

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Πειράματα προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης πιθανών ισχυρών και
εκλεκτικών αναστολέων της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης**

ΣΤΑΥΡΙΝΟΥΔΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Πειράματα προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης πιθανών ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

Σταυρινουδάκης Νικόλαος

A.M.: 291507

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κόκοτος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κόκοτος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαυρομούστακος Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαγκριώτη Βικτώρια, Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/11/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη (2-AG) διαθέτει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Ρυθμίζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και του αναλγητικού στρες και τον έλεγχο των φλεγμονών του νευρικού συστήματος. Η λιπάση μονοακυλογλυκερόλης (MAGL) είναι το κυριότερο ένζυμο, υπεύθυνο για το μεταβολισμό της 2-AG, μέσω της *in vivo* υδρόλυσης αυτής. Μια προσέγγιση ώστε να ανακτηθούν οι φαρμακολογικές ιδιότητές της, θεωρείται η αναστολή του ενζύμου MAGL.

Αρχικά, εκτελέστηκαν *in silico* πειράματα μοριακής πρόσδεσης ενώσεων με γνωστή βιολογική δράση για να αποδειχθεί ότι τα διατιθέμενα από το εργαστήριο λογισμικά μοριακής πρόσδεσης μπορούν να τα επικυρώσουν. Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα κατά τον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων της MAGL είναι η χρήση βιολογικών πειραμάτων με διαφορετικές συνθήκες οι οποίες, ορισμένες φορές, καταλήγουν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Για να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία, η σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης επιτεύχθηκε σε ομάδες μορίων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ταυτόσημες συνθήκες στα βιολογικά πειράματα. Ένα ακόμη πρόβλημα που προέκυψε κατά την εφαρμογή των πειραμάτων, είναι η παρουσία μόνο δύο κρυσταλλογραφικών μελετών του ενζύμου με αναστολέα προσδεμένο σε αυτό. Αυτός ο μικρός αριθμός κρυσταλλογραφικών δεδομένων καθιστά δύσκολη την εξερεύνηση του τρόπου με τον οποίο προσδένονται τα υπό εξέταση ανάλογα καθώς αποδεικνύεται ότι προσεγγίζουν το καθένα με διαφορετικό τρόπο το ενεργό ή αλλοστερικό κέντρο. Εκτός αυτού, υπάρχει διαφοροποίηση στη διαμόρφωση της κοιλότητας του ενεργού κέντρου στο χώρο, μεταξύ της ανοιχτής και της κλειστής μορφής του ενζύμου, οπότε έπρεπε να γίνουν πειράματα και στις δύο μορφές για να ελεγχθούν τα αποτελέσματα.

Αφού επιτεύχθηκε επικύρωση των πειραματικών αποτελεσμάτων, εκτελέστηκε μοριακή πρόσδεση μιας μεγάλης βάσης δεδομένων καινοτόμων δομών οι οποίες δεν έχουν αποτιμηθεί βιολογικά. Εκείνες οι ενώσεις οι οποίες προσδέθηκαν ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα της MAGL εξετάστηκαν και στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα της FAAH ώστε να ελεγχθεί η εκλεκτικότητά τους ανάμεσα στα δύο ένζυμα. Τα παράγωγα πυρρολιδινόνης που είχαν συντεθεί ως πιθανοί αναστολείς της ρενίνης επέδειξαν πολύ ισχυρή πρόσδεση στη MAGL και όχι ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της FAAH, υποδεικνύοντάς τα ως υποσχόμενα εκλεκτικά μόρια.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μοριακή Μοντελοποίηση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ενδοκαννβινοειδές σύστημα, παράγωγα πυρρολιδινόνης, μοριακή πρόσδεση, λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης, αμιδική υδρολάση των λιπαρών οξέων

ABSTRACT

2-Arachidonoylglycerol (2-AG) possesses a wide range of pharmacological properties. These include the modulation of neurotransmitter release, control of neuro-inflammation and regulation of cancer cell growth to stress-induced analgesia. The enzyme monoacylglycerol lipase (MAGL) plays an important role in its metabolism by *in vivo* hydrolyzing it. To restore its pharmacological properties, MAGL inhibition is considered a putative therapeutic target.

First, we have applied *in silico* docking experiments of compounds with known biological activity using existing software available in our laboratory in order to validate the reported results. One significant problem we faced exploring the literature data is that the inhibition of MAGL enzyme has been determined by various biological assays which in some cases lead to controversial results. To overcome this difficulty, we have applied and compared docking results at the molecules subjected to identical biological assays. Another problem encountered in the application of docking studies is the presence of only two x-ray crystallographic results in which MAGL is co-crystallized with an inhibitor. Such a short number of crystallographic data makes difficult the decision of the exact mode of action for novel compounds as they are found to approach in different ways the active or allosteric sites. Except that, there is a difference between the open and the close form of the tunnel containing the catalytic triad, so we had to test the results in both forms of the enzyme.

After we have validated the data with known experimental biological values, we applied molecular docking using a data base of novel compounds that have not been evaluated biologically. Those compounds that showed the highest score were also docked at the enzyme FAAH to test their selectivity between the two enzymes. The pyrrolidinone analogues that were initially synthesized as renin inhibitors showed the highest potency towards MAGL and adequate selectivity to FAAH, indicating that they constitute a promising class of molecules to further explore.

SUBJECT AREA: Molecular Modeling

KEYWORDS: endocannabinoid system, pyrrolidinone derivatives, molecular docking, monoacylglycerol lipase, fatty acid amide hydrolase

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν και μου συμπαράσθηκαν στην προσπάθεια αυτή.

Θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Κόκοτο Γεώργιο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη συνεχή υποστήριξη, την ενθάρρυνση, την πολύτιμη καθοδήγησή του και τις εύστοχες υποδείξεις του τόσο κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας όσο και κατά τη συγγραφή της.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω στον Αναπλ. Καθηγητή κ. Μαυρομούστακο Θωμά για την καθοδήγησή του, για όλες τις δημιουργικές συζητήσεις μας, για την καταλυτική συμβολή του στην πορεία αυτής της έρευνας, το συνεχές ενδιαφέρον του και τις σημαντικές υποδείξεις του τόσο για την πειραματική διαδικασία όσο και για τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα ακόμα ευχαριστώ οφείλω στη Λέκτορα κ. Μαγκριώτη Βικτώρια για τη βοήθεια και τις συμβουλές της κατά τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Επίσης είμαι πραγματικά ευγνώμων στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Νεοφύτου Νίκη, για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκμάθηση των προγραμμάτων και την άπογη συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Βασιλακάκη Σοφία για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, την άπογη συνεργασία που είχαμε και την αμέριστη συμπαράστασή της.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βαρβαρίγου Νικολέττα για την εξαιρετική συνεργασία της, τη βοήθειά της και τη φιλική ατμόσφαιρα στο εργαστήριο.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους καλούς μου φίλους Ψυκαράκη Μανώλη, Τρυφωνίδου Μαρία και Ρεβέλου Παναγιώτα για τις συμβουλές, τη συμπαράσταση και τις ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε όλο το διάστημα των σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Annette Höglund της εταιρίας Schrödinger, η οποία με βοήθησε άμεσα και έγκυρα με οποιαδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα με το πρόγραμμα.

Τέλος, ευχαριστώ πάνω από όλους τους γονείς μου Δημήτρη και Μαργαρίτα, καθώς και την αδερφή μου Βασιλική για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών, για την αγάπη και την υποστήριξή τους σε όλα τα βήματά μου και για όσα μου έχουν προσφέρει απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	16
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	16
1.1 Η ανακάλυψη των φυσικών και ενδογενών κανναβινοειδών.....	16
1.1.1 Η ανακάλυψη του συστήματος κανναβινοειδών	17
1.2 Κανναβινοειδείς υποδοχείς	19
1.3 Δράση ενδοκανναβινοειδών.....	20
1.3.1 Ανανταμίδιο (AEA)	20
1.3.2 2-Αραχιδοנוύλογλυκερόλη (2-AG).....	22
1.4 Μεταφορά ενδοκανναβινοειδών μέσα στο κύτταρο.....	25
1.5 Λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL)	26
1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ενζύμου.....	26
1.5.2 Κατανομή MAGL σε όργανα και ιστούς	27
1.5.3 Φυσιολογικός ρόλος της MAGL.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	29
ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΤΡΙΤΟΤΑΓΩΝ ΔΟΜΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΑΣΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (MAGL).....	29
2.1 Τριτοταγής δομή της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης	29
2.2 Τριτοταγής δομή της αμιδοϋδρολάσης του λιπαρού οξέος	33
2.3 Κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου της μονοακυλογλυκερόλης	35
2.3.1 Κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3HJU.....	35
2.3.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικό 3JW8 και 3JWE.....	35
2.3.3 Κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3PE6.....	36
2.4 Σύγκριση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών	37
2.5 Κρυσταλλογραφικές μελέτες της αμιδοϋδρολάσης των λιπαρών οξέων (FAAH).....	39
2.6 Τρόποι πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAGL.....	40
2.7 Τρόποι πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της FAAH	42

2.8	Κατηγορίες αναστολέων της MAGL	43
2.9	Εκλεκτικότητα κατά τη μοριακή πρόσδεση	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3		46
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ.....		46
3.1	Υπολογιστική χημεία και η χρησιμότητά της	46
3.2	Σχεδιασμός και διαδικασία προώθησης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος στην αγορά με τη χρήση μοριακής μοντελοποίησης.....	47
3.3	Δυνατότητες Μοριακής Μοντελοποίησης	49
3.4	Ελαχιστοποίηση ενέργειας (Minimization method).....	50
3.5	Διαμορφωτική ανάλυση	52
3.5.1	Μέθοδοι τυχαίας αναζήτησης	52
3.5.2	Μέθοδοι συστηματικής αναζήτησης	53
3.5.3	Μοριακή Δυναμική.....	53
3.6	Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking).....	53
3.6.1	Αλγόριθμοι Μοριακής Πρόσδεσης.....	54
3.6.1.1	Αλγόριθμοι Monte Carlo (MC).....	54
3.6.1.2	Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής	54
3.6.1.3	Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic Algorithms, GA).....	55
3.6.1.4	Αλγόριθμοι Σταδιακής Ανοικοδόμησης (Incremental Construction).....	55
	Μοριακή Πρόσδεση με τη χρήση του λογισμικού Surflex-Dock.....	55
3.6.2	Μοριακή Πρόσδεση με το GLIDE	56
3.6.3	Πρωτόκολλο Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης Προσαρμογής IFD (Induced Fit Docking)	60
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ		61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4		62
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		62
4.1	Ενώσεις που μελετήθηκαν	62
4.2	Σχεδιασμός ενώσεων.....	62
4.2.1	Μοριακή δυναμική: Μελέτη του διαμορφωτικού χώρου των ενώσεων.....	62

4.2.2	Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης.....	62
4.2.3	Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock.....	67
4.2.4	Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Glide	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5		69
ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΓΝΩΣΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗ MAGL		69
5.1	Αναστολείς που αντιδρούν με τη σερίνη του ενεργού κέντρου	69
5.1.1	Πρόσδεση του φυσικού υποστρώματος στο ένζυμο MAGL	69
5.1.2	Πρόσδεση αναλόγων της 2-AG	70
5.1.3	Αναστολείς με Υ διαμόρφωση	74
5.1.4	Ενώσεις παράγωγα ουρίας	76
5.1.5	Οργανοφωσφορικοί και οργανοθειούχοι αναστολείς	78
5.1.6	URB 602,754, JZL195, CAY10499	81
5.1.7	Μακρίας αλυσίδας 1,2-διαμίνες και παρεμφερείς ενώσεις.....	82
5.1.8	Η ένωση OMDM169.....	84
5.2	Αναστολείς που αντιδρούν με τις κυστεΐνες πλησίον του ενεργού κέντρου	85
5.2.1	Ομάδες ενώσεων που αντιδρούν με τη σουλφιδρυλομάδα της κυστεΐνης: Μαλεϊμίδια, Δισουλφίδια, Ισοθειαζολίνες	85
5.2.2	Φυσικά τερπενοειδή	88
ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 5 ^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ		91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6		92
ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗ MAGL.....		92
6.1	Πυρρολιδινονικά παράγωγα	92
6.2	Ανάλογα πυρρολιδινόνης (MMK).....	94
6.3	Παράγωγα της 1-οξαζόλ-2-υλ-7-φαινυλ-επταν-1-όνης με υποκατάσταση στον οξαζολικό δακτύλιο	98
6.4	Παράγωγα της ένωσης BV6.....	101
6.5	Παράγωγα του 2-μεθυλο-1H-ινδολίου.....	104

6.6	Παράγωγα του 1-μεθυλο-1H-ινδολίου.....	113
6.7	Παράγωγα 2-οξοαμιδίων των φυσικών αμινοξέων	114
6.8	Παράγωγα 2-οξοαμιδίων	119
6.9	Παράγωγα αμιδίων	121
6.10	Παράγωγα θειουρίας	122
6.11	Παράγωγα προπανοκετόνης	123
6.12	Παράγωγα της πυρρολιδίνης.....	123
6.13	Παράγωγα τριφθοροκετόνης	124
	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 6 ^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	125
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	126
	ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ FAAH.....	126
7.1	Πειράματα για τη διαπίστωση εκλεκτικότητας ενώσεων μεταξύ των ενζύμων MAGL και FAAH.....	126
	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 7 ^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	133
	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	134
	Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	135
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	136
	Ονοματολογία των ενώσεων κατά IUPAC	136
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	142

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Στα αριστερά η δομή της Δ^9 -THC. Στο κέντρο το φυτό <i>Cannabis sativa</i> . Στα δεξιά το φύλλο του φυτού <i>Cannabis sativa</i>	17
Σχήμα 1.2: Δομές ανανταμιδίου AEA και 2-AG	18
Σχήμα 1.3: Η βιοχημική οδός του αραχιδονικού οξέος.....	19
Σχήμα 1.4: Υπέρθωση των κανναβινοειδών υποδοχέων CB ₁ και CB ₂	20
Σχήμα 1.5: Υδρόλυση του AEA από τη FAAH	21
Σχήμα 1.6: Υδρόλυση της 2-AG από τη MAGL.....	22
Σχήμα 1.7: Η σχετική δραστηριότητα μεμβρανικών σερίνο-υδρολασών του εγκεφάλου ποντικού έναντι της 2-AG.....	24
Σχήμα 1.8: Πιθανή υποκυττάρια τοπολογία ενζύμων που υδρολύουν τη 2-AG.	25
Σχήμα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση πιθανής πορείας της μεταφοράς της 2-AG στο κύτταρο	26
Σχήμα 1.10: Τεταρτοταγής δομή και σχηματικό διάγραμμα της MAGL.....	26
Σχήμα 1.11: Οι τρεις δράσεις της MAGL.....	28
Σχήμα 2.1: Η δομή α/β υδρολάσης της MAGL, το σημείο εισόδου του υδρόφοβου καναλιού και η καταλυτική τριάδα στο ενεργό κέντρο αυτού	30
Σχήμα 2.2: Στα αριστερά παριστάνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου και στα δεξιά το σημείο εισόδου του υδρόφοβου καναλιού.	30
Σχήμα 2.3: Χάρτης υδροφιλικότητας-υδροφοβικότητας της κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL με το φυσικό υπόστρωμα προσδεμένο σε αυτή..	31
Σχήμα 2.4: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της MAGL.....	32
Σχήμα 2.5: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής της FAAH.....	33
Σχήμα 2.6: Η κοιλότητα του ενεργού κέντρου και η καταλυτική τριάδα της FAAH.	34
Σχήμα 2.7: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης SAR629 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της MAGL	36
Σχήμα 2.8: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης ZYH με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της MAGL	37
Σχήμα 2.9: Υπέρθωση των δομών των αναστολέων SAR629 (πορτοκαλί χρώμα) και ZYH (πράσινο χρώμα) στη κοιλότητα του ενεργού κέντρου της MAGL.....	38

Σχήμα 2.10: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης QK5 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της FAAH.....	40
Σχήμα 2.11: Μηχανισμός αντίδρασης ενώσεων παραγώγων του μαλεϊμιδίου με τις κυστεΐνες πλησίον του ενεργού κέντρου της MAGL	40
Σχήμα 2.12: Μηχανισμός αντίδρασης πρόσδεσης και υδρόλυσης της 2-AG στο ενεργό κέντρο της MAGL.....	41
Σχήμα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού καταλυτικού μηχανισμού βασιζόμενος στη καταλυτική τριάδα της MAGL.....	42
Σχήμα 2.14: Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδρόλυση αμιδίου που καταλύεται από τη FAAH	43
Σχήμα 2.15: Θερμοδυναμικά αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης (α) μιας υδρόφοβης και (β) μιας αμφίφιλης ένωσης στον υποδοχέα στόχο και σε ένα δεύτερο υποδοχέα	45
Σχήμα 3.1: Πορεία ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων	49
Σχήμα 3.2: Με τη βοήθεια των αλγορίθμων η ενέργεια της ένωσης ελαχιστοποιείται.	51
Σχήμα 3.3: Προσδιορισμός περιοχών πυρήνα (core region) και διαμορφωμερών (rotamer groups).....	57
Σχήμα 3.4: Τα στάδια αξιολόγησης των προσδετών με χρήση του αλγορίθμου Glide	58
Σχήμα 4.1: Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων με τις οποίες είχαν κρυσταλλογραφηθεί οι πρωτεΐνες στις αντίστοιχες κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	63
Σχήμα 4.2: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης SAR629. Με λευκό και γκρι χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται το μοτίβο πρόσδεσης της ένωσης όπως στην κρυσταλλογραφική μελέτη..	64
Σχήμα 4.3: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης SAR629 με χρήση του αλγορίθμου Prime.....	64
Σχήμα 4.4: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης του ZYH..	65
Σχήμα 4.5: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης του QK5.	66
Σχήμα 4.6: Υπέρθωση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών.	66
Σχήμα 4.7: Υπέρθωση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών στη περιοχή της υδρόφοβης κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL	67
Σχήμα 5.1: Πρόσδεση της 2-AG στο ένζυμο της MAGL με χρήση του προγράμματος Maestro	70
Σχήμα 5.2: Οι τρεις φαρμακοφόρες περιοχές στη δομή της 2-AG	70

Σχήμα 5.3: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης α-Met-1-AG που παρουσίασε τη μεγαλύτερη βαθμονόμηση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAGL.	73
Σχήμα 5.4: Οι μηχανισμοί αντίδρασης και η δομή των αναστολέων SAR629 και JZL184 αντίστοιχα.	74
Σχήμα 5.5: Οι ενώσεις (Α) SAR629 και (Β) JZL184 αντίστοιχα, προσδεμένες στο ενεργό κέντρο της MAGL λαμβάνοντας τη χαρακτηριστική διευθέτηση, σχήματος Υ στο χώρο.	76
Σχήμα 5.6: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης 67 στο ενεργό κέντρο της MAGL.	78
Σχήμα 5.7: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης OMDM169 στο ένζυμο της MAGL.	85
Σχήμα 5.8: Πιθανός μηχανισμός πρόσδεσης στη MAGL ενώσεων που βασίζονται στην ισοθειαζολινόνη.	86
Σχήμα 5.9: Μοριακή πρόσδεση των ενώσεων Α) NAM και Β) ΟΕΙΟ.	88
Σχήμα 5.10: Μοριακή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της MAGL των ενώσεων πριστιμερίνη (αριστερά) και ευφόλη (δεξιά).	90
Σχήμα 8.1: Χάρτης ηλεκτροστατικού δυναμικού της ένωσης Renin5t.	134

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Κατανομή του ΑΕΑ σε ιστούς θηλαστικών	21
Πίνακας 1.2: Κατανομή της 2-AG σε ιστούς θηλαστικών	22
Πίνακας 2.1: Οι 4 κατηγορίες αναστολέων της MAGL.....	44
Πίνακας 5.1: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	72
Πίνακας 5.2: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	75
Πίνακας 5.3: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	77
Πίνακας 5.4: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	79
Πίνακας 5.5: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	82
Πίνακας 5.6: Αναστολή %, K _i , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	83
Πίνακας 5.7: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	84
Πίνακας 5.8: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	87
Πίνακας 5.9: Τιμές IC ₅₀ , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες	89
Πίνακας 6.1: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	92
Πίνακας 6.2: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες.....	94
Πίνακας 6.3: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	99
Πίνακας 6.4: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	101
Πίνακας 6.5: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	104
Πίνακας 6.6: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες.....	113

Πίνακας 6.7: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	114
Πίνακας 6.8: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	119
Πίνακας 6.9: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	121
Πίνακας 6.10: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	122
Πίνακας 6.11: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	123
Πίνακας 6.12: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	123
Πίνακας 6.13: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες.....	124
Πίνακας 7.1: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου των ενώσεων	126
Πίνακας 7.2: Συγκριτικός πίνακας βαθμονόμησης πρόσδεσης FAAH vs MAGL	133

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία» που οργανώνει το Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών το ακαδημαϊκό έτος 2009-2011.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

1.1 Η ανακάλυψη των φυσικών και ενδογενών κανναβινοειδών

Οι φαρμακευτικές και ψυχοτρόπες ιδιότητες του φυτού *Cannabis sativa* (Σχήμα 1.1) ήταν γνωστές στην αρχαιότητα από πολλούς πολιτισμούς σε ολόκληρο τον κόσμο παρ' όλο που ακόμη και σήμερα η χημική και βιολογική βάση στην οποία στηρίζονται δεν έχει γίνει πλήρως αντιληπτή. Πρωτοκαλλιεργήθηκε για τις ίνες του στην Ασία και χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη κατασκευή υφασμάτων και σχοινιών. Σύμφωνα με αναφορές στον Ηρόδοτο, οι Σκύθες στη κεντρική Ασία έκαιγαν το φυτό και η οσμή που αναδύοταν ήταν πολύ ευχάριστη και προκαλούσε τη μέθη. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι γνώριζαν από τον πρώτο αιώνα μ.Χ. τη *Cannabis Sativa* και τις φαρμακευτικές της ιδιότητες. Ο Πεδάνιος Διοσκουρίδης, θεμελιωτής της φαρμακολογίας, στο περίφημο σύγγραμά του 'Περί Ύλης Ιατρικής' (*Materia Medica*) συμπεριέλαβε το φυτό ανάμεσα στα φυτά με φαρμακευτικές ιδιότητες. Στη παραδοσιακή Κινέζικη φαρμακοποιία (200 μ.Χ.) η κάνναβη αναφέρεται με το όνομα 'ma' και 'ta ma' που σημαίνει 'εκλεκτή κάνναβις' και περιγράφεται η ικανότητά της να καταπολεμά τον πόνο, τη ναυτία, τον πυρετό, τις μολύνσεις, τις γυναικολογικές διαταραχές καθώς και να προκαλεί διέγερση της όρεξης.

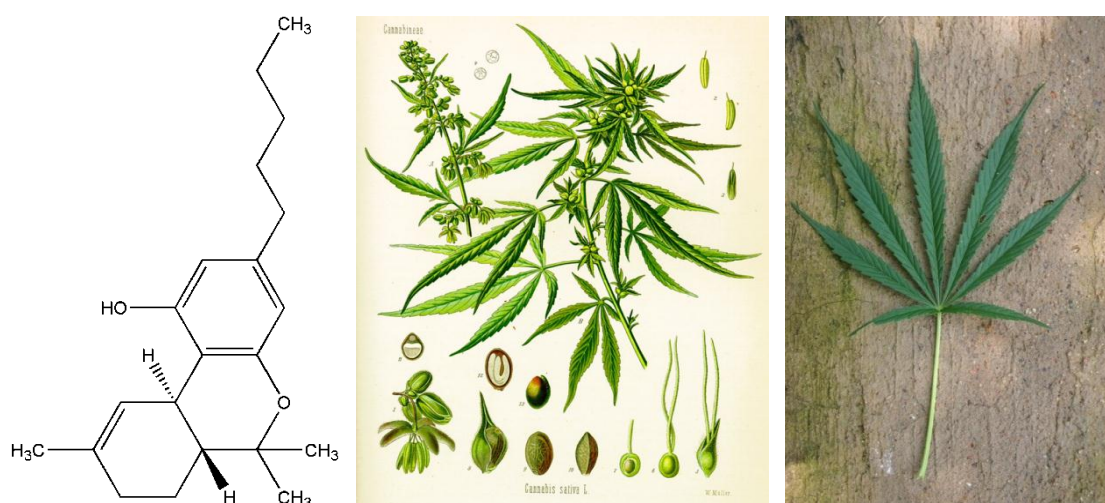
Η πρώτη αποδεδειγμένη αναφορά χρήσης της κάνναβης ως φάρμακο ήταν η ανακάλυψη ενός γκρίζου απανθρακωμένου υλικού το οποίο περιείχε τη Δ^8 -τετραϋδροκανναβινόλη και βρισκόταν δίπλα στο σώμα μίας εγκύου γυναίκας, σε τάφο κοντά στην Ιερουσαλήμ (315 - 392 μ.Χ.). Το φυτό προσέλκυσε το ενδιαφέρον των Ευρωπαίων επιστημόνων όταν τα στρατεύματα του Ναπολέοντα έφεραν από την Αίγυπτο πληροφορίες για την ψυχοδραστική επίδρασή του. Τους αιώνες που ακολούθησαν η κάνναβη και τα παράγωγά της χρησιμοποιήθηκαν για διάφορους σκοπούς. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα ο Σκωτσέζος γιατρός W.B. O' Shaughnessy εισήγαγε τη κάνναβη στην ιατρική του δυτικού κόσμου, ενώ στα επόμενα χρόνια ακολούθησαν επιστημονικές δημοσιεύσεις σχετικά με τα ιατρικά οφέλη της. Πιο σημαντική δημοσίευση αποτελεί εκείνη του 1848 στο περιοδικό *British Pharmacopoeia* στην οποία περιγράφηκαν σχεδόν με ακρίβεια τα ψυχοδραστικά αποτελέσματα της κάνναβης στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων της ευφορίας, της χαλάρωσης, της ταχυκαρδίας και της υποθερμίας^[1].

Ωστόσο, η συστηματική έρευνα για τα δραστικά χημικά συστατικά της κάνναβης αποδείχθηκε πολύ χρονοβόρα. Μόλις στις αρχές του 20^{ου} αιώνα επισημάνθηκαν οι επικίνδυνες δράσεις της κάνναβης και διατυπώθηκε η άποψη ότι αποτελεί ουσία που προκαλεί εξάρτηση, γι' αυτό και η κατανάλωσή της πρέπει να θεωρηθεί παράνομη. Σήμερα η κατανάλωση κάνναβης έχει ποινικοποιηθεί στις περισσότερες χώρες του κόσμου, με την Ελλάδα ανάμεσα σε αυτές. Παρ' όλα αυτά, τα παράγωγά της (μαριχουάνα, χασίς) παραμένουν

τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ναρκωτικά των δυτικών κοινωνιών, ενώ είναι ιδιαίτερα δημοφιλή σε νεαρά άτομα. Το μοριακό και φαρμακολογικό υπόστρωμα στο οποίο οφείλονται αυτές οι ιδιότητες αποσαφηνίστηκε σχετικά πρόσφατα.

1.1.1 Η ανακάλυψη του συστήματος κανναβινοειδών^[2]

Το 1964 οι Gaoni και Mechoulam κατόρθωσαν να απομονώσουν και να διευκρινίσουν τη δομή του ενεργού συστατικού της κάνναβης, τη Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη^[3] (Δ^9 -THC) (Σχήμα 1.1). Αποδείχθηκε ότι αυτό το λιπιδικό συστατικό, παράγωγο των τερπενοειδών, ήταν το μόνο βασικό ψυχοτροπικά ενεργό συστατικό της κάνναβης^[4]. Η Δ^9 -THC βρίσκεται στη κίτρινη ρητίνη που καλύπτει τα φύλλα και τα σύνθετα άνθη του ώριμου θηλυκού φυτού. Σε αντίθεση με τη μορφίνη, τη κοκαΐνη και άλλα αλκαλοειδή φυτικής προέλευσης, η Δ^9 -THC είναι ένα συστατικό υψηλής υδροφοβικότητας και σε αυτή την ιδιότητά της οφείλεται η καθυστέρηση της προόδου στην έρευνα των επιδράσεών της για περίπου τρεις δεκαετίες. Η υψηλή συγγένειά της με τα λιπίδια οδήγησε στο εσφαλμένο συμπέρασμα ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης της είναι παρόμοιος με αυτόν των γενικών αναισθητικών. Αρχικά, η επικρατούσα άποψη ήταν ότι η Δ^9 -THC δρα μέσω μη ειδικής διαταραχής της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών. Η παρασκευή συνθετικών αναλόγων της Δ^9 -THC, τα οποία παρουσίαζαν στερεοειδικότητα πρόσδεσης, οδήγησε στην υποψία ότι τα φυτοκανναβινοειδή προσδένονται εξειδικευμένα σε υποδοχείς.

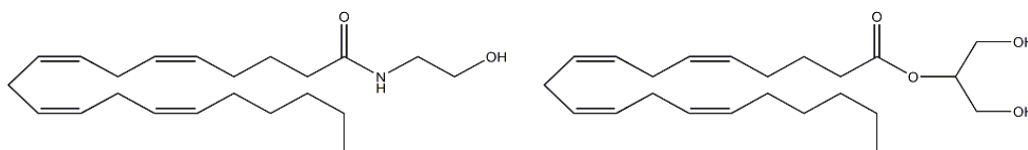


Σχήμα 1.1: Στα αριστερά η δομή της Δ^9 -THC. Στο κέντρο το φυτό *Cannabis sativa*. Στα δεξιά το φύλλο του φυτού *Cannabis sativa*

Το γεγονός ότι τα κανναβινοειδή αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση^[5] ήταν το πρώτο και κυριότερο πειραματικό δεδομένο που έδειξε ότι η δράση τους οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με έναν ειδικό πρωτεϊνικό υποδοχέα. Ο Howlett και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που συγκέντρωσαν και παρουσίασαν αποδείξεις για την ύπαρξη αυτών των κανναβινοειδών υποδοχέων. Το 1988 ανακαλύφθηκε μια ειδική, υψηλής συγγένειας θέση πρόσδεσης στον ιστό του εγκεφάλου^[6] και κατόπιν κλωνοποίησης του συγκεκριμένου ιστού από εγκέφαλο αρουραίου, προσδιορίστηκε η αλληλουχία του πρώτου κανναβινοειδούς υποδοχέα CB₁^[7] στον οποίο προσδένεται η Δ^9 -

THC. Τρία χρόνια αργότερα, ανακαλύφθηκε στο ανοσοποιητικό σύστημα ένας αντίστοιχος δεύτερος περιφερειακός υποδοχέας των κανναβινοειδών ο οποίος επίσης κλωνοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η αλληλουχία του και αναφέρεται ως CB₂ υποδοχέας^[8].

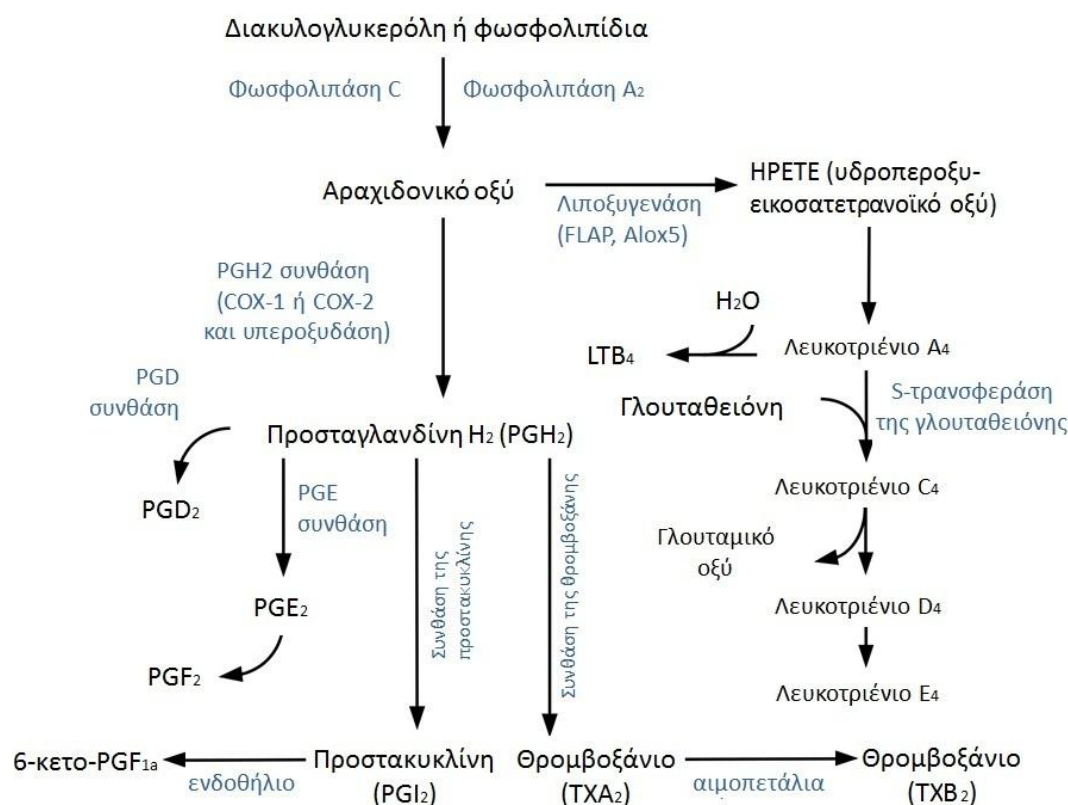
Ο Mechoulam και η ομάδα του θεώρησαν ότι εφόσον υπήρχε ένας ειδικός υποδοχέας για τα κανναβινοειδή, λογικό ήταν να υπάρχουν και ενδογενώς παραγόμενα εξειδικευμένα κανναβινοειδή υποκατάστατα που θα ενεργοποιούν αυτούς τους υποδοχείς. Ύστερα από μελέτες το 1992 απομονώθηκε το πρώτο ενδογενές κανναβινοειδές^[9], το οποίο ήταν λιπίδιο. Το συστατικό αναγνωρίστηκε ως το αμίδιο του αραχιδονικού οξέως με αιθανολαμίνη και ονομάστηκε ανανταμίδιο από τη σανσκριτική λέξη 'ananda' που σημαίνει ευδαιμονία και τη λέξη αμίδιο για να χαρακτηρίσει τη χημική του δομή. Το λιπιδικό αυτό μόριο κατέχει δομικά χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα των εικοσανοειδών, τα οποία δρουν ως βιοχημικοί μεσολαβητές για τη μετάδοση των κυτταρικών ερεθισμάτων από τη μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκκρίνονται δηλαδή από κάθε κύτταρο, με σκοπό να ελέγχουν το εξωτερικό περιβάλλον και να μεταφέρουν στο κύτταρο ερεθίσματα από αυτό. Λίγα χρόνια μετά απομονώθηκε και δεύτερο ενδογενές κανναβινοειδές, η 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλη (2-AG), στον εγκέφαλο^[10] και στο έντερο του σκύλου^[11]. Η 2-AG βρίσκεται στον εγκέφαλο σε συγκέντρωση περίπου 180 φορές μεγαλύτερη απ' ό,τι το ανανταμίδιο^[12]. Μέχρι το τέλος του 20^{ου} αιώνα μόνο τα δύο ανωτέρω ενδοκανναβινοειδή είχαν ανακαλυφθεί (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Δομές ανανταμιδίου AEA (αριστερά) και 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλης 2-AG (δεξιά). Πρόκειται για λιπιδικής φύσεως μόρια, τα οποία έχουν δυο κοινά χαρακτηριστικά: ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (αραχιδονικό οξύ) και μια πολική κεφαλή (αιθανολαμίνη και γλυκερόλη αντίστοιχα).

Από τότε μέχρι σήμερα έχει ανακαλυφθεί ένας μεγάλος αριθμός ενδοκανναβινοειδών, τα οποία προέρχονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και ανήκουν στις οικογένειες των N-ακυλοαιθανολαμινών (NAE) και μονοακυλογλυκερολών (AcG). Αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη δύο οικογενειών ενδογενώς παραγομένων και δομικά σχετιζομένων ενώσεων, ικανών να προσδεθούν στους κανναβινοειδείς υποδοχείς. Η δράση τους είναι μεγάλης βιολογικής σημασίας, ιδιαίτερα επειδή το λιπαρό οξύ που απελευθερώνεται από την υδρόλυσή τους είναι το αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ 'διοχετεύεται' σε επόμενες μεταβολικές πορείες, διαμέσου των οποίων μετατρέπεται σε μία ομάδα ενώσεων που ονομάζονται εικοσανοειδή^[13]. Τα εικοσανοειδή συνιστούν μία οικογένεια χημικών ενώσεων λιπιδικής φύσεως οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μεταγωγής σήματος στον οργανισμό, με αποτέλεσμα την εκδήλωση ενός μεγάλου φάσματος βιολογικών αποκρίσεων. Η δράση τους μπορεί να είναι αυτοκρινής ή παρακρινής. Η αυτοκρινής δράση αφορά την έκκριση ορμονών από ένα κύτταρο με σκοπό τη πρόσδεσή τους σε υποδοχείς που βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο που την εκκρίνει, ενώ παρακρινής σε διαφορετικό κύτταρο

που βρίσκεται πλησίον αυτού. Όλες οι χημικές ενώσεις που απαρτίζουν αυτή την ομάδα, αποτελούνται από είκοσι άτομα άνθρακα. Κοινός τους πρόδρομος είναι το αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολικές πορείες που οδηγούν στην παραγωγή τους, ονομάζονται 'βιοχημική οδός του αραχιδονικού οξέος' (Σχήμα 1.3).

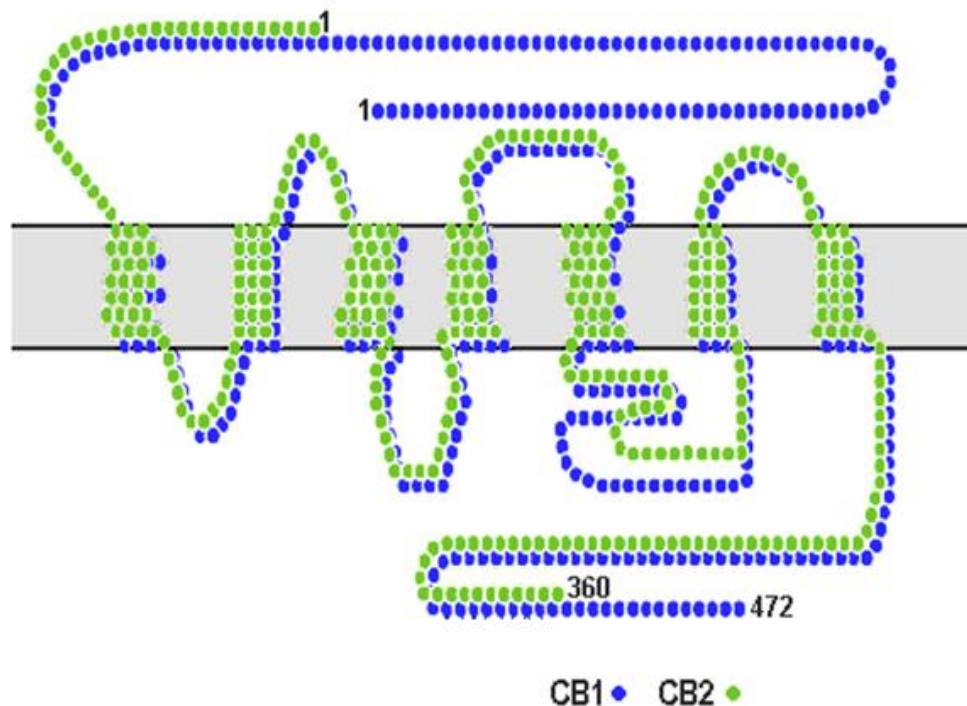


Σχήμα 1.3: Η βιοχημική οδός του αραχιδονικού οξέος

Συνολικά η σήμανση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών αποτελείται από τους κανναβινοειδείς υποδοχείς, τους ενδογενείς αγωνιστές τους (ενδοκανναβινοειδή) και τα μεταβολικά ένζυμα που ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα αυτών των προσδετών.

1.2 Κανναβινοειδείς υποδοχείς

Όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν δυο είδη κανναβινοειδών υποδοχέων (CB), ο CB₁ και ο CB₂ οι οποίοι έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηρισθεί πλήρως. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που φέρουν επτά διαμεμβρανικές έλικες και συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες. Παρουσιάζουν συνολική ομολογία 44% στην αλληλουχία των αμινοξέων τους ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνει σε 66% στη διαμεμβρανική περιοχή τους και έχουν διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ. Ο CB₁ υποδοχέας περιέχει 72 επιπλέον αμινοξέα συγκριτικά με τον CB₂ στη Ν-τελική περιοχή, 15 επιπλέον αμινοξέα στο τρίτο εξωκυτταρικό βρόγχο καθώς επίσης και 13 αμινοξέα στη C-τελική περιοχή (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Υπέρθυση των κανναβινοειδών υποδοχέων CB₁ και CB₂

Ο CB₁ υποδοχέας έχει βρεθεί τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όσο και σε περιφερειακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του λεπτού εντέρου και της μήτρας^[14]. Η κατανομή του CB₁ υποδοχέα στον εγκέφαλο και ο εντοπισμός του σχετίζεται με τις γνωστές επιδράσεις των κανναβινοειδών στη μνήμη, στην αντίληψη και στον έλεγχο της κίνησης.

Ο CB₂ υποδοχέας έχει βρεθεί σε περιφερειακούς ιστούς όπως στη σπλήνα και σε άλλα κύτταρα που σχετίζονται με ανοσοχημικές λειτουργίες, αλλά όχι στον εγκέφαλο^[8]. Ο εντοπισμός του CB₂ υποδοχέα στο ανοσοποιητικό σύστημα καταδεικνύει έναν ανοσορυθμιστικό ρόλο για αυτόν τον υποδοχέα.

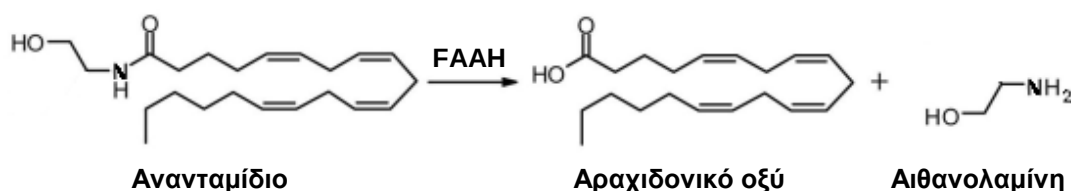
1.3 Δράση ενδοκανναβινοειδών

Ως ενδοκανναβινοειδή, ορίζονται τα ενδογενώς παραγόμενα λιπιδικά μόρια που έχουν την ικανότητα να προσδένονται και να ενεργοποιούν τους κανναβινοειδείς υποδοχείς ως φυσικοί προσδέτες τους. Τα ενδοκανναβινοειδή, σε αντίθεση με τους κλασσικούς νευροδιαβιβαστές, δεν αποθηκεύονται μέσα στο κύτταρο, αλλά παράγονται από πρόδρομα λιπίδια της μεμβράνης μόνο εφόσον παρουσιαστεί ανάγκη, μετά από ενεργοποίηση και με τη δράση διαφόρων ενζύμων. Στη συνέχεια δρουν κοντά στη περιοχή στην οποία συντέθηκαν. Μετά από την απελευθέρωσή τους και τη σηματοδοτική τους δράση, τα ενδοκανναβινοειδή, είτε μέσω διάχυσης είτε μέσω ειδικών πρωτεϊνικών μεταφορέων, εισέρχονται και πάλι στο κύτταρο όπου και απενεργοποιούνται με υδρόλυση με πολύ γρήγορο ρυθμό.

1.3.1 Ανανταμίδιο (AEA)

Το πρώτο ενδοκανναβινοειδές που μελετήθηκε πλήρως είναι το AEA, το οποίο απομονώθηκε αρχικά από τους Devane *et. al.* το 1992^[9]. Η ομάδα αυτή

εκχύλισε τα λιπίδια του ιστού εγκεφάλου αρουραίου με οργανικούς διαλύτες και τα διαχώρισε με χρωματογραφικές τεχνικές, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε και η ικανότητα δέσμευσης της ένωσης στους κανναβινοειδείς υποδοχείς σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Με αυτό τον τρόπο απομόνωσαν ένα λιπιδικό συστατικό το οποίο χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας και φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ως το αμίδιο του αραχιδονικού οξέως με αιθανολαμίνη. Το AEA συμπεριφέρεται ως μερικός αγωνιστής^[15,16] των κανναβινοειδών υποδοχέων και εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς το CB₁ (K_i= 61 nM) σε σχέση με το CB₂ υποδοχέα (K_i= 1930 nM). Αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (η οποία οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της ακυλοτρανσφεράσης, του ενζύμου που παράγει το πρόδρομο μόριο N-αραχιδονοϋλφωσφατιδυλαιθανολαμίνη, NAPE) ή ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων νευροδιαβιβαστών οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης του ανανταμιδίου από φωσφολιπιδικά πρόδρομα μόρια που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Τα μόρια που βιοσυνθέτουν το ανανταμίδιο δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Μεταβολίζεται ταχύτατα, μέσω υδρόλυσης του αμιδικού του δεσμού, σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη και το κύριο ένζυμο υπεύθυνο γι' αυτή την υδρόλυση είναι η αμιδική υδρόλαση των λιπαρών οξέων (FAAH)^[17] (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5: Υδρόλυση του AEA από τη FAAH

Στον πίνακα 1.1 περιγράφεται η κατανομή του AEA που έχει βρεθεί σε ιστούς διαφόρων θηλαστικών.

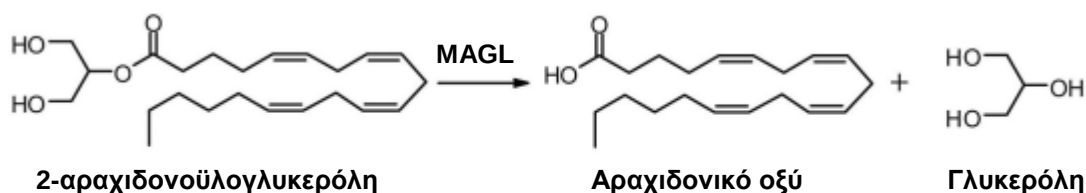
Πίνακας 1.1: Κατανομή του AEA σε ιστούς θηλαστικών

Ιστός	Είδος θηλαστικού	Βιβλιογραφία
Εγκέφαλος	Αρουραίου	Felder 1996 ^[18]
	Χοίρου	Schmid 1995 ^[19]
	Βοδιού	Schmid 1995 ^[19]
	Ανθρώπου	Felder 1996 ^[18]
Νεφροί		Deutsch 1997 ^[20]
Όρχεις		Sugiura 1996 ^[21]
Δέρμα	Αρουραίου	Felder 1996 ^[18]
Σπλήνα		Felder 1996 ^[18]
Πλάσμα αίματος		Giuffrida & Piomelli 1998 ^[22]
Σπλήνα		Felder 1996 ^[18]
Καρδιά	Ανθρώπου	Felder 1996 ^[18]
Καρκινικά κύτταρα μαστού		Bisognio 1998 ^[23]
Μήτρα	Ποντικού	Schmid 1997 ^[24]

1.3.2 2-Αραχιδοנוύλογλυκερόλη (2-AG)

Το 1995 οι ομάδες των Mechoulam *et. al.*^[11] και Sugiura *et. al.*^[10] ανακάλυψαν πως η 2-AG είναι ενδογενής προσδέτης των κανναβινοειδών υποδοχέων ενώ χαρακτήρισαν πλήρως την ένωση. Η 2-AG ανήκει στην οικογένεια των μονοακυλογλυκερολών οι οποίες είναι λιπιδικοί μεταβολίτες που συνεχώς συντίθενται, παραγωγοποιούνται και υδρολύονται στα κύτταρα των θηλαστικών και οι οποίες παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία πρόδρομων ενώσεων. Η 2-AG είναι συνήθως το κύριο συστατικό των κυτταρικών μονοακυλογλυκερολών, οι οποίες παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία πρόδρομων ενώσεων, διότι το περισσότερο από το κυτταρικό αραχιδονικό οξύ εστεροποιείται στην *sn*-2 θέση των γλυκεροφωσφολιπιδίων.

Όπως οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις, έτσι και η 2-AG βρίσκεται στη διασταύρωση διαφόρων μεταβολικών πορειών των λιπιδίων, όπου μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως τελικό προϊόν μιας πορείας αλλά και ως πρόδρομο μόριο μίας άλλης. Αυτοί οι διαφορετικοί μεταβολικοί ρόλοι μπορούν να εξηγήσουν τις υψηλές συγκεντρώσεις της στον εγκέφαλο (περίπου 180 φορές μεγαλύτερη από το AEA) και υποδηλώνει ότι ένα σημαντικό κλάσμα της στον εγκέφαλο χρησιμοποιείται για λειτουργίες συντήρησης παρά για μεταγωγή σήματος. Η 2-AG, πέραν του ότι βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, προσδένεται και πιο ισχυρά από το AEA. Συμπεριφέρεται ως πλήρης αγωνιστής των δυο κανναβινοειδών υποδοχέων^[10,25,26,27], εκδηλώνοντας κανναβιμιμητικές δράσεις όπως υποθερμία και υποκινητικότητα. Οι α και β ισομορφές της *sn*-1 λιπάσης της διακυλογλυκερόλης (DAGLα και DAGLβ) έχουν αναγνωριστεί ως βιοσυνθετικά ένζυμα της 2-AG, ενώ όπως συμβαίνει και με το AEA, για την ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών ενζύμων είναι απαραίτητη η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η 2-AG μεταβολίζεται ταχύτατα, μέσω υδρόλυσης του εστερικού της δεσμού, σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη και το κύριο ένζυμο υπεύθυνο γι' αυτή την υδρόλυση είναι η λιπάση της μονοάκυλογλυκερόλης (MAGL)^[28] (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Υδρόλυση της 2-AG από τη MAGL

Στον πίνακα 1.2 περιγράφεται η κατανομή της 2-AG που έχει βρεθεί σε ιστούς διαφόρων θηλαστικών.

Πίνακας 1.2: Κατανομή της 2-AG σε ιστούς θηλαστικών		
Ιστός	Είδος θηλαστικού	Βιβλιογραφία
Εγκέφαλος Πλάσμα αίματος Νεφροί Σπλήνα Πάγκρεας Σπλάχνα	Αρουραίου	Sugiura 1995 ^[10] Stella 1997 ^[12]
	Σκύλου	Mecloulam 1995 ^[11]

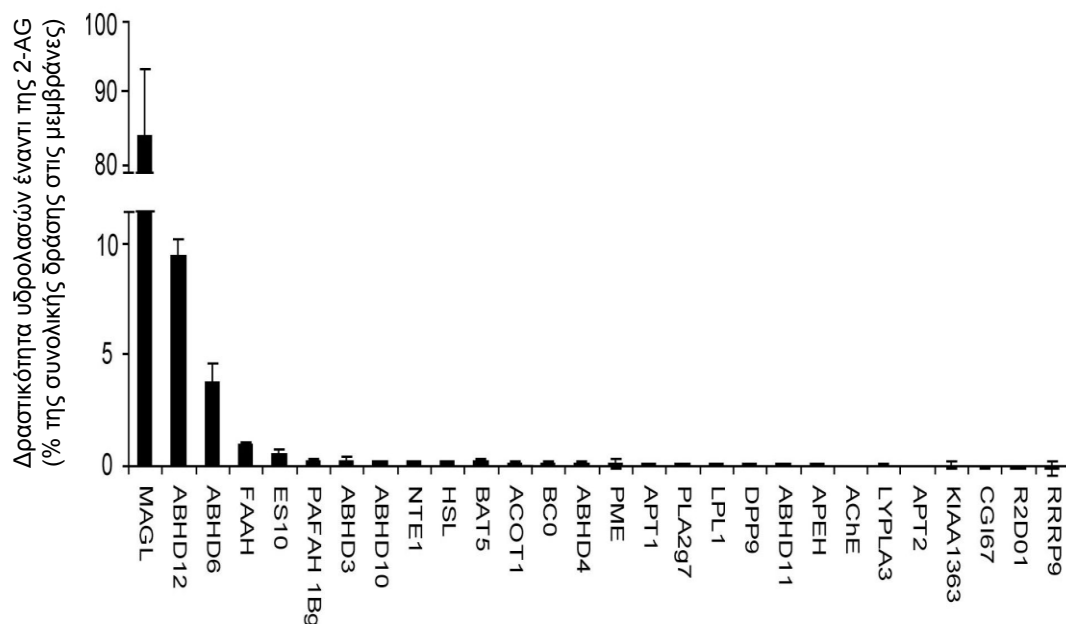
Ύστερα από ποσοτικές μελέτες σχετικά με τη κατανομή των δύο ενδοκανναβινοειδών στα θηλαστικά προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- i) Σε όλους τους ιστούς όπου και τα δύο ενδοκανναβινοειδή προσδιορίστηκαν, το AEA ήταν παρόν σε σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες σε σύγκριση με τη 2-AG.
- ii) Τα βασικά επίπεδα AEA ήταν 10 φορές χαμηλότερα από αυτά των κλασσικών νευροδιαβιβαστών αλλά αυξάνονταν σημαντικά στους ιστούς μετά θάνατο^[18,19].
- iii) Το AEA συχνά συνοδευόταν από υψηλά επίπεδα μη ενδοκανναβινοειδών αμιδίων λιπαρών οξέων.
- iv) Μη κανναβινομιμητικές μονοακυλογλυκερόλες όπως η μονο-παλμιτόϋλο, μονο-ελάϋλο και μονο-λινελάϊλο γλυκερόλες συνόδευαν τη 2-AG σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν^[10].

Η δράση της 2-AG τερματίζεται με παρόμοιο τρόπο με αυτό του AEA, ενώ η δομική ομοιότητα των δυο μορίων οδήγησε αρχικά στην υπόθεση ότι και τα δυο τους απενεργοποιούνται από τη δράση των ίδιων ενζύμων. Με βάση τη παρατήρηση αυτή, και αφού αποδείχθηκε ότι η FAAH είναι ικανή να υδρολύσει τη 2-AG με παρόμοιο ρυθμό, λογικό ήταν να θεωρηθεί η FAAH ως ένζυμο που υδρολύει και τα δύο. Ωστόσο η υπόθεση αυτή διαψεύστηκε διότι:

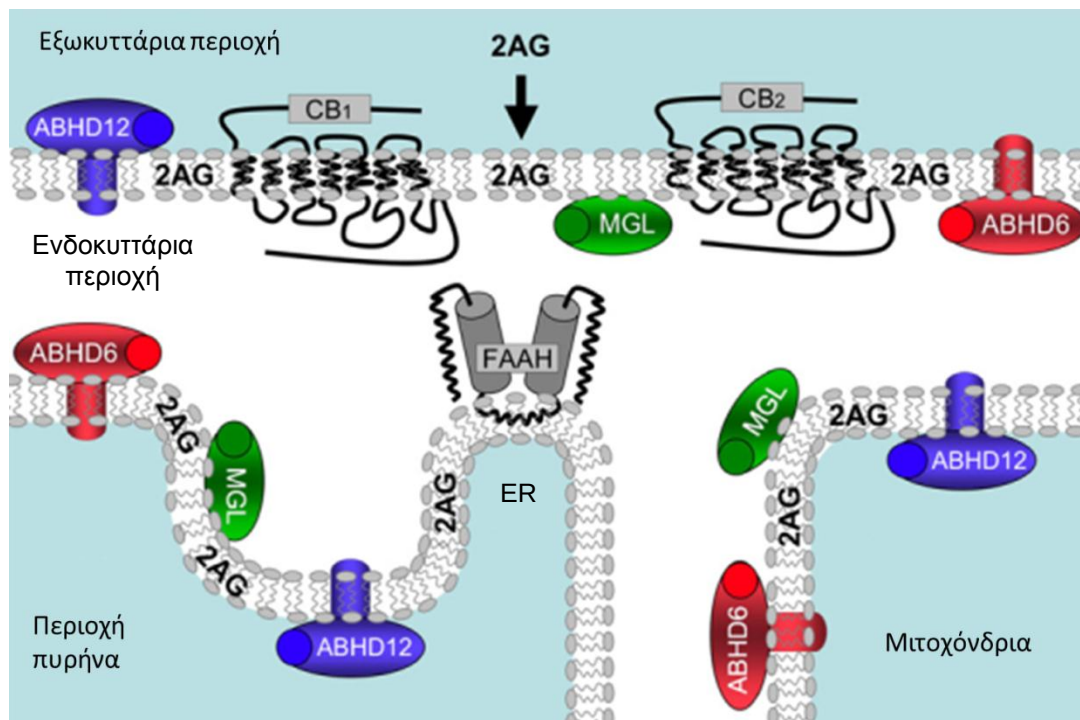
- A. Η συνθετική 2-AG αποικοδομείται γρήγορα στο αίμα ποντικού, ενώ το AEA είναι σταθερό κάτω από τις ίδιες συνθήκες^[29].
- B. Ο εγκέφαλος χοίρου περιέχει δραστικότητα υδρολάσης της 2-AG, η οποία μπορεί να διαχωριστεί χρωματογραφικά από τη FAAH^[30].
- Γ. Οι αναστολείς της FAAH, σε συγκεντρώσεις που παρεμποδίζουν τελείως την αποικοδόμηση του AEA, δεν έχουν καμία επίδραση στην υδρόλυση της 2-AG^[31].
- Δ. Η υδρόλυση της 2-AG διατηρείται σε ποντίκια που έχουν έλλειψη του γονιδίου της FAAH^[29].

Βάσει των παραπάνω επιχειρημάτων και ύστερα από σειρά πειραμάτων σε πληθώρα μεμβρανικών σερίνο-υδρολασών αποδείχθηκε ότι το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για τη κατάλυση της υδρόλυσης της 2-AG σε ανέπαφους νευρώνες (βασικός μηχανισμός για την απενεργοποίησή της) είναι η MAGL^[32] (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Η σχετική δραστηριότητα μεμβρανικών σερίνο-υδρολασών του εγκεφάλου ποντικού έναντι της 2-AG

Επίσης πρόσφατα αποδείχθηκε *in vitro* ότι το AEA και η 2-AG αναστέλλουν εκλεκτικά και δραστικά τον πολλαπλασιασμό των ανθρωπίνων κυττάρων του καρκίνου του μαστού. Τα *in vivo* αποτελέσματα όμως μπορεί να διαφέρουν γιατί εξαρτώνται από τις φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες που επικρατούν καθώς και τον εκάστοτε ιστό που αναλύεται.^[33] Τα ενδοκανναβινοειδή παρ' όλο που δρουν κυρίως μέσω των CB₁ και CB₂ υποδοχέων, αλληλεπιδρούν και με άλλους υποδοχείς, όπως για παράδειγμα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το GPR55 υποδοχέα. Επιπλέον, εκτός από τα δυο αυτά βασικά ένζυμα καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών έχουν αναφερθεί και άλλα ένζυμα που μπορούν να τα υδρολύσουν *in vitro*, όπως η FAAH-2, η κυκλοξυγονάση (COX), η λιποξυγονάση (LOX), και οι AB-υδρολάσες ABHD6 και ABHD12. Τα ένζυμα MAGL, ABHD6 και ABHD12 μπορούν να εντοπισθούν στη κυτταρική μεμβράνη, στις μεμβράνες του πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Οι κανναβινοειδείς υποδοχείς CB₁ και CB₂ βρίσκονται σε αφθονία στη κυτταρική μεμβράνη, ενώ αντίστοιχα η FAAH βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη ενδοπλασματικού δικτύου (ER) (Σχήμα 1.8).



