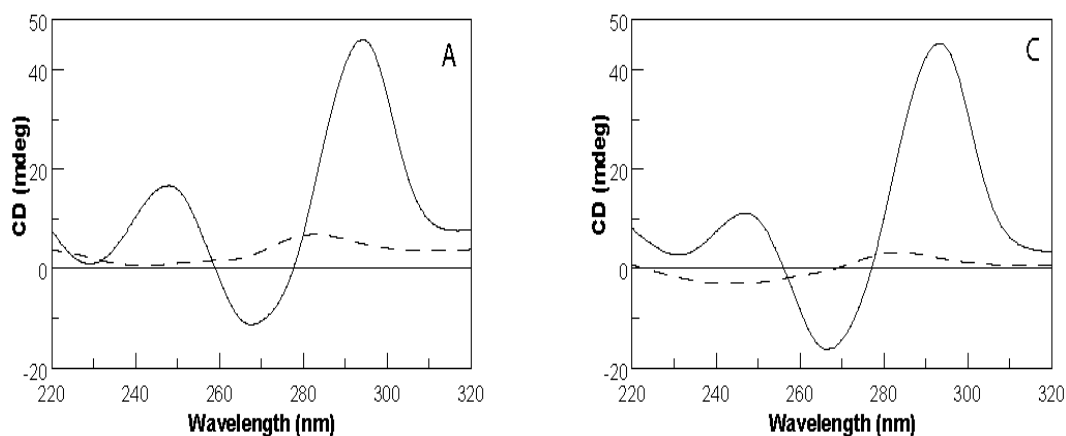
Le due molecole mostrano la medesima conformazione dell'anello zuccherino, ossia la conformazione *S-type*. La principale differenza strutturale tra l'analogo modificato e il TBA riguarda la disposizione spaziale del residuo T3. Come indicato, infatti, da NOE diagnostici tra T3-Me e G2-H8, e fra T3-H6 e G2-H8, il residuo T3 in **1** si ripiega all'interno del solco tra i filamenti G1-G2 e G5-G6. Altra lieve differenza strutturale va ascritta all'orientamento del residuo T7, che si ripiega nel solco formato dai filamenti G5-G6 e G10-G11. Questa seconda differenza strutturale probabilmente è dovuta ad un diverso ripiegamento del backbone in questa porzione della molecola, che spinge lo zucchero di T7 più vicino alle basi G8 e G6 rispetto al TBA naturale (**Fig.93**).



**Fig. 93** Visione laterale del TBA e di **1**. tutti i residui sono riportati in rosso Magenta esclusi T3 e T7 (in giallo). Si nota chiaramente la diversa disposizione di T3 e T7.

Come riportato nel precedente paragrafo, allo scopo di valutare l'effetto dell'introduzione di un sito di inversione di polarità sul profilo CD e sulla

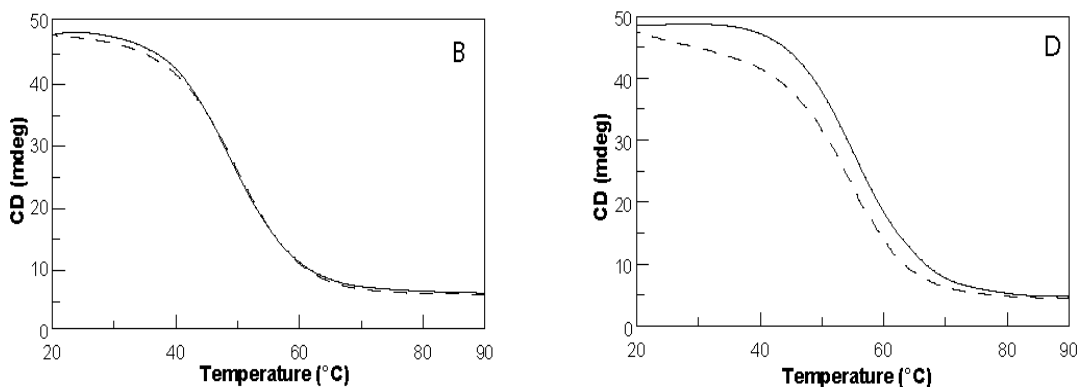
stabilità termica delle risultanti strutture quadruplex, per **1** e per il TBA naturale sono stati acquisiti spettri CD ed esperimenti di CD melting ed annealing. In particolare, **1** e il TBA presentano un profilo CD perfettamente sovrapponibile, caratterizzato dalla presenza di due bande positive rispettivamente a 248 e 294 nm e una negativa a 267 nm, tipiche di strutture quadruplex a filamenti anti-paralleli,<sup>25-27</sup> contenenti residui in conformazione glicosidica *syn* ed *anti* (**Fig.94**).



**Fig. 94** Profili CD di TBA (A) e **1** (C).

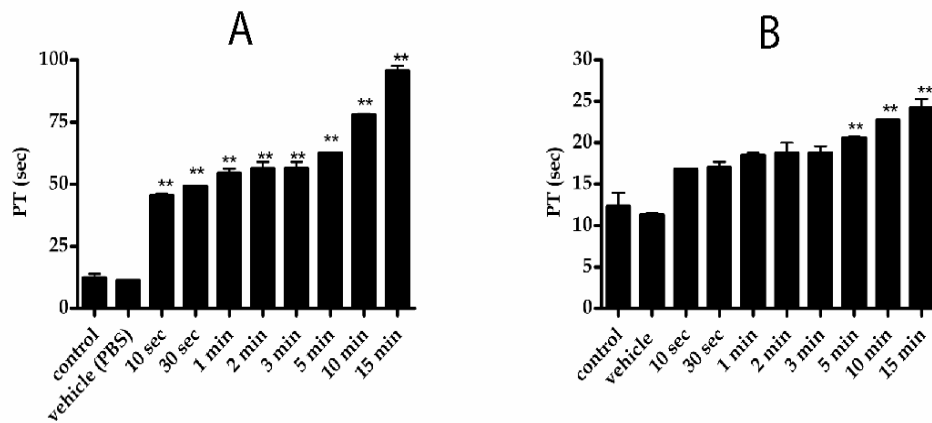
Tenendo conto che la velocità di formazione delle quadruplex è molto lenta, gli esperimenti di CD melting ed annealing sono stati acquisiti con una velocità di scansione di 10°C/h. Per entrambi gli oligonucleotidi non si osserva un significativo fenomeno di isteresi, indicando che, nelle condizioni sperimentali usate, entrambi i sistemi erano abbastanza vicini all'equilibrio. La quadruplex formata da **1** è leggermente più stabile di quella formata dal TBA data una  $T_m$  di 58 °C a fronte dei 54 °C dell'analogo non modificato (**Fig.95**).





