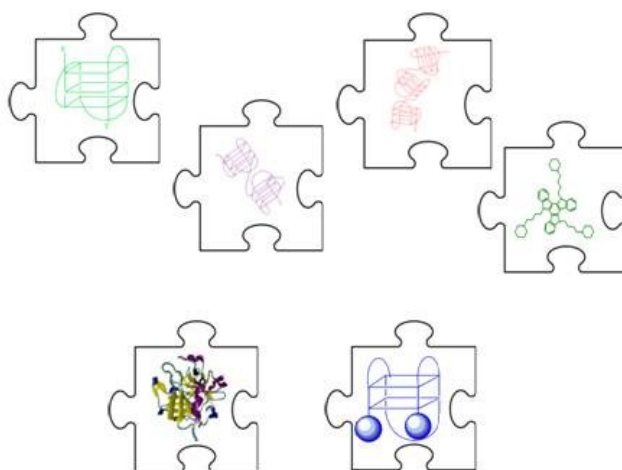


# Interazioni tra acidi nucleici, proteine e potenziali farmaci antitumorali: un approccio chimico-fisico

---

**Annunziata Cummaro**



Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche  
XXV Ciclo  
Università degli Studi di Napoli "Federico II"



2013

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”  
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI



TESI DI DOTTORATO  
IN SCIENZE CHIMICHE  
XXV CICLO

**Interazioni tra acidi nucleici, proteine e potenziali  
farmaci antitumorali:  
un approccio chimico-fisico**

Annunziata Cummaro

TUTORE  
Prof.ssa Concetta Giancola

RELATORE  
Prof. Marco D'Ischia

CO-TUTORE  
Dr. Luigi Petraccone

COORDINATORE DEL XXV CICLO  
Prof. Lucio Previtiera



Se per Itaca volgi il tuo viaggio,  
fa' voti che ti sia lunga la via,  
e colma di vicende e conoscenze.

(Costantino Kavafis)



<b>PREFAZIONE</b>	<b>1</b>
-------------------	----------

## **Indice**

<b>CAPITOLO 1 G-QUADRUPLEX</b>	<b>3</b>
1.1 G-Quadruplex: ruolo biologico	3
1.1.1 <i>G-Quadruplex nei telomeri</i>	5
1.1.2 <i>G-Quadruplex come aptameri</i>	8
1.2 G-Quadruplex: struttura e polimorfismo	10
1.2.1 <i>Caratteristiche strutturali delle G-Quadruplex</i>	10
1.2.2 <i>Polimorfismo strutturale delle G-quadruplex telomeriche umane</i>	12
1.3 Scopo della tesi	14
<b>CAPITOLO 2 METODI</b>	<b>16</b>
2.1 Calorimetria di titolazione isoterma (ITC)	16
2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	19
2.3 Spettroscopia CD (Dicroismo Circolare)	23
2.3.1 <i>Dicroismo circolare nelle quadruplex</i>	25
2.4 Spettroscopia di Fluorescenza	26
<b>CAPITOLO 3 PROPRIETA' DI BINDING DELLE SEQUENZE TELOMERICHE: EFFETTO DELLA SEQUENZA E DEL CROWDING</b>	<b>30</b>
3.1 Proprietà di binding delle quadruplex telomeriche umane (multimeri)	32
3.1.1 <i>Risultati e discussione</i>	34
3.1.2 <i>Conclusioni</i>	42
3.1.3 <i>Materiali e metodi</i>	43

3.2	Il binding delle sequenze telomeriche in condizioni di affollamento molecolare (crowding)	46
	3.2.1 <i>Risultati e discussione</i>	47
	3.2.2 Studio del binding di azatrux alla quadruplex parallela d[(TGGGGT) <sub>4</sub> ]	50
	3.2.3 Studio della selettività del binding di azatrux al DNA telomerico umano	55
	3.2.4 <i>Conclusioni</i>	56
	3.2.5 <i>Materiali e metodi</i>	58
	<b>CAPITOLO 4 INTERAZIONE G-QUADRUPLEX-PROTEINA: UN APTAMERO FLUORESCENTE DELLA TROMBINA</b>	<b>61</b>
4.1.	Gli aptameri	61
4.2	Trombina: struttura e funzione	63
4.3	TBA (Thrombin binding aptmer)	66
4.4	Un nuovo derivato fluorescente bis-coniugato del TBA	69
	4.4.1 <i>Risultati e discussione</i>	72
	4.2.2 <i>Conclusioni e future prospettive</i>	82
	4.2.3 <i>Materiali e metodi</i>	83
	<b>Bibliografia</b>	<b>87</b>
	<b>Pubblicazioni</b>	<b>93</b>

## Prefazione

I filamenti di DNA ricchi di guanine sono in grado di strutturarsi in diversi tipi di quadruplex. La varietà delle conformazioni che queste assumono, dovuta a fattori come la sequenza delle basi e le condizioni sperimentali in cui esse sono analizzate, costituisce un elemento distintivo per il riconoscimento specifico di ligandi e proteine. L'interazione tra G-quadruplex e macromolecole biologiche è, infatti, alla base di molti meccanismi cellulari come il controllo della lunghezza del telomero umano, della regolazione dei processi di trascrizione, di traduzione e di senescenza.

La conoscenza di queste interazioni, dunque, non solo è importante per definire la relazione tra struttura e funzione dei complessi biologici ma lo è soprattutto per razionalizzare la progettazione di farmaci in grado di intervenire in modo selettivo in tali processi quando diventano patologici.

Nell'ambito della progettazione di farmaci (*drug-design*) le G-quadruplex rappresentano, da un lato, un target molecolare, dall'altro possono essere esse stesse utilizzate come veri e propri agenti farmacologici. Il primo aspetto è associato alle sequenze telomeriche umane, presenti all'estremità 3' del DNA, in grado di strutturarsi in quadruplex. Il telomero funge da orologio biologico della cellula. Ad ogni replicazione, infatti, esso si accorcia fino al raggiungimento di una lunghezza critica che determina l'inizio del processo di apoptosi cellulare. Nelle cellule cancerose tale processo è impedito da un enzima, la telomerasi, che sintetizza nuove sequenze TTAGGG all'estremità 3', rendendo tali cellule immortali. La stabilizzazione, ad opera di piccole molecole, delle quadruplex potenzialmente presenti in questo tratto, può impedire alla telomerasi di avere accesso al filamento inibendone l'azione catalitica e rappresentando così una potenziale strategia anticancro. È quindi indispensabile uno studio approfondito delle sequenze telomeriche umane e delle loro proprietà di *binding* al fine di uno sviluppo mirato di molecole in grado di interagire con esse in modo selettivo.

La maggioranza degli studi riportati in letteratura sono condotti su sequenze brevi in grado di formare un'unica quadrupla elica in soluzione. Tali studi sono tuttavia lontani dal mimare le reali condizioni fisiologiche del telomero. Quest'ultimo infatti è costituito da numerose ripetizioni di guanine in grado di strutturarsi in più unità di quadruplex consecutive le cui proprietà di *binding* non sono desumibili dalla singola unità. Inoltre, le condizioni sperimentali nelle quali le quadruple eliche sono indagate, ovvero nei tamponi acquosi, non riproducono appieno l'affollamento molecolare presente nella cellula.

La prima parte del presente lavoro di tesi focalizza l'attenzione sull'analisi di queste due questioni analizzando in primis l'interazione di una nuova molecola di sintesi, azatrux, con le sequenze (AGGGTT)<sub>4</sub>, (TTAGGG)<sub>8</sub>TT (TTAGGG)<sub>12</sub>TT, in grado di strutturarsi in una, due e tre quadruple eliche consecutive e successivamente investigando le proprietà di



*binding* di una singola quadrupla elica d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] in condizioni di affollamento molecolare simulate dal PEG 200%.

La seconda parte del lavoro di tesi è incentrata sull' utilizzo di queste strutture come aptameri. Gli aptameri sono filamenti oligonucleotidici che grazie alla loro struttura tridimensionale, si legano selettivamente ad un target molecolare e ne inibiscono l'attività.

È questo il caso del TBA<sub>15</sub>, un noto oligonucleotide strutturato in quadrupla elica capace di legarsi alla trombina, una proteina coinvolta nella cascata della coagulazione. Il complesso TBA-trombina produce un effetto anticoagulante per inibizione dell'attività della proteina.

Negli ultimi tempi molte modifiche sono state apportate a questo oligonucleotide, queste sono volte sia a migliorarne le proprietà farmacologiche sia a sfruttarne il riconoscimento specifico per scopi diagnostici.

In particolare, questa seconda parte della tesi è incentrata sulla caratterizzazione strutturale e termodinamica di un derivato fluorescente del TBA, coniugato con una molecola di dansile ed una di β-ciclodestrina. Inoltre, mediante studi di calorimetria a titolazione isoterma, ne è stata analizzata l'energetica dell'interazione con la trombina. Le proprietà mostrate da questo derivato possono essere impiegate per la costruzione di un biosensore nella rilevazione della proteina pro-coagulante.

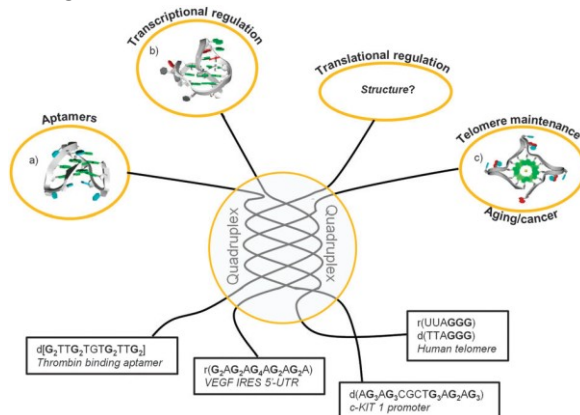
In conclusione, i risultati ottenuti offrono informazioni essenziali sia per la progettazione razionale di nuovi farmaci antitumorali sia per l'utilizzo delle quadruplex in ambito diagnostico.

# Capitolo 1 G-QUADRUPLEX

## 1.1 G-quadruplex: ruolo biologico

L'immagine più comune del DNA sin dal 1953, è rappresentata da una struttura a doppia elica, denominata forma B [1]. È ormai noto, però, che il DNA può adottare una varietà di conformazioni alternative dovute a particolari sequenze, all'ambiente in cui esso si trova e alle interazioni che stabilisce con le diverse proteine. Queste strutture secondarie "non canoniche", che includono la forma Z (Z-DNA), le triple eliche (triplex), le strutture cruciformi e le quadruple eliche (G-quadruplex), giocano un ruolo chiave nei processi biologici. Esse, infatti, sono coinvolte nella duplicazione, trascrizione, replicazione e apoptosi cellulare.

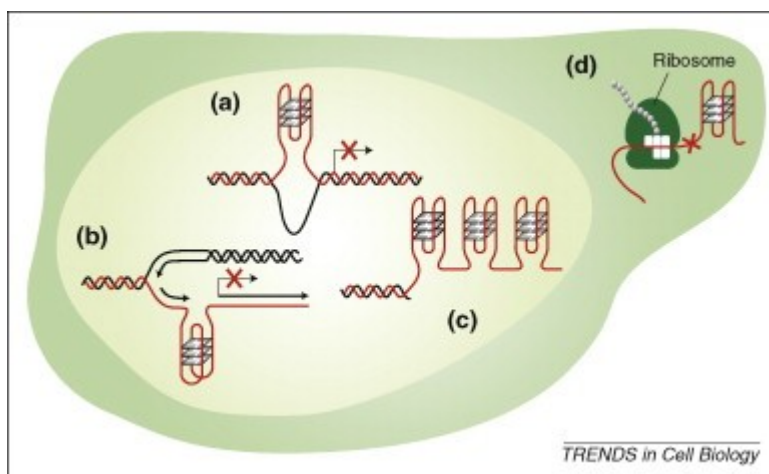
Attualmente l'enorme quantità di dati genomici riguardanti la specificità di interazione DNA-proteine e DNA-ligandi, responsabile di tutti i meccanismi cellulari fisiologici e/o patologici, ha guidato la ricerca verso l'individuazione di nuovi target molecolari in grado di interagire in modo univoco con il proprio partner biologico. In questo ambito le G-quadruplex, strutture secondarie formate da sequenze ricche di guanine, hanno rappresentato un elemento di attrazione sia per la loro possibile presenza in regioni coinvolte nella regolazione cellulare (fig.1.1)[2] sia per la capacità di interagire selettivamente con ligandi di varia natura.



**Fig.1.1** Ruoli biologici delle quadruplex. le quadruple eliche contenute nel genoma possono essere implicate nella regolazione trascrizionale (b), nei processi cancerosi (c) o possono essere utilizzate come aptameri (a), (collie, parkinson CHEM. Soc. Rev. 2011, 40, 5867-5892)

Studi computazionali condotti su vari organismi hanno rivelato che la localizzazione delle sequenze in grado di formare quadruple eliche (*G4 motif*) non è casuale all'interno del genoma ma pare sia direttamente collegata ai domini funzionali[3]. Tali sequenze sono distribuite in modo simile in specifiche regioni, come ad esempio nei promotori di alcuni oncogeni [4][5][6][7], nelle sequenze terminali del DNA telomerico, in alcune regioni

all'estremità 5' degli RNA messaggeri e spesso la composizione in basi di queste sequenze è conservata nelle diverse specie [4][8] (fig1.2).



**Fig.1.2:** Possibile localizzazione di strutture G-quadruplex nella cellula. Nel nucleo la formazione di tali strutture potrebbe avvenire nelle regioni a doppia elica ricche di guanine, come nei promotori (a) e durante la replicazione (b). La regione telomericca a singolo filamento favorirebbe la formazione di quadruplex consecutive (c). Fuori dal nucleo la regione terminale dell'RNA messaggero può formare G4 e impedire la traduzione (d). Lipps, Rhodes rew 2010.

La distribuzione *non-random* delle quadruplex e l'evoluzione conservativa della loro posizione nel genoma avvalorano l'ipotesi che queste strutture svolgono una o più funzioni regolatrici all'interno della cellula.

L'attenzione per le quadruple eliciche è cresciuta in modo esponenziale nel tempo e i numerosi studi hanno reso sempre più chiara la relazione tra la sequenza, la localizzazione e le funzioni da esse esplicate.

L'insieme di questi studi ha individuato diverse funzioni biologiche svolte dalle G-quadruplex (fig 1.1), tra queste:

- 1) la regolazione della trascrizione di numerosi promotori oncogeni,
- 2) la regolazione dei processi post-trascrizionali quando sono presenti negli RNA messaggeri,
- 3) la partecipazione all'architettura dei telomeri di molti organismi,
- 4) uno *scaffold* molecolare per la progettazione e sintesi di aptameri.

La regolazione della trascrizione ad opera delle G-quadruplex è dovuta alla presenza di alcune sequenze ricche di guanine a monte dei siti di trascrizione di geni coinvolti nella crescita e nella proliferazione cellulare [9][10]. Sequenze potenzialmente in grado di strutturarsi in quadruplex sono state ritrovate in molti promotori oncogeni umani come c-MYC [11], c-KIT [12], BCL-2 [13][14], K-RAS [15] e RET [16]. L'espressione di questi oncogeni è associata ad un gran numero di patologie cancerose. La regolazione

trascrizionale è determinata dall'equilibrio quadruplex-singolo filamento. La formazione di una quadrupla elica in ciascuno di questi promotori determina il silenziamento dell'espressione dell'oncogene, poiché l'ingombro sterico fornito dalla quadruplex rende inaccessibile il filamento genomico all'apparato trascrizionale.

Le G-quadruplex possono anche controllare processi post-trascrizionali. In questo caso la loro presenza non è a livello del DNA ma dell'RNA. Alcune RNA-quadruplex sono state ritrovate nel genoma virale dell'HIV e nell'herpes simplex dove controllano i processi di dimerizzazione e traslazione [17][18]. Altre sono state ritrovate nella regione 5'UTR (regione terminale) dell'mRNA di alcuni oncogeni, dove la loro presenza impedisce al ribosoma di traslare sul trascritto di RNA e quindi di compiere il processo di traduzione, con una conseguente diminuzione dei livelli di proteina [19].

Recentemente, le RNA-quadruplex sono state associate, anche, a due forme di disabilità mentali come la sindrome "Fragile X" (FXS) e quella "FRAXE" entrambe responsabili di ritardi mentali.

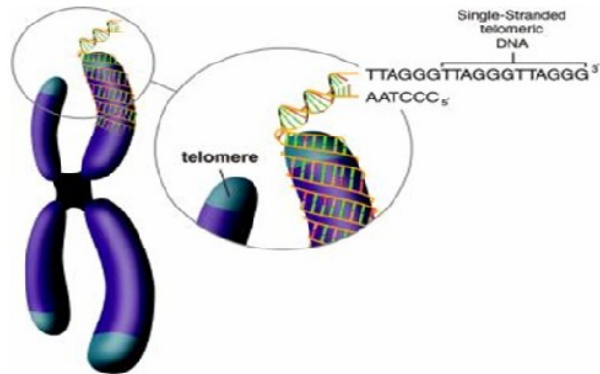
Infine, le G-quadruplex partecipano alla composizione dei telomeri e possono essere utilizzate come aptameri per il controllo di alcuni processi patologici. Questi due aspetti sono l'oggetto di studio di questa tesi e saranno trattati dettagliatamente nei paragrafi successivi.

### ***1.1.1. G-quadruplex nei telomeri***

Il ruolo biologico farmacologicamente più interessante svolto dalle quadruplex è proprio quello associato alla funzionalità del telomero.

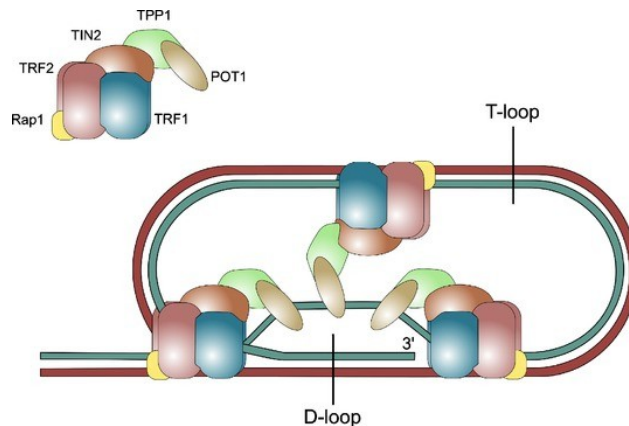
I telomeri sono complessi nucleoproteici localizzati all'estremità del cromosoma lineare eucariotico. Essi proteggono il DNA dal "meccanismo di erosione" che si verifica ad ogni divisione cellulare, impediscono la fusione delle estremità del DNA durante la replicazione cellulare e proteggono l'acido nucleico dall'attacco delle nucleasi [20][21][22].

Il DNA telomerico umano è formato da sequenze (TTAGGG) altamente ripetute. Nelle cellule eucariotiche, la regione telomerica è costituita per la maggior parte della lunghezza da DNA a doppio filamento (circa 5-15 chilobasi), mentre l'ultimo tratto lungo circa 200 nucleotidi protrude come singolo filamento all'estremità 3' terminale in cui sono presenti decine di ripetizioni del troncamento TTAGGG [23] (fig1.3).



**Fig.1.3:** il telomero umano è posto all'estremità cromosomica. Esso è costituito da un tratto di DNA a doppio filamento ed un breve tratto a singolo filamento all'estremità 3'.

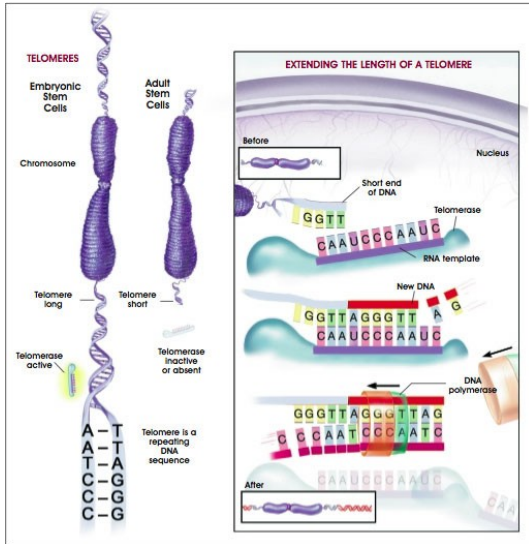
Nei vertebrati tale DNA è associato a sei diverse proteine (POT1, TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, Rap1) che formano il complesso Shelterin (fig.1.4). Questo complesso è responsabile della regolazione dell'equilibrio conformazionale della porzione telomerica e indirettamente controlla l'azione della telomerasi.



**Fig.1.4:** rappresentazione semplificata del complesso Shelterin e formazione del T-loop nella regione terminale del telomero

Il telomero è implicato nel mantenimento della lunghezza del DNA nel ciclo cellulare, un meccanismo cruciale correlato ai processi di senescenza e apoptosi[24][25][26]. Nelle cellule somatiche, ad ogni replicazione, il DNA telomerico si accorcia, questo è dovuto all'incapacità della DNA polimerasi di replicarne completamente il filamento "lagging". L'erosione del telomero avviene fino al raggiungimento di una lunghezza critica, la quale stabilisce l'inizio del processo di senescenza e apoptosi cellulare. A differenza delle cellule somatiche, nelle cellule cancerose è sovra-espresso un enzima, la telomerasi, in grado di intervenire nell'omeostasi di questo processo impedendo il fisiologico accorciamento del

telomero. Questo enzima, una trascrittasi inversa, sintetizza sequenze TTAGGG all'estremità 3' del DNA libero (fig.1.5), promuovendo così il processo di “immortalità cellulare” nelle cellule tumorali [27].

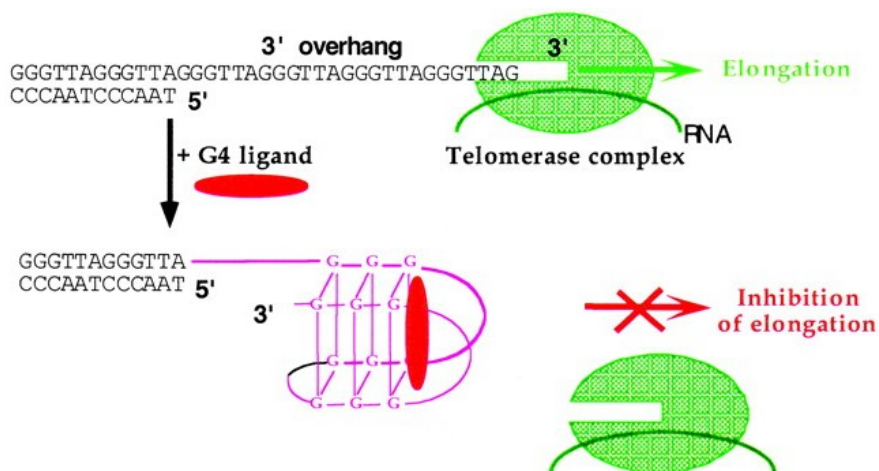


**Fig.1.5:** rappresentazione della lunghezza telomerica in una cellula embrionale ed in una cellula somatica. Il processo di estensione del telomero ad opera della telomerasi si realizza sintetizzando nuove sequenze TTAGGG all'estremità 3' terminale.

L'inibizione della telomerasi, dunque, impedirebbe il processo di immortalità cancerosa e pertanto potrebbe rappresentare un'innovativa strategia antitumorale.

Un possibile meccanismo di inibizione di questa trascrittasi inversa consiste nello stabilizzare il DNA telomerico in una conformazione non accessibile all'enzima. L'azione della telomerasi è, infatti, fortemente condizionata dalla struttura assunta dal filamento singolo che sporge dal DNA telomerico: affinché essa possa agire è necessario che l'estremità 3' del DNA telomerico sia presente come filamento singolo lineare.

La presenza di sequenze ricche di guanine in questo tratto permette, però, al filamento di strutturarsi in quadruple eliche, che rappresentano un vero ingombro sterico per la telomerasi. Piccole molecole in grado di stabilizzare la struttura a quadrupla elica possono impedire all'enzima di avere accesso al filamento, inibendone l'attività [28] (fig.1.6). Quindi, l'interazione e la stabilizzazione ad opera di questi potenziali *drug* rappresentano i punti critici della nuova strategia anticancro[29][30].



**Fig.1.6:** la stabilizzazione delle quadruple eliche all'estremità telomerica impedisce alla telomerasi di avere accesso al filamento e quindi di esplicare la sua azione catalitica

A tal proposito un gran numero di molecole con caratteristiche strutturali diverse sono state sintetizzate negli ultimi anni al fine di interagire in modo specifico con le G-quadruplex telomeriche umane e di aumentarne la stabilità. Una progettazione razionale di questi *drug* necessita di una conoscenza approfondita delle proprietà di *binding* delle sequenze telomeriche umane in grado di strutturarsi in quadrupla elica. Lo studio delle proprietà di binding delle sequenze telomeriche umane in condizioni quanto più vicine a quelle fisiologiche è l'oggetto di studio della prima parte della tesi e sarà trattato nel capitolo 3.

### 1.1.2. G-quadruplex come aptameri

Le quadruple eliche presenti nel genoma rappresentano, quindi, un target biologico per molecole in grado di legarsi ad esse e di esplicare un controllo indiretto sulla trascrizione, traduzione e apoptosi cellulare. Le G-quadruplex, però, possono trovare impiego anche come dei veri e propri agenti farmacologici in grado di intervenire in processi patologici[31][32]. La capacità di queste strutture di assumere una ben determinata struttura tridimensionale, mediante il quale sono in grado di riconoscere in modo specifico un target molecolare, le ha rese ancora più interessanti per le molteplici prospettive di impiego. Grazie a questa caratteristica strutturale, infatti, esse si prestano ad essere utilizzate come aptameri [33]. Gli aptameri sono dei filamenti oligonucleotidici in grado di strutturarsi e di stabilire delle interazioni altamente specifiche con il proprio bersaglio, tale specificità è comparabile con quella relativa alla formazione del complesso antigene-anticorpo. Oltre alla specificità d'azione essi presentano numerosi vantaggi che riguardano

la versatilità di utilizzo, la semplicità della sintesi, la biocompatibilità, la mancanza di effetti collaterali.

Tuttavia, come tutti gli oligonucleotidi, essi sono estremamente sensibili alle nucleasi che possono degradare il filamento diminuendone la concentrazione efficace e il tempo di emivita. Per ovviare a questo problema sono state progettate e sintetizzate diverse modifiche che hanno migliorato la stabilità di questi filamenti e il loro profilo farmacocinetico e farmacodinamico.

Gli esempi di aptameri a struttura quadruplex sono numerosi (tabella 1.1) e molti di questi sono entrati nelle diverse fasi della sperimentazione clinica.

**Tabella 1.1: esempi di aptameri a struttura quadruplex e relative proteine target**

Proteine Target	Aptameri di DNA e RNA quadruplex	Rif.
a-Thrombin	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	[34]
HIV gp120	d(TTGGGGTT)	[35]
Prion protein	GUGCGGGAUUGAGGGACGAUGGGGAAGU; (GGA) <sub>4</sub>	[36,37]
Human RNase H1	d(CGCTCGCTCCGTGTGGCTTGGGTTGGGTGTGGCAGTGA C)	[38]
Stat3	d(GGGC) <sub>4</sub>	[39]
NFκB receptor activator	AUCGGGAAGGGCUAGGGUGGGUUAU	[40]
HIV Integrase	d(GGGGTGGGAGGAGGGT)	[41]
Insulin	d(ACAGGGGTGTGGGG) <sub>2</sub>	[42]
HIV reverse transcriptase	d(CAGGCGTTAGGGAAGGGCGTCGAAAGCAGGGTGGG)	[43]
NFκB, nucleolin	d(GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG)	[44]
Coronavirus helicase	d(AGCGGCATATGGTGGTGGGTGGTATGGTC)	[45]
VEGF	d(TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA)	[46]
Protein tyrosine phosphatase Shp-2	d(AGCGTCGAATACCACCGGGGTTTTGGTGGGGGGG CTGGGTTGTCTTGGGGGTGGGCTAATGGAGCTCGTGGTC AT)	[44]
Polyphosphate kinase 2	d(GGTTN) <sub>n</sub>	[47]

Uno degli aptameri più studiati è rappresentato dal TBA (thrombin binding aptamer), un oligonucleotide di 15 basi con attività anticoagulante [48]. Il TBA si è rivelato un inibitore diretto della Trombina, una proteina coinvolta nella cascata della coagulazione alla quale si lega con alta specificità. Lo sviluppo clinico di questo potenziale anticoagulante è stato condotto fino alla fase I di sperimentazione clinica. La rapida attività anticoagulante e la biocompatibilità hanno reso tale molecola attraente dal punto di vista farmacologico.



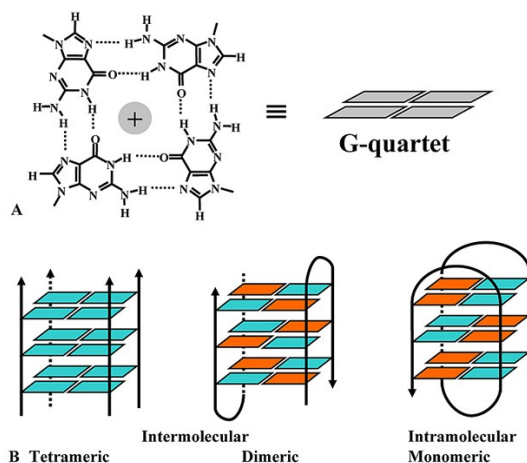
Il riconoscimento specifico nei confronti della trombina, però, può essere impiegato anche per scopi diagnostici [50]. La possibilità di coniugare l'oligonucleotide a molecole fluorescenti rende l'aptamero un biosensore in grado di rivelare i livelli di trombina in situ. L'ultimo capitolo di questa tesi sarà dedicato all'analisi dell'interazione di un derivato fluorescente del TBA con la trombina. Questo studio può essere un valido supporto per la progettazione di futuri biosensori.

## 1.2 G-Quadruplex: struttura e polimorfismo

### 1.2.1 Caratteristiche strutturali delle G-Quadruplex

Le G-quadruplex sono strutture secondarie di DNA e RNA formate da sequenze ricche di guanine. L'unità di base è costituita da una struttura ciclica planare (G-tetrad o G-quartet) formata dall'associazione di quattro guanine unite tra loro mediante legami idrogeno di tipo Hoogsteen, ovvero legami alternativi che permettono un diverso ri-arrangiamento delle basi rispetto a quello canonico di Watson-Crick [51]. Le quattro basi così associate formano il piano o tetrade di guanine. Gli ossigeni carbonilici (O6) delle basi guaniniche, appartenenti a ciascun piano [52], delineano una cavità al centro della tetrade che è in grado di accomodare cationi monovalenti come sodio e potassio [53], che contribuiscono alla stabilità della struttura.

I piani di guanine, infine, espongono una grossa superficie ricca di elettroni, dovuta agli anelli aromatici delle basi azotate, e ciò permette alle tetradi di impilarsi l'una sull'altra mediante interazioni di *stacking* (fig.1.6).



**Fig.1.6:** rappresentazione schematica del riarrangiamento planare delle guanine (A) a formare un G-quartet e rappresentazione di una quadruplex tetramolecolare, bimolecolare, monomolecolare (B)

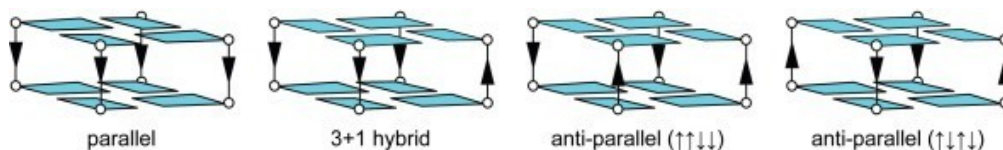
Nonostante il motivo strutturale appena descritto sia comune a tutte le quadruple eliche, queste strutture sono caratterizzate da un elevato grado di polimorfismo. La loro diversa topologia è dovuta a vari elementi che le compongono. Le quadruple eliche possono differire, infatti, per il numero di quartetti di guanine, per la polarità dei filamenti, per localizzazione e la lunghezza dei *loop*.

