



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum scienze chimiche

**Complessi a base di oro come  
potenziali agenti antitumorali:  
studi di interazione con  
proteine modello.**

**Gold-based complexes as  
potential anticancer agents:  
studies of interaction with  
model proteins.**

**Relatore**  
Luigi Messori

**Correlatore**  
Mirko Severi

**Candidato**  
Lorenzo Giusti

# Indice

<b>1.Introduzione</b> .....	3
1.1 Composti inorganici come farmaci .....	3
1.2 Il caso del cisplatino .....	4
1.3 Complessi di Ru, Ti ed Au come alternative al cisplatino.....	6
1.3.1 complessi del Rutenio .....	6
1.3.2 I complessi del titanio.....	9
1.3.3 I complessi dell'oro .....	10
1.4 Step farmacologici.....	18
<b>2.Scopo</b> .....	19
<b>3.Materiali e metodi</b> .....	25
3.1 Materiali .....	25
3.2 Metodi .....	27
3.2.1 Spettrofotometria UV-visibile .....	27
3.2.2 Spettrometria di massa .....	30
3.2.3 Spettroscopia di emissione atomica ICP-OES .....	33
<b>4.Procedura sperimentale</b> .....	37
<b>5.Risultati e discussione</b> .....	42
5.1 Spettri di assorbimento UV-vis .....	42
5.2 Spettri di massa in alta risoluzione.....	45
5.2.1 Soluzioni contenenti Au <sub>2</sub> phen .....	46
5.2.2 Soluzioni contenenti Auoxo6 .....	51
5.2.3 Soluzioni contenenti Auranofin .....	56
5.3 Risultati spettroscopia ICP-OES .....	61
5.4 Conclusioni.....	63
<b>6.Bibliografia</b> .....	66

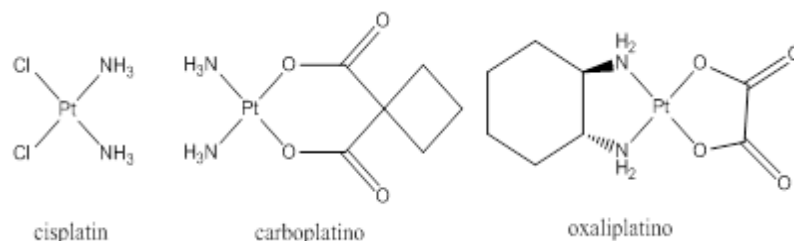
## 1.Introduzione

### 1.1 Composti inorganici come farmaci

L'utilizzo di composti a base di metalli in ambito medico risale al XVI secolo, periodo a cui fanno riferimento documenti che testimoniano il ricorso a tali mezzi per il trattamento di casi di cancro<sup>1</sup>.

Oggi il range di utilizzo di molecole contenenti atomi metallici si è notevolmente espanso, tra le varie applicazioni terapeutiche è possibile menzionare l'utilizzo di composti a base di argento come antimicrobici, l'utilizzo di farmaci a base di oro per combattere l'artrite e il ruolo assunto dal platino nello sviluppo di farmaci antitumorali.

In particolare il successo ottenuto dallo sviluppo di complessi a base di platino attivi nel trattamento di particolari tipi di tumore solido tra cui i tumori testicolari, dell'ovaio, della testa, del collo e della vescica<sup>2,3</sup> ha fornito un notevole impulso alla ricerca nel campo dello sviluppo di complessi metallici come antitumorali. L'interesse verso questo tipo di composti nasce intorno agli anni '60 a seguito della scoperta del cisplatino (CDDP) e dei suoi effetti nocivi prodotti sul processo di scissione cellulare ad opera di Rosenberg<sup>1</sup>. Da quel momento sono stati sintetizzati numerosi complessi vincolati all'attività dello ione  $Pt^{2+}$  ma solo in pochi sono riusciti a soddisfare i requisiti di chemiotossicità, selettività e potenza richiesti per essere etichettati come agenti chemioterapici, tra questi menzioniamo il carboplatino e l'oxaliplatino aventi spettro di azione analogo al cisplatino ma una minore tossicità.

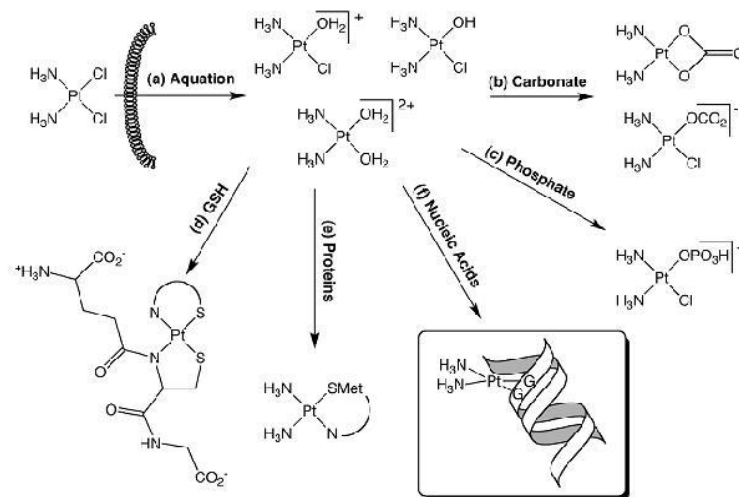


**Fig. 1.1** Formula di struttura di complessi a base di platino con proprietà anti-tumorali.

## 1.2 Il caso del cisplatino

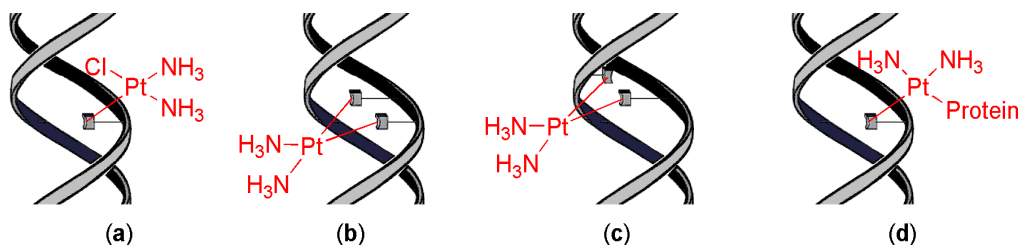
Uno dei complessi che ha avuto ed ha più largo utilizzo come mezzo chemioterapico è sicuramente il cisplatino, complesso del platino II ( $d^8$ ) avente coordinazione quadrato planare con 2 leganti Cl e 2 leganti  $NH_3$ , il quale, in particolare, ha trovato largo utilizzo nel trattamento del cancro ai testicoli<sup>4</sup>. La peculiarità di questo complesso risiede nella tendenza mostrata dai leganti Cl a essere sostituiti da molecole di acqua: all'interno del sistema circolatorio questa sostituzione viene limitata dall'elevata concentrazione di ioni cloruro, garantendo così l'integrità del complesso fino all'arrivo all'interno della cellula, dove la reazione di "attivazione" della molecola è dunque permessa; in tal modo il farmaco può interagire con il DNA ed esplicare il proprio effetto farmacologico. Ciononostante è stato dimostrato che parte del complesso somministrato viene a legarsi con l'albumina (proteina avente funzioni di trasporto di acidi grassi e di ormoni all'interno del corpo umano la quale si trova in grandi quantità nel sistema circolatorio), diminuendo l'efficacia del farmaco e producendo effetti collaterali. Gli effetti collaterali sono principalmente dovuti al fatto che il CDDP non è selettivo, ma colpisce oltre le cellule cancerose, anche quelle che si riproducono, rapidamente, come quelle presenti nei reni o nei bulbi piliferi<sup>3</sup>.

L'azione del cisplatino si manifesta una volta penetrato all'interno della membrana delle cellule tumorali attraverso processi di diffusione passiva, ovvero favorita da un gradiente di concentrazione, e di diffusione attiva attraverso appositi trasportatori di membrana<sup>5,6</sup>. La bassa concentrazione di  $Cl^-$  (circa 4-20mM) nel citoplasma permette la sostituzione degli ioni cloruro con molecole d'acqua le quali rendono il farmaco attivo ed incapace di fuoriuscire dalla cellula<sup>7</sup>. La forma attiva del cisplatino è rappresentata dalla formula  $[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$ , a questa si affiancano vari sottoprodotti ottenuti dalla sostituzione con leganti solfati e fosfati o da una ulteriore molecola di acqua.



**Fig. 1.2** Rappresentazione schematica della reattività del cisplatino all'interno del citoplasma.

La citotossicità del complesso è prevalentemente dovuta alla capacità dello ione metallico di coordinarsi agli atomi di azoto contenuti negli anelli imidazolici dei residui di guanina in più modi: l'addotto formato con maggiore frequenza presenta una coordinazione del metallo con 2 residui di guanina consecutivi su di un filamento definita "intrastrand cross-link", altre forme di coordinazione prevedono l'interazione del metallo con 2 residui di guanina di filamenti opposti ("interstrand cross-link") o la formazione di un legame tra lo ione Pt (II) ed un solo residuo di guanina. A volte è possibile individuare addotti complesso-proteina mono-funzionalizzati ad un singolo residuo di guanina.



**Fig. 1.3** Rappresentazione dei possibili siti di binding del complesso lungo la struttura del DNA.

I legami formati producono notevoli variazioni nella struttura del DNA rendendone impossibile la trascrizione e duplicazione<sup>6,8,9</sup>.

I problemi di questo trattamento, oltre agli effetti collaterali causati, sono rappresentati da forme di resistenza sviluppate dalle cellule tumorali, che si esplicano attraverso una minore tendenza ad assimilare il complesso ed attraverso la capacità di riconoscimento ed espulsione del componente.

### **1.3 Complessi di Ru, Ti ed Au come alternative al cisplatino**

Se da una parte l'esperienza ottenuta dallo studio dei farmaci antitumorali a base di platino evidenziò come i complessi metallici possano, in maniera relativamente semplice, portare all'apoptosi delle cellule cancerose, dall'altra mise in luce la necessità di sviluppare e testare nuovi tipi di composti di coordinazione per limitare gli effetti nocivi e sintetizzare farmaci più specifici per i vari casi di patologie neoplastiche.

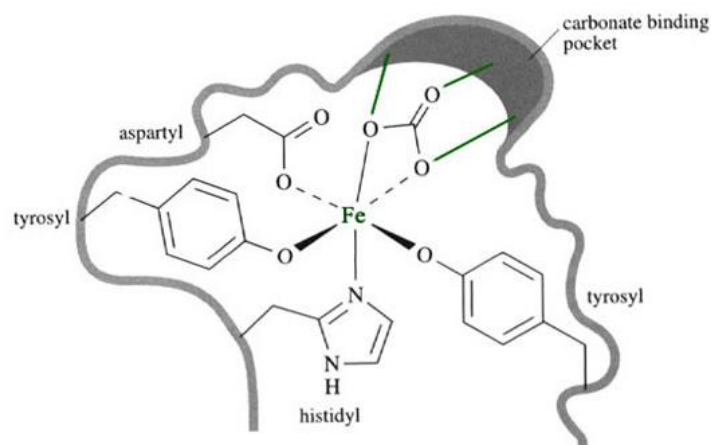
Inizialmente la ricerca fu espansa ai soli complessi del platino, modificati usando una ampia tipologia di leganti e variando il numero di atomi del metallo presenti in una molecola di complesso<sup>10,11</sup>. A partire dagli anni '80 molti gruppi di ricerca decisero di sviluppare e testare complessi contenenti nuovi ioni metallici a causa dell'elevata tossicità (in particolare per i reni) posseduta dal platino<sup>12</sup>.

#### **1.3.1 complessi del Rutenio**

I complessi del rutenio oltre ad essere studiati e sviluppati come agenti antimicrobici<sup>13</sup>, immunosoppressori<sup>14</sup> o agenti antimalarici<sup>15</sup> hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica per le potenzialità possedute come agenti anticancerogeni<sup>16</sup>. Questi pur essendo in grado di legarsi a filamenti di DNA ed a specifiche proteine, mostrano un minor grado di tossicità per l'organismo. Il rutenio presenta due possibili stati ossidativi in soluzione

acquosa: Ru (II) ,avente configurazione elettronica  $d^6$  basso spin, e Ru (III) caratterizzato da uno stato  $d^5$  paramagnetico; le 2 configurazioni descritte oltre a permettere ai complessi di Ru di partecipare a reazioni di ossido-riduzione con componenti biologiche ne vincolano la geometria coordinativa ad una struttura di tipo ottaedrico. La possibilità di sfruttare le proprietà di entrambe le specie ha portato allo sviluppo di complessi che contengono rutenio (III) in qualità di profarmaci, in grado cioè di raggiungere la forma attiva sfruttando il potenziale di riduzione caratteristico dei tessuti tumorali. Questi, grazie alla minore quantità di ossigeno ed alla maggiore acidità, rappresentano l'ambiente di reazione ideale per ottenere la riduzione a Ru(II) (stato ossidativo in cui si manifesta l'attività farmacologica del composto di coordinazione).

Il trasporto dei complessi attraverso il sistema circolatorio è operato in larga parte dalla transferrina, glicoproteina addetta al trasporto di Fe(III) nel sangue. La somiglianza esistente tra ioni del ferro e del rutenio trivalente rende incapace la transferrina di operare una distinzione tra i 2metalli, quest'ultima infatti sfruttando i 2 siti di legame contenenti 2 gruppi fenolici (forniti da residui di tirosina), un residuo di istidina ed uno di aspartato mostra un elevato grado di affinità sia verso il ferro che verso il rutenio.



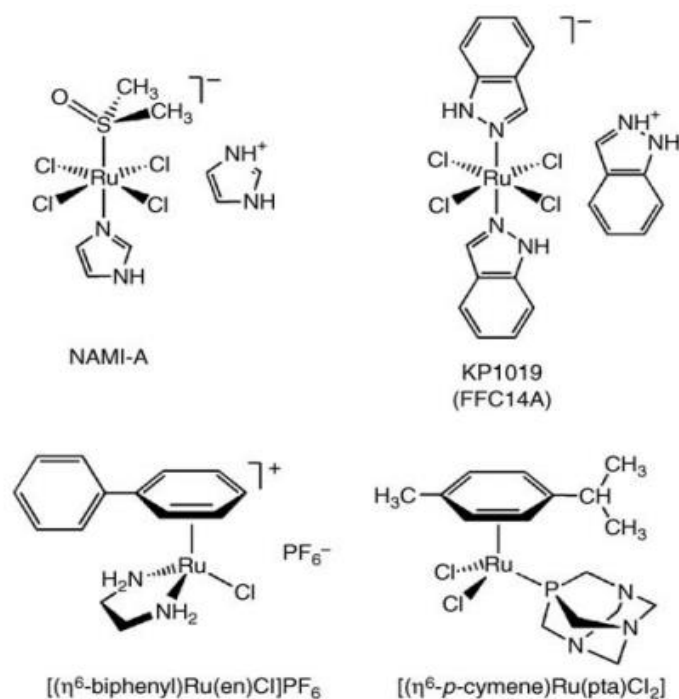
**Fig. 1.4** Sito di coordinazione del metallo all'interno della transferrina.

La maggiore diffusione di questi composti all'interno di cellule tumorali è dovuta alla presenza di un numero più elevato di recettori per la transferrina

sulla loro membrana (le componenti neoplastiche, crescendo più rapidamente e in maniera incontrollata necessitano di un maggior apporto di ferro).

Alcuni tra i più importanti composti di coordinazione del rutenio testati come antitumorali sono etichettati come NAMI (New Anti-tumour Metastasis Inhibitor). I leganti più frequentemente utilizzati in questo tipo di complessi sono il gruppo cloruro, l'ammoniaca, il dimetilsolfossido ed una ampia gamma di eterocicli.

Alcuni dei complessi del rutenio che hanno mostrato attività più intensa sono il NAMI-A, il KP1019, il  $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$  ed il  $[(\eta^6\text{-benzene})\text{Ru}(\text{pta})\text{Cl}_2]$ : i primi 2 rappresentano composti del rutenio trivalente in quali sono già sottoposti a test clinici mentre gli ultimi sono considerati molecole appartenenti ad una nuova classe di areni con interessanti proprietà antitumorali.



**Fig. 1.5** Formule di strutture di complessi del rutenio studiati come agenti anti-tumorali.

Per quanto riguarda il NAMI-A, le ricerche cliniche hanno dimostrato un' elevata reattività del complesso all'interno del sistema circolatorio imputabile a reazioni di riduzione del centro metallico con l'acido ascorbico e alla

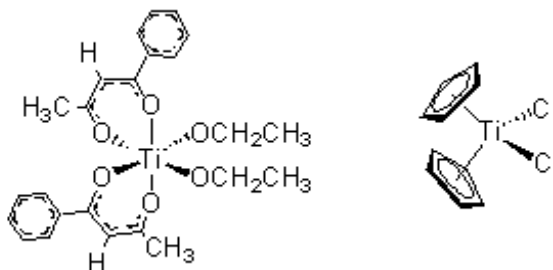


formazione di interazioni con l'albumina e la transferrina. Ulteriori ricerche hanno evidenziato una scarsa attitudine del composto a instaurare legami stabili con i filamenti del DNA, ciò presuppone un meccanismo di azione basato su target di origine proteica.

Il KP1019 ha mostrato particolare efficacia nei confronti delle linee cellulari SW480 e HT29, le quali hanno mostrato disfunzioni mitocondriali in seguito all'esposizione al complesso.

### 1.3.2 I complessi del titanio

I complessi del titanio hanno dimostrato di possedere una ampia tipologia di proprietà antitumorali pur presentando un meccanismo di azione che si differenzia da quello del cisplatino. Attualmente sono oggetto di studi clinici i complessi del budotitanio e del titanocene, questi si sono rivelati particolarmente efficaci nei confronti del carcinoma dell'intestino e del seno<sup>17,18</sup>.



