



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Υπολογιστική μελέτη των αλληλεπιδράσεων
πρωτεΐνης/προσδέτη και DNA/συμπλόκων παρεμβολέων-
DNA με στόχο το σχεδιασμό νέων φαρμάκων»**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΥΡΙΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Επιβλέπων: Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Υπολογιστική μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης/προσδέτη και DNA/συμπλόκων παρεμβολέων-DNA με στόχο το σχεδιασμό νέων φαρμάκων»

Αγγελική Συριοπούλου

A.M. : 181513

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής

Αθανάσιος Γκιμήσης, Καθηγητής

Γεωργία Μελαγράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

Σεπτέμβριος 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υπολογιστικός ορθολογικός σχεδιασμός αποτελεί έναν βασικό πυλώνα στον σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Συνήθως, τα φάρμακα δρουν σε συγκεκριμένες ενώσεις-στόχους, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες, DNA ή λιπιδικές διπλοστιβάδες. Ως απόρροια αυτού, η μοριακή πρόσδεση αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων. Στη διάρκεια του πειράματος της μοριακής πρόσδεσης γίνεται χρήση συγκεκριμένων αλγορίθμων και συναρτήσεων αξιολόγησης προκειμένου να μελετηθεί η ισχύς της αλληλεπίδρασης του προσδέτη με τον υποδοχέα. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, το AutoDock είναι ένα πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιεί ένα σύνολο αλγορίθμων για την επίλυση συγκεκριμένων προβλημάτων. Τέτοιοι αλγόριθμοι είναι οι Monte Carlo Simulated Annealing (SA), Genetic Algorithm (GA) και ο υβριδικός αλγόριθμος local search GA, γνωστός και ως Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Διεξήχθησαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης παραγώγων του καφεϊκού, σαλβιανικού και ροσμαρινικού οξέος σε πρωτεϊνικό υποδοχέα (Bcl-xL), με τη χρήση του AutoDock, με σκοπό την πληρέστερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φυσικών προϊόντων. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των ιδιοτήτων πρόσδεσης των δύο πρώτων σε σχέση με τις ιδιότητες του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο αποτελεί σύζευξη τους. Στόχος ήταν να κατανοηθεί εάν η δημιουργία από τη φύση υβριδικών συνθέτων μορφών οδηγεί σε μόρια με ευνοϊκότερη πρόσδεση. Αυτό πραγματικά αποδείχθηκε για τον πρωτεϊνικό υποδοχέα Bcl-xL. Επίσης, έλαβαν χώρα *in silico* υπολογισμοί προκειμένου να ελεγχθεί η πρόσδεση (παρεμβολή) συμπλόκων μετάλλου, ως μέταλλο-θεραπευτικές ενώσεις, σε μόριο DNA και πιο συγκεκριμένα σε DNA θύμου αδένα μοσχαριού.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μοριακή Μοντελοποίηση, Σχεδιασμός Φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ: Μοριακή μοντελοποίηση, Σχεδιασμός Φαρμάκων, Αντικαρκινικά, Μοριακή Πρόσδεση, Μοριακή Δυναμική, AutoDock, Αλγόριθμος, Πρωτεΐνη, DNA, Σύμπλοκα μετάλλων

ABSTRACT

Computational rational drug design is a key pylon in the design of new drugs. Typically, drugs act on specific target compounds, such as proteins, DNA, or lipid bilayers. As a result, molecular docking is an important part of rational drug design. During molecular docking process, specific algorithms and scoring functions are used aiming to study the interactions' strength between the ligand and the receptor. As mentioned above, AutoDock is a program that uses a set of algorithms to solve specific problems. Monte Carlo Simulated Annealing (SA), Genetic Algorithm (GA) and the hybrid local search GA algorithm, also known as the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) are algorithms AutoDock uses. Molecular docking calculations of caffeine, salvia and rosmarinic acid derivatives on a protein receptor (Bcl-xL) were performed, using AutoDock, in order to better understand the mechanism of action of natural products. In addition, the binding properties of the first two were compared with the properties of rosmarinic acid, which is the result of their coupling. The aim was to understand whether the creation by nature of hybrid composite forms leads to molecules with more favorable binding. This was actually demonstrated for the Bcl-xL protein receptor. In silico calculations were also performed to control the binding (intercalation) of metal complexes, as metal-therapeutic compounds, to a DNA molecule and more specifically to calf thymus DNA.

SUBJECT AREA: Molecular Docking, Drug Design

KEYWORDS: Molecular modeling, Drug design, Anticancer drugs, Molecular docking, Molecular dynamics, AutoDock, Algorithm, Protein, DNA, Metal complexes

Αφιερωμένο στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό του. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω, επιπλέον, για τη βοήθεια του και την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αθανάσιο Γκιμήση, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, για τις πολύτιμες διορθώσεις του.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωργία Μαλεργάκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, και για τις πολύτιμες διορθώσεις και τα σχόλια της.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανδρέα Τζάκο, ο οποίος υπήρξε επιβλέπωντας της πτυχιακής μου εργασίας όντας προπτυχιακή φοιτήτρια, για την ανάθεση του θέματος και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Βασικό ρόλο στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έπαιξαν οι υποψήφιες διδάκτορες Χοντζοπούλου Ελένη, Μόσχοβου Καλλιόπη και Κυριακίδη Σοφία. Θα ήθελα να τις ευχαριστήσω για τη συνεχή επιστημονική βοήθεια τους, για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριό και πάνω από όλα για τη στήριξη τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα και για την άριστη συνεργασία: Νικολέτα Ζουπάνου, Χριστίνα Κοτζαστράτη, Γιώργο Σκουφά, Βίκη Βάκαλη καθώς και τους Δημήτρη Ντουντανιώτη, Γιώργο Λεόνη και Γιάννη Ανδρεαδέλη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πολύ δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για τη συνεχή υποστήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	Σελ.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Σκοπός Μεταπτυχιακής Εργασίας	
1.1. Σκοπός	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Σχεδιασμός Φαρμάκων – <i>Insilico</i> μελέτες	
2.1. Εισαγωγή	4
2.2. Σχεδιασμός Φαρμάκων	4
2.3. Μοριακή Μοντελοποίηση	7
2.4. Μοριακή Πρόσδεση	10
2.5. Εφαρμοζόμενοι Αλγόριθμοι	12
2.6. Αλγόριθμοι Αναζήτησης – Γενικές Πληροφορίες	13
2.6.1. Αλγόριθμοι Αναζήτησης – Άκαμπτες Δομές	14
2.6.2. Αλγόριθμοι Αναζήτησης – Εύκαμπτες Δομές	15
2.7. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης ή Βαθμονόμησης	18
2.7.1. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης Βασισμένες στο Πεδίο Δυνάμεων	19
2.7.2. Εμπειρικές Συναρτήσεις Βαθμολόγησης	20
2.7.3. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης Βασισμένες στη Γνώση	20
2.7.4. Συναρτήσεις Επικρατέστερης Βαθμολόγησης	21
2.8. Λογισμικό AutoDock	21
2.8.1. AutoDockTools: Το γραφικό περιβάλλον του AutoDock	24
2.9. Μοριακή Δυναμική	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Καρκίνος & Θεραπεία	
2.1. Καρκίνος	27
2.1.1. Τύποι Καρκίνου	31
2.1.2. Είδη Θεραπείας	34
2.2. Χημειοθεραπεία	35
2.2.1. Οι ανταγωνιστές της Bcl-xL, ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα	37
2.2.1.1. Αγωνιστές & Ανταγωνιστές	37
2.2.1.2. Η πρωτεΐνη Bcl-xL	38

