



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

**SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF INFORMATICS AND TELECOMMUNICATION**

**INTERDISCIPLINARY POSTGRADUATE PROGRAM
"INFORMATION TECHNOLOGIES IN MEDICINE AND BIOLOGY"**

MASTER THESIS

Investigation of the S427F oncogenic mutation effects on the RXR α structure and dynamics

Georgia S. Stergiou

Supervisor: **Dr. Zoe Cournia**, Researcher - Assistant Professor Level,
Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens
(BRFAA)

ATHENS

JULY 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ"**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση των επιδράσεων της ογκογενοῦς μετάλλαξης S427F στη δομή και τη δυναμική της πρωτεΐνης RXR α

Γεωργία Σ. Στεργίου

Επιβλέπουσα: Δρ. Ζωή Κούρνια, Ερευνήτρια Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

MASTER THESIS

Investigation of the S427F oncogenic mutation effects on the RXR α structure and dynamics

Georgia S. Stergiou
S.N.: PIV0187

SUPERVISOR: **Dr. Zoe Cournia**, Researcher - Assistant Professor Level,
Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens
(BRFAA)

EXAMINATION COMMITTEE: **Dr. Zoe Cournia**, Researcher - Assistant Professor Level,
Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens
(BRFAA)
Dr. Stavros Perantonis, Research Director, Institute of
Informatics and Telecommunications National Center for
Scientific Research "Demokritos"
Dr. Georgia Xanthou, Researcher - Assistant Professor
Level, Biomedical Research Foundation of the Academy of
Athens (BRFAA)

JULY 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση των επιδράσεων της ογκογενούς μετάλλαξης S427F στη δομή και τη δυναμική της πρωτεΐνης RXRα

Γεωργία Σ. Στεργίου

A.M.: ΠΙΒ0187

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: **Δρ. Ζωή Κούρνια**, Ερευνήτρια Γ', Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ
ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Δρ. Ζωή Κούρνια, Ερευνήτρια Γ', Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)
Δρ. Σταύρος Περαντώνης, Διευθυντής Έρευνας, Ινστιτούτο
Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών, Εθνικό Κέντρο
Επιστημονικής Έρευνας «Δημόκριτος»
Δρ. Γεωργία Ξάνθου, Ερευνήτρια Γ', Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

ABSTRACT

Retinoid X Receptor alpha (RXR α) is a nuclear hormone receptor of the vitamin A metabolite, 9-cis Retinoic Acid (RA). When bound to 9-cis RA, RXR α can activate the transcription of specific genes by serving either as an obligate heterodimer partner for many nuclear receptors (NRs) or as a homodimer partner. These dimers play a significant role in many physiological conditions such as regulation of metabolic rate, cell growth and differentiation. However, some of them are involved in pathological conditions such as premature birth, skin deceases and cancer development.

Studies have shown that 5-8% of bladder cancer patients bear the S427F single point mutation on RXR α , where a serine is replaced by phenylalanine at amino acid position 427. Biological experiments demonstrated that this mutation increases the expression of genes regulated by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR). PPAR, in turn, switches on genes that aid cancer cells growth. Although valuable, biochemical studies aimed at determining the exact molecular mechanism of how the S427F mutation exerts its oncogenic action on RXR α in relation to its partners lack sufficient resolution for investigating the detailed underlying molecular interactions that bring about the observed result. Computational experiments such as Molecular Dynamics simulations (MD) together with atomic-level detailed experiments such as X-ray crystallography supplement biological experiments as they provide atomic resolution of the conformational changes that biomolecules undergo during a biological process. With the use of MD simulations, details of conformational changes are sampled to clarify mechanistic characteristics of biological processes that may otherwise be elusive.

In the present study, following up on a series of experiments that showed that the mutant RXR α inhibits the transcription of genes regulated by the RXR α homodimer, we investigated the effects of the S427F mutation on the structure and dynamics of the RXR α homodimer in the presence and absence of the ligands 9-cis RA. MD simulations were performed in order to elucidate the structural and dynamical consequences of this oncogenic mutation on the RXR α protein and its synergistic interaction for both Wild Type (WT) and mutant RXR α homodimer. Moreover, control simulations were performed to compare with previously reported data from the WT and mutant RXR α -PPAR γ heterodimer. Results were also compared with previously performed RAR-RXR α heterodimer simulations. Furthermore, Dynamical Network Analysis was used to illustrate differences in the inter-residue pathways of the three dimers, in order to examine if there is a disruption in the communication.

Our results show that the mutation S427F does not affect the dimerization ability of the RXR α homodimer neither in the presence nor the absence of the endogenous ligand 9-cis RA. However, further analysis of the mutant demonstrates an increase of the solvent accessible surface area of the binding site in both monomers of the dimer in the absence of the ligands compared to the WT protein, which would prohibit the 9-cis RA from binding. Finally, we validated our results analyzing the findings of the simulated RXR α -PPAR γ heterodimer and compared to previous RAR-RXR α simulations.

