

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

FACOLTA' DI CHIMICA

Corso di laurea in

CHIMICA

TITOLO DELLA TESI:

“Studio delle interazioni di composti citotossici dell'oro con proteine modello”

“Interaction studies of cytotoxic gold compounds with model proteins”

Timbro del
Dipartimento

Relatore

Prof. Messori Luigi

Tesi di laurea di

Iacopo Lardori

A.A. 2010/2011

INDICE

Introduzione	p. 2
Complessi metallici citotossici	p. 2
I composti dell'oro citotossici	p. 3
Target cellulari e molecolari dei composti di oro:	p. 5
strategie di indagine per lo studio delle interazioni con proteine	
Metodologia per lo studio delle interazioni fra metallofarmaci e proteine	p. 6
Scopo del lavoro	p. 10
Materiali e metodi	p. 11
Spettrofotometria UV-visibile	p. 11
Spettrometria di massa di tipo ESI	p. 13
Risultati	p. 18
Spettrofotometria UV-visibile	p. 18
Spettrometria ESI	p. 21
Interazioni con le proteine modello	p. 22
Discussione dei risultati	p. 40
Conclusioni	p. 41
Bibliografia	p. 43

STUDIO DELLE INTERAZIONI DI COMPOSTI CITOTOSSICI DELL'ORO CON PROTEINE MODELLO

INTRODUZIONE

Complessi metallici citotossici

Il trattamento di numerose patologie neoplastiche è spesso condotto mediante l'uso di farmaci contenenti centri metallici. Tra le sostanze più efficaci all'interno di questa categoria farmacologica, troviamo i composti a base di platino, che risultano estremamente attivi nel trattamento di particolari tipi di tumore solido tra cui, ad esempio, i tumori testicolari, dell'ovaio, della testa, del collo e della vescica^{1,2}.

Sulla base di questi risultati farmacologici, negli ultimi anni, molti sforzi sono stati dedicati dalla comunità scientifica, allo sviluppo e alla realizzazione di nuovi composti di coordinazione a base metallica che possiedano apprezzabili proprietà antitumorali. Lo scopo delle ricerche è stato principalmente quello di ottenere sostanze con un'efficacia superiore, un'incrementata selettività per il tessuto tumorale, una ridotta tossicità, ed un più ampio spettro di attività rispetto al cisplatino e ai suoi derivati. Tuttavia, al momento, di centinaia di composti testati, solo una piccolissima parte ha dato buoni risultati clinici e soltanto pochissimi, tutti a base di platino, sono stati riconosciuti come agenti chemioterapico di uso clinico, in alternativa al cisplatino^{3,4}.

Sebbene i complessi di platino siano i complessi metallici più intensamente studiati come farmaci antitumorali, la ricerca è stata estesa allo studio di altri metallofarmaci non a base di platino, con la speranza di ampliare lo spettro di azione e ridurre la tossicità. In anni recenti è stato dimostrato che alcuni complessi di rutenio, opportunamente sostituiti, mostrano una accettabile stabilità in ambiente fisiologico ed, al contempo, sono dotati di significative proprietà antitumorali in vitro^{5,6}.

Questi sono stati oggetto di intensi studi ad opera di vari gruppi di ricerca internazionali^{7,8}. Numerosi composti di questa serie hanno dimostrato, a livello preclinico, interessanti proprietà antitumorali accompagnate da un profilo di tossicità sistemica generalmente migliore rispetto ai classici farmaci a base di platino. Un altro esempio significativo è costituito dai complessi metallici a base di oro, che hanno attirato l'interesse dei ricercatori fin dai primi anni '80 per la loro stretta affinità strutturale ed elettronica con i composti di platino. In particolare sono risultati interessanti alcuni nuovi complessi di oro(III) e oro(I) con incoraggianti proprietà biologiche, che sono tutt'oggi oggetto di estese investigazioni chimiche e biologiche.

I composti dell'oro citotossici

Il profilo farmacologico mostrato dal cisplatino, come precedentemente detto, ha suggerito che anche altri farmaci antitumorali basati su altri complessi metallici potessero avere effetti citotossici, anche se con "target" differenti, quindi con un differente spettro di attività biologica e sperabilmente una minore tossicità.

In questa ricerca di composti alternativi a quelli del platino, i complessi dell'oro in particolare hanno attirato molta attenzione della comunità scientifica negli ultimi anni⁹.

Dato che l'Au(III) è sia isoelettronico (d^8) che isostrutturale con il Pt(II), i complessi a geometria quadrata planare di Au(III) si stanno dimostrando degli eccellenti e innovativi candidati per test di citotossicità; anche se, in diversi casi, a differenza dei composti di platino (II), i complessi di oro(III) hanno mostrato una stabilità cinetica molto più bassa rispetto a quelli del platino, oltre a presentare una discreta sensibilità alla luce e la tendenza a ridursi ad oro metallico.

La chimica dell'oro inoltre presenta alcuni aspetti unici che sono conseguenza di uniche e importanti proprietà dello ione metallico: l'oro infatti è propenso a formare forti legami oro-oro (interazioni aurofiliche), inoltre la sua chimica redox è strettamente legata a cambi nella sua sfera di coordinazione: passa frequentemente da complessi quadrati planari di Au(III) a complessi lineari di Au(I). Tutti questi aspetti possono essere sfruttati per ipotizzare e creare una vasta gamma di composti farmacologicamente attivi basati su complessi di oro¹⁰.

In particolare, alcuni tra i composti dell'oro si sono rivelati particolarmente

interessanti.

Complessi di Au(I): I più importanti complessi di Au(I) sviluppati a scopo medico sono complessi di tiolati e fosfine, sono per lo più complessi bicoordinati a geometria lineare¹¹. L'esempio più rappresentativo di questo genere di composti è l'Auranofin¹², esistente sotto forma monomeric, la cui chimica in soluzione acquosa è stata intensamente investigata ed è stato dimostrato che il legante tiolico risulta più labile rispetto alla fosfina, subendo una rapida acquazione; a sua volta, la specie cationica risultante mostra una particolarmente forte reattività con le biomolecole, inoltre in letteratura sono riportati gli effetti antiproliferativi *in vitro* e *in vivo* di questo composto nei confronti di cellule umane tumorali¹³.

Complessi di Au(III): Una vasta gamma di questi complessi, che mostrano una chimica strutturale molto varia, sono stati considerati come potenziali farmaci anticancro. Tra questi, quelli che sono stati presi in considerazione per questo studio di tesi, possono essere raggruppati in due classi: complessi classici organometallici mononucleari di Au(III) (AubipyC¹⁴), e complessi di Au(III) binucleari (Auoxo6¹⁵, Au₂Phen¹⁶).

L'Au₂Phen è un complesso di Au(III) binucleare con gli atomi d'oro connessi con due legami a ponte d'ossigeno, con 2 leganti di 2,9-dimetilfenantrolina.

L'Auoxo6, è analogo all'Au₂phen con la differenza che i leganti in questo caso sono costituiti da una coppia di 6,6' - dimethyl - 2,2' - biperidina al posto delle fenantrolina sostituite.

Entrambi i centri d'oro in questi due composti presentano una geometria quadrata planare con una leggera distorsione piramidale.

L'AubipyC è un complesso organometallico di Au(III) coordinato con una 6-(1,1-dimetilbenzil)-2,2' - biperidina ed un ossidril; quello che distingue questa classe di complessi organometallici è la presenza all'interno del complesso di un legame diretto Au-C, che contribuisce alla stabilizzazione del centro Au(III).

Questi tre composti di Au(III) possiedono proprietà citotossiche che sono state valutate su test *in vitro*, secondo procedure standard di sperimentazione. In particolare, studi *in vitro* condotti dal gruppo del prof. Messori in collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia dell'Università degli Studi di Firenze su cellule umane di carcinoma ovarico sia sensibili (A2780/S) che resistenti (A2780/R) al cisplatino hanno mostrato per tutti e tre i complessi significative proprietà citotossiche^{15,16}.

Le proprietà antiproliferative di Au₂phen e Auoxo₆ e AubipyC sono state anche testate grazie alla procedura sviluppata presso l'istituto Oncotest di Berlino¹⁷. Mediante l'utilizzo dell'algoritmo COMPARE¹⁸ applicato all'analisi dei dati di inibizione della crescita da parte dei tre complessi di Au(III) è stato osservato che i profili di Au₂phen sono simili a quelli di Auoxo₆; questo comportamento è in accordo la pronunciata analogia strutturale tra i due composti¹⁹.

Target cellulari e molecolari dei composti di oro: strategie di indagine per lo studio delle interazioni con proteine

I tanti studi che sono apparsi negli ultimi 20 anni su complessi di platino antitumorali hanno rivelato l'estrema complessità dei meccanismi molecolari dei metallofarmaci, meccanismi che non possono essere giustificati solo sulla base di un blocco delle principali funzioni del DNA. Studi dettagliati hanno chiaramente mostrato come la formazione di addotti Pt-DNA portano alla fine alla morte cellulare attraverso una complessa cascata di eventi biochimici, anche con il coinvolgimento di alcune specifiche proteine. D'altra parte, un discreto numero di interazioni dirette dei composti di platino con proteine intra o extra-cellulari sono state indubbiamente dimostrate²⁰. Il significato funzionale di queste interazioni non è stato ancora chiarito; comunque queste sembrano giocare un ruolo chiave nella tossicità e nei processi di resistenza, come pure nel meccanismo farmacologico globale. Più in generale, per alcuni metallofarmaci antitumorali (sia di platino che non) sono state chiaramente evidenziate alcune interazioni con vari targets biomolecolari distinti dal DNA, che risultano importanti ai fini del loro profilo farmacologico e tossicologico²⁰. Sulla base di questi argomenti, risulta veramente importante estendere gli studi del meccanismo di azione alla considerazione di alcuni bersagli biomolecolari, intra ed extra-cellulari, focalizzando l'attenzione su specifici targets proteici, in modo da orientare razionalmente la sintesi di nuovi composti.

Numerosi studi *in vitro* sono stati fatti nel corso degli ultimi dieci anni per tentare di spiegare il meccanismo di azione di questi composti dell'oro; sono state formulate varie ipotesi in proposito ma ancora il meccanismo molecolare responsabile dei loro effetti biologici rimane per gran parte sconosciuto. Tuttavia l'abbondanza di dati farmacologici per una discreta varietà di composti ha portato all'identificazione di alcuni

processi cellulari probabilmente coinvolti nella loro azione citotossica.

Per quanto riguarda il meccanismo dell'azione citotossica ed antitumorale dei derivati di oro(III), al momento, si può solo dire che, nella maggior parte dei casi, è certamente diverso da quello dei derivati di platino(II). Contrariamente ai derivati di platino(II), il target primario per questi composti, molto probabilmente, non è il DNA. Si è visto, infatti, che il legame con gli acidi nucleici è principalmente di natura elettrostatica, debole e reversibile. Un dato di grande interesse è anche rappresentato dalla elevata reattività dei composti dell'oro con i gruppi imidazolo ed i gruppi tiolici delle proteine²¹.

Uno studio sulle interazioni di alcuni complessi di oro(III) con albumina serica bovina ha mostrato che si possono formare robusti addotti nei quali l'oro(III) è legato a istidine superficiali della proteina²². Queste interazioni con proteine potrebbero essere responsabili dell'elevata citotossicità di questi complessi. Si è visto, inoltre, che i complessi di oro(III) sono inibitori specifici della tioredossina reduttasi mitocondriale²³. Questo seleno-enzima, che protegge la cellula dallo stress ossidativo, rappresenta un target specifico per i complessi di oro(III), in analogia con i composti antiartritici di oro(I) e con vari altri farmaci antitumorali.

Grazie a questi studi è stato inoltre possibile definire più classi di composti, differenziate dalla loro modalità di azione con target biologici.

Composti dell'oro come l'Auranofin, sono capaci di coordinare debolmente le catene laterali di biomolecole (ad esempio gruppi tiolici o imidazolici) dopo un processo di attivazione. Come detto prima, nel caso dell'Auranofin l'attivazione è causata dal rilascio di un legante, e la successiva coordinazione alla biomolecola.

Infine, vi sono complessi di Au(III), come ad esempio l'Auoxo6, capaci di reagire con le biomolecole, provocando a esse un danno redox.

Metodologia per lo studio delle interazioni fra metallofarmaci e proteine

Al fine di capire le modalità di interazione fra complessi metallici e proteine, il

gruppo del prof. Messori ha sviluppato in anni recenti dei protocolli sperimentali per la caratterizzazione di tali sistemi basati sulla spettrometria di massa²⁴.

Per effettuare le nostre misure abbiamo utilizzato 3 proteine modello: Lisozima, Citocromo C e Ubiquitina che hanno un comportamento estremamente favorevole nei confronti dell'analisi mediante spettrometria ESI MS, infatti sono tutte e tre piccole proteine facilmente ionizzabili, che presentano alcuni siti favorevoli per il legame col metallo (in particolare alcuni residui di cisteina, istidina e metionina).

Le tre proteine sono mostrate nelle figure riportate di seguito.

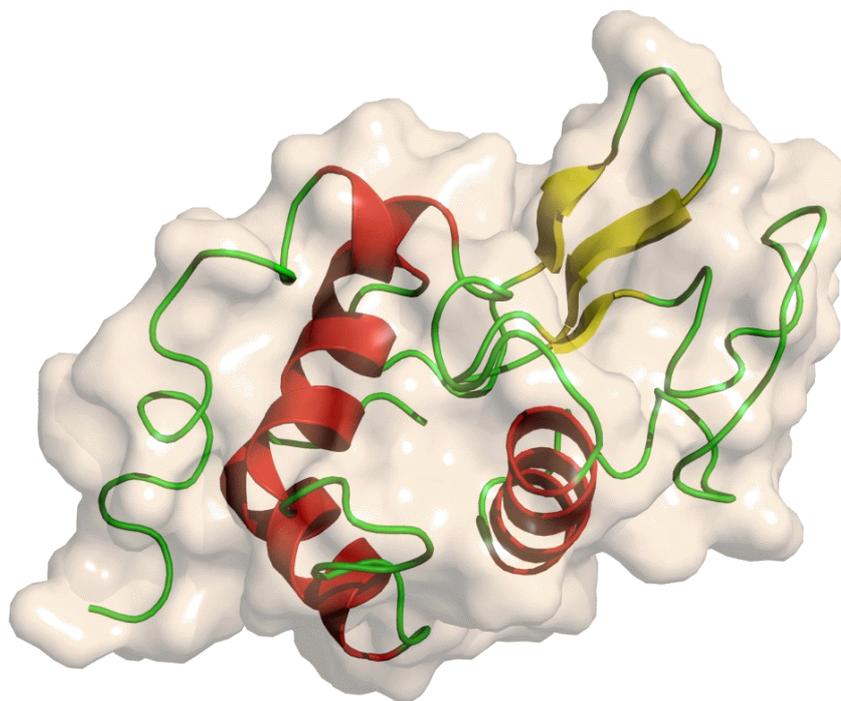


Figura 1. *Modello tridimensionale di lisozima*

Il lisozima è un enzima di 14,4 kDa presente in tessuti animali, dotato di attività battericida; è abbondantemente presente in numerose secrezioni animali e umane, come ad esempio le lacrime e la saliva. Si trova anche in concentrazioni abbastanza elevate nell'albume d'uovo. Il lisozima che abbiamo usato è proprio quello proveniente dall'albume d'uovo.