2.2.1.3.	Φυσικά προϊόντα, ως ανταγωνιστές της Bcl-xL	43
2.2.2.	Παρεμβολείς DNA	44
<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Πειραματική Διαδικασία		
1.1.	Περιγραφή Σκοπού Πειραματικού Μέρους	54
1.2.	Υλικά & Μέθοδοι	54
1.2.1.	Μοριακή Πρόσδεση	54
1.2.2.	Σχεδιασμός και προετοιμασία παραγώγων Καφεϊκού, Σαλβιανικού και Ροσμαρινικού οξέος	55
1.2.3.	Προετοιμασία συμπλόκων τετραμικού οξέος	55
1.2.4.	Προετοιμασία Υποστρωμάτων	56
1.2.5.	Μοριακή Δυναμική των συμπλόκων, προετοιμασία του συστήματος και φάση παραγωγής	56
1.2.6.	Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων	57
1.3.	AutoDock: Οδηγός Χρήσης/ Πειραματική Διαδικασία	57
1.3.1.	Μοριακή πρόσδεση συμπλόκων μετάλλου σε μόριο DNA με άγνωστη θέση πρόσδεσης (blinddocking)	58
1.3.2.	Μοριακή πρόσδεση σε πρωτεΐνη γνωρίζοντας το ενεργό της κέντρο (συν-κρυσταλλωμένη με προσδέτη)	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Παρουσίαση Αποτελεσμάτων		
2.1.	Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης Παραγώγων Καφεϊκού, Σαλβιανικού και Ροσμαρινικού οξέος	69
2.1.1.	Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Καφεϊκού οξέος	69
2.1.2.	Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Σαλβιανικού οξέος	78
2.1.3.	Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Ροσμαρινικού οξέος	85
2.1.4.	Συμπεράσματα Πειραμάτων	91
2.2.	Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης των τριών συμπλόκων N-ακέτυλο-3-άκυλο-5-	93

αρυλίδενοτετραμικού οξέος με χαλκό, ψευδάργυρο και
κάδμιο

2.2.1. Συμπεράσματα Πειραμάτων 98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιβλιογραφία

3.1. Βιβλιογραφία 99

Κατάλογος Σχημάτων	Σελ.
Σχήμα 1: Κατηγορίες αλγορίθμων αναζήτησης άκαμπτων δομών	14
Σχήμα 2: Κατηγορίες αλγορίθμων αναζήτησης εύκαμπτων δομών	15
Σχήμα 3: Κατηγορίες συναρτήσεων βαθμολόγησης	19
Σχήμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των εφαρμογών του AutoDockTools	25
Σχήμα 5: Στάδια ανωμαλίας κυττάρων από το 1 έως το 4	36

Κατάλογος Εικόνων	Σελ.
Εικόνα 1: Απεικόνιση σχεδιαγράμματος για τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων μορίων	10
Εικόνα 2: Απεικόνιση μοντέλου κλειδιού-κλειδαριάς	11
Εικόνα 3: Απεικόνιση μοντέλου επαγωγίμης προσαρμογής (induced fit)	12
Εικόνα 4: Τριδιάστατη δομή πρωτεΐνης 3ZLR	45
Εικόνα 5: Δομή ροσμαρινικού ως εστέρας καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος	47
Εικόνα 6: Δομή νουκλεοτιδίου	47
Εικόνα 7: α) Χαρακτηριστικά δομής DNA, β) Μερική χημική δομή DNA, γ) Το DNA στο χώρο	48
Εικόνα 8: Δομή πυρρολίδινο-2,4-διόνης	53
Εικόνα 9: Δομή τετραμικού οξέος	53
Εικόνα 10: Δομές των συμπλόκων N-ακέτυλο-3-άκυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με τα τρία μέταλλα Cu, Zn και Cd	54
Εικόνα 11: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση στόχων εργασίας	56
Εικόνα 12: Δομές N-ακέτυλο-3-άκυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος, καθώς επίσης και των συμπλόκων του με τα μέταλλα Cu, Zn και Cd	58
Εικόνα 13: Στιγμιότυπο της οθόνης της οθόνης που παρουσιάζει τα βελάκια, τα οποία εμφανίζουν τα αμινοξέα που απαρτίζουν την πρωτεΐνη	69
Εικόνα 14: Στιγμιότυπο της οθόνης που παρουσιάζει τα «τετράγωνα επιλογής»	69
Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν στον σχεδιασμό των παραγώγων	72
Εικόνα 16: Δομικός σκελετός παραγώγων καφεϊκού οξέος	73
Εικόνα 17: Κινητική ισορροπίας ειδών αντιστρεπτής αναστολής	73
Εικόνα 18: Δομές των παραγώγων του καφεϊκού οξέος που παρουσίασαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση στη Bcl-xL	75
Εικόνα 19: Στιγμιότυπο ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του παραγώγου CA33 και οι αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης	77

Εικόνα 20: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στα άτομα του προσδέτη.	79
Εικόνα 21: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης και έχοντας ως σημείο αναφοράς την διαμόρφωσή της όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock	79
Εικόνα 22: Σταθερότερες αλληλεπιδράσεις παραγωγού CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 46.53% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	80
Εικόνα 23: Υπέρθυση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του CA33 στο 46.53% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	81
Εικόνα 24: Δομικός σκελετός παραγώγων σαλβιανικού οξέος	81
Εικόνα 25: Δομές των παραγώγων του σαλβιανικού οξέος που παρουσίασαν ευνοϊκότερη πρόσδεση στη πρωτεΐνη.	83
Εικόνα 26: Στιγμιότυπο ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του παραγωγού SA64 και αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.	84
Εικόνα 27: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στα άτομα του προσδέτη.	85
Εικόνα 28: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης έχοντας ως σημείο αναφοράς τη διαμόρφωσή της όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock.	86
Εικόνα 29: Σταθερότερη αλληλεπίδραση του παραγωγού CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	87
Εικόνα 30: Υπέρθυση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του SA64 στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	87
Εικόνα 31: Δομικός σκελετός παραγώγων ροσμαρινικού οξέος.	88
Εικόνα 32: Δομές παραγώγων ροσμαρινικού οξέος με 5 χαμηλότερες ενέργειες πρόσδεσης.	89

Εικόνα 33: Αλληλεπιδράσεις παραγώγου RA124 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcl-xL.	90
Εικόνα 34: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης και στα άτομα του προσδέτη.	91
Εικόνα 35: Διάγραμμα RMSD της πρωτεΐνης έχοντας ως σημείο αναφοράς τη δομή της, όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock.	92
Εικόνα 36: Σταθερότερη αλληλεπίδραση του παραγώγου CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	93
Εικόνα 37: Υπέρθεση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του SA64 στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.	94
Εικόνα 38: Τριδιάστατη δομή μορίου DNA με PDP ID: 1BNA.	96
Εικόνα 39: Σύνολο 30 διαμορφώσεων του συμπλόκου του καδμίου, όπως προσδέθηκαν στη δίκλινη έλικα του μορίου DNA.	97
Εικόνα 40: Στιγμιότυπο καλύτερης διαμόρφωσης συμπλόκου του καδμίου στο μόριο DNA.	98
Εικόνα 41: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του συμπλόκου του ψευδαργύρου με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης.	99
Εικόνα 42: Σύνολο διαμορφώσεων του συμπλόκου του ψευδαργύρου, όπως προσδέθηκαν στη δίκλινη έλικα του μορίου DNA.	99
Εικόνα 43: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του συμπλόκου του χαλκού με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης.	100
Εικόνα 44: Σύνολο διαμορφώσεων του συμπλόκου του χαλκού όπως προσδέθηκαν στη μικρή αύλακα του δίκλινου μορίου.	101

Κατάλογος Πινάκων	Σελ.
Πίνακας 1: Κοστολόγηση σταδίων σχεδιασμού φαρμάκων για μία ένωση.	7
Πίνακας 2: Σύνομη περιγραφή χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.	38
Πίνακας 3: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων καφεϊκού οξέος που παρουσιάζουν τις ευνοϊκότερες τιμές συγγένειας πρόσδεσης.	76
Πίνακας 4: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων καφεϊκού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.	78
Πίνακας 5: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων σαλβιανικού οξέος που παρουσιάζουν τις ευνοϊκότερες τιμές συγγένειας πρόσδεσης	82
Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων σαλβιανικού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.	84
Πίνακας 7: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων ροσμαρινικού οξέος που παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές ενέργειας πρόσδεσης	89
Πίνακας 8: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων ροσμαρινικού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.	90
Πίνακας 9: Τιμές ενέργειας πρόσδεσης, σταθερών αναστολής και αριθμοί CCDC για τα τρία σύμπλοκα μετάλλων με το N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικό οξύ.	97
Πίνακας 10: Τιμές σταθεράς k_b υπολογιστικής και πειραματικής μελέτης.	102

