



Università degli studi di Pisa

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Fisiopatologiche Generali

Tesi di Laurea

**“Analisi *in vitro* per la valutazione dell’effetto citotossico di nuovi
inibitori di Akt in associazione con gemcitabina in linee cellulari
tumoriali di polmone”**

Candidata

Danae Pracella

Relatore

Prof. Romano Danesi

Correlatori

Prof. Aldo Paolicchi

Dott. Alessandro Celi

Anno accademico 2008-2009

INDICE

Riassunto	p. 4
------------------	-------------

I. PARTE TEORICA

1. Generalità sul cancro del polmone	p. 8
1.1 Epidemiologia	p. 8
1.2 Classificazione istologica	p. 10
1.3 Terapia medica	p. 13
1.4 Determinanti genetici	p. 17
1.5 Stadiazione TNM	p. 22
2. Gemcitabina	p. 26
2.1 Caratteristiche del composto e meccanismo d'azione	p. 26
2.2 Gemcitabina e induzione dell'apoptosi	p. 30
2.3 Studi clinici e associazioni chemioterapiche nel cancro del polmone	p. 35
3. Farmaci bersaglio molecolare specifici	p. 37
3.1 Pathway PI3K/PDK1/Akt	p. 37
3.2 Akt: Meccanismo d'azione e ruolo nella neoplasia	p. 42
3.3 Farmaci inibitori di Akt e PDK1	p. 48
3.4 Significato degli SNPs 3 e 4 di Akt	p. 53
4. Scopo della tesi	p. 56

II. PARTE SPERIMENTALE

5. Materiali e metodi	p. 58
5.1 Colture cellulari	p. 58
5.2 Inibitori di PDK1/Akt: G22 e G24	p. 59
5.3 Analisi della citotossicità di gemcitabina e composti inibitori di Akt	p. 60
5.4 Analisi della fosforilazione della proteina Akt	p. 62
5.5 Estrazione del DNA cellulare	p. 64
5.6 PCR quantitativa con discriminazione allelica	p. 66
5.7 Analisi della modulazione del ciclo cellulare	p. 69
6. Risultati	p. 71
6.1 Citotossicità di gemcitabina e composti inibitori di Akt	p. 71
6.2 Riduzione della fosforilazione di Akt	p. 74
6.3 PCR quantitativa con discriminazione allelica	p. 78
6.4 Modulazione del ciclo cellulare indotta dai composti inibitori di Akt.	p. 79
7. Discussione	p. 81
Bibliografia	p. 86

Riassunto

Il cancro del polmone rappresenta il tumore con il più alto tasso di mortalità e con la maggiore incidenza in tutto il mondo. Alla diagnosi oltre l'80% dei casi di carcinoma polmonare presenta il sottotipo istologico non a piccole cellule (NSCLC). Ancor oggi la diagnosi di tale tumore è sfortunatamente tardiva, in media 7 mesi dopo la comparsa dei sintomi, e il 75% dei pazienti presenta al momento della diagnosi uno stadio localmente avanzato o metastatico. Per questi casi lo standard terapeutico è rappresentato dalla chemioterapia, che ha come obiettivo primario la palliazione dei sintomi, il prolungamento della sopravvivenza e il miglioramento delle condizioni generali.

Il farmaco chemioterapico gemcitabina è stato approvato come terapia di prima linea nei casi avanzati di NSCLC. Gemcitabina è un analogo nucleoside della deossicitidina, il suo meccanismo d'azione consiste nell'alterazione della sintesi degli acidi nucleici mediante meccanismi di competizione e incorporazione di falsi substrati. Inoltre, è stato dimostrato che tale farmaco è responsabile dell'induzione apoptotica in diverse linee cellulari, incluse quelle di carcinoma polmonare e, in relazione a questo, determina una riduzione dei livelli della proteina antiapoptotica Akt attiva.

Negli ultimi anni nuove strategie terapeutiche hanno assunto una grande rilevanza, fra queste ci sono i farmaci biologici a bersaglio molecolare. Questi composti sono in grado di bloccare la crescita tumorale attraverso l'inibizione di molecole implicate nei meccanismi di sopravvivenza cellulare. Recentemente è stato dimostrato che la via del segnale PI3K/PDK1/Akt risulta frequentemente alterata in diversi tipi di tumore nell'uomo. Questo pathway ricopre un ruolo fondamentale non soltanto nello sviluppo neoplastico, ma anche nella potenziale risposta del tumore al trattamento. La proteina Akt, una volta attivata ad opera degli enzimi PI3K e PDK1, svolge un ruolo chiave nella

tumorigenesi in quanto promuove la crescita, la sopravvivenza e l'angiogenesi delle cellule tumorali. La glicogeno sintasi chinasi-3, i membri della famiglia Forkhead, la ciclina D, gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendente p27 e p21, la pro-caspasi 9 e NF- κ B sono solo alcuni dei target di Akt. Pertanto l'inibizione del segnale mediato da Akt rappresenta un interessante e valido strumento al fine di migliorare l'effetto delle terapie anticancro esistenti.