Data la sua massa ridotta e l'abbondanza di numerosi siti carichi positivamente su di essa, il lisozima si presenta molto adatta per analisi di massa ESI MS; inoltre possiede la particolarità di riuscire a formare cristalli con relativa facilità rispetto ad altre proteine conosciute, rendendola un modello ideale per studiarne la geometria tramite diffrazione a raggi X degli addotti metallofarmaco-proteina.

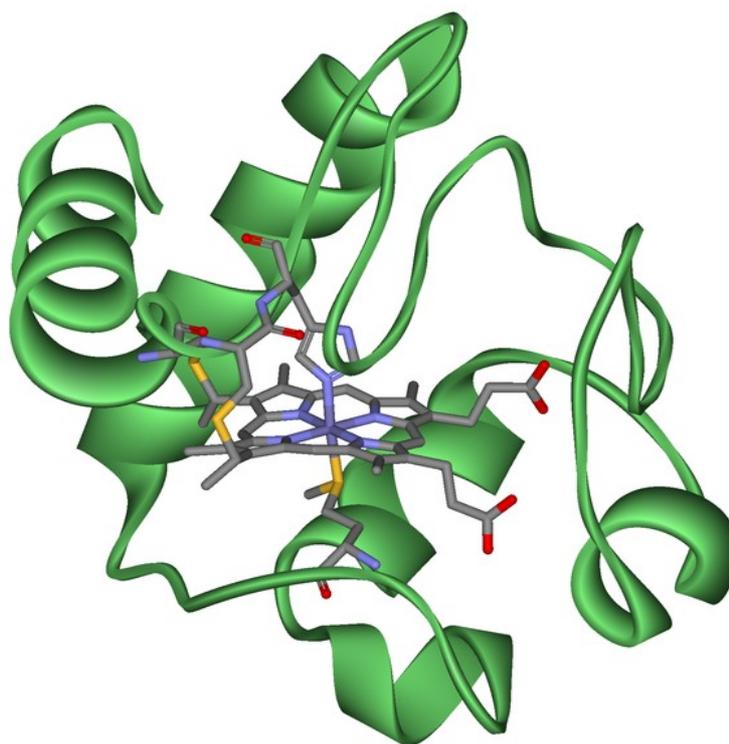


Figura 2. *Modello tridimensionale del citocromo c*

Il Cyt c è una piccola emoproteina di 12,4 kDa libera di diffondere nello spazio intermembrana, tra la membrana interna ed esterna dei mitocondri.

Il citocromo c è in grado di catalizzare diverse reazioni quali l'idrossilazione e l'ossidazione aromatica, e mostra attività perossidasiica ossidando vari donatori di elettroni, quali ad esempio l'acido 2-cheto-4-tiometilbutirrico e la 4-amminoantipirina.

Il Cyt c è anche un intermedio nel processo di apoptosi, esso è rilasciato dai mitocondri in risposta agli stimoli pro-apoptotici causando il rilascio di ioni Ca^{2+} i quali sono responsabili dell'innesco di un meccanismo a feedback che porta all'apoptosi.

Anche questa proteina possiede alcune caratteristiche che la rendono particolarmente adatta per gli studi di spettrometria di massa, come il basso peso molecolare e la presenza di svariati siti sulla sua superficie (ad esempio: His 25 e Met 65) che possono facilmente reagire con metalli di transizione. Inoltre è spettroscopicamente rilevante la presenza di un gruppo eme legato covalentemente alla proteina, capace di dare caratteristiche bande di assorbimento nel visibile.

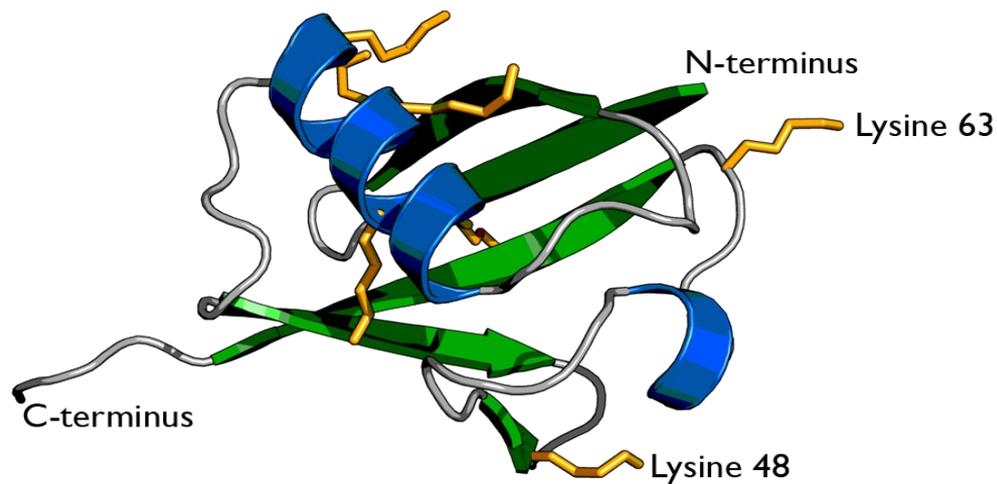


Figura 3. *Modello tridimensionale dell'ubiquitina*

Infine, l'ubiquitina è una piccola proteina regolatoria, di 8564.47 Da, responsabile della degradazione di alcune proteine. La proteolisi ubiquitina-dipendente è importante sia nella regolazione dei processi cellulari che nell'eliminazione delle proteine difettose.

Di questa proteina sono già state studiate in passato le interazioni con complessi di platino^{25,26}.

Tutte e tre le proteine manifestano un'elevata stabilità in soluzioni che imitano le condizioni fisiologiche, sono solubili in acqua e si possono facilmente trovare in commercio a un prezzo relativamente basso. Queste caratteristiche rendono meno complesso il lavoro sperimentale su questi sistemi modello.

SCOPO DEL LAVORO

Per questo lavoro di tesi abbiamo preso in esame 4 composti dell'oro con riconosciute proprietà citotossiche e, abbiamo cercato di capire la tipologia delle interazione che essi instaurano con le proteine, che sono i loro probabili bersagli biomolecolari. A questo fine abbiamo scelto 3 proteine modello: Lisozima, Citocromo C e Ubiquitina che risultano essere particolarmente adatte per gli studi biofisici che intendevamo svolgere. In particolare, in questo lavoro di tesi, l'analisi delle interazioni è stata svolta con misure spettrofotometriche nell'UV-vis e con misure di spettrometria di massa ESI MS. Lo studio si è focalizzato sulla identificazione e caratterizzazione degli addotti che si possono eventualmente formare nelle reazioni fra i composti citotossici dell'oro e le proteine modello selezionate. La caratterizzazione dettagliata e a livello molecolare di tali addotti consente di ottenere interessanti informazioni per la comprensione delle interazioni che intervengono fra i metallofarmaci e le proteine. Più in generale è possibile definire modelli caratteristici di metallazione delle proteine che possono giocare un ruolo importante nel meccanismo dell'azione biologica di tali sostanze.

La ricerca si è basata su quattro rappresentativi composti dell'oro mostrati in figura:

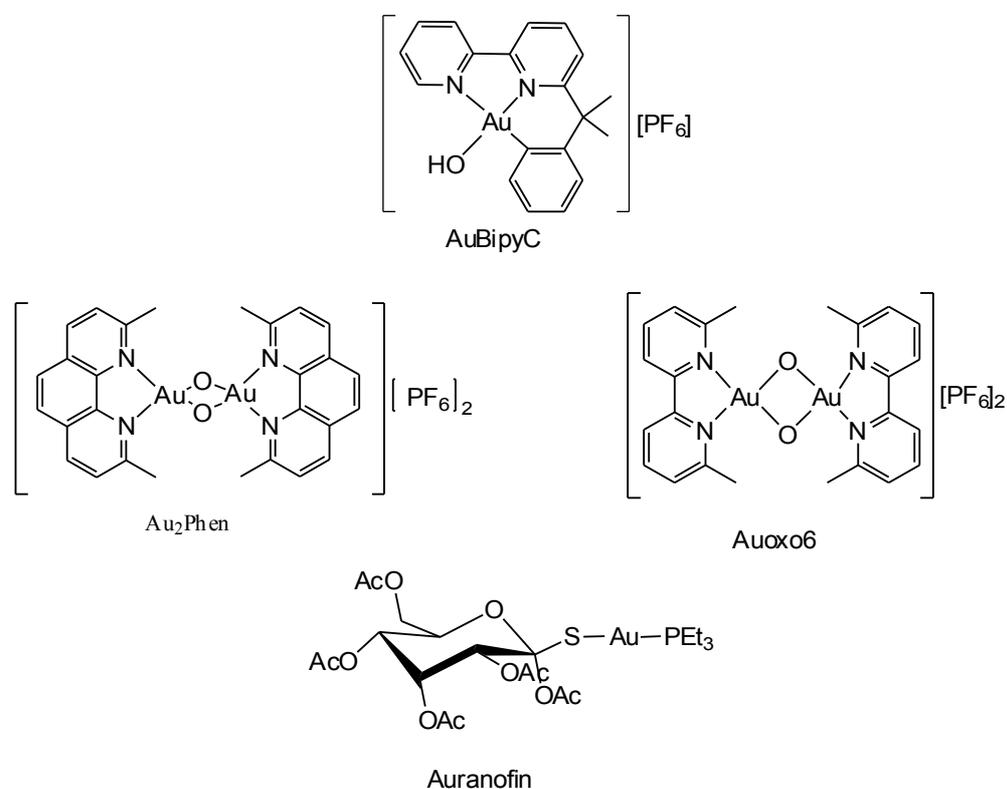


FIGURA 4. Rappresentazione schematica dei composti utilizzati

MATERIALI E METODI

Materiali

I composti selezionati per lo studio fanno parte di una collezione di complessi metallici a base di oro già presente nel laboratorio del Prof. Messori. In particolare, i complessi Au₂phen, Auoxo₆ e AuBipyC provengono da una stretta collaborazione che il gruppo intrattiene con la Prof. Cinellu del Dipartimento di Chimica dell'Università di Sassari^{14,15,16}, mentre l'Auranofin è un prodotto commerciale (Vincibiochem EI-206).

Citocromo c da cuore di cavallo (C7752), ubiquitina da cellule del sangue (U6253) e lisozima da albume d'uovo (L7651) sono stati acquistati da Sigma e utilizzati senza ulteriore purificazione.

Gli spettri UV- visibile sono stati registrati su uno spettrofotometro Varian Cary 50 UV-VIS, mentre gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa LTQ-Orbitrap ad alta risoluzione (Thermo, San Jose, CA, USA), dotato di una sorgente ESI convenzionale.

Per la preparazione dei campioni, le polveri dei composti sono state sciolte in solventi appositi, in modo da preparare delle soluzioni madre concentrate, che successivamente sono state diluite nei vari ambienti acquosi. In particolare, i composti di oro(III), sono stati disciolti in DMSO fino ad ottenere una concentrazione 10⁻² M, mentre l'auranofin, Au(I), è stato disciolto in una miscela EtOH/H₂O sempre per raggiungere una concentrazione di 10⁻² M.

Ciascuna delle 3 proteine modello invece sono state disciolte in acqua fino alla concentrazione 10⁻³M, e poi a sua volta diluite nell'apposito tampone per le misure.

Metodi

Spettrofotometria UV-Visibile

La spettroscopia UV-visibile è una tecnica analitica che si basa sulla capacità di alcune molecole di assorbire alle lunghezze d'onda dell'UV-Visibile. L'assorbimento

provoca l'eccitazione di un elettrone che passa da un orbitale molecolare a bassa energia ad un altro con energia superiore. L'elettrone passa temporaneamente da uno stato fondamentale ad uno stato eccitato.

La regione UV-Visibile si estende all'incirca dai 100 agli 800 nm ma gli spettrofotometri più comunemente usati lavorano nell'intervallo tra 200 e 700 nm. L'energia contenuta nella radiazione in questo campo è sufficiente per eccitare gli elettroni che appartengono ad orbitali π di legame, o a coppie di elettroni non di legame. Le transizioni che generalmente si osservano sono del tipo: $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ (si veda figura).

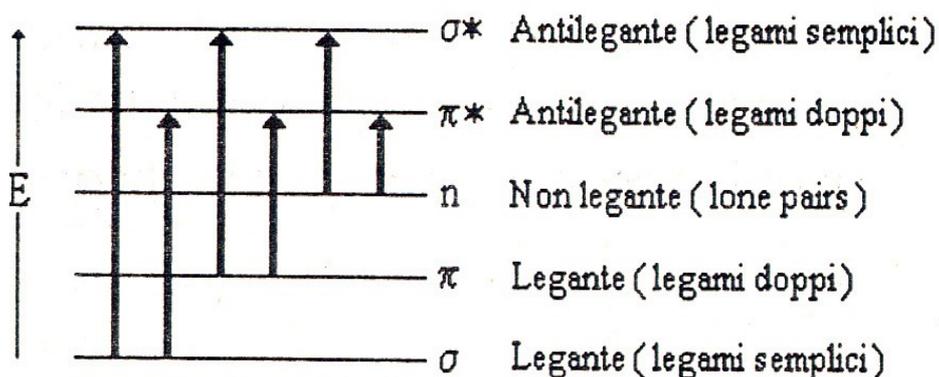


Figura 5. *Transizioni elettroniche possibili per una molecola coniugata.*

Le molecole restano allo stato eccitato per un tempo dell'ordine di 10^{-8} - 10^{-9} secondi, tornando poi allo stato fondamentale attraverso vari processi, sia radioattivi che non. I gruppi capaci di dare assorbimento di radiazioni nell'UV e nel visibile sono detti cromofori. Se all'interno della molecola questi gruppi non sono presenti, la molecola non assorbe nella regione dell'UV-Visibile e viene a mancare la possibilità di analizzare il composto a tali lunghezze d'onda. L'entità dell'assorbimento della radiazione da parte di una soluzione è regolata da due principi fondamentali: l'assorbimento della luce è correlato in modo esponenziale al numero di molecole di cromoforo che sono presenti in soluzione, cioè alla concentrazione del cromoforo in

soluzione [C], l'assorbimento della luce è correlato in modo esponenziale alla lunghezza del percorso della luce stessa attraverso la soluzione assorbente.

Questi due principi sono riassunti nella Legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon C l$$

dove A è l'assorbanza, l è la lunghezza della cella in cui è contenuto il campione (cm), ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) è il coefficiente d'estinzione molare e C è la concentrazione del cromoforo ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Questa legge quantifica quindi l'entità di assorbimento di una soluzione in funzione della concentrazione del cromoforo presente.

Spettrometria di massa di tipo ESI

La spettrometria di massa è una tecnica analitica molto potente, usata per identificare prodotti incogniti, per fare determinazioni quantitative di composti noti e per chiarirne sia le proprietà strutturali che quelle chimiche. La particolarità interessante di questo metodo d'analisi è rappresentata dalle quantità di campione estremamente limitate che servono per fare tali esperimenti. In alcuni casi è stato utilizzato un quantitativo inferiore al picogrammo e a concentrazioni molto basse in miscele complesse.

Questa tecnica comporta la disintegrazione di composti organici in frammenti ionici in fase gassosa. Questi ioni sono accelerati a velocità specifiche usando un campo elettrico e quindi separati, per mezzo dell'analizzatore, in base al loro differente valore di m/z; ciascun frammento viene quindi rilevato in sequenza nel tempo. Quello che si ottiene alla fine è lo spettro di massa, ovvero un diagramma di abbondanza ionica in funzione del rapporto m/z.