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

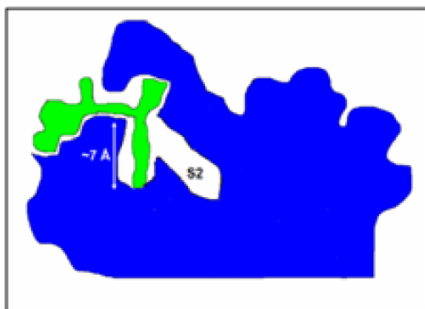
Σκοπός Μεταπτυχιακής Εργασίας



1.1. Σκοπός Εργασίας

Πρωταρχικός στόχος της εργασίας είναι η μελέτη δύο διαφορετικών υποστρωμάτων με χρήση του προγράμματος AutoDock. Σε αυτά τα πλαίσια, σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν παράγωγα τριών φυσικών προϊόντων, ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος ως πιθανοί αναστολείς της πρωτεΐνης Bcl-xL. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης συμπλόκων N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με Cu(II), Zn(II) και Cd(II), τα οποία χάρη συντομίας θα αναφέρονται ως σύμπλοκα τετραμικού οξέος. Τέλος, δημιουργήθηκε εγχειρίδιο χρήσης του προγράμματος με στόχο τη θεμελίωση του στο εργαστήριο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

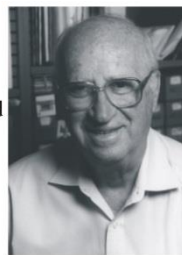


Emil Fisher
(1852 - 1919)



Μοντέλο
του κλειδιού και της κλειδαριάς

Daniel Koshland
(1920 -)



Μοντέλο
της «επαγόμενης προσαρμογής»

2.1. Εισαγωγή

Στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα ξεκίνησαν οι έρευνες με σκοπό τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός υποδοχέα και ενός προσδέτη, εξαιτίας της μεγάλης σπουδαιότητας του ρόλου τους στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων. Ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων αποτελεί μία πολύ απαιτητική και χρονοβόρα διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει συνοπτικά τον προσδιορισμό ενός φαρμακευτικού στόχου, τον σχεδιασμό της φαρμακευτικής ένωσης, τη σύνθεσή της στο εργαστήριο, την επικύρωση της δραστηριότητάς της και τέλος, την εδραίωση της στην αγορά.

Η Οδύσσεια της αρχικής ένωσης στόχου προς την Ιθάκη, τη παραγωγή ενός φαρμακευτικού προϊόντος απαιτεί όχι μόνο χρόνο αλλά και τεράστιο κόστος. Με γνώμονα πρόσφατες μελέτες, έχει προκύψει ότι η παραγωγή ενός νέου φαρμάκου κοστίζει κατά μέσο όρο \$800 εκατομμύρια και απαιτεί περίπου 15 χρόνια για να εδραιωθεί επίσημα στην αγορά. Αυτό είναι απόρροια του γεγονότος ότι στον σχεδιασμό φαρμάκων η αποτυχία αποτελεί περισσότερο τον κανόνα παρά την εξαίρεση, αφού σχετίζεται με απρόβλεπτους κινδύνους όπως η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα.

2.2. Σχεδιασμός Φαρμάκων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ένα φάρμακο προκειμένου να κυκλοφορήσει και να εδραιωθεί στην αγορά απαιτεί μια μακροχρόνια και μεγάλου κόστους διαδικασία καθώς περιλαμβάνει πολλά στάδια.

Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο βήμα για τον σχεδιασμό φαρμάκων είναι η κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας και ο εντοπισμός του υπεύθυνου μακρομορίου απ' το οποίο προκαλείται. Αρχικά, πραγματοποιείται η αποτίμηση του βιολογικού στόχου του υποψήφιου φαρμάκου. Η στόχευση του φαρμάκου στην αναστολή της δράσης κάποιου ενζύμου-πρωτεΐνης και αντίστοιχα στο DNA ή το RNA απαιτεί την πλήρη γνώση της δομής και της λειτουργίας του εκάστοτε στόχου. Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει πλέον αποσαφηνιστεί πλήρως, δίνοντας την πληροφορία για την ύπαρξη 500.000 πρωτεϊνών στο ανθρώπινο σώμα, από τις οποίες μόνο οι 10.000 έχουν μελετηθεί διεξοδικά και είναι γνωστή η κρυσταλλογραφική τους τριτοταγής δομή.

Γνωρίζοντας τον βιολογικό στόχο, καθώς επίσης και το ενεργό του κέντρο, ο σχεδιασμός φαρμάκων γίνεται περισσότερο ρεαλιστικός και εφικτός. Ο ερευνητής, γνωρίζοντας τη δομή του μακρομορίου-στόχου μπορεί να σχεδιάσει ορισμένα μόρια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενώσεις-οδηγούς. Η γνώση της τριτοταγούς δομής του ενεργού κέντρου πληροφορεί για τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να παρουσιάζει ένα μόριο (δυνάμει φάρμακο) για να εισέλθει και να συγκρατηθεί στο ενεργό κέντρο (π.χ. λιποφιλία, ικανότητα ιοντισμού, αρωματικότητα, υδροφιλία). Η επίτευξη της βέλτιστης ενεργειακά

πρόσδεσης αποτελεί αρχικό στάδιο της *insilico* εφαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης στον Ορθολογικό Σχεδιασμό Φαρμάκων. για να σχεδιάσει μόρια-ενώσεις οδηγούς. Είναι περιττό ν' αναφερθεί ότι αυτού του είδους ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων για βιολογικούς στόχους που η μοριακή τους δομή δεν έχει αποσαφηνιστεί είναι αδύνατος.

Έπειτα από την εύρεση πιθανών ενώσεων-οδηγών, οι ενώσεις αυτές, καθώς επίσης και πιθανά παράγωγά τους χρησιμοποιούνται ως πιθανά φάρμακα σε προσομοιώσεις αποτίμησης δράσης των ενώσεων αυτών με το βιολογικό στόχο. Χρησιμοποιούνται διάφορα λογισμικά που προσομοιάζουν τις κυτταρικές συνθήκες, υπολογίζοντας θεωρητικά κατά πόσο η δομή του μορίου θα μπορούσε να αποτελεί δυνάμει φάρμακο, λαμβάνοντας υπόψη και την τριδιάστατη δομή του κυτταρικού στόχου. Είναι πολύ χρήσιμο, λοιπόν, να αξιοποιηθεί οποιοδήποτε υπολογιστικό εργαλείο μπορεί να δώσει έγκυρα αποτελέσματα ως προς τη λειτουργικότητα και την τοξικότητα ενός πιθανού φαρμάκου.

Από τη διαδικασία αυτή των προσομοιώσεων, ορισμένα μόρια θα απορριφθούν ως πιθανά φάρμακα, καθώς δεν θα πληρούν τις δομικές προϋποθέσεις ώστε να αλληλεπιδράσουν με τον βιολογικό στόχο. Έπειτα, ξεκινά η σύνθεση των πιθανών ενώσεων-οδηγών, καθώς επίσης και ορισμένων αναλόγων τους, έτσι ώστε στη συνέχεια να ελεγχθεί η βιοχημική δράση τους.

