

ABSTRACT

La metilazione dei residui di lisina delle proteine istoniche, catalizzata dalle proteine lisina metiltransferasi (PKMT), svolge un ruolo importante in numerosi processi fisiopatologici nelle cellule eucariote, influenzando l'espressione genica e lo stato della cromatina. Nella famiglia delle PKMT, la proteina G9a ha un ruolo chiave in diversi stati patologici, in particolare nel silenziamento di geni che codificano per *tumor suppressor* e nella regolazione di altri eventi che riguardano la cromatina. Pertanto, è interesse della comunità scientifica individuare modulatori potenti e selettivi di tale enzima. Ad oggi, in letteratura sono stati descritti pochi inibitori dell'attività di G9a che possano essere utilizzati in saggi su modelli cellulari o animali. Accanto a ciò, la limitata diversità chimica di tali modulatori spinge la ricerca di nuove entità chimiche.

In questo lavoro di tesi vengono presentati due approcci volti all'identificazione di nuove classi chimiche per la modulazione di G9a. In un caso, da un punto di vista chimico-farmaceutico, è stata considerata la modifica del nucleo centrale del composto UNC0638, uno dei migliori *probe* per studi cellulari dell'attività di G9a, mediante espansione d'anello, che ha portato ad un derivato a nucleo 1,4-benzodiazepinico, **EML741**. Per validare il nostro approccio di *design*, abbiamo progettato e sintetizzato una piccola libreria di analoghi. L'attività di questi composti è stata saggiata *in vitro* sfruttando un saggio AlphaLISA. Il composto **EML741** ha inibito l'attività di G9a allo stesso modo del composto di riferimento. Inoltre, esso è un inibitore competitivo rispetto al substrato e non-competitivo rispetto al cofattore, selettivo nei confronti di un piccolo pannello di enzimi epigenetici. **EM741** ha mostrato di avere favorevoli proprietà chimico-fisiche, dal momento che è solubile e stabile in mezzi acquosi e inoltre ha un buon profilo di permeabilità di membrana nei saggi PAMPA e PAMPA-BBB, anche migliori del composto *lead*.

Il secondo approccio è stato volto ad esplorare lo spazio chimico in maniera più ampia, generando una linea cellulare *reporter* che aumenta l'espressione di una proteina fluorescente come risultato dei cambiamenti nella struttura della cromatina

indotti dall'inibizione di G9a. Per mezzo di infezione lentivirale, un costrutto codificante per una *blue fluorescent protein* (BFP) è stato integrato nella linea di leucemia mieloide cronica KBM7, in *loci* genici la cui organizzazione è regolata dall'attività di G9a. Due linee cellulari sono state selezionate e la loro specificità nell'evidenziare l'inibizione dell'enzima è stata valutata in via preliminare. La validazione di queste linee è ancora in corso. Quando sarà completata, *questo reporter* potrà essere utilizzato in *screening* di librerie sia chimiche che genetiche.

