

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

**"ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΤΗ
ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΥΟ C2-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΔΙΜΕΡΩΝ ΠΥΡΡΟΛΟ[2,3-*f*]ΚΙΝΟΛΙΝΩΝ"**

ΒΑΡΒΑΡΙΓΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

"ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΥΟ C2-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΔΙΜΕΡΩΝ ΠΥΡΡΟΛΟ[2,3-*f*]ΚΙΝΟΛΙΝΩΝ"

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΡΒΑΡΙΓΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

A.M.: 281501

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ανδρέας Τσοτίνης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 02/12/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση δυο C2-υποκατεστημένων [2,3-*f*]κινολινών που παρουσιάζουν κυτταροτοξικό χαρακτήρα και πιθανή αντικαρκινική δράση. Αρχικά μελετήθηκαν τα πειραματικά δεδομένα φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μίας και δύο διαστάσεων για τη διερεύνηση των διαμορφώσεων που λαμβάνουν οι ενώσεις. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων με τη βοήθεια υπολογιστικών μεθόδων μοριακής δυναμικής υπό συνθήκες κενού, υδατικού περιβάλλοντος και περιβάλλοντος διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ακολούθως, οι ενώσεις μελετήθηκαν για την ικανότητά τους να διαπερνούν τον υδάτινο φραγμό των λιπιδικών διπλοστιβάδων και να εισέρχονται σε αυτές, με πειράματα μοριακής δυναμικής. Τέλος, μελετήθηκε η μοριακή πρόσδεση των ενώσεων αυτών σε αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (DNA) για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης τους.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές στα διάφορα περιβάλλοντα και στόχους δράσης λαμβάνουν εκτεταμένες δομές, σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα NMR όπου δεν παρατηρήθηκαν μεγάλης εμβέλειας NOEs. Η βιολογική σημασία αυτών των αποτελεσμάτων είναι υπό μελέτη.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μοριακή Μοντελοποίηση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: φασματοσκοπία NMR, μοριακή δυναμική, μοριακή πρόσδεση, λιπιδικές διπλοστιβάδες, κυτταροτοξική δράση, DNA

ABSTRACT

In the present thesis a conformational analysis of two C2-substituted [2,3-*f*] quinolines presenting cytotoxic and potential anticancer activity was applied. Initially, the experimental data of one- and two- dimensional nuclear magnetic resonance spectra were analyzed to structurally elucidate them and search their conformational properties. Then, a conformational analysis of the compounds under study was performed, using computational methods and molecular dynamics procedures in vacuum, in water solution environment and in DMSO solution environment. Subsequently, the compounds were studied for their ability to cross the water barrier of lipid bilayers and enter within the bilayer core using molecular dynamics experiments. Finally, the molecular docking of these compounds in nucleotide sequences (DNA) was studied, in order to investigate their mode of action, as DNA constitutes their target.

The obtained results showed that these compounds adopt an extended conformation in all environments studied. This is in accordance with NMR data which showed no wide range NOEs. The biological consequences of these results are under study.

SUBJECT AREA: Molecular Modeling

KEYWORDS: NMR spectroscopy, molecular dynamics, molecular docking, lipid bilayers, cytotoxic activity, DNA

Πίνακας Περιεχομένων

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 18 |
| Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή | 19 |
| 1.1 Καρκίνος..... | 19 |
| 1.2 Βιολογία του Καρκίνου | 19 |
| 1.2.1. Επίκτητη επάρκεια στα αυξητικά σήματα..... | 21 |
| 1.2.2. Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα | 22 |
| 1.2.3 Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) | 23 |
| 1.2.4. Απεριόριστη Δυνατότητα αντιγραφής | 23 |
| 1.2.5 Διατήρηση της αγγειογένεσης..... | 24 |
| 1.2.6. Προσβολή του ιστού και μετάσταση..... | 24 |
| 1.3 Κατηγορίες νεοπλασιών | 24 |
| Κεφάλαιο 2 – Χημειοθεραπευτική Αντιμετώπιση του Καρκίνου..... | 26 |
| 2.1 Εισαγωγή..... | 26 |
| 2.2 Βασικές αρχές της δομής και αντιγραφής του DNA..... | 28 |
| 2.3 Αλκυλιωτικοί παράγοντες..... | 31 |
| 2.3.1 Μηχανισμός δράσης..... | 33 |
| 2.4 Αντιμεταβολίτες και νουκλεοζιτικά παράγωγα..... | 36 |
| 2.4.1 Ανάλογα φυλλικού οξέος – Μεθοτρεξάτη | 36 |
| 2.4.2 Ανάλογα πυριμιδινών – 5-φθοροουρακίλη | 37 |
| 2.4.3 Ανάλογα πουρινών – 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη | 38 |
| 2.5 Αντιμιτωτικά φάρμακα | 39 |
| 2.5.1 Αλκαλοειδή της Vinca | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2 Επιποδοφυλλοτοξίνες..... | 40 |
| 2.6 Παράγοντες ενδοπαρεμβολής..... | 41 |
| 2.6.1 Ανθρακυκλίνες..... | 42 |
| 2.6.2 Αντικαρκινικά αντιβιοτικά | 42 |
| 2.7 Συμπεράσματα..... | 45 |
| Κεφάλαιο 3 – Σκοπός παρούσας εργασίας | 47 |
| Κεφάλαιο 4 – Διαμορφωτική ανάλυση χημικών ενώσεων με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και μεθόδων Μοριακής Μοντελοποίησης | 49 |
| 4.1 Εισαγωγή..... | 49 |
| 4.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου (¹ H-NMR)..... | 49 |
| 4.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR)..... | 50 |
| 4.3.1 Ομοπυρηνικό πείραμα 2D-COSY | 51 |
| 4.3.2 Ομοπυρηνικό πείραμα 2D-NOESY | 51 |
| 4.4 Υπολογιστικές Μέθοδοι Ελαχιστοποίησης Ενέργειας (Energy Minimization)..... | 52 |
| 4.5 Διαμορφωτική Ανάλυση | 53 |
| 4.5.1 Μέθοδοι Συστηματικής Αναζήτησης..... | 53 |
| 4.5.2 Μέθοδοι Τυχαίας Αναζήτησης | 53 |
| 4.5.3 Μέθοδοι Μοριακής Δυναμικής..... | 54 |
| 4.6 Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) | 56 |
| 4.6.1 Εφαρμογή Μοριακής Πρόσδεσης GLIDE | 57 |
| Κεφάλαιο 5 – Λιπιδικές Διπλοστιβάδες | 60 |
| 5.1 Εισαγωγή..... | 60 |
| 5.2 Σύνθεση, δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών..... | 60 |
| 5.3 Τα λιπίδια..... | 62 |
| 5.4 Διμυριστόυλ-φωσφατιδυλοχολίνη (DMPC) | 63 |

| | |
|---|-----|
| 5.5 Επίδραση βιοδραστικών μορίων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες | 64 |
| Κεφάλαιο 6 – Διαμορφωτική Ανάλυση δύο C2-υποκατεστημένων πυρρολο[2,3- <i>f</i>]κινολινών | 66 |
| 6.1 Πειράματα Φασματοσκοπίας NMR..... | 66 |
| 6.1.1 Παράμετροι φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού | 66 |
| 6.1.2 Μελέτη της ένωσης 5e με χρήση Φασματοσκοπίας NMR σε διαλύτη DMSO | 67 |
| 6.1.3 Μελέτη της ένωσης 5g με Φασματοσκοπία NMR σε διαλύτη DMSO | 74 |
| 6.1.4 Παρατηρήσεις από τα πειραματικά δεδομένα NMR..... | 79 |
| 6.2 Μελέτη διαμορφωτικού χώρου ενώσεων υπό κενό με τη Μέθοδο Μοριακής Δυναμικής Υψηλής Θερμοκρασίας Ανόπτωσης (Simulated Annealing)..... | 80 |
| 6.2.1 Σχεδιασμός και ελαχιστοποίηση ενώσεων | 80 |
| 6.2.2 Πειραματική Μέθοδος | 80 |
| 6.2.3 Προσομοίωση υπό κενό της ένωσης 5e | 80 |
| 6.2.4 Προσομοίωση υπό κενό της ένωσης 5g | 85 |
| 6.3 Μελέτη διαμορφωτικού χώρου ενώσεων με τη Μέθοδο Μοριακής Δυναμικής σε περιβάλλον διαλύτη | 90 |
| 6.3.1 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 5e σε υδατικό περιβάλλον και σε περιβάλλον διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO) | 90 |
| 6.3.2 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 5g σε υδατικό περιβάλλον και σε περιβάλλον διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO) | 98 |
| 6.3 Γενικά Συμπεράσματα | 103 |
| Κεφάλαιο 7 – Μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων 5e και 5g σε λιπιδικές διπλοστιβάδες με τη βοήθεια μεθόδων Μοριακής Δυναμικής..... | 105 |
| 7.1 Μοντέλα προσομοίωσης | 105 |
| 7.2 Παράμετροι Προσομοιώσεων | 105 |
| 7.3 Αποτελέσματα | 106 |

| | |
|---|-----|
| 7.3.1 Αποτελέσματα προσομοίωσης για την ένωση 5e | 107 |
| 7.3.2 Αποτελέσματα προσομοίωσης για την ένωση 5g | 110 |
| 7.4 Συμπεράσματα..... | 113 |
| Κεφάλαιο 8 – Μοριακή Πρόσδεση των ενώσεων 5e και 5g σε τμήματα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών | 114 |
| 8.1 Εισαγωγή..... | 114 |
| 8.2 Υλικά και μέθοδοι..... | 115 |
| 8.3 Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης | 117 |
| 8.3.1 Μοριακή Πρόσδεση της ένωσης 5e | 117 |
| 8.3.2 Μοριακή Πρόσδεση της ένωσης 5g | 119 |
| 8.4 Σημαντικές Παρατηρήσεις..... | 121 |
| 8.5 Πειράματα μοριακής δυναμικής των συμπλόκων των ενώσεων 5e και 5g με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες | 122 |
| 8.5.1 Παράμετροι Προσομοίωσης..... | 122 |
| 8.5.2 Αποτελέσματα | 123 |
| 8.5.3 Παρατηρήσεις..... | 126 |
| Κεφάλαιο 9 – Γενικά Συμπεράσματα και παρατηρήσεις | 127 |
| 9.1 Διερεύνηση διαμορφώσεων σε περιβάλλοντα κενού, νερού και διμεθυλοσουφοξειδίου | 127 |
| 9.2 Διερεύνηση διαμορφώσεων και λειτουργίας των ενώσεων 5e και 5g σε βιολογικά περιβάλλοντα | 130 |
| 9.2.1 Περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας διμυριστόυλ-φωσφατιδυλοχολίνης (Dimystoylphosphatidylcholine, DMPC) | 130 |
| 9.2.2 Αλληλεπίδραση ενώσεων με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες – Προσομοίωση περιβάλλοντος κυτταρικού πυρήνα | 130 |
| Πίνακας Ορολογίας..... | 132 |

| | |
|---|-----|
| Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων | 132 |
| Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια..... | 133 |
| Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους..... | 133 |
| Βιβλιογραφία | 134 |

Κατάλογος Εικόνων

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1.1: Οι έξι δυνητικές αλλαγές που οδηγούν στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων..... | 21 |
| Εικόνα 2.1 : Δομική αναπαράσταση του DNA. | 29 |
| Εικόνα 2.2: Διχάλα αντιγραφής DNA. | 30 |
| Εικόνα 2.3: Πιθανές θέσεις αλκυλίωσης στις αζωτούχες βάσεις..... | 34 |
| Εικόνα 2.4: Μηχανισμός δράσης αλκυλιωτικών παραγόντων | 35 |
| Εικόνα 2.5: α. Σισπλατίνη, β. καρβοπλατίνη..... | 36 |
| Εικόνα 2.6: Χημικές δομές α. Φυλλικού οξέος, β. Μεθοτρεξάτης | 37 |
| Εικόνα 2.7: Χημικές δομές α. Ουρακίλης, β. 5-φθοροουρακίλης | 38 |
| Εικόνα 2.8: Χημικές δομές α. 6-θειογουανίνης, β. 6-μερκαπτοπουρίνης..... | 39 |
| Εικόνα 2.9 Χημικές δομές των αλκαλοειδών της Vinca: α. Βινμπλαστίνη, β. Βινκριστίνη..... | 40 |
| Εικόνα 2.10: Χημική δομή της ετοποσίδης..... | 41 |
| Εικόνα 2.11: Τα σημαντικότερα φάρμακα των ανθρακυκλινών | 42 |
| Εικόνα 2.12: Απεικόνιση ενδοπαραμβολής της δακτινομυκίνης στο DNA..... | 43 |
| Εικόνα 2.13: Χημική δομή της μπλεομυκίνης..... | 44 |
| Εικόνα 2.14: Εξειδίκευση δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων κατά τα στάδια του κυτταρικού κύκλου | 45 |
| Εικόνα 2.15: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων..... | 46 |
| Εικόνα 3.1: Χημικές δομές των πυρρολο-[2,3-f]κινολινών 5e και 5g | 48 |
| Εικόνα 4.1: Φάσμα NMR δύο διαστάσεων..... | 51 |
| Εικόνα 4.2: Συσχέτιση πυρήνων στο COSY. Με το βέλος επισημαίνεται η ομοπυρηνική συσχέτιση μεταξύ δυο γειτονικών πρωτονίων με σταθερά σύζευξης J_{HH} | 51 |
| Εικόνα 5.1: Μοντέλο «ρευστού μωσαϊκού» των κυτταρικών μεμβρανών [36]..... | 61 |
| Εικόνα 5.2: Δομή λιποειδούς διπλοστιβάδας..... | 62 |
| Εικόνα 5.3: Το υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα ενός φωσφολιπιδίου, συγκεκριμένα μιας φωσφατιδυλοχολίνης..... | 63 |
| Εικόνα 5.4: Το μόριο της διμυριστούλ-φωσφατιδυλοχολίνης..... | 63 |

| | |
|---|-----|
| Εικόνα 5.5: Λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC περιβαλλόμενη από μόρια νερού. | 64 |
| Εικόνα 6.1: Χημική δομή της ένωσης 5e | 67 |
| Εικόνα 6.2: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 5e σε διαλύτη DMSO..... | 68 |
| Εικόνα 6.3: Αλειφατική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR της ένωσης 5e | 69 |
| Εικόνα 6.4: Αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR της ένωσης 5e | 69 |
| Εικόνα 6.5: Φάσμα 2D COSY της ένωσης 5e σε διαλύτη DMSO..... | 71 |
| Εικόνα 6.6: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης 5e σε διαλύτη DMSO. | 72 |
| Εικόνα 6.7: Χημική δομή της ένωσης 5g | 74 |
| Στην εικόνα 6.8 που ακολουθεί παρατίθεται το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 5e | 74 |
| Εικόνα 6.8: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 5g σε διαλύτη DMSO..... | 75 |
| Εικόνα 6.9: Αλειφατική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR της ένωσης 5g | 76 |
| Εικόνα 6.10: Αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR της ένωσης 5g | 76 |
| Εικόνα 6.11: Φάσμα 2D COSY της ένωσης 5g σε διαλύτη DMSO..... | 77 |
| Εικόνα 6.12: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης 5g σε διαλύτη DMSO. | 78 |
| Εικόνα 6.13: Αρχείο τοπολογίας (topology file) της ένωσης 5e | 92 |
| Εικόνα 6.14: Απλοποιημένη δομή αρχείου *.mdp, όπου ορίζονται οι παράμετροι για κάθε προσομοίωση..... | 92 |
| Εικόνα 6.15: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης 5e σε υδατικό περιβάλλον. Η ένωση βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση..... | 93 |
| Εικόνα 6.16: Επικρατούσα διαμόρφωση της ένωσης 5e κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης..... | 93 |
| Εικόνα 6.17: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης 5e σε περιβάλλον DMSO..... | 96 |
| Εικόνα 6.18: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης 5e σε περιβάλλον DMSO σε κατάσταση ισορροπίας..... | 96 |
| Εικόνα 6.19: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης 5g σε υδατικό περιβάλλον | 99 |
| Εικόνα 6.20: Επικρατέστερη Διαμόρφωση της ένωσης 5g σε υδατικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης..... | 99 |
| Εικόνα 6.21: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης 5g σε περιβάλλον DMSO. | 101 |
| Εικόνα 6.22: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης 5g σε περιβάλλον DMSO κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης..... | 102 |
| Εικόνα 7.1: Ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση 5e κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| Εικόνα 7.2: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης 5e κατά τη συνολική διάρκεια της προσομοίωσης..... | 109 |
| Εικόνα 7.3: Επικρατέστερη διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση 5g μέσα στο σύστημα DMPC-νερού κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. | 112 |
| Εικόνα 7.4: Ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση 5g μέσα στο σύστημα DMPC-νερού κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης..... | 112 |
| Εικόνα 8.1 : Α. Χημικές δομές αναστολέων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών Α.Πενταμιδίνη, Β. Νετροψίνη..... | 115 |
| Εικόνα 8.2: Χημικές δομές των πυρρολο-[2,3-f]κινολινών 5e και 5g | 116 |
| Εικόνα 8.3: Σύμπλοκο ένωσης 5e με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1d64. | 118 |
| Εικόνα 8.4: Σύμπλοκο ένωσης 5e με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1dne. | 119 |
| Εικόνα 8.5: Σύμπλοκο ένωσης 5g με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1d64. | 120 |
| Εικόνα 8.6: Σύμπλοκο ένωσης 5g με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1dne | 121 |
| Εικόνα 8.7: Σύστημα συμπλόκου 5e -1d64 περιβαλλόμενο από μόρια νερού και κατιόντα νατρίου (Na ⁺), όπως χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η ένωση διακρίνεται με πορτοκαλί χρώμα..... | 124 |
| Εικόνα 8.8: Σύστημα συμπλόκου 5g -1d64 περιβαλλόμενο από μόρια νερού και κατιόντα νατρίου (Na ⁺), όπως χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η ένωση διακρίνεται με πράσινο χρώμα. | 125 |
| Εικόνα 9.1: Σύγκριση των διαμορφώσεων της ένωσης 5e σε περιβάλλοντα κενού και διαλυτών..... | 128 |
| Εικόνα 9.2: Σύγκριση των διαμορφώσεων της ένωσης 5g σε περιβάλλοντα κενού και διαλυτών..... | 129 |
| Εικόνα 9.3: Σύγκριση των διαμορφώσεων των ενώσεων 5e και 5g περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας DMPC. | 131 |
| Εικόνα 9.3: Σύγκριση των διαμορφώσεων των ενώσεων 5e και 5g μετά από πρόσδεση σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες,..... | 131 |

Κατάλογος Πινάκων

| | |
|--|-----|
| Πίνακας 2.1: Κατηγορίες αλκυλιωτικών παραγόντων | 32 |
| Πίνακας 6.1: ¹ H NMR Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ένωσης 5e σε διαλύτη DMSO. | 73 |
| Πίνακας 6.2: ¹ H NMR Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ένωσης 5g σε διαλύτη DMSO. | 79 |
| Πίνακας 6.3: Κατηγορίες διαμορφώσεων της ένωσης 5e μετά από προσομοίωση υπό κενό..... | 81 |
| Πίνακας 6.4: Κατηγορίες διαμορφώσεων της ένωσης 5g μετά από προσομοίωση υπό κενό..... | 85 |
| Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της ένωσης 5e σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. | 118 |
| Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της ένωσης 5g σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. | 120 |

Κατάλογος Σχημάτων

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 6.1: Κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης 5e ανά κατηγορία επί του συνολικού αριθμού των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα. | 84 |
| Σχήμα 6.2: Κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης 5g ανά κατηγορία επί του συνολικού αριθμού των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα. | 89 |
| Σχήμα 6.3: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο. | 94 |
| Σχήμα 6.4 α. Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα των μεταβολών της πυκνότητας του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. | 95 |
| Σχήμα 6.5: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο. | 97 |
| Σχήμα 6.6: α. Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα των μεταβολών της πυκνότητας του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. | 97 |
| Σχήμα 6.7: α. Διάγραμμα ολικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. | 100 |
| Σχήμα 6.8: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα πυκνότητας σε συνάρτηση με χρόνο. | 100 |
| Σχήμα 6.9: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. | 102 |
| Σχήμα 6.10: α. Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα πυκνότητας σε συνάρτηση με χρόνο. | 103 |
| Σχήμα 7.1: Προφίλ πυκνοτήτων κατά μήκος του άξονα Z για τα συστήματα α. 5e-DMPC-νερό. β. 5g-DMPC-νερό. | 106 |
| Σχήμα 7.2: Απεικόνιση μεταβολής δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο για α. Τα πρώτα 20 ns. β. Τα επόμενα 20 ns. γ. Τα τελευταία 60 ns της προσομοίωσης. | 107 |
| Σχήμα 7.3: Απεικόνιση μεταβολής της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο για α. Τα πρώτα 20ns. β. Τα επόμενα 20ns. γ. Τα τελευταία 60ns της προσομοίωσης. | 108 |
| Σχήμα 7.4: Απεικόνιση μεταβολής δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο για α. Τα πρώτα 40ns. β. Τα επόμενα 60ns. | 110 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 7.5: Απεικόνιση μεταβολής θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο για α. Τα πρώτα 40ns. β. Τα επόμενα 60ns. | 111 |
| Σχήμα 8.1: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο. | 124 |
| Σχήμα 8.2: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο. | 125 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική 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 από το Νοέμβριο του 2010 έως το Σεπτέμβριο του 2011. Τα πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Χημείας της Σλοβενίας υπό την επίβλεψη της Δρ. Simona G. Grdadolnik. Τα πειράματα Μοριακής Δυναμικής στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και DNA πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών υπό την επίβλεψη του Δρ. Μάνθου Παπαδόπουλου.

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

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Θωμά Μαυρομούστακο για την ανάθεση του ερευνητικού θέματος και την πολύτιμη βοήθειά του, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, σε όλα τα στάδια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αστείρευτη υπομονή που υπέδειξε καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Γρηγόριο Μεγαριώτη, χωρίς την επιστημονική συμβολή του οποίου δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στους Δρ. Μάνθο Παπαδόπουλο και Δρ. Γεώργιο Λεονή για τις εποικοδομητικές συζητήσεις κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες, και ιδιαίτερα τη Νίκη Νεοφύτου, το Νίκο Σταυρινουδάκη και τη Σοφία Βασιλακάκη για όλη τη βοήθεια και συμπαράσταση τόσο σε επαγγελματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται το σύνολο 100 και παραπάνω διαφορετικών και διακριτών ασθενειών ή διαταραχών οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων και οι οποίες οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο καρκίνος μπορεί να προσβάλλει οποιονδήποτε ιστό του σώματος και λαμβάνει πολλές και διαφορετικές μορφές ανάλογα σε ποιο σημείο του σώματος εμφανίζεται.

Τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται είτε άμεσα στον παρακείμενο ιστό με «διήθηση», είτε μεταφέρονται σε άλλες θέσεις του οργανισμού μέσω των αιμοφόρων αγγείων και της λεμφικής οδού (μετάσταση).

Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου παίρνουν την ονομασία τους από το είδος του κυττάρου ή οργάνου το οποίο προσβάλλουν αρχικά. Ακόμα και στην περίπτωση εξάπλωσης της νόσου (μετάσταση) σε άλλα ζωτικά όργανα, η ονομασία της ασθένειας παραμένει ίδια με την αρχική.

1.2 Βιολογία του Καρκίνου

Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα ενός οργανισμού χαρακτηρίζονται από έναν παρόμοιο μοριακό μηχανισμό ο οποίος ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Πολλοί φυσικοί και χημικοί παράγοντες όπως η ηλικία, η γενετική προδιάθεση, οι καρκινογόνες ουσίες, το ανοσολογικό σύστημα, η διατροφή, το περιβάλλον και οι ογκογόνοι ιοί, ενδέχεται να προκαλέσουν απορύθμιση του μοριακού αυτού μηχανισμού και να οδηγήσουν στην προοδευτική μεταλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό [1].

Η καρκινογένεση είναι μία πολυδιάστατη διαδικασία, κάθε βήμα της οποίας αντικατοπτρίζει διαφορετικά γεγονότα γενετικών μεταλλάξεων οι οποίες οδηγούν προοδευτικά στην μετατροπή υγιών αρχικά κυττάρων σε καρκινικά. Μελέτες σε καρκινικούς ιστούς έχουν αποκαλύψει τις ενδιάμεσες βιοχημικές οδούς που οδηγούν στην προοδευτική μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων, μέσω μιας

σειράς προκαρκινικών καταστάσεων, σε κακοήθεις όγκους [2]. Οι παρατηρήσεις αυτές τεκμηριώθηκαν περαιτέρω από ένα πλήθος ευρημάτων που έδειξαν ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων έχει τροποποιηθεί αμετάβλητα σε πολλαπλές περιοχές ως αποτέλεσμα διασπάσεων, που οφείλονται είτε σε ακαθόριστες βλάβες, είτε σε εμφανείς μεταλλάξεις ή ακόμα και σε αλλαγές στο χρωμόσωμα [3].

Η έναρξη της καρκινογένεσης οριοθετείται συνήθως από το σχηματισμό μιας υπερπλασίας, ή ενός φυσιολογικού φαινοτυπικά πληθυσμού κυττάρων με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Το επόμενο στάδιο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μη φυσιολογικού φαινοτύπου σε ορισμένους εκπροσώπους του κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος εμφανίζει δυσπλασία. Η εξέλιξη της δυσπλασίας αριθμητικά και μορφολογικά χαρακτηρίζει το εντοπισμένο καλοήθες νεόπλασμα. Το καλοήθες νεόπλασμα διαφοροποιείται από τα κακοήθη κυρίως λόγω της έλλειψης δυνατότητας εισβολής και καταστροφής γειτονικών ιστών και μετάστασης σε μακρινούς ιστούς και όργανα, δημιουργώντας νέους όγκους [4].

Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ουσιαστικά η παραγωγή ενός γονιδιώματος στο σύνολο του καρκινικού πληθυσμού, διαφοροποιημένου σε πολλαπλά σημεία, ως συνέπεια σημειακών μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών αλλαγών. Είναι γεγονός ότι οι διάφοροι τύποι καρκίνου δεν χαρακτηρίζονται από τις ίδιες γονιδιακές αλλαγές. Περισσότεροι από 100 ευδιάκριτοι τύποι καρκίνων και ογκιδίων είναι δυνατόν να αναπτυχθούν σε συγκεκριμένα όργανα, εγείροντας πλήθος ερωτημάτων σχετικά με την εμπλοκή των καρκινικών γονιδίων στην παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται από τα υγιή κύτταρα, και τον αριθμό των ευδιάκριτων ομαλών κύκλων που πρέπει να διακοπούν σε ένα φυσιολογικό κύτταρο για να μεταλλαχθεί σε καρκινικό. Ωστόσο, ο κατάλογος των καρκινικών γονιδιωμάτων μπορεί να συρρικνωθεί σε έναν κατάλογο που περιλαμβάνει έξι δυνητικές αλλαγές στη φυσιολογία του κυττάρου οι οποίες εκλεκτικά οδηγούν στην κακοήθη ανάπτυξη (Εικόνα 1.1).

Αναλυτικότερα αυτές αφορούν:

- 1) Επίκτητη επάρκεια στα αυξητικά σήματα (self-sufficiency in Growth Signals)

- 2) Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα (Insensitivity to Antigrowth Signals)
- 3) Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), (Evasion of programmed cell death, apoptosis)
- 4) Απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής (limitless replicative potential)
- 5) Διατήρηση της αγγειογένεσης (sustained angiogenesis)
- 6) Προσβολή του ιστού και μετάσταση (tissue invasion and metastasis)



Εικόνα 1.1: Οι έξι δυνητικές αλλαγές που οδηγούν στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων

1.2.1. Επίκτητη επάρκεια στα αυξητικά σήματα

Τα υγιή κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μιτογόνα σήματα αύξησης τα οποία μεταφέρονται στο κύτταρο μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων. Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων – σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα – δεν απαιτεί τη συμμετοχή των διεγερτικών αυτών παραγόντων. Τα καρκινικά

κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολλά από τα σήματα που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό τους, με αποτέλεσμα να μειώνεται η εξάρτησή τους από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Αυτή η ανεξάρτηση από τα εξωτερικά ερεθίσματα διακόπτει ένα πολύ κρίσιμο σημείο στον ομοιοστατικό μηχανισμό, ο οποίος όταν λειτουργεί φυσιολογικά διασφαλίζει την ομαλή συμπεριφορά των διαφόρων κυττάρων μέσα στον ιστό. Οι τρεις σημαντικότερες βιοχημικές οδοί για την επίτευξη της αυτονομίας αυτής έχουν διαλευκανθεί και αφορούν διαφοροποιήσεις: α) που προκαλούνται στα εξωκυττάρια σήματα που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό, β) στους διακυτταρικούς μεταγωγείς των σημάτων και γ) στους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς που μεταφράζουν τα σήματα σε κυτταρική λειτουργία [5].

1.2.2. Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα

Σε έναν υγιή ιστό, πολλαπλά αντι-αυξητικά σήματα λειτουργούν προς την κατεύθυνση της διατήρησης της ηρεμίας του κυττάρου (κατάσταση αδράνειας G_0) και της ομοιόστασης του ιστού, εξασφαλίζοντας τον κρίσιμο αριθμό αυτών για τη λειτουργία του ιστού. Όπως και οι αυξητικοί παράγοντες, δρουν μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και συνδέονται με τους αντίστοιχους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς. Η ικανότητα των σημάτων αυτών να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων προκαλείται μέσω δυο διακριτών μηχανισμών οι οποίοι είτε οδηγούν το κύτταρο σε κατάσταση αδράνειας από την οποία μπορούν να επαναδραστηριοποιηθούν όταν το επιτρέψουν τα κατάλληλα εξωκυτταρικά σήματα, είτε καθοδηγούν τα κύτταρα σε μόνιμη εγκατάλειψη της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας μπαίνοντας σε μεταμιτωτικές καταστάσεις [6].

Τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στους παραπάνω μηχανισμούς είτε με περιορισμένη έκφραση των απαιτούμενων υποδοχέων, είτε με μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στην αναστολή του πολλαπλασιασμού. Ουσιαστικά παρακάμπτουν το κύκλωμα ελεγχόμενου πολλαπλασιασμού προκειμένου να πολλαπλασιαστούν.

1.2.3 Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αυξάνονται δεν καθορίζεται μόνο από το βαθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και από τον βαθμό καταστροφής των κυττάρων. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση, είναι ο μηχανισμός της καταστροφής αυτής. Η επίκτητη αντίσταση στην απόπτωση αποτελεί ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό όλων των καρκινικών τύπων.

Η διαδικασία της απόπτωσης ενυπάρχει σε λανθάνουσα μορφή σε όλα είδη των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Όταν ενεργοποιηθεί, ως αποτέλεσμα πλήθους φυσιολογικών σημάτων, η αποπτωτική διαδικασία ξεκινάει και ακολουθείται πιστά μέχρι την εξαφάνιση του κατεστραμμένου κυττάρου.

Τα καρκινικά κύτταρα παρακάμπτουν τη συγκεκριμένη διαδικασία συνήθως μέσω μιας λειτουργικής διαφοροποίησης της πρωτεΐνης p53 με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του μηχανισμού που εντοπίζει βλάβες γενετικού υλικού [7].

1.2.4. Απεριόριστη Δυνατότητα αντιγραφής

Η ικανότητα αντιγραφής των κυττάρων είναι πεπερασμένη. Τα άκρα των χρωμοσωμάτων αποτελούνται από χιλιάδες επαναλήψεις μιας εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας η οποία ονομάζεται τελομερές. Σκοπός του τελομερούς είναι η προστασία των χρωμοσωμικών άκρων. Σε κάθε κυτταρικό κύκλο αρκετά τελομερή δεν αντιγράφονται στο θυγατρικό DNA με αποτέλεσμα όταν ένας κυτταρικός πληθυσμός ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο αριθμό διπλασιασμών, τα χρωμοσώματα χωρίς τελομερή πλέον στα άκρα τους, συντήκονται προκαλώντας αναπόφευκτα τον κυτταρικό θάνατο.

Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται εμφανίζονται να εξαντλούν την ικανότητά τους να διπλασιάζονται, αλλά στη συνέχεια υπερπηδούν το φράγμα της θνησιμότητας αποκτώντας απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής που οδηγεί στην ανάπτυξη και το σχηματισμό θανάσιμων καρκινικών όγκων.

1.2.5 Διατήρηση της αγγειογένεσης

Η τροφοδοσία των κυττάρων με οξυγόνο και απαραίτητα στοιχεία που μεταφέρονται μέσω του αίματος είναι κρίσιμη για την ομαλή λειτουργία και επιβίωση του κυττάρου, υποχρεώνοντας ουσιαστικά κάθε κύτταρο να είναι συνδεδεμένο με έναν ιστό μέσω ενός τριχοειδούς αγγείου αίματος. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία σχηματισμού ενός ιστού, η ανάπτυξη νέων αγγείων (αγγειογένεση) απενεργοποιείται.

Στα υγιή κύτταρα ο μηχανισμός της αγγειογένεσης ρυθμίζεται αυστηρά από το κύτταρο και λειτουργεί μόνο για σύντομες περιόδους και μετά αναστέλλεται πλήρως. Αντίθετα στα καρκινικά κύτταρα η διαδικασία της αγγειογένεσης επάγεται και χρησιμοποιείται ως μηχανισμός ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού.

1.2.6. Προσβολή του ιστού και μετάσταση

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός όγκου, οι καρκινικές μάζες παράγουν μεταναστευτικά κύτταρα, τα οποία αφού εξέλθουν από τον κύριο όγκο, προσβάλλουν γειτονικούς ιστούς και από εκεί μεταφέρονται σε άλλα σημεία του οργανισμού όπου δημιουργούν νέες αποικίες. Οι αποικίες αυτές, γνωστές ως μεταστάσεις, είναι η κύρια αιτία θανάτου για το μεγαλύτερο ποσοστό των καρκίνων. Η ικανότητα της μετάστασης καθιστά ικανά τα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από τον αρχικό όγκο και να αποικήσουν σε καινούργια σημεία του σώματος στα οποία υπάρχει πληθώρα χώρου και θρεπτικών συστατικών. Οι νέοι όγκοι του δημιουργούνται, αποτελούν μια μίξη καρκινικών και υγιών κυττάρων.

Οι παραπάνω έξι διαφοροποιήσεις είναι οι απαραίτητες συνθήκες για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η ιεραρχία ωστόσο με την οποία εμφανίζονται στη διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό ποικίλει μεταξύ των διαφόρων τύπων νεοπλασιών.

1.3 Κατηγορίες νεοπλασιών

Όπως προαναφέρθηκε, περισσότερα από 100 είδη καρκίνων έχουν χαρακτηριστεί στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ αναφορικά με όγκους συγκεκριμένων οργάνων,

παρατηρούνται και υποείδη [8]. Συνοπτικά, οι νεοπλασίες κατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

I. Τα καρκινώματα, τα οποία προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα και σε αυτά περιλαμβάνεται σχεδόν το 90% των ανθρώπινων καρκίνων.

II. Τα σαρκώματα, τα οποία προέρχονται από κύτταρα του συνδετικού ιστού και είναι πιο σπάνια.

III. Τις λευχαιμίες και τα λεμφώματα, τα οποία προέρχονται από το μεσόδερμα συμπεριλαμβανομένων των μυών, οστών, ερυθρών αιμοσφαιρίων, ινοβλαστών και κυττάρων της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου και καλύπτουν το 8% των ανθρώπινων καρκίνων.

Κεφάλαιο 2 – Χημειοθεραπευτική Αντιμετώπιση του Καρκίνου

2.1 Εισαγωγή

Η αντικαρκινική θεραπεία στοχεύει κατ'αρχήν στην πλήρη εξάλειψη όλων των καρκινικών κυττάρων. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, σκοπός είναι η μείωση κατά το δυνατό του αριθμού των καρκινικών κυττάρων, η βελτίωση των συμπτωμάτων και η επέκταση του χρόνου επιβίωσης εξασφαλίζοντας ικανοποιητική ποιότητα ζωής [9]. Επιπλέον, στοχεύει την εκλεκτική καταστροφή των κακοήθων κυττάρων με την ελάχιστη δυνατή βλάβη στον οργανισμό, διαδικασία η οποία παρουσιάζει δυσκολίες κυρίως λόγω του ότι τα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα έχουν πανομοιότητες σχεδόν απαιτήσεις για την επιβίωσή τους.

Η πλειονότητα των κυτταροτοξικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη δρουν σε στάδια του κυτταρικού μεταβολισμού τα οποία σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, όπως είναι η σύνθεση του DNA, εκμεταλλεύοντας την αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [10]. Δεν εντοπίζονται ωστόσο, όλα τα κύτταρα ενός όγκου στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Η συσχέτιση της δράσης των φαρμάκων με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου αποτελεί κρίσιμο στοιχείο που καθορίζει την αποτελεσματικότητά τους και την επιλογή του καλύτερου συνδυασμού αυτών.

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες ενδέχεται να δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ή να δρουν εντελώς ανεξάρτητα του κυτταρικού κύκλου (αλκυλιωτικοί παράγοντες). Για το λόγο αυτό, οι σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν πολυφαρμακευτική αγωγή με συνδυασμό χημειοθεραπευτικών και από τις δυο παραπάνω κατηγορίες, προκειμένου να υπάρξει αποτελεσματικότητα στο εύρος των ανθεκτικών κυτταρικών σειρών σε έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, μετριάζοντας παράλληλα το ενδεχόμενο ανάπτυξης νέων ανθεκτικών κυττάρων [9,11].

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, που έχουν κλινική εφαρμογή σήμερα και δρουν σε κάποια από τα στάδια σύνθεσης του DNA ή της διαδικασίας μίτωσης του

κυττάρου, διακρίνονται σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους στις παρακάτω κατηγορίες [9,12]:

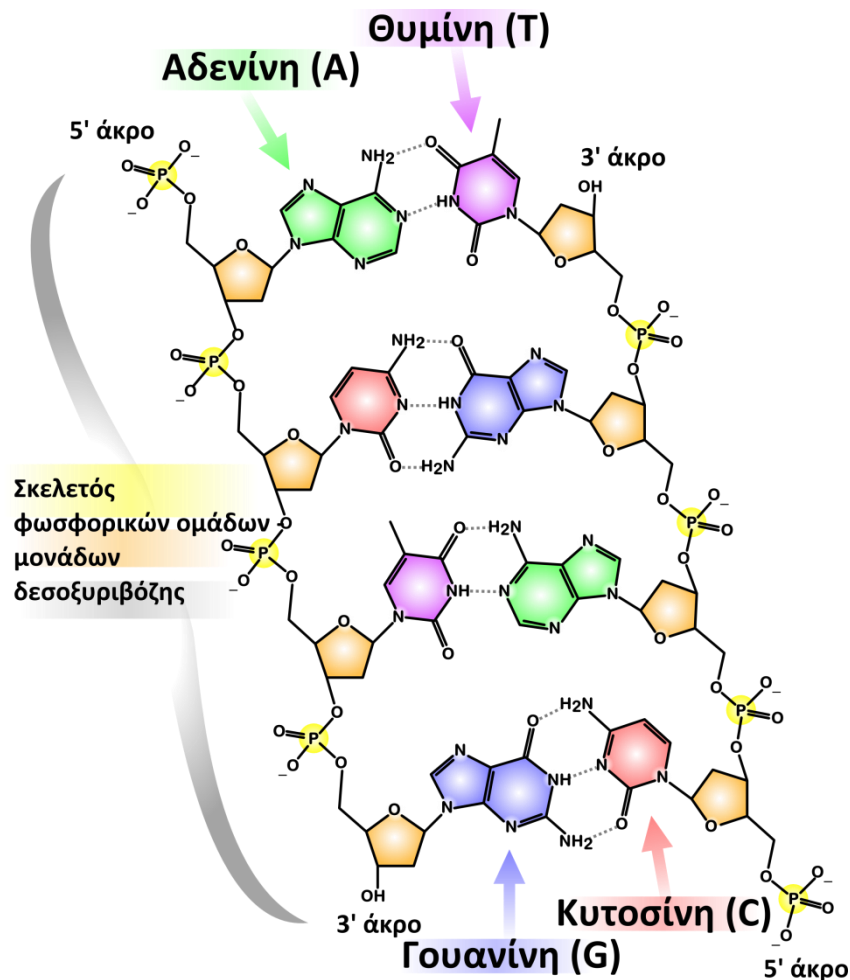
- Αλκυλιωτικοί παράγοντες
 - οι οποίοι αλκυλιώνουν το DNA εμποδίζοντας την αντιγραφή και μεταγραφή του (μουστάρδες αζώτου, κυκλοφωσφαμίδιο, μελφαλάνη, χλωραμβουκίλη, θειοτέπα, νιτροζουρίες)
 - Σύμπλοκα λευκόχρυσου που παρουσιάζουν ίδια δράση με τους αλκυλιωτικούς παράγοντες (σισπλατίνη)
- Αντιμεταβολίτες και νουκλεοζιτικά παράγωγα
 - Ανάλογα φυλλικού οξέος που αναστέλλουν τη σύνθεση νουκλεοτιδίων (μεθοτρεξάτη)
 - Ανάλογα πυριμιδινών με την ίδια δράση (5-φθοροουρακίλη, κυταραβίνη)
 - Ανάλογα πουρινών τα οποία ενσωματώνονται στον σκελετό του DNA και RNA (6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη)
- Αντιμιτωτικά φάρμακα
 - Παράγοντες που προσδένονται στην τουμπουλίνη, διαμελίζοντας τη μιτωτική άτρακτο ή σταθεροποιώντας τους σωληνίσκους (αλκαλοειδή της Vinca, επιποδοφυλοτοξίνες)
- Αντικαρκινικά αντιβιοτικά
 - προσδένονται και αποδιοργανώνουν το DNA ή/και αναστέλλουν την αντιγραφή του και τη σύνθεση του RNA (μπλεομυκίνη, μιτομυκίνη, ανθρακυκλίνες)
- Άλλα χημειοθεραπευτικά αντινεοπλασματικά φάρμακα
 - υδροξυουρία, ασπαραγινάση, αμσακρίνη, μονοκλωνικά αντισώματα, τριοξείδια αρσενικού

2.2 Βασικές αρχές της δομής και αντιγραφής του DNA

Το DNA αποτελεί την πλουσιότερη πηγή βιολογικών πληροφοριών ενός ζωντανού οργανισμού. Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες καταγεγραμμένες σε 23 χρωμοσώματα, και το DNA δομεί κάθε φορά τη βάση του χρωμοσώματος των ζωντανών οργανισμών. Το γεγονός ότι ένα κύτταρο είναι η απαρχή για το σχηματισμό ενός πληθυσμού κυττάρων μέσω της κυτταρικής διαίρεσης είναι γνωστό. Για να προχωρήσει η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης φυσικά, είναι απαραίτητο προηγουμένως να έχει προηγηθεί ο διπλασιασμός καθενός από τα μόρια που δομούν το κύτταρο, μεταξύ και των οποίων και του DNA. Αντιγραφή είναι η ονομασία που δίνεται στη διαδικασία διπλασιασμού του γενετικού υλικού [13].

Το μοντέλο της διπλής ελικοειδούς δομής του DNA, που προτάθηκε από τους Watson και Crick [14], αποτελείται από δύο πολυμερείς, συμπληρωματικές στην αλληλουχία τους, αλυσίδες DNA (Εικόνα 2.1). Οι υπομονάδες που αποτελούν τις αλυσίδες ονομάζονται νουκλεοτίδια. Σε κάθε αλυσίδα, φωσφορικές ομάδες εναλλάσσονται με μονάδες δεσοξυριβόζης μέσω ομοιοπολικών δεσμών, σχηματίζοντας τον «σκελετό» της έλικας. Στο κέντρο της διπλής έλικας βρίσκονται οι αζωτούχες βάσεις, ενώ περιφερειακά βρίσκονται οι αλυσίδες από μόρια σακχάρου και φωσφορικού οξέος έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων. Οι αλυσίδες παρουσιάζουν πολικότητα ή κατεύθυνση. Συγκεκριμένα, στη διπλή έλικα τοποθετούνται παράλληλα αλλά σε αντίθετες κατευθύνσεις, ελισσόμενες δεξιόστροφα. Στο δακτύλιο του σακχάρου καθενός νουκλεοτιδίου εντοπίζεται μία από τις ακόλουθες τέσσερις αζωτούχες βάσεις: αδενίνη (A), γουανίνη (G), θυμίνη (T) και κυτοσίνη (C). Οι πρώτες δυο αποτελούν την κατηγορία των πουρινών, ενώ οι τελευταίες αυτή των πυριμιδινών. Κάθε βάση συνδέεται με δυο ή τρεις δεσμούς υδρογόνου με άλλη βάση που βρίσκεται στην απέναντι συμπληρωματική αλυσίδα. Το ζευγάρι των βάσεων πραγματοποιείται αποκλειστικά μεταξύ αδενίνης-θυμίνης και γουανίνης-κυτοσίνης με δύο και τρεις δεσμούς υδρογόνου αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό καθορίζει και την έννοια της συμπληρωματικότητας των δυο αλυσίδων, που σημαίνει ότι οποιοδήποτε τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μπορεί να δράσει ως εκμαγείο

για τη σύνθεση της συμπληρωματικής ώστε να προχωρήσει ο διπλασιασμός του DNA και η αναπαραγωγή του κυττάρου. Η πληροφορία για τη σύνθεση όλων των πρωτεϊνικών μορίων ενός οργανισμού παρέχεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων κατά μήκος της αλυσίδας του DNA.