Schema di uno spettrometro di massa

Lo spettrometro di massa può essere diviso in tre parti fondamentali: fonte di ionizzazione, analizzatore, rivelatore. Il campione viene introdotto nella fonte di ionizzazione dello strumento e viene quindi ionizzato, poiché gli ioni sono più facilmente manipolabili rispetto alle molecole neutre. Questi ioni vengono estratti dentro la regione "analizzatore" dello spettrometro di massa dove vengono separati in base al loro rapporto massa carica (m/z). Gli ioni così separati vengono identificati ed appena il segnale arriva al rivelatore si ottiene uno spettro della abbondanza relativa degli ioni in funzione del rapporto m/z . L'analizzatore, il rivelatore e spesso anche la fonte di ionizzazione vengono mantenuti sotto vuoto per dare agli ioni la possibilità di viaggiare da una parte all'altra dello strumento senza incontrare ostacolo da parte delle molecole dell'aria.

Metodi di ionizzazione del campione

Il campione può già esistere in forma ionica in soluzione, oppure può essere ionizzato di concerto con la sua volatilizzazione o mediante altri metodi nella sorgente ionica. In dettaglio esistono diverse metodiche per ottenere la frammentazione ionica; le più comuni utilizzano sorgenti ioniche a ionizzazione per mezzo di elettroni ("ionizzazione elettronica", EI), in cui gli ioni vengono generati mediante bombardamento di molecole gassose con un fascio di elettroni ad alta energia (circa 70 eV). Questa tecnica di ionizzazione è la più usata per quelle molecole che possono essere facilmente vaporizzate e che non si decompongono durante la vaporizzazione. Tuttavia, a causa dell'elevato potenziale, tale metodo viene definito "ad alta energia", ossia è una ionizzazione forte ("hard") che può portare ad una estesa frammentazione che lascia poco o niente dello ione molecolare. In assenza dello ione molecolare, il peso molecolare e la struttura non sono facilmente determinabili. Questo fatto ha portato alla messa a punto di tecniche di ionizzazione a più bassa energia (ionizzazione morbida, "soft").

Altri metodi di ionizzazione ampiamente usati sono: la ionizzazione chimica, l'impatto elettronico, la ionizzazione elettrospray (ESI) e MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation). Il metodo che è stato utilizzato in questo progetto di tesi fa parte delle nuove tecniche "soft" di "ionizzazione per elettronebulizzazione", ed è noto con il nome di ESI-MS, ovvero Electrospray Ionization Mass Spectrometry.

Ionizzazione electropray (ESI)

La ionizzazione electropray (*ESI*) è una delle tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica più adatte per le analisi di molecole polari con peso molecolare compreso tra meno di 100 Da e più di 1.000.000 Da.

Durante la ionizzazione *electrospray* standard il campione viene dissolto in un solvente polare e volatile, e quindi aspirato attraverso un sottile capillare di acciaio inossidabile (75-150 micrometri i.d.) ad una velocità di flusso tra 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 1 mL/min . All'estremità del capillare, situato all'interno della sorgente di ionizzazione, viene applicato un alto voltaggio di 3 -4 KV. A causa di questo forte campo elettrico, il campione che emerge dall'estremità viene disperso in gocce di aerosol altamente cariche. Questo processo viene favorito dall'introduzione di un gas nebulizzato che scorre attorno al capillare. Questo gas, solitamente azoto, aiuta a direzionare lo spray che fuoriesce dal capillare verso lo spettrometro di massa.

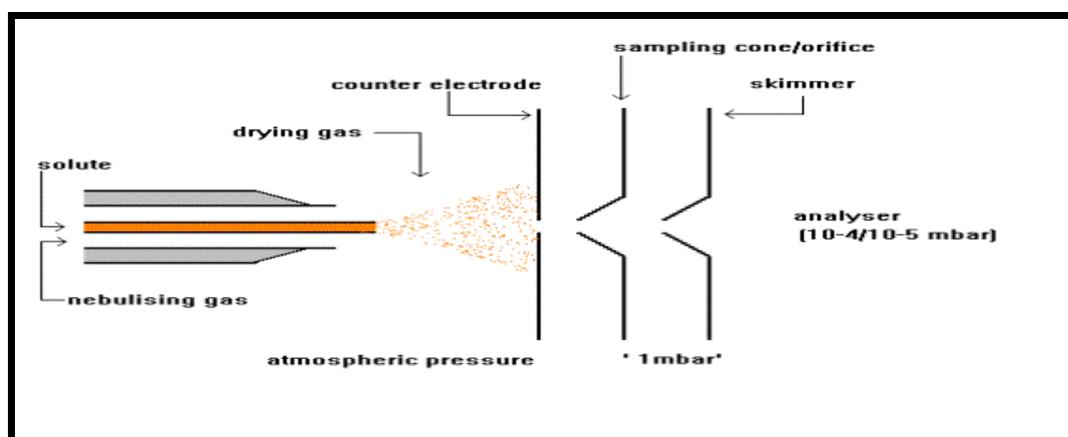


Figura 6. Sorgente standard di ionizzazione elettrospray.

Le gocce cariche del campione diventano più piccole grazie alla evaporazione del solvente, la quale viene assistita da una corrente calda di azoto ("drying gas"). Raggiunta una densità di carica critica, gli ioni in soluzione, vengono rilasciati dalle gocce, e passano attraverso un cono di campionamento, o un orifizio, verso un regione intermedia vuota, e da qui attraverso una piccola apertura sono inviati verso l'analizzatore.

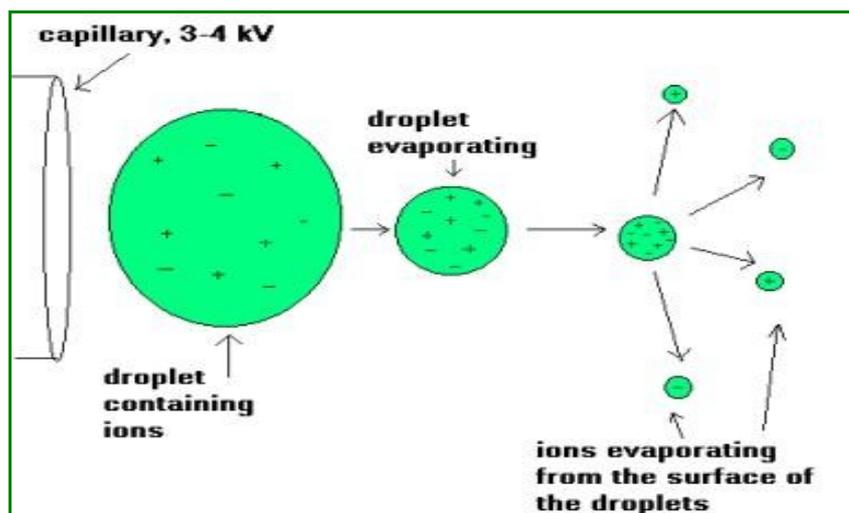


Figura 7. *Processo di ionizzazione elettrospray*

Analisi e separazione degli ioni del campione

La principale funzione dell'analizzatore di massa è di separare o risolvere gli ioni, formati nella sorgente di ionizzazione e che si trovano in fase gassosa, in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Gli analizzatori più comunemente utilizzati sono i settori magnetici ed elettrici, i quadrupoli, le trappole ioniche (ion traps), gli spettrometri basati sulla risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR) e gli analizzatori del tempo di volo (TOF, Time of Flight).

Questi analizzatori si differenziano per il rapporto m/z che possono ricoprire, per l'accuratezza della massa e per la risoluzione ottenibile. La compatibilità dei differenti analizzatori varia a seconda dei diversi metodi di ionizzazione.

Rivelatore e registrazione dei dati

Il rivelatore verifica il flusso di ioni, lo amplifica e il segnale è poi trasmesso al "data system" dove viene registrato sottoforma di spettro di massa. Gli ioni vengono rivelati, dopo la loro separazione, trasformando l'energia prodotta dalla loro collisione sulla superficie del rivelatore, in modo da provocare l'emissione di altri ioni, elettroni o fotoni, che vengono poi misurati mediante opportuni rivelatori di luce o di carica. I valori di m/z degli ioni sono riportati nello spettro in funzione della loro intensità relativa, in modo da mostrare il numero di componenti nel campione, la massa molecolare di ciascun componente e la relativa abbondanza degli stessi nel campione. Gli spettri vengono riportati spesso in forma di semplici istogrammi. Operando una opportuna deconvoluzione dei diversi valori di m/z ottenuti, è possibile determinare il peso molecolare, ad esempio di una proteina, con notevole accuratezza, spesso fino a una parte per diecimila.

RISULTATI

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la spettrofotometria UV-visibile per osservare il comportamento dei metallofarmaci presi in esame in soluzioni a pH fisiologico, in presenza o in assenza di una proteina, e in modo da caratterizzare la stabilità dei vari complessi in soluzione e capire le eventuali modificazioni che possono verificarsi nell'arco di 24h a causa delle interazioni che possono instaurarsi con la proteina. In seguito, grazie all'ausilio di uno spettrometro di massa ESI MS siamo andati a indagare in dettaglio l'eventuale formazione di addotti complesso metallico-proteina, cercando di identificare i frammenti di composto che si possono andare a legare alla proteina stessa.

Spettrofotometria UV-vis

Inizialmente è stato seguito il comportamento di ciascun complesso metallico nel tampone di riferimento a pH fisiologico, per andare ad investigare la stabilità di ciascun composto di oro. Per questo, aliquote delle soluzioni madre di ciascun complesso dell'oro sono state diluite in tampone fosfato 10 mM a pH 7.4 fino alla concentrazione finale di 10^{-5} M. Gli addotti con le proteine, invece, sono stati preparati in modo da avere un rapporto metallo-proteina di 3:1, con una concentrazione finale di proteina pari a 10^{-5} M. I campioni da analizzare sono stati posti in cuvette di quarzo, perché anche nella regione dell'ultravioletto questo materiale non assorbe e risulta trasparente. Le cuvette che abbiamo utilizzato hanno cammino ottico di 1 cm.

Come analisi preliminare abbiamo registrato gli spettri di assorbimento durante l'arco di 24h dei metallofarmaci nella soluzione di fosfato per verificarne la stabilità all'interno della soluzione. Abbiamo osservato gli spettri dei vari composti in soluzione ogni 10 minuti nella prima ora, per cercare di seguire eventuali rapidi cambi dovuti all'idrolisi o all'interazione diretta con le proteine, e successivamente la registrazione è continuata ogni ora per 24 ore.

