



UNIVERSITÀ DI PISA
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

*“Sintesi di derivati benzo[d]isotiazolici quali inibitori di
differenti isoforme dell’anidrasi carbonica”*

Relatori:

Prof.ssa La Motta Concettina

.....

Dott.ssa Sartini Stefania

.....

Candidata:

Nazzaro Paola

.....

Il contenuto di questa tesi di laurea è strettamente riservato, essendo presenti argomenti tutelati dalla legge come segreti. Pertanto tutti coloro che ne prendono conoscenza sono soggetti all'obbligo, sanzionato anche penalmente dagli articoli 325 e 623 del codice penale, di non divulgare e di non utilizzare le informazioni acquisite.

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

SSD/CHIM08

Ad Omar
per questa e per ogni prossima vita
io scelgo Te

Grazie...

Vorrei dire grazie alle mie relatrici, la Prof.ssa Concettina La Motta e la Dott.ssa Stefania Sartini.

Vorrei dire grazie alle mie compagne di studio. Grazie ad Annina che è un'amica speciale! In questi anni abbiamo condiviso molte cose insieme, i pranzi, i pomeriggi a studiare, gli esami! Grazie per tutte le risate e per tutti i momenti di spensieratezza! Se non ti avessi conosciuto non sarebbe stato lo stesso!

Grazie a Rita che mi ha accompagnato in questi mesi di laboratorio! Spero di continuare la nostra amicizia anche al di fuori dell'università!

Grazie a Federica per tutto quello che mi ha dato! Sappi che anche se ci separano molti chilometri, ti considero sempre il mio "mon amour"!

Grazie alla mia famiglia che ha fatto tanti sacrifici per sostenermi negli studi.

Grazie alla mia mamma, una donna speciale e forte, grazie al mio babbo, un uomo che stimo profondamente, e grazie a mio fratello. Vi voglio bene.

Grazie alla mia nonna Maria Stella per il suo essere stata dolce e protettiva, per i suoi consigli e per avermi fatto sentire amata in ogni istante. Ti penso sempre.

Grazie alla mia nonna Maria e al mio nonno Gennaro perchè ogni volta che vengo a trovarvi mi sento coccolata e capita.

Grazie ai miei zii, alle mie zie e ai miei cugini! Un grazie speciale va a zio Michele che mi ha insegnato che nella vita non ci si deve mai arrendere.

Grazie a Patrizia per ogni volta che mi ha ascoltato senza mai farmi sentire giudicata.

Grazie ad Omar, il mio amore. Grazie perchè sei l'unica persona che riesce a tranquillizzarmi quando sono agitata e pensierosa. Grazie perchè solo con te riesco ad essere pienamente me stessa. Grazie per essermi stato vicino sempre.

Grazie perchè quando mi guardi con i tuoi occhioni verdi, capisco che nella vita non ho bisogno di altro se non del tuo amore.

INDICE

1 PREMESSA	1
2 CLASSIFICAZIONE, STRUTTURA E MECCANISMO CATALITICO DELLA PROTEINA ANIDRASI CARBONICA	3
2.1 ANIDRASI CARBONICA α	3
2.1.1 Introduzione	3
2.1.2 Strutture 3D CA- α	5
2.2 ANIDRASI CARBONICA β	6
2.3 ANIDRASI CARBONICA γ	6
2.4 LEGAME CON LO ZINCO	7
2.5 MECCANISMO CATALITICO: STUDI CINETICI E MOLECOLARI	8
2.6 LEGAME E INTERVERSIONE CO_2 e HCO_3^-	9
3 ANIDRASI CARBONICA IX	11
3.1 INTRODUZIONE	11
3.2 ATTIVITÀ CATALITICA CA IX	13
3.3 STRUTTURA 3D DI CA IX	15
3.4 ESPRESSIONE DI CA IX NEI TESSUTI SANI E NEI TESSUTI TUMORALI	17
3.4.1 Regolazione di CA IX nelle cellule tumorali	18
3.5 CA IX E MANTENIMENTO DEL pH TUMORALE	22
4 ANIDRASI CARBONICA XII	29
4.1 INTRODUZIONE	29
4.2 ATTIVITÀ CATALITICA DI CA XII	31
4.3 ESPRESSIONE DI CA XII NEI TESSUTI TUMORALI	32
4.3.1 Anidrase carbonica XII: potenziale marker nel carcinoma al seno	33
4.3.2 Espressione anidrase carbonica XII nei tessuti oculari sani e nei tessuti affetti da glaucoma	36
5 INIBITORI ANIDRASI CARBONICA	38
5.1 INTRODUZIONE	38
5.2 INIBITORI ANIONICI	38
5.3 ANTICORPI MONOCLONALI	40

