



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

**Studio dell'interazione di DNA con
complessi di metalli di transizione**

Tesi di Dottorato del
Dott. Riccardo Bonsignore

Tutor
Dott. Giampaolo Barone

Co-Tutor
Prof. Antonino Lauria

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

XXIV Ciclo

*“Yet the timeless in you is aware of life's timelessness
And knows that yesterday is but today's memory and tomorrow is today's dream”*

Kahlil Gibran, The Prophet

A mio Padre.

Sommario

| | |
|--|----|
| Abstract | 2 |
| Capitolo 1 - Introduzione | 3 |
| 1.1 La struttura del DNA | 4 |
| 1.2 Meccanismi di interazione con il DNA | 11 |
| 1.3 L'importanza dei metalli | 20 |
| 1.4 G4-DNA binders | 24 |
| Capitolo 2 - Studio dell'interazione con DNA di complessi di Ni^{II}, Cu^{II} e Zn^{II} con basi di Schiff tetradentate planari. | 27 |
| 2.1 Introduzione | 28 |
| 2.2 Sintesi e caratterizzazione | 31 |
| 2.3 Studio dell'interazione con DNA-duplex | 32 |
| 2.4 Studio dell'interazione con G4-DNA | 42 |
| 2.5 Saggi biologici | 53 |
| 2.6 Conclusioni | 61 |
| 2.7 Parte sperimentale | 62 |
| Capitolo 3 – Studio dell'interazione con DNA di leganti triazinici. | 70 |
| 3.1 Introduzione | 71 |
| 3.2 Studio dell'interazione con DNA-duplex | 72 |
| 3.3 Conclusioni | 77 |
| 3.4 Parte sperimentale | 78 |
| Ringraziamenti | 79 |
| Curriculum Accademico | 80 |
| Appendice | 82 |
| Bibliografia | 87 |

Abstract

Il presente lavoro di tesi è costituito di tre capitoli. Un'introduzione generale sulla struttura del DNA e sui principali metodi di interazione di piccole molecole con il polinucleotide è l'oggetto del Capitolo 1. Nel Capitolo 2 sono descritti le sintesi di complessi di basi di Schiff di Ni^{II}, Cu^{II} e Zn^{II} (**1**, **2** e **3**) e gli studi effettuati sull'interazione con B-DNA e G4-DNA in soluzione acquosa. I risultati ottenuti mostrano che i tre complessi sono intercalanti del B-DNA, stabilizzanti ed in grado di indurre la formazione di strutture G4-DNA. I risultati di DNA-*binding* trovano un ottimo riscontro negli studi dell'attività citotossica *in vitro* condotti su linee cellulari tumorali umane, mediante saggi sull'attività anti-proliferativa, sul ciclo cellulare e sull'arresto della reazione a catena della polimerasi (PCR). In dettaglio, è stata dimostrata la capacità dei tre complessi di bloccare efficacemente la replicazione delle cellule tumorali, con un ordine di efficacia che segue l'ordine della forza di DNA-*binding*: **1** > **2** > **3**. L'arresto della PCR dei complessi **1** e **2** è in particolare correlata alla loro capacità di indurre la formazione di strutture G4 su opportune sequenze nucleotidiche. Il Capitolo 3 è incentrato sullo studio dell'interazione di B-DNA con quattro nuovi leganti triazinici, che hanno mostrato attività anti-proliferativa nei confronti di linee cellulari tumorali.

Capitolo 1

Introduzione

| | |
|--|----|
| 1.1 La struttura del DNA | 4 |
| 1.2 Meccanismi di interazione con il DNA | 11 |
| 1.2.1 Interazione covalente | 11 |
| 1.2.2 Intercalazione | 13 |
| 1.2.3 Groove binding | 16 |
| 1.3 L'importanza dei metalli | 20 |
| 1.4 G4-DNA binders | 24 |

1.1. La struttura del DNA

Il DNA, acido desossiribonucleico, è la biblioteca della cellula, che conserva e dispensa tutte le informazioni necessarie per espletare le proprie funzioni vitali. Da un punto di vista chimico-farmaceutico, esso rappresenta un recettore per diversi tipi di farmaci, tra cui quelli ad azione antitumorale. Tali farmaci, nella maggior parte dei casi, sono poco selettivi non potendo distinguere il DNA di una cellula tumorale da quello di una cellula sana. Ciò che differenzia queste due tipologie di cellule è soprattutto la presenza nella prima di un'incontrollata divisione cellulare. In una cellula tumorale i geni relativi alla proliferazione cellulare sono sempre attivati al fine di garantire un costante processo mitotico e, di conseguenza, la differenziazione cellulare appare spenta o solo parzialmente attivata. Un agente *DNA-binder* non potendo discriminare tra i due tipi cellulari attaccherà sia la cellula sana che quella tumorale ma, per la sua più lenta divisione cellulare, una cellula normale potrà attivare diversi meccanismi di riparazione del genoma.¹

Il DNA è un polimero lineare le cui unità monomeriche sono rappresentate dai nucleotidi, molecole costituite da un gruppo fosfato, un anello β -furanosidico di 2-deossiribosio e una base azotata.

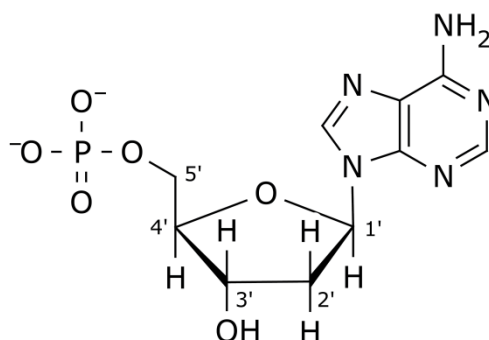


Figura 1. Struttura di un nucleotide con il gruppo fosfato in posizione 5'.

Esistono due diverse tipologie di basi azotate nel DNA: basi puriniche, adenina e guanina, e basi pirimidiniche, ossia citosina e timina.

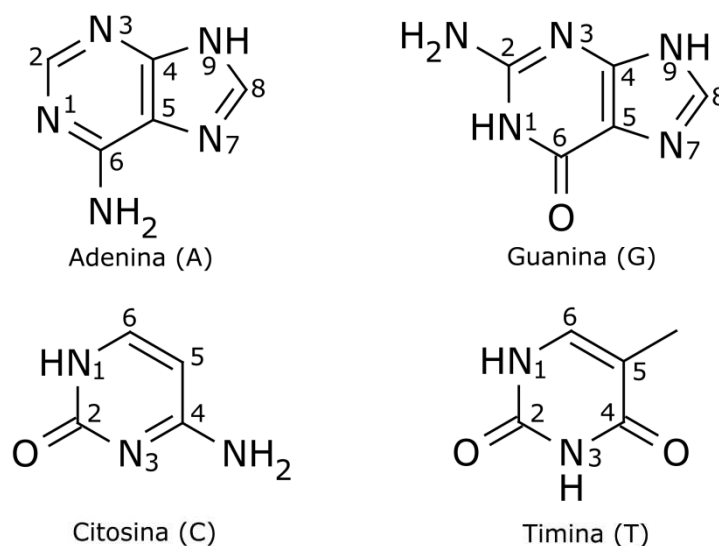


Figura 2. Struttura delle quattro basi azotate del DNA.

La base azotata di un nucleotide è legata, con un legame N- β -glicosidico, all'atomo di carbonio 1' del pentosio, mediante l'atomo di azoto N1 nelle pirimidine o l'atomo N9 nelle purine.

I quattro deossiribonucleotidi sono covalentemente legati tra loro mediante il fosfato in posizione 5' di un nucleotide e la funzione ossidrilica presente in posizione 3' dello zucchero del nucleotide seguente.² Tale legame, detto 5'-3' fosfodiesterio, risulta essere particolarmente stabile poiché la carica negativa del gruppo fosfato, in condizioni fisiologiche, previene da eventuali attacchi nucleofili.¹

La più comune tra le strutture secondarie del DNA, la struttura B, fu elucidata per la prima volta da Watson e Crick nel 1953:³ essi proposero che l'acido deossiribonucleico fosse costituito da due filamenti polinucleotidici avvolti ad elica intorno ad un asse centrale, seguendo un andamento destrorso ed anti-parallelo, ossia che un filamento scorresse in direzione 5'-3' e l'altro in quella opposta, cioè 3'-5'. Ogni filamento, così facendo, risulta costituito da uno scheletro di zuccheri e gruppi fosfato dal quale sporgono lateralmente le basi azotate legate allo zucchero, distanti assialmente 3.4 Å e ruotate di circa 36° lungo l'asse della doppia elica, nella conformazione assunta in condizioni fisiologiche.^{4,5} In questo modo sono necessarie 10 coppie di basi per compiere un giro completo dello scheletro della doppia elica. Inoltre, a causa dell'asimmetria dei due filamenti, ogni rotazione attorno all'asse causa la formazione di due scanalature aventi differente grandezza: i *major* ed i *minor grooves*, con ampiezza di circa 15 e 6 Å rispettivamente.⁶ Tali scanalature sono

fondamentali per l'interazione del polinucleotide con biomolecole, poiché sono le zone attraverso cui le basi azotate sono accessibili a fattori della trascrizione e/o a fattori della replicazione.

I due filamenti sono tenuti uniti da legami a idrogeno tra le basi azotate della doppia elica e, poiché la distanza tra i due filamenti è pressoché costante, il loro appaiamento non può avvenire in maniera casuale. Ad esempio, un appaiamento tra due purine occuperebbe uno spazio troppo grande per permettere un'elica regolare e, viceversa, un appaiamento tra due pirimidine ne occuperebbe troppo poco.¹ L'appaiamento avviene infatti solo tra basi complementari, secondo il cosiddetto “*Watson-Crick base pairings*”, ossia tra un'adenina ed una timina oppure tra una citosina ed una guanina. In questo modo la prima coppia condivide due legami ad idrogeno, con gli atomi N6 e N1 dell'adenina che si legano rispettivamente con l'O4 e l'N3 della timina, mentre per la coppia guanina e citosina si instaurano tre legami ad idrogeno tra O6, N1 e N2 della guanina con rispettivamente N4, N3 e O2 della citosina (vedi Figure 2 e 3). Le coppie di basi inoltre, sporgendo tutte verso il centro della doppia elica, danno luogo ad interazioni di *stacking* π - π che contribuiscono a stabilizzare ulteriormente la struttura del DNA, creando una regione cilindrica idrofobica all'interno della doppia elica ed una idrofilica esterna, costituita dallo scheletro zucchero-fosfato.⁷

Infine, la carica negativa dei gruppi fosfato nello scheletro del polinucleotide determina una repulsione elettrostatica tra i due singoli filamenti complementari. A contrastare questo evento è la presenza in soluzione di controioni, ad esempio K^+ e Na^+ o cationi divalenti, come il Mg^{2+} , che spesso legano a ponte due fosfati siti su filamenti opposti, stabilizzando ulteriormente la doppia elica.⁸

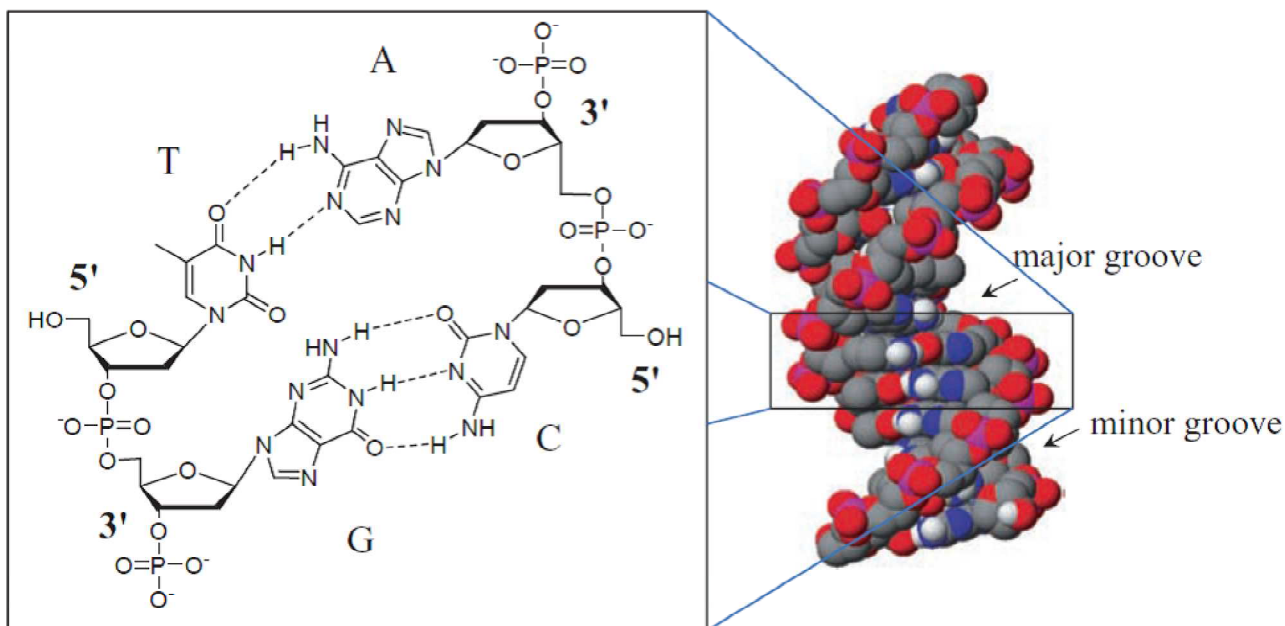


Figura 3. Struttura del B-DNA, in cui sono evidenziati i *grooves* ed i legami tra i monomeri che costituiscono la doppia elica. Gli atomi sono: carbonio (grigio), idrogeno (bianco), azoto (blu), ossigeno (rosso) e fosforo (viola).

Il DNA assume una distribuzione di conformazioni diverse a causa della flessibilità della catena di atomi di carbonio alchilici che costituisce lo scheletro del polimero, e quindi dell'elevato numero di angoli torsionali che descrivono la geometria dei singoli filamenti del polinucleotide.⁵ Le diverse conformazioni del DNA a doppia elica sono state raggruppate in famiglie, contraddistinte da lettere dell'alfabeto, e caratterizzate ciascuna da un ristretto intervallo di valori di parametri geometrici, quali ad esempio la distanza delle coppie di basi dallo stesso asse, l'inclinazione delle coppie di basi rispetto all'asse e ad un piano perpendicolare all'asse elicoidale, l'ampiezza delle scanalature (*grooves*) maggiore e minore. La conformazione più stabile in condizioni fisiologiche è detta B. Le altre due più comuni varianti strutturali del DNA sono dette A e Z. La prima è favorita in sistemi a scarso contenuto d'acqua ed infatti la sua presenza nelle cellule è ancora incerta. Nelle cellule possono essere presenti, invece, brevi tratti di Z-DNA, caratterizzato da un'elicità levogira, che sembrerebbe avere funzioni nella regolazione dell'espressione di alcuni geni o nella ricombinazione genetica.^{5,9}

Il polimorfismo del DNA ha suscitato un crescente interesse negli studiosi negli ultimi decenni, principalmente poiché è stato ritenuto una via per la regolazione dell'espressione genica e dunque un fattore da considerare per la cura di malattie

dovute a disordini genetici.⁸ Tra le strutture del DNA “non-canoniche”, particolare attenzione è stata rivolta verso i cosiddetti *DNA G-quadruplexes* (G4-DNA) ossia strutture costituite da tetradi di guanine unite da legami idrogeno di tipo *Hoogsteen*, diversi cioè da quelli comunemente ritrovati nella coppie di basi di Watson & Crick: essi infatti coinvolgono gli azoti N1, N2 e N7 e l’ossigeno O6 di ogni guanina, come rappresentato in Figura 4. Ogni quartetto è a sua volta in grado di disporsi, sebbene leggermente ruotato, parallelamente ad un altro quartetto dello stesso filamento attraverso interazioni di *stacking* π - π , formando in tal modo un polimero con struttura anch’essa elicoidale. Infine la tetraide è stabilizzata dalla presenza di ioni K^+ nel canale centrale, debolmente coordinati agli atomi di ossigeno O6 della guanina (Figura 4).

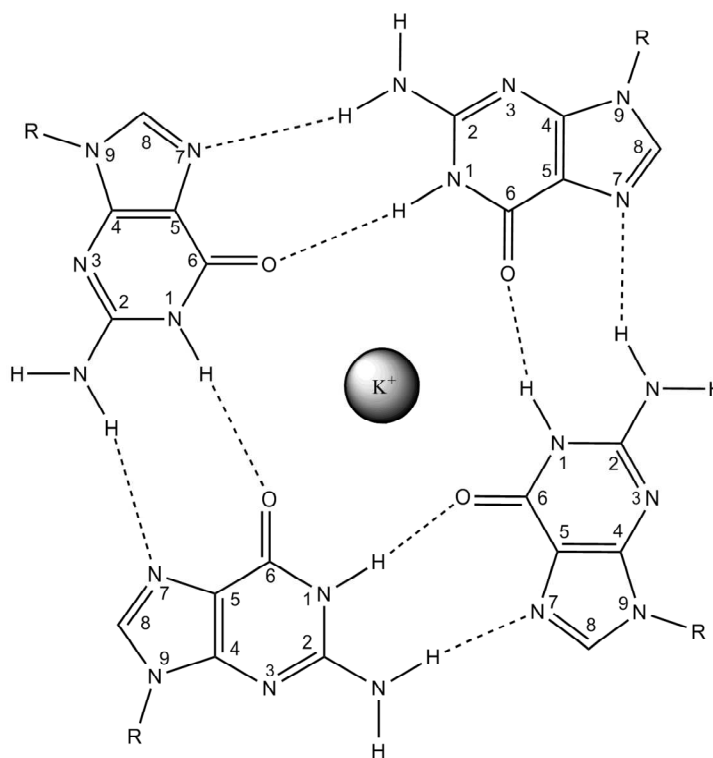


Figura 4. Tetrade di guanine legate da legami Hoogsteen.

Tali strutture G4 giocano un ruolo fondamentale nella replicazione cellulare e, per tale ragione, sono importanti nei processi carcinogeni e di invecchiamento.¹⁰⁻¹⁴ Inoltre, si ritiene che esse siano implicate nella regolazione dell’espressione del gene dell’insulina,¹⁵ nelle “*triplet repeat sequences*” responsabili di alcuni disordini neurologici come la *sindrome dell’X fragile*,¹⁶⁻¹⁹ nonché in patologie autoimmuni come il *lupus eritematoso*.²⁰

Da un punto di vista strutturale esistono diversi tipi di G4 a seconda della lunghezza dei *loop*, della sequenza e dell’orientamento dei filamenti rispetto all’asse principale

del G4. Inoltre, le strutture G4 possono essere sia di natura intramolecolare sia intermolecolare. In quest'ultimo caso, la struttura secondaria è data dall'unione di più filamenti che possono arrangiarsi in tutte le possibili combinazioni parallele ed antiparallele. In particolare, i filamenti di connessione, chiamati *loop*, sono così definiti: *edgewise* o laterali, che collegano due filamenti adiacenti antiparalleli; *loop double chain reversal* che uniscono due filamenti adiacenti paralleli, e *loop* diagonali, che legano due filamenti antiparalleli ma opposti (Figura 5).²¹

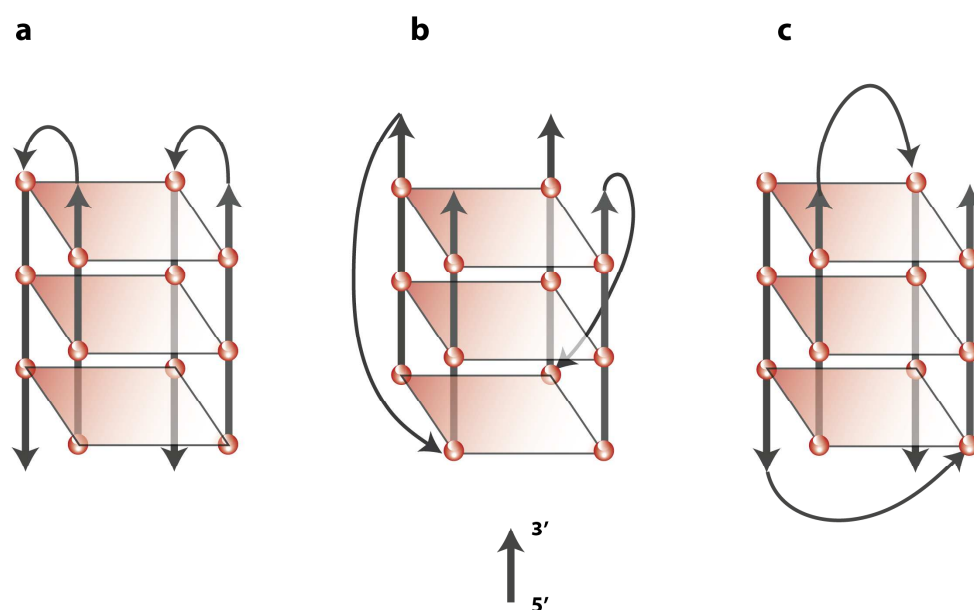


Figura 5. Rappresentazione schematica di G4 intermolecolare di tipo: antiparallelo *edgewise* (a); G4 parallelo *double chain reversal* (b); G4 antiparallelo diagonale (c).

Allo stesso modo un G4 può formarsi intramolecolarmente, ossia su uno stesso filamento, dando luogo ancora una volta a G4 antiparalleli *edgewise*, G4 antiparalleli *edgewise* e diagonali e G4 paralleli con *loop double chain reversal*, come rappresentato in Figura 6.

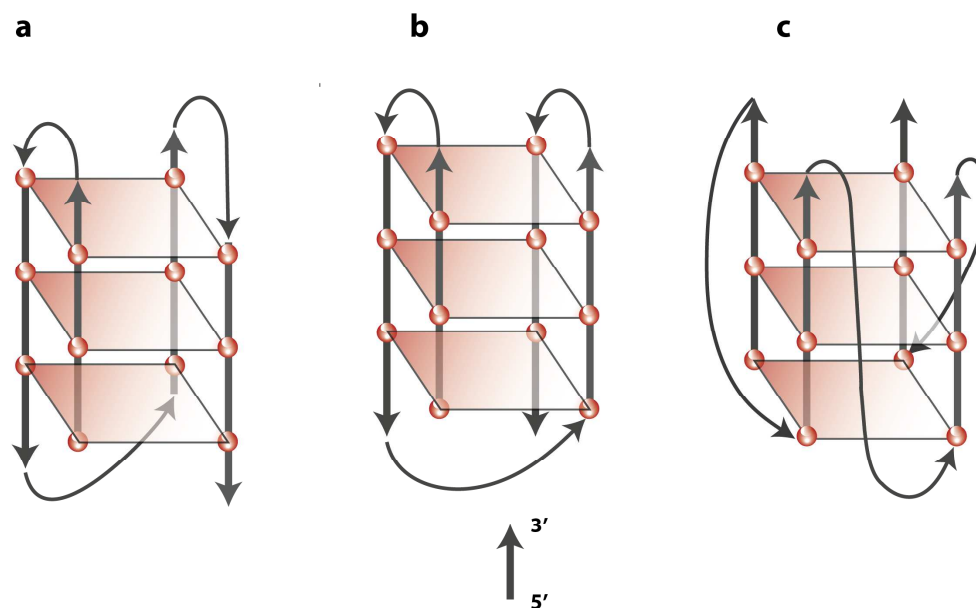


Figura 6. Rappresentazione schematica di G4 intramolecolari di tipo: antiparalleli *edgewise* (a); G4 antiparallelo *edgewise* e diagonale (b); G4 parallelo *double chain reversal* (c).

Nelle tetradi costituenti i G4, la disposizione della guanina rispetto al legame glicosidico non è sempre identica: è infatti possibile che, nella medesima tetraed, vi siano guanine con orientamento *sin* ed altre di tipo *anti* rispetto al ciclo del desossiribosio (vedi ad esempio la Figura 1, dove la base adenina è in *anti*) per un totale quindi di 16 possibili combinazioni per tetrade. Inoltre, anche la successione di guanine lungo lo stesso filamento può presentare altrettanto differente orientamento. Secondo una recente classificazione si può affermare che un G4 nel quale i filamenti scorrono nella stessa direzione, ossia un *quadruplex* parallelo, possiede sempre guanine impilate che presentano il medesimo orientamento. Le possibili strutture risultanti vengono definite del gruppo 1. I G4 antiparalleli invece possono essere di due tipi: nel gruppo 2, lungo uno stesso filamento, si riscontrano almeno due guanine con il medesimo orientamento e un'altra a differente disposizione, cioè sono ad esempio *sin-sin-anti* o *anti-anti-sin*. Infine un G4 antiparallelo del gruppo 3 è sempre costituito da guanine successive che presentano un orientamento differente, ad esempio *sin-anti-sin-anti* (Figura 7).²²

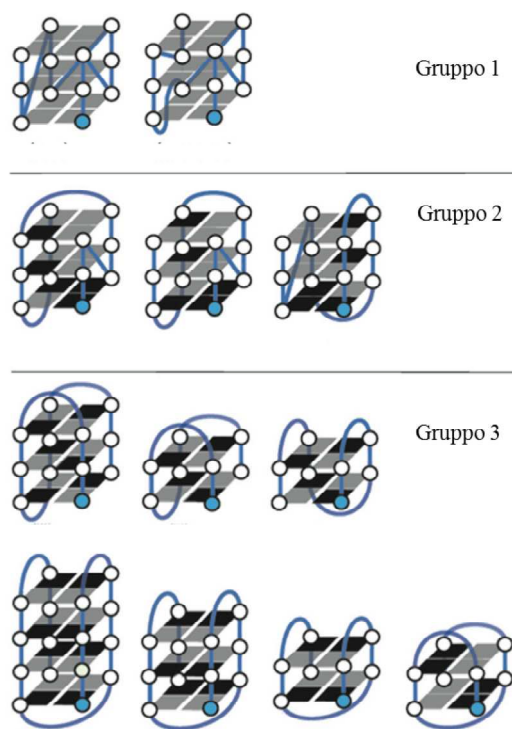


Figura 7. Classificazione in gruppi dei G4 in funzione dell'orientamento delle guanine contigue. La differente colorazione del quadrato indica un diverso orientamento: *syn* (nero) ed *anti* (grigio).²²

I G4 sono stati recentemente isolati, ad esempio, nei telomeri di cellule umane.^{23–26} Questi, sotto forma di G4, non sono suscettibili all'azione della telomerasi, enzima che durante la replicazione del DNA catalizza l'allungamento del polinucleotide in prossimità dei telomeri, e la cui inibizione induce senescenza e morte cellulare.^{27,28} Inoltre, altre regioni del DNA, ad esempio promoter di proto-oncogeni come *c-myc*, sono ricchi in guanine e, per tale ragione, possono organizzarsi per dar luogo a strutture di tipo G4.²⁹ Pertanto, il controllo nella formazione dei G4 può divenire un mezzo di cura per molte malattie come il cancro.

1.2. Meccanismi di interazione con il DNA

1.2.1. Interazione covalente

È ampiamente noto a partire dagli anni '70 che il DNA sia il bersaglio cellulare del *cis*-dicloro-diammino-platino(II) (*cis*-platino), uno tra i principali farmaci tuttora utilizzati in terapia antitumorale (Figura 9a).^{30,31} La natura dell'addotto formato con il polinucleotide non fu determinata sino agli anni '80, quando venne proposto un meccanismo di interazione basato su un legame di coordinazione tra due atomi N7 di guanine adiacenti e lo ione platino.³² Tale addotto fu caratterizzato strutturalmente nel

1995, quando Lippard *et al.* pubblicarono la struttura cristallina del *cis*-platino legato ad un dodecamero di DNA.³³ In questa struttura, la doppia elica, senza interruzione dei legami ad idrogeno di Watson e Crick, è ripiegata fortemente lungo il solco maggiore con un conseguente cambiamento conformazionale verso la forma A del DNA.

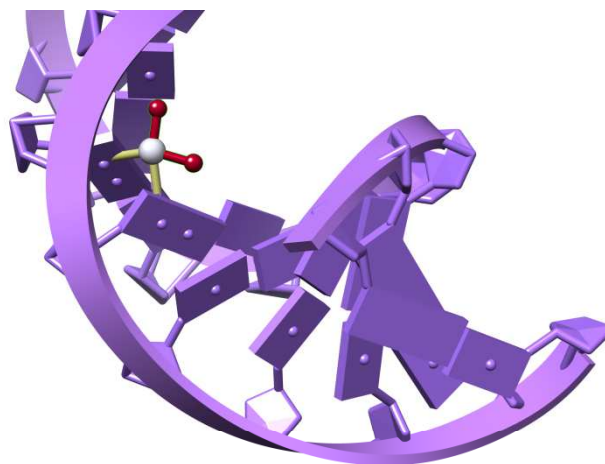


Figura 8. Struttura dell'addotto tra *cis*-diamminoplatino(II) e B-DNA.³³

Tale significativa distorsione è riconosciuta da una serie di proteine cellulari, dette “proteine contenenti il gruppo ad alta mobilità” (HMG) che, riconoscendo il complesso cisplatino-DNA, innescano una serie di lesioni citotossiche cui consegue l’inibizione della sintesi sia del RNA che del DNA.^{34,35}

Altri esempi di farmaci comunemente usati in terapia sono le molecole organiche mecloretamina, ciclofosfamide e carmustina (Figura 9b, c, d), dette alchilanti perché in grado d’esercitare effetti citotossici legandosi covalentemente ai gruppi nucleofili presenti su diversi costituenti cellulari, soprattutto il DNA inibendone trascrizione e replicazione.³⁵

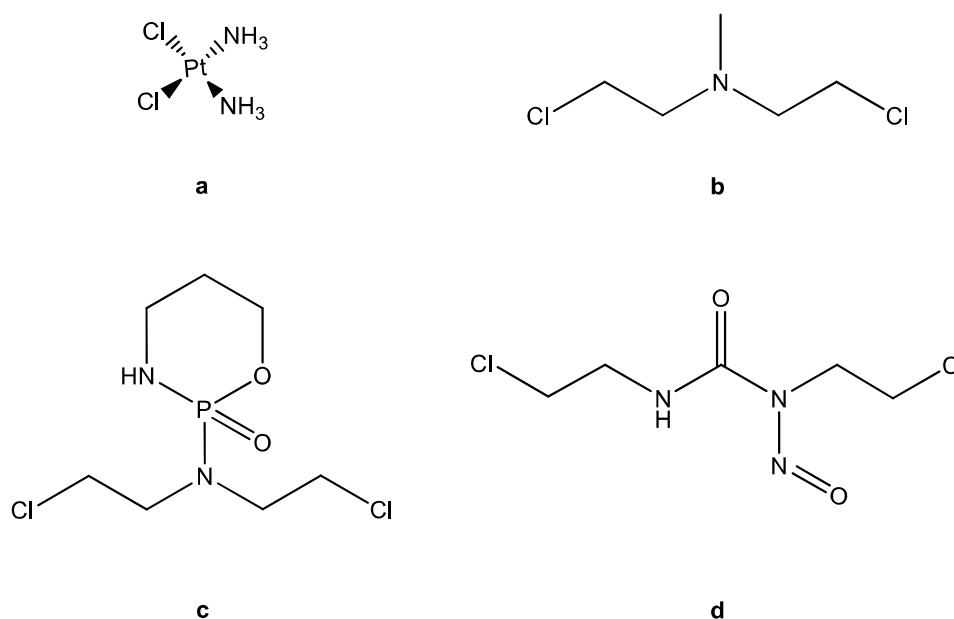


Figura 9. Strutture chimiche di alcune tra le molecole che interagiscono covalentemente con il DNA: cisplatino (a), mecloretamina (b), ciclofosfamida (c) e carmustina (d).

1.2.2. Intercalazione

Il concetto di intercalazione venne proposto circa cinquant'anni fa da Lerman per spiegare la forte affinità di alcuni cromofori aromatici per il DNA.^{36,37} Con il termine “intercalazione” ci si riferisce all’inserimento di un sistema planare ed aromatico tra due consecutive coppie di basi del DNA, perpendicolarmente rispetto all’asse della doppia elica.³⁷⁻³⁹ Tale interazione è stabilizzata principalmente da interazioni di *stacking* π - π e da interazioni idrofobiche.^{40,41}

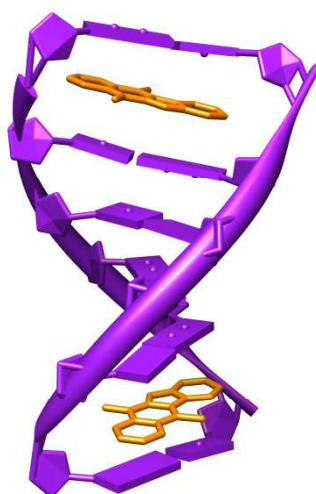


Figura 10. Struttura cristallografica di un’ellipticina intercalata nel B-DNA.⁴²

L'inserimento di un'intercalante non rompe i legami ad idrogeno tra le coppie di basi A-T, G-C ma causa una sostanziale variazione nella struttura del DNA che perde la sua regolare struttura elicoidale: gli angoli torsionali della catena zucchero-fosfato cambiano per permettere l'ingresso dell'agente intercalante, con conseguente separazione assiale di due basi consecutive, allungamento e srotolamento del DNA.⁴³ Come naturale conseguenza, il polinucleotide non è più in grado di funzionare da stampo per il processo di replicazione ed è al tempo stesso inutilizzabile per la trascrizione proteica. Infatti, le variazioni strutturali indotte a seguito dell'intercalazione rendono il polinucleotide irricognoscibile da parte dei fattori proteici ed enzimatici che catalizzano sia la trascrizione proteica che la replicazione del genoma. Inoltre, l'incapacità da parte di enzimi di riparazione nel riconoscere il polinucleotide, rende spesso impossibile alla cellula la riparazione dei danni accumulati nel DNA con conseguente ingresso in fase apoptotica e morte cellulare. Negli ultimi 50 anni, cioè a partire dai primi esperimenti di Lerman riguardanti il *binding* di acridine e proflavine al DNA^{36,37}, il numero di molecole intercalanti studiate è cresciuto a dismisura ma generalmente queste possono essere raggruppate in sei diverse famiglie: antraceni, acridine, antrachinoni, fenantridine, fenantroline ed ellipticine (Figura 11).

