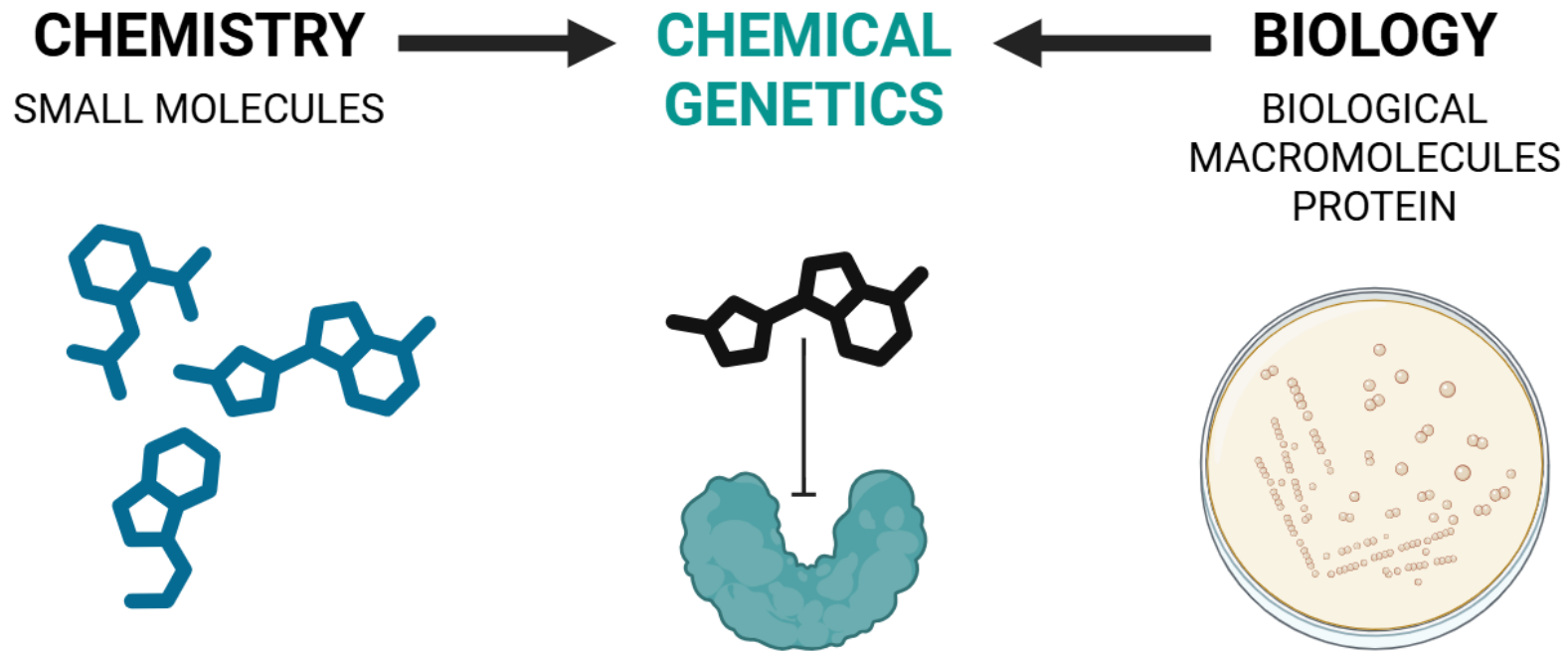


Genetica chimica: un approccio alternativo per lo studio di sistemi biologici complessi mediante l'utilizzo di *small-molecules*



Basi teoriche e casi studio

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

Introduzione

Cenni storici

Approcci di
genetica chimica

High-throughput
screening

Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

Uno sguardo al
mondo vegetale

Cenni storici

Esempi storici di successo (ad hoc)

- **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

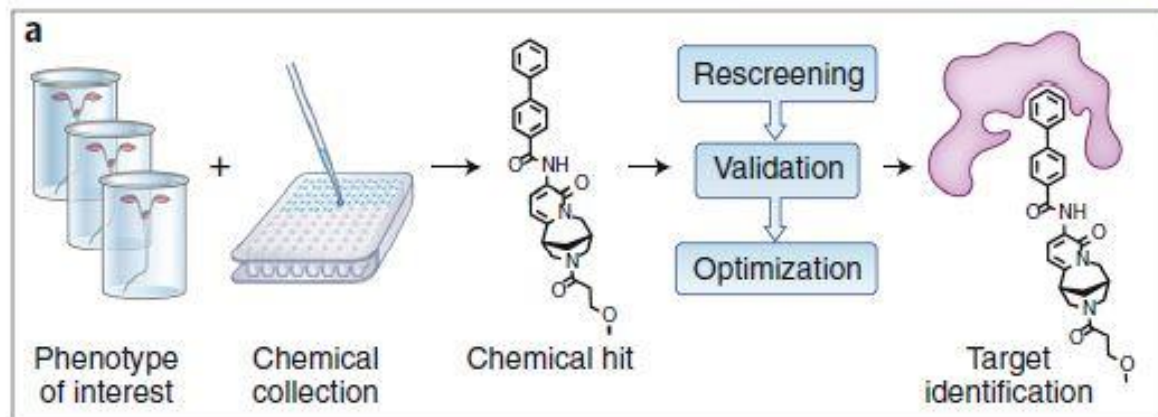


Uno sguardo al
mondo vegetale

Step sperimentali nei due approcci

(Hypothesis-generating)

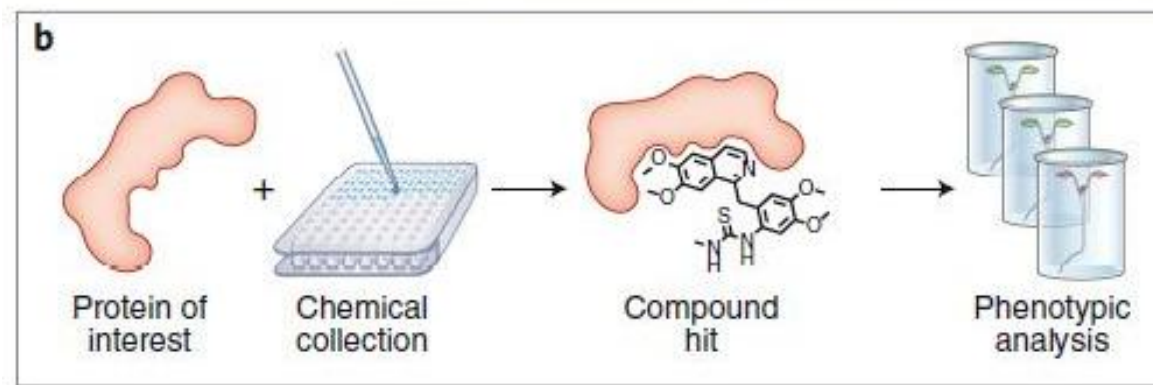
Forward chemical genetics



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

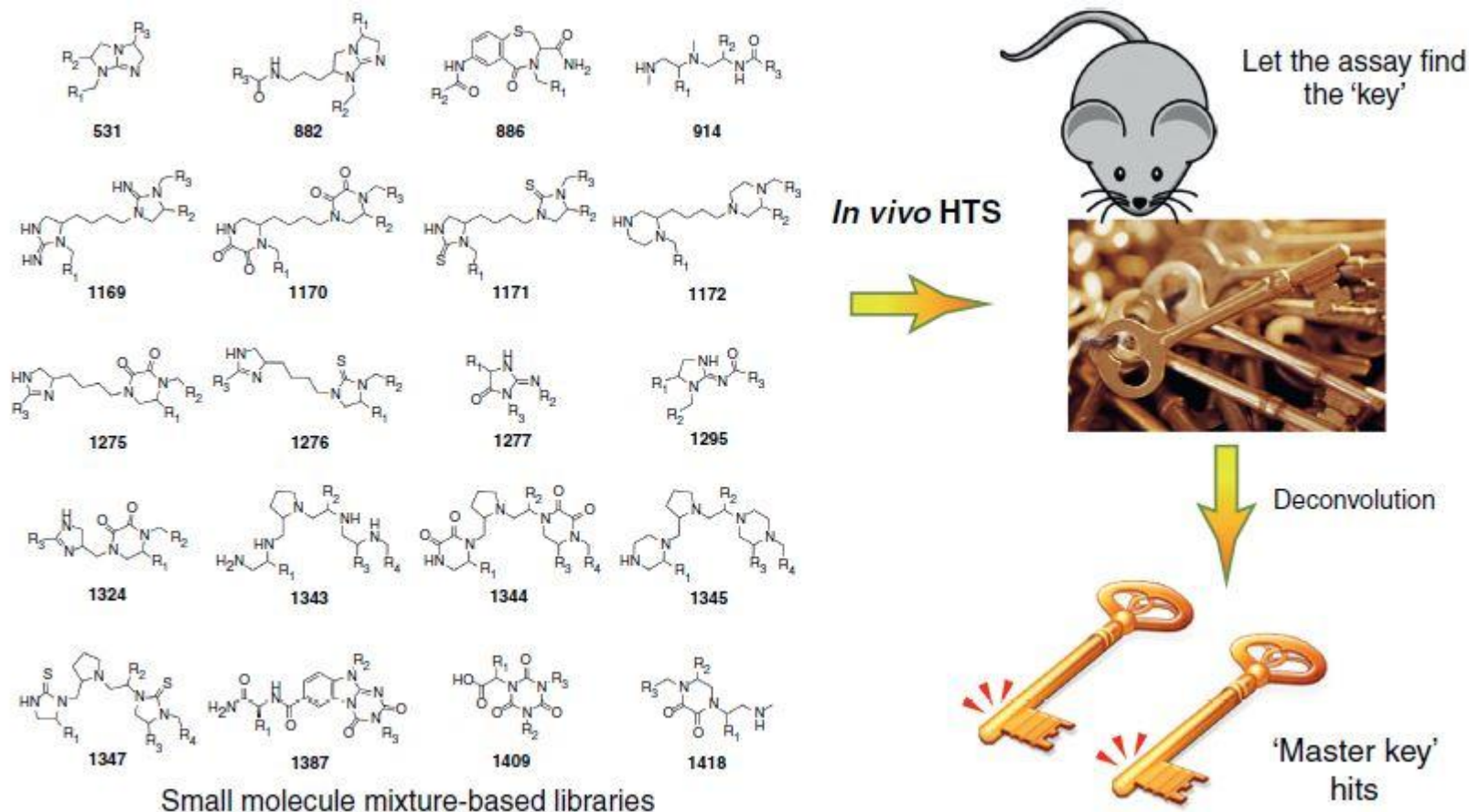
High-throughput
screening

Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

Uno sguardo al
mondo vegetale

High-throughput screening



Introduzione

Cenni storici

Approcci di
genetica chimica

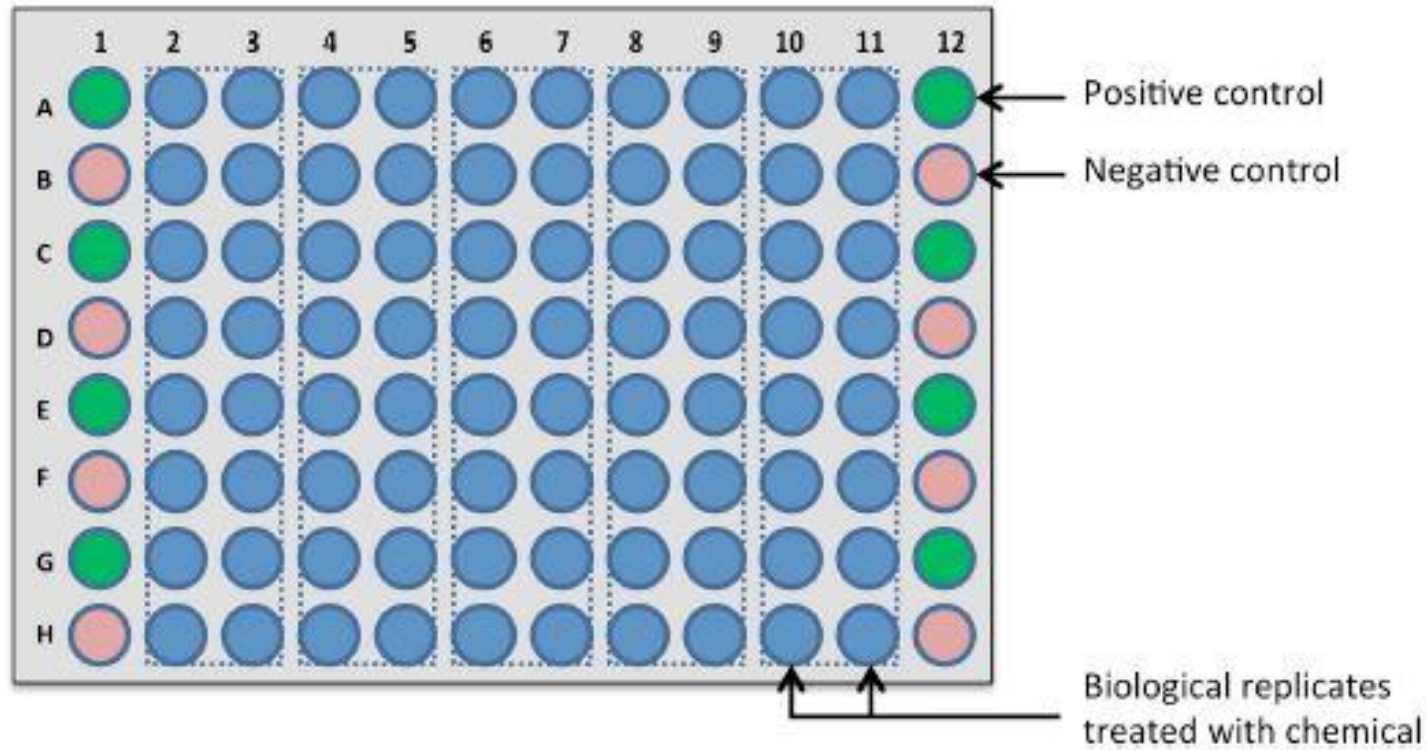
High-throughput
screening

Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

Uno sguardo al
mondo vegetale

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

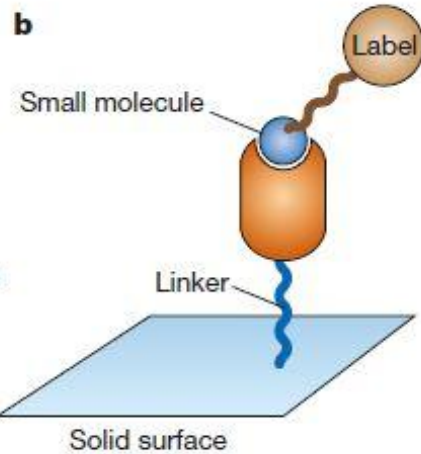
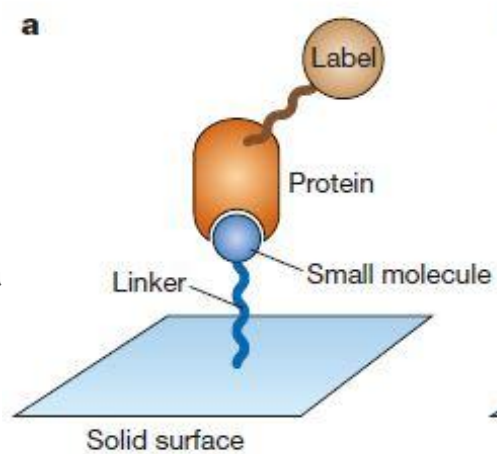
Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

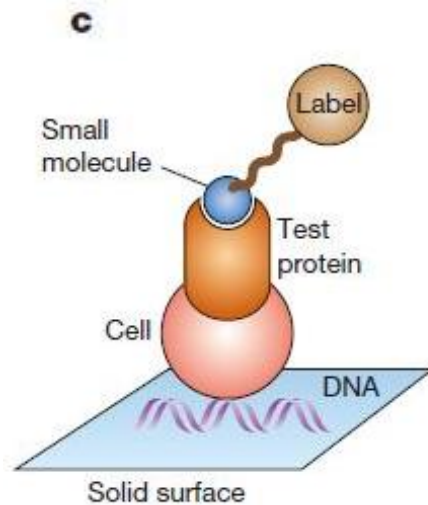
Uno sguardo al
mondo vegetale

Metodi di screening

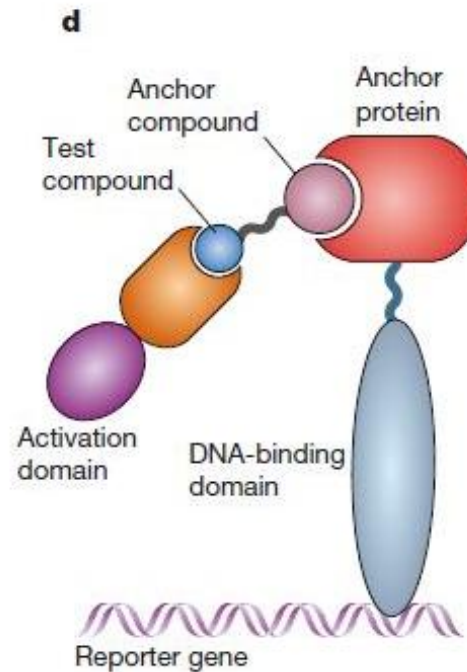
Small molecules covalently linked to a surface



Cells microarray that overexpress desired protein



Protein immobilized on a surface



Yeast threehybrid system

Introduzione

Cenni storici



Approcci di genetica chimica



High-throughput screening



Drug repurposing

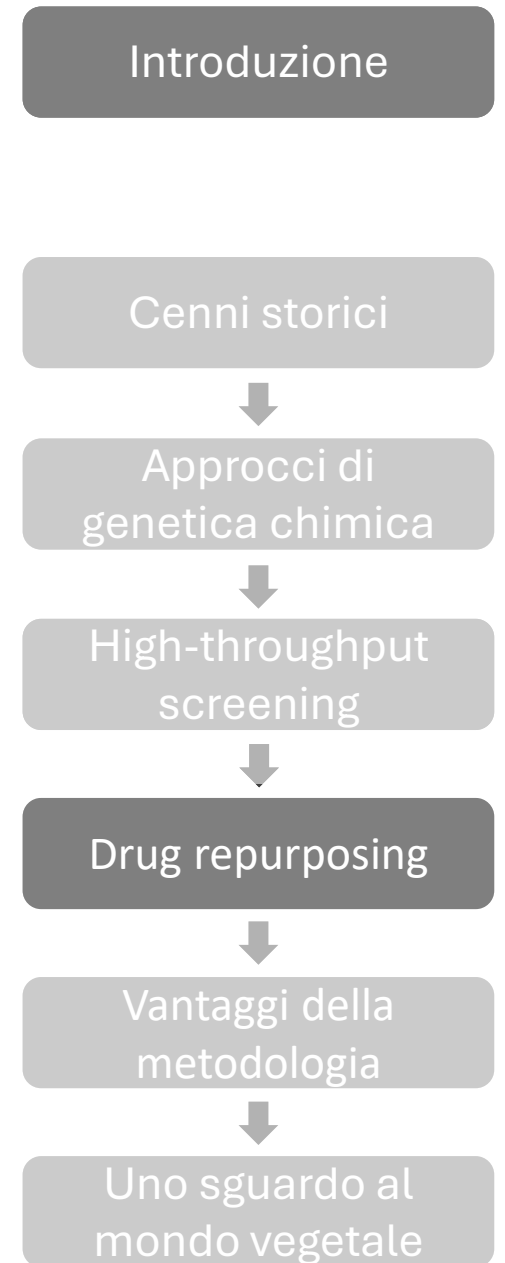


Vantaggi della metodologia



Uno sguardo al mondo vegetale

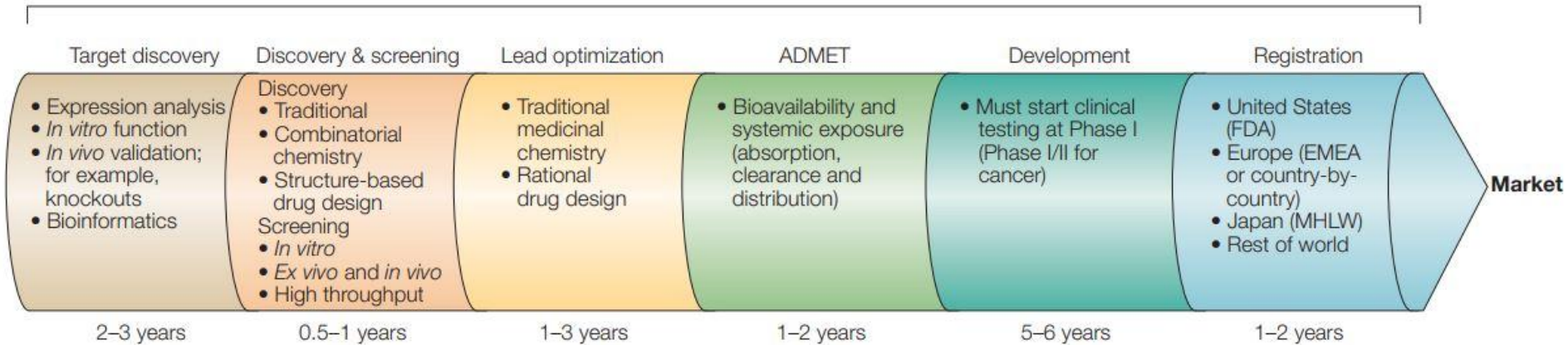
Quali small molecules?



Processo di drug discovery *de novo*

a

De novo drug discovery and development
• 10–17 year process
• <10% overall probability of success



