



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Tecnologie Chimiche

Studi di interazione tra target biologici e complessi di Au(III) come potenziali antitumorali

Studies of interaction between biological target and complexes of Au(III) as prospective anticancer

Relatore

Luigi Messori

Correlatore

Lara Massai

Candidato

Christofer Antonio Scutto

Anno accademico 2014/2015

INDICE GENERALE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 Complessi metallici in medicina
- 1.2 L'oro in medicina
- 1.3 Complessi di Au(III) con leganti N-eterociclici
- 1.4 Il Cancro
- 1.5 Proteine come target farmacologici
 - 1.5.1. Lisozima (HEWL)
 - 1.5.2. Citocromo C (Cyt_c)
 - 1.5.3. Ribonucleasi (RNase)
- 1.6 Telomeri

2. SCOPO DELLA RICERCA

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Materiali
- 3.2 Metodi e strumentazione
 - 3.2.1. Spettroscopia UV-vis
 - 3.2.2. Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (¹H-NMR)
 - 3.2.3. Spettrometria di massa

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

- 4.1 Spettri di assorbimento UV-vis
 - 4.1.1. Stabilità in soluzione dei complessi di Au(III)
 - 4.1.2. Interazioni con proteine
 - 4.1.2.1. Interazione con Lisozima (HEWL)
 - 4.1.2.2. Interazione con Citocromo equino (Cyt_c)
 - 4.1.2.3. Interazione con Ribonucleasi (RNase)
- 4.2 Spettri ¹H-NMR
- 4.3 Spettri di massa ad alta e bassa risoluzione
- 4.4 Studi di Citotossicità in vitro

5. CONCLUSIONI

6. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 Complessi metallici in medicina

Gli ioni metallici sono necessari per alcune importanti funzioni nell'organismo umano; la loro carenza o il loro eccesso nel corpo umano può essere causa di notevoli patologie.

Alcuni ioni metallici, possono risultare tossici per l'organismo, uno degli esempi più noti è l'avvelenamento da metalli pesanti come piombo, mercurio, cromo, cadmio e arsenico. Ad esempio in tossicologia e nella medicina del lavoro ha un relevantissima importanza l'intossicazione da piombo cronica detta anche Saturnismo la quale si manifesta con anoressia, nervosismo, complicazioni epatiche, ossee, renali, del sistema nervoso e il tipico orletto gengivale nero. Anche i metalli essenziali possono essere dannosi e tossici all'organismo se presenti in concentrazioni elevate o troppo basse; ad esempio il rame è classificato come un oligoelemento essenziale e stimolatorio; questo deve essere presente nell' organismo in quantità media di 75-150 mg e qualora raggiungesse un dosaggio maggiore potrebbe provocare emolisi delle membrane cellulari, causando ittero e emoglobinuria (emoglobina nelle urine) ⁽¹⁾ .

Alcuni ioni metallici hanno trovato impiego come farmaci antitumorali. Sin dal 1960 sono stati oggetto di studio complessi metallici del platino; ad esempio il cis-platino ha riscontrato successo come agente antitumorale in particolare nelle cellule tumorali localizzate nei testicoli, nelle ovaie, nel collo e nella testa ⁽²⁾; tuttavia il farmaco non è in grado di distinguere le cellule sane da quelle tumorali, ed inoltre tende ad accumularsi in alcuni tessuti provocando così tutta una serie di effetti collaterali tra i quali danni renali, diminuzione dei livelli di magnesio, potassio e calcio nel sangue, nausea e vomito . Un'altra problematica sull' utilizzo di questi farmaci riguarda fenomeni di resistenza. Da qui nasce l'esigenza di cercare nuovi composti aventi una maggiore attività, tale da ovviare al problema della resistenza, e magari con tossicità ridotta. Ad esempio i composti dell' oro esibiscono un rilevante effetto citotossico nei confronti delle cellule cancerogenee, pertanto possono trovare applicazione come potenziali farmaci antitumorali;

1.2 L'oro in medicina

L'oro (Au) è un metallo di transizione con numero atomico 79, appartenente al gruppo 11, periodo 4, blocco d, configurazione elettronica $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$. La sua massa atomica è di circa 196.97 uma. Presenta elevate energie di prima e seconda ionizzazione (889.3 kJ/

mol e 1980.0 kJ/mol, rispettivamente), ed un valore di elettronegatività di 2.54, caratteristiche che giustificano la sua chimica per lo più covalente. L'oro presenta due stadi di ossidazione +1, +3; possiede struttura cristallina cubica a facce centrate. È il più malleabile e il più duttile di tutti i metalli. In natura si trova all' interno di rocce e sedimenti, sotto forma di pepite, grani, quasi sempre associato a pirite o quarzo dai quali viene estratto con metodi meccanici e complessazione con lo ione cianuro ⁽³⁾; La sua resistenza all'attacco di altre sostanze lo ha reso particolarmente adatto per l' utilizzo in diversi campi quali, ad esempio, la gioielleria, l' elettronica. Non viene infatti intaccato da acidi o da ossidanti in condizioni normali, basti pensare che è possibile scioglierlo solo utilizzando una miscela, nota come acqua regia, formata da acido nitrico e cloridrico in rapporto volumetrico 1:3 ⁽⁴⁾. In soluzione acquosa Au(I) è instabile e dismuta in Au(0) e Au(III). Molti suoi composti sono altamente tossici a causa dell' alto potenziale ossidante (es. H₂AuCl₄ ed i suoi sali), ma è possibile minimizzare la tossicità utilizzando leganti appropriati in grado di stabilizzare il centro metallico; l'attività e tossicità dei complessi dipendono anche dal carattere idrofilo/lipofilo che deve essere ben bilanciato, in modo da avere una solubilità sufficiente in ambiente fisiologico e una lipofilità tale da consentire l'ingresso della molecola all' interno delle cellule; anche lo stato di ossidazione influisce sulla tossicità del metallo, d'altra parte Au(III) è un forte ossidante e quindi potenzialmente tossico. Attualmente, le potenziali proprietà antitumorali dei complessi di oro stanno suscitando sempre più interesse. Au(I) è termodinamicamente più stabile e meno ossidante di Au(III), risultando così meno tossico per l'organismo; inizialmente furono eseguiti dei test su Auranofin (Fig.1). Lo studio delle interazioni tra Auranofin e proteine modello, quali albumina serica ha permesso di ottenere informazioni utili per l' interpretazione del meccanismo di trasporto nelle cellule ⁽⁵⁾.

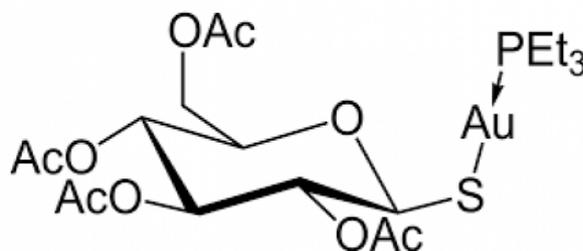


Fig.1: struttura dell' Auranofin

Oltre all' Auranofin anche complessi di Au(I) con fosfine, come ad esempio [Au(dppe)₂]Cl (Fig.2) o anche (Et₃P)AuCl (Fig.3), esibiscono ⁽⁶⁾ una modesta attività antitumorale ⁽⁶⁾.

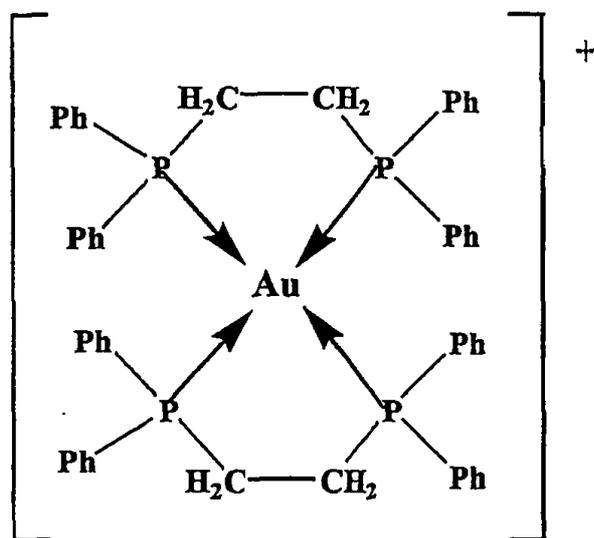


Fig.2: struttura $[Au(dppe)_2]Cl$

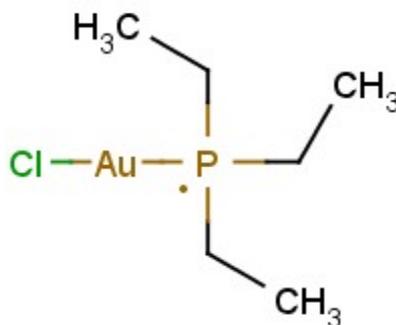


Fig.3: struttura $(Et_3P)AuCl$

Gli esempi fin ora citati riassumono alcuni responsi di studi condotti sulla base di complessi di Au(I) come potenziali agenti antitumorali; nel seguente lavoro di tesi si propone lo studio di complessi di Au(III) come potenziali agenti antitumorali.

Come accennato precedentemente l' Au(III) a causa della minore stabilità rispetto all' Au(I), ha trovato minori applicazioni come potenziale agente farmacologico, tuttavia lo sviluppo avvenuto negli ultimi decenni di nuove tipologie di leganti per lo ione Au(III), assicuranti maggiore stabilità, minore citotossicità e migliori proprietà farmacologiche in vitro, ha consentito una potenziale applicazione di questi complessi nel campo della farmacologia. Inoltre i complessi di Au(III) sono elettronicamente e strutturalmente equivalenti ai complessi di Pt(II) e pertanto possiedono un' attività pressochè simile.

I complessi di Au(III) possono essere classificati nelle seguenti classi:

- Complessi mononucleari di Au(III): sono strutture quadrato-planari in cui lo ione centrale è legato a donatori Cl e azoti raggruppati in leganti polidentati . Recentemente è dimostrato che alcuni complessi mononucleari di Au(III) sono sufficiente-

mente stabili all'interno di un ambiente fisiologico e significativamente citotossici nei confronti di linee cellulari tumorali ⁽⁷⁾.

- Complessi Au(III)-porfirine (Fig.4): sono strutture molto stabili alla riduzione. Il legante porfirinico stabilizza in modo marcato lo ione Au(III) ostacolandone la riduzione.

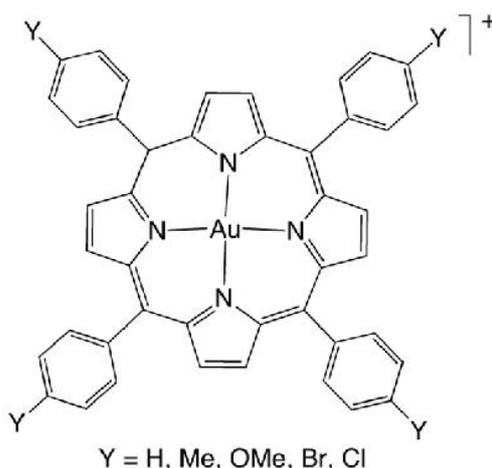


Fig.4:Struttura complessi Au(III)-porfirine

- Complessi dinucleari di Au(III) (Fig.5): sono strutture aventi una disposizione planare; costituiti dal "diamond core" Au₂O₂ collegato a due leganti bipyridilici.

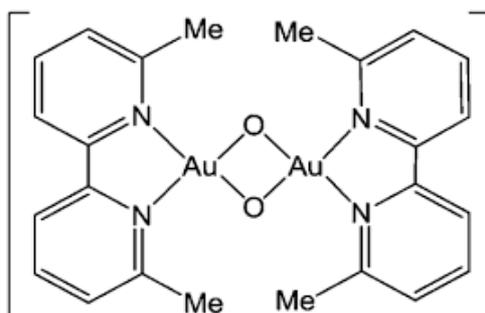


Fig.5: struttura di un complesso dinucleare di Au(III)

- Composti organometallici di Au(III) (Fig.6): sono caratterizzati dalla presenza di almeno un legame diretto carbonio-Au(III), molto importante per la stabilizzazione dell'oro nello stato di ossidazione +3; generalmente stabili in condizioni fisiologiche. Hanno scarsa propensione ad essere ridotti ad Au(I). Sono significativamente citotossici per linee cellulari tumorali umane. Complessi appartenenti a questa categoria sono i composti di coordinazione di Au(III) con leganti N-eterociclici, proposti

come oggetto di studio nel seguente lavoro di tesi. Ad esempio il complesso $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]$, attraverso studi condotti su delle linee cellulari tumorali, ha mostrato un rilevante effetto di citotossicità ⁽⁸⁾.

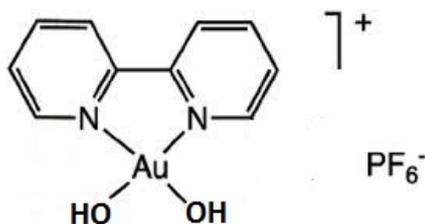


Fig.6: struttura $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]$

1.3 Complessi di oro con leganti N-eterociclici

Questi complessi organometallici sono caratterizzati dalla presenza di un ligando biperidile all'interno di una disposizione planare quadrata di $\text{Au}(\text{III})$. In questo complesso due posizioni di coordinamento della struttura planare quadrata sono occupati da due atomi di azoto del legante biperidile, le rimanenti posizioni sono occupate da altri gruppi funzionali.

Aubipyc (Fig.7)

Formula chimica $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{AuF}_6\text{N}_2\text{OP}$; Peso molecolare: 632,29 g/mol; è un complesso organometallico di $\text{Au}(\text{III})$ i cui leganti sono due azoti di un dipiridile, un carbonio di un anello benzenico e un gruppo ossidrilico; quest'ultimo rappresenta la caratteristica principale di questo complesso

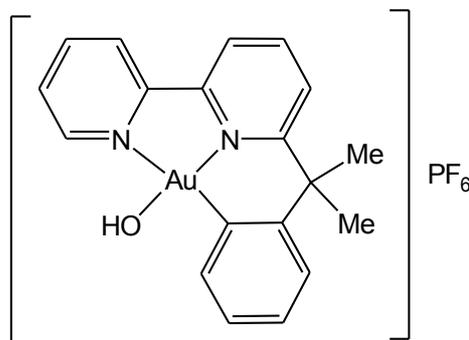


Fig.7: struttura Aubipyc

Aubipy-H[NH(CO)CH₃] (Fig.8)

Formula chimica $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{AuF}_6\text{N}_3\text{OP}$; peso molecolare: 673,34 g/mol; è un complesso organometallico di $\text{Au}(\text{III})$ i cui leganti sono i due azoti di un dipiridile, un carbonio di un anello benzenico e l' azoto dell' etanammide; quest'ultimo gruppo rappresenta la

caratteristica principale di questo complesso che lo differenzia dal precedente.

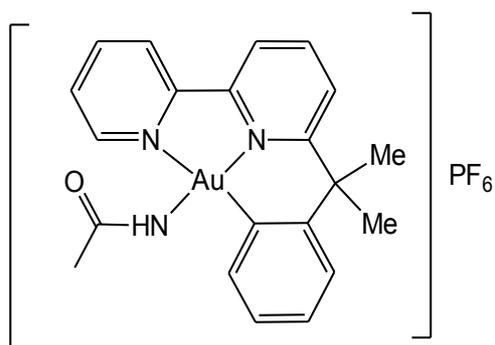


Fig.8: struttura $\text{Au}(\text{bipy-H})[\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3]$

$[\text{Au}_2(\text{bipy-H}_2)(\mu\text{-O})]$ (Fig.9)

Formula chimica $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{Au}_2\text{F}_{12}\text{N}_4\text{OP}_2$; peso molecolare 1246,56 g/mol; è un complesso organometallico di Au(III); per l'esattezza è il dimero dell'Aubipyc in cui le due unità monomeriche sono legate tra di loro mediante un legame a ponte con un ossigeno; un'unità monomerica si comporta da specie donatrice perdendo l'idrogeno del gruppo ossidrilico, mentre l'altra unità invece perde il gruppo ossidrilico in modo da comportarsi da accettore di elettroni.

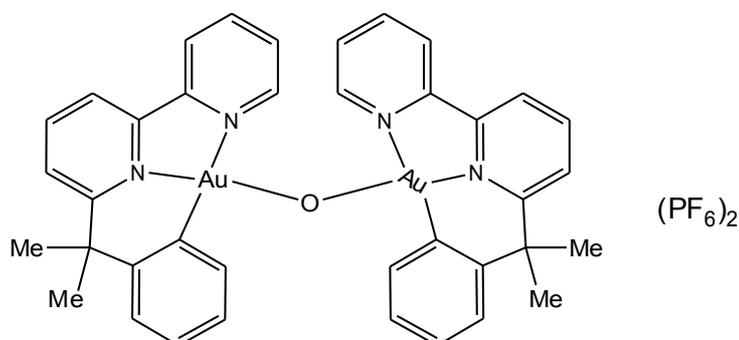


Fig.9: struttura $[\text{Au}_2(\text{bipy-H}_2)(\mu\text{-O})]$

1.4 Il Cancro

Il cancro non è una singola malattia, ma un termine generico usato per racchiudere un gruppo di oltre un centinaio di malattie che manifestano dei tratti comuni.