Ένωση-οδηγός χαρακτηρίζεται μια ένωση, η οποία έχει επιτύχει στις βιοχημικές δοκιμές και πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

- Η εξάρτηση της δραστηριότητας από τη συγκέντρωση της ουσίας
- Η δράση σε βιοχημικές και κυτταρικές καλλιέργειες
- Η δράση σε συγκέντρωση μικρότερη από μια συγκέντρωση IC_{50} (micromolar ή nanomolar)
- Η βασική κατανόηση της σχέσης δομής-δραστηριότητας
- Ο κινητικός χαρακτηρισμός δημιουργίας του συμπλόκου ένωσης-στόχου
- Η αποτίμηση της εκλεκτικότητας
- Απόλυτα ταυτοποιημένη δομή και καθαρότητα
- Αποτίμηση σταθερότητας
- Γνωστή μέθοδος σύνθεσης
- Να υπάρχει προφανής διαδικασία περαιτέρω βελτιστοποίησης της ένωσης
- Μέτρηση διαλυτότητας
- Η μέτρηση του συντελεστή κατανομής (logD)
- Πρόβλεψη της μεταβολικής αποσύνθεσης
- Πρόβλεψη ή μέτρηση φαρμακοκινητικής
- Πρόβλεψη τοξικότητας
- Πιθανότητα παρενεργειών

Στη συνέχεια, πιθανές ενώσεις-οδηγοί που έχουν επιτύχει στις βιοχημικές δοκιμές, ελέγχονται για τη δραστικότητά τους σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro*. Σ' αυτό το στάδιο των δοκιμών, πολλά δυνάμει φάρμακα θα αποτύχουν σε περίπτωση που προκαλούν τη θανάτωση των κυτταροκαλλιεργειών ή δεν είναι αρκετά λιπόφιλα ώστε να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη ή έχουν ελλιπή δραστικότητα ως προς τον επιθυμητό βιολογικό στόχο.

Τα μόρια που θα αποδειχθούν επιτυχή και απ' αυτή τη δοκιμασία, θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε πειράματα *in vivo*, σε πειραματόζωα. Οι μελέτες σε αυτό το στάδιο πραγματοποιούνται για περίπου 7 χρόνια. Οι μελέτες αυτές, αν και θέτουν ηθικά διλήμματα ως προς την εκμετάλλευση των ζώων, είναι απαραίτητες για την καταπολέμηση των ασθενειών, καθώς είναι η πρώτη φορά που το φάρμακο χορηγείται σε θηλαστικά και καταγράφονται οι αρνητικές του επιδράσεις στους ζωικούς οργανισμούς.

Τα υποψήφια φάρμακα που θα περάσουν με επιτυχία και αυτή τη φάση περνούν στο επόμενο στάδιο της φάσης που είναι η χορήγησή τους στον άνθρωπο (κλινικές μελέτες). Τα πρώτα χρόνια, χορήγηση γίνεται σε υγιή άτομα (Φάση I), η οποία αν είναι επιτυχημένη συνεχίζεται η χορήγηση σε ασθενείς που βρίσκονται σε διάφορα στάδια της ασθένειας (Φάση II). Τέλος, όσα φάρμακα επιτύχουν και στη Φάση II, χορηγούνται στη συνέχεια σε χιλιάδες ασθενείς (Φάση III), ώστε να καθοριστεί η απαιτούμενη δοσολογία του φαρμάκου. Έπειτα, το φάρμακο κατατίθεται προς έγκριση και αξιολόγησή του και στη συνέχεια κυκλοφορία του στην αγορά. Ακόμα και όταν κυκλοφορήσει στην αγορά, το φάρμακο ελέγχεται για πιθανές παρενέργειες για περίπου 7 χρόνια.

Στατιστικές μελέτες επιβεβαιώνουν πως πάνω από το 90% των φαρμάκων που κατατίθενται στο Διεθνή Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) απορρίπτονται και το 75% του κόστους αντιστοιχεί στις αποτυχίες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης του φαρμάκου.[1] Ο σχεδιασμός φαρμάκων μπορεί να αποτύχει για διάφορους λόγους. Ορισμένες ασθένειες είναι τόσο σπάνιες που το κόστος ανάπτυξης φαρμάκων (Πίνακας 1) δε θα καλυπτόταν ποτέ από τα κέρδη των πωλήσεων. Ακόμα και όταν υπάρχει η απαραίτητη αγορά, όπως και οι βιοχημικές δοκιμές, επιτυχής διαθέσιμη μέθοδος μπορεί να αποτυγχάνει να δώσει ενώσεις με αρκετά υψηλή δράση. Ενώσεις που είναι δραστικές κατά μιας ασθένειας μπορεί να είναι πολύ τοξικές, να μην είναι βιοδιαθέσιμες ή να είναι πολύ δαπανηρές στην κατασκευή τους. Πρέπει να σημειώσουμε ότι σπάνια το υψηλό κόστος κατασκευής είναι επαρκής αποτρεπτικός λόγος για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Έτσι, αν λάβουμε υπόψη το κόστος, τον κόπο και τον χρόνο για να παραχθεί ένα φάρμακο, η ανάπτυξη νέων τεχνικών με σκοπό τη μείωση των πιθανοτήτων αποτυχίας, καθίσταται επιτακτική ανάγκη.[1]

Πίνακας 1: Κοστολόγηση σταδίων σχεδιασμού φαρμάκου για μια ένωση.

Πείραμα	Τυπικό κόστος ανά ένωση (\$)
Υπολογιστική χημεία	10
Βιοχημική δοκιμή	400
Δοκιμή σε κυτταρική καλλιέργεια	4,000
Τοξικότητα σε ποντίκια	12,000
Κρυσταλλική δομή πρωτεΐνης	100,000
Δοκιμή αποτελεσματικότητας σε ποντίκια	300,000
Διητή συστηματική από στόματος τοξικότητα σε ποντίκια	800,000
Ανθρώπινες κλινικές δοκιμές	500,000,000

2.3. Μοριακή Μοντελοποίηση

Ο ορθολογικός σχεδιασμός ξεκινά με την προϋπόθεση της γνώσης της μοριακής βάσης της ασθένειας και του μηχανισμού της, καθώς επίσης και του υποδοχέα που ευθύνεται για την εκδήλωσή της. Ο υποδοχέας αυτός καλείται φαρμακευτικός στόχος και είναι ένα βιομόριο, το οποίο σχετίζεται ή εμπεριέχεται σε μια μεταβολική ή βιοσηματοδοτική οδό που αφορά μια συγκεκριμένη ασθένεια. Τα βιομόρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη μιας νόσου επικοινωνώντας είτε με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος τα οποία οδηγούν στην εξέλιξη κάποιας βιοσηματοδοτικής ή μεταβολικής πορείας. Κατά συνέπεια, η διαμόρφωση των βιολογικών λειτουργιών που εκτελούνται από τα βιομόρια αυτά θα ήταν επωφελής και επιτεύξιμη με τους εξής τρόπους:

- Αναστέλλοντας τη λειτουργία τους με μικρά μόρια τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια (affinity) από τα φυσικά μόρια που θα προσδένονταν στο ενεργό τους κέντρο.
- Αναστέλλοντας τις διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιομορίων με μικρά μόρια.
- Ενεργοποιώντας βιομόρια των οποίων οι λειτουργίες έχουν απορρυθμιστεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως στη περίπτωση του καρκίνου.

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων μπορεί να διαχωριστεί σε δύο βασικές κατηγορίες:

- Α. Ανάπτυξη μικρών μορίων τα οποία μπορούν να στοχεύσουν μόρια στόχους (πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα) με γνωστή τριδιάστατη δομή.

Αυτή η προσέγγιση είναι ευρέως διαδεδομένη και προτιμάται από τις φαρμακευτικές εταιρίες για το σχεδιασμό φαρμάκων (SBDD: StructureBasedDrugDesign).