Introduzione

Cenni storici

Approcci di
genetica chimica

High-throughput
screening

Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

Uno sguardo al
mondo vegetale

Risk-reward



Introduzione

Cenni storici



Approcci di
genetica chimica



High-throughput
screening



Drug repurposing

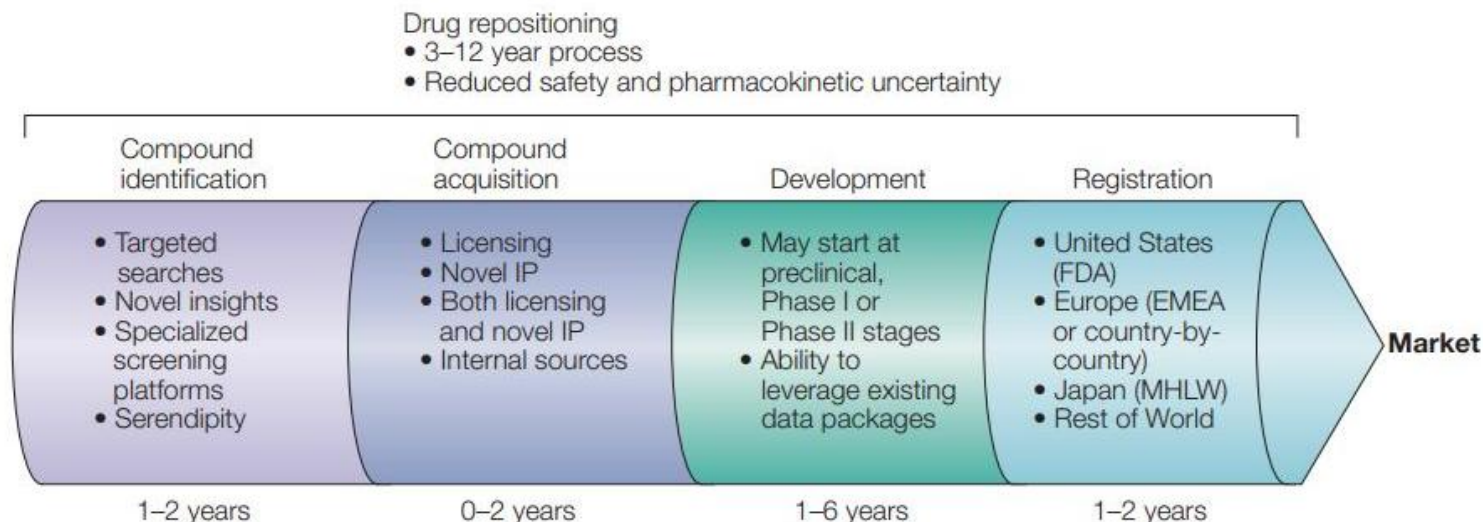


Vantaggi della
metodologia



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



Introduzione

Cenni storici

Approcci di
genetica chimica

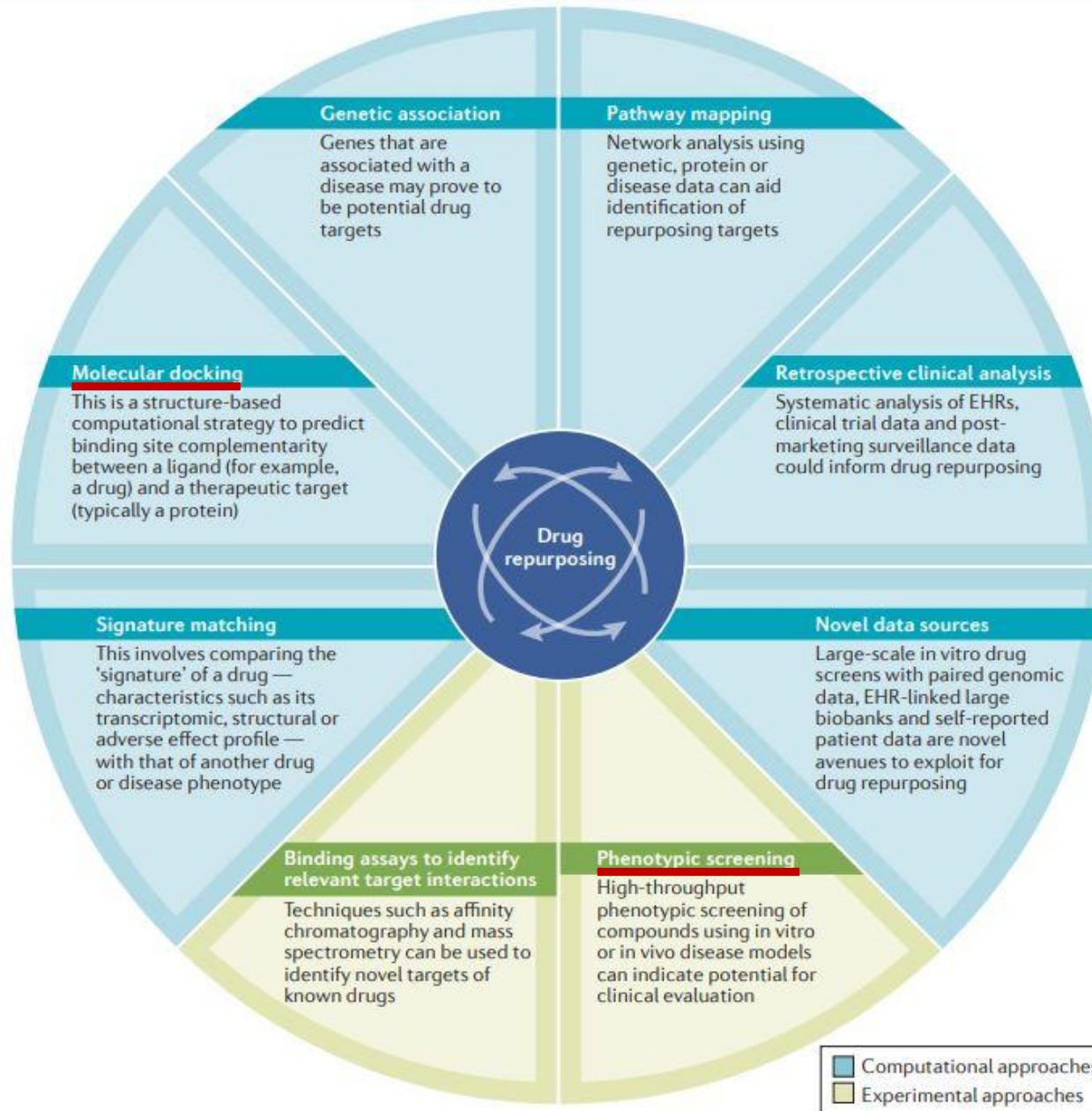
High-throughput
screening

Drug repurposing

Vantaggi della
metodologia

Uno sguardo al
mondo vegetale

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/>

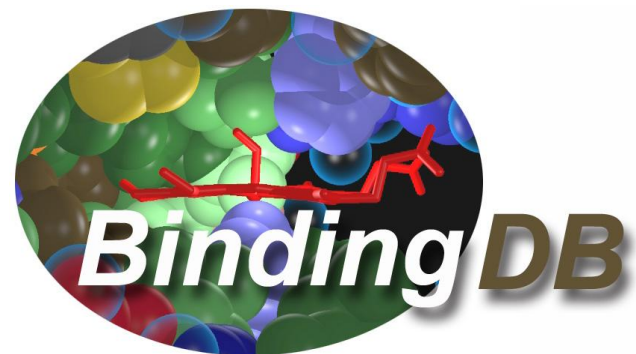
PubChem



ChEMBL



BindingDB



Introduzione

Cenni storici

Approcci di
genetica chimica

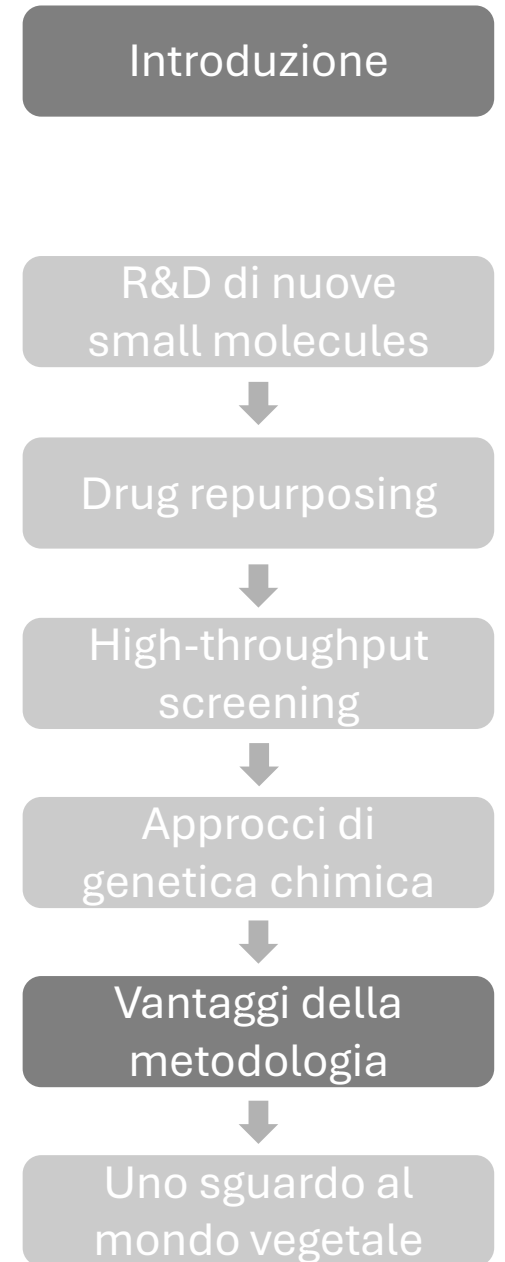
High-throughput
screening

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

Introduzione

R&D di nuove
small molecules



Drug repurposing



High-throughput
screening



Approcci di
genetica chimica



Vantaggi della
metodologia



Uno sguardo al
mondo vegetale

Caso studio I – epigenetic

5-Azacytidine and pancreatic cancer

Caso studio I

Basi
dell'epigenetica



Metilazione del DNA
e cancro



5-Azacitidina
e analoghi



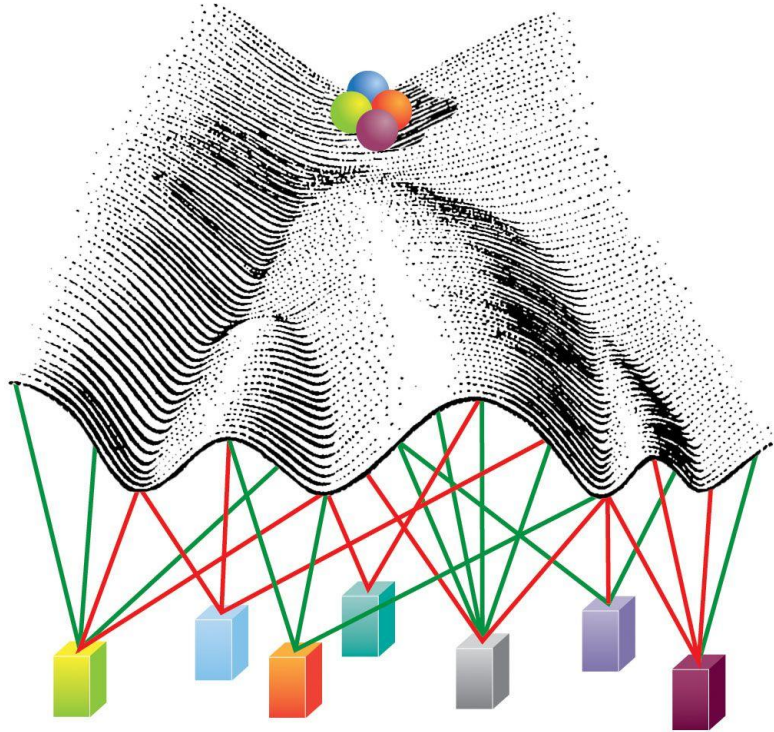
Dati sperimentali



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

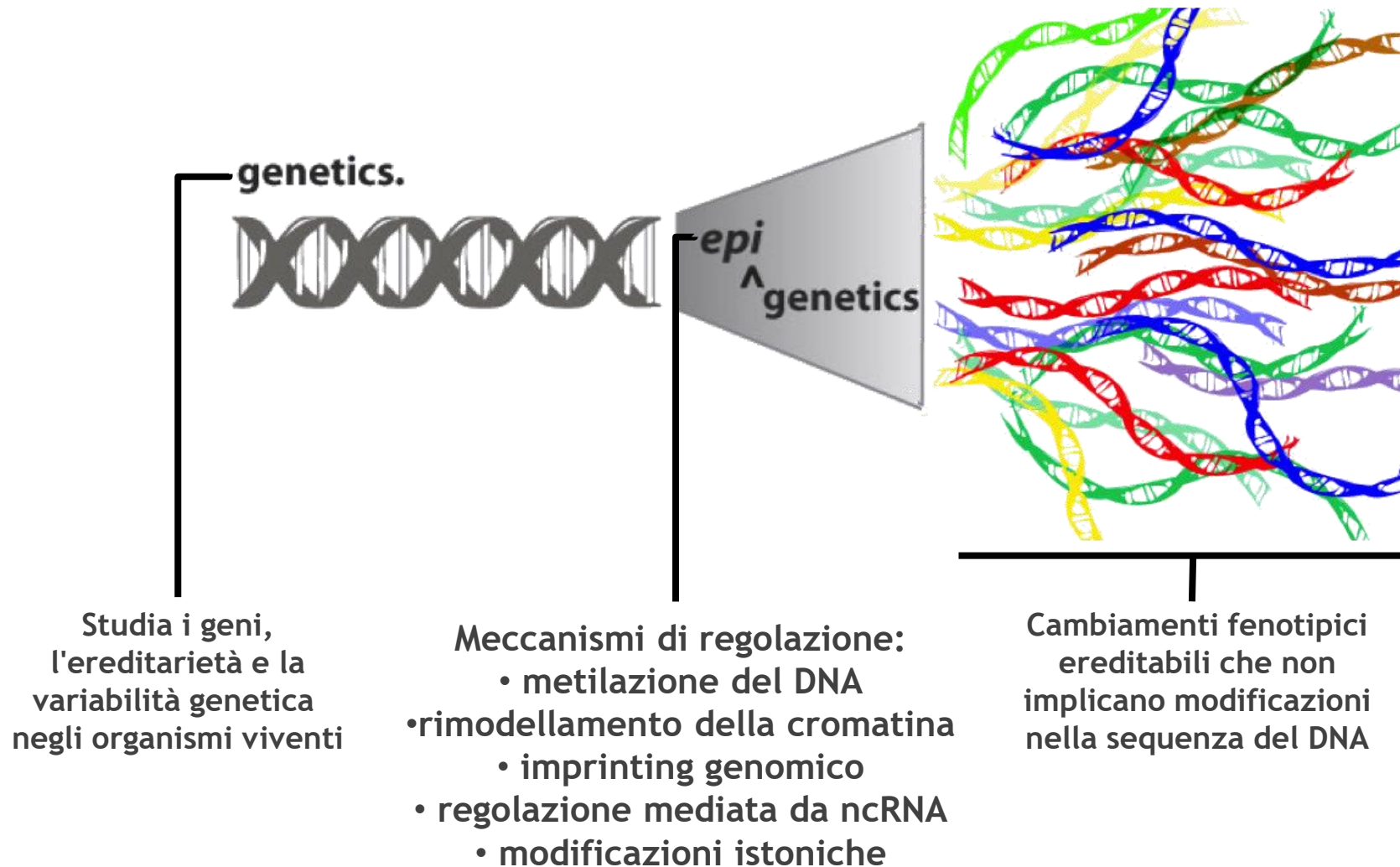


Dati sperimentali



Modello

Meccanismi di regolazione epigenetici



Caso studio I

Basi dell'epigenetica

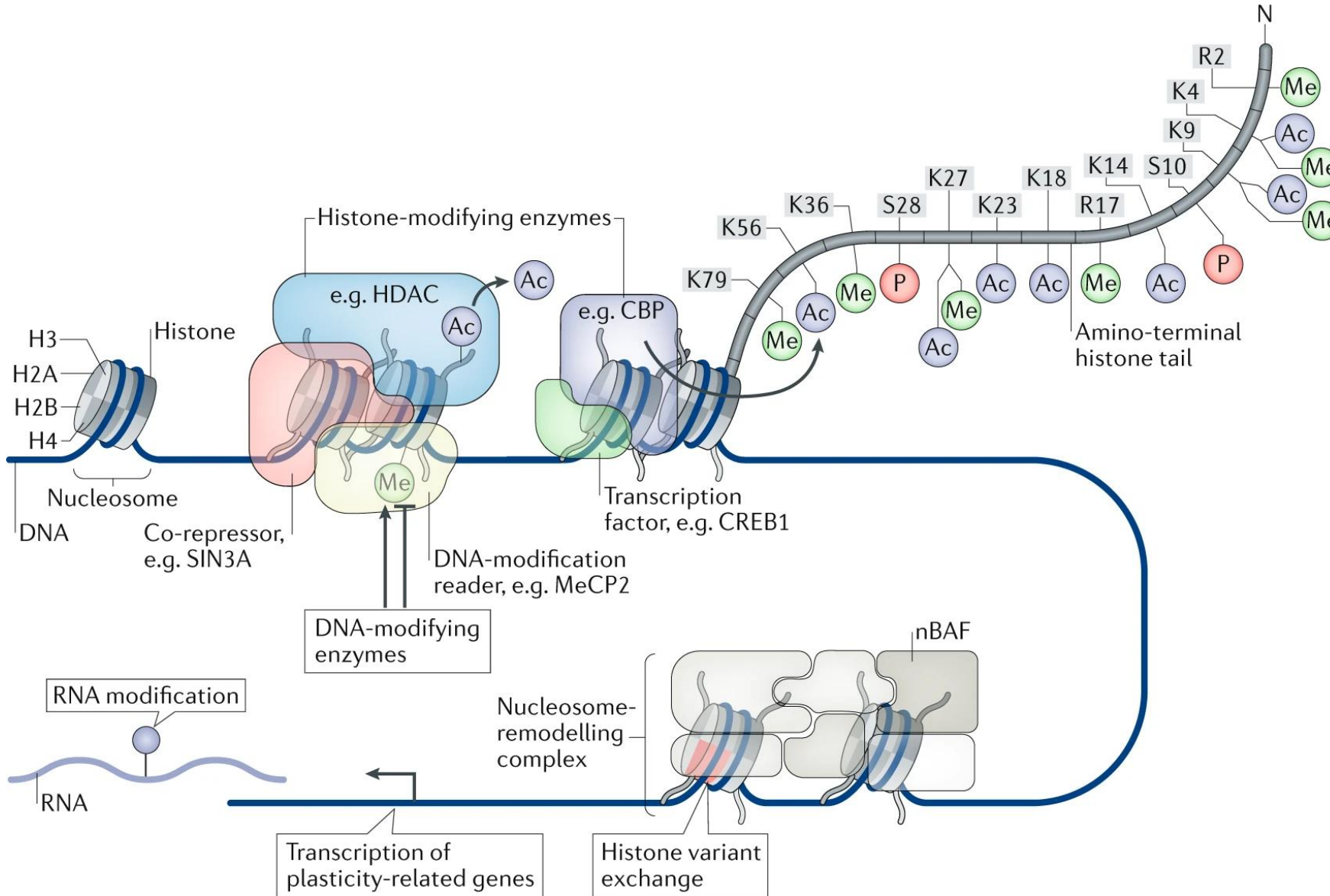
Metilazione del DNA e cancro

5-Azacitidina e analoghi

Dati sperimentali

Modello

Panoramica: la complessità della regolazione



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica

Metilazione del DNA
e cancro

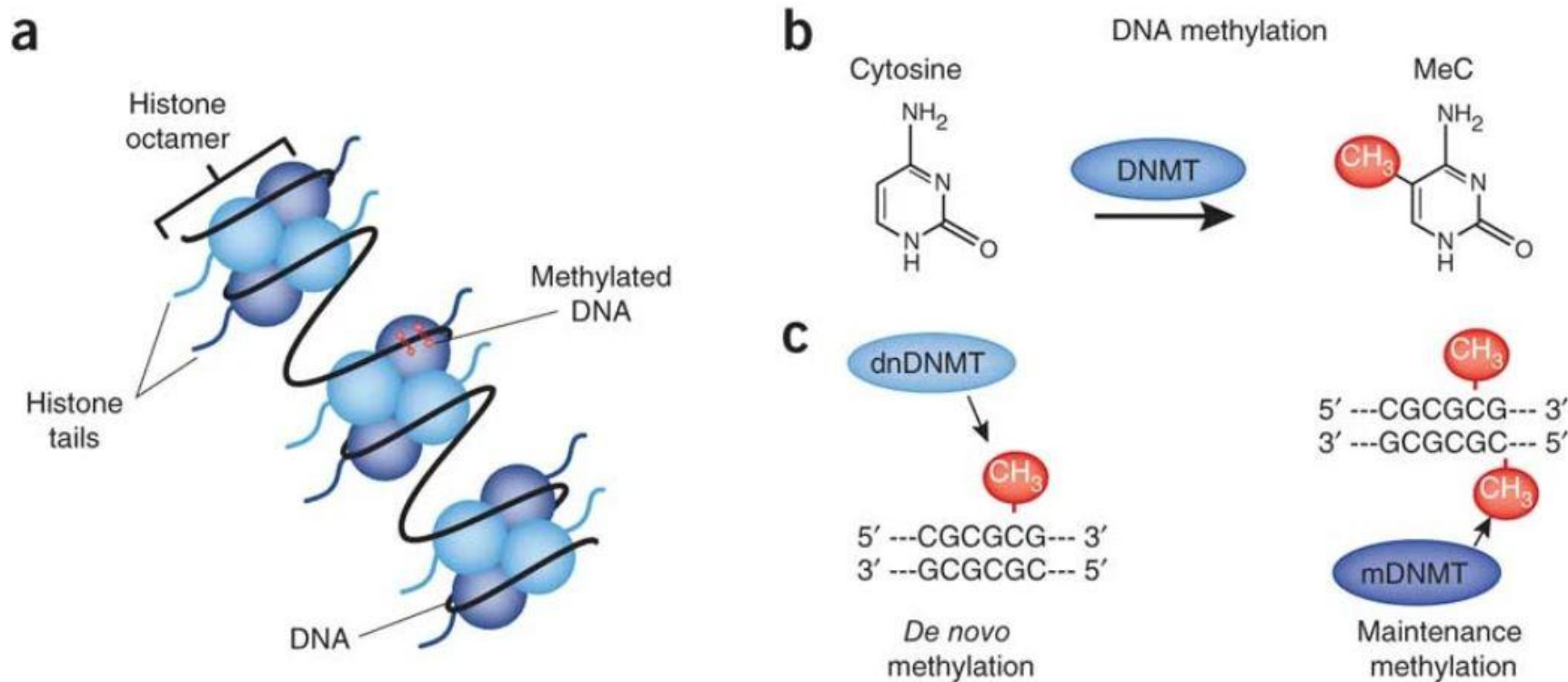
5-Azacitidina
e analoghi

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

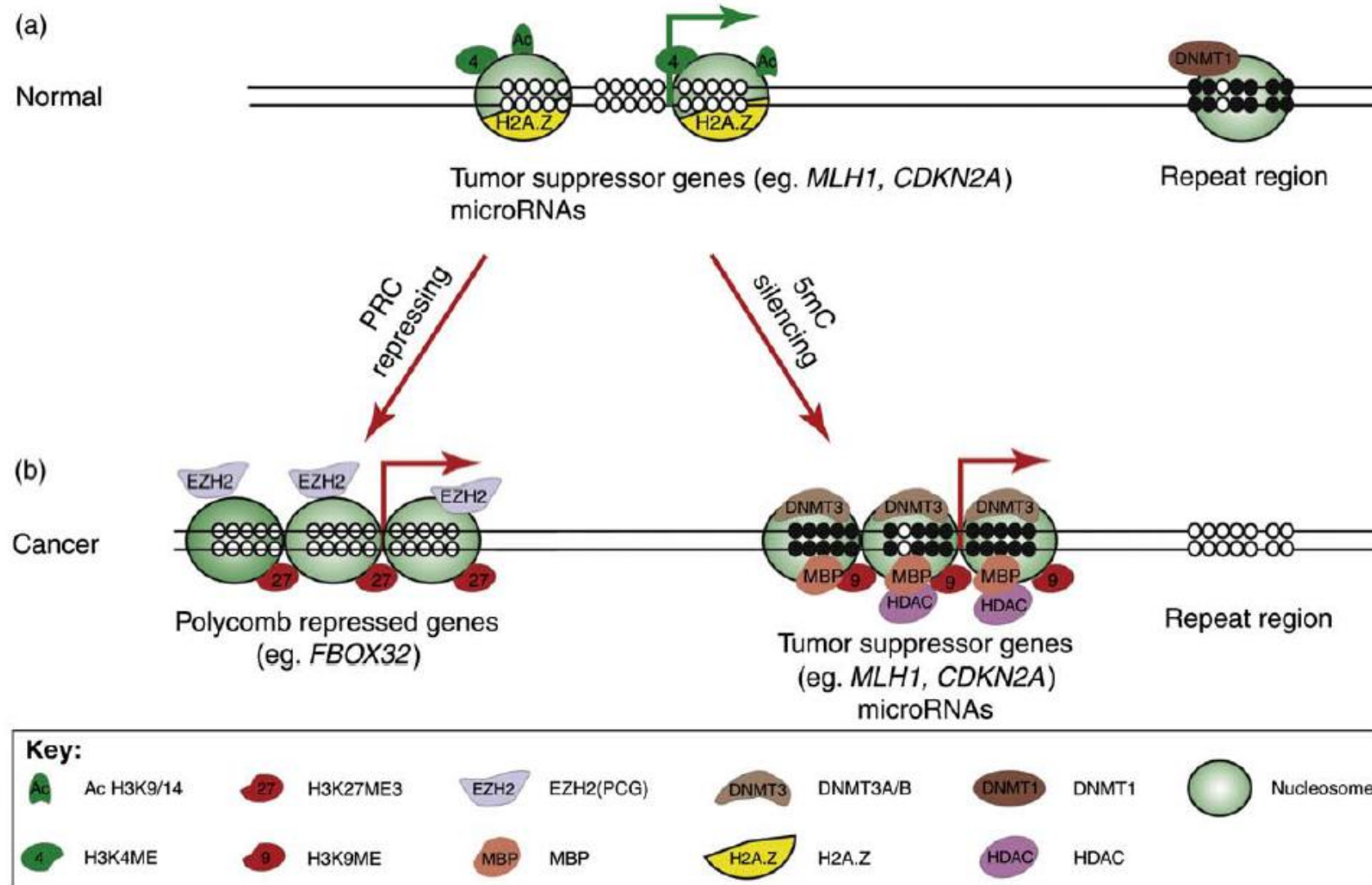
Metilazione del DNA
e cancro

5-Azacitidina
e analoghi

Dati sperimentali

Modello

Alterazioni epigenetiche in cellule tumorali



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica

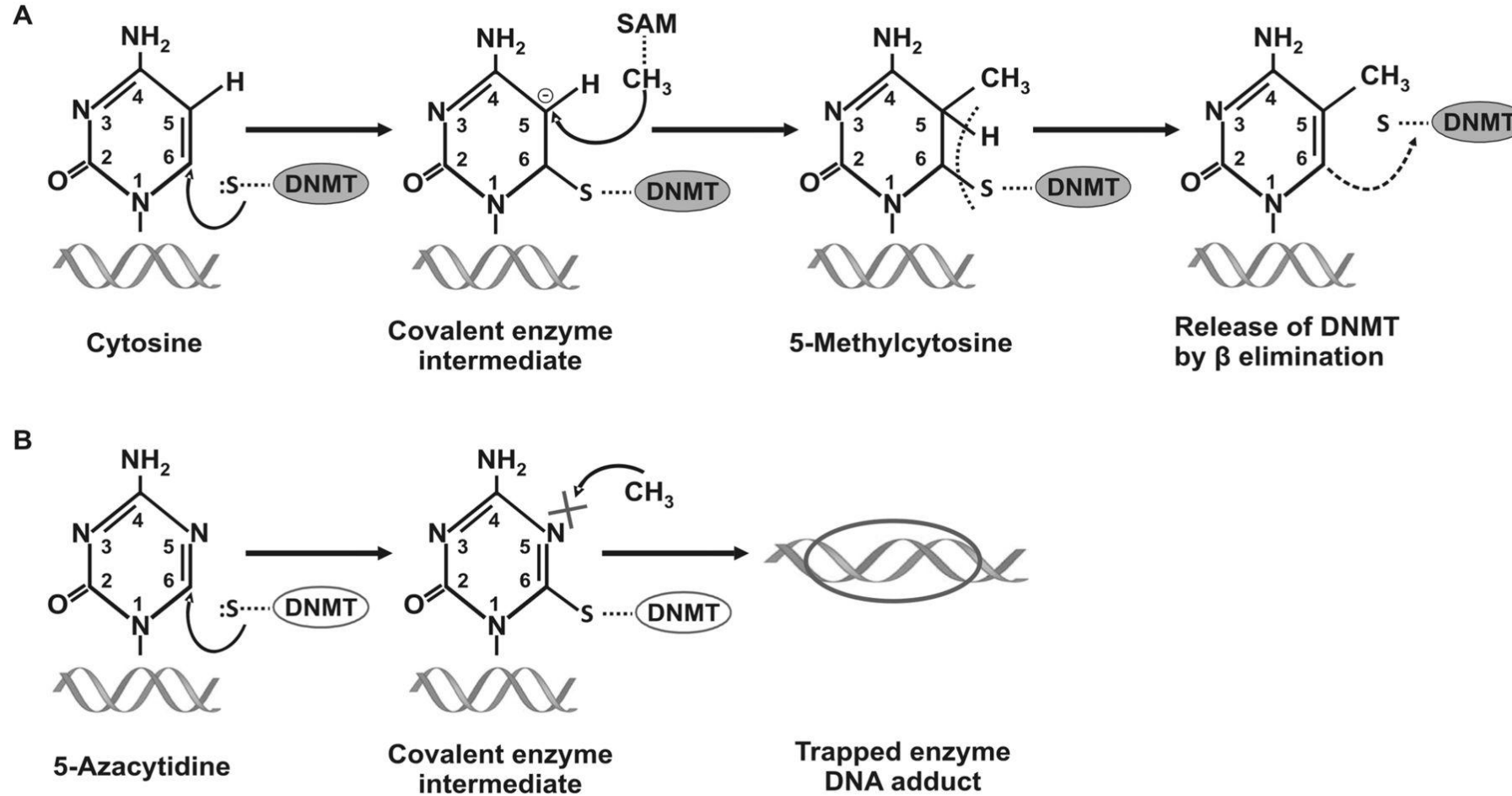
Metilazione del DNA
e cancro

5-Azacidina
e analoghi

Dati sperimentali

Modello

5-azacytidine – meccanismo d'azione



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica

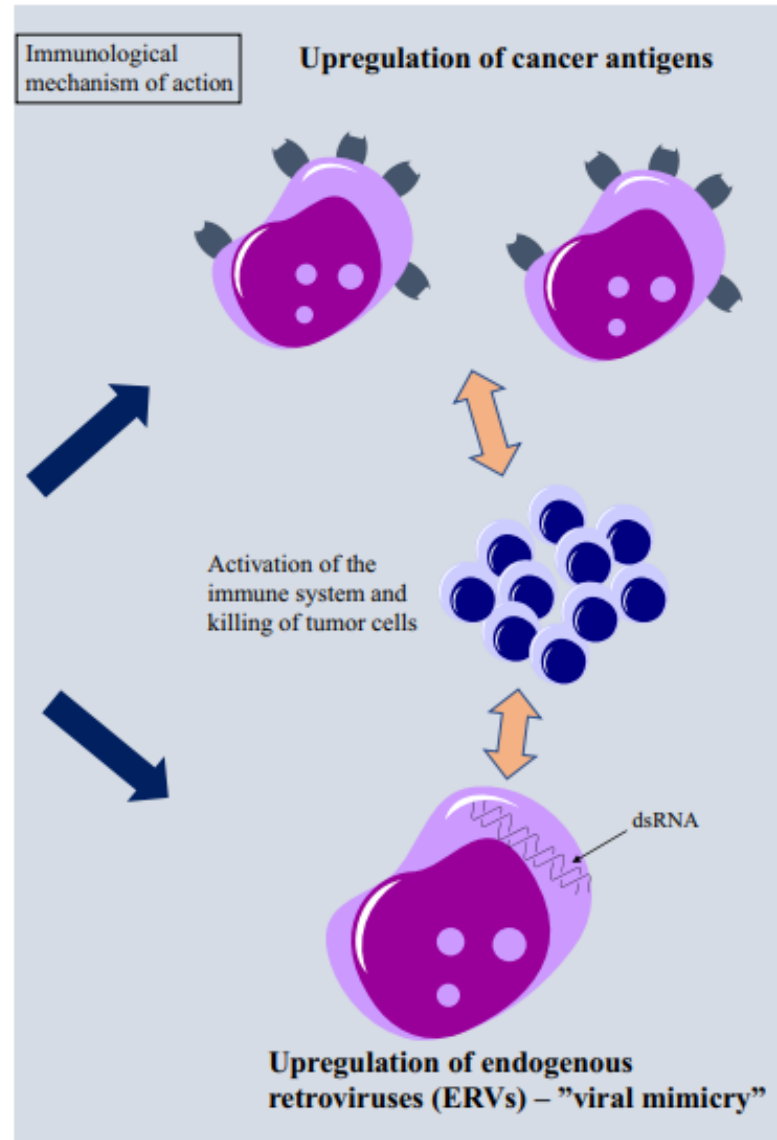
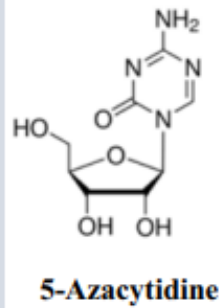
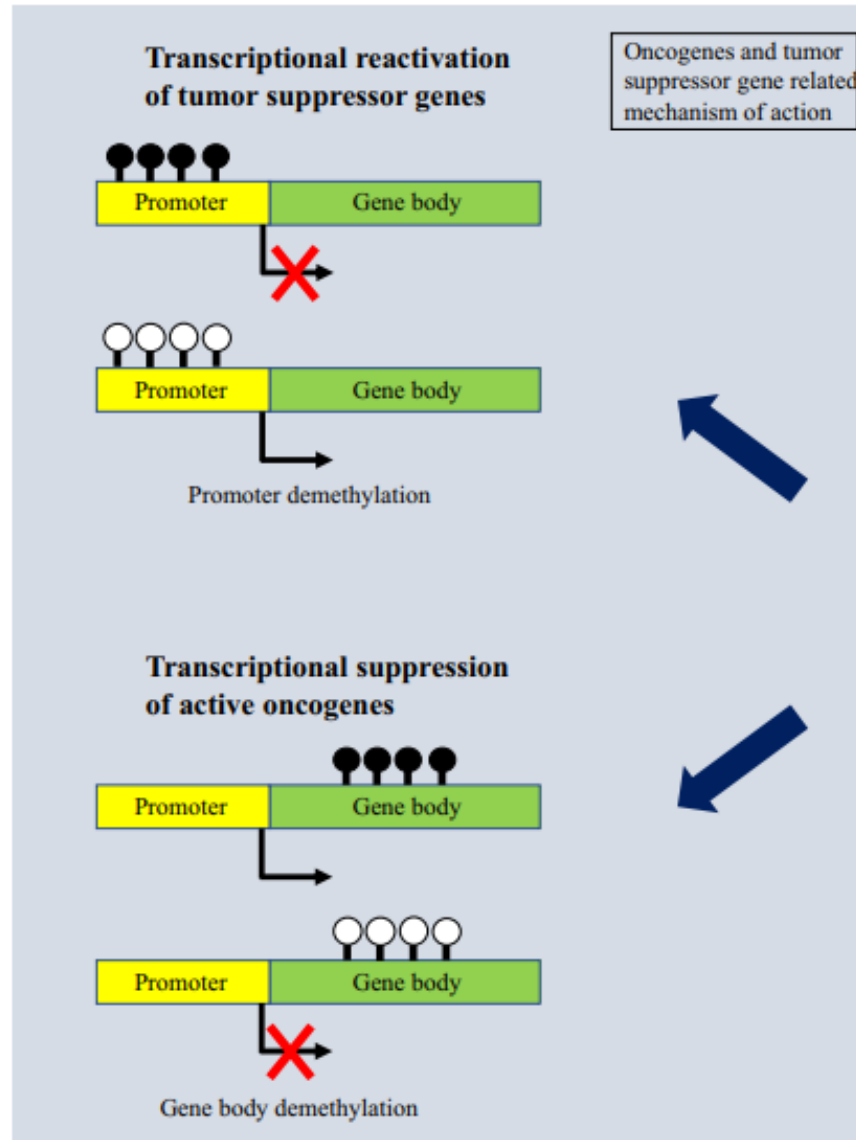
Metilazione del DNA
e cancro

5-Azacytidina
e analoghi

Dati sperimentali

Modello

5-azacytidine – applicazioni



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica

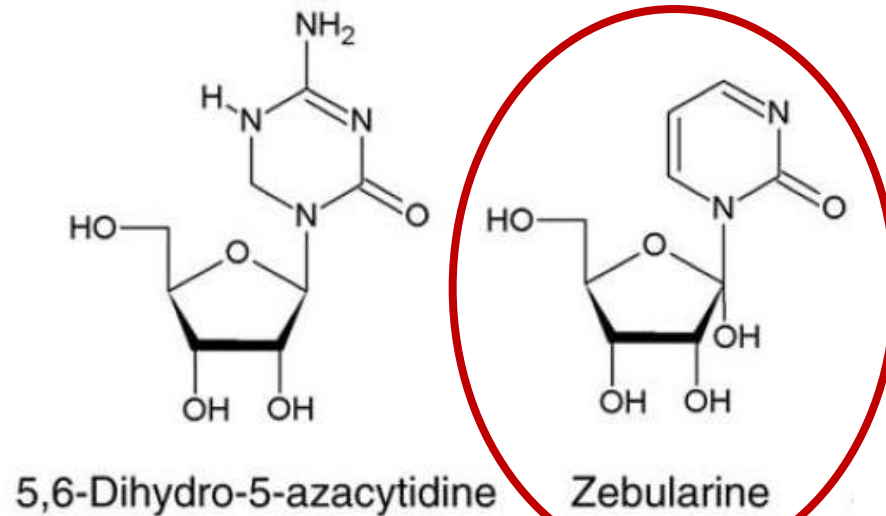
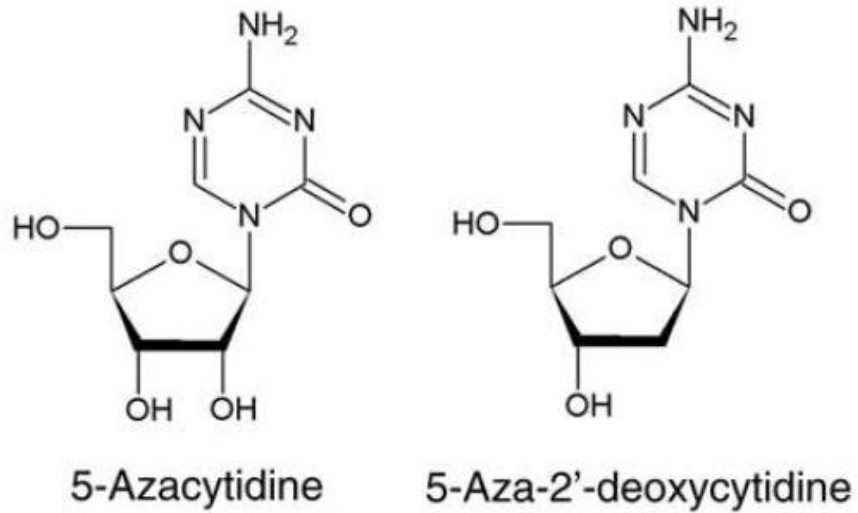
Metilazione del DNA
e cancro