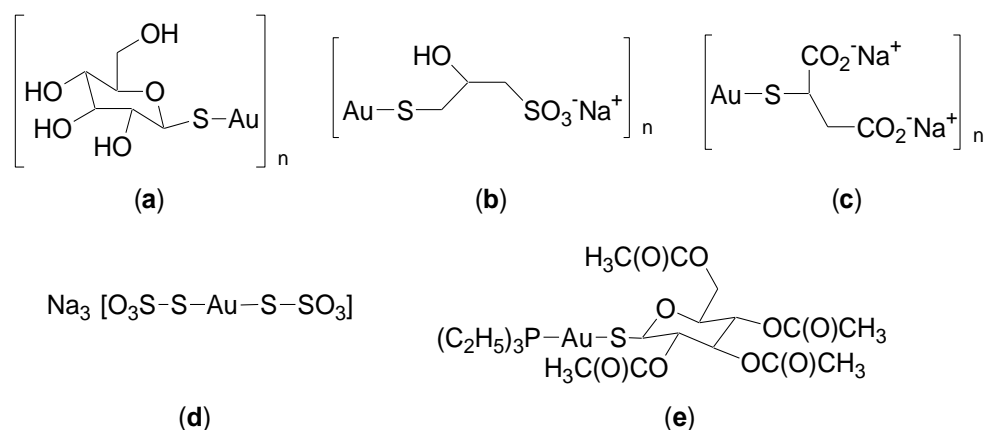
**Fig. 1.6** Formula di struttura del budotitanio (a sinistra) e del titanocene (a destra).

In particolare il budotitanio rappresenta il primo complesso non basato sul platino a essere sottoposto a test clinici i quali hanno dimostrato un limite di dosaggio più elevato rispetto ai composti di coordinazione del platino. A questo risultato si contrappone la necessità di un trattamento cronico per ottenere gli effetti desiderati, ciononostante alcune ricerche<sup>19,20</sup> hanno dimostrato come l'utilizzo combinato di questo tipo di molecole e di altri farmaci antitumorali rappresenta una potenziale area di ricerca.

Gli studi delle interazioni cui è soggetto il titanocene all'interno del citoplasma sono state effettuate sfruttando anche il microscopio a trasmissione elettronica, l'utilizzo di questo strumento ha permesso di individuare accumulo di titanio nei nuclei di cellule tumorali umane impiantate sotto la cute di topi. Ulteriori studi hanno determinato che l'instaurarsi dei legami complesso-DNA avviene molto più rapidamente rispetto al cisplatino e che in condizioni di saturazione il DNA può arrivare a contenere uno ione titanio ogni quattro paia di basi. Rimane invece da determinare il sito di coordinazione del titanio sulla sequenza nucleotidica, la natura di ione hard dello ione  $Ti^{4+}$  rende ipotizzabile che i leganti appartenenti alla struttura biologica siano gli atomi di ossigeno presenti nei gruppi fosfato che intervallano i nucleosidi.

### 1.3.3 I complessi dell'oro

L'utilizzo di composti a base di oro come farmaci risale all'inizio del XX secolo, periodo nel quale la "crisoterapia" (dal greco criso=oro) fu espansa ed approfondita a seguito dei risultati positivi mostrati dai trattamenti contro l'artrite reumatoide con composti tiolati dell'oro. Questi composti necessitavano di una somministrazione via sottocutanea, ambiente in cui l'idrofilicità dei leganti forniva una stabilità sufficiente a controllare il dosaggio del farmaco basato sull'attività dello ione metallico<sup>21</sup>.



**Fig. 1.7** Rappresentazione di alcuni complessi dell'oro (I) utilizzati nel trattamento dell'artrite reumatoide: aurotioglucosio (solganol) (a), aurotiopropanol solfonato

(allocrysin) (b), aurotiomalato (myochrysin) (c), auro-bistiosolfato (sanochrysin) (d) e auranofin (ridaura) (e).

Da questo tipo di composti si sono sviluppati farmaci attualmente utilizzati in clinica come l'Auranofin (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -d-glucopyranosato-*S*-triethylphosphine gold(I)), composto che può essere definito come una evoluzione dei precedenti complessi dell' Au(I) grazie alla possibilità di essere somministrato per via orale.

Le proprietà immunosoppressive ed antinfiammatorie dei composti dell'oro<sup>22</sup> hanno indotto durante gli anni'80 molti gruppi di ricerca a studiarne gli effetti all'interno di sistemi biologici afflitti da patologie neoplastiche così come da tempo era fatto per i complessi del platino. Le motivazioni che hanno giustificato la scelta dell'oro come ione coordinante in complessi potenzialmente utilizzabili come anti-tumorali risiedono anche nelle proprietà elettroniche mostrate dall'Au(III). Questo presenta una configurazione elettronica analoga a quella del Pt(II), la quale è in grado di assicurare una coordinazione di tipo quadrato planare confrontabile con quella del cisplatino. Ciononostante la ricerca fu inizialmente ostacolata dalla instabilità mostrata dai complessi dell'Au(III), i quali presentavano elevata fotosensibilità e alta tendenza a ridursi a oro metallico in ambienti riducenti come quelli degli organismi mammiferi .

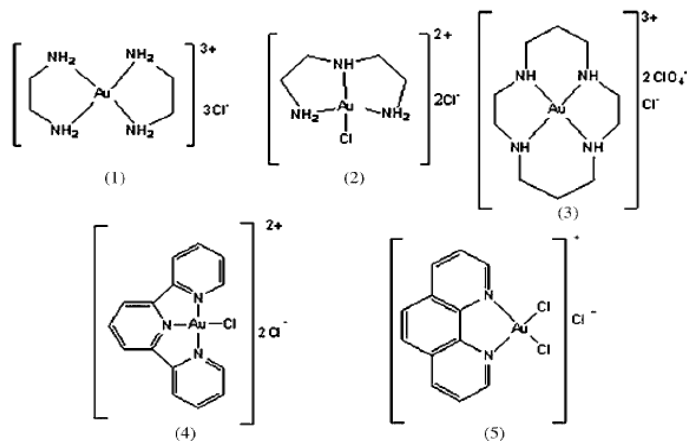
#### *Au(I)*

Negli anni '80 fu approfondita l'analisi degli effetti dell'Au(I) su cellule *in vitro*; come già detto le analogie tra gli effetti prodotti da farmaci antitumorali come la 6-mercaptopurina e agenti antiartritici, favorirono lo sviluppo di questo settore di ricerca. Uno dei primi farmaci antiartritici ad essere testati come potenziali farmaci anticancro fu Auranofin (Lorber, 1979). Fu rilevato che questo composto era in grado di inibire la crescita di cellule tumorali coltivate *in vitro* e che aveva la capacità, sebbene limitata, di arrestare la crescita di un tumore modello (leucemia P388) nel topo<sup>23</sup>.

Mirabelli e collaboratori (1985-'86), partendo da Auranofin e cambiando sistematicamente la fosfina, il legante allo zolfo o entrambi i leganti, ottennero 62 complessi di Au(I) che vennero testati sia *in vitro*, contro il melanoma B16 e la leucemia P388, che *in vivo* contro la leucemia P388 intraperitoneale del topo. I primi studi meccanicistici mostrarono che sia Auranofin che  $\text{Et}_3\text{PAuCl}$  alteravano la funzione mitocondriale: successivamente questi risultati vennero reinterpretati come l'induzione di meccanismi apoptotici mitocondriali. I primi studi sui complessi di Au(I) indicarono che i leganti fosfinici erano un requisito necessario per l'attività antitumorale e che la presenza di proteine seriche limitava la citotossicità verso cellule tumorali in vivo a causa dell'elevata reattività dei complessi lineari dell'Au(I) con i tioli delle proteine. Il meccanismo di citotossicità di auranofin e di una vasta gamma di altri composti di Au(I) con leganti fosfina (sia monodentata che bidentata), NHC, e fosfoli è stato collegato all'inibizione della tioredoxina riduttasi attraverso l'interazione del centro Au(I) con il residuo di selenocisteina.

### *Au(III)*

Nel successivo decennio la ricerca in questo settore ricevette un notevole impulso a seguito dello sviluppo di nuove tipologie di leganti per lo ione Au(III) le quali assicuravano maggiore stabilità, minore citotossicità e generalmente migliori proprietà farmacologiche *in vitro*. Alcuni dei composti con una minore labilità cinetica sviluppati in quel periodo sono:  $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ ,  $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$ ,  $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  e  $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  come si può notare la maggiore stabilità è attribuibile all'utilizzo di leganti polidentati o macrociclici.



**Fig. 1.8** Rappresentazione delle formule di struttura di  $[\text{Au}(\text{en}_2)]\text{Cl}_3$  (1),  $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (2),  $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$  (3),  $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (4) e del  $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  (5).

I composti dell'oro trivalente che hanno mostrato proprietà antitumorali e sufficiente stabilità possono essere raggruppati nelle seguenti classi<sup>24</sup>:

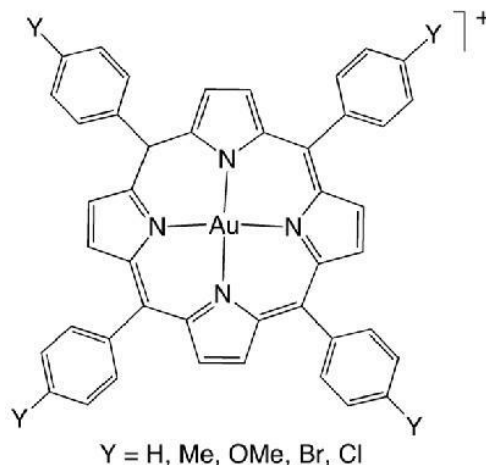
1) complessi mononucleari di Au(III).

Sono strutture quadrato-planari in cui lo ione centrale è legato a donatori Cl (destinato a subire reazioni di sostituzione ad opera dell'acqua una volta inserito in ambienti biologici) e azoti raggruppati in leganti polidentati contenenti più gruppi amminici in modo da abbassare il potenziale di riduzione del centro metallico.

Altri interessanti complessi appartenenti a questa categoria sono i composti di coordinazione contenenti leganti ditiocarbammato i quali presentano una maggiore citotossicità del cisplatino ed una maggiore velocità di azione anche nei confronti di linee cellulari resistenti a quest'ultimo.

2) complessi Au(III)-porfirine.

Una vasta serie di complessi di Au(III) con leganti porfirinici è stata riportata da Che e collaboratori nel 2003. I complessi, molto stabili alla riduzione, mostrano potenti proprietà antitumorali *in vitro* verso una varietà di linee cellulari tumorali umane con moderata selettività per le cellule tumorali rispetto a quelle sane.

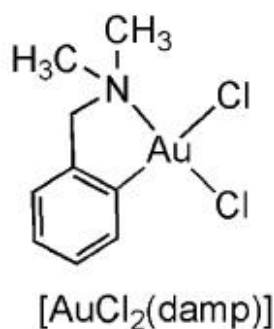


**Fig. 1.9** Formula di struttura di un generico complesso di oro con legante porfirinico.

Il composto prototipo (Y = H), studiato in modo più esteso, mostra promettenti attività *in vivo* verso il carcinoma epatocellulare e nasofaringeo. Il legante porfirinico stabilizza in modo marcato lo ione Au(III) nei confronti della riduzione, così che non viene ridotto dai riducenti biologici come il GSH e l'acido ascorbico. È stato proposto che il composto interagisca con bersagli biomolecolari mediante interazioni non covalenti in quanto non si ha riduzione dell'attività in presenza di siero fetale bovino. L'attività biologica delle Au(III)-porfirine deve essere attribuita alla molecola intatta. È stato ipotizzato che il target primario per le Au(III)-porfirine sia il DNA in seguito ad intercalazione; tuttavia, studi recenti rivelano che le Au(III)-porfirine possono influire notevolmente sulle funzioni mitocondriali.

### 3) Composti organometallici di Au(III)

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 una scarsa propensione ad essere ridotti ad Au(I). Significativamente citotossici per linee cellulari tumorali umane. [AuCl<sub>2</sub>(damp)] è stato studiato come analogo del cisplatino, in cui lo stato di ossidazione Au(III) è stabilizzato dalla coordinazione del gruppo arile  $\sigma$ -legato in un anello chelato a cinque membri.

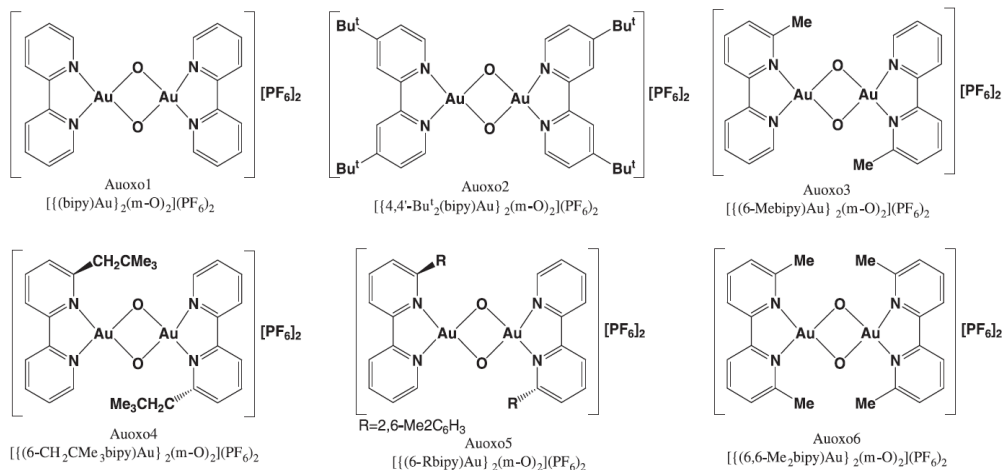


**Fig. 1.10** Struttura del complesso  $[\text{AuCl}_2(\text{damp})]$ .

Tale complesso ha dimostrato tossicità differenziale in un pannello di linee cellulari tumorali umane i cui derivati con acetato e malonato sono risultati moderatamente attivi *in vivo* contro carcinomi umani xenotrapianti.

#### 4) complessi dinucleari di Au(III)

Questi composti hanno recentemente mostrato stabilità apprezzabile sotto condizioni simil-fisiologiche e manifestato importanti effetti antiproliferativi verso linee cellulari tumorali umane. Contengono un motivo strutturale comune, consistente in un  $\text{Au}_2\text{O}_2$  "diamond core" collegato a due ligandi biperidinici in una disposizione approssimativamente planare.



**Fig. 1.11** Rappresentazioni della struttura e di vari complessi dinucleari dell'oro.

Tra i complessi raffigurati in figura il derivato 6,6'-dimetil-2,2'-biperidinio è quello che ha mostrato maggior potere ossidante, la minor stabilità termica e la maggior citotossicità. La correlazione tra potenziale redox e citotossicità è un interessante dato

in grado di fornire indizi sul meccanismo di azione dei composti di coordinazione dell'oro.

Vari composti antitumorali di Au(III) hanno dimostrato di superare la resistenza al cisplatino e ad altri farmaci antitumorali e di causare la morte cellulare per apoptosi tramite processi DNA-indipendenti.

Inizialmente fu ipotizzato che i complessi dell'oro agissero in maniera analoga ai composti del platino: la verifica è stata effettuata esponendo direttamente a vari tipi di ditiocarbammati dell'oro il DNA purificato estratto da esemplari di vitello. I risultati della ricerca hanno evidenziato che l'interazione tra le 2 componenti si esplica nella rapida formazione di un numero elevato di "interstrand cross-links" di natura elettrostatica i quali vanno a inficiare i meccanismi di traduzione del corredo genetico delle cellule malate portandole all'apoptosi<sup>25</sup>.

Ciononostante i successivi studi in vitro dimostrarono che le interazioni Au-DNA fossero troppo deboli per spiegare la morte programmata delle cellule, ciò ha indotto a pensare che la sequenza di nucleotidi non rappresenta l'unico target di questi composti.

La reattività dei composti di coordinazione dell'oro nei sistemi biologici è fortemente influenzata dalla particolare affinità che lo ione Au(I) mostra verso leganti tiolici che possono essere presenti nei residui di cisteina degli enzimi presenti nell'organismo. Due proteine che risentono della presenza di oro sono l'albumina serica e la tioredossina reduttasi (TrxR). La prima rappresenta la proteina plasmatica più presente nell'uomo, questa è in grado di trasportare il 90% dell'oro extracellulare grazie all'elevata presenza di tioli nella sua struttura (la struttura primaria include 35 residui di cisteina). La tioredossina reduttasi è una proteina facente parte del sistema tioredossinico cellulare, quest'ultimo, insieme al sistema del glutatione, si occupa della regolazione redox all'interno della cellula. La TrxR è responsabile, insieme ad altri enzimi, di importanti funzioni cellulari come la riduzione di ribonucleotidi per la sintesi del DNA e la dismutazione effettuata nei confronti dei ROS.



L'espressione dei livelli della forma citosolica del Trx è usato come indicatore dell'aggressività di vari tipi di carcinoma<sup>26</sup> in quanto un'alta concentrazione di questi componenti rappresenta una forma di inibizione del processo di apoptosi. L'azione dei complessi dell'oro su questo tipo di molecola si manifesta attraverso la reazione con i gruppi tiolici e selenici presenti nella struttura della proteina; è stato dimostrato che questo meccanismo permette a composti dell'oro(I) di provocare il danneggiamento e la morte di linee cellulari di carcinoma ovarico (che si erano mostrate resistenti all'esposizione al cisplatino) a causa dell'alterazione degli equilibri redox provocati dall'inibizione della tioredossina<sup>27</sup>. Stesso effetto è stato prodotto dall'esposizione a complessi dell'oro trivalente: si suppone che l'interazione con la proteina avvenga nella porzione contenente selenio del terminale carbossilico dell'enzima<sup>28</sup>.