In generale le quadruplex possono essere classificate in base a: 1) stechiometria di filamenti, 2) orientazione dello scheletro zucchero-fosfato, 3) conformazione dello zucchero 4) orientazione dei *loop*.

In base al numero di filamenti che le compongono, esse possono essere distinte in (fig.1.6):

- monomolecolari, costituite da un unico filamento in grado di ripiegarsi su se stesso;
- bimolecolari, formate da due filamenti con ri-arrangiamento intramolecolare o intermolecolare
- tetramolecolari, formate dall'associazione dei 4 filamenti.

Lo scheletro zucchero-fosfato può assumere una diversa orientazione. Indipendentemente dal numero di filamenti che compongono la quadruplex, la disposizione di questo può essere parallela, se i 4 tratti (nel caso di una quadrupla monomolecolare) o i 4 filamenti (nel caso di una tetramolecolare) sono orientati tutti nella stessa direzione, antiparallela se due sono orientati in un verso e i restanti nell'altro, e "3+1" se tre filamenti sono in un verso e uno nel verso opposto (fig.1.7).



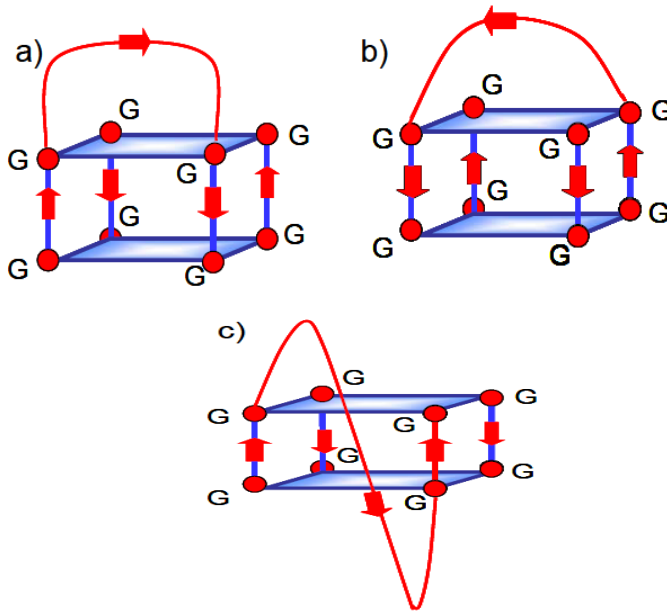
**Fig.1.7** rappresentazione della disposizione dei filamenti in conformazione parallela, ibrida 3+1, e due diverse conformazioni antiparallele

L'orientazione di queste catene non è casuale ma è direttamente connessa alla disposizione delle guanine *syn* e *anti* all'interno della G-tetrade.

Un ruolo particolarmente importante è attribuito ai *loop*, linker di connessione tra le basi appartenenti alla stessa tetrade o a tetradi differenti che molto spesso sono responsabili del riconoscimento specifico per i ligandi. I *loop* possono essere classificati in base alla disposizione, alla grandezza e alla sequenza che li compongono. Essi si distinguono in:

- *loop* laterali o *Edge-wise* che connette due filamenti adiacenti antiparalleli [54][55] (fig.1.8 a),
- *Loop diagonali* che connettono due filamenti opposti antiparalleli [56][57][55] (fig.1.8 b)

- *Loop propeller* che connette filamenti adiacenti paralleli [58][59][60] (fig.1.8c).



**Fig.1.8:** rappresentazione dei loop laterali (a), diagonali (b), propeller (c)

La stabilità strutturale e la variabilità conformazionale, infine, sono determinate anche dalla natura dei cationi accomodati nella cavità centrale presente tra le tetradi.

Per ragioni legate al raggio atomico le quadruplex risultano più stabili quando coordinate con  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (abbondanti nell'ambiente cellulare) mentre sono destabilizzate dalla presenza di Cesio e Litio. Quest'ultimo, in particolare, non favorisce la formazione di quadruplex.

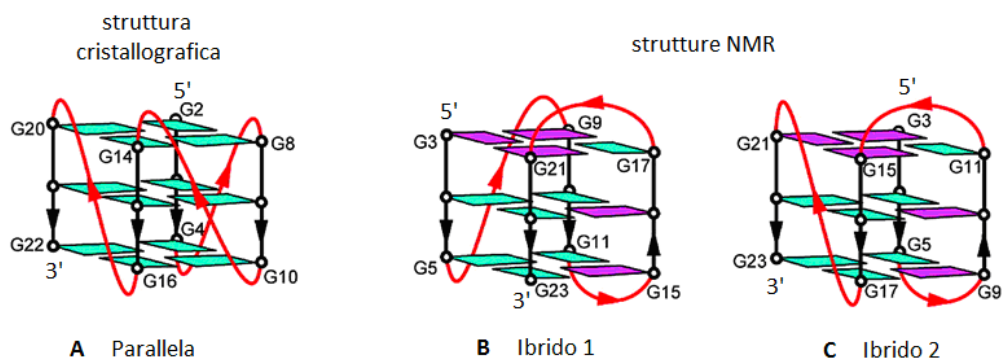
I cationi sodio e potassio non solo influenzano la stabilità e la cinetica di formazione della quadrupla elica ma anche la conformazione da essa assunta. Questo ultimo aspetto è particolarmente importante se si considerano le sequenze telomeriche umane. La variabilità conformazionale può influenzare le proprietà di binding del telomero e quindi la conoscenza della struttura telomerica è fondamentale per investigare la reale interazione con il *drug*.

### **1.2.2 Polimorfismo strutturale delle G-quadruplex telomeriche umane**

Le quadruple eliche sono in grado di adottare diverse conformazioni a seconda dello ione presente in soluzione e delle condizioni nelle quali esse vengono studiate. Un elevato grado di polimorfismo strutturale è stato riscontrato in sequenze telomeriche umane. Lo

studio in presenza di  $K^+$  è quello biologicamente più interessante, ci si limita quindi alla descrizione di *quadruplex* monomolecolari formate da sequenze telomeriche in presenza di  $K^+$ .

La prima tipologia di *quadruplex* è stata determinata studiando la sequenza d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] (22 mer) mediante raggi X [59]. La struttura presente nel cristallo adotta una conformazione “parallela”, ovvero il filamento oligonucleotidico si ripiega in modo tale che i tratti del backbone abbiano tutti la stessa polarità e i tre piani di G-tetradi, caratterizzati dalla guanine tutte in *anti*, sono connessi da tre *loop* TTA simmetrici *propeller* (fig1.9).



**Fig 1.9:** strutture quadruplex in presenza di potassio: struttura cristallografica parallela (A), strutture in soluzione: ibrido1 (B) ed ibrido2 (C). In verde sono evidenziate le guanine in *anti* e in viola quelle in *syn*.

La stessa sequenza utilizzata per gli studi cristallografici è stata analizzata in soluzione mediante NMR. In queste condizioni la sequenza ha mostrato due conformazioni in equilibrio contenente i tre piani di guanine definite ibride o anche 3+1 [52][60][61][62]. Esse sono state distinte in ibrido 1 e ibrido 2 (fig.1.9 B,C) e sono caratterizzate da una diversa disposizione dei loop.

L'ibrido 1 e l'ibrido 2 sono entrambi in conformazione 3+1, ovvero la polarità dei filamenti è disposta in modo tale che tre filamenti siano orientati in un senso e il quarto nel senso opposto. Esse differiscono per la posizione del filamento opposto e per il riarrangiamento dei loop (fig 1.8 B,C). In particolare partendo dall'estremità 5' all'estremità 3', il filamento con direzione opposta rispetto agli altri tre è il terzo nell'Ibrido-1 e il secondo nell'Ibrido-2. L'Ibrido-1 e l'Ibrido-2 differiscono, inoltre, per l'arrangiamento dei loop: partendo dall'estremità 5', i loop seguono l'ordine *propeller*-laterale-laterale nell'ibrido 1 e laterale-laterale-*propeller* nell'ibrido 2.

Le due forme sembrano coesistere in soluzione e il loro equilibrio è governato dalla presenza delle basi “*flanking*” all'estremità 3' (solitamente timine) [63]. L'ibrido 2, ad esempio, sembra essere favorito dalla presenza di timine all'estremità 3'.

Nelle stesse condizioni saline è stata recentemente osservata una “forma3” ovvero una conformazione antiparallela di tipo “basket”[64] che differisce da quella in sodio per il

numero di piani di guanine che la compongono. I quattro filamenti hanno polarità a due a due opposta e il loro ripiegamento somiglia proprio ad un cestino da basket, da cui prende il nome.

Questo polimorfismo strutturale ha stimolato un ampio dibattito su quale sia la conformazione biologicamente rilevante. Va inoltre sottolineato che gli studi strutturali riportati sono effettuati su sequenze telomeriche contenenti non più di quattro tratti di guanine in grado di formare una singola struttura quadruplex.

Tuttavia l'estremità 3' del filamento telomerico è costituito da circa 200 nucleotidi, in grado di strutturarsi in quadruple eliche consecutive. Molto poco ancora si conosce di questo aspetto strutturale delle quadruple eliche, dell'influenza che ciascuna quadrupla elica esercita sull'altra e sulle proprietà di *binding* da esse possedute.

La presenza nel telomero di quadruplex non isolate, l'influenza reciproca di tali strutture, la conformazione assunta da esse sono fattori determinanti nella progettazione di ligandi selettivi per il telomero.

### 1.3 Scopo della tesi

La scoperta delle quadruple eliche presenti all'interno del DNA, la conoscenza sempre più approfondita dei processi fisiologici e patologici nei quali esse sono coinvolte e l'analisi delle interazioni che stabiliscono con ligandi di varia natura, hanno reso attraente il filone di ricerca finalizzato ad indagarne le potenziali applicazioni in vari ambiti come quello terapeutico, diagnostico, analitico, biotecnologico ed ingegneristico.

La capacità di queste strutture di assumere un diverso ripiegamento in funzione della sequenza e delle condizioni in cui esse si trovano ha rappresentato un requisito fondamentale per comprendere la loro specificità di interazione con il target molecolare. Il riconoscimento specifico gioca un ruolo chiave nella regolazione dei processi cellulari nei quali le G-quadruplex sono coinvolte e, dunque, la conoscenza di tali meccanismi può essere utile per ristabilire un equilibrio fisiologico all'interno della cellula.

Il lavoro di tesi mette in luce questo duplice aspetto dello stesso filone. Esso consta di due parti: la prima è stata dedicata all'analisi delle proprietà di *binding* di troncamenti telomerici in grado di formare due e tre quadruple eliche consecutive (multimeri) al fine di ottimizzare il *drug-design* di molecole potenzialmente antitumorali in grado di legarsi al telomero. Tali proprietà sono state poi confrontate con quelle di un troncamento in grado di formare una sola quadrupla elica in soluzione. La comparazione delle strutture con diversa sequenza ha permesso di evidenziare delle notevoli differenze non desumibili considerando come modello una singola quadrupla elica. Infine, è stata valutata la differente affinità del ligando per una sequenza telomerica umana in condizioni di

affollamento molecolare. Il ligando utilizzato per investigare le diverse proprietà di binding del telomero in condizioni fisiologiche è un nuovo derivato del triazatruxene (azatrux), attivo su diverse linee cellulari cancerose.

Questi studi possono essere un supporto nell'ambito della progettazione di nuovi farmaci antitumorali.

La seconda parte è stata volta alla caratterizzazione strutturale di un nuovo aptamero della trombina e allo studio dell'interazione tra questo derivato e la proteina coinvolta nella cascata della coagulazione. Il derivato in questione è stato progettato a partire dal TBA (thombin binding aptamer) e ha mostrato spiccate proprietà di fluorescenza grazie alla coniugazione dell'estremità 3' con il dansile e 5' con la beta-ciclodestrina. Il sistema dansile-ciclodestrina non solo ha permesso di avere utili e rapide informazioni riguardo la struttura del nuovo TBA ma anche dei dati relativi alla sua interazione con la proteina. Le potenzialità di questo sistema si prestano a numerose prospettive applicative, come, ad esempio, la costruzione di un biosensore.

L'analisi delle interazione, la caratterizzazione del processo di associazione e la stabilità dei diversi sistemi oggetto di questa tesi sono state studiate mediante tecniche calorimetriche, quali ITC e DSC, e tecniche spettroscopiche quali dicroismo circolare, UV, fluorescenza.

## Capitolo 2 METODI

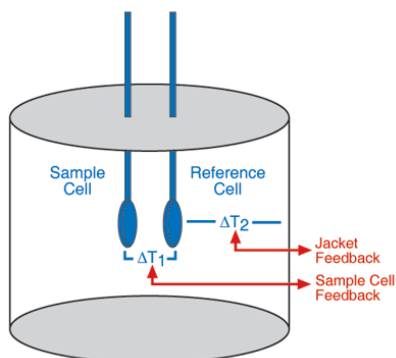
### 2.1 Calorimetria di titolazione isoterma (ITC)

La calorimetria di titolazione isoterma (ITC) è una tecnica biofisica che permette di caratterizzare in maniera diretta l'energetica dell'interazione tra Quaduplex e piccoli ligandi, proteine, peptidi ed altre biomolecole [65]. Esso rappresenta un metodo accurato per determinare in un singolo esperimento i parametri termodinamici che caratterizzano il *binding* a temperatura costante. Tradizionalmente, un esperimento ITC è eseguito utilizzando il metodo della titolazione incrementale, ovvero un preciso volume di titolante è aggiunto ad intervalli di tempo regolari alla soluzione contenente, ad esempio, la macromolecola. Il calore generato o assorbito è registrato sottoforma di picchi. L'integrazione dell'area di ciascun picco, previa normalizzazione per mole di ligando aggiunto e successiva interpolazione mediante un opportuno modello, fornisce la costante di affinità, l'entalpia e la stechiometria del processo di *binding*.

L'ITC permette, anche, di valutare separatamente, a partire dall'energia libera di *binding*, il contributo entalpico ed entropico, questo permette di avere ulteriori informazioni sulla natura delle forze che guidano il processo di interazione [66].

I calorimetri ITC usati per gli esperimenti riportati in questa tesi sono il CSC 5300 nano ITC IIIA e il nano ITC Low Volume della TA instruments.

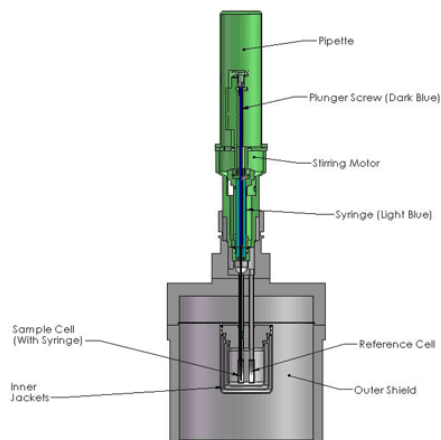
Un calorimetro di titolazione isoterma (ITC) (fig 2.1) è costituito da due celle identiche da 1 mL, una cella di misura che solitamente contiene uno dei due reagenti ed una di riferimento che contiene acqua o tampone. Esse sono composte da un materiale con alta conducibilità termica e sono poste in una camera adiabatica. Una coppia di termopile associata alle celle (TED) è usata per rilevare la differenza di temperatura tra le due durante l'esperimento e mantenerne il controllo. Dei sensori termoelettrici registrano questa differenza in termini  $\mu\text{cal}$  o  $\mu\text{J}$  in funzione del tempo.



**Fig.2.1:** illustrazione di un calorimetro ITC. All'interno del rivestimento adiabatico sono presenti le celle di riferimento contenente acqua e la cella campione contenente uno dei due componenti della titolazione.

L'energia richiesta per riportare a zero la differenza tra le celle rappresenta il segnale calorimetrico ed è monitorato come funzione del tempo.

In un tipico esperimento ITC il ligando è contenuto in una siringa (con un volume compreso tra i 25-250  $\mu\text{L}$ ) montata all'interno di un titolatore automatico (fig 2.2).



**Fig 2.2:** rappresentazione schematica di un calorimetro ITC. In verde è rappresentato il titolatore automatico in cui è alloggiata la siringa, in grigio il rivestimento adiabatico contenente le celle.

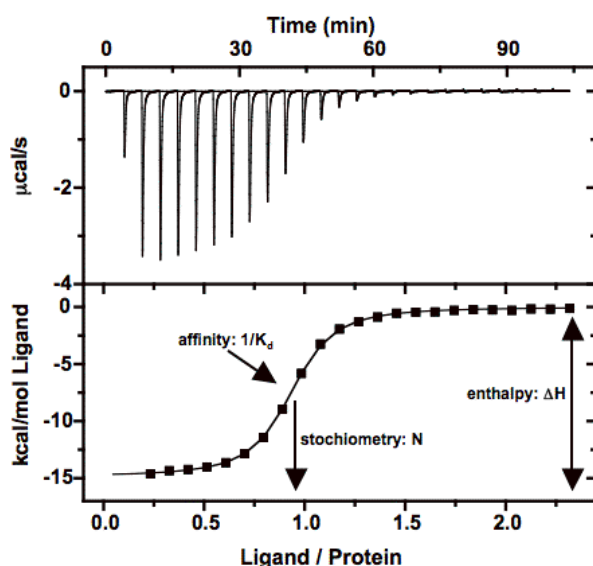
Le iniezioni del ligando all'interno della cella campione, contenente l'altro componente della reazione, sono controllate da un sistema computerizzato che permette di iniettare da 1 a 20  $\mu\text{L}$  per ogni aggiunta. Ad ogni iniezione il rapido mescolamento dei reagenti è garantito dall'agitazione che può essere opportunamente regolato.

Il calore assorbito o prodotto durante una titolazione calorimetrica ad ogni iniezione ( $q_i$ ) è proporzionale alla frazione di ligando legato alla macromolecola ( $V \times \Delta L_i$ ) e alla specifica entalpia di legame. Quindi per la reazione di *binding* analizzata  $q_i = V \times \Delta H \times \Delta L_i$  dove  $V$  rappresenta il volume della cella e  $\Delta L_i$  rappresenta la variazione della concentrazione di ligando ad ogni aggiunta. Il calore ad ogni aggiunta è calcolato integrando l'area di ciascun picco. Nelle iniezioni iniziali, tutto o la maggior parte di ligando si lega alla macromolecola producendo dei picchi solitamente più grandi, la cui area è dipendente dalla natura dell'associazione. Quando la concentrazione di ligando aumenta, la macromolecola si satura e di conseguenza meno calore è sviluppato o assorbito per ulteriori addizioni di titolante. Piccole variazioni di calore dopo la completa saturazione sono attribuite al calore di diluizione del ligando e ad altri effetti non-specifici. Nella fig.2.3 è riportato un profilo del segnale prodotto dalle iniezioni in sequenza(a) e il profilo



ottenuto integrando il calore ad ogni iniezione.

## Isothermal Titration Calorimetry (ITC)



**Fig.2.3:** profilo caratteristico di una titolazione calorimetrica isoterma. In alto sono riportati i dati grezzi, in basso sono riportati i dati integrati ed ininterpolati. Dal punto di flesso della sigmoide è possibile stabilire il rapporto stechiometrico dei due componenti nel complesso, dalla pendenza si deriva la costante di affinità e dal salto tra il piede ed il plateau della sigmoide si determina l'entalpia del processo.

Il profilo sigmoideale dei dati integrati e normalizzati fornisce direttamente la stechiometria del complesso, rappresentata dal punto di flesso della curva. In modo diretto l'esperimento ITC fornisce inoltre i parametri della  $K_b$  e dell'entalpia ( $\Delta H$ ).

Una volta ottenuti questi parametri, le variazioni di energia libera ( $\Delta_b G^\circ$ ) e di entropia ( $\Delta_b S^\circ$ ) relative all'associazione possono essere ricavate usando semplici e ben note espressioni termodinamiche. Il  $\Delta_b G^\circ$  è relazionata alla costante di equilibrio da:

$$\Delta_b G^\circ = - R T \ln K_b \quad (1)$$

dove  $R$  è la costante dei gas e  $T$  è la temperatura espressa in gradi Kelvin.

Il  $\Delta_b S^\circ$  invece può essere calcolato usando la relazione che deriva dal secondo principio della termodinamica:

$$\Delta_b G^\circ = \Delta_b H^\circ - T \Delta_b S^\circ \quad (2)$$

L'ITC permette di dare informazioni anche su *binding* complessi, caratterizzati da stechiometrie superiori a 1:1 discriminando i *binding* multipli da quelli cooperativi.

I limiti di questa tecnica sono solo in relazione alla concentrazione dei sistemi da studiare, solitamente le concentrazioni usate sono comprese tra 10-100 $\mu$ M e in relazione alla costante di associazione. Quest'ultima deve essere compresa tra 10<sup>2</sup>-10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.

Dunque, l'ITC è una tecnica accurata e versatile che si presta all'analisi di numerosi sistemi come quelli che coinvolgono macromolecole, *drug*, proteine, peptidi, anticorpi, etc. Ad essa sono attribuiti numerosi vantaggi quali la possibilità di avere la caratterizzazione termodinamica del processo di binding in un solo esperimento, la possibilità di lavorare in soluzione, una procedura totalmente automatizzata e, con i nuovi strumenti di ultima generazione, quantità ridotte di materiale.

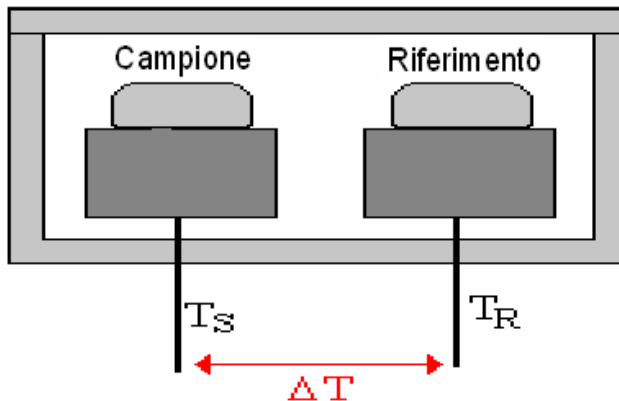
## 2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per ottenere i parametri termodinamici relativi alla stabilità delle strutture TBA\_Cd e TBA\_SCd, sono state condotte misure calorimetriche mediante calorimetria differenziale a scansione. Il metodo si basa sulla misura del calore assorbito o ceduto da un sistema, al variare della temperatura, quando in esso avviene qualche trasformazione. Il termine "differenziale" si riferisce al fatto che il comportamento del campione viene confrontato con quello del riferimento che non subisce, nel corso dell'analisi, alcun cambiamento chimico-fisico. Quanto al termine "scansione", esso indica che durante l'analisi si aumenta la temperatura del campione e del riferimento effettuando una scansione termica. Tale tecnica permette di ricavare una relazione diretta tra due grandezze fondamentali coniugate, la temperatura e l'entalpia, consentendo una trattazione termodinamica rigorosa. Per l'analisi dei sistemi oggetto di questa tesi è stato utilizzato il NANO DSC (TA INSTRUMENTS).

Il NANO DSC presenta una elevata sensibilità e una impareggiabile prestazione nello studio di campioni biologici. In generale il DSC viene utilizzato per determinare la stabilità termica e la capacità termica delle macromolecole, verifica l'effetto delle mutazioni sulla stabilità, determina il numero di domini termodinamici in una proteina, fornisce indicazioni sullo stato oligomero di una proteina o di un acido nucleico[67].

L'intervallo di temperatura esplorabile va da -10°C a 130°C. La velocità di scansione può variare in un intervallo molto ampio, da 0.001 fino a 2°C/min.

Il calorimetro a scansione di temperatura misura le differenze nella capacità termica, al variare della T, tra la cella contenente il campione (sciolto in apposito tampone) e quella contenente il riferimento (lo stesso tampone usato per il campione) (fig.2.4).

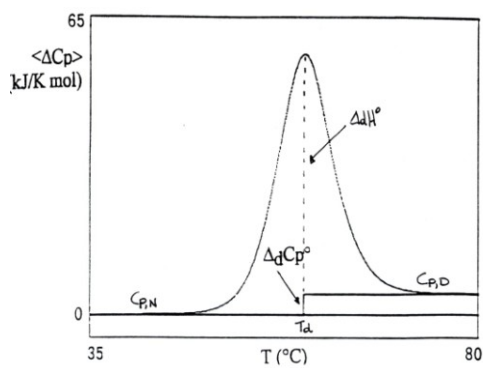


**Figura 2.4:** Schema dell'alloggiamento delle cellette in un calorimetro DSC.

Per valutare tale differenza di capacità termica si riscaldano contemporaneamente, con velocità programmata e costante, entrambe le celle. Il NANO DSC fa uso di un innovativo sistema di due celle capillari, di oro o di platino, che possono contenere fino a 0.33 ml di soluzione. Il capillare, spesso, ritarda l'insorgenza dell'aggregazione delle proteine al termine del processo di denaturazione. Gli elementi riscaldanti e raffreddanti sono degli elementi termoelettrici solidi, che permettono un accurato controllo della temperatura del campione. Il controllo della pressione avviene attraverso un pistone ad alta pressione. La pressione costante (3 Atm) è applicata durante l'esperimento DSC per ottenere la capacità termica ( $C_p$ ) a pressione costante, per prevenire la formazione di bolle e l'ebollizione. Nell'eseguire scansioni su soluzioni, la cella di riferimento è caricata con un opportuno volume di tampone, così da poter registrare la capacità termica eccesso del soluto contenuto nella soluzione caricata nella cella di misura. Le termopile misurano la piccolissima differenza di temperatura tra ciascuna delle celle e il blocco metallico.

Il principio di funzionamento del DSC si basa sulla richiesta di uguaglianza tra le temperature del riferimento e del campione. La differenza nelle temperature rivelata dai sensori fornisce un segnale di correzione per le potenze delle unità di riscaldamento incaricate di realizzare la coincidenza tra le temperature. La differenza tra le energie fornite dai riscaldatori è quindi misurata e registrata come funzione lineare del tempo e della temperatura. Quando la soluzione di misura non mostra alcun effetto termico si registra una differenza di potenziale nulla, dal momento che il flusso di calore verso o dalle celle è uguale; quando, invece, c'è un effetto termico, esso si sovrappone ai flussi di calore tra celle e blocco e si registra una differenza di potenziale non nulla (principio di Calvet). Il tracciato registrato dal calorimetro è una curva potenza/tempo, che può essere convertita in una curva capacità termica molare apparente sulla temperatura calibrando il calorimetro per effetto Joule. Il calorimetro è interfacciato con un Personal Computer per la raccolta automatica dei dati e per l'analisi è stato utilizzato un software appositamente progettato. La curva di capacità termica molare apparente è ottenuta correggendo ogni curva

calorimetrica per la curva di calibrazione strumentale e per la curva di scansione tampone-tampone. La capacità termica così ottenuta è corretta per il numero di moli e per la velocità di scansione. La funzione capacità termica eccesso,  $\langle \Delta C_p \rangle$ , è ottenuta assumendo, per la determinazione della linea di base, una dipendenza lineare dalla temperatura per la capacità termica dello stato nativo. Le curve calorimetriche, pertanto, si originano dalla misura della capacità termica eccesso,  $\langle \Delta C_p \rangle$ , in funzione della temperatura. Un tipico profilo DSC è mostrato in Figura 2.5.



**Figura 2.5:** Profilo DSC di una macromolecola:  $C_{p,N}$  e  $C_{p,D}$  rappresentano le capacità termiche dello stato nativo e denaturato a pressione costante,  $\Delta H^{\circ}$  è la variazione di entalpia associata al processo di unfolding,  $T_d$  è la temperatura di denaturazione

La temperatura del massimo del picco calorimetrico è indicata con  $T_m$  o  $T_d$ . La dissociazione o denaturazione della macromolecola produce un picco centrato alla temperatura  $T_m$  di transizione (temperatura di melting). Se la transizione è reversibile, quando la macromolecola viene riportata allo stato nativo con una scansione in raffreddamento, si osserva un picco di segno opposto.

La variazione d'entalpia associata al processo di denaturazione termica è ottenuta dal diagramma della capacità termica eccesso in funzione della temperatura misurando l'area sottesa al picco, come riassunto dalla seguente relazione:

$$\Delta H_{...l} = \int \Delta C_p(T) dT$$

La variazione d'entalpia così misurata è detta calorimetrica ed è una stima diretta del reale calore che si svolge durante il processo di denaturazione, indipendente da qualsiasi modello proponibile per interpretare la transizione. L'entalpia associata alla transizione è data dall'integrazione dell'area sottesa al picco calorimetrico. Quanto detto implica che

l'area sottesa al picco calorimetrico viene attribuita interamente alla temperatura del massimo del picco, nonostante il processo si estenda su un certo intervallo di temperatura. Questa procedura può essere giustificata in maniera valida dal fatto che costruendo una curva teorica ad uno stadio, con il massimo a  $T_m$ , ed una variazione di entalpia pari a  $\Delta H^{\circ}_{cal}(T_m)$  essa si estende su di un intervallo di temperatura uguale a quello della curva sperimentale. La variazione di entropia associata alla transizione è calcolata dall'integrazione dell'area della curva di  $\langle \Delta C_p \rangle / T$  rispetto alla  $T$ . La variazione d'entropia è ottenuta mediante la seguente relazione:

$$\Delta S^{\circ}_{cal} = \int \frac{\langle \Delta C_p(T) \rangle}{T} dT$$

Uno dei maggiori vantaggi della microcalorimetria differenziale a scansione è rappresentato dalla possibilità di determinare direttamente la variazione di entalpia ( $\Delta H_{cal}$ ) in gioco senza fare ipotesi sulla natura del processo in esame.

La variazione del  $\Delta H_{v.H.}$  stimata a partire dalle curve di *melting* ottenute con il microscopio circolare si basa, invece, su una precisa ipotesi del processo in esame, e cioè che sia un processo che avviene con un singolo stadio (cioè non coinvolge specie intermedie).

Il confronto tra il  $\Delta H^{\circ}(T_m)$  misurato e il  $\Delta H_{v.Hoff}$  indica se la transizione è ad uno stadio o più stadi. Se il processo di denaturazione è realmente a due stati l'entalpia calorimetrica,  $\Delta H(T_d)$ , e l'entalpia di van't Hoff,  $\Delta H_{v.H.}(T)$ , devono coincidere.

Considerando gli errori associati alle determinazioni sperimentali, per affermare che il processo è a due stati è necessario che il rapporto :

$$R = \frac{\Delta_{cal}(T_d)}{\Delta_{v.H.}(T_d)}$$

sia molto vicino all'unità. Confrontando, quindi, i due valori di variazione di entalpia è possibile ottenere una conferma del processo in esame:

se  $\Delta H^{\circ}_{cal} = \Delta H^{\circ}_{v.H.}$  il sistema è del tipo  $N \rightleftharpoons D$ ;

se  $\Delta H^{\circ}_{cal} > \Delta H^{\circ}_{v.H.}$  il processo prevede formazione d'intermedi il cui numero è, approssimativamente, ottenibile dal rapporto tra le due grandezze;

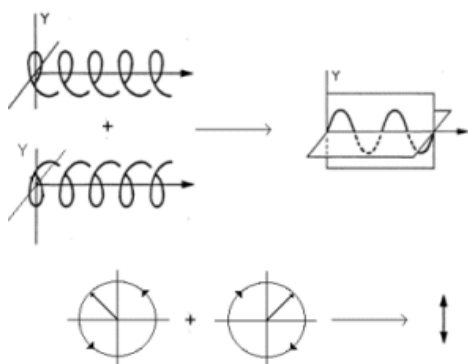
se  $\Delta H^{\circ}_{cal} < \Delta H^{\circ}_{v.H.}$  allora possiamo concludere che il processo prevede meccanismi come, ad esempio, l'aggregazione.