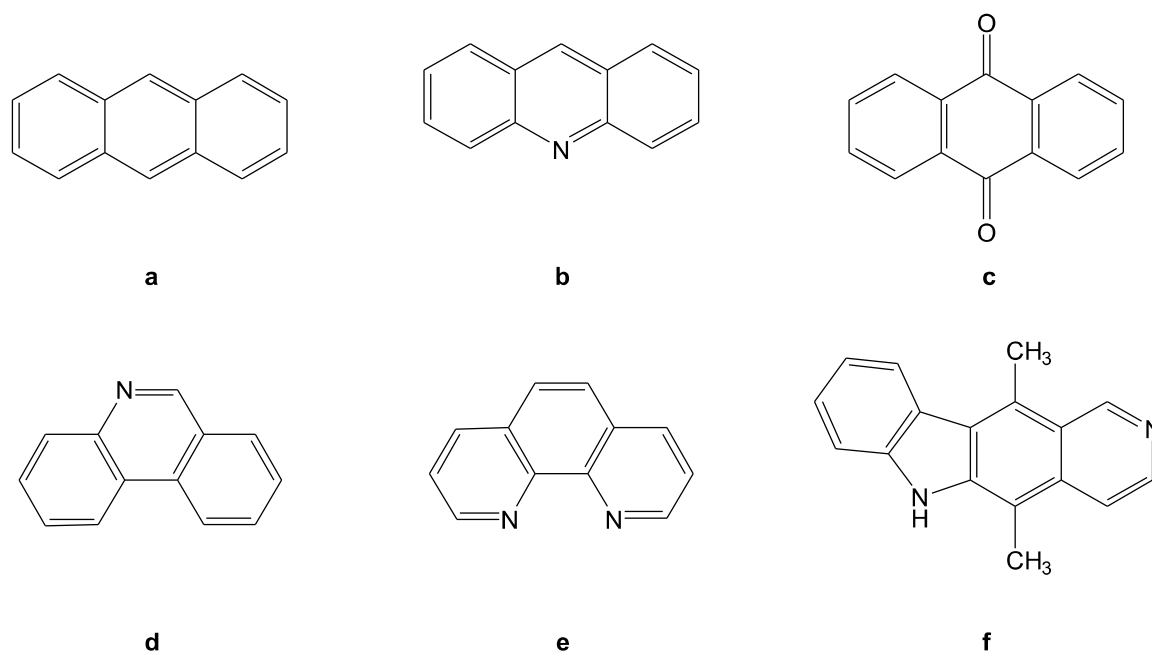


Figura 11. Principali strutture di molecole intercalanti: antracene (a), acridina (b), antrachinone (c), fenantridina (d), fenantrolina (e) ed ellipticina (f).

Attualmente esistono quattro principali intercalanti organici approvati dal *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento dei carcinomi umani: daunorubicina, doxorubicina, mitoxantrone e amsacrina (Figura 12).⁴¹ La prima molecola (Figura 12a) è un farmaco naturale prodotto dal batterio *Streptomyces coeruleorubidus* ed è usato nel trattamento di molte leucemie acute o, come preparazione liposomiale, nel trattamento dell'HIV correlato al *sarcoma di Kaposi*. La doxorubicina (Figura 12b) è prodotta dal batterio *Streptomyces peucetius* (var. *caesius*) ed è l'analogo idrossilato della daunorubicina: malgrado la loro somiglianza strutturale, l'applicazione terapeutica di tale agente è assai differente. La doxorubicina è impiegata in combinazione con altri farmaci nella terapia dei sarcomi e di molti carcinomi, compresi il carcinoma della mammella e del polmone, nonché nella leucemia linfocitica acuta e dei linfomi. Entrambe le antracicline, inoltre, agiscono sia nella fase S che nella fase G2 del ciclo cellulare e, oltre all'azione intercalante, si legano alla membrana cellulare impedendo il corretto funzionamento dei trasporti dipendenti dall'attivazione del fosfatidil-inositolo e producono radicali dell'ossigeno a seguito della riduzione a radicali liberi semichinolonici, catalizzata dalla citocromo p-450 riduttasi, con rottura finale dei filamenti del DNA.^{35,44}

Il mitoxantrone (Figura 12c), sebbene sia utilizzato come immunosoppressore nel trattamento della Sclerosi Multipla (MS), viene anche utilizzato in aggiunta ad altri farmaci antineoplastici nel trattamento della leucemia acuta non-linfocitica negli adulti. L'amsacrina, o m-AMSA, (Figura 12d) è stata lungamente utilizzata nel trattamento delle leucemie acute adulte e dei linfomi maligni ma recentemente è stata classificata quale "farmaco orfano", ossia un farmaco che non viene prodotto o immesso sul mercato poiché la scarsa domanda è insufficiente a coprire i costi di produzione e fornitura.⁴¹

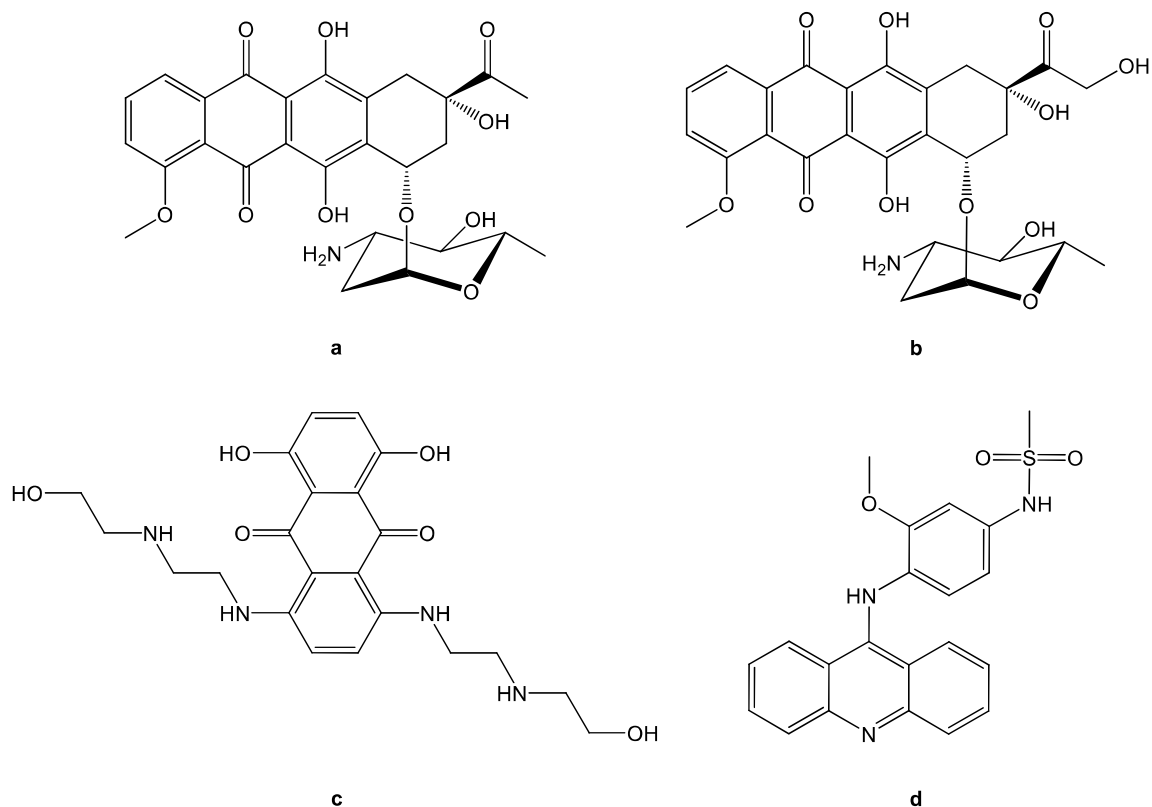


Figura 12. Strutture di quattro principali intercalanti usati in terapia: Daunorubicina (a), Doxorubicina (b), Mitoxantone (c) e Amsacrina (d).

1.2.3. *Groove binding*

Con il termine *groove binder* ci si riferisce ad una classe di composti in grado di legarsi ai solchi del DNA. Tali zone rappresentano infatti i siti cui si legano i fattori regolanti la trascrizione proteica o la replicazione del DNA mediante interazioni idrofobiche e legami ad idrogeno.⁴⁵ Un *groove binder*, occupando spesso siti fondamentali per l'avvio della sintesi proteica e della replicazione del genoma, inibisce tali funzioni cellulari costringendo la cellula alla morte.

Per la differente grandezza dei solchi, oligonucleotidi e proteine si legano al solco maggiore mentre piccole molecole, ad esempio derivati di sintesi, preferiscono il solco minore, dove la quantità di basi e di conseguenza la possibilità di formare legami ad idrogeno è inferiore. In tal modo, il *minor groove binding* permette una maggiore specificità d'azione. Tali molecole posseggono numerose proprietà biologiche, ad esempio antiprotozoiche ed antibatteriche sebbene buona parte della ricerca sui *minor groove binders* si focalizzi sullo sviluppo di agenti antineoplastici. Ciononostante, non tutti i *minor groove binders* sono utili a fini terapeutici ma possono avere impieghi in

altri aspetti della ricerca: alcuni tra essi, ad esempio, per la loro alta specificità sono stati utilizzati per l'analisi dei cromosomi.⁴⁶

I più importanti rappresentanti di questa categoria di composti sono alcune diarilammine come DAPI e berenil (Figura 14a, b). Il primo, un agente fluorescente ancora oggi adoperato in indagini microscopiche,⁴⁶ si è dimostrato in grado di legare selettivamente regioni del DNA ricche in sequenze AT, con gli anelli fenilici ed indolici paralleli verso il *groove* a copertura della sequenza ATT.⁴⁷ Cionondimeno, l'uso clinico del DAPI come agente antimicrobico è stato limitato dai suoi effetti secondari. Al contrario il berenil, anch'esso avente come bersaglio sequenze ATT dei solchi minori, presenta minori effetti tossici ed è tuttora utilizzato in medicina veterinaria nel trattamento della tripasonomiasi.⁴⁸

Buona parte degli agenti *groove binders*, in realtà, non legano zone del DNA ricche in G-C poiché la presenza di gruppi amminici nel *minor groove* rende tali sequenze stericamente più ostruite.⁴⁶ In aggiunta alla attività antimicrobiche, è stato notato che sostanze che legano sequenze ricche in timina ed adenina esibiscono ottime attività antitumorali.⁴⁹ I principali esempi di *groove binders* ad azione antitumorale sono rappresentati dalla netropsina e dalla distamicina A (Figura 14c, d), prodotti naturali ottenuti rispettivamente da *Streptomyces netropsis* e *Streptomyces distallicus*^{46,50} ed aventi come target regioni contenenti quattro o più sequenze AT.^{51,52} A partire da tali composti naturali sono stati sintetizzati nuovi agenti *groove binders* ad elevata attività antitumorale, come ad esempio la tallimustina (TXNU) (Figura 14e) ottenuta per addizione di una funzione benzoica e di una mostarda azotata allo scheletro della distamicina.⁵³ Il farmaco, per la sua struttura distamicino-simile, riesce a combinare gli effetti sul DNA di un agente alchilante con la specificità tipica di un *minor groove binder*. La molecola così ottenuta causa un danno al DNA abbastanza differente rispetto ai comuni agenti alchilanti: confrontando gli effetti sul ciclo cellulare di un tipico alchilante con la tallimustina è evidente infatti che, mentre le cellule che subiscono un processo di alchilazione risentono di un rallentamento della fase S con successivo arresto in fase G2, quelle alchilate dalla tallimustina compiono un completo ciclo cellulare prima di esser bloccate nella fase G2.⁵⁴ Tale assenza di risposta in fase S, evidente nelle cellule trattate con tallimustina, rende quest'ultime incapaci di

riparare i danni al DNA in seguito all'alchilazione.⁵⁵ Ad oggi, la molecola ha superato studi di fase I per il trattamento della leucemia mieloide acuta mentre l'assenza di apprezzabili risultati in fase II non ha permesso un ulteriore *trial* per il trattamento del carcinoma del colon-retto e del carcinoma polmonare a piccole cellule. Particolarmente promettente negli studi clinici è la brostalicina (Figura 14f), *minor groove binder* che riesce ad espletare funzioni DNA-alchilanti in presenza di alti livelli di glutazione: tale molecola infatti ha superato studi di fase II per il trattamento di sarcomi dei tessuti molli in pazienti che non avevano risposto alla terapia tradizionale.⁴⁶

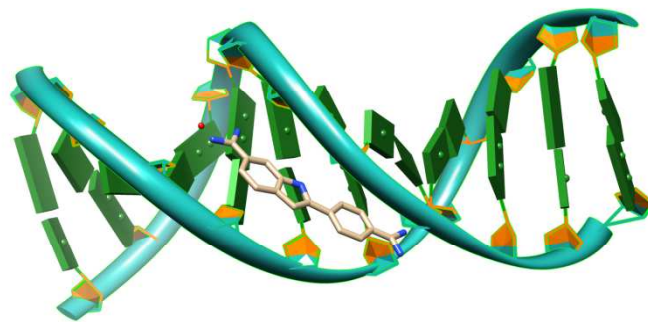


Figura 13. Struttura del DAPI nel *minor groove* del DNA.⁵⁶

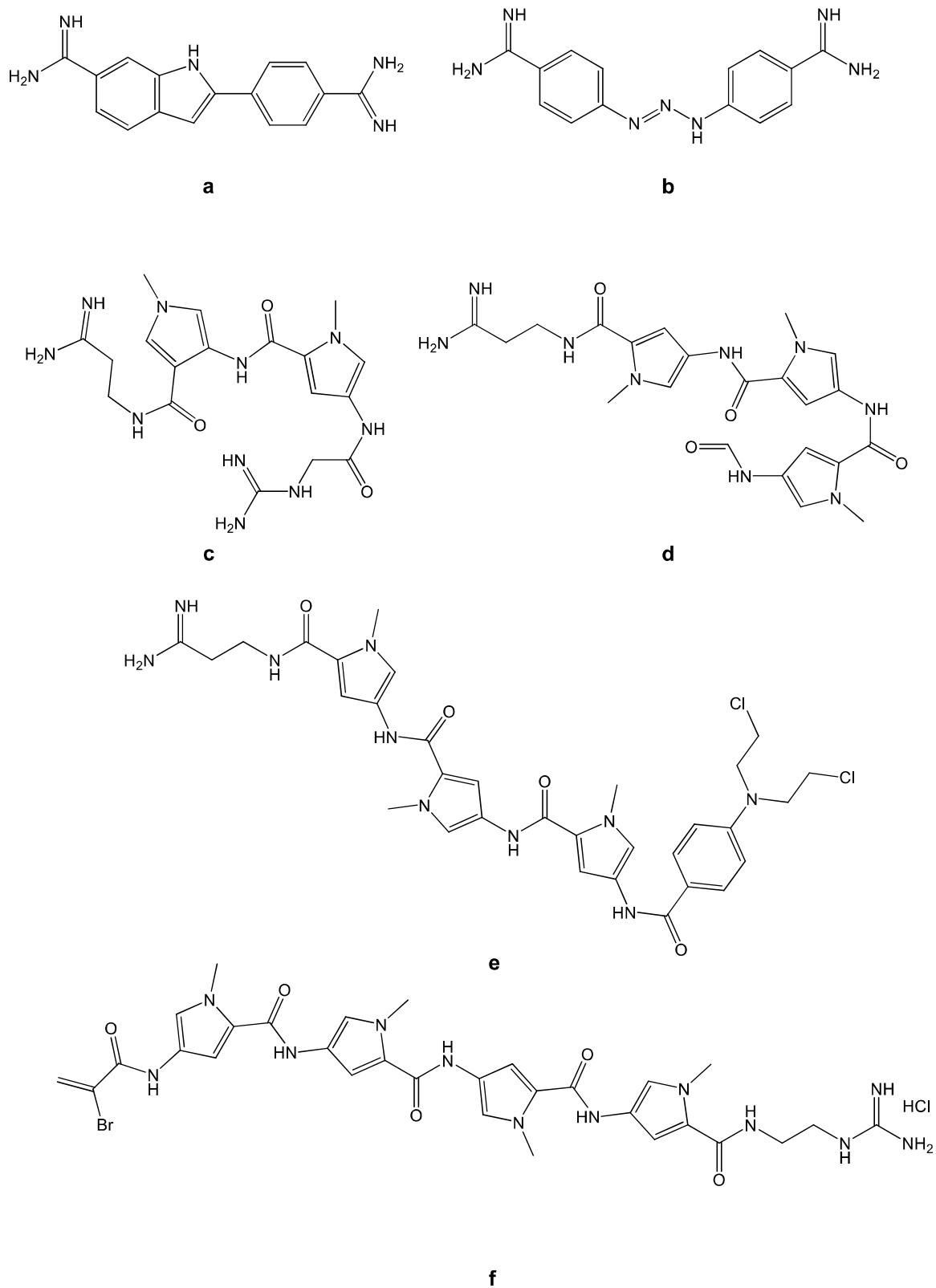


Figura 14. Struttura di alcuni tra i più noti *groove-binders*: DAPI (a), Berenil (b), Netropsina (c), Distamicina A (d), Tallimustina (e), Brostallicina (f).

1.3. L'importanza dei metalli

La capacità del cisplatino di inibire la divisione cellulare ed i risultati confortanti ottenuti su pazienti affetti da neoplasie hanno accentuato l'interesse verso lo sviluppo di farmaci *metal-based*, molecole cioè che, oltre alla componente organica tipica di un farmaco, contengono anche un centro metallico.^{57,58} Nonostante il suo successo, il cisplatino è risultato efficace solo in un numero limitato di tumori, presentando molti effetti collaterali ed, in alcuni casi, anche il fenomeno della “farmacoresistenza”.^{35,59} Nel corso degli anni sono dunque stati sintetizzati una serie di farmaci a base di platino con minori effetti collaterali (Figura 15). Inoltre, sempre al fine di ridurre gli effetti secondari, la ricerca ha proposto nuovi *drug-delivery systems*: un esempio recente consiste nell'incapsulamento del cisplatino nella cavità della ferritina, proteina di stoccaggio per il ferro, che può essere accumulata in alcuni tessuti tumorali. La proteina caricata di farmaco ha mostrato una buona azione nei confronti del feocromocitoma del ratto, come dimostrato dalla sua attività citotossica nei confronti della linea cellulare PC12.⁶⁰

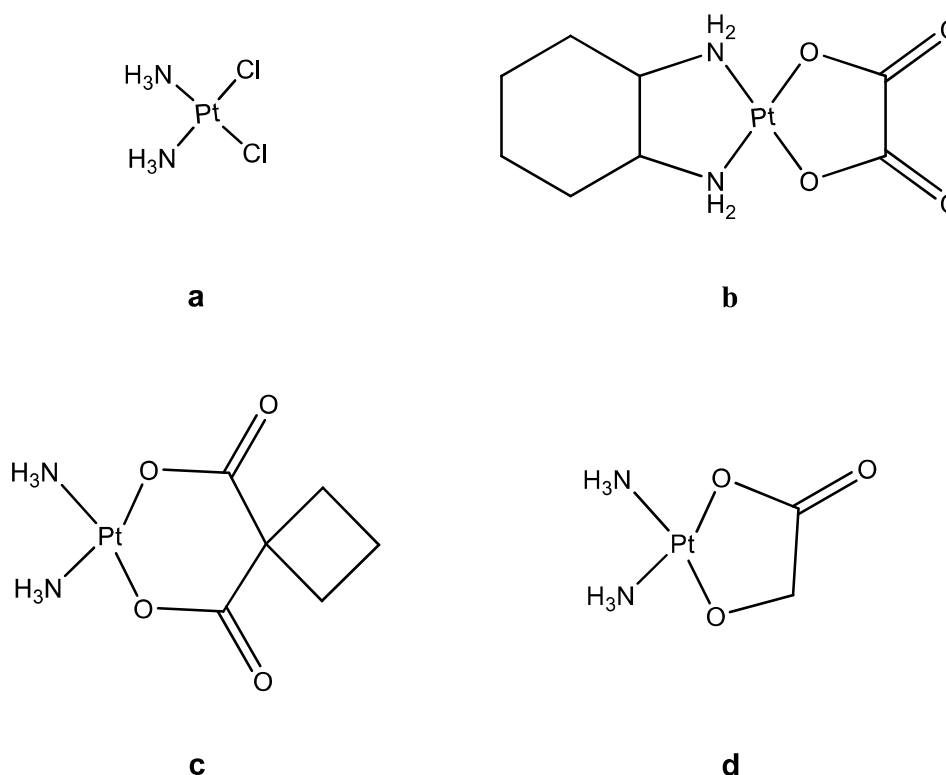


Figura 15. Strutture dei complessi di Platino clinicamente usati come farmaci antitumorali: cisplatino (a), oxaliplatino (b), carboplatino (c), nedaplatino (d).

Studi più recenti hanno spostato l'attenzione dal platino verso nuovi complessi metallici di rutenio(II) e cobalto(III) con leganti planari contenenti vari anelli aromatici condensati (Figura 16).⁶¹

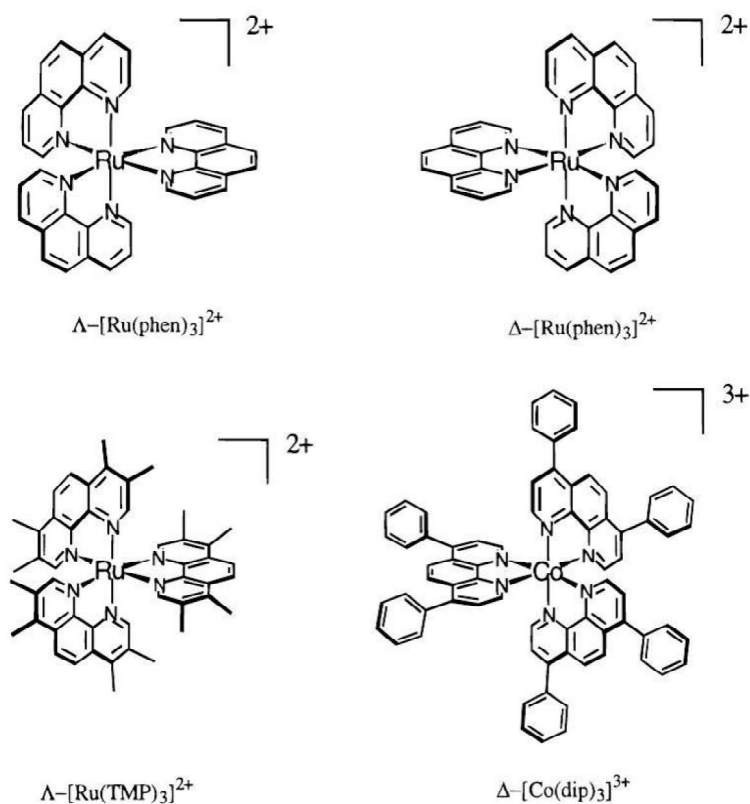


Figura 16. Struttura di complessi ottaedrici del Ru^{II} e Co^{III} con i leganti phen (fenantrolina), TMP e dip (fenantrolina sostituite).

Ad esempio, tra i complessi del rutenio ad attività citotossica e promettente attività antitumorale si ricordano quelli ottenuti con leganti aromatici planari 1,4,5,8-tetraazofenantrene (TAP), 1,4,5,8,9,12-esaazotrifetilene (HAT), 1,10-fenantrolino[5,6-b]1,4,5,8,9,12-esaazotrifetilene (PHEHAT) o complessi bimetallici con il legante 2,3-bis-(2-piridil)-benzo[g]chinossalina (dpb) (Figura 17).^{62,63}

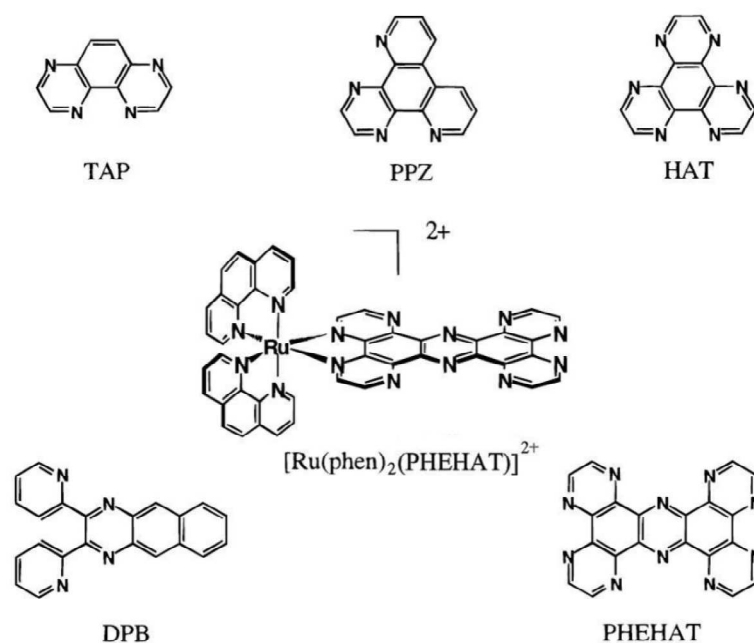


Figura 17. Leganti aromatici planari utilizzati per sintetizzare nuovi complessi con il rutenio(II).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi complessi organometallici di rutenio in grado di interagire con il DNA ed alcuni tra essi, come NAMI-A e KP1019, sono stati sottoposti a studi clinici di fase I.^{57,64–68} Altri derivati arenici di rutenio(II), sintetizzati rispettivamente dai gruppi di Peter J. Sadler e Paul J. Dyson, denominati rispettivamente RM175^{69,70} e RAPTA-T^{71,72} hanno mostrato attività antitumorale *in vitro* ed *in vivo*.

Inoltre altri studi effettuati su complessi di Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} , Zn^{II} , Cd^{II} , Au^{II} e Hg^{II} con la base di Schiff derivata dalla condensazione di 2,6-diformil-4-metilfenolo e 5-aminouracile hanno mostrato che tali complessi esercitano una significativa attività inibitoria su cellule di *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cirroflagellus*.⁷³

Generalmente la cellula utilizza molecole organiche per il riconoscimento del DNA piuttosto che complessi di metalli di transizione. Questi ultimi sono invece presenti essenzialmente nei siti attivi di enzimi e cofattori.⁷⁴ Ciononostante l'utilizzo dei complessi metallici come DNA-*binders* comporta alcuni vantaggi. Innanzitutto la presenza dello ione metallico di solito rende cationico il complesso, aumentando in tal modo sia la solubilità in soluzione acquosa sia l'attrazione elettrostatica con i gruppi fosfato, carichi negativamente.

In secondo luogo, un metallo coordinato svolge il ruolo di “ancora”, mantenendo in posizione una rigida impalcatura tridimensionale di leganti che legano il DNA. Esempi frequenti sono dati da complessi a geometria quadrato planare la cui planarità gioca un ruolo cruciale nell’interazione con DNA.^{74,75}

Inoltre, la presenza del metallo conferisce alla molecola caratteristiche proprietà elettrochimiche e fotochimiche, migliorando spesso l’attività degli agenti DNA attivi. Ad esempio, un catione metallico tende a rendere i leganti aromatici coordinati elettrone-deficienti e, di conseguenza, maggiormente adatti ad interazioni di *stacking* π - π come elettroneattrattori.^{71,75}

Di non poca importanza è poi l’osservazione, fatta dai gruppi di ricerca di Sadler⁷⁶ e di Dyson,⁷⁷ secondo la quale alcuni complessi metallici tipicamente intercalanti possono presentare dei meccanismi di interazione “misti”, rafforzando così la loro capacità di legame nei confronti del polinucleotide e di conseguenza le loro proprietà antitumorali. Recenti studi, inoltre, hanno mostrato che complessi di nichel(II), rame(II) e zinco(II), con numero di coordinazione minore a sei, presentano un’eccellente attività anti-proliferativa contro linee cellulari tumorali, probabilmente a seguito della formazione di nuovi legami covalenti tra il centro metallico e gli O e/o gli N delle basi del polinucleotide.^{76,78–83}

L’importanza di questo tipo di ricerca risiede non solo nelle possibili proprietà antitumorali dei nuovi complessi sintetizzati, ma anche nel fatto che questi stessi complessi possono trovare grandi applicazioni nel campo biomedico. Si è osservato, per esempio, che molti dei complessi DNA-intercalanti producono luminescenza a seguito dell’avvenuta interazione, caratteristica non osservata quando gli stessi complessi si trovano semplicemente in soluzione acquosa. Questo fenomeno, denominato *molecular light switch*, trova grande applicazione nel campo della diagnostica e fa sì che tali complessi possano essere utilizzati come “sonde” del DNA.⁷⁴

In quest’ottica, particolare interesse hanno recentemente assunto i complessi metallici di nichel(II), rame(II) e zinco(II), elementi essenziali nell’ambiente intracellulare degli organismi viventi, dove sono spesso contenuti in diverse metalloproteine.^{84–89} Tali ioni metallici sono oggi presenti in molti farmaci impiegati in differenti ambiti, dalla cura antibatterica ed antimicotica sino ai

secondo cui l'effetto antitumorale mediato dall'inibizione della telomerasi fosse possibile solo in seguito a lunghe esposizioni ai suoi inibitori.¹⁰⁰

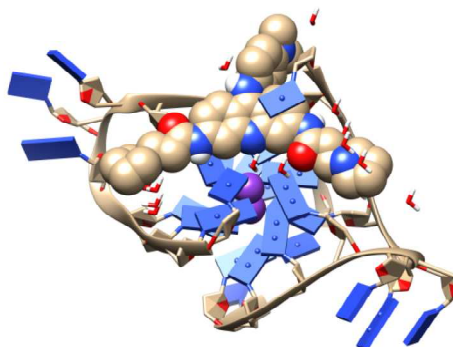


Figura 19. Struttura cristallografica di G4 intermolecolare parallelo legato ad una molecola di BRACO-19.⁹⁸

Successivamente, diversi derivati acridinici sono stati sintetizzati servendosi dello scheletro del BRACO-19, al fine di aumentarne l'affinità verso i G4 e dunque l'attività biologica: la sostituzione con derivati triazolici in posizione 3,9 (Figura 18b), ad esempio, ha mostrato simili livelli di attività rispetto al BRACO-19 sebbene quest'ultimo presentasse una migliore selettività nei confronti del G4.¹⁰¹ Risultati incoraggianti sono stati altresì ottenuti con il derivato 2,10-disostituito in Figura 18c, la cui attività inibitoria si espleta a concentrazioni inferiori al micromolare,¹⁰² o con strutture macrocicliche quali ad esempio la Telomestatina (Figura 20).

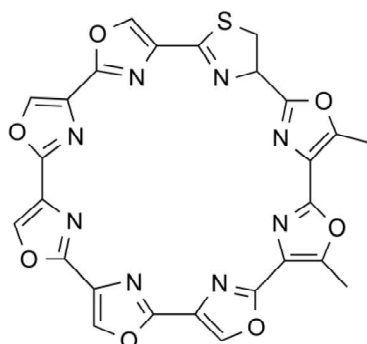


Figura 20. Telomestatina.