I meccanismi di azione precedentemente descritti permettono di definire tre classi principali di composti di oro, secondo la loro modalità di azione con bersagli biologici:

- Composti di Au come profarmaci in grado di coordinarsi strettamente, dopo l'attivazione, alle catene laterali di biomolecole, es. tioli, imidazoli, e selenoli. Questo comportamento implica un meccanismo di metallazione simile a quello dei composti di platino.
- Complessi di Au come grandi cationi in grado di attraversare le membrane e di legarsi non covalentemente a biomolecole (proteine, enzimi, DNA).
- Composti di Au che reagiscono con biomolecole principalmente attraverso la chimica redox provocando danno ossidativo come ad esempio Auoxo6.

La descrizione delle interazioni con le componenti esonucleari rappresenta un passo cruciale nella determinazione del meccanismo di azione dei complessi dell'oro (III) in quanto vi è una alta probabilità che l'ingresso nel nucleo cellulare avvenga nella forma ridotta, meno adatta a provocare danni attraverso l'interazione col DNA.

## 1.4 Test farmacologici

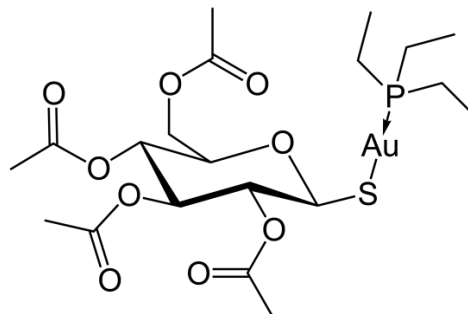
L'analisi degli effetti citotossici di composti metallici include un'ampia tipologia di metodi i quali possono essere raggruppati in vari stadi di sperimentazione che terminano, solo in pochissimi casi, nell'approvazione come farmaco. I test a cui viene sottoposto un potenziale farmaco possono essere identificati in:

- test *in vitro*. Comprendono varie tipologie di approcci come l'esposizione al composto analizzato di proteine, DNA o molecole biologiche in genere tutte estratte dal sistema di appartenenza e purificate. Sono analisi sfruttate per capire il meccanismo di azione di una molecola una volta accertata la tossicità verso una particolare linea di cellule tumorali.
- test *in vivo*. Rappresentano un modo per verificare le proprietà antitumorali di un composto inserito però in un contesto biologico più complesso. Solitamente ciò richiede il controllo della proliferazione di particolari tipologie di cellule tumorali umane inizialmente implementate sotto la cute di cavie animali sui quali vengono registrati gli effetti.
- trials clinici. Sono un insieme di verifiche che richiedono periodi anche molto lunghi ed ingenti spese di gestione, perciò vengono sottoposti a questo tipo di sperimentazione solamente un numero esiguo di complessi che hanno mostrato efficacia molto elevata.

## 2.Scopo

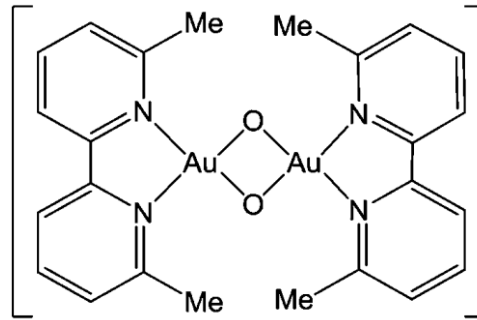
Il lavoro di tesi portato avanti presso il dipartimento di chimica dell'Università di Firenze all'interno del gruppo di ricerca del Prof. Luigi Messori mira a determinare l'efficacia che 3 complessi dell'oro mostrano nell'interagire con proteine cellulari modello che svolgono ruoli chiave nei meccanismi di regolazione dell'attività metabolica della cellula. I complessi selezionati sono i seguenti:

- Auranofin: si tratta di un complesso che come spesso succede per i composti dell'Au(I) presenta una geometria coordinativa lineare in cui lo ione metallico è legato ad un gruppo tetraacetiltioglicosidico e ad una trietilfosfina. La presenza del legante trietilfosfinico permette a questa molecola di incrementare la solubilità in ambienti apolari come quello intestinale (è infatti somministrabile per via orale) garantendo così un rilascio del composto nel flusso sanguigno più graduale ed una minore tossicità per i reni, come già descritto nell'introduzione. Questo complesso contenente l'oro nella sua forma monovalente rappresenta un farmaco già commercializzato contro l'artrite reumatoide sono quindi già disponibili numerosi dati clinici e la sua interazione con l'albumina serica<sup>29</sup>.



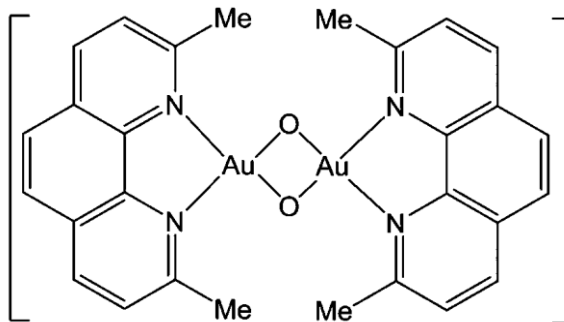
**Fig. 2.1** Formula di struttura di Auranofin.

- Auoxo6: è complesso binucleare contenente due ioni Au (III) che formano una struttura a diamante con due ossigeni a ponte. La coordinazione dei metalli è completata da un legante bipyridilico contenente due atomi di azoto donatori i quali riescono a conferire adeguata stabilità elettrochimica agli ioni dell'oro.



**Fig. 2.2** Formula di struttura di Auoxo6.

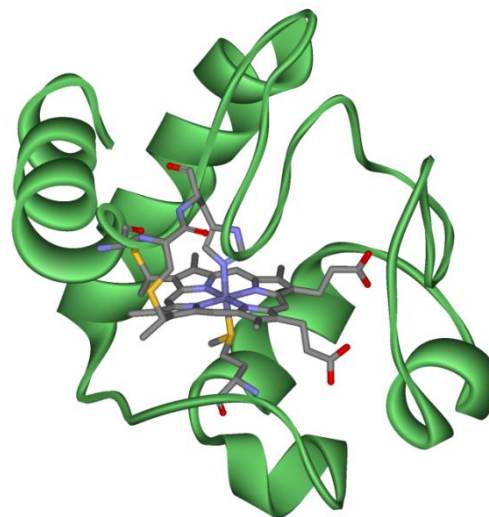
- Au<sub>2</sub>phen: è un complesso simile al precedente nel quale i leganti bipyridilici sono sostituiti con la 2,9-dimetilfenantrolina. Analizzato ai raggi X questo complesso mostra un coordinazione quadrato planare con una lieve distorsione piramidale.



**Fig. 2.3** Formula di struttura di Au<sub>2</sub>phen.

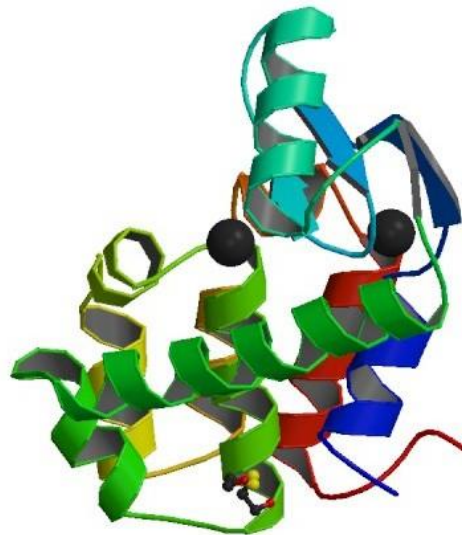
Le proteine prese come modello di interazione sono:

- Citocromo C (cyt C): è una piccola emoproteina di 12,4 kDa libera di diffondere nello spazio intermembrana, tra la membrana interna ed esterna dei mitocondri. È in grado di catalizzare diverse reazioni tra le quali l'idrossilazione e l'ossidazione aromatica, inoltre 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  $\text{Ca}^{2+}$ , i quali sono responsabili dell'innesco di un meccanismo a feedback che porta all'apoptosi. Questa proteina possiede alcune caratteristiche che la rendono particolarmente adatta per gli studi di interazione con metallo-farmaci, 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 ed una intensa colorazione rosso-arancio.



**Fig. 2.4** Rappresentazione della struttura del citocromo C.

- Lisozima: è un enzima di circa 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. Data la sua massa ridotta e l'abbondanza di numerosi siti carichi positivamente su di essa, il lisozima, come il citocromo c si presenta molto adatta per analisi di tipo 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.



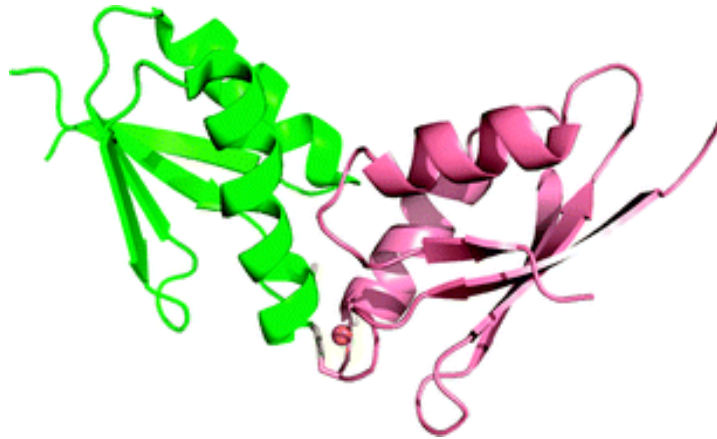
**Fig. 2.5** Rappresentazione della struttura del lisozima.

- Ribonucleasi (RNasi): rappresentano un'ampia tipologie di nucleasi che hanno la funzione di catalizzatori della reazione di idrolisi dell'RNA. Sono importanti regolatori della sintesi di proteine in quanto sono in grado di degradare i filamenti di m-RNA destinati a subire il processo di traduzione da parte del ribosoma. Le capacità di idrolisi di questo tipo di proteine ne rendono necessario l'utilizzo anche all'interno del processo di maturazione dell'RNA, ovvero nella rimozione delle sequenze di nucleotidi non codificanti.



**Fig. 2.6** Rappresentazione della struttura della ribonucleasi.

- Atox1: è una proteina citoplasmatica coinvolta nei processi di endocitosi dello ione  $\text{Cu}^+$ . In particolare la funzione di quest'enzima si esplica con il trasporto degli ioni del rame dal citoplasma alle proteine ATPasi presenti nella faccia trans dell'apparato del golgi. Attraverso la sua struttura l'Atox1 presenta anche funzioni di antiossidante nei confronti dei componenti ROS presenti nell'organismo. È una molecola difficile da trattare in ambienti esterni alla cellula in quanto la presenza di gruppi di cisteina richiede l'imposizione di un ambiente riducente per evitare la formazione di ponti disolfuro.



**Fig. 2.7** Rappresentazione della struttura dell'atox1.

Il metodo sfruttato per determinare la tipologia ed il grado di interazione tra proteine e complessi può essere diviso nelle seguenti fasi:

1. Incubazione delle proteine in presenza di un eccesso di complesso ad una temperatura a 37° C e verifica della formazione di addotti attraverso spettrometria di massa ad alta risoluzione ESI-MS.
2. Allontanamento del complesso non reagito attraverso dispositivi Centricon® con membrana in cellulosa rigenerata con MWCO (molecular weight cutoff) nominale 3 o 10 KDa.
3. Quantificazione dell'oro legatosi alla proteina attraverso ICP-OES.



## 3.Materiali e metodi

### 3.1 Materiali

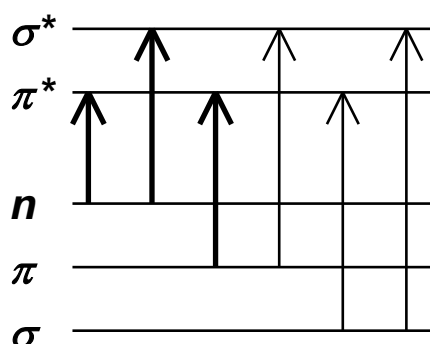
- **Citocromo c** (12358.31Da), Questa proteina è stata acquistata da Sigma Aldrich (codice del prodotto C7752).
- **Lisozima** (14304.8Da), il campione utilizzato è della tipologia HEWL (hen egg whit lysozime). Il composto è stato acquistato dal catalogo Sigma Aldrich (codice L7651).
- **RNasi** (13681.26Da), come le precedenti proteine è stata acquistata dalla società Sigma Aldrich (R5500).
- **Atox1** (7269Da), è stato acquistato da Giotto Biotech. Il composto è stato ottenuto mediante implementazione del gene umano codificante la proteina all'interno del corredo genetico di un campione di E.Coli. Tale metodo comporta la formazione di una miscela contenente Atox1 e Atox1-meteonina in rapporto 3 a 1 circa a causa del meccanismo di trascrizione delle specie E.Coli il quale prevede una possibile aggiunta di un residuo di meteonina per terminare la lettura dell'RNA. La purezza dei cristalli è stata accertata attraverso SDS-PAGE, tecnica che ha mostrato una purezza del campione maggiore del 95%.
- **Auoxo6** (1084.41Da) è stato sintetizzato e cristallizzato all'interno del dipartimento di chimica dell'Università di Sassari da parte del gruppo della Prof.ssa M.A.Cinellu<sup>30</sup>.

- **Au<sub>2</sub>phen** (1132.39Da), anche questo è stato sintetizzato da parte del gruppo della Prof.ssa M.A.Cinellu all'interno del dipartimento di chimica dell'università di Sassari<sup>31</sup>.
- **Auranofin** (678.50Da) come detto in precedenza, è un composto attualmente commercializzato come farmaco e perciò di facile ottenimento.

## 3.2 Metodi

### 3.2.1 Spettrofotometria UV-visibile

La spettrofotometria UV-visibile è una tecnica analitica che sfrutta l'interazione tra radiazioni elettromagnetiche di frequenza compresa tra 200 e 720 nm e gli analiti. L'assorbimento di questo range di frequenze provoca all'interno delle molecole transizioni di tipo elettronico, ovvero l'energia relativa a radiazioni di questo tipo è in grado di eccitare la popolazione di elettroni presenti negli orbitali di legame  $\sigma$  e  $\pi$ .



**Fig. 3.1** Rappresentazione schematica delle possibili transizioni a seguito dell'assorbimento di radiazioni nel campo dell'UV.

Le transizioni osservate più spesso sono le transizioni  $\pi\text{-}\pi^*$ ,  $n\text{-}\pi^*$  e  $n\text{-}\sigma^*$ , le altre sono transizioni meno probabili e richiedono radiazioni più energetiche che ricadono nel campo dell'UV lontano. Per questo motivo i gruppi cromofori (ovvero la porzione di molecola in cui avviene l'interazione con la radiazione) sono perlopiù composti da sistemi coniugati come anelli aromatici, gruppi carbonilici o dieni. I vari stati elettronici molecolari, diversamente da quelli degli atomi, possiedono intervalli energetici relativamente ampi a causa della sovrapposizione di livelli vibrazionali e rotazionali. Ciascun livello elettronico è quindi a sua volta suddiviso energeticamente. Un dato livello energetico ( $E_{\text{tot}}$ ) corrisponde ad uno stato elettronico vibrazionale e rotazionale della molecola. Per una transizione elettronica si ha quindi:

$$4E_{\text{tot}} = 4E_{\text{el}} + 4E_{\text{vib}} + 4E_{\text{rot}}$$

in cui i termini si riferiscono rispettivamente alla differenza di energia elettronica, vibrazionale e rotazionale. In particolare risulta

$\Delta E_{el} \gg \Delta E_{vib} \gg \Delta E_{rot}$ , per cui il contributo rotazionale viene, in genere, trascurato e le transizioni vengono dette “vibroniche”. In spettroscopia di assorbimento UV-vis le transizioni vibroniche hanno origine dallo stato vibrazionale  $v=0$  dello stato elettronico fondamentale, l'unico stato apprezzabilmente popolato a temperatura ambiente, ad uno dei livelli vibrazionali dello stato elettronico eccitato della molecola. Perciò le transizioni elettroniche si traducono in bande di assorbimento nello spettro UV-vis.

L'assorbimento effettuato da parte dei composti di coordinazione può essere spiegato attraverso la teoria del campo cristallino: questa afferma che la presenza di cariche puntiformi (assimilabili ai doppietti elettronici posseduti dagli atomi donatori) nei dintorni dello ione metallico causa la rimozione della degenerazione degli orbitali d dello ione. La frequenza assorbita dallo ione coordinatore dipenderà perciò dal tipo di coordinazione e dall'intensità dello splitting provocato dai leganti. Nel caso in cui lo ione metallico sia coordinato ad un legante organico l'assorbimento causa transizioni di tipo LMCT (ligand to metal charge transfer) o MLCT (metal to ligand charge transfer) ovvero di processi redox interni al complesso.

La quantità di radiazione assorbita è descritta attraverso la definizione dell'assorbanza:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Dove  $I_0$  rappresenta l'intensità della radiazione sorgente inviata sul campione mentre  $I$  è l'intensità della radiazione uscente dal campione.

Il termine dell'assorbanza è a sua volta correlato alla natura ed alla concentrazione del campione attraverso la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon b C$$

Dove

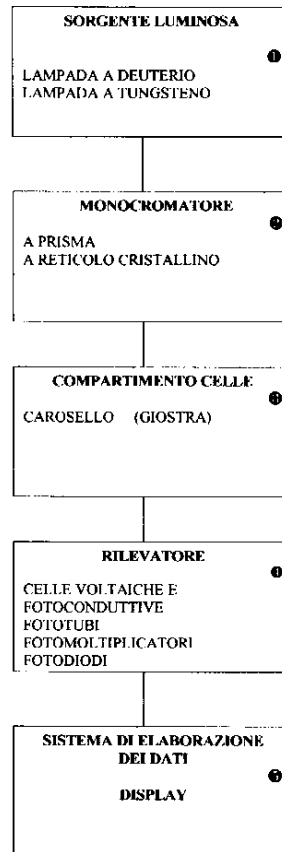
-C rappresenta la concentrazione del cromoforo espressa in molarità

-b rappresenta la lunghezza della cella in cui è contenuto il campione

- $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare che risulta costante in un determinato range di concentrazioni.