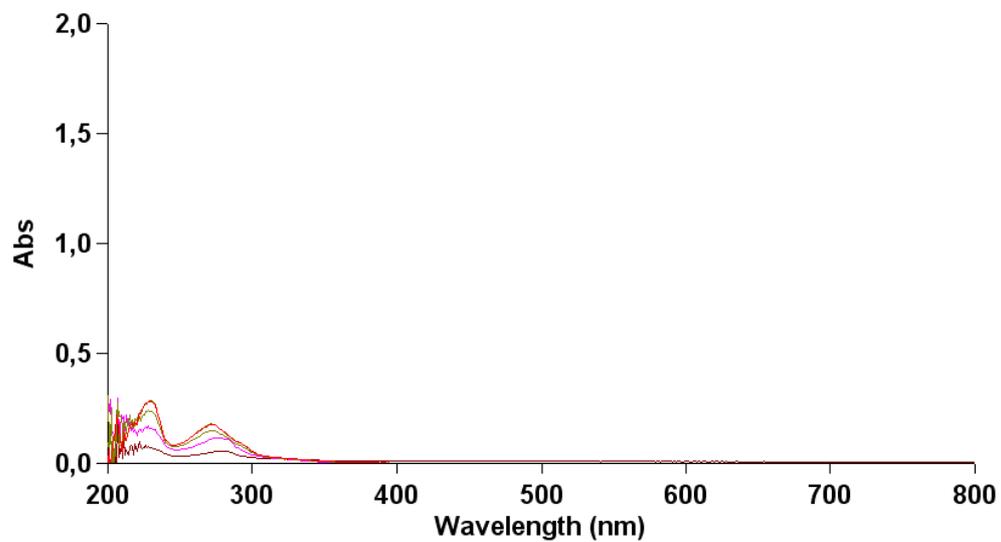


Figura 8. *Spettro di assorbimento di Auranofin*

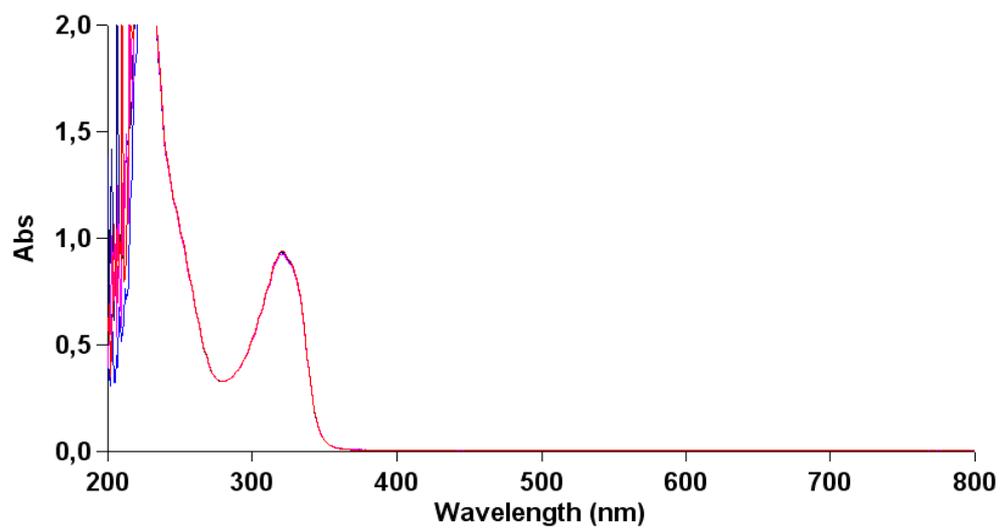


Figura 9. *Spettro di assorbimento di AubipyC*

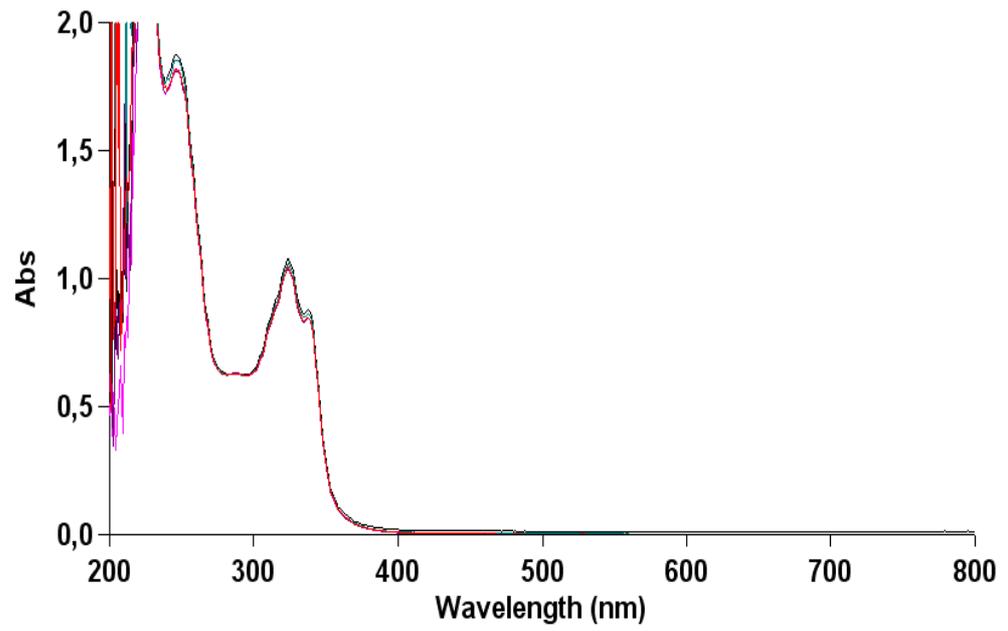


Figura 10. *Spettro di assorbimento di Auoxo6*

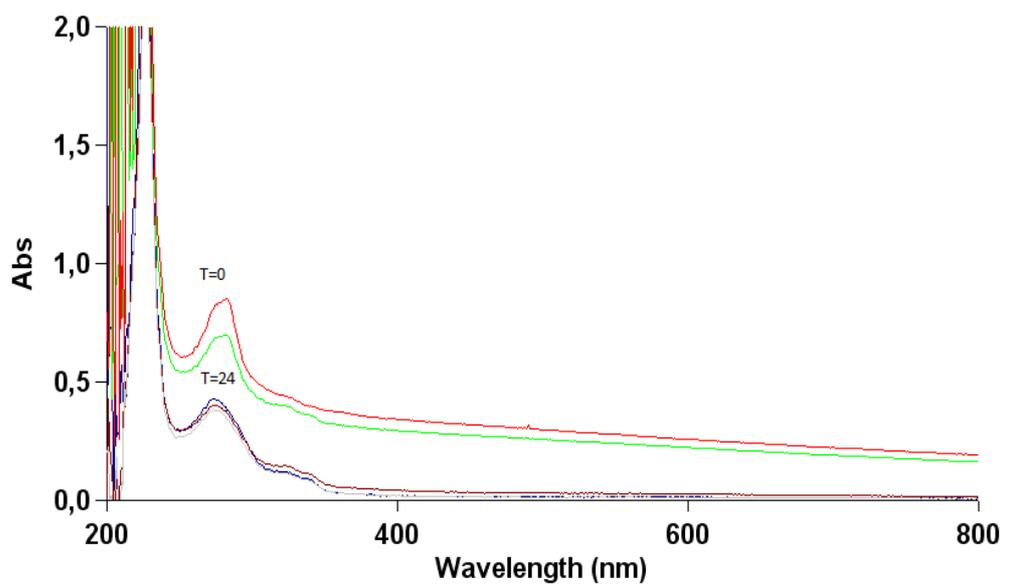


Figura 11. *Spettro di assorbimento di Au₂phen*

Nell'arco di 24 ore, tutti e tre i composti di Au(III) manifestano un'apprezzabile stabilità, come documentato dalla sostanziale stabilità dei loro spettri di assorbimento. L'unico spettro a subire delle modificazioni è stato quello dell'Au₂phen, per il quale si può ipotizzare che parte del composto sia andato incontro a precipitazione, come ci si può aspettare data la sua scarsa solubilità, ma non a modificazioni chimiche, visto che non sono state osservate modificazioni sostanziali nella posizione e forma delle sue bande di assorbimento.

Una volta caratterizzato il comportamento dei composti in ambiente a pH fisiologico, siamo passati allo studio delle interazioni che questi composti hanno con le proteine modello selezionate. Per prima cosa abbiamo registrato lo spettro di assorbimento UV-visibile delle proteine da sole, dopodiché abbiamo aggiunto ciascun composto in 4 diverse cuvette contenenti la soluzione col tampone fosfato e la proteina presa in esame, eseguendo una serie di scansioni analoga a quella fatta per i singoli composti dell'oro liberi, seguendo in dettaglio lo spettro elettronico degli addotti complesso-proteina nell'arco delle 24h.

La spettroscopia di assorbimento UV, è stata scelta come metodo per monitorare in continuo il comportamento del cromoforo di Au(III) nel tampone di riferimento e per cercare di osservare, sempre in continuo, se l'interazione con le proteine modello può portare a modificazioni della banda di questo cromoforo o della proteina stessa.

Successivamente per andare a fondo nella natura di queste interazioni siamo ricorsi a studi mediante spettrometria di massa di tipo ESI MS dei composti con le proteine modello.

Spettrometria ESI MS

Per le analisi, i campioni da analizzare sono stati preparati diluendo una quantità equivalente delle 3 proteine (100 μ M) con un tampone di tetrametilammonio acetato (25mM) a pH 7.4. Successivamente sono stati aggiunti i 4 complessi d'oro (in rapporto 3:1 complesso metallico:proteina) alla soluzione, e i campioni sono stati incubati a 37°C

per 72h per simulare delle condizioni fisiologiche.

Prima di essere iniettati nello strumento per l'analisi, i campioni sono stati diluiti 20 volte con acqua. Gli spettri di massa sono stati registrati tramite iniezione diretta (5 μ l/min) in uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Orbitrap (Thermo, San Jose, CA, USA), dotato di una sorgente ESI.

Le condizioni di lavoro erano le seguenti : voltaggio dello spray 3.1 kV, voltaggio del capillare 45V e temperatura del capillare 220°C. La guaina e i gas ausiliari sono stati settati rispettivamente a 17 e 1 (unità arbitrarie).

Per l'acquisizione è stato usato il software Xcalibur 2.0 (Thermo).

Interazioni con le proteine modello

Per ciascuno dei 4 composti dell'oro oggetto di questo lavoro di tesi riportiamo la descrizione del comportamento in soluzione e lo studio delle interazioni con le varie proteine modello analizzate mediante spettrofotometria e ESI MS.

La linea rossa corrisponde allo spettro di assorbimento della proteina libera.

Auranofin

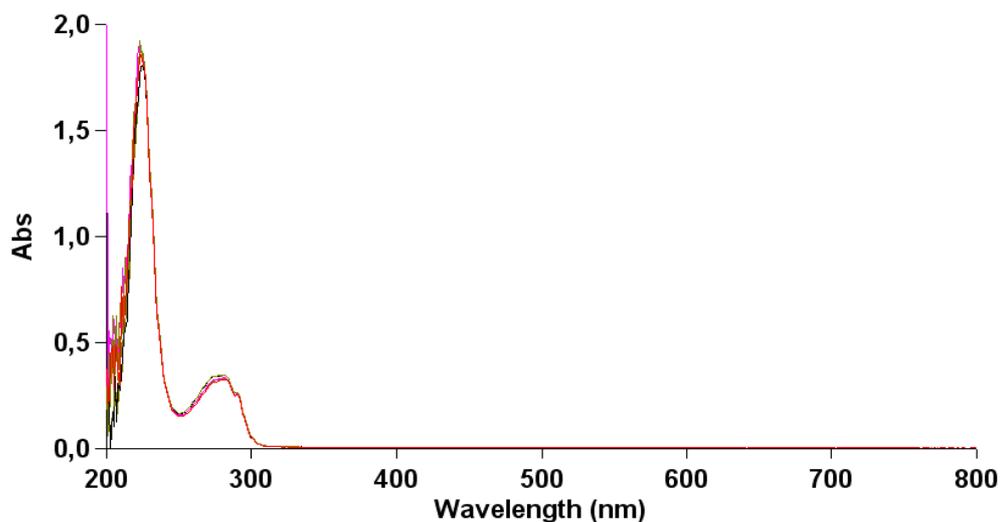


Figura 12. *Spettro di assorbimento di Auranofin+lisozima*

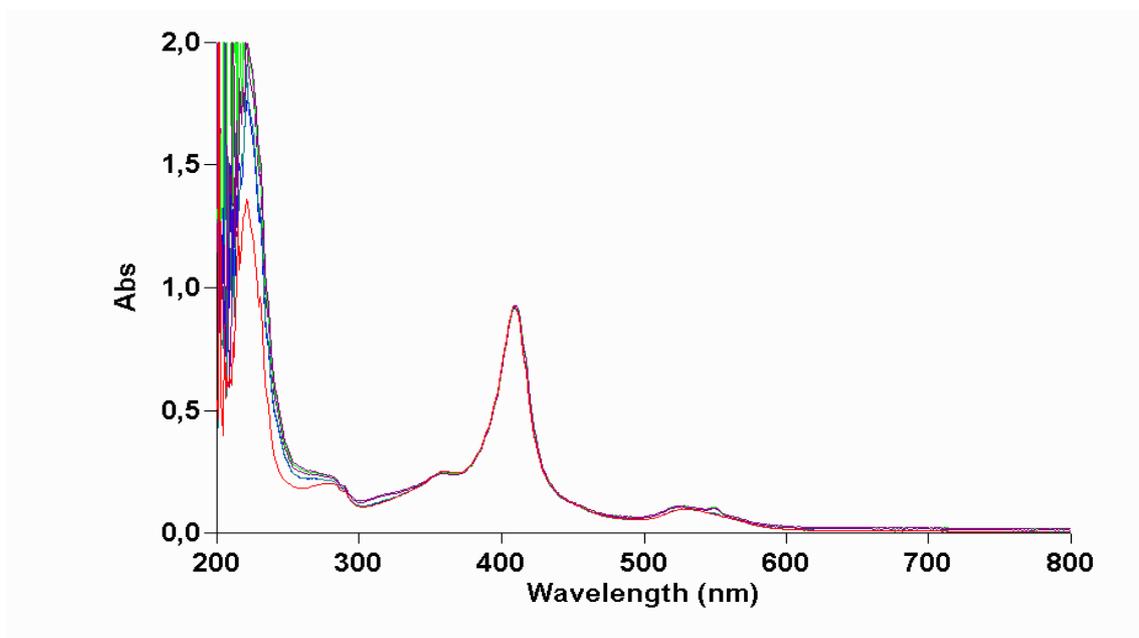


Figura 13. *Spettro di assorbimento di Aurano-fin+citocromo c*

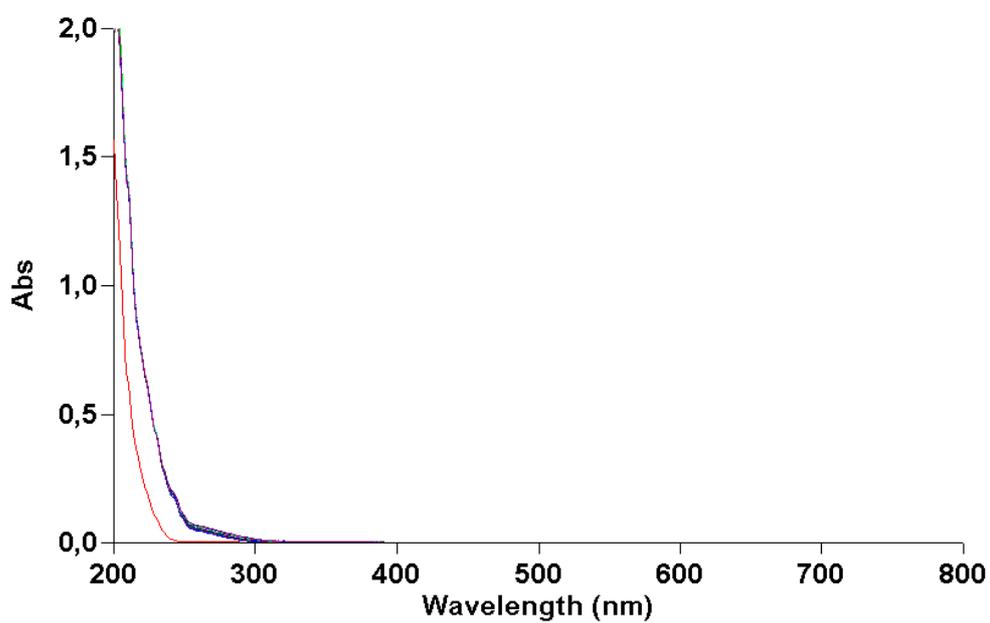


Figura 14. *Spettro di assorbimento di Aurano-fin+ubiquitina*

Per quanto riguarda Aurano-fin, questo composto non ha una banda di assorbimento nella regione spettrale tra 200 e 700 nm, però dall'osservazione degli

spettri UV-visibile di questo con le proteine modello vediamo che, questo rimane invariato durante tutte le 24h di osservazione. Solo nello spettro auranofin + ubiquitina vediamo che la banda di assorbimento dell'ubiquitina subisce una lieve modificazione rispetto a quello che si osserva per la proteina libera, che fa sospettare un'interazione complesso-proteina capace di far spostare la banda di assorbimento dell'ubiquitina libera a lunghezze d'onda maggiori.

Quindi, per chiarimenti su eventuali processi di metallazione delle proteine abbiamo registrato gli spettri di massa relativi alle tre proteine modello con l'auranofin.

