

Università degli Studi di Roma
“SAPIENZA”

Facoltà di Farmacia e Medicina

**Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia
Farmaceutiche**

Tesi Sperimentale

***Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1): studio del “binding mode” di
diverse classi di inibitori***

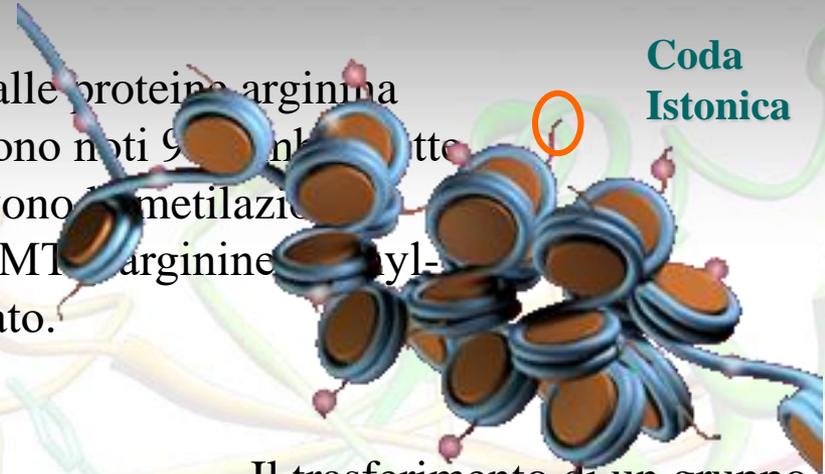
Relatore
Prof. Rino Ragno

Laureanda
Vanessa Torino
Matricola 318405

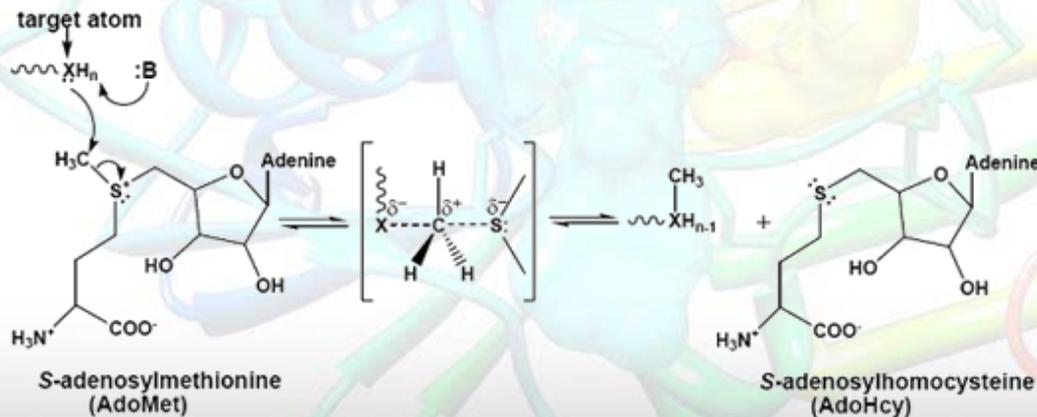
A.A. 2010/2011

Le modificazioni post-traduzionali note sono: l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione, l'ubiquitinazione, la sumoilazione e l'ADP-ribosilazione. La metilazione delle arginine è catalizzata dalle proteine arginina metiltransferasi (PRMT), di cui nell'uomo sono noti 9 sottotipi (PRMT 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) che promuovono la metilazione grazie alla presenza del dominio catalitico RMT ("arginine methyl-transferase domain") estremamente conservato.

Coda Istonica



Il trasferimento di un gruppo metilico dall'S-adenosil-metionina (AdoMet) all'azoto guanidinico dell'arginina, portando alla formazione di S-adenosil-omocisteina (AdoHcy) e metilarginina.



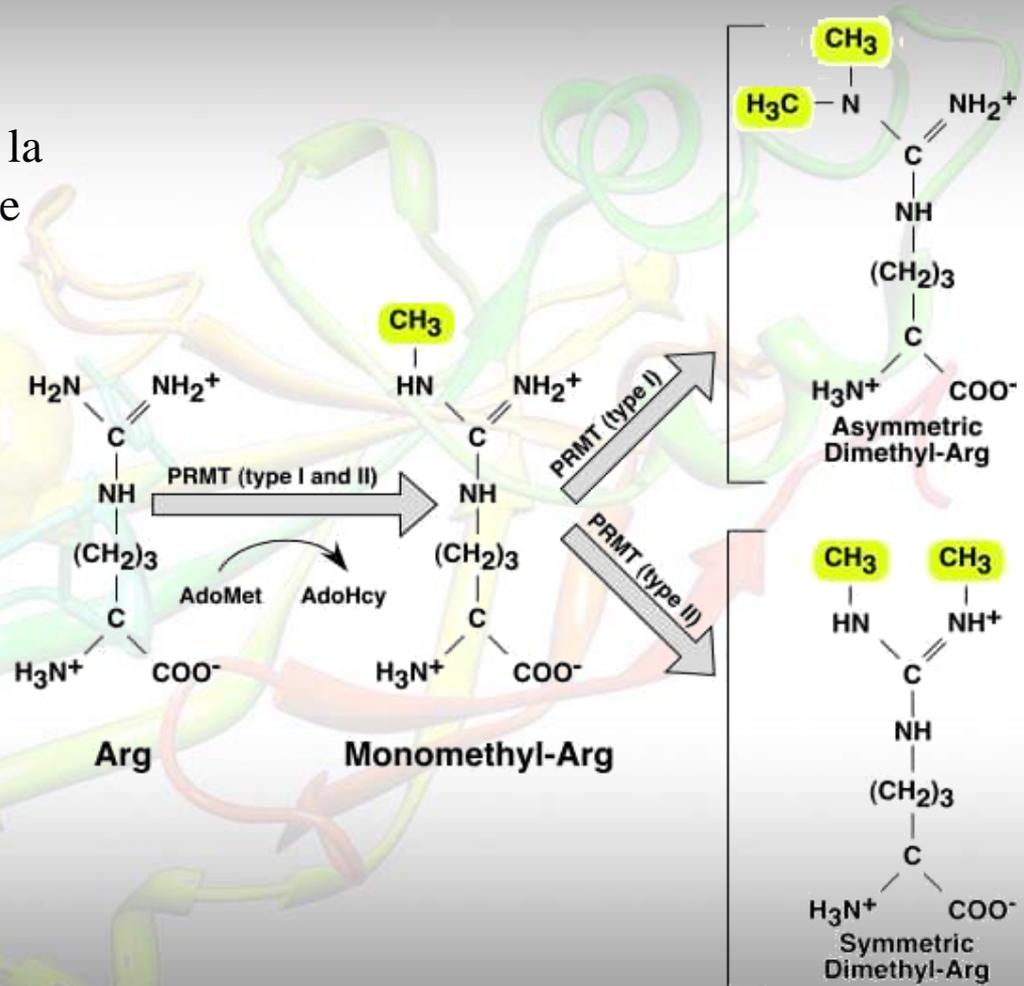
Metilazione in regioni *consensus* “RGG, RG e GRG”

Due gruppi di PRMT:

- **“tipo I”** (PRMT1, 3, 4, 6 e 8) catalizzano la formazione di dimetil-arginine asimmetriche (aDMA)

- **“tipo II”** (PRMT5 e 7) catalizzano la formazione di dimetil-arginine simmetriche (sDMA)