Questo macrociclo polioisozolico, isolato da *Streptomyces anulatus*, stabilizza i G4 telomerici in maniera fortemente selettiva e, pertanto, presenta una forte attività inibitoria verso la telomerasi;^{103,104} studi recenti hanno inoltre dimostrato che la molecola riesce anche a stabilizzare i G4 formati in zone promoter come ad esempio il proto-oncogene *c-myb*.¹⁰⁵

Al fine d'ottenere la stabilizzazione dei G4 è necessario che la molecola stabilizzante presenti un sistema π -delocalizzato, in grado di dar luogo ad interazione di *end-stacking* con il quartetto di guanine, ed alcune catene laterali, polari o cariche positivamente, che aumentino sia la solubilità dell'agente G4-interagente sia le interazioni attrattive con i gruppi fosfato della catena polinucleotidica, carichi negativamente. Inoltre, per aumentare la capacità di interazione con i G4, è ritenuta utile la presenza di una carica positiva centrale che possa trovarsi al centro del canale formato dalle guanine, in seguito all'interazione con il G4.¹⁰⁶ Tale carica, infatti, si ritiene possa sostituire lo ione sodio o potassio che normalmente occupa il canale centrale, portando dunque ad una migliore stabilizzazione della molecola nel *quadruplex*. Proprio per quest'ultima caratteristica, complessi di metalli di transizione (vedi Figura 21) hanno recentemente trovato applicazione quali agenti *G4-binders* e suscitato interesse da parte della comunità scientifica.¹⁰⁷⁻¹¹¹

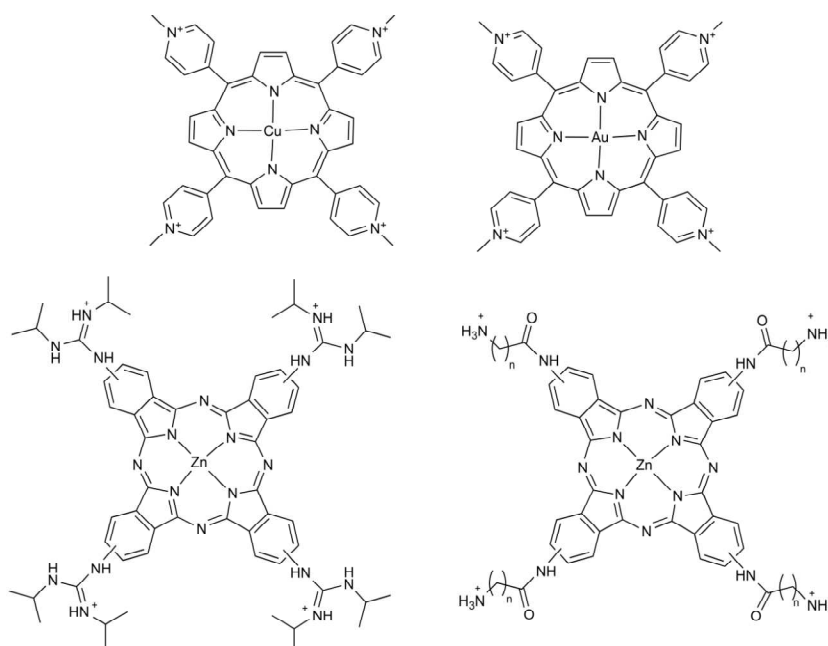


Figura 21. Alcuni esempi di complessi metallici G4 stabilizzanti.¹¹²

Capitolo 2

Studio dell'interazione con DNA di complessi di Ni^{II}, Cu^{II} e Zn^{II} con basi di Schiff tetradentate planari.

| | | |
|---------|--|----|
| 2.1 | Introduzione | 28 |
| 2.2 | Sintesi e caratterizzazione | 31 |
| 2.3 | Studio dell'interazione con DNA-duplex | 32 |
| 2.3.1 | Spettroscopia UV-visibile | 32 |
| 2.3.2 | Dicroismo Circolare | 36 |
| 2.3.3 | Denaturazione termica del DNA | 39 |
| 2.3.4 | Viscosità | 40 |
| 2.3.5 | Calcoli DFT/MM e studi EXAFS | 41 |
| 2.4 | Studio dell'interazione con G4-DNA | 42 |
| 2.4.1 | Spettroscopia UV-visibile | 42 |
| 2.4.2 | Dicroismo Circolare | 47 |
| 2.5 | Saggi biologici | 53 |
| 2.5.1 | Attività anti-proliferativa | 53 |
| 2.5.2 | Analisi dell'effetto dei complessi sul ciclo cellulare | 56 |
| 2.5.3 | Saggio sull'arresto della PCR | 58 |
| 2.6 | Conclusioni | 61 |
| 2.7 | Parte sperimentale | 62 |
| 2.7.1 | Materiali e metodi | 62 |
| 2.7.2 | Sintesi e caratterizzazione | 62 |
| 2.7.3 | Studio dell'interazione con B-DNA | 64 |
| 2.7.4 | Studio dell'interazione con G4-DNA | 65 |
| 2.7.5 | Saggi biologici | 66 |
| 2.7.5.1 | Attività anti-proliferativa | 66 |
| 2.7.5.2 | Analisi dell'effetto dei complessi sul ciclo cellulare | 69 |
| 2.7.5.3 | Saggio sull'arresto della PCR | 69 |

2.1. Introduzione

La condensazione tra un'ammina e un'aldeide per ottenere una base di Schiff rappresenta una delle più note reazioni chimiche.^{113,114} Tra le più comuni aldeidi utilizzate, quella salicilica ha assunto un ruolo chiave in chimica organica ed inorganica: la sua condensazione con 1,2-diaminoetano, con 1,2-fenilendiamina o con il 2,3-diaminonaftalene porta infatti alla formazione di molecole ampiamente note, impiegate come leganti tetradentati e conosciute rispettivamente con gli acronimi di “Salen”, “Salphen” e “Salnaphen” (figura 22), facilmente sintetizzabili, molto stabili e dalle interessanti proprietà farmacologiche.^{95,96,115–120}

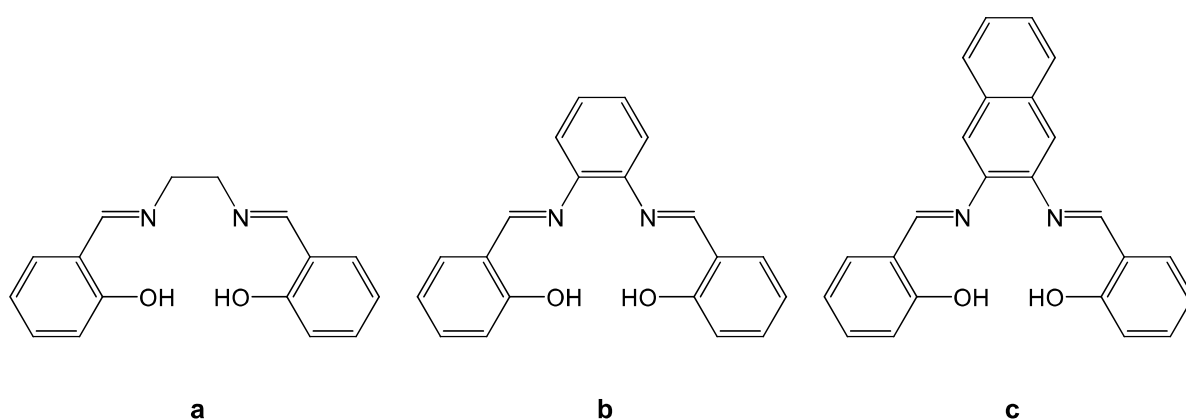


Figura 22. Strutture di H₂Salen (N,N'-bis-salicilidene-etilendiamina) (a), H₂Salphen (N,N'-bis-salicilidene-1,2-fenilendiamina) (b), H₂Salnaphen (N,N'-bis-salicilidene-2,3-naftalendiamina) (c).

I leganti presentano un ottimale sistema chelante tetradentato N₂O₂. Per la loro basicità di Lewis, infatti, sia gli azoti imminici che i due gruppi ossidrilici deprotonati formano legami di coordinazione con uno ione metallico, con una geometria pressoché planare.^{121,122}

A partire dal 1889, quando Combes preparò il primo legante di tipo Salen e il suo complesso di rame,¹²³ l'ampio ventaglio di possibili applicazioni ha aumentato l'interesse verso questi complessi metallici. In chimica organica, ad esempio, tali composti si sono dimostrati ottimi catalizzatori per molteplici reazioni quali ossidazioni di alcoli,¹²⁴ ossidazioni asimmetriche,^{125–128} aperture di epossidi¹²⁹ e polimerizzazioni stereoselettive.^{130,131} In particolare, l'uso di un complesso metallico ottenuto a partire da un legante di tipo Salphen e Mn^{III}, noto come “catalizzatore di

Jacobsen” (Figura 23), rappresenta uno tra i più efficienti metodi per l’epossidazione entantioselettiva di olefine non funzionalizzate.^{132–134}

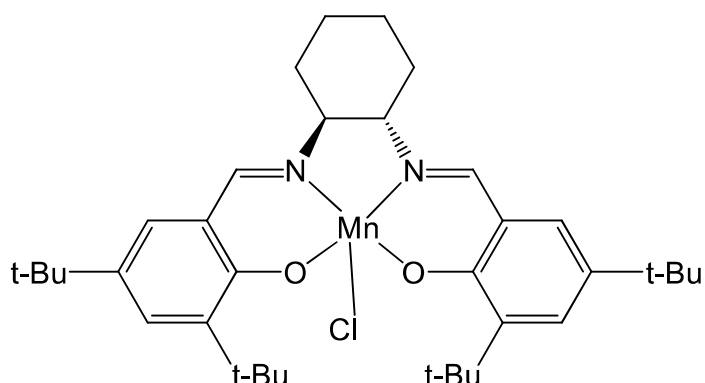


Figura 23. Struttura del catalizzatore di Jacobsen.

I complessi di tali basi di Schiff hanno inoltre trovato ampia applicazione anche nell’ambito chimico-farmaceutico per, ad esempio, le loro caratteristiche antinfiammatorie, antibiotiche e antivirali.^{114,124,135} Particolarmente interessante è anche la loro attività antitumorale: ad esempio, un derivato di Fe^{III}Salphen ha dimostrato una potente attività citostatica verso le linee cellulari di cancro ovarico,^{136,137} mentre un analogo complesso di Mn^{III} (EUK178), per le sue proprietà di *scavenger* contro il perossido di idrogeno, ha mostrato una notevole capacità protettiva verso cellule fibroblastiche.^{137,138} Altri derivati di Mn^{III} riescono inoltre ad indurre apoptosi nelle cellule MCF-7^{139,140} mentre, da un recente studio su complessi di Fe^{III}Salphen, è emersa una elevata capacità di indurre apoptosi in cellule leucemiche, anche in presenza di cellule farmaco-resistenti alla daunorubicina o alla vincristina, farmaco ampiamente utilizzato, in associazione con altri, nella cura di diversi tumori.¹⁴¹

La presenza di una struttura planare e di un sistema π -delocalizzato rendono inoltre questi complessi ottimi candidati all’interazione con DNA. Di fatto, sono numerosi gli studi di *binding* di complessi metallici di tipo Salphen con il polinucleotide.^{142–148} In tal senso, la possibilità di estendere la porzione aromatica attraverso l’utilizzo del 2,3-diaminonaftalene dovrebbe portare a migliori agenti DNA-intercalanti: tale ipotesi è supportata da dati di letteratura che dimostrano che nel caso di complessi di Mn^{III} con leganti tipo Salen, Salphen e Salnaphen ad un aumento della porzione aromatica corrisponde una riduzione della concentrazione di composto necessaria all’inibizione

del 50% della proliferazione (definita *growth inhibition 50*, GI₅₀) delle cellule MCF-7.¹⁴⁰

Inoltre, è ben noto che complessi di basi di Schiff rappresentano una classe di potenti G4-DNA *stabilizer*. Ad esempio, Vilar *et al.* hanno riportato la sintesi di due complessi quadrato planari di nichel con leganti tetradentati di tipo Salphen. Tali complessi presentano una sorprendente attività stabilizzante nei confronti dei G4 ottenuti dalla sequenza *h-Telo*, e soprattutto una migliore selettività verso questa isoforma di DNA rispetto al più noto BRACO-19.¹¹¹

In questo contesto, la parte preponderante del mio lavoro di tesi verterà sullo studio dell'interazione dei complessi di tipo Salnaphen, mostrati in Figura 24a, nei confronti del DNA nella sua conformazione più comune, B-DNA, e sotto forma di G4. I primi saranno inoltre paragonati con i dati di letteratura degli analoghi Salphen in Figura 24b. Tali complessi, da me sintetizzati, presentano infatti i requisiti di aromaticità e planarità necessari per l'interazione sia con B-DNA sia con G4. Inoltre, come recentemente accertato, la presenza di catene laterali cariche positivamente dovrebbe agevolare e rafforzare l'interazione con entrambe le isoforme, B e G4, del DNA, mediante interazione elettrostatica con i gruppi fosfato dello scheletro del polinucleotide.^{75,142}

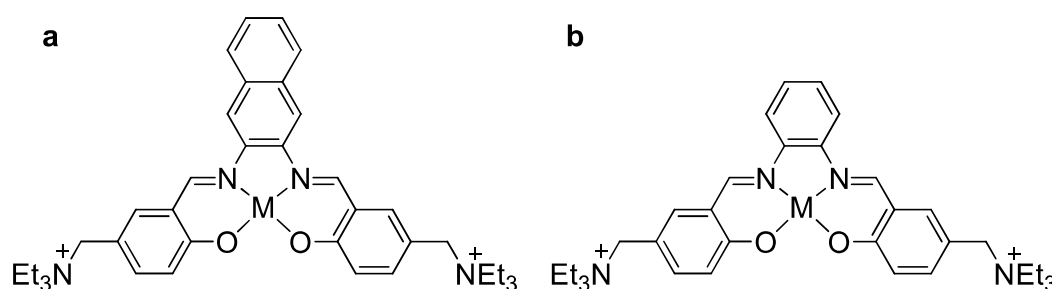


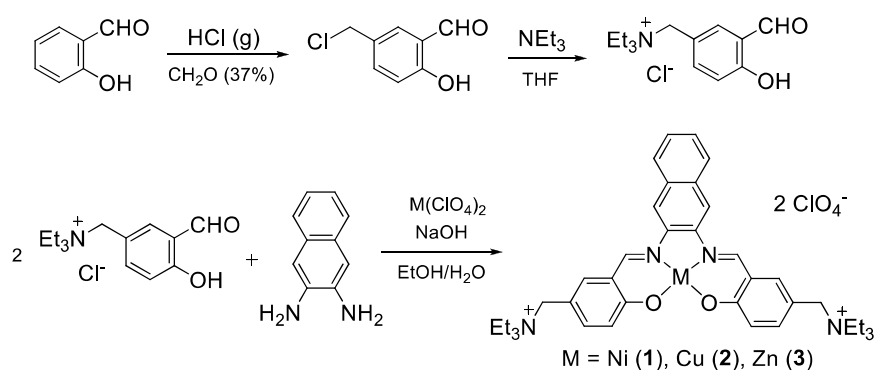
Figura 24. a) Struttura dei tre complessi di N,N'-bis-5-(trietilammoniometil)-salicilidene-2,3-naftalendiiminato sintetizzati; M = Ni (1), Cu (2), Zn (3). b) Struttura dei tre complessi di N,N'-bis-5-(trietilammoniometil)-salicilidene-2,3-fenilendiiminato;^{95,96} M = Ni (4), Cu (5), Zn (6).

La loro sintesi e caratterizzazione strutturale è quindi l'argomento del primo paragrafo, mentre successivamente è riportato lo studio dell'interazione con il polinucleotide mediante l'utilizzo di tecniche come la spettroscopia UV-visibile, dicroismo circolare e studi sulla variazione della viscosità e della temperatura di *melting* del DNA. La

seconda parte del capitolo riguarda studi di interazione con i G4 delle sequenze *h-Telo* e *c-myc*. In ultimo sono presentati saggi biologici su linee cellulari tumorali condotti servendosi dei complessi sintetizzati.

2.2. Sintesi e caratterizzazione

I complessi **1-3** sono stati sintetizzati per reazione tra la 5-trietilammoniometil-salicilaldeide cloruro, 2,3-diaminonaftalene e il perclorato del metallo, in rapporti 2:1:1, mediante reazione *one pot* (Schema 1). In dettaglio, la 5-trietilammoniometil-salicilaldeide cloruro è stata preparata a partire dalla 5-clorometil-salicilaldeide e dalla trietilamina in tetraidrofurano, come riportato in letteratura.⁹⁶ Una soluzione acquosa basica di questo reagente è stata quindi aggiunta goccia a goccia ad una soluzione etanolica contenente diamina e perclorato del metallo, preparata precedentemente. Dopo 4 ore è stato possibile isolare un precipitato che, ricristallizzando da metanolo/acqua, permetteva d'ottenere i complessi **1-3** come perclorati.



Schema 1. Sintesi dei complessi **1-3**

A causa della sua natura paramagnetica, non è stato possibile registrare uno spettro NMR risolutivo del complesso **2**. I complessi di nichel e zinco, **1** e **3**, al contrario sono stati caratterizzati mediante spettroscopia NMR: l'avvenuta coordinazione mediante N_2O_2 con conseguente struttura quadrato planare è stata confermata dall'esperimento NMR sul complesso **1**. I complessi di questo metallo avente configurazione elettronica d^8 , infatti, assumono una natura diamagnetica solo in seguito ad una coordinazione finale di tipo quadrato planare. Inoltre, secondo quanto riportato in letteratura,¹⁴⁹ il diamagnetismo dei complessi Ni^{II} Salen è mantenuto in soluzione in presenza sia di

solventi coordinanti che di solventi non coordinanti. Dagli stessi spettri NMR (vedi appendice, Figure A1-A4) è inoltre evidente l'avvenuta coordinazione del centro metallico con il legante tipo Salnaphen: negli esperimenti $^1\text{H-NMR}$, ad esempio, i picchi caratteristici risultano allargati e a frequenze dipendenti dalla presenza di nichel(II) o zinco(II) nel sito di coordinazione (vedi Figure A1-A4).

Inoltre, i dati sugli *stretching* M-N e M-O ottenuti da spettroscopia IR, e riportati in Tabella 1, sono in linea con i valori riportati in letteratura.¹⁵⁰

Tabella 1. Frequenze di *stretching* dei legami N-M e O-M dei complessi sintetizzati.

| Complesso | ν M-N | ν M-O |
|-----------|----------------------|----------------------|
| 1 | 475 cm^{-1} | 506 cm^{-1} |
| 2 | 469 cm^{-1} | 503 cm^{-1} |
| 3 | 468 cm^{-1} | 552 cm^{-1} |

Una conferma finale ai risultati delle indagini strumentali sopra descritte è data dall'analisi centesimale dei composti. Come riportato in Tabella 2, i valori percentuali di carbonio, idrogeno e azoto dimostrano che, a differenza del complesso **3**, nel caso dei complessi **1** e **2** il prodotto finale contiene due molecole di H_2O incluse nel solido isolato.

Tabella 2. Analisi centesimale dei complessi **1-3**. I valori teorici di **1** e **2** si riferiscono alla forma bis-idrata, quelli di **3** alla forma non idrata.

| | 1 | | 2 | | 3 | |
|----------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| | <i>Teorico</i> | <i>Sperimentale</i> | <i>Teorico</i> | <i>Sperimentale</i> | <i>Teorico</i> | <i>Sperimentale</i> |
| C | 51.49 % | 50.05 % | 51.21 % | 51.72 % | 53.25 % | 53.01 % |
| H | 5,91 % | 5.61 % | 5.88 % | 5.46 % | 5.64 % | 5.76 % |
| N | 6.32 % | 5.90 % | 6.29 % | 6.55 % | 6.54 % | 5.90 % |

2.3. Studio dell'interazione con DNA-duplex

2.3.1. Spettroscopia UV-visibile

Per verificare l'interazione con il polinucleotide si è scelto di titolare spettrofotometricamente, a temperatura costante, i tre complessi con quantità crescenti di B-DNA. Gli spettri UV-vis dei composti in esame, rappresentati da una linea nera continua in Figura 25, condividono una banda d'assorbimento intensa intorno ai 250

nm. Bande d'assorbimento caratteristiche, dovute a transizioni di tipo *infra-ligand*, sono altresì evidenti in ognuno degli spettri registrati, nella fattispecie a 346 nm per **1**, a 316 nm per **2** ed a 304 nm per **3**. In ultimo, si riscontra una banda dovuta a transizioni *d-d* poco intensa intorno ai 467 nm per il complesso di **1**, mentre bande più intense sono evincibili per i complessi **2** a 406 nm e **3** a 384 nm. Questi ultimi due tipi di transizioni sono di primaria importanza per la titolazione con DNA: poiché, infatti, la banda di assorbimento del B-DNA è sita a 258 nm,¹⁵¹ qualsiasi variazioni delle bande sopra ai 300 nm non potrà essere imputabile a fenomeni di tipo additivo bensì ad una vera e propria perturbazione degli stati elettronici del complesso, in seguito all'interazione con DNA.

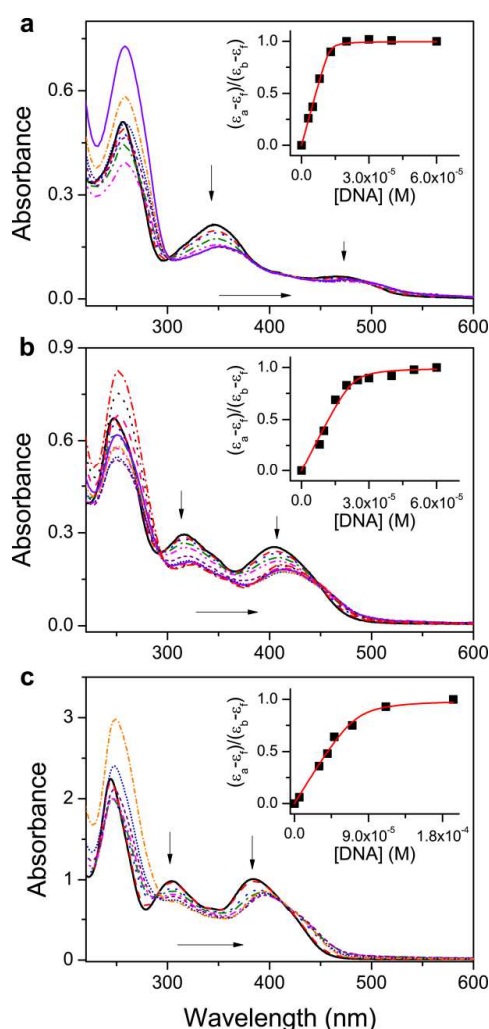


Figura 25. Spettri di assorbimento di **1** (a), **2** (b) e **3** (c) in presenza di quantità crescenti di ct-DNA in tampone Tris-HCl 1 mM. (a) $[1]=8 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]=0-100 \mu\text{M}$. (b) $[2]=13 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]=0-60 \mu\text{M}$. (c) $[3]=35 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]=0-193 \mu\text{M}$. Nei riquadri, *fitting* dei dati di assorbanza, a 346 nm per **1**, a 316 nm per **2** e a 304 nm per **3**, in funzione della concentrazione molare di DNA.

Come evidente in Figura 25 gli spettri dei complessi sono fortemente modificati dall'aggiunta di quantità crescenti di DNA: le bande presenti al di sopra dei 300 nm, infatti, subiscono un abbassamento graduale di intensità (effetto ipocromico) fino al massimo rapporto utilizzato, oltre che uno spostamento verso più alte lunghezze d'onda (effetto batocromico). Anche le bande intorno ai 250 nm subiscono un iniziale effetto ipocromico sino ad un rapporto molare $[DNA_{\text{fosfato}}]/[ML^{2+}] \approx 1.2$: oltre questo valore, di fatti, si osserva la comparsa di un effetto ipercromico dovuto al contemporaneo assorbimento a queste lunghezze d'onda del polinucleotide, che a tali concentrazioni diventa rilevante. Nel caso specifico, le bande di assorbimento del complesso **1** a 346 nm, **2** a 316 nm e **3** a 304 nm subiscono batocromismo rispettivamente di 5, 8 e 11 nm ed ipocromismo di circa il 42%, 35% e 26%. Questi risultati, attribuibili ad interazioni di *stacking* π - π tra gli anelli naftalenici dei complessi e le basi azotate del DNA, suggeriscono che i tre complessi cationici agiscono come DNA-intercalanti, come riportato in letteratura.^{83,147,152} Inoltre, la presenza di un punto isosbestico intorno ai 310 nm (per **1**), 295 nm (per **2**) e 290 nm (per **3**) dimostra l'esistenza di un equilibrio in soluzione tra il complesso metallico legato al DNA e il complesso non legato al polinucleotide.

Al fine di determinare la costante intrinseca di *binding* (K_b) che espliciti l'affinità dei complessi verso il polinucleotide e la stechiometria (s) del sistema complesso metallico-DNA, i dati della titolazione sono stati razionalizzati secondo il *metodo di Carter*.¹⁵³ Nella fattispecie, il rapporto $(\varepsilon_a - \varepsilon_f)/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ a 346 nm per **1**, 316 nm per **2** e a 304 nm per **3** è stato riportato in funzione della concentrazione molare del DNA (riquadro in Figura 25) ed analizzato con le equazioni 1a ed 1b:

$$\frac{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} = \frac{b - \left(\frac{b^2 - 2K_b^2 C_t [DNA_{\text{fosfato}}]}{s} \right)^{1/2}}{2K_b C_t} \quad (1a)$$

$$b = 1 + K_b C_t + \frac{K_b [DNA_{\text{fosfato}}]}{2s} \quad (1b)$$

in esse C_t è la concentrazione totale del complesso metallico, ε_f è il coefficiente d'estinzione molare in soluzione del complesso isolato, determinato tramite curve di taratura, e ε_b corrisponde al coefficiente d'estinzione molare determinato al *plateau* dei grafici di titolazione, quando cioè ogni ulteriore aggiunta di DNA non causa nessuna

variazione nello spettro d'assorbimento. In ultimo, ϵ_a è stato determinato come il rapporto tra l'assorbanza misurata e la concentrazione molare dei complessi **1-3**.

I valori di K_b e di s , riportati in Tabella 3 insieme ai restanti risultati della titolazione, confermano che ogni complesso metallico si lega fortemente al DNA e che l'affinità verso il polinucleotide decresce nell'ordine **1 > 2 > 3**, come riportato in letteratura per complessi tipo Salphen dei medesimi metalli.^{95,96} Tutti i complessi, inoltre, presentano una stechiometria di interazione pari a 1.

Tabella 3. Costanti di DNA-binding (K_b , M^{-1}), stechiometria di interazione (s), effetto ipocromico (%) e batocromico (nm) dei complessi **1-3**. (Figura 24a).

| | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| K_b | $(1.03 \pm 0.05) \cdot 10^7$ | $(2.9 \pm 0.2) \cdot 10^6$ | $(6.2 \pm 0.3) \cdot 10^5$ |
| S | 0.74 ± 0.06 | 0.87 ± 0.07 | 1.01 ± 0.07 |
| Ipocromismo | 42 | 35 | 26 |
| Batocromismo | 5 | 8 | 11 |

Inoltre, da un confronto con i dati di letteratura sui valori di K_b , determinati nelle stesse condizioni sperimentali, riportati in Tabella 4 è evidente che i complessi di tipo Salnaphen **1-3** qui discussi abbiano una migliore affinità nei confronti del DNA rispetto agli analoghi Salphen **4-6**, mostrati in Figura 24b.^{95,96}

Tabella 4. K_b dei complessi **4-6**.^{95,96}

| | K_b (M^{-1}) |
|----------|---|
| 4 | $(4.2 \pm 0.4) \cdot 10^6$ |
| 5 | $(1.28 \pm 0.05) \cdot 10^6$ |
| 6 | $(2.35 \pm 0.01) \cdot 10^4$ |

Infine, al fine di poter determinare un'eventuale affinità preferenziale verso una specifica sequenza di coppie di basi, è stata condotta un'analoga titolazione del complesso di nichel con i polinucleotidi di sintesi [poly(dA-dT)]₂ e [poly(dG-dC)]₂, costituiti rispettivamente da Adenine e Timine alternate (Figura 26a) e da Guanine e Citosine alternate (Figura 26b).

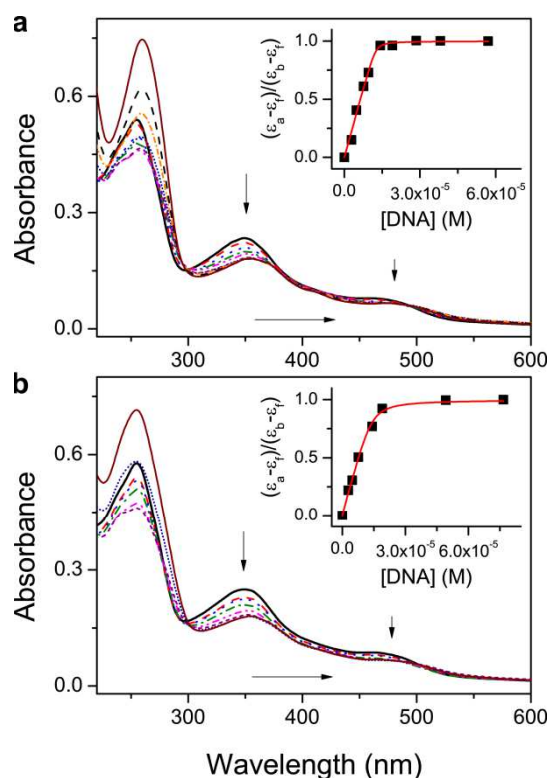


Figura 26. Spettri di assorbimento di **1** in presenza di quantità crescenti di [poly(dA-dT)]₂ (a) e di [poly(dG-dC)]₂ (b) in Tris-HCl 1 mM. [**1**] = 9 μM; [DNA_{fosfato}] = 0-80 μM. Le frecce indicano le variazioni spettrali a seguito dell'aggiunta di polinucleotide.

I valori, riportati in Tabella 5 mostrano che l'affinità verso sequenze AT è simile a quella già ricavata per il ct-DNA ed è di un ordine di grandezza maggiore rispetto alla K_b per le sequenze GC.

Tabella 5. Costanti di *binding* (K_b , M^{-1}) e stechiometria (s) di **1** con [poly(dA-dT)]₂ e [poly(dG-dC)]₂.

| | [poly(dA-dT)] ₂ | [poly(dG-dC)] ₂ |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| K_b | $(1.3 \pm 0.3) \cdot 10^7$ | $(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^6$ |
| s | 0.70 ± 0.03 | 0.73 ± 0.01 |

Questi risultati suggeriscono quindi che il legame del complesso metallico con il ct-DNA è attribuibile alla sua interazione preferenziale con le coppie di basi AT che, come riportato in letteratura, in effetti costituiscono il 60% circa della composizione di basi del DNA.¹⁵⁴

2.3.2. Dicroismo Circolare

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica assai utile per monitorare variazioni nella struttura del DNA a seguito della sua interazione con molecole: i segnali registrati al

CD sono infatti suscettibili anche di lievi variazioni nella struttura secondaria del polinucleotide.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ La tecnica si basa sul differente assorbimento da parte di una sostanza chirale delle due componenti, destrogira e levogira, della luce polarizzata circolarmente. In base a ciò, l'interazione tra ogni componente della luce ed una sostanza chirale sarà differente e, per tale ragione, produrrà uno spettro CD.¹⁵⁶ Il B-DNA, per la sua elicità destrogira, è una molecola particolarmente adatta a studi di dicroismo circolare, soprattutto in presenza di sostanze achirali: in questo caso, di fatti, qualsiasi variazione nello spettro del B-DNA, avvenuta dopo l'esposizione alla molecola achirale, è attribuibile all'interazione con tale sostanza.

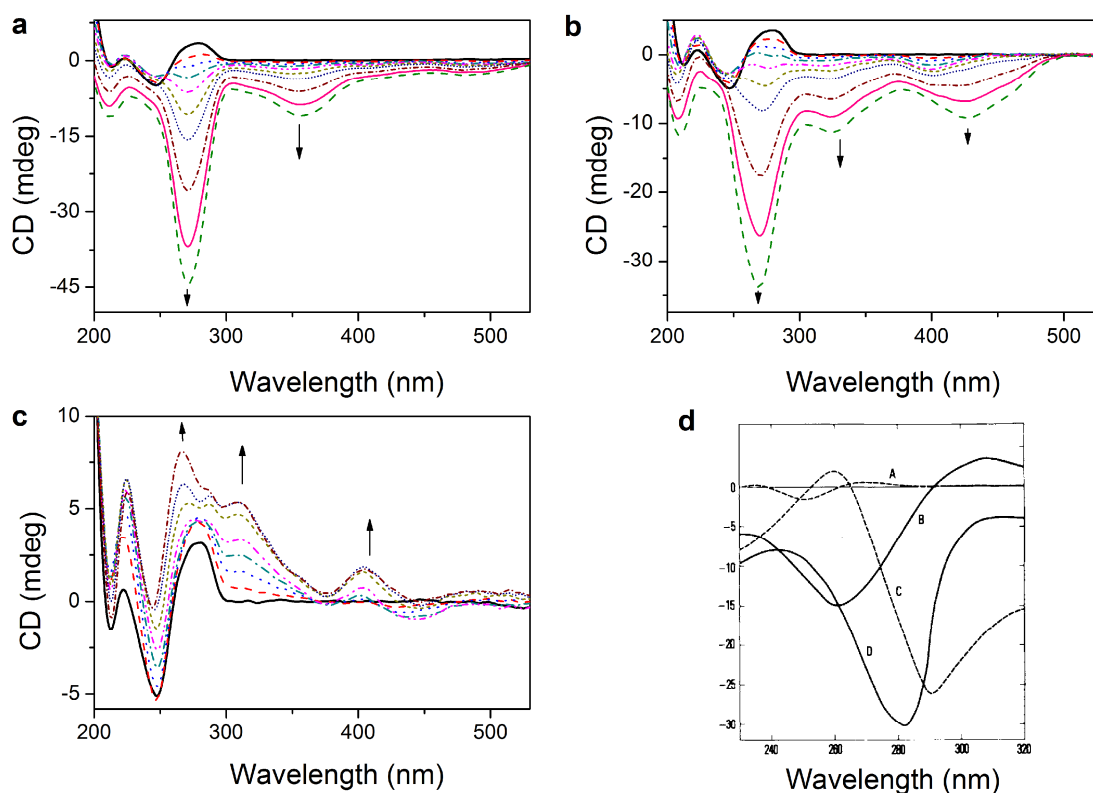


Figura 27. Spettri CD di ct-DNA (linea continua nera) in presenza di quantità crescenti di **1** (a), **2** (b) e **3** (c) in 1.0 mM Tris-HCl. $[DNA_{fosfato}] = 50 \mu M$. (a) $[1] = 0-30 \mu M$. (b) $[2] = 0-26 \mu M$. (c) $[3] = 0-20 \mu M$. (d) Spettri CD della forma ψ formatasi a partire da $[poly(dA-dT)]_2$ in presenza di quantità crescenti di soluti (A-D).¹⁵⁸

Lo spettro tipico del B-DNA, rappresentato dalla linea continua nera nella Figura 27a, b, c, consiste in due bande, una positiva intorno ai 275 nm ed una negativa avente il suo minimo a 245 nm. Nel corso degli esperimenti da me condotti, sono stati registrati spettri CD di una soluzione di DNA 50 μM in Tris-HCl 1.0 mM in presenza

di quantità crescenti di complessi **1**, **2** e **3** sino ad un rapporto $[ML^{2+}]/[DNA_{fosfato}]$ rispettivamente pari a 0.6, 0.6 e 0.4. Come evidente dai grafici in Figura 27, lo spettro del B-DNA isolato è drasticamente modificato dalle successive aggiunte dei tre complessi metallici. In particolare, in entrambe le titolazioni di **1** (Figura 27a) e di **2** (Figura 27b) si osserva una diminuzione ed un *blue-shift* della banda positiva del DNA a 275 nm. Tale banda diventa negativa rispettivamente a concentrazioni di **1** e **2** superiori a 5 e 10 μM .

