

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTÀ DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA DELLE SOSTANZE NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXIV CICLO 2008-2011

***“PROGETTAZIONE ANALISI STRUTTURALE E IMPLICAZIONI
FARMACOLOGICHE DI COMPLESSI A QUADRUPLA ELICA DEL
DNA ”***

Coordinatore del corso:

Ch.^{ma} Prof. Maria Valeria D'Auria

Docente Tutore:

Ch.^{mo} Prof. Aldo Galeone

Candidato:

Dott. Giuseppe Citarella

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	4
<i>Bibliografia</i>	8
CAPITOLO 1	
STRUTTURE G-QUADRUPLEX DEL DNA	9
<i>1.1 Variabilità strutturale nelle G-Quadruplex</i>	10
<i>1.2 Stabilizzazione di strutture G-quadruplex: importanza dei cationi e delle interazioni di stacking</i>	17
<i>1.3 Importanza biologica delle strutture G-quadruplex</i>	21
<i>1.4 La caratterizzazione strutturale del DNA mediante tecniche spettroscopiche</i>	34
<i>Bibliografia</i>	41
CAPITOLO 2	
STRUTTURE QUADRUPLEX COME TARGET BIOLOGICI	
<i>2.1 Introduzione</i>	47
<i>2.2 Effetto dell'introduzione di siti abasici sulle proprietà cinetiche termodinamiche e strutturali di sequenze formanti quadruplex</i>	48
<i>2.3 Risultati e discussioni</i>	51
<i>2.4 Parte sperimentale</i>	64
<i>Bibliografia</i>	69
CAPITOLO 3	
QUADRUPLEX COME POTENZIALI AGENTI FARMACOLOGICI: GLI APTAMERI	
<i>3.1 Introduzione</i>	72

<i>3.2 Effetti dell'introduzione di 8-metil-2'-deossiguanosina sugli aspetti strutturali, sulla stabilità e sulla cinetica di formazione delle Quadruplex tetramolecolari</i>	74
<i>3.3 Risultati e discussioni</i>	76
<i>3.4 Conclusioni</i>	86
<i>3.5 Parte sperimentale</i>	88
<i>Bibliografia</i>	95

CAPITOLO 4

EFFETTO DELL'INTRODUZIONE DI DUE RESIDUI DI 8-METIL-2'-DEOSSIGUANOSINA: UN TENTATIVO DI ORIENTARE I FILAMENTI

<i>4.1 Introduzione</i>	98
<i>4.2 Risultati e discussioni</i>	99
<i>4.3 Conclusioni</i>	121
<i>4.4 Parte sperimentale</i>	124
<i>Bibliografia</i>	129

CAPITOLO 5

MODIFICHE A LIVELLO DEL BACKBONE

SINTESI E ANALISI STRUTTURALI DI OLIGONUCLEOTIDI ETEROCHIRALI FORMANTI QUADRUPLEX

<i>5.1 Introduzione</i>	133
<i>5.2 Risultati e discussioni</i>	135
<i>5.3 Conclusioni</i>	147
<i>5.4 Parte sperimentale</i>	148
<i>Bibliografia</i>	151

Introduzione generale

Negli ultimi decenni, la scoperta dei meccanismi molecolari alla base di molte patologie ha intensificato gli studi di nuove strategie terapeutiche in grado di interferire con l'espressione genica, processo in cui l'informazione contenuta nel codice genetico è tradotta in complessi macromolecolari di natura proteica.

Molte patologie virali (HIV, patologie causate da adenovirus, citomegalovirus, etc.) e tumorali (leucemie, linfomi, melanomi)¹ sono provocate da alterazioni proteiche; gli oligonucleotidi sintetici, naturali e analoghi, si presentano come una valida alternativa alla tradizionale terapia farmacologica, basata sull'inibizione di una proteina (enzima o complesso multi-proteico) anomala, agendo a monte del processo di produzione della proteina stessa mediante due strategie: antigene e antisenso.

Nella strategia antigene il bersaglio è il DNA genomico; infatti, prevede l'utilizzo di un oligonucleotide (TFO: Triplex Forming Oligonucleotide) in grado di appaiarsi con la doppia elica di DNA, principalmente a livello dei promotori genici, andando a formare una tripla elica (triplex) in uno specifico tratto di sequenza. Le triplex determinano il blocco della traduzione del DNA bersaglio del TFO, silenziando l'informazione in esso contenuta (**Fig. 1**).

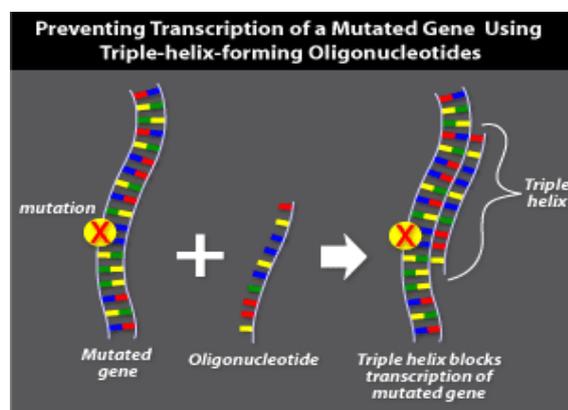


Fig. 1 Strategia antigene.

Nella strategia antisenso, invece, il bersaglio è il trascritto di mRNA; infatti, l'oligonucleotide terapeutico si appaia con il trascritto di RNA bloccando la traduzione proteica in diversi modi: arrestando il processo di splicing dell'mRNA, interferendo con l'apparato ribosomiale o mediante l'attivazione dell'RNasi H, che taglia i filamenti ribonucleotidici nelle doppie eliche ibride DNA/RNA (**Fig. 2**).

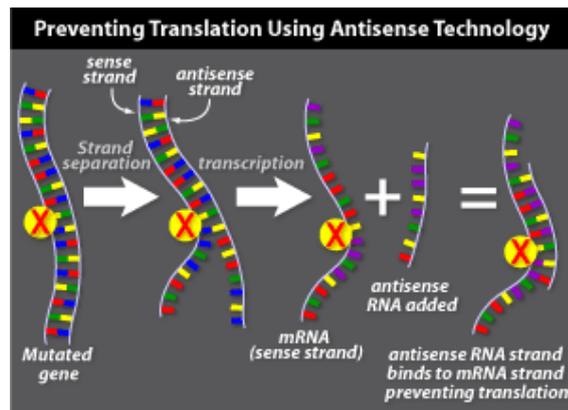


Fig. 2 Strategia antisenso.

Un altro approccio terapeutico, molto promettente, è quello degli aptameri, oligonucleotidi sintetici selezionati in base alla loro capacità di legare con elevata affinità un target terapeutico, in genere di natura proteica, interferendo con la sua attività.

Nonostante le diverse applicazioni terapeutiche, determinate dall'alta specificità d'azione, e le promettenti proprietà farmacodinamiche, gli oligonucleotidi naturali presentano grossi limiti dal punto di vista farmacocinetico per il loro impiego in vivo, a causa della rapida degradazione da parte delle nucleasi e per la difficoltà di attraversamento delle membrane biologiche.

Per superare tali limiti, sono stati progettati oligonucleotidi sintetici, analoghi di sequenze naturali, apportando modifiche chimiche a livello del *backbone* zucchero-fosfato o a livello delle basi azotate, dotati della stessa affinità e specificità per le molecole target, ma con profili farmacocinetici migliori.

La forma predominante del DNA genomico è la doppia elica “classica” di Watson e Crick². Tuttavia, in base alla sequenza e alle condizioni dell’ambiente in cui si trova, il DNA può presentare un’elevata variabilità di strutture secondarie: DNA di tipo A, B, Z, strutture cruciformi, *hairpin*, a tripla elica (triplex), a quadrupla elica (quadruplex) (Fig. 3).

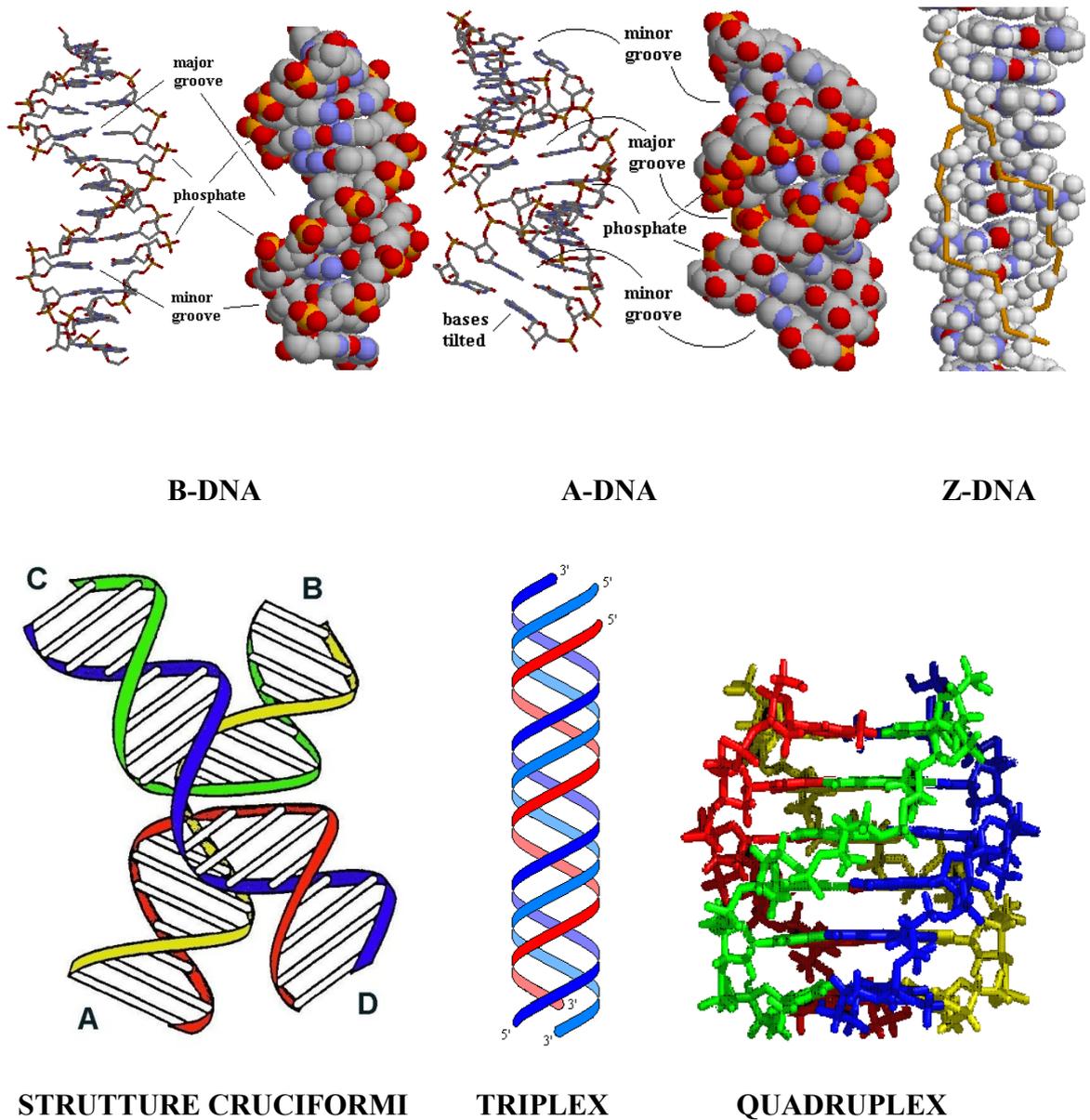


Fig. 3 Strutture secondarie del DNA.

Un’area di ricerca molto attiva è rappresentata dalla determinazione del ruolo biologico delle strutture inusuali del DNA. Diversi i campi di maggiore interesse, in particolare la

presenza e il potenziale ruolo in vivo³⁻⁴ di tali strutture, le modalità di formazione e la regolazione delle informazioni da esse trasportate, la possibilità di utilizzare oligonucleotidi (ODN) capaci di formare strutture secondarie come agenti terapeutici.

Durante il triennio di dottorato di ricerca ho focalizzato la mia attenzione sullo studio di strutture G-Quadruplex del DNA (**Fig. 4**), complessi a quadrupla elica adottati da sequenze ricche di guanine, presenti a livello biologico e potenzialmente coinvolti in alcuni processi importanti, quali la replicazione, la trascrizione, la ricombinazione genica⁵ e la funzionalità telomerica⁶.

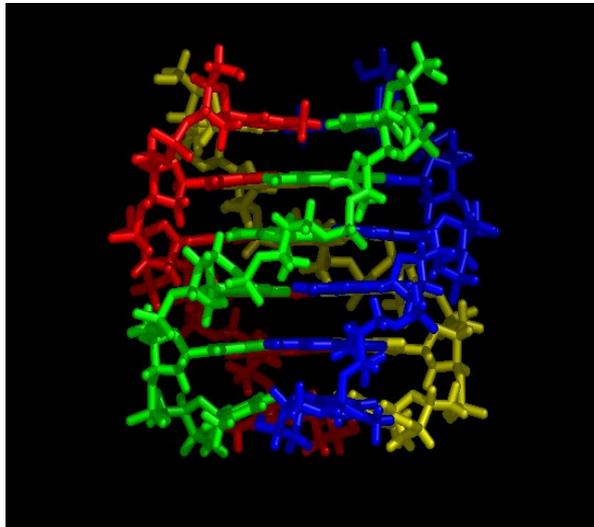


Fig. 4. Modello tridimensionale di una G-quadruplex.

In particolare, mi sono occupato principalmente della sintesi e analisi strutturale, mediante tecniche spettroscopiche, UV, CD, NMR mono e bidimensionale, di oligonucleotidi e analoghi formanti strutture quadruplex e di valutare le loro potenziali applicazioni in campo terapeutico.

Bibliografia

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

Capitolo 1: Strutture G-Quadruplex del DNA

Le quadruplex sono inusuali strutture secondarie del DNA a quattro filamenti, adottate da sequenze ricche di guanine (G). Le unità fondamentali di tali strutture sono le tetradi di G o quartetti di G (**Fig. 5**), organizzazioni planari di quattro guanosine legate tra loro da legami idrogeno (H) di tipo Watson-Crick e Hoogsteen. Ciascuna base guaninica si comporta contemporaneamente da donatore e da accettore di due legami H¹ (di tipo Hoogsteen), che coinvolgono rispettivamente l'N1-H e l'N2-H di una guanina e l'N7 e l'O6 del residuo adiacente.

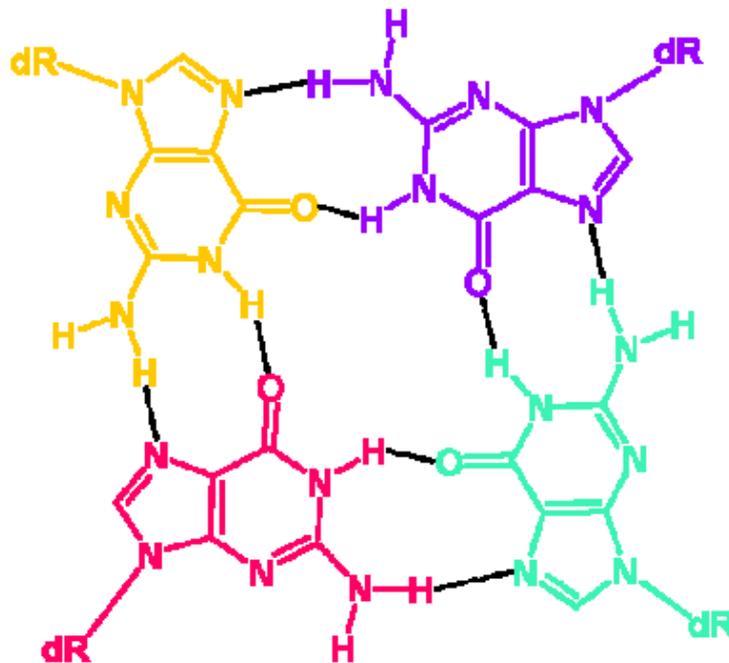


Fig. 5 Tetrade di Guanine.

La tetrade di G crea una cavità centrale (**Fig. 6**).

L'unione di quattro filamenti di DNA con sequenze ricche in G formano una struttura eliocoidale destrorsa², stabilizzata da una serie di tetradi di G sovrapposte l'una all'altra ad una distanza di 3.3 \AA ³⁻⁴. Al centro dell'elica si crea una cavità centrale in cui si

affacciano gli atomi di ossigeno (O6) carbonilici delle basi, rendendo energeticamente sfavorita⁵ la formazione del complesso, per cui è necessaria la presenza di uno ione. Infatti, al centro della cavità centrale, per stabilizzare la quadruplex, è necessaria la presenza di ioni metallici⁶ monovalenti o bivalenti.

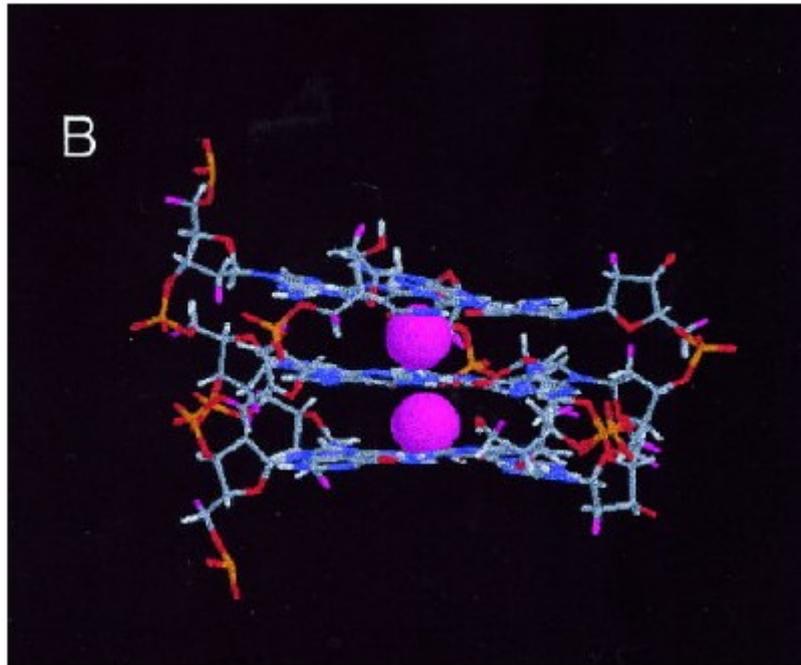


Fig. 6 Disposizione dei cationi all'interno della cavità centrale delle strutture G-quadruplex.

I cationi più efficaci sono il K^+ e il Na^+ . Ogni catione presenta una propria geometria di coordinazione. Infatti, il K^+ si posiziona tra due tetradi, coordinato da otto ossigeni carbonilici, con una geometria di tipo antiprismatico bpiramidale⁷. Il Na^+ , invece, può disporsi anche al centro di ogni tetrade, coordinato da quattro O6, con una geometria di coordinazione di tipo planare.

1.1 Variabilità strutturale nelle G-Quadruplex.

Le G-quadruplex sono caratterizzate da un'elevata variabilità strutturale determinata dalla stechiometria dei filamenti, dal loro relativo orientamento e dalla conformazione dell'angolo glicosidico delle guanine coinvolte nelle tetradi.

Le conformazioni a quadrupla elica possono essere costituite dal ripiegamento di un unico filamento oligonucleotidico (G-quadruplex monomolecolari)⁸, dall'interazione tra due (G-quadruplex bimolecolari)⁹ o quattro filamenti (G-quadruplex tetramolecolari)¹⁰ (**Fig. 7**).

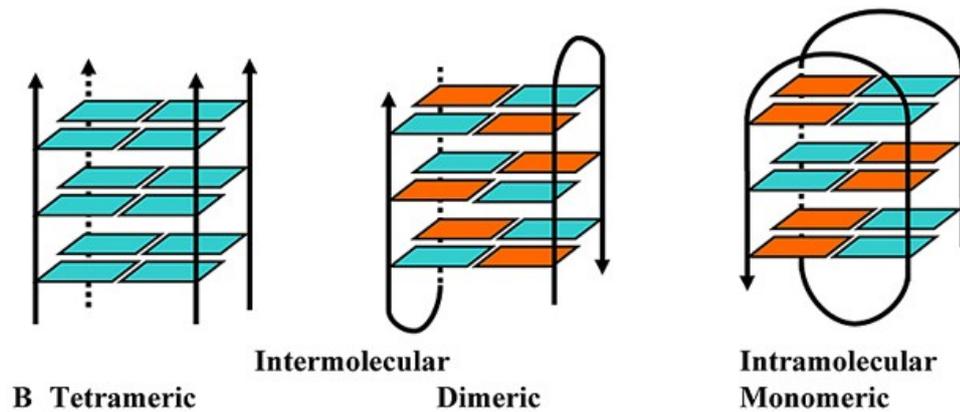


Fig. 7 Classificazione delle G-Quadruplex.

L'unione di quattro filamenti ricchi in G formano sempre quadruplex a filamenti tutti paralleli¹¹ con una struttura altamente simmetrica.

Il modello principale di tale tipologia di conformazione è la struttura del cristallo formato dal complesso [d(TGGGGT)]₄ (**Fig. 8**) con ioni Na⁺, disposti o a sandwich tra i piani di G o coplanari al quartetto.¹²

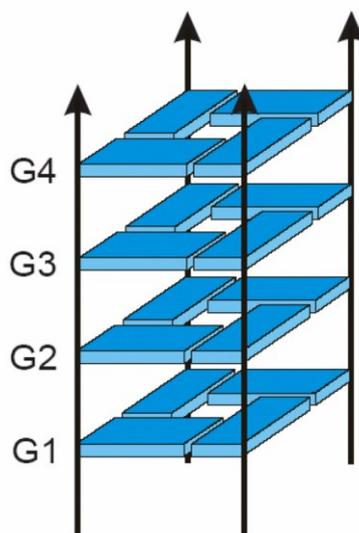


Fig. 8 Modello schematico del TGGGGT.

Un oligonucleotide contenente all'interno della sequenza due regioni ricche di G, può ripiegarsi in un *hairpin*, mediante appaiamenti di tipo Hoogsteen tra le guanine delle due regioni della sequenza. La dimerizzazione di due *hairpin* porta alla formazione di una G-quadruplex bimolecolare con la presenza di due *loop*, che si possono orientare in maniera differente, dando origine a ripiegamenti diversi: *loop* laterali (*edgewise loop*) connettono catene adiacenti antiparallele e *loop* diagonali (*diagonal loop*) che attraversano la struttura G-quadruplex per connettere catene antiparallele. *Loop* laterali nella struttura quadruplex possono fronteggiarsi o disporsi alle estremità opposte dello "scaffold"; *loop* diagonali, invece, devono necessariamente disporsi ai lati opposti della struttura per motivi di ingombro sterico e di repulsione elettrostatica tra i backbone carichi negativamente. Un esempio di tale tipologia di quadruplex è fornito dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha*, d(G₄T₄G₄) (**Fig.9**), che da studi NMR in soluzione con ioni Na⁺ ha rivelato la capacità di organizzarsi in una quadruplex bimolecolare con *loop* diagonali.¹³⁻¹⁴

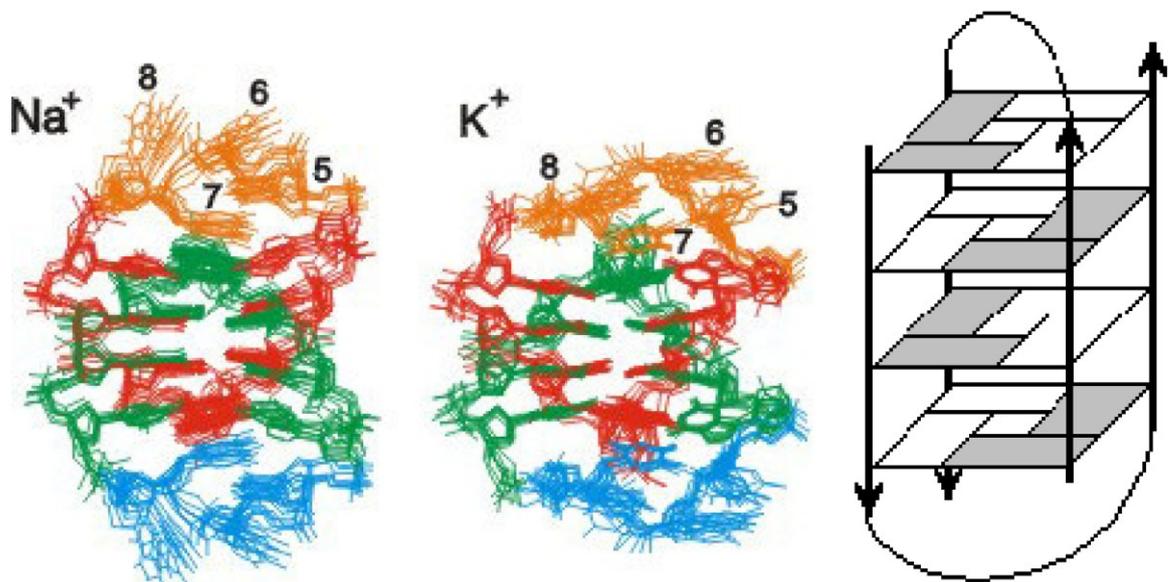


Fig. 9 Sovrapposizione delle otto migliori strutture a quadrupla elica adottate dal frammento della sequenza telomerica di *Oxytricha* in soluzione di ioni Na⁺ o K⁺.

Un unico filamento oligonucleotidico contenente più regioni con sequenze ricche in G può ripiegarsi in una struttura G-quadruplex unimolecolare contenente tre *loop*.¹⁵ I *loop* si

sistemano in una struttura G-quadruplex con un'orientazione antiparallela; un esempio molto studiato di tale struttura è l'aptamero legante la trombina, il TBA (*Trombin Binding Aptamers*), con sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG) (**Fig. 10**) Mediante studi di NMR si è visto che in soluzione questo oligonucleotide forma una quadruplex monomolecolare a filamenti adiacenti antiparalleli con due piani di G, connessi tra loro da un *loop* centrale (TGT) e due *loop* laterali (TT).¹⁶⁻¹⁷

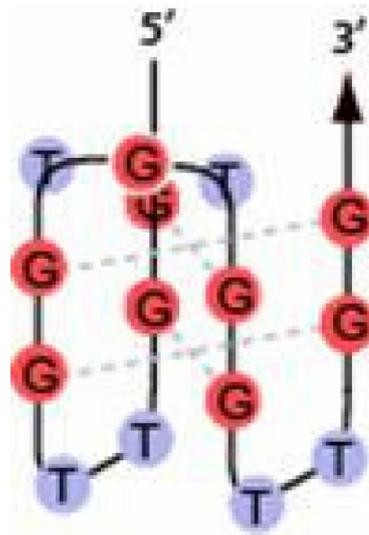


Fig. 10 Rappresentazione della quadruplex uni molecolare adottata dal TBA.

Alcune indagini su cristalli formati da sequenze telomeriche, che adottano conformazioni a quadrupla elica in presenza di ioni K^+ , hanno aumentato la variabilità strutturale dei complessi G-quadruplex per la presenza di nuove tipologie di *loop* di connessione.¹⁸ Per esempio, il 22-mer d[AGGG(TTAGGG)3] forma una quadruplex intramolecolare in cui i tre *loop* (TTA) si dispongono con geometria “*double-chain-reversal*” per dare una quadruplex unimolecolare con quattro filamenti paralleli; tali *loop*, per la loro particolare geometria, che si allontana dalla parte centrale della struttura, può essere un potenziale sito di riconoscimento per proteine e macromolecole biologiche¹⁹ (**Fig.11**).

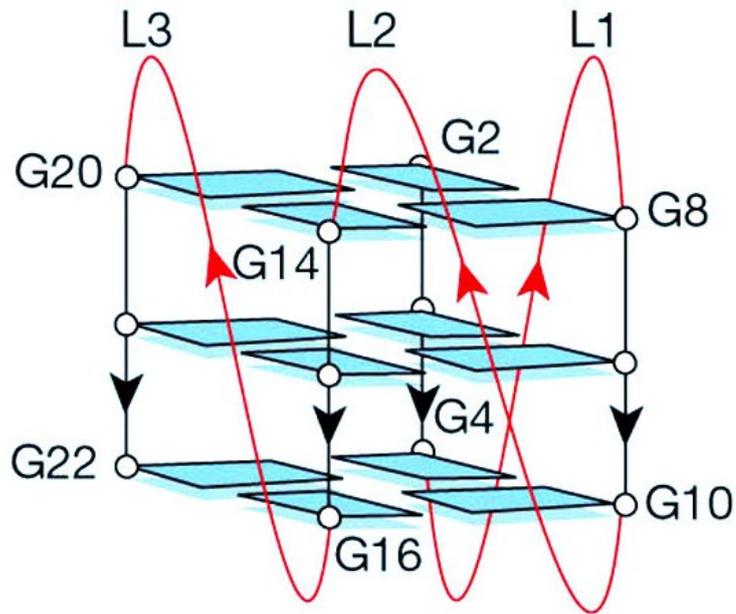


Fig. 11 Rappresentazione schematica della struttura di d[AGGG(TTAGGG)3].

Studi strutturali hanno definito in parte la natura e il ruolo dei *loop* nelle strutture G-quadruplex; essi non sono completamente liberi e flessibili, ma possono interagire (interazioni di stacking) con la tetrade più vicina. Inoltre, altre basi in prossimità di tetradi di G hanno la possibilità di formare a loro volta strutture planari stabilizzate da interazioni di stacking con i piani di G adiacenti.²⁰ Infatti, oltre a tetradi di G sono stati osservati altri tipi di tetradi, quali tetradi U4, T4 e A4,^{20,21,22} nonché tetradi miste, del tipo G:C:G:C,²³ confermando l'ipotesi secondo cui le interazioni di stacking possono indirizzare la formazione di tetradi alternative.

Altra variazione strutturale nei complessi G-quadruplex è l'orientamento di filamenti adiacenti, che possono avere differente polarità; infatti, i filamenti che costituiscono una quadruplex possono disporsi in quattro modi diversi: tutti e quattro paralleli, tre paralleli e uno antiparallelo, paralleli a due a due adiacenti, o paralleli alternati. (**Fig.12**)

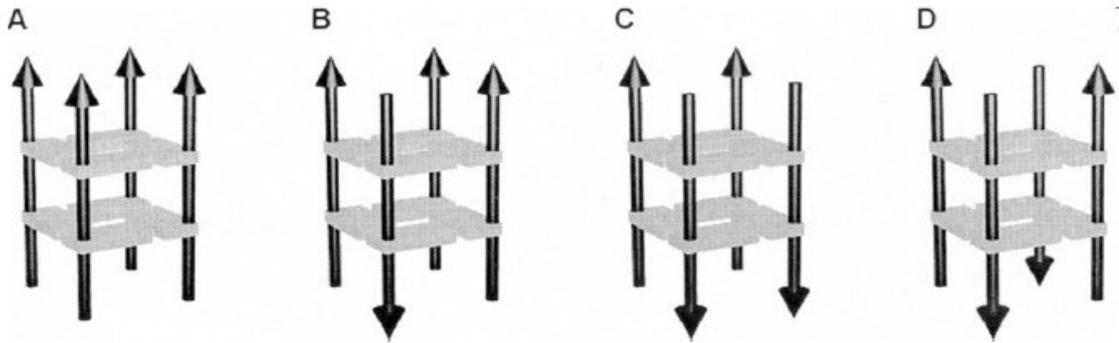


Fig. 12 G-Quadruplex con diverso orientamento relativo dei filamenti. (A) Tutti i filamenti paralleli. (B) Tre filamenti paralleli e uno antiparallelo. (C) Due coppie di filamenti adiacenti paralleli. (D) Filamenti antiparalleli alternati.

I filamenti possono disporsi secondo una determinata polarità all'interno di ogni struttura. Mediante metodologie di spettroscopia NMR^{11,24} e cristallografia¹² è stato osservato che le G-quadruplex tetramolecolari adottano preferenzialmente una disposizione a filamenti tutti paralleli. Un esempio di struttura a tre filamenti paralleli e uno antiparallelo è stata determinata, sempre con l'ausilio della spettroscopia NMR, nella sequenza ripetuta di *Tetrahymena*.²⁵ Ci sono, inoltre, molti esempi di strutture G-quadruplex con coppie di filamenti paralleli^{13,15,26} adiacenti e coppie di filamenti paralleli alternati.^{17,26}

Un ulteriore elemento che determina la variabilità strutturale delle G-quadruplex è la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nella formazioni dei quartetti. Generalmente, nel *B-DNA* le guanosine sono presenti in conformazione *anti*, mentre nelle strutture a quadrupla elica possono adottare anche la conformazione *syn*. (**Fig. 13**)

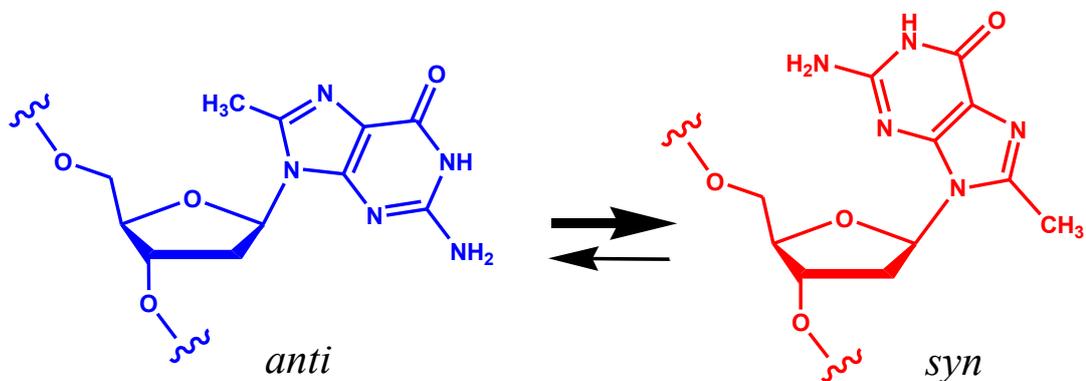


Fig. 13 Orientazione intorno al legame glicosidico.

La libertà conformazionale delle guanine all'interno della stessa tetrad è limitata dall'orientamento dei filamenti della quadruplex. Infatti, in genere, nel caso di strutture con basi naturali a filamenti tutti paralleli, le guanine di uno stesso quartetto devono avere tutte un angolo torsionale glicosidico di tipo *anti*, invece, in strutture antiparallele, i filamenti devono avere tutti angoli torsionali opposti (*anti/syn*).

La conformazione glicosidica delle basi influenza l'energia di stacking e l'ampiezza dei solchi tra i filamenti. Mentre il B-DNA canonico ha un solco minore e uno maggiore, la sovrapposizione delle tetradi di G determina la formazione di quattro solchi non sempre identici, che possono essere di dimensione ampia, stretta o media. Nel caso di quadruplex tetramolecolari con quattro filamenti paralleli tutte le G di una tetrad adottano la stessa conformazione glicosidica, formando quattro solchi di ampiezza media. Nel caso di quadruplex antiparallele, l'ampiezza dei solchi della struttura G-quadruplex è influenzata dalla polarità dei legami Hoogsteen tra le guanine adiacenti. Infatti, il solco formato in presenza di un'interazione tra un residuo di guanina donatore di legami idrogeno con conformazione glicosidica *syn* ed un residuo di guanina adiacente accettore con conformazione *anti* è del tipo stretto⁸; mentre, quando la polarità tra le guanine adiacenti è invertita, si forma un solco laterale ampio²⁸; in ultimo, se le guanine adiacenti adottano la medesima conformazione glicosidica, l'ampiezza dei solchi laterali sarà intermedia²⁸ e uguale su tutti i lati della quadruplex.(Fig. 14)

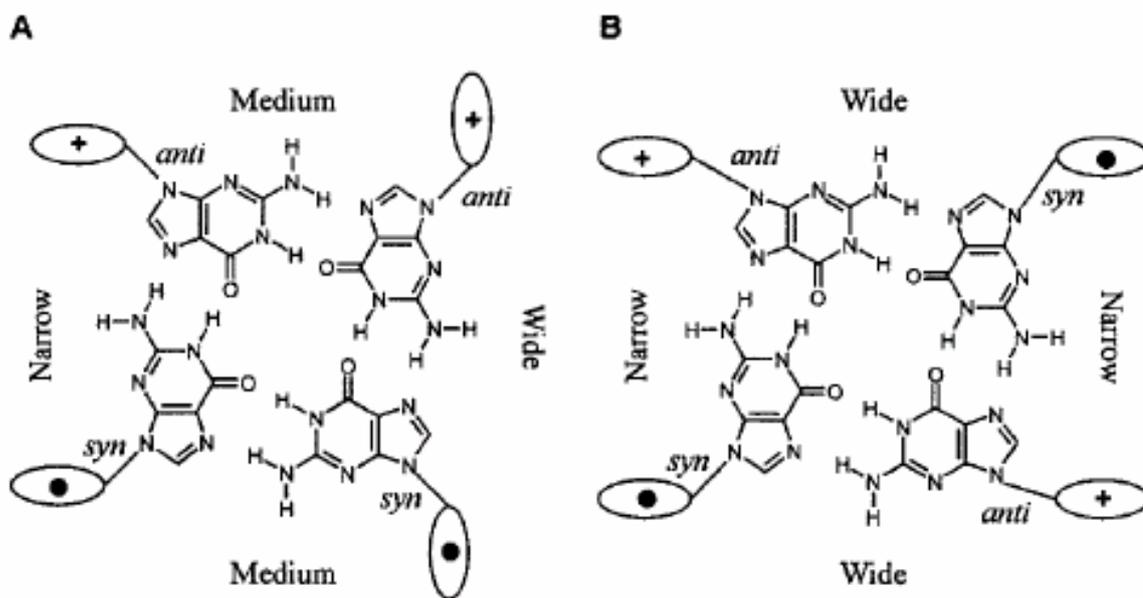


Fig. 14 Le interazioni tra angoli torsionali glicosidici e polarità dei filamenti danno origine a solchi di ampiezze differenti.

In generale strutture quadruplex a filamenti antiparalleli devono avere basi sia in conformazione *syn* che *anti* per garantire il loro appaiamento nelle tetradi. Sono state caratterizzate, infatti, diverse strutture sia con basi completamente in *anti*,^{11,24,30} sia con un'alternanza regolare di conformazioni *syn/anti*^{13,14,26,31,32} o una miscela di esse tanto lungo il filamento che nell'ambito delle singole tetradi.^{8,33,34}

1.2 *Importanza dei cationi e delle interazioni di stacking nella stabilizzazione delle strutture G-quadruplex.*

Una delle caratteristiche delle strutture G-quadruplex è l'interazione con determinati cationi, capaci di inserirsi nel canale centrale formato dalla sovrapposizione dei quartetti di G (Fig. 15).

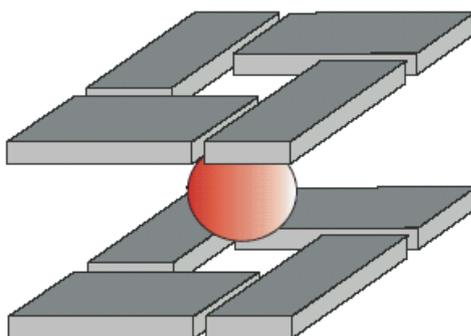


Fig. 15. Coordinazione di cationi monovalenti tra due quartetti di G.

Nella cavità centrale delle strutture G-quadruplex si affacciano gli ossigeni carbonilici (O-6) delle guanine formanti le tetradi che, mediante legami di coordinazione con i cationi, ne stabilizzano la struttura. La capacità di formazione di legami di queste interazioni è correlata alle dimensioni del raggio ionico (**Fig. 16**).



 **monovalent cation (eg potassium, sodium)**

Fig. 16 Tetrade di G con catione.

Nella serie dei metalli alcalini l'ordine di stabilizzazione è $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+$, mentre per i metalli alcalino-terrosi è

$\text{Sr}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.¹ Gli ioni litio non favoriscono la formazione di nessun tipo di struttura quadruplex.³⁸

È ormai ben noto che la coordinazione di ioni potassio,³⁵ e più raramente ioni sodio²⁸ e stronzio,³⁶ aumenta sia la stabilità termodinamica che la cinetica di formazione di tali strutture.³⁷ Potassio e stronzio hanno raggi ionici simili (1.3Å) e si adattano perfettamente alle cavità tra tetrad di guanine.

Non è ancora nota, invece, la capacità di stabilizzazione dei cationi multivalenti. In alcuni esperimenti fatti con concentrazioni millimolari di Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , sembra che questi ioni contrastino la formazione di strutture a quadrupla elica indotte da ioni K^+ .³⁹

Inoltre, va tenuto presente che nel nucleo delle cellule viventi i cationi liberi predominanti sono quattro tipi, presenti nelle seguenti concentrazioni approssimative: K^+ (150 mM), Na^+ (5 mM), Mg^{2+} (0.5 mM), e Ca^{2+} (0.2 μM). Tutti gli altri cationi hanno concentrazioni fisiologiche nell'ordine subnanomolare, quindi le strutture G-quadruplex legano preferenzialmente ioni K^+ o Na^+ , forme cationiche che predominano nelle cellule. La selettività delle G-quadruplex verso ioni K^+ , piuttosto che Na^+ , è stata spesso attribuita alla migliore capacità di K^+ di adattarsi alla cavità centrale delineata dalle tetrad di G. Oltre alla teoria dell'adattamento ottimale, si pensa che, nella migliore stabilizzazione del K^+ rispetto ad altri cationi, siano coinvolti anche fattori elettronici.⁴⁰

Inoltre, è stato dimostrato che la migliore stabilizzazione del K^+ , rispetto al Na^+ , è determinata dalle energie libere di idratazione⁴¹. In conclusione, senza l'interazione con i cationi, le conformazioni a quadrupla elica risultano elettricamente sfavorite, per cui un catione ottacoordinato, che instaura interazioni catione-dipolo con otto guanine, è necessario per la formazione dei quartetti di G, le unità strutturali dei complessi quadruplex. Le repulsioni tra i cationi inseriti all'interno delle cavità centrali sono stabilizzate dalle parziali cariche negative degli ossigeni carbonilici degli anelli aromatici

delle purine. Tali interazioni stabilizzano le strutture G-quadruplex più di qualsiasi altro tipo di legame.

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

Lo stacking tra le basi è guidato da interazioni elettrostatiche e di van der Waals.^{43,44}

In primo luogo, tale tipo di interazione è considerata un effetto dipolo, legato alla presenza di un'ampia superficie aromatica polarizzabile; il dipolo si instaura probabilmente per interazione tra atomi parzialmente carichi positivamente, presenti alla periferia di una base, e la nube di elettroni π , localizzata al centro. Le basi azotate danno interazioni di stacking maggiori rispetto ai comuni sistemi aromatici, in quanto i gruppi N-H e C=O, più polarizzati dei classici legami C-H presenti nei comuni idrocarburi planari, aumentano la densità di carica positiva rispettivamente sull'atomo di idrogeno e sull'atomo di carbonio.

In secondo luogo, dati sperimentali emersi da studi effettuati da Spöner e collaboratori suggeriscono che in queste interazioni siano coinvolti effetti idrofobici inusuali.^{43,44}

Infatti, è stato dimostrato che le interazione di van der Walls delle tetradi di G sono fortemente attrattive, con un $\Delta H = -49 \text{ kcal mol}^{-1}$, mentre la componente elettrostatica è repulsiva, con un $\Delta H = +28 \text{ kcal mol}^{-1}$,⁴⁵ con il risultato di un'energia di stacking totale pari a $\Delta H = -21 \text{ kcal mol}^{-1}$. Il contributo entalpico dovuto allo stacking di un quartetto ($\Delta H = -21 \text{ kcal mol}^{-1}$), dunque, è maggiore di quello calcolato per una doppia elica di DNA ($\Delta H = -15 \text{ kcal mol}^{-1}$), inoltre, anche le interazioni G-quadruplex-ligandi rivelano l'intervento di effetti idrofobici "non classici".⁴⁶ Questi effetti derivano dalla disponibilità di un'ampia superficie di stacking aromatica contenente atomi polarizzabili⁴⁴ e dal rilascio

di molecole d'acqua, debolmente legate alla superficie aromatica, al momento dell'impilamento. Dunque varie interazioni non covalenti (legami idrogeno, interazioni catione-dipolo e interazioni di van der Waals) collaborano a definire la struttura, la dinamica e, di conseguenza, anche la funzione di questi complessi macromolecolari.