Il cancro o detto anche carcinoma o ancora neoplasia è caratterizzato da una crescita irregolare e incontrollata di cellule e dalla possibilità della loro diffusione in altre parti del corpo. Almeno una persona ogni tre sviluppa un cancro durante la sua vita e uno ogni quattro uomini, o una ogni cinque donne, ne muore. In realtà il cancro non è una malattia solamente umana e neanche una caratteristica dei mammiferi ma può contagiare quasi tutti gli organismi pluricellulari; il tumore è una massa di cellule malate di cancro, è l'

espressione visibile di un processo di formazione del tessuto neoplastico che può essersi sviluppato per anni ⁽⁹⁾. Come umani, siamo formati da milioni di cellule. Alcune di queste sono specifiche per certi tessuti, per esempio le cellule epiteliali si possono trovare nel tratto gastrointestinale, nella vescica, nei polmoni, nel seno, nella pelle. Questo gruppo di cellule comprende circa il 70% dei tumori, ma ogni cellula può essere un potenziale bersaglio per lo sviluppo di un carcinoma. Le cellule del nostro corpo si possono suddividere in quattro grandi categorie:

- le mesenchime: che costituiscono il tessuto connettivo; i fibroblasti, le ossa, la cartilagine, i muscoli, i vasi sanguigni e linfatici;
- le epiteliali: sono cellule specifiche e specializzate per ogni tipo di organo come la pelle, l'intestino, i polmoni;
- le emato-linfatiche: raggruppano una larga varietà, per la maggior parte derivate dal midollo spinale, come i globuli rossi o bianchi, i macrofagi e i linfociti, che vanno ad accumularsi nei linfonodi;
- il sistema nervoso. Costituito dai neuroni del sistema nervoso centrale o periferico.

Il tumore è lo sviluppo di una selezione naturale di mutazioni, del DNA di cellule che proliferano per molti cicli e per lunghi periodi. Le cellule tumorali si differenziano dalle sane per il fatto di mostrare un'anormale proliferazione. I tumori sono in grado di provocare la morte diretta o indiretta secondo il sito nel quale si trovano.

Il traguardo da raggiungere è quello di ricercare un farmaco con un'alta selettività, verso i tessuti bersaglio per i quali mostri un effetto tossico che sia invece minore verso le altre cellule sane. Le linee cellulari impiegate per condurre la ricerca sono riportate nel paragrafo 4.4 (Test di Citotossicità in vitro).

1.5 Proteine come target farmacologici

Il corpo umano ha decine di migliaia di proteine diverse, coinvolte in un'ampia varietà di ruoli; pertanto è possibile una classificazione di queste molecole biologiche in:

- Proteine di trasporto (emoglobina, lipoproteine, transferina)
- Proteine di riserva (caseina, ovalbumina)
- Proteine contrattili (actina, miosina)
- Proteine strutturali (collagene, cheratina, fibroina)
- Proteine di difesa (immunoglobuline)
- Proteine regolatrici (ormoni)

- Enzimi (idrolasi, proteasi)

Se uno ione metallico, sotto forma di farmaco-metallo, si lega ad una proteina, che ha una funzione essenziale, potrebbe compromettere in modo irreversibile l'attività biologica della proteina stessa; ciò potrebbe essere sufficiente a creare scompensi e conseguente morte cellulare. Ad esempio le proteine di membrana, conosciute anche come carriers, che hanno il compito di permettere il passaggio di molecole di grandi dimensioni, che altrimenti non attraverserebbero le membrane cellulare, possono permettere il passaggio di cationi metallici che pertanto sono liberi di manifestare la loro azione citotossica.

Esistono delle proteine contenenti uno o più ioni metallici uguali. Queste ultime rientrano nella categoria delle metalloproteine .

Nelle metalloproteine gli ioni metallici costituiscono parte integrante della struttura proteica e non possono essere rimossi senza alterare le funzioni delle stesse. A questo gruppo appartengono i metalloenzimi, che per la loro attività catalitica utilizzano uno o più ioni metallici come la superossidismutasi contenente rame, zinco, manganese o ferro e la glutationeperossidasi. L'associazione dei metalli con le proteine fu riconosciuta fin da quando le proteine cominciarono ad essere chimicamente individuate. Per esempio già nel XIX secolo era stata accertata la presenza di rame nella emocianina dei molluschi e di ferro nell'emoglobina dei cani. Poi fu scoperto che i metalli partecipano al trasporto di ossigeno e alla catalisi enzimatica.

Spesso è possibile anche rimpiazzare lo "ione nativo" di un metalloenzima con altri ioni ottenendo un altro metalloenzima ancora cataliticamente attivo. Ciò accade particolarmente per sostituzione dello ione Zn(II) nativo con Co(II) come nel caso della carbossipeptidasi, anidrasi carbonica e le deidrogenasi alcolica, malica ecc. Questi due ioni in effetti sono molto simili dal punto di vista della chimica di coordinazione, in quanto hanno dimensioni e costanti di stabilità simili e la stessa preferenza per le coordinazioni tetraedrica,ottaedrica e pentacoordinata nell'ordine. Lo ione metallico può essere sostituito anche in metalloproteine non attive senza apparenti cambiamenti. I metalli nelle metalloproteine possono partecipare al trasporto di ossigeno, alle funzioni catalitiche.

Un esempio specifico di metalloproteine è quello delle metalloproteinasasi, enzimi proteolitici della classe delle proteasi. Costituiscono una vasta famiglia di enzimi, tra cui emergono per importanza le metalloproteinasasi di matrice caratterizzate da un dominio catalitico che lega lo zinco (endopeptidasi zinco-dipendenti). Le metalloproteinasasi di matrice (MMP) si classificano in base al tipo di dominio e preferenza di substrato; sono in grado di degradare tutti i tipi di proteine della matrice ed inoltre sono coinvolte anche nella frammentazione di recettori sulla superficie cellulare e nel rilascio di ligandi che inducono l'apoptosi cellulare.

Per lo sviluppo di farmaci a base metallica è importante identificare i meccanismi di azione di queste molecole, individuare il sistema di trasporto intracellulare, i processi metabolici a cui sono soggette fisiologicamente e le eventuali interazioni con le biomolecole naturalmente presenti nell' organismo. Nel seguente lavoro di tesi sono riportati gli studi di interazione di complessi di Au(III) con tre proteine modello: Lisozima (HEWL); Citocromo (Cyt_c) e Ribonucleasi (RNase).

1.5.1 Lisozima (HEWL)

Enzima del gruppo delle glicosidasi (Fig.10). È presente nelle secrezioni lacrimali, nella saliva e nel siero dei mammiferi. La sua molecola è costituita da una sola catena polipeptidica formata dall'unione di 129 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 14.600 Da. La sua complessa struttura che presenta pochi tratti ad α -elica e un tratto simile alla struttura β a foglietti antiparalleli, è stabilizzata da quattro ponti di solfuro. È considerata una delle sostanze fisiologiche di difesa infettiva (sistema immunitario innato), preposta alla protezione di quegli organi che più facilmente vengono a contatto con i microrganismi patogeni (cavo orale, congiuntiva, vagina ecc..). Infatti la funzione primaria attribuita a questo enzima è la difesa da infezioni batteriche; idrolizza il legame glicosidico tra l'acido N-acetilmuramico e la N-acetil-glucosammina, costituenti principali dei mucopeptidi della parete cellulare di molti batteri gram-positivi. Il lisozima viene usato come target biologico per vari studi di interazione con metallo-farmaci in quanto, da dati di letteratura, si è visto essere reattivo in particolar modo con i complessi di Au(III). Gli studi sono stati condotti impiegando lisozima di uovo di gallina (HEWL).

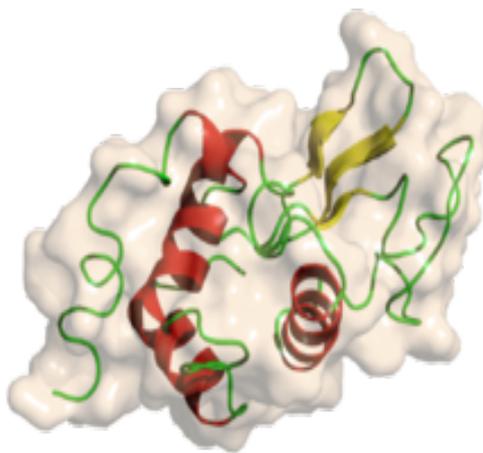


Fig.10: struttura 3D del Lisozima

1.5.2 Citocromo (Cyt_c)

Sono proteine ferroporfiriniche deputate al trasporto di elettroni per mezzo di una variazione reversibile di valenza del ferro. Sono divisi in vari gruppi (*a, b, c* ecc.) che si differenziano per alcune caratteristiche del gruppo prostetico e si distinguono per differenze di solubilità e di spettro di assorbimento. Con i piridinnucleotidi e i nucleotidi flavinici, i Cyt costituiscono il più importante sistema di trasferimento di elettroni dai substrati all'ossigeno atmosferico, permettono cioè l'ossidazione dei substrati con simultanea produzione di energia (fosforilazione ossidativa). Gli elettroni provenienti dai flavinnucleotidi passano al Cyt *b* quindi al Cyt *c*₁ e al Cyt *C* (Fig.11), da questo al Cyt *A* e infine alla citocromoossidasi, enzima con peso molecolare pari circa a 250.000 Da, costituito da 7 catene polipeptidiche contenenti 2 atomi di rame, presente anche in alcuni batteri; catalizza il trasferimento di 4 elettroni dal Cyt *C* a 2 atomi di ossigeno molecolare, che si riducono e formano acqua, nella parte terminale della catena respiratoria. Il trasporto degli elettroni avviene nei mitocondri, sulla cui membrana interna sono disposti i cinque Cyt presenti nella catena respiratoria.

Il Cyt *C* possiede un peso molecolare di 12.400 Da; la sua struttura primaria consiste in una catena di 104 aminoacidi.

Possiede potenziali siti di legame per gli ioni metallici comprendendo le metionine e le istidine. Per questo motivo è utilizzata come proteina modello per i vari studi di interazione con i potenziali metallo-farmaci. Inoltre è spettroscopicamente rilevante la presenza di un gruppo eme legato covalentemente alla proteina, capace di dare caratteristiche bande di assorbimento nel visibile ed una intensa colorazione rosso-arancio.

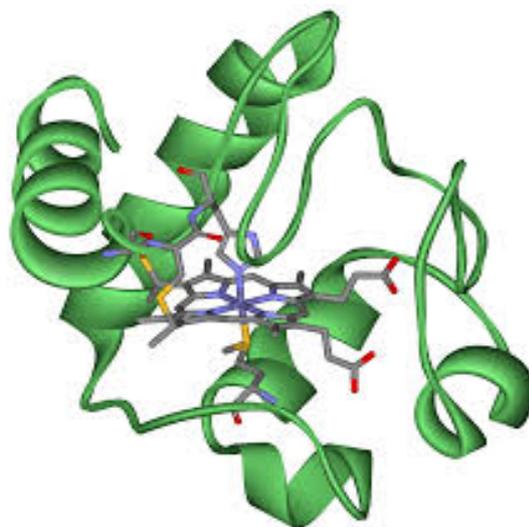


Fig.11: struttura 3D del CytC

1.5.3 Ribonucleasi (RNase)

Le ribonucleasi, abbreviate comunemente in RNasi, sono delle nucleasi che catalizzano l'idrolisi dell'acido ribonucleico (RNA) che viene così scisso in componenti più piccoli.

Queste si classificano in:

- endoribonucleasi (RNasi A, RNasi H)
- esoribonucleasi (RNasi T, RNasi D)

Nel seguente lavoro di tesi per condurre gli studi si impiega un campione di RNasi A che rappresenta uno degli enzimi più resistenti e più comunemente usati nella ricerca (ad esempio ribonucleasi A pancreatica bovina).

La Ribonucleasi A (Fig.12) è un piccolo enzima (124 residui, 13.7kDa), che degrada l'RNA durante la digestione. Dato che è una proteina relativamente piccola, stabile e facilmente purificabile, la ribonucleasi è stata uno degli enzimi più studiati nella ricerca biochimica. Ha una struttura compatta e molto stabile formata da 5 filamenti β e 3 α eliche. La sua stabilità è da imputare, oltre ai legami a idrogeno intracatena, soprattutto a quattro ponti disolfurici tra i residui cisteinici che legano insieme parti diverse della catena proteica e la aiutano a mantenere una forma compatta. La ribonucleasi A è una macchina molecolare pericolosa per le cellule perché taglia in modo indiscriminato ogni RNA che incontra. È tossica per le cellule al punto che è stata anche sperimentata come farmaco anticancro. Sfortunatamente si è rivelata tossica non solo per le cellule cancerose, ma anche per quelle normali e quindi il suo uso in chemioterapia è stato abbandonato.

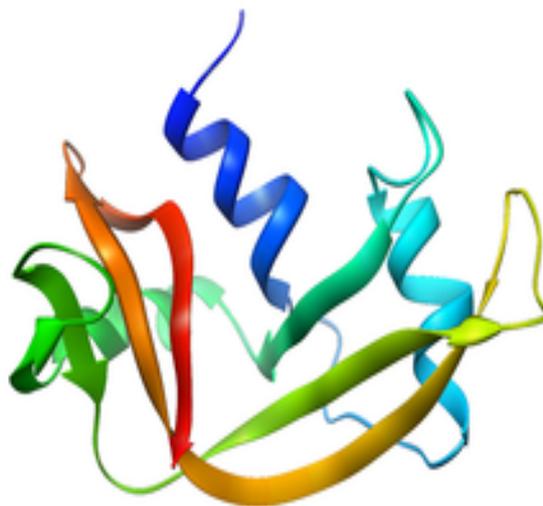


Fig.12: struttura 3D dell' RNase A

1.6 Telomeri

I cromosomi eucariotici sono molecole lineari, a doppio filamento, che terminano generalmente con un segmento di 10000 coppie di basi, costituito da piccole sequenze nucleotidiche ripetute in tandem denominate telomeri (5'-TTAGGG-3' nell'uomo), identificati alla fine del 1980.

I telomeri variano in lunghezza da poche decine di coppie di basi, a decine di migliaia di coppie di basi e rappresentano delle regioni di DNA non codificanti. La loro importanza risiede nella capacità di dare stabilità al DNA, evitando che i cromosomi si avvolgano su se stessi o si ricombinino in corrispondenza delle estremità. In quest'ultimo caso, si verrebbero a creare lunghi cromosomi con due centromeri, che tenderebbero ad impacchettarsi e, non potendo più andare incontro ad eventi mitotici, condurrebbero alla morte cellulare.

I telomeri si accorciano progressivamente attraverso cicli successivi di divisioni cellulari, e telomeri criticamente accorciati innescano l'apoptosi. Le ripetizioni telomeriche, presenti in numerosi organismi, si dispongono a G-quadruplex o G-tetrad o G₄-DNA). Tali strutture sono generate attraverso legami a idrogeno tra quattro guanine (che formano la cosiddetta *tetrate*) e stabilizzate attraverso la presenza di un catione monovalente (solitamente il potassio) che si dispone al centro della tetrate stessa (Fig.14).

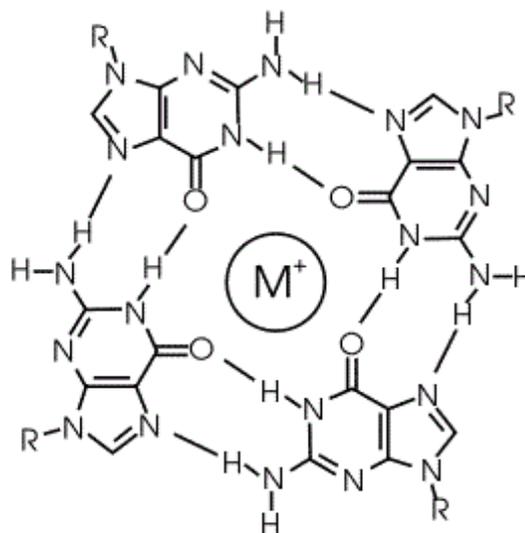


Fig.13 : struttura del G-quadruplex

L'enzima che allunga i telomeri e mantiene la loro struttura è noto come telomerasi. Questi aggiunge specifiche sequenze ripetute all'estremità 3' del DNA nella regione telomerica dei cromosomi. La maggior parte delle cellule eucariotiche necessita di una particolare

polimerasi (appunto la telomerasi), per mantenere invariata la lunghezza del DNA telomerico alle estremità dei cromosomi. La telomerasi è un complesso ribonucleoproteico. Una piccola regione della componente a RNA, detta regione stampo, è complementare alla sequenza telomerica. Questa regione consente l'appaiamento tra l'estremità telomerica di un cromosoma e il sito catalitico del complesso e guida la sintesi della corretta sequenza del DNA telomerico. Ne consegue che la telomerasi è una trascrittasi inversa (TERT), ossia una DNA polimerasi RNA-dipendente ⁽¹⁰⁾.

Generalmente le cellule umane somatiche sono sprovviste di tale enzima e con il crescere dell'età replicativa tendono a perdere gradualmente i telomeri; al contrario, la maggior parte delle cellule trasformate o tumorali riattiva la telomerasi. Queste osservazioni hanno forti implicazioni sulla ricerca nel campo delle malattie connesse all'invecchiamento, tra cui anche il cancro.

In questo lavoro di tesi si propone lo studio dell' addotto tra un filamento di DNA telomerico TEL23, la cui sequenza di basi azotate è (TTAGGG)₃TTAGG, in avvolgimento quadruplex.

Le possibili caratteristiche degli addotti sono state studiate mediante spettrometria di massa.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il cis platino è un complesso metallico che ha trovato applicazione come agente antitumorale; tuttavia i numerosi effetti collaterali causati e la resistenza sviluppata dalle cellule cancerogene nei confronti di questo ha indirizzato la ricerca verso lo studio di complessi di platino alternativi come carboplatino, oxaliplatino, transplatino ecc. Negli ultimi anni oltre allo studio dei complessi del platino sono stati ricercati anche complessi di altri ioni metallici in qualità di agenti antitumorali, come ad esempio i complessi di oro; Questo lavoro di tesi svolto con il gruppo di ricerca del Prof. Luigi Messori si è focalizzato sulla ricerca di tre complessi metallici di Au(III).