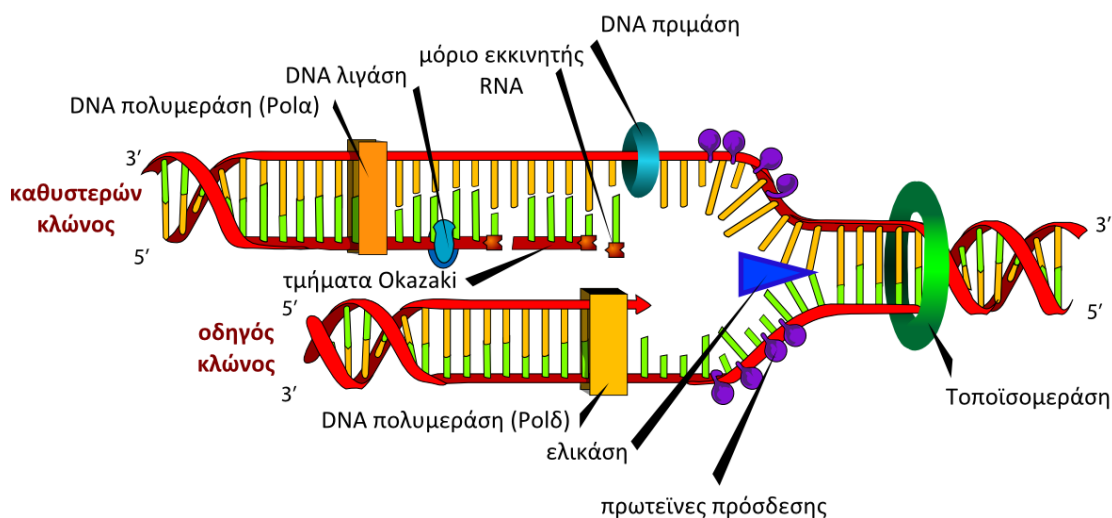


Εικόνα 2.1 : Δομική αναπαράσταση του DNA.

Στη συμπληρωματικότητα βασίζεται η αντιγραφή του DNA, κατά την οποία κάθε μια από τις δύο αλυσίδες ενός μορίου λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση της συμπληρωματικής του, καταλήγοντας έτσι σε δυο νέα, πανομοιότυπα με το αρχικό μόρια DNA. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα ένα στη θυγατρική αλυσίδα, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο του νεοσυντιθεμένου μορίου. Κατά συνέπεια η αντιγραφή πραγματοποιείται στην κατεύθυνση 5' προς 3' της νουκλεοτιδικής αλυσίδας.

Στο εσωτερικό του κυττάρου, η αντιγραφή πραγματοποιείται στα πλαίσια μιας δομής σχήματος Y, η οποία αποκαλείται «διχάλα αντιγραφής». Η χαρακτηριστική

αυτή δομή μετακινείται σταθερά κατά μήκος της μητρικής έλικας, επιμηκύνοντας δυο θυγατρικές έλικες DNA (οι δυο θυγατρικοί κλώνοι της διχάλας). Ενεργό ρόλο στη διχάλα αντιγραφής παίζουν οι DNA πολυμεράσες για τις δυο μητρικές αλυσίδες. Η μια από τις δυο μετακινείται σταθερά προσθέτοντας νουκλεοτίδια προς την κατεύθυνση της αντιγραφής, ενώ η δεύτερη μετακινείται αντίθετα προς την κατεύθυνση επιμήκυνσης της θυγατρικής αλυσίδας που συνθέτει, παράγοντας τα λεγόμενα τμήματα Okazaki. Μια DNA λιγάση εξυπηρετεί τη σύνδεση αυτών για τη δημιουργία συνεχούς θυγατρικής αλυσίδας. Στη διχάλα αντιγραφής εντοπίζονται και επιπλέον ένζυμα, όπως οι πρωτεΐνες εκκινητές, η DNA ελικάση που ανοίγει την έλικα του μητρικού μορίου, η DNA τοποϊσομεράση που ξετυλίγει το μητρικό DNA και DNA πριμάσες για τη σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών που υποβοηθούν τη δράση των πολυμερασών [13]. Δομική αναπαράσταση της διχάλας αντιγραφής και των ενζύμων που εμπλέκονται παριστάνεται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2: Διχάλα αντιγραφής DNA.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη το γεγονός ότι η αντιγραφή είναι από τις κατεξοχή αναγκαίες διαδικασίες για την κυτταρική διαίρεση και ότι η διαίρεση αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, γίνεται αντιληπτό ότι το γενετικό υλικό και οι διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται αποτελούν στόχους θεραπευτικών παραγόντων. Οι αντικαρκινικοί παράγοντες που στοχεύουν το DNA κατατάσσονται μεταξύ των πιο αποτελεσματικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική σήμερα, ενώ παράλληλα οδηγούν σε σημαντική αύξηση της επιβίωσης

των ασθενών στην περίπτωση που χορηγούνται σε συνδυασμό με φάρμακα που έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης [15].

2.3 Αλκυλιωτικοί παράγοντες

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου τις τελευταίες πέντε δεκαετίες. Είναι η παλαιότερη κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό συνδυασμένης χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση ευρείας ποικιλίας λεμφικών και συμπαγών καρκίνων [16].

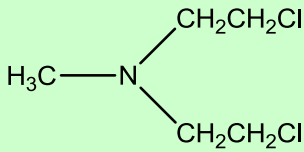
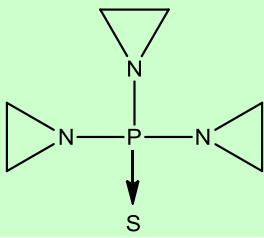
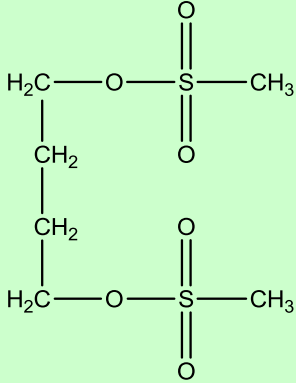
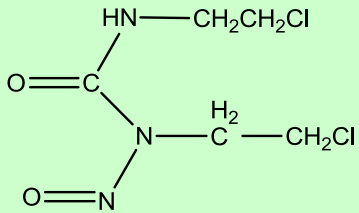
Η φαρμακολογική δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων διαταρράσει θεμελιώδεις μηχανισμούς που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συγκεκριμένα τη σύνθεση του DNA και την κυτταρική διαίρεση. Οι ενώσεις αυτές αλκυλιώνουν και κύτταρα που δεν έχουν ικανότητα διαίρεσης, όμως παρουσιάζουν εξαιρετική κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα που πρόκειται να διαιρεθούν. Σε αντίθεση με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες, δρουν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Παρ' όλα αυτά, η τοξικότητά τους εκδηλώνεται συνήθως όταν το κύτταρο είναι στην S φάση παρά στην G₂ ή τη μίτωση. Τα πολυνουκλεοτίδια είναι πιο επιρρεπή σε αλκυλίωση στη μη ζευγαρωμένη κατάσταση παρά στην ελικοειδή μορφή, όπως συμβαίνει κατά την αντιγραφή του DNA [17].

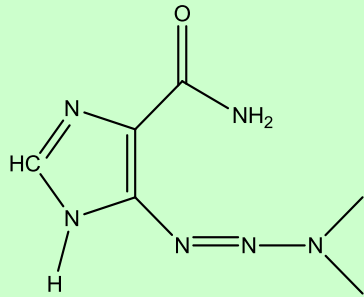
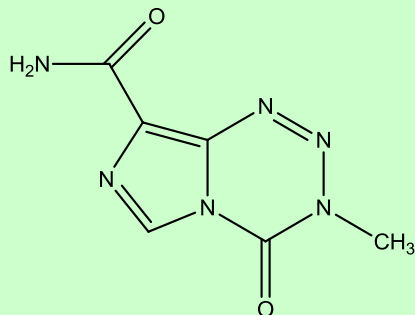
Πολλοί εκπρόσωποι αλκυλιωτικών παραγόντων έχουν κλινική εφαρμογή στη χημειοθεραπεία νεοπλασματικών νοσημάτων σήμερα. Ταξινομούνται σε έξι κύριες υποομάδες βάσει της δομής και της δράσης τους:

- Μουστάρδες αζώτου
- Αιθυλενιμίνες
- Σουλφονικοί αλκυλεστέρες
- Νιτροζουρίες
- Τριαζένια
- Φάρμακα που μεθυλιώνουν το DNA, όπως η τεμολοζομίδη

Στον πίνακα 1 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι 6 κατηγορίες των αλκυλιωτικών παραγόντων, οι χαρακτηριστικοί τους εκπρόσωποι καθώς και οι νεοπλασματικές ασθένειες στις οποίες χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 2.1: Κατηγορίες αλκυλιωτικών παραγόντων

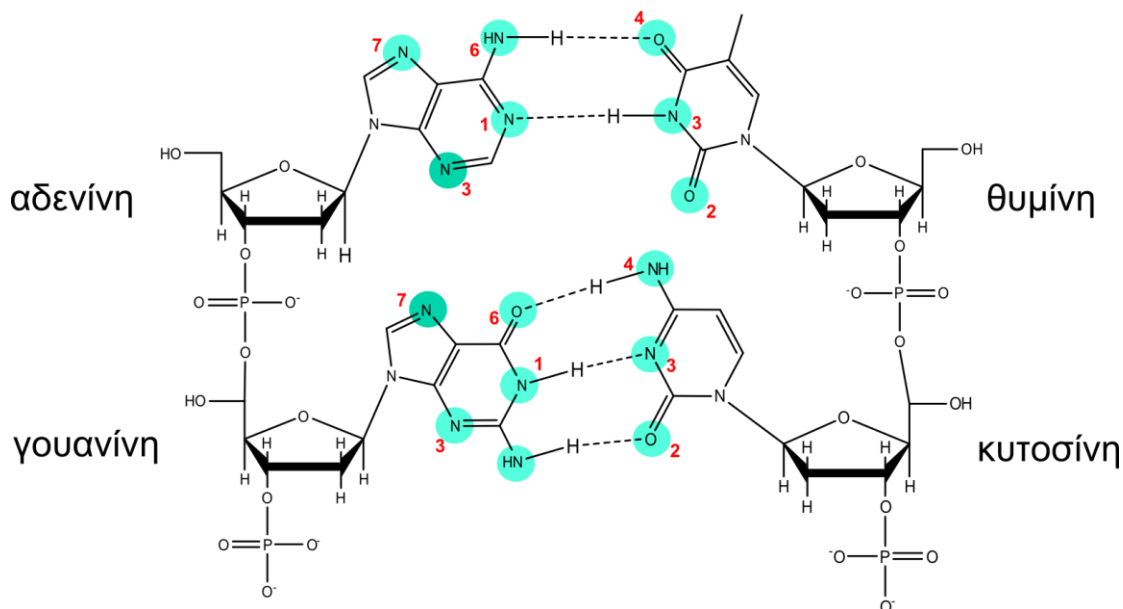
| Κατηγορίες αλκυλιωτικών παραγόντων | Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι | Μηχανισμός Δράσης | Νεοπλασματικές ασθένειες |
|------------------------------------|---|--|--|
| Μουστάρδες Αζώτου | Μεχλωραιθαμίνη  | Δημιουργία δεσμών με το DNA Αναστολή σύνθεσης και λειτουργίας DNA | Λεμφώματα Hodgkin και non-Hodgkin, οξεία και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία |
| Αιθυλενιμίνες | Θειοτέπα  | Ίδιος με παραπάνω | Καρκίνος ωθηκών, μαστού |
| Σουλφονικοί αλκυλεστέρες | Μπουσουλφάνη  | Ίδιος με παραπάνω | Χρόνια κοκκιοκυτταρική λευχαιμία |
| Νιτροζουρίες | Καρμουσίνη  | Ίδιος με παραπάνω | Λεμφώματα Hodgkin και non-Hodgkin, πρωτοπαθείς όγκοι του εγκεφάλου |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

| | | | |
|----------------|---|--|--------------------------------------|
| Τριαζένια | Δακαρβαζίνη  | Μεθυλίωση DNA Αναστολή σύνθεσης και λειτουργίας DNA | Κακοήθες μελάνωμα, λεμφώματα Hodgkin |
| Μεθυλιωτές DNA | Τεμολοζομίδη  | Ίδιος με παραπάνω | Μελανώματα, καρκίνος εγκεφάλου |

2.3.1 Μηχανισμός δράσης

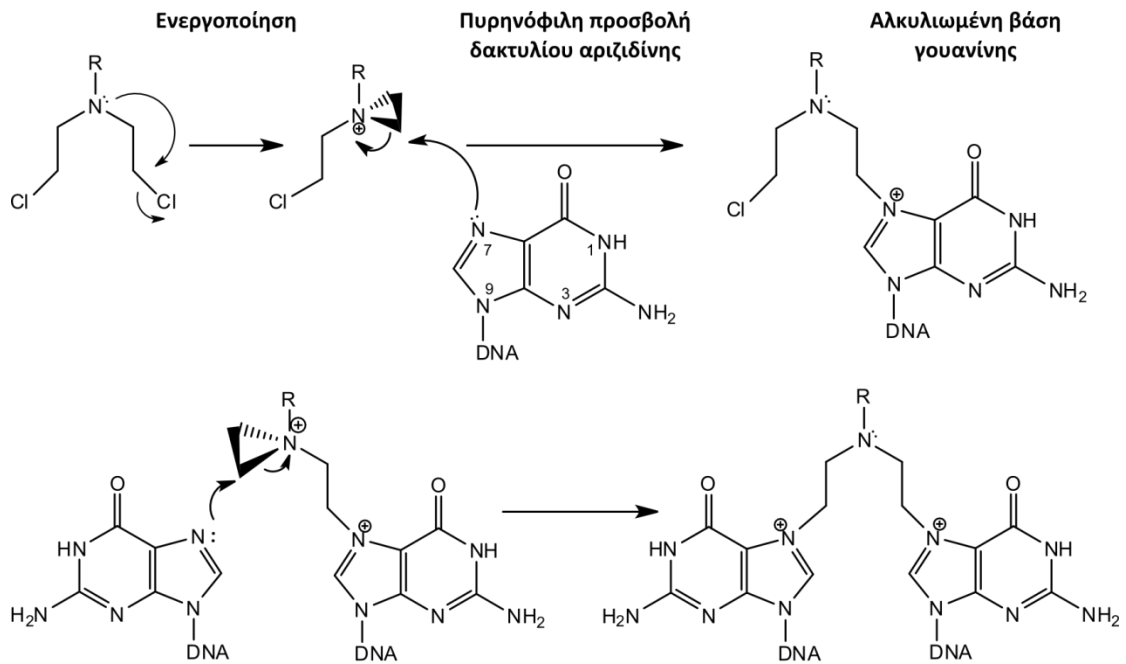
Κοινό χαρακτηριστικό των αλκυλιωτικών παραγόντων αποτελεί η ικανότητά τους να συνεισφέρουν αλκυλομάδες σε βιολογικά ζωτικά μακρομόρια, οπότε δρουν ως ισχυρά ηλεκτρονιόφιλα μέσω σχηματισμού ιόντων αιθυλενιμινών ή καρβοκατιόντων [18]. Τα ιόντα που σχηματίζονται συνδέονται ομοιοπολικά με μακρομόρια σε πυρηνόφιλες περιοχές. Τέτοιες περιοχές εντοπίζονται συνήθως σε μακρομόρια και περιλαμβάνουν φωσφορικές ομάδες, αμινομάδες, σουλφυδρυλομάδες, υδροξυλομάδες, καρβοξυλομάδες και ιμιδαζολικές ομάδες, όπως αυτές που βρίσκονται σε αμινοξέα όπως κυστεΐνη, λυσίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, στις αζωτούχες βάσεις του DNA και του RNA. Η φύση και η κατανομή των επιδράσεων των αλκυλιωτικών παραγόντων εξαρτώνται από ένα πλήθος παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της φύσης περιοχής του DNA με την οποία αλληλεπιδρούν, τη στερεοχημεία του αλκυλιωτικού υποκαταστάτη και το χημικό χαρακτήρα του αλκυλιωτικού παράγοντα. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δώδεκα διαφορετικές θέσεις αλκυλίωσης, με την κυριότερη να εντοπίζεται κυρίως στο άζωτο στη θέση N7 της γουανίνης (παρατηρείται το 90% περίπου των περιπτώσεων μονοαλκυλίωσης), λόγω του ότι εμφανίζεται να οδηγεί σε κυτταρικό

θάνατο. Συνεκτιμάται ωστόσο, ότι και άλλα πυρηνόφιλα άτομα στις πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις μπορούν να υποστούν αλκυλίωση, όπως τα άζωτα N1 και N3 της αδενίνης, το άζωτο N3 της κυτοσίνης και το οξυγόνο O6 της γουανίνης. Οι πιθανές θέσεις αλκυλίωσης στις αζωτούχες βάσεις παρουσιάζονται στην εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3: Πιθανές θέσεις αλκυλίωσης στις αζωτούχες βάσεις

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, είτε στην αρχική τους μορφή, είτε μετά από μεταβολική ενζυμική ενεργοποίησή τους, αλκυλώνουν πυρηνόφιλες θέσεις στο κύτταρο βάσει ενός κοινού μηχανισμού ο οποίος, εν συντομία, περιγράφεται παρακάτω. Το χλώριο, ως καλή αποχωρούσα ομάδα, διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή του αζώτου μέσω αντίδρασης τύπου S_N1 , με τελικό σχηματισμό ενός ιόντος αιθυλενιμίνης. Ακολούθως, το ιόν δύναται να αντιδράσει μέσω μηχανισμού καρβοκατιόντος ή ενδιάμεσου συμπλόκου με ευρεία ποικιλία θέσεων που παρουσιάζουν υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα, δίνοντας το τελικό προϊόν αλκυλίωσης. Στην περίπτωση των διλειτουργικών παραγόντων η παραπάνω διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί και για τη δεύτερη χλωροαιθυλομάδα αλκυλώνοντας έτσι και μια δεύτερη πυρηνόφιλη θέση (Εικόνα 2.4).



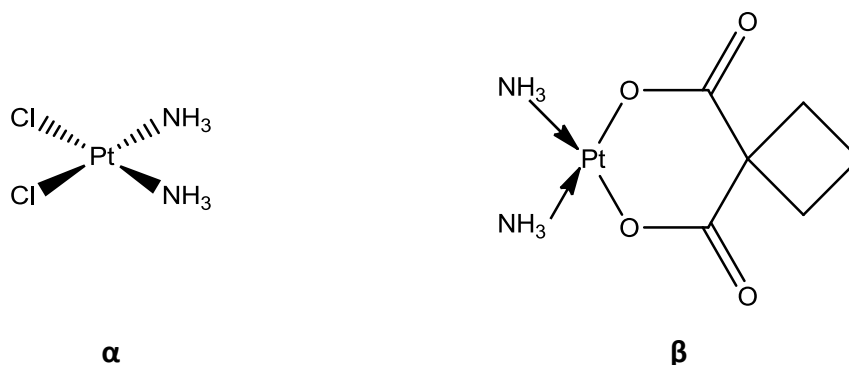
Αλκυλίωση δεύτερης βάσης γουανίνης οδηγεί στη δημιουργία δεσμών τύπου χιαστί (cross-linking)

Εικόνα 2.4: Μηχανισμός δράσης αλκυλιωτικών παραγόντων

Η βλάβη στις βάσεις μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω χημικές τροποποιήσεις, όπως την απώλεια μια βάσης και τον σχηματισμό δεσμών μεταξύ των βάσεων της ίδιας αλυσίδας (intrastrand crosslinking) ή των γειτονικών αλυσίδων του DNA (interstrand). Η αλκυλίωση της γουανίνης οδηγεί σε λάθος ενσωμάτωση θυμίνης ή κατακερματισμό της αλυσίδας του DNA [19-21].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο σχηματισμός χιαστού τύπου δεσμών μεταξύ των αλυσίδων του DNA αντιπροσωπεύει την πλέον βλαβερή συνέπεια της αλκυλίωσης, αφού οδηγεί στην καταστροφή της διχάλας διπλασιασμού του DNA. Οι πιο αποτελεσματικοί αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι οι διλειτουργικοί. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι η θειοτέπα, η μελφαλάνη, η χλωραμβουκίλη καθώς επίσης και τα σύμπλοκα λευκόχρυσου όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη (Εικόνα 2.5) τα οποία κατατάσσονται μαζί με τους αλκυλιωτικούς παράγοντες λόγω του παρόμοιου μηχανισμού δράσης που παρουσιάζουν. Οι χιαστί τύπου δεσμοί είναι πολύ πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν από τα μονοαλκυλιωμένα παράγωγα, γι'αυτό και οι διλειτουργικοί παράγοντες εμφανίζουν κυρίως κυτταροτοξική δράση σε αντίθεση με τους μονολειτουργικούς, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση. Οι χιαστί τύπου δεσμοί παρατηρούνται κυρίως σε νουκλετιδικές αλληλουχίες με αφθονία ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης, επομένως οι

διλειτουργικοί παράγοντες παρουσιάζουν εκλεκτικότητα όσο αφορά την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γενετικού υλικού και τις θέσεις που αλκυλιώνουν έναντι των μονολειτουργικών.



Εικόνα 2.5: α. Σισπλατίνη, β. καρβοπλατίνη

Οι σημαντικότερες φαρμακολογικές δράσεις των αλκυλιωτικών παραγόντων αφορούν στη διατάραξη βασικών μηχανισμών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και ειδικότερα τη σύνθεση του DNA και την κυτταρική διαίρεση. Η ικανότητα να επεμβαίνουν στη δομή και τις λειτουργίες του DNA σε ιστούς που έχουν μεγάλους ρυθμούς πολλαπλασιασμού αποτελεί τη βάση των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους καθώς και πολλές από τις τοξικές παρενέργειές τους [18-21].

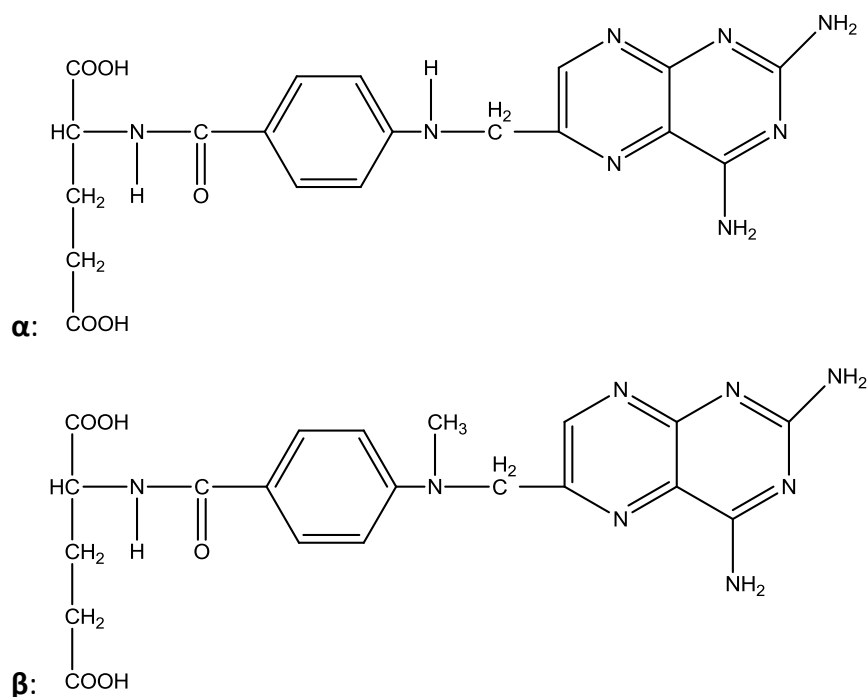
2.4 Αντιμεταβολίτες και νουκλεοζιτικά παράγωγα

Οι αντιμεταβολίτες είναι δομικά ανάλογα των δομικών στοιχείων του DNA και του RNA. Παρεμβαίνουν στην αναπαραγωγή του DNA και του RNA, αντικαθιστώντας τις αζωτούχες βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες προκαλούν βλάβη στα κύτταρα κατά τη διάρκεια σύνθεσης του DNA, στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται κυρίως για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, των ωθηκών, του εντερικού καρκίνου του πεπτικού σωλήνα, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις λευχαιμιών [12,19,22].

2.4.1 Ανάλογα φυλλικού οξέος – Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη είναι ανάλογο του φυλλικού οξέος που παρουσιάζει υψηλή χημική συγγένεια με το ενεργό καταλυτικό κέντρο του ενζύμου της διϋδροφυλλικής αναγωγής (dihydrofolate reductase, DHFR), παρεμβαίνοντας στη σύνθεση του τετραϋδροφυλλικού οξέος (tetrahydrofolate, THF), το οποίο παίζει πολύ σημαντικό

ρόλο στη σύνθεση του άλατος του θυμιδικού οξέος, των νουκλεοτιδίων πουρίνης, και των αμινοξέων σερίνη και μεθειονίνη. Για το λόγο αυτό, η χρήση μεθοτρεξάτης οδηγεί στην αναστολή των προαναφερθέντων μεταβολικών διαδικασιών παρεμβαίνοντας στον σχηματισμό του DNA, του RNA, και αρκετών σημαντικών κυτταρικών πρωτεϊνών. Η κυτταροτοξική-θεραπευτική δράση της μεθοτρεξάτης εξαρτάται άμεσα από το σχηματισμό των πολυγλουταμικών μεταβολιτών οι οποίοι σχηματίζονται ενδοκυτταρικά, συγκρατούνται εκλεκτικά εντός των καρκινικών κυττάρων και βοηθούν σημαντικά στην αναστολή των ενζύμων που εμπλέκονται με τις προαναφερθείσες μεταβολικές διαδικασίες. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται οι χημικές δομές του φυλλικού οξέος και της μεθοτρεξάτης (Εικόνα 2.6).

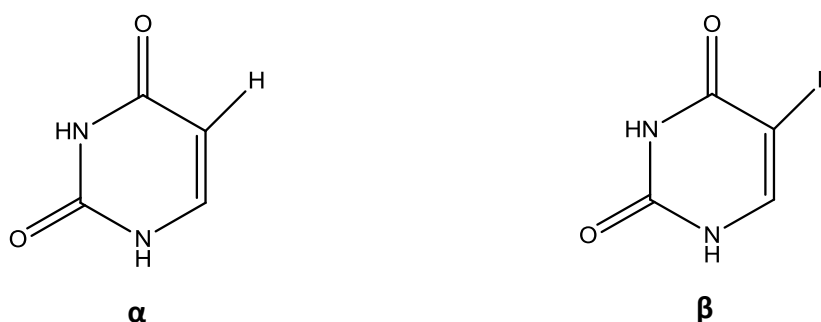


Εικόνα 2.6: Χημικές δομές α. Φυλλικού οξέος, β. Μεθοτρεξάτης

2.4.2 Ανάλογα πυριμιδινών – 5-φθοροουρακίλη

Η 5-φθοροουρακίλη (5-fluorouracil, 5-FU) είναι ανενεργή στην αρχική της μορφή και για να δράσει απαιτείται ενεργοποίηση της μέσω μιας σειράς περίπλοκων ενζυματικών αντιδράσεων, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία ριβόσυλο- και δεσοξυριβόσυλο- νουκλεοτιδικών μεταβολιτών. Ο κύριος εκπρόσωπος αυτών των μεταβολιτών, το 5-φθορο-2'-δεσοξουριδινο-5'-μονοφωσφορικό άλας (5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, FdUMP), σχηματίζει σύμπλοκο με τη συνθάση του

άλατος του θυμιδικού οξέος εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση του άλατος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Επίσης, η 5-φθοροουρακίλη μετατρέπεται σε κάποιες άλλες ουσίες όπως τα 5-φθοροουριδινό-τριφωσφορικά άλατα τα οποία παρεμβάλλονται στις λειτουργίες του RNA - και ιδιαίτερα στην μετάφραση του mRNA - ή αναστέλλουν τη σύνθεση και λειτουργία του DNA. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται οι χημικές δομές της ουρακίλης και της 7-φθοροουρακίλης (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7: Χημικές δομές α. Ουρακίλης, β. 5-φθοροουρακίλης

2.4.3 Ανάλογα πουρινών – 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη

6-θειογουανίνη

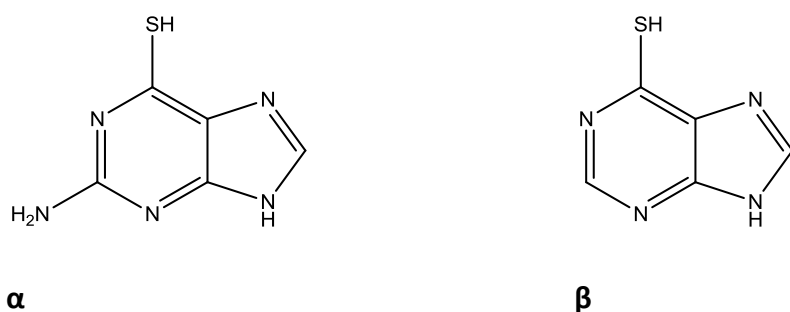
Η 6-θειογουανίνη (6-TG) συμμετέχει στην αναστολή αρκετών ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσυνθετική πορεία de novo σύνθεσης νουκλεοτιδίων πουρίνης. Η δράση της 6-θειογουανίνης έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση αρκετών μεταβολικών κακώσεων όπως η αναστολή δυνατότητας αλληλομετατροπής νουκλεοτιδίων πουρίνης, η μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων νουκλεοτιδίων γουανίνης – η οποία οδηγεί στην αναστολή σύνθεσης γλυκοπρωτεϊνών –, η παρεμβολή στο σχηματισμό του DNA και του RNA, και η εισωμάτωση των νουκλεοτιδίων θειοπουρίνης στο DNA και στο RNA. Η 6-θειογουανίνη παρουσιάζει συνεργιστική δράση όταν χρησιμοποιείται μαζί με την ουσία κυταραβίνη στην αντιμετώπιση περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας σε ενήλικες.

6-μερκαπτοπουρίνη

Η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) ήταν το πρώτο ανάλογο θειοπουρίνης το οποίο παρουσίασε αντικαρκινική δράση. Χρησιμοποιείται ως κύριος αντινεοπλασματικός παράγοντας στις περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας σε ανηλίκους. Η 6-

μερκαπτοπουρίνη είναι ανενεργή στην αρχική της μορφή, και για να γίνει δραστική μεταβολίζεται με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφοριβοζυλομεταφοράση της υποξανθίνης-γουανίνης (HGPRT) και σχηματίζει το μονοφωσφορικό νουκλεοτιδικό 6-θειοϊνσοϊνικό οξύ, το οποίο συμμετέχει στην αναστολή αρκετών ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσυνθετική πορεία de novo σύνθεσης νουκλεοτιδίων πουρίνης. Η μονοφωσφορική μορφή μετατρέπεται τελικά στην τριφωσφορική μορφή, η οποία ενσωματώνεται στο DNA και το RNA.

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται οι χημικές δομές της 6-θειογουανίνης και της 6-μερκαπτοπουρίνης (Εικόνα 2.8).



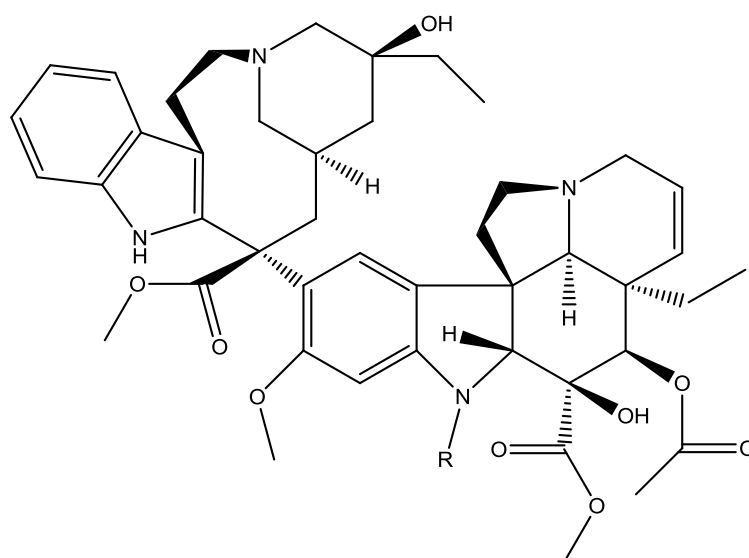
Εικόνα 2.8: Χημικές δομές α. 6-θειογουανίνης, β. 6-μερκαπτοπουρίνης

2.5 Αντιμιτωτικά φάρμακα

Τα αντιμιτωτικά φάρμακα αναστέλλουν τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων κατά το στάδιο της μίτωσης διαμελίζοντας τη μιτωτική άτρακτο και εμποδίζουν τον διαχωρισμό του DNA κατά τη διαίρεση των κυττάρων. Προέρχονται κυρίως από φυσικά προϊόντα όπως αλκαλοειδή έκδοχα από φυτά. Η αντινεοπλασματική τους δράση εμφανίζεται κυρίως κατά τη φάση M του κυτταρικού κύκλου, όμως ταυτόχρονα αυτά τα φάρμακα καταστρέφουν τα υγιή κύτταρα σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση πολλών και διαφορετικών τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, των πνευμόνων καθώς επίσης και σε περιπτώσεις λευχαιμιών και μυελωμάτων [12,19,22].

2.5.1 Αλκαλοειδή της Vinca

Οι δυο κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η βινμπλαστίνη και η βινκριστίνη (Εικόνα 2.9). Και τα δυο αυτά φάρμακα προέρχονται από το φυτό *Vinca Rosea*, έχουν παρόμοια δομή και ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει αναστολή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης, η οποία διαταράσσει τη συνδεσμολογία των μικροσωληνίσκων – κύριου συστατικού του κυτταρικού σκελετού και της μιτωτικής αδράκτου. Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Χορηγούνται κυρίως σε αιματολογικές παθήσεις όπως τα λεμφώματα Hodgkin's και non-Hodgkin's. Το κυριότερο μειονέκτημα της χορήγησης αυτών των φαρμάκων είναι ότι έχουν ισχυρή νευροτοξική δράση.



α. R= -CH₃

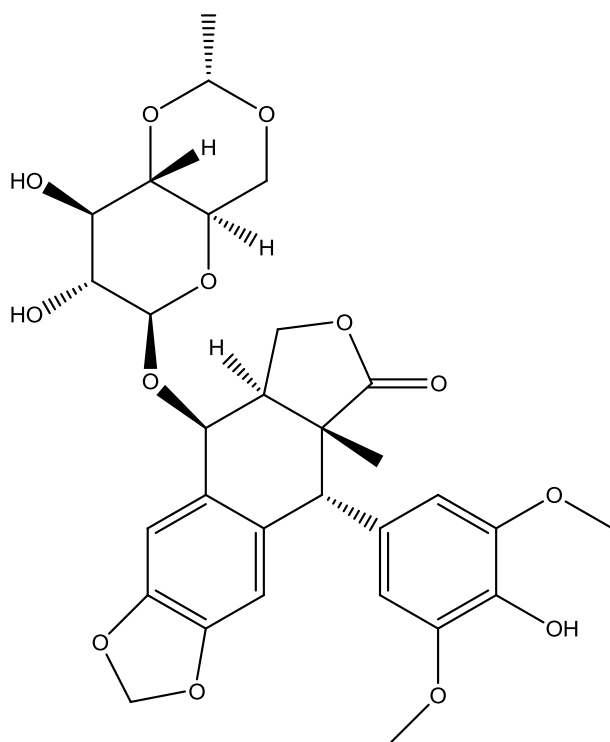
β. R= -CHO

Εικόνα 2.9 Χημικές δομές των αλκαλοειδών της Vinca: α. Βινμπλαστίνη, β. Βινκριστίνη

2.5.2 Επιποδοφυλλοτοξίνες

Οι επιποδοφυλλοτοξίνες είναι αλκαλοειδή φυσικά προϊόντα που προέρχονται από το φυτό *Rododaphllum peltatum*. Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής, η ετοποσίδη και η τενιποσίδη παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, αναστέλλοντας το ένζυμο της τοποισομεράσης II. Η αναστολή οφείλεται στη δημιουργία ενδιάμεσου τριαδικού συμπλόκου του φαρμάκου με το DNA και το ένζυμο, το οποίο εμποδίζει την επανασύνδεση των δυο κλώνων της έλικας του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση προβλημάτων στην σύνθεση του DNA που οδηγεί σε κυτταρικό

θάνατο (απόπτωση). Στην εικόνα 2.10 παρουσιάζεται η χημική δομή της ετοποσίδης.



Εικόνα 2.10: Χημική δομή του ετοποσίδη

2.6 Παράγοντες ενδοπαρεμβολής

Μια πολύ σημαντική τάξη αντικαρκινικών μορίων που αλληλεπιδρούν με το DNA, χωρίς όμως να σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με κάποια από τις βάσεις του, είναι οι παράγοντες ενδοπαρεμβολής. Περιλαμβάνουν επίπεδα αρωματικά συστήματα τα οποία διεισδύουν μεταξύ των βάσεων του DNA, των τριτοταγών δομών του RNA ή και των δυο σχηματίζοντας αντιστρεπτά σύμπλοκα, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική διαίρεση.

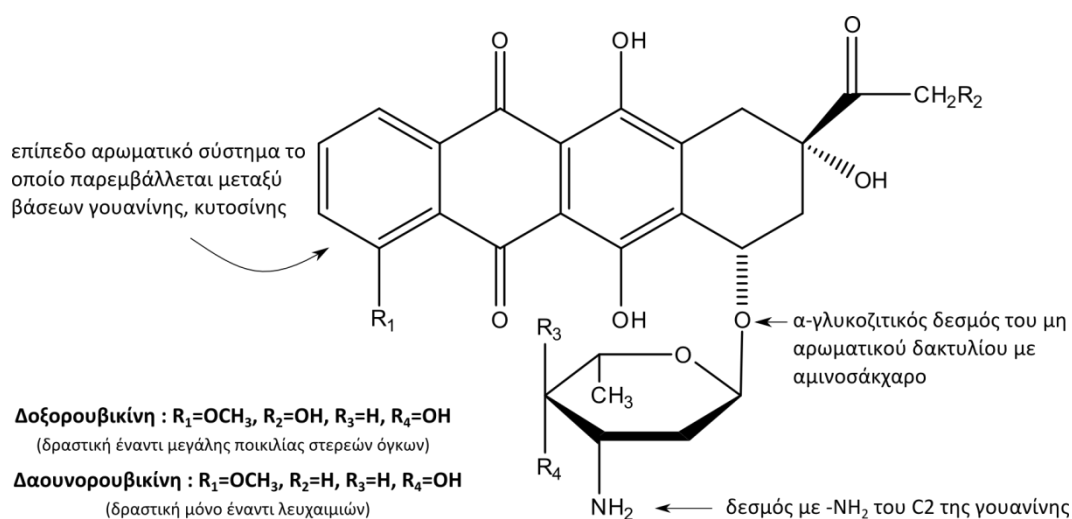
Η ενδοπαρεμβολή επιτυγχάνεται όταν το συνήθως θετικά φορτισμένο μόριο σε φυσιολογικό pH, προσεγγίζει την εξωτερική περιοχή της έλικας του νουκλεϊκού οξέος και στη συνέχεια το επίπεδο αρωματικό τμήμα του διεισδύει μεταξύ των βάσεων, διεθετούμενο παράλληλα ως προς αυτές. Με αυτόν τον τρόπο, απομακρύνονται μεταξύ τους τα διαδοχικά ζεύγη βάσεων και η έλικα του νουκλεϊκού οξέος επιμηκύνεται με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασής της με ζωτικά για τη λειτουργία της ένζυμα.

Τα μόρια που ενδοπαρεμβάλλονται έχουν κυτταροτοξικές, μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ιδιότητες. Όχι μόνο ενδοπαρεμβάλλονται αλλά και προκαλούν βλάβες στο DNA μέσω άλλων μηχανισμών, όπως με την αλκυλίωση ή τη σχάση των κλώνων του, ή την αναστολή των τοποϊσομερασών.

Τα σημαντικότερα φάρμακα της κατηγορίας αυτής είναι οι ανθρακυκλίνες και τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά.

2.6.1 Ανθρακυκλίνες

Τα σημαντικότερα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι η δοξορουβικίνη και η δαουνορουβικίνη, που παράγονται από το *Streptomyces peucetius* (Εικόνα 2.11). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης τους, εκτός της ενδοπαρεμβολής, είναι η ικανότητα του κινονικού δακτυλίου να σχηματίζει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δραστικές ρίζες υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$), καθώς και ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^{2-}), τα οποία επιδρούν βλαπτικά επί του DNA. Το γεγονός αυτό, άλλωστε, ευθύνεται και για την καρδιοτοξικότητα αυτών των μορίων [22].



Εικόνα 2.11: Τα σημαντικότερα φάρμακα των ανθρακυκλινών

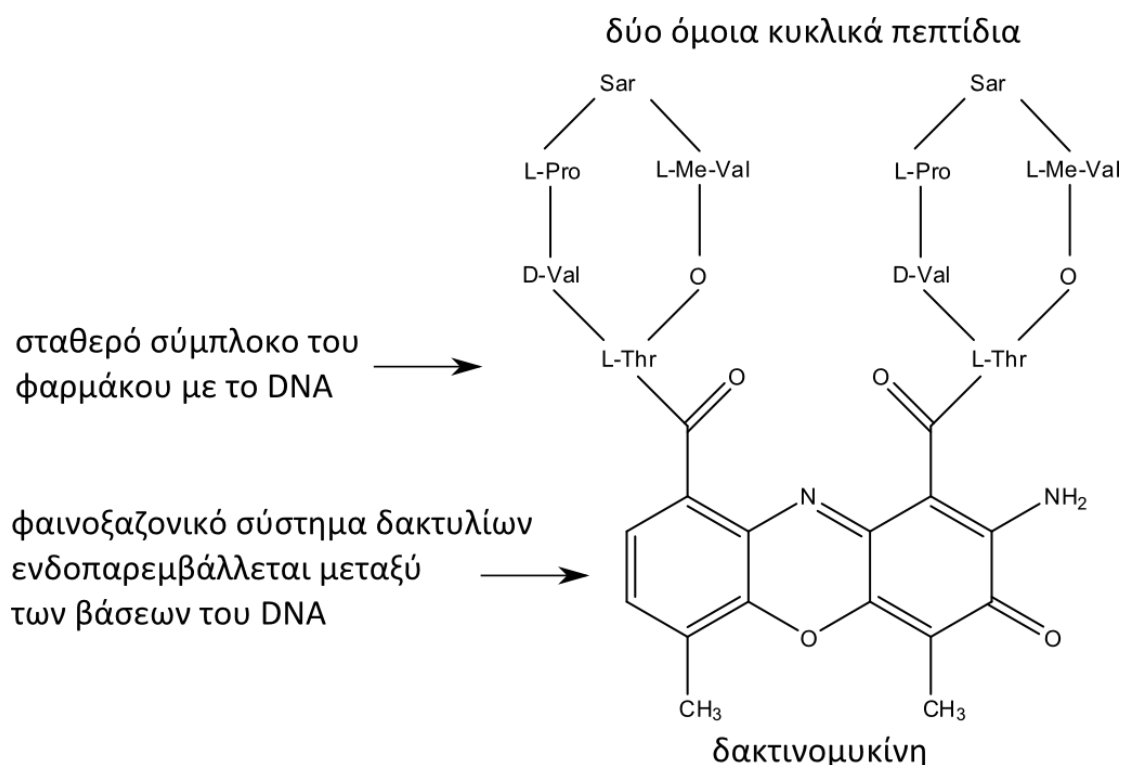
2.6.2 Αντικαρκινικά αντιβιοτικά

Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων με πολύπλοκη συνήθως χημική δομή. Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά, ενώ διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες δεν χρησιμοποιούνται σήμερα για αυτό το σκοπό, λόγω της μεγάλης τοξικότητάς τους. Αντίθετα, χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως

αντικαρκινικά φάρμακα. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η δακτινομυκίνη και η μπλεομυκίνη A₂ και B₂, ενώσεις που απομονώνονται από στρεπτομύκητες [12,22].

Δακτινομυκίνη

Αποτελείται από ένα φαινοξαζονικό σύστημα δακτυλίων στο οποίο ενώνονται δύο όμοια κυκλικά πολυπεπίδια. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την καθοριζόμενη από το DNA σύνθεση του RNA, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλει και τη σύνθεση του DNA (Εικόνα 2.12).



Εικόνα 2.12: Απεικόνιση ενδοπαρεμβολής της δακτινομυκίνης στο DNA

Μπλεομυκίνη

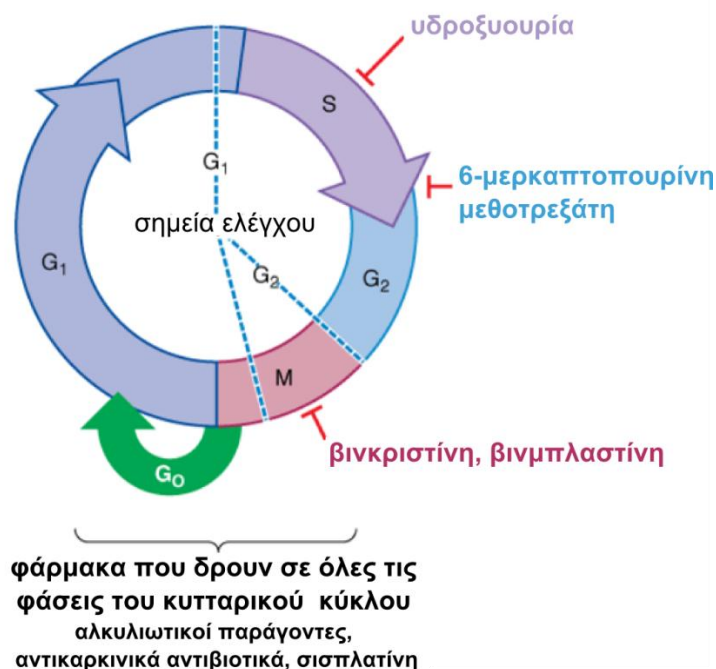
Η μπλεομυκίνη είναι ένα μικρό πεπτίδιο το οποίο περιλαμβάνει μια περιοχή πρόσδεσης DNA στο ένα άκρο του, και μια περιοχή πρόσθεσης σιδήρου στο άλλο άκρο του (Εικόνα 2.13). Η αντικαρκινική του δράση οφείλεται στην ενδοπαρεμβολή του στο DNA, αλλά και στο σχηματισμό συμπλόκων με Fe²⁺ και O₂, τα οποία ενεργοποιούνται με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου, και μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών προκαλεί τη σχάση ενός ή και των δύο κλώνων του DNA.