1.3 Importanza biologica delle strutture G-quadruplex

L'interesse verso queste particolari strutture è aumentato quando è stato scoperto il loro potenziale coinvolgimento in alcuni importanti processi biologici. Infatti, numerose sequenze in grado di adottare conformazioni a quadrupla elica sono presenti a livello di importanti regioni genomiche di organismi eucarioti, mentre non è stata riscontrata nessuna evidenza della loro presenza in genomi di organismi procarioti. Queste particolari regioni ricche di guanine sono state individuate a livello dei telomeri⁴⁷ (**Fig.17**), delle regioni switch di immunoglobuline,⁴⁸ nelle regioni promotrici del gene *c-myc* e di altri oncogeni,⁴⁹ a livello del gene dell'insulina umana⁵⁰ e del gene della suscettibilità al retinoblastoma.⁵¹

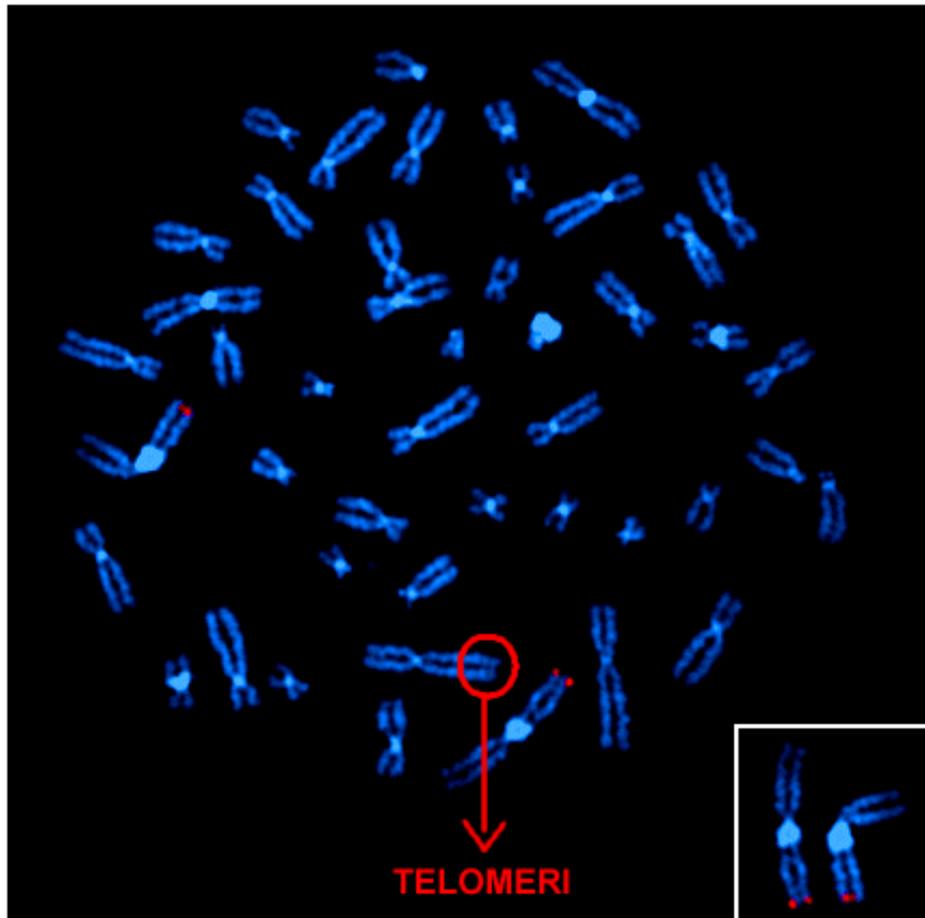


Fig. 17 Cromosomi e telomeri.

La capacità di regioni genomiche, in presenza di cationi monovalenti, di adottare strutture a quadrupla elica *in vitro*, ha aperto un dibattito scientifico sul loro potenziale ruolo *in vivo*. Da alcuni studi è emerso che le strutture G-quadruplex possono agire in modi differenti, a seconda del processo in cui potrebbero essere coinvolte, agendo sia come modulatori positivi che negativi; *in vitro*, infatti, è stato individuato un coinvolgimento di tali strutture nella meiosi,¹⁰ in importanti processi biochimici a livello dell'estremità telomerica^{9,31} dei cromosomi eucariotici, delle regioni promotrici di geni^{49,51} e dei siti di ricombinazione.⁵²

Una delle prime prove *in vivo* sul coinvolgimento delle G-quadruplex a livello biologico è emersa dagli studi effettuati da Hurley e collaboratori nel 2002. Questi autori individuarono una quadruplex monomolecolare che coinvolgeva 20-30 coppie di basi nel promotore del gene oncosoppressore *c-myc*.⁵³

Un importante esempio di interazione G-quadruplex-proteine è rappresentata dall'interazione G-quadruplex-telomerasi. Strutture G-quadruplex, infatti, sono riscontrabili a livello dei telomeri. I telomeri sono regioni terminali dei cromosomi, composti da una sequenza di DNA altamente ripetuto (TTAGGG)_n, che non codifica per alcun prodotto proteico. Queste strutture hanno un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. Senza il DNA telomerico, infatti, i cromosomi umani rischierebbero di dar luogo a fusioni delle estremità con conseguente formazione di cromosomi dicentrici o multicentrici.⁴ Tali cromosomi alterati potrebbero rompersi durante la mitosi con conseguenti danni irreparabili per la cellula, quali senescenza o apoptosi.⁵⁴ (Fig. 18)

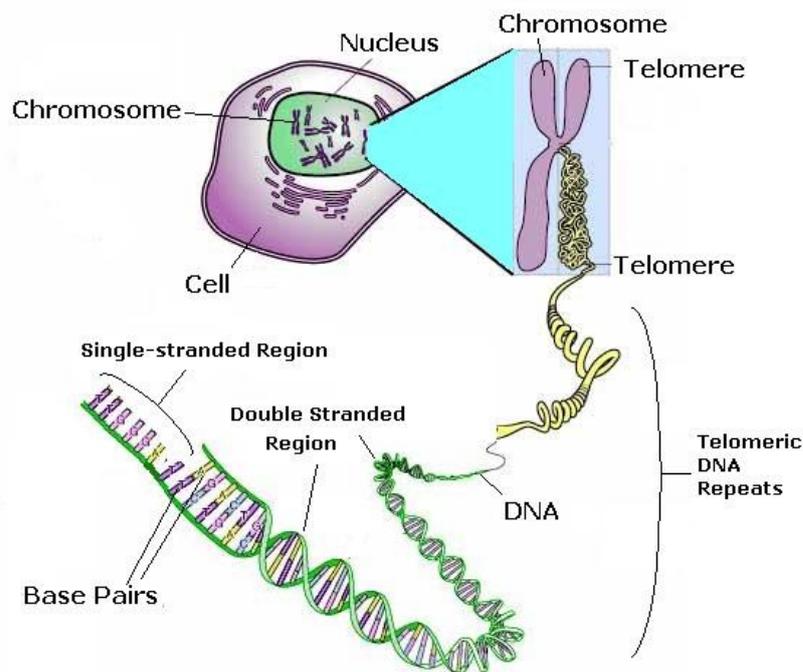


Fig. 18 Localizzazione cellulare dei telomeri.

I telomeri, inoltre, hanno il compito di prevenire la perdita delle informazioni genetiche durante la replicazione cellulare. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, i quali vengono

accorciati ad ogni replicazione, ci sarebbe una significativa perdita di informazione genetica. Vi sono prove che questo progressivo accorciamento dei telomeri sia associato all'invecchiamento della cellula e dell'intero organismo. Il DNA telomerico nell'uomo è una sezione di 5000-15000 basi di sequenza ripetuta $d(TTAGGG)_n$. In ciascun ciclo di replicazione cellulare si perdono da 50-500 unità TTAGGG, per cui la lunghezza del DNA telomerico diminuisce con l'età e può essere presa come parametro dello stato di invecchiamento cellulare.(Fig. 19)

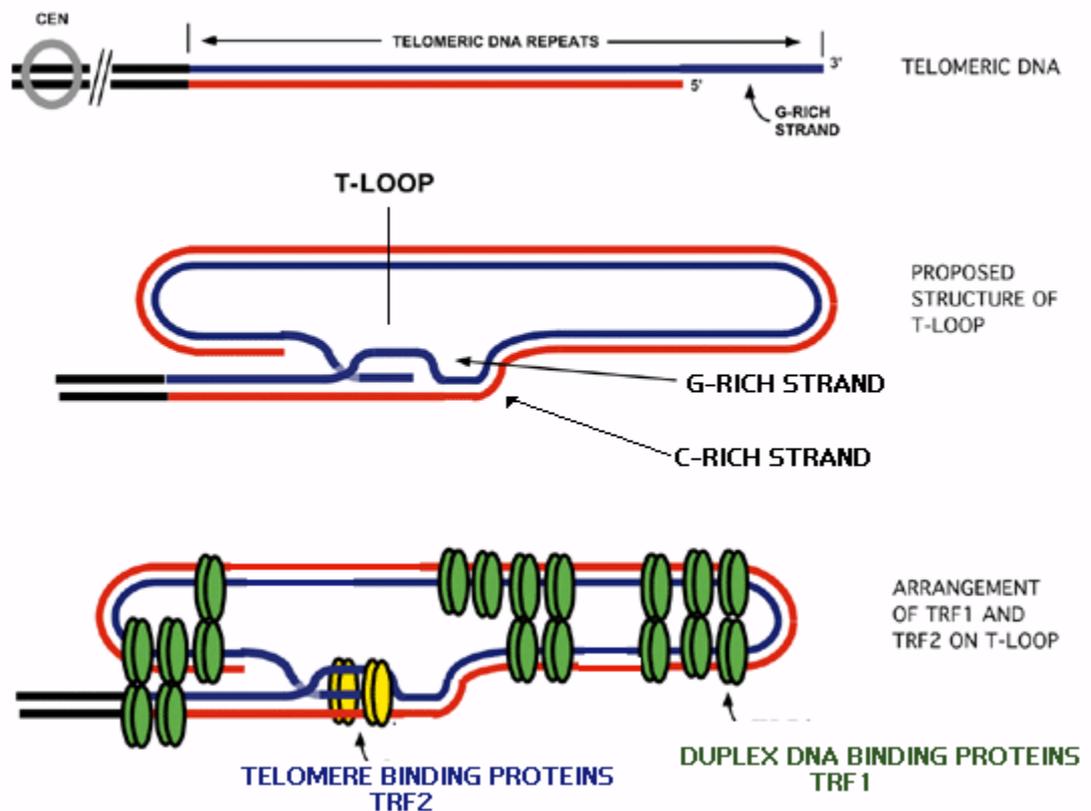


Fig. 19 Probabile meccanismo di funzionamento delle estremità telomeriche del DNA.

È stato ipotizzato che i telomeri siano coinvolti nelle patologie cancerose, dal momento che l'induzione *in vitro* della telomerasi permette ad alcune cellule di sfuggire all'irreversibile processo di invecchiamento cellulare ed acquisire una capacità replicativa pressochè infinita.⁵⁵ I telomeri si accorciano a causa del meccanismo di replicazione del filamento

lagging del DNA. I filamenti del DNA *duplex* sono complementari antiparalleli, per cui un filamento è in direzione 5'-3', mentre il suo complementare ha direzionalità opposta. La replicazione del DNA non ha inizio dalle estremità dei cromosomi ma da varie regioni più centrali, e siccome tutte le DNA polimerasi polimerizzano in direzione 5'-3', il DNA in replicazione presenterà un filamento *leading* (veloce o anticipato) ed uno *lagging* (lento o ritardato).

Sul filamento *leading*, la DNA polimerasi può produrre un filamento complementare senza ostacoli, perché procede da 5' a 3'; al contrario, ciò non è possibile per la direzione 3'-5'. Per risolvere questo problema, piccole sequenze di RNA (RNA primer) legano tale filamento e agiscono come innesco (*primers*), favorendo l'attacco della DNA polimerasi e l'avvio della polimerizzazione; questo processo genera la formazione dei frammenti di Okazaki. (Fig. 20)

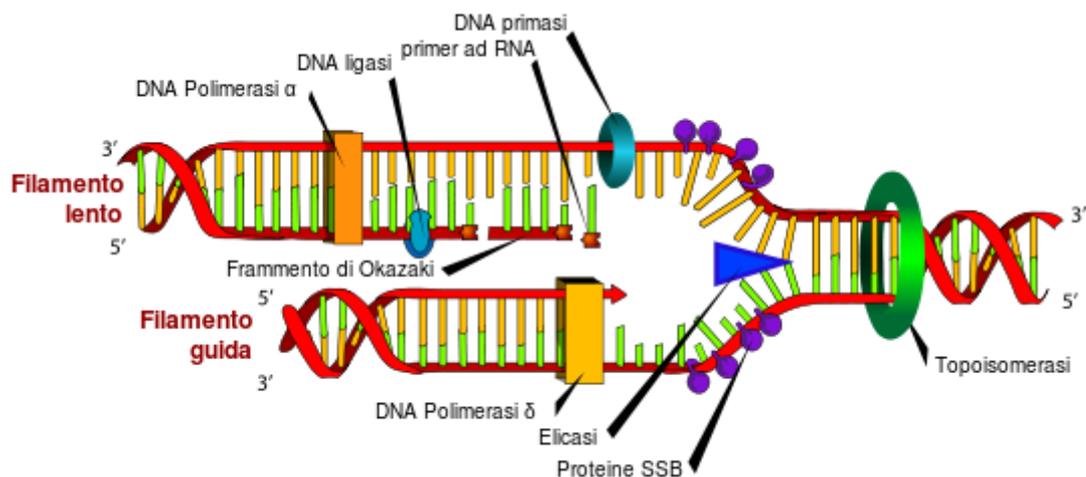


Fig. 20 *Replicazione dei frammenti di Okazaki.*

I frammenti di Okazaki sono brevi tratti di filamenti di DNA aggiunti dalla DNA-polimerasi, che sostituisce l'RNA dei primers e lega i pezzi di DNA aggiunti mediante la DNA ligasi, che forma il legame fosfodiesterico tra frammenti consecutivi. Questo accade presso tutti i siti del filamento *lagging*. Nella regione terminale, l'ultimo *primer* di RNA non può essere rimosso perché non c'è spazio sul filamento libero per l'attacco della DNA-

polimerasi. Per cui, in questa regione, l'RNA viene distrutto da RNAsi e non vi è alcuna sostituzione con DNA; di conseguenza ad ogni evento di replicazione si ha una perdita di 50-200 basi, con conseguente accorciamento del DNA cromosomiale. Per evitare che ciò avvenga, la cellula possiede un enzima atto a preservare la lunghezza telomerica, la telomerasi.

La telomerasi è una ribonucleoproteina con attività di trascrittasi inversa, che consiste di una componente ad RNA (TR) con sequenza AATCCC, una proteina catalitica (hTERT) ed una proteina accessoria (TP1).⁵⁶⁻⁵⁸ Tale enzima catalizza la sintesi di una serie di unità d(T₂AG₃) a partire dall'estremità 3' telomerica (che funge da *primer*) impedendo in definitiva l'accorciamento telomerico⁵⁹(Fig. 21).

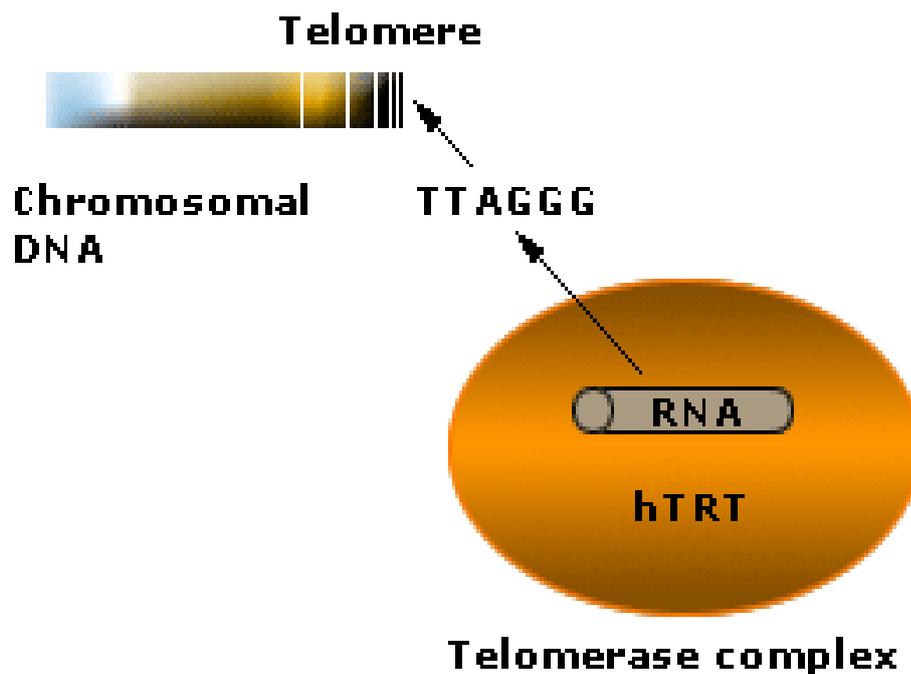


Fig. 21 Meccanismo d'azione della telomerasi.

La telomerasi è presente nell'80-90% delle cellule tumorali ed è assente nella maggior parte delle cellule somatiche. La sua presenza e la sua attività possono essere utilizzate come marker di cellule tumorali; ossia cellule sfuggite al processo di invecchiamento e in grado di replicarsi in maniera incontrollata.⁶⁰⁻⁶²

Tale enzima può rappresentare un potenziale bersaglio di farmaci nella chemioterapia antitumorale, con il vantaggio di una scarsa tossicità perché o non presente, o non attivo nelle cellule somatiche. La telomerasi è presente anche a livello delle cellule staminali e germinali, ma lo stato di quiescenza delle cellule staminali permette di distinguerle dalle cellule tumorali.⁶³

La telomerasi può essere inibita impedendo l'interazione con il substrato. Come già detto in precedenza, la porzione terminale telomerica è costituita dalla sequenza 5'-TTAGGG-3' che è in grado di ripiegarsi in una struttura quadruplex intramolecolare (**Fig. 22**), inoltre, è possibile anche che le condizioni ioniche necessarie alla formazione e stabilizzazione della quadruplex siano in grado di inibire l'enzima. Cech e collaboratori, studiando l'attività telomerica di *Oxytricha nova*, hanno dimostrato che l'attività telomerica diminuisce quasi definitivamente in presenza di ioni K^+ , inoltre l'assemblaggio del DNA telomerico in quadruplex influisce sull'allungamento telomerico, fungendo così da regolatore negativo dell'allungamento telomerico in vivo.⁶⁴

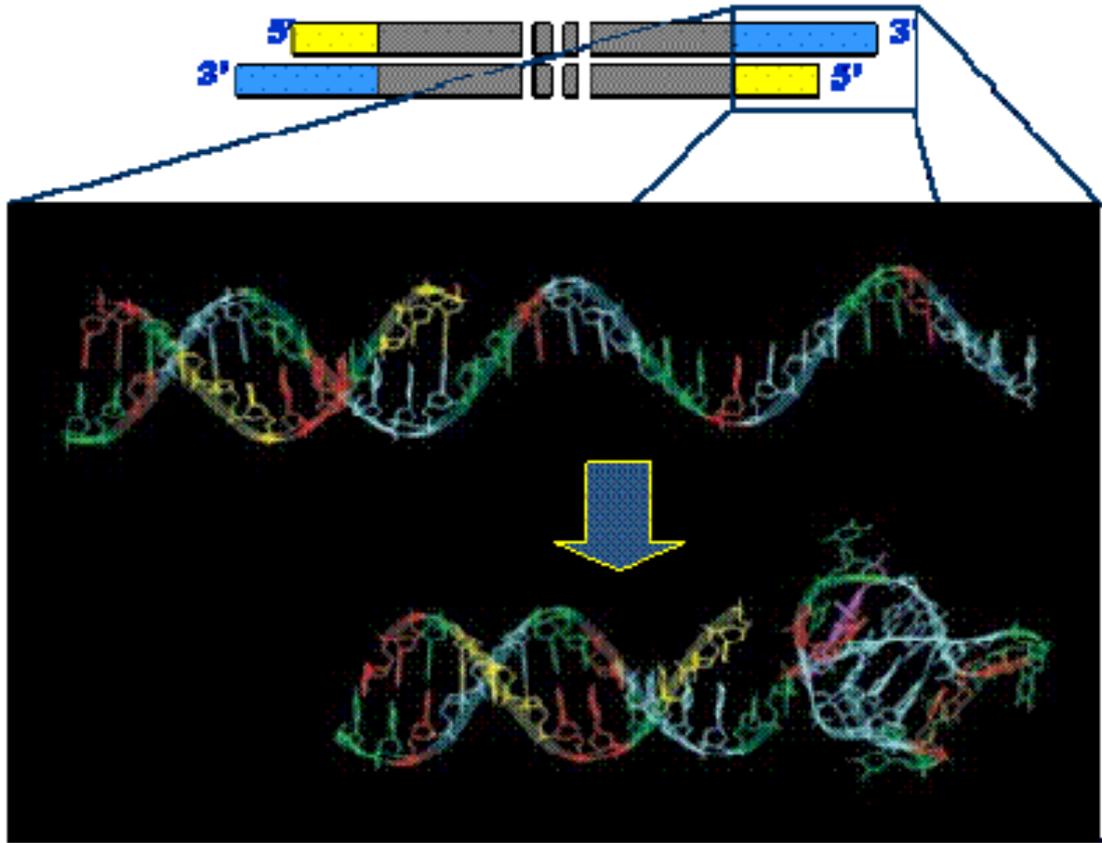


Fig. 22 Strutture quadruplex presenti alle estremità telomeriche.

Lo spostamento dell'equilibrio da singolo filamento a struttura quadruplex, quindi, è uno dei modi in cui è possibile inibire la telomerasi; per cui, composti in grado di legare e stabilizzare tali strutture possono interferire con l'attività della telomerasi e garantire il mantenimento dei telomeri, trasformando quindi cellule cancerose, con attività proliferativa incontrollata e immortali, in cellule in grado invecchiare e raggiungere uno stato quiescente.

La maggior parte degli inibitori della telomerasi sono composti aromatici in grado di stabilizzare le G-quadruplex mediante interazioni di stacking con i quartetti di G. L'etidio bromuro, un ben noto intercalante delle doppie eliche, lega il DNA a quadrupla elica,⁶⁵ ma dispone di una ridotta superficie di contatto con i quartetti di G, per cui appare evidente che gli inibitori migliori sono quei composti dotati di una più ampia superficie aromatica polarizzabile.

Nel 1997 si è scoperto che i derivati antrachinonici sono in grado di legare il DNA quadruplex e di inibire l'attività telomerica.⁶⁶ Da allora sono stati scoperti centinaia di inibitori della telomerasi,⁶⁷⁻⁷² aprendo un dibattito circa le modalità di interazione di inibitori aromatici con il DNA a quadrupla elica. Secondo alcuni tali composti intercalano tra i quartetti di G,⁴⁶ secondo altri invece stabiliscono interazioni di stacking solo con i quartetti di G presenti alle estremità terminali delle strutture.⁷³ (Fig. 23)

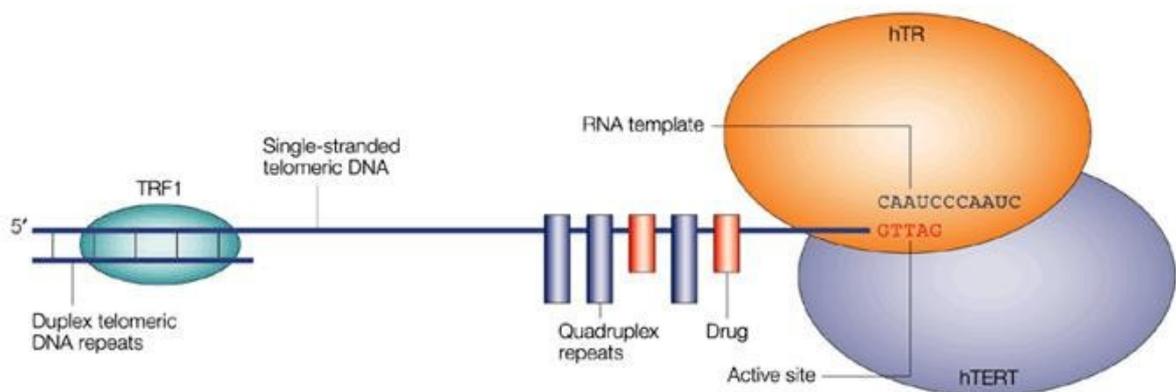


Fig. 23 Stabilizzazione di strutture quadruplex alle estremità telomeriche per effetto di farmaci intercalanti e di farmaci interagenti con l'estremità terminale della quadruplex conseguente blocco dell'attività telomerica.

Le strutture ligandi/quadruplex, ottenute mediante tecniche di spettroscopia NMR,^{74,75} diffrazione di fibre⁷⁶ e analisi cristallografica a raggi X⁷⁷, hanno stabilito che l'interazione avviene con i quartetti terminali al 3', invece che mediante intercalarsi tra essi. Infatti, l'intercalazione tra i quartetti della parte centrale, risulta energeticamente sfavorevole per l'avvolgimento dell'elica, in quanto va a destabilizzare le interazioni di *stacking* tra i piani di G⁷⁸ e interferisce con il posizionamento dei cationi all'interno del canale centrale, facendo perdere la geometria di coordinazione adottata per mantenere stabile la struttura. Le G-quadruplex inoltre interagiscono anche con aggregati di ligandi, data l'ampia superficie di contatto fornita dal quartetto di G.^{79,80} Infine, il più potente e selettivo inibitore della telomerasi è la telomestatina, un prodotto naturale isolato dallo *Streptomyces*

anulatus.⁸¹ Mediante studi di NMR e di modellistica molecolare (*molecular modelling*) è emerso che la telomestatina stabilisce interazione di stacking con le tetradi di G, a conferma del fatto che la stabilizzazione in quadruplex del terminale telomerico a singolo filamento è fondamentale per l'inibizione della telomerasi.⁸²

Un altro importante esempio di interazione G-quadruplex-proteina è rappresentato dall'interazione di aptameri con una determinata molecola proteica bersaglio. Gli aptameri sono per definizione macromolecole oligonucleotidiche (DNA o RNA) che legano con elevata affinità e specificità una vasta gamma di molecole bersaglio, quali proteine o altre molecole organiche. Tali molecole possono avere dimensioni variabili, comprese tra 3 e 60kDa, e assumere diverse conformazioni tridimensionali determinate da interazioni di tipo Watson e Crick, Hoogsteen e interazioni inusuali. La capacità di ripiegamento fa sì che tali molecole siano in grado di interagire con il proprio ligando mediante il meccanismo “chiave-serratura”, legando selettivamente il bersaglio (*target*) e inibendone la funzione. Numerosi aptameri attivi si ripiegano in strutture G-quadruplex. (Fig. 24)

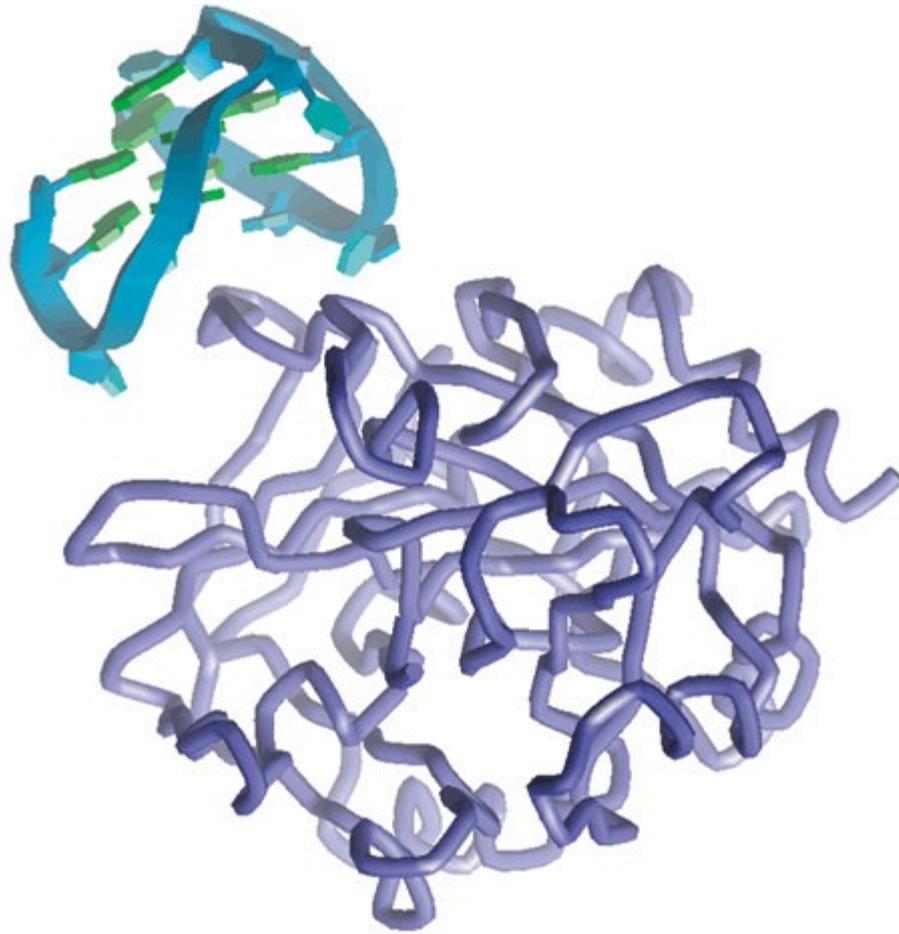


Fig. 24 Esempio di interazione aptamero-target (in verde)..

Gli aptameri vengono selezionati mediante una tecnica detta SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). La SELEX è una tecnica di selezione *in vitro* che combina i principi della chimica combinatoriale a tecniche di biologia molecolare, e permette quindi di identificare e selezionare molecole aptameriche, a RNA o DNA, caratterizzate da un'elevata selettività e specificità di legame verso un'ampia varietà di proteine e piccole molecole⁸⁵⁻⁸⁷, partendo da enorme collezione (*library*) di oligomeri a sequenza casuale. Il processo di selezione naturale, avviene mediante cicli ripetuti in condizioni sempre più stringenti (cioè sfavorevoli all'interazione), finalizzati all'isolamento di una o poche molecole che hanno un'elevatissima affinità di legame con il *target*; a tale processo, poi, segue l'amplificazione degli oligomeri selezionati mediante PCR.

Le strutture di numerosi aptameri sono state determinate mediante spettroscopia NMR e cristallografia a raggi X.^{88,89} Uno degli aptameri più noti e più studiati è il TBA (**Fig25**) (*Trombin Binding Aptamer*), un pentadecamero deossiribonucleotidico di sequenza d(GGTTGGTGTGGTTGG),⁹⁰ in grado di inibire *in vitro* il processo, catalizzato dalla trombina, che porta alla formazione del coagulo di fibrina.⁹⁰ Studi NMR hanno rivelato che il TBA in soluzione adotta preferenzialmente una struttura caratterizzata da due quartetti di G, connessi da un loop centrale di sequenza TGT e due loop laterali più corti di sequenza TT. La struttura e l'attività biologica sono K⁺-dipendenti.

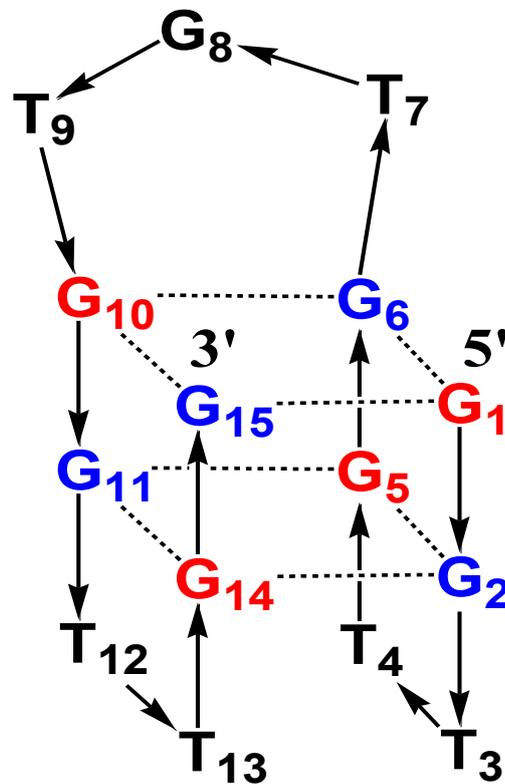


Fig. 25 Thrombin Binding Aptamer.

Successivamente sono stati individuati altri aptameri di natura deossiribonucleotidica, strutturalmente correlati al TBA. Si tratta di inibitori dell'integrasi del virus HIV, estremamente efficaci in quanto caratterizzati da valori di IC₅₀ nell'ordine di grandezza

del nanomolare;^{92,93} questi si organizzano tendenzialmente in una struttura G-quadruplex monomolecolare molto simile a quella del TBA (**Fig.26**).^{94,95}

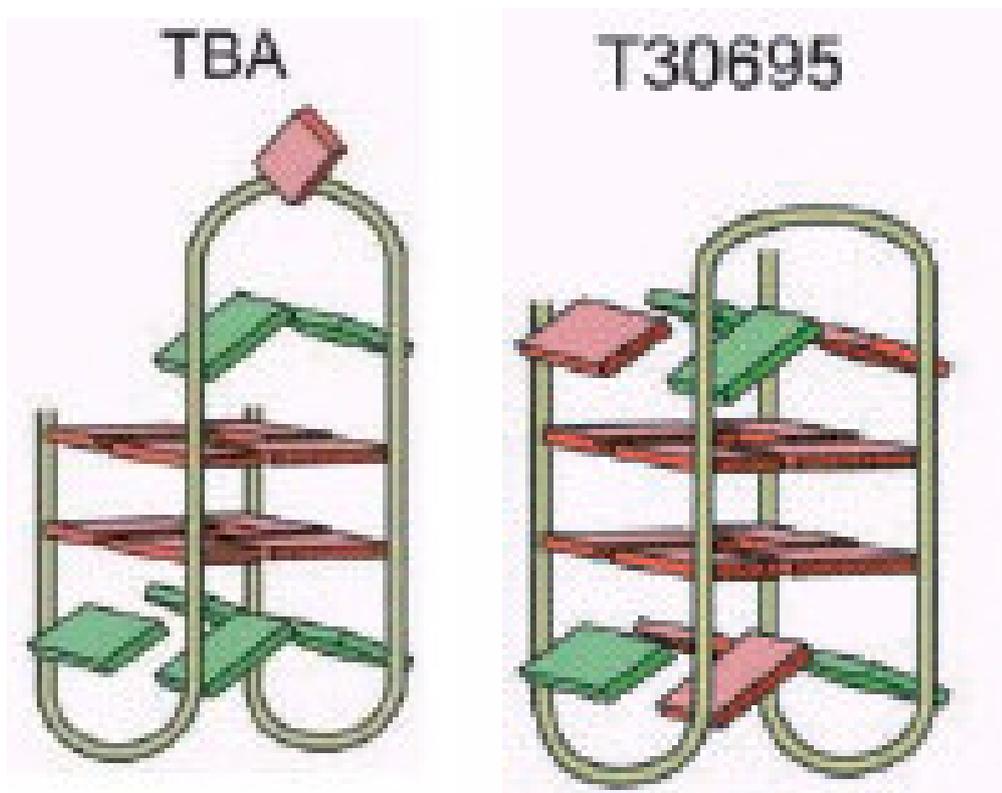


Fig. 26 Rappresentazione schematica della struttura del TBA e dell'aptamero per l'integrasi dell'HIV (T30695) in cui si evidenzia la loro netta somiglianza.

Sebbene molte proteine interagenti con aptameri, fattori oncogenici,⁹⁶ anticorpi⁹⁷ e proteine telomeriche siano in grado di legare stabilmente strutture quadruplex, sono ancora poco noti i dettagli molecolari relativi alle interazioni G-quadruplex-proteine.⁵²

Alcuni chiarimenti in merito sono stati ottenuti dalla risoluzione della struttura del cristallo della trombina con il TBA, che hanno rivelato la presenza di interazioni ioniche che coinvolgono i gruppi fosfato presenti nei loop dell'aptamero e le catene laterali di alcuni residui di lisina e arginina della trombina.^{98,99} La risoluzione della struttura del cristallo della proteina telomerica di *Oxytricha nova* complessata con $[d(G_4T_4G_4)]_4$,¹⁰⁰ come nel caso della struttura in soluzione, individua una quadruplex bimolecolare³⁵ con loop diagonali (**Fig.8**).

La maggior parte delle interazioni che si instaurano tra gli aptameri e le proteine, ovvero interazioni di Van der Waals, interazioni elettrostatiche e legami idrogeno, coinvolgono i *loop* piuttosto che il nucleo centrale del core di G. Nei casi in cui sono disponibili le strutture dell'aptamero con la proteina, quindi sia per il TBA, sia per il telomero di *Oxytricia*, sono evidenti poche interazioni tra la proteina e il nucleo centrale delle quadruplex. Le G-quadruplex, dunque, sembrano fungere da impalcatura di sostegno per i *loop*, che invece presentano maggiori siti di legame per le interazioni con le macromolecole. La scoperta di un numero crescente di proteine, spesso dotate di funzione enzimatica, che riconoscono le strutture quadruplex, suggerisce un ruolo biologico sempre più importante per queste strutture secondarie del DNA. Pertanto studi volti principalmente al chiarimento dell'entità delle interazioni G-quadruplex-proteine potrebbero aiutarci a comprendere i meccanismi alla base del riconoscimento molecolare, agevolando la progettazione di nuovi farmaci.

1.4 Caratterizzazione strutturale del DNA mediante tecniche spettroscopiche.

Per la progettazione di nuovi farmaci e, di conseguenza, per l'applicazione di questi nelle terapie farmacologiche, è necessaria una conoscenza dettagliata delle relazioni struttura/attività. Data la stretta correlazione tra struttura e funzione, la maggior parte degli studi sugli acidi nucleici sono mirati alla delucidazione degli aspetti strutturali di tali macromolecole.

La prima tecnica utilizzata nello studio degli acidi nucleici, e del DNA in particolare, è stata la diffrazione a raggi X. Tale tecnica ha il grosso vantaggio di fornire strutture ad alta risoluzione, ma risulta di difficile applicazione per due motivi: il primo è che per essere utilizzato è necessario disporre di un cristallo del campione da analizzare e questo è molto difficile da ottenere per gli acidi nucleici; il secondo è che questa tecnica non permette lo studio di molecole in soluzione, condizione più vicina a quella fisiologica.

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

Il fenomeno del dicroismo circolare (CD) si osserva quando molecole otticamente attive assorbono in maniera differente la luce circolarmente polarizzata a destra e a sinistra. Le vengono effettuate con un spettropolarimetro CD. Strutture secondarie differenti presentano spettri CD differenti. Quindi l'analisi degli spettri CD può fornire una prima indicazione sulle strutture presenti nelle macromolecole biologiche.

La Spettroscopia di Assorbimento Ultravioletto è la tecnica più utilizzata per determinare le temperature di melting (T_m) degli acidi nucleici. Esperimenti di UV melting forniscono informazioni sulla stabilità degli acidi nucleici. Variazioni della temperatura di melting (ΔT_m) di determinate strutture sono spesso correlate a variazioni di condizioni sperimentali, inserimento di basi modificate all'interno delle sequenze, o interazioni con altre macromolecole biologicamente attive.

Una curva di UV melting di una struttura secondaria del DNA si ottiene registrando la variazione di assorbanza a 260 nm in funzione della temperatura; all'aumentare della temperatura, infatti, gli acidi nucleici strutturati fondono, cioè si trasformano in un filamento non ordinato (random coil), esponendo le basi alla radiazione, con conseguente incremento dell'assorbanza. Tuttavia, questi metodi spettroscopici forniscono soltanto informazioni sulla struttura nel suo complesso, senza dare informazione dettagliate sulla struttura locale.

Recentemente ha trovato un largo impiego nello studio degli acidi nucleici, grazie a nuove tecniche di ionizzazione e volatilizzazione, la spettrometria di massa. Tale tecnica è largamente utilizzata per caratteristiche riguardanti la struttura primaria del DNA.

Attualmente la principale tecnica spettroscopica utilizzata per l'analisi dettagliata della struttura e delle conformazioni, adottate da brevi sequenze oligonucleotidiche, è la

Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). I dati NMR forniscono non solo informazioni sulla struttura, ma anche sulle dinamiche, gli equilibri conformazionali, il ripiegamento e le interazioni intra- e intermolecolari in soluzione, in aggiunta il campione viene analizzato in soluzione, condizione ideale per lo studio degli acidi nucleici. Tale tecnica consente l'acquisizione di una serie di dati sperimentali da cui è possibile l'elaborazione di una struttura tridimensionale con l'impiego di appositi programmi informatici.

Lo studio strutturale di biomolecole mediante la spettroscopia NMR si basa principalmente sull'interazione in presenza di un campo magnetico esterno tra i momenti magnetici dei singoli nuclei coi piccoli campi magnetici creati dagli spin di nuclei vicini. Tale interazione del tipo spin-spin può essere sfruttata per correlare diversi nuclei di una molecola gli uni con gli altri. I nuclei possono interagire sia "direttamente", attraverso lo spazio, che "indirettamente", attraverso i legami. Per nuclei con numero quantico di spin pari ad $\frac{1}{2}$ l'interazione "indiretta" avviene tramite polarizzazione degli elettroni di legame ed è nota come "accoppiamento spin-spin" o "*J-coupling*", mentre l'interazione "diretta" è alla base dell'effetto nucleare Overhauser (NOE), che consente la misura delle distanze spaziali tra nuclei di idrogeno. Un'analisi dettagliata dello spettro di un acido nucleico si basa sia sulle correlazioni attraverso lo spazio che attraverso i legami.

Le correlazioni attraverso i legami raggruppano singoli spin in sistemi di spin, che sono usati per l'analisi degli spettri. Negli acidi nucleici le costanti di accoppiamento *J* tra due nuclei separati da tre legami sono quelle che forniscono il maggior numero di informazioni per lo studio della loro struttura, poiché il valore della costante di accoppiamento dipende direttamente dall'ampiezza dell'angolo di torsione intorno al legame centrale secondo la nota relazione di Karplus,^{103,104} ed è quindi di notevole importanza per stabilire la geometria del legame e l'angolo diedro intorno ad esso. Gli esperimenti NMR che correlano nuclei differenti mediante *J-coupling* sono spesso esperimenti del tipo COSY

(COrrrelation SpectroscopY).¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Un'unità nucleotidica è caratterizzata da una serie di angoli torsionali che ne definiscono la struttura: angoli di torsione del *backbone* (α , β , γ , δ , ϵ , e ζ), angoli di torsione endociclici, responsabili della conformazione dell'anello furanosico (da ν_0 a ν_4), e infine l'angolo torsionale glicosidico (χ), tra la base e l'anello zuccherino (**Fig.27**).

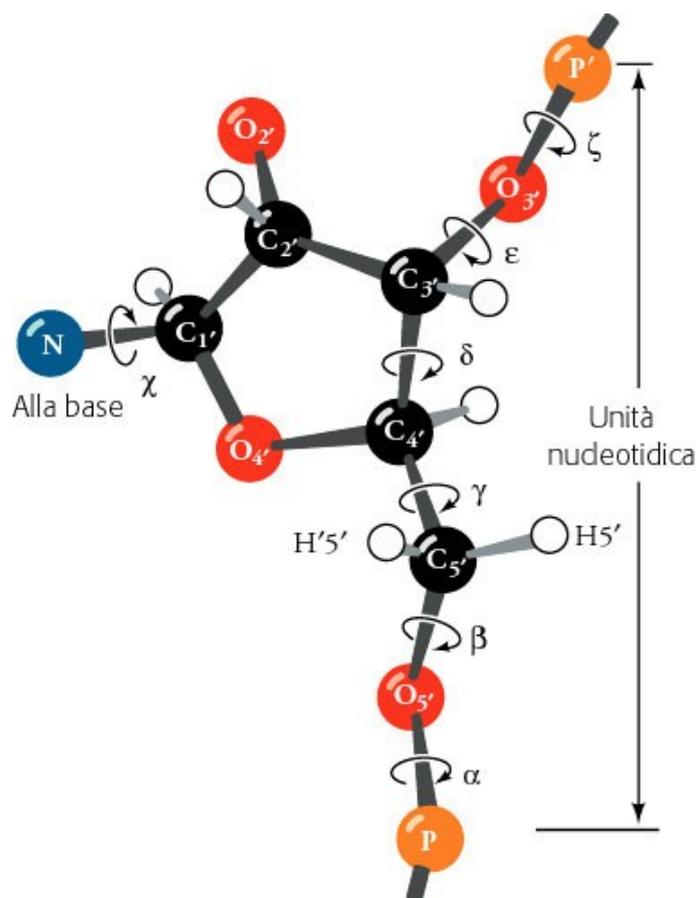


Fig. 27 *Struttura del backbone.*

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

Per determinare la conformazione glicosidica di un nucleotide, cioè l'orientazione della base rispetto all'anello del deossiribosio, è necessario conoscere il valore dell'angolo torsionale glicosidico. Esso può essere determinato misurando le distanze tra i protoni dell'anello zuccherino e quelli della base azotata. In particolare mediante l'interpretazione di spettri 2D-NOESY si valuta la distanza tra i protoni aromatici della base, H8 o H6, a seconda che si tratti di un anello purinico o pirimidinico rispettivamente, e l'H1' dello zucchero.(Fig.28)

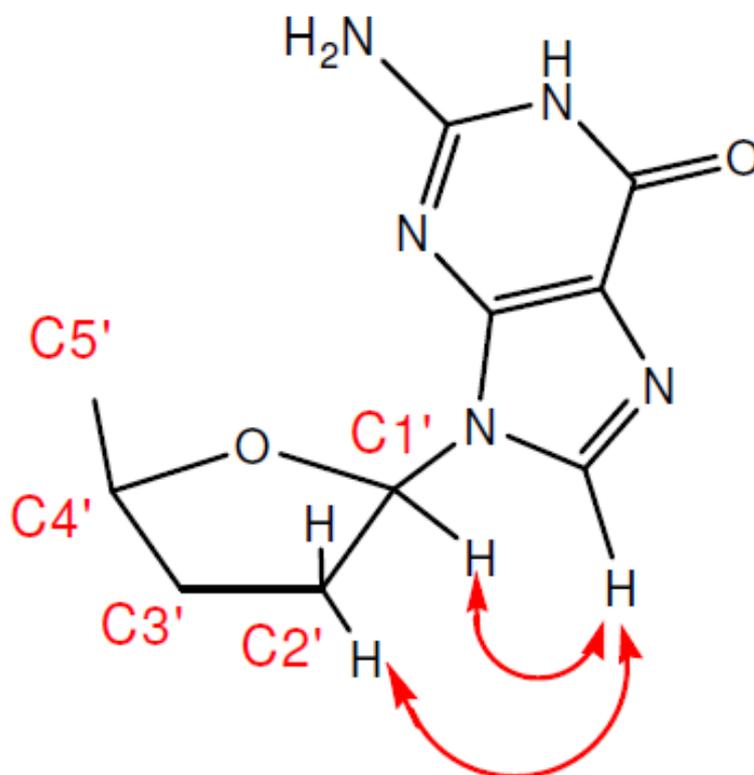


Fig. 28 Rappresentazione schematica dei NOE coinvolgenti il protone in 8 e rispettivamente H1' e H2'/H2'', diagnostici della conformazione glicosidica adottata.

