

OBIETTIVI

Identificare ed analizzare nuovi farmaci/composti molecolari ad azione citotossica e/o citostatica che possano agire come potenziali inibitori della chinasi AKT, conosciuta anche come proteina chinasi B o PKB, quindi che possano inibire la cascata di segnalazione della P13K/AKT/mTOR. La famiglia di chinasi AKT è composta da tre membri: AKT1, AKT2, AKT3; essi attivano le vie biochimiche che regolano svariati processi quali la proliferazione, la sopravvivenza, la crescita, la migrazione, l'invasione e l'angiogenesi, e svolgono un ruolo fondamentale nel pathway della P13K in seguito alla stimolazione da parte di fattori di crescita e citochine.

Le alterazioni nella via di segnalazione P13K/AKT costituiscono un punto chiave nell'insorgenza e nella progressione di molte neoplasie, in particolare l'attivazione costitutiva di AKT promuove l'acquisizione di un fenotipo maligno.

Esistono in commercio molecole di sintesi riportate come inibitori selettivi e diretti di AKT.

In questo studio l'obiettivo posto è quello di identificare nuovi potenziali ligandi di AKT che possano presentare una funzione inibitoria sulla chinasi.

ATTIVITA' SVOLTE

Sono state applicate tecniche di modelling molecolare in modo da effettuare uno screening virtuale di più di 1,5 milioni di composti provenienti da diversi database.

Sono state così selezionate le molecole che meglio sembravano interagire con AKT attraverso una simulazione di docking attribuendo ad esse un valore di score.

Sono stati analizzati alcuni composti derivati dall'analisi *in silico*, i quali potenzialmente dovrebbero presentare un'attività inibitoria di AKT.

Il primo composto sottoposto ad analisi è stato l' STK004, dosato su differenti linee cellulari.

In particolare sono state selezionate linee cellulari esprimenti alti livelli di fosforilazione basale della chinasi AKT come le MDA-MB-468 (cellule di adenocarcinoma mammario) e le SKOV3 (cellule di carcinoma ovarico).

Come controllo negativo si è scelto di riferirsi alle MDA-MB231, in quanto, al contrario delle linee cellulari sopracitate, esprimono bassi livelli di fosforilazione di AKT.

Con lo scopo di valutare la vitalità cellulare e quindi di testare la citotossicità del composto STK044, si sono fatti dei saggi di MTT nei quali il farmaco solubilizzato in DMSO (il dimetilsolfossido) è stato utilizzato sulle linee cellulari sopra elencate a differenti concentrazioni (a titolo di esempio: 10nM, 100nM, 1µM, 10 µM, 100µM) ed a vari tempi (a partire dal tempo zero fino alle 72 ore).

Parallelamente, le cellule di controllo sono state ugualmente trattate con soluzione di DMSO all'1%.

Stesso lavoro sperimentale, con analoga procedura, si è fatto per il farmaco STK101, STK044165, STL337320 e BAS00291868 su linee cellulari H460 (cellule di carcinoma polmonare) e PC-3 (cellule di carcinoma prostatico).

Per valutare la capacità inibitoria del composto STK044 su AKT sono stati allestiti dei saggi biochimici attraverso cui è stato possibile determinare i livelli di fosforilazione di un substrato diretto di AKT quale GSK3, PhosphoPRAS40.

Sono state effettuate delle cinetiche di fosforilazione sia a tempi brevi che a tempi lunghi sulle cellule trattate con diverse concentrazioni del farmaco.

Successivamente è stato analizzato attraverso immunoblot il livello basale di espressione di fosfo-GSK3α e fosfo-GSK3β utilizzando gli anticorpi specifici: fosfo-GSK3α S21 e fosfo-GSK3β S9 e valutato anche i livelli di fosforilazione di AKT sulla serina 473.

Sono stati fatti molti esperimenti di western blot per valutare i livelli di recettori specifici presenti su cellule tumorali. Le cellule sono state lisate e i lisati li ho usati per fare il western blotting, ho

usato degli anticorpi specifici(PARP, P-PRAS) ,seguiti da un secondario e l'anti-actina per fare una normalizzazione. I segnali sono stati ottenuti con il sistema di chemiluminescenza ECL.

RISULTATI CONSEGUITI

La via delle protein chinasi è responsabile della traduzione della gran parte dei segnali cellulari. Perturbazioni a carico di questo sistema sono alla base di gravi disturbi come l'infiammazione, il diabete e il cancro.

Poiché solitamente le protein chinasi si trovano all'interno della cellula in uno stato inattivo, e vengono attivate da particolari segnali, questi disturbi possono essere riconducibili ad una iperattività, causata da malfunzionamento o iperespressione della via di traduzione del segnale operato dalle chinasi. Risulta evidente, quindi, che l'utilizzo di inibitori di questi enzimi possa essere importante nel trattamento delle malattie sopra elencate.

Infatti, farmaci che hanno come bersaglio le protein chinasi sono oggetto di studi clinici, mentre altri ancora sono stati già introdotti in terapia.

Esempi ne sono il Gleevec® (Imatinib), inibitore di Abl, nel trattamento della leucemia mieloide cronica; Terceva® (Erelotinib) utilizzato nel trattamento del tumore del polmone.

Il primo inibitore delle protein chinasi passato alla fase clinica fu il Fasudil (HA1077) , che nel 1995 è stato impiegato nel trattamento del vasospasmo cerebrale.

Riguardo agli esperimenti da me condotti, ciascuna delle molecole utilizzate si è dimostrata più o meno citotossica sulle linee testate ed è stata evidenziata una discreta diminuzione dei livelli di fosforilazione dei target di AKT sopra indicati.

Il lavoro di gruppo in generale ha condotto alla: 1)Identificazione di una nuova mutazione somatica che causa il cancro al polmone e ha contribuito a chiarire i meccanismi fisio-patologici che portano all'attivazione del pathway PI3K/Akt .

2)Identificazione dei meccanismi fisio-patologici che portano all'attivazione del pathway PI3K/Akt nei carcinomi polmonari.

DESCRIZIONE DELLA STRUTTURA OSPITANTE

Così come previsto dal progetto una prima parte della formazione comune a tutti i partecipanti a Napoli, successivamente ho proseguito la formazione presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Scuola di Medicina e Chirurgia, Campus Universitario "S Venuta" – loc. Germaneto, 88100 Catanzaro

Riferimenti del tutor scientifico

e-mail: viglietto@unicz.it

telefono: 0961.3694086

Campus Universitario Germaneto, Livello 7