2.7 Συμπεράσματα

Η κατανόηση του κύκλου ζωής των καρκινικών κυττάρων είναι πολύ σημαντική για τη ορθή χρήση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Αν και κύτταρα από διαφορετικά καρκινώματα παρουσιάζουν διαφορές στο χρόνο διπλασιασμού τους, όλα τα κύτταρα ακολουθούν τα ίδια στάδια του κυτταρικού κύκλου:

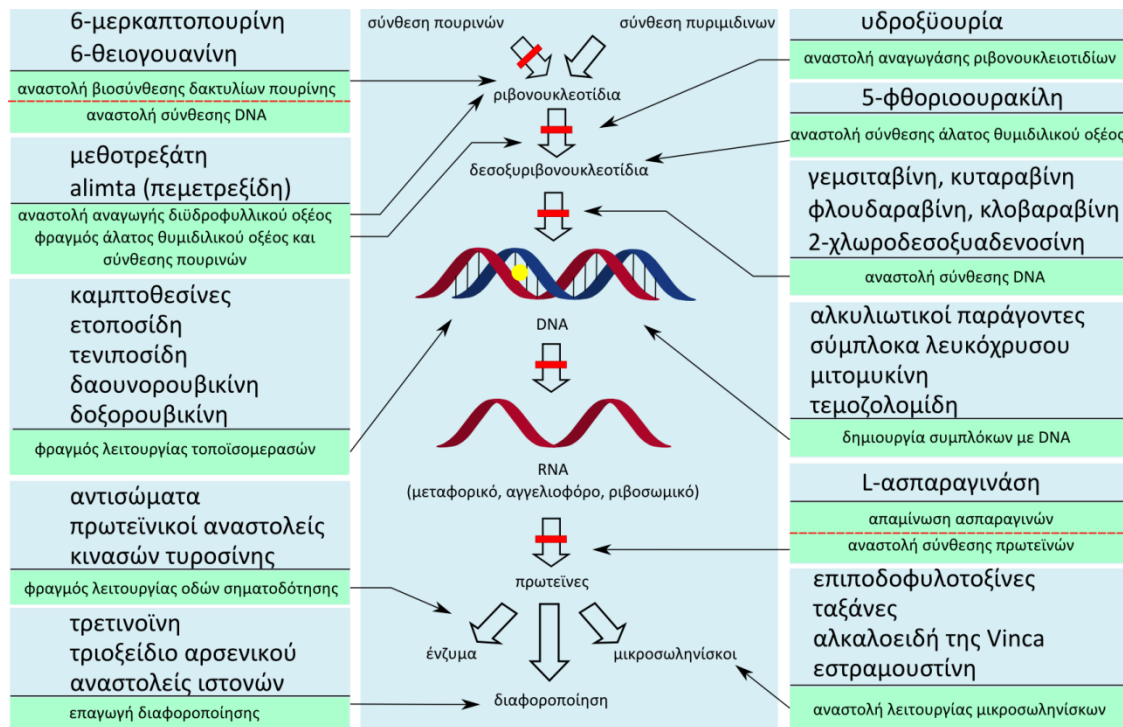
- Το στάδιο G_1 όπου λαμβάνει χώρα η προετοιμασία (πρωτεϊνοσύνθεση) για την είσοδο του κυττάρου στη φάση S.
- Τη φάση S, κατά τη διάρκεια της οποίας λαμβάνει χώρα διπλασιασμός του DNA του πυρήνα του κυττάρου και ακριβής αντιγραφή κάθε χρωμοσώματος.
- Τη φάση G_2 , που ακολουθεί την ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA.
- Τη μιτωτική φάση M, όπου το κύτταρο διαιρείται σε δυο θυγατρικά κύτταρα.
- Τη φάση ηρεμίας G_0 .

Στην εικόνα 2.14 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η εκλεκτική δράση κάποιων χημειοθεραπευτικών παραγόντων όσο αφορά στα στάδια του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 2.14: Εξειδίκευση δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων κατά τα στάδια του κυτταρικού κύκλου

Από όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία είναι αντιληπτό ότι τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία όσο αφορά στη δομή και τον μηχανισμό δράσης τους. Στην εικόνα 2.15 που ακολουθεί, παρουσιάζονται σχηματικά οι κυτταρικοί στόχοι των χημειοθεραπευτικών παραγόντων.

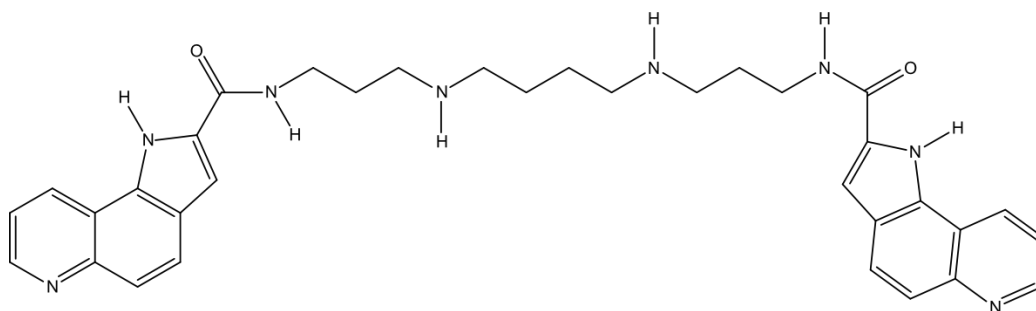


Εικόνα 2.15: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων

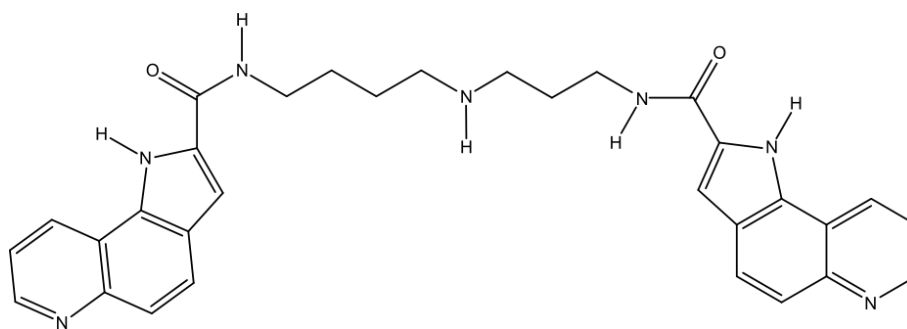
Κεφάλαιο 3 – Σκοπός παρούσας εργασίας

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 2, φαρμακευτικοί παράγοντες που παρουσιάζουν δυνατότητα ομοιοπολικής σύνδεσης με το DNA είναι γνωστοί για την πολύ σημαντική αντικαρκινική τους δράση, η οποία αποδίδεται κυρίως στην ικανότητά τους να σχηματίζουν αδιάσπαστες ενώσεις προσθήκης με ζεύγη βάσεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Οι περισσότερες από τις γνωστές αυτές ενώσεις περιέχουν 3 ή 4 αρωματικά χρωμοφόρα στον σκελετό τους και έχουν επαρκές μέγεθος ώστε να αναγνωρίζουν 2 ή 3 ζεύγη βάσεων [23,24]. Η εισαγωγή αρωματικών ετεροκυκλικών συστημάτων σε μόρια-παράγοντες, οδήγησε σε αναγνώριση περιοχών της αλληλουχίας του DNA και δραματική αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους, η οποία οφείλεται στη δυνατότητα δημιουργίας άκαμπτων, μη-αντιστρεπτών δεσμών με την έλικα του DNA [25].

Κατά τη διάρκεια της έρευνας πάνω στην ανάπτυξη καινοτόμων παραγόντων που εμφανίζουν δυνατότητα σύνδεσης με το DNA, έχουν ήδη δημοσιευθεί η συνθετική πορεία και ο κυτταροτοξικός χαρακτήρας μιας κατηγορίας C2-υποκατεστημένων πυρρολο[2,3-*f*]κινολονών [26]. Στην προσπάθεια περαιτέρω έρευνας της δραστηριότητας αυτής της κατηγορίας των ενώσεων, στο εργαστήριο του Καθηγητή Α. Τσοτίνη του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν οι ακόλουθες πυρρολο[2,3-*f*]κινολίνες **5e** και **5g** (Εικόνα 3.1).



5e



5g

Εικόνα 3.1: Χημικές δομές των πυρρολο-[2,3-*f*]κινολινών **5e** και **5g**.

Οι εν ενώσεις αυτές παρουσίασαν ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές του καρκίνου του πνεύμονα NSCLC-N16-L16 (Non-Small-Cell-Lung-Carcinoma) και ιδιαίτερα η **5e** [27].

Αρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των διαμορφώσεων που λαμβάνουν οι ενώσεις **5e** και **5g**, συνδυάζοντας πειραματικά δεδομένα φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR) μίας και δύο διαστάσεων (COSY, NOESY), και διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων με τη βοήθεια υπολογιστικών μεθόδων μοριακής δυναμικής υπό συνθήκες κενού, υδατικού περιβάλλοντος και περιβάλλοντος διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

Επόμενος στόχος ήταν η μελέτη των ενώσεων **5e** και **5g** για την ικανότητά τους να διαπερνούν τον υδάτινο φραγμό των λιπιδικών διπλοστιβάδων και να εισέρχονται σε αυτές. Τα μόρια αυτά προκειμένου να εξασκήσουν τη βιολογική τους δράση στον πυρήνα του κυττάρου θα πρέπει να περάσουν από αυτό το υδάτινο φραγμό των μεμβρανών.

Τέλος, μελετάται η μοριακή πρόσδεση των ενώσεων αυτών σε αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (DNA) για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης τους και την ύπαρξη ή όχι φαινομένου δημιουργίας δεσμών τύπου χιαστί με τις αζωτούχες βάσεις (cross-linking effect).

Κεφάλαιο 4 – Διαμορφωτική ανάλυση χημικών ενώσεων με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και μεθόδων Μοριακής Μοντελοποίησης

4.1 Εισαγωγή

Η διαμόρφωση που λαμβάνει ένα βιοδραστικό μόριο όπως μια φαρμακευτική ένωση στο περιβάλλον που δρα, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ευνοϊκή αλληλεπίδρασή του με το κέντρο δράσης του, όπως για παράδειγμα το ενεργό κέντρο ενός πρωτεϊνικού υποδοχέα. Ένα διαμορφωτικά ευέλικτο μόριο μπορεί να λαμβάνει ποικίλες διαμορφώσεις σε διαφορετικές συνθήκες διαλύτη, θερμοκρασίας ή pH. Η βιοδραστικότητα ενός μορίου οφείλεται συνήθως σε μια από τις διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας, χωρίς να ταυτίζεται απαραίτητα με αυτήν της χαμηλότερης ενέργειας. Μέσω των μεθόδων διαμορφωτικής ανάλυσης επιτυγχάνεται η εύρεση του συνόλου των ενεργειακά ευνοϊκών διαμορφώσεων ενός μορίου με σκοπό την κατανόηση της σχέσης δομής και δράσης αυτού.

Η φασματοσκοπία NMR συμβάλλει σημαντικά στην απόκτηση πληροφοριών για τη εύρεση μιας στατιστικά χαμηλής ενέργειας διαμόρφωσης ενός μορίου σε διάλυμα. Συνδυάζοντας τις πειραματικές πληροφορίες σε συνδυασμό με χρήση θεωρητικών υπολογιστικών μεθόδων, επιτυγχάνεται η εύρεση των ενεργειακά χαμηλών διαμορφώσεων ενός μορίου.

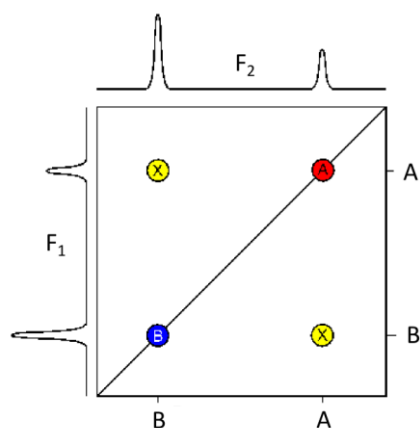
4.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR)

Το δείγμα ακτινοβολείται με απλό παλμό, ο οποίος φέρνει τη μαγνήτιση των διαφόρων πυρήνων υδρογόνου σε κατάλληλη γωνία για ανίχνευση. Η μεταφερόμενη μαγνήτιση του κάθε πυρήνα διαφέρει ανάλογα με το χημικό και μαγνητικό περιβάλλον και διαρκεί όσο η ακτινοβολήση του δείγματος (μs). Στη συνέχεια το επαγόμενο ηλεκτρικό σήμα υφίσταται επεξεργασία (Ελεύθερη Φθίνουσα Επαγωγή – Free Induction Decay, FID) με χρήση μετασχηματισμού Fourier οπότε λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα στο πεδίο συχνοτήτων. Επειδή η

φασματοσκοπία ^1H NMR είναι ποσοτική, καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των πρωτονίων σε ένα μόριο μέσω της ολοκλήρωσης των κορυφών. Κάθε κορυφή συντονισμού αντιστοιχεί σε ένα ή περισσότερα μαγνητικά ισοδύναμα πρωτόνια. Σε πολύπλοκα μόρια, παρατηρείται αλληλεπικάλυψη κορυφών με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων για την ταυτοποίησή τους. Στην περίπτωση των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, η φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων ήταν επαρκής για την ταυτοποίηση και ανάλυση διαμορφώσεων των μελετηθέντων μορίων [28].

4.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR)

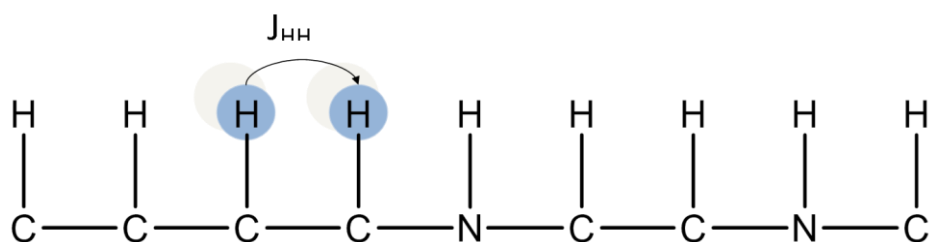
Σε ένα φάσμα NMR δύο διαστάσεων γίνεται καταγραφή δυο διαφορετικών πληροφοριών σε δύο διαφορετικές διαστάσεις ή σε δύο διαφορετικούς άξονες συχνοτήτων F_1 και F_2 . Στον ένα άξονα F_2 καταγράφονται οι απορροφήσεις συγκεκριμένου πυρήνα (^1H ή ^{13}C) ενός μορίου και στον άλλο άξονα F_1 καταγράφονται οι απορροφήσεις άλλων πυρήνων που σχετίζονται ή αλληλεπιδρούν με αυτούς του άξονα F_2 . Υπάρχουν δυο κατηγορίες φασμάτων δυο διαστάσεων, τα ομοπυρηνικά και τα ετεροπυρηνικά. Χαρακτηριστικό του ομοπυρηνικού φάσματος δύο διαστάσεων είναι η εμφάνιση κορυφών επί της διαγωνίου και εκτός διαγωνίου. Οι επί της διαγωνίου κορυφές αποτελούν προβολές των φασμάτων που βρίσκονται στους κύριους άξονες. Οι εκτός διαγωνίου είναι συμμετρικές κορυφές και φανερώνουν σύζευξη μέσω δεσμού ή χώρου των υπό μελέτη πυρήνων. Στην εικόνα 4.1 παρουσιάζεται ένα δείγμα φάσματος 2 διαστάσεων σε καθορισμένο επίπεδο [28].



Εικόνα 4.1: Φάσμα NMR δύο διαστάσεων.

4.3.1 Ομοπυρηνικό πείραμα 2D-COSY

Στα ομοπυρηνικά φάσματα COSY (Correlated Spectroscopy) και οι δυο άξονες F_1 και F_2 παρέχουν απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα, π.χ. ^1H - ^1H . Η συσχέτιση των πυρήνων είναι αποτέλεσμα της σύζευξης τους μέσω δεσμών με μια σταθερά σύζευξης J . Η σύζευξη είναι δυνατή μόνο μεταξύ γειτονικών πρωτονίων (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2: Συσχέτιση πυρήνων στο COSY. Με το βέλος επισημαίνεται η ομοπυρηνική συσχέτιση μεταξύ δυο γειτονικών πρωτονίων με σταθερά σύζευξης J_{HH} .

4.3.2 Ομοπυρηνικό πείραμα 2D-NOESY

Το ομοπυρηνικό φάσμα 2D-NOESY στηρίζεται στο φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect), εξαιτίας του οποίου μεταβάλλεται η ένταση απορρόφησης ενός πρωτονίου, όταν ακτινοβολείται ένα άλλο πρωτόνιο που βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα. Το φαινόμενο NOE εμφανίζεται λόγω μεταφοράς μαγνήτισης μέσω του μηχανισμού αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου. Η μεταβολή της έντασης της κορυφής αλληλεπίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογης της έκτης δύναμης της μεταξύ τους απόστασης. Ισχυρά σήματα NOE αντιστοιχούν σε αποστάσεις πυρήνων μέχρι 2.5 \AA , μέτριας έντασης σήματα αντιστοιχούν σε αποστάσεις $2.5\text{-}3.7 \text{ \AA}$, ενώ ασθενείς αλληλεπιδράσεις σε αποστάσεις από $3.7\text{-}5.0 \text{ \AA}$.

4.4 Υπολογιστικές Μέθοδοι Ελαχιστοποίησης Ενέργειας (Energy Minimization)

Η δυναμική ενέργεια ενός μορίου είναι συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων του και καθορίζεται από ενδομοριακές και μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μέσα στο υπό μελέτη σύστημα. Μέσω των μεθόδων ελαχιστοποίησης ενέργειας επιδιώκεται η εύρεση διαμόρφωσης με χαμηλή δυναμική ενέργεια. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος γίνεται χρήση αλγορίθμων ελαχιστοποίησης ενέργειας πρώτης και δεύτερης τάξης.

Για τους αλγορίθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας θεωρείται ότι οποιαδήποτε συνάρτηση $F(X)$, με μεταβλητή X , μπορεί να αναλυθεί σε μια σειρά Taylor γύρω από το ελάχιστο X_0 .

$$F(X) = F(X_0) + (X - X_0)F'(X_0) + \frac{1}{2}(X - X_0)^2 F''(X_0) + \dots \quad \text{όπου,}$$

F' , η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης και

F'' , η δεύτερη παράγωγος της συνάρτησης.

Οι αλγόριθμοι πρώτης τάξης χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο της συνάρτησης της δυναμικής ενέργειας, δηλαδή την κλίση. Οι κύριοι αλγόριθμοι αυτής της τάξης είναι ο αλγόριθμος Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descent), ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient), καθώς επίσης και ο αλγόριθμος του Powell. Η διαφορά μεταξύ τους έγκειται στο γεγονός ότι στους δυο τελευταίους το σημείο έναρξης για κάθε βήμα προκύπτει από το αμέσως προηγούμενο. Αντίθετα στον αλγόριθμο Βαθύτατης Κατάδυσης δεν λαμβάνονται υπόψη πληροφορίες από τα προηγούμενα βήματα.

Οι αλγόριθμοι δεύτερης τάξης όπως ο Newton-Raphson, χρησιμοποιούν τόσο την πρώτη όσο και τη δεύτερη παράγωγο της συνάρτησης της δυναμικής ενέργειας. Το κύριο πλεονέκτημά τους είναι ότι οδηγούν ευκολότερα στην εύρεση ενεργειακού ελαχίστου. Γι'αυτό το λόγο, κατά τη διαδικασία ελαχιστοποίησης ενέργειας, εφαρμόζονται αρχικά οι αλγόριθμοι πρώτης τάξης και ακολουθούν οι αλγόριθμοι δεύτερης τάξης [29,30].

4.5 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. Με τη χρήση διαμορφωτικής ανάλυσης είναι δυνατή η εύρεση του συνόλου των ενεργειακά χαμηλών διαμορφώσεων ενός μορίου. Οι αλγόριθμοι αυτοί λειτουργούν μεταβάλλοντας τις ευέλικτες διέδρες γωνίες του μορίου ή τις ατομικές καρτεσιανές συντεταγμένες του μορίου και κατηγοριοποιούνται ως εξής:

1. Μέθοδοι Συστηματικής Αναζήτησης
2. Μέθοδοι Τυχαίας Αναζήτησης
3. Μέθοδοι Μοριακής Δυναμικής

4.5.1 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 των 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 μέχρι την πλήρη περιστροφή όλων των υπό μελέτη δεσμών και οδηγεί στην παραγωγή νέων ελαχιστοποιημένων διαμορφώσεων. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ο αριθμός των παραγόμενων διαμορφώσεων αυξάνεται εκθετικά, με αποτέλεσμα να απαιτείται ομαδοποίηση των διαμορφώσεων που συγκλίνουν διαμορφωτικά, άρα και ενεργειακά [31].

4.5.2 Μέθοδοι Τυχαίας Αναζήτησης

Αντίθετα με τους αλγόριθμους συστηματικής αναζήτησης, οι διαμορφώσεις που προκύπτουν από τις μεθόδους τυχαίας αναζήτησης δεν μπορούν να προβλεφθούν. Σε κάθε βήμα πραγματοποιείται μια τυχαία μεταβολή στις συντεταγμένες των

ατόμων ή τις διέδρες γωνίες της αρχικής διαμόρφωσης του μορίου. Μεταβολή στις καρτεσιανές συντεταγμένες προκαλείται δίνοντας νέες τυχαίες τιμές για τις συντεταγμένες x , y , z . Μεταβολή στις διέδρες γωνίες πραγματοποιείται 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 λαμβάνονται υπ' όψη λιγότεροι βαθμοί ελευθερίας κατά τους υπολογισμούς. Η νέα διαμόρφωση που προκύπτει ελαχιστοποιείται ενεργειακά χρησιμοποιώντας αλγόριθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας. Κάθε νέα διαμόρφωση γίνεται ενακτήρια για τον επόμενο κύκλο εφόσον είναι ενεργειακά χαμηλότερη από την προηγούμενη διαμόρφωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας είναι η απαίτηση μεγάλου υπολογιστικού χρόνου [31].

4.5.3 Μέθοδοι Μοριακής Δυναμικής

Με τη χρήση μεθόδων Μοριακής Δυναμικής γίνεται προσομοίωση της συμπεριφοράς ενός μοριακού συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. Η τεχνική αυτή προσομοιάζει τη φυσική κίνηση ενός μοριακού συστήματος, καθώς αυτό δονείται και περιστρέφεται εσωτερικά γύρω από τους δεσμούς του. Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης υπολογίζεται η ενέργεια του συστήματος με τη χρήση πεδίου δυνάμεων (Force Field, FF), το οποίο προσδιορίζει τις δυνάμεις που ασκούνται σε κάθε άτομο, σε μια καθορισμένη γεωμετρία του συστήματος. Τα βήματα κατά τη διάρκεια μιας προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής είναι τα ακόλουθα:

1. Επιλέγονται οι αρχικές θέσεις (συντεταγμένες) των ατόμων του μοριακού συστήματος. Στην προσομοίωση συστημάτων που βρίσκονται σε ισορροπία, επιλέγεται μια αρχική διαμόρφωση, η οποία προσεγγίζει αυτή που είναι επιθυμητό να προσομοιωθεί. Είναι σημαντικό να αποφεύγονται διαμορφώσεις που περιλαμβάνουν υψηλής ενέργειας αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν αστάθεια κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Για πρωτεϊνικά μόρια, οι συντεταγμένες λαμβάνονται από κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Για προσομοίωση ενός υπό μελέτη μορίου σε περιβάλλον διαλύτη, το μόριο τοποθετείται στο κέντρο και περιβάλλεται από τα μόρια του διαλύτη.

2. Επιλέγονται οι αρχικές ταχύτητες των ατόμων, έτσι ώστε να ικανοποιούν την κατανομή Boltzmann σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, και κανονικοποιούνται, προκειμένου η συνολική ορμή του συστήματος να είναι μηδέν.
3. Υπολογίζεται η ορμή κάθε ατόμου από την ταχύτητα και τη μάζα του.
4. Υπολογίζονται οι δυνάμεις που ασκούνται σε κάθε άτομο, ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεών του με άλλα άτομα.
5. Μετά από χρονικό διάστημα Δt , που αποτελεί και το βήμα της προσομοίωσης, υπολογίζονται οι νέες θέσεις των ατόμων στο χώρο.
6. Υπολογίζονται οι νέες ταχύτητες και οι επιταχύνσεις των ατόμων.
7. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 3-6 μέχρι το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία. Το σύστημα φτάνει σε ισορροπία όταν δεν παρατηρούνται μεταβολές στην κινητική ενέργεια, στη θερμοκρασία ή σε άλλες ιδιότητες του συστήματος εντός χρονικού διαστήματος της τάξης των 10ps. Η κατάσταση ισορροπίας δεν αντιστοιχεί σε διαμόρφωση ελάχιστης ενέργειας.
8. Αφού το σύστημα έλθει σε ισορροπία, καταγράφονται οι ατομικές συντεταγμένες του συστήματος σε μικρά διαστήματα. Οι συντεταγμένες σε συνάρτηση με το χρόνο αποτελούν το αρχείο τροχιάς (trajectory file), που περιγράφει τα δυναμικά χαρακτηριστικά του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Για τη σωστή εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας, είναι πολύ σημαντική η επιλογή του κατάλληλου πεδίου δυνάμεων, καθώς επίσης και η επιλογή του βήματος της προσομοίωσης. Μεγάλες τιμές του βήματος της προσομοίωσης έχουν ως αποτέλεσμα τα άτομα του συστήματος να διανύουν μεγάλες αποστάσεις και οι νέες τιμές τους που αποθηκεύονται στο αρχείο τροχιάς, να μην προσομοιάζουν την κίνηση με μεγάλη ακρίβεια.

Για τη σωστή περιγραφή της προσομοίωσης του χημικού συστήματος, θα πρέπει κάθε ιδιότητα του συστήματος να δίνει μια κανονική κατανομή γύρω από τη μέση τιμή της. Η διαδικασία της προσομοίωσης, που έχει περιγραφεί προηγουμένως, αφορά σύστημα σταθερού όγκου (V), αριθμού σωματιδίων (ατόμων ή μορίων, N) και θερμοκρασίας (T).

Η διαδικασία της Μοριακής Δυναμικής επιτυγχάνεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο, το σύστημα θερμαίνεται σταδιακά, μέχρι να φτάσει σε μια τελική θερμοκρασία και στο δεύτερο στάδιο αφήνεται να έρθει σε ισορροπία. Η θερμοκρασία που αποδίδεται στο σύστημα αυξάνει την κινητική του ενέργεια, με αποτέλεσμα να μπορεί να υπερπηδήσει ενεργειακά φράγματα. Στο τρίτο στάδιο γίνεται προσομοίωση της κίνησης του σε καθορισμένο χρόνο. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στα αρχεία τροχιάς (trajectory files) και από αυτά μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες τόσο για την κίνηση όσο και για τη διαμόρφωση του μορίου.

Η επιλογή της θερμοκρασίας και του χρόνου της προσομοίωσης γίνεται ανάλογα με το υπό μελέτη σύστημα. Κατά την εφαρμογή της Μοριακής Δυναμικής στη διαμορφωτική ανάλυση επιλέγονται διαμορφώσεις σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα από τα αρχεία τροχιάς και ελαχιστοποιούνται ενεργειακά, για να φτάσουν στο κοντινότερο ελάχιστο. Μετά την ελαχιστοποίηση ενέργειας, το υπό μελέτη μόριο μπορεί να βρεθεί σε ένα διαφορετικό τοπικό ελάχιστο σε σύγκριση με την αρχική διαμόρφωση [29].

Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής Υψηλής Θερμοκρασίας Ανόπτωσης (Simulated Annealing)

Στις μεθόδους Μοριακής Δυναμικής, περιλαμβάνεται η Μοριακή Δυναμική Υψηλής Θερμοκρασίας Ανόπτωσης (Simulated Annealing). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, το υπό μελέτη σύστημα υποβάλλεται αρχικά σε υψηλή θερμοκρασία έτσι ώστε να υπερπηδήσει τα ενεργειακά φράγματα, λαμβάνοντας νέες διαμορφώσεις. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται με στόχο το σύστημα να μεταπέσει σε διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας από την αρχική. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται κυκλικά αρκετές φορές, στοχεύοντας στη λήψη πολλαπλών διαμορφώσεων του υπό μελέτη συστήματος. Στη συνέχεια, οι διαμορφώσεις του υπό μελέτη συστήματος ελαχιστοποιούνται ενεργειακά για να καταστεί βέβαιο ότι το σύστημα βρίσκεται πραγματικά σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας [32].

4.6 Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

Μέσω των θεωρητικών πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης καθίσταται δυνατή η κατανόηση του προσανατολισμού, της τοποθέτησης και των αλληλεπιδράσεων που

παρατηρούνται κατά την πρόσδεση μιας ένωσης σε ένα μεγαλομόριο-στόχο. Η ένωση μπορεί να είναι φαρμακευτικό μόριο χημικής ή βιολογικής προέλευσης (χημική ένωση, μονοκλωνικό αντίσωμα), και το μεγαλομόριο ένα ένζυμο (πρωτεΐνη) ή τμήμα της έλικας του DNA. Με την ανάπτυξη της υπολογιστικής χημείας και των μεθόδων μοντελοποίησης, δίνεται πλέον η δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε διάφορους αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης με τους οποίους γίνεται χρήση διαφορετικών παραμέτρων όπως για παράδειγμα δυνάμεις Coulomb και Van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ύπαρξη δεσμών υδρογόνου, ώστε να εκτιμηθεί και να βαθμολογηθεί ο τρόπος πρόσδεσης διαφόρων υπό μελέτη ενώσεων στους αντίστοιχους υποδοχείς τους.

4.6.1 Εφαρμογή Μοριακής Πρόσδεσης GLIDE

Μια από τις πιο σύγχρονες εφαρμογές μοριακής πρόσδεσης είναι η εφαρμογή Glide της εταιρείας Schrödinger. Η συγκεκριμένη εφαρμογή δίνει την δυνατότητα προσομοιώσεων όπου ο προσδέτης μπορεί να θεωρείται άκαμπτος ή εύκαμπτος, ενώ ο υποδοχέας διατηρείται άκαμπτος, με εξαίρεση την περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων ή πλευρικών αλυσίδων. Στην περίπτωση όπου ο προσδέτης θεωρείται άκαμπτος, τότε γίνεται προσπάθεια πρόσδεσης αυτού ως έχει στον υποδοχέα. Εάν επιλεγεί να είναι εύκαμπτος - δηλαδή να έχει τη δυνατότητα να λαμβάνει διαφορετικές διαμορφώσεις - , πριν την προσπάθεια πρόσδεσης δημιουργείται ένα σύνολο πιθανών αρχικών διαμορφώσεων, οι οποίες ιεραρχούνται και αξιολογούνται ως προς την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Οι διαμορφώσεις που αξιολογούνται θετικά, υποβάλλονται σε διαδικασίες ελαχιστοποίησης ενέργειας. Αυτές οι διαμορφώσεις στη συνέχεια επανεξετάζονται ως προς τις γωνίες των δεσμών τους σε μια προσπάθεια να βρεθεί μια ακόμη πιο ευνοϊκή ενεργειακά διαμόρφωση. Όσες διαμορφώσεις περάσουν από όλα αυτά τα στάδια αξιολογούνται από τη συνάρτηση GlideScore και λαμβάνουν την τελική βαθμολογία πρόσδεσης GS (GlideScore), η οποία προκύπτει από το άθροισμα των ακόλουθων συνισταμένων:

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

Όπου:

- **VdW:** Ενέργεια Van der Waals. Υπολογίζεται με μειωμένα ολικά ιοντικά φορτία σε ομάδες με πλήρες φορτίο όπως ιόντα μετάλλων, ομάδες καρβοξυλίου και γουανιδινικές ομάδες.
- **Coul:** Ενέργεια Coulomb. Υπολογίζεται με μειωμένα ολικά ιοντικά φορτία σε ομάδες με πλήρες φορτίο όπως ιόντα μετάλλων, ομάδες καρβοξυλίου και γουανιδινικές ομάδες.
- **Lipo:** Όρος μέσω του οποίου υπολογίζονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- **Hbond:** Όρος μέσω του οποίου υπολογίζεται η ενέργεια των δεσμών υδρογόνου. Υπολογίζεται ανάλογα με την ιοντική κατάσταση του δότη και του δέκτη.
- **Metal:** Όρος μέσω του οποίου υπολογίζεται η ενέργεια αλληλεπιδράσεων με μέταλλο. Περιλαμβάνει μόνο αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα δέκτες.
- **BuryP:** Μη ευνοϊκή βαθμολόγηση για μη αποκαλυπτόμενες πολικές ομάδες.
- **RotB:** Μη ευνοϊκή βαθμολόγηση για τον περιορισμό περιστροφής δεσμών που έχουν τη δυνατότητα περιστροφής.
- **Site:** Όρος μέσω του οποίου υπολογίζεται η ενέργεια πολικών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Περιλαμβάνει τις πολικές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα που δεν εμπίπτουν στους δεσμούς υδρογόνου σε μια υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου.

Κατά την προετοιμασία ενός πειράματος πρόσδεσης στο Glide, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε τρία επίπεδα ακρίβειας. Το πρώτο επίπεδο ονομάζεται **HTVS** (High Throughput Virtual Screening, Σάρωσης Υψηλού Ρυθμού Απόδοσης) και είναι κατάλληλο για να παρέχει μια πρώτη εκτίμηση πιθανής πρόσδεσης. Είναι πολύ χρήσιμο στον έλεγχο βιβλιοθηκών με μεγάλο αριθμό ενώσεων - προσδετών καθώς είναι πολύ γρήγορο. Το δεύτερο επίπεδο ονομάζεται **SP** (Standard Precision), παρέχει χαμηλό βαθμό ακρίβειας και είναι αρκετά γρήγορο. Το τρίτο επίπεδο ονομάζεται **XP** (Extra Precision) και παρέχει την υψηλότερη

ακρίβεια στους υπολογισμούς πρόσδεσης ενός πιθανού προσδέτη, έχει όμως μεγαλύτερες χρονικές απαιτήσεις. Συνήθως χρησιμοποιείται το επίπεδο XP λόγω της υψηλής του ακρίβειας, της ικανότητας του να απορρίπτει εσφαλμένες «θετικές» βαθμολογίες και του ορθού συσχετισμού μεταξύ ευνοϊκών λύσεων και αντίστοιχα ευνοϊκής βαθμολογίας (Glide Score). Κατά τη χρήση της μεθόδου XP, τοποθετούνται αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και δομείται το μόριο δεσμό προς δεσμό. Οι λύσεις που προκύπτουν, υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης XP. Είναι δυνατή και η χρήση συνδυασμού των μεθόδων **SP** και **XP** [33].

Κεφάλαιο 5 – Λιπιδικές Διπλοστιβάδες

5.1 Εισαγωγή

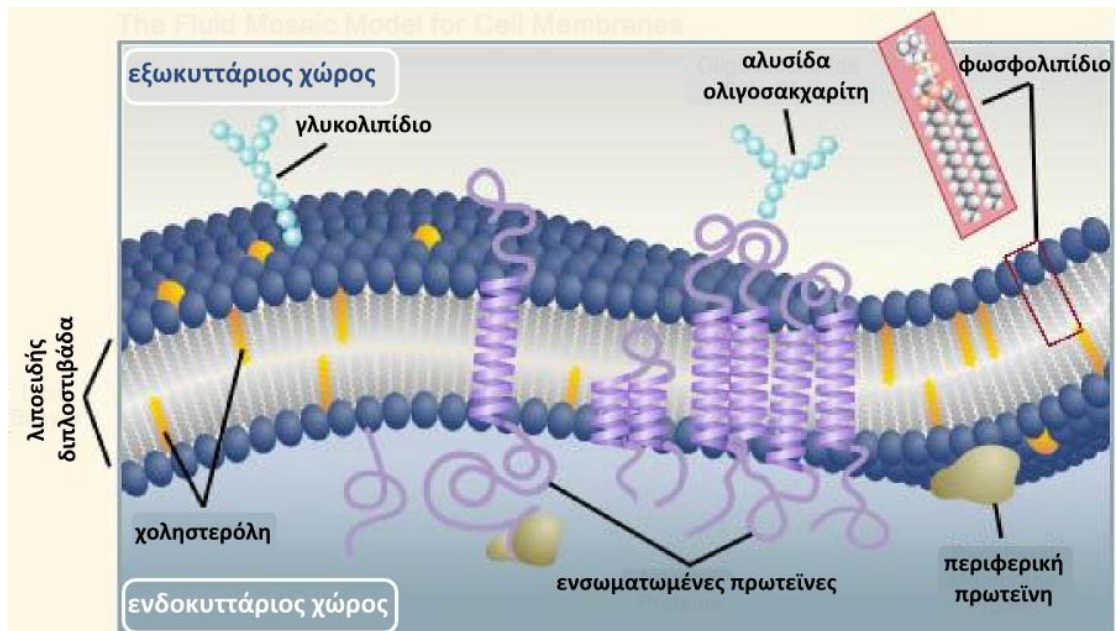
Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από μια μεμβράνη η οποία ορίζει τη δομή του κυττάρου και επιτρέπει επιλεκτικά τη διέλευση μορίων και ιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο. Ο σκοπός των κυτταρικών μεμβρανών είναι να διαχωρίζουν τα περιεχόμενα των κυττάρων από το εξωτερικό περιβάλλον. Περιέχουν τις πρωτεΐνες που επιτελούν ουσιαστικό ρόλο στην προσκόλληση, την αναγνώριση και την επικοινωνία των κυττάρων. Οι μεμβράνες των διαφόρων κυττάρων διαφέρουν τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία, όλες όμως αποτελούνται κυρίως από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες [34].

5.2 Σύνθεση, δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών

Η βασική δομή των κυτταρικών μεμβρανών αποτελείται από μια υδάτινη λιπιδική διπλοστιβάδα με ενσωματωμένες πρωτεΐνες. Τα σχετικά ποσοστά λιπιδίων και πρωτεϊνών διαφέρουν ανάλογα τα κυτταρικά όργανα τα οποία περικλείουν.

Τα λιπίδια αποτελούν περίπου το 50% της μάζας των περισσότερων ζωϊκών κυττάρων. Οι σημαντικότερες κατηγορίες λιπιδίων είναι τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη και τα γλυκολιπίδια. Στις μεμβράνες τα φωσφολιπίδια είναι συχνά ακόρεστα. Η λιπιδική διπλοστιβάδα περιέχει επίσης χοληστερόλη, η ποσότητα της οποίας αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ρευστότητας των μεμβρανών.

Τα συστατικά αυτά των διπλοστιβάδων μαζί με τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες δημιουργούν μια εικόνα «ρευστού μωσαϊκού» λόγω της ρευστότητας των λιπιδίων και της ετερογένειας της μεμβράνης ως σύνολο. Επίσης, στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης συνδέονται και άλλες μη ενσωματωμένες πρωτεΐνες, οι περιφερικές πρωτεΐνες. Τέλος, αλυσίδες ολιγοσακχαριτών συνδέονται στενά τόσο με τις πρωτεΐνες που ονομάζονται γλυκοπρωτεΐνες, όσο και με ορισμένα λιπίδια [35]. Στην εικόνα 5.1 απεικονίζεται το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού των κυτταρικών μεμβρανών.



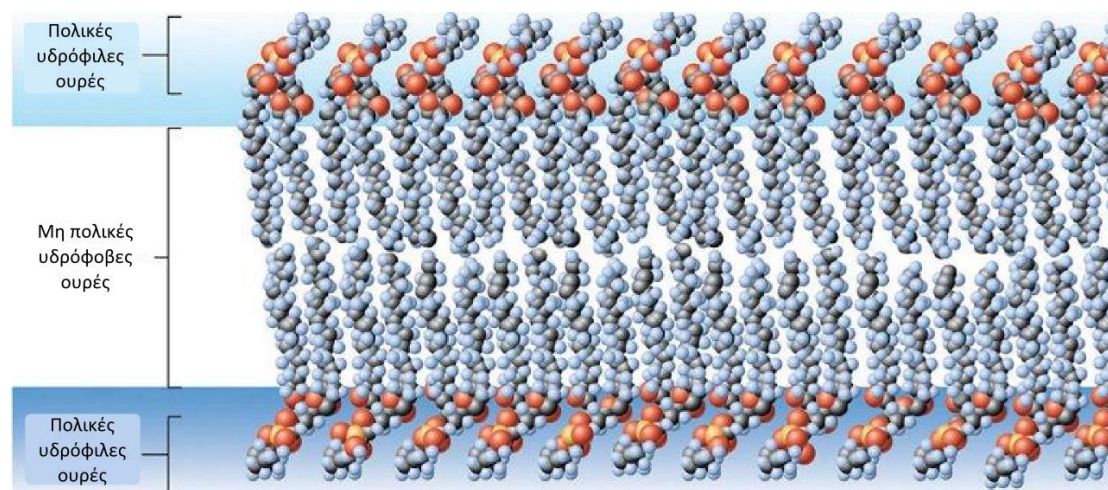
Εικόνα 5.1: Μοντέλο «ρευστού μωσαϊκού» των κυτταρικών μεμβρανών [36].

Η πιο σημαντική λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης είναι η διατήρηση της σταθερότητας του κυτταροπλάσματος και η προστασία του κυττάρου από δυσμενείς για τη ζωή και τη λειτουργία του εξωτερικών παραγόντων. Συγχρόνως, διασφαλίζει μια συνεχή ροή ύλης και ενέργειας από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου προς το εσωτερικό και αντίστροφα. Η ροή αυτή καθορίζεται από τα δομικά χαρακτηριστικά της κυτταρικής μεμβράνης η οποία είναι διαπερατή από ενώσεις και συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή βιολογική δράση του κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα είναι αδιαπέραστη από διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες που μπορεί να διαταράξουν την κανονική λειτουργία του κυττάρου.

Οι κυτταρικές μεμβράνες παρουσιάζουν επίσης έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Αυτές καθορίζουν την είσοδο των φαρμακευτικών μορίων στο κύτταρο. Τα φαρμακευτικά μόρια για να εξασκήσουν τη δράση τους στο εσωτερικό του κυττάρου, πρέπει να διαπεράσουν τις μεμβρανικές λιπιδικές διπλοστιβάδες. Αν δεν έχουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά, δεν μπορούν να διαπεράσουν. Υπάρχουν και περιπτώσεις φαρμάκων τα οποία δρουν απευθείας σε μεμβρανικούς υποδοχείς, ή διαχέονται μέσα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Σε αυτές τις περιπτώσεις η δράση του φαρμάκου εκφράζεται με τη μεταβολή που προκαλείται στις διαμορφώσεις των λιπιδίων από τα φαρμακευτικά μόρια.

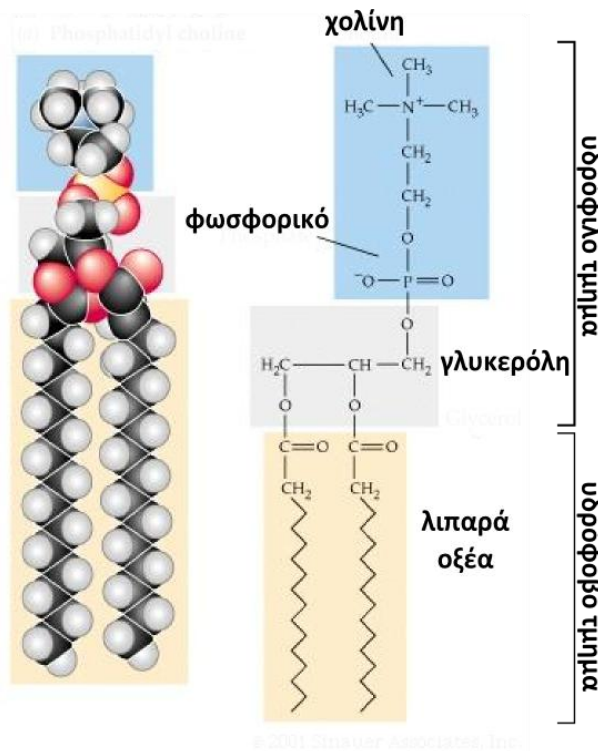
5.3 Τα λιπίδια

Τα λιπίδια περιέχουν στο μόριό τους ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα. Το γεγονός αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να σχηματίζουν αυθόρμητα διπλοστοιβάδες όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Δομή λιποειδούς διπλοστιβάδας

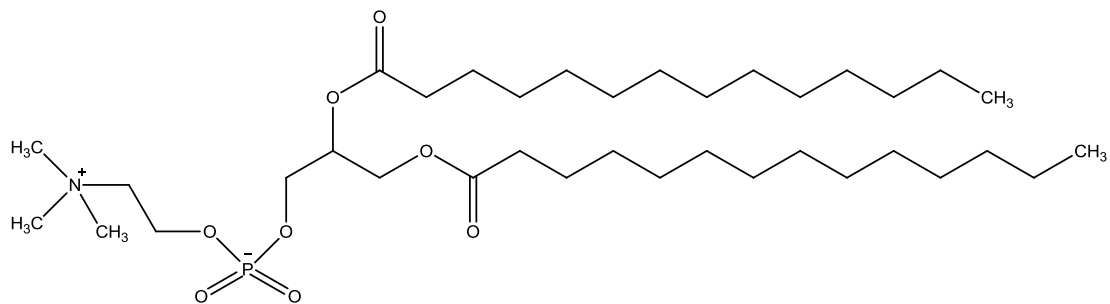
Τα φωσφολιπίδια τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στις βιολογικές μεμβράνες, αποτελούνται από ένα δομικό σκελετό γλυκερόλης στον οποίο προσαρτώνται δυο αλυσίδες λιπαρών οξέων (υδρόφοβο τμήμα) και μια φωσφορυλιωμένη αλκοόλη (υδρόφιλο τμήμα), η οποία ονομάζεται πολική κεφαλή (Εικόνα 5.3). Τα περισσότερα φωσφολιπίδια σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν αυθόρμητα λιπιδική διπλοστοιβάδα λόγω του μεγάλου όγκου που καταλαμβάνουν οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων [34].