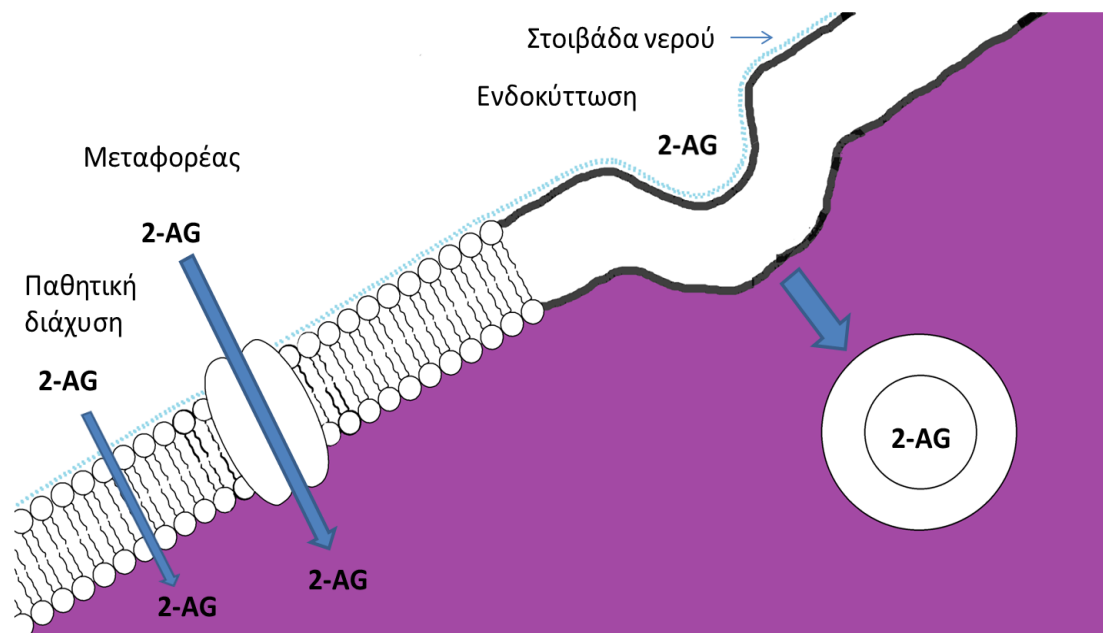
Σχήμα 1.8: Πιθανή υποκυττάρια τοπολογία ενζύμων^[33] που υδρολύουν τη 2-AG.

1.4 Μεταφορά ενδοκανναβινοειδών μέσα στο κύτταρο

Η ανάγκη μεταφοράς των ενδοκανναβινοειδών έξω και μέσα στο κύτταρο, αποτελεί σημαντικό τμήμα της δράσης τους όσο και της πορείας απενεργοποίησής τους.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με τον τρόπο που το AEA διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Όπως προκύπτει από κινητικές μελέτες και από εκλεκτική αναστολή του, ο πιο πιθανός μηχανισμός βασίζεται στην ύπαρξη ενός πρωτεϊνικού μεταφορέα στην κυτταρική μεμβράνη. Αρχικά το ανανταμίδιο προσλαμβάνεται από νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα είτε με ειδικό μηχανισμό πρόσληψης μέσω μεταφορέα υψηλής συγγένειας του μεμβρανικού μεταφορέα ανανταμιδίου (AMT), είτε με απλή διάχυση. Αφού εισέλθει εντός του κυττάρου, αποικοδομείται από τη FAAH σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη. Ο μεταφορέας ανανταμιδίου έχει την ικανότητα να λειτουργεί προς δυο κατευθύνσεις, είναι δηλαδή δυνατόν να βοηθά το AEA να εισέρχεται ή να αποβάλλεται έξω από τα κύτταρα.

Η μεταφορά της 2-AG στα κύτταρα εμφανίζεται να πραγματοποιείται με όλους τους πιθανούς τρόπους^[34], παθητική ή διευκολυνόμενη διάχυση, μεταφορά ή ενδοκύτωση, ανάλογα με το κύτταρο (Σχήμα 1.9). Έχει βρεθεί ότι η πρόσληψη της 2-AG σε κάποια κύτταρα παρουσιάζει παρόμοιες κινητικές ιδιότητες με αυτή του AEA. Εκτός από ομοιότητες η μεταφορά τους παρουσιάζει και διαφορές. Από τη μια πλευρά το AEA και η 2-AG μπορούν να εμποδίσουν το ένα τη μεταφορά του άλλου. Από την άλλη το αραχιδονικό οξύ προκαλεί μείωση στη συσσώρευση της 2-AG αλλά δεν επηρεάζει αυτή του AEA.

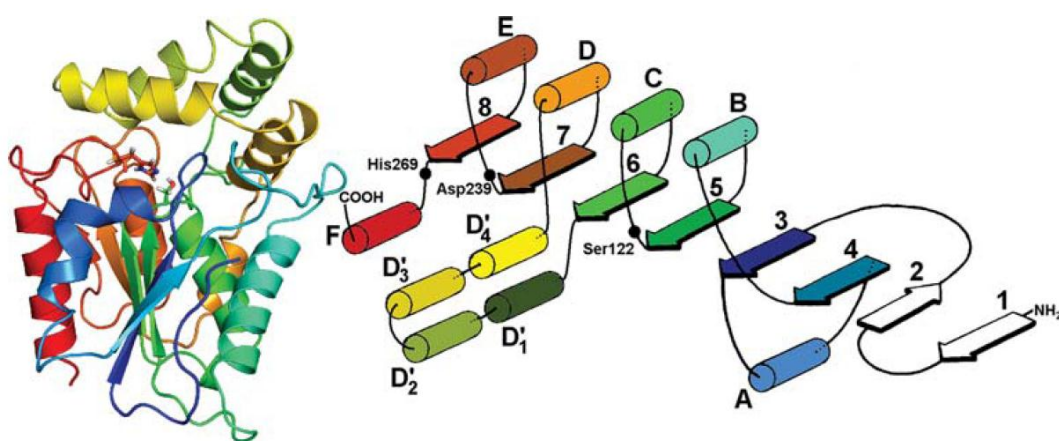


Σχήμα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση πιθανής πορείας της μεταφοράς της 2-AG στο κύτταρο

1.5 Λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL)

1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ενζύμου

Η MAGL απομονώθηκε σε καθαρή μορφή για πρώτη φορά το 1975 από λιπώδη ιστό αρουραίου και το μοριακό της βάρος υπολογίζεται στα 33 kDa. Σε πρόσφατη φασματοσκοπική ανάλυση βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη δε διαθέτει δισουλφιδικές γέφυρες. Ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων 'α/β υδρολάσες' (Σχήμα 1.10) και θεωρείται ότι σχετίζεται με τις μικροβιακές αλοπεροξυδάσες και λυσοφωσfolιπάσες^[35]. Το βέλτιστο pH δράσης της MAGL κυμαίνεται μεταξύ 7 με 8, αλλά έχει βρεθεί να δρα και σε pH 10.



Σχήμα 1.10: Τεταρτοταγής δομή και σχηματικό διάγραμμα της MAGL. Στα αριστερά παριστάνεται η τρισδιάστατη δομή της. Η καταλυτική τριάδα εμφανίζεται με τη μορφή συρμάτων (sticks and balls). Στα δεξιά το σχηματικό διάγραμμα της α/β πτυχωτής υδρολάσης

Πρόκειται για ένα ένζυμο με δραστικότητα υδρολάσης σερίνης, που βρίσκεται στο κυτοσόλιο αλλά και σε μεμβρανικά κλάσματα. Οι κυτοσολικές σερινο-υδρολάσες είναι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα 2- και 1-μονογλυκερίδια σε λιπαρό οξύ και γλυκερόλη. Κατά αντιστοιχία η MAGL υδρολύει κυρίως τη 2-AG σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη.

Η εξειδίκευση υποστρώματός της μελετήθηκε έμμεσα, με μέτρηση της αναστολής που προκαλούν διάφορα υποστρώματα στην υδρόλυση της [³H] 2-OG. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι παράγωγα της 1-AG με 20 άτομα άνθρακα στη λιπαρή αλυσίδα και 2 έως 5 ακόρεστους δεσμούς αποτελούν υποστρώματα της κυτοσολικής MAGL, ενώ μεγαλύτερη εξειδίκευση παρουσίασε η 2-AG που αποτελεί και το φυσικό της υπόστρωμα. Τα αμινοξέα που κατέχουν κύριο λόγο στη κατάλυση είναι η Ser132, η Asp249 και η His279. Η καταλυτική αυτή τριάδα είναι χαρακτηριστική των εστερασών και των λιπασών.

1.5.2 Κατανομή MAGL σε όργανα και ιστούς

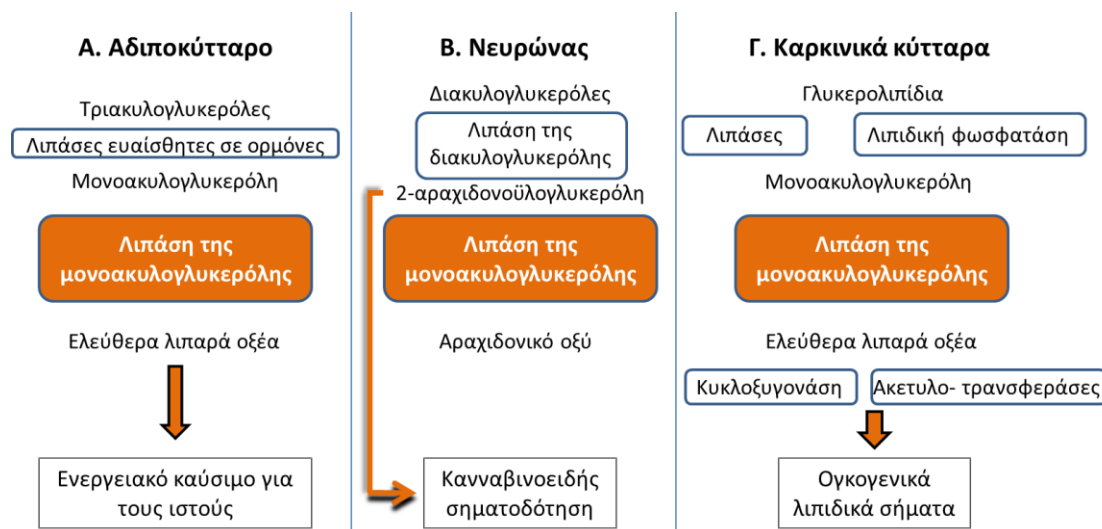
Πολύ πριν εξακριβωθεί ότι η 2-AG εμπλέκεται στο σύστημα ενδοκανναβινοειδών, υπήρχε έντονο ενδιαφέρον για τα ένζυμα που μεταβολίζουν μονοακυλογλυκερόλες, αφού τα μόρια αυτά υπάρχουν σε αφθονία στον οργανισμό σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες του ΑΕΑ. Η κλωνοποίηση της MAGL έχει πραγματοποιηθεί ως τώρα από ιστούς και όργανα προερχόμενα από αρουραίο και ποντίκι και η δραστικότητά της έχει εντοπισθεί σε εγκέφαλο χοίρου και ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Η σύγκριση της αλληλουχίας του ενζύμου με διάφορους άλλους οργανισμούς έδειξε υψηλή έκφραση στα θηλαστικά, μέτρια έκφραση σε φυτά, βακτήρια και ιούς, και χαμηλή έκφραση σε ασπόνδυλα και πρωτόζωα.

Η συχνή παρουσία μονοακυλογλυκερολών στον οργανισμό κάνει απαραίτητη και τη παρουσία του κατάλληλου ενζύμου για την υδρόλυσή τους, με αποτέλεσμα η MAGL να είναι ένα ένζυμο που απαντάται σε πληθώρα ιστών. Η σύνδεση της MAGL με την αποικοδόμηση της 2-AG έστρεψε το ενδιαφέρον στον εντοπισμό της MAGL στον εγκέφαλο και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι MAGL ποντικών, αρουραίων και ανθρώπων εμφανίζουν αρκετά μεγάλο βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία αμινοξέων. Η MAGL έχει βρεθεί στον εγκέφαλο ανθρώπων, χοίρων, κουνελιών, αρουραίων και ποντικών, στα αιμοπετάλια ανθρώπων, κουνελιών, αρουραίων και ποντικών καθώς και σε μία πληθώρα ιστών ποντικίου.

1.5.3 Φυσιολογικός ρόλος της MAGL

Όπως αναφέρθηκε, η 2-AG είναι ένα σημαντικό συστατικό του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο και προσδένεται στους κανναβινοειδείς υποδοχείς. Η MAGL είναι το κύριο ένζυμο που την υδρολύει. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που παράγονται από την υδρόλυση δρουν ως πηγή ενέργειας για το σώμα. Η έλλειψη δράσης της MAGL και η απότομη αύξηση της 2-AG στον εγκέφαλο συνδέεται με διάφορες καταστάσεις όπως καταπληξία των άκρων, σπασμούς κτλ. Η αναστολή της MAGL στον εγκέφαλο προκαλεί αναλγησία μέσω της αύξησης της 2-AG. Η MAGL είναι επίσης γνωστή για τη συμμετοχή της στη διάσπαση των λιπιδικών αποθηκών τριακυλογλυκερόλης (TAG), η οποία

αποτελεί ένα από τα βασικότερα στάδια της μεταβολικής ομοιόστασης. Τέλος, μόλις πρόσφατα ανακαλύφθηκε από τους Nomura *et. al.*^[36] ότι η MAGL έχει την ικανότητα να ελέγχει την απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από τις λιπιδικές αποθήκες των καρκινικών κυττάρων. Αυτό τους επιτρέπει να παράγουν σήματα που προωθούν την ανάπτυξη όγκου. Με αυτά τα δεδομένα το ένζυμο αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο. Συνοπτικά αυτές οι τρεις δράσεις της MAGL^[37] περιγράφονται στο σχήμα 1.11.



Σχήμα 1.11: Οι τρεις δράσεις της MAGL

(Α) Η MAGL καταλύει το τελευταίο στάδιο της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό, παρέχοντας ενέργεια στους ιστούς μέσω των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται.

(Β) Η MAGL υδρολύει τη 2-AG σε νευρώνες, συντονίζοντας την ενδοκανναβινοειδή σηματοδότηση.

(Γ) Η MAGL ελέγχει τη παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων από τα καρκινικά κύτταρα.

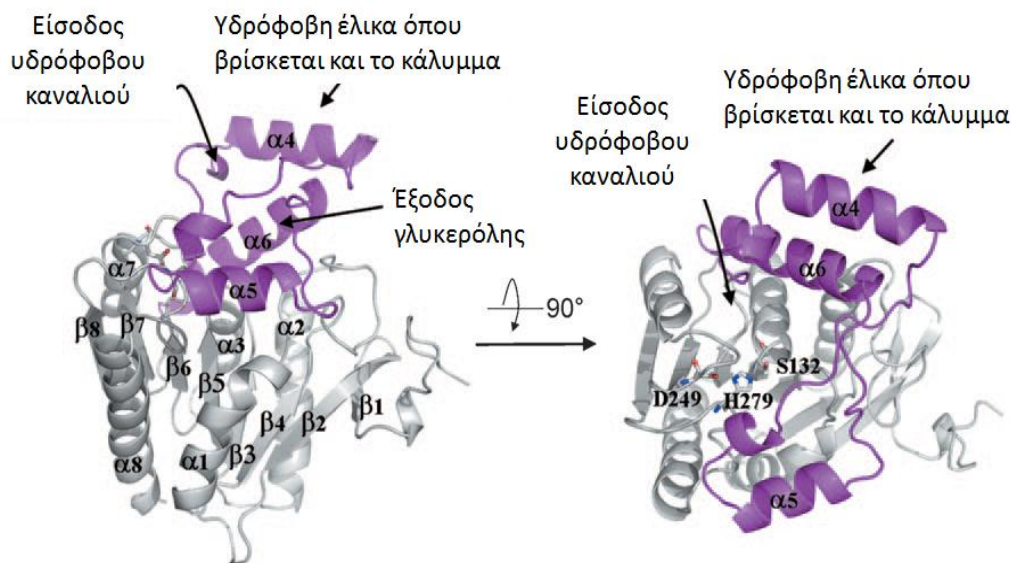
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΤΡΙΤΟΤΑΓΩΝ ΔΟΜΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΑΣΗ ΤΗΣ ΜΟΝΟΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (MAGL)

2.1 Τριτοταγής δομή της λιπάσης της μονοακυλογκυκερόλης

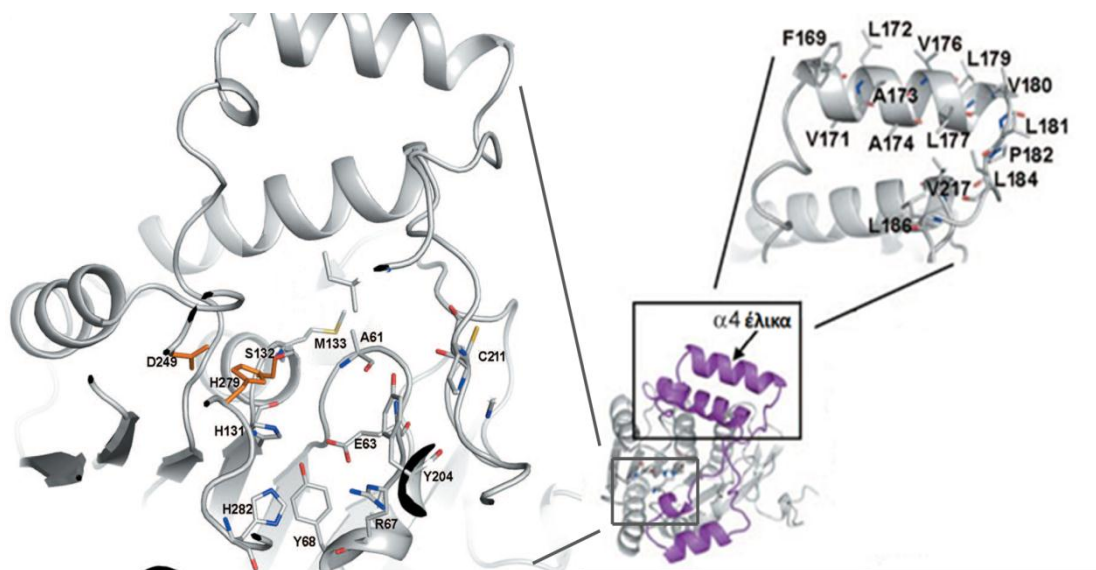
Η MAGL αποτελεί μέλος της οικογένειας των λιπιδικών σερίνο υδρολασών και βρίσκεται τόσο στο κυτοσόλιο όσο και στη μεμβρανική περιοχή των κυττάρων. Όλες οι λιπάσες έχουν τη χαρακτηριστική δομή α/β υδρολάσης, αποτελούμενες από ένα κεντρικό υδρόφοβο β-φύλλο οχτώ πτυχών (7 παράλληλες και μια αντιπαράλληλη ως προς τις υπόλοιπες πτυχές) που περιβάλλεται από οκτώ αμφιφιλικές α-έλικες (Σχήμα 2.1). Μέλη αυτής της υπερ-οικογένειας των α/β υδρολασών είναι επίσης και οι εστερικές υδρολάσες, οι αλλοπεροξειδάσες, οι εποξειδικές υδρολάσες και ορισμένα ειδικά ένζυμα. Το β-φύλλο και οι α-έλικες της α/β υδρολάσης διευθετούνται στο χώρο κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν στο εσωτερικό τους μια υδρόφοβη κοιλότητα εντός της οποίας βρίσκεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η κοιλότητα αυτή έχει την ικανότητα να φιλοξενήσει μια πληθώρα ενώσεων χωρίς να μεταβληθούν τα τρισδιάστατα χαρακτηριστικά της. Οι ενώσεις που εισέρχονται βοηθούν στη ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας της αντίστοιχης πρωτεΐνης.

Η αναστολή της υδρολυτικής δράσης της MAGL από φθοροφωσφονικά παράγωγα υποδεικνύει την ύπαρξη μιας δραστηκής σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το ένζυμο επίσης αναστέλλεται από παράγωγα του βενζοϊκού οξέος με υδράργυρο και από το χλωρίδιο του υδραργύρου προτείνοντας την ύπαρξη απαραίτητων για τη δράση του ενζύμου σουλφυδρυλομάδων. Η πρώτη προσπάθεια για αναγνώριση της δομής και της καταλυτικής περιοχής της MAGL έγινε από τους Karlsson *et al.*^[38] με χρήση σημειακών μεταλλάξεων αλλά και συγκρίσεις με τη δομή και την αλληλουχία άλλων λιπασών και εστερασών που συνδέονται εξελικτικά με τη MAGL. Με αυτό τον τρόπο προτάθηκε ότι η καταλυτική τριάδα της MAGL συνίσταται από τα αμινοξέα Ser132, Asp249 και His279, όπως παριστάνεται στο σχήμα 2.1.



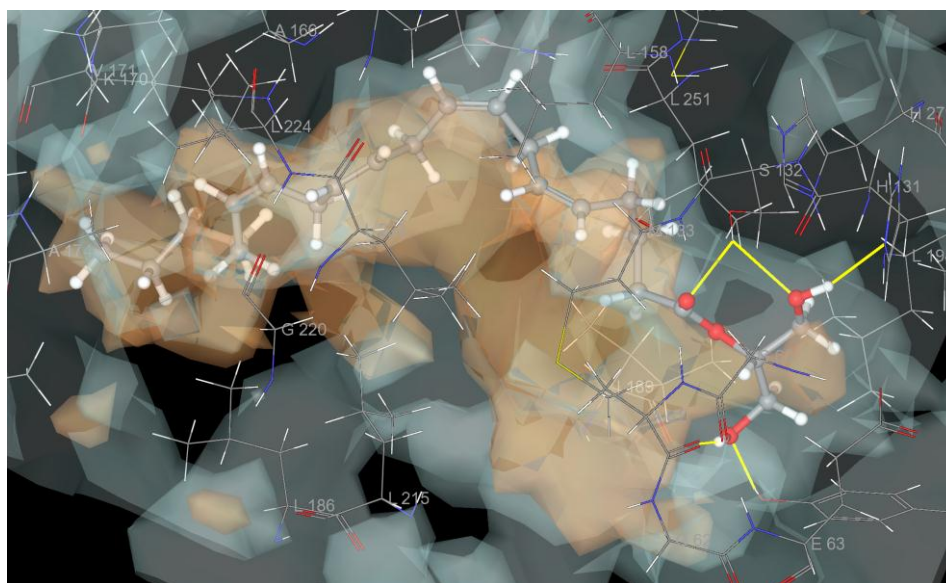
Σχήμα 2.1: Η δομή α/β υδρολάσης της MAGL, το σημείο εισόδου του υδρόφοβου καναλιού και η καταλυτική τριάδα στο ενεργό κέντρο αυτού

Η καταλυτική τριάδα βρίσκεται στο κάτω άκρο ενός καναλιού, μεγέθους περίπου 25 Å σε μήκος και 8 Å σε πλάτος, που εκτείνεται από το εσωτερικό ως την επιφάνεια του ενζύμου. Στο άνω άκρο του καναλιού υπάρχει ένα είδος καλύμματος (cap domain) το οποίο αποτελείται από δυο μεγάλες θηλίες που περιβάλλουν την έλικα α4 (αμινοξέα 161 - 235) (Σχήμα 2.2). Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δυο ασύμμετρων μονάδων του ενζύμου είναι η σχετική θέση αυτού του καλύμματος. Η έλικα α4 παίρνει μέρος στο πακετάρισμα κατά τη κρυσταλλοποίηση και οι διαφορετικές διαμορφώσεις τις οποίες παρουσιάζει συνηγορούν ότι αυτό το κάλυμμα είναι ευέλικτο. Έτσι, παρόλο που η είσοδος της κοιλότητας αυτής είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη, η καταλυτική τριάδα είναι θαμμένη στο βάθος αυτής. Το κανάλι λοιπόν είναι φραγμένο στο ένα άκρο αλλά διαθέτει μια ευρεία έξοδο στη κορυφή του στη περιοχή του διαλύτη.



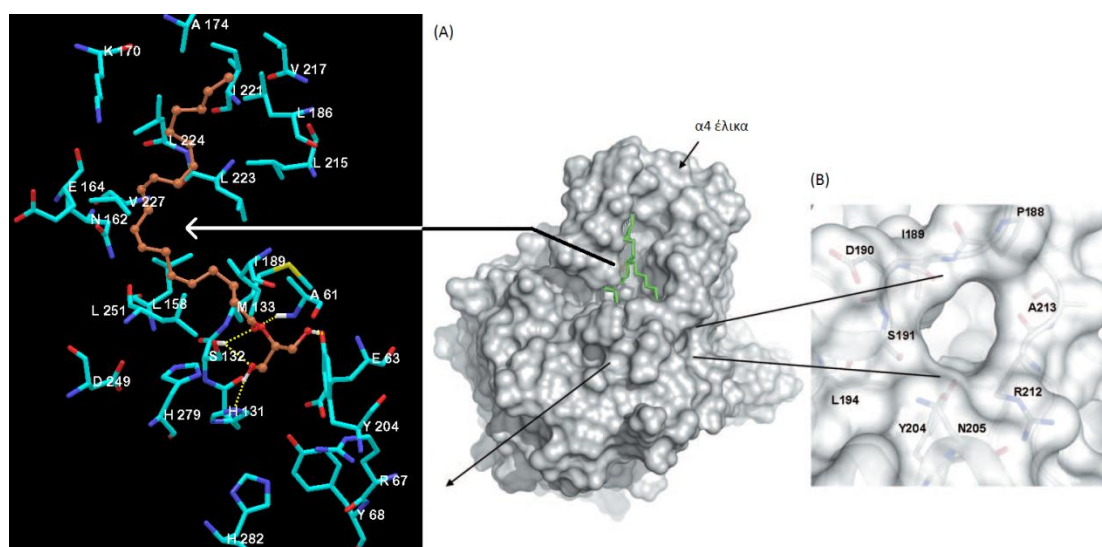
Σχήμα 2.2: Στα αριστερά παριστάνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου και στα δεξιά το σημείο εισόδου του υδρόφοβου καναλιού.

Εντός της κοιλότητας και καθώς οδεύουμε προς το ενεργό κέντρο, η έλικα α4 είναι ουδέτερη και πολύ λιπόφιλη. Γι' αυτό, η έλικα αυτή οριοθετεί μια ζώνη αυξημένης υδροφοβικότητας στην επιφάνεια της MAGL. Επιπλέον, μαζί με τα αμινοξέα Leu184 και Leu186, η ζώνη αυτή αποτελεί ιδανικό σημείο εισόδου για το κανάλι και το ενεργό κέντρο (Σχήμα 2.2). Τα άπολα και λιπόφιλα αμινοξέα της έλικας α4 δεν κατευθύνονται ούτε προς το ενεργό κέντρο, ούτε και προς την είσοδο της κοιλότητας, αλλά περισσότερο προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει ότι η MAGL βρίσκεται στο κύτταρο ως ένα αμφίφιλο ένζυμο και αυτή η υδρόφοβη έλικα επιτρέπει ή να έρθει σε επαφή είτε να προσκολληθεί στη μεμβράνη με σκοπό να φτάσει τα λιπόφιλα υποστρώματα. Στη συνέχεια, η διαμόρφωση της κοιλότητας σε συνδυασμό με το υδρόφοβο περιστόμιο αποτελούν ιδανικό σημείο εισόδου για υδρόφοβα και ογκώδη μόρια όπως και η 2-AG. Τρία ακόμη αμινοξέα (Asn162, Glu164 και Lys170) περιβάλλουν τη μια πλευρά του περιστομίου από το οποίο γίνεται η είσοδος στο ενεργό κέντρο. Αυτά τα αμινοξέα θεωρείται ότι παρέχουν στη MAGL τον τρόπο να αντιδράσουν μέσω αλληλεπιδράσεων ιόντος-διπόλου και διπόλου-διπόλου, με το πολικό τμήμα της εκάστοτε ένωσης (γλυκερόλη για τη 2-AG) προτού βυθιστεί στο άκρο της κοιλότητας. Εναλλακτικά, η Lys170 μπορεί να αλληλεπιδράσει με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των φωσφολιπιδίων. Συνολικά λοιπόν, η MAGL μπορεί να προσελκύσει τα λιπιδικά υποστρώματα από το μεμβρανικό περιβάλλον και να τα οδηγήσει στο ενεργό κέντρο ώστε να σταματήσει τη δράση τους. Μια πληθώρα υδρόφοβων αμινοξέων σχηματίζουν το κανάλι που οδηγεί από την επιφάνεια στη πυρηνόφιλη σερίνη. Συγκεκριμένα τα αμινοξέα Leu158, Ala174, Leu186, Ile189, Leu215, Val217, Ile221, Leu223, Leu224, Val227 και Leu251 είναι διευθετημένα στο χώρο έτσι ώστε να αλληλεπιδρούν με το υδρόφοβο τμήμα της εκάστοτε ένωσης και με αυτό τον τρόπο να επιδρούν στην εκλεκτικότητα της MAGL σε λιπιδικά υποστρώματα. Το σε χωρική εγγύτητα περιβάλλον της καταλυτικής τριάδας παρουσιάζει περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα από ότι το κανάλι όπως παριστάνεται και στο σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3: Χάρτης υδροφιλικότητας-υδροφοβικότητας της κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL με το φυσικό υπόστρωμα προσδεμένο σε αυτή. Με πορτοκαλί παριστάνεται το υδρόφοβο κανάλι που σχηματίζουν τα αντίστοιχα αμινοξέα.

Πλησίον του ενεργού κέντρου, υπάρχουν τα αμινοξέα Ala61 και Met133 τα οποία σχηματίζουν την οπή οξυανιόντος χρησιμοποιώντας την αμινομάδα τους, σταθεροποιώντας τη πρόσδεση της εκάστοτε ένωσης με το σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιαμέσου. Η οπή αυτή δεν προϋπάρχει στο ένζυμο αλλά σχηματίζεται κατά την είσοδο του προσδέματος. Πέραν της οπής οξυανιόντος, η υδροξυλομάδα της Tyr68, η αμινομάδα των His131 και His282, το καρβοξύλιο της Glu63, το καρβονύλιο της Ala61 και η γουανιδίνη της Arg67 οριοθετούν μια πολική κοιλότητα στην οποία προσαρμόζεται η πολική κεφαλή γλυκερόλης της 2-AG. Το υδρόφιλο τμήμα της γλυκερόλης της 2-AG αλληλεπιδρά με τη καρβονυλομάδα της Ala61, την αλκοόλη της Tyr204 και το καρβοξύλιο της Glu63. Η His131 μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά με τη γλυκερόλη και συνεπώς να συμμετέχει στην εκλεκτικότητα της MAGL. Το φυσικό υπόστρωμα στο υδρόφοβο κανάλι και η αλληλεπίδρασή του με τη καταλυτική τριάδα και την οπή οξυανιόντος παρίστανονται στο σχήμα 2.4A.

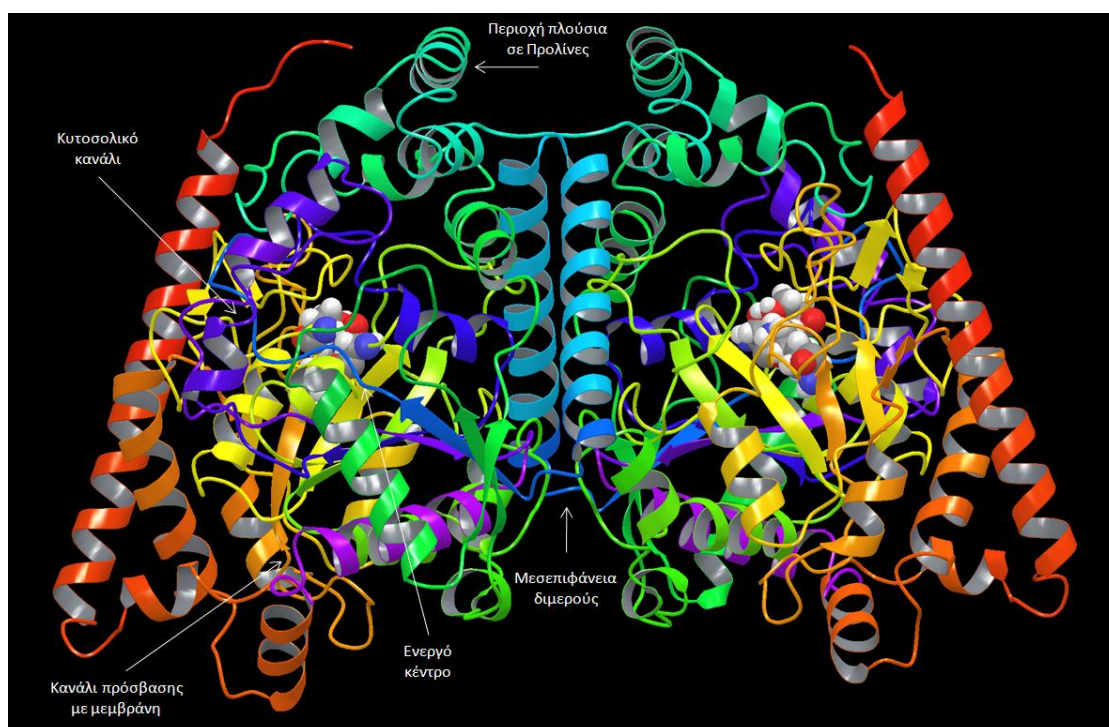


Σχήμα 2.4: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της MAGL. Στο (Α) το φυσικό υπόστρωμα προσδεμένο στο υδρόφοβο κανάλι με τη καταλυτική τριάδα και την οπή οξυανιόντος και στο (Β) το μικρό άνοιγμα, σημείο εξόδου της γλυκερόλης

Στο φραγμένο εσωτερικό άκρο του καναλιού υπάρχει ένα μικρό άνοιγμα, διαμέτρου 5 Å, το οποίο συνδέει το ενεργό κέντρο του ενζύμου με την πρωτεΐνη. Αυτό το μικρό κανάλι που απαρτίζεται από τα αμινοξέα Pro188 έως Ser191, Leu194, Tyr204, Asn205, Arg212 και Ala213, είναι κάθετο ως προς το κεντρικό κανάλι και οδηγεί από την υδρόφιλη κοιλότητα του ενεργού κέντρου στη μεμβρανική περιοχή (Σχήμα 2.4B). Με βάση αυτά τα δεδομένα αποτελεί ιδανικό σημείο εξόδου για το υδρόφιλο προϊόν της υδρόλυσης της εκάστοτε ένωσης και ειδικότερα της γλυκερόλης για τη 2-AG. Το υπόλοιπο υδρόφοβο προϊόν της υδρόλυσης ακολουθεί την αντίστροφη πορεία και απομακρύνεται στο κυτοσολικό τμήμα του κυττάρου. Το σχήμα του καναλιού είναι ταυτόσημο στα δυο μόρια της ασύμμετρης μονάδος, κάτι το οποίο σημαίνει ότι το κανάλι δεν επηρεάζεται κατά τη κρυσταλλοποίηση.

2.2 Τριτοταγής δομή της αμιδοϋδρολάσης του λιπαρού οξέος

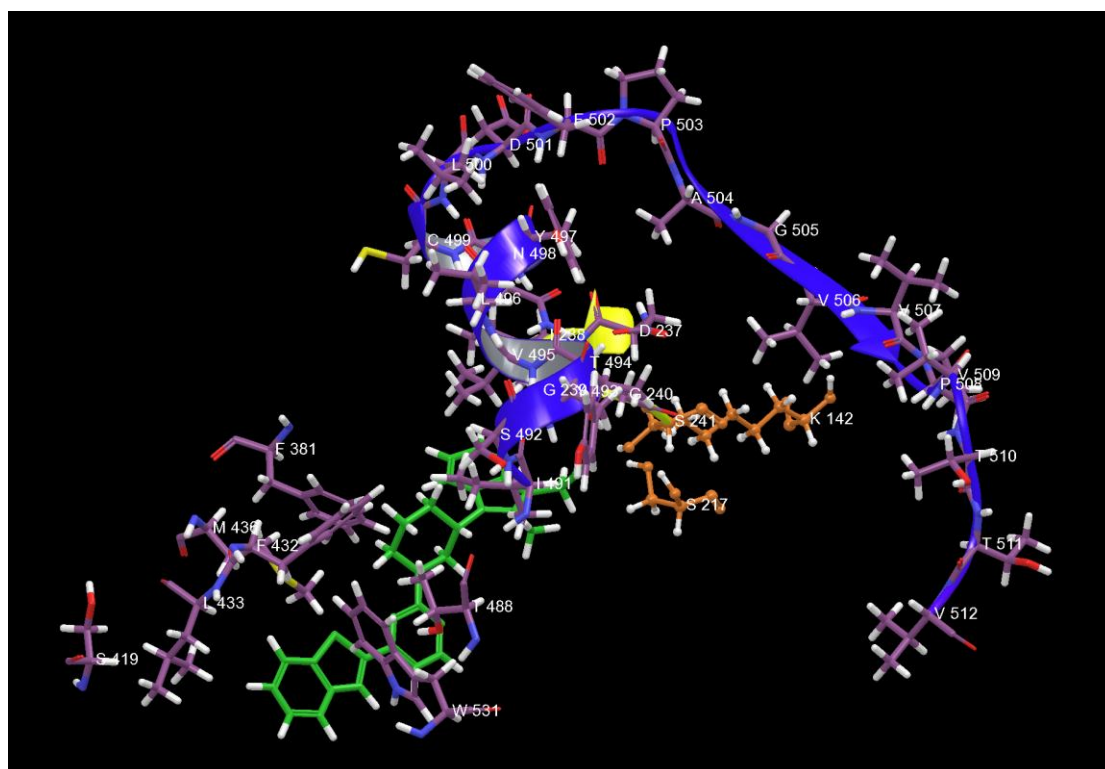
Η FAAH είναι το κύριο ένζυμο καταβολισμού του AEA και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια των αμιδασών. Το μόριο διαθέτει στο N-τελικό άκρο μια αλληλουχία αμινοξέων (από το 9 έως το 29) η οποία αποτελεί την ταυτότητα των αμιδασών (Amidase signature, AS). Σε αυτή την περιοχή βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο καθώς και μια περιοχή πλούσια σε προλίνες η οποία μπορεί να αποτελεί τόπο αλληλεπίδρασης της FAAH με άλλες πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη δραστηριότητά της και την υποκυτταρική της τοποθέτηση. Η FAAH διαθέτει 579 αμινοξέα και εμφανίζεται ως διμερές ένζυμο. Επίσης διαθέτει πολλαπλά κανάλια τα οποία επιτρέπουν την αυθόρμητη πρόσβαση του ενζύμου τόσο στη μεμβρανική όσο και στη κυτοσολική πλευρά του κυττάρου και βοηθούν στη δέσμευση του υποστρώματος και στην απελευθέρωση του προϊόντος. Η δομική αρχιτεκτονική της FAAH είναι τέτοια, ώστε να επιτρέπει την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο, αφού πρώτα αυτό περάσει διαμέσου της μεμβράνης. Μετά την υδρόλυση του υποστρώματος, το υδρόφοβο λιπαρό οξύ θα βγει μέσα από το μεμβρανικό κανάλι, ενώ το υδρόφιλο αμίδιο θα βγει μέσα από το κυτοσολικό. Το κυτοσολικό κανάλι είναι πιθανό να παίζει έναν επιπλέον ρόλο στην είσοδο των μορίων του νερού που απαιτούνται. Οι επιμέρους περιοχές της δομής της FAAH παριστάνονται στο σχήμα 2.5.



Σχήμα 2.5: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής της FAAH

Η μελέτη της δομής της FAAH αποκάλυψε ότι διαθέτει επίσης μια πολύ καλά προστατευμένη καταλυτική τριάδα της οικογένειας των αμιδασών, η οποία αποτελείται από τα αμινοξέα Ser241, Ser217 και Lys142. Μετά την εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων του ενζύμου και με τη χρήση σημειακών μεταλλάξεων σε σερίνες της περιοχής ταυτότητας των αμιδασών, αποδείχθηκε πως η Ser217 και η Ser241 εμπλέκονται στο μηχανισμό της

κατάλυσης. Η Ser241 είναι το πυρηνόφιλο κέντρο, ενώ σημαντικό ρόλο στη κατάλυση έχει και η Lys142, η οποία δρα ως γενικός οξεοβασικός καταλύτης. Ο ρόλος της Ser217 δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένος, εικάζεται όμως ότι μπορεί να δρα ως γέφυρα μεταξύ των άλλων δύο αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Με χρήση σημειακών μεταλλάξεων βρέθηκε επίσης ότι τα αμινοξέα Ser419 και Ser492 έως Val512 είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση του λιπαρού οξέος στο ένζυμο. Μια ξεχωριστή μελέτη πρότεινε ότι η Lys142 είναι υπεύθυνη για την εξειδίκευση υποστρώματος αφού η σημειακή μετάλλαξη του αμινοξέος άλλαξε την προτίμηση του ενζύμου από αμίδιο>εστέρα σε εστέρα>αμίδιο. Η κοιλότητα του ενεργού κέντρου και η καταλυτική τριάδα της FAAH παρίστανται στο σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6: Η κοιλότητα του ενεργού κέντρου και η καταλυτική τριάδα της FAAH. Με πορτοκαλί χρώμα παρίστανται τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας QK5.

Συμπερασματικά, μπορεί να λεχθεί ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει πρόσδεση της αλυσίδας του λιπαρού οξέος του υποστρώματος στη FAAH από τα αμινοξέα 419, 492-512 και πυρηνόφιλη προσβολή του άνθρακα του διπλού δεσμού από τη Ser241. Επιπλέον, η Lys142 δρα ως βάση ενεργοποιώντας και σταθεροποιώντας τη Ser241 και η Ser217 σταθεροποιεί το ανιόν του οξυγόνου το οποίο προκύπτει από τη πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού.

2.3 Κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου της μονοακυλογλυκερόλης

Μέχρι σήμερα, στη βάση δεδομένων Brookhaven Protein Data Bank στο διαδίκτυο, υπάρχουν τέσσερις κρυσταλλογραφικές μελέτες για το ένζυμο της λιπάσης της μονοακυλογλυκερόλης τόσο στην απο- όσο και στην υποκατεστημένη της μορφή. Η πρώτη έχει κωδικό 3HJU και καταχωρήθηκε από τους Labar *et al*^[39]. Η δεύτερη και η τρίτη έχουν κωδικούς 3JWE και 3JW8 αντίστοιχα, και καταχωρήθηκαν από τους Bertrand *et al*^[40]. Τέλος, η πιο πρόσφατη έχει κωδικό 3PE6 και καταχωρήθηκε τον Φεβρουάριο του 2011 από την ομάδα της Schalk-Hihi *et al*^[41].

2.3.1 Κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3HJU

Η συγκεκριμένη κρυσταλλογραφική μελέτη^[39] καταχωρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του Μαΐου του 2009 ενώ η δομή της στη διαδικτυακή βάση δεδομένων δημοσιεύθηκε στις αρχές Δεκεμβρίου του ίδιου χρόνου με κωδικό 3HJU. Τελευταία φορά τροποποιήθηκε στα τέλη Ιανουαρίου του 2010. Η διακριτική ικανότητα λήψεως των κρυστάλλων ήταν στα 2,2 Å. Στη προκείμενη μελέτη το φυσικό ένζυμο εμφανίζεται ως διμερές και εντός της κοιλότητας του ενεργού κέντρου υπάρχουν μόρια γλυκερόλης. Για κάθε ασύμμετρη μονάδα, στο καταλυτικό κέντρο υπάρχει και από ένα μόριο γλυκερόλης. Τα μόρια αυτά δε χρησιμοποιούνται ως υποκαταστάτες αλλά για να διατηρηθεί το σχήμα της κοιλότητας του ενεργού κέντρου στις δυο ασύμμετρες μονάδες.

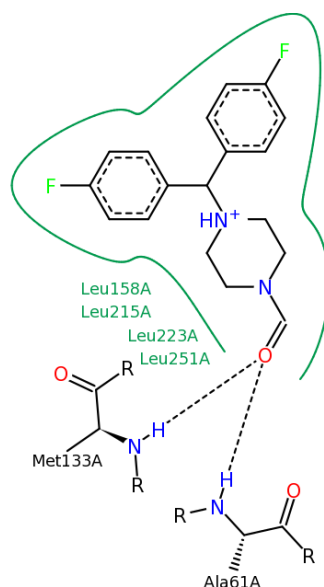
2.3.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικό 3JW8 και 3JWE

Οι δυο κρυσταλλογραφικές μελέτες παραπέμπουν στο ίδιο άρθρο^[40]. Στη πρώτη το φυσικό ένζυμο βρίσκεται στην απο- μορφή ενώ στη δεύτερη είναι προσδεμένος ο αναστολέας 1-[δις(4-φθοροφαινυλο)μεθυλο]-4-(1H-1,2,4-τριαζολ-1-υλκαρβονυλο)πιπεραζίνη (SAR629) στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη κρυσταλλογραφική μελέτη καταχωρήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα Σεπτεμβρίου του 2009 ενώ η δομή της στη διαδικτυακή βάση δεδομένων δημοσιεύθηκε στα τέλη Δεκεμβρίου του 2009 και δόθηκαν οι κωδικοί 3JW8 και 3JWE αντίστοιχα. Τελευταία φορά τροποποιήθηκε στα μέσα Αυγούστου του 2010.

Για τη κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3JW8 η διακριτική ικανότητα λήψεως των κρυστάλλων ήταν στα 2,10 Å. Η πρωτεΐνη εμφανίζεται ως διμερές και στη κοιλότητα του ενεργού κέντρου στη μια ασύμμετρη μονάδα υπάρχουν τέσσερα και στη δεύτερη τρία μόρια 2-μεθυλο-πεντανο-2,4-διόλης (MPD). Το επιπλέον μόριο MPD στην πρώτη ασύμμετρη μονάδα χρειάζεται για τη σταθεροποίηση της θέσης της α4 έλικας. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να βοηθήσουν την ανάπτυξη των κρυστάλλων. Επίσης ορισμένα αμινοξέα μεθειονίνης, από οκτώ σε κάθε μονομερές, έχουν μετατραπεί σε σεληνομεθειονίνες. Αυτή η μετατροπή βοηθά στη διευκρίνιση της δομής της πρωτεΐνης κατά τη κρυσταλλογραφία με χρήση ακτίνων Χ.

Για τη κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3JWE η διακριτική ικανότητα λήψεως των κρυστάλλων ήταν στα 2,70 Å. Η φυσική πρωτεΐνη όπως και πριν εμφανίζεται ως διμερές. Στη μια ασύμμετρη μονάδα βρίσκεται προσδεμένος ο αναστολέας SAR629 μέσω ομοιοπολικού δεσμού με το αμινοξύ Ser132 της καταλυτικής τριάδας και μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala61 και

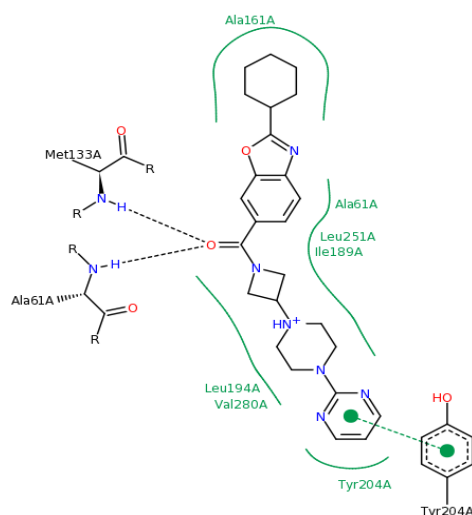
Met133 (οπή οξυανιόντος), όπως παριστάνεται στο σχήμα 2.7. Στη δεύτερη ασύμμετρη μονάδα υπάρχει ακριβώς ο ίδιος αναστολέας προσδεμένος με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και με την ίδια διευθέτηση αλλά και ένα επιπλέον δεύτερο μόριο του ίδιου αναστολέα ακριβώς από πάνω από το προηγούμενο, στη κοιλότητα του ενεργού κέντρου χωρίς να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι αυτό το δεύτερο μόριο δε σχετίζεται με τον μηχανισμό αναστολής, αλλά η παρουσία του οφείλεται μάλλον στην πολύ μεγάλη συγκέντρωση του λιπόφιλου αναστολέα σε σχέση με αυτή της πρωτεΐνης.



Σχήμα 2.7: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης SAR629 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της MAGL

2.3.3 Κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3PE6

Η πιο πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη έχει κωδικό 3PE6^[41], καταχωρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη Οκτωβρίου του 2010 και η δομή της στη διαδικτυακή βάση δεδομένων δημοσιεύθηκε στις αρχές Μαρτίου του 2011. Η διακριτική ικανότητα λήψεως των κρυστάλλων ήταν 1,35 Å, δηλαδή αυξημένη συγκριτικά με τις προηγούμενες μελέτες. Ωστόσο, η πρωτεΐνη σε αντίθεση με τις προηγούμενες αναφερόμενες μελέτες, εμφανίζεται ως μονομερές και έχει υποστεί μεταλλάξεις. Η Lys46 έχει μεταλλαχθεί σε Ala46, η Leu179 σε Ser179 και τέλος η Leu186 σε Ser186. Τέλος, στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου είναι προσδεμένος ο αναστολέας (2-κυκλοεξυλο-1,3-βενζοξαζολ-6-υλ){3-[4-(πυριμιδιν-2-υλ)πιπεραζιν-1-υλ]αζετιδιν-1-υλ}μεθανόνη, (ZYH) μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala61 και Met133 της οπής οξυανιόντος, όπως παριστάνεται στο σχήμα 2.8.



Σχήμα 2.8: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης ZYH με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της MAGL

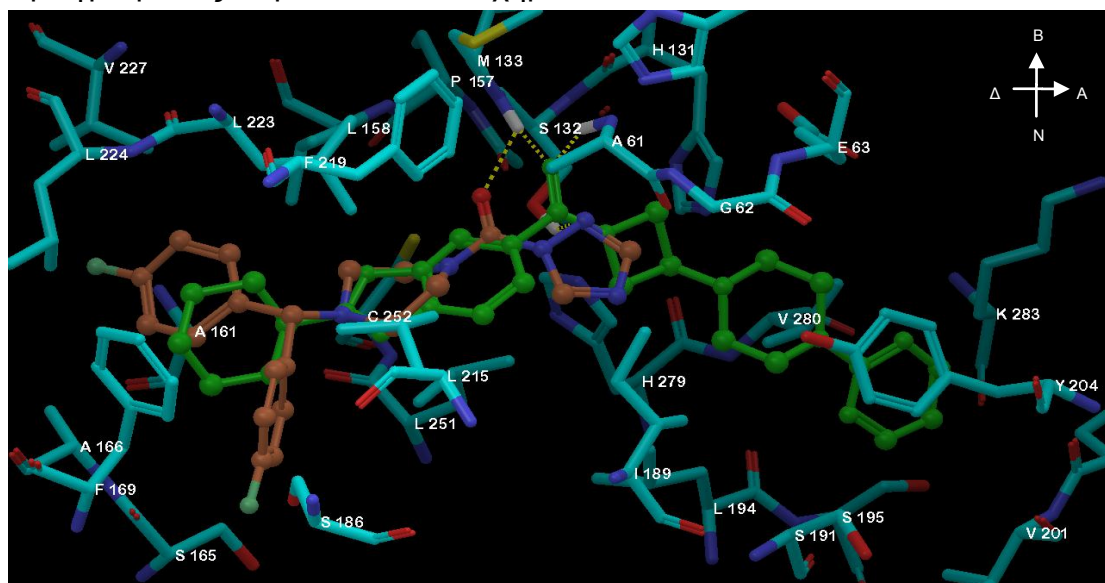
2.4 Σύγκριση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών

Συγκρίνοντας τις τέσσερις διαθέσιμες κρυσταλλογραφικές μελέτες για το ένζυμο της MAGL προκύπτουν τα παρακάτω. Στις τρεις πρώτες το ένζυμο διαθέτει δυο ασύμμετρες μονάδες ενώ στη πιο πρόσφατη μελέτη εμφανίζεται ως μονομερές. Υπέρθεση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου που προέκυψε από τις τέσσερις κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνει ότι η πλειονότητα των ατόμων άνθρακα σχεδόν ταυτίζονται, με πολύ μικρή απόκλιση. Ωστόσο, ένα μικρό κομμάτι του ενζύμου στη περιοχή του καλύμματος (lid-domain) και συγκεκριμένα η περιοχή των αμινοξέων από 161 έως 183 εμφανίζει μεγάλες αποκλίσεις. Στις τρεις πρώτες κρυσταλλογραφικές μελέτες το κάλυμμα είναι ανοιχτό (όπως συμβαίνει στη φυσική πρωτεΐνη), ενώ στη πιο πρόσφατη το κάλυμμα είναι κλειστό (όπως συμβαίνει μετά την είσοδο της εκάστοτε ένωσης στη κοιλότητα).

Όπως προκύπτει από τη σύγκριση των κρυσταλλογραφικών μελετών με κωδικό 3HJU και 3PE6, το κάλυμμα υφίσταται αναδιάρθρωση έπειτα από τη πρόσδεση αναστολέα. Η μετάβαση από την ανοιχτή μορφή στην κλειστή που περιέχει τον αναστολέα, μπορεί να περιγραφεί ως η κυλιόμενη κίνηση της α4 έλικας πάνω από το καταλυτικό κέντρο που έχει ως αποτέλεσμα μία σχεδόν κατά 180° περιστροφή της κατά φορά αντίθετη από αυτή των δεικτών του ρολογιού. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, της μετατόπισης της α4 έλικας (αμινοξέα από 168 έως 180 στην ανοιχτή διεύθετηση) επίσης ενσωματώνονται τα αμινοξέα 163 έως 167 στο N τελικό άκρο της. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της εσωτερικής συσπείρωσης είναι ότι η είσοδος στο ενεργό κέντρο φράσσεται σε σημαντικό βαθμό, θάβοντας σχεδόν εξολοκλήρου τον αναστολέα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Το μικρό άνοιγμα στο πλάι του ενεργού κέντρου, από το οποίο θεωρείται ότι απομακρύνεται η γλυκερόλη που παράγεται από την υδρόλυση, είναι τελείως κλειστό και αυτό επίσης οφείλεται σε αυτή τη δομική αναδιάρθρωση του ενζύμου.

Όσο αφορά τις κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικό 3JWE και 3JW8, στη πρώτη το ένζυμο βρίσκεται στην απο- μορφή και στη δεύτερη στο ένζυμο είναι

προσδεμένος αναστολέας. Στη κρυσταλλογραφική μελέτη με τον αναστολέα το ένζυμο εμφανίζεται ως διμερές. Στη μία ασύμμετρη μονάδα υπάρχει ένα μόριο του αναστολέα SAR629 προσδεμένο με ομοιοπολικό δεσμό με το τελικό οξυγόνο της καταλυτικής σερίνης 132, ενώ στη δεύτερη ασύμμετρη μονάδα υπάρχουν δυο μόρια του ίδιου αναστολέα. Το ένα μόριο του αναστολέα συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με τη σερίνη 132 με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που συνδέεται και το προηγούμενο μόριο στη πρώτη μονάδα, ενώ το δεύτερο είναι σφηνωμένο ακριβώς από πάνω από το προηγούμενο χωρίς σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού. Οι συγγραφείς θεώρησαν ότι το επιπλέον μόριο αναστολέα οφείλεται απλά στην υψηλή περίσσεια συγκέντρωσης του αναστολέα στο συγκεκριμένο πείραμα. Η φυσική πρωτεΐνη όμως βρίσκεται στην ανοιχτή μορφή της, σε αντίθεση με την κλειστή δομή που αναφέρεται στη μελέτη 3PE6. Χρησιμοποιώντας τον αναστολέα της κρυσταλλογραφικής μελέτης 3PE6 στη μελέτη με κωδικό 3JW8, παρατηρείται ότι εκτείνεται σε όλη τη περιοχή του ενεργού κέντρου αλλά περιορίζεται στην ανατολική πλευρά λόγω της κλειστής κοιλότητας, αφήνοντας πολύ μικρό χώρο για βελτιστοποίηση του αναστολέα. Στην δυτική πλευρά της κοιλότητας, η α4 έλικα στη κλειστή διαμόρφωση δημιουργεί ένα τείχος γύρω από το ενεργό κέντρο από τη πλευρά της κυκλοεξυλο ομάδας. Ο αναστολέας SAR629 είναι τοποθετημένος προς το δυτικό μέρος της κοιλότητας με τις δυο χλωρο-φαινυλο ομάδες να είναι μερικώς εκτεθειμένες στο διαλύτη εξαιτίας της ανοιχτής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Ο αναστολέας SAR629 υιοθετεί μια διαμόρφωση στο χώρο σχήματος Υ με τις δυο χλωρο-φαινυλο ομάδες να κοιτούν προς αντίθετες κατευθύνσεις και να είναι κάθετες μεταξύ τους. Εκτός από μεταξύ τους αυτές οι ομάδες είναι κάθετες και ως προς τον 'σύνδεσμο πιπεριδίνης' υιοθετώντας μια διαμόρφωση ανάκλιντρου. Πέρα του ομοιοπολικού δεσμού ο αναστολέας αλληλεπιδρά με το ένζυμο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ελάχιστων πολικών αλληλεπιδράσεων. Η τοποθέτηση στο χώρο εντός της κοιλότητας του ενζύμου καθώς και η υπέρθεση των αναστολέων SAR629 και ZYH που αναφέρθηκε προηγουμένως παρίστανται στο σχήμα 2.9.



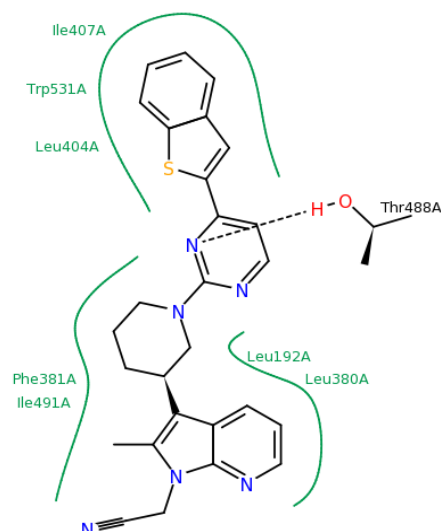
Σχήμα 2.9: Υπέρθεση των δομών των αναστολέων SAR629 (πορτοκαλί χρώμα) και ZYH (πράσινο χρώμα) στη κοιλότητα του ενεργού κέντρου της MAGL

Μία από τις πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις του αναστολέα της κρυσταλλογραφικής μελέτης 3PE6 είναι ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού καρβονυλίου του με το αμινοξύ Met133. Το καρβαμίδικό καρβονύλιο του αναστολέα SAR629 της μελέτης 3JWE βρίσκεται περίπου στην ίδια θέση στο χώρο αλλά κατευθύνεται προς την αντίθετη κατεύθυνση αλληλεπιδρώντας με αυτό τον τρόπο με τα αμινοξέα Ala61 και Met133 ταυτόχρονα. Μία πιο ενδελεχής ανάλυση της υπέρθεσης των δυο αυτών συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-αναστολέα αποκαλύπτει ότι ο αναστολέας SAR629 δε θα μπορούσε να προσδεθεί στη κλειστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης αφού τόσο ο δακτύλιος του τριαζολίου όσο και οι δύο φθορο-βένζυλο ομάδες του αναστολέα δεν θα χωρούσαν στη κοιλότητα της πρωτεΐνης, κάτι που θα προκαλούσε αλλοίωση του μορίου. Σε αντίθεση με αυτό ο αναστολέας της μελέτης 3PE6 θα μπορούσε να προσδεθεί και στην ανοιχτή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Κατά τη μετατροπή από την ανοιχτή στη κλειστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης το ενεργό κέντρο μεταβάλλεται, ειδικά η περιοχή του βρόχου που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 184 έως 192 και ο οποίος συνδέει την έλικα α4 με την έλικα α5, μετακινούμενο ανοδικά κοντύτερα στον αναστολέα, ελαττώνοντας το υδρόφοβο κανάλι.

2.5 Κρυσταλλογραφικές μελέτες της αμυδοϋδρολάσης των λιπαρών οξέων (FAAH)

Μέχρι σήμερα, στη βάση δεδομένων Brookhaven Protein Data Bank στο διαδίκτυο, υπάρχουν δεκαπέντε κρυσταλλογραφικές μελέτες για το ένζυμο της αμιδικής υδρολάσης των λιπαρών οξέων τόσο στην απο- όσο και στην υποκατεστημένη της μορφή. Η πρώτη δημοσιεύτηκε στις αρχές του Δεκεμβρίου του 2002 με κωδικό 1MT5^[42]. Στη συνέχεια ακολούθησαν οι κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικό 2VYA^[43], 2WAP^[44], 2WJ1^[45], 2WJ2^[45], 3K7F^[46], 3K83^[46], 3K84^[46], 3LJ6^[47], 3LJ7^[47], 3QK5^[48], 3QJ8^[49], 3QJ9^[49], 3QKV^[49] και η πιο πρόσφατη στο φυσικό ένζυμο με κωδικό 3OJ8^[50]. Στο σύνολο αυτών των κρυσταλλογραφικών μελετών έγιναν πειράματα επαλήθευσης (validation tests) τα οποία έδειξαν ότι η κρυσταλλογραφική μελέτη με κωδικό 3QK5^[48] είναι η καταλληλότερη για τα πειράματα εκλεκτικότητας.

