



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA

“TOR VERGATA”

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA in BIOTECNOLOGIE

MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE

XXII CICLO

**GLUTATIONE S-TRASFERASI P1-1 COME
POSSIBILE BERSAGLIO PER LO
SVILUPPO DI NUOVI CHEMIOTERAPICI.
UN APPROCCIO BIVALENTE**

Dottoranda: Silvia Pezzola

a.a. 2009/2010

Docente guida: Prof.ssa Anna Maria Caccuri

Coordinatore: Prof. G. Federici

Around here, however, we don't look backwards for very long.

We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious...

And curiosity keep leading us down new paths.

(Walt Disney)

Ad Anna, Claudia e Pierluca

INDICE	Pagg.
RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1. GLUTATIONE S-TRASFERASI E RESISTENZA	
AI FARMACI CHEMIOTERAPICI	4
1.1 <i>Struttura delle Glutazione S-trasferasi</i>	4
1.1.2 <i>Coniugazione di composti elettrofili al GSH.</i>	5
1.1.3 <i>Le GST possono legare e trasportare ligandi</i> <i>non substrato</i>	7
1.2 <i>L'iperespressione delle GST induce</i> <i>farmaco-resistenza</i>	7
1.3 <i>Le GST sono regolatori endogeni delle MAP chinasi</i>	8
1.4 <i>GST come bersagli terapeutici</i>	11
1.4.1 <i>Modulatori dell'attività enzimatica</i>	11
2. NUOVI CHEMIOTERAPICI CHE SUPERANO LA RESISTENZA:	15
2.1 <i>NBDHEX è un modulatore dell'attivazione di JNK</i>	15
2.2 <i>La Brostalicina sfrutta il potenziale catalitico delle GST</i>	19
2. PROGETTI DI RICERCA	21
2.1 <i>GSTP1-I1le104/Val GSTP1-I1le104/Ala e nuovi derivati</i> <i>dell'NBDHEX</i>	22
2.2 <i>Ruolo delle Glutazione Trasferasi nel meccanismo di</i> <i>attivazione della brostalicina</i>	23
3. MATERIALI E METODI	25
3.1 <i>Materiali e reagenti</i>	26
3.2 <i>Enzimi</i>	26
3.3 <i>Legame dell'NBDHEX alle GST</i>	27
3.4 <i>Analisi Spettrofotometrica.</i>	27

3.5 Sintesi e caratterizzazione del 6(7-sulfo-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esanolo	27
3.6 Studi di inibizione delle GST	28
3.7 Linee cellulari e metodi utilizzati per le prove di efficacia in vitro	29
3.8. Cinetica di ingresso dell'SBDHEX	30
3.9. Analisi in HPLC-UV/MS della reazione tra GSH e brostallicina.	30
3.10. Analisi HPLC-MS degli addotti brostallicina-GSH (composti 6 e 7)	31
3.11. Analisi spettrofluorimetrica della reazione tra brostallicina e GSH.	31
3.12. Determinazione del meccanismo della reazione brostallicina-GSH catalizzata dalla GSTP1-1.	32
3.13. Impiego della Taq polimerasi stop assay.	32
4. RISULTATI	34
4.1. GSTP1-1Ile104/Val GSTP1-1Ile104/Ala E NUOVI DERIVATI DELL'NBDHEX	35
4.1.1.1 La mutazione Ile104/Val aumenta l'affinità della GSTP1-1 per l'NBDHEX	36
4.1.1.2 Un modello per il disegno di nuovi inibitori	39
4.1.2.1. Sintesi e caratterizzazione del il 6-(7-sulfo-2,1,3- benzossadiazol-4-iltio)esanolo	40
4.1.2.2 Verifica della sintesi e determinazione della purezza del composto: Spettroscopia ¹ HNMR e analisi cromatografica mediante HPLC.	42
4.1.2.3 L'SBDHEX è più solubile dell'NBDHEX	44
4.1.2.4 L'SBDHEX è meno affine per la GSTP1-1 rispetto all'NBDHEX	45
4.1.2.5 L'SBDHEX non forma il complesso-σ	46

4.1.2.6 <i>L'SBDHEX non ha un effetto citotossico</i>	48
4.1.2.7 <i>L'SBDHEX non è in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico</i>	48
4.1.3.1 <i>Analoghi del NBDHEX che presentano una sostituzione del gruppo legato al C4 dell'anello benzossadiazolico</i>	50
4.1.3.2.1 <i>Sostituzione dell'esanolo con il benzene, studi di solubilità</i>	50
4.1.3.2.2 <i>Sostituzione dell'esanolo con il benzene, studi di interazione con le GST</i>	52
4.1.3.3.1 <i>Sostituzione dell'esanolo con un gruppo benzen-carbossilico, studi di solubilità</i>	54
4.1.3.3.2 <i>Sostituzione dell'esanolo con un gruppo benzen-carbossilico, studi di affinità con le GST</i>	55
4.1.3.3.3 <i>Analisi spettrofotometrica della formazione del complesso-σ</i>	55
4.1.3.3.4 <i>Determinazione dell'LD_{50}</i>	56
4.1.3.4.1. <i>Sostituzione dell'esanolo con un gruppo benzen-carbossilico esterificato,</i>	57
4.1.3.5.1 <i>Sostituzione dell'esanolo con un gruppo benzen-ammidico, studi di solubilità</i>	58
4.1.3.5.2 <i>Sostituzione dell'esanolo con un gruppo benzen-ammidico, studi di affinità con le GST</i>	58
4.1.3.5.3 <i>Analisi spettrofotometrica dell'interazione con il GSH</i>	59
4.1.3.5.4 <i>La formazione dell'addotto 2876-GSH non influenza l'affinità per la GSTP1-1</i>	60
4.1.3.5.5 <i>Determinazione dell'LD_{50}</i>	62
4.2. RUOLO DELLE GLUTATIONE TRASFERASI NEL MECCANISMO D'ATTIVAZIONE DELLA BROSTALLICINA	64
4.2.1. <i>Le cellule che iperesprimono sia la GST Pi che la GST Mu sono più sensibili alla brostallicina</i>	65
4.2.2 <i>Analisi HPLC-UV/MS della reazione tra brostallicina e il GSH</i>	65

4.2.3. <i>La brostalicina e i suoi derivati inibiscono la GSTP1-1 e la GSTM2-2.</i>	68
4.2.4 <i>La brostalicina e i suoi addotti con il GSH non inibiscono irreversibilmente la GSTP1-1 e la GSTM2-2</i>	72
4.2.5 <i>La reazione tra brostalicina e GSH si può seguire spettrofluorimetricamente</i>	73
4.2.6 <i>Analisi cinetica della reazione brostalicina-GSH catalizzata dalla GSTP1-1</i>	76
4.2.7. <i>Studi a pH fisiologico: per l'attivazione della brostalicina è necessaria la GST mentre l'α-cloro derivato⁵ lega covalentemente il DNA anche in assenza di GSH/GST.</i>	78
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	82
6. BIBLIOGRAFIA	88