Nel caso della titolazione con il complesso **3** la banda positiva a 275 nm è incrementata monotonicamente e subisce una suddivisione in due ulteriori bande a 266 e 287 nm (Figura 27c). Particolarmente interessante è inoltre la formazione di nuove bande di dicroismo circolare indotto (ICD) a seguito dell'aggiunta dei complessi sintetizzati: per ogni aggiunta di **1** e **2** si osserva infatti la formazione di bande ICD nella zona negativa dello spettro, a 356 e 479 nm per il complesso **1** (Figura 27a) e a 325 e 426 nm per il complesso **2** (Figura 27b). Altresì, l'aggiunta di **3** a soluzioni di B-DNA comporta la formazione di tre bande ICD di cui due, a 405 e 513 nm, positive ed una negativa meno marcata a 447 nm (Figura 27c). Tale evidenza è particolarmente interessante. Infatti, poiché le zone interessate dalle bande ICD non rappresentano regioni dello spettro in cui il B-DNA assorbe e, poiché i complessi 1-3 non presentano assorbimenti al CD a causa della loro achiralità, si può concludere che a seguito dell'interazione tra polinucleotide e complessi metallici si formino nuovi cromofori a causa del forte legame dei complessi all'ossatura del DNA.

Infine, lo spettro CD registrato in presenza dei complessi **1** e **2** a concentrazioni superiori a 15 μM è simile a quello registrato per forme condensate quale lo ψ -DNA (Figura 27d).¹⁵⁹ Tale evidenza suggerisce che i complessi di nichel(II) e di rame(II), ad alte concentrazioni, inducano la formazione di aggregati supramolecolari di DNA, similmente a quanto precedentemente osservato per gli analoghi composti Salphen.^{95,96}

I risultati raccolti nel corso della titolazione CD indicano dunque che, a seguito dell'interazione del DNA con i complessi **1-3**, si verificano profonde modifiche conformazionali nella struttura del polinucleotide. Tali modifiche sono ancora una volta in linea con quelle registrate per simili composti DNA intercalanti e rafforzano

l'ipotesi che i complessi sintetizzati interagiscano con il polinucleotide mediante questo tipo di interazione.

2.3.3. Denaturazione termica del DNA

Lo studio della temperatura di *melting* (T_m) del polinucleotide rappresenta una tecnica assai utile nello studio delle interazioni di *binding* tra piccole molecole e DNA. Con l'aumentare della temperatura, infatti, il DNA a doppio filamento si dissocia nei suoi singoli filamenti: si definisce temperatura di *melting* del DNA la temperatura alla quale la metà delle coppie di basi totali non è appaiata.¹⁶⁰ Tale temperatura è fortemente influenzata dalla stabilità della doppia elica. Pertanto, qualsiasi sostanza che interagisca con il DNA stabilizzandone o destabilizzandone la struttura secondaria provocherà rispettivamente un aumento o una diminuzione della temperatura di denaturazione del polinucleotide. L'intercalazione e l'interazione elettrostatica, ad esempio, producono solitamente una stabilizzazione della doppia elica del DNA che si traduce in un aumento della T_m del polinucleotide.¹⁶¹

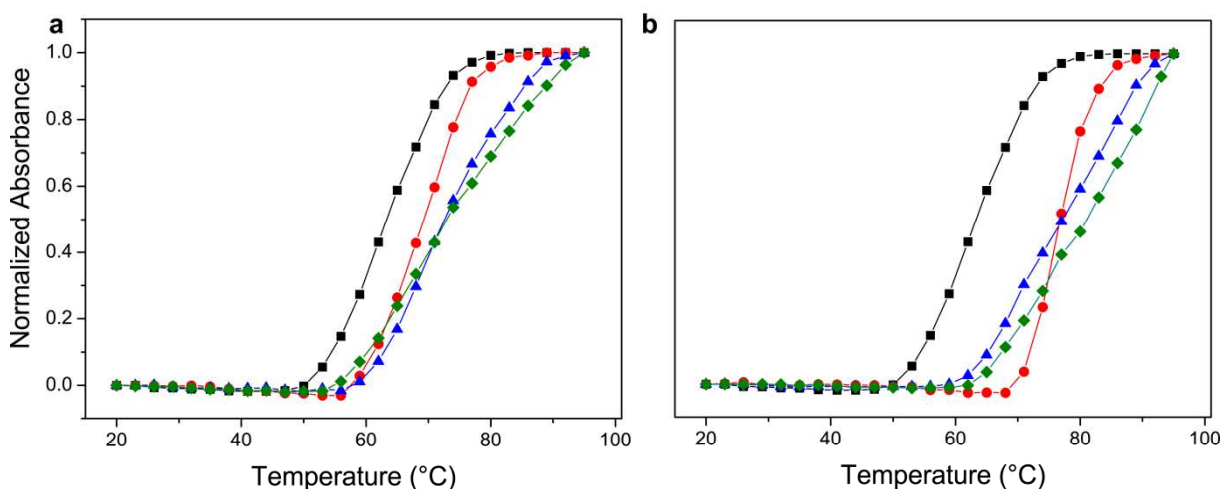


Figura 28. Curve di denaturazione di ct-DNA 50 μM (quadrati) in presenza di **1** (rombi), **2** (triangoli) e **3** (cerchi), in Tris-HCl 1.0 mM, al rapporto $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]$ pari a 0.05 (a) e 0.10 (b).

In Figura 28 sono riportate le curve di denaturazione termica di una soluzione di DNA 50 μM in Tris-HCl 1 mM in presenza di quantità crescenti dei complessi di nichel, rame e zinco. In dettaglio, la T_m del DNA (63.5 ± 1 °C, linea nera in Figura 28) aumenta rispettivamente di 10, 9 e 6 °C in presenza dei complessi **1**, **2** e **3** al rapporto molare $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}] = 0.05$ (Figura 28a) e di 19, 14 e 13 °C al rapporto $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}] = 0.10$ (Figura 28b). Questi risultati indicano che i complessi

interagiscono fortemente con il polinucleotide stabilizzandone la struttura a doppia elica. Tale stabilizzazione è in accordo con l'avvenuta intercalazione dei complessi nel polinucleotide, evidenziata dagli spettri CD in Figura 27, ulteriormente rafforzata dalla presenza dei gruppi trietilammonici, carichi positivamente, che per tale ragione interagiscono con i gruppi fosfato del DNA.

Infine i valori delle T_m , riepilogati in Tabella 6, confermano l'ordine di forza nell'interazione ottenuto attraverso le titolazioni UV-vis, cioè $1 > 2 > 3$.

Tabella 6. Variazione della T_m di una soluzione di ct-DNA 50 μM in presenza di quantità crescenti di complessi 1-3.

| $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]$ | $\Delta T_m (\pm 1) ^\circ\text{C}$ | | |
|--|-------------------------------------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 0.05 | 10 | 9 | 6 |
| 0.10 | 19 | 14 | 13 |

2.3.4. Viscosità

La viscosità di una soluzione di DNA rappresenta un ulteriore importante parametro utile a dimostrare se tra il polinucleotide ed una molecola esista interazione. In particolare, è noto che in seguito all'avvenuta intercalazione si verifica sempre un aumento della viscosità del DNA, poiché questo tipo di interazione causa un aumento della separazione assiale tra le coppie di basi attigue presenti nel sito di intercalazione della doppia elica e quindi un allungamento del polinucleotide.¹⁶²

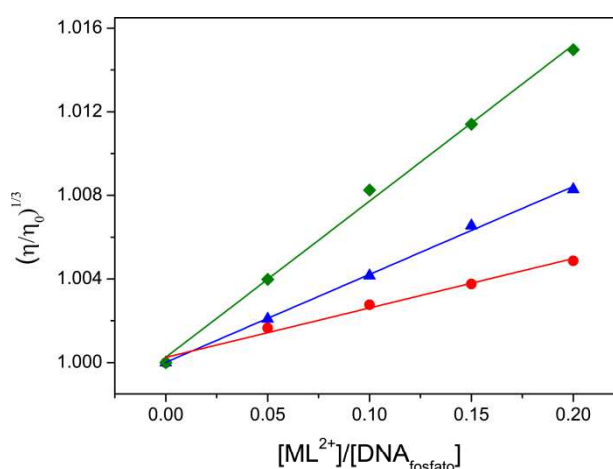


Figura 29. Viscosità relativa di una soluzione di DNA 50 μM in presenza di **1** (rombi), **2** (triangoli) e **3** (cerchi) in Tris-HCl 1 mM, ai rapporti $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]$ (R_1) indicati.

Nel caso specifico, la viscosità relativa di una soluzione di DNA, ossia il rapporto tra la viscosità della soluzione in esame (η) e quella di una soluzione di DNA alla medesima concentrazione (η_0), aumenta linearmente in seguito all'aggiunta di **1**, **2** e **3** a rapporti molari $[\text{ML}^{2+}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]$ compresi tra 0 e 0.20 come riportato in Figura 29. Questi risultati confermano che i tre complessi sono DNA-intercalanti. Inoltre la pendenza dei tre andamenti lineari decresce nell'ordine $\mathbf{1} > \mathbf{2} > \mathbf{3}$. In dettaglio, i tre coefficienti di correlazione della regressione lineare sono maggiori di 0.99 e le pendenze dei tre trend lineari sono pari a 0.074, 0.042 e 0.023 in presenza rispettivamente di **1**, **2** e **3**. Questi risultati indicano che l'aumento della viscosità relativa registrato in presenza dei complessi di nichel e di rame rispetto a quello osservato in presenza del complesso di zinco è più grande di circa tre e due volte rispettivamente, confermando ulteriormente l'ordine nell'interazione con DNA già osservato negli esperimenti precedentemente riportati.

2.3.5. Calcoli DFT/MM e spettroscopia di assorbimento dei raggi X

Sui composti **1-3** da me sintetizzati sono stati effettuati ulteriori studi da altri componenti del gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio progetto di Dottorato.¹⁶³

In particolare, sono stati registrati spettri d'assorbimento dei raggi X (XAS) di soluzioni del complesso di zinco **3** in presenza di ct-DNA, presso il Sincrotrone ESRF di Grenoble (Francia). Inoltre, calcoli DFT/MM del complesso supramolecolare tra **1**, **2**, **3** e $[\text{dodeca}(\text{dA-dT})_2]$, hanno mostrato che la forte interazione dei complessi **1-3** con il DNA è dovuta a tre principali interazioni: i) l'attrazione elettrostatica dei gruppi trietilammonici e i fosfati del DNA; ii) l'intercalazione degli anelli naftalenici; iii) la coordinazione del centro metallico con un eteroatomo delle basi azotate, principalmente con gli ossigeni carbonilici o gli azoti amminici. La struttura calcolata per il complesso **3**- $[\text{dodeca}(\text{dA-dT})_2]$ riproduce egregiamente lo spettro EXAFS ottenuto sperimentalmente per il complesso tra **3** e ct-DNA. Tale risultato rappresenta la prima prova dell'avvenuta coordinazione, in soluzione, di uno ione metallico con il DNA nativo. Infine, l'energia di formazione relativa all'intercalazione dei complessi **1-3** tra le basi AT del DNA, calcolata in termini di energia libera di Gibbs in soluzione acquosa, è in eccellente accordo con quella ottenuta sperimentalmente tramite

l'equazione $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_b)$, servendosi dalle costanti ottenute nel corso della titolazione spettrofotometrica.

2.4. Studio dell'interazione con G4-DNA

Come riportato nel paragrafo 2.1, i complessi **1-3** posseggono i requisiti strutturali fondamentali anche per interagire con il G4-DNA:¹¹¹ planarità, carica centrale e presenza di catene laterali cariche. Come detto, composti che mostrano selettività di legame per il G4-DNA rispetto al B-DNA potrebbero mostrare una citotossicità specifica per cellule tumorali e quindi una minore tossicità su cellule sane. Per tale ragione sono state effettuate titolazioni spettrofotometriche UV-vis e CD dei tre composti in presenza sia di G4-DNA che di B-DNA, al fine di valutare l'affinità verso la forma G4-DNA e l'eventuale selettività rispetto al B-DNA. Per lo studio con G4 sono state scelte le sequenze oligonucleotidiche *h-Telo* (5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') e *c-myc* (5'-GGGAGGGTGGGGAGGGTGGG-3'). Rispetto agli studi riportati nel precedente paragrafo 2.3, è stato qui necessario utilizzare un tampone differente (100 mM in KCl e 50 mM in Tris-HCl), per permettere l'*annealing* delle sequenze nucleotidiche sintetiche, ossia il loro ripiegamento in strutture G4. È noto che la costante di DNA-*binding*, K_b , diminuisce all'aumentare della forza ionica della soluzione.⁸³ Di conseguenza, come mostrato di seguito, le costanti di *binding* K_b per B-DNA in queste condizioni sperimentali sono risultate minori di quelle riportate in Tabella 3.

2.4.1. Spettroscopia UV-visibile

In Figura 30 è mostrato l'effetto dell'aggiunta di quantità crescenti di G4-DNA a soluzioni con concentrazione costante di **1-3**. Gli spettri UV-vis dei tre complessi subiscono un notevole effetto ipocromico e batocromico in prossimità della banda *infra-ligand*. Questi risultati, quasi identici sia per l'aggiunta di *h-Telo* sia per quella di *c-myc*, sono riassunti in Tabella 7 e suggeriscono l'avvenuta interazione dei complessi con i due G4-DNA.¹⁶⁴ Infatti, oltre alla struttura planare ed aromatica che può dar luogo ad interazioni di *end-stacking*, i tre complessi di nichel, rame e zinco presentano una parziale carica positiva sul centro metallico che, per tale ragione, può posizionarsi al centro del quartetto di guanine aumentando la stabilizzazione del complesso sul G4,

attraverso la sostituzione dello ione potassio che normalmente occupa tale posizione. La presenza di catene laterali cariche positivamente, costituite dai gruppi trietilammonici, contribuisce a stabilizzare ulteriormente i complessi mediante interazione elettrostatica con lo scheletro del *quadruplex*, carico negativamente per la presenza dei gruppi fosfato.

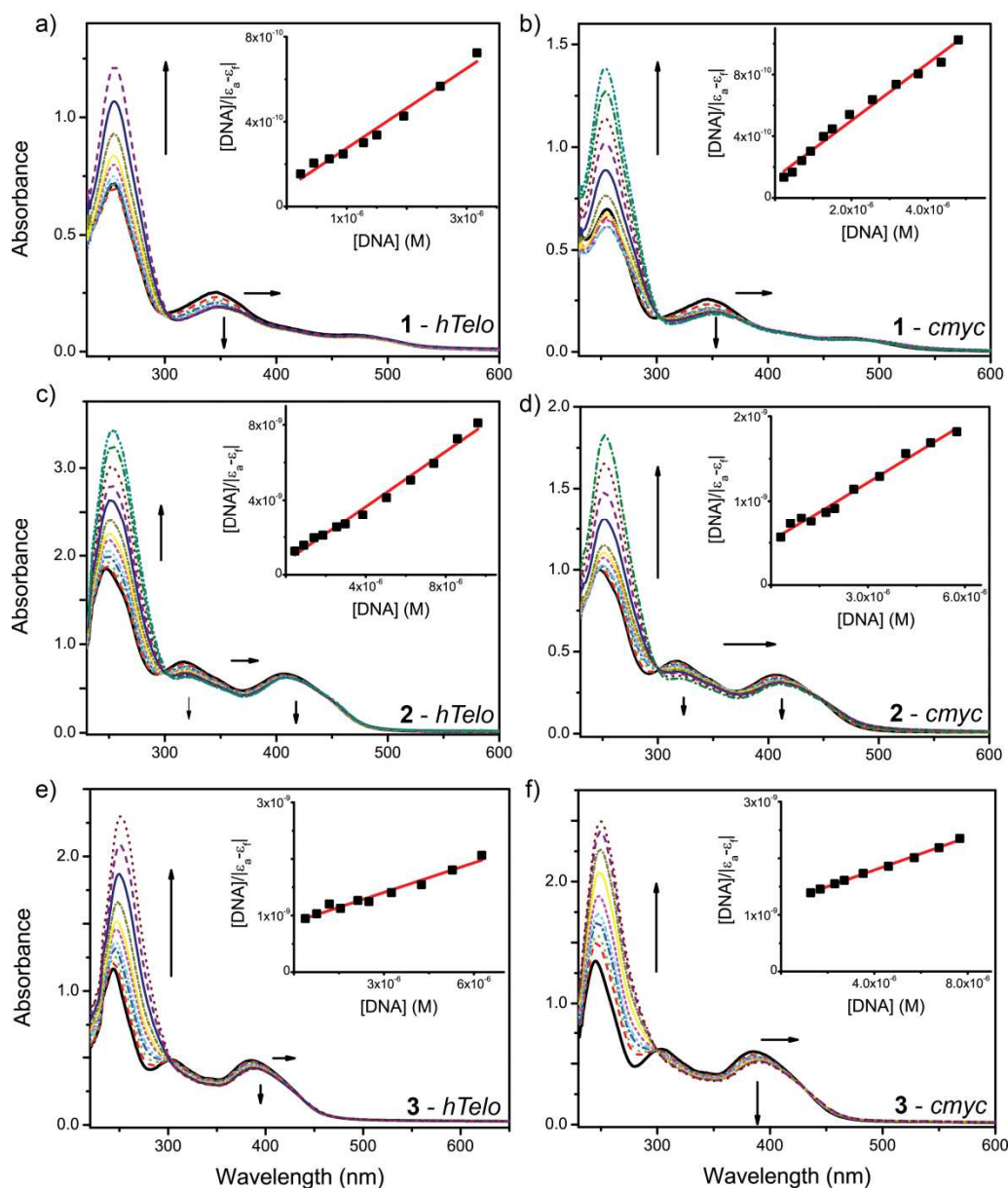


Figura 30. Titolazioni UV-vis dei complessi **1** (a, b), **2** (c, d) e **3** (e, f) in presenza di quantità crescenti di G4-DNA di *h-Telo* (colonna di sinistra) e *c-myc* (colonna di destra) in buffer Tris-HCl 50 mM e KCl 100mM. Le frecce indicano le variazioni in seguito all'aggiunta dei G4. (a) **[1]** = 13.4 μM , [*h-Telo*] = 0.00-3.17 μM ; (b) **[1]** = 13.7 μM , [*c-myc*] = 0.00-4.80 μM ; (c) **[2]** = 35.1 μM , [*h-Telo*] = 0.00-9.60 μM ; (d) **[2]** = 19.4 μM , [*c-myc*] = 0.00-5.75 μM ; (e) **[3]** = 21.8 μM , [*h-Telo*] = 0.00-6.26 μM ; (f) **[3]** = 27.3 μM , [*c-myc*] = 0.00-7.26 μM . Nei riquadri i *linear fitting* ottenuti utilizzando i coefficienti ϵ_a ed ϵ_b a 346 nm per **1**, a 407 nm per **2** e a 304 nm per **3**.

Per calcolare la costante di *binding*, K_b (Tabella 7), si è adoperato il metodo del *reciprocal plot*, come riportato in alcuni studi sull'interazione tra complessi metallici e G4.¹⁶⁵ Ciononostante, i valori di K_b ottenuti sono confrontabili con quelli che si ottengono applicando il metodo di Carter (ossia le equazioni *1a* ed *1b*, dati non riportati).

In particolare, il rapporto $[\text{DNA}]/|\varepsilon_a - \varepsilon_f|$ a 346 nm per **1**, a 407 nm per **2** e a 304 nm per **3** è stato riportato in funzione della concentrazione molare di G4-DNA (riquadro in Figura 30) servendosi dell'equazione 2:

$$\frac{[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]}{|\varepsilon_a - \varepsilon_f|} = \frac{[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]}{|\varepsilon_b - \varepsilon_f|} + \frac{1}{(|\varepsilon_b - \varepsilon_f| \times K_b)} \quad (2)$$

dove $[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]$ è la concentrazione dell'oligonucleotide determinata tramite spettroscopia UV-visibile, ε_f è il coefficiente d'estinzione molare in soluzione del complesso isolato, determinato tramite curve di taratura, e ε_b corrisponde al coefficiente d'estinzione molare determinato al *plateau* dei grafici di titolazione, quando cioè ogni ulteriore aggiunta di G4-DNA non causa nessuna variazione nello spettro d'assorbimento. In ultimo, ε_a è stato determinato come rapporto tra l'assorbanza misurata e la concentrazione molare dei complessi **1-3**.

Tabella 7. Confronto tra i valori di K_b (M^{-1}), ipocromismo (%) e batocromismo (nm) ottenuti per i complessi in presenza di B-DNA (ct-DNA) e dei due G4-DNA (*h-Telo* e *c-myc*).

| | ct-DNA | <i>h-Telo</i> | <i>c-myc</i> |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| K_b | | | |
| 1 | $(4.43 \pm 0.37) \times 10^4$ | $(2.16 \pm 0.57) \times 10^6$ | $(1.54 \pm 0.20) \times 10^6$ |
| 2 | $(1.68 \pm 0.13) \times 10^4$ | $(2.04 \pm 0.12) \times 10^5$ | $(4.46 \pm 0.42) \times 10^5$ |
| 3 | $(1.33 \pm 0.14) \times 10^4$ | $(1.98 \pm 0.21) \times 10^5$ | $(1.16 \pm 0.28) \times 10^5$ |
| Ipocromismo | | | |
| 1 | 26 | 25 | 30 |
| 2 | 22 | 22 | 24 |
| 3 | 12 | 13 | 14 |
| Batocromismo | | | |
| 1 | 5 | 4 | 6 |
| 2 | 5 | 3 | 2 |
| 3 | 3 | 4 | 4 |

Nelle stesse condizioni sperimentali adoperate per lo studio dell'interazione con G4-DNA, gli spettri UV-vis dei composti in esame, rappresentati da linee nere continue in Figura 31, mostrano, in presenza di quantità crescenti di B-DNA, variazioni molto simili a quelle riportate in Figura 25 a più bassa forza ionica. In particolare, gli spettri UV-vis sono profondamente modificati dall'aggiunta di B-DNA con batocromismo di 5 nm per i complessi **1** e **2**, e di 3 nm per il complesso **3**. È inoltre evidente un chiaro effetto ipocromico con abbassamenti pari rispettivamente al 26, 22 e 12 % (Tabella 7).

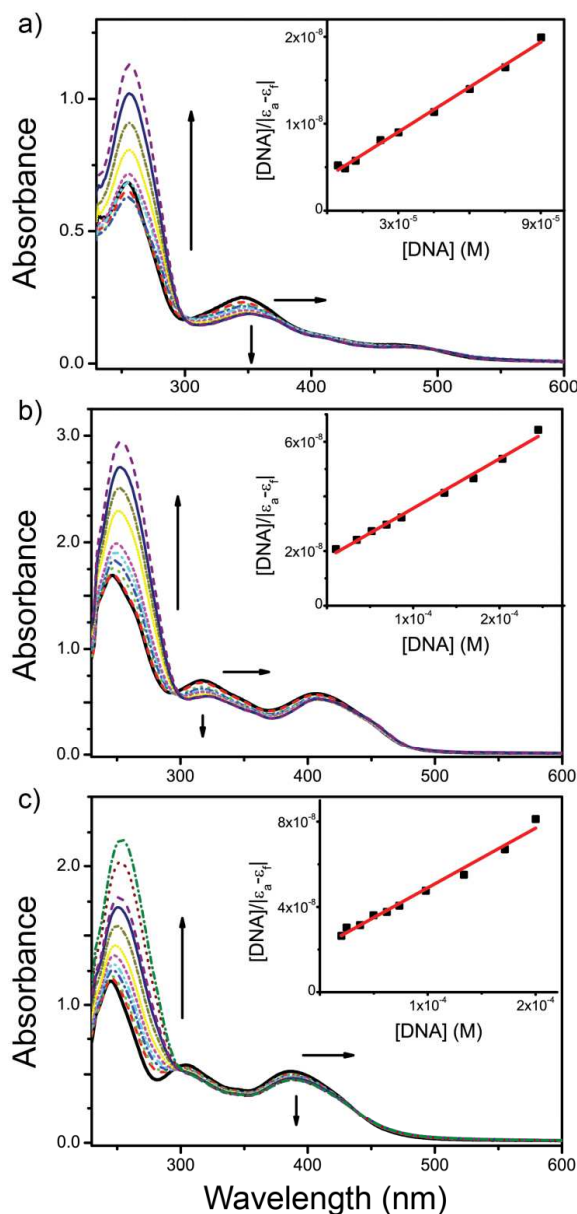


Figura 31. Titolazione UV-vis di **1** (a), **2** (b) e **3** (c) in presenza di quantità crescenti di ct-DNA in tampone Tris-HCl 50 mM e KCl 100 mM. Le frecce indicano le variazioni in seguito all'aggiunta del B-DNA. (a) $[1] = 13.1 \mu M$, $[DNA] = 0.00-90.15 \mu M$ (b) $[2] = 30.9 \mu M$, $[DNA] = 0.00-244.91 \mu M$ (c) $[3] = 23.6 \mu M$, $[DNA] = 0.00-251.50 \mu M$. Nei riquadri i *linear fitting* ottenuti utilizzando i coefficienti ϵ_a ed ϵ_b a 346 nm per **1**, a 407 nm per **2** e a 304 nm per **3**.

I valori di K_b ottenuti per il B-DNA (Tabella 7) sono inferiori di circa due ordini di grandezza se paragonati a quelli ottenuti in solo Tris-HCl 1 mM (Tabella 4). Tuttavia anche a più alta forza ionica l'ordine di interazione rimane $1 > 2 > 3$.

Inoltre, dai risultati delle K_b in Tabella 7 è evidente che, sebbene i complessi **1-3** interagiscano fortemente con la forma B del DNA, la loro capacità di interazione nei confronti dei G4 sia di *h-Telo* che di *c-myc* è di circa un ordine di grandezza superiore.

Questo interessante risultato dimostra che i complessi sono selettivi nei confronti dei G4-DNA rispetto al B-DNA. Infine, è interessante notare che i complessi **1** e **3** presentano un'affinità maggiore per la sequenza *h-Telo* rispetto alla *c-myc*. D'altro canto, il complesso **2** possiede una K_b più alta verso la seconda sequenza piuttosto che verso *h-Telo*, mostrando così una maggiore affinità nei confronti di *c-myc*.

2.4.2. Dicroismo Circolare

Il CD è una tecnica molto importante per la caratterizzazione strutturale dei G4 in soluzione, essendo appunto tale tecnica altamente sensibile a piccole variazioni nella conformazione chirale di una biomolecola attiva.^{22,155,166} Nelle strutture G4, come nel B-DNA, solo le basi azotate assorbono nella regione UV-vis mentre il contributo della catena zucchero-fosfato è trascurabile.²² In particolare, la guanina presenta due bande di assorbimento caratteristiche, relative a transizioni $\pi-\pi^*$ polarizzate lungo l'asse maggiore e lungo quello minore, rispettivamente a circa 279 e 248 nm.²² Ma nei G4-DNA, il fatto che le guanine delle tetrad siano ruotate vicendevolmente sino a formare una doppia elica causa un fenomeno detto *chiral exciton coupling* tra i momenti di dipolo di transizione di due guanine vicinali, dando luogo a segnali dicroici strettamente dipendenti dalla conformazione assunta dal G4-DNA, che diviene quindi chirale e con un caratteristico spettro di dicroismo circolare. Per questo motivo, il CD è molto utile per studiare l'interazione con piccole molecole che causano variazioni conformazionali nella struttura G4.¹⁶⁷ Il CD fornisce inoltre fondamentali informazioni strutturali circa l'avvenuta formazione del G4. È noto ad esempio che una sequenza *h-Telo non-annealed* presenta al CD un'elicità positiva a 255 nm, tipica della sequenza a singolo filamento, mentre in seguito ad *annealing* compaiono una banda positiva a 290 nm ed una spalla a 270 nm.¹⁴²

Come riportato nel Capitolo 1, nonostante esistano diversi tipi di strutture G4 esse possono essere classificate in tre gruppi (vedi Figura 7): tale classificazione è possibile poiché ognuno di questi gruppi presenta un caratteristico spettro CD. I G4 appartenenti al gruppo 1, infatti, presentano un'intensa banda positiva a 264 nm ed una negativa a 245 nm (Figura 32a), mentre il gruppo 2 è caratterizzato da due bande positive a 290 e 264 nm e da una terza banda negativa a 240 nm (Figura 32b); infine il gruppo 3

presenta due bande positive a 290 e 240 nm ed una banda negativa a 264 nm (Figura 32c).

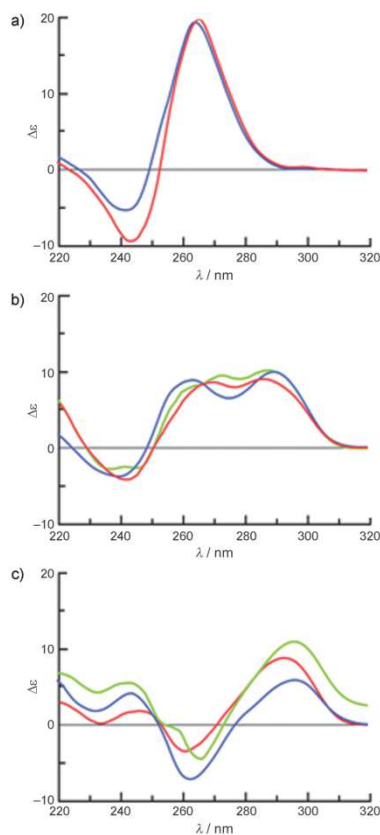


Figura 32. Spettri CD di tre gruppi di G4-DNA: gruppo 1 (a); gruppo 2 (b); gruppo 3 (c).²²

Nel caso specifico, in una soluzione 50 mM in Tris-HCl e 100 mM in KCl, la sequenza *h-Telo* forma un G4 intramolecolare ibrido, cioè con tre porzioni di filamento orientate parallelamente ed una porzione orientata antiparallelamente rispetto all'asse del G4.^{168,169} Si è però osservato che alcuni agenti *G4-stabilizer* possono indurre e stabilizzare preferenzialmente una delle due conformazioni parallele o antiparallele.^{165,170-172} Ad ogni modo, la presenza della banda positiva a 290 nm e della spalla a 270 nm (linea nera continua in Figura 33a, c, e) permette di classificare il G4 di *h-Telo* come appartenente al gruppo 2.¹⁷³

In seguito all'aggiunta di quantità crescenti di **1** ad una soluzione di *h-Telo* a concentrazione costante è possibile osservare un aumento di intensità della prima banda, che si sposta a 295 nm, ed una diminuzione della spalla a 264 nm circa (Figura 33a). Paragonando questo risultato con quelli trovati in letteratura,¹⁷⁴ si può concludere

che il complesso **1**, in queste condizioni sperimentali, induce delle variazioni conformazionali favorendo la conformazione antiparallela del G4, con un possibile passaggio da una struttura del secondo ad una del terzo gruppo. Un risultato simile è stato ottenuto inoltre per il complesso **2** (Figura 33c), mentre il complesso **3**, benché interagisca con il G4, come testimoniato dalla comparsa di una banda ICD negativa intorno ai 400 nm, non mostra alcuna preferenza per la struttura parallela o antiparallela (Figura 33e).