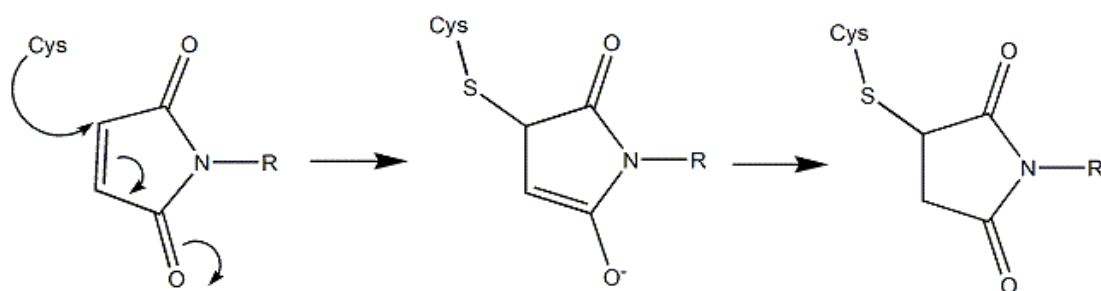
Η συγκεκριμένη κρυσταλλογραφική μελέτη καταχωρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη Ιανουαρίου του 2011 και η δομή της στη διαδικτυακή βάση δεδομένων δημοσιεύθηκε στις αρχές Απριλίου του 2011, ενώ τελευταία φορά τροποποιήθηκε στο δεύτερο μισό του ίδιου μήνα. Η πρωτεΐνη έχει απομονωθεί από εγκέφαλο αρουραίου. Οι κρυσταλλικές δομές προέκυψαν με χρήση ακτίνων Χ και η διακριτική ικανότητα λήψεως των κρυστάλλων ήταν στα 2,20 Å. Στη προκείμενη μελέτη το ένζυμο εμφανίζεται ως διμερές. Στο πρώτο μονομερές υπάρχουν ένα μόριο γλυκερόλης, έξι μόρια 1,2-αιθανοδιόλης και εντός της κοιλότητας του ενεργού κέντρου ένα μόριο (3-((3R)-1-[4-(1-βενζοθιοφαιν-2-υλ)πυριμιδιν-2-υλ]πιπεριδιν-3-υλ)-2-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-β]πυριδιν-1-υλ)ακετονιτριλίου (QK5) συνδεδεμένο μέσω δεσμών υδρογόνου (Σχήμα 2.10). Στο δεύτερο μονομερές υπάρχουν εννέα μόρια 1,2-αιθανοδιόλης και ένα μόριο QK5 στην αντίστοιχη θέση και συνδεδεμένο με τον ίδιο τρόπο όπως και στο πρώτο μονομερές.



Σχήμα 2.10: Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης QK5 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της FAAH

2.6 Τρόποι πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAGL

Οι πρώτοι αναστολείς της MAGL περιγράφηκαν 40 χρόνια πριν και αποτελούνται κυρίως από ενώσεις που αντιδρούν με την ομάδα σουλφυδρυλίου του αμινοξέος κυστεΐνης. Κυριότερος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το N-αιθυλομαλεϊμίδιο (NEM)^[51]. Βασιζόμενοι στο γνωστό τρόπο με τον οποίο προσδένεται το NEM και στο τρισδιάστατο μοντέλο της MAGL βρέθηκε ότι η πρόσδεση γίνεται με δύο κυστεΐνες που υπάρχουν στο ενεργό κέντρο της MAGL (Cys218 και Cys252). Η ομάδα του Saario^[52] συνέθεσε μια σειρά από παράγωγα του μαλεϊμιδίου των οποίων ο τρόπος πρόσδεσης περιλαμβάνει μια αντίδρασης προσθήκης (Michael addition) με ένα από τα αμινοξέα που διαθέτουν σουλφυδρυλ-ομάδα (Σχήμα 2.11).



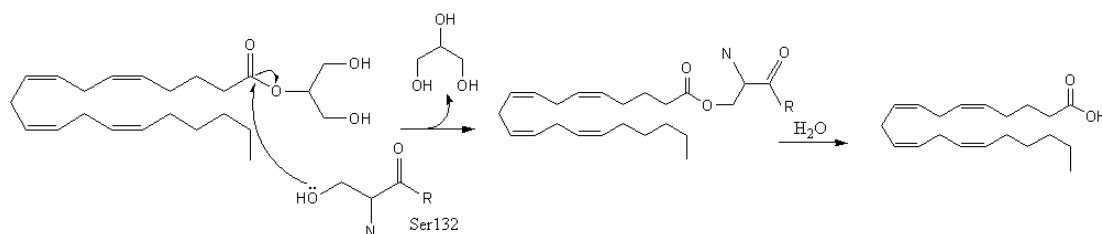
Σχήμα 2.11: Μηχανισμός αντίδρασης ενώσεων παραγώγων του μαλεϊμιδίου με τις κυστεΐνες πλησίον του ενεργού κέντρου της MAGL

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του N-αραχιδονυλομαλεϊμιδίου (NAM), το περισσότερο βιοδραστικό από τις ενώσεις αυτής της κατηγορίας. Το NAM παρά την υψηλή τιμή IC_{50} (0,14 μ M) προσδένεται ακόμη ισχυρότερα με τα ένζυμα της FAAH, ABHD6 και ABHD12. Αυτό δείχνει ότι το μόριο αυτό δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα. Παρ' όλα αυτά το NAM χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακολογικό μέσο για να αποκαλύψει τις συνέπειες της διακοπής δράσης της MAGL και να επιδείξει τη διαφορά επίδρασης μεταξύ 2-AG και AEA.

Παρόμοια και άλλες ενώσεις στοχεύουν τις κυστεΐνες του ενεργού κέντρου όπως τα δισουλφιράμη^[53] και δι(4-μεθυλ-1 πιπεραζινυλθειοκαρβονυλο)-δισουλφίδιο^[54] τα οποία προσδένονται με ένα από τα αμινοξέα Cys218 και Cys252, και τα μόρια οκτυλινόνη^[55] και πριστιμερίνη^[56] τα οποία προσδένονται με ένα από τα αμινοξέα Cys211 και Cys218.

Πέρα των ανωτέρω ενώσεων και ύστερα από πειράματα βρέθηκε ότι η υδρόλυση της 2-AG, τόσο από τη κυτοσολική όσο και από τη μεμβρανική MAGL, αναστέλλεται και από διάφορες κατηγορίες συστατικών που αποτελούν και αναστολείς της FAAH. Οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν φθοροφωσφονικά παράγωγα (MAFP)^[57,58] και σουλφονυλοφθορίδια (PMSF, HDSF)^[58], τα οποία είναι αναστολείς υδρολασών σερίνης αλλά και τριφθορομεθυλοκετόνες (ATFMK)^[57]. Η δράση του ενζύμου φαίνεται ακόμη ότι αναστέλλεται από ελεύθερα λιπαρά οξέα, όπως το αραχιδονικό οξύ. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για το ένζυμο από εγκεφαλικές μεμβράνες αρουραίου, από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, σε νευρώνες αρουραίου και σε μεμβρανική και κυτοσολική MAGL από εγκέφαλο χοίρου. Παρόλα αυτά κάποιοι ισχυροί αναστολείς της FAAH δεν επηρεάζουν την καταλυτική δράση της MAGL^[58]. Για παράδειγμα ο εκλεκτικός αναστολέας της FAAH, AA-5-HT, το α-κετο παράγωγο OL-53 και το URB597 το οποίο ανήκει στη κατηγορία των καρβαμικικών παραγώγων, δεν ανέστειλαν την αποικοδόμηση του 2-AG.

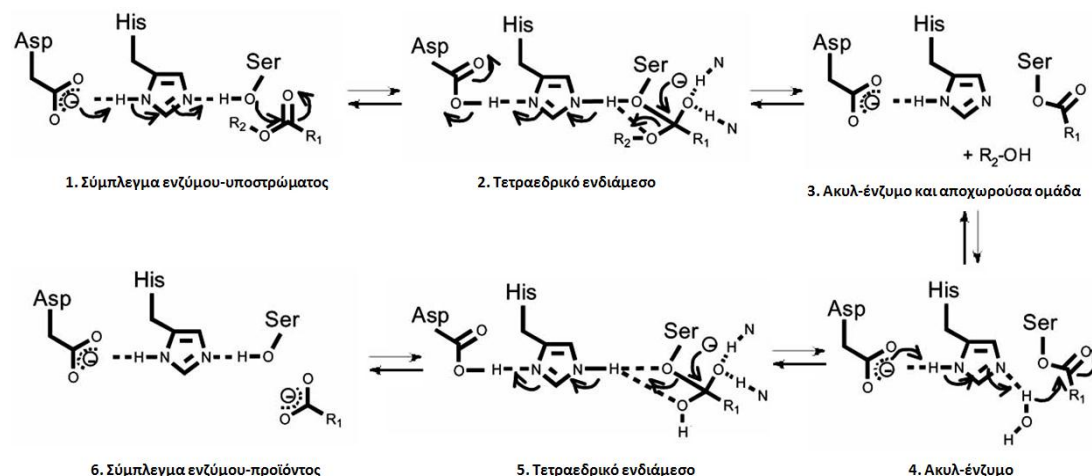
Τα αμινοξέα όμως που παίζουν τον κυριότερο ρόλο στη υδρόλυση της 2-AG είναι η Ser132, η Asp249 και η His279, τα αμινοξέα δηλαδή του ενεργού κέντρου^[38]. Η 2-AG που αποτελεί και το φυσικό υπόστρωμα της MAGL προσδένεται με το ένζυμο, σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με το αμινοξύ Ser132 όπως παριστάνεται στο σχήμα 2.12.



Σχήμα 2.12: Μηχανισμός αντίδρασης πρόσδεσης και υδρόλυσης της 2-AG στο ενεργό κέντρο της MAGL

Ο πιθανότερος μηχανισμός δράσης της καταλυτικής τριάδας είναι ο ακόλουθος^[59]. Όταν το υπόστρωμα πλησιάσει το ενεργό κέντρο, ο εστερικός του δεσμός υφίσταται υδρόλυση με βάση ένα μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν των σέρινο-πρωτεασών. Η κατάλυση ξεκινά με πυρηνόφιλη προσθήκη του υδροξυλίου της Ser132 στον ευάλωτο άνθρακα του καρβονυλίου του υποστρώματος. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση, η σερίνη ενεργοποιείται μέσω ενός δεσμού υδρογόνου που δημιουργεί με τη His279. Στη συνέχεια σχηματίζεται ένα τετράεδρο ακυλο-ένζυμο, το οποίο σταθεροποιείται από την οπή οξυανιόντος. Η κατάρρευση του τετραεδρικού ενδιάμεσου οδηγεί σε απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας και το σχηματισμό ενός δεύτερου συμπλέγματος ακυλο-ενζύμου. Τέλος, για να λάβει χώρα η απακυλίωση χρειάζεται η παρουσία ενός μορίου νερού στο ενεργό

κέντρο. Παρόμοια με τη καταλυτική σερίνη, το μόριο νερού ενεργοποιείται από ένα ισχυρό πυρηνόφιλο. Στο σχήμα 2.13 περιγράφεται συνολικά ο πιθανός μηχανισμός αντίδρασης της καταλυτικής τριάδας με το εκάστοτε υποστρώμα.



Σχήμα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού καταλυτικού μηχανισμού βασιζόμενος στη καταλυτική τριάδα της MAGL

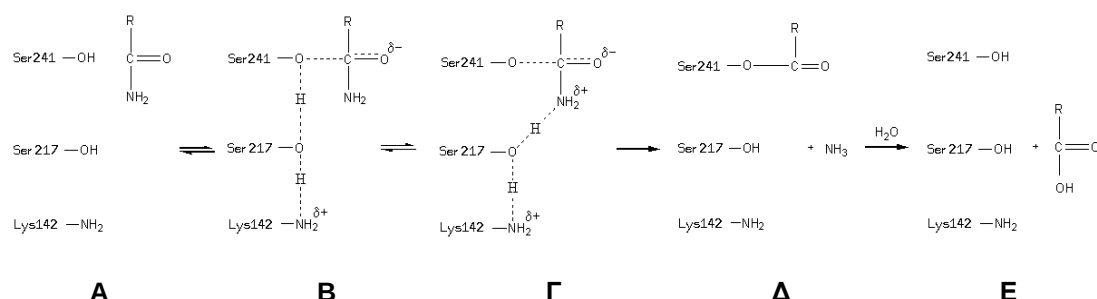
Οι μελέτες που αφορούν τη MAGL είναι πολύ λιγότερες σε αριθμό συγκριτικά με αυτές της FAAH και η πιο λεπτομερής ανάλυση και κατανόηση της δομής της θα ήταν πολύτιμη.

2.7 Τρόποι πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της FAAH

Για το μόριο της FAAH ο τρόπος πρόσδεσης των αναστολέων είναι πιο σαφής καθώς η κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το ενεργό κέντρο όπως και το άνοιγμα αυτής είναι μεγαλύτερο από τα αντίστοιχα της MAGL και σε αυτό οφείλεται και το πρόβλημα εκλεκτικότητας μεταξύ αυτών των δυο ενζύμων. Για τη διευκρίνιση του καταλυτικού μηχανισμού της FAAH αρχικά χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι αναστολείς. Με αυτό τον τρόπο βρέθηκε ότι η δράση του ενζύμου εμποδίζεται από ουσίες που αναστέλλουν πρωτεάσες σερίνης και κυστεΐνης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η FAAH έχει τη σερίνη ή τη κυστεΐνη να δρα ως πυρηνόφιλο στο ενεργό της κέντρο. Η υπόνοια αυτή μελετήθηκε αργότερα με τη χρήση σημειακών μεταλλάξεων στις σερίνες 217, 218 και 241 της αλληλουχίας ταυτότητας των αμιδασών (amidase signature). Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων ήταν να μειωθεί η καταλυτική δράση της FAAH, αποδεικνύοντας την ύπαρξη αυτών των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι η Ser241 είναι το καταλυτικό πυρηνόφιλο^[60].

Με την ίδια μέθοδο βρέθηκε ότι τα αμινοξέα 419 και 492-512 είναι υπεύθυνα για τη πρόσδεση του λιπαρού οξέος του υποστρώματος στη μεμβράνη. Ο προτεινόμενος μηχανισμός για το στάδιο της ακυλίωσης κατά την υδρόλυση των αμιδίων περιγράφεται στο σχήμα 2.14. Στο (Α) η Lys142 είναι αρχικά σε πρωτονιωμένη κατάσταση, στο (Β) παρουσιάζεται η Lys142 να αποσπά ένα πρωτόνιο από τη Ser217, η οποία με τη σειρά της αποσπά ένα πρωτόνιο από τη Ser241 που δρα ως πυρηνόφιλο, ενώ στο (Γ) η προσβολή του πυρηνόφιλου στο καρβονύλιο του υποστρώματος λαμβάνει χώρα με έναν

συζευγμένο τρόπο με προσφορά πρωτονίου στο άτομο του αζώτου της ομάδας του αμιδίου του υποστρώματος. Στο (Δ) επιτυγχάνεται η προσφορά ενός πρωτονίου από τη Lys142 στη Ser217, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου άκυλο ενζύμου, ενώ η Lys142 και η Ser217 επανέρχονται στις αρχικές τους καταστάσεις. Τέλος, με τη προσθήκη νερού το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση και απελευθερώνεται οξύ (Ε).

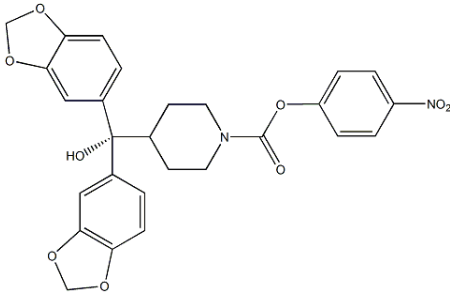
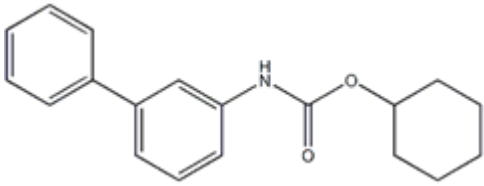
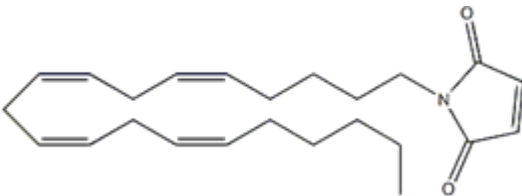
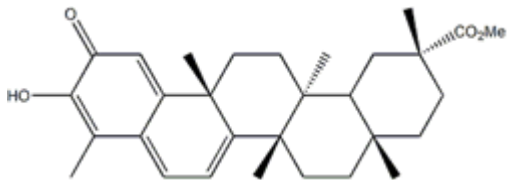


Σχήμα 2.14: Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδρόλυση αμιδίου που καταλύεται από τη FAAH

2.8 Κατηγορίες αναστολέων της MAGL^[40,59]

Μέχρι σήμερα υπάρχουν τέσσερις γνωστές κατηγορίες αναστολέων της MAGL. Η πρώτη περιλαμβάνει ενώσεις που αντιδρούν με τη Ser132 του ενεργού κέντρου, όπως η ένωση JZL184 και τα ανάλογα του φυσικού υποστρώματος, οι οποίες εμφανίζουν quasi-μη αντιστρεπτό μηχανισμό. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει μη ανταγωνιστικούς, μερικώς αντιστρεπτούς προσδέτες των οποίων η δομή δεν μοιάζει με αυτή των ενδογενών καννβινοειδών, όπως ο URB602, επιδεικνύουν αναλγητική δράση, όμως είναι αρκετά ασθενείς και εμφανίζουν χαμηλή εκλεκτικότητα ως προς τη MAGL. Στη τρίτη κατηγορία ανήκουν ενώσεις οι οποίες αντιδρούν με αμινοξέα κυστεΐνης που βρίσκονται κοντά στη καταλυτική τριάδα, όπως ο NAM. Οι ενώσεις που ανήκουν στη πρώτη κατηγορία θεωρείται ότι σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το αμινοξύ Ser132 της καταλυτικής τριάδας και οι ενώσεις της τρίτης κατηγορίας με ένα από τα αμινοξέα Cys211, Cys218, Cys252 πλησίον του ενεργού κέντρου αντίστοιχα. Τέλος υπάρχει και μια τέταρτη κατηγορία όπως ανακαλύφθηκε πρόσφατα, τα φυσικά τερπενοειδή των οποίων η δομή διαφέρει πολύ από αυτή των υπολοίπων δομών που έχουν μελετηθεί. Οι προσδέτες αυτοί της MAGL βασίζονται στην ισοθιαζολόνη, όπως η ένωση πριστιμερίνη, ο πιο ισχυρός αναστολέας που προέρχεται από αυτή τη κατηγορία, οι οποίοι παρουσιάζουν έναν αντιστρεπτό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με τη MAGL και είναι οι μοναδικοί αναστολείς που συνδέονται μόνο μέσω δεσμών υδρογόνου, συνήθως με τα αμινοξέα Cys211 ή Cys218 ή Cys252. Συνοπτικά οι κυριότεροι εκφραστές της κάθε κατηγορίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2.1.

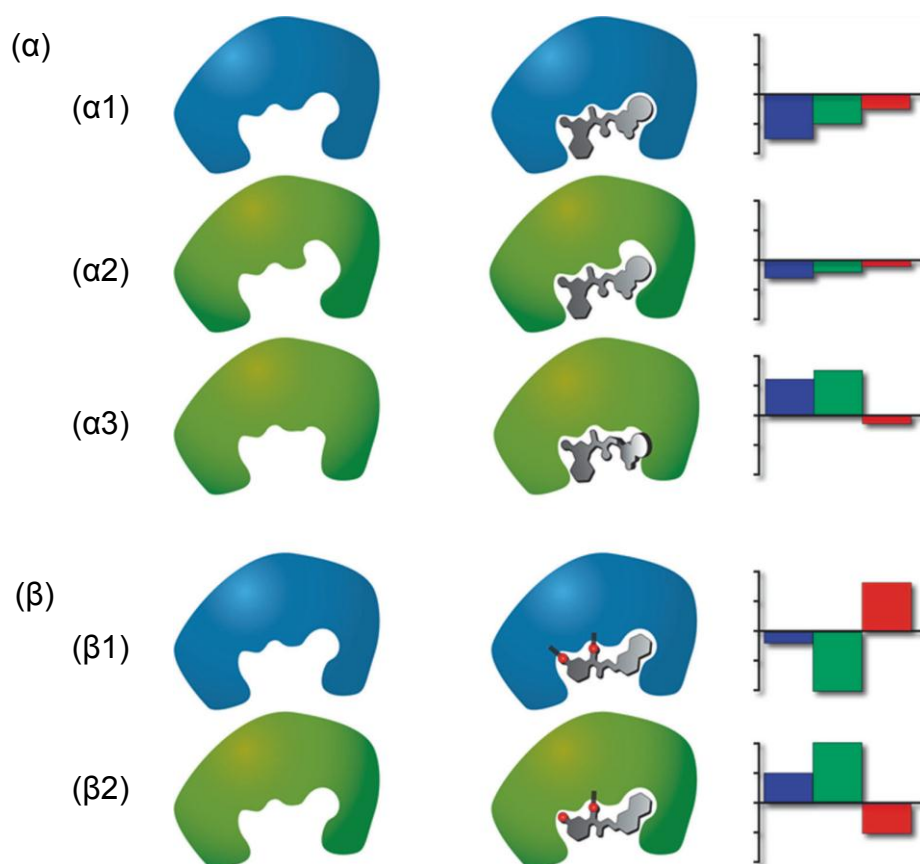
Πίνακας 2.1: Οι 4 κατηγορίες αναστολέων της MAGL

ΤΑΞΗ Α	ΤΑΞΗ Β
- Αλληλεπίδραση με τη Ser132 - Μέσω quasi-μη αντιστρεπτού μηχανισμού - Πρόσδεση με ομοιοπολικό δεσμό	- Αλληλεπίδραση με τη Ser132 - Μη ανταγωνιστικοί - Μέσω μερικώς αντιστρεπτού μηχανισμού - Πρόσδεση με ομοιοπολικό δεσμό
 JZL184	 URB602
ΤΑΞΗ Γ	ΤΑΞΗ Δ
- Αλληλεπίδραση με μια από τις Cys 211-218-252 - Μέσω quasi-μη αντιστρεπτού μηχανισμού - Πρόσδεση με ομοιοπολικό δεσμό	- Αλληλεπίδραση με μια από τις Cys 211-218-252 - Μέσω αντιστρεπτού μηχανισμού - Πρόσδεση με δεσμούς υδρογόνου
 NAM	 Pristimerin

2.9 Εκλεκτικότητα κατά τη μοριακή πρόσδεση^[61]

Η εκλεκτικότητα μεταξύ μορίων τα οποία εμφανίζουν παρεμφερή δομή και δραστηριότητα, όπως συμβαίνει με τα ένζυμα MAGL και FAAH, είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί. Στη μοριακή πρόσδεση είναι επιθυμητή η βαθμονόμηση με τη χαμηλότερη αρνητική τιμή μεταβολής ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG). Όπως προκύπτει από την εξίσωση $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, η ΔG προέρχεται από τη συνεισφορά του ενθαλπικού (ΔH) και του εντροπικού (ΔS) παράγοντα. Στην περίπτωση (α) ενός υδρόφοβου μορίου, το ιδανικό θα ήταν να έχει καλή συμπληρωματικότητα με το μόριο στόχο και να προσδένεται ευνοϊκά στο ενεργό του κέντρο. Σε αυτή τη περίπτωση (α1) η ΔG παίρνει μεγάλη αρνητική τιμή, έχοντας συνεισφέρει σε αυτό τόσο ο ενθαλπικός όσο και ο εντροπικός παράγοντας. Για να επιτευχθεί εκλεκτικότητα σε σχέση με έναν άλλο υποδοχέα στόχο θα πρέπει η ίδια ένωση να μην έχει το ίδιο ευνοϊκή συμπληρωματικότητα. Σε αυτή τη περίπτωση (α2) ο ενθαλπικός και ο

εντροπικός παράγοντας εμφανίζονται μειωμένοι σε σχέση με τη προηγούμενη περίπτωση και επομένως και η ΔG . Μία άλλη περίπτωση ($\alpha 3$) είναι η ένωση να μην εισέρχεται πλήρως ή κάποια τμήματά της να μην είναι συμπληρωματικά με τα αμινοξέα του υποδοχέα οπότε ο ενθαλπικός παράγοντας να έχει πολύ θετική τιμή και μεγαλύτερη σε απόλυτη τιμή από την εντροπία. Το αποτέλεσμα είναι η ΔG να είναι θετική και επομένως η διεργασία να μην είναι αυθόρμητη. Συνήθως όμως τα φαρμακευτικά μόρια δεν αποτελούν αμιγώς υδρόφοβες ενώσεις αλλά αμφίφιλες. Κατά συνέπεια και ο τρόπος σχεδιασμού εκλεκτικών αναστολέων γίνεται μέσω σταδιακής δόμησης της ένωσης οδηγού (lead compound) με πολικά και υδρόφοβα τμήματα. Σε αυτή τη περίπτωση (β) αν η ένωση που μας ενδιαφέρει διαθέτει πολικές ομάδες ($\beta 1$) και έστω ότι σχηματίζει δύο ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το μόριο στόχο τότε ο ενθαλπικός παράγοντας βελτιώνεται πολύ, όμως λόγω της πρόσδεσης της ένωσης ο εντροπικός παράγοντας παίρνει θετική τιμή και συνολικά η ΔG έχει χαμηλή αρνητική τιμή. Αν η ίδια ένωση προσδένεται μέσω ενός ισχυρού δεσμού υδρογόνου με το ανταγωνιστικό μόριο ($\beta 2$) τότε ο εντροπικός παράγοντας βελτιώνεται αλλά ο ενθαλπικός παίρνει θετικές τιμές και συνολικά η ΔG εμφανίζεται με μικρές θετικές τιμές. Από τη συζήτηση αυτή συμπεραίνεται ότι και σε αυτή τη περίπτωση των αμφίφιλων ενώσεων μπορεί να επιτευχθεί εκλεκτικότητα αλλά είναι πιο δύσκολο να προβλεφθεί και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι πολικές αλληλεπιδράσεις. Παραστατικά τα πιο πάνω εξηγούνται στο σχήμα 2.15



Σχήμα 2.15: Θερμοδυναμικά αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης (α) μιας υδρόφοβης και (β) μιας αμφίφιλης ένωσης στον υποδοχέα στόχο (χρωματισμένος μπλε) και σε ένα δεύτερο υποδοχέα (χρωματισμένος πράσινος)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

3.1 Υπολογιστική χημεία και η χρησιμότητά της

Ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων διαφόρων χημικών ενώσεων με γνώση το δομικό σκελετό τους χωρίς να είναι απαραίτητη η πειραματική σύνθεσή τους, αποτελούσε και συνεχίζει να αποτελεί μια πρόκληση για την υπολογιστική χημεία^[62]. Οι τιμές αυτών των ιδιοτήτων είναι χρήσιμες για το σχεδιασμό, τον έλεγχο και τη κατανόηση των χημικών αντιδράσεων, καθώς και την πρόβλεψη αρνητικών επιπτώσεων τους όπως η τοξικότητα τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον. Υπάρχει λοιπόν ανάγκη για αξιόπιστες μεθόδους πρόβλεψης της σχέσης που συνδέει τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου με τις ιδιότητές του για το σχεδιασμό νέων μοριακών δομών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν διαθέσιμες οι τιμές των ιδιοτήτων για όλες τις χημικές ενώσεις, ενώ ο πειραματικός προσδιορισμός τους τις περισσότερες φορές απαιτεί αρκετό χρόνο και έχει υψηλό κόστος. Αυτό σημαίνει πως είναι επιτακτική η ανάγκη για κατευθυνόμενη σύνθεση προς συγκεκριμένα μόρια με σημαντική πιθανότητα να παρουσιάσουν επιθυμητές ιδιότητες.

Μελετώντας τη δραστικότητα κάποιων ουσιών σε συνάρτηση με τα δομικά χαρακτηριστικά τους, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως ενώσεις με παρόμοια δομή εμφανίζουν γενικά παρόμοιες τιμές δραστικότητας και ιδιοτήτων. Οι διαφορές που προκαλούνται στις ιδιότητες, όταν κάποια δομικά χαρακτηριστικά μεταβάλλονται, μπορούν να συσχετιστούν θεωρητικά με κάποιες ποιοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας. Τέτοιου είδους σχέσεις μπορούν να εξαχθούν μελετώντας το βασικό σκελετό ενός μορίου, τη δραστικότητά/ιδιότητές του και τις μεταβολές σε αυτή, που μπορεί να προκληθούν από τη μεταβολή των δομικών του χαρακτηριστικών, π.χ. με την εισαγωγή στο μόριο διαφορετικών υποκαταστατών. Μια τέτοια μελέτη θα μπορούσε να προσδιορίσει, για παράδειγμα, ποιος υποκαταστάτης ή ποιος συνδυασμός υποκαταστατών είναι υπεύθυνος για την αύξηση ή και μείωση της δραστικότητας και σε τι βαθμό. Μια τέτοια πληροφορία θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη στο σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου, αφού με κατάλληλο σχεδιασμό της δομής θα ήταν δυνατό να επιτευχθεί συνδυασμός μεγιστοποίησης της δραστικότητας και ελαχιστοποίησης των ανεπιθύμητων ενεργειών.

Έχει γίνει προσπάθεια για μαθηματική έκφραση και ερμηνεία των συσχετίσεων αυτών, καθώς η επεξεργασία των διαθέσιμων δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια πιο συστηματική αξιοποίηση των αποτελεσμάτων. Μια προσέγγιση προς την κατεύθυνση αυτή αποτελεί και η μεθοδολογία που αναπτύσσεται ακολούθως.

- **Στάδιο 1.** Ανάπτυξη μοντέλου ποσοτικής συσχέτισης μεταξύ δομής, δραστηριότητας και ιδιοτήτων.

Αρχικά επιλέγονται μόρια για τα οποία είναι ήδη γνωστή η δραστηριότητα ή η ιδιότητα η οποία θα αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης. Από τα μόρια αυτά δημιουργείται η αρχική βάση δεδομένων. Είναι επιθυμητό η βάση αυτή να περιλαμβάνει όσο το δυνατό περισσότερες πληροφορίες για την επίδραση των δομικών μεταβολών στην υπό μελέτη δραστηριότητα-ιδιότητα.

- **Στάδιο 2.** Σχεδιασμός νέων μορίων.

Στόχος στο στάδιο αυτό είναι η εύρεση μορίων τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται στην αρχική βάση δεδομένων. Σχεδιασμός δηλαδή νέων παραγώγων με χημική τροποποίηση της δομής αυτών της αρχικής βάσης δεδομένων, τα οποία σύμφωνα με τον εικονικό έλεγχο θα εμφανίζουν επιθυμητή τιμή δραστηριότητας-ιδιοτήτων. Για το σκοπό αυτό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ποικίλες τεχνικές, με κυριότερο εκφραστή αυτών τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης (docking) προσδετών (ligands) σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς (receptors).

- **Στάδιο 3.** Σύνθεση και αξιολόγηση. Ανατροφοδότηση της βάσης δεδομένων

Αφού εξαντληθούν όλα τα περιθώρια της υπολογιστικής (*in silico*) έρευνας, τα παράγωγα που προτείνονται από τα προηγούμενα στάδια συνθέτονται και αξιολογούνται ως προς τη τιμή της προς μελέτη δραστηριότητας-ιδιότητας. Με αυτό τον τρόπο ανατροφοδοτείται και η αρχική βάση δεδομένων με στόχο τον επαναπροσδιορισμό της και τη δημιουργία νέας με βελτιωμένη ικανότητα πρόβλεψης. Η ανατροφοδότηση αυτή είναι σημαντική για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων καθώς και την αύξηση της αξιοπιστίας της. Με τον εμπλουτισμό λοιπόν του μοντέλου αυξάνει και ο χώρος των αξιόπιστων προβλέψεων της (domain of applicability).

Η προαναφερθείσα μεθοδολογία βρίσκει εφαρμογή σε μια πληθώρα προβλημάτων στοχευόμενου σχεδιασμού βιολογικά δραστηριών μορίων αλλά και σχεδιασμού υλικών με επιθυμητές ιδιότητες.

3.2 Σχεδιασμός και διαδικασία προώθησης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος στην αγορά με τη χρήση μοριακής μοντελοποίησης

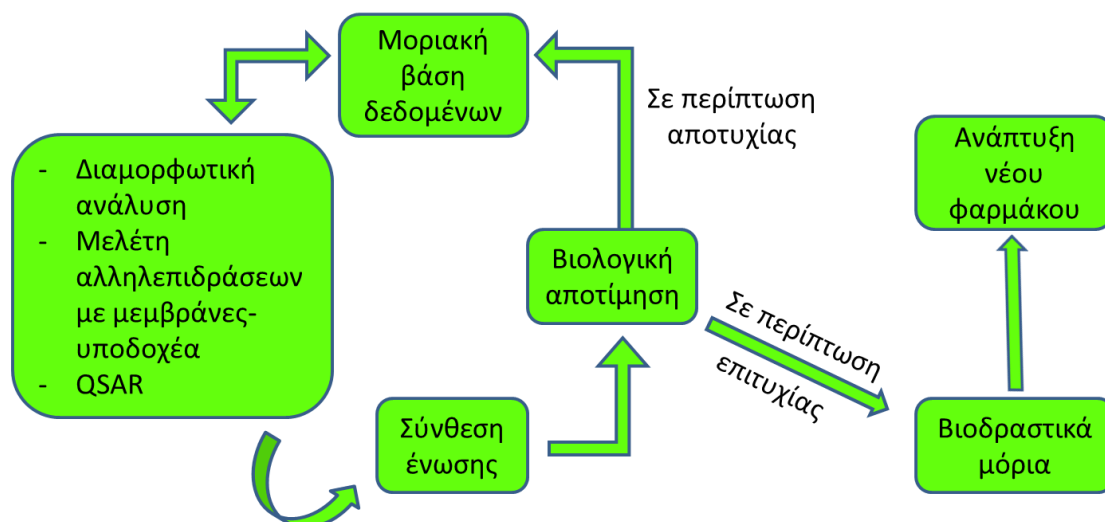
Προκειμένου να εισαχθεί στην αγορά ένα φαρμακευτικό σκεύασμα, πρέπει πρώτα να περάσει επιτυχώς από στάδια ελέγχου τα οποία έχουν καθοριστεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA). Οι έλεγχοι αυτοί αποτελούν μακρά και πολυδάπανη διαδικασία, την οποία μόνο ελάχιστα σκευάσματα καταφέρνουν να περάσουν επιτυχώς για να προωθηθούν στην αγορά. Όταν οι επιστήμονες καταλήξουν σε μια δραστική ένωση η οποία επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα σε μια διαταραχή του οργανισμού, ξεκινά ο ενδεδειγμένος έλεγχος της ένωσης. Συγκεκριμένα, ακολουθούνται τα εξής τέσσερα στάδια ελέγχου^[63] :

- A) Μελέτη των φαρμακολογικών, φαρμακο-κινητικών και τοξικολογικών χαρακτηριστικών της ένωσης. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε καλλιέργειες κυττάρων, μικροοργανισμούς και πειραματόζωα. Οι προ-κλινικές μελέτες μπορεί να διαρκέσουν χρόνια και πολλές ουσίες μπορεί να παρουσιάσουν ιδιότητες που δεν τις καθιστούν ικανές να χαρακτηριστούν ως φάρμακα. Οι προ-κλινικές μελέτες αφορούν μελέτες οι οποίες γίνονται σε κυτταροκαλλιέργειες (*in vitro*), βιοχημικές μελέτες σε απομονωμένα ένζυμα (*ex vivo*) ή πειράματα σε πειραματόζωα (*in vivo*).
- B) Κλινικές δοκιμές : Αρχικά γίνονται σε υγιείς εθελοντές, στη συνέχεια σε μια ομάδα ασθενών με συγκεκριμένη ασθένεια και τέλος σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών.
- Γ) Αίτηση έγκρισης του υποψήφιου φαρμάκου.
- Δ) Εφόσον εγκριθεί, παραγωγή του φαρμάκου.

Σε παλαιότερα χρόνια η εύρεση ενός φαρμακευτικού σκευάσματος γινόταν με τυχαία επιλογή (random screening), ενώ σήμερα με τη πρόοδο της επιστήμης ο σχεδιασμός μιας φαρμακευτικής ουσίας γίνεται με συνδυασμό δεδομένων από πολλές παρεμφερείς επιστήμες όπως Βιοχημεία, Βιοπληροφορική (Bioinformatics), Υπολογιστική χημεία, Μοριακή Μοντελοποίηση, Συνδυαστική Χημεία (Combinatorial Chemistry), Βιοτεχνολογία με Σάρωση Υψηλής Απόδοσης (High-Throughput Screening) και Βιολογία Γονιδιακή και Πρωτεομική (Genomics and Proteomics). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ορθολογικός τρόπος σχεδιασμού μιας φαρμακευτικής ουσίας (Rational Drug Design) ο οποίος εξελίχθηκε σημαντικά με την ανάπτυξη υπολογιστικών συστημάτων με μεγαλύτερη ισχύ. Έτσι, γνωρίζοντας τόσο τη μοριακή βάση της ασθένειας-στόχου όσο και τα μοριακά χαρακτηριστικά των φαρμακευτικών μορίων που ενεργούν στο κέντρο δράσης, μειώνεται ο χρόνος ανάπτυξης ενός φαρμάκου και αυξάνεται η πιθανότητα επιτυχίας του.

Στο σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων θεμελιώδης υπόθεση είναι ότι η φαρμακευτική δράση επιτυγχάνεται με τη πρόσδεση ενός μικρού μορίου που όπως αναφέραμε αποτελεί τον προσδέτη στη κοιλότητα ενός άλλου μορίου (συνήθως πρωτεϊνικής προέλευσης) μεγαλύτερου μεγέθους τον υποδοχέα. Για να γίνει η πρόσδεση μεταξύ των δύο μορίων, θα πρέπει να εμφανίζουν 'χημική' και 'γεωμετρική' συμπληρωματικότητα. Επομένως, πρωταρχικό βήμα στο σχεδιασμό φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών είναι η μοντελοποίηση της τρισδιάστατης δομής των μορίων, εφόσον ο υποδοχέας έχει γνωστή διαμόρφωση.

Η μοριακή μοντελοποίηση εφαρμόζεται ευρέως στο σχεδιασμό καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων. Επιπλέον, λόγω της ανάπτυξης των διαφόρων τεχνικών μοριακής πρόσδεσης καθώς και των στατιστικών αναλύσεων σχέσης δομής-δράσης τα τελευταία χρόνια έχει ελαττωθεί σημαντικά ο χρόνος και το προσωπικό που απαιτούνται για τη σύνθεση νέων εν δυνάμει φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτή η χρήση *in silico* τεχνικών καλείται ορθολογικός σχεδιασμός νέων φαρμάκων (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Πορεία ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων

Ο ορθολογικός σχεδιασμός ξεκινά από ένα γνωστό μηχανισμό δράσης μιας ασθένειας και με βάση αυτόν προτείνονται τα μόρια τα οποία σχεδιάζονται. Έπειτα μέσω της υπολογιστικής χημείας εκτελείται:

- Διαμορφωτική ανάλυση του εκάστοτε φαρμακευτικού μορίου, ώστε να προκύψουν ενεργειακά ευνοϊκές διαμορφώσεις και τελικά να επιλεγούν οι βιοδραστικές διαμορφώσεις, εκείνες δηλαδή που προκαλούν βιολογικό αποτέλεσμα.
- Μελέτη των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τις βιολογικές μεμβράνες και τον υποδοχέα.
- Ποσοτικές μελέτες δομής-δράσης.

3.3 Δυνατότητες Μοριακής Μοντελοποίησης

Συνολικά οι δυνατότητες της Μοριακής Μοντελοποίησης περιλαμβάνουν τα ακόλουθα^[64]:

- ✚ Τρισδιάστατη αναπαράσταση της μοριακής δομής των μορίων.
- ✚ Χρήση μοριακών γραφικών για το χειρισμό του μοριακού συστήματος.
- ✚ Υπολογισμός και ελαχιστοποίηση της ενέργειας ενός μοριακού συστήματος.
- ✚ Διαμορφωτική ανάλυση ενός μορίου.
- ✚ Προσομοίωση ενός μοριακού συστήματος.
- ✚ Υπολογισμός των μοριακών ιδιοτήτων.
- ✚ Υπέρθεση μοριακών συστημάτων.
- ✚ Μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (docking) ή γενικά κέντρα δράσης τους (DNA, λιπιδικές διπλοστιβάδες).
- ✚ Μελέτη ποσοτικού συσχετισμού δομής δράσης (3D-QSAR) φαρμακευτικών μορίων.

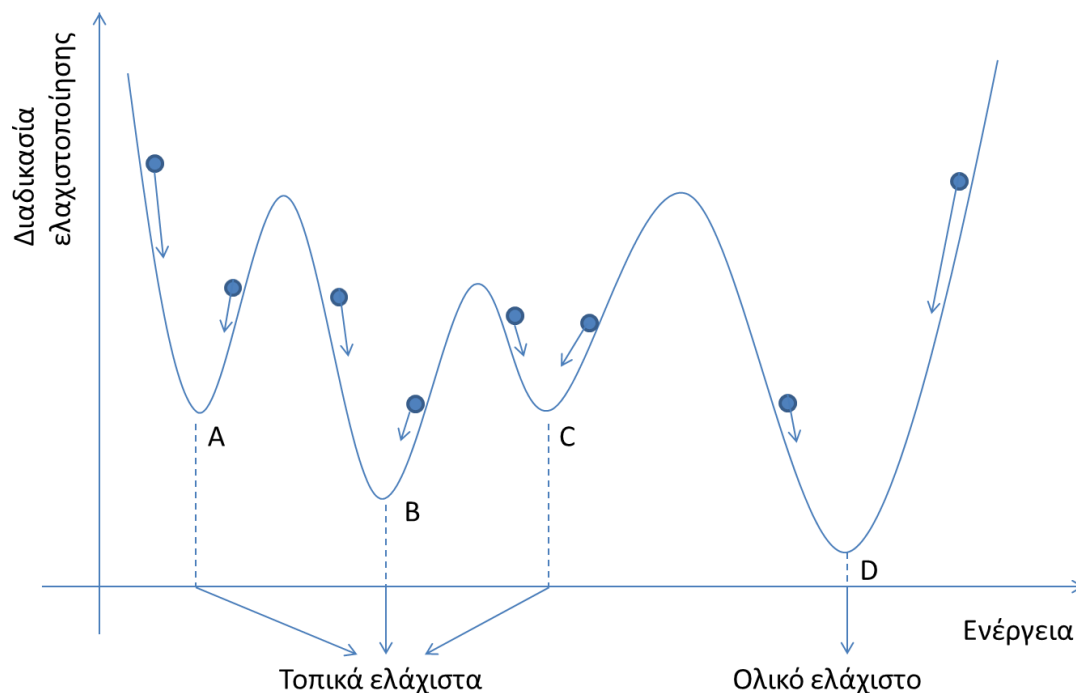
Όλες αυτές οι δυνατότητες παρέχονται από λογισμικά πακέτα τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα.

3.4 Ελαχιστοποίηση ενέργειας (Minimization method)

Η δυναμική ενέργεια ενός μορίου είναι συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων του. Η διευθέτηση των ατόμων ενός μορίου στο χώρο που αντιστοιχεί στη μικρότερη για το μόριο δυναμική ενέργεια είναι και η πιο σταθερή διαμόρφωση^[65]. Ένα μόριο N ατόμων προσδιορίζεται από $3N$ καρτεσιανές συντεταγμένες (ή $3N-6$ εσωτερικές) και αυτές ορίζουν την πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (PES - Potential Energy Surface). Κάθε ένα σημείο της επιφάνειας αντιστοιχεί σε μία διαμόρφωση του μορίου που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Σε μια επιφάνεια ενέργειας μπορεί να υπάρχουν πολλά ενεργειακά ελάχιστα (τοπικά ελάχιστα). Αυτό που θα αντιστοιχεί στη μικρότερη ενέργεια όλων είναι γνωστό ως το ολικό ελάχιστο (global energy minimum).

Στη Μοριακή Μοντελοποίηση εφαρμόζονται οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας (minimization algorithms), προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των διευθετήσεων των ατόμων του μορίου οι οποίες αντιστοιχούν στα σημεία της επιφάνειας με τη χαμηλότερη ενέργεια. Υπάρχουν πολλοί αλγόριθμοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτό το σκοπό και συνηθέστερο κριτήριο επιλογής του κατάλληλου είναι ο χρόνος που απαιτείται για να προσεγγισθεί το τοπικό ενεργειακό ελάχιστο (Σχήμα 3.2). Οι αλγόριθμοι αυτοί χρησιμοποιούν την εναρκτήρια διαμόρφωση του μορίου, 'κατέρχονται' την επιφάνεια ενέργειας και σταματούν στο πρώτο ενεργειακό ελάχιστο που 'συναντούν'.

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας κατατάσσονται ανάλογα με την τάξη τους, δηλαδή ανάλογα με τη μεγαλύτερη παράγωγο της συνάρτησης που χρησιμοποιεί ο κάθε αλγόριθμος. Στους αλγόριθμους πρώτης τάξης^[66,67] γίνεται χρήση της πρώτης παραγώγου ενώ στης δεύτερης τάξης γίνεται χρήση της πρώτης και της δεύτερης παραγώγου. Υπάρχει και μια μέθοδος υπολογισμού που δε χρησιμοποιεί τις παραγώγους της συνάρτησης (μέθοδος simplex) και μπορεί να θεωρηθεί ως μηδενικής τάξης. Κατά τη διαδικασία ελαχιστοποίησης ενέργειας συνήθως γίνεται συνδυασμός με τη χρήση περισσότερων του ενός αλγορίθμων ώστε να επιτευχθεί το τοπικό ελάχιστο. Γι' αυτό πρώτα χρησιμοποιούνται οι αλγόριθμοι μηδενικής τάξης, στη συνέχεια οι αλγόριθμοι πρώτης τάξης και τέλος οι αλγόριθμοι δεύτερας τάξεως.



Σχήμα 3.2: Με τη βοήθεια των αλγορίθμων η ενέργεια της ένωσης ελαχιστοποιείται. Όσο μικρότερης τάξης είναι ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται, τόσο περισσότερες είναι οι πιθανότητες να οδηγηθούμε σε κάποιο τοπικό ελάχιστο. Όσο μεγαλύτερης τάξης είναι ο αλγόριθμος τόσο πιο χρονοβόρα η όλη διαδικασία και οδηγούμαστε στο ολικό ελάχιστο.

Για τους αλγορίθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας οποιαδήποτε συνάρτηση $F(X)$, με μεταβλητή x , μπορεί να αναλυθεί σε μια σειρά Taylor γύρω από το ελάχιστο x_0 σύμφωνα με την εξίσωση:

$$F(x) = F(x_0) + (x - x_0)F'(x_0) + \frac{1}{2}(x - x_0)^2 F''(x_0) + \dots$$

όπου, F' , η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης.

F'' , η δεύτερη παράγωγος της συνάρτησης.

Οι κυρίως χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι πρώτης τάξεως είναι ο αλγόριθμος Βαθύτερης Κατάδυσης (Steepest Descend), ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient) και ο αλγόριθμος Συζυγούς Βαθμιδωτού Πεδίου (Powell). Οι δυο τελευταίοι αλγόριθμοι είναι παρόμοιοι, αλλά στον αλγόριθμο Powell χρησιμοποιούνται πιο εξελιγμένοι κανόνες για τη μετακίνηση πάνω στην ενεργειακή επιφάνεια συγκριτικά με τον αλγόριθμο βαθμιδωτής σύζευξης. Επιπλέον, σε αυτούς τους δυο αλγορίθμους το σημείο έναρξης για κάθε βήμα είναι αυτό που προκύπτει από το αμέσως προηγούμενο, ενώ για τον αλγόριθμο βαθύτερης κατάδυσης δεν λαμβάνεται υπόψη καμία πληροφορία από το προηγούμενο βήμα.

Ο κυρίως χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος δεύτερης τάξης είναι ο Newton-Raphson. Ο αλγόριθμος αυτός οδηγεί το μόριο ευκολότερα στη δομή με την ελάχιστη τιμή ενέργειας του εκάστοτε τοπικού ελαχίστου στο οποίο βρίσκεται αυτό. Κατά συνέπεια, εάν ύστερα από την επίδραση των αλγορίθμων μηδενικής και πρώτης τάξης, εφαρμοστεί αυτός ο αλγόριθμος, είναι σχεδόν

βέβαιο ότι η ένωση έχει ελαχιστοποιηθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό. Ωστόσο το βασικό μειονέκτημα των αλγορίθμων δεύτερης τάξης είναι ότι η όλη διαδικασία είναι πολύ χρονοβόρα, ιδίως για μακρομόρια και πρωτεΐνες για τα οποία είναι απαγορευτική. Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται η τροποποιημένη μορφή του αλγορίθμου Newton Raphson (Adopted Basis Newton Raphson).

3.5 Διαμορφωτική ανάλυση

Ο διαμορφωτικός χώρος ενός μορίου δεν μπορεί να μελετηθεί μόνο με χρήση αλγορίθμων ελαχιστοποίησης ενέργειας. Αυτό συμβαίνει γιατί όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι αλγόριθμοι αυτοί εντοπίζουν το πρώτο ενεργειακό ελάχιστο, το οποίο βρίσκεται πλησιέστερα στην αρχική διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση μπορεί να μην είναι και η σταθερότερη που μπορεί να υπάρχει, καθώς δεν μπορεί να καλυφθεί με αυτή τη διαδικασία όλος ο διαμορφωτικός χώρος. Εάν χρησιμοποιηθεί και ένας αλγόριθμος διαμορφωτικής ανάλυσης είναι δυνατή η παραγωγή περισσότερων εναρκτήριων διαμορφώσεων και η εύρεση περισσότερων ενεργειακά ελαχιστοποιημένων διαμορφώσεων στην επιφάνεια ενέργειας^[66]. Οι αλγόριθμοι αυτοί λειτουργούν μεταβάλλοντας τις ευέλικτες διέδρες γωνίες του μορίου ή τις ατομικές καρτεσιανές συντεταγμένες του μορίου και κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- i. **Μέθοδοι τυχαίας αναζήτησης (Random Search Methods)**
- ii. **Μέθοδοι συστηματικής αναζήτησης του διαμορφωτικού χώρου (Grid Scan)**
- iii. **Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics)**

3.5.1 Μέθοδοι τυχαίας αναζήτησης

Με τη χρήση αυτής της μεθοδολογίας είναι δυνατή η μετάβαση από μια περιοχή της επιφάνειας της ενέργειας του μορίου σε μια εντελώς διαφορετική μέσα σε ένα μόλις βήμα προκαλώντας τυχαία μεταβολή είτε στις καρτεσιανές συντεταγμένες των ατόμων x , y , z είτε στις διέδρες γωνίες με τυχαία περιστροφή των απλών δεσμών (με δυνατότητα περιστροφής) διατηρώντας το μήκος τους και τις γωνίες τους σταθερές. Το πλεονέκτημα της μεθόδου μεταβολής των διέδρων γωνιών είναι ότι κατά τους υπολογισμούς λαμβάνονται υπ' όψη λιγότεροι βαθμοί ελευθερίας. Κάθε νέα διαμόρφωση που προκύπτει ελαχιστοποιείται ενεργειακά χρησιμοποιώντας αλγόριθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας. Υπάρχουν τρεις τρόποι επιλογής της εναρκτήριας διαμόρφωσης σε κάθε νέο κύκλο της επαναληπτικής διαδικασίας:

- (1) χρήση της διαμόρφωσης που μόλις έχει αποθηκευτεί από τον προηγούμενο κύκλο,
- (2) τυχαία επιλογή μίας από τις αποθηκευμένες διαμορφώσεις δίνοντας προτεραιότητα σε αυτές που έχουν επιλεχθεί τις λιγότερες φορές,
- (3) επιλογή της χαμηλότερης ενεργειακά διαμόρφωσης που έχει αποθηκευτεί μέχρι τη στιγμή εκείνη.

Το μειονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας είναι η απαίτηση μεγάλου υπολογιστικού χρόνου ώστε να καλυφθεί μεγάλο τμήμα της επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας. Οι διαμορφώσεις που προκύπτουν από τις μεθόδους τυχαίας αναζήτησης δεν μπορούν να προβλεφθούν.

3.5.2 Μέθοδοι συστηματικής αναζήτησης

Με τους αλγόριθμους αυτής της κατηγορίας μελετάται ο διαμορφωτικός χώρος ενός μορίου εκτελώντας συνεχείς και προβλέψιμες μεταβολές στην αρχική διαμόρφωση του μορίου. Σε αυτή την προσέγγιση ορίζονται οι διέδρες γωνίες του μορίου που έχουν τη δυνατότητα να περιστραφούν. Οι δεσμοί περιστρέφονται συστηματικά από 0 έως 360 μοίρες ανά συγκεκριμένο βήμα, το οποίο μπορεί να καθοριστεί, χωρίς να μεταβάλλεται το μήκος δεσμών. Κάθε νέα διαμόρφωση που προκύπτει ελαχιστοποιείται ενεργειακά ώστε οι διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας να αντιστοιχούν σε τοπικό ελάχιστο της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας. Η αναζήτηση συνεχίζεται ώστε να περιστραφούν όλοι οι υπό μελέτη δεσμοί και να παραχθούν νέες ελαχιστοποιημένες διαμορφώσεις. Ο αριθμός των διαμορφώσεων που θα προκύψουν εξαρτάται από το πλήθος των δεσμών περιστροφής καθώς και τη τιμή της γωνίας που ορίζεται. Για παράδειγμα μια δομή με 2 διέδρες γωνίες όπου η κάθε γωνία θα μπορεί να μεταβάλλεται ανά 10^0 μπορεί να δώσει $36^2 = 1296$ διαμορφώσεις και από αυτές επιλέγονται οι ενεργειακά ευνοϊκότερες.

3.5.3 Μοριακή Δυναμική

Σε αυτή τη μεθοδολογία το μόριο θερμαίνεται σταδιακά μέχρι να φτάσει μια τελική θερμοκρασία και στη συνέχεια αφήνεται να έρθει σε ισορροπία. Η θερμοκρασία που δίδεται στο σύστημα αυξάνει την κινητική του ενέργεια με αποτέλεσμα αυτό να μπορεί να υπερπηδήσει τα ενεργειακά φράγματα και συνεπώς να είναι δυνατή η μελέτη διαφορετικών περιοχών της επιφάνειας της Δυναμικής Ενέργειας. Μια τεχνική που χρησιμοποιείται σε αυτή την κατηγορία για τη διερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου είναι η υψηλής θερμοκρασίας ανόπτηση μοριακής δυναμικής (Simulated Annealing)^[67]. Η διαδικασία που ακολουθείται με χρήση αυτής της τεχνικής χωρίζεται σε κύκλους. Κάθε κύκλος ξεκινά με αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος έως ένα μέγιστο που έχουμε ορίσει, ώστε να αυξηθεί η κινητική ενέργεια του μορίου, να υπάρξει ελεύθερη περιστροφή των δεσμών και να υπερπηδήσει το μόριο τα ενεργειακά φράγματα. Η θερμοκρασία αυτή παραμένει σταθερή για κάποιο διάστημα έως ότου το μόριο αναδιευθετηθεί σε μια νέα διαμόρφωση. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται έως ένα ελάχιστο, καταγράφεται η τελική διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας, αν είναι γεωμετρικά μη αποδεκτή απομακρύνεται, και έτσι ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της διαδικασίας. Η πορεία αυτή επαναλαμβάνεται και για τους υπόλοιπους κύκλους. Η αυξομείωση της θερμοκρασίας και ο χρόνος προσομοίωσης εξαρτάται από το υπό μελέτη σύστημα, καθώς αν η προσομοίωση γίνει σε εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία υπάρχει πιθανότητα να παραμορφωθεί η γεωμετρία του μορίου.

3.6 Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

Μέσω των *in silico* πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης καθίσταται δυνατή η πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου που προκύπτει κατά την πρόσδεση μιας ένωσης (προσδέτης) σε ένα μεγαλύτερο μόριο (υποδοχέας). Ο υποδοχέας

μπορεί να είναι ένα ένζυμο ή τμήμα της έλικας του DNA ή και λιπιδική διπλοστιβάδα ενώ η ένωση προσδέτης μπορεί να είναι ένα φαρμακευτικό μόριο, το οποίο προσδένεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του υποδοχέα που καλείται ενεργό κέντρο ή θήκη πρόσδεσης. Σκοπός είναι να επιτευχθεί πρόσδεση με το μέγιστο αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα, και οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ενέργεια πρόσδεσης $E_{\text{πρόσδεσης}}$ που περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση^[63]:

$$E_{\text{πρόσδεσης}} = E_{\text{EI}} + E_{\text{II}} + E_{\text{HI}} + E_{\text{CII}} + E^*$$

όπου:

E_{EI} : Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Electrostatic Interactions).

E_{II} : Επαγωγικές αλληλεπιδράσεις (Inductive Interactions).

E_{HI} : Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Hydrophobic Interactions).

E_{CII} : Συνδυασμένων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (Combined Intermolecular Interactions).

E^* : Απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά τη σύνδεση υποδοχέα-προσδέτη.

3.6.1 Αλγόριθμοι Μοριακής Πρόσδεσης

Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι οι οποίοι χρησιμοποιούν διαφορετικές παραμέτρους (για παράδειγμα δυνάμεις Coulomb και VdW, δεσμοί υδρογόνου) ώστε να βαθμολογήσουν το μοτίβο πρόσδεσης των διαφόρων υπό μελέτη ενώσεων.

3.6.1.1 Αλγόριθμοι Monte Carlo (MC)

Οι συγκεκριμένοι αλγόριθμοι τοποθετούν το μόριο με τυχαίο τρόπο στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα και πραγματοποιούνται τυχαίες αλλαγές στη περιστροφή δεσμών και στις διέδρες γωνίες του. Έστερα από κάθε βήμα ακολουθεί ελαχιστοποίηση ενέργειας του μορίου. Το πλεονέκτημα αυτών των αλγορίθμων είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια απλή συνάρτηση ενέργειας, η οποία δεν απαιτεί πληροφορίες από κάποια συνάρτηση παραγώγου.

3.6.1.2 Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής

Οι αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής στηρίζονται στην επίλυση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, σε αντίθεση με τον αλγόριθμο Monte Carlo, τη παγίδευση του μορίου σε τοπικά ελάχιστα, καθώς δεν μπορεί να υπερπηδήσει ενεργειακά φράγματα μεγαλύτερα των 1-2 Kcal. Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί τροποποιημένες μέθοδοι που επιτρέπουν βελτιωμένη διερεύνηση της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας κατά τη πρόσδεση. Μια από αυτές είναι η μέθοδος των Wang και Pak^[68], οι οποίοι έκαναν χρήση μιας τεχνικής που ονόμασαν 'μεταπήδηση φρέατος' (Well Jumping Technique). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στη πρόσδεση ευέλικτων προσδετών και χρησιμοποιεί μια κλιμακωτή συνάρτηση στην εξίσωση της κίνησης.