Gli spettrofotometri sono strumenti relativamente semplici composti da una sorgente continua di radiazioni UV-vis, un apparato monocromatore, il contenitore per il campione ed un rivelatore di radiazioni.

**SCHEMA A BLOCCHI DI UNO SPETTROFOTOMETRO  
UV-VISIBILE**



**Fig. 3.2** schema a blocchi di uno spettrofotometro UV-visibile.

Le misure sono state effettuate con uno spettrofotometro UV-vis a singolo raggio Cary Varian 50 Bio dotato lampada allo xeno all'interno del quale i nostri campioni, inseriti all'interno di celle di quarzo, sono stati sottoposti ad una scansione di lunghezze d'onda tra gli 800 ed i 200 nm ad una velocità pari a 600nm/min.

### 3.2.2 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica ad alta sensibilità in grado di fornire informazioni riguardanti:

- la composizione qualitativa e quantitativa di analiti sia organici che inorganici in miscele complesse;
- la struttura di una vasta gamma di specie molecolari complesse;
- i rapporti isotopici degli atomi nei campioni;
- la struttura e la composizione di superfici solide.

Il metodo consiste in un processo di ionizzazione e eventualmente frammentazione effettuati per via elettronica o per via chimica attraverso l'utilizzo di appositi intermedi di ionizzazione in un ambiente sottoposto ad un elevato grado di vuoto. Le fonti di ionizzazione sono spesso classificate come sorgenti hard, ovvero in grado di frammentare intensamente le molecole precursori, o come sorgenti soft, caratterizzate dalla capacità di formare ioni anche con un basso grado di frammentazione.

Le specie cariche create nella sezione dello ionizzazione vengono accelerate attraverso una differenza di potenziale elettrico e trasportati nel reparto dell'analizzatore. Quest'ultimo è in grado di selezionare una definita specie ionica in base al rapporto tra massa e carica permettendo una progressiva scansione dei frammenti prodotti. Esistono vari tipi di analizzatori che si distinguono per valori di risoluzione, costi ed ingombri:

-Gli analizzatori a settore elettrico sono costituiti da un condotto curvo ai alle cui pareti è applicata una definita differenza di potenziale in continuo in grado di deviare il moto degli ioni in base al valore del rapporto  $m/z$ .

-Gli analizzatori a settore magnetico hanno una struttura simile ai precedenti, ma in questo caso la deviazione degli ioni è effettuata attraverso l'imposizione di un campo magnetico di direzione perpendicolare al moto dei frammenti ionici. Ogni carica in movimento all'interno di un campo magnetico subisce una accelerazione perpendicolare rispetto al vettore velocità secondo la relazione:

$F = q\vec{v} \wedge \vec{B}$  dove  $q$  è la carica dello ione,  $v$  la sua velocità e  $B$  il campo magnetico in cui è immerso.

-Gli analizzatori a tempo di volo sono elementi discontinui che separano le specie ioniche in base al tempo impiegato ad attraversare un percorso rettilineo. La relazione tra tempo di volo, massa e carica è descritta dalla seguente equazione:

$t = \frac{l}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{z}}$  dove  $l$  rappresenta la lunghezza del percorso ed  $U$  è la differenza di potenziale che imprime il moto agli ioni.

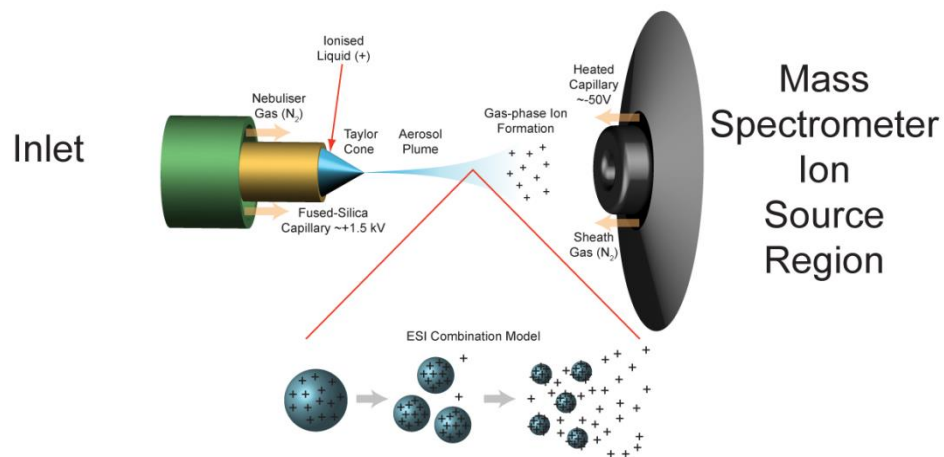
-Gli analizzatori a quadrupolo sono strumenti poco ingombranti e relativamente semplici usati molto spesso in sequenza per aumentare il potere risolvibile dello strumento. Sono costituiti da 4 sbarre metalliche a cui viene applicato una differenza di potenziale alternata sfasata di  $90^\circ$  tra le coppie di sbarre opposte in grado di far infrangere contro le pareti dell'analizzatore tutte le specie ioniche tranne quella desiderata. Variando progressivamente la frequenza del campo è possibile effettuare una scansione dei frammenti presenti

-L'analizzatore a trappola ionica è composto da una camera contenente 2 elettrodi a calotta ed uno ad anello attraverso i quali viene applicato un campo elettrico alternato la cui regolazione permette la selezione di un determinato valore di  $m/z$ .

La popolazione di ioni provenienti dall'analizzatore viene quindi convertita in segnale elettronico attraverso adeguati rivelatori come il rivelatore a dinodo continuo o il rivelatore a trappola ionica, permettendo, attraverso l'uso calcolatori, di ottenere uno spettro di massa.

Le acquisizioni degli spettri di massa dei nostri campioni sono state effettuate con uno spettrometro ad alta risoluzione LTQ orbitrap® (ThermoScientific,

San Jose, CA, USA) all'interno del centro interdipartimentale di spettrometria di massa (CISM) dell'Università di Firenze. La necessità di una fonte di ionizzazione estremamente soft, in grado quindi di limitarsi a caricare le specie proteiche analizzate, ha portato all'adozione di una sistema ESI (electrospray ionization).



**Fig. 3.3** Rappresentazione schematica di un ionizzatore elettrospray.

Le tecniche ESI-MS prevedono la nebulizzazione del campione attraverso un capillare riscaldato all'interno di una camera sottoposta ad una tensione dell'ordine dei KV. Questo tipo di trattamento porta alla formazione di una dispersione di gocce cariche la cui densità di carica va progressivamente aumentando a causa della volatilizzazione del solvente. Il risultato finale di questo processo è rappresentato da una popolazione di ioni carichi filtrata dallo skimmer.

Le condizioni di lavoro durante l'acquisizione degli spettri sono le seguenti:

- flusso di inserimento del campione 5ml/min
- voltaggio applicato allo spray 3,1 kV
- voltaggio del capillare 45V
- temperatura del capillare 220°C
- risoluzione nominale 100000
- solvente tampone ammonioacetato pH 6.8



### 3.2.3 Spettroscopia di emissione atomica ICP-OES

L'ICP-OES è una delle tecniche analitiche più comunemente utilizzate per la determinazione di elementi in traccia all'interno delle più disparate matrici.

Si sfrutta la radiazione elettromagnetica emessa dagli atomi in un sistema eccitato e da questa si ricavano informazioni sia quantitative che qualitative circa la composizione di un campione. Le informazioni quantitative sono correlate all'intensità della radiazione emessa, mentre quelle qualitative dipendono dalla lunghezza d'onda alla quale la radiazione è stata emessa.

Il grande vantaggio di questa tecnica, è senz'altro la possibilità di eseguire determinazioni simultanee e riproducibili di molti elementi diminuendo così in modo notevole i tempi di misura per ciascun campione.

Nella spettrometria in emissione ottica (OES) il campione viene scaldato a temperature elevate tanto da ottenere non solo la dissociazione in atomi, ma anche da causare un numero significativo di eccitazioni da collisione (e ionizzazione) degli atomi del campione. Una volta eccitati gli atomi tenderanno a decadere nel loro stato fondamentale emettendo radiazioni elettromagnetiche comprese nel range dell'UV-visibile.

Le sorgenti di eccitazione utilizzate in passato per le tecniche in emissione sono state essenzialmente le scariche elettriche: per molti anni si sono usate fondamentalmente l'arco in corrente continua e la scintilla in corrente alternata; più recentemente si sono affermati altri tipi di scarica cioè i plasma (ICP, DCP, MIP). Un plasma è essenzialmente ogni stato della materia che contenga una frazione apprezzabile (>1%) di elettroni e ioni positivi, oltre che atomi neutri radicali e molecole.

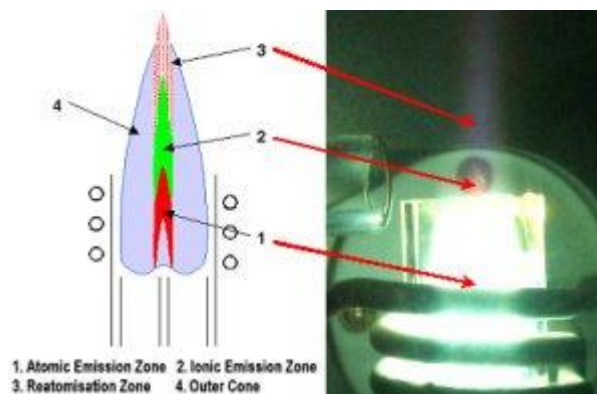
In particolare il plasma utilizzato nella tecnica adottata in questo lavoro di tesi è un plasma accoppiato induttivamente (ICP) supportato da argon. Le torce per l'ICP-OES sono costituite solitamente da quarzo e prevedono la presenza di tre tubi concentrici per i flussi di argon e per l'iniezione del campione.

Lo spazio tra i due tubi esterni è molto ridotto allo scopo di favorire il passaggio di argon ad alta velocità: questo è necessario perché il gas che passa in questo settore ha il compito di mantenere fredde le pareti della torcia e di condurre il plasma; questo flusso è detto di raffreddamento o flusso esterno

(circa 16 L/min). Il flusso di argon che passa nella zona intermedia si dice flusso ausiliario (circa 1 L/min) e serve a mantenere il plasma distante dal tubo intermedio e dall'iniettore, inoltre rende più semplice l'introduzione dell'aerosol all'interno del plasma. Nel tubo centrale della torcia viene introdotto il campione; il flusso qui impiegato è di circa 0.8 L/min, tuttavia è sufficiente a perforare il plasma perché la velocità è resa elevata dalla piccola sezione del tubo.

I vantaggi derivanti dall'uso dell'ICP rispetto ad altre sorgenti si identificano essenzialmente nella stabilità, nelle elevate temperature raggiunte (6800 K al centro del plasma), che permettono di eliminare molte interferenze chimiche e nella capacità di lavorare in condizioni che permettono di eliminare molte interferenze causate dalla matrice. La torcia è circondata da una spirale in rame (bobina di induzione o load coil) la quale è collegata ad un generatore di radiofrequenze (RF).

Quando si applica la potenza RF (circa 1200W) una corrente alternata fluisce avanti e indietro con una frequenza corrispondente a quella del generatore (40MHz) generando campi elettrici e magnetici.



**Fig. 3.4** rappresentazione schematica di atomizzatore a plasma accoppiato induttivamente.

Al gas argon che fluisce all'interno della torcia viene applicata una scintilla che provoca l'asportazione di alcuni elettroni dagli atomi del gas: gli elettroni sono così catturati nel campo magnetico ed accelerati inducendone la collisione con altri atomi di argon dai quali a loro volta asportano elettroni; in questo modo si

innesca una reazione a catena che trasforma il gas in un plasma composto da atomi di argon, elettroni e ioni di argon.

La sorgente ICP è mantenuta all'interno della torcia dall'energia RF che continuamente viene trasferita al processo di accoppiamento induttivo.

Ciò che si vede è una “fiamma” di forma toroidale molto intensa, bianca e brillante che può essere schematicamente suddivisa in zone così come mostrato in figura.

Il campione viene introdotto nel cuore del plasma, attraverso la regione di induzione, in forma di aerosol (liquido in argon): ogni goccia va incontro ai seguenti processi:

- Desolvatazione (formazione di microparticelle di sali)
- Vaporizzazione (decomposizione in gas formato dalle singole molecole)
- Atomizzazione (dissociazione nei singoli atomi)
- Eccitazione
- Ionizzazione

Per aumentare la resa di eccitazione il campione è introdotto mediante un nebulizzatore il quale deve essere in grado di inserire tutto il campione in uno stato di aerosol di diametro inferiore ai 10 $\mu$ m in modo riproducibile. La nebulizzazione può avvenire attraverso forze pneumatiche, le quali sfruttano il flusso di un gas ad alta velocità, o attraverso forze meccaniche generate dagli ultrasuoni generati da un trasduttore piezoelettrico oscillante.

In ICP-OES le informazioni relative al campione vengono desunte tramite la misurazione della luce emessa dagli atomi e dagli ioni eccitati del plasma.

Poiché ogni elemento emette a lunghezze d'onda diverse l'insieme dell'emissione proveniente dal plasma sarà una radiazione policromatica, che quindi dovrà essere scomposta nelle singole componenti allo scopo di identificare le specie responsabili dell'emissione.

La separazione più comune prevede la dispersione fisica tramite un reticolo di diffrazione che è incluso in uno spettrometro. Gli spettrometri per l'analisi spettrale adottati negli strumenti ICP-OES possono essere sequenziali o simultanei.

Gli spettrometri sequenziali, o a scansione, determinano un elemento alla volta e funzionano mediante un singolo o doppio monocromatore in movimento che compie la scansione dello spettro. I monocromatori sono in genere a reticolo olografico con un sistema di movimento molto veloce che permette l'acquisizione di circa un elemento al minuto.

Le misure sono state effettuate con lo strumento Varian 720-ES Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES) equipaggiato con un nebulizzatore ultrasonico CETAC U5000 AT+. Oltre agli standard ottenuti dalla diluizione di una soluzione stock da 1000 mg/L è stato utilizzato anche uno standard interno di Ge in concentrazione di 1 ppm in ogni campione. Le righe di emissione registrate per la determinazione dell'oro sono le lunghezze d'onda 242.794nm, 208.207nm e 267.594nm.

Di seguito sono riportate le condizioni operative dello strumento:

- Instrument Varian 720-ES
- R.F. Power 1.25 KW
- Plasma argon flow rate 16.5 L min<sup>-1</sup>
- Auxiliary argon flow rate 1.50 L min<sup>-1</sup>
- Nebulizer argon flow rate 0.75 L min<sup>-1</sup>
- Replicate Read Time 20 s
- Instr Stabilization Delay 30 s
- Sample introduction settings:
- Sample Uptake 30 s
- Flow Rate 1 mL min<sup>-1</sup>
- Rinse Time 180 s

## 4.Procedura sperimentale

Inizialmente sono state preparate tramite diluizione le seguenti soluzioni:

- soluzioni  $10^{-2}$  M in dimetil solfossido (DMSO) dei complessi a base di oro;
- soluzione  $10^{-3}$  M in acqua milliQ delle proteine.

Sono state quindi ottenute attraverso diluizioni le soluzioni descritte di seguito:

		Concentrazione finale complesso	Concentrazione finale proteina
<b>Soluzione 1</b>	Au <sub>2</sub> phen-Cyt C	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 2</b>	Auoxo6-Cyt C	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 3</b>	Auranofin-Cyt c	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 4</b>	Au <sub>2</sub> phen-RNasi	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 5</b>	Auranofin-RNasi	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 6</b>	Auoxo6-RNasi	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 7</b>	Au <sub>2</sub> phen-LisoZ.	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 8</b>	Auranofin-LisoZ.	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 9</b>	Auoxo6-LisoZ.	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M
<b>Soluzione 10</b>	Auranofin-ATOX1	$3 \cdot 10^{-4}$ M	$3 \cdot 10^{-5}$ M
<b>Soluzione 11</b>	Auoxo6-ATOX1	$3 \cdot 10^{-4}$ M	$3 \cdot 10^{-5}$ M
<b>Soluzione 12</b>	Au <sub>2</sub> phen-ATOX1	$3 \cdot 10^{-4}$ M	$3 \cdot 10^{-5}$ M

Da notare che il trattamento delle soluzioni di Atox1 ha richiesto l'imposizione di un ambiente riducente a causa della tendenza mostrata dai residui di cisteina 12 e cisteina 15 a formare ponti disolfuro modificanti la struttura della proteina.

Tutte le soluzioni ottenute sono state incubate per 72 ore ad una temperatura di 37°C all'interno del termostato digital thermoblock® (FALC INSTRUMENTS s.r.l., Treviglio (BG), Italy).

Dalle soluzioni, a titolo di controllo, sono state prelevate aliquote poi sottoposte a spettrometria di massa: le soluzioni contenenti citocromo c, ribonucleasi e lisozima presentano una concentrazione di proteina pari a  $10^{-4}$ M ed un rapporto complesso:proteina di 3:1. Le tre soluzioni contenenti atox1 sono invece state preparate con una concentrazione di proteina pari a 30  $\mu$ M e rapporto complesso:proteina di 1:1. Al termine del periodo di incubazione sono stati registrati gli spettri di massa delle 12 soluzioni previa diluizione in tampone ammonioacetato per confermare la formazione di addotti.