Εικόνα 5.3: Το υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα ενός φωσφολιπιδίου, συγκεκριμένα μιας φωσφατιδυλοχολίνης.

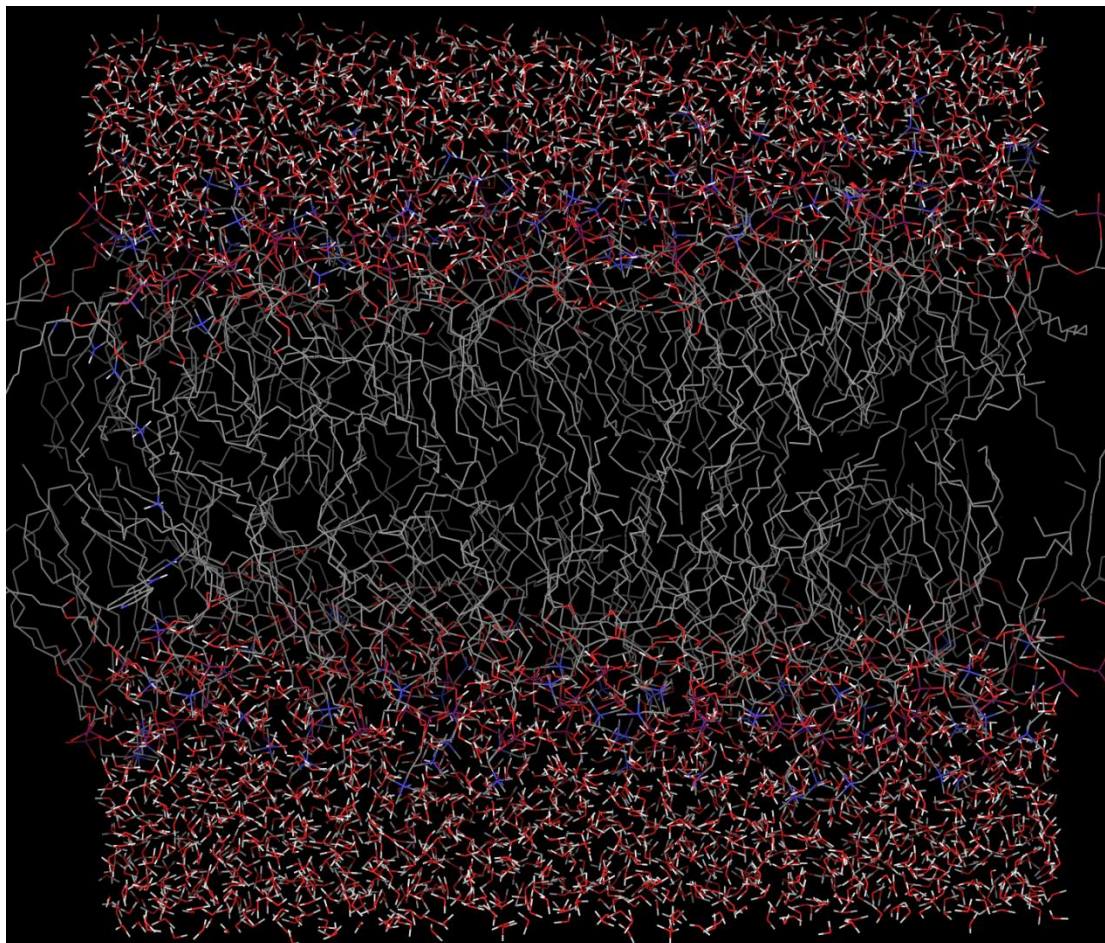
5.4 Διμυριστούλ-φωσφατιδυλοχολίνη (DMPC)

Για τη δημιουργία των λιποειδών διπλοστιβάδων χρησιμοποιήθηκε η διμυριστούλ-φωσφατιδυλοχολίνη (Dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC). Αυτή αποτελείται από ένα γλυκερολικό σκελετό στον οποίο οι δυο γειτονικές υδροξυλομάδες είναι εστεροποιημένες με δυο μόρια μυριστοϊκού οξέος. Οι αλκυλικές αλυσίδες του οξέος αποτελούν το υδρόφοβο τμήμα του μορίου. Η πολική κεφαλή του αποτελείται από μια φωσφορυλιωμένη χολίνη που είναι εστεροποιημένη στην τρίτη υδροξυλομάδα της γλυκερόλης (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4: Το μόριο της διμυριστούλ-φωσφατιδυλοχολίνης

Η χρήση της λιποειδούς διπλοστιβάδας DMPC επιλέχθηκε στις μελέτες γιατί αποτελεί ένα απλό σύστημα προσομοίωσης των δομικών ιδιοτήτων των βιολογικών μεμβρανών και είναι ευρέως διαδεδομένη [37,38,39]. Όπως όλα τα φωσφολιπίδια, έτσι και η DMPC, σε υδατικό περιβάλλον, σχηματίζει αυθόρμητα διπλοστιβάδες εξαιτίας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC περιβαλλόμενη από μόρια νερού.

5.5 Επίδραση βιοδραστικών μορίων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες

Όπως προαναφέρθηκε, οι φαρμακολογικές ιδιότητες πολλών φαρμάκων σχετίζονται με την ικανότητά τους να εισέρχονται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Η θέση που λαμβάνει ένα μόριο μέσα στη διπλοστιβάδα εξαρτάται όχι μόνο από τη διαλυτότητά του στο υδρόφοβο περιβάλλον, αλλά και από τη δυνατότητα προσέγγισης των πολικών του τμημάτων στη διπλοστιβάδα. Αυτό οφείλεται στη διάταξη των υδρογονικών αλυσίδων της διπλοστιβάδας. Όταν ένα μόριο τοποθετηθεί κοντά στις πολικές κεφαλές των υδρογονικών αλυσίδων όπου δεν υπάρχει μεγάλη δυνατότητα

κίνησης, θα προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στις ιδιότητες της διπλοστιβάδας, ενώ αντίστοιχα εάν το μόριο τοποθετηθεί κοντά στη λιγότερο οργανωμένη περιοχή της διπλοστιβάδας (δηλαδή στο τελικό μεθυλενικό άκρο), θα προκαλέσει μικρότερες μεταβολές. Συνεπώς τα πολικά τμήματα του μορίου προσανατολίζονται κοντά στην πολική κεφαλή, εφόσον οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των υπόλοιπων τμημάτων του μορίου του επιτρέπουν να διευθετηθεί κατάλληλα [34,38].

Όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι μεταβολές που προκαλούνται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες εξαιτίας της εισδοχής φαρμακευτικών μορίων είναι αποτέλεσμα του τρόπου κατανομής αυτών μέσα στις διπλοστιβάδες και συγκεκριμένα:

- Της διαμόρφωσης που λαμβάνουν τα μόρια εντός των λιποειδών διπλοστιβάδων, η οποία καθορίζεται από τα στερεοηλεκτρονικά χαρακτηριστικά τους.
- Του προσανατολισμού των υδρόφοβων και υδρόφιλων τμημάτων τους.
- Των αλληλεπιδράσεών τους με τα φωσφολιπίδια.

Κεφάλαιο 6 – Διαμορφωτική Ανάλυση δύο C2-υποκατεστημένων πυρρολο[2,3-f]κινολινών

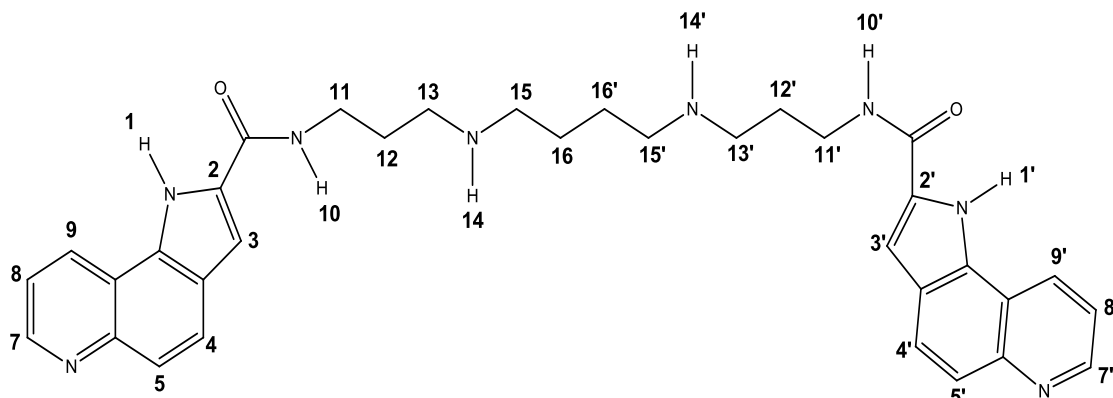
6.1 Πειράματα Φασματοσκοπίας NMR

6.1.1 Παράμετροι φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν για κάθε ένωση, με διάλυση 2 mg ένωσης σε 0.75 ml δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (d₆-DMSO). Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί σωληνίσκοι NMR 5 mm μεγάλης ακρίβειας (high precision). Τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο 800 MHz της εταιρίας Varian με χρήση αισθητήρα 5 mm συντονιζόμενου σε ευρεία ζώνη συχνοτήτων. Το πείραμα δύο διαστάσεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν ευαίσθητο στη φάση (phase sensitive). Έγινε χρήση διαφόρων χρόνων μίξεως 75-800 ms για να διαπιστωθεί η επαναληπτικότητα των σημάτων NOE και να αποφευχθούν τυχόν σήματα διάχυσης των σπιν (spin diffusion).

Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών και των ρουτινών της εταιρίας Varian και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό mNova, έκδοση 7.0, της εταιρείας Mestrelab Research. Οι ολοκληρώσεις των κορυφών καθώς επίσης και οι κορυφές συσχετισμού στα φάσματα δύο διαστάσεων υπολογίστηκαν με τις μεθόδους ολοκλήρωσης του προγράμματος mNova.

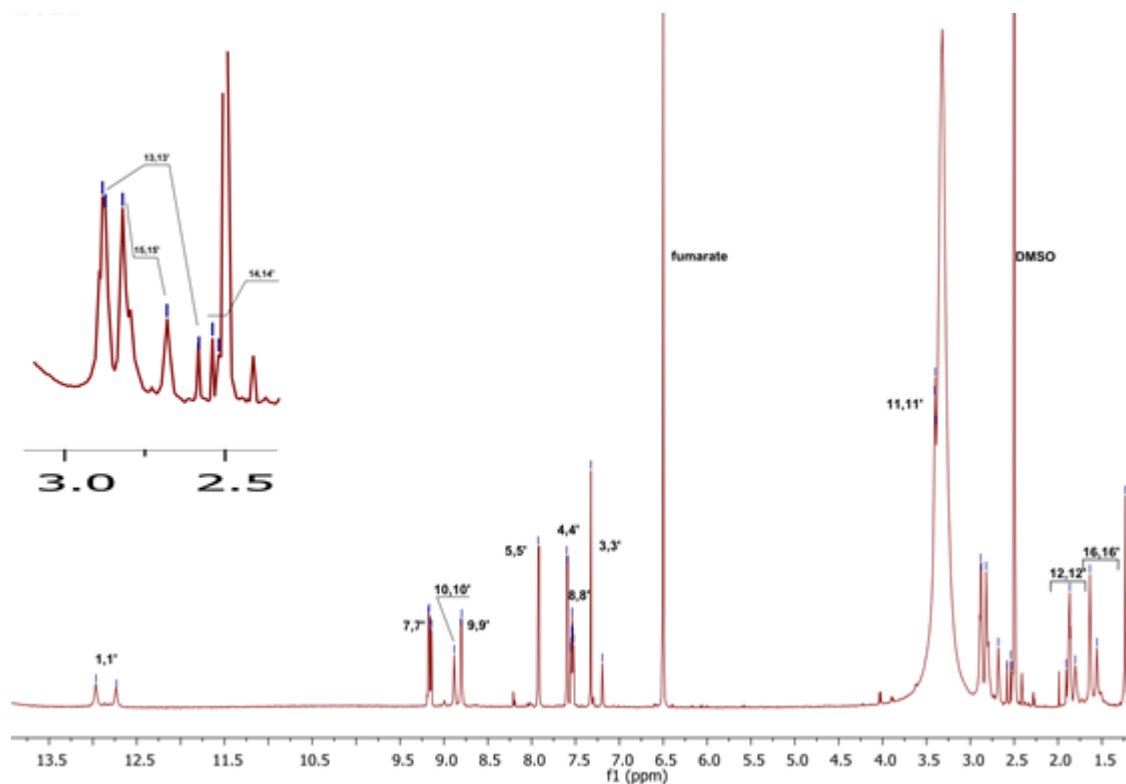
6.1.2 Μελέτη της ένωσης 5e με χρήση Φασματοσκοπίας NMR σε διαλύτη DMSO



Εικόνα 6.1: Χημική δομή της ένωσης 5e.

Η επιλογή λήψης των φασμάτων NMR της ένωσης σε DMSO έγινε με βάση το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο διαλύτη η ένωση 5e είναι αφενός πλήρως διαλυτή και αφετέρου το DMSO δεν εμφανίζει κορυφές στην αρωματική περιοχή. Επίσης, οι κορυφές του DMSO που εμφανίζονται στην αλειφατική περιοχή δεν αλληλοεπικαλύπτονται με αυτές της 5e.

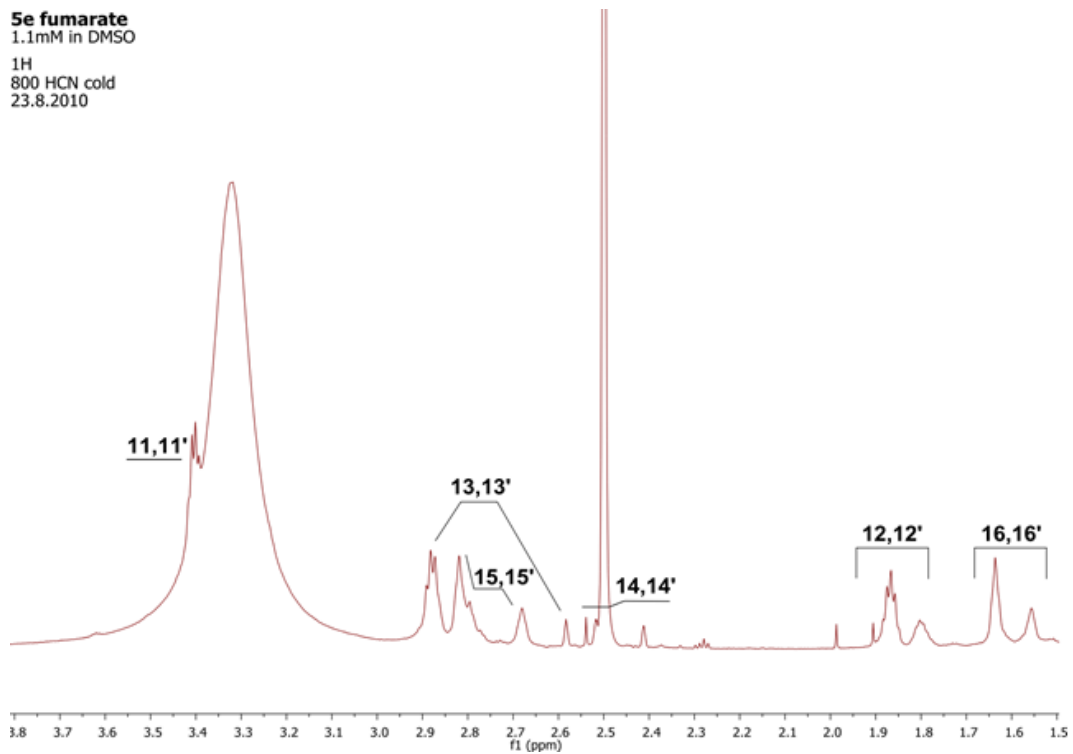
Στην εικόνα 6.2 που ακολουθεί παρατίθεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 5e.



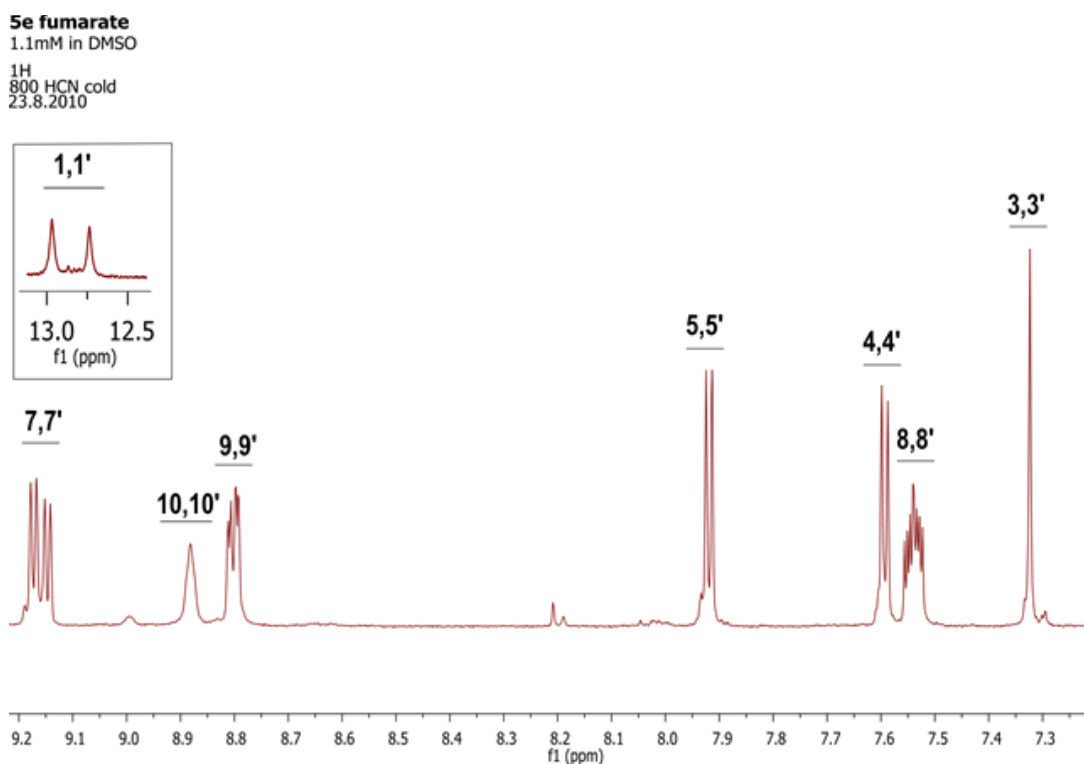
Εικόνα 6.2: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5e** σε διαλύτη DMSO.

Για την πλήρη ταυτοποίηση των κορυφών της ένωσης έγινε χρήση συνδυασμού φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων. Όπως παρατηρείται και από την εικόνα 6.2, το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5e** αποτελείται από δυο περιοχές. Στην πρώτη, η οποία εντοπίζεται σε υψηλές χημικές μετατοπίσεις (> 6.5 ppm), εμφανίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων του αρωματικού συστήματος της ένωσης, ενώ στην δεύτερη η οποία εντοπίζεται σε χαμηλές μετατοπίσεις (1.5 – 3.5 ppm) εμφανίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας της ένωσης.

Στις εικόνες 6.3 και 6.4 που ακολουθούν παρατίθενται αντίστοιχα η αλειφατική και η αρωματική περιοχή της ένωσης.



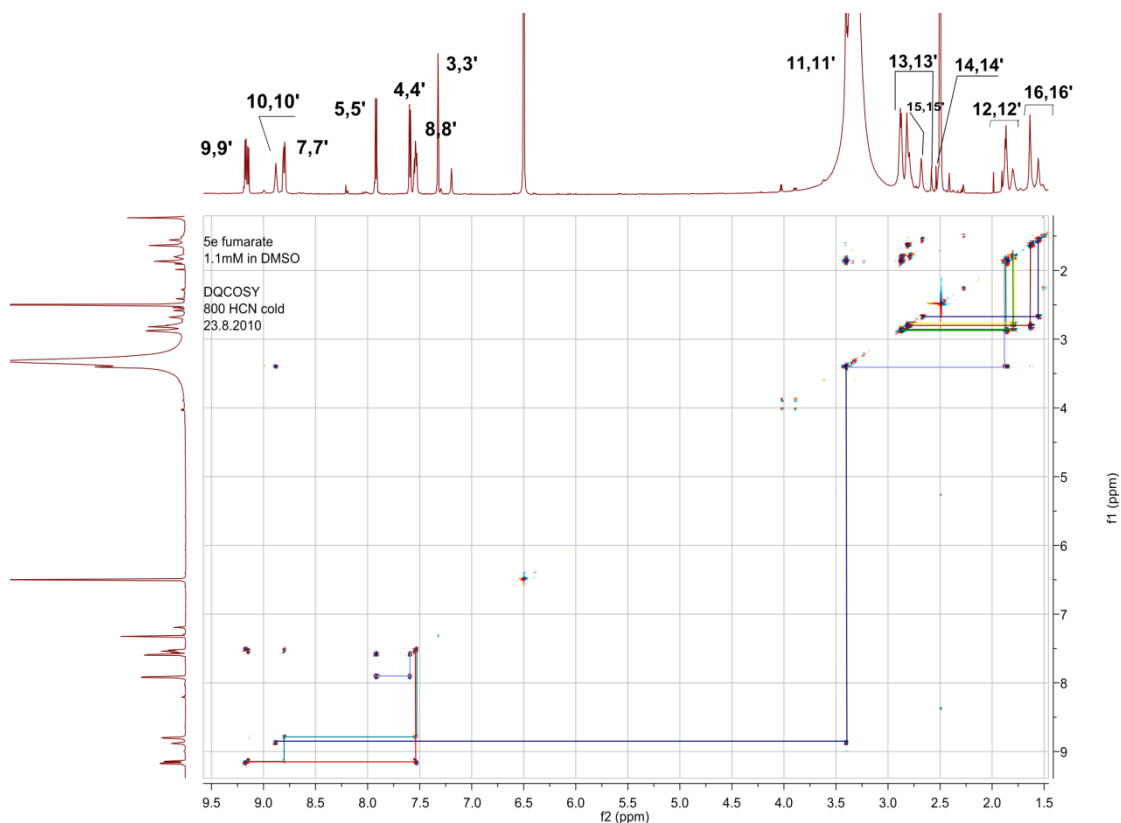
Εικόνα 6.3: Αλειφατική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **5e**.



Εικόνα 6.4: Αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **5e**.

Η ταυτοποίηση των κορυφών της ένωσης ξεκίνησε αρχικά από την αρωματική περιοχή (Εικόνα 6.4) και συγκεκριμένα από τον εντοπισμό των κορυφών των πρωτονίων NH των πενταμελών δακτυλίων 1,1' στην υψηλότερη περιοχή συντονισμού στα 12,97 και 12,74 ppm. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των πρωτονίων 7,7' στα 9,15 και 9,17 ppm. Πρόκειται για δυο διπλές κορυφές (d), καθώς τα δυο αυτά πρωτόνια είναι χημικώς μη ισοδύναμα μεταξύ τους. Επίσης, επειδή βρίσκονται κοντά στο άζωτο θα έχουν και τη μεγαλύτερη αποπροστασία. Με τη χρήση του φάσματος δυο διαστάσεων 2D COSY της ένωσης (Εικόνα 6.5) παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτονίων 7,7' με τα 8,8' που εμφανίζουν μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 7,54 ppm και ακολούθως ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 9,9' που εμφανίζουν μια διπλή-διπλών κορυφή (dd) στα 8,80 ppm.

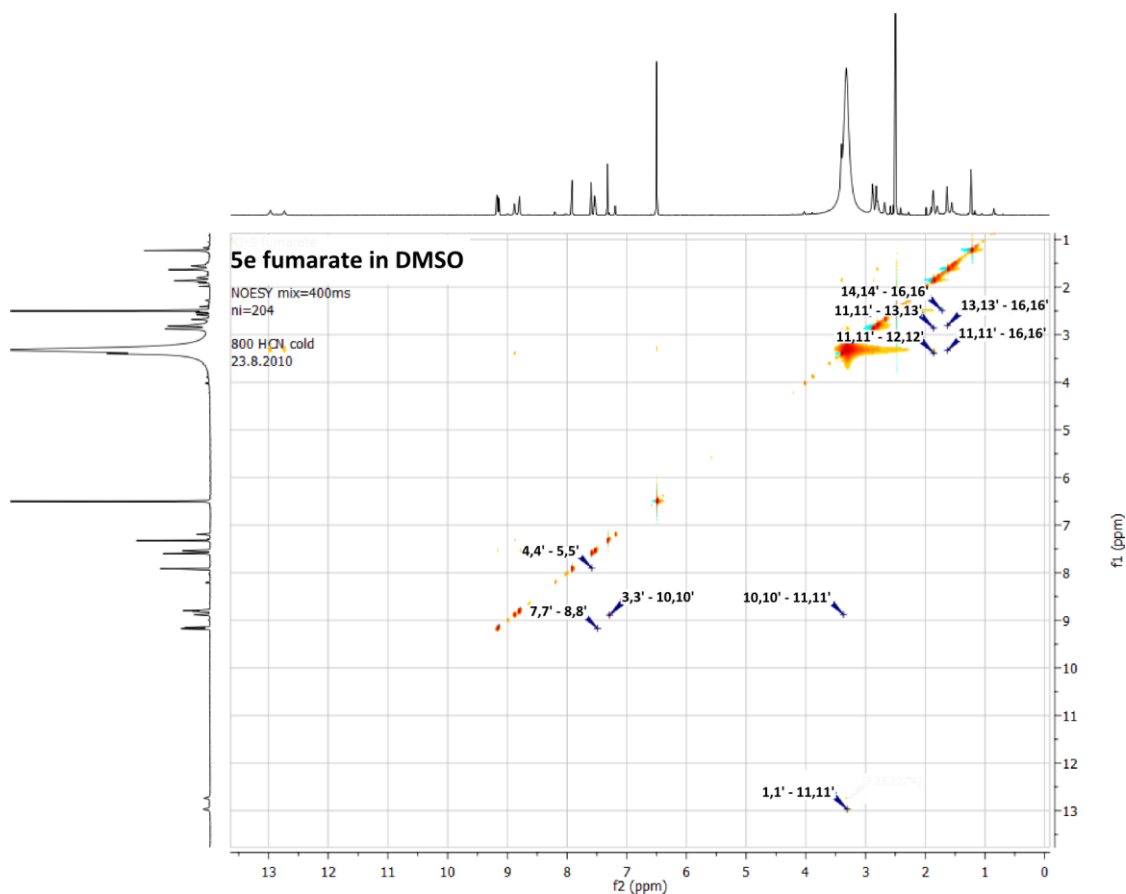
Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των πρωτονίων 4,4' και 5,5' οι οποίες εμφανίζονται στα 7,59 και 7,92 ppm αντίστοιχα και συσχετίζονται μόνο μεταξύ τους. Επίσης λόγω περισσότερο εγγύτητας προς το άζωτο αναμένεται να έχει μεγαλύτερη χημική μετατόπιση. Τέλος, τα πρωτόνια 3,3' εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή, η οποία δεν αλληλεπιδρά με καμία άλλη και παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 7.32 ppm.



Εικόνα 6.5: Φάσμα 2D COSY της ένωσης **5e** σε διαλύτη DMSO.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση των πρωτονίων της αλειφατικής περιοχής του μορίου έπαιξε ο εντοπισμός των πρωτονίων 10,10', τα οποία εμφανίζουν μια απλή κορυφή στα 8.88 ppm. Από την κορυφή συσχέτισης αυτών των πρωτονίων που εμφανίζεται στο φάσμα 2D COSY (Εικόνα 6.5), ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 11,11' τα οποία εμφανίζουν μια πολλαπλή κορυφή στα 3.39-3.42 ppm. Στη συνέχεια, από το ίδιο φάσμα ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 12,12' τα οποία εμφανίζουν πενταπλές κορυφές (quin) στα 1.87 και 1.80 ppm και τα πρωτόνια 13,13' τα οποία εμφανίζουν πεπλατυμένες κορυφές (br) στα 2.88 και 2.58 ppm.

Στη συνέχεια από τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα 2D COSY ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 14,14' που εμφανίζουν απλές κορυφές (s) στα 2.54 και 2.52 ppm, τα πρωτόνια 15,15' που εμφανίζουν πεπλατυμένες κορυφές (br) στα 2.81 και 2.68 ppm και τελευταία τα πρωτόνια 16,16', τα οποία εμφανίζουν πεπλατυμένες κορυφές (br) σε χαμηλότερες τιμές ppm (συγκεκριμένα στα 1.64 και 1.56 ppm), καθώς είναι τα πλέον προστατευμένα στην αλειφατική περιοχή του μορίου.



Εικόνα 6.6: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης **5e** σε διαλύτη DMSO.

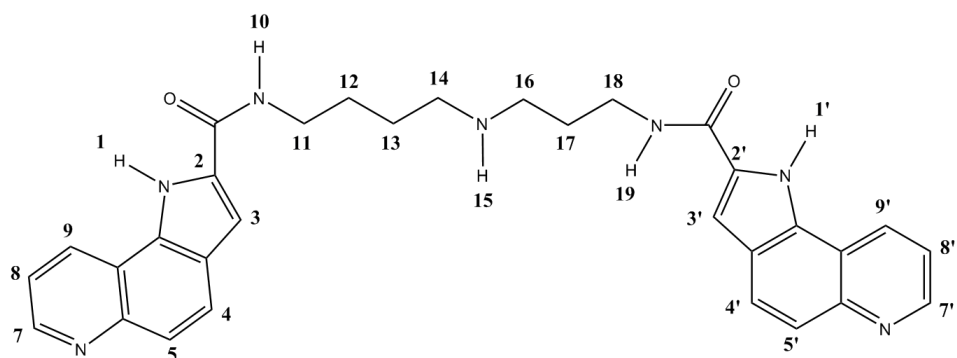
Μετά την πλήρη ταυτοποίηση των πρωτονίων της ένωσης **5g** εξετάστηκε το αντίστοιχο φάσματα 2D NOESY (Εικόνα 6.6) για τον εντοπισμό κρίσιμων σημάτων συσχετισμού. Ως σήματα συσχετισμού, αναγνωρίζονται εκείνα τα πρωτόνια τα οποία έχουν εγγύτητα στο χώρο. Στην Εικόνα 6.6 παρουσιάζονται τα σήματα συσχετισμού που δίνουν τα πρωτόνια της ένωσης **5e**.

Στον Πίνακα 6.1 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η πλήρης ταυτοποίηση των πρωτονίων της ένωσης **5e**.

Πίνακας 6.1: ^1H NMR Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ένωσης **5e** σε διαλύτη DMSO.

| Πρωτόνιο | Χημική Μετατόπιση (ppm) | Πλήθος Πρωτονίων | Πολλαπλότητα Κορυφών (J) |
|---------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| 1, 1' | 12.97 | 1 | m |
| | 12.74 | 1 | m |
| 3, 3' | 7.32 | 2 | s |
| 4, 4' | 7.59 | 2 | d (J=8.8 Hz) |
| 5, 5' | 7.92 | 2 | d (J=8.9 Hz) |
| 7, 7' | 9.17 | 1 | d (J=8.4 Hz) |
| | 9.15 | 1 | d (J=8.2 Hz) |
| 8, 8' | 7.54 | 2 | m |
| 9, 9' | 8.80 | 2 | dd (J=10.8, 3.6 Hz) |
| 10, 10' | 8.88 | 2 | s |
| 11, 11' | 3.39 - 3.42 | 4 | m |
| 12, 12' | 1.87 | 2 | quin |
| | 1.80 | 2 | quin |
| 13, 13' | 2.88 | 3 | br |
| | 2.58 | 1 | br |
| 14, 14' | 2.54 | 1 | s |
| | 2.52 | 1 | s |
| 15, 15' | 2.81 | 3 | br |
| | 2.68 | 1 | br |
| 16, 16' | 1.64 | 2 | br |
| | 1.56 | 2 | br |
| Φουμαρικό οξύ | 6.50 | 4 | s |

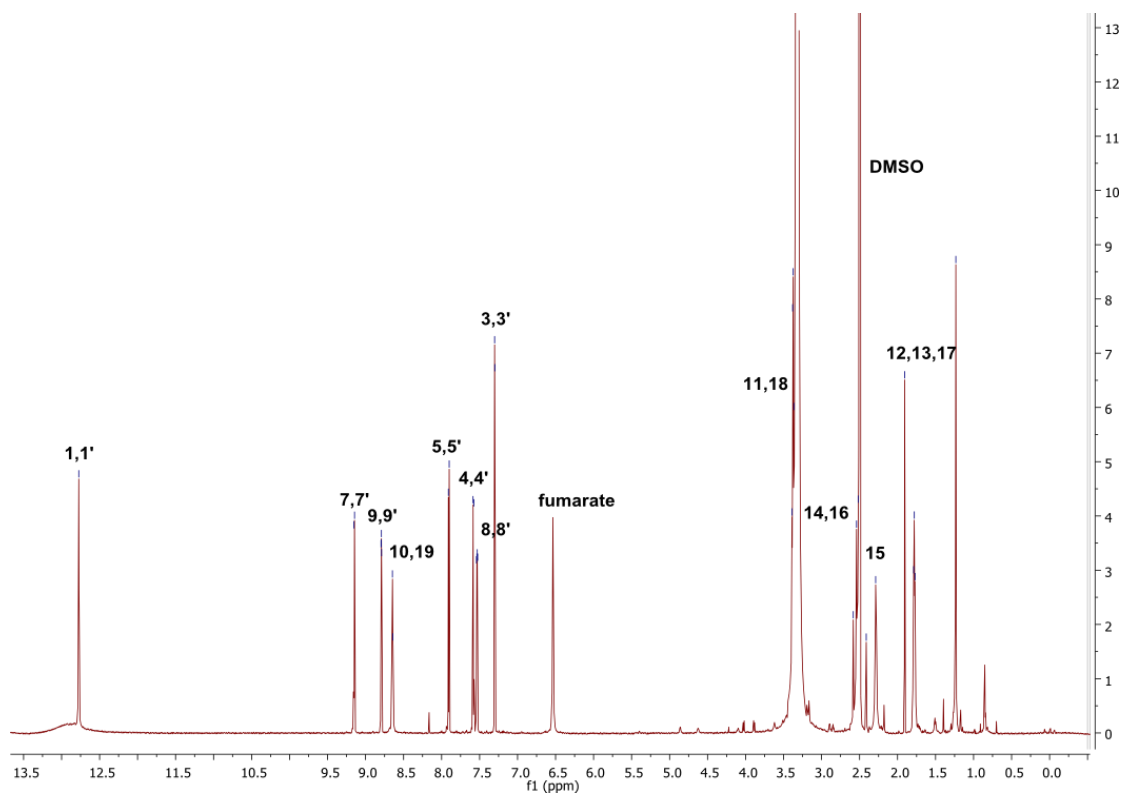
6.1.3 Μελέτη της ένωσης 5g με Φασματοσκοπία NMR σε διαλύτη DMSO



Εικόνα 6.7: Χημική δομή της ένωσης **5g**

Όπως προαναφέρθηκε για την ένωση **5e**, και στην ένωση **5g** η επιλογή λήψης των φασμάτων NMR της ένωσης σε DMSO έγινε με βάση το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο διαλύτη η ένωση **5g** είναι αφενός πλήρως διαλυτή και αφετέρου το DMSO δεν εμφανίζει κορυφές στην αρωματική περιοχή. Επίσης, οι κορυφές του DMSO που εμφανίζονται στην αλειφατική περιοχή δεν αλληλοεπικαλύπτονται με αυτές της **5g**.

Στην εικόνα 6.8 που ακολουθεί παρατίθεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **5e**.



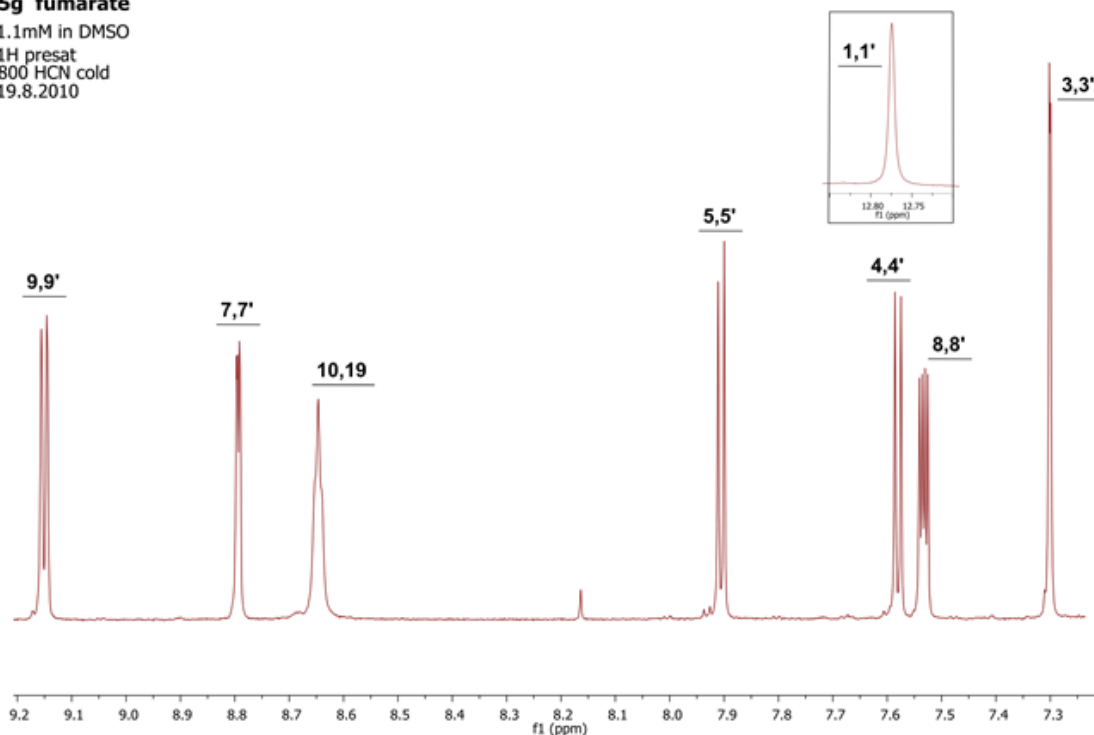
Εικόνα 6.8: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5g** σε διαλύτη DMSO.

Για την πλήρη ταυτοποίηση των κορυφών της ένωσης έγινε χρήση συνδυασμού φασμάτων NMR μιας και δυο διαστάσεων. Όπως παρατηρείται και από την εικόνα 6.8, το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5g** αποτελείται από δυο περιοχές. Στην πρώτη, η οποία εντοπίζεται σε υψηλές μετατοπίσεις (> 6.5 ppm), εμφανίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων του αρωματικού συστήματος της ένωσης, ενώ στην δεύτερη η οποία εντοπίζεται σε χαμηλές μετατοπίσεις (1.5 – 3.5 ppm) εμφανίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας της ένωσης.

Στις εικόνες 6.9 και 6.10 που ακολουθούν παρατίθενται αντίστοιχα η αλειφατική και η αρωματική περιοχή της ένωσης.

5g fumarate

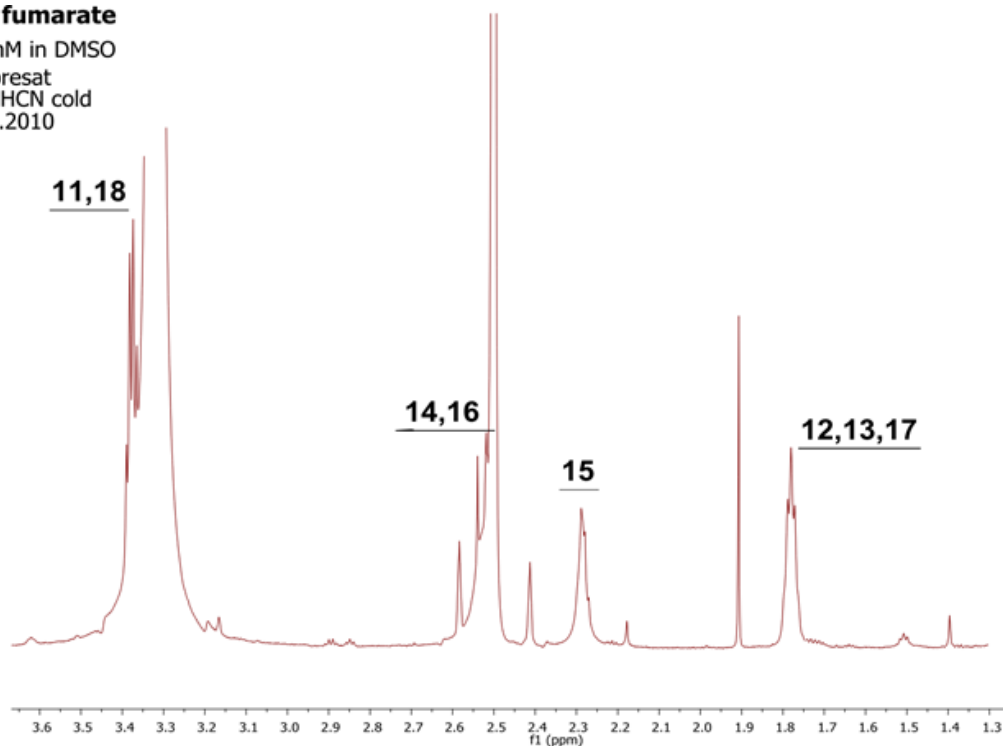
1.1mM in DMSO
1H presat
800 HCN cold
19.8.2010



Εικόνα 6.9: Αλειφατική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **5g**.

5g fumarate

1.1mM in DMSO
1H presat
800 HCN cold
19.8.2010

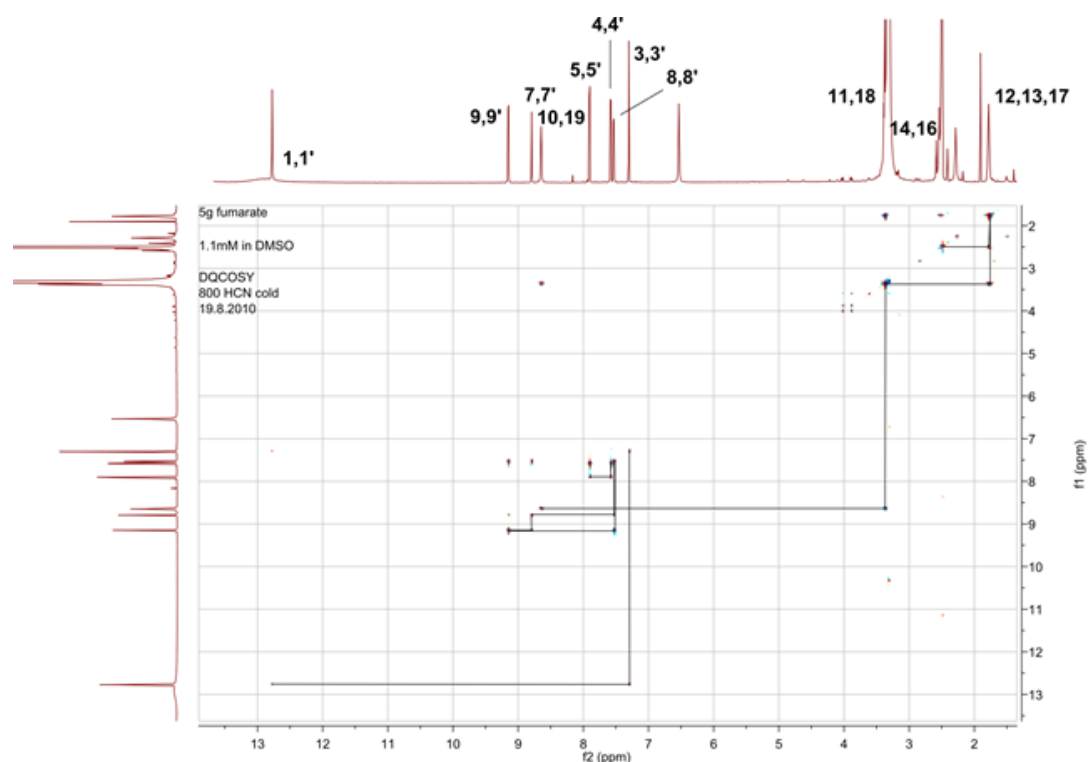


Εικόνα 6.10: Αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **5g**.