5.4 SULFONAMMIDI	42
5.5 CUMARINE E FENOLI	46
6 INTRODUZIONE PARTE SPERIMENTALE	51
7 PARTE SPERIMENTALE	56
7.1 MATERIALI E METODI	56
7.2 PROCEDURE SPERIMENTALI, PROPRIETÀ FISICHE E DATI SPETTROSCOPICI	57
BIBLIOGRAFIA	67

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.	Rappresentazione schematica del sito attivo di CA II.	6
Figura 2.	Struttura trimerica CA γ .	7
Figura 3.	Meccanismo catalitico CA II.	9
Figura 4.	Struttura di CA IX.	11
Figura 5.	Meccanismo di attivazione ipossia-indotto di HIF-1.	13
Figura 6 A.	Variazione di k_{cat}/k_M per CA IX in funzione del pH per la reazione di idratazione della CO ₂ . Curva di titolazione della proteina formata da CA + PG (pK _a 6.49).	14
Figura 6 B.	Variazione di k_{cat}/k_M per CA IX in funzione del pH per la reazione di idratazione della CO ₂ . Curva di titolazione della proteina formata soltanto da CA (pK _a 7.01).	14
Figura 7.	Struttura 3D del dominio catalitico di CA IX.	15
Figura 8.	Modello proposto per il riarrangiamento strutturale del dimero CA IX sulla membrana cellulare.	16
Figura 9.	Relazione tra espressione di CA IX e invasione cellulare con formazione di metastasi.	20
Figura 10.	Regolazione del pH tumorale da parte di CA IX.	23
Figura 11 A.	Analisi mediante immunoblotting utilizzando l'anticorpo monoclonale M75 delle cellule controllo (mock) e delle cellule MDCK transfettate entrambe mantenute in normossia (21% O ₂) o esposte ad ipossia (2% O ₂) per 48 h.	25
Figura 11 B.	Analisi immunofluorescente delle cellule MDCK-mock e MDCK-CA IX.	25
Figura 11 C.	Valutazione del pH delle cellule MDCK-mock e MDCK-CA IX mantenute in normossia e ipossia.	25
Figura 11 D.	Valutazione della concentrazione di acido lattico delle cellule MDCK-mock e MDCK-CA IX mantenute in normossia e ipossia.	25
Figura 12 A.	Struttura chimica degli inibitori selettivi di CA IX.	26
Figura 12 B.	Variazione del pH 48 h dopo l'aggiunta degli inibitori alle cellule.	26
Figura 12 C.	Le cellule trattate con l'inibitore marcato con FITC per 48 h in normossia e ipossia.	26
Figura 13 A.	Rappresentazione schematica dell'enzima CA IX e delle delezioni fatte sul dominio PG e CA.	27
Figura 13 B.	Valutazione dell'acidificazione del pHe indotta dall'enzima CA IX, dall'enzima Δ CA e dall'enzima Δ PG in normossia e in ipossia.	27
Figura 14 A.	Le linee cellulari HeLa e SiHa incubate per 48 h in normossia e ipossia sia in assenza che in presenza dell'inibitore CAI#3.	28
Figura 14 B.	Analisi delle linee cellulari HeLa e SiHa trattate con l'inibitore CAI#3 marcato con FITC.	28
Figura 14 C.	Analisi mediante immunoblotting con l'anticorpo monoclonale M75 dell'espressione di CA IX nelle linee cellulari HeLa e SiHa in normossia e ipossia.	28
Figura 15.	Organizzazione strutturale del dimero di CA XII.	30
Figura 16.	Rappresentazione del sito attivo di CA XII.	31