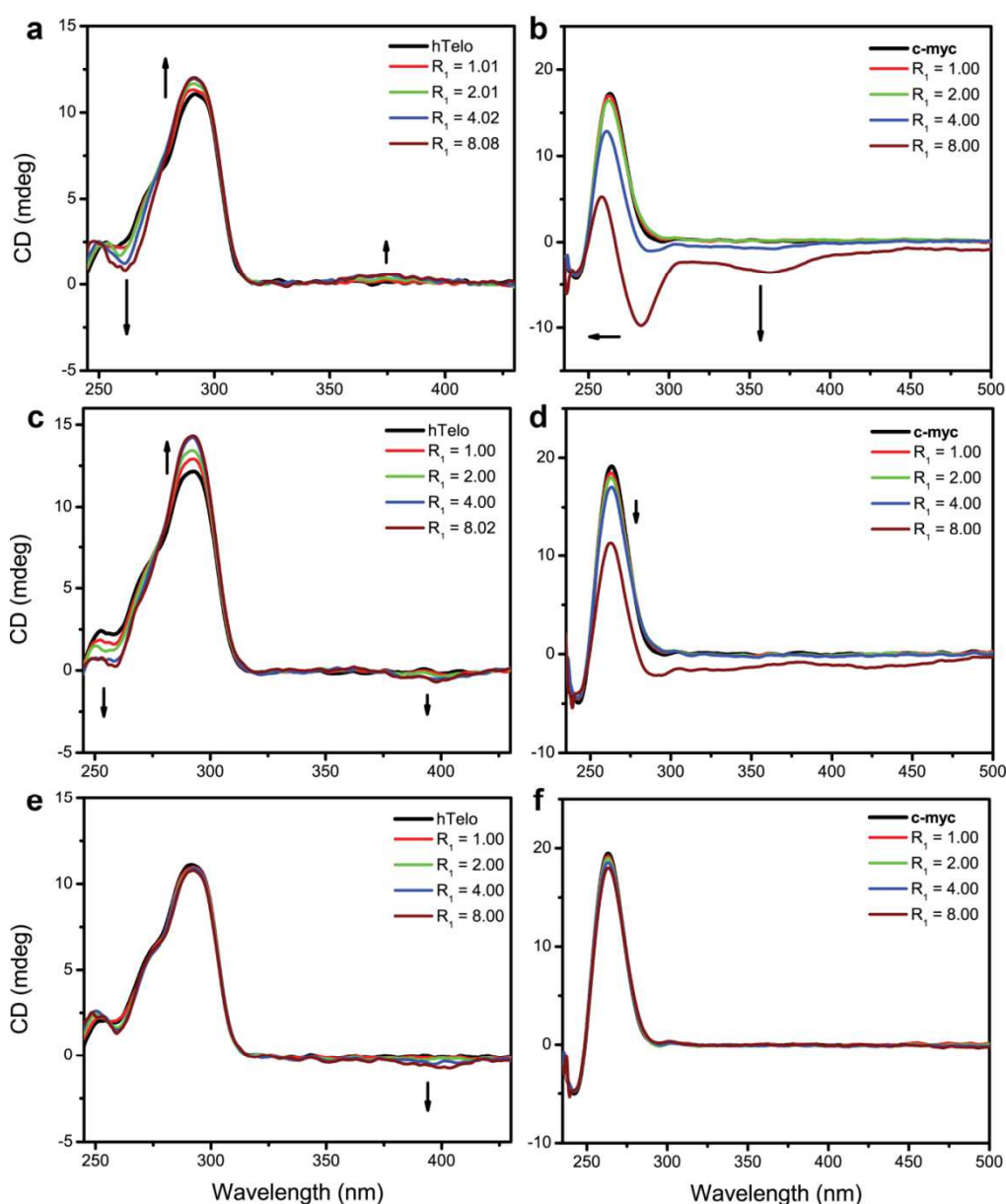


Figura 33. Spettri CD di G4-DNA ottenuti da sequenze *h-Telo* (a, c, e) e *c-myc* (b, d, f) in presenza di quantità crescenti di **1** (a, b), **2** (c, d), e **3** (e, f) aggiunte in soluzione 50 nM Tris-HCl (pH = 7.5) e 100 mM in KCl. (a) [*h-Telo*] = 3.0 μ M; (b) [*c-myc*] = 3.0 μ M; (c) [*h-Telo*] = 2.0 μ M; (d) [*c-myc*] = 2.0 μ M; (e) [*h-Telo*] = 2.0 μ M; (f) [*c-myc*] = 2.0 μ M.

Il picco positivo a 263 nm e quello negativo a circa 245 nm (linea nera continua in Figura 33b, d, f) permette di classificare invece il *c-myc* quale G4 parallelo appartenente al gruppo 1.^{175,176} L'aggiunta di quantità crescenti sia di **1** che di **2** causa un abbassamento del picco a 263 nm indicando, anche in questo caso, una preferenza nei confronti delle strutture antiparallele su quelle parallele. Il complesso **3**, al contrario, stabilizza il G4 senza indurre alcun cambiamento conformazionale. Inoltre, in seguito all'aggiunta dei complessi metallici si osserva sempre la comparsa di una banda di dicroismo indotta (ICD) in entrambi *h-Telo* e *c-myc* (eccetto nel caso dell'interazione tra **3** e *c-myc*), che conferma ulteriormente che i complessi metallici interagiscono efficacemente con i G4 in esame.

Poiché il CD fornisce informazioni sull'avvenuta formazione dei G4, si è ritenuto parecchio interessante studiare se i complessi **1-3**, oltre a stabilizzare i già formati G4, fossero in grado di indurre la formazione in assenza degli ioni potassio. Per poter verificare ciò sono stati condotti esperimenti CD sulla sequenza del DNA *h-Telo* in presenza di quantità crescenti di **1-3**, servendosi del tampone 50 mM in Tris-HCl privo di ioni K⁺.

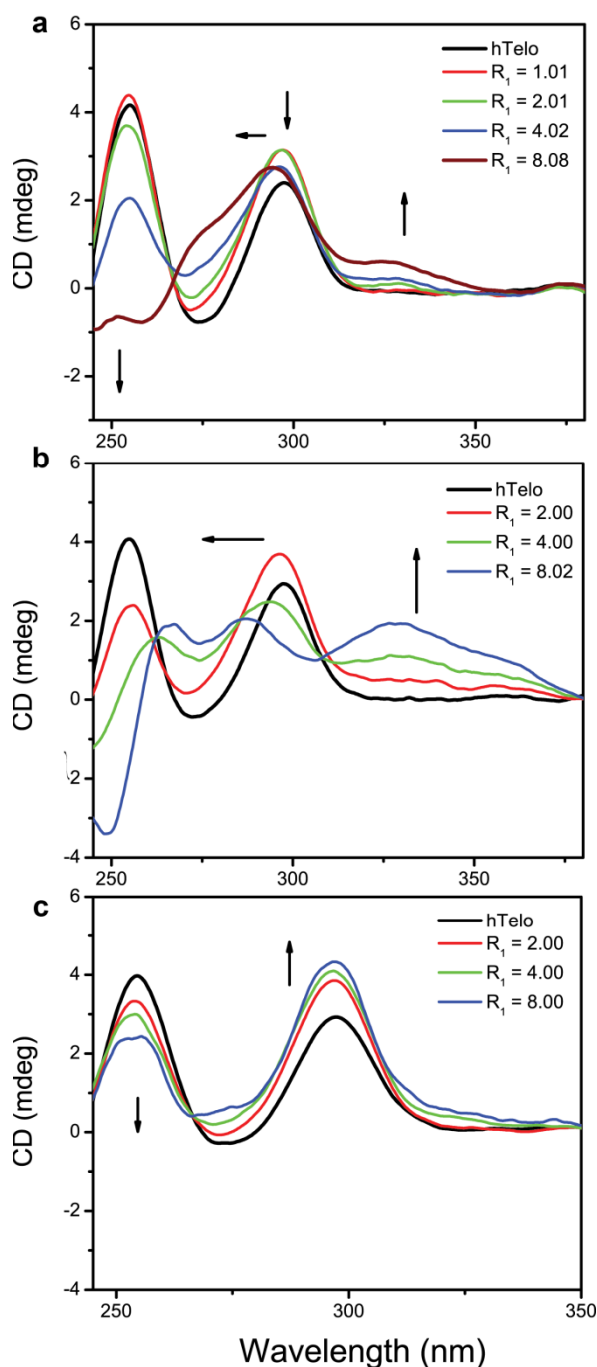


Figura 34. Spettri CD di sequenze *h-Telo* del DNA in presenza di quantità crescenti di complessi **1** (a) **2** (b) e **3** (c), in 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5). [*h-Telo*] = 2.0 μ M

Lo spettro CD tipico di una sequenza *h-Telo* a singolo filamento (linea nera in Figura 34) non subisce interessanti variazioni in presenza del complesso **3**, come riportato in Figura 34c: in questo caso, infatti, è possibile notare soltanto una variazione di intensità dei segnali normalmente registrati per la sequenza *h-Telo*. In seguito all'aggiunta dei complessi **1** e **2**, invece, lo spettro di *h-Telo non-annealed*

subisce modifiche significative, con una diminuzione della banda a 250 nm ed un aumento di quelle associate alla struttura G4 (Figura 34a, b).

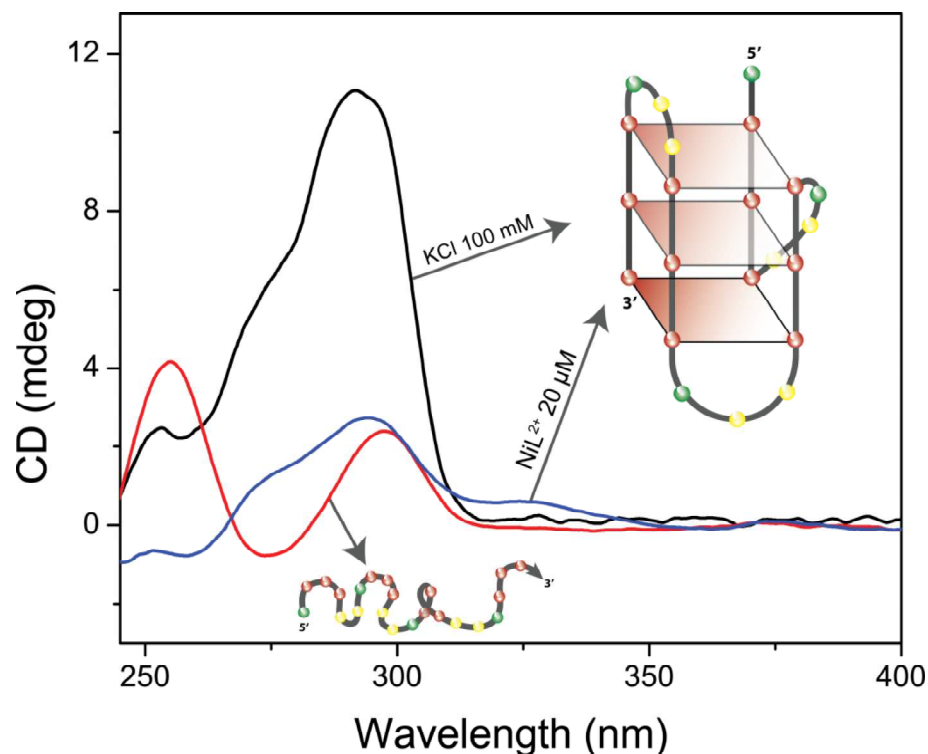


Figura 35. Spettri CD di una soluzione 3 μM di *h-Telo non annealed* (linea rossa), organizzata in G4 in presenza di K^+ 100 mM (linea nera) e organizzata in G4 in presenza di 20 μM di **1** (linea blu). Tutte le soluzioni sono state preparate con una concentrazione costante (50 mM) di tampone Tris-HCl.

Ancora una volta, il caso più interessante è rappresentato dal complesso **1** la cui aggiunta ad una soluzione di *h-Telo non-annealed* comporta una diminuzione del picco positivo a 250 nm circa (associato appunto alla forma *monostrand* di *h-Telo*) ed un aumento dei picchi positivi a 264 e 295 nm, tipici della forma G4 della sequenza *h-Telo* (Figura 35). Questo risultato indica inequivocabilmente che il complesso **1** induce la formazione della conformazione G4 anche in assenza dei cationi K^+ e quindi in condizioni fisiologiche in cui, normalmente, essa non esiste. Questa evidenza permette quindi di supporre che la capacità del complesso **1** di stabilizzare e di promuovere la formazione di G4 potrebbe essere collegata ad interessanti proprietà biologiche, come in effetti riportato nel paragrafo successivo.

2.5. Saggi biologici

2.5.1. Attività anti-proliferativa

Lo screening sull'attività anti-proliferativa è stato dapprima condotto presso il *National Cancer Institute* (Bethesda, MD, USA) nell'ambito del *Developmental Therapeutic Program* (DTP) su 60 diverse linee cellulari. Tali cellule sono a loro volta raggruppate in 9 pannelli, ognuno riguardante un differente tipo di tumore: leucemia, melanoma, carcinoma polmonare a piccole cellule, ovarico, renale, prostatico, carcinoma del colon, del sistema nervoso centrale e della mammella. Il saggio ha avuto inizio con un test monodose (*one-dose test*) nel corso del quale i composti sono stati inoculati, ad una concentrazione costante (pari a 10 μ M), nelle 60 colture cellulari, successivamente incubate per 48 ore. Al termine del tempo di incubazione è stato possibile rilevare la percentuale di crescita cellulare. Tutti i derivati per i quali è stata riscontrata una percentuale di crescita delle cellule tumorali minore del 32% sono stati ulteriormente valutati contro le 60 cellule a 5 concentrazioni differenti, comprese tra i 10^{-4} e i 10^{-8} M.

Nello specifico, al saggio monodose i complessi **2** e **3** hanno mostrato una lieve attività anti-proliferativa, senza tuttavia scendere al di sotto del 32 % discriminante per il successivo screening. Il complesso di nichel **1**, viceversa, ha mostrato una notevole attività anti-proliferativa con percentuali di crescita cellulare tali da permettere lo screening a 5 dosi (per la trattazione completa riferirsi alle Figure A5, A6, A7 in Appendice). È inoltre interessante notare che l'analogo di tipo Salphen non è in grado di causare un'inibizione della crescita cellulare tale da giustificare un saggio a 5 dosi, secondo il protocollo NCI. Questa evidenza conferma ulteriormente l'ipotesi, stabilita in sede progettuale, che sarebbe stato possibile migliorare l'effetto antitumorale servendosi di derivati aventi un anello benzenico condensato in più.

A seguito del saggio monodose, il complesso **1** è stato sottoposto allo screening a 5 dosi dal quale è stato possibile ricavare una serie di parametri utili a valutarne l'attività antitumorale. Mediante questo studio è infatti possibile ottenere: il GI_{50} ossia quella concentrazione di complesso alla quale non più del 50% della popolazione cellulare si è replicata; la TGI (*total growth inhibition*), la concentrazione di complesso in cui la percentuale di crescita cellulare è pari allo 0%; la LC_{50} (*lethal concentration 50*) cioè

quella concentrazione alla quale non solo si è arrestata la crescita cellulare ma sopravvivono solo la metà delle cellule inizialmente incubate.

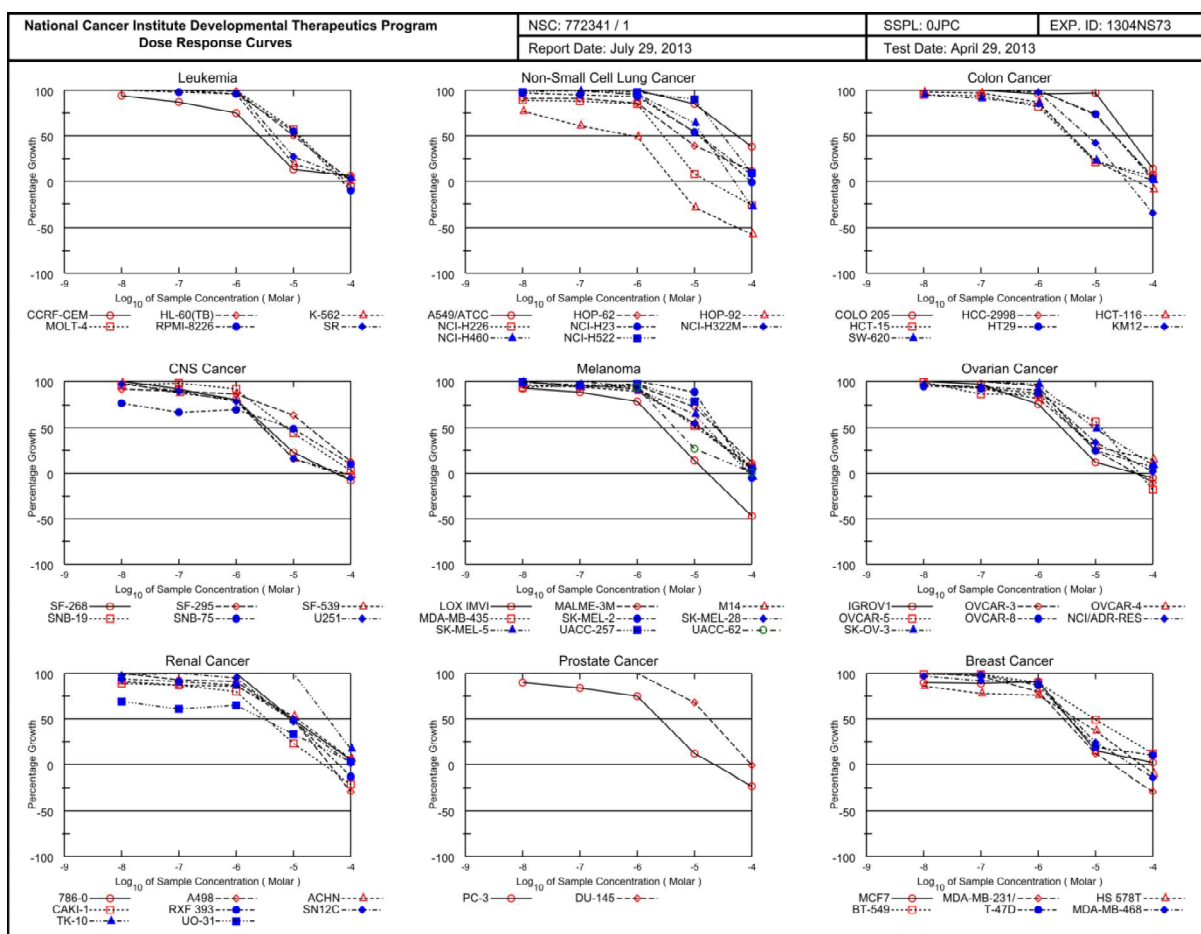


Figura 36. Curve dose-risposta del complesso **1** nei confronti delle linee cellulari saggiate, divise in nove pannelli tumorali. Da ognuna di esse è possibile derivare i valori di GI_{50} , LC_{50} e di TGI.

Come mostrato in Figura 36 e in Figura 37, il complesso di nichel **1** possiede ottime capacità inibenti verso tutti le linee cellulari saggiate: il valore del $\text{Log}(GI_{50})$ è infatti compreso tra -6.12 e -4.26 con un valore medio di -5.12. Questo risultato dimostra dunque che il complesso **1** è in grado d'agire come agente antitumorale verso tali cellule con un GI_{50} medio, dato dal *Mean Graph Mid point*, pari a 7.6 μM .

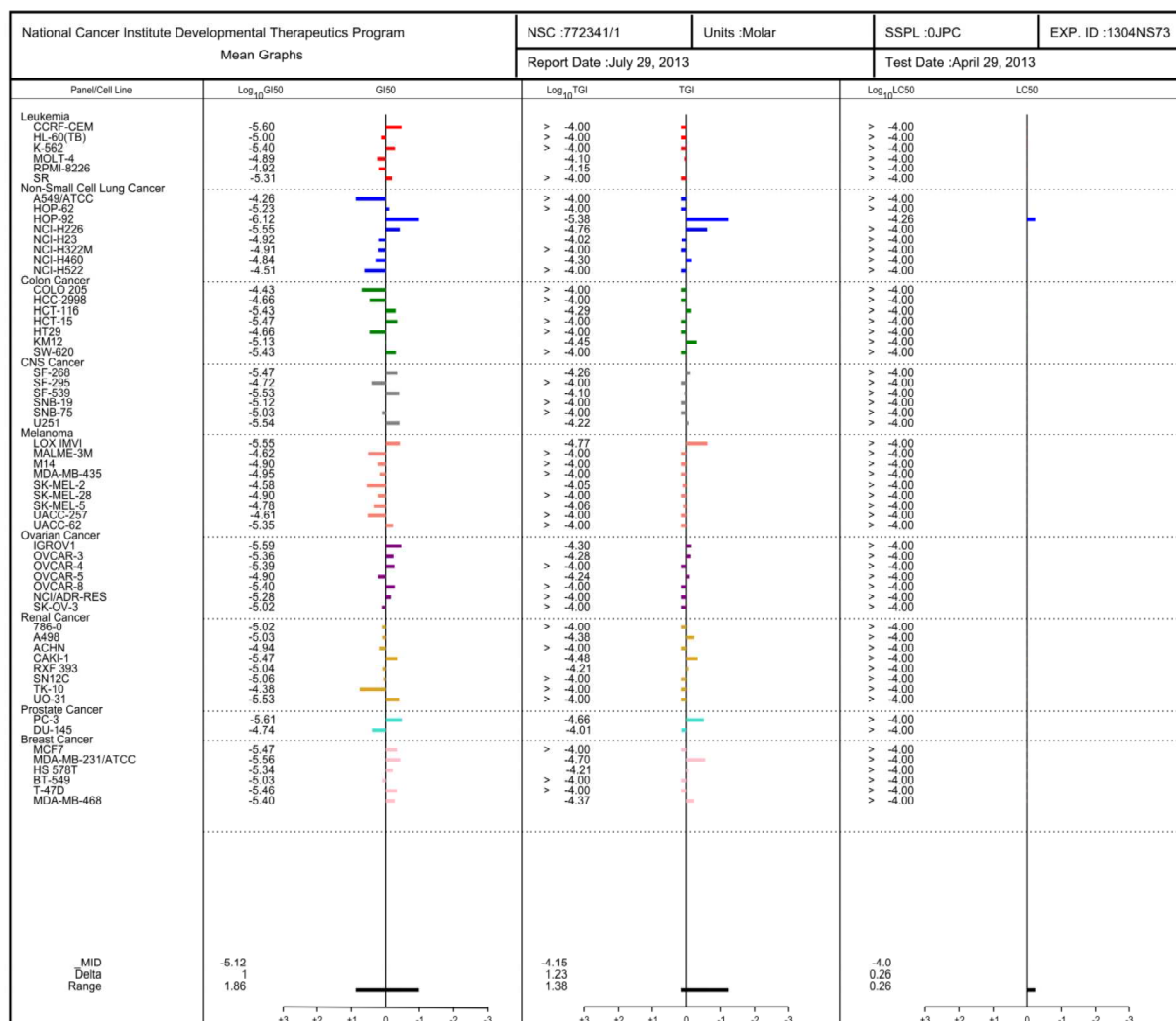


Figura 37. Saggio a 5 dosi del complesso 1 nei confronti di diverse linee cellulari (Mean Graph).

In particolare, la linea cellulare che risponde meglio al trattamento con **1** è la HOP-92, per la quale il GI₅₀ (circa 0.75 μM) si discosta maggiormente dal valore medio. Inoltre nel caso del cancro della mammella (*Breast Cancer* in Figura 37), a differenza dei restanti 8 pannelli, il complesso **1** presenta valori di GI₅₀ sempre al di sotto della media, salvo per le cellule BT-549. È particolarmente interessante notare che in tutti i casi studiati il valore di LC₅₀ è sempre superiore a 10 mM, lontano cioè parecchi ordini di grandezza dal valore di GI₅₀.

Per potere inoltre stimare una differenza nel comportamento biologico in presenza anche dei complessi **2** e **3** si è deciso di ripetere il saggio anti-proliferativo verso le cellule HeLa, non saggiate all'NCI, e nei confronti delle cellule MCF-7 che, tra le linee del cancro della mammella, si sono dimostrate come le più responsive al complesso **1**. Questo secondo screening ha confermato che i complessi **2** e **3**

presentano modeste attività anti-proliferative se confrontate con quelle del complesso **1**.

In particolare i valori di GI_{50} ottenuti dopo esposizione ai complessi per 24 e 48 ore sono presentati in Tabella 8 e dimostrano che il complesso **3**, dopo le prime 24 ore, presenta degli effetti citotossici particolarmente bassi verso entrambe le cellule saggiate, con un GI_{50} superiore ai 50 μM . Dopo 48 ore, invece, non si osservano grosse differenze tra i GI_{50} dei complessi **2** e **3** sulle cellule HeLa (rispettivamente 10.15 ± 0.94 e 13.04 ± 1.42 μM), mentre il complesso **2** si è dimostrato più attivo rispetto a **3**, sempre dopo 48 ore, verso le cellule MCF-7 (13.58 ± 1.22 e 21.94 ± 2.04 μM). Inoltre, dopo le 48 ore di trattamento, il complesso **1**, in accordo con i dati forniti dal NCI, ha mostrato valori di GI_{50} particolarmente bassi, sintomo di una maggiore citotossicità come da accordo con i dati ottenuti durante la titolazione spettrofotometrica.

Tabella 8. Valori di GI_{50} ottenuti per i complessi **1-3** su cellule HeLa e MCF-7.

| Linea Cellulare | [1] μM | | [2] μM | | [3] μM | |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------|------------------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| HeLa | 16.58 ± 1.72 | 0.31 ± 0.07 | 22.32 ± 1.36 | 10.15 ± 0.94 | > 50 | 13.04 ± 1.42 |
| MCF-7 | 9.80 ± 0.81 | 1.42 ± 0.08 | 29.26 ± 2.36 | 13.58 ± 1.22 | > 50 | 21.94 ± 2.04 |

Infine, come evidente in Tabella 8, l'ordine della capacità anti-proliferativa nei confronti delle linee cellulari segue esattamente quello della forza di interazione sia con B-DNA che con G4-DNA (**1** > **2** > **3**), lasciando quindi supporre che il DNA sia il bersaglio biologico di tali complessi, tramite il quale si esplica la loro attività citotossica.

2.5.2. Analisi dell'effetto dei complessi sul ciclo cellulare

I risultati sulla crescita di cellule tumorali in seguito ad esposizione ai complessi **1-3** mostrano un chiaro dato sulla capacità dei complessi d'arrestare *in vitro* la crescita di queste linee tumorali. L'effetto antitumorale può essere però ottenuto attraverso necrosi cellulare o per apoptosi. È risaputo che, tra i due eventi, l'unico preferibile per un potenziale trattamento terapeutico è il secondo. Durante la necrosi, infatti, le cellule subiscono un processo di lisi cui consegue il riversamento all'esterno dell'intero contenuto cellulare, compresi ad esempio enzimi che possono danneggiare le

membrane delle cellule adiacenti. Ciò determina una reazione immunitaria improvvisa dell'organismo e spesso un'incontrollata risposta infiammatoria.¹⁷⁷ I complessi **1-3** hanno dimostrato non indurre necrosi nelle cellule MCF-7 ed HeLa nell'intervallo di concentrazioni comprese tra 0.1 e 25 μM , come risulta dall'esito negativo del test sull'attività del LDH extracellulare. Per comprendere quindi in quale momento del ciclo cellulare questi complessi siano attivi ed avere un quadro più chiaro del loro comportamento in ambiente cellulare è stata condotta un'analisi di citometria a flusso, con incubazione delle cellule per 48 ore a concentrazioni di **1-3** pari alla propria GI_{50} ed al doppio di tale valore. Per ciclo cellulare si intende la serie di eventi che intercorrono tra una divisione cellulare ed un'altra: tali eventi sono raggruppati in fasi, etichettate con simboli alfanumerici. Durante la prima fase, detta G0/G1, le cellule quiescenti raddoppiano le proprie dimensioni e costruiscono numerosi organuli necessari alla vita cellulare. Nella fase successiva, detta S, avviene la sintesi e la duplicazione del materiale genetico. Quindi, durante la successiva fase, G2, la cellula si prepara alla mitosi, con la formazione del fuso mitotico, necessario alla divisione cromosomica. Infine la cellula procede alla mitosi, nella fase detta M, cui seguirà una nuova fase G0/G1 con la quale inizia un nuovo ciclo cellulare.¹⁷⁸

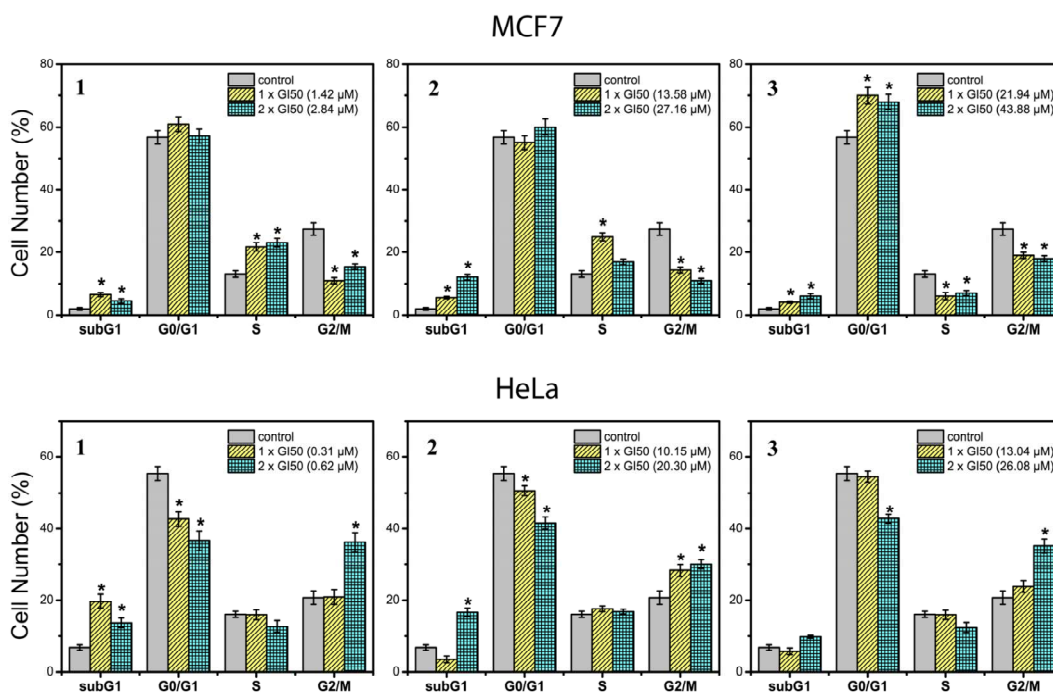


Figura 38. Distribuzione della popolazione cellulare nei diversi momenti del ciclo cellulare a seguito del trattamento con i complessi **1-3**

Come si può osservare in Figura 38, nel caso delle cellule MCF-7 i complessi **1-3** inducono un arresto precoce, con accumulo delle cellule in fase G₀/G₁ e/o in fase S e con una riduzione della fase G₂/M. Tale risultato è interessante perché l'arresto in fase G₁ è un importante meccanismo di difesa che le cellule adottano per evitare la replicazione di DNA danneggiato.¹⁷⁹ È inoltre evidente un aumento della popolazione cellulare in fase sub-G₁, indicativo della presenza di cellule apoptotiche. Nel caso delle cellule HeLa, invece, è presente una forte soppressione della fase G₀/G₁ con arresto nelle fasi G₂/M.

Questo differente risultato ottenuto nei confronti delle due linee cellulari trova spiegazione nella possibilità che i complessi **1-3**, a seconda del tipo di cellula tumorale, inibiscano differenti funzioni del DNA. È inoltre possibile che, in alcune linee cellulari, i complessi interagiscano con forme di DNA differenti da quella B, ad esempio con i G₄, giustificando quindi l'arresto del ciclo cellulare in fasi diverse.

2.5.3. Saggio sull'arresto della PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una procedura sviluppata per l'amplificazione *in vitro* di sequenze del DNA: in questo contesto, la tecnica è stata ampiamente utilizzata come un modello della replicazione del DNA nelle cellule o per analizzare il DNA estratto da piccole quantità di campioni biologici.¹⁸⁰

Tale tecnica si basa su diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento, sfruttando la capacità da parte di una particolare DNA polimerasi (definita Taq polimerasi) di resistere al calore. Infatti il frammento da amplificare, miscelato ad un largo eccesso di deossiribonucleotidi trifosfati (dNTP), Taq polimerasi e *primer* oligonucleotidici costruiti in modo tale da esser complementari alle porzioni terminali della sequenza da amplificare, deve essere scaldato per permetterne la denaturazione. Il successivo raffreddamento permette l'appaiamento della sequenza *primer*, a partire dalla quale la Taq polimerasi "ricopierà" il filamento originale. Il ripetersi ciclico del riscaldamento e del raffreddamento, insieme al largo eccesso di *primer*, deossiribonucleotidi e polimerasi, permette una replicazione esponenziale dei frammenti di DNA.

In questo contesto, qualora i composti **1-3** fossero in grado di indurre la formazione di strutture G₄ nel frammento da amplificare, esso, una volta denaturato, non potrebbe

appaiarsi con i dNTP, rendendo impossibile quindi la sua replicazione e bloccando di conseguenza la PCR.