**Fig. 95** Curve di melting (—) e di annealing (-----) del TBA (B) e di **1** (D).

Per stimare gli effetti delle variazioni strutturali descritte sull'attività biologica di **1** si è ricorsi al saggio di valutazione del PT (*Prothrombin Time*). Il saggio del PT è stato effettuato su **1** in stretto paragone con il TBA, utilizzando plasma umano. Per eliminare variabili causate da misure effettuate in giorni differenti, i campioni di **1** e del TBA sono stati preparati nello stesso momento e fatti strutturare in concomitanza mediante riscaldamento dei campioni per 10 minuti a 80°C e lento raffreddamento a temperatura ambiente. I saggi sono stati condotti dopo una settimana dalla procedura di preparazione dei campioni. Il TBA ha mostrato un effetto significativamente più marcato rispetto ad **1** sia nell'entità dell'attività che nella durata d'azione (**Fig.96**). Successivi studi di incubazione hanno dimostrato che l'effetto del TBA è già presente dopo 10 secondi di incubazione e persiste fino a 15 minuti. **1**, invece, presenta un'attività minore rispetto al TBA e a più lenta insorgenza; il PT, infatti, con l'oligomero modificato comincia ad essere significativo dopo 5 minuti di incubazione.



**Fig. 96** Valutazione del tempo di protrombina effettuata su plasma umano. Sull'asse delle x sono riportati i minuti di incubazione, mentre sull'asse delle y è riportato il PT in secondi. Il pannello A si riferisce al TBA mentre il pannello B si riferisce a **1**.

I dati biologici raccolti implicano che le modifiche strutturali di **1** ne alterano sensibilmente l'attività biologica e quindi la sua capacità di interazione con la trombina. Data l'apparente somiglianza strutturale con il TBA, la ridotta attività biologica, in un primo momento, è parsa ingiustificata. Tuttavia, è interessante notare che il TBA inibisce l'attività della trombina interagendo con il suo esosito per il fibrinogeno.<sup>39</sup> In particolare, è stato proposto che l'associazione TBA/trombina si realizzi in due modi diversi: attraverso il loop T7-G8-T9 (come suggerito dalla cristallografia a raggi X) o attraverso i residui T3 e T12 (come suggerito dai modelli NMR).<sup>39</sup> Secondo il modello ottenuto dai raggi X, il residuo T7 si inserisce in una tasca idrofobica, a livello dell'esosito di interazione con il fibrinogeno, formata dai residui Ile24, His71, Ile79 e Tyr117, mentre in accordo con i dati NMR, il residuo T3 interagisce con i residui Tyr76 e Ile82.

Pertanto la ridotta attività biologica di **1** potrebbe essere ascritta al differente orientamento adottato dai residui T3 e T7 in **1** rispetto al TBA naturale (**Fig.93**) e la sua più lenta insorgenza potrebbe derivare dalla necessità di **1**, in presenza della trombina, di riorganizzare la propria struttura in modo da orientare opportunamente i residui T3 e T7 per consentirne il legame. La sua ridotta attività anticoagulante, in generale, potrebbe essere ascritta all'insieme di variazioni strutturali osservate, quali orientamento relativo dei filamenti, conformazioni glicosidiche delle basi e ampiezze dei solchi.

Questi dati potrebbero fornire chiarimenti sulle variabili coinvolte nella formazione e stabilizzazione di strutture quadruplex. Infatti, **1** preferisce chiaramente adottare l'orientamento dei filamenti "3+1" al posto del classico "2+2" tipico di questo tipo di struttura (vedi TBA, **Fig.90**), pur essendo possibili entrambe le disposizioni. Questo rafforza l'idea che la topologia "3+1" non va considerata un'anomalia, ma uno stabile "scaffold" per la realizzazione di una quadruplex.<sup>33-36</sup> Tale struttura, inoltre, rappresenta il primo esempio di una struttura quadruplex con parte centrale organizzata con topologia "3+1", contenente solo due quartetti di G.

In conclusione tale studio contribuisce a chiarire il ripiegamento strutturale adottato dal DNA telomerico,<sup>33-36</sup> e ad approfondire la natura delle interazioni TBA/trombina. Dato che l'orientamento relativo dei filamenti "3+1" incrementa la stabilità termica della quadruplex formata e visto che **1** non è

privo di attività biologica, lo “*scaffold*” qui descritto potrebbe rappresentare la piattaforma di lancio per la progettazione di nuovi farmaci anticoagulanti.

Ulteriori studi strutturali e termodinamici su oligonucleotidi contenenti l’inversione di polarità 5’-5’ e 3’-3’ sono attualmente in corso.

#### ***5.4.1 Parte sperimentale.***

##### *Sintesi e purificazione degli oligomeri Q1, Q2 e Q3*

Gli oligonucleotidi  $3'GGT^{5'}-5'TGGTGTGGTTGG^{3'}$  e il suo analogo naturale  $5'GGTTGGTGTGGTTGG^{3'}$  (TBA) sono stati assemblati mediante l’utilizzo del sintetizzatore automatico Millipore Ciclone Plus DNA, sfruttando la chimica in fase solida dei  $\beta$ -cianoetilfosforamiditi su scala 15  $\mu$ mol. La sintesi di **1** è stata effettuata con le procedure standard relativamente al tratto  $5'TGGTGTGGTTGG^{3'}$  e usando 5’-fosforamiditi per il tratto  $3'GGT^{5'}$ .

Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 55°C per 12 ore. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H<sub>2</sub>O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46). Per l’eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare dei buffer A e B ( 100%A; 0% B→0%A; 100%B) in 30 min. a temperatura ambiente ad un flusso di 1.0 ml/min. *Buffer A*: 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH<sub>3</sub>CN; *Buffer B*: 1 M KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20%

(v/v) CH<sub>3</sub>CN. I tempi di ritenzione per gli oligomeri isolati sono i seguenti: **1** =19.0 min; TBA=20.5 min. Gli oligomeri sono stati raccolti e successivamente desalificati su colonne Sep-Pak (C18) mediante eluizione con H<sub>2</sub>O e metanolo.

Tutti gli oligomeri sono risultati puri all’NMR più del 99%.

