

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE

XIX CICLO

**Caratterizzazione chimico-fisica di quadruple
eliche di DNA**

Candidata: Dott.ssa Ida Duro
Tutore: Ch.mo Prof. Guido Barone
Relatore: Ch.ma Prof.ssa Daniela Montesarchio
Coordinatore Ch.ma Prof.ssa Rosa Lanzetta

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

ABSTRACT

G-rich DNA sequences can adopt unusual four-stranded DNA structures, called DNA G-quadruplex [1]. The fundamental building block of these structures is the G-tetrad (also called G-quartet) [2]. The G-tetrad consists of a planar arrangement of four guanine bases associated through a cyclic array of hydrogen bonds in which each guanine base accepts and donates two hydrogen bonds. The formation of G-quadruplexes requires the presence of metal cations playing a key role in the stabilization by coordinating between adjacent stacks of G-tetrad via the four electronegative O6 guanine carbonyl groups, which are directed toward the centre of each tetrad.

G-quadruplexes biomedical relevance has recently expanded, due to the identification of two potential applications:

- 1) Anticancer therapy [3];
- 2) Design of novel aptameric nucleic acids as tools aimed at binding and inhibiting particular proteins [4].

The first application comes from the observation that G-quadruplexes formation at the 3'-end of telomeres may inhibit the telomerase enzyme, an event which can induce cancer cells to escape senescence [5-6].

Several ligands have been shown to inhibit telomerase and to bind to quadruplexes formed by the human telomeric DNA. The induction of quadruple formation in telomeric DNA 3'-overhang repeats by ligands would favour the telomerase inhibition, so that these ligands would be potential anticancer agents [7-8]. In other words, drugs that stabilize quadruplex structures inhibit the telomerase activity, because this enzyme requires a single-strand template.

The second application is due to the ability of aptamers based on the quadruplex motif to specifically bind particular proteins.

Aptamers are small nucleic acid molecules that specifically bind to molecular targets. Targets are a wide range of molecules from proteins to nucleic acids and small molecules. Some aptamers were found to form quadruplex structures. Among these the most studied aptamers are the Thrombin Binding Aptamer (TBA) and the inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) [9].

In some cases, selected aptamers cannot be directly used in vivo, and their properties need to fit living cell conditions. In addition, the utilization of nucleic acids for therapeutic purpose requires their stability under physiological conditions.

The incorporation of modified bases into oligonucleotides may produce useful changes in physical and biological properties of the resulting DNA fragments, due to an increased stability, or higher resistance to nucleolytic enzymes [10].

In this frame, I studied the thermodynamic stability of G-quadruplex-DNA molecules containing different number of G-tetrads respect to the d(TGGGGT) sequence from the 3'-overhang of *Oxytrichia* telomere. The gel electrophoresis demonstrates that the oligonucleotides d(TGGGT), d(TGGGGT) and d(TGGGGGT) form single quadruplex. CD spectra of the studied sequences were characteristic of parallel-stranded, tetramolecular quadruplexes. The thermodynamic parameters of quadruplex dissociation were obtained from the equilibrium CD spectra. Taking into account that the rates of quadruplex formation/dissociation are extremely slow, to avoid a kinetic influence on the collected data, we allowed thermodynamic equilibrium to be reached at each temperature. Analysis of the thermodynamic data reveals that the addition of one G-tetrad greatly increases both the enthalpy and melting temperature (T_m) values of the quadruple dissociation. Particularly, the subtraction of one G-tetrad to the telomeric sequence d(TGGGGT) decreases the thermal stability by about 10 °C whereas the addition of one G-tetrad strongly increases the thermal stability by about 52 °C.

Another subject of my research was the thermodynamic characterization of structural modifications of two different truncations of the human telomeric sequence: d(AGGGT) and d(TAGGGT). NMR studies suggest that the quadruplex [d(AGGGT)]₄ is characterized by an A-tetrad at the 5' terminal where four As are held together by H-bonds in a plane and each A is in a *syn* glycosidic conformation. In contrast, no A-tetrad has been observed in the quadruplex [d(TAGGGT)]₄ [11]. The adenines of the human telomeric repeat oligonucleotide d(AGGGT) and d(TAGGGT) were substituted by 2'-deoxy-8-(hydroxyl)-adenosine, 2'-deoxy-8-(propyn-1-yl)adenosine or by 8-bromodeoxyadenosine. The biophysical properties of the resulting quadruplex structures were compared with the unmodified quadruplexes.

The unfolding of the quadruplexes was investigated using circular dichroism. The sequences exhibited a spectrum characterized by a positive band at 263 nm and a negative

band at 245 nm. These spectra are characteristic of parallel-stranded, tetramolecular quadruplexes. The analysis of the thermodynamic parameters reveals that the introduction of the 2'-deoxy-8-(propyn-1-yl) adenosine or of the 8-bromodeoxyadenosine stabilizes both the [d(AGGGT)]₄ and [d(TAGGGT)]₄ quadruplexes in comparison with the unmodified quadruplexes. On the other hand, the introduction of the hydroxyl in position 8 of adenosine in the [d(AGGGT)]₄ quadruplex does not change the thermodynamic stability of the resulting quadruplex whereas destabilises the [d(TAGGGT)]₄ quadruplex.

Another modified nucleotide used in my research was the 8-bromodeoxyguanosine residue (dG^{Br}). Particularly, I characterised the tetramolecular quadruplexes formed by the oligonucleotide d(TGGGT), where two or three guanosines are substituted by 8-bromodeoxyguanosine residues (dG^{Br}). The oligonucleotides used were:



The physico-chemical characterization has been performed by means of circular dichroism. The spectra of the unmodified sequence show the signature bands for the quadruplexes involving four parallel strands, a positive band at 263 nm and a negative band at 243 nm, whereas the introduction of the 8-Br-dG residues causes significant changes over the whole range of the CD spectra. The thermodynamic parameters were obtained from the analysis of the CD melting. Interestingly, the introduction of two 8-Br-dG residues in different positions of the same sequence d(TGGGT) affects in opposite way the thermodynamic stability of the canonical [d(TGGGT)]₄ quadruplex. Indeed, the substitution of the two adjacent dG residues near the dT at the 5' and 3' position, as for [d(TG^{Br}G^{Br}GT)]₄, results in a more stable quadruplex in comparison with the unmodified. The same substitution of the two non adjacent dG residues near the dT at the 5' and 3' position, as for [d(TG^{Br}GG^{Br}T)]₄ results in a decrease in thermodynamic stability. In the last year of my PhD. course, my attention has been focused on the tetramolecular quadruplex formed by the sequence d(TGGGAG). Recently, Hotoda and co-workers demonstrated that the sequence d(TGGGAG), decorated with large aromatic groups at their 5'-end, are potent anti-HIV active compounds [12]. Interestingly, the lead sequence ^{5'}d(TGGGAG)^{3'} was found to be

inactive against HIV-1 without end modifications, and active at μM concentrations when 5'-conjugated with aromatic groups [13-14]. This antiviral activity was correlated with the ability of G-rich sequences to form stable quadruplex structures, postulated to be the species directly interacting with the *in vivo* targets. An interesting modifications proposed to improve the pharmacological profile of these oligonucleotides is the linkage of one or two saccharide residues at the 3' and 5' ends [15]. Glyco-conjugation increases nucleases resistance and cell uptake and can also reduce unwanted aggregation. In this frame, I characterised a set of model glyco-conjugated oligonucleotides carrying Hotoda's sequence d($5'\text{TGGGAG}^3'$) with one or two saccharide residues at the 3' or at the 5' ends. The studied sequences were:

SEQUENCE (5'-3')
$5'\text{TGGGAG}^3'$ (a)
glucose- $5'\text{TGGGAG}^3'$ (b)
$5'\text{TGGGAG}^3'$ -glucose (c)
sucrose- $5'\text{TGGGAG}^3'$ (d)
$5'\text{TGGGAG}^3'$ -sucrose (e)
mannose- $5'\text{TGGGAG}^3'$ (f)
$5'\text{TGGGAG}^3'$ -mannose (g)

The thermodynamic parameters for the dissociation of the quadruplexes formed by the glyco-conjugated oligonucleotides were compared with those of the unmodified [$5'\text{d}(\text{TGGGAG})^3'$]₄ quadruplex. The analysis of the thermodynamic parameters showed that the insertion of a monosaccharide-phosphate residue at the 5' end (b and f) was detrimental to quadruplex formation, while a stabilization was obtained for the 3'-conjugation with the monosaccharides tested (c and g). In the case of the disaccharide moiety, the quadruplexes were destabilized both in the 5' and 3'-conjugation (d and e, respectively).

References

1. Lee, J. S.; Evans, D. H.; Morgan, A., R. *Nucleic Acids Research* **1980**, 8,4305.
2. Guschlbauer, W.; Chantot, J. F.; Thiele, D. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 491.
3. Mokbell, K. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2003**, 19, 470.
4. Wenn, J. D.; Gray, D. M. *Biochemistry*, **2002**, 41, 11438.
5. Wai, L. K. *Med. Gen. Med.*, **2004**, 26, 19.
6. Palombo, M. *Curr. Med. Chem. Anti-Agent*, **2004**, 4, 425.
7. Kelland, L. R. *Lancet Oncol.*, **2001**, 2, 95-102.
8. Alberti, P.; Lacroix, L.; Guittat, L.; H el ene, C.; Mergny, J. L. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2003**, 3, 23.
9. Kusser, W. J. *Biotechnol.*, **2000**, 74, 27-38.
10. Jing, N.; Rando, R. F.; Pommier, Y.; Hogan, M. E. *Biochemistry*, **1997**, 36, 12498
11. Blackburn, E. H. *Cell* **1994**, 77, 621.
12. Hotoda, H., Koizumi, M., Koga, R., Kaneko, M., Momota, K., Ohmine, T., Furukawa, H., Agatsuma, T., Nishigaki, T., Sone, J., Tsutsumi, S., Kosaka, T., Abe, K., Kimura, S., and Shimada, K. **1998** *J. Med. Chem.*, 41, 3655.
13. Koizumi, M., Kaneko, M., Ohmine, T., Furukawa, H., Nishigaki, T **1999** Patent JP98/04625, PCT/WO99/19474.
14. Keniry, M.A. **2001**, *Biopolymers*, 56, 123.
15. Adinolfi, M.; De Napoli, L.; Di Fabio, G.; Iadonisi, A. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1879.

INDICE

CAPITOLO 1

Quadruple eliche di DNA

1.1 Introduzione	9
1.2 Importanza delle quadruple eliche	13
1.3 Sistemi studiati	19

CAPITOLO 2

Metodi e Materiali

2.1 Dicroismo circolare	21
2.1.1 Curve di equilibrio	25
2.2 Calorimetria Differenziale a Scansione	26
2.3 Elettroforesi	30
2.4 preparazione delle soluzioni	32
2.5 Analisi Termodinamica	34

CAPITOLO 3

Quadruple eliche contenenti diversi numeri di G-tetradi

3.1 Introduzione	37
3.2 Analisi dei parametri termodinamici delle quadruple eliche [d(TGGGT)] ₄ , [d(TGGGGT)] ₄ [d(TGGGGGT)] ₄	39

CAPITOLO 4

Quadruple eliche formate da DNA telomerico umano modificate.

4.1 Introduzione	45
4.2 Analisi dei parametri termodinamici del processo di dissociazione delle quadruple eliche [d(AGGGT)] ₄ e [d(TAGGGT)] ₄	48
4.3 Analisi degli spettri CD delle quadruple eliche di DNA	

[d(TA ^{OH} G ₃ T)] ₄ , [d(TA ^{Br} G ₃ T)] ₄ , [d(TA ^{Pr} G ₃ T)] ₄ , [d(A ^{OH} G ₃ T)] ₄	
[d(A ^{Br} G ₃ T)] ₄ e [d(A ^{Pr} G ₃ T)] ₄	53
4.4 Conclusioni	59
CAPITOLO 5	
Quadruple eliche contenenti residui 8-bromo-guanine.	
5.1 Introduzione	61
5.2 Analisi degli spettri CD delle quadruple eliche di DNA	
[d(TGGGT)] ₄ , [d(TG ^{Br} G ^{Br} GT)] ₄ , [d(TG ^{Br} GG ^{Br} T)] ₄	63
CAPITOLO 6	
Quadruple eliche contenenti all'estremità 3' o 5' residui monosaccaridici e disaccaridici.	
6.1 Introduzione	67
6.2 Risultati e discussioni	69
6.3 Analisi termodinamica delle quadruple eliche	72
6.4 Conclusioni	83
Bibliografia	84

CAPITOLO 1

QUADRUPLE ELICHE DI DNA

1.1 Introduzione

Le sequenze di DNA ricche in guanine hanno la capacità di ripiegarsi su se stesse formando le *quadruple eliche di DNA* [1,2]. Una quadrupla elica si forma grazie alla capacità delle basi di guanine di organizzarsi in unità dette G-tetradi, che consistono in un arrangiamento co-planare delle quattro basi azotate associate attraverso legami ad idrogeno Hoogsteen [3] (fig.1.1). I piani delle G-tetradi non si sovrappongono perfettamente ma sono leggermente ruotati tra loro, dando luogo ad una quadrupla elica destrorsa

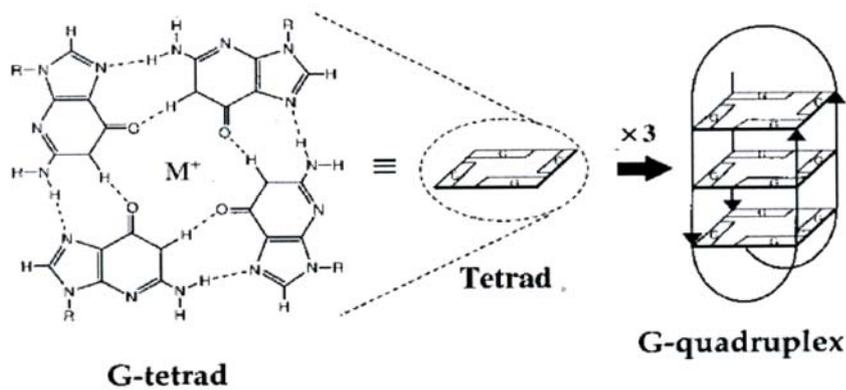


fig.1.1 Disposizione di una tetrade di guanine in quadrupla elica.

Alla stabilità totale della struttura contribuiscono i legami ad idrogeno e le interazioni di “stacking” tra piani successivi di tetradi, distanti circa 3.4 Å. Inoltre la sovrapposizione delle tetradi di guanine crea all’interno di una quadrupla elica una cavità cilindrica, in cui si affacciano gli otto ossigeni carbonilici delle guanine, la cui caratteristica è la selettiva interazione con alcuni ioni metallici, mono e bivalenti che bene si adattano alla cavità.

Gli ioni non hanno tutti la stessa specificità, alcuni conferiscono una maggiore stabilità termodinamica rispetto ad altri, ciò è dovuto alla grandezza stessa dello ione ed al modo in cui esso occupa lo spazio disponibile. Nell'interazione i vari ioni perdono l'acqua di idratazione.

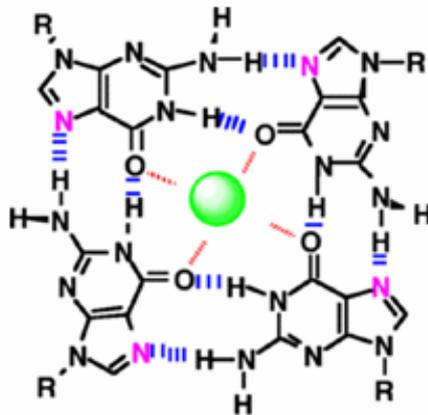


fig.1.2 Coordinazione ad opera degli ioni metallici.

Studi precedenti hanno permesso di creare delle scale di stabilizzazione sia per gli ioni alcalini che per gli ioni alcalino-terrosi, che conferiscono stabilità nel seguente ordine: $K^+ > Na^+ >> Rb^+ > Cs^+ >> Li^+$, e $Sr^{2+} >> Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ [4].

Tra questi, gli ioni K^+ e Sr^{2+} , avendo un raggio ionico di circa 1.3 Å sono quelli che meglio si adattano alla cavità tra due G-tetrad e quindi contribuiscono a dare una maggiore stabilità termodinamica. L'aggiunta di Li^+ invece esercita una forte inibizione alla formazione di ogni specie di quadrupla elica [5].

La concentrazione ed il tipo di ione presente in soluzione, oltre a stabilizzare la quadrupla elica, influiscono anche sulla sua conformazione.

Le quadruple eliche possono avere diversa struttura, dettata dalla molecolarità, dall'orientazione dei filamenti e dalla conformazione del legame glicosidico tra la base azotata e lo zucchero deossiribosio (fig 1.3).

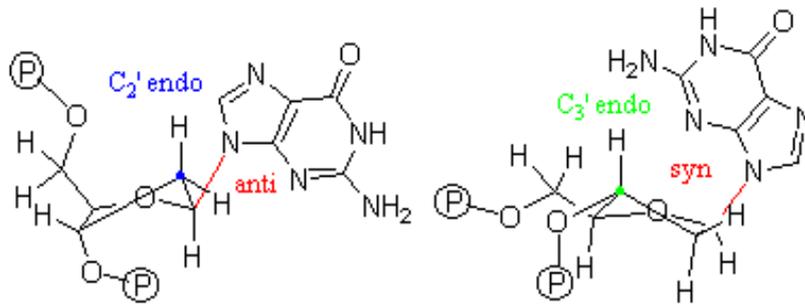


fig.1.3 Rotazione intorno al legame N-glicosidico.

Una quadrupla elica può formarsi attraverso due processi: intramolecolare o intermolecolare. Nel primo processo interviene un singolo filamento di DNA che si ripiega su se stesso, e la quadrupla elica risultante è monomolecolare (fig.1.4a). Nel secondo processo possono intervenire due o quattro filamenti, e la quadrupla elica risulta essere rispettivamente bimolecolare (fig.1.4b) o tetramolecolare (fig.1.4c) [6].

I filamenti costituenti la quadrupla elica di DNA possono trovarsi tutti paralleli tra loro, tre paralleli ed uno antiparallelo, due paralleli e due no ed in quest'ultimo caso, quelli con la stessa orientazione possono trovarsi adiacenti o alternati (fig.1.4).

È dimostrato che è possibile indurre transizioni strutturali antiparallelo-parallello o bimolecolare-tetramolecolare, variando lo ione o la forza ionica della soluzione [7].

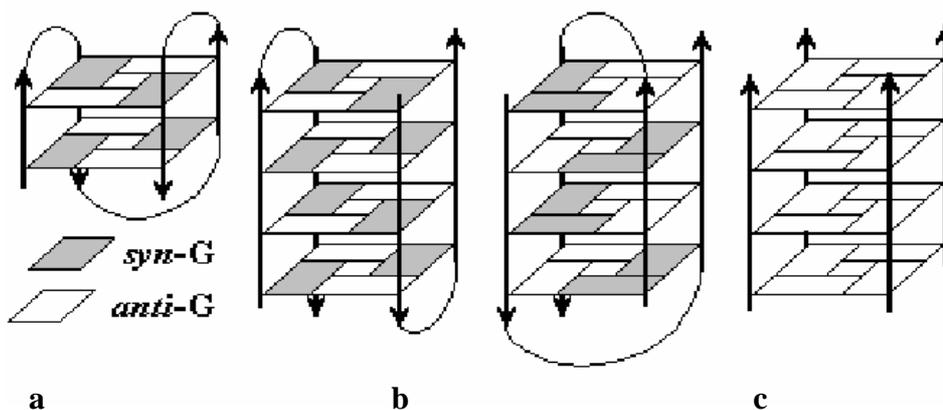


fig.1.4 Esempi di strutture con molecolarità diversa.

La conformazione del legame glicosidico tra la base azotata e lo zucchero, influenza la grandezza dei solchi laterali tra i filamenti di DNA.

Se le guanine sono tutte in conformazione *anti*, i quattro solchi sono tutti identici e sono di lunghezza media (fig.1.5a); se l'orientazione è di tipo *syn-syn-anti-anti*, si generano due solchi medi, uno piccolo e uno grande (fig.1.5b); infine se l'orientazione è di tipo *syn-anti-syn-anti* si formano due solchi più stretti e due più larghi (fig.1.5c).

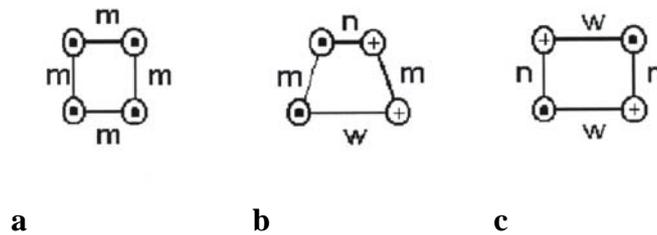


fig.1.5 Le differenti conformazioni creano solchi di diversa grandezza.

1.2 Importanza biologica delle quadruple eliche

Le strutture a quadrupla elica hanno riscosso un notevole interesse principalmente per il loro possibile utilizzo *in vivo*. Infatti, le sequenze ricche in guanine sono presenti in zone del genoma umano di rilevanza biologica, ad esempio alla fine del cromosoma eucariotico come complesso telomero-proteina (fig 1.6); nelle regioni switch di immunoglobuline; in regioni promotrici e in sequenze associate a malattie umane [5,8].

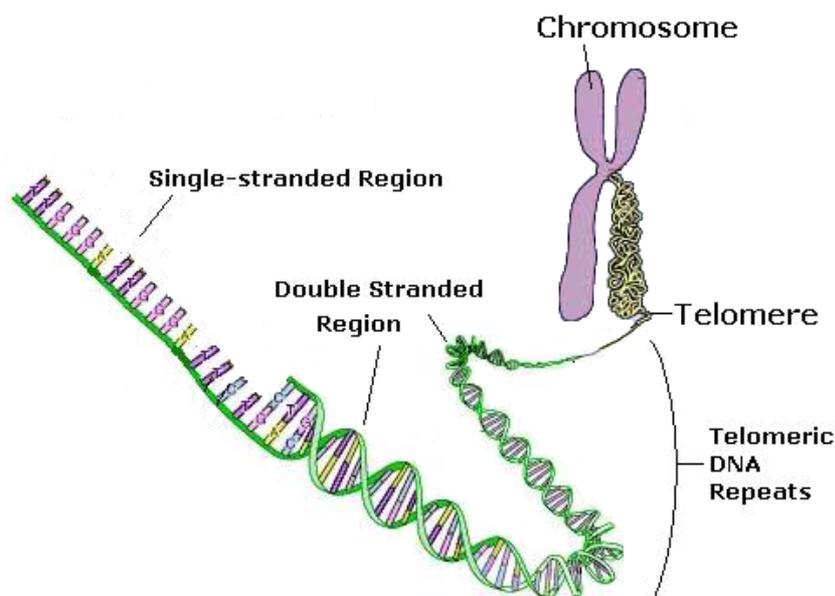


fig.1.6 DNA telomerico degli eucarioti

Oltre ad un loro potenziale ruolo biologico *in vivo*, l'importanza delle quadruplex in campo biomedico è stata recentemente riconosciuta per due possibili applicazioni:

- 1) nella terapia anticancro [9];
- 2) nella progettazione di nuovi oligonucleotidi (aptameri) che riconoscono ed inibiscono particolari proteine [10].