In questa tesi la tecnica DSC è stata utilizzata per verificare la stabilità termodinamica dei derivati oligonucleotidici strutturati un quadrupla elica TBA\_Cd e TBA\_Scd (capitolo 4).

## 2.3 Spettroscopia CD (Dicroismo Circolare)

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che fornisce un gran numero di informazioni relative al contenuto della struttura secondaria di una macromolecola, alla variazione della struttura in funzione della temperatura o di agenti chimici (denaturazione termica o chimica), all'interazione con i ligandi, alla variazione conformazionale di acidi nucleici e proteine. Il CD è una tecnica spettroscopica di assorbimento, basata sull'interazione tra un campione otticamente attivo e la luce piano polarizzata. Un campione è otticamente attivo quando è chirale. Le molecole chirali possono essere intrinsecamente asimmetriche (cioè non possiedono assi di rotazioni impropri) o possono acquisire una chiralità dovuta ad un intorno geometrico tridimensionale asimmetrico (come accade nella maggior parte delle biomolecole).

La radiazione piano polarizzata può essere considerata come la somma di una componente circolarmente polarizzata destra e una componente circolarmente polarizzata sinistra (fig 2.6) aventi la stessa ampiezza.



**Fig.2.6:** rappresentazione della luce piano-polarizzata come somma della componente circolarmente destra e circolarmente sinistra

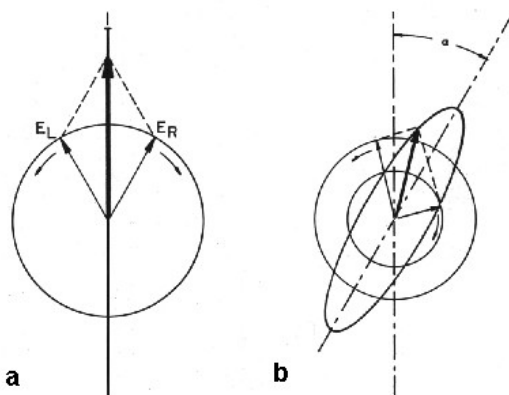
La combinazione delle due componenti circolarmente polarizzate in senso opposto intorno all'asse di propagazione risulta in luce piano polarizzata, che oscilla in un piano perpendicolare alla direzione di propagazione.

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

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

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

Se quest'ultima cade in una zona di assorbimento del campione, oltre allo sfasamento, si avrà un diverso assorbimento delle due componenti circolari, per cui l'ampiezza dei loro vettori elettrici non risulterà più uguale e la radiazione uscente dal campione non è più piano polarizzata (fig. 2.7a), ma ellitticamente polarizzata (fig. 2.7b).



**Fig 2.7:** la radiazione piano polarizzata (a) diventa ellitticamente polarizzata (b) per effetto del passaggio attraverso un campione otticamente attivo

Il fenomeno del dicroismo circolare si ha, quindi, quando la radiazione piano polarizzata incidente sul campione cade in una regione dello spettro elettromagnetico nella quale la molecola assorbe. Le regioni di lunghezza d'onda esplorate possono essere diverse, il caso più comune è quello dell'UV-visibile (200-800 nm). Il dicroismo circolare è quindi un tipo di spettroscopia di assorbimento che sfrutta le stesse transizioni elettroniche che si verificano nel normale assorbimento UV-visibile.

Il CD è la differenza tra i coefficienti di estinzione molare della componente circolarmente polarizzata sinistra e destra ( $\epsilon_L - \epsilon_R$ ) ed è legato alla differenza di assorbenza dalla legge di Lambert-Beer:

$$\Delta A_\lambda = A_L - A_R = \epsilon_L \cdot l \cdot c - \epsilon_R \cdot l \cdot c = \Delta \epsilon \cdot l \cdot c$$

$A_L$  è l'assorbanza della luce circolarmente polarizzata sinistra,  $A_R$  è l'assorbanza della luce circolarmente polarizzata destra,  $\epsilon_L$  è il coefficiente di estinzione molare delle luce circolarmente polarizzata sinistra ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $\epsilon_R$  è il coefficiente di estinzione molare delle luce circolarmente polarizzata destra ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $l$  è il cammino ottico (in cm) e  $c$  è la concentrazione del campione (in M).

Sperimentalmente si misura l'angolo di ellitticità, indicata con  $\theta$ , che è l'arcotangente del rapporto tra l'asse minore e l'asse maggiore dell'ellisse descritta dal vettore campo elettrico. L'ellitticità è correlata al diverso assorbimento delle due componenti come segue:

$$\theta = \pi l (\epsilon_L - \epsilon_R) / \lambda$$

dove  $\epsilon_L - \epsilon_R$  è la differenza tra i due coefficienti di assorbimento che prende il nome di “dicroismo circolare”,  $l$  è il cammino ottico e  $\lambda$  è la lunghezza d’onda della radiazione incidente.

Da  $\theta$ , normalizzando per la concentrazione della soluzione (espressa in molarità) e per il cammino ottico della cella (espresso in centimetri), si ricava l’ellitticità molare:

$$[\theta] = \theta / 10 * c * l$$

dove  $CD$  è il segnale  $CD$ ,  $c$  è la concentrazione molare del singolo filamento,  $l$  è il cammino ottico della cella in centimetri.

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

Questa tecnica presenta numerosi vantaggi come l’utilizzo di piccole quantità di campione (data l’elevata sensibilità), non è una tecnica distruttiva, permette di rilevare i cambiamenti strutturali dovuto a variazione di pH o di intorno chimico, fornisce informazioni in tempi brevi.

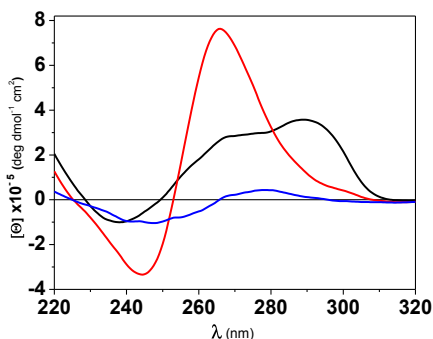
### **2.3.1. Dicroismo circolare nelle quadruplex**

Poiché la tecnica  $CD$  è estremamente sensibile alla variazione della conformazione delle macromolecole, essa può essere molto utile nell’investigazione delle quadruplex. Oltre a fornire informazioni di tipo conformazionali [68][69], è possibile, infatti, monitorando la variazione dello spettro  $CD$  in funzione di un opportuno parametro (temperatura, pH, tempo), studiare un grande numero di fenomeni (denaturazioni, rinaturazioni, cinetiche, *binding*).

Le lunghezze d’onda utilizzate rientrano nel *range* 220-340 nm, tipico intervallo di assorbimento degli acidi nucleici. Le transizioni che originano lo spettro  $CD$  sono, essenzialmente, le transizioni elettroniche  $\pi - \pi^*$  nelle basi azotate. Gli spettri  $CD$  sono sensibili alla conformazione dei legami glicosidici (*syn* o *anti*) delle guanine adiacenti lungo i filamenti che costituiscono la *quadruplex* (figura 1.7) [70]. Guanine che hanno la stessa conformazione glicosidica *anti* lungo un filamento mostrano nello spettro  $CD$  un picco positivo a 264 nm e un piccolo picco negativo a 240 nm, come osservato per la conformazione parallela [71]. Le due conformazioni di tipo ibrido adottate dalle *quadruplex* (Ibrido-1 e Ibrido-2) mostrano un profilo  $CD$  diverso da quello della conformazione parallela: è presente un picco positivo a 290 nm, una spalla meno intensa a 264 nm ed un minimo negativo a 240 nm. Le due conformazioni Ibrido-1 e Ibrido-2 mostrano uno spettro  $CD$  molto simile perché hanno lo stesso *core* di guanine, con analoga conformazione dei legami glicosidici lungo i filamenti della *quadruplex*. Lo spettro  $CD$  del filamento oligonucleotidico non strutturato presenta un’intensità  $CD$  praticamente nulla, con un picco positivo a circa 280 nm ed un negativo a circa 240 nm di bassissima



intensità. In figura 2.8 sono riportati gli andamenti tipici dei profili CD della conformazione parallela (in rosso), ibrida (in nero) e del singolo filamento non strutturato (in blu) (fig.2.8).



**Fig 2.8:** profili CD tipici di una quadruplex parallela (in rosso), ibrida (in nero) e del singolo filamento non strutturato (in blu)

Il dicroismo circolare può essere utilizzato anche per effettuare esperimenti di denaturazione termica, monitorando il segnale CD ad una lunghezza d'onda fissa in funzione della temperatura, o per valutare il *binding* effettuando delle titolazioni.

In questo lavoro di tesi il CD è stato utilizzato per verificare il *folding* delle sequenze oligonucleotidiche utilizzate (d(AGGGTT)<sub>4</sub>, d[(TTAGGG)<sub>8</sub>TT], d[(TTAGGG)<sub>12</sub>TT], d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] d[TGGGGT] e TBA\_Cd, TBA\_SCD ), la stabilità termica dei diversi complessi (azatrux-quadruplex) e il binding delle varie quadruplex al drug.

## 2.4 Spettroscopia di Fluorescenza

La spettroscopia di fluorescenza è una delle tecniche biofisiche più utilizzate per studiare la struttura e la funzione di macromolecole biologiche. Il principio della tecnica si basa sull'emissione di una radiazione ad una certa lunghezza d'onda in seguito all'eccitazione del campione con una determinata energia. L'assorbimento di luce da parte di una molecola corrisponde ad un assorbimento di energia che promuove un elettrone dallo stato fondamentale a quello eccitato. Una volta eccitata elettronicamente, una molecola torna allo stato fondamentale attraverso 2 processi: non radiativi e radiativi. Nei processi non radiativi l'energia in eccesso è dispersa sotto forma di calore, tale energia viene trasferita ai gradi di libertà vibrazionali, rotazionali, e traslazionali delle molecole circostanti attraverso le collisioni e non viene emessa radiazione. Nei processi radiativi le molecole eliminano

l'energia in eccesso emettendo spontaneamente radiazione elettromagnetica. I processi radiativi possono essere di due tipi: fluorescenza e fosforescenza.

Nei sistemi comunemente studiati (contenenti solamente atomi di carbonio, azoto, ossigeno) lo stato elettronico fondamentale è quasi sempre di singoletto ( $S_0$ ). Le transizioni elettroniche più probabili avvengono fra stati di uguale molteplicità; una molecola può quindi essere eccitata dallo stato fondamentale di singoletto ad uno stato di singoletto eccitato ( $S_1$ ), per assorbimento di una radiazione di un'opportuna lunghezza d'onda. La molecola elimina parte dell'energia, accumulata in seguito all'assorbimento, non radiativamente, scendendo la scala dei livelli vibrazionali fino a raggiungere il livello vibrazionale più basso dello stato elettronico eccitato (rilassamento vibrazionale). Da questo livello, poi, la molecola può tornare allo stato fondamentale emettendo spontaneamente una radiazione (radiazione di fluorescenza) che, ovviamente, avrà una minore energia (maggiore lunghezza d'onda) rispetto alla radiazione di assorbimento, poiché parte dell'energia sarà persa per rilassamento vibrazionale. L'emissione di fluorescenza è quindi dovuta alla transizione dal più basso livello vibrazionale dello stato elettronico eccitato di singoletto allo stato fondamentale, anch'esso di singoletto.

In questo lavoro di tesi, la fluorescenza è stata utilizzata da un lato per avere informazioni strutturali riguardo l'oligonucleotide modificato, TBA\_Cd, contenente il dansile come fluoroforo, dall'altro per avere informazioni riguardanti l'interazione di azatrux con le sequenze telomeriche umane e del derivato TBA\_Cd con la trombina. In particolare, per monitorare il *binding* dell'azatrux alle sequenze telomeriche umane è stata seguita la diminuzione della fluorescenza dell'azatrux dovuta all'interazione con il DNA. Per seguire la destrutturazione dell'aptamero modificato si è invece monitorata la diminuzione di fluorescenza del dansile al variare della temperatura. Infine per avere informazioni sul *binding* dell'aptamero modificato alla trombina è stato sfruttato l'effetto FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) che si verifica tra il dansile dell'aptamero e i triptofani contenuti nella trombina.

Il FRET è un processo di trasferimento di energia da una molecola di un donatore D in uno stato elettronico eccitato ad una molecola accettore A nello stato elettronico fondamentale. Esso avviene attraverso un'interazione dipolo-dipolo tra due molecole ed è dipendente dalla distanza tra le due, che deve essere compresa tra 1-10 nm. Inoltre, poiché nel processo di trasferimento l'energia del donatore viene ceduta all'accettore, è necessario che la regione dello spettro in cui il donatore emette coincida quanto più possibile con quella in cui l'accettore assorbe (fig.2.9).

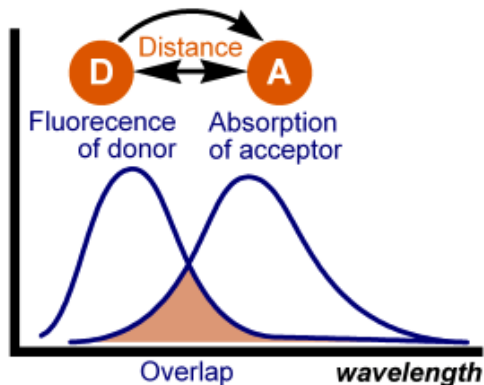


fig.2.9: l'effetto FRET dipende dalla distanza tra donatore e accettore e dalla sovrapposizione tra i loro spettri di emissione ed assorbimento.

Le misure FRET possono essere utilizzate per determinare la distanza tra donatore e accettore (proprio perché fortemente dipendente dalla distanza tra i due), determinare la presenza di interazioni specifiche a livello nanometrico, determinare la velocità dei processi di variazione conformazionale nei sistemi proteici o polimerici.

In questo lavoro di tesi l'effetto FRET è stato utilizzato per investigare l'interazione tra il derivato bis-coniugato del TBA con la trombina. Nel caso specifico il triptofano appartenente alla proteina è considerato un donatore mentre il dansile, appartenente al TBA Cd, è presente come accettore. Come si può osservare dagli spettri riportati in fig. 2.10 lo spettro di emissione del trp (indicato con la linea verde nella regione compresa tra i 300-400nm) è completamente sovrapponibile allo spettro di assorbimento del dansile (linea tratteggiata rossa nella stessa regione dell'emissione del trp), per cui se le due specie sono spazialmente vicine eccitando il trp a 280 nm si osserverà l'emissione del dansile nella regione compresa tra 500-600 nm, per effetto del trasferimento di energia.

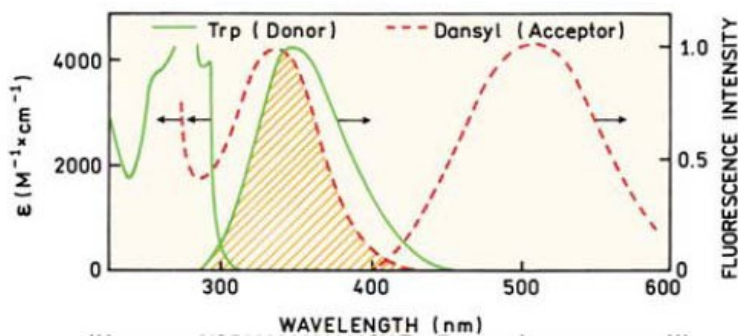


fig.2.10: nella regione compresa tra i 300-400nm è presente lo spettro di emissione del trp (verde), completamente sovrapposto a quello di assorbimento del dansile (rosso tratteggiato nella stessa regione).L'emissione del trp determina un trasferimento di energia al dansile che emette nella regione compresa tra 400-600 nm (linea tratteggiata rossa).

L'analisi dell'effetto FRET, combinato ad altre tecniche spettroscopiche e calorimetriche, ha contribuito a far comprendere la natura dei diversi eventi di binding relativi al processo di interazione tra il TBA modificato e la proteina.

## Capitolo 3

# PROPRIETA' DI BINDING DELLE G-QUADRUPLEX TELOMERICHE: EFFETTO DELLA SEQUENZA E DEL CROWDING

Come descritto nel cap.1, l'estremità a singolo filamento che protrude al 3' del DNA telomerico umano è in grado di strutturarsi in G-quadruplex. In questa regione, l'equilibrio quadruplex-singolo filamento gioca un ruolo fondamentale nel processo di inibizione della telomerasi, enzima over-espresso nell'85% dei tumori, e quindi nella strategia anticancro. Piccole molecole in grado di indurre la formazione e la stabilizzazione delle quadruple eliche possono essere considerate potenzialmente agenti antitumorali. Numerosi studi sono stati volti alla progettazione e sintesi di ligandi in grado di interagire con le G-quadruplex in modo efficace e selettivo[72]. Antrachinoni[73], acridine[74], porfirine, telomostatine[75], sono solo alcune classi di *drug* ampiamente studiate a tale scopo. Nell'investigazione del *binding* di tali molecole con le G-Quadruplex, questi studi trascurano due aspetti fondamentali legati alla natura e alle condizioni fisiologiche delle quadruple eliche telomeriche umane. Il primo è relativo alla lunghezza del filamento telomerico. Le numerose ripetizioni TTAGGG presenti all'estremità 3' terminale fanno ipotizzare che *in vivo* il filamento sia in grado di strutturarsi in più unità di quadruplex consecutive (multimeri) (fig. 3.1) [18][62][76][77][78][79].

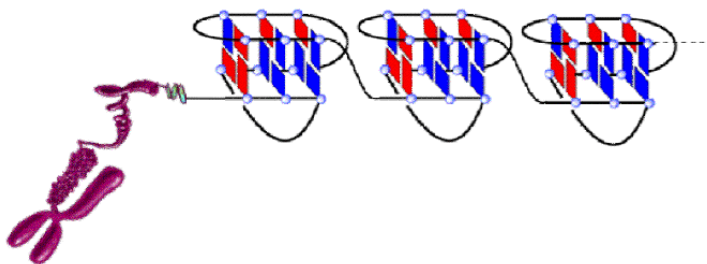
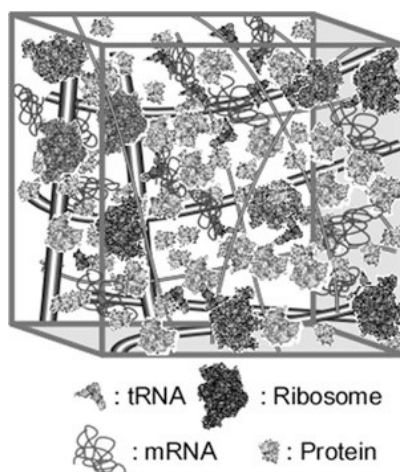


Fig.3.1: rappresentazione schematica delle G-quadruplex consecutive presenti all'estremità telomerica umana

Le proprietà di *binding* appartenenti a queste strutture potrebbero essere differenti da quelle considerate per una singola quadruplex in soluzione. L'influenza reciproca delle unità consecutive, la presenza di un'interfaccia tra queste, potrebbero guidare l'interazione in modo non prevedibile considerando come modello una singola unità di quadruplex. Le sequenze brevi, contenenti solo 4 ripetizioni di TTAGGG, in grado di strutturarsi in una quadruplex isolata non possono rappresentare, quindi, il giusto modello per mimare il telomero umano.

Il secondo aspetto, anch'esso poco considerato, è relativo alle condizioni sperimentali in cui sono analizzate le interazioni tra il DNA telomerico ed i ligandi. Le "condizioni diluite", ovvero quelle costituite da tamponi acquosi, in cui sono stati effettuati la maggior

parte degli esperimenti riportati in letteratura sono lontane dal mimare l'ambiente cellulare nel quale le quadruplex sono presenti[80]. Come è noto, lo spazio intracellulare è occupato da diverse biomolecole come proteine, acidi nucleici, metaboliti e ioni. Queste rappresentano il 40% del volume totale della cellula, da cui si deduce che tale ambiente è alquanto “affollato” (fig.2.2)[81]. Le condizioni di affollamento (*crowding*) molecolare possono influenzare la conformazione delle quadruple eliche e di conseguenza la loro capacità di interagire con il target.

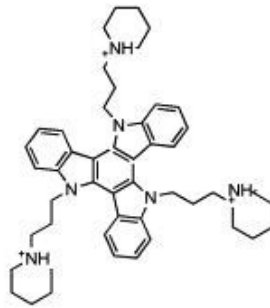


**Fig.3.2:** rappresentazione schematica dello spazio intracellulare “affollato” da biomolecole [81]

Questi due aspetti, fondamentali per valutare le proprietà di *binding* del telomero umano in condizioni fisiologiche, sono stati affrontati in questa tesi di dottorato.

Per lo studio dell'interazione dell'estremità telomerica sono stati utilizzati i troncamenti  $d(AGGGTT)_4$ ,  $d[(TTAGGG)_8TT]$  e  $d[(TTAGGG)_{12}TT]$  in grado di formare rispettivamente una, due e tre quadruple eliche consecutive. La scelta di tali sequenze è stata volta a dimostrare che i troncamenti lunghi, strutturati in più unità di quadruplex, rappresentano un modello migliore del telomero umano nella progettazione di ligandi selettivi per il DNA telomerico. Il secondo aspetto, quello relativo alle condizioni fisiologiche, è stato investigato valutando l'interazione di una singola quadruplex in una soluzione contenente il 40% di polietilenglicole 200 (PEG200), utilizzato come agente di *crowding*.

Un derivato idrosolubile del triazatruxene (azatrux) (fig.3.3) è stato usato come *probe* per investigare questi due aspetti che influenzano il *binding* al telomero.



**Fig.3.3:** struttura del 5,10,15-tris[4(1piperidino)butyl]diindolo[3,2-a:3',2'-c]carbazolo (azatrux)

Tale derivato è stato progettato e sintetizzato dal gruppo del prof. Ortaggi dell'Università "Sapienza" di Roma. Esso è costituito da un *core* in cui è presente un'estesa coniugazione che ne permette l'interazione con i piani della tetrad terminali di guanine della G-quadruplex mediante *end-stacking* e dalle 3 catene laterali contenenti anelli piperidinici che non solo contribuiscono alla sua solubilità ma favoriscono anche l'interazione elettrostatica con i fosfati esposti nel solco della quadruplex [82]. Oltre a queste caratteristiche strutturali azatrux ha mostrato buone proprietà spettroscopiche, in particolare di fluorescenza, che lo hanno reso un buon candidato per tali studi.

### 3.1 Proprietà di *binding* delle quadruplex telomeriche umane (multimeri)

Le proprietà di *binding* relative alle sequenze telomeriche umane in grado di strutturarsi in più unità di quadruplex consecutive sono state studiate a partire dai troncamenti  $d[(TTAGGG)_8TT]$  e  $d[(TTAGGG)_{12}TT]$ , in grado di formare rispettivamente due e tre quadruplex in successione. Tali proprietà sono state, poi, comparate con quelle appartenenti ad una singola unità di quadruplex con sequenza  $d(AG_3TT)_4$ . Questo studio è stato volto a dimostrare che la presenza di un sito all'interfaccia tra le quadruple eliche

consecutive è determinante nel processo di *binding* al telomero e tale proprietà non può essere dedotta conducendo studi di interazione su una singola unità di quadruplex.

La maggior parte dei dati riportati in letteratura sono relativi alle sequenze oligonucleotidiche brevi contenenti solo 4 ripetizioni TTAGGG, in grado, quindi, di strutturarsi in una quadrupla elica singola. Poiché il DNA telomerico umano è costituito da decine di ripetizioni, è ragionevole pensare che questo si strutturi in modo più complesso, ovvero in più unità di quadruplex consecutive. Tale ipotesi è stata supportata da diverse tecniche sperimentali. Una recente immagine di microscopia a forza atomica (AFM), ad esempio, mostra la formazione di 4 quadruple eliche vicine per la sequenza telomerica  $(TTAGGG)_{16}$  [83](fig.3.4).

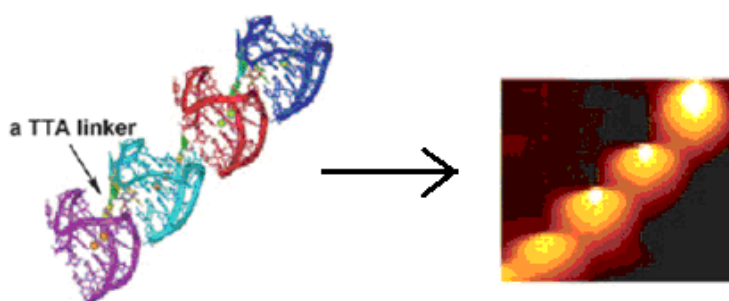
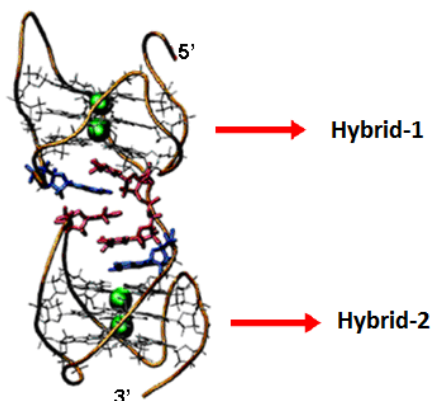


Fig.3.4: immagine AFM del tetramero formato dalla sequenza telomerica lunga  $(TTAGGG)_{16}$

Le strutture multimeriche (termine utilizzato per definire impropriamente le ripetute unità di quadruplex) rappresentano il vero *scaffold* molecolare per la progettazione di molecole potenzialmente antitumorali. L'analisi di queste strutture, però, è resa complessa dalla molteplicità di conformazioni che ciascuna quadrupla elica contenuta nel filamento può assumere, nonché dalla presenza e dal tipo di interazioni che si stabiliscono tra le unità di quadruplex.

Chaires e collaboratori, sulla base di alcune evidenze sperimentali, hanno supposto che la sequenza  $5'(TTAGGG)_8TT3'$  (50 mer), oggetto di questi studi di *binding*, sia in grado di formare in soluzione due quadruplex consecutive caratterizzate dalla successione di una quadrupla elica ibrido 1 e ibrido2 [77] (fig.3.5).





**Fig.3.5:** rappresentazione della struttura appartenente alla sequenza  $5'(\text{TTAGGG})_8\text{TT}3'$ . Le due unità di quadruplex consecutive sono in conformazione ibrido1-ibrido2.

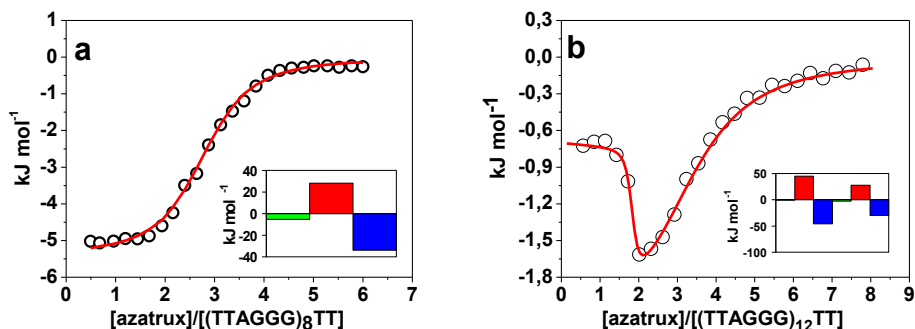
Pochi studi sono riportati in letteratura, per la sequenza  $5'(\text{TTAGGG})_{12}\text{TT}3'$ . Tale troncamento è in grado di formare tre quadruple eliche consecutive caratterizzate da una eterogeneità di conformazioni ibride in soluzione [77][84].

In questa tesi sono state utilizzate una combinazione di tecniche spettroscopiche e calorimetriche per investigare la natura e l'energetica delle interazioni tra azatrux e le sequenze telomeriche  $d(\text{AG}_3\text{TT})_4$ ,  $d5'(\text{TTAGGG})_8\text{TT}3'$ ,  $d5'(\text{TTAGGG})_{12}\text{TT}3'$ . La sequenza  $d(\text{AG}_3\text{TT})_4$ , utilizzata come confronto per le sequenze più lunghe, si presenta in conformazione ibrido2 dovuta alla presenza di basi *flanking* all'estremità 3'.

### 3.1.1 Risultati e discussione

#### 3.1.1.1 Studio del processo di *binding* mediante calorimetria isoterma di titolazione (ITC)

L'energetica dell'interazione tra azatrux e la sequenza  $d[(\text{TTAGGG})_8\text{TT}]$  e  $d[(\text{TTAGGG})_{12}\text{TT}]$ , è stata caratterizzata mediante calorimetria isoterma di titolazione (ITC). Ciascuna sequenza telomerica in cella (10-20  $\mu\text{M}$ ) è stata titolata con aggiunte di 10  $\mu\text{L}$  di una soluzione di ligando (160  $\mu\text{M}$ ) disciolto nello stesso tampone del DNA. Le curve di binding ottenute integrando i dati calorimetrici sono state interpolate mediante un modello a siti indipendenti ed equivalenti.



**Fig.3.6:** profili ITC dell'interazione Azatrux/d[(TTAGGG)<sub>8</sub>TT] (a) e Azatrux/ d[(TTAGGG)<sub>12</sub>TT] (b). Nella firma termodinamica il verde indica il contributo entalpico ( $\Delta_b H$ ), il rosso il contributo entropico ( $T\Delta_b S$ ), il blu l'energia di Gibbs ( $\Delta_b G$ )

Nella figura 3.6 è presente nel riquadro la firma termodinamica del processo. In particolare, il contributo dell'energia libera per i processi di binding (in blu) sono ripartiti nel contributo entalpico (verde) e nel contributo entropico (rosso). In tabella 3.1 sono riportati i parametri termodinamici delle interazioni.

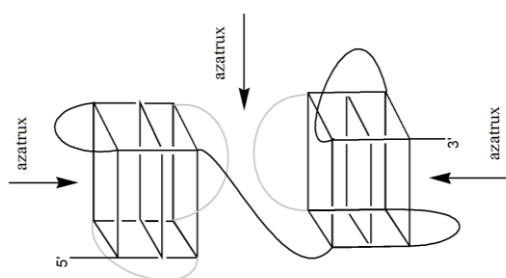
**Tabella 3.1: Parametri termodinamici dell'interazione tra azatrux e le sequenze telomeriche umane**

Sequenze	n ( $\pm 0.1$ )	$k_b$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta_b H^0$ ( $kJ mol^{-1}$ )	$T\Delta_b S^0$ ( $kJ mol^{-1}$ )	$\Delta_b G^0$ ( $kJ mol^{-1}$ )
*(AGGGTT) <sub>4</sub>	1.0	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^5$	-	-	$-36.0 \pm 0.8$
(TTAGGG) <sub>8</sub> TT	2.8	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^6$	$-5.5 \pm 0.3$	$28.5 \pm 0.6$	$-34.0 \pm 0.5$
(TTAGGG) <sub>12</sub> TT	1.8	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^8$	$-0.7 \pm 0.04$	$45.0 \pm 0.3$	$-45.6 \pm 0.3$
	1.8	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$	$-2.3 \pm 0.1$	$28.0 \pm 0.3$	$-30.2 \pm 0.3$

\* i valori sono stati ottenuti mediante fluorescenza

Considerando i valori relativi alla sequenza che forma due unità di quadruplex (dimero), (TTAGGG)<sub>8</sub>TT, si osserva un rapporto stechiometrico Azatrux/dimero di circa 3:1 e una costante di binding di  $1.1 \times 10^6 M^{-1}$ . Sia il contributo entalpico che quello entropico sono termini favorevoli all'interazione. Il contributo entalpico negativo indica la formazione di nuove interazioni ( $-5.5 kJ mol^{-1}$ ) mentre il contributo entropico positivo potrebbe essere dovuto al rilascio di molecole d'acqua e/o ad un rilassamento della struttura [85][86]. Nella

tabella 3.1 i valori del dimero sono comparati con quelli relativi all'interazione dello stesso Azatrux con una singola quadrupla elica (monomero)  $(AG_3TT)_4$ . Per questa sequenza non è stato possibile ottenere dei dati ben risolti mediante ITC poiché il calore misurato per questa interazione è molto basso, pertanto i parametri nella tabella si riferiscono ad un esperimento di titolazione di fluorescenza (riportato in seguito). Azatrux lega la singola unità di quadruplex con una stechiometria 1:1 e una costante di *binding* pari a  $5.0 \times 10^5 M^{-1}$ . È interessante notare come il dimero leghi 3 molecole di ligando, ovvero un'unità in più rispetto a quella attesa considerando la stechiometria 1:1 appartenente alla singola quadruplex. Una possibile interpretazione di tale stechiometria potrebbe essere quella di considerare due siti alle estremità delle quadruplex (*end-stacking*) ed un terzo all'interfaccia tra le due quadruple eliche, nel quale il ligando può intercalarsi (fig.3.7).