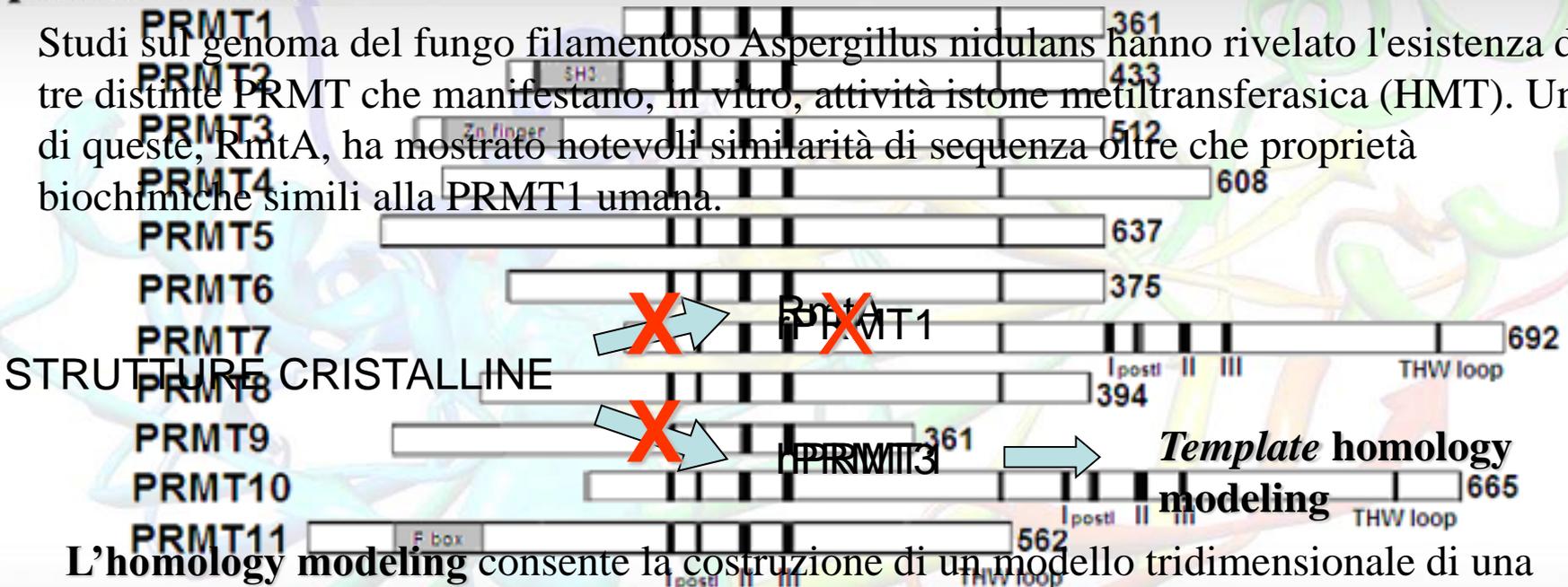
Per PRMT2 e PRMT9 non è stata invece ancora dimostrata alcuna attività enzimatica



PRMT1

Tra le diverse isoforme, PRMT1 è quella predominante in quanto in grado di compiere l'85% della metilazione delle arginine proteiche in vivo.

Studi sul genoma del fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* hanno rivelato l'esistenza di tre distinte PRMT che manifestano, in vitro, attività istone metiltransferasica (HMT). Una di queste, RmtA, ha mostrato notevoli similarità di sequenza oltre che proprietà biochimiche simili alla PRMT1 umana.



L'homology modeling consente la costruzione di un modello tridimensionale di una proteina "target", di cui non si conosce la struttura terziaria, a partire dalla sua sequenza di aminoacidi (struttura primaria) e dalla struttura tridimensionale sperimentale di una proteina omologa ad essa correlata (il modello o "template").

Assunzione di base: due proteine che presentano un'identità di sequenza del 30% circa, molto probabilmente avranno una struttura simile.

METILAZIONE DELLE ARGININE LOCALIZZAZIONE DI PRMT1 PROTEICHE & PATOLOGIE



Le PRMT sono coinvolte:

Pur essendo le PRMT, vitali per il normale sviluppo e funzionamento

- nel processamento dell'RNA dell'organismo, la metilazione dei residui di arginina può essere legata anche a
 - nella trasduzione del segnale
- situazioni patologiche e se n'è osservata l'implicazione principalmente:

- nella riparazione del DNA
- membrana plasmatica.
- nella regolazione trascrizionale
- nelle infezioni virali

Cancro

• nel trattamento della prima ADMA libero, ha un ruolo chiaro nelle malattie

• nel differenziamento delle cellule neurost. prodotto, è in grado di comportarsi da PRMT1: componente essenziale del complesso trascrizionale oncogenico della

inibitori importanti risultano quindi, essere **piccole molecole in grado di inibire**

• **Sclerosi Multipla** sia PRMT1 che PRMT4 reprimendo così l'attivazione trascrizionale recettore-mediata da parte di estrogeni e androgeni.

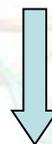
Le PRMT sono note anche come coattivatori per i recettori nucleari e sono suscettibili di sovraespressione in tumori ormono-dipendenti come il cancro della prostata e della mammella.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