La prima applicazione deriva dall'osservazione che la formazione di G-quadruplex alle estremità 3' dei telomeri può inibire l'enzima telomerasi,

una nucleoproteina che ha il compito di conservare la lunghezza dei cromosomi.

Il DNA telomerico comprende una sequenza di oligonucleotidi estremamente breve e semplice, TAGGGT, ripetuta varie volte. Nelle normali cellule somatiche, durante il processo di replicazione, i telomeri progressivamente si accorciano poiché l'enzima DNA polimerasi non copia completamente le estremità [11]. Ad ogni ciclo replicativo il DNA telomerico degli eucarioti si accorcia fino ad arrivare ad un punto critico, quindi si arresta la replicazione e vi è l'apoptosi [12, 13]. Nelle cellule germinali e staminali, invece, l'enzima telomerasi previene l'accorciamento catalizzando la sintesi di unità di DNA telomerico. Inoltre, la telomerasi è attiva in molte cellule tumorali favorendone la tumorigenesi [14-17]. Questa differente espressione nelle cellule somatiche e in quelle tumorali è il punto di partenza per la valutazione di inibitori della telomerasi come potenziali agenti anticancro [18-22]. Nel 1991 Zahler e collaboratori hanno verificato che il ripiegamento in quadrupla elica del singolo filamento del DNA telomerico inibisce l'attività telomerasica *in vitro* [23]. Un approccio per inibire la telomerasi nelle cellule tumorali, quindi, è il riconoscimento dell'estremità del DNA telomerico come bersaglio, favorendone la formazione di strutture a quadrupla elica. Sono state individuate diverse molecole che si legano alla sequenza telomerica umana e inibiscono la telomerasi [24]. La formazione di strutture a quadrupla elica promossa dai ligandi favorisce l'inibizione della telomerasi cosicché questi ligandi sono dei potenziali agenti antitumorali.

Le strutture G-quadruplex sono anche coinvolte nel controllo della trascrizione dell'oncogene c-MYC la cui superespressione è associata con una varietà di differenti tumori umani [25, 26]. In molti casi i ligandi delle G-quadruplex, che inibiscono la telomerasi, stabilizzano la quadruplex intermolecolare del promotore del c-MYC e possono essere potenzialmente utilizzati per inibire il gene di trascrizione del c-MYC in cellule tumorali.

La seconda applicazione è dovuta all'abilità di oligonucleotidi strutturati in quadrupla elica a legare specificamente e ad inibire le funzioni di particolari proteine.

Piccole molecole di acido nucleico che si legano in modo specifico a molecole "target" sono dette aptameri. Gli aptameri possono essere utilizzati come agenti terapeutici. Un modo per ottenere oligonucleotidi con grande affinità e specificità per molecole bersaglio è la tecnologia SELEX (Evoluzione sistematica dei ligandi per arricchimento esponenziale) [27].

Aptameri formanti strutture a quadrupla elica sono risultati potenti inibitori dell'integrasi dell'HIV-1, l'enzima responsabile dell'inserzione del DNA virale in quello della cellula ospite, e della trombina [28]. In alcuni casi gli aptameri sintetizzati non possono essere direttamente utilizzati *in vivo* e le loro proprietà sono funzione delle condizioni in cui si trova la cellula vivente. Dunque, l'utilizzo di acidi nucleici per scopi terapeutici richiede che siano stabili in condizioni fisiologiche.

L'incrementata abilità nella sintesi di oligonucleotidi modificati, nonché lo sviluppo di studi biofisico-chimici, hanno permesso di creare aptameri con migliori proprietà chimico-fisiche e biologiche, con conseguente e significativo impatto sulle biotecnologie e sullo sviluppo di farmaci.

L'incorporazione di basi modificate in oligonucleotidi può produrre degli utili cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche e biologiche nei risultanti frammenti di DNA, come un'aumentata stabilità e un'elevata resistenza agli enzimi nucleotidici. Diversi nucleotidi modificati sono stati oggetto di studio negli ultimi anni [29].

Un esempio di modifica è l'introduzione di un acido nucleico peptidico, PNA, all'interno della catena principale di acidi nucleici, dando vita a degli ibridi DNA-PNA, le cosiddette DNA-PNA chimere [30,31]. Nel PNA un residuo di 2-amminoetilglicina, prende il posto dello zucchero e del gruppo fosfato all'interno del nucleotide, e le basi sono legate alla catena principale mediante il gruppo carbonil metilene (fig.1.7).

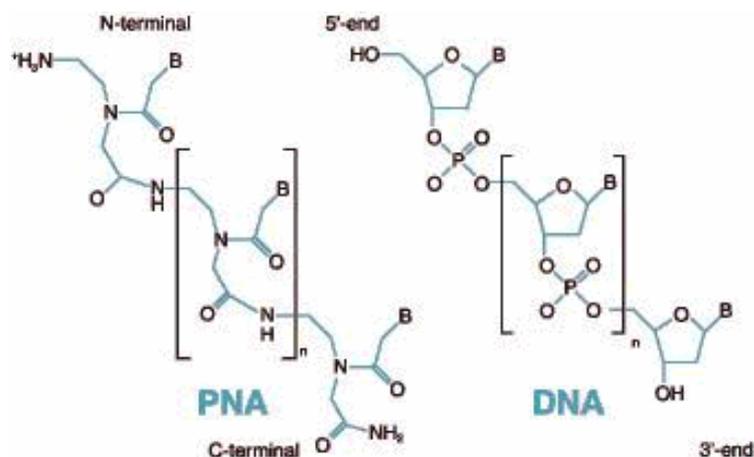


fig.1.7 Struttura del PNA e del DNA.

Le applicazioni del PNA però sono limitate a causa della scarsa solubilità, dell'incapacità ad interagire con determinati enzimi e della difficoltà a penetrare la membrana cellulare[32]. Alcuni di questi problemi sono stati risolti utilizzando le chimere. Le chimere presentano tutte le proprietà caratteristiche sia del DNA che del PNA, infatti sono stabili alle nucleasi e alle proteasi, sono solubili in acqua ed entrano con più facilità nelle cellule [33]. Inoltre, le chimere PNA-DNA formano triple e quadruple eliche più stabili rispetto ai corrispondenti sistemi formati esclusivamente da oligonucleotidi di DNA [34,35]. Questi risultati incoraggiano gli studi sulle chimere PNA-DNA per un loro utilizzo in campo biomedico.

Un'altra valida alternativa ai classici nucleotidi è l'LNA (acido nucleico bloccato), dall'inglese Locked Nucleic Acid, che fu sintetizzato per la prima volta nel 1988. L'LNA contiene un ponte metilenico tra l'O-2' e il C-4' dello zucchero nucleosidico (fig 1.8).

anti, con conseguente effetto sulla stabilità termodinamica della quadrupla elica di DNA.

1.3 Sistemi studiati

Una prima parte del lavoro di tesi ha riguardato la caratterizzazione chimico-fisica di tre sequenze oligonucleotidiche $d(^5TGGGT^3')$, $d(^5TGGGGT^3')$ e $d(^5TGGGGGT^3')$.

I tre oligonucleotidi formano una struttura a quadrupla elica di DNA con la stessa molecolarità, ma contenente rispettivamente tre, quattro e cinque G-tetradi. Lo scopo di tale studio è stato quello di verificare l'influenza del numero di G-tetradi sulla stabilità termodinamica delle quadruple eliche risultanti.

Una seconda parte del lavoro di dottorato ha riguardato la caratterizzazione chimico-fisica di quadruple eliche tetramolecolari contenenti basi modificate. In particolare è stata focalizzata l'attenzione su sequenze derivanti da troncamenti del DNA telomerico umano del tipo $d(AGGGT)$ e $d(TAGGGT)$ e recanti sull'adenina in posizione 8 i seguenti gruppi sostituenti: ossidrilico, bromo e propino. Tali sequenze mostrano particolare interesse in quanto studi NMR hanno rivelato che la quadruplex $[d(^5AGGGT^3')]_4$ presenta una A-tetrate una struttura analoga alla classica G-tetrate. Tale struttura non è presente nella quadruplex $[d(^5TAGGGT^3')]_4$. L'introduzione di questi sostituenti è stato dettato dal tentativo di verificare l'effetto che essi hanno sulla A-tetrate e sulla stabilità complessiva delle quadruple eliche.

Le sequenze studiate sono state indicate nel modo seguente: $d(A^{OH}G_3T)$, $d(TA^{OH}G_3T)$, $d(A^{Br}G_3T)$, $d(TA^{Br}G_3T)$, $d(A^{Pr}G_3T)$ e $d(TA^{Pr}G_3T)$; le proprietà chimico-fisiche delle quadruple eliche formate da tali sequenze sono state poi confrontate con le rispettive quadruplex derivanti da sequenze non modificate.

Un'altra modifica ha riguardato la sostituzione di un atomo di idrogeno in posizione 8 della guanina con il bromo nella sequenza base $d(TGGGT)$. Sono state, quindi studiate le proprietà chimico-fisiche delle seguenti quadruple eliche:

$[d(^5'TG^{Br}GG^{Br}T^{3'})]_4$, $[d(^5'TG^{Br}G^{Br}GT^{3'})]_4$ e poi confrontate con la sequenza non modificate. Infine l'ultima parte del lavoro di dottorato ha riguardato lo studio chimico-fisico di quadruple eliche di sequenza $^5'd(TGGGAG)^{3'}$, contenente all'estremità 5' o 3' residui monosaccaridici 5' o 3' residui monosaccaridici (glucosio, 5'-Glu e 3'-Glu, o mannosio, 5'-Man e 3'-Man), o disaccaridici (saccarosio, 5'-Sac e 3'-Sac). La stabilità di tali sistemi è stata poi confrontata con quella della quadrupla elica non modificata.

La caratterizzazione chimico-fisica di questi sistemi è stata effettuata mediante microcalorimetria differenziale a scansione, dicroismo circolare e gel elettroforesi.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Dicroismo circolare

Tra le diverse tecniche spettroscopiche, quella più utilizzata nello studio di complessi di acidi nucleici è il dicroismo circolare, che si basa essenzialmente sull'interazione tra le molecole chirali e la luce piano polarizzata. Questa tecnica presenta diversi vantaggi: richiede basse quantità di campione; non è distruttiva; permette di rilevare con accuratezza cambiamenti dovuti all'ambiente esterno (es. pH, temperatura).

Le onde luminose possono essere descritte da vettori elettrici e magnetici perpendicolari tra di loro, che oscillano in fase in tutte le direzioni normali alla direzione di propagazione. I loro parametri caratteristici sono: la lunghezza d'onda, la frequenza ed il numero d'onda. La luce piano polarizzata, invece, è descritta dai vettori del campo elettrico e magnetico, che oscillano ciascuno in una sola direzione normale a quella di propagazione, e si ottiene facendo passare attraverso uno schermo Polaroid o un prisma di Nicol la radiazione elettromagnetica.

Ad una data frequenza della luce, la natura dell'interazione dipende dalle proprietà della materia, in particolare dalla sua composizione chimica e può dar luogo principalmente a tre fenomeni: trasmissione, assorbimento o diffusione. Questi fenomeni causano una differenza di velocità di propagazione della luce nel mezzo rispetto a quella nel vuoto. Tale fenomeno è descritto dalla seguente relazione:

$$n = c/v$$

dove n è l'indice di rifrazione, c è la velocità di propagazione nel vuoto e v è la velocità di propagazione nel mezzo. Le molecole sensibili al piano di polarizzazione della luce sono quelle chirali e si dividono in due gruppi:

- molecole attive perché intrinsecamente asimmetriche, cioè prive di un centro di simmetria;
- molecole attive perché contenute in un intorno geometrico tridimensionale asimmetrico.

La luce polarizzata in un piano è costituita dalla sovrapposizione di due onde in fase tra loro e circolarmente polarizzate, i cui vettori elettrici hanno ampiezze pari alla metà della radiazione risultante e ruotano in senso opposto intorno all'asse di propagazione, descrivendo delle eliche (fig. 2.1).

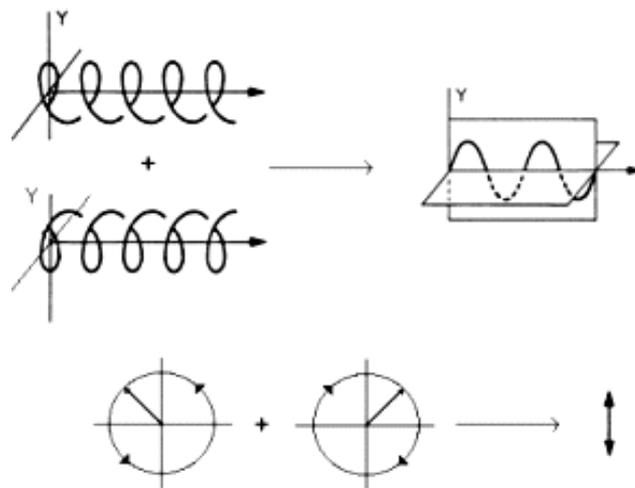


fig. 2.1 Componenti circolarmente polarizzate della luce piano polarizzata.

Quando questa luce attraversa un campione otticamente attivo, le due componenti, una levogira e l'altra destrogira, si propagano a velocità diversa. Dopo aver attraversato il mezzo le due onde si ricombinano dando luogo ad una radiazione che è ancora piano polarizzata, ma il piano di polarizzazione è ruotato rispetto a quello della luce incidente di un angolo α :

$$\alpha = \pi l (n_L - n_R) / \lambda$$

dove n_L ed n_R sono rispettivamente gli indici di rifrazione dell'una e dell'altra componente, l è il cammino ottico e λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Se quest'ultima cade in una zona di assorbimento del campione, oltre allo sfasamento, si avrà un diverso assorbimento delle due componenti circolari, per cui l'ampiezza dei loro vettori elettrici non risulterà più uguale e la radiazione uscente dal campione non è più piano polarizzata (fig. 2.2a), ma ellitticamente polarizzata (fig. 2.2b).

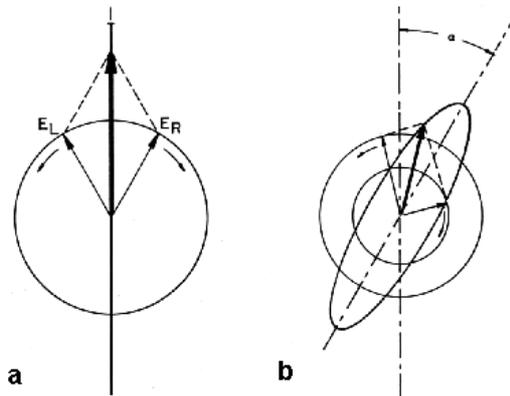


fig. 2.2 Radiazione circolarmente polarizzata dopo il passaggio attraverso un campione chirale.

Sperimentalmente si misura l'angolo di ellitticità, indicata con θ , che è la tangente del rapporto tra l'asse minore e l'asse maggiore dell'ellisse. L'ellitticità è correlata al diverso assorbimento delle due componenti come segue:

$$\theta = \pi l (\varepsilon_L - \varepsilon_R) / \lambda$$

dove $\varepsilon_L - \varepsilon_R$ è la differenza tra i due coefficienti di assorbimento che prende il nome di "dicroismo circolare", l è il cammino ottico e λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Da θ , normalizzando per la concentrazione della soluzione espressa in molarità e per il cammino ottico della cella espresso in centimetri, si ricava l'ellitticità molare:

$$[\theta] = 100 \theta / (c l)$$

Riportando l'ellitticità molare in funzione della lunghezza d'onda o della frequenza della radiazione si ottiene una curva CD, caratterizzata da bande positive o negative a seconda del tipo di cromoforo in esame.

Le misure di dicroismo circolare sono state eseguite con uno spettrofotometro JASCO 715, calibrato con una soluzione acquosa di acido (d)-(+)-10-canforsolfonico a 290 nm. Sono state utilizzate celle in quarzo con una lunghezza di cammino ottico pari ad 1 mm, l'intervallo di lunghezza d'onda esplorato è stato 220 - 340 nm.

Gli spettri sono stati registrati con un'ampiezza di banda di 2.0 nm, ad una velocità di scansione di 5 nm/min; inoltre sono stati normalizzati sottraendo lo spettro relativo al solo tampone e sono stati mediati su almeno tre scansioni.

2.1 1 Curve di equilibrio

Il processo di dissociazione delle quadruplex è un processo lento e cineticamente controllato è stato necessario, per uno studio termodinamico rigoroso, portare il sistema in condizioni di equilibrio. Le curve di denaturazione termica in condizione di equilibrio sono state ottenute mediante dicroismo circolare. La temperatura effettiva di dissociazione di ciascun sistema è stata, infatti, calcolata dal punto di flesso di una curva sigmoideale ottenuta riportando l'ellitticità molare, letta a punto di massimo, in funzione della temperatura.

Ogni punto della curva è stato ottenuto leggendo il valore dell'ellitticità di uno spettro registrato ad una predefinita temperatura a cui il campione è stato incubato per un tempo sufficientemente lungo affinché fosse raggiunto l'equilibrio tra la specie di partenza (quadruplex) e quella finale (singolo filamento). La condizione di equilibrio è stata verificata dalla sovrapposizione di due o tre spettri registrati, in intervalli di tempo successivi, alla temperatura data.

2.2 Calorimetria Differenziale a Scansione.

La stabilità termodinamica delle strutture a quadrupla elica è stata studiata mediante la microcalorimetria differenziale a scansione. Le misure calorimetriche sono state effettuate con un calorimetro Setaram Micro-DSC di terza generazione. Il metodo si basa sulla misura del calore assorbito o ceduto dal sistema al variare della temperatura in seguito alle sue trasformazioni. L'intervallo di temperatura che si può esplorare va da -10 a 100°C. Il controllo della temperatura è effettuato mediante una programmazione, ascendente o discendente, che può variare in un intervallo molto ampio, da 0.1°C/h fino a 1.2°C/min.

Il calorimetro a scansione di temperatura misura la differenza di capacità termica di un campione rispetto ad un riferimento. Per valutare tale differenza di capacità termica si riscaldano contemporaneamente, con velocità programmata e costante, entrambe le celle che sono disposte in maniera simmetrica rispetto all'ambiente circostante (intorno delle celle), costituito da un volano termico e un bagno con il quale scambiano calore. Gli elementi riscaldanti e raffreddanti sono degli elementi Peltier. Nell'eseguire scansioni su soluzioni, la cella di riferimento contiene il tampone ed i sali all'opportuna forza ionica così da poter registrare la capacità termica eccesso del soluto contenuto nella soluzione della cella di misura. Elementi molto importanti per qualsiasi calorimetro sono i sensori termici, termopile, poichè dalla loro sensibilità dipende la sensibilità dell'intera apparecchiatura. Le termopile, batterie di termocoppie (circa 10.000) opportunamente orientate ed assemblate in modo da pesare tutti gli elementi di superficie trasmittente, sono capaci di trasformare ed amplificare una piccolissima differenza di temperatura in una differenza di potenziale. Nel corso di una scansione, le termopile devono essere stabili e la loro risposta indipendente dal tempo e dal numero di cicli di riscaldamento; devono, inoltre, avere alta conducibilità termica e buon contatto termico; devono essere di piccole dimensioni ed avere bassa capacità termica.

Molto importante, ai fini della sensibilità, è un sistema di riscaldamento e di raffreddamento costante. La temperatura delle celle è regolata attraverso un flusso

di calore che proviene o che va verso il blocco metallico in cui esse sono immerse; la temperatura del blocco è fatta variare con velocità costante. La regolazione della temperatura è assicurata da un bagno contenente dodecano in circolazione forzata. Le termopile misurano la piccolissima differenza di temperatura tra ciascuna delle celle e il blocco metallico. Quando la soluzione di misura non mostra alcun effetto termico si registra una differenza di potenziale nulla, dal momento che il flusso di calore verso o dalle celle è uguale; quando, invece, c'è un effetto termico, esso si sovrappone ai flussi di calore tra celle e blocco e si registra una differenza di potenziale non nulla (principio di Calvet). I calorimetri che si basano su tale principio sono anche detti microcalorimetri a flusso di calore. Il calorimetro è periodicamente calibrato per effetto Joule, inviando un impulso di corrente elettrica, di intensità e durata nota, attraverso la resistenza produce lo sviluppo di una quantità nota di calore che è misurata e valutata dallo strumento.

Il calorimetro è interfacciato con un Personal Computer IBM per la raccolta automatica dei dati e per l'analisi è stato utilizzato un software appositamente progettato [39]. La curva di capacità termica molare apparente è ottenuta correggendo ogni curva calorimetrica per la curva di calibrazione strumentale e per la curva di scansione tampone-tampone. La capacità termica così ottenuta è corretta per il numero di moli e per la velocità di scansione. La funzione capacità termica eccesso, $\langle \Delta C_p \rangle$, è ottenuta assumendo, per la determinazione della linea di base, una dipendenza lineare dalla temperatura per la capacità termica dello stato nativo [40]. Le curve calorimetriche, pertanto, si originano dalla misura della capacità termica eccesso, $\langle \Delta C_p \rangle$, in funzione della temperatura. Una tipica curva calorimetrica della doppia elica del DNA è mostrata in Figura 2.3. Il picco è attribuito alla dissociazione della doppia elica nei due singoli filamenti. La temperatura del massimo del picco calorimetrico è indicata con T_m . Dall'integrazione dell'area sottesa al picco calorimetrico si ottiene l'entalpia associata alla transizione, $\Delta H^\circ (T_m)$. La variazione di entropia associata alla transizione è calcolata dall'integrazione dell'area della curva di $\langle \Delta C_p \rangle / T$ rispetto alla T.