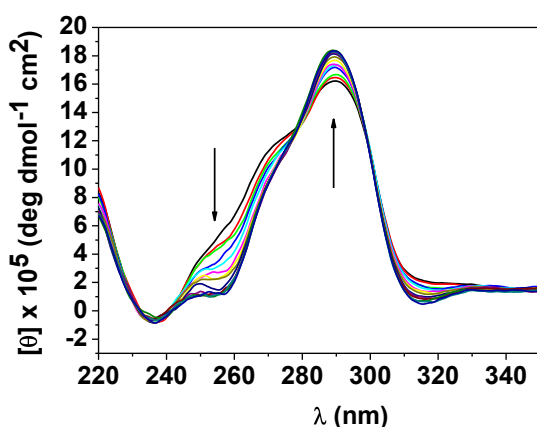


**Fig.3.7:** rappresentazione schematica della possibile interazione tra la sequenza  $(TTAGGG)_8TT$  e tre molecole di azatrux

Per validare l'ipotesi della presenza di un sito a "sandwich" tra le due quadruplex è stato effettuato lo stesso esperimento di titolazione sulla sequenza strutturata in tre quadruplex,  $(TTAGGG)_{12}TT$  [76]. Il profilo ITC (fig.3.6 b) mostra la presenza di due eventi separati, con stechiometria diversa. La curva calorimetrica è stata analizzata considerando i due eventi indipendenti l'uno dall'altro. Ciascun evento di *binding* presenta una stechiometria incentrata su 2 per un legame complessivo di 4 molecole di azatrux ad una molecola di  $(TTAGGG)_{12}TT$ . Tale stechiometria è consistente con l'ipotesi che due molecole si leghino al 3' e al 5' e altre due ai due siti interni posti all'interfaccia delle quadruplex. Se si confrontano i dati con quelli relativi alla sequenza in grado di formare due quadruple eliche il diverso profilo termodinamico degli eventi potrebbe essere attribuito alle diversità dei siti formati nelle due sequenze. Questo studio preliminare suggerisce, quindi, che la presenza di siti interni alla struttura possono avere un ruolo importante nell'interazione con il ligando.

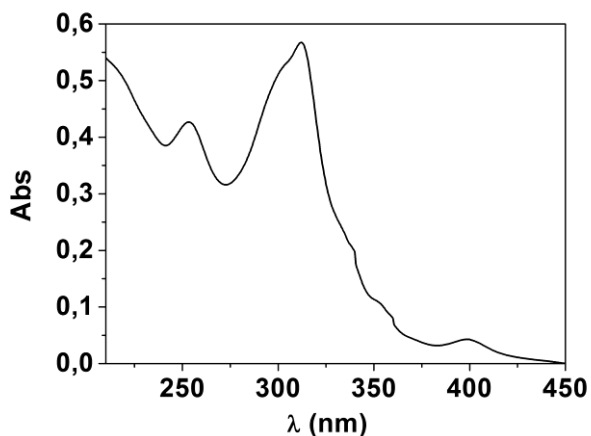
### 3.1.1.2 Studio del processo di *binding* mediante tecniche spettroscopiche (UV, CD, Fluorescenza)

Per avere ulteriori informazioni riguardo le interazioni tra azatrux e le sequenze telomeriche, i campioni sono stati sottoposti ad analisi spettroscopica mediante CD. In figura 3.8 sono riportati gli spettri della titolazione di (TTAGGG)<sub>8</sub>TT con azatrux.



**Fig.3.8:** spettri di Dicroismo Circolare di (TTAGGG)<sub>8</sub>TT (2μM) all'aumentare della concentrazione di azatrux. Le frecce indicano l'incremento del segnale a 290 nm e il decremento del segnale a 255 nm osservati durante la titolazione .

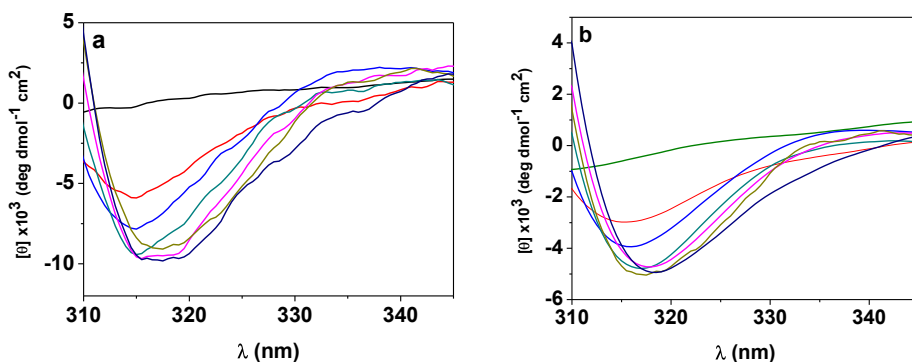
Come si può osservare la sequenza formante due quadruple eliche, in assenza di ligando, mostra il tipico spettro di una struttura ibrido1-ibrido2 [77]. Lo spettro CD del complesso mostra un incremento della banda a 290 nm e un decremento a 255 e 316 nm, rilevando un cambio conformazionale del DNA all'aggiunta di azatrux. Il cambiamento dello spettro CD potrebbe essere dovuto al contributo dello spettro CD indotto (ICD) di azatrux nella regione di assorbimento del DNA, infatti lo spettro UV di azatrux è compreso tra i 220 e i 380 nm, con un massimo a 313 nm [82](fig.3.9).



**Fig.3.9:** spettro UV di azatrux in soluzione tampone contenente 20mM fosfato, 0.1 mM EDTA, 70 mM KCl a pH 6.8

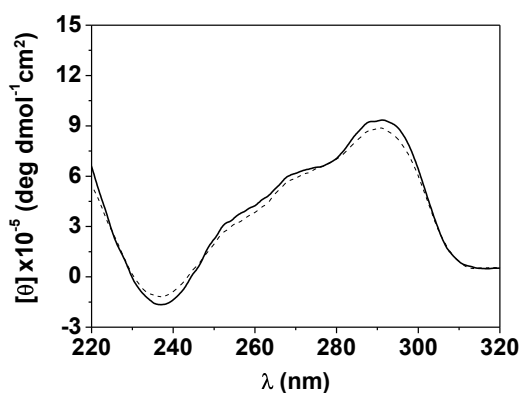
La figura 3.10 mostra l'andamento degli spettri CD ottenuti titolando azatrux con la sequenza telomerica (TTAGGG)<sub>8</sub>TT (in a) e con (AGGGTT)<sub>4</sub> (in b). All'aumentare della concentrazione del DNA in entrambi i casi si assiste ad una induzione del segnale CD nella regione di azatrux. Come si può osservare questo fenomeno è più intenso per la sequenza formante due unità di quadruplex rispetto a quella monomerica.

In questa regione a lunghezze d'onda superiori ai 310 nm, non è presente assorbimento delle sequenze telomeriche e l'induzione del segnale si deve all'interazione del ligando con i troncamenti in esame. L'incremento negativo del segnale CD indotto è significativo di un *binding* tra il ligando e le quadruplex di tipo intercalativo o di un *end-stacking* [87][88].



**Fig.3.10:** spettri ICD (*induced CD*) di azatrux all'aumentare della concentrazione di (TTAGGG)<sub>8</sub>TT (a) e all'aumentare della concentrazione di (AGGGTT)<sub>4</sub> (b)

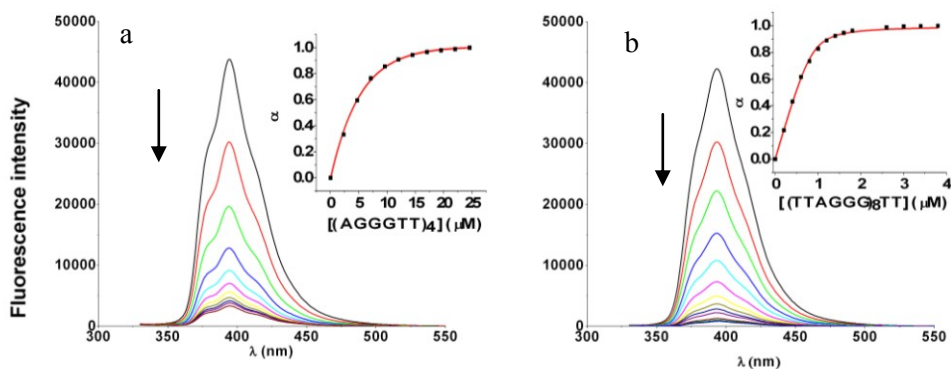
Infine, osservando lo spettro CD della sequenza  $(TTAGGG)_{12}TT$  (fig.3.11) sia la forma che l'intensità suggeriscono la presenza di tre quadruplex consecutive (linea continua) e tale profilo non subisce alcuna variazione quando il DNA è complessato con il ligando (linea tratteggiata).



**Fig.3.11:** profilo CD della sequenza telomerica  $(TTAGGG)_{12}TT$  (linea continua) e del complesso azatrux/ $(TTAGGG)_{12}TT$  (linea tratteggiata) in eccesso di azatrux

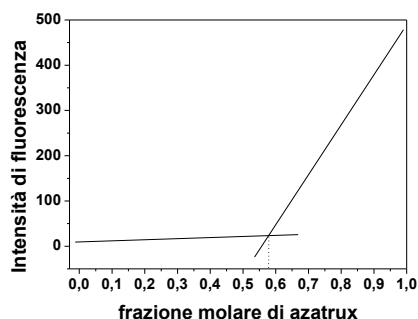
È interessante notare che nello spettro del complesso non è presente un segnale CD indotto nella regione del ligando, questo suggerisce la presenza di un legame simmetrico di azatrux alla struttura multimerica in grado di formare tre quadruplex.

Il derivato del triazatruxene ha mostrato buone proprietà di fluorescenza che sono state utilizzate per ricavare delle informazioni riguardanti la sua interazione con il DNA. In figura 3.12 è mostrata la variazione degli spettri di fluorescenza ottenuti titolando azatrux con il 24 mer (a) e il 50 mer (b).



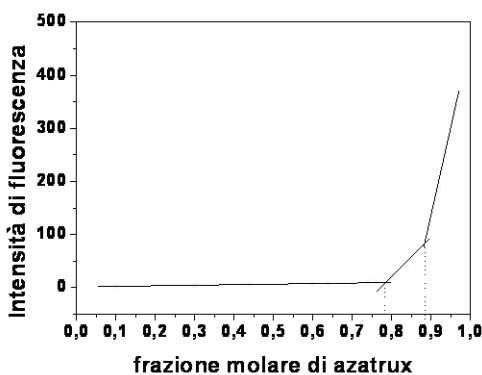
**Fig.3.12:** spettri di emissione di fluorescenza di azatrux in assenza e in presenza di  $(AGGGTT)_4$  (a) e di  $(TTAGGG)_8TT$  (b) a  $T= 25\text{ }^\circ\text{C}$ . Le frecce indicano una diminuzione del segnale di fluorescenza all'aumentare della concentrazione. Nell'*inset* è riportata la frazione di azatrux legato in funzione della concentrazione del DNA con la relativa interpolazione dei dati mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti. La lunghezza d'onda di eccitazione di azatrux è 320 nm.

Azatrux mostra un massimo di emissione di fluorescenza a 394 nm quando è eccitato a 320nm. Come si osserva, all'aumentare della concentrazione di ligando l'intensità degli spettri di fluorescenza diminuisce. Al punto di saturazione la fluorescenza di azatrux è completamente "quenciata" in presenza di  $(TTAGGG)_8TT$  (b) mentre è ancora presente in maniera residuale nel complesso con  $(AGGGTT)_4$ . Nel riquadro di ciascuna figura (3.12 a,b) sono mostrate le corrispondenti curve di *binding* ottenute riportando la frazione di ligando legato ( $\alpha$ ) in funzione della concentrazione di DNA. I dati sperimentali sono stati interpolati mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti che ha permesso di ricavare i parametri relativi alla costante e alla stechiometria. Per la sequenza  $(AGGGTT)_4$ , la stechiometria del complesso è uguale a 1 e la costante di binding è  $5.0 \times 10^5\text{ M}^{-1}$ . Tale stechiometria è confermata anche dall'esperimento *job plot* (fig. 3.13), esperimento nel quale la concentrazione del complesso rimane costante ma varia la frazione molare di ligando e che permette di determinare la stechiometria di uno o più eventi di *binding*. Riportando l'intensità di fluorescenza in funzione della frazione molare di ligando si osserva un cambio della pendenza dei dati sperimentali ad una frazione molare di azatrux di circa 0.57.



**Fig.3.13:** esperimento job plot di fluorescenza azatrux/(AGGGTT)<sub>4</sub>. L'incrocio delle rette rappresenta la stechiometria del complesso corrispondente a 0.57 in termini di frazione molare di azatrux.

L'interpolazione dei dati per il complesso azatrux/(TTAGGG)<sub>8</sub>TT (riquadro in fig.2.12 b) ha permesso di ottenere la  $k_b$  pari a  $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Il valore della stechiometria è risultato di circa 8-9 molecole di *drug*, valore di gran lunga maggiore rispetto alla stechiometria osservata mediante ITC. Per indagare questa discordanza è stato eseguito un esperimento per la costruzione di un *job plot* (fig.3.14).



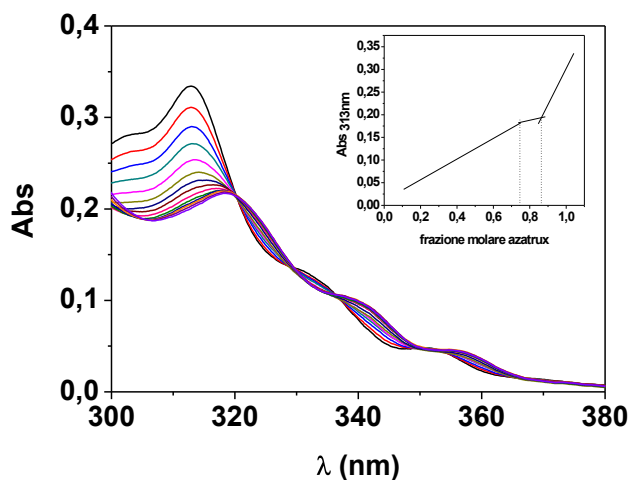
**Fig.3.14:** esperimento job plot di fluorescenza azatrux/(TTAGGG)<sub>8</sub>TT. L'incrocio tra le rette mostra la stechiometria del complesso pari a 3:1 per il primo evento e 8:1 per il secondo evento di binding.

L'analisi del job plot mostra che sono distinguibili due eventi: il primo per una frazione di ligando uguale 0.77 corrispondente ad una stechiometria 3:1 per il complesso ligando/DNA, il secondo per una frazione molare pari a 0.88 corrispondente ad una stechiometria di circa 8:1 per lo stesso complesso. La stechiometria del primo evento è in accordo con i dati ITC, mentre il secondo evento non è visibile nell'esperimento di calorimetria. Quest'ultimo potrebbe essere dovuto alle interazioni elettrostatiche non specifiche che si vengono ad instaurare tra i fosfati del DNA carichi negativamente e le tre cariche positive presenti su ciascuna molecola di azatrux quando le concentrazioni delle



specie sono elevate. Probabilmente tali interazioni avvengono senza cessione o acquisto di calore e questo spiegherebbe perché l'ITC non è in grado di rilevarle.

L'interazione tra azatrux e i troncamenti telomerici umani è stata ulteriormente investigata mediante titolazione UV-Vis. In figura 3.15 sono mostrati gli spettri della titolazione UV di azatrux all'aumentare della concentrazione di  $(TTAGGG)_8TT$ , mentre nel riquadro è mostrato l'esperimento job plot per lo stesso complesso.



**Fig.3.15:** spettri di assorbimento UV in assenza e in presenza di  $(TTAGGG)_8TT$  A 25°C. Nel riquadro è mostrato il job plot UV per il *binding* tra azatrux e la sequenza  $(TTAGGG)_8TT$

Nel profilo della titolazione è possibile osservare una diminuzione dell'intensità dello spettro UV di azatrux all'aumentare della concentrazione del DNA. Oltre ad un 30 % di ipocromicità è presente anche uno *shift* verso il rosso degli spettri, da 313 nm a 320. Anche l'esperimento job plot UV mostra una stechiometria complessa caratterizzata da due eventi che sono in accordo con il job plot di fluorescenza. Anche in questo caso il primo evento corrisponde ad una stechiometria 3:1, mentre il secondo è indicativo di una stechiometria più alta.

### 3.1.2 Conclusioni

Il derivato idrosolubile del triazatruxene è stato utilizzato per investigare le proprietà di *binding* di sequenze telomeriche in grado di formare più unità di quadruplex consecutive, tali proprietà sono state poi comparate con quelle appartenenti ad una singola quadrupla elica. In primo luogo è stata analizzata la sequenza  $(TTAGGG)_8TT$ , che è in grado di formare due quadruple eliche consecutive di tipo ibrido1-ibrido2 tenute insieme da

interazioni di *stacking* presenti all'interfaccia [77]. Il confronto è stato fatto analizzando la sequenza (AGGGTT)<sub>4</sub>, alla quale precedenti studi hanno attribuito la formazione di una singola quadruplex di tipo ibrido2 [62][63].

Azatrux lega la sequenza dimerica con una più alta stechiometria (3:1) rispetto a quella attesa considerando come modello la singola quadruplex, per questa unità infatti il complesso mostra una stechiometria 1:1. Il rapporto stechiometrico 3:1 azatrux/(TTAGGG)<sub>8</sub>TT è consistente con una interazione di *stacking* di due molecole di ligando ai piani di guanine terminali ed una molecola intercalante all'interfaccia tra le due quadruplex. A sostegno di questa ipotesi ci sono i risultati ottenuti sulla sequenza (TTAGGG)<sub>12</sub>TT, strutturata in tre quadruple eliche consecutive. Per tale sequenza i siti presenti all'interfaccia sono due e la stechiometria totale del complesso è di 4 molecole di drug (due all'interfaccia e due esterne) per una molecola di DNA. Il segnale CD indotto con andamento negativo è diagnostico di una interazione end-*stacking*, che conferma l'ipotesi di binding. Inoltre l'effetto ipocromico dell'assorbanza e la forte diminuzione dell'intensità di fluorescenza quando azatrux lega il DNA suggeriscono una interazione di tipo end-*stacking* come era atteso per questa molecola.

È interessante notare che la sequenza strutturata in 3 unità lega il *drug* con una affinità molto più alta rispetto a quella monomerica e dimerica (tab.3.1 primo evento). Questo potrebbe essere attribuito proprio alla presenza dei due siti all'interfaccia quadruplex-quadruplex, tuttavia sono necessari ulteriori studi per confermare tali ipotesi.

In conclusione, dunque, questo lavoro è stato volto a dimostrare che 1) le unità di quadruplex presenti in strutture complesse non sono indipendenti l'una dall'altra e 2) che la presenza di siti all'interfaccia può avere una notevole influenza sul *binding* che non è prevedibile considerando come modello una singola quadruplex. Tali studi possono essere un valido supporto al *drug-design* di nuove molecole in grado di legare in modo specifico sequenze telomeriche umane.

### **3.1.3 Materiale e metodi**

#### **3.1.3.1 Preparazione dei campioni**

Le sequenze oligonucleotidiche d(AGGGTT)<sub>4</sub>, d(TTAGGG)<sub>8</sub>TT, d(TTAGGG)<sub>12</sub>TT usate per questo studio sono state sintetizzate e purificate dalla Primm Company (Milano). Il derivato 5,10,15-tris[4(1-piperidino)butil]diindolo[3,2-a:3',2'-c]carbazolo (azatrux) è stato sintetizzato dal gruppo del prof. Ortaggi dell'università Sapienza di Roma, secondo il protocollo riportato in letteratura[82].

I campioni di DNA sono stati preparati dissolvendo il composto liofilizzato in una soluzione tampone contenente 20mM fosfato, 0.1mM EDTA, 70 mM KCl a pH 6.8. le

soluzioni così preparate sono state annilate riscaldandole a 95°C per 5 minuti e lasciandole raffreddare lentamente fino a T ambiente. Infine le soluzioni sono state equilibrate a 4°C per 1 giorno. La concentrazione degli oligonucleotidi è stata misurata mediante assorbimento UV a 90°C usando il valore del coefficiente di estinzione molare a 260nm di 245.100 per d(AGGGTT)<sub>4</sub>, 505.600 per d(TTAGGG)<sub>8</sub>TT e 750.000 per d(TTAGGG)<sub>12</sub>TT. Il coefficiente di estinzione molare è stato calcolato con il modello del primo vicino [89]. La soluzione di azatrux è stata preparata sciogliendo il liofilizzato nello stesso tampone usato per il DNA. La concentrazione è stata determinata usando il coefficiente di estinzione molare a 313 nm= 48000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 3.1.3.2 Esperimenti di calorimetria di titolazione isoterma (ITC)

Gli esperimenti ITC sono stati effettuati a 298K usando il microcalorimetro CSC-5300 Nano ITC. Prima di ogni esperimento il pH delle soluzioni è stato controllato, la cella di riferimento è stata riempita con acqua deionizzata e le soluzioni di DNA sono state degassate per 5 min per eliminare bolle d'aria.

Ad ogni iniezione è stato aggiunto un volume di 5-10 µL di una soluzione contenente azatrux (160 µM) ad una soluzione di DNA (10-20 µM) disciolta nello stesso tampone, per un volume totale di 250 µL. Per permettere al sistema di ritornare in equilibrio per ogni iniezione è stato programmato un tempo di 400 s. Il calore di diluizione è stato registrato effettuando un altro esperimento in cui il ligando è stato titolato nel solo tampone. Il calore della diluizione è stato poi sottratto alla misura di interazione. Il calore normalizzato in funzione del rapporto molare dei componenti ha fornito una isoterma di binding. Tale isoterma è stata interpolata mediante un modello a siti indipendenti ed equivalenti grazie al programma Bindwork che ha permesso la valutazione diretta della K<sub>b</sub>, della stechiometria e dell'entalpia del processo. Gli altri parametri termodinamici sono stati calcolati mediante le relazioni descritte nel capitolo 2.

### 3.1.3.3 Esperimenti di dicroismo circolare (CD)

Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-715, associato ad un elemento Peltier per il controllo della Temperatura (modello PTC-378W1). L'ellitticità molare  $\theta$  (mdeg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) è stata calcolata dall'equazione  $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}}/10 \times l \times c$ , dove  $[\theta]_{\text{obs}}$  è l'ellitticità, C è la concentrazione molare dell'oligonucleotide e l il cammino ottico. Per registrare lo spettro CD compreso tra 220 e 320 nm sono state utilizzate celle con un cammino ottico compreso tra 0.1 e 1.0 cm e una concentrazione di oligonucleotide compresa tra 2 e 40 µM. Gli spettri sono stati acquisiti con una velocità di scansione di 20 nm /min, una bandwidth di 2 nm. Ad ogni spettro è stata sottratta la misura del tampone.

Il CD indotto è stato registrato aggiungendo la soluzione di DNA a quella di azatrux in cella. La concentrazione di azatrux per i vari esperimenti è stata di 8  $\mu\text{M}$  mentre la concentrazione di DNA è variata in un range compreso tra 0-60  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.3.4 Esperimenti di Fluorescenza

Le misure di fluorescenza sono state effettuate mediante lo spettrofluorimetro JASCO FP-750. Le *slit* per l'eccitazione e per l'emissione sono state programmate per una larghezza di 5nm. Azatrux è stato eccitato a 320 nm e lo spettro di emissione è stato registrato tra i 340 e i 500nm. Il processo di associazione tra le strutture quadruplex e il drug è stato studiato seguendo la variazione di fluorescenza all'aumentare della concentrazione di DNA. Le titolazioni sono state eseguite aggiungendo il DNA alla soluzione contenente azatrux in cella. La concentrazione di azatrux in cella è di 8  $\mu\text{M}$  disciolto in una soluzione tampone contenente 20mM fosfato, 0.1mM EDTA, 70 mM KCl a pH 6.8. La frazione del ligando legato ( $\alpha$ ) in ogni punto della titolazione è stata calcolata seguendo la variazione dell'intensità di fluorescenza a 395 nm, utilizzando la seguente relazione:

$$\alpha = \frac{I_{\lambda} - I_{\lambda}^{\text{free}}}{I_{\lambda}^{\text{bound}} - I_{\lambda}^{\text{free}}}$$

Dove  $I_{\lambda}$  rappresenta l'intensità di fluorescenza a 395nm alle diverse concentrazioni di DNA;  $I_{\lambda}^{\text{free}}$  rappresenta l'intensità di fluorescenza del drug da solo e  $I_{\lambda}^{\text{bound}}$  di quello completamente legato.

Per la costruzione del job plot la frazione molare di azatrux è stata fatta variare da 0 a 1 e la concentrazione totale di ligando+DNA (8 $\mu\text{M}$ ) è rimasta costante durante tutto l'esperimento.

### 3.1.3.5 Esperimenti di titolazione UV-Vis

Le titolazioni UV-Vis sono state condotte allo spettrofotometro Cary 5000 UV-Vis, associato ad un termostato. I campioni sono stati analizzati in cellette di quarzo da 1 cm. Gli spettri sono stati registrati in un range compreso tra 300-380 nm alla temperatura di 25 °C. Per la costruzione del job plot la frazione molare di azatrux è stata fatta variare da 0 a 1 e la concentrazione totale di ligando+DNA (8 $\mu\text{M}$ ) è rimasta costante durante tutto l'esperimento. Tale esperimento è stato utilizzato per valutare la stechiometria dei complessi.

### 3.2 Il *binding* delle sequenze telomeriche in condizioni di affollamento molecolare (*crowding*)

Oltre alla lunghezza e alla variabilità strutturale dei troncamenti telomerici costituiti da più unità di quadruplex, l'altro aspetto che bisogna considerare nell'approccio razionale al *drug-design* di molecole in grado di legarsi al telomero umano *in vivo* è quello relativo alla conoscenza delle strutture quadruplex presenti in un ambiente fisiologico. Come è noto, lo spazio intracellulare è occupato per il 40% da molecole di varia natura [80][90][91][92], pertanto l'ambiente cellulare in cui avvengono la maggior parte delle reazioni biochimiche è sicuramente affollato (*crowded*).

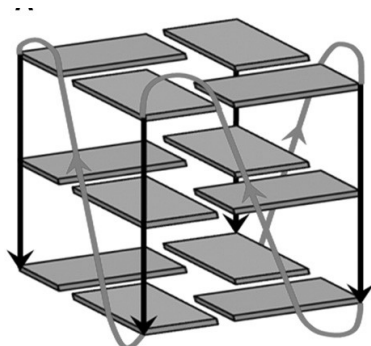
Numerosi studi hanno dimostrato che il "*molecular crowding*" non solo influenza la stabilità e la strutturazione delle biomolecole ma anche la termodinamica e la cinetica dei processi di associazione e dissociazione in cui esse sono coinvolte [93][94][95]. Le condizioni di affollamento molecolare sembrano essere lontane, dunque, dalle soluzioni diluite nelle quali normalmente vengono studiati questi sistemi. Uno studio realistico delle sequenze telomeriche umane necessita, quindi, di analizzare queste strutture in un tampone che mimi le condizioni cellulari.

Solitamente tali condizioni sono riprodotte mediante l'utilizzo di co-soluti. Questi ultimi devono essere dotati di inerzia nei confronti dei sistemi analizzati, devono essere sufficientemente solubili nel tampone acquoso e commercialmente disponibili come polimeri di varia lunghezza [96]. Essi sono definiti *agenti di crowding*. Gli agenti di crowding non interagiscono in modo specifico con la macromolecola studiata ma, per effetto del volume escluso e della deidratazione, possono influenzare la conformazione adottata dalla macromolecola in esame [97].

A tale scopo, diverse molecole sono state utilizzate come mimetici delle condizioni fisiologiche quali alcoli, glicoli, amminoacidi, acetonitrile, ammine naturali[98][99].

Il più diffuso agente di *crowding* è rappresentato dal polietilen-glicole (PEG), un polimero naturale che si dissolve in acqua a concentrazioni relativamente elevate e che si trova commercialmente disponibile in catene polimeriche con differente peso molecolare. Esso non interagisce con le quadruple eliche poiché la sua interazione sarebbe sfavorita termodinamicamente. La sua funzione è quella di occupare un notevole volume sottraendolo all'acqua.

Recenti studi hanno messo in luce che le condizioni di *molecular crowding* in soluzione di  $K^+$  favoriscano la conversione della G-quadruplex di tipo ibrido in una conformazione tutta parallela di tipo "propeller"(fig.3.16).



**Fig.3.16:** rappresentazione schematica di una quadruplex parallela di tipo “propeller” presente in condizioni di affollamento molecolare

La conversione conformazionale indotta dal PEG dimostra che il *molecular crowding* gioca un ruolo importante nella formazione di quadruplex delle regioni telomeriche e può drasticamente alterare le proprietà cinetiche e biofisiche di tali strutture.

È dunque necessario studiare la natura delle interazioni *quadruplex-drug* in queste condizioni più vicine a quelle presenti nel nucleo.

Per analizzare questo aspetto è stata investigata l’interazione di azatrux con una quadrupla elica parallela formata dalla sequenza telomerica umana d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] in una soluzione al 40% di PEG200. Il modo in cui azatrux interagisce con la quadruplex è stato caratterizzato mediante spettroscopia CD, UV e fluorescenza, mentre l’energetica dell’interazione è stata determinata mediante ITC.

L’interazione di azatrux con la sequenza d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] formante una quadruplex parallela è stata comparata con quella relativa alla quadruplex parallela tetra molecolare formata dalla sequenza d[TGGGGT]. Infine, per valutare la selettività di interazione è stato caratterizzato il *binding* di azatrux alla doppia elica e ad un’altra quadruplex presente nel genoma (c-Kit87up) nelle medesime condizioni sperimentali.

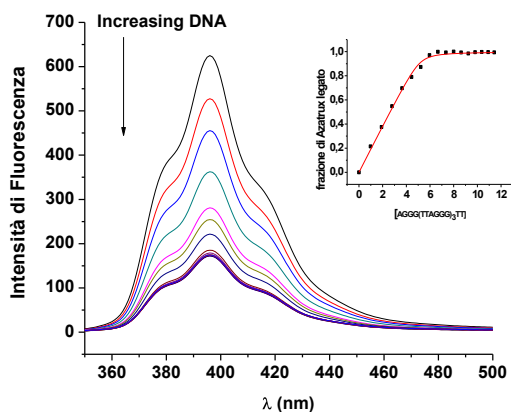
### 3.2.1 Risultati e discussione

#### 3.2.1.1 Studio del *binding* in “crowding conditions” mediante tecniche spettroscopiche (UV, Dicroismo Circolare, Fluorescenza)

La spettroscopia di fluorescenza ed UV-Vis sono state utilizzate per investigare il *binding* della sequenza telomerica d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT], in grado di strutturarsi in una quadrupla elica parallela in una soluzione al 40% di PEG 200, ad azatrux.