Per questo motivo, in collaborazione con il Dott. Cosimo Ducani del Karolinska Institute di Stoccolma (Svezia), sono stati condotti dei saggi sull'arresto della PCR in presenza di quantità crescenti di complessi **1-3**. L'oligonucleotide testato, corrispondente alla sequenza *c-myc*, è in grado di dar luogo a strutture G4 in ambiente fisiologico, come già riportato nel Capitolo 1.²⁹ Esso è stato sottoposto a 35 cicli PCR in presenza di concentrazioni crescenti di **1**, **2** e **3**. Al termine di tali cicli, il risultato della PCR, visualizzato su gel di poliacrilammide, ha mostrato che tutti i complessi saggiati, sebbene con diversa efficienza, inibiscono la PCR (Figura 39). In particolare il più efficace è stato il complesso **1**, in grado di inibire il 50% della PCR già ad una concentrazione pari a 0.2 μM (Figura 39a). Altrettanto interessante è il comportamento di **2** in grado di inibire circa il 70% della PCR ad una concentrazione pari a 1 μM mentre il complesso **3** causa inibizioni apprezzabili solo a concentrazioni più alte (circa 10 e 30 μM), mostrando indirettamente una minore capacità di indurre la formazione dei G4. Tali risultati confermano i dati ottenuti dalle titolazioni UV-vis e CD già riportati nei paragrafi precedenti e sottolineano ancora una volta l'ordine di interazione trovato nel corso degli altri esperimenti condotti sia sul B-DNA che sui G4, ossia: **1** > **2** > **3**. È importante notare che i presenti studi, a differenza di quanto riportato in letteratura,¹⁸¹ sono stati condotti in assenza di KCl, a dimostrazione che anche in tali condizioni i composti **1-3** sono in grado di indurre la formazione di G4.

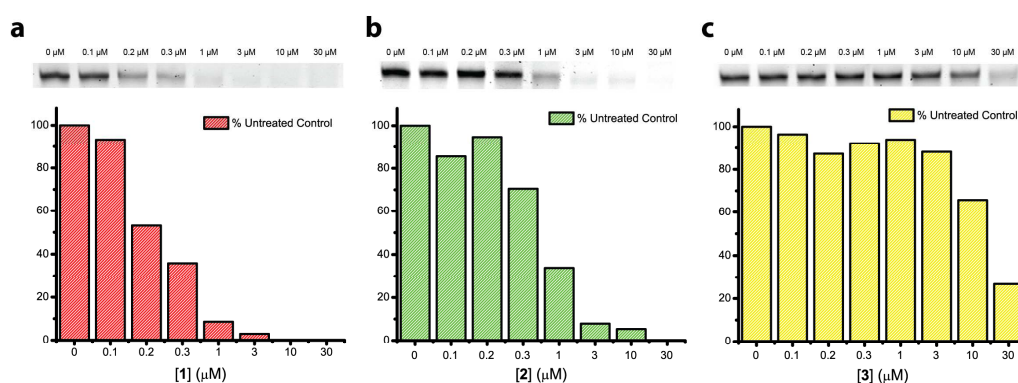


Figura 39. Saggio sull'inibizione della PCR dell'oligonucleotide *c-myc* in presenza di concentrazioni crescenti dei complessi **1** (a), **2** (b) e **3** (c).

Per verificare inoltre che l'inibizione riscontrata nel saggio sulla PCR sia dovuta principalmente alla stabilizzazione della struttura G4 dell'oligonucleotide, il medesimo test è stato condotto servendosi di una sequenza *c-myc*, denominata "Pu22mu", (5'-GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG-3') sintetizzata in modo da contenere un numero di guanine inferiore rispetto alla sequenza originale (Figura 40).

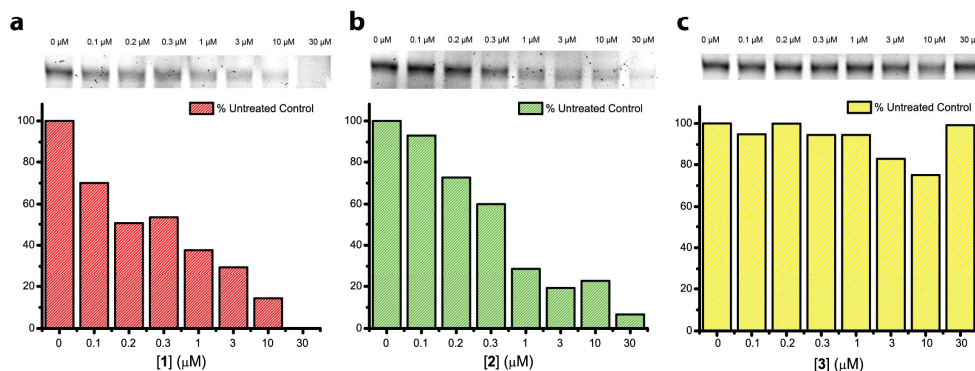


Figura 40. Saggio sull'inibizione della PCR dell'oligonucleotide Pu22mu in presenza di concentrazioni crescenti dei complessi **1** (a), **2** (b) e **3** (c).

In questo caso sono state necessarie concentrazioni più alte di complessi per indurre l'inibizione della PCR. In particolare, è stato necessario l'utilizzo di una concentrazione di **1** pari a 30 μM per avere una completa inibizione della PCR, mentre in presenza dell'oligonucleotide non mutato (Figura 39a) i prodotti della PCR scomparivano quasi del tutto già ad una concentrazione pari a 1 μM . Allo stesso modo, il complesso **2** riesce ad inibire la PCR della sequenza Pu22mu solo ad alte concentrazioni (Figura 40b), mentre il complesso **3** non è in grado di interferire con l'amplificazione della sequenza, anche alle più alte concentrazioni testate (Figura 40c).

Tali risultati rivelano che i complessi **1-3** inibiscono meno efficacemente la PCR della sequenza Pu22mu rispetto a quella della sequenza *c-myc* originale. Laddove quindi l'induzione del G4 è strutturalmente impossibile per la presenza di una sequenza genica mutata, i complessi rispondono con una minore efficacia, dimostrando quindi che la loro capacità di inibire la PCR della sequenza *c-myc* è principalmente correlata alla capacità di indurre e stabilizzare strutture di tipo G4-DNA.

2.6. Conclusioni

Tre nuovi complessi di nichel(II), rame(II) e zinco(II), **1**, **2**, e **3**, di una base di Schiff planare tetradentata, sono stati sintetizzati e caratterizzati. Studi di interazione con B-DNA hanno dimostrato che i tre composti sono DNA intercalanti. In particolare, l'ordine decrescente delle costanti di DNA-*binding*, K_b , è $\mathbf{1} > \mathbf{2} > \mathbf{3}$. La K_b del complesso di nichel(II) è di circa due ordini di grandezza superiore a quello del complesso di zinco(II).

Studi spettroscopici condotti su G4-DNA di sequenze *h-Telo* e *c-myc*, hanno mostrato che i tre complessi stabilizzano anche i G4. I valori di K_b anche in questo caso decrescono nell'ordine $\mathbf{1} > \mathbf{2} > \mathbf{3}$, e sono di oltre un ordine di grandezza superiori rispetto a quelli ottenuti per il B-DNA. È quindi evidente la preferenza da parte dei tre complessi per conformazioni G4 del DNA. Inoltre, studi di dicroismo circolare in assenza di ioni potassio in soluzione, hanno permesso di dimostrare che il complesso di nichel(II) induce la formazione di strutture G4 anche in condizioni di bassa forza ionica.

I risultati di DNA-*binding* sono in ottima correlazione con i saggi di citotossicità *in vitro* effettuati su linee cellulari di tumori umani. In particolare, il composto **1** ha mostrato una forte inibizione della crescita tumorale. Inoltre, l'efficacia citotossica segue lo stesso ordine $\mathbf{1} > \mathbf{2} > \mathbf{3}$, dell'affinità sia per B-DNA che per G4-DNA. A seconda della linea cellulare, si è assistito al blocco di fasi diverse del ciclo cellulare. Ciò avvalorava l'ipotesi che tali composti riescano ad interagire con diverse forme di DNA, preferendo particolari sequenze G4 in funzione del tumore. In particolare, la capacità di indurre la formazione di G4 dei due complessi **1** e **2** è stata ulteriormente dimostrata dal saggio sull'arresto della PCR. Infatti i due complessi hanno inibito efficacemente l'amplificazione di una sequenza *c-myc* che non aveva subito un processo di *annealing*.

2.7. Parte sperimentale

2.7.1. Materiali e metodi

I solventi e i reagenti sono tutti commerciali e sono stati utilizzati senza alcuna necessaria purificazione. Tutti i reattivi usati nel corso delle sintesi, il DMSO e MTT sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM, RPMI, siero fetale di bovino (FBS), PBS, la soluzione di L-glutammina (200 mM), la soluzione di trispina-EDTA (170000 U/l di tripsina e 0.2 g/l di EDTA) e la soluzione di penicillina-streptomicina (10000 U/ml di penicillina e 10 mg/ml di streptomicina) sono stati acquistati da Lonza (Verviers, Belgio).

Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR sono stati registrati con uno spettrometro NMR Bruker Avance da 200 MHz. Uno spettrometro Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR è stato utilizzato per gli spettri IR.

Gli spettri UV-vis sono stati registrati servendosi di un spettrofotometro a doppio raggio Cary 1E, equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura di tipo Peltier. Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati con uno spettropolarimetro Jasco J-715. In entrambi i casi sono state usate cuvette di quarzo dal cammino ottico di 1 cm. Le misure di viscosità sono state ottenute attraverso un viscosimetro di tipo Ubbelodhe alla temperatura costante di 25 ± 0.1 °C e servendosi di un cronografo digitale per misurare il tempo di percorrenza della soluzione.

2.7.2. Sintesi e caratterizzazione

1: Il cloruro di 5-(triethylammoniumethyl)salicylaldehyde (135.5 mg, 0.50 mmol) è stato sciolto in acqua con due equivalenti di NaOH (20.0 mg, 0.50 mmol). Questa soluzione è stata aggiunta ad una soluzione etanolica di 2,3-naftalendiamina (39.5 mg, 0.25 mmol) e di $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (92.3 mg, 0.25 mmol). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore al termine delle quali era possibile isolare un precipitato arancione brillante. Quest'ultimo è stato lavato con etanolo freddo ed etere dietilico e ricristallizzato con una miscela al 50% di metanolo/acqua per ottenere il prodotto finale come un solido arancione (resa 106.0 mg, 48%).

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1.32–1.38 (m, 18H, CH_3); 3.16–3.19 (d, 12H, $J=9.6$ Hz, CH_2); 4.38 (s, 4H, CH_2); 6.92–6.96 (d, 2H, $J=13.2$ Hz, Ar); 7.41–7.46

(d, 2H, J=12.9 Hz, Ar); 7.54–7.58 (m, 2H, Ar); 7.71 (s, 2H, Ar); 7.88–7.93 (m, 2H, Ar); 8.61 (s, 2H, Ar), 10.16–10.68 (s, 2H, CH).

^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 7.5 (CH_3); 51.4 (CH_2); 58.8 (CH_2); 99.5 (Ar); 114.1 (Ar); 114.7 (Ar); 121.0 (Ar); 127.3 (Ar); 128.0 (Ar); 132.1 (Ar); 138.7 (Ar); 138.9 (Ar); 139.9 (Ar); 157.5 (Ar); 166.2 (CH).

Analisi elementale, sperimentale (e teorica) per $\text{C}_{38}\text{Cl}_2\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Ni}$ (**1**, 2ClO_4^- , $2\text{H}_2\text{O}$): C, 50.05%, H, 5.61%, N 5.60% (C, 51.49%, H, 5.91%, N, 6.62%).

IR: ν (C=N) 1619 cm^{-1} ; ν (N-Ni) 506 cm^{-1} ; ν (O-Ni) 475 cm^{-1} .

UV [nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 256 ($5.93 \cdot 10^4$), 346 ($2.55 \cdot 10^4$), 467 ($7.67 \cdot 10^3$).

2: Il cloruro di 5-(trietilammoniometil)salicilaldeide (140.0 mg, 0.52 mmol) è stato sciolto in acqua con due equivalenti di NaOH (20.0 mg, 0.50 mmol). Questa soluzione è stata aggiunta ad una soluzione etanolica di 2,3-naftalendiamina (39.8 mg, 0.25 mmol) e di $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (92.6 mg, 0.25 mmol). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore al termine delle quali era possibile isolare un precipitato verde scuro. Quest'ultimo è stato lavato con etanolo freddo ed etere dietilico e ricristallizzato con una miscela al 50% di metanolo/acqua per ottenere il prodotto finale come un solido verde (resa 165.3 mg, 74%).

Analisi elementale, sperimentale (e teorica) per $\text{C}_{38}\text{Cl}_2\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Cu}$ (**2**, 2ClO_4^- , $2\text{H}_2\text{O}$): C, 51.72%, H, 5.46%, N 6.55% (C, 51.21%, H, 5.88%, N, 6.29%).

IR: ν (C=N) 1625 cm^{-1} ; ν (N-Cu) 503 cm^{-1} ; ν (O-Cu) 469 cm^{-1} .

UV [nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 247 ($5.14 \cdot 10^4$), 316 ($2.26 \cdot 10^4$), 406 ($1.91 \cdot 10^3$).

3: Il cloruro di 5-(trietilammoniometil)salicilaldeide (135.4 mg, 0.50 mmol) è stato sciolto in acqua con due equivalenti di NaOH (20.1 mg, 0.50 mmol). Questa soluzione è stata aggiunta ad una soluzione etanolica di 2,3-naftalendiamina (39.2 mg, 0.25 mmol) e di $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (94.0 mg, 0.25 mmol). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore al termine delle quali era possibile isolare un precipitato giallo brillante. Quest'ultimo è stato lavato con etanolo freddo ed etere dietilico e ricristallizzato con una miscela al 50% di metanolo/acqua per ottenere il prodotto finale come un solido giallo (resa 169.0 mg, 79%).

^1H NMR (200 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 1.18-1.44 (m, 18H, CH_3); 3.13-3.15 (m, 12H, CH_2); 4.32 (s, 4H, CH_2); 6.68-6.72 (d, 2H, $J=12.6$ Hz, Ar); 7.25-7.29 (d, 2H, $J=12.9$ Hz, Ar); 7.46-7.60 (m, 4H, Ar); 7.89-8.02 (m, 2H, Ar); 8.22-8.34 (m, 2H, Ar); 9.07 (s, 2H, CH).

^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 7.5 (CH_3); 51.1 (CH_2); 59.5 (CH_2); 110.8 (Ar); 114.1 (Ar); 119.5 (Ar); 123.8 (Ar); 126.4 (Ar); 127.8 (Ar); 132.1 (Ar); 137.4 (Ar); 139.2 (Ar); 140.9 (Ar); 163.5 (Ar); 173.2 (CH).

Analisi elementale, sperimentale (e teorica) per $\text{C}_{38}\text{Cl}_2\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Zn}$ (**3**, 2ClO_4^-): C, 53.01%, H, 5.76%, N 5.90% (C, 53.25%, H, 5.64%, N, 6.54%).

IR: ν (C=N) 1626 cm^{-1} ; ν (N-Zn) 552 cm^{-1} ; ν (O-Zn) 468 cm^{-1} .

UV [nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 244 ($6.27 \cdot 10^4$), 304 ($2.80 \cdot 10^4$), 384 ($2.81 \cdot 10^3$).

2.7.3. Studio dell'interazione con B-DNA

Le titolazioni UV-vis sono state condotte aggiungendo quantità crescenti di DNA di timo di vitello (ct-DNA) ad una soluzione di complesso a concentrazione costante. Gli esperimenti di *melting* del DNA sono stati condotti registrando l'assorbanza di una soluzione di ct-DNA a 258 nm mentre la temperatura veniva innalzata gradualmente dai 20 ai 95 °C ad una velocità di 0.5 °C min^{-1} . Titolazioni CD, esperimenti sulla variazione della T_m e della viscosità del DNA sono stati condotti aggiungendo quantità crescenti di complesso metallico ad una soluzione di DNA a concentrazione costante. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in buffer Tris-HCl 1 mM a pH = 7.5.

Le soluzioni di DNA sono state preparate a partire da DNA di timo di vitello liofilizzato (Fluka, BioChemika) risospeso in tris-idrossimetil-aminometano (Tris-HCl) 1.0 mM e dializzato secondo letteratura come di seguito riportato.¹⁸²

Un tubo da dialisi di cellofan di 40 cm circa è stato immerso in 1 l di soluzione al 50% di etanolo per 1 ora; quindi è stato trasferito in 1 l di soluzione di NaHCO_3 10 mM e EDTA 2mM per 1 ora. Ciascuna operazione è stata ripetuta due volte al fine di eliminare la glicerina presente nella membrana come plastificante e tracce di composti solforosi e ioni di metalli pesanti. Dopo averla lavata abbondantemente con acqua

bidistillata, la membrana è stata immersa in acqua bidistillata e conservata in frigo a 4 °C.

250 mg circa di DNA sono stati quindi sciolti in 40 ml di Tris-HCl 1mM a pH = 7.5. La dissoluzione del polinucleotide è stata agevolata da una blanda agitazione meccanica per alcuni giorni avvenuta in camera fredda per evitare la denaturazione del polinucleotide. La soluzione omogenea di DNA è stata quindi trasferita nel tubo di dialisi precedentemente preparato e, con entrambe le estremità del tubo legate, essa è stata dializzata per 6 ore contro 1 l di soluzione di Tris-HCl 1 mM e EDTA 5 mM (pH = 7.5), agitando la soluzione con un'ancoretta magnetica al fine di raggiungere più velocemente l'equilibrio osmotico. Per eliminare la presenza di EDTA inoltre, il tubo da dialisi contenente la soluzione di DNA è stato trasferito in 1 l di Tris-HCl 1 mM (pH = 7.5) e ulteriormente dializzato per 6 ore. Tale operazione è stata ripetuta cinque volte servendosi ogni volta di una soluzione dializzante di Tris-HCl 1 mM (pH = 7.5).

La concentrazione del DNA, espressa in unità monomeriche ($[DNA_{\text{fosfato}}]$), è stata quindi determinata attraverso spettrofotometria UV, usando $7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ come coefficiente d'estinzione molare a 258 nm.¹⁸³

2.7.4. Studio dell'interazione con G4-DNA

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in un tampone KCl 100 mM e Tris-HCl 50 mM a pH = 7.5. Le sequenze 22-mer di *h-Telo* (5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') e 20-mer di *c-myc* (5'-GGGAGGGTGGGGAGGGTGGG-3') sono state acquistate presso BioGenerica BioTechnology (Italia). Gli oligonucleotidi sono stati disciolti in acqua MilliQ per ottenere una soluzione stock 100 μM : successivamente tali soluzioni sono state diluite alle opportune concentrazioni servendosi del tampone 50 mM Tris-HCl/100 mM KCl (pH = 7.5). Le soluzioni oligonucleotidiche sono state sottoposte ad *annealing*, processo che dal singolo filamento porta all'organizzazione in G4, riscaldandole per 5 minuti a 90 °C e lasciandole quindi raffreddare lentamente a temperatura ambiente. La concentrazione di oligonucleotide è stata quindi controllata misurando l'assorbanza delle singole soluzioni e servendosi del loro coefficiente di estinzione molare (*h-Telo*, $\epsilon = 259 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, *c-myc*, $\epsilon = 238 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

I complessi sono stati disciolti in DMSO per ottenere delle soluzioni stock 10 mM, successivamente diluite alle concentrazioni desiderate servendosi del tampone 50 mM Tris-HCl/100 mM KCl (pH = 7.5), mantenendo sempre una percentuale in DMSO inferiore al 3%.

Le titolazioni UV-vis e CD sono state dunque eseguite secondo quanto già descritto nel paragrafo 2.7.3.

2.7.5. Saggi biologici

2.7.5.1. Attività anti-proliferativa

Metodologia DTP-NCI per lo screening *in vitro*. Le linee cellulari tumorali sono state fatte crescere nel terreno di coltura RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 contenente il 5% di siero bovino fetale e L-glutamina (2 mM). Per un tipico esperimento di screening, le cellule sono state inoculate in piastre a 96 pozzetti a 100 μ L e sono state piastrate alla densità di 5000 - 40000 cellule/pozzetto a seconda della velocità di crescita della singola linea cellulare. Dopo la semina, le piastre sono state incubate a 37°C, in aria contenente 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa per 24 h prima di aggiungere i composti in esame.

Dopo un giorno, due piastre per ogni linea cellulare sono state fissate *in situ* con TCA, per ottenere la popolazione cellulare per ogni linea di cellule tumorali, prima dell'aggiunta della sostanza (al tempo zero, Tz).

I composti da testare sono stati solubilizzati in DMSO ad una concentrazione 400 volte più alta di quella desiderata e conservati in congelatore prima dell'uso. Al momento dell'aggiunta del composto, un'aliquota del concentrato congelato è stato scongelato e diluito con mezzo di coltura, contenente 50 μ g di gentamicina, sino ad una concentrazione pari al doppio della concentrazione massima finale desiderata. Infine sono state preparate altre 4 diluizioni seriali (1:10) per un totale di 5 diverse soluzioni a concentrazione diverse, più una soluzione di controllo.

Screening test a 1-dose, 60 linee cellulari: il giorno dell'esecuzione del test o il giorno precedente l'aggiunta, alle piastre con le colture cellulari è stato aggiunto anche lo standard adriamicina (NSC 123127) preparato e conservato nelle stesse condizioni del composto da saggiare. Il test è stato condotto alla singola dose di 10⁻⁵ M. Se i risultati

ottenuti hanno superato i criteri di selezione, il composto viene saggiato nuovamente nello screening a 5-dosi 60 linee cellulari.

Aliquote di 100 μl di queste diverse soluzioni sono state aggiunte agli appropriati pozzetti, già contenenti 100 μl di mezzo di coltura, in modo da ottenere la concentrazione desiderata di composto. Dopo l'aggiunta del campione in esame, le piastre sono state incubate a 37°C, in aria contenente 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa per 48 h.

Per cellule aderenti, il saggio si conclude con l'aggiunta di TCA freddo: le cellule sono state fissate *in situ* con l'aggiunta di 50 μl di TCA freddo al 50%_{o_{p/v}} e incubate per 60 minuti a 4°C. Dopo aver scartato il supernatante, le piastre sono state lavate cinque volte con acqua ed asciugate all'aria. Quindi, dopo aggiunta di 100 μl di soluzione sulforodamina B (SRB) (0.4%_{o_{p/v}} in 1% di acido acetico), le piastre sono state nuovamente incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo il fissaggio, il colorante non legato è stato rimosso con cinque lavaggi con acido acetico al 1% e le piastre sono state asciugate all'aria. Infine, il colorante è stato solubilizzato con Tris-HCl ed è stata misurata l'assorbanza su un lettore di piastre automatico alla lunghezza d'onda di 515 nm.

Per cellule in sospensione è stata usata la medesima metodologia ma il test è terminato con il fissaggio delle cellule alla base dei pozzetti mediante l'aggiunta di 50 ml di TCA al 80%.

Si sono ottenute così 7 misure di assorbanza: tempo zero (Tz), controllo (c), e crescita cellulare in presenza di una delle 5 concentrazioni di composto in esame (Ti). La percentuale di inibizione della crescita è stata calcolata per ogni concentrazione cellulare secondo l'equazione (3a) se $T_i \geq T_z$; oppure secondo l'equazione (3b) quando $T_i < T_z$.

$$\frac{(T_i - T_z)}{(c - T_z)} \times 100 \quad (3a)$$

$$\frac{(T_i - T_z)}{T_z} \times 100 \quad (3b)$$

È stato quindi possibile calcolare, per ogni composto testato, tre parametri dose-risposta. GI₅₀ (percentuale di inibizione è pari a 50) rappresenta la dose in cui la crescita si è dimezzata. TGI rappresenta invece la concentrazione cui la crescita è totalmente inibita (quando $T_i = T_z$). Infine, LC₅₀ rappresenta la dose letale, calcolata

quando, secondo l'equazione 3b, il valore è pari a -50. Qualora inoltre l'effetto non sia stato raggiunto o addirittura sia stato superato, il valore di tale parametro è stato espresso con un ">" o un "<" la concentrazione massima o minima testata.

Screening test su cellule MCF-7 e HeLa. Il metodo adoperato si basa sul protocollo descritto da Mossman e rivisto poi recentemente da Aleksic.^{184,185}

In dettaglio, le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti in 100 µl di mezzo di coltura completo, ad una densità di semina direttamente correlata al tempo di raddoppiamento delle cellule. Le cellule MCF-7, pertanto, sono state seminate a $1.5 \cdot 10^4$ cellule/cm² mentre le HeLa a $1.0 \cdot 10^4$ cellule/cm⁻¹. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37 °C, 5 % CO₂, 95 % di aria e ad un'umidità relativa del 100 %, quindi il medium è stato rimpiazzato da 100 µl di medium fresco contenente il 5%_{v/v} di FBS.

Le soluzioni stock dei complessi metallici 1-3 (20 mM) sono state preparate dissolvendo i composti solidi in DMSO: le soluzioni utilizzate per i test sono state preparate il giorno stesso del test tramite diluizione della soluzione stock con il mezzo di coltura completo. Le concentrazioni finali per i saggi biologici sono state comprese tra 0.1 e 50 µM.

24 ore dopo la semina, sono state aggiunte ad ogni pozzetto aliquote di 100 µl di ogni complesso alla concentrazione stabilita e le piastre sono quindi state incubate per 24 o 48 ore. In ogni esperimento, la concentrazione di DMSO non ha mai superato lo 0.25% ed è stato utilizzato, come controllo, un mezzo di coltura allo 0.25% in DMSO. Trascorso il tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con 50 µl di mezzo FBS-free contenente 0.5 mg/ml di MTT. Il mezzo è stato quindi scartato dopo un'incubazione di 4 ore a 37 °C e il formazano formato nelle cellule è stato disciolto in DMSO.

Con un lettore di micropiastre è stato possibile leggere l'assorbanza a 570 nm, ottenendo i valori al tempo zero, T_z, ed al tempo T_i, usati nell'equazioni 3a e 3b per ottenere la percentuale di inibizione della crescita cellulare.

La concentrazione necessaria ad un'inibizione della crescita pari al 50% (GI₅₀) per ogni complesso è stata infine calcolata dalle curve dose-risposta attraverso regressione lineare. Qualora inoltre l'effetto non sia stato raggiunto o addirittura stato superato, il

valore di tale parametro è stato espresso con un “>” la concentrazione massima testata. Ogni risultato è la media di tre separati esperimenti condotti in quadruplicati.

2.7.5.2. *Analisi del ciclo cellulare*

Gli effetti dell'esposizione ai complessi 1-3 sul ciclo cellulare sono stati studiati mediante colorazione del DNA con ioduro di propidio (PI) e citometria a flusso. Le cellule MCF-7 e HeLa sono state seminate in piastre a 6 pozzetti alla densità di $2.5 \cdot 10^4$ cellule/cm² e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con o senza il composto da testare per 24 o 48 ore. Le cellule quindi sono state raccolte, lavate con PBS, fissate con etanolo freddo al 70% e mantenute a -20 °C. Le cellule fissate sono state quindi centrifugate, risospese in PBS ed incubate per 30 minuti a 37 °C con la soluzione di colorazione, composta da 20 µg/ml di ioduro di propidio, 200 µg/ml di RNase A e Triton X-100 in PBS. Il contenuto di DNA è stato sottoposto ad analisi FACS (fluorescence-activated cell sorting, Coulter[®] Epics[®] XLTM, Beckman) attraverso cui è stato possibile ottenere la percentuale di cellule nelle diverse fasi cellulari. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in doppio e riprodotti almeno due volte.

2.7.5.3. *Saggio sull'arresto della PCR.*

I saggi sono stati condotti in un volume finale di 25 µl contenente tampone 1X PCR (Thermoscientific, 75 mM in Tris-HCl, 20 mM in (NH₄)₂SO₄, 0.1%_{v/v} Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, dNTP 0.5 mM, 7.5 pmol di ogni oligonucleotide, 1.5 U di Taq DNA Polimerasi-ricombinante (Thermoscientific) e concentrazioni crescenti di complessi testati. Tali soluzioni sono state incubate in un termociclatore (MJ Research PTC-225-Tetrad PCR System) alle seguenti condizioni: 94 °C per 5 minuti, seguiti da 35 cicli di 94 °C per 30 s, 58 °C per 30 s e 72 °C per 1 min, ed infine a 2 °C per 10 minuti. Lo stesso procedimento è stato seguito per l'oligonucleotide Pu22mu. I prodotti della PCR sono quindi stati caricati su gel di poliacrilamide nativa al 15% in tampone 1X TBE e fatti correre per 45 minuti a 180 V. In ultimo i gel sono stati lasciati riposare per 10 minuti con SYBR gold (Invitrogen), sono state raccolte le immagini finali mediante UV trans-illumination (UVITEC) e sono state analizzate con il software Image J.

Capitolo 3

Studio dell'interazione con DNA nativo di leganti triazinici.

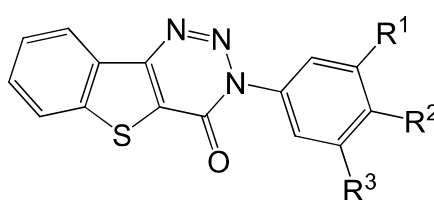
| | |
|--|----|
| 3.1 Introduzione | 71 |
| 3.2 Studio dell'interazione con DNA-duplex | 72 |
| 3.2.1 Spettroscopia UV-Visibile | 72 |
| 3.2.2 Dicroismo Circolare | 74 |
| 3.2.3 Denaturazione termica del DNA | 75 |
| 3.2.4 Viscosità | 76 |
| 3.3 Conclusioni | 77 |
| 3.4 Parte sperimentale | 78 |
| 3.4.1 Materiali e metodi | 78 |

3.1. Introduzione

Da molti decenni parte della ricerca di sostanze antitumorali si è spostata verso la sintesi di molecole planari con un'aromaticità piuttosto estesa:^{186,187} queste caratteristiche strutturali riescono spesso a conferire alla sostanza finale un'ottima capacità antitumorale, sovente mediata da legami con proteine tipiche di quella particolare tipologia di tumore. Cionondimeno, la presenza di strutture planari rende tali sostanze altrettanto interessanti nell'interazione con DNA, specie in presenza di anelli tiofenici che tendono ad aumentare ulteriormente l'aromaticità del composto finale. Inoltre, un particolare interesse nell'ambito dell'interazione con il polinucleotide può essere riscontrato in presenza di nuclei 1,2,3-triazinici: tale *core* potrebbe facilmente aprirsi in condizioni fisiologiche o in seguito a metabolismo, formando così un derivato in grado di dare luogo ad alchilazione dei siti nucleofili del DNA.¹⁸⁸

Curiosamente esistono pochi riferimenti in letteratura riguardanti la sintesi di nuclei benzotieno[3,2-*d*]-1,2,3-triazinici¹⁸⁹ e, in quei pochi presenti, non esistono accenni all'attività biologica di questi composti, eccetto l'attività anti-iperlipidemica mostrata da pochi tetraidro-derivati.¹⁹⁰⁻¹⁹²

In questo contesto, sono stati condotti studi di DNA-*binding* dei derivati **8-11** (Figura 41) recentemente sintetizzati.¹⁹³



- 8)** R¹=H; R²=F; R³=Cl
9) R¹=H; R²=CH₃; R³=H
10) R¹=H; R²=OCH₃; R³=H
11) R¹=OCH₃; R²=OCH₃; R³=OCH₃

Figura 41. Strutture dei derivati triazenicici **8-11**.

Tali studi rappresentano il primo esempio di interazione di queste molecole con il DNA. Infatti, in letteratura sono stati riportati studi di DNA-*binding* di complessi metallici di rutenio(II), renio(I) e rame(II) con leganti 1,3,5-triazinici che hanno mostrato interessanti attività antitumorali.¹⁹⁴⁻¹⁹⁷

Il presente capitolo è quindi incentrato sugli studi dell'interazione con il polinucleotide dei 4 leganti sintetizzati, utilizzando le stesse tecniche spettroscopiche ed idrodinamiche descritte ed utilizzate nel precedente capitolo.

3.2. Studio dell'interazione con DNA-duplex

3.2.1. Spettroscopia UV-Visibile

I composti **8-11** mostrano una banda d'assorbimento all'UV-vis localizzata tra i 250 e i 280 nm; bande caratteristiche, site tra i 300 e i 370 nm, sono inoltre evidenti per ogni derivato analizzato. Nella fattispecie tali bande, localizzate a 348 nm (**8**), 339 e 364 nm (**9**), 342 nm (**10**) e 333 nm (**11**), sono state fondamentali nello studio dell'interazione con il B-DNA poiché in questa zona il polinucleotide non assorbe. Inoltre, il trend lineare dell'assorbimento dei composti all'UV-vis in funzione della concentrazione molare degli stessi dimostra che la legge di Lambert-Beer è verificata nell'intervallo di concentrazioni studiate.

In tutti i casi studiati, salvo per il composto **8**, lo spettro caratteristico del derivato in esame subisce una netta modifica in seguito all'aggiunta di quantità crescenti di ct-DNA, mostrando un chiaro ipocromismo (Figura 42).