A questo punto si è proceduto ad allontanare il complesso non reagito all'interno delle soluzioni attraverso filtri a taglio molecolare modello Ultracel YM-3® (MERCK MILLIPORE, Darmstadt, Germania, 2014) composti da cellulosa rigenerata con cutoff di 3000 e 10000 Da. La separazione si è articolata in più sessioni di filtrazione: al termine di ogni centrifugazione è stato verificato attraverso analisi spettrofotometrica UV-Vis del filtrato l'effettivo allontanamento del complesso. La concentrazione della proteina all'interno dei filtri è rimasta inalterata attraverso aggiunte equivalenti di H<sub>2</sub>O milliQ tranne che nel caso della soluzione 9 (Auoxo6-Lys): dato che parte della soluzione è stata accidentalmente persa, si è proceduto determinando il volume rimasto (420  $\mu$ L) ed effettuando una ulteriore diluizione in H<sub>2</sub>O che ha portato la concentrazione della proteina ad un valore di  $4.2 \cdot 10^{-5}$ M.

500 $\mu$ L delle soluzioni contenenti gli addotti e le proteine non reagite sono quindi state sottoposte ad attacco acido con un 1 mL di soluzione contenente HCl ed HNO<sub>3</sub> per analisi in tracce in rapporto 3:1. L'attacco acido è avvenuto ad una

temperatura di 80°C per un periodo di 24 ore all'interno dell'impianto digital thermoblock® in cui sono state aggiunte altre 16 soluzioni necessarie all'impostazione della baseline e al lavaggio dell'ICP-OES durante l'analisi. La preparazione dei campioni è terminata con la diluizione dei 28 campioni con acqua milliq fino ad un volume poco superiore ai 5mL necessari all'analisi, il volume esatto dei campioni è stato determinato attraverso la misura della massa e della densità utilizzando bilancia elettronica analitica (sensibilità 0.01mg). Di seguito si riporta la tabella relativa alla determinazione del volume di campione dopo diluizione.

	<b>cuve</b> <b>tta</b>	<b>m<sub>cuvetta</sub></b> <b>(g)</b>	<b>m<sub>camp+cuvet</sub></b> <b>ta</b> <b>(g)</b>	<b>m<sub>campione</sub> (g)</b>	<b>densità</b> <b>(g/mL)</b>	<b>V<sub>campione</sub></b> <b>(mL)</b>
	1	6,09611	11,39104	5,29493	1,02960	5,143
<b>sol. 1</b>	2	6,00286	11,31456	5,3117	1,04263	5,095
	3	6,07677	11,56373	5,48696	1,02314	5,363
<b>sol. 2</b>	4	5,94985	11,42802	5,47817	1,03449	5,296
	5	6,03066	11,73473	5,70407	1,03087	5,533
<b>sol. 3</b>	6	5,91406	11,44388	5,52982	1,03389	5,349
	7	6,01715	11,24657	5,22942	1,02790	5,087
<b>sol. 4</b>	8	6,04829	11,55434	5,50605	1,04213	5,283
	9	5,84324	11,38856	5,54532	1,02779	5,395
<b>sol. 5</b>	10	6,05546	12,21388	6,15842	1,03372	5,958

	11	5,99782	11,25233	5,25451	1,03235	5,090
<b>sol. 6</b>	12	5,82139	11,10158	5,28019	1,03620	5,096
	13	6,02959	11,2798	5,25021	1,03569	5,069
<b>sol. 7</b>	14	6,06763	11,62626	5,55863	1,03074	5,393
	15	6,03348	11,78151	5,74803	1,03240	5,568
<b>sol. 8</b>	16	5,83081	11,02829	5,19748	1,03877	5,003
	17	6,03403	11,3711	5,33707	1,03268	5,168
<b>sol. 9</b>	18	5,83446	11,61478	5,78032	1,04169	5,549
	19	6,07483	11,71097	5,63614	1,02782	5,484
<b>sol. 10</b>	20	6,07507	11,91605	5,84098	1,03944	5,619
	21	5,91411	11,70975	5,79564	1,03318	5,610
<b>sol. 11</b>	22	6,06417	11,96236	5,89819	1,03867	5,679
	23	6,00896	12,04899	6,04003	1,02383	5,899
<b>sol. 12</b>	24	5,98942	11,29919	5,30977	1,03947	5,108
	25	6,07063	11,5206	5,44997	1,0385	5,248
	A	6,00515	11,215	5,20985	1,03682	5,025
	Z	6,05287	11,29336	5,24049	1,03619	5,057



La quantità di oro contenuta nei suddetti campioni è stata quindi determinata, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Roberto Udisti, attraverso spettroscopia di emissione atomica stimolata da plasma accoppiato induttivamente.

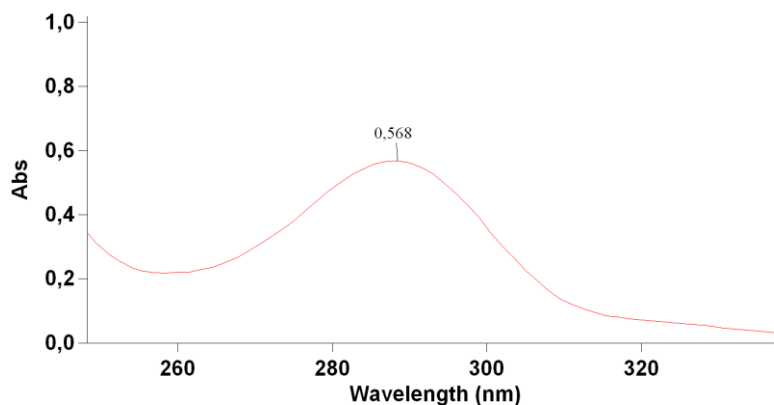
## 5. Risultati e discussione

Durante il lavoro di ricerca abbiamo ottenuto dati da misure indipendenti. La correlazione dei risultati ottenuti rappresenta quindi un passo cruciale nella determinazione delle differenti affinità esistenti tra proteine e complessi. Il fulcro dell'attività di elaborazione dati coinciderà con la comparazione tra i dati ottenuti dalla spettrometria di massa in alta risoluzione e quelli ottenuti dalla spettroscopia di emissione.

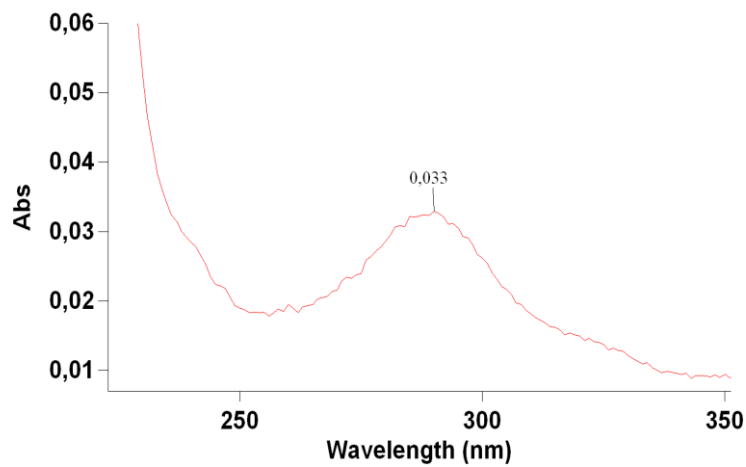
Dalla spettrometria di massa possiamo infatti ricavare importanti informazioni riguardo la stechiometria di reazione tra proteina e complesso riuscendo a individuare gli addotti che si formano durante il periodo di incubazione. L'analisi spettroscopica ci permette invece di ottenere un dato quantitativo certo sulla capacità dell'oro di coordinarsi alle proteine modello in condizioni simili a quelle fisiologiche.

### 5.1 Spettri di assorbimento UV-vis

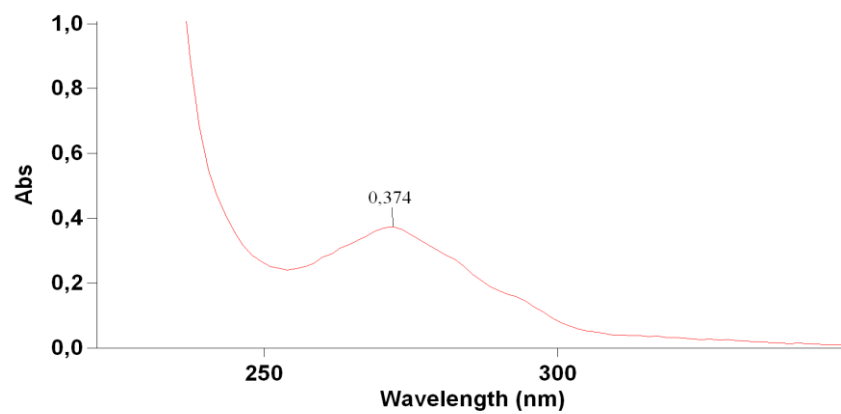
Innanzitutto riporto gli spettri di assorbimento UV-Vis acquisiti al fine di verificare il completo allontanamento dei complessi attraverso i filtri a taglio molecolare. A titolo di esempio sono riportati solo alcuni degli spettri riportati dopo ogni lavaggio; essi si riferiscono al primo e ultimo lavaggio effettuati:



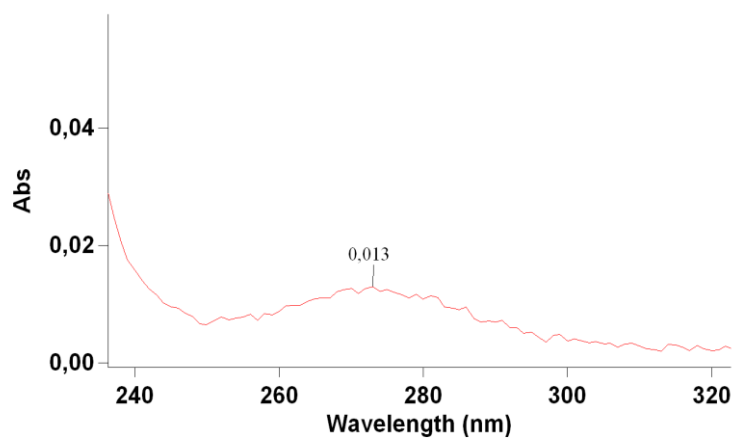
**Fig. 5.1** Spettro di assorbimento UV-vis del primo filtrato ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e citocromo c.



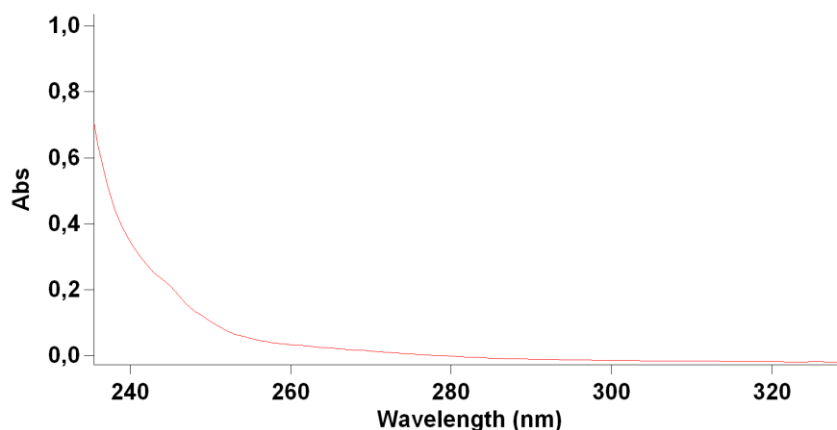
**Fig. 5.2** Spettro di assorbimento UV-vis dell'ultimo filtrato ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e citocromo c.



**Fig. 5.3** Spettro di assorbimento UV-vis del primo filtrato ottenuto dalla soluzione contenente Au<sub>2</sub>phen e ribonucleasi.



**Fig. 5.4** Spettro di assorbimento UV-vis dell'ultimo filtrato ottenuto dalla soluzione contenente Au<sub>2</sub>phen e ribonucleasi.



**Fig. 5.5** Spettro di assorbimento UV-vis del primo filtrato ottenuto dalla soluzione contenente Aurano-fin e lisozima.

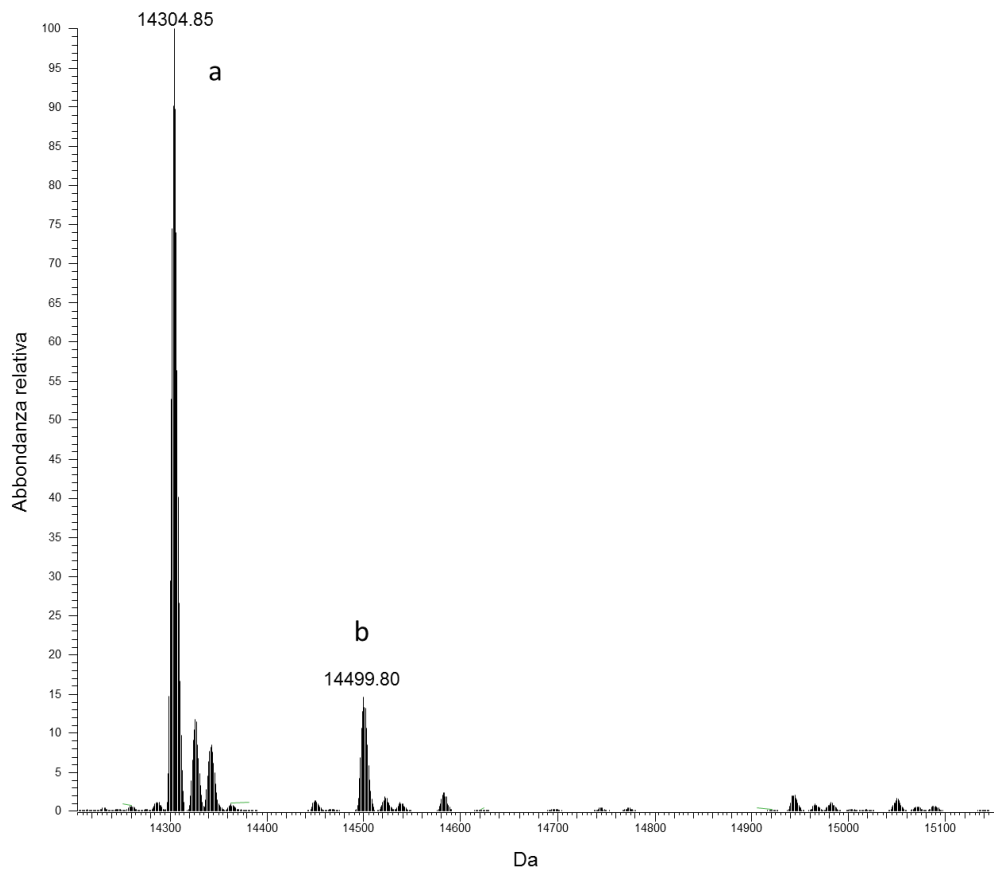
Come si può notare dagli spettri riportati Aurano-fin non presenta coefficienti di assorbività molare nel range UV-Vis sufficientemente elevati per rilevarne la presenza e quindi l'allontanamento dell'eccesso non legato alla proteina (almeno alle concentrazioni da noi utilizzate). Viceversa gli altri due complessi mostrano elevata assorbanza nelle condizioni sperimentali utilizzate e quindi, anche per Aurano-fin (il quale presenta il minor peso molecolare), abbiamo considerato sufficiente un numero di lavaggi pari a quelli utilizzati per le soluzioni contenenti gli altri complessi. Sono state dunque effettuate sessioni di centrifugazione finché le assorbanze hanno mostrato non diminuire più significativamente.

## 5.2 Spettri di massa in alta risoluzione

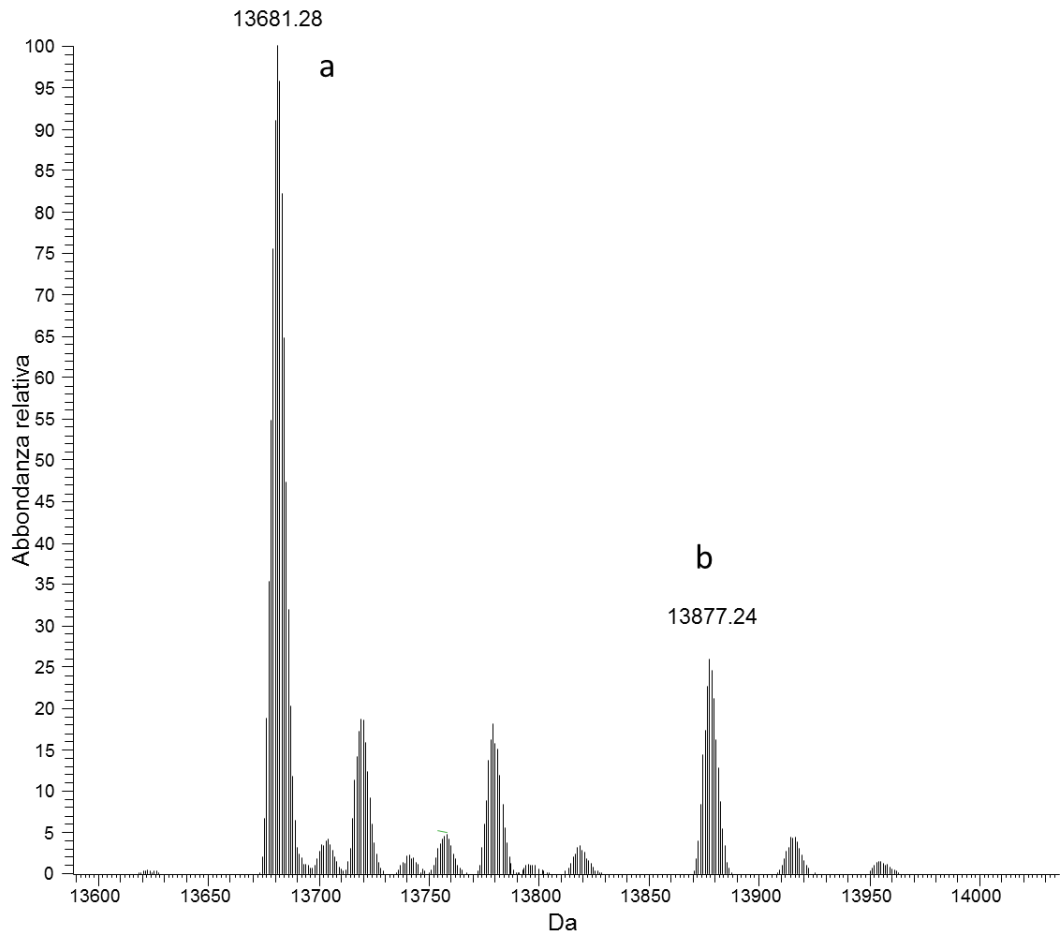
Come già detto in precedenza gli spettri di massa degli addotti sono stati ottenuti mediante sistema di ionizzazione elettrospray il quale ha permesso la formazione specie proteiche multicariche grazie ad un processo di protonazione favorito dal solvente. A tal proposito è necessario sottolineare che le soluzioni contenenti atox1 hanno richiesto l'adozione di un solvente in grado di protonare con più efficacia la struttura proteica a causa della minore concentrazione disponibile. Per aumentare la resa di ionizzazione delle soluzioni contenenti atox1 è stato utilizzato acido formico, tale scelta si è basata su esperimenti pregressi che avevano evidenziato come la presenza di acido formico sia essenziale al fine di ottenere spettri ESI-MS di buona qualità. Inoltre, mentre per gli altri campioni il rapporto tra complesso e proteina era di 3:1, per le soluzioni contenenti la proteina atox1, è stato impiegato un rapporto 1:1. Gli spettri di massa ottenuti sono stati analizzati tramite un programma di deconvoluzione.