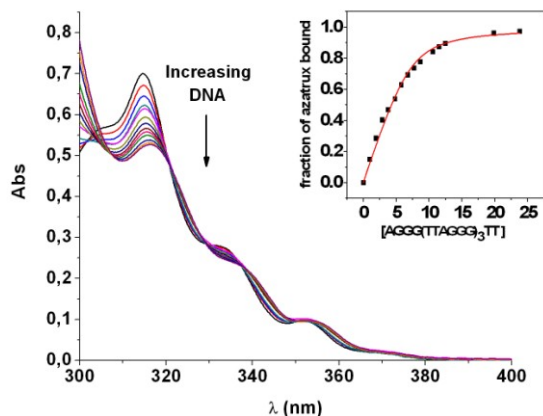
Quando azatrux non è legato mostra un massimo di emissione di fluorescenza a 394 nm quando è eccitato a 321 nm. La figura 3.17 mostra un decremento dell’intensità degli

spettri di emissione del derivato azatruxene all'aumentare della concentrazione di DNA, senza però che ne sia modificata la forma. La curva di *binding* presente nell'*inset* è stata ottenuta riportando la frazione molare del ligando legato in funzione del rapporto molare  $[DNA] / [azatrux]$ . L'interpolazione dei dati mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti ha permesso di ottenere la stechiometria del complesso pari a 1:1 e la costante di binding uguale a  $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ .



**Fig.3.17:** spettri di emissione di fluorescenza di una soluzione  $8 \mu\text{M}$  di azatrux in assenza e in presenza della quadrupla elica telomerica. Nel riquadro i dati sono riportati come frazione di azatrux legato in funzione della concentrazione del DNA. L'interpolazione (linea rossa) è stata effettuata mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti.

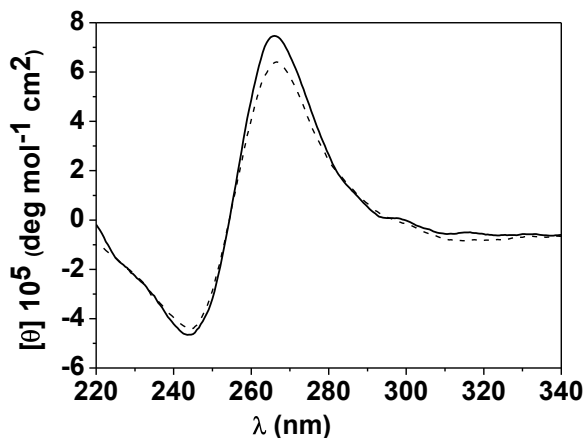
Gli spettri UV-Vis di azatrux all'aumentare della concentrazione di DNA mostrano una ipocromicità di circa il 30% e uno shift del massimo a più alte lunghezze d'onda (*red shift*) da 313 nm a 317 nm (fig.3.18).



**Fig.3.18:** spettri UV-Vis di una soluzione 7  $\mu\text{M}$  di azatrux all'aumentare della concentrazione della quadruplex telomerica. Nel riquadro è riportata la frazione di ligando legato in funzione della concentrazione di  $d[\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}]$ .

Come si può osservare sono presenti diversi punti isobestici rispettivamente a 321 nm, 329 nm e 337 nm che indicano chiaramente l'esistenza di un equilibrio di binding con la presenza in soluzione della specie libera e legata. L'intenso effetto ipocromico suggerisce che il modo in cui azatrux si lega alla quadrupla elica telomerica è di tipo *end-stacking*. Interpolando i dati riportati come frazione di ligando legato in funzione della concentrazione di  $d[\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}]$  (fig 3.18 riquadro), si ottiene la stechiometria del complesso pari a 1:1 e la  $k_b$  uguale a  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

In presenza del 40% di PEG lo spettro CD mostra il tipico profilo di una quadruplex parallela con un massimo diagnostico a 264nm e un minimo a 241 nm (fig.3.19).



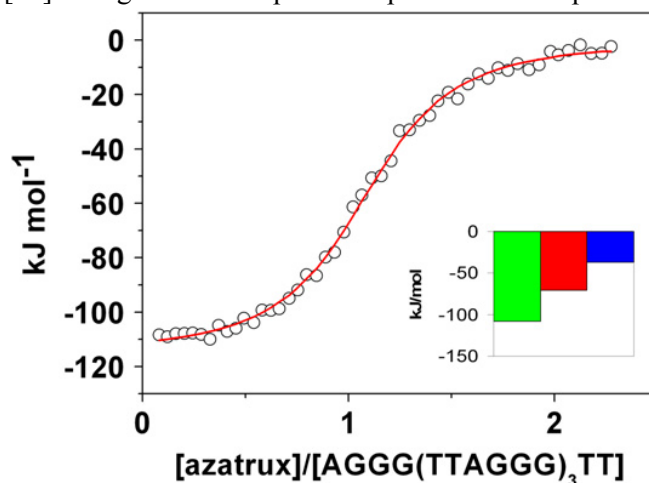
**Fig.3.19:** spettro CD della sequenza telomerica umana  $d[\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}]$  in condizione di crowding (linea continua), insieme al suo complesso 1:1 con azatrux (linea tratteggiata)



Questo risultato è in accordo con altri studi che indicano che il PEG200 induce la formazione di una quadrupla elica parallela[100][101]. Come si osserva dalla fig.3.19, l'aggiunta di azatruX in un complesso 1:1 non modifica significativamente la topologia della quadrupla elica.

### 3.2.1.1 Studio del *binding* in “crowding conditions” mediante tecniche di calorimetria isoterma (ITC)

Per caratterizzare termodinamicamente il processo di interazione tra azatruX e la struttura G-quadruplex parallela sono stati effettuati esperimenti di calorimetria a titolazione isoterma (ITC) [65]. In figura 3.20 è riportato il profilo ITC del processo.



**Fig.3.20:** isoterma di titolazione tra azatruX e  $d[\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}]$  ottenuta mediante ITC a  $25^\circ\text{C}$ . I cerchi rappresentano i dati sperimentali ottenuti integrando i dati grezzi e sottraendo il calore della diluizione del ligando nel tampone. Nell'*inset* è rappresentata la firma termodinamica del processo di interazione: il contributo entalpico ( $\Delta H$ ) è mostrato in verde, il contributo entropico ( $T\Delta S$ ) in rosso e l'energia libera di Gibbs in blu ( $\Delta G$ ).

La curva di *binding* è monofasica incentrata sulla stechiometria del complesso pari a 1. I dati sperimentali sono stati interpolati mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti. I parametri termodinamici del processo sono mostrati nella tabella 3.2.

**Tabella 3.2. Parametri termodinamici dell'interazione tra azatrux e strutture G-quadruplex determinati mediante ITC a 25°C**

Quadruplex	n	$k_b$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta_b H^0$ ( $kJmol^{-1}$ )	$T\Delta_b S^0$ ( $kJmol^{-1}$ )	$\Delta_b G^0$ ( $kJmol^{-1}$ )
Condizioni di crowding molecolare					
d[AGGG(TTAGGG) <sub>3</sub> TT	1.1	$3.1 \times 10^6$	-108	-71	-37.0
d(AGGGTT) <sub>4</sub>	1.9	$3.6 \times 10^6$	-48	-11	-37.0
Condizioni diluite					
d(AGGGTT) <sub>4</sub>	2	$2.0 \times 10^5$	-1	28	-29

L'errore sperimentale per ciascun parametro termodinamico è <8%

La firma termodinamica del processo (riquadro fig.3.20) rivela che l'interazione è entalpicamente guidata, suggerendo che il complesso è stabilizzato dalla formazione di interazioni favorevoli tra azatrux e la G-quadruplex. La valutazione della costante di binding è in perfetto accordo con quella determinata mediante tecniche spettroscopiche (UV e Fluorescenza). Il contributo entropico negativo suggerisce che il complesso è molto più rigido rispetto alle due molecole non legate.

Al fine di delucidare la struttura del complesso azatrux/DNA telomerico, presso il gruppo del prof. Niedle della School of Pharmacy di Londra sono stati effettuati studi di modellistica molecolare.

Il cristallo della struttura del 22-mer con sequenza telomerica umana d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] (codice PDB 1KF1) è stato usato come template per lo studio di *modelling*. La struttura è di tipo parallelo con dei *loop*, definiti propeller, costituiti dalle basi TTA e presenta due piani di guanine sia all'estremità 3' che a quella 5' che potenzialmente possono essere usati come siti di binding per azatrux. L'adenina terminale è stata rimossa al fine di generare un 21 mer. All'interno della cavità posta al centro dei piani di guanine impilati sono posti ioni  $K^+$  che stabilizzano la struttura. Sono stati creati due modelli per verificare l'affinità dei diversi siti di *binding* per azatrux: l'uno in cui azatrux è legato al 3' e l'altro in cui è legato al 5'. Il complesso maggiormente favorito è stato selezionato dalle strutture "*docked*" sulla base del calcolo di energia di *binding* dopo la procedura di minimizzazione. Tale complesso è risultato essere quello in cui azatrux è presente al 3'. Questo risultato è probabilmente dovuto a due ragioni: 1) la prima è dovuta all'orientazione del TTA loop che forma un solco nel quale può essere accomodata una delle catene laterali del triazatruxene, 2) la seconda è dovuta alla polarità 5'-3' del filamento che permette all'estremità al 3' di esporre il *backbone* con i fosfati carichi negativamente che interagiscono favorevolmente con le cariche positive presenti su azatrux.

Il modello relativo al complesso mostra che il core di azatrux interagisce ampiamente con il quartetto di guanine terminale della quadrupla elica mediante interazioni  $\pi$ - $\pi$  stacking e due delle tre catene laterali del triazatruxene entrano nel solco formato dal TTA loop (fig.3.21). La carica positiva degli atomi di azoto presenti nell'anello piperidinico delle catene laterali interagisce con i gruppi fosfati esposti del *backbone*.

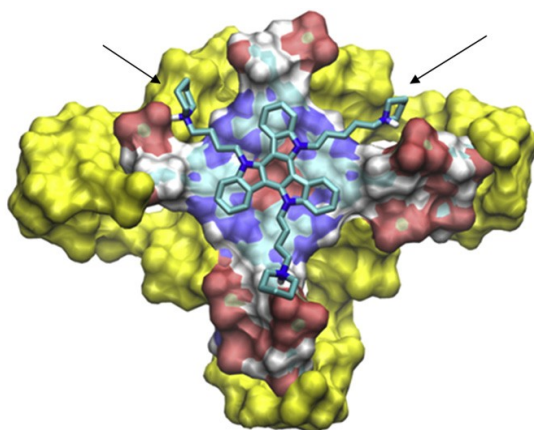


Fig.3.21 modello per l'interazioni  $\pi$ - $\pi$  stacking tra il quartetto di G terminale della quadrupla elica e azatrux

### 3.2.2 Studio del *binding* di azatrux alla quadruplex parallela [d(TGGGGT)<sub>4</sub>]

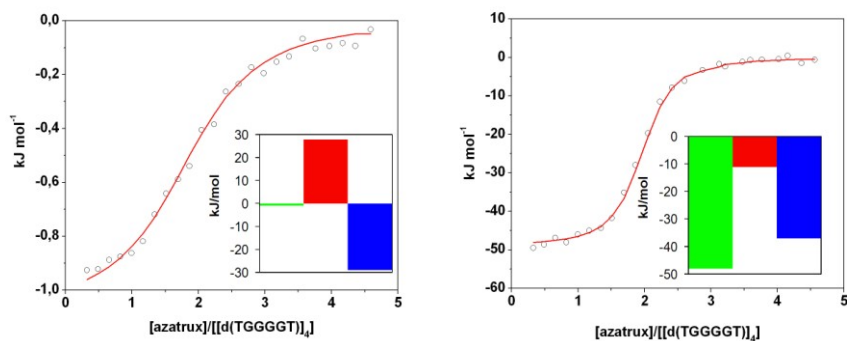
Per testare la capacità di azatrux di legarsi ai piani di guanine terminali della conformazione parallela della quadruplex, è stata analizzato il binding di tale ligando con una parallela "standard" formata dalla sequenza [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] in una soluzione diluita contenente K<sup>+</sup>. Tale sequenza forma una quadruplex tutta antiparallela, come quella formata dal troncamento telomerico di 22-mer.

Il vantaggio di utilizzare la [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] consiste nel fatto che tale sequenza forma una quadruplex parallela tetramolecolare anche in condizioni diluite, ovvero senza la presenza di PEG200. Questa condizione è risultata essere indispensabile per la titolazione NMR del DNA tetramolecolare con azatrux. Gli esperimenti NMR sono stati effettuati dal prof. Randazzo dell'Università di Napoli, facoltà di Farmacia.

L'aggiunta di azatrux alla quadruplex ha procurato un ampliamento dei segnali NMR, in particolare quelli relativi ai segnali imminici nella regione compresa tra 10.5 e 12.0 ppm. La variazione di tali segnali è consistente con un binding *end-stacking* tra azatrux e il DNA. La titolazione mostra che all'aggiunta di 1 equivalente di azatrux per la struttura tetramolecolare sia favorita la formazione del complesso 1:1, con la presenza del drug in posizione 5'. All'aumentare della concentrazione di drug si osserva, poi, una saturazione alla stechiometria azatrux/[d(TGGGGT)<sub>4</sub>] di 2:1.

I maggiori cambiamenti nei "chemical shift" dei segnali aromatici della T1, G2, G5 e T6 e dei protoni imminici di G2 e G5 suggeriscono che azatrux interagisca con entrambe le superfici esterne delle tetradi presenti alle estremità mediante interazioni  $\pi$ -stacking.

Per confrontare i parametri termodinamici dell'interazione relativi alla sequenza telomerica umana è stato eseguito lo stesso esperimento ITC per la sequenza [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] sia in presenza che in assenza di PEG200 (fig.3.22).

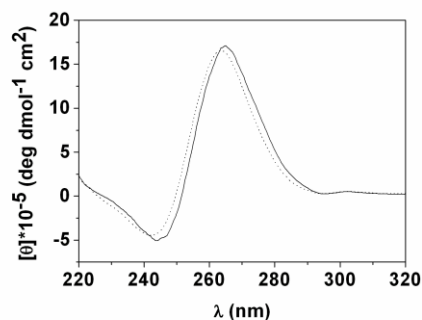


**Fig.3.22:** profili ITC per azatrux/TGGGGT in condizioni diluite (dx) e in presenza di PEG200 (sx)

I profili ITC sono monofasici e sono simili per i due sistemi. L'interpolazione dei dati è stata eseguita in entrambi i casi con un modello a siti indipendenti ed equivalenti. Sia in condizioni diluite che in PEG200 la stechiometria del complesso azatrux/DNA è di 2:1, che conferma la stechiometria ottenuta mediante titolazione NMR. È interessante notare che vi sono notevoli differenze tra i parametri termodinamici e le costanti per gli esperimenti eseguiti in assenza e in presenza di PEG200 (Tab.3.2). In particolare in presenza di PEG l'evento di *binding* è entalpicamente guidato mentre è entropicamente guidato in sua assenza, come mostra anche la firma termodinamica del processo (riquadro in fig.3.22).

In presenza di PEG, il contributo dell'energia libera è molto favorevole e corrisponde ad una costante di *binding* di un ordine più grande rispetto all'assenza di PEG, indicando che le condizioni di affollamento molecolare aumentano l'affinità del ligando per le strutture quadruplex. Le condizioni di *crowding* non hanno alcuna influenza sul *folding* della struttura della sequenza [d(TGGGGT)<sub>4</sub>], come mostra il profilo CD in figura 2.23. Il co-

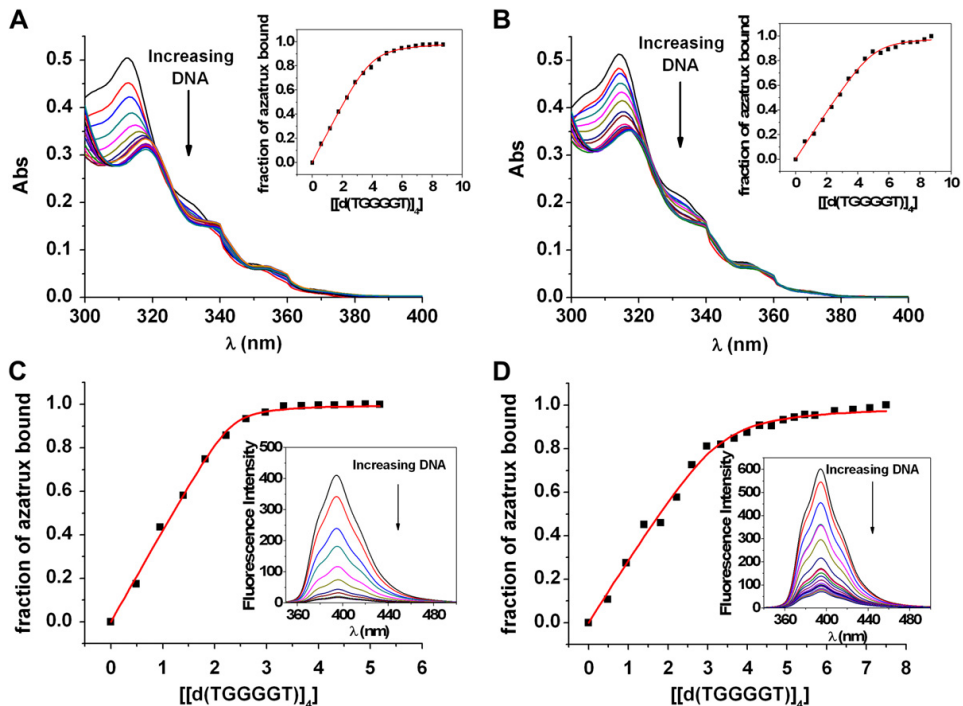
soluto, dunque, non partecipa al *binding* ma il suo contributo potrebbe essere dovuto solo alla riduzione dell'attività dell'acqua nella soluzione.



**Fig.3.23:** spettro CD della quadruplex con sequenza [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] in condizioni diluite (dotted line) in condizione di crowding (solid line)

Il confronto tra le costanti di binding e l'energia libera (tab 3.2) ottenuta in condizioni di *crowding* per la sequenza umana d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] e per la sequenza [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] rivela che azatrux lega queste due quadruplex con un'affinità molto simile suggerendo lo stesso modo di binding.

Infine, lo stesso set di esperimenti di titolazione UV-Vis e di fluorescenza che hanno caratterizzato la sequenza telomerica umana sono stati eseguiti sulla quadruplex [d(TGGGGT)<sub>4</sub>] sia in presenza che in assenza di PEG (fig.3.24).



**Fig 3.24:** (A,B) spettri di titolazione UV-Vis di una soluzione di azatrux in assenza e in presenza di successive aggiunte di  $[d(TGGGGT)_4]$ . Nell'inset è riportata la frazione di azatrux legato in funzione della concentrazione del DNA. (C,D) spettri di emissione di fluorescenza (inset) in assenza e in presenza di successive aggiunte di quadruplex.

La figura 3.24 mostra gli esperimenti di titolazione UV in presenza e in assenza di PEG (A,B) e di fluorescenza (C,D). In tutti i casi si osserva un cambiamento negli spettri UV-Vis e in quelli di fluorescenza di azatrux all'aggiunta della  $[d(TGGGGT)_4]$ , tali cambiamenti sono molto simili a quelli osservati per la sequenza telomerica umana. L'interpolazione delle curve di binding confermano la stechiometria 2:1 trovata mediante esperimenti ITC. Le costanti di binding sono:  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (UV in assenza di PEG),  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (UV in presenza di PEG) e  $9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (fluorescenza in assenza di PEG) e  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (fluorescenza in presenza di PEG).

### 3.2.3 Studio sulla selettività del *binding* di azatrux al DNA telomerico umano

La selettività di azatrux per il DNA a quadrupla elica è stata valutata studiando la sua affinità per la sequenza di DNA  $d(CGCGAATTCGCG)$  in grado di formare una doppia elica. Gli spettri UV-Vis non cambiano all'aumentare della concentrazione della duplex (fig.3.25) e questo suggerisce che azatrux non interagisce con la duplex.

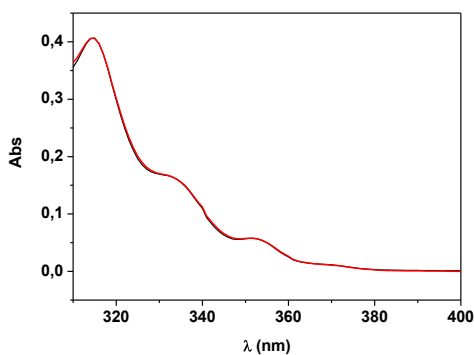


Fig.3.25: spettro UV-Vis di azatrux (nero) e di azatrux in presenza di un eccesso di duplex (rosso)

Per valutare, invece, la selettività rispetto ad un'altra quadruplex biologicamente rilevante è stata analizzata l'affinità per la sequenza promotrice del c-kit87up. Gli spettri di fluorescenza di azatrux sono stati registrati all'aumentare della concentrazione di c-kit87up (fig.3.26) e le relative curve di *binding* sono interpolate mediante il modello a siti indipendenti ed equivalenti.

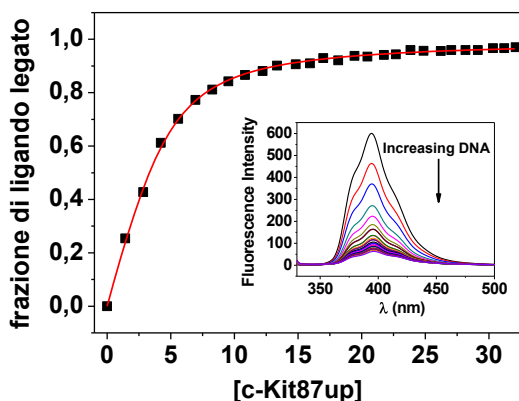


Fig.3.26: spettri di emissione di fluorescenza di azatrux al variare della concentrazione di c-Kit87up.

La stechiometria del complesso è di 2:1 e la costante di binding è di  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , tali risultati mostrano che l'affinità è minore rispetto alla quadrupla elica telomerica analizzata.

### 3.2.4 Conclusioni

La topologia parallela delle quadruplex sembra la più favorita per le sequenze telomeriche umane di DNA in condizioni fisiologiche di affollamento molecolare. E' dunque

importante conoscere i profili energetici e strutturali che governano il binding a questa particolare topologia di struttura quadruplex. Nel presente studio è stata utilizzata una combinazione di tecniche spettroscopiche e calorimetriche per valutare il *binding* di azatrux alla conformazione parallela della quadrupla elica.

Al fine di indurre una conformazione parallela nel troncamento telomerico umano d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT], le condizioni di affollamento molecolare sono state simulate attraverso l'aggiunta di PEG200 alla soluzione di DNA. Gli esperimenti di titolazione di fluorescenza ed UV suggeriscono che in queste condizioni la quadrupla elica lega una molecola di azatrux. Lo spettro CD di d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] in condizioni di *crowding* è caratteristico di una topologia parallela e il legame con azatrux non cambia questo tipo di conformazione. Questa osservazione è in linea con un modello in cui azatrux lega la parallela al piano di guanine terminali della quadruplex anziché in modo intercalativo. Infatti, l'intercalazione tra i quartetti di guanine è stericamente impedita dalla presenza di propeller loop nella G-quadruplex parallela. Inoltre, il notevole effetto ipocromico e lo shift osservato nello spettro UV di azatrux, titolato con il DNA, suggeriscono un modo di binding che coinvolge interazioni di stacking tra il core aromatico di azatrux e le basi del DNA esposte. La formazione di tali interazioni è supportata anche dai dati calorimetrici che evidenziano un forte contributo entalpico (-108kJ/mol) nell'interazione con azatrux.

Un'ipotesi plausibile potrebbe essere quella che vede il ligando interagire facendo *stacking* con il quartetto terminale di guanine. Tale interazione è stata largamente osservata in molte strutture cristallografiche dei complessi quadruplex-ligando. Gli studi computazionali supportano questa ipotesi mostrando che il *core* aromatico di azatrux interagisce efficacemente con il quartetto 3' terminale senza causare una deformazione della struttura quadruplex. Tale risultato è in accordo con il profilo CD in cui è evidente che il legame alla sequenza telomerica non ne cambia la conformazione. Studi di dinamica molecolare hanno poi evidenziato il ruolo nell'interazione delle catene laterali legate al triazatruxene. In particolare, gli azoti carichi positivamente delle due piperidine presenti sulle catene laterali interagiscono con il *backbone* fosfodiesterico carico negativamente. Tali interazioni insieme con quelle di *stacking* tra il *core* di azatrux e la superficie del quartetto di guanine risultano in accordo con il grande contributo entropico osservato all'ITC per la formazione del complesso azatrux-quadruplex. L'analisi computazionale ha anche mostrato che queste interazioni impartiscono una rigidità al complesso, tale dato è in accordo con il contributo entropico negativo osservato all'ITC. Successivamente, al fine di confermare la capacità di azatrux di legare la quadrupla elica parallela è stata valutata la sua interazione con la quadruplex parallela di riferimento di sequenza [d(TGGGGT)]<sub>4</sub>. Questa quadruplex ha tutti gli angoli glicosidici in conformazione anti, come in una quadrupla elica parallela formata da un troncamento telomerico umano in condizioni di affollamento molecolare, ma la struttura tetra molecolare è in grado di assumere tale topologia anche in assenza delle condizioni di *crowding*. Gli esperimenti ITC eseguiti in presenza ed in assenza di PEG200 mostrano che azatrux lega la [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> con una stechiometria 2:1. I dati NMR, ottenuti in condizioni diluite, evidenziano un *end-stacking*



tra le due molecole di ligando e i due piani terminali di guanine nella quadrupla elica. La firma termodinamica del processo di binding in presenza di PEG200 è in accordo con i dati ricavati per la sequenza telomerica umana, ovvero il processo di binding è entalpicamente guidato e ciò suggerisce che l'interazione avviene in modo simile per le due quadruplex. E' interessante notare che azatrux lega con una stechiometria 2:1 la sequenza d(TGGGGT)<sub>4</sub>, mentre la stechiometria del complesso per il troncamento telomerico umano è di 1:1. Una spiegazione plausibile per questa discrepanza potrebbe risiedere nel differente ruolo giocato dalle timine nelle due quadruplex. Nella d(TGGGGT)<sub>4</sub> le timine non sono strutturate e sono molto flessibili, ciò suggerisce che probabilmente non partecipano all'interazione con azatrux, rendendo i due piani terminali di guanine equivalenti. Al contrario, gli studi computazionali mostrano che nella sequenza telomerica umana la presenza delle basi strutturate in un *loop* determina differenze significative nella geometria delle due estremità della quadrupla elica. Ciò è causa della mancata equivalenza delle due estremità e del legame di azatrux all'estremità 3'.

In conclusione, gli esperimenti e i risultati computazionali qui presentati supportano l'ipotesi che azatrux si leghi alla quadrupla elica parallela preferenzialmente in *end-stacking* e ciò grazie alla presenza di un *core* aromatico planare. Tuttavia un importante ruolo è svolto dalle catene laterali del triazatruxene, che ottimizzano questo modo di *binding*. Il *modelling* suggerisce anche che la lunghezza da due a cinque atomi di carbonio per la catena spaziatrice della molecola di azatrux è ottimale per l'effettiva interazione con i solchi. Un ultimo parametro critico per l'interazione è rappresentato dalla polarità delle catene laterali, che possono interagire con i fosfati mediante interazioni elettrostatiche.

### 3.2.5 Materiale e metodi

#### 3.2.5.1 Preparazione del campione

Le sequenze d[AGGG(TTAGGG)3TT], d(TGGGGT) e d(CGCGAATTCGCG) sono state sintetizzate e purificate dalla Primm (Milano), mentre la sequenza d(AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG) è stata sintetizzata secondo un protocollo riportato in letteratura [102]. I campioni di quadruplex e duplex sono stati preparati sciogliendo i composti liofilizzati in un tampone contenente 20 mM fosfato con 70 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 40% (w/v) of PEG 200, a pH 7.0. La sequenza d(TGGGGT) è stata sciolta nello stesso tampone ma in assenza di PEG200. Le soluzioni sono state riscaldate a 95°C per 5 minuti e lasciate raffreddare lentamente a T ambiente. Infine, sono state fatte equilibrare a 4 °C per un giorno. La concentrazione degli oligonucleotidi è stata

determinata mediante UV alla temperatura di 90°C utilizzando i seguenti coefficienti di estinzione molare a 260 nm: 245.100, 57.800, 110.700 e 226,700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> rispettivamente per d[AGGG(TTAGGG)3TT], d(TGGGGT), d(CGCGAATTCGCG) e d(AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG). Il coefficiente di estinzione molare è stato calcolato con il modello del primo vicino. Azatrux è stato sciolto nello stesso tampone precedentemente descritto e la sua concentrazione è stata determinata all'UV mediante coefficiente di estinzione molare a 313 nm= 48,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.5.2 Esperimenti di calorimetria a titolazione isoterma (ITC)

Gli esperimenti ITC sono stati effettuati a 298K usando il microcalorimetro CSC-5300 Nano ITC. Prima di ogni esperimento il pH delle soluzioni è stato controllato, la cella di riferimento è stata riempita con acqua deionizzata e le soluzioni di DNA sono state degassate per 5 min per eliminare bolle d'aria.

Ad ogni iniezione è stato aggiunto un volume di 5-10 µL di una soluzione contenente azatrux (160-200 µM) ad una soluzione di DNA (10-20 µM) disciolta nello stesso tampone, per un volume totale di 250 µL. Per permettere al sistema di ritornare in equilibrio per ogni iniezione è stato programmato un tempo di 400 s. Il calore di diluizione è stato registrato effettuando un altro esperimento in cui il ligando è stato titolato nel solo tampone. Il calore della diluizione è stato poi sottratto alla misura di interazione. Il calore normalizzato in funzione del rapporto molare dei componenti ha fornito una isoterma di binding. Tale isoterma è stata interpolata mediante un modello a siti indipendenti ed equivalenti grazie al programma Bindwork che ha permesso la valutazione diretta della K<sub>b</sub>, della stechiometria e dell'entalpia del processo. Gli altri parametri termodinamici sono stati calcolati mediante le relazioni fondamentali della termodinamica descritti nel capitolo 2.

### 3.2.5.3 Esperimenti di dicroismo circolare

Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-715, associato ad un elemento Peltier per il controllo della temperatura (modello PTC-378W1). L'ellitticità molare  $\theta$  (mdeg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) è stata calcolata dall'equazione  $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} / 10 \times l \times c$ , dove  $[\theta]_{\text{obs}}$  è l'ellitticità, C è la concentrazione molare dell'oligonucleotide e l il cammino ottico. Per registrare lo spettro CD compreso tra 220 e 320 nm sono state utilizzate celle con un cammino ottico compreso tra 0.1 e 1.0 cm e una concentrazione di oligonucleotide di 5 x 10<sup>-5</sup> M. Gli spettri sono stati acquisiti con una velocità di scansione di 20 nm /min ed una bandwidth di 2 nm. Ad ogni spettro è stata sottratta la misura del tampone.