Η ταυτοποίηση των κορυφών της ένωσης **5g** ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στην ένωση **5e**. Αρχικά, μελετώντας την αρωματική περιοχή (Εικόνα 6.10)

εντοπίστηκαν οι κορυφές των πρωτονίων NH των πενταμελών δακτυλίων 1,1' στην υψηλότερη περιοχή συντονισμού στα 12,77 ppm. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των πρωτονίων 7,7' στα 8,79 ppm. Πρόκειται για μια κορυφή διπλή-διπλών (dd). Με τη χρήση του φάσματος δυο διαστάσεων 2D COSY της ένωσης (Εικόνα 6.11) παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτονίων 7,7' με τα 8,8' που εμφανίζουν μια κορυφή διπλή-διπλών (dd) στα 7,53 ppm και ακολούθως ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 9,9' που εμφανίζουν μια διπλή κορυφή (d) στα 9,15 ppm.

Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των πρωτονίων 4,4' και 5,5' οι οποίες εμφανίζονται στα 7,58 ppm (διπλή κορυφή, d) και 7,91 ppm (διπλή κορυφή, d) αντίστοιχα και συσχετίζονται μόνο μεταξύ τους. Τέλος, τα πρωτόνια 3,3' εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή, η οποία δεν αλληλεπιδρά με καμία άλλη και παρουσιάζει χημική μετατόπιση στα 7,30 ppm.

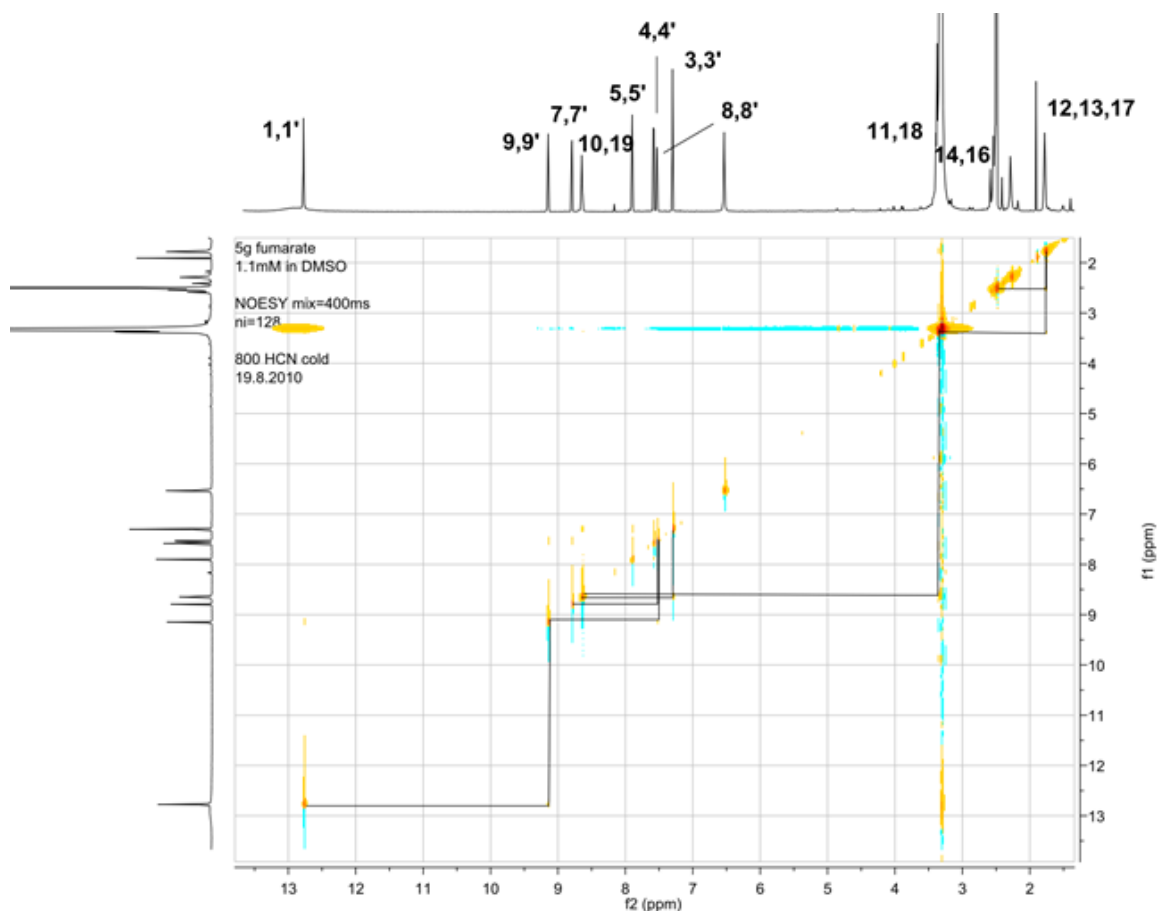


Εικόνα 6.11: Φάσμα 2D COSY της ένωσης **5g** σε διαλύτη DMSO.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση των πρωτονίων της αλειφατικής περιοχής της ένωσης **5g** έπαιξε ο εντοπισμός των πρωτονίων 10,19, τα οποία εμφανίζουν μια πεπλατυμένη απλή κορυφή (bs) στα 8,64 ppm. Από την κορυφή συσχέτισης αυτών των πρωτονίων που εμφανίζεται στο φάσμα 2D COSY (Εικόνα 6.11),

ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 11,18 τα οποία εμφανίζουν μια πολλαπλή κορυφή στα 3,38 – 3,41 ppm. Στη συνέχεια, από το ίδιο φάσμα ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια 12, 13, 17 τα οποία εμφανίζουν πενταπλή κορυφή (quin) στα 1,80 ppm και τα πρωτόνια 14,16 τα οποία εμφανίζουν απλές κορυφές στα 2,58, 2,54 και 2,52 ppm. Τέλος, ταυτοποιήθηκε το πρωτόνιο 15, το οποίο εμφανίζει απλή κορυφή στα 2,29 ppm.

Μετά την πλήρη ταυτοποίηση των πρωτονίων της ένωσης **5g** εξετάστηκε το αντίστοιχο φάσμα 2D NOESY (Εικόνα 6.12) για τον εντοπισμό κρίσιμων σημάτων συσχετισμού. Ως σήματα συσχετισμού, αναγνωρίζονται εκείνα τα πρωτόνια τα οποία έχουν εγγύτητα στο χώρο. Στην Εικόνα 6.12 παρουσιάζονται τα σήματα συσχετισμού που δίνουν τα πρωτόνια της ένωσης **5g**.



Εικόνα 6.12: Φάσμα 2D NOESY της ένωσης **5g** σε διαλύτη DMSO.

Στον Πίνακα 6.2 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η πλήρης ταυτοποίηση των πρωτονίων της ένωσης **5g**.

Πίνακας 6.2: ^1H NMR Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της ένωσης **5g** σε διαλύτη DMSO.

| Πρωτόνιο | Χημική Μετατόπιση (ppm) | Πλήθος Πρωτονίων | Πολλαπλότητα Κορυφών (J) |
|---------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| 1, 1' | 12.77 | 2 | s |
| 3, 3' | 7.30 | 2 | s |
| 4, 4' | 7.58 | 4 | d (J=8.8 Hz) |
| 5, 5' | 7.91 | 2 | d (J=8.8 Hz) |
| 7, 7' | 8.79 | 2 | dd(J=4.2, 1.4 Hz) |
| 8, 8' | 7.53 | 2 | dd (J=8.3, 4.2 Hz) |
| 9, 9' | 9.15 | 2 | d (J=8.1 Hz) |
| 10, 19 | 8.64 | 2 | bs (J=4.8 Hz) |
| 11, 18 | 3.38 - 3.41 | 4 | m |
| 12, 13, 17 | 1.78 | 6 | quin |
| 14, 16 | 2.58 | 1 | s |
| | 2.54 | 1 | s |
| | 2.52 | 2 | s |
| 15 | 2.29 | 1 | s |
| Φουμαρικό οξύ | 6.50 | 4 | s |

6.1.4 Παρατηρήσεις από τα πειραματικά δεδομένα NMR

Κατ' αρχήν επιτεύχθηκε πλήρης ταυτοποίηση των πρωτονίων για τις δύο ενώσεις που μελετήθηκαν. Από την αποτίμηση των φασμάτων NMR των ενώσεων **5e** και **5g** προέκυψε ότι ενώ η ένωση **5e** έχει μοριακή συμμετρία, τα πρωτόνιά της δεν είναι μαγνητικά ισοδύναμα και αναμένεται ότι λαμβάνουν διαφορετικές διαμορφώσεις.

Επίσης μετά από την ενδελεχή εξέταση των φασμάτων NOE, εξήχθη το συμπέρασμα ότι και τα δύο μόρια αναμένεται ότι θα λαμβάνουν εκτεταμένες διαμορφώσεις, αφού δεν παρατηρήθηκαν σήματα συσχετισμού μακράς εμβέλειας (απομακρυσμένα δηλαδή χωρικά). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με χρήση πειραμάτων διαφόρων χρόνων μίξεων κατά το πείραμα 2D NOESY.

6.2 Μελέτη διαμορφωτικού χώρου ενώσεων υπό κενό με τη Μέθοδο Μοριακής Δυναμικής Υψηλής Θερμοκρασίας Ανόπτωσης (Simulated Annealing)

6.2.1 Σχεδιασμός και ελαχιστοποίηση 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 αλγόριθμων ελαχιστοποίησης ενέργειας Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descent), Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient) και Powell. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Tripos (termination: Gradient 0,01 kcal/mol, max iterations: 5000).

6.2.2 Πειραματική Μέθοδος

Για τη μελέτη του διαμορφωτικού χώρου των ενώσεων **5e** και **5g** υπό κενό, χρησιμοποιήθηκε Μοριακή Δυναμική και συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση της μοριακής τροχιάς με ανόπτωση (Simulated Annealing). Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και για τις δύο ενώσεις, η μέγιστη θερμοκρασία είχε την τιμή 2000 °K για χρονικό διάστημα 2000 fs και η ελάχιστη θερμοκρασία την τιμή 0 °K για χρονικό διάστημα 10000 fs. Επίσης επιλέχθηκε να γίνει επιπλέον ελαχιστοποίηση ενέργειας στο σύστημα πριν την είσοδο στο πείραμα προσομοίωσης μοριακής τροχιάς με ανόπτωση. Το πείραμα επαναλήφθηκε για το μέγιστο αριθμό κύκλων (100) με στόχο να προκύψουν 100 διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας για κάθε ένωση που μελετήθηκε. Για κάθε ένωση, εξετάστηκαν και οι 100 δομές για τον εντοπισμό των ενεργειακά χαμηλών διαμορφώσεων.

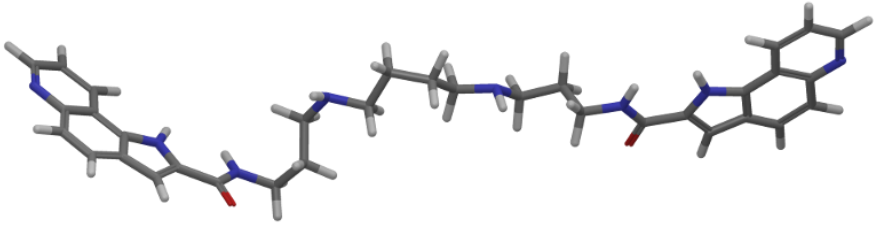
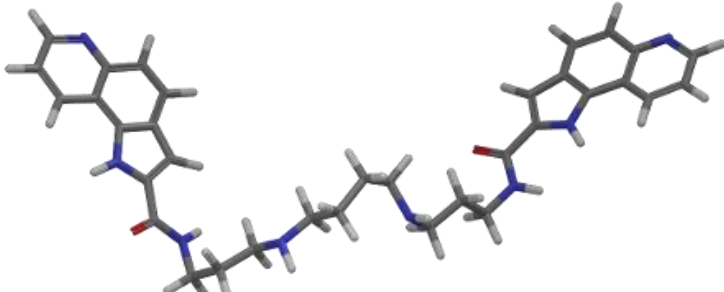
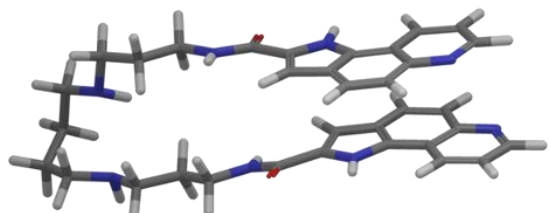
6.2.3 Προσομοίωση υπό κενό της ένωσης 5e

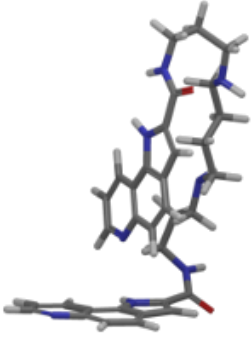
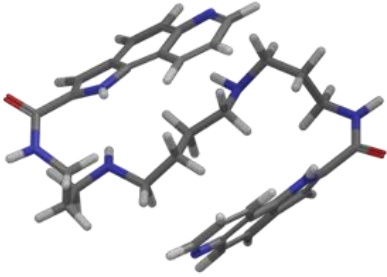
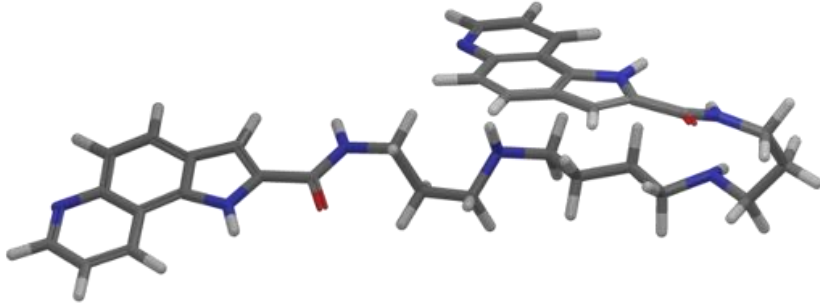
Αποτελέσματα

Μετά την ενδελεχή ανάλυση των 100 συνολικά πιθανών διαμορφώσεων που προέκυψαν, οι διαμορφώσεις κατατάχθηκαν σε έξι κατηγορίες ανάλογα με τον προσανατολισμό των αρωματικών συστημάτων ως προς την αλειφατική αλυσίδα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η δυναμική τους ενέργεια.

Στον πίνακα 6.3 που ακολουθεί, παρατίθενται οι κύριοι εκπρόσωποι αυτών των κατηγοριών, οι δυναμικές ενέργειές τους και ο αριθμός των δομών που αντιστοιχεί σε κάθε κατηγορία από τις 100 συνολικά που προέκυψαν.

Πίνακας 6.3: Κατηγορίες διαμορφώσεων της ένωσης **5e** μετά από προσομοίωση υπό κενό

| Κατηγορία Διαμορφώσεων | Δυναμική Ενέργεια (kcal/mol) |
|---|------------------------------|
| <p>A. Δομές με πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση</p>  | -208.104 |
| Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 6 από τις 100 δομές που προέκυψαν. | |
| <p>B. Δομές με σχεδόν εκτεταμένη διαμόρφωση</p>  | -252.915 |
| Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 23 από τις 100 δομές που προέκυψαν | |
| <p>Γ. Δομές με διαμόρφωση που παρουσιάζει π-π stacking</p>  | -94.523 |
| Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 29 από τις 100 δομές που προέκυψαν | |
| <p>Δ. Δομές με διαμόρφωση T.</p> | -165.452 |

| | |
|--|------------------------|
|  | |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 16 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |
| <p>Ε. Δομές με διαμόρφωση S.</p>  | <p>-47.940</p> |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 10 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |
| <p>ΣΤ. Δομές με ποκίλες διαμορφώσεις</p>  | <p>-139.501</p> |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 14 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |

Όπως παρατηρείται και από τον πίνακα 6.3, κάθε κατηγορία διαμορφώσεων εμφανίζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία A, οι διαμορφώσεις είναι πλήρως εκτεταμένες και παρουσιάζουν χαμηλή δυναμική ενέργεια.

- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία Β, χαρακτηριστική είναι η σχετική σύγκλιση στο χώρο των αρωματικών περιοχών. Επίσης οι δομές της κατηγορίας Β, εμφάνισαν τις χαμηλότερες δυναμικές ενέργειες.
- Χαρακτηριστικό των ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία Γ είναι η στίβαξη (stacking) των αρωματικών δακτυλίων ώστε να επιτυγχάνονται π-π αλληλεπιδράσεις. Οι δυναμικές ενέργειες που εμφανίζονται σε αυτήν την κατηγορία είναι ελαφρά μεγαλύτερες.
- Χαρακτηριστικό των δομών της κατηγορίας Δ είναι η στίβαξη των αρωματικών δακτυλίων με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι κάθετοι μεταξύ τους. Η στίβαξη αυτή είναι γνωστό ότι δημιουργεί ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις.
- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία Ε, παρατηρείται διαμόρφωση τύπου S. Χαρακτηριστικό αυτών των δομών είναι ότι εμφανίζουν τις μεγαλύτερες δυναμικές ενέργειες.
- Στην κατηγορία ΣΤ ανήκουν οι δομές που εμφανίζουν «ποικίλες διαμορφώσεις». Ενώ το μεγαλύτερο μέρος της ένωσης είναι εκτεταμένο, παρατηρείται αναδίπλωση του ενός αρωματικού άκρου και τοποθέτησή του σε χωρική εγγύτητα με την αλειφατική αλυσίδα.

Συμπεράσματα

Από τις παραπάνω προτεινόμενες διαμορφώσεις, αυτές των κατηγοριών Γ, Δ, Ε και ΣΤ απορρίπτονται, καθώς θα αναμενόταν στα φάσματα δύο διαστάσεων 2D-NOESY να εμφανίζονται περισσότερα σήματα αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, στις διαμορφώσεις της κατηγορίας Γ όπου παρατηρείται π-π στίβαξη θα αναμένονταν συσχετισμοί στο χώρο μεταξύ των δύο αρωματικών συστημάτων. Στις διαμορφώσεις της κατηγορίας Δ όπου παρατηρείται Τ στοίβαξη εκτός από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αρωματικών συστημάτων θα αναμένονταν και συσχετισμοί στο χώρο μεταξύ κάποιων αρωματικών πρωτονίων και της αλειφατικής αλυσίδας. Στις διαμορφώσεις των κατηγοριών Ε και ΣΤ, θα αναμένονταν συσχετισμοί στο χώρο μεταξύ κάποιων αρωματικών πρωτονίων και της αλειφατικής

αλυσίδας, αφού και στις δυο περιπτώσεις οι αρωματικοί δακτύλιοι βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα με την αλειφατική αλυσίδα.

Οι δυο υπόλοιπες προτεινόμενες διαμορφώσεις (κατηγορίες A και B), μπορούν να εξηγήσουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι ενέργειες αυτών των διαμορφώσεων είναι χαμηλές και επομένως ευνοϊκές. Οι κατηγορίες αυτές αποτελούν το 29% των διαμορφώσεων που έχουν ληφθεί κατά την προσομοίωση της τροχιάς του μορίου.

Στο σχήμα 6.1 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης **5e** ανά κατηγορία σε σχέση με το συνολικό αριθμό των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα.



Σχήμα 6.1: Κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης **5e** ανά κατηγορία επί του συνολικού αριθμού των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα.

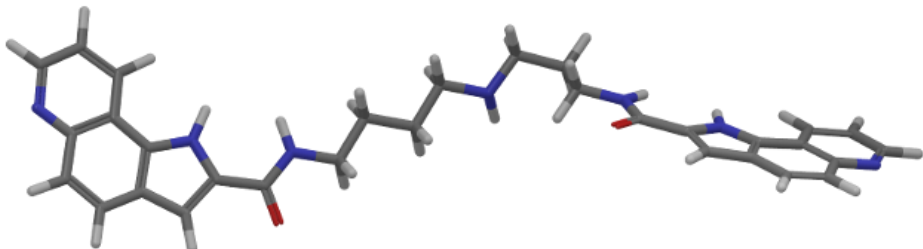
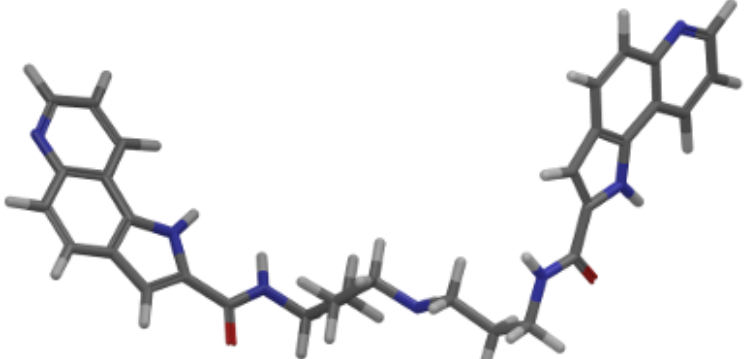
6.2.4 Προσομοίωση υπό κενό της ένωσης 5g

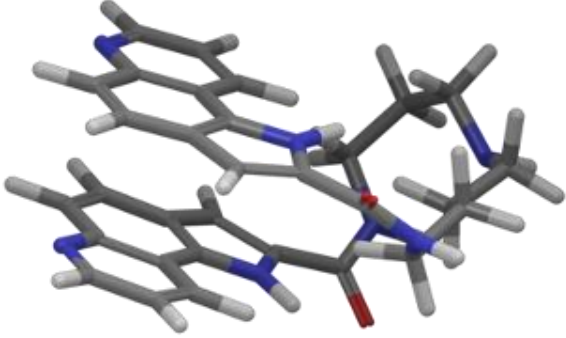
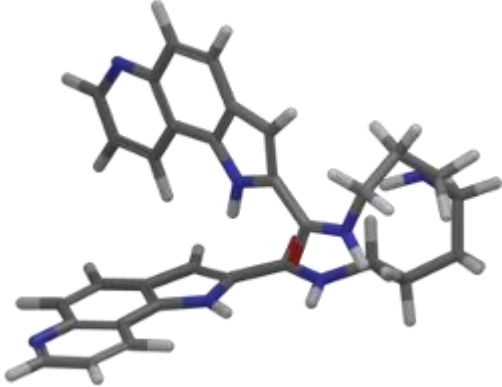
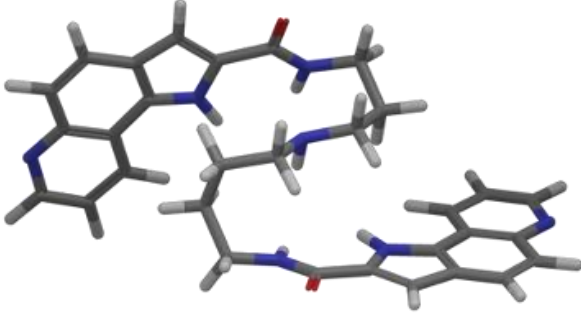
Αποτελέσματα

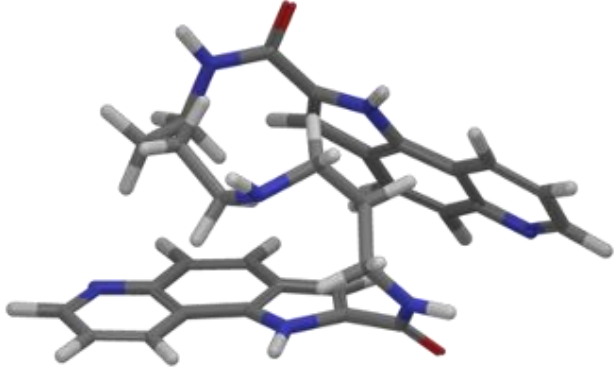
Μετά την διεξοδική ανάλυση των 100 συνολικά πιθανών διαμορφώσεων που προέκυψαν για την ένωση **5g**, οι διαμορφώσεις κατατάχθηκαν σε έξι κατηγορίες ανάλογα με τον προσανατολισμό των αρωματικών συστημάτων ως προς την αλειφατική αλυσίδα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η δυναμική τους ενέργεια.

Στον πίνακα 6.4 που ακολουθεί, παρατίθενται οι κύριοι εκπρόσωποι αυτών των κατηγοριών, οι δυναμικές ενέργειές τους και ο αριθμός των δομών που αντιστοιχεί σε κάθε κατηγορία από τις 100 συνολικά που προέκυψαν.

Πίνακας 6.4: Κατηγορίες διαμορφώσεων της ένωσης **5g** μετά από προσομοίωση υπό κενό

| Κατηγορία Διαμορφώσεων | Δυναμική Ενέργεια (kcal/mol) |
|---|------------------------------|
| A. Δομές με πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση  | -234.279 |
| Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 5 από τις 100 δομές που προέκυψαν. | |
| B. Δομές με σχεδόν εκτεταμένη διαμόρφωση  | -253.521 |
| Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 13 από τις 100 δομές που προέκυψαν | |

| | |
|--|------------------------|
| <p>Γ. Δομές με διαμόρφωση που παρουσιάζει π-π stacking</p>  | <p>-76.307</p> |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 55 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |
| <p>Δ. Δομές με διαμόρφωση T.</p>  | <p>-163.764</p> |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 6 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |
| <p>Ε. Δομές με διαμόρφωση S.</p>  | <p>-44.996</p> |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 11 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |
| <p>ΣΤ. Δομές με ποκίλες διαμορφώσεις</p> | <p>-155.463</p> |

| | |
|---|--|
|  | |
| <p>Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν 10 από τις 100 δομές που προέκυψαν</p> | |

Όπως παρατηρείται και από τον πίνακα 6.4, κάθε κατηγορία διαμορφώσεων εμφανίζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία Α, οι διαμορφώσεις είναι πλήρως εκτεταμένες και παρουσιάζουν χαμηλή δυναμική ενέργεια.
- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία Β, χαρακτηριστική είναι η σχετική σύγκλιση στο χώρο των αρωματικών περιοχών. Όπως και στην περίπτωση της ένωσης **5e**, οι δομές της κατηγορίας Β εμφάνισαν τις χαμηλότερες δυναμικές ενέργειες.
- Χαρακτηριστικό των ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία Γ είναι η στίβαξη των αρωματικών δακτυλίων ώστε να επιτυγχάνονται π-π αλληλεπιδράσεις. Στη συγκεκριμένη κατηγορία διαμορφώσεων ανήκει το μεγαλύτερο ποσοστό των δομών που προέκυψαν από την προσομοίωση της ένωσης **5g**. Όλες οι διαμορφώσεις αυτής της κατηγορίας εμφάνισαν υψηλές δυναμικές ενέργειες. Η δομή που απεικονίζεται στον πίνακα είναι αυτή με τη χαμηλότερη δυναμική ενέργεια.
- Χαρακτηριστικό των δομών της κατηγορίας Δ είναι η στίβαξη των αρωματικών δακτυλίων με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι κάθετοι μεταξύ τους. Η στίβαξη αυτή είναι γνωστό ότι δημιουργεί ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις.

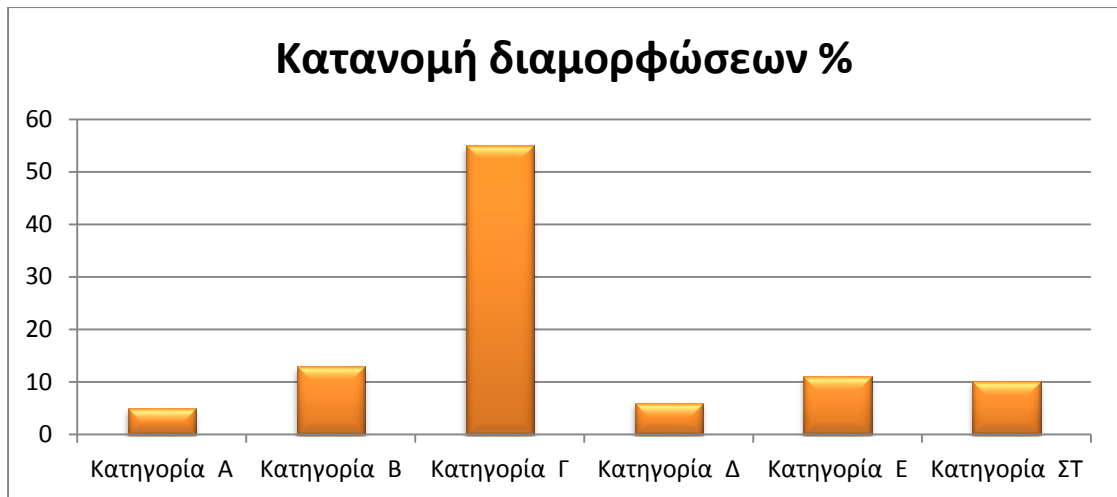
- Στις δομές που ανήκουν στην κατηγορία E, παρατηρείται διαμόρφωση τύπου S. Όπως και στην περίπτωση της ένωσης **5e**, χαρακτηριστικό αυτών των δομών είναι ότι εμφανίζουν τις μεγαλύτερες δυναμικές ενέργειες.
- Για την ένωση **5g**, στην κατηγορία ΣΤ ανήκουν οι δομές που εμφανίζουν διαμορφώσεις όπου η ένωση είναι αναδιπλωμένη και οι αρωματικοί δακτύλιοι βρίσκονται πολύ κοντά στην αλειφατική αλυσίδα.

Συμπεράσματα

Από τις παραπάνω προτεινόμενες διαμορφώσεις, αυτές των κατηγοριών Γ, Δ, E και ΣΤ απορρίπτονται, καθώς και στην περίπτωση της ένωσης **5g** θα αναμενόταν στα φάσματα δύο διαστάσεων 2D-NOESY να εμφανίζονται περισσότερα σήματα αλληλεπίδρασης για τους ίδιους λόγους όπως και στην περίπτωση της ένωσης **5e**. Οι δυο υπόλοιπες προτεινόμενες διαμορφώσεις (κατηγορίες A και B), μπορούν να εξηγήσουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι ενέργειες αυτών των διαμορφώσεων είναι χαμηλές και επομένως ευνοϊκές.

Είναι αξιοσημείωτο ότι και για αυτήν την ένωση, οι διαμορφώσεις που είναι πλήρως εκτεταμένες (κατηγορία A), παρουσιάζουν υψηλότερη ενέργεια συγκριτικά με τις διαμορφώσεις με λιγότερο εκτεταμένη διαμόρφωση (κατηγορία B). Οι κατηγορίες αυτές αποτελούν το 18% των διαμορφώσεων που έχουν ληφθεί κατά την προσομοίωση της τροχιάς του μορίου, 11% μικρότερο ποσοστό από αυτό της ένωσης **5e**.

Στο σχήμα 6.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης **5g** ανά κατηγορία σε σχέση με το συνολικό αριθμό των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα.



Σχήμα 6.2: Κατανομή των διαμορφώσεων της ένωσης **5g** ανά κατηγορία επί του συνολικού αριθμού των 100 διαμορφώσεων που προέκυψαν από το πείραμα.

6.3 Μελέτη διαμορφωτικού χώρου ενώσεων με τη Μέθοδο Μοριακής Δυναμικής σε περιβάλλον διαλύτη

6.3.1 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 5e σε υδατικό περιβάλλον και σε περιβάλλον διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO)

Για την περαιτέρω ανάλυση των διαμορφώσεων που λαμβάνει η ένωση **5e**, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, όπου η ένωση τοποθετήθηκε σε περιβάλλον διαλύτη, αρχικά σε νερό (H₂O) και στη συνέχεια σε DMSO. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα GROMACS. Ένα πλεονέκτημα του προγράμματος GROMACS είναι ότι απαιτεί λιγότερη υπολογιστική ισχύ, γεγονός που μειώνει κατά πολύ το συνολικό χρόνο διεξαγωγής ενός πειράματος μοριακής δυναμικής [40,41].

Δημιουργήθηκε κύβος προσομοίωσης, όπου τοποθετήθηκε η υπό μελέτη ένωση και στη συνέχεια πληρώθηκε με μόρια διαλύτη, και με αυτή τη μέθοδο δόθηκε η δυνατότητα παρακολούθησης των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με τα μόρια του διαλύτη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Πειραματική Διαδικασία

Για την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής με το πρόγραμμα GROMACS, απαιτήθηκε η δημιουργία των αρχείων τοπολογίας (topology files) για την ένωση **5e**. Η ένωση σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος JME editor και το αρχείο τοπολογίας της ένωσης δημιουργήθηκε από τον εξυπηρετητή (server) PRODRG που είναι διαθέσιμος στην ιστοσελίδα <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>[43].

Στη συνέχεια, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος GROMACS έκδοση 4.5.3, και τη χρήση του πεδίου δυνάμεων fmx. Αρχικά οριστήκαν οι διαστάσεις του κύβου προσομοίωσης 5 nm X 5 nm X 5 nm περιμετρικά της ένωσης και ο κύβος πληρώθηκε με τα μόρια του διαλύτη. Ορίστηκε σύστημα με κανονικοποιημένες συνθήκες NVT (σύστημα σταθερού αριθμού σωματιδίων, όγκου και θερμοκρασίας) στους 300 °K με περιοδικές οριακές συνθήκες (periodic boundary conditions), και η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή από το θερμοστάτη Berendsen [42]. Οι ηλεκτροστατικές

αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο πλέγματος σωματιδίων Ewald (PME μέθοδος) [44]. Οι αποστάσεις αποκοπής (cutoff distances) για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων Coulomb και Van der Waals ορίστηκαν στα 1.4 nm. Το στοιχειώδες κυβικό σύστημα όπου περιέχονταν η ένωση **5e** και τα μόρια του νερού παρουσίασε πυκνότητα 996 kg/m^3 , ενώ στην περίπτωση επιδιалύτωσης με DMSO 1160 kg/m^3 . Πριν από την προσομοίωση μοριακής δυναμικής, εφαρμόστηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας στο πλήρες σύστημα (**5e** και διαλύτης), χωρίς περιορισμούς χρησιμοποιώντας την μέθοδο βαθειάς κατάδυσης για 1000 βήματα. Τέλος, ο χρόνος προσομοίωσης ορίστηκε για συνολικά 40 ns, στους 300 °K με χρονικό βήμα που αντιστοιχεί 0,01 ps, και για τους δυο διαλύτες.

Στην Εικόνες 6.13 και 6.14 που ακολουθούν παρατίθενται δείγματα των αρχείων που απαιτούνται για τη διεξαγωγή προσομοιώσεων μέσω του προγράμματος GROMACS.

```
#include "ffgmh.itp"
#include "ki9.itp"

[ moleculetype ]
; Name nrexcl
Protein_A    3

; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "posre.itp"
#endif

; Include water topology
#include "spc.itp"

#ifdef POSRES_WATER
; Position restraint for each water oxygen
[ position_restraints ]
; i funct  fcx  fcy  fcz
  1  1   1000  1000  1000
#endif

; Include generic topology for ions
#include "ions.itp"
```

```

[ system ]
; Name
ki9 in water

[ molecules ]
; Compound      #mols
DRG              1

```

Εικόνα 6.13: Αρχείο τοπολογίας (topology file) της ένωσης **5e**.

```

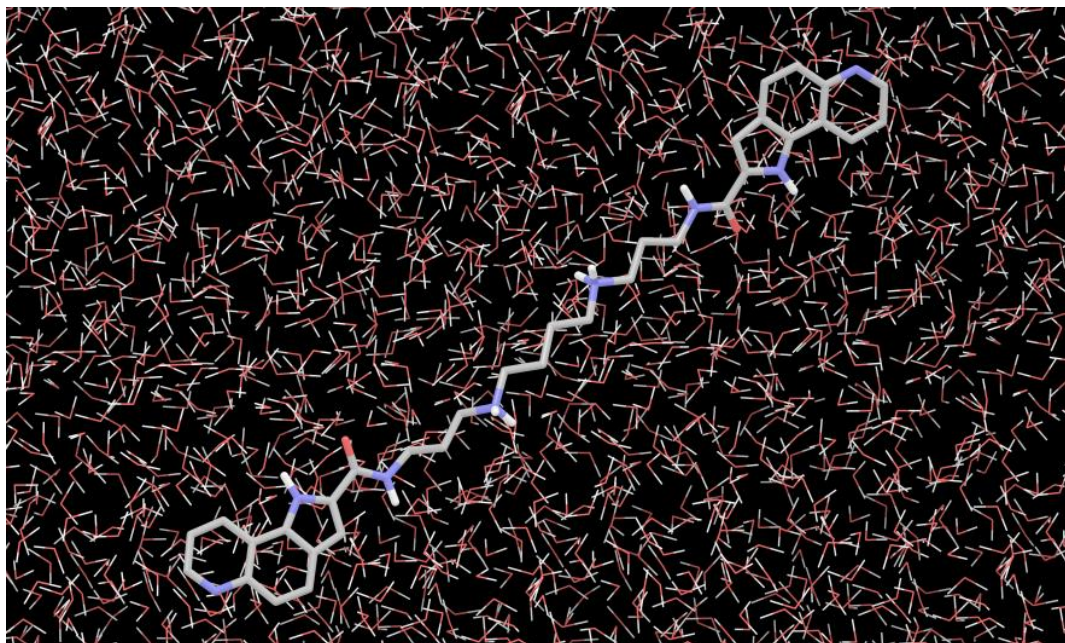
title = drg_trp
cpp = /lib/cpp ; location of cpp on SGI
define = -DFLEX_SPC ; Use Ferguson's Flexible water model [4]
constraints = none
integrator = steep /*steep for energy minimization with steepest
descent, md for molecular dynamics simulation*/
dt = 0.002 ; ps ! /*step time in ps*/
nsteps = 500 /*total number of steps*/
nstlist = 10
ns_type = grid
rlist = 0.9
coulombtype = PME ; Use particle-mesh ewald
rcoulomb = 0.9
rvdw = 1.0
fourierspacing = 0.12
fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-5
optimize_fft = yes
;
; Energy minimizing stuff
;
emtol = 1000.0
emstep = 0.01
nstenergy=10

```

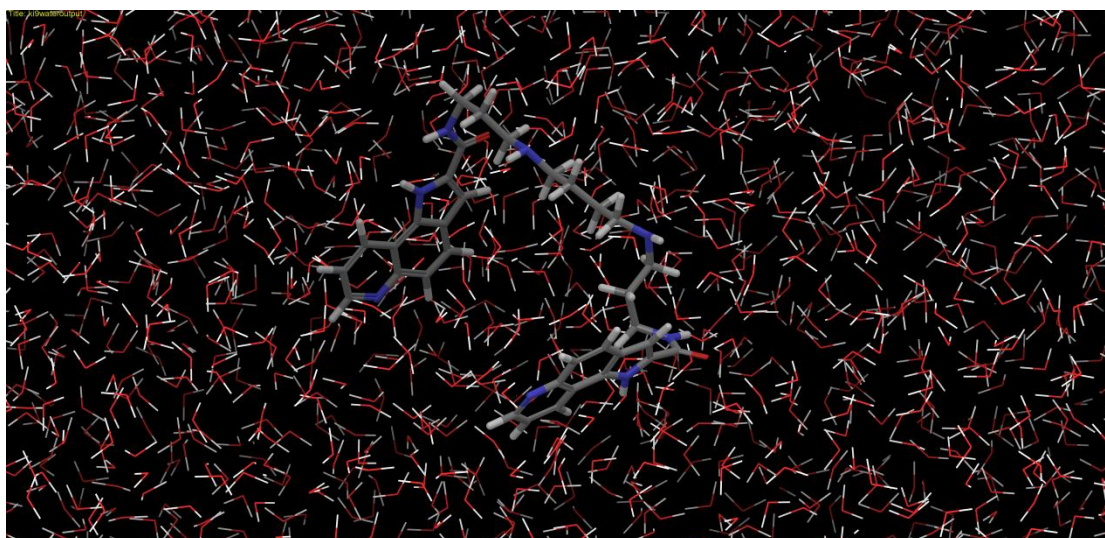
Εικόνα 6.14: Απλοποιημένη δομή αρχείου *.mdp, όπου ορίζονται οι παράμετροι για κάθε προσομοίωση.

Αποτελέσματα προσομοίωσης σε υδατικό περιβάλλον

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι διαμορφώσεις που έλαβε η ένωση **5e** σε υδατικό περιβάλλον στην αρχή της προσομοίωσης και αφού εξισορρόπησε ενεργειακά.

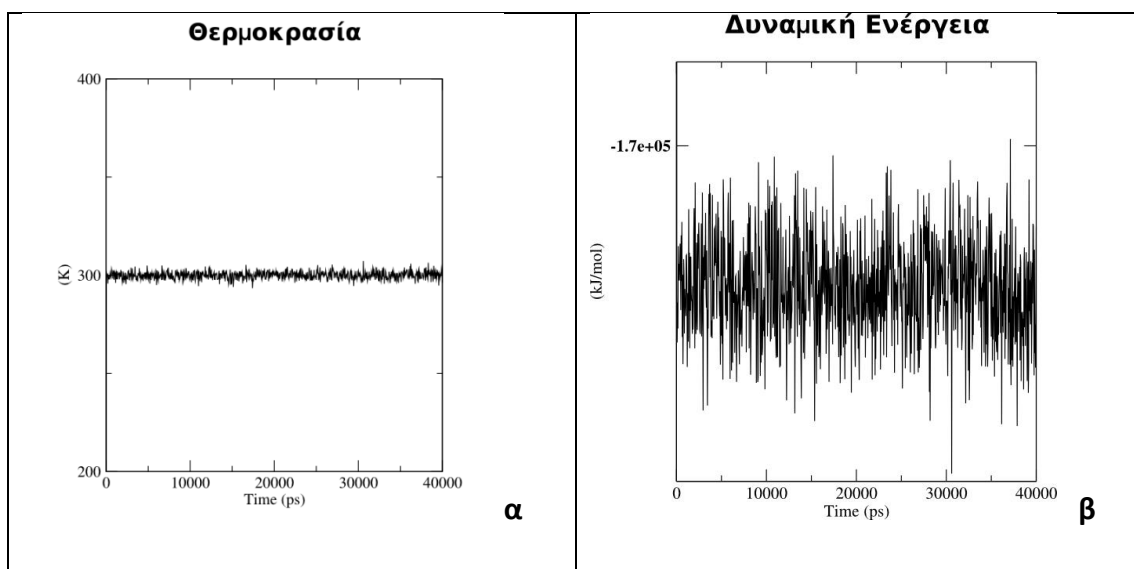


Εικόνα 6.15: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης **5e** σε υδατικό περιβάλλον. Η ένωση βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση.



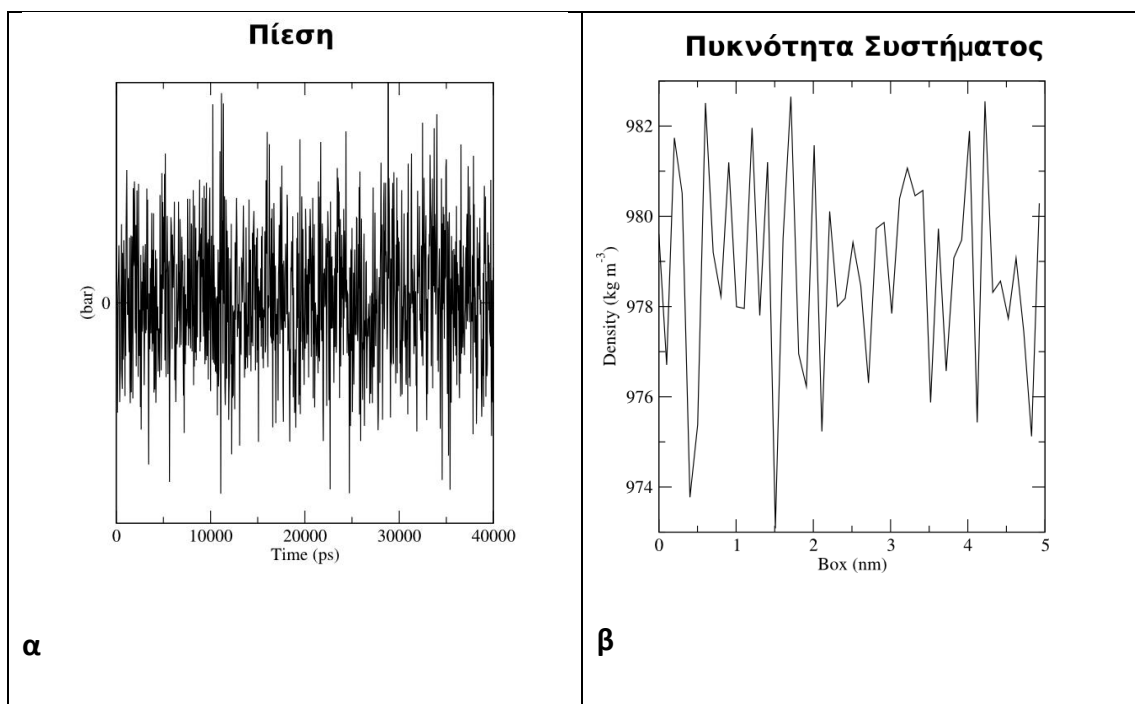
Εικόνα 6.16: Επικρατούσα διαμόρφωση της ένωσης **5e** κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Για τη διασφάλιση ενός επιτυχούς πειράματος μοριακής δυναμικής, πρέπει η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης να διατηρείται σταθερή και το σύστημα να οδηγείται σε ενεργειακή ισορροπία. Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά της προσομοίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο.



