

Uzasadnienie projektu i cele badawcze

Rak płuc jest najczęściej diagnozowanym nowotworem i główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów u mężczyzn i kobiet na całym świecie. Metabolizm komórki, mitochondria i mikrośrodowisko nowotworu stanowią ważne cele farmakologiczne dla opracowania nowych leków przeciwnowotworowych. Kinaza adenylanowa 4 (AK4) jest enzymem obecnym w mitochondriach komórki, który reguluje metabolizm i homeostazę nukleotydów adeninowych i guaninowych. W ciągu ostatniej dekady ludzka AK4 stała się nowym markerem diagnostycznym i prognostycznym oraz celem terapeutycznym dla różnych rodzajów raka, w szczególności raka płuc. Stwierdzono, że AK4 reguluje różne procesy związane z biologią i patologią komórek, np. wzrost (proliferacja) i śmierć (apoptoza) komórki, oddychanie komórkowe, przerzutowanie komórek nowotworowych oraz oporność na leki przeciwnowotworowe i radioterapię. AK4 zmienia (przeprogramowuje) metabolizm komórkowy, aby promować wzrost nowotworu i przerzuty. Ponadto, najnowsze odkrycia ujawniają patologiczną rolę AK4 w nienowotworowych chorobach płuc z wysokim tempem proliferacji komórek oraz w chorobach zapalnych. Jednak brak zatwierdzonych leków celujących w kinazę AK4 czy jakichkolwiek obiecujących selektywnych inhibitorów (spowalniaczy) tego enzymu utrudnia badania nad znaczeniem patologicznym i potencjałem terapeutycznym AK4 w różnych jednostkach klinicznych. Podejście odwrotnej farmakologii, które polega na testowaniu bibliotek związków na interesującym nas celu (np. enzym, receptor), jest pierwszym krokiem w nowoczesnym odkrywaniu leków. Pierwszym celem projektu badawczego jest odkrycie małowzrostowych inhibitorów ludzkiej AK4 w oparciu o wysokoprzepustowe badanie przesiewowe (ang. high-throughput screening, HTS) dużego zbioru różnorodnych związków chemicznych i biologicznie czynnych molekuł. Drugim celem jest potwierdzenie i ocena wybranych związków, a następnie synteza i szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna i strukturalna ich pochodnych (ang. hit expansion phase). W ramach wczesnego odkrywania leków będziemy badać cytotoksyczność *in vitro*, sposób wiązania inhibitorów z enzymem, ich selektywność oraz właściwości farmakokinetyczne, wykorzystując zarówno techniki komputerowego wspomaganie projektowania leków (ang. computer-aided drug design, CADD) jak i podejścia eksperymentalne. Trzeci cel obejmuje ocenę biologiczną najsilniejszych inhibitorów AK4 z zastosowaniem modeli *in vitro* (ludzkie linie komórek niedrobnokomórkowego raka płuc oraz przedklinicznych modeli *ex vivo* (tzw. precyzyjnie pocięte ludzkie skrawki płuc, ang. human precision-lung cut slices). Oprócz szczegółowej analizy cytotoksyczności zbadamy efekt tych związków na m.in. wzrost, śmierć, inwazję, metabolizm, szlaki transdukcji sygnału komórek nowotworowych i produkcję czynników prozapalnych. Zaplanowane badania pozwolą nam w dokładny sposób określić mechanizm działania i przedkliczną aktywność przeciwnowotworową inhibitorów AK4.

Zastosowane metody badawcze

Cele projektu zostaną osiągnięte poprzez integrację wielu technik i podejść z następujących dyscyplin: chemii organicznej i fizycznej, farmakologii molekularnej, biochemii, biologii molekularnej, komórkowej i tkankowej oraz metod obliczeniowych. Ludzka kinaza AK4 zostanie wyprodukowana jako białko rekombinowane stosując bakteryjny system ekspresyjny. Przeszukiwanie bibliotek zostanie przeprowadzone przy użyciu testu opartego na luminescencji, a trafione związki i ich zdolność do hamowania AK4 zostaną potwierdzone i ocenione zaawansowanymi technikami analitycznymi (wysokosprawna chromatografia cieczowa) i spektroskopią fluorescencyjną. Ustalimy, jaka jest skuteczność, selektywność i mechanizm działania inhibitorów AK4. Ocena biologiczna zostanie przeprowadzona ustalonymi metodami stosowanymi w biologii komórki i tkanek oraz przy użyciu najnowocześniejszych technik, takich jak profilowanie kinomu technologią mikromacierzy peptydowych PamChip, analiza metabolizmu komórkowego w czasie rzeczywistym technologią Seahorse extracellular flux, czy też technika sekwencjonowana RNA (bulk RNA sequencing) pozwalająca na analizę całego transkryptomu z wysoką wydajnością.

Wpływ i znaczenie projektu

Mimo szerokiego i istotnego znaczenia AK4 w powstawaniu nowotworów i rosnącego zainteresowania tym enzymem na całym świecie, do tej pory nie opracowano żadnych specyficznych inhibitorów i leków celujących w ten enzym. Stąd, jedyną opcją badania roli AK4 w żywych systemach i progresji choroby są drogie i trudne technicznie manipulacje genetyczne lub modele przeszczepu ksenogenicznego. Opracowanie przez nas pierwszych małowzrostowych inhibitorów celujących w kinazę AK4 dostarczy pierwszego narzędzia farmakologicznego, które będzie podejściem bardziej elastycznym, prostszym, tańszym i szybszym. Otworzy to nowy rozdział w światowych badaniach nad AK4. Wyznaczone mechanizmy hamowania i działania, selektywność oraz przedkliczny potencjał przeciwnowotworowy pierwszych inhibitorów AK4 pozwolą nam określić zależności struktura-aktywność oraz kluczowe interakcje między inhibitorem i AK4, a w dalszej przyszłości rozpocząć fazy optymalizacji cząsteczki wiodącej i dalszych badań klinicznych. Tym samym realizacja proponowanego projektu badawczego kładzie podwaliny pod nowatorskie terapie raka płuc i innych chorób, w których dojdzie do rozwoju i progresji odkryto patologiczną rolę AK4.