### 3.2.5.4 Esperimenti di Fluorescenza

Le misure di fluorescenza sono state effettuate mediante lo spettrofluorimetro JASCO FP-750. Le *slit* per l'eccitazione e per l'emissione sono state programmate per una larghezza di 5nm. Azatrux è stato eccitato a 321 nm e lo spettro di emissione è stato registrato tra i 340 e i 500nm. Tutte le cuvette utilizzate hanno cammino ottico di 1 cm. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di PEG 200 al 40% eccetto che per la quadruplex formata dalla sequenza d[(TGGGGT)]<sub>4</sub>, per la quale non è stato aggiunto PEG200 alla soluzione tampone. Il processo di associazione tra le strutture quadruplex e il drug è stato studiato seguendo la variazione di fluorescenza all'aumentare della concentrazione di DNA. Le titolazioni sono state eseguite aggiungendo il DNA alla soluzione contenente azatrux in cella. La concentrazione di azatrux in cella è di 6-8 μM. La frazione del ligando legato ( $\alpha$ ) in ogni punto della titolazione è stata calcolata seguendo la variazione dell'intensità di fluorescenza a 395 nm, utilizzando la seguente relazione:

$$\alpha = \frac{I_{\lambda} - I_{\lambda}^{\text{free}}}{I_{\lambda}^{\text{bound}} - I_{\lambda}^{\text{free}}}$$

Dove  $I_{\lambda}$  rappresenta l'intensità di fluorescenza a 395nm alle diverse concentrazioni di DNA;  $I_{\lambda}^{\text{free}}$  rappresenta l'intensità di fluorescenza del drug da solo e *bound* di quello completamente legato.

Le risultanti curve di binding sono state ottenute riportando la frazione di saturazione in funzione della concentrazione di DNA. I dati sono stati interpolati mediante un modello a siti indipendenti ed equivalenti.

### 3.2.5.5 Esperimenti UV-Vis

Le titolazioni UV-Vis sono state condotte allo spettrofotometro Cary 5000 UV-Vis, associato ad un termostato, usando cellette di quarzo da 1 cm. La titolazione UV è stata effettuata aggiungendo una soluzione di DNA al drug in cella.

Gli spettri sono stati registrati in un range compreso tra 300-400 nm alla temperatura di 25 °C. Tutte le cuvette utilizzate hanno cammino ottico di 1 cm. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di PEG 200 al 40% eccetto che per la quadruplex formata dalla sequenza d[(TGGGGT)]<sub>4</sub>, per la quale non è stato aggiunto PEG200 alla soluzione tampone. La frazione del ligando legato ( $\alpha$ ) in ogni punto della titolazione è stata calcolata seguendo la variazione dell'intensità dello spettro di assorbimento a 313 nm (si veda fluorescenza).

## CAPITOLO 4

# INTERAZIONE G-QUADRUPLEX-PROTEINA: UN APTAMERO FLUORESCENTE DELLA TROMBINA

### 4.1 Aptameri

Un'altra applicazione delle strutture quadruplex in ambito biomedico è il loro utilizzo come aptameri (paragrafo 1.1.2). E' stato dimostrato, infatti, che singoli filamenti oligonucleotidici in grado di formare quadruplex possono, grazie alla loro struttura tridimensionale, riconoscere specifiche proteine e regolarne la funzione.

Gli aptameri esibiscono dei significativi vantaggi, quali una buona stabilità in un largo intervallo di pH e temperatura, una discreta facilità della sintesi con la possibilità di incorporare una grande varietà di modifiche chimiche nella sequenza. Tuttavia, uno dei maggiori svantaggi di queste molecole è rappresentato dalla sensibilità alla degradazione enzimatica per effetto delle nucleasi, che ne determina una breve emivita.

Ciononostante nell'ultimo decennio, al fine appunto di migliorarne la stabilità e la resistenza alle nucleasi, sono stati condotti molti studi finalizzati all'introduzione di opportune modifiche agli oligonucleotidi. Alcune di queste modifiche sono state indirizzate ad aumentarne la stabilità verso gli enzimi nucleolitici e sono per lo più a carico dello scheletro zucchero-fosfato [103] o delle basi azotate[104], con l'introduzione, ad esempio, di un gruppo 2'-fluoro [105] o LNA [106].

Ulteriori modifiche sono state introdotte per migliorare le proprietà farmacocinetiche di queste molecole. La coniugazione con il PEG (polietilenglicole), ad esempio, ha aumentato l'emivita dell'aptamero specifico per TGFβ2 [107] rendendolo meno soggetto a fenomeni di escrezione. In altri casi, invece, l'introduzione di un gruppo aromatico o ingombrante si è rilevato determinante per l'attività delle molecole: è questo il caso, per esempio, di un oligonucleotide strutturato in quadruplex con attività antagonista per la proteina gp120 coinvolta nell'HIV, che mostra un'elevata attività solo se la posizione 5' è coniugata con un gruppo aromatico ingombrante [108].

Ma le modifiche strutturali dei filamenti possono essere anche di tipo funzionale, quali l'introduzione di molecole *label* per l'utilizzo degli aptameri nel campo della diagnostica. Pertanto, sia per l'approccio innovativo sia per la versatilità di utilizzo che per la flessibilità della sintesi, gli aptameri hanno rappresentato un'attrattiva nell'ambito della ricerca farmaceutica.

Numerosi aptameri sono entrati in diverse fasi della sperimentazione clinica e alcuni di questi oggi rappresentano un vero e proprio agente terapeutico. Vale la pena citare il Pegaptanib (Macugen-OSI Pharmaceutical) (tab. 4.1), un aptamero ad RNA, impiegato nel

trattamento della degenerazione maculare. Si tratta del primo farmaco di natura aptamerica approvato dalla FDA (Food and Drug Administration), farmaco che interafisce con il VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) ed ha un'azione anti-angiogenica [109]. In fase II di sperimentazione clinica, invece, è il AS1411, un agente chemioterapico utilizzato nel trattamento del carcinoma renale [110] ed in grado di strutturarsi in quadruplex [111].

**Tabella 4.1: Esempi di aptameri in fase clinica**

<b><i>Aptamero, Target</i></b>	<b><i>Compagnia</i></b>	<b><i>Patologia</i></b>	<b><i>Stadio dello sviluppo clinico</i></b>
Pegaptanib (macugen), VEGF-165	Eyeteck Ph./ Pfizer	AMD, retinopatia diabetica	Approvato dalla FDA nel 2004, Fase II per la retinopatia diabetica
REG-1 (RB006/RB007), fattore IXa, AS1411, nucleolina, NU172, trombina	Regado Biosciences  Antisoma Nuveno/Archemix	PCI, CABG  RCC, AML  PCI, CABG	Fase I: anticoagulante reversibile, Fase II: studi completati Fase I: regressione tumore, FaseII: studio FaseI: nessun effetto coll. FaseII: programmata
ARC1779, fattore von Willebrand	Archemix	TMA, TTP, CEA	Fase I: nessun effetto collaterale, Fase II: sotto studio
ARC183, trombina	Archemix	CABG	Fase I: profilo dosi non ottimale

Abbreviazioni: AMD, ago-related macular de generation; PCI, percutaneous coronary intervention; CABG, coronary artery bypass graft; RCC, renal cell carcinoma; AML, acute myeloid leukemia; TMA, thrombotic microangiopathias; TTP, trombocitopenia purpura [112].

Tra gli aptameri in grado di strutturarsi in quadrupla elica (tab.1.1), in questa tesi di dottorato è stato preso in considerazione quello della trombina TBA<sub>15</sub> (thrombin binding aptamer).

Esso ha suscitato un grande interesse per le proprietà farmacologiche dimostrate. L'oligonucleotide di 15 basi, ripiegato in una quadruplex antiparallela, è in grado di riconoscere specificamente la trombina, una proteina coinvolta nella cascata della coagulazione e di inibirne l'attività. La rapida azione anticoagulante e la biocompatibilità mostrate dall'aptamero hanno rappresentato un'innovazione nell'ambito degli anticoagulanti. Numerosi studi dal 1990 sono stati condotti su questa molecola al fine di migliorarne le sue caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche. Ma le modifiche di questo aptamero non sono state volte solo a migliorare le sue proprietà farmacologiche. Recentemente, infatti, è stata posta una grande attenzione alla possibilità di poter sfruttare il riconoscimento specifico della trombina per scopi diagnostici ed analitici. Questo aspetto si deve essenzialmente alla possibilità di coniugare queste molecole con un'ampia varietà di marcatori, quali *quencher*, molecole radioattive o molecole fluorescenti che ne permettono l'utilizzo come biosensori. I bio-sensori possono essere utili all'individuazione e alla quantizzazione del target molecolare. A tale scopo in questa ultima parte della tesi

saranno investigate la stabilità e l'interazione con la trombina di un nuovo derivato fluorescente del TBA coniugato con il dansile e una  $\beta$ -ciclodestrina. La stabilità termodinamica dell'aptamero modificato è stata studiata mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e dicrosimo circolare mentre l'energetica dell'interazione con la trombina è stata caratterizzata mediante tecniche calorimetriche (calorimetria a titolazione isoterma) e spettroscopiche (Uv-vis, dicrosimo circolare, fluorescenza). Per meglio inquadrare l'ambito generale dal quale prende le mosse lo studio presentato in questa tesi, nei paragrafi 4.2 e 4.3 viene descritta la struttura e la funzione della trombina e la sua interazione con l'aptamero non modificato, mentre nel paragrafo 4.4 viene descritto l'aptamero modificato.

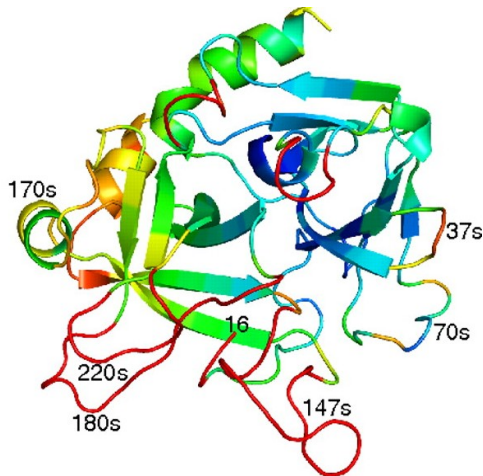
#### ***4.2 Trombina: struttura e funzione***

La trombina è una serina proteasi multifunzionale coinvolta nei processi di procoagulazione, anticoagulazione e omeostasi cellulare.

Essa gioca un ruolo chiave nella cascata della coagulazione, convertendo il fibrinogeno solubile nella fibrina insolubile [113] e catalizzando molte altre reazioni implicate nella formazione del coagulo, come l'attivazione piastrinica [114][115], l'attivazione di altri fattori di coagulazione del sangue (V, VIII, XIII), la stimolazione dell'aggregazione piastrinica, l'induzione della mitogenesi nei fibroblasti e nei macrofagi e il reclutamento della proteina C. Un eccesso di questo enzima o una inappropriata localizzazione genera una manifestazione patologica conosciuta come trombosi.

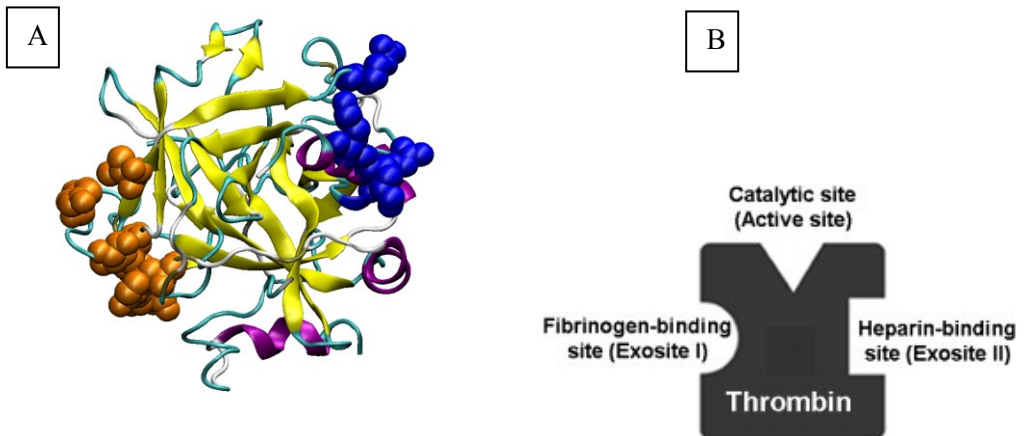
La struttura cristallografica dell'alfa-trombina ( $\alpha$ Th) mostra il tipico ripiegamento delle serin-proteasi, ossia essa si compone di due catene prevalentemente a struttura beta, tenute insieme da un ponte disolfurico. Le due catene segnano una profonda fessura in cui è posto il sito catalitico (AT), che, come nella famiglia delle proteasi, è costituito dalla triade amminoacidica serina-istidina-asparagina (nel caso della trombina Ser195, His57 e Asp 102).

Tuttavia, la trombina si differenzia da questa famiglia di proteine per la presenza all'interno della struttura di due esositi carichi positivamente e di lunghe inserzioni di *loop* [116][117], che sono responsabili della multifunzionalità dell'enzima (fig.4.3). L'inserzione 60 (o  $\beta$ -inserzione) e il *loop*  $\gamma$  (loop di autocatalisi) sono direttamente responsabili del controllo relativo alla specificità del substrato per il sito attivo. Una trombina privata del *loop* di autocatalisi non sarà in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina [118].



**Fig.4.3:** rappresentazione schematica della trombina: oltre all' $\alpha$  elica e ai foglietti  $\beta$  possono essere distinti i vari loop numerati

Nel riconoscimento specifico del ligando un ruolo essenziale è giocato da due siti, denominati Esosito I (Exo I) e Esosito II (ExoII), collocati in modo opposto rispetto al sito attivo (fig.4.4).



**Fig.4.4:** (A) Rappresentazione schematica della struttura a raggi X della trombina (codice PDB 1PPB). L'esosito I e II sono colorati in arancione e blu, rispettivamente. In viola e giallo sono evidenziati l' $\alpha$  elica e il foglietto beta. (B) Rappresentazione semplificata della trombina e dei siti chiave

È stato dimostrato che tali esositi direzionano il substrato verso il sito attivo, contribuiscono all'apertura della regione responsabile della catalisi ed esplicano un'azione regolatrice reclutando altre molecole in grado di legarsi alla trombina. I ligandi che

interagiscono con questi due siti promuovono un ri-arrangiamento strutturale locale o a distanza della proteina mediante il quale l'attività è regolata [119].

Entrambi i siti sono carichi positivamente grazie alla presenza di amminoacidi basici. Questi siti sono anche denominati ABE-I (Anion binding exosite I) e ABE-II (Anion binding exosite II) proprio per la loro capacità di legare gruppi carichi negativamente appartenenti a substrati, cofattori e inibitori. L'esosito I contiene anche una tasca idrofobica, a differenza dell'esosito II che è caratterizzato solo da un vasto numero di cariche positive.

L'esosito I in condizioni fisiologiche è in grado di riconoscere e legare il fibrinogeno, esplicando un'azione coagulante, ma è in grado di legarsi anche ad altri mediatori come la trombomodulina (TM), la irudina ed alle proteasi attivate dai recettori PAR1 e PAR3. L'esosito II, invece, accomoda l'eparina, un ligando che ha effetti anticoagulanti, ma può interagire anche con benzofurani solfati, fibrinogeno  $\gamma'$ , fattore VII e il recettore piastrinico GpIba [116][117][120].

Recentemente molti studi sono stati compiuti per dimostrare l'influenza che ciascun esosito esercita sull'altro, ipotizzando una comunicazione "*long-range*". Alcune ricerche indicano che la trombina può accomodare i ligandi contemporaneamente in entrambi gli esositi, ottenendo un'azione sinergica [121][122][123][124]; altri suggeriscono che il legame ad un esosito ostacola fortemente l'evento di *binding* all'altro esosito [125][126]. Le discrepanze in queste teorie si devono alla variabilità dei ligandi e all'ambiente nel quale il complesso è esaminato.

È chiaro, quindi, che l'inibizione e la regolazione dell'attività della trombina sono processi complessi che possono determinarne il ruolo fisiologico e/o patologico. In questo contesto, la capacità di modulare le proprietà coagulanti dell'enzima, attraverso composti sintetici, diventa un importante goal nella prevenzione e nel trattamento della trombosi e delle patologie cardiovascolari. L'inibizione della trombina può essere attuata mediante varie strategie [51]. Una di queste è rappresentata dal blocco del sito attivo: analoghi del substrato possono legarsi covalentemente ai residui catalitici ed impedirne l'attività. Un altro meccanismo prevede il blocco dei siti allosterici, in particolare l'esosito I può essere inibito attraverso un substrato macromolecolare, mentre l'esosito II può interagire con l'eparina. In questo ultimo caso si formerà un complesso con le SERPIN (serine-proteasi-inhibitor) che determinerà un'inibizione irreversibile della trombina.



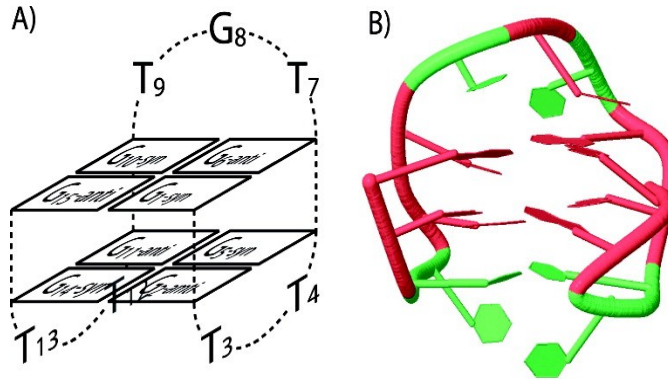
### 4.3 TBA (*Thrombin binding aptamer*)

Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta alla progettazione e alla sintesi di aptameri che potessero legarsi alla trombina ed inibirne l'attività. La strategia basata sull'utilizzo degli aptameri, infatti, rappresentava una strada innovativa e promettente nell'ambito degli anticoagulanti sia per la specificità dell'interazione, sia per la maneggevolezza della molecola che per l'assenza di effetti collaterali.

Nel 1990 Bock e collaboratori sintetizzarono una famiglia di singoli filamenti di DNA che esibivano un'affinità per la trombina compresa tra 2 e 200 nM. Il più potente di questi aptameri, chiamato TBA (*thrombin binding aptamer*), è costituito dalla sequenza oligonucleotidica di 15 basi d(5'GGTTGGTGTGGTTGG3'). Il team di ricercatori ipotizzò il meccanismo di inibizione della trombina attribuendolo all'affinità del TBA per il sito del fibrinogeno. Da allora l'aptamero della trombina è stato oggetto di numerosi studi. L'analisi *in vitro* ed *in vivo* non solo ha messo in evidenza l'attività antitrombinica dovuta alla mancata conversione del fibrinogeno in fibrina, ma anche l'influenza sull'aggregazione piastrinica e il prolungamento del tempo di protrombina (PT), significativi di una maggiore difficoltà del sangue a coagulare.

Da un punto di vista farmacocinetico, il TBA ha mostrato una emivita compresa tra i 2 e 7 minuti, senza significative formazioni di ematomi né di eventi emorragici. Questi dati, dunque, confermavano le potenzialità dell'aptamero nella terapia anticoagulante in ambito clinico, la cui sperimentazione è proseguita fino alla fase I.

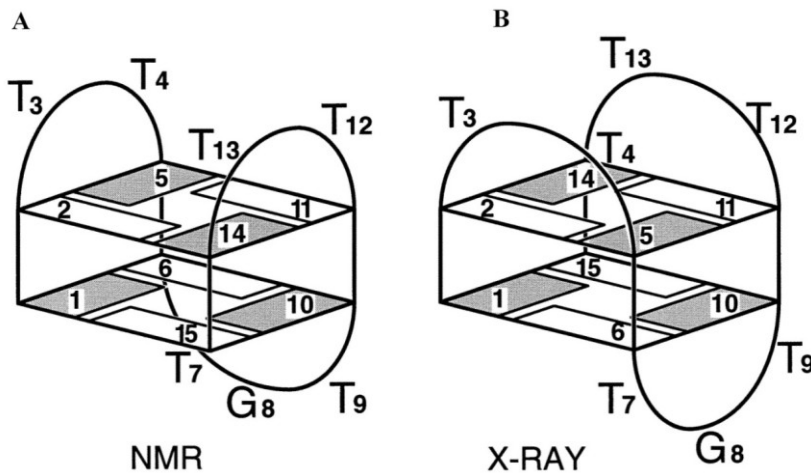
Studi strutturali, effettuati mediante spettroscopia NMR e cristallografia a raggi X, hanno mostrato che la sequenza ricca di guanine, in presenza di specifici cationi come il  $K^+$ , si struttura in una quadrupla elica monomolecolare antiparallela con una conformazione a sedia. Il *core* del TBA è formato da due piani di guanine, queste sono connesse da un *loop* centrale costituito dalle basi TGT e da due *loop* laterali più piccoli formati dalle basi TT, posizionati in modo opposto al primo (fig.4.5) [48]. I *loop* formati dalle due timine consecutive descrivono un solco stretto, mentre quello con sequenza TGT forma un solco più ampio, questa diversa ampiezza dei solchi è dovuta alla disposizione delle guanine in conformazione glicosidica *syn-anti-syn-anti*. La quadrupla elica risultante è detta antiparallela poiché la polarità dello scheletro nucleotidico, lungo i legami fosfodiesterici che connettono due guanine consecutive che appartengono alla stessa tetrad, sono alternativamente 3'-5' e 5'-3'. L'intera struttura è stabilizzata dalle interazioni di *stacking* tra i piani, dalla coordinazione del catione, ma anche da ponti idrogeno tra la T13 e la T4 ed interazioni di *stacking* stabilite tra le basi del *loop* grande e la tetrad di guanine spazialmente più vicina.



**Fig.4.5** (A) Schema della struttura G-quadruplex del TBA in soluzione. (B) struttura NMR del TBA (148D, Protein Data Bank (PDB))

L'analisi mediante FRET [127] e misure di dicroismo circolare [128] hanno evidenziato che la trombina funge da *chaperone* molecolare per il TBA, ovvero ne assiste il *fold*ing quando le condizioni non ne permettono un perfetto ripiegamento e ne stabilizza la conformazione. Gli studi strutturali del complesso TBA-Trombina hanno aperto un dibattito sulla stechiometria dell'interazione e sul numero e tipo di siti coinvolti nel *binding* [48][129][130][131].

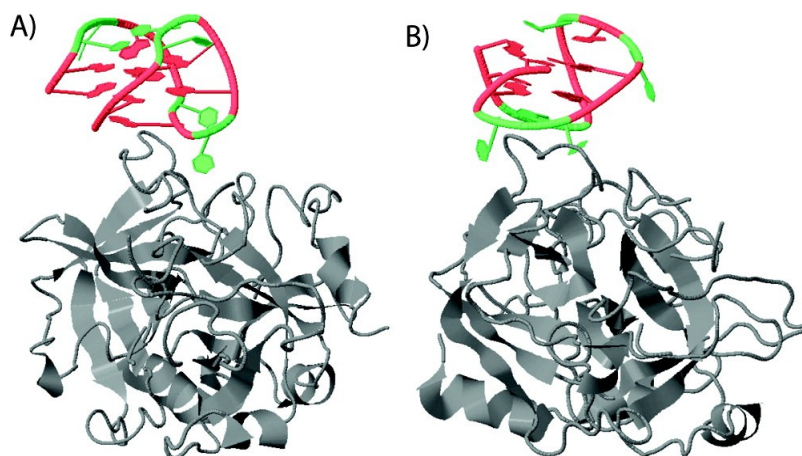
La struttura del complesso, risolta per la prima volta mediante raggi X [48], presentava delle differenze rispetto alla struttura NMR del solo aptamero in soluzione (fig.4.6). Pur mantenendo lo stesso core, la disposizione dei loop del TBA nel cristallo risultava differente se comparata con quella dei dati NMR.



**Fig. 4.6:** Struttura del solo TBA (A) risolta mediante dati NMR, struttura del TBA nel complesso con la trombina (B) risolta mediante dati cristallografici.

Nella struttura a raggi X i TT loop interconnettono le basi del solco maggiore, mentre il *loop* TGT interconnette le basi del solco minore. Nel modello NMR i solchi sono descritti in modo opposto.

Se si osserva il complesso si può notare che i *loop* TT dell'aptamero interagiscono con l'esosito II della proteina, mentre il *loop* TGT interagisce con l'esosito I di un'altra trombina, in un modello a *sandwich*. Successivamente la struttura cristallografica del complesso fu rideterminata con una migliore risoluzione e l'analisi dei dati fu fatta alla luce anche delle coordinate NMR del TBA. In questo secondo modello i *loop* TT della proteina sono coinvolti nel legame all'esosito I, mentre il *loop* TGT interagisce con l'esosito II di una seconda proteina (fig.4.7).

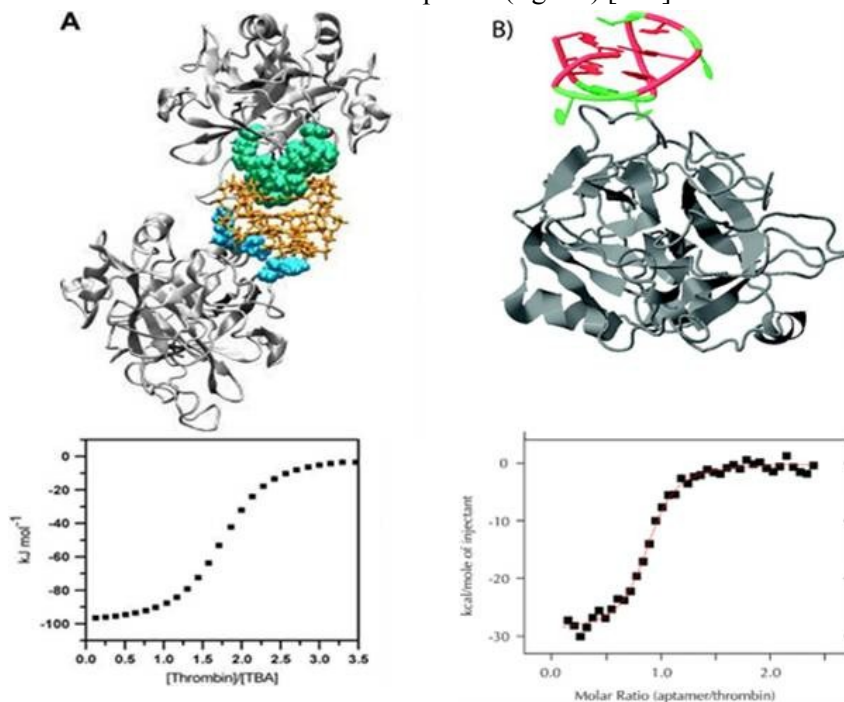


**Fig.4.7** Modello strutturale del complesso TBA-trombina (A) risolto mediante raggi X ad una risoluzione 2.9 (B) risolto mediante raggi X ad una risoluzione 2.8 e coordinato a dati NMR [106].

Al fine di chiarire le varie ambiguità relative alla struttura del complesso, sono stati sintetizzati vari mutanti del TBA nei quali sono state modificate le basi azotate che interagiscono con la trombina. I saggi di attività farmacologica di queste molecole hanno mostrato che la modifica di una base nel *loop* TGT non comporta una variazione sensibile dell'attività anticoagulante. Viceversa, se la modifica si apporta ai *loop* TT, si osservano grosse variazioni di attività. Ciò ha suggerito che i *loop* TT hanno un ruolo determinante nell'attività inibente e quindi è ragionevole pensare che leghino il sito di riconoscimento del fibrogene (esosito I), mentre il *loop* TGT si lega al sito dell'eparina (esosito II). Una successiva e più esauriente analisi dei dati di diffrazione ha suggerito che il modello descritto mediante l'accordo tra i dati cristallografici e NMR è da considerarsi più attendibile.

Quanto alla stechiometria, alcuni studi effettuati mediante calorimetria isoterma di titolazione sono in accordo con il modello a *sandwich* di Padmanabhan, nel quale un TBA

è legato a due trombine [131][132], altri studi più recenti, invece, individuano una stechiometria 1:1 nella formazione del complesso (fig.4.8) [131].



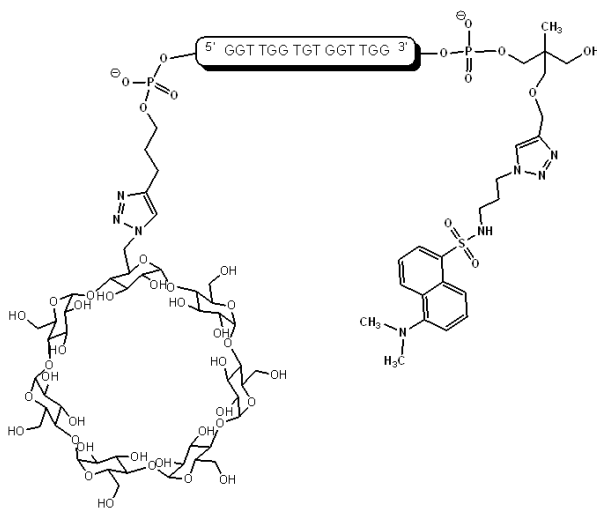
**Fig.4.8** (A)Modello strutturale del complesso TBA-Trombina 1:2. Sono mostrati i residui dell'interazione dell' esosito I (verde) e dell'esosito II(azzurro). (B) Modello strutturale del complesso TBA-Trombina 1:1. In basso sono presentati i relativi profili ITC.

#### 4.4 Un nuovo derivato fluorescente bis-coniugato del TBA

Specificità di interazione e rapida degradazione ad opera delle nucleasi rappresentano, rispettivamente, il vantaggio e lo svantaggio dell'utilizzo dell'aptamero della trombina. Queste due caratteristiche, però, hanno rappresentato il punto di partenza per le successive modifiche apportate alla struttura appena discussa.

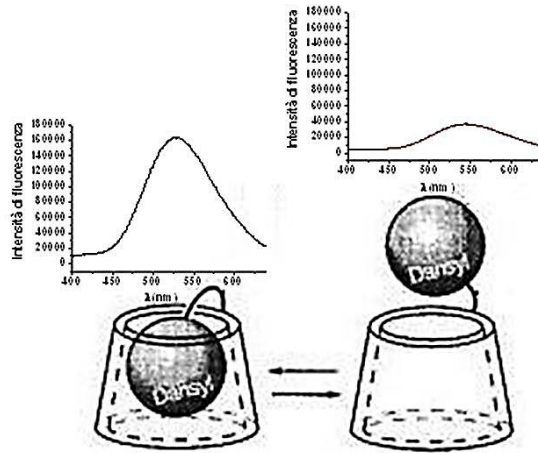
Da un lato modifiche strutturali dell'aptamero sono state volte a migliorarne la stabilità e la resistenza alle nucleasi, intervenendo sullo scheletro zuccherofosfato [133][134][135] e/o modificando le basi della sequenza [136][137], dall'altro l'introduzione di gruppi

fluorescenti ha permesso l'immediata rilevazione e quantizzazione della proteina legata. A tal proposito, presso il gruppo di ricerca del professor Morvan dell'Università di Montpellier (Francia), è stato sintetizzato un TBA doppiamente coniugato, ovvero entrambe le estremità dell'oligonucleotide sono impegnate con la  $\beta$ -ciclodestrina (CDs) al 5' e con il dansile al 3' (fig 4.9).



**Fig.4.9:** derivato del TBA con il dansile in posizione 3' e la  $\beta$ -ciclodestrina in posizione 5'

Il sistema  $\beta$ -ciclodestrina/dansile è un sistema chemosensore [137]. I chemosensori sono dei trasduttori di segnale. Solitamente sono costituiti da una struttura recettiva che può ospitare una o più molecole e da un'unità cromoforica grazie alla quale è possibile monitorare il processo di inclusione. Nel caso specifico la molecola recettiva è rappresentata dalla ciclodestrina che può ospitare nella sua cavità il dansile (molecola ospite) (fig.4.10). Il dansile è un derivato del naftalene con spiccate proprietà di fluorescenza [137]. Esso è particolarmente sensibile alla variazione dell'ambiente che lo circonda, infatti la sua emissione di fluorescenza è massima quando il fluoroforo è immerso in un ambiente apolare e diminuisce con l'esposizione al solvente acquoso. Tale molecola, quindi, presenta uno spettro di fluorescenza intenso quando è inclusa nella ciclodestrina mentre la sua fluorescenza diminuisce quando, uscendo dalla cavità, è esposta all'ambiente polare [138][139][140][141][142][143](fig.4.11).



