

UTILIZAREA VECTORILOR RETROVIRALI IN SCREENINGUL PRECLINIC DE LIBRARIILE MOLECULARE

Carmen C. Diaconu¹, Alexandra Dusa², Stefan N. Constantinescu²

1) Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, Bucuresti

2) Signal Transduction Unit, UCL, si Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles

Introducere: Screeningul preclinic de compusi este o etapa critica in procesul de identificare a unor noi medicamente. Scopul principal al dezvoltarii metodelor de screening “high-throughput” (HTS) este identificarea rapida si corecta a unor compusi activi prin analiza unui numar mare de molecule. Desi sistemele celulare reprezinta o modalitate atractiva de caracterizare a genelor si/sau proteinelor tinta si a activitatii unor compusi, dezvoltarea unor astfel de sisteme robuste, utile in screeningul HTS este inca in stadiu initial.

Pentru a testa strategia noastra de screening, am investigat o colectie de molecule pe un panel de linii celulare dependente de tirozinkinaze JAK. JAK2 V617F identificata in 2005 ca fiind molecula “cheie” implicata in patogeneza moleculara a neoplasmelor mieloproliferative este in prezent investigata foarte intens in ceea ce priveste posibilitatile de inhibitie. Avand in vedere rolul esential al formei normale a JAK2 (JAK2wt) in hematopoieza si in activitatea diferitor citokine si hormoni, inhibitia selectiva a formei mutante ar putea duce la identificarea unor molecule cu potential terapeutic ridicat si fara efecte adverse.

Material si metoda. Sistemul nostru HTS s-a bazat pe generarea unor linii celulare hematopoietice (Ba/F3) care exprima stabil in urma transductiei cu retrovirusuri, forma normala a JAK2, forma mutanta JAK2V617F si respectiv JAK1V658F, o forma mutanta constitutiv activa a JAK1, omologa JAK2 V617F. ADNc pentru formele mutante ale JAK1 si JAK2 s-a obtinut prin mutageneza *in situ* utilizand vectori retrovirali bicistronici.

Rezultate: Sistemul stabilit a permis investigarea unei colectii de aprox. 2000 molecule, in vederea identificarii unor inhibitori selectivi pentru JAK2V617F versus JAK2wt si JAK1V658F, avand in vedere omologia si plasticitatea lor structurala. 4-5% din compusii investigati au inhibat neselectiv proliferarea celulelor Ba/F3 JAK2V617F, Ba/F3 JAK2wt si Ba/F3 JAK1V658F. Doar 2% dintre compusi au inhibat preferential JAK2V617F. Pentru a identifica compusi cu potential mare de inhibitie si selectivitate va fi necesar screeningul unor librarii mai mari de molecule.

Concluzii: Aceeasi strategie ar putea fi adaptata la screeningul unor librarii de anticorpi, siARN si ADNc, utilizand paneluri de teste celulare bazate pe diferite familii de gene (kinaze, proteaze, receptori, co-receptori). Metoda permite screeningul unui numar mare de compusi pe sisteme care mentin conformatia fiziologica a moleculelor tinta si pot investiga simultan toxicitatea celulara neselectiva.