Σχήμα 6.3: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης και κατά μέσο όρο στους 299.998 °K. Η δυναμική ενέργεια του συστήματος διατηρήθηκε κατά μέσο όρο στα -170854 kJ/mol κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Σχήμα 6.4 α. Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. **β.** Διάγραμμα των μεταβολών της πυκνότητας του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

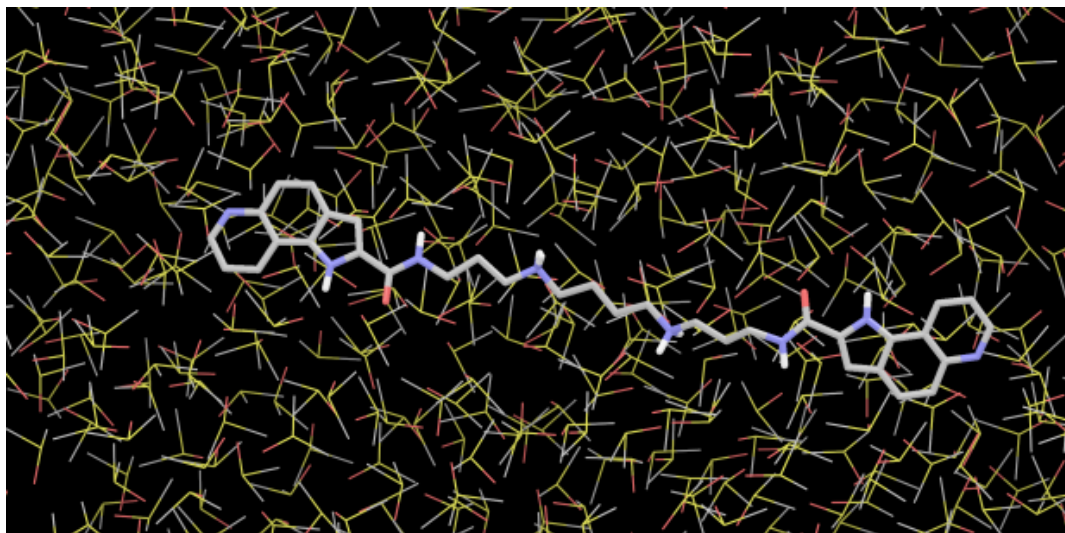
Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 6.4 α, η πίεση του συστήματος διατηρήθηκε σταθερή και κοντά στο 1 bar κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Από το διάγραμμα μεταβολής της πυκνότητας (σχήμα 6.4 β), διαφαίνονται μικρές μεταβολές στην πυκνότητα του συστήματος που οφείλονται κυρίως στην κίνηση της ένωσης **5e** κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης μέσα στον διαλύτη.

Συμπεράσματα

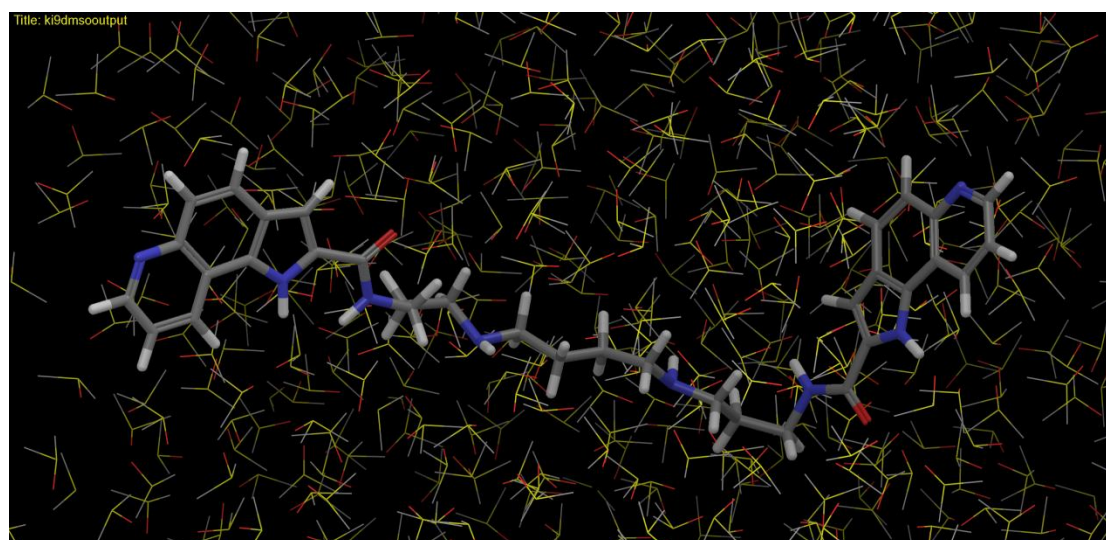
Από την παρακολούθηση της προσομοίωσης της ένωσης **5e** σε υδατικό περιβάλλον παρατηρήθηκε ότι η ένωση στιγμιαία λαμβάνει διαφορετικές διαμορφώσεις αλλά κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια της προσομοίωσης βρίσκεται σε σχετικά εκτεταμένη διαμόρφωση, όπου τα μόρια του νερού παρεμβάλλονται των αρωματικών περιοχών της ένωσης (Εικόνα 6.16). Η διατήρηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης δείχνει τη σταθερότητα της ένωσης σε υδατικό περιβάλλον.

Αποτελέσματα προσομοίωσης σε περιβάλλον DMSO

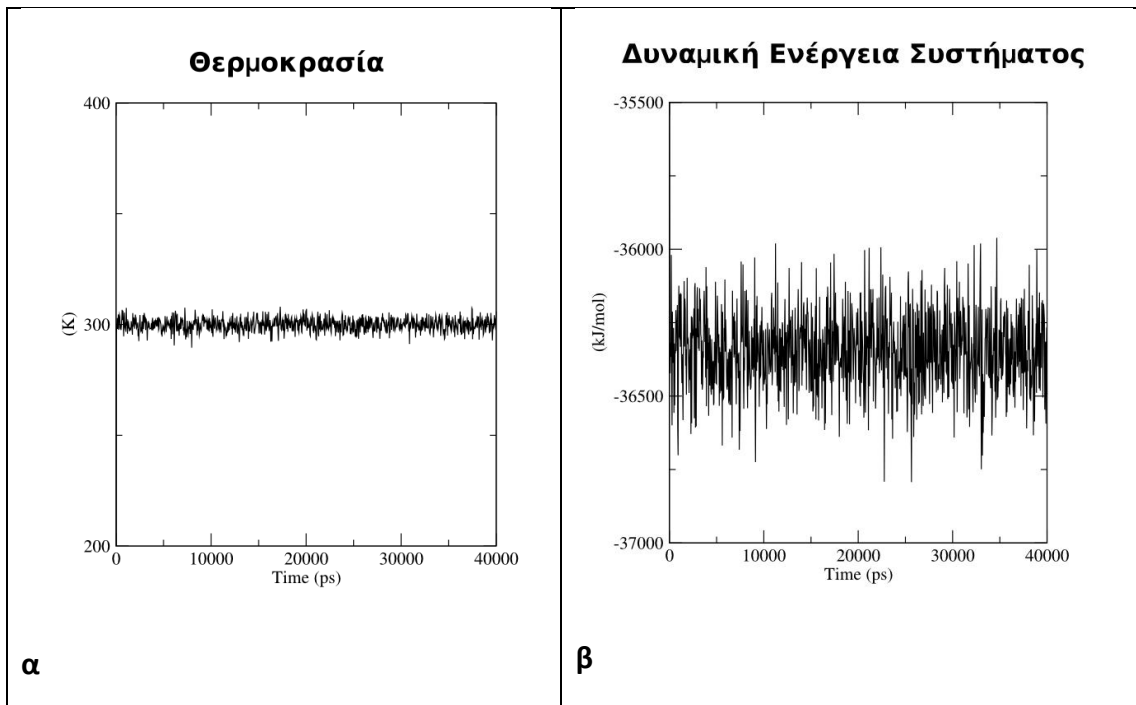
Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται οι διαμορφώσεις της ένωσης σε περιβάλλον DMSO στην αρχή και στο τέλος της προσομοίωσης, και στη συνέχεια παρατίθενται τα κύρια χαρακτηριστικά της προσομοίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 6.17: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης **5e** σε περιβάλλον DMSO.

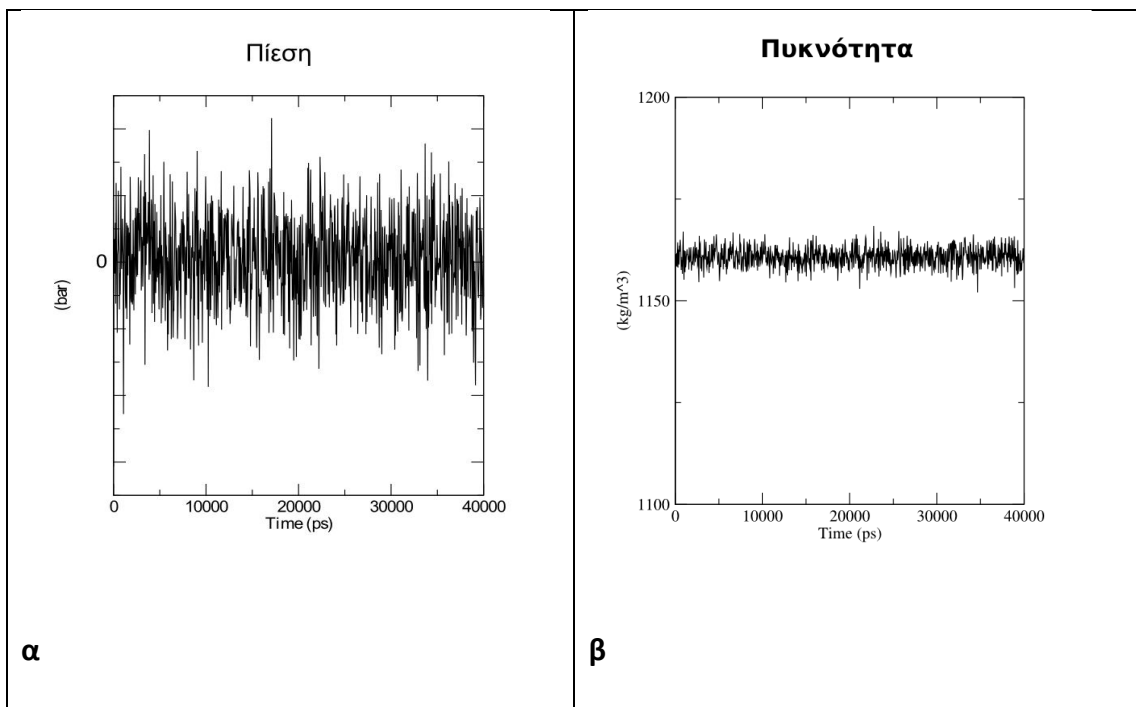


Εικόνα 6.18: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης **5e** σε περιβάλλον DMSO σε κατάσταση ισορροπίας.



Σχήμα 6.5: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης η θερμοκρασία του συστήματος ήταν κατά μέσο όρο $299.977 \text{ }^\circ\text{K}$, και η δυναμική ενέργεια -46565.4 kJ/mol . Επίσης η πίεση του συστήματος ήταν κατά μέσο 0.884994 bar και η πυκνότητα 1160.77 kg/m^3 .



Σχήμα 6.6: α. Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα των μεταβολών της πυκνότητας του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της ένωσης **5e** σε περιβάλλον DMSO παρατηρείται ότι η ένωση κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια της προσομοίωσης λαμβάνει εκτεταμένη διαμόρφωση με τις αρωματικές περιοχές της ένωσης να βρίσκονται σε αντικρυστή θέση. Η διατήρηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης δείχνει τη σταθερότητα της ένωσης σε περιβάλλον DMSO.

6.3.2 Διαμορφωτική ανάλυση της ένωσης 5g σε υδατικό περιβάλλον και σε περιβάλλον διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO)

Για την περαιτέρω ανάλυση των διαμορφώσεων που λαμβάνει η ένωση **5g**, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, όπου η ένωση τοποθετήθηκε σε περιβάλλον διαλύτη, αρχικά σε νερό και στη συνέχεια σε διμεθυλοσουλφοξείδιο. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα GROMACS.

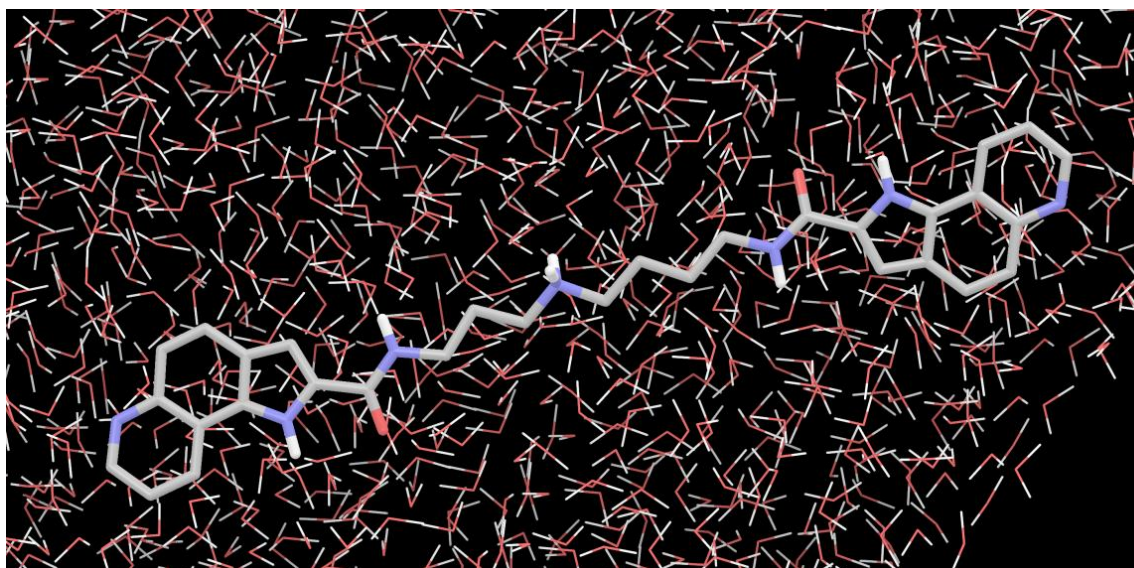
Πειραματική Διαδικασία

Για την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής με το πρόγραμμα GROMACS, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.3.1.

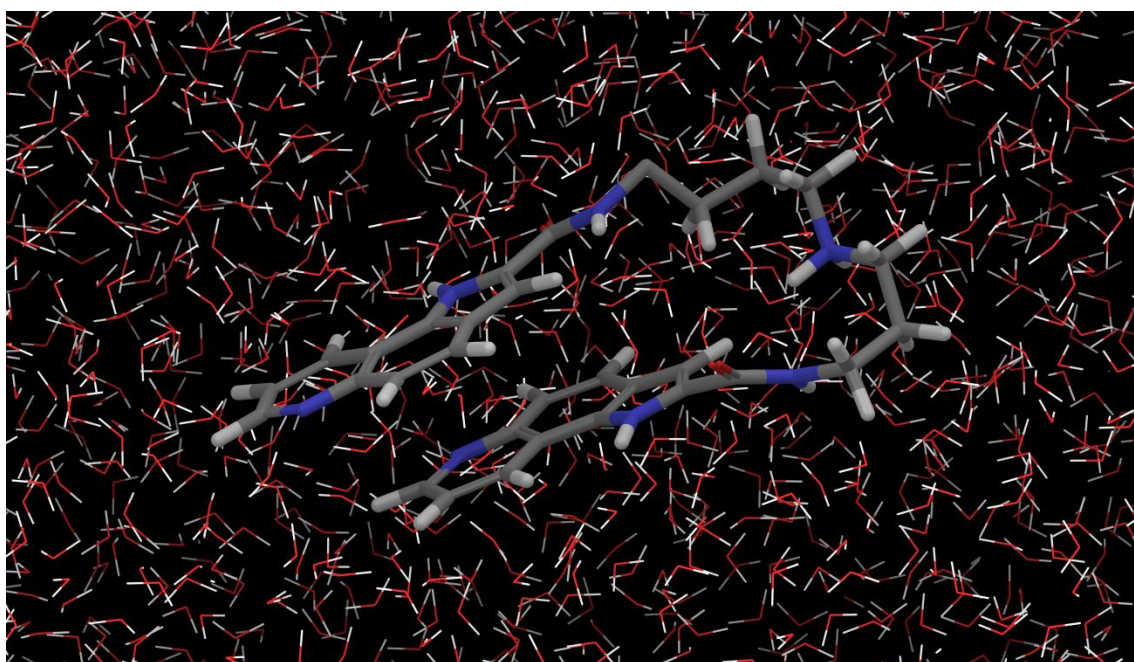
Οι χρόνοι προσομοίωσης ορίστηκαν στα 40 ns και για τις δυο προσομοιώσεις, όμως η προσομοίωση της **5g** σε υδατικό περιβάλλον ολοκληρώθηκε μέχρι τα 23 ns, λόγω εξισορρόπησης του συστήματος.

Αποτελέσματα προσομοίωσης σε υδατικό περιβάλλον

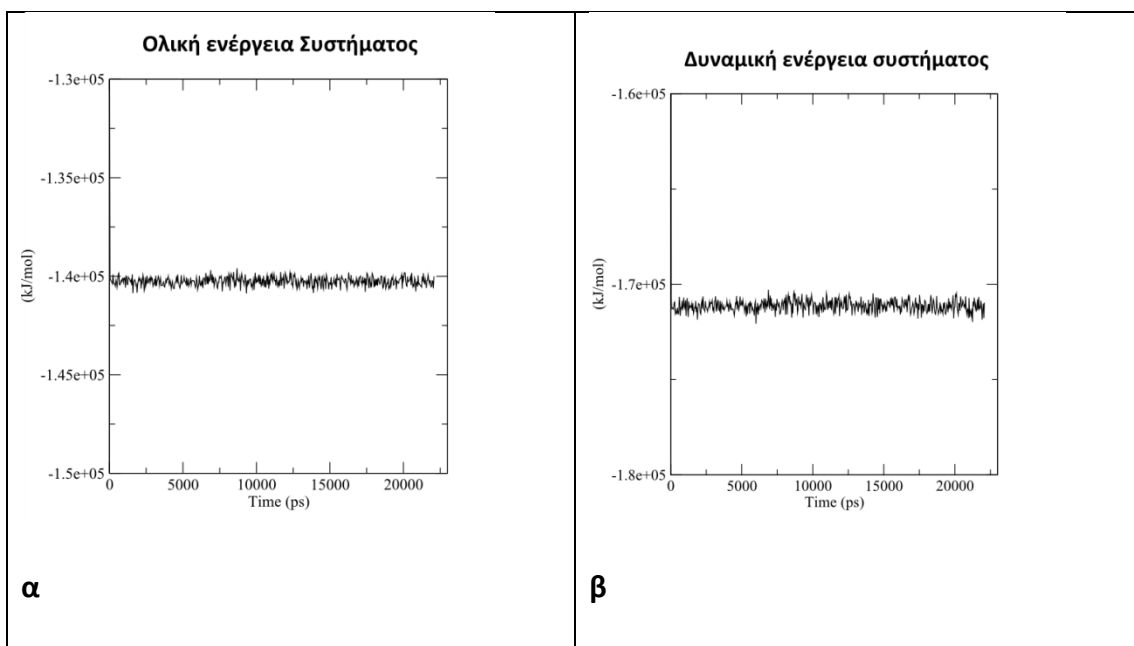
Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται οι διαμορφώσεις της ένωσης σε υδατικό περιβάλλον στην αρχή και στο τέλος της προσομοίωσης, και στη συνέχεια παρατίθενται τα κύρια χαρακτηριστικά της προσομοίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 6.19: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης **5g** σε υδατικό περιβάλλον

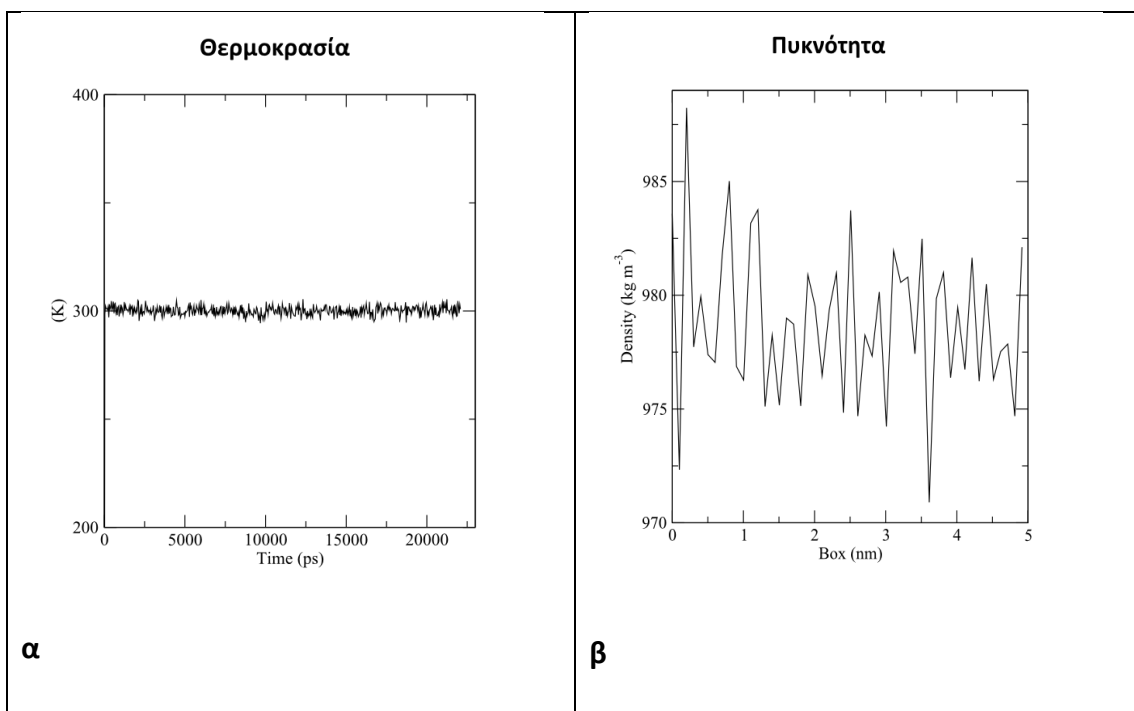


Εικόνα 6.20: Επικρατέστερη Διαμόρφωση της ένωσης **5g** σε υδατικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης



Σχήμα 6.7: α. Διάγραμμα ολικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι η συνολική ενέργεια του συστήματος κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ήταν κατά μέσο όρο -140265 kJ/mol , ενώ η δυναμική ενέργεια του συστήματος κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ήταν κατά μέσο όρο -171125 kJ/mol . Η θερμοκρασία του συστήματος διατηρήθηκε κατά μέσο όρο στους $299.999 \text{ }^\circ\text{K}$ και η πυκνότητα στα 978.516 kg/m^3 (Σχήμα 6.8).



Σχήμα 6.8: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα πυκνότητας σε συνάρτηση με χρόνο.

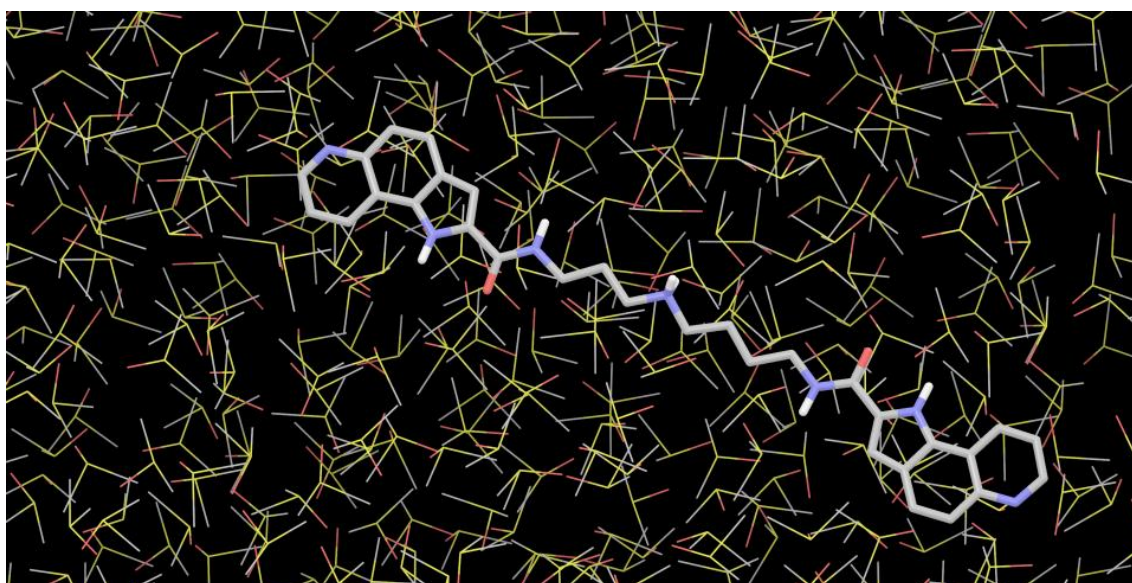
Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της ένωσης **5g** σε υδατικό περιβάλλον παρατηρείται ότι η ένωση ισορροπεί σε διαμόρφωση όπου οι αρωματικές περιοχές της ένωσης βρίσκονται σε τέτοια θέση ώστε να δημιουργούνται αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις. Όπως και στην περίπτωση της προσομοίωσης υπό κενό, παρατηρείται ότι εν λόγω διαμόρφωση είναι η επικρατέστερη για την ένωση **5g**.

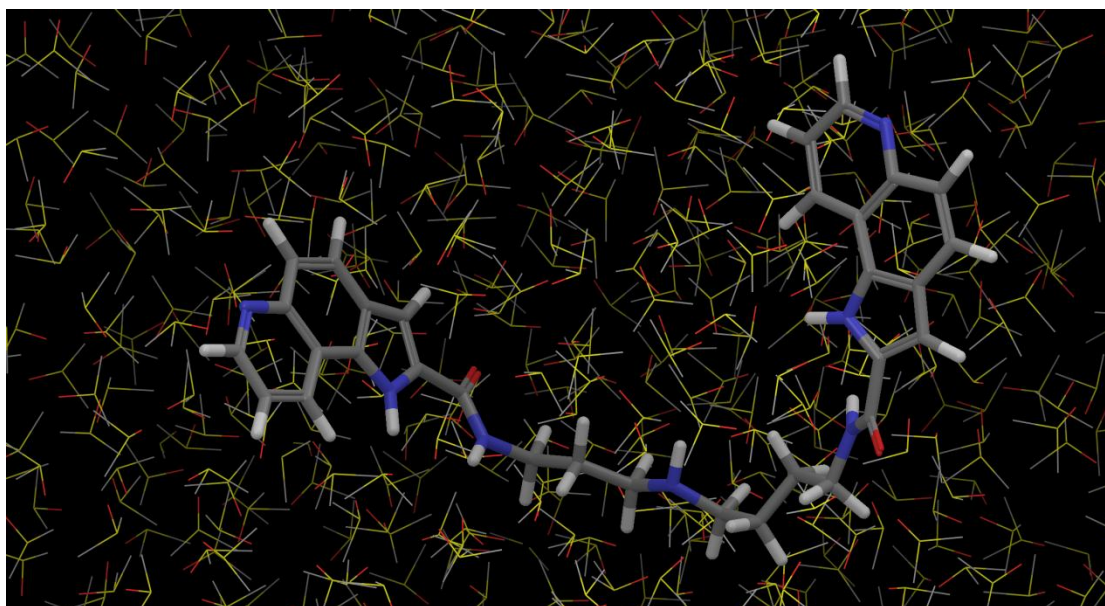
Η διατήρηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης δείχνει τη σταθερότητα της ένωσης σε υδατικό περιβάλλον.

Αποτελέσματα προσομοίωσης σε περιβάλλον DMSO

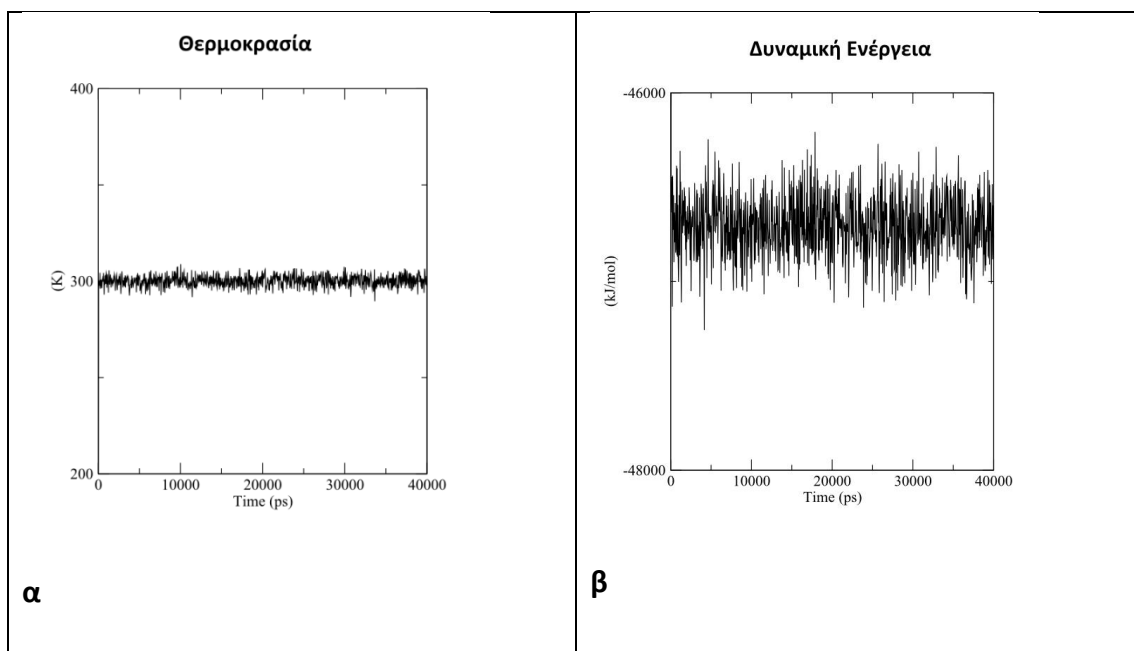
Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται οι διαμορφώσεις της ένωσης σε περιβάλλον DMSO στην αρχή, σε μια ενδιάμεση κατάσταση και στο τέλος της προσομοίωσης, και στη συνέχεια παρατίθενται τα κύρια χαρακτηριστικά της προσομοίωσης σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 6.21: Αρχική διαμόρφωση της ένωσης **5g** σε περιβάλλον DMSO.

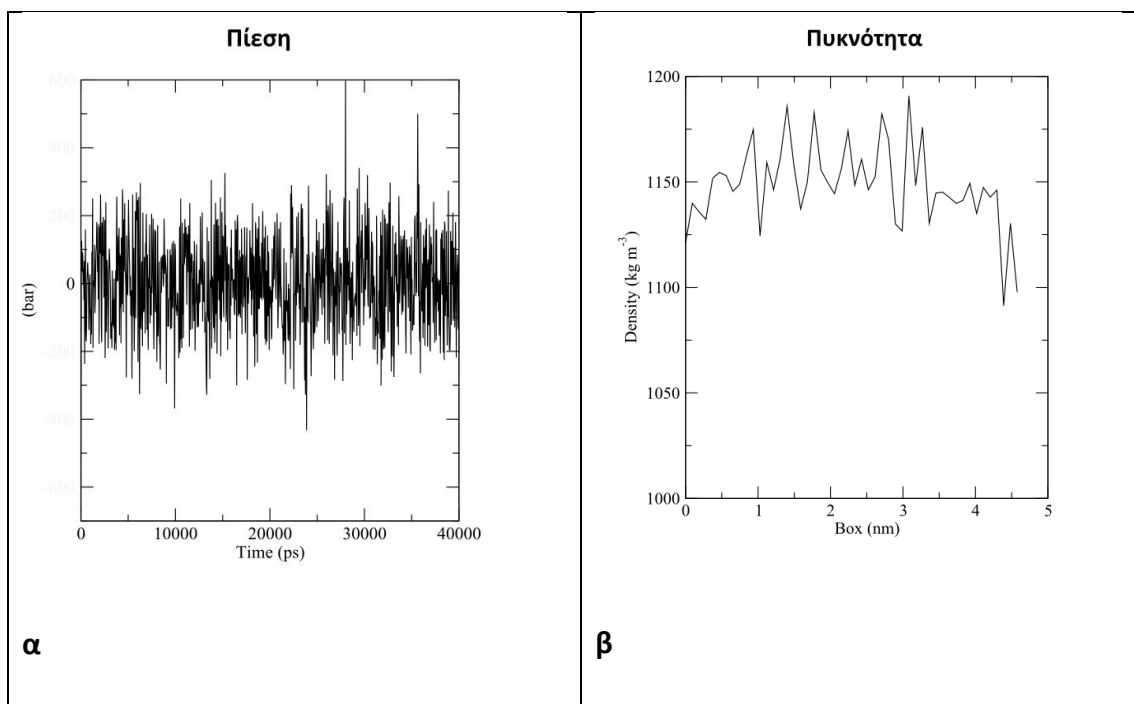


Εικόνα 6.22: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης **5g** σε περιβάλλον DMSO κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Σχήμα 6.9: **α.** Διάγραμμα θερμοκρασίας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. **β.** Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι η συνολική ενέργεια του συστήματος κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ήταν κατά μέσο όρο -36467.4 kJ/mol, ενώ η δυναμική ενέργεια του συστήματος κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ήταν κατά μέσο όρο -46707.2 kJ/mol. Η θερμοκρασία του συστήματος διατηρήθηκε κατά μέσο όρο στους 299.977 °K, η πίεση στα 0.886842 bar η πυκνότητα στα 978.516 kg/m³ (Σχήμα 6.10).



Σχήμα 6.10: **α.** Διάγραμμα πίεσης σε συνάρτηση με το χρόνο. **β.** Διάγραμμα πυκνότητας σε συνάρτηση με χρόνο.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης της ένωσης **5g** σε περιβάλλον DMSO παρατηρείται ότι η ένωση λαμβάνει στιγμιαία διαφορετικές διαμορφώσεις, αλλά και σε αυτήν την περίπτωση ισορροπεί όταν οδηγείται τελικά σε διαμόρφωση εκτεταμένη όπου οι αρωματικές περιοχές της ένωσης βρίσκονται σε τέτοια θέση ώστε τα αρωματικά συστήματα να είναι προσανατολισμένα το ένα προς το άλλο. Η διατήρηση της δυναμικής ενέργειας του συστήματος σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης δείχνει τη σταθερότητα της ένωσης σε υδατικό περιβάλλον.

6.3 Γενικά Συμπεράσματα

Από τη διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων **5e** και **5g** με τη βοήθεια των μεθόδων φασματοσκοπίας NMR και μοριακής μοντελοποίησης προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα υδρογόνα των ενώσεων δεν είναι μαγνητικά ισοδύναμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι και οι δυο ενώσεις δύνανται να λάβουν ποικίλες διαμορφώσεις ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

- Οι ανοιχτές διαμορφώσεις όπου τα αρωματικά συστήματα βρίσκονται προσανατολισμένα το ένα προς το άλλο παρουσιάζουν τη χαμηλότερη ενέργεια στα πειράματα υπό κενό.
- Οι διαμορφώσεις όπου οι ενώσεις είναι αναδιπλωμένες και τα αρωματικά συστήματα βρίσκονται πολύ κοντά στις αλειφατικές αλυσίδες παρουσιάζουν την υψηλότερη ενέργεια στα πειράματα υπό κενό.
- Η ένωση **5e** υπό κενό εμφανίζεται σε παρόμοιο ποσοστό σε διαμόρφωση εκτεταμένη όπου οι αρωματικές περιοχές της ένωσης βρίσκονται προσανατολισμένες η μια προς την άλλη, και σε διαμόρφωση όπου οι αρωματικές περιοχές βρίσκονται σε τέτοια θέση ώστε να δημιουργούνται αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις. Η πρώτη κατηγορία διαμορφώσεων εμφανίζεται ως επικρατέστερη στα πειράματα σε περιβάλλον διαλύτη (νερό και διμεθυλοσουλφοξείδιο).
- Αντίθετα, στην περίπτωση της ένωσης **5g** η επικράτηση των διαμορφώσεων με στίβαξη αρωματικών δακτυλίων (π-π αλληλεπιδράσεις) είναι προφανής τόσο στη μελέτη υπό κενό, όσο και στην προσομοίωση σε υδατικό περιβάλλον. Όμως στην περίπτωση προσομοίωσης σε περιβάλλον διμεθυλοσουλφοξειδίου, η διαμόρφωση που λαμβάνεται είναι αντίστοιχη αυτήν της ένωσης **5e**, όπου οι αρωματικές περιοχές της ένωσης βρίσκονται προσανατολισμένες η μια προς την άλλη αλλά σχετικά απομακρυσμένες.
- Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τα πειραματικά δεδομένα της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, όπου δεν παρατηρούνται σήματα συσχετισμού μακράς εμβέλειας για τις ενώσεις όταν διαλυθούν σε περιβάλλον νερού-διμεθυλοσουλφοξειδίου.
- Σε πολικά συστήματα τα μόρια του διαλύτη (νερό, DMSO) περιβάλλουν της ενώσεις και σχηματίζουν γέφυρα επικοινωνίας, η οποία αποτρέπει την εγγύτητα στο χώρο των δύο αρωματικών συστημάτων.

Κεφάλαιο 7 – Μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων 5e και 5g σε λιπιδικές διπλοστιβάδες με τη βοήθεια μεθόδων Μοριακής Δυναμικής

7.1 Μοντέλα προσομοίωσης

Για την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής σε λιπιδικές διπλοστιβάδες, οι ενώσεις **5e** και **5g** σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος JME editor και τα αρχεία τοπολογίας των ενώσεων δημιουργήθηκαν από τον εξυπηρετητή PRODRG [43].

Όσον αφορά τις δομές των μορίων της διπλοστιβάδας DMPC, υιοθετήθηκε ενωμένη αναπαράσταση των ατόμων (united atom representation) και τα αρχεία τοπολογίας προμηθεύτηκαν από την ιστοσελίδα Teilemann όπου ήταν διαθέσιμα [45,46,47]. Για την περιγραφή των μορίων του νερού υιοθετήθηκε η απεικόνιση απλού σημείου (SPC model) [48].

Τα υπό μελέτη συστήματα και στις δυο περιπτώσεις (**5e**-DMPC-WATER και **5g**-DMPC-WATER) αποτελούνταν από 128 DMPC μορίων στην υγρή κρυσταλλική φάση, 3655 μόρια νερού και ένα μόριο από την κάθε ένωση.

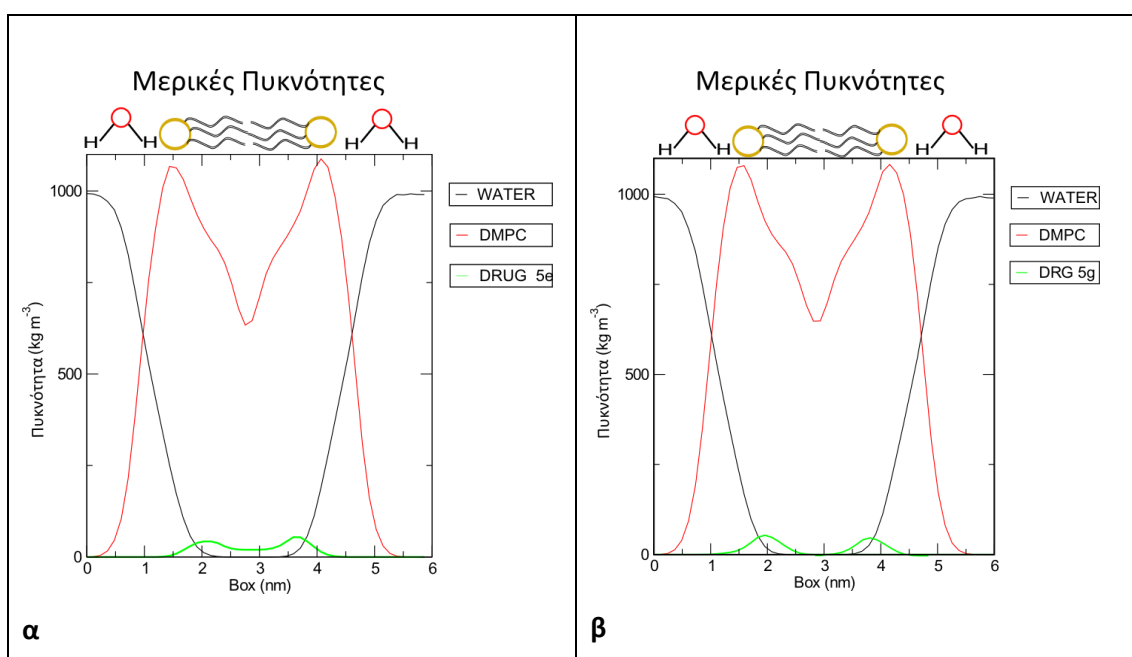
7.2 Παράμετροι Προσομοιώσεων

Όλες οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής GROMACS, έκδοση 4.5.1 [41,49,50]. Οι εξισώσεις της κίνησης ολοκληρώθηκαν σε χρονικά βήματα των 2 fs και όλοι οι δεσμοί περιορίστηκαν στο μήκος ισορροπίας τους με τη βοήθεια του αλγορίθμου LINCS [51]. Η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή στους 310 °K με τη χρήση του θερμοστάτη Berendsen, με σταθερά χρόνου σύζευξης ίση με 0.1 ps ,ενώ χρήση του βαροστάτη Berendsen επιλέχθηκε για τη διατήρηση της πίεσης του συστήματος σε 1 bar [42]. Αυτό που διασφαλίζουν οι προαναφερθείσες παράμετροι, είναι ότι κατά τη διεύθυνση του άξονα Z η κίνηση είναι ανεξάρτητη από το επίπεδο των αξόνων XY, αλλά και στις δύο περιπτώσεις η σταθερά χρόνου σύζευξης ορίζεται στο 1 ps. Όσον αφορά τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος, εφαρμόστηκε ακτίνα αποκοπής ίση με 1 nm, με την χρήση διορθωτικών όρων για την πίεση και την ενέργεια. Επιπλέον, η μέθοδος

Particle Mesh Ewald (PME) χρησιμοποιήθηκε για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεγάλων αποστάσεων [44,52]. Όλες οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των συστημάτων διπλοστιβάδας πραγματοποιήθηκαν για συνολικό χρόνο 100 ns.

7.3 Αποτελέσματα

Ως πρώτο βήμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής επιλέχθηκε η κατανομή των ενώσεων κατά το μήκος του άξονα Z, όπως αυτό παριστάνεται στην Εικόνα 7.1 όπου απεικονίζονται όλα τα προφίλ ηλεκτρονικής πυκνότητας για τις ενώσεις, τα μόρια του νερού και τη διπλοστιβάδα DMPC. Οι ενώσεις **5e** και **5g** προτιμούν να βρίσκονται στο εσωτερικό της διπλοστιβάδας αν και αρχικά είχαν τοποθετηθεί έξω από το διπλοστιβάδα.



Σχήμα 7.1: Προφίλ πυκνοτήτων κατά μήκος του άξονα Z για τα συστήματα **α. 5e-DMPC-νερό. β. 5g-DMPC-νερό.**

Όπως περιγράφεται στα σχήματα 7.1 (α) και 7.1 (β), οι διπλοστιβάδες της DMPC θεωρούνται κεντροσυμμετρικές. Στο κέντρο της στιβάδας όπου υπάρχουν μόνο άτομα άνθρακα (C) και υδρογόνου (H) η ηλεκτρονική πυκνότητα είναι χαμηλή ($\approx 700 \text{ kg m}^{-3}$). Στην πολική κεφαλή όπου υπάρχουν επιπρόσθετα άτομα αζώτου (N), οξυγόνου (O) και φωσφόρου (P), η πυκνότητα είναι μεγαλύτερη (υπερβαίνει τα 100 kg m^{-3}). Η υδατινή στιβάδα έχει μεγαλύτερη πυκνότητα κοντά στην πολικά κεφαλή.

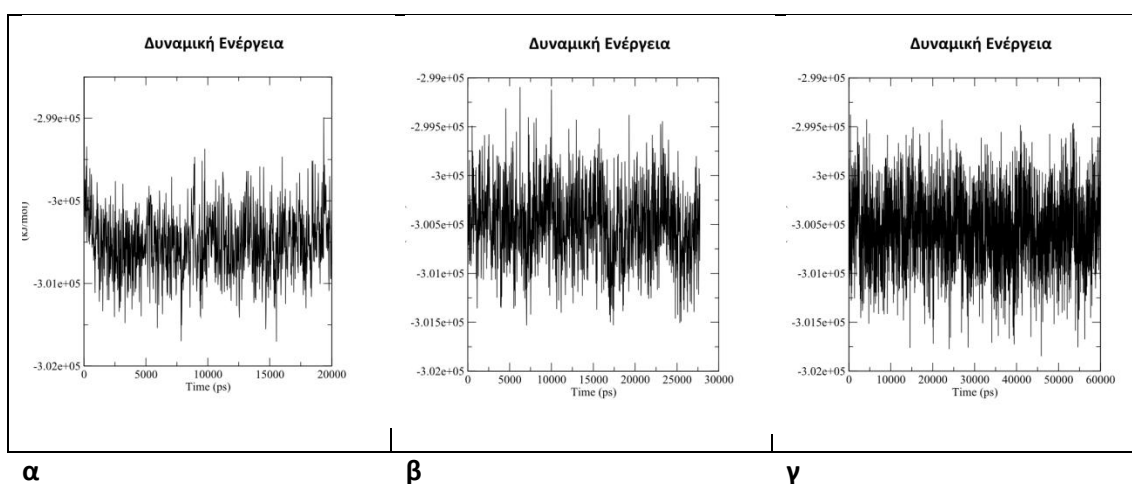
Οι ενώσεις **5e** και **5g** κυμαίνονται 0,5 – 1,5 nm μακριά από το κέντρο της διπλοστιβάδας. Αυτό σημαίνει ότι τα μόρια κατανέμονται από την πολική φάση προς το λιπόφιλο τμήμα.