**Fig.4.11:** descrizione del sistema dansile-ciclodestrina: quando il dansile è incluso nella ciclodestrina lo spettro di fluorescenza è intenso (sx), quando il dansile esce dalla ciclodestrina l'intensità dello spettro di fluorescenza diminuisce (dx).

Il derivato del TBA bis-coniugato (TBA\_Cd), dunque, permette di avere rapidamente delle informazioni riguardanti il *fold* della struttura. Infatti, se le due estremità sono spazialmente vicine tanto da permettere l'inclusione del dansile nella ciclodestrina, lo spettro di fluorescenza presenterà un notevole incremento dell'intensità confrontato con quello in cui il dansile è completamente esposto al solvente. Quindi uno spettro di fluorescenza intenso potrà ragionevolmente essere associato all'aptamero strutturato in quadrupla elica poiché in questa condizione l'estremità 3' sarà vicina al 5' e il fluoroforo potrà accomodarsi nella ciclodestrina. In altre parole il passaggio da singolo filamento non strutturato a G-quadruplex si identifica in un rilevante aumento di fluorescenza.

Anche sulla trombina sono presenti dei gruppi fluorescenti come il triptofano. Il sistema dansile/triptofano è molto utile anche per avere informazioni riguardanti l'interazione con la trombina. Il dansile, infatti, rappresenta un ottimo "accettore" nell'esperimento di fluorescenza energy transfer (FRET). Tale esperimento, la cui discussione è rimandata al paragrafo successivo, permette di seguire l'interazione tra l'aptamero modificato e la trombina.

Tenendo conto delle proprietà appena descritte, il TBA bi-coniugato potrebbe essere utilizzato per future applicazioni diagnostiche allo scopo di determinare, ad esempio, i livelli di trombina nei fluidi biologici.

#### 4.4.1 Risultati e discussioni

La caratterizzazione strutturale del TBA bis-coniugato con dansile e  $\beta$ -ciclodestrina (TBA\_CD) e del TBA mono-coniugato con dansile senza ciclodestrina (TBA\_SCd) è stata eseguita mediante dicroismo circolare, che ha permesso di determinare la conformazione adottata dagli oligonucleotidi in soluzione (fig.3.12). Entrambi gli aptameri sono stati sciolti in tampone potassio fosfato e sottoposti ad *annealing*, procedura che prevede il riscaldamento degli oligo a 90°C per 5 minuti e il raffreddamento lento fino a temperatura ambiente. Tale procedura favorisce la specie termodinamicamente più stabile in soluzione. Gli spettri sono stati registrati ad una temperatura di 10°C e sono stati confrontati con lo spettro del TBA naturale nelle stesse condizioni.

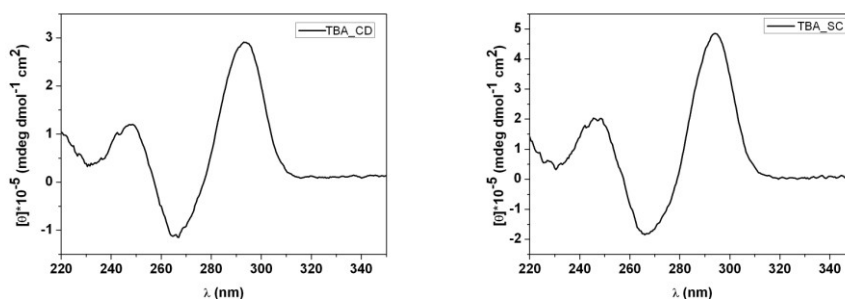


Fig. 4.12: spettro CD del TBA\_CD (sinistra) e TBA\_SC (destra)

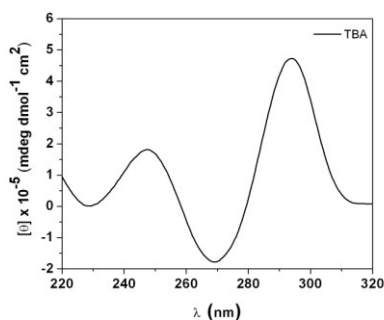
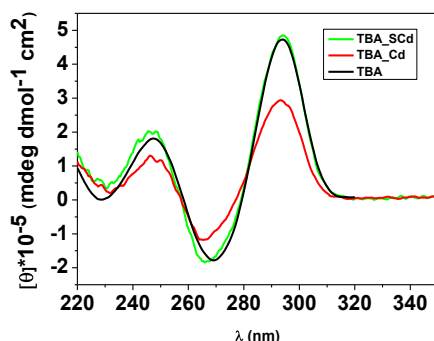


Fig. 4.13: spettro CD del TBA non modificato

Come si osserva, gli spettri sono qualitativamente molto simili. I profili CD sono tipici di una struttura G-quadruplex monomolecolare antiparallela [144][145] con due bande positive a 295 nm e 290 nm e una banda negativa a 267 nm (fig. 3.12 e 3.13).

Se si sovrappongono gli spettri è possibile apprezzare la differenza di intensità dei massimi e dei minimi appartenenti alle diverse specie (fig.4.14).



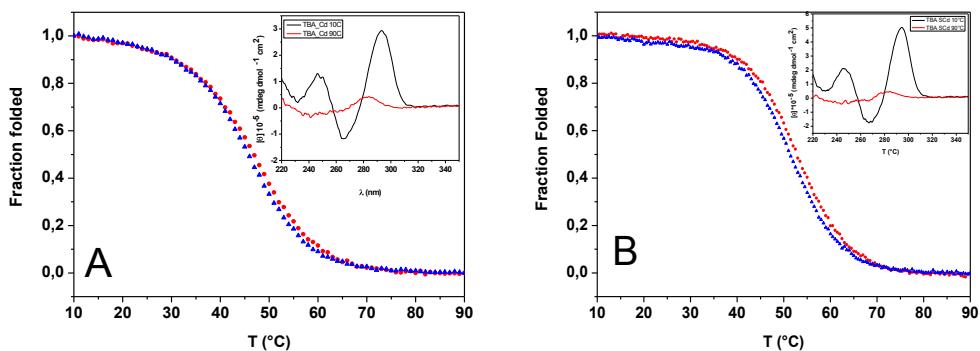
**Fig.4.14:** sovrapposizione spettri CD del TBA non modificato (nero), del TBA senza ciclodestrina (verde) e del TBA con la ciclodestrina (rosso)

In particolare il profilo del TBA naturale è completamente sovrapponibile al TBA SCd, mentre una piccola differenza si può notare per il TBA bis-modificato. Questa differenza potrebbe essere dovuta proprio alla presenza della ciclodestrina che con il suo ingombro sterico interferisce nel *folding* della quadrupla elica.

Per valutarne la stabilità termodinamica, gli oligonucleotidi modificati sono stati sottoposti a denaturazione termica. La curva di denaturazione è stata registrata nell'intervallo di temperatura tra 10 e 90 °C ed è stata ottenuta seguendo la variazione del segnale CD alla lunghezza d'onda di 295 nm (fig.4.15).

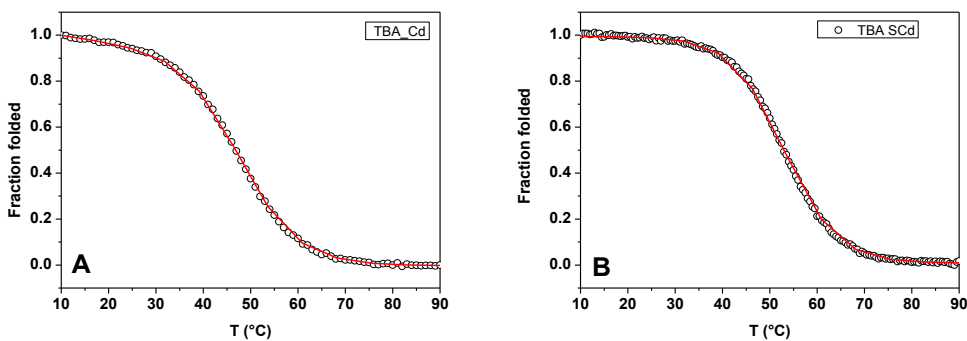
Inoltre, sono state registrate per ciascun oligonucleotide diverse curve di denaturazione al variare della velocità di scansione. La completa sovrapposizione dei profili di *folding* e di *unfolding* di ciascuna scansione e i parametri termodinamici similari, ricavati dalle curve registrate a 1°C/min, 2°C/min e 0.5 °C/min, indicano che il processo di denaturazione è reversibile.





**Fig.4.15:** profili CD di *melting* (rosso) e *annealing* (blu) del TBA con ciclodestrina (A) e TBA senza ciclodestrina (B) seguiti a 295nm, nell'inset sono mostrati gli spettri a 10°C e 90 °C per ciascuna specie.

L'interpolazione dei dati mediante l'equazione di van't Hoff (fig.4.16), nell'ipotesi che il processo di denaturazione da quadruplex (Q) a singolo filamento (S) sia ad unico stadio, ha permesso di ricavare il  $\Delta H$  e la  $T_m$  per ciascun sistema.



**Fig.4.16:** interpolazione dei profili di denaturazione CD del TBA con la ciclodestrina (A) e TBA senza ciclodestrina (B) mediante equazione di Van't Hoff per il modello a due stati.

Nella tabella 4.2 sono riportate le temperature di *melting* e i  $\Delta H_{v.H.}$  delle sequenze modificate comparate con il TBA naturale in tampone fosfato di potassio.

**Tabella 4.2 Parametri termodinamici derivati dalle curve di denaturazione termica ottenute mediante dircoismo circolare**

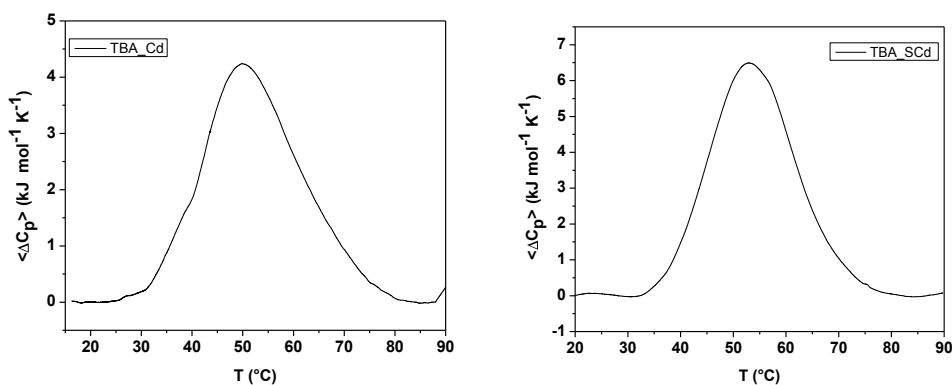
	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>vH</sub> (kJ/mol)</b>	<b>Rif.</b>
<b>TBA</b>	52	160	Martino et al. NAR 2006 vol.34 n.22,6653-6662// RUSSO KRAUSS NAR 2012 1-10
<b>TBA Cd</b>	49	140	
<b>TBA SCd</b>	53	168	

L'errore sperimentale è ΔH<sub>vH</sub> (±15%), T<sub>m</sub> (±1 °C)

Le temperature di *melting* e le entalpie di denaturazione sono in accordo con l'ipotesi che l'assenza della ciclodestrina nel derivato mono-coniugato del TBA permette una strutturazione dell'oligonucleotide più simile al TBA non modificato, mentre la presenza della ciclodestrina nel derivato bis-coniugato perturba, anche se di poco, il sistema.

Per una completa caratterizzazione termodinamica gli oligonucleotidi modificati sono stati sottoposti ad analisi calorimetrica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC).

La scansione termica è stata registrata nell'intervallo di temperatura tra 0 °C e 100 °C con una velocità di 1°C/min (fig.4.17).



**Fig.4.17:** profili DSC del TBA\_Cd (sinistra) e del TBA\_SCd (destra) a confronto

In accordo con i dati spettroscopici, le misure DSC hanno messo in evidenza la reversibilità del processo e l'assenza di un controllo cinetico nella transizione da Quadruplex a singolo filamento. In tabella 4.3 sono riassunti i dati calorimetrici dei TBA modificati comparati con quelli riportati in letteratura del TBA naturale.

**Tabella 4.3: Dati calorimetrici DSC del TBA, TBA Cd e TBA SCd**

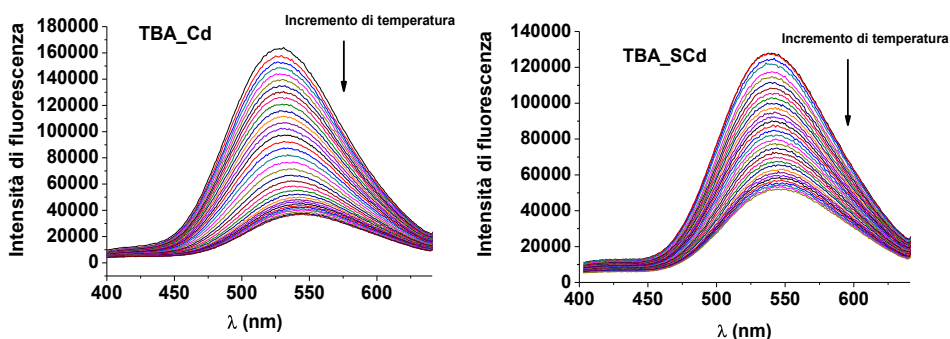
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH°(T <sub>m</sub> ) (kJ/mol)	ΔS°(T <sub>m</sub> ) (kJ/mol)	ΔG° <sub>298</sub> (kJ/mol)	Rif.
TBA	53	107	0.30	17	[130]
TBA Cd	49	100	0.31	7	
TBA SCd	53	130	0.40	11	

L'errore sperimentale sui parametri termodinamici è ±5%, T<sub>m</sub> (±1 °C)

La difficoltà di definire opportunamente la linea di base per questi sistemi si riflette in una sottostima dei valori di entalpia. Tuttavia se si tiene conto di questo errore è possibile considerare i dati calorimetrici in linea con quelli spettroscopici.

Come descritto nel paragrafo precedente, il sistema dansile-cilodestrina è noto per la sua proprietà di *enhancement* di fluorescenza. Questa proprietà può essere molto utile sia per avere informazioni strutturali riguardo il *folding* dell'aptamero sia per avere informazioni riguardo l'interazione con la trombina. Tale sistema si presta, quindi, ad essere utilizzato nella rilevazione della trombina nel sangue come potenziale applicazione diagnostica.

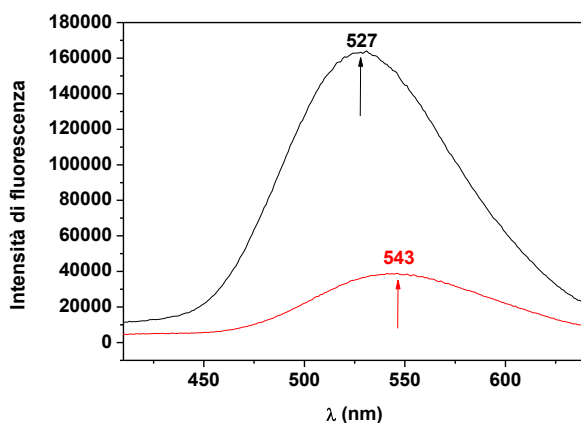
Al fine di investigare le proprietà appena descritte sono stati condotti esperimenti di fluorescenza sui campioni in esame. Le soluzioni 1 μM di ciascun aptamero sono state riscaldate in un intervallo di temperatura compreso tra 10 e 80 °C con una velocità di scansione di 1°C/min. Poiché il dansile è intrinsecamente fluorescente e la sua variazione di fluorescenza è sensibile all'ambiente che lo circonda, è stato possibile seguire proprio l'emissione del dansile durante il processo di *melting*. La molecola, quindi, è stata eccitata a 327 nm, lunghezza d'onda a cui corrisponde il massimo di assorbimento UV del dansile. L'analisi degli spettri di emissione registrati tra 400 e 650 nm variando la temperatura ha permesso di apprezzare la differenza tra lo stato iniziale e quello finale per ciascun aptamero (fig.4.18).



**Fig.4.18:** Spettri di fluorescenza all'aumentare della temperatura per il TBA Cd (sinistra) e il TBA SCd (destra)

All'aumentare della temperatura, come era atteso, lo spettro di emissione è sempre meno intenso, come riprova del fatto che nella destrutturazione della molecola il dansile è sempre più esposto all'ambiente polare. Se si esaminano gli spettri in figura 4.18 si nota che il sistema dansile-TBA-ciclodestrina mostra una maggiore variazione di intensità (75% circa) rispetto al derivato senza ciclodestrina (60%). Lo "spegnimento" del segnale di fluorescenza è dovuto proprio al passaggio del dansile dall'ambiente completamente apolare, rappresentato dalla cavità interna della ciclodestrina, all'ambiente polare del solvente acquoso.

Se si osserva con attenzione l'andamento degli spettri in funzione della temperatura è possibile notare non solo la diminuzione di intensità ma anche uno spostamento del massimo a lunghezze d'onda maggiore (*red shift*) di circa 15 nm (fig.4.19) per il derivato bis-coniugato.



**Fig.4.19:** spettro di fluorescenza a 10 °C(nero) e a 80 °(rosso)C. Le frecce indicano lo *shift* della  $\lambda_{max}$  dello spettro di emissione del TBA con la ciclodestrina all'aumentare della temperatura.

Riportando i valori del massimo di emissione del dansile in funzione della temperatura (fig.4.20) ed interpolando i dati sperimentali con il modello ad un unico stadio  $Q \leftrightarrow S$ , utilizzando l'equazione di van't Hoff, è possibile ottenere la  $T_m$  e il  $\Delta H_{vH}$  del processo di denaturazione.

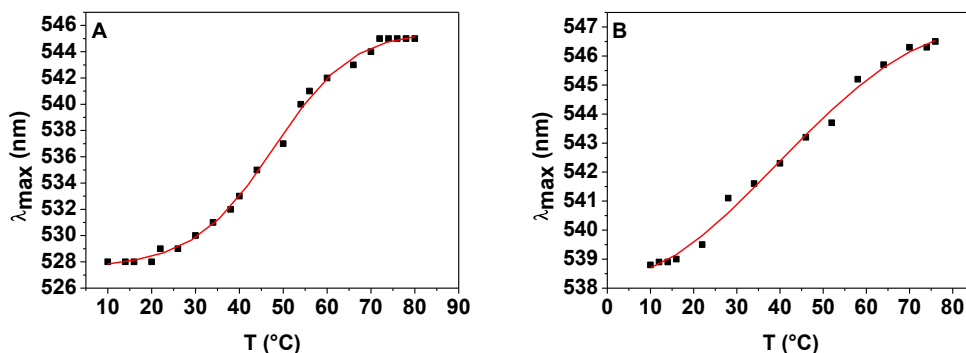
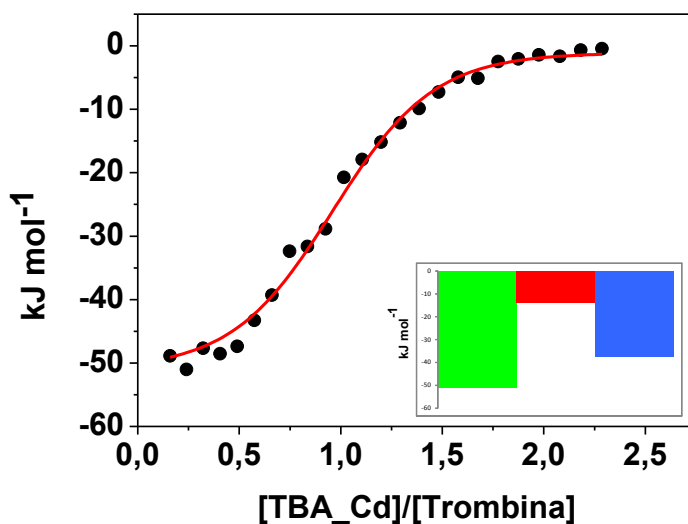


Fig.4.20: andamenti del massimo di emissione del dansile in funzione della temperatura per TBA\_Cd (A) e TBA\_SCd (B)

Come si osserva dai profili in fig.4.20 l'andamento sigmoidale è molto più definito per il TBA con la ciclodestrina, comparato a quello senza ciclodestrina. Questo potrebbe essere dovuto sia ad una maggiore cooperatività del processo sia ad un più esteso red-shift presente negli spettri del TBA\_CD ed attribuibile proprio alla presenza della ciclodestrina che crea un ambiente nettamente apolare. L'interpolazione dei dati sperimentali nel caso del TBA\_Cd ha permesso di ricavare la  $T_m$  pari a  $50 \pm 3$  °C e il valore di  $\Delta H_{v,H}$  pari a  $122 \pm 20$  kJ/mol.

Il valore della  $T_m$  e del  $\Delta H$  sono simili ai valori ottenuti dagli esperimenti di *melting* mediante CD, questo suggerisce che il fenomeno di esclusione del dansile dalla ciclodestrina è concomitante con il processo di fusione dell'intera struttura quadruplex. Nel caso del TBA\_SCd non è stato possibile interpolare i dati poiché il profilo sigmoidale non è abbastanza definito da permetterne un'analisi accurata.

L'interazione tra la Trombina e il derivato bi-coniugato del TBA è stata investigata mediante calorimetria a titolazione isoterma (ITC). In figura 4.21 è riportato l'esperimento di titolazione condotto a 25 °C in cui la proteina è titolata con l'aptamero.



**Fig.4.21:** profilo calorimetrico della titolazione [TBA Cd]/ [Trombina]. I cerchi rappresentano i dati sperimentali mentre la linea rappresenta l'interpolazione mediante il modello a siti indipendenti. Nell'*inset* è mostrata la firma termodinamica della reazione: il contributo entalpico ( $\Delta H^\circ$ ) in verde, quello entropico ( $T\Delta S^\circ$ ) in rosso, e la variazione di energia di Gibbs ( $\Delta G^\circ$  298K) in blu.

L'interazione tra il TBA modificato e la trombina è un processo esotermico. La sigmoide relativa all'evento di *binding* è caratterizzata da un profilo monofasico con stechiometria 1, ovvero ogni molecola di trombina interagisce con una molecola di TBA bi-coniugato. Il profilo monofasico e la stechiometria incentrata su 1 hanno permesso di interpolare i dati con un modello a siti indipendenti ed equivalenti.

I parametri termodinamici dell'interazione sono riportati in tabella 4.4. La costante di *binding* è paragonabile a quella del TBA non modificato nelle stesse condizioni.

La firma termodinamica del processo (riquadro fig.4.21) rivela che l'interazione è entalpicamente guidata, ciò suggerisce che il complesso è stabilizzato dalla formazione di interazioni favorevoli tra il TBA modificato e la trombina. Tuttavia il contributo entalpico sembrerebbe essere più basso rispetto a quello riportato in letteratura[130], questo potrebbe essere dovuto alla presenza della ciclodestrina che ingombra stericamente il TBA rendendo più difficile il legame con la trombina.

**Tabella 4.4: parametri termodinamici dell'interazione tra TBA Cd e Trombina ottenuti mediante ITC**

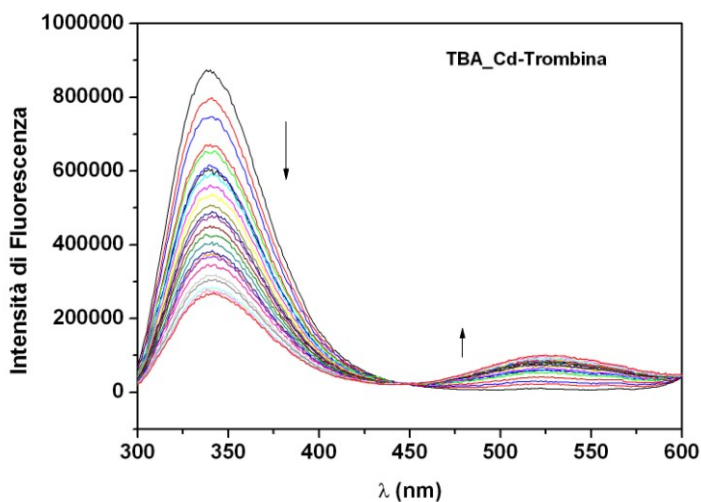
	<b>n</b>	<b>K<sub>b</sub></b> <b>(M<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔH°</b> <b>(kJ/mol)</b>	<b>TΔS°</b> <b>(kJ/mol)</b>	<b>ΔG°</b> <b>(kJ/mol)</b>
<b>TBA_Cd/Trombina</b>	1.1±0.1	(3.3±1.0)x10 <sup>6</sup>	-51.0±0.5	-13.8±2.0	-37.2±2.0

Il processo di interazione è stato caratterizzato anche mediante spettroscopia di fluorescenza. Come già evidenziato in precedenza, il dansile, non solo è particolarmente sensibile alla variazione dell'ambiente circostante ma è considerato anche un buon accettore per il *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) quando il triptofano è utilizzato come donatore. Quest'ultima proprietà permette di avere utili informazioni riguardanti il cambio conformazionale di una proteina o, come in questo caso, l'interazione tra due molecole.

Nella trombina sono presenti diversi "donatori" come triptofani e tirosine, uno di questi (Tyr117) [146], in particolare, si trova nell'esosito I ed è responsabile del contatto tra l'aptamero e la proteina.

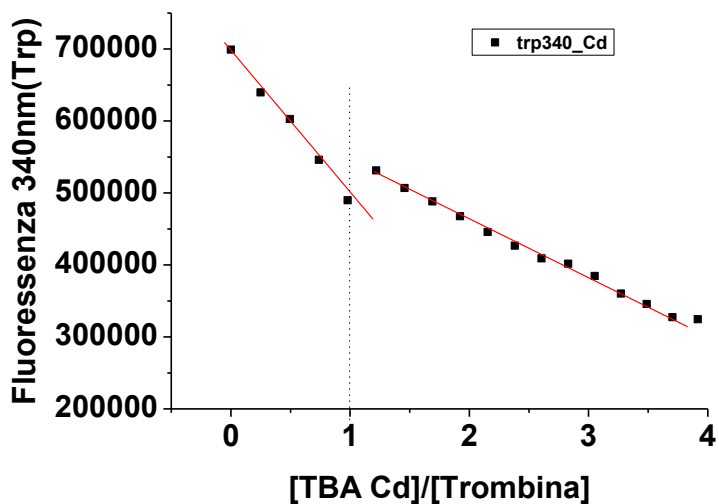
Il binding del TBA bis-coniugato con la trombina è stato dunque monitorato sfruttando l'effetto FRET tra i triptofani della proteina e il dansile dell'aptamero.

Per verificare l'effetto FRET effetto, 1.25 μM di proteina sono stati titolati con un eccesso di TBA\_Cd. La trombina in cella è stata eccitata alla lunghezza d'onda 280nm, λ<sub>max</sub> di assorbimento dei cromofori aromatici. Lo spettro di emissione è stato registrato tra i 300 e i 600 nm in modo da rilevare sia l'emissione del Trp (tra 300 e 400 nm) che l'emissione del dansile (450-600nm) (fig.4.22).



**Fig.4.22:** titolazione di fluorescenza della trombina (in cella) con il TBA\_Cd . Le frecce indicano l'andamento del segnale a 340 nm e 525 nm durante la titolazione.

Come si può notare, all'aggiunta del titolante l'intensità del massimo di fluorescenza a 340 nm (corrispondente all'emissione del triptofano) diminuisce, mentre quello a 525 nm aumenta. La diminuzione dello spettro è significativa dell'interazione tra TBA e trombina. In figura 4.23 è riportata la variazione a 340nm in funzione del rapporto tra i due componenti (fig.4.23).



**Fig.4.23:** Segnale di emissione di fluorescenza del Triptofano a 340nm in funzione del rapporto TBA Cd/Trombina



Sebbene non sia possibile determinare un chiaro evento di *binding*, nel grafico è riscontrabile una netta discontinuità che separa due andamenti. Il primo è caratterizzato da un rapido decremento della fluorescenza in corrispondenza del rapporto 1:1, seguito da un secondo andamento il cui decremento è molto meno pronunciato. L'andamento dei dati di fluorescenza suggerisce che il fenomeno di *binding* è complesso, dovuto probabilmente alle interazioni aspecifiche che si vengono ad instaurare tra la trombina e l'aptamero o alla degradazione della proteina nel tempo. I due andamenti potrebbero essere consistenti con l'ipotesi che la trombina legghi in modo specifico e con elevata affinità il TBA\_Cd in un rapporto 1:1 e che, in eccesso di titolante, si instaurino interazioni aspecifiche di tipo elettrostatico.

Lo stesso esperimento di fluorescenza è stato ripetuto con il TBA senza ciclodestrina. L'andamento dei dati è molto simile, anche se nel caso del TBA SCd la discontinuità è meno accentuata rispetto al TBA Cd (fig.4.24).

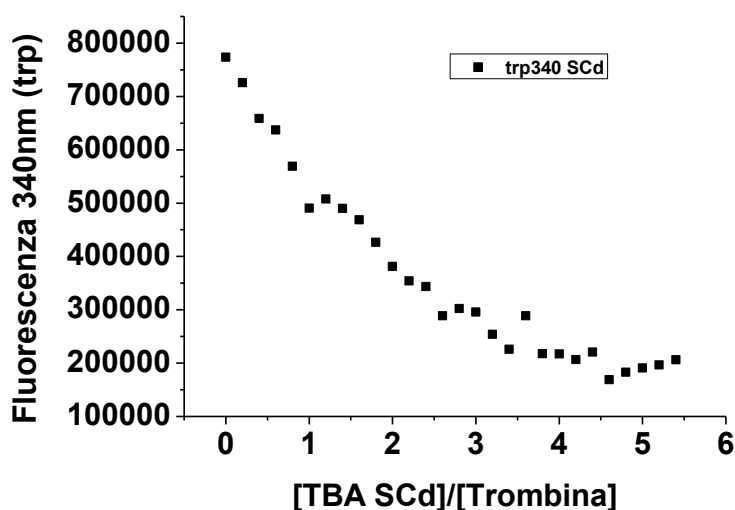


Fig.4.24: Segnale di emissione di fluorescenza del Triptofano a 340nm vs rapporto TBA SCd/Trombina

#### 4.4.2 Conclusioni e future prospettive

Gli aptameri sono una classe di acidi nucleici non naturali in grado di legare bersagli biologici come proteine, DNA, RNA e piccole molecole. Le interazioni che stabiliscono con il proprio target sono simili a quelle che intercorrono tra antigene e anticorpo, tale

caratteristica è dovuta alla plasticità conformazionale dell'oligonucleotide che è in grado di assumere una struttura tridimensionale capace di riconoscere in modo specifico il bersaglio.

Il riconoscimento specifico, la versatilità di impiego, l'accessibilità della sintesi sono gli elementi che rendono queste molecole interessanti in ambito farmaceutico e diagnostico.