Le correlazioni spaziali forniscono informazioni necessarie per la determinazione della struttura di una macromolecola e vengono misurate sfruttando l'effetto nucleare Overhauser (NOE).^{106,109} Dall'interpretazione di spettri 2D-NOESY è possibile ricavare le distanze tra gli atomi vicini a partire dai contatti NOE tra atomi di idrogeno vicini nella molecola.¹¹⁰ I picchi di correlazione (*cross-peak*) NOE connettono coppie di atomi di

idrogeno separati da una distanza inferiore ai 5 Å. I nuclei coinvolti nelle correlazioni NOE possono appartenere anche a residui nucleotidici diversi e lontani nella sequenza, ma spazialmente vicini. L'effetto NOE riflette il trasferimento di magnetizzazione tra spin che interagiscono mediante associazione dei propri dipoli. L'intensità di un segnale NOE dipende dall'inverso della sesta potenza della distanza tra i nuclei, per cui diminuisce drasticamente con l'aumentare delle distanze stesse e generalmente non è possibile osservare NOE tra protoni lontani più di 5 Å. La conoscenza di tali brevi distanze protone-protone internucleotidiche rende possibile l'assegnazione sequenziale dei segnali appartenenti a nucleotidi adiacenti, nell'ambito della stessa molecola. L'analisi conformazionale del DNA e dei suoi complessi prevede la previa attribuzione nello spettro protonico di tutti i segnali scambiabili (in soluzioni di H₂O) e non scambiabili (in soluzioni di D₂O), effettuata secondo i ben conosciuti criteri descritti per gli oligonucleotidi in soluzione.¹¹⁰⁻¹¹²

L'assegnazione dei protoni di ogni base e dei singoli sistemi di spin dei deossiribosi all'interno della sequenza primaria si basa sull'analisi degli effetti NOE esistenti tra i protoni dei residui vicinali e sugli accoppiamenti scalari in ogni sistema di spin isolato. Esistono, infatti, delle connettività sequenziali di NOE, tali che (con l'eccezione del protone della base all'estremità 5' di ogni catena, che mostra solo NOE intraresiduo) nelle eliche di DNA destrogire ogni protone H6 pirimidinico o H8 purinico del residuo (i) si trova in prossimità dei protoni H2', H2'' e H1' dello stesso residuo (i) e degli stessi protoni dello zucchero precedente (i-1) verso l'estremità 5'. La stessa connettività di sequenza che coinvolge i protoni aromatici si riscontra anche coi protoni H3' ed in alcuni casi anche con i protoni H4' (in esperimenti NOESY con *mixing time* lunghi, quindi in presenza del fenomeno di diffusione di spin).

L'assegnazione dei protoni degli zuccheri si basa, invece, sull'effetto NOE presente tra i nuclei di uno stesso anello e fondamentalmente sul loro accoppiamento scalare, per cui

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

Bibliografia

1. M. Gellert, J. F. Chantot, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1990**, 8, 491-511.
2. M. Gellert, N. M. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, 48, 2013.
3. S. B. Zimmerman, *Biopolymers*, **1975**, 14, 889-890.
4. S. B. Zimmerman, G. H. Cohen, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.*, **1975**, 92, 181-192.
5. J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1356-1359.
6. M. Borzo, C. Detellier, P. Laszlo, A. J. Paris, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 1124.
7. S. M. Kerwin, *Current Pharmaceutical Design*, **2000**, 6, 441-471.
8. Y. Wang, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 251, 76-94.
9. W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature*, **1989**, 342, 825-829.
10. D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1988**, 334, 364-366.
11. Y. Wang, D. J. Patel, *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112-8119.
12. K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 171-182.
13. F. W. Smith, J. Feigon, *Nature*, **1992**, 356, 164-168.
14. F. W. Smith, J. Feigon, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8682-8692.
15. Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1993**, 1, 263-282.
16. K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofberger, S. Swaminathan, P. H. Bolton, *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899-1904.
17. P. Schultze, R. F. Macaya, J. Feigon, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 1532-1547.
18. G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature*, **2002**, 417, 876-880.
19. D. J. Patel, *Nature*, **2002**, 417, 807-808.
20. J. Sühnel, *Biopolymers*, **2001**, 56, 32-51.
21. P. K. Patel, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 2457-2464.
22. P. K. Patel, A. S. R. Koti, R. V. Hosur, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 3836-3843.

23. A. Kettani, S. Bouaziz, A. Gorin, H. Zhao, R. Jones, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1998**, 282, 619-636.
24. F. Aboul-ela, A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Nature*, **1992**, 360, 280-282.
25. Y. Wang, D. J. Patel, *Structure*, **1994**, 2, 1141-1156.
26. P. Catasti, X. Chen, R. K. Moyzis, E. M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 264, 534-545.
27. R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 3745-3749.
28. G. Laughl, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *Science*, **1994**, 265, 520-524.
29. D. Mohanty, M. Bansal, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 1767-1774.
30. Y. Wang, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1993**, 234, 1171-1183.
31. E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco, E. H. Blackburn, *Cell*, **1987**, 51, 899-908.
32. K. L. Green, Y. Wang, D. Live, *J. Biomol. NMR*, **1995**, 5, 333-338.
33. F. W. Smith, F. W. Lau, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, 91, 10546-10550.
34. G. D. Strahan, R. H. Shafer, M. A. Keniry, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 5447-5455.
35. T. Simonsson, R. Sjöback, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 17379-17383.
36. F. M. Chen, *Biochemistry*, **1992**, 31, 3769-3776.
37. D. S. Pilch, G. E. Plum, K. J. Breslauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, 5, 334-342.
38. D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.*, **1992**, 211, 191-199.
39. S. W. Blume, V. Guarcello, W. Zacharias, D. M. Miller, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 617-625.
40. W. S. Ross, C. C. Hardin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6070-6080.
41. N. V. Hud, F. W. Smith, F. A. L. Anet, J. Feigon, *Biochemistry*, **1996**, 35, 15383-15390.

42. J. D. Gu, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 529-532.
43. E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2001**, 30, 1-22.
44. E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 1244-1287.
45. N. Spackova, I. Berger, J. Spöner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5519-5534.
46. I. Haq, J. O. Trent, B. Z. Chowdhry, T. C. Jenkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1768-1779.
47. E. H. Blackburn, *Nature*, **1991**, 350, 569-573.
48. D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1990**, 344, 410-414.
49. T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1167-1172.
50. G. I. Bell, M. J. Selby, W. J. Rutter, *Nature*, **1982**, 295, 31-35.
51. A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 49-53.
52. I. Smirnov, R. H. Shaker, *Biopolymers*, **2001**, 56, 209-227.
53. A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 11593-11598.
54. T. De Lange, T. Jacks, *Cell*, **1999**, 98, 273-275.
55. W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg, *Nature*, **1999**, 400, 464-468.
56. J. Feng, W. Funk, S. Wang, S. Weinrich, A. Avilion, C. Chium, R. Adams, E. Chang, R. Allsopp, J. Yu, S. Le, M. West, C. Harley, W. Andrews, C. Greider, B. Villeponteau, *Science*, **1995**, 269, 1236.
57. J. Lingner, T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, T. R. Cech, *Science*, **1997**, 276, 561.
58. L. Harrington, T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M.B. Bass, I. Arruda, M. O. Robinson, *Science* 1997, 275, 973.
59. V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore, *Cell*, 1997, 88, 657-666.
60. A. M. Burger, M. C. Bibby, J. A. Double, *Brit. J. Cancer*, 1997, 75, 516.
61. J. C. Soria, P. Vielh, A. K. el-Naggar, *Adv. Anat. Pathol.*, 1998, 5, 86.

62. V. Urquidi, D. Tarin, S. Goodison, *Annali Med.*, 1998, 30, 419.
63. S. Sharma, E. Raymond, H. Soda, D. Sun, S. G. Hilsenbeck, A. Sharma, E. Izbicka, B. Windle, D. D. Von Hoff, *Ann. Oncology*, 1997, 8, 1063.
64. A. m. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature*, 1991, 350, 718-720.
65. Q. Guo, M. Lu, L. A. Marky, N. R. Kallenbach, *Biochemistry*, 1992, 31, 2451-2455.
66. D. Y. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 2113-2116.
67. S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2002, 1, 383-393.
68. H. Y. Han, L. H. Hurley, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21, 136-142.
69. P. J. Perry, J. R. P. Arnold, T. C. Jenkins, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2001, 10, 2141-2156.
70. S. M. Kerwin, *Curr. Pharm. Des.*, 2000, 6, 441-471.97, 276, 561.
71. L. H. Hurley, R. T. Wheelhouse, D. Sun, S. M. Kerwin, *Pharmacol. Ther.*, 2000, 85, 141-158.
72. Z. Chen, D. R. Corey, *Adv. Cancer Res.*, 2003, 87, 31-58.
73. H. Y. Han, D. R. Langley, A. Rangan, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 6485-6495.
74. O. Yu. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V. V. Chemeris, S. M. Kerwin, L. H. Hurley, *Biochemistry*, 1998, 37, 12367-12374.
75. E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens, M. S. Searle, *Angew. Chem.*, 2001, 113, 4885-4887; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 4749- 4751.
76. M. A. Read, S. Neidle, *Biochemistry*, 2000, 39, 13422-13432.
77. S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, 2003, 326, 117-125.
78. G. R. Clark, P. D. Pytel, C. J. Squire, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 4066-4067.

79. S. M. Kerwin, G. Chen, J. T. Kern, P. W. Thomas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 447-450.
80. J. T. Kern, P. W. Thomas, S. M. Kerwin, *Biochemistry*, **2002**, 41, 11379-11389.
81. K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1262-1263.
82. M. Y. Kim, H. Vankayalapati, S. Kazuo, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2098-2099.
83. C. Tuerk, L. Gold, *Science*, **1990**, 249, 505-510.
84. A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature*, **1990**, 818-822.
85. A. D. Ellington, W. Xu, *Biochemistry*, **1996**, 93, 7475-7480.
86. J. Hamm, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 2220-2227.
87. J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 20556-20567.
88. J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chem. Biol.*, **1996**, 3, 611-617.
89. D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1997**, 1, 32-46.
90. L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature*, **1992**, 355, 564-566.
91. J. A. Kelly, J. Feigon, T. O. Yeates, *J. Mol. Biol.*, **1996**, 256, 417-422.
92. A. Mazumder, N. Neamati, J. O. Ojwang, S. Sunder, R. F. Rando, Y. Pommier, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13762-13771.
93. N. J. Jing, R. F. Rando, Y. Pommier, M. E. Hogan, *Biochemistry*, **1997**, 36, 12498-12505.
94. N. J. Jing, M. E. Hogan, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 34992-34999.
95. N. J. Jing, C. Marchand, J. Liu, R. Mitra, M. E. Hogan, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 21460-21467.

96. V. Dapic, P. J. Bates, J. O. Trent, A. Rodger, S. D. Thomas, D. M. Miller, *Biochemistry*, **2002**, 41, 3676-3685.
97. C. Shaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 8572-8577.
98. K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sadler, A. Tulinsky, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 17651-17654.
99. K. Padmanabhan, A. Tulinsky, *Acta Crystallogr., Sect. D*, **1996**, 52, 272-282.
100. M. P. Hovarth, S. C. Schultz, *J. Mol. Biol.*, **2001**, 310, 367-377.
101. C. S. M. Olsthoorn, *Ph. D. Thesis*, **1981**, Leiden.
102. C. R. Cantor, P. R. Shimmel, *Biophysical Chemistry*, Vol. II, **1980**, Freeman & Co., San Francisco.
103. F. M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 11-15.
104. C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. De Leeuw, H. P. M. De Leeuw, C. Altona, *Org. Magn. Reson.*, **1981**, 15, 43-52.
105. W. P. Aue, E. Batholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 2229-2246.
106. G. Wider, *Progr. NMR Spectrosc.*, **1998**, 32, 193-275.
107. G. Wider, S. Macura, A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.*, **1984**, 56, 207-234.
108. V. Sklenar, H. Miyashiro, G. Zon, H. T. Miles, A. Bax, *FEBS Lett.*, **1986**, 208, 94-98.
109. I. Solomon, *Phys. Rev.*, **1955**, 99, 559-565.
110. K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, **1986**, Wiley: New York.
111. D. J. Patel, L. Shapiro, D. Hare, *Quat. Rev. Biophys.*, **1989**, 20, 35-112.
112. B. R. Reid, *Quat. Rev. Biophys.*, **1987**, 20, 1-34.

Capitolo 2: Strutture quadruplex come target biologici.

2.1 Introduzione

L'integrità del genoma è di vitale importanza per la replicazione e la sopravvivenza cellulare. Tuttavia, un'ampia varietà di cause, l'esposizione a sostanze genotossiche e i processi cellulari soggetti ad errori rendono il DNA piuttosto vulnerabile a danni e mutazioni¹ (Fig. 29).

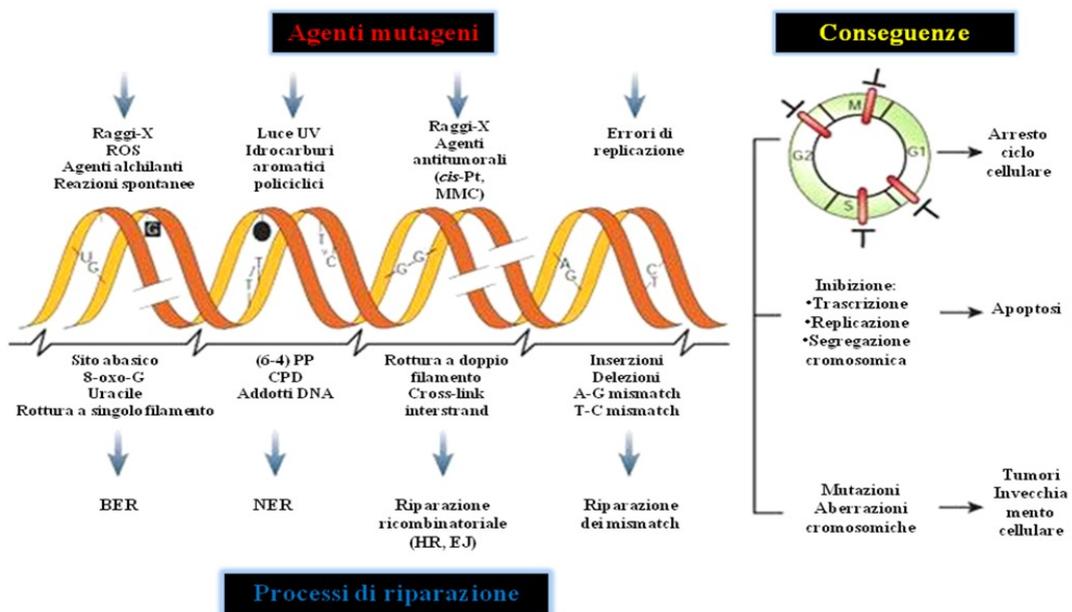


Fig. 29 Possibili danni al DNA.

I più comuni danni al DNA sono: siti abasici, basi modificate, delezioni, inserzioni, ossidazione delle basi, dimeri di pirimidina, rotture dei filamenti, appaiamento errato o mancata incorporazione delle basi. Tra questi i siti abasici [siti apurinici/apirimidinici (AP)] rappresentano una delle lesioni più frequenti nel DNA. Possono essere la conseguenza di due processi: l'idrolisi spontanea del legame N-glicosidico^{2,3} (generalmente depurinazione) o la rimozione di una base alterata da parte della DNA glicosidasi durante la prima fase del processo di riparazione per escissione delle basi^{2,4}. In aggiunta a queste due cause, prodotti chimici dannosi come radicali liberi e agenti alchilanti possono promuovere il rilascio di

basi, spesso attraverso l'introduzione di modificazioni che destabilizzano il legame N-glicosidico generando un miglior gruppo uscente^{6,7}. E' stato stimato che la depurinazione spontanea nella doppia elica del DNA causa la perdita di ~10000 purine per cellula di mammifero al giorno^{6,7} e considerando che a ciò si aggiungono i siti AP prodotti dalla DNA glicosidasi, che rimuove le basi alterate, la quantità giornaliera di siti abasici generati è probabilmente molto più elevata. Secondo una stima orientativa, infatti, i livelli medi si attestano intorno a 50000-200000 siti abasici per cellula al giorno in diversi tessuti di ratto e fegato umano.⁸

2.2 Effetto dell'introduzione di siti abasici sulle proprietà cinetiche, termodinamiche e strutturali di sequenze formanti quadruplex

La formazione di siti abasici per via enzimatica avviene a causa dell'azione di specifici sistemi di riparazione delle basi modificate: il processo BER (*base excision repair*) e il sistema MGMT (MetilGuanina-DNA-MetilTransferasi).

La formazione di basi alterate può avvenire in diversi modi. Per esempio, specie reattive dell'ossigeno, prodotti del normale processo di respirazione cellulare, possono generare vari tipi di danni ossidativi a livello delle basi del DNA, inclusa la 8-oxo-7,8-diidroguanina che è frequentemente impiegata come *biomarker* per il danno ossidativo al DNA.^{9,10} Inoltre, l'alchilazione non enzimatica da fonti endogene genera prodotti citotossici e mutageni, come 3-alchiladenine e O⁶-alchilguanine.^{11,12} I processi di metilazione, ossidazione e deamminazione possono produrre ulteriori tipi di basi danneggiate, come la N⁷-metilguanina, 5,6-diidrossitimina (Tg) o uracile.¹²⁻¹⁴ L'accumularsi di siti AP non riparati può essere fatale per la cellula, ostacolandone la replicazione. Tra l'altro anche quando sono bypassati dalle DNA polimerasi, i siti AP determinano spesso l'inserimento di basi mutagene sul filamento complementare.^{2,15} Inoltre, queste lesioni sono soggette a una reazione di β -eliminazione relativamente facile che porta ad una rottura del filamento

di DNA non processato.^{4,16,17} Infine, studi recenti hanno dimostrato che il residuo aldeidico formato da un sito AP può generare un legame interfilamento via carbinolamina/imina con il gruppo amminico esociclico in 2 di un residuo guanidinico sul filamento opposto della doppia elica.¹⁸

Poiché la maggior parte degli eventi che generano siti AP coinvolge residui di guanina, la presenza di simili lesioni nel DNA diventa particolarmente importante in tratti ricchi di G. Questi sono stati osservati in porzioni critiche del genoma quali regioni promotrici di diversi geni, DNA ribosomiali, ripetizioni ipervariabili quali minisatelliti e microsatelliti, geni a copia singola, così come telomeri e regioni variabili della catena pesante delle immunoglobuline.

I tratti *G-rich* hanno la potenzialità di formare strutture quadruplex in seguito a destabilizzazione transitoria del duplex. Infatti, la formazione in vivo di queste strutture è legata alla temporanea denaturazione del DNA nei tratti ricchi di guanine, durante i processi di replicazione, trascrizione e ricombinazione. Inoltre, mediante l'utilizzo di algoritmi per la ricerca di tratti ricchi di G in genomi umani e batterici¹⁹⁻²¹ è stata osservato che la presenza di molte sequenze formanti quadruplex sono prevalentemente presenti a livello delle regioni di promotrici di geni oncogeni e in misura inferiore a livello di geni oncosoppressori.²² Anche se tali considerazioni suggeriscono chiaramente una relazione tra siti abasici, sequenze ricche in G e strutture quadruplex, fino ad ora, sono stati riportati solo pochi lavori in letteratura in cui siti abasici sono stati inseriti unicamente all'interno di loop di strutture quadruplex.²³⁻²⁶

Per valutare l'effetto dell'introduzione di siti abasici nei tratti di G delle strutture quadruplex sia antiparallele che intraparallele, abbiamo intrapreso uno studio sistematico sulle caratteristiche strutturali e sulle proprietà cinetiche e termodinamiche di oligonucleotidi (ODNs) formanti strutture a quadrupla elica, contenenti siti abasici.

Per questo progetto, sono stati sintetizzati cinque oligonucleotidi basati sulla sequenza naturale d(TGGGGGT) (Tabella 1), in cui ciascun residuo di guanina è stato sostituito, uno per volta, da un sito abasico. Data l'instabilità del sito naturale emiacetalico AP, al suo posto è stato impiegato un analogo tetraidrofuranico, detto dSpacer (dS). (**Fig. 30**)

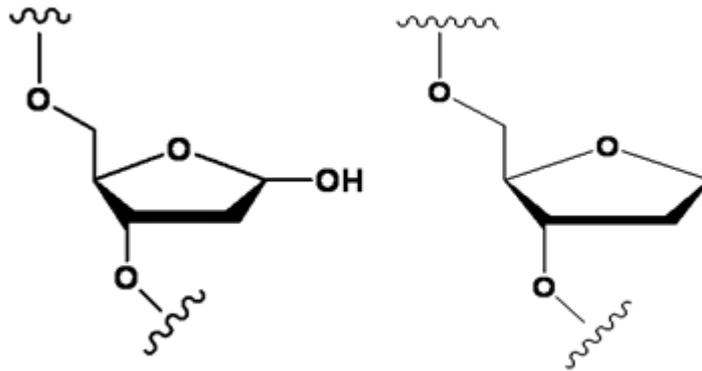


Fig. 30. A sinistra sito abasico naturale. A destra struttura del dSpacer.

Le principali proprietà strutturali di tali ODN modificati, la stabilità termica e i processi di associazione e dissociazione di tali complessi macromolecolari sono stati esaminati fondamentalmente con l'impiego di tecniche spettroscopiche, quali Risonanza Magnetica Nucleare e Dicroismo Circolare. Tali studi hanno evidenziato diversi effetti sequenza-dipendente sulla flessibilità e stabilità delle strutture quadruplex formate dagli ODN sintetizzati.

Oligonucleotidi Sintetizzati		$T_{1/2}$ °C
nome	Sequenza (5'-3')	
AQ1	d(TSGGGGT)	>100
AQ2	d(TGSGGGT)	87
AQ3	d(TGGSGGT)	<25;75
AQ4	d(TGGGSGT)	63
AQ5	d(TGGGGST)	>100

Tabella 1. Sequenze degli oligonucleotidi sintetizzati e temperature di melting

2.3 Risultati e discussione

2.3.1 Esperimenti NMR

Tutti i campioni NMR (vedi la sezione materiali e metodi) sono stati riscaldati per 5-10 minuti a 80°C e lentamente raffreddati a temperatura ambiente. Le soluzioni contenenti i campioni sono stabilizzate per almeno una settimana a 4°C. Dopo questi accorgimenti i campioni sono pronti per essere analizzati mediante ¹H-NMR. Gli spettri sono stati registrati usando una sequenza d'impulsi di tipo WATERGATE per la soppressione del segnale dell'H₂O. Il raggiungimento di una situazione di equilibrio è garantito dalla sovrapposizione degli spettri a distanza di tempo.

Con l'esclusione di alcuni segnali di minore intensità, dovuti a conformazioni di secondaria importanza comunque presenti in soluzione, l'aspetto relativamente semplice della maggior parte degli spettri 1D degli oligomeri (**Fig. 31**) indica che, nelle condizioni sperimentali adoperate, gli ODN modificati formano principalmente un'unica ben definita conformazione stabilizzata da legami a idrogeno e consistente in una struttura quadruplex altamente simmetrica contenente quattro tetradi di guanine, in cui tutti i filamenti sono

equivalenti gli uni agli altri e dotati di una simmetria quaternaria. Infatti, tutti gli spettri ^1H -NMR dei differenti campioni rivelano nella regione 10.5-12.0 p.p.m la presenza di quattro segnali principali, attribuibili ai protoni imminici coinvolti in legami a idrogeno di tipo Hoogsteen e responsabili della formazione dei quartetti di G, e inoltre rivelano nella regione aromatica dello spettro sei principali singoletti, di cui quattro appartenenti ai protoni H8 delle guanine e due ai protoni H6 delle due timine. D'altro canto, è interessante notare che ci sono differenze significative negli spettri monodimensionali dei diversi campioni, suggerendo così che l'introduzione di una singola unità dS può produrre effetti differenti a seconda della sua posizione all'interno della sequenza.

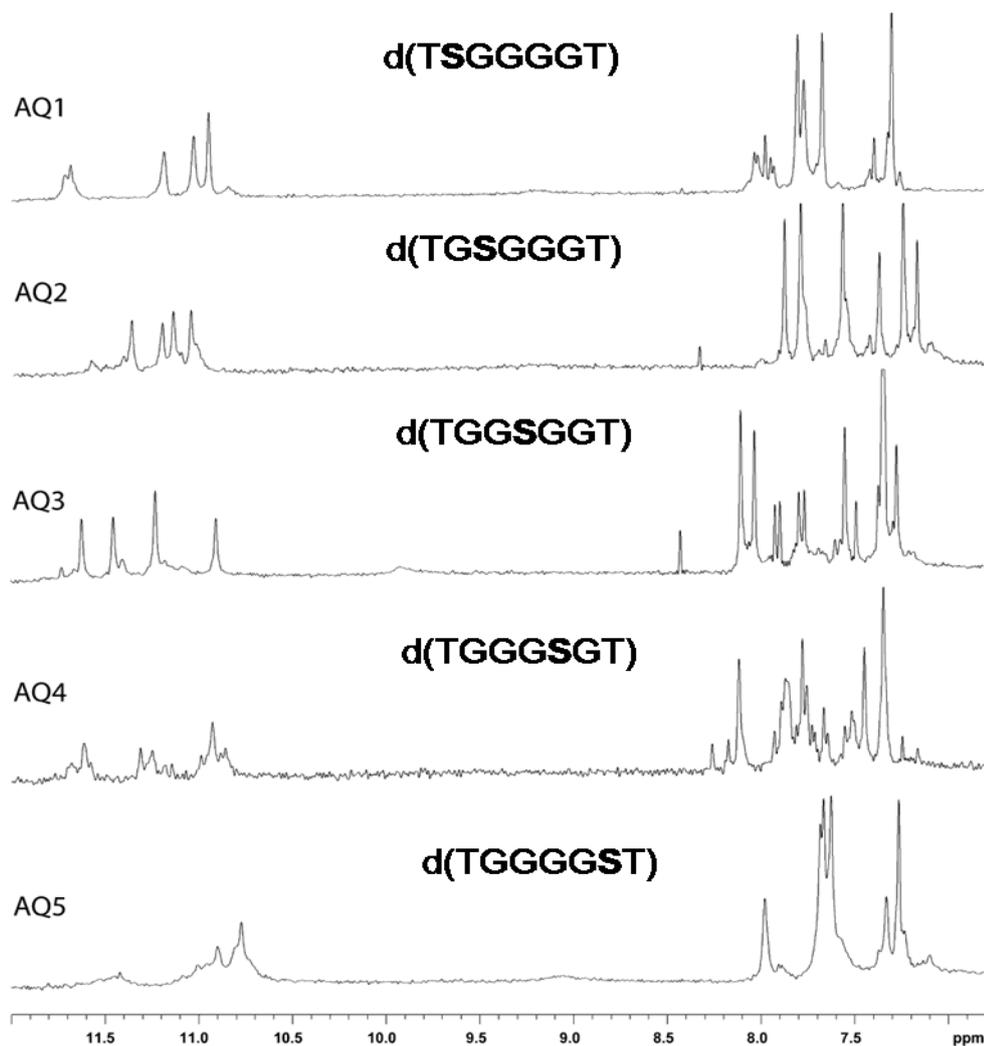


Fig. 31 Regione aromatica e dei protoni imminici degli spettri ^1H -NMR degli ODN AQ1-AQ5

Nonostante l'aspetto piuttosto complicato degli spettri $^1\text{H-NMR}$ mostrato da alcuni ODN, per tutti i campioni è stato possibile effettuare l'assegnazione di quasi tutti i picchi della specie più abbondante presente in soluzione. L'assegnazione è stata fatta sulla base di spettri NOESY e TOCSY, ottenuti a 500 MHz, seguendo le procedure standard.

Come riportato per altre strutture quadruplex parallele, i picchi di correlazione NOE osservati tra G-H8 e T-H6 con i protoni H1', H2', H2" del proprio residuo di deossiribosio e i protoni H1', H2', H2" del deossiribosio al 5' suggeriscono che tutte le quadruplex assumono una struttura elicoidale destrorsa. Per quanto riguarda gli angoli torsionali del legame glicosidico, la mancanza di forti segnali NOE tra G-H8 e il protone H1' dello stesso residuo, in confronto con quelli osservati tra G-H8 e i protoni H2'/ H2" del suo deossiribosio, indica che tutti i residui guanosinici dei complessi considerati adottano una conformazione glicosidica di tipo anti.

Come atteso, per la maggior parte dei campioni, il normale *pattern* di connettività sequenziale NOE è interrotto a livello del dSpacer. Questo dato indica che il sito abasico costituisce una sorta di "punto di rottura" nel percorso di connettività NOE lungo i filamenti dei complessi analizzati, con conseguente separazione spaziale delle due risultanti porzioni di quadruplex. Tuttavia la sequenza **AQ2** rappresenta un'eccezione degna di nota. Infatti, lo spettro NOESY di **AQ2** (**Fig. 32**) mostra la presenza di un forte effetto NOE tra i protoni aromatici dei due residui di dG adiacenti all'unità spaziatrice, indicando che, in questo caso, le due porzioni della molecola (prima e dopo il dS) risultano spazialmente vicine, diversamente dagli altri complessi quadruplex.

Per quanto riguarda **AQ1**, lo spettro protonico monodimensionale è interessato da un leggero ampliamento delle linee dei segnali e da uno allargamento dei picchi di risonanza appartenenti al quartetto di G adiacente al dS, suggerendo una maggiore flessibilità conformazionale all'estremità 5' del complesso. L'inserimento del dS nella posizione centrale (**AQ3**), invece, ostacola la completa associazione dei filamenti in una struttura

quadruplex, come dimostrato dallo spettro monodimensionale NMR del campione, acquisito a 25°C dopo diverse settimane di equilibratura a 5°C, come per le altre quadruplex. Infatti, questo spettro mostra la presenza principalmente di dodici segnali nella regione tra 7.0 e 8.5 p.p.m e solo quattro picchi, attribuibili ai protoni imminici, nella regione tra 10.8 e 11.8 p.p.m. Aumentando la temperatura a 80°, i sei segnali aromatici di minore intensità gradualmente aumentano di intensità, mentre gli altri sei, insieme con i quattro picchi dei protoni imminici, progressivamente scompaiono. Dunque a 80° nella regione aromatica dello spettro 1D sono presenti solo sei segnali, mentre non sono presenti i picchi relativi ai protoni imminici. Questo dato indica chiaramente che, in queste condizioni, **AQ3** è completamente destrutturato, mentre a 25°C la struttura quadruplex è in equilibrio con la sua forma a singolo filamento.

Il comportamento di **AQ4** appare relativamente più complicato, dal momento che lo spettro protonico monodimensionale mostra un notevole numero di segnali, probabilmente a causa della presenza in soluzione di più tipi di strutture quadruplex. Tuttavia, malgrado l'eterogeneità strutturale osservata, lo spettro NOESY mostra dei *cross-peak* piuttosto dispersi che ci hanno consentito di assegnare la maggior parte dei protoni non scambiabili seguendo le procedure standard, anche se i segnali diventano più deboli e meno definiti per le G-tetrad in prossimità del dSpacer.

Per quanto riguarda **AQ5**, il suo spettro ¹H-NMR indica la presenza in soluzione di una struttura quadruplex principale, i cui segnali sono interessati da un consistente ampliamento delle linee e da una parziale sovrapposizione se confrontati con gli altri complessi. Questo dato suggerisce che il complesso è caratterizzato da una flessibilità conformazionale che diviene più significativa per le porzioni della molecola in prossimità dell'unità dSpacer.

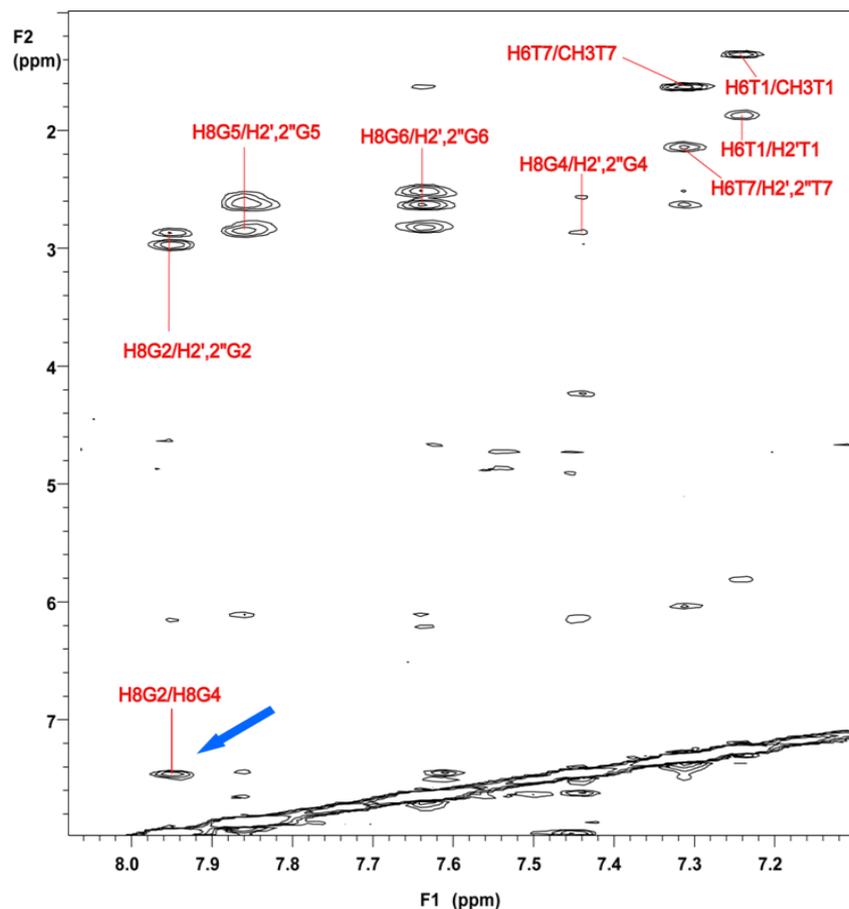


Fig. 32 Regione espansa dello spettro 2D NOESY della sequenza AQ2 correlante l'H8 della base e i protoni H2'/H2'' dello zucchero di ciascun residuo. La freccia indica un NOE tra i protoni aromatici di G2 e G4.

2.3.2 Elettroforesi su gel

Al fine di determinare la molecolarità dei complessi, è stata effettuata un'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) (Fig. 33) di tutti i campioni usando come riferimento la quadruplex [d(TGGGGT)]₄. La migrazione di tutti i campioni non denaturati degli ODN contenenti dS analizzati appare indubbiamente minore rispetto a quella dei rispettivi singoli filamenti, indicando chiaramente la presenza di complessi multimolecolari. Inoltre la loro mobilità elettroforetica è paragonabile a quella della quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli [d(TGGGGT)]₄ suggerendo pertanto la formazione di complessi aventi la stessa molecolarità. È importante sottolineare che, per tutti i campioni, non sono state individuate strutture sovramolecolari di dimensioni maggiori delle quadruplex.

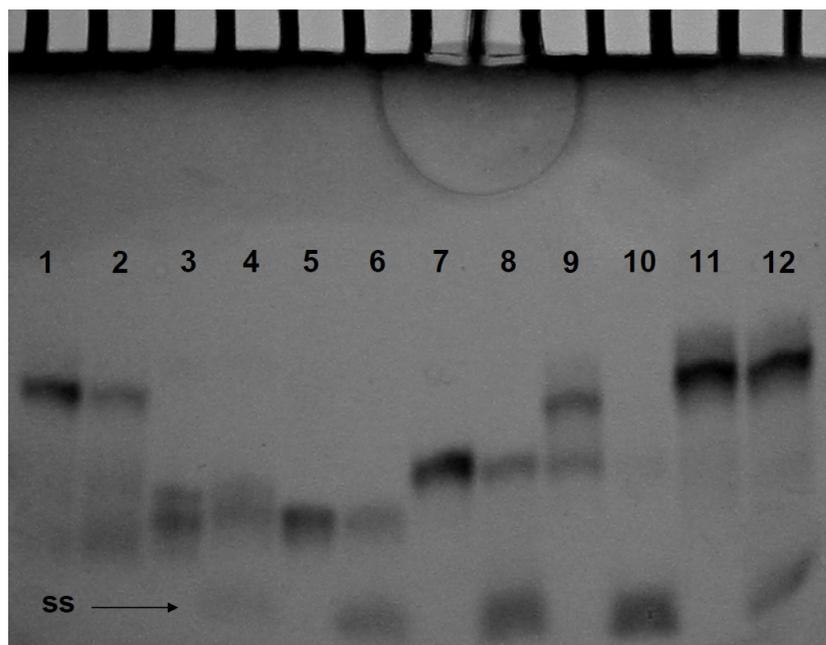


Fig. 33 Linea 1: *[d(TGGGGT)]4 nativa*; linea 2: *[d(TGGGGT)]4 denaturata*; linea 3: *AQ1 nativa*; linea 4: *AQ1 denaturato*; linea 5: *AQ2 nativo* ; linea 6: *AQ2 denaturato*; linea 7: *AQ3 nativo*; linea 8: *AQ3 denaturato*; linea 9: *AQ4 nativo*; linea 10: *AQ4 denaturato*; linea 11: *AQ5 nativo*; linea 12: *AQ5 denaturato* . Per tutti gli ODN, eccetto AQ4, si verifica solo una parziale denaturazione. La freccia nera indica la presenza di una lieve banda relativa alla presenza di AQ1 come singolo filamento.

2.3.3 Spettroscopia CD e analisi termica

Tutte le sequenze esaminate in questo studio mostrano lo spettro CD caratteristico di strutture quadruplex parallele²⁷, aventi tutti i residui in conformazione glicosidica *anti*. Questo dato conferma i risultati ottenuti mediante gli esperimenti NMR.

Il confronto tra l'intensità dell'ellitticità molare dei vari spettri CD suggerisce che le sequenze esaminate non formano la stessa quantità di struttura quadruplex. Infatti, l'intensità del segnale CD è maggiore per le strutture quadruplex formate dalle sequenze aventi il dSpacer più vicino all'estremità 5', mentre il segnale è più debole nel caso delle strutture formate dalle sequenze aventi il dSpacer più vicino all'estremità 3'. Il processo di dissociazione termica è cineticamente controllato vista la bassa velocità sia del processo di associazione sia di quello di dissociazione delle quadruplex osservate. Per questo motivo, sono state registrate temperature di melting apparenti ($T_{1/2}$) (Tabella 1) e non temperature

all'equilibrio²⁸. Poiché le sequenze esaminate mostrano proprietà molto differenti, i risultati ottenuti per ognuna di esse sono riportati separatamente.

AQ1 e AQ5. L'analisi termica effettuata sulle strutture quadruplex formate dalle sequenze d(TSGGGGT) e d(TGGGGST) suggerisce che esse hanno una maggiore stabilità rispetto agli altri ODN esaminati. (Fig. 34) È interessante notare che le temperature apparenti di melting ($T_{1/2}$), registrate sia alla velocità di riscaldamento di 1°C/min sia di 0.5°C/min, sono superiori a 100°C e solo per la struttura quadruplex ottenuta dalla sequenza **AQ5**, sono state ottenute delle parziali curve di melting. Entrambe le sequenze, dunque, sono in grado di formare strutture quadruplex molto stabili che non si dissociano ad alte temperature. Infatti i campioni, dopo un lungo periodo a 95°C, sono ancora in grado di riprodurre il caratteristico spettro CD di una struttura quadruplex parallela. L'elevata stabilità termica delle strutture quadruplex ottenute da queste sequenze non ha reso possibile una caratterizzazione cinetica dei relativi processi di associazione e dissociazione, data l'impossibilità di disgregare la struttura iniziale. (Fig. 35)

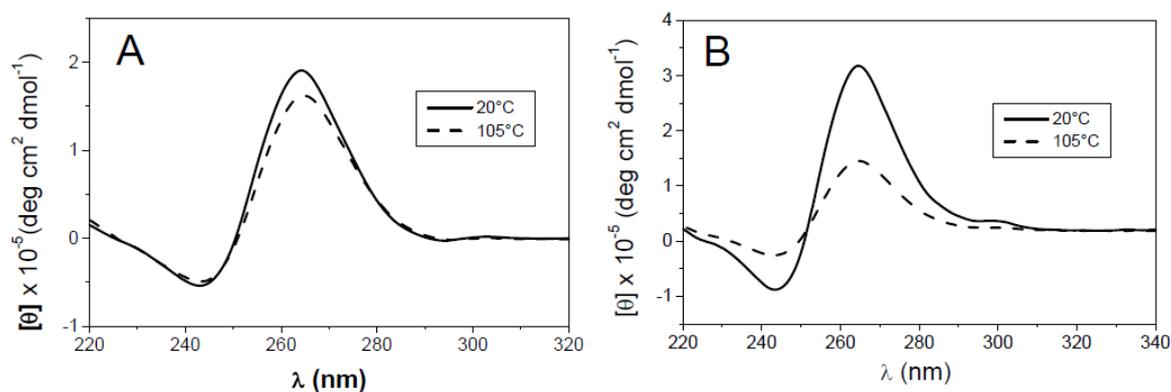


Fig. 34 Spettri CD delle strutture quadruplex AQ1 (A) e AQ5 (B) ottenuti a 20°C (linea continua) e a 105°C (linea tratteggiata). I segnali caratteristici di strutture quadruplex parallele sono ancora presenti ad alte temperature suggerendo un'elevata stabilità termica di queste strutture.

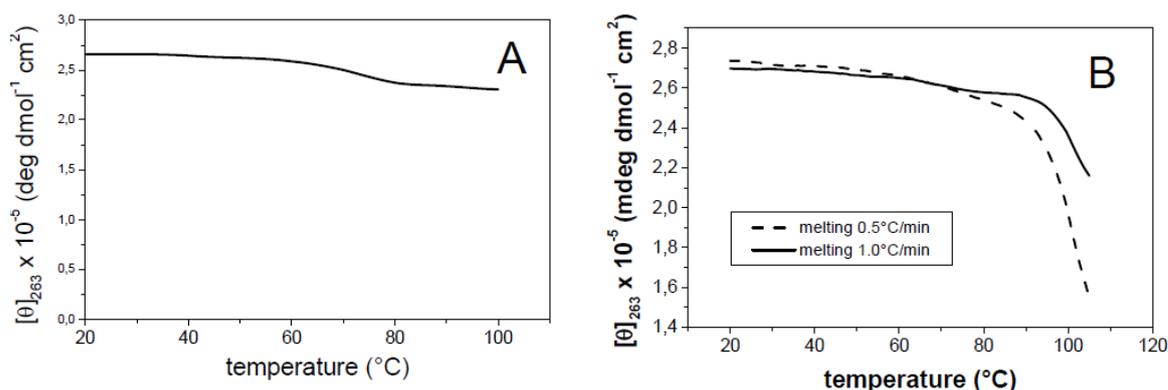


Fig. 35 Analisi termica delle strutture quadruplex formate da AQ1 (A) e AQ5 (B). I grafici riportano le curve di melting ottenute a una velocità di riscaldamento di 1.0°C/min (linea continua) e 0.5°C/min (linea tratteggiata) seguendo il segnale a 263 nm. In entrambi i casi il processo di melting non termina, suggerendo l'elevata stabilità termica delle risultanti strutture quadruplex.