3.6.1.3 Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic Algorithms, GA)

Κατά τη χρήση των γενετικών αλγορίθμων η ευκαμψία του προσδέτη γύρω από τους δεσμούς περιστροφής του κωδικοποιείται σε γονίδια. Οι ευνοϊκότερες ενεργειακά λύσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο, δηλαδή αναπαράγονται στην επόμενη γενιά λύσεων και λαμβάνουν μια τυχαία μετάλλαξη και διασταύρωση. Το αποτέλεσμα της πρόσδεσης επηρεάζεται από το μέγεθος του πληθυσμού και τη συχνότητα των διασταυρώσεων και μεταλλάξεων. Οι αλγόριθμοι GOLD και AutoDock 4.0 αποτελούν παραδείγματα γενετικών αλγορίθμων μοριακής πρόσδεσης.

3.6.1.4 Αλγόριθμοι Σταδιακής Ανοικοδόμησης (Incremental Construction)

Οι αλγόριθμοι σταδιακής πρόσδεσης αρχικά διαιρούν το μόριο προσδέτη σε μικρότερα άκαμπτα τμήματα, διασπώντας όλους τους δεσμούς με ικανότητα περιστροφής. Έπειτα, επιλέγεται ένα τμήμα του μορίου, το οποίο καλείται βάση, και αυτό προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Πάνω σε αυτό τοποθετούνται όλα τα υπόλοιπα τμήματα του μορίου. Για κάθε νέο τμήμα που προσδένεται, μεταβάλλονται οι διέδρες γωνίες ώστε να προσδιοριστεί η διαμόρφωση που δίνει τα επιτυχήστερα αποτελέσματα πρόσδεσης. Αυτό επιτυγχάνεται με αλγορίθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας όπως το Surflex-Dock, το FlexX και το Dock 6.0.

Μοριακή Πρόσδεση με τη χρήση του λογισμικού Surflex-Dock

Ο αλγόριθμος Surflex-Dock είναι ένας εμπειρικός αλγόριθμος βαθμολόγησης της πρόσδεσης ενώσεων στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου-στόχου^[69,70]. Είναι ιδιαίτερα επιτυχημένος στην απόρριψη διαμορφώσεων οι οποίες είναι εσφαλμένες αλλά το πρόγραμμα τις εμφανίζει ως σωστές, (false positives)^[71] που μπορούν να ληφθούν κατά την πρόσδεση της ένωσης. Ο αλγόριθμος αυτός πραγματοποιεί την πρόσδεση αφού οριστεί ο διαμορφωτικός χώρος (protomol)^[72] εντός του ενζύμου, στον οποίο πρόκειται να προσδεθεί η ένωση. Αυτό δε συνεπάγεται όμως ότι αποτελεί και ένα διαμορφωτικό κλειστό χώρο με καθορισμένα όρια στον οποίο αποκλειστικά μπορεί να γίνει η πρόσδεση. Αυτός ο αρχικός ορισμός του διαμορφωτικού χώρου με χρήση του protomol γίνεται ώστε να κατευθύνει την αρχική τοποθέτηση της ένωσης στο ένζυμο κατά την έναρξη του πειράματος πρόσδεσης. Η βαθμολόγηση των διαφορετικών διαμορφώσεων της ένωσης γίνεται με βάση την τοποθέτηση τους στο ένζυμο και όχι στα αυστηρά όρια του αρχικού διαμορφωτικού χώρου.

Ο τρόπος με τον οποίο δημιουργείται ο αρχικός διαμορφωτικός χώρος είναι ο εξής: Καταρχήν η επιφάνεια της πρωτεΐνης θεωρείται ότι καλύπτεται από τρεις τύπους αισθητήρων (probes), η χρήση των οποίων υποδεικνύει περιοχές ύπαρξης υδρογονικών δεσμών και επιθυμητών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα,

- i) Περιοχές με παρουσία αισθητήρων μεθανίου (CH_4) καταμετρώνται ως περιοχές στερικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.
- ii) Περιοχές με παρουσία αισθητήρων N-H ως περιοχές δοτών δεσμών υδρογόνου
- iii) Περιοχές με παρουσία αισθητήρων C=O ως δέκτες δεσμών υδρογόνου.

Έπειτα η συνάρτηση βαθμολόγησης τοποθετεί και προσανατολίζει τους αισθητήρες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να βελτιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις τους με τα άτομα της πρωτεΐνης. Η βαθμολογία του κάθε αισθητήρα αναπαριστά τη συνεισφορά στην πρόσδεση ενός ατόμου του προσδέτη εάν το άτομο αυτό βρισκόταν στη θέση του αισθητήρα. Στο τέλος μόνο οι αισθητήρες με τη μεγαλύτερη βαθμολογία καταμετρώνται για το επόμενο βήμα. Στη συνέχεια απορρίπτονται διαμορφώσεις όπου τα άτομα των γειτονικών αμινοξέων της πρωτεΐνης έρχονται σε απόσταση μικρότερη της τιμής 0,5 Å, λόγω απωστικών δυνάμεων van der Waals. Αφού οριστεί ο διαμορφωτικός χώρος εντός του ενεργού κέντρου, τότε γίνεται η τοποθέτηση του προσδέτη εντός αυτού. Ο προσδέτης χωρίζεται σε τμήματα τα οποία τοποθετούνται κατά τέτοιο τρόπο στους αισθητήρες ώστε να προκύπτουν οι ευνοϊκότερες αλληλεπιδράσεις. Οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις διατηρούνται, αξιολογούνται και λαμβάνουν τη βαθμολόγηση πρόσδεσης, η οποία εκφράζεται ως $-\log_{10}(K_d)$ (σταθερά σύμπλεξης του συμπλόκου ενζύμου-προσδέτη). Η σταθερά K_d αναφέρεται στη σταθερά διάστασης του συμπλέγματος και όσο μικρότερη είναι η τιμή της τόσο σταθερότερη η πρόσδεση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

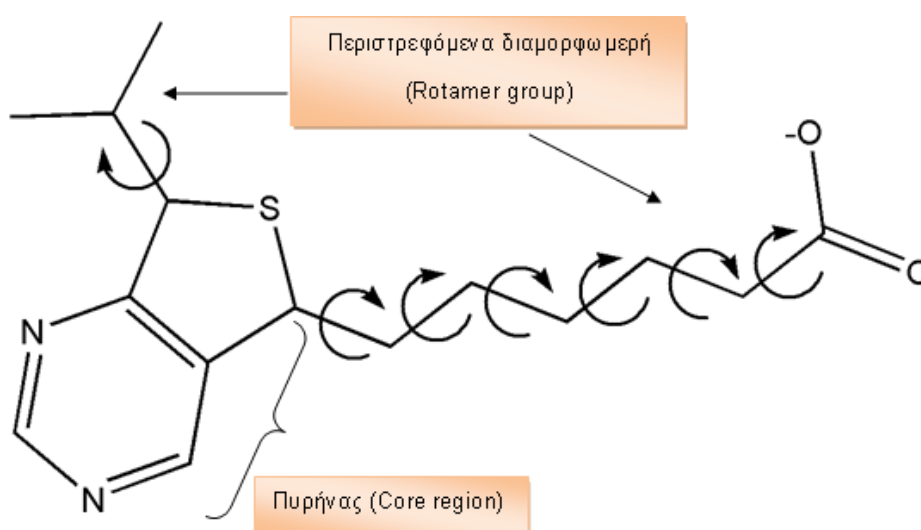
Η συνάρτηση βαθμολόγησης αθροίζει τα επιμέρους αθροίσματα που απαρτίζουν συνισταμένες των υδρόφοβων και των πολικών αλληλεπιδράσεων, των απωστικών δυνάμεων, του παράγοντα εντροπίας και επιδιαλύτωσης^[73].

3.6.2 Μοριακή Πρόσδεση με το GLIDE

Ένα από τα συχνά χρησιμοποιούμενα λογισμικά μοριακής πρόσδεσης είναι το Glide της εταιρίας Schrödinger^[74]. Ο υποδοχέας μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη ή ένας μη πρωτεϊνικός συμπαράγοντας. Η μοριακή πρόσδεση με το Glide μπορεί να γίνει θεωρώντας τον προσδέτη άκαμπτο ή εύκαμπτο ενώ ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων). Εάν επιλεγεί ο προσδέτης να είναι άκαμπτος τότε αυτός προσδένεται στον υποδοχέα ως έχει, ενώ εάν επιλεγεί να είναι εύκαμπτος δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει πριν ξεκινήσει η πρόσδεση. Η θέση και ο προσανατολισμός κάθε προσδέτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ονομάζεται 'πόζα' (pose). Οι αρχικές διαμορφώσεις που δημιουργούνται από τη χρήση του προγράμματος περνούν μέσα από μια σειρά φίλτρων ιεράρχησης που εκτιμούν και αξιολογούν την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Τα αρχικά φίλτρα ελέγχουν το μέγεθος του προσδέτη και τη συμπληρωματικότητα των αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χρησιμοποιώντας μια μέθοδο πλέγματος (grid-based) βασισμένη στην εμπειρική συνάρτηση

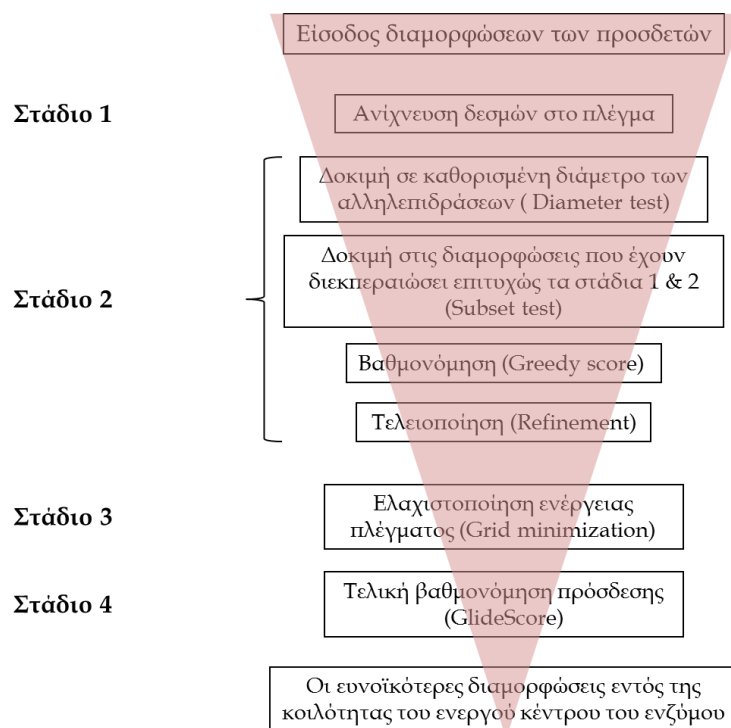
ChemScore. Το σχήμα και οι ιδιότητες του ενζύμου, αναπαρίστανται με ένα εικονικό 'πλέγμα' με διάφορα μικρότερα πεδία (field sets) τα οποία αντιστοιχούν σε αυξανόμενη ακρίβεια αποτελέσματα (scores). Στον αλγόριθμο Glide, θεωρώντας δεδομένη την ευκαμψία του προσδέτη, πραγματοποιείται εκτεταμένη αναζήτηση διαμορφώσεων και απορρίπτονται οι διαμορφώσεις που δεν προσαρμόζονται στην πρωτεϊνική κοιλότητα που μελετάται. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία ο κάθε προσδέτης χωρίζεται σε διάφορες νοητές περιοχές.

Ο βασικός διαχωρισμός είναι η περιοχή του πυρήνα (core region) και ένας αριθμός περιστρεφόμενων διαμορφωμερών (rotamer groups). Το καθένα από αυτά τα διαμορφωμερή συνδέεται με τον πυρήνα μέσω ενός περιστρεφόμενου δεσμού. Ως πυρήνας ορίζεται το άκαμπτο τμήμα του μορίου που παραμένει εάν 'αφαιρεθούν' όλα τα τμήματα του μορίου τα οποία εν δυνάμει μπορούν να περιστραφούν (Σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3: Προσδιορισμός περιοχών πυρήνα (core region) και διαμορφωμερών (rotamer groups)

Κατά τη μοριακή πρόσδεση, το εύκαμπτο τμήμα του μορίου προσαρμόζεται στο ενεργό κέντρο δημιουργώντας ένα σύνολο πιθανών διαμορφώσεων, οι οποίες στη συνέχεια αξιολογούνται από το λογισμικό ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους. Οι διαμορφώσεις με την καλύτερη ικανότητα πρόσδεσης, βάση των φίλτρων αξιολόγησης του προγράμματος, ελαχιστοποιούνται ενεργειακά και επανεξετάζονται ως προς τις γωνίες των δεσμών τους με σκοπό να βρεθεί μια ακόμη πιο ευνοϊκή ενεργειακά διαμόρφωση. Στη συνέχεια, το σύνολο των δομών με την πιο ικανοποιητική ενεργειακά διαμόρφωση αξιολογείται από τη συνάρτηση GlideScore (GS) και λαμβάνει την τελική βαθμολογία πρόσδεσης GS (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4: Τα στάδια αξιολόγησης των προσδετών με χρήση του αλγορίθμου Glide

Με τη συνάρτηση GlideScore υπολογίζεται το σύνολο των επιμέρους αθροισμάτων που προκύπτουν από τις εξής συνισταμένες:

- **Ενέργεια Van der Waals VdW** : Υπολογίζεται με μειωμένα ολικά ιοντικά φορτία σε ομάδες με πλήρες φορτίο όπως μέταλλα, καρβοξυλομάδες και γουανιδινομάδες.
- **Ενέργεια Coulomb Coul** : Υπολογίζεται με μειωμένα ολικά ιοντικά φορτία σε ομάδες με πλήρες φορτίο όπως μέταλλα, καρβοξυλομάδες και γουανιδινομάδες
- **Lipo** : Όρος για υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- **Hbond** : Όρος για τους δεσμούς υδρογόνου. Περιλαμβάνει παραμέτρους ανάλογα με την ιοντική κατάσταση του δότη και του δέκτη.
- **Metal** : Όρος για την πρόσδεση του μετάλλου. Περιλαμβάνει μόνο αλληλεπιδράσεις με ανιοντικούς δέκτες.
- **BuryP** : Αρνητική βαθμολόγηση για μη αποκαλυπτόμενες πολικές ομάδες
- **RotB** : Αρνητική βαθμολόγηση για ακινητοποιημένους περιστρεφόμενους δεσμούς
- **Site** : Πολικές αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο. Βαθμολογεί θετικά πολικές αλληλεπιδράσεις (δεν περιλαμβάνονται οι δεσμοί υδρογόνου) σε υδρόφοβο περιβάλλον.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω παραμέτρους, η βαθμολογία πρόσδεσης GScore προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{GScore} = 0.065 \cdot \text{vdW} + 0,130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{HBond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}$$

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος μοριακής πρόσδεσης στο Glide, μπορούν να εφαρμοστούν τρία επίπεδα ακρίβειας.

1. Το επίπεδο σάρωσης υψηλού ρυθμού απόδοσης **HTVS** (High-Throughput Virtual Screening), το οποίο είναι κατάλληλο για μεγάλες βιβλιοθήκες δεδομένων λόγω του μικρού χρόνου. Με τη βοήθεια αυτού του επιπέδου μπορούν να αναγνωριστούν ενεργά προϊόντα από μια μεγάλη χημική βιβλιοθήκη με ακρίβεια και σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα να αναγνωριστούν αυτά τα ενεργά προϊόντα εξαρτάται κυρίως από τη καταλληλότητα και τη ποιότητα των βιβλιοθηκών που χρησιμοποιούνται στο εκάστοτε πείραμα.
2. Το επίπεδο **SP** (Standard Precision) με το οποίο παρέχεται χαμηλότερος βαθμός ακρίβειας αλλά είναι αρκετά γρήγορο.
3. Τέλος, η εταιρία Schrödinger εισήγαγε πρόσφατα μια βελτιωμένη λειτουργία στο λογισμικό της μοριακής πρόσδεσης Glide, το οποίο ονόμασε 'λειτουργία επιπρόσθετης ακρίβειας'^[75] (Glide XP scoring function) [XP = extra precision]. Τα νέα χαρακτηριστικά αυτής της λειτουργίας είναι ότι επιτυγχάνεται ακριβέστερες βαθμονομήσεις στη μοριακή πρόσδεση εφαρμόζοντας:
 - Μεγάλη αρνητική βαθμονόμηση (penalties) τόσο για τον προσδέτη όσο και για τον υποδοχέα σε πολικές και φορτισμένες ομάδες κατά την απομάκρυνση των μορίων νερού (desolvation).
 - Ταυτοποίηση ειδικών δομικών μοτίβων (specific structural motifs) που συμπεριλαμβάνουν εξαιρετικά μεγάλες συνεισφορές στην αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης.

Η συνάρτηση βαθμονόμησης στο λογισμικό XP Glide παρέχεται από τη παρακάτω εξίσωση:

$$\text{XP Glide Score} = E_{\text{coul}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{penalty}}$$

Οι όροι που προσδιορίζουν μια ευνοϊκή πρόσδεση είναι:

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{hyd_enclosure}} + E_{\text{hb_nn_motif}} + E_{\text{hb_cc_motif}} + E_{\text{PI}} + E_{\text{hb_pair}} + E_{\text{phobic_pair}}$$

Οι όροι που παρεμποδίζουν τη πρόσδεση είναι:

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolv}} + E_{\text{ligand_strain}}$$

Όπου:

$E_{\text{hyd_enclosure}}$ = Ενέργεια υδροφοβικού εγκλεισμού

$E_{\text{hb_nn_motif}}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από ουδέτερα άτομα

$E_{\text{hb_cc_motif}}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από φορτισμένα άτομα

E_{PI} = Ενέργεια π-κατιονικών αλληλεπιδράσεων

$E_{hb_pair} + E_{phobic_pair}$ = Ενέργεια ζευγών ατόμων που εμπλέκονται σε υδρογονικούς δεσμούς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αντίστοιχα.

Παρ' όλο που το επίπεδο XP απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί, χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της υψηλής του ακρίβειας, της ικανότητάς του να απορρίπτει εσφαλμένες «θετικές» βαθμολογίες (false positives) και του καλού συσχετισμού μεταξύ επιτυχών λύσεων και επιτυχούς βαθμολογίας (Glide Score). Κατά τη μέθοδο XP, ο αλγόριθμος τοποθετεί αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και δομεί το μόριο δεσμό προς δεσμό. Οι λύσεις που προκύπτουν, υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης XP.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και συνδυασμός των μεθόδων SP (Standard Precision) και XP (Extra Precision), λαμβάνοντας αρχικά ικανό αριθμό διαμορφώσεων προσδεμένων στο ενεργό κέντρο, έπειτα επιλογή των ευνοϊκότερων συμπλόκων προσδέτη-υποδοχέα που σχηματίστηκαν και εφαρμογή σε αυτά του επιπέδου XP για βελτιωμένα αποτελέσματα.

3.6.3 Πρωτόκολλο Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης Προσαρμογής IFD (Induced Fit Docking)

Η μοριακή πρόσδεση με τη χρήση του προγράμματος Glide της εταιρίας Schrödinger βασίζεται στην υπόθεση ότι ο υποδοχέας είναι άκαμπτos ενώ ο αναστολέας είναι ελεύθερος να κινηθεί. Αυτή η υπόθεση του ακλόνητου υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά αποτελέσματα, αφού στη πραγματικότητα πολλές πρωτεΐνες υφίστανται μετατοπίσεις των πλευρικών αλυσίδων τους ή αλυσίδων του βασικού κορμού τους ή και των δυο κατά τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης με τον αναστολέα. Αυτές οι μεταβολές επιτρέπουν στον υποδοχέα να μεταβάλλει τη κοιλότητα του ενεργού του κέντρου ώστε να προσδένεται ευνοϊκότερα σε αυτό ο αναστολέας ο οποίος προσαρμόζεται καλύτερα στη κοιλότητα. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως επαγόμενη προσαρμογή (induced fit)^[74] και είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν περιπλοκές κατά τη διαδικασία σχεδιασμού δομών νέων φαρμάκων. Βάσει του πρωτοκόλλου IFD αρχικά γίνεται μοριακή πρόσδεση του αναστολέα στον υποδοχέα με τη χρήση του Glide, στη συνέχεια ακολουθεί βελτιστοποίηση της δομής της πρωτεΐνης για τις δομές που προέκυψαν από το προηγούμενο βήμα με χρήση του Prime, και στο τρίτο και τελευταίο βήμα γίνεται νέα μοριακή πρόσδεση με χρήση του Glide, μεταξύ των δομών που προέκυψαν στο πρώτο βήμα και της βελτιστοποιημένης δομής της πρωτεΐνης που προέκυψε από το δεύτερο βήμα. Μέσω της επαγόμενης μοριακής πρόσδεσης προσαρμογής μπορεί να επιτευχθεί:

- ❖ Αναπαραγωγή ενός ακριβούς συμπλέγματος ενός αναστολέα ο οποίος είναι γνωστό ότι είναι ενεργός αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί στη δεδομένη άκαμπτη δομή του υποδοχέα.
- ❖ Διάσωση των αναστολέων οι οποίοι είναι γνωστό ότι προσδένονται με τον υποδοχέα αλλά εμφανίζουν χαμηλή βαθμολογία στα κλασικά πειράματα *in silico*.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των ενδοκανναβινοειδών έχουν πλέον πλήρως εξακριβωθεί. Το ΑΕΑ και η 2-AG, τα πρώτα ενδοκανναβινοειδή που απομονώθηκαν, έχουν ευρεία βιολογική δράση που θα μπορούσε να είναι επωφελής σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο πόνος, η φλεγμονή, ο νευροεκφυλισμός, ο καρκίνος, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Huntington, η παχυσαρκία και το καρδιογενές σοκ. Δυστυχώς, η θεραπευτική χρήση των ενδοκανναβινοειδών περιορίζεται από τον σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής τους *in vivo*, επακόλουθο της γρήγορης ενζυματικής τους υδρόλυσης. Τα ένζυμα FAAH και MAGL θεωρούνται πλέον ως οι κύριες αιτίες της υδρόλυσης του ΑΕΑ και της 2-AG, αντίστοιχα. Ωστόσο, ενώ το ένζυμο FAAH έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός της MAGL βρίσκεται μόνο στην αρχή. Για τη FAAH είναι ήδη γνωστές ενώσεις οι οποίες προσδένονται ισχυρά και εκλεκτικά με το ένζυμό της, εμφανίζοντας αντιφλεγμονώδη και κατά του άγχους δράση. Για τη MAGL δεν έχουν συντεθεί αντίστοιχες ενώσεις που να εμφανίζουν εκλεκτικότητα στο ένζυμό της.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αναζήτηση ισχυρών και εκλεκτικών ενώσεων που να μπορούν να αναστείλουν το ένζυμο MAGL, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για τη μετέπειτα σύνθεση φαρμάκων που δρουν στο σύστημα των ενδοκανναβινοειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ενώσεις που μελετήθηκαν

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε διεξοδικά, με χρήση των αλγορίθμων Surflex-dock και Glide, η ενδεχόμενη πρόσδεση μιας μεγάλης βιβλιοθήκης ενώσεων έναντι του ενζύμου λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL). Από το σύνολο αυτών των ενώσεων, για αυτές που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση εξετάσθηκε η ενδεχόμενη πρόσδεσή τους και στο ένζυμο αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH) ώστε να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα αυτών των αναστολέων ανάμεσα στα δυο ένζυμα.

Οι περισσότερες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν συντεθεί στο εργαστήριο του Καθηγητή Γ. Κόκοτου και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Π. Μουτεβελή-Μηνακάκη.

4.2 Σχεδιασμός ενώσεων

Οι ενώσεις σχεδιάστηκαν στην πλατφόρμα σχεδιασμού του προγράμματος SYBYL 8.0 της εταιρίας TRIPOS. Στη συνέχεια η ενέργεια των ενώσεων ελαχιστοποιήθηκε με χρήση των αλγορίθμων ελαχιστοποίησης ενέργειας Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descent), Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient) και τον αλγόριθμο του Powell. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Tripos (Termination: Gradient 0,01 kcal/mol, Max Iterations: 5000).

4.2.1 Μοριακή δυναμική: Μελέτη του διαμορφωτικού χώρου των ενώσεων

Η μελέτη του διαμορφωτικού χώρου των ενώσεων έγινε με προσομοίωση της μοριακής τους τροχιάς με ανόπτηση (Simulated Annealing)^[70]. Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος η μέγιστη θερμοκρασία είχε την τιμή 2000 K για 2000 fs και η ελάχιστη θερμοκρασία την τιμή 0 K για 10.000 fs. Στις ενώσεις με διπλούς δεσμούς ή στερεογονικά κέντρα, εφαρμόστηκαν ηπιότερες συνθήκες ($T_{\min} = 700$ K) ώστε να διατηρηθεί η στερεοχημεία τους ενώ έγινε επιπλέον ελαχιστοποίηση ενέργειας στο σύστημα πριν την έναρξη του πειράματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε για 100 κύκλους οπότε και προέκυψαν 100 διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας για κάθε ένωση, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης.

4.2.2 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης

Για το σκοπό της μελέτης της πρόσδεσης κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκαν δύο αλγόριθμοι, ο αλγόριθμος Surflex-Dock του εμπορικού πακέτου SYBYL και ο αλγόριθμος Glide του εμπορικού πακέτου MAESTRO.

Όλες οι κρυσταλλογραφικές μελέτες των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν, προετοιμάστηκαν κατάλληλα χρησιμοποιώντας την εφαρμογή του προγράμματος MAESTRO 'Protein Preparation Wizard' ώστε να διορθωθούν τυχόν λάθη που μπορεί να υπάρχουν στην κρυσταλλογραφική μελέτη και να ελεγχθεί ο ορθός ιοντισμός των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων της

πρωτεΐνης σε φυσιολογικό pH. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον ορθό ιονισμό των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων της ιστιδίνης, του γλουταμικού οξέος και του ασπαρτικού οξέος. Επίσης, ελέγχθηκαν οι τάξεις δεσμών των ατόμων των αμινοξέων των πρωτεϊνών (Assign Bond Orders), προστέθηκαν υδρογόνα, αφαιρέθηκαν τα μη σημαντικά μόρια νερού της κρυσταλλογραφικής μελέτης και ελαχιστοποιήθηκε η ενέργεια της τριτοταγούς διαμόρφωσης των υπό μελέτη πρωτεϊνών μόνο για τα άτομα υδρογόνου θέτοντας ως περιορισμό ότι η τιμή RMSD μεταξύ των αρχικών και τελικών διαμορφώσεων να μην υπερβαίνει τα 0,3 Å.

Στη συνέχεια, για την ορθή αξιολόγηση και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, έγινε δοκιμαστική αναπαραγωγή του τρόπου πρόσδεσης των πρωτεϊνών με τις ενώσεις που υπήρχαν κρυσταλλογραφικά δεδομένα (validation test). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος του Surflex-Dock (Σχήμα 4.1) ενώ ανάλογη πειραματική πορεία ακολουθήθηκε και με τον αλγόριθμο του Glide.

Έναρξη πειράματος μοριακής πρόσδεσης

- | | |
|--|---|
| <p>1. Χρήση τυπικών τιμών
(default values)
Threshold 0.5
Bloat 0
Υπολογισμός RMSD_A</p> | <p>2. Χρήση όλων των πιθανών συνδυασμών των
τιμών Threshold και Bloat
(όπου $0.01 \leq \text{Threshold} \leq 1.00$ και $0 \leq \text{Bloat} \leq 10$)
Υπολογισμός RMSD_B</p> |
|--|---|



Σύγκριση των τιμών RMSD_A και RMSD_B



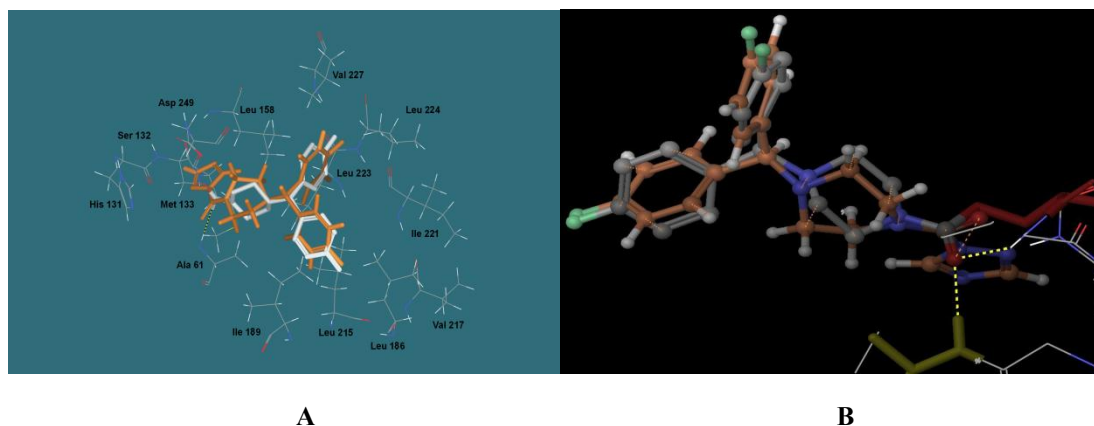
Χρήση πειραματικών συνθηκών υπό τις οποίες ελήφθη η μικρότερη τιμή RMSD
(Η τιμή RMSD θα πρέπει να είναι απαραίτητα μικρότερη της μονάδας)

Σχήμα 4.1: Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων με τις οποίες είχαν κρυσταλλογραφηθεί οι πρωτεΐνες στις αντίστοιχες κρυσταλλογραφικές μελέτες

Στην περίπτωση της MAGL (PDB: 3JWE), η κρυσταλλογραφική μελέτη της εμφανίζει τον αναστολέα 1-[δισ(4-φθοροφαινυλ)μεθυλ]-4-(1H-1,2,4-τριαζολ-1-υλκαρβονυλ)πιπεραζίνη (SAR629) προσδεμένο μέσω ομοιοπολικού δεσμού με την πρωτεΐνη.

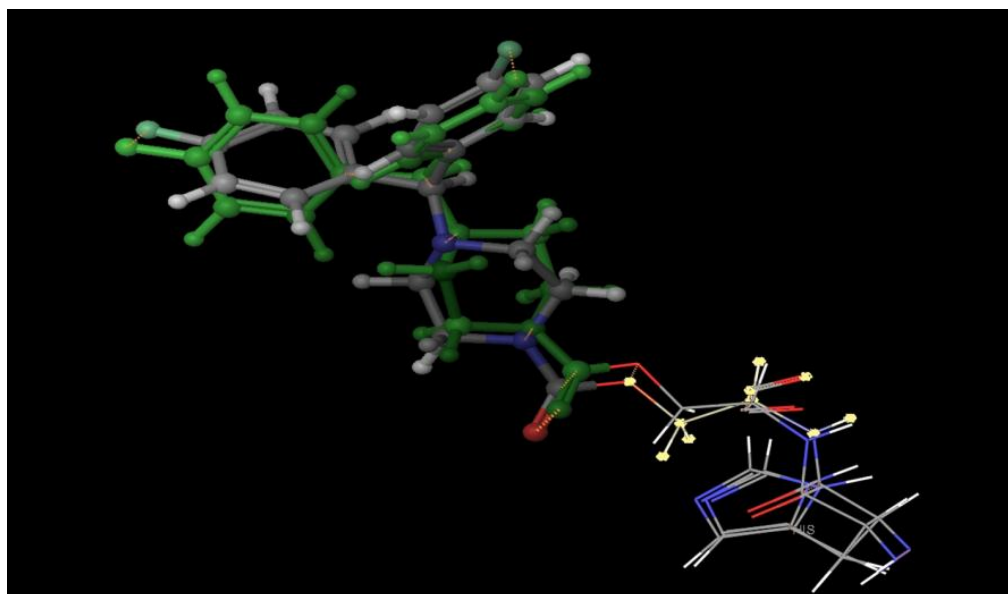
Η αναπαραγωγή του τρόπου πρόσδεσης του αναστολέα SAR629 στη MAGL έδωσε το αποτέλεσμα που παριστάνεται στο Σχήμα 4.2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, η βαθμολόγηση της συγγένειας πρόσδεσης με

χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock ήταν -11.32 kcal/mol ενώ βαθμολογία πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Glide ήταν -9.40 kcal/mol. Η τιμή RMSD όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Surflex-Dock ήταν 0.47 Å ενώ η αντίστοιχη τιμή όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Glide ήταν 0.432 Å.



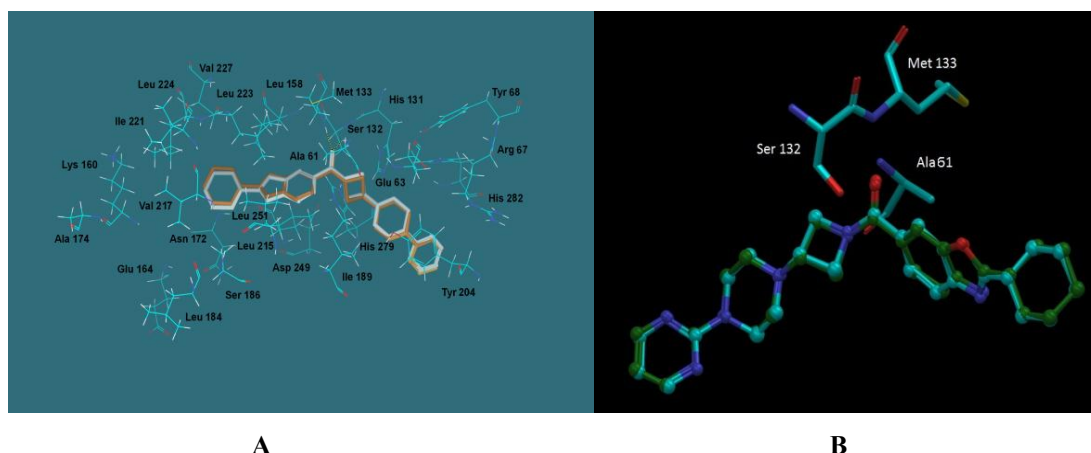
Σχήμα 4.2: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης SAR629. Με λευκό και γκρι χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται το μοτίβο πρόσδεσης της ένωσης όπως στην κρυσταλλογραφική μελέτη. Με πορτοκαλί χρώμα αναπαρίσταται ο τρόπος πρόσδεσης όπως επαληθεύτηκε (A) με χρήση του αλγορίθμου Surflex-Dock και (B) με χρήση του αλγορίθμου Glide.

Επειδή το πρόγραμμα Surflex-Dock δεν έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ αναστολέα και ενζύμου, τα ανωτέρω πειράματα επαναλήφθηκαν με τον αλγόριθμο Prime του προγράμματος Maestro. Με τη βοήθεια αυτού του αλγορίθμου σχηματίστηκε ο ζητούμενος ομοιοπολικός δεσμός και το πείραμα έδωσε ακόμη καλύτερο RMSD με τιμή 0.238 Å (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης SAR629 με χρήση του αλγορίθμου Prime. Με γκρι χρώμα αναπαρίσταται το μοτίβο πρόσδεσης της ένωσης στη κρυσταλλογραφική μελέτη και με πράσινο χρώμα ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης όπως επαληθεύτηκε με χρήση του αλγορίθμου Prime.

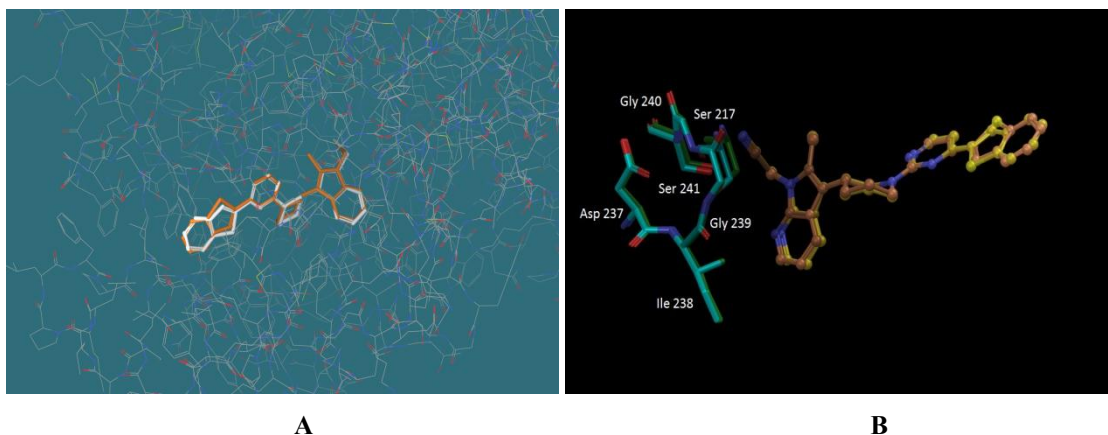
Στην περίπτωση της MAGL (PDB: 3PE6), η κρυσταλλογραφική μελέτη της εμφανίζει τον αναστολέα (2-κυκλεξυλ-1,3-βενζοξαζολ-6-υλ){3-[4-(πυριμιδιν-2-υλ)πιπεραζιν-1-υλ]αζετιδιν-1-υλ}μεθανόνη (ZYH) προσδεμένο με την πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα από τη χρήση των αλγορίθμων Surflex-Dock και Glide για τη μοριακή πρόσδεση του ZYH στη πρωτεΐνη παριστάνονται στο σχήμα 4.4. Η τιμή RMSD όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Surflex-Dock ήταν 0.26 Å και η βαθμολογία της συγγένειας πρόσδεσης -15.09 kcal/mol, ενώ η αντίστοιχη τιμή όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Glide ήταν 0.18 Å και η βαθμολογία πρόσδεσης -12.94 kcal/mol.



Σχήμα 4.4: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης του ZYH. Με λευκό και πράσινο χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται το μοτίβο πρόσδεσης της ένωσης της κρυσταλλογραφικής μελέτης. Με πορτοκαλί και γαλάζιο χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται ο τρόπος πρόσδεσης όπως επαληθεύτηκε (Α) με χρήση του αλγορίθμου Surflex-Dock και (Β) με χρήση του αλγορίθμου Glide.

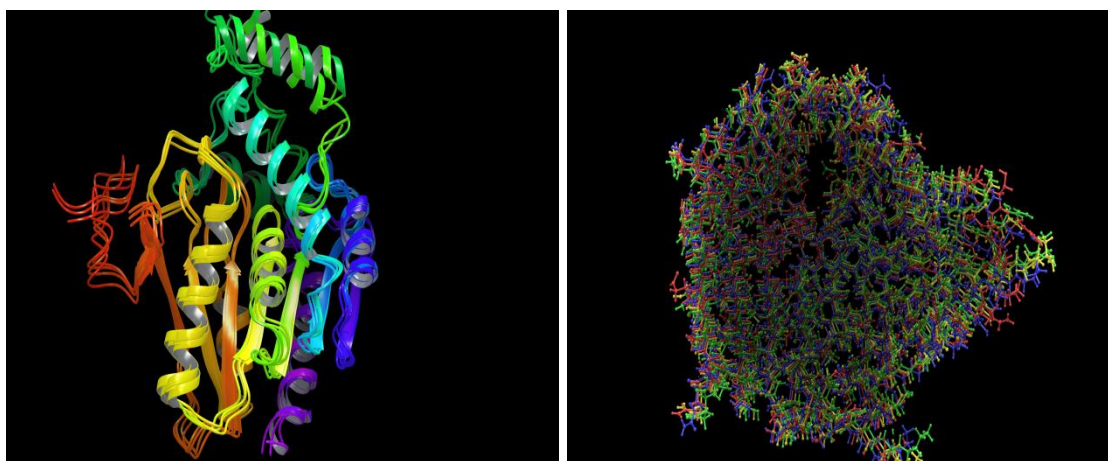
Παράλληλα με τη μελέτη της MAGL, μελετήθηκε και το ένζυμο της FAAH ώστε να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα των ενώσεων ως προς τα δύο ένζυμα. Το ένζυμο FAAH (PDB: 3QK5) έχει κρυσταλλωθεί με την ένωση (3-{(3R)-1-[4-(1-βενζοθειοφαιν-2-υλ)πυριμιδιν-2-υλ]πιπεριδιν-3-υλ}-2-μεθυλ-1H-πυρρολο[2,3-β]πυριδιν-1-υλ) ακετονιτρίλιο (QK5).

Τα αποτελέσματα από την χρήση των αλγορίθμων Surflex-Dock και Glide για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης του QK5 στο ένζυμο FAAH παριστάνονται στο σχήμα 4.5. Η τιμή RMSD όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Surflex-Dock ήταν 0.44 Å και η βαθμολογία συγγένειας πρόσδεσης -15.44 kcal/mol, ενώ η αντίστοιχη τιμή όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο Glide ήταν 0.37 Å και η βαθμολογία πρόσδεσης -13.79 kcal/mol.

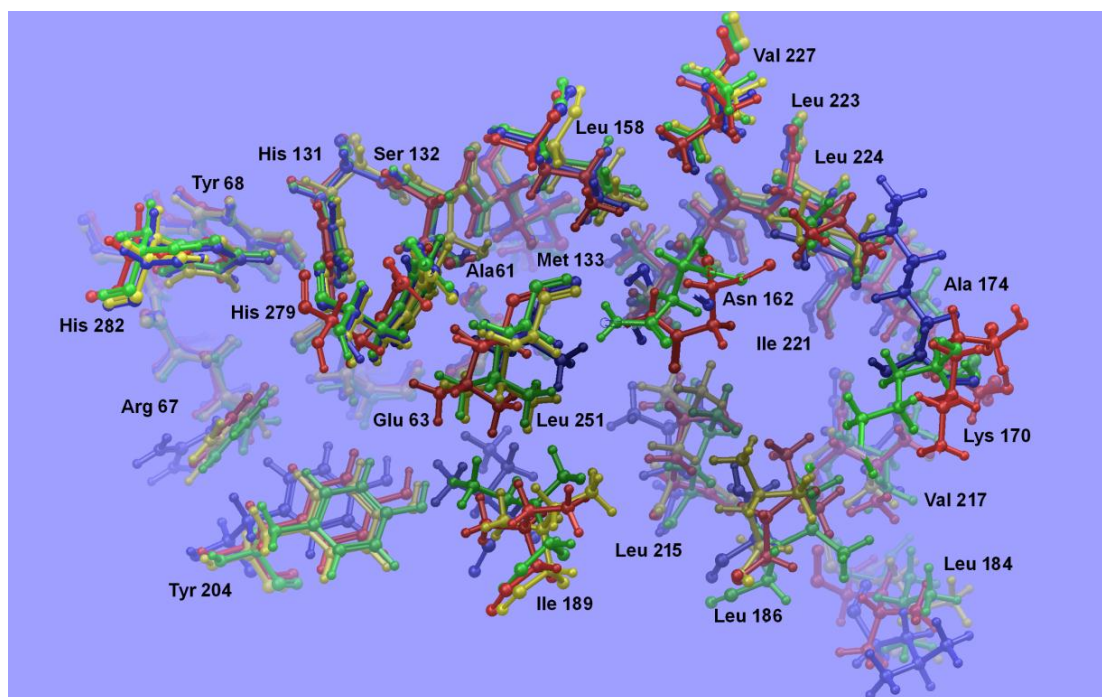


Σχήμα 4.5: Επαλήθευση του τρόπου πρόσδεσης του QK5. Με λευκό και πορτοκαλί χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται το μοτίβο πρόσδεσης της ένωσης όπως στη κρυσταλλογραφική μελέτη. Με πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα αναπαριστάται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης όπως επαληθεύτηκε (A) με χρήση του αλγορίθμου Surflex-Dock και (B) με χρήση του αλγορίθμου Glide.

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, υπάρχουν τέσσερις κρυσταλλογραφικές μελέτες για το ένζυμο της MAGL από τις οποίες έπρεπε να επιλεγεί η μία για τα πειράματα της παρούσας έρευνας. Για το λόγο αυτό έγινε υπέρθεση και των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών και εξετάστηκε η τριτοταγής δομή των ενζύμων (Σχήμα 4.6) και μετά, ειδικότερα, η περιοχή των αμινοξέων που σχηματίζουν την υδρόφιλη κοιλότητα του ενεργού κέντρου (Σχήμα 4.7) με χρήση του προγράμματος Maestro. Από τη σύγκριση των τιμών RMSD που προέκυψε συγκρίνοντας ανά δυο τις κρυσταλλογραφικές μελέτες δε βρέθηκε διαφορά μεγαλύτερη των 0.39 Å και οι τιμές κυμαίνονταν στα 1.69 Å. Ειδικά όταν η σύγκριση περιορίστηκε στην περιοχή του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης η διαφορά μειώθηκε στα 0.04 Å με τιμές γύρω στα 0.74 Å.



Σχήμα 4.6: Υπέρθεση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών. Στα αριστερά αναπαριστάται ο σκελετός των πρωτεϊνών. Στα δεξιά παριστάνονται επίσης και οι πλευρικές αλυσίδες όλων των αμινοξέων.



Σχήμα 4.7: Υπέρθεση των τεσσάρων κρυσταλλογραφικών μελετών στη περιοχή της υδρόφοβης κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα επαλήθευσης του τρόπου πρόσδεσης των συγκρυσταλλομένων ενώσεων στα αντίστοιχα ένζυμα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων.

4.2.3 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock

Στις κρυσταλλογραφικές μελέτες, 3JWE, 3PE6 της MAGL και 3QK5 της FAAH ο εντοπισμός του διαμορφωτικού χώρου (protomol) έγινε με βάση την ένωση με την οποία έγινε η κρυσταλλογραφική μελέτη για κάθε ένζυμο (by ligand). Για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες της MAGL με κωδικούς 3HJU και 3JW8, ο εντοπισμός του διαμορφωτικού χώρου (protomol) έγινε με βάση τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (by residues). Οι παράμετροι που καθόρισαν το μέγεθος του διαμορφωτικού χώρου (protomol) ρυθμίστηκαν σε “threshold” 0.5 και “bloat” 0 αντίστοιχα. Επίσης, τέθηκε η επιλογή για κάθε μία εναρκτήρια διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας των ενώσεων να προκύψουν πέντε πιθανές λύσεις και να πραγματοποιηθεί επιπλέον ελαχιστοποίηση ενέργειας στο σύστημα πριν και μετά το πείραμα μοριακής πρόσδεσης.

4.2.4 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Glide

Αναφορικά με τις κρυσταλλογραφικές μελέτες 3JWE, 3PE6 της MAGL και 3QK5 της FAAH, η δημιουργία των αρχείων πλέγματος της πρωτεΐνης (Grid generation files) έγινε με επιλογή της ένωσης με την οποία έγινε η κρυσταλλογραφική μελέτη για κάθε ένζυμο (pick molecule). Για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες της MAGL με κωδικούς 3HJU και 3JW8, η δημιουργία των αρχείων πλέγματος της πρωτεΐνης έγινε με επιλογή των αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Ο διαμορφωτικός χώρος στον οποίο έγινε η

πρόσδεση των ενώσεων σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε ως ένας κύβος διαστάσεων 16x16x16 Å.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος υψηλής ακρίβειας (XP mode)^[75] και τέθηκε η επιλογή για κάθε μία εναρκτήρια διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας των ενώσεων να προκύψουν δέκα πιθανές λύσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΓΝΩΣΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗ MAGL

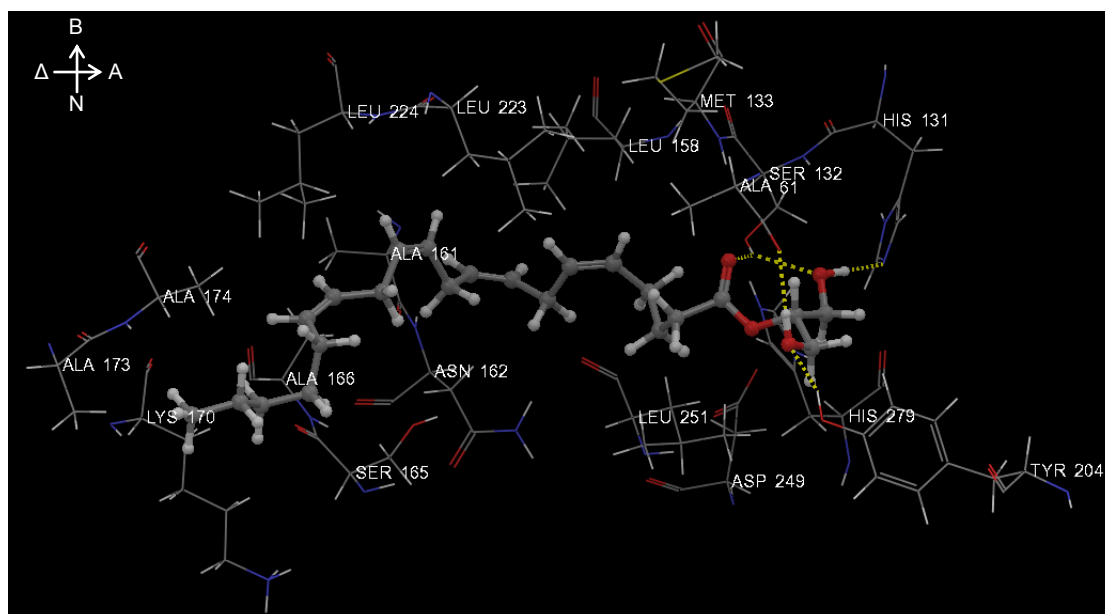
Στο πρώτο μέρος της έρευνας εξετάστηκαν ενώσεις οι οποίες έχουν ήδη μελετηθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες για την ανασταλτική τους δράση έναντι της MAGL. Οι μέχρι τώρα γνωστοί αναστολείς έχει βρεθεί ότι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) εκείνους που αντιδρούν με τη Ser132 του ενεργού κέντρου και β) εκείνους που αλληλεπιδρούν με μία από τις κυστεΐνες Cys211, Cys218, Cys252 που βρίσκονται πλησίον της καταλυτικής τριάδας.

5.1 Αναστολείς που αντιδρούν με τη σερίνη του ενεργού κέντρου

5.1.1 Πρόσδεση του φυσικού υποστρώματος στο ένζυμο MAGL

Η 2-αραχιδονούλο-γλυκερόλη (2-AG) αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα της MAGL. Η 2-AG όμως μπορεί να δράσει και ως υπόστρωμα της FAAH και ειδικότερα, σε ορισμένα κύτταρα, αναστολή δράσης της FAAH οδηγεί σε αύξηση συγκέντρωσης της 2-AG. Ωστόσο, πειραματικά δεδομένα *in vivo* έδειξαν ότι στο σύστημα ενδοκανναβινοειδών η FAAH δε συμμετέχει σημαντικά στο μεταβολισμό της 2-AG.

Κατά τη πρόσδεση της 2-AG στο ένζυμο MAGL, η μακριά υδρόφοβη αλυσίδα του μορίου σταθεροποιείται στην δυτική πλευρά του υδρόφοβου καναλιού αναπτύσσοντας μεγάλο αριθμό υδρόφοβων και van der Waals αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα Lys170, Ala173, Ala174, Leu223, Leu224, Ala166, Ser165, Asn162, Ala161, Leu158 Leu251 και Met133. Το δραστικό καρβονύλιο δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με τη καταλυτική Ser132. Τέλος, η πολική κεφαλή δημιουργεί τέσσερις δεσμούς υδρογόνου από τις οποίες οι δύο επιτυγχάνονται με τα αμινοξέα Ala61 και Met131. Αυτά ανήκουν στην οπή οξυανiónτος, που τη διατηρούν σταθερή στο χώρο. Η απόσταση μεταξύ του οξυγόνου της καταλυτικής σερίνης και του δραστικού άνθρακα της εστερομάδας της 2-AG είναι 2,1 Å, η οποία αποτελεί ιδανική θέση ώστε να λάβει χώρα ο σχηματισμός δεσμού μεταξύ τους. Στην εικόνα 5.1 παριστάνεται το αποτέλεσμα του πειράματος μοριακής πρόσδεσης με την υψηλότερη βαθμονόμηση, της 2-AG στο μόριο της MAGL με χρήση του προγράμματος Maestro.

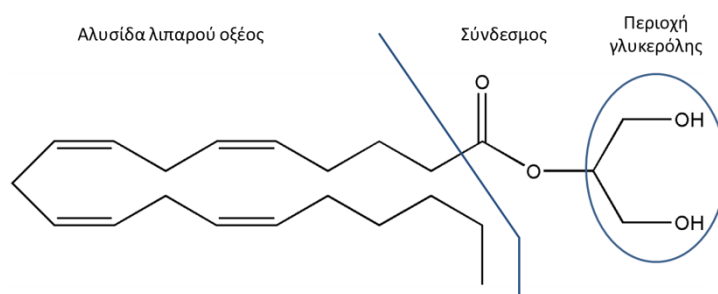


Σχήμα 5.1: Πρόσδεση της 2-AG στο ένζυμο της MAGL με χρήση του προγράμματος Maestro

5.1.2 Πρόσδεση αναλόγων της 2-AG

Η αναζήτηση εκλεκτικών αναστολέων του ενζύμου της MAGL ξεκίνησε χρησιμοποιώντας ως βάση το ενδογενές υπόστρωμά της και μεταβάλλοντας ελαφρώς τη δομή του ώστε να καταλήξουν σε νέες ενώσεις οι οποίες προσδοκούσαν ότι θα έχουν βελτιωμένη εκλεκτικότητα και θα προσδένονται ακόμη πιο ισχυρά στον υποδοχέα.

Στη δομή της 2-AG διακρίνονται τρία τμήματα: i) η μακριά αλυσίδα του λιπαρού οξέως, ii) ο σύνδεσμος και iii) η περιοχή γλυκερόλης, όπως παριστάνεται στο σχήμα 5.2.



Σχήμα 5.2: Οι τρεις φαρμακοφόρες περιοχές στη δομή της 2-AG

Το ανανταμίδιο (AEA) διαθέτει ως σύνδεσμο μια αμιδομάδα έναντι της εστερομάδας και αντί για γλυκερόλη διαθέτει αιθανολαμίνη. Αν και αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα της FAAH, προσδένεται και με το ένζυμο της MAGL αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Μεταβάλλοντας μόνο την ομάδα εστέρα της 2-AG σε αμίδιο προκύπτει η ένωση αραχιδονόυλο-σερινόλη^[76] η οποία προσδένεται ισχυρότερα του AEA^[76] αλλά ασθενέστερα της 2-AG^[76] και χωρίς να εμφανίζει εκλεκτικότητα. Τα δύο μικρότερης αλυσίδας και με λιγότερους διπλούς δεσμούς ομόλογα της 2-AG, 2-ολεϋλο-γλυκερόλη (2-OG) και 2-

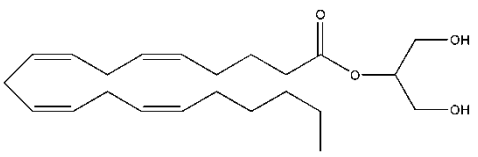
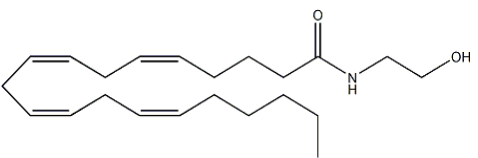
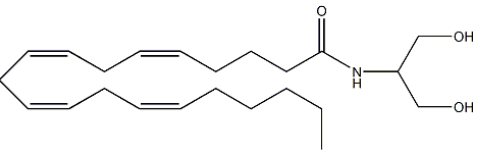
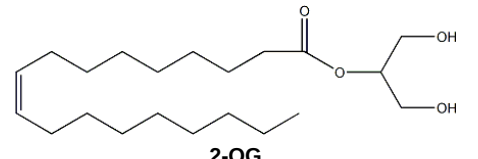
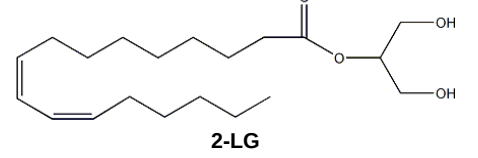
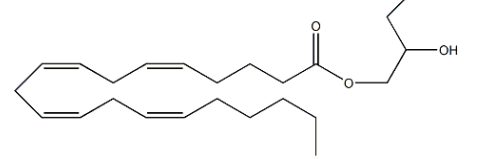
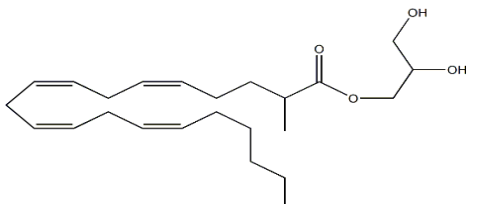
λινολεϋλο-γλυκερόλη (2-LG)^[76], εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια με τη 2-AG ως προς τη MAGL αλλά η εκλεκτικότητά τους σε αυτή σε σχέση με τη FAAH είναι πολύ ελαττωμένη. Το ισομερές 1-αραχιδοϋλο-γλυκερόλη (1-AG)^[76] εμφανίζει συναφή αν και ελαφρώς ασθενέστερη ικανότητα πρόσδεσης και εκλεκτικότητας ως προς τη MAGL σε σχέση με τη 2-AG. Οι ενώσεις α-Met-1-AG, O2203 και O2204^[77] προσδένονται αρκετά ισχυρά στη MAGL στα *in vitro* πειράματα, με τις δύο τελευταίες κάπως ασθενέστερα από ότι η πρώτη. Καμία από τις τρεις ενώσεις δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τη MAGL και στα *in vivo* πειράματα καμία δεν προκάλεσε ενεργοποίηση των κανναβινοειδών υποδοχέων. Το μακρύτερης αλυσίδας ανάλογο της α-Met-1-AG, η O4081^[78], παρόλο που προσδένεται πολύ ισχυρά με τη MAGL και πάλι δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς αυτή. Τέλος, η τριφθοροκετόνη του αραχιδονικού οξέος (ATFMK)^[58,59,76,80,82] προσδένεται αρκετά ισχυρά με τη MAGL αλλά πολύ ισχυρότερα με τη FAAH, εμφανίζοντας μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς τη FAAH έναντι της MAGL. Τα *in vitro* πειράματα της ATFMK στη MAGL δείχνουν ότι η μέγιστη αναστολή είναι μόνο 75% σε συγκέντρωση 1 mM.

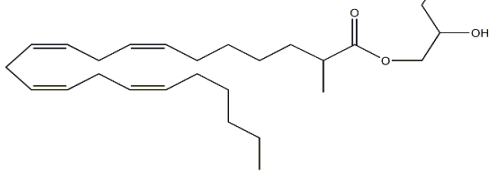
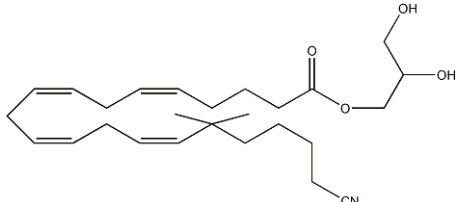
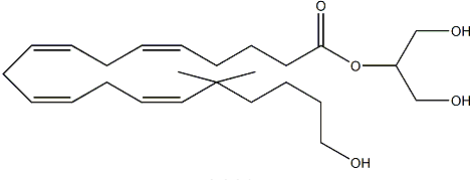
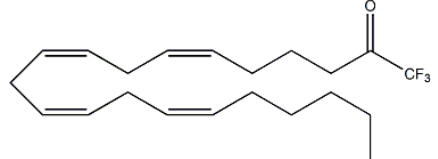
Τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα. Όλες οι ενώσεις εμφανίζουν υψηλές ενέργειες πρόσδεσης και συνδέονται με παρεμφερή τρόπο με τη MAGL, σχηματίζοντας γενικά πολλούς δεσμούς υδρογόνου και τις περισσότερες φορές με τα αμινοξέα Ser132, Ala61, His131 και Tyr204. Οι μεγαλύτερες βαθμολογίες ως προς την ενέργεια πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και οι περισσότεροι δεσμοί υδρογόνου παρατηρούνται στις ενώσεις α-Met-1-AG (Σχήμα 5.3), O2203 και O2204 ενώ η ένωση ATFMK δεν είχε όσο υψηλή βαθμολογία όσο αναμενόταν και η σύνδεσή της με το μόριο της MAGL γίνεται μέσω μόλις ενός δεσμού υδρογόνου με τη Ser132 του ενεργού κέντρου.

Συμπληρωματικά πειράματα που έγιναν στη νέα κρυσταλλογραφική μελέτη της MAGL με κωδικό 3PE6, επίσης συμφωνούν με τα ανωτέρω αποτελέσματα με μοναδικές εξαιρέσεις τις ενώσεις 2-OG και 2-LG οι οποίες εμφανίζουν αισθητά χαμηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης και σχηματίζουν μικρό αριθμό δεσμών υδρογόνου. Η ένωση ATFMK στην ανοιχτή μορφή του ενζύμου προσδένεται ισχυρότερα παρουσιάζοντας υψηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης και περισσότερους δεσμούς υδρογόνου από ότι στη κλειστή μορφή του ενζύμου της μελέτης 3JW8.