Uno dei maggiori vantaggi della microcalorimetria differenziale a scansione è rappresentato dalla possibilità di determinare simultaneamente ed in modo indipendente, sia l'entalpia reale sia l'entalpia di van't Hoff [41]. L'entalpia calorimetrica $\Delta H^\circ(T_m)$ è calcolata dall'area sottesa alla curva DSC e non implica nessuno schema di reazione, mentre l'entalpia di van't Hoff $\Delta H_{v.H.}$ è direttamente legata alla costante del processo in corso, $K(T)$, quindi è necessario fare un'ipotesi sulla stechiometria della reazione. L'equazione di van't Hoff è:

$$\frac{d \ln K(T)}{dT} = \frac{\Delta H_{v.H.}}{RT^2} \quad (II.1)$$

Per calcolare il $\Delta H_{v.H.}$ è necessario attribuire una precisa espressione alla $K(T)$.

Le misure calorimetriche sono state condotte nell'intervallo da 0 °C a 100 °C a diverse velocità di scansione. I valori per le grandezze termodinamiche sperimentali sono la media di almeno 5 scansioni.

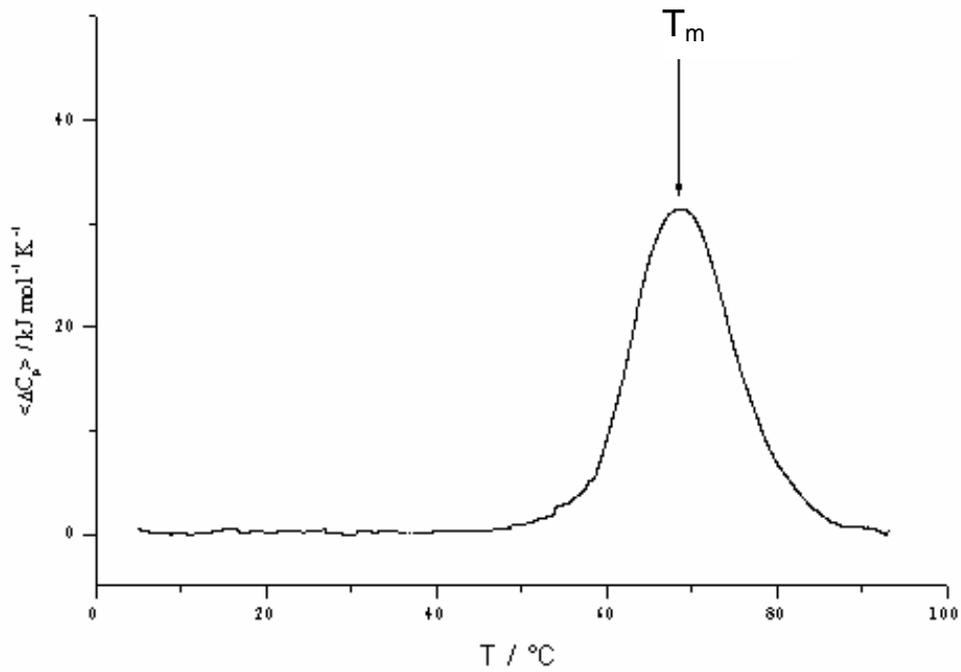


Figura 2.3. Profilo calorimetrico relativo al processo di dissociazione di una doppia elica costituita da 16 coppie di basi (16-mer). La freccia indica il massimo del picco calorimetrico a cui corrisponde la temperatura T_m .

2.3 Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica che viene utilizzata per la separazione di molecole cariche in soluzione che migrano in modo differente in un campo elettrico in base al loro rapporto carica/massa e alla loro forma. Sono molte infatti le molecole d'interesse biologico che possiedono gruppi ionizzabili e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche: amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, acidi nucleici.

L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta, fondamentalmente da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica, pertanto i cationi migrano verso il catodo e gli anioni verso l'anodo a una velocità che dipende dall'equilibrio tra la forza di spinta del campo elettrico e le forze frenanti (frizionali ed elettrostatiche) esistenti tra ioni e mezzo circostante.

Perché l'elettroforesi abbia luogo, il campione va sciolto in un tampone, col quale va inoltre saturato il supporto per consentire la conduzione della corrente. Il tampone serve, inoltre, per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare la cui carica cambia con il pH.

La corrente è mantenuta costante lungo il circuito dall'elettrolisi che ha luogo agli elettrodi, entrambi i quali pescano in recipienti contenenti il tampone. Durante l'elettrolisi, al catodo, si producono ioni ossidrile e idrogeno, mentre all'anodo si producono ioni idrogeno e ossigeno.

Gli ioni ossidrile, prodotti al catodo, aumentano la dissociazione del componente acido debole (HA) della miscela tampone e ciò provoca un aumento della formazione di A^- che conduce corrente all'anodo. Qui gli ioni A^- si combinano con gli ioni H^+ per riformare HA con successivo rifornimento di elettroni al circuito elettrico; quindi la maggior parte della corrente è pertanto condotta dagli ioni del tampone e solo una piccola quota è condotta dagli ioni del campione.

Nell'elettroforesi condotta su un supporto i componenti del campione migrano come bande distinte che, al termine della corsa, possono essere rivelate mediante opportune reazioni cromogeniche; nel caso degli acidi nucleici le bande si rivelano con bromuro di etidio, un particolare intercalante in grado di formare un complesso con il DNA che assorbe nell'UV.

L'entità della migrazione degli ioni risulterà proporzionale sia alla corrente sia al tempo. La velocità di migrazione aumenta all'aumentare della carica netta del campione che dipende, generalmente, dal pH; essa diminuisce all'aumentare del peso molecolare e questo perché aumentano le forze frizionali ed elettrostatiche rispetto al mezzo circostante. Molecole di dimensioni simili ma di forma diversa mostrano differenti caratteristiche di migrazione a causa del diverso effetto delle forze frizionali ed elettrostatiche.

Il supporto utilizzato per l'elettroforesi delle molecole di quadruple eliche di DNA è costituito da gel di poliacrilammide non denaturante al 20% preparato al momento dell'uso, il tampone utilizzato è TRIS-Borato (TBE) 1x a pH 8.0, la tensione applicata ai capi della cella elettroforetica è pari a 100 Volt. I gel ottenuti sono stati esposti alla luce UV per evidenziare le bande e sono stati fotografati con una macchina fotografica digitale.

2.4 La preparazione delle soluzioni

Le soluzioni delle tre quadruple eliche $[d(TGGGT)]_4$, $[d(TGGGGT)]_4$ $[d(TGGGGGT)]_4$ sono state preparate sciogliendo gli oligonucleotidi in un tampone fosfato di sodio 10 mM pH 7.0, NaCl 200mM ed EDTA 0.1mM.

Le soluzioni di quadrupla elica di DNA dei sistemi $[d(AG_3T)]_4$, $[d(TAG_3T)]_4$, $[d(A^{OH}G_3T)]_4$, $[d(TA^{OH}G_3T)]_4$, $[d(A^{Pr}G_3T)]_4$, $[d(TA^{Pr}G_3T)]_4$, $[d(A^{Br}G_3T)]_4$, $[d(TA^{Br}G_3T)]_4$, sono state preparate sciogliendo gli oligonucleotidi in tampone fosfato di potassio 10 mM, pH 7.0 EDTA 0.1 mM e KCl 1 M .

I sistemi $[d(TGGGT)]_4$, $[d(^{5'}TG^{Br}GG^{Br}T^3')]_4$ e $[d(^{5'}TG^{Br}G^{Br}GT^3')]_4$ sono stati sciolti in tampone potassio fosfato 10mM pH 7.0, 200mM di KCl e 0.1 mM di EDTA. Le soluzioni di quadrupla elica di DNA dei sistemi, $[d(^{5'}TGGGAG^3')]_4$, $[d(\text{Glucosio-}^{5'}TGGGAG^3')]_4$, $[d(^{5'}TGGGAG^3'-\text{Glucosio})]_4$, $[d(\text{Mannosio-}^{5'}TGGGAG^3')]_4$, $[d(^{5'}TGGGAG^3'-\text{Mannosio})]_4$, $[d(\text{Saccarosio-}^{5'}TGGGAG^3')]_4$ e $[d(^{5'}TGGGAG^3'-\text{Saccarosio})]_4$ sono state preparate sciogliendo gli opportuni oligonucleotidi in un tampone contenente fosfato di potassio 10 mM a pH 7.0, KCl 200 mM ed EDTA 0.1 mM.

Tutte le soluzioni di quadrupla elica sono state riscaldate per cinque minuti a 90 °C e successivamente lasciate raffreddare lentamente fino a temperatura ambiente per evitare qualsiasi controllo cinetico ed ottenere la struttura di quadrupla elica termodinamicamente più stabile. Successivamente le soluzioni sono state equilibrate a 4 °C per 24 ore e quindi sottoposte a misure calorimetriche e spettroscopiche.

La concentrazione di tutti i campioni è stata calcolata dai valori di assorbanza a 260 nm (massimo di assorbimento del DNA) letti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 17 utilizzando la legge di Lambert-Beer. Gli spettri UV sono stati registrati ad una temperatura tale che in soluzione le quadruple eliche fossero completamente denaturate; come coefficiente di assorbimento è stato utilizzato quello relativo al singolo filamento che forma il complesso. I coefficienti sono stati calcolati mediante la procedura basata sull'influenza del primo vicino sul coefficiente di assorbimento di ognuna delle basi azotate, descritto da *Cantor et al* (1970) [42].

$$\varepsilon (\text{singolo TGGGT}) = 47700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{singolo TGGGGT}) = 57800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{singolo TGGGGGT}) = 67900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{singolo AG}_3\text{T}) = 53700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

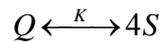
$$\varepsilon (\text{singolo TAG}_3\text{T}) = 61700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon (\text{singolo } 5'\text{TG}_3\text{AG}3') = 62500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Per le sequenze modificate sono stati usati gli stessi coefficienti di assorbimento di estinzione molare delle rispettive sequenze non modificate. I coefficienti di estinzione molare, riportati per i vari oligonucleotidi, sono stati calcolati con un errore che non eccede il 4 %.

2.5 Analisi termodinamica

I valori del ΔH° di dissociazione di ciascuna quadrupla elica, possono essere calcolati dalle curve CD di dissociazione termica all'equilibrio, utilizzando l'equazione di van't Hoff, e ipotizzando che l'equilibrio tra la quadrupla elica (Q) ed i singoli filamenti (S) sia descritto da un processo ad un unico stadio:



Date le condizioni di equilibrio, e considerata la stechiometria del processo, è possibile scrivere le seguenti equazioni:

$$C_t = 4[Q] + [S] \quad (\text{II.2})$$

$$K = \frac{[S]^4}{[Q]} \quad (\text{II.3})$$

dove [Q] è la concentrazione di quadrupla elica, [S] quella del singolo filamento, C_t è la concentrazione totale espressa in moli di singolo filamento e K è la costante di equilibrio.

Considerando la frazione di popolazione di ciascuna specie in soluzione:

$$f_s = \frac{[S]}{C_t} \quad (\text{II.4})$$

$$f_Q = \frac{[Q]}{C_t} \quad (\text{II.5})$$

è possibile riscrivere le prime due equazioni nel modo seguente:

$$4f_Q + f_s = 1 \quad (\text{II.6})$$

$$K = \frac{f_s^4 C_t^3}{f_Q} \quad (\text{II.7})$$

Il sistema di equazioni (II.6 – II.7) è stato risolto utilizzando degli algoritmi in MATLAB. Le soluzioni del sistema si possono inserire nell'equazione usata per calcolare l'ellitticità molare in funzione del grado di avanzamento del processo:

$$[\theta] = [\theta]_1 f_Q + [\theta]_2 f_s \quad (\text{II.8})$$

dove $[\theta]_1$ è l'ellitticità molare della specie S nello stato di quadrupla elica e $[\theta]_2$ è l'ellitticità molare della specie S nello stato di singolo filamento. I valori delle costanti di equilibrio sono stati ottenuti dalla relazione:

$$K(T) = K(T_m) e^{\left(\frac{-\Delta H}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)} \quad (\text{II.9})$$

dove $K(T_m)$ è la costante di equilibrio alla temperatura nel punto di flesso della curva di dissociazione della quadrupla elica. Considerando la stechiometria del processo e assumendo che a T_m il grado di avanzamento sia 0.5, otteniamo:

$$K(T_m) = 32C_Q^3 \quad (\text{II.10})$$

dove per C_Q si intende la concentrazione totale di quadrupla elica.

Le curve di dissociazione termica ottenute con questo metodo, interpolano bene tutti i punti sperimentali. Quindi l'ipotesi iniziale è corretta: ovvero la dissociazione delle quadruple eliche può essere descritta da un processo ad un unico stadio.

Con tale metodo è possibile ottenere anche i parametri termodinamici relativi al processo di dissociazione.

Infatti, dal ΔH° ottenuto dai punti sperimentali e dal valore della $K(T_m)$, è possibile calcolare il valore del ΔS° del processo, utilizzando la relazione:

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m} + R \ln K(T_m) \quad (\text{II.11})$$

Infine, dai valori di ΔH° e di ΔS° ottenuti dalle curve di equilibrio si calcola la variazione di energia libera di Gibbs a 298 K, utilizzando l'equazione termodinamica:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{II.12}).$$

CAPITOLO 3

Quadruple eliche contenenti diversi numeri di G-tetradi

3.1 Introduzione

La scoperta che il DNA e l'RNA possano formare delle eliche contenenti più di due filamenti, risale ai primi studi sulle strutture degli acidi nucleici [43]. Negli ultimi anni queste strutture hanno suscitato un considerevole interesse che deriva da due separate linee di indagine: il potenziale uso degli acidi nucleici come agenti terapeutici [44,45] e l'evidenza che le strutture alternative (non di tipo B) possono avere specifiche funzioni *in vivo*. In particolare, sequenze di DNA ricche di guanine possono formare delle inusuali strutture a quattro filamenti, note come quadruple eliche (G-quadruplex) [1].

Queste sequenze ricche di guanine sono particolarmente abbondanti in zone del genoma di una certa rilevanza biologica, come, per esempio, in regioni promotrici di geni [46,8], in sequenze associate a malattie neurodegenerative [47] ed, in particolare, nella parte terminale dei cromosomi eucariotici [48], dove si associano a proteine per formare i telomeri. La maggior parte del "DNA telomerico" si presenta come una doppia elica, costituita da numerose copie ripetute di una sequenza oligonucleotidica ricca di guanine. La parte 3'-terminale, invece, è un singolo filamento che, come noto da studi cristallografici ai raggi X e studi NMR in soluzione, ha la capacità di ripiegarsi per formare strutture G-quadruplex [2].

Le sequenze ripetute del DNA telomerico variano a seconda degli organismi, ma in tutte si riscontra la presenza di un elevato numero di guanine. In particolare, le sequenze ripetute di *Oxytricha*, *Tetrahymena* ed *Homo sapiens* sono rispettivamente $d(T_4G_4)$, $d(T_2G_4)$, $d(T_2AG_3)$.

In questo capitolo è riportata la caratterizzazione chimico-fisica di tre sequenze oligonucleotidiche $d(^5'TGGGT^{3'})$, $d(^5'TGGGGT^{3'})$ e $d(^5'TGGGGGT^{3'})$ che differiscono per il numero di G-tetradi, dove il deossinucleotide $d(^5'TGGGGT^{3'})$ è preso come riferimento e corrisponde alla sequenza troncata di *Oxytrichia*.

Lo scopo di tale studio è stato quello di verificare l'influenza del numero di G-tetradi sulla stabilità termodinamica delle quadruple eliche risultanti. Le metodologie usate per la caratterizzazione sono state il dicroismo circolare e l'elettroforesi su gel di poliacrilammide.

3.2 Analisi dei parametri termodinamici delle quadruple eliche

$[d(TGGGT)]_4$, $[d(TGGGGT)]_4$, $[d(TGGGGGT)]_4$

Il processo di dissociazione delle tre quadruple eliche è stato studiato utilizzando il dicroismo circolare. Le misure sono state eseguite a pH 7 in una soluzione tampone 10 mM di fosfato di sodio in presenza di 200 mM NaCl e 0.1M EDTA.

I tre sistemi analizzati sono caratterizzati da spettri di dicroismo circolare a 20°C con una banda positiva a 263 nm ed una negativa a 243 nm tipiche di quadruple eliche tetramolecolari a filamenti paralleli. Le figure 3.1, 3.2 e 3.3 mostrano rispettivamente gli spettri CD a 20°C delle tre sequenze.

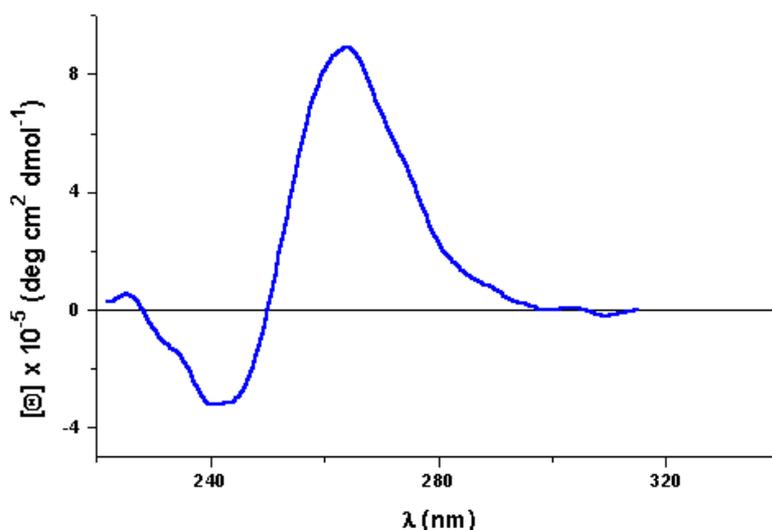


Fig.3.1 Spettro CD a 20°C della quadruplex $[d(TGGGT)]_4$

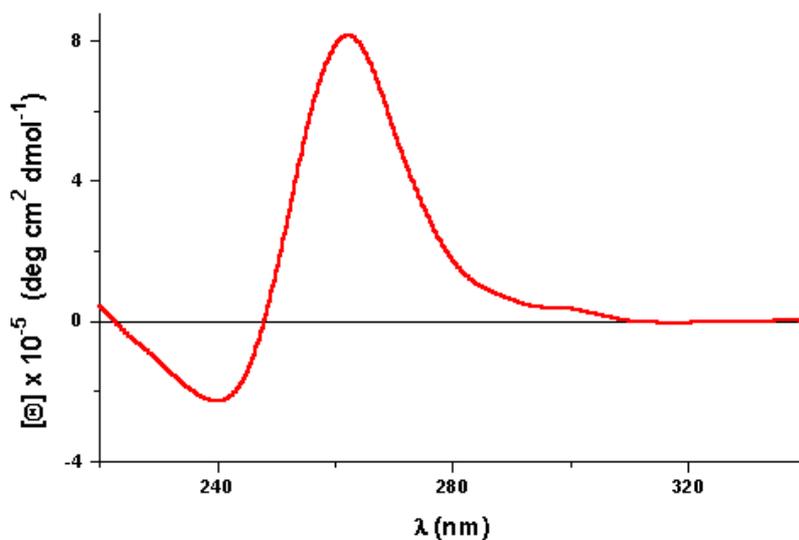


Fig.3.2 Spettro CD a 20°C della quadruplex [d(TGGGGT)]₄

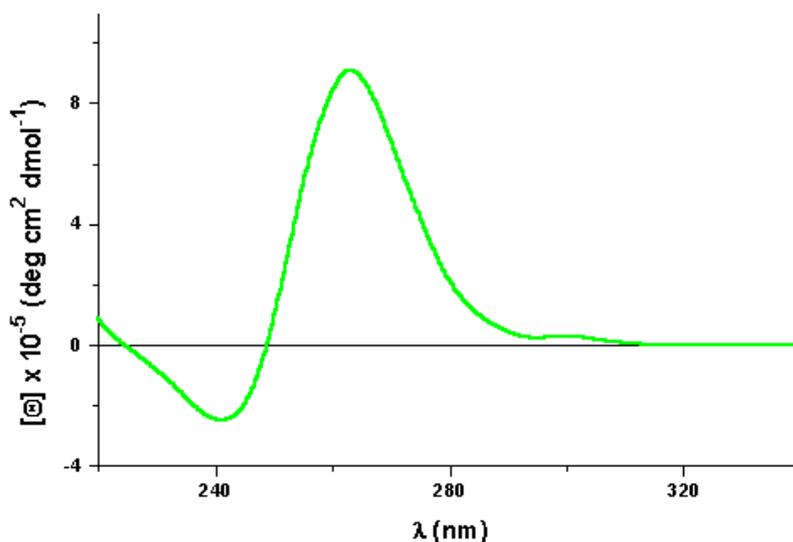


Fig.3.3 Spettro CD a 20°C della quadruplex [d(TGGGGGT)]₄

Per ottenere i dati termodinamici corretti è stato necessario costruire le curve di denaturazione termica in condizioni di equilibrio (Fig. 3.4, 3.5. e 3.6) seguendo la metodologia riportata nel paragrafo 2.1.1.