In base a quanto appena riportato, si è ipotizzato che l'utilizzo di farmaci inibitori di Akt in associazione con gemcitabina favorisca l'inibizione del segnale di sopravvivenza evocato dalla proteina Akt, consentendo così una maggiore efficacia del farmaco standard anche nei casi di chemioresistenza. Lo scopo della presente tesi è stato analizzare l'eventuale effetto citotossico risultante dall'associazione del farmaco gemcitabina, con due nuovi composti inibitori di Akt, G22 e G24, su linee cellulari di cancro del polmone umano NSCLC.

Nella prima parte del lavoro sperimentale è stata valutata l'azione antitumorale sia dei singoli composti inibitori di Akt, sia delle loro associazioni con gemcitabina, mediante test di citotossicità cellulare. L'effetto inibitore sulla crescita cellulare è stato analizzato mediante conteggio diretto delle cellule residue vive dopo i trattamenti chemioterapici. Sulla base della percentuale di inibizione, è stata poi calcolata per ogni trattamento la concentrazione inibente il 50% della crescita cellulare definita IC₅₀. Successivamente, è stata condotta un'analisi dello stato fosforilativo della proteina Akt dopo ogni trattamento attraverso saggi immunoenzimatici ELISA, per verificare l'azione dei composti inibitori di Akt e l'eventuale effetto sinergico dell'associazione con gemcitabina. Successivamente è stata eseguita mediante Real Time PCR una discriminazione allelica per analizzare i due polimorfismi a singolo nucleotide, o SNPs, di Akt nelle linee cellulari in esame (SNP 3/4). L'aplotipo maggiore di entrambi gli

SNPs, rispettivamente CC e GG, determina una maggiore quantità di Akt e pertanto una minore risposta apoptotica, influenzando così l'eventuale risposta cellulare al trattamento farmacologico. Infine, per valutare le eventuali modulazioni del ciclo cellulare indotte da G22 e G24 è stata effettuata un'analisi con citofluorimetria a flusso, che prevede l'utilizzo dello ioduro di propidio come marcatore del DNA.

I risultati della citotossicità dei singoli composti inibitori di Akt mostrano un effetto citotossico dose dipendente. La successiva analisi delle combinazioni ha dimostrato che il trattamento in cui la gemcitabina precede entrambi i composti ha un effetto sinergico rispetto alla combinazione inversa, con una maggiore efficacia per il farmaco G24.

Dall'analisi dello stato fosforilativo di Akt emerge che il composto G24 determina riduzioni consistenti della fosforilazione di tale proteina (da - 36,5% a -59,4%, rispettivamente nelle HCC827 e nelle A549), a differenza del composto G22 che mostra una riduzione del 22,39% solo nella linea A549. Lo studio degli SNP di *akt1* ha riportato lo stesso genotipo per le due linee cellulari in esame, omozigoti per l'allele wild type dello SNP3 e eterozigoti per lo SNP4. Pertanto i polimorfismi analizzati non sono in grado di giustificare la diversa risposta delle linee cellulari al trattamento.

Infine l'analisi del ciclo cellulare ha evidenziato un blocco delle cellule nella fase G1 dopo il trattamento con i composti G22 e G24 in entrambe le linee in studio. Questo dato potrebbe spiegare l'effetto di antagonismo delle combinazioni in cui i composti precedono la gemcitabina, dal momento che la gemcitabina viene incorporata nelle cellule in fase di attiva proliferazione (fase S).

I risultati preliminari di questo studio evidenziano l'esistenza di un'interazione di tipo sinergica sequenza specifica tra questi nuovi inibitori di Akt, G22 e G24 e la

gemcitabina, in parte giustificato dalla modulazione del ciclo cellulare e dallo stato fosforilativo della proteina Akt.

Sarà necessario approfondire il meccanismo d'azione di tali molecole, in quanto il progresso di queste indagini è finalizzato da un lato al potenziamento della risposta tumorale al trattamento farmacologico standard nei pazienti resistenti, e dall'altro alla riduzione degli effetti tossici collaterali causati dalle alte dosi dei farmaci chemioterapici.