### *Risonanza Magnetica Nucleare*

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione approssimativa di 2.0 mM in 0.6 ml (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA.

Per gli esperimenti in D<sub>2</sub>O, l’H<sub>2</sub>O è stata sostituita con D<sub>2</sub>O per essiccamento del campione, liofilizzazione e ridissoluzione in D<sub>2</sub>O pura.

Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz e su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shift* dei protoni (<sup>1</sup>H), mentre il segnale del fosforo dell’acido fosforico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% v/v) lo è stato per i *chemical shift* dei <sup>31</sup>P. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H<sub>2</sub>O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti WATERGATE<sup>28</sup> per la soppressione del segnale dell’acqua. Un esperimento eteronucleare <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-COSY è stato registrato in D<sub>2</sub>O con 2048 punti nella dimensione t<sub>2</sub> e 96 incrementi in t<sub>1</sub>, e un’ampiezza spettrale di 500 Hz nella dimensione di <sup>31</sup>P. Gli spettri NOESY sono stati acquisiti in modo “*phase*

*sensitive*<sup>40</sup> con *mixing times* di 100 e 200 ms (T=25°C e 5°C). Per gli spettri NOESY e <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC<sup>41</sup> in H<sub>2</sub>O è stata utilizzata la sequenza di gradienti WATERGATE<sup>28</sup> per la soppressione del segnale del solvente.

Gli spettri TOCSY<sup>42</sup> sono stati registrati in D<sub>2</sub>O con *mixing times* di 100 ms. Gli esperimenti NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura STATES-TPPI.<sup>43</sup> In tutti gli esperimenti 2D i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t<sub>2</sub> e 400-512 FID nella dimensione t<sub>1</sub>. Il tempo di rilassamento è stato settato a 3 s per gli esperimenti NOESY usati nella determinazione della struttura, mentre a 1.2 s per tutti gli altri esperimenti.

I dati NMR sono stati processati su una SGI Octane workstation usando il software FELIX 98 (Accelrys, San Diego, CA).

#### *Calcoli strutturali*

Le integrazioni del volume dei crosspeak sono state effettuate con il programma FELIX 98, usando gli esperimenti NOESY registrati a *mixing time* di 100 ms. I volumi dei *crosspeak* NOE sono stati poi convertiti in distanze limiti dopo essere stati calibrati usando le distanze fisse note di H2'/H2'' di G1, G2, G5, G8, T9, G10, G11, T12, T13 e G14. Successivamente è stato generato un file di distanze limite NOE con tre classificazioni: forti effetti NOE ( $1.8 \text{ \AA} \leq r_{ij} \leq 3.0 \text{ \AA}$ , laddove 1.8 Å è il raggio di van der Waals e  $r_{ij}$  è la distanza interprotonica fra i protoni  $i,j$ ), effetti NOE

di media intensità ( $2.5 \text{ \AA} \leq r_{ij} \leq 4.0 \text{ \AA}$ ) e deboli effetti NOE ( $3.5 \text{ \AA} \leq r_{ij} \leq 5.5 \text{ \AA}$ ). Sono state così usate un totale di 198 distanze.

Sono state usate le *constraint* riguardanti i ponti ad idrogeno con i limiti di *upper* e *lower distance* rispettivamente di  $2.0 \text{ \AA}$  e  $1.7 \text{ \AA}$  per gli accettori di idrogeni e  $3.0 \text{ \AA}$  e  $2.7 \text{ \AA}$  per i donatori-accettori. Queste *constraint* non hanno portato ad un aumento di violazioni.

Nei calcoli inoltre sono stati usati 54 angoli di torsione del *backbone*. In accordo con i dati NMR gli angoli di torsione glicosidici sono stati mantenuti in un *range* di  $-160^\circ/-70^\circ$  per le G *anti*, mentre per i residui di G *syn* è stato imposto il *range*  $10^\circ/100^\circ$ .

I calcoli sono stati effettuati usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di  $4*r$  e per compensare parzialmente la mancanza di solvente è stato usato un cut-off infinito per le interazioni di non legame.<sup>17</sup>

Strutture tridimensionali coerenti con le *constraint* NOE e dell'angolo diedro sono state costruite mediante calcoli di annealing simulato. Usando una disposizione completamente casuale degli atomi, è stata elaborata un'iniziale struttura dell'oligonucleotide. L'energia conformazionale è stata minimizzata usando il metodo *steepest descent* seguito da quello *quasi-Newton-Raphson* (VA09A). Sono state effettuate simulazioni per 500 ps utilizzando il programma DISCOVER (Accelrys, San Diego, CA, Usa), con un campo di forza CVFF. La simulazione è partita a 1000 K, e per passaggi successivi la temperatura è stata diminuita a 273 K. Il passaggio finale è stata l'ulteriore

minimizzazione dell'energia per rifinire le strutture ottenute, usando in maniera consecutiva gli algoritmi *steepest descent* e *quasi-Newton-Raphson (VA09A)*.

Sia nei calcoli di dinamica che di meccanica molecolare le restrizioni delle distanze sono state utilizzate con una costante di forza di  $1 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . Sono state generate 20 strutture. Per le migliori 7 strutture sono stati calcolati valori di RMSD di  $0.75 \pm 0.27 \text{ \AA}$  e  $0.90 \pm 0.31 \text{ \AA}$ , rispettivamente per il backbone e per gli atomi pesanti.

Le illustrazioni delle strutture sono state create con il programma INSIGHT II, versione 2005 (Accelrys, Technologies Inc.).

Tutti i calcoli sono stati svolti su un PC dotato di Linux WS 4.0.

#### *Spettroscopia CD.*

I campioni CD di **1** e del TBA stati preparati ad una concentrazione di  $1 \cdot 10^{-4}$  M; gli spettri sono stati acquisiti nello stesso tampone utilizzato per gli esperimenti NMR, sfruttando uno spettrofotometro JASCO 715 CD, accoppiato a una cella programmabile, termoelettricamente controllata (JASCO PTC-348).

La lunghezza d'onda è stata variata da 220 a 320 nm alla velocità di  $100 \text{ nm min}^{-1}$ . Le misure sono state effettuate a  $20^\circ\text{C}$ , utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm. Gli spettri CD sono stati registrati con una risposta di 16 s e un'ampiezza di banda di 2.0 nm. Agli spettri dei campioni è stato sottratto lo spettro del tampone.