AQ2. I profili CD di melting e annealing sono stati ottenuti rispettivamente a una velocità di riscaldamento e raffreddamento di 1.0°C/min e a una concentrazione di ODN di 5×10^{-5} M. La presenza di un fenomeno di isteresi tra i profili di melting e annealing indica che le reazioni di associazione/dissociazione non sono all'equilibrio termodinamico durante gli esperimenti di riscaldamento e raffreddamento^{28,29}. È interessante notare che lo spettro CD, registrato a una temperatura di 20°C subito dopo l'annealing, mostra un'intensità molto debole, mentre, lasciando stabilizzare il campione per un giorno a 2°C, il segnale CD aumenta di intensità recuperando il tipico profilo di una struttura quadruplex. (Fig. 36) Dal momento che, dopo un lungo periodo di conservazione a 2°C, il campione è in grado di riprodurre lo spettro CD tipico di una quadruplex parallela, possiamo affermare che il processo di destrutturazione è un processo reversibile. Il processo di associazione è dipendente dalla concentrazione di singolo filamento e diventa misurabile usando una concentrazione più elevata (1×10^{-4} M). Infatti, a conferma di ciò, sono state acquisite curve di melting e annealing utilizzando differenti concentrazioni di ODN e diverse velocità di riscaldamento/raffreddamento. In particolare, le curve di melting e annealing sono state registrate a tre differenti concentrazioni di singolo filamento (5×10^{-5} , 1×10^{-4} e 1×10^{-3} M).

Tutte le curve di melting mostrano la stessa $T_{1/2}$, indicando chiaramente la natura monomolecolare del processo di dissociazione. Invece, le curve di annealing variano all'aumentare della concentrazione di singolo filamento: più alta è la concentrazione di singolo filamento, maggiore è la frazione di quadruplex formatasi al termine dell'annealing. L'ultimo risultato è chiaramente un effetto correlato alla molecolarità del processo di associazione, in cui quattro filamenti devono interagire tra loro per formare la quadruplex.

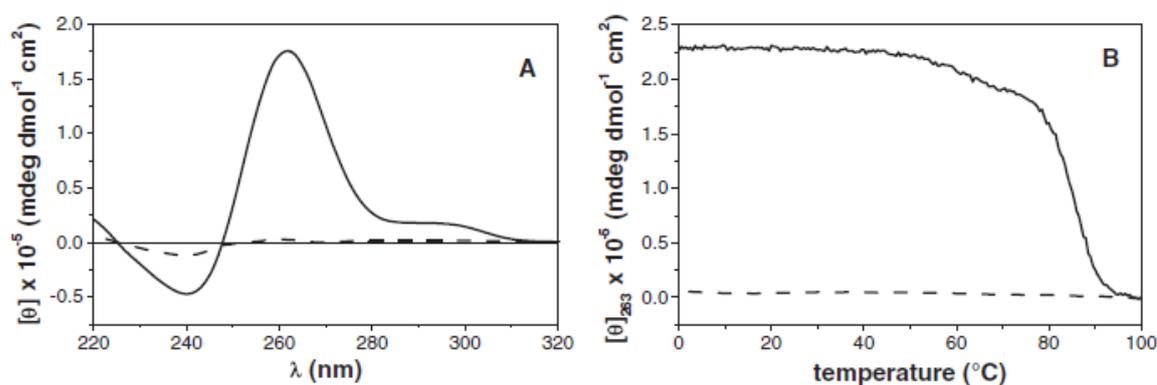


Fig. 36 Spettroscopia CD (A): il grafico riporta lo spettro ottenuto a 20°C (linea continua) e dopo riscaldamento a 100°C (linea tratteggiata). L'analisi termica (B) mostra la curva di melting (linea continua) e quella di annealing (linea tratteggiata) registrate a una velocità di riscaldamento e raffreddamento di 1°C/min

AQ3. La curva di melting, acquisita appena dopo l'annealing e registrata nell'intervallo di temperatura tra 5 e 90°C a una concentrazione di singolo filamento di $5 \times 10^{-5} \text{M}$, non mostra un profilo sigmoide e risulta molto simile a quella di annealing. La presenza di un'isteresi molto debole tra le due curve suggerisce una quasi istantanea reversibilità del processo di dissociazione/associazione. A causa dell'assenza di una curva sigmoide, non è possibile definire rigorosamente la temperatura di melting della molecola studiata; tuttavia una $T_{1/2}$ minore di 25°C indica chiaramente una bassa stabilità termica dell'oligonucleotide strutturato. È interessante notare che, lasciando equilibrare la soluzione di ODN a 5°C per una settimana, lo spettro CD cambia. (**Fig. 37**) Nel nuovo profilo CD il picco classico a

263nm diminuisce d'intensità e compare un segnale positivo più basso a 290nm suggerendo la presenza in soluzione di minori quantità di altre strutture quadruplex. Diverse sono anche le caratteristiche termiche: la nuova curva di melting, a forma di sigmoide, mostra una più alta temperatura di fusione (75°C). Invece la curva di annealing non cambia e il notevole effetto di isteresi indica che in questa nuova configurazione il sistema è sotto un intenso controllo cinetico²⁷ che ha impedito una più approfondita caratterizzazione del sistema.

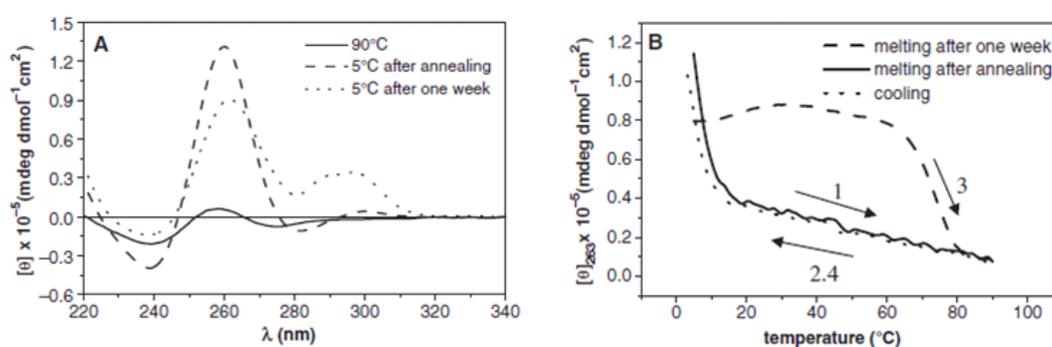


Fig. 37: Lo schema A riporta gli spettri delle strutture quadruplex acquisiti a 90°C, a 5°C dopo l'annealing (mediante raffreddamento del campione da 90°C a 1°C/min) e dopo una settimana di conservazione a 5°C. In B sono riportate le curve di melting ottenute a una velocità di riscaldamento di 1°C/min registrate dopo la procedura di annealing (1) e dopo una settimana di conservazione a 5°C (3). In entrambi i casi i profili di annealing (2,4) sono molto simili.

AQ4. I profili CD di melting e annealing sono stati ottenuti a una velocità di riscaldamento/raffreddamento di 1°C/min e a una concentrazione di 5×10^{-5} M. È presente un'isteresi tra i profili di melting e annealing^{28,29} indicando che la reazione di associazione/dissociazione non è in equilibrio termodinamico durante gli esperimenti di riscaldamento e raffreddamento. È interessante notare che lo spettro CD, registrato subito dopo l'annealing, mostra un'intensità molto debole, mentre conservando il campione per un giorno a 2°C, lo spettro CD, registrato a 20°C, presenta un segnale più intenso recuperando il profilo tipico di una struttura quadruplex. (Fig. 38) Dato che il campione, dopo un lungo periodo di conservazione a 2°C, è in grado di riprodurre il tipico spettro CD di una struttura quadruplex parallela, il processo di destrutturazione si può considerare

reversibile. Per questo campione, come per **AQ2**, gli esperimenti di melting e annealing, sono stati effettuati utilizzando differenti concentrazioni di singolo filamento e differenti velocità di scansione. I dati sperimentali raccolti hanno condotto alle stesse conclusioni riportate precedentemente per **AQ2**, ossia che il processo di dissociazione è monomolecolare mentre quello di associazione implica una più elevata molecolarità.

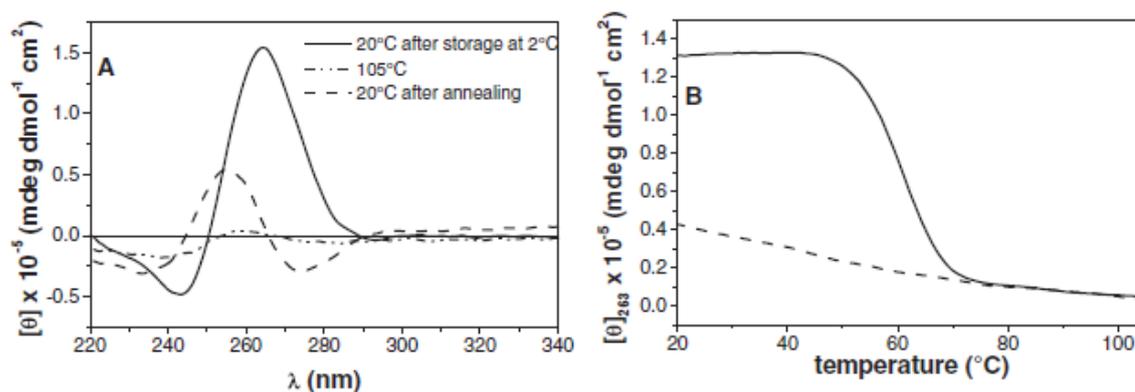


Fig. 38 Spettroscopia CD (A): sono riportati gli spettri acquisiti a 20°C dopo un periodo di conservazione a 2°C e prima del riscaldamento (linea continua), a 105°C e a 20°C dopo l'annealing. **Analisi termica (B):** curva di melting (linea continua) e di annealing (linea tratteggiata) ottenute a una velocità di riscaldamento/raffreddamento di 1°C/min.

2.3.4 Molecular modelling

In figura 37 sono riportati i modelli molecolari delle strutture quadruplex della sequenza naturale [d(TGGGGGT)]₄ e di **AQ2**, ottenuti come descritto nella parte sperimentale.

A parte la presenza di una tetrad di G addizionale, il modello ottenuto relativo a [d(TGGGGGT)]₄ risulta molto simile alla struttura ai raggi-X del complesso [d(TGGGGT)]₄ proposta da Phillips *et al.*³⁰ D'altro canto i *pattern* di NOE mostrati dalle quadruplex contenenti dSpacer sono estremamente simili a quelli mostrati da diverse strutture quadruplex parallele che adottano una struttura elicoidale destrorsa (inclusa [d(TGGGGT)]₄),^{31,32,33} anche se il *pattern* di connettività è interrotto dalla presenza del

residuo dS nella maggior parte delle strutture quadruplex modificate studiate. Queste considerazioni rendono valido l'approccio con cui è stato realizzato il modello. (Fig. 39)

Il modello molecolare di **AQ2** si basa sui dati ottenuti dagli esperimenti NMR mostrando chiaramente la presenza di interazioni di *stacking* tra le tetradie fiancheggianti il sito abasico. Tuttavia, un confronto tra i modelli delle quadruplex $[d(TGGGGGT)]_4$ e **AQ2** suggerisce significative differenze. In particolare, nel modello di **AQ2** la tetradie adiacente al dS verso l'estremità 5' non risulta completamente planare a causa di un notevole effetto "buckle" (cedimento, piegamento). In accordo con tale situazione strutturale la $T_{1/2}$ di **AQ2** risulta minore rispetto a quella delle quadruplex ottenute dalle sequenze **AQ1**, **AQ5** e TGGGGT, in cui il tratto di G non è interrotto.

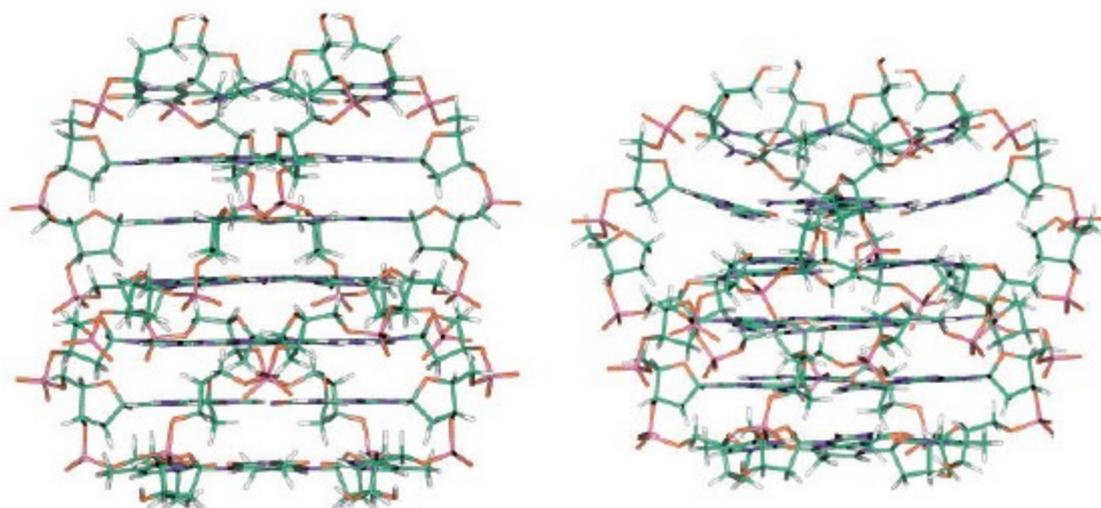


Fig. 39 modelli molecolari delle quadruplex formate dagli ODN TGGGGGT (a sinistra) e AQ2 (a destra). Le strutture sono orientate con l'estremità 5' verso l'alto.

Da quanto finora esposto, risulta chiaro che l'inserimento di un dSpacer, che mima un sito abasico, all'interno della sequenza $d(TGGGGT)$, determina significative variazioni sulla stabilità e flessibilità delle strutture quadruplex risultanti. Tali effetti dipendono fortemente dalla posizione dello spaziatore all'interno della sequenza. La presenza del dSpacer riduce la stabilità delle strutture quadruplex in maniera sito-dipendente senza tuttavia

compromettere la possibilità di formare strutture quadruplex sufficientemente stabili da poter essere studiate. In generale, l'introduzione di un dSpacer in prossimità dell'estremità 3' riduce la stabilità in maniera più significativa rispetto a quando è posizionato nella regione 5' terminale. Le strutture quadruplex formate dalle sequenze modificate sintetizzate presentano differenti stabilità termiche e risultano tutte meno stabili rispetto alla quadruplex naturale d[(TGGGGT)]₄ contenente lo stesso numero di tetradi di G.³⁴

Gli ODN **AQ1** e **AQ5** sono in grado di formare stabili strutture quadruplex parallele che non si dissociano alle massime temperature strumentali raggiungibili. Questo risultato suggerisce che la presenza del dSpacer al di fuori del tratto di G non produce forti effetti destabilizzanti sulla struttura quadruplex, sebbene in entrambi i casi, gli esperimenti NMR suggeriscano un incremento della flessibilità della molecola nelle regioni adiacenti al dS, in particolare nella regione 3'. Infatti, un confronto tra le regioni imminiche dei loro spettri ¹H-NMR, da cui emerge un notevole allargamento delle linee dei segnali di **AQ5** rispetto ad **AQ1**, indica chiaramente una maggiore flessibilità della regione 3' terminale.

D'altro canto, quando il dSpacer si trova all'interno del tratto di G, come nel caso degli ODN **AQ2**, **AQ3** e **AQ4** la stabilità termica diminuisce come suggerito da un confronto tra le T_{1/2} delle strutture quadruplex da essi formate. Questo effetto è particolarmente evidente quando il dS è collocato in prossimità della regione 3' terminale. Infatti, nel caso particolare della quadruplex ottenuta dalla sequenza **AQ2**, l'effetto d'interruzione della sovrapposizione delle tetradi di G, chiaramente presente per tutte le altre strutture, risulta fortemente contrastato da un adattamento molecolare che proietta esternamente dalla struttura il dSpacer, permettendo così un'efficace sovrapposizione delle tetradi adiacenti al dS stesso.

A conferma dell'effetto destabilizzante in 3', la presenza del dSpacer nelle quadruplex **AQ3** e **AQ4** induce chiaramente la formazioni di diversi tipi di quadruplex. In particolare, la struttura derivante dall'auto-associazione dell'ODN **AQ3**, subito dopo il processo di

annealing, è caratterizzata da una temperatura di melting minore di 25°C e da uno spettro CD caratteristico di quadruplex contenenti tutte G in conformazione glicosidica anti. Sulla base di questi risultati si è giunti alla conclusione che il sistema sia formato da una combinazione di almeno due differenti popolazioni: le specie non strutturate e le molecole strutturate. I dati ottenuti indicano che le molecole strutturate meno stabili gradualmente evolvono in un sistema composto da una struttura quadruplex parallela principale più stabile e da minori quantità di quadruplex differenti, come suggerito dallo spettro CD nel quale sono presenti segnali caratteristici sia di quadruplex parallele sia antiparallele. Purtroppo essendo molto lenta la velocità di conversione, non è stato possibile pianificare un esperimento per seguire nel dettaglio il riarrangiamento molecolare. L'insieme dei dati sperimentali raccolti indica che l'inserimento di un sito abasico al centro del tratto di G diminuisce la capacità di formare stabili strutture quadruplex favorendo la formazione di una miscela di diverse conformazioni. Tale effetto negativo probabilmente è dovuto all'interruzione delle interazioni di *stacking* prodotta dall'unità dSpacer nella molecola. Tenendo conto dei risultati del presente studio, potrebbe essere interessante valutare gli effetti della presenza di siti abasici in altri tipi di strutture quadruplex, in particolare quelle strutture il cui ruolo biologico è stato accertato o è fortemente sospettato come, per esempio, i telomeri e i promotori degli oncogeni *c-kit* e *c-myc*. Pertanto ulteriori ricerche a riguardo sono attualmente in corso presso i laboratori di ricerca in cui si è svolta la mia attività di tesi.

2.4 Parte sperimentale

2.4.1 Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi **AQ1-AQ5** sono stati sintetizzati su un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA ricorrendo alla chimica in fase solida dei fosforamiditi su scala 15 µM. La

sintesi è stata realizzata usando 3'-fosforamiditi e un 5'-dimetossitritil-3'-fosforamidito-1',2'-dideossiribosio (dSpacer) per l'introduzione, in ogni sequenza, di un residuo che mimava un sito abasico. Gli oligomeri sono stati staccati dal supporto e deprotetti mediante trattamento con ammoniaca liquida concentrata a 55° per un'intera notte. Il filtrato e i successivi lavaggi sono stati concentrati a pressione ridotta, disciolti in acqua e purificati mediante HPLC su una colonna Nucleogel Sax (Macherey-Nagel, 1000-8/46), usando come eluenti:

- tampone A: soluzione acquosa a pH 7.0 20mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ contenente il 20% (v/v) di CH_3CN ;
- tampone B: soluzione acquosa a pH 7.0 1M KCl, 20mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ contenente il 20% (v/v) di CH_3CN ;
- e un gradiente lineare da 0 a 100% di B in 30min a una velocità di flusso di 1ml/min.

2.4.2 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

I campioni NMR sono stati preparati a una concentrazione di ~5mM in 0,6 ml ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 v/v) di soluzione tampone contenente 10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 70mM KCl e 0,2mM EDTA (pH 7.0). Per gli esperimenti in D_2O , l'acqua è stata sostituita con D_2O seccando i campioni, che sono stati liofilizzati e quindi disciolti in D_2O . Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian Unity INOVA 500 MHz. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silopentano-5-sulfonato sono stati presi come riferimento per gli ^1H *chemical shifts*. Gli spettri protonici 1D dei campioni sono stati registrati in H_2O usando una sequenza d'impulsi di tipo WATERGATE³⁵ per la soppressione del segnale del solvente. Gli spettri NOESY sono stati registrati in modalità “*phase sensitive*”³⁶ usando un

mixing time di 180ms ($T=25^{\circ}\text{C}$). Per gli spettri NOESY in H_2O , con un mixing time di 120ms, è stata usata la sequenza di impulsi di tipo WATERGATE. Gli spettri TOCSY³⁷, con un mixing time di 120ms, sono stati acquisiti in soluzione di D_2O . NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura TPPI³⁸. In tutti gli esperimenti bidimensionali, i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi t_2 e 400-512 fid nella dimensione t_1 . Il tempo di rilassamento è stato settato a 1.2s per tutti gli esperimenti.

2.4.3 Elettroforesi su gel

Gli oligonucleotidi modificati sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti. I campioni equilibrati nel tampone NMR (20mM KH_2PO_4 , 70mM KCl e 0,2 mM EDTA, pH 7) sono stati caricati su un gel al 20% di poliacrilammide contenente TBE 2,5x e KCl 50mM. Come soluzione tampone di corsa è stato utilizzato TBE 1x contenente KCl 100mM. I campioni di riferimento a singolo filamento sono stati ottenuti mediante denaturazione con LiOH. Per tutti i campioni, appena prima del caricamento, è stata aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE 1x-100mM KCl = 2:1. L'elettroforesi è stata eseguita a 9.2V/cm e a una temperatura intorno ai 5°C . Le bande sono state visualizzate mediante irradiazione UV.

2.4.4 Spettroscopia CD e analisi termica

I campioni di quadruplex sono stati preparati sciogliendo la soluzione degli ODN liofilizzati in un tampone fosfato 10mM avente 70mM KCl, 0,2 mM EDTA a pH 7.0. La soluzione è stata sottoposta ad equilibratura mediante riscaldamento a 95°C per 5min e lento raffreddamento a temperatura ambiente. La concentrazione degli oligonucleotidi disciolti è stata determinata mediante misurazione all'UV a 95°C , usando

come coefficiente di estinzione molare il valore calcolato mediante il modello³⁹ più simile per la sequenza d(TGGGGT). L'associazione e dissociazione termica delle strutture quadruplex è stata monitorata registrando il segnale CD a 263 nm in funzione della temperatura. L'ellitticità molare è stata calcolata mediante l'equazione $[\theta] = CD/10 \times c \times l$, dove CD rappresenta l'intensità del segnale CD, c è la concentrazione molare del singolo filamento e l è il cammino ottico in cm. La temperatura è stata aumentata/diminuita mediante controllo elettronico a una velocità di scansione di 0.5 e 1.0°C/min.

2.4.5. Molecular Modelling

Le principali caratteristiche conformazionali delle quadruplex **AQ1-AQ5** sono state esaminate mediante uno studio di molecular modelling. È stato utilizzato il campo di forza AMBER usando il set di parametri di AMBER 99⁴⁰. Le coordinate iniziali per il modello di partenza della quadruplex [d(TGGGGT)]₄ sono state ricavate dalla struttura NMR in soluzione della quadruplex [d(TTGGGGT)]₄ (*Protein data bank entry number 139D*), scegliendo in maniera casuale una delle quattro strutture disponibili. Il modello iniziale della G-quadruplex [d(TGGGGT)]₄ è stato costruito sostituendo il secondo residuo timidinico in ognuno dei quattro filamenti d(TTGGGGT) con uno guanosinico. Le strutture quadruplex complete sono state realizzate usando il programma di costruzione delle molecole Biopolymer building tool di Discover eliminando ciascun residuo guanosinico, uno per volta, e sostituendolo con un'unità di dSpacer per ogni filamento. Per compensare parzialmente la mancanza del solvente usato, i calcoli sono stati eseguiti usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di 4r, e un cut off infinito per interazioni di non-legame.⁴¹ Usando il metodo "steepest descent" seguito da quello quasi-Newton-Raphson (VA09A), l'energia conformazionale di ogni complesso è stata minimizzata fino a raggiungere una convergenza a un gradiente RMS di 0,1Kcal/mol Å. Le

figure delle strutture sono state elaborate usando il programma INSIGHT II, versione 2005.

Tutti i calcoli sono stati eseguiti su un PC con Linux ES 2.6.9.

Bibliografia

1. Goljer, I., Kumar, S. and Bolton, *J.Biol. Chem.*, **1995**, 270, 22980-22987.
2. Loeb, L.A and Preston,B., *Ann. Rev. Genet.*, **1996**, 20, 201-230.
3. Lindahl, T., *Ann. Rev. Biochem.*, **1982**, 51, 61-87.
4. Weiss, B. and Grossman L., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1987**, 60, 1-34.
5. McCullough, A.K., Dodson, M.L. and Lloyd, R.S., *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, 68, 255-285.
6. Lindahl, T., *Nature*, **1993**, 362, 709-715.
7. Lindhal, T. and Nyberg, B., *Biochemistry*, **1972**, 11, 3610-3618.
8. Nakamura, J. and Swenberg, J.A., *Cancer Res.*, **1999**, 59, 2522-2526.
9. Escodd, *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, 34, 1089-1099.
10. Escodd, *Carcinogenesis*, **2002**, 23, 2129-2133.
11. Schmutte, C., Yang A. S., Nguyen, T. T., Beart, R.V. and Jones, P.A., *Cancer Res.*, **1996**, 56, 2375-2381.
12. Rydberg, B. and Lindhal, T., *EMBO J.*, **1982**, 1, 211-216.
13. Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.L., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **1997**, 131, 1-87.
14. Lindhal, T. and Nyberg, B., *Biochemistry*, **1974**, 13, 3405-3410.
15. Bockrath, R., Kow, Y. W. and Wallace, S. S., *E. coli. Mutat. Res.* **1993**, 288, 207-214.
16. Wu, X. and Wang, Z., *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 956-962.
17. Sud'ina, A. E., Volkov, E. M., Oretskaia, T. S., Degtiarev, S. Kh., Gonchar, D. A. and Kubareva, E. A. *Bioorgan. Khim. (Mosk)*, **2000**, 26, 442-447 .
18. Dutta, S., Chowdhury, G., and Gates, K.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1852-1853.

19. Todd, A. K., Jonhston, M. and Neidle, S., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2901-2907.
20. Huppert, J. L. and Balasubramanian, S., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 2908-2916.
21. Rawal, P., Kummarasetti, V.B., Ravindran, J., Kumar, N., Halder, K., Sharma, R., Mukerji, M., Das, S.K. and Chowdhury. S., *Genome Res.*, **2006**, 16, 644-655.
22. Eddy, J. and Maizels, N., *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 3887-3896.
23. Antonacci, C. and Sheardy, R. D., In *Abstract 37th Middle Atlantic Regional Meeting of the American Chemical Society*, **2005**, May, 22-25.
24. Cevec, M., and Plavec, J., *Biochemistry*, **2005**, 44, 15238-15246.
25. Rachwal, P.A., Brown, T. and Fox, K.T., *FEBS Lett.*, **2007**, 581, 1657-1660.
26. Rachwal, P.A., Findlow, L. S., Werner, M.J., Brown, T. and Fox, K.T., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 4214-4222.
27. Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L., Nasti, L., Barone, G. and Giancola, C., *Biochemistry*, **2005**, 34, 4877-4884.
28. Mergny, J.L., De Cian, A., Ghelab, A., Saccà, B. and Lacroix, L., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 81-94.
29. Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Galeone, A., Barone, G. and Giancola, C., *Biopolymers*, **2005**, 77, 75-85.
30. Philips, K., Dauter, Z., Murchie, A.I., Lilley, D.M and Luisi, B., *J. Mol. Biol.*, **1997**, 273, 171-182.
31. Wang, Y. and Patel, D.J., *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112-8119.
32. Wang, Y. and Patel, D.J., *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 1171-1183.
33. Aboul-ela, F., Murchie, A.I.H., Norman, D.G. and Lilley, D.M.J., *J. Mol. Biol.*, **1994**, 234, 458-471.
34. Petraccone, L., Pagano, B., Esposito, V., Randazzo, A., Piccialli, G., Barone, G., Mattia, C.A and Giancola, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16215-16223.
35. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V.J., *J. Biomol. NMR*, **1992**, 2, 661-665.

36. Jeener, J., Meier, B., Bachmann, H.P. and Ernst, R.R., *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.
37. Braunschweiler, L. and Ernst, R.R., *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528.
38. Marion, D., and Wuthrich, K., *Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 113, 967-974.
39. Cantor, C.R., Warshaw, M.M and Shapiro, H., *Biopolymers*, **1970**, 9, 1059-1077.
40. Merkina, E.E and Fox, K.R., *Biophys. J.*, **2005**, 89, 365-373.
41. Cornell, W.D., Cieplack, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W. and Kollman, P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5179-5197.
42. Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 765-784.

Quadruplex come potenziali agenti farmacologici, gli aptameri.

Capitolo 3: Quadruplex contenenti basi modificate.

3.1 Introduzione

Le G-quadruplex sono strutture estremamente polimorfiche, in particolare differiscono per la conformazione glicosidica delle guanine coinvolte nelle tetradi alla base di tali strutture, per la stechiometria e l'orientamento relativo dei filamenti, per la conformazione dei *loop* che collegano i filamenti, ove presenti. Tali caratteristiche sono spesso correlate tra loro. Per esempio, sequenze oligonucleotidiche contenenti un unico tratto di guanine generalmente formano strutture G-quadruplex tetramolecolari, in cui tutti i filamenti si dispongono parallelamente tra loro e le guanine coinvolte nelle G-tetradi alla base di tali strutture adottano preferenzialmente una conformazione glicosidica di tipo *anti*.¹

Diverse modifiche, sia della base azotata che del *backbone* zucchero-fosfato, sono state studiate con l'obiettivo di migliorare la stabilità, o fornire strutture G-quadruplex con proprietà uniche. Modifiche chimiche dei filamenti possono anche rivelare aspetti strutturali caratteristici di questi macro-complessi. Sono state studiate diverse modifiche apportate alla base e/o allo scheletro zucchero-fosfato.^{2,3}

Uno dei modi più semplici per ottenere strutture quadruplex modificate è quello di introdurre un analogo della guanina all'interno delle sequenze oligonucleotidiche; infatti, in diversi studi precedenti sono stati investigati gli effetti dell'introduzione di analoghi della guanina, in strutture formanti quadruplex tetramolecolari a filamenti paralleli. Tali studi suggeriscono che molti quartetti di G formati da oligonucleotidi contenenti basi modificate non apportano miglioramenti alla stabilità strutturale, ma esistono solamente grazie alla conformazione co-planare formata dai quartetti di G. Come già detto: “*Le guanine sono le migliori amiche di un quartetto!*”³

Tuttavia, eccezioni degne di nota sono gli analoghi modificati della guanina in posizione 8. Questa posizione si affaccia nel solco della struttura quadruplex, per cui non ostacola gli appaiamenti Watson-Crick e Hoogsteen che si formano tra le basi. La 8-Bromo-2'-deossiguanosina e la 8-ammino-2'-deossiguanosina sono particolarmente interessanti, dal momento che è stato dimostrato che queste modifiche accelerano la velocità di formazione dei complessi a quadrupla elica^{3,4}. L'incorporazione della 8-ammino-2'-deossiguanina, tuttavia, può aumentare significativamente il polimorfismo nelle strutture quadruplex⁴. Sebbene questi residui modificati impartiscano interessanti proprietà alle strutture quadruplex, l'assenza di protoni non scambiabili in posizione 8 rappresenta il loro limite maggiore per lo studio dei dettagli strutturali. Ad esempio, la prova diretta che una guanina si disponga in conformazione glicosidica *syn* o *anti*, può essere facilmente valutata mediante l'utilizzo dell'¹H-NMR, in particolare, comparando gli effetti NOE tra il protone in posizione 8 e i protoni H1' o H2'' dello zucchero. Il gruppo metilico, infatti, presentando un ingombro sterico paragonabile al bromo ed al gruppo amminico, è similmente incline a promuovere la conformazione glicosidica *syn*, (**Fig. 40**) ma allo stesso tempo fornisce importanti informazioni strutturali sulla base dei contatti NOE stabiliti dai suoi protoni.

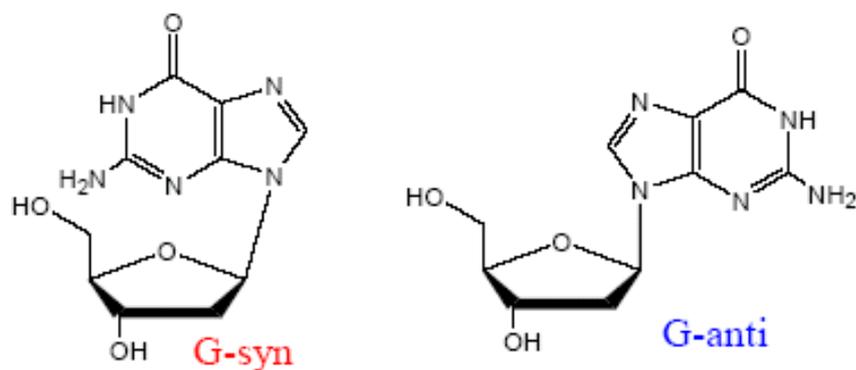


Fig. 40 Conformazioni glicosidiche *syn* e *anti* dell'8-metil-2'-deossiguanosina.

3.2 Effetti dell'introduzione di 8-metil-2'-deossiguanosina sugli aspetti strutturali, sulla stabilità e sulla cinetica di formazione delle quadruplex tetramolecolari.

È nota la capacità della 8-metil-2'-deossiguanosina di adottare preferenzialmente la conformazione glicosidica *syn* sia nel DNA di tipo Z⁵⁻⁷ sia nelle strutture quadruplex antiparallele. Per esempio la sostituzione di uno o più residui di G canonici che adottano una conformazione *syn* con tale monomero modificato incrementa l'attività inibitoria nei confronti della trombina del TBA^{8,9}. Similmente, la 8-metil-2'-deossiguanosina stabilizza la struttura quadruplex proposta per il terminale 5' del gene di suscettibilità del retinoblastoma¹⁰. Invece, quando tale sostituzione avviene a carico di residui di G che adottano una conformazione di tipo *anti*, si determina, in genere, una diminuzione della stabilità e dell'attività biologica^{8,9}. Tuttavia gli effetti di tale sostituzione nella struttura quadruplex parallela [d(TG₃T)]₄, in cui tutti i residui di G adottano una conformazione glicosidica *anti*, si sono rivelati fortemente sequenza-dipendente. In particolare, la sostituzione del primo residuo implica la formazione di una quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli contenente un'insolita tetrade di G *syn*, che risulta notevolmente più stabile del suo analogo naturale. Al contrario la sostituzione del secondo residuo di G determina la formazione di una quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli con tutti i residui in conformazione glicosidica *anti*, analogamente alla sua controparte naturale, nonostante la presenza del gruppo metilico che generalmente favorisce la conformazione *syn*. Pertanto allo scopo di approfondire la correlazione tra orientamento relativo dei filamenti, conformazione glicosidica delle guanosine, stabilità termica e posizione modificata nella sequenza, sono stati studiati sei oligonucleotidi (ODNs) (**I-VI** in tabella 1) contenenti un residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina (**M**), mediante l'utilizzo di diverse tecniche. In un precedente lavoro¹¹, sono state studiate quadruplex formate da analoghi

della sequenza naturale [d(TGGGT)]₄, (ODN **I**, **II**) mediante l'utilizzo di tecniche spettroscopiche NMR e CD.

Nome	Sequenza	T _{1/2} (°C) λ _{max} (CD)(70mM K ⁺ , 100μM s.s. ODN)	T _{1/2} (°C) λ _{max} (CD)(70mM Na ⁺ , 100μM s.s. ODN)	k _{on} (4°C) M ⁻³ s ⁻¹
TG₃T	TGGGT	45 ^a	c	1.26 x 10 ⁸
I	TMGGT	66 ^a	c	1.88 x 10 ⁹
II	TGMGT	52 ^a	c	2.49 x 10 ⁸
TG₄T	TGGGGT	b	65	2.15 x 10 ⁹
III	TMGGGT	b	75	3.15 x 10 ¹⁰
IV	TGMGGT	b	65	5.41 x 10 ⁹
V	TGGMGT	b	47	1.46 x 10 ⁹
VI	TGGGMT	79	32	2.13 x 10 ⁸

Tabella 1: sequenze oligonucleotidiche analizzate, temperature di melting apparente (T_{1/2}), costanti cinetiche di associazione (k_{on}). M = 8-metil-2'-deossiguanosina. ^a vedi rif. 11; ^b Temp. non determinate (molto stabile); ^c non determinata.

Per questo studio sono stati sintetizzati quattro oligonucleotidi, analoghi della sequenza naturale d(TG₄T), formante una struttura quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli con tutti i residui di G in conformazione glicosidica *anti*, in cui è stato sostituito un residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina in tutte le posizioni possibili.

Tutti gli oligomeri sono stati sottoposti a dettagliata indagine strutturale con l'impiego di tecniche spettroscopiche (NMR CD). Inoltre sono stati anche studiati mediante l'utilizzo di tecniche biochimiche (elettroforesi su gel non denaturante) e biofisiche.

3.3 Risultati e discussione

3.3.1 Analisi Biofisica

Per dimostrare la formazione di complessi tetramolecolari sono state utilizzate metodologie biochimiche e biofisiche; una di queste è l'analisi della migrazione dei campioni su gel non denaturante di poliacrilammide (PAGE).

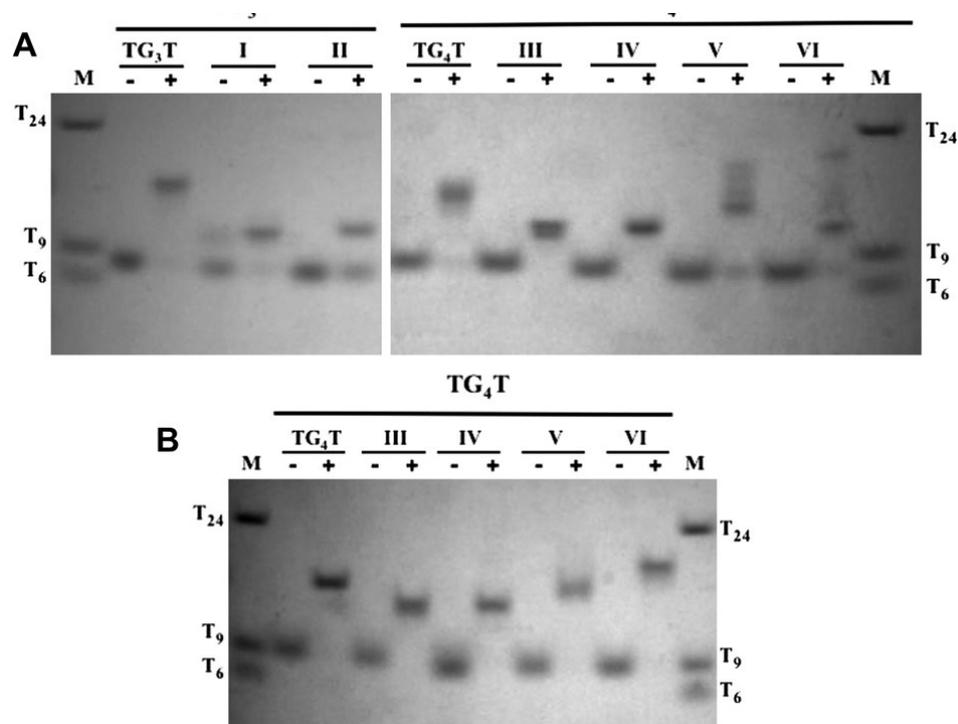


Fig. 41. PAGE degli ODN sintetizzati. I campioni sono stati caricati su gel in condizioni non denaturanti, la corsa elettroforetica è stata effettuata a 19°C (A) e 35°C (B). Le bande col segno “-“corrispondono alle sequenze pretrattate con LiOH, ossia gli ODN denaturati, quelle col segno “+” corrispondono invece alle sequenze strutturate in quadruplex.

Come mostrato in figura 41, gli ODN I-VI, così come le loro controparti naturali TG₃T e TG₄T, in presenza di ioni potassio, presentano una banda ritardata rispetto alla banda singola che è presente nel campione di controllo a singolo filamento.

E' stata notata una differenza nella mobilità dei campioni a seconda delle condizioni in cui il gel viene preparato; infatti, a bassa concentrazione di acrilammide (12%) le strutture

quadruplex migrano più velocemente rispetto ai filamenti singoli. Questo dato aumenta la difficoltà dell'analisi di una quadrupla elica durante il processo elettroforetico, suggerendo una complessa relazione tra gli aspetti strutturali, le cariche e la migrazione elettroforetica. Dall'analisi dei gel presenti in figura 41 è possibile vedere che la posizione dei singoli filamenti è relativamente omogenea (indicati con segno “-“), mentre le posizioni delle bande delle quadruplex (indicate con segno “+”), sono differenti tra loro.

In generale, le quadruplex contenenti il monomero modificato migrano più velocemente rispetto alla loro controparte naturale; la conversione da single-strand a quadruplex è quasi completa per tutti i campioni (in pochi casi resta una leggera frazione di campione di partenza). Una banda principale è stata osservata per molte strutture, sebbene alcune piccole, ma considerevoli, differenze sono state osservate per alcuni campioni nel gel elettroforetico a 19°C (**Fig. 41 A**); tuttavia, è stata osservata una completa conversione da singolo filamento a quadruplex per tutti gli oligonucleotidi modificati nel gel a circa 35°C (**Fig. 41B**).

La formazione di strutture quadruplex è stata ulteriormente confermata mediante l'utilizzo di metodi spettroscopici, CD e NMR. In figura 42 A sono presentati gli spettri di differenza isotermica (IDS) delle quadruplex modificate confrontate con la loro controparte naturale. Sebbene siano evidenti delle differenze in intensità, i profili IDS sembrano essere molto simili, e paragonabili a quelli riportati per altre strutture quadruplex tetramolecolari^{3,14,21}.

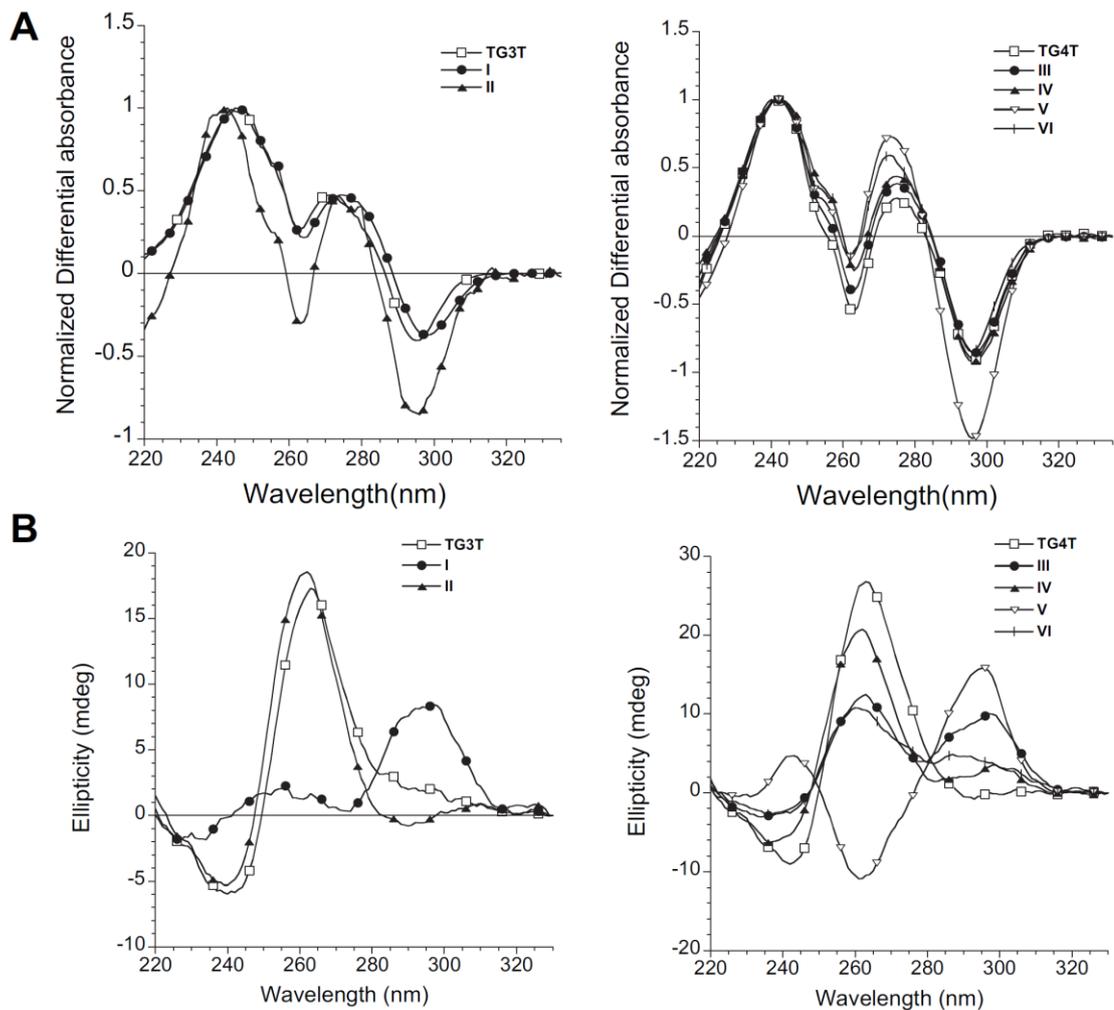


Fig. 42 Spettri IDS (A) e CD (B). Tutti i campioni sono confrontati con la loro controparte naturale.