### 5.2.1 Soluzioni contenenti Au<sub>2</sub>phen

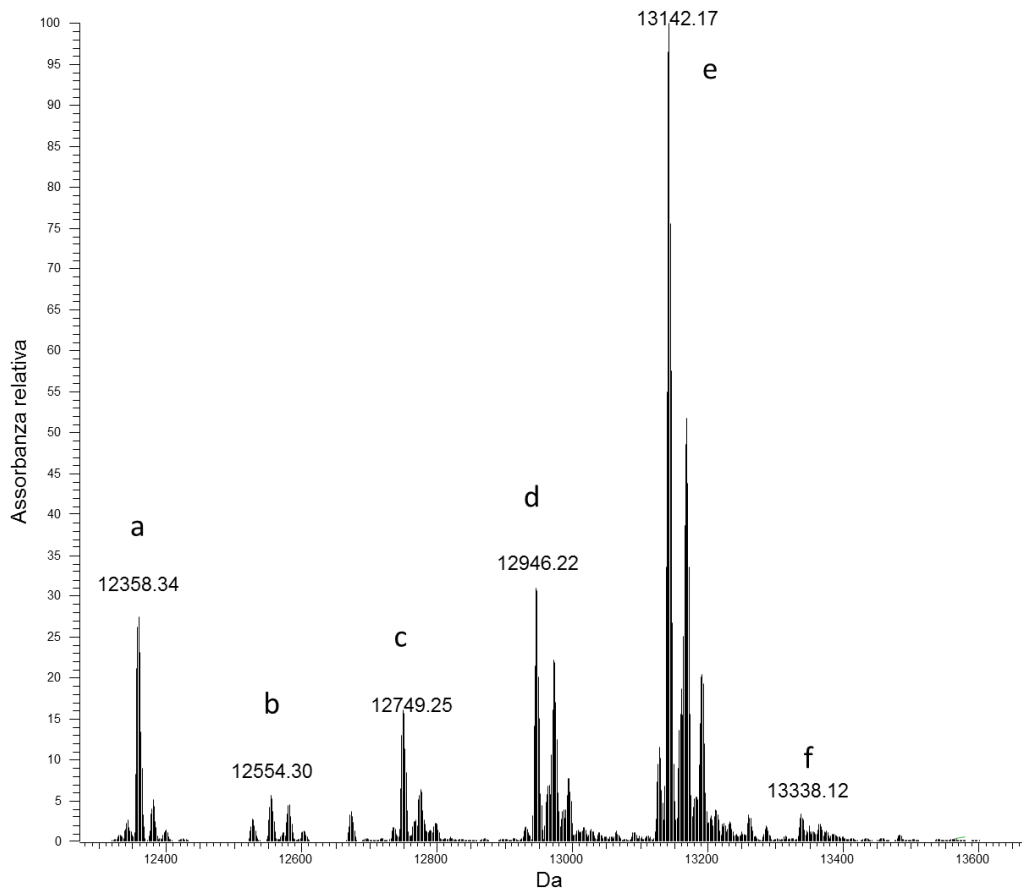
Si riportano in basso gli spettri di massa deconvoluti ottenuti dalle soluzioni contenenti il complesso Au<sub>2</sub>phen:



**Fig. 5.6** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Au<sub>2</sub>phen e lisozima in rapporto 3:1 incubate per 72 ore a 37 °C. Al picco della proteina (a) si affianca un picco di scarsa intensità (b) imputabile alla formazione di un addotto oro(I)-proteina con stechiometria 1: 1.

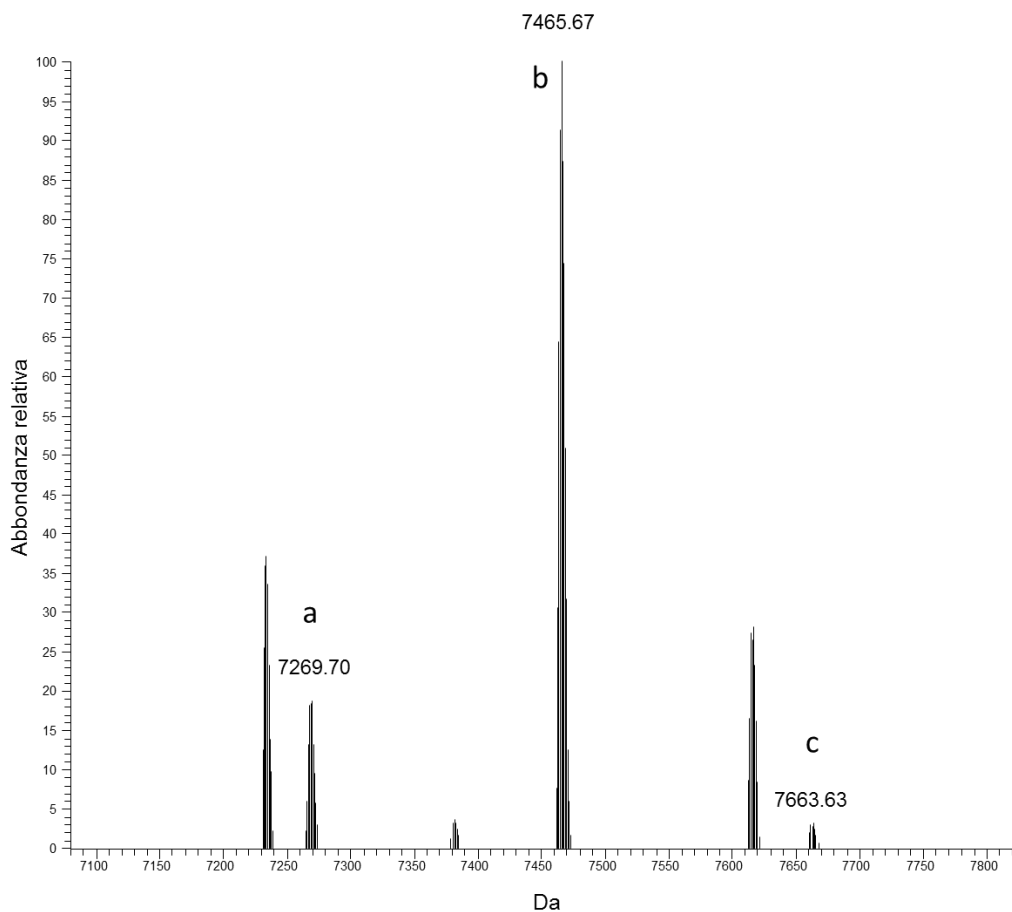


**Fig. 5.7** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente  $\text{Au}_2\text{phen}$  e ribonucleasi in rapporto 3:1 incubata per 72 ore a 37 °C. Lo spettro ottenuto mostra anche in questo caso presenza di proteina non legata (a) e presenza di addotto Au(I)-proteina in rapporto 1:1 (b).



**Fig. 5.8** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente  $\text{Au}_2\text{phen}$  e citocromo c in rapporto 3:1 incubata per 72 ore a 37 °C. Lo spettro mostra una elevatissima presenza di addotti a varia stechiometria. A partire dal picco relativo alla proteina non legata (a) si nota un progressivo aumento dell'intensità delle forme pluri-metallate che culmina col picco della struttura tetrametallata (e). Si può osservare inoltre come sia la metallazione avvenga attraverso la coordinazione di Au(I).



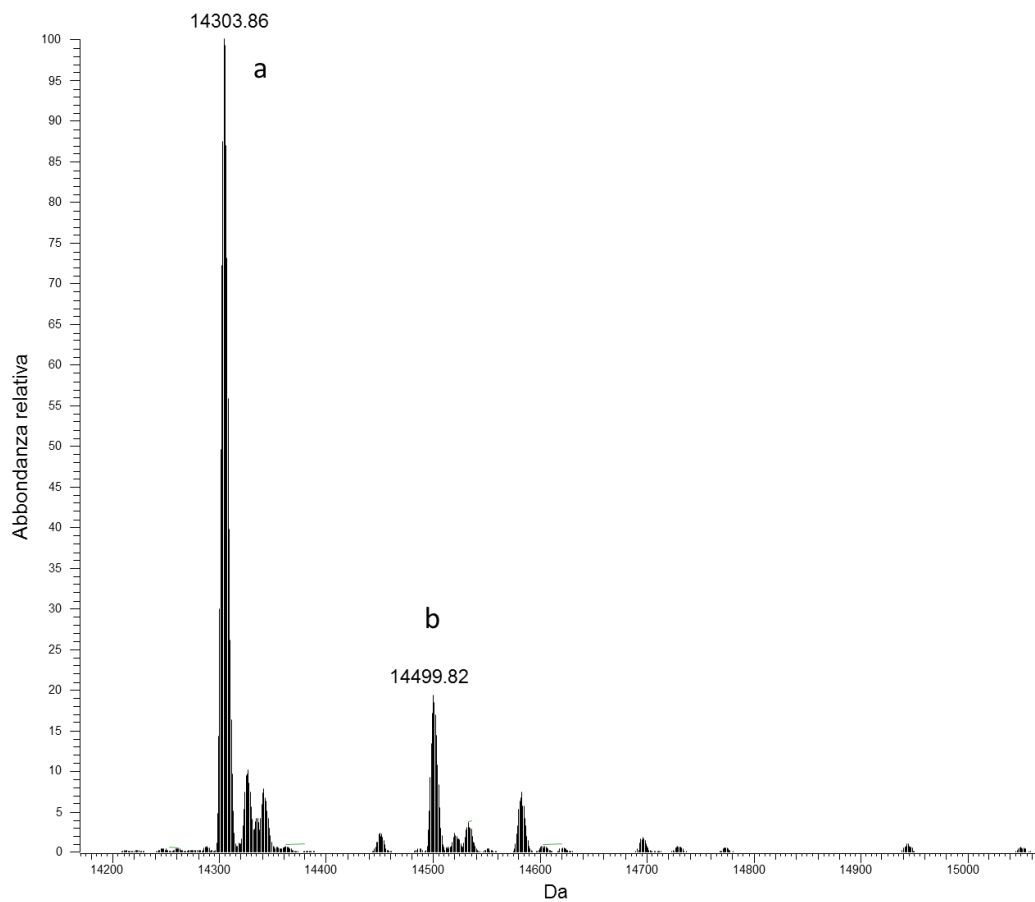


**Fig. 5.9** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente  $\text{Au}_2\text{phen}$  e atox1 in rapporto 1: 1 incubata per 20 ore a temperatura ambiente. Vi è elevata presenza dell'addotto Au(I)-proteina con stechiometria 1:1 (b), è possibile inoltre verificare anche la presenza della proteina bimetallata.

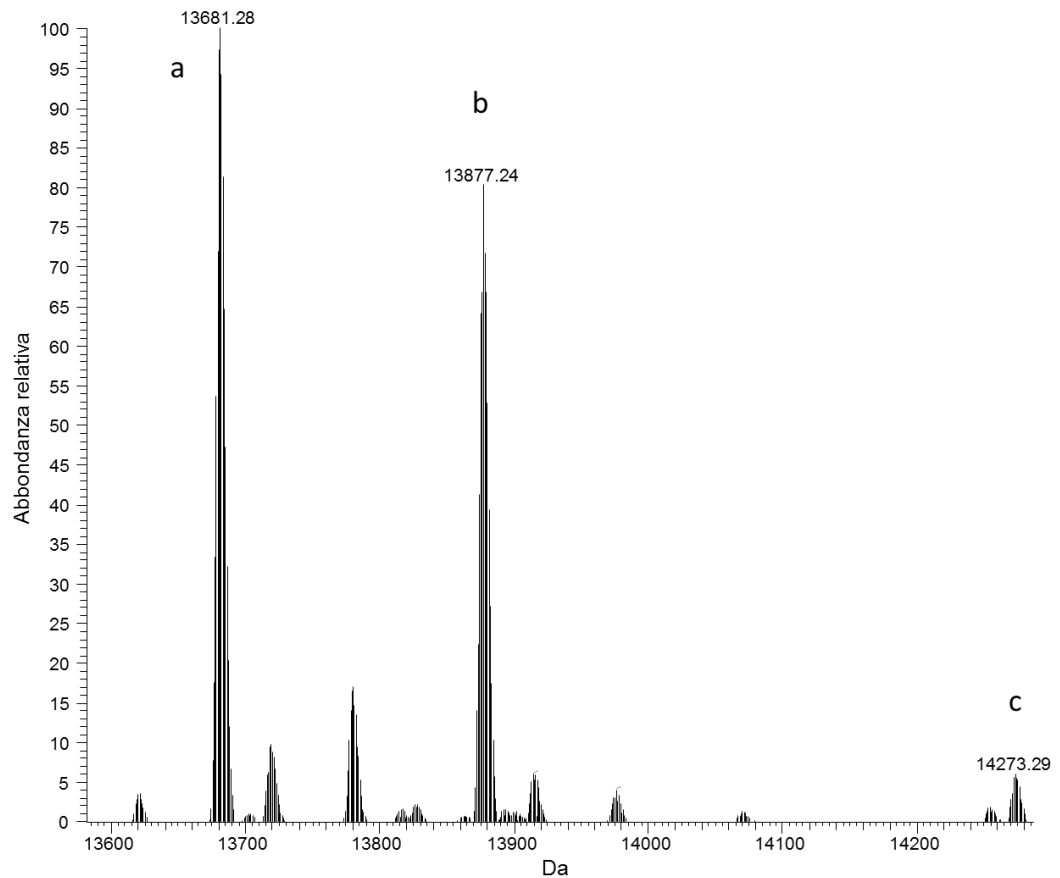
Gli spettri di massa delle soluzioni contenenti Au<sub>2</sub>phen acquisiti dal LTQ-Orbitrap ESI-MS evidenziano come l'affinità verso il complesso vari notevolmente in base alla proteina considerata. La proteina risultata più reattiva nei confronti dell'Au<sub>2</sub>phen è sicuramente il citocromo c. Oltre all'elevata presenza di addotti ciò che risalta maggiormente è la tendenza di questa proteina a coordinare più favorevolmente 4 ioni Au(I). Conoscendo la struttura primaria della proteina possiamo supporre che i siti di coordinazione del metallo siano le catene laterali dei residui met-65, met-80, his-18 e his-33. L'assenza di picchi relazionabili alla formazione di addotti tra il complesso di Au(III) di partenza e le proteine implica che il meccanismo di reazione preveda la degradazione del complesso tramite riduzione dell'oro alla forma monovalente.