Tali complessi sono:

- Aubipyc
- Aubipy-H[NH(CO)CH₃]
- [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)]

Partendo da campioni già sintetizzati, per gentile concessione della Prof. M.A. Cinellu, sono state testate le stabilità dei tre complessi di Au(III), la loro reattività nei confronti di molecole biologiche e la loro citotossicità nei confronti di linee cellulari tumorali; La ricerca è stata condotta mediante spettrofotometria UV-vis, spettrometria di risonanza magnetica

nucleare e spettrometria di massa.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

- *Complessi di Au(III)*: Aubipyc, Aubipy-H[NH(CO)CH₃], [Au₂(bipy-H₂)(μ⁻O)]. I composti sono stati sintetizzati dalla Prof. M.A. Cinellu- Dipartimento di Chimica e Farmacia – University di Sassari/Department of Chemistry and Pharmacy, University of Sassari.
- *Ammonio Acetato*: codice A1542; 20 mM, pH 6,8. Il composto è stato acquistato dal catalogo SIGMA-ALDRICH Co. LCC (Milano, Italia).
- *DMSO (dimetilsolfossido)*: Merk-Millipore – 8.02912.
- *PB*: tampone fosfato pH 7,4.
- *Citocromo c*: citocromo di cuore equino (C7752); peso molecolare 12358.31 Da. Il composto è stato acquistato dal catalogo SIGMA-ALDRICH Co. LCC (Milano, Italia).
- *Lisozima*: il campione utilizzato è della tipologia HEWL (hen egg whit lysozime). (L7651); peso molecolare 14304.8 Da. Il composto è stato acquistato dal catalogo SIGMA-ALDRICH Co. LCC (Milano, Italia).
- *RNasi*: Ribonucleasi A (R5500); peso molecolare 13681.26 Da. Il composto è stato acquistato dal catalogo SIGMA-ALDRICH Co. LCC (Milano, Italia).
- *TEL23*: frammento telomerico; sequenza (TTAGGG)₃TTAGG.
- *Linee cellulari tumorali* : HTC-116 (colon rettale).
- *Linee cellulari sane* : L-929 (fibroblasti murini).

3.2 Metodi e strumentazione

3.2.1 Spettroscopia UV-vis

La spettroscopia UV-visibile (spesso indicata anche come “spettroscopia UV-vis”) è un comune metodo di analisi delle molecole e di altri tipi di sostanze chimiche. Può essere definita come un tipo di spettroscopia atta ad esaminare la capacità di un analita a interagire con la luce ultravioletta o visibile attraverso l'assorbimento. La luce nel campo

dell' ultravioletto o del visibile trasporta una quantità di energia pari alla differenza tra i livelli energetici diversi per gli elettroni di alcune molecole. Quando l' energia della luce coincide esattamente con la differenza tra due livelli energetici di un elettrone in una molecola e questa molecola assorbe quella luce, l' elettrone viene eccitato da un orbitale a bassa energia ad un orbitale vuoto ad energia superiore.

L'assorbimento della luce ultravioletta o visibile, specialmente nell 'intervallo tra 200 e 780 nm, spesso determina nelle molecole transizioni elettroniche da parte di elettroni π o di elettroni di non legame (n) che passano nello stato eccitato, indicato con π^* . E' da questa la ragione per cui le molecole organiche che hanno solo legami singoli e elettroni σ tendono a non assorbire nella regione dell' UV-vis.

La porzione di molecola che possiede proprietà tali da permettere l' assorbimento della luce prende il nome di "Cromoforo": Un cromoforo tipico di una molecola organica è caratterizzato da legami π , spesso coniugati in sequenza ad altri legami di questo tipo, in grado di assorbire efficacemente la luce ultravioletta o visibile.

L'assorbimento di luce nel campo UV-vis è possibile anche nel caso di ioni di metalli di transizione quando vanno incontro a transizioni elettroniche che coinvolgono gli elettroni dei legami d.

Lo strumento per la realizzazione delle misure di assorbimento UV-vis è detto spettrometro (Fig.14).

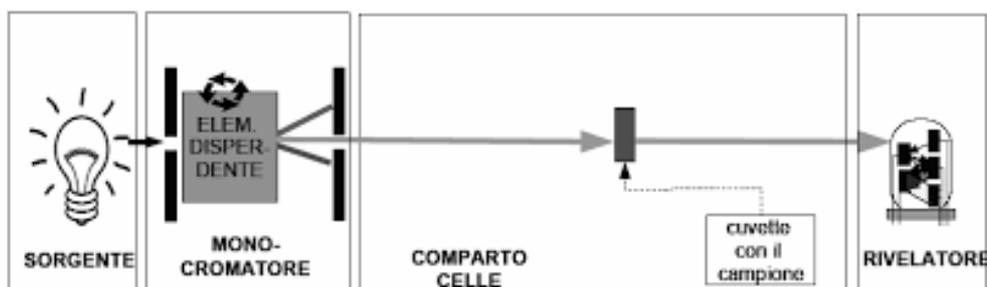


Fig.14: schema generico di uno spettrometro UV-vis mono raggio

In questo strumento è possibile riconoscere quattro componenti fondamentali: (1) una sorgente di luce, (2) un selettore di lunghezze d' onda (monocromatore), (3) un campione e un porta campione, (4) un rivelatore per la registrazione delle quantità di luce che passa attraverso il campione.

Per poter misurare la quantità di luce assorbita da un campione si ricorre alla legge di Beer:

$$A = \epsilon b C$$

dove:

- A: assorbanza del campione
- C: concentrazione molare del campione
- ϵ : coefficiente di assorbività molare
- b: cammino ottico della cuvetta

Questa legge fornisce una relazione lineare tra l'assorbanza misurata per un analita e la sua concentrazione nel campione ⁽¹¹⁾.

Per effettuare analisi qualitative si fanno passare, una alla volta, le singole radiazioni monocromatiche di un raggio policromatico a spettro continuo, attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità, le diverse lunghezze d'onda. Riportando i valori in un grafico lunghezza d'onda contro assorbimento, si ottiene lo spettro della sostanza esaminata (Fig.15). La posizione delle bande di assorbimento permette di identificare una sostanza, per confronti diretti con campioni noti o tramite banche dati di spettri.

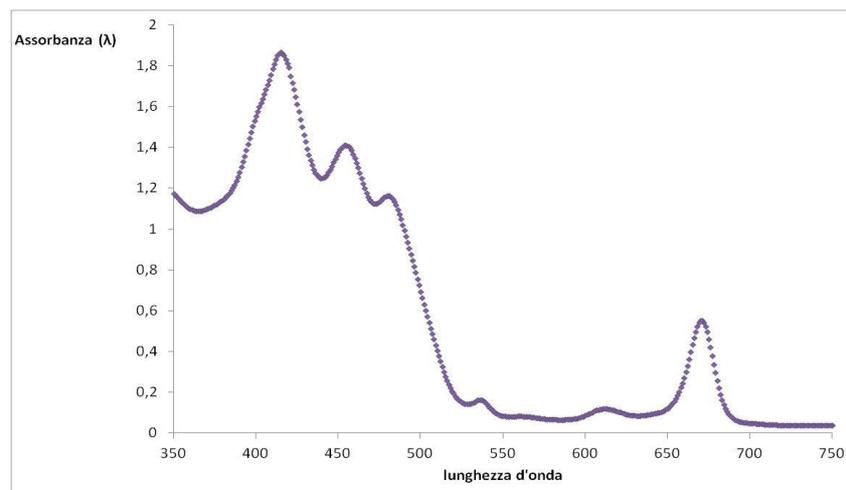


Fig.15: generico spettro di assorbimento UV-vis

Gli spettri di assorbimento UV-vis analizzati per questo lavoro di tesi sono stati registrati con uno spettrofotometro UV-vis Varian Cary 50 BIO (Fig.16).



Fig.16: spettrofotometro UV-vis Varian Cary 50 BIO

3.2.2 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$)

In questa tecnica viene sfruttata proprio una delle proprietà di base di alcuni atomi, ovvero la capacità di creare un campo magnetico attorno a sé stesso grazie alla rotazione intorno al proprio asse. La rotazione del nucleo atomico su se stesso crea un momento magnetico: l'elemento più semplice avente momento magnetico nucleare, è l'idrogeno magnetico. Non tutti i nuclei atomici possiedono proprietà magnetiche, ma solo nuclei con numero atomico e/o massa atomica dispari, ovvero quando il loro numero quantico di spin I è $\pm 1/2$. Perché è importante che un nucleo possieda proprietà magnetiche? Perché proprio sfruttando questa proprietà è possibile far interagire il campo magnetico generato dalla particella in rotazione su sé stessa con un campo magnetico esterno, applicato in uno spazio all'interno del quale è posizionata la particella. Quando il nucleo si trova in un campo magnetico esterno, il suo spin si allinea con esso. Nuclei diversi immersi in un campo magnetico interagiranno con questo in maniera diversa, fornendo, di conseguenza, segnali diversi.

I nuclei sono dotati di un intorno chimico, costituito da altri atomi e/o altre molecole che li circondano con le relative nubi elettroniche, ed essi stessi sono circondati dalla propria "nube" di particelle. Il campo magnetico applicato induce, pertanto, sull'intorno elettronico di ogni nucleo, un campo magnetico locale opposto. La nube elettronica provoca una modificazione locale del campo applicato che viene definita schermatura. Ciò si traduce in una differente posizione dei picchi di assorbimento a seconda proprio dell'intorno chimico, ecco quindi che si parla di spostamento chimico (chemical shift);

In base allo spostamento chimico è possibile distinguere, per esempio nel caso del protone, a quale gruppo funzionale appartiene un determinato H, e in base al tipo di segnale, multiplo o singolo, è possibile determinare se è legato ad un determinato atomo

singolarmente o è circondato da altri atomi di H con cui può accoppiarsi. Di conseguenza ciò permette di ottenere una serie di importantissime informazioni strutturali e sull'intorno del tipo di nucleo che stiamo studiando. I principi di spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ vengono applicati con l'ausilio dello spettrometro (Fig.17).

Le misure sono state effettuate con uno spettrometro ULTRASHIELD 400 PLUS.

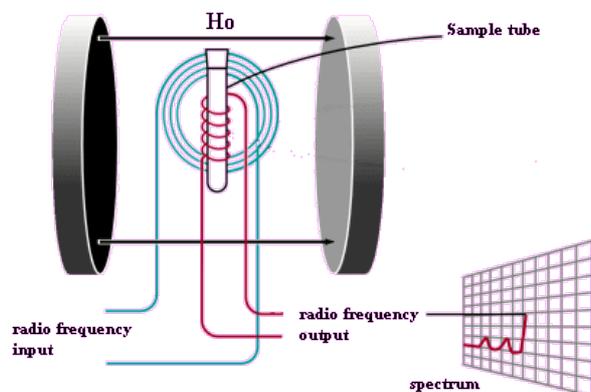


Fig.17: Schema generico spettroscopia a risonanza magnetica nucleare

3.2.3 Spettrometria di massa

L'esperimento di spettrometria di massa consiste nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione. Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta la concentrazione relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa /carica. L'interpretazione dello spettro di massa consiste nello studio dei segnali dovuti agli ioni generati nell'esperimento, dai quali si può ricostruire a ritroso la struttura molecolare originale.

Le analisi spettrali si realizzano con uno strumento detto spettrometro di massa (Fig.18).

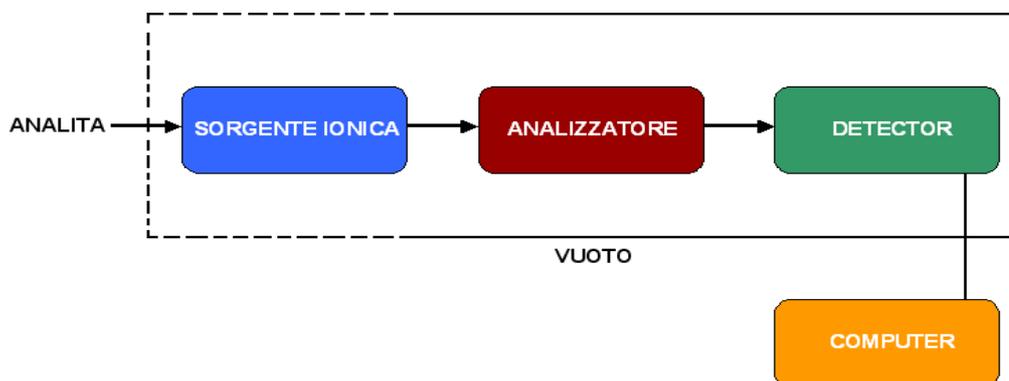


Fig.18: schema di uno spettrometro di massa

Il campione può essere un gas, oppure un liquido o un solido che vengono vaporizzati o sublimati.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una sorgente ionica. In genere gli elettroni sono emessi da un filamento caldo di tungsteno o renio, e passano attraverso un condotto, che crea il raggio, nella parte centrale della camera che contiene il campione gassoso. La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore che consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica; il rivelatore identifica gli ioni che sono arrivati all' analizzatore e il sistema di elaborazione dati traccia lo spettro. In questo lavoro di tesi gli spettri sono stati registrati con l' ausilio di uno spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ-Orbitrap (ThermoScientific, San Jose, CA, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1.1 Stabilità in soluzione dei complessi di Au(III)

Inizialmente sono state testate le solubilità dei tre complessi di Au(III) in acqua milliQ.

Dalle prove effettuate è emersa una buona solubilità in solvente acquoso da parte dell' AubipyC e dell' AubpyNHCOCH₃; invece il complesso Au₂(bipy-H₂) (μ -O) ha mostrato poca solubilità in acqua ma buona solubilità in dimetil-solfossido (DMSO).

Sono state preparate le seguenti soluzioni stock in 1mL :

- soluzione 10⁻² M in dimetil-solfossido (DMSO) di [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)]
- soluzione 10⁻³ M in acqua milliQ di AubipyC
- soluzione 10⁻³ M in acqua milliQ di AubipyNHCOCH₃

La stabilità in tampone acquoso (Ammonio acetato e PB ossia tampone fosfato) dei tre complessi è stata studiata attraverso analisi spettrofotometriche UV-vis.

Attraverso diluizioni delle soluzioni stock, sono state ottenute le soluzioni descritte di seguito:

<i>Soluzione</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume complex</i>	<i>Volume Am.Ac</i>
Aubipyc	30 μM	30 μL	970 μL
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]	30 μM	30 μL	970 μL
Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)	30 μM	3 μL	997 μL

<i>Soluzione</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume complex</i>	<i>Volume PB</i>
Aubipyc	30 μ M	30 μ L	970 μ L
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]	30 μ M	30 μ L	970 μ L
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]	30 μ M	3 μ L	997 μ L

Gli spettri sono stati registrati in un arco di tempo di 72 h operando in un range di lunghezza d'onda di 200-800nm.