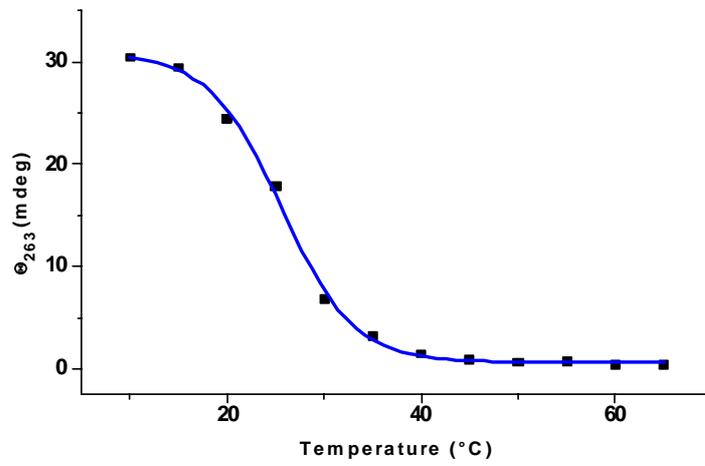


Fig.3.4 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex [d(TG₃T)]₄

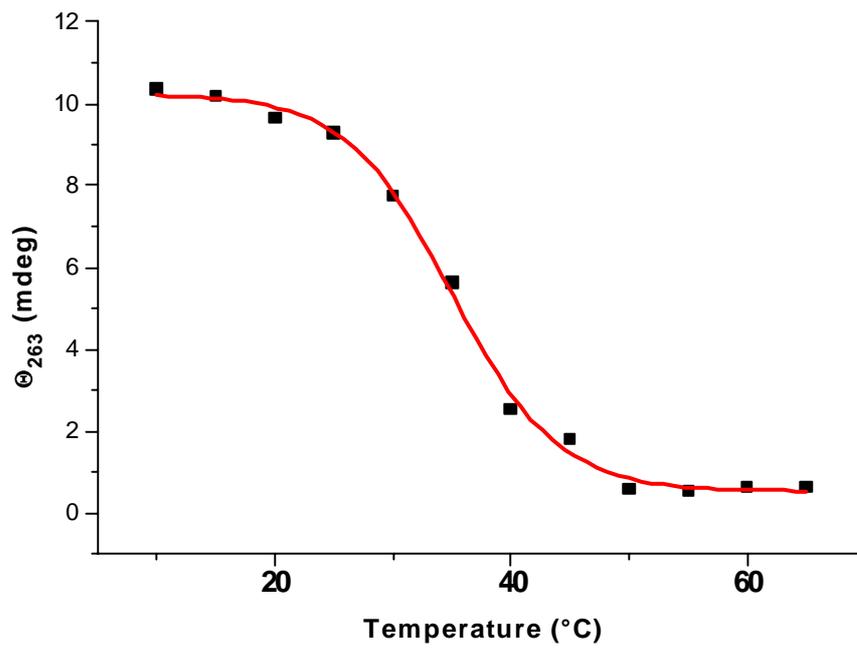


Fig.3.5 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex [d(TG₄T)]₄

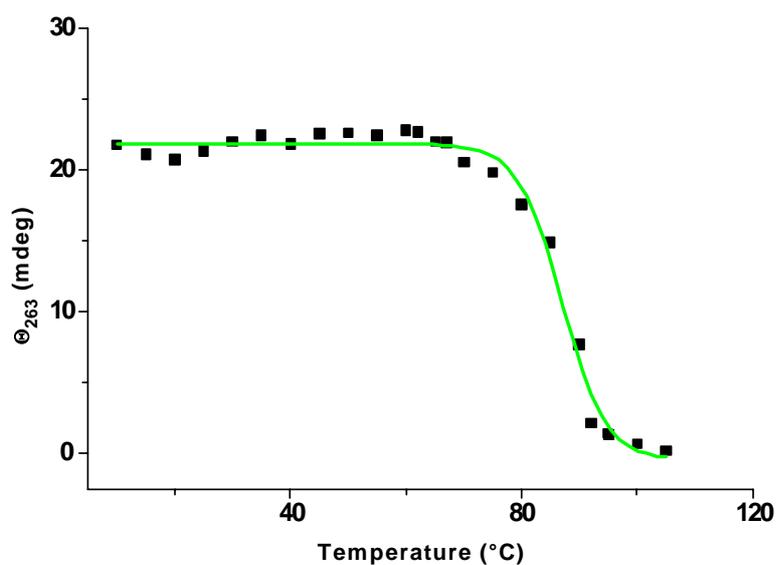


Fig.3.6 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex [d(TG₅T)]₄

Analizzando le curve di melting, mediante un modello a due stati (paragrafo 2.5), sono stati ricavati i parametri termodinamici per la dissociazione delle quadruple eliche (tabella 3.1) .

Tabella 3.1

Parametri termodinamici relativi alla dissociazione delle quadruple eliche [d(TG₃T)]₄, [d(TG₄T)]₄ e [d(TG₅T)]₄

Quadruplex	T _m (°C)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (kJmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° ₂₉₈ (kJmol ⁻¹)
[d(TG ₃ T)] ₄	25.2	231 ± 11	0.55 ± 0.04	67 ± 13
[d(TG ₄ T)] ₄	35	320 ± 10	0.82 ± 0.03	75 ± 15
[d(TG ₅ T)] ₄	87.2	-	-	-

I tre sistemi mostrano una transizione cooperativa con una T_m corrispondente al flesso della curva, di 25°C per la quadruplex $[d(TG_3T)]_4$, 35°C per la $[d(TG_4T)]_4$ e 87°C per la $[d(TG_5T)]_4$. Il valore di ΔH° per la $[d(TG_4T)]_4$ risulta di 340 kJ mol⁻¹, un valore che corrisponde ad un ΔH° di 70 kJ mol⁻¹ per tetrate, in accordo a quanto riportato in letteratura per una quadruplex $[d(TG_3T)]_4$ [49]. Per la $[d(TG_5T)]_4$ non è stato possibile calcolare il valore del ΔH° di dissociazione perché la fine della transizione avviene a temperature non accessibili sperimentalmente.

I valori di ΔH° e ΔS° ottenuti dalle curve di equilibrio ci consentono di calcolare le variazioni di energia libera di Gibbs associate al processo, a pH 7.0 e ad una temperatura di 298 K, tramite la nota equazione termodinamica:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Nel calcolo, la differenza di capacità termica tra lo stato iniziale e finale è stata considerata nulla come assunta da diversi autori [50].

Il calcolo del ΔG° ha messo in evidenza che l'ordine della stabilità termodinamica rispecchia l'ordine relativo della temperatura di dissociazione.

La caratterizzazione delle tre quadruple eliche è stata anche fatta con l'elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturante al 20%. Il gel è stato effettuato a 25°C per 5 ore a 100V (10 V/cm) usando come tampone TRIS-Borato (TBE) 45 mM e 1 mM EDTA a pH 8.0. Per evidenziare le bande si è utilizzato il bromuro di etidio, che intercalandosi tra le basi azotate degli oligonucleotidi le rende visibili alla luce UV. Il gel è stato fotografato con una Panasonic DMC-LC40

Come si evidenzia dalla figura del gel ogni sequenza forma una singola quadruplex. (fig 3.7).

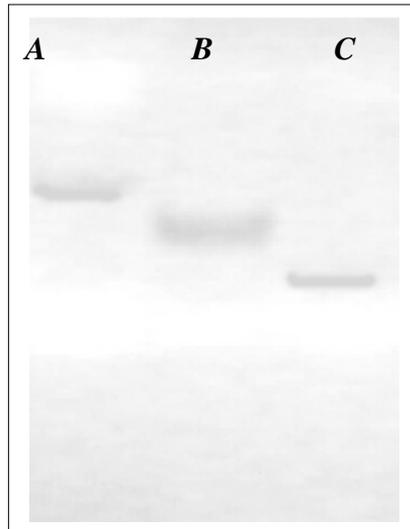


Fig. 3.7. Gel di poliacrilammide non denaturate al 20% di $[d(TGGGT)]_4$ (C); $[d(TGGGGT)]_4$ (B) e $[d(TGGGGGT)]_4$ (A).

Analizzando i parametri termodinamici è stato dedotto che un piano di guanine in meno rispetto alla $d(5'TGGGGT3')$ comporta una diminuzione di temperatura di fusione di circa 10°C , mentre un piano di guanine in più porta ad un notevole aumento di stabilità termica di circa 52°C .

In conclusione, uno studio termodinamico è il primo punto per capire i fattori che governano il processo di formazione delle quadruple eliche di DNA, e per la sintesi di nuovi oligonucleotidi per applicazioni terapeutiche.

Il confronto tra i parametri termodinamici della TGGGGT e della TGGGT permette di concludere che la stabilizzazione introdotta da una tetradè è essenzialmente di natura entalpia.

CAPITOLO 4

Quadruple eliche formate da DNA telomerico umano modificate.

4.1 Introduzione

Le sequenze oligonucleotidiche $[d(AG_3T)]_4$ e $[d(TAG_3T)]_4$ corrispondenti a due differenti troncamenti della sequenza ripetitiva $d(TTAG_3)_n$ del DNA telomerico umano formano quadruple eliche tetramolecolari a filamenti paralleli in presenza di KCl [50]. L'interesse per questi sistemi è scaturito dall'osservazione, supportata da studi NMR, che la quadruplex $[d(AG_3T)]_4$ presenta una struttura alternativa alla classica G-tetrate. Questa struttura è una A-tetrate costituita, cioè, da un piano di adenine [51], si è inoltre riscontrato che la A-tetrate non è presente nella sequenza $[d(TAG_3T)]_4$ [52]. In particolare nella A-tetrate il legame N-glicosidico ha conformazione *sin* mentre nelle G-tetradi i legami glicosidici hanno preferenzialmente conformazione *anti* in una quadruplex tetramolecolare. Questo piano di adenine presenta una flessibilità che consente alle basi di formare legami ad idrogeno tra il gruppo amminico di una base e alternativamente gli azoti in posizione 1 e 7 delle basi di adenina adiacenti [53,54].(fig 4.1)

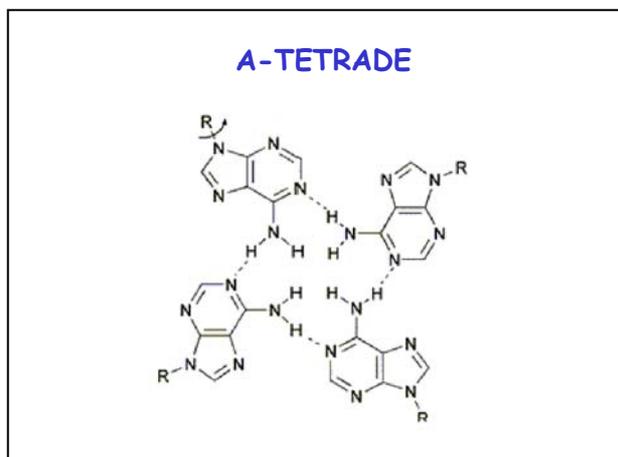


Fig.4.1 A-tetrate

La presenza di A-tetrad in strutture a quadrupla elica potrebbe avere un ruolo chiave nei meccanismi molecolari coinvolti nel riconoscimento dei telomeri all'interno della cellula.

L'obiettivo è stato quello di studiare l'effetto della presenza della A-tetrade nella quadruplex $[d(AG_3T)]_4$ rispetto alla $[d(TAG_3T)]_4$ per verificare se essa potesse stabilizzare o meno la quadrupla elica. Inoltre si è studiato l'effetto dell'introduzione di alcune modifiche sulle sequenze troncate dei telomeri umani sulla formazione e sulla stabilità delle corrispondenti strutture a quadrupla elica.

Le sequenze studiate sono $d(A^{OH}G_3T)$, $d(TA^{OH}G_3T)$, $d(A^{Br}G_3T)$, $d(TA^{Br}G_3T)$, $d(A^{Pr}G_3T)$ e $d(TA^{Pr}G_3T)$. Con OH, Br e Pr si indicano rispettivamente i gruppi sostituenti ossidrilici bromo e propino in posizione 8 della adenina delle sequenze oligonucleotidiche (Fig. 4.2).

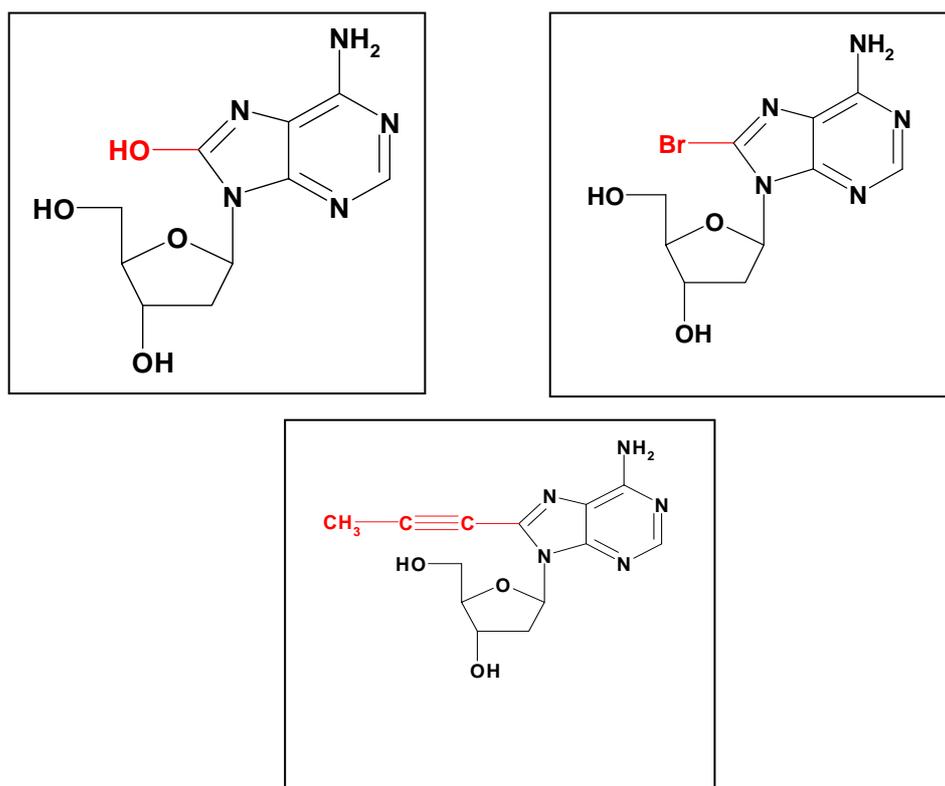


Fig.4.2 Adenine sostituite in posizione 8 con i gruppi: ossidrilici, bromo e propino

Le proprietà chimico-fisiche delle quadruple eliche formate dalle sequenze modificate sono state confrontate con le quadruple eliche formate dalle stesse sequenze non modificate. Il confronto dei dati sperimentali ha fornito informazioni

utili per una maggiore comprensione dei fattori essenziali che governano la stabilità delle strutture a quadrupla elica di DNA.

La caratterizzazione chimico-fisica è stata condotta mediante le tecniche di dicroismo circolare e microcalorimetria differenziale a scansione.

4.2 Analisi dei parametri termodinamici del processo di dissociazione delle quadruple eliche $[d(AG_3T)]_4$ e $[d(TAG_3T)]_4$

Il processo di dissociazione delle due quadruple eliche è stato studiato utilizzando la microcalorimetria differenziale a scansione e il dicroismo circolare. Le misure sono state eseguite a pH 7 in una soluzione tampone 10 mM di fosfato di potassio in presenza di 1M KCl e 0.1M EDTA alla stessa concentrazione.

I relativi profili della capacità termica in funzione della temperatura sono riportati nelle figure 4.3 e 4.4. Le curve calorimetriche sono caratterizzate da un picco centrato ad una temperatura di 67 °C per la quadruplex $[d(TAG_3T)]_4$ e di 63 °C per la quadruplex $[d(AG_3T)]_4$.

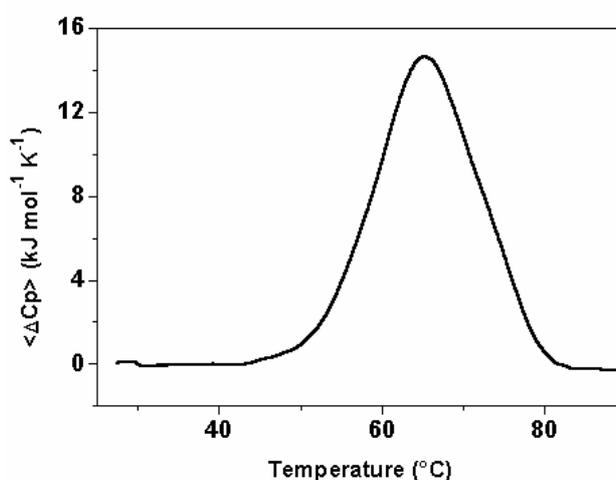


Fig.4.3 Profilo calorimetrico relativo al processo di dissociazione della quadruplex $[d(TAG_3T)]_4$

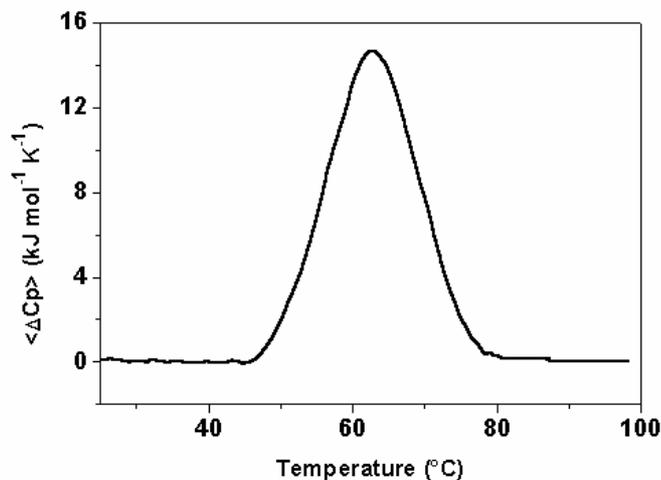


Fig.4.4 Profilo calorimetrico relativo al processo di dissociazione della quadruplex $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$

Per entrambi i sistemi le curve calorimetriche sono state registrate a velocità di scansione di $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. I profili calorimetrici registrati alle differenti velocità di scansione hanno fornito valori di T_m differenti sia per la $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ che per la $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ ad indicare, quindi, che il processo di dissociazione di entrambi i sistemi risente di un controllo cinetico. Di conseguenza i profili calorimetrici non sono curve di equilibrio e la temperatura del massimo del picco è solo una temperatura apparente di dissociazione. Teoricamente l'equilibrio può essere raggiunto a velocità di scansione basse, ma i profili calorimetrici ottenuti a velocità di riscaldamento di $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ non hanno consentito di ricavare dati termodinamici accurati. Per questo motivo per ottenere i dati termodinamici corretti è stato necessario costruire le curve di denaturazione termica in condizioni di equilibrio (Fig. 4.5 e 4.6) seguendo la metodologia riportata nel paragrafo 2.1.1.

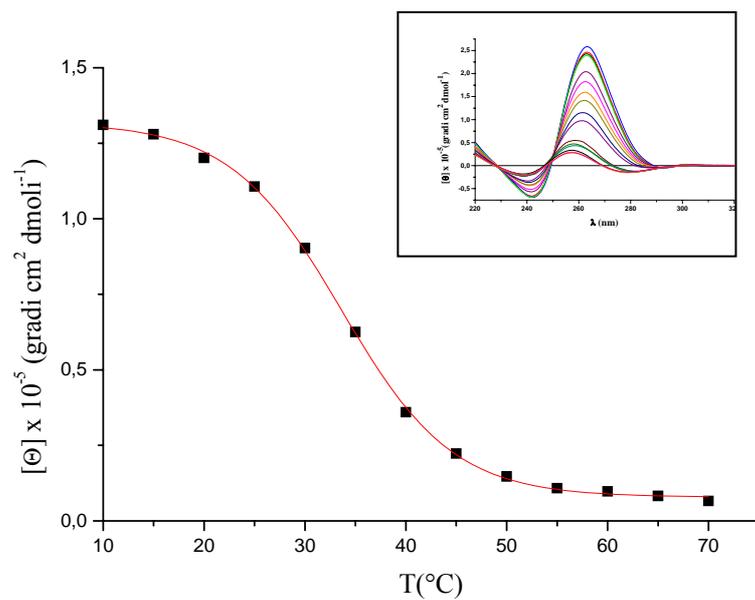


Fig.4.5 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(AG_3T)]_4$ e spettri CD registrati a differenti temperature.

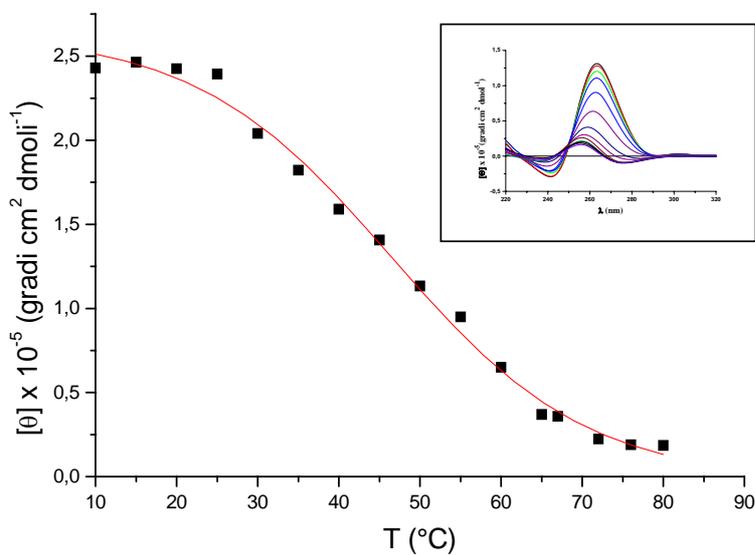


Fig.4.6 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(TAG_3T)]_4$ e spettri CD registrati a differenti temperature.

Analizzando le curve di melting, mediante un modello a due stati (paragrafo 2.5), sono stati ricavati i parametri termodinamici per la dissociazione delle quadruple eliche (tabella 4.1).

Tabella 4.1

Parametri termodinamici relativi alla dissociazione delle quadruple eliche [d(AG₃T)]₄ [d(TAG₃T)]₄

DNA QUADRUPLEX	T_m	ΔH° kJ mol⁻¹	ΔS° kJ mol⁻¹ K⁻¹	ΔG°(298) kJ mol⁻¹
[d(TAG₃T)]₄	51 ± 1	210 ± 10	0.43 ± 0.03	82 ± 1
[d(AG₃T)]₄	37 ± 1	280 ± 13	0.68 ± 0.04	77 ± 1

La T_m all'equilibrio della quadruplex [d(TAG₃T)]₄ è più alta della quadruplex [d(AG₃T)]₄. Il valore del ΔH° relativo alla dissociazione della quadruplex [d(TAG₃T)]₄ di 210 kJ mol⁻¹ corrisponde ad un ΔH° per la formazione di una tetrad di 70 kJ mol⁻¹ se si ammette che siano formate solo le G-tetrad. Per la quadruplex [d(AG₃T)]₄ il ΔH° è pari a 280 kJ mol⁻¹. Il ΔH° di dissociazione della [d(AG₃T)]₄ risulta essere, quindi, 70 kJ mol⁻¹ più alto rispetto a quello della [d(TAG₃T)]₄. Questa differenza potrebbe essere imputabile proprio alla formazione del piano di adenine nella [d(AG₃T)]₄. Anche il ΔS° per la dissociazione della [d(AG₃T)]₄, pari a 0.68 kJ mol⁻¹ K⁻¹, risulta più alto rispetto a quello della [d(TAG₃T)]₄ che è di 0.43 kJ mol⁻¹ K⁻¹.