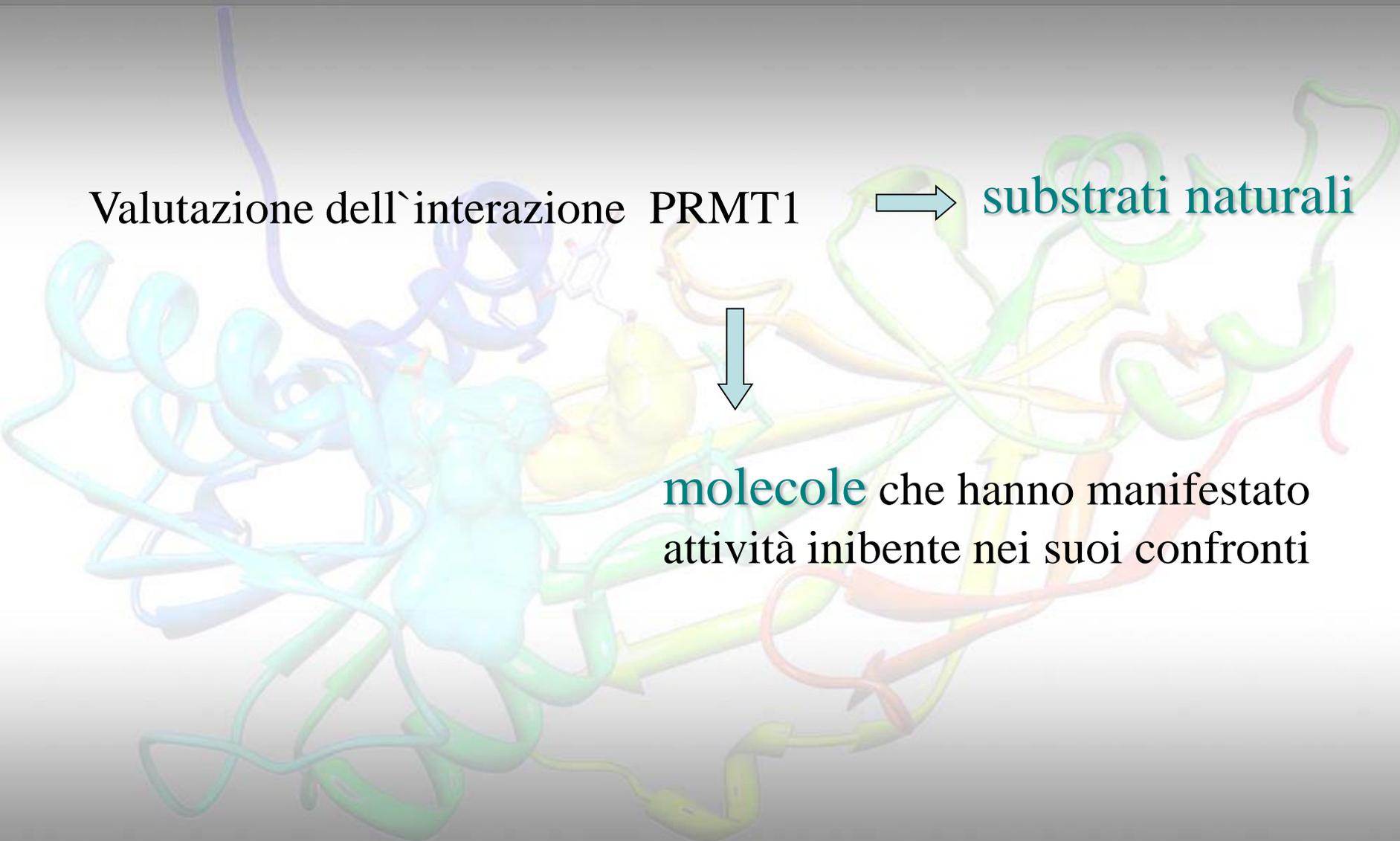
Valutazione dell'interazione PRMT1



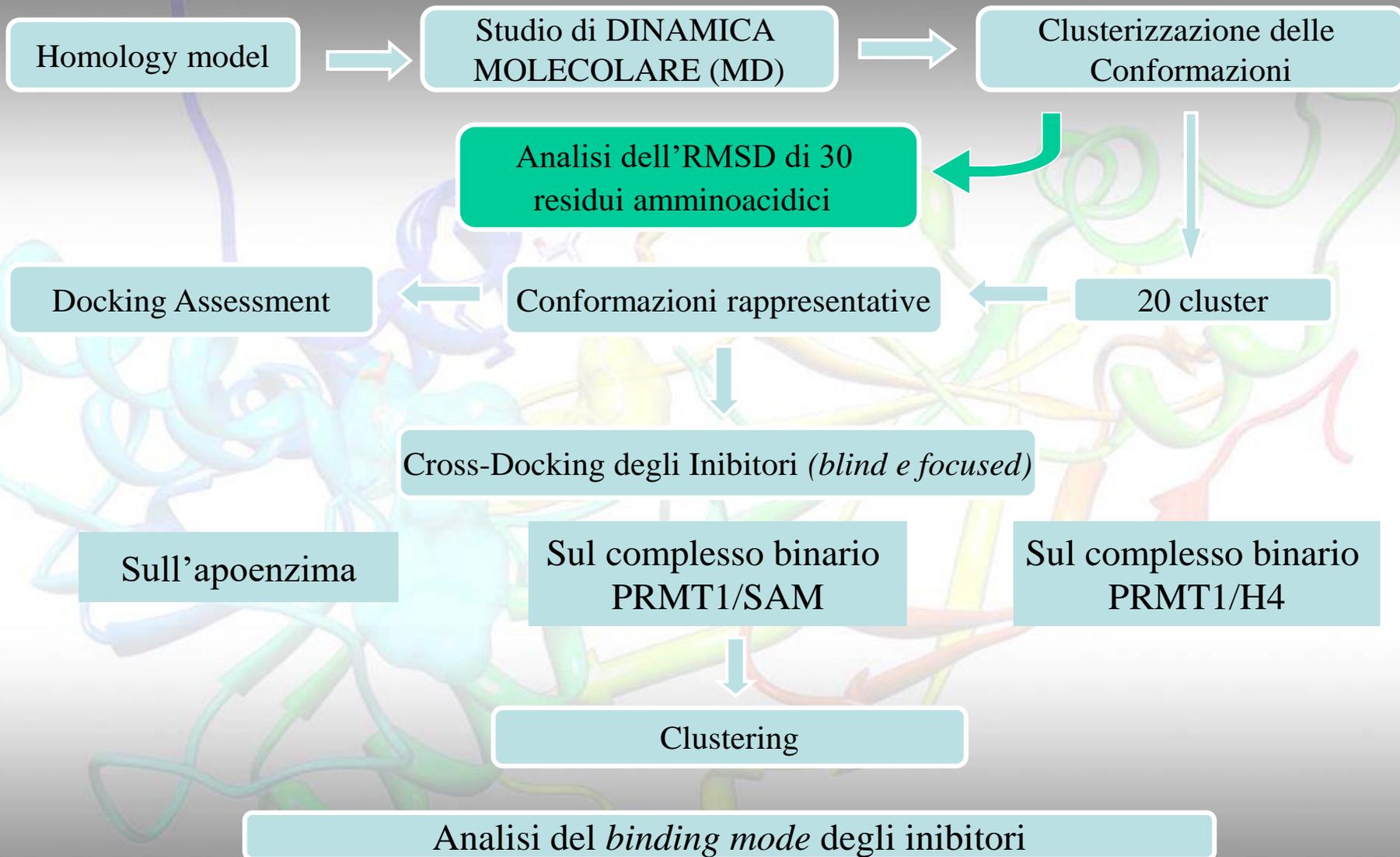
substrati naturali



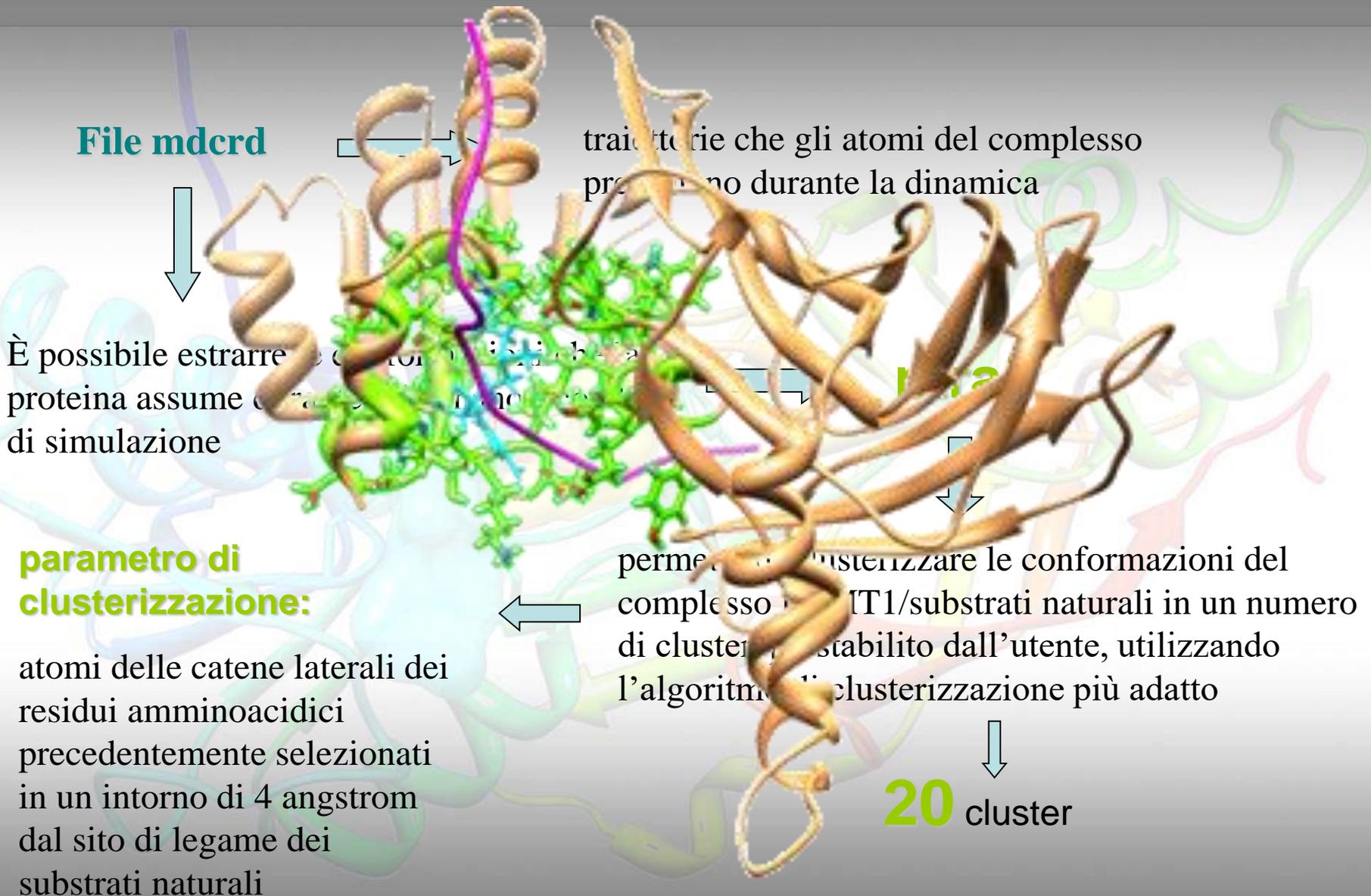
molecole che hanno manifestato
attività inibente nei suoi confronti