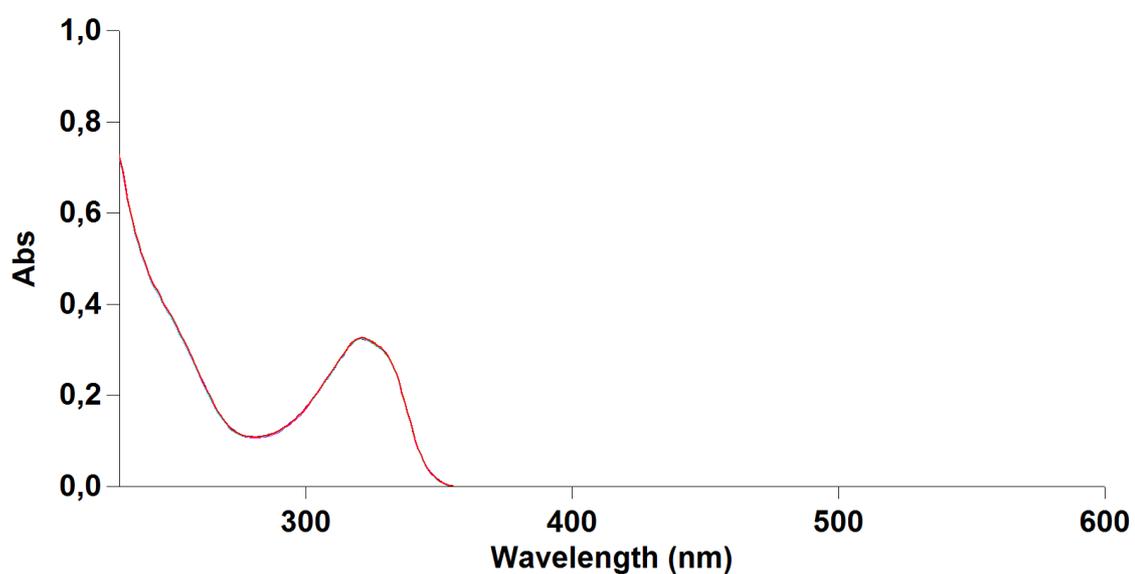


Fig.19: Spettro di assorbimento UV-vis Aubipyc in Am.Ac

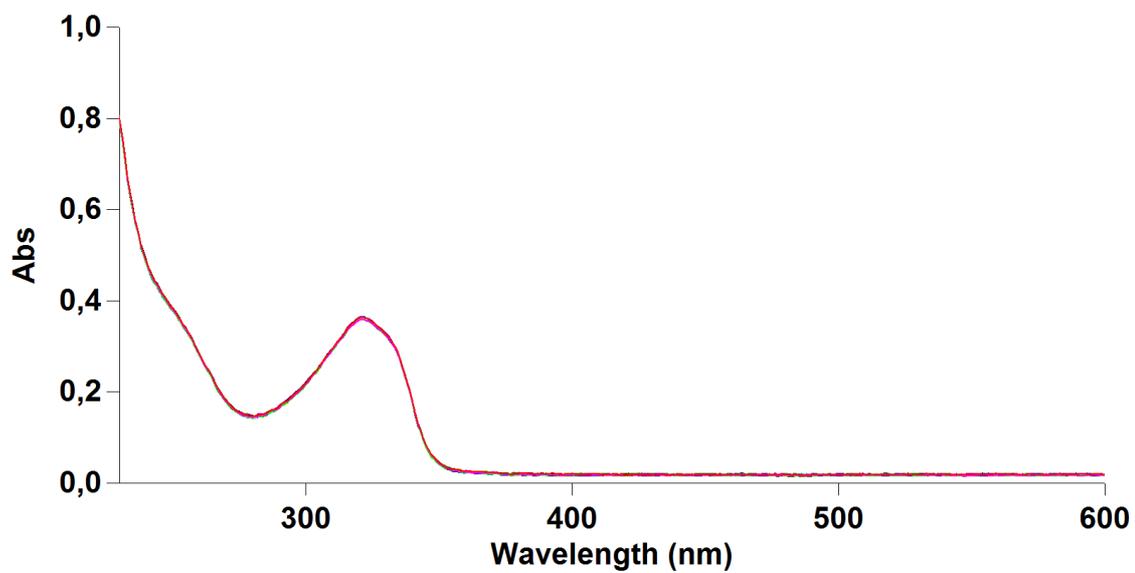


Fig.20: Spettro di assorbimento UV-vis AubipyNHCOCH₃ in Am.Ac

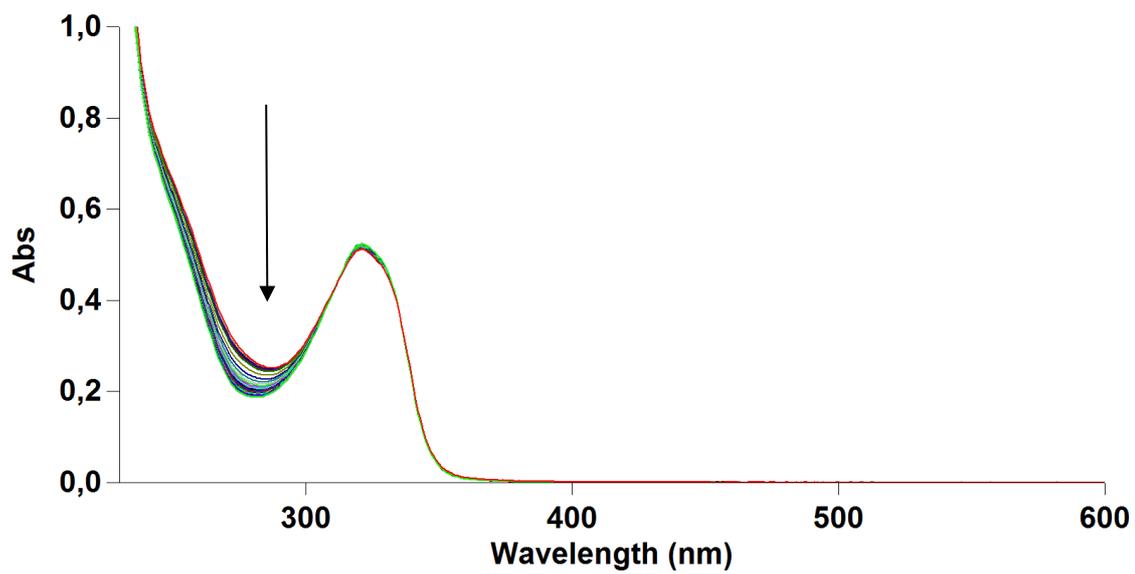


Fig.21: Spettro di assorbimento UV-vis Au₂bipy in Am.Ac

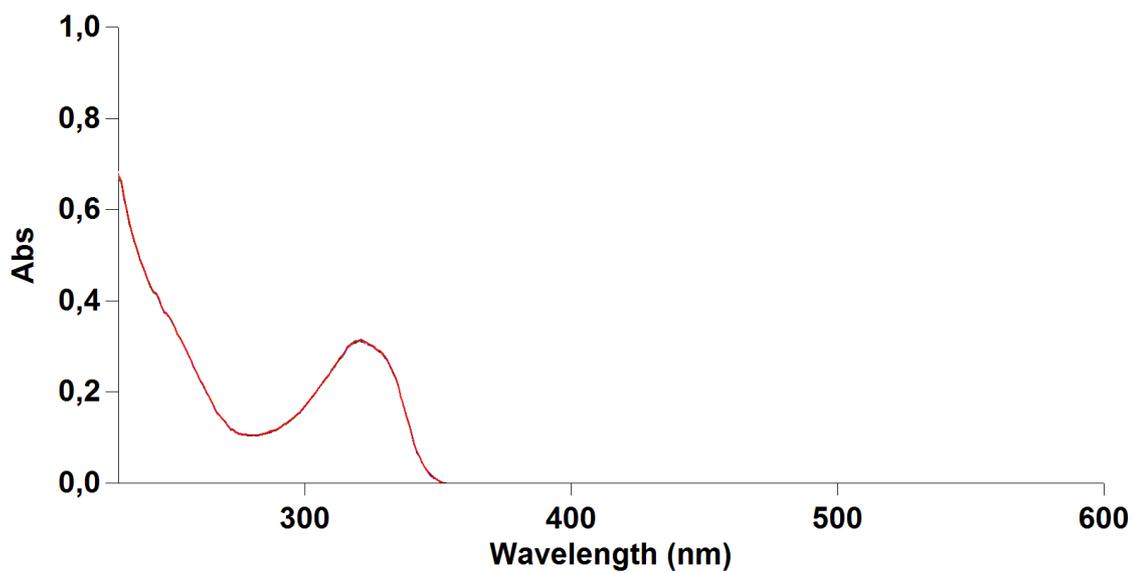


Fig.22: Spettro di assorbimento UV-vis Aubipyc in PB

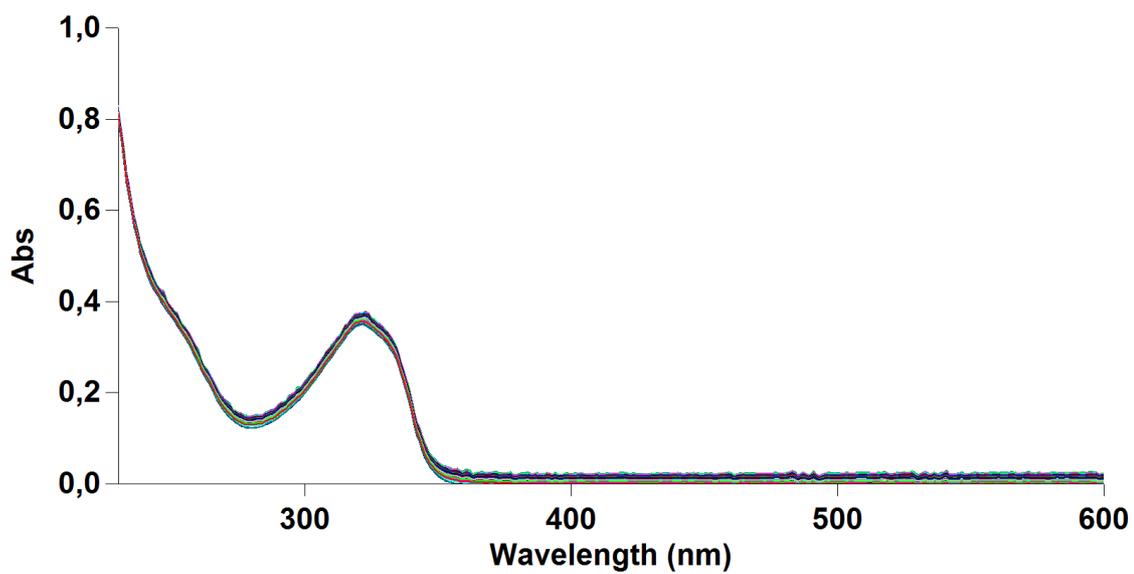


Fig.23: Spettro di assorbimento UV-vis AubipyNHCOCH₃ in PB

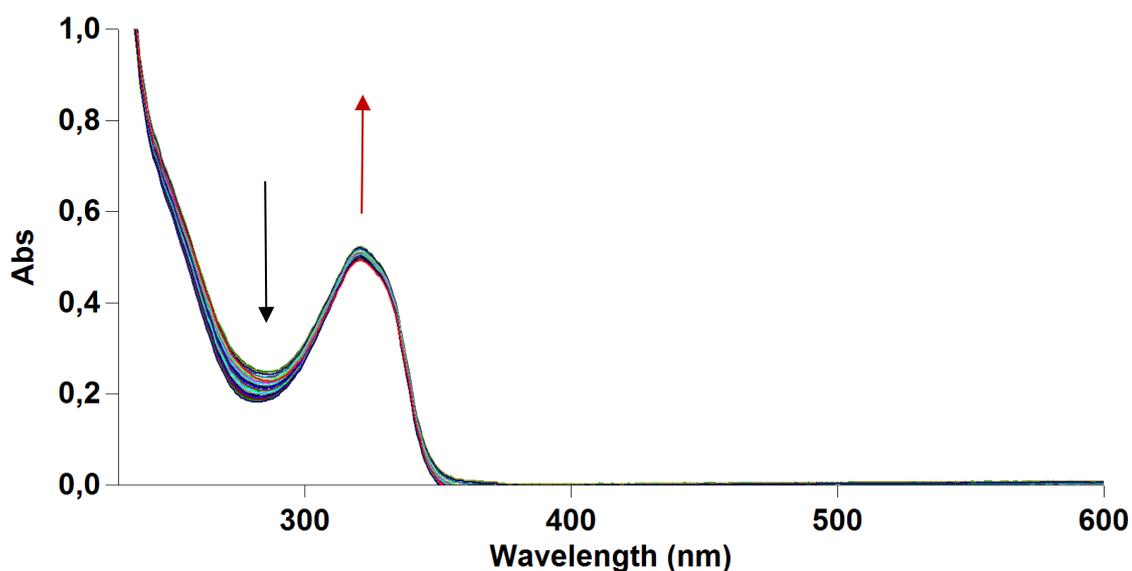


Fig.24: Spettro di assorbimento UV-vis Au2bipy in PB

Dalle analisi spettrali effettuate si può concludere che i complessi Aubipyc, AubipyNHCOCH₃ sono stabili in tampone acetato e tampone fosfato; confrontando per ogni singolo complesso lo spettro di assorbimento nei due diversi tamponi si nota una stabilità pressochè equivalente. Per quanto riguarda l' Au2bipy dalle analisi spettrali si nota che in presenza di ammonio acetato si ha una variazione della banda spettrale intorno a 230 nm nel corso delle 72h e una perfetta stabilità a circa 330 nm; nel caso del tampone fosfato invece si riscontra si una variazione della banda spettrale intorno a 280 nm ma anche una innalzamento rilevante variazione intorno a 330 nm nell'arco delle 72 h. Questo è imputabile al fatto che il suddetto complesso è più stabile in tampone acetato rispetto al tampone fosfato.

4.1.2 Interazioni con proteine

Le interazioni tra le proteine modello e i complessi di Au(III) sono state state studiate con analisi spettrofotometriche UV-vis in Ammonio acetato.

Attraverso diluizioni delle soluzioni stock delle proteine e dei complessi, sono state ottenute le soluzioni descritte di seguito:

<i>Soluzione</i>	<i>Conc.fin complex</i>	<i>Conc.fin proteina</i>	<i>Volume complex</i>	<i>Volume proteina</i>	<i>Volume Am.Ac</i>
Aubipyc-HEWL	30 µM	10 µM	30 µL	10 µL	960 µL
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]-HEWL	30 µM	10 µM	30 µL	10 µL	960 µL
[Au ₂ (bipy-H ₂)(µ-O)]-HEWL	30 µM	10 µM	3 µL	10 µL	987 µL

Aubipyc-Cytc	30 μ M	10 μ M	30 μ L	10 μ L	960 μ L
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]-Cytc	30 μ M	10 μ M	30 μ L	10 μ L	960 μ L
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]-Cytc	30 μ M	10 μ M	3 μ L	10 μ L	987 μ L
Aubipyc-RNase	30 μ M	10 μ M	30 μ L	10 μ L	960 μ L
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]-RNase	30 μ M	10 μ M	30 μ L	10 μ L	960 μ L
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]-RNase	30 μ M	10 μ M	3 μ L	10 μ L	987 μ L

Gli spettri sono stati registrati in un arco di tempo di 24 h operando in un range di lunghezza d'onda di 200-800nm.

4.1.2.1 Interazione con Lisozima (HEWL)

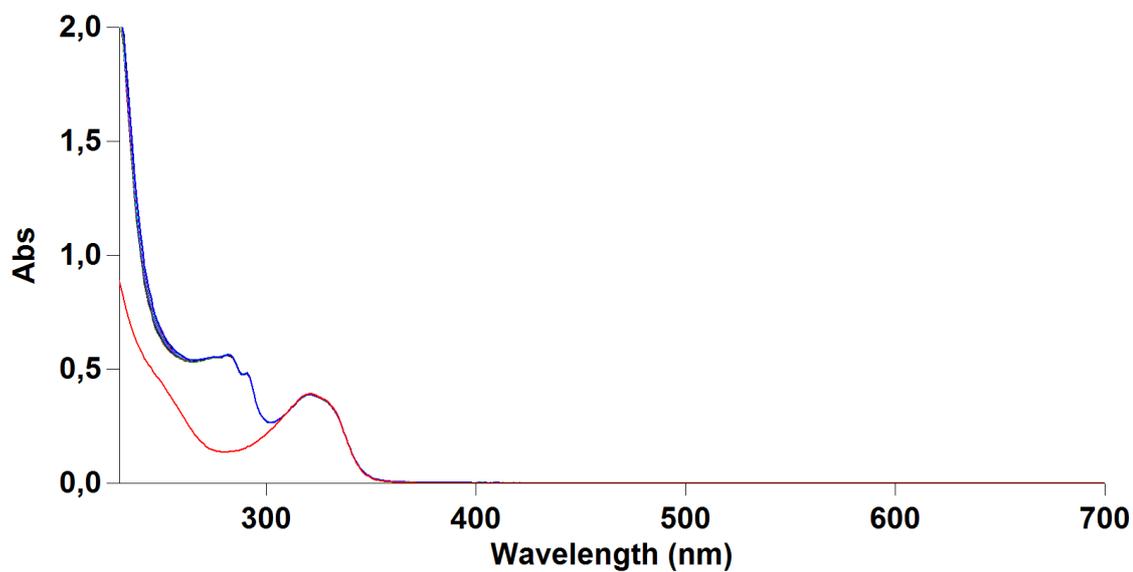


Fig.25: Spettro di assorbimento UV-vis Aubipyc con HEWL in *Am.Ac*

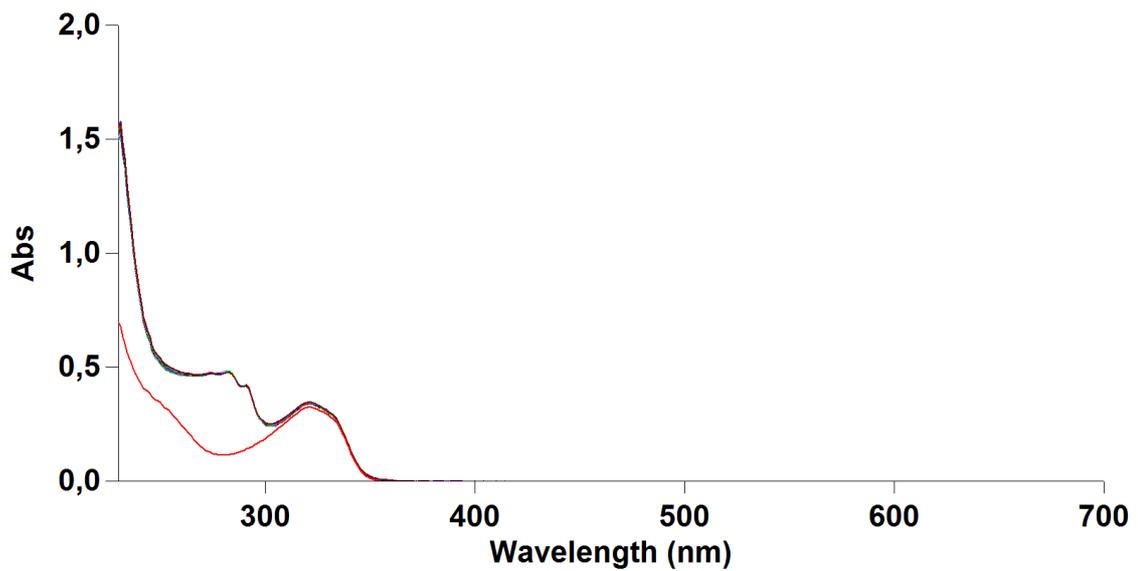


Fig.26: Spettro di assorbimento UV-vis AubipyNHCOCH₃ con HEWL in *Am.Ac*

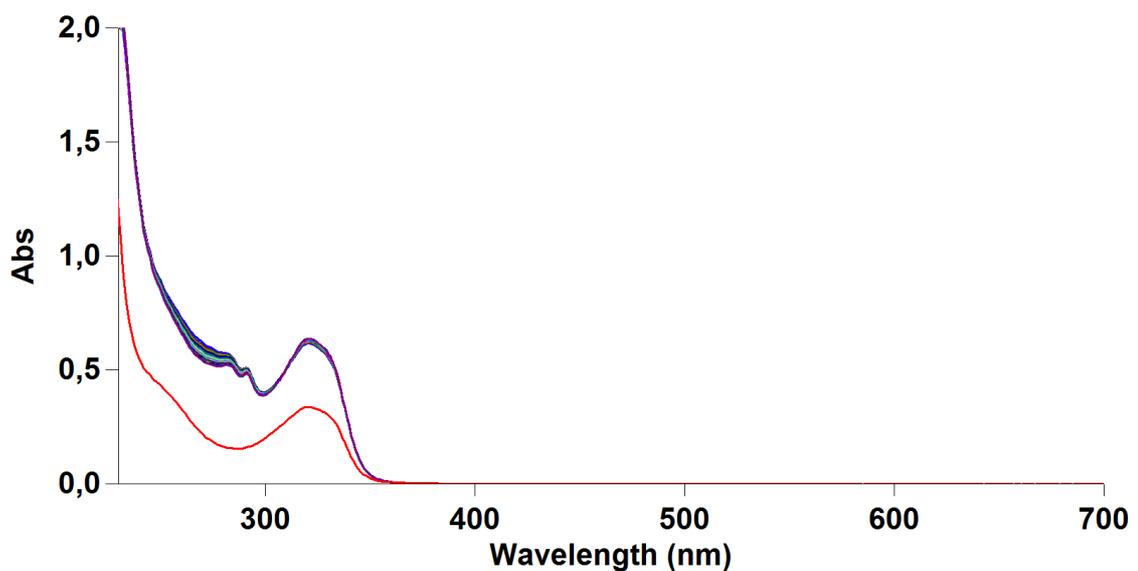


Fig.27: Spettro di assorbimento UV-vis Au₂bipy con HEWL in *Am.Ac*

Nel caso dell'Aubipyc e dell' AubipyNHCOCH₃ non si hanno variazioni spettrali, sembra quindi che anche nel caso in cui i complessi si leghino alla proteina, questo non provochi variazione nella sua struttura. Nel caso di Au₂bipy la variazione che si nota è data, molto probabilmente alla rottura del composto nel suo monomero.