Στις εικόνες που ακολουθούν παρατίθενται τα κύρια χαρακτηριστικά των προσομοιώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο και ακολούθως οι διαμορφώσεις που λαμβάνουν οι ενώσεις εντός της διπλοστιβάδας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται αρχικά για την ένωση **5e** και στη συνέχεια για την ένωση **5g**.

7.3.1 Αποτελέσματα προσομοίωσης για την ένωση **5e**

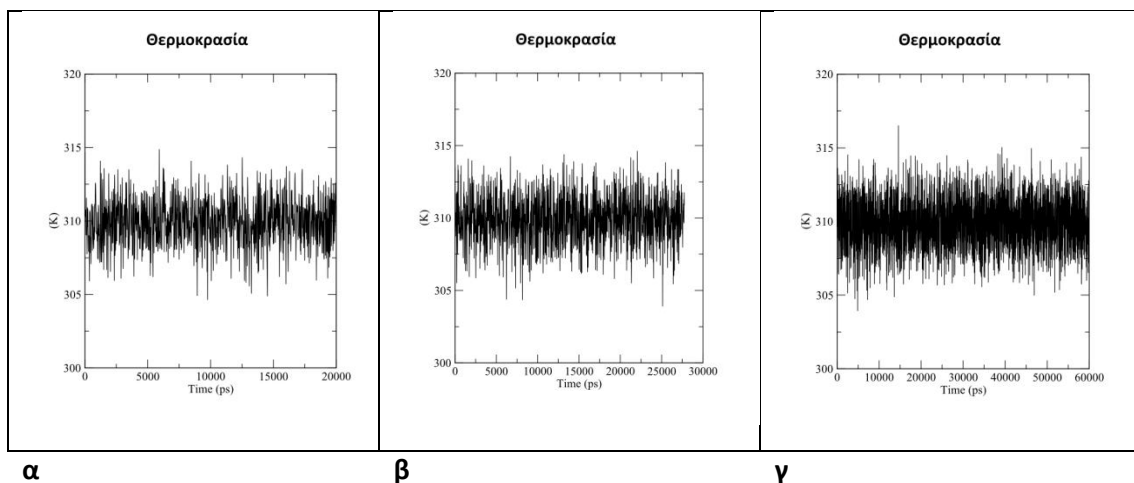
Η προσομοίωση της ένωσης **5e** στη λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα στάδια. Αρχικά το σύστημα **5e**-DMPC-νερό ελαχιστοποιήθηκε ενεργειακά, και στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για 20 ns, 20 ns και 60 ns αντίστοιχα. Η διαμόρφωση που προέκυπτε από κάθε βήμα ήταν η εναρκτήρια για το επόμενο. Η συνολική διάρκεια της προσομοίωσης ήταν 100 ns.

Στα σχήματα 7.2 και 7.3 παρατίθενται οι μεταβολές της δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο και της θερμοκρασίας αντίστοιχα.



Σχήμα 7.2: Απεικόνιση μεταβολής δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο για **α**. Τα πρώτα 20 ns. **β**. Τα επόμενα 20 ns. **γ**. Τα τελευταία 60 ns της προσομοίωσης.

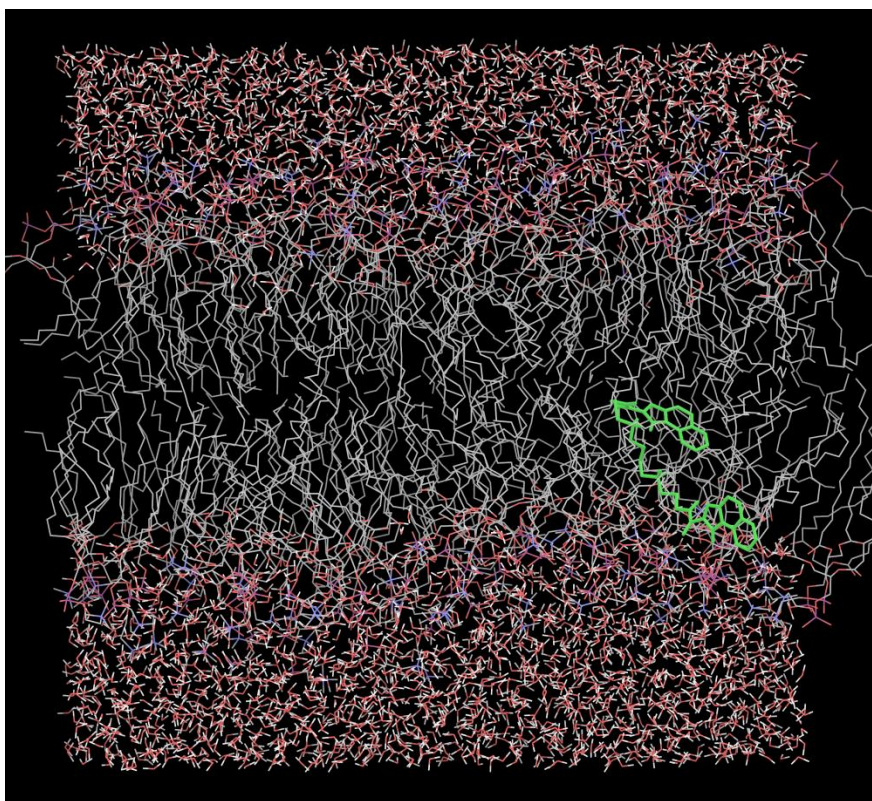
Η δυναμική ενέργεια του συστήματος υπολογίστηκε ότι κατά μέσο όρο ήταν ίση με -300492 kJ/mol για πρώτα 20 ns, -300492 kJ/mol για τα επόμενα 20 ns και -300568 kJ/mol για τα τελευταία 60 ns της προσομοίωσης.



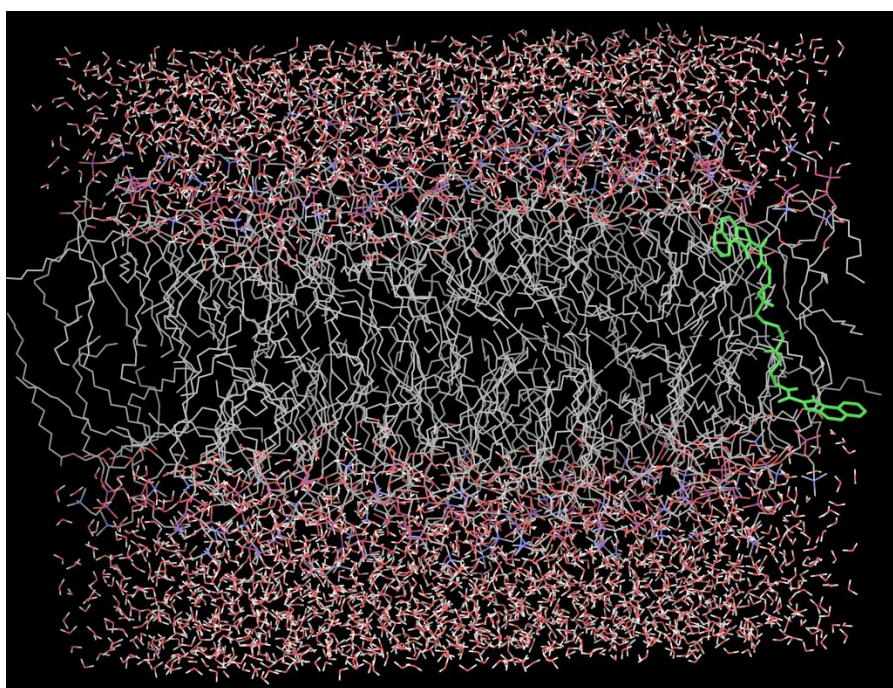
Σχήμα 7.3: Απεικόνιση μεταβολής της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο για **α.** Τα πρώτα 20ns. **β.** Τα επόμενα 20ns. **γ.** Τα τελευταία 60ns της προσομοίωσης.

Η θερμοκρασία του συστήματος υπολογίστηκε ότι κατά μέσο όρο ήταν ίση με 309.958 °K.

Στην Εικόνα 7.1 που ακολουθεί παρατίθεται μια ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση **5e** μέσα στο σύστημα DMPC-νερό κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, ενώ στην Εικόνα 7.2 παρατίθεται η επικρατέστερη διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση **5e** καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 7.1: Ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση **5e** κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης

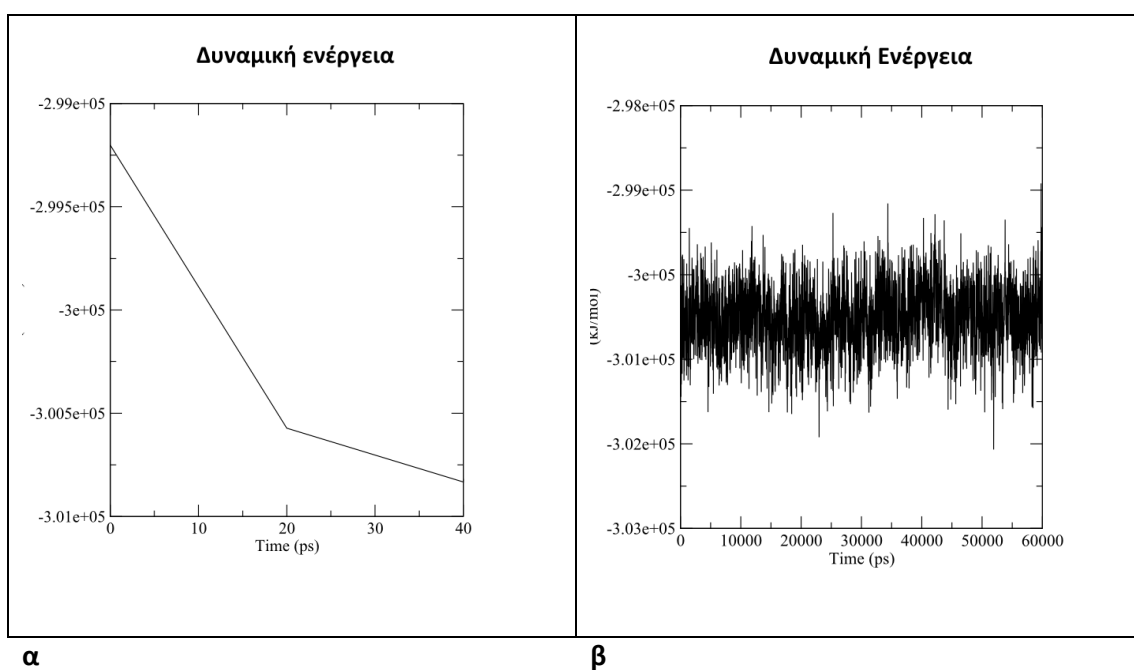


Εικόνα 7.2: Επικρατέστερη διαμόρφωση της ένωσης **5e** κατά τη συνολική διάρκεια της προσομοίωσης

7.3.2 Αποτελέσματα προσομοίωσης για την ένωση 5g

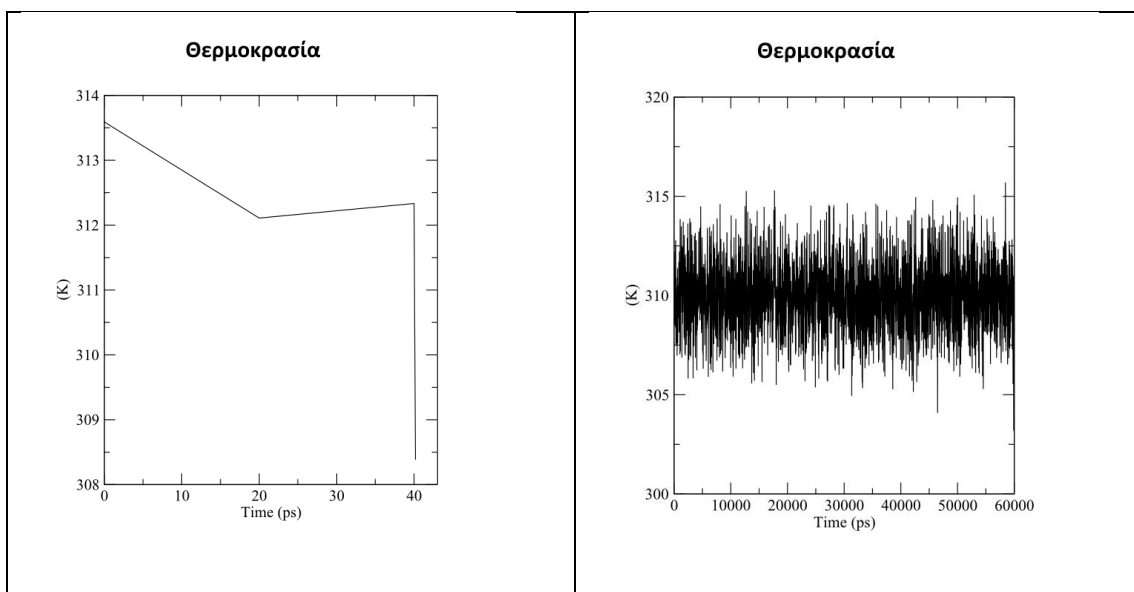
Η προσομοίωση της ένωσης **5g** στη λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά το σύστημα **5g**-DMPC-νερό υπεβλήθη σε προσομοίωση διάρκειας 40 ns κατά την έναρξη της οποίας ελαχιστοποιήθηκε ενεργειακά και στη συνέχεια ακολούθησε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για 60 ns. Η διαμόρφωση που προέκυπτε από το πρώτο βήμα ήταν η εναρκτήρια για το επόμενο. Η συνολική διάρκεια της προσομοίωσης ήταν 100 ns.

Στα Σχήματα 7.4 και 7.5 παρατίθενται οι μεταβολές της δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο και της θερμοκρασίας αντίστοιχα.



Σχήμα 7.4: Απεικόνιση μεταβολής δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο για **α**. Τα πρώτα 40ns. **β**. Τα επόμενα 60ns.

Όπως διαφαίνεται και από το Σχήμα 7.4, κατά τη πρώτη προσομοίωση των 40 ns το σύστημα σταθεροποιήθηκε ενεργειακά και οδηγήθηκε σε δυναμική ενέργεια ίση με -300213 kJ/mol, την οποία και διατήρησε και κατά τη δεύτερη προσομοίωση των 60ns.



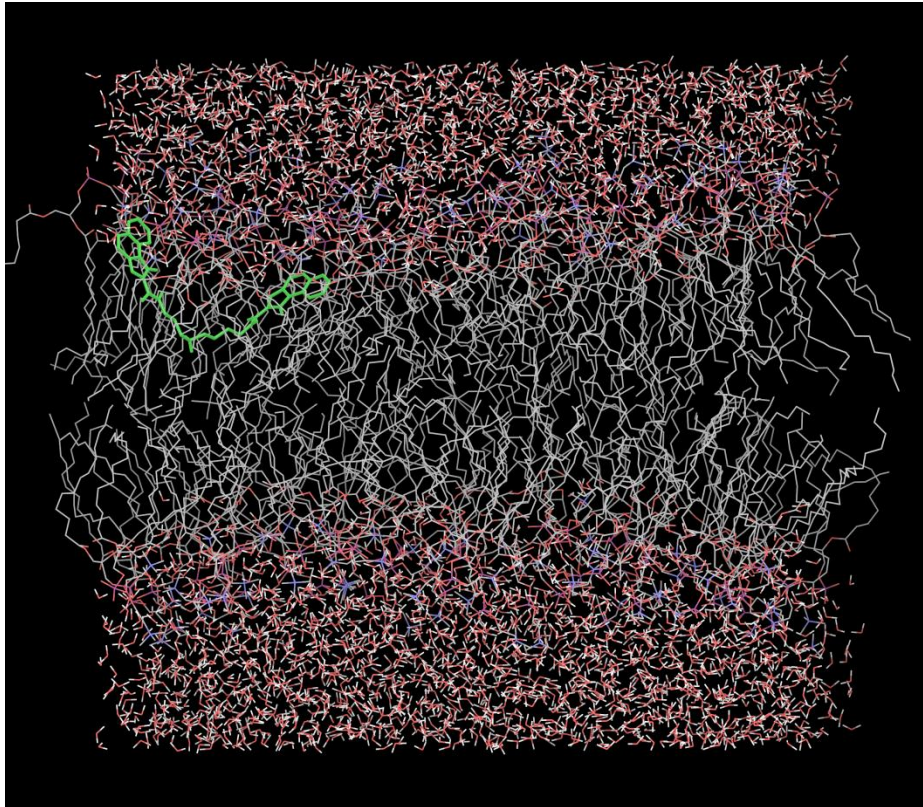
α

β

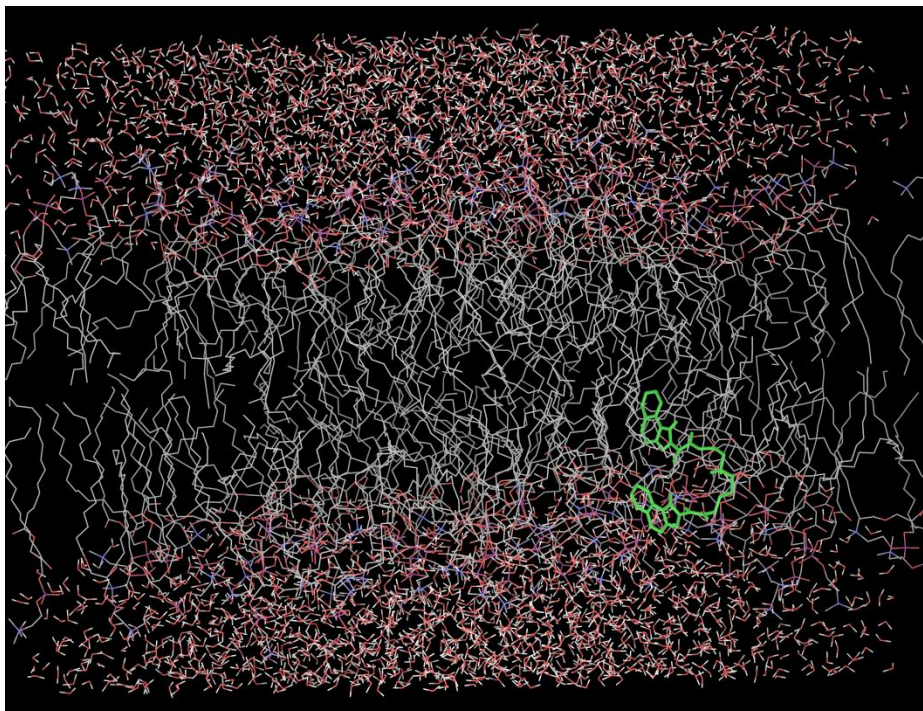
Σχήμα 7.5: Απεικόνιση μεταβολής θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο για **α**. Τα πρώτα 40ns. **β**. Τα επόμενα 60ns.

Όπως διαφαίνεται και στο Σχήμα 7.5 κατά τη πρώτη προσομοίωση των 40ns το σύστημα οδηγήθηκε σε θερμοκρασία ίση με 309.989 °K, την οποία και διατήρησε και κατά τη δεύτερη προσομοίωση των 60 ns.

Στις Εικόνες 7.3 και 7.4 που ακολουθούν παρατίθενται δύο διαμορφώσεις που λαμβάνει η ένωση **5g** μέσα στο σύστημα DMPC-νερό κατά τη συνολική διάρκεια της προσομοίωσης. Η επικρατέστερη διαμόρφωση παρατίθεται στην εικόνα 7.3.



Εικόνα 7.3: Επικρατέστερη διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση **5g** μέσα στο σύστημα DMPC-νερού κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 7.4: Ενδιάμεση διαμόρφωση που λαμβάνει η ένωση **5g** μέσα στο σύστημα DMPC-νερού κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

7.4 Συμπεράσματα

Από τα πειράματα μοριακής δυναμικής διαφαίνεται ότι οι ενώσεις **5e** και **5g** έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν τον υδάτινο φραγμό των λιπιδικών διπλοστιβάδων και να εισέρχονται σε αυτές. Για την ακρίβεια διεισδύουν εύκολα στις διπλοστιβάδες όπου και κατανέμονται στο λιπόφιλο τμήμα τους, δηλαδή μεταξύ της πολικής φάσης (πολικής κεφαλής-γλυκερολικού σκελετού) και αλκυλικής αλυσίδας.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι και τα δύο μόρια προσαρμόζονται σε εκτεταμένες διαμορφώσεις. Στην περίπτωση του **5e** οι αλκυλικές αλυσίδες είναι παράλληλες αυτές της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Οι αρωματικοί δακτύλιοι τοποθετούνται κάθετα και παράλληλα προς τις αλκυλικές αλυσίδες σχηματίζοντας σχέση T. Η ίδια σχέση T ισχύει και για την ένωση **5g** αλλά στην περίπτωση αυτή η αλκυλική του αλυσίδα είναι κάθετη προς τις αλκυλικές αλυσίδες της λιπιδικής διπλοστιβάδας.

Κεφάλαιο 8 – Μοριακή Πρόσδεση των ενώσεων 5e και 5g σε τμήματα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

8.1 Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, οι ενώσεις **5e** και **5g** παρουσίασαν ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του πνεύμονα NSCLC-N16-L16 (Non-Small-Cell-Lung-Carcinoma) και ιδιαίτερα η **5e** [24]. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε να μελετηθεί η μοριακή πρόσδεση των ενώσεων αυτών σε αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (DNA) για τη διερεύνηση του τρόπου πρόσδεσής τους και την ύπαρξη ή όχι φαινομένου δημιουργίας δεσμών τύπου χιαστί με τις αζωτούχες βάσεις (cross-linking effect).

Τα μόρια που συνδέονται με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (DNA sequences) και παρουσιάζουν ανασταλτική δράση, εμφανίζονται με δύο κύριους τρόπους αλληλεπίδρασης-σύνδεσης με το DNA [53]:

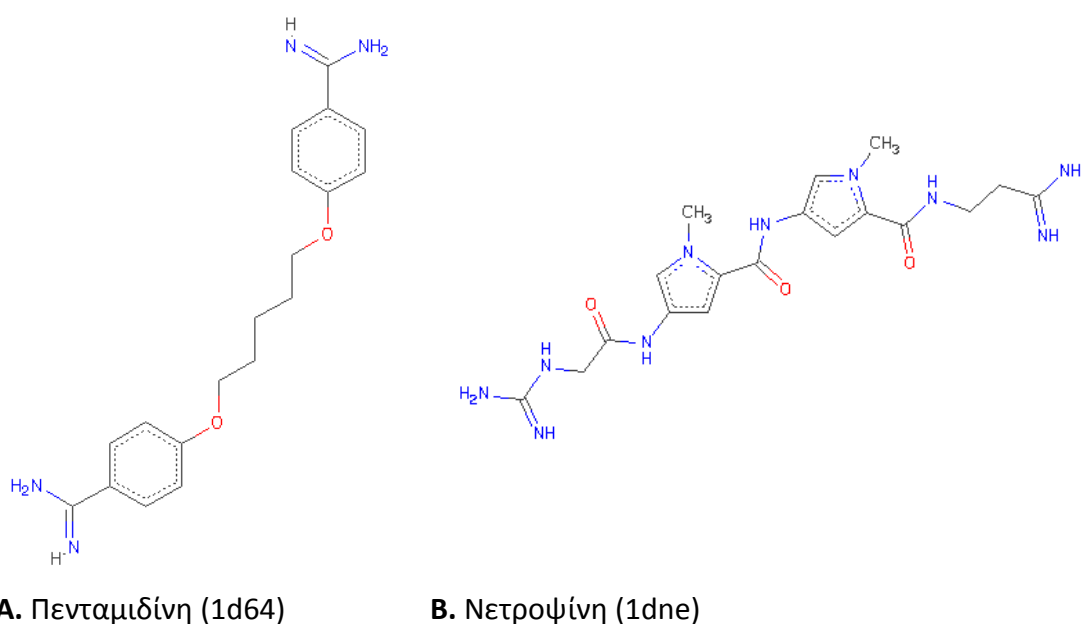
- Α. Μόρια προσδέτες της μεγάλης και της μικρής αύλακας του DNA. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ενώσεις οι οποίες ενώνονται με τις έλικες μέσω δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.
- Β. Μόρια ενδοπαρεμβολείς. Οι ενώσεις που παρουσιάζουν αυτή τη δράση τοποθετούνται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις και σταθεροποιούνται κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων π στίβαξης. Προκαλούν δομικές αλλοιώσεις στο DNA με σκοπό τη διάνοιξη χώρου ανάμεσα σε δυο διαδοχικές αζωτούχες βάσεις όπου τοποθετούνται, γεγονός που αναστέλλει την αντιγραφή και μετάφραση του DNA προκαλώντας μεταλλάξεις. Συνήθως είναι ενώσεις με αρωματικά και επίπεδα συστήματα.

Οι ενώσεις **5e** και **5g** αποτελούνται από αρωματικά-επίπεδα συστήματα τα οποία ενώνονται από αλειφατικές αλυσίδες. Λόγω της ύπαρξης των αρωματικών συστημάτων στις δομές τους έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως μόρια ενδοπαρεμβολείς. Επίσης λόγω της ύπαρξης των αζώτων στις αλειφατικές αλυσίδες,

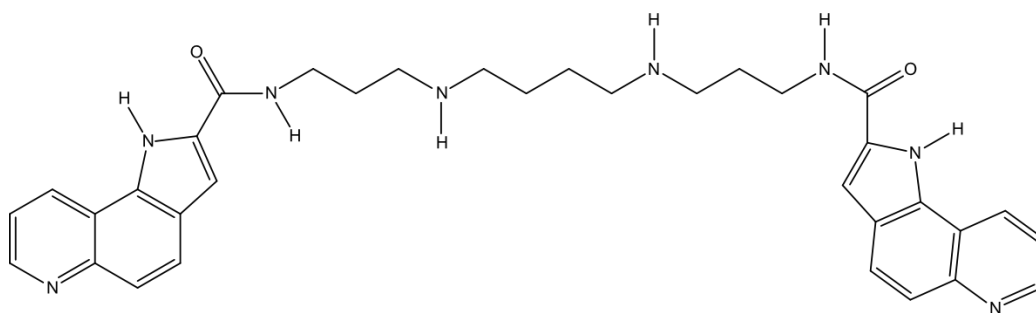
έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης μέσω δεσμών υδρογόνου στη μεγάλη αύλακα του DNA.

8.2 Υλικά και μέθοδοι

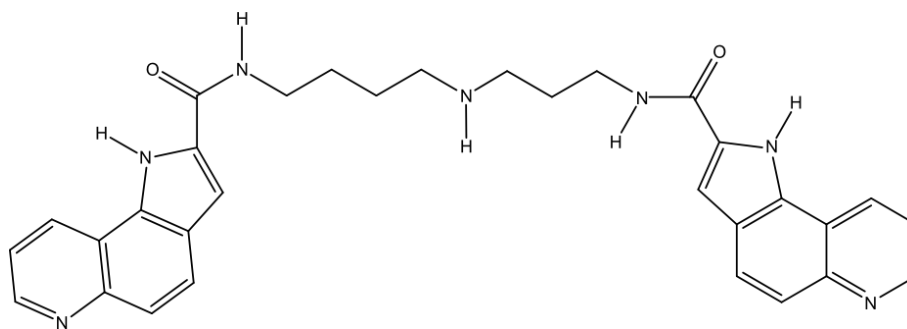
Για τη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων **5e** και **5g** έγινε χρήση του προγράμματος GLIDE της πλατφόρμας εφαρμογών MAESTRO της εταιρείας Schrodinger. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που επιλέχθηκαν ήταν οι 1d64 [54] και 1dne [55] (κωδικοί καταχώρησης Protein Data Bank, www.pdb.org), κυρίως γιατί περιλαμβάνουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με υψηλή παρουσία ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης [23,56] και γιατί τα μόρια αναστολείς με τα οποία έχουν συγκρυσταλωθεί - η πενταμιδίνη για την μελέτη 1d64 και η νετροψίνη για την 1dne - παρουσιάζουν δομικές αναλογίες με τις υπό μελέτη ενώσεις (Εικόνες 8.1, 8.2).



Εικόνα 8.1 : A. Χημικές δομές αναστολέων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών A.Πενταμιδίνη, B. Νετροψίνη.



5e



5g

Εικόνα 8.2: Χημικές δομές των πυρρολο-[2,3-*f*]κινολινών **5e** και **5g**.

Επιλέχθηκε να πραγματοποιηθούν πειράματα μοριακής πρόσδεσης και για τις δύο ενώσεις (**5e**, **5g**) και στις δύο κρυσταλλογραφικές μελέτες για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του τρόπου πρόσδεσης με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Για την προετοιμασία των κρυσταλλογραφικών μελετών πριν την εφαρμογή των αλγορίθμων μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή του προγράμματος **MAESTRO Protein Preparation Wizard**. Η εφαρμογή παρέχει μια σειρά από αυτοματοποιημένα βήματα για την ορθή προετοιμασία αρχείων κρυσταλλογραφικών μελετών πριν υποβληθούν σε υπολογισμούς μοριακής μοντελοποίησης. Χρησιμοποιώντας το εργαλείο “Preprocess and analyze structure”, ελέγχεται ο σωστός ιοντισμός των υποδομών (substructures) της μελέτης σε φυσιολογικό pH. Για τη σωστή προετοιμασία των δομών του DNA, ελέγχθηκαν οι τάξεις δεσμών των ατόμων μέσω του εργαλείου “Assign Bond Orders” και προστέθηκαν υδρογόνα, δεν αφαιρέθηκαν τα μόρια νερού της κρυσταλλογραφικής μελέτης και ελαχιστοποιήθηκε η ενέργεια της τριτοταγούς διαμόρφωσης των υπό μελέτη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μόνο για τα άτομα υδρογόνου θέτοντας ως περιορισμό η τιμή RMSD μεταξύ των αρχικών και τελικών διαμορφώσεων να μην υπερβαίνει τα 0,3 Å.

Για την αναγνώριση του χώρου πιθανής πρόσδεσης από το πρόγραμμα [57], η δημιουργία των αρχείων πλέγματος της πρωτεΐνης (Grid generation files) έγινε με επιλογή της ένωσης με την οποία για κάθε ένζυμο έγινε η κρυσταλλογραφική μελέτη (pick molecule).

Για τον έλεγχο της πρόσδεσης των ενώσεων **5e** και **5g**, χρησιμοποιήθηκαν και για τις δυο ενώσεις οι 100 ελαχιστοποιημένες δομές που είχαν προκύψει από τα πειράματα μοριακής δυναμικής σε κενό (simulated annealing) όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 6.

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

Η μεθοδολογία για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης που ακολουθήθηκε, σχεδιάστηκε σύμφωνα με τον τρόπο μελέτης ατόμων προσδετών σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία [58-61].

8.3 Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

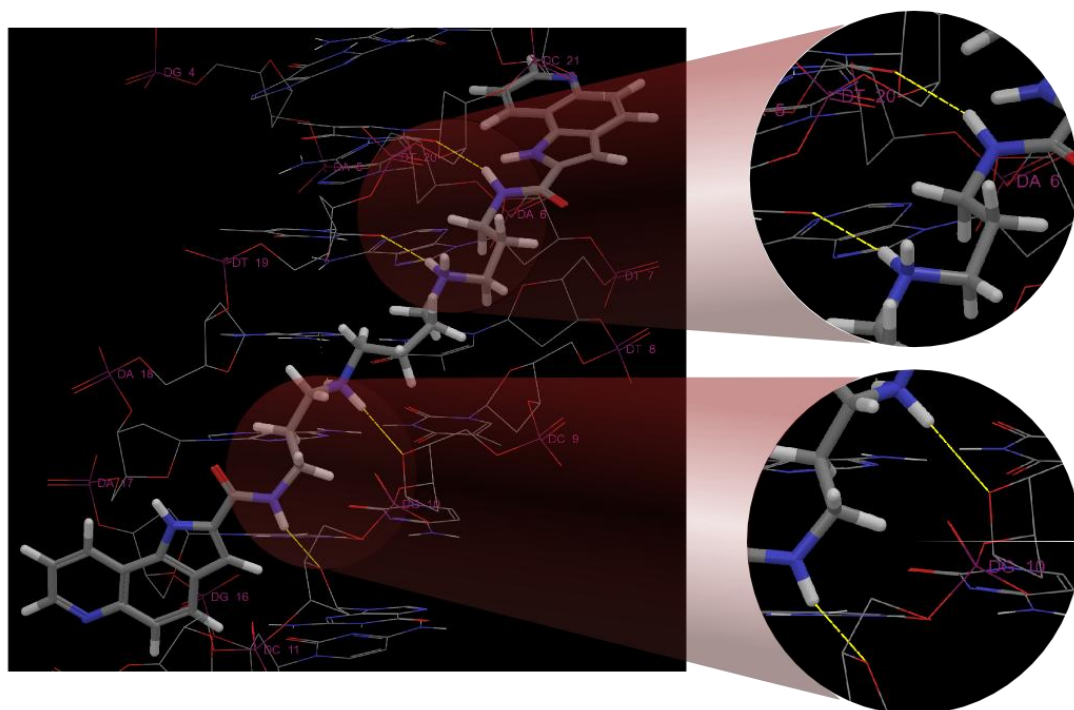
8.3.1 Μοριακή Πρόσδεση της ένωσης 5e

Μετά την ενδελεχή ανάλυση όλων των δομών που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης παρατηρείται ότι η ένωση **5e** τοποθετείται στη μεγάλη αύλακα του DNA και προσδέεται με δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι δημιουργούνται ανάμεσα στα άτομα του αζώτου και του οξυγόνου της ένωσης, και τις αζωτούχες βάσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Στον Πίνακα 8.1 και στις Εικόνες 8.3 και 8.4 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **5e**, σε δύο δομές νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

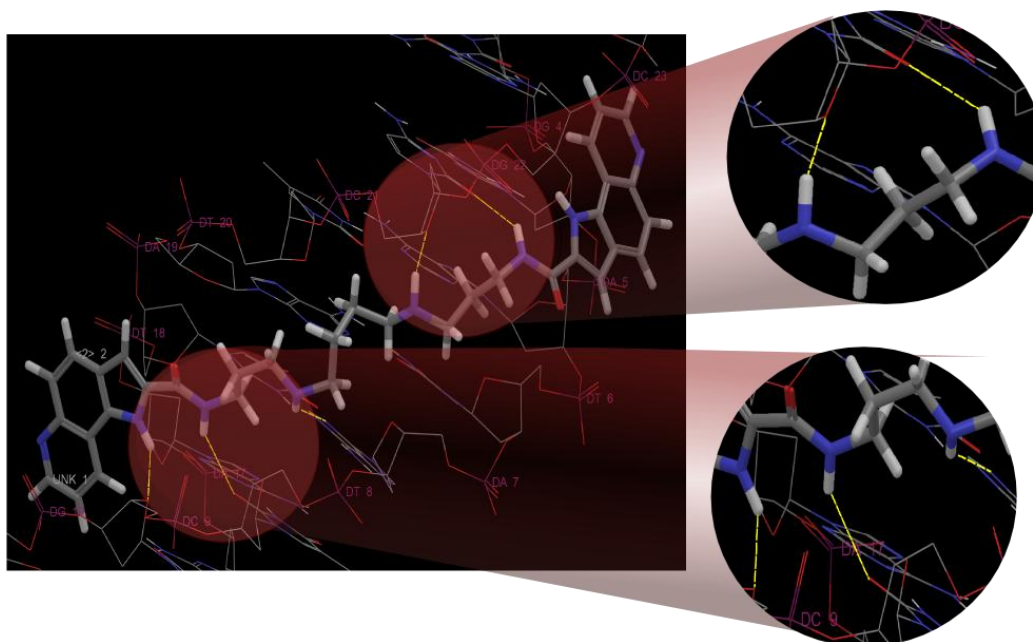
Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **5e** σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

| Κρυσταλλογραφική Μελέτη | Βαθμολογία Πρόσδεσης (Glide Score) |
|-------------------------|------------------------------------|
| 1d64 | -13.094 |
| 1dne | -10.018 |



Εικόνα 8.3: Σύμπλοκο ένωσης **5e** με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1d64.

Όπως διαφαίνεται στην Εικόνα 8.3, στην περίπτωση πρόσδεσης της ένωσης **5e** με την αλληλουχία 1d64, παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα υδρογόνα των αζώτων του αλειφατικού μέρους της ένωσης και των οξυγόνων των αζωτούχων βάσεων θυμίνης (DT20), κυτοσίνης (DC21), καθώς επίσης και με οξυγόνα φωσφορικού οξέος του σκελετού της έλικας.



Εικόνα 8.4: Σύμπλοκο ένωσης **5e** με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1dne.

Όπως διαφαίνεται στην Εικόνα 8.4, στην περίπτωση πρόσδεσης της ένωσης **5e** με την αλληλουχία 1dne, παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα υδρογόνα των αζώτων του αλειφατικού μέρους της ένωσης και των οξυγόνων των αζωτούχων βάσεων γουανίνης (DG22), κυτοσίνης (DC9), αδερίνης (DA7) καθώς επίσης και με οξυγόνα φωσφορικού οξέος του σκελετού της έλικας.

Μια πολύ σημαντική παρατήρηση που προέκυψε από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **5e**, είναι ότι η ένωση προσδέεται και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου και στους δύο κλώνους της αλυσίδας του DNA, εμφανίζοντας πρόσδεση τύπου χιαστί με τις αζωτούχες βάσεις (cross-linking effect).

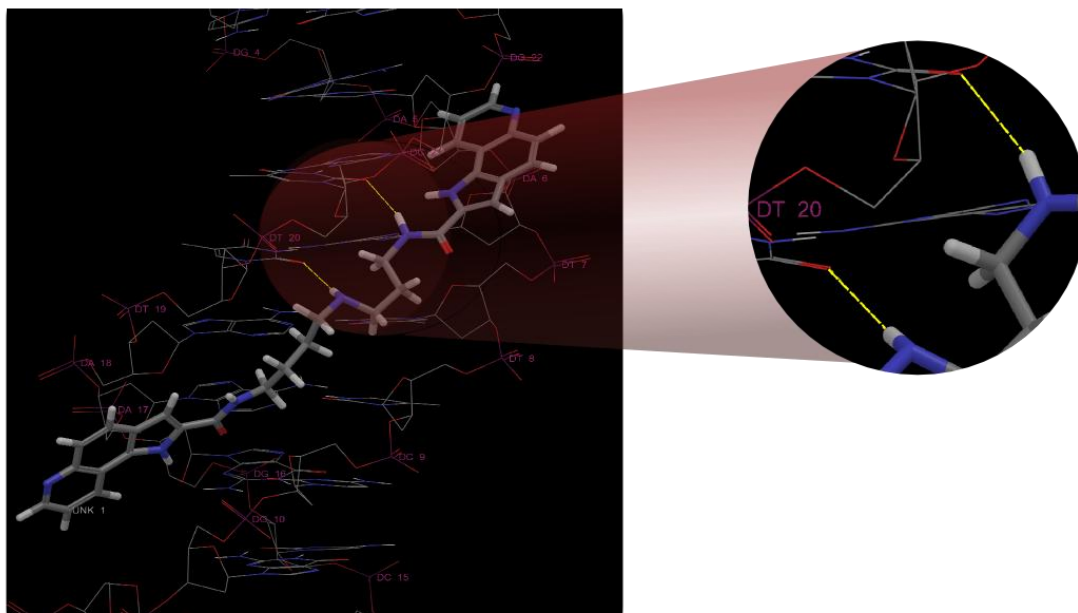
8.3.2 Μοριακή Πρόσδεση της ένωσης **5g**

Μετά την ενδελεχή ανάλυση όλων των δομών που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης παρατηρείται ότι η ένωση **5g** τοποθετείται στη μεγάλη αύλακα του DNA και προσδέεται με δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι δημιουργούνται ανάμεσα στα άτομα του αζώτου και του οξυγόνου της ένωσης, και τις αζωτούχες βάσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Στον Πίνακα 8.2 και τις Εικόνες 8.5 και 8.6 παρατίθενται τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **5g**, σε δύο δομές νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

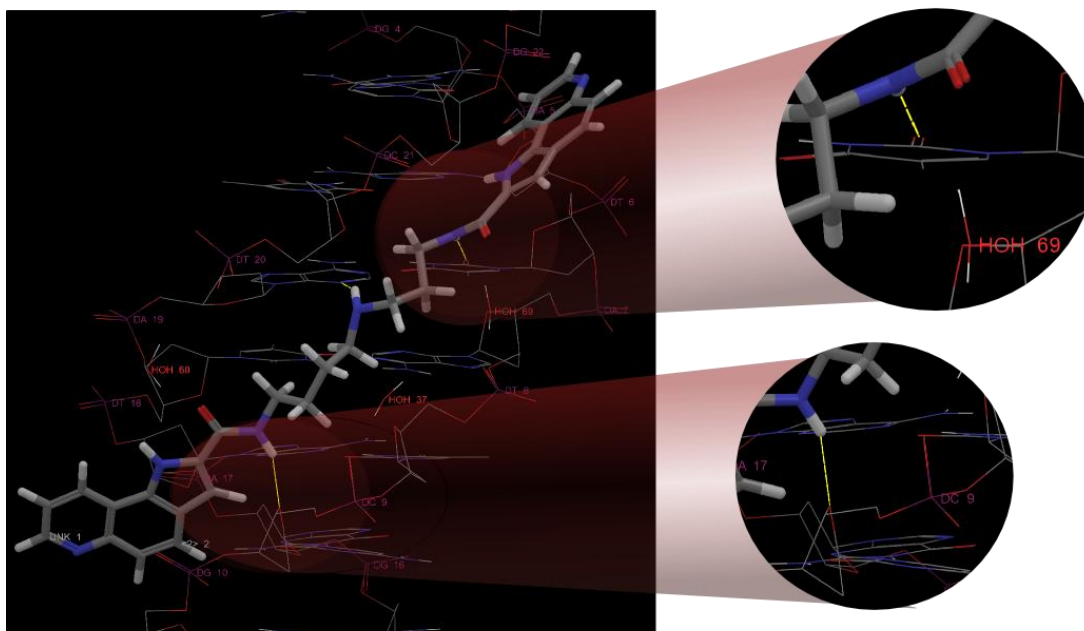
Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **5g** σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

| Κρυσταλλογραφική Μελέτη | Βαθμολογία Πρόσδεσης (Glide Score) |
|-------------------------|------------------------------------|
| 1d64 | -9.695 |
| 1dne | -9.228 |



Εικόνα 8.5: Σύμπλοκο ένωσης **5g** με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1d64.

Όπως διαφαίνεται στην Εικόνα 8.5, στην περίπτωση πρόσδεσης της ένωσης **5g** με την αλληλουχία 1d64, παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα υδρογόνα των αζώτων του αλειφατικού μέρους της ένωσης και των οξυγόνων των αζωτούχων βάσεων θυμίνης (DT20), κυτοσίνης (DC21).



Εικόνα 8.6: Σύμπλοκο ένωσης **5g** με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 1dne

Όπως διαφαίνεται στην Εικόνα 8.6, στην περίπτωση πρόσδεσης της ένωσης **5g** με την αλληλουχία 1dne, παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα υδρογόνα των αζώτων του αλειφατικού μέρους της ένωσης και των οξυγόνων των αζωτούχων βάσεων θυμίνης (DT6, DT20) καθώς επίσης και με οξυγόνα φωσφορικού οξέος του σκελετού της έλικας.

8.4 Σημαντικές Παρατηρήσεις

Από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων **5e** και **5g** σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες προέκυψαν οι ακόλουθες παρατηρήσεις:

- Συγκρίνοντας τις βαθμολογίες πρόσδεσης και για τις δυο ενώσεις, παρατηρείται ότι η ένωση **5e** προσδέεται ευνοϊκότερα στο DNA. Δημιουργεί μεγαλύτερο πλήθος δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται περισσότερο στη μεγάλη αύλακα του DNA.
- Η ένωση **5e**, προσδέεται και με τους δυο κλώνους του DNA, παρουσιάζοντας φαινόμενο πρόσδεσης τύπου χιαστί με τις αζωτούχες βάσεις (cross-linking effect). Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε όλες τις δομές που προέκυψαν, ανεξαρτήτως κρυσταλλογραφικής μελέτης που

επιλέχθηκε (1d64, 1dne) και ανεξαρτήτως αρχικής διαμόρφωσης της ένωσης.

- Αντίθετα, η ένωση **5g** εμφάνισε φαινόμενο πρόσδεσης τύπου χιαστί σε πολύ μικρότερο ποσοστό, και συγκεκριμένα μόνο κατά την πρόσδεση με την κρυσταλλογραφική μελέτη 1dne.
- Και για τις δυο ενώσεις, παρατηρήθηκε ότι ανεξαρτήτως της αρχικής διαμόρφωσης της ένωσης που δοκιμάστηκε για την πρόσδεση, το αποτέλεσμα ήταν οι ενώσεις να τοποθετούνται σε εκτεταμένες διαμορφώσεις στη μεγάλη αύλακα του DNA. '

Από τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις εξηγείται και η υψηλότερη κυτταροτοξική δράση που εμφάνισε η ένωση **5e** έναντι των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του πνεύμονα NSCLC-N16-L16 [24] σε σχέση με την ένωση **5g**.

8.5 Πειράματα μοριακής δυναμικής των συμπλόκων των ενώσεων **5e** και **5g** με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες

Τα σύμπλοκα ενώσεων-νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης μελετήθηκαν στη συνέχεια με πειράματα μοριακής δυναμικής για τον έλεγχο της σταθερότητας του συμπλόκου σε υδατικό περιβάλλον, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης.

8.5.1 Παράμετροι Προσομοίωσης

Για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έγινε χρήση συνδυασμού των προγραμμάτων AMBER και GROMACS.