Procedura sperimentale

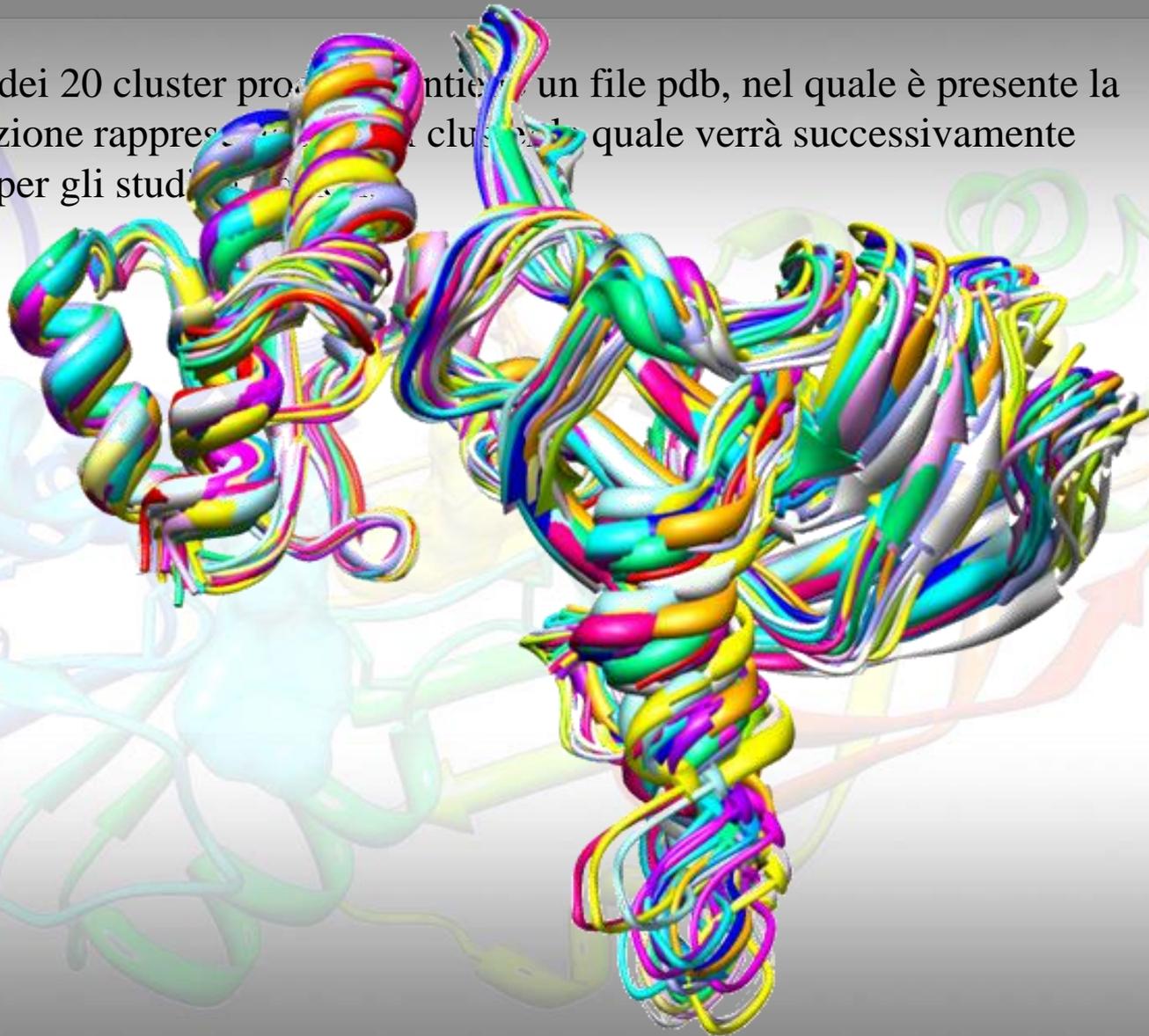


Clusterizzazione delle conformazioni



Clusterizzazione delle conformazioni

Ciascuno dei 20 cluster prodotti contiene un file pdb, nel quale è presente la conformazione rappresentativa del cluster, la quale verrà successivamente utilizzata per gli studi.



2 step: valutare la capacità del programma di riprodurre la conformazione di legame delle molecole facenti parte del complesso ternario iniziale di lavoro (PRMT1, SAM,

Re-Docking:

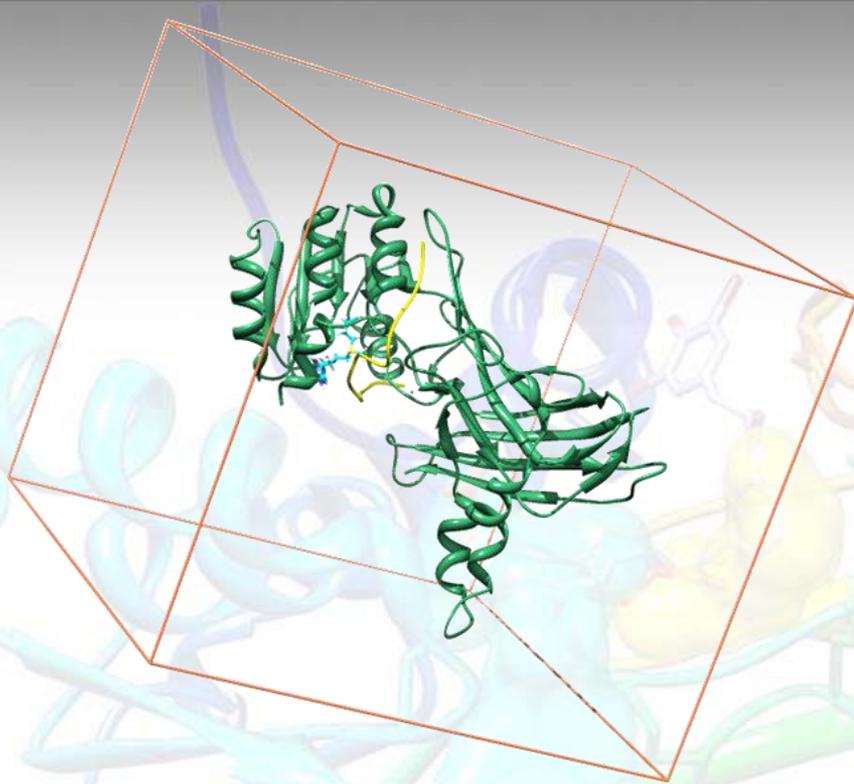
porzione di istone H4) in modo da poter applicare la stessa procedura di allineamento structure-based a molecole di cui non è noto il *binding mode*. In questa fase si verifica se il programma è effettivamente in grado di reinserire la key nella lock esattamente nel sito da essa occupato precedentemente.

Re-Docking Modeled:

Simile al precedente ma utilizza modelli molecolari dei substrati naturali disegnati ab initio dall'operatore. Ciò consente di valutare la capacità del programma di riprodurre la conformazione di legame delle *key* nel sito di legame del recettore, in totale assenza di dati sperimentali.

Gli esperimenti di validazione sono stati eseguiti utilizzando:

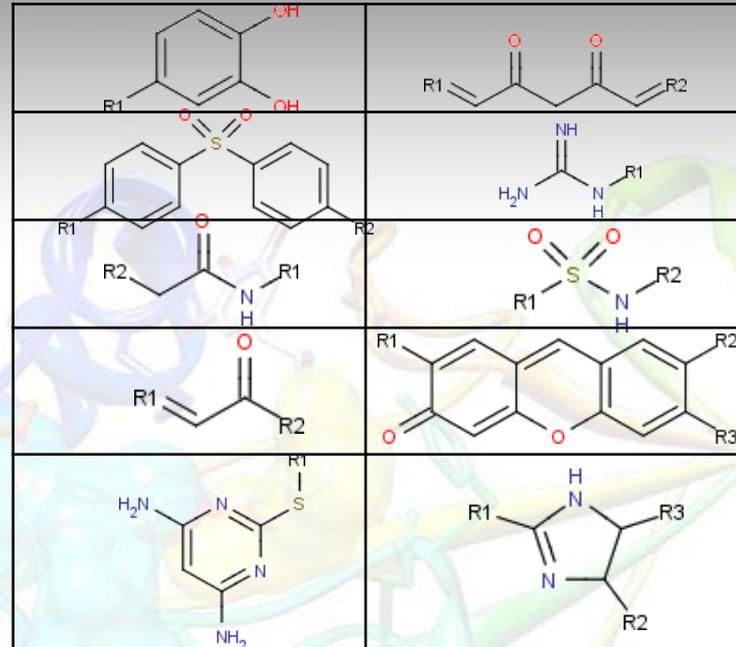
- Apoptosina
- PRMT1/III + SAM → PRMT1/III/SAM
- PRMT1/SAM + ARG → PRMT1/SAM/ARG



Cross-Docking degli inibitori

	BF Average RMSD
Redocking ARG	1.71
Redocking SAM	0.93
Redocking Istone	2.75
Redocking Modeled apo	
ARG	1.82
Istone	3.19
SAM	1.46
Redocking Modeled PRMT1/ARG	
SAM	2.29
Redocking Modeled PRMT1/SAM	
ARG	1.30
Istone	3.65

Cross-Docking degli inibitori (*blind*)

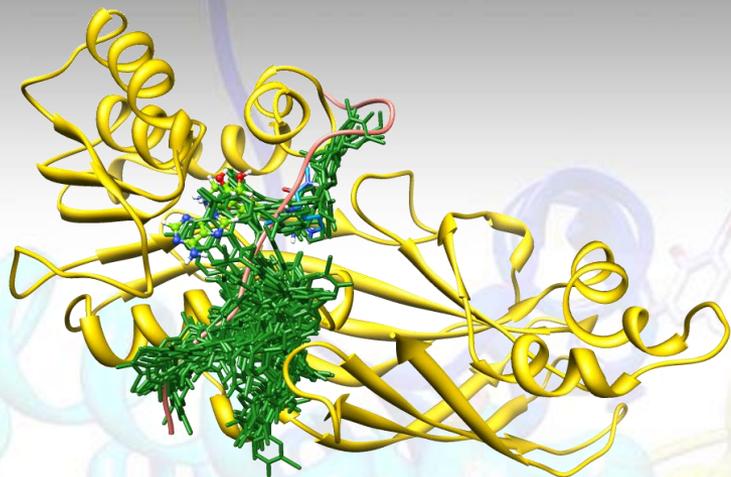


114 inibitori

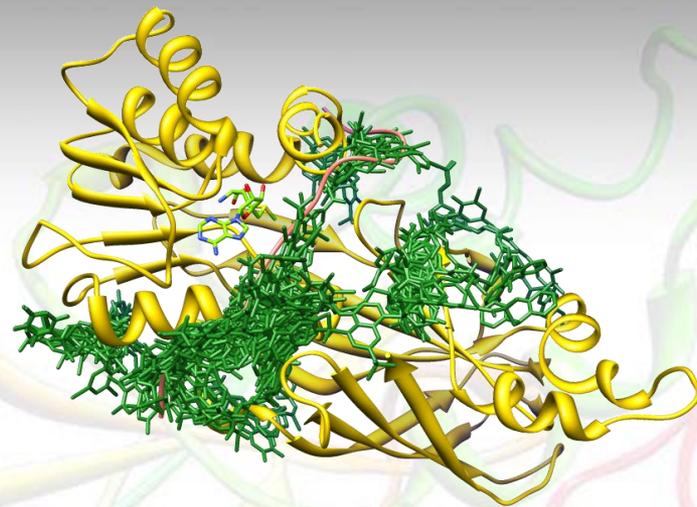
Clusterizzazione dei risultati mediante Autodock 4.0 tre modalità di *cross-docking*.