4.1.2.2 Interazione con Citocromo equino (CytC)

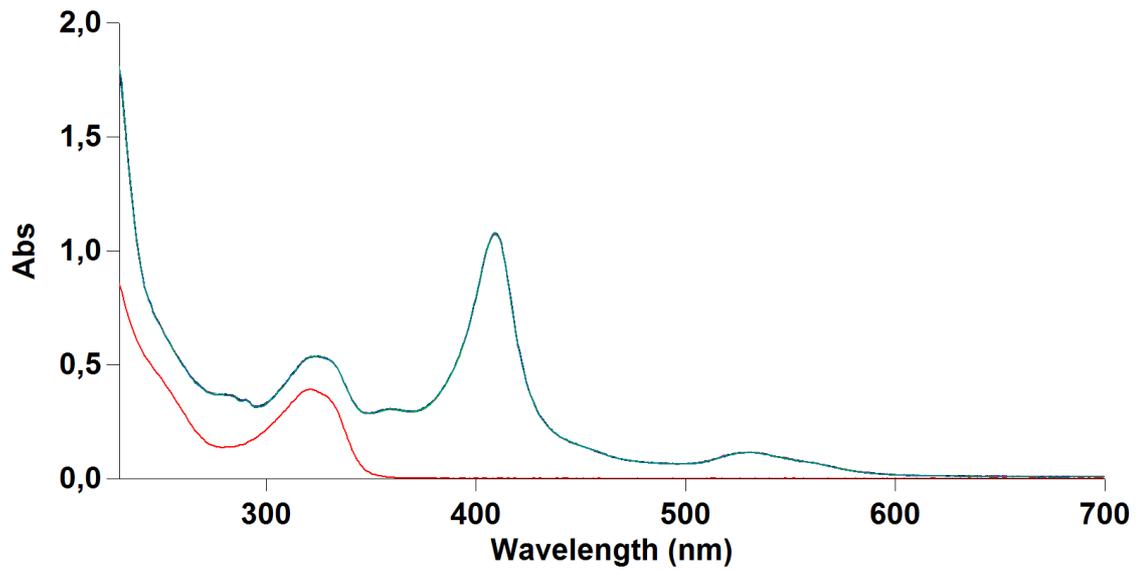


Fig.28: Spettro di assorbimento UV-vis Aubipyc con CytC in *Am.Ac*

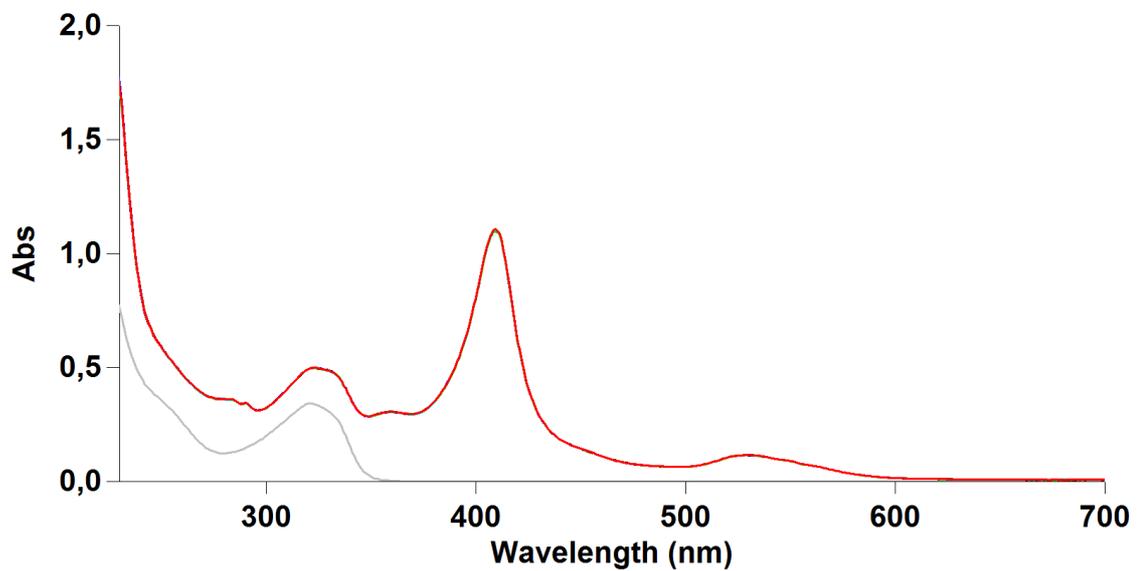


Fig.29: Spettro di assorbimento UV-vis AubipyNHCOCH₃ con CytC in *Am.Ac*

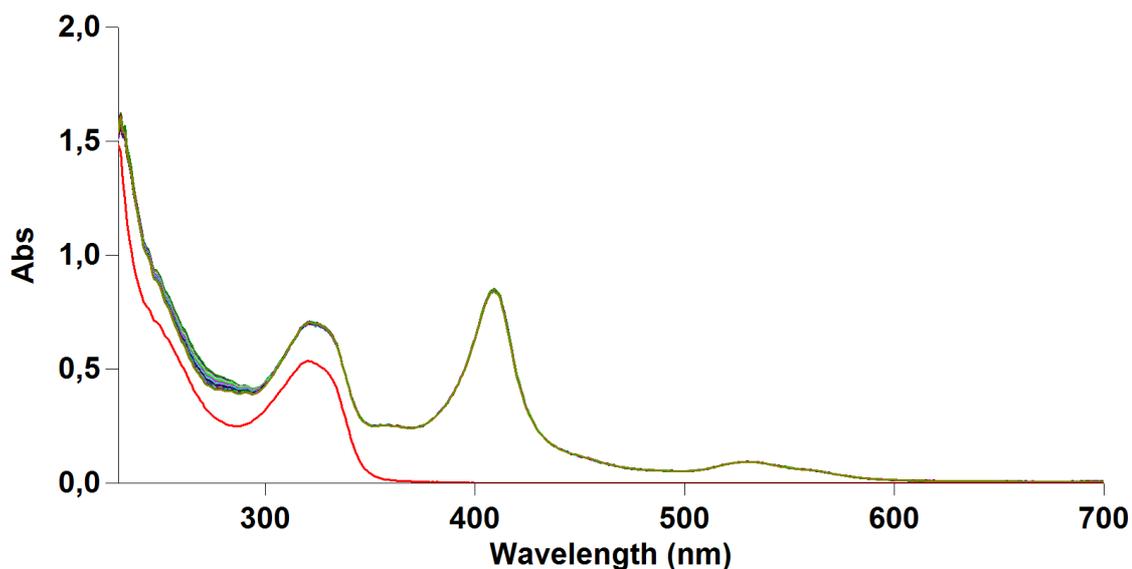


Fig.30: Spettro di assorbimento UV-vis Au2bipy con CytC in *Am.Ac*

Con i primi due composti (Aubipyc e AubipyNHCOCH₃) non si hanno variazioni spettrali, pertanto sembra che anche nel caso in cui i complessi si leghino alla proteina, questo non provochi variazione nella sua struttura. Nel caso di Au2bipy la variazione che si nota è data, molto probabilmente alla rottura del composto nel suo monomero.

4.1.2.3 Interazione con Ribonucleasi (RNase)

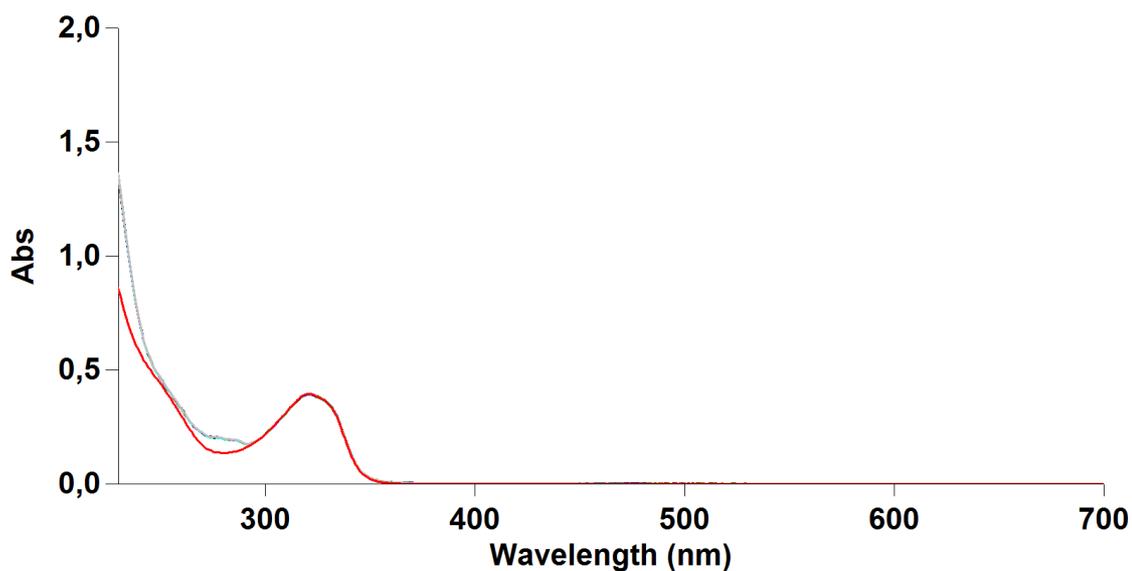


Fig.31: Spettro di assorbimento UV-vis Aubipyc con RNase in *Am.Ac*

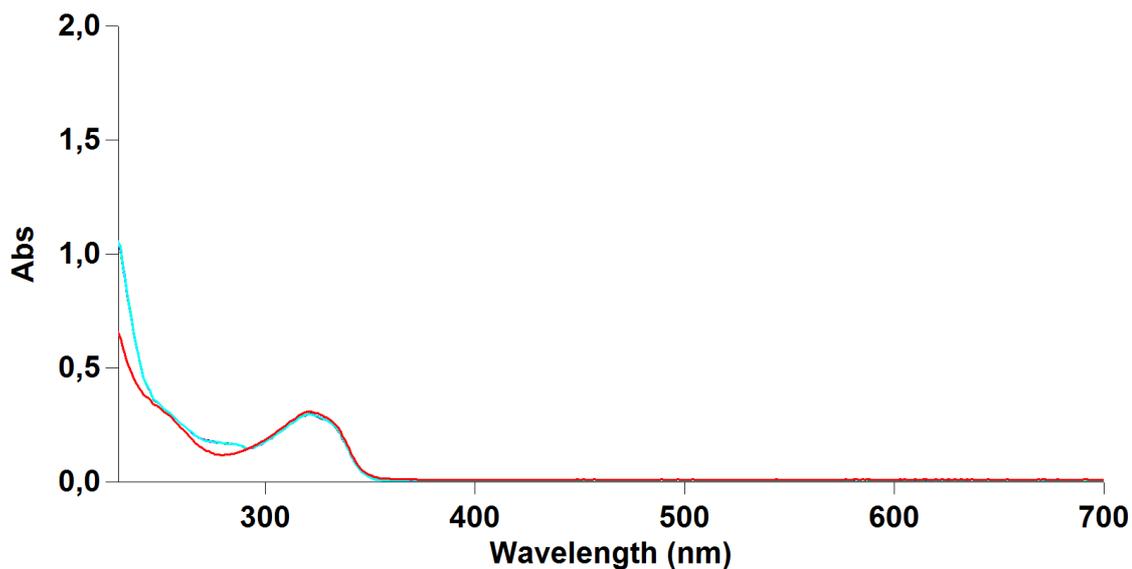


Fig.32: Spettro di assorbimento UV-vis AubipyNHCOCH₃ RNase in *Am.Ac*

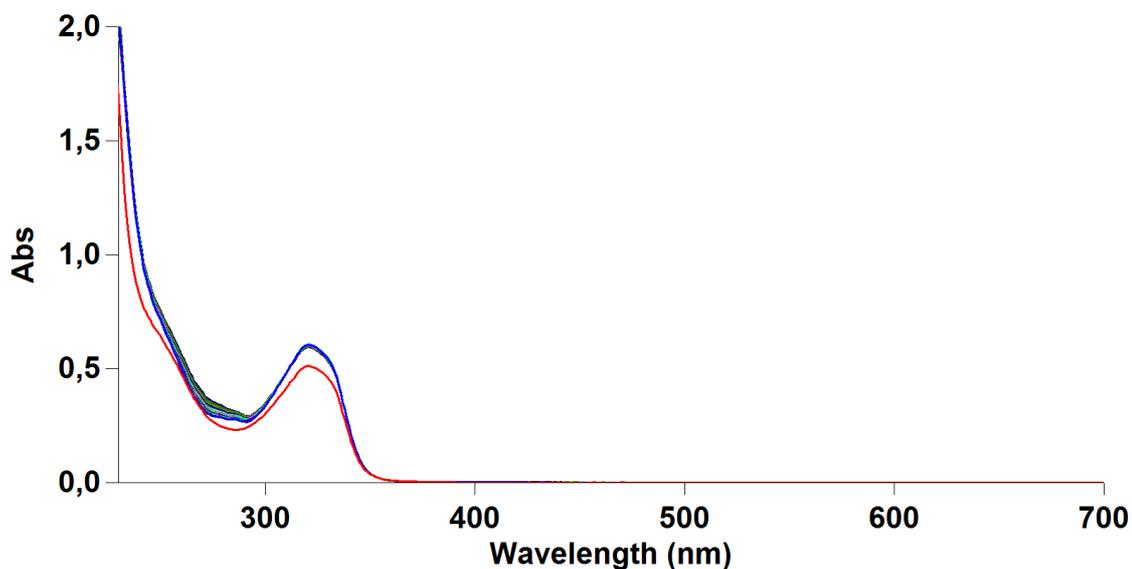


Fig.33: Spettro di assorbimento UV-vis Au₂bipy RNase in *Am.Ac*

Anche in questo caso con i primi due composti (Aubipyc e AubipyNHCOCH₃) non si hanno variazioni nello spettro, sembra quindi che anche nel caso in cui i complessi si leghino alla proteina, questo non provochi variazione nella sua struttura. Per quanto riguarda l'Au₂bipy la variazione spettrale che si nota è data, molto probabilmente alla rottura del composto nel suo monomero.

4.2 Spettri $^1\text{H-NMR}$

L'analisi spettroscopica è stata condotta con l'ausilio di soluzioni dei complessi Aubipyc e AubipyNHCOCH₃, in acqua deuterata, a delle concentrazioni pari a 1000 μM in un volume teorico totale di 600 μL .

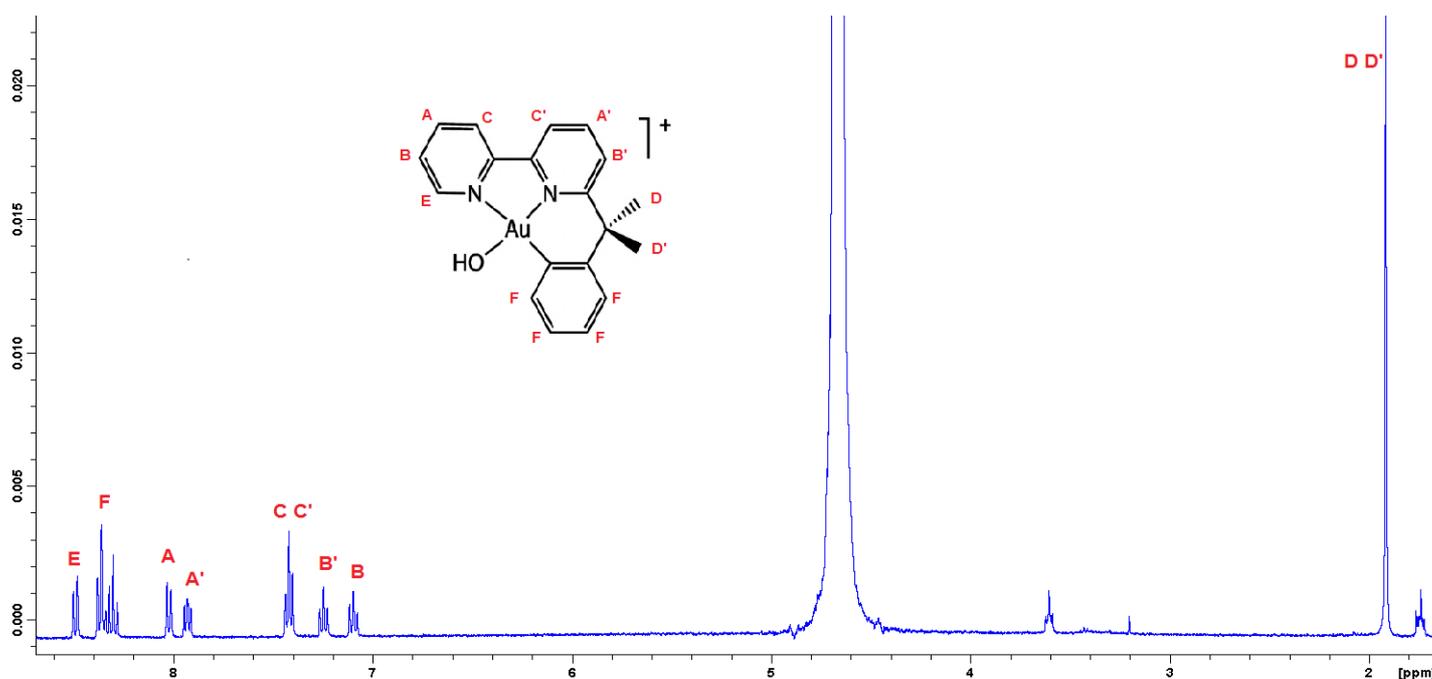


Fig.34: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del Aubipyc in D_2O

Dall'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso Aubipyc si notano i seguenti segnali :