Le curve di fusione sono state ottenute raccogliendo i dati nel *range* tra 20°C e 90°C, alla lunghezza d'onda del loro massimo effetto Cotton (294 nm). I dati di CD melting sono stati registrati nello stesso tampone degli esperimenti NMR, utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm con una velocità di scansione di 10°C/h.

#### *Saggio del tempo di protrombina*

Campioni di plasma umano sono stati raccolti mediante puntura venosa, in presenza di 0.1 volumi di citrato di sodio al 3.8% e successivamente frazionati mediante centrifugazione a 2000g per 5 minuti. I tempi di PT sono stati misurati usando un apparecchio Koagulab MJ Coagulation System con uno specifico kit RecombiPlas Tin HemosIL (Inst. Labs, Lexington, USA). In breve, questo metodo si basa su un reagente trombolastinico ad alta sensibilità basato su un fattore ricombinante di tessuto umano. L'aggiunta di ricombiplastina al plasma in presenza di ioni calcio determina l'attivazione del *pathway* estrinseco. Questo determina la conversione del fibrinogeno in fibrina, con formazione di un gel solido. La procedura è stata eseguita secondo manuale. TBA, **1** o il veicolo (PBS) sono stati aggiunti in differenti momenti in aliquote di volume di 2 µl fino ad arrivare alla concentrazione finale di 20 µM. I dati sono espressi come  $media \pm s.e.m.$  e sono rappresentativi di almeno tre diverse misure.

## ***Bibliografia***

1. A. Bradbury, A. Cattaneo, *Trends Neurosci.*, **1995**, 18, 243-249.
2. T. Clacson, J. A. Wells, *Trends Biotechnol.*, **1994**, 12, 173-184.
3. C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **1990**, 249, 505-510.
4. L.C., Griffin, G.F., Tidmarsh, L.C., Bock, J.J., Toole, L.K. Leung, *Bloods*, **1993**, 81, 3271-3276.
5. W.X., Li, A.V., Kaplan, G.F., Grant, J.J., Toole, L.K. Leung, *Blood*, **1994**, 83, 677-682.
6. G.-X., He, S.H., Krawczyk, S., Swaminathan, S.G., Regan, J.P., Dougherty, T., Terhorst, V.S., Law, L.C., Griffin, S., Coutrè, N. Bischofberger, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2234-2242.
7. A. I. H. Murchie, F. Aboul-ela, G. Laughlan, B. Luisi, D. M. J. Lilley, *J. Nucleic Acids Mol. Biol.*, **1995**, 9, 143-164.
8. C. C. Hardin, E. Henderson, T. Watson, J. K. Prosser, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4460-4472.
9. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 1244-1287.
10. N. Spackova, I. Berger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5519-5534.
11. I. Haq, J. O. Trent, B. Z. Chowdhry, T. C. Jenkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1768.
12. W. S. Ross, C. C. Hardin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6070-6080.

- 13.N. V. Hud, F. W. Smith, F. A. L. Anet, J. Feigon, *Biochemistry*, **1996**, 35, 15383-15390.
- 14.R. Conrad, L. M. Keranen, A. C. Newton, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 32051-32054.
- 15.S.M., Nimjee, C.P., Rusconi, B.A. Sullenger, *Annual Review of Medicine*, **2005**, 56, 555-583,
- 16.L.C., Block, L.C., Griffin, J.A. Latham, E.H., Vermaas, J.J. Toole, *Nature*, **1992**, 355, 564-566.
- 17.K.Y., Wang, S., McCurdy, R.G., Shea, S., Swaminathan, P.H. Bolton, *Biochemistry*, **1993**, 32,1899-1904.
- 18.R.F., Macaya, P., Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 3745-3749.
- 19.L.R., Paborsky, S.N., McCurdy, L.C., Griffin, J.J., Toole, L.K. Leung, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 20808-20811.
- 20.C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. De Leeuw, C. Altona, *Org. Magn. Reson.*, **1981**, 15, 43-52.
- 21.W. P. Aue, E. Batholdi, R. R. Ernst, *J. Chem Phys.*, 1976, 64, 2229-2246.
- 22.G. Wider, *Progr. NMR Spectrosc.*, 1998, 32, 193-275.
- 23.E., Dias, J.L., Battiste, J.R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4479-4480.

- 24.G.-X., He, J.P., Williams, M.J., Postich, S., Swaminathan, S.G., Regan, T., Terhorst, V.S., Law, L.C., Griffin, M.T., Cheri, S., Coutrè, N. Bischofberger, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 4224-4231.
- 25.M., Lu, Q. Guo, N.R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 598–601.
- 26.M., Lu, Q. Guo, N.R. Kallenbach, *Biochemistry*, **1993**, 32, 3596–3603.
- 27.I. Smirnov, R.H. Shafer, *Biochemistry*, **2000**, 39, 1462–1468.
- 28.M., Piotto, V. Saudek, V.J. Sklenar, *J. Biomol. NMR*, 1992, **2**, 661-665.
- 29.F.W., Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8682-8692.
- 30.Y., Wang, D.J., Patel, *Structure*, **1993**, 1, 263-282.
- 31.C., Fernandez, T., Szyperski, A., Ono, H., Iwai, S., Tate, M., Kainosho, K Wuthrich,. *J. Biomol. NMR*, **1998**, 12(1), 25-37.
- 32.S. Kim, L., Lin, B.R. Reid, *Biochemistry*, **1992**, 31, 3564-3574.
- 33.N., Zhang, A.T., Phan, D.J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17277-17285.
- 34.Y. Wang, D.J. Patel, *Structure*, **1994**, 2, 1141-1155.
- 35.K.N., Luu, A.T., Phan, V., Kuryavyi, L., Lacroix, D.J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, in press
- 36.A., Ambrus, D., Chen, J., Dai, T., Bialis, R.A., Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res*, **2006**, 34, 2723-2735.
- 37.R. Lavery, H. Sklenar, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1988**, 6, 63-91.
- 38.R. Lavery, H. Sklenar, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, 6,655-667.
- 39.K., Padmanachan, A. Tulinsky, *Acta Cryst.*, **1996**, D52, 272-282.

- 40.J., Jeener, B., Meier, H.P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.
- 41.V., Sklenar, M., Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson.*, **1993**, 102, 241-245.
- 42.L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528.
- 43.D., Marion, M., Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **1989**, 85, 393-399.
- 44.S.J., Weiner, P.A., Kollman, D.A., Case, U.C., Singh, C., Ghio, G., Alagona, S., Profeta, P.J. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 765-784.