B. Ανάπτυξη μικρών μορίων με προκαθορισμένες ιδιότητες για συγκεκριμένους στόχους, των οποίων οι κυτταρικές τους λειτουργίες και οι δομικές τους πληροφορίες είναι άγνωστες (LBDD: LigandBasedDrugDesign).[2]

Με την αναγνώριση ενός νέου στόχου λαμβάνονται υπόψη και οι δύο τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως με σκοπό την ανάπτυξη μορίων μικρού μοριακού βάρους. Εκτός όμως από τη μοριακή πρόσδεση εξετάζονται και διάφορες άλλες πτυχές που περιλαμβάνονται στον ορθολογικό σχεδιασμό και καταγράφονται περιληπτικά πιο κάτω:

- των ενεργειών πρόσδεσης ως προς τη συγγένεια και την εξειδίκευση
- της ισορροπίας μεταξύ υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας
- της απορρόφησης
- της κατανομής
- του μεταβολισμού
- της απέκκρισης
- της τοξικότητας των αρχικών μικρών μορίων
- προϊόντων που οφείλονται σε βιομετατροπές σε διάφορες φάσεις της μεταβολικής διεργασίας
- της ποσοτικής σχέσης δομής-δραστηκότητας (QSAR)
- της ποσοτικής σχέσης δομής-ιδιότητας (QSPR)

Οι περισσότερες από τις πιο πάνω ιδιότητες συμπεριλαμβανομένου και του σχεδιασμού ενός μικρού μορίου μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών, οι οποίες κερδίζουν ολοένα και περισσότερο χώρο στη φαρμακευτική βιομηχανία.[2] Η υπολογιστική χημεία είναι το πεδίο της χημείας στο οποίο γίνεται χρήση προγραμμάτων υπολογιστών με στόχο την επίλυση διάφορων προβλημάτων, για παράδειγμα τη μελέτη μιας άγνωστης ένωσης ως πιθανό φάρμακο. Κάνοντας χρήση λογισμικού ηλεκτρονικών υπολογιστών και βάσεις δεδομένων (ή αλλιώς, βιβλιοθήκες ενώσεων) δίνεται η δυνατότητα αξιολόγησης και επιλογής ενός πιθανού φαρμάκου ανάμεσα σε πολλές ενώσεις προκειμένου να συντεθεί στο εργαστήριο και να προχωρήσει σε προ-κλινικές και κλινικές μελέτες. Έτσι ο σχεδιασμός φαρμάκων με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών όχι μόνο μειώνει το κόστος παραγωγής ενός φαρμάκου αλλά και τον χρόνο ο οποίος απαιτείται για να κυκλοφορήσει ένα φάρμακο στην αγορά. Κατά τη διάρκεια του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων γίνεται αναγνώριση και έλεγχος των ενώσεων οδηγών με σκοπό το προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου ή την ανακάλυψη πιθανών παρενεργειών. Ακόμη, βοηθούν στη βελτιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας των δυνάμει φαρμάκων.[1]

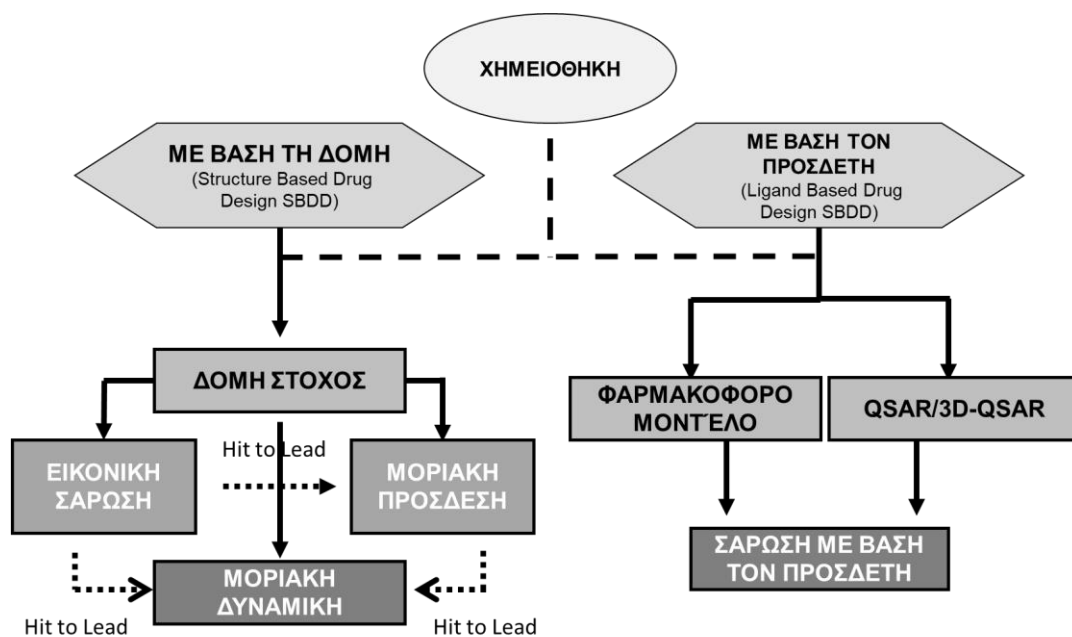
Η μοριακή μοντελοποίηση αποτελεί ένα κλάδο της υπολογιστικής χημείας και περιλαμβάνει όλες τις θεωρητικές μεθόδους και τις υπολογιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ώστε να προσομοιωθεί και να μελετηθεί η δομή και η συμπεριφορά χημικών μορίων, είτε πρόκειται για μικρά χημικά συστήματα ή για μεγάλα βιολογικά μακρομόρια και υλικά (www.nature.com).

Η μοριακή μοντελοποίηση αποτελεί ερευνητικό κλάδο της χημείας που χρησιμοποιεί πρωτόκολλα που βασίζονται στη θεωρητική χημεία και έχει τη δυνατότητα να ενσωματώσει στα μοντέλα αυτά πειραματικά δεδομένα, όπως για παράδειγμα η διαμόρφωση ενός μορίου στο χώρο. Αποτελεί στην ουσία μια γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος που μπορεί να αξιολογήσει ικανοποιητικά μοριακές συμπεριφορές και να προσομοιώσει τη δράση μεγάλων βιολογικών συστημάτων, όπως το κύτταρο.

Οι τεχνικές της μοριακής μοντελοποίησης έχουν εξελιχθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και γίνονται μέρα με τη μέρα απαραίτητα εργαλεία πολλών χημικών, φυσικών και βιολογικών ερευνών. Οι κυριότεροι λόγοι εξέλιξης του κλάδου είναι η σχετικά πρόσφατη αύξηση του όγκου των πληροφοριών που αφορούν τις πρωτεΐνες, πληροφορίες που προέρχονται είτε από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ή από NMR και μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Δευτερευόντως, εκτός από την εξέλιξη του τομέα της δομικής βιολογίας, υπάρχουν ταυτόχρονοι ταχύτατοι ρυθμοί ανάπτυξης τόσο σε υπολογιστικές τεχνικές όσο και στην ανάπτυξη λογισμικών. Είναι αλήθεια ότι όσο περισσότερο αυξάνονται οι δυνατότητες και η ταχύτητα των υπολογιστών, δίνεται στους ερευνητές η δυνατότητα να προσομοιάσουν όλο και πιο πολύπλοκα συστήματα. Ο κλάδος της μοριακής μοντελοποίησης βρίσκει εφαρμογές στη διαμορφωτική ανάλυση βιοδραστικών μορίων, τη μοριακή τους πρόσδεση, τη μοριακή δυναμική, σχέσεις δομής-δράσης, προσομοίωση διάχυσης, μεταβολισμού και απέκκρισης.

Η μοριακή μοντελοποίηση αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην ανάπτυξη και στον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων. Η ανάπτυξη αλγορίθμων και λογισμικών που προβλέπουν τη μοριακή πρόσδεση μικρών μορίων (ligands) σε υποδοχείς, αλλά και η στατιστική ανάλυση της σχέσης δομής-δράσης των φαρμακευτικών μορίων αποτελεί ισχυρό πλεονέκτημα των υπολογιστικών τεχνικών. Η μέθοδος εμφανίζει το πλεονέκτημα του μικρού κόστους για την αξιολόγηση πιθανών φαρμακευτικών μορίων, πριν το στάδιο της κοστοβόρας σύνθεσής τους. Η χρήση *in silico* (υπολογιστικών) μεθόδων για τον προσδιορισμό των χημικών δομών που παρουσιάζουν συγκεκριμένη βιολογική

δράση ονομάζεται Ορθολογικός Σχεδιασμός Νέων Φαρμακευτικών Μορίων με Εξειδικευμένη Βιολογική Δράση. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1: Απεικόνιση Σχεδιαγράμματος για τον Ορθολογικό Σχεδιασμό Καινοτόμων Μορίων.

2.4. Μοριακή Πρόσδεση(Docking)

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) ανήκει στη πρώτη κατηγορία του ορθολογικού σχεδιασμού όπου οι μοριακοί στόχοι παρουσιάζουν γνωστή τριδιάστατη δομή και είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στον σχεδιασμό φαρμάκων.[3] Ο όρος μοριακή πρόσδεση αναφέρεται στον αλγόριθμο που χρησιμοποιείται για να προβλεφθεί αν μια χημική ένωση μπορεί να προσδεθεί στο ενεργό ή στο αλλοστερικό κέντρο μιας πρωτεΐνης (ή οποιοδήποτε άλλου στόχου) καθώς επίσης και να προσδιορίσει τις αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζει η ένωση με τα αμινοξέα του ενεργού ή αλλοστερικού κέντρου. Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί σημείο αναφοράς στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων αφού χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί αν μια ένωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναστολέας μίας πρωτεΐνης ή όχι. Πιο συγκεκριμένα, μέσω των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης δίνεται η δυνατότητα της απεικόνισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων σε ατομικό επίπεδο, επιτρέποντας την αξιολόγηση της χημικής συμπεριφοράς μικρών μορίων στο ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα καθώς επίσης την αποσαφήνιση σημαντικών βιοχημικών διεργασιών.[4] Η διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης αποτελείται από δύο βασικά στάδια:

1. προσδιορισμός του προσανατολισμού της χαμηλής ενέργειας διαμόρφωσης στο ενεργό κέντρο (συνήθως καλείται πόζα). Η χαμηλής

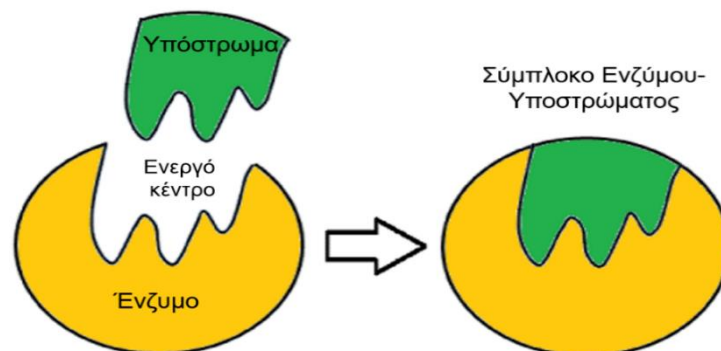
ενέργειας διαμόρφωση υπολογίζεται με διάφορους τρόπους οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με το πρόγραμμα της μοριακής πρόσδεσης.

2. υπολογισμός την ενέργειας πρόσδεσης κάνοντας χρήση συγκεκριμένων υπολογιστικών συναρτήσεων.[3]

Στη περίπτωση που τα αποτελέσματα είναι θετικά, δηλαδή η διαδικασία παρέχει αρνητικές τιμές ενέργειας πρόσδεσης, η υποψήφια ένωση συνήθως υποβάλλεται σε πειράματα μοριακής δυναμικής προκειμένου να ελεγχθεί και η σταθερότητα του μορίου στο ενεργό κέντρο. Στη συνέχεια αν το μόριο παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα συντίθεται στο εργαστήριο.

Η γνώση της θέσης του ενεργού κέντρου στη πρωτεΐνη (συμβαίνει στις περισσότερες των περιπτώσεων) αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μοριακής πρόσδεσης. Επίσης, με σύγκριση της εκάστοτε πρωτεΐνης με μια οικογένεια πρωτεϊνών που παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες ή με πρωτεΐνες που είναι συν-κρυσταλλωμένες με άλλους προσδέτες, παρέχονται πληροφορίες για το ενεργό της κέντρο. Στη περίπτωση που η θέση του ενεργού κέντρου δεν είναι γνωστή είτε γίνεται χρήση άλλων προγραμμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό του (GRID, POCKETκ.τ.λ), ή λαμβάνει χώρα πείραμα μοριακής πρόσδεσης σε ολόκληρη τη δομή της πρωτεΐνης (blindedocking).[4]

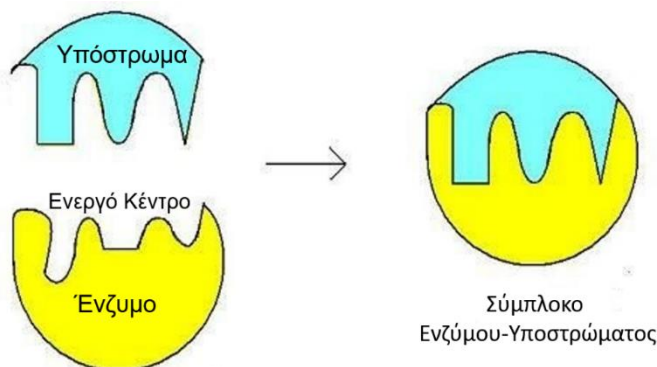
Υπάρχουν διάφορα μοντέλα που περιγράφουν τη σχέση ενός υποδοχέα με έναν προσδέτη με προγενέστερο αυτό του κλειδιού-κλειδαριάς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, το οποίο προτάθηκε από τον Fischer, ο υποδοχέας είναι η κλειδαριά και το κλειδί είναι ο προσδέτης ο οποίος εφαρμόζει στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα όπως το κλειδί στη κλειδαριά. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Απεικόνιση του μοντέλου κλειδιού κλειδαριάς.

Όσον αφορά τη μοριακή πρόσδεση, οι προγενέστερες μέθοδοι βασίζονταν στο μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς και οι προσδέτες αντιμετωπίζονταν ως άκαμπτες δομές. Μεταγενέστερα, η υπόθεση της επαγωγίμης προσαρμογής (induced fit hypothesis) που πρότεινε ο Koshland, άλλαξε τα δεδομένα επειδή εξοστράκισε το μοντέλο κλειδιού κλειδαριάς. Σε αυτό το μοντέλο θεωρείται ότι η σύνδεση ενός προσδέτη στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου ή μιας πρωτεΐνης

οδηγεί στην αλλαγή διαμόρφωσης του κέντρου δράσης ή του προσδέτη ή και των δύο. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Απεικόνιση μοντέλου επαγωγίμης προσαρμογής (induced fit).

Πρότεινε ο Koshland δηλαδή ότι ο υποδοχέας και ο προσδέτης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ρυθμίζοντας κατάλληλα και οι δύο τη τρισδιάστατη διαμόρφωση τους έτσι ώστε να προκύψει ένα όσο το δυνατόν σταθερότερο σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα. Κατά συνέπεια, αυτή η θεωρία οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κατά τη διάρκεια της μοριακής πρόσδεσης ο προσδέτης και ο υποδοχέας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εύκαμπτες δομές.[5, 6] Με αυτή την προϋπόθεση θα περιγράψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται.

Υπάρχουν πολυάριθμα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης. Τα βασικά τους δομικά στοιχεία είναι δύο: ο αλγόριθμος αναζήτησης και ο αλγόριθμος βαθμολόγησης. Ιδανικά, ο αλγόριθμος αναζήτησης ή δειγματοληψίας αναπαράγει τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η σύνδεση των μορίων, ενώ με τη χρήση της συνάρτησης βαθμολόγησης οι διαμορφώσεις οι οποίες προκύπτουν από τον αλγόριθμο αναζήτησης κατατάσσονται με φθίνουσα σειρά και υπολογίζεται η ενέργεια πρόσδεσής τους.

2.5. . Εφαρμοζόμενοι Αλγόριθμοι

Αλγόριθμος είναι η ακριβής περιγραφή μιας σειράς βημάτων που απαιτούνται για την επίλυση ενός προβλήματος. Έτσι, αποτελείται από μια σειρά εντολών, οι οποίες αν εφαρμοστούν σωστά οδηγούν στην επίλυση του προβλήματος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ως αλγόριθμος δεν χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε σειρά από εντολές. Οι εντολές που εμπεριέχονται στον αλγόριθμο αλλά και ο ίδιος ο αλγόριθμος θα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά είναι τα εξής:

- Είσοδος (input): είναι τα στοιχεία που χρειάζεται ο αλγόριθμος για να εκτελεσθεί.

- Έξοδος (output): είναι τα στοιχεία που παράγει ο αλγόριθμος, δηλαδή τα αποτελέσματά του.
- Καθοριστικότητα (definiteness): κάθε εντολή θα πρέπει να είναι μονοσήμαντη, που σημαίνει να καθορίζει με απόλυτη σαφήνεια και ακρίβεια τον τρόπο εκτέλεσης της σε κάθε δυνατή περίπτωση.
- Περατότητα (finiteness) : με την εκτέλεση των βημάτων του αλγορίθμου θα πρέπει να φτάνουμε σε ένα τέλος, σε κάθε δυνατή περίπτωση.
- Αποτελεσματικότητα (effectiveness) : κάθε εντολή θα πρέπει να είναι διατυπωμένη με απλό τρόπο ώστε να μπορεί να εκτελεσθεί.

2.6. Αλγόριθμοι αναζήτησης- Γενικές πληροφορίες.

Σύμφωνα με τη θεωρητική πληροφορική ο αλγόριθμος αναζήτησης στοχεύει στην εύρεση ενός αντικειμένου με συγκεκριμένες ιδιότητες μεταξύ ενός συνόλου αντικειμένων.

Σε ένα πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης ο αλγόριθμος αναζήτησης, όπως προδίδει και το όνομά του, αναζητεί διάφορες διαμορφώσεις και προσανατολισμούς του προσδέτη στο ενεργό κέντρο. Με την αναζήτηση αυτή παράγονται οι διαφορετικές πόζες. Με τη πάροδο του χρόνου έχουν αναπτυχθεί διαφορετικοί αλγόριθμοι αναζήτησης τηρώντας τα απαραίτητα κριτήρια με σκοπό την πρόβλεψη των διαμορφώσεων που θα έχει ένα δυνάμει φάρμακο και είναι διαθέσιμοι για τους χρήστες των προγραμμάτων. Τα προγενέστερα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης τοποθετούσαν ένα μόριο στο ενεργό κέντρο διατηρώντας το άκαμπτο σε αντίθεση με τα νεότερα προγράμματα που χρησιμοποιούν αλγόριθμους οι οποίοι περιλαμβάνουν διαμορφωτικές αλλαγές στο προσδέτη. Οι αλγόριθμοι αναζήτησης διαφέρουν όσον αφορά την ευκαμψία των συμμετεχόντων μορίων με αποτέλεσμα να διακρίνονται σε:

1. Μεθόδους που αφορούν πρόσδεση σε άκαμπτες δομές
2. Μεθόδους για «εύκαμπτη σύνδεση»

Ανάλογα με το μέγεθος του χώρου που καταλαμβάνεται για να λάβει χώρα η αναζήτηση και έπειτα η πρόσδεση, η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα είναι δύο κρίσιμα χαρακτηριστικά των αλγορίθμων αναζήτησης.

Οι εύκαμπτες δομές αποτελούν πιο ρεαλιστικά μοντέλα για να περιγράψουν τα βιολογικά μόρια λαμβάνοντας υπόψη περιστροφικούς, μεταφραστικούς και διαμορφωτικούς βαθμούς ελευθερίας. Έτσι η μοριακή πρόσδεση δύο μορίων (προσδέτη και υποδοχέα) με εύκαμπτες τριδιάστατες δομές αποτελεί πιο ακριβή προσέγγιση του σχηματισμού συμπλόκων *in vivo* και ειδικά όταν κατά τη σύνδεση λαμβάνουν χώρα διαμορφωτικές αλλαγές.

Αρχικά εμφανίστηκαν αλγόριθμοι πρόσδεσης εύκαμπτου προσδέτη, σύμφωνα με τους οποίους ο προσδέτης παρουσιάζει πλήρη ή μερική ευκαμψία. Αργότερα όμως εξαιτίας της σπουδαιότητας της υπόθεσης της επαγωγίσιμης προσαρμογής αναπτύχθηκαν εξειδικευμένοι αλγόριθμοι που λαμβάνουν υπόψη και τη μερική ευκαμψία του υποδοχέα.

Οι αλγόριθμοι αναζήτησης διακρίνονται σε αυτούς που θεωρούν τα εμπλεκόμενα μόρια (προσδέτη και υποδοχέα) ως εύκαμπτες δομές και σε αυτούς που τα θεωρούν ως άκαμπτες δομές.[7]

2.6.1. Αλγόριθμος Αναζήτησης – Άκαμπτες Δομές

Οι αλγόριθμοι που θεωρούν το προσδέτη και τον υποδοχέα ως άκαμπτες δομές αναπτύχθηκαν αρχικά για την ανάλυση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

Μεταγενέστερα, βελτιστοποιήθηκαν ώστε να «ψάχνουν» τη θέση πρόσδεσης και την κατάλληλη διαμόρφωση του συμπλέγματος προσδέτη-υποδοχέα. Οι τρισδιάστατες δομές των μορίων θεωρούνται γνωστές. Παρ' όλ' αυτά, οι αλγόριθμοι αυτοί δεν θεωρούνται επιτυχείς αν υπάρχει διαμορφωτική αλλαγή κατά τη διάρκεια πρόσδεσης του προσδέτη. Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά δύο αλγόριθμοι που θεωρούν τις εμπλεκόμενες σε μια μοριακή πρόσδεση δομές ως άκαμπτες. (Σχήμα 1)

Αλγόριθμοι Αναζήτησης – Άκαμπτες Δομές

- Γρήγορος Μετασχηματισμός Fourier
- Αντιστοιχίας Σχήματος

Σχήμα 1: Κατηγορίες αλγορίθμων αναζήτησης άκαμπτων δομών.

Σύμφωνα με τη φυσική, μια άκαμπτη δομή αποτελεί μια εξιδανίκευση ενός συμπαγούς σώματος του οποίου η θέση προσδιορίζεται από τη θέση του κέντρου μάζας του και από το όγκο του, λαμβάνοντας υπόψη έξι βασικές παραμέτρους που αναφέρονται ως βαθμοί ελευθερίας. Υπάρχουν τρεις βαθμοί περιστροφής και τρεις μεταβατικοί βαθμοί ελευθερίας οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τις πιθανές κινήσεις του ατόμου στο τριδιάστατο χώρο. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις άκαμπτων δομών βασίζονται στη θεώρηση πως υπάρχει γεωμετρική αντιστοιχία μεταξύ των μορίων και στην Αντιστοιχία Σχήματος (SM: ShapeMatching) και στον γρήγορο Μετασχηματισμό Fourier (FFT: FastFourierTransformation).[7]

Οι πρώτοι υπολογισμοί εφαρμόστηκαν για την αναζήτηση συμπληρωματικότητας σχήματος μεταξύ δυο μορίων. Το 1982 ο Kuntz παρουσίασε μια μέθοδο με σκοπό τη διερεύνηση γεωμετρικά εφικτών στοιχίσεων προσδετών και υποδοχέων με γνωστές δομές. Στην προσέγγιση του αντιμετωπίζει τις γεωμετρικές αλληλεπιδράσεις δύο άκαμπτων σωμάτων ως σφαίρες, όπου το ένα σώμα (ο «υποδοχέας») περιέχει «κοιλότητες» ή «αυλακώσεις» που σχηματίζουν περιοχές δέσμησης (bindingsites) για το δεύτερο, το οποίο ονομάζει και «προσδέτη». Στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η διόρθωση των 6 βαθμών ελευθερίας (3 μεταφορικούς και 3 προσανατολισμούς), οι οποίοι καθορίζουν τις ευνοϊκότερες σχετικές θέσεις των δύο σωμάτων.[5, 7]

Το 1992 οι Katchalski-Katzir ανέπτυξαν μια μέθοδο σύμφωνα με την οποία ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ατομικές συντεταγμένες για τη ψηφιακή αναπαράσταση ενός μορίου, χωρίς να λαμβάνει υπόψη άλλες πληροφορίες για τις θέσεις πρόσδεσης του. Οι επιφάνειες των μορίων δεν υφίστανται μετασχηματισμό εκτός από μια απλή τριδιάστατη ψηφιοποίηση, διατηρώντας όλα τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Επίσης, ο αλγόριθμος αξιοποιεί τεχνικές μετασχηματισμού και συσχέτισης υπολογίζει τη συνάρτηση συσχέτισης που εκτιμά τον βαθμό της διείσδυσης και της αλληλεπικάλυψης της μοριακής επιφάνειας και λαμβάνει υπόψη έξι βαθμούς ελευθερίας χρησιμοποιώντας τον μετασχηματισμό Fourier. Αυτή η προσέγγιση σε σύγκριση με την προσέγγιση αντιστοιχίας σχήματος αξιολογεί ταχύτερα πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των μορίων.[7, 8]

2.6.2. Αλγόριθμοι Αναζήτησης – Εύκαμπτες Δομές

Οι μέθοδοι πρόσδεσης εύκαμπτων δομών διακρίνονται στις συστημικές μεθόδους, στις στοχαστικές ή τυχαίες μεθόδους και στις προσδιοριστικές μεθόδους και θα αναλυθούν στη συνέχεια λεπτομερώς. (Σχήμα 2)



Σχήμα 2: Κατηγορίες αλγορίθμων αναζήτησης εύκαμπτων δομών.

Ένα παράδειγμα συστημικού αλγορίθμου αναζήτησης είναι αυτό της σταδιακά αυξανόμενης δόμησης (IC: Incrementalconstruction). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη προσέγγιση ο προσδέτης σπάει σε μικρότερα δομικά τμήματα τα

οποία υποβάλλονται σε διαδικασία πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο ξεχωριστά και συνδέονται ομοιοπολικά «συναρμολογώντας» ξανά τον προσδέτη.

Οι αλγόριθμοι αντιστοίχισης (MA: MatchingAlgorithms) αποτελούν ένα ακόμη είδος συστημικού αλγορίθμου αναζήτησης. Βασίζονται στο μοριακό σχήμα και αντιστοιχούν τον προσδέτη στο ενεργό κέντρο σύμφωνα με τα σχηματικά χαρακτηριστικά και τις χημικές πληροφορίες του μορίου.

Οι στοχαστικές ή τυχαίες μέθοδοι αναζητούν τον διαμορφωτικό χώρο εντός του υποδοχέα τροποποιώντας τυχαία μια διαμόρφωση του προσδέτη ή έναν πληθυσμό προσδετών. Ο αλγόριθμος MonteCarlo και ο γενετικός αλγόριθμος και ο αλγόριθμος προσομοιωμένης ανόπτησης είναι τρεις τυπικοί αλγορίθμων που ανήκουν στις τυχαίες μεθόδους. [7]

Η μέθοδος MonteCarlo (MC) παράγει πόζες του προσδέτη μέσω περιστροφής των δεσμών του, μετατόπισης και περιστροφής του σκελετού του. Η διαμόρφωση η οποία λαμβάνεται από τον μετασχηματισμό ελέγχεται με κριτήρια που βασίζονται στην ενέργεια. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος MonteCarlo εξετάζει τις θερμοδυναμικά προσιτές καταστάσεις του συστήματος δημιουργώντας μικρές τυχαίες αλλαγές στη διαμόρφωση του συστήματος οι οποίες είτε γίνονται αποδεκτές ή απορρίπτονται. Η πόζα που γίνεται αποδεκτή, αποθηκεύεται και τροποποιείται περαιτέρω για να παραγάγει την επόμενη διαμόρφωση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να ληφθεί ο προκαθορισμένος αριθμός διαμορφώσεων. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της MonteCarlo είναι ότι οι αλλαγές ενδέχεται να είναι αρκετά μεγάλες επιτρέποντας στον προσδέτη να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα στην πιθανή επιφάνεια ενέργειας.[3, 9]

Ο γενετικός αλγόριθμος (GA: GeneticAlgorithm), ακόμη μια στοχαστική μέθοδος, πηγάζει από την εξελικτική θεωρία του Δαρβίνου. Ο γενετικός αλγόριθμος μιμείται τη διαδικασία της εξέλιξης χειριζόμενος μια συλλογή δεδομένων δομών που ονομάζονται χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα αντιστοιχούν σε έναν τυχαία παραγόμενο πληθυσμό που είναι οι διαφορετικές πόζες του προσδέτη. Κάθε πόζα χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο καταστατικών μεταβλητών οι οποίες περιγράφουν, προσανατολισμό και διαμόρφωση του προσδέτη σε σχέση με τον υποδοχέα. Οι βαθμοί ελευθερίας του προσδέτη κωδικοποιούνται ως δυαδικές χορδές που ονομάζονται γονίδια. Αυτά τα γονίδια συνθέτουν τα χρωμοσώματα τα οποία στην ουσία αντιπροσωπεύουν τη πόζα του προσδέτη. Κάθε ένα από τα χρωμοσώματα αξιολογείται με την κατάλληλη βαθμολογία συγγένειας, όπου η συγγένεια αντιπροσωπεύει την ολική ενέργεια αλληλεπίδρασης του προσδέτη με την πρωτεΐνη. Η μετάλλαξη και η διασταύρωση είναι δύο είδη γενετικών τελεστών στον γενετικό αλγόριθμο. Με τη μετάλλαξη γίνονται τυχαίες αλλαγές στα γονίδια, ενώ η διασταύρωση ανταλλάσσει γονίδια μεταξύ των χρωμοσωμάτων. Όταν ο γενετικός τελεστής επηρεάσει τα γονίδια, το αποτέλεσμα είναι μια νέα διαμόρφωση του προσδέτη. Στη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης οι γενετικοί τελεστές εφαρμόζονται με

σκοπό τη δημιουργία χώρου δειγματοληψίας. Η επιλογή των απογόνων μιας συγκεκριμένης γενιάς λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τη καταλληλότητα του ατόμου. Τα καταλληλότερα χρωμοσώματα με ευνοϊκές ενεργειακά βαθμολογίες σώζονται για να μεταδοθούν στην επόμενη γενιά, ενώ από την άλλη πλευρά εκείνα με μη ευνοϊκή ενεργειακά βαθμολογία, χάνονται. Οι ενεργειακά ευνοϊκές δομές που προκύπτουν θα εκτιμηθούν από τη συνάρτηση βαθμολόγησης και εκείνη που θα αξιολογηθεί ως προτιμητέα θα χρησιμοποιηθεί για την επόμενη γενιά. Η επιβίωση των καταλληλότερων χρωμοσωμάτων επιτρέπει την εξέλιξη των βέλτιστων αποτελεσμάτων που αντιπροσωπεύουν το σωστότερο τρόπο δέσμευσης.[7]

Ο αλγόριθμος προσομοιωμένης απόπτωσης (SimulatedAnnealing) αποτελεί μια τεχνική κατά την οποία λαμβάνουν χώρα αλλαγές στη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εύρεσης της ευνοϊκότερης διαμόρφωσης. Ο προσδέτης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης πλησιάζει τη πρωτεΐνη η οποία είναι στατική καθ' όλη τη διάρκεια. Στο κάθε βήμα της προσομοίωσης λαμβάνει χώρα μια μικρή, τυχαία μετατόπιση στον κάθε βαθμό ελευθερίας του προσδέτη και