I valori di ΔH° e ΔS° ottenuti dalle curve di equilibrio ci consentono di calcolare i valori di ΔG° a 298 K, relativi al processo di dissociazione. La variazione di energia libera di Gibbs a pH 7 associata al processo è stata calcolata utilizzando la ben nota equazione termodinamica:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Nel calcolo la differenza di capacità termica tra lo stato iniziale e finale è stata considerata nulla dal momento che sperimentalmente è risultato un $\Delta C_p \cong 0$.

**4.3. Analisi degli spettri CD delle quadruple eliche di
DNA $[d(TA^{OH}G_3T)]_4$, $[d(TA^{Br}G_3T)]_4$, $[d(TA^{Pr}G_3T)]_4$, $[d(A^{OH}G_3T)]_4$
 $[d(A^{Br}G_3T)]_4$ e $[d(A^{Pr}G_3T)]_4$**

I sei sistemi analizzati sono caratterizzati da spettri di dicroismo circolare a 20°C con una banda positiva a 263 nm ed una negativa a 243 nm tipiche di quadruple eliche tetramolecolari a filamenti paralleli, in accordo con i dati riportati da Breslauer e collaboratori [54]. Le figure 4.7 e 4.8 mostrano rispettivamente gli spettri per le quadruplex $[d(AG_3T)]_4$ e $[d(TAG_3T)]_4$ confrontati con gli spettri delle corrispondenti quadruplex modificate: $[d(TA^{Br}G_3T)]_4$, $[d(TA^{Pr}G_3T)]_4$, $[d(A^{Br}G_3T)]_4$ e $[d(A^{Pr}G_3T)]_4$. Si nota che gli spettri sono simili nella forma e presentano alcune differenze nell'intensità del massimo.

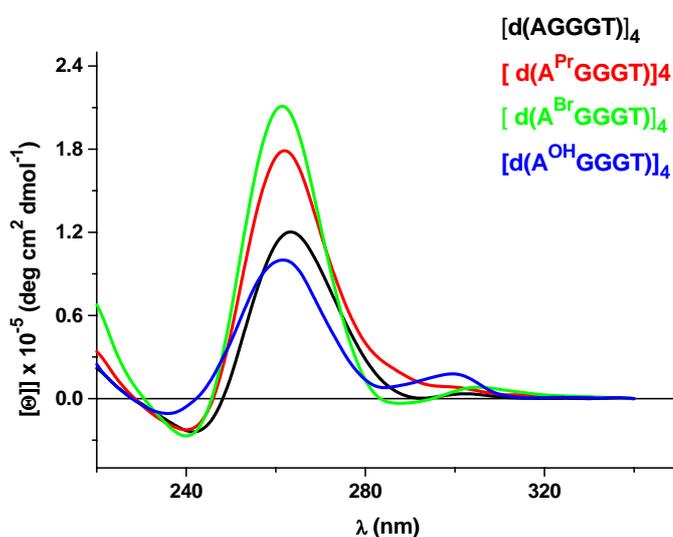


Fig.4.7 Spettri CD a 20°C delle quadruplex $[d(AG_3T)]_4$ $[d(A^{OH}G_3T)]_4$ $[d(A^{Br}G_3T)]_4$ e $[d(A^{Pr}G_3T)]_4$

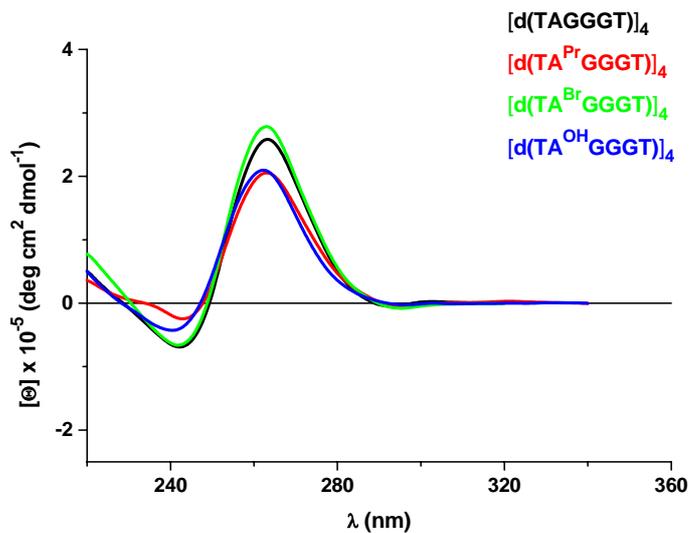


Fig.4.8 Spettri CD a 20°C delle quadruplex $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ $[d(\text{TA}^{\text{OH}}\text{G}_3\text{T})]_4$ $[d(\text{TA}^{\text{Br}}\text{G}_3\text{T})]_4$ e $[d(\text{TA}^{\text{Pr}}\text{G}_3\text{T})]_4$

Poiché anche per il processo di dissociazione delle quadruplex modificate si è rivelato un processo lento e cineticamente controllato come nel caso delle non modificate è stato necessario, per uno studio termodinamico rigoroso, portare il sistema in condizioni di equilibrio. Le curve di denaturazione termica in condizione di equilibrio sono state ottenute, seguendo la procedura descritta precedentemente (paragrafo 2.1.1).

Tutte le curve di equilibrio sono state interpolate con il modello a due stati (parag. 2.5). Le figure 4.9-4.14 mostrano le curve di equilibrio e gli spettri registrati alle varie temperature per tutti i sistemi modificati.

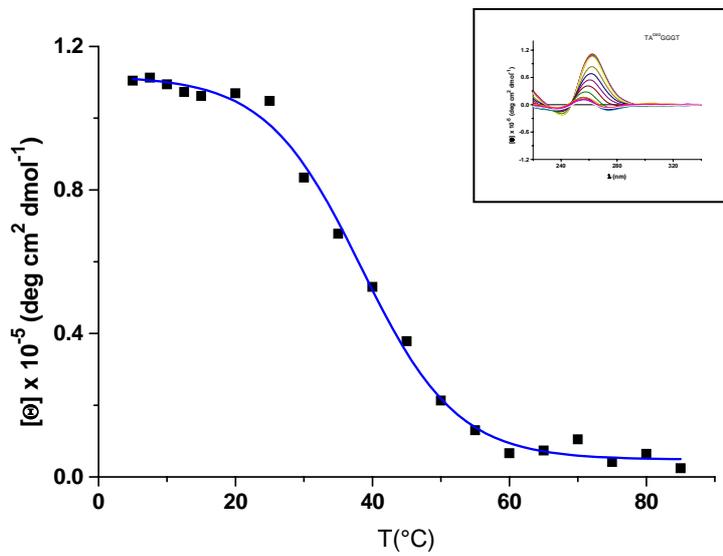


Fig.4.9 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(TA^{OH}G_3T)]_4$ e spettri CD registrati a differenti temperature.

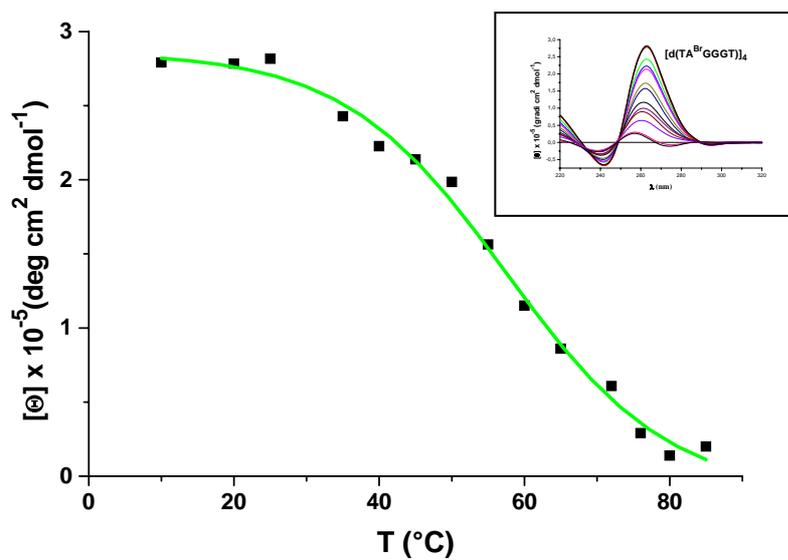


Fig.4.10 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(TA^{Br}G_3T)]_4$ e spettri CD registrati a differenti temperature.

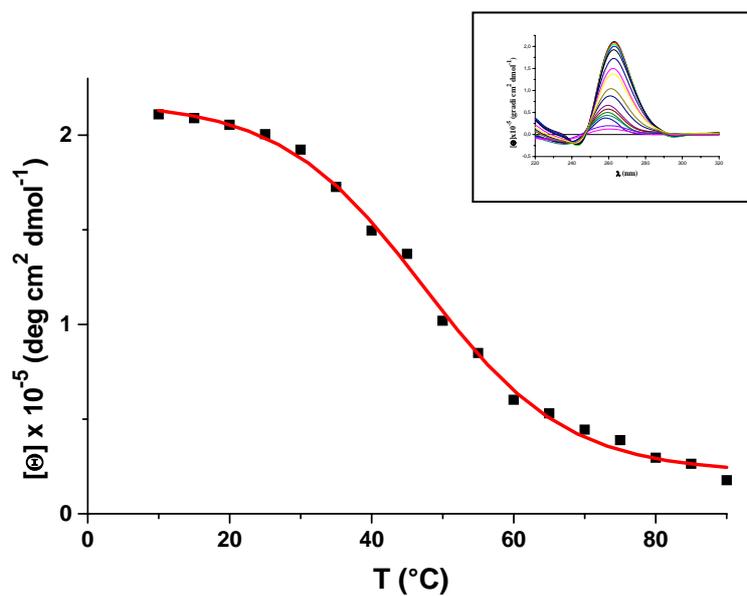


Fig.4.11 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(TA^{Pr}G_3T)]_4$ e spettri CD registrati a differenti temperature.

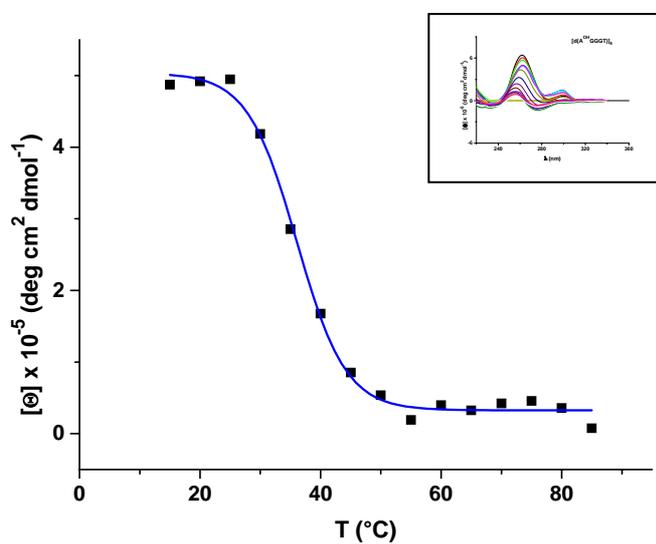


Fig.4.12 Curve di denaturazione termica all'equilibrio delle quadruplex $[d(A^{OH}G_3T)]_4$ modificate e spettri CD registrati a differenti temperature

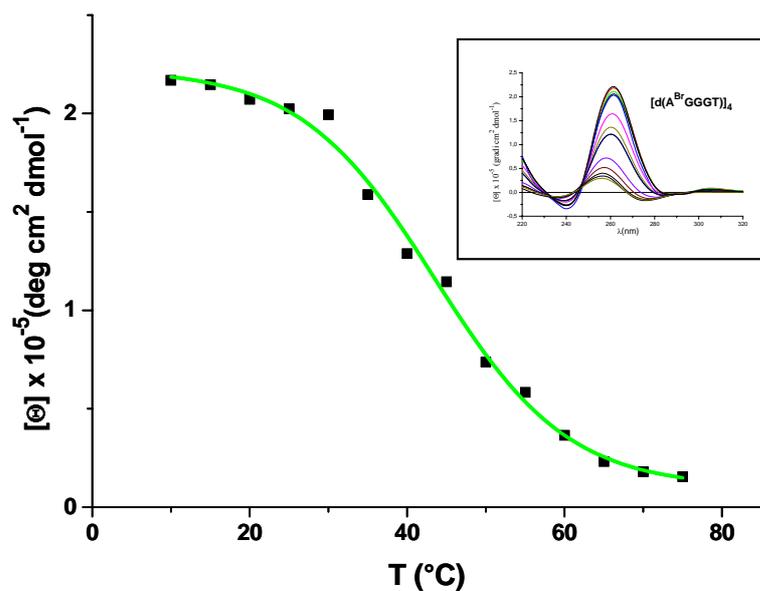


Fig.4.13 Curve di denaturazione termica all'equilibrio delle quadruplex $[d(A^{Br}G_3T)]_4$ modificate e spettri CD registrati a differenti temperature.

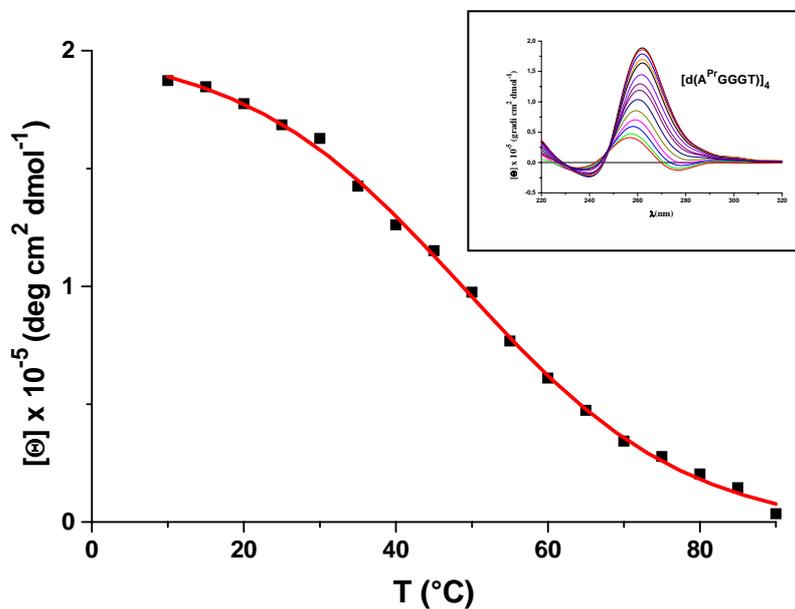


Fig.4.14 Curve di denaturazione termica all'equilibrio delle quadruplex $[d(A^{Pr}G_3T)]_4$ modificate e spettri CD registrati a differenti temperature.

In Tab.4.2 sono mostrate le T_m di equilibrio e i parametri termodinamici di tutti i sistemi studiati.

Tabella 4.2

Parametri termodinamici relativi alla dissociazione delle quadruple eliche.

Quadruplex	$T_m(^{\circ}\text{C})$ (± 1)	ΔH° kJ mol ⁻¹	ΔS° kJ mol ⁻¹ K ⁻¹	$\Delta G^{\circ}(298 \text{ K})$ kJ mol ⁻¹ (± 1)
[d(TAG₃T)]₄	51	210 \pm 10	0.43 \pm 0.03	81
[d(TA ^{Pr} G ₃ T)] ₄	53	220 \pm 11	0.45 \pm 0.04	85
[d(TA ^{OH} G ₃ T)] ₄	38	180 \pm 10	0.33 \pm 0.03	82
[d(TA ^{Br} G ₃ T)] ₄	60	210 \pm 10	0.41 \pm 0.02	88
[d(AG₃T)]₄	37	280 \pm 13	0.68 \pm 0.04	77
[d(A ^{OH} G ₃ T)] ₄	37	280 \pm 13	0.68 \pm 0.04	77
[d(A ^{Pr} G ₃ T)] ₄	53	170 \pm 8	0.30 \pm 0.03	80
[d(A ^{Br} G ₃ T)] ₄	48	200 \pm 9	0.40 \pm 0.02	81

I valori del ΔH° per le quadruplex [d(TA^{OH}G₃T)]₄, [d(TA^{Pr}G₃T)]₄ e [d(TA^{Br}G₃T)]₄ sono confrontabili con quello della quadruplex [d(TAG₃T)]₄. Il sistema [d(A^{Pr}G₃T)]₄ presenta il valore di ΔH° più basso, pari a 170 kJ mol⁻¹. Dal calcolo del ΔG° si osserva che i sistemi [d(A^{OH}G₃T)]₄, [d(A^{Br}G₃T)]₄ e [d(A^{Pr}G₃T)]₄ hanno una stabilità termodinamica confrontabile e leggermente più bassa rispetto ai sistemi [d(TA^{Pr}G₃T)]₄ e [d(TA^{Br}G₃T)]₄.

4.4 Conclusioni

Le informazioni raccolte mediante il dicroismo circolare e la microcalorimetria differenziale a scansione hanno permesso di caratterizzare completamente, dal punto di vista chimico-fisico, il processo di dissociazione delle due quadruplex, $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ e $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$. L'analisi dei dati riportati in Tab 4.1 mostra che la quadruplex $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ risulta sia termicamente che termodinamicamente più stabile della quadruplex $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$. Essendo il ΔH° per la dissociazione della quadruplex $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ più basso, se confrontato con quello per la dissociazione della $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$, la sua maggiore stabilità termodinamica va associata essenzialmente al termine entropico. Il ΔS° per la dissociazione della $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ è, infatti, più piccolo del corrispondente valore per la $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ ed è, quindi, più favorevole alla formazione della struttura a quadrupla elica. D'altra parte queste differenze nei parametri termodinamici relativi alle due quadruplex si accordano bene con l'ipotesi che nella sequenza $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ si abbia la formazione di un piano aggiuntivo di adenine che non si forma nella sequenza $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$. Il più alto valore del ΔH° riscontrato per la dissociazione della $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ corrisponderebbe proprio alla rottura del piano di adenine. Allo stesso tempo l'esistenza di questo stesso piano di adenine è sufficiente per conferire maggiore rigidità alla struttura della quadruplex $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ giustificando la maggiore variazione di entropia sperimentalmente misurata per il processo di dissociazione di questa quadruplex.

In conclusione l'analisi termodinamica fornisce una prova indiretta a conferma della formazione dell'A-tetrade nella sequenza d(AGGGT) e allo stesso tempo mette in risalto l'importanza del termine entropico, associato alla formazione di questo piano, nel determinare la stabilità complessiva della struttura a quadrupla elica

L'analisi dei dati riportati nella Tab.4.2 mostra che l'introduzione dei sostituenti ossidrilici, bromo e propino ha un effetto diverso sulle due sequenze.

In particolare per il sistema $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ l'introduzione dei gruppi bromo e propino porta ad una marcata variazione nel ΔH° e nel ΔS° , i cui valori risultano notevolmente inferiori rispetto agli stessi parametri della sequenza non modificata. Mentre l'introduzione del gruppo OH non causa alcuna variazione nei parametri

termodinamici. Nella sequenza $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$, invece, non si ha una così spiccata variazione dei termini entalpico ed entropico per introduzione delle stesse modifiche. Questi dati sembrano suggerire che l'introduzione delle modifiche comporti una notevole variazione strutturale nel sistema $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$, ma non nella $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$.

Questa situazione potrebbe essere dovuta al fatto che le modifiche introdotte disturbano parzialmente la formazione della A-tetrate nella quadruplex $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ mentre hanno un effetto non marcato sulla $[d(\text{TAG}_3\text{T})]_4$ dove il piano di adenine era assente già in partenza.

La mancata formazione del piano di adenine nella $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$ modificata può facilmente rendere conto dell'abbassamento riscontrato nel ΔH° . Allo stesso tempo la perdita del piano di adenine conferisce alla struttura una minore rigidità che si riflette nella diminuzione del termine entropico.

In particolare il propino è il sostituente che comporta un maggior effetto destrutturante nella sequenza $[d(\text{AG}_3\text{T})]_4$, come è evidente dai valori di ΔH° e ΔS° entrambi più bassi se confrontati con quelli della sequenza modificata col bromo. Questa differenza potrebbe essere dovuta più che ad un diverso ingombro sterico dei due sostituenti ad un'eventuale capacità del bromo di interagire con il sistema π adiacente.

CAPITOLO 5

Quadruple eliche contenenti residui 8-bromo-guanine

5.1 Introduzione

Le tetradi di guanine sono strutture interessanti in molti campi di ricerca [56] che vanno dalla chimica strutturale alla biologia molecolare e, recentemente, alla chimica analitica [57]. Le quadruple eliche presentano polimorfeismo riguardo tre aspetti: l'orientazione relativa dei filamenti, l'angolo di torsione glicosidico *syn/anti* dei residui di guanina, e la struttura dei loops (dove presenti) che collegano i filamenti. La natura dei cationi presenti nel tampone svolge un ruolo chiave nella selezione tra le varie strutture che gli oligonucleotidi possono adottare [58]

Il pentanucleotide 5'-d(TGGGT)-3', in presenza di ioni potassio, forma un'elica tetramolecolare stabile, già caratterizzata mediante tecniche termodinamiche e spettroscopiche [59], con tutti i filamenti paralleli e con tutte le guanine in conformazione glicosidica *anti*. Tuttavia, la sostituzione di un singolo atomo in una guanina può produrre notevoli variazioni nelle proprietà chimico-fisiche dell'acido nucleico risultante.

Per esempio, la presenza di un sostituito ingombrante come l'atomo di bromo in posizione 8 della guanina può destabilizzare la normale conformazione *anti* della base, costringendo il legame glicosidico nella conformazione *sin* [60]. In particolar modo, questa ipotesi è stata verificata per una quadrupla elica unimolecolare con filamenti antiparalleli, in cui la sostituzione di un idrogeno in posizione 8 della guanina con un atomo di bromo, con conformazione *syn* stabilizza la struttura, mentre se la base si trova in *anti* si ha una destabilizzazione [61].

Pertanto è stato interessante studiare l'effetto di più sostituzioni su quadruple eliche di DNA tetramolecolari a filamenti paralleli. Sono state prese in esame le sequenze:

1. d(TGGGT)
2. d(TG^{Br}G^{Br}GT),
3. d(TG^{Br}GG^{Br}T),
4. d(TG^{Br}G^{Br}G^{Br}T),

5. $d(\text{TGG}^{\text{Br}}\text{G}^{\text{Br}}\text{T})$.

con Br si indica la sostituzione di un atomo di idrogeno in posizione 8 della guanina con un atomo di bromo (Fig. 5.1). Da studi NMR si evince che solo le strutture 1,2,3 formano quadruple eliche.