### 5.2.2 Soluzioni contenenti Auoxo6

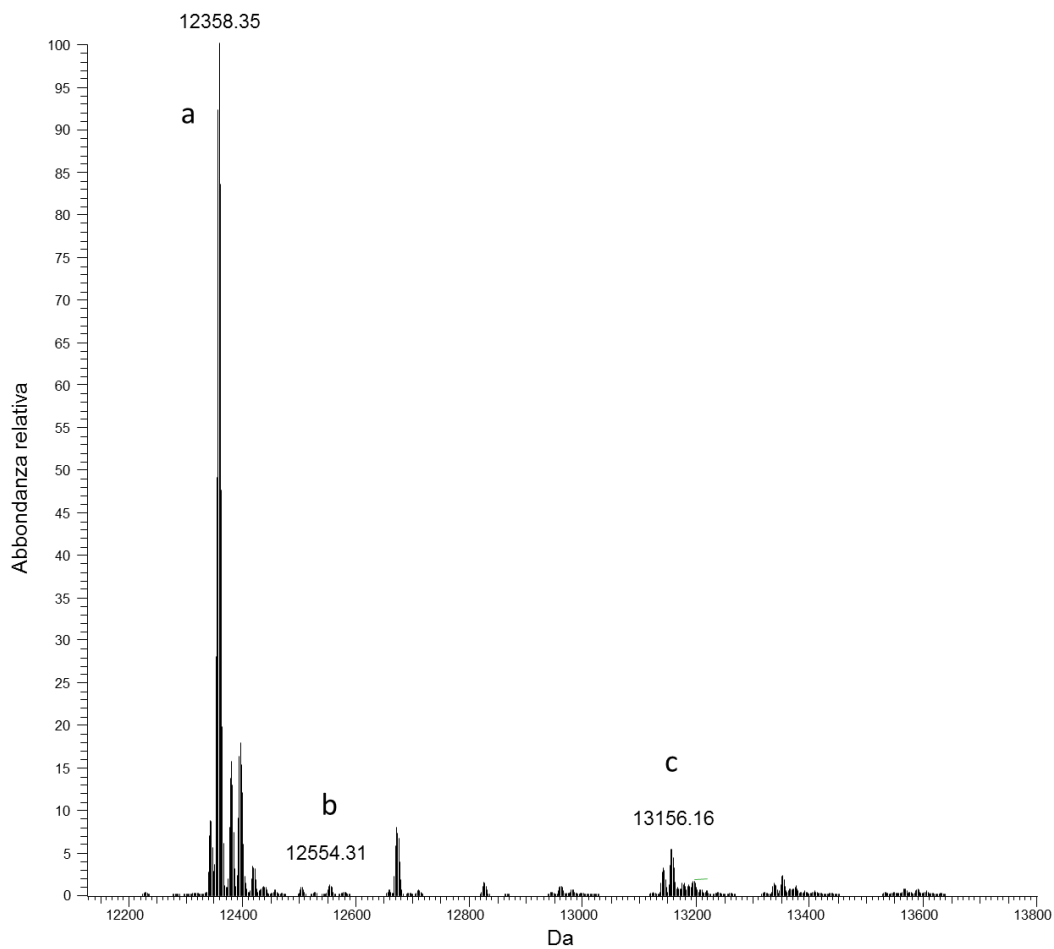
Di seguito si riportano gli spettri di massa ottenuti dalle soluzioni incubate in presenza di Auoxo6:



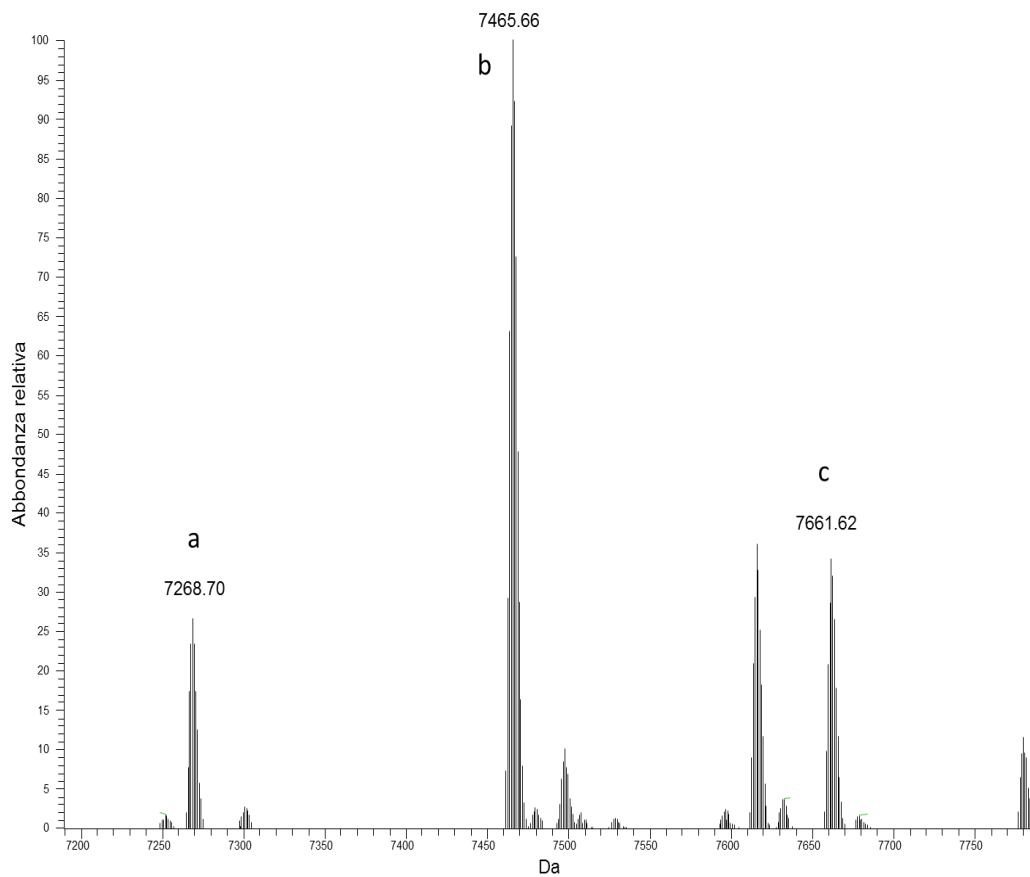
**Fig. 5.10** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e lisozima in rapporto 3: 1 incubata per 72 ore a 37 °C. Come si può notare, l'esposizione della proteina al complesso ha portato alla formazione di un picco assegnabile all'addotto Au(I)-proteina (b).



**Fig. 5.11** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e ribonucleasi in rapporto 3:1 incubate per 72 ore a 37 °C. Lo spettro mostra la presenza di quantità comparabili di ribonucleasi(a) e di addotto monometallato (addotto Au(I)-proteina) (b).



**Fig. 5.12** spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e citocromo c in rapporto 3: 1 incubata per 72 ore a 37 °C. è interessante notare la formazione di proteina coordinata con quattro atomi di Au(I) (c).

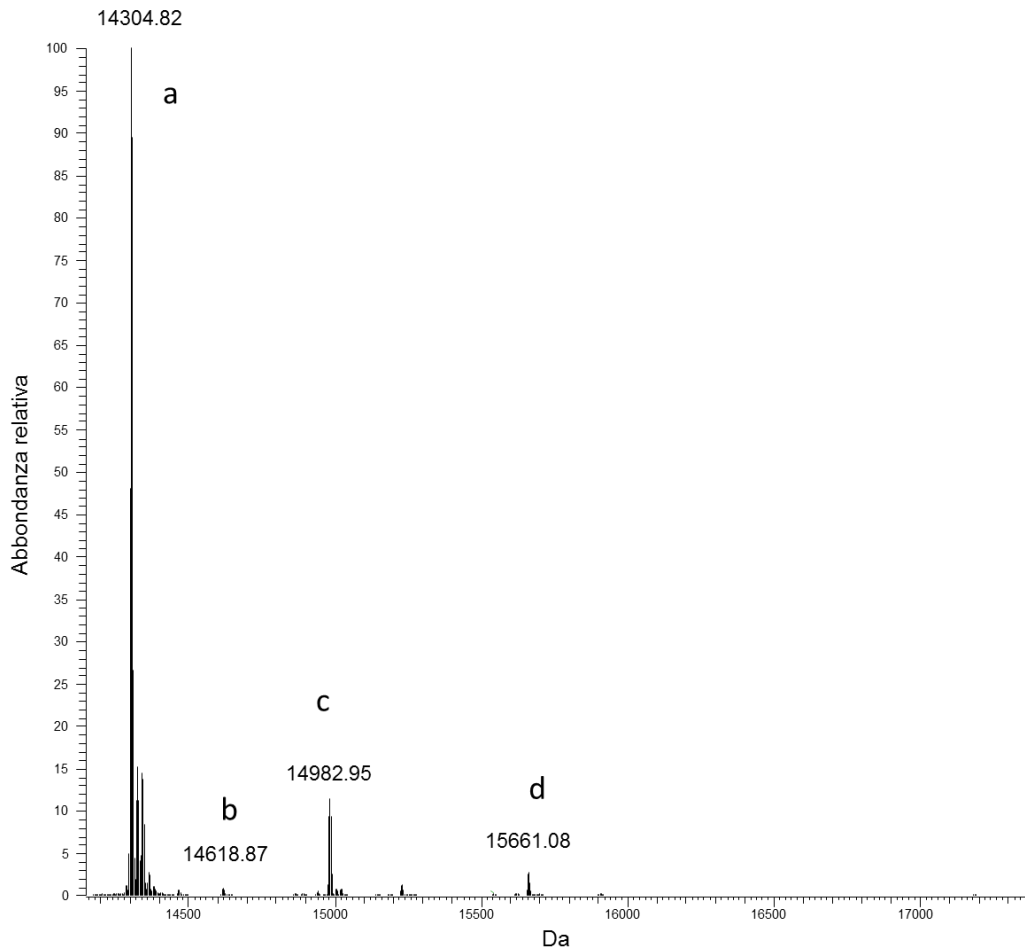


**Fig. 5.13** spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auoxo6 e atox1 in rapporto 1: 1 lasciate ad incubare per 72 ore a 37 °C. Sono evidenti i picchi relativi agli addotti contenuti un atomo di Au(I) (b) e due atomi di Au(I) (c).

L'analisi degli spettri di massa delle soluzioni contenenti il complesso Auoxo6 evidenzia una elevata affinità del composto di coordinazione verso la ribonucleasi: lo spettro in questione mostra una considerevole presenza di monoaddotto, è inoltre presente una quantità rilevabile di addotto tetrametallato. Rispetto alle misure relative al complesso Au<sub>2</sub>phen notiamo una forte diminuzione nella formazione di addotti con il citocromo c.. Per quanto riguarda la soluzione atox1-auoxo6 si conferma l'alta presenza di addotti con stechiometria 1:1 e 1:2, in particolare possiamo verificare una affinità leggermente più elevata dell'atox1 verso l'auoxo6 rispetto all'Au<sub>2</sub>phen esplicitata da una più alta concentrazione dell'addotto bimetallato.

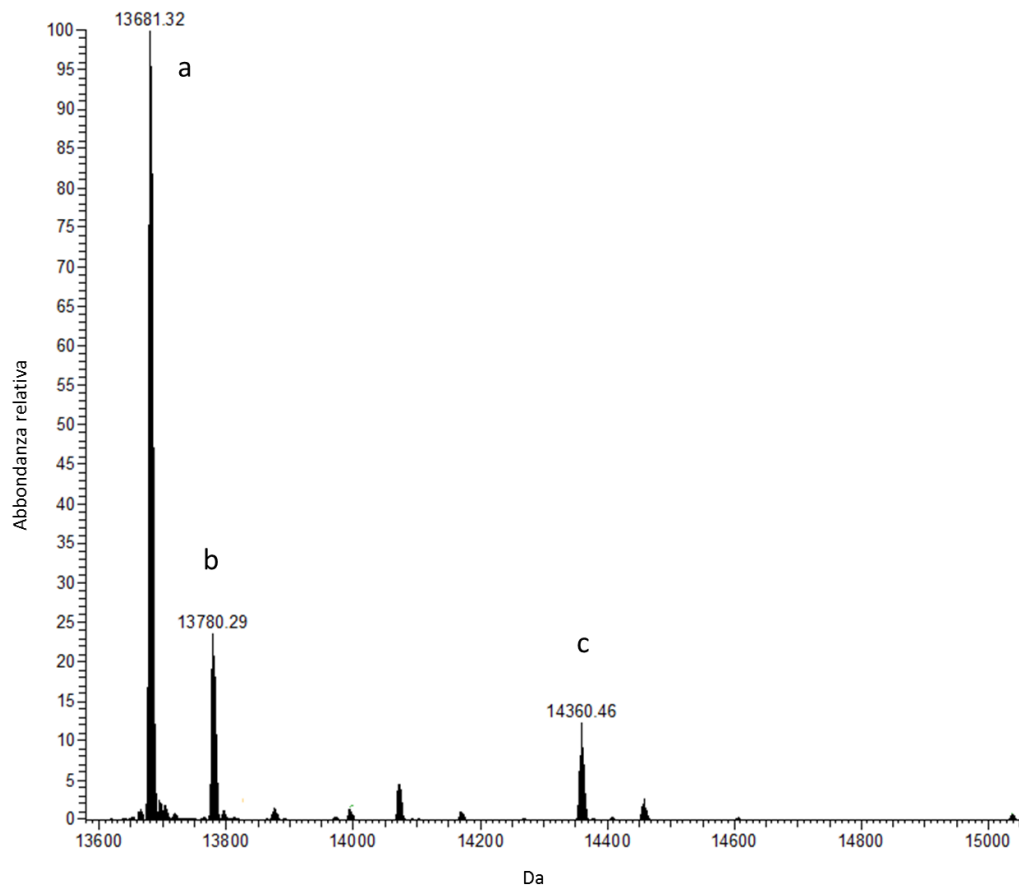
### 5.2.3 Soluzioni contenenti Auranofin

Di seguito si riportano gli spettri di massa ottenuti dalle soluzioni incubate in presenza di Auoxo6:

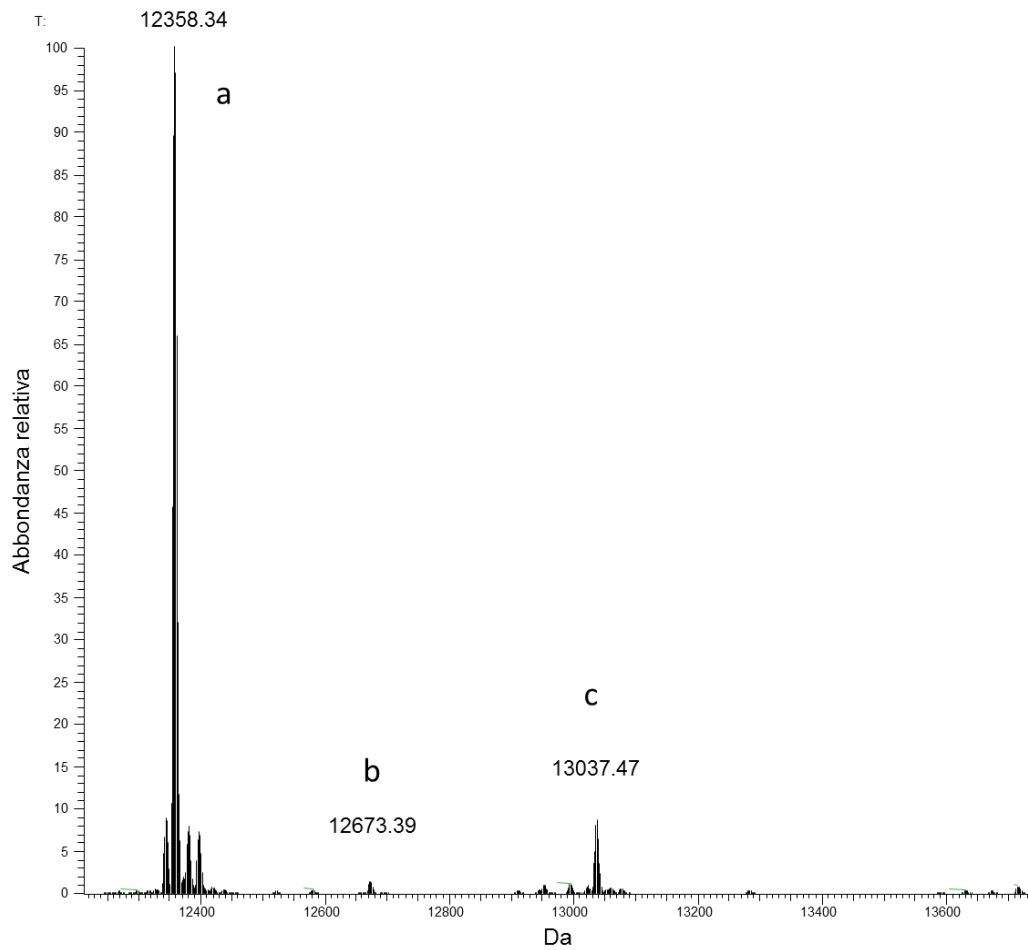


**Fig. 5.14** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auranofin e lisozima in rapporto 31 incubate per 72 ore a 37 °C. Lo spettro di massa presenta il picco relativo alla proteina nativa (a). Sono presenti picchi relativi alla formazione di addotti tra la proteina e l'intero complesso (c), tra la proteina e 2 molecole di Auranofin (d) e tra la proteina ed il composto di coordinazione privo della parte zuccherina (b).

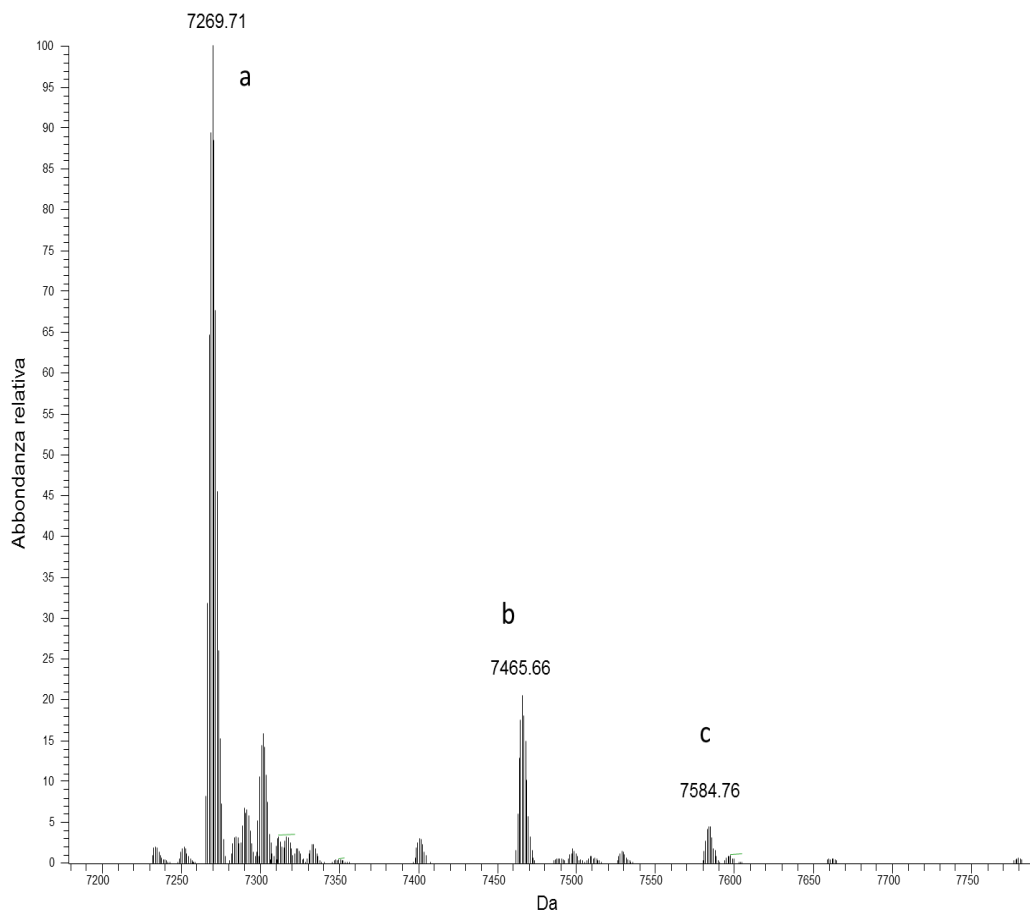




**Fig. 5.15** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auranofin e ribonucleasi in rapporto 3:1 incubata per 72 ore a 37 °C. Lo spettro, oltre al picco molecolare della proteina (a), evidenzia la formazione di un addotto ribonucleasi-fosfato (b) e di un addotto proteina-Auranofin (c).