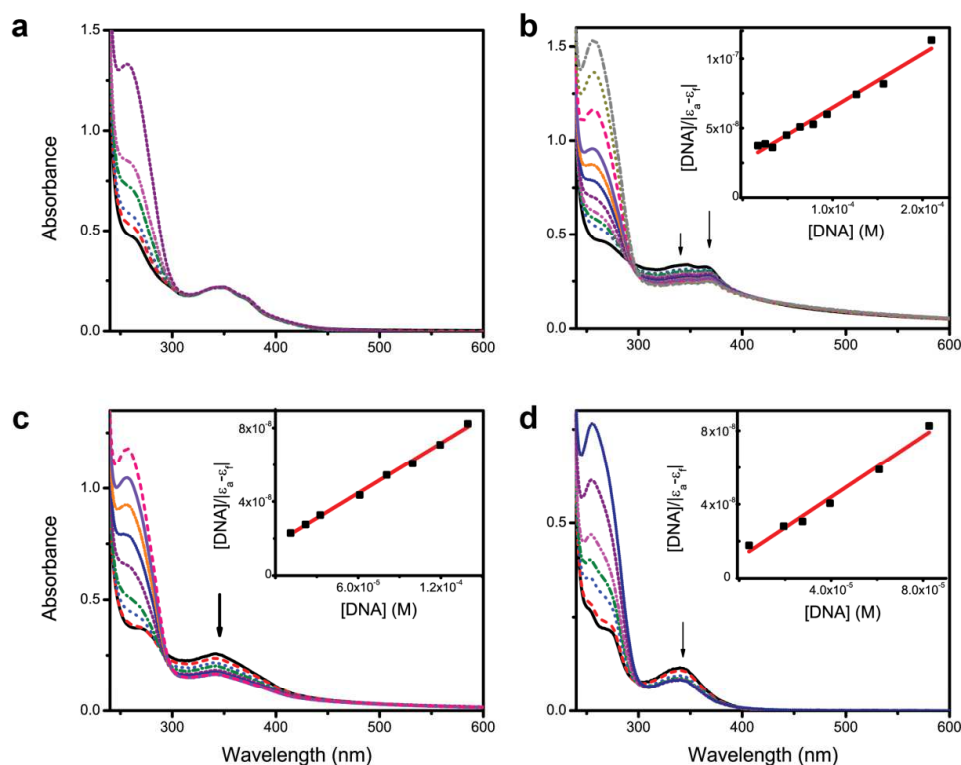


Figura 42. Spettri di assorbimento dei derivati **8** (a), **9** (b), **10** (c) e **11** (d) in presenza di quantità crescenti di ct-DNA. (a) **[8]** = 60 μM , $[\text{DNA}] = 0.0\text{-}285.5 \mu\text{M}$; (b) **[9]** = 51.4 μM , $[\text{DNA}] = 0.0\text{-}210.0 \mu\text{M}$; (c) **[10]** = 54 μM , $[\text{DNA}] = 0.0\text{-}141.0 \mu\text{M}$; (d) **[11]** = 29.1 μM , $[\text{DNA}] = 0.0\text{-}82.8 \mu\text{M}$. Nei riquadri, *fitting* dei dati sperimentali.

In particolare, la banda d'assorbimento a 339 nm del composto **9** mostra un ipocromismo di circa il 25%, quella del composto **10**, sita a 342 nm, subisce un abbassamento del 28% e quella a 333 nm del derivato **11** presenta un effetto ipocromico di circa il 29%. In tutti i casi analizzati, inoltre, l'assenza di uno *shift* batocromico ha permesso di escludere l'eventuale intercalazione dei composti, come riportato in letteratura.^{198–200} Come negli studi precedenti i dati ottenuti nel corso delle titolazioni sono stati razionalizzati mediante l'equazione 2, ottenendo le costanti di affinità (K_b) riportate in Tabella 9.

Tabella 9. Costanti di affinità verso il DNA dei derivati **8-11**.

| | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| K_b (M^{-1}) | / | $(1.5 \pm 0.2) \times 10^4$ | $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4$ | $(7.6 \pm 2) \times 10^4$ |

Tali valori sono simili a quelli di alcuni noti agenti DNA-*groove binders*^{80,200} e sembrano indicare che i composti **9-11** interagiscano con il polinucleotide proprio mediante questa via. Inoltre esiste un evidente ordine di interazione con il DNA, cioè

11 > **10** > **9**, mentre per il derivato **8** non è stata possibile calcolare una K_b : il suo comportamento in presenza di quantità crescenti di ct-DNA è completamente differente da quello degli analoghi della medesima serie, non mostrando infatti nessun effetto ipocromico né batocromico. Tale risultato dimostra dunque che in presenza di polinucleotide non sussiste alcuna perturbazione dei livelli elettronici del derivato **8** (Figura 42a). È infine interessante notare che i valori di K_b dei derivati **9-11** sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riscontrati per complessi metallici di leganti 1,3,5 triazinici.^{196,197}

3.2.2. Dicroismo Circolare

Come già riportato nel capitolo precedente, qualsiasi sostanza che interagisce con il DNA, causa una distorsione della sua struttura secondaria. Tale evidenza è particolarmente marcata nel corso dell'intercalazione, mentre un *groove-binder*, non riuscendo a svolgere il DNA, ne perturba solo lievemente la struttura secondaria, con lievi variazioni percettibili al CD. Per questa ragione sono stati registrati spettri CD di soluzioni di DNA a concentrazione costante con quantità crescenti di leganti. Come mostrato in Figura 43, i risultati dimostrano che lo spettro di dicroismo circolare del B-DNA non cambia mai drasticamente come accadrebbe se i derivati **8-11** agissero da intercalanti.^{95,96}

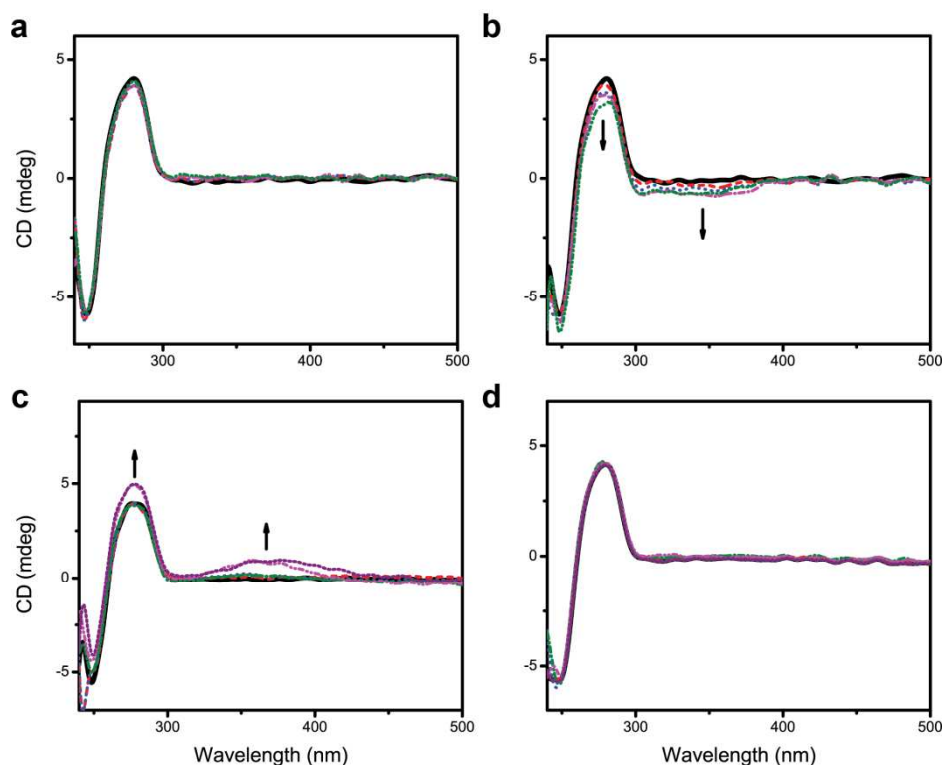


Figura 43. Spettri CD di ct-DNA in presenza di quantità crescenti di **8** (a), **9** (b), **10** (c) e **11** (d). (a) [DNA] = 50 μM , [**8**] = 0.0-35.05 μM ; (b) [DNA] = 50 μM , [**9**] = 0.0-24.96 μM ; (c) [DNA] = 50 μM , [**10**] = 0.0-35.04 μM ; (d) [DNA] = 50 μM , [**11**] = 0.0-35.04 μM . Le frecce indicano i cambiamenti in presenza di rapporti molari $R_1 = [\text{Binder}]/[\text{DNA}]$ maggiori.

Nel caso specifico, i composti **8** e **11** non causano mai alcuna evidente variazione nello spettro CD del ct-DNA (Figura 42a, d) mentre lievi variazioni possono essere notate per i composti **9** e **10**: la banda dicroica del DNA a 275 nm infatti diminuisce in presenza di **9** ed aumenta ad alti rapporti molari [**10**]/[DNA_{fosfato}] (Figura 42b, c). Inoltre le bande ICD presenti nella regione compresa tra 300 e 400 nm per i composti **9** e **10** dimostrano che, a seguito della loro interazione con il polinucleotide, essi interagiscono come nuovi cromofori.

Questi risultati permettono quindi di affermare che nessuna profonda variazione conformazionale avvenga nella struttura secondaria del B-DNA in seguito all'interazione con i composti **8-11**: tale evidenza è riferita in letteratura essere comune nei casi di *groove-binding*.⁸⁰

3.2.3. Denaturazione termica del DNA

I profili di denaturazione termica di una soluzione di ct-DNA in presenza di quantità crescenti di derivati triazinici **8-11** sono stati ottenuti riportando in grafico

l'assorbanza a 258 nm in funzione della temperatura: è prevedibile infatti che, a differenza dell'intercalazione, un *groove-binding* produca deboli o addirittura assenti aumenti della T_m del DNA.^{80,155,161,201,202}

Gli incrementi della T_m ottenuti nel corso degli esperimenti mostrano che tale valore non è mai fortemente perturbato dalla presenza dei composti in esame.

Tabella 10. ΔT_m di soluzioni 50 μM di ct-DNA in presenza dei derivati **8-11** al rapporto molare

$$[\text{Binder}]/[\text{DNA}] = 0.10.$$

| | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|----------|----------|-----------|-----------|
| $\Delta T_m (\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ | 0.0 | 1.7 | 5.0 | 4.0 |

Nella fattispecie, i ΔT_m ottenuti (Tabella 11) ad un rapporto molare [molecola]/[DNA_{fosfato}] pari a 0.10 sono sempre compresi tra 1.7 e 5.0 (± 0.1) $^\circ\text{C}$: tali valori sono inferiori rispetto ai tipici ΔT_m riportati per derivati aventi chiare capacità intercalanti.²⁰³ Inoltre, per quanto riguarda il composto **8**, l'assenza di una variazione della T_m è ancora una volta in accordo con i risultati precedentemente riportati, mostrando assenza di interazione con il polinucleotide.

3.2.4. Viscosità

Gli studi di viscosità hanno una grande importanza nel comprendere il meccanismo di interazione di una molecola con il B-DNA.^{204,205} In assenza di informazioni dettagliate come quelle fornite da cristallografia ai raggi X o NMR, gli esperimenti sulla viscosità del DNA chiariscono in maniera univoca se avvenga o meno l'intercalazione di un agente nella doppia elica del DNA. Come già riportato nel capitolo precedente, infatti, l'intercalazione causa un'elongazione assiale cui consegue ovviamente un netto incremento della viscosità della soluzione di DNA. Sono stati quindi condotti esperimenti sulla variazione della viscosità del DNA in modo da escludere definitivamente l'intercalazione quale via di interazione dei composti **8-11** con il polinucleotide.

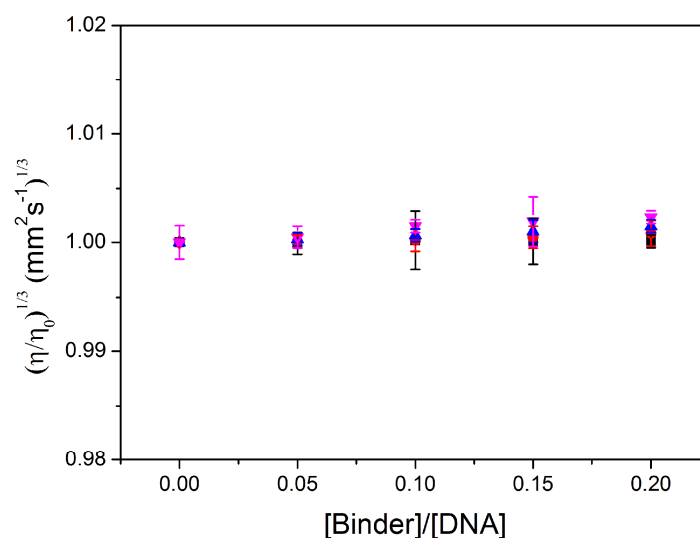


Figura 44. Viscosità relativa di soluzioni di DNA (50 μM) a differenti rapporti $[\text{Binder}]/[\text{DNA}]$. Quadrati neri, **8**; cerchi rossi, **9**; triangoli verso l'alto, blu, **10**; triangoli verso il basso, rosa, **11**.

Come riportato in Figura 44, la viscosità relativa di una soluzione 50 μM di DNA non varia significativamente in presenza dei derivati **8-11**. Questo importante risultato permette quindi di definire con buona certezza l'assenza dell'intercalazione di tali composti nel ct-DNA e rinforza la conclusione che i composti **9-11** interagiscano con il DNA in prossimità dei suoi solchi come *groove-binders*, mentre nessuna interazione è osservata per il derivato **8**.

3.3. Conclusioni

Gli studi di DNA-*binding* hanno permesso di stabilire che i composti **9-11** sono *groove-binders*, mentre il derivato **8** non sembra interagire con il B-DNA.

Questo risultato è in linea con i dati biologici sulla soppressione del ciclo cellulare da parte del composto **10**,¹⁹³ che mostrano un accumulo delle cellule HeLa in fase G0/G1, correlabile ad un avvenuto danneggiamento del polinucleotide.

È inoltre interessante notare che l'ordine nell'interazione con DNA (**11** > **10** > **9**) segue esattamente il grado di sostituzione della molecola testata, con il derivato trisostituito (**11**) che presenta una maggiore affinità rispetto al disostituito (**10**) ed al monosostituito (**9**).

3.4. Parte sperimentale

3.4.1. *Materiali e metodi*

I solventi e i reagenti sono tutti commerciali e sono stati utilizzati senza alcuna necessaria purificazione.

Gli spettri UV-vis sono stati registrati servendosi di un spettrofotometro a doppio raggio Cary 1E, equipaggiato con un sistema di controllo della temperatura di tipo Peltier. Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati con uno spettropolarimetro Jasco J-715. In entrambi i casi sono state usate cuvette di quarzo dal cammino ottico di 1 cm. Le misure di viscosità sono state ottenute attraverso un viscosimetro di tipo Ubbelodhe alla temperatura costate di 25 ± 0.1 °C e servendosi di un cronografo digitale per misurare il tempo di percorrenza della soluzione.

Tutti i derivati sono stati solubilizzati in DMSO e gli esperimenti sono stati eseguiti in una miscela DMSO/Tris-HCl (1 mM, pH = 7.5) con una percentuale in DMSO che non ha mai superato il 5% come riportato in letteratura.²⁰⁶ Le titolazioni UV-vis sono state condotte aggiungendo quantità crescenti di ct-DNA (DNA estratto dal timo di vitello) ad una soluzione di complesso a concentrazione costante. Gli esperimenti di *melting* del DNA sono stati condotti registrando l'assorbanza di una soluzione di ct-DNA a 258 nm mentre la temperatura veniva innalzata gradualmente dai 20 ai 95 °C ad una velocità di 0.5 °C min^{-1} . Titolazioni CD, esperimenti sulla variazione della T_m e della viscosità del DNA sono stati condotti aggiungendo quantità crescenti di complesso metallico ad una soluzione di DNA a concentrazione costante.

Le soluzioni di DNA sono state preparate a partire da DNA di timo di vitello liofilizzato (Fluka, BioChemika) risospeso in tris-idrossimetil-aminometano (Tris-HCl) 1.0 mM e dializzato secondo letteratura come già riportato nel capitolo precedente.

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro desidero innanzitutto sentitamente ringraziare le persone che, nel corso di questo lungo cammino, mi hanno più formato. *In primis* un enorme “grazie” va al mio tutor Giampaolo Barone per avermi seguito con passione, pazienza e dedizione, spronandomi sempre a dare il massimo anche nei momenti più complicati. Un altrettanto enorme ringraziamento lo rivolgo ad Alessio Terenzi, validissimo collaboratore oltre che amico, sempre pronto ad insegnarmi, aiutarmi e a chiarire qualsiasi dubbio venisse alla mia mente. Grazie anche ad Antonino Lauria, un Amico prima ancora d’essere “il prof”, ed alla Professoressa Almerico per il supporto datomi nel corso di questi tre anni. Un grazie di cuore anche al Professore Gennaro, per avere sopportato, lungo questi anni, le mie invasioni per le titolazioni CD, permettendomi sempre di lavorare nelle migliori condizioni.

Grazie anche a tutti gli interni che si sono susseguiti nei tre anni ed in particolar modo a Mariangela, Elisa ed Antonella (in rigoroso ordine cronologico): l’aver dato qualcosa a voi ha arricchito innanzitutto me.

Infine, il più grande ringraziamento lo dedico alla mia Famiglia, per avermi sempre sostenuto e per aver accettato le mie scelte, dandomi sempre la possibilità di inseguire i miei sogni.

Riccardo

Curriculum Accademico

RICCARDO BONSIGNORE

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

Università degli Studi di Palermo

Viale delle Scienze, Parco d'Orleans

90128, Palermo, Italia

Gennaio 2010 – Dottorando in Scienze Chimiche presso l'Università di Palermo.

Giugno 2010 – Abilitato all'esercizio della professione del *Farmacista*.

Luglio 2009 – Dottore Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche con la valutazione finale 110/110 cum laude.

Pubblicazioni e Congressi

- Lauria, R. Bonsignore, A. Terenzi, A. Spinello, F. Giannici, A. Longo, A.M. Almerico, G. Barone, “*Nickel(II), copper(II) and zinc(II) metallo-intercalators: structural details of the DNA-binding by a combined experimental and computational investigation*”, Submitted.
- A. Terenzi, R. Bonsignore, A. Spinello, C. Gentile, A. Martorana, C. Ducani, B. Högberg, A.M. Almerico, A. Lauria, G. Barone, “*Selective G-Quadruplex Stabilizers: Schiff-base Metal Complexes with Anticancer Activity*”, Submitted.
- Lauria, A. Alfio, R. Bonsignore, C. Gentile, A. Martorana, G. Gennaro, G. Barone, A. Terenzi, A.M. Almerico, “*New Benzothieno[3,2-d]-1,2,3-triazines with Antiproliferative Activity: Synthesis, Biology, and Spectroscopic Studies*”, Submitted.

- A. Terenzi, R. Bonsignore, C. Gentile, A. Martorana, G. Barone, A. Lauria, A. M. Almerico, “*Selective G-quadruplex stabilizers: salphen-like complexes with antiproliferative activity*”, XXII National Meeting on Medicinal Chemistry, Roma, 10-13 Settembre 2013.
- A. Attanzio, M.A. Girasolo, L. Tesoriere, M. Capobianco, G. Barone, S. Rubino, R. Bonsignore, P. Sabatino, G. Stocco, “*Attività anti-proliferativa di derivati di organostagno(IV) con Na-Boc-Ornitina e studio dell'azione pro-apoptotica del derivato $Ph_3Sn(Boc-Orn)$* ”, Meeting Biotecnologie ricerca di base interdisciplinare traslazionale in ambito biomedico, Palermo, 27-28 Giugno 2013.
- S. Rubino, R. Bonsignore, A. Attanzio, L. Tesoriere, M.A. Girasolo, G. Barone, “*Complessi di Platino(II): sintesi, studi di DNA binding e loro attività antitumorale in vitro*”, Meeting Biotecnologie ricerca di base interdisciplinare traslazionale in ambito biomedico, Palermo, 27-28 Giugno 2013.
- A. Terenzi, A. Martorana, R. Bonsignore, C. Gentile, G. Barone, A. Lauria, A.M. Almerico, “ *Ni^{II} , Cu^{II} and Zn^{II} Salphen-like complexes: selective G-quadruplex stabilizers*”, NPCF7 Nuove Prospettive in Chimica Farmaceutica, Savigliano (CN), 29-31 Maggio 2013.
- A. Terenzi, R. Bonsignore, A. Martorana, A.M. Almerico, A. Lauria, G. Barone, “*Synthesis characterization and DNA binding studies of potential G4 stabilizer metal complexes*”, XXI National Meeting on Medicinal Chemistry, Palermo, 17-20 Luglio 2012.
- G. Barone, R. Bonsignore, A. Spinello, A. Terenzi, “*The interaction of DNA with metal complexes: computational investigations*”, Primo Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Teorica e Computazionale della SCI, Pisa, 22-23 Febbraio 2012.
- R. Bonsignore, A. Terenzi, G. Barone, A.M. Almerico, A. Lauria, “*Studio dell'interazione di DNA-nativo con $Zn(3-Acetil-1-(2-nitrofenil)pentan-1,4-dionato)_2$* ”, Congresso congiunto sezioni Sicilia-Calabria SCI, Messina, 1-2 Dicembre 2011.

Appendice

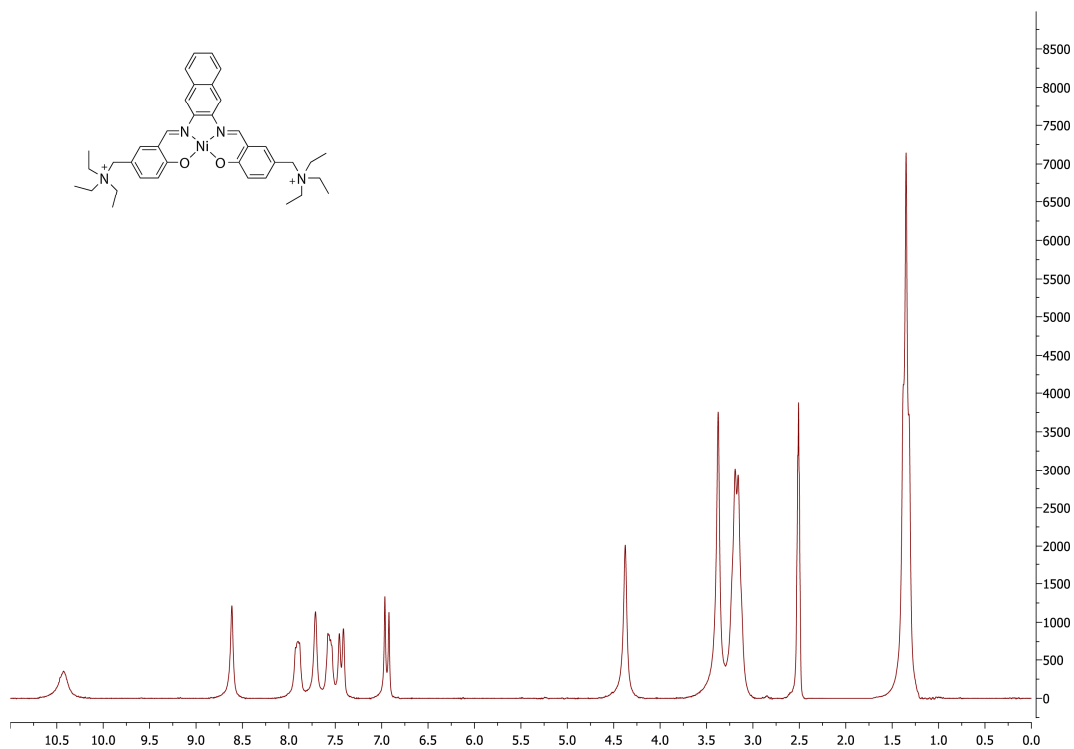


Figura A1. Spettro ¹H-NMR di **1** in DMSO, 200 MHz.

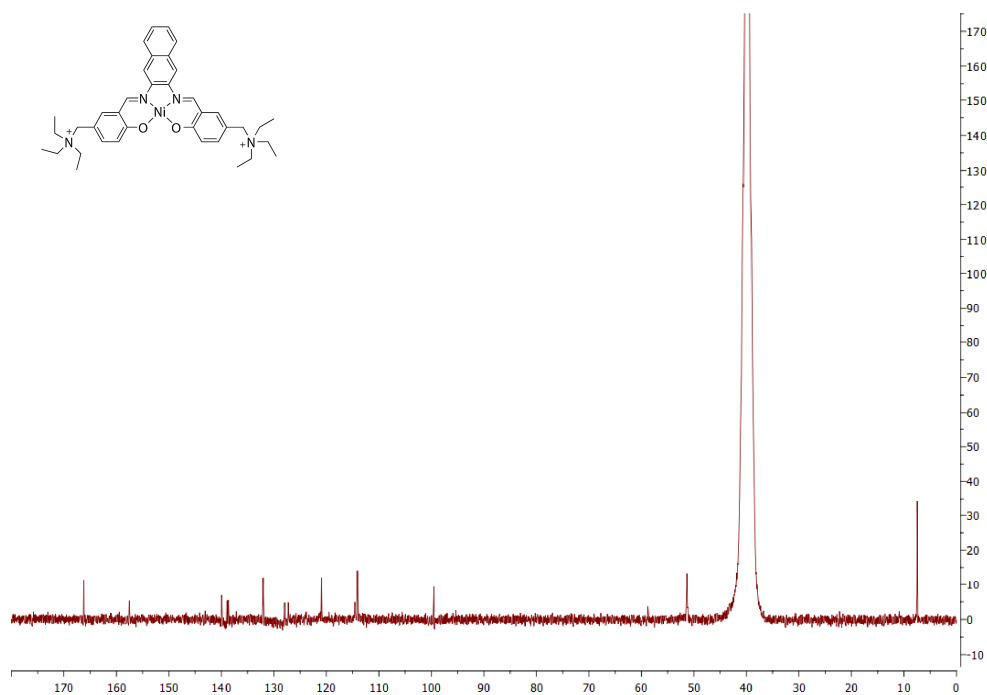


Figura A2. Spettro ¹³C-NMR di **1** in DMSO, 50 MHz.

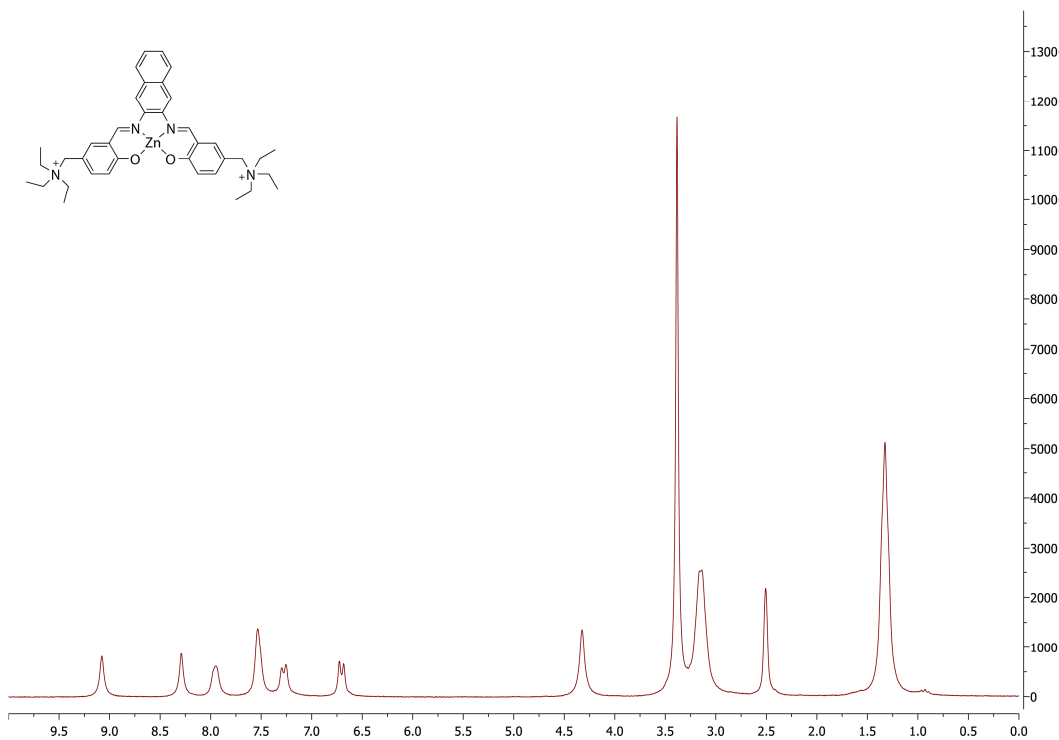


Figura A3. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di **3** in DMSO, 200 MHz.

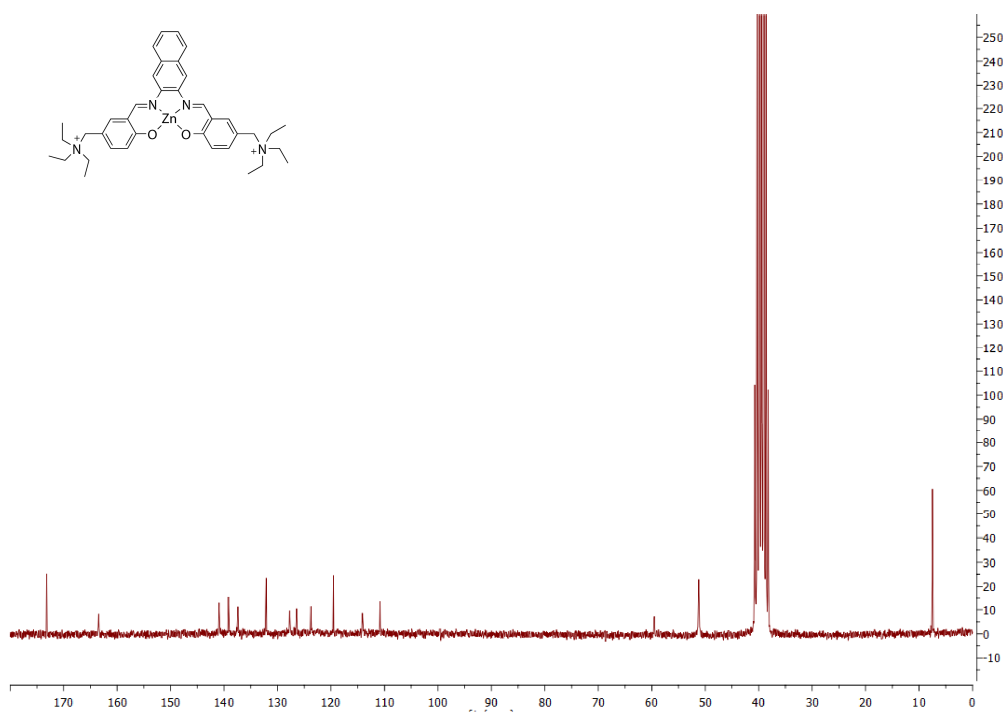


Figura A4. Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di **3** in DMSO, 50 MHz.

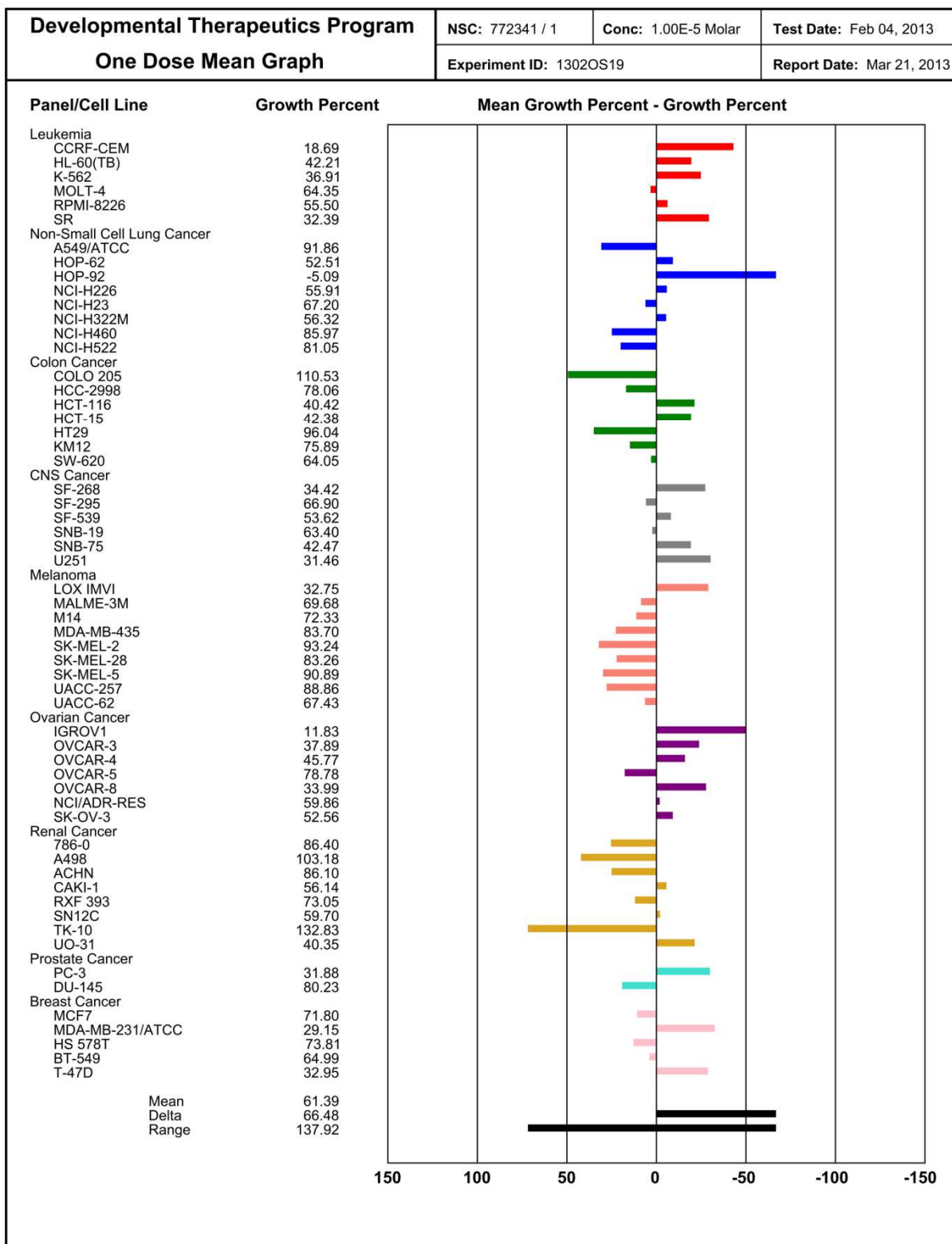


Figura A5. Saggio monodose del complesso 1 eseguito presso il NCI (USA).