- $\delta = 8,49(\text{dd}, 1\text{H}, \text{piridina}) \text{ ppm}$
- $\delta = 8,377\text{-}8,298(\text{m}, 4\text{H}, \text{benzene}) \text{ ppm}$
- $\delta = 8,027(\text{t}, 1\text{H}, \text{piridina}) \text{ ppm}$
- $\delta = 7,41(\text{t}, 2\text{H}, \text{piridine}) \text{ ppm}$
- $\delta = 7,242(\text{t}, 1\text{H}, \text{piridina}) \text{ ppm}$
- $\delta = 7,094(\text{t}, 1\text{H}, \text{piridina}) \text{ ppm}$
- $\delta = 1,955(\text{s}, 6\text{H}, \text{metili}) \text{ ppm}$
- $\delta = 1,79(\text{t}, 1\text{H}, \text{piridina}) \text{ ppm}$

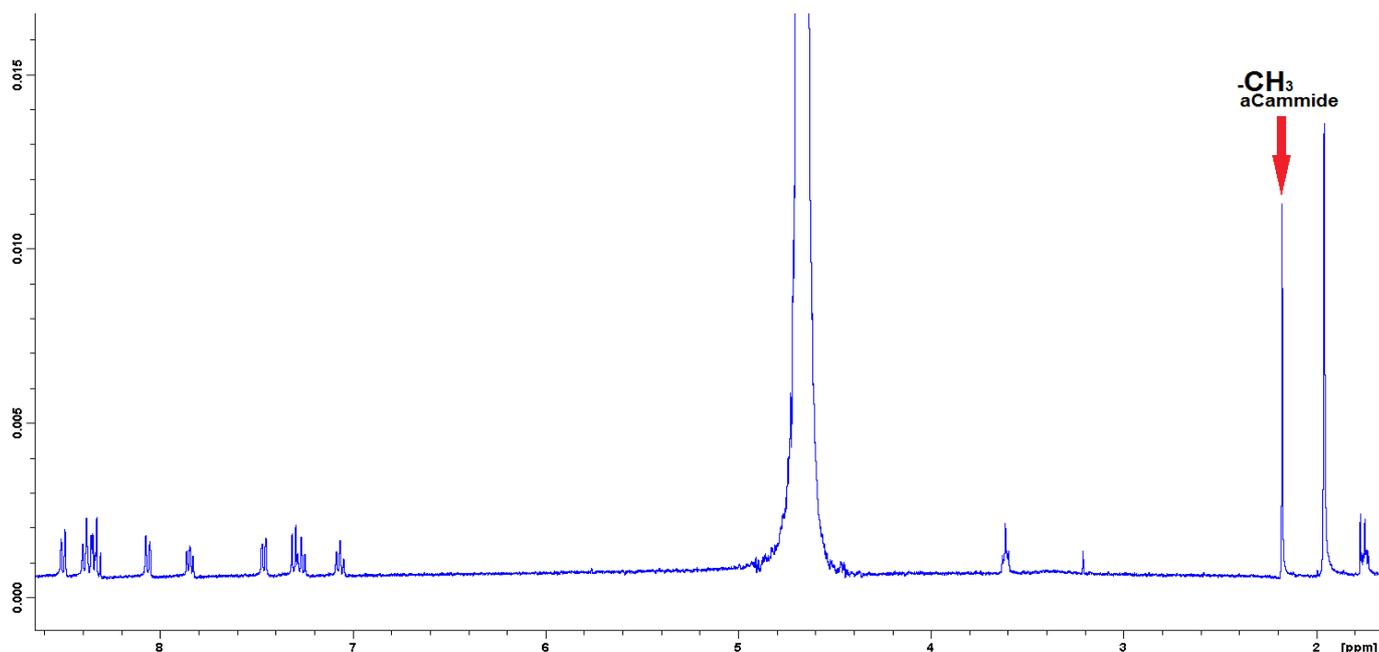


Fig.35: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del AubipyNHCOCH_3 in D_2O

Dall' analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso AubipyNHCOCH_3 si nota che a differenza del complesso precedente si evidenzia un picco con $\delta = 2,181$ ppm che è un singoletto integrante 3 idrogeni; picco caratteristico del metile dell' acetammide.

Gli spettri ottenuti mostrano che i due complessi sono perfettamente stabili nell'arco di 48h.

4.3 Spettri di massa ad alta e bassa risoluzione

Le interazioni tra le proteine modello e i complessi di Au(III) sono stati state studiate con analisi spettrometriche di massa in Ammonio acetato.

Attraverso diluizioni delle soluzioni stock delle proteine e dei complessi, sono state ottenute le soluzioni descritte di seguito:

<i>Soluzione</i>	<i>Conc.fin. complex</i>	<i>Conc.fin. proteina</i>	<i>Volume complex</i>	<i>Volume proteina</i>	<i>Volume Am.Ac</i>
Aubipyc - HEWL	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]- HEWL	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]- HEWL	300 μM	100 μM	3 μL	10 μL	87 μL
Aubipyc - Cytc	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]- Cytc	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL

[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ-O)]- Cytc	300 μM	100 μM	3 μL	10 μL	87 μL
Aubipyc - RNase	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]- RNase	300 μM	100 μM	30 μL	10 μL	60 μL
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ-O)]- RNase	300 μM	100 μM	3 μL	10 μL	87 μL

Gli spettri di massa sono stati registrati in un arco di tempo di 24 h e di 48 h e sono stati analizzati tramite un programma di deconvoluzione.

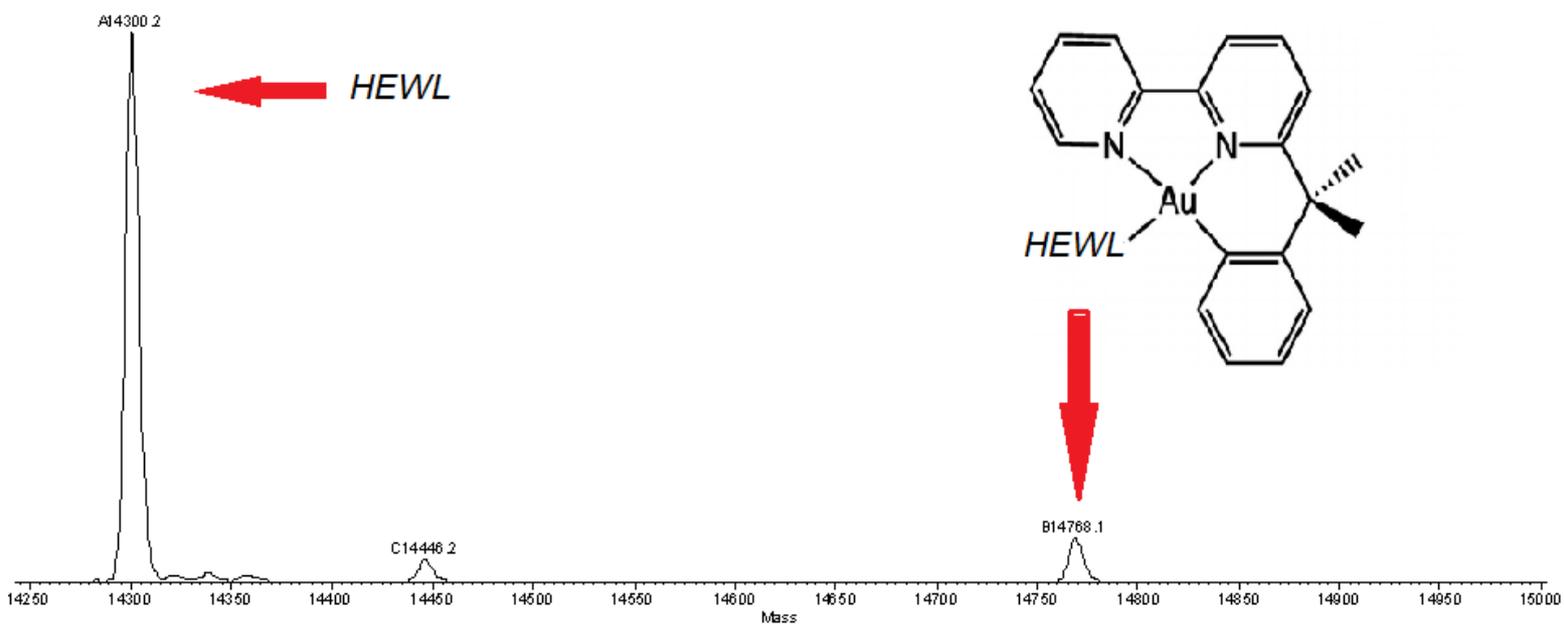


Fig.36 : spettro di massa in bassa risoluzione HEWL- Aubipyc (24 h)

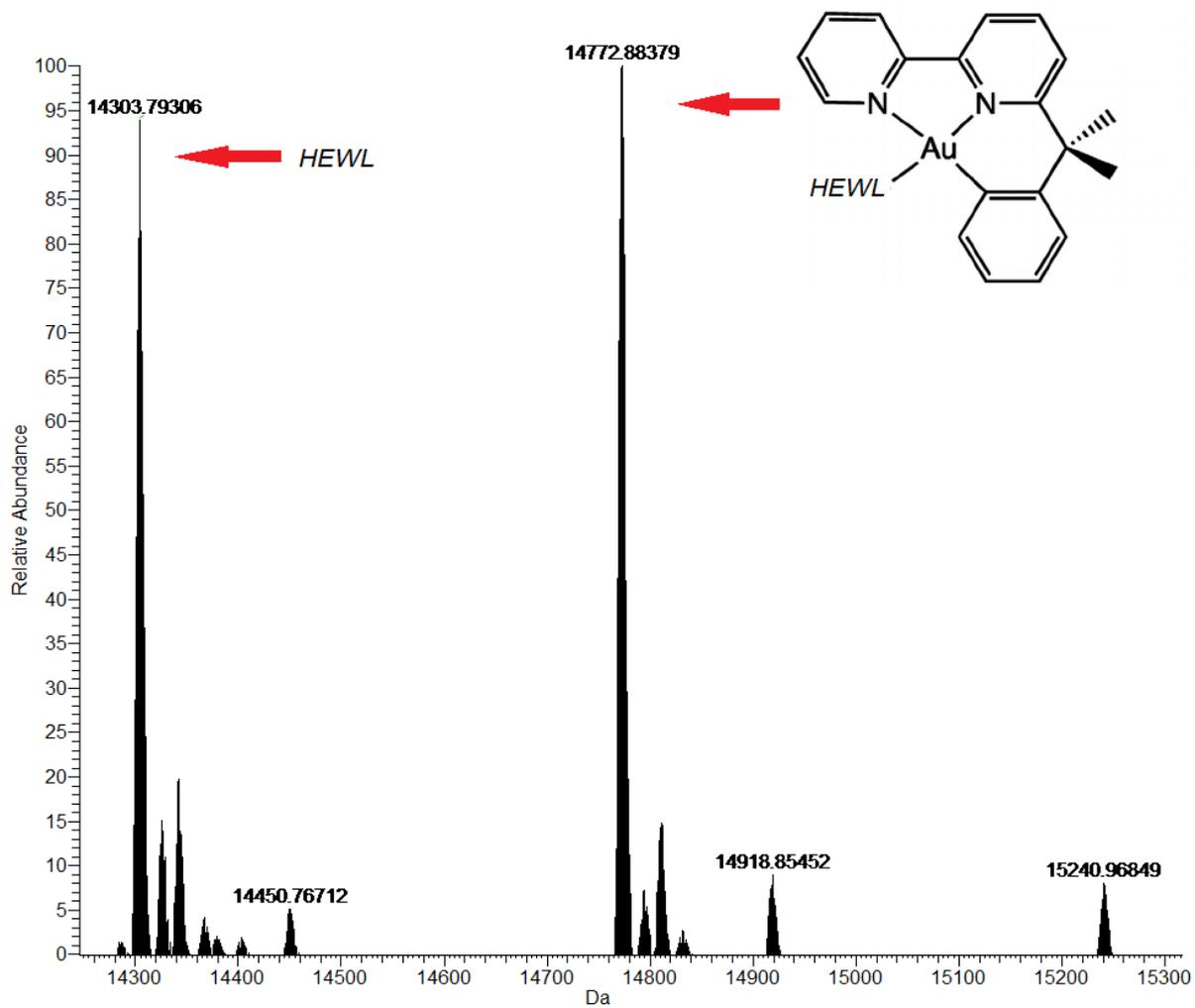


Fig.37: spettro di massa in alta risoluzione Aubipyc-HEWL(48 h)

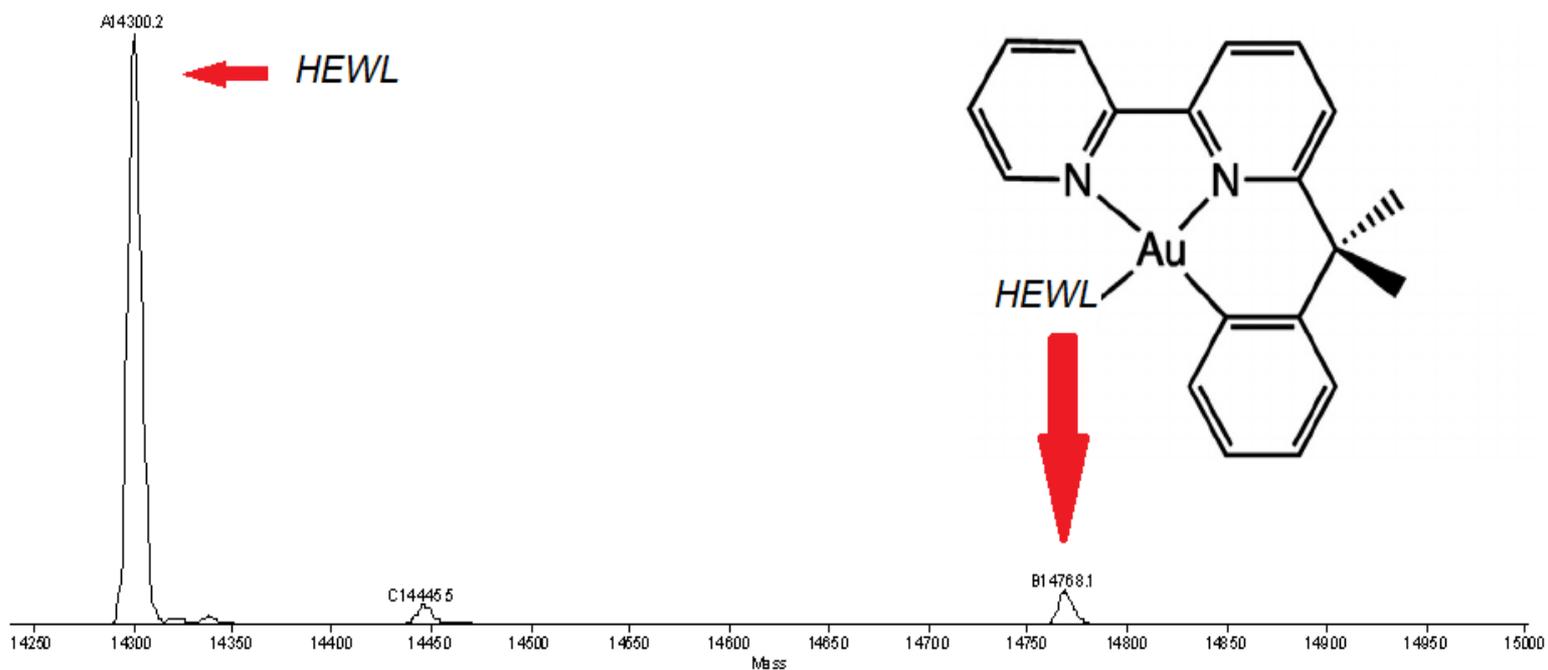


Fig.38: spettro di massa in bassa risoluzione AubipyNHCOCH₃-HEWL (24 h)

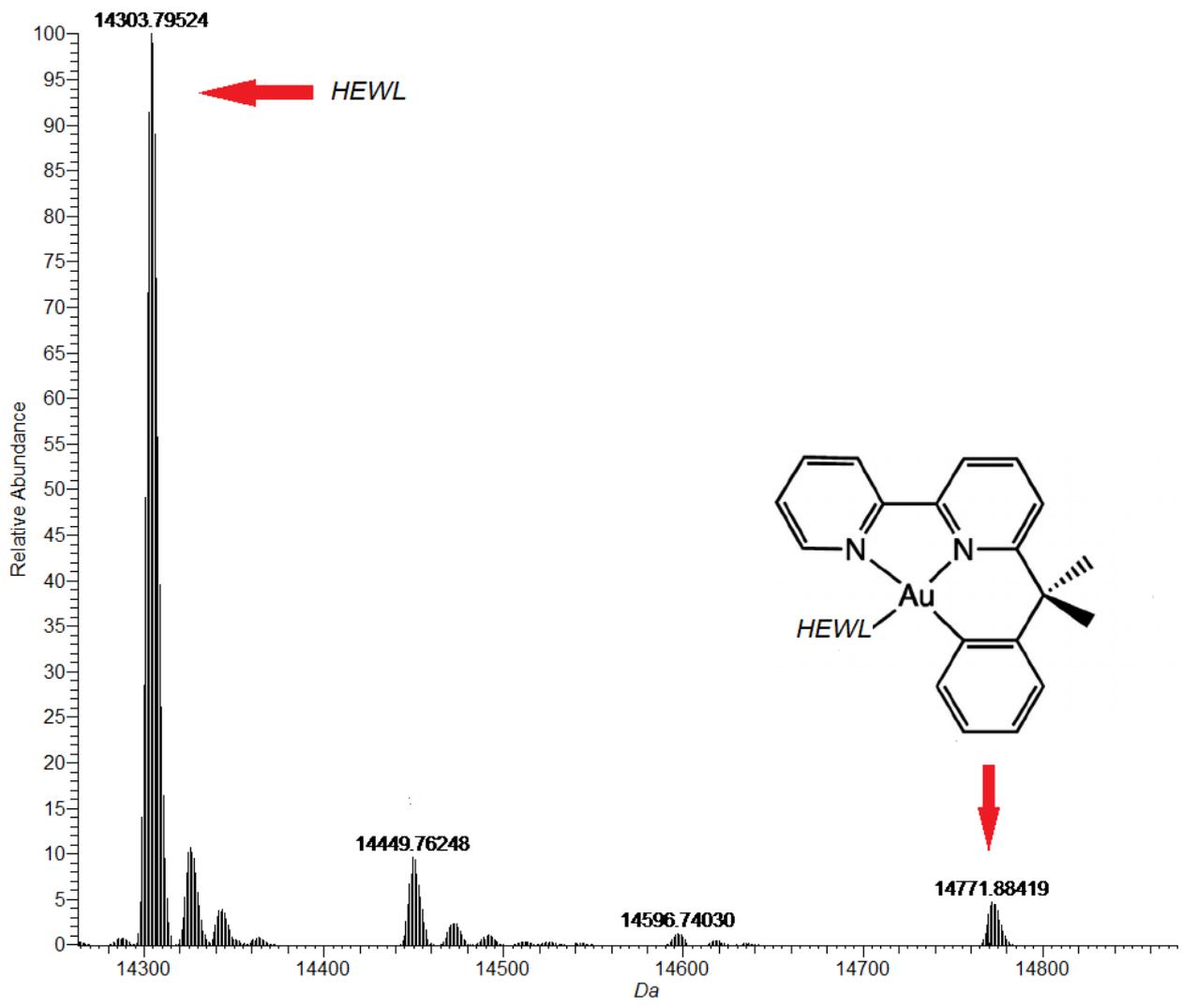


Fig.39: spettro di massa in alta risoluzione AubipyNHCOCH₃-HEWL (48 h)