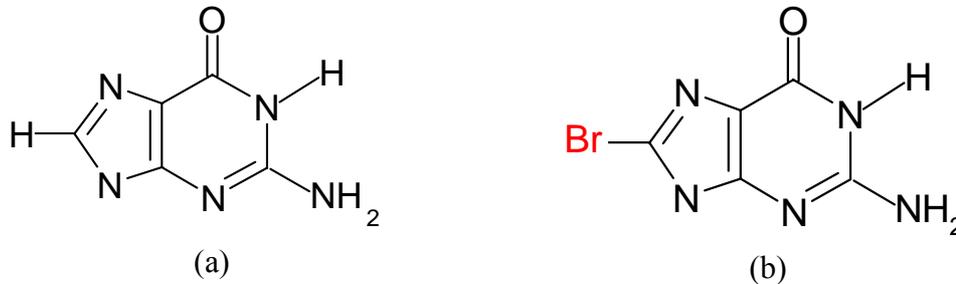


Fig. 5.1 Struttura della guanina (a); struttura della guanina con modifica (b)

Le quadruple eliche modificate sono state caratterizzate mediante dicroismo circolare e le loro proprietà chimico-fisiche sono state confrontate con la quadrupla elica non modificata. I dati sperimentali hanno fornito informazioni utili per una maggiore comprensione dei fattori essenziali che governano la stabilità delle strutture a quadrupla elica di DNA.

5.2. Analisi degli spettri CD delle quadruple eliche di DNA $[d(TGGGT)]_4$, $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$, $[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$

Il processo di dissociazione delle tre quadruple eliche è stato studiato utilizzando il dicroismo circolare. Le misure sono state eseguite a pH 7 in una soluzione tampone 10 mM di fosfato di potassio in presenza di 200 mM KCl e 0.1M EDTA a una concentrazione di singolo filamento di $2 \cdot 10^{-4}$ M. Gli spettri CD dei due oligonucleotidi modificati sono stati registrati a 10°C e confrontati con lo spettro della quadrupla elica non modificata. (Fig 5.2)

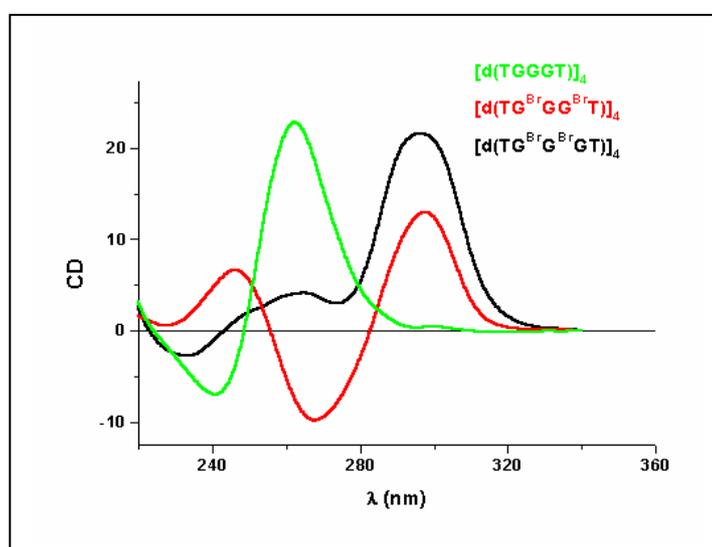


Fig.5.2 Spettri CD a 10°C delle quadruplex $[d(TGGGT)]_4$, $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$, $[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$.

In maniera sorprendente l'introduzione del bromo sui diversi piani di guanine fornisce diversi spettri CD. Lo spettro della sequenza non modificata mostra una banda positiva a 263 nm ed una negativa a 243 nm tipica di quadruple eliche tetramolecolari a filamenti paralleli, mentre lo spettro CD della $d(TG^{Br}GG^{Br}T)$ mostra una banda negativa a 263 nm e una banda positiva a 295 nm, invece lo spettro della $d(TG^{Br}G^{Br}GT)$ ha due bande positive a 263 e 295 nm. Spettri con tali bande sono solitamente caratteristici di quadruple eliche con filamenti antiparalleli [62] Questo fatto suggerisce che i residui sostituiti hanno un effetto determinante sulla struttura della quadrupla elica costringendoli ad adottare una conformazione glicosidica *sin*.

Poiché gli spettri NMR hanno mostrato che le quadruple eliche hanno strutture tetramolecolari a filamenti paralleli.

I dati termodinamici sono stati ottenuti dalle curve di denaturazione termica in condizioni di equilibrio (Fig. 5.3, 5.4 e 5.5) seguendo il metodo riportato nel paragrafo 2.1.1.

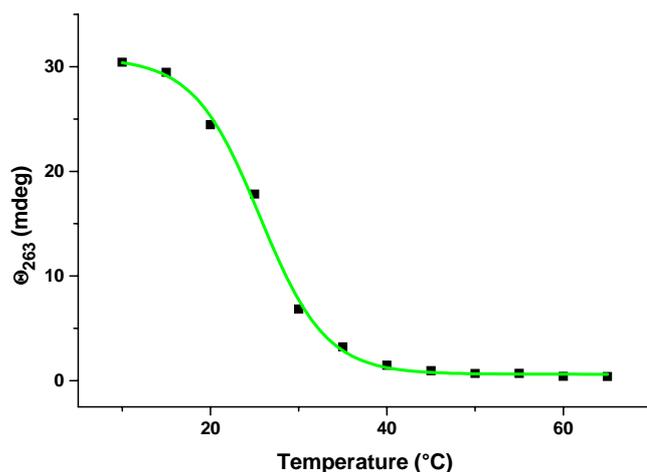


Fig.5.3 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex [d(TGGGT)]₄

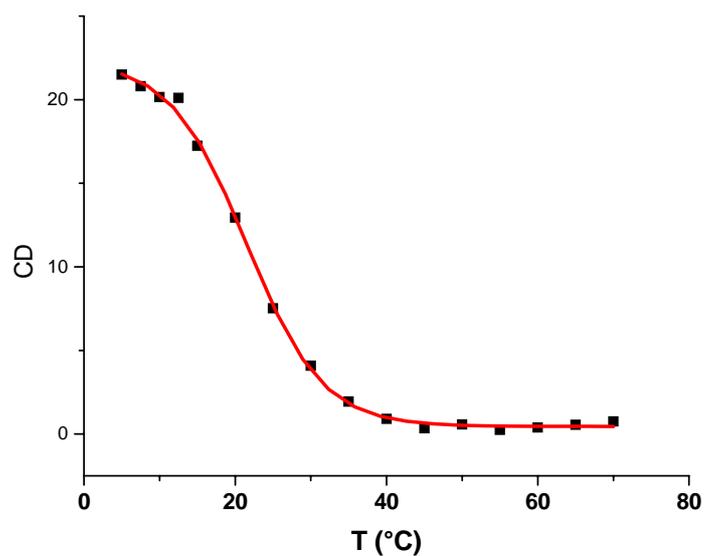


Fig.5.4 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex [d(TG^{Br}GG^{Br}T)]₄

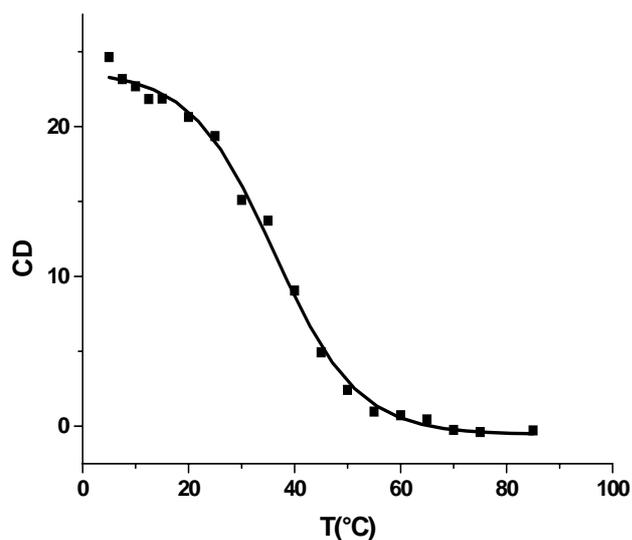


Fig.5.5 Curva di denaturazione termica all'equilibrio della quadruplex $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$

Analizzando le curve di melting, mediante un modello a due stati (paragrafo 2.5), sono stati ricavati i parametri termodinamici per la dissociazione delle quadruple eliche (tabella 5.1).

Tabella 5.1

Parametri termodinamici relativi alla dissociazione delle quadruple eliche $[d(TGGGT)]_4$, $[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$, $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$

Quadruplex	T_m (°C) ± 1	H° (kJ mol ⁻¹)	S° (kJmol ⁻¹ K ⁻¹)	G°_{298} (kJmol ⁻¹)
$[d(TGGGT)]_4$	30	220 \pm 11	0.51 \pm 0.04	68 \pm 12
$[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$	21	200 \pm 9	0.47 \pm 0.02	60 \pm 11
$[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$	37	270 \pm 12	0.65 \pm 0.04	76 \pm 15

I sistemi studiati mostrano una transizione cooperativa con una temperatura di melting (T_m), corrispondente al flesso della curva, di 30°C per la quadruplex

$[d(TGGGT)]_4$, di 21°C per $[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$ e di 37°C per $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$. È interessante notare che l'introduzione degli atomi di bromo sulle guanine, in differenti posizioni lungo la sequenza oligonucleotidica, comporta diversi effetti sulla stabilità termodinamica in confronto alla non modificata. Infatti analizzando i parametri termodinamici si osserva che la sostituzione di due residui di guanina adiacenti, come nel caso della $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$ produce un aumento di stabilità della quadrupla elica rispetto alla non modificata; mentre la stessa sostituzione con guanine non adiacenti, come avviene nella $[d(TG^{Br}GG^{Br}T)]_4$, comporta una diminuzione della stabilità termodinamica. Il valore di ΔH° per la denaturazione della quadrupla elica $[d(TG^{Br}G^{Br}GT)]_4$ è di 70 kJ mol⁻¹ più alto rispetto al valore ottenuto per la quadrupla elica non modificata. Ciò indica che l'elevata stabilità termodinamica osservata per questo sistema è di origine entalpica.

CAPITOLO 6

Quadruple eliche contenenti all'estremità 3' o 5' residui monosaccaridici e disaccaridici.

6.1 Introduzione

Recentemente, Hotoda e collaboratori, hanno dimostrato che oligonucleotidi ricchi in guanine, funzionalizzati con gruppi aromatici all'estremità 5', hanno una potente attività anti-HIV [63]. In particolare la sequenza $5'd(TGGGAG)^3'$, che è in grado di formare una struttura a quadrupla elica, risulta inattiva senza modifiche, mentre le sequenze recanti le modifiche sono attive in concentrazioni micromolari. [64,4].

Questa attività anti virale è stata correlata con la capacità delle sequenze ricche in guanine di formare stabili strutture a quadrupla elica, ipotizzando che esse siano le specie che interagiscono direttamente con i target *in vivo*.

Un'interessante modifica, proposta per migliorare il profilo farmacologico degli oligonucleotidi, è l'introduzione all'estremità 3' e 5' di residui mono e disaccaridici [64]. Questa ultima modifica permette di aumentare la stabilità degli oligonucleotidi rispetto alle nucleasi e riduce la loro tendenza ad aggregare.

L'attenzione è stata focalizzata sullo studio chimico-fisico di quadruple eliche di sequenza $d(5'TGGGAG3')$, contenente all'estremità 5' o 3' residui monosaccaridici (glucosio o mannosio) o disaccaridici (saccarosio).

Ci si propone di valutare se anche le quadruple eliche contenenti residui mono- o disaccaridici presentino tale attività, in modo da poter correlare la loro stabilità con l'attività anti-HIV.

In fig. 6.1 sono riportate le strutture dei residui mono e disaccaridici introdotti nella sequenza.

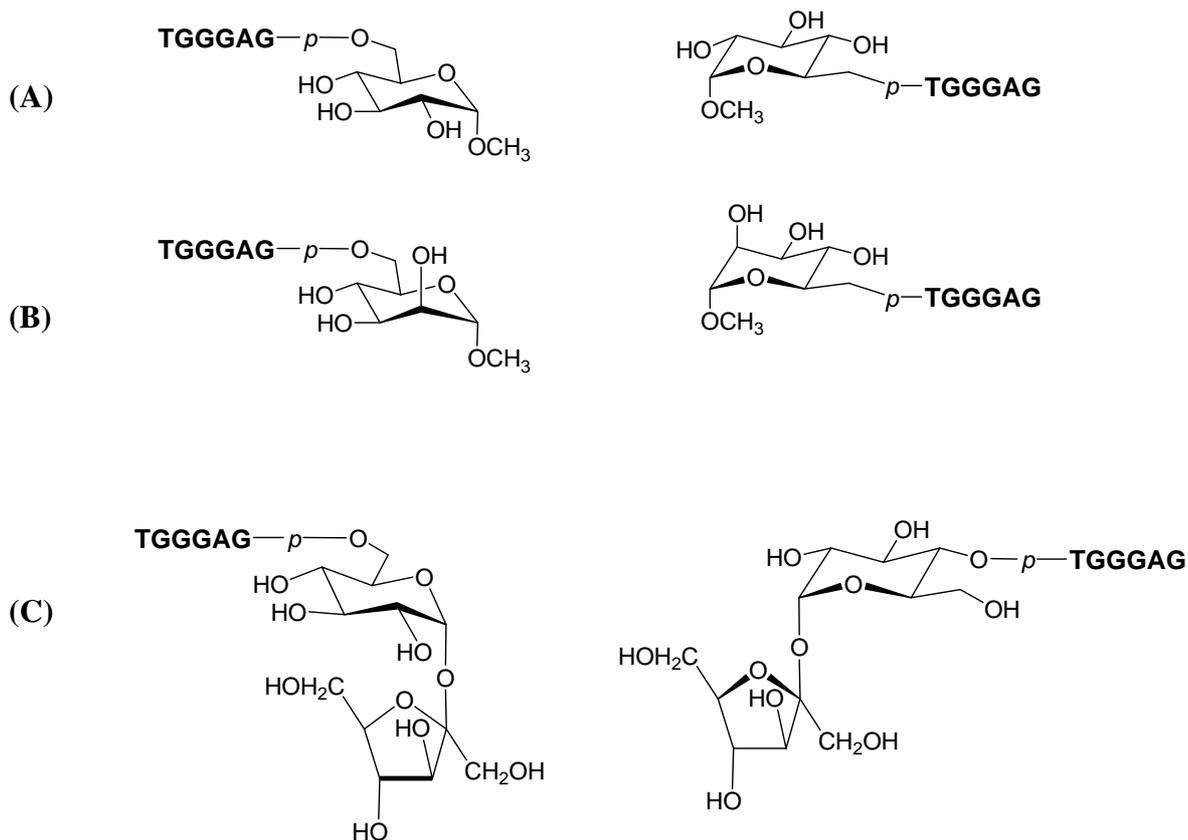


Figura 6.1 Struttura dei residui mono- o disaccaridi:
(A) glucosio, **(B)** mannosio e **(C)** saccarosio

Sono state utilizzate le seguenti abbreviazioni:

$[d(\text{Glucosio-}^{5'}\text{TGGGAG}^{3'})]_4$	(5'-Glu)
$[d(^{5'}\text{TGGGAG}^{3'}\text{-Glucosio})]_4$	(3'-Glu)
$[d(\text{Mannosio-}^{5'}\text{TGGGAG}^{3'})]_4$	(5'-Man)
$[d(^{5'}\text{TGGGAG}^{3'}\text{-Mannosio})]_4$	(3'-Man)
$[d(\text{Saccarosio-}^{5'}\text{TGGGAG}^{3'})]_4$	(5'-Sac)
$[d(^{5'}\text{TGGGAG}^{3'}\text{-Saccarosio})]_4$	(3'-Sac)

La stabilità di queste quadruple eliche è stata poi confrontata con quella della quadrupla elica non modificata $[d(^{5'}\text{TGGGAG}^{3'})]_4$. La caratterizzazione chimico-fisica delle quadruple eliche è stata condotta mediante dicroismo circolare.

6.2 Risultati e discussioni

Nella figura 6.2 sono stati riportati gli spettri CD a 20 °C delle quadruple eliche recanti il glucosio (pannello A), il mannosio (pannello B) e il saccarosio (pannello C) nelle posizioni 3' e 5', e paragonato allo spettro della quadrupla elica non modificata.

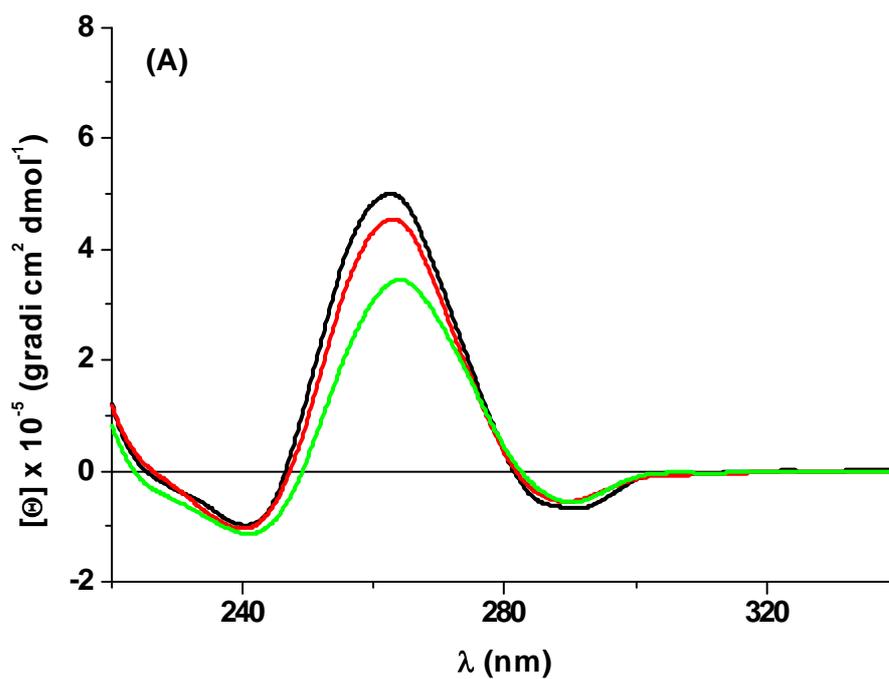


Figura 6.2A Spettri CD a 20°C di:
[d(^{5'}TGGGAG^{3'})]₄ (nero), [d(Glucosio-^{5'}TGGGAG^{3'})]₄ (rosso), [d(^{5'}TGGGAG^{3'}-
Glucosio)]₄ (verde).

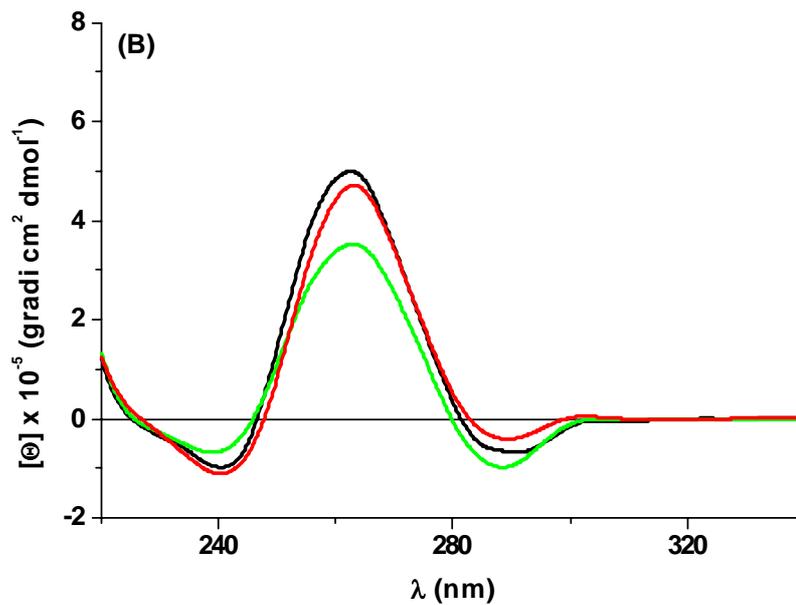


Figura 6.2B Spettri CD a 20°C di:
 $[d(5' \text{TGGGAG}^{3'})_4]$ (nero), $[d(\text{Mannosio}-5' \text{TGGGAG}^{3'})_4]$ (rosso), $[d(5' \text{TGGGAG}^{3'} - \text{Mannosio})_4]$ (verde).

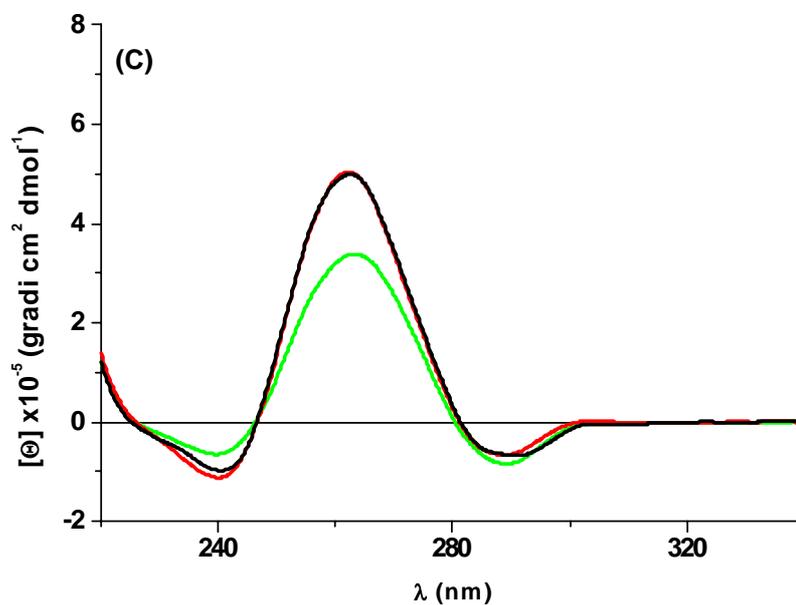


Figura 6.2C Spettri CD a 20°C di:
 $[d(5' \text{TGGGAG}^{3'})_4]$ (nero), $[d(\text{Saccarosio}-5' \text{TGGGAG}^{3'})_4]$ (rosso),
 $[d(5' \text{TGGGAG}^{3'} - \text{Saccarosio})_4]$ (verde).