## Capitolo 6: Classificazione topologica di strutture quadruplex.

### 6.1 Introduzione

Le strutture G-quadruplex hanno rivelato una variabilità strutturale sorprendente. Possono differire sulla base di diversi elementi strutturali, quali l'orientamento relativo dei filamenti, il tipo, le dimensioni, la sequenza e il numero di loop che li connettono (laddove sono presenti) che, a sua volta, determina la molecolarità del complesso, l'angolo di torsione glicosidico *syn/anti* dei residui di guanina, etc.

Data l'estrema complessità e variabilità di tali strutture, è molto difficile realizzare una classificazione che tenga conto di tutti gli aspetti precedentemente elencati. La mancanza di regole per una dettagliata descrizione ostacola il confronto fra i risultati riportati da gruppi di ricerca differenti, considerato l'interesse interdisciplinare per le strutture G-quadruplex. Poiché il numero di strutture studiate sta crescendo rapidamente, si avverte concretamente l'esigenza di disporre di un metodo di classificazione generale che consenta un confronto semplice e rapido fra complessi diversi.

A tale scopo si è pensato di proporre una classificazione topologica della maggior parte delle strutture G-quadruplex tenendo conto principalmente di due caratteristiche: orientamento relativo dei filamenti e la natura dei *loop* che li connettono.

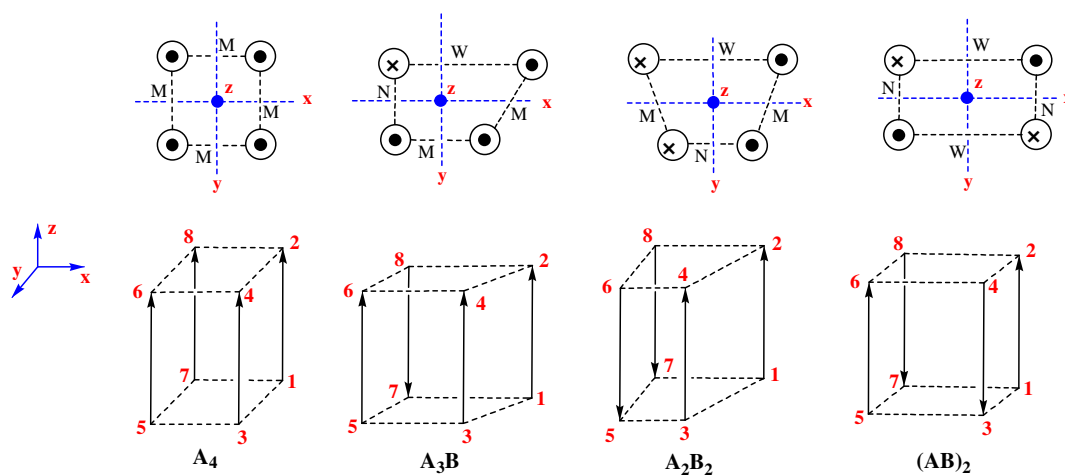
La classificazione di strutture G-quadruplex proposta si basa su una serie di caratteristiche gerarchiche:

- 1) Orientamento relativo dei filamenti.
- 2) Numero di *loop* che connettono i filamenti.
- 3) Connettività dei *loop*.
- 4) Sequenza (dimensione dei *loop* e dei tratti di G coinvolti nella formazione di tetradi).
- 5) Conformazione glicosidica *syn/anti* dei residui di G.

### ***6.2 Orientamento relativo dei filamenti***

Riguardo all'orientamento relativo dei filamenti, sono stati osservati tutti i casi teoricamente possibili. Le strutture quadruplex possono essere “parallele”, “antiparallele” (di due tipi) o “miste parallele/antiparallele”, spesso indicate come 3+1. Per indicare le varie G-quadruplex caratterizzate da un diverso orientamento relativo dei filamenti si è proposto l'utilizzo della seguente semplice nomenclatura: AAAA (o  $A_4$ ) per le quadruplex parallele, AAAB (o  $A_3B$ ) per quelle miste parallele/antiparallele e AABB (o  $A_2B_2$ ) e ABAB (o  $(AB)_2$ ) per i due tipi di strutture antiparallele, in cui A indica filamenti che puntano verso l'alto e B filamenti che puntano verso il basso (**Fig.97**). Grazie alle differenti dimensioni dei solchi, queste quattro famiglie principali sono caratterizzate da proprietà di simmetria diverse. Limitando la

nostra discussione agli assi, la famiglia  $A_4$  possiede un asse di simmetria quaternario (asse Z), la famiglia  $A_2B_2$  possiede un asse di simmetria binario (asse Y), la famiglia  $(AB)_2$  possiede tre assi di simmetria binari (assi X, Y e Z), mentre la famiglia  $A_3B$  non possiede assi di simmetria.



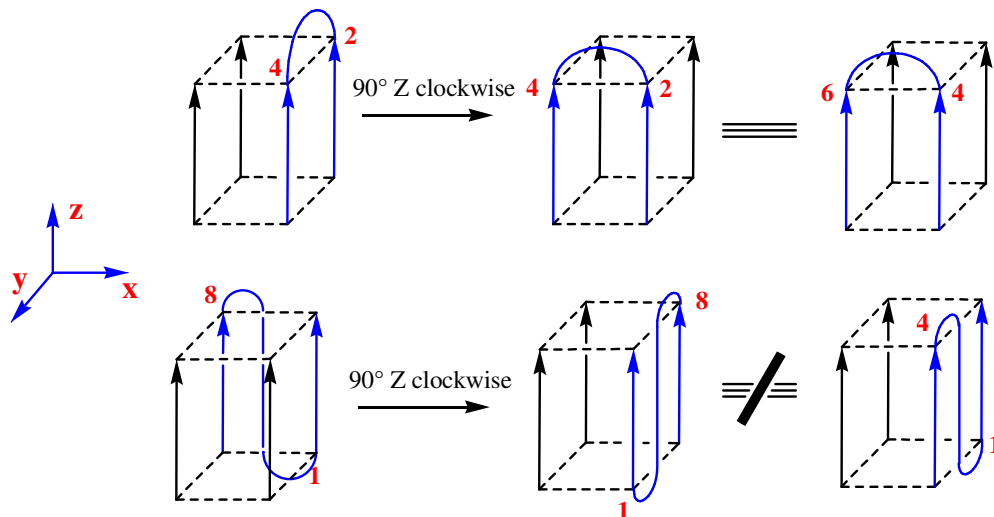
**Fig. 97** Strutture delle quattro famiglie principali e sistema di numerazione delle estremità proposto. I filamenti sono disposti in accordo con le dimensioni dei solchi nei vari complessi. La parte superiore della figura mostra una visione dall'alto delle strutture, dove le estremità 5' sono indicate da una x e le estremità 3' da un punto.