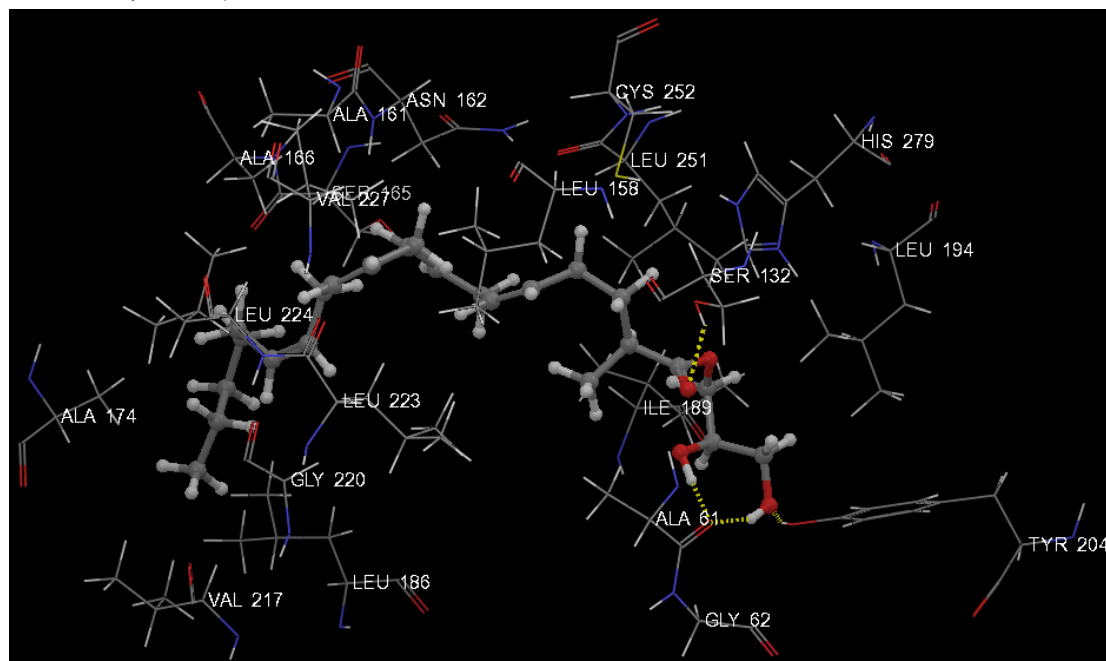
Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου εμφανίζονται στον πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ (μM) (Κυτοσολική MAGL εγκεφάλου αρουραίου)		Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL		
 2-AG	37% ¹	13	-12,300	Ser132 Ala61 His131 Tyr204
			-12,061	Ala61 Met133 2x H ₂ O
 AEA	27,5% ¹		-10,062	Ser132 Ala61 Tyr204
			-10,104	Ala61 Met133
 Αραχιδονόυλο-σερινόλη	78	73	-9,642	Ser132 Ala61 His131 Tyr204
			-8,991	Ala61 Met133
 2-OG	2,5	15	-9,117	Ser132 Ala61 Tyr204
			-5,849	Ser186
 2-LG	22	12	-9,554	Ser132 Ala61 His131 Tyr204
			-5,927	Pro188 Gly187
 1-AG	42% ¹	17	-10,309	Ser132 2x Ala61 His279 Tyr204
			-11,672	Ala61 Met133 H ₂ O
 α-Met-1-AG	33	11	-12,521	Ser132 2x Ala61 Tyr204
			-12,090	Ala61 Met133 H ₂ O

 O4081	5,1	5,8	-10,372	Ser132 2x Ala61 Tyr204
			-11,979	Ala61 Met133 His279 H ₂ O
 O2203	68	90	-12,416	Ser132 2x Ala61 Tyr204
			-11,015	2x Ala61 Met133 Asp190
 O2204	35	14	-11,433	2x Ser132 Ala61 His131 Tyr204 Ser165
			-11,152	Ala61 Met133 Ser165 Glu63
 ATFMK	0,55	2,9	-7,394	Ser132
			-9,371	Ala61 Met133 His279 H ₂ O

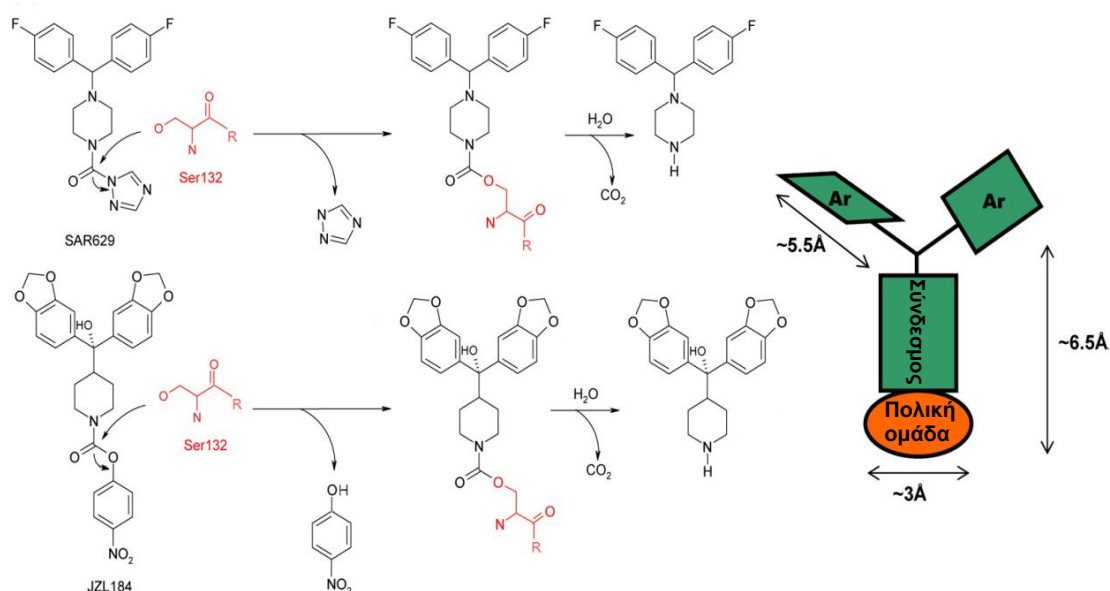
¹% αναστολή στα 100 μ M



Σχήμα 5.3: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης α -Met-1-AG που παρουσίασε τη μεγαλύτερη βαθμονόμηση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAGL.

5.1.3 Αναστολείς με Υ διαμόρφωση

Ο αναστολέας JZL184^[79,80,81,82] είναι από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα για τη MAGL. Η δομή και ο τρόπος πρόσδεσης του JZL184 με το ένζυμο της MAGL είναι παρόμοιοι με του αναστολέα SAR629^[40] στο ίδιο ένζυμο και παριστάνεται στο σχήμα 5.4. Δομικά αποτελούνται από τρεις περιοχές: i) μια πολική κεφαλή, ii) ένα σύνδεσμο (ουρία και καρβαμιδικό οξύ αντίστοιχα) και iii) δυο ογκώδεις αρωματικές ομάδες.



Σχήμα 5.4: Οι μηχανισμοί αντίδρασης και η δομή των αναστολέων SAR629 και JZL184 αντίστοιχα. Στα δεξιά με πράσινο χρώμα αναπαρίστανται τα υδρόφοβα φαρμακοφόρα μέρη και με πορτοκαλί χρώμα τα πολικά φαρμακοφόρα των ενώσεων. Με Ar χαρακτηρίζονται τα αρωματικά μέρη των ενώσεων.

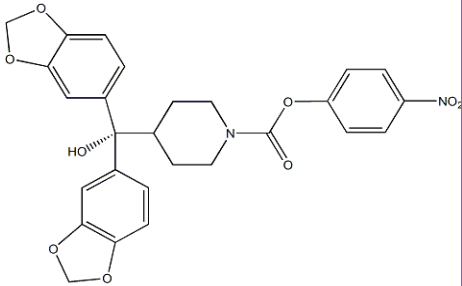
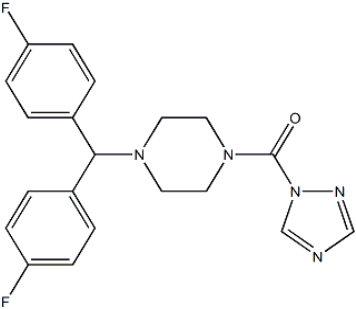
Ο μηχανισμός πρόσδεσής τους μιμείται αυτόν της 2-AG, δημιουργώντας έναν ισχυρό, μη αντιστρεπτό ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ της Ser132 του ενεργού κέντρου και του καρβονυλικού οξυγόνου τους και απομακρύνοντας ένα μόριο τριαζολίου ή ένα μόριο p-νιτροφαινόλης, αντίστοιχα. Το υπόλοιπο μόριο υιοθετεί μια χαρακτηριστική διεύθετη στο χώρο σχήματος Υ. Οι δύο αρωματικές ομάδες τοποθετούνται κάθετα μεταξύ τους και κάθετα ως προς τον υπόλοιπο κορμό της ένωσης. Με τη διεύθετη αυτή των επιμέρους περιοχών τα μόρια υιοθετούν μια μορφή ανάκλιντρου στο χώρο. Τα μόρια σταθεροποιούνται περαιτέρω μέσω της οπής οξυανιόντος από van der Waals, υδρόφοβες και μερικές πολικές αλληλεπιδράσεις.

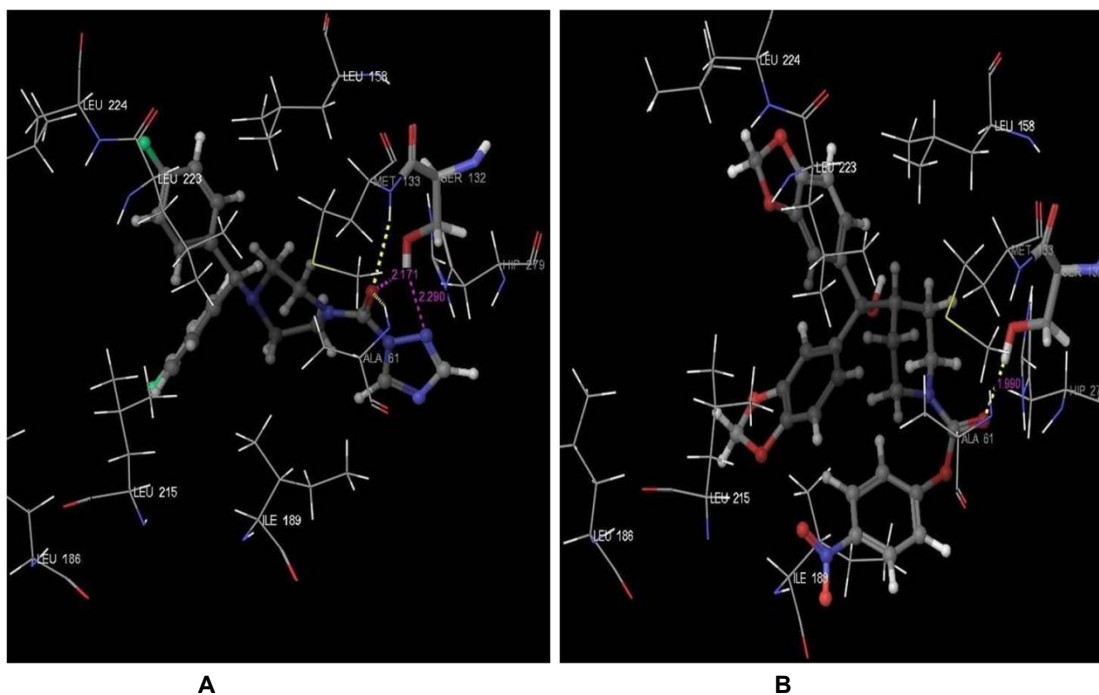
Τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα εμφανίζοντας υψηλές ενέργειες πρόσδεσης για τα δύο μόρια, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα αναμενόμενα αμινοξέα και λαμβάνοντας τη χαρακτηριστική διαμόρφωση στο χώρο, όπως παριστάνεται και στο σχήμα 5.5.

Επιπλέον, τα πειραματικά δεδομένα στη νέα κρυσταλλογραφική μελέτη 3PE6 δίνουν πολύ χαμηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης για την ογκώδη ένωση JZL184 λόγω της ανοιχτής διαμόρφωσης της κοιλότητας του ενζύμου (Κεφάλαιο 2, Υποενότητα 2.4). Η ένωση SAR629 λόγω του μικρότερου μεγέθους της εμφανίζει υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης σε σχέση με την ένωση JZL184, ωστόσο η τιμή είναι και πάλι χαμηλότερη από την αντίστοιχη της μελέτης 3JW8.

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC_{50} και τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου εμφανίζονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2: Τιμές IC_{50} , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

Ένωση	IC_{50} (nM) (Μεμβράνες στον εγκέφαλο ποντικίου)		Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL		
 JZL184	4	8	-10,309	Ser132 Ala61 His131 Tyr204
			-5,956	Ser132 Met133 Ser165
 SAR629	Δεν υπάρχουν δεδομένα	Δεν υπάρχουν δεδομένα	-9,625	Ala61 Met133
			-8,708	Ser132 Met133



Σχήμα 5.5: Οι ενώσεις (Α) SAR629 και (Β) JZL184 αντίστοιχα, προσδεμένες στο ενεργό κέντρο της MAGL λαμβάνοντας τη χαρακτηριστική διευθέτηση, σχήματος Υ στο χώρο.

5.1.4 Ενώσεις παράγωγα ουρίας

Το καρβαμόυλο τετραζόλιο προϊόν της Ely-Lilly, η ένωση LY-1,5^[80,81,82,83,84], θεωρήθηκε αρχικά εκλεκτικός αναστολέας της FAAH. Μετά από πειράματα αποδείχθηκε πως μπορεί να προσδεθεί το ίδιο ισχυρά και με καρβοξυλάσες και με άλλες λιπάσες, όπως η MAGL, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, κάτι το οποίο σημαίνει πως το μόριο εμφανίζει χαμηλή εκλεκτικότητα. Η ένωση ωστόσο εμφανίζεται ως μίγμα με το τοποϊσομερές της LY-2,5^[80,83,84]. Η ένωση LY-2,5 εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια και προσδένεται πιο ισχυρά με το ένζυμο της MAGL σε σχέση με την ένωση LY-1,5, παρόλο που εμφανίζει και αυτό χαμηλή εκλεκτικότητα.

Η ένωση **66**^[82,85] παρασκευάστηκε από την ομάδα του Καθηγητή Α. Μακρυγιάννη. Η πρόσδεσή της στο μόριο της MAGL είναι ασθενέστερη κατά μια τάξη μεγέθους από αυτή της ένωσης LY-2,5 ωστόσο εμφανίζει ικανοποιητική εκλεκτικότητα ως προς το συγκεκριμένο ένζυμο. Με βάση την ένωση **66** παρασκευάστηκε από τη Sanofi-Aventis η ένωση **67**^[82,86], η οποία διατηρεί την ίδια εκλεκτικότητα, όμως προσδένεται ισχυρότερα με τη MAGL, εμφανίζοντας IC₅₀ ίδιας τάξης μεγέθους με την ένωση LY-2,5.

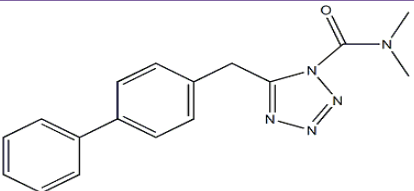
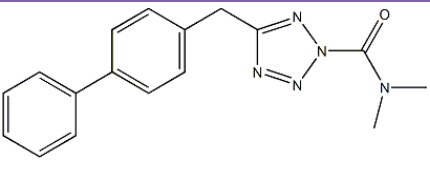
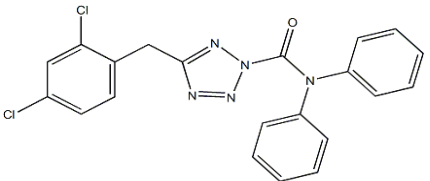
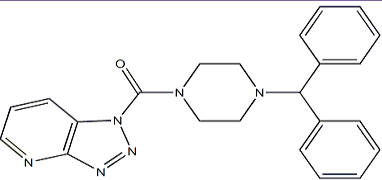
Όπως και παραπάνω, τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν με τα *in vitro* πειράματα. Τα δύο τοποϊσομερή LY εμφανίζουν αρκετά υψηλή ενέργεια πρόσδεσης, με την ένωση LY-2,5 να έχει ελαφρώς υψηλότερη. Η πρόσδεσή τους στο ένζυμο της MAGL γίνεται με τον ίδιο τρόπο, δημιουργώντας δύο δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser132 και Ala61. Αντίστοιχα και οι δύο επόμενες ενώσεις, εμφανίζουν αρκετά υψηλή ενέργεια πρόσδεσης, με την ένωση **67** να προσδένεται πολύ ισχυρότερα της ένωσης **66**. Η διαμόρφωση που παίρνουν στο χώρο τα μόρια είναι η ίδια και ο τρόπος πρόσδεσής τους

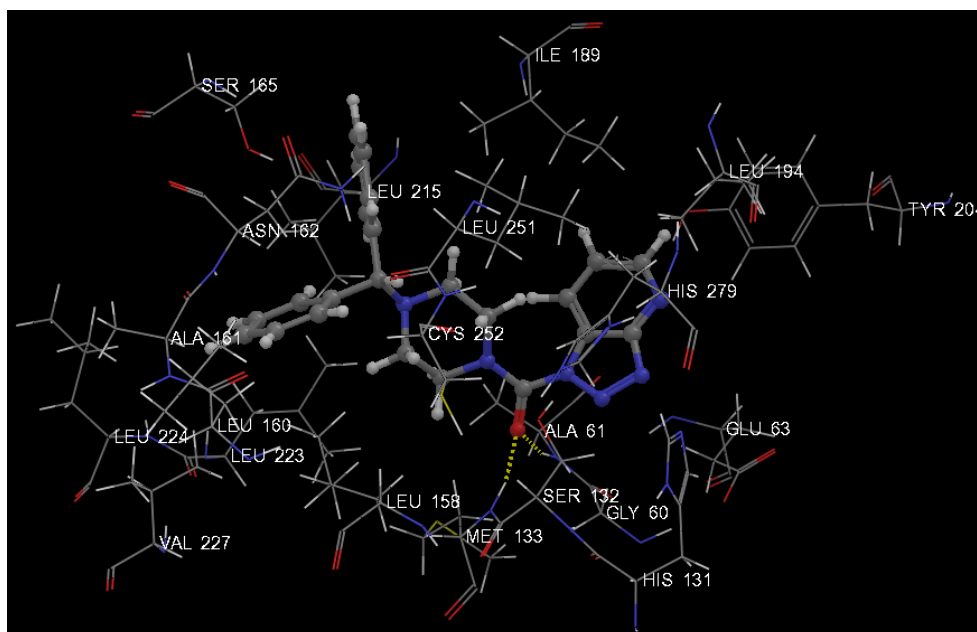
στο ένζυμο της MAGL γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala61 και Met133 της οπής οξυανιόντος και μέσω υδρόφοβων και van der Waals αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα Ser165, Ile189, Tyr204, Leu194, Leu251, Cys252, Asn162, Ala161, Leu160, Val227, Leu224, Leu223, Ser132, His131, His279, Gly60, Met133, Leu158, Ala61 και Leu215. Η μοριακή πρόσδεση της ένωσης **67** παριστάνεται στο σχήμα 5.6.

Αντίστοιχα πειράματα που έγιναν στην 3PE6 επίσης συμφωνούν με τα ανωτέρω δεδομένα εμφανίζοντας και υψηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης για τις περισσότερες από τις ενώσεις της κατηγορίας.

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

Ένωση	IC ₅₀ (μM)			Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί Υδρογόνου
	FAAH	MAGL	Πηγή		
 LY-1,5	0,0021	8,1	MAGL σε εγκέφαλο αρουραίου	-8,357	Ala61 Ser132
				-9,541	Ser132 Met133
 LY-2,5	0,0033	0,002	MAGL σε εγκέφαλο αρουραίου	-8,716	Ala61 Ser132
				-9,094	Ala61 Met133
 66	13	0,04	Ανασυν- δρασμένη ανθρώπινη MAGL	-7,242	Ala61 Met133
				-9,752	Ala61 Met133
 67	Δεν εμφάνισε δραστικό- τητα	0,004	MAGL σε εγκέφαλο ποντικού	-9,882	Ala61 Met133
				-9,048	Ser132 Met133



Σχήμα 5.6: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης 67 στο ενεργό κέντρο της MAGL

5.1.5 Οργανοφωσφορικοί και οργανοθειούχοι αναστολείς

Στη συνέχεια εξετάζονται οργανοφωσφορικές και οργανοθειούχες ενώσεις των οποίων η σχέση δομής-δραστηκότητάς τους έχουν μελετηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* δρώντας ως αναστολείς της MAGL στις μεμβράνες του εγκεφάλου ποντικών. Σε αυτή την κατηγορία, οι περισσότερες ενώσεις παρ' ότι προσδένονται ισχυρά με το ένζυμο της MAGL και με πολύ καλές τιμές IC₅₀ στα *in vitro* πειράματα, καμία ένωση δε δείχνει αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα για το συγκεκριμένο ένζυμο και συνήθως προσδένονται ισχυρότερα με το ένζυμο της FAAH. Πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις MAFP^[58,59,80,82,87,88,89], IDFP^[78,82,88,89], MOPF^[78,88], EOPF^[78,88], OP3^[89], OP4^[89] και OP6^[89] είναι ισχυροί αναστολείς της MAGL *in vitro*, ωστόσο από αυτές μόνο οι ενώσεις IDFP και OP4 είναι και *in vivo* αρκετά δραστικές, χωρίς να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα στη MAGL. Όλες οι οργανοθειούχες ενώσεις προσδένονται ασθενώς με τη MAGL και πολύ ισχυρά με τη FAAH. Η ένωση παραοξόνη^[82,88,89] προσδένεται ασθενώς και στα δυο ένζυμα. Τέλος οι ενώσεις S-εννεαούλ-BDPO^[78,88] και UP101^[59] προσδένονται ισχυρά με τη MAGL αλλά το ίδιο ισχυρά με τη FAAH και με άλλα ένζυμα.

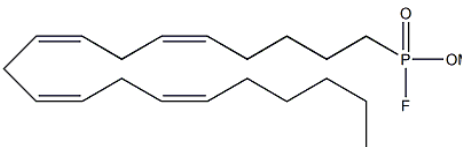
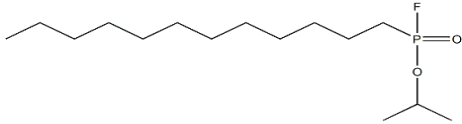
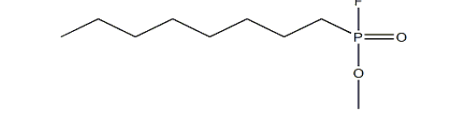
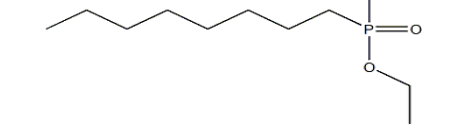
Τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα στις περισσότερες περιπτώσεις. Η ένωση MAFP εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενέργεια πρόσδεσης με τη MAGL. Οι ενώσεις IDFP, MOPF και EOPF εμφανίζουν χαμηλή βαθμολογία και προκύπτει το συμπέρασμα ότι όσο μικρότερη είναι η υδρόφοβη αλυσίδα του μορίου τόσο μικρότερη και η βαθμολογία. Η ένωση παραοξόνη εμφανίζει χαμηλή βαθμολογία και λόγω του μικρού της μεγέθους δε δίνει κάποιο σαφές μοτίβο πρόσδεσης. Οι ενώσεις UP101 και S-εννεαούλ-BDPO εμφανίζουν χαμηλή βαθμολογία και προσδένονται ασθενώς, μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με το ένζυμο. Οι ενώσεις OP3 και OP4 εμφανίζουν σχετικά μέτριες ενέργειες πρόσδεσης, ενώ η ένωση OP6 δίνει χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης συγκριτικά με τις OP3 και OP4. Οι οργανοθειούχες

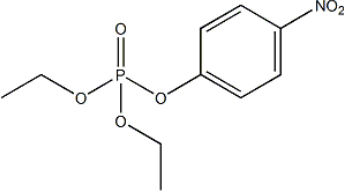
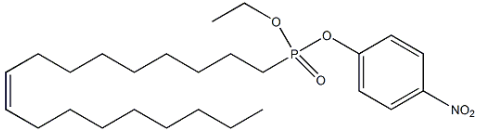
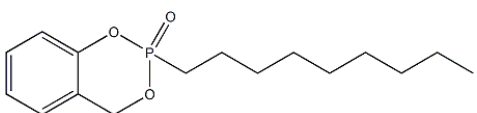
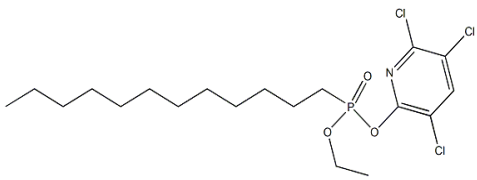
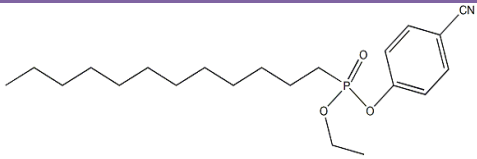
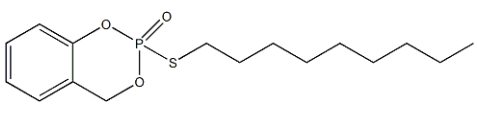
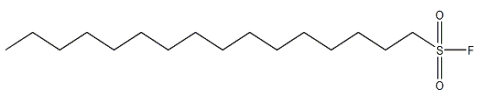
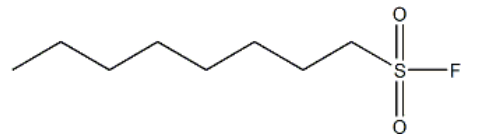
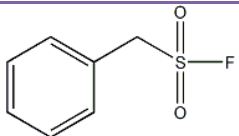
ενώσεις δίνουν πολύ χαμηλές βαθμολογίες και η πρόσδεση των ενώσεων γίνεται με ελάχιστους δεσμούς υδρογόνου. Οι ενώσεις OS10^[88,89] και PMSF^[58,59,82] έχουν πολύ μικρό μέγεθος και δεν εμφανίζουν κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο πρόσδεσης, αντιδρώντας κάθε φορά με διαφορετικό αμινοξύ. Η οργανοθειούχα ένωση που δίνει την υψηλότερη βαθμολογία μεταξύ αυτών είναι η ένωση HDSF^[58,59] λόγω της μακριάς και ευέλικτης υδρόφοβης αλυσίδας της.

Επιβεβαίωση των παραπάνω υπολογιστικών αποτελεσμάτων έγινε και από τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης στην κρυσταλλογραφική μελέτη 3PE6. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ένωση MAFP, η οποία δίνει πολύ χαμηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης από ότι στη μελέτη 3JW8. Η ένωση που προσδένεται ισχυρότερα είναι η OP4, ενώ οι οργανοθειούχες ενώσεις και σε αυτή τη μελέτη προσδένονται ασθενώς.

Τα παραπάνω δεδομένα μαζί με τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου παρουσιάζονται στον πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

Ένωση	IC ₅₀ (nM)(Σε μεμβράνες εγκεφάλου ποντικού)		Glide GScore	Δεσμοί υδρογόνου
	MAGL	FAAH	3JW8 άνω 3PE6 κάτω	
 MAFP	2,2±0,3	0,10±0,02	-8,680	Ser132
			-5,542	His279 Ser132 Ala61 Met133
 IDFP	0,76±0,33	3,0±2	-6,479	Ser132
			-6,994	Ser132
 MOPF	3,0±0,2	0,79±0,15	-4,408	Ser132
			-5,859	His279 Ser132 Met133
 EOPF	3,0±0,7	0,6±0,05	-2,520	Ser132
			-5,031	His279 2x Ser132 Met133 Ala61

 Παραοξόνη	2300±1100	540±18	-4,664	2x Ser132
			-5,259	Ala61 Met133
 UP-101	3,2±0,17	0,18±0,14	-6,953	Ala61
			-6,262	Asp190
 S-ε-nεaύλ-BDPO	0,31±0,03	0,15±0,01	-4,894	Ser132
			-5,277	Ser132 Ala61 Met133
 OP3	0,14±0,01	42±12	-7,569	Ser132 Met133 Ala61
			-8,938	Ser132 H ₂ O
 OP4	0,07±0,01	12±3	-7,585	Ser132 Gly214
			-9,484	Ser132 Met133
 OP6	0,31±0,03	0,15±0,01	-5,894	Ser132
			-7,750	Ser132 Ala61 Met133
 HDSF	241±17	2,1±0,1	-5,113	Ile189 Gly214
			-4,075	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 OS10	140±2	1,9±0,2	-3,383	Asn162
			-3,928	Ser132 Met133
 PMSF	155000±7000	900	-3,812	Asn162
			-4,317	Δεν σχηματίζει δεσμούς

5.1.6 URB 602,754, JZL195, CAY10499

Οι δομές των ενώσεων URB602^[80,82,91,92,93] και URB754^[78] διαφέρουν πολύ από εκείνες των ενδογενών κανναβινοειδών, μη διαθέτοντας μακριές ανθρακικές αλυσίδες. Οι ενώσεις αυτές αρχικά θεωρήθηκαν πολύ ισχυροί αναστολείς της MAGL. Η ένωση URB754 έδειξε να προσδένεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο της MAGL και να εμφανίζει εκλεκτικότητα τάξης μεγέθους 150 φορές μεγαλύτερη έναντι της FAAH. Η ένωση URB602 έδειξε να προσδένεται ασθενέστερα με τη MAGL αλλά να μην επηρεάζει καθόλου τη FAAH. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά αμφισβητήθηκαν και δεδομένα από νέα πειράματα δείχνουν ότι και οι δύο ενώσεις προσδένονται με σχετικά παρόμοια ισχύ και στα δύο ένζυμα, χωρίς να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα στο ένζυμο της MAGL^[92].

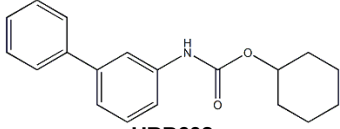
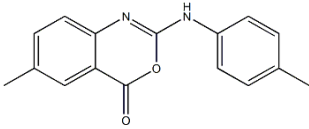
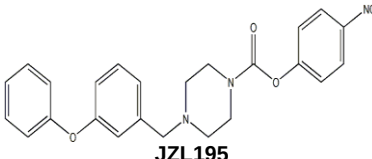
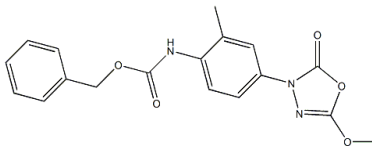
Η ένωση JZL195^[82,94] είναι ισχυρός αναστολέας και των δύο ενζύμων αναστέλλοντας την υδρόλυση του AEA και της 2-AG εξίσου. Μάλιστα τα *in vitro* αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης της έναντι των ενζύμων MAGL και FAAH μπορούν να συγκριθούν με αυτά των JZL184 και PF-3845, οι οποίοι είναι από τους ισχυρότερους και ειδικούς αναστολείς των ενζύμων αντίστοιχα. Αυτή η 'διπλή' δράση της ένωσης JZL195 δείχνει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του τρόπου αναγνώρισης/πρόσδεσης των ενώσεων AEA και 2-AG στα αντίστοιχα ένζυμα, γεγονός που οδηγεί στην βελτιστοποίηση της δραστηριότητας της JZL195. Τέλος, και η ένωση CAY10499^[80,82,95] εμφανίζει 'διπλή' δράση καθώς προσδένεται και στα δύο ένζυμα αρκετά ισχυρά, εμφανίζοντας εκλεκτικότητα ως προς αυτά.

Τα αντίστοιχα πειράματα της μοριακής μοντελοποίησης στην κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα. Οι ενώσεις URB602 και URB754 εμφανίζουν μέτρια βαθμολογία και η πρόσδεσή τους γίνεται με τη βοήθεια ενός μόνο δεσμού υδρογόνου με τη Ser132. Η ένωση JZL195 εμφανίζει αρκετά υψηλή βαθμολογία ως προς την ενέργεια πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά η πρόσδεσή της γίνεται μέσω ενός μόνο δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Ser132 του ενεργού κέντρου. Τέλος, η ένωση CAY10499 εμφανίζει μέτρια βαθμολογία, παρόμοια με τις δύο πρώτες ενώσεις της κατηγορίας, αλλά προσδένεται ισχυρότερα στο ένζυμο σχηματίζοντας τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser132, Leu251 και Tyr204.

Κατά πλήρη σύμπτωση και τα πειραματικά αποτελέσματα στην 3PE6 συμφωνούν με τα ανωτέρω δεδομένα, εμφανίζοντας αρκετά υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης σε όλες τις ενώσεις της κατηγορίας.

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα εμφανίζονται στον πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ (μM)			Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL	Πηγή		
 URB602	17	28	Εγκέφαλος αρουραίου	-7,435	Ser132
				-9,959	Ala61 Met133
 URB754	31,8±3,8	0,2±0,02	Εγκέφαλος αρουραίου	-7,236	Ser132
				-10,919	Ala61 Met133
 JZL195	0,002	0,004	Μεμβράνες εγκεφάλου ποντικίου	-8,278	Ser132
				-10,838	H ₂ O
 CAY10499	0,086 ¹	0,092 ²	1.Εγκέφαλος αρουραίου 2.Ανθρώπινη MAGL	-7,349	Ser132 Leu251 Tyr204
				-9,675	Ala61 Met133 H ₂ O

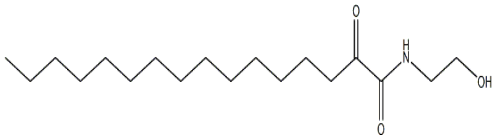
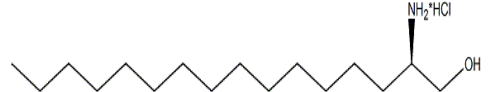
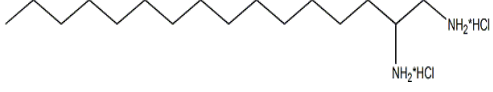
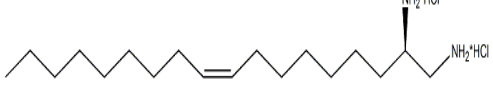
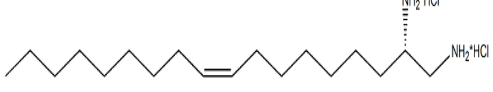
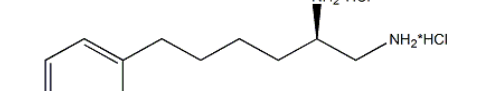
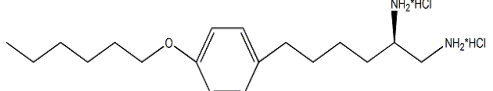
5.1.7 Μακριάς αλυσίδας 1,2-διαμίνες και παρεμφερείς ενώσεις

Μια μεγάλη ομάδα ενώσεων 1,2-διαμινών που διαθέτουν μακριά αλυσίδα και ορισμένες ακόμη παρεμφερείς ενώσεις^[90] έχουν συντεθεί και έχει ελεγχθεί η ανασταλτική τους δράση έναντι των ενζύμων FAAH και MAGL στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γ. Κόκοτου. Η ένωση GK5α προκαλεί ασθενή αναστολή και δεν εμφανίζει κάποια εκλεκτικότητα για τα δύο ένζυμα. Τα *S* και *R* εναντιομερή των ενώσεων GK5β και GK5γ αναστέλλουν τη δράση και των δύο ενζύμων στον ίδιο βαθμό. Η ένωση GK5δ (*S*) προσδένεται στη MAGL σχετικά ισχυρά με τιμή K_i=21,8 μM, ενώ παράλληλα δεν αναστέλλει τη δράση της FAAH σημαντικά. Το εναντιομερές αυτής της ένωσης, GK5δ (*R*), αναστέλλει τη δράση της MAGL με τιμή K_i=39 μM, καθώς και της FAAH σε ποσοστό 25%. Από τις δύο τελευταίες διαμίνες GK5ε και GK5ζ, η πρώτη είναι εντελώς ανενεργή, ενώ η δεύτερη ασθενώς ενεργή και στα δύο ένζυμα αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα από την μοριακή μοντελοποίηση στις κρυσταλλογραφικές μελέτες 3JW8 και 3PE6 συμφωνούν με τα *in vitro* δεδομένα. Όλες οι ενώσεις εμφανίζουν αρκετά χαμηλή βαθμολογία και προσδένονται με το ένζυμο μέσω δεσμών υδρογόνου με μικρό αριθμό αμινοξέων. Η ένωση που εμφανίζει την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης είναι η GK5δ (*S*).

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα που έχουν ληφθεί από το εργαστήριο εμφανίζονται στον πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6: Αναστολή %, K_i , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	Αναστολή (%) σε εγκέφαλο αρουραίου		K_i για τη MAGL (μ M)	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL			
 GK5α	23,8	27,5		-6,925	Ser132 Ala61 Tyr204
				-7,640	Ser132 Met133 H ₂ O
 GK5β (S)	33,6	31,5		-3,585	His131 His279
				-2,925	Arg67 2x Glu63
 GK5β (R)	31,3	30,0		-3,224	Ser132 Ala61
				-4,394	Arg67 2x Glu63 H ₂ O
 GK5γ	31,2	30,3	58,7	(S) -3,974	Ala61 His131
				(S) -3,629	H ₂ O
				(R) -4,338	Ala61 His131
				(R) -3,297	2x Glu63 H ₂ O
 GK5δ (S)	4,9	49,9	21,8	-6,367	Ala61 His131
				-6,976	Gly187
 GK5δ (R)	25,9	42,2	39,0	-5,729	Ala61 His131
				-5,167	Ser132
 GK5ε	0,0	0,0		-4,946	Ala61 His131
				-5,720	Ala61
 GK5ζ	30,9	25,9		-6,184	Ala61
				-5,960	Ala61 Ser191

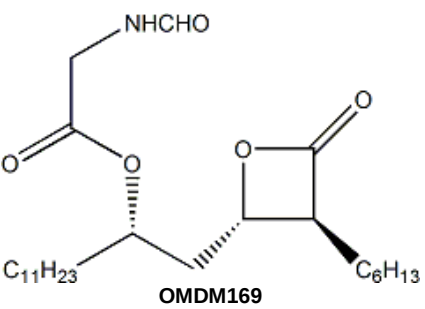
5.1.8 Η ένωση OMDM169

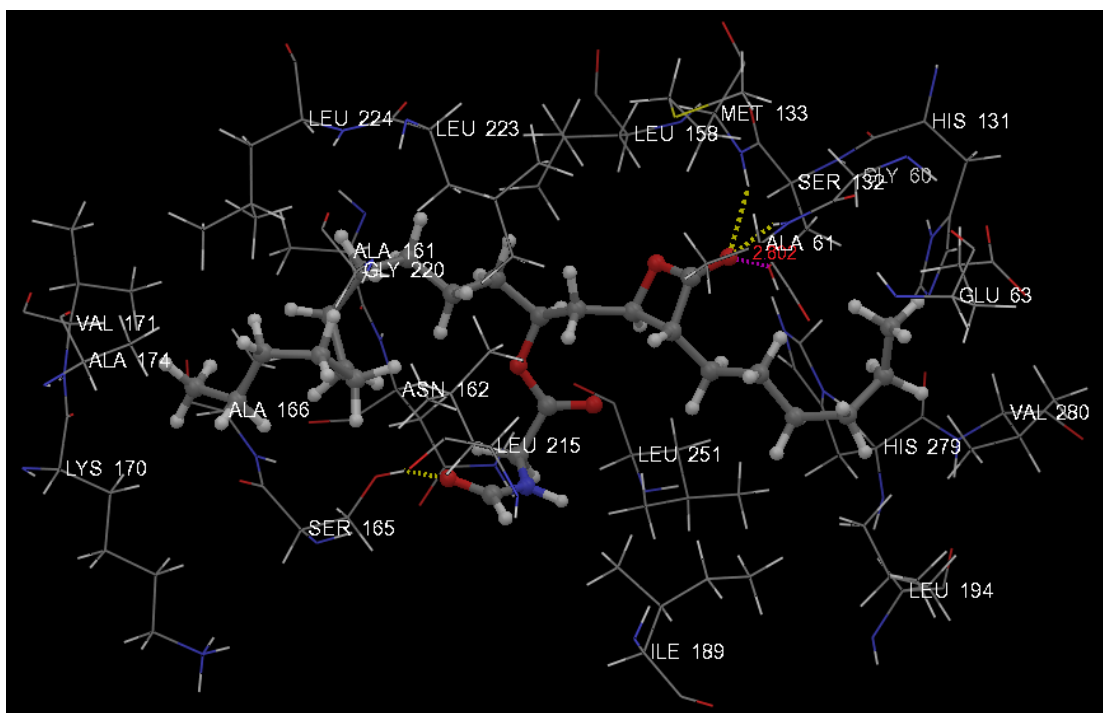
Η ένωση OMDM169^[80,81,82,96,97] είναι ένα συνθετικό παράγωγο του αναστολέα λιπασών τετραϋδρολιπστατίνης (tetrahydrolipstatin). Πρόκειται για έναν πολύ ισχυρό, πιο ισχυρό από την ένωση JZL184, και αντιστρεπτό αναστολέα της υδρόλυσης της 2-AG, ο οποίος εμφανίζει ικανοποιητική εκλεκτικότητα στο ένζυμο της MAGL σε σχέση με τη FAAH στα *in vitro* πειράματα. Το μόριο δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τους κανναβινοειδείς υποδοχείς για άμεση πρόσδεση με αυτούς, ούτε με τη λιπάση της διακυλογλυκερόλης, η οποία είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση της 2-AG από τις διάκυλογλυκερόλες. Ωστόσο, η ένωση μπορεί να προσδεθεί ισχυρά με τη παγκρεατική λιπάση όπως και με άλλες πεπτικές λιπάσες. Τέλος, ενώ τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων είναι πολύ εντυπωσιακά, τα αντίστοιχα αποτελέσματα των *in vivo* πειραμάτων που έγιναν για να ελεγχθεί η φαρμακολογική δράση του δείχνουν ότι αναστέλλει από ελάχιστα έως και καθόλου την υδρόλυση της 2-AG για λόγους που ακόμη δεν έχουν γίνει σαφείς.

Και σε αυτή τη περίπτωση, τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης και στις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες συμφωνούν με τα ανωτέρω δεδομένα. Η ένωση εμφανίζει πολύ υψηλή βαθμολογία, ανάλογη της 2-AG, και η πρόσδεσή της στο ενεργό κέντρο της MAGL σταθεροποιείται μέσω τριών δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala61, Met133 και Ser165. Το οξυγόνο της καρβονυλομάδας του μορίου βρίσκεται σε απόσταση 2,8 Å από το οξυγόνο της Ser132, η οποία είναι ιδανική για το σχηματισμό δεσμού. Τα αποτελέσματα αυτά παριστάνονται στο σχήμα 5.7.

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου εμφανίζονται στον πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ (μM) (Σε εγκέφαλο αρουραίου)		Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL		
 OMDM169	3,0	0,32±0,02	-12,064	Ala61 Met133 Ser165
			-12,837	Ala61 Met133 Asp190 H ₂ O



Σχήμα 5.7: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης OMDM169 στο ένζυμο της MAGL

5.2 Αναστολείς που αντιδρούν με τις κυστεΐνες πλησίον του ενεργού κέντρου

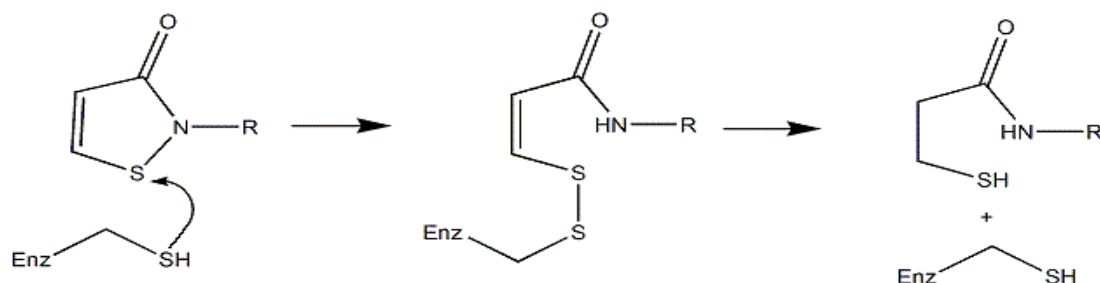
5.2.1 Ομάδες ενώσεων που αντιδρούν με τη σουλφιδρυλομάδα της κυστεΐνης: Μαλειμίδια, Δισουλφίδια, Ισοθειαζολίνες

Η ένωση N-αραχιδονυλομαλειμίδιο (NAM)^[55,80,82] ήταν από τους πρώτους ισχυρούς αναστολείς της MAGL που συντέθηκαν. Σε αντίστοιχα πειράματα σε μεμβράνες εγκεφάλου αρουραίου η ανασταλτική της δράση έδωσε $IC_{50}=0,14$ μ M, ενώ υπάρχουν ερευνητικές ομάδες οι οποίες ισχυρίζονται ότι έχουν βρει και ακόμη χαμηλότερες τιμές, συνεπώς προσδένεται ακόμη πιο ισχυρά. Ωστόσο, ενώ εμφανίζει μερική εκλεκτικότητα προς τη MAGL είναι πολύ δραστικό μόριο και μπορεί να προσδεθεί με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών το ίδιο ισχυρά.

Ένα άλλο μαλειμίδιο, η ένωση **54**^[80,82], προσδένεται στη MAGL ανθρωπίνων κυττάρων με $IC_{50}= 790$ nM το οποίο είναι δύο τάξεις μεγέθους ισχυρότερα σε σχέση με τη FAAH. Για τις δύο ανωτέρω ενώσεις καθώς και για όλα τα παράγωγα μαλειμιδίου ο πιθανότερος μηχανισμός πρόσδεσής τους με τη MAGL αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.

Η ένωση δισουλφιράμη^[53,54,80,82], η οποία για πολλά χρόνια χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την καταπολέμηση του αλκοολισμού, προσδένεται ισχυρά με τη MAGL ανθρωπίνων κυττάρων. Όμως η ερευνητική ομάδα του Karapada^[54] μεταβάλλοντας τις πλευρικές ομάδες της δισουλφιράμης, συνέθεσαν την ένωση **56**^[54,80,82], το οποίο προσδένεται ακόμη πιο ισχυρά στο καθαρό ένζυμο της MAGL και εμφανίζει 1000 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα έναντι της FAAH. Τέλος, η ένωση οκτιλινόνη^[55,80] προσδένεται μέσω ενός μερικώς

αντιστρεπτού μηχανισμού πολύ ισχυρά με το ένζυμο της MAGL αρουραίου. Η πρόσδεση γίνεται μέσω αντίδρασης προσθήκης με τη Cys218. Μετατρέποντας την όκτυλο- ομάδα της ένωσης σε ολεϋλο- ομάδα, προκύπτει η ένωση ΟΕΙΟ^[55,80,82], η οποία προσδένεται κατά μια τάξη μεγέθους ισχυρότερα με το ένζυμο της MAGL. Ο προτεινόμενος μηχανισμός πρόσδεσης των δύο τελευταίων ενώσεων καθώς και παραγώγων αυτών στη MAGL περιγράφεται στο σχήμα 5.8.



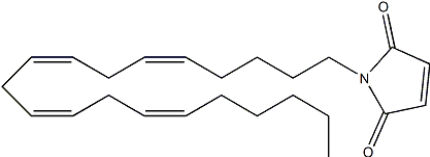
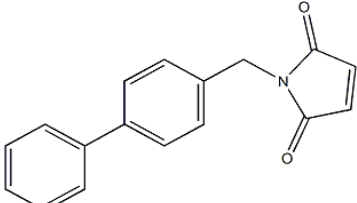
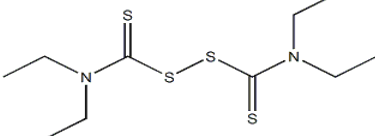
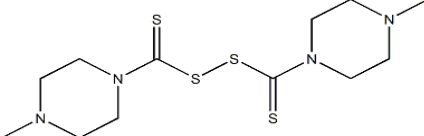
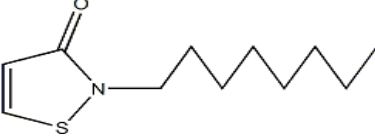
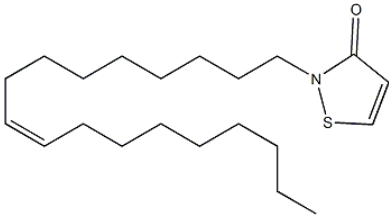
Σχήμα 5.8: Πιθανός μηχανισμός πρόσδεσης στη MAGL ενώσεων που βασίζονται στην ισοθειαζολινόνη.

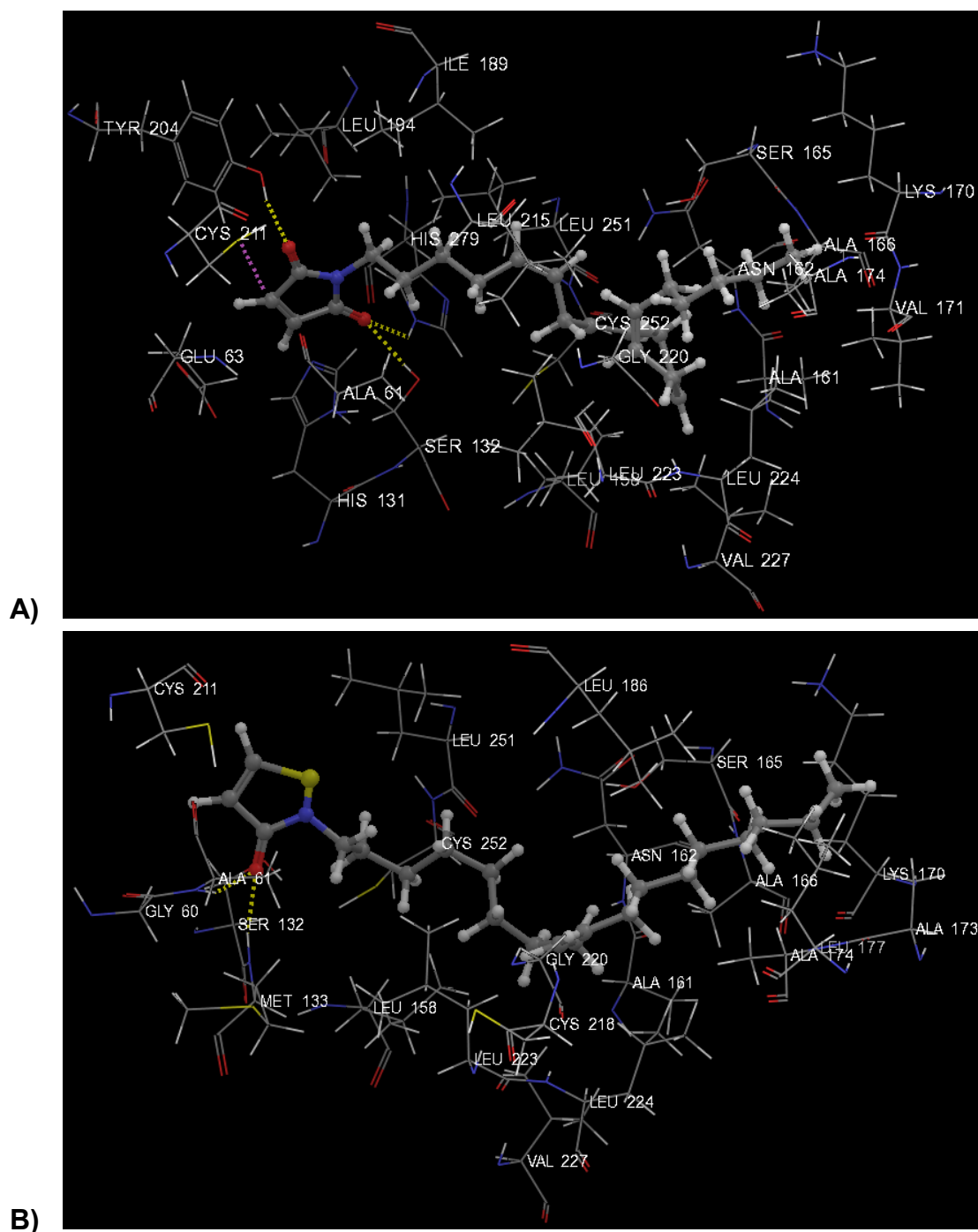
Τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα ανωτέρω δεδομένα. Η ένωση NAM προσδένεται ισχυρά με τη MAGL, δίνοντας υψηλή βαθμολογία και σχηματίζοντας τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser132, His279 και Tyr204. Η ένωση **54** εμφανίζει κάπως χαμηλότερη βαθμολογία και σταθεροποιείται με ένα μόλις δεσμό υδρογόνου με τη Ser132. Οι ενώσεις δισουλφιράμη και **56** εμφανίζουν και αυτές χαμηλή βαθμολογία με τη δεύτερη να προσδένεται ελαφρώς ισχυρότερα σε σχέση με τη πρώτη όπως αναμενόταν, ενώ σχηματίζουν τον ίδιο δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Asn162. Τέλος, οι ενώσεις οκτιλινόνη και ΟΕΙΟ εμφανίζουν υψηλές βαθμολογίες, με τη δεύτερη λόγω της μακρύτερης αλυσίδας της να προσδένεται ισχυρότερα, και σταθεροποιούνται σχηματίζοντας από δύο δεσμούς υδρογόνου η καθεμία με τα αμινοξέα της οπής οξυανιόντος, Ala61 και Met133. Η μοριακή πρόσδεση των ενώσεων NAM και ΟΕΙΟ παριστάνονται στο σχήμα 5.9. Η απόσταση της σουλφιδρυλομάδας του αμινοξέως Cys211 από το διπλό δεσμό του αρωματικού δακτυλίου του NAM είναι 3,2 Å και αντίστοιχα από το άτομο θείου από τον αρωματικό δακτύλιο του ΟΕΙΟ είναι 2,9 Å, αποστάσεις ιδανικές για το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού.

Τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3PE6 συμφωνούν επίσης με τα ανωτέρω δεδομένα, δίνοντας αρκετά υψηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης σε όλες τις ενώσεις της κατηγορίας αυτής.

Συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ και τα υπολογιστικά αποτελέσματα του εργαστηρίου εμφανίζονται στον πίνακα 5.8.

Πίνακας 5.8: Τιμές IC₅₀, βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ (μM)		Έρευνα σε	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
	FAAH	MAGL			
 N-αραχιδόνυλομαλεϊμίδιο (NAM)	3,3	0,14	Μεμβράνες εγκεφάλου αρουραίου	-8,745	Ser132 His279 Tyr204
				-12,223	Ala61 Met133
 54	17	0,79	Ανθρώπινη MAGL	-6,184	Ser132
				-9,518	Ala61
 Δισουλφιράμη		0,36	Ανθρώπινη MAGL	-4,267	Δεν σχηματίζει δεσμούς
				-5,506	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 56	200	0,11	Καθαρό ένζυμο	-6,140	Asn162
				-8,765	H ₂ O
 Οκτιλινόνη		0,088	MAGL αρουραίου	-8,563	Ala61 Met133
				-10,520	Ala61 Met133
 OEIO		0,0043		-9,399	Ala61 Met133
				-10,650	H ₂ O



Σχήμα 5.9: Μοριακή πρόσδεση των ενώσεων A) NAM και B) OEIO

5.2.2 Φυσικά τερπενοειδή

Τα φυσικά τερπενοειδή^[56,80,82] πριστιμερίνη, ευφόλη και σελαστρόλη προσδένονται στο ένζυμο της MAGL πολύ ισχυρά μέσω ενός αντιστρεπτού μηχανισμού. Με τη βοήθεια της μεθόδου της μετάλλαξης των αμινοξέων και σε συνδυασμό με τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης βρέθηκε ότι ο τρόπος πρόσδεσης αυτών των ενώσεων είναι μέσω αλληλεπίδρασης με ένα από τα δύο γειτονικά αμινοξέα Cys211 ή Cys218. Όλοι οι μέχρι τώρα γνωστοί ισχυροί αναστολείς της MAGL, μερικοί από τους οποίους οι εστέρες του καρβαμιδικού οξέος, τα μαλειμίδια, οι τετραζόλες και οι ισοθειαζολινόνες

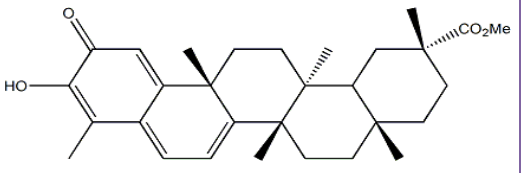
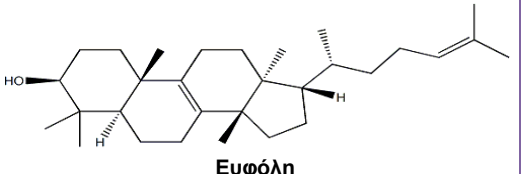
δρουν δημιουργώντας ομοιοπολικό δεσμό είτε με τη σερίνη του ενεργού κέντρου είτε με τις κυστεΐνες πλησίον αυτής. Τα φυσικά αυτά βιοϊσοστερικά τερπενοειδή προσδένονται με το ένζυμο με αντιστρεπτό μηχανισμό, μέσω δεσμών υδρογόνου.

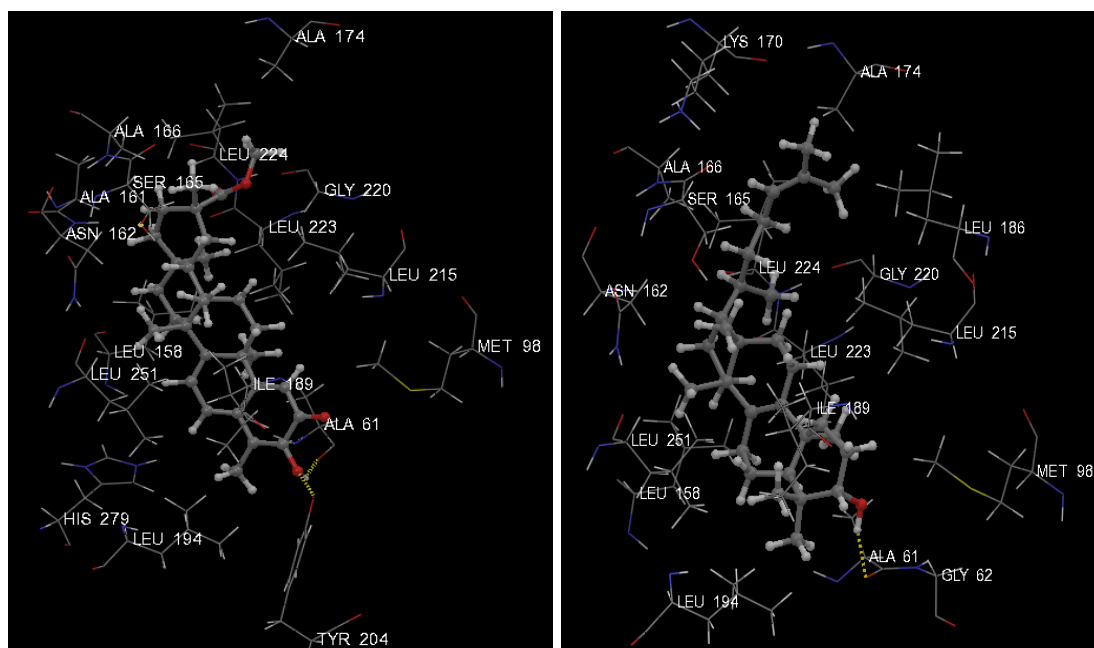
Από τα πειράματα προσομοίωσης στη κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 προκύπτει συμφωνία με τα *in vitro* πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, και οι τρεις ενώσεις εμφανίζουν αρκετά υψηλές βαθμολογίες με το μόριο της ευφόλης να δίνει τη μεγαλύτερη. Η ένωση πριστιμερίνη προσδένεται στο ένζυμο της MAGL σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala61 και Tyr204 ενώ η ένωση ευφόλη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Ala61 και η ένωση σελαστρόλη με τα αμινοξέα Ser132 και Met133. Εκτός από τους δεσμούς υδρογόνου, οι ενώσεις σταθεροποιούνται και από υδρόφοβες και van der Waals αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Cys252, Ala166, Lys170, Leu223, Leu224, Gly220, Leu158, Ser132, Ala61, Gly62, Met98, Leu215, Leu186, Ala174, Ser165, Asn162, Leu251, Ile189 και Leu194. Η μοριακή πρόσδεση των ενώσεων πριστιμερίνη και ευφόλη παρουσιάζονται στο σχήμα 5.10.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, τα πειραματικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης για τη κρυσταλλογραφική μελέτη 3PE6 δείχνουν ότι κανένα από τα τρία μόρια δεν καταφέρνει να προσεγγίσει το εσωτερικό της κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL.

