

# Genetica chimica: un approccio alternativo per lo studio di sistemi biologici complessi mediante l'utilizzo di *small-molecules*

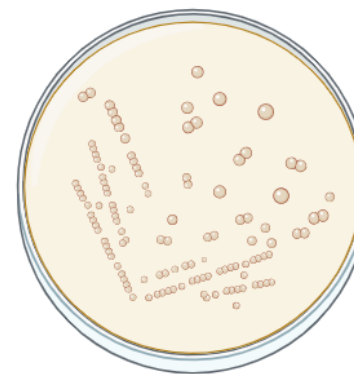
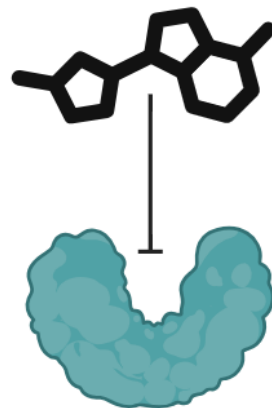
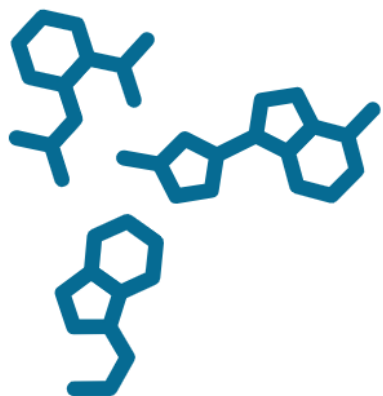
**CHEMISTRY**  
SMALL MOLECULES



**CHEMICAL  
GENETICS**



**BIOLOGY**  
BIOLOGICAL  
MACROMOLECULES  
PROTEIN



**Basi teoriche e casi studio**

[chiara.longo@uniroma1.it](mailto:chiara.longo@uniroma1.it)

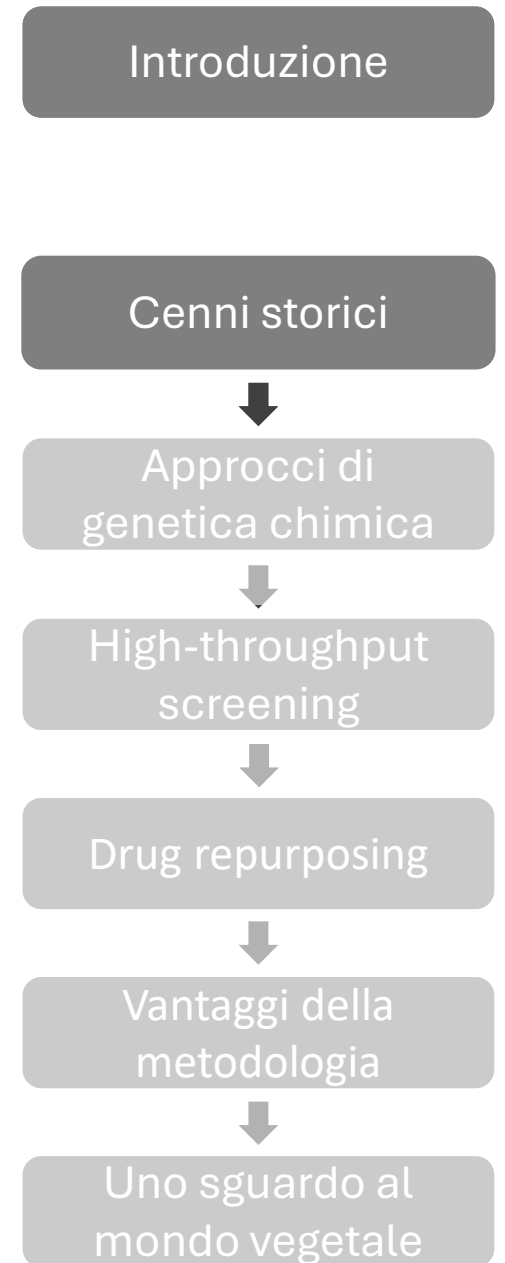
**Chiara Longo, PhD**

# In questa lezione:

- Genetica chimica: introduzione
- Caso studio I: *small-molecules* nella ricerca contro il cancro e per lo studio dell'epigenetica
- Casi studio II: *repurposing* di *small-molecules* in pianta
- Conclusioni

# Cenni storici

- Anni '60-'80: Prime applicazioni di molecole per perturbare processi biologici
- Anni '90: Definizione formale del termine 'chemical genetics'
- 2000-2010: Espansione della chemical biology e HT screening
- 2010- Oggi: Integrazione con genomica, farmacologia, e nuove tecnologie



# Cenni storici

## Esempi storici di successo

- **Colchicina**: usata per studiare la **tubulina** e i **microtubuli**. (Taylor et al., 1965)-mitosi  
**Paclitaxel (Taxol)**: stabilizzatore dei **microtubuli**. (Jordan et al., 1999) -mitosi
- **Reserpina** e **L-DOPA**: fondamentali per scoprire la trasmissione dopaminergica (Carlsson et al., 1999) (Nobel).
- **Phorbol diesteri**: per lo studio della proteina chinasi C (PKC) e del signaling cellulare. (Nishizuka et al., 1985)
- **Rapamicina, FK506**: studiati per comprendere i segnali tra citoplasma e nucleo. (Liu et al., 1991)
- **Trapoxina**: ha portato all'identificazione degli **istone deacetilasi** (HDAC). (Taunton et al., 1996)

Introduzione

Cenni storici

Approcci di  
genetica chimica

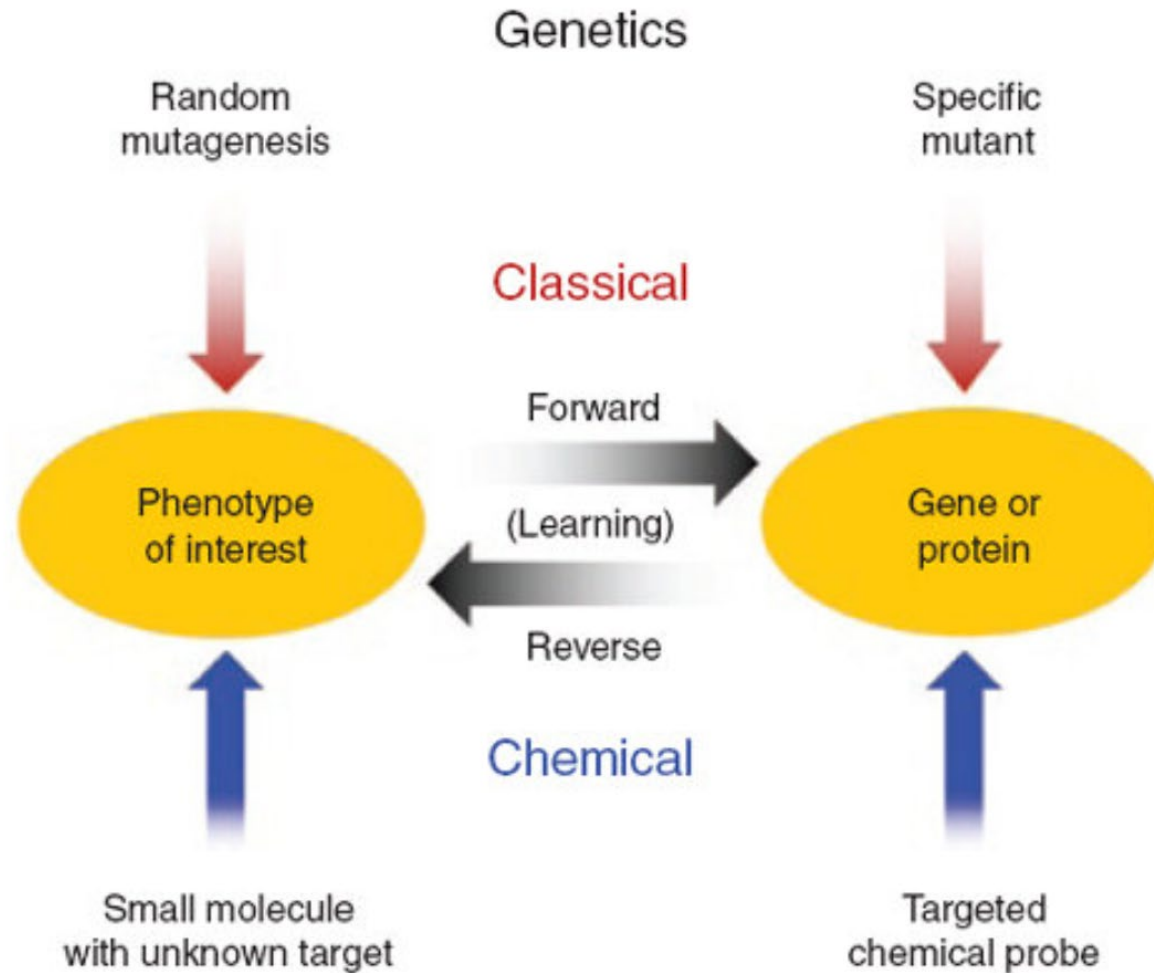
High-throughput  
screening

Drug repurposing

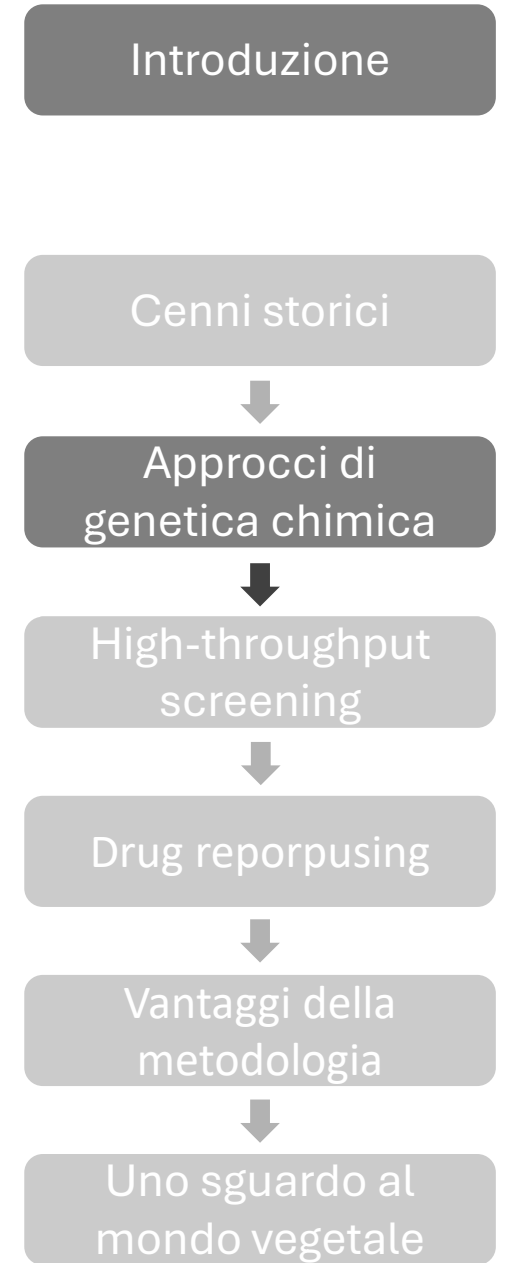
Vantaggi della  
metodologia

Uno sguardo al  
mondo vegetale

# Chemical genetics



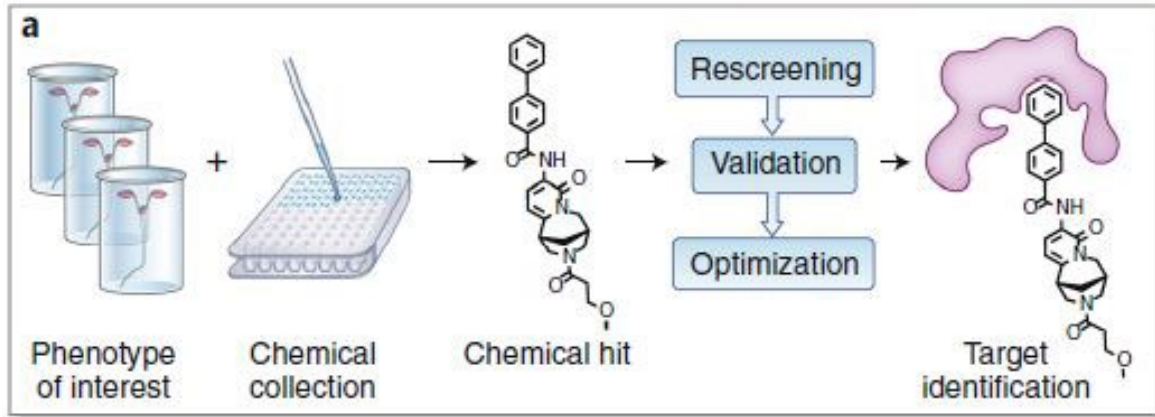
“Chemical genetics enables a dynamic, reversible and protein-level perturbation of biological systems, complementing traditional gene-based approaches.”



# Step sperimentali nei due approcci

(Hypothesis-generating)

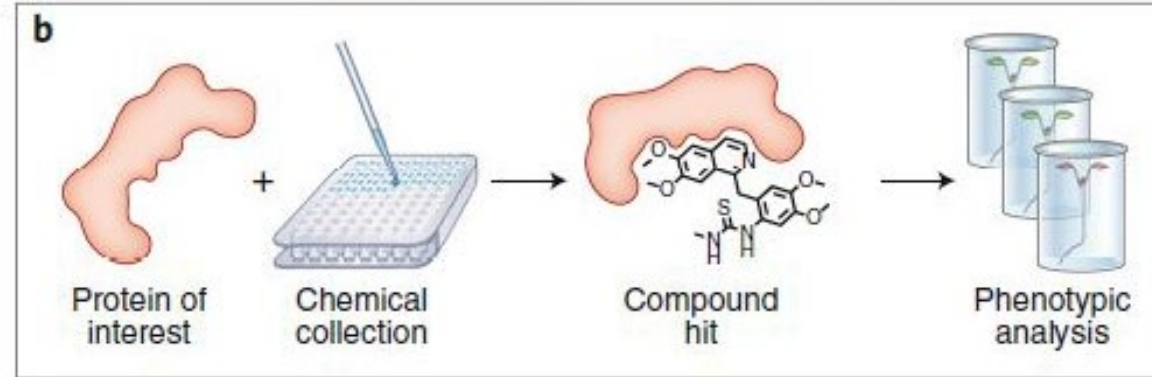
Forward chemical genetics



Partendo da un fenotipo noto, testiamo molecole che lo inducono. Quindi cerchiamo e validiamo il target della molecola. Alcune problematiche...

(Hypothesis-based)

Reverse chemical genetics



Partendo da un target di interesse, testiamo molecole bioattive. Quindi cerchiamo quali fenotipi vengono indotti per ricostruire la funzione.

Introduzione

Cenni storici

Approcci di genetica chimica

High-throughput screening

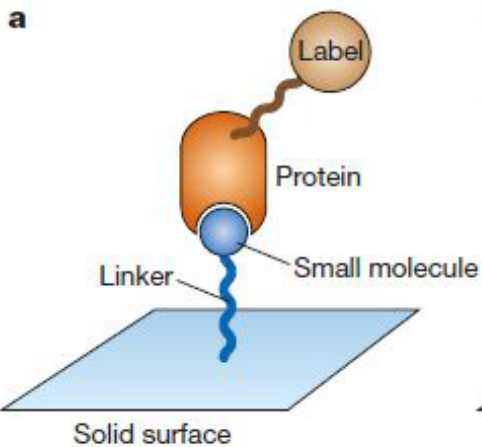
Drug repurposing

Vantaggi della metodologia

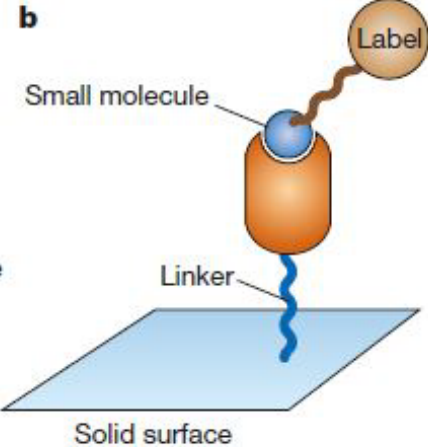
Uno sguardo al mondo vegetale

# Metodi di screening

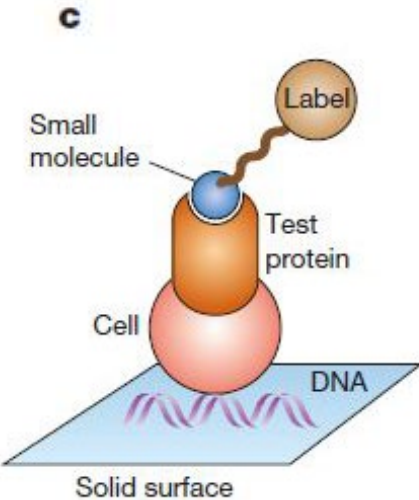
Small molecules covalently linked to a surface



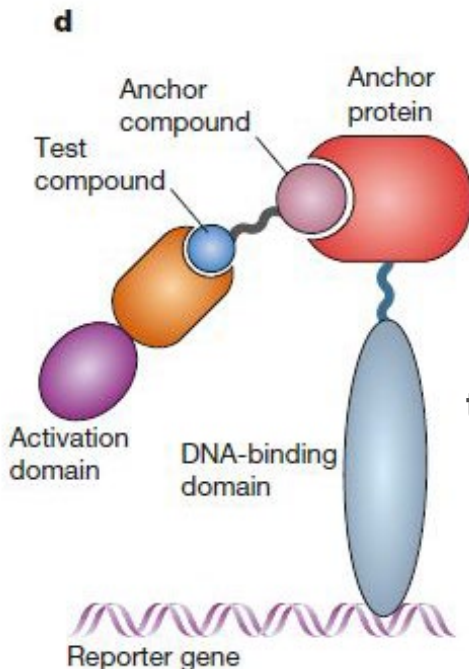
Protein immobilized on a surface



Cells microarray that overexpress desired protein



Yeast threehybrid system



Introduzione

Cenni storici

Approcci di genetica chimica

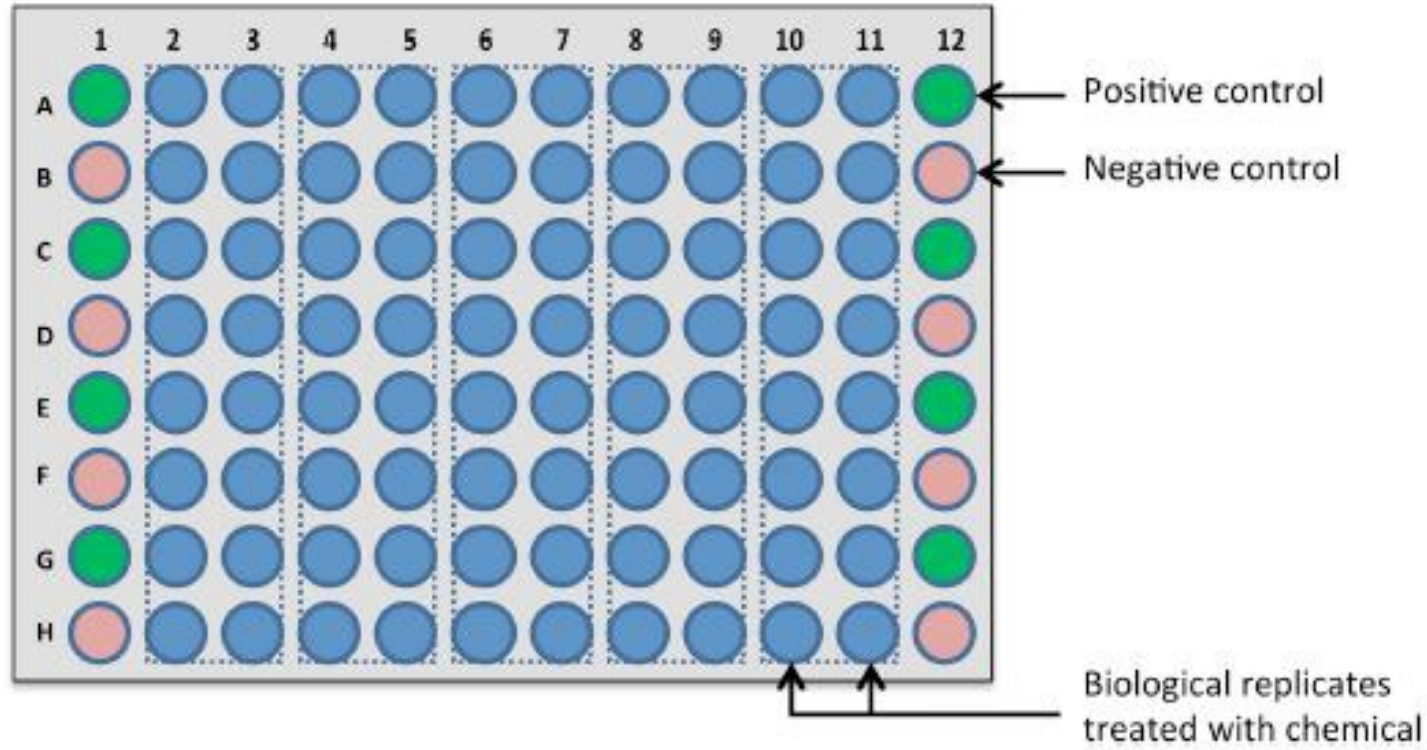
High-throughput screening

Drug repurposing

Vantaggi della metodologia

Uno sguardo al mondo vegetale

# High-throughput screening – Design della plate



Ciascuna molecola viene testata in doppia replica biologica in una plate da 96 pozzetti, consentendo l'analisi di 40 molecole. Le colonne 1 e 12 sono dedicate ai controlli, 8 positivi e 8 negativi, distribuiti in ordine alternato.

Introduzione

Cenni storici

Approcci di  
genetica chimica

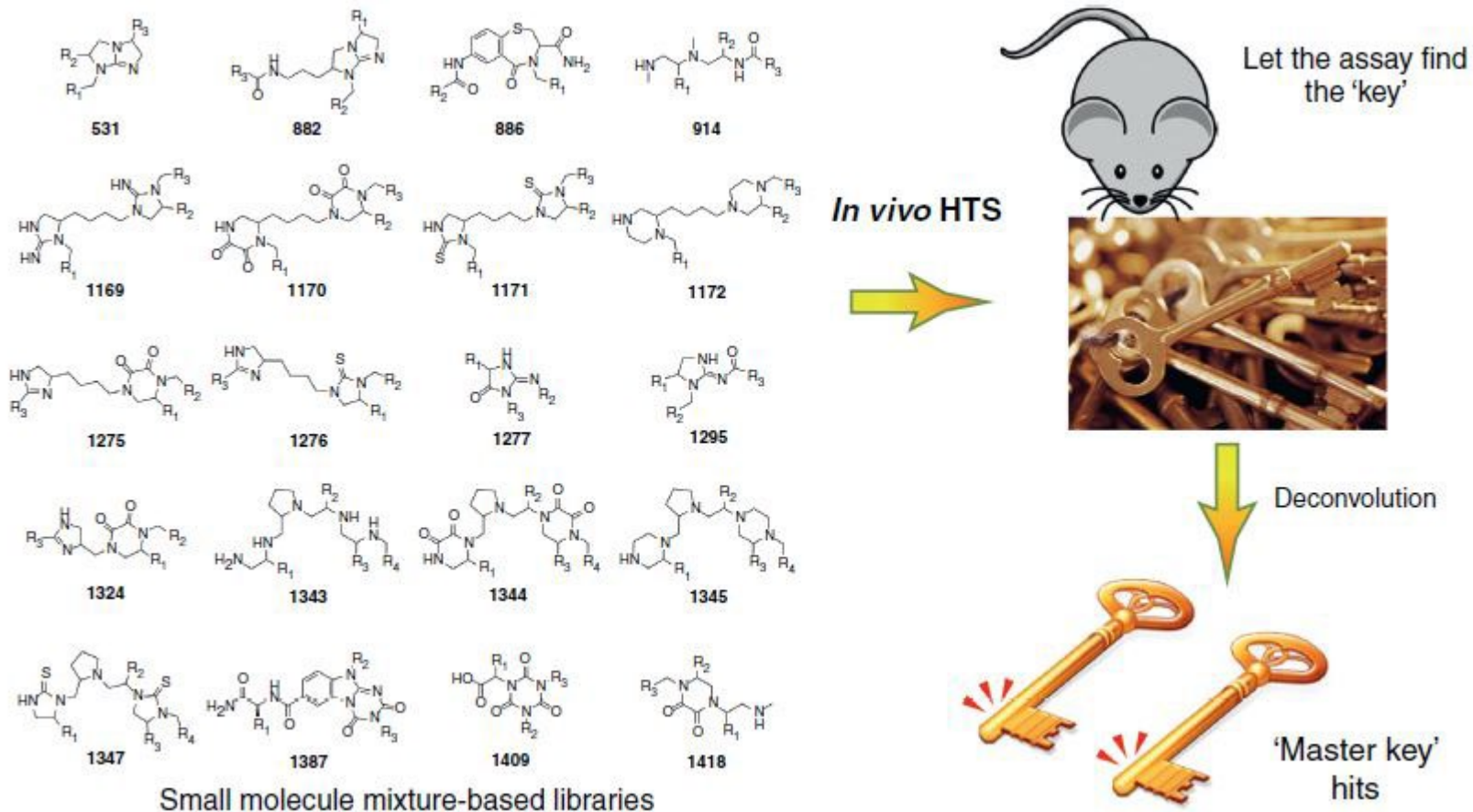
High-throughput  
screening

Drug repurposing

Vantaggi della  
metodologia

Uno sguardo al  
mondo vegetale

# High-throughput screening



Introduzione

Cenni storici

Approcci di  
genetica chimica

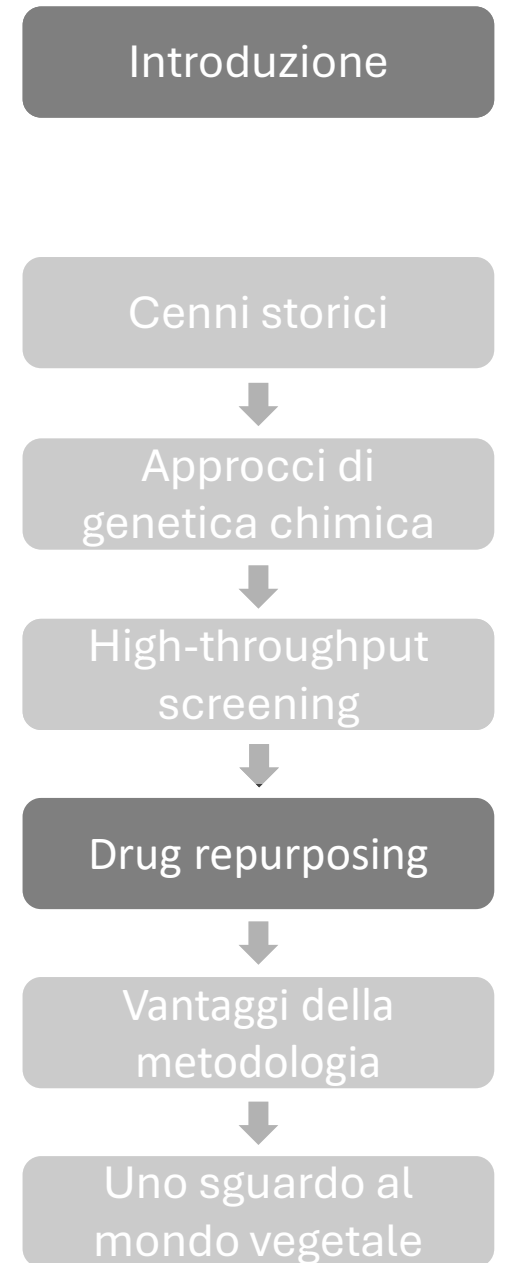
High-throughput  
screening

Drug repurposing

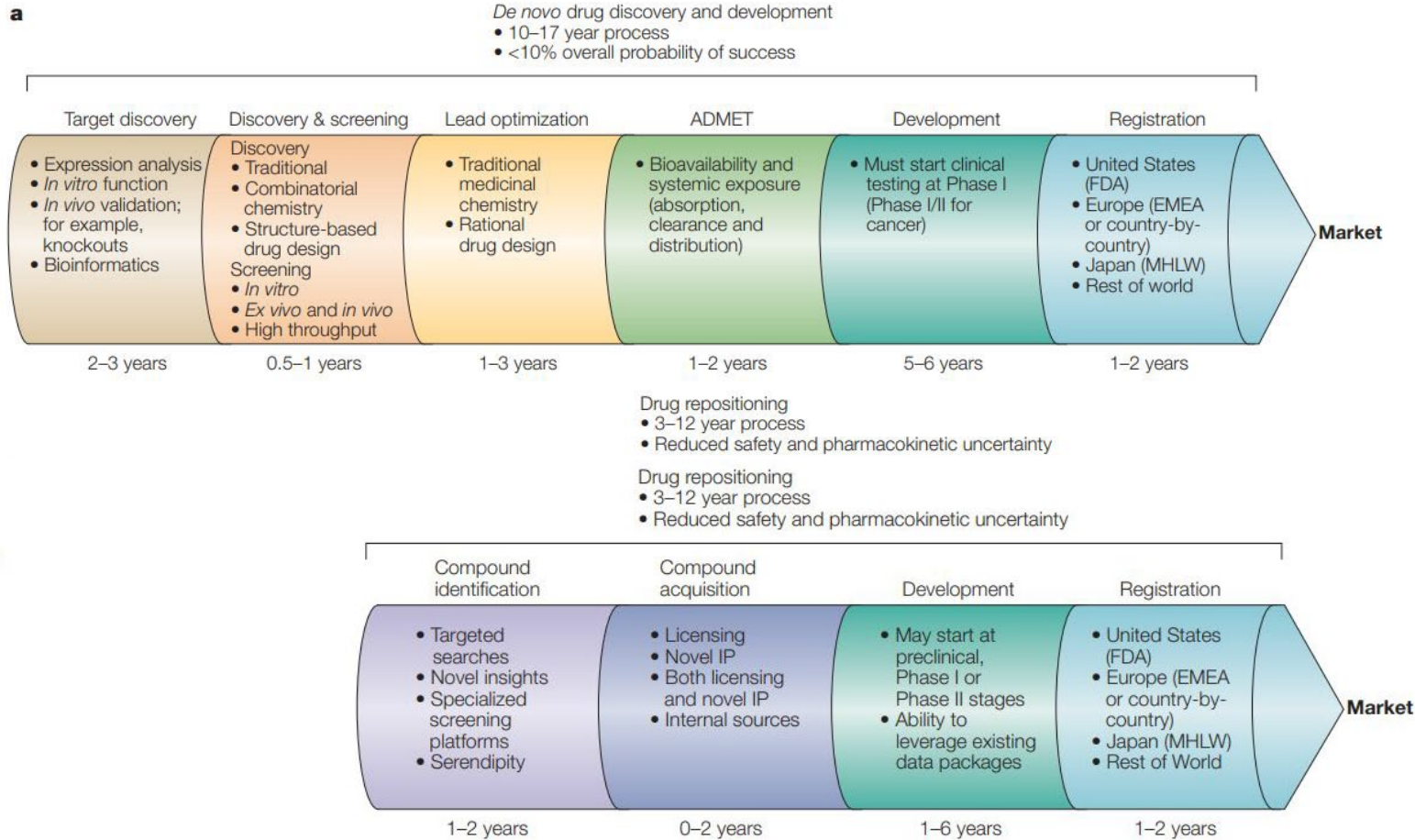
Vantaggi della  
metodologia

Uno sguardo al  
mondo vegetale

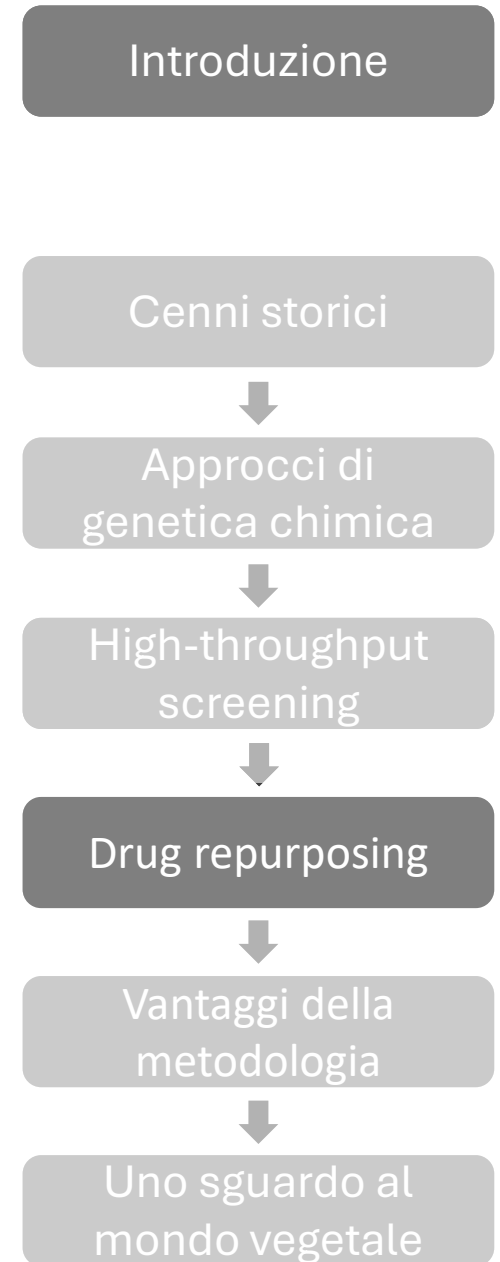
# Quali small molecules?



# Processo di drug discovery *de novo* vs repurposing



Spese e tempi di Ricerca e Sviluppo più alte  
 Numero di molecole approvate più basso  
 Repurposing Indice Risk-Reward molto più basso



# Risk-reward



Introduzione

Cenni storici

Approcci di genetica chimica

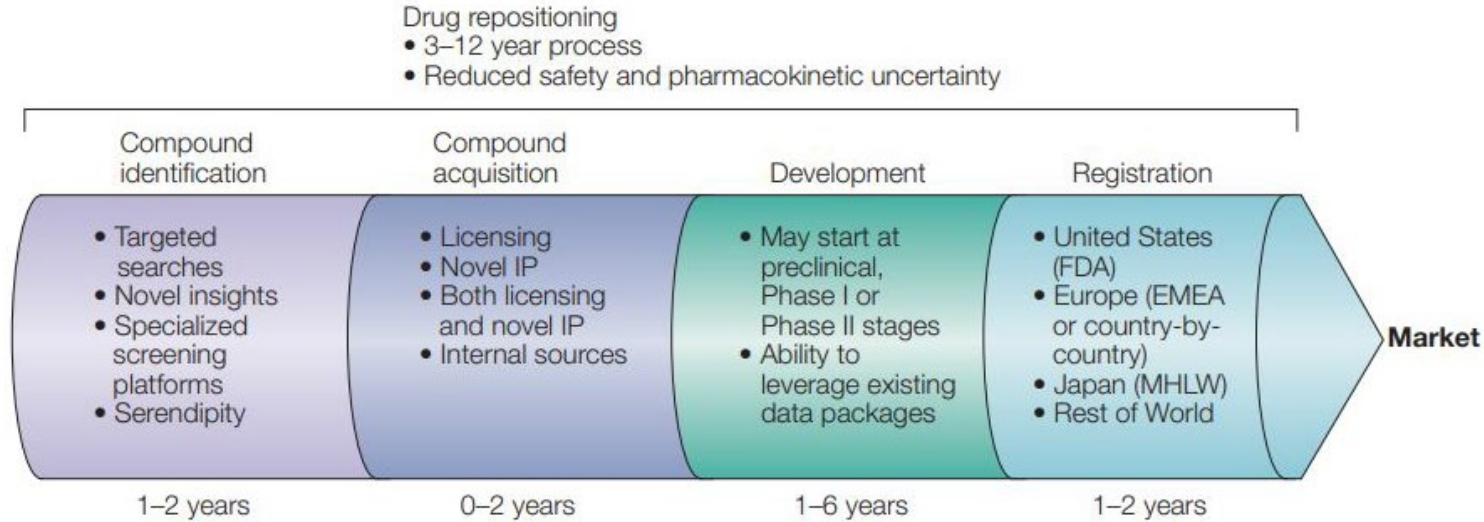
High-throughput screening

Drug repurposing

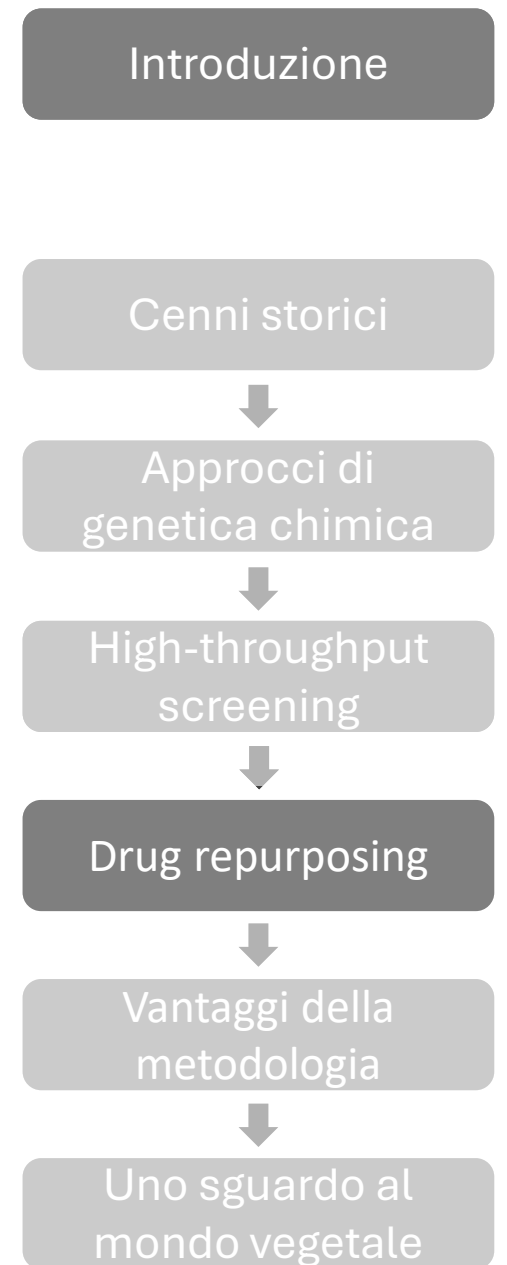
Vantaggi della metodologia

Uno sguardo al mondo vegetale

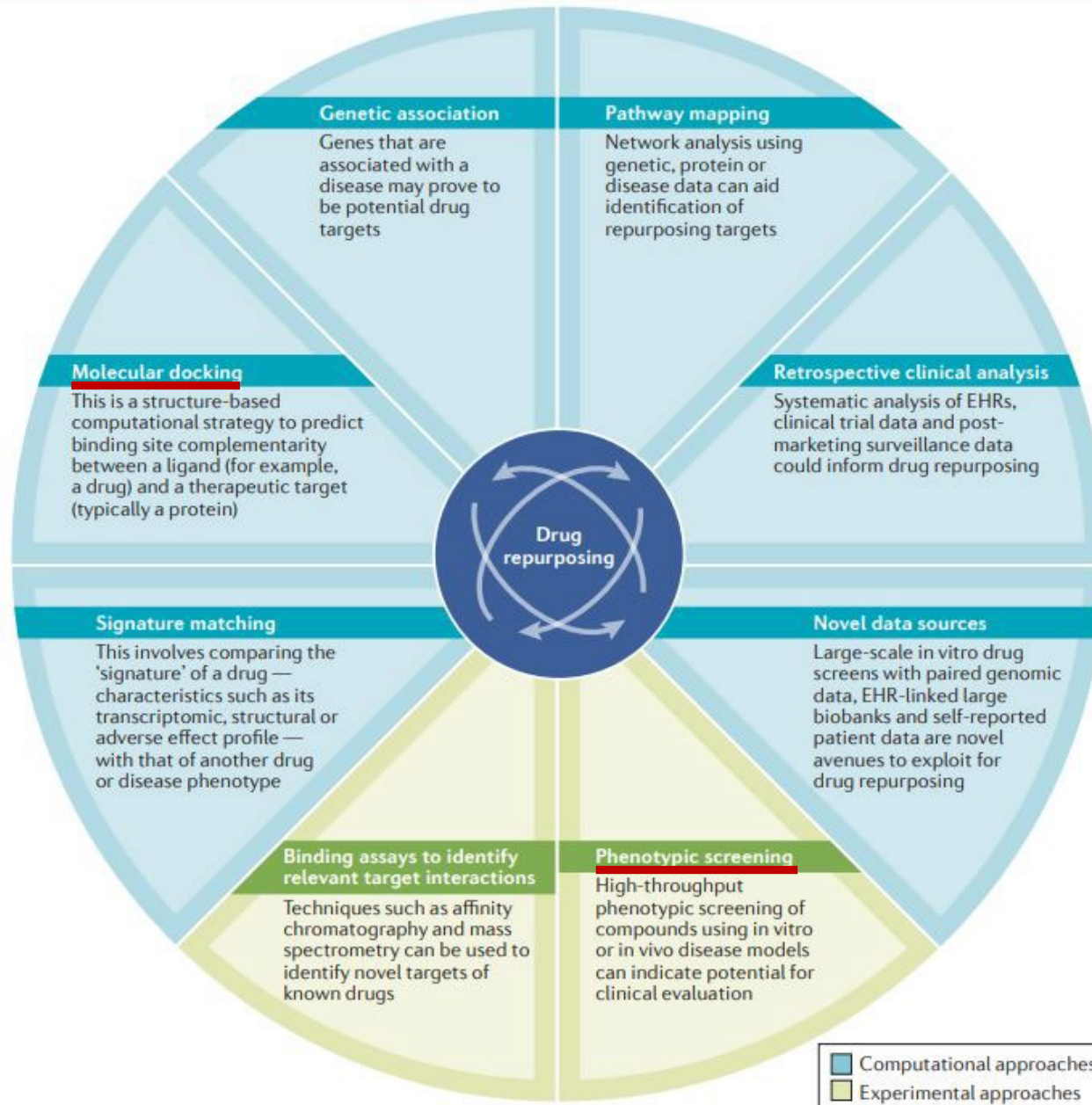
# Processo di drug repurposing



Strategie di *repurposing* permettono di ridurre le tempistiche di ricerca e sviluppo assicurando un ridotto fattore di rischio, grazie alle precedenti fasi di sviluppo clinico che assicurano profili di sicurezza e farmacocinetiche ben noti



# Approcci usati in drug repurposing



Introduzione

Cenni storici

Approcci di genetica chimica

High-throughput screening

Drug repurposing

Vantaggi della metodologia

Uno sguardo al mondo vegetale

# Database

## Box 1 Selected resources for systems chemical biology

### Genes

Entrez Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>

### Proteins

SwissProt: <http://expasy.org/sprot/>

### Structures of biological macromolecules

PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Structural Genomics Consortium: <http://www.sgc.utoronto.ca/>

### Pathways

KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>

MetaCyc: <http://metacyc.org/>

BioCarta: <http://www.biocarta.com/genes/index.asp>

Reactome: <http://www.reactome.org/>

### Receptors

GPCRdb: <http://www.gpcr.org/7tm/>

NHRs: <http://www.nursa.org/>

Ion channels: <http://www.iuphar-db.org/iuphar-ic/index.html>

### Biochemical pathway reaction kinetics

SABIORK: <http://sabio.villa-bosch.de/SABIORK/>

BRENDA: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>

### Small molecules

PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

### Network simulators

Xyce: <http://www.cs.sandia.gov/Xyce/>

BioNetGen: <http://cellsignaling.lanl.gov/bionetgen/index.shtml>

### Annotated biological models

<http://www.ebi.ac.uk/biomodels/>

### Uncertainty analysis

DAKOTA: <http://www.cs.sandia.gov/DAKOTA/>

### Cheminformatics tools

OpenEye software: <http://www.eyesopen.com/>

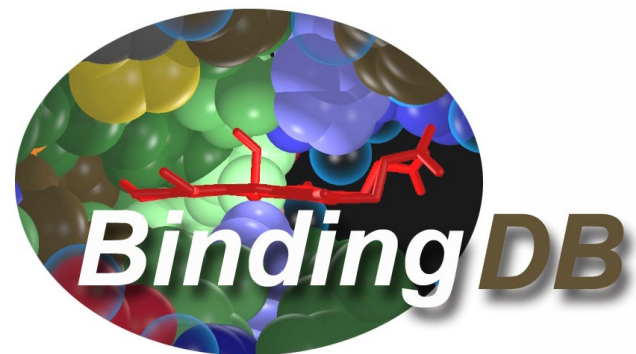
PubChem

PubChem

ChEMBL

ChEMBL

BindingDB



Introduzione

Cenni storici

Approcci di  
genetica chimica

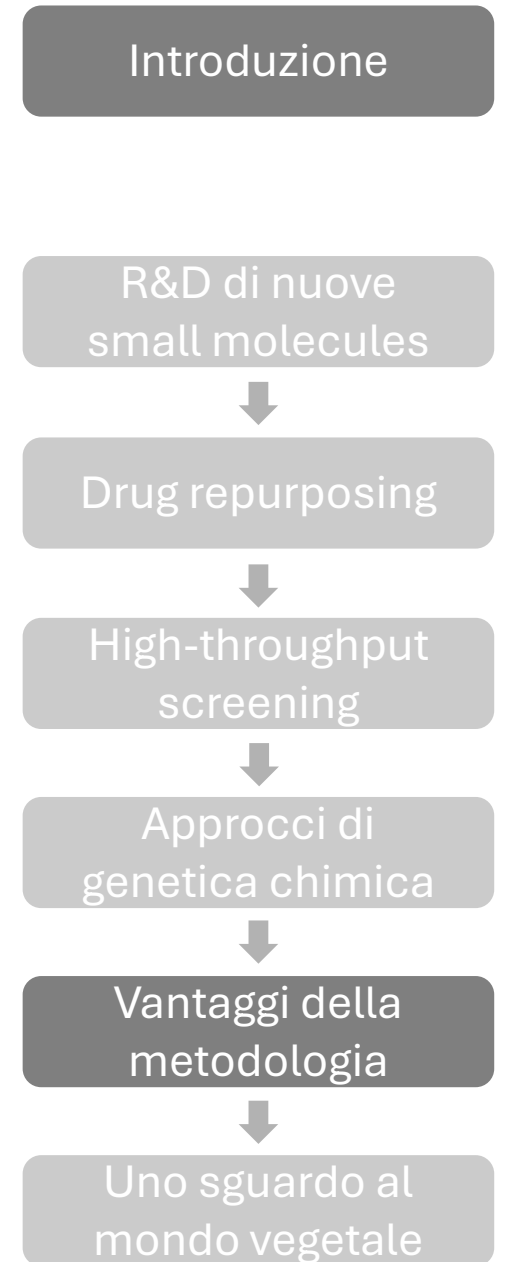
High-throughput  
screening

Drug repurposing

Vantaggi della  
metodologia

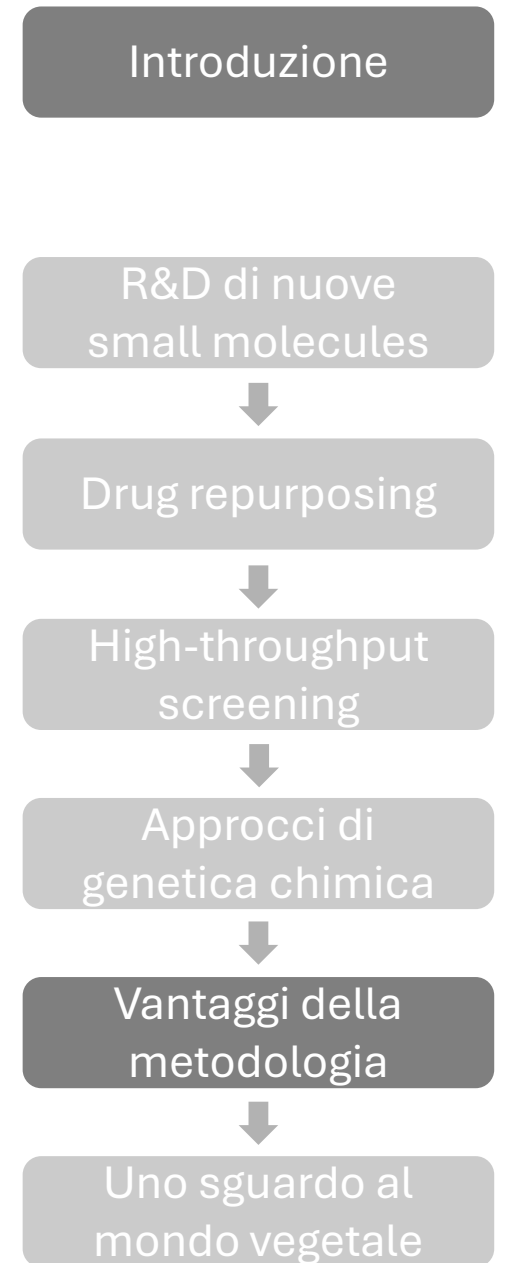
Uno sguardo al  
mondo vegetale

# Quali sono i vantaggi di questa metodologia?



# Analizziamone alcuni:

- ▶ Possibilità di utilizzo a differenti concentrazioni, permettendo l'analisi di un più ampio spettro di fenotipi
- ▶ Modulazione del tempo di esposizione alle molecole, con possibilità di rescue dinamico delle normali funzioni dell'organismo
- ▶ Possibilità di agire contemporaneamente su un ampio gruppo di proteine con funzioni ridondanti
- ▶ Applicazione topica delle molecole, al fine di agire solamente su uno specifico organo dell'organismo studiato
- ▶ Applicazione su specie non geneticamente alterabili, al fine di studiare geni omologhi
- ▶ Possibilità di studiare mutazioni embrioletali/che rendono l'organismo sterile



# Caso studio I – epigenetic

## 5-Azacytidine and pancreatic cancer

Caso studio I

Basi  
dell'epigenetica



Metilazione del DNA  
e cancro



5-Azacitidina  
e analoghi



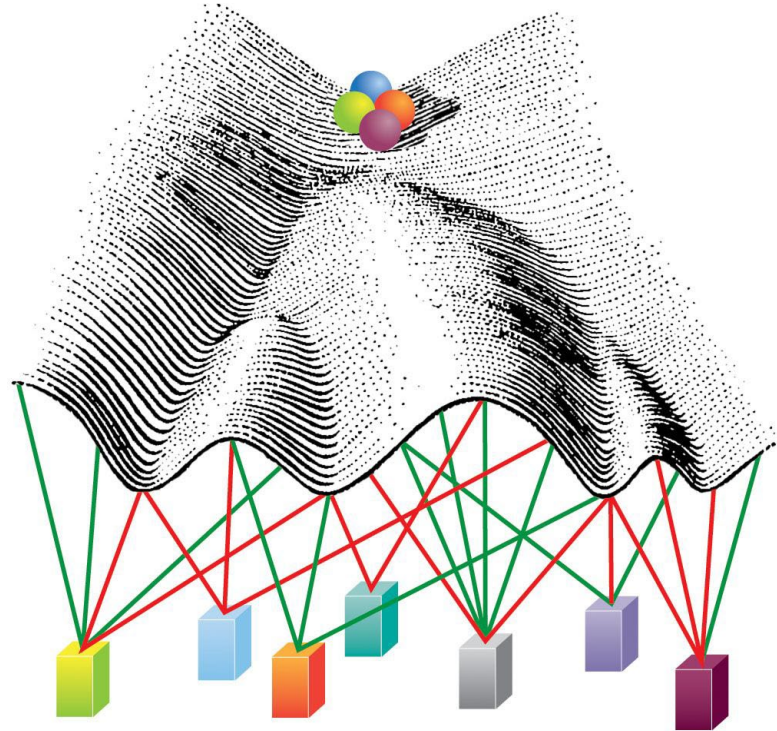
Dati sperimentali



Modello

# Epigenetica: *on top of genetics*

“the study of changes in gene function that are mitotically and/or meiotically heritable and that do not entail a change in DNA sequence”



The epigenetic landscape integrates the connected concepts of competence, induction, and regulative abilities of the genes into a single model designed to explain cellular differentiation, a long-standing problem in embryology. Waddington envisioned the epigenetic landscape as a series of ridges and valleys a cell can traverse on its way to a final tissue type.

Waddington, C.H., 1957

Caso studio I

Basi  
dell'epigenetica

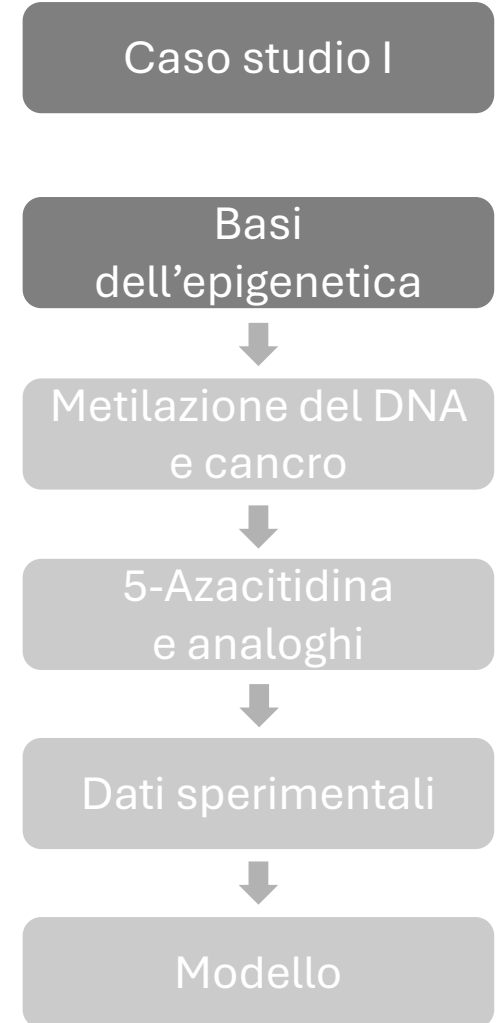
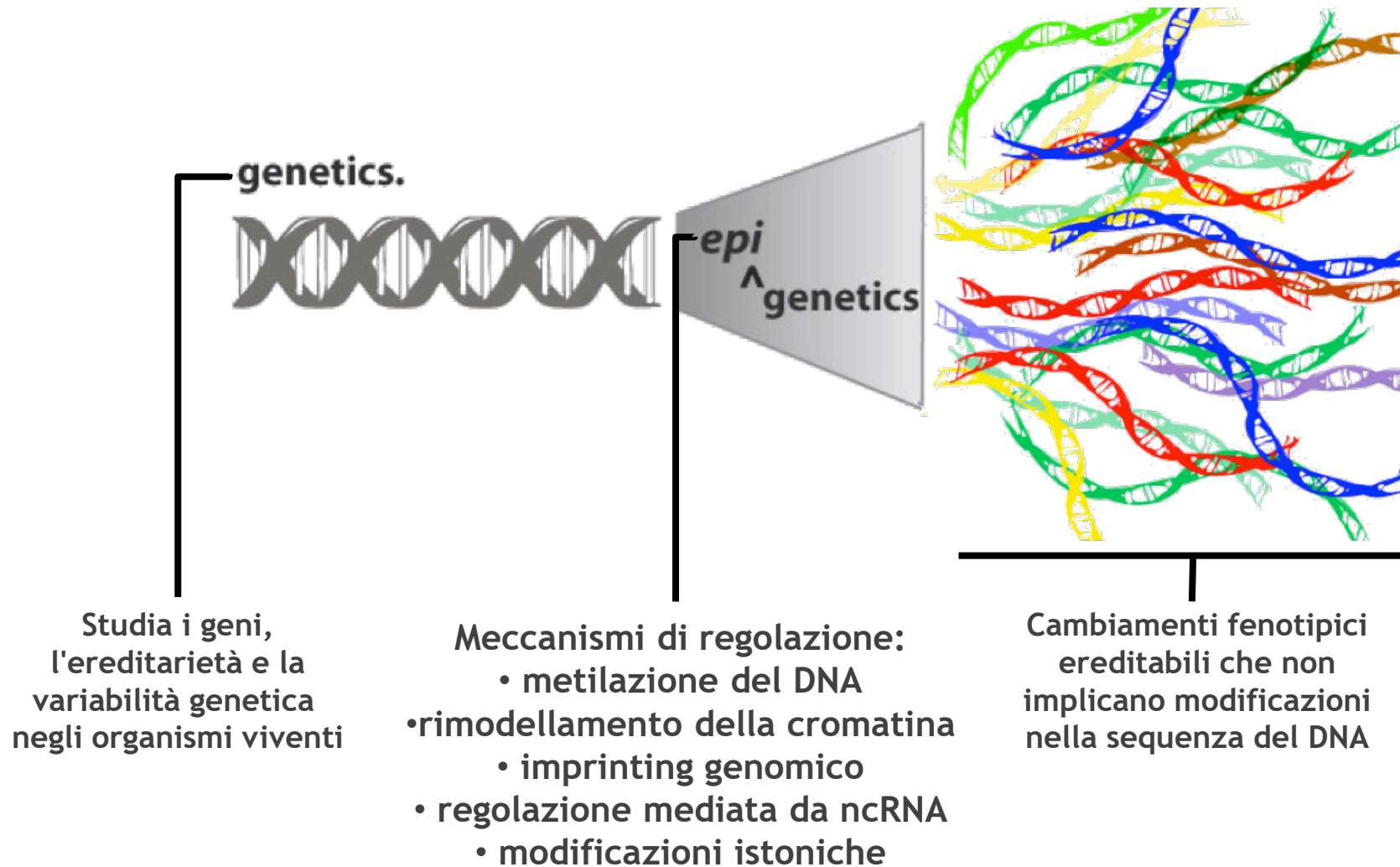
Metilazione del DNA  
e cancro

5-Azacitidina  
e analoghi

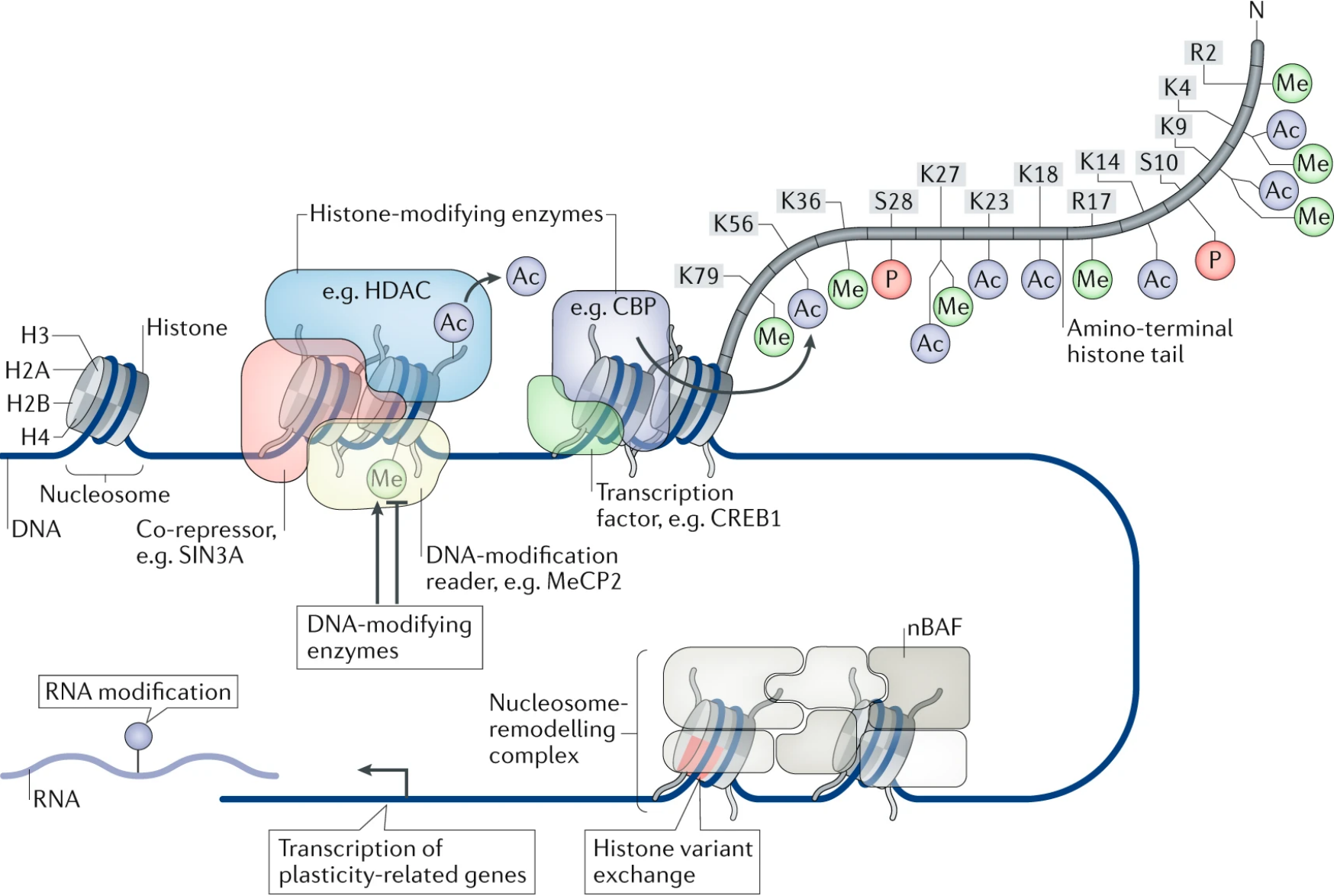
Dati sperimentali

Modello

# Meccanismi di regolazione epigenetici



# Panoramica: la complessità della regolazione



Caso studio I

Basi dell'epigenetica

Metilazione del DNA e cancro

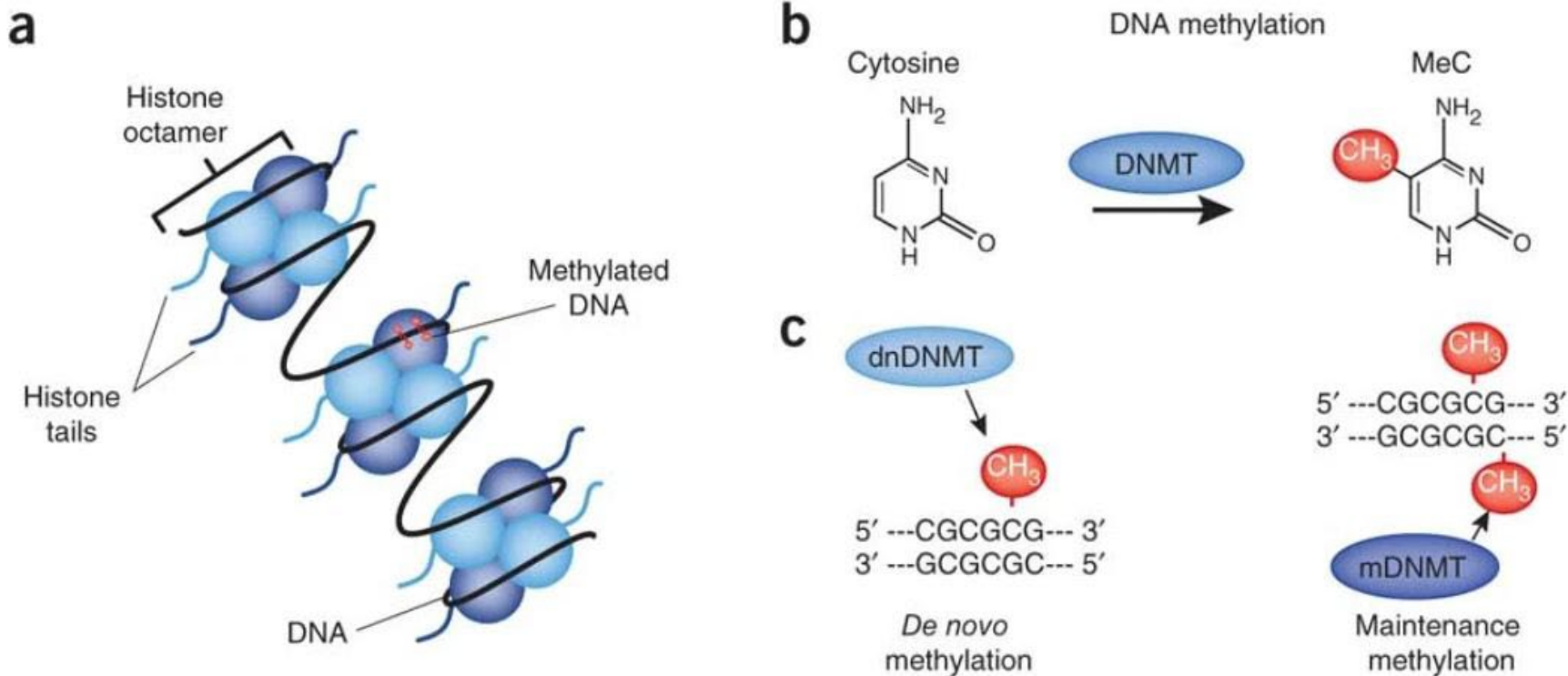
5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

# Metilazione del DNA – DNMT

La metilazione del DNA avviene sulla citosina, mediante l'aggiunta di un gruppo metilico nella posizione 5 dell'anello pirimidinico per mezzo di una DNMT.



DNMT3A e DNMT3B avviano la metilazione *de novo*, mentre DNMT1 è l'enzima di mantenimento che agisce sul DNA emimetilato a seguito della replicazione

Caso studio I

Basi dell'epigenetica

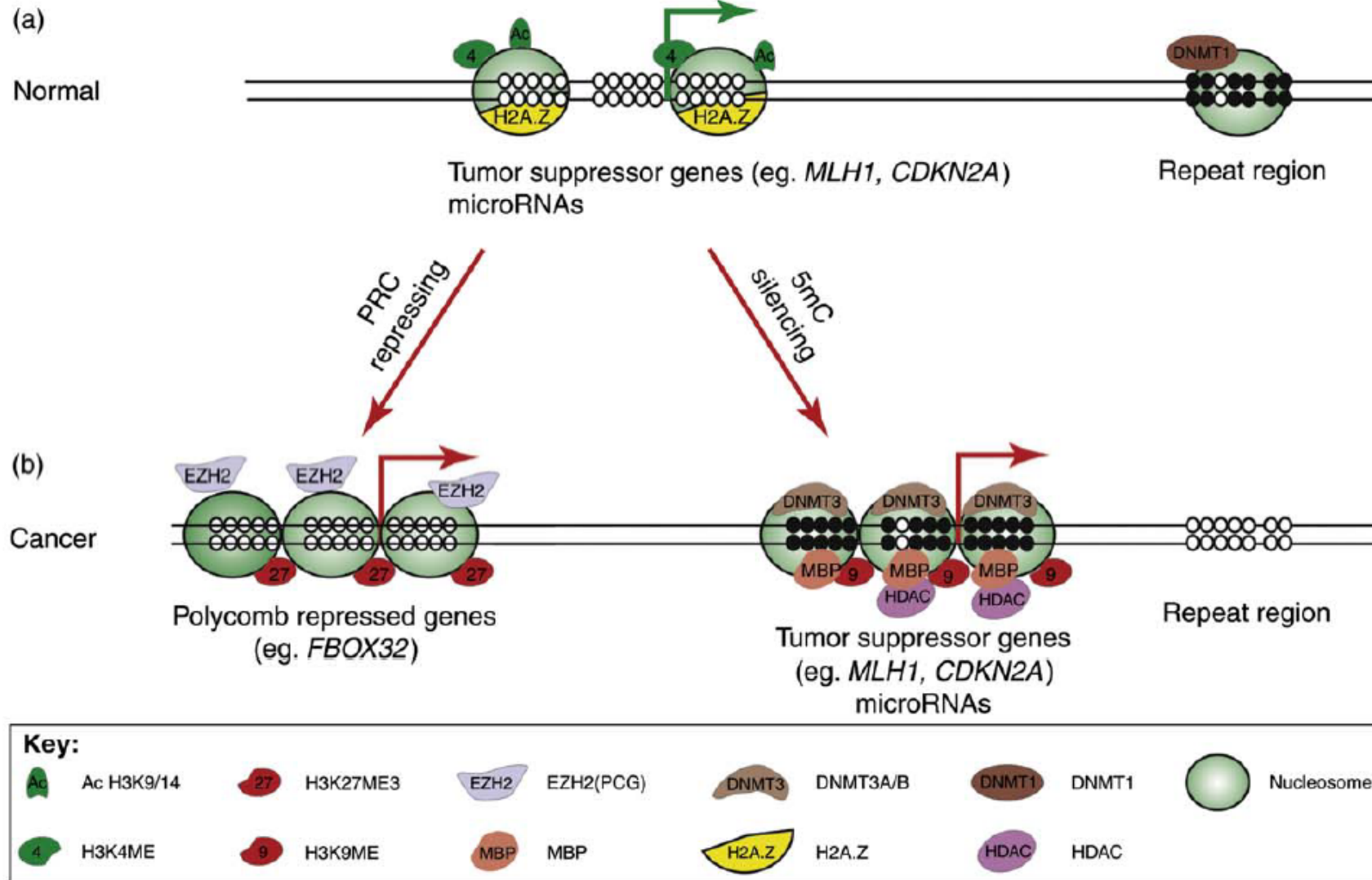
Metilazione del DNA e cancro

5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

# Alterazioni epigenetiche in cellule tumorali



Caso studio I

Basi dell'epigenetica

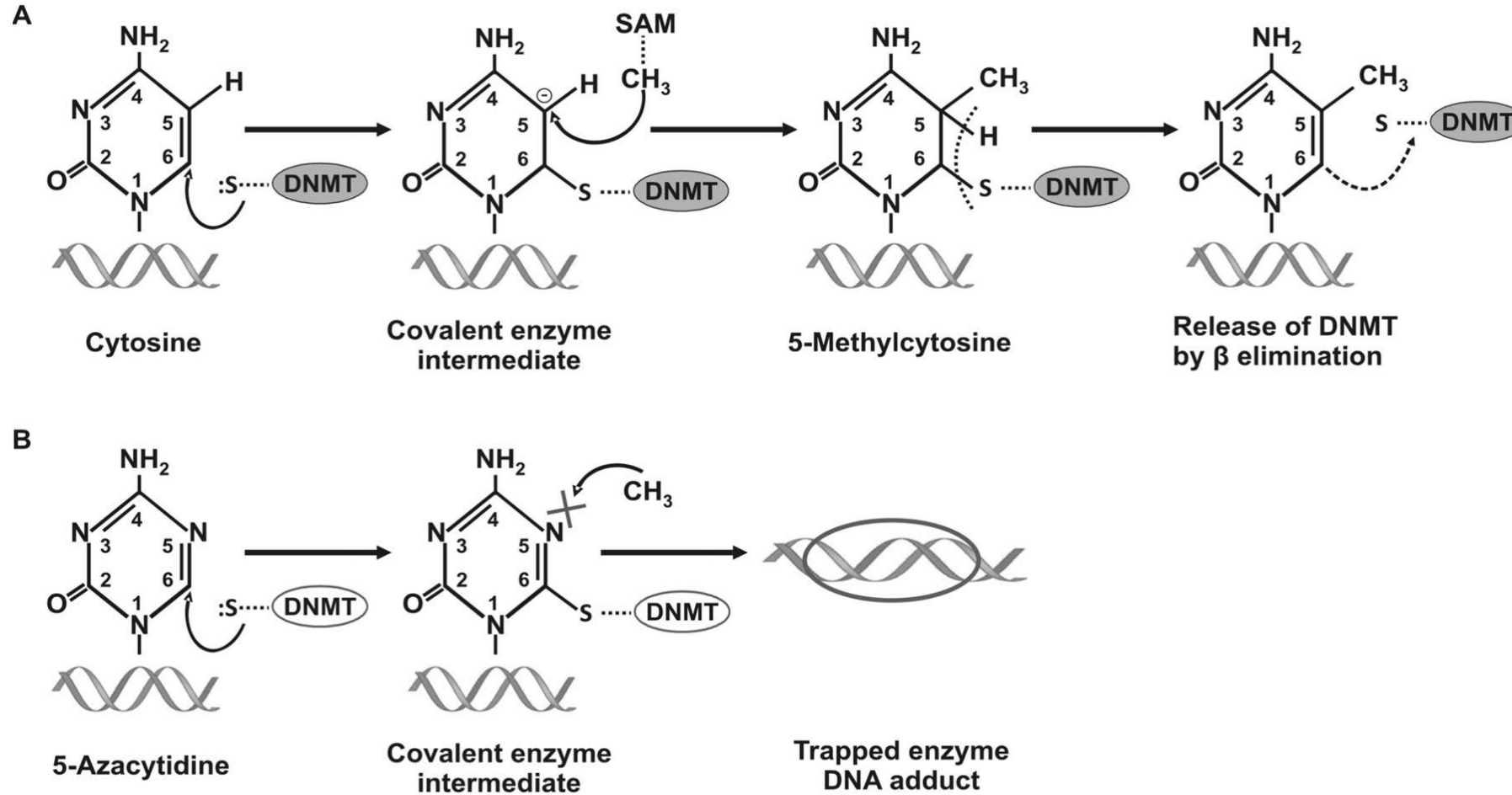
Metilazione del DNA e cancro

5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

# 5-azacytidine – meccanismo d'azione



Caso studio I

Basi  
dell'epigenetica

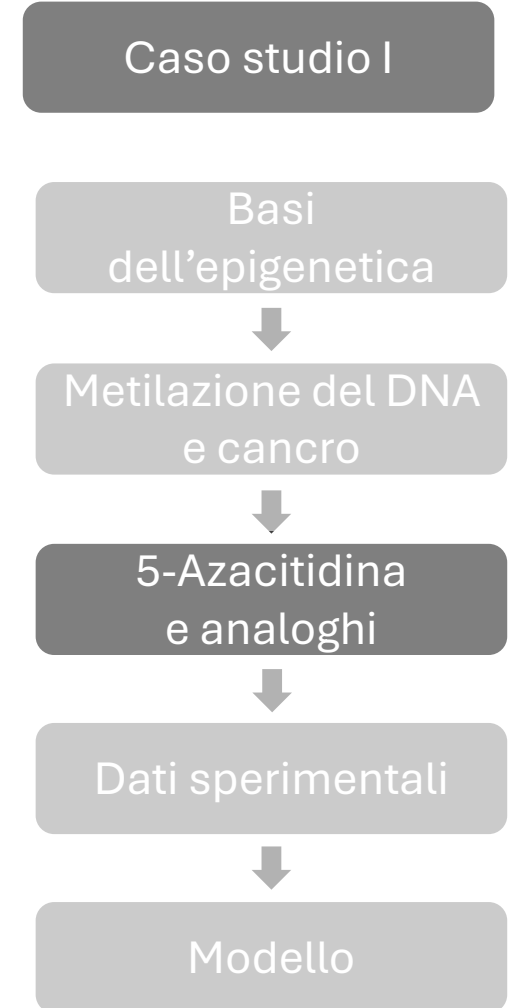
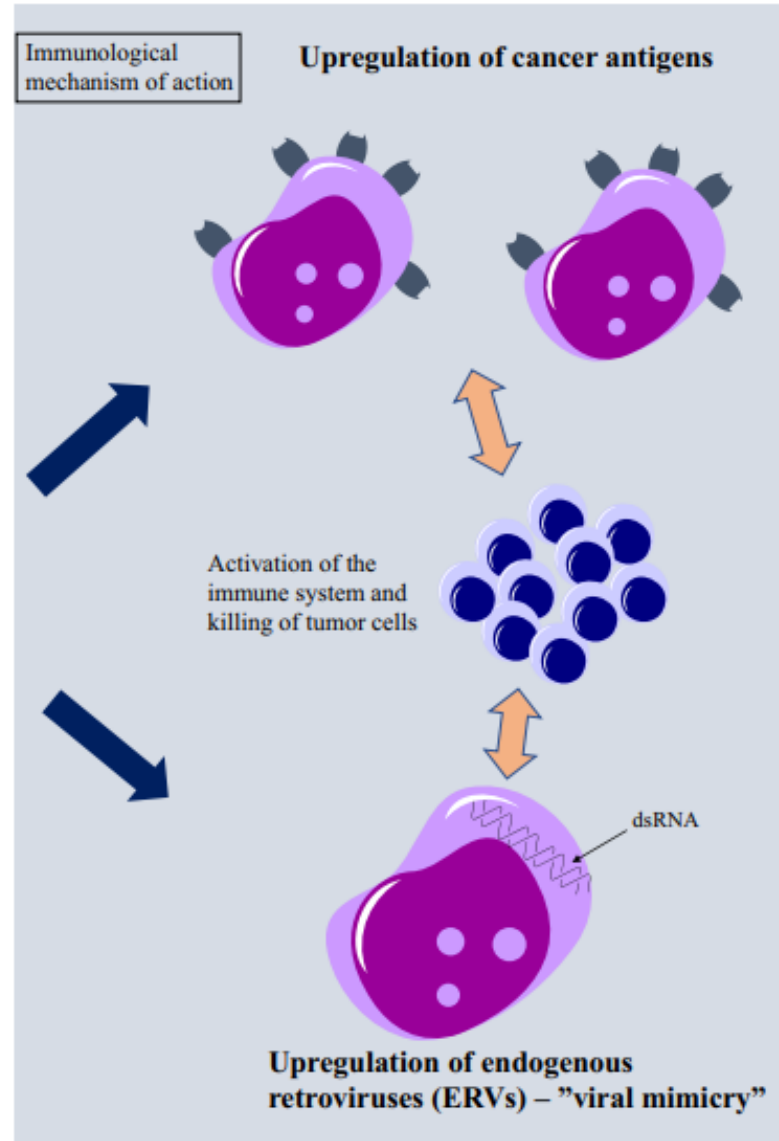
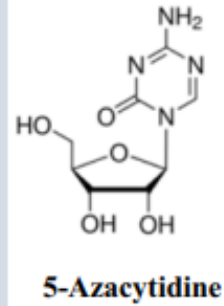
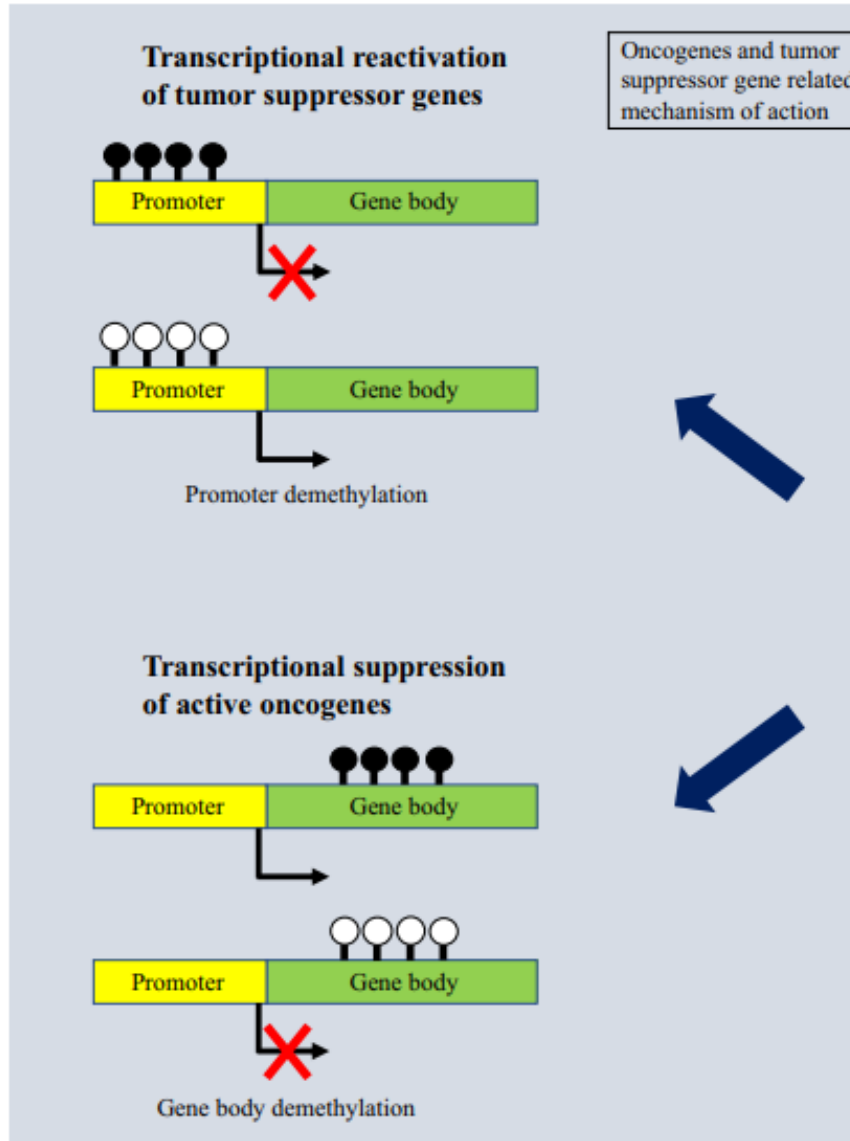
Metilazione del DNA  
e cancro

5-Azacitidina  
e analoghi

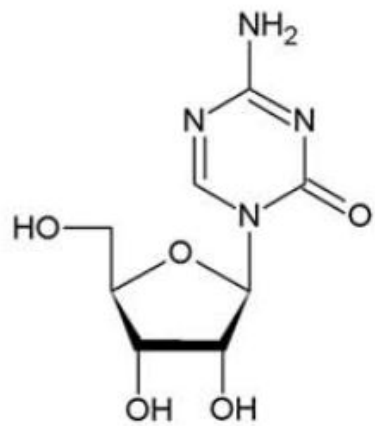
Dati sperimentali

Modello

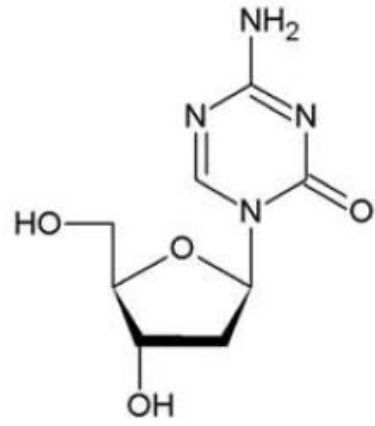
# 5-azacytidine – applicazioni



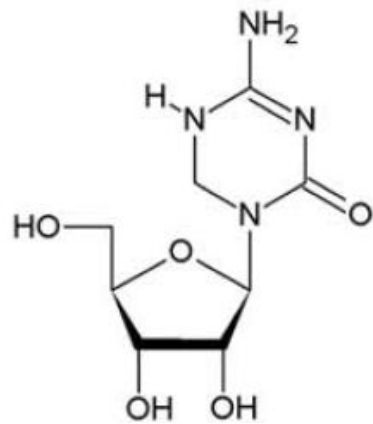
# Nucleosidi analoghi



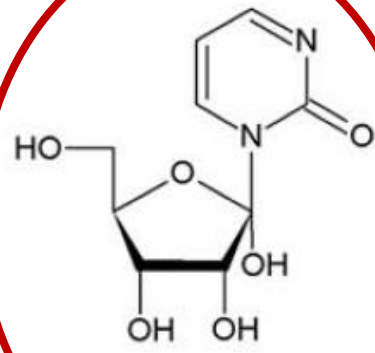
5-Azacytidine



5-Aza-2'-deoxycytidine



5,6-Dihydro-5-azacytidine



Zebularine

Caso studio I

Basi  
dell'epigenetica



Metilazione del DNA  
e cancro



5-Azacitidina  
e analoghi



Dati sperimentali



Modello

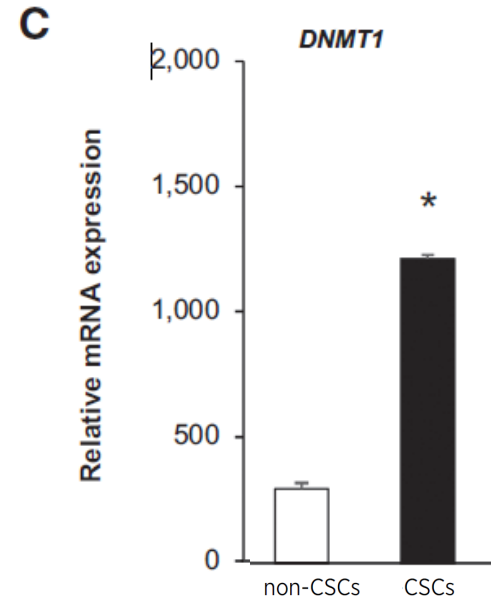
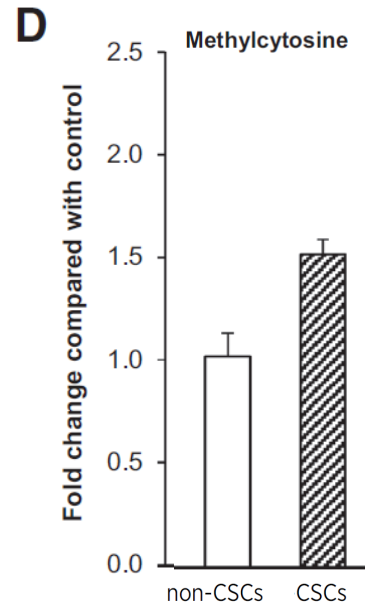
# Overview

Tumor and Stem Cell Biology

Cancer Research

## DNMT1 Inhibition Reprograms Pancreatic Cancer Stem Cells via Upregulation of the miR-17-92 Cluster

Sladjana Zagorac<sup>1,2</sup>, Sonia Alcalá<sup>2,3</sup>, Gustavo Fernandez Bayon<sup>4</sup>, Tony Bou Kheir<sup>1</sup>, Matthieu Schoenhals<sup>1</sup>, Anna González-Neira<sup>5</sup>, Mario Fernandez Fraga<sup>4</sup>, Alexandra Aicher<sup>1,2</sup>, Christopher Heeschen<sup>1,2</sup>, and Bruno Sainz, Jr.<sup>2,3</sup>



Caso studio I

Basi dell'epigenetica

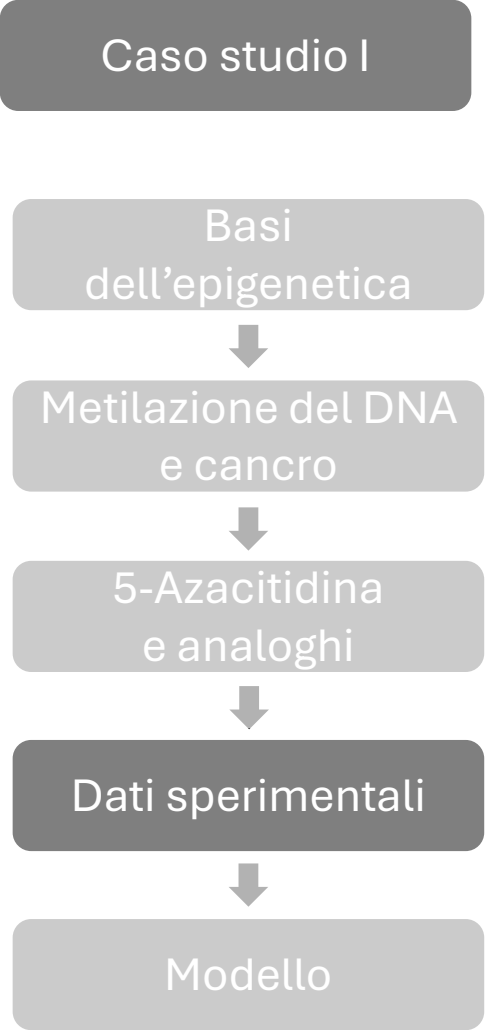
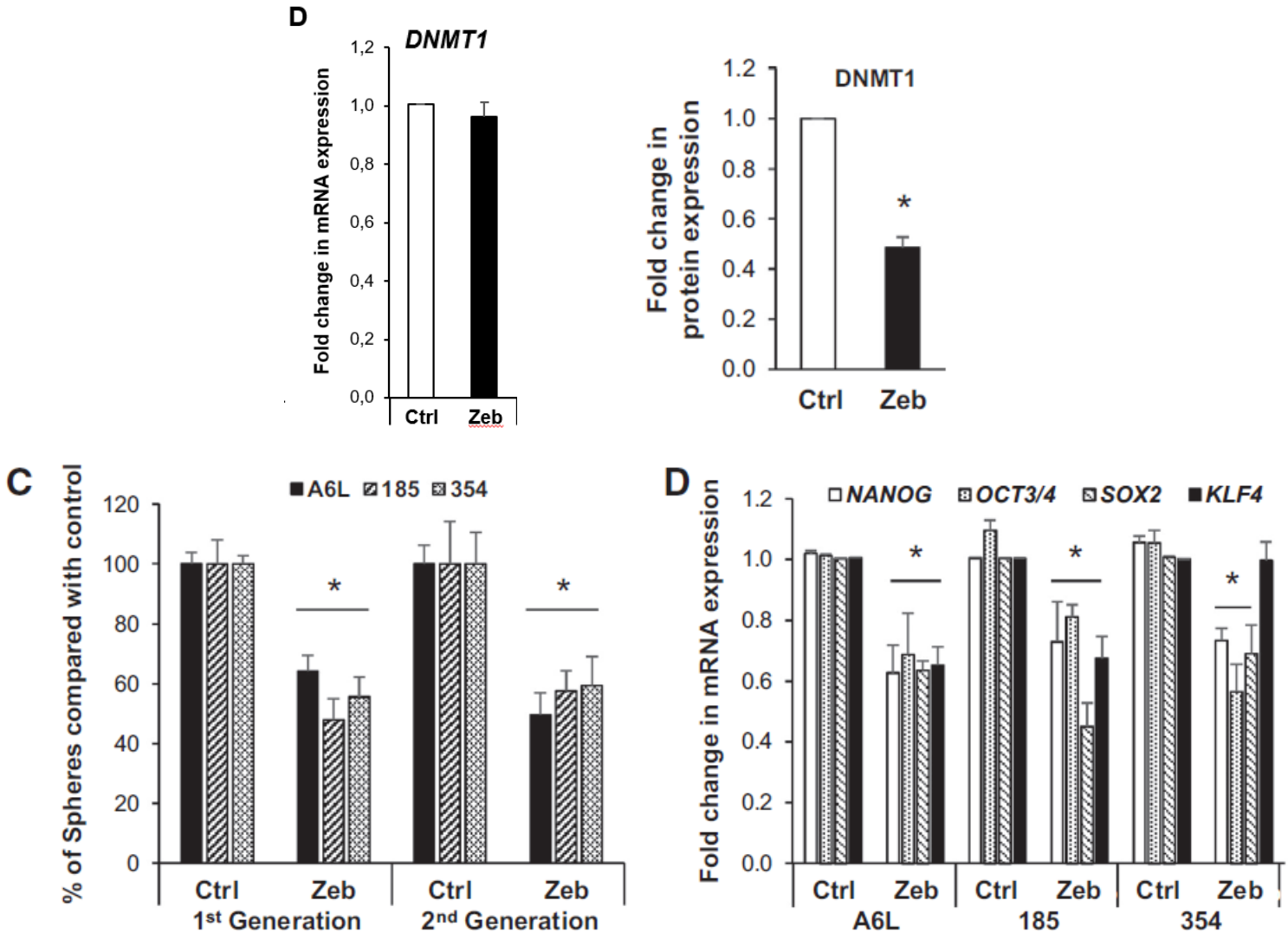
Metilazione del DNA e cancro

5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

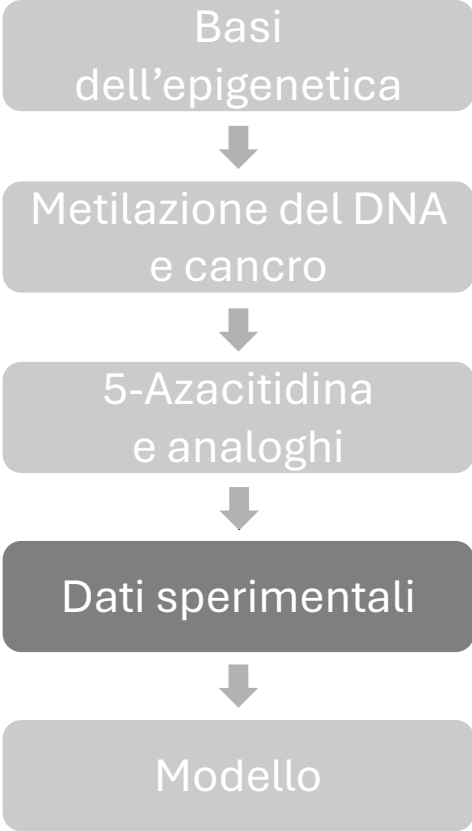
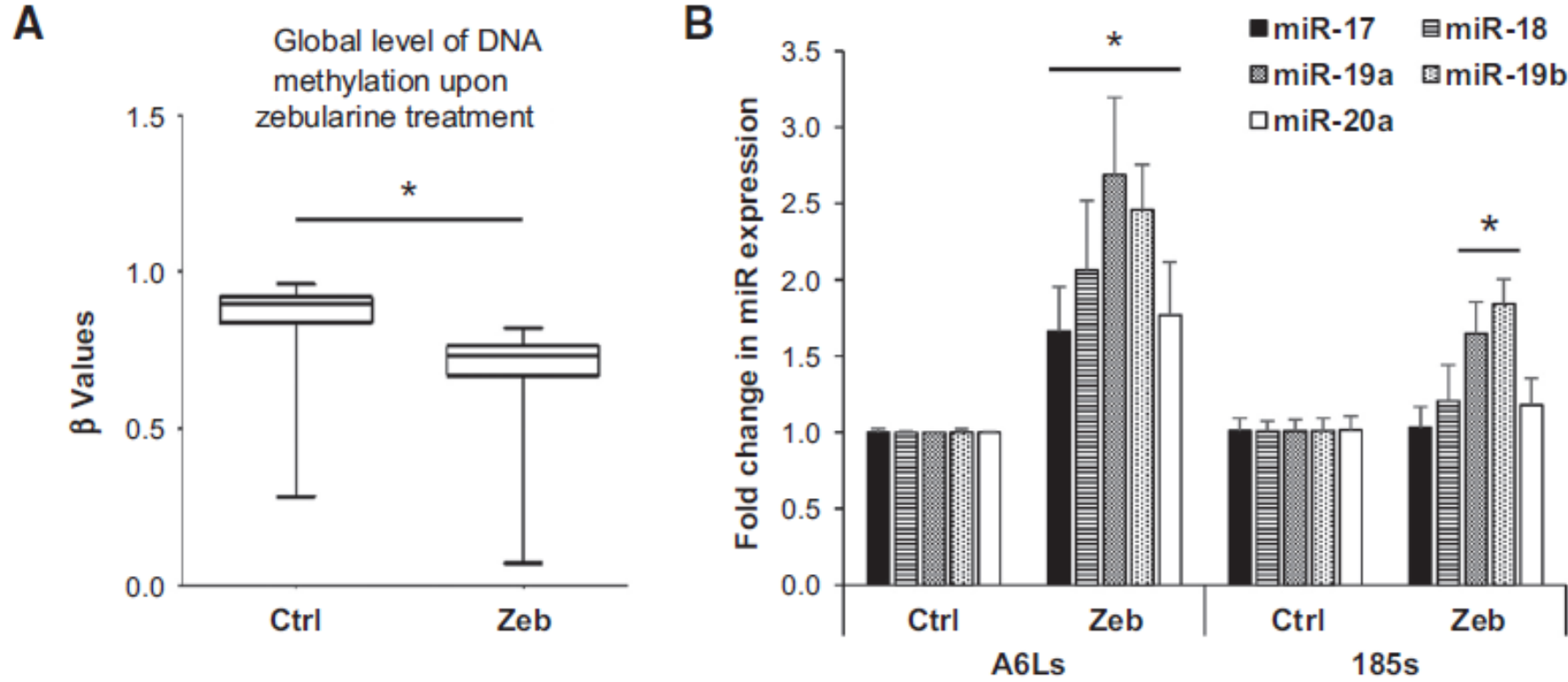
# Effetti del trattamento con Zebularina



Zebularina riduce la proteina DNMT1 e riduce le caratteristiche di stemness in diverse linee cellulari cancerose

# Attivazione del *cluster* miR-17-92

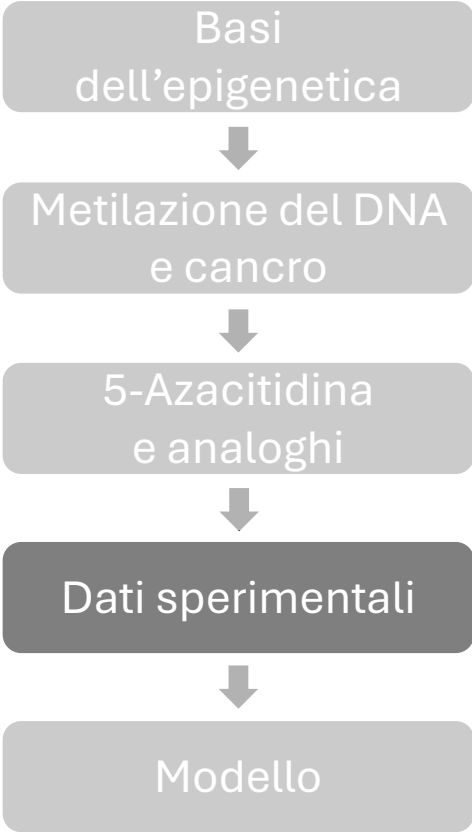
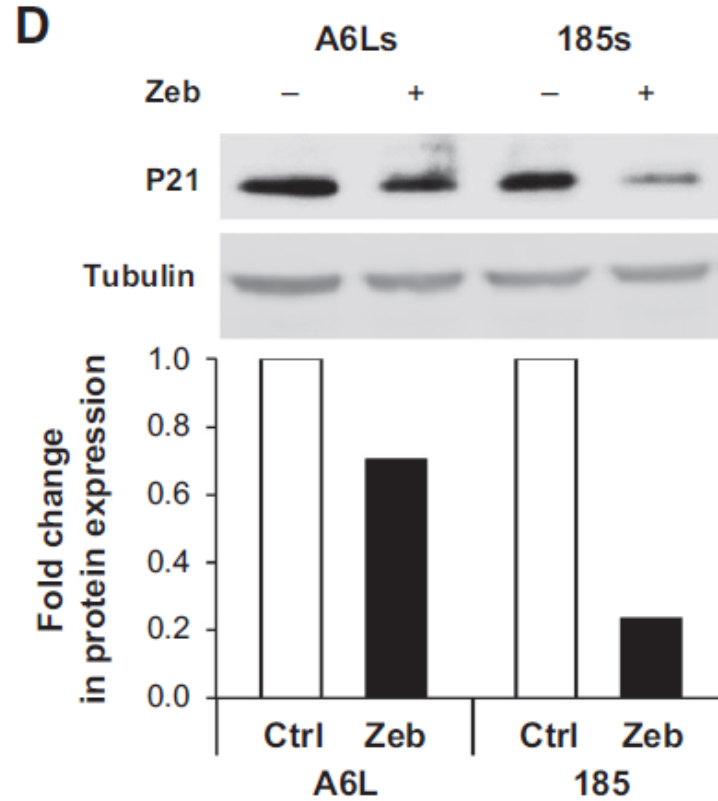
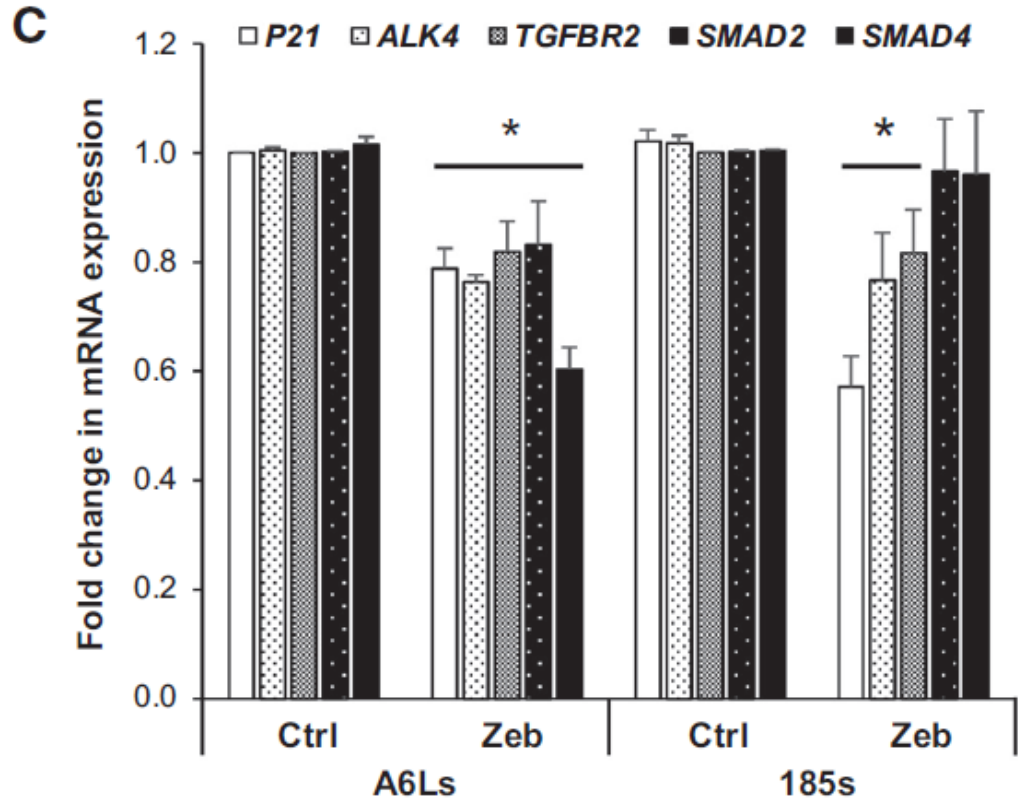
Caso studio II



Zebularina riduce la metilazione totale del DNA e aumenta l'espressione del cluster miR-17-92  
Cluster correlato ai processi delle PDAC CSCs

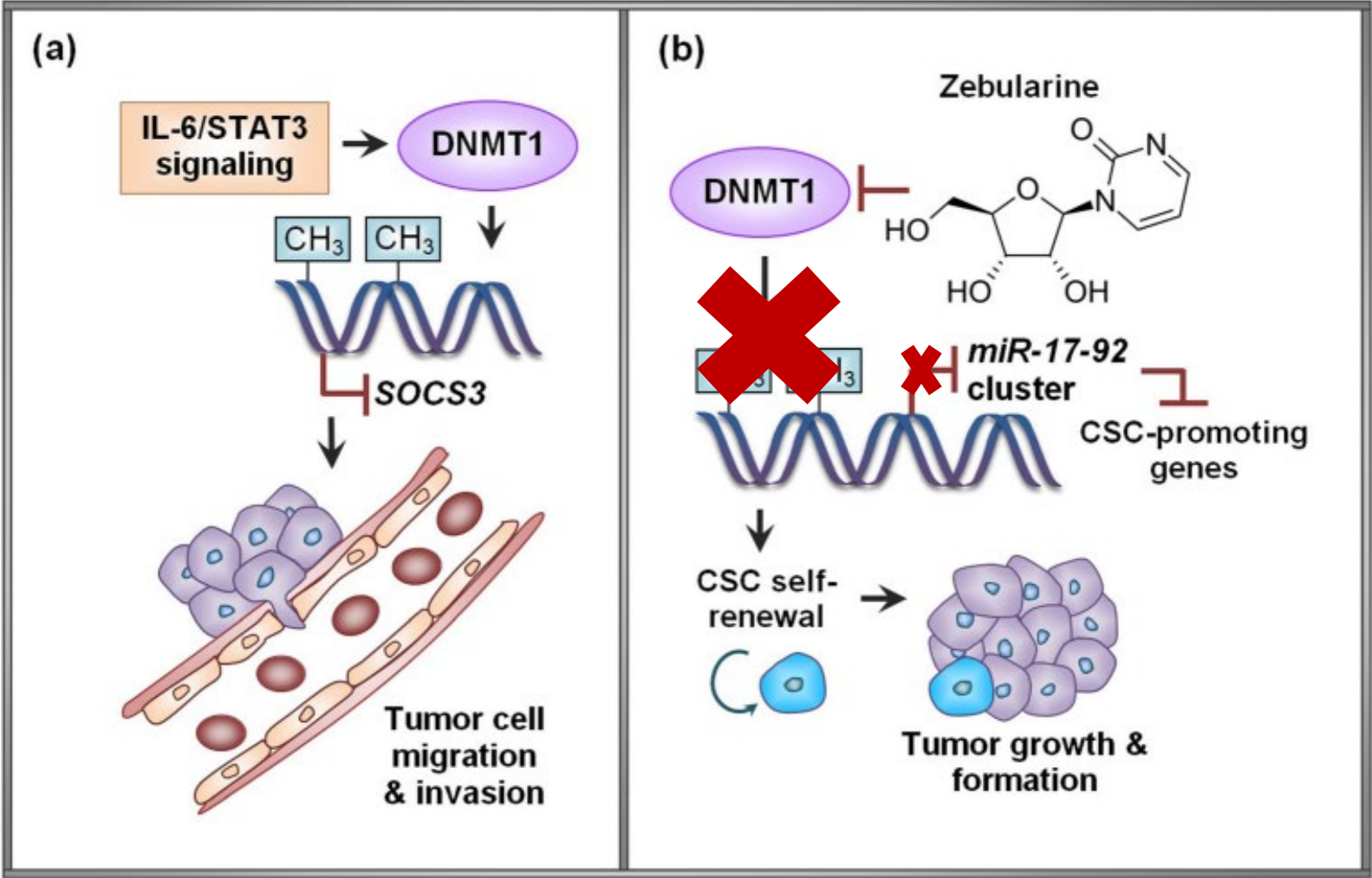
# Gene Known as targets of the miR-17-92 cluster

Caso studio I



Zebularina riduce l'espressione di molte proteine target del cluster miR 17-92  
 Inclusa la proteina P21 che regola il ciclo cellulare

# Meccanismo di azione della Zebularina



Caso studio I

Basi dell'epigenetica

Metilazione del DNA e cancro

5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

## **Casi studio II – plant biology research**

**Screening di libreria di epidrugs  
che aumentino la resilienza agli stress  
abiotici**

# Nuovo progetto

Caso studio II

Elevata conservazione dei **regolatori epigenetici** tra mammiferi e piante

**Analisi** di una *library* di **epidrugs** efficaci contro *target* epigenetici umani

**Identificazione di uno o più composti che aumentino la tolleranza agli stress abiotici**

(Lab. Prof.ssa Roberta Costi, Dipartimento CTF)

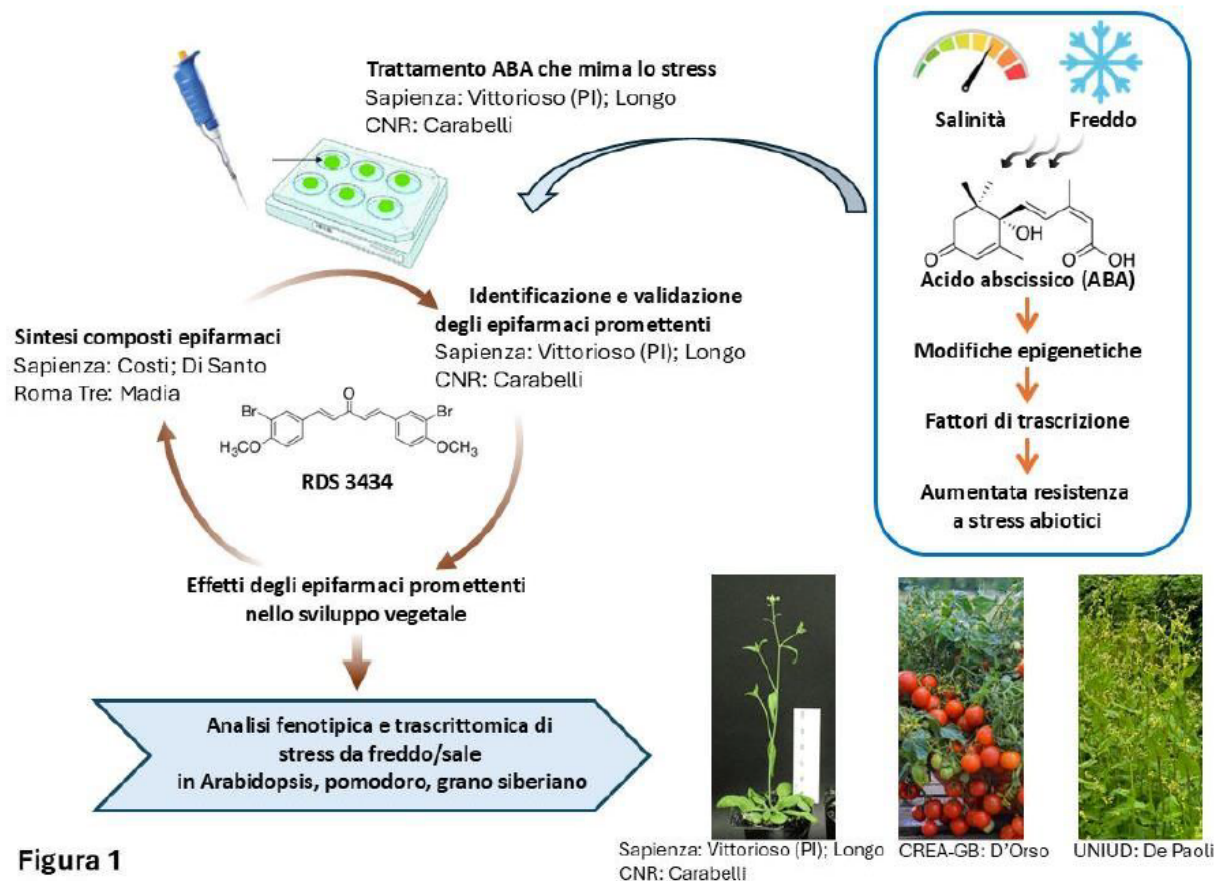
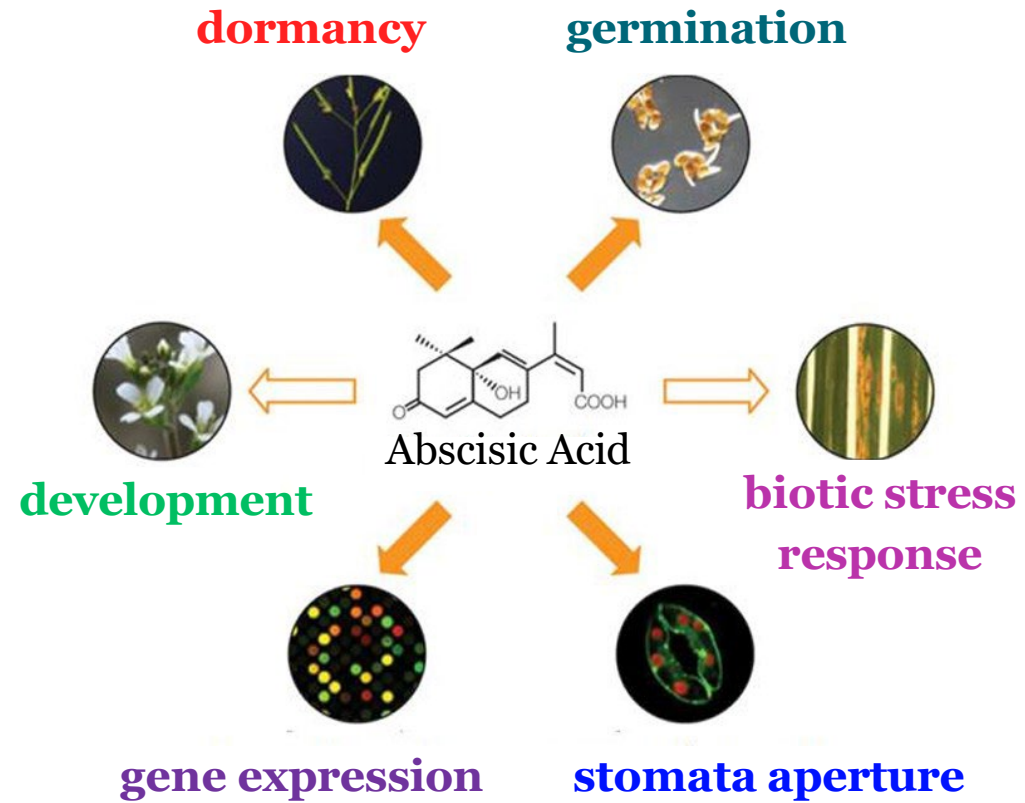


Figura 1

# Stress abiotici

L'insieme di **condizioni ambientali estreme e avverse** che inducono alterazioni di *pathway* e di meccanismi biomolecolari

Risposta delle piante allo stress tramite **variazione** dei livelli di acido abscissico (**ABA**), ormone della risposta allo stress



**Enviromental Stress tolerance**



Calore



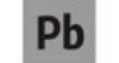
Freddo



Siccità  
inondazioni



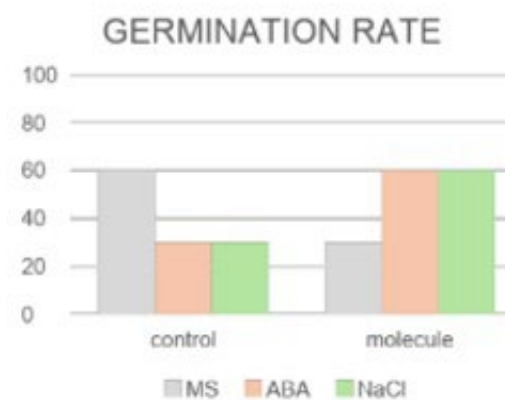
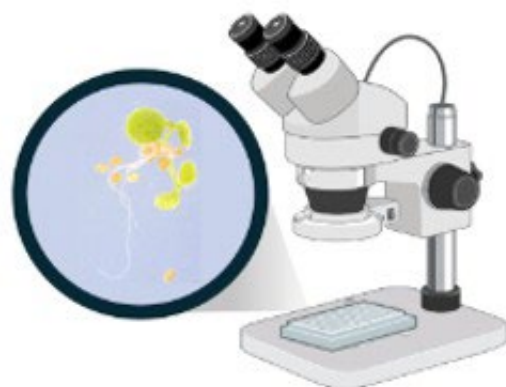
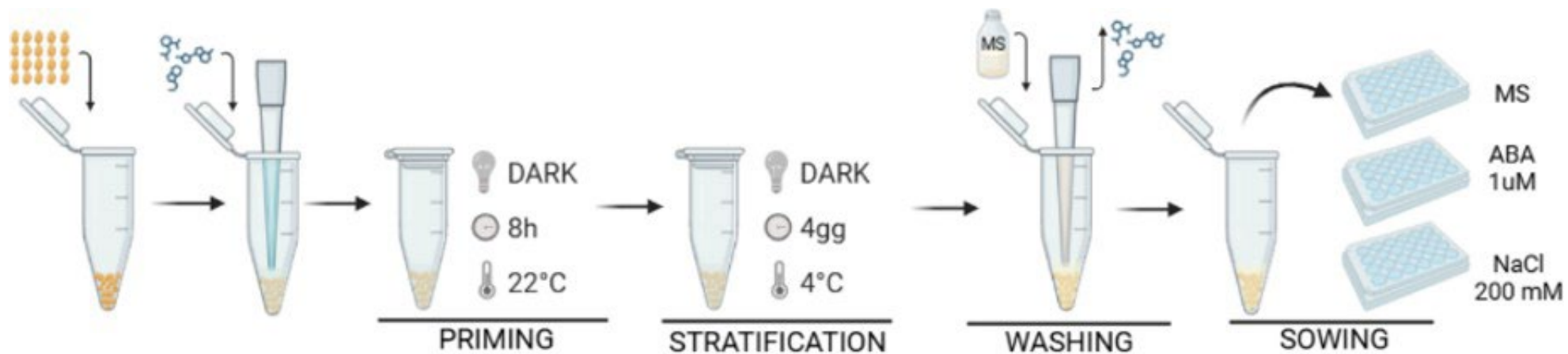
Salinità



Metalli

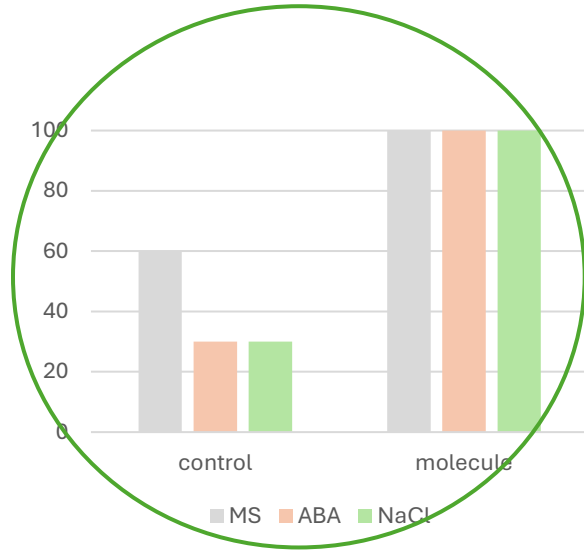
Caso studio II

# Set up di screening fenotipico

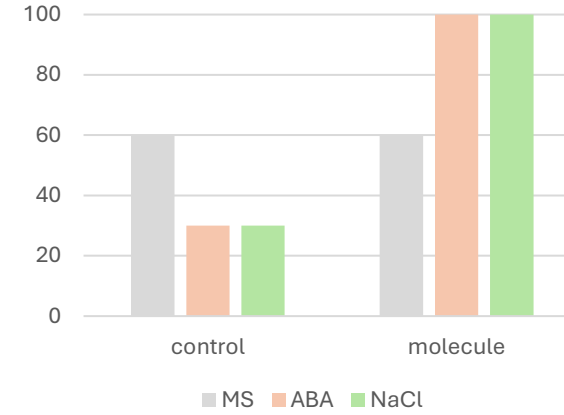
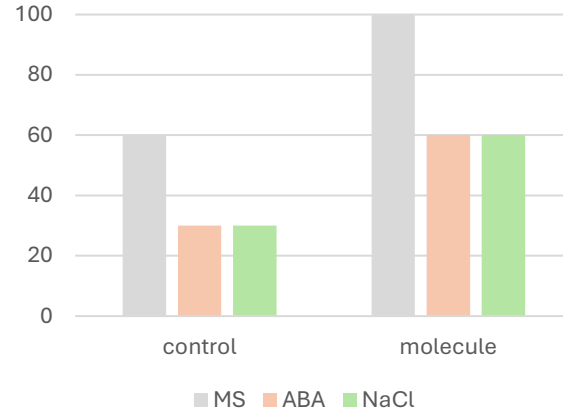


# SCREENING CRITERIA

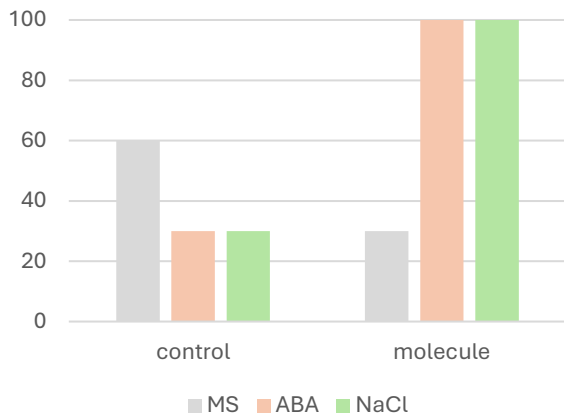
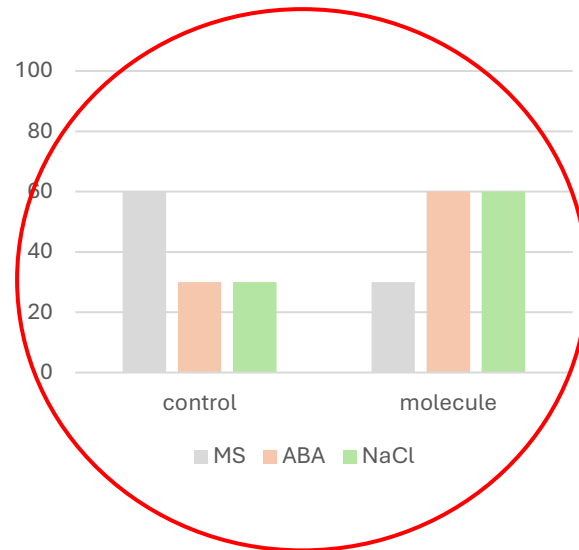
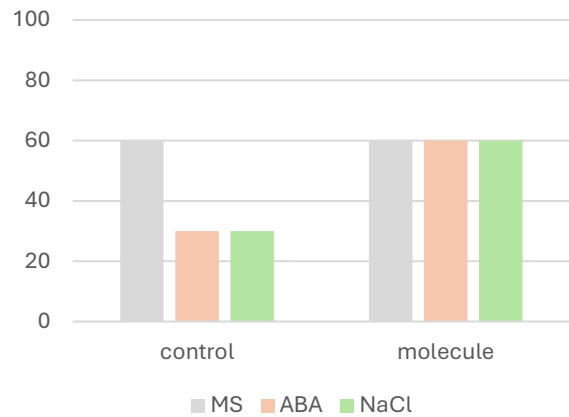
Caso studio II



what I ordered on wish



**\* IMPROVMENT EFFECTS OF GERMINATION, AT LEAST TWO TIMES HIGHER COMPARE TO THE INTERNAL CONTROL, IN BOTH THE STRESS CONDITIONS**

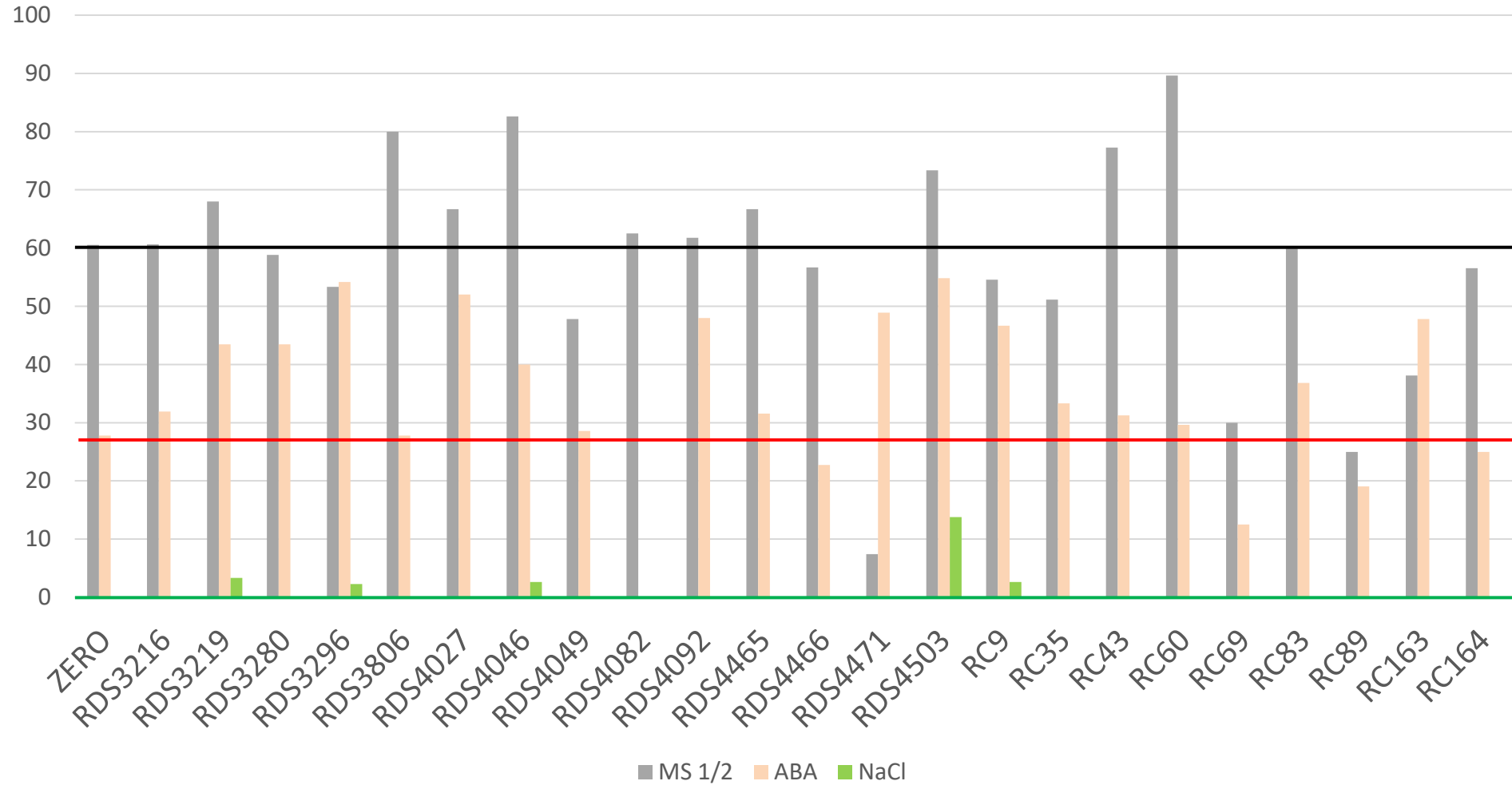


what I got

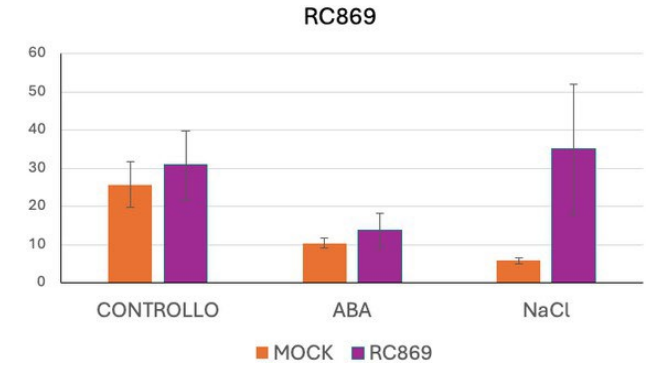
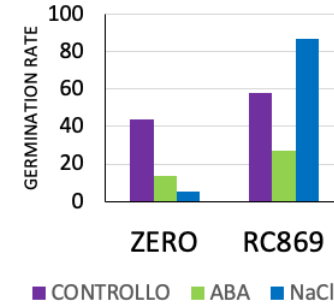
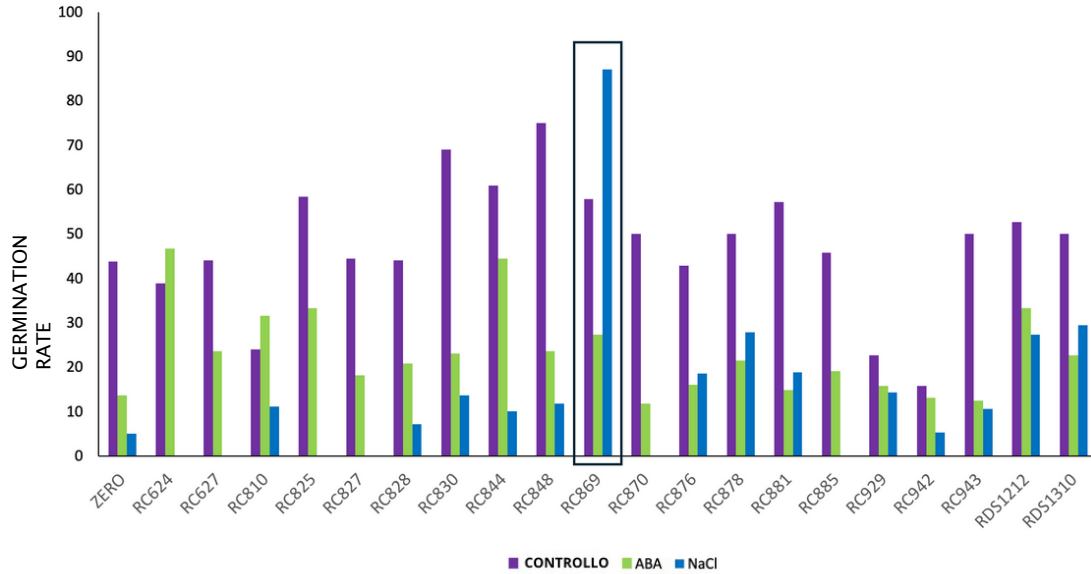
# SCREENING CRITERIA

Caso studio II

## GRUPPO 2

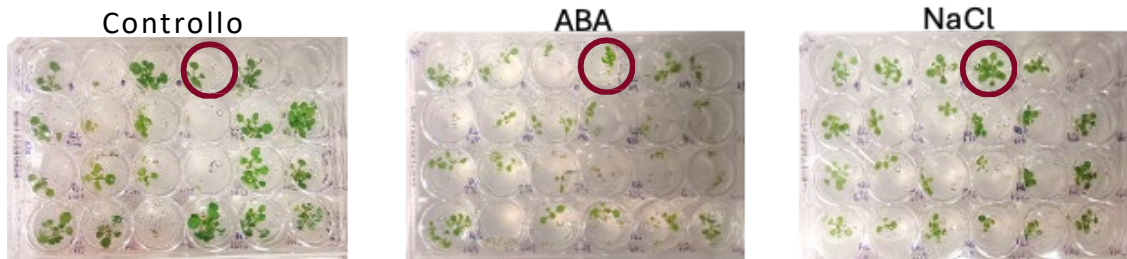


# Molecola RC869 selezionata



N=3  
n=20

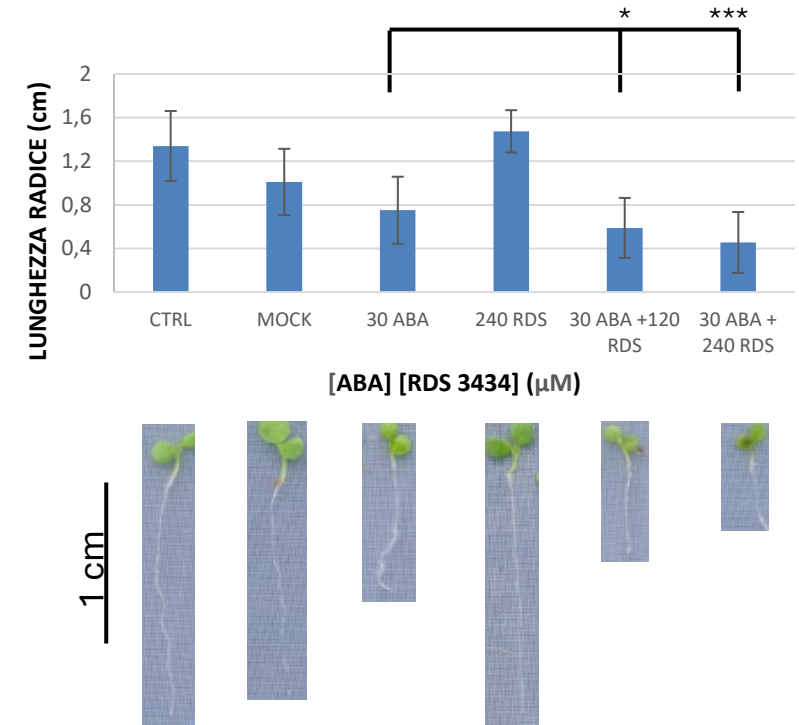
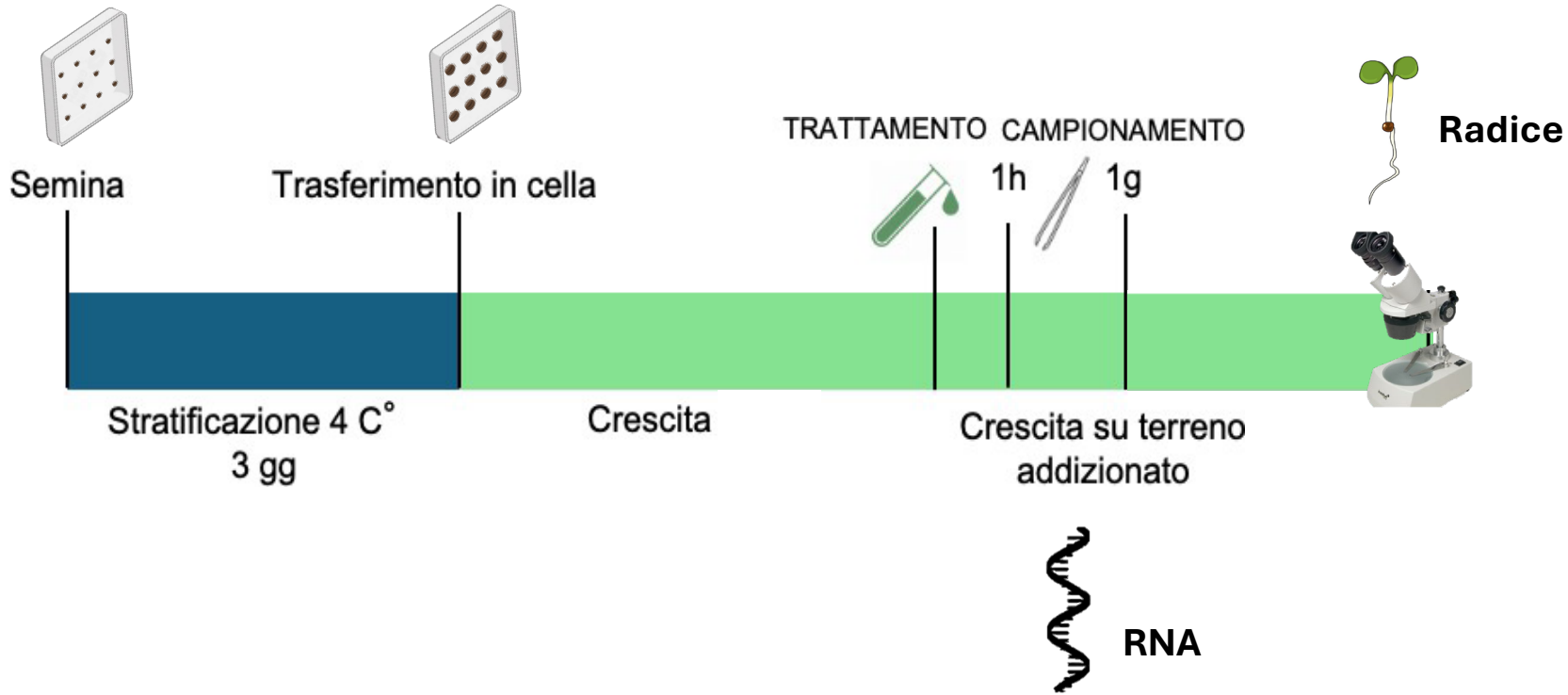
## Percentuale di **germinazione** a seguito del trattamento



Germinazione a **11 giorni**

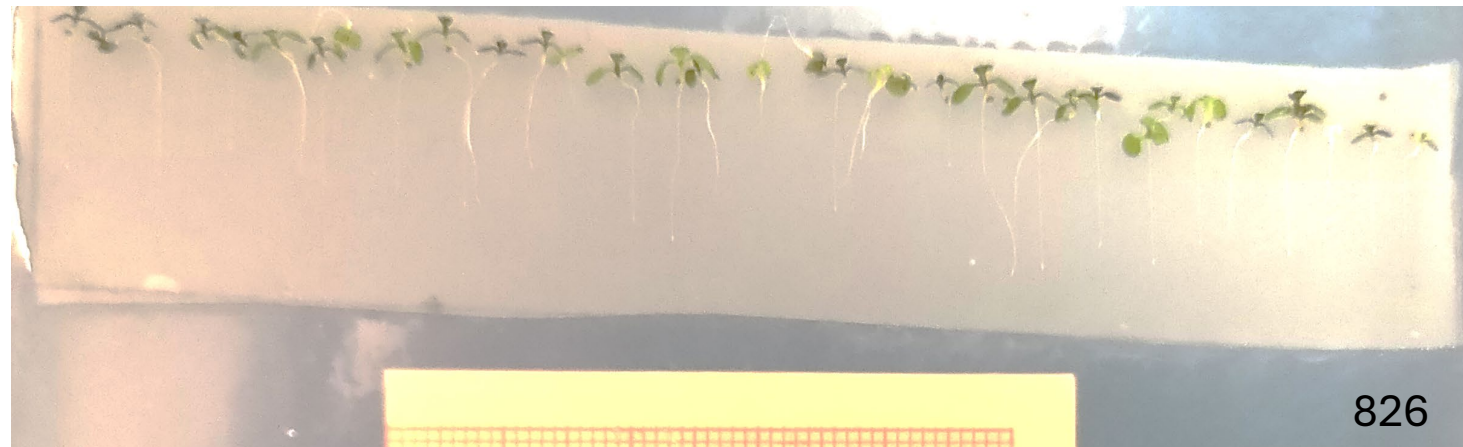
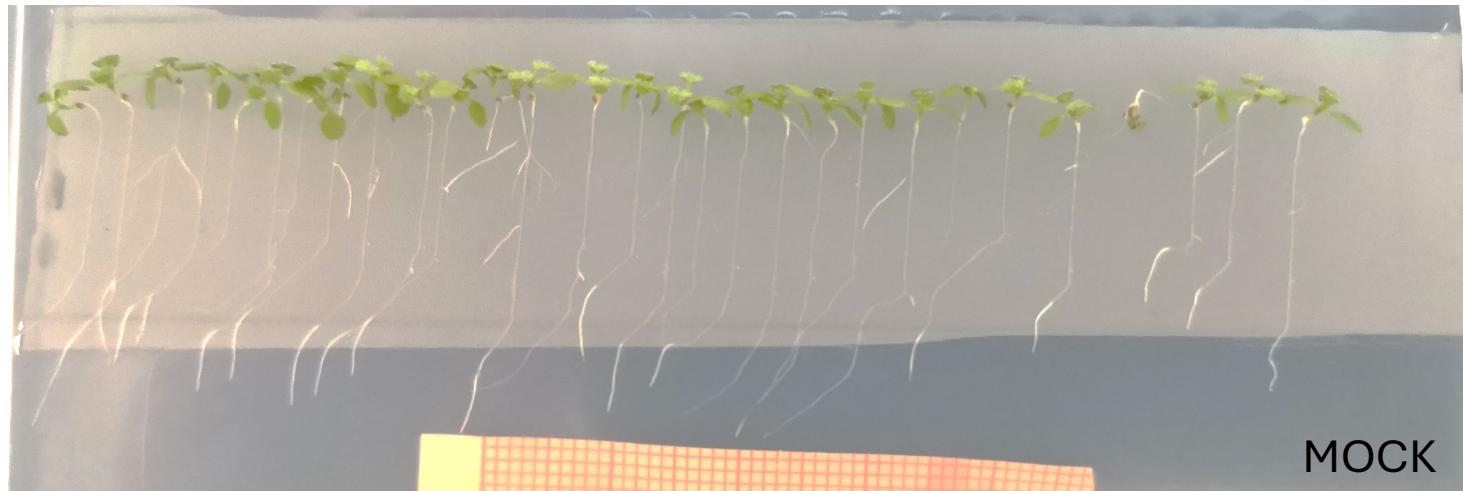
Molecole a struttura **pirimidinica** sono note da tempo per essere **inibitori di HDAC**

# RE-SCREENING DELLE MOLECOLE SELEZIONATE: MOLECOLA E STRESS INSIEME DOPO CRESCITA IN CONDIZIONI OTTIMALI ROOT LENGTH



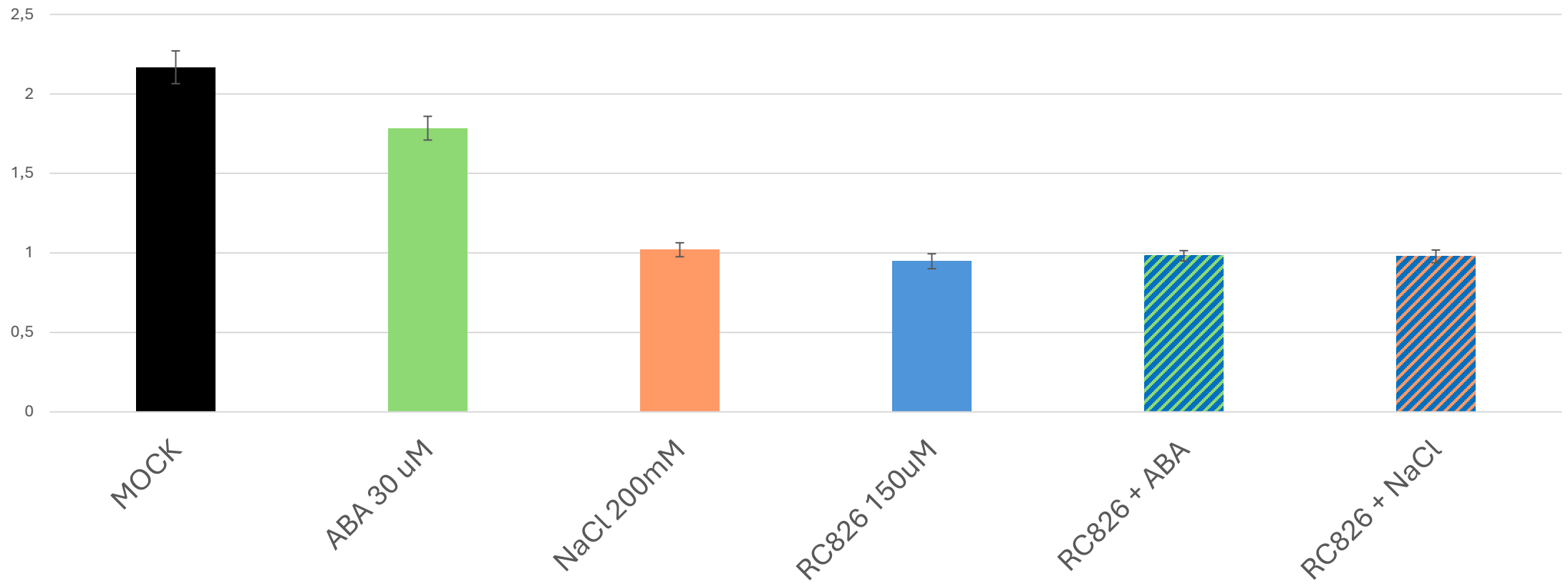
*I gruppo* FENOTIPO RC826

Caso studio II



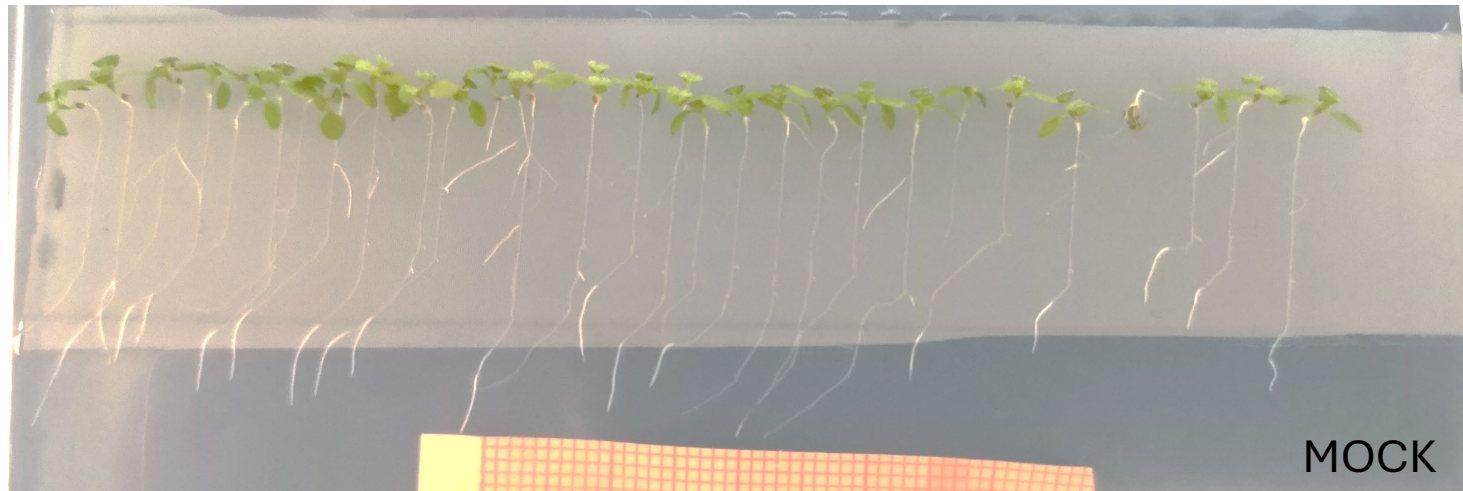
# RE-SCREENING DELLE MOLECOLE SELEZIONATE:

## ROOT LENGTH



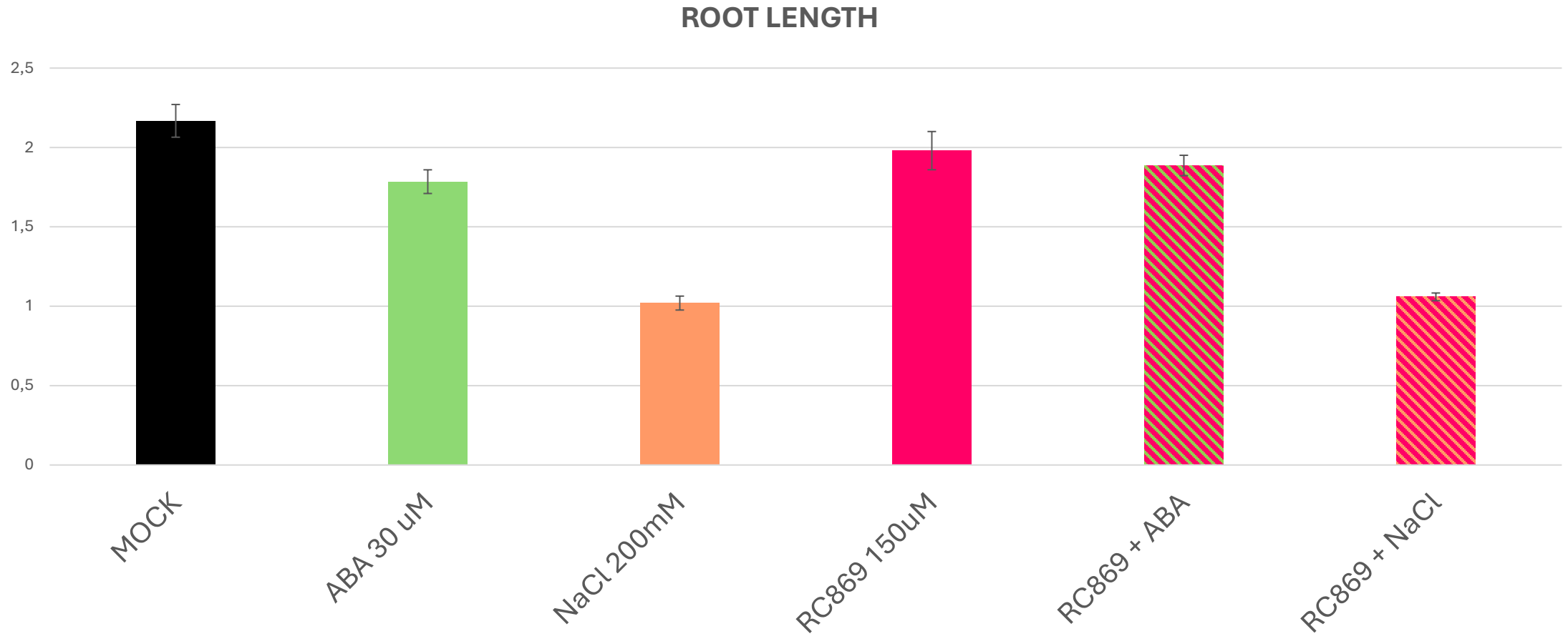
*I gruppo* FENOTIPO RC869

Caso studio II

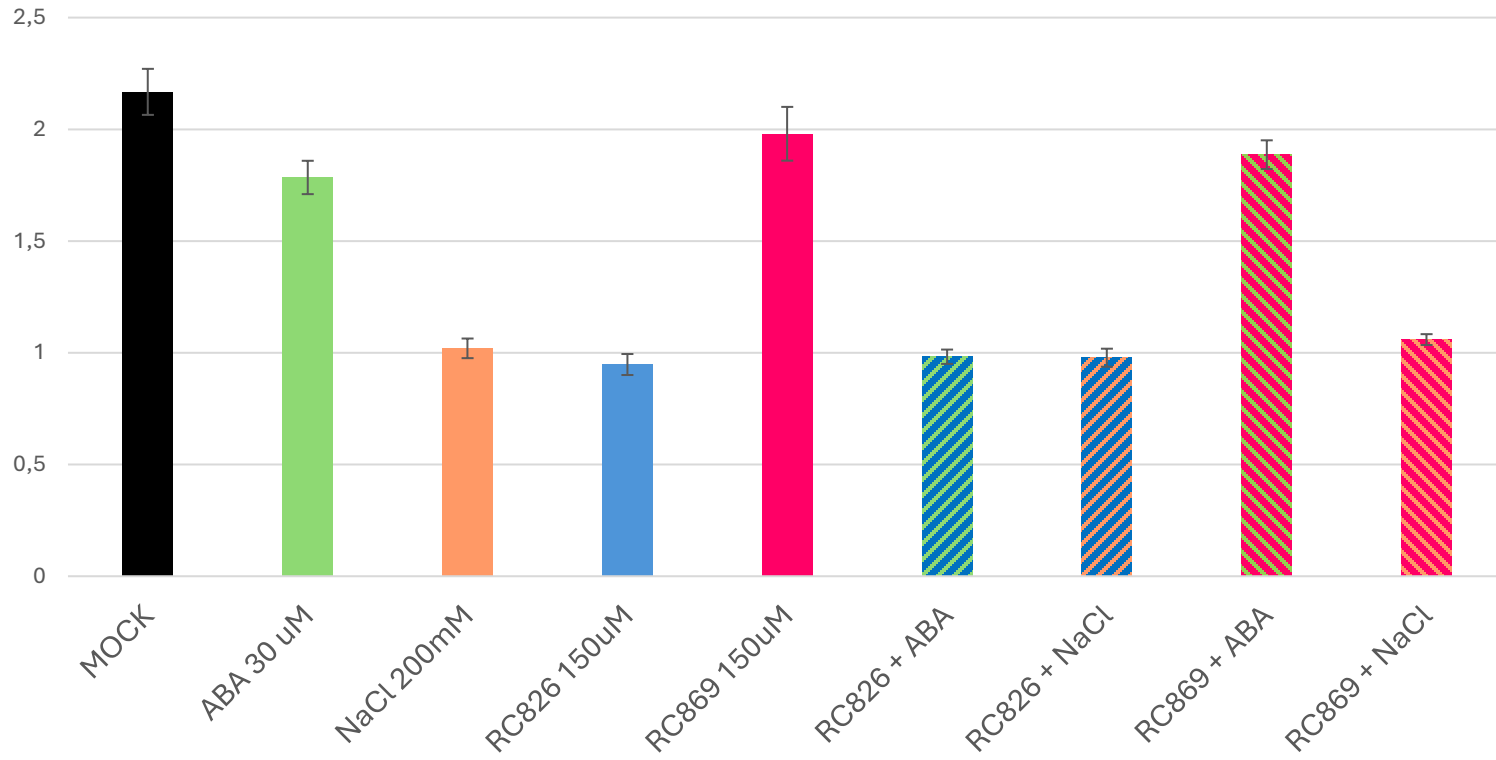


# RE-SCREENING DELLE MOLECOLE SELEZIONATE:

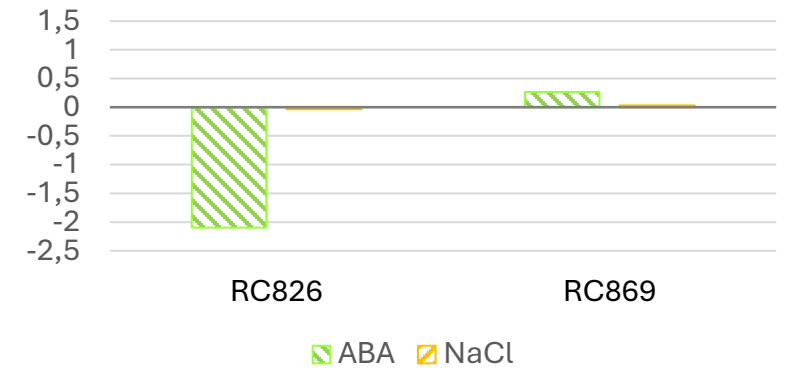
Caso studio II



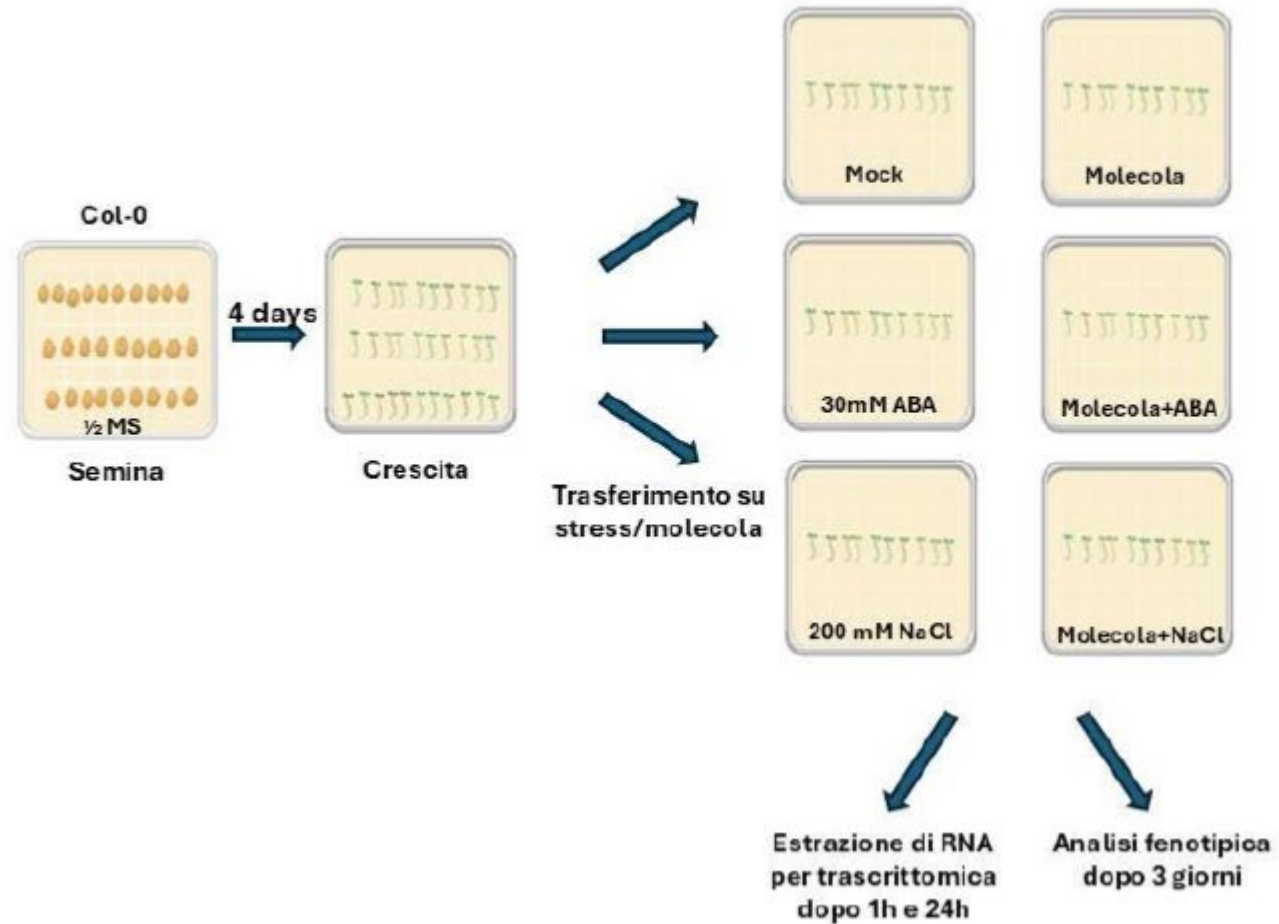
ROOT LENGTH



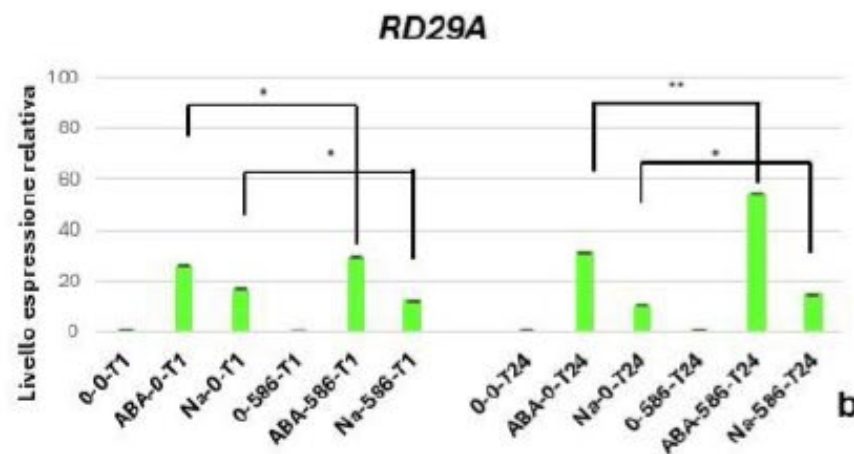
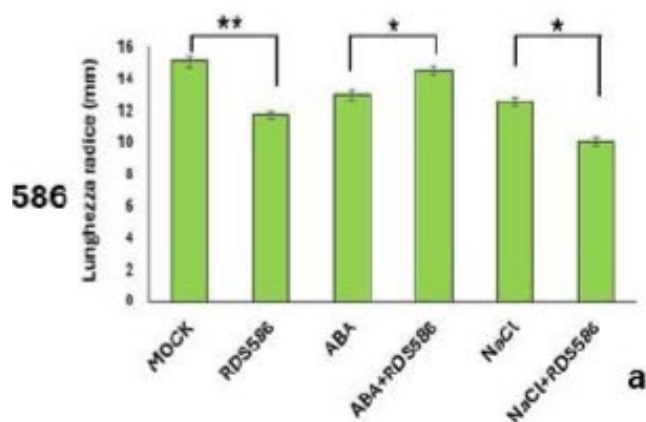
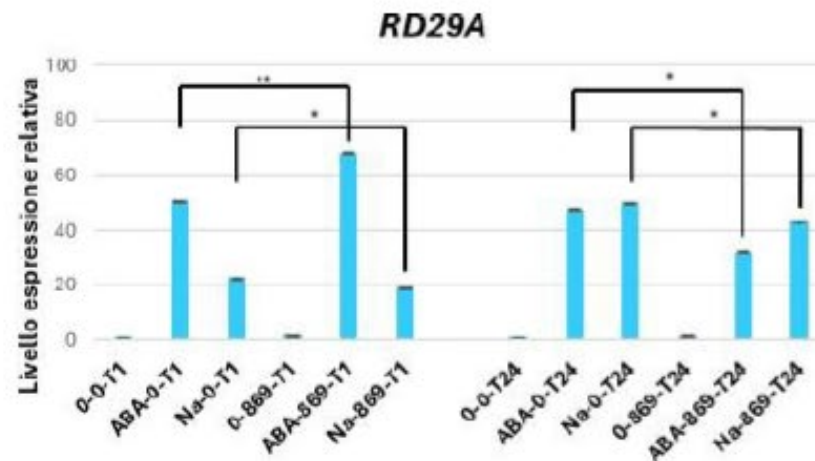
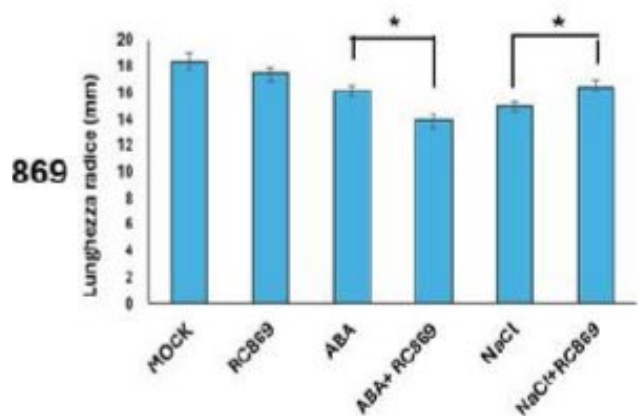
Indice di Recupero



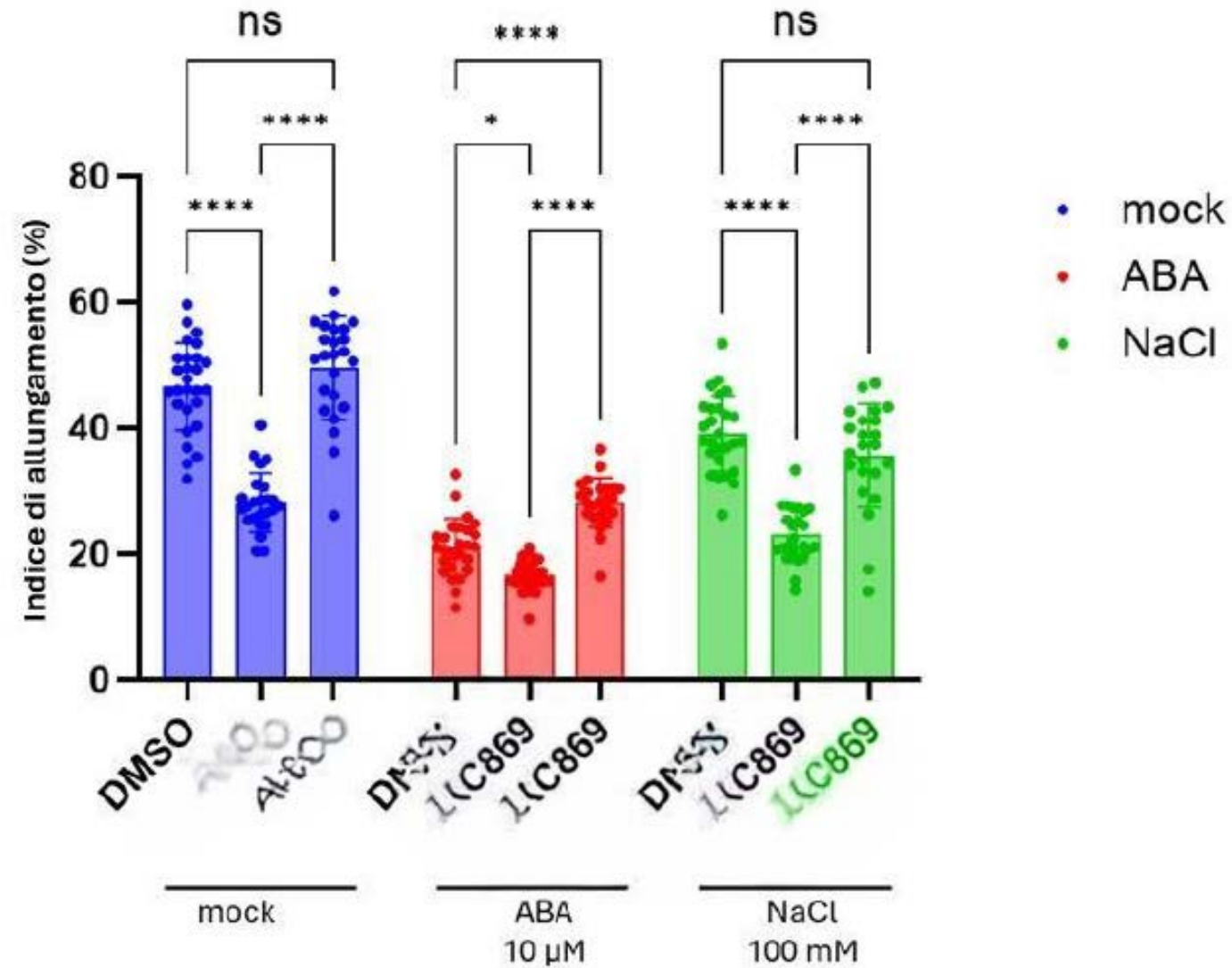
## Configurazione sperimentale dell'analisi fenotipica e trascrittomica sulle plantule



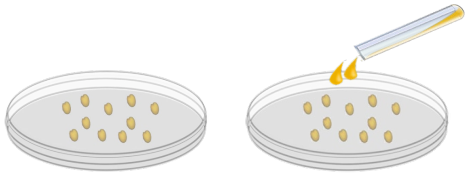
## Analisi degli effetti fenotipici e molecolari in *Arabidopsis*



# Analisi fenotipica in pomodoro

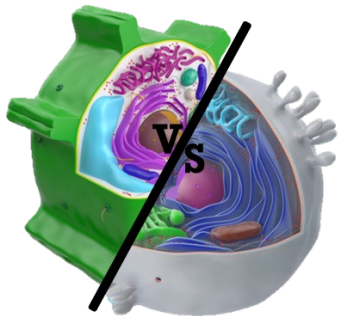
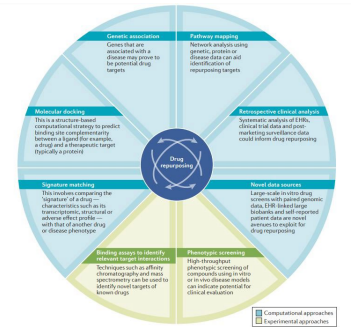


# Ricapitoliamo i punti principali:



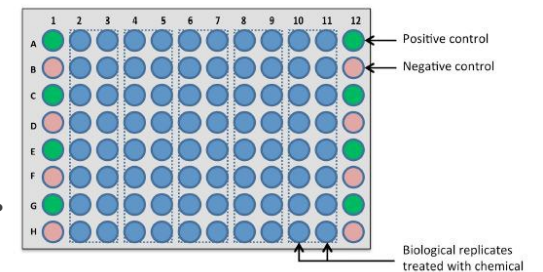
Strategie di genetica chimica, sia phenotype-based (forward) che target-based (reverse), risultano di estremo di interesse dalla ricerca applicativa a quella di base, fornendo un approccio alternativo e complementare alla genetica classica.

Sebbene il numero di small-molecules sia continuamente in aumento, le molecole testate e approvate sono una frazione esigua. Approcci di drug repurposing possono dare nuova luce a composti scartati, permettendo di risparmiare risorse.



Strategie di drug repurposing permettono inoltre di sfruttare la gigantesca disponibilità di molecole prodotte in campi molto finanziati, come la ricerca contro il cancro, in altri campi di ricerca mediante HTS e analisi preliminari *in silico*.

*Research goes slowly:* screening per identificare composti bioattivi in organismi diversi da quelli inizialmente target sono lunghi e dispendiosi. Normalmente le librerie testate contengono (decine di) migliaia di molecole, di cui solo una minima frazione viene ammessa a test successivi.



**Grazie per l'attenzione**

**Domande?**

[chiara.longo@uniroma1.it](mailto:chiara.longo@uniroma1.it)

# Altri esempi su piante del nostro laboratorio... per approfondire

[Home](#) > [BMC Plant Biology](#) > [Article](#)

## Inhibition of Polycomb Repressive Complex 2 activity reduces trimethylation of H3K27 and affects development in *Arabidopsis* seedlings

Research article | Open access | Published: 16 October 2019



International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

## New Inhibitors of the Human p300/CBP Acetyltransferase Are Selectively Active against the Arabidopsis HAC Proteins

Chiara Longo <sup>1,†</sup>, Andrea Lepri <sup>1,†</sup>, Andrea Paciolla <sup>1</sup>, Antonella Messore <sup>2</sup>, Daniela De Vita <sup>3</sup>, Maria Carmela Bonaccorsi di Patti <sup>4</sup>, Matteo Amadei <sup>4</sup>, Valentina Noemi Madia <sup>2</sup>, Davide Ialongo <sup>2</sup>, Roberto Di Santo <sup>2</sup>, Roberta Costi <sup>2</sup> and Paola Vittorioso <sup>1,\*</sup>



Review

## Plants and Small Molecules: An Up-and-Coming Synergy

A. Lepri <sup>1,†</sup>, C. Longo <sup>1,†</sup>, A. Messore <sup>2</sup>, H. Kazmi <sup>1</sup>, V. N. Madia <sup>2</sup>, R. Di Santo <sup>2</sup>, R. Costi <sup>2</sup> and P. Vittorioso <sup>1,\*</sup>