- **Binding Energy** \implies Best Docked (BD) \rightarrow Conformazione a più bassa energia
 - Sull'apoenzima
 - Sul complesso binario PRMT1/SAM
 - Sul complesso binario PRMT1/H4
- RMSD** \implies **Cluster** \implies **Best Cluster (BC)** \rightarrow Conformazione a più bassa energia del *cluster* più popolato

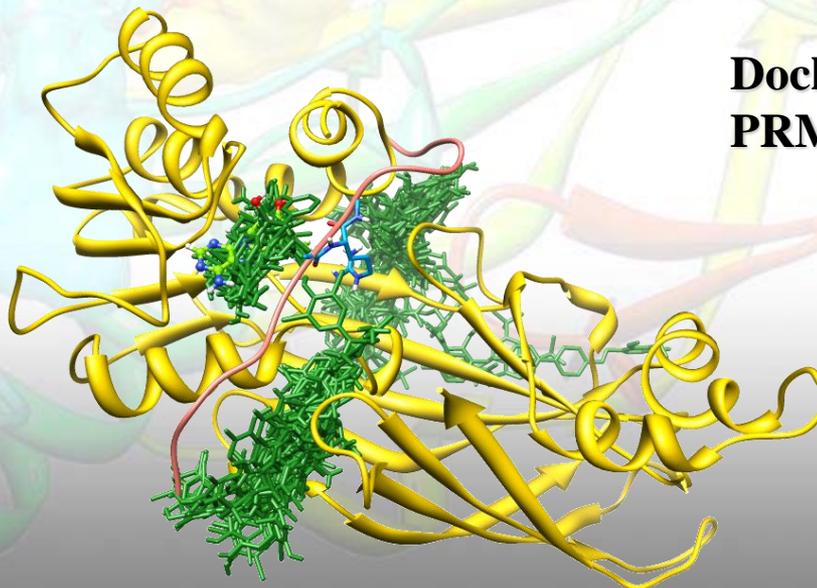
Conformazioni BD



**Docking
sull'apoenzima**



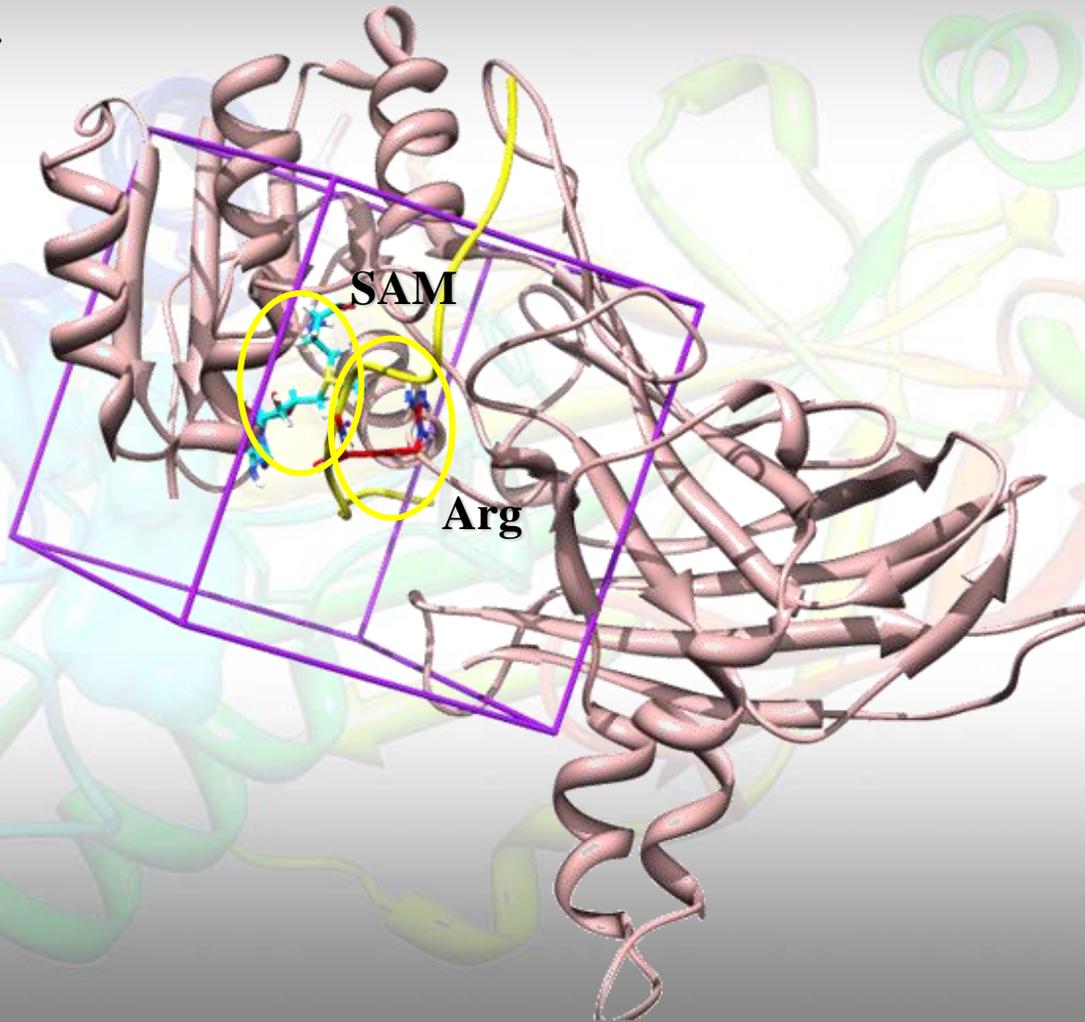
**Docking sul complesso
PRMT1/SAM**



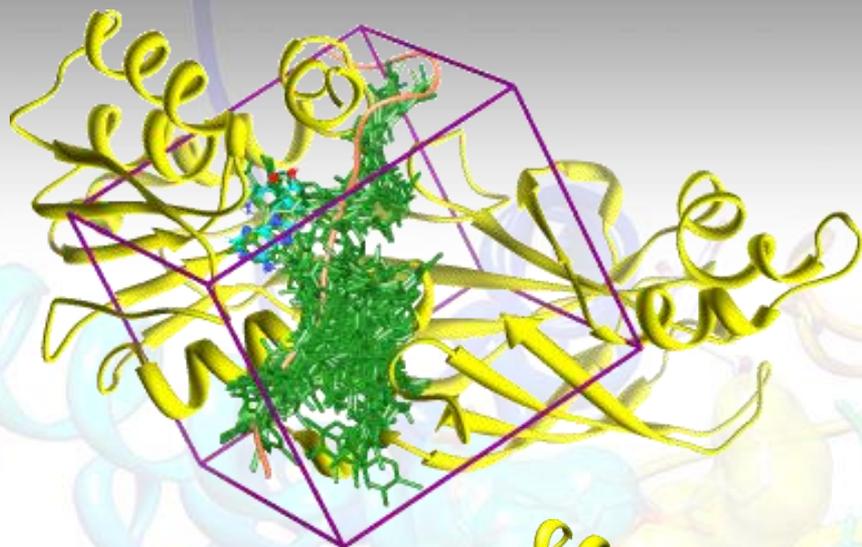
**Docking sul
complesso
PRMT1/H4**

Cross-Docking degli inibitori (*focused*)

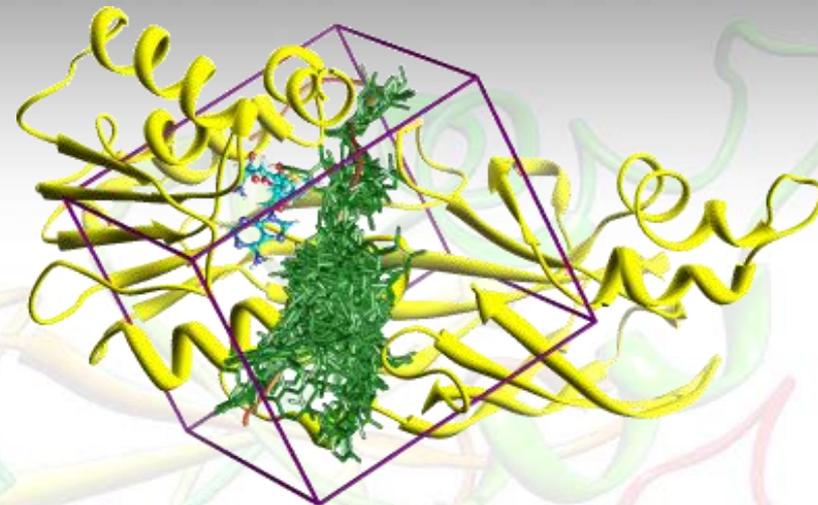
Tenendo in considerazione i risultati del *blind docking* è stata effettuata una seconda analisi restringendo lo spazio di ricerca del docking attorno al sito di legame dei substrati naturali dell'enzima.