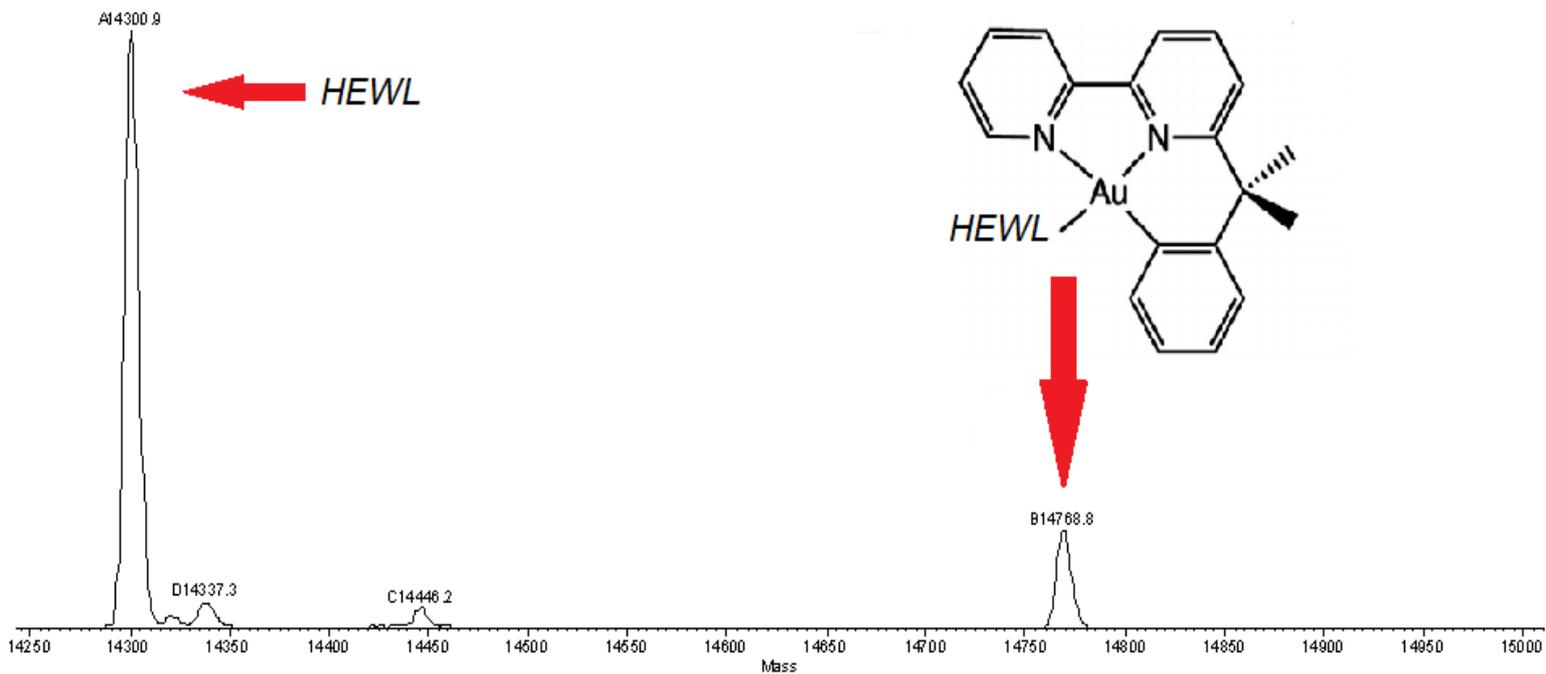


Fig.40 : spettro di massa in alta risoluzione $[Au_2(bipy-H_2)(\mu-O)]^-$ HEWL (24h)

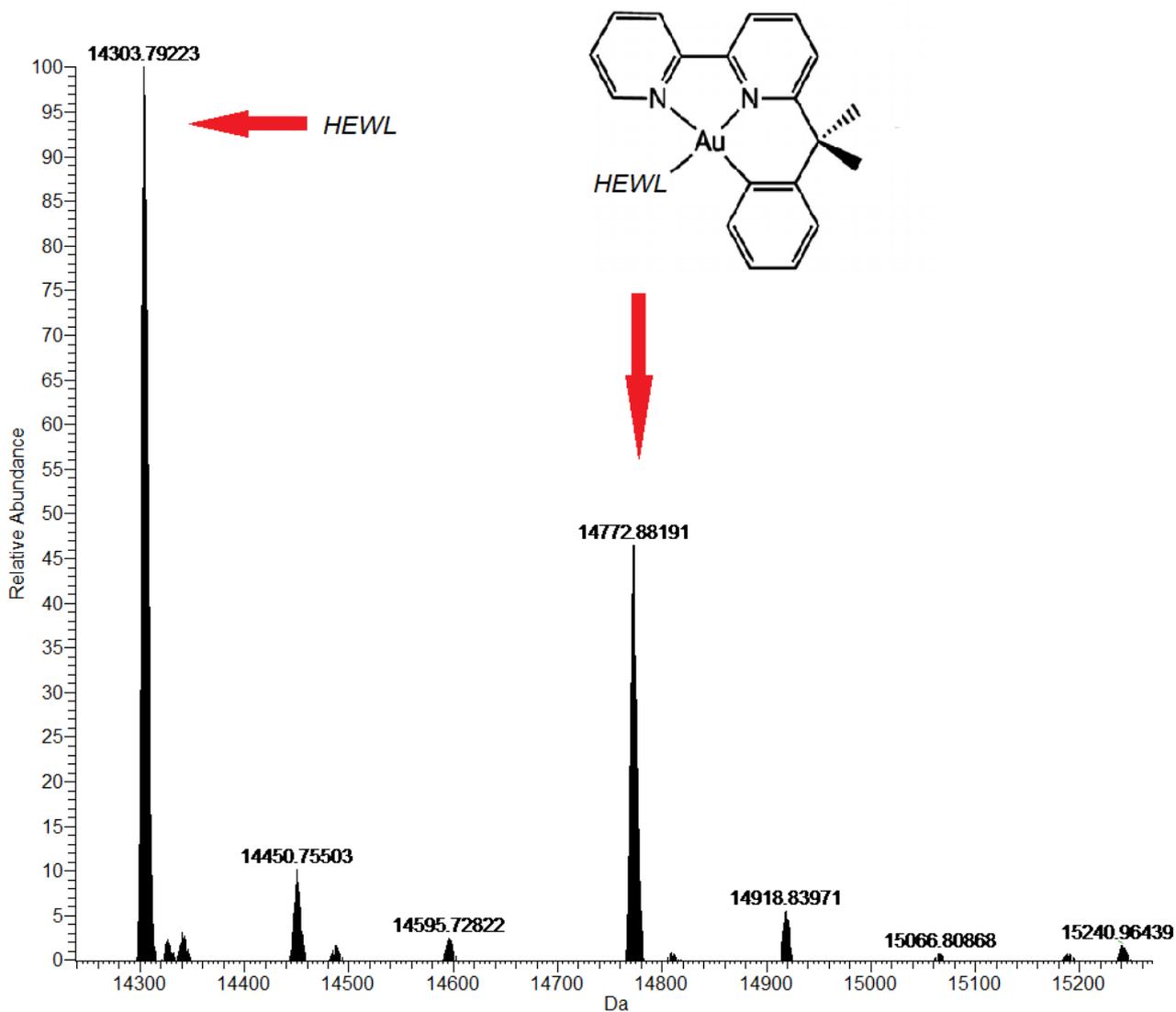


Fig.41 : spettro di massa in alta risoluzione $[Au_2(bipy-H_2)(\mu-O)]^-$ HEWL (48 h)

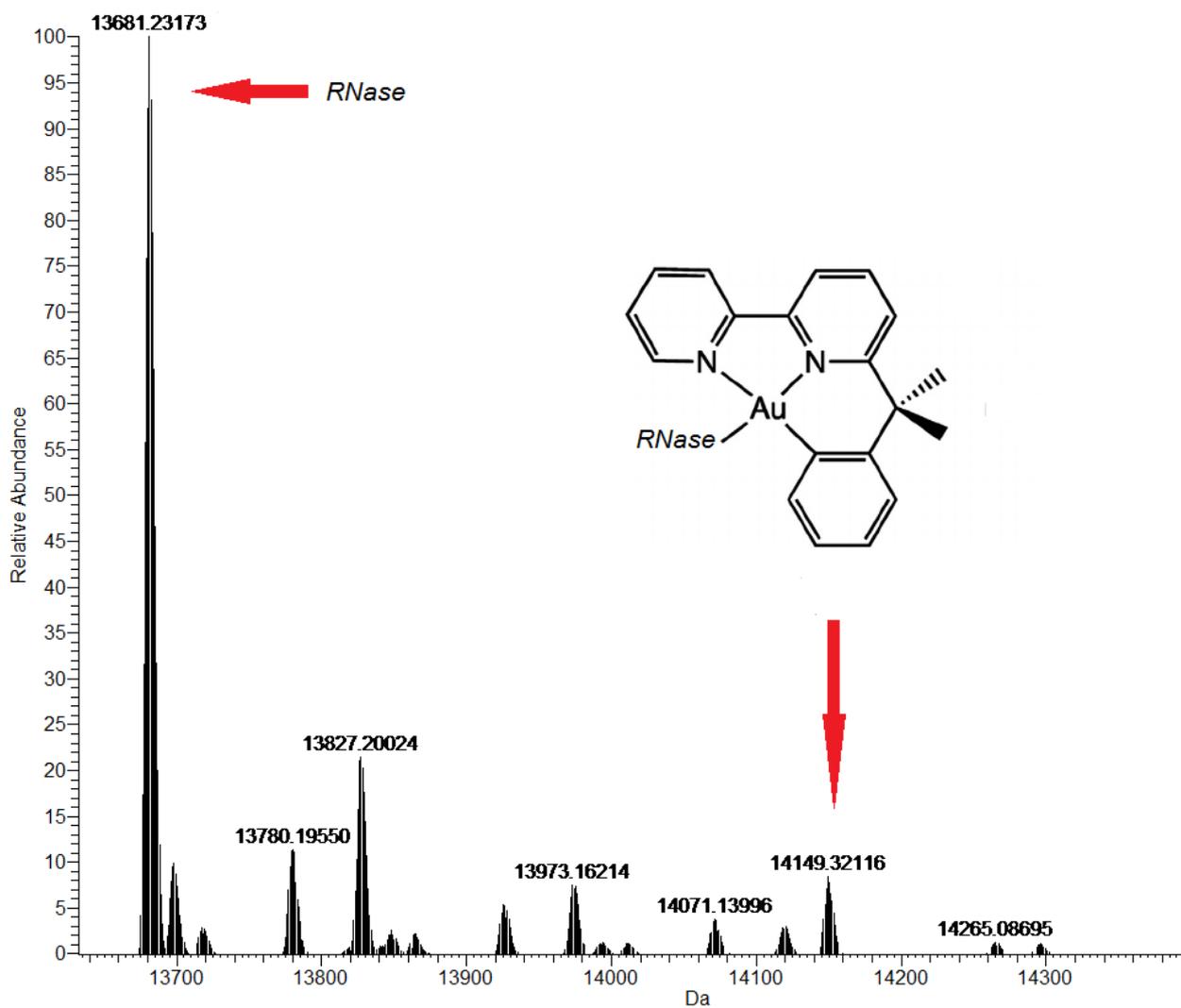


Fig.42 : spettro di massa in alta risoluzione $[Au_2(bipy-H_2)(\mu-O)]^-$ RNase (24 h)

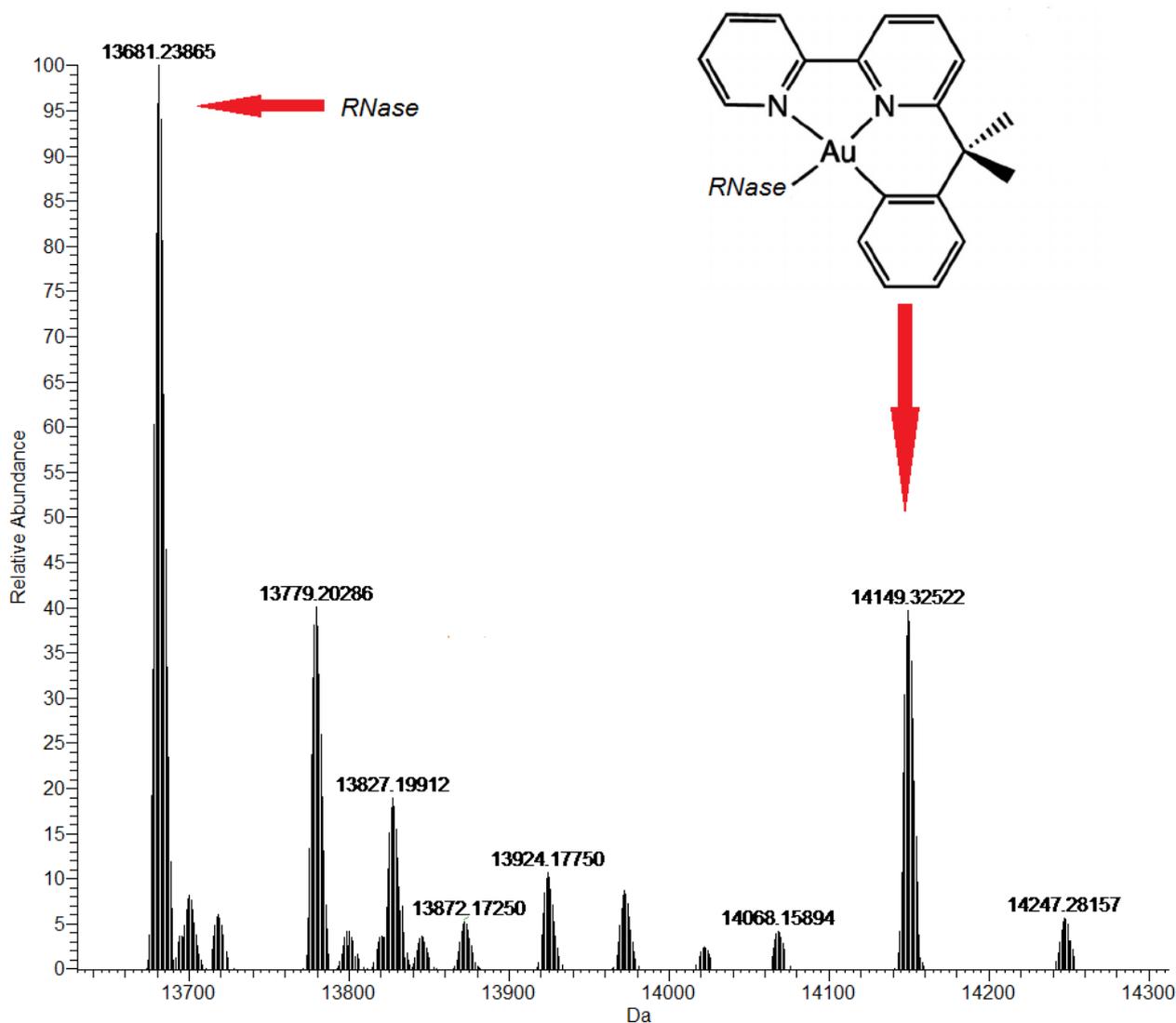


Fig.43 : spettro di massa in alta risoluzione $[Au_2(bipy-H_2)(\mu-O)]-RNase$ (48 h)

Dalle analisi spettrali effettuate sono stati ottenuti i seguenti risultati :

- $Au(bipy)$: il suddetto complesso non si lega alle proteine citocromo e ribonucleasi; tuttavia presenta un' affinità con il lisozima, con il quale forma un addotto (il complesso perde il gruppo ossidrilico e si lega alla proteina) . Da notare che dalle 24 alle 48 ore si ha un aumento dell' intensità del picco caratteristico dell' addotto formatosi tra il complesso e la proteina.
- $Au(bipy)NHCOCH_3$: il suddetto complesso non si lega alle proteine citocromo e ribonucleasi; tuttavia presenta un' affinità con il lisozima, con il quale forma un addotto (il complesso perde il gruppo funzionale ammidico e si lega alla proteina). Da notare che a differenza dell' $Au(bipy)$ l' affinità per la proteina sembra minore e questo è dimostrabile dalla minore intensità del picco dell' addotto formatosi nell' arco delle 24 e 48 ore.
- $[Au_2(bipy-H_2)(\mu-O)]$: Il suddetto complesso a differenza dei due complessi precedenti forma degli addotti sia con la ribonucleasi che con il lisozima (in entrambi i casi i complessi si dissociano nelle rispettive unità monomeriche e si

legano ai target biologici); da notare che nel caso dell' addotto formato con il lisozima, l' intensità del picco aumenta notevolmente dalle 24 alle 48 ore; per quanto riguarda invece l' addotto formato con la ribonucleasi anche in questo caso si ha un' aumento dell' intensità del picco caratteristico dell' addotto. Il complesso non forma addotti con il citocromo.