Στον πίνακα 5.9 παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} σε εγκέφαλο αρουραίου και τα υπολογιστικά αποτελέσματα και από τις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες που βρέθηκαν στο εργαστήριο.

Πίνακας 5.9: Τιμές IC_{50} , βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

ΕΝΩΣΗ	IC_{50} (nM) (σε εγκέφαλο αρουραίου)	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 Πριστιμερίνη	93±8	-8,820	Ala61 Tyr204
		-5,111	Asp190
 Ευφόλη	315±1	-9,740	Ala61
		-5,716	Thr168
 Σελαστρόλη	1600±400	-8,087	Ser132 Met133
		-5,297	Asp190 H ₂ O



**Σχήμα 5.10: Μοριακή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της MAGL των ενώσεων
πριστιμερίνη (αριστερά) και ευφόλη (δεξιά)**

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 5^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Ένα βασικό μειονέκτημα των προγραμμάτων προσομοίωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης είναι ότι δεν έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ του αναστολέα και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Έτσι, ενώ οι κρυσταλλογραφικές μελέτες ορισμένων ενώσεων από αυτές που μελετήθηκαν δείχνουν την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων ένωσης-ενζύμου μέσω ομοιοπολικού δεσμού, ο παράγοντας αυτός δεν ήταν δυνατόν να έχει κάποια επίδραση στο αποτέλεσμα του υπολογισμού της ενέργειας πρόσδεσης.

Επίσης ενώ γενικά υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των βιολογικών αποτελεσμάτων και του βαθμού βαθμονόμησης πρόσδεσης, αυτή δεν είναι γραμμική και παρουσιάζονται εξαιρέσεις. Μπορεί όμως να λεχθεί ότι οι δραστηκότερες ενώσεις παρουσιάζουν και το μεγαλύτερο βαθμό βαθμονόμησης.

Ένα μεγάλο πρόβλημα που παρουσιάζεται στα βιολογικά δεδομένα είναι ότι τα μόρια που μελετήθηκαν, όσον αφορά τη πρόσδεσή τους, αποτιμήθηκαν σε διαφορετικές βιολογικές δοκιμές. Αυτό κάνει τη σύγκριση των δεδομένων δυσχερή. Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τα μόρια ταξινομήθηκαν σε κατηγορίες και αποτιμήθηκαν με την ίδια βιολογική δοκιμή. Μόνο με τον τρόπο αυτό τα συμπεράσματα είναι συγκρίσιμα. Σε όσες ενώσεις δεν υπήρχε αυτή η δυνατότητα η κατηγοριοποίηση έγινε με βάση την ομοιότητα στη δομή των μορίων τους. Το θετικό από την μελέτη των πειραματικών αποτελεσμάτων ήταν ότι ανεξάρτητα του είδους των βιολογικών δειγμάτων που έγιναν οι βιολογικές δοκιμές, τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα. Οι πιο δραστικές ενώσεις προσδένονταν ισχυρά, μέσω μεγάλου αριθμού δεσμών υδρογόνου, και εμφάνιζαν υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης. Οι λιγότερο δραστικές ενώσεις έδιναν χαμηλότερη ενέργεια βαθμονόμησης.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά στη μελέτη ενώσεων που δεν έχουν αποτιμηθεί βιολογικά. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προταθούν νέα συνθετικά μόρια με πιθανή βελτιωμένη φαρμακολογική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗ MAGL

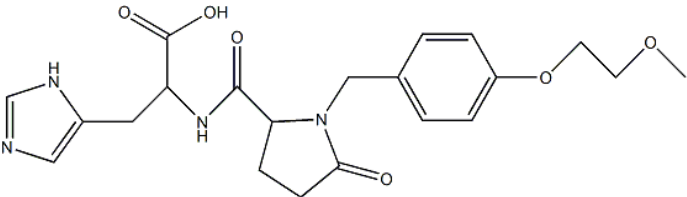
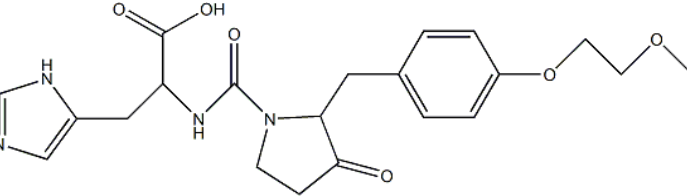
Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε ενώσεις για τις οποίες δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής η βιολογική τους δράση ως προς το ένζυμο MAGL.

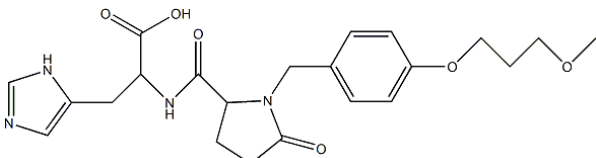
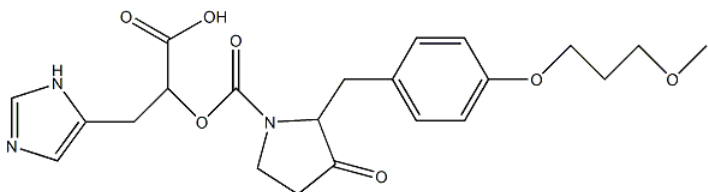
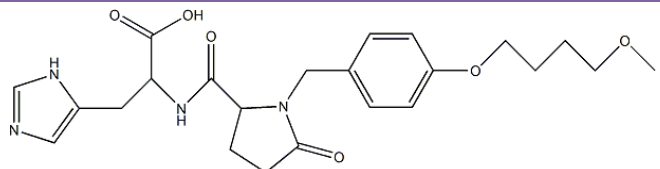
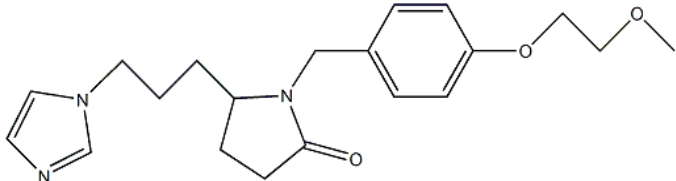
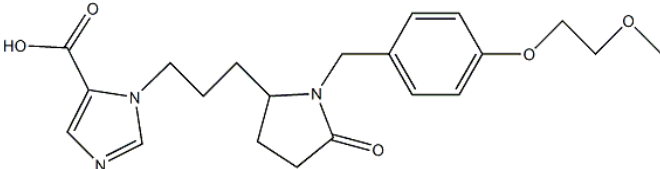
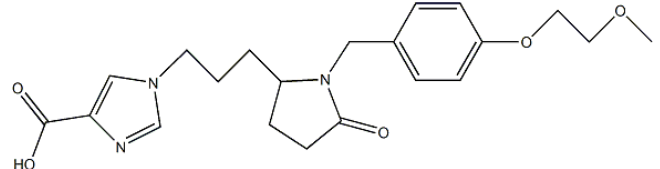
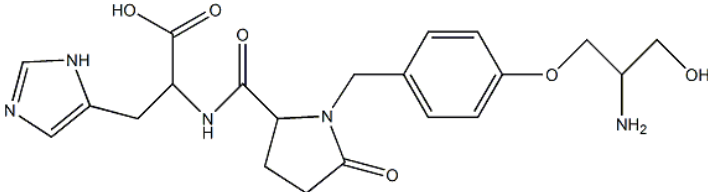
6.1 Πυρρολιδινονικά παράγωγα

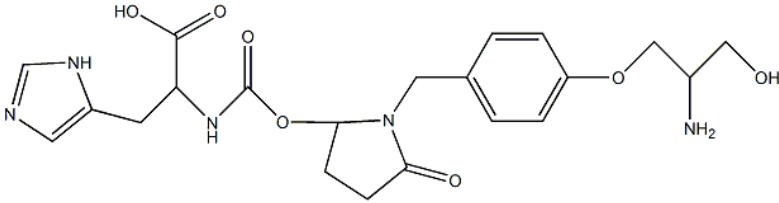
Ενώσεις που συντέθηκαν στο εργαστήριο της Αναπλ. Καθηγήτριας Π. Μηνακάκη, με σκοπό να μελετηθεί η δράση τους ως αναστολείς της ρενίνης^[98], χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης στις δύο κρυσταλλογραφικές δομές, pdb:3JW8 και 3PE6. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όλες οι ενώσεις που μελετήθηκαν δίνουν πολύ υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της MAGL σχηματίζοντας μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα οι ενώσεις Renin1A, Renin3, Renin4, Renin5, Renin1At, Renin1Bt και Renin5t δίνουν πολύ υψηλή ενέργεια πρόσδεσης, ανάλογη ή μεγαλύτερη από εκείνη του φυσικού υποστρώματος. Επίσης οι ενώσεις δίνουν μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου, πολικών και van der Waals αλληλεπιδράσεων. Οι ενώσεις Renin1At, Renin1Bt και Renin5t δεν έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα εργαστηριακά και προέρχονται από δομικές τροποποιήσεις των ενώσεων Renin1A, Renin1B και Renin5 αντίστοιχα.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Δομή	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 Renin1A	-11,974	Ser132 Asn162 Ile189 Gly187
	-11,112	Ser186 2x H ₂ O
 Renin1At	-10,358	Gly220 Asn162 Ile189
	-13,070	Ala61 Asp190 2x H ₂ O

 Renin1B	-9,462	Ala61 Met133 Asn162 Ser165
	-11,145	Ser132 Ser186 H ₂ O
 Renin1Bt	-12,904	Ala61 Met133 Tyr204 Ile189 Leu251 Ser165
	-12,293	Ser132 Ala61 Met133 Ser186 2x H ₂ O
 Renin1C	-9,174	Ser132 2x Ala61
	-11,327	Ser132 Met133
 Renin2	-11,266	Ala61 Met133 Asn162 Ile189
	-9,033	Ala61 H ₂ O
 Renin3	-12,882	Ala61 Met133 Ile189 Ser165
	-9,639	Ser132 H ₂ O
 Renin4	-12,195	Ala61 Met133 Asn162 Ile189
	-11,295	Ser132 H ₂ O
 Renin5	-12,240	Ala61 Met133 Ser165 Met98 Cys211 Gly214
	-10,188	Met133 Glu63 H ₂ O

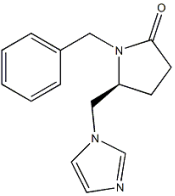
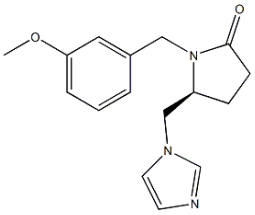
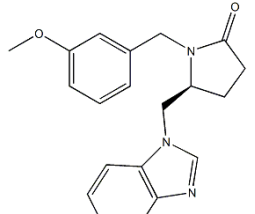
 Renin5t	-13,001	Ala61 Met133 Gly220 Ser165 Tyr204 Gly214 Cys211
	-13,614	Ala61 Met133 Glu63 Ser186 H ₂ O

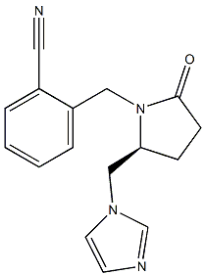
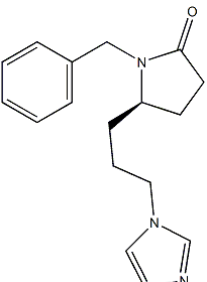
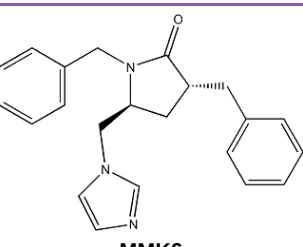
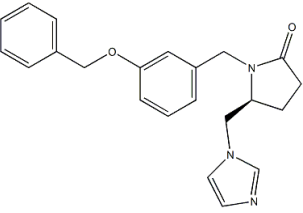
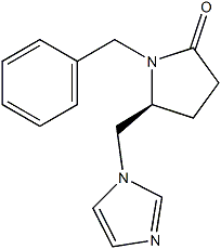
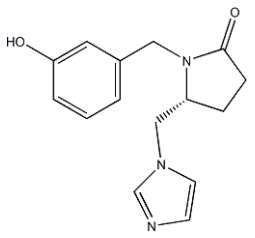
6.2 Ανάλογα πυρρολιδινόνης (MMK)

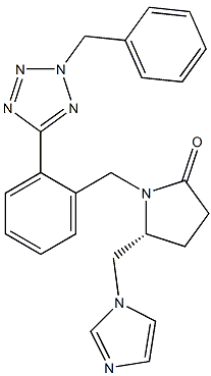
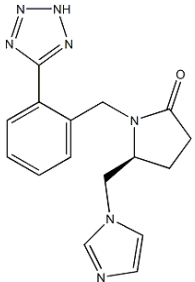
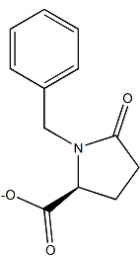
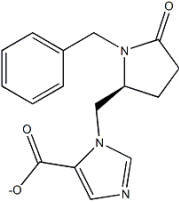
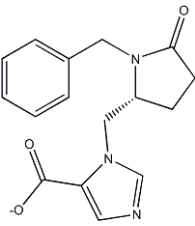
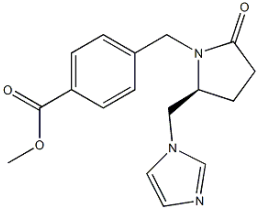
Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας^[99,100] συντέθηκαν στο εργαστήριο της Αναπλ. Καθηγήτριας Π. Μηνακάκη. Σε καμία από τις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες δεν υπήρξε ένωση που να δίνει ισχυρή πρόσδεση με το ένζυμο της MAGL. Οι ενώσεις με την υψηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης της κατηγορίας και στις δύο μελέτες είναι οι MMK7, MMK18Bion και MMK18Cion.

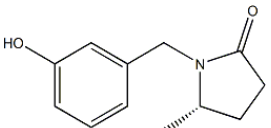
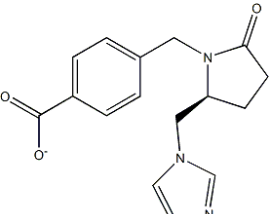
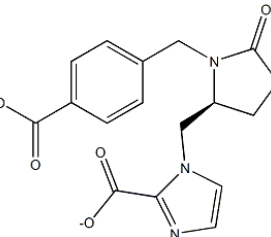
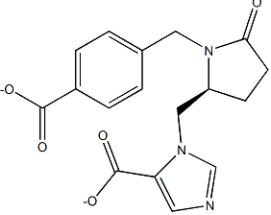
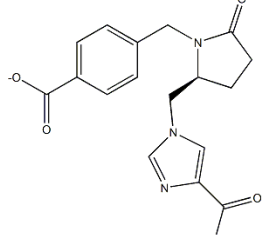
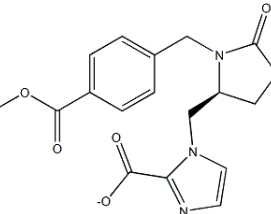
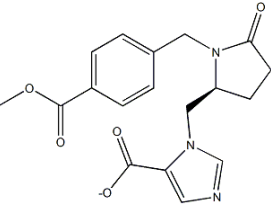
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2.

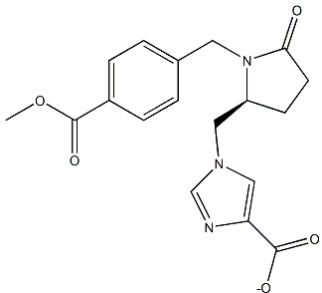
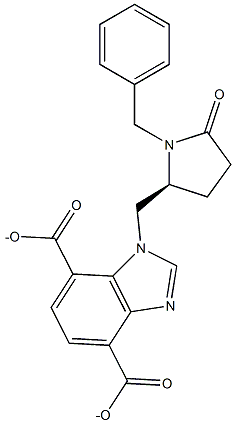
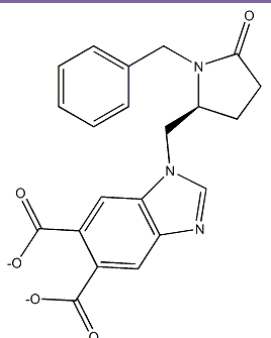
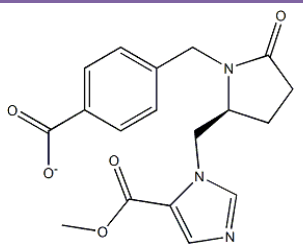
Πίνακας 6.2: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 MMK1	-5,022	Ser132
	-6,853	Ser132
 MMK2	-5,179	Ser132
	-6,633	Ser132 Ser186
 MMK3	-6,704	Ser132
	-7,844	Met133

 MMK4	-5,878	Ser132
	-7,983	Ser132 Ser186
 MMK5	-6,215	Ser132 Ile189
	-7,979	H ₂ O
 MMK6	-7,008	Asn162
	-8,896	Ser132 Ala61 Met133
 MMK7	-7,390	Ser132 Ile189
	-9,180	Ser132 Ser186
 MMK8	-5,080	Ser132
	-7,770	Ser186
 MMK8ion	-6,147	Ala61 Ile189
	-5,693	Ser132 Met133 Ser186

 MMK9	-7,534	Ser165
	-5,793	H ₂ O
 MMK10	-5,644	Cys211 Tyr204
	-4,799	Asp190
 MMK11	-5,960	Asn162 Ser165
	-6,168	Ser132
 MMK12	-6,107	Ser132 Ile189 Tyr204
	-3,076	Ser132 Ser186
 MMK13	-6,019	Ser132 Ile189
	-6,553	Ser132
 MMK14	-6,991	Ser132 Ile189 Gly214
	-8,089	Ala61 Met133 Ser186

 MMK15	-5,068	Tyr204
	-6,386	Ser132
 MMK16ion	-6,027	Ser132 Ser165
	-6,951	Ser132 Met133
 MMK17Aion	-6,517	Ser132 Ser165
	-7,252	Ser132 Met133
 MMK17Bion	-6,911	Ser132 Ile189 Gly214
	-7,547	Ser132 Met133 Ser186
 MMK17Cion	-6,821	Ser132 Ile189 Gly214 Ser165
	-7,741	Ser132 Met133 Ser186
 MMK18Aion	-6,109	Ile189 Ser165
	-7,717	Ala61 Met133 Ser186
 MMK18Bion	-7,179	Ser132 Ile189 Ser165
	-7,758	Ser132 Ala61 Met133 Ser186

 MMK18Cion	-7,580	Ser132 Ile189 Asn162
	-7,957	Ser132 Met133 Ser186
 MMK19ion	-6,997	Tyr204 Ser165
	-6,451	Ser132
 MMK20	-7,582	Ile189 Tyr204 Ser165
	-6,038	Ser132 Ser186
 MMK21	-6,928	Ile189 Gly214 Asn162
	-7,325	Ser132 Ala61 Ser186

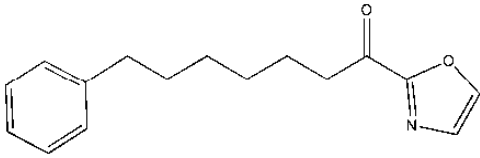
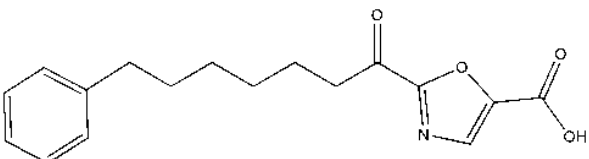
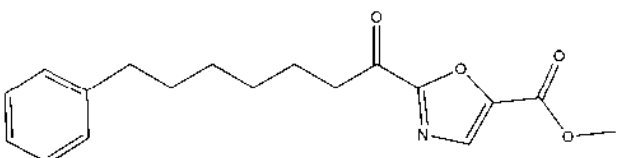
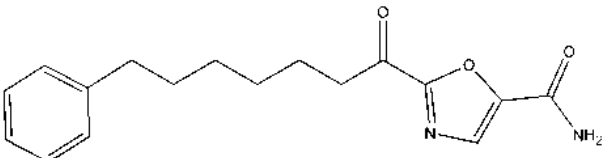
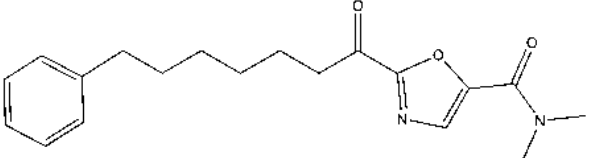
6.3 Παράγωγα της 1-οξαζόλ-2-υλ-7-φαινυλ-επταν-1-όνης με υποκατάσταση στον οξαζολικό δακτύλιο

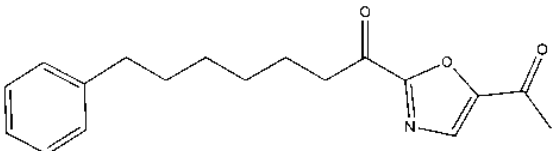
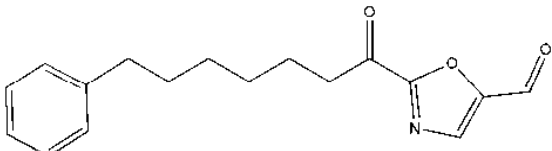
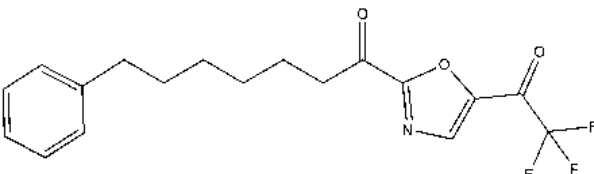
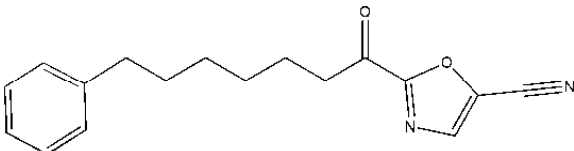
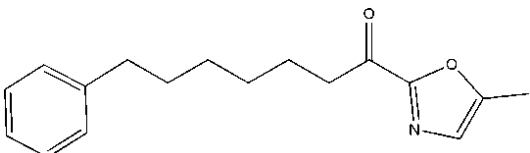
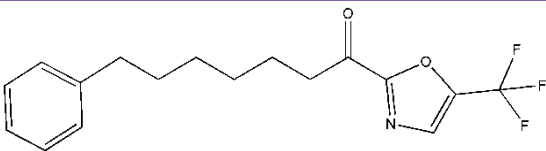
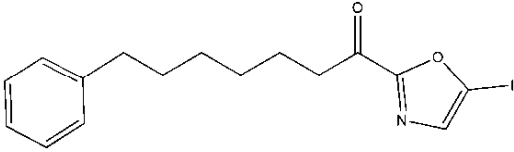
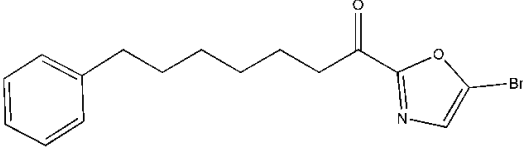
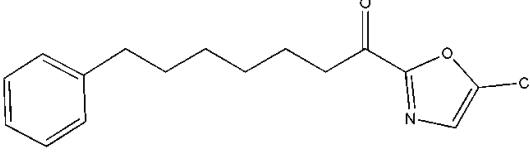
Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας^[101] έχουν σχεδιασθεί να στοχεύουν το ένζυμο κυτοσολική φωσφολιπάση A₂ (GIVA cPLA₂) από τον Καθ. Γ. Κόκοτο. Αρκετές από αυτές έχουν ήδη συντεθεί και έχει μελετηθεί η δράση τους έναντι της GIVA cPLA₂. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν αρκετά υψηλές ενέργειες πρόσδεσης. Για την κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 η ένωση A4 εμφανίζει την ευνοϊκότερη τοποθέτηση στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου του

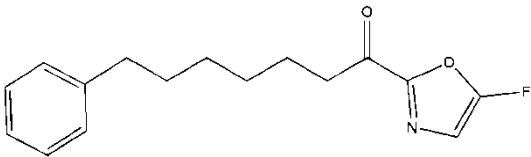
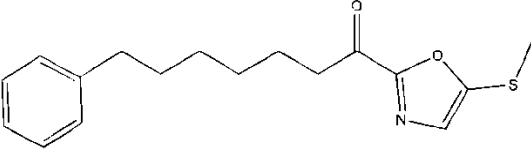
ενζύμου, έχει σχετικά υψηλή ενέργεια πρόσδεσης και σχηματίζει τέσσερεις δεσμούς υδρογόνου. Από αυτούς, οι δύο είναι μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης με τα αμινοξέα Ala61 και Met133 αντίστοιχα της οπής οξυανιόντος και οι άλλοι δύο δεσμοί επιτυγχάνονται με τα αμινοξέα Ser132 και His279 αντίστοιχα της καταλυτικής τριάδας. Για την κρυσταλλογραφική μελέτη 3PE6 οι ενώσεις A2 και A3 εμφανίζουν πολύ υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης, ανάλογη με εκείνη του φυσικού υποστρώματος. Επίσης και οι ενώσεις A4 και A8 παρουσιάζουν υψηλή ενέργεια πρόσδεσης και προσδένονται ισχυρά με το ένζυμο μέσω τριών και πέντε δεσμών υδρογόνου αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις οι οποίες διαθέτουν τη χαρακτηριστική αμιδομάδα και καρβοξυλομάδα δίνουν τις υψηλότερες βαθμολογίες.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 A1	-5,614	Ser132
	-9,755	Ala61 Met133
 A2	-9,894	Gly214 Cys211
	-12,321	Ala61 Met133
 A3	-6,985	Ser132 Ala61 Met133 His279
	-12,710	Ala61 Met133
 A4	-8,866	Ser132 Ala61 Met133 His279
	-10,387	Ser132 Ala61 Met133
 A5	-7,990	Ser132
	-10,392	Ser132 H ₂ O

 A6	-7,310	Ser132
	-9,488	Ser132 H ₂ O
 A7	-6,873	Ser132
	-10,496	Ala61 Met133
 A8	-8,645	Ser132
	-11,228	Ser132 Ala61 Met133 2x H ₂ O
 A9	-7,522	Ile189
	-8,916	Ser132 H ₂ O
 A10	-7,083	Ile189
	-9,343	Ala61 Met133
 A11	-8,514	Ser132
	-9,528	Ala61 Met133
 A12	-7,844	Ser132
	-10,800	Ala61 Met133
 A13	-8,189	Ile189
	-11,162	Ala61 Met133
 A14	-7,444	Ile189
	-10,495	Ala61 Met133

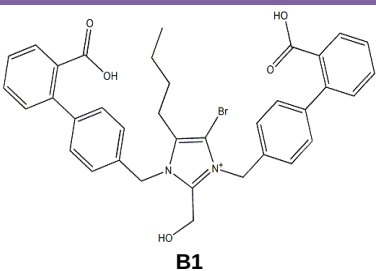
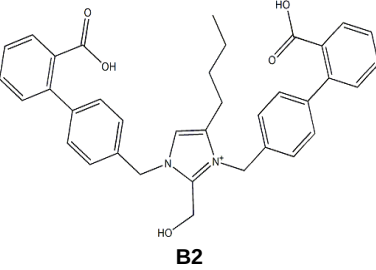
 A15	-7,325	Ile189
	-9,803	Ala61 Met133
 A16	-7,255	Asn162
	-11,386	Ala61 Met133

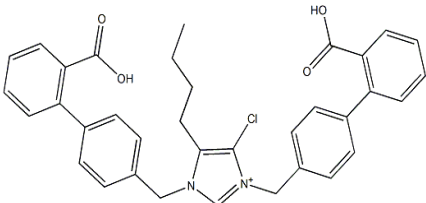
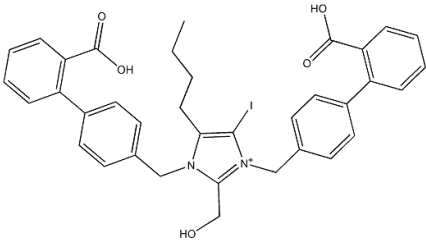
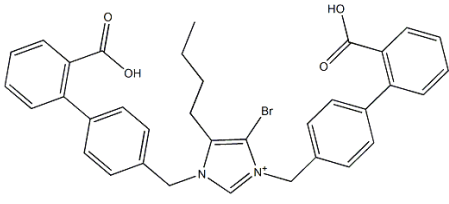
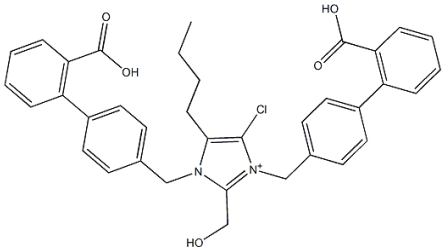
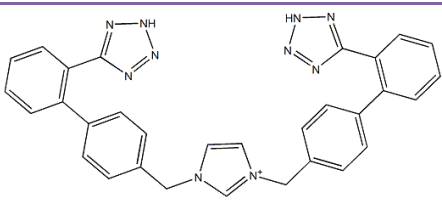
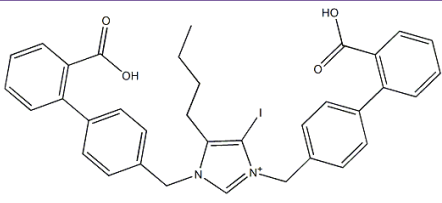
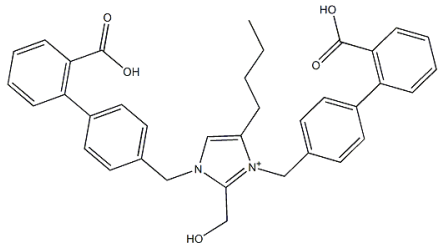
6.4 Παράγωγα της ένωσης BV6

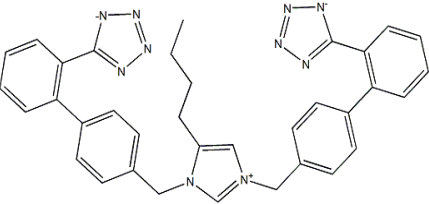
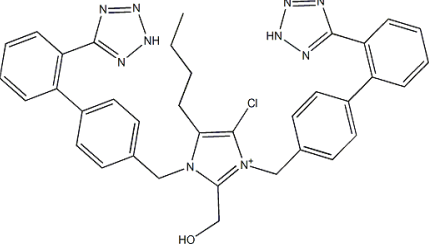
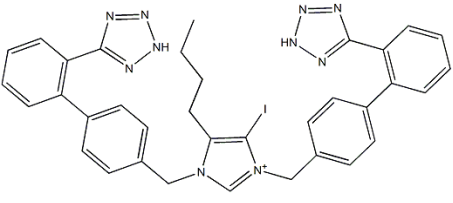
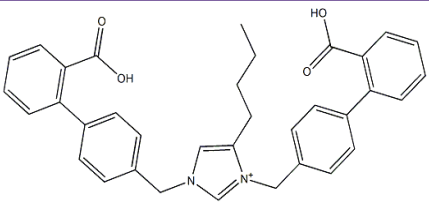
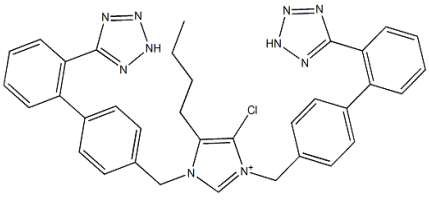
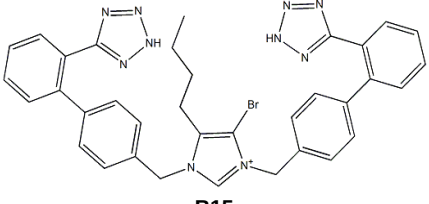
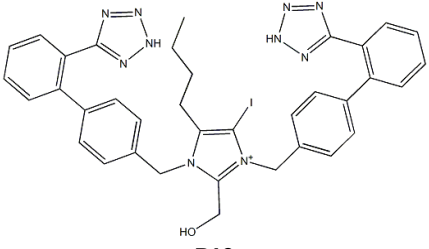
Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας^[102] συντέθηκαν στο εργαστήριο του Καθηγητή Ι. Ματσούκα. Όλες οι ενώσεις, εξαιρουμένων των ενώσεων από B14 έως B18 εμφανίζουν υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης για τα πειράματα που έγιναν στη 3JW8. Οι ενώσεις B1, B2 και B3 παρουσιάζουν ενέργεια πρόσδεσης ανάλογη με εκείνη του φυσικού υποστρώματος. Ωστόσο, δεν προσδένονται ικανοποιητικά, λόγω του μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου με το ένζυμο της MAGL και λόγω του μεγάλου μεγέθους των μορίων, συνιστώντας τις ενώσεις αυτές μη ικανούς αναστολείς της MAGL. Στα πειράματα που έγιναν στην 3PE6, όλες οι ενώσεις εμφανίζουν μικρή ενέργεια πρόσδεσης, πολύ χαμηλότερη σε σχέση με της προηγούμενης μελέτης. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μεγάλα μεγέθους μόρια δεν μπορούν να εισχωρήσουν ικανοποιητικά στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου.

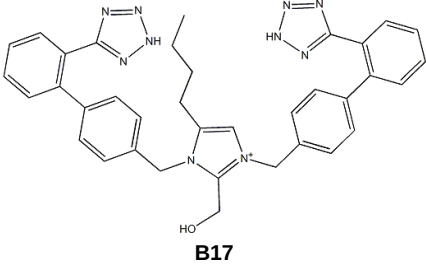
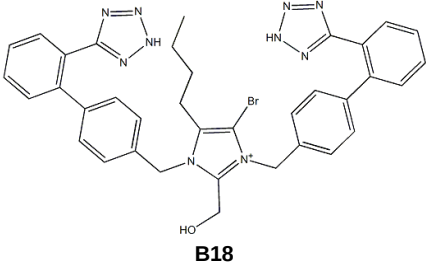
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 B1	-12,665	Ala 61 Gly 187
	-6,220	Ile189 Asp190 Ser191
 B2	-11,831	Ala 61 Gly 187 Asn 162
	-6,184	Arg250 Glu164

 B3	-11,753	Ser 132
	-5,728	Gly187 H ₂ O
 B4	-11,294	Ala 61 Gly 187
	-3,751	2x Arg250 Asp190
 B5	-11,260	Ala 61 Ser 165
	-5,895	Ser191 H ₂ O
 B6	-10,757	Ala 61 Gly 187 Asn 162
	-5,812	Asp190 Pro188
 B7	-10,533	Δεν σχηματίζει δεσμούς
	-7,197	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B8	-10,348	Ala 61
	-5,780	Pro188 Asp253
 B9	-10,246	Ala 61 Gly 187
	-5,429	Arg250 Asp253 Glu164

 B10	-10,190	Met 133
	-4,497	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B11	-9,199	Gly 187
	-4,279	Asn205
 B12	-9,199	Tyr 204 Cys 211
	-3,182	Asn205
 B13	-9,038	Ala 61 Val 217
	-6,320	Ser191 Pro188
 B14	-8,352	Δεν σχηματίζει δεσμούς
	-4,053	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B15	-8,048	Tyr 204 Cys 211
	-4,458	Ser186 Asp253
 B16	-7,578	Tyr 204 Cys 211
	-5,461	Glu164 Gly187

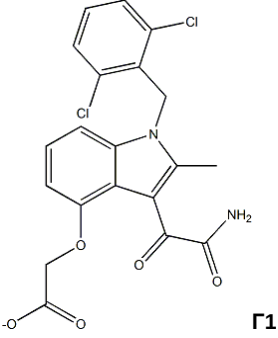
 B17	-6,550	Δεν σχηματίζει δεσμούς
	-4,810	Ser186 Asn162
 B18	-6,500	Gly 187 Asn 162
	-5,061	Asp253

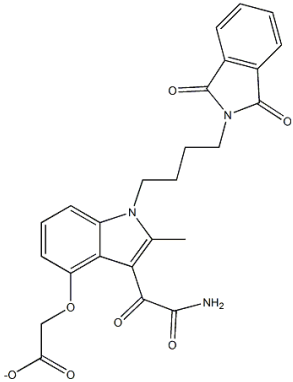
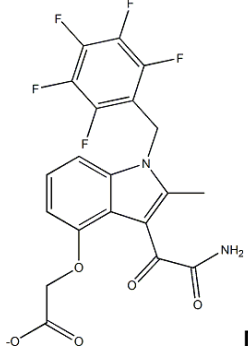
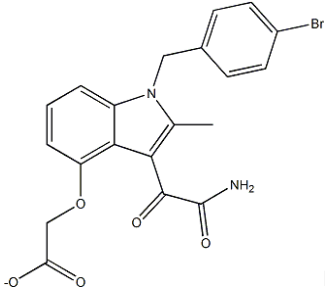
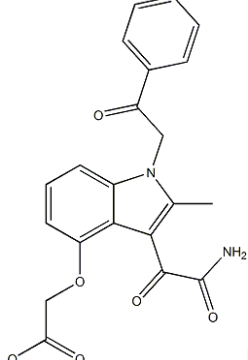
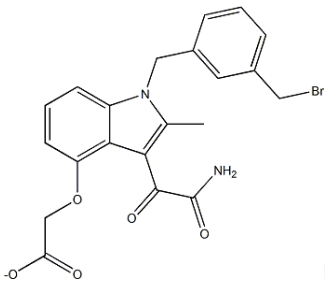
6.5 Παράγωγα του 2-μεθυλο-1H-ινδολίου

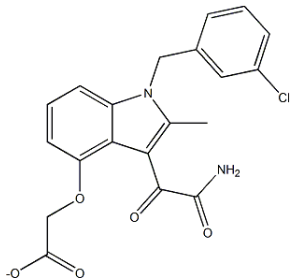
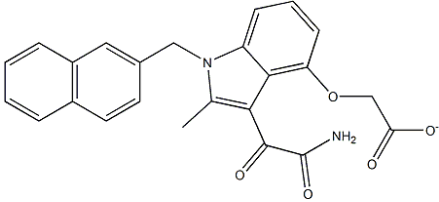
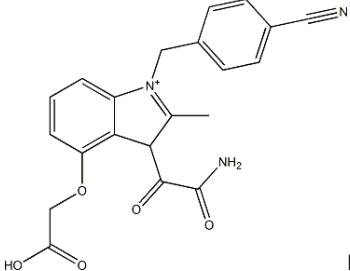
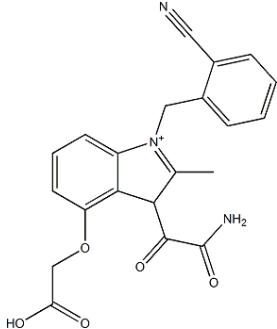
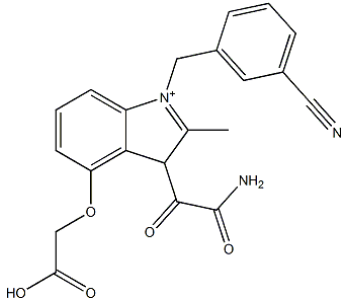
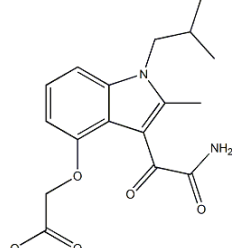
Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας αποτελούν αναστολείς των εκκριτικών φωσφολιπάσης A₂ (GIIA sPLA₂). Τα πειραματικά δεδομένα από τη μοριακή μοντελοποίηση δείχνουν ότι οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας^[103] προσδένονται ευνοϊκότερα στην κρυσταλλογραφική μελέτη 3JW8 έναντι της 3PE6. Πιο συγκεκριμένα, σε όλες τις ενώσεις η ενέργεια βαθμονόμησής τους που έδωσε η μελέτη 3JW8 είναι σταθερά πολύ μεγαλύτερη από εκείνη που προκύπτει από τη μελέτη 3PE6 και η τοποθέτηση των μορίων στον χώρο της κοιλότητας του ενεργού κέντρου είναι αρκετά διαφορετική. Για τη μελέτη 3JW8 η ένωση Γ2 έχει την πιο υψηλή ενέργεια πρόσδεσης και δείχνει ότι προσδένεται ισχυρά μέσω τεσσάρων δεσμών υδρογόνου. Τα αποτελέσματα για την ένωση Γ2 από τη μελέτη 3PE6 δεν ήταν αντίστοιχα ικανοποιητικά.

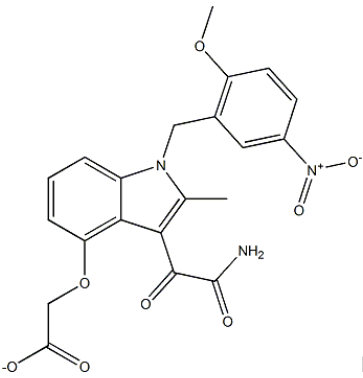
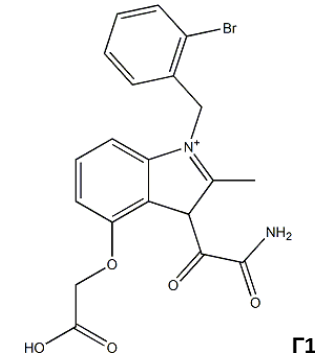
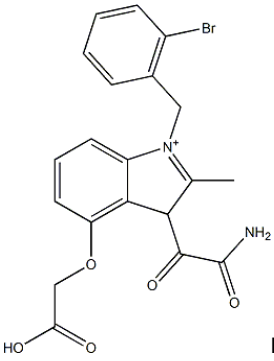
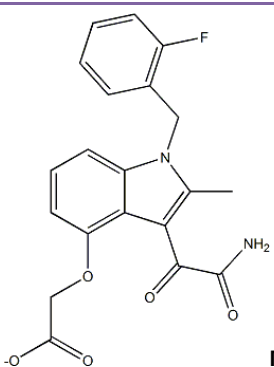
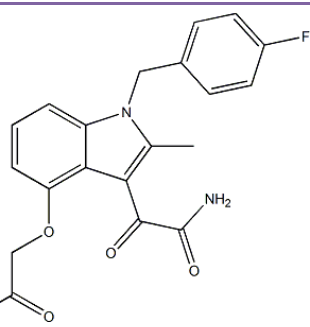
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5.

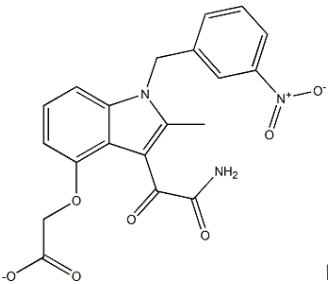
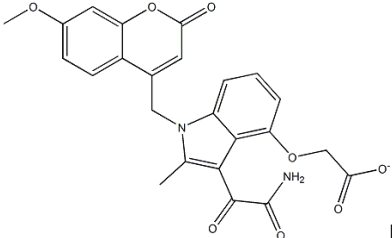
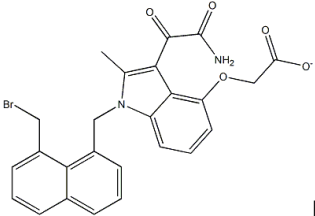
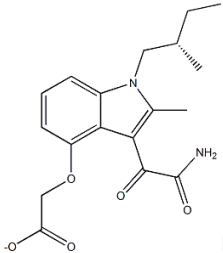
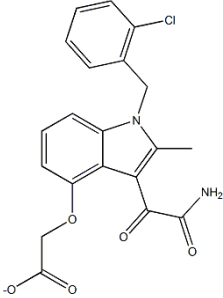
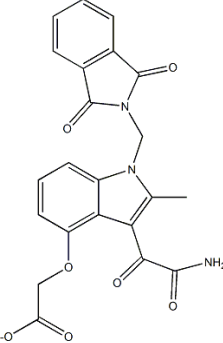
Πίνακας 6.5: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

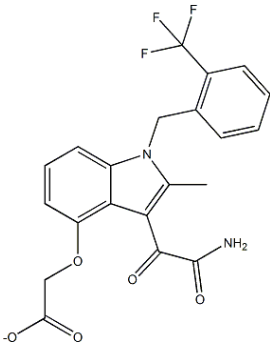
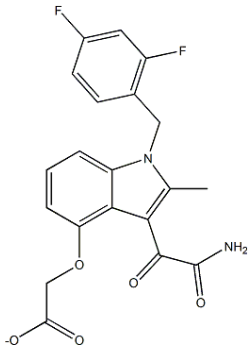
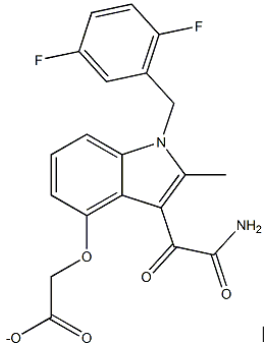
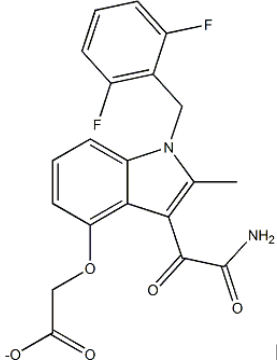
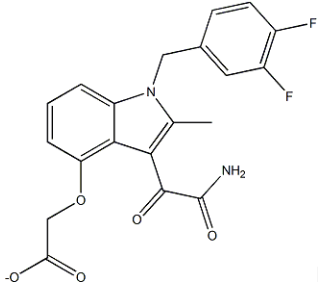
Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 Γ1	-9,206	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,677	Gly187

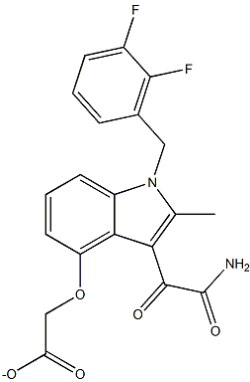
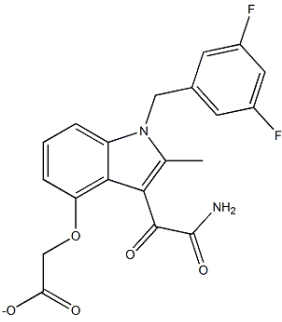
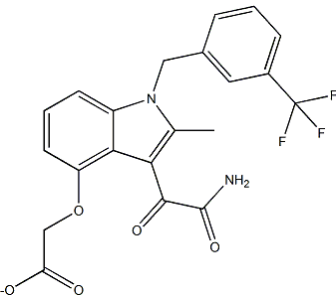
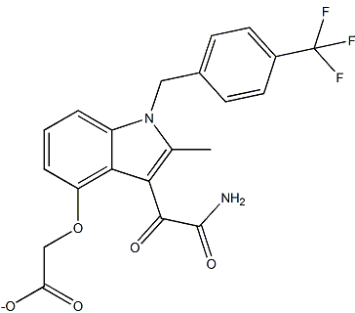
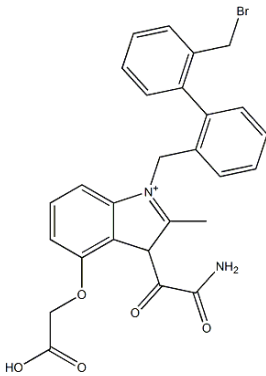
 Γ2	-11,010	Ala61 Ser165 Ile189 Gly214
	-3,070	Ala161 Ser228
 Γ3	-9,433	Ser132 Tyr204
	-4,595	Gly187
 Γ4	-9,275	Ala61 Ile189 Gly214
	-5,059	Ser165 Gly187
 Γ5	-8,524	Ser132 Ile189 Gly214
	-6,085	Ser186 Gly187
 Γ6	-9,071	Ser132 His279 Tyr204
	-3,343	Gly187

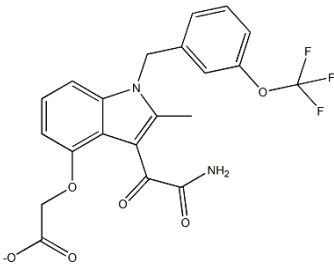
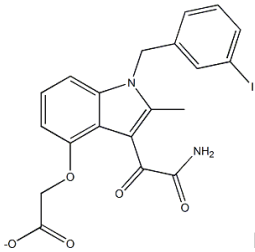
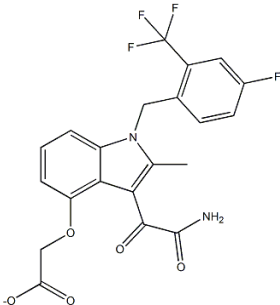
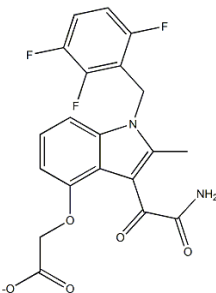
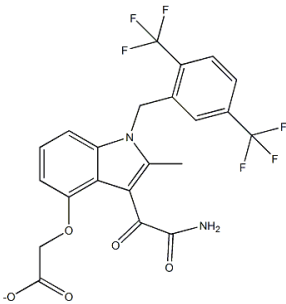
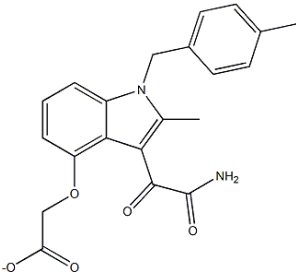
 Γ7	-9,221	Ser132 His279 Ile189 Cys211
	-3,819	Ser186 Gly187
 Γ8	-9,959	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,496	Gly187
 Γ9	-8,035	Ala61 Ile189 Gly214 Asn162
	-5,527	Ser165 Gly187
 Γ10	-7,840	Ala61 Ile189 Gly214
	-8,446	Ala61 Met133
 Γ11	-8,141	Ala61 Ile189 Gly214 Asn162
	-6,936	Ser132 Asp190
 Γ12	-8,017	Ala61 Ile189 Gly214
	-3,667	Δεν σχηματίζει δεσμούς

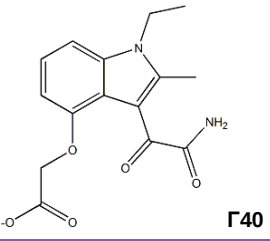
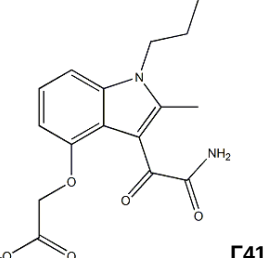
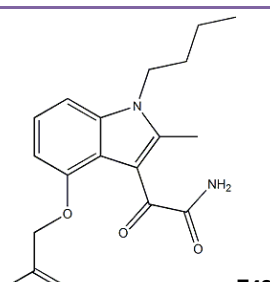
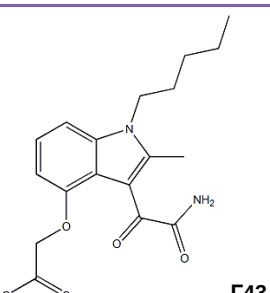
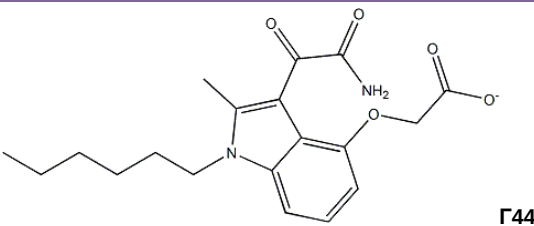
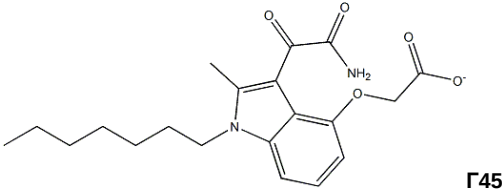
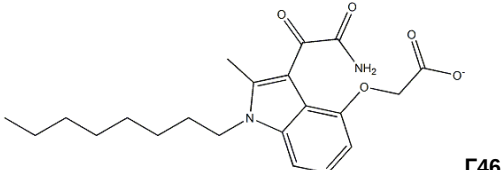
 Γ13	-9,172	Ser132 His279 Tyr204
	-4,453	Glu164
 Γ14	-7,665	Ser132 His279 Ile189 Cys211
 Γ15	-5,668	Ala61 Met133
 Γ16	-7,124	Ser132 Cys211
 Γ17	-4,793	Ser132
	-8,507	Ser132 Ala61 Met133 His279 Ile189
	-4,566	Δεν σχηματίζει δεσμούς
	-8,833	Ser132 Tyr204
	-3,460	Arg250

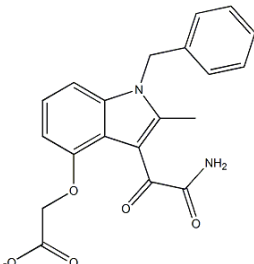
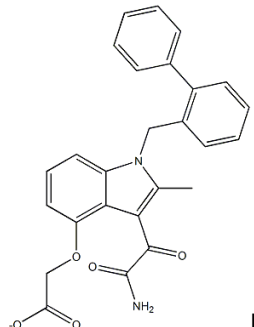
 Γ18	-8,528	Ala61 Ile189 Gly214 Asn162
	-4,282	Ser165
 Γ19	-9,264	Ala61 His279 Ile189 Gly214 Asn162
	-4,901	Asp190 Glu164
 Γ20	-8,559	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,458	Ser165
 Γ21	-8,593	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,532	Thr168
 Γ22	-8,612	Ser132 Tyr204
	-3,554	Ser165 Gly187
 Γ23	-10,271	Ala61 Ile189 Gly214 Ser165
	-4,719	Ser165

 Γ24	-9,290	Asn162 Ser165
	-3,595	Ser165 Gly187
 Γ25	-9,498	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,826	Gly187
 Γ26	-9,074	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,868	Asp190 Gly187
 Γ27	-8,971	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,538	Ser186
 Γ28	-9,064	Ala61 Ile189 Gly214 Ser165
	-4,119	Asp190 Gly187

 Γ29	-9,231	Ser132 His279 Ile189 Tyr204 Ser165
 Γ30	-8,899	Ala61 Ile189 Gly214 Tyr204
 Γ31	-9,183	Ala61 Ile189 Gly214
 Γ32	-8,930	Ala61 Ile189 Gly214
 Γ33	-9,542	Ser132 Ala61 Ile189 Gly214

 Γ34	-9,689	Ala61 Ile189 Gly214 Asn162
	-3,427	Ser186 H ₂ O
 Γ35	-8,490	Ile189 Tyr204
	-3,310	Asp190 H ₂ O
 Γ36	-9,593	Ser132 Tyr204
	-1,915	Asn162 Asp190 Pro188
 Γ37	-9,108	Ala61 Ile189 Gly214 Asn162
	-4,437	Asp190 Gly187
 Γ38	-10,200	His279 2x Tyr204 Ser165
	-4,246	Asp190 Gly187 Arg250
 Γ39	-9,277	Ala61 Ile189 Gly214
	-3,144	Gly187

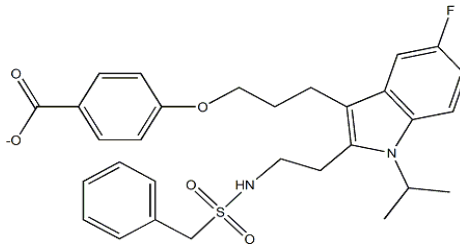
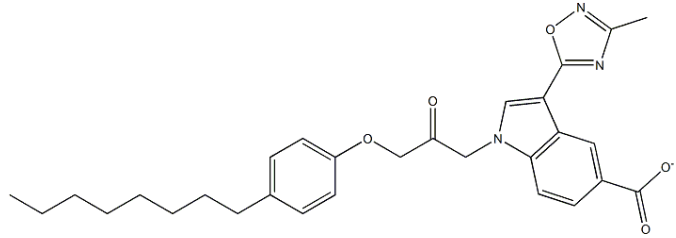
	-8,112	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,299	Ser165 2x Arg250
	-8,347	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,619	Asp190 H ₂ O
	-7,637	Ala61 Ile189 Gly214
	-5,362	Pro188 Arg250
	-8,464	Ala61 His279 Ile189 Gly214
	-6,176	Pro188
	-8,571	Ala61 Ile189 Gly214
	-6,553	Pro188 Arg250
	-9,159	Ala61 His279 Ile189 Gly214
	-5,030	Ser165 2x Arg250
	-8,406	Ala61 Ile189 Gly214
	-6,169	Gly187 Arg250

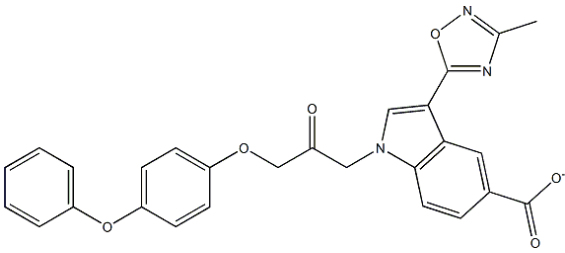
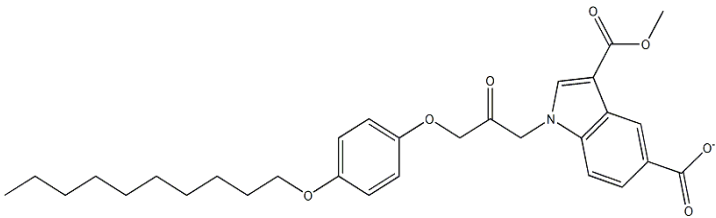
 Γ47	-8,714	Ala61 Ile189 Gly214
	-4,170	Gly187
 Γ48	-9,874	Ala61 Ile189 Gly214 Tyr204
	-4,589	Ser165

6.6 Παράγωγα του 1-μεθυλο-1H-ινδολίου

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας αποτελούν αναστολείς της GIVA cPLA₂. Τα υπολογιστικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης στις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν ότι και τα τέσσερα μόρια αυτής της κατηγορίας^[104,105] αν και αρκετά ογκώδη, εμφανίζουν αρκετά υψηλές ενέργειες πρόσδεσης. Η ένωση Δ1 δίνει την υψηλότερη βαθμονόμηση πρόσδεσης και για την ανοιχτή και για την κλειστή μορφή του ενζύμου, ωστόσο το μόριο δεν μπορεί να εισέλθει ολόκληρο στη κοιλότητα του ενεργού κέντρου του ενζύμου και προσδένεται ασθενώς, μέσω μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου. Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου από τις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 Δ1	-11,699	His279 Cys252
	-8,888	Ser186 Gly187
 Δ2	-8,702	Ser132
	-8,456	Ser132 Met133

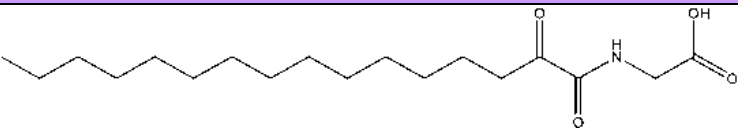
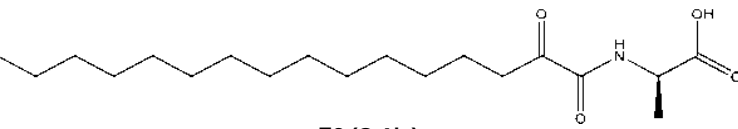
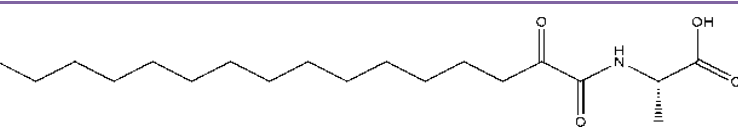
 Δ3	-10,087	Ser132 Cys211
	-8,235	Ser132 Ser186
 Δ4	-9,120	Ile189 Tyr204
	-7,740	Ala61 Met133 Asp190

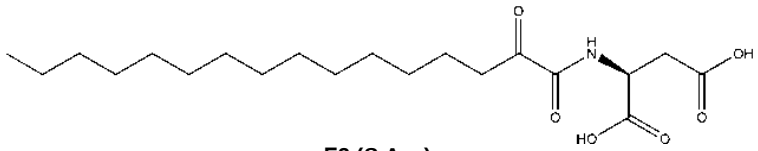
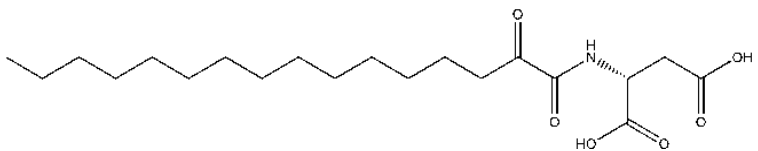
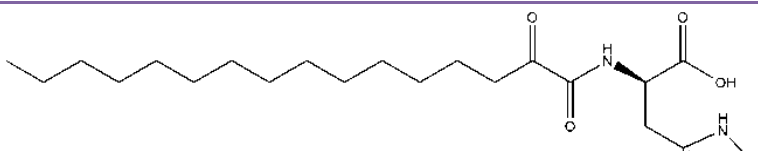
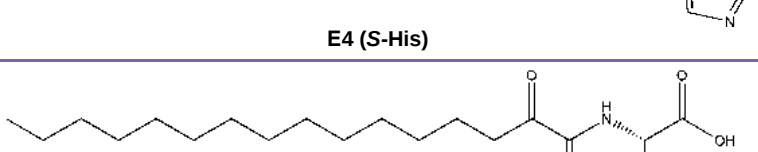
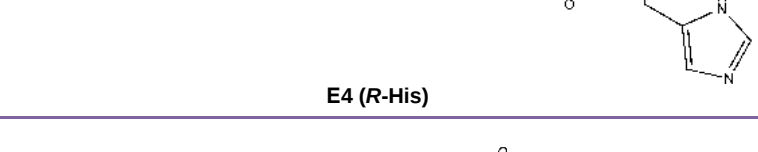
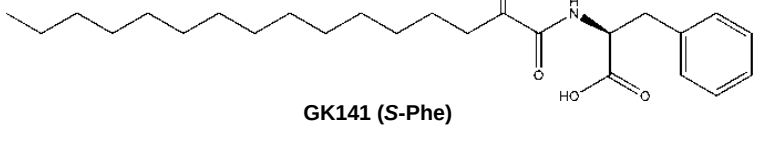
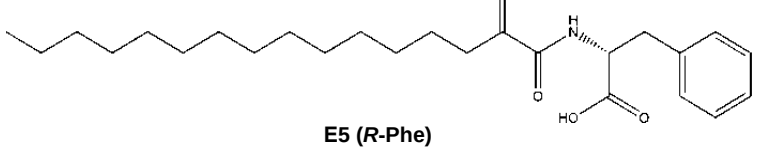
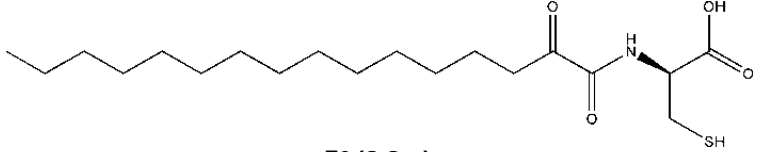
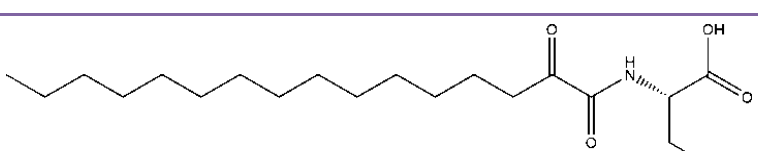
6.7 Παράγωγα 2-οξοαμιδίων των φυσικών αμινοξέων

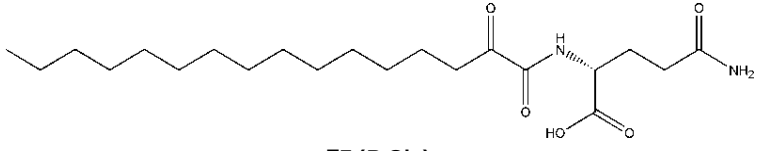
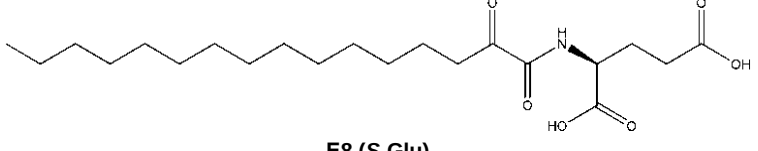
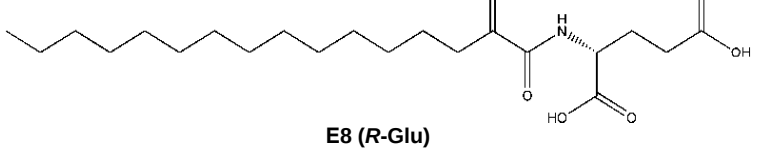
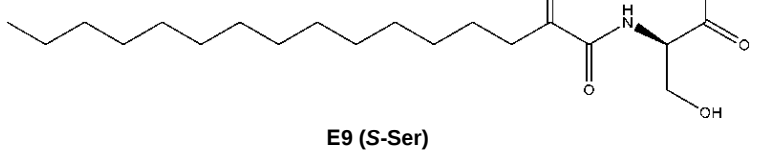
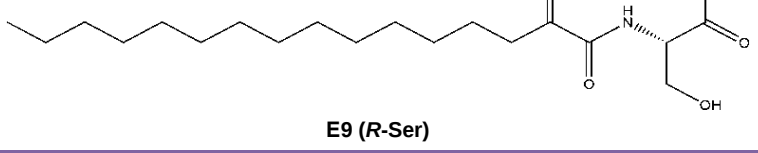
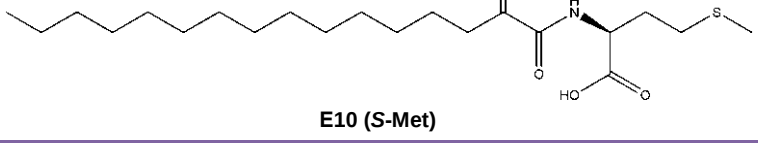
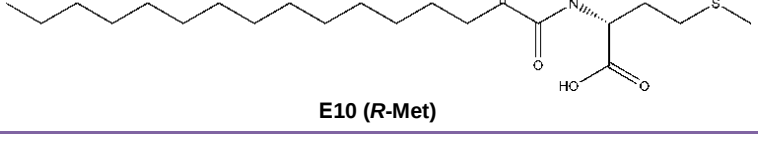
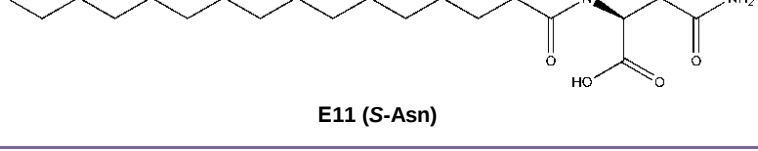
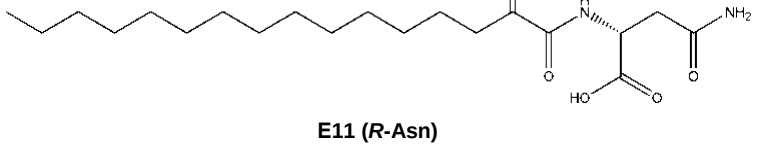
Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν σχεδιασθεί για τη μελέτη εξειδίκευσης σε σχέση με κυτοσολική και εκκριτική PLA₂. Έχει ήδηδειχθεί ότι το 2-οξοαμίδιο που στηρίζεται σε (S)-Leu είναι πολύ καλός αναστολέας της GlIAsPLA₂^[106]. Οι ενώσεις αυτές λόγω της πληθώρας πολικών δραστηριοτήτων ομάδων στη δομή τους σχηματίζουν μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα της κοιλότητας του ενεργού κέντρου και με αυτό τον τρόπο προσδένονται ισχυρά με το ένζυμο. Στη μελέτη 3JW8 υψηλή ενέργεια πρόσδεσης δίνουν η ένωση GK111, τα δύο εναντιομερή των ενώσεων E17 και E20 όπως και τα R εναντιομερή των ενώσεων E4 και E9, σχηματίζοντας πληθώρα δεσμών υδρογόνου. Στη μελέτη 3PE6 όλες οι ενώσεις εμφανίζουν αρκετά μειωμένες τιμές ενέργειας πρόσδεσης σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη εκτός της ένωσης GK111. Τα μόρια που προσδένονται ισχυρότερα είναι η ένωση GK111 και τα S εναντιομερή των ενώσεων E6 και E20.