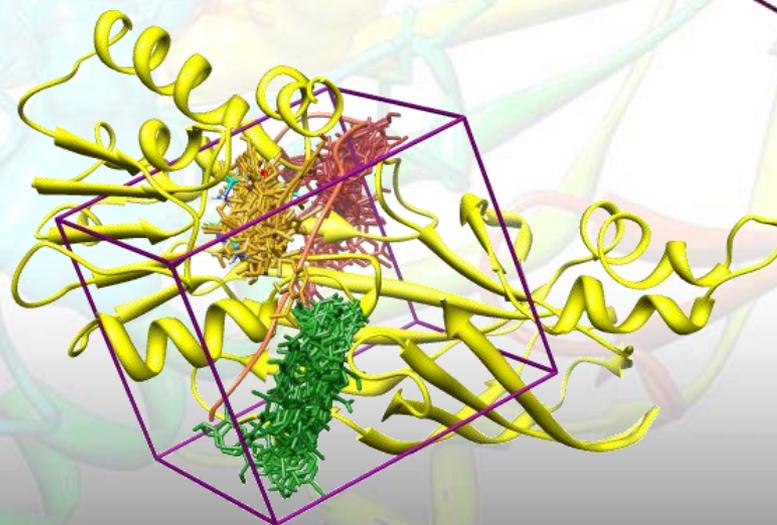
Clusterizzazione e risultati



**Docking
sull'apoenzima**



**Docking sul complesso
PRMT1/SAM**

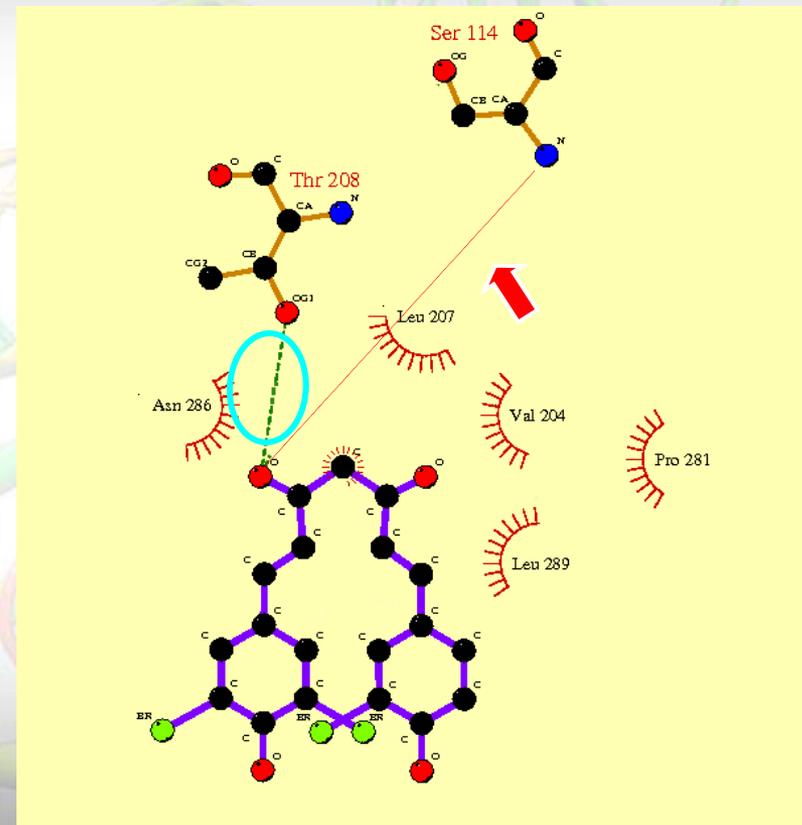
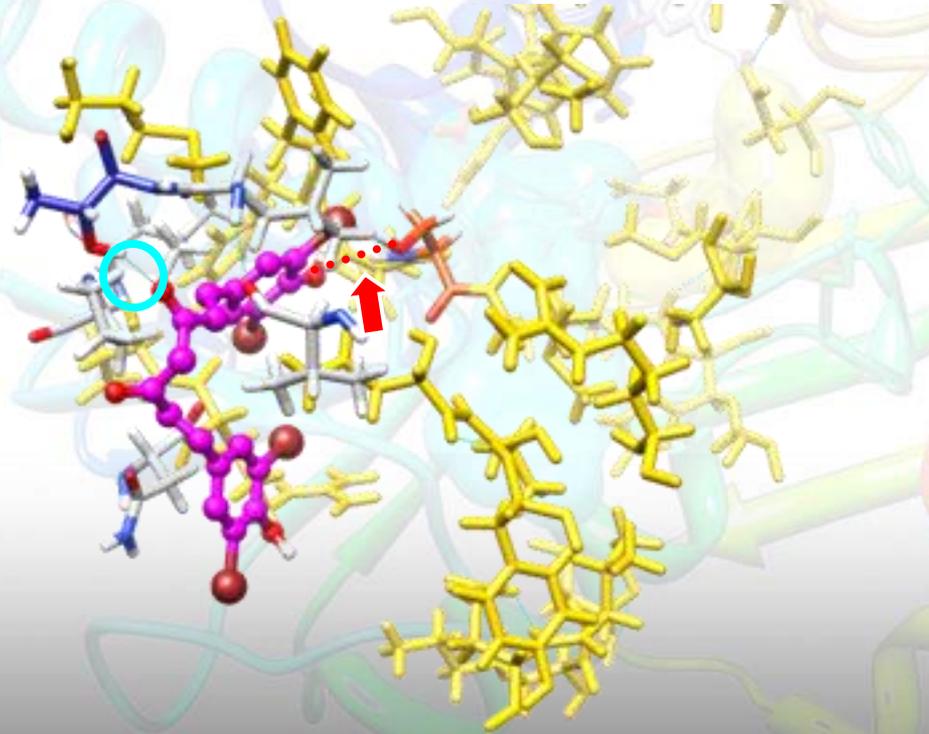


**Docking sul
complesso
PRMT1/H4**

Analisi grafica degli Inibitori e Discussione

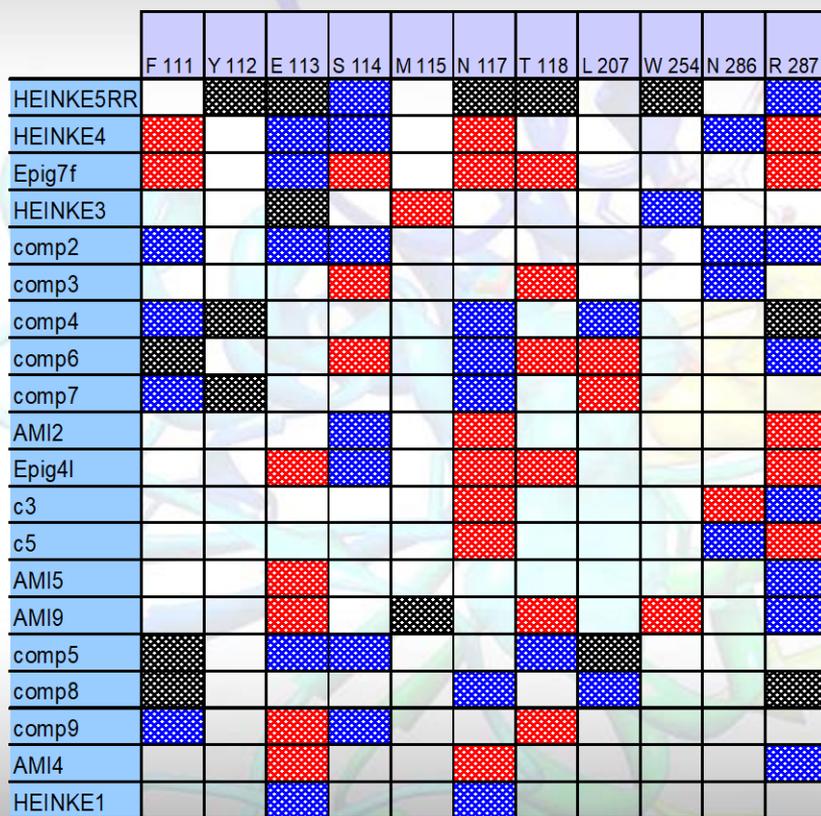
Il *binding mode* di ognuna delle strutture degli inibitori è stato sottoposto ad un'attenta analisi grafica, effettuata tramite i software:

- UCSF Chimera
- LIGPLOT

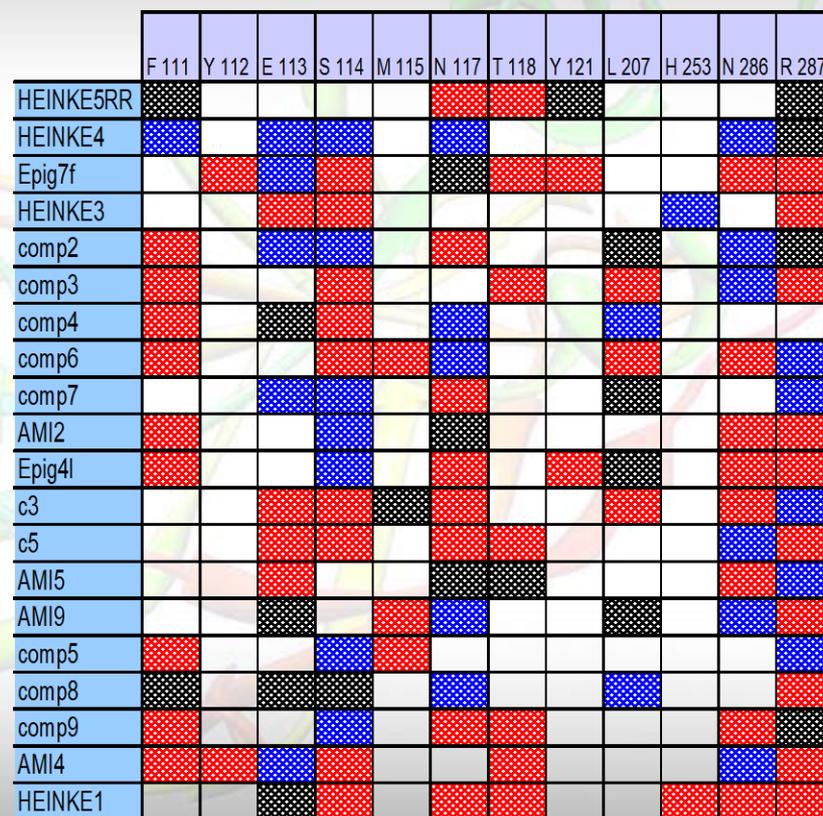


Discussione

Quest'analisi ha permesso il riconoscimento di alcuni residui amminoacidici che sembrano rivestire un ruolo importante nella capacità della PRMT1 di legare i diversi inibitori, oltre che, interagire anche con la coda istonica e con il cosubstrato SAM.

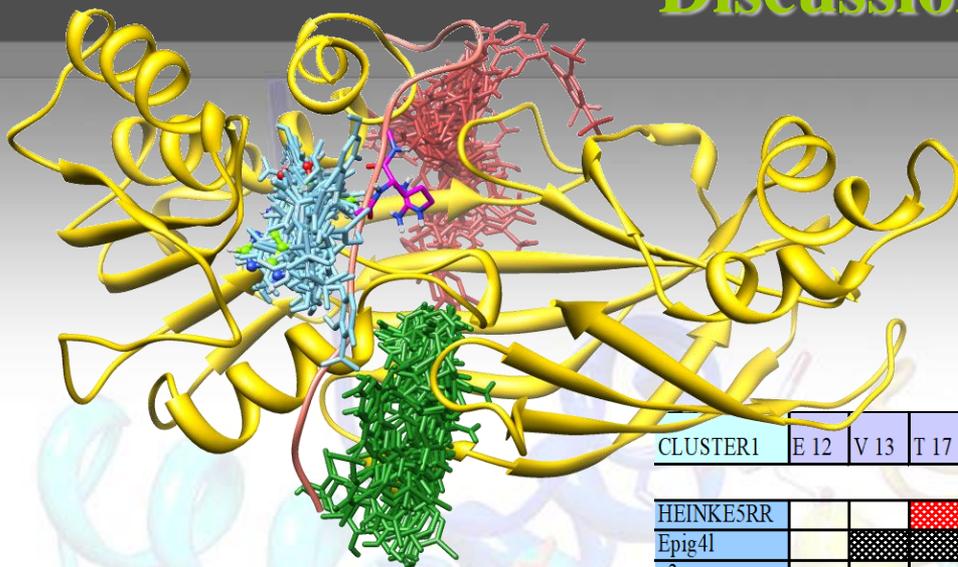


Cross-Docking sull'apoenzima



Cross-Docking sul complesso PRMT1/SAM

Discussione

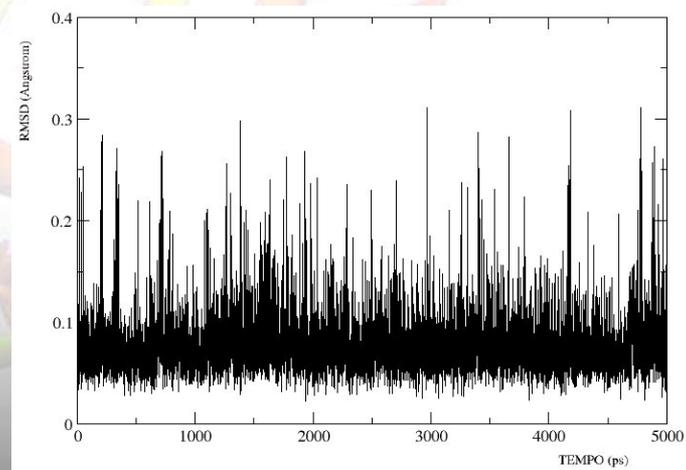
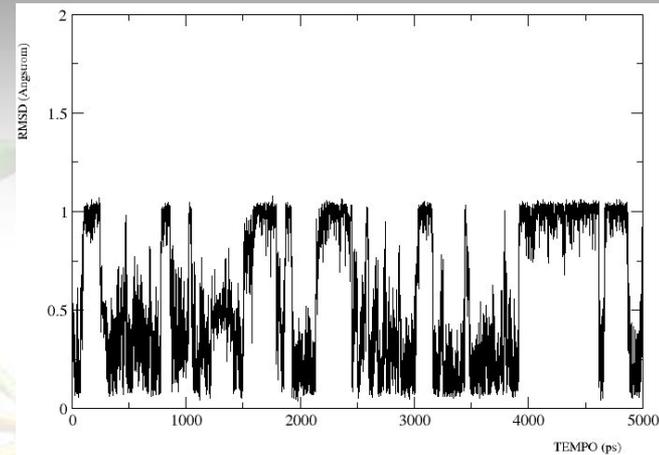
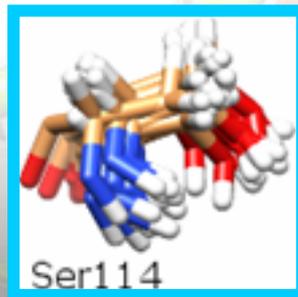
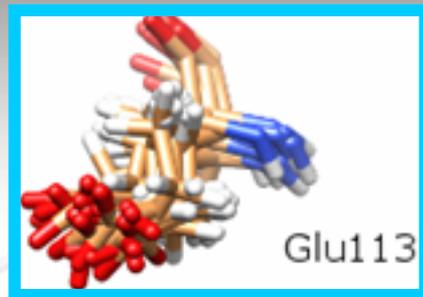
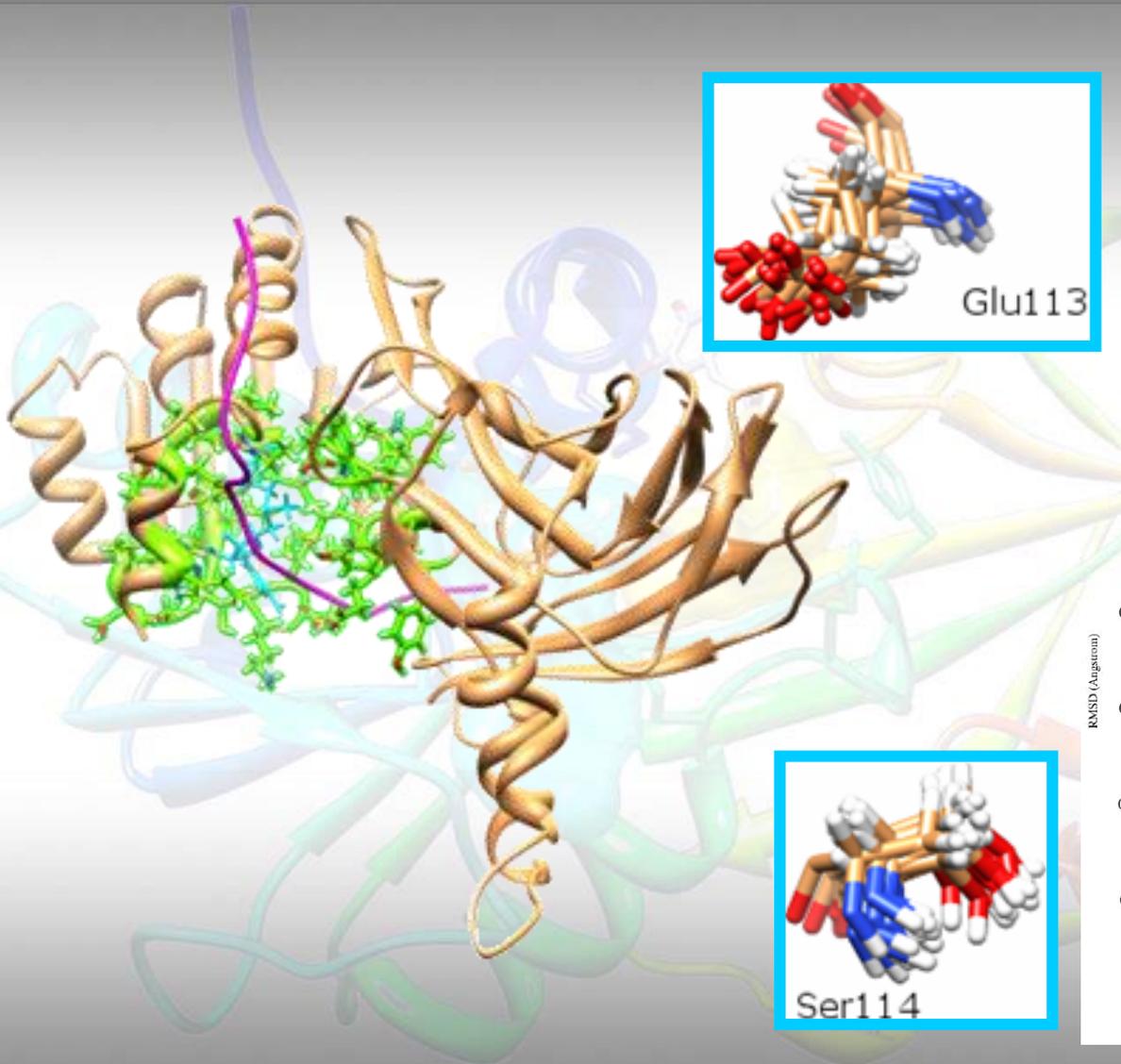