Gli spettri CD delle quadruple eliche studiate sono qualitativamente simili, presentano un'intensa banda positiva a 263 nm ed una banda negativa a 243 nm.

Questi spettri sono caratteristici di quadruple eliche tetramolecolari a filamenti paralleli con le basi azotate in conformazione *anti*, come riportato in letteratura.

Ciò conferma che le sequenze d(^{5'}TG₃AG^{3'}) contenenti residui di zuccheri in 5' ed in 3' formano una struttura a quadrupla elica tetramolecolare a filamenti paralleli.

6.3 Analisi termodinamica delle quadruple eliche

Le temperature di dissociazione delle quadruple eliche sono influenzate dalla velocità di scansione a cui si segue il processo, evidenziando così un controllo cinetico. Questo mostra che il processo di dissociazione è di non-equilibrio. Anche per questi sistemi è stato necessario costruire le curve di denaturazione termica in condizioni di equilibrio [66]. Tali curve sono state ottenute per punti, mediante misure di Dicroismo Circolare.

Riportando gli spettri a diversa temperatura (fig.6 3, 6.4, 6.5 e 6.6), si evidenzia che il segnale CD, alla lunghezza d'onda caratteristica della quadrupla elica (263 nm), diminuisce all'aumentare della temperatura. In questo modo è stato possibile seguire il processo di dissociazione della quadrupla elica.

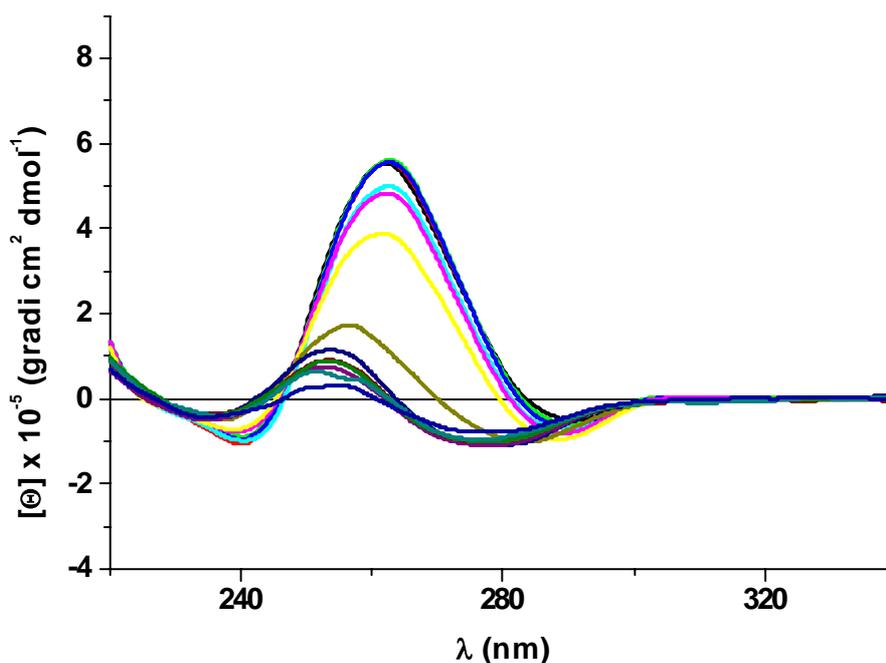


Figura 6.3. Spettri CD registrati a differenti temperature per la quadrupla elica $[d(5'TGGGAG^3')]_4$

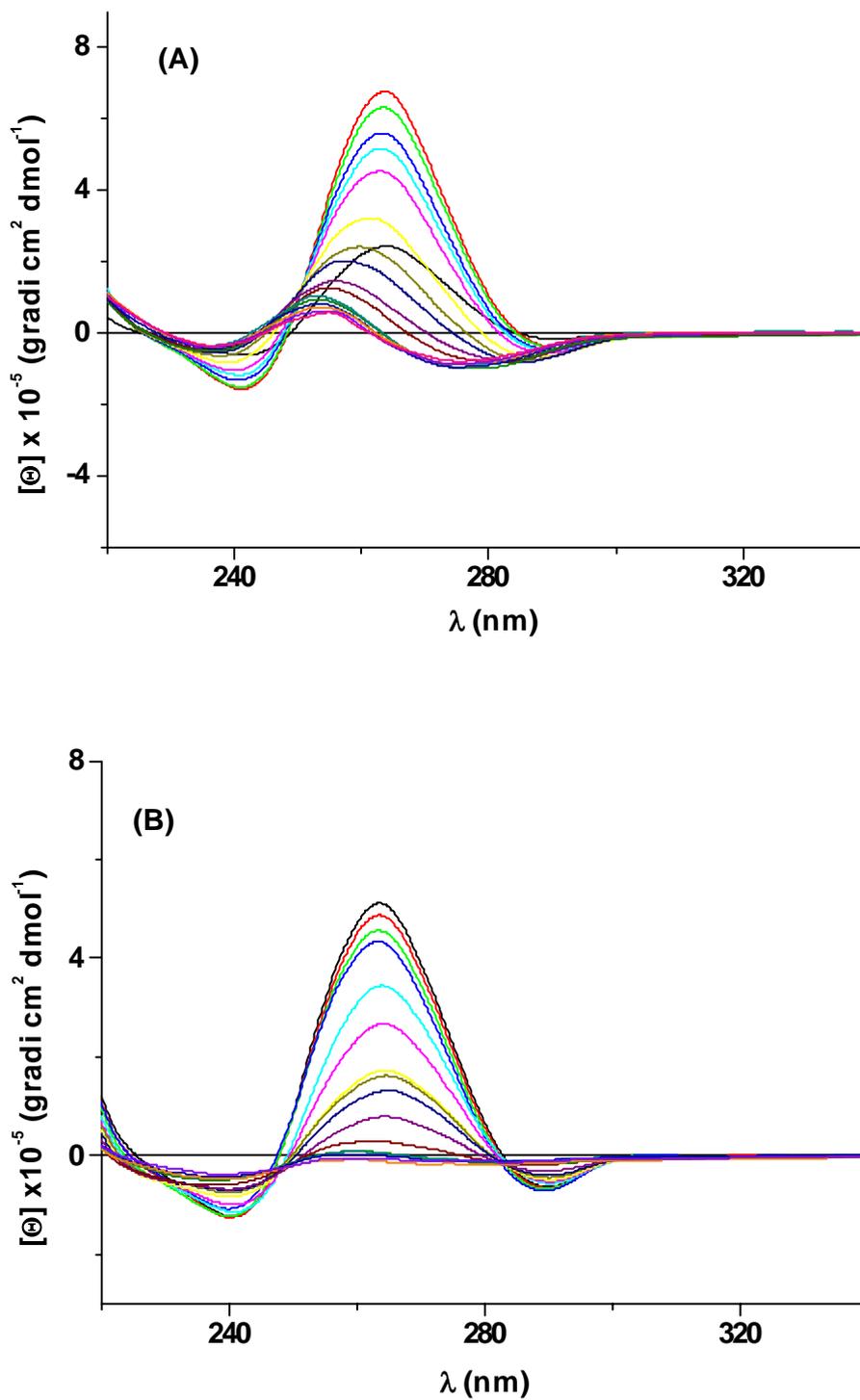


Figura 6.4. Spettri CD registrati a differenti temperature per:
 (A) la quadrupla elica $[d(\text{Glucosio-}^{5'}\text{TGGGAG}^{3'})]_4$
 (B) la quadrupla elica $[d(^{5'}\text{TGGGAG}^{3'} - \text{Glucosio})]_4$

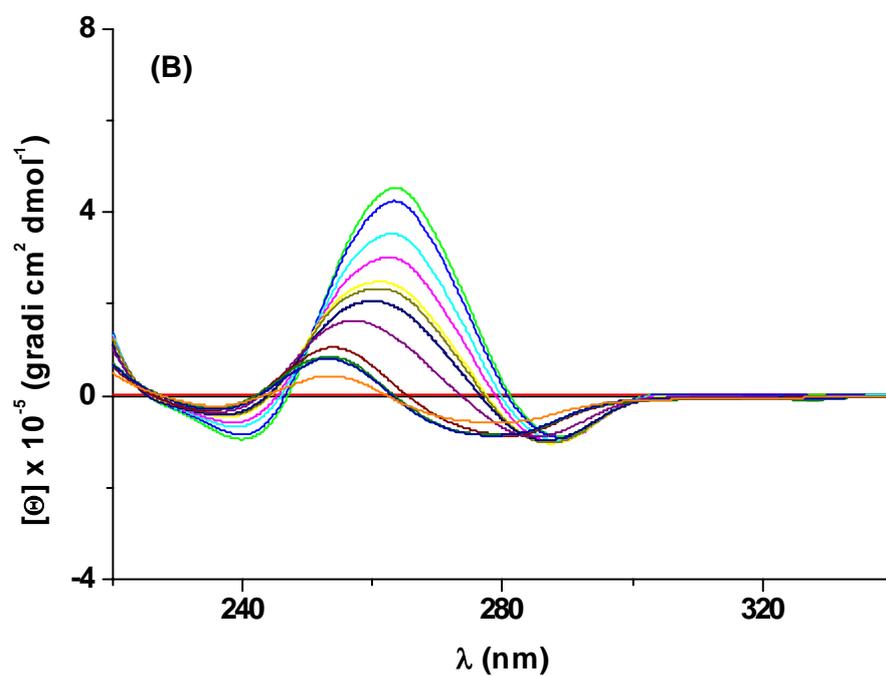
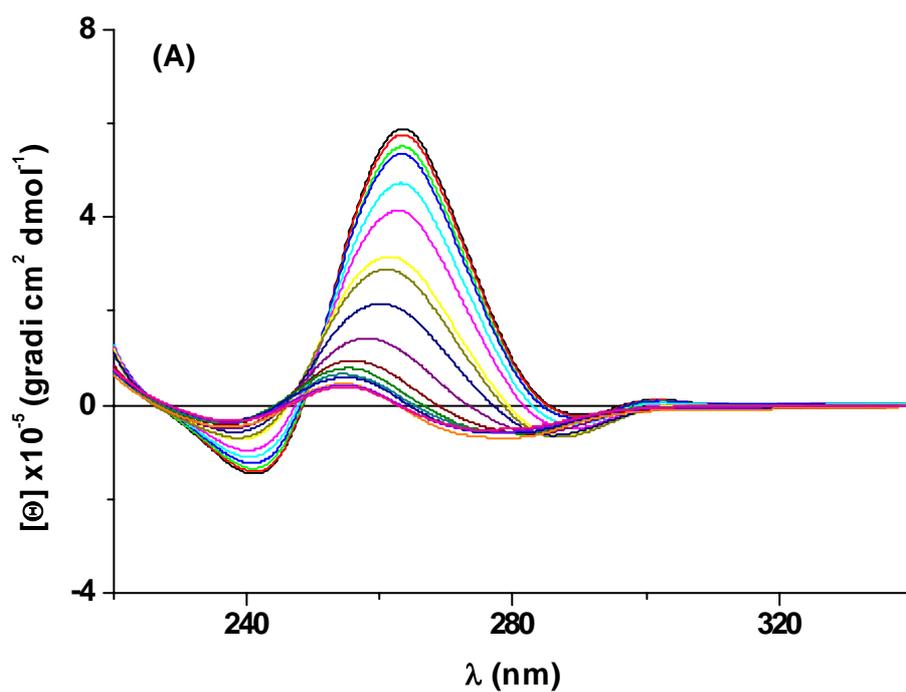


Figura 6.5. Spettri CD registrati a differenti temperature per:
 (A) la quadrupla elica $[d(\text{Mannosio-5}'\text{TGGGAG}^{3'})]_4$
 (B) la quadrupla elica $[d(5'\text{TGGGAG}^{3'}\text{-Mannosio})]_4$

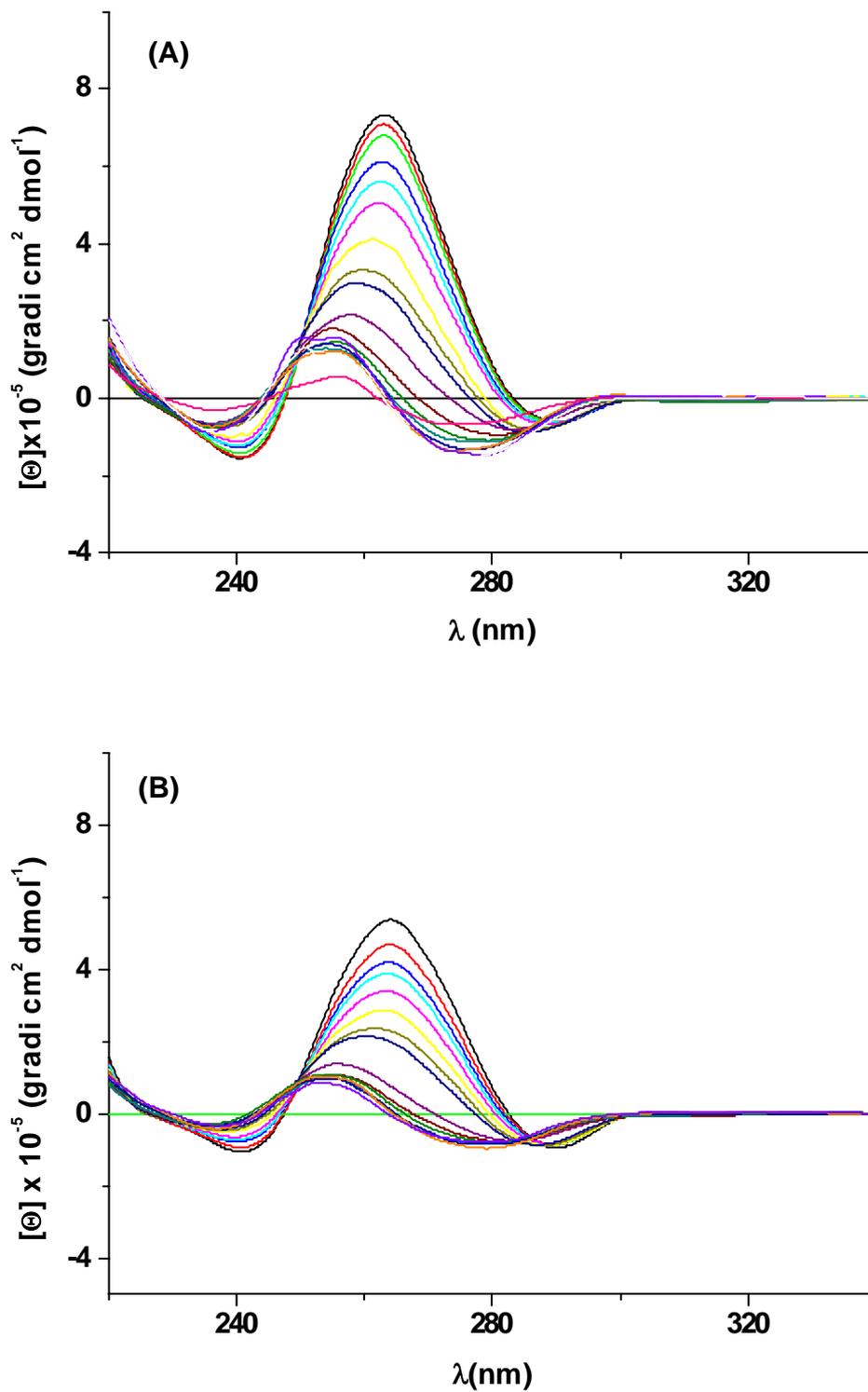


Figura 6.6. Spettri CD registrati a differenti temperature per:
 (A) la quadrupla elica $[d(\text{Saccarosio-}^5\text{TGGGAG}^3)]_4$
 (B) la quadrupla elica $[d(^5\text{TGGGAG}^3\text{-Saccarosio})]_4$

Il valore di ellitticità a 263 nm è stato riportato in funzione della temperatura, ottenendo così la curva di dissociazione della quadrupla elica (fig.6.7, 6.8, 6.9 e 6.10).

La T_m per la dissociazione di ogni quadrupla elica in singolo filamento è stata ottenuta dal punto di flesso di ciascuna curva sigmoideale.

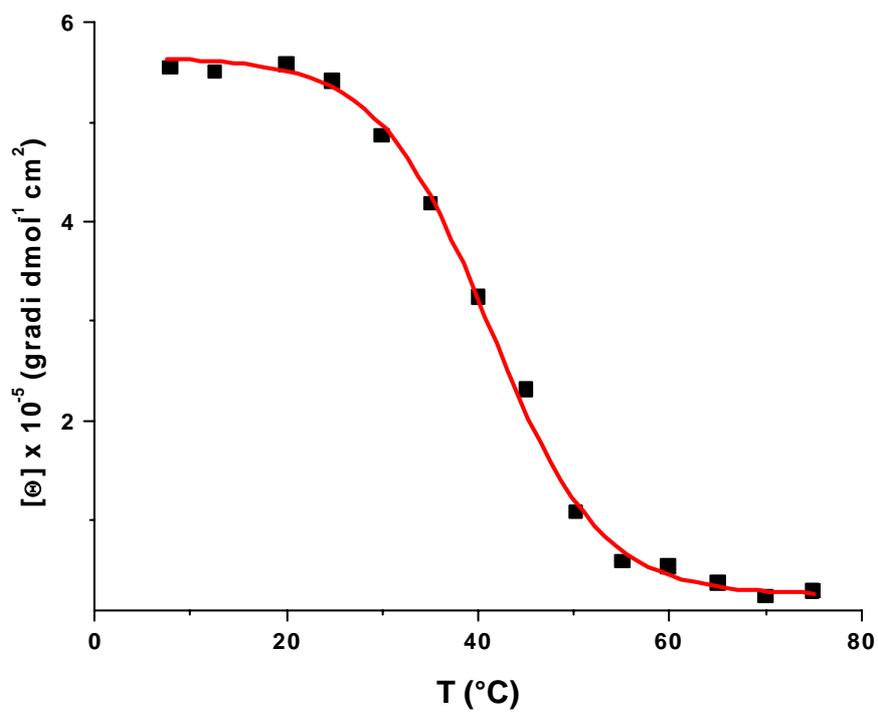


Figura 6.7. Curva di dissociazione della quadrupla elica $[\text{d}(\overset{5'}{\text{TGGGAG}}\overset{3'})_4]$

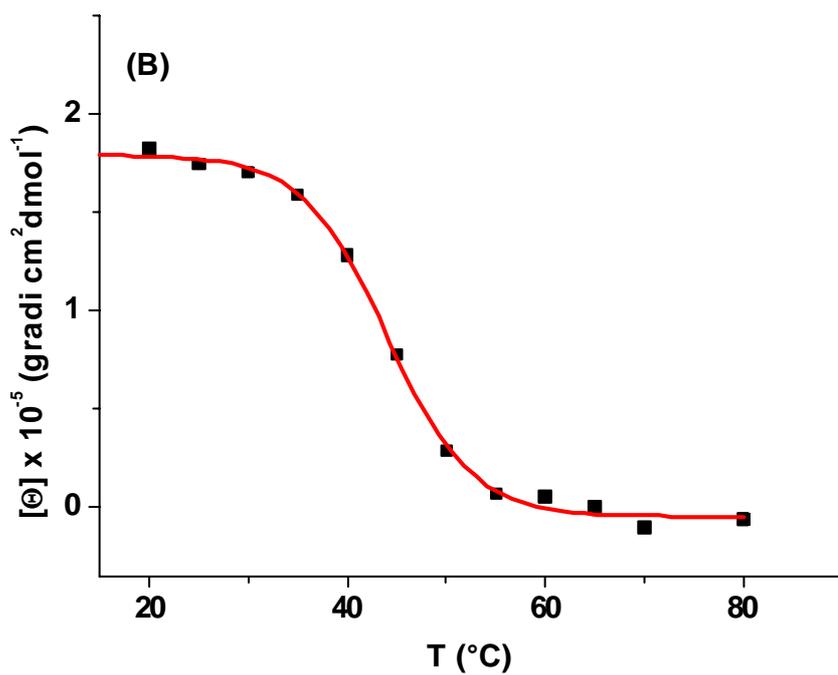
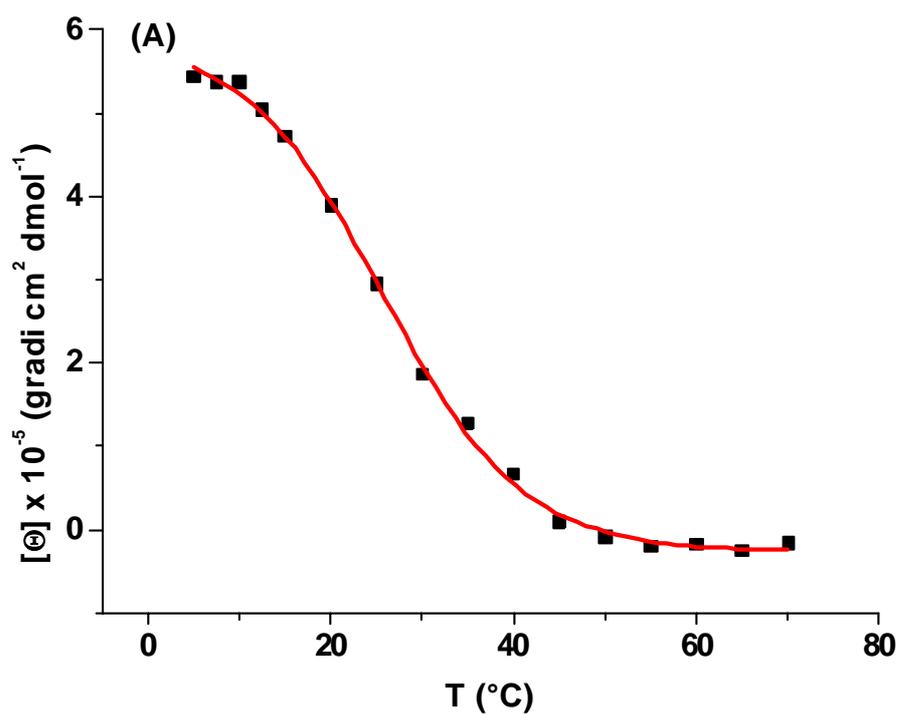