### 6.3 Numero dei loop che connettono i filamenti e loro connettività.

Ciascuna delle quattro famiglie principali già descritte può essere divisa in sotto-famiglie, in primo luogo, tenendo conto del numero di *loop* presenti (uno, due, tre o quattro) e, in secondo luogo, tenendo conto delle connettività dei *loop*. Data la possibile presenza di siti di inversione di polarità 3'-3' o 5'-5', le quadruplex possono mostrare tra i *loop* diversi tipi di connettività, che differiscono per ciascuna delle quattro famiglie principali grazie al diverso tipo di simmetria che le caratterizza. Allo scopo di classificare tutti i tipi di



*loop* è essenziale indicare le otto estremità (quattro 3' e quattro 5'), presenti in una struttura quadruplex impiegando i numeri da 1 a 8 (**Fig.97**). Per convenzione, le strutture sono disposte in modo tale che la maggior parte dei filamenti punti verso l'alto in direzione 5'-3', i numeri identificativi dei *loop* sono assegnati a partire dall'estremità 5' di un filamento che punta verso l'alto e proseguendo in senso orario in modo da assegnare i numeri più piccoli ai filamenti che puntano verso l'alto. Le estremità nella porzione inferiore della struttura sono indicate da numeri dispari, mentre le estremità presenti nella parte superiore sono individuate da numeri pari (**Fig.97**). Questo sistema di numerazione convenzionale ci permette di identificare ciascun *loop* mediante un numero a due cifre che indica le estremità connesse.



**Fig. 98** Equivalenza topologica.

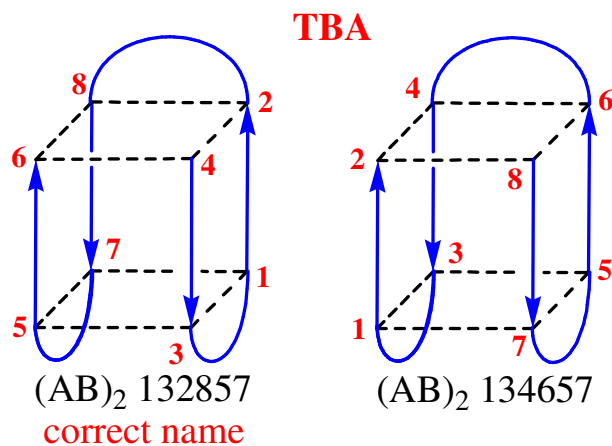
Dato che ciascuna famiglia principale è caratterizzata da distinte proprietà di simmetria, molti *loop* risultano topologicamente equivalenti. In questi casi si assume come numero corretto del *loop* quello più basso. Per esempio, nella

famiglia  $A_4$  i *loop* 24 e 46 sono topologicamente equivalenti dato che risultano tra loro sovrapponibili dopo una rotazione di  $90^\circ$  in senso orario del complesso che contiene il *loop* 24, intorno all'asse Z. Invece, i *loop* 18 e 14 non sono topologicamente equivalenti, dato che non possono essere sovrapposti mediante qualsiasi rotazione della struttura (**Fig.98**).

È evidente che, nel caso di quadruplex che contengano più di un *loop*, il numero di strutture teoricamente possibili diviene notevolmente elevato. La **Tabella 1** elenca la quantità di strutture non topologicamente equivalenti presenti in ciascuna famiglia principale e in ciascuna sotto-famiglia. Anche se risulta un numero totale apparentemente ingestibile, ogni struttura topologica può essere identificata da una sequenza di numeri a due cifre, dal più piccolo al più grande, indicanti ciascuno un tipo di *loop*. Per esempio la quadruplex  $(AB)_2$  132857 contiene i tre *loop* 13, 28 e 57 e corrisponde alla struttura dell'aptamero legante la trombina (TBA). Utilizzando un sistema di numerazione alternativo il nome potrebbe essere  $(AB)_2$  134657. In questo caso si preferisce il numero più basso (il primo indicato) (**Fig.99**).

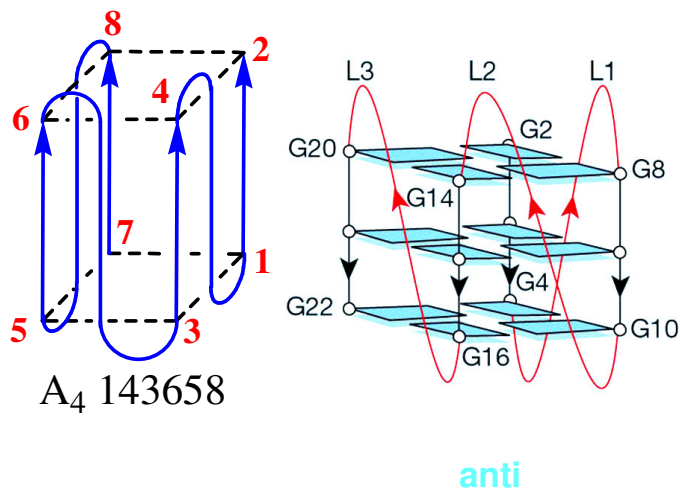
	0 loops	1 loop	2 loops	3 loops	4 loops	total
AAAA	1	8	58	112	35	214
AAAB	1	28	210	420	105	764
AABB	1	16	114	224	65	420
ABAB	1	10	66	126	45	248
	4	62	448	882	250	1646

**Tabella 1**

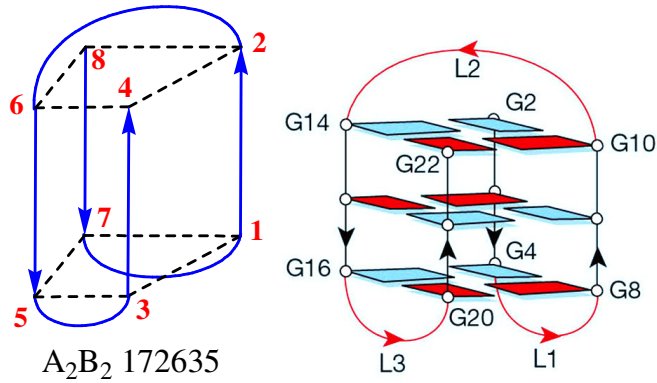


**Fig. 99**

Allo stato attuale sono state investigate solo poche strutture rispetto al numero totale di possibilità topologiche. Alcuni esempi degni di nota, con relativa classificazione, presenti in letteratura sono riportati di seguito.