CLUSTER1	E 12	V 13	T 17	N 20	E 104	C 109	R 137	T 139	N 231	I 232	E 233	R 240	G 242	F 243	S 244	P 247	S 249	P 250
HEINKE5RR			Red				Red		Black		Black	Black	Black	Black	Black			Black
Epig4l		Black	Black		Black				Black		Red	Black	Red	Black	Red			Black
c3													Black	Black				Black
AMI5		Red	Red										Black					Black
AMI4		Black	Black										Red	Black				
CLUSTER2	F 111	T 112	E 113	S 114	L 116	N 117	K 203	V 204	E 205	L 207	T 208	M 279	R 280	P 281	N 286	R 287	D 288	L 289
Epig7f				Red				Black			Blue			Black	Black			Black
comp3		Black			Black		Red			Blue				Black	Black			Black
AMI2	Blue								Black					Black				
comp5							Blue				Red	Red	Black			Red		
comp8	Black	Black			Black		Red			Blue				Black	Black	Black	Black	Black
CLUSTER3	H 1	I 4	H 5	M 8	R 14	D 36	G 38	S 39	G 40	THR4	I 43	L 44	V 60	C 61	K 87	V 88	S 103	E 104
HEINKE4				Black		Blue	Blue				Black							Black
HEINKE3				Black										Black				Blue
AMI9			Black	Black		Blue			Black		Black	Black		Black				Red
HEINKE1			Red	Black	Blue				Black		Red			Black				Red

Cross-Docking sul complesso PRMT1/H4

Blu: legami H **Rosso:** interazioni elettrostatiche **Nero:** interazioni idrofobiche
Bianco: assenza d'interazione

Discussione e Conclusioni



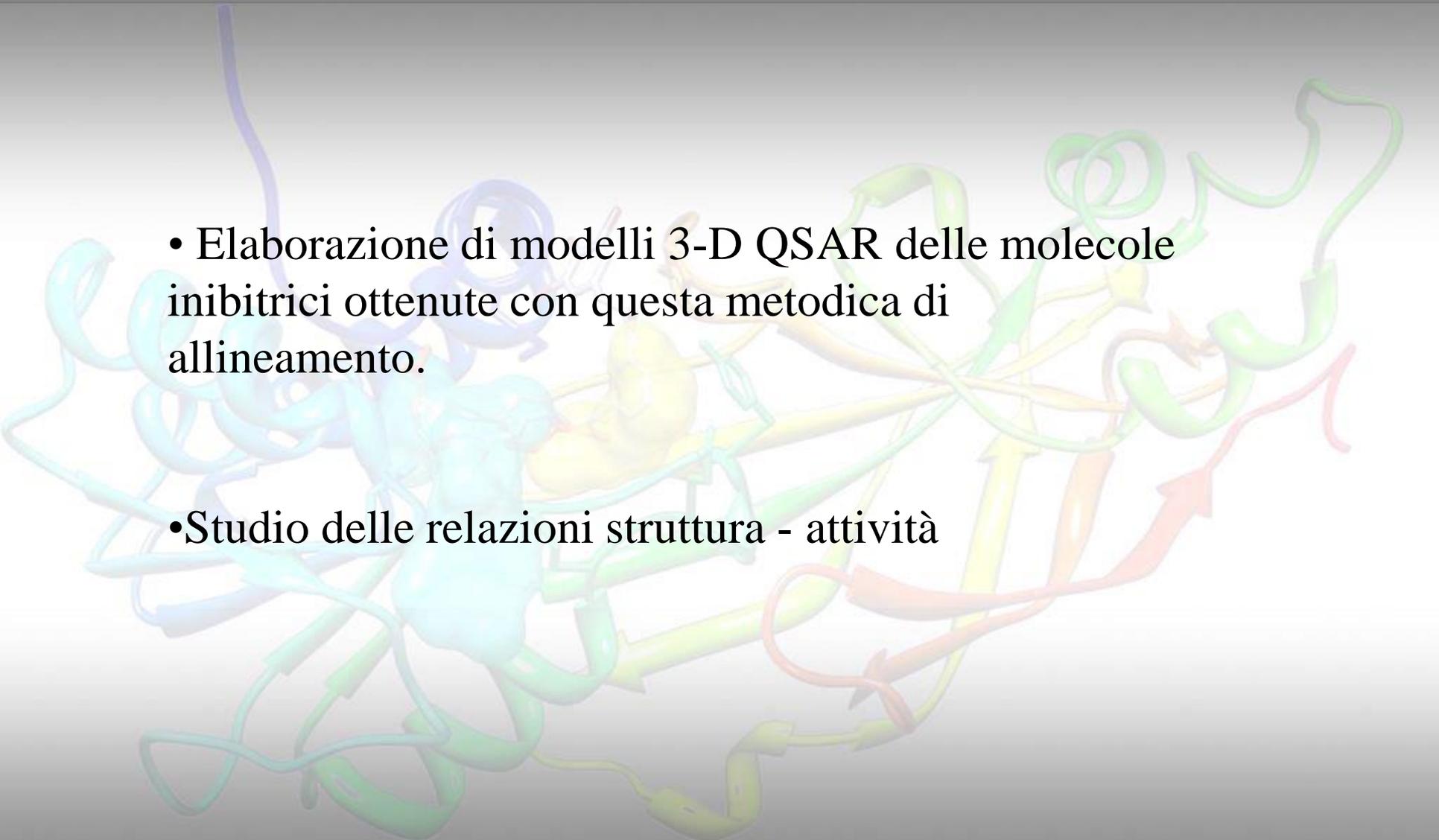
Quindi in base a quanto ottenuto si può desumere che:

- La variabilità geometrica della macromolecola gioca un ruolo importante influenzando la capacità della stessa di interagire con classi di inibitori molto diverse tra loro.
- In assenza di dati sperimentali sono possibili due diversi scenari a seconda che sia presente o no il substrato proteico.
- Poichè in assenza dell'istone le interazioni che gli inibitori instaurano sono principalmente di natura elettrostatica e legami H



IPOTESI

Il meccanismo di inibizione potrebbe essere principalmente di tipo competitivo nei confronti dell'istone.

- 
- Elaborazione di modelli 3-D QSAR delle molecole inibitrici ottenute con questa metodica di allineamento.
 - Studio delle relazioni struttura - attività



Grazie per l'attenzione