Figura 6.8. Curva di dissociazione della:
 (A) quadrupla elica $[d(\text{Glucosio-}^5\text{TGGGAG}^3)]_4$
 (B) quadrupla elica $[d(^5\text{TGGGAG}^3\text{-Glucosio})]_4$

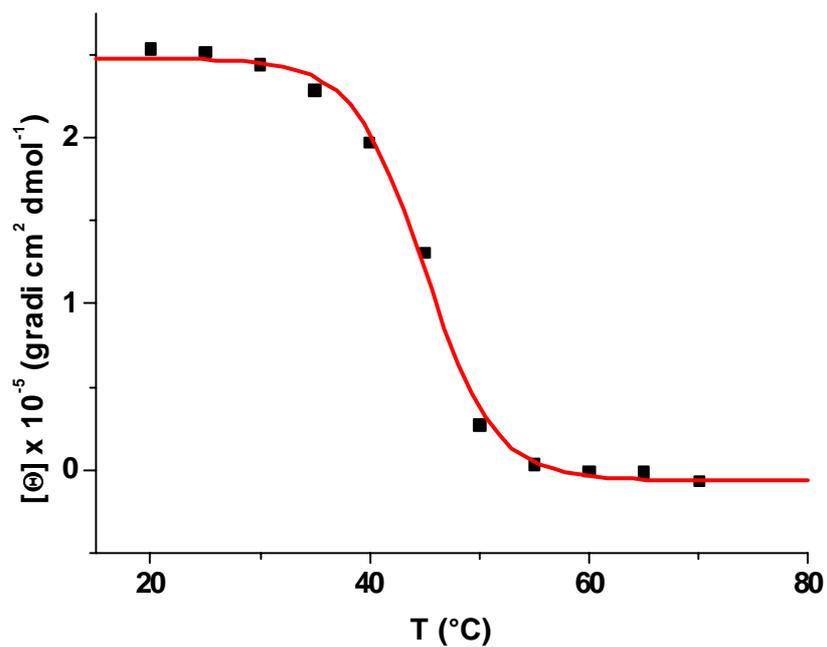
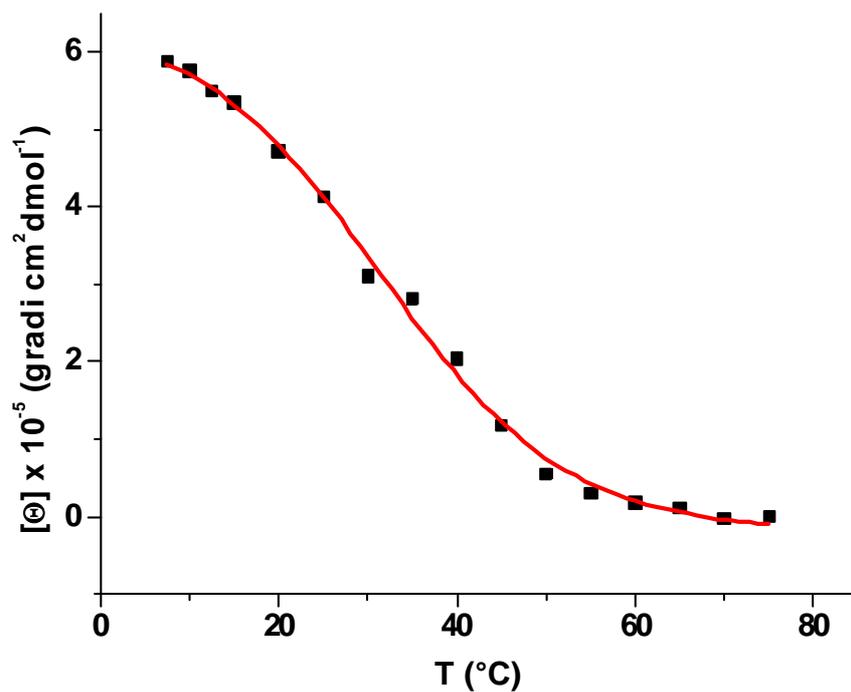


Figura 6.9. Curva di dissociazione della:
 (A) quadrupla elica $[d(\text{Mannosio-}^5\text{TGGGAG}^3)]_4$
 (B) quadrupla elica $[d(^5\text{TGGGAG}^3\text{-Mannosio})]_4$

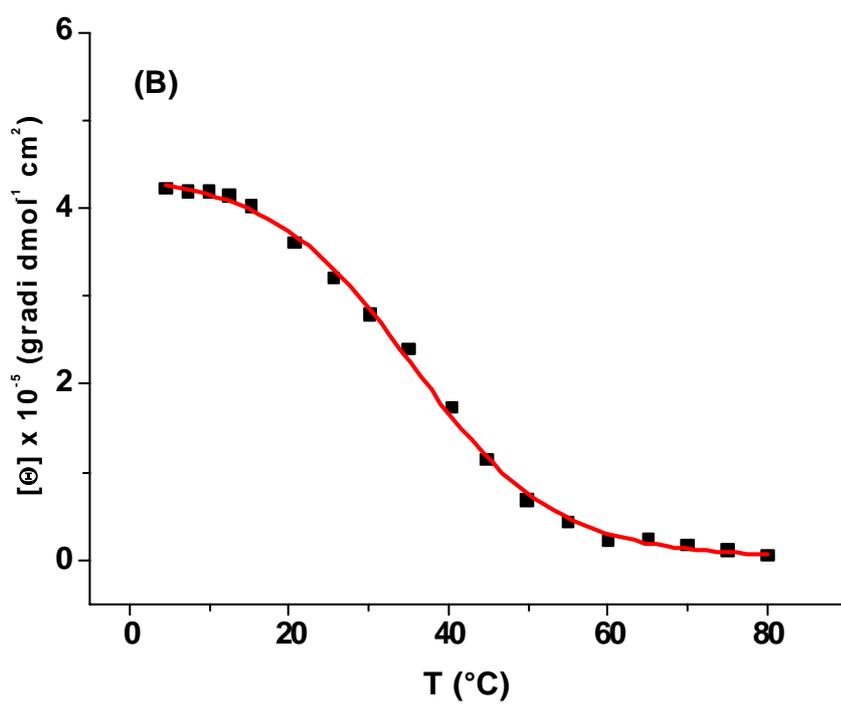
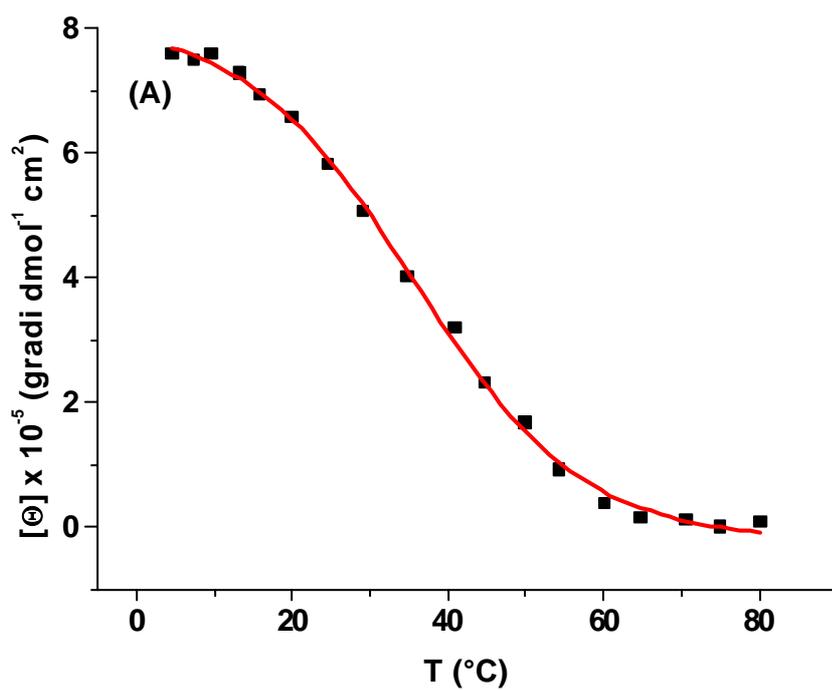


Figura 3.9. Curva di dissociazione della:
 (A) quadrupla elica [d(Saacariosio-^{5'}TGGGAG^{3'})]₄
 (B) quadrupla elica [d(^{5'}TGGGAG^{3'}-Saccariosio)]₄

In tabella 6.1 sono riportati i parametri termodinamici dei sistemi studiati.

Tabella6.1: Parametri termodinamici per la dissociazione delle quadruple eliche.

	T_m °C	ΔH° kJ mol ⁻¹	ΔS° kJ mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG°_{298} kJ mol ⁻¹
5'TGGGAG ^{3'}	41.1 ± 1	325 ± 12	0.81 ± 0.03	83.6 ± 12
Glucosio-5'TGGGAG ^{3'}	25.7 ± 1	190 ± 10	0.42 ± 0.03	65.4 ± 13
5'TGGGAG ^{3'} -Glucosio	44.0 ± 1	400 ± 13	1.04 ± 0.04	90.1 ± 15
Mannosio-5'TGGGAG ^{3'}	31.4 ± 1	200 ± 15	0.44 ± 0.03	69.2 ± 14
5'TGGGAG ^{3'} -Mannosio	45.0 ± 1	420 ± 10	1.10 ± 0.04	91.6 ± 16
Saccarosio-5'TGGGAG ^{3'}	35.5 ± 1	210 ± 10	0.46 ± 0.04	72.3 ± 17
5'TGGGAG ^{3'} -Saccarosio	35.6 ± 1	200 ± 13	0.43 ± 0.03	71.9 ± 15

Tutti i sistemi mostrano una transizione cooperativa con una T_m corrispondente al punto di flesso della sigmoide.

Il valore di ΔH° per la quadrupla elica non modificata è di 325 kJ mol^{-1} , questo valore è consistente con la formazione di quattro tetradi di guanine [67]. Le quadruple eliche di 3'-Glu e 3'-Man, presentano una temperatura di dissociazione ed un valore di ΔH° più alto rispetto a quello della quadrupla elica non modificata. Le quadruple eliche 5'-Glu e 5'-Man presentano un andamento inverso con un valore più basso sia di temperatura di dissociazione che di ΔH° rispetto alla quadrupla elica non modificata. Da quest'analisi risulta, quindi, che l'introduzione in posizione 3' sia del glucosio che del mannosio porta sempre ad una stabilizzazione della quadrupla elica mentre l'introduzione degli stessi zuccheri in posizione 5' porta ad una marcata destabilizzazione della quadrupla elica. Inoltre, dai parametri termodinamici ricavati, appare chiaro che sia l'effetto stabilizzante che quello destabilizzante hanno una origine entalpica. Infatti nel caso delle quadruple eliche 3-glu e 3-man si osserva un incremento nel valore di ΔH° (rispetto alla quadrupla elica non modificata) di circa 90 kJ mol^{-1} mentre per le quadruple eliche 5-glu e 5-man si ha una diminuzione di circa 130 kJ mol^{-1} . Questo andamento nella stabilità delle quadruple eliche contenenti mannosio e glucosio può essere correlato con le diverse caratteristiche strutturali che la quadrupla elica non modificata presenta alle estremità 5' e 3'. Queste due estremità, infatti, non sono equivalenti dal punto di vista strutturale. L'estremità in 3' presenta quattro guanine che molto probabilmente sono strutturate in una G-tetrade mentre l'estremità 5' presenta quattro timine che, di solito, in posizione terminale non si strutturano in maniera rigida e sono molto più mobili delle guanine in 3'. Di conseguenza, gli zuccheri in 3', direttamente legati alla G-tetrade, hanno una minor mobilità rispetto a quelli legati alle timine in 5'. Questo potrebbe favorire la strutturazione degli zuccheri in posizione 3' mediante interazioni (es. legami idrogeno). Inoltre questi zuccheri "immobilizzati" potrebbero contribuire a proteggere la G-tetrade dal solvente stabilizzandola ulteriormente. Nel caso degli zuccheri in 5' l'estrema mobilità delle timine e, quindi, degli zuccheri non consentirebbe la formazione di strutture stabili. Questa ipotesi è consistente anche con i valori di entropia osservati che indicano una entropia di dissociazione (e quindi una struttura

iniziale più rigida) più alta per le quadruple eliche 3'-Man e 3'-Glu rispetto alle quadruple eliche 5'-Man e 5'-Glu.

Un caso a parte è il saccarosio che, invece, destabilizza in egual misura la quadrupla elica non modificata sia se introdotto in 5' sia se introdotto in 3'. Questo comportamento può essere dovuto alla natura essenzialmente diversa del saccarosio rispetto al mannosio e al glucosio, il primo infatti è un disaccaride mentre gli ultimi due sono monosaccaridi. E' probabile che il saccarosio sia troppo ingombrante e quindi porti a delle interazioni steriche sfavorevoli anche se introdotto all'estremità 3'.

6.4 Conclusioni

In quest'ultima parte del lavoro di tesi è stata focalizzata l'attenzione sullo studio chimico-fisico di quadruple eliche di sequenza $d(5'TGGGAG3')$, contenente all'estremità 5' o 3' residui monosaccaridici (glucosio, 5'-Glu e 3'-Glu, o mannosio, 5'-Man e 3'-Man), o disaccaridici (saccarosio, 5'-Sac e 3'-Sac). La stabilità di tali sistemi è stata poi confrontata con quella della quadrupla elica non modificata. La caratterizzazione chimico-fisica delle quadruple eliche è stata condotta mediante dicroismo circolare.

L'analisi dei parametri termodinamici, ha messo in evidenza che l'introduzione in posizione 3' di monosaccaridi (glucosio e mannosio) porta ad una stabilizzazione della quadrupla elica, mentre l'introduzione degli stessi zuccheri in 5' destabilizza la quadrupla elica. Inoltre, è stato osservato che sia l'effetto stabilizzante che quello destabilizzante hanno una origine entalpica. Il diverso comportamento delle due estremità rispetto all'introduzione di questi zuccheri è da ricondurre alla diversa struttura delle due estremità: l'estremità 3' potrebbe presentare una tetraide di guanine mentre l'estremità 5' presenta delle timine molto mobili. Il disaccaride saccarosio, invece, destabilizza in egual misura la quadrupla elica non modificata sia se introdotto in 5' sia se introdotto in 3'. Questo è probabilmente dovuto al suo maggior ingombro sterico rispetto ai monosaccaridi utilizzati.

Attualmente è in fase di sperimentazione il test di attività anti-HIV delle sequenze studiate, presso il laboratorio del Prof. Jan Balzarini del Dipartimento di Microbiologia e Immunologia dell'Università Lueven in Belgio. In futuro ci si propone di correlare la stabilità di questi sistemi con la loro attività anti-HIV.

Bibliografia

1. Lee J. S.; Evans, D. H. ; Morgan, A. R. *Nucleic Acids Research* **1980**, 8, 4305
2. Blackburn, E. H., *Nature*, **1991**, 350, 569
3. Phillips, K.; Dauter, Z.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. J.; Luisi, B. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 171
4. Kenery, M. A. *Biopolymers*, **2001**, 56, 123
5. Sen, D.; Gilbert, W. *Nature*, **1988**, 344, 364
6. Simonsson, T. *Biol. Chem.* **2001**, 382, 621
7. Marathias, V. M.; Bolton, P. H. *Biochemistry*, **1999**, 38, 4355
8. Kilpatrick, M. W.; Torri, A.; Kang, D. S.; Engler, J. A.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* 1986, 12, 11350
9. Mokbell, K. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2003**, 19, 470
10. Wenn, J. D.; Gray, D. M. *Biochemistry*, **2002**, 41, 11438
11. Bryan, T. M.; Cech, T. R. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1999**, 11, 318
12. Harley, C. B.; Futcher, A. B.; Greider, C. W. *Nature*, **1990**, 345, 458

13. Allsopp, R. C.; Harley, C.B. *Exp. Cell. Res.*, **1995**, 219, 130
14. Kim, N. W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K. R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.C.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, R.; Shay, J.W. *Science*, **1994**, 336, 2011
15. Wai, L. K. *Med. Gen. Med.*, **2004**, 26, 19
16. Mondello, C.; Scovassi, A. I. *Biochem. Cell. Biol.*, **2004**, 82, 498
17. Palumbo, M. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, **2004**, 4, 425
18. Sharma, S.; Raymond, E.; Soda, H.; Sun, D.; Hilsenbeck, S.G.; Sharma, A.; Izbicka, E.; Windle, B.; Von Hoff, D.D. *Ann Oncol.*, **1997**, 8, 1063
19. Neidle, S.; Kelland, L.R. *Anticancer Drug Des.*, **1999**, 14, 341
20. Kelland, L. R. *Lancet Oncol.*, **2001**, 2, 95
21. Mergny, J. L.; Hélène, C. *Nature Med.*, **1998**, 4, 1366
22. Alberti, P.; Lacroix, L.; Guittat, L.; Hélène, C.; Mergny, J. L. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2003**, 3, 23
23. Zahler, A.M.; Williamson, J.R.; Cech, T.R.; Prescott, D.M. *Nature*, **1991**, 350, 718
24. Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B.E.; Salazar, M.; Kerwin, S.M.; Trent, J.O.; Jenkins, T.C.; Neidle, S.; Hurley, L.H. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2113
25. Pelengaris, S.; Rudolph, B.; Littlewood, T. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2000**, 99, 100

26. Spencer, C.A.; Groudine, M. *Adv. Cancer Res.*, **1991**, 56, 1
27. Ellington, A. D., Szostak, J. W. *Nature*, **1990**, 346, 818
28. Kusser, W. J. *Biotechnol.*, **2000**, 74, 27 ed i riferimenti in esso citati
29. Jing, N.; Rando, R. F.; Pommier, Y.; Hogan, M. E. *Biochemistry*, **1997**, 36, 12498
30. Misra, H. S.; Pandey, P. K.; Modak, M. J.; Vinayak, R. Pandey, V. N. *Biochemistry*, **1998**, 37, 1917
31. Vinayak, R.; Van der Laan, A. C.; Brill, R.; Otteson, K.; Andrus, A.; Kuyl-Yeheskiely, E.; Van Boom, J. H. *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, 16, 1653
32. Egholm, M., Buchard, O.; Nielsen, P.E.; Berg, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1895.
33. Uhlmann, E. *Biol. Chem* **1998**, 379, 1045.
34. Petraccone, L.; Erra, E.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; De Napoli, L.; Barone, G.; Giancola, C. *Biopolymers* **2004**, 73, 434.
35. Petraccone, L.; Pagano, B.; Esposito, V.; Randazzo, A.; Piccialli, G; Barone, G.; Mattia, C. A.; Giancola, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16215.
36. Dominick, P. K.; Jarstfer, M. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 5050
37. Jepsen, J. S.; Sorensen, M. D.; Wengel, J. *Oligonucleotides*, **2004**, 14, 130
38. Randazzo, A.; Esposito, V.; Ohlenschlager, O.; Ramachandran, R.; Mayol,

L. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32, 3083

39. Barone, G.; Del Vecchio, P.; Fessas, D.; Giancola, C.; Graziano, G. J. *Thermal Anal.*, (**1993**), 39, 2779
40. Freire, E.; Biltonen, R.L.; *Biopolymers*, **1978**, 17, 436
41. Privalov, P.L.; *Adv. Protein Chem.*, **1979**, 33, 167
42. Cantor, C.R.; Warshaw, M.M.; Shapiro, H. *Biopolymers* **1970**, 9, 1059.
43. Saenger W.; *Principles of Nucleic Acid Structure*, **1984**. New York; Springer-Verlag;
44. Chubb J.M.; Hogan M.E.; *Trends Biotechnol* **1992**, 10, 132
45. Hélèn C.; *Anticancer Drug Des* **1991**, 6, 569.
46. Evans, T.; Schon, E.; Gora-Maslak, G.; Patterson, J.; Efstratiadis, A. *Nucleic Acid Research* **1984**, 12, 8043.
47. Fry, M.; Loeb, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 4950.
48. Blackburn, E. H. *Cell* **1994**, 77, 621.
49. Jin, R. Z.; Gaffney, B.L.; Wang, C.; Jones, R.A.; Breslauer, K.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8832.
50. Kankia, B.I., Marky, L.A., *J. Am. Chem Soc.*, **2001**, 123, 10799.
51. Hardin, C.C.; Henderson E.; Walk, S.K; Tinoco Jr. I.; Blackburn, E.H; *Cell* **1987**, 51, 899

52. Prasanta Patel K.;Koti A.S.R.;Hosur R.V.; *Nucleic Acids Research*, **1999**, Vol 27, No 19.
53. Parkinson, G.N.; Michael, P.H.; Lee & Neidle S.; *Letters to Nature* **2002**, Vol. 417.
54. Töhol, J.; Eimer, W.; *Biophys. Chem.* **1997**, 67, 177.
55. Kankia, B.I., Marky,L.A., *J. Am.Chem.* **2001**, 123, 10799.
56. Jeffery, T. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 668.
57. Li, J:J., Fang, X., Tan, W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, 292, 31.
58. Wlodarczyk, A., Grzybowski, P., Patkowski, A., Dobek, A, *J. Phys. Chem.*, **2005**, 109, 3597.
59. Renzhe, J.; Barbara, L.; Gaffney, Chuan W.; Roger A; Jones and Kenneth J. Breslauer, *Biochemistry* **1992**,89, 8832
60. (a) Uesugi, S., Ikehara, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 3250. (b) Jordan, F., Niv H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, 476, 265. (c) Uesugi, S., Ohkubo, M., Urata, H., Ikehara, M., Kobayashi, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 99, 3250.
61. Dias, E, Battiste, J.L., Williamson, J.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 4479.
62. Wang, Y., Patel, D.J., *Structure*, **1993**,1,263.

63. Hotoda, H., Koizumi, M., Koga, R., Kaneko, M., Momota, K., Ohmine, T., Furukawa, H., Agatsuma, T., Nishigaki, T., Sone, J., Tsutsumi, S., Kosaka, T., Abe, K., Kimura, S., and Shimada, K. **1998** *J. Med. Chem.*, 41, 3655.
64. Koizumi, M., Kaneko, M., Ohmine, T., Furukawa, H., Nishigaki, T **1999** Patent JP98/04625, PCT/WO99/19474.
65. Adinolfi, M.; De Napoli, L.; Di Fabio, G.; Iadonisi, A. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1879.
66. Petraccone, L.; Erra E.; Esposito V.; Randazzo. A.; Galeone, A.; Barone, G.; Giancola, C. *Biopolymers*, **2005**, 77, 75.
67. Guschlbauer, W.; Chantot, J. F.; Thiele, D. J. *Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 491-511.