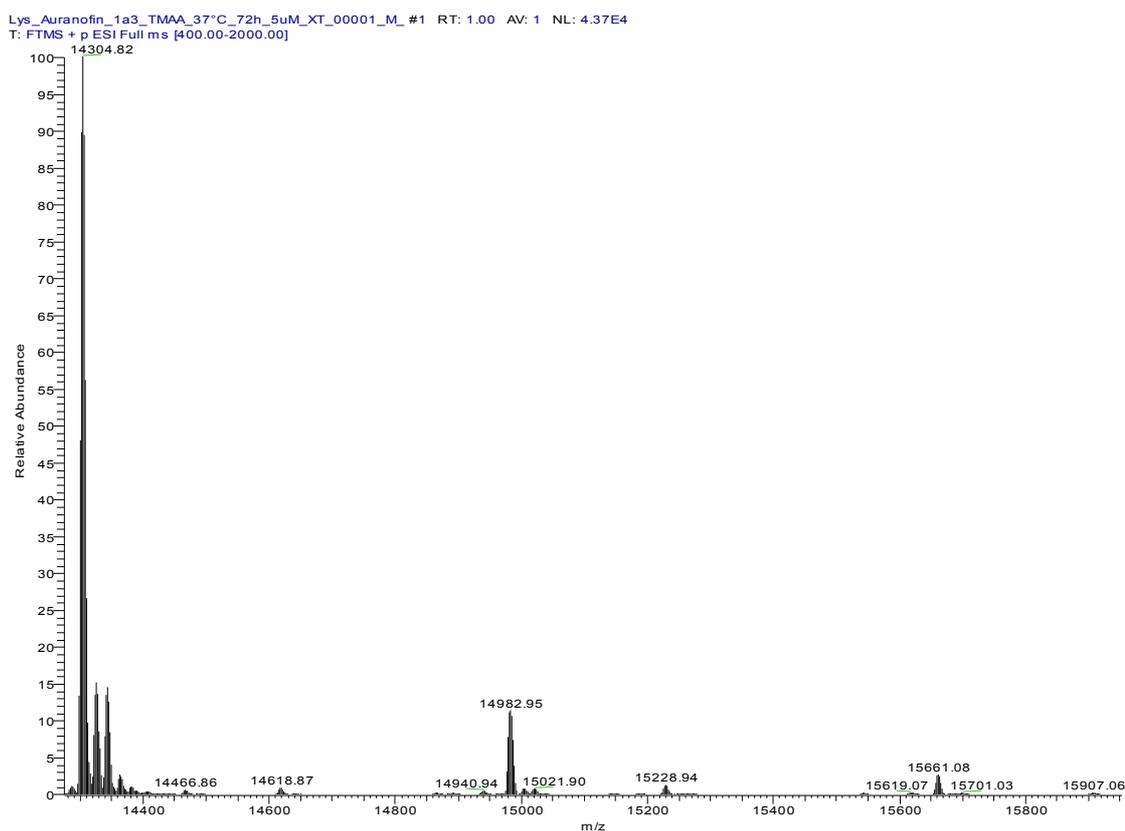


Figura 15. *Spettro di massa di Auranofin + lisozima*

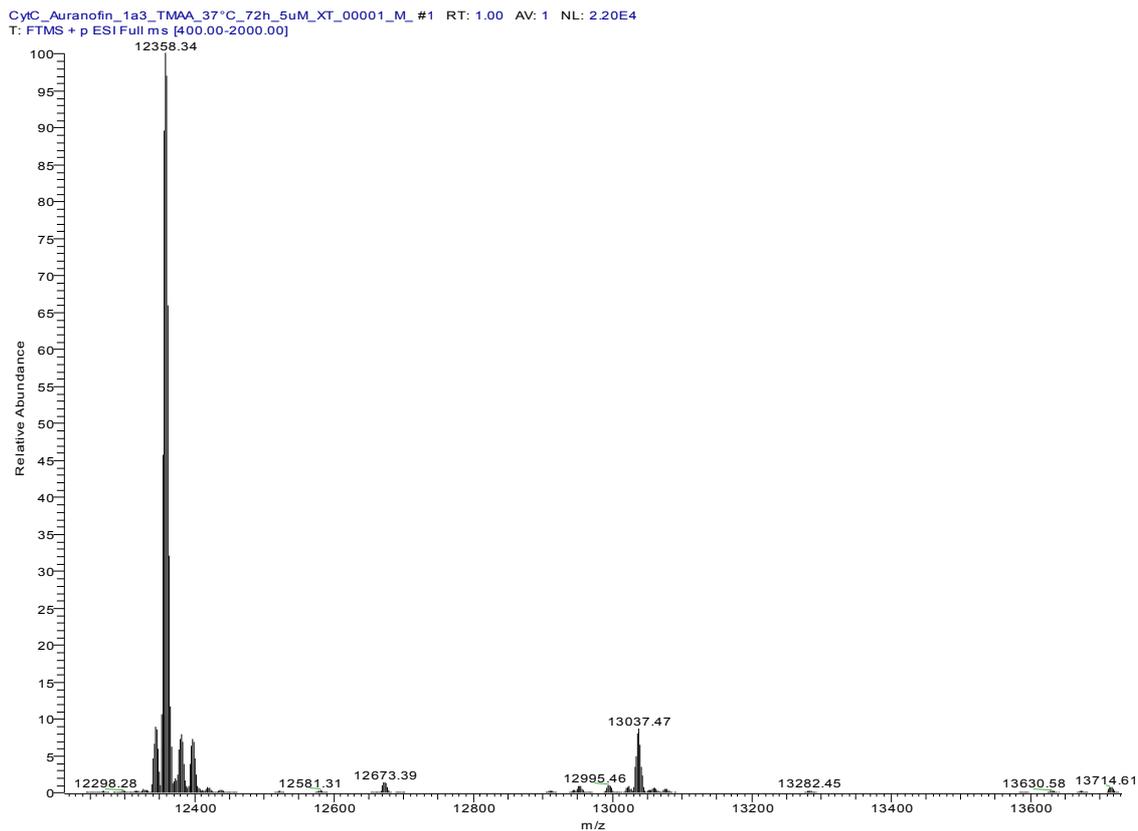


Figura 16. Spettro di massa di Auranofin+citocromo c

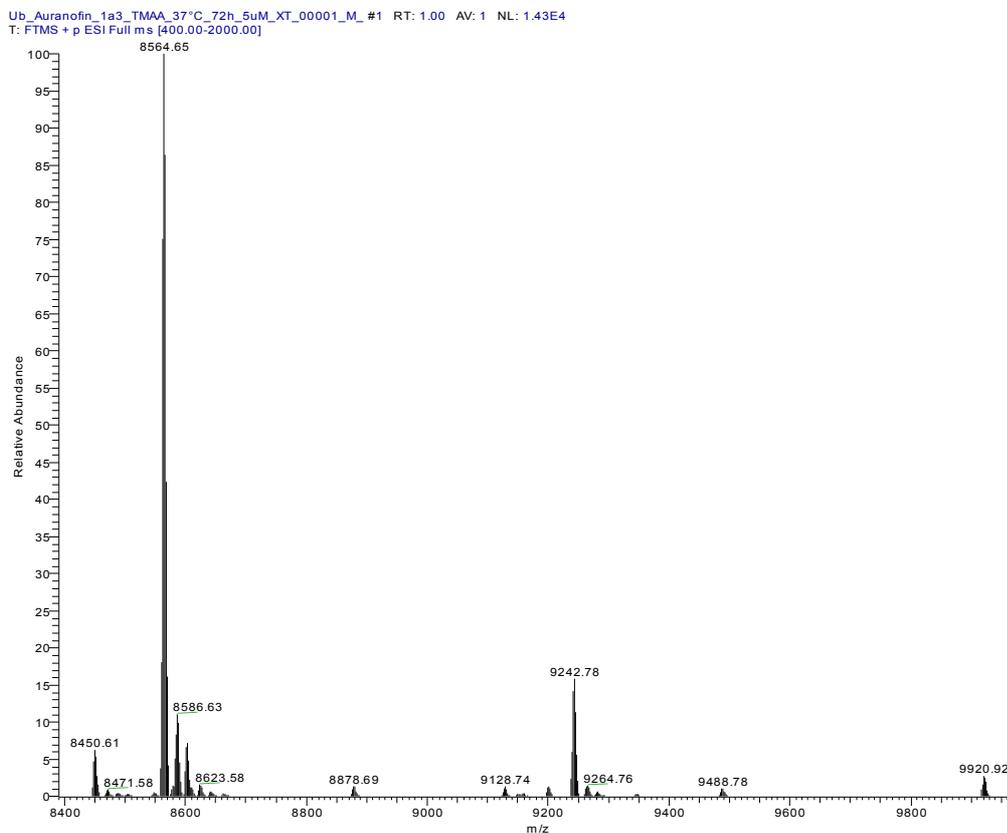


Figura 17. Spettro di massa di Auranofin+ubiquitina

Questi tre spettri ci danno conferma dell'attività complessante che l'auranofin ha nei confronti delle tre proteine selezionate, infatti possiamo osservare in tutti e tre gli spettri l'addotto auranofin-proteina formatosi: sebbene una piccola percentuale di complesso perda la molecola di zucchero che possiede prima di complessarsi, la maggior parte dell'addotto è formata dall'intero composto che interagisce con la proteina attraverso interazioni non covalenti. In questo caso possiamo considerare l'interazione significativa benché il picco a maggiore intensità rimanga quello della proteina libera.

Non sono presenti segnali evidenti che denotino la formazione di addotti dove ioni di Au(I), liberatisi dai leganti, siano coordinati alle proteine.

AubipyC

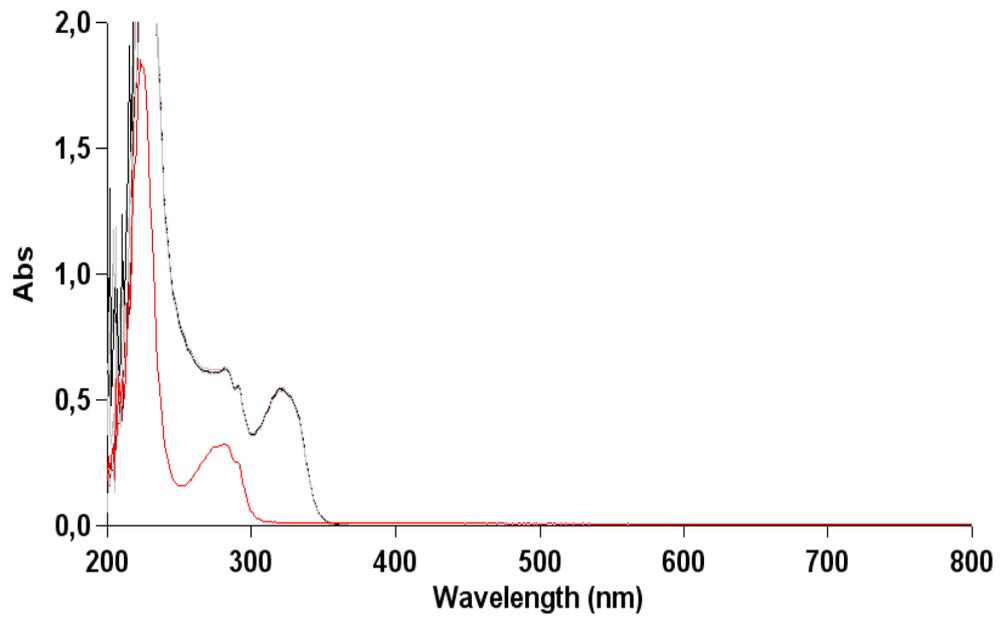


Figura 18. *Spettro di assorbimento di AubipyC+lisozima*

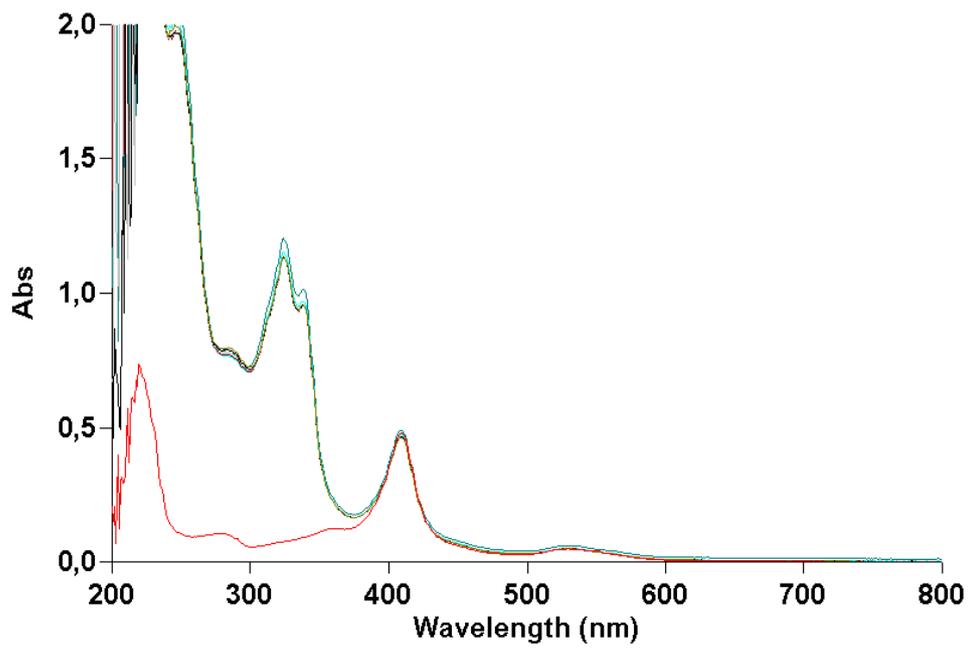


Figura 19. *Spettro di assorbimento di AubipyC+citocromo c*

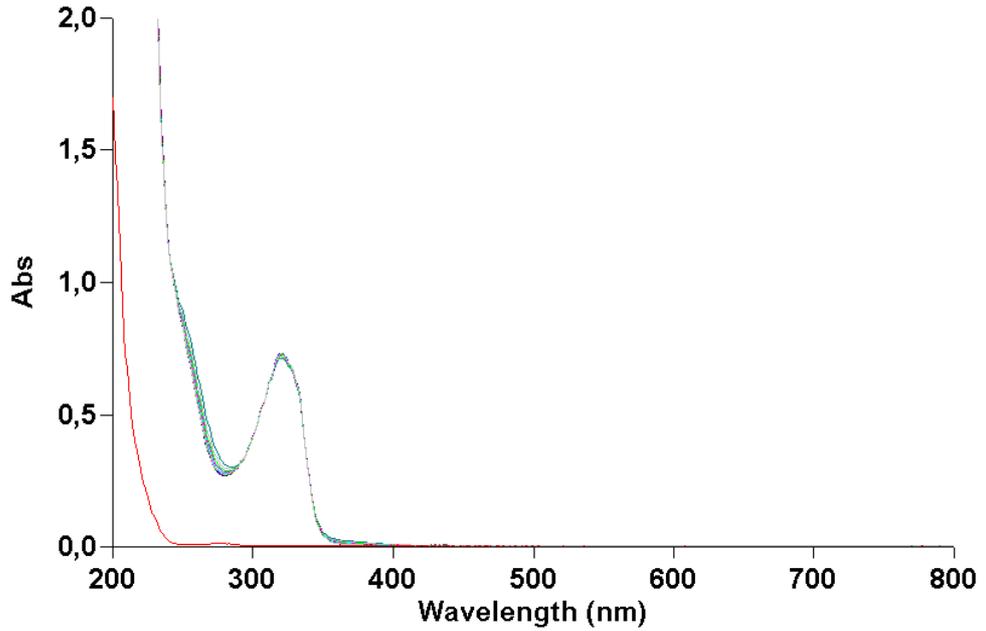


Figura 20. *Spettro di assorbimento di Aubipyc+ubiquitina*

Dopo aver registrato gli spettri UV-visibile di questo composto addizionato alle varie proteine, abbiamo visto che in questo caso i cromofori non subiscono modificazioni nell'arco delle 24h nella reazione con le proteine all'interno della soluzione di tampone a pH 7.4. Il passo successivo anche in questo caso è stata l'osservazione degli spettri di massa:

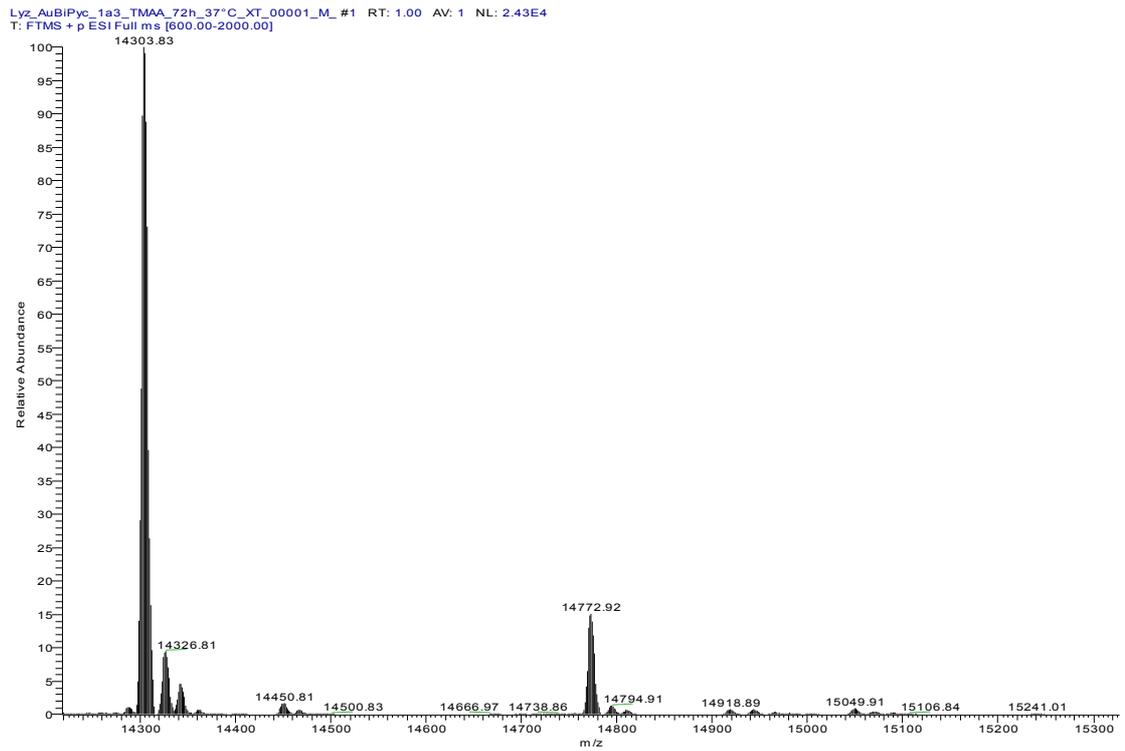


Figura 21. Spettro di massa di AubipyC+lisozima

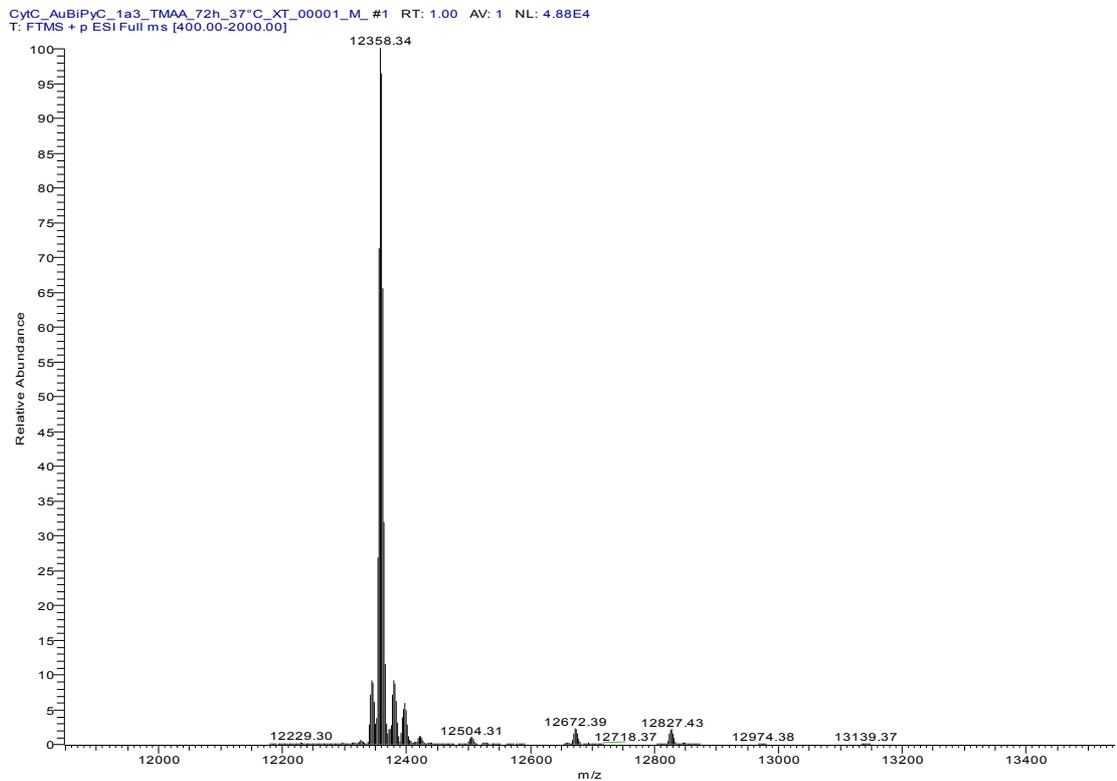


Figura 22. Spettro di massa di AubipyC+citocromo C

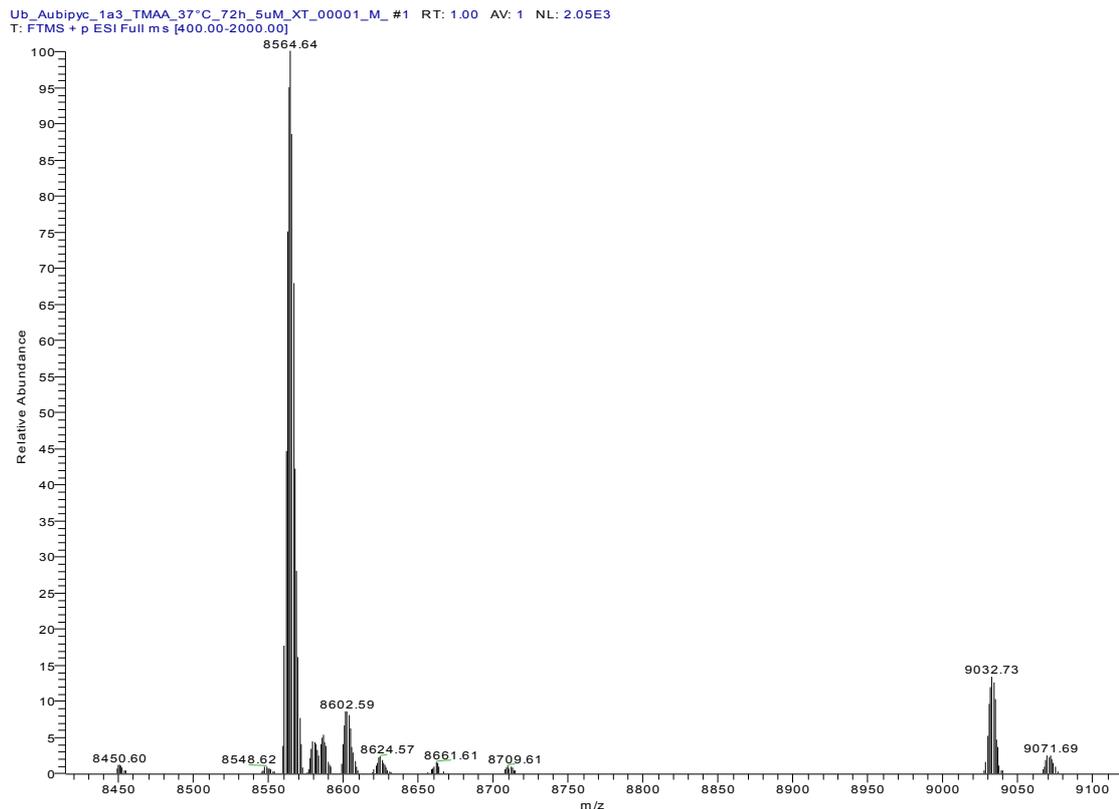


Figura 23. *Spettro di assorbimento di AubipyC+ubiquitina*

Osservando gli spettri degli addotti di AubipyC con lisozima o ubiquitina si nota la tendenza del composto a formare addotti con queste proteine rilasciando il gruppo ossidrilico, quindi assumendo la forma bivalente e mantenendo il legante, evitando la riduzione del centro di Au che mantiene il suo stato di ossidazione +3.

L'interazione invece di AubipyC con il citocromo c è ancora inferiore: osserviamo infatti dallo spettro di massa che solo un debole picco è dovuto all'addotto con il complesso di Au(III), e uno ancora più debole dovuto all'interazione con l'anione PF_6^- , probabilmente grazie alla presenza nel citocromo di una lisina carica positivamente.

Nel complesso possiamo dire che l'efficienza di metallazione di questo complesso relativamente a tutte e tre le proteine è bassa, con percentuali degli addotti formati nell'ordine del 10% del totale. Questi risultati sono in linea con l'elevata stabilità, documentata da studi precedenti, del cromoforo dell'AubipyC.

Auoxo6

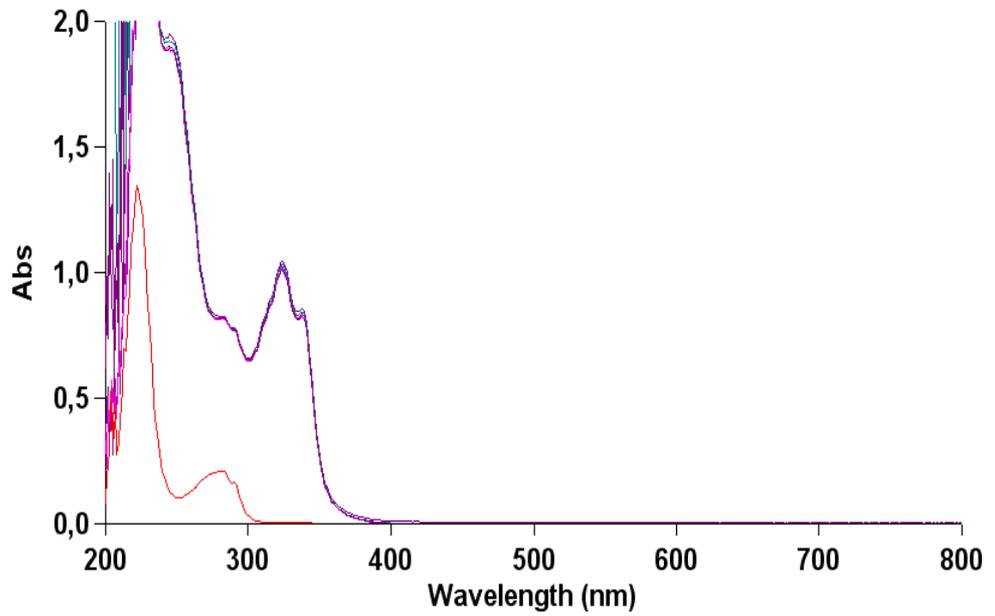


Figura 24. *Spettro di assorbimento di Auoxo6+lisozima*

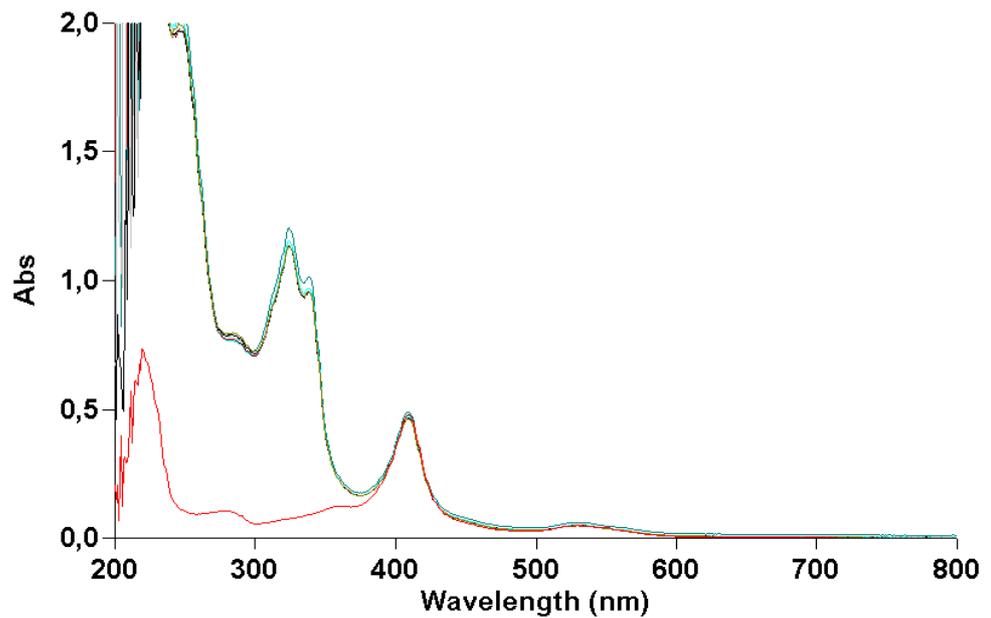


Figura 25. *Spettro di assorbimento di Auoxo6+citocromo c*

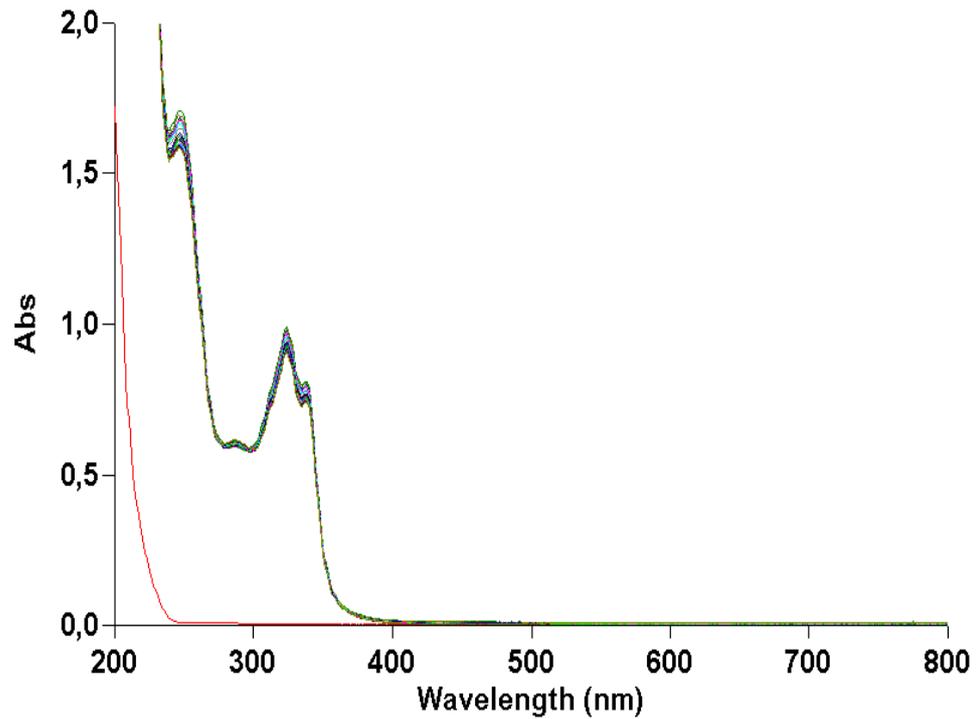


Figura 26. *Spettro di assorbimento di Auoxo6+ubiquitina*

Dagli spettri UV-visibile complesso-proteina è evidente che l'aggiunta della proteina alla soluzione non porta a rilevanti modificazioni dei cromofori del complesso di Au(III); in particolare non si osserva nessuna massiva riduzione del centro di Au(III).