Figura 17.	Relazione tra costante cinetica K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) e pH per la reazione di idrolisi catalizzata da CA XII.	31
Figura 18.	Relazione tra costante cinetica K_{cat} (s^{-1}) e il pH per la reazione di idrolisi catalizzata da CA XII.	32
Figura 19.	Relazione CA XII-necrosi e CA XII-gravità del tumore.	34
Figura 20 A.	Relazione tra CA XII e sopravvivenza priva di ricadute.	35
Figura 20 B.	Relazione tra CA XII e sopravvivenza complessiva.	35
Figura 21.	Analisi northern blot dell'espressione di CA IX, CA XII e CA IV in culture NPE di un paziente con glaucoma (GCE-T), di un paziente sano (ODM-C4) e di un controllo positivo da cellule di carcinoma renale RCC (786-0).	37
Figura 22 A.	Rappresentazione del sito attivo di CA II.	39
Figura 22 B.	Rappresentazione del complesso enzima- HSO_3^- .	39
Figura 22 C.	Rappresentazione del complesso enzima ione-formiato.	39
Figura 22 D.	Rappresentazione del complesso enzima-azide.	40
Figura 22 E.	Rappresentazione del complesso enzima-ione solfato.	40
Figura 23.	Rappresentazione del legame dell'inibitore acetazolamide con il sito attivo di CA II.	43
Figura 24.	Strutture chimiche degli inibitori sulfonamidici 1, 2 a-b, 3-7, 8 e 9 .	43
Figura 25.	Strutture chimiche degli inibitori sulfonamidici 10, 11, 12, 13 e 14 .	44
Figura 26.	Struttura chimica di due inibitori selettivi di CA IX. (15) Sulfonammide marcata con fluoresceina. (16) Sulfonammide carica positivamente.	45
Figura 27.	Struttura chimica dell'inibitore selettivo delle isoforme IX e XII 17 .	46
Figura 28.	Strutture chimiche dei composti cumarini sostituiti e non sostituiti analizzati come potenziali inibitori selettivi di CA IX e CA XII.	47
Figura 29.	Formazione degli acido 2-idrossicinnamici 20 e 21 dall'idrolisi CA- mediata delle cumarine A e B.	47
Figura 30.	Struttura chimica del composti cumarinico Umbelliferone analizzato come potenziale inibitore selettivo di CA IX e CA XII.	47
Figura 31.	Strutture chimiche dei derivati cumarinici 23-26 .	48
Figura 32.	Rappresentazione del complesso CA II- fenolo.	50
Figura 33.	Scaffold benzo[d]isotiazolico.	51

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.	Parametri cinetici di CA IX in confronto con le altre isoforme.	14
Tabella 2.	Studio di valutazione dell'espressione di CA IX e del suo utilizzo come marker prognostico.	18
Tabella 3.	Correlazione tra espressione di CA IX e prognosi del paziente.	18
Tabella 4.	Analisi dei valori massimi delle costanti catalitiche di CA XII, I, II, III e IV.	32
Tabella 5.	Caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti sottoposti allo studio.	34
Tabella 6.	Espressione di CA XII e CA IX nei tessuti oculari.	36
Tabella 7.	Valori K_i calcolati per le hCA I, hCAII, hCA V e hCA IX.	45
Tabella 8.	Valutazione K_i composti 18, 19, 22, 23-26.	48
Tabella 9.	Valutazione K_i (nM) dei composti 27, 28 e 29 a-e.	52
Tabella 10.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 31.	57
Tabella 11.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 31.	57
Tabella 12.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 33.	59
Tabella 13.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 33.	59
Tabella 14.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 34.	60
Tabella 15.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 34.	60
Tabella 16.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 a.	61
Tabella 17.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 a.	61
Tabella 18.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 b.	62
Tabella 19.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 b.	62
Tabella 20.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 c.	63
Tabella 21.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 c.	63
Tabella 22.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 d.	64
Tabella 23.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 d.	64
Tabella 24.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 e.	65
Tabella 25.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 e.	65
Tabella 26.	Caratteristiche chimico-fisiche del composto 28 f.	66
Tabella 27.	Caratteristiche spettroscopiche del composto 28 f.	66