Questi profili confermano che una lunga incubazione dei campioni a singolo filamento, in presenza di ioni potassio a bassa temperatura, portano ad una lenta conversione da singolo filamento a quadruplex. In contrasto, l'analisi degli spettri CD ha rivelato differenze che non emerse dai profili IDS (**Fig. 42B**). Da notare come strutture quadruplex aventi profili IDS simili, presentino spettri CD differenti.

In figura 42B sono mostrati i profili CD degli oligonucleotidi **I-VI**, confrontati con la loro controparte naturale, TG₃T e TG₄T. Gli ODN **II** e **IV** mostrano un profilo CD paragonabile agli analoghi naturali di riferimento, con un massimo a 265 e un minimo a 240nm circa, compatibile con un struttura tetramolecolare a filamenti tutti paralleli.

Invece, gli spettri CD degli ODN **I** e **V** presentano un profilo tipico di strutture quadruplex antiparallele con due massimi, uno a circa 245-250 e uno a 295nm e un minimo a 265nm, mentre gli ODN **III** e **VI** presentano due massimi, a 260 e 290-295nm.

L'interpretazione di tali risultati, e la determinazione dell'orientamento dei filamenti (paralleli e antiparalleli) in base a questi rimane abbastanza complicata, sebbene la presenza di un massimo a 295nm suggerisca la presenza di residui di guanina in conformazione glicosidica *syn*²².

Da notare che per gli ODN **IV** e **VI**, gli spettri CD dipendono fortemente dal tempo di incubazione dopo l'*annealing*; infatti, per l'ODN **IV**, tra gli spettri registrati dopo un breve periodo di incubazione (48h), e quelli ad un tempo più lungo (circa un mese dopo l'*annealing*), si nota un incremento del segnale a 265nm e una diminuzione di quello a 290-295nm, invece, per l'ODN **VI** si verifica un comportamento opposto. Questo dato suggerisce che dopo l'*annealing*, due o più specie potrebbero essere coinvolte in un equilibrio che, molto lentamente, si sposta nettamente verso la struttura predominante nella soluzione di partenza.

Inoltre, per valutare la stabilità termica delle strutture quadruplex formate, sono stati effettuati esperimenti CD melting, i cui risultati sono riportati in tabella 1 e in figura.

Gli oligonucleotidi **III**, **IV** e **V**, in tampone potassio, formano strutture molto resistenti al calore se confrontati con l'analogo naturale, con una piccola, ma significativa frazione di struttura quadruplex resistente a temperature superiori a 90°C. Invece, nelle stesse condizioni, l'ODN **VI** presenta una temperatura di fusione di 79°C, suggerendo che la presenza della 8-metil-2'-deossiguanosina, quando presente al terminale 3' del tratto di G, provoca una diminuzione della stabilità termica rispetto alla sua controparte naturale TG₄T. Per valutare la dipendenza della stabilità termica in relazione alla posizione del monomero modificato all'interno del tratto di G, sono stati effettuati esperimenti CD melting in tampone 70mM NaCl.

I profili CD dei campioni in sodio sono molto simili a quelli registrati in potassio, ciò indica che non ci sono significative differenze strutturali tra i complessi a quadrupla elica in presenza di cationi diversi. Le temperature di melting registrate in Na^+ mostrano chiaramente che la stabilità termica diminuisce man mano che il residuo modificato viene inserito verso l'estremità 3'; l'ODN **III** (dove il monomero modificato (**M**) è inserito al posto del primo residuo di G canonica dal lato 5') presenta una temperatura di fusione superiore alla sua controparte naturale. Come precedentemente riportato¹¹, i valori di $T_{1/2}$ di strutture modificate, analoghe della sequenza TG_3T , presentano un trend simile. In ultimo, da un confronto tra le cinetiche di associazione dei filamenti degli ODN da noi sintetizzati è emerso che, anche in questo caso, la posizione del residuo modificato (**M**) influisce sulle cinetiche in maniera sequenza dipendente. Infatti, quando è inserito al terminale 5', presenta unacinetica di associazione dei filamenti più veloce di quindici volte, mentre quando è inserito al terminale 3', la velocità di associazione dei filamenti è dieci volte più lenta se paragonata alla controparte naturale. La presenza invece del monomero modificato al centro del tratto di G, non produce effetti significativi sulle cinetiche rispetto alla controparte naturale.

Da tali risultati si possono trarre due conclusioni: in primo luogo, quando inserito al terminale 5' del tratto di G, il residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina, provoca un aumento nella velocità di associazione dei filamenti (confrontando l'OND **I** con il TG_3T e l'ODN **III** con il TG_4T); in secondo luogo, che l'influenza del residuo modificato è sequenza dipendente, come dimostra la progressiva diminuzione delle cinetiche di associazione man mano che il monomero modificato viene inserito verso il terminale 3'.

3.3.2 Risonanza Magnetica nucleare e Molecular Modelling

Siccome è richiesto un lungo tempo di incubazione per ottenere la formazione di strutture predominanti in soluzione, gli esperimenti NMR sono stati eseguiti diverse settimane dopo la preparazione dei campioni. I profili CD degli ODNs **III-IV**, ottenuti dai campioni NMR(70mM diKCl, 100µM di campione), sono molto simili ai profili CD ottenuti in 100mM di KCl (**Fig. 42B**)

Una delle caratteristiche distintive delle strutture contenenti tetrad di G è la presenza di protoni immidici nella regione 10.5-12.0 p.p.m. nello spettro ¹H-NMR.²³. L'esame di questa regione è comunemente usata per valutare se gli oligonucleotidi adottano un'unica struttura e per fornire informazioni sulla simmetria.

Infatti, la presenza di quattro segnali ben definiti in questa regione per gli oligonucleotidi **III** e **IV** indica che, nelle condizioni utilizzate, entrambi gli oligomeri modificati adottano una singola struttura ben definita altamente simmetrica, contenente quattro tetrad di G.(**Fig. 43**)

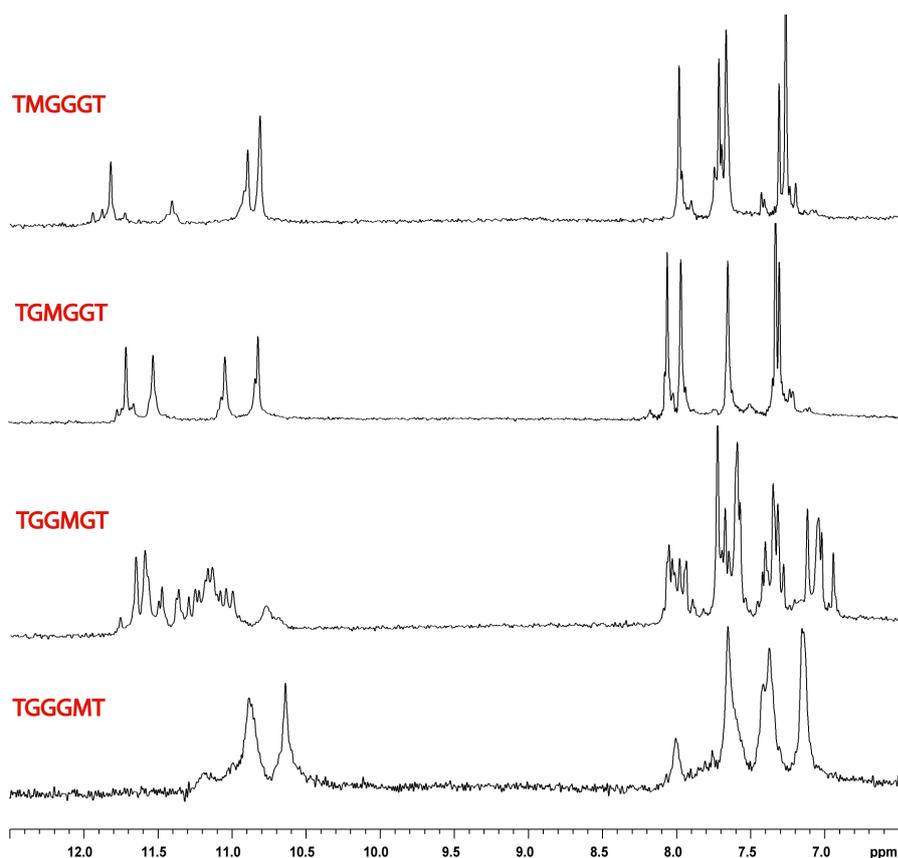


Fig. 43 Regione espansa degli spettri ^1H NMR degli ODN modificati sintetizzati

Lo spettro dell'ODN **VI**, invece, mostra la presenza di due segnali nella regione tra 10.4-11.0 ppm, ciascuno dei quali integra per due protoni.

Dal momento che tutti gli ODNs esaminati contengono quattro residui di G nelle loro sequenze, le strutture quadruplex formate da **III**, **IV** e **VI**, posseggono una simmetria quaternaria (C_4), con tutti i filamenti paralleli ed equivalenti tra loro. Questa simmetria è confermata dalla presenza di cinque segnali principali nella regione dei protoni aromatici 7.0-8.0 p.p.m., dei quali, tre appartenenti al protone in 8 (H8) delle guanine e due all'H6 delle timine. Inoltre, è stata osservata in tutti e tre i campioni la presenza di tre gruppi metilici di risonanza nelle regioni tra 1.3-1.6 p.p.m. (attribuibili ai due metili della timina) e 2.2-2.4 p.p.m. (attribuibili ai metili delle guanine modificate). Per quanto concerne l'analisi dello spettro dell'ODNs **V**, la situazione è leggermente più complicata, dato che nella regione dei protoni imidici è presente un sovrappollamento di segnali che suggerisce la

presenza di diversi tipi di strutture quadruplex in soluzione. La coesistenza di più specie ci ha impedito di effettuare una precisa assegnazione e uno studio strutturale più approfondito per tale ODN modificato.

Dall'analisi degli spettri NOESY e TOCSY degli oligonucleotidi **III** e **IV** (500 MHz) e **VI** (700 MHz) a 25°C, emerge che tutti i campioni assumono una struttura ad elica destrorsa, come riportato per altre strutture quadruplex²⁵⁻²⁷ dall'analisi dei picchi di correlazione NOE osservati tra G-H8 e T-H6 e i protoni dello zucchero H1', H2'-H2'', e i protoni H1', H2'-H2'' sul lato 5'. In particolare, nel caso dell'ODN **IV** la presenza di deboli effetti NOE tra G-H8/**M**-CH₃8 e H1' dello zucchero e di forti effetti NOE tra G-H8/**M**-CH₃8 e H2'/H2'' del deossiribosio indica che tutte le guanine del complesso, sia naturali che modificate, adottano una conformazione glicosidica di tipo *anti*²⁸ (**Fig. 44 B**). Per quanto riguarda invece **III** e **VI**, tutte le guanine canoniche adottano una conformazione di tipo *anti*, mentre i residui modificati adottano una conformazione di tipo *syn*, come indicato dalla presenza nello spettro NOESY di un intenso picco di correlazione tra il gruppo metilico in 8 e i protoni H1' dello zucchero²⁹ (**Fig. 44 A e C**). Inoltre, i picchi di correlazione NOE, fra il gruppo metilico di un residuo modificato **M** e il protone NH della base modificata presente nel filamento adiacente risultano di intensità paragonabile a quelli che coinvolgono i protoni H8 e NH delle tetradi non modificate, suggerendo che i residui modificati non sono disposti casualmente, ma risultano spazialmente vicini e disposti in maniera coplanare.

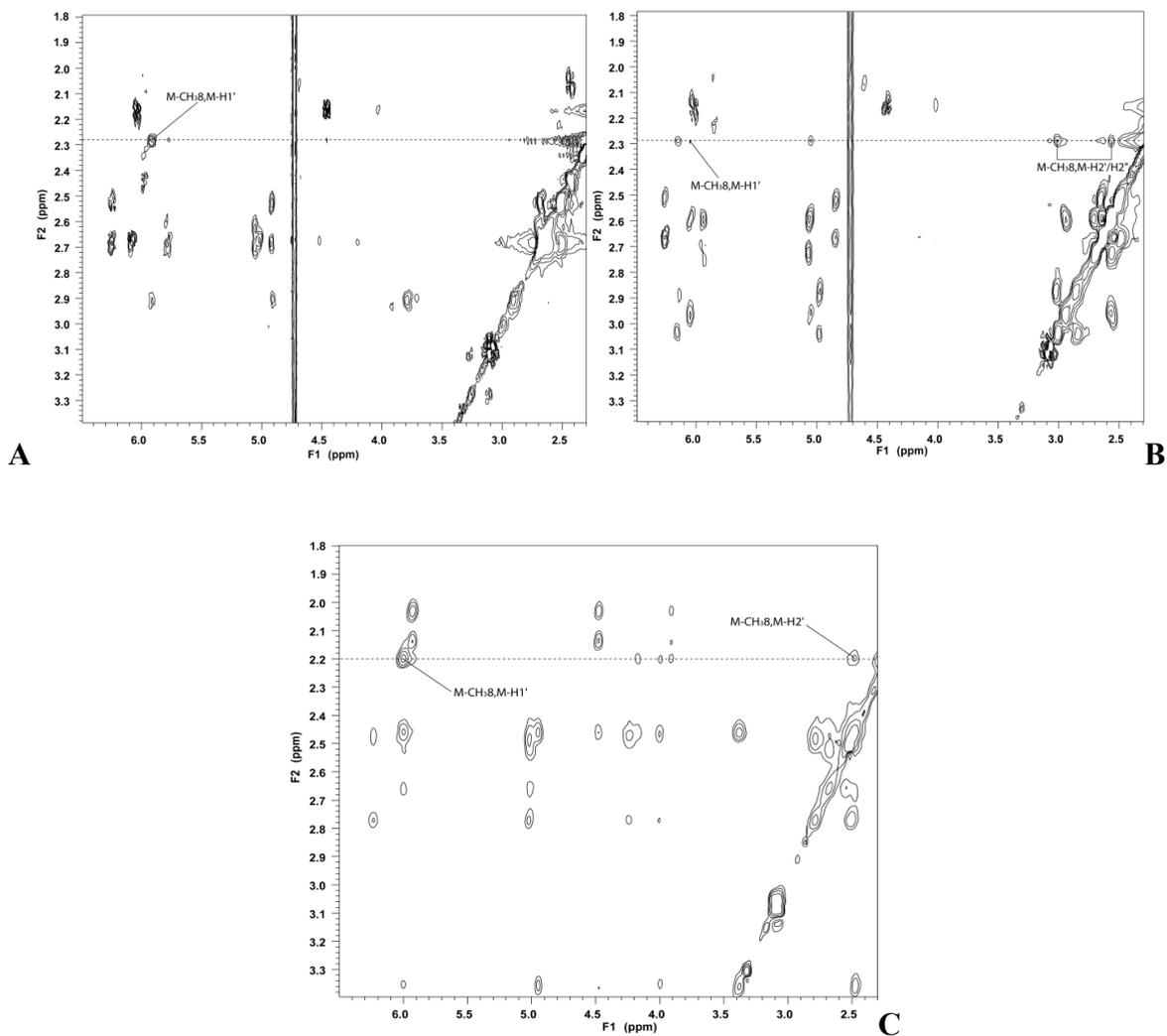


Fig. 44 Regione espansa degli spettri NOESY delle quadruplex formate da formed by III (A), IV (B) and VI (C), che correla i protoni del metile in 8 e i protoni H1' e H2'/H2'' della base modificata.

In figura 45 è mostrata una rappresentazione schematica delle quadruplex formate dagli ODN III, IV e VI; inoltre, usando i dati NMR sono stati costruiti modelli molecolari (Fig. 46) per tali oligonucleotidi.

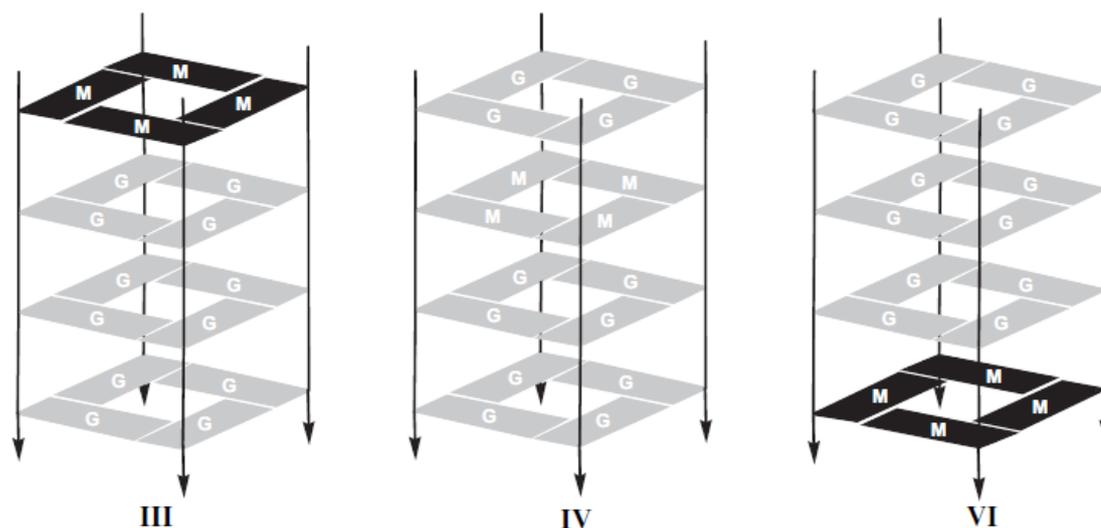


Fig. 45 Rappresentazione schematica degli ODN III, IV, VI. Le conformazioni glicosidiche anti e syn sono rispettivamente in grigio e nero. M = 8-metil-2'-deossiguanosina.

Nonostante la presenza di una tetrate di G aggiuntiva, il modello ottenuto per l'ODN III è molto simile al modello dell'ODN I riportato in un precedente lavoro¹¹.

Come previsto, gli ODN da noi selezionati presentano tutti una struttura quadruplex tetramolecolare a filamenti paralleli ed equivalenti tra loro e con elicità destrorsa. I residui modificati che assumono una conformazione glicosidica *all-syn*, non provocano nessuna distorsione particolare nello scheletro della struttura. Nel modello IV è possibile vedere che tutte le guanine delle tetradi coinvolte nella struttura presentano una conformazione glicosidica *anti* per cui, come risulta dai dati NMR, la presenza del residuo modificato, non influenza la conformazione delle tetradi della struttura.

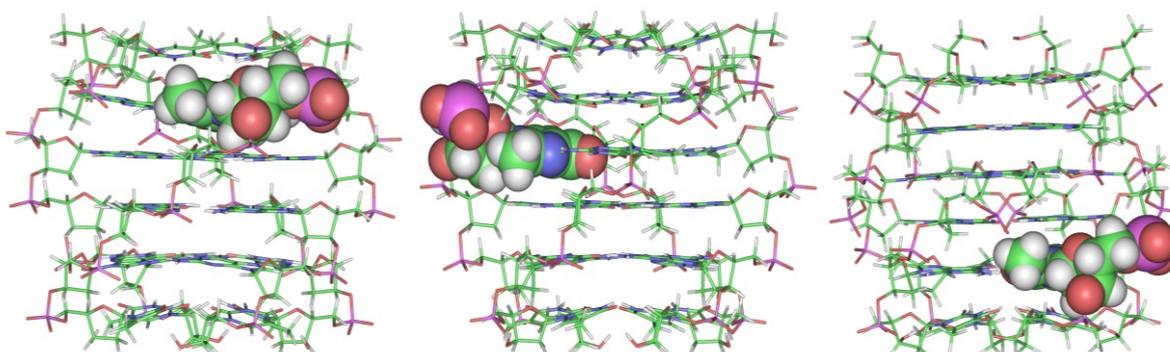


Fig. 46 Modelli molecolari delle G-quadruplex formate dagli ODN III (a), IV (b) e VI (c).

3.4 Conclusioni

Nel presente studio, abbiamo analizzato l'effetto della 8-metil-2'-deossiguanosina (**M**) sulle strutture quadruplex, stabilità termica e cinetiche di formazione dei complessi degli oligonucleotidi da noi sintetizzati. L'influenza del residuo modificato all'interno delle strutture è sequenza dipendente.

Le $T_{1/2}$ dei nostri campioni, confrontate con le rispettive controparti naturali, suggeriscono che il residuo modificato stabilizza maggiormente il complesso quando è inserito all'estremità 5' del tratto di G (tabella 1). Tale effetto è stato osservato anche per costanti di associazione (k_{on}), infatti la velocità di formazione del complesso aumenta quando il residuo modificato si trova in prima posizione lungo il tratto di G. Tale dato è in accordo con altri risultati riportati in diversi studi riguardanti quadruplex tetramoleolare di sequenza 5'TRGGGT-3'(dove R= 8-amino-2'_deossiguanosina o 8-bromo-2'-deossiguanosina)^{3,4}; sebbene in questi casi la k_{on} calcolata è risultata essere maggiore rispetto a quella dell'ODN **III**.

La spettroscopia NMR è stata utilizzata per confermare l'abilità del gruppo metilico in posizione 8 delle guanine di indurre una conformazione glicosidica *syn* delle tetradi in quadruplex parallele. Anche in questo caso l'effetto è sequenza dipendente. Infatti, la sostituzione del primo residuo di G canonica, sia nell'ODN **I** che nell'ODN **III**, favorisce la formazione di una tetrad tutta in conformazione glicosidica *all-syn*, cosa che non accade quando il residuo sostituito è in seconda posizione (ODN **II** e **IV**). In questi casi, nonostante la presenza del monomero modificato, la struttura risultante presenta tetradi tutte in conformazione glicosidica *all-anti*. Infatti, la stabilità termica di tali complessi è paragonabile a quella dei rispettivi analoghi naturali privi di modifiche. Come mostrato in studi precedenti¹¹, la sostituzione di un residuo di G canonico con un monomero modificato (**M**) in terza posizione, porta alla formazione di una quadruplex particolarmente instabile. Questo dato è confermato anche quando la sostituzione avviene

nella stessa posizione nella sequenza TG₄T; infatti, tale sostituzione (ODN **V**) porta alla formazione di più strutture in soluzione, tutte meno stabili rispetto alla controparte naturale.

In ultimo, l'introduzione del monomero modificato (**M**) al terminale 3' del tratto di G in TG₄T, porta alla formazione di un complesso caratterizzato dalla presenza di una tetrad all-*syn* e una temperatura di melting più bassa rispetto agli altri ODN modificati **III**, **IV** e **V**.

In generale, i dati NMR suggeriscono che, per le quadruplex modificate esaminate, la formazione dei complessi contenenti tetradi *all-syn* è particolarmente favorita quando il monomero modificato è inserito nelle posizioni terminali (5' o 3') del tratto di G.

Gli spettri CD mostrano alcune caratteristiche interessanti. Per quanto concerne gli oligonucleotidi **II** e **IV**, essi presentano spettri molto simili alla rispettiva controparte naturale, ovvero con un massimo a 265 e un minimo a 240nm, tipico di strutture quadruplex tetramolecolari a filamenti tutti paralleli con tutte le tetradi in conformazione glicosidica *all-anti*. In contrasto, invece, gli spettri CD degli ODN **III** e **VI** presentano due bande positive, una a 260 e una a 295nm, caratteristiche di strutture quadruplex contenenti tetradi in conformazione glicosidica *syn*.

Studi cinetici e NMR dell'ODN **III**, in cui il residuo modificato (**M**) è inserito all'estremità 5', conferma l'ipotesi che una tetrad di G *all-syn* in questa posizione è coinvolta nel processo di nucleazione e di inizio del processo di formazione dei complessi³. Inoltre, la temperatura di fusione di questo complesso, paragonata alla controparte naturale, è maggiore; probabilmente, la causa di tale effetto è da attribuire alle interazioni di stacking che si instaurano tra una tetrad *all-syn* e una *all-anti* adiacente, come suggerito anche dai modelli molecolari.

La capacità del residuo di 8-metil-2'-deossiguanosina di stabilizzare e accelerare le cinetiche di formazione dei complessi, quando inserito in posizioni specifiche, apre la

strada a diverse e interessanti prospettive future nel campo degli aptameri a quadrupla elica, quali il fosforotioato anti-HIV $[d(T_2G_4T_2)_4]^{32,33}$ e analoghi della sequenza $[d(GAGGT)_4]^{34-36}$.

Inoltre la presenza di un gruppo metilico potrebbe garantire maggiori possibilità di legame con la molecola target attraverso interazioni di natura idrofobica. Attualmente è in corso la sintesi di diverse sequenze contenenti più di un residuo M da sottoporre ad analisi strutturale.

3.5 Parte Sperimentale

3.5.1 Sintesi e purificazione degli ODN I-VI

La preparazione di oligodeossiribonucleotidi contenenti il residuo 8-metil-2'-deossiguanosina è stata realizzata con la tecnica del fosforamidito utilizzando un sintetizzatore automatico in fase solida. La strategia sintetica è mostrata nello schema riportato in figura 47.

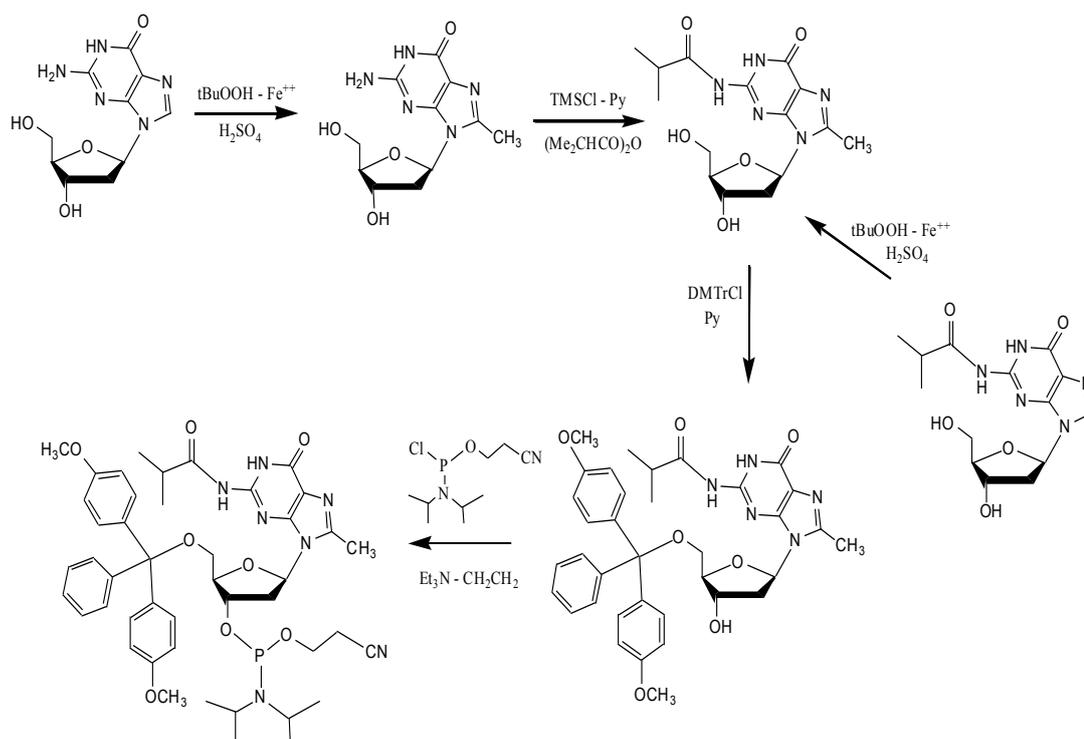


Fig. 47 Schema sintetica del residuo modificato 8-metil-2'-deossiguanosina

Lo schema sintetico, proposta da Khoda e collaboratori,¹² si articola in due fasi: la sintesi della base modificata e l'incorporazione nella sequenza nucleotidica. Nella strategia di sintesi, il composto di partenza è il composto naturale 2'-deossiguanosina, disponibile commercialmente.

Nel primo step (metilazione della guanina) la 2'-deossiguanosina viene aggiunta ad una soluzione di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8,3g) in H_2SO_4 . Una soluzione di tert-butil idroperossido (2,5 g) in H_2O (40 ml) viene aggiunta goccia a goccia in 4 minuti.

Successivamente, il pH è stato portato alla neutralità con una soluzione acquosa di NaOH 1N. La reazione è stata monitorata tramite TLC, usando come eluente CHCl_3 :MeOH 7:3. Il solvente è stato allontanato per liofilizzazione e i prodotti sono stati estratti dal residuo per trattamento con MeOH a caldo. La 8-metil-2'-deossiguanosina è stata separata dalla miscela con una colonna cromatografica su gel di silice, usando come eluente CHCl_3 con aggiunta progressiva di MeOH per aumentare gradualmente la forza dell'eluente.

Nel secondo step (protezione transiente) la 8-metil-2'-deossiguanosina (500 mg) è stata coevaporata con piridina dry (5ml \times 3) e sospesa in piridina dry (18 ml). Dopodichè, per proteggere temporaneamente gli ossidrili in 5' e in 3', è stato aggiunto il trimetilclorosilano (1,12 ml); la miscela è stata lasciata sotto agitazione per 30 min. in acqua e ghiaccio.

In seguito è stata aggiunta l'anidride isobutirrica (1,48 ml) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. Dopodichè il pallone di reazione è stato rimesso in ghiaccio e si è effettuata l'aggiunta di H_2O (3,7 ml) e NH_4OH concentrato (3,7 ml). Dopo 30 min. il solvente è stato rimosso per evaporazione. Il residuo è stato disciolto in H_2O (15 ml) e lavato con etere dietilico (30 ml \times 3). La fase acquosa è stata ridotta a due/terzi del volume e tenuta per un giorno a 4°C. Il prodotto di reazione, la N²-isobutirril-8-metil-2'-deossiguanosina (476 mg) è stata coevaporata con piridina dry (5 ml \times 3) e sospesa in piridina dry (10 ml). Successivamente, sono stati aggiunti 4,4'-dimetossitricloruro (578 mg), trietilammina (263 μ l) e 4-dimetilamminopiridina (8,3 mg)

come catalizzatore. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per due ore a temperatura ambiente. L'andamento della reazione è stato monitorato tramite TLC, usando come eluente CHCl_3 :MeOH 9:1. In seguito, è stata aggiunta H_2O (10 ml) ed è stata effettuata un'estrazione con etere etilico. La fase organica è stata anidrificata con MgSO_4 , filtrata e concentrata a pressione ridotta.

Il prodotto della reazione, la 5'-O- (4'-4'-dimetossitritil)- N^2 -isobutirril-8-metil-2'-deossiguanosina, è stato purificato con una colonna cromatografica su gel di silice, usando come eluente CHCl_3 , piridina (0,1% v/v) con progressiva aggiunta di CH_3OH per aumentare gradualmente la forza eluente.

L'ultimo step del processo di sintesi della base modificata è la fosfitilazione del gruppo 3'-OH. Per tale step di sintesi l'anidricità dell'ambiente di reazione è fondamentale, per cui viene condotto in "dry box", uno spazio delimitato in cui l'umidità è ridotta al minimo per la presenza di agenti essiccanti.

Il prodotto della reazione precedente (102 mg) è stato trattato con diclorometano (1 ml) e trietilammina (54 μl). Successivamente è stato aggiunto goccia a goccia il reattivo fosfitilante, ossia il N-N'-diisopropilammino-2-cianoetilclorofosfito. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 30 min. a temperatura ambiente. La formazione del prodotto è stata monitorata tramite TLC (CHCl_3 :MeOH 19:1).

Allontanando il solvente per evaporazione, sono stati aggiunti 5 ml di una miscela tetraidrofurano-benzene (1:4). Dopo 10 min., il prodotto di reazione, il 3'-(2-cianoetil-N,N'-diisopropil)-fosfitil-5'-DMTr- N^2 -isobutirril-8-metil-2'-dG, è stato raccolto per filtrazione e coevaporato con benzene dry (5 ml \times 2).

Gli oligonucleotidi modificati **I-VI** sono stati assemblati mediante l'utilizzo del sintetizzatore automatico Millipore Ciclone Plus DNA, sfruttando la chimica in fase solida dei β -cianoetilfosforamiditi su scala 15 μmol . Gli oligomeri **I-VI** sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca

concentrata a 55°C per 12 ore. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H₂O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46). Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare dei buffer A e B (100%A; 0% B_0%A; 100%B) in 30 min. a temperatura ambiente ad un flusso di 1.0 ml/min. *Buffer A*: 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH₃CN; *Buffer B*: 1 M KCl, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH₃CN. Le frazioni di uno stesso oligomero sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18) mediante eluizione con H₂O e metanolo. Tutti gli oligomeri sono risultati puri all'NMR più del 98%.

3.5.2 Gel elettroforetico non denaturante

Il gel elettroforetico non denaturante consente la separazione tra oligonucleotidi a singolo filamento e strutture quadruplex tetramolecolari. I campioni sono caricati al in un gel al 20% di poliacrilammide (acrilammide/bis-acrilammide 19:1), TBE e 10mM di KCl. L'elettroforesi viene effettuata a 4 W/gel per mantenere la temperatura ferma a 19°C (migrazione in camera fredda) o 35°C (elettroforesi a temperatura ambiente). Per consentire la completa formazione delle quadruplex, campioni molto concentrati (300µM) (indicati con il segno “+”) sono incubati a 4°C per 48 ore a 4°C in 100mM di KCl. In parallelo, i campioni (indicati con segno “-“) sono incubati in 40 mM di LiOH per 15 minuti e successivamente neutralizzati con 40 mM di HCl. Il buffer di litio cacodilato è stato preparato mescolando acido cacodilico con LiOH.

Le bande dei campioni sono visualizzate mediante l'utilizzo di una lampada UV a 254 nm e una camera digitale. Questo metodo permette di visualizzare solo ODN che assorbono ad una lunghezza d'onda di 25nm. Sono stati confrontate migrazioni sia tra analoghi naturali che modificati, con e senza catione.

3.5.3 Dicroismo Circolare (CD), Isotermal Different Spectrum (IDS) e Thermal Different Spectrum (TDS).

Le condizioni sperimentali in cui sono stati effettuati tali studi hanno previsto l'utilizzo di un tampone di litio cacodilato 10 mM a pH 7.2 cui è stato aggiunto KCl 100mM. Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO-810 usando cuvette in quarzo con un cammino ottico tra 0.2 e 1.0 centimetro, come precedentemente descritto.⁴ Gli spettri a differenza termica sono stati ottenuti calcolando la differenza tra l'assorbanza degli spettri prima e dopo la transizione da quadruplex a single-strand¹³. Gli spettri di differenza isotermica (IDS) sono stati ottenuti calcolando la differenza tra l'assorbanza degli spettri dei campioni nelle forme strutturate e destrutturate.

3.5.4 Studi cinetici

Questi esperimenti sono stati condotti partendo dall'isolamento dei filamenti isolati e comparando l'associazione sia di sequenze modificate che non modificate, utilizzando esperimenti UV isotermici, in K⁺ a 6.6°C. Per studiare l'impatto del residuo modificato in determinate posizioni, i dati sono stati elaborati utilizzando quelli di un modello precedentemente pubblicato^{3,4} e sono state calcolate le costanti cinetiche (k_{on}) di associazione. L'ordine corrispondente della reazione di associazione è stato stimato essere $n=4$, come negli studi precedenti. Sono stati testati campioni con concentrazione dei filamenti compresa tra 10 e 100 μ M.

3.5.5. Esperimenti Melting

I campioni CD degli ODN **III-VI** e la loro controparte naturale [d(TGGGGT)₄], sono preparati a concentrazione 1×10^{-4} M usando le stesse soluzioni tampone usate per preparare i campioni NMR (10 mM KH₂PO₄, 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0) e i corrispettivi

in tampone sodio (10 mM NaH₂PO₄, 70 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0). Gli spettri delle curve di melting sono registrati utilizzando lo spettrofotometro Jasco 715 CD, utilizzando cuvette con un cammino ottico di 0.1 centimetro, con un controllo termico della celletta di alloggiamento della cuvetta (Jasco PTC-348). Le curve CD melting sono alla lunghezza d'onda in cui si ha l'effetto cotton massimo per tutte le quadruplex e con una variazione di temperatura di 10°C h⁻¹.

3.5.6 Risonanza Magnetica Nucleare

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione approssimativa di 5.0 mM in 0.6 ml (H₂O/D₂O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH₂PO₄/K₂HPO₄, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 minuti a 80°C e lentamente raffreddati a temperatura ambiente per circa 10-12 ore. I campioni vengono lasciati all'equilibrio per circa quattro settimane e gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H₂O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti WATERGATE¹⁵ per la soppressione del segnale dell'acqua. Per essere certi che il processo di *annealing* sia completo, vengono effettuati esperimenti in tempi diversi e si verifica la sovrapposizione degli spettri risultanti. Per gli esperimenti in D₂O, l'H₂O è stata sostituita con D₂O per essiccamento del campione, liofilizzazione e ridissoluzione in D₂O pura. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UnityINOVA 700 MHz. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shifts* dei protoni (1H). Gli spettri NOESY sono stati acquisiti in modalità “*phase sensitive*”¹⁶ con *mixing times* di 100 e 200 ms (T=25°C), per quelli in H₂O è stata utilizzata la sequenza di gradienti WATERGATE²² per la soppressione del segnale del solvente. Gli spettri TOCSY¹⁷ sono stati registrati in D₂O con *mixing times* di 120 ms. Gli esperimenti NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura TPPI¹⁸. In tutti gli esperimenti 2D i dati nel dominio del tempo consistono di

2048 punti complessi in t2 e 400-512 FID nella dimensione t1. Il tempo di rilassamento è stato settato ad 1.2 s per tutti gli esperimenti.

3.5.7 *Molecular modelling*

Le principali caratteristiche conformazionali delle quadruplex **III**, **IV** e **VI** sono state esaminate mediante uno studio di molecular modelling. È stato utilizzato il campo di forza AMBER usando il set di parametri di AMBER 99¹⁹. Le coordinate iniziali per il modello di partenza della quadruplex [d(TGGGGT)]₄ sono state ricavate dalla struttura NMR in soluzione della quadruplex [d(TTGGGGT)]₄ (*Protein data bank entry number 139D*), scegliendo in maniera casuale una delle quattro strutture disponibili. Il modello iniziale della G-quadruplex [d(TGGGGT)]₄ è stato costruito sostituendo il secondo residuo timidinico in ognuno dei quattro filamenti d(TTGGGGT) con un guanosinico. Le strutture quadruplex complete sono state realizzate usando il programma di costruzione delle molecole Biopolymer building tool di Discover eliminando, uno per volta, un residuo 2'-deossiguanosina G2 (**III**), G3 (**IV**) e G5 (**VI**) e sostituendoli con il monomero modificato 8-metil-2'-deossiguanosina per ogni filamento. Come emerso dai risultati NMR, i residui modificati sono stati sistemati in conformazioni glicosidica *syn* nelle strutture **III** (G2) e **VI** (G5), e in conformazione *anti* in **IV** (G3). Per compensare parzialmente la mancanza del solvente usato, i calcoli sono stati eseguiti usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di 4r, e un cut off infinito per interazioni di non-legame²⁰. Usando il metodo "steepest descent" seguito da quello quasi-Newton-Raphson (VA09A), l'energia conformazionale di ogni complesso è stata minimizzata fino a raggiungere una convergenza a un gradiente RMS di 0,1Kcal/mol Å. Le figure delle strutture sono state elaborate usando il programma INSIGHT II, versione 2005. Tutti i calcoli sono stati eseguiti su un PC con Linux ES 2.6.9.

Bibliografia

1. Jeffery T.D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 668–698.
2. Saha, S., Cai, J., Eiler, D. and Hamilton, A.D., *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1685-1687.
3. Gros, J., Rosu, F., Amrane, S., De Cian, A., Gabelica, V., Lacroix, L. and Mergny, J.-L., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 3064-3075.
4. Gros, J., Avino, A., Lopez de la Osa, J., Gonzalez, C., Lacroix, L., Perez, A., Orozco, M., Eritja, R. and Mergny, J.-L., *Chem. Commun.*, **2008**, 2926-2928.
5. Suguyama, H., Kawai, K., Matsunaga, A., Fujimoto, K., Saito, I., Robinson, H. and Wang, A. H. J., *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 1272-1278.
6. Cherrak, I., Mauffret, O., Santamaria, F., Hocquet, A., Ghomi, M., Rayner, B. and Femandjian, S., *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 23, 6986-6995.
7. Xu, Y., Ikeda, R. and Sugiyama, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13519-13524.
8. He, G.-X., Krawczyk, S.H., Swaminathan, S., Shea, R. G., Dougherty, J. P. Terhorst, T., Law, V. S., Griffin, L.C., Coutre, S. and Bischofberger, N., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2234-2242.
9. Krawczyk, S.H., Bischofberger, N., Griffin, L.C., Law, V. S., Shea, R. G. and Swaminathan, S., *Nucleosides Nucleotides*, **1998**, 14, 1109-1116.
10. Xu, J. and Sugiyama, H., *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 949-954.
11. Virgilio, A., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L. and Galeone, A., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 6188-6195.
12. Kohda, K., Tsunomoto, H., Minoura, Y., Tanabe, K. and Shibutani, S., *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, 9, 1278-1284.
13. Mergny, J.-L., Lacroix, L., Amrane, S. and Chaires, J.B., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 138/1-138/6.

14. Mergny, J.-L., De Cian, A., Ghelav, A., Saccà, B. and Lacroix, L., *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 81-94.
15. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V.J., *J. Biomol. NMR* 2, **1992**, 661-665.
16. Jeener, J., Meier, B., Bachmann, H. P. and Ernst. R. R. *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.
17. Braunschweiler, L. and Ernst. R. R. *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528.
18. Marion, D. and Wuthrich, K., *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 113, 967-974.
19. Cornell, W. D., Cieplack, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5179-5197.
20. Weiner, S. J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 765-784.
21. Mergny, J.-L., Phan, A. T. and Lacroix, L., *FEBS Lett.*, **1998**, 435, 74-78.
22. Masiero, S., Trotta, R., Pieraccini, S., De Tito, S., Perone, R., Randazzo, A. and Spada, G. P., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 2683-2692.
23. Feigon, J., Koshlap, K. M. and Smith, F. W., *Meth. Enzymol.*, **1995**, 261, 225-255.
24. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleics Acids*. **1986**, Wiley, NY.
25. Wang, Y. and Patel, D.J., *Biochemistry*, **1992**, 31, 8112-8119.
26. Wang, Y. and Patel, D.J., *J. Mol.Biol.*, **1993**, 234, 1171-1183.
27. Aboul-ela, F., Murchie, A. I. H., Normann, D. G. and Lilley, D. M. J., *J. Mol.Biol.*, **1994**, 234, 458-471.
28. Patel, P.K., and Hosur, R.V., *Nucleic Acids Res.***1999**, 27, 2457-2464.
29. Wang, Y., and Patel, D. J. *Structure*, **1993**, 1, 263-282.
30. Smith, F.W. and Feigon, J., *Biochemistry*, **1993**, 32, 8683-8692.
31. Gray, D.M., Wen, J.-D., Gray, C. W., Repges, R., Repges, C., Raabe, G. and Fleischhauer, J. *Chirality*, **2008**, 20, 431-440.

32. Wyatt, J. R., Vickers, T. A., Roberson, J. -L., Buckheit, R. W. jr., Klimkait, T., DeBaets, E., Davis, P. W., Rayner, B., Imbach, J.L. and Ecker, D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1994**, USA 91, 1356-1360.
33. Ecker, D.J., Wyatt, J. R., Vickers, T. A., Buckheit, R., Roberson, J. and Imbach, J.-L., *Nucleosides Nucleotides*, **1998**, 14, 1117-1127.
34. Koizumi, M., Akahori, K., Ohmine, T., Tsutsumi, S., Sone, J., Kosaka, T., Kaneco, M., Kimura, S. and Shimada, K., *bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 2213-2216.
35. D'Onofrio, J., Petraccone, L., Erra, E., Martino, L., Di Fabio, G., De Napoli, L., Giancola C. and Montesarchio, D., *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18, 1194-1204.
36. D'Onofrio, J., Petraccone, L., Martino, L., Di Fabio, G., Iadonisi, A., Balzarini, J., Giancola C. and Montesarchio, D., *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 607-616.