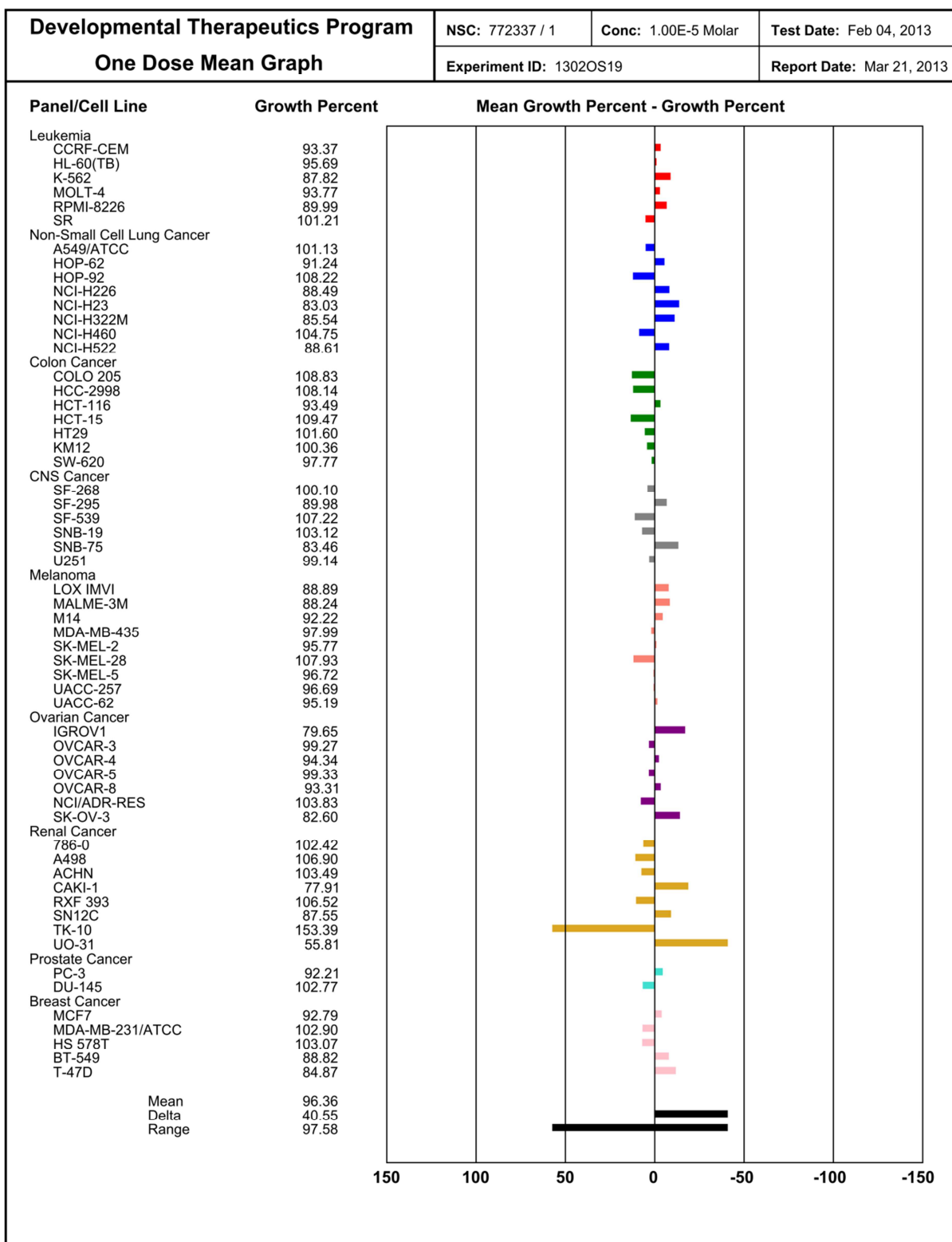


Figura A6. Saggio monodose del complesso 2 eseguito presso il NCI (USA).

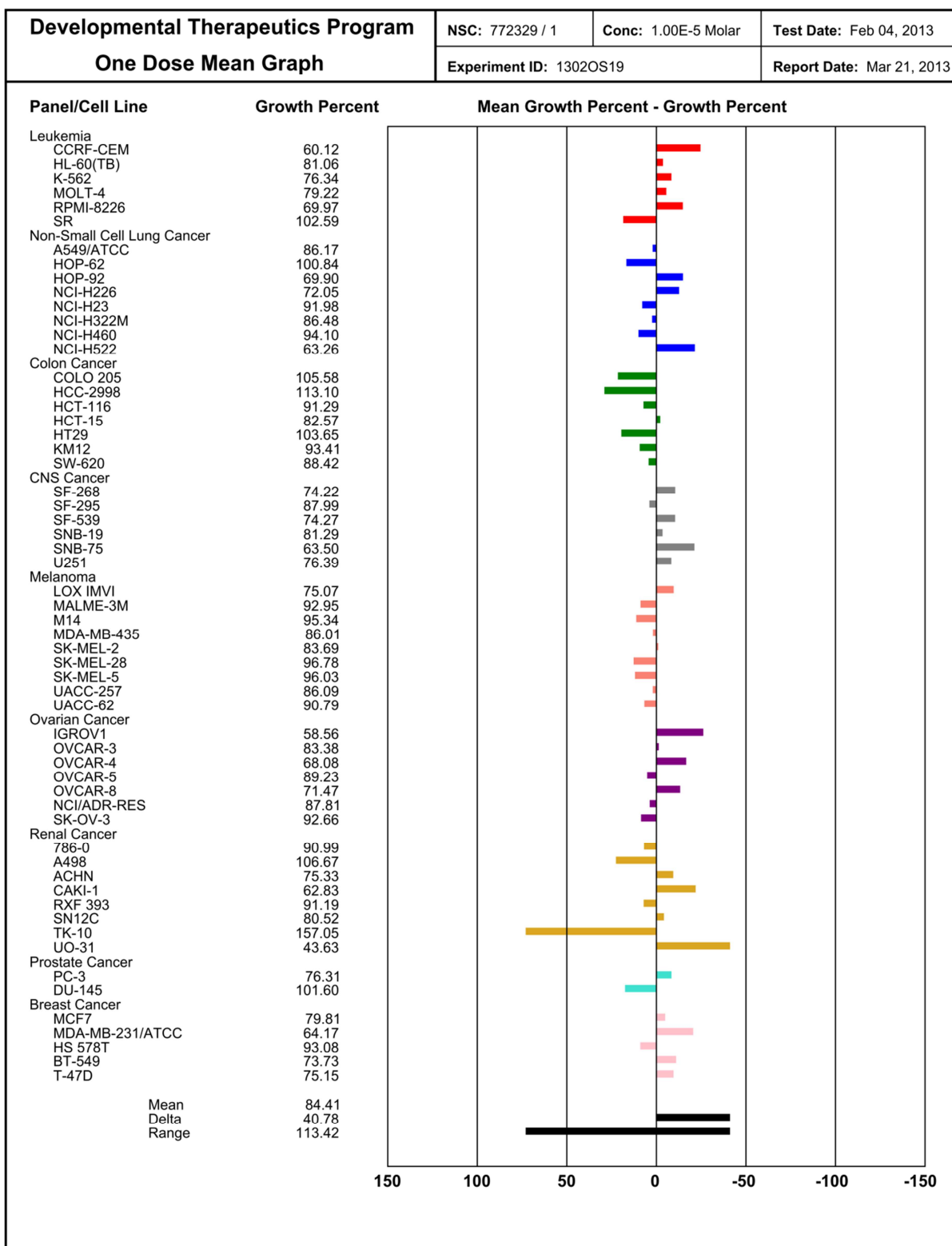


Figura A7. Saggio monodose del complesso di 3 eseguito presso il NCI (USA).

Bibliografia

- (1) Silverman, R. B. *The organic chemistry of drug design and drug action*; 2nd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston, 2004.
- (2) Dekker, C. A.; Michelson, A. M.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.* **1953**, 947–951.
- (3) Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- (4) Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. *Nucleic acids: structures, properties, and functions*; University Science Books: Sausalito, Calif., 2000.
- (5) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer Verlag: New York, 1984.
- (6) Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. *Nature* **1980**, *287*, 755–758.
- (7) Gray, D. M.; Hung, S.-H.; Johnson, K. H. In *Methods in Enzymology*; Kenneth Sauer, Ed.; Biochemical Spectroscopy; Academic Press, 1995; Vol. Volume 246, pp. 19–34.
- (8) Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G. D. *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*; 1st ed.; Wiley, 2008.
- (9) Nelson, E. M.; Tewey, K. M.; Liu, L. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 1361–1365.
- (10) Sen, D.; Gilbert, W. *Nature* **1988**, *334*, 364–366.
- (11) Cech, T. R. *Nature* **1988**, *332*, 777–778.
- (12) Sundquist, W. I.; Klug, A. *Nature* **1989**, *342*, 825–829.
- (13) Williamson, J. R.; Raghuraman, M. K.; Cech, T. R. *Cell* **1989**, *59*, 871–880.
- (14) Blackburn, E. H. *Nature* **1991**, *350*, 569–573.
- (15) Hammond-Kosack, M. C.; Kilpatrick, M. W.; Docherty, K. *J. Mol. Endocrinol.* **1992**, *9*, 221–225.
- (16) Fry, M.; Loeb, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 4950–4954.
- (17) Kettani, A.; Kumar, R. A.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 638–656.
- (18) Darnell, J. C.; Jensen, K. B.; Jin, P.; Brown, V.; Warren, S. T.; Darnell, R. B. *Cell* **2001**, *107*, 489–499.
- (19) Schaeffer, C.; Bardoni, B.; Mandel, J. L.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Moine, H. *EMBO J.* **2001**, *20*, 4803–4813.
- (20) Brown, B. A., 2nd; Li, Y.; Brown, J. C.; Hardin, C. C.; Roberts, J. F.; Pelsue, S. C.; Shultz, L. D. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37*, 16325–16337.
- (21) Döchler, M. *J. Drug Target.* **2012**, *20*, 389–400.
- (22) Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10645–10648.
- (23) Paeschke, K.; Juranek, S.; Simonsson, T.; Hempel, A.; Rhodes, D.; Lipps, H. *J. Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 598–604.

- (24) Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 847–854.
- (25) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 8572–8577.
- (26) Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186.
- (27) Gomez, D.; Wenner, T.; Brassart, B.; Douarre, C.; O'Donohue, M.-F.; El Khoury, V.; Shin-Ya, K.; Morjani, H.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38721–38729.
- (28) Rodriguez, R.; Müller, S.; Yeoman, J. A.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15758–15759.
- (29) Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11593–11598.
- (30) Harder, H. C.; Rosenberg, B. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **1970**, *6*, 207–216.
- (31) Reslová, S. *Chem. Biol. Interact.* **1971**, *4*, 66–70.
- (32) Stone, P. J.; Kelman, A. D.; Sinex, F. M. *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 793–801.
- (33) Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Nature* **1995**, *377*, 649–652.
- (34) Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307–320.
- (35) Howland, D.; Mycek, M. *Le basi della farmacologia*; Zanichelli.; Bologna, 2007.
- (36) Luzzati, V.; Masson, F.; Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 634–639.
- (37) Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18–30.
- (38) Dougherty, G.; Pigram, W. J. *Crit. Rev. Biochem.* **1982**, *12*, 103–132.
- (39) Berman, H. M.; Young, P. R. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 87–114.
- (40) Howegrant, M.; Lippard, S. J. *Biochemistry (Mosc.)* **1979**, *18*, 5762–5769.
- (41) Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Kemp, S.; Aldrich-Wright, J. R. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 627–648.
- (42) Canals, A.; Purciolas, M.; Aymamí, J.; Coll, M. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 1009–1012.
- (43) Jennette, K. W.; Gill, J. T.; Sadowick, J. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6159–6168.
- (44) Champe, P. C.; Harvey, R.; Ferrier, D. R. *Le basi della biochimica*; Zanichelli, 2006.
- (45) Woynarowska, B. A.; Woynarowski, J. M. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2002**, *1587*, 309–317.
- (46) Cai, X.; Gray Jr., P. J.; Von Hoff, D. D. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 437–450.
- (47) Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Pavani, M. G.; Romagnoli, R. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 475–528.
- (48) Barrett, M. P.; Gemmill, C. G.; Suckling, C. J. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *139*, 12–23.

- (49) Stephens, B.; Han, H.; Hostetter, G.; Demeure, M. J.; Von Hoff, D. D. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 202–210.
- (50) Finlay, A. C.; Hochstein, F. A.; Sobin, B. A.; Murphy, F. X. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 341–343.
- (51) Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Biochemistry (Mosc.)* **1988**, *27*, 8088–8096.
- (52) Baguley, B. C. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *43*, 167–181.
- (53) Brogгинi, M.; Erba, E.; Ponti, M.; Ballinari, D.; Geroni, C.; Spreafico, F.; D’Incalci, M. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 199–204.
- (54) Erba, E.; Mascellani, E.; Pifferi, A.; D’Incalci, M. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **1995**, *62*, 170–175.
- (55) Rossi, R.; Montecucco, A.; Capolongo, L.; Mezzina, M.; Chevallier-Lagente, O.; Sarasin, A.; Ciarrocchi, G. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 3779–3783.
- (56) Larsen, T. A.; Goodsell, D. S.; Cascio, D.; Grzeskowiak, K.; Dickerson, R. E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 477–491.
- (57) Jones, C. J.; Thornback, J. *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*; Royal Society of Chemistry, 2007.
- (58) García, B.; Garcia-Tojal, J.; Ruiz, R.; Gil-García, R.; Ibeas, S.; Donnadiou, B.; Leal, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1892–1900.
- (59) Lippert, B. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *182*, 263–295.
- (60) Yang, Z.; Wang, X.; Diao, H.; Zhang, J.; Li, H.; Sun, H.; Guo, Z. *Chem. Commun.* **2007**, 3453–3455.
- (61) Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777–2795.
- (62) Carlson, D. L.; Huchital, D. H.; Mantilla, E. J.; Sheardy, R. D.; Murphy, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6424–6425.
- (63) Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J. M. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, 91–106.
- (64) Thompson, K. H.; Orvig, C. *Dalton Trans.* **2006**, 761–764.
- (65) Simonneaux, G.; Allardyce, C. S. *Bioorganometallic chemistry*; Springer: Berlin; New York, 2006.
- (66) Han Ang, W.; Dyson, P. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 4003–4018.
- (67) Coluccia, M.; Natile, G. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 111–123.
- (68) Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
- (69) Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1652–1657.
- (70) Sundquist, W. I.; Lippard, S. J. *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 293–322.
- (71) Farrell, N. In *Comprehensive Coordination Chemistry II*; Editors in Chief: J. A. McCleverty; T. J. Meyer, Eds.; Pergamon: Oxford, 2003; pp. 809–840.

- (72) Bergamo, A.; Masi, A.; Dyson, P. J.; Sava, G. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 1281–1289.
- (73) Hueso-Ureña, F.; Illán-Cabeza, N. A.; Moreno-Carretero, M. N.; Martínez-Martos, J. M.; Ramírez-Expósito, M. J. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 326–334.
- (74) Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem. Commun.* **2007**, 4565–4579.
- (75) Campbell, N. H.; Karim, N. H. A.; Parkinson, G. N.; Gunaratnam, M.; Petrucci, V.; Todd, A. K.; Vilar, R.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2011**, *55*, 209–222.
- (76) Liu, H.-K.; Sadler, P. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359.
- (77) Kilpin, K. J.; Clavel, C. M.; Edafe, F.; Dyson, P. J. *Organometallics* **2012**, *31*, 7031–7039.
- (78) Terenzi, A.; Tomasello, L.; Spinello, A.; Bruno, G.; Giordano, C.; Barone, G. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 103–110.
- (79) Terenzi, A.; Fanelli, M.; Ambrosi, G.; Amatori, S.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Liveri, V. T.; Barone, G. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 4389–4395.
- (80) Terenzi, A.; Barone, G.; Piccionello, A. P.; Giorgi, G.; Guarcello, A.; Portanova, P.; Calvaruso, G.; Buscemi, S.; Vivona, N.; Pace, A. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9140–9145.
- (81) Zhong, X.; Wei, H.-L.; Liu, W.-S.; Wang, D.-Q.; Wang, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3774–3777.
- (82) Zhong, X.; Yi, J.; Sun, J.; Wei, H.-L.; Liu, W.-S.; Yu, K.-B. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1090–1092.
- (83) Barone, G.; Terenzi, A.; Lauria, A.; Almerico, A. M.; Leal, J. M.; Busto, N.; García, B. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2848–2862.
- (84) Williams, R. J. P.; Fraústo da Silva, J. J. R. *The natural selection of the chemical elements: the environment and life's chemistry*; Clarendon Press: Oxford, 1997.
- (85) Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*; Oxford University Press: Oxford; New York, 2001.
- (86) Siegel, A.; Siegel, H.; Siegel, R. K. . *Nickel and its surprising impact in nature*; Wiley: New York (N.Y.), 2007.
- (87) Kaim, W.; Rall, J. *Angew. Chem.-Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 43–60.
- (88) Jaouen, R. In *Bioorganometallics*; Wiley-VCH: Weinheim, 2006; p. 444.
- (89) Lippard, S. J.; Berg, J. M. *Principles of bioinorganic chemistry*; University Science Books: Mill Valley, Calif., 1994.
- (90) Holder, A. A. *Annu. Rep. Sect. Inorg. Chem.* **2012**, *108*, 350–368.
- (91) Farrell, N. *Uses of inorganic chemistry in medicine*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999.
- (92) Ronconi, L.; Sadler, P. J. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1633–1648.
- (93) Schwietert, C. W.; McCue, J. P. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 67–89.
- (94) Chen, H. M.; Parkinson, J. A.; Novakova, O.; Bella, J.; Wang, F. Y.; Dawson, A.; Gould, R.; Parsons, S.; Brabec, V.; Sadler, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14623–14628.

- (95) Barone, G.; Gambino, N.; Ruggirello, A.; Silvestri, A.; Terenzi, A.; Turco Liveri, V. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 731–737.
- (96) Silvestri, A.; Barone, G.; Ruisi, G.; Anselmo, D.; Riela, S.; Liveri, V. T. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 841–848.
- (97) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4844–4849.
- (98) Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6722–6724.
- (99) Incles, C. M.; Schultes, C. M.; Kempinski, H.; Koehler, H.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1201–1206.
- (100) Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1489–1496.
- (101) Sparapani, S.; Haider, S. M.; Doria, F.; Gunaratnam, M.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12263–12272.
- (102) Laronze-Cochard, M.; Kim, Y.-M.; Brassart, B.; Riou, J.-F.; Laronze, J.-Y.; Sapi, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3880–3888.
- (103) Doi, T.; Shibata, K.; Yoshida, M.; Takagi, M.; Tera, M.; Nagasawa, K.; Shin-ya, K.; Takahashi, T. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 387–393.
- (104) Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1262–1263.
- (105) Miyazaki, T.; Pan, Y.; Joshi, K.; Purohit, D.; Hu, B.; Demir, H.; Mazumder, S.; Okabe, S.; Yamori, T.; Viapiano, M.; Shin-ya, K.; Seimiya, H.; Nakano, I. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1268–1280.
- (106) Arola, A.; Vilar, R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1405–1415.
- (107) Keating, L. R.; Szalai, V. A. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 15891–15900.
- (108) Sun, R. W.-Y.; Li, C. K.-L.; Ma, D.-L.; Yan, J. J.; Lok, C.-N.; Leung, C.-H.; Zhu, N.; Che, C.-M. *Chem - Eur J* **2010**, *16*, 3097–3113.
- (109) Alzeer, J.; Vummidi, B. R.; Roth, P. J. C.; Luedtke, N. W. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 9362–9365.
- (110) Alzeer, J.; Luedtke, N. W. *Biochemistry (Mosc.)* **2010**, *49*, 4339–4348.
- (111) Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992–5993.
- (112) Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4020–4034.
- (113) Schiff, H. *Ann Suppl* **1864**, *3*, 343.
- (114) Atwood, D. A.; Harvey, M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 37–52.
- (115) Sitlani, A.; Long, E. C.; Pyle, A. M.; Barton, J. K. *J Am Chem Soc* **1992**, *114*, 2303–2312.

- (116) Li, L.-Z.; Zhao, C.; Xu, T.; Ji, H.-W.; Yu, Y.-H.; Guo, G.-Q.; Chao, H. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1076–1082.
- (117) Crans, D. C.; Keramidis, A. D.; Hoover-Litty, H.; Anderson, O. P.; Miller, M. M.; Lemoine, L. M.; Pleasic-Williams, S.; Vandenberg, M.; Rossomando, A. J.; Sweet, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5447–5448.
- (118) Yang, X.-B.; Wang, L.; Zhang, J.; Zhang, Z.-W.; Lin, H.-H.; Zhou, L.-H.; Yu, X.-Q. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *24*, 125–130.
- (119) Yang, X.-B.; Huang, Y.; Zhang, J.-S.; Yuan, S.-K.; Zeng, R.-Q. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*, 1421–1424.
- (120) Silvestri, A.; Barone, G.; Ruisi, G.; Lo Giudice, M. T.; Tumminello, S. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 589–594.
- (121) Baleizao, C.; Garcia, H. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3987–4043.
- (122) Smith, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; Wiley-Blackwell: Chicester, 2012.
- (123) Combes, A. In *Les Comptes Rendus de l'Academie des sciences - Institute de France*; 1889; Vol. 108, p. 1252.
- (124) Aziz, A. A. *Synth. React. Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem.* **2011**, *41*, 384–393.
- (125) Jacobsen, E. N. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 421–431.
- (126) Palucki, M.; Finney, N. S.; Pospisil, P. J.; Güler, M. L.; Ishida, T.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 948–954.
- (127) Castilla, A. M.; Curreli, S.; Escudero-Adán, E. C.; Belmonte, M. M.; Benet-Buchholz, J.; Kleij, A. W. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5218–5221.
- (128) Sawada, Y.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4559–4561.
- (129) Ready, J. M.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2687–2688.
- (130) Hirahata, W.; Thomas, R. M.; Lobkovsky, E. B.; Coates, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17658–17659.
- (131) Whiteoak, C. J.; Salassa, G.; Kleij, A. W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 622–631.
- (132) Zhang, W.; Loebach, J. L.; Wilson, S. R.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801–2803.
- (133) Jacobsen, E. N. *Comprehensive Organometallic Chemistry II*; Pergamon: New York, 1995; Vol. 12.
- (134) Canali, L.; Sherrington, D. C. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 85–93.
- (135) Wooley, P. H.; Whalen, J. D. *Agents Actions* **1992**, *35*, 273–279.
- (136) Lange, T. S.; Kim, K. K.; Singh, R. K.; Strongin, R. M.; McCourt, C. K.; Brard, L. *PLoS One* **2008**, *3*, e2303.
- (137) Dalla Cort, A.; De Bernardin, P.; Forte, G.; Mihan, F. Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3863–3874.

- (138) Doctrow, S. R.; Huffman, K.; Marcus, C. B.; Tocco, G.; Malfroy, E.; Adinolfi, C. A.; Kruk, H.; Baker, K.; Lazarowych, N.; Mascarenhas, J.; Malfroy, B. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4549–4558.
- (139) Ansari, K. I.; Kasiri, S.; Grant, J. D.; Mandal, S. S. *Dalton Trans.* **2009**, 8525–8531.
- (140) Ansari, K. I.; Grant, J. D.; Kasiri, S.; Woldemariam, G.; Shrestha, B.; Mandal, S. S. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 818–826.
- (141) Mandal, S. S. *Leuk. Res.* **2011**, *35*, 571–572.
- (142) Arola-Arnal, A.; Benet-Buchholz, J.; Neidle, S.; Vilar, R. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 11910–11919.
- (143) Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4837–4847.
- (144) Muller, J. G.; Kayser, L. A.; Paikoff, S. J.; Duarte, V.; Tang, N.; Perez, R. J.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *186*, 761–774.
- (145) Clarke, A. J.; Yamamoto, N.; Jensen, P.; Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2009**, 10787–10798.
- (146) Hille, A.; Ott, I.; Kitanovic, A.; Kitanovic, I.; Alborzinia, H.; Lederer, E.; Wolf, S.; Metzler-Nolte, N.; Schafer, S.; Sheldrick, W. S.; Bischof, C.; Schatzschneider, U.; Gust, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 711–725.
- (147) Terenzi, A.; Ducani, C.; Male, L.; Barone, G.; Hannon, M. J. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11220–11226.
- (148) Qin, W.; Long, S.; Panunzio, M.; Biondi, S. *Molecules* **2013**, *18*, 12264–12289.
- (149) Hobday, M. D.; Smith, T. D. *Coord. Chem. Rev.* **1973**, *9*, 311–337.
- (150) Anitha, C.; Sheela, C. D.; Tharmaraj, P.; Sumathi, S. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *96*, 493–500.
- (151) Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*; Macmillan Higher Education, 2008.
- (152) Uno, T.; Hamasaki, K.; Tanigawa, M.; Shimabayashi, S. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1676–1683.
- (153) Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901–8911.
- (154) Barone, G.; Fonseca Guerra, C.; Bickelhaupt, F. M. *ChemistryOpen* **2013**, DOI: 10.1002/open.201300019.
- (155) Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–274.
- (156) Rodger, A.; Nordén, B. *Circular dichroism and linear dichroism*; Oxford University Press: Oxford; New York, 1997.
- (157) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–1725.
- (158) Shin, Y. A.; Eichhorn, G. L. *Biopolymers* **1984**, *23*, 325–335.
- (159) Ramos, J. E. B.; de Vries, R.; Neto, J. R. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23661–23665.
- (160) Liu, Y.-J.; Chao, H.; Tau, F.-L.; Yuan, Y.-X.; Wei, W.; Ji, L.-N. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 530–537.
- (161) Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; McConnell, D. J.; Ohuigin, C. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 6017–6034.
- (162) Huang, H.-L.; Liu, Y.-J.; Zeng, C.-H.; He, L.-X.; Wu, F.-H. *DNA Cell Biol.* **2010**, *29*, 261–270.

- (163) Lauria, A.; Bonsignore, R.; Terenzi, A.; Spinello, A.; Giannici, F.; Longo, A.; Almerico, A. M.; Barone, G. *Submitted*.
- (164) Kieltyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14*, 1145–1154.
- (165) Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8371–8380.
- (166) Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H. *Methods* **2007**, *43*, 324–331.
- (167) Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2683–2692.
- (168) Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Lacroix, L.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9963–9970.
- (169) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2723–2735.
- (170) Zhou, J.; Yuan, G. *Chem. – Eur. J.* **2007**, *13*, 5018–5023.
- (171) Goncalves, D. P. N.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K. M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3337–3342.
- (172) Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*; John Wiley & Sons, 2012.
- (173) Rezler, E. M.; Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Kim, M.-Y.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9439–9447.
- (174) Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 9427–9435.
- (175) Ou, T.-M.; Lu, Y.-J.; Zhang, C.; Huang, Z.-S.; Wang, X.-D.; Tan, J.-H.; Chen, Y.; Ma, D.-L.; Wong, K.-Y.; Tang, J. C.-O.; Chan, A. S.-C.; Gu, L.-Q. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1465–1474.
- (176) Wu, P.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H.; Yan, S.-C.; Zhu, N.; Abagyan, R.; Che, C.-M. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 13008–13021.
- (177) Longo, D. L.; Fausi, A. S.; Kasper, D. L.; Hauser, S. L.; Jameson, L.; Loscalzo, J. *Harrison's principles of internal medicine*; McGraw-Hill medical: New York, 2011.
- (178) Watson, J. D. *Molecular biology of the gene*; Pearson: Boston, 2013.
- (179) Smith, M. L.; Fornace, A. J. J. *Mutat. Res.* **1996**, *340*, 109–124.
- (180) Gibbs, R. A. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1202–1214.
- (181) Lemarteleur, T.; Gomez, D.; Paterski, R.; Mandine, E.; Mailliet, P.; Riou, J.-F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 802–808.
- (182) McPhie, P. *Methods Enzymol.* **1971**, *22*, 23–32.
- (183) Kennedy, S. D.; Bryant, R. G. *Biophys. J.* **1986**, *50*, 669–676.
- (184) Mosmann, T. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (185) Aleksić, M.; Bertoša, B.; Nhili, R.; Uzelac, L.; Jarak, I.; Depauw, S.; David-Cordonnier, M.-H.; Kralj, M.; Tomić, S.; Karminski-Zamola, G. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5044–5060.

- (186) Cirrincione, G.; Almerico, A. M.; Barraja, P.; Diana, P.; Lauria, A.; Passannanti, A.; Musiu, C.; Pani, A.; Murtas, P.; Minnei, C.; Marongiu, M. E.; La Colla, P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2561–2568.
- (187) Diana, P.; Barraja, P.; Lauria, A.; Montalbano, A.; Almerico, A. M.; Dattolo, G.; Cirrincione, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 267–272.
- (188) Lauria, A.; Diana, P.; Barraja, P.; Almerico, A. M.; Cirrincione, G.; Dattolo, G. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 747–750.
- (189) Beck, J. R.; Yahner, J. A. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1733–1734.
- (190) Beck, J. R.; Yahner, J. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2450–2452.
- (191) Viswanatha, G. L.; Janaki Priyadarshini B; Hanumanthappa, S.; Rangappa, S.; Janardhanan, S. *Oman Med. J.* **2012**, *27*, 388–395.
- (192) W. Schneller, S.; W. Clough, F. *Heterocycles* **1975**, *3*, 135.
- (193) Lauria, A.; Alfio, A.; Bonsignore, R.; Gentile, C.; Martorana, A.; Gennaro, G.; Barone, G.; Terenzi, A.; Almerico, A. M. *Submitted*.
- (194) Mao, Z.; Zheng, X.; Zhong, Y.; Huang, H.; Ji, L. High efficiency telomerase inhibitor and application of telomerase inhibitor in antitumor drug. CN102898478 (A), January 30, 2013.
- (195) Busto, N.; Valladolid, J.; Martínez-Alonso, M.; Lozano, H. J.; Jalón, F. A.; Manzano, B. R.; Rodríguez, A. M.; Carrión, M. C.; Biver, T.; Leal, J. M.; Espino, G.; García, B. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 9962–9974.
- (196) Ma, D.-L.; Che, C.-M.; Siu, F.-M.; Yang, M.; Wong, K.-Y. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 740–749.
- (197) Abdi, K.; Hadadzadeh, H.; Salimi, M.; Simpson, J.; Khalaji, A. D. *Polyhedron* **2012**, *44*, 101–112.
- (198) Patra, A. K.; Bhowmick, T.; Roy, S.; Ramakumar, S.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 2932–2943.
- (199) Barton, J. K.; Danishefsky, A. T.; Goldberg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2172–2176.
- (200) Patra, A. K.; Roy, S.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 1591–1599.
- (201) Neyhart, G. A.; Grover, N.; Smith, S. R.; Kalsbeck, W. A.; Fairley, T. A.; Cory, M.; Thorp, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4423–4428.
- (202) Jana, B.; Senapati, S.; Ghosh, D.; Bose, D.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *116*, 639–645.
- (203) Eichhorn, G. L.; Shin, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7323–7328.
- (204) Lerman, L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, *49*, 94–98.
- (205) Dougherty, G.; Pilbrow, J. R. *Int. J. Biochem.* **1984**, *16*, 1179–1192.
- (206) Bisceglie, F.; Pinelli, S.; Alinovi, R.; Tarasconi, P.; Buschini, A.; Mussi, F.; Mutti, A.; Pelosi, G. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 195–203.