Per osservare eventuali processi di metallazione sono stati registrati i risultati dell'analisi di massa:

Lyz_Auoxo6_1a3_TMAA_72h_37°C_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 3.62E3
T: FTMS + p ESI Full ms [600.00-2000.00]

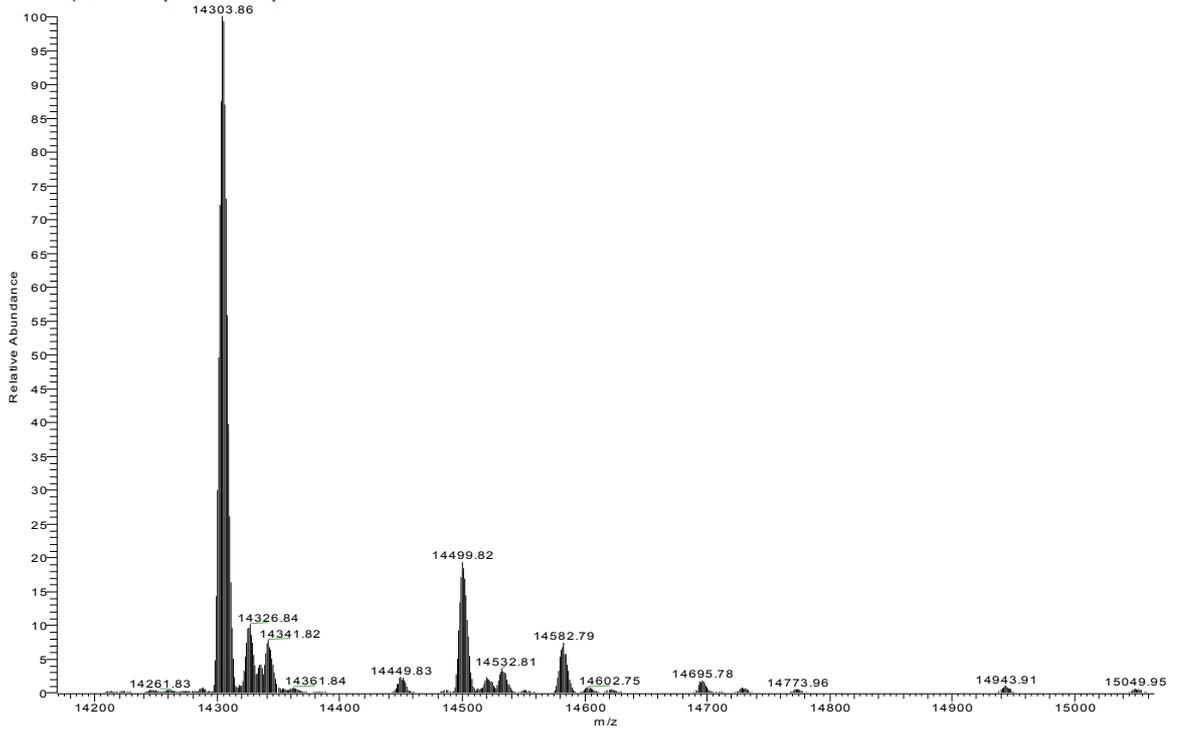


Figura 27. Spettro di massa di Auoxo6+lysizima

CYC_Auoxo6_1a3_TMAA_72h_37°C_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 9.07E3
T: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]

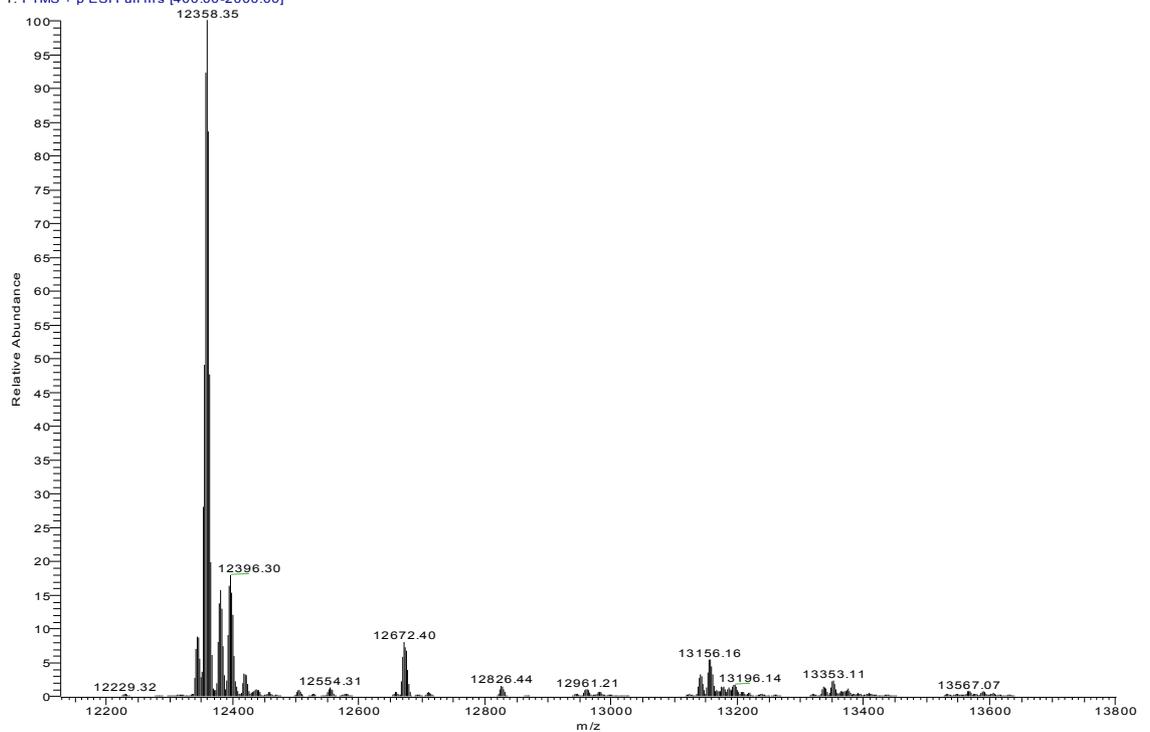


Figura 28. Spettro di massa di Auoxo6+citocromo c

Dall'analisi degli spettri di massa, si osserva sia nel caso di Auoxo6+lisoizima, sia in Auoxo6+citocromo C, una debole ma particolare interazione: il complesso di Au(III) nel legarsi con la proteina perde i suoi leganti, andando in contro a una riduzione a Au(I). In entrambi gli spettri si osserva un addotto tra la proteina e un Au “nudo”, che, nel caso del lisoizima è l'addotto predominante, seguito dal lisoizima con 2 Au “nudi”; mentre nel caso del citocromo C l'addotto più abbondante è il picco corrispondente alla proteina coordinata a 4 Au “nudi”; molto debole infatti è il segnale dato dall'addotto con un solo atomo di oro.

Per quanto riguarda gli eventuali addotti tra Auoxo6 e ubiquitina, è stato impossibile registrarne lo spettro di massa, poiché la probabile formazione di un addotto ha causato la formazione di un precipitato colloidale che non ha reso possibile l'iniezione in macchina, per l'analisi.

Au₂phen

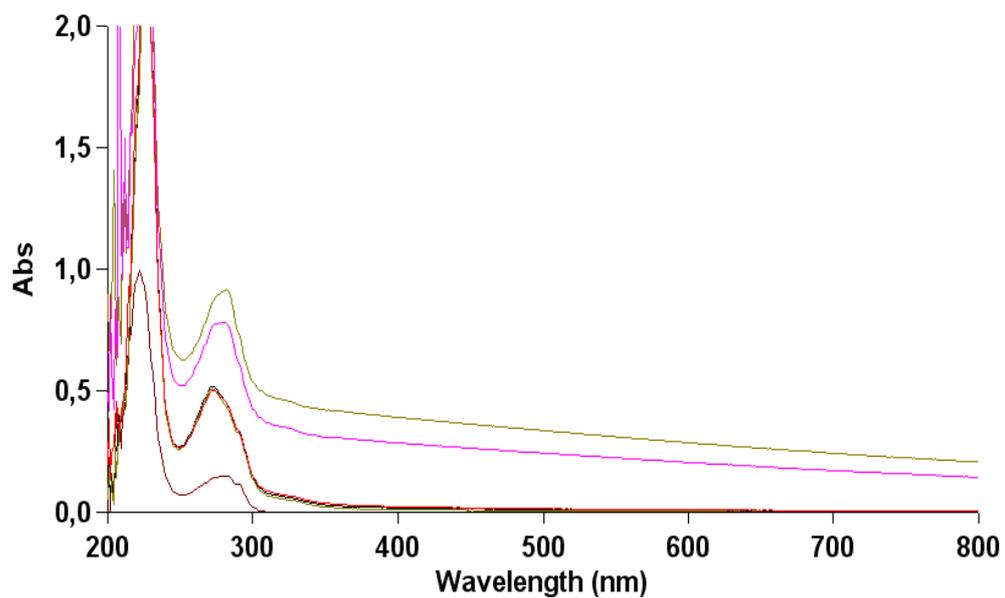


Figura 29. Spettro di assorbimento di Au₂phen+lisozima

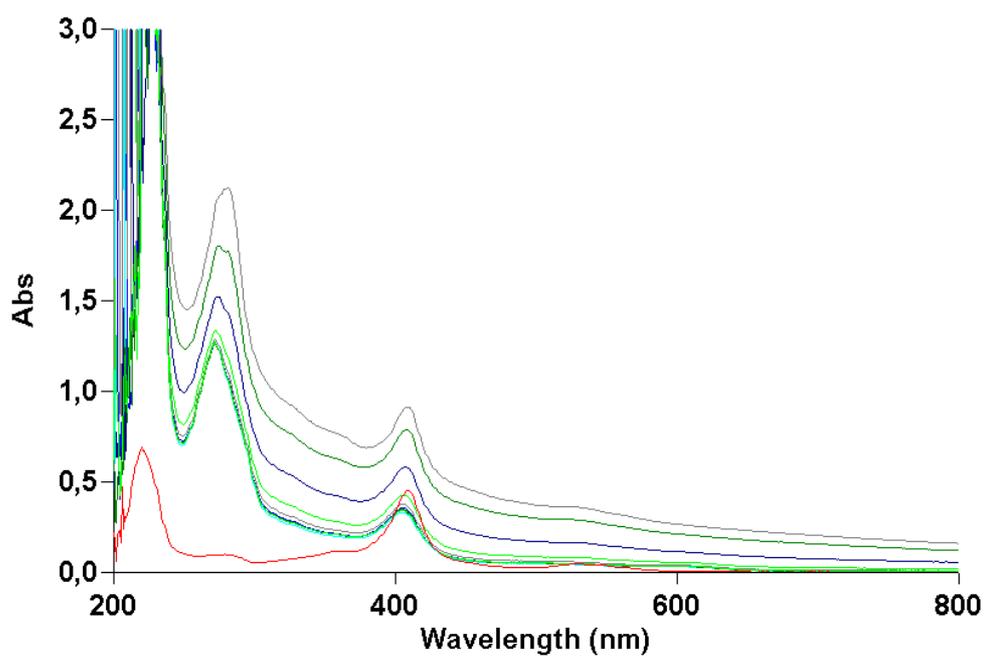


Figura 30. Spettro di assorbimento di Au₂phen+citocromo c

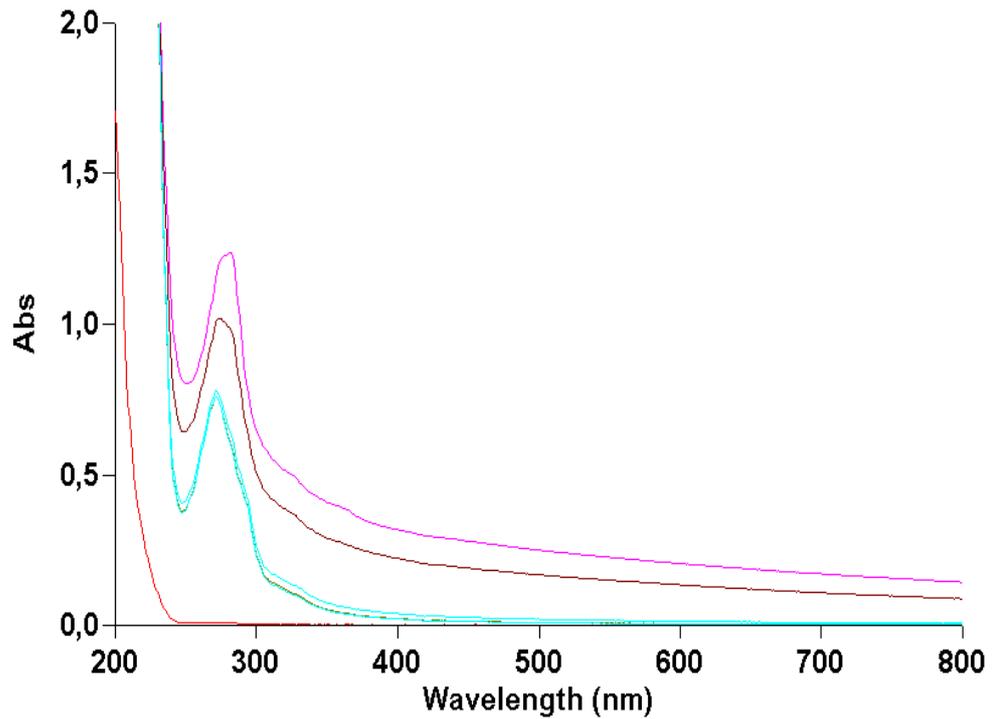


Figura 31. *Spettro di assorbimento di Au₂phen+ubiquitina*

Come precedentemente detto, registrando sia lo spettro UV-visibile di questo composto da solo, sia insieme alle proteine modello, si va incontro a precipitazione. È stato ovviare a questo inconveniente modificando la composizione della soluzione, aggiungendo il 50% di DMSO alla soluzione di tampone fosfato, come si vede dallo spettro riportato in fig. 32:

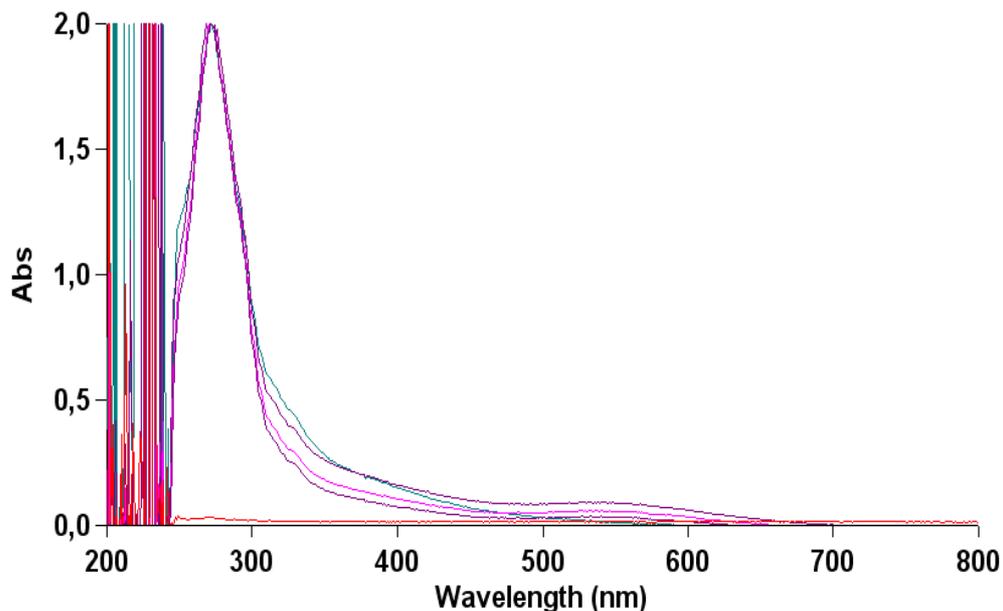


Figura 32. *Spettro di assorbimento di Au₂phen in soluzione al 50% di DMSO*

L'aggiunta però di un eccessivo quantitativo di DMSO ha un potere citotossico non trascurabile verso alcune linee cellulari e può portare ad alterare il risultato e le capacità citotossiche del composto in esame.