Attraverso spettrometria di massa è stata valutata anche l' interazione dei tre complessi nei confronti di un frammento telomerico TEL23 in avvolgimento quadruplex. Attraverso delle diluzioni delle soluzioni madre dei tre complessi e del telomero sono state ottenute le soluzioni riportate di seguito in tabella:

<i>Soluzione</i>	<i>Conc.fin complex</i>	<i>Conc.fin. telomero</i>	<i>Volume complex</i>	<i>Vol. TEL23</i>	<i>Vol. LCW</i>
Aubipyc -TEL23	150 μ M	50 μ M	3,75 μ L	12,5 μ L	8,75 μ L
Aubipy-H[NH(CO)CH ₃]- TEL23	150 μ M	50 μ M	3,75 μ L	12,5 μ L	8,75 μ L
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]- TEL23	150 μ M	50 μ M	0,75 μ L	25 μ L	24,25 μ L

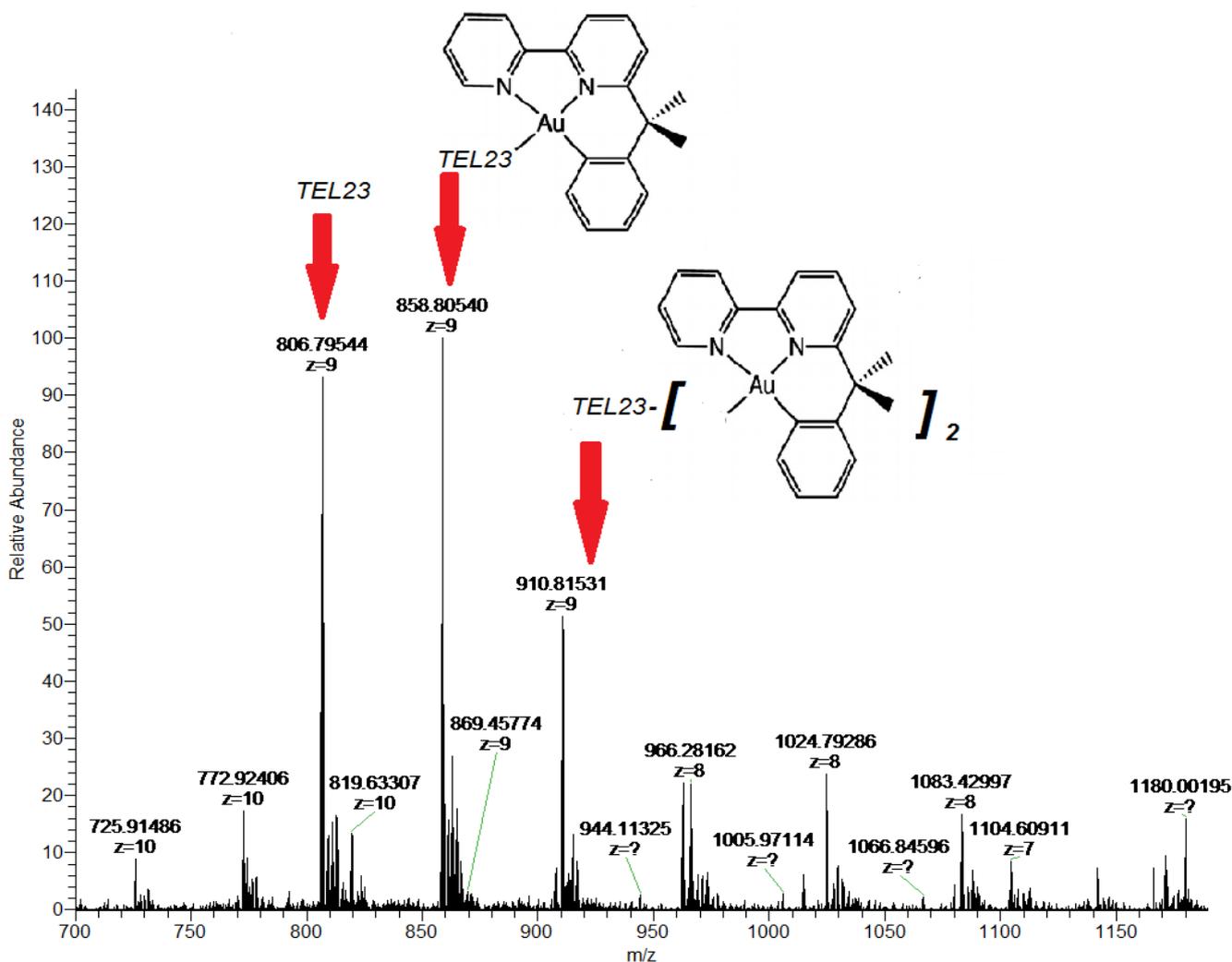


Fig.45: spettro di massa in alta risoluzione TEL23-Aubipyc (24 h)

Il complesso Aubipyc è l'unico ripetto ai complessi Aubipy-H[NH(CO)CH₃] e [Au₂(bipy-H₂)(μ-O)] ad avere un'affinità con il frammento telomerico TEL23; questo è stato dimostrato dall'analisi degli spettri di massa dai quali è possibile notare che nell'arco delle 24 h, il complesso ha formato degli addotti con il target biologico.

I tipi di addotti formati dal complesso con il target biologico sono i seguenti:

- TEL23-Aubipy (il target biologico si è legato al complesso, il quale ha perso il gruppo ossidrilico).
- TEL23-[Aubipy]₂ (il target biologico si è legato a due unità di complesso che hanno perso i gruppi ossidrilici).

4.4 Studi di Citotossicità in vitro

Per poter studiare le risposte cellulari ai farmaci in vitro, vengono impiegate colture cellulari ricavate da tessuti umani. Tali colture cellulari restano in vita grazie al mantenimento di

condizioni specifiche per ogni linea cellulare. La linea cellulare utilizzata in questo lavoro di tesi, per testare il grado di citotossicità dei metallo-complessi, è la linea di carcinoma del colon rettile HCT-116. Per effettuare la coltura di queste cellule si impiega un terreno di coltura liquido; Il terreno in questione è un RPM I 1640 senza glutammina; l' assenza di glutammina è dovuta al fatto che tale molecola si degrada durante periodi di conservazione prolungati del terreno, pertanto si preferisce aggiungerla in seguito; Il terreno in questione rappresenta solo una base che dovrà essere arricchita con la successiva aggiunta di FBS 10% in volume (siero fetale bovino); una volta coltivate le cellule, è di fondamentale importanza sostituire il terreno vecchio con un terreno nuovo in modo tale da eliminare i cataboliti. Dato che le cellule crescono formando un monostrato, una volta esaurito lo spazio a disposizione nella fiasca (contenitore del terreno), queste stratificano procedendo quindi verso la morte cellulare, indi per cui bisogna effettuare una procedura chiamata " Passaggio" che permette di trapiantare le cellule in nuove fiasche. Le linee cellulari hanno caratteristiche e quindi necessità di crescita diverse. Le HCT-116 utilizzate per gli esperimenti svolti in questo lavoro di tesi, vengono mantenute in incubazione a 37 C° - 5% CO₂.

Lo scopo di tale esperienza è stato quello di testare gli effetti sulla proliferazione delle cellule tumorali in esame da parte dei tre complessi di Au(III) in un range di concentrazione tra 0 e 20 µM.

Tale esperienza impiega un totale di 3 giorni. Il primo giorno si pongono le cellule in coltura nel multipozzetto da 96, poi si lasciano in incubazione; il secondo giorno si somministrano le dosi di farmaco in concentrazioni diverse nei pozzetti, poi vanno di nuovo in incubazione; dopo 48 ore avviene la procedura di conta di vitalità con trypan blue (Fig.45); questi è un colorante vitale derivato del toluene molto utilizzato nella conta di cellule in coltura nelle fasi di studio sperimentale in quanto ha la capacità di colorare le cellule morte di blu permettendone la distinzione da quelle vive.

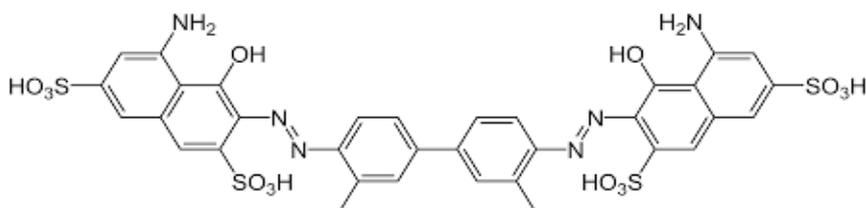


Fig.45: trypan blue

Tale procedura prevede le seguenti fasi:

- aspirazione del terreno;
- lavaggio delle cellule con 50 µL di PBS (tampone fosfato salino);
- distacco delle cellule con 50 µL di tripsina per pozzetto seguita da un incubazione per un tempo di circa 5 minuti;
- aggiunta di 10 µL di trypan blue e 10 µL di sospensione cellulare per la conta in camera di Burker (Fig.46) perché questo colorante vuole una diluizione 1:1;

- riempimento della camera di Burkler;
- conta cellulare;



Fig.46: camera di Burkler

Di seguito in tabella è riportata l' azione citotossica dei tre complessi nei confronti della linea cellulare HTC-116

<i>Complesso</i>	<i>Azione citotossica</i>	<i>IC50 (μM) HTC-116</i>
Aubipyc	inefficace	>20
AubipyH-[NH(CO)CH ₃]	inefficace	>20
[Au ₂ (bipy-H ₂)(μ -O)]	efficace	IC50=14,9±0,6

Il complesso [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)] è l' unico che ha dimostrato un' azione citotossica rilevante nel range tra 0 e 20 μM pertanto è stato determinato l' IC50 (concentrazione che inibisce il 50% della popolazione cellulare rispetto al controllo).

Di seguito è riportato un diagramma che illustra l' andamento della popolazione con la concentrazione di complesso somministrato. (K rappresenta l' IC50; R è la bontà del fitting).

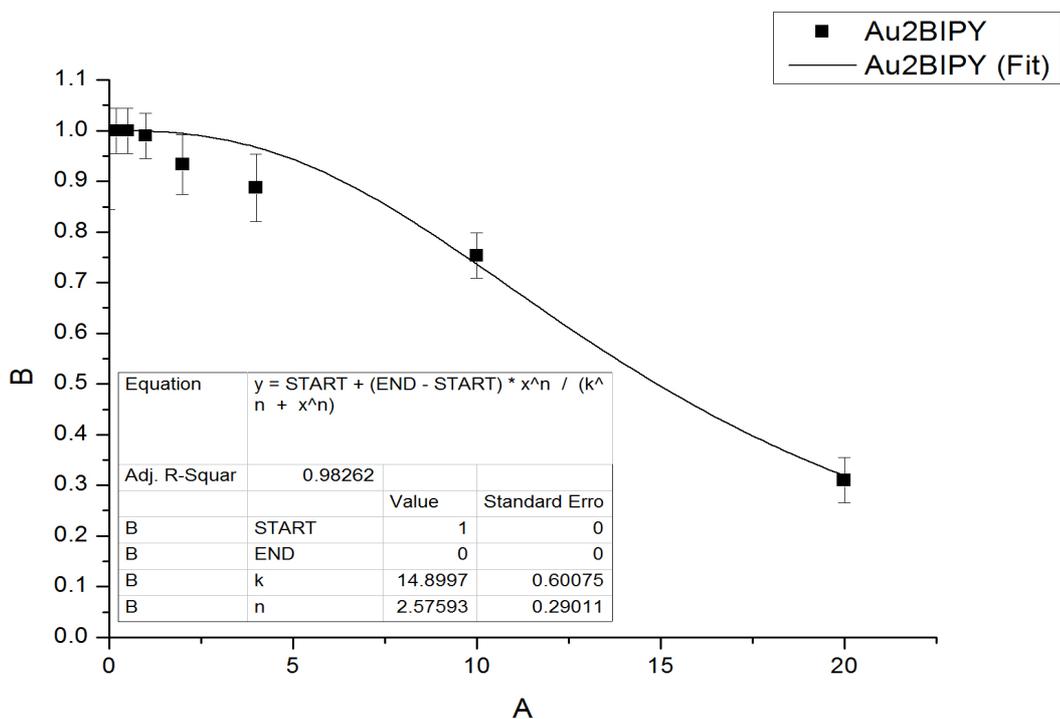


Fig.47: curva dose-risposta

Per accertare la presunta selettività del complesso $[Au_2(bipy-H_2)(\mu -O)]$ nei confronti delle cellule tumorali HTC-116, sono stati condotti degli studi con linee cellulari sane L-929 (fibroblasti murini). Di seguito in tabella è riportato l'IC50.

Complesso	Azione citotossica	IC50 L-929
$[Au_2(bipy-H_2)(\mu -O)]$	inefficace	< 50 μM

Il test condotto su queste linee cellulari sane ha dimostrato la non citotossicità del complesso $[Au_2(bipy-H_2)(\mu -O)]$ nei confronti delle cellule sane.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati studiati tre complessi di Au(III) ossia Aubipyc, Aubipy-H[NH(CO)CH₃] e $[Au_2(bipy-H_2)(\mu -O)]$ come potenziali farmaci antitumorali in soluzione e la loro interazione con target biologici: lisozima, citocromo c, ribonucleasi e un frammento telomerico (TEL23).

Attraverso prove di solubilità è stato dimostrato che i complessi Aubipyc e Aubipy-H[NH(CO)CH₃] sono solubili in acqua, invece il complesso $[Au_2(bipy-H_2)(\mu -O)]$ è insolubile in acqua ma solubile in DMSO.

Studi di stabilità effettuati tramite spettroscopia di assorbimento UV-vis hanno dimostrato la buona stabilità dei complessi Aubipyc e Aubipy-H[NH(CO)CH₃] in Acetato di ammonio e tampone fosfato nell' arco di 72 h; invece il complesso [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)] ha mostrato una maggiore stabilità in ammonio acetato rispetto al tampone fosfato.

Studi di stabilità effettuati tramite spettroscopia ¹H-NMR hanno dimostrato che i complessi Aubipyc e Aubipy-H[NH(CO)CH₃] in D₂O sono stabili nell'arco di 48 h.

Dalle analisi di spettrometria di massa condotte con le tre proteine modello si è potuto verificare che i complessi Aubipyc e Aubipy-H[NH(CO)CH₃] non formano addotti con ribonucleasi e citocromo ma si legano con il lisozima, con il quale sembrano pertanto avere un' affinità. Il complesso [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)] invece non si lega con il citocromo però forma addotti con lisozima e ribonucleasi.

In base a studi di citotossicità condotti in vitro su linee cellulari tumorali HCT-116 è stato dimostrato che i complessi Aubipyc e Aubipy-H[NH(CO)CH₃] non mostrano un'azione citotossica nei confronti della linea cellulare, citotossicità mostrata invece dal complesso [Au₂(bipy-H₂)(μ -O)].

Test di citotossicità *in vitro* condotto su linee cellulari sane L-929 ha dimostrato che il complesso non manifesta un' azione citotossica nei confronti delle cellule sane ed è pertanto selettivo per le cellule tumorali.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] F. Briganti, Laboratorio di preparazioni chimiche.

[2] K. B. Garbutcheon, S. P. grant, B. W. Harper, A. M. Krause, Heuer, M. Manohar, N. Orkey and Janice R. Aldrich -Wright, *Med . Chem*, 2011, 11 , 521-542.

[3] I. Bertini, C. Luchinat, F. Mani. *Chimica inorganica*. CEA. Sett. 2007.

[4] I. Bertini, C. Luchinat , F. Mani, *Chimica*. CEA. Sett. 2007.

[5] R. Rubbiani, S. Can, I. Kitanovic, H. Alborizinia, M. Stefanopoulou, M. Kokoschka, S. Monchenesang, W. S. Scheldrick, S. Wolf , I. Ott, *Med. Chem*. 2011, 54, 8646-8657.

[6] M. V. baker, P. J. Barnard , S. J. Berners-price, S. K. Brayshaw, J. L . Hickey, B. W. Skelton, A. H. White. *Journal of Organometallic Chemistry* 690 (2005) 5625-5635.

[7] Carotti, S. Guerri, A. Mazzei, T. Messori, L. Mini, E.Orioli, P. G. *Inorg. Chim. Acta* 1998, 281, 90-94.

[8] G. Marcon, S. Carotti, M. Coronello, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, T. Mazzei, M. A. Cinellu, G. Minghetti. *J. Med. Chem*. 2002, 45, 1672-1677.

[9] V. Kumar, A. K Abbas, N. fausto, J. C. Aster, *Patologia generale*.

[10] Y.Maida, K. Masutomi, *Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase*.

[11] D. S. Hage, J. D. Carr. *Chimica analitica e analisi quantitativa*.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare Il Prof. Luigi Messori per avermi accolto come tirocinante nel suo laboratorio di ricerca e per gli stimoli che mi ha saputo trasmettere nel corso di questi mesi di attività scientifica.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Lara Massai per la solerte e assidua assistenza nel corso dello svolgimento di questo lavoro di tesi e per le correzioni apportate ed i suggerimenti dati nel corso della attenta lettura di questa tesi. Ringrazio anche il Dott. Gianluca Bartoli per la sua disponibilità e per avermi fatto svolgere una parte di questo progetto al dipartimento di patologia.

Desidero ringraziare mia Madre per i suoi sacrifici, senza i quali non avrei potuto intraprendere questo percorso di studi; infine ringrazio tutti coloro che hanno contribuito anche con un suggerimento a rendere possibile il raggiungimento di questo traguardo.