

Sintesi

Lo studio dell'identificazione dei target molecolari e del meccanismo d'azione dei composti vegetali gioca un ruolo critico nei processi di "drug discovery". La conoscenza della bioattività delle molecole vegetali può portare a diversi vantaggi: in primis, è possibile conoscere a pieno il loro potenziale terapeutico; inoltre, può essere possibile identificare i loro effetti collaterali, la loro tossicità e anche studi di relazione struttura-attività.

Tale progetto di ricerca si avvale di un approccio di "*Reverse Chemical Genetics*", che si fonda sullo screening di librerie di piccole molecole (nel nostro caso molecole vegetale opportunamente fornite dal Dipartimento di Farmacia (DIFARMA)-Prodotti Naturali Bioattivi dell'Università di Salerno (UNISA), Fisciano, Italy) capaci di interagire con specifiche proteine target e sulla validazione dell'interazione proteina/molecola vegetale. Nel mio progetto di Dottorato mi sono dedicato allo studio di tre proteine target, over-esprese nelle cellule tumorali e identificate come potenziali markers in tali linee cellulari: Nucleolina, Heat Shock Protein 70 (Hsp70) e Heat Shock Protein 90 (Hsp90).

La Nucleolina (NCL) è una proteina multifunzionale coinvolta in molti processi quali trascrizione del DNA, biogenesi dei ribosomi e regolazione degli mRNA di proteine anti-apoptiche e proliferative come AKT1, Bcl2, p53. Lo screening di una libreria di diterpeni a struttura *ent*-kauranica ed *ent*-trachilobanica è stato condotto mediante *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA) su cellule Jurkat (cellule leucemiche) ed HeLa (cellule tumorali della cervice uterine), identificando come principale ligando di Nucleolina l'acido 6,19-diidrossi-*ent*-trachiloban-17-oico (**12**) isolato da *Psiadia punctulata* ((Vatke) Asteraceae). L'interazione Nucleolina/**12** è stata validata in cellule HeLa mediante CETSA e *Drug Affinity Responsive Target Stability* (DARTS). L'interazione Nucleolin RNA Binding Domains 1-2/**12** è stata investigata mediante *Saturation Transfer Difference NMR* (STD-NMR), *WaterLOGSY* e *Surface Plasmon Resonance* (SPR): nessuna interazione è stata osservata con questi due domini di Nucleolina. Successivamente, il meccanismo d'azione di tale diterpene è stato investigato in cellule HeLa utilizzando Citometria a Flusso (blocco in fase sub G₀/G₁), analisi Western Blot (riduzione intracellulare degli mRNA di AKT1 e Bcl2), MTT (IC₅₀: 20 ± 1 μM), saggi di Sintesi Proteica e di "Wound Healing" (riduzione del 20% della migrazione cellulare). Pertanto, l'acido 6,19-diidrossi-*ent*-trachiloban-17-oico (**12**) può essere considerato come un nuovo modulatore di Nucleolina.

Il secondo target oggetto di studio del mio dottorato è stato lo chaperon molecolare Hsp70. E' stata testata, su tale proteina, una libreria diterpenica mediante *Surface Plasmon Resonance* (SPR), al fine di selezionare putativi ligandi di Hsp70. I risultati SPR hanno mostrato l'*ent*-7β-acetossi,18-

idrossi-15 α ,16 α -epossikaurano (noto come epossisiderolo o composto **27**, isolato da varie specie di *Sideritis* (Lamiaceae)) quale migliore interattore di Hsp70 (K_D : 54 ± 1.2 nM). L'abilità dell'epossisiderolo di interagire con l'Hsp70 e di modularne l'attività è stata studiata mediante Spettrometria di Massa (legame di tipo non-covalente), DARTS e WB. Inoltre, tale diterpene ha mostrato citotossicità in cellule HeLa attraverso saggio MTT (IC_{50} : 20 ± 0.9 μ M), Citometria a Flusso (blocco in fase G₂/M e subG₀/G₁) e WB per il suo effetto sui livelli intracellulari di Hsp70, Hsp90, delle proteine "client" di Hsp70, e sui livelli citosolici e di membrana dello chaperon (riduzione). Infine, sono stati condotti: saggio ATPasico (50% di riduzione dose-dipendente) e studi di molecular docking (interazione con il dominio N-terminale di Hsp70). In conclusione, in questo studio l'epossisiderolo è stato identificato come nuovo promettente inibitore di Hsp70 mediante tecniche *cell-free* e *cell-based*.

Un'altra proteina oggetto di studio in tale progetto è stata Hsp90. Diterpeni a struttura fusicoccanica isolati da *Hypoestes forsskaolii* ((Vahl) Acanthaceae), abietanica da *Zhumeria majdae* ((Rech.f. & Wendelbo) Lamiaceae) e da diverse specie di *Salvia* (Lamiaceae) sono stati testati su Hsp90 mediante SPR e MTT in cellule HeLa, Jurkat e MCF7 (cellule tumorali del seno), selezionando il 18-idrossi-ipoestenone (**6**) e il lanugone Q (**20**) come ligandi di Hsp90. Il composto **6** e **20** hanno mostrato citotossicità (IC_{50}) rispettivamente di 18 ± 1 μ M in HeLa e 20 ± 2 μ M in MCF7. Inoltre, sono state condotte analisi citofluorimetriche e WB: arresto in fase G₂/M del ciclo cellulare e riduzione dei livelli di p-Cdc2, pAKT1 e pERK1 in cellule HeLa dopo trattamento con **6** (10 μ M and 20 μ M for 48h); riduzione dei livelli di pERK, pAKT, ciclina A in MCF7 dopo 48h di trattamento con **20** (18 μ M). Tali diterpeni sono stati testati su Hsp90 anche mediante saggio di attività ATPasica, portando a riduzione dose-dipendente dell'idrolisi dell'ATP con il composto **6** (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M), laddove nessuna inibizione è stata indotta da **20**. Successivamente, studi di molecular docking sono stati condotti con **6**, e l'analisi computazionale ha suggerito un'interazione nel dominio C-terminale dello chaperon. In conclusione, in questo studio il 18-idrossi-ipoestenone e il lanugone Q sono stati identificati come nuovi interattori di Hsp90, capaci di modulare la sua attività e i livelli delle sue proteine "client".