Possiamo comunque vedere che, come nel caso dei composti precedentemente analizzati, gli spettri UV-visibile del composto Au₂phen con la proteina generalmente non porta a modificazioni significative rispetto al complesso o alla proteina isolati, fatta eccezione per l'addotto con il citocromo C: in questo caso infatti, notiamo che, confrontando questo spettro con quello del composto dell'oro libero, il picco di assorbimento del composto di Au(III), seppur diminuendo di intensità col passare del tempo in entrambi gli spettri a causa della poca solubilità del composto, cambia il suo profilo caratteristico a seconda che si trovi libero in soluzione, o in presenza della proteina. Questo è un chiaro indicatore di un'interazione avvenuta, che sarà meglio esplicitata andando ad analizzare gli spettri di massa.

Lyz_Au2Phen_1a3_TMAA_72h_37°C_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.04E4
T: FTMS + p ESI Full ms [600.00-2000.00]

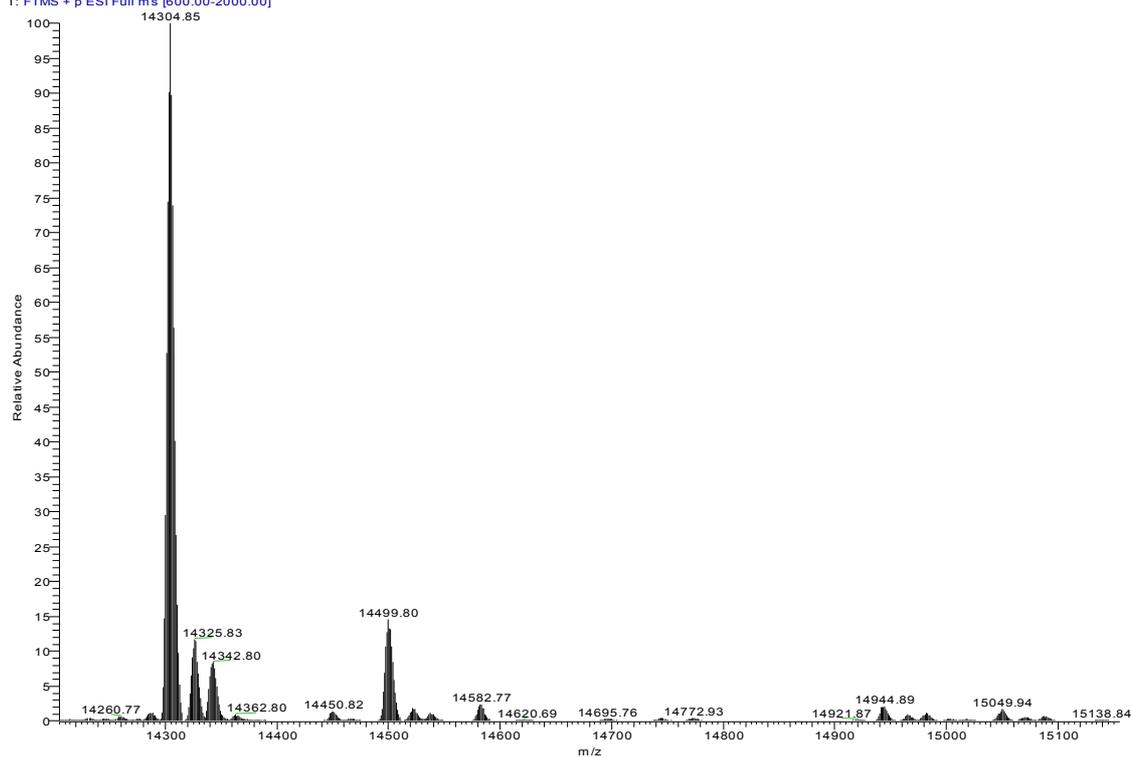


Figura 33. Spettro di massa di Au₂phen+lisozima

CytC_Au2Phen_1a3_TMAA_72h_37°C_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.43E4
T: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]

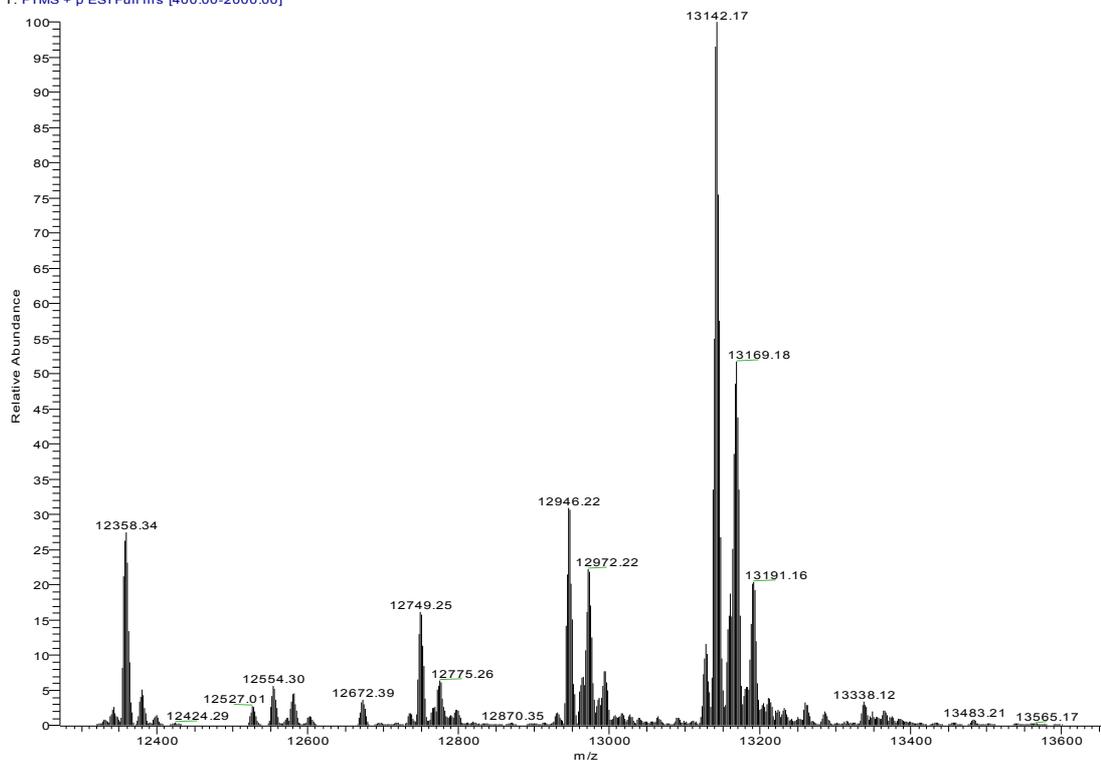


Figura 34. Spettro di massa di Au₂phen+citocromo c

I risultati trovati in questo caso sono molto rilevanti, specialmente per il citocromo C. Nel caso dell'interazione con questa proteina infatti, l' Au_2phen , forma addotti con ori “nudi” in analogia a quanto visto per il complesso di Auoxo6 (da notare infatti la discreta somiglianza strutturale), in questo caso la reattività con il Cyt c è ancora più elevata rispetto al precedente; basti osservare che il picco con la maggiore abbondanza relativa non è più quello della proteina libera, ma dell'addotto delle proteina con legati 4 atomi di Au(I), seguito dall'addotto con 3 Au(I).

Per quanto riguarda la formazione di addotti con il lisozima, lo spettro ottenuto risulta sotto tutti gli aspetti simile all'analogo registrato per l'Auoxo6, con la presenza principale di un addotto con legato singolo atomo di oro, con tracce di un bisaddotto, ma il maggiore picco di intensità relativa rimane in entrambi i casi quello della proteina libera.

Lo spettro relativo all'ubiquitina è stato impossibile da registrare a causa dei problemi di precipitazione già riscontrati per l'Auoxo6.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Con questo studio abbiamo sistematicamente analizzato le interazioni di tre rappresentativi composti di Au(III) con delle proteine modello al fine di indagare i processi di metallazione implicati. Studi analoghi sono stati fatti sull' Auranofin, un farmaco presente in commercio per la cura dell'artrite, costituito da un complesso di Au(I).

La spettrofotometria UV-visibile ci ha permesso di monitorare in maniera costante i vari campioni per tutto il tempo di incubazione; mentre gli spettri ESI MS registrati sui campioni al termine del periodo di incubazione si sono rivelati particolarmente utili per determinare la stechiometria degli addotti formati e la natura dei frammenti metallici legati alla proteina.

In particolare, la metallazione della proteina può essere documentata, nella maggioranza dei casi, grazie all'identificazione di una varietà di addotto metallo-proteina negli spettri ESI MS.

Dai nostri studi è emerso che sono tre i tipi principali di addotti metallofarmaco-proteina, addotti che ragionevolmente si sono formati secondo i seguenti meccanismi:

- a)* Riduzione dell'Au(III) e successiva coordinazione della proteina a ioni di Au(I).
- b)* Coordinazione di una specie stabile di Au(III) alla proteina.
- c)* Legame non coordinativo del complesso intatto con la proteina.

Sono state riscontrate notevoli differenze nell'efficienza dei processi di metallazione e nelle quantità di addotto formatesi; queste differenze possono risultare importanti per la comprensione di questi processi, soprattutto da parte dei composti di Au(III). Particolarmente interessante è stato il caso della reazione dell' Au_2phen con citocromo c, che ha portato alla formazione di una notevole quantità dell' addotto formato da 4 ioni di Au(III) legati alla proteina.

Il nostro studio ha dimostrato l'importanza dei processi di metallazione delle proteine, i quali possono avere un ruolo determinante nella citotossicità dei composti di oro presi in esame. È ragionevole pensare che i complessi di Au che abbiamo analizzato possano alterare un discreto numero di proteine cellulari attraverso i meccanismi sopra descritti, e portare alla disattivazione delle suddette. A sua volta, la disattivazione selettiva di queste proteine può causare danni irreversibili alle cellule e apoptosi.

CONCLUSIONI

Con questo lavoro di tesi abbiamo voluto indagare le reazioni che si svolgono fra alcuni composti citotossici dell'oro e selezionate proteine modello. In particolare il nostro interesse è stato rivolto alla descrizione degli addotti che si possono formare fra metallofarmaci selezionati e alcune proteine modello, nella convinzione che una precisa caratterizzazione di questi addotti potesse fornire informazioni importanti sui processi di metallazione delle proteine che avvengono a livello cellulare, sicuramente importanti per la comprensione del complessivo profilo farmacologico di queste sostanze.

Preliminarmente abbiamo studiato il comportamento dei composti metallici da soli dopo solubilizzazione nel tampone di riferimento. L'obiettivo di questa parte dello studio consisteva nell'asserire la stabilità dei composti nel tampone di riferimento a pH fisiologico. Dalle analisi è stato osservato che i composti esaminati mostrano una apprezzabile stabilità nell'arco di 24 ore. Tuttavia abbiamo anche ben documentato che l'aggiunta di agenti biologici con potere riducente determina in vari casi la riduzione del centro oro (III).

Lo studio della reazioni con le proteine è stato condotto avvalendosi di tecniche spettrofotometriche e di spettrometria di massa. L'analisi spettrofotometrica consente di monitorare i campioni su tutto l'arco temporale che abbiamo selezionato. Mentre gli studi di spettrometria ESI MS condotti sui campioni alla fine del tempo di incubazione ci hanno consentito di valutare e caratterizzare gli addotti metallofarmaco-proteina che si fossero eventualmente formati.

In molti casi grazie ai dati ESI MS abbiamo potuto documentare la formazione di addotti. Tali addotti nella maggior parte dei casi consistono della proteina più una specie derivata dal composto metallico.

A seconda della natura dei complessi metallici e delle proteine è stata osservata una discreta varietà di situazioni. Sulla base dei risultati riportati si può affermare che il processo di formazione di addotti può seguire una serie di percorsi diversi che portano ad una varietà di addotti strutturalmente differenti. Tuttavia, la previsione dei meccanismi di azione, la comprensione del tipo di interazione e della quantità di addotto a metallo-proteina che si possa formare rimane un compito molto difficile in quanto il processo di metallazione delle proteine sembra dipendere sia dalla natura del complesso metallico sia da quella della proteina.

In altre parole è difficile proporre un modello preciso per la metallazione delle

proteine, anche se alcune tendenze generali possono essere identificate, ogni singolo caso deve essere investigato in dettaglio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Orvig C. and Abrams M.J. *Special Issue on Medicinal Inorganic Chemistry, Chem. Rev.* 1999, 99 (9).
- 2) Keppler, B. K. *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; VCH: Weinheim, 1993.
- 3) M.S. Robillard, J. Reedijk, *Platinum-based anticancer drugs. In: Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 2nd ed.; R.B. King (Ed.), John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2005;*
- 4) pp 4488; J.L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda, E. Cvitkovic, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 2000, 35, 75; N. Uchida, Y. Takeda, K. Hojo, R. Maekawa, K. Sugita, T. Yoshioka, *Eur. J. Cancer* 1998, 34, 1796.
- 5) Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, Sava G. *Ruthenium antimetastatic agents. Curr Top Med Chem.* 2004, 4, 1525-35.
- 6) Yan YK, Melchart M, Habtemariam A, Sadler PJ. *Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. Chem Commun (Camb).* 2005; 38, 4764-76.
- 7) Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK.
- 8) Kostova I. *Curr Med Chem.* 2006;13(9):1085-107.
- 9) Shaw CF III. *Gold-based therapeutic agents. Chem Rev* 1999;99:2589–2600.
- 10) S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Med. Res. Rev.*, 2010. 30, 550-580.
- 11) L. Messori, G. Marcon, in: *Metal Ions in Biological Systems 2004, A. Sigel, H. Sigel (Eds), Marcel Dekker, Inc., New York., vol 41, pp. 279.*
- 12) Kean WF, Hart L, Buchannan WW (1997) *Br J Rheumatol* 36:560–572.
- 13) Mirabelli CK, Johnson RK, Sung CM, Faucette L, Muirhead K, Crooke ST., *Cancer Res.* 1985 Jan;45(1):32-9.
- 14) Marcon G, Carotti S, Coronello M, Messori L, Mini E, Orioli P, Mazzei T, Cinellu MA, Minghetti G (2002) *J Med Chem* 45:1672–1677.
- 15) Casini A, Cinellu MA, Minghetti G, Gabbiani C, Coronello M, Mini E, Messori

- L* (2006) *J Med Chem* 49:5524–5531
- 16) M.A. Cinellu, L. Maiore, M. Manassero, A. Casini, M. Arca, H.H. Fiebig, G. Kelter, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Gabbiani, L. Messori, *ACS Med. Chem. Lett.* 2010, 1, 336–339.
- 17) <http://www.oncotest.de>
- 18) Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA, Rubinstein L, Plowman J, Boyd MR (1989) *J Natl Cancer Inst* 81:1088–1092.
- 19) A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M.A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H.H. Fiebig, L. Messori, *J Biol Inorg Chem* (2009) 14:1139–1149.
- 20) K.R. Barnes, S.J. Lippard, in: *Met Ions Biol Syst.* 2004, 42, 143.
- 21) C. Gabbiani, L. Messori, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11, 929-939.
- 22) Marcon, G; Messori, L; Orioli, P; Cinellu, MA; Minghetti, G., *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 4655-4661.
- 23) A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1692–1707.
- 24) A. Casini, A. Guerri, C. Gabbiani, L. Messori, *J. of Inorg. Biochem.* 102 (2008) 995–1006.
- 25) Gibson, C. E. Costello, *Eur. Mass Spectrom.* 1999, 5, 501 – 510.
- 26) T. Peleg-Shulman, D. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 3171 –3172.