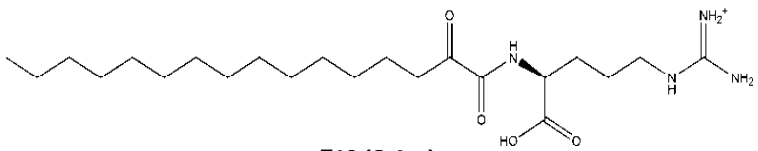
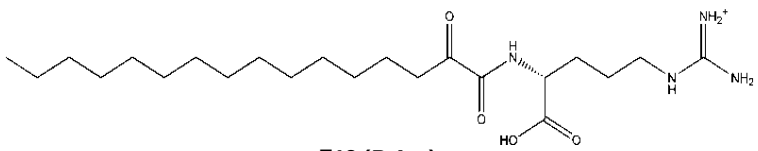
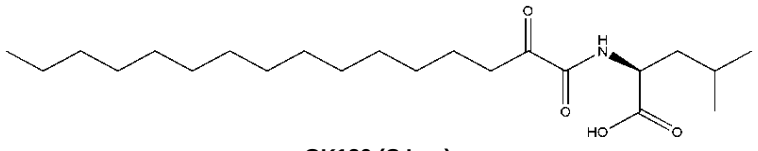
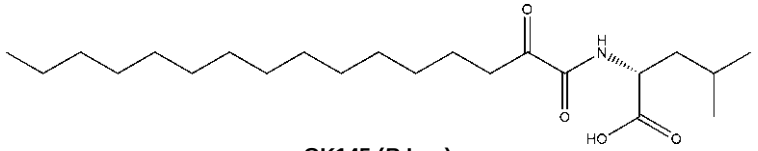
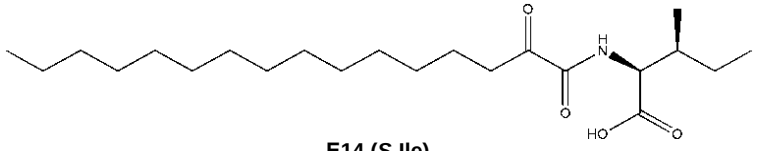
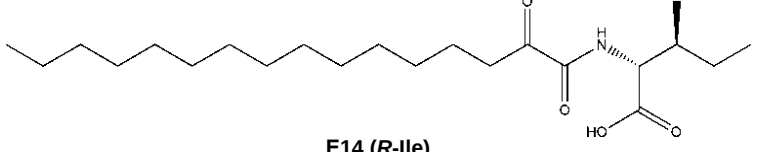
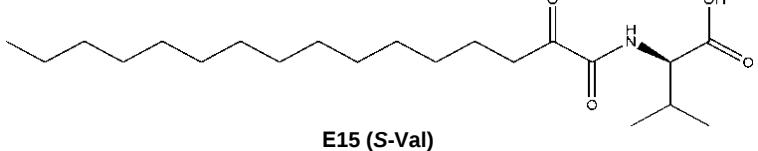
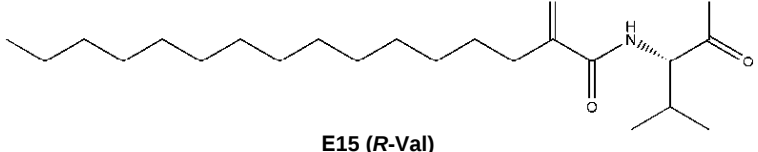
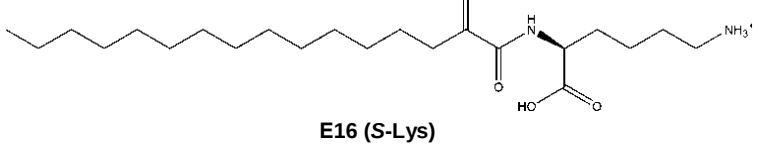
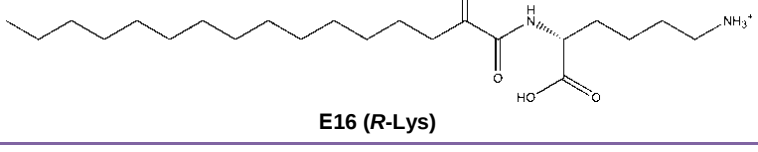
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7.

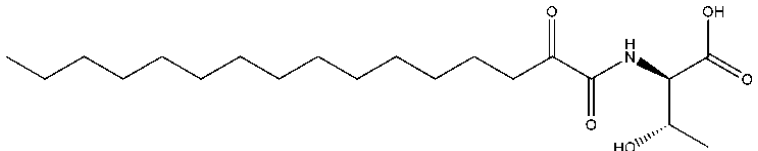
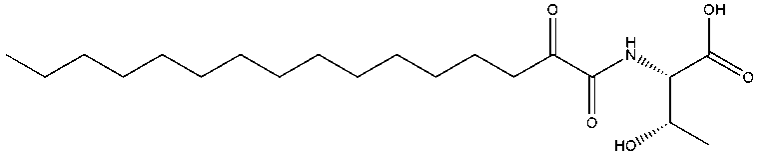
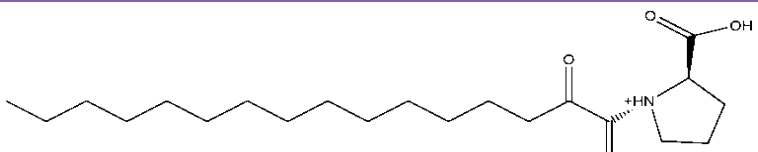
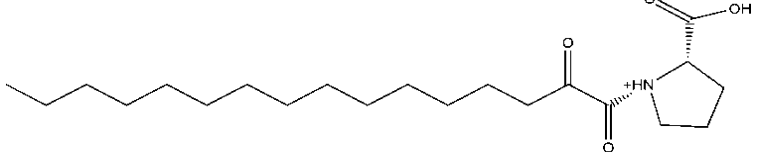
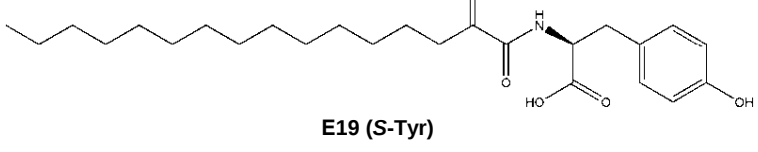
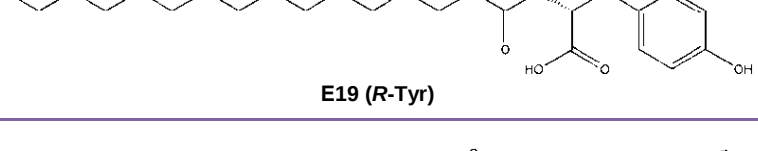
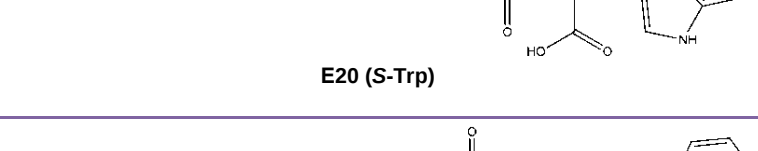
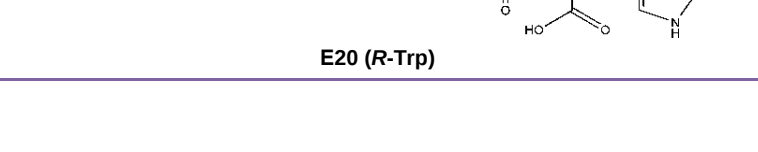
Πίνακας 6.7: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 GK111 (Gly)	-9,923	Ser132 Ala61
	-10,620	Ser132 2x H ₂ O
 E2 (S-Ala)	-9,722	Ser132 2x Ala61 His279
	-5,880	Ser186 H ₂ O
 E2 (R-Ala)	-9,734	2x Ser132 His279
	-7,187	Ser132 H ₂ O

 E3 (S-Asp)	-9,796	2x Ser132 His279 Tyr204
	-5,584	Ser186
 E3 (R-Asp)	-9,877	Ser132 Ala61 Met133 Tyr204
	-7,139	H ₂ O
 E4 (S-His)	-9,295	Ser132 Gly214 Tyr204
	-7,625	His131 His279
 E4 (R-His)	-10,558	Ser132 Ala61 Met133 Tyr204
	-7,252	Glu63 Arg67
 GK141 (S-Phe)	-10,214	Ser132 Ala61 Met133
	-7,410	Ser132 Ala61 Met133
 E5 (R-Phe)	-9,433	Ser132
	-6,679	Gly187
 E6 (S-Cys)	-9,003	Cys211 Ile189 Gly214 Leu215
	-8,631	Ser132 H ₂ O
 E6 (R-Cys)	-9,869	2x Ser132 2x Ala61 His279
	-5,738	Ser186
 E7 (S-Gln)	-9,238	Ser132 His279 Cys211
	-5,831	Ser186 Gly187

 E7 (R-Gln)	-9,814	Ser132 Ala61 Cys211 Tyr204
	-7,328	Ser186 H ₂ O
 E8 (S-Glu)	-8,917	Ser132 Tyr204
	-6,185	Ser186 H ₂ O
 E8 (R-Glu)	-9,131	Ser132 His279
	-7,588	Ser186 Asp190
 E9 (S-Ser)	-9,775	Ser132 Ala61 His279 Tyr204
	-7,437	H ₂ O
 E9 (R-Ser)	-11,269	2x Ser132 2x Ala61 His279 Tyr204
	-7,167	2x H ₂ O
 E10 (S-Met)	-9,346	Ala61 Tyr204
	-7,768	Ser132 H ₂ O
 E10 (R-Met)	-9,333	Ser132 Ala61 Met133
	-4,837	Ser186 H ₂ O
 E11 (S-Asn)	-9,668	2x Ser132 Ala61 His279
	-7,042	Ser132 Gly220 H ₂ O
 E11 (R-Asn)	-9,741	Ser132 Ala61 Met133 Tyr204
	-7,272	Ser86 H ₂ O

 E12 (S-Arg)	-9,673	2x Ser132 His279 Cys211
	-6,636	Ser165 2x H ₂ O
 E12 (R-Arg)	-9,133	Ser132 His279
	-7,284	Ala61 Met133 Glu63
 GK126 (S-Leu)	-9,721	2x Ser132 His279
	-4,416	Ser186
 GK145 (R-Leu)	-9,576	Ser132 Ala61 Met133
	-5,380	Ala61 His279
 E14 (S-Ile)	-9,187	Ala61
	-6,490	Ser186
 E14 (R-Ile)	-9,326	Ser132 Ala61 Met133
	-7,075	H ₂ O
 E15 (S-Val)	-8,813	Ser132 Ala61 His279
	-3,478	Ser186
 E15 (R-Val)	-8,951	Ser132 Ala61
	-4,978	Ser132 H ₂ O
 E16 (S-Lys)	-8,248	Ala61 Cys211
	-3,731	Ser186
 E16 (R-Lys)	-4,203	Ser132 Cys211
	-6,239	Ser132 H ₂ O

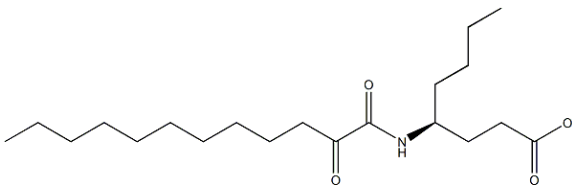
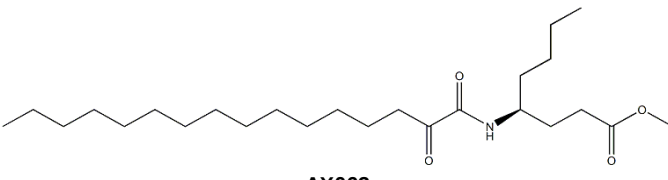
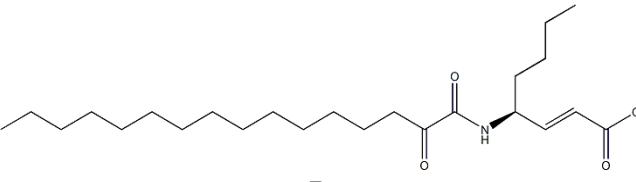
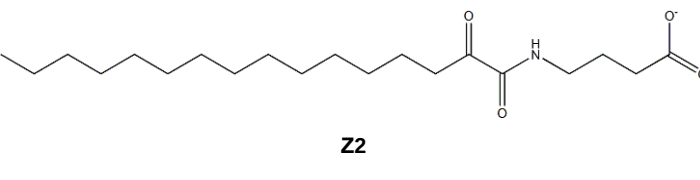
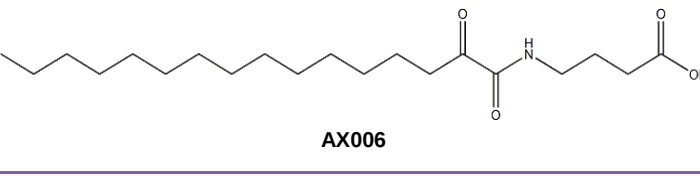
 E17 (S-Thr)	-11,100	Ser132 Ala61 His279 Tyr204
	-7,327	H ₂ O
 E17 (R-Thr)	-10,330	Ser132 Ala61 His279 Tyr204
	-7,234	Ser186 Gly220 H ₂ O
 E18 (S-Pro)	-7,069	Ala61
	-5,609	H ₂ O
 E18 (R-Pro)	-7,641	Asn162 Ser165
	-6,995	H ₂ O
 E19 (S-Tyr)	-9,089	Ser132 Cys211
	-8,980	Ser132 Ala61 Met133
 E19 (R-Tyr)	-9,675	Ser132 Cys211
	-7,310	Ser186 Gly187 Asp190
 E20 (S-Trp)	-11,647	Ser132 Ala61 Met133 Cys211
	-6,988	Ala61 Met133
 E20 (R-Trp)	-10,576	Ser132
	-3,351	Ser186

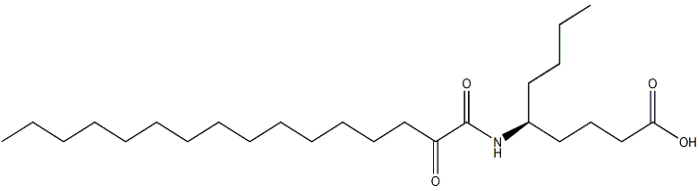
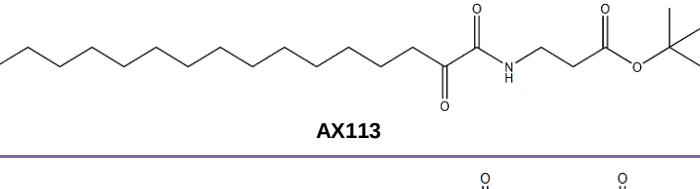
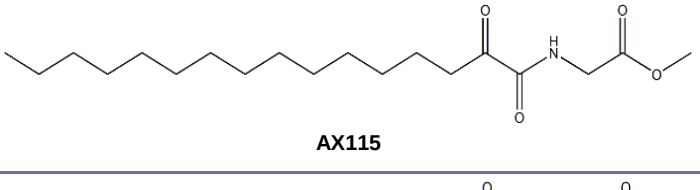
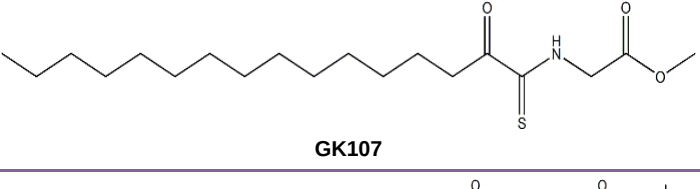
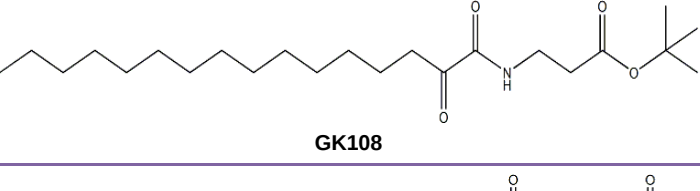
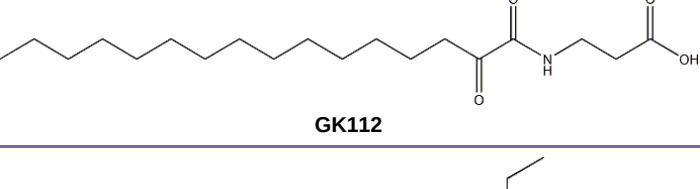
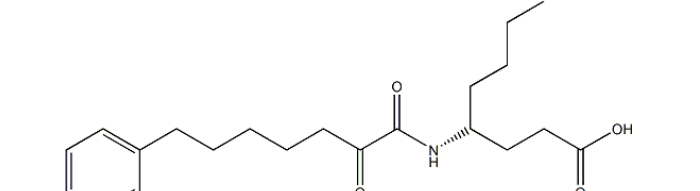
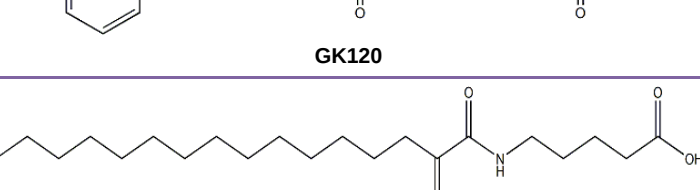
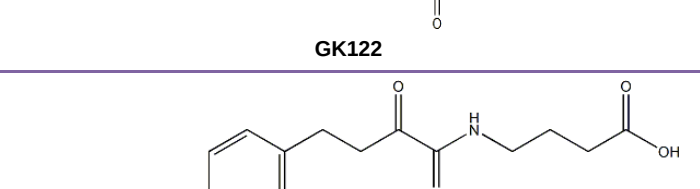
6.8 Παράγωγα 2-οξοαμιδίων

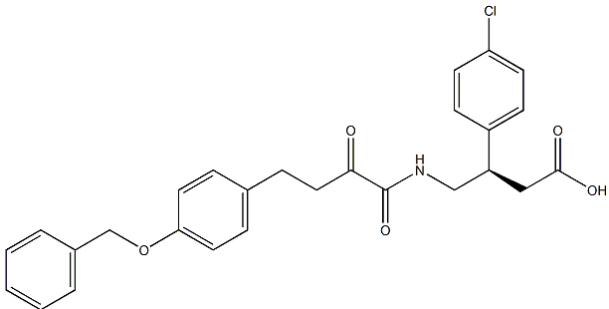
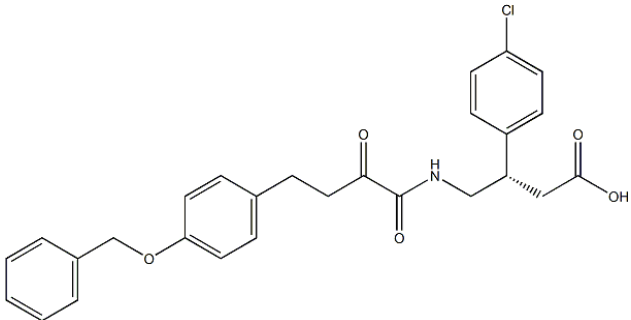
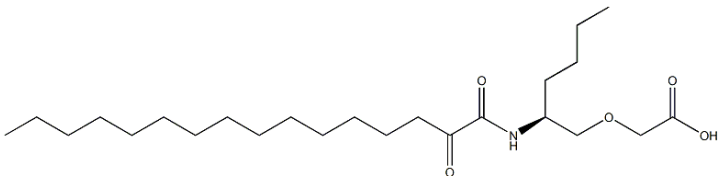
Οι ενώσεις με κωδικό AX και GK έχουν σχεδιασθεί και συντεθεί στα εργαστήρια του Καθηγητή Γ. Κόκοτου στα πλαίσια του προγράμματος που στοχεύει στην ανάπτυξη νέων καινοτόμων αναστολέων PLA₂ με αντιφλεγμονώδη δράση^[107,108,109,110]. Οι περισσότερες από τις ενώσεις της κατηγορίας δίνουν αρκετά υψηλή ενέργεια πρόσδεσης, όμως την ευνοϊκότερη πρόσδεση από αυτές εμφανίζουν οι ενώσεις AX006^[107], AX007^[107], AX113^[108], GK120, GK122^[106], GK123 και τα δύο εναντιομερή της ένωσης GK124. Οι αναφερόμενες ενώσεις παρουσιάζουν υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης και στις δύο κρυσταλλογραφικές δομές, ενώ σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.8.

Πίνακας 6.8: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 πάνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί Υδρογόνου
 AX007	-8,426	Ser132 His279
	-10,113	Ala61 Met133 H ₂ O
 AX063	-8,318	Ser132 Ile189
	-7,763	Ser186
 Z1	-6,411	Ser132 Ala61 Ile189
	-8,146	Ser186 Asp190
 Z2	-7,295	Ser132 Ala61 Ile189 Gly214
	-9,820	Ser132 Met133 H ₂ O
 AX006	-10,950	Ser132 Ala61 Gly214 Cys211
	-9,609	H ₂ O

 AX109	-6,624	Ser132 Gly214 Cys211
	-5,819	Ser165 Ser186 Pro188
 AX113	-8,644	Ser165
	-10,588	Ala61 Met133 H ₂ O
 AX115	-9,159	Ile189 Tyr204
	-9,906	Ala61 Met133 H ₂ O
 GK107	-8,502	Ile189
	-7,427	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 GK108	-8,452	Asn162 Ser165
	-9,031	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 GK112	-9,826	Ser132 Ala61 His279
	-8,029	3x H ₂ O
 GK120	-10,118	Ser132 Ile189 Gly214 Cys211
	-9,635	Ser132 H ₂ O
 GK122	-10,453	Ile189 Gly214 Cys211
	-10,413	H ₂ O
 GK123	-9,978	Ser132 Asn162 Ser165
	-10,562	Δεν σχηματίζει δεσμούς

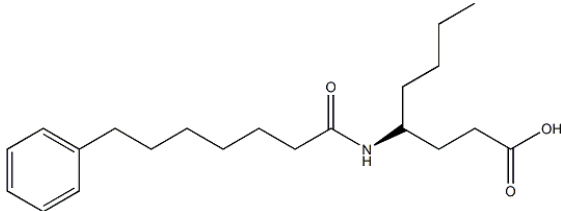
 GK124R	-9,968	Ser132 Ala61
	-11,861	Ser132
 GK124S	-11,974	Ser132 Ala61
	-10,071	Ser132
 GK125	-9,799	Ala61 Gly214 Cys211
	-6,724	Ser186

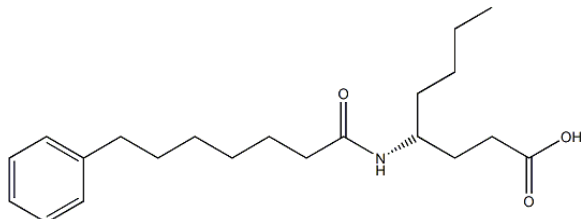
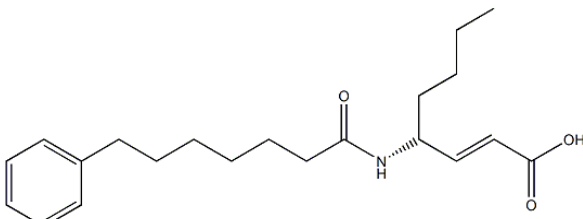
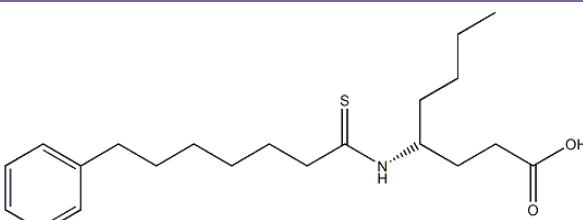
6.9 Παράγωγα αμιδίων

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν σχεδιασθεί και συντεθεί στα εργαστήρια του Καθηγητή Γ. Κόκοτου. Η ένωση GK115 αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της GV sPLA₂^[108]. Όλες οι ενώσεις εμφανίζουν σχετικά υψηλές ενέργειες πρόσδεσης, ωστόσο η διεύθυνση των μορίων εντός της κοιλότητας του ενεργού κέντρου του ενζύμου δεν είναι ικανοποιητικός. Μεταξύ αυτών των ενώσεων την ευνοϊκότερη πρόσδεση δίνει η ένωση GK114^[108].

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.9.

Πίνακας 6.9: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 πάνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί Υδρογόνου
 GK114	-9,527	Ser132 Ala61
	-10,742	3x H ₂ O

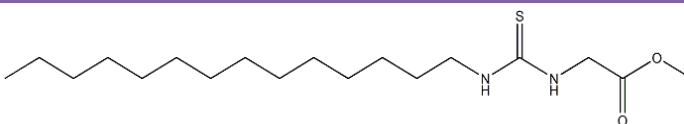
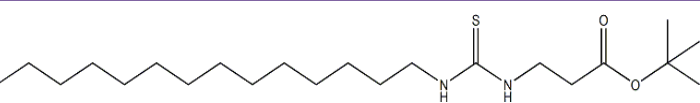
 GK115	-8,895	Ala61
	-9,239	Ser186 H ₂ O
 GK116	-9,257	Ile189 Cys211
	-9,249	H ₂ O
 GK117	-8,514	Ile189 Gly214 Cys211
	-9,034	Ser186 H ₂ O

6.10 Παράγωγα θειουρίας

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν συντεθεί στα εργαστήρια του Καθηγητή Γ. Κόκοτου. Τα αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης δείχνουν ότι τα παράγωγα θειουρίας δεν αποτελούν πιθανούς αναστολείς της MAGL. Η βαθμονόμηση πρόσδεση και των δύο ενώσεων στις δύο κρυσταλλογραφικές δομές είναι πολύ χαμηλός καθώς και η πρόσδεση γίνεται ασθενώς μέσω μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου και αρκετές φορές όχι με τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας ή της οπής οξυανιόντος.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.10.

Πίνακας 6.10: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

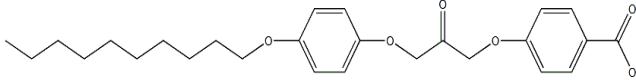
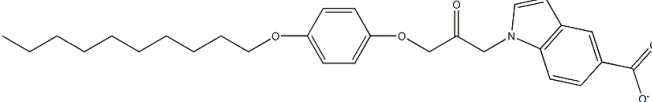
Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 GK109	-8,255	Ser132 Ala61
	-7,191	Glu63 H ₂ O
 GK110	-7,677	Asn162 Ser165
	-6,115	Ser186 H ₂ O

6.11 Παράγωγα προπανοκετόνης

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν αναστολείς της GIVA cPLA₂^[105,111]. Τα πειραματικά δεδομένα και από τις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν πως θα μπορούσαν να αποτελέσουν αναστολείς της MAGL. Και οι δύο ενώσεις εμφανίζουν υψηλές ενέργειες πρόσδεσης, ενώ προσδένονται ισχυρά με το ένζυμο με μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.11.

Πίνακας 6.11: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

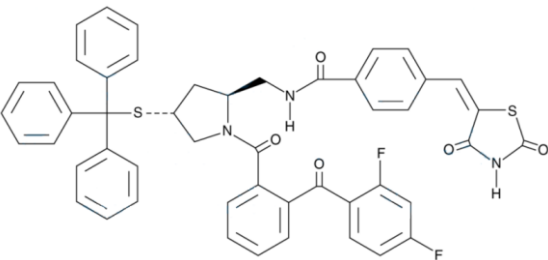
Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 AR_C70484XX	-11,220	Ser132 Ile189 Asn162 Gly214
	-11,896	Ala61 Met133 H ₂ O
 H1	-8,669	Ser132 Gly214
	-11,269	Ala61 Met133 H ₂ O

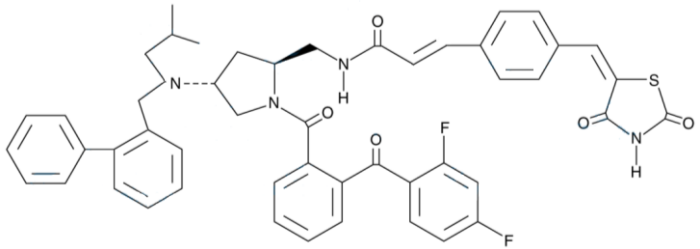
6.12 Παράγωγα της πυρρολιδίνης

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της GIVA cPLA₂ με *in vivo* δραστηριότητα. Τα μόρια αυτής της κατηγορίας^[112,113] εξ' αιτίας του πολύ μεγάλου μεγέθους τους δεν μπορούν να εισέλθουν ολόκληρα εντός της κοιλότητας του ενεργού κέντρου της MAGL. Πέραν αυτού, το τμήμα τους που εισέρχεται στη κοιλότητα προσδένεται ασθενώς, μέσω μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου και πολικών ή van der Waals αλληλεπιδράσεων, χωρίς να εμφανίζει κάποιο σαφές μοτίβο πρόσδεσης. Συνεπώς, οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας δεν αποτελούν ικανούς αναστολείς για το ένζυμο της MAGL.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.12.

Πίνακας 6.12: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 πυρροφαινόνη	-9,452	His279 Ser165 Ile189
	-4,148	Ile189

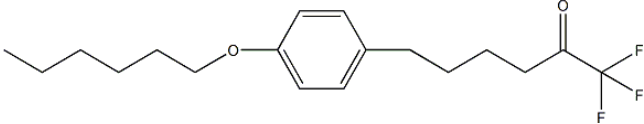
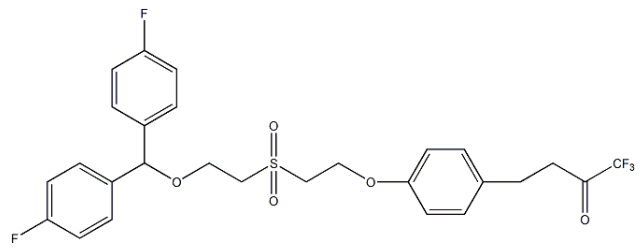
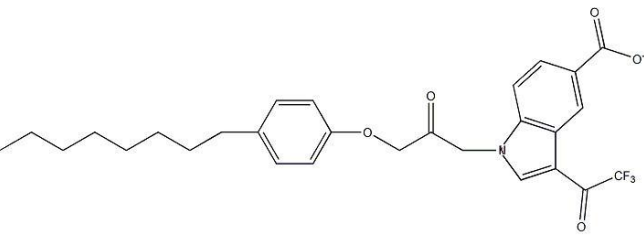
 Θ1	-9,267	Ser132 Tyr204
	-7,969	Ser186 H ₂ O

6.13 Παράγωγα τριφθοροκετόνης

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν στις δύο κρυσταλλογραφικές δομές αρκετά υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης. Στη κρυσταλλογραφική δομή 3JW8 η τοποθέτηση των μορίων I1^[114] και I2 στον χώρο δεν είναι ευνοϊκή, ενώ στην κρυσταλλογραφική δομή 3PE6 τα μόρια αυτά προσδένονται ασθενώς με το ένζυμο σχηματίζοντας μικρό αριθμό δεσμών υδρογόνου, συγκριτικά με το σύνολο των δραστικών ομάδων των μορίων. Η ένωση που παρουσιάζει την ευνοϊκότερη πρόσδεση είναι η I3^[114], η οποία δίνει πολύ υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης και στις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.13.

Πίνακας 6.13: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου στις δύο μελέτες

Ένωση	Glide GScore 3JW8 άνω 3PE6 κάτω	Δεσμοί υδρογόνου
 I1	-8,208	Ser132 Asn162
	-10,192	Ala61 Met133 H ₂ O
 I2	-9,177	Ser132 His279 Asn162
	-10,460	Ala61 Met133
 I3	-11,721	Ser132 Ile189
	-10,733	Ser132 Ala61 Ser186

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 6^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης των δύο κρυσταλλογραφικών δομών της MAGL (ανοικτή και κλειστή μορφή της κοιλότητας) έδειξαν ότι για ορισμένες τάξεις ενώσεων η βαθμονόμηση πρόσδεσης είχε μεγάλη διαφορά. Αυτό αποδεικνύει ότι οι δύο κρυσταλλογραφικές δομές έχουν διαφορετικό τρόπο και ευχέρεια πρόσδεσης για ορισμένες ενώσεις, παρ' όλο που θεωρήσαμε ότι έχουν βιοδραστική διαμόρφωση με ίση πιθανότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δυσκολεύει την πρόβλεψη μοριακής πρόσδεσης σε άγνωστες ενώσεις.

Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν αρκετές είχαν ικανοποιητικό βαθμό πρόσδεσης.

Εκτός από την ισχυρή πρόσδεση των ενώσεων με το ένζυμο της MAGL, επιθυμητό ήταν να εμφανίζουν και εκλεκτικότητα στο συγκεκριμένο ένζυμο. Για το λόγο αυτό ορισμένες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν στο κεφάλαιο 6 υποβλήθηκαν σε αντίστοιχα *in silico* πειράματα στο ένζυμο FAAH. Κριτήριο για την επιλογή των ενώσεων θεωρήθηκε η εμφάνιση βαθμού βαθμονόμησης κάτω των -10 kcal/mol και για τις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Με δεδομένο τη διαφορετικότητα της κοιλότητας μεταξύ των δύο ενζύμων και της διαφορετικής σύστασης των ενεργών κέντρων, η εμφάνιση εκλεκτικότητας θεωρητικά ήταν ένας προσιτός στόχος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ FAAH

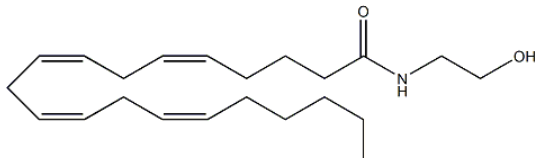
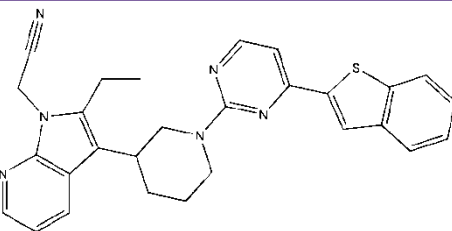
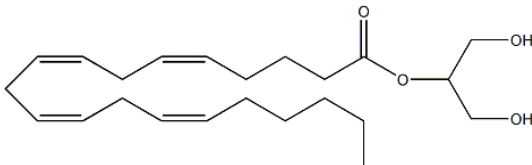
Ύστερα από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης στο ένζυμο της MAGL, οι ενώσεις που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση, δοκιμάστηκαν και στο μόριο της FAAH. Σκοπός της δεύτερης σειράς των *in silico* πειραμάτων με υπόστρωμα τη FAAH ήταν να διαπιστωθεί τυχόν εκλεκτικότητα ανάμεσα στα δύο ένζυμα.

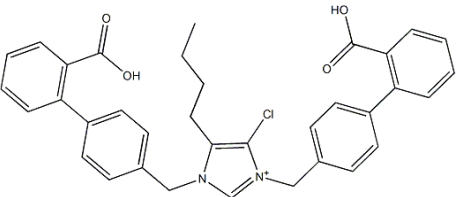
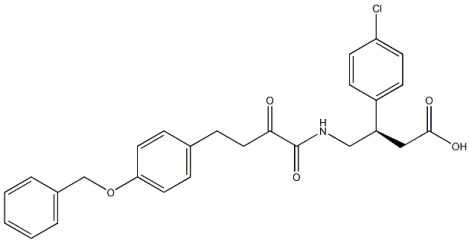
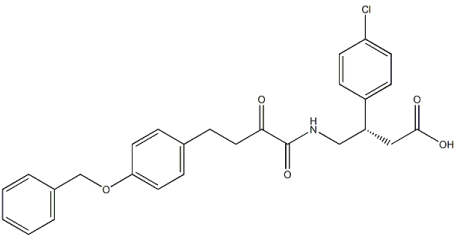
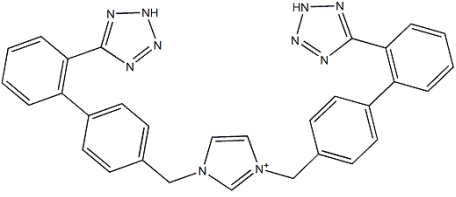
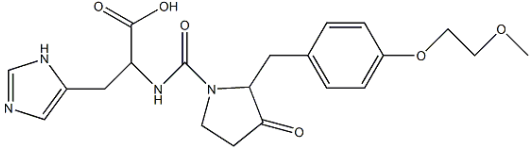
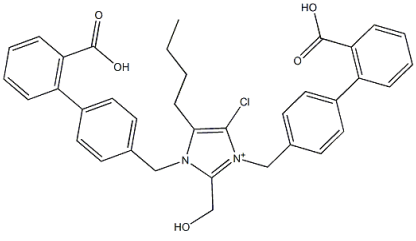
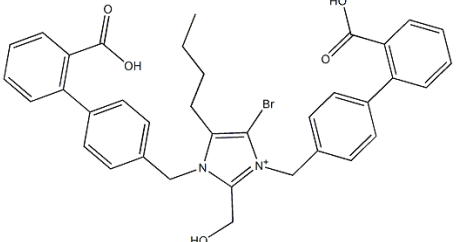
7.1 Πειράματα για τη διαπίστωση εκλεκτικότητας ενώσεων μεταξύ των ενζύμων MAGL και FAAH

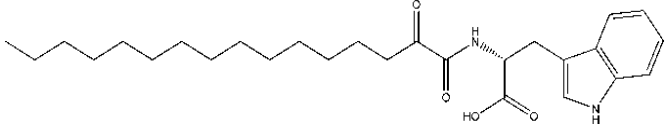
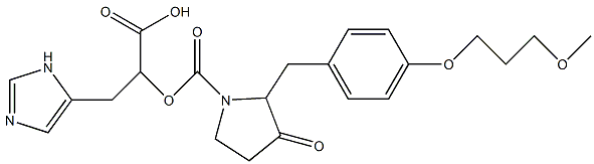
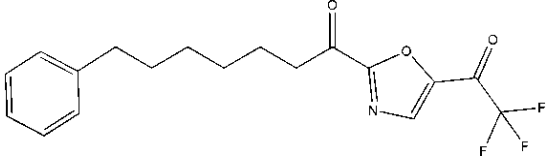
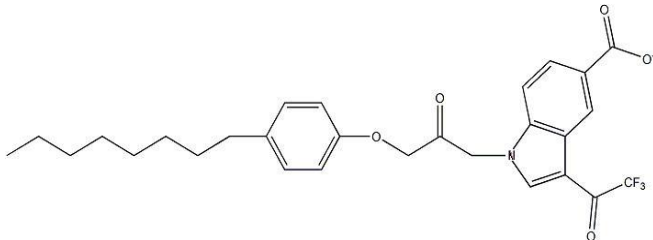
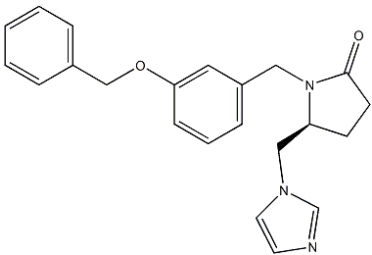
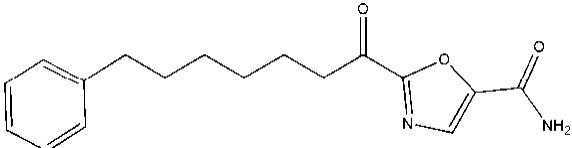
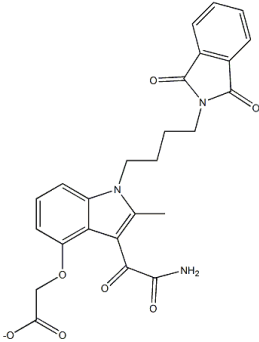
Για τη καλύτερη αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων τα αρχικά πειράματα πρόσδεσης έγιναν πάνω στο φυσικό υπόστρωμα (AEA) και σε γνωστούς αναστολείς της FAAH. Ο πρώτος γνωστός αναστολέας που μελετήθηκε είναι η 2-AG που αποτελεί και φυσικό υπόστρωμα της MAGL. Ο δεύτερος αναστολέας που μελετήθηκε είναι η ένωση QK5, ένας από τους γνωστούς και ισχυρούς αναστολείς της FAAH που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα.

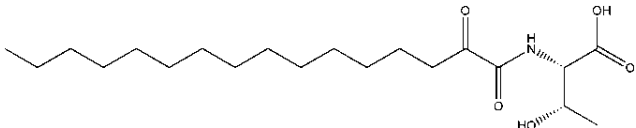
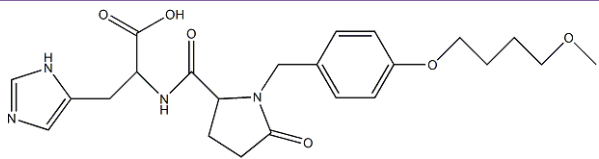
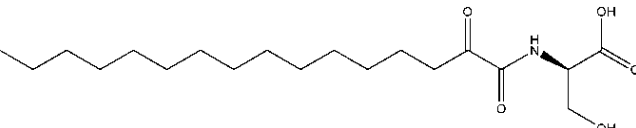
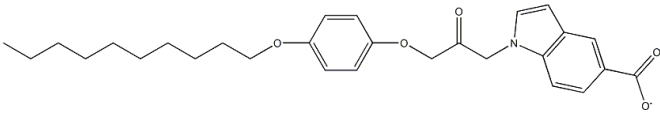
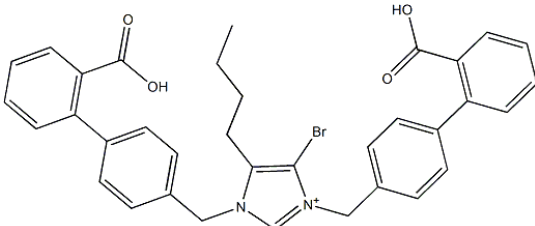
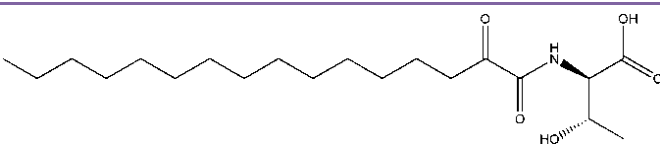
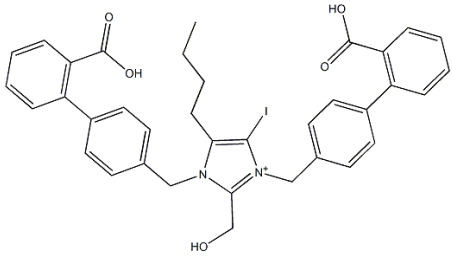
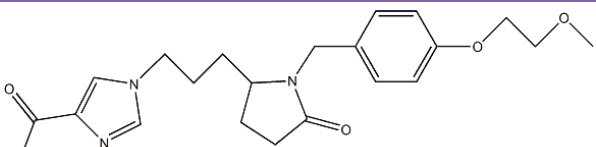
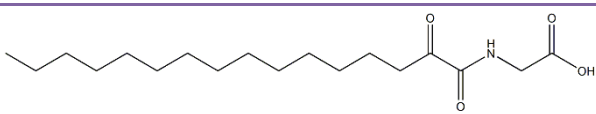
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στο ένζυμο της FAAH, για όλες τις ενώσεις οι οποίες συνδέονται ισχυρά με το ένζυμο της MAGL παριστάνονται στον πίνακα 7.1.

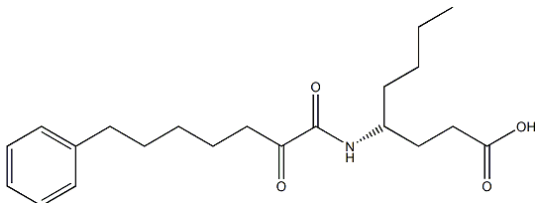
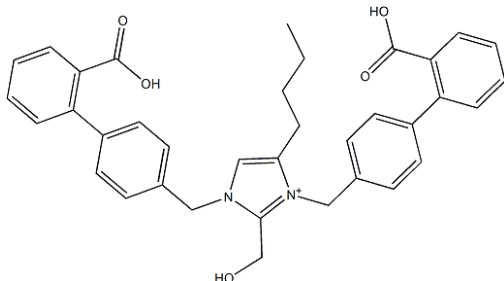
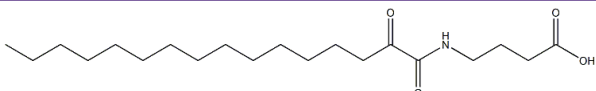
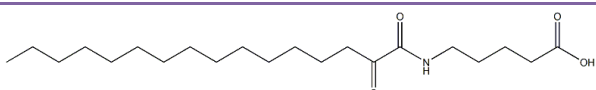
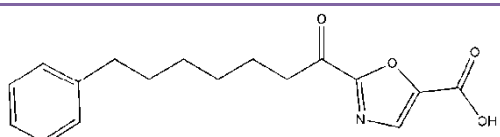
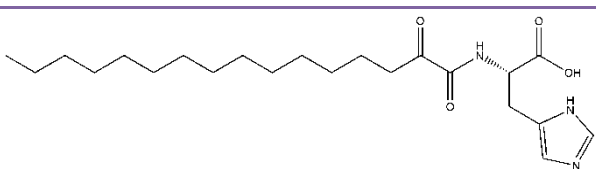
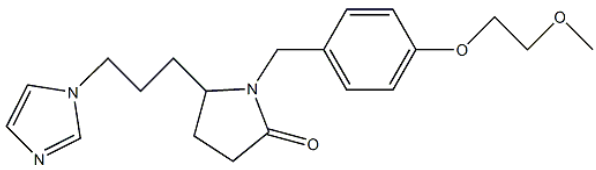
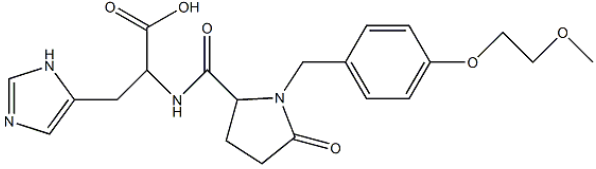
Πίνακας 7.1: Βαθμονόμηση πρόσδεσης και δεσμοί υδρογόνου των ενώσεων

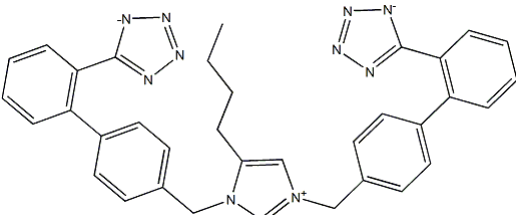
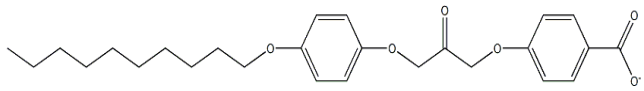
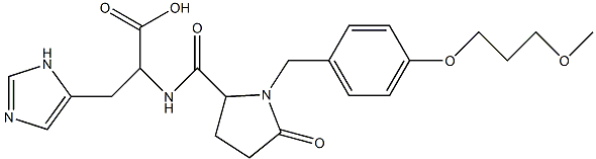
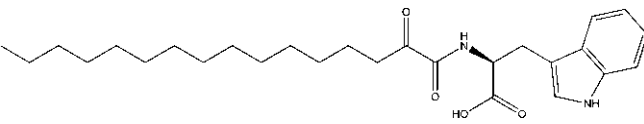
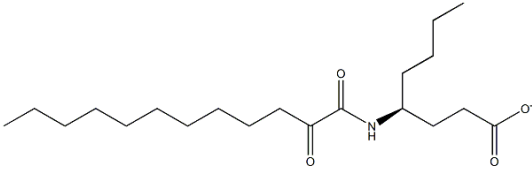
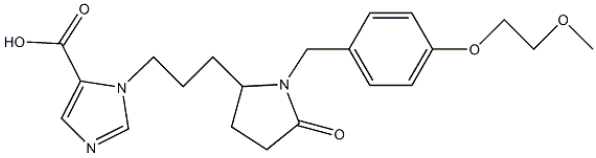
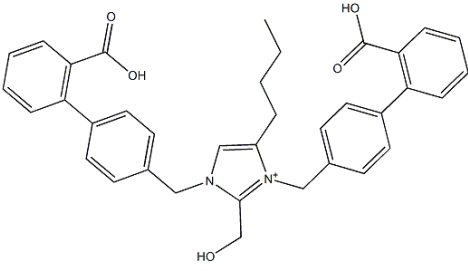
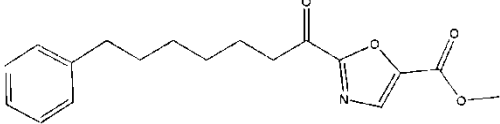
Ένωση	Glide GScore	Δεσμοί υδρογόνου
 AEA	-11,772	Thr488 Gly485 Asp403
 QK5	-13,791	Thr488
 2-AG	-11,100	Ser241 Ile238 Met191

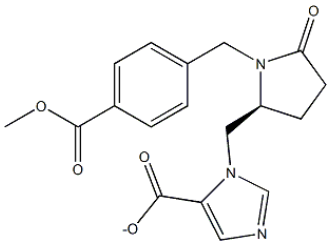
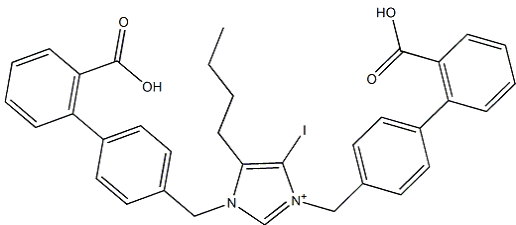
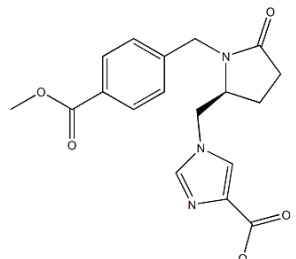
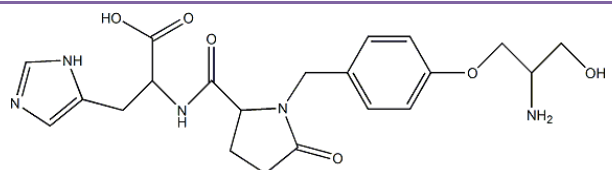
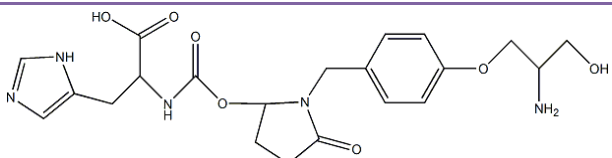
 B3	-15,998	Trp531 Leu380
 GK124R	-14,466	Ser241 Phe194
 GK124S	-13,964	Ser217 Val270 Glu273
 B7	-13,162	Met191 Trp531
 Renin1At	-12,566	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B6	-12,477	Leu192 Gly485 Asp403
 B1	-12,474	Leu192 Gly485

 E20 S	-12,178	Asp403 Trp531 Gly485
 Renin1Bt	-12,005	Gly485 Pro484 Gly273
 A8	-11,872	Thr488
 I3	-11,768	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 MMK7	-11,653	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 A4	-11,582	Pro484 Phe194
 Γ2	-11,549	2x Asp403 Trp531

 E17 R	-11,310	Ser241
 Renin1C	-11,243	Leu192 Phe194
 E9 R	-11,211	Ser241
 H1	-11,171	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B5	-11,161	Asp403 Arg486 Pro484 Phe194
 E17 S	-11,158	Ser241
 B4	-11,153	2x Asp403 Gly485 Pro484 Phe194
 Renin4	-10,930	Ser241 Gly239
 GK111	-10,893	Ser241

 GK120	-10,786	Ser241
 B9	-10,774	Pro484 Phe194 Trp531 Asp403
 AX006	-10,763	Met191
 GK122	-10,635	Ser241
 A2	-10,624	Ser241
 E4 R	-10,621	Ser217 Cys269 Val270
 Renin2	-10,593	Ser217
 Renin1A	-10,246	Ser241 Trp531

 B10	-10,209	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 AR_C70484XX	-10,095	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 Renin1B	-9,890	Ser241
 E20 R	-9,810	Trp531
 AX007	-9,757	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 Renin3	-9,562	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 B2	-9,504	Trp531 Asp403
 A3	-9,197	Thr488 Trp531

 MMK18Bion	-8,756	Phe194 Asp403 Trp531
 B8	-8,668	Δεν σχηματίζει δεσμούς
 MMK18Cion	-8,114	Arg486
 Renin5	-7,949	Asp403 Phe194
 Renin5t	-6,278	Asp403 Trp531

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ 7^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν, αυτές οι οποίες είχαν τιμή πρόσδεσης μικρότερη από -10 kcal/mol και στις δύο κρυσταλλογραφικές δομές δοκιμάστηκαν περαιτέρω για την πρόσδεσή τους και στην FAAH, με σκοπό να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα έναντι των δύο ενζύμων. Θεωρήσαμε ως εκλεκτικότητα τη διαφορά δύο μονάδων μεταξύ της βαθμονόμησης πρόσδεσης που προέκυψε από τις μελέτες των δύο ενζύμων.