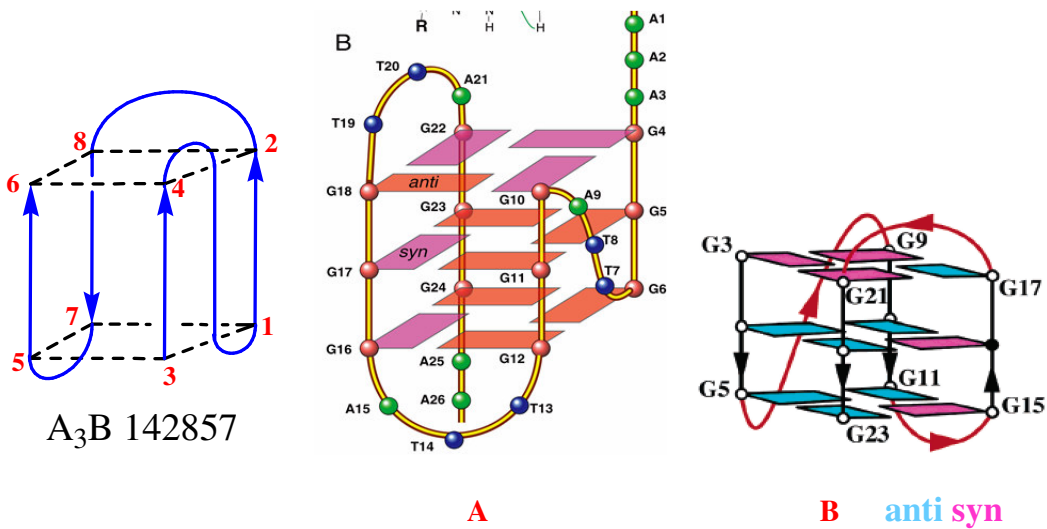


Human tel. seq. AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>;  
 K<sup>+</sup> form; X-ray  
 Nature 2002, 417, 876-880.



anti syn

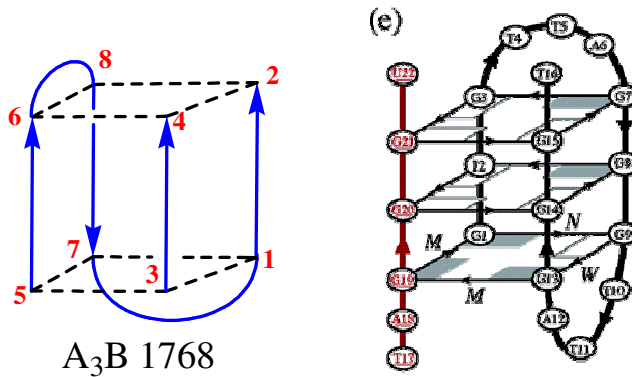
Human tel.seq.AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>; Na<sup>+</sup> form; NMR  
Structure 1993, 1, 263-282.



(a) Mod. human tel seq.  $A_3(GGGTTA)_3G_3A_2$ ;

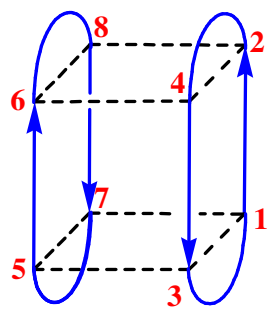
NAR 2006, 34, 9, 2723-2735.

(b) Human tel.seq. [T(TAGGG)<sub>4</sub>]; JACS 2006, 128, 9963-9970.

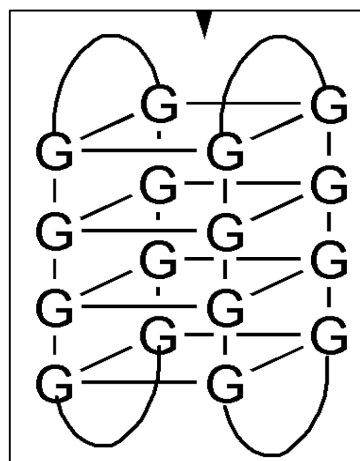


Association of two human telomeric sequences;

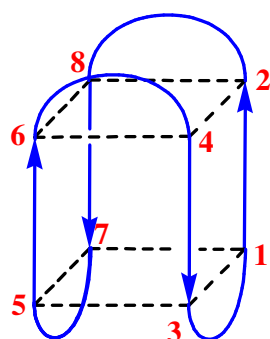
JACS 2005, 127, 17277-17285.



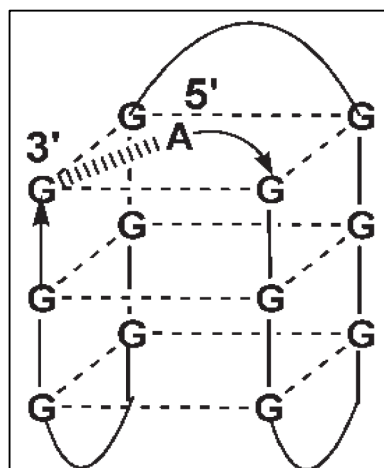
(AB)<sub>2</sub> 13245768



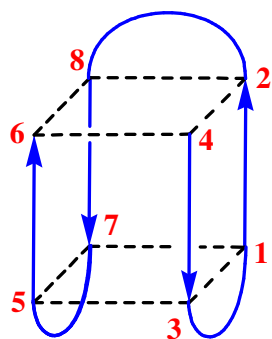
Synthesized by chemical ligation  
Chem. Comm. 2002, 2686-2687.



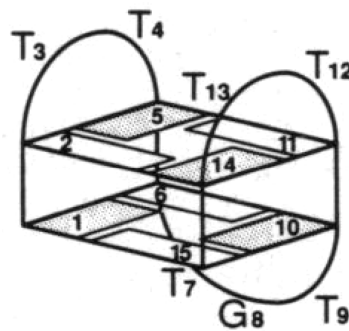
(AB)<sub>2</sub> 13284657



Synthesized by covalent ligation  
NAR 2005, 33, 10, 3185-3192.