SUBJECT AREA: Computational Molecular Biophysics

KEYWORDS: RXR α , PPAR γ , bladder cancer, molecular dynamics, dynamical network analysis

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας του ρετινοειδούς Χ άλφα (RXRα) είναι ένας υποδοχέας πυρηνικής ορμόνης του μεταβολίτη βιταμίνης Α, 9-cis ρετινοϊκό οξύ (RA). Όταν συνδέεται με το 9-cis RA, ο RXRα μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων εξυπηρετώντας είτε ως υποχρεωτικός συνεργάτης ετεροδιμερούς για πολλούς πυρηνικούς υποδοχείς (NRs) είτε ως συνεργάτης ομοδιμερούς. Αυτά τα διμερή παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές καταστάσεις όπως η ρύθμιση του μεταβολικού ρυθμού, η κυτταρική ανάπτυξη και η διαφοροποίηση. Εντούτοις, μερικοί από αυτούς εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η πρόωρη γέννηση, οι δερματικές ασθένειες και η ανάπτυξη του καρκίνου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το 5-8% των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης φέρουν τη μετάλλαξη S427F μονού σημείου στον RXRα, όπου μια σερίνη αντικαθίσταται από φαινυλαλανίνη στη θέση αμινοξέος 427. Βιολογικά πειράματα κατέδειξαν ότι αυτή η μετάλλαξη αυξάνει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από τον πολλαπλασιαστή υπεροξυσώματος - ενεργοποιημένος υποδοχέας (PPAR). Ο PPAR, με τη σειρά του, ενεργοποιεί τα γονίδια που βοηθούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Αν και πολύτιμες, βιοχημικές μελέτες που στοχεύουν στον προσδιορισμό του ακριβούς μοριακού μηχανισμού του τρόπου με τον οποίο η μετάλλαξη S427F ασκεί την ογκογόνο δράση της στον RXRα σε σχέση με τους συνεργάτες της δεν έχουν επαρκή ανάλυση για να διερευνήσουν τις λεπτομερείς υποκείμενες μοριακές αλληλεπιδράσεις που επιφέρουν τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Υπολογιστικά πειράματα, όπως οι προσομοιώσεις της Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ) μαζί με τα λεπτομερή πειράματα σε επίπεδο ατομικής ανάλυσης, όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, συμπληρώνουν τα βιολογικά πειράματα καθώς παρέχουν ατομική ανάλυση των διαμορφωτικών αλλαγών που υφίστανται τα βιομόρια κατά τη διάρκεια μιας βιολογικής διαδικασίας. Με τη χρήση προσομοιώσεων ΜΔ, εξετάζονται λεπτομερώς οι μεταβολές της διαμόρφωσης για να αποσαφηνιστούν τα μηχανιστικά χαρακτηριστικά των βιολογικών διεργασιών που διαφορετικά θα μπορούσαν να αποφευχθούν.

Στην παρούσα μελέτη, ακολουθώντας μια σειρά πειραμάτων που έδειξαν ότι ο μεταλλαγμένος RXRα αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από το ομοδιμερές RXRα, ερευνήσαμε τα αποτελέσματα της μετάλλαξης S427F στη δομή και τη δυναμική του ομοδιμερούς RXRα με την παρουσία και την απουσία των συνδετών 9-cis RA. Διεξήχθησαν προσομοιώσεις ΜΔ προκειμένου να διασαφηνισθούν οι δομικές και δυναμικές συνέπειες αυτής της ογκογενούς μετάλλαξης στην πρωτεΐνη RXRα και η συνεργιστική της αλληλεπίδραση τόσο για το ομοδιμερές καθαρού τύπου (WT) όσο και για μεταλλαγμένο RXRα ομοδιμερές. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις ελέγχου για σύγκριση με προηγούμενα αναφερόμενα δεδομένα από το WT και μεταλλαγμένο RXRα-PPARγ ετεροδιμερές. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν επίσης με προηγούμενες προσομοιώσεις του ετεροδιμερούς RAR-RXRα. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκε Δυναμική Ανάλυση Δικτύων για την απεικόνιση των διαφορών στα μονοπάτια μεταξύ των υπολειμμάτων και των τριών διμερών, προκειμένου να εξεταστεί εάν υπάρχει διαταραχή στην επικοινωνία.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η μετάλλαξη S427F δεν επηρεάζει την ικανότητα διμερισμού του ομοδιμερούς RXRα ούτε παρουσία ούτε απουσία των ενδογενών συνδετών 9-cis RA. Εντούτοις, περαιτέρω ανάλυση του μεταλλαγμένου καταδεικνύει αύξηση της προσπελάσιμης από διαλύτη επιφάνειας της περιοχής δέσμησης και στα δύο μονομερή του διμερούς απουσία των συνδετών σε σύγκριση με την WT πρωτεΐνη, η οποία θα απαγόρευε την δέσμηση του 9-cis RA. Τέλος, επικυρώσαμε τα αποτελέσματά μας αναλύοντας τα ευρήματα του προσομοιωμένου ετεροδιμερούς RXRα-PPARγ και συγκρίνοντάς τα με προηγούμενες προσομοιώσεις του RAR-RXRα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υπολογιστική Μοριακή Βιοφυσική

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: RXR α , PPAR γ , καρκίνο της ουροδόχου κύστης, μοριακή δυναμική, δυναμική ανάλυση δικτύου