Η υπορουτίνα ANTECHAMBER του προγράμματος AMBER 11 και το πεδίο δυνάμεων AMBER GAFF με ορισμό ατομικών μερικών φορτίων AM-1 BCC, χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία και την απόκτηση των παραμέτρων των πεδίων δυνάμεων για τις ενώσεις **5e** και **5g** [62,63,64].

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των συμπλόκων **5e/5g-DNA** πραγματοποιήθηκαν επίσης με χρήση του προγράμματος GROMACS και του πεδίου δυνάμεων AMBER-03. Ο κύβος προσομοίωσης πληρώθηκε με 4043 μόρια νερού,

που περιγράφονται από το μοντέλο SPC, ενώ 22 ιόντα Na⁺ προστέθηκαν για να την εξουδετέρωση του φορτίου του συστήματος.

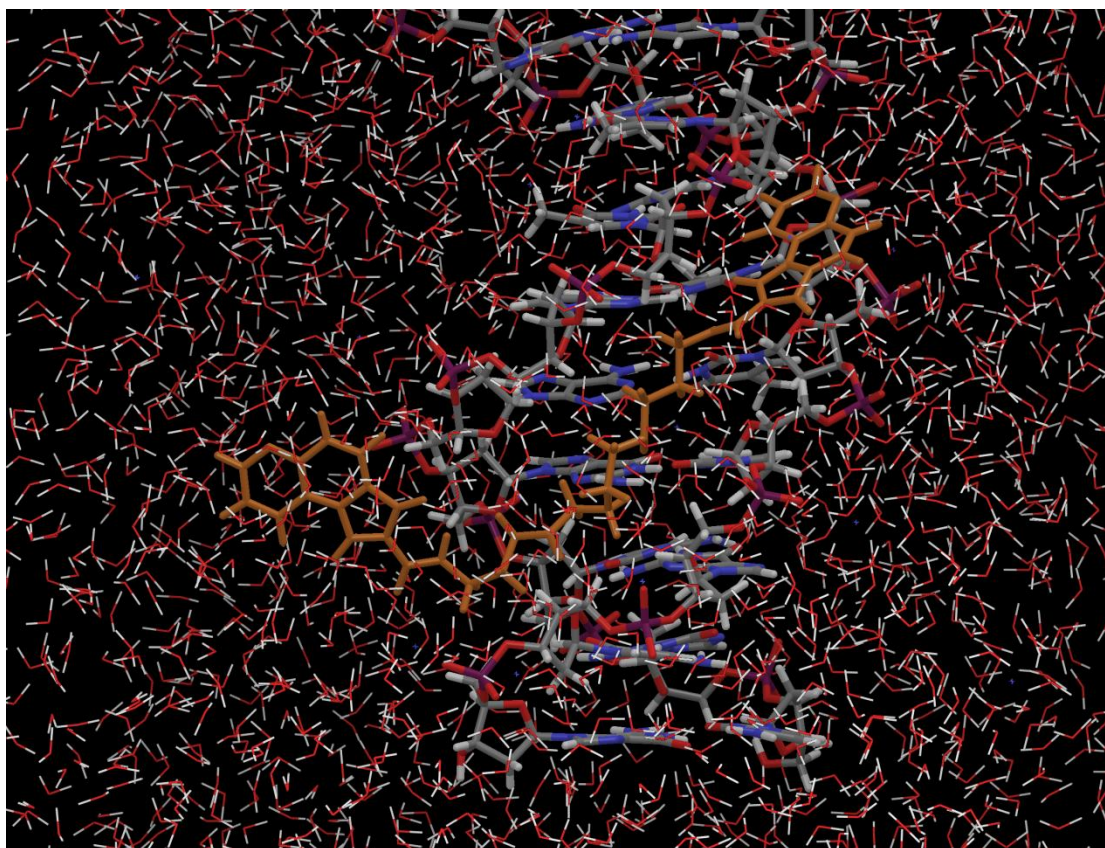
Οι ενώσεις, σε κάθε περίπτωση εντοπίζονται στη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Το συνολικό σύστημα υποβλήθηκε αρχικά σε ελαχιστοποίηση ενέργειας με χρήση της μεθόδου Βαθείας Κατάδυσης (Steepest Descent). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις αρχικά για 10 ns και στη συνέχεια για 40 ns. Οι εξισώσεις της κίνησης ολοκληρώθηκαν σε χρονικά βήματα των 2 fs και όλοι οι δεσμοί περιορίστηκαν στο μήκος ισορροπίας τους με τη βοήθεια του αλγορίθμου LINCS [51]. Ορίστηκε σύστημα με κανονικοποιημένες συνθήκες NPT (σύστημα σταθερού αριθμού σωματιδίων, όγκου, θερμοκρασίας και πίεσης) με περιοδικές οριακές συνθήκες. Η θερμοκρασία και η πίεση διατηρήθηκαν σταθερές στους 310 °K και 1 bar αντίστοιχα, με τις σταθερές του χρόνου να είναι 0.1 ps και 1 ps για το θερμοστάτη και τον βαροστάτη Berendsen [42]. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο πλέγματος σωματιδίων Ewald (PME μέθοδος) [44]. Οι αποστάσεις αποκοπής (cutoff distances) για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων Coulomb και Van der Waals ορίστηκαν στα 1.0 nm.

Οι παράμετροι που ορίστηκαν για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής επιλέχθηκαν σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία πάνω σε μελέτες μοριακής δυναμικής σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες [65-68].

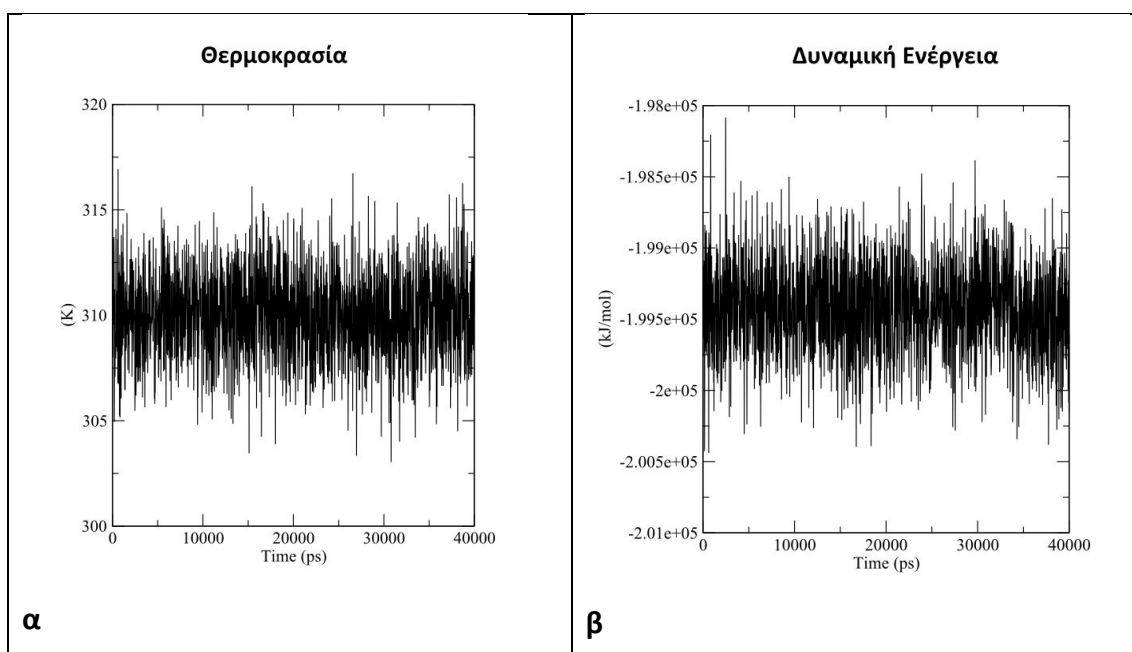
8.5.2 Αποτελέσματα

Στην Εικόνες 8.7 και 8.8 που ακολουθούν απεικονίζονται τα συστήματα που δημιουργήθηκαν για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των συμπλόκων των ενώσεων **5e** και **5g** με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Στα Σχήματα 8.1 και 8.2 που ακολουθούν, απεικονίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά των προσομοιώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο για τις ενώσεις **5e** και **5g** αντίστοιχα.



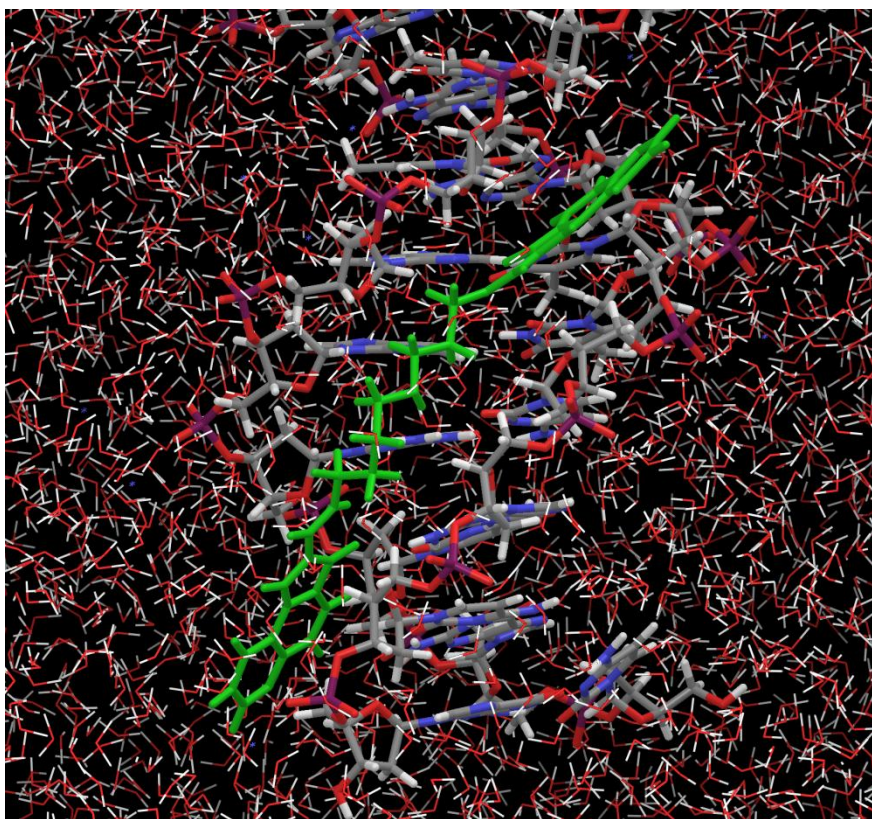
Εικόνα 8.7: Σύστημα συμπλόκου **5e-1d64** περιβαλλόμενο από μόρια νερού και κατιόντα νατρίου (Na^+), όπως χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η ένωση διακρίνεται με πορτοκαλί χρώμα.



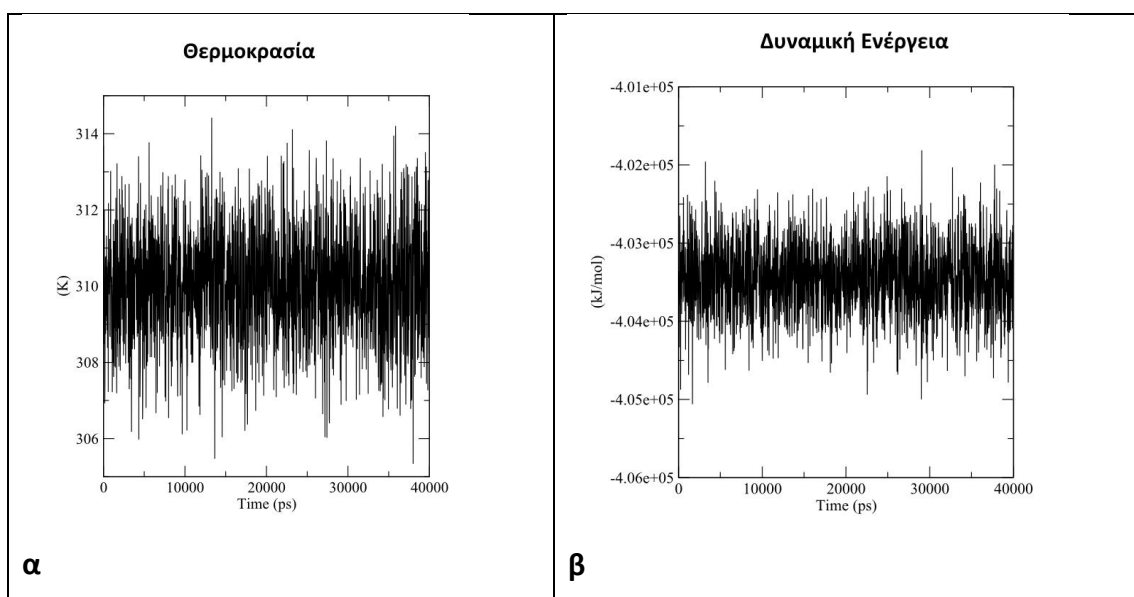
Σχήμα 8.1: **α.** Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. **β.** Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης και κατά μέσο όρο στους $309,984 \text{ } ^\circ\text{K}$. Η δυναμική ενέργεια του

συστήματος διατηρήθηκε κατά μέσο όρο στα -199425 kJ/mol κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 8.8: Σύστημα συμπλόκου **5g-1d64** περιβαλλόμενο από μόρια νερού και κατιόντα νατρίου (Na^+), όπως χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η ένωση διακρίνεται με πράσινο χρώμα.



Σχήμα 8.2: α. Διάγραμμα θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. β. Διάγραμμα δυναμικής ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο.

Υπολογίστηκε ότι η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης και κατά μέσο όρο στους 309,998 °K. Η δυναμική ενέργεια του συστήματος διατηρήθηκε κατά μέσο όρο στα -403425 kJ/mol κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

8.5.3 Παρατηρήσεις

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων της μοριακής δυναμικής προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Το σύμπλοκο της ένωσης **5e**-DNA παρέμεινε σταθερό καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 8.1).
- Το σύμπλοκο της ένωσης **5g**-DNA παρέμεινε σταθερό καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 8.2).
- Υπήρχε παρουσία δεσμών υδρογόνου της ένωσης **5e** με τις αζωτούχες βάσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και συγκεκριμένα τα υδρογόνα που είναι συνδεδεμένα με άζωτα της αλειφατικής αλυσίδας της ένωσης, δημιουργούσαν δεσμούς υδρογόνου με κυτοσίνες (DG) και γουανίνες (DC) για περισσότερο από το 80% της προσομοίωσης.
- Αντίθετα, στην περίπτωση της ένωσης **5g** δεν παρατηρήθηκε παρουσία δεσμών υδρογόνου, παρά μόνο για το 6% της προσομοίωσης.

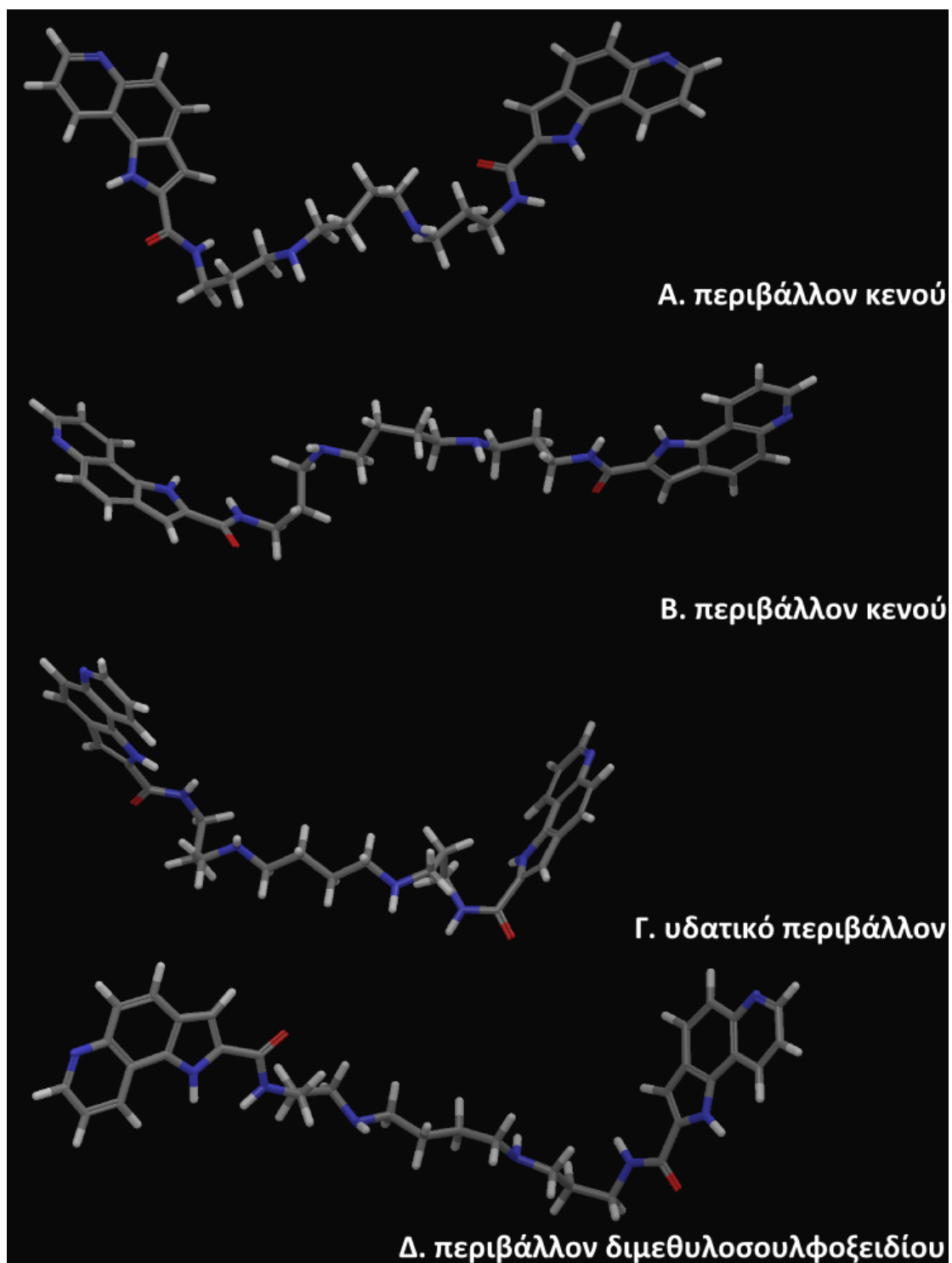
Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν για άλλη μια φορά ότι η ένωση **5e** παρουσιάζει καλύτερη και σταθερότερη πρόσδεση με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, γεγονός που εξηγεί και την καλύτερη κυτταροτοξική της δράση.

Κεφάλαιο 9 – Γενικά Συμπεράσματα και παρατηρήσεις

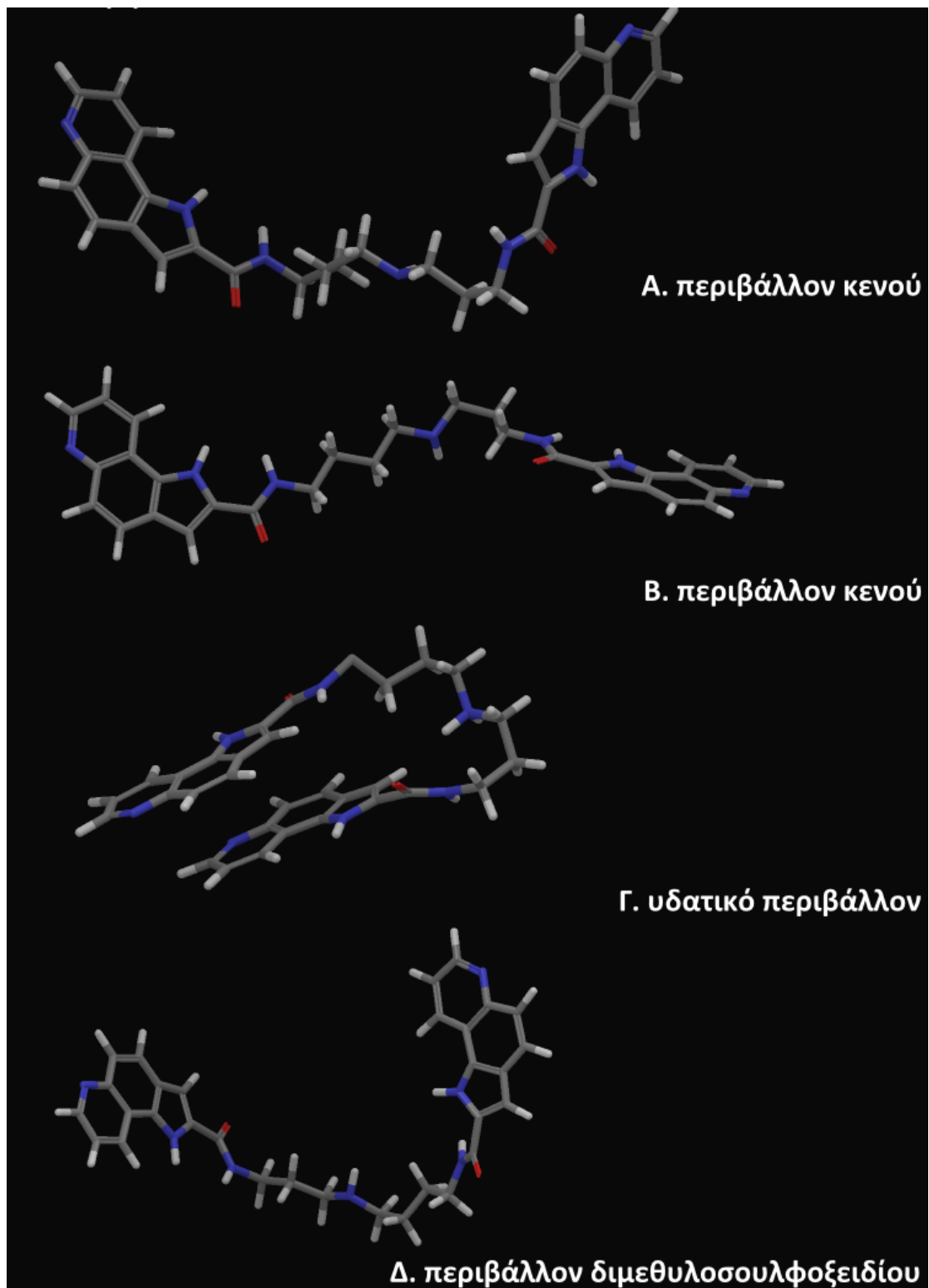
9.1 Διερεύνηση διαμορφώσεων σε περιβάλλοντα κενού, νερού και διμεθυλοσουλφοξειδίου

Αρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των διαμορφώσεων που λαμβάνουν οι ενώσεις **5e** και **5g**, συνδυάζοντας πειραματικά δεδομένα φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR) μίας και δύο διαστάσεων (COSY, NOESY), και διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων με τη βοήθεια υπολογιστικών μεθόδων μοριακής δυναμικής υπό συνθήκες κενού, υδατικού περιβάλλοντος και περιβάλλοντος διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Τα κύρια συμπεράσματα από τη μελέτη των ενώσεων ήταν τα ακόλουθα:

- Από την πλήρη ανάλυση και ταυτοποίηση των φασμάτων NMR εξήχθη το συμπέρασμα ότι και τα δύο μόρια αναμένεται ότι θα λαμβάνουν εκτεταμένες διαμορφώσεις.
- Από τη διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων σε περιβάλλοντα κενού, νερού και διμεθυλοσουλφοξειδίου προέκυψε ένα ευρύ φάσμα διαμορφώσεων.
- Για την ένωση **5e**, ανεξαρτήτως περιβάλλοντος, προέκυψε ότι η ένωση λαμβάνει εκτεταμένες διαμορφώσεις (Εικόνα 9.1).
- Για την ένωση **5g**, προέκυψε ότι ευνοούνται οι εκτεταμένες διαμορφώσεις όπου τα αρωματικά συστήματα προσανατολίζονται το ένα προς το άλλο αλλά και οι διαμορφώσεις όπου παρατηρείται στίβαξη των αρωματικών δακτυλίων της ένωσης (Εικόνα 9.2).



Εικόνα 9.1: Σύγκριση των διαμορφώσεων της ένωσης **5e** σε περιβάλλοντα κενού και διαλυτών



Εικόνα 9.2: Σύγκριση των διαμορφώσεων της ένωσης **5g** σε περιβάλλοντα κενού και διαλυτών

9.2 Διερεύνηση διαμορφώσεων και λειτουργίας των ενώσεων **5e** και **5g** σε βιολογικά περιβάλλοντα

Επόμενος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των ενώσεων **5e** και **5g** σε βιολογικά περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις μελετήθηκαν αρχικά για την ικανότητά τους να διαπερνούν τον υδάτινο φραγμό των λιπιδικών διπλοστιβάδων και να εισέρχονται σε αυτές, και στη συνέχεια ακολούθησε έρευνα του μηχανισμού πρόσδεσης των ενώσεων σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

9.2.1 Περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας διμυριστόυλ-φωσφατιδυλοχολίνης (Dimystoylphosphatidylcholine, DMPC)

Από τα πειράματα μοριακής δυναμικής σε λιπιδικές διπλοστιβάδες διαφάνηκε ότι οι ενώσεις **5e** και **5g** έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν τον υδάτινο φραγμό των λιπιδικών διπλοστιβάδων και να εισέρχονται σε αυτές. Για την ακρίβεια διεισδύουν εύκολα στις διπλοστιβάδες όπου και κατανέμονται στο λιπόφιλο τμήμα τους, δηλαδή μεταξύ της πολικής φάσης (πολικής κεφαλής-γλυκερολικού σκελετού) και αλκυλικής αλυσίδας.

Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός και στο περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας, και οι δυο ενώσεις εμφανίστηκαν σε σχετικά εκτεταμένες διαμορφώσεις (Εικόνα 9.3).

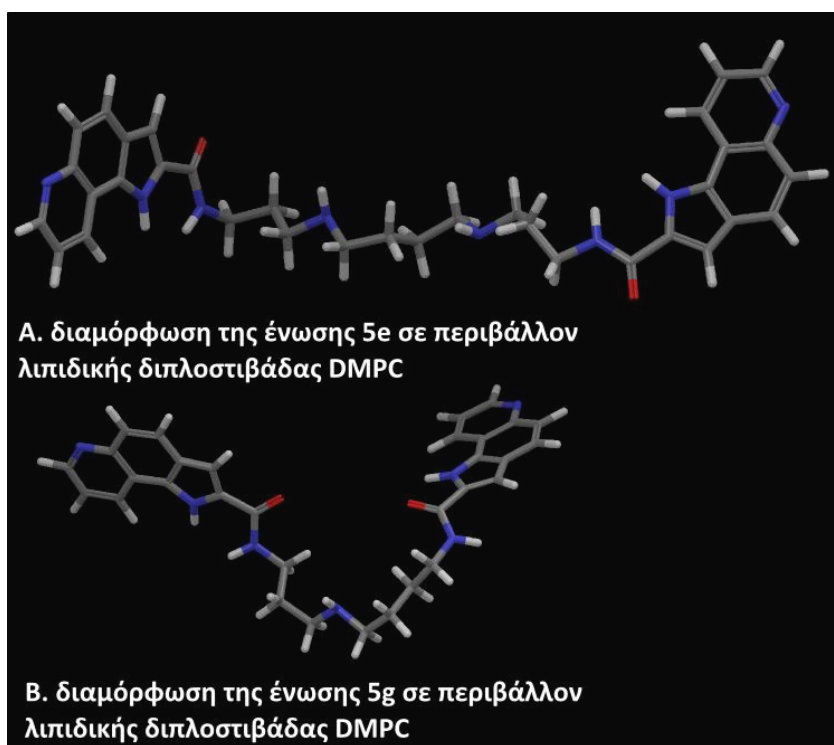
9.2.2 Αλληλεπίδραση ενώσεων με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες – Προσομοίωση περιβάλλοντος κυτταρικού πυρήνα

Από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων **5e** και **5g** σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες προέκυψαν οι ακόλουθες παρατηρήσεις:

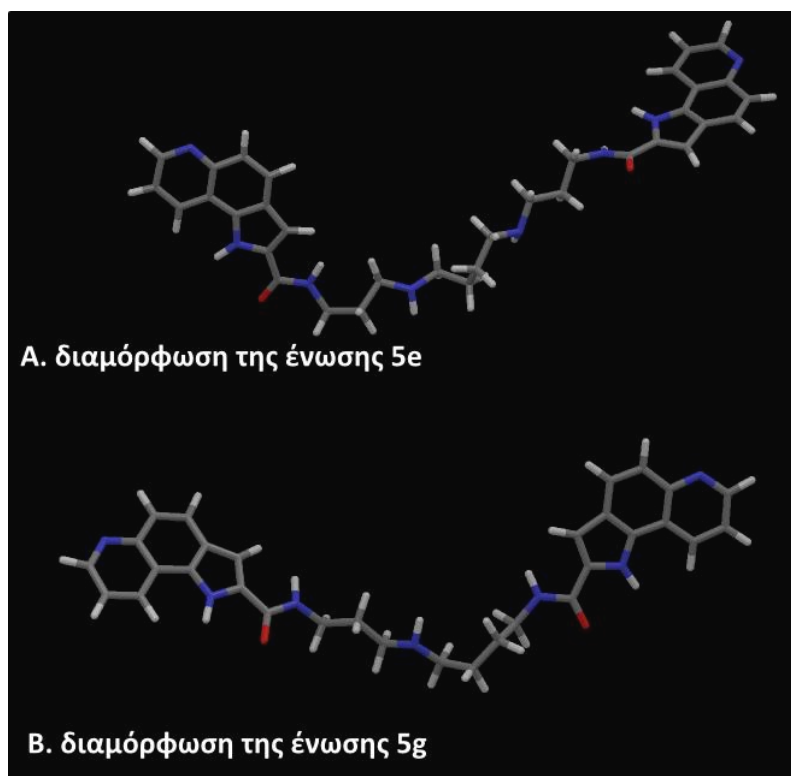
- Η ένωση **5e** προσδένεται ευνοϊκότερα στο DNA παρουσιάζοντας φαινόμενο πρόσδεσης τύπου χιαστί με τις αζωτούχες βάσεις (cross-linking effect).
- Και οι δύο ενώσεις τοποθετούνται σε εκτεταμένες διαμορφώσεις στη μεγάλη αύλακα του DNA (Εικόνα 9.4).

Ως γενικό συμπέρασμα προκύπτει ότι η ένωση **5e** λαμβάνει περισσότερη εκτεταμένη διαμόρφωση στα διάφορα περιβάλλοντα ενώ η ένωσης **5g** λαμβάνει εκτεταμένη διαμόρφωση τύπου V. Αυτή η διαφορά στη συστροφή μεταξύ των δύο

ενώσεων, ιδιαίτερα στα περιβάλλοντα που προσομοιάζουν τα βιολογικά μπορεί να σχετίζεται με τη διαφορετική βιολογική τους συμπεριφορά.



Εικόνα 9.3: Σύγκριση των διαμορφώσεων των ενώσεων **5e** και **5g** περιβάλλον λιπιδικής διπλοστιβάδας DMPC.



Εικόνα 9.3: Σύγκριση των διαμορφώσεων των ενώσεων **5e** και **5g** μετά από πρόσδεση σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Πίνακας Ορολογίας

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

| Ξενόγλωσσος όρος | Ελληνικός Όρος |
|------------------------------------|---|
| Intrastrand crosslinking | Σχηματισμός δεσμών μεταξύ των βάσεων της ίδιας αλυσίδας |
| Interstrand crosslinking | Σχηματισμός δεσμών μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων του DNA |
| Nuclear Magnetic Resonance | Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού |
| Cross-linking effect | Σχηματισμός δεσμών τύπου χιαστί |
| Energy Minimization | Ελαχιστοποίησης Ενέργειας |
| Steepest Descent | Αλγόριθμος Βαθύτατης Κατάδυσης |
| Conjugated Gradient | Αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης |
| Molecular Docking | Μοριακή Πρόσδεση |
| GlideScore | Βαθμολογία πρόσδεσης |
| Force Field | πεδίου δυνάμεων |
| Trajectory file | Αρχείο τροχιάς |
| Simulated Annealing | Μοριακή Δυναμικής Υψηλής Θερμοκρασίας Ανόπτωσης |
| Dimystoylphosphatidylcholine | διμυριστόυλ-φωσφατιδυλοχολίνη |
| High Throughput Virtual Screening, | Σάρωσης Υψηλού Ρυθμού Απόδοσης |
| Gradient | Κλίση |
| Interactions | Αλληλεπιδράσεις |
| Cutoff distances | αποστάσεις αποκοπής |

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

| | |
|--------------------------|------------------------------------|
| DNA | Δεσοξυριβονουκλεοτίδιο |
| RNA | Ριβονουκλεοτίδιο |
| NSCLC-N16-L16 | Non-Small-Cell-Lung-Carcinoma |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| DMSO | Διμεθυλοσουλφοξείδιο |
| d6-DMSO | δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο |
| FF | Force Field |
| ¹H NMR | Φάσμα πρωτονίου NMR |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| NOE | Nuclear Overhauser Effect |
| HTVS | High Throughput Virtual Screening, |
| SP | Standard Precision |
| XP | Extra Precision |
| m | Multiple, πολλαπλή |
| d | Double, διπλή |
| dd | Doubledouble, διπλή διπλών |
| quin | Quintet, πενταπλή |
| Br | Broad, ευρεία |
| DMPC | Dimystoylphosphatidylcholine |
| GROMACS | |
| PME | Partcile Mesh Ewald |
| SPC | Simple Point Calculations |
| RMSD | Root Mean Square Deviation |

Βιβλιογραφία

1. Ames, B.N. , **“Mutagenesis and Carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors”**, *Environ. Molec. Mut.* 14 (Suppl . 16):66-77, **1989**.
2. Foulds, L. **“The experimental Study of Tumor Progression”**, *Cancer. Res.*, 14: 327-339, **1954**.
3. Kinzler, K. W., Vogelstein, B. **“Lessons from Hereditary Colorectal Cancer”**, *Cell*, 87, 159-170, **1996**.
4. Weinberg R.A., **“How Cancer Arises?”**, *Scientific American*, September **1996**.
5. Fedi P., Tronick S.R., Aaronson S.A., **“Growth Factors”** in *“Cancer Medicine”* , J.F. Holland, et al., Editors. **2000**, B.C. Decker Inc.: Hamilton. p. 41-64.
6. Weinberg R.A., **“The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control”**, *Cell*, Vol. 81, **1995**, 323-330.
7. Wiley A.H., Kerr J.F., Currie A.R, **“Cell death: the significance of apoptosis”**, *Int. Rev. Cytol.*, **1980**, 68, 251-306.
8. Hananah D. and Weinberg R.A., **“The Hallmarks of Cancer”**, *Cell*, 100, 57, **2000**.
9. Davila Gonzalez I., Solazar Saez R., Moreno Rodilla E., Lafford Yges E. and Lorente Toledano F., **“Hypersensitivity Reactions to Chemotherapy Drugs”**, *Alergol. Immuno.Clin.*, 15, 161, **2000**.
10. Rimington C. and Riley P.A., **“The biochemical approach to Cancer Therapy: A short essay”**, *Int. J. Biochem.*, 25, 1385, **1993**.
11. Malhorta V. and Perry M.E., **“Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window”**, *Cancer Biology & Therapy*, 2, 5, **2003**.
12. Tintinalli’s Emergency Medicine, Chapter e **235.1**, **“Common therapeutic Agents”**.
13. Alberts B., **“DNA Replication and Recombination”**, *Nature*, 421, 431, **2003**.
14. Watson J.P. and Crick F.H., **“A structure for deoxyribose nucleic acid”**, *Nature*, 171, 737, **1953**.
15. Slapak, C.A. Kufe, D.W.; In: **“Harrison’s principles of internal medicine”**, 14th ed., McGraw-Hill, Inc., Health Professions Div., NY, **1998**.
16. Armitage J.O., Antman K.H. eds **“High-dose cancer therapy: pharmacology, hematopoietins, stem cells”**, ed 2, Baltimore: Williams and Wilkins, **802**, **1995**.
17. Hemminki K. and Ludlum D.B., **“Covalent modification of DNA by antineoplastic agents”**, *J. Nat. Cancer Inst.*, 73, 1021, **1984**.
18. Sanderson B.J.S. and Shield A.J., **“Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents”**, *Mutation Res.*, 355, 41, **1996**.
19. Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C. (ed.), Goodman & Gilman’s **“The Pharmacological Basis of Therapeutics”**, Mcgraw-Hill, **2010**.
20. Benigni R., Palombo F. and Dagliotti E., **“Multivariate statistical analysis of mutation spectra of alkylating agents”**, *Mutation Res.*, 267, 77, **1992**.
21. Wilman D.E.V. and Connors T.A., **“Molecular structure and antitumour activity of alkylating agents”** in: S.Neidle and M.J. Waring (Eds.) *Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action*, MacMillan, London, 233, **1983**.
22. Katzung B., Masters S., Trevor A., **“Basic And Clinical Pharmacology”**, Chapter 54: **“Cancer Chemotherapy”**, McGraw-Hill 11th Edition, **2009**.

23. Mattes W.B., Hartley J.A., Kohn K.W., Matheson D.W., **“GC-rich regions in genomes as targets for DNA alkylation”**, *Carcinogenesis*, **1988**, 8(11), 2065-2072.
24. Miliard J.T., Weidner M.F., Kirchner J.J., Ribeiro S., Hopkins P.B., **“Sequence preferences of DNA interstrand crosslinking agents: quantification of interstrand crosslink locations in DNA duplex fragments containing multiple crosslinkable sites”**, *Nucleic Acids Research*, **1991**, 19(8), 1885-1891.
25. Hadden M.K., Blagg B.S.J., **“Dimeric Approaches to Anti-Cancer Chemotherapeutics”**, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2008**, 8(7), 807-816.
26. Tsoinis, A., Vlachou, M., Zouroudis S., Jeney, A., Timer, F., Thurston, D.E., Roussakis, C., **“A Facile Synthesis of C2-Substituted Pyrrolo[2,3-f]quinolines with Cytotoxic Activity”**, *Lett. Drug Des. Discov.* **2005**, 2, 189-192.
27. Tsoinis, A.; Vlachou, M.; Gerasimopoulou, M.; Eikosipentaki, A.; Ioannidis, C.; Klouvidaki, A.; Afroudakis P.A.; Moreau D.; Roussakis, C., **“Symmetrical Derivatives of C2-Substituted Pyrrolo[2,3-f]quinolones: Synthesis, Cytotoxicity and Drug Delivery Studies”**, *Lett. Drug Des. Discov.*, **2007**, 4, 87-91.
28. Μαυρομούστακος Θ., Ματσούκας Ι., **«Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού»**, Εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, Αθήνα **2006**.
29. Μαυρομούστακος Θ., Ζουμπουλάκης Π., **«Μοριακή Μοντελοποίηση: Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία»**, Εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, Αθήνα **2008**.
30. Leach A. R., **“Molecular Modelling: Principles and Applications”**, Second Edition, Pearson Education EMA, **2001**.
31. Patrick, G.L., **“An Introduction to Medicinal Chemistry”**, Oxford University Press, **2001**, p. 331-334.
32. Kirkpatrick, S., Gelatt, C.D. Jr., Vecchi M.P., **“Optimization by Simulated Annealing”**, *Science*, **1983**, 220, 671-680.
33. Glide, version 5.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2010**.
34. Stryer L., Berg J.M., Tumoczko J., **“Biochemistry”** 5th edition, W.H.Freeman & Co Ltd, **2002**.
35. Singer S.J., Nicolson G.L. **“The fluid mosaic model of the structure of cell membranes”**, *Science*, **1972**, 175 (23), 720-731.
36. <http://www.tutorvista.com/biology/membrane-lipid-bilayer>
37. Gupta, D.; Kothekar, V. **“Molecular dynamics simulation of the interaction of nifedipine and its meta and para NO₂ analogs with a hydrated dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC) bilayer”**, *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, **1998**, 431, 17-31.
38. Feller S.E., **“Molecular dynamics simulations of lipid bilayers”**, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2000**, 5, 217-223.
39. Chiu S.W., Clark M., Bakaji V., Subramaniam S., Scott H.L., Jakobsson E., **“Incorporation of Surface Tension into Molecular Dynamics Simulation of an Interface: A Fluid Phase Lipid Bilayer Membrane”**, *Biophys. J.*, **1995**, 69, 1230-1245.
40. Rognan, D., **“Molecular dynamics simulations: A tool for drug design”**, *Perspectives in Drug Discovery and Design*, **1998**, 9 (11), 181-209.

41. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C., **"GROMACS: Fast, flexible, and free"**, *Journal of Computational Chemistry*, **2005**, *26* (16), 1701-1718.
42. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A., & Haak, J. R., **"Molecular dynamics with coupling to an external bath"**, *The Journal of Chemical Physics*, **1984**, *81*(8), 3684-3690.
43. Schuttelkopf A.W., Van Aalten D.M.F., **"PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes"**, *Acta Crystallographica*, **2004**, *D60*, 1355-1363.
44. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G., **"A smooth particle mesh ewald method"**, *The Journal of Chemical Physics*, **1995**, *103*(19), 8577-8593.
45. <http://people.ucalgary.ca/~Tieleman/download.html>
46. Tieleman D. P., Berendsen H. J. C., **"Molecular Dynamics Studies of Lipid Bilayers"**, *J. Chem. Phys.*, **1996**, *105*, 4871.
47. Berger, O., Edholm, O., Jahnig, F., **"Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature."**, *Biophys. J.*, **1997**, *72*, 2002.
48. Berendsen H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Hermans, J., **"Intermolecular Forces"**, Pullman, B. ed. D. Reidel Publishing Company Dordrecht, **1981**, 331-342.
49. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., van Drunen, R., **"GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation"**, *Comp. Phys. Comm.*, **1995**, *91*, 43.
50. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Sijbers, A., Feenstra, K. A., van Drunen, R., Berendsen, H. J. C., **"GROMACS User Manual"**, version 3.3, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen: The Netherlands, **2005**.
51. Hess. B., Bekker, H., Berendsen H. J. C., Fraaije J., **"LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations"**, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463.
52. Darden, T., York, D., Pedersen, L., **"Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems"**, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
53. Holt P.A., Chaires J.B., Trent J.O., **"Molecular Docking of Intercalators and groove-binders to nucleic acids using autodock and surflex"**, *J. Chem. Inf. Model* , **2008**, *48*, 1602-1615.
54. Edwards K.J., Jenkins T.C., Neidle S., **"Crystal Structure of a Pentamidine-Oligonucleotide Complex: Implications for DNA-Binding Properties"**, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 7104-7109.
55. Coll M., Aymami J., Van der Marel G.A., Van Boom J.H., Rich A., Wang A.H.J., **"Molecular Structure of the Netropsin-d(CGCGATATCGCG) Complex: DNA Conformation in an Alternating AT Segment"**, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 310-320.
56. Vekhoff P., Ceccaldi A., Polverari D., Pylouster J., Pisano C., Arimondo P.B., **"Triplex Formation on DNA Targets: How to Choose the Oligonucleotide"**, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 12277-12289.

57. Ricet C.G., Netz P.A., **“Docking Studies on DNA-ligand Interactions: Building and Application of a Protocol To Identify the Binding Mode”**, *J. Chem. Inf. Model*, **2009**, *49*, 1925-1935.
58. Vargiu A.V., Ruggerone P., Magistrato A., Carloni P., **“Sliding of Alkylating Anticancer Drugs along the Minor Groove of DNA: New Insights on Sequence Selectivity”**, *Biophysical Journal*, **2008**, *94*, 550-561.
59. Suckling C.J., **“Molecular Recognition and physicochemical properties in the discovery of selective antibacterial minor groove binders”**, *J. Phys. Org. Chem.*, **2008**, *21*, 575-583.
60. Numm C.M., Garman E., Neidle S., **“Crystal Structure of the DNA Decamer d(CGCAATTGCG) Complexed with Minor Groove Binding Drug Netropsin”**, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 4792-4799.
61. Janovec L., Kozurkova M., Sabolova D., Ungvarsky J., Paulikova H., Plsikova J., Vantova Z., Imrich J., **“Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling”**, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2011**, *19*, 1790-1801.
62. Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., Case, D.A., **“Development and testing of a general amber force field”**, *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1157.
63. Jakalian, A., Bush, B.L., Jack, D.B., Bayly, C.I., **“Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I Method”**, *J. Comput. Chem.*, **2000**, *21*, 132.
64. Jakalian, A., Jack, D.B., Bayly, C.I., **“Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation”**, *J. Comput. Chem.*, **2002**, *23*, 1623.
65. Vargiu A.V., Ruggerone P., Magistrato A., Carloni P., **“Anthramycin-DNA binding explored by molecular simulations”**, *J. Phys. Chem. B.*, **2006**, *110*, 24687-24695.
66. Koonammackal M.V., Nellipparambil U.V.N., Sudarsanakumar C., **“Molecular dynamics simulations and binding free energy analysis of DNA minor groove complexes of curcumin”**, *J. Mol. Model.*, **2001**, *17(11)*, 2805-2816.
67. Dolenc J., Oostenbrink C., Koller J., van Gunsteren W.F., **“Molecular dynamics simulations and free energy calculations of netropsin and distamycin binding to an AAAAA DNA binding site”**, *Nucleic Acids Research*, **2005**, *33 (2)*, 725-733.
68. Soares T.A., Hunenberg P.H. Kastenholz M.A., Krautler V., Lenz T., Lind R.D., Oostenbrink C., van Gunsteren W.F., **“An improved nucleic acid parameter set for the GROMOS force field”**, *J. Comput Chem*, **2005**, *26 (7)*, 725-737.