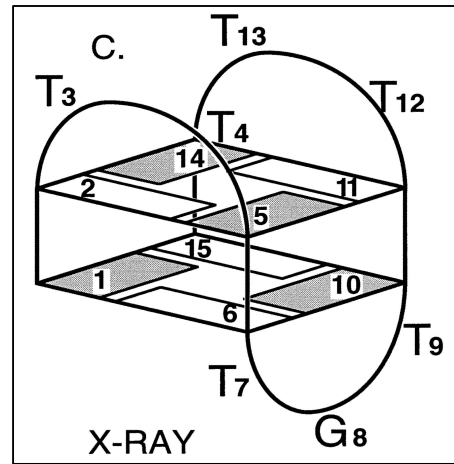
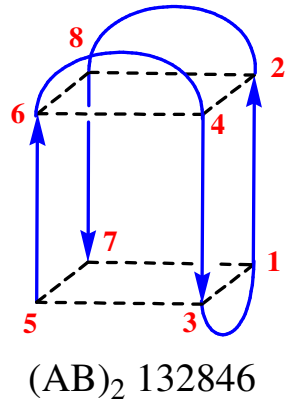


(AB)<sub>2</sub> 132857

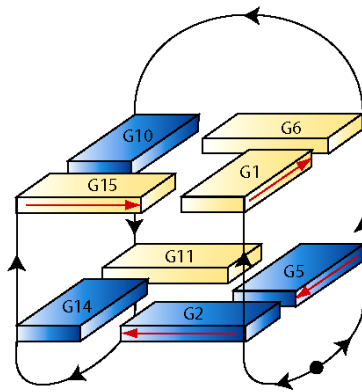
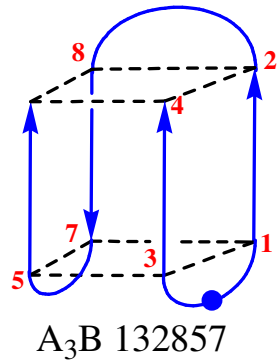


anti syn

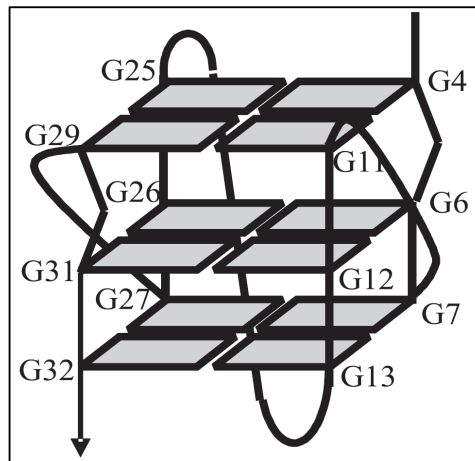
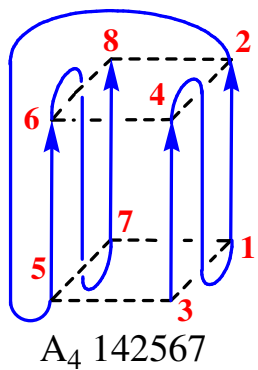
Thrombin binding aptamer (TBA); NMR  
PNAS 1993, 90, 3745-3749.



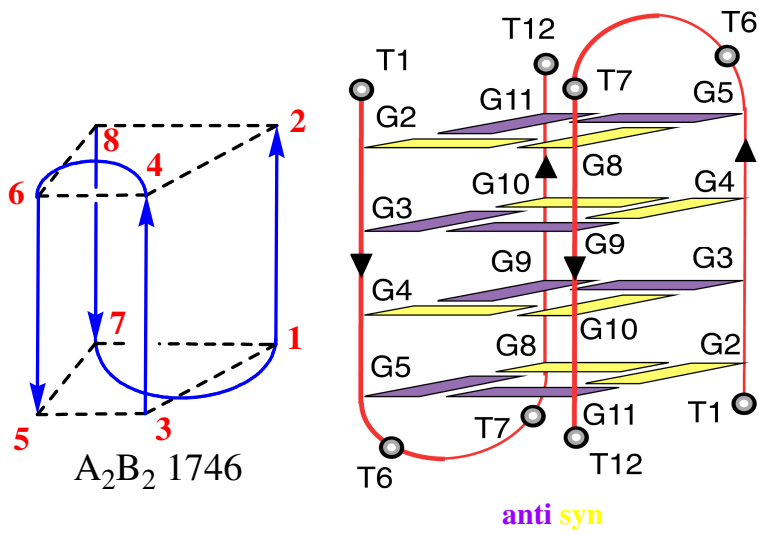
Thrombin binding aptamer (TBA);  
X-ray  
J. Biol. Chem. 1993, 268, 17651.



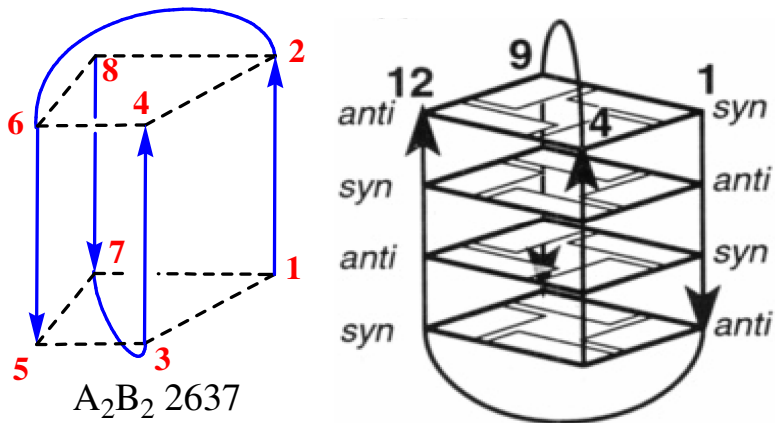
TBA analogue containing a 5'-5' inversion of polarity site (blue dot);  
NAR 2006, in press.



anti  
Proposed for the *KRAS* proto-oncogene promoter  
NAR 2006, 34, 9, 2536-2549.



Tetrahymena telomeric seq.  
 [(TGGGGT)<sub>2</sub>]; Na<sup>+</sup>  
 J. Mol. Biol. 2004, 338, 93-102.



Sequences [(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]  
 Biochemistry 1993, 32, 8682-8692.