Sin dagli anni '90 uno dei più studiati aptameri è stato il TBA, ovvero un filamento di DNA in grado di riconoscere e legare specificamente la trombina, una proteina chiave del processo di coagulazione. Il TBA, dunque, ha rappresentato il primo *drug* anticoagulante con una struttura oligonucleotidica. Da allora sono state condotte molte ricerche in questo ambito al fine di migliorare le caratteristiche strutturali e le proprietà farmacologiche di questa nuova classe di molecole. Le principali modifiche sono state volte a rendere più stabile e meno suscettibile l'oligonucleotide alle nucleasi. A tale scopo sono state introdotte modifiche riguardanti le basi azotate [147], lo scheletro zucchero fosfato o la coniugazione con molecole ad alto peso molecolare. Ma le modifiche sono state indirizzate anche alla costruzione di "aptasensori" [148], aptameri in grado di rilevare bersagli molecolari nei fluidi biologici. Questa strategia ha previsto l'introduzione di molecole *label* all'estremità del filamento. Tali molecole sono dotate di spiccate proprietà di fluorescenza che ne permettono il monitoraggio.

In questo contesto, il derivato del TBA coniugato al dansile ed alla ciclodestrina si presta sia ad applicazioni *in vitro* che *in vivo*. Da un lato la presenza dei due "pendagli" alle estremità del filamento maschera il sito di riconoscimento delle esonucleasi, rendendo l'oligo meno sensibile alla degradazione enzimatica, dall'altro il sistema ciclodestrina/dansile mostra un *enhancement* di fluorescenza che può essere utile nella rilevazione analitica della trombina.

Ulteriori studi sono necessari al fine di ottimizzare le proprietà della molecola, tale da permetterne l'uso sia nella terapia anticoagulante che nella costruzione di un aptasensore.

#### **4.4.3 Materiali e Metodi**

##### **4.4.3.1 Preparazione delle soluzioni**

Gli aptameri TBA-dansile con e senza ciclodestrina sono stati sintetizzati, purificati e liofilizzati presso il gruppo di ricerca del prof. Morvan dell'Università di Montpellier (Francia). Le molecole sono state solubilizzate in un tampone  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  10mM, KCl 70 mM, EDTA 0.2 mM a pH 7.0. Le soluzioni sono state sottoposte ad *annealing*, procedura che prevede il riscaldamento fino a 90°C per 5 minuti e il successivo raffreddamento lento fino a temperatura ambiente. Infine le soluzioni sono state fatte equilibrare a 4°C per 24 ore.

La concentrazione delle molecole di DNA in soluzione è stata determinata mediante misure di assorbimento UV utilizzando uno spettrofotometro Jasco UV-vis . Gli spettri UV

sono stati registrati alla temperatura di 80°C per assicurare la completa destrutturazione delle molecole in soluzione. Il pattern di cellette utilizzato è stato 0,1-1 cm.

Il coefficiente di estinzione molare è stato calcolato con la regola del primo vicino, sommando il contributo dei singoli nucleotidi. Poichè il dansile presenta un assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm, l'  $\epsilon_{260}$  del TBA modificato è stata ottenuto sommando il coefficiente di estinzione molare del TBA a quello del dansile alla lunghezza d'onda di 260 nm:

$$\epsilon \text{ TBA}_{260\text{nm}} = 143300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon \text{ dansile}_{260\text{nm}} = 7304 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon \text{ TBA modf.}_{260\text{nm}} = 150604 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

La trombina liofilizzata è stata acquistata presso la Sigma-Aldrich. A ciascun fiala contenente 1000 unità di proteina sono stati aggiunti 1000  $\mu\text{L}$  dello stesso tampone utilizzato per il TBA, ottenendo una soluzione 10  $\mu\text{M}$  di trombina in  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  10mM, KCl 70 mM, EDTA 0.2 mM, 50mM sodio Citrato, 150mM NaCl, 0,2 mM EDTA. In questo caso la concentrazione è stata determinata mediante Nanodrop1000, applicando la legge di Lambert-Beer e utilizzando il valore del coefficiente di estinzione molare riportato in letteratura a 280 nm [25], pari a  $\epsilon_{280}=68442 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.3.2 Misure di dicroismo circolare (CD)

Le misure di dicroismo circolare sono state eseguite con uno spettrofotometro JASCO J715, calibrato con una soluzione acquosa di acido (d)-(+)-10-canforsolfonico a 290 nm, associato ad un elemento Peltier per il controllo della temperatura (modello PTC-378W1). L'ellitticità molare  $\theta$  (mdeg  $\text{cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) è stata calcolata dall'equazione  $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}}/10 \times l \times c$ , dove  $[\theta]_{\text{obs}}$  è l'ellitticità, C è la concentrazione molare dell'oligonucleotide e l il cammino ottico. Per registrare lo spettro CD compreso tra 220 e 320 nm sono state utilizzate celle con un cammino ottico compreso tra 0.1 e 1.0 cm e una concentrazione di oligonucleotide compresa tra 5  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . Gli spettri sono stati acquisiti con una velocità di scansione di 20 nm /min ed una bandwidth di 2 nm. Ad ogni spettro è stata sottratta la misura del tampone.

Gli spettri CD al variare della temperatura sono stati registrati in un intervallo compreso tra 10°C a 90°C. Le curve di *melting* e di *annealing* sono state ottenute riportando l'ellitticità a 295 nm in funzione della temperatura. I parametri termodinamici sono stati ricavati interpolando i dati sperimentali mediante il modello di van't Hoff nell'ipotesi di un processo ad un unico stadio.

#### 4.4.3.3 Misure di Fluorescenza

Le misure di fluorescenza sono state effettuate mediante lo spettrofluorimetro FLUOROMAX4-HORIBA. Le *slit* per l'eccitazione e per l'emissione sono state programmate per una larghezza di 5nm. Tutte le cuvette utilizzate hanno cammino ottico di 1 cm. Per gli esperimenti di *melting* di fluorescenza i derivati mono e bi-coniugati sono

stati eccitati a 327nm e gli spettri di emissione sono stati registrati tra 400-600 nm al variare della temperatura compresa tra i 10°C-80°C. La concentrazione degli oligonucleotidi modificati utilizzata per questi esperimenti è compresa tra 1-10 µM. Per gli esperimenti di titolazione che hanno evidenziato l'effetto FRET la trombina è stata posta in cella in una concentrazione compresa tra 0,1-1.25 µM. Il campione è stato eccitato alla lunghezza d'onda tipica dei fluorofori aromatici  $\lambda_{ex}=280\text{nm}$ . Gli spettri di emissione sono stati registrati tra 300-650 nm.

#### **4.4.3.4 Misure di calorimetria a titolazione isoterma (ITC)**

Gli esperimenti ITC sono stati effettuati a 298 K usando il microcalorimetro Nano ITC Low Volume. Prima di ogni esperimento il pH delle soluzioni è stato controllato, la cella di riferimento è stata riempita con acqua deionizzata e le soluzioni di DNA sono state degassate per 5 min per eliminare bolle d'aria. Prima di effettuare la titolazione calorimetrica isoterma, al tampone in cui sono stati sciolti i due oligonucleotidi sono stati aggiunti 50mM sodio Citrato, 150mM NaCl, 0,2 mM EDTA in modo da rendere il tampone finale uguale a quello in cui è stata disciolta la trombina, ovvero  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  10mM, KCl 70 mM, 50mM sodio Citrato, 150mM NaCl, 0,2 mM EDTA.

Ad ogni iniezione è stato aggiunto un volume di 2 µL di una soluzione contenente TBA bis-coniugato (34 µM) ad una soluzione di Trombina (5 µM) disciolta nello stesso tampone, per un volume totale di 300 µL. Per permettere al sistema di ritornare in equilibrio per ogni iniezione è stato programmato un tempo di 300 s. Il calore di diluizione è stato registrato effettuando un altro esperimento in cui il ligando è stato titolato nel solo tampone. Il calore della diluizione è stato poi sottratto alla misura di interazione. Il calore normalizzato in funzione del rapporto molare dei componenti ha fornito una isoterma di binding. Tale isoterma è stata interpolata mediante un modello a siti indipendenti ed equivalenti che ha permesso la valutazione diretta della  $K_b$ , della stechiometria e dell'entalpia del processo. Gli altri parametri termodinamici sono stati calcolati mediante le relazioni fondamentali della termodinamica descritte nel capitolo 4.

#### **4.4.3.5 Misure di calorimetria a scansione differenziale (DSC)**

Gli esperimenti di microcalorimetria a scansione differenziale (DSC) sono stati eseguiti sui derivati del TBA mono e bi-coniugati mediante NanoDSC-III microcalorimeter della TA instruments. Gli oligonucleotidi sono stati disciolti in tampone  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  10mM, KCl 70 mM, EDTA 0.2 mM a pH 7.0 ad una concentrazione di 100 µM. Le soluzioni sono state accuratamente degassate prima della loro utilizzazione e loro profili termici sono stati

analizzati nel range di temperatura compreso tra 0-100 ° C ad una velocità di scansione di 1 ° C al minuto.

La calibrazione dello strumento è stata effettuata riempiendo entrambe le celle (riferimento e campione) con la soluzione tampone e accumulando diverse scansioni fino al raggiungimento dell'equilibrio. Successivamente nella cella campione è stato caricato l'oligonucleotide sciolto nello stesso tampone del riferimento. Le scansioni sono state registrate nello stesso intervallo della calibrazione. Sono state raccolte un minimo di sei scansioni per ogni esperimento per verificare la reversibilità del processo termico. La curva di denaturazione è stata analizzata mediante il software associato allo strumento. La linea di base è stata scelta come funzione polinomiale. La  $T_m$  è stata stimata prendendo in considerazione il massimo del picco del termogramma. L'entalpia calorimetrica ( $\Delta H_{cal}$ ) ed entropia ( $\Delta S_{cal}$ ) per il processo di transizione sono state determinate direttamente dalla curva DSC, con un modello modo indipendente.

## Bibliografia

- [1] Watson e Crick, *Nature*. **1953** May 30;171(4361):964-7.
- [2] Yang D, Okamoto K. *Future Med Chem*. **2010** Apr;2(4):619-46. Review
- [3] Huppert, j. L. *Chem Soc Rev* 37 (7), 1375-1384 (**2008**)
- [4] Capra JA, Paeschke K, Singh M, Zakian VA. *PLoS Comput Biol*. **2010** Jul 22;6(7)
- [5] Todd AK, Johnston M, Neidle S. *Nucleic Acids Res*. **2005** May 24;33(9):2901-7
- [6] Hershman SG, Chen Q, Lee JY, Kozak ML, Yue P, Wang LS, Johnson FB *Nucleic Acids Res*. **2008** Jan;36(1):144-56.
- [7] Huppert JL, Balasubramanian S. *Nucleic Acids Res*. **2005** May 24;33(9):2908-16.
- [8] Nakken S., Rognes T., Hovig E. *Nucleic Acids Res*. **2009** Sep;37(17):5749-56.
- [9] Rustighi A, Tessari MA, Vascotto F, Sgarra R, Giacotti V, Manfioletti G. *Biochemistry* **2002**;41(4):1229–1240.
- [10] Hurley LH, Siddiqui-Jain A. *Genet Eng News* **2005**;25(1):26–26.
- [11] Dang CV, *Cell* **2012** 149(1):22-35
- [12] Ashman LK, Griffith R. *Expert Opin Investig Drugs*. **2013** Jan;22(1):103-15
- [13] Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Zukic B, Spasovski V, Glumac I, Colovic M, Colovic N, Jurisic V, Scorilas A, Pavlovic S, Tosic N. *Med Oncol*. **2013** Mar;30(1):405.
- [14] Yang Y, Wu J, Guan H, Fang L, Li J, Li M. *FEBS Lett*. **2012**;586(20):3608-12
- [15] Chung C, Christianson M., *J Oncol Pharm Pract*. **2013** Mar 14
- [16] Eddy J, Maizels N. *Nucl Acids Res* **2006**;34(14):3887–3896.
- [17] W. I. Sundquist and S. Heaphy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, 90, 3393–3397.
- [18] B. C. Horsburgh, H. Kollmus, H. Hauser and D. M. Coen, *Cell*, **1996**, 86, 949–959
- [19] S. Kumari, A. Bugaut, J. L. Huppert and S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 218–221.
- [20] Blackburn EH. *Nature* **2000**;408(6808):53–56.
- [21] Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T., *Cell* **1998**;92(3):401–413
- [22] Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. *Cell* **2001**;106(3):275–286
- [23] E. H. Blackburn, *Nature*, **1991**, 350, 569-573.
- [24] Zaug AJ, Podell ER, Cech TR *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**;102(31):10864-9.
- [25] Denchi EL, de Lange T. *Nature*. **2007** Aug 30;448(7157):1068-71.
- [26] Miyoshi T, Kanoh J, Saito M, Ishikawa F. *Science*. **2008** Jun 6;320(5881):1341-4.
- [27] C. Mondello, A. I. Scovassi, *Biochem. Cell. Biol.*, **2004**, 82, 498-507.
- [28] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, *Nature* **1991**, 350, 718-720
- [29] Neidle S., *FEBS J*. **2010** Mar;277(5):1118-25
- [30] De Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, Mergny JL. *Biochimie*. **2008** Jan;90(1):131-55.

- [31] Wu J, Wang C, Li X, Song Y, Wang W, Li C, Hu J, Zhu Z, Li J, Zhang W, Lu Z, Yang CJ. *PLoS One*. **2012**;7(9):e46393
- [32] Virgilio A, Esposito V, Citarella G, Mayol L, Galeone A. *Chembiochem*. **2012** 13(15):2219-24.
- [33] Viglasky V, Hianik T. *Gen Physiol Biophys*. **2013** Mar 4.
- [34] K. Padmanabhan, K.P. Padmanabhan, J.D. Ferrara, J.E. Sadler, A. Tulinsky, J. *Biol. Chem.* 268 (**1993**) 17651e17654
- [35] J.R. Wyatt, T.A. Vickers, J.L. Roberson, R.W. Buckheit Jr., T. Klimkait, E. DeBaets, P.W. Davis, B. Rayner, J.L. Imbach, D.J. Ecker, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.91 (1994) 1356e1360.
- [36] S. Weiss, D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok, E.L. Winnacker, *J. Virol.* 71 (**1997**) 8790e8797.
- [37] A. Matsugami, T. Mashima, F. Nishikawa, K. Murakami, S. Nishikawa, K. Noda, T. Yokoyama, M. Katahira, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* (**2008**) 179e180.
- [38] F. Pileur, M.L. Andreola, E. Dausse, J. Michel, S. Moreau, H. Yamada, S.A. Gaidamakov, R.J. Crouch, J.J. Toulme, C. Cazenave, *NAR*. 31 (2003) 5776e5788.
- [39] N. Jing, Y. Li, X. Xu, W. Sha, P. Li, L. Feng, D.J. Twardy, *DNA Cell. Biol.* 22 (**2003**) 685e696.
- [40] T. Mori, A. Oguro, T. Ohtsu, Y. Nakamura *NAR*. 32 (**2004**) 6120e6128.
- [41] A.T. Phan, V. Kuryavyi, J.B. Ma, A. Faure, M.L. Andreola, D.J. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (**2005**) 634e639.
- [42] A.C. Connor, K.A. Frederick, E.J. Morgan, L.B. McGown, *J. Am.Chem. Soc.* 128 (**2006**) 4986e4991.
- [43] D. Michalowski, R. Chitima-Matsiga, D.M. Held, D.H. Burke, *NAR* 36 (**2008**) 7124e7135.
- [44] A.C. Girvan, Y. Teng, L.K. Casson, S.D. Thomas, S. Juliger, M.W. Ball, J.B. Klein, W.M. Pierce Jr., S.S. Barve, P.J. Bates, *Mol. Cancer Ther.* 5 (**2006**) 1790e1799.
- [45] K.T. Shum, J.A. Tanner, *Chembiochem* 9 (**2008**) 3037e3045.
- [46] Y. Nonaka, K. Sode, K. Ikebukuro, *Molecules* 15 (**2010**) 215e225.
- [47] K.T. Shum, E.L. Lui, S.C. Wong, P. Yeung, L. Sam, Y. Wang, R.M. Watt, J.A. *Biochemistry* 50 (**2011**) 3261e3271.
- [48] Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A. *J Biol Chem*. **1993** Aug 25;268(24):17651-4
- [50] Yan S, Huang R, Zhou Y, Zhang M, Deng M, Wang X, Weng X, Zhou X. *Chem Commun (Camb)*. **2011** Jan 28;47(4):1273-5.
- [51] Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. *Proc Natl Acad Sci* **1962** Dec 15;48:2013-8.
- [52] Luu KN, Phan AT, Kuryavyi V, Lacroix L, Patel DJ. *J Am Chem Soc*. **2006** 128(30):9963-70.
- [53] Keniry MA. Biopolymers. **2000-2001**;56(3):123-46. Review

- [54] Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Apr 15;90(8):3745-9.
- [55] Wang Y, Patel DJ. *J Mol Biol*. **1993** Dec 20;234(4):1171-83.
- [56] Haider S, Parkinson GN, Neidle S. *J Mol Biol*. **2002**;320(2):189-200.
- [57] Smith FW, Feigon J. *Nature*. **1992**;356(6365):164-8.
- [58] Kettani A, Gorin A, Majumdar A, Hermann T, Skripkin E, Zhao H, Jones R, Patel DJ. *J Mol Biol*. **2000** Mar 31;297(3):627-44.
- [59] Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. *Nature*. **2002**; 417(6891):876-80.
- [60] Ambrus A., Chen Y., Bouaziz G., Yang T, **2006** *Nucleic Acids Res*, 34, 2723
- [61] Phan AT, Luu KN, Patel DJ. *Nucleic Acids Res*. **2006**;34(19):5715-9.
- [62] Dai J, Carver M, Punchihewa C et al (**2007**) *Nucleic Acids Res* 35:4927–4940
- [63] Dai J, Carver M, Yang D (**2008**) *Biochimie* 90:1172–1183.
- [64] Lim KW, Amrane S, Bouaziz S et al (**2009**) *J Am Chem Soc* 131:4301–4309
- [65] Pagano B, Mattia CA, Giancola C. *Int J Mol Sci*. **2009** Jul 2;10(7):2935-57.
- [66] PhanAT, Kuryavvi V, Gaw HY & Patel DJ, **2005**, *Nat ChemBiol*,1, 167–173.
- [67] Pagano B, Randazzo A, Fotticchia I, Novellino E, Petraccone L, Giancola C *Methods*. **2013** pii: S1046-2023(13)00072-8.
- [68] J.S. Ren, K.G. Qu, J.O. Trent, J.B. Chaires, *Nucleic Acids Res*. **2002**, 30, 2307-2315.
- [69] P.A. Rachwal, T. Brown, K.R. Fox, *Biochemistry* **2007**, 46, 3036-3044.
- [70] V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, *Nucl. Acids. Res*. **2003**, 31, 2097-2107
- [71] J. Seenissamy, E.M. Rezler, T.J. Powell, D. Tye, V. Gokhale, C.S. Joshi, A. Siddiqui-Jain, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, 126, 8702-8709.
- [72] Neidle S., *Febs J*. 277 (**2010**) 1118-1125
- [73] Sun D., Thompson B., Trent J O, Neidle S, Hurley LH. **1997** *J Med Chem* 40, 2113-2116
- [74] Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S. *Cancer Res*. **2005** Feb 15;65(4):1489-96.
- [75] Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. *Oncogene* **2006** Sep 21;25(42):5719-25.
- [76] H.Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto *J. Am. Chem. Soc*. 128 (**2006**)15461e15468.
- [77] L. Petraccone, J.O. Trent, J.B. Chaires, , *J. Am. Chem. Soc*. 130 (**2008**) 16530e16532
- [78] L. Petraccone, N.C. Garbett, J.B. Chaires, J.O. Trent, *Biopolymers* 93 (**2010**) 533e548.
- [79] Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 48 (**2009**)7833e7836
- [80] A.P. Minton, *J. Biol. Chem*. **2001**, 276, 10577-10580.
- [81] Fujimoto T, Nakano S, Sugimoto N, Miyoshi D. *J Phys Chem B*. **2013** Jan 31;117(4):963-72.



- [82] Ginnari-Satriani L, Casagrande V, Bianco A, Ortaggi G, Franceschin M. *Org Biomol Chem.* **2009** Jun 21;7(12):2513-6
- [83] Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, 48, 7833-7836.
- [84] Cummaro A, Fotticchia I, Franceschin M, Giancola C, Petraccone L. *Biochimie.* **2011** Sep;93(9):1392-400.
- [85] Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I, Collins BM. *J Mol Recognit.* **2010** Sep-Oct;23(5):395-413.
- [86] Roselin LS, Lin MS, Lin PH, Chang Y, Chen WY. *Biotechnol J.* **2010** Jan;5(1):85-98.
- [87] Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JB. *Nat Protoc.* **2007**;2(12):3166-72.
- [88] Hudson, Brooks, Graves *Biochemistry* 48 (**2009**) 4440-4447.
- [89] Cantor CR, Warshaw MM, Shapiro H. *Biopolymers.* **1970**;9(9):1059-77.
- [90] Zimmerman SB, Trach SO (**1991**) *J Mol Biol* 222:599–620.
- [91] Parsegian VA, Rand RP, Rau DC (**2000**) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3987–3992.
- [92] Ellis RJ, Minton AP (**2003**) *Nature* 425:27–28
- [93] Zimmerman SB, Minton AP (**1993**) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22:27–65.
- [94] Zhou H-X, Rivas G, Minton AP (**2008**) *Annu Rev Biophys* 37:375–397
- [95] Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS (**2000**) Sizedependent. *J Biol Chem* 275:1625–1629)
- [96] Miyoshi D, Sugimoto N. *Biochimie* **2008** Jul;90(7):1040-51.
- [97] J. Zhou, C. Wei, G. Jia, X. Wang, Q. Tang, Z. Feng, C. Li, *Biophysical Chemistry* **2008**, 136, 124-12.
- [98] Capp MW, Pegram LM, Saecker RM, Kratz M, Riccardi D, Wendorff T, Cannon JG, Record MT Jr (**2009**). *Biochemistry* 48:10372–10379.
- [99] Knowles DB, LaCroix AS, Deines NF, Shkel I, Record MT Jr (**2011**). *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12699–12704.
- [100] L. Martino, B. Pagano, I. Fotticchia, S. Neidle, C. Giancola, *J. Phys.Chem.* 113 (**2009**) 14779e14786.
- [101] Y. Xue, Z.Y. Kan, Q. Wang, Y. Yao, J. Liu, Y.H. Hao, Z. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (**2007**) 11185e11191.
- [102] J. Amato, B. Pagano, N. Borbone, Oliviero, V. Gabelica, E.D. Pauw, S. D'Errico, V. Piccialli, M. Varra, C. Giancola, G. Piccialli, L. Mayol, *Bioconjug.Chem.* 22 (**2011**) 654e663
- [103] Galeone A, Mayol L, Virgilio A, Virno A, Randazzo A., *Mol Biosyst.* **2008** May;4(5):426-30
- [104] Chang Geng Peng, Masad J. Damha, *Nucl. Acids. Res.* **2007**; 35(15): 4977–4988
- [105] E. Pitts, R. Corey *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**; 95(20): 11549–11554.
- [106] Pradhan D, Hansen LH, Vester B, Petersen M. *Chemistry* **2011** ;17(8):2405-13.
- [107] Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, Wilson C, McCauley TG, *Pharm Res.* **2004** Dec;21(12):2234-46

- [108] Koizumi M, Koga R, Hotoda H, Ohmine T, Furukawa H, Agatsuma T, Nishigaki T, Abe K, Kosaka T, Tsutsumi S, Sone J, Kaneko M, Kimura S, Shimada K *Bioorg Med Chem.* **1998** Dec;6(12):2469-75.
- [109] Bunka DH, Platonova O, Stockley PG. *Curr Opin Pharmacol.* **2010** ;10(5):557-62.
- [110] Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO, *Exp Mol Pathol.* **2009** Jun;86(3):151-6
- [111] Tuteja R, Tuteja N. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998;33(6):407-36
- [112] *Discovery Medicine*; ISSN: 1539-6509; *Discov Med* 11(61):487-496, June 2011.
- [113] Brummel KE, Butenas S, Mann KG, *J Biol Chem.* **1999** Aug 6;274(32):22862-70
- [114] Lundblad RL, White GC *Platelets.* 2005 Nov;16(7):373-85. Review
- [115] Tanaka KA, Gruber A, Szlam F, Bush LA, Hanson SR, Di Cera E *Blood Coagul Fibrinolysis.* **2008** Jul;19(5):465-8
- [116] Di Cera, E. (2008) *Mol Aspects Med* **29**, 203-254
- [117] Lane, D. A., Philippou, H., and Huntington, J. A. (2005) *Blood* **106**, 2605-2612
- [118] Dang, Q. D., Sabetta, M., and Di Cera, E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 19649-19651
- [119] Malovichko MV, Sabo TM, Maurer MC *J Biol Chem.* **2013** Feb 1.
- [120] Sidhu PS, Liang A, Mehta AY, Abdel Aziz MH, Zhou Q, Desai UR. (2012) *J Med Chem* **54**, 5522-5531
- [121] Nimjee SM, Oney S, Volovyk Z, Bompiani KM, Long SB, Hoffman M, Sullenger BA *RNA.* **2009** Dec;15(12):2105-11.
- [122] Verhamme IM, Olson ST, Tollefsen DM, Bock PE. *J Biol Chem.* **2002**; 277(9):6788-98. Epub 2001 Nov 27.
- [123] Li W, Johnson DJ, Adams TE, Pozzi N, De Filippis V, Huntington JA. *J Biol Chem.* 2010 Dec 3;285(49):38621-9.
- [124] Lancellotti S, Rutella S, De Filippis V, Pozzi N, Rocca B, De Cristofaro R. *J Biol Chem.* 2008 Oct 31;283(44):30193-204.
- [125] Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI. *J Biol Chem.* **1997** Oct 10;272(41):25493-9.
- [126] Petretera NS, Stafford AR, Leslie BA, Kretz CA, Fredenburgh JC, Weitz JI. *J Biol Chem.* **2009** Sep 18;284(38):25620-9
- [127] Baldrich E, O'Sullivan CK. *Anal Biochem.* **2005** Jun 1;341(1):194-7.
- [128] Nagatoishi S, Tanaka Y, Tsumoto K. *Biochem Biophys Res Commun.* **2007** Jan 19;352(3):812-7.
- [129] Padmanabhan K, Tulinsky A. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **1996** Mar 1;52(Pt 2):272-82.
- [130] Pagano B, Martino L, Randazzo A, Giancola C. *Biophys J.* **2008** Jan 15;94(2):562-9.
- [131] Nallagatla SR, Heuberger B, Haque A, Switzer C. *J Comb Chem.* 2009 May-Jun;11(3):364-9.
- [132] Nagatoishi S, Isono N, Tsumoto K, Sugimoto N. *Biochimie.* **2011** Aug;93(8):1231-8.

- [133] Avino A, Fabrega C, Tintore M, Eritja R. *Curr Pharm Des.* **2012**;18(14):2036-47
- [134] Bonifacio L, Church FC, Jarstfer MB *Int J Mol Sci.* **2008** Mar;9(3):422-33
- [135] Martino L, Virno A, Randazzo A, Virgilio A, Esposito V, Giancola C, Bucci M, Cirino G, Mayol L. *Nucleic Acids Res.* **2006**;34(22):6653-62.
- [136] Goji S, Matsui J. *J Nucleic Acids.* **2011**;2011:316079.
- [137] He GX, Krawczyk SH, Swaminathan S, Shea RG, Dougherty JP, Terhorst T, Law VS, Griffin LC, Coutré S, Bischofberger N. *J Med Chem.* **1998** Jun 18;41(13):2234-42.
- [137] A. Ueno, A. Ikeda, H. Ikeda, T. Ikeda, F. Toda *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 382-387
- [138] Ueno, A.; Minato, S.; Suzuki, I.; Fukushima, M.; Ohkubo, M.; Osa, T.; Hamada, F.; Murai, K. *Chem. Lett.* **1990**, 605-608.
- [139] Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Oguma, N.; Nakamura, A.; Ikeda, T.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10980-10988.
- [140] Hamasaki, K.; Usui, S.; Ikeda, H.; Ikeda, T.; Ueno, A. *Supramol. Chem.* **1997**, *8*, 125-135
- [141] Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1411-1418.
- [142] Hamada, F.; Kondo, Y.; Ito, R.; Suzuki, I.; Osa, T.; Ueno, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1993**, *15*, 273-279
- [143] Wang, Y.; Ikeda, T.; Ikeda, H.; Ueno, A.; Toda, F. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 1598-1607.
- [144] Lu M, Guo Q, Kallenbach NR. *Biochemistry.* **1993** Jan 19;32(2):598-601.
- [145] Smirnov I, Shafer RH. *Biochemistry.* **2000** Feb 15;39(6):1462-8.
- [146] Russo Krauss I, Merlino A, Randazzo A, Novellino E, Mazzarella L, Sica F. *Nucleic Acids Res.* **2012**;40(16):8119-28.
- [147] Bucci EM, Valente M, Musumeci D, Sapio R, Anrò V, Roviello GN, Moccia M. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2007**;26(8-9):1047-50.
- [148] Famulok M, Mayer G. *Acc Chem Res.* **2011** Dec 20;44(12):1349-58

## Publicazioni

- 1) **Cummaro A., Fotticchia I., Franceschin M., Giancola C., Petraccone L., Binding properties of human telomeric quadruplex multimers: a new route for drug design., *Biochimie*, 2011, 93(9):1392-400**

### Abstract

Human telomeric G-quadruplex structures are known to be promising targets for an anticancer therapy. In the past decade, several research groups have been focused on the design of new ligands trying to optimize the interactions between these small molecules and the G-quadruplex motif. In most of these studies, the target structures were the single quadruplex units formed by short human DNA telomeric sequences (typically 21e26 nt). However, the 30-terminal single-stranded human telomeric DNA is actually 100e200 bases long and can form higher-order structures by clustering several consecutive quadruplex units (multimers). Despite the increasing number of structural information on longer DNA telomeric sequences, very few data are available on the binding properties of these sequences compared with the shorter DNA telomeric sequences. In this paper we use a combination of spectroscopic (CD, UV and fluorescence) and calorimetric techniques (ITC) to compare the binding properties of the (TTAGGG)<sub>8</sub>TT structure formed by two adjacent quadruplex units with the binding properties of the (AG<sub>3</sub>TT)<sub>4</sub> single quadruplex structure. The three side-chained triazatruxene derivative azatrux and TMPyP4 cationic porphyrin were used as quadruplex ligands. We found that, depending on the drug, the number of binding sites per quadruplex unit available in the multimer structure was smaller or greater than the one expected on the basis of the results obtained from individual quadruplex binding studies. This work suggests that the quadruplex units along a multimer structure do not behave as completely independent. The presence of adjacent quadruplexes results in a diverse binding ability not predictable from single quadruplex binding studies. The existence of quadruplexequadruplex interfaces in the full length telomeric overhang may provide an advantageous factor in drug design to enhance both affinity and selectivity for DNA telomeric quadruplexes.

- 2) Petraccone L., Fotticchia I., **Cummaro A.**, Pagano B., Ginari-Satriani L., Haider S., Randazzo A., Novellino E., Neidle S., Giancola C., **The triazatruxene derivate azatrux binds ti the parallel form of the human telomeric G-quadruplex under molecular crowding conditions: biophysical and molecular modelling study.** *Biochimie*, 2011, 93(8):1318-27

The present study has employed a combination of spectroscopic, calorimetric and computational methods to explore the binding of the three side-chained triazatruxene derivative, termed azatrux, to a human telomeric G-quadruplex sequence, under conditions of molecular crowding. The binding of azatrux to the tetramolecular parallel [d(TGGGGT)]<sub>4</sub> quadruplex in the presence and absence of crowding conditions, was also characterized. The data indicate that azatrux binds in an end-stacking mode to the parallel G-quadruplex scaffold and highlights the key structural elements involved in the binding. The selectivity of azatrux for the human telomeric G-quadruplex relative to another biologically relevant G-quadruplex (c-Kit87up) and to duplex DNA was also investigated under molecular crowding conditions, showing that azatrux has good selectivity for the human telomeric G-quadruplex over the other investigated DNA structures.