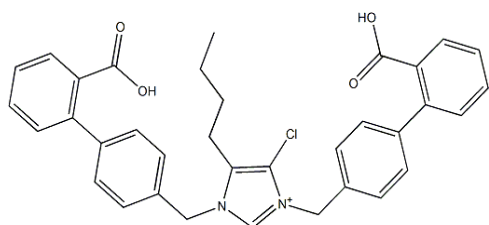
Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι υπάρχει ικανοποιητική πρόσδεση των ενώσεων και στο μόριο της FAAH. Ωστόσο, σε ορισμένες ενώσεις (πίνακας 7.2) ο τρόπος και η ενέργεια πρόσδεσης δείχνουν μια πιθανή προτίμηση και άρα εκλεκτικότητα στο μόριο της MAGL. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις από τη κατηγορία πυρρολιδινονικά παράγωγα, συντεθέντων ως πιθανών αναστολέων ρενίνης, δείχνουν να ευνοείται η πρόσδεσή τους στη MAGL με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα τη Renin5t η οποία στις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες της MAGL είχε βαθμονόμηση πρόσδεσης -13,001 kcal/mol και -13,614 kcal/mol, ενώ στη FAAH η βαθμονόμηση πρόσδεσης ήταν -6,278 kcal/mol. Αυτό δείχνει ότι οι ενώσεις αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για περαιτέρω βελτιστοποίησή τους και έρευνα για την εύρεση εκλεκτικών αναστολέων της MAGL.

Πίνακας 7.2: Συγκριτικός πίνακας βαθμονόμησης πρόσδεσης FAAH vs MAGL

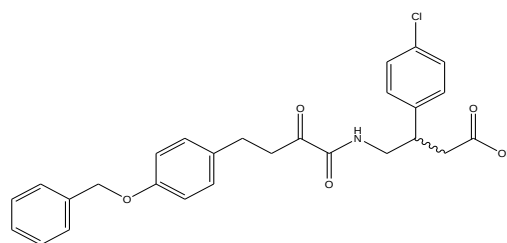
Ένωση	Glide GScore FAAH	Glide GScore MAGL (3JW8)	Glide GScore MAGL (3PE6)
Renin5t	-6,278	-13,001	-13,614
Renin5	-7,949	-12,240	-10,188
Renin3	-9,562	-12,882	-9,639
Renin1B	-9,890	-9,462	-11,145
Renin1A	-10,246	-11,974	-11,112
Renin4	-10,930	-12,195	-11,295
Renin1Bt	-12,005	-12,904	-12,293
Renin1At	-12,566	-10,358	-13,070
AR_C70484XX	-10,095	-11,220	-11,896
A2	-10,624	-9,894	-12,321
A3	-9,197	-6,985	-12,710
B2	-9,504	-11,831	-6,184

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης για την FAAH, οι ενώσεις B3 και τα δύο εναντιομερή της GK124 δίνουν πολύ υψηλή βαθμονόμηση πρόσδεσης σε σχέση με γνωστούς αναστολείς και θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας.

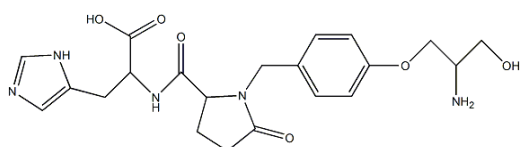


B3

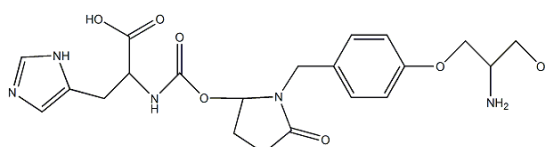


GK124

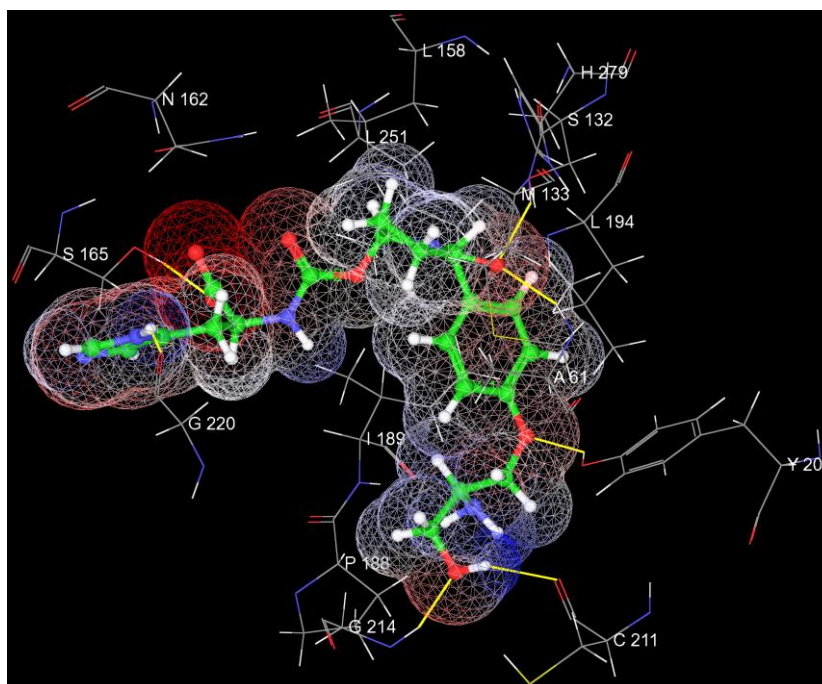
Επιπλέον, η έρευνα για την εύρεση ενώσεων με εκλεκτικότητα ως προς την MAGL -που αποτέλεσε και τον κύριο ερευνητικό στόχο της παρούσας διατριβής– έδειξε ότι τα πυρρολιδινονικά παράγωγα που συντέθηκαν ως πιθανοί αναστολείς ρενίνης και συγκεκριμένα οι ενώσεις renin5 & renin5t, έχουν σημαντικές πιθανότητες να αποτελέσουν συνθετικό στόχο με σκοπό την *in vitro* μελέτη τους.



Renin5



Renin5t



Σχήμα 8.1: Χάρτης ηλεκτροστατικού δυναμικού της ένωσης Renin5t. Με μπλε χρώμα παριστάνεται η περιοχή όπου υπερισχύει το θετικό φορτίο και με κόκκινο χρώμα η περιοχή όπου υπερισχύει το αρνητικό φορτίο.

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

GLIDE	Grid-Based-Ligand Docking with Energetics
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
RMSD	Root Mean Square Deviation
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
MAGL	Monoacylglycerol Lipase
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase
ABHDs	α/β Hydrolases
DAGL	Diacylglycerol Lipase
LOX	Lipoxygenase
COX	Cyclooxygenase
PGs	Prostaglandins
AMT	Anandamide Membrane Transporter
ER	Endoplasmic reticulum

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ονοματολογία των ενώσεων κατά IUPAC

AA-5-HT	Arachidonoylserotonin
OL-53	1-(oxazolo[4,5-b]pyridine-2-yl)-1-oxo-6-phenylhexane
URB597	Cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoyl biphenyl-3-yl ester
2-AG	Icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester
AEA	Icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide
Αραχιδονόυλο-σερινόλη	Icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid (2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl)-amide
2-OG	Octadec-9-enoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester
2-LG	Heptadeca-9,11-dienoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester
1-AG	Icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester
α-Met-1-AG	2-Methyl-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester
O4081	2-Methyl-docosa-7,10,13,16-tetraenoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester
O2203	20-Cyano-16,16-dimethyl-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester
O2204	20-Hydroxy-16,16-dimethyl-icosa-5,8,11,14-tetraenoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester
ATFMK	1,1,1-Trifluoro-henicos-6,9,12,15-tetraen-2-one
JZL184	4-(Bis-benzo[1,3]dioxol-5-yl-hydroxy-methyl)-piperidine-1-carboxylic acid 4-nitro-phenyl ester methane
SAR629	{4-[Bis-(4-fluoro-phenyl)-methyl]-piperazin-1-yl}-[1,2,4]triazol-1-yl-methanone
LY-1,5	5-Biphenyl-4-ylmethyl-tetrazole-1-carboxylic acid dimethylamide
LY-2,5	5-Biphenyl-4-ylmethyl-tetrazole-2-carboxylic acid dimethylamide
66	5-(2,4-Dichloro-benzyl)-tetrazole-2-carboxylic acid diphenylamide
67	(4-Benzhydryl-piperazin-1-yl)-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-1-yl-methanone
MAFP	Arachidonyl fluorophosphonate
IDFP	Isopropyl dodecylfluorophosphonate
MOPF	Methyl octylphosphonofluoridate
EOPF	Ethyl octylphosphonofluoridate
Paraoxon	Phosphoric acid diethyl ester 4-nitro-phenyl ester
UP-101	Octadec-9-enyl-phosphonic acid ethyl ester 4-nitro-phenyl ester
S-Nonyl-BDPO	2-Nonyl-4H-benzo[1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide
OP3	Dodecyl-phosphonic acid ethyl ester 3,5,6-trichloro-pyridin-2-yl ester
OP4	Dodecyl-phosphonic acid 4-cyano-phenyl ester ethyl ester
OP6	2-Nonylsulfanyl-4H-benzo[1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide
HDSF	Hexadecanesulfonyl fluoride
OS10	Octanesulfonyl fluoride
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride
URB602	[1,1-Biphenyl]-3-yl-carbamic acid, cyclohexyl ester
URB754	[6-Methyl-2-[(4-methylphenyl)-amino]-4H-3,1benzoxazin-4-one
JZL195	4-(3-Phenoxy-benzyl)-piperazine-1-carboxylic acid 4-nitro-phenyl ester
CAY10499	[4-(5-Methoxy-2-oxo-[1,3,4]oxadiazol-3-yl)-2-methyl-phenyl]-carbamic acid benzyl ester
GK5α	2-Oxo-hexadecanoic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide
GK5β	Amino-hexadecan-1-ol
GK5γ	Hexadecane-1,2-diamine

GK5δ	Octadec-9-ene-1,2-diamine
GK5ε	6-Phenyl-hexane-1,2-diamine
GK5ζ	6-(4-Hexyloxy-phenyl)-hexane-1,2-diamine
OMDM169	Formylamino-acetic acid 1-(3-hexyl-4-oxo-oxetan-2-ylmethyl)-dodecyl ester
NAM	1-Icosa-5,8,11,14-tetraenyl-pyrrole-2,5-dione
54	1-biphenyl-4-ylmethylmaleimide
56	bis(4-methyl-1-piperazinylthiocarbonyl)disulfide
Octhilinone	2-octyl-isothiazol-3-one
OEIO	2-octadec-9-enyl-isothiazol-3-one
Pristimerin	10-Hydroxy-2,4a,6a,9,12b,14a-hexamethyl-11-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,11,12b,13,14,14a,14b-tetradecahydro-picene-2-carboxylic acid methyl ester
Euphol	17-(1,5-Dimethyl-hex-4-enyl)-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol
Celastrol	10-Hydroxy-2,4a,6a,9,12b,14a-hexamethyl-11-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,11,12b,13,14,14a,14b-tetradecahydro-picene-2-carboxylic acid
Renin1A	3-(3H-Imidazol-4-yl)-2-({1-[4-(2-methoxy-ethoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-propionic acid
Renin1At	3-(3H-Imidazol-4-yl)-2-({2-[4-(2-methoxy-ethoxy)-benzyl]-3-oxo-pyrrolidine-1-carbonyl}-amino)-propionic acid
Renin1B	3-(3H-Imidazol-4-yl)-2-({1-[4-(3-methoxy-propoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-propionic acid
Renin1Bt	2-[4-(3-Methoxy-propoxy)-benzyl]-3-oxo-pyrrolidine-1-carboxylic acid 1-carboxy-2-(3H-imidazol-4-yl)-ethyl ester
Renin1C	3-(3H-Imidazol-4-yl)-2-({1-[4-(4-methoxy-butoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-propionic acid
Renin2	5-(3-Imidazol-1-yl-propyl)-1-[4-(2-methoxy-ethoxy)-benzyl]-pyrrolidin-2-one
Renin3	3-(3-{1-[4-(2-Methoxy-ethoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidin-2-yl}-propyl)-3H-imidazole-4-carboxylic acid
Renin4	1-(3-{1-[4-(2-Methoxy-ethoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidin-2-yl}-propyl)-1H-imidazole-4-carboxylic acid
Renin5	2-({1-[4-(2-Amino-3-hydroxy-propoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-3-(3H-imidazol-4-yl)-propionic acid
Renin5t	2-{1-[4-(2-Amino-3-hydroxy-propoxy)-benzyl]-5-oxo-pyrrolidin-2-yl}oxycarbonylamino-3-(3H-imidazol-4-yl)-propionic acid
MMK1	1-Benzyl-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK2	5-Imidazol-1-ylmethyl-1-(3-methoxy-benzyl)-pyrrolidin-2-one
MMK3	5-Benzoimidazol-1-ylmethyl-1-(3-methoxy-benzyl)-pyrrolidin-2-one
MMK4	2-(2-Imidazol-1-ylmethyl-5-oxo-pyrrolidin-1-ylmethyl)-benzonitrile
MMK5	1-Benzyl-5-(3-imidazol-1-yl-propyl)-pyrrolidin-2-one
MMK6	1,3-Dibenzyl-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK7	1-(3-Benzyloxy-benzyl)-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK8	1-Benzyl-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK8ion	1-(3-Hydroxy-benzyl)-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK9	1-[2-(2-Benzyl-2H-tetrazol-5-yl)-benzyl]-5-imidazol-1-ylmethyl-pyrrolidin-2-one
MMK10	5-Imidazol-1-ylmethyl-1-[2-(2H-tetrazol-5-yl)-benzyl]-pyrrolidin-2-one
MMK11	1-Benzyl-5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid
MMK12	3-(1-Benzyl-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl)-3H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK13	3-(1-Benzyl-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl)-3H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK14	4-(2-Imidazol-1-ylmethyl-5-oxo-pyrrolidin-1-ylmethyl)-benzoic acid

	methyl ester
MMK15	1-(3-Hydroxy-benzyl)-5-methyl-pyrrolidin-2-one
MMK16ion	4-(2-Imidazol-1-ylmethyl-5-oxo-pyrrolidin-1-ylmethyl)-benzoic acid
MMK17Aion	1-[1-(4-Carboxy-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-1H-imidazole-2-carboxylic acid anion
MMK17Bion	3-[1-(4-Carboxy-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-3H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK17Cion	1-[1-(4-Carboxy-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-1H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK18Aion	1-[1-(4-Methoxycarbonyl-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-1H-imidazole-2-carboxylic acid
MMK18Bion	3-[1-(4-Methoxycarbonyl-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-3H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK18Cion	1-[1-(4-Methoxycarbonyl-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-1H-imidazole-4-carboxylic acid
MMK19ion	1-(1-Benzyl-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl)-1H-benzoimidazole-4,7-dicarboxylic acid
MMK20	1-(1-Benzyl-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl)-1H-benzoimidazole-5,6-dicarboxylic acid
MMK21	3-[1-(4-Carboxy-benzyl)-5-oxo-pyrrolidin-2-ylmethyl]-3H-imidazole-4-carboxylic acid methyl ester
A1	1-Oxazol-2-yl-7-phenyl-heptan-1-one
A2	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carboxylic acid
A3	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carboxylic acid methyl ester
A4	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carboxylic acid amide
A5	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carboxylic acid dimethylamide
A6	1-(5-Acetyl-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A7	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carbaldehyde
A8	7-Phenyl-1-[5-(2,2,2-trifluoro-acetyl)-oxazol-2-yl]-heptan-1-one
A9	2-(7-Phenyl-heptanoyl)-oxazole-5-carbonitrile
A10	1-(5-Methyl-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A11	7-Phenyl-1-(5-trifluoromethyl-oxazol-2-yl)-heptan-1-one
A12	1-(5-Iodo-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A13	1-(5-Bromo-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A14	1-(5-Chloro-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A15	1-(5-Fluoro-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
A16	1-(5-Methylsulfanyl-oxazol-2-yl)-7-phenyl-heptan-1-one
B1	5-Bromo-4-butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-2-hydroxymethyl-3H-imidazol-1-ium
B2	5-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-2-hydroxymethyl-3H-imidazol-1-ium
B3	4-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-5-chloro-3H-imidazol-1-ium
B4	4-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-2-hydroxymethyl-5-iodo-3H-imidazol-1-ium
B5	5-Bromo-4-butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-3H-imidazol-1-ium
B6	4-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-5-chloro-2-hydroxymethyl-3H-imidazol-1-ium
B7	1,3-Bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B8	4-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-5-iodo-3H-imidazol-1-ium
B9	5-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-2-hydroxymethyl-3H-imidazol-1-ium
B10	4-Butyl-1,3-bis-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B11	4-Butyl-5-chloro-2-hydroxymethyl-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-

	biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B12	4-Butyl-5-iodo-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B13	5-Butyl-1,3-bis-(2'-carboxy-biphenyl-4-ylmethyl)-3H-imidazol-1-ium
B14	4-Butyl-5-chloro-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B15	5-Bromo-4-butyl-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B16	4-Butyl-2-hydroxymethyl-5-iodo-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B17	4-Butyl-2-hydroxymethyl-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
B18	5-Bromo-4-butyl-2-hydroxymethyl-1,3-bis-[2'-(2H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H-imidazol-1-ium
Г1	[3-Aminooxalyl-1-(2,6-dichloro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г2	{3-Aminooxalyl-1-[4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-butyl]-2-methyl-1H-indol-4-yloxy}-acetic acid
Г3	(3-Aminooxalyl-2-methyl-1-pentafluorophenylmethyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г4	[3-Aminooxalyl-1-(4-bromo-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г5	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(2-oxo-2-phenyl-ethyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г6	[3-Aminooxalyl-1-(3-bromomethyl-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г7	[3-Aminooxalyl-1-(3-chloro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г8	(3-Aminooxalyl-2-methyl-1-naphthalen-2-ylmethyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г9	3-Aminooxalyl-4-carboxymethoxy-1-(4-cyano-benzyl)-2-methyl-3H-indolium
Г10	3-Aminooxalyl-4-carboxymethoxy-1-(2-cyano-benzyl)-2-methyl-3H-indolium
Г11	3-Aminooxalyl-4-carboxymethoxy-1-(3-cyano-benzyl)-2-methyl-3H-indolium
Г12	(3-Aminooxalyl-1-isobutyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г13	[3-Aminooxalyl-1-(2-methoxy-5-nitro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г14	3-Aminooxalyl-1-(3-bromo-benzyl)-4-carboxymethoxy-2-methyl-3H-indolium
Г15	3-Aminooxalyl-1-(2-bromo-benzyl)-4-carboxymethoxy-2-methyl-3H-indolium
Г16	[3-Aminooxalyl-1-(2-fluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г17	[3-Aminooxalyl-1-(4-fluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г18	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(3-nitro-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г19	[3-Aminooxalyl-1-(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г20	[3-Aminooxalyl-1-(8-bromomethyl-naphthalen-1-ylmethyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г21	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(2-methyl-butyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г22	[3-Aminooxalyl-1-(2-chloro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г23	[3-Aminooxalyl-1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-ylmethyl)-2-

	methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г24	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(2-trifluoromethyl-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г25	[3-Aminooxalyl-1-(2,4-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г26	[3-Aminooxalyl-1-(2,5-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г27	[3-Aminooxalyl-1-(2,6-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г28	[3-Aminooxalyl-1-(3,4-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г29	[3-Aminooxalyl-1-(2,3-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г30	[3-Aminooxalyl-1-(3,5-difluoro-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г31	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(3-trifluoromethyl-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г32	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(4-trifluoromethyl-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г33	3-Aminooxalyl-1-(2'-bromomethyl-biphenyl-2-ylmethyl)-4-carboxymethoxy-2-methyl-3H-indolium
Г34	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(3-trifluoromethoxy-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г35	[3-Aminooxalyl-1-(3-iodo-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г36	[3-Aminooxalyl-1-(4-fluoro-2-trifluoromethyl-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г37	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(2,3,6-trifluoro-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г38	[3-Aminooxalyl-1-(2,5-bis-trifluoromethyl-benzyl)-2-methyl-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г39	[3-Aminooxalyl-2-methyl-1-(4-methyl-benzyl)-1H-indol-4-yloxy]-acetic acid
Г40	(3-Aminooxalyl-1-ethyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г41	(3-Aminooxalyl-2-methyl-1-propyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г42	(3-Aminooxalyl-1-butyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г43	(3-Aminooxalyl-2-methyl-1-pentyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г44	(3-Aminooxalyl-1-hexyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г45	(3-Aminooxalyl-1-heptyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г46	(3-Aminooxalyl-2-methyl-1-octyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г47	(3-Aminooxalyl-1-benzyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Г48	(3-Aminooxalyl-1-biphenyl-2-ylmethyl-2-methyl-1H-indol-4-yloxy)-acetic acid
Δ1	4-{3-[1-Benzhydryl-5-fluoro-2-(2-phenylmethanesulfonylamino-ethyl)-1H-indol-3-yl]-propoxy}-benzoic acid
Δ2	3-(3-Methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-1-[3-(4-octyl-phenoxy)-2-oxo-propyl]-1H-indole-5-carboxylic acid
Δ3	3-(3-Methyl-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-1-[2-oxo-3-(4-phenoxy-phenoxy)-propyl]-1H-indole-5-carboxylic acid
Δ4	1-[3-(4-Decyloxy-phenoxy)-2-oxo-propyl]-1H-indole-3,5-dicarboxylic acid 3-methyl ester
GK111 (E1)	(2-Oxo-hexadecanoylamino)-acetic acid
E2	2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
E3	2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-succinic acid
E4	3-(3H-Imidazol-4-yl)-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
GK141 (E5)	2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-3-phenyl-propionic acid
E6	3-Mercapto-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid

E7	4-Carbamoyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
E8	2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-pentanedioic acid
E9	3-Hydroxy-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
E10	4-Methylsulfanyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
E11	2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-succinamic acid
E12	5-Guanidino-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-pentanoic acid
GK126 (E13)	4-Methyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-pentanoic acid
GK145 (E13)	4-Methyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-pentanoic acid
E14	3-Methyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-pentanoic acid
E15	3-Methyl-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
E16	5-Carboxy-5-(2-oxo-hexadecanoylamino)-pentyl-ammonium
E17	3-Hydroxy-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
E18	2-Carboxy-1-(2-oxo-hexadecanoyl)-pyrrolidinium
E19	3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
E20	3-(1H-Indol-3-yl)-2-(2-oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
AX007	4-(2-Oxo-dodecanoylamino)-octanoic acid
AX063	4-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-octanoic acid methyl ester
Z1	4-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-oct-2-enoic acid
Z2	4-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
AX006	4-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-butyric acid
AX109	5-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-nonanoic acid
AX113	3-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid tert-butyl ester
AX115	(2-Oxo-hexadecanoylamino)-acetic acid methyl ester
GK107	(2-Oxo-hexadecanethioylamino)-acetic acid methyl ester
GK108	3-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid tert-butyl ester
GK112	3-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-propionic acid
GK120	4-(2-Oxo-7-phenyl-heptanoylamino)-octanoic acid
GK122	5-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-pentanoic acid
GK123	4-[4-(4-Benzoyloxy-phenyl)-2-oxo-butyrylamino]-butyric acid
GK124	4-[4-(4-Benzoyloxy-phenyl)-2-oxo-butyrylamino]-3-(4-chloro-phenyl)-butyric acid
GK125	[2-(2-Oxo-hexadecanoylamino)-hexyloxy]-acetic acid
GK114	S 4-(7-Phenyl-heptanoylamino)-octanoic acid
GK115	R 4-(7-Phenyl-heptanoylamino)-octanoic acid
GK116	4-(7-Phenyl-heptanoylamino)-oct-2-enoic acid
GK117	4-(7-Phenyl-heptanethioylamino)-octanoic acid
GK109	(3-Tetradecyl-thioureido)-acetic acid methyl ester
GK110	3-(3-Tetradecyl-thioureido)-propionic acid tert-butyl ester
AR_C70484XX	4-[3-(4-Decyloxy-phenoxy)-2-oxo-propoxy]-benzoic acid
H1	1-[3-(4-Decyloxy-phenoxy)-2-oxo-propyl]-1H-indole-5-carboxylic acid
Πυρροφαινόνη	N-{1-[2-(2,4-Difluoro-benzoyl)-benzoyl]-4-tritylsulfanyl-pyrrolidin-2-ylmethyl}-3-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylidenemethyl)-benzamide
Θ1	N-{4-(Biphenyl-2-ylmethyl-isobutyl-amino)-1-[2-(2,4-difluoro-benzoyl)-benzoyl]-pyrrolidin-2-ylmethyl}-3-[4-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylidenemethyl)-phenyl]-acrylamide
I1	1,1,1-Trifluoro-6-(4-hexyloxy-phenyl)-hexan-2-one
I2	4-[4-(2-[2-Bis-(4-fluoro-phenyl)-methoxy]-ethanesulfonyl)-ethoxy]-phenyl]-1,1,1-trifluoro-butan-2-one
I3	1-[3-(4-Octyl-phenoxy)-2-oxo-propyl]-3-(2,2,2-trifluoro-acetyl)-1H-indole-5-carboxylic acid

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 D. Piomelli, The Molecular Logic of Endocannabinoid Signalling, *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 4, no. 11, 2003, pp. 873-884.
- 2 Α. Νικολάου, και Γ. Κόκοτος, Endocannabinoids. In *Bioactive Lipids*, The Oily Press: Bridgewater, England, 2004, pp. 245-264.
- 3 Y. Gaoni, and R. Mechoulam, Isolation, Structure and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 86, 1964, pp. 1646-1647.
- 4 R. Mechoulam, and Y. Gaoni, The Absolute Configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the Major Active Constituent of Hashish, *Tetrahedron Lett.*, Vol. 12, no. 12, 1967, pp. 1109-1111.
- 5 A.C. Howlett, Inhibition of Neuroblastoma Adenylyl Cyclase by Cannabinoid and Nantadol Compounds, *Life Sci.*, Vol. 35, 1984, pp. 1803-1810.
- 6 W.A. Devane, F.A. Dysarz, M.R. Johnson, L.S. Melvin, and A.C. Howlett, Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain, *Mol. Pharmacol.*, Vol. 34, no. 5, 1988, pp. 605-613.
- 7 L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, and T. Bolhler, Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA, *Nature*, Vol. 346, no. 6284, 1990, pp. 561-564.
- 8 S. Munro, K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids, *Nature*, Vol. 365, no. 6441, 1993, pp. 61-65.
- 9 W.A. Devane, L. Hanuš, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, and R. Mechoulam, Isolation and Structure of a Brain Constituent that Binds to the Cannabinoid Receptor, *Science*, Vol. 258, no. 5, 1992, pp. 1946-1949.
- 10 T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, and K. Waku, 2-Arachidonoylglycerol: a Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 215, no. 1, 1995, pp.89-97.
- 11 R. Mechoulam, S. Ben-Shabat, L. Hanuš, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, A.R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B.R. Martin, D.R. Compton, R.G. Pertwee, G. Griffin, M. Bayewitch, J. Barg, and Z. Vogel, Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, that Binds to Cannabinoid Receptors, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 50, no. 1, 1995, pp. 83-90.

- 12 N. Stella, P. Schweitzer, and D. Piomelli, A Second Endogenous Cannabinoid that Modulates Long-Term Potentiation, *Nature*, Vol. 388, 1997, pp. 773-778.
- 13 C.A. Rouzer, and L.J. Marnett, Endocannabinoid Oxygenation by Cyclooxygenases, Lipoxygenases, and Cytochromes P450: Cross-Talk between the Eicosanoid and Endocannabinoid Signaling Pathways, *Chem. Rev.*, Vol. 111, no. 10, 2011, pp. 5899-5921.
- 14 M. Herkenham, A.B. Lynn, M.D. Little, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, and K.C. Rice, Cannabinoid Receptor Localization in Brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, no. 5, 1990, pp. 1932-1936.
- 15 T.H. Burkey, R.M. Quock, P. Consroe, F.J. Ehlert, Y. Hosohata, W.R. Roeske, and H.I. Yamamura, Relative Efficacies of Cannabinoid CB₁ Receptor Agonists in the Mouse Brain, *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 336, 1997, pp. 295-298.
- 16 M. Glass, and J.K. Northrup, Agonist Selective Regulation of G-proteins by Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors, *Mol. Pharmacol.*, Vol. 56, 1999, pp. 1362-1369.
- 17 P.C. Schmid, M.L. Zuzarte-Augustin, and H.H. Schmid, Properties of Rat Liver N-acylethanolamine Amidohydrolase, *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, no. 26, 1985, pp. 14145-14149.
- 18 C.C. Felder, A. Nielsen, E.M. Briley, M. Palkovits, J. Priller, J. Axelrod, D.N. Nguyen, J.M. Richardson, R.M. Riggan, G.A. Koppel, S.M. Paul, and G.W. Becker, Isolation and Measurement of the Endogenous Cannabinoid Receptor Agonist, Anandamide, in Brain and Peripheral Tissues of Human and Rat, *FEBS Lett.*, Vol. 393, 1996, pp. 231-235.
- 19 P.C. Schmid, R.J. Krebsbach, S.R. Perry, T.M. Dettmer, J.L. Maasson, and H.H.O. Schmid, Occurrence and Postmortem Generation of Anandamide and Other Long-Chain N-acylethanolamines in Mammalian Brain, *FEBS Lett.*, Vol. 375, 1995, pp. 117-120.
- 20 D.G. Deutsch, S. Lin, W.A. Hill, K.L. Morse, D. Salehani, G. Arreaza, R.L. Omeir, and A. Makriyannis, Fatty Acid Sulfonyl Fluorides Inhibit Anandamide Metabolism and Bind to the Cannabinoid Receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 231, no. 1, 1997, pp. 217-221.
- 21 T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, T. Tonegawa, S. Nakane, A. Yamashita, and K. Waku, N-arachidonylethanolamine (anandamide), an Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand, and Related Lipid Molecules in the Nervous Tissues, *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, Vol. 14, 1996, pp. 51-56.
- 22 A. Giuffrida, and D. Piomelli, Isotope Dilution GC/MS Determination of Anandamide and Other Fatty Acylethanolamides in Rat Blood Plasma, *FEBS Lett.*, Vol. 422, 1998, pp. 373-376.

- 23 T. Bisogno, D. Melck, L. De Petrocellis, M.Y. Bobrov, N.M. Gretskaya, V.V. Bezuglov, N. Sitachitta, W.H. Gerwick, and V. Di Marzo, Arachidonoylserotonin and Other Novel Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 248, no. 3, 1998, pp. 515-522.
- 24 P.C. Schmid, T. Kuwae, R.J. Krebsbach, and H.H. Schmid, Anandamide and Other N-acyl ethanolamines in Mouse Peritoneal Macrophages, *Chem. Phys. Lipids*, Vol. 87, no. 2, 1997, pp. 103-110.
- 25 T. Sugiura, T. Kodaka, S. Kondo, S. Nakane, H. Kondo, K. Waku, Y. Ishima, K. Watanabe, and I. Yamamoto, Is the Cannabinoid CB₁ Receptor a 2-Arachidonoylglycerol Receptor? Structural Requirements for Triggering a Ca²⁺ Transient in NG108-15 Cells, *J. Biochem.*, Vol. 122, no. 4, 1997, pp. 890-895.
- 26 T. Sugiura, T. Kodaka, S. Nakane, T. Miyashita, S. Kondo, Y. Suhara, H. Takayama, K. Waku, C. Seki, N. Baba, and Y. Ishima, Evidence that the Cannabinoid CB₁ Receptor is a 2-Arachidonoylglycerol Receptor. Structure-Activity Relationship of 2-Arachidonoylglycerol, Ether-Linked Analogues, and Related Compounds, *J. Biol. Chem.*, Vol. 274, no. 5, 1999, pp. 2794-2801.
- 27 W. Gonsiorek, C. Lunn, X. Fan, S. Narula, D. Lundell, and R.W. Hipkin, Endocannabinoid 2-Arachidonyl Glycerol is a Full Agonist Through Human Type 2 Cannabinoid Receptor: Antagonism by Anandamide, *Mol. Pharmacol.*, Vol. 57, no. 5, 2000, pp. 1045-1050.
- 28 T.P. Dinh, D. Carpenter, F.M. Leslie, T.F. Freund, I. Katona, S.L. Sensi, S. Kathuria, and D. Piomelli, Brain Monoglyceride Lipase Participating in Endocannabinoid Inactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 99, no. 16, 2002, pp. 10819-10824.
- 29 Z. J  rai, J.A. Wagner, S.K. Goparaju, L. Wang, R.K. Razdan, T. Sugiura, A.M. Zimmer, T.I. Bonner, A. Zimmer, and G. Kunos, Cardiovascular Effects of 2-Arachidonoyl Glycerol in Anesthetized Mice, *Hypertension*, Vol. 35, no. 2, 2000, pp. 679-84.
- 30 M. Beltramo, and D. Piomelli, Carrier-Mediated Transport and Enzymatic Hydrolysis of the Endogenous Cannabinoid 2-Arachidonoylglycerol, *Neuroreport*, Vol. 11, no. 6, 2000, pp. 1231-1235.
- 31 A.H. Lichtman, G. Griffin, and B.F. Cravatt, Pharmacological Activity of Fatty Acid Amides is Regulated, but not Mediated, by Fatty Acid Amide Hydrolase *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Vol. 302, no. 1, 2002, pp. 73-79.
- 32 J.L. Blankman, G.M. Simon, and B.F. Cravatt, A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol, *Chem. Biol.*, Vol. 14, no. 12, 2007, pp. 1347-1356.

- 33 W. Marrs, and N. Stella, 2-AG + 2 New Players = Forecast for Therapeutic Advances, *Chem. Biol.*, Vol. 14, no. 12, 2007, pp. 1309-1311.
- 34 A. Hermann, M. Kaczocha, and D.G. Deutsch, 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) Membrane Transport: History and Outlook, *AAPS J.*, Vol. 8, no. 2, 2006, pp. 409-412.
- 35 A.L. Bowman, and A. Makriyannis, Refined Homology Model of Monoacylglycerol Lipase: Toward a Selective Inhibitor, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, Vol. 23, no. 11, 2009, pp. 799-806.
- 36 D.K. Nomura, J.Z. Long, S. Niessen, H.S. Hoover, S.W. Ng, and B.F. Cravatt, Monoacylglycerol Lipase Regulates a Fatty Acid Network that Promotes Cancer Pathogenesis, *Cell*, Vol. 140, no. 1, 2010, pp. 49-61.
- 37 M. Guzmán, A New Age for MAGL, *Chem. Biol.*, Vol. 17, no. 1, 2010, pp. 4-6.
- 38 M. Karlsson, J.A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist, and C. Holm, cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase. Evolutionary Relationship to Esterases, Lysophospholipases, and Haloperoxidases, *J. Biol. Chem.*, Vol. 272, no. 43, 1997, pp. 27218-27223.
- 39 G. Labar, C. Bauvois, F. Borel, J.L. Ferrer, J. Wouters, and D.M. Lambert, Crystal Structure of the Human Monoacylglycerol Lipase, a Key Actor in Endocannabinoid Signaling, *ChemBioChem*, Vol. 11, no. 2, 2010, pp. 218-227.
- 40 T. Bertrand, F. Augé, J. Houtmann, A. Rak, F. Vallée, V. Mikol, P.F. Berne, N. Michot, D. Cheuret, C. Hoornaert, and M. Mathieu, Structural Basis for Human Monoglyceride Lipase Inhibition, *J. Mol. Biol.*, Vol. 396, no. 3, 2010, pp. 663-673.
- 41 A. Schalk-Hihi, C. Schubert, R. Alexander, S. Bayoumy, J.C. Clemente, I. Deckman, R.L. DesJarlais, K.C. Dzordzorme, C.M. Flores, B. Grasberger, J.K. Kranz, F. Lewandowski, L. Liu, H. Ma, D. Maguire, M.J. Macielag, M.E. McDonnell, T. Mezzasalma-Haarlander, R. Miller, C. Milligan, C. Reynolds, and L.C. Kuo, Crystal Structure of a Soluble Form of Human Monoglyceride Lipase in Complex with an Inhibitor at 1.35 Å Resolution, *Protein Sci.*, Vol. 20, 2011, pp. 670-683.
- 42 M.H. Bracey, M.A. Hanson, K.R. Masuda, R.C. Stevens, and B.F. Cravatt, Structural Adaptations in a Membrane Enzyme that Terminates Endocannabinoid Signaling, *Science*, Vol. 298, no. 5599, 2002, pp. 1793-1796.
- 43 M. Mileni, D.S. Johnson, Z. Wang, D.S. Everdeen, M. Liimatta, B. Pabst, K. Bhattacharya, R.A. Nugent, S. Kamtekar, B.F. Cravatt, K. Ahn, and R.C. Stevens, Structure-Guided Inhibitor Design for Human FAAH by

- Interspecies Active Site Conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 105, no. 35, 2008, pp. 12820-12824.
- 44 K. Ahn, D.S. Johnson, M. Mileni, D. Beidler, J.Z. Long, M.K. McKinney, E. Weerapana, N. Sadagopan, M. Liimatta, S.E. Smith, S. Lazerwith, C. Stiff, S. Kamtekar, K. Bhattacharya, Y. Zhang, S. Swaney, K. Van Becelaere, R.C. Stevens, and B.F. Cravatt, Discovery and Characterization of a Highly Selective FAAH Inhibitor that Reduces Inflammatory Pain, *Chem. Biol.*, Vol. 16, no. 4, 2009, pp. 411-420.
 - 45 M. Mileni, J. Garfinkle, J.K. DeMartino, B.F. Cravatt, D.L. Boger, and R.C. Stevens, Binding and Inactivation Mechanism of a Humanized Fatty Acid Amide Hydrolase by α -Ketoheterocycle Inhibitors Revealed from Co-Crystal Structures, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 131, no. 30, 2009, pp. 10497-10506.
 - 46 M. Mileni, J. Garfinkle, C. Ezzili, F.S. Kimball, B.F. Cravatt, R.C. Stevens, and D.L. Boger, X-ray Crystallographic Analysis of α -Ketoheterocycle Inhibitors Bound to a Humanized Variant of Fatty Acid Amide Hydrolase, *J. Med. Chem.*, Vol. 53, no. 1, 2010, pp. 230-240.
 - 47 M. Mileni, S. Kamtekar, D.C. Wood, T.E. Benson, B.F. Cravatt, and R.C. Stevens, Crystal Structure of Fatty Acid Amide Hydrolase Bound to the Carbamate Inhibitor URB597: Discovery of a Deacylating Water Molecule and Insight into Enzyme Inactivation, *J. Mol. Biol.*, Vol. 400, no. 4, 2010, pp. 743-754.
 - 48 D.J. Gustin, Z. Ma, X. Min, Y. Li, C. Hedberg, C. Guimaraes, A.C. Porter, M. Lindstrom, D. Lester-Zeiner, G. Xu, T.J. Carlson, S. Xiao, C. Meleza, R. Connors, Z. Wag, and F. Kayser, Identification of Potent, Noncovalent Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 21, 2011, pp. 2492-2496.
 - 49 X. Min, S.T. Thibault, A.C. Porter, D.J. Gustin, T.J. Carlson, H. Xu, M. Lindstrom, G. Xu, C. Uyeda, Z. Ma, Y. Li, F. Kayser, N.P.C. Walker, and Z. Wang, Discovery and Molecular Basis of Potent Noncovalent Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 108, no. 18, 2011, pp. 7379-7384.
 - 50 C. Ezzili, M. Mileni, N. McGlinchey, J.Z. Long, S.G. Kinsey, D.G. Hochstatter, R.C. Stevens, A.H. Lichtman, B.F. Cravatt, E.J. Bilsky, and D.L. Boger, Reversible Competitive α -Ketoheterocycle Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Containing Additional Conformational Constraints in the Acyl Side Chain: Orally Active, Long-Acting Analgesics, *J. Med. Chem.*, Vol. 54, no. 8, 2011, pp. 2805-2822.
 - 51 F.P. Kupiecki, Partial Purification of Monoglyceride Lipase from Adipose Tissue, *J. Lipid Res.*, Vol. 7, no. 2, 1966, pp. 230-235.
 - 52 S.M. Saario, O.M.H. Salo, T. Nevalainen, A. Poso, J.T. Laitinen, T. Järvinen, and R. Niemi, Characterization of the Sulfhydryl-Sensitive Site in the Enzyme Responsible for Hydrolysis of 2-Arachidonoyl-glycerol in

- Rat Cerebellar Membranes, *Chem. Biol.*, Vol. 12, no. 6, 2005, pp. 649-656.
- 53 A. Viso, J.A. Cisneros, and S. Ortega-Gutiérrez, The Medicinal Chemistry of Agents Targeting Monoacylglycerol Lipase, *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 8, no. 3, 2008, pp. 231-246.
 - 54 J.F. Mayaux, E. Cerbelaud, F. Soubrier, P. Yeh, F. Blanche, and D. Pétré, Purification, Cloning, and Primary Structure of a New Enantiomer-Selective Amidase from a Rhodococcus Strain: Structural Evidence for a Conserved Genetic Coupling with Nitrile Hydratase, *J. Bacteriol.*, Vol. 173, no. 21, 1991, pp. 6694-6704.
 - 55 G. Morra, A. Genoni, M.A.C. Neves, K.M. Merz, Jr. and G. Colombo, Molecular Recognition and Drug-Lead Identification: What Can Molecular Simulations Tell Us?, *Curr. Med. Chem.*, Vol. 17, 2010, pp. 25-41.
 - 56 D.C. Young, *Computational drug design: A guide for Computational and Medicinal Chemists*, John Wiley & Sons, Inc., 2009, pp. 14-16.
 - 57 S.K. Goparaju, N. Ueda, K. Taniguchi, and S. Yamamoto, Enzymes of Porcine Hydrolyzing 2-Arachidonoylglycerol, an Endogenous Ligand of Cannabinoid Receptors, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 57, no. 4, 1999, pp. 417-423.
 - 58 W.O. Foe, T.L. Lemke, and D.A. Williams, *Principles of Medicinal Chemistry*, Williams & Wilkins Rose Tree Corporate Center USA, 1995, pp. 58-73.
 - 59 Θ. Μαυρομούστακος, και Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*, Ιατρικές εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, 2008, pp. 84-92.
 - 60 G.L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, 2001, pp. 331-334.
 - 61 Y. Kawasaki, and E. Freire, Finding a Better Path to Drug Selectivity, *Drug Discov. Today*, vol. 16, 2011, pp. 985-990.
 - 62 D.S. Goodsell, and A.J. Olson, Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, Vol. 8, 1990, pp. 195-202.
 - 63 Y. Pak, and S. Wang, Application of a Molecular Dynamics Simulation Method with a Generalized Effective Potential to the Flexible Molecular Docking Problems, *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, 1999, pp. 354-359.
 - 64 A.N. Jain, T.G. Dietterich, R.H. Lathrop, D. Chapman, R.E. Critchlow Jr., B.E. Bauer, T.A. Webster, and T. Lozano-Perez, A Shape-Based Machine Learning Tool for Drug Design, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 8, 1994, pp. 635-652.

- 65 W. Welch, J. Ruppert, and A.N. Jain, Hammerhead: Fast, Fully Automated Docking of Flexible Ligands to Protein Binding Sites, *Chem. Biol.*, vol. 3, 1996, pp. 449-462.
- 66 A.N. Jain, Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine, *J. Med. Chem.*, vol. 46, 2003, pp. 499-511.
- 67 J. Ruppert, W. Welch, and A.N. Jain, Automatic Identification and Representation of Protein Binding Sites for Molecular Docking, *Protein Sci.*, vol. 6, 1997, pp. 524-533.
- 68 A.N. Jain, Scoring Noncovalent Protein-Ligand Interactions: A Continuous Differentiable Function Tuned to Compute Binding Affinities, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 10, 1996, pp. 427-440.
- 69 *Glide*, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, User Manual, 2010.
- 70 R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, and D.T. Mainz, Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes, *J. Med. Chem.*, Vol. 49, 2006, pp. 6177-6196.
- 71 N. Ghafouri, G. Tiger, R.K. Razdan, A. Mahadevan, R.G. Pertwee, B.R. Martin, and C.J. Fowler, Inhibition of Monoacylglycerol Lipase and Fatty Acid Amide Hydrolase by Analogues of 2-Arachidonoylglycerol, *Br. J. Pharmacol.*, Vol. 143, no. 6, 2004, pp. 774-784.
- 72 D.M. Lambert, and C.J. Fowler, The Endocannabinoid System: Drug Targets, Lead Compounds, and Potential Therapeutic Applications, *J. Med. Chem.*, Vol. 48, no. 16, 2005, pp. 5059-5087.
- 73 S. Vandevoorde, Overview of the Chemical Families of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase Inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 8, no. 3, 2008, pp. 247-267.
- 74 J.Z. Long, W. Li, L. Booker, J.J. Burston, S.G. Kinsey, J.E. Schlosburg, F.J. Pavón, A.M. Serrano, D.E. Selley, L.H. Parsons, A.H. Lichtman, and B.F. Cravatt, Selective Blockade of 2-Arachidonoylglycerol Hydrolysis Produces Cannabinoid Behavioral Effects, *Nat. Chem. Biol.*, Vol. 5, no. 1, 2009, pp. 37-44.
- 75 G. Labar, J. Wouters, and D.M. Lambert, A Review on the Monoacylglycerol Lipase: At the Interface Between Fat and Endocannabinoid Signalling, *Curr. Med. Chem.*, Vol. 17, no. 24, 2010, pp. 2588-2607.
- 76 S. Petrosino, and V. Di Marzo, FAAH and MAGL Inhibitors: Therapeutic Opportunities from Regulating Endocannabinoid Levels, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, Vol. 11, no. 1, 2010, pp. 51-62.

- 77 A. Minkkilä, S. Saario, and T. Nevalainen, Discovery and Development of Endocannabinoid-Hydrolyzing Enzyme Inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 10, no. 8, 2010, pp. 828-858.
- 78 G. Ortar, M. Grazia Cascio, A. Schiano Moriello, M. Camalli, E. Morera, M. Nalli, and V. Di Marzo, Carbamoyl Tetrazoles as Inhibitors of Endocannabinoid Inactivation: A Critical Revisitation, *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. 43, no. 1, 2008, pp. 62-72.
- 79 N. Zvonok, L. Pandarinathan, J. Williams, M. Johnston, I. Karageorgos, D.R. Janero, S.C. Krishnan, and A. Makriyannis, Covalent Inhibitors of Human Monoacylglycerol Lipase: Ligand-Assisted Characterization of the Catalytic Site by Mass Spectrometry and Mutational Analysis, *Chem. Biol.*, Vol. 15, no. 8, 2008, pp. 854-862.
- 80 A. Makriyannis, L. Pandarinathan, N. Zvonok, T. Parkkari, and L. Chapman, Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase for Modulation of Cannabinoid Receptors, US Patent Application 20110166138, 2011.
- 81 A. Hoornaert, Triazolopyridine Carboxamide Derivatives, Preparation thereof and Therapeutic Use thereof, SANOFI-AVENTIS Patent application number: 20110071161, 2011.
- 82 D.G. Deutsch, R. Omeir, G. Arreaza, D. Salehani, G.D. Prestwich, Z. Huang, and A. Howlett, Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate: A Potent Irreversible Inhibitor of Anandamide Amidase, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 53, no. 3, 1997, pp. 255-260.
- 83 S.M. Saario, J.R. Savinainen, J.T. Laitinen, T. Järvinen, and R. Niemi, Monoglyceride Lipase-Like Enzymatic Activity is Responsible for Hydrolysis of 2-Arachidonoylglycerol in Rat Cerebellar Membranes, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 67, no. 7, 2004, pp. 1381-1387.
- 84 G.B. Quistad, R. Klintenberg, P. Caboni, S.N. Liang, and J.E. Casida, Monoacylglycerol Lipase Inhibition by Organophosphorus Compounds Leads to Elevation of Brain 2-Arachidonoylglycerol and the Associated Hypomotility in Mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 211, no. 1, 2006, pp. 78-83.
- 85 D.K. Nomura, C.S.S. Hudak, A.M. Ward, J.J. Burston, R.S. Issa, K.J. Fisher, M.E. Abood, J.L. Wiley, A.H. Lichtman, and J.E. Casida, Monoacylglycerol Lipase Regulates 2-Arachidonoylglycerol Action and Arachidonic Acid Levels, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 18, no. 22, 2008, pp. 5875-5878.
- 86 V. Magrioti, G. Naxakis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Makriyannis, and G. Kokotos, A Novel Monoacylglycerol Lipase Inhibitor with Analgesic and Anti-Inflammatory Activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 18, no. 20, 2008, pp. 5424-5427.

- 87 A.G. Hohmann, R.L. Suplita, N.M. Bolton, M.H. Neely, D. Fegley, R. Mangieri, J.F. Krey, J.M. Walker, P.V. Holmes, J.D. Crystal, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, G. Tarzia, and D. Piomelli, An Endocannabinoid Mechanism for Stress-Induced Analgesia, *Nature*, Vol. 435, no. 7045, 2005, pp. 1108-1112.
- 88 A.R. King, A. Duranti, A. Tontini, S. Rivara, A. Rosengarth, J.R. Clapper, G. Astarita, J.A. Geaga, H. Luecke, M. Mor, G. Tarzia, and D. Piomelli, URB602 Inhibits Monoacylglycerol Lipase and Selectively Blocks 2-Arachidonoylglycerol Degradation in Intact Brain Slices, *Chem. Biol.*, Vol. 14, no. 12, 2007, pp. 1357-1365.
- 89 S. Vandevoorde, K.O. Jonsson, G. Labar, E. Persson, D.M. Lambert, and C.J. Fowler, Lack of Selectivity of URB602 for 2-Oleoylglycerol Compared to Anandamide Hydrolysis *in vitro*, *Br. J. Pharmacol.*, Vol. 150, no. 2, 2007, pp. 186-191.
- 90 J.Z. Long, D.K. Nomura, R.E. Vann, D.M. Walentiny, L. Booker, X. Jin, J.J. Burston, L.J. Sim-Selley, A.H. Lichtman, J.L. Wiley, and B.F. Cravatt, Dual Blockade of FAAH and MAGL Identifies Behavioral Processes Regulated by Endocannabinoid Crosstalk *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 106, no. 48, 2009, pp. 20270-20275.
- 91 G.G. Muccioli, G. Labar, and D.M. Lambert, CAY10499, A Novel Monoglyceride Lipase Inhibitor Evidenced by an Expeditious MGL Assay, *ChemBioChem*, Vol. 9, no. 16, 2008, pp. 2704-2710.
- 92 T. Bisogno, G. Ortar, S. Petrosino, E. Morera, E. Palazzo, M. Nalli, S. Maione, and V. Di Marzo, Development of a Potent Inhibitor of 2-Arachidonoylglycerol Hydrolysis with Antinociceptive Activity *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1791, no. 1, 2009, pp. 53-60.
- 93 S. Petrosino, A. Ligresti, and V. Di Marzo, Endocannabinoid Chemical Biology: A Tool for the Development of Novel Therapies, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Vol. 13, no. 3, 2009, pp. 309-320.
- 94 A.R King, A. Lodola, C. Carmi, J. Fu, M. Mor, and D. Piomelli, A Critical Cysteine Residue in Monoacylglycerol Lipase is Targeted by a New Class of Isothiazolinone-Based Enzyme Inhibitors, *Br. J. Pharmacol.*, Vol. 157, no. 6, 2009, pp. 974-983.
- 95 C.N. Kapanda, G.G. Muccioli, G. Labar, J.H. Poupaert, and D.M. Lambert, Bis(dialkylaminethiocarbonyl)disulfides as Potent and Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors, *J. Med. Chem.*, Vol. 52, no. 22, 2009, pp. 7310-7314.
- 96 G. Labar, C. Bauvois, G.G. Muccioli, J. Wouters, and D.M. Lambert, Disulfiram is an Inhibitor of Human Purified Monoacylglycerol Lipase, the Enzyme Regulating 2-Arachidonoylglycerol Signaling, *ChemBioChem*, Vol. 8, no. 11, 2007, pp. 1293-1297.

- 97 A.R. King, E.Y. Dotsey, A. Lodola, K.M. Jung, A. Ghomian, Y. Qiu, J. Fu, M. Mor, and D. Piomelli, Discovery of Potent and Reversible Monoacylglycerol Lipase Inhibitors, *Chem. Biol.*, Vol. 16, no. 10, 2009, pp. 1045-1052.
- 98 A. Politi, S. Durdagi, P. Moutevelis-Minakakis, G. Kokotos, M.G. Papadopoulos, and T. Mavromoustakos, Application of 3D QSAR CoMFA/CoMSIA and *in silico* Docking Studies on Novel Renin Inhibitors Against Cardiovascular Diseases, *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. 44, no. 9, 2009, pp. 3703-3711.
- 99 T. Mavromoustakos, P. Moutevelis-Minakakis, C.G. Kokotos, P. Kontogianni, A. Politi, P. Zoumpoulakis, J. Findlay, A. Cox, A. Balmforth, A. Zoga, and E. Iliodromitis, Synthesis, Binding Studies and *in vivo* Biological Evaluation of Novel Non-Peptide Antihypertensive Analogues, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14, no. 13, 2006, pp. 4353-4360.
- 100 P. Moutevelis-Minakakis, M. Gianni, H. Stougiannou, P. Zoumpoulakis, A. Zoga, A.D. Vlahakos, E. Iliodromitis, and T. Mavromoustakos, Design and Synthesis of Novel Antihypertensive Drugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 13, no. 10, 2003, pp. 1737-1740.
- 101 F.A. Romero, I. Hwang, and D.L. Boger, Delineation of a Fundamental Alpha-Ketoheterocycle Substituent Effect for Use in the Design of Enzyme Inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 128, no. 43, 2006, pp. 14004-14005.
- 102 G. Agelis, P. Roumelioti, A. Resvani, S. Durdagi, M.E. Androutsou, K. Kelaidonis, D. Vlahakos, T. Mavromoustakos, and J. Matsoukas, An Efficient Synthesis of a Rationally Designed 1,5 Disubstituted Imidazole AT(1) Angiotensin II Receptor Antagonist: Reorientation of Imidazole Pharmacophore Groups in Losartan Reserves High Receptor Affinity and Confirms Docking Studies, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, Vol. 24, no. 9, 2010, pp. 749-758.
- 103 B.P. Smart, Y.H. Pan, A.K. Weeks, J.G. Bollinger, B.J. Bahnson, and M.H. Gelb, Inhibition of the Complete Set of Mammalian Secreted Phospholipases A₂ by Indole Analogues: A Structure-Guided Study, *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 12, no. 7, 2004, pp. 1737-1749.
- 104 S. Bovens, A.S. Elfringhoff, M. Kaptur, D. Reinhardt, M. Schäfers, and M. Lehr, 1-(5-Carboxyindol-1-yl)propan-2-one Inhibitors of Human Cytosolic Phospholipase A2 α : Effect of Substituents in Position 3 of the Indole Scaffold on Inhibitory Potency, Metabolic Stability, Solubility, and Bioavailability, *J. Med. Chem.*, Vol. 53, 2010, pp. 8298-8308.
- 105 J. Ludwig, S. Bovens, C. Brauch, A.S. Elfringhoff, and M. Lehr, Design and Synthesis of 1-indol-1-yl-propan-2-ones as Inhibitors of Human Cytosolic Phospholipase A2 α , *J. Med. Chem.*, Vol. 49, no. 8, 2006, pp. 2611-2620.

- 106 V.D. Mouchlis, V. Magrioti, E. Barbayianni, N. Cermak, R.C. Oslund, T.M. Mavromoustakos, M.H. Gelb, and G. Kokotos, Inhibition of Secreted Phospholipases A₂ by 2-Oxoamides Based on α -Amino Acids: Synthesis, *in vitro* Evaluation and Molecular Docking Calculations, *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 19, 2011, pp. 735-743.
- 107 G. Kokotos, D.A. Six, V. Loukas, T. Smith, V. Constantinou-Kokotou, D. Hadjipavlou-Litina, S. Kotsovolou, A. Chiou, C.C. Beltzner, and E.A. Dennis, Inhibition of Group IVA Cytosolic Phospholipase A₂ by Novel 2-Oxoamides *in vitro*, in cells, and *in vivo*, *J. Med. Chem.*, Vol. 47, no. 14, 2004, pp. 3615-3628.
- 108 G. Antonopoulou, E. Barbayianni, V. Magrioti, N. Cotton, D. Stephens, V. Constantinou-Kokotou, E.A. Dennis, and G. Kokotos, Structure-Activity Relationships of Natural and Non-Natural Amino Acid-Based Amide and 2-Oxoamide Inhibitors of Human Phospholipase A₂ Enzymes, *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 16, no. 24, 2008, pp. 10257-10269.
- 109 A. Stephens, E. Barbayianni, V. Constantinou-Kokotou, A. Peristeraki, D.A. Six, J. Cooper, R. Harkewicz, R.A. Deems, E.A. Dennis, and G. Kokotos, Differential Inhibition of Group IVA and Group VIA Phospholipases A₂ by 2-Oxoamides, *J. Med. Chem.*, Vol. 49, no. 9, 2006, pp. 2821-2828.
- 110 G. Kokotos, S. Kotsovolou, D.A. Six, V. Constantinou-Kokotou, C.C. Beltzner, and E.A. Dennis, Novel 2-Oxoamide Inhibitors of Human Group IVA Phospholipase A₂, *J. Med. Chem.*, Vol. 45, no. 14, 2002, pp. 2891-2893.
- 111 S. Connolly, C. Bennion, S. Botterell, P.J. Croshaw, C. Hallam, K. Hardy, P. Hartopp, C.G. Jackson, S.J. King, L. Lawrence, A. Mete, D. Murray, D.H. Robinson, G.M. Smith, L. Stein, I. Walters, E. Wells, and W.J. Withnall, Design and Synthesis of a Novel and Potent Series of Inhibitors of Cytosolic Phospholipase A₂ Based on a 1,3-Disubstituted Propan-2-one Skeleton, *J. Med. Chem.*, Vol. 45, no. 6, 2002, pp. 1348-1362.
- 112 T. Ono, K. Yamada, Y. Chikazawa, M. Ueno, S. Nakamoto, T. Okuno, and K. Seno, Characterization of a Novel Inhibitor of Cytosolic Phospholipase A₂ α , Pyrrophenone, *Biochem. J.*, Vol. 363, 2002, pp. 727-735.
- 113 K. Seno, T. Okuno, K. Nishi, Y. Murakami, F. Watanabe, T. Matsuura, M. Wada, Y. Fujii, M. Yamada, T. Ogawa, T. Okada, H. Hashizume, M. Kii, S. Hara, S. Hagishita, S. Nakamoto, K. Yamada, Y. Chikazawa, M. Ueno, I. Teshirogi, T. Ono, and M. Ohtani, Pyrrolidine Inhibitors of Human Cytosolic Phospholipase A₂, *J. Med. Chem.*, Vol. 43, no. 6, 2000, pp. 1041-1044.
- 114 A. Baskakis, V. Magrioti, N. Cotton, D. Stephens, V. Constantinou-Kokotou, E.A. Dennis, and G. Kokotos, Synthesis of Polyfluoro Ketones for Selective Inhibition of Human Phospholipase A₂ Enzymes, *J. Med. Chem.*, Vol. 51, no. 24, 2008, pp. 8027-8037.