**Fig. 5.16** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auranofin e ribonucleasi in rapporto 3:1 incubata per 72 ore a 37 °C. Anche in questo caso è visibile il picco relativo alla proteina nativa (a), a questo si affiancano il picco relativo alla formazione di un addotto citocromo c-Auranofin (c) ed il picco relativo all'addotto formatosi tra la proteina ed il composto di coordinazione privo del motivo glicosidico (b).



**Fig. 5.17** Spettro di massa ottenuto dalla soluzione contenente Auranofin e atox1 in rapporto 11 incubate per 48 ore ad una temperatura di 30 °C. Rispetto alle altre soluzioni contenenti Atox1 è evidente la diminuzione di formazione degli addotti: visibile il picco relativo alla proteina nativa (a). I rimanenti picchi evidenziano la formazione di un addotto atox1-Au(I) (b) e di uno tra la proteina ed il composto di coordinazione privo del tiozucchero (c).

Auranofin mostra un meccanismo di azione radicalmente differente dai complessi precedentemente analizzati. Au<sub>2</sub>phen ed Auoxo6 interagiscono infatti con la proteina attraverso una reazione di riduzione, questa porta alla formazione di addotti metallo-proteina in cui lo ione monovalente risulta coordinato linearmente dai gruppi funzionali appartenenti alle catene laterali dei residui amminoacidici della proteina.. Gli spettri di massa delle soluzioni di Auranofin dimostrano invece la formazione di addotti tra le proteine ed il complesso, che in questo caso rimane intatto o tra la proteina ed un frammento del composto stesso. La presenza dell'addotto proteina-Auranofin è confermata in tutte le soluzioni tranne che in quella contenente atox1, nella soluzione Auranofin-lisozima si arriva a ottenere un addotto contenente ben due molecole di Auranofin.

### 5.3 Risultati spettroscopia ICP-OES

L'utilizzo di una tecnica sensibile come ICP-OES ci ha permesso di ottenere dati quantitativi riguardanti la capacità dei tre complessi analizzati di formare addotti con le proteine modello. Per ottenere la massa di oro contenuta all'interno dei vari campioni è stato necessario calcolare il volume delle soluzioni in cui è avvenuto l'attacco acido e che successivamente sono state sottoposte ad indagine spettroscopica.

	Vcampione	Vcampione	m(Au)/V	m(Au)
	mL	L	ug/L	ug
<b>Au2phen-LisoZ</b>	5,393	0,005393	2212,9	11,93401
<b>Au2phen-RNasi</b>	5,283	0,005283	4503,8	23,79569
<b>Au2phen-Cyt C</b>	5,095	0,005095	3674,2	18,71808
<b>Auoxo6-LisoZ</b>	5,549	0,005549	2623,8	14,55942
<b>Auoxo6-RNasi</b>	5,096	0,005096	19384,8	98,77935
<b>Auoxo6-Cyt C</b>	5,296	0,005296	11285,5	59,76241
<b>Auranofin-LisoZ</b>	5,003	0,005003	88,6	0,443142
<b>Auranofin-RNasi</b>	5,958	0,005958	632,2	3,766495
<b>Auranofin-Cyt C</b>	5,349	0,005349	677,3	3,622423
<b>Au2phen-ATOX1</b>	5,108	0,005108	580,1	2,963065
<b>Auoxo6-ATOX1</b>	5,679	0,005679	655,8	3,723866
<b>Auranofin-ATOX1</b>	5,619	0,005619	1280	7,192491

L'elevata sensibilità della tecnica ha richiesto di intervallare le misurazioni sui campioni con letture di bianchi con lo scopo di eliminare dallo strumento eventuali tracce di oro relative alla precedente acquisizione (effetto memoria). I valori di concentrazione sono stati corretti attraverso la misura dell'intensità di emissione di 2 bianchi, una nella parte iniziale dell'acquisizione ed uno al termine delle misurazioni. La media delle concentrazioni ottenute dalle letture dei bianchi è stata sottratta alla concentrazione dei campioni.

I dati ottenuti dall'ICP-OES mostrano un elevata quantità di oro presente all'interno delle soluzioni contenenti Auoxo6, in particolare il complesso ha mostrato una elevata affinità con la molecola di ribonucleasi. Il risultato è confermato dallo spettro di massa il quale ci permette di affermare che dei 98.8 µg di oro coordinati alla proteina la maggior parte è impegnata nel formare addotti mono-metallati mentre la restante forma con la ribonucleasi composti con stechiometria 1:3. Le soluzioni contenenti Au<sub>2</sub>phen mostrano in assoluto quantità di oro inferiori, possiamo però notare una maggiore capacità di questo complesso a generare addotti con ribonucleasi e citocromo c (valori di massa di oro legato pari a 23.8 e 18.7 µg) che con lisozima. La stessa tendenza è presente anche nelle soluzioni incubate in presenza di Auranofin, è possibile infatti notare il basso valore di oro legato pari a 0.44 µg. Lo stesso complesso però, al contrario di Auoxo6 e Au<sub>2</sub>phen, mostra una buona capacità di legarsi all'atox1, tale affinità è evidenziata da una quantità di oro legata (7.2µg) quasi doppia rispetto agli altri composti di coordinazione.

## 5.4 Conclusioni

Nell'ultimo decennio, i complessi di oro hanno guadagnato crescente attenzione come potenziali agenti antitumorali. Le modalità con cui tali complessi esplicano il loro effetto citotossico rimangono tuttavia in larga parte sconosciute. Riscontri sperimentali permettono di ipotizzare come, questa classe di complessi, a differenza dei farmaci a base di platino attualmente in clinica, sia scarsamente reattiva nei confronti del DNA<sup>32</sup>. È possibile supporre quindi che la loro azione biologica sia dovuta all'interazione con le proteine; infatti l'inattivazione di proteine cellulari essenziali, in seguito alla coordinazione del centro metallico, può rappresentare un evento capace di innescare processi che culminano nella morte cellulare programmata (apoptosi).

In questo lavoro di tesi sono state analizzate, in modo sistematico, le interazioni di tre complessi metallici a base di oro ( $Au_2phen$ ,  $Auoxo6$  ed Auranofin) con quattro proteine modello (lisozima, citocromo c, ribonucleasi e atox1). Tale studio ha permesso di ottenere dettagli a livello molecolare sul processo di metallazione della proteina ad opera dei diversi farmaci.

Auranofin, è un composto di coordinazione in cui il metallo è presente nella sua forma monovalente. Tale composto è già utilizzato come farmaco per le sue proprietà antinfiammatorie per il trattamento di artrite reumatoide. Il complesso possiede una struttura lineare in cui il centro metallico viene coordinato da una molecola di trietilfosfina e da un legante tetraacetiltioglicosidico.

$Au_2phen$  ed  $Auoxo6$  sono invece due composti dell'oro(III) dinucleari, con geometria quadrato planare. Entrambi i complessi sono caratterizzati dalla presenza di un core a diamante, in cui i due anioni  $O^{2-}$  coordinano i due atomi di oro.  $Au_2phen$  è caratterizzato dalla presenza dei due leganti 2,9-dimetilfenantrolina che coordinano e conferiscono adeguata stabilità ai due centri metallici mentre  $Auoxo6$  possiede due leganti 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridina.

Il protocollo sperimentale utilizzato ha previsto l'utilizzo di due tecniche indipendenti: spettrometria di massa e spettroscopia di emissione ICP-OES.

Attraverso tali tecniche è stato possibile ottenere informazioni riguardanti la tipologia (ESI-MS) e la quantità (ICP-OES) di addotto formatosi.

Gli spettri di massa hanno evidenziato come il tipo e l'abbondanza relativa degli addotti vari in funzione del complesso e della proteina in esame.

I complessi Au<sub>2</sub>phen ed Auoxo6 interagiscono con le proteine formando addotti stabili a varia stechiometria. Il meccanismo di reazione, per entrambi, prevede la perdita dei leganti a seguito della riduzione del centro metallico (il quale allo stato di ossidazione +1 non è in grado di coordinarsi con geometria quadrata-planare) che viene quindi coordinato dai gruppi disponibili dei residui amminoacidici.

Au<sub>2</sub>phen e Auoxo6 hanno mostrato la capacità di formare addotti tetrametallati con il citocromo c: è dunque ipotizzabile che vi sia più di un sito di binding utile alla coordinazione. Come riportato in letteratura, tali siti sono verosimilmente rappresentati da residui amminoacidici accessibili quali met-65 met-80 his-18 his-33<sup>33</sup>.

Dagli spettri di massa delle soluzioni incubate in presenza dei due complessi di Au(III) è possibile inoltre notare una elevata produzione di addotto metallo-ribonucleasi (rapporto circa 1:1), tale risultato può essere spiegato dalla struttura della proteina la quale è in grado di fornire due residui di istidina (His119 ed His12) per coordinare un singolo ione Au(I)<sup>34</sup>. Al contrario gli spettri acquisiti dalle soluzioni Auoxo6-lisozima e Au<sub>2</sub>phen-lisozima hanno mostrato la formazione di una bassa quantità di addotti. In questo caso, l'ipotesi più probabile è che la coordinazione del centro metallico avvenga ad opera del residuo His15.

La stessa tendenza è stata confermata dall'analisi ICP-OES: entrambi i complessi di Au(III) hanno mostrato una maggiore capacità di legarsi a citocromo c e ribonucleasi rispetto al lisozima.

Auranofin ha mostrato un meccanismo di azione del tutto diverso, gli spettri di massa ottenuti hanno evidenziato la formazione di addotti contenenti l'intera molecola o il complesso privo del tio-zucchero. Il complesso manifesta perciò una maggiore stabilità riuscendo comunque ad interagire con le proteine



attraverso il centro metallico, senza che questo sia coinvolto in meccanismi ossidoriduttivi.

L'analisi ICP-OES ha confermato anche nel caso di Auranofin la minore capacità di formare addotti da parte del lisozima. Confrontando i valori di oro legatosi alle proteine è possibile notare come i complessi di oro(III) riescano a formare una maggiore quantità di addotto con lisozima, ribonucleasi e citocromo c rispetto ad Auranofin. Tale capacità è probabilmente dovuta alla maggiore reattività di questi complessi. Gli spettri di massa in presenza di Atox1 mostrano la formazione di addotti mono o bimetallati, nota la sequenza amminacidica possiamo supporre che i siti di binding per l'oro siano rappresentati dai residui di cisteina 12 e 15, gli stessi siti sono i responsabili del trasporto di ioni  $\text{Cu}^+$  all'interno del citoplasma<sup>35</sup>.

Alla luce dei risultati ottenuti possiamo affermare che il protocollo di analisi messo a punto è adatto ad ottenere informazioni sia qualitative che quantitative riguardo l'interazione tra i complessi metallici e proteine modello. I risultati dimostrano come i complessi di oro oggetto di studio agiscano come profarmaci e siano attivati da reazioni di riduzione oppure parziale o completo rilascio dei leganti, al termine delle quali il centro metallico è coordinato dai residui amminoacidici accessibili che possiedono gruppi donatori come cisteina, metionina e istidina. Inoltre è possibile confermare la capacità di Auranofin di interagire con proteine chiave del metabolismo cellulare come Atox1.

Concludendo sono state evidenziate reattività diverse in funzione del complesso così come delle diverse proteine target; occorre inoltre sottolineare ancora una volta come l'interazione con proteine rappresenti un aspetto essenziale nello studio di metallo-farmaci. Da questo punto di vista, studi come quello effettuato in questo lavoro di tesi su sistemi modello possono dare dunque importanti informazioni meccanicistiche.

## 6.Bibliografia

- [1] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, **1965**, 205 698.
- [2] C. Orvig, M.J. Abrams, Special Issue on Medicinal Inorganic Chemistry, *Chem. Rev.* **1999**, 99.
- [3] B.K. Keppler, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy, *VCH, Weinheim, New York*, **1993**, 391
- [4] P. Pil, S.J. Lippard, encyclopedia of cancer, *J.R. Bertino (ed.), academic press*, **1997**, 392.
- [5] L.R. Kelland, *Drugs*, **2000**, 59 suppl. 4:1-8, discussion 37-8.
- [6] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, 99,2467.
- [7] S.E. Miller, D.A. House, *inorg. Chim. Acta*, **1989**, 166, 189.
- [8] P.J. Whitehead, S.J. Lippard, Metal Ions in Biological Systems, *A. Sigel, H.Sigel (ed), Marcel Dekker, Inc.: New York*, **1996**, vol.32
- [9] K.B. Lee, D. Wang, S.J. Lippard, P.A.Sharp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 4239
- [10] J. Reedijk, New Clues for platinum antitumour chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 3611-3616.
- [11] M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K Keppler, Antitumor metal compounds: More than theme and variations. *Dalton Trans.*, **2008**, 183-194.
- [12] B.K. Keppler, E.A. Vogel, in: H.M. Pinedo, J.H. Schornagel (Eds.), Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy, *Plenum Press, New York*, **1996**, p. 253.
- [13] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, D.J. Ellis, P.A. Salter, R. Scopelliti, *j. organomet. Chem.* **2003**, 668, 35.
- [14] M.J. Clarke, V. Bailey, P.Doan, C. Hiller, K.J. LaChance-Galang, H.Daghlian, S.Mandal, C.M. Bastos, D. Lang, *inorg.chem.* **1996**, 35, 4896.

- [15] R.A. Sanchez-Delgado, M. Navarro, H. Perez, J.A. Urbina, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1095
- [16] R.E. Aird, J. Cummings, A.A. Ritchie, M. Muir, R.E. Morris, H. Chen, P.J. Sadler, D.I. Jodrell, *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 1652
- [17] E. Melendez, Titanium complexes in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2002**, 42, 309-315.
- [18] B.K. Keppler, M. Hartmann, New tumor-inhibiting metal complexes. chemistry and antitumor properties. *Met. Based Drugs*, **1994**, 1, 145-150.
- [19] P. Köpf-Maier, H. Köpf, W. Wagner, Different inhibition pattern of the nucleic acid metabolism after *in vitro* treatment with titanocene and vanadocene dichlorides. *Naturwissenschaften*, **1981**, 68, 272-273.
- [20] P. Köpf-Maier, H. Köpf, Tumorhemmung durch titanocendichlorid: Erste hinweise zum wirkungsmechanismus, *Naturwissenschaften*, **1980**, 67, 415-416.
- [21] S.M. Cottrill, H.L. Sharma, D.B. Dyson, R.V. Parish, C.A. McAuliffe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, **1989**, 53 and references therein.
- [22] J. R. Ward, *Am. J. Med.*, **1988**, 85, 39.
- [23] F. Novelli, M. Recine, F. Sparatore, C. Juliano, triorganotin compounds as antimicrobial agents, *Farmaco*, **1999**, 54, 232.
- [24] Chiara Gabbiani, Corso Metalli Medicina, **2014**, lezione 8-9, 25.
- [25] L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca`, A. Trevisan, D. Fregona, Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: Solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties, *J Med Chem*, **2006**, 49, 1648–1657.
- [26] L. Engman, M. McNaughton, M. Gajewska, S. Kumar, A. Birmingham, G. Powis, Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold(III) compounds, *Anticancer Drugs*, **2006**, 17, 539–544.
- [27] C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M.P. Rigobello, Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, 42, 872–881.
- [28] M.P. Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M. Agostina Cinellu, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: Consequences on mitochondrial functions, *J Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1634–1641.

- [29] M.T. Coffey, C.F. Shaw III, M.K. Eidsness, J.W. Watkins II, R.C. Elder, Reactions of auranofin and Et<sub>3</sub>PAuCl with bovine serum albumin, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 333–339.
- [30] M.A. Cinellu, G. Minghetti, M. V. Pinna, S. Stoccoro, A. Zucca, M. Manassero and, M. Sansoni,  $\mu$ -Oxo and alkoxo complexes of gold(III) with 6-alkyl-2,2'-bipyridines. Synthesis, characterization and X-ray structures *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 1735–1742.
- [31] M.A. Cinellu, L. Maiore, M. Manassero, A. Casini, M. Arca, H. Fiebig, G. Kelter, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Gabbiani, L. Messori, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 336.
- [32] C.Gabbiani, L. Massai, F. Scaletti, E. Michelucci, L. Maiore, M.A. Cinellu, L. Messori, Protein metalation by metal-based drugs: reactions of cytotoxic gold compounds with cytochrome c and lysozyme, *J Biol Inorg Chem*, DOI: 10.1007/s00775-012-0952-6
- [33] T. Zhao, F.L. King, Direct Determination of the Primary Binding Site of Cisplatin on Cytochrome c by Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, 20, 1141–1147
- [34] L. Messori, F. Scaletti, L. Massai, M., A. Cinellu, I.R. Krauss, G. di Martino, A. Vergara, L. Paduano, A. Merlino, Interactions of gold-based drugs with proteins: crystal structure of the adduct formed between ribonuclease A and a cytotoxic gold(III) compound, *Metallomics*, **2014**, , 6, 233-236.
- [35] C. Gabbiani, F. Scaletti, L. Massai, E. Michelucci, M.A. Cinellu, L. Messori, Medicinal gold compounds form tight adducts with the copper chaperone Atox-1: biological and pharmacological implications, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 11623–11625.