Capitolo 4: Effetto dell'introduzione di due residui di 8-metil-2'-deossiguanosina: un tentativo di orientare i filamenti.

4.1 Introduzione

Allo scopo di approfondire la correlazione tra orientamento relativo dei filamenti, conformazione glicosidica delle guanosine, stabilità termica e posizione modificata nella sequenza, sulla base dei risultati ottenuti dal progetto precedente, si è pensato di effettuare uno studio strutturale basato sulla spettroscopia NMR e CD di tutti i possibili analoghi delle sequenze d(TGGGT) e d(TGGGGT), contenenti due residui di 8-metil-2'-deossiguanosina in tutte le combinazioni possibili (mostrati in tabella 1).

In particolare, è stata valutata la capacità di questi residui modificati di orientare i filamenti e, in tal modo, di influenzare la topologia delle strutture quadruplex tetramolecolari.

Nome	Sequenza	$T_{1/2}$ (°C) λ_{max} (CD)
TG ₃ T	TGGGT	45 ^a
T12	TMMGT	57 ^a
T13	TMGMT	34 ^a
T23	TGMMT	N. D.
TG ₄ T	TGGGGT	65 ^b
F12	TMMGGT	73 ^b
F13	TMGMGT	47 ^b
F14	TMGGMT	51 ^b
F23	TGMMGT	52 ^b
F24	TGMGMT	34 ^b
F34	TGGMMT	24 ^b

Tabella 1: sequenze di oligonucleotidi studiati e temperature apparenti di melting ($T_{1/2}$) delle quadruplex adottate. ^a 70mM K⁺; ^b 70mM Na⁺; M = 8-metil-2'-deossiguanosina; N.D. non determinata.

4.2 Risultati e discussioni

4.2.1 Esperimenti NMR

Per valutare e verificare le ipotesi che ci hanno portato alla sintesi degli oligonucleotidi disostituiti da noi sintetizzati, sono stati condotti esperimenti NMR e CD. Questi studi ci hanno permesso di acquisire informazioni più dettagliate sulla strutture adottate dagli ODN investigati.

In particolare la presenza di segnali dei protoni immidici, nella regione dello spettro NMR compresa tra 10,5 e 12,0 p.p.m., indica la presenza di tetradi di G¹. Quindi l'analisi di questa regione è di norma utilizzato sia per valutare se l'oligonucleotide adotta una o più strutture, che per fornire indicazioni riguardo la sua simmetria.

L'aspetto semplice degli spettri 1D NMR degli oligonucleotidi **T12**, **T13**, **F12**, **F14** e **F24** (**Fig. 48**) in tampone K⁺ (o in Na⁺) indica che questi oligomeri, nelle condizioni utilizzate, formano principali strutture G-quadruplex con un elevata simmetria, contenenti tre (**T12** e **T13**) o quattro (**F12**, **F14** e **F24**) tetradi di G, con i filamenti tutti equivalenti tra loro. Lo spettro ¹H-NMR di **T12** (500 MHz, T=25°C) mostra la presenza di tre segnali principali nelle regione 10.8-12.0 p.p.m., attribuibile ai protoni immidici coinvolti nei legami idrogeno di tipo Hoogsteen nei quartetti di G, e la presenza di tre singoletti nella regione dei protoni aromatici, uno appartenente all'H8 della guanina non modificata, e due all'H6 delle timine. Inoltre, è stata osservata la presenza di segnali di risonanza dei metili, nelle regioni 1.6 (appartenenti ai due metili delle timine) e 2.2-2.5 p.p.m. dello spettro (appartenenti ai metili delle guanine).

Per quanto riguarda lo spettro 1D di **T13** invece, alla stessa temperatura, mostra la presenza di due set di segnali nella zona aromatica tra 7,2 e 8,2 p.p.m., ciascuno formato da tre segnali con intensità leggermente diversa e solo tre picchi immidici di minore dimensione nella regione compresa tra 10,8 e 12,0 p.p.m.. Alzando la temperatura a 50°C,

tre dei sei segnali incrementano gradualmente di intensità, mentre gli altri tre, insieme ai picchi immidici, scompaiono progressivamente. Quindi a 50°C sono presenti solo tre picchi nella regione aromatica dello spettro $^1\text{H-NMR}$. Questi dati indicano chiaramente che, alla temperatura di 50°C, **T13** è presente come singolo filamento, che a 25°C, coesiste in quantità quasi uguali con una struttura quadruplex.

Al fine di migliorare il rapporto quadruplex/singolo filamento, è stata abbassata la temperatura fino a 7°C. In queste condizioni, lo spettro 1D, mostra che **T13** forma una struttura quadruplex altamente simmetrica con quattro filamenti paralleli (come per **T12**), come indicato dal numero di protoni immidici ed aromatici (**Fig. 48**).

Gli oligonucleotidi **F12**, **F14** e **F24** contengono quattro residui di guanina, di cui due modificati. Tali sequenze formano strutture quadruplex con quattro filamenti paralleli ed equivalenti tra loro. Lo spettro NMR mostra la presenza di quattro protoni immidici nella regione tra 10,5 e 12,0 p.p.m. e quattro segnali singoletti nella regione aromatica tra 7,0 e 8,0 p.p.m. di cui, due appartenenti ai due idrogeni in posizione 8 delle guanine non modificate e due appartenenti agli idrogeni in posizione 6 delle timine. L'equivalenza dei filamenti delle strutture formate dagli ODN **F12**, **F14** e **F24** è ulteriormente confermata dalla presenza di quattro segnali di risonanza nelle regioni tra 1.3 e 1.6 p.p.m., attribuibili ai due T-CH₃, e due tra le regioni 2.2 e 2.5 p.p.m. attribuibili ai due M-CH₃, come osservato per i tre campioni.

Al contrario, lo spettro 1D NMR di **F13** (**Fig. 48**) è risultato più complicato rispetto a quelli precedenti. Infatti, in questo caso, la regione dei protoni immidici è abbastanza affollata suggerendo la coesistenza di più strutture quadruplex. Tuttavia, anche se la regione dei protoni immidici non permette di attribuire una simmetria principale alla struttura, la presenza di otto segnali principali nella regione degli aromatici sembra compatibile con la presenza di un'unica conformazione predominante a simmetria binaria. Per quanto concerne invece gli ODN **T23**, **F23** e **F34**, data la presenza di un

sovraffollamento di segnali nelle regioni dei protoni immidici e aromatici (dati non mostrati), non è stato possibile individuare una struttura principale per questi campioni.

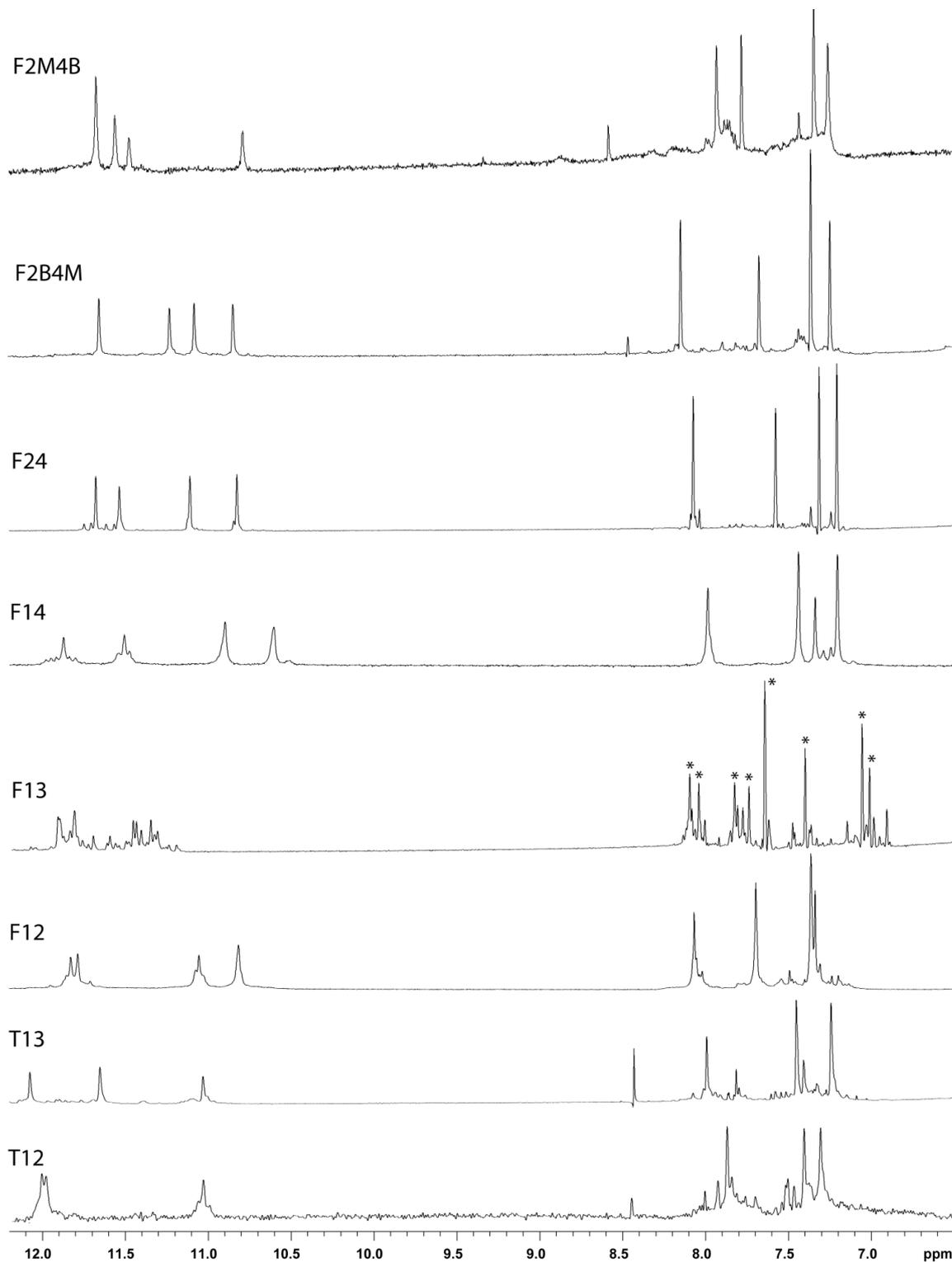


Fig. 48 Regione espansa degli spettri $^1\text{H-NMR}$

L'aspetto relativamente semplice degli spettri 1D degli oligonucleotidi **T12**, **T13**, **F12**, **F14** e **F24** indica che, nelle condizioni utilizzate, questi oligonucleotidi formano strutture ben definite e stabilizzate da legami a idrogeno. Pertanto, sono stati effettuati ulteriori studi con tecniche NMR bidimensionali, che permettono di individuare quali protoni sono vicini nello spazio, al fine di ottenere informazioni più dettagliate circa l'esatta struttura e l'architettura assunta da queste molecole. Gli spettri NOESY(**Fig. 49-55**) e TOCSY hanno mostrato picchi di correlazione ben dispersi. Quindi, sia i valori dei protoni scambiabili che quelli non scambiabili sono stati assegnati seguendo le procedure standard. Dagli effetti NOE tra i protoni G-H8 e T-H6 con i propri protoni H1', H2' e H2" e con quelli H1', H2' e H2" del residuo adiacente, è emerso che le sequenze si strutturano in eliche destrorse.

Per quanto riguarda invece, gli angoli torsionali glicosidici: in tutte le strutture quadruplex formate dai cinque oligonucleotidi studiati, la presenza di un debole effetto NOE tra G-H8 e il protone in posizione 1 dello zucchero, in confronto col forte effetto NOE tra G-H8 e il protone in posizione 2 del deossiribosio, indica che tutte le guanine non modificate assumono una conformazione glicosidica di tipo *anti*, indipendentemente dalla sequenza. Tuttavia, poichè il comportamento dei residui metilati è sequenza dipendente, analizzeremo queste strutture una per volta.

Nella struttura quadruplex formata dall'oligonucleotide **T12**, la prima guanina modificata assume una conformazione di tipo *syn*, come suggerito dall'intenso effetto NOE tra il metile in posizione 8 e il protone H1' dello zucchero, e il debole effetto NOE tra il metile in posizione 8 e i protoni in posizione H2' del deossiribosio. Al contrario, la seconda guanina modificata, assume una conformazione *anti* come per le guanine non modificate.

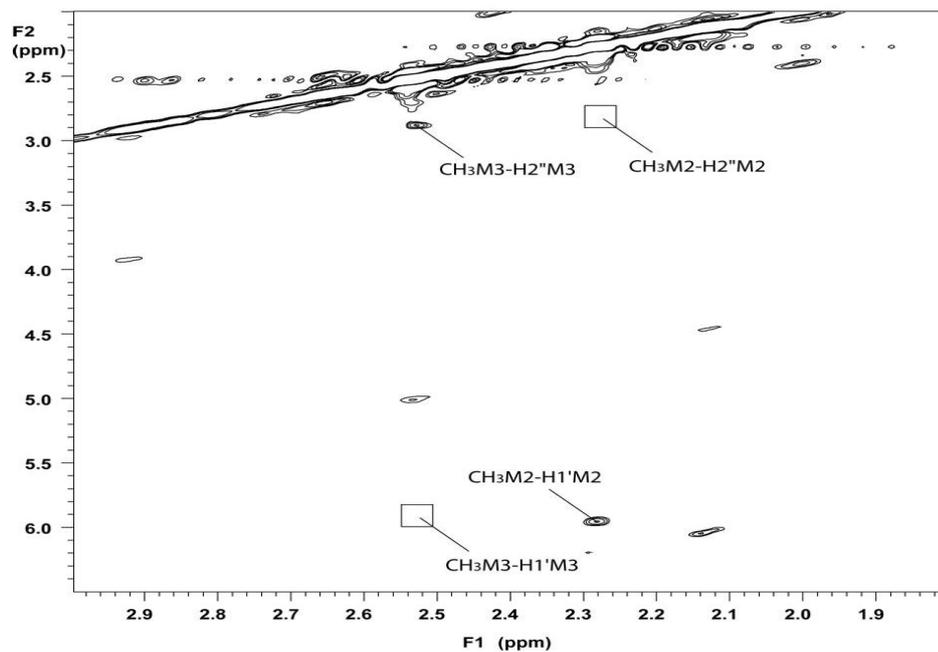


Fig. 49 Regione espansa dello spettro NOESY dell'oligonucleotide T12

L'oligonucleotide **F12** assume un comportamento simile a quello di **T12**. Infatti, anche in questo caso solo la prima guanina assume una conformazione *syn* mentre le altre (compresa la seconda modificata) assumono una conformazione di tipo *anti*.

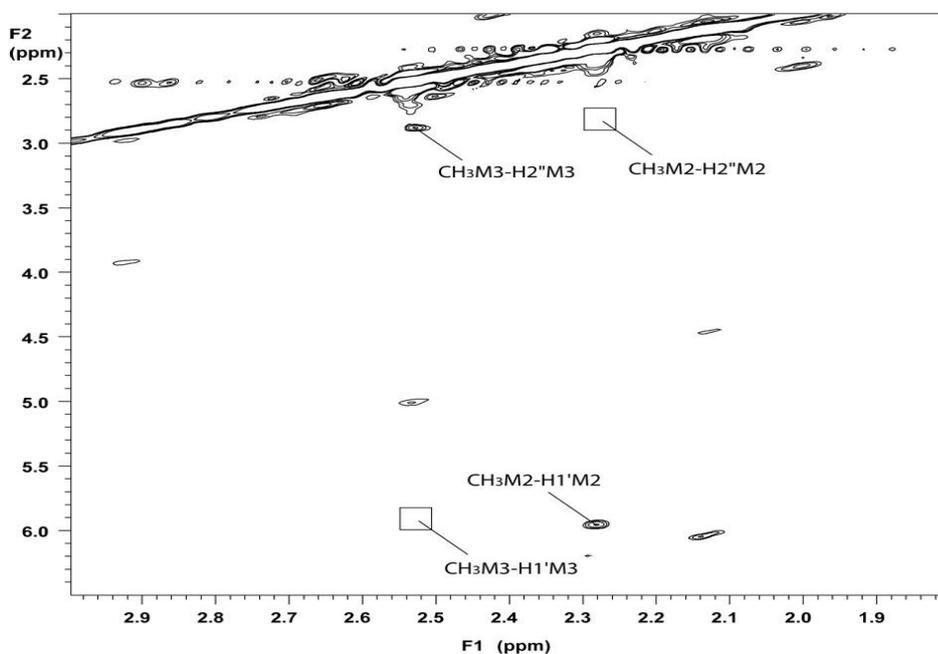


Fig. 50 Regione espansa dello spettro NOESY dell'oligonucleotide F12

I dati NMR per **T12** e **F12** sono compatibili con la formazione di strutture quadruplex parallele tetramolecolari caratterizzate da una tetrade all-*syn* all'estremità 5' e due (per

T12) o tre (per **F12**) tetradi all-*anti* (**Fig. 56**). Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti dai derivati monosostituiti TG₃T e TG₄T nella prima e seconda posizione, nei quali, la guanina modificata forma una tetradde all-*syn* solo se posizionata all'estremità 5'^{2,3}. Gli studi NMR 2D sulla quadruplex formata dall'oligonucleotide **T13** rivelano che entrambe le guanosine modificate adottano una conformazione glicosidica di tipo *syn* (**Fig. 51**), anche se questa struttura risulta essere meno stabile rispetto alle strutture quadruplex di **T12** e rispetto alla struttura quadruplex di riferimento (TGGGT)₄. Anche in questo caso i dati NMR sono compatibili con le strutture quadruplex tetramolecolari parallele nelle quali le due tetradi all-*syn* sono presenti all'estremità 3' e 5', mentre la tetradde centrale contenente la guanosina non modificata, adotta una conformazione glicosidica *anti*. **T13** è la prima struttura quadruplex individuata in cui le guanine con conformazioni *syn* prevalgono su quelle *anti*

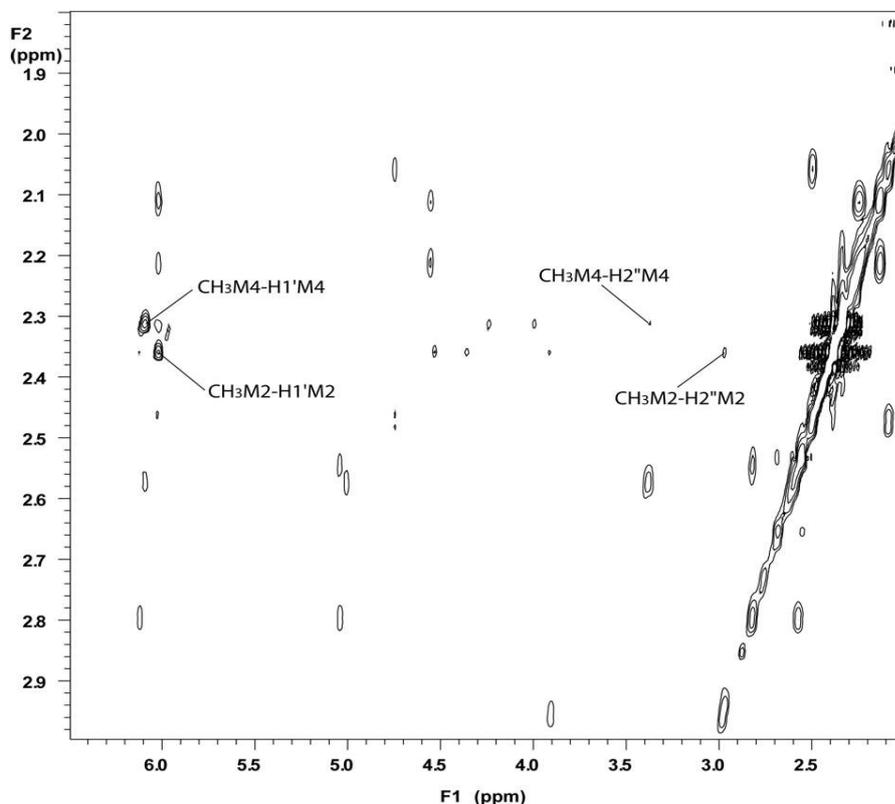


Fig. 51 Regione espansa dello spettro NOESY dell'oligonucleotide **T13**.

Per quanto riguarda l'oligonucleotide **F14**, i dati NMR mostrano che entrambi i residui modificati adottano una conformazione glicosidica di tipo *syn* suggerendo la formazione di una struttura quadruplex caratterizzata da due tetradi all-*syn* all'estremità 5' e 3' del tratto di guanine. Questo risultato è in accordo con la struttura quadruplex adottata dai derivati monosostituiti TMGGGT e TGGGMT, nei quali la guanosina metilata forma una tetraide all-*syn* in entrambi i casi.²

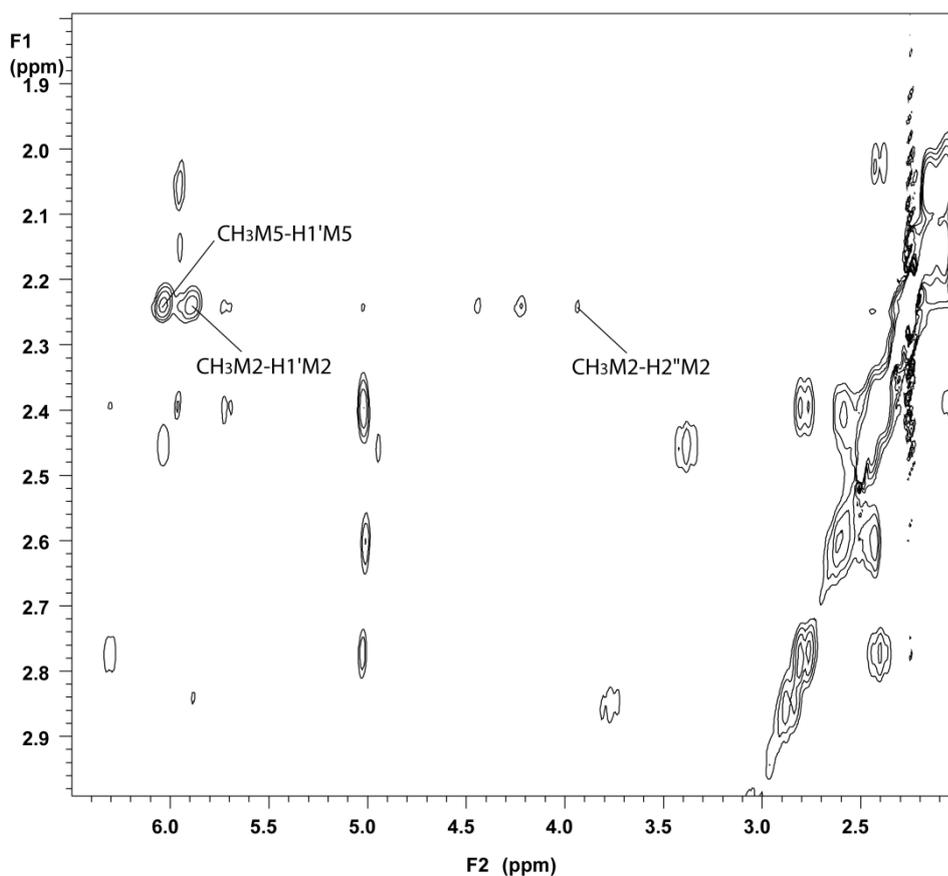


Fig. 52 Regione espansa dello spettro NOESY dell'oligonucleotide F14.

Per quanto riguarda l'oligonucleotide **F24**, sfortunatamente, lo spettro NOESY mostra che i valori di *chemical shifts* del gruppo metilico in posizione 8 e del protone in posizione 1 del deossiribosio, sono molto simili per entrambi i residui metilici (**Fig. 53**), ciò comporta un forte effetto NOE con picchi sovrapposti che non è possibile risolvere, pur avendo tentato di acquisire gli spettri aumentando il campo magnetico (700 MHz), variando le condizioni

di temperatura ed aumentando la concentrazione di KCl in soluzione (140mM).

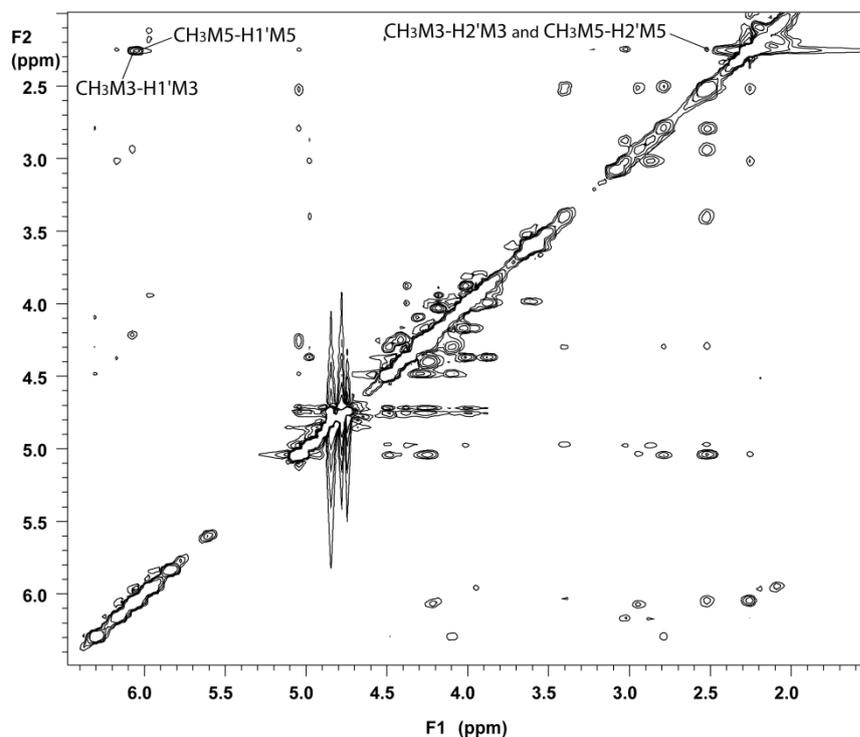


Fig. 53 Regione espansa dello spettro NOESY dell'oligonucleotide F24.

Tuttavia, lo spettro NOESY mostra la presenza di almeno un residuo metilico con conformazione di tipo *syn*, quindi siamo portati a credere che entrambe le guanosine modificate adottano una conformazione glicosidica di tipo *syn* per le seguenti ragioni: 1) il picco NOE che coinvolge il metile in posizione 8 della guanina e il protone in posizione 1 dello zucchero, è abbastanza largo da far pensare che entrambi i metili possono essere coinvolti; 2) i picchi NOE che coinvolgono i gruppi metilici e i protoni in posizione 2 dello zucchero sono più piccoli, e con intensità molto simile per entrambi i metili, rispetto al picco che coinvolge i metili e i protoni in posizione 1 dello zucchero, suggerendo che entrambi adottano la stessa conformazione glicosidica che dovrebbe essere *syn*, dal momento che lo spettro NOESY mostra almeno una conformazione *syn* per il residuo metilsostituito; 3) Come accade per altre strutture quadruplex contenenti le sequenze 5'-G(anti)G(*syn*)-3', c'è un'interruzione della correlazione tra i residui G₂M₃ e G₄M₅⁴.

Tuttavia, per confermare questa ipotesi abbiamo studiato il comportamento di due oligonucleotidi analoghi di **F24**, appositamente preparati, di sequenza 5'-TGBGMT-3' (**F2B4M**) e 5'-TGMGBT-3' (**F2M4B**), dove M = 8-metil2'-deossiguanosina e B = 8-Bromo-2'-deossiguanosina. Tenendo conto che il raggio di van der Waals del bromo e del metile sono comparabili e ugualmente capaci di promuovere una conformazione glicosidica *syn*^{5,39}, le strutture quadruplex formate da questi campioni sono molto simili a quella formata da **F24**. Comunque, nei casi di **F2B4M** e **F2M4B**, la presenza di un unico residuo di 8-metil2'-deossiguanosina per ogni sequenza, ci ha consentito di osservare individualmente il comportamento dei residui modificati nelle due strutture quadruplex, aggirando così la sovrapposizione dei valori di *chemical shifts* tra i gruppi metilici in posizione 8 e i protoni H1' dello zucchero osservati per **F24**. Entrambi gli analoghi di **F24** formano un'unica struttura predominante in soluzione (**Fig. 48**). per entrambe le strutture quadruplex formate da **F2M4B** e **F2B4M**, la presenza di forti effetti NOE tra il gruppo metilico in posizione 8 e il protone H1' dello zucchero, comparati con i più deboli o assenti picchi di correlazione tra il metile e l'H2' (**Fig. 54**), indicano chiaramente che i residui M adottano una conformazione glicosidica *syn*.

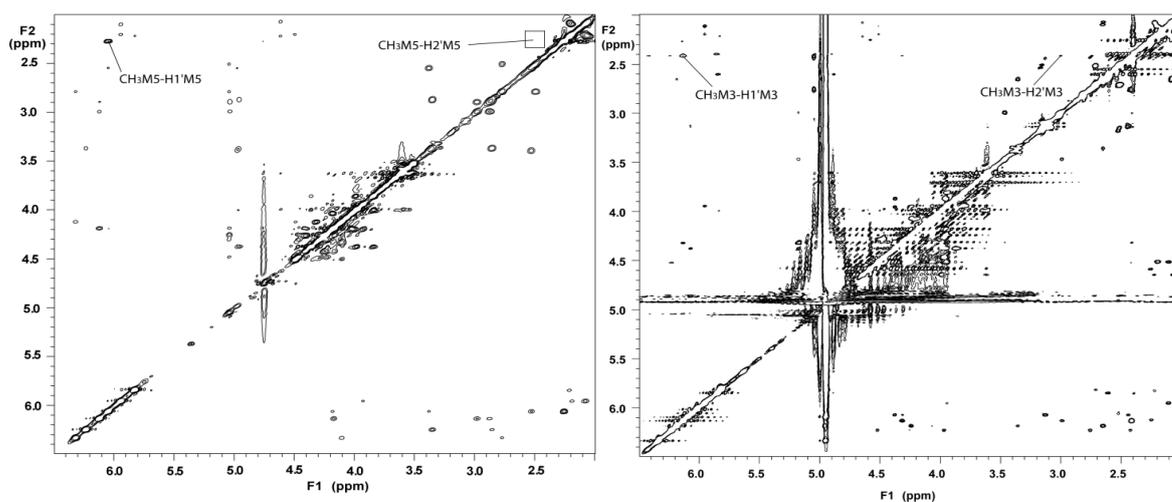


Fig. 54 Regione espansa degli spettri NOESY di **F2B4M**(a sinistra) e **F2M4B**(a destra)

Dal momento che non sono stati osservati effetti NOE tra i vari filamenti per le quadruplex formante da **F24**, **F2M4B** e **F2B4M**, l'insieme dei dati indica chiaramente che **F24** forma una quadruplex tetramolecolare a filamenti tutti paralleli, in cui i residui modificati M e i residui canonici di G adottano conformazioni glicosidiche *syn* e *anti*, rispettivamente, e i quattro filamenti sono equivalenti tra loro, dando così luogo ad un complesso caratterizzato da un'alternanza di tetradi all-*anti* e all-*syn*, non osservato in letteratura in precedenza (**Fig. 56**).

Sebbene lo spettro ¹H-NMR di **F13** (**Fig. 48**) sembra abbastanza complicato, suggerendo così la presenza di diversi tipi di strutture quadruplex, il numero di protoni imidici di risonanza potrebbe essere compatibile con una conformazione a quadrupla elica caratterizzata da simmetria binaria. Anche se gli spettri NOESY (**Fig. 55**) e TOCSY ci hanno permesso di assegnare solo parzialmente le risonanze, tre importanti aspetti emergono da questi dati: in primo luogo, la presenza di quattro tipi di residui modificati M (**Fig. 55 A**) che adottano tutti una conformazione glicosidica di tipo *syn* e quattro monomeri di G, sono tutti in conformazione glicosidica *anti*; in secondo luogo, la presenza di quattro tipi di timine (**Fig. 55 B**); e terzo, un picco di correlazione NOESY tra T1-H6 e T6-CH₃ appartenenti allo stesso tipo di filamento(**Fig. 55 B**).

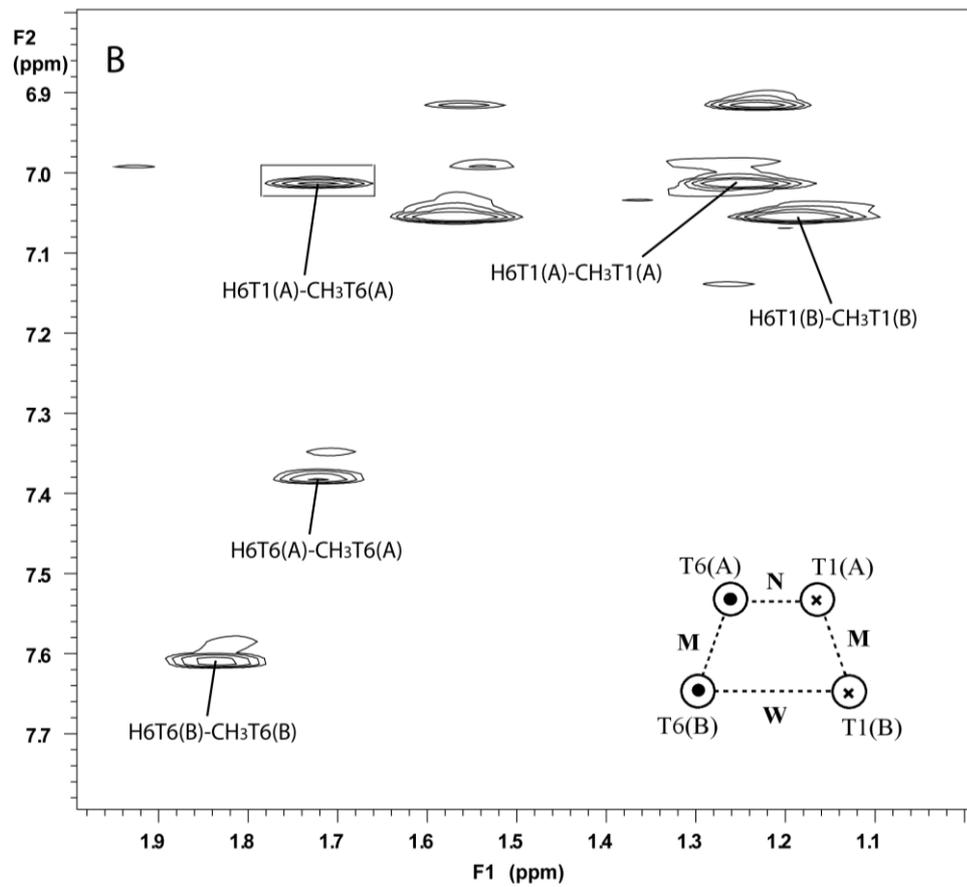
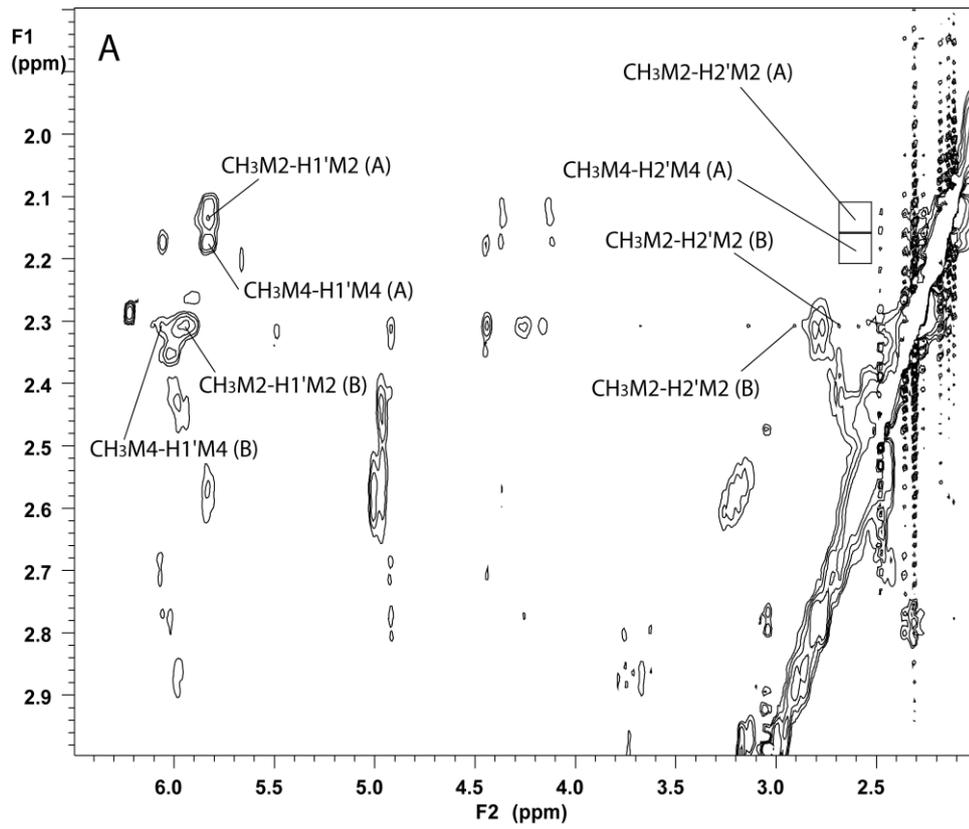


Fig. 55 Regione espansa degli spettri NOESY di T13.

4.2.2 Dicroismo Circolare (CD)

Questa tecnica spettroscopica è spesso usata per l'analisi di oligonucleotidi, in quanto ci consente di acquisire informazioni preliminari circa il tipo di quadruplex o semplicemente di confermare le informazioni strutturali ottenute con altre tecniche. Per quanto riguarda i nostri oligonucleotidi, abbiamo utilizzato la tecnica CD in un secondo momento, dopo aver accertato con gli esperimenti NMR sopra riportati, la presenza di strutture quadruplex.

Secondo i dati presenti in letteratura, i profili CD possono essere interpretati a seconda della diversa orientazione di sovrapposizione tra le tetradi di G adiacenti, piuttosto che in base all'orientamento relativo dei filamenti (paralleli o antiparalleli). Infatti, considerando la natura eterotopica delle due facce di una tetrate, quando due G-tetradi sono impilate, ognuna di esse può interagire con quella adiacente sulla stessa faccia (testa-testa o coda-coda) o sulla faccia opposta (testa-coda) dando luogo a sovrapposizioni definite eteropolari e omopolari, rispettivamente⁷.

In figura 57 sono riportati gli spettri CD degli oligonucleotidi **T12** e **T13**, confrontati con la loro controparte naturale (TG_3T).

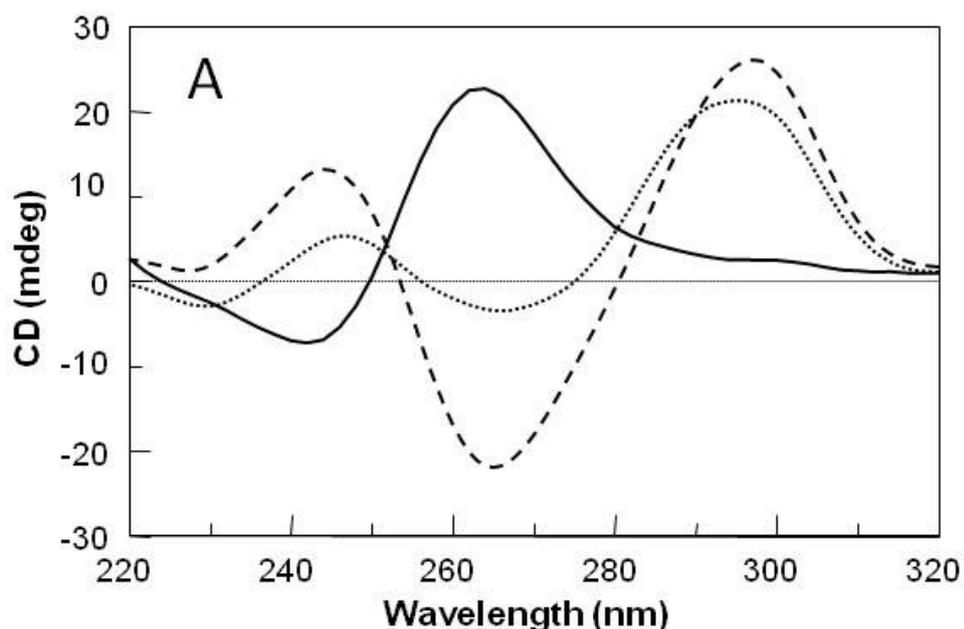


Fig. 57 Spettri CD a 20° C degli oligonucleotidi TG_3T (—), T12(.....) e T13(- - -).

Il profilo CD dell'oligonucleotide **T12** mostra due bande positive a 246 e 295 nm e due bande negative a 230 e 266 nm. In accordo con i dati NMR, la struttura proposta è caratterizzata da una sovrapposizione eteropolare (HH) ed una omopolare (HT) (**Fig. 57**), come per le strutture quadruplex formate da oligonucleotidi TBGGT (tetramolecolare, B = 8-Bromo-2'-deossiguanosina),⁸ TMGGT (tetramolecolare)² e G₃T₄G₃ (bimolecolare)⁹⁻¹¹, che mostrano un profilo CD simile.⁷

Lo spettro CD di **T13**, invece, mostra due bande positive a 244 e 297 nm ed una larga banda negativa a 265 nm. La struttura quadruplex proposta per questo oligonucleotide mostra due sovrapposizioni eteropolari (HH). Il profilo CD di **T13** è pressochè sovrapponibile agli spettri di strutture quadruplex antiparallele come quelle formate da oligonucleotidi G₄T₄G₄ (bimolecolare)^{12,13} e G₄T₂G₄TGTG₄T₂G₄ (monomolecolare)¹³, in cui le tetradi di G sono impilate solo attraverso sovrapposizioni eteropolari. Infatti, i profili CD di tali strutture sono sovrapponibili con quello di **T13**, questo dato conferma la struttura quadruplex da noi proposta per tale ODN in accordo con gli esperimenti NMR.

Le principali caratteristiche dello spettro di **T23** (non mostrato) sono la presenza di una banda positiva a 257 e una negativa a 291nm che sembra suggerire una dominanza di strutture parallele contenenti sovrapposizioni omopolari (HT). Tuttavia, in questo caso, come sottolineato in precedenza nella sezione NMR, un'elevata presenza di singolo filamento e l'assenza di una struttura principale rende difficile ottenere delle informazioni strutturali attendibili dallo spettro CD.

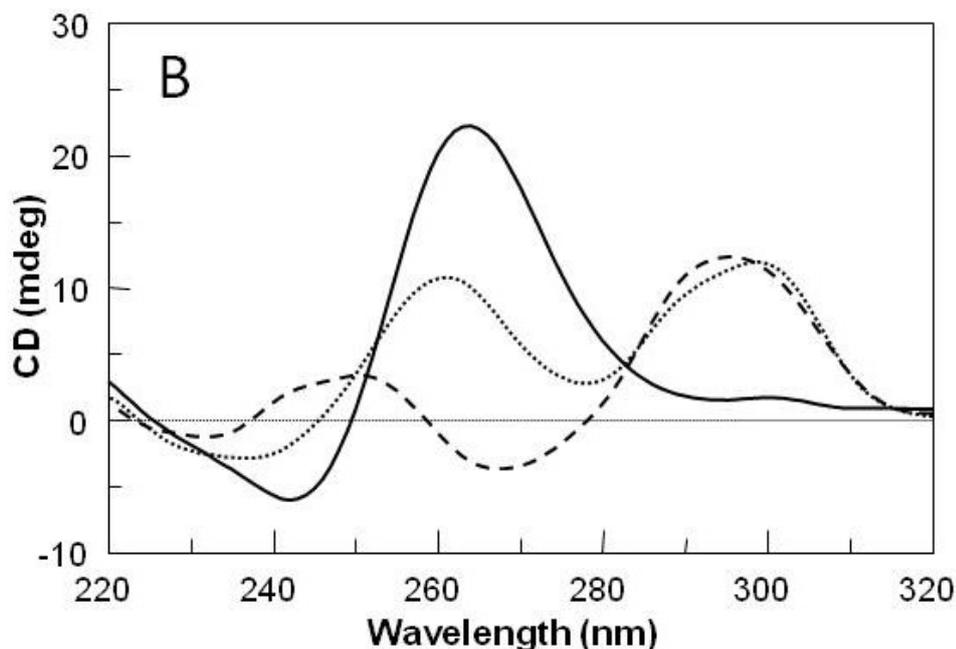


Fig. 58 Spettri CD a 20° C degli oligonucleotidi TG₄T (—), F12(.....), F14(- - -).

In figura 58 sono mostrati gli spettri di **F12** e **F14**, confrontati con la loro controparte naturale (TG₄T). Il profilo CD di **F12** mostra due bande positive a 261 e 299 nm ed una banda negativa a 237 nm. Gli esperimenti NMR hanno indicato una struttura quadruplex parallela tetramolecolare nella quale la prima tetrate è all-*syn* mentre le altre sono all-*anti*, quindi caratterizzate da una sovrapposizione eteropolare(HH) e due omopolari(HT) (**Fig. 56**). Questo tipo di arrangement si verifica nella struttura quadruplex formata dall'oligonucleotide TMGGGT³ che mostra uno spettro CD pressochè sovrapponibile a quello della quadruplex **F12**, tranne che per la diversa intensità della banda a 297 nm che potrebbe essere attribuita alla presenza di due residui metilici in **F12**. Inoltre è stato riscontrato lo stesso numero di sovrapposizioni eteropolari ed omopolari, in strutture quadruplex proposte per alcuni oligonucleotidi contenenti siti di inversione di polarità come ^{3'}TGG^{5'}-^{5'}GGT^{3'} (due sovrapposizioni HT ed una HH) e ^{5'}TGG^{3'}-^{3'}GGT^{5'} (due sovrapposizioni HT ed una TT), che mostrano profili CD simili a quello di **F12**⁷⁻¹⁴.

Lo spettro CD di **F14** mostra due bande positive a 250 e 296 nm e due bande negative a 231 e 268 nm. In questo caso, i risultati NMR hanno suggerito una struttura quadruplex

caratterizzata da due sovrapposizioni eteropolari (una HH ed una TT) ed una omopolare che, formano una quadruplex con una struttura mai analizzata in precedenza. Questo non ci ha permesso di confermare la struttura proposta tramite un confronto diretto dello spettro CD di **F14** con strutture quadruplex simili. Nonostante questo, il confronto degli spettri CD di **F14** e **T13** (che formano una struttura quadruplex con sovrapposizioni eteropolari) mostra chiaramente che la banda negativa intorno ai 265 nm (caratteristica delle sovrapposizioni eteropolari)⁷ è relativamente meno pronunciata in **F14**, come previsto per una struttura quadruplex in cui si verificano due sovrapposizioni eteropolari ed una omopolare. Pertanto, anche in questo caso, il profilo CD è in accordo con la stessa struttura proposta in base ai dati NMR.

Lo spettro CD di **F13** (**Fig. 59**) supporta l'ipotesi in base ai dati NMR precedentemente descritti, dal momento che esso presenta due bande positive a 243 e 297 nm e un'intensa banda negativa a 263 nm, che corrisponde ad un profilo CD tipico di una struttura quadruplex antiparallela caratterizzata da sovrapposizioni eteropolari. Più significativamente, lo spettro CD di **F13** è praticamente sovrapponibile a quello della quadruplex bimolecolare $[d(G_4T_4G_4)]_2$ ¹³, che si ripiega con un arrangiamento antiparallelo, in cui due filamenti adiacenti corrono in una direzione e gli altri in direzione opposta (tipo A_2B_2)⁶, (**Fig. 56**).

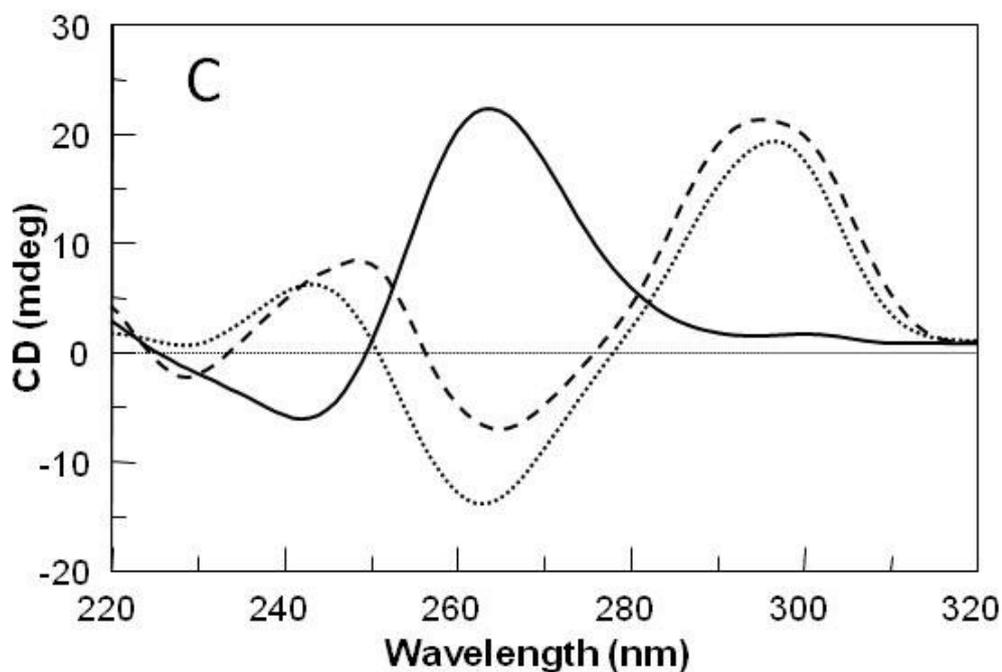


Fig. 59 Spettri CD a 20° C degli oligonucleotidi TG₄T (—), F13(.....), F24(- - -).

Anche per quanto riguarda **F24**, lo spettro CD avvalorza l'ipotesi avanzata dagli esperimenti NMR. Infatti, il profilo CD mostra due bande positive a 248 e 295 nm e due bande negative a 228 e 265 nm, suggerendo solo la presenza di sovrapposizioni eteropolari [per esempio, confronta gli spettri CD di **F24** con le quadruplex con sovrapposizioni eteropolari **F13**, $[d(G_4T_4G_4)]_2$ ^{12,13} e $d(G_4T_4G_4TGTG_4T_4G_4)$ ¹³].

I profili CD di **F23** e **F34**, sembrano molto simili a quello di **F14** (**Fig. 58**). Tuttavia, in questi casi, come per **T23** e contrariamente a quanto accade per **F14**, i dati NMR non supportano la presenza di una struttura principale, rendendo così impossibile l'acquisizione di informazioni affidabili dagli spettri CD.

Allo scopo di stimare la stabilità termica delle strutture quadruplex formate dai nostri oligonucleotidi modificati sono stati effettuati esperimenti CD melting e annealing, confrontati con gli analoghi naturali $[d(TG_3T)]_4$ e $[d(TG_4T)]_4$, nelle stesse condizioni sperimentali. Dal momento che, in tampone potassio, per molti oligonucleotidi modificati analoghi del TGGGGT non è stato possibile apprezzare le curve di melting, sono stati effettuati esperimenti in tampone sodio, mentre per gli analoghi modificati del TGGGT è

stato utilizzato il tampone potassio. Nel primo caso i profili CD melting in sodio (non mostrati) sono molto simili a quelli in potassio, indicando che non ci sono particolari differenze strutturali tra i complessi quadruplex in presenza di cationi sodio e potassio. Come previsto, data la natura dei complessi, sono stati osservati diversi fenomeni di isteresi per tutti gli oligonucleotidi (dati non mostrati), nonostante la velocità di scansione usata molto lenta (10°C/h), indicando che i sistemi non sono all'equilibrio.

Tuttavia, i buoni profili melting ottenuti ci hanno consentito di determinare la temperatura apparente di melting ($T_{1/2}$), generalmente considerata utile per confrontare la stabilità termica.¹⁵ Le temperature di melting apparenti degli ODN modificati sono riportati nella tabella 1. Le $T_{1/2}$ delle quadruplex formate dagli oligonucleotidi **T12** e **F12** risultano essere più alte delle loro controparti naturali, confermando così i risultati ottenuti per ODN modificati analoghi delle sequenze TGGGT e TGGGGT, contenenti un unico residuo modificato M^{2,3}, in cui l'introduzione di una 8-metil-2'-deossiguanosina al terminale 5' del tratto di G, provoca un miglioramento della stabilità termica, mentre la stessa modifica in seconda posizione non ha effetti significativi su tali proprietà. D'altra parte, per strutture quadruplex parallele (**T12**, **T13**, **F12**, **F14** e **F24**), i dati dimostrano chiaramente che la stabilità termica diminuisce quando la posizione dei residui modificati si sposta verso il terminale 3', questo risultato è in accordo con i dati ottenuti per ODN modificati, analoghi delle sequenze TGGGT e TGGGGT, contenenti un unico residuo modificato^{2,3}.

Le $T_{1/2}$ dei complessi formati da **F23** e **F34**, sono in buon accordo con questa tendenza, sebbene in questi casi, i dati NMR non ci hanno permesso di ottenere dettagli strutturali approfonditi.

4.2.3 Elettroforesi su Gel

Al fine di stimare la molecolarità dei complessi, abbiamo effettuato esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturante degli analoghi modificati confrontati con le loro controparti naturali (**Fig. 60**).

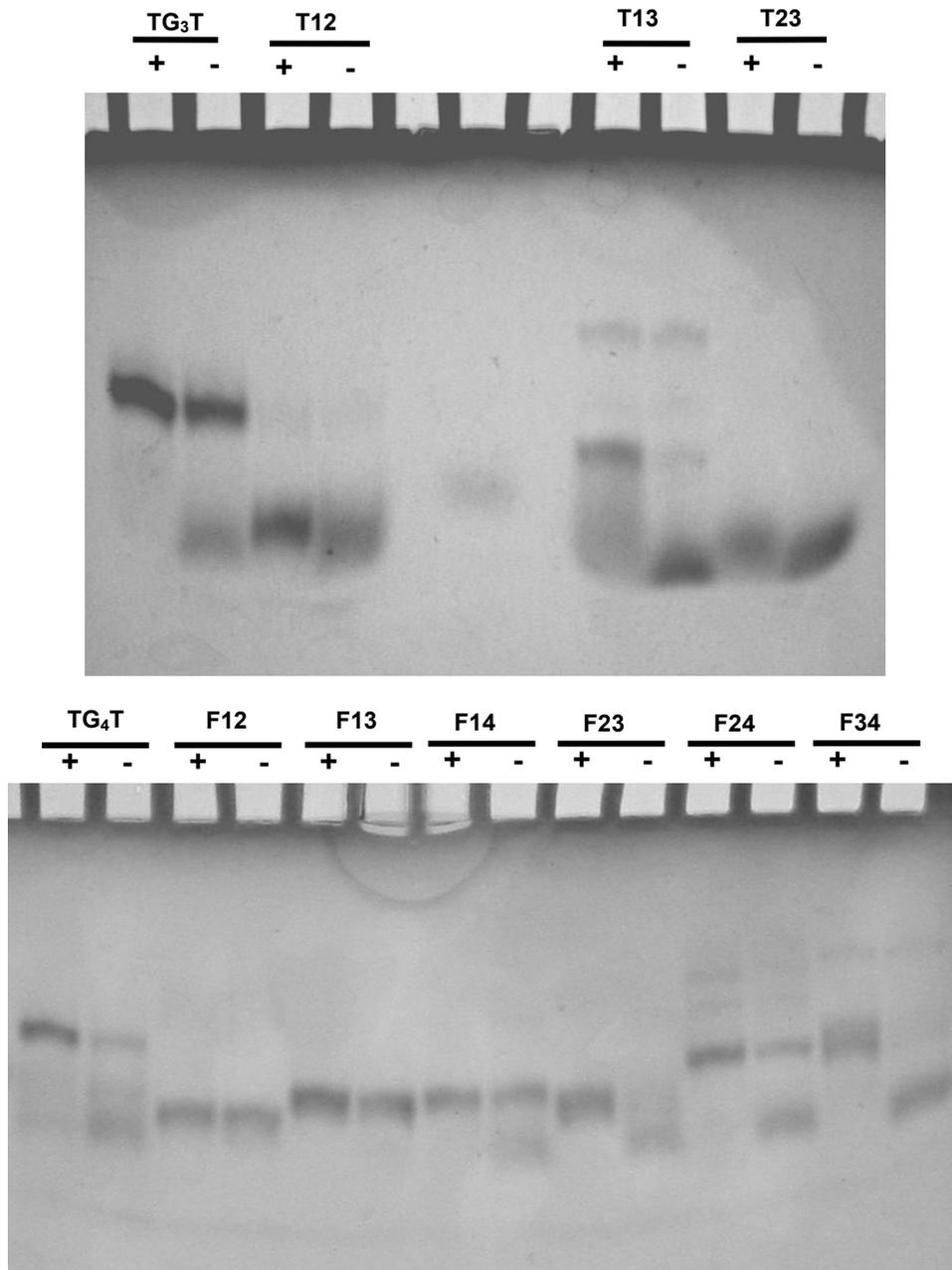


Fig 60. PAGE degli ODN sintetizzati. I campioni sono stati caricati su gel in condizioni non denaturanti, Le bande col segno “-“corrispondono alle sequenze pretrattate con LiOH, ossia gli ODN denaturati, quelle col segno “+” corrispondono invece alle sequenze strutturate in quadruplex.

Per la maggior parte dei casi, la migrazione dei campioni non denaturati è chiaramente più lenta, rispetto al corrispondente a singolo filamento, mostrando chiaramente la presenza di complessi multi molecolari. I campioni **T12**, **F12**, e **F13** si rinaturano completamente durante la corsa del gel, mentre ciò non accade per **F14** e **F24**. D'altra parte, nel caso di **T23**, si osserva solo il filamento singolo, probabilmente a causa della mancanza di una

struttura principale presente in soluzione, come suggerito dai dati NMR. Per entrambe le serie (TGGGT e TGGGGT), le strutture modificate migrano più velocemente rispetto alla controparte naturale. Tale effetto è stato osservato anche per la motilità elettroforetica di campioni monosostituiti della stessa serie³.

In diversi casi, non sono state rivelate strutture più grandi delle quadruplex tetramolecolari. A parte **T13**, **F24** e **F34**, in cui il profilo elettroforetico fa sospettare la presenza di complessi di ordine superiore nelle condizioni usate, negli altri casi non sono state rivelate strutture di maggiori dimensioni delle quadruplex tetramolecolari.

4.2.4 Molecular Modelling

I dati in letteratura riguardanti strutture simili e i dati NMR raccolti per questi studi, ci hanno consentito di ottenere modelli molecolari per le quadruplex formate da **T12**, **T13**, **F12**, **F13**, **F14** e **F24**, e confrontare le loro strutture. Nei modelli molecolari relativi a **T12** e **F12** (**Fig. 61**), è possibile notare che tutte le purine coinvolte nella formazione di tetradi di G, incluse quelle modificate M, sono in grado di formare tetradi planari e ben definite. Le quadruplex risultanti mostrano una buona elicITÀ destrorsa e una simmetria quaternaria.

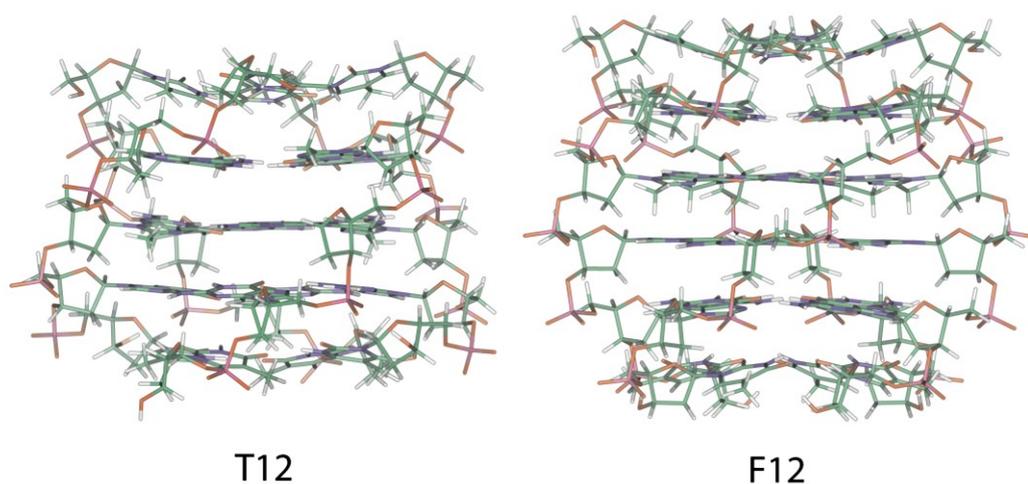


Fig. 61 Modelli molecolari di T12 e F12

In entrambi i complessi, i residui modificati M assumono una perfetta conformazione glicosidica *syn*, senza causare nessuna distorsione del *backbone* e mostrando uno *stacking* ottimale con la tetrate modificata all-*anti* sottostante. Per quanto concerne **F24** (**Fig. 62**), **F14** e **T13** (non mostrati), come ci aspettavamo, tutti complessi presentano una geometria elicoidale destrorsa, in cui i filamenti sono equivalenti tra loro senza distorsioni di rilievo, nonostante la presenza di due tetradi modificate all-*syn*.

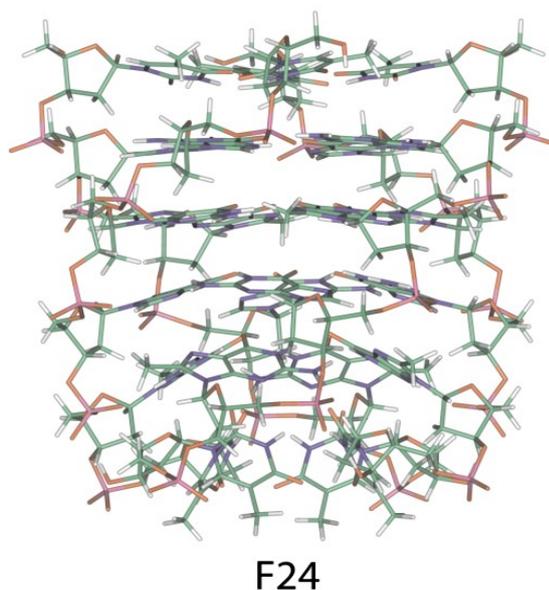
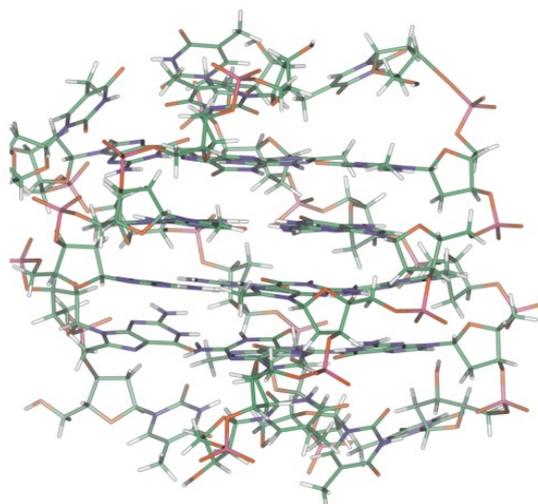


Fig. 62 Modelli molecolari di **F24**

Tuttavia, è interessante notare che nei modelli di **F14** che **F24**, le prime due tetradi al terminale 5', hanno una conformazione quasi planare, mentre le restanti tetradi hanno una lieve distorsione particolarmente evidente al 3'. In particolare, questo fenomeno è più pronunciato per **T13**, in cui i residui modificati M, adiacenti al lato 3', sono solo parzialmente impegnati nella tetrate, quindi più accessibili al solvente, in accordo con i dati NMR registrati a 25°C (dati non mostrati). Le caratteristiche strutturali dei modelli molecolari discussi sopra sono in accordo con i dati ottenuti dalla misura delle temperature di melting apparenti, che indicano chiaramente che le quadruplex modificate **T12** e **F12**, sono più stabili delle strutture formate dagli ODN omologhi (tabella 1). Nel caso di **F13**, i dati NMR e CD suggeriscono che la quadruplex che si forma, mostra filamenti paralleli e

adiacenti due a due, con un'alternanza di residui 5'-*syn-anti-syn-anti*-3', lungo il tratto di G, dando luogo a quattro tetradi *syn- syn-anti-anti*, in cui i monomeri modificati M e quelli di G adottano conformazioni glicosidiche *syn* e *anti*, rispettivamente. Questa disposizione dei filamenti implica una caratteristica peculiare: la presenza di due solchi simmetrici di ampiezza media, un solco stretto e uno largo; la larghezza dei solchi è determinata dall'orientazione dei filamenti e dalle conformazioni glicosidiche degli zuccheri.



F13

Fig. 63 Modelli molecolari di F13.

Nel nostro modello (**Fig. 63**), quattro gruppi metilici appartenenti ai residui modificati, si posizionano perfettamente all'interno del solco medio (due gruppi metilici per ogni solco), mentre i restanti quattro metili rimanenti si affacciano nel solco maggiore. Da notare che, questo arrangiamento strutturale non provoca nessuna particolare distorsione nel complesso a quadrupla elica che è simile alla struttura con loop diagonali della struttura mostrata dalla sequenza telomerica ripetuta di *Oxytricha* [d(G₄T₄G₄)]₂ in soluzione¹⁶.

4.3 *Discussione*

Sin dalla prima decade dopo la scoperta delle G-quadruplex, queste strutture sono state studiate con successo mediante l'introduzione di guanine modificate in sequenze di DNA, osservando le caratteristiche strutturali e la stabilità termodinamica. In questo contesto, la posizione C8 delle guanine è particolarmente favorevole, principalmente per due ragioni: 1) non produce nessun effetto sugli appaiamenti Watson-Crick e Hoogsteen, caratteristici delle tetradi di G; 2) un sostituito ingombrante in questa posizione sposta l'equilibrio in favore della conformazione glicosidica *syn*. Se da un lato, la sostituzione in una guanina *syn* con un analogo contenente un sostituito in posizione 8, ha dimostrato essere piuttosto stabilizzante nella struttura, dall'altro lato, la stessa sostituzione per una guanina *anti* diminuisce la stabilità, suggerendo così l'utilizzo di guanosine con sostituiti in posizioni 8 come sonde chimiche¹⁷. Una notevole eccezione per questo ruolo, è data dall'introduzione di guanine con sostituiti in posizione 8, in strutture quadruplex parallele, aventi, generalmente, contenente residui in conformazione glicosidica *anti*. Diversi autori hanno riportato che l'inserimento di 8-bromo-2'deossiguanosina¹⁸, 8-ammino-2'deossiguanosina¹⁹ o 8-metil-2'deossiguanosina³, al terminale 5' del tratto di G, in quadruplex tetramolecolari come $[d(TG_nT)_4]$ (dove $n = 3-5$), aumenta la stabilità termica e accelera le cinetiche di formazione dei complessi. Inoltre sono emersi risultati interessanti riguardanti le caratteristiche strutturali. Ad esempio, nelle strutture quadruplex $[d(TG_3T)_4]$ e $[d(TG_4T)_4]$, gli effetti dell'incorporazione di residui di 8-metil-2'deossiguanosina, sono dipendenti dalla sequenza³: la sostituzione della prima G canonica porta alla formazione di una tetrate all-*syn*, mai osservata prima in soluzione, mentre la sostituzione della seconda G della sequenza, non produce alcun effetto sulla conformazione glicosidica del residuo, che resta in *anti*, nonostante la presenza del sostituito che generalmente promuove la conformazione glicosidica *syn*.

Dato che è presente un unico studio riguardante l'introduzione di più di un residuo di guanosina sostituita in posizione 8 all'interno di strutture quadruplex parallele, abbiamo investigato l'abilità di formare complessi G-quadruplex, e le loro proprietà strutturali, di oligonucleotidi analoghi delle sequenze TG₃T e TG₄T, in cui due residui di G canonica sono stati sostituiti da due residui di 8-metil-2'-deossiguanosina (tabella 1).

I risultati ottenuti per gli ODN **T12** e **F12** confermano quelli ottenuti nel lavoro precedentemente presentato in questa tesi, e presente in letteratura, in cui un solo residuo di G canonica è sostituito con una 8-metil-2'-deossiguanosina^{2,3}; tali ODN adottano una struttura tetranolecolare a filamenti paralleli, caratterizzata dalla presenza di una tetrade modificata all-*syn* sovrapposta ad una tetrade modificata all-*anti*. Da notare che **F12** preferisce formare questa struttura inusuale, sebbene in linea di principio potrebbe adottare diverse orientazioni dei filamenti, in ognuno delle quali le G canoniche e i monomeri modificati potrebbero adottare conformazioni glicosidiche *anti* e *syn*, rispettivamente.

Il caso di **T13** è particolarmente interessante. Come già visto, esso adotta una struttura quadruplex parallela contenente due tetradi di G modificate all-*syn*. Al meglio delle nostre conoscenze, questa è la prima struttura quadruplex accertata, in cui il numero delle purine in conformazione glicosidica *syn* eccede quello dei residui in *anti*, sebbene questa struttura risulta quella meno stabile della serie.

Anche **F14** preferisce adottare una disposizione dei filamenti parallela.

I casi di **F13** e **F24** vale la pena discuterli insieme. Infatti, in entrambe le sequenze degli oligonucleotidi i residui canonici di G si alternano coi residui modificati M. In linea di principio, questi ODN sarebbero in grado di formare tutti i tipi di strutture G-quadruplex tetramolecolari, caratterizzate dalla presenza di residui di G canoniche e modificate, che adottano una conformazione glicosidica *anti* e *syn*, rispettivamente. Tuttavia, il loro comportamento sembra essere abbastanza differente. Difatti, **F24** forma una struttura G-quadruplex mai osservata in letteratura, in cui sono presenti tetradi di G all-*anti* e tetradi di

M all-*syn*, alternate. Al contrario, i dati NMR, CD e di modellistica molecolare suggeriscono fortemente che **F13** adotta un struttura principale caratterizzata da filamenti paralleli due a due (tipo A_2B_2)⁶ e da quattro tetradi *syn-syn-anti-anti*, in cui i monomeri di G adottano conformazione glicosidica *anti*, mentre quelli modificati M adottano una conformazione glicosidica *syn*. Tale arrangiamento dei filamenti è simile a quello osservato per la struttura quadruplex bimolecolare adottata in soluzione dalla sequenza telomeriche di *Tetrahymena* [d(TG₄TTG₄T)]²² e di *Oxytricia* [d(G₄T₄G₄)]¹⁶. E' da notare che tutte le strutture quadruplex antiparallele contenenti due o quattro tetradi sovrapposte descritte in letteratura [sia di tipo A_2B_2 che $(AB)_2$]⁶, caratterizzate dalla presenza di un residuo di tipo *syn* all'estremità 5'^{16,22-25,40}. Inoltre, tale caratteristica è presente anche in strutture quadruplex contenenti tre tetradi^{26-34,41}. Questo aspetto è stato sfruttato con successo nel *design* di nuove topologie di strutture G-quadruplex, tramite il controllo del folding attraverso la lunghezza dei loop.³⁵

La struttura G-quadruplex proposta per **F13** è in accordo con i dati presenti in letteratura per altre conformazioni a quadrupla elica antiparallele, in quanto il tratto di G parte con un residuo modificato M, che favorisce una conformazione glicosidica *syn*. Al meglio delle nostre conoscenze, questa è la prima struttura quadruplex antiparallela messa in evidenza da dati NMR e CD, sebbene altri autori hanno proposto la formazione di una struttura tetramolecolare di tipo A_2B_2 per la sequenza telomerica umana ripetuta d(TTAGGGTTAGGG), in tampone sodio³⁶.

Al contrario, sebbene la sequenza di **F24** è composta da un'alternanza di residui di G canonici e modificati, i filamenti adottano un arrangiamento parallelo. Questo dato potrebbe essere spiegato tenendo conto che il tratto di G di questo ODN non parte con un monomero modificato M, che generalmente promuove una conformazione glicosidica *syn*, come nel caso di **F13**, rendendo non particolarmente favorevole la formazione di un complesso antiparallelo.

I risultati descritti in questo lavoro, forniscono ulteriori informazioni sulle caratteristiche strutturali dei complessi a quadrupla elica, quali la relativa orientazione dei filamenti e la conformazione dell'angolo glicosidico, espandendo le conoscenze sui motivi strutturali delle G-quadruplex. In particolare è stata studiata la capacità di due residui di 8-metil-2'-deossiguanosina, introdotti in diverse posizioni del tratto di G, di orientare i filamenti paralleli nei complessi paralleli: gli ODN contenenti due residui modificati M, possono formare sia strutture parallele che antiparallele. La possibilità di introdurre all'interno del solco della quadruplex un gruppo metilico, come potenziale sito di interazione idrofobica, è di interesse nel campo di aptameri tetramolecolari con interesse farmacologico, come l'aptamero fosforotioato anti-HIV $[d(T_2G_4T_2)]_4$ ³⁷ e gli analoghi della sequenza $[d(GAGGT)]_4$ ², allo scopo di migliorare l'affinità e la specificità verso i loro target. Inoltre, alcune strutture esaminate in questo lavoro potrebbero essere considerate come buoni modelli per lo studio delle interazioni tra i composti che interagiscono con i solchi (*groove binder*) e le strutture quadruplex di interesse biologico³⁸.

4.4 Parte sperimentale

4.4.1 Sintesi e purificazione degli oligonucleotidi.

Il monomero modificato è stato sintetizzato secondo la procedura di Khoda *et al.*⁴², precedentemente riportata.

Gli oligonucleotidi modificati riportati in tabella 1 sono stati sintetizzati mediante l'utilizzo del sintetizzatore automatico Millipore Ciclone Plus DNA, sfruttando la chimica in fase solida dei β -cianoetilfosforamiditi su scala 15 μ mol. Gli oligomeri sintetizzati sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa di ammoniaca concentrata a 55°C per 12 ore. La miscela è stata quindi filtrata, lavata e successivamente concentrata a pressione ridotta. In seguito è stata ridisciolta in H₂O ed analizzata e purificata per HPLC su una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-

8/46). Per l'eluizione del campione è stato usato un gradiente lineare dei tamponi A e B (100%A; 0% B_0%A; 100%B) in 30 min. a temperatura ambiente ad un flusso di 1.0 ml/min. *Buffer A*: 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ in soluzione acquosa a pH7.0, contenente 20% (v/v) CH₃CN; *Buffer B*: 1 M KCl, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ in soluzione acquosa a pH 7.0, contenente 20% (v/v) CH₃CN. Le frazioni di uno stesso oligomero sono state raccolte e successivamente desalificate su colonne Sep-Pak (C18) mediante eluizione con H₂O e metanolo. Tutti gli oligomeri sono risultati puri all'NMR più del 98%.

4.4.2 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione approssimativa di 3.0 mM in 0.6 ml (H₂O/D₂O 9:1 v/v) di una soluzione tampone a pH7, 10 mM di KH₂PO₄/K₂HPO₄, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA. Tutti i campioni sono stati riscaldati per 5-10 minuti a 80°C e lentamente raffreddati a temperatura ambiente per circa 10-12 ore. I campioni vengono lasciati all'equilibrio per circa quattro settimane e gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H₂O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti DPGSE⁴³ per la soppressione del segnale dell'acqua. Per essere certi che il processo di annealing sia completo, vengono effettuati esperimenti in tempi diversi e si verifica la sovrapposizione degli spettri risultanti. Per gli esperimenti in D₂O, l'H₂O è stata sostituita con D₂O per essiccamento del campione, liofilizzazione e ridissoluzione in D₂O pura. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shifts* dei protoni (¹H). E' stata usata la sequenza di gradienti DPGSE per acquisire gli spettri NOESY⁴⁴ con *mixing times* di 80 e 180 ms (T=25°C), per quelli in H₂O per la soppressione del segnale del solvente. Gli spettri TOCSY⁴⁵ sono stati registrati in D₂O con *mixing times* di 120 ms. Gli esperimenti NOESY e TOCSY sono stati registrati usando la procedura STATES-TPPI⁴⁶. In tutti gli esperimenti

2D i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t_2 e 400-512 FID nella dimensione t_1 . Il tempo di rilassamento è stato settato ad 1.2 s per tutti gli esperimenti.

4.4.3 Dicroismo Circolare(CD)

Gli esperimenti di dicroismo circolare degli oligonucleotidi modificati e della loro controparte naturale, sono stati effettuati ad una concentrazione di $1,0 \times 10^{-4}$ M in una soluzione acquosa tamponata a pH 7,0 di KH_2PO_4 10 mM, KCl 70 mM, EDTA 0,2 mM (NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 70 mM, EDTA 0,2 mM), impiegando delle cuvette a quarzo, con un cammino ottico della lunghezza di 1 cm, utilizzando uno spettrofotometro CD Jasco. La variazione di assorbanza è stata registrata nel range di lunghezza d'onda tra 320- 220 nm a 20°C. I campioni CD-melting sono preparati a concentrazione 1×10^{-4} M usando gli stessi buffer in potassio utilizzati per preparare i campioni NMR (10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0) e i corrispettivi in buffer sodio (10 mM NaH_2PO_4 , 70 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0).Gli spettri delle curve di melting sono registrati utilizzando lo spettrofotometro Jasco 715 CD, utilizzando cuvette con un cammino ottico di 0.1 centimetro, con un controllo termico della celletta di alloggio della cuvetta (Jasco PTC-348). Le curve CD melting sono alla lunghezza d'onda in cui si registra l'effetto cotton massimo per tutte le quadruplex e un variazione di temperatura di 10°C h^{-1} .

4.4.4 Elettroforesi su gel

Gli oligonucleotidi modificati sono stati analizzati mediante gel di poliacrilammide non denaturante (PAGE). I campioni, sciolti nel *buffer* NMR (10 mM KH_2PO_4 , 70 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.0), vengono caricati sul gel contenente il 20% di poliacrilammide, TBE (Tris-Acido borico-EDTA) 2.5x 50mM KCl. La corsa viene effettuata in tampone

TBE 1x, contenente KCl 100mM. I campioni a singolo filamento sono preparati mediante denaturazione con LiOH. Per tutti i campioni è aggiunta una soluzione di glicerolo/TBE 1 x 100mM KCl 2:1 prima del caricamento. La corsa elettroforetica viene effettuata a 9.2V/cm ad una temperatura di 5°C. Le bande sono visualizzate mediante lampada UV.

4.4.5 Molecular Modelling

Le principali caratteristiche conformazioni delle quadruplex **F12**, **F14**, **F13**, **T12**, **T13**, sono state esplorate mediante studi di modellistica molecolare. È stato utilizzato il campo di forza AMBER usando il set di parametri di AMBER 99⁴⁷. In tutti i casi, con l'eccezione di **T13**, per i modelli iniziali delle quadruplex [d(TGGGGT)]₄ e [d(TGGGT)]₄ sono state ricavate dalla struttura NMR in soluzione della quadruplex [d(TTGGGGT)]₄ (*Protein data bank entry number* 139D), scegliendo in maniera casuale una delle quattro strutture disponibili. Il modello iniziale della G-quadruplex [d(TGGGGT)]₄ è stato costruito eliminando il secondo residuo timidinico in ognuno dei quattro filamenti d(TTGGGGT). Il modello del [d(TGGGT)]₄ è stato costruito partendo dal modello [d(TGGGGT)]₄, rimuovendo il residuo di timina al terminale 3' e sostituendo il monomero terminale di 8-metil-2'-deossiguanosina con uno di timina. Le strutture quadruplex complete sono state costruite usando il programma di costruzione delle molecole Biopolymer building tool di Discover eliminando, due monomeri di G canonica per volta e sostituendoli con due di 8-metil-2'-deossiguanosina per ogni modello. In accordo con i dati NMR, i monomeri modificati sono stati posizionati in conformazione glicosidica *syn* per M2 e in *anti* per M3, sia per i modelli di **T12** che di **F12**. per i casi di **T13**, **F14** e **F24**, tutti i residui modificati si dispongono in conformazione glicosidica *syn*. Per quanto concerne **F13**, le coordinate iniziali per la costruzione del modello iniziale, sono state prese dalla struttura NMR in soluzione della quadruplex [d(GGGGTTTTGGGG)]₂ (*Protein data bank entry number* 156D), eliminando due residui centrali di timina presenti nel loop per entrambi i filamenti

d(GGGGTTTTGGGG) e aggiungendo residui di timina alle estremità che mostrano residui di 2'-deossiguanosina liberi, è stata ottenuta una struttura quadruplex antiparallela [d(TGGGGT)]₄. La struttura quadruplex completa è stata realizzata usando il programma di costruzione delle molecole Biopolymer building tool di Discover eliminando, due monomeri di G canonica per volta e sostituendoli con due di 8-metil-2'-deossiguanosina per ogni modello. In accordo con i dati NMR, nel modello di **F13** i residui di 8-metil-2'-deossiguanosina M2, M4, M8 e M10 sono stati posizionati in conformazione *syn*. Per compensare parzialmente la mancanza del solvente usato, i calcoli sono stati eseguiti usando una costante dielettrica macroscopica dipendente dalla distanza di 4r, e un *cut off* infinito per interazioni di non-legame⁴⁸. Usando il metodo “*steepest descent*” seguito da quello quasi-Newton-Raphson (VA09A), l'energia conformazionale di ogni complesso è stata minimizzata fino a raggiungere una convergenza a un gradiente RMS di 0,1Kcal/mol Å. Le figure delle strutture sono state elaborate usando il programma INSIGHT II, versione 2005. Tutti i calcoli sono stati eseguiti su un PC con Linux ES 2.6.9.

Bibliografia

1. Feigon, J., Koshlap, K. M. and Smith, F. W. *Meth. Enzymol.*, **1995**, 261, 225–255.
2. Virgilio, A., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L. and Galeone, A. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 6188–6195.
3. Thao Tran, P.L., Virgilio, A., Esposito, V., Citarella, G., Mergny, J.-L. and Galeone, A. *Biochimie*, **2011**, 93, 399–408.
4. Smith, F.W. and Feigon, J. *Nature*, **1992**, 356, 164–167.
5. Sugiyama, H., Kawai, K., Matsunaga, A., Fujimoto, K., Saito, I., Robinson, H. and Wang, A.H.-J. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 1272–1278.
6. Esposito, V., Galeone, A., Mayol, L., Oliviero, G., Virgilio, A. and Randazzo, L. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2007**, 26, 1155–1159.
7. Masiero, S., Trotta, R., Pieraccini, S., De Tito, S., Perone, R., Randazzo, A. and Spada, G.P. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 2683–2692.
8. Esposito, V., Randazzo, A., Piccialli, G., Petraccone, L., Giancola, C. and Mayol, L. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 313–318.
9. Scaria, P.C., Shire, S.J. and Shafer, R.H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10336–10340.
10. Smith, F.W., Lau, F.W. and Feigon, J. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 10546–10550.
11. Keniry, M.A., Strahan, G.D., Owen, E.A. and Shafer, R.H. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, 631–643.
12. Kypr, J., Kejnovska, I., Renciuik, D. and Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 1713–1725.
13. Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L., Nasti, L., Barone, G. and Giancola, C. *Biochemistry*, **2004**, 43, 4877–4884.

14. Esposito, V., Virgilio, A., Randazzo, A., Galeone, A. and Mayol, L. *Chem. Commun.*, **2005**, 31, 3953–3955.
15. Mergny, J.L., De Cian, A., Ghelab, A., Sacca', B. and Lacroix, L. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 81-94.
16. Smith, F.W. and Feigon, J. *Biochemistry*, **1993**, 32, 8682–8692.
17. Dias, E., Battiste, J.L. and Williamson, J.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 4479–4480.
18. Gros, J., Rosu, F., Amrane, S., De Cian, A., Gabelica, V., Lacroix, L. and Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 3064–3075.
19. Gros, J., Avino, A., Lopez de la Osa, J., Gonzalez, C., Lacroix, L., Perez, A., Orozco, M., Eritja, R. and Mergny, J.-L. *Chem. Commun.*, **2008**, 25, 2926–2928.
20. Petraccone, L., Duro, I., Randazzo, A., Virno, A., Mayol, L. and Giancola, C. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2007**, 26, 669–674.
21. Cang, X., Sponer, J. and Cheatham, T.E. III *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 4499–4512.
22. Phan, A.T., Modi, Y.S. and Patel, D.J. *J. Mol. Biol.*, **2004**, 338, 93–102.
23. Wang, K.Y., McCurdy, S., Shea, R.G., Swaminathan, S. and Bolton, P.H. *Biochemistry*, **1993**, 32, 1899–1904.
24. Amrane, S., Ang, R.W., Tan, Z.M., Li, C., Lim, J.K., Lim, J.M., Lim, K.W. and Phan, A.T. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, 931-938.
25. Lim, K.W., Amrane, S., Bouaziz, S., Xu, W., Mu, Y., Patel, D.J., Luu, K.N. and Phan, A.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 4301–4309.
26. Phan, A.T. and Patel, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 125, 15021–15027.
27. Zhang, N., Phan, A.T. and Patel, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 127, 17277–17285.
28. Xu, Y., Noguchi, Y. and Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 5584–5591.

29. Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R.A. and Yang, D. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 2723-2735.
30. Phan, A.T., Luu, K.N. and Patel, D.J. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 5715-5719.
31. Luu, K.N., Phan, A.T., Kuryavyi, V., Lacroix, L. and Patel, D.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9963–9970.
32. Dai, J., Punchihewa, C., Ambrus, A., Chen, D., Jones, R.A. and Yang, D. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 2240-2250.
33. Dai, J., Carver, M., Punchihewa, C., Jones, R.A. and Yang, D. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 4927-4940.
34. Phan, A.T., Kuryavyi, V., Luu, K.N. and Patel, D.J. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 6517-6525.
35. Webba da Silva, M., Trajkovski, M., Sannohe, Y., Ma'ani, H.N., Sugiyama, H. and Plavec, J. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, 48, 9167–9170.
36. Kaushik, M., Bansal, A., Saxena, S. and Kukreti, S. *Biochemistry*, **2007**, 46, 7119–7131.
37. Wyatt, J.R., Vickers, T.A., Roberson, J.L., Buckheit, R.W. Jr, Klimkait, T., DeBaets, E., Davis, P.W., Rayner, B., Imbach, J.L. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 1356–1360.
38. Martino, L., Virno, A., Pagano, B., Virgilio, A., Di Micco, S., Galeone, A., Giancola, C., Bifulco, G., Mayol, L. and Randazzo, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 16048–16056.
39. Xu, Y., Ikeda, R. and Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13519–13524.
40. Hu, L., Lim, K.W., Bouaziz, S. and Phan, A.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 16824–16831.
41. Matsugami, A., Xu, Y., Noguchi, Y., Sugiyama, H. and Katahira, M. *FEBS J.* **2007**, 274, 3545-3556.

42. Kohda, K., Tsunomoto, H., Minoura, Y., Tanabe, K. and Shibutani, S. *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 1278-1284.
43. Dalvit, C. *J. Biomol. NMR*, **1998**, 11, 437-444.
44. Jeener, J., Meier, B., Bachmann, H.P. and Ernst, R.R. *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.
45. Braunschweiler, L. and Ernst, R.R. *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528.
46. Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, A. *J. Magn. Reson.*, **1989**, 85, 393-399.
47. Cornell, W.D., Cieplack, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W. and Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5179-5197.
48. Xu, Y. and Sugiyama, H. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 949-954.

Modifiche a livello del backbone

Capitolo 5: Sintesi e analisi strutturale di oligonucleotidi eterochirali formanti quadruplex

5.1 Introduzione

Gli oligodeossiribonucleotidi (ODN) eterochirali sono formati sia da L-nucleotidi (naturali) sia da D-nucleotidi (non naturali). (Fig.64)

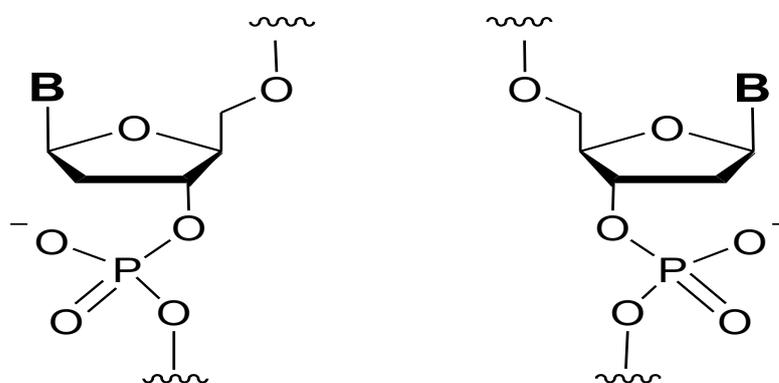


Fig. 64 Struttura di un D-nucleotide (dx) e di un L-nucleotide (sx)

Tali ODN sono stati ampiamente studiati per la loro capacità di formare strutture duplex eterochirali¹⁻⁵ particolarmente resistenti all'attacco delle nucleasi³⁻⁵, in vista di potenziali applicazioni nella strategia antisense.

Inoltre gli ODN eterochirali mostrano interessanti proprietà strutturali, che dipendono dal contesto della sequenza in cui sono inseriti. In particolare, il decanucleotide modificato $d({}^mC_1G_2{}^mC_3G_4C_5L G_6L {}^mC_7G_8{}^mC_9G_{10})$ (in cui mC =5-metil-2'-deossicitosina, C_L =L-deossicitosina e G_L =L-deossiguanosina) forma una doppia elica completamente destrorsa di tipo B⁶ in cui il nucleo centrale (C_LpG_L), che consta di residui L, si organizza in un atipico Z-DNA destrorso.

È interessante notare che gli stessi residui centrali C_LG_L nel decanucleotide d(C₁^mG₂C₃G₄C₅L G₆L C₇G₈C₉G₁₀) (in cui ^mG=8-metil-2'-deossiguanosina) sono in grado di promuovere, in condizioni saline fisiologiche, un duplex completamente sinistrorso, in cui i nucleotidi D (residui 1-4 e 7-10) assumono la tipica conformazione sinistrorsa del Z-DNA, mentre i residui centrali L adottano un'inusuale conformazione di tipo B sinistrorsa⁷. Interessanti applicazioni tecnologiche sono state basate sugli oligonucleotidi D/L. Per esempio, una regione a L-DNA, in un D/L-DNA, potrebbe essere utilizzata come etichetta per consentire il rilevamento di L-DNA prodotti da PCR, mediante l'utilizzo di tecniche quali la *surface plasmon resonance imaging*.^{8,9}

In un'altra applicazione la conformazione sinistrorsa dell'elica del L-DNA è stata utilizzata per analizzare differenti tipi di marker su piattaforme universali di *microarray*.¹⁰ Infine, l'introduzione di una struttura a L-DNA-stem in una struttura hairpin di acidi nucleici risulta ottimale nella preparazione di *molecular beacon* dotati di strutture superiori con maggiore stabilità e selettività.¹¹

Sebbene gli ODN eterochirali mostrino interessanti proprietà strutturali e notevoli potenzialità applicative, data la loro resistenza all'attacco delle nucleasi, tuttavia non è stata ancora verificata la loro capacità di formare strutture quadruplex, nonostante la notevole importanza di tali conformazioni secondarie del DNA in diversi campi, quali la chimica strutturale, la biologia molecolare e la chimica analitica.¹²

Pertanto, è stato intrapreso uno studio sistematico concernente le caratteristiche strutturali di una serie di ODN, potenzialmente in grado di formare strutture quadruplex, contenenti, oltre ai canonici residui nucleotidici di tipo D, residui di tipo L.

La caratterizzazione strutturale degli oligonucleotidi modificati sintetizzati è stata effettuata fondamentalmente mediante l'impiego di tecniche spettroscopiche, quali Risonanza Magnetica Nucleare e Dicroismo Circolare.

5.2 Risultati e discussioni

È stata scelta come sequenza di riferimento l'oligonucleotide d(TGGGGT), capace di organizzarsi in una struttura quadruplex tetramolecolare destrorsa a filamenti paralleli estremamente stabile ed ampiamente caratterizzata.¹³

Sebbene tale sequenza sia più corta della maggior parte delle sequenze di importanza biologica in grado di formare strutture quadruplex, sulla base della sua composizione e tenendo conto di tutte le possibili combinazioni, si possono in linea di principio generare 64 sequenze eterochirali, pari a 32 coppie di enantiomeri.

Secondo i principi di chiralità, ogni oligonucleotide eterochirale avrà lo stesso comportamento del suo enantiomero in un ambiente chimico achirale e mostrerà un profilo CD ad esso speculare. In tale lavoro di tesi sono riportati i risultati preliminari ottenuti dall'analisi strutturale degli ODN riportati nella **Tabella 1**.

Sequenza (5'-3')	Nome	T _{1/2} °C	Sequenza (5'-3')	Nome	T _{1/2} °C
TGGGGT	all D	>90	TGGGGT	L5	N.D.
TGGGGT	all L	>90	TGGGGT	L6	>90
TGGGGT	L123	70	TGGGGT	L34	>90
TGGGGT	L456	70	TGGGGT	L45	74
TGGGGT	L4	78	TGGGGT	L56	84

Tabella 1. Nomi, sequenze e temperature di fusione degli ODN studiati. I residui L sono riportati in grassetto

Gli ODN **all D** e **all L** sono omochirali, essendo costituiti rispettivamente da tutti residui o di tipo D o di tipo L. In **L123** ed **L456**, invece, solo metà della sequenza è composta da residui L, rispettivamente all'estremità 5' o 3'. **L4**, **L5**, **L6** sono stati sintetizzati introducendo un solo residuo L in posizioni diverse partendo dall'estremità 3', mentre **L34**,

L45 ed **L56** contengono ciascuno due residui L adiacenti in posizioni differenti all'estremità 3'.

5.2.1 Dicroismo Circolare

Siccome l'ODN omochirale **all D** forma una quadruplex canonica destrorsa, il suo enantiometro **all L** formerà una quadruplex sinistrorsa. Pertanto, gli spettri CD di questi ODN (**Fig.65**) possono essere presi come riferimento per studiare le caratteristiche degli ODN eterochirali oggetto della nostra ricerca.

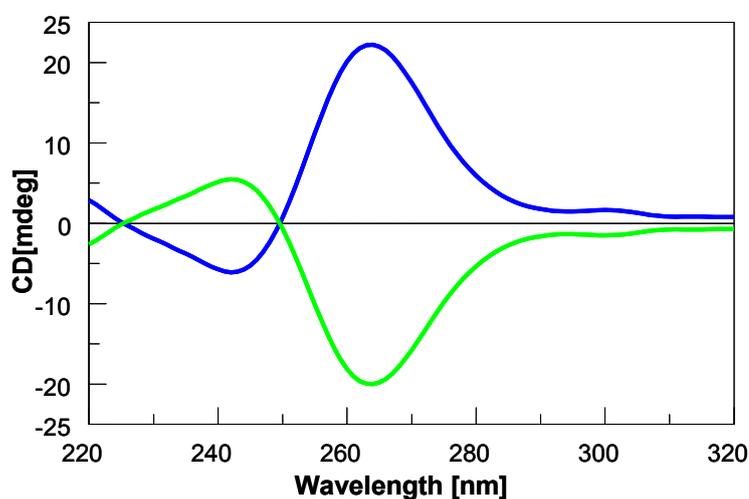


Fig. 65 Spettri CD degli ODN all D (blu) e all L (verde) a 20°C

Gli spettri CD degli ODN **L123** ed **L456** sono tipici di una coppia enantiomerica. Inoltre, il massimo (**L123**) e il minimo (**L456**) a 265 nm sono indicativi del fatto che **L123** forma una quadruplex parallela destrorsa, mentre **L456** forma una quadruplex parallela sinistrorsa (**Fig.66**)

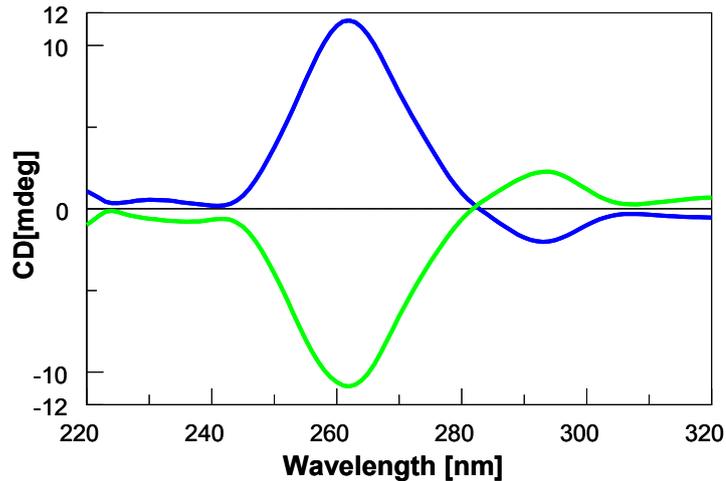


Fig. 66 Spettri CD degli ODN L123 (blu) e L345 (verde) a 20° C

Tale dato sperimentale suggerisce che l'elicità della struttura è fortemente influenzata dal tipo di nucleotidi presenti all'estremità 3'. Pertanto allo scopo di valutare il numero di monomeri modificati necessario a modulare l'elicità della struttura sono stati sintetizzati gli ODN **L4**, **L5**, **L6**, in cui sono stati sostituiti, uno per volta, monomeri L al posto di canonici monomeri D nel terminale 3'.

I relativi profili CD presentano un massimo a 265nm caratteristico di strutture quadruplex tetramolecolari parallele destrorse (**Fig. 67**); tuttavia la presenza in **L4** di un ulteriore picco con un massimo a 295nm sembra indicare la presenza di più strutture in soluzione. Da questi dati si desume che la presenza di un solo L-nucleotide verso il terminale 3' o all'interno del run di G, non è in grado di modificare il verso dell'avvolgimento dell'elica naturale di una struttura quadruplex.

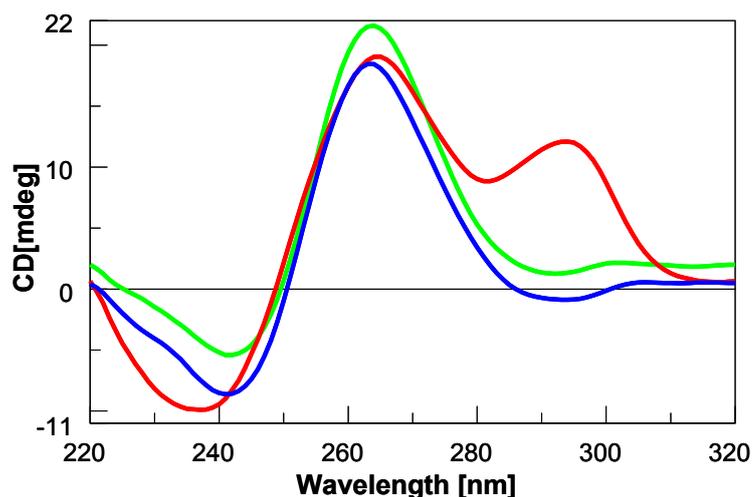


Fig. 67 Spettri CD degli ODN L4 (rosso), L5 (verde) e L6 (blu) a 20°C

Il passo successivo è stato quindi quello di sintetizzare ed analizzare gli ODN **L34**, **L45**, e **L56**, in cui sono stati inseriti in posizioni adiacenti due L-nucleotidi all'interno del run di G e verso il terminale 3'. I relativi profili CD sono mostrati in figura 68.

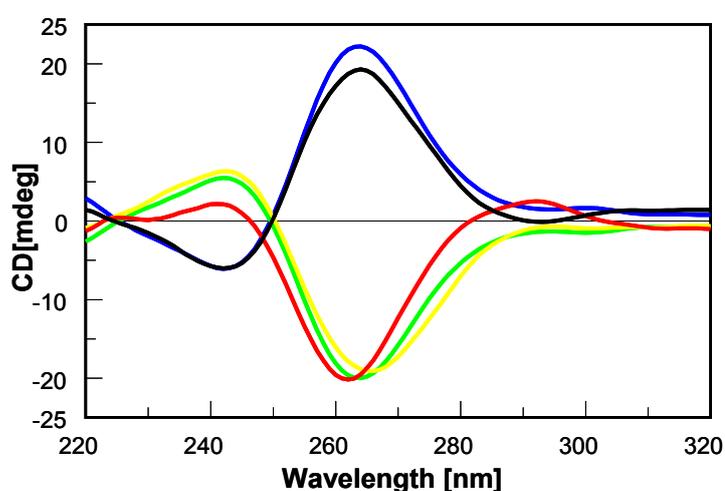


Fig. 68 Spettri CD degli ODN all D (blu), all L (verde), L34 (giallo), L45 (rosso) e L56 (nero)

L56 mostra un profilo dicrico sovrapponibile all'analogo naturale **all-D**, indicativo di una struttura elicoidale destrorsa. **L34** e **L45**, presentano invece profili paragonabili all'analogo **all-L**, caratterizzati da un massimo a 243 e un minimo a 263nm, tipico di quadruplex a filamenti paralleli sinistrorse.

Tale dato conferma il ruolo cruciale del terminale 3' nell'influenzare l'elicità dell'elica e, in particolare, suggerisce un ruolo ancora più importante della parte centrale del run di G.

5.2.2 Risonanza Magnetica Nucleare

Per confermare la capacità degli ODN analizzati di formare strutture quadruplex, sono stati effettuati esperimenti NMR a diverse temperature.

La maggior parte degli ODN eterochirali, negli spettri NMR monodimensionali a 25°C, presentano diversi segnali nella regione fra 10.5-12.0 ppm, diagnostica dei protoni immidici.

In tale regione spettrale mostri un sovraffollamento di segnali, anche sovrapposti tra loro, ciò è comunque indicativo della presenza di strutture quadruplex per tutti gli ODN (**Fig. 69**)

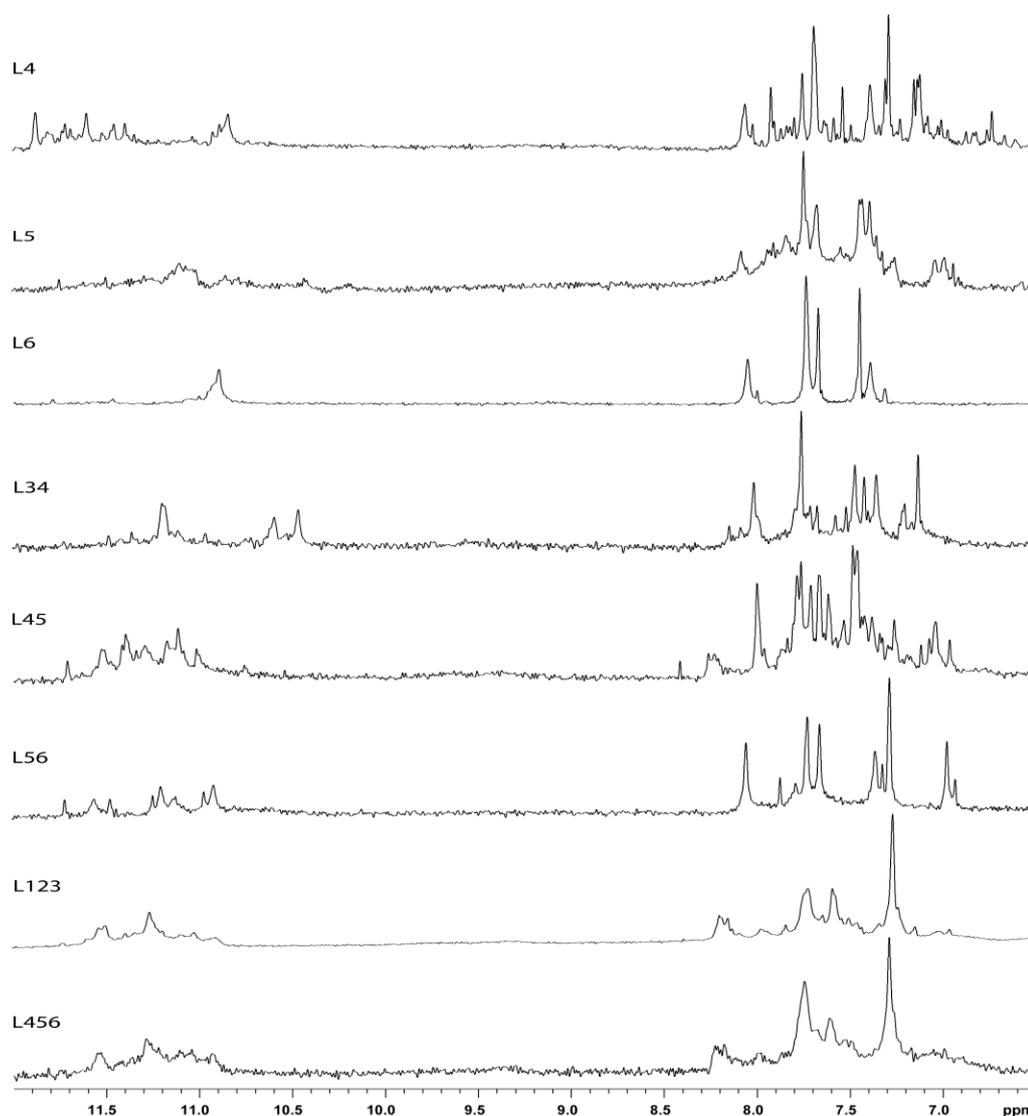


Fig. 69 Spettri ¹H-NMR degli ODN eterochirali sintetizzati (500 MHz, T= 25°C)

Inoltre, per la maggior parte degli ODN eterochirali, un incremento della temperatura si traduce in una semplificazione dello spettro ¹H-NMR. In particolare, gli spettri ¹H-NMR degli ODN **L123**, **L6**, **L45** e **L56**, a temperature che variano dai 50° ai 70° C, mostrano quattro segnali principali nella regione dei protoni immidici e di sei segnali principali nella regione dei protoni aromatici, suggerendo così la presenza di strutture quadruplex a simmetria quaternaria (**Fig.70**).

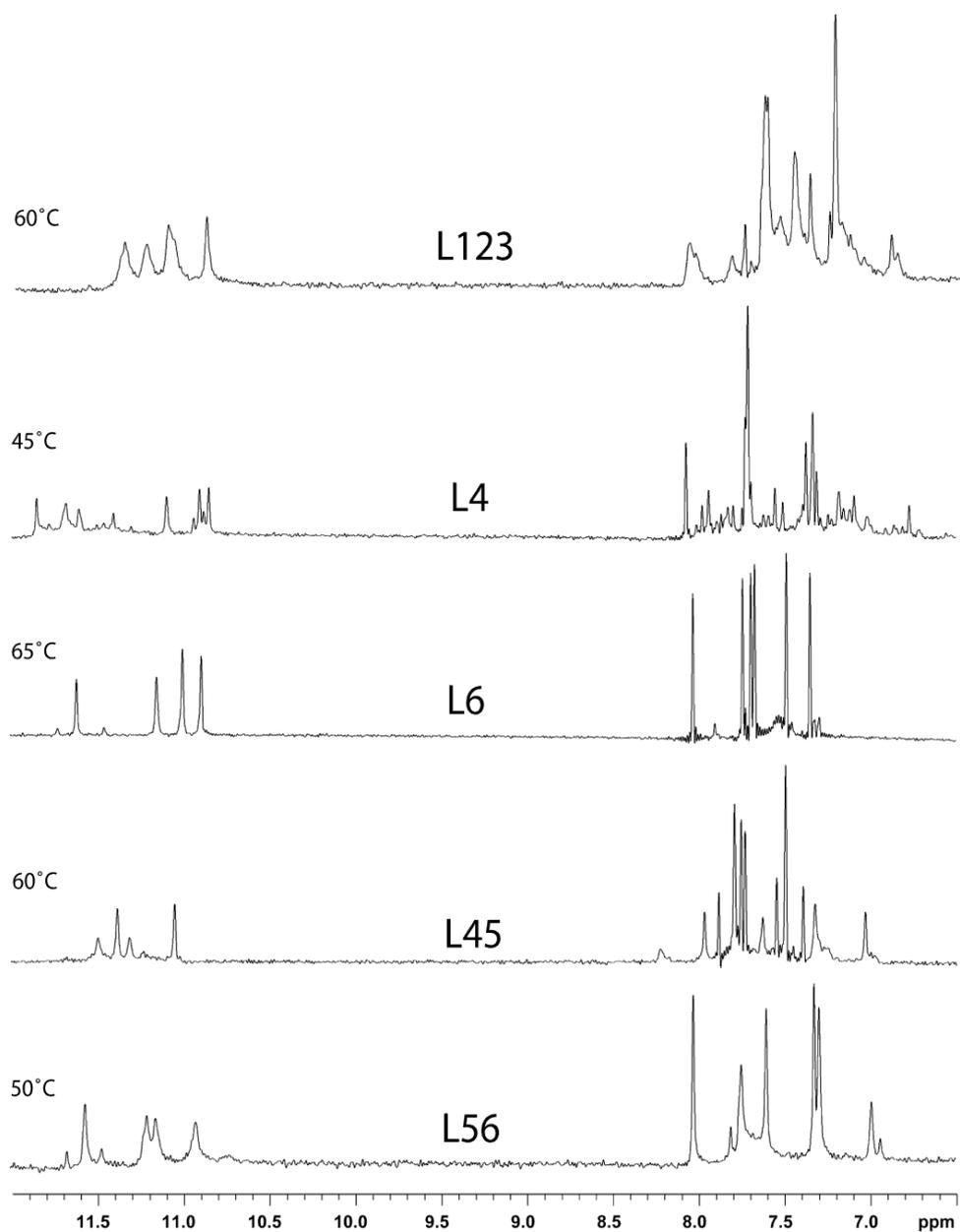


Fig. 70 Spettri $^1\text{H-NMR}$ degli ODN eterochirali sintetizzati acquisiti a varie temperature

Inoltre, al fine di ottenere relative alla informazioni sulla stabilità termica, i nostri ODN(in tampone K^+) sono stati sottoposti ad esperimenti CD melting. I risultati sono riportati nella tabella 1. Tutte le quadruplex eterochirali sembrano essere abbastanza stabili per essere sottoposte in futuro ad ulteriori indagini strutturali ad alta temperatura, sebbene quasi tutte mostrino una temperatura di fusione più bassa rispetto alla controparte naturale [d(TGGGGT) $_4$].

Benchè il profilo NMR a differenti temperature di diversi ODN si sia rivelato interessante, la nostra attenzione si è focalizzata sull'ODN **L34**. Quest'ultimo mostra, infatti, un profilo CD che suggerisce fortemente la presenza di una quadruplex sinistrorsa, inaspettata per un ODN eterochirale composto per lo più da residui D ed uno spettro ^1H -NMR ben risolto a temperature più basse rispetto agli altri ODN.

Altro aspetto interessante di **L34** è l'andamento dello spettro protonico, che si osserva incrementando la temperatura. Infatti, lo spettro ^1H -NMR per temperature fino a 40°C mostra chiaramente un singolo set di segnali di protoni imminici e aromatici nella regione da 7 a 12 ppm, indicativa della presenza di un singolo tipo di quadruplex a simmetria quaternaria. Tuttavia, quando la temperatura supera i 40°C , si ha un progressivo spostamento dei segnali di questa specie e, in contemporanea, compare un nuovo set di segnali che indica la formazione di una nuova quadruplex a simmetria quaternaria in equilibrio con la precedente.

A circa 70°C , è evidente solo la seconda serie di segnali, anche se in queste condizioni nella regione aromatica compaiono anche i segnali appartenenti alla specie non strutturata, indicativi di una parziale fusione della quadruplex (**Fig. 71**).

L34

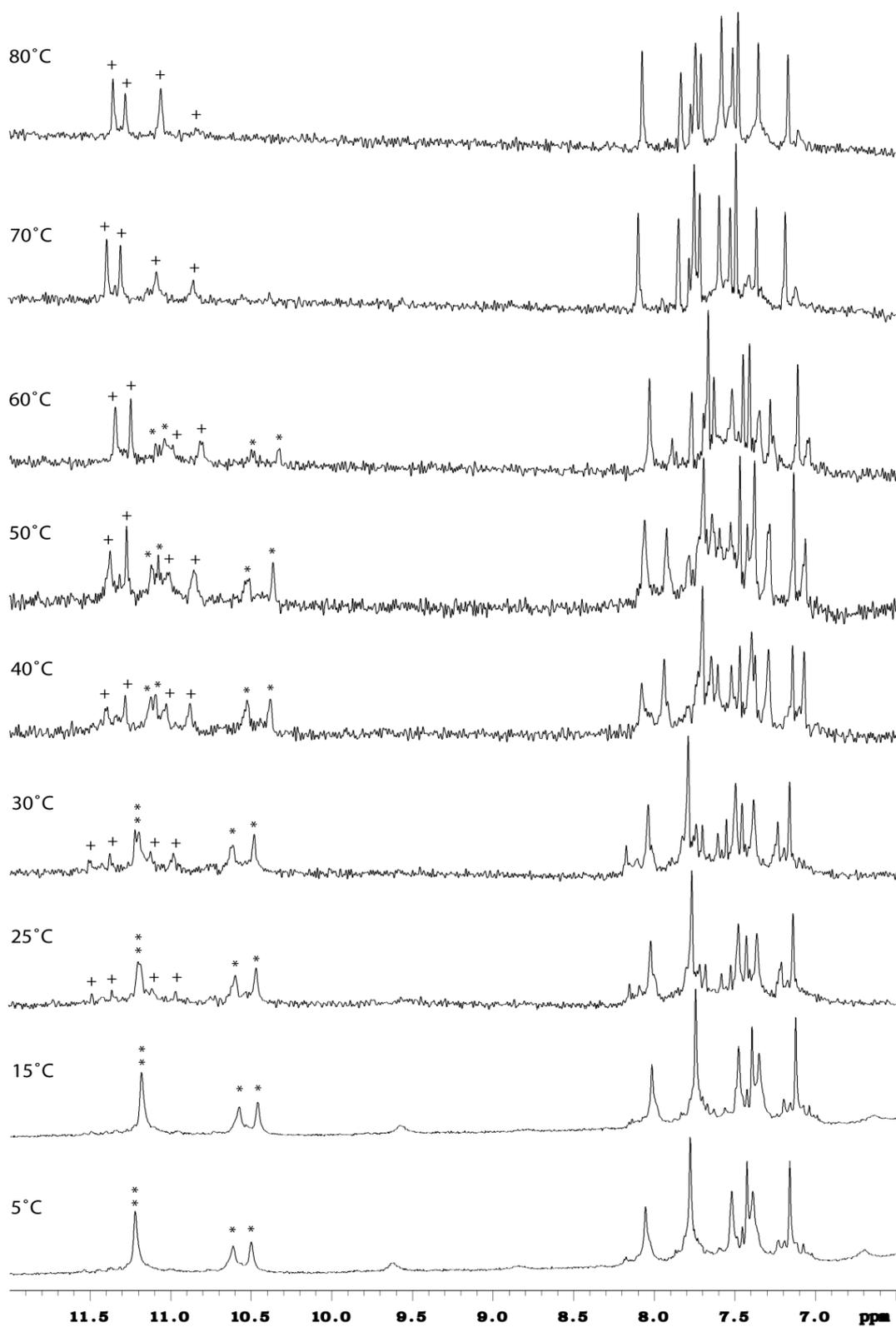


Fig. 71 Spettri $^1\text{H-NMR}$ di L34 a diverse temperature. Con (*) sono indicati i segnali appartenenti alla specie presente a bassa temperatura e con (+) sono indicati quelli della specie maggiormente rappresentata ad alta temperatura

Dal confronto tra gli spettri CD di **L34** a 5 e 70°C si evince chiaramente la presenza in entrambi i casi di una struttura quadruplex sinistrorsa, essendo tali spettri estremamente simili (**Fig. 72**).

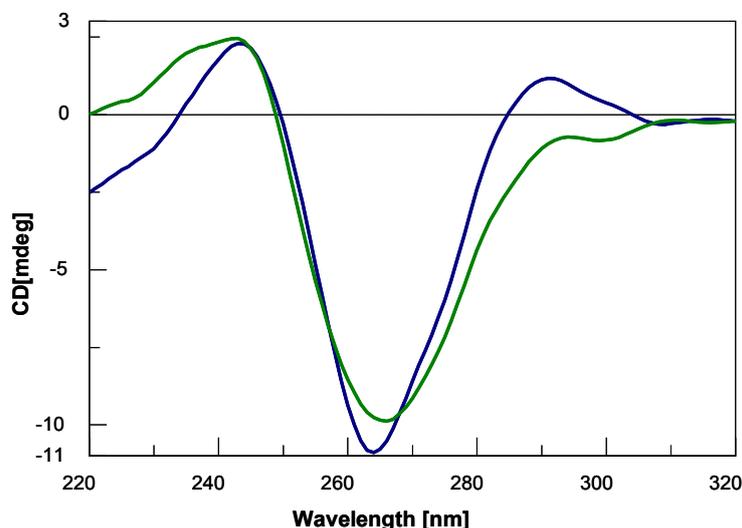


Fig. 72 Spettri CD di L34 a 5 °C (verde) e a 70 °C (blu)

Per stabilire più in dettaglio gli aspetti della struttura quadruplex sinistrorsa adottata dall'ODN **L34**, sono stati effettuati esperimenti NMR bidimensionali (2D-NOESY e 2D-TOCSY) a bassa temperatura. I risultati ottenuti ci hanno permesso di assegnare completamente le frequenze di risonanza dei protoni delle singole specie presenti in soluzione (**Tabella 2**).

L34 d(T₁G₂G^L₃G^L₄G₅T₆)									
	H8/H6	H1'	H2'/H2''	H3'	H4'	H5'/H5''	CH ₃	NH1	NH ₂ -2
T ₁	7.20	5.83	1.89/2.25	4.56	3.81	3.30/3.21	1.43	-	-
G ₂	7.46	6.14	2.77/2.85	5.23	4.53	4.25/4.07	-	11.25	n.a.
G ^L ₃	8.09	6.08	2.78/3.02	5.09	4.53	4.23/4.06	-	11.25	n.a.
G ^L ₄	7.55	5.77	2.53/3.01	5.11	4.95	4.38/4.25	-	10.66	9.63/8.89
G ₅	7.42	6.42	2.13/3.02	5.02	4.75	4.41/4.27	-	10.53	8.91
T ₆	7.81	6.36	2.40/2.46	4.73	4.64	4.26/4.15	2.02	-	-

Tabella 2. Chemical shift dei protoni della quadruplex sinistrorsa formata dall'ODN L34 in 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA (pH 7.0, T = 5°C). n.a.=non assegnato

I picchi di correlazione NOE osservati tra i protoni G-H8 e T-H6 con i protoni H1', H2' ed H2'' dello stesso residuo e con i protoni H1', H2' ed H2'' del residuo precedente dal lato 5', sono tipici di un avvolgimento elicoidale in quadruplex.

Tuttavia, sono emerse differenze significative rispetto ad altre strutture quadruplex a filamenti paralleli, come ad esempio quella canonica [d(TG₄T)₄]. In primo luogo, il pattern di connettività NOE è interrotto a livello dei residui G5-T6, inoltre i protoni H1' di G5, H1' di T6 e H6 di T6 mostrano inusuali valori di *chemical shifts*, spostati a campi più bassi rispetto ai protoni corrispondenti degli altri residui, che invece mostrano i valori tipici riscontrati in analoghe strutture quadruplex¹³.

Da notare ancora che, mentre per la maggior parte dei residui mancano i contatti tra i protoni aromatici H8 di ciascun residuo con il residuo, che precede nella sequenza (NOE G_nH8/G_{n-1}H8), il contatto NOE tra i due residui di tipo L inseriti nel *core* della struttura (H8G3-H8G4) è chiaramente evidente (**Fig. 73**).

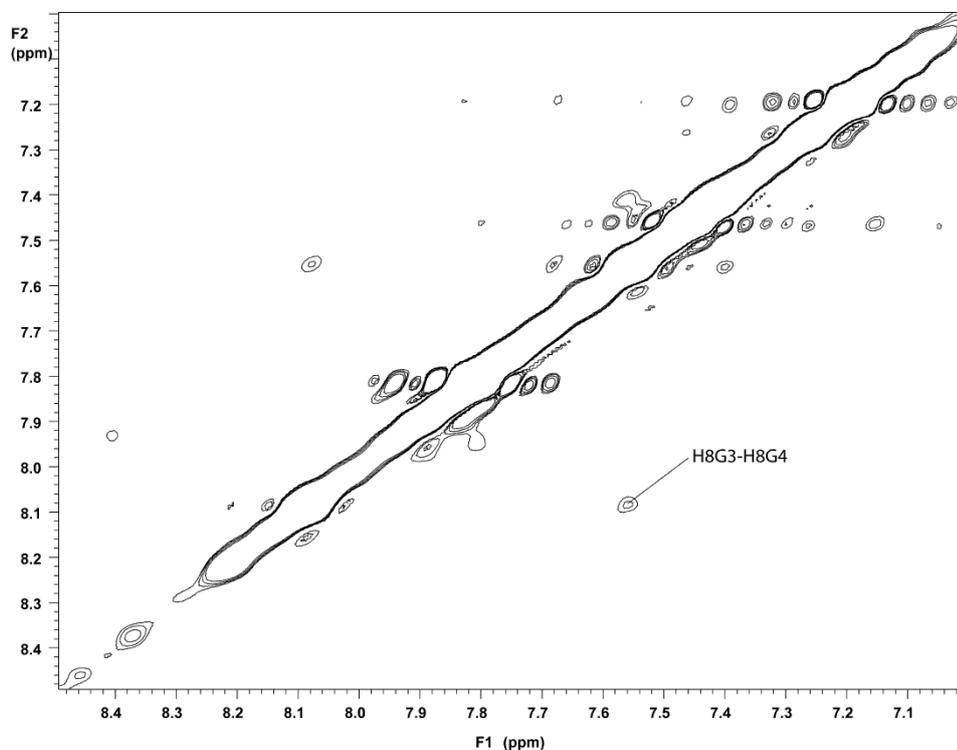


Fig. 73 Regione espansa dello spettro NOESY di L34 a 5 °C

In ultimo si è osservato che i residui G2 formano una tetraide completamente *syn*, come indicato dalla presenza di un intenso picco di correlazione NOE *intra*-residuo tra G2H8 e G2H1' a fronte di un debole picco NOE G2H8-G2H2'/H2'' (Fig.74).

La vicinanza spaziale dei protoni H8/H1' nell'ambito del medesimo residuo è compatibile, infatti, con una conformazione glicosidica di tipo *syn*.

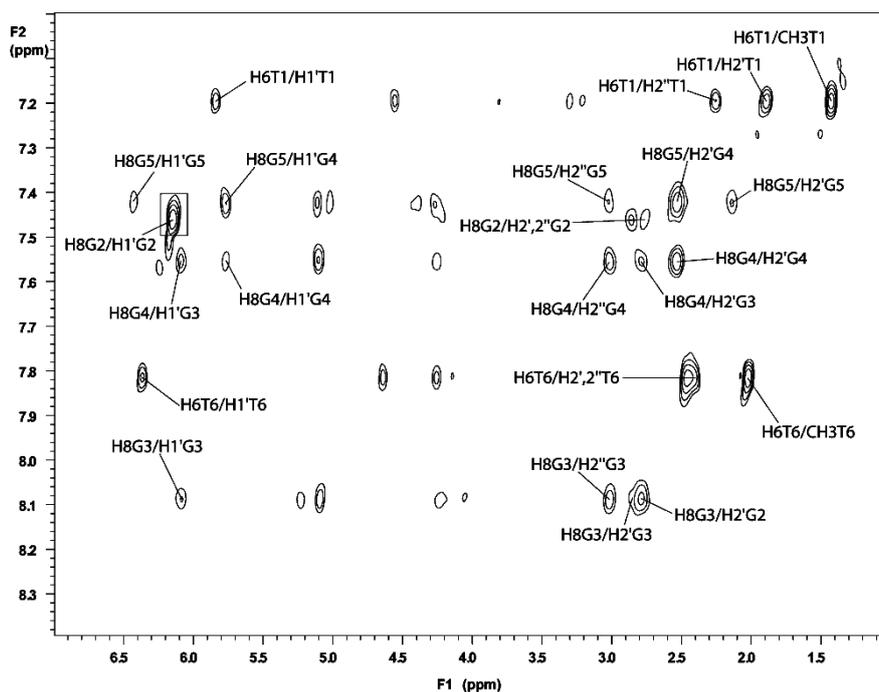


Fig. 74. Regione espansa dello spettro NOESY di L34 a 5 °C

Sulla base di tali osservazioni è stata elaborata una schematica rappresentazione della struttura quadruplex proposta per L34 a 5°C (Fig. 75).

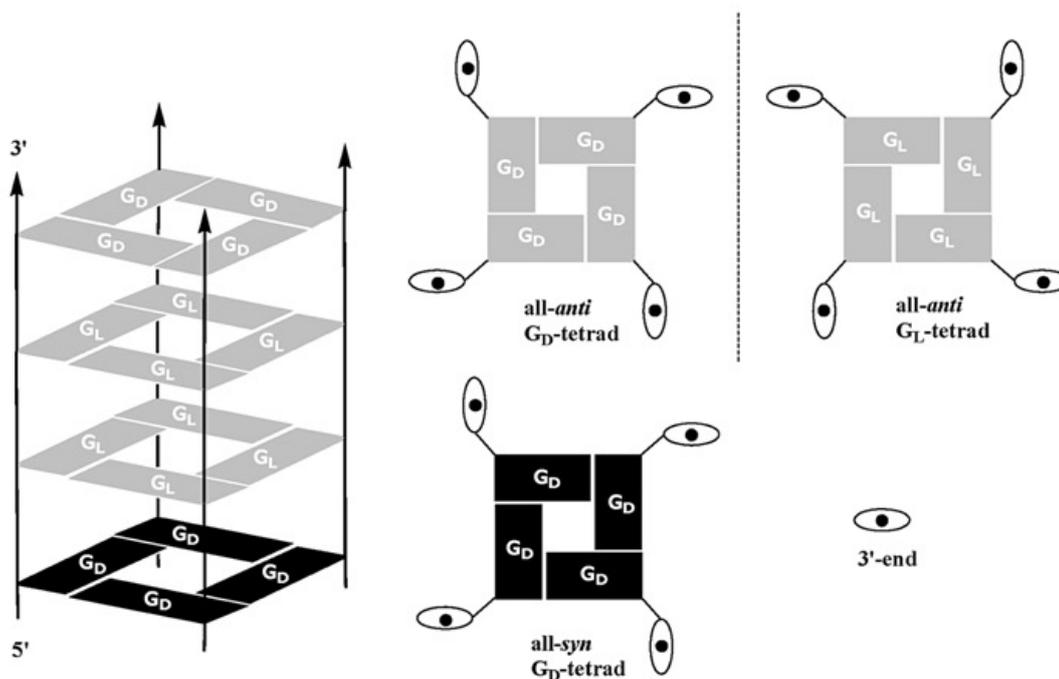


Fig. 75 Rappresentazione schematica della struttura quadruplex adottata dall'ODN L34. In grigio sono riportate le tetradi di G anti e in nero quella syn

5.3 Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti, possiamo chiaramente affermare che gli ODN eterochirali sono in grado di formare stabili strutture quadruplex sia destrorse sia sinistrorse. Inoltre, risulta evidente che le caratteristiche dell'estremità 3' giocano un ruolo fondamentale nel controllare il senso di avvolgimento della struttura elicoidale, dal momento che l'ODN **L456**, in cui tre nucleotidi di tipo L sono inseriti all'estremità 3', mostra un profilo CD estremamente simile a quello della quadruplex sinistrorsa formata dall'ODN omochirale **all L**.

Gli esperimenti NMR e CD a differente temperatura dimostrano chiaramente che la maggior parte dei D/L-ODNs, formano diverse strutture quadruplex a temperature critiche; in particolare, i risultati più interessanti sono stati ottenuti dall'analisi strutturale dell'ODN **L34**, in grado di formare due diverse strutture quadruplex sinistrorse a due differenti temperature.

La possibilità che gli ODN eterochirali siano in grado di formare strutture quadruplex apre nuove prospettive in tutti i campi di ricerca in cui tali strutture secondarie del DNA sono coinvolte, come farmacologia e la biologia molecolare¹⁴, la chimica analitica¹⁵ e le nanotecnologie¹⁶.

In particolare, diversi aptameri biologicamente importanti adottano nella loro porzione bioattiva la conformazione di strutture quadruplex¹⁷, l'impiego di ODN eterochirali potrebbe incrementare la loro resistenza alle nucleasi in modo da consentire loro una maggiore permanenza nell'ambiente biologico cellulare. La validità di questo approccio riguarda maggiormente gli aptameri TBA¹⁸ e anti-HIV¹⁹.

5.4 Parte sperimentale

5.4.1 Sintesi e purificazione degli oligomeri

Tutti gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati su un sintetizzatore Millipore Cyclone Plus DNA, utilizzando la chimica in fase solida dei β -cianoetilfosforamiditi su scala 15 μ mol.

Gli oligomeri sono stati rimossi dal supporto solido e deprotetti mediante trattamento con una soluzione acquosa al 30% di NH_3 a 55°C per tutta la notte. Successivamente la miscela è stata filtrata, lavata e concentrata a pressione ridotta. successivamente è stata ridisciolta in H_2O , analizzata e purificata mediante HPLC (cromatografia liquida ad elevata prestazione) utilizzando una colonna Nucleogel SAX (Macherey–Nagel, 1000-8/46). Per l'eluizione del campione sono stati utilizzati: *Buffer A*: 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ in una soluzione acquosa a pH 7.0, contenente 20% (v/v) di CH_3CN ; *Buffer B*: 1 M KCl, 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ in soluzione acquosa a pH 7.0, contenente 20% (v/v) di CH_3CN .

E' stato utilizzato un gradiente lineare dei *buffer A e B* (100% A; 0% B - 0% A; 100% B) in 30 minuti ad un flusso di 1.0 ml/min. Le frazioni dei vari oligomeri sono state raccolte e

successivamente desalificate su colonne Sep- Pak (C-18). Tutti gli oligomeri sono risultati puri all'NMR più del 98%.

5.4.2 Dicroismo circolare

I campioni CD sono stati preparati ad una concentrazione di 1×10^{-4} M utilizzando la stessa soluzione tampone usata per gli studi NMR: 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 70 mM KCl e 0.2 mM EDTA a pH 7.0. Gli spettri CD di tutte le quadruplex sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofotometro JASCO 715 CD, utilizzando una cuvetta in quarzo con un cammino ottico di 0.1 cm. La lunghezza d'onda è stata variata da 220 a 320 nm alla velocità di 100 nm min^{-1} .

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

La temperatura è stata mantenuta costante a 20°C con una cella programmabile termoelettricamente controllata (JASCO Peltier PTC-348).

5.4.3 Esperimenti di Risonanza Magnetica Nucleare

I campioni NMR sono stati preparati ad una concentrazione di circa 2.0 mM in 0.6 ml ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}=9:1 \text{ v/v}$) di una soluzione tampone 10 mM di $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 70 mM di KCl e 0.2 mM di EDTA a pH 7.0. Gli spettri NMR sono stati registrati con uno spettrometro Varian Unity INOVA 700 MHz e Varian Unity INOVA 500MHz. Gli spettri protonici monodimensionali dei campioni in H_2O sono stati registrati usando la sequenza di gradienti DPGSE per la soppressione del segnale dell'acqua. I segnali relativi ai protoni del sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-solfonato (DSS) sono stati usati come riferimento per i *chemical shifts* dei protoni (^1H). La sequenza di gradienti DPGSE è stata utilizzata per gli

esperimenti di tipo NOESY e TOCSY in H₂O con *mixing times* rispettivamente di 200 e 100ms. Tutti gli esperimenti sono stati registrati utilizzando la procedura STATES-TPPI. In tutti gli esperimenti 2D i dati nel dominio del tempo consistono di 2048 punti complessi in t₂ e 400-512 FID nella dimensione t₁. Il tempo di rilassamento è stato settato ad 1.2 s per tutti gli esperimenti.

Bibliografia

1. Urata, H., Ueda, Y., Suhara, H., Nishioka, E. and Akagi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7135-7138;
2. Blommers, M. J. J., Tondelli, L., and Garbesi, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7886-7896;
3. Damha, M. J., Giannaris, P. A. and Marfey, P. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7877-7885;
4. Urata, H., Shimizu, H., Hiroaki, H., Kohda, D. and Akagi, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 79-83;
5. Kawakami, J., Tsujita, K. and Sugimoto, N. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 77-82;
6. Mauffret, O., El Amri, C., Santamaria, F., Tevanian, G., Rayner, B. and Femandjian, S. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4403-4409.
7. Cherrak, O. Mauffret, F. Santamaria, A. Hocquet, M. Ghomi, B. Rayner, S. Femandjian, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6986-6995.
8. Hayashi, G., Hagihara, M. and Nakatani, K., *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 261-262.
9. Hayashi, G., Hagihara, M., Kobori, K. and Nakatani, K., *Chem. Bio. Chem.* **2007**, *8*, 169-171.
10. Hauser, N. C., Martinez, R., Jacob, A., Rupp, S., Hoheisel, D.J. and Matysiak, S. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5101-5111.
11. Kim, Y., Yang, C.J. and Tan, W. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279-7287.
12. Niedle, S. and Balasubramanian, S. *Quadruplex Nucleic Acids* **2006**, RCS Publishing, London.
13. F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, D. G. Norman, D. M. J. Lilley, *J. Mol. Biol.* **1994**, *234*, 458-471.
14. Maizels, N., in: Niedle, S. and Balasubramanian, S. *Quadruplex Nucleic Acids* **2006**, 228-252, RCS Publishing, London.
15. E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 241-264.
16. Alberti, P., Bourdoncle, A., Sacca, B., Lacroix, L. and Mergny, J.-L. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3383-3391.
17. Gatto, B., Palumbo, M. and Sissi, C. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1248-1265.
18. Wang, K. Y., McCurdy, S., Shea, R. G., Swaminathan. S. and Bolton P.H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1899-1904.

19. Oliviero, G., Amato, J., Borbone, N., D'Errico, S., Galeone, A., Mayol, L., Heider, S., Olubiyi, O., Hoorelbeke, B., Balzarini, J. and Piccialli, G. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8971-8973.