5-Azacitidina
e analoghi

Dati sperimentali

Modello

Nucleosidi analoghi



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica



Metilazione del DNA
e cancro



5-Azacitidina
e analoghi



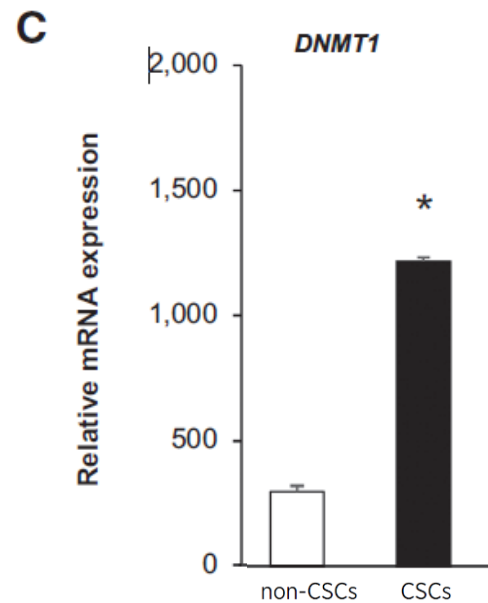
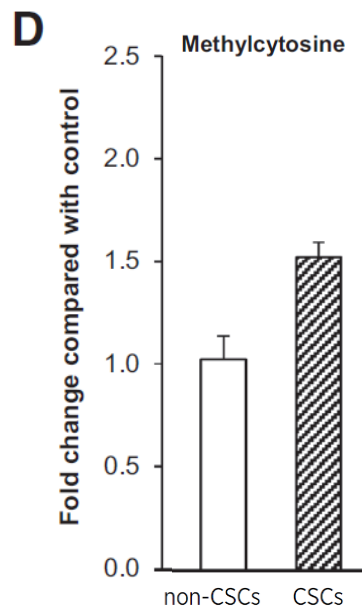
Dati sperimentali



Modello

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

Sladjana Zagorac^{1,2}, Sonia Alcala^{2,3}, Gustavo Fernandez Bayon⁴, Tony Bou Kheir¹, Matthieu Schoenhals¹, Anna González-Neira⁵, Mario Fernandez Fraga⁴, Alexandra Aicher^{1,2}, Christopher Heeschen^{1,2}, and Bruno Sainz, Jr.^{2,3}



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica



Metilazione del DNA
e cancro



5-Azacitidina
e analoghi

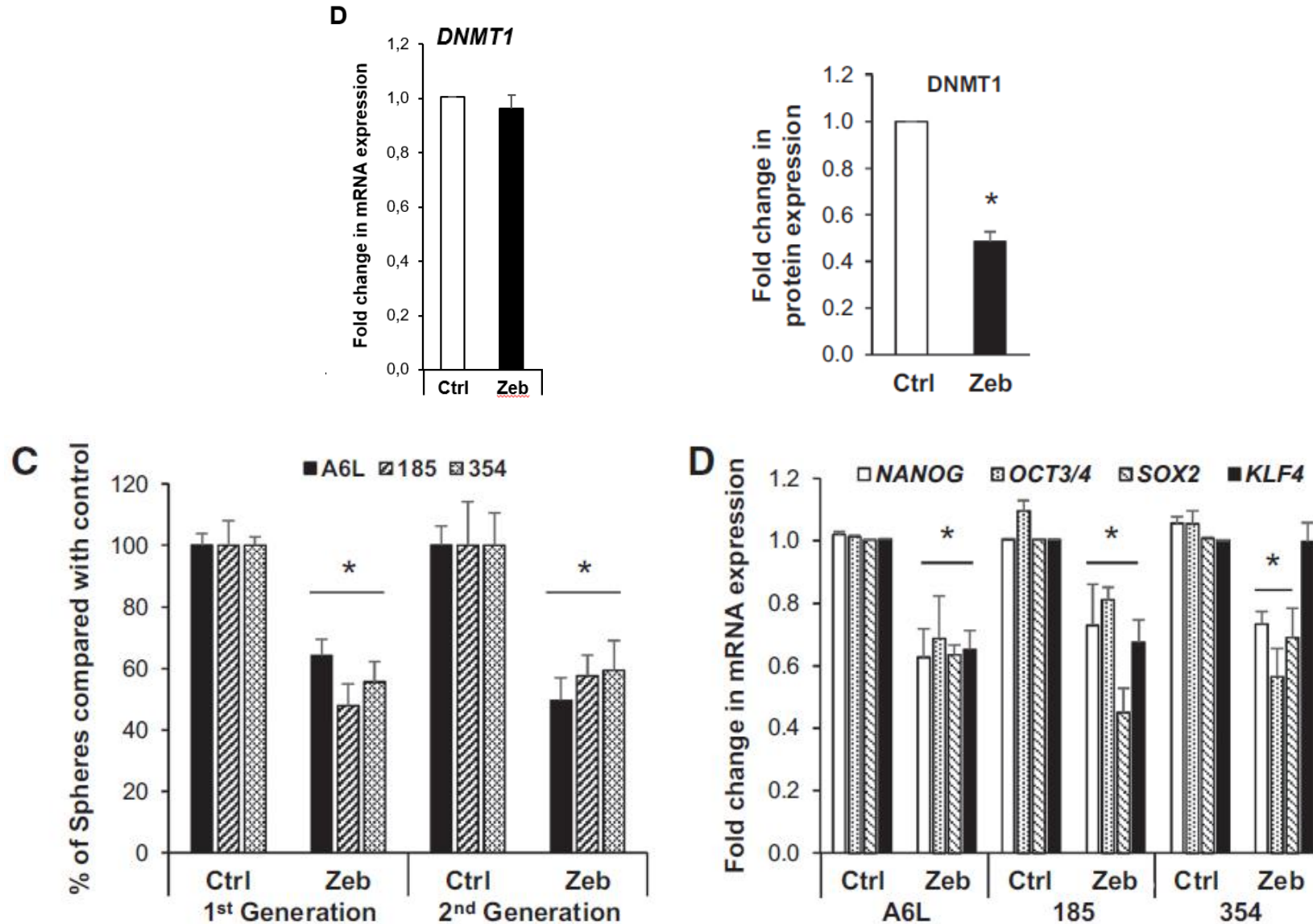


Dati sperimentali



Modello

Effetti del trattamento con Zebularina



Caso studio I

Basi
dell'epigenetica



Metilazione del DNA
e cancro



5-Azacitidina
e analoghi



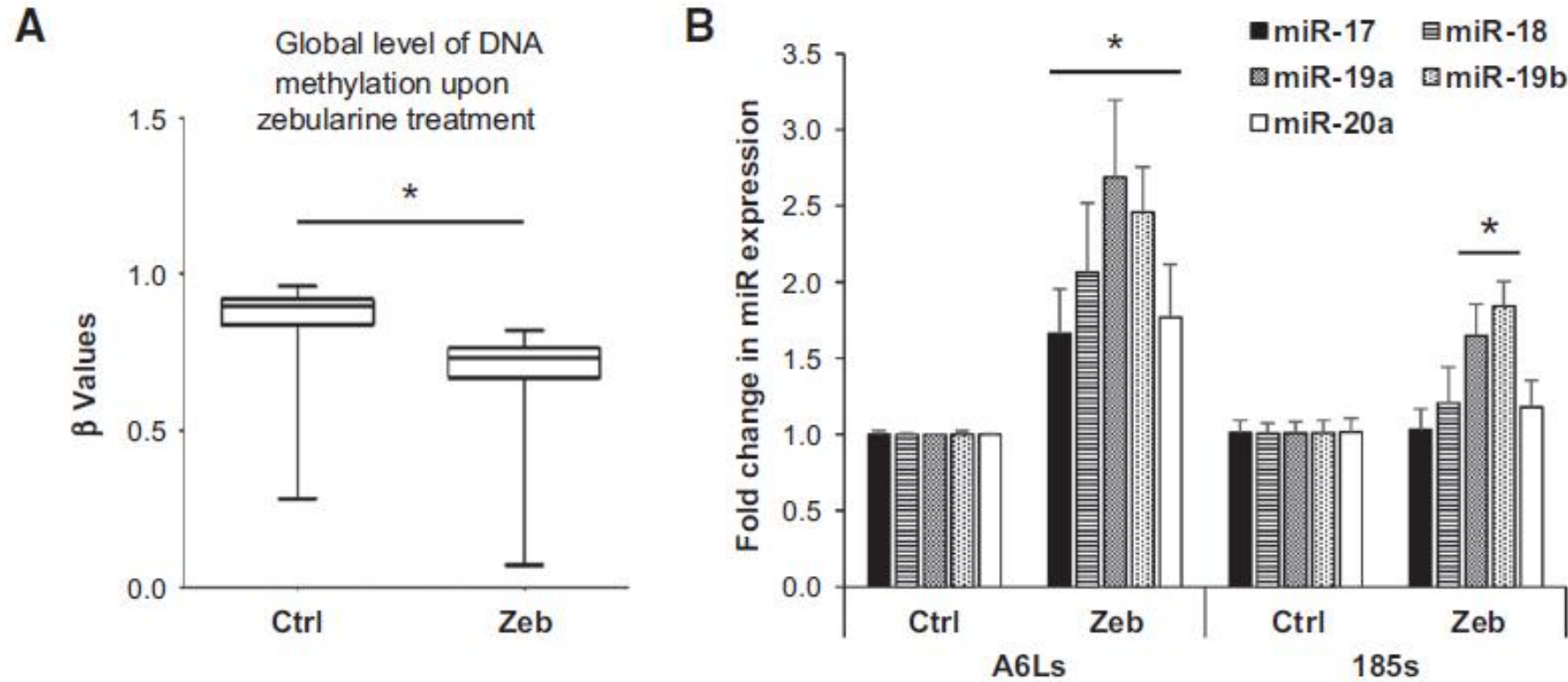
Dati sperimentali



Modello

Attivazione del *cluster* miR-17-92

Caso studio II



Basi
dell'epigenetica

Metilazione del DNA
e cancro

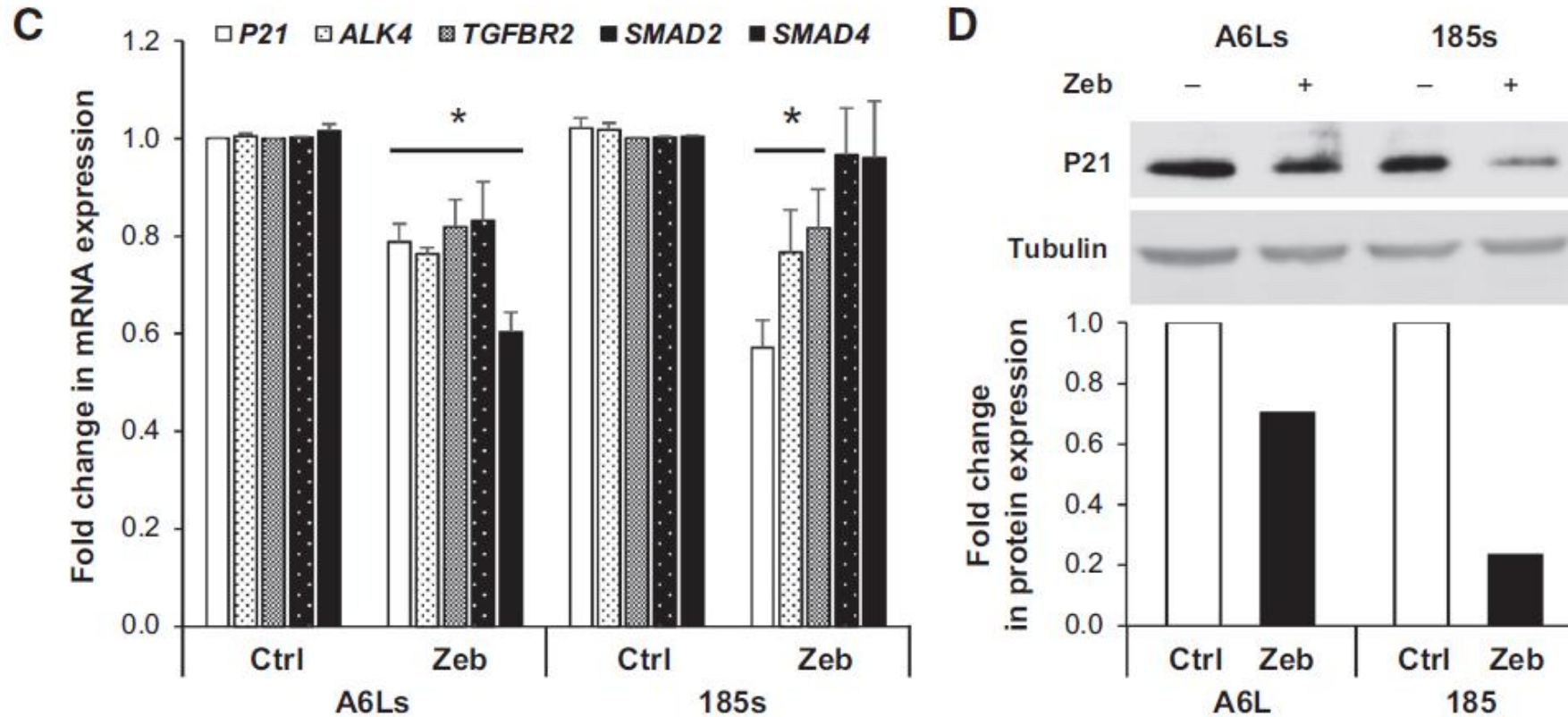
5-Azacitidina
e analoghi

Dati sperimentali

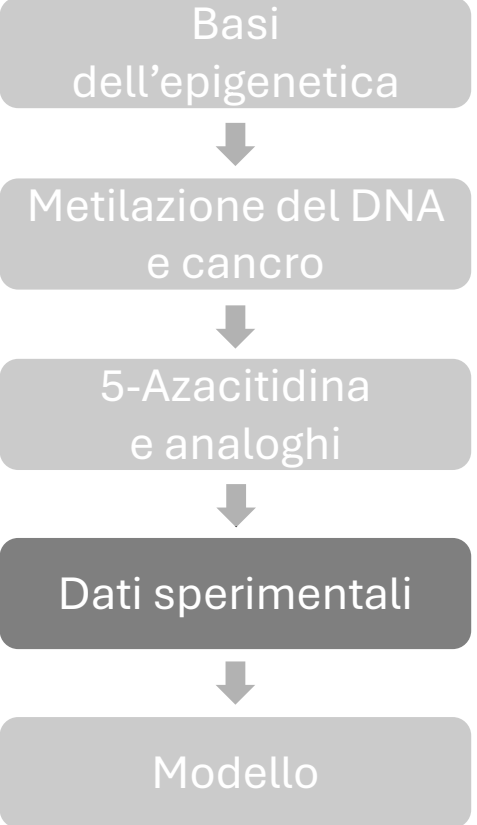
Modello

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

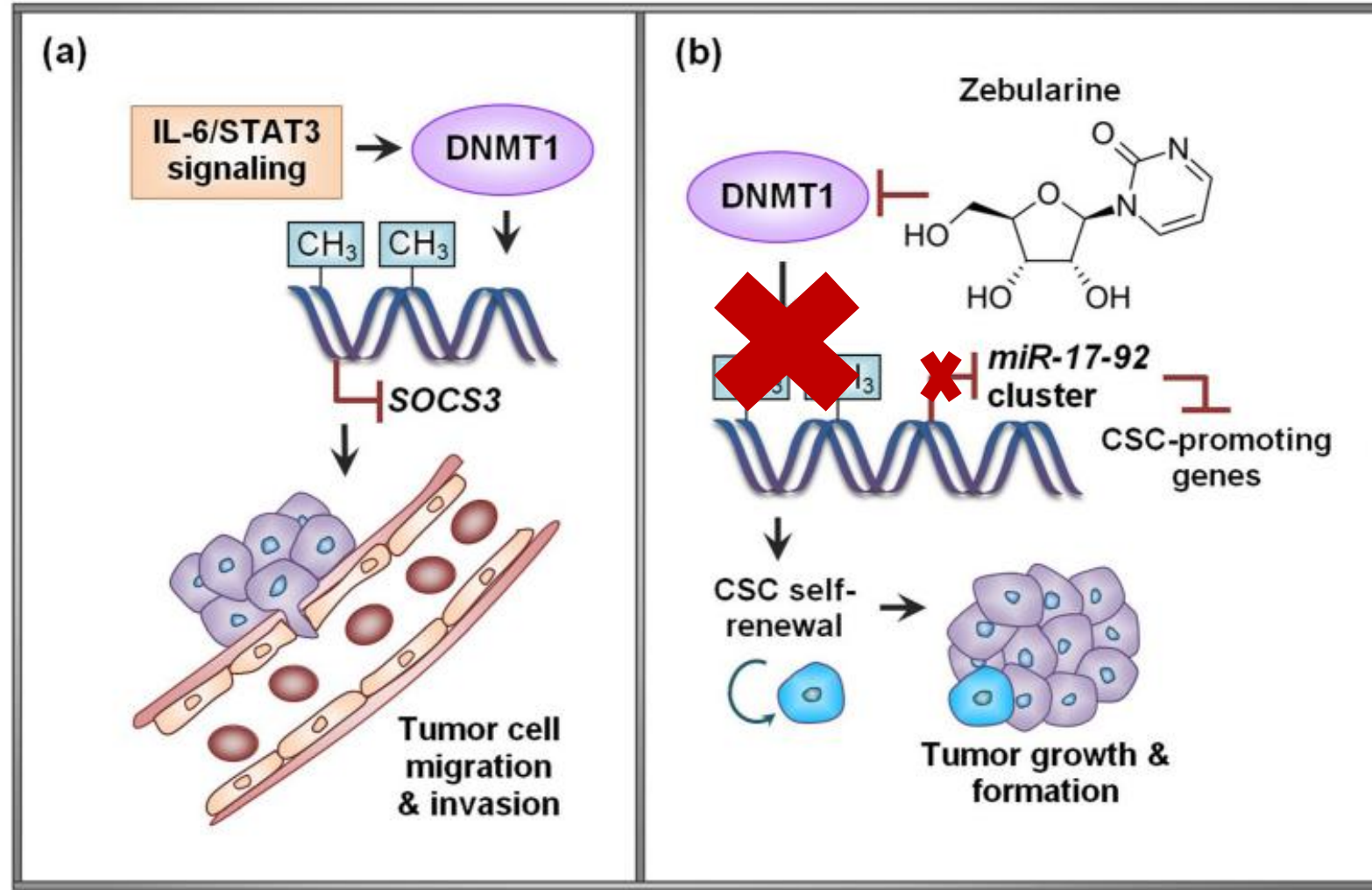
Caso studio I



have been implicated in pancreatic CSC phenotypes including self-renewal and chemoresistance



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

RDS 3434 and RDS 3061 repurposing for epigenetic studies in plant

Caso studio II

HP1, Polycomb
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants

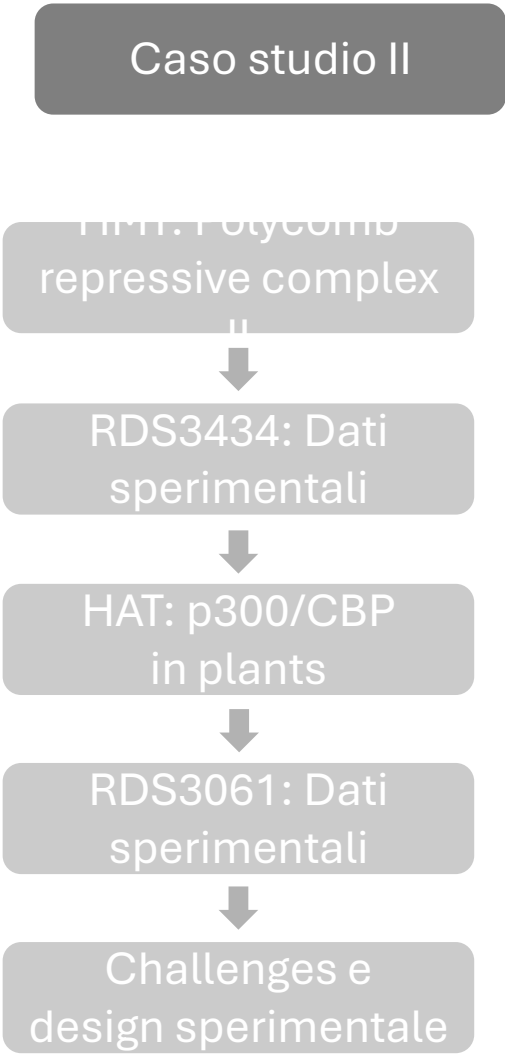
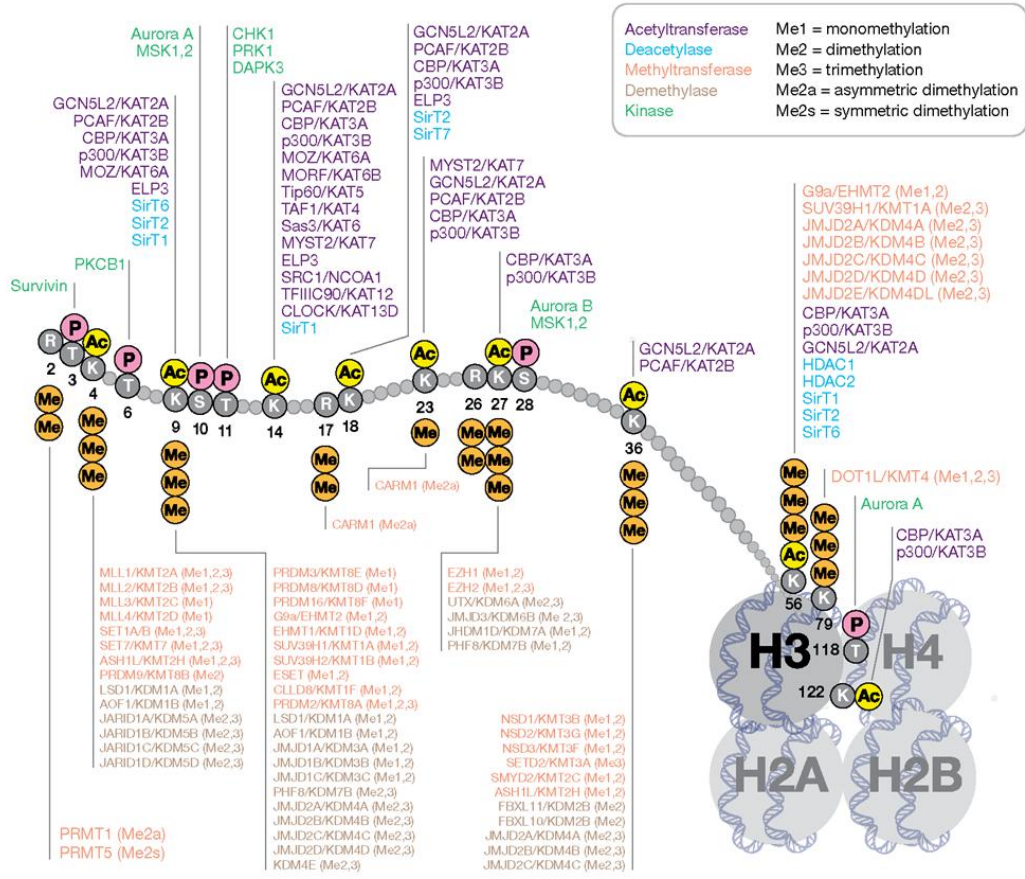
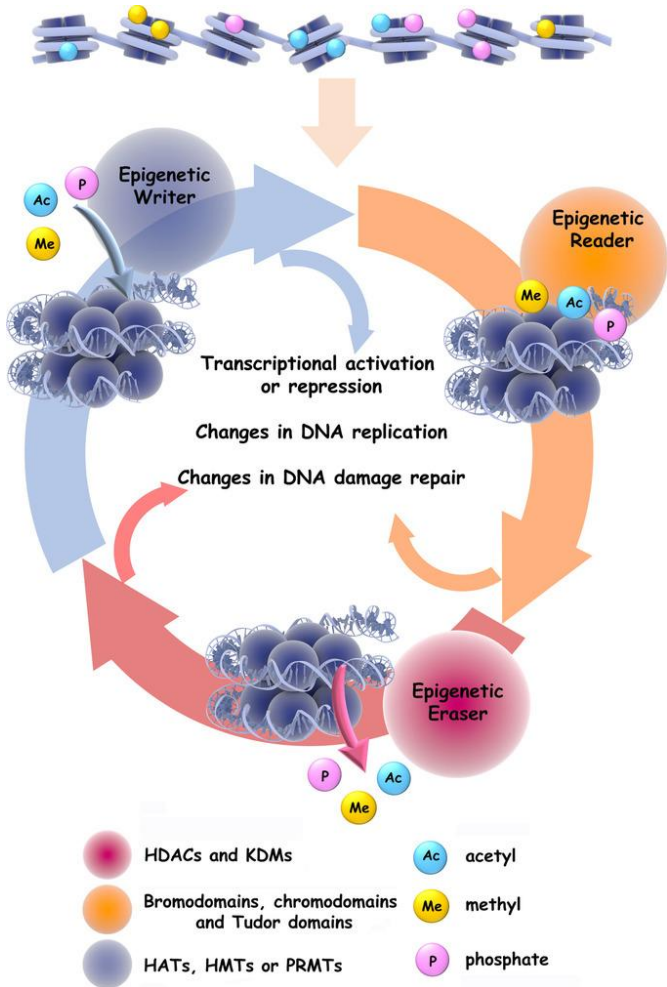


RDS3061: Dati
sperimentali

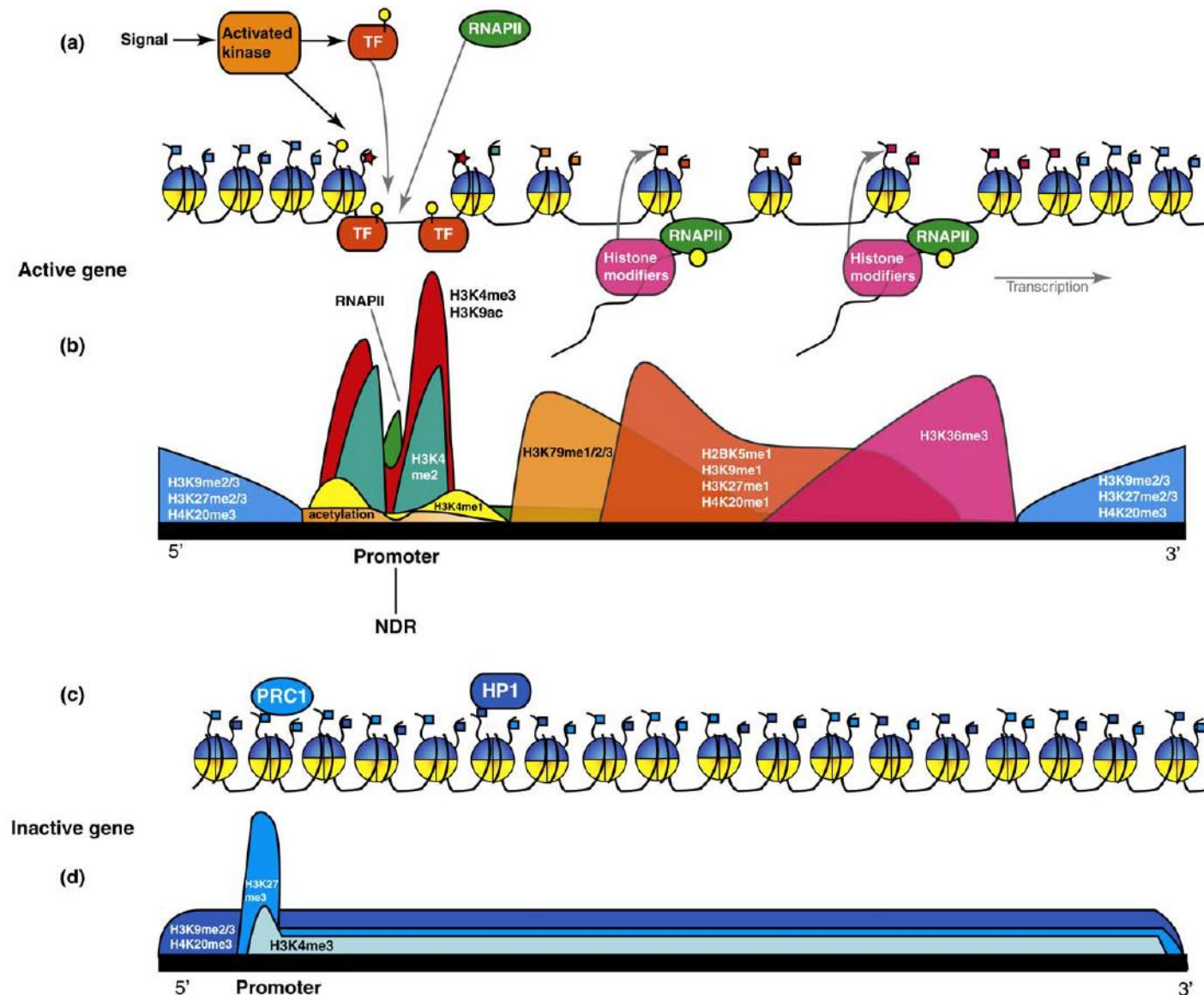


Challenges e
design sperimentale

Un altro meccanismo epigenetico: PTM istoniche



Il codice istonico



Caso studio II

PRC1, Polycomb repressive complex

RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

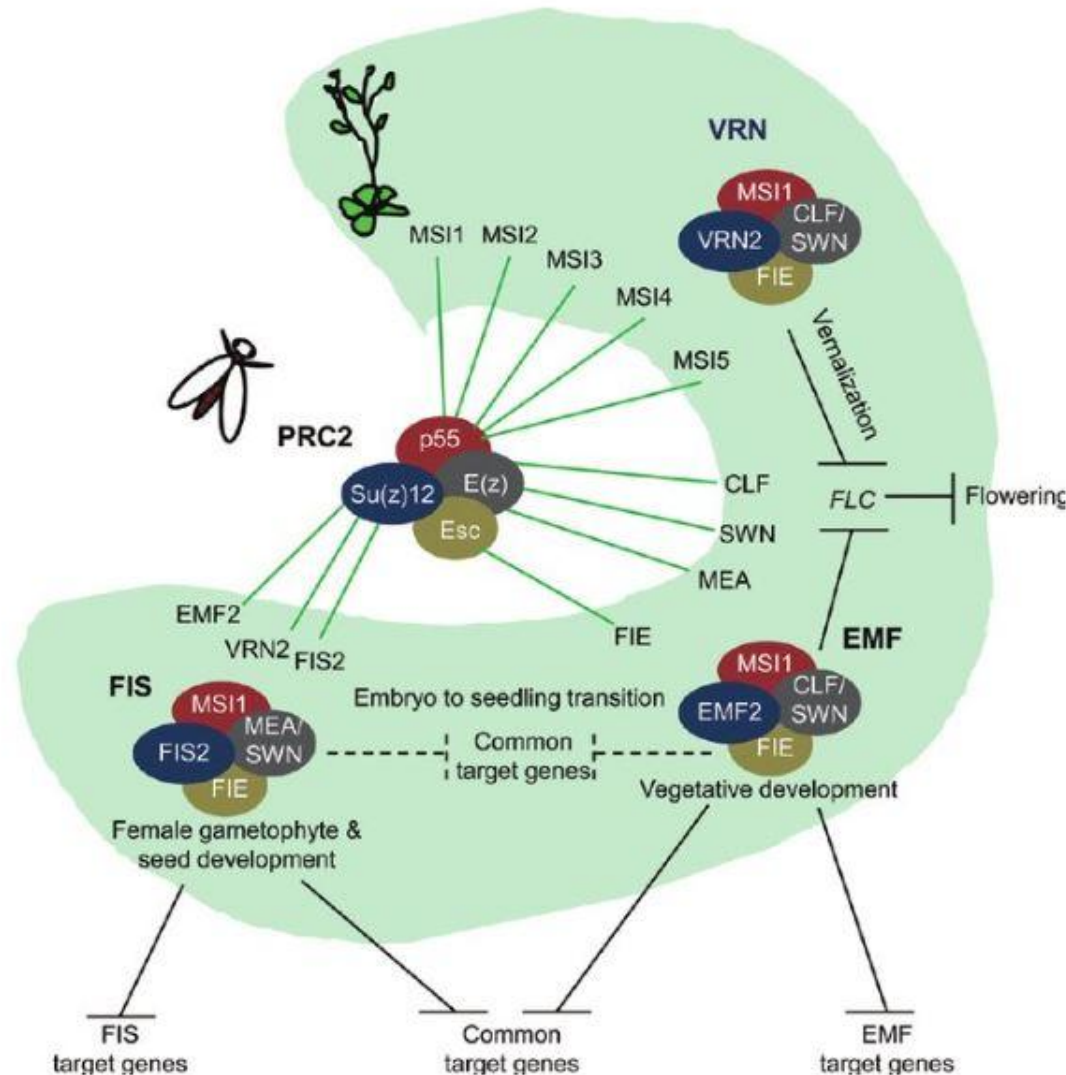
Challenges e design sperimentale

Polycomb Repressive Complex 2

Le proteine del gruppo Polycomb (PcG) costituiscono un sistema di repressione trascrizionale conservato in molti eucarioti, come *Drosophila*, mammiferi e piante.

PRC2 è composto da quattro subunità principali, che in *Drosophila* sono codificate da geni a copia singola.

In base alle combinazioni delle subunità, in *Arabidopsis* sono stati descritti tre complessi PRC2: EMF, VRN e FIS, che hanno funzioni distinte sebbene condividano alcuni geni bersaglio.



Caso studio II

HMT: Polycomb repressive complex II

RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

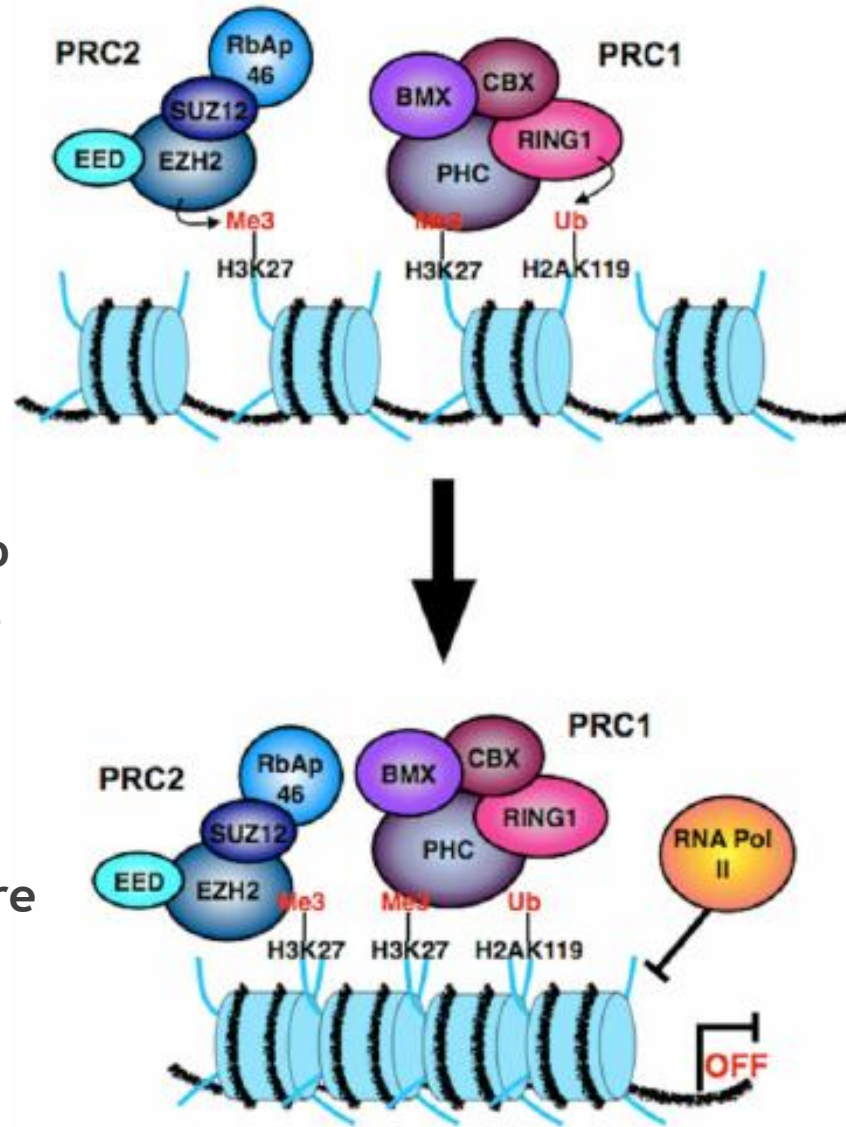
Challenges e design sperimentale

Metilazione istonica: marker di repressione di PRC1 e PRC2

PRC1 catalizza il trasferimento di un'ubiquitina sulla lisina 119 dell'istone H2A (H2Aub), mentre PRC2 trimetila la lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3).

Il marker H3K27me3 viene riconosciuto da PRC1 che stabilisce una repressione trascrizionale stabile mediante la monoubiquitinazione H2Aub.

I complessi possono comunque funzionare indipendentemente svolgendo funzioni diverse, a seconda delle proteine interagenti e dei geni bersaglio



Caso studio II

HMT: Polycomb
repressive complex II

RDS3434: Dati
sperimentali

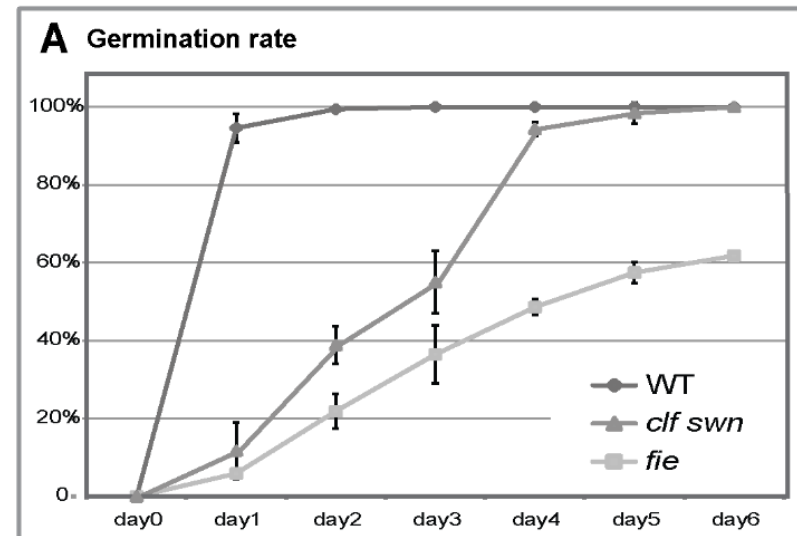
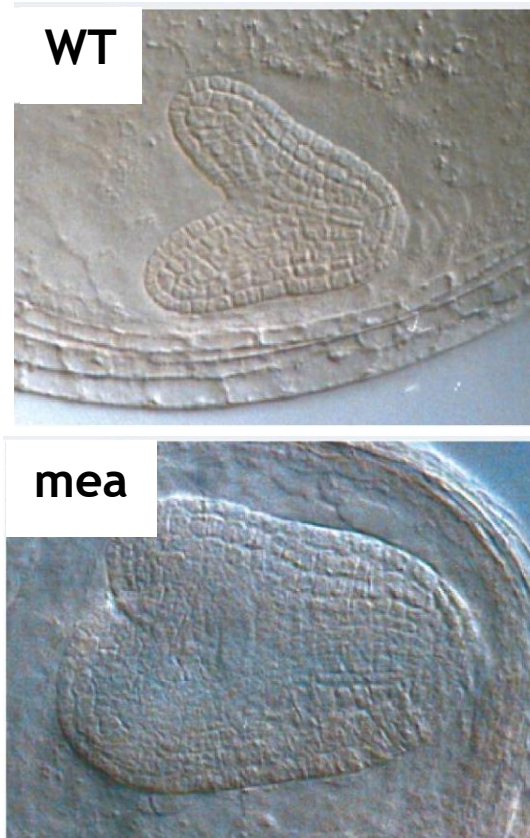
HAT: p300/CBP
in plants

RDS3061: Dati
sperimentali

Challenges e
design sperimentale

Mutanti PRC2

In pianta, mutazioni di PRC2 risultano embrioletali...



Caso studio II

HMT: Polycomb repressive complex II



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants



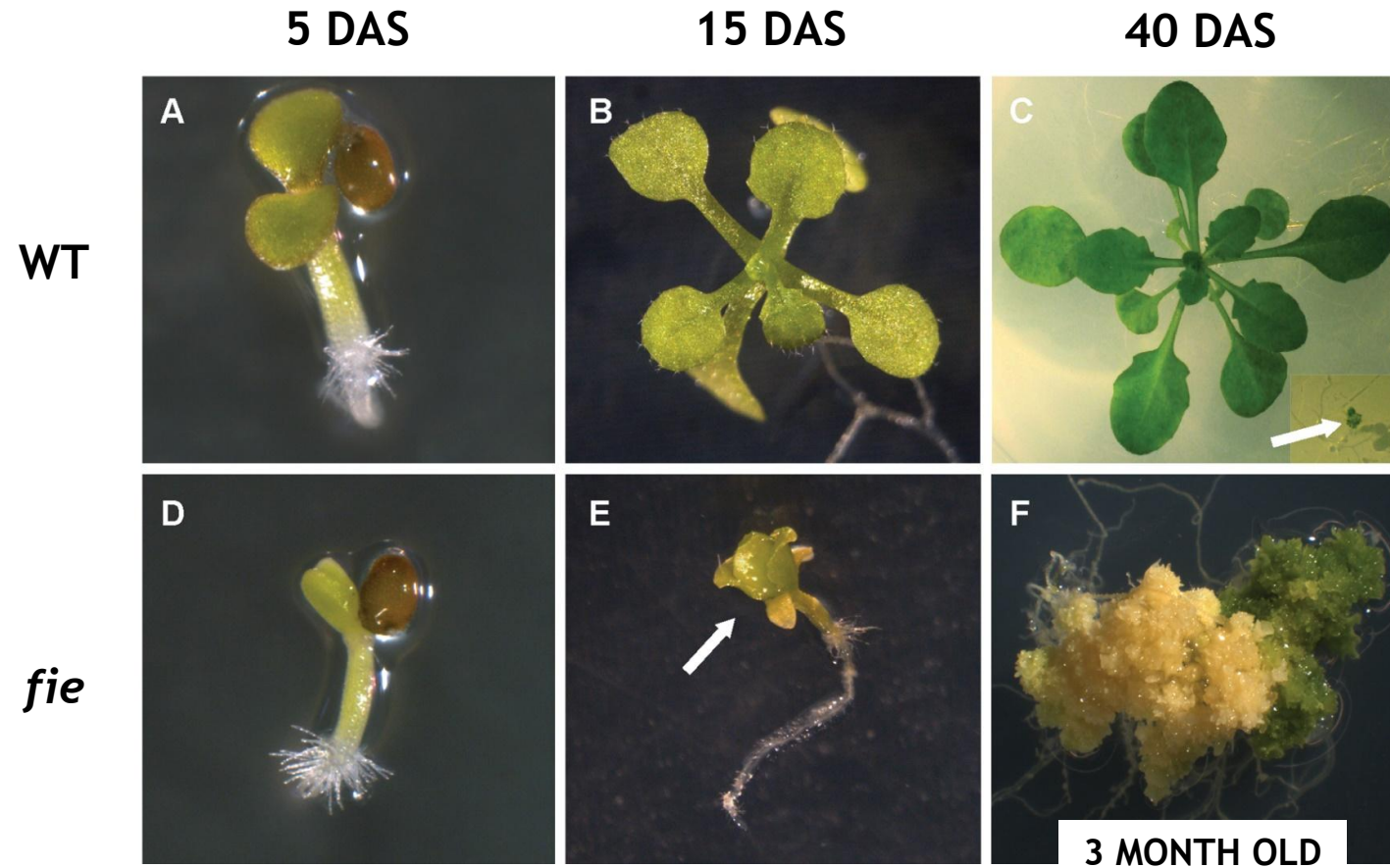
RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

Mutanti PRC2

...oppure causa di sviluppo anormale



Ciò ha ostacolato lo studio della funzione PRC2 negli anni

Caso studio II

HMT: Polycomb repressive complex II



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants



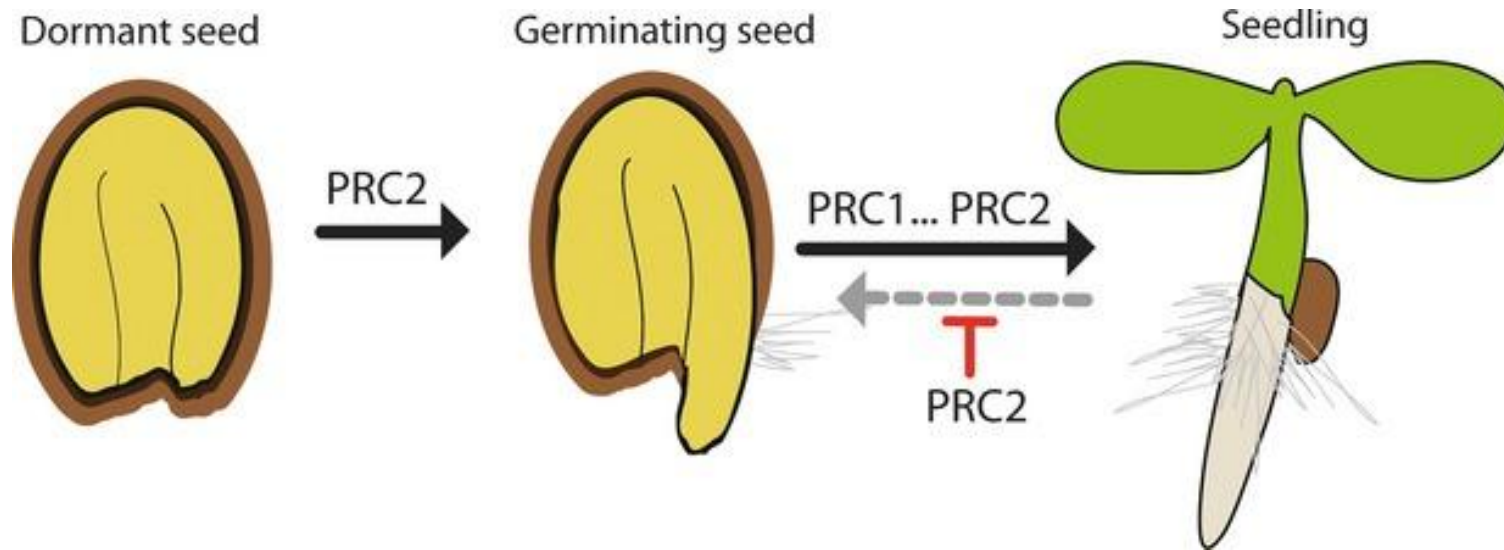
RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

PRC2 nella transizione dormienza-germinazione

La fine della dormienza richiede l'attività di PRC2 per reprimerne i principali regolatori.



PRC2 è inoltre necessario per la repressione stabile dei geni embrionali.
Disfunzioni di PRC2 consentono l'inizio dello sviluppo della plantula ma provocano una successiva reversione al programma di maturazione embrionale

Caso studio II

HMT: Polycomb repressive complex II

RDS3434: Dati sperimentali

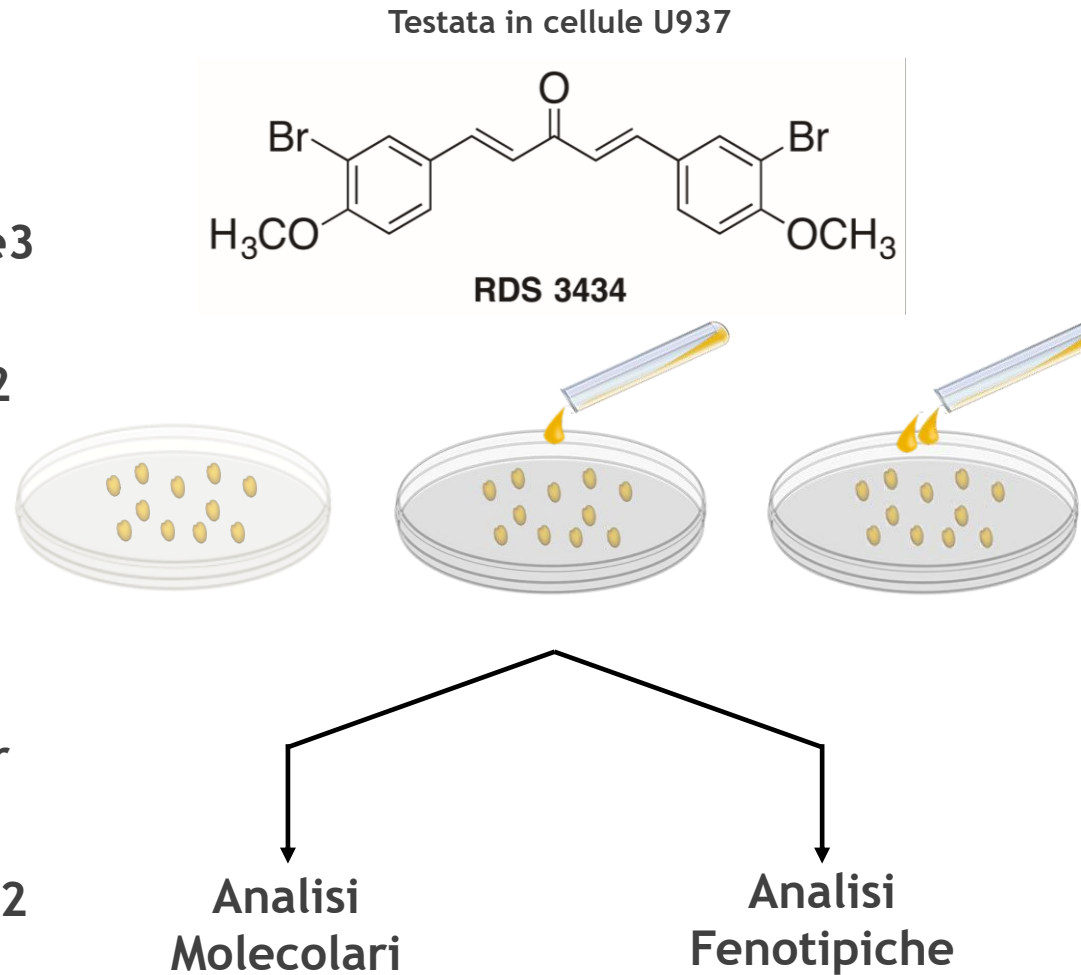
HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

RDS3434: *small-molecule* per studiare PRC2 in *Arabidopsis thaliana*

- ▶ Dimostrare che il trattamento con RDS3434 determina una diminuzione del marker H3K27me3
- ▶ Dimostrare che RDS3434 è selettivamente attivo contro PRC2
- ▶ Dimostrare che il trattamento con RDS3434 determina un aumento specifico e dose-dipendente dei livelli di espressione dei geni bersaglio di PRC2, con una conseguente riduzione del marker H3K27me3 sui loci corrispondenti
- ▶ Dimostrare che l'inibizione di PRC2 influisca sullo sviluppo di semi e plantule



Caso studio II

PRC2 Polycomb repressive complex

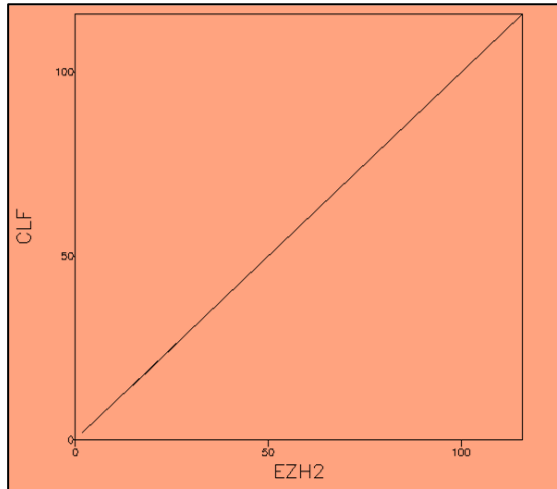
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

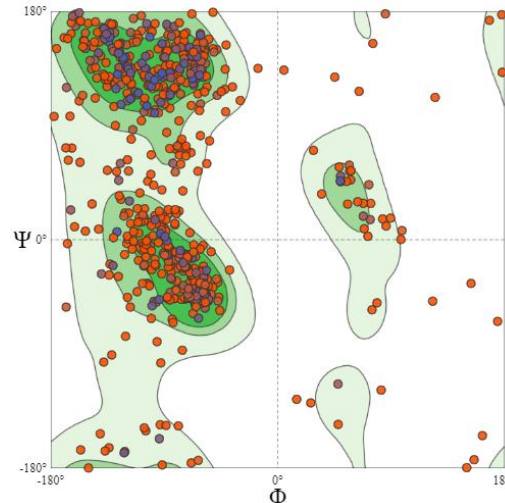
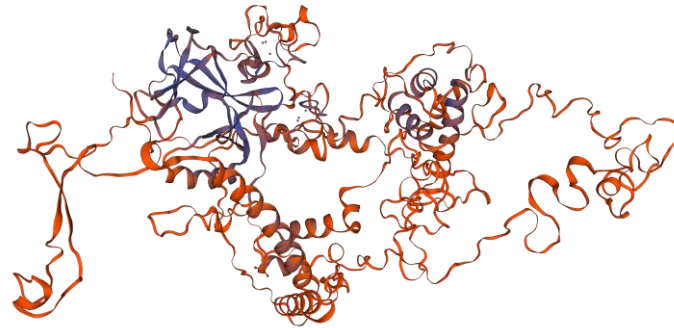
Challenges e design sperimentale

Elevata percentuale di identità del dominio catalitico EZH2 tra uomo e Arabidopsis



```
#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: 752-867
# 2: 612-727
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 116
# Identity:   75/116 (64.7%)
# Similarity: 95/116 (81.9%)
# Gaps:       0/116 ( 0.0%)
# Score: 423.0
#
#=====
```

<https://www.ebi.ac.uk/Tools>



<https://swissmodel.expasy.org/>

Caso studio II

HPH1: Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

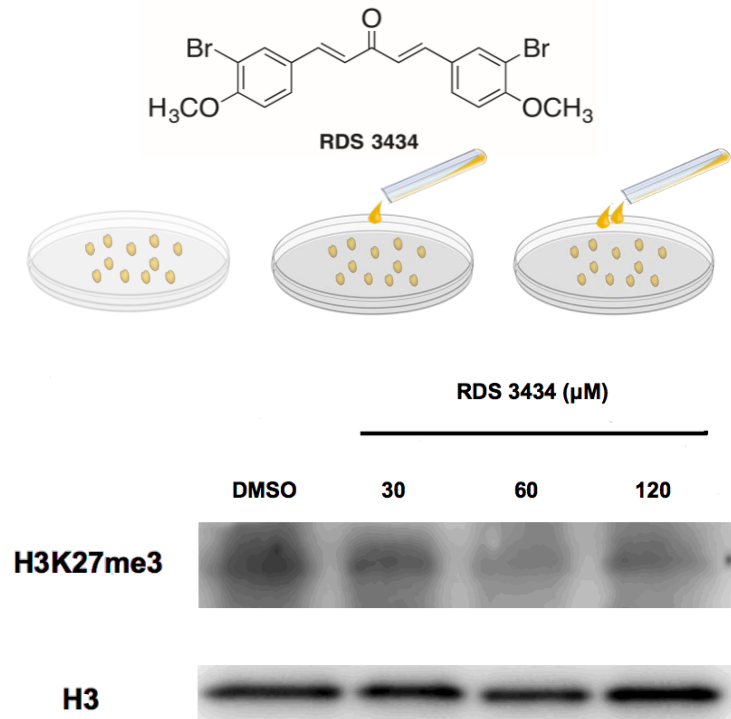


RDS3061: Dati sperimentali

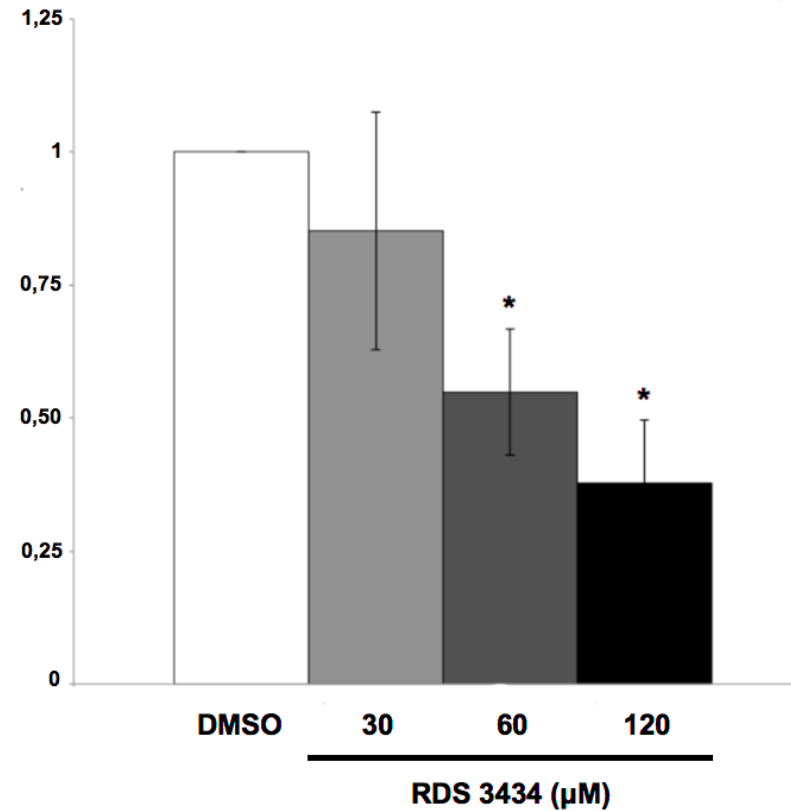


Challenges e design sperimentale

Il trattamento con RDS 3434 determina una diminuzione dose-dipendente di H3K27me3



Relative H3K27me3 Protein Level



Caso studio II

RNA Polycomb repressive complex

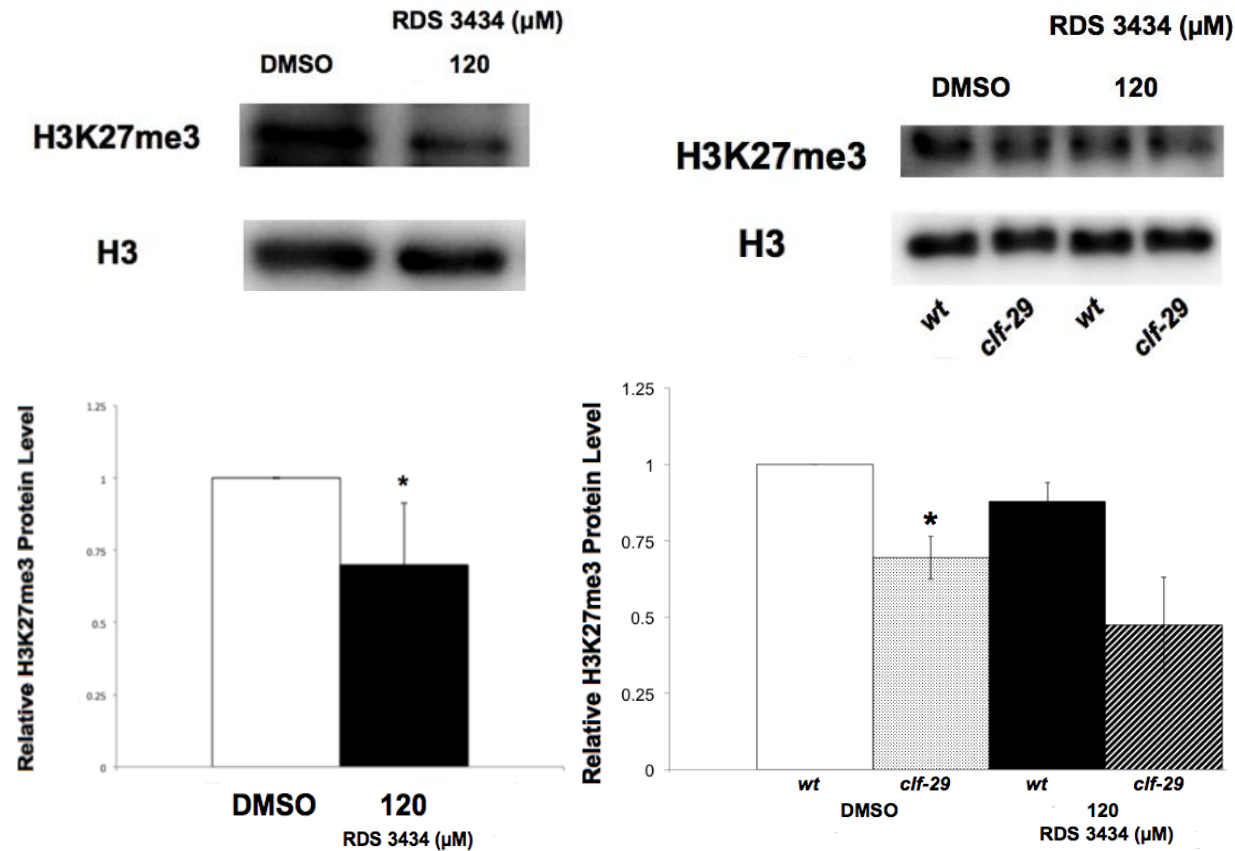
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

Nel mutante *clf-29*, i livelli di H3K27me3 sono ulteriormente ridotti dal trattamento con RDS 3434



Caso studio II

HAT: Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

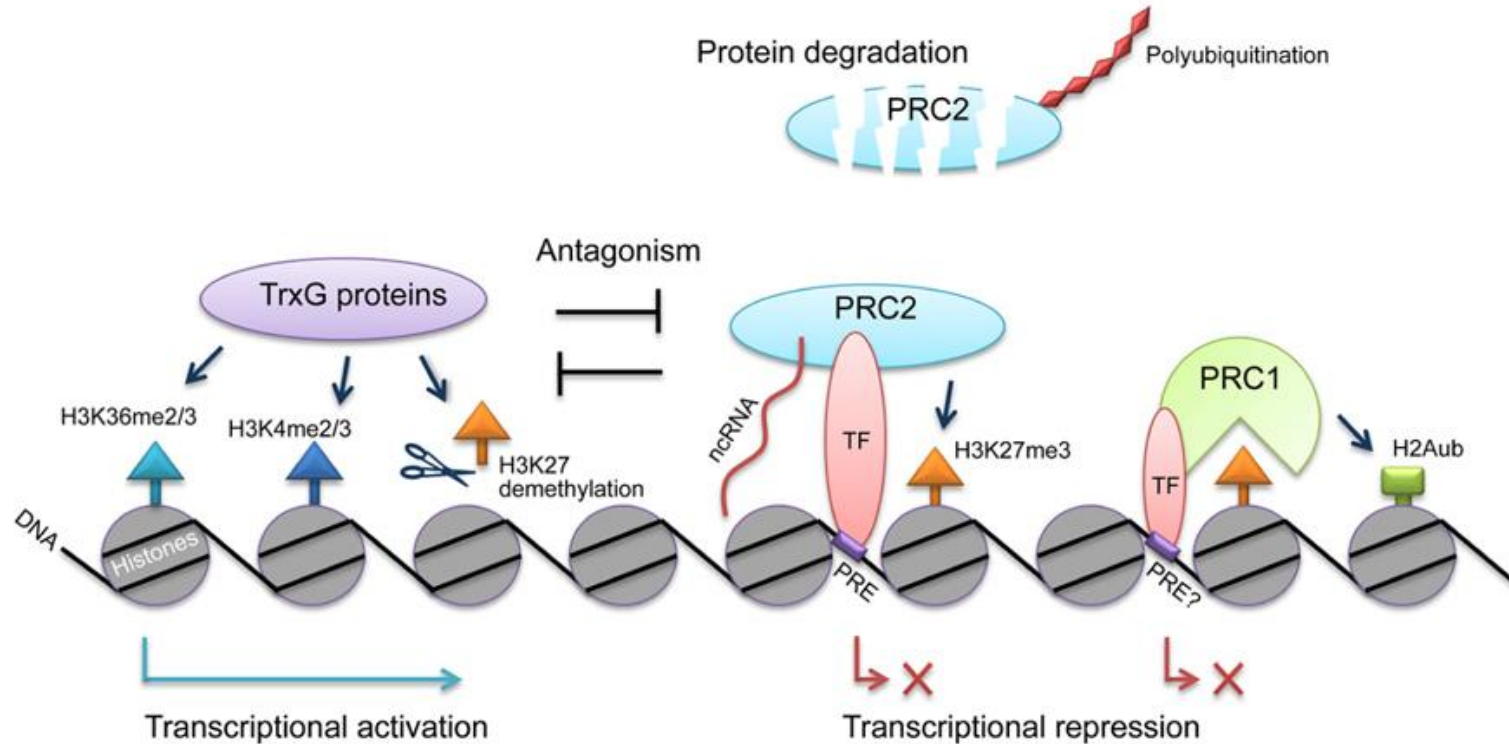


RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

L'attività repressiva del marker epigenetico H3K27me3 è contrastata da H3K4me3



La trimetilazione della Lisina 4 dell'istone H3 è associata a geni trascritti attivamente ed è depositata dai complessi proteici Trihorax (trxG)

Caso studio II

PRC1, Polycomb repressive complex

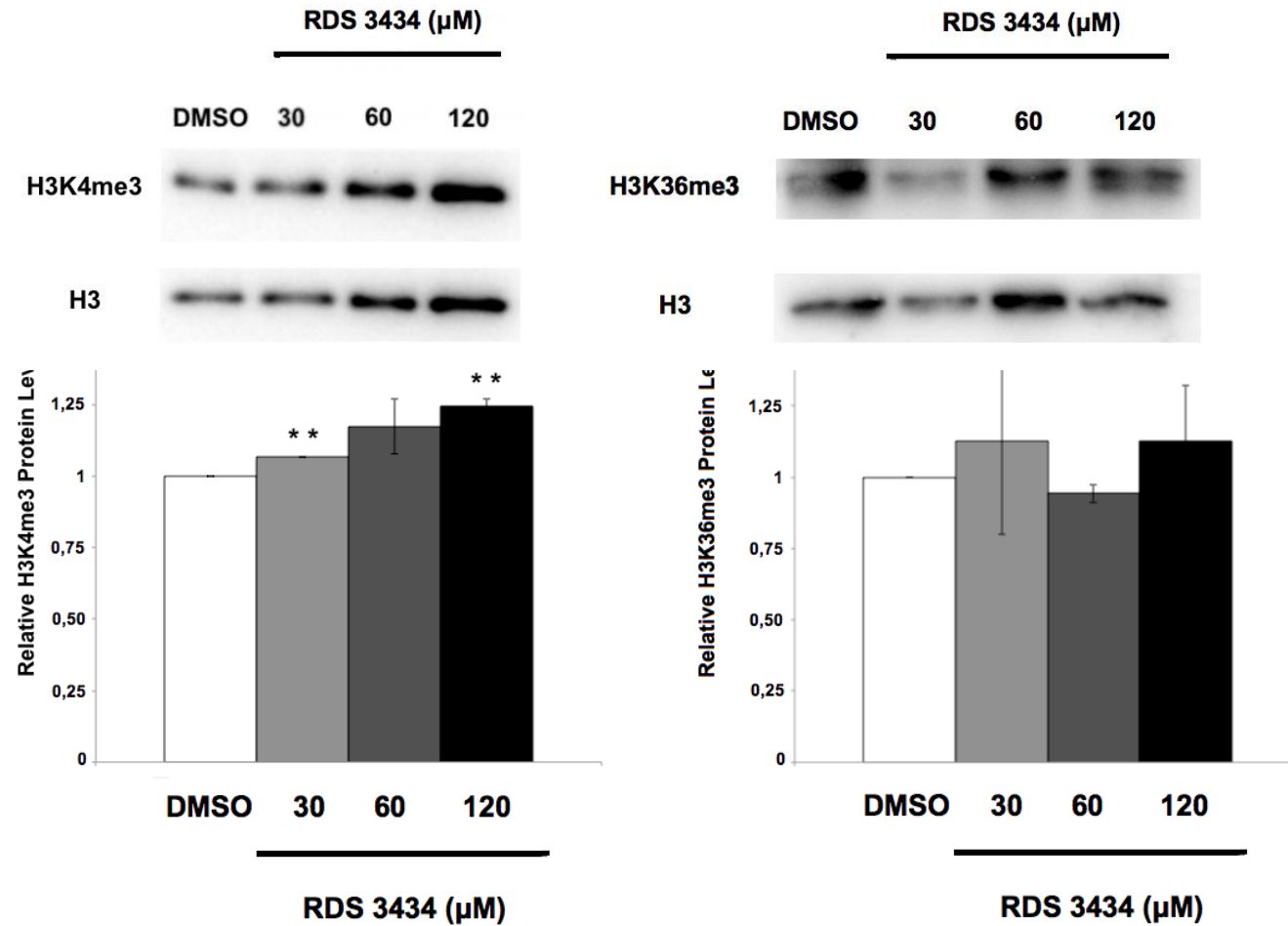
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

RDS 3434 è selettivamente attivo contro PRC2



Caso studio II

PRC1, Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

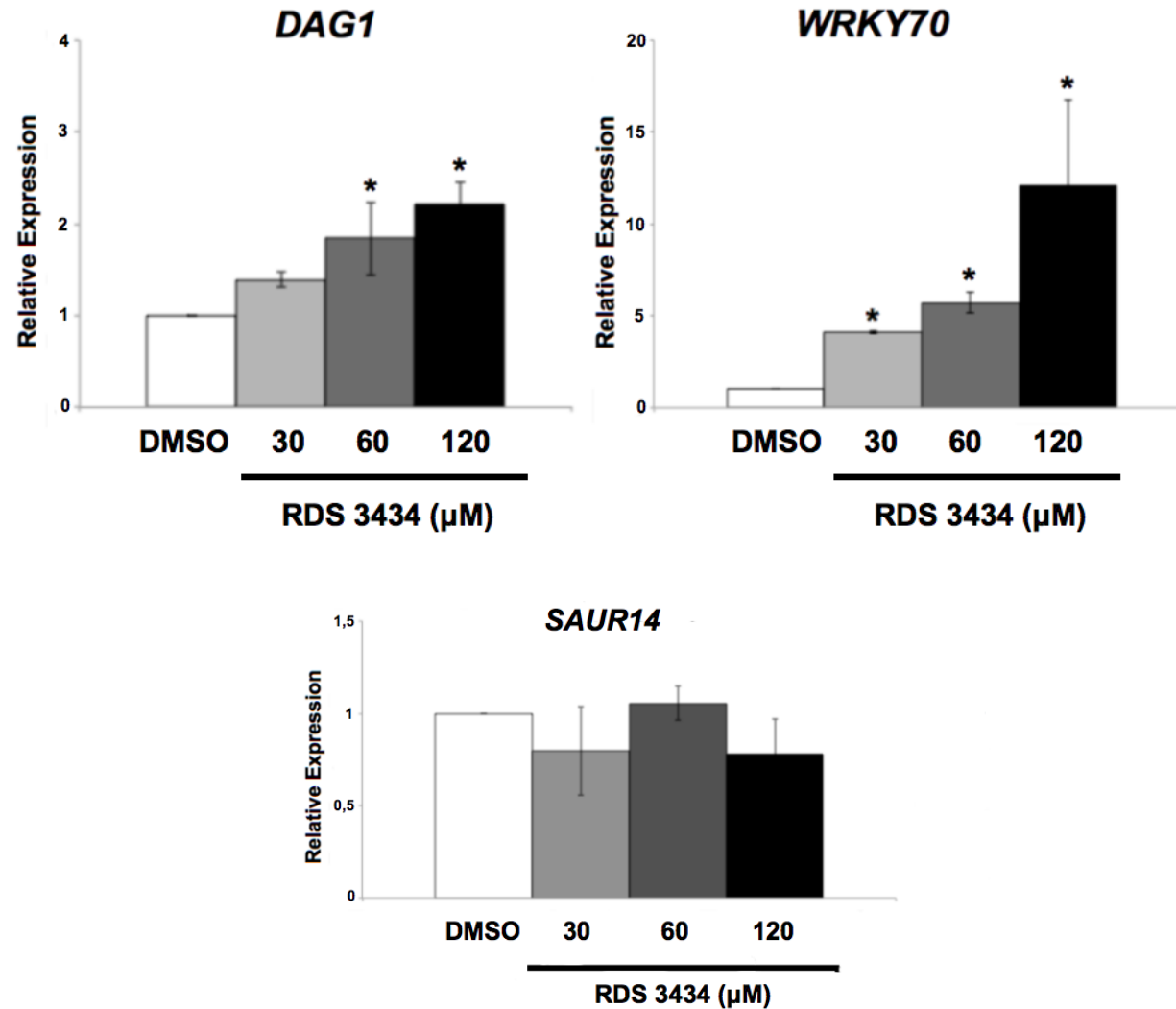


RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

Il trattamento con RDS 3434 aumenta selettivamente il livello di espressione dei geni bersaglio PRC2



Caso studio II

PRC2: Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

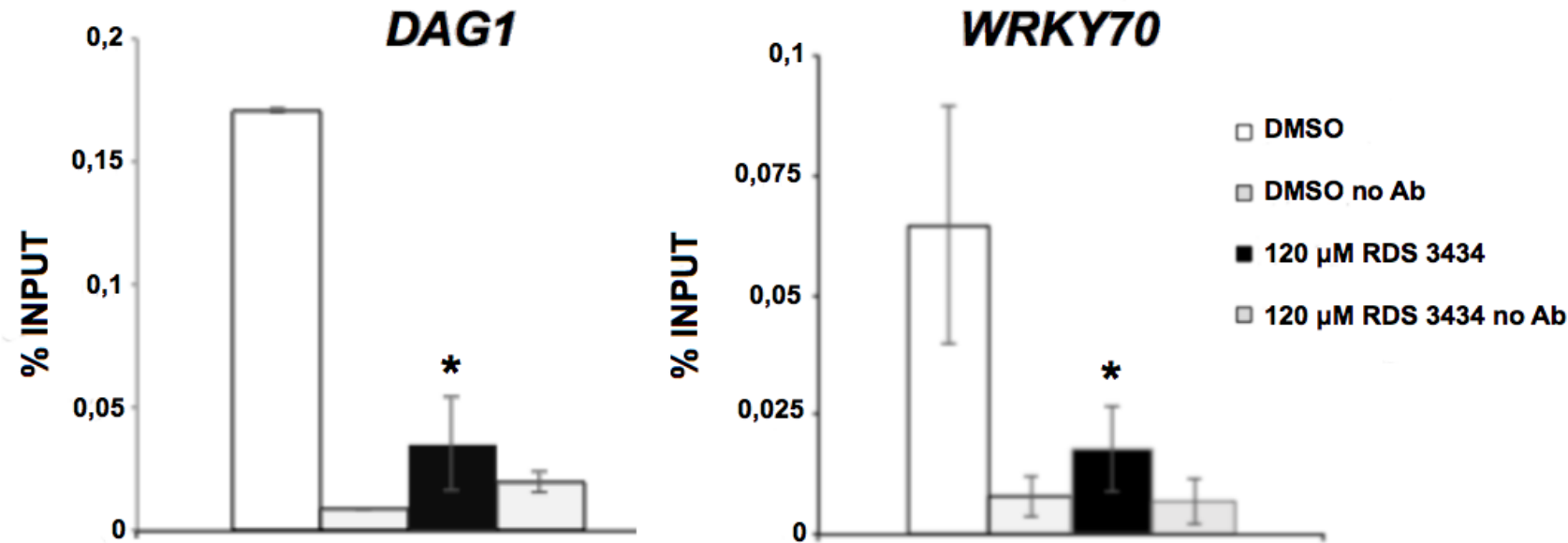


RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

Il trattamento con RDS 3434 riduce i livelli di H3K27me3 sui loci target di PRC2 (ChIP)



Caso studio II

PRC2 Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

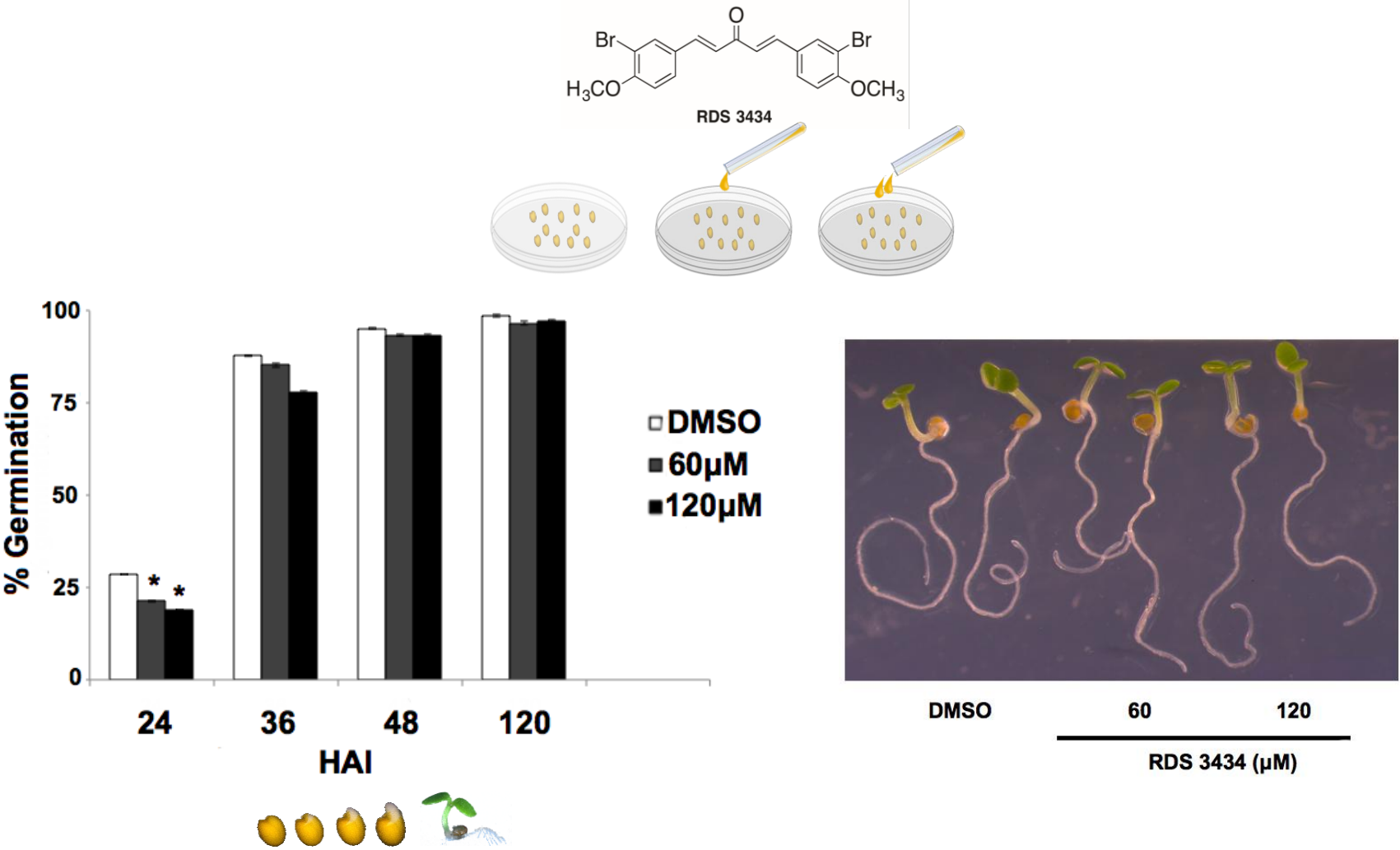


RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

La riduzione dei livelli del marker H3K27me3 influisce sulla germinazione dei semi



Caso studio II

RNA Polycomb
repressive complex

RDS3434: Dati
sperimentali

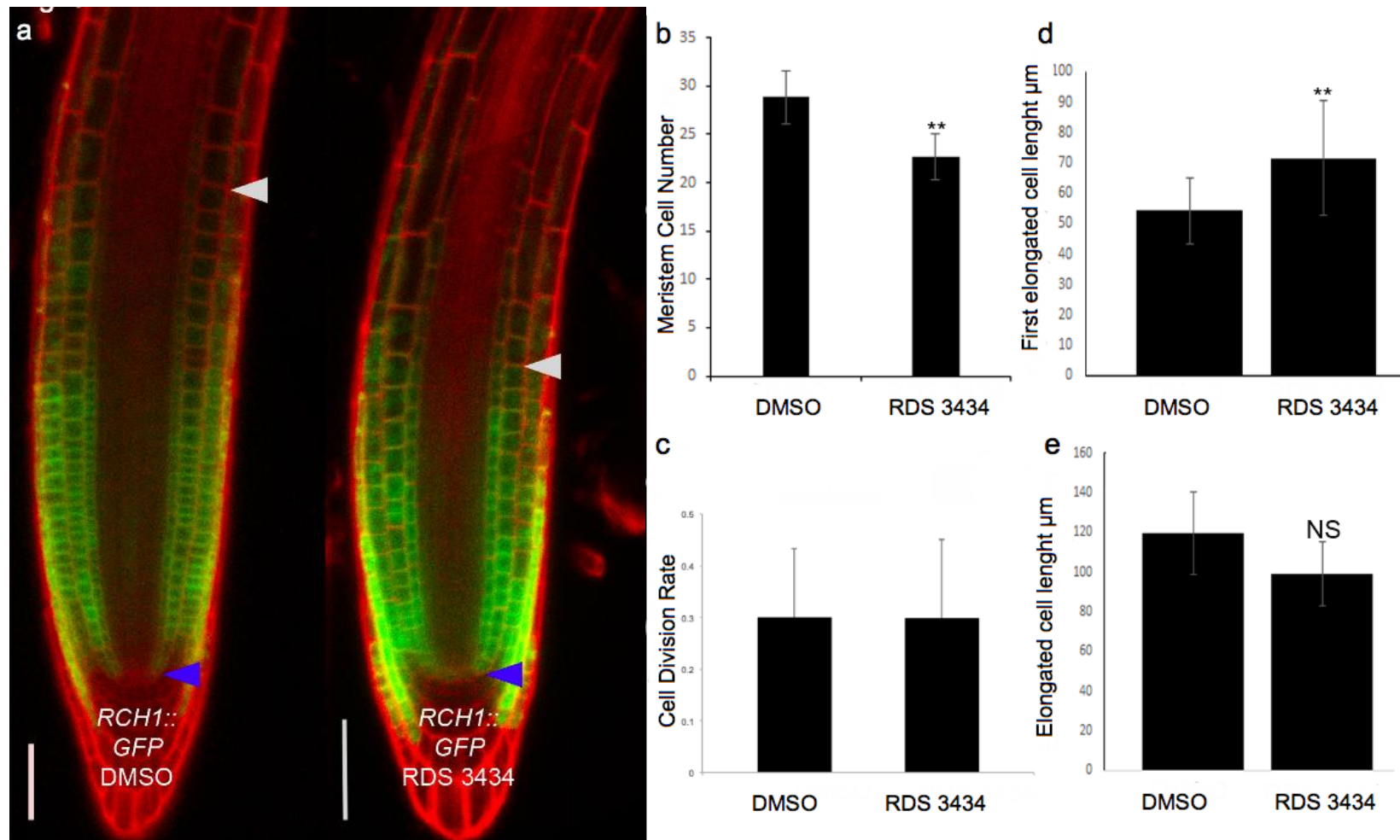
HAT: p300/CBP
in plants

RDS3061: Dati
sperimentali

Challenges e
design sperimentale

La riduzione dei livelli del marker H3K27me3 influenza anche lo sviluppo delle radici (240μM)

Caso studio II



the first elongated cells were longer in RDS 3434-treated plants indicating that RDS 3434 affects root meristem activities **controlling the elongation/differentiation potential**

H3K27me3 Polycomb repressive complex

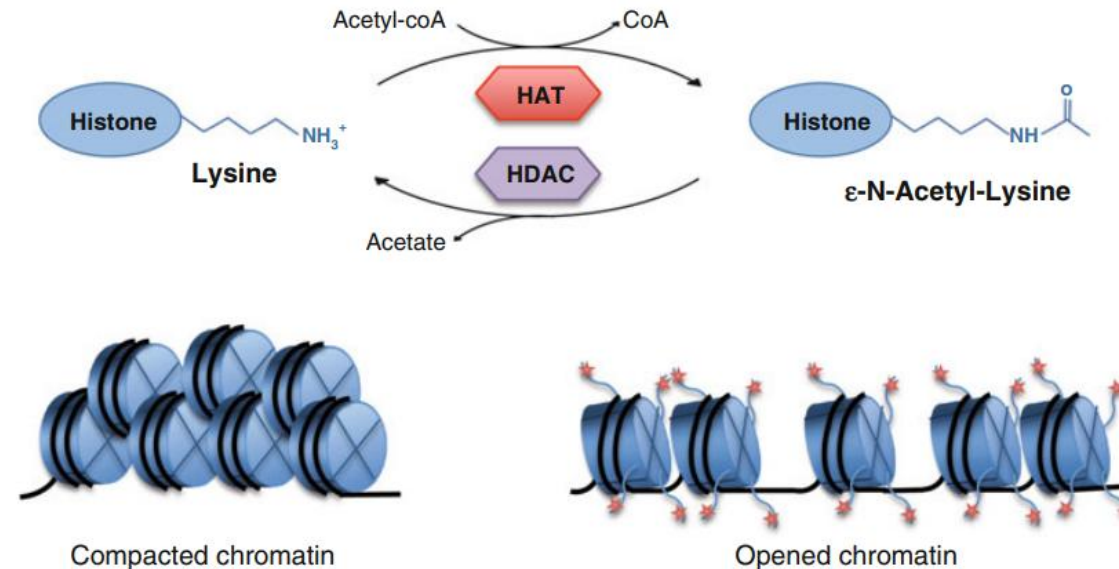
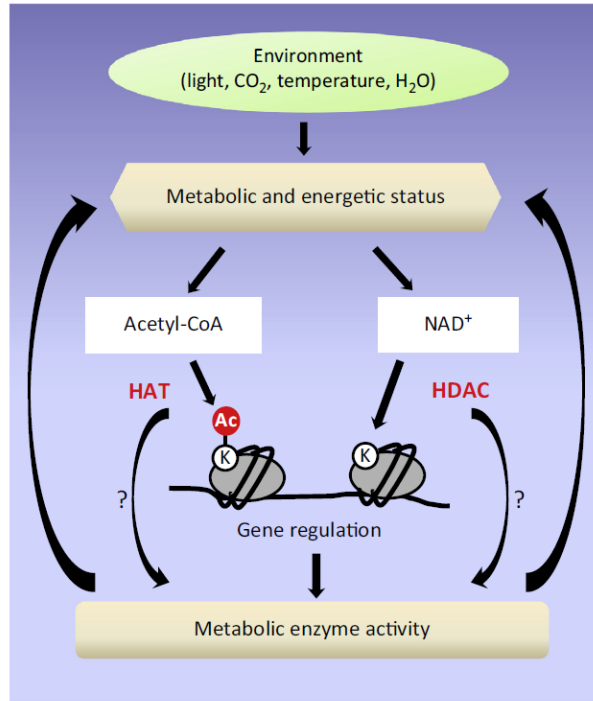
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

Acetilazione istonica: marker di attivazione trascrizionale



Acetil-CoA e NAD, metaboliti fondamentali nella modulazione del flusso metabolico cellulare, sono utilizzati come substrati o cofattori nelle reazioni catalizzate da HATs e HDACs, rispettivamente. L'acetilazione è dunque un processo strettamente correlato allo stato energetico cellulare

Caso studio II

RNA Polycarb
repressive complex

RDS3434: Dati
sperimentali

HAT: p300/CBP
in plants

RDS3061: Dati
sperimentali

Challenges e
design sperimentale

Aumentare la disponibilità di molecole bioattive in pianta: studio di inibitori di acetiltransferasi istoniche

Caso studio II

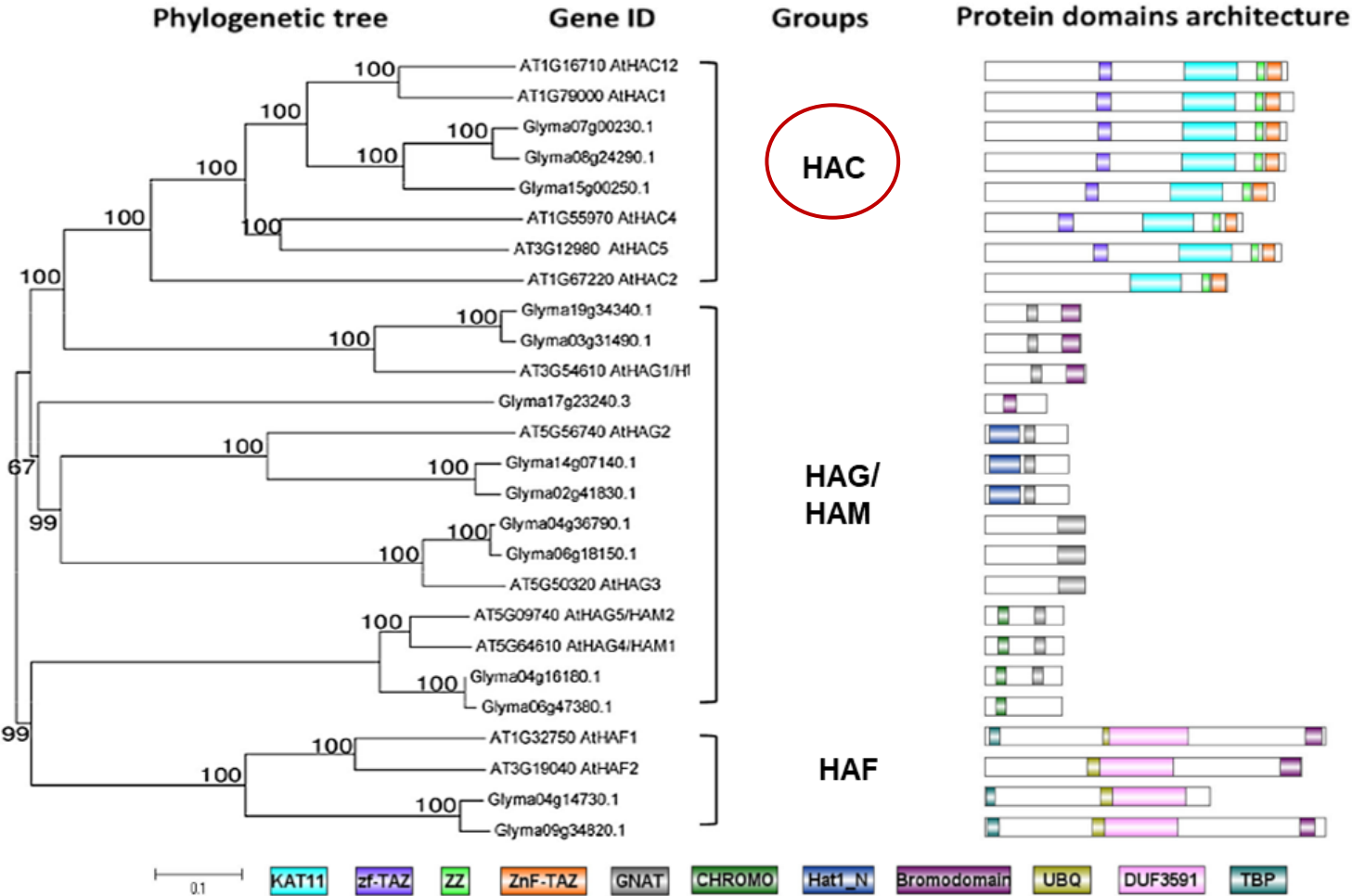
RNAi Polycomb repressive complex

RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

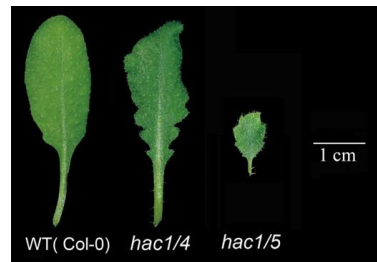
Challenges e design sperimentale



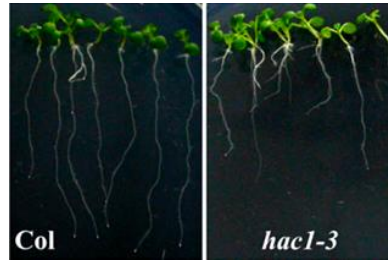
Target complessi: effetti pleiotropici nei processi di sviluppo

In *Arabidopsis* cinque geni appartenenti alla categoria HAC:
HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 e HAC12

con effetti pleiotropici nei
processi di sviluppo:



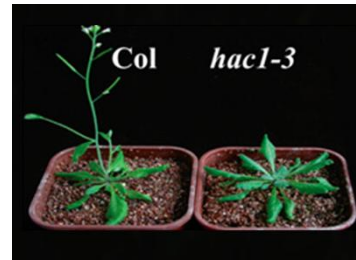
Foglie piccole, scure,
increspate e
dentellate



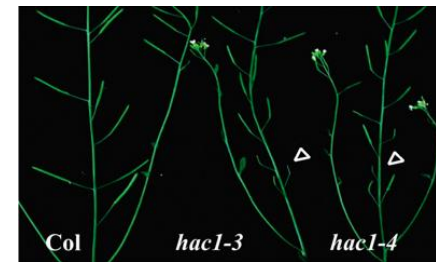
Accorciamento
radice primaria



Accorciamento ipocotile
e ipersensibilità all'etilene



Periodo
fioritura ritardato



Accorciamento
silique

Caso studio II

RNA Polycomb
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants

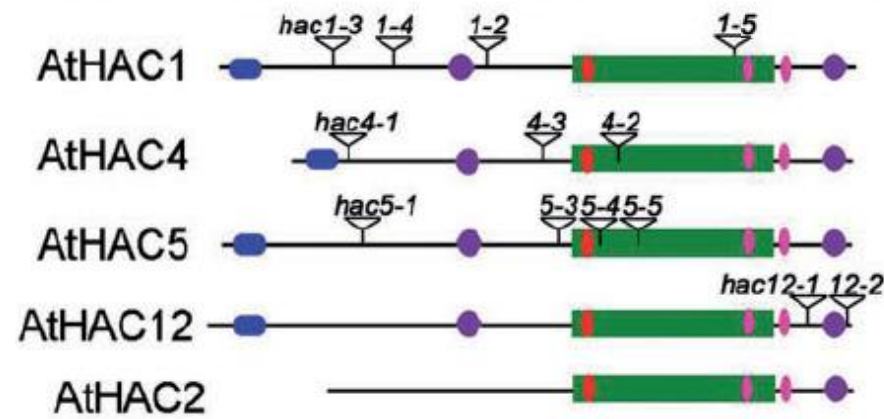


RDS3061: Dati
sperimentali



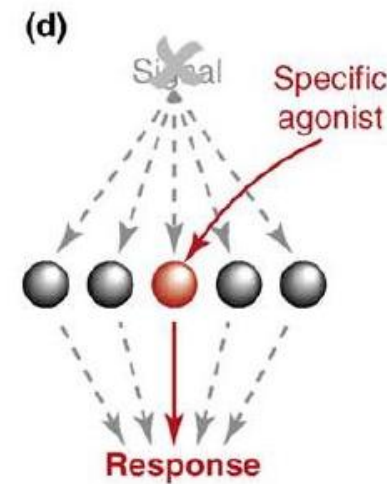
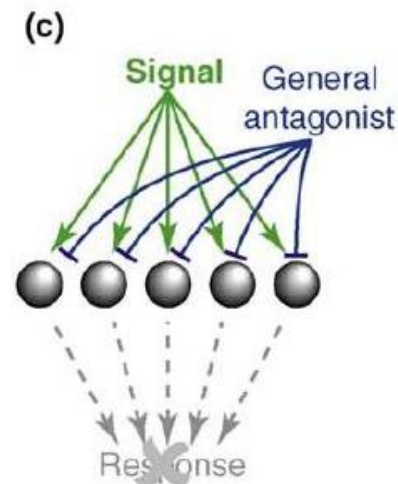
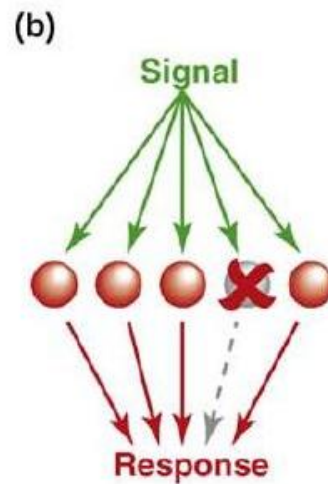
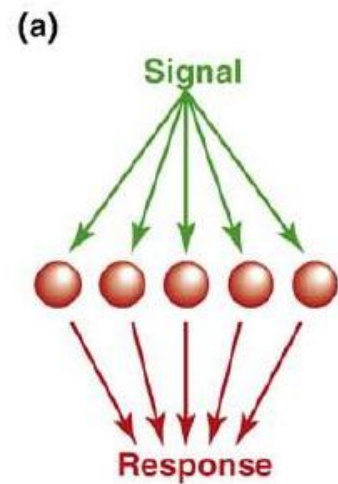
Challenges e
design sperimentale

Problemi di ridondanza



Forward genetics

Chemical genetics



Caso studio II

RNAi, Polycomb
repressive complex

RDS3434: Dati
sperimentali

HAT: p300/CBP
in plants

RDS3061: Dati
sperimentali

Challenges e
design sperimentale

One does not simply study epigenetic regulators



Involvement of Arabidopsis Histone Acetyltransferase HAC Family Genes in the Ethylene Signaling Pathway

Chao Li^{2,3,4,*}, Jiang Xu^{1,2,4}, Jian Li², Qingyun Li² and Hongchun Yang²

¹Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081 China

²National Institute of Biological Sciences, Beijing, 102206 China

³Department of Molecular Biology and Biochemistry, Lederle Graduate Research Tower, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

Among all the mutants, the *hac1hac5* double mutant displayed the most severe phenotypes and the *hac1hac5hac4* mutant showed the second most severe phenotypes. Moreover, the *hac1hac5* double mutant and the *hac1hac5hac4* triple mutant are sterile. These results strongly indicate that HAC1, HAC12, HAC4 and HAC5 function synergistically, with HAC1 being dominant and HAC5 being the closest coordinator of HAC1.

Caso studio III

RNA Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants



RDS3061: Dati sperimentali



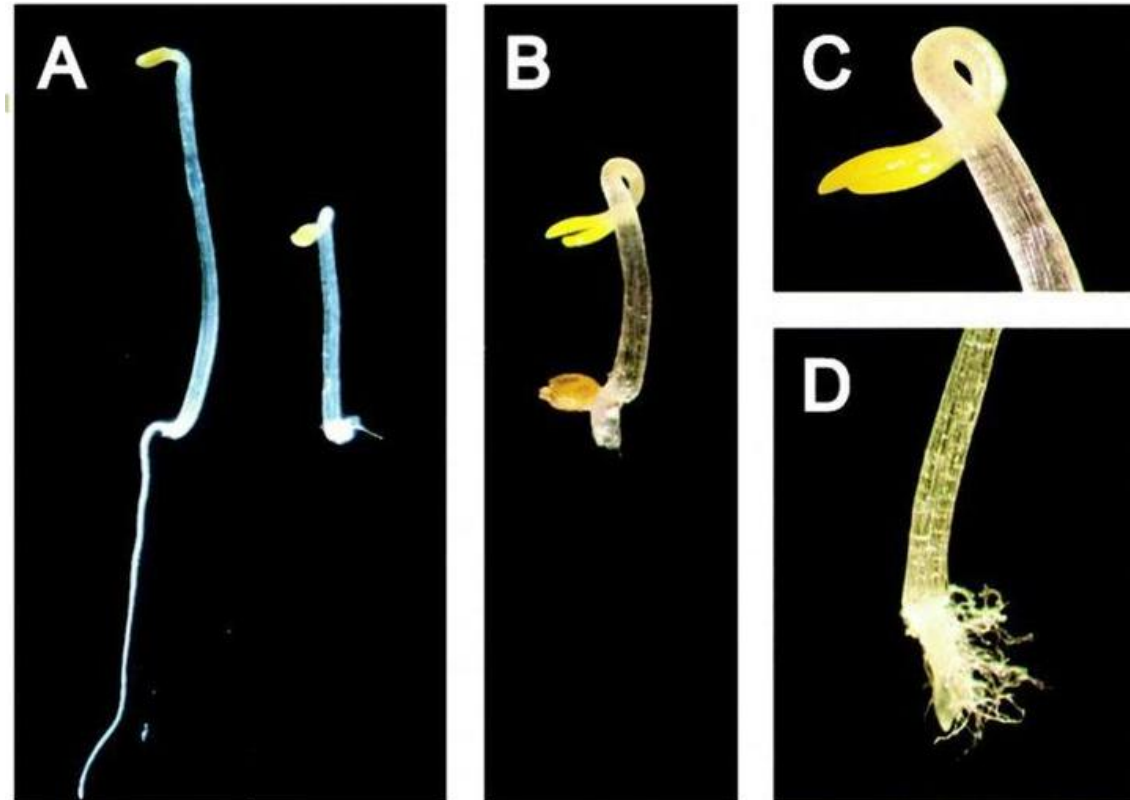
Challenges e design sperimentale

Risposta al fitormone etilene in plantula

Caso studio II

Tripla risposta etilene:

- ▶ Ridotto allungamento cellulare
- ▶ Espansione radiale
- ▶ Formazione uncino apicale



RNAi Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants



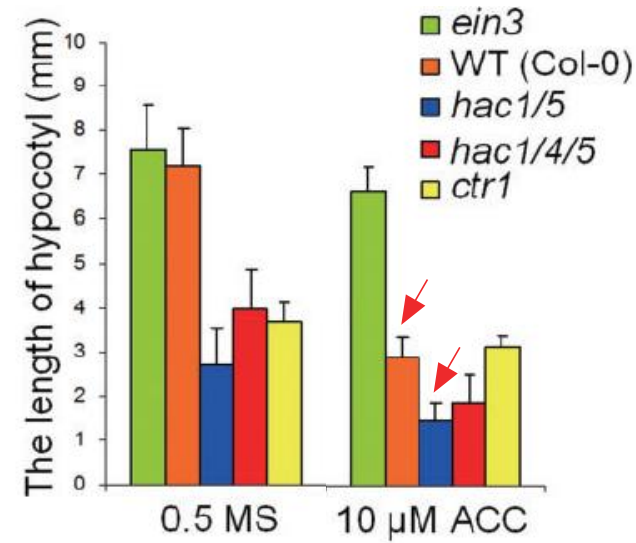
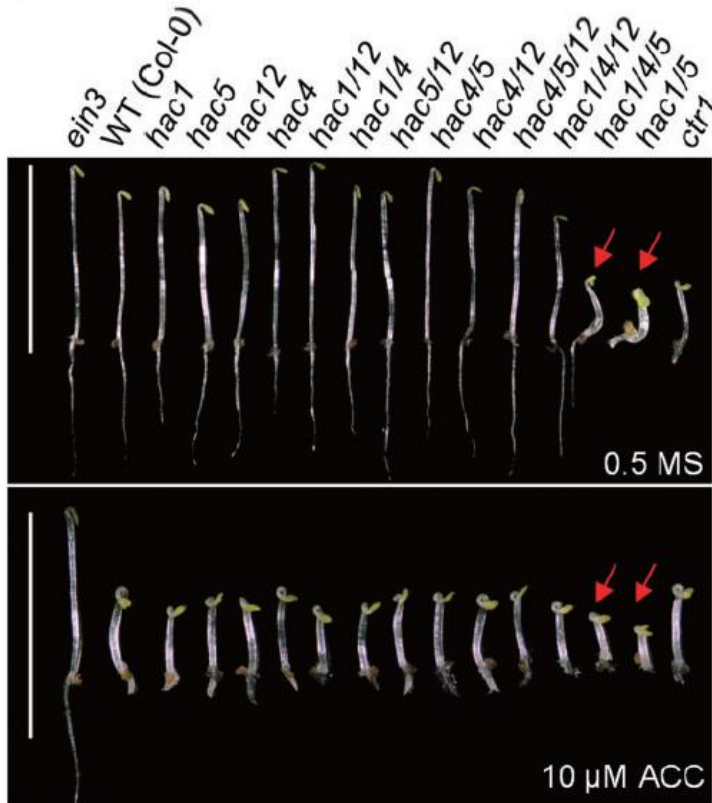
RDS3061: Dati sperimentali



Challenges e design sperimentale

I mutanti *hac* risultano ipersensibili all'etilene

Mutanti doppi e tripli delle *hac* sono stati studiati in relazione alla loro ipersensibilità all'etilene nel processo di allungamento dell'ipocotile



In presenza di ACC (precursore dell'etilene) i doppi mutanti *hac* ipocotile sono più corti rispetto al WT

Caso studio II

RNAi Polycomb repressive complex

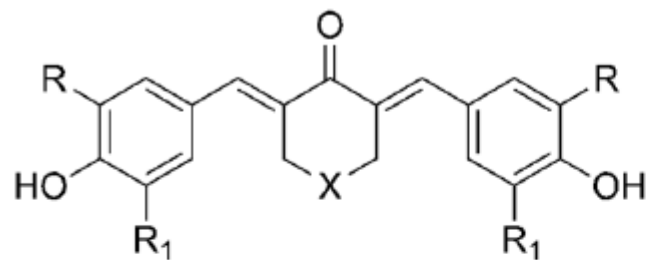
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

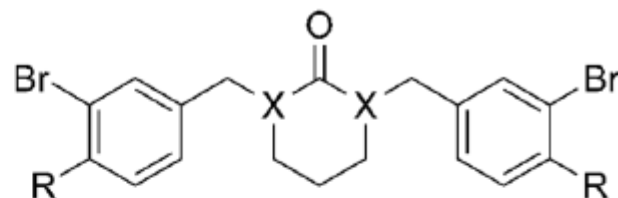
RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

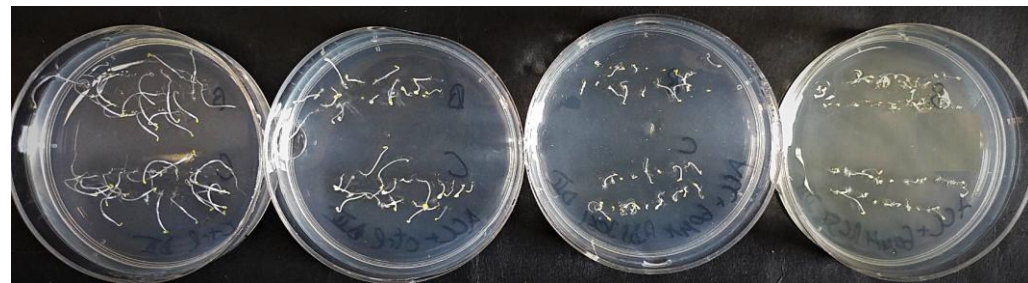
Un approccio di genetica chimica per fenocopiare i mutanti *hac*



- 1a** X = CH₂; R = Br; R₁ = H
- 1b** X = S; R = Br; R₁ = H
- 1c** X = CH₂; R = F; R₁ = H
- 1d** X = CH₂; R = Cl; R₁ = H
- 1e** X = CH₂; R = Br; R₁ = Br
- 1f** X = CH₂; R = I; R₁ = H

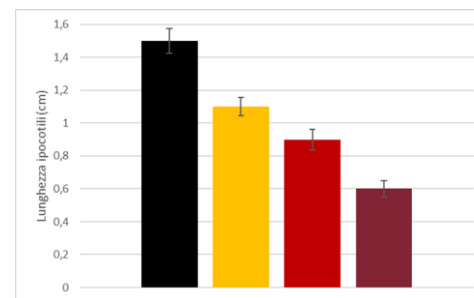


- 2a** X = N; R = OCH₃
- 2b** X = N; R = OH
- 2c** X = CH; R = OH



Control

Increasing inhibitor concentrations



Caso studio II

RNAi: Polycomb repressive complex

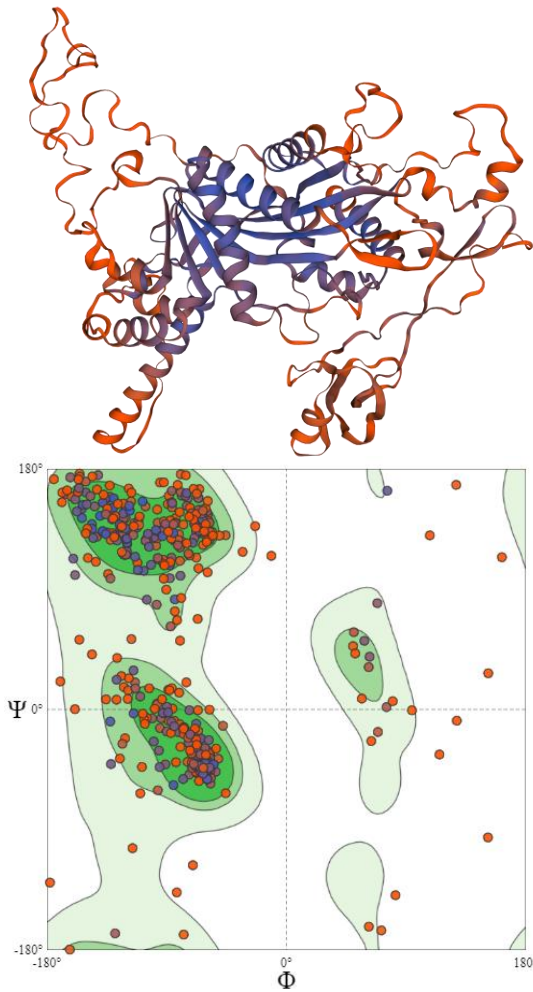
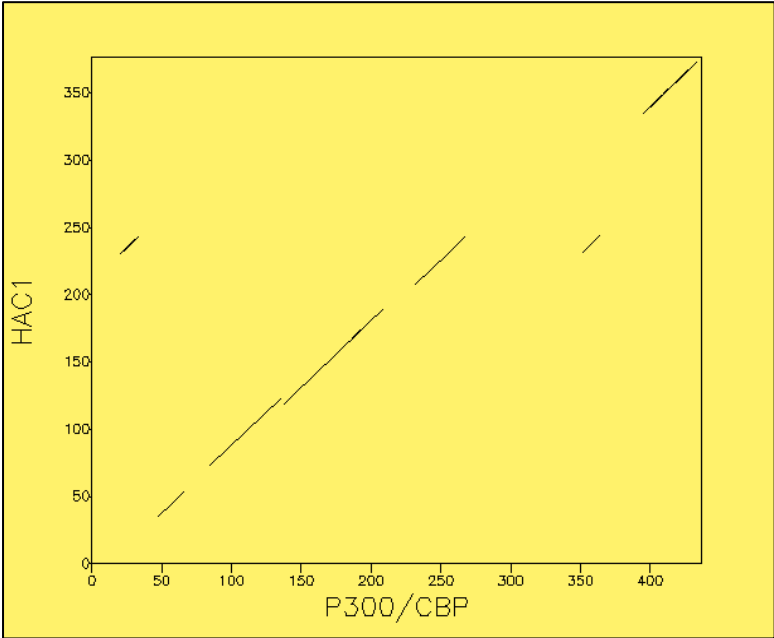
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

Buona percentuale di identità del del sito catalitico di P300/HAC tra uomo e pianta



Caso studio II

RNAi: Polycomb repressive complex

RDS3434: Dati sperimentali

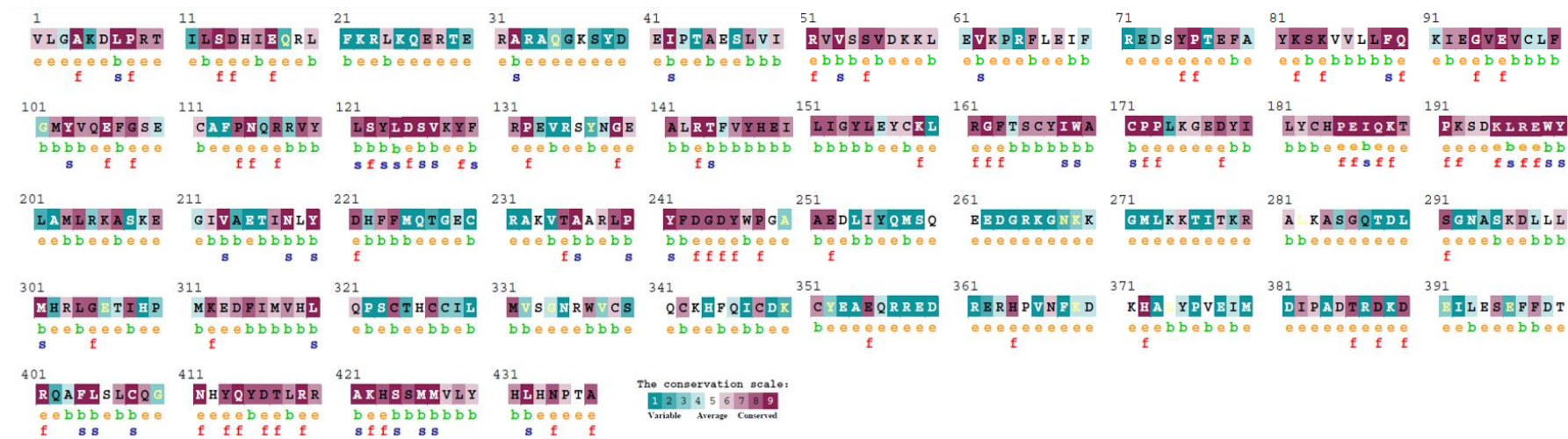
HAT: p300/CBP in plants

RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

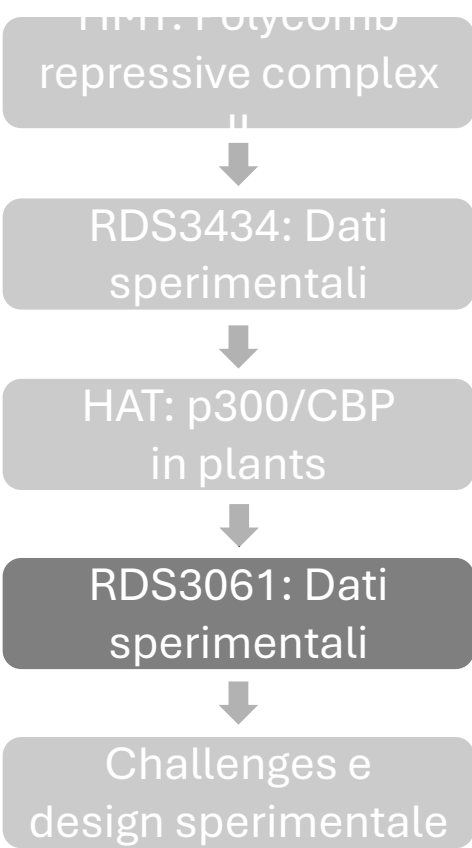
Conservazione sito catalitico HAC1

La sequenza amminoacidica del dominio catalitico della proteina HAC1 è stata analizzata mediante l'utilizzo del server ConSurf

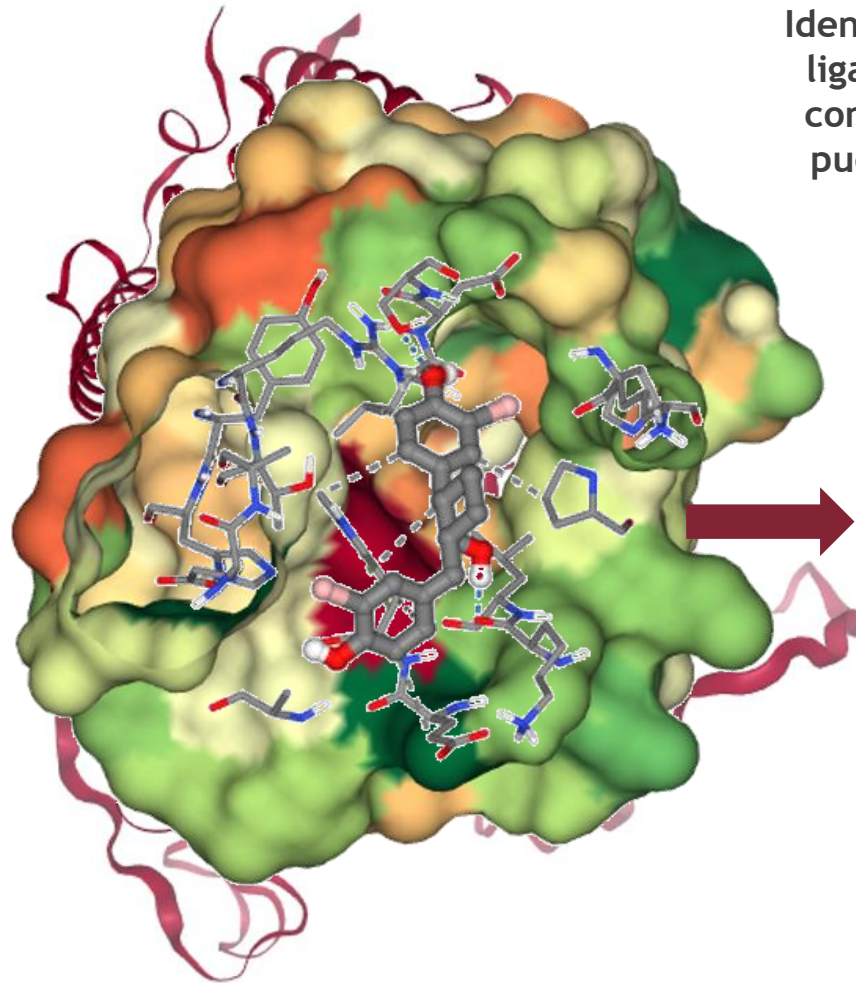


Vengono evidenziati i residui più importanti da un punto di vista funzionale e strutturale. Da notare che sono gli stessi con cui l'inibitore entra maggiormente a contatto

Caso studio II



Interazioni proteina – *small-molecule*



Identificazione della conformazione bioattiva del ligando attraverso l'esplorazione in silico delle conformazioni energeticamente favorevoli che può assumere nell'interazione con il bersaglio

2.5 Å:

Prolina-191, Lisina-195, Leucina-196,
Glutammato-198, Triptofano-199

191
PKSDKLREWY
eeeeebbbb
ff fssfs

3.5 Å:

Leucina-124 e Serina-126

121
LSYLDVSKYF
bbbbebbb
sfssfs fs

Caso studio II

RNA Polymerase
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants



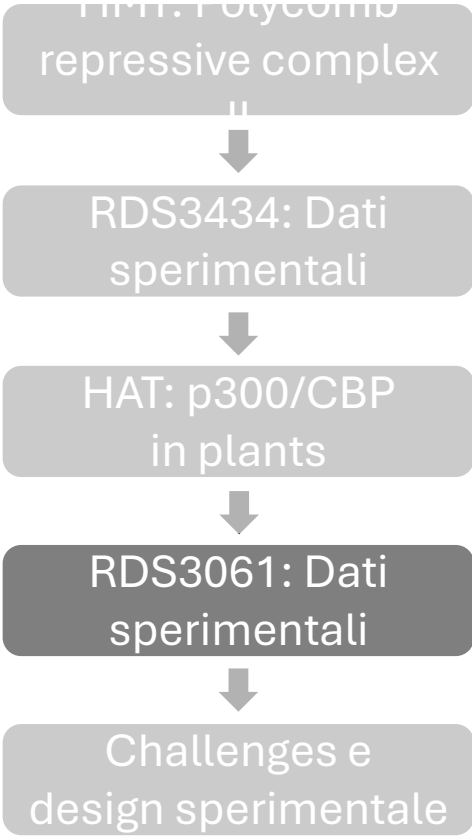
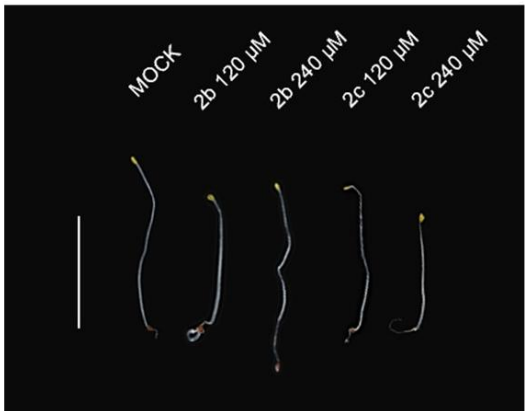
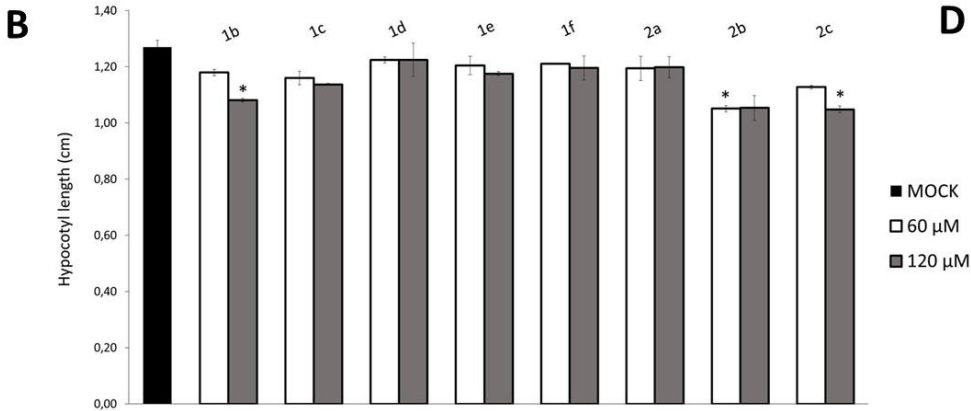
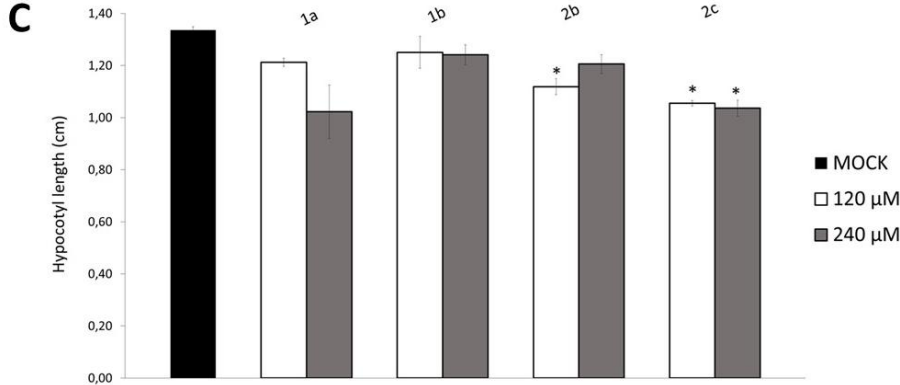
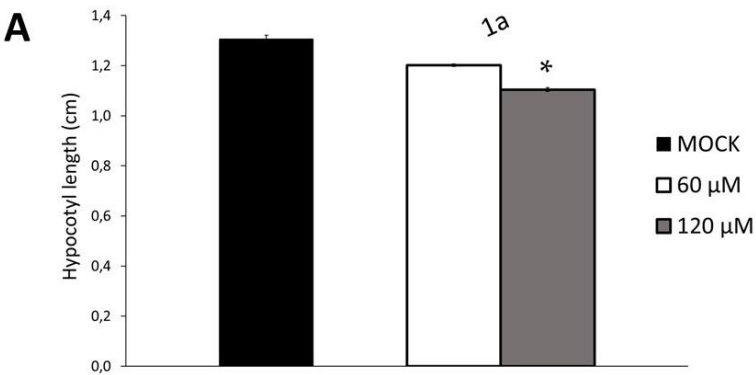
RDS3061: Dati
sperimentali



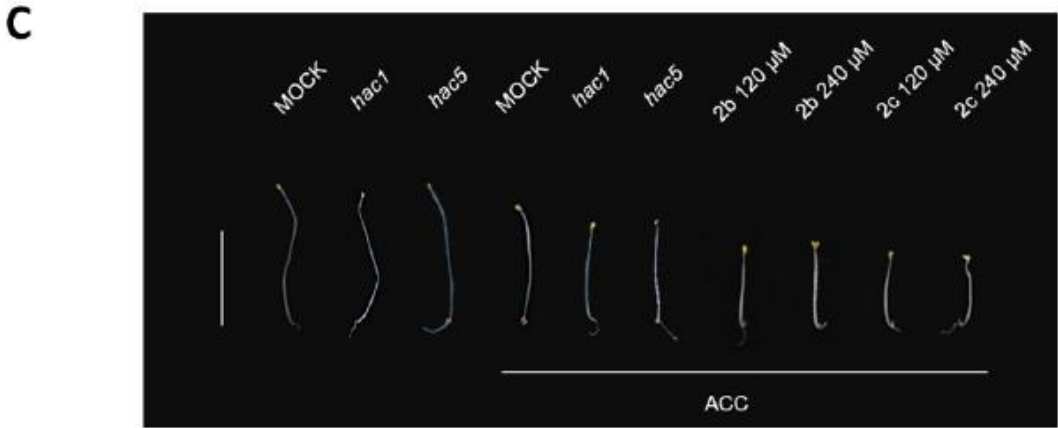
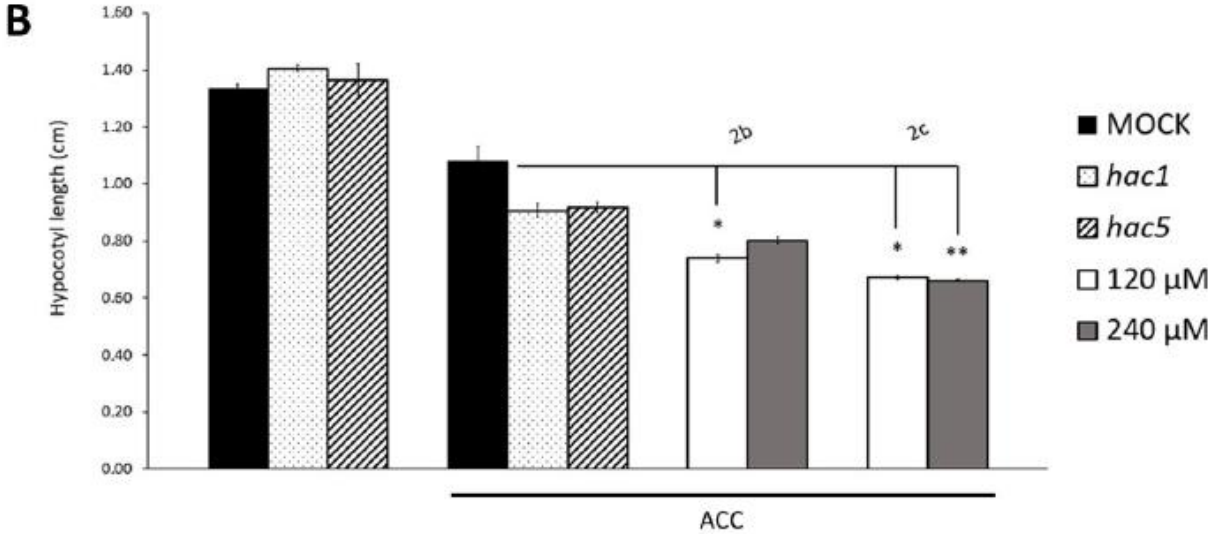
Challenges e
design sperimentale

Lead compound e primo screening

Caso studio II



Il trattamento chimico causa fenotipi più forti rispetto ai mutanti hac in presenza di ACC



Caso studio II

RNAi Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants



RDS3061: Dati sperimentali

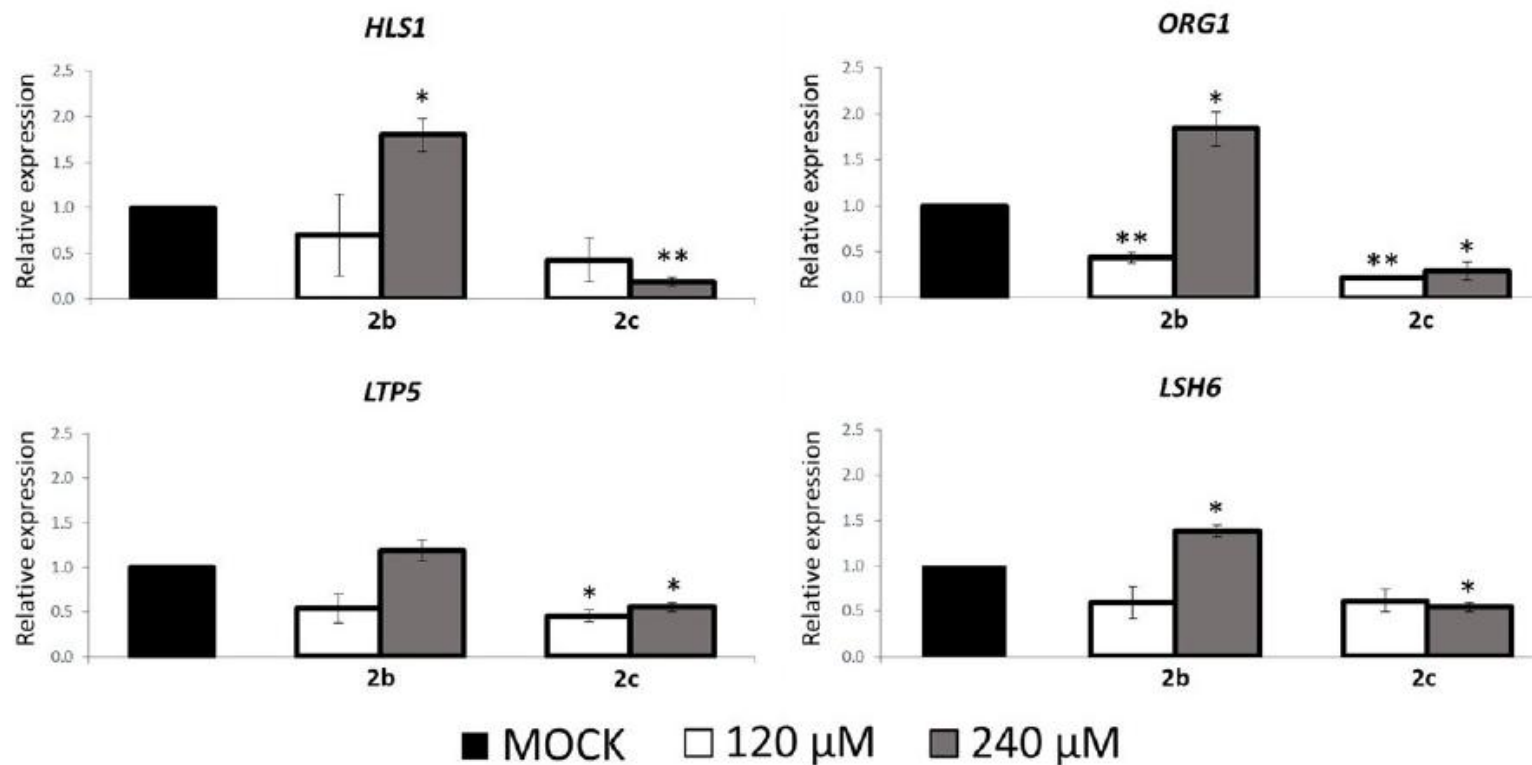


Challenges e design sperimentale

Il trattamento con gli inibitori influisce sull'espressione dei geni bersaglio delle HAC

Caso studio II

A



RNA Polycomb
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants

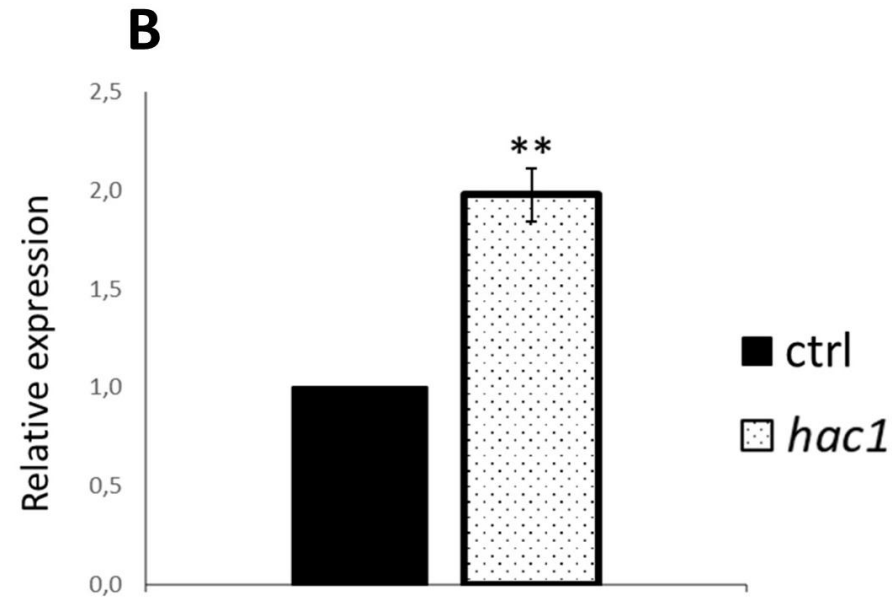
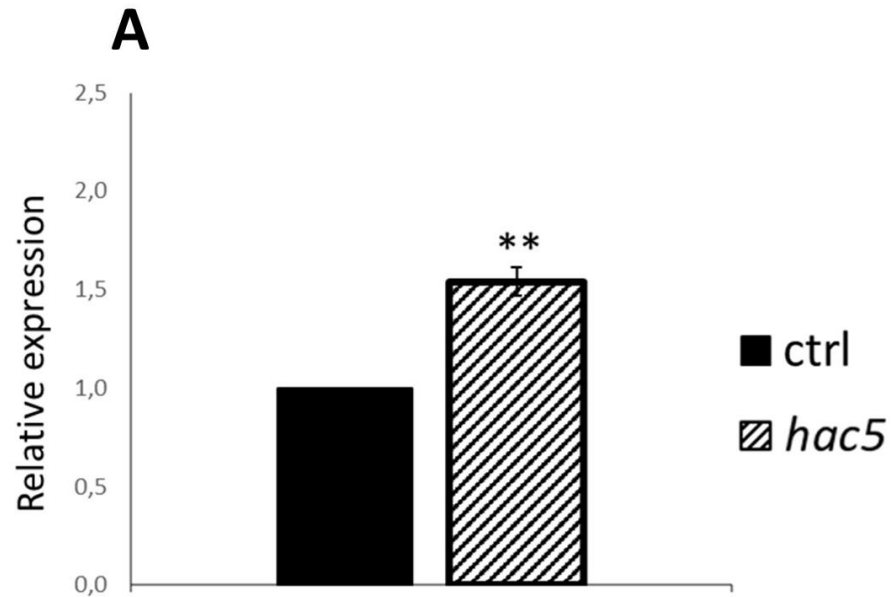


RDS3061: Dati
sperimentali



Challenges e
design sperimentale

I mutanti *hac* regolano mutualmente la loro espressione: effetto compensazione



Caso studio II

RNA Polycomb
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants

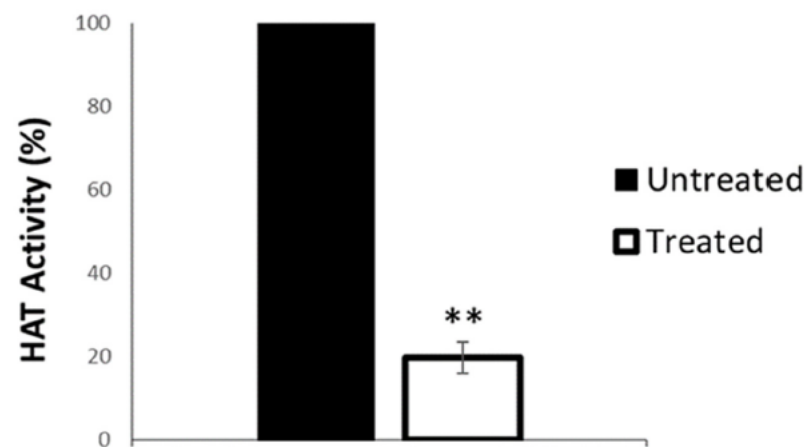
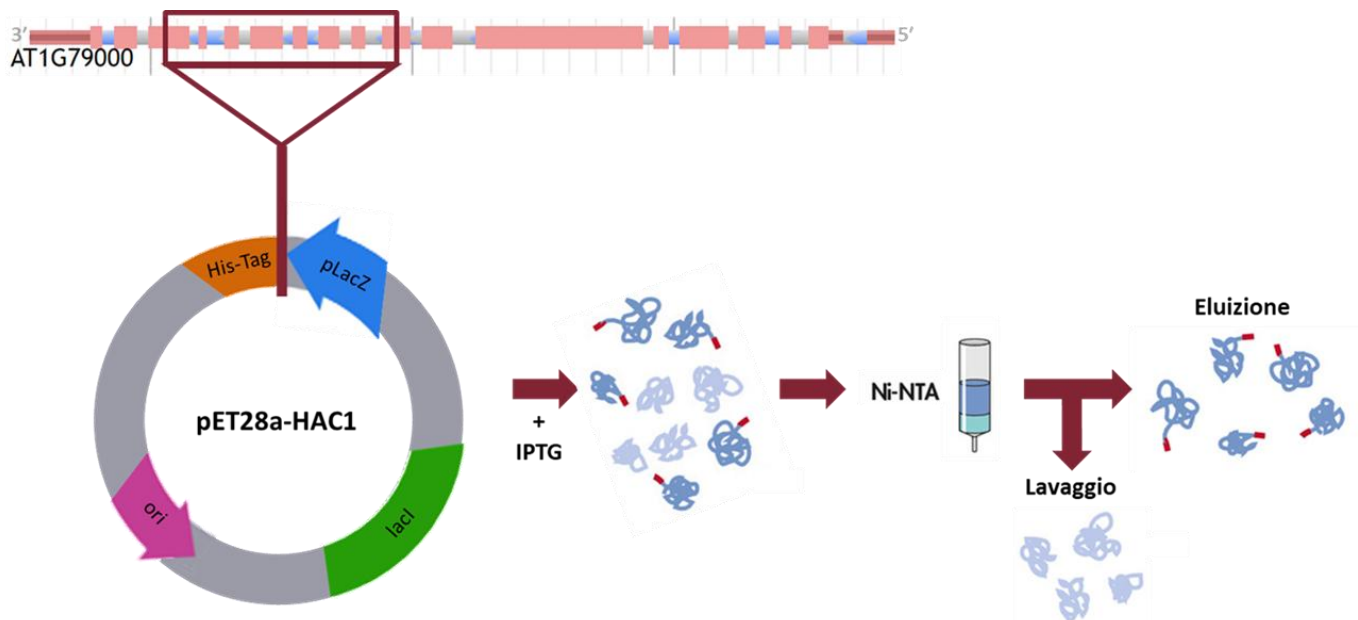


RDS3061: Dati
sperimentali

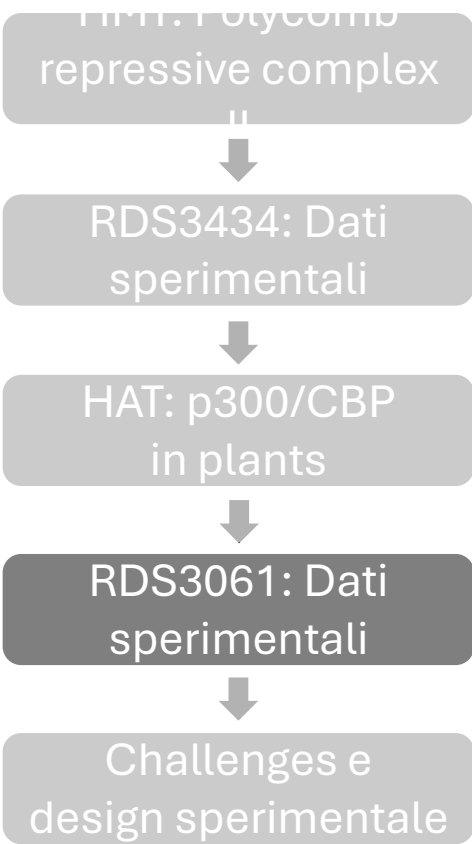


Challenges e
design sperimentale

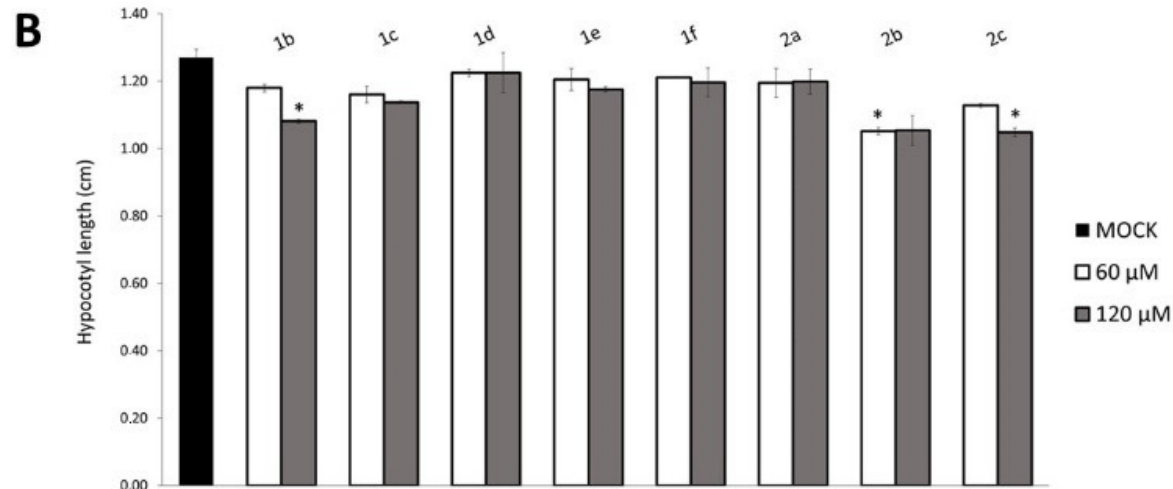
Saggio di acetilazione *in vitro*



Caso studio II



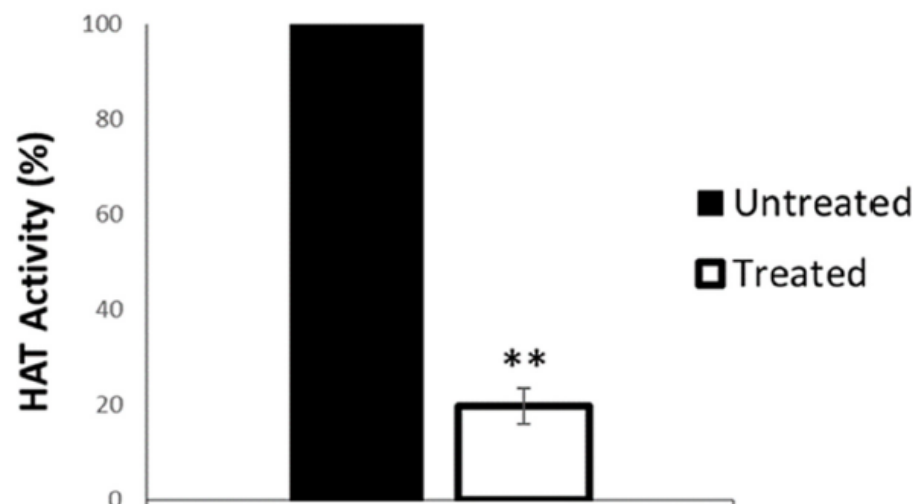
Challenges del drug repurposing



Necessità di ampie librerie:
Non troverai un farmaco efficace
con un solo tentativo...

... ma allo stesso tempo gli
screening fenotipici
richiedono denaro e tempo

Poiché si utilizzano molecole
progettate per altri target, sono
necessarie saggi biochimici a
supporto dell'efficacia e della
specificità delle molecole



Caso studio II

RNA Polymerase
repressive complex



RDS3434: Dati
sperimentali



HAT: p300/CBP
in plants

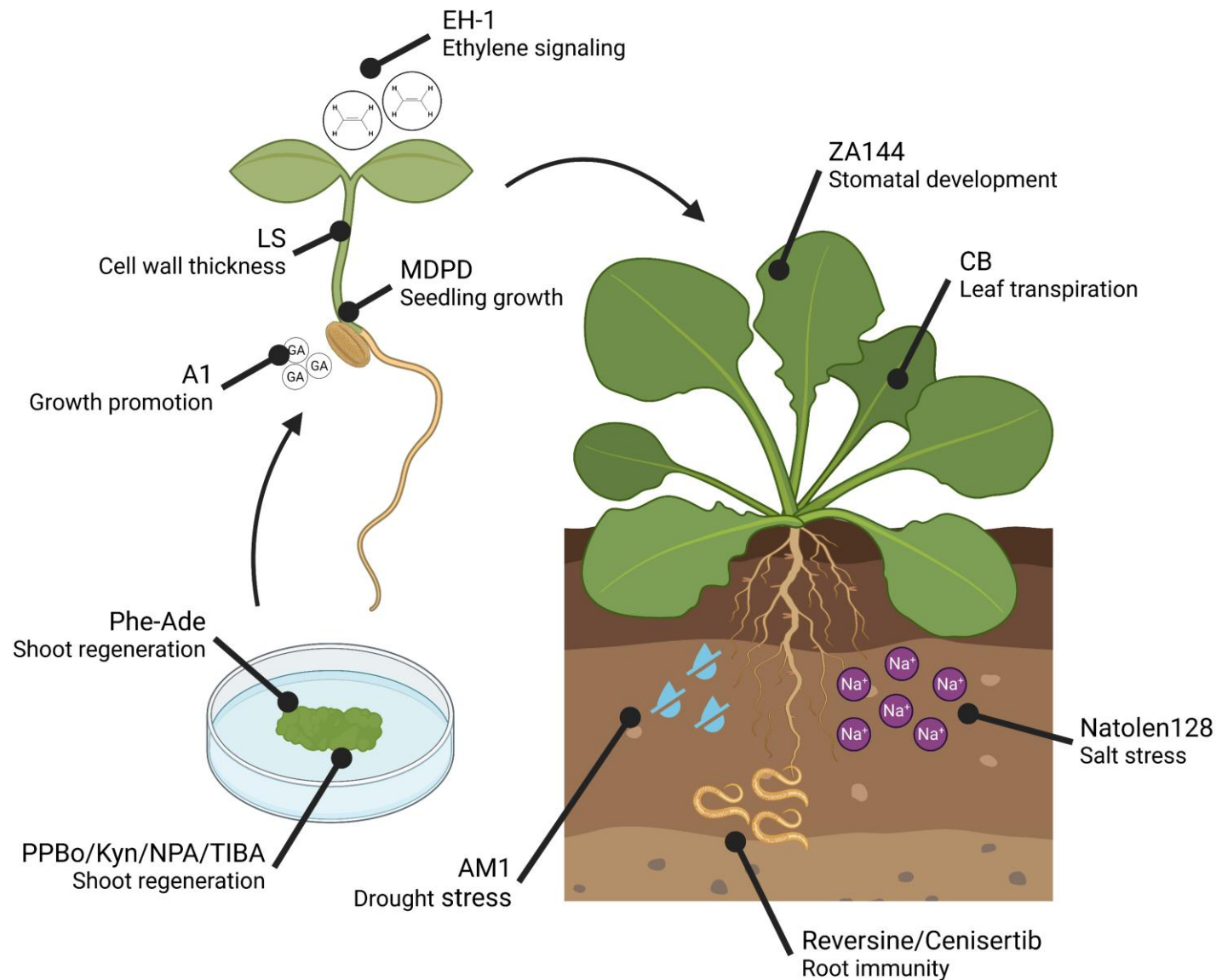


RDS3061: Dati
sperimentali



Challenges e
design sperimentale

Molecole disponibili



Caso studio II

RNAi Polycomb repressive complex



RDS3434: Dati sperimentali



HAT: p300/CBP in plants

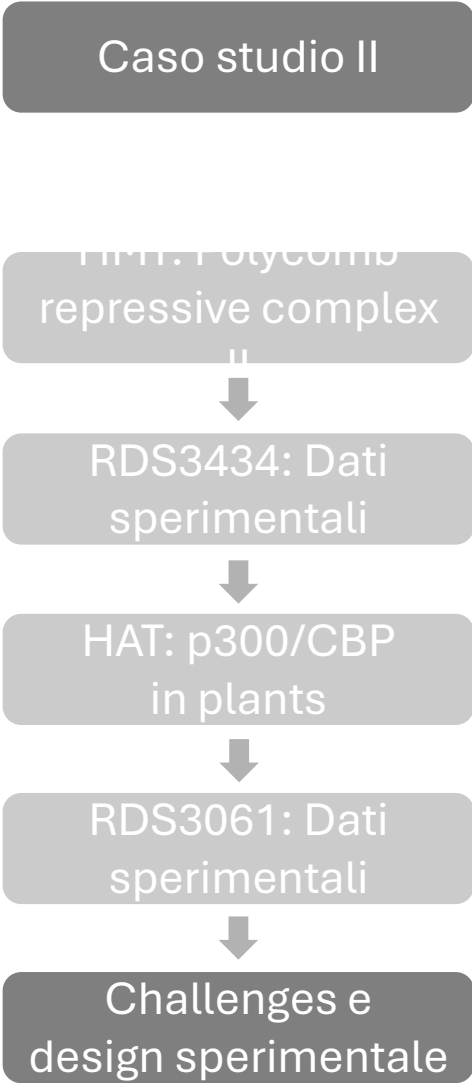
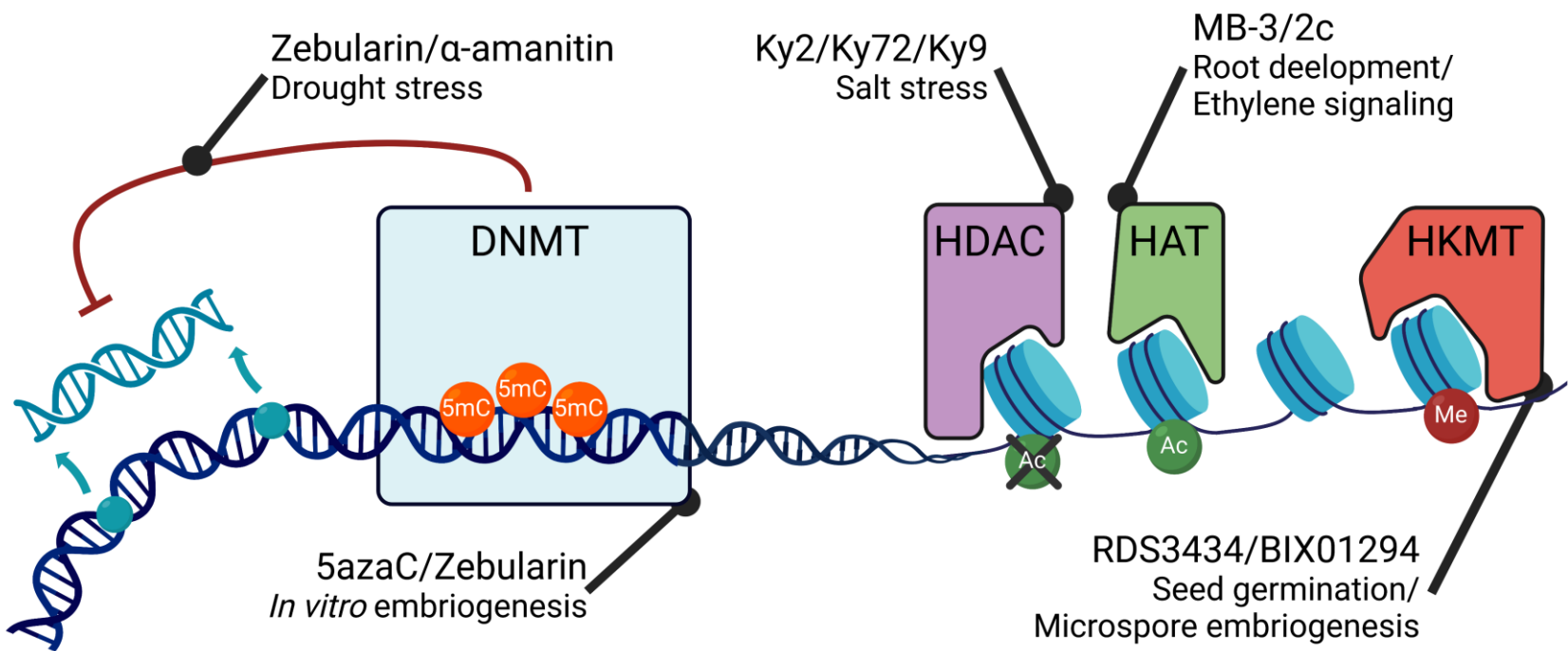


RDS3061: Dati sperimentali

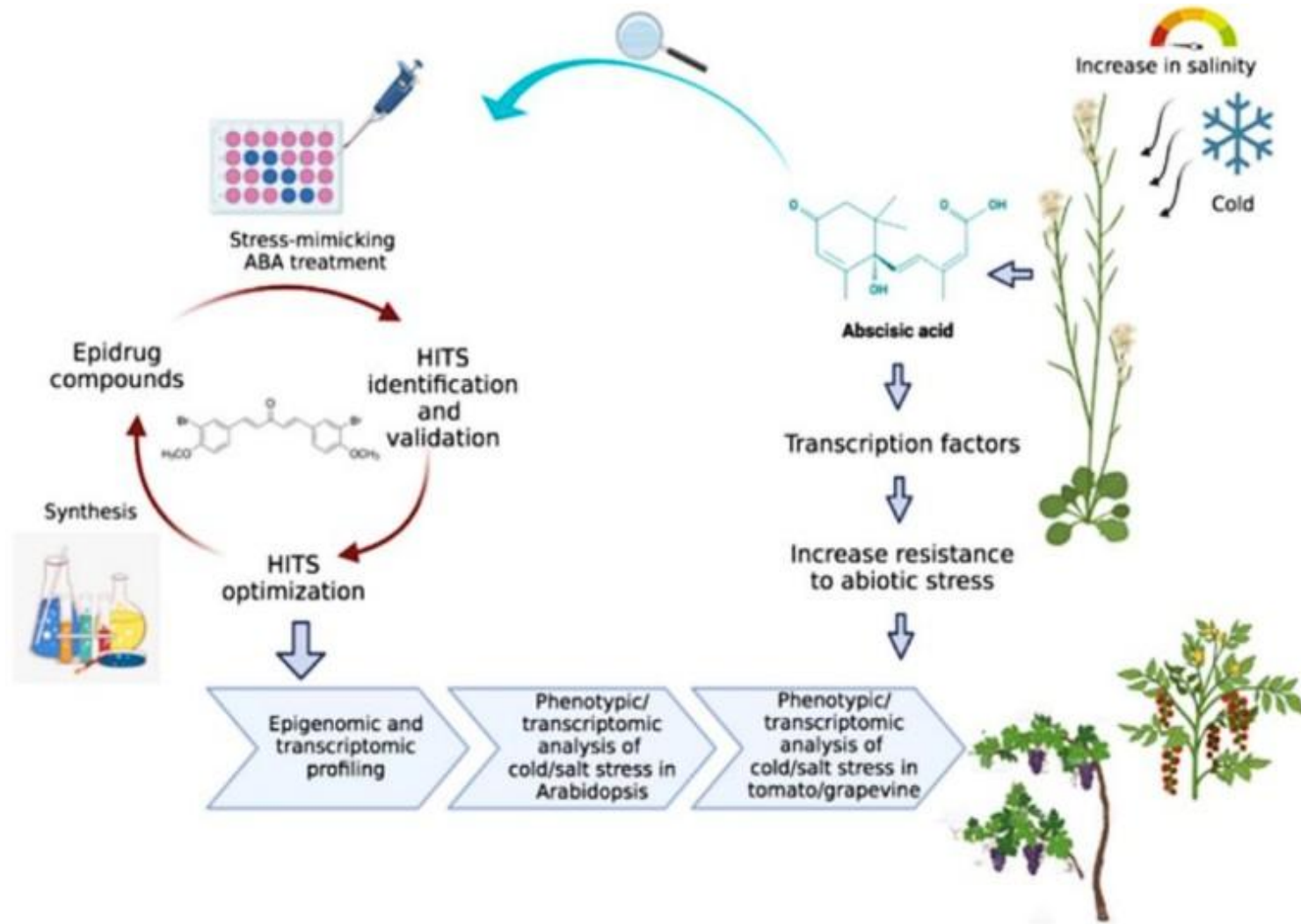


Challenges e design sperimentale

Molecole disponibili



Nuovo progetto



Elevata conservazione dei
regolatori epigenetici tra
mammiferi e piante

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

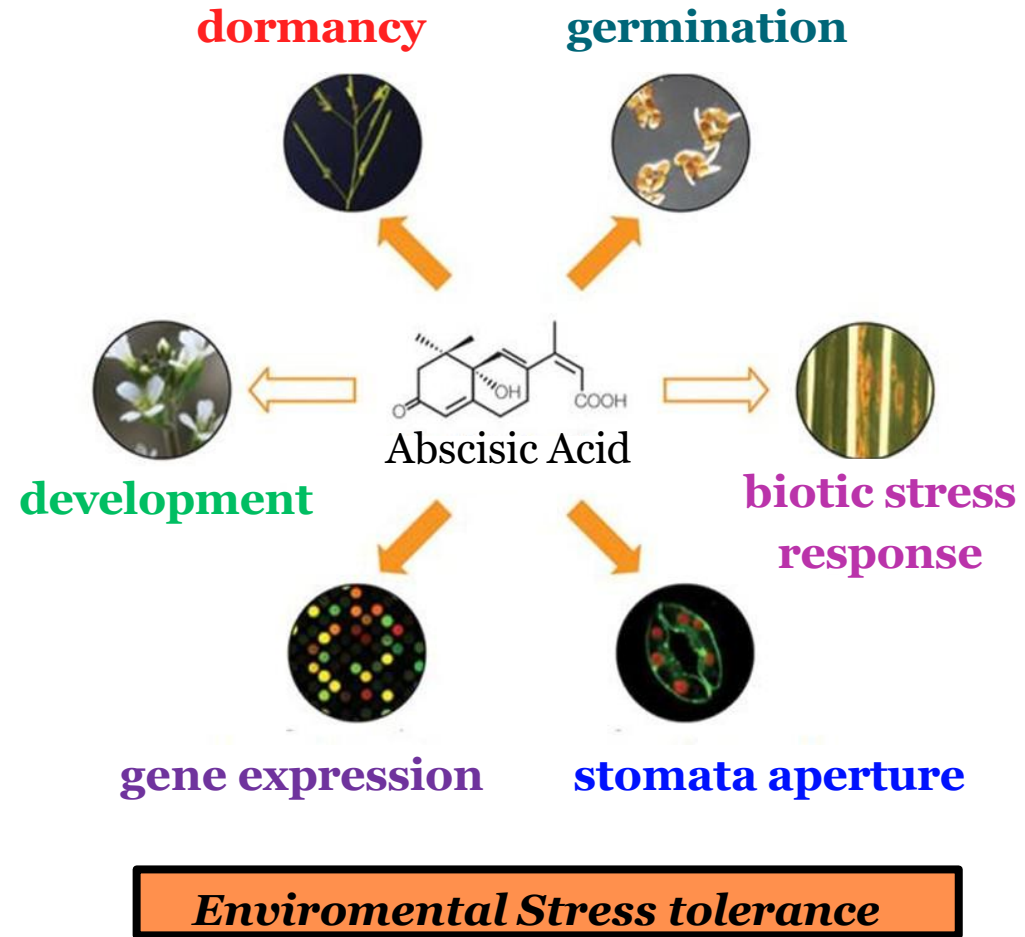
**Identificazione di uno o più composti che
aumentino la tolleranza agli stress
abiotici**

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

Stress abiotici

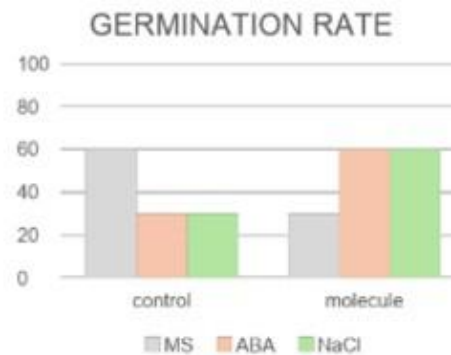
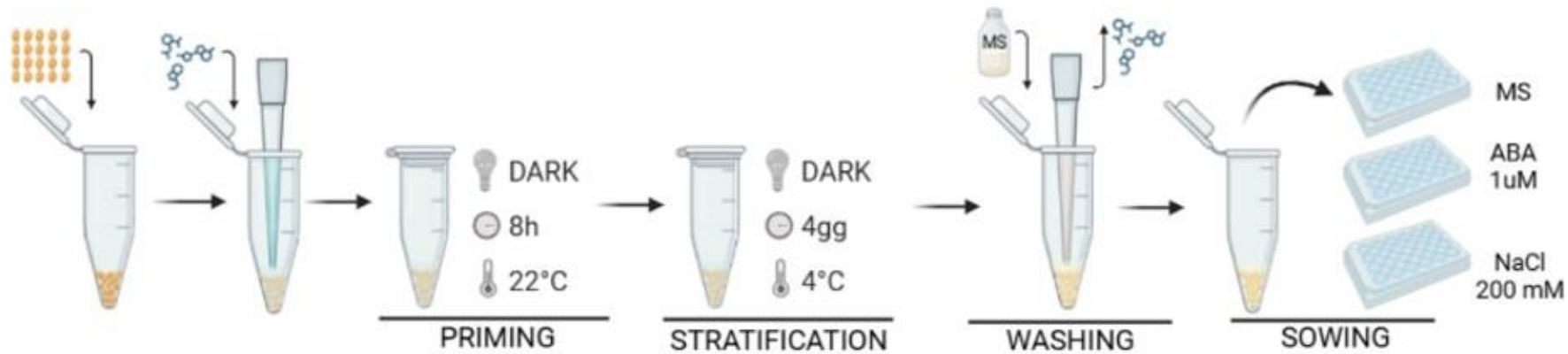
L'insieme di **condizioni ambientali estreme e avverse** che inducono alterazioni di *pathway* e di meccanismi biomolecolari

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



Set up di screening fenotipico

Caso studio II



HMT: Polycomb repressive complex II

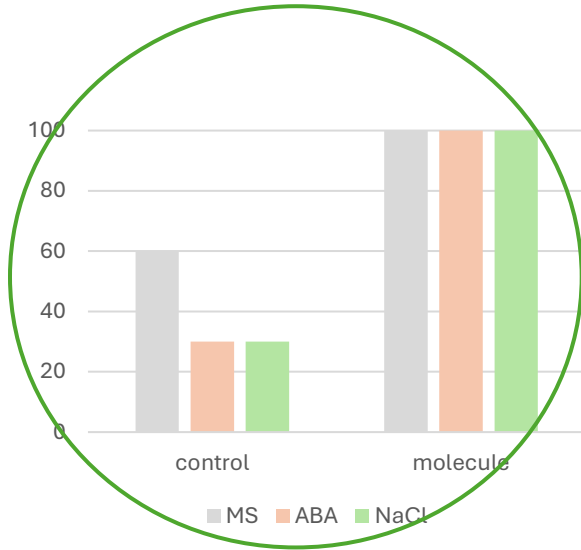
RDS3434: Dati sperimentali

HAT: p300/CBP in plants

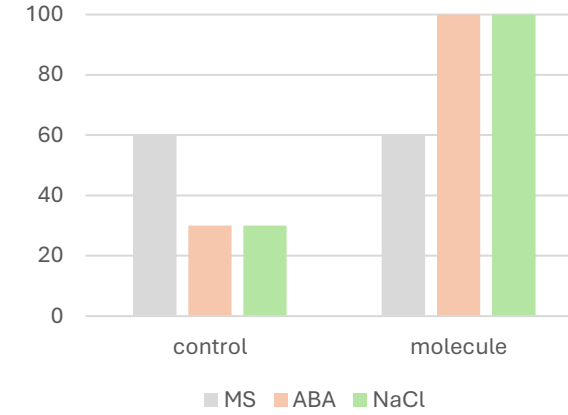
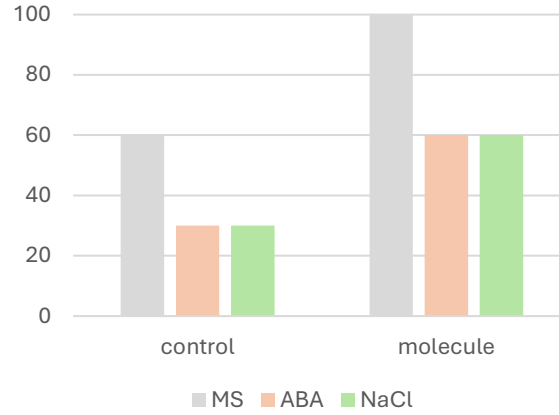
RDS3061: Dati sperimentali

Challenges e design sperimentale

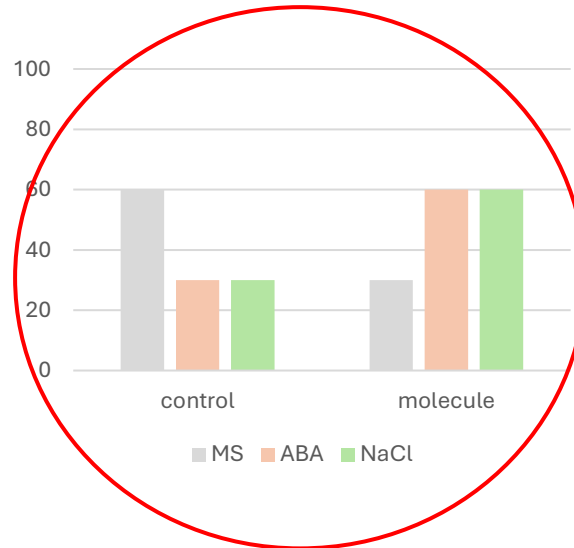
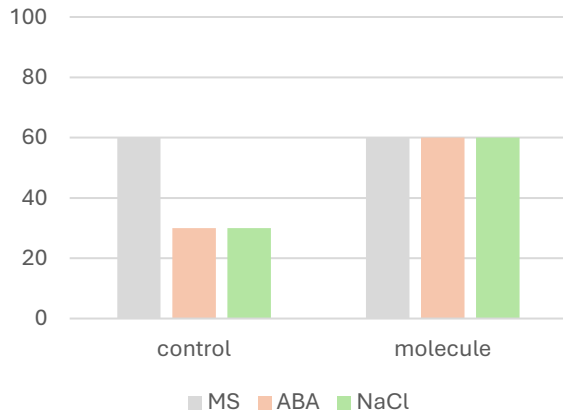
SCREENING CRITERIA



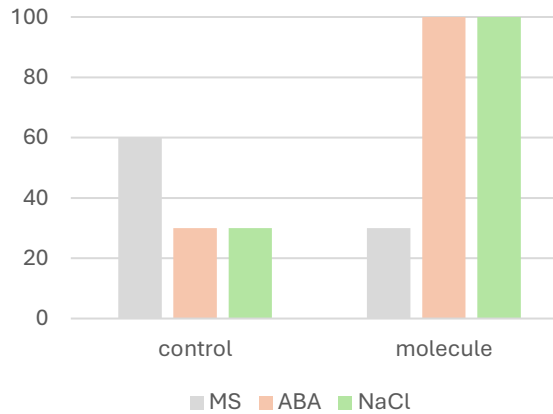
what I ordered on wish



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

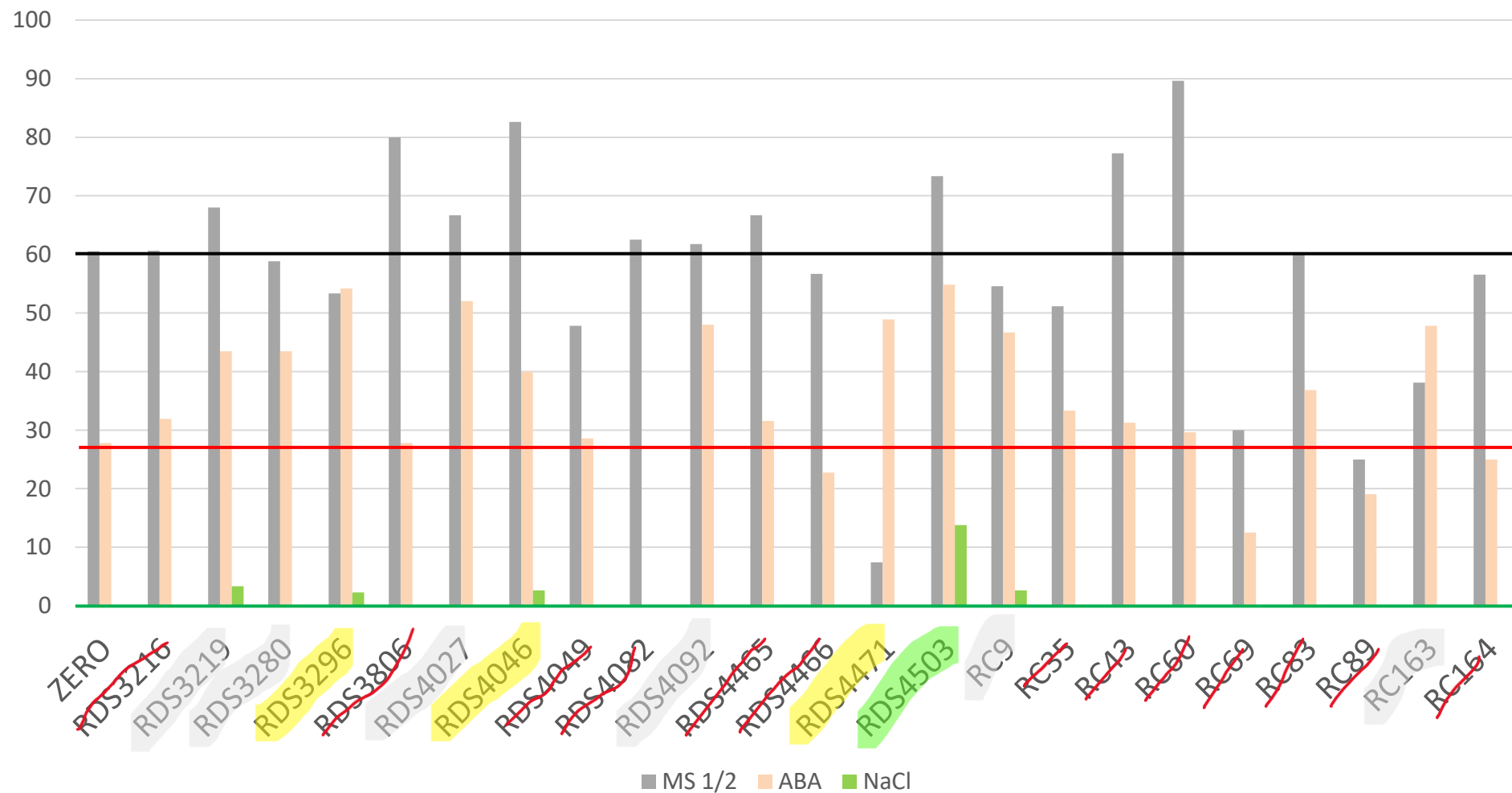


what I got

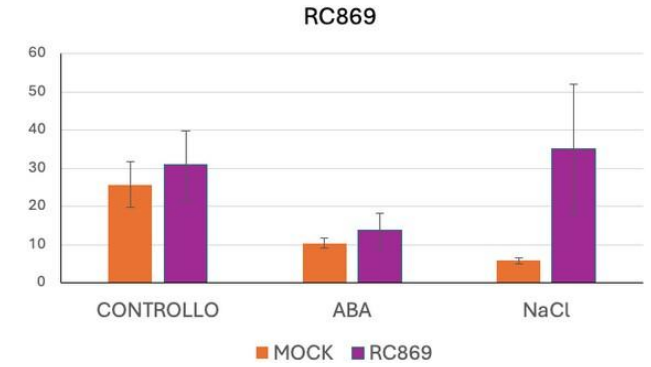
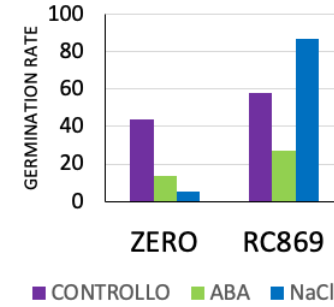
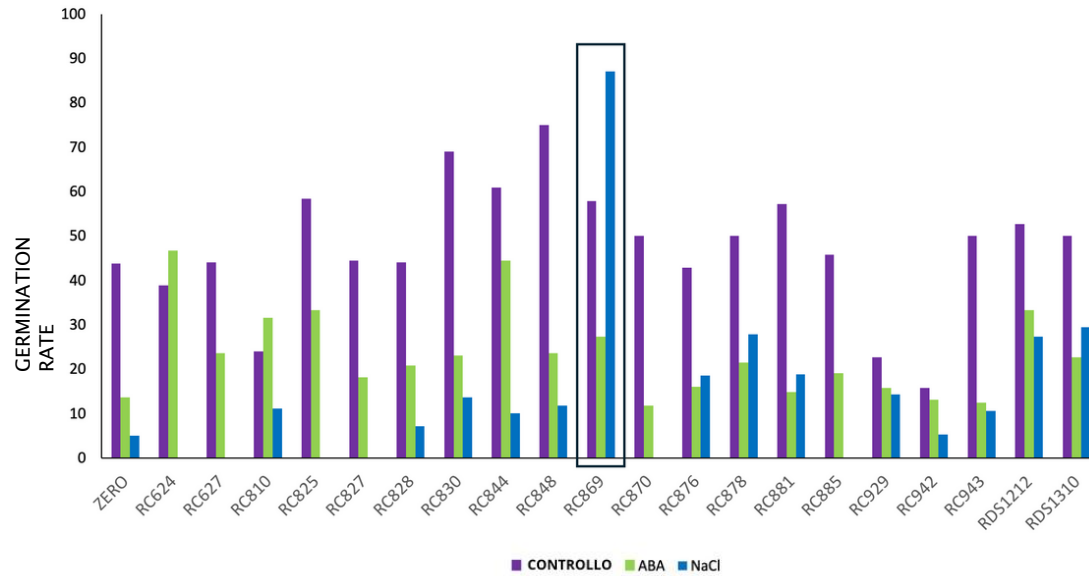


SCREENING CRITERIA

GRUPPO 2

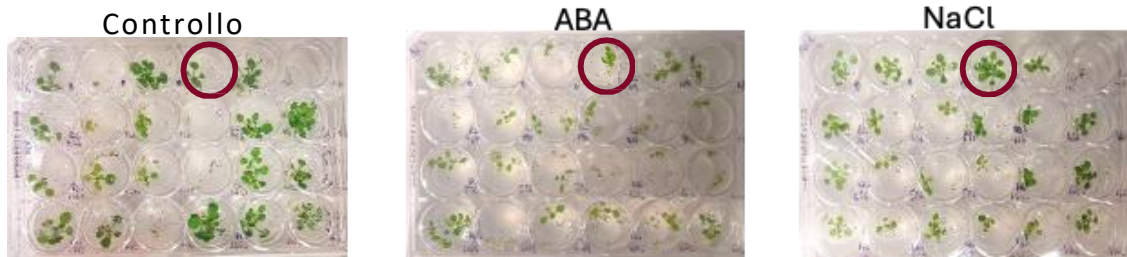


Molecola RC869 selezionata

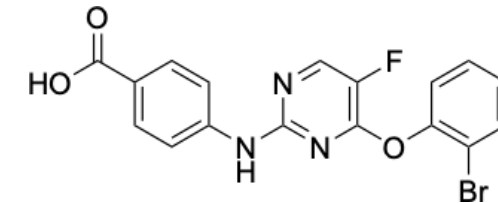


N=3
n=20

Percentuale di **germinazione** a seguito del trattamento



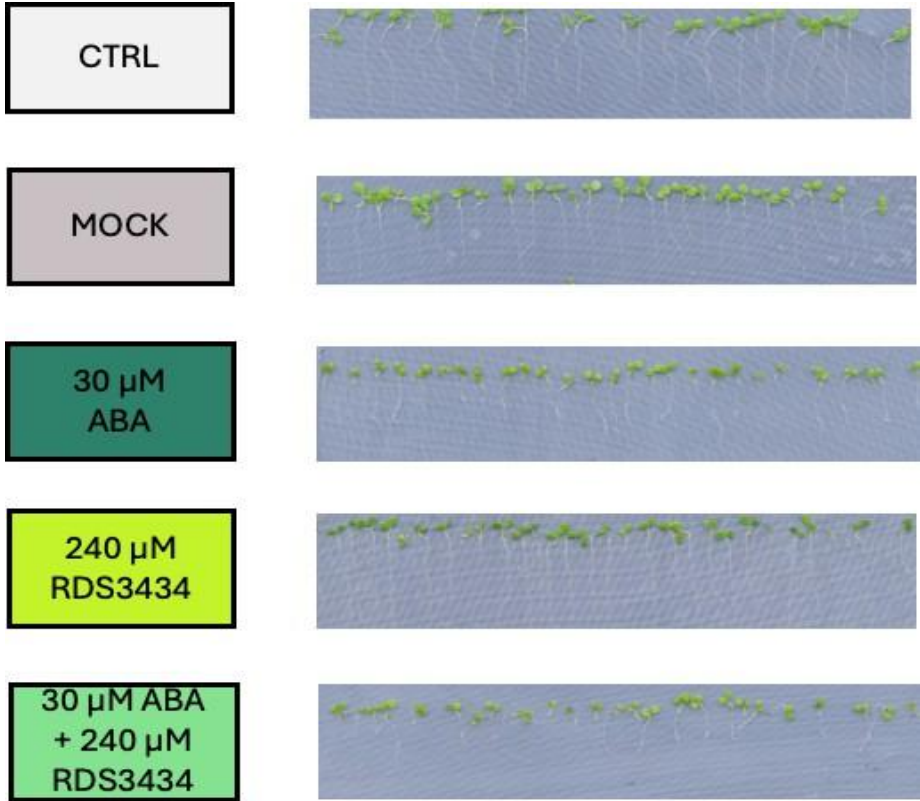
Germinazione a **11 giorni**



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

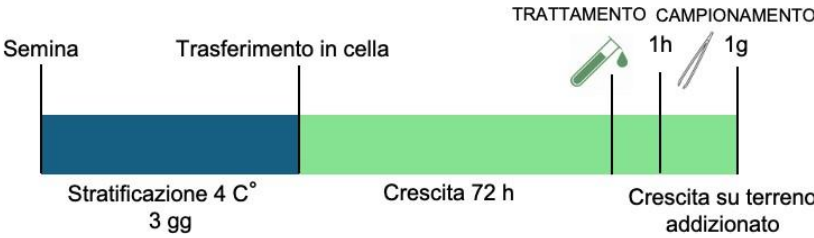
Analisi molecolare

Geni di **risposta** allo **stress**

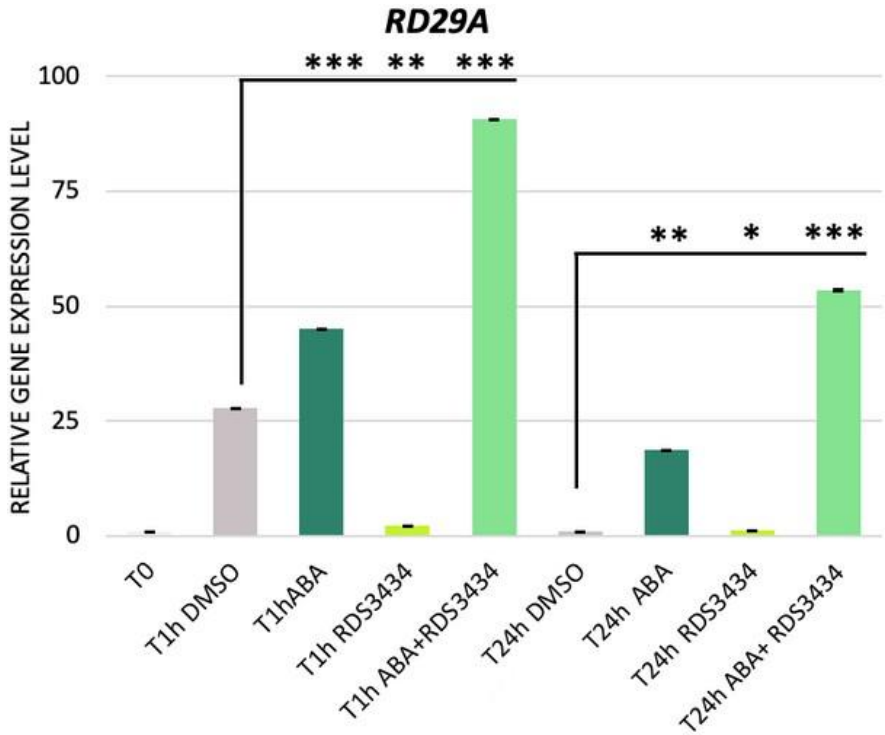


N = 2 n = 30

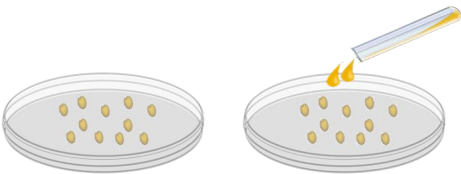
Set up per studiare gli effetti delle **small molecules**



RD29A è un gene *marker* della risposta allo stress e del *signaling* dell'ABA

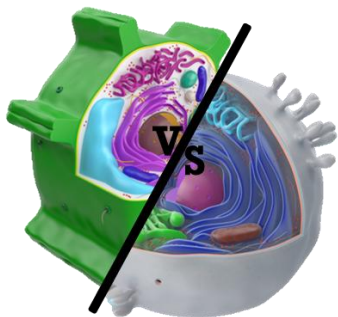


Ricapitoliamo i punti principali:

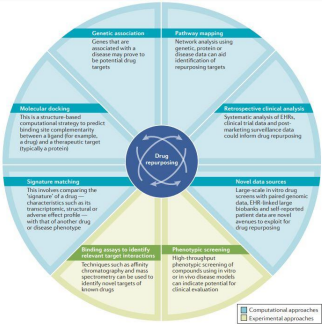


Strategie di genetica chimica, sia phenotype-based (forward) che target-based (reverse), risultano di estremo di interesse dalla ricerca applicativa a quella di base, fornendo un approccio alternativo e complementare alla genetica classica.

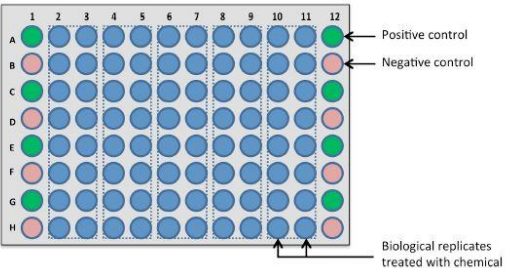
Sebbene il numero di small-molecules sia continuamente in aumento, le molecole testate e approvate sono una frazione esigua. Approcci di drug repurposing possono dare nuova luce a composti scartati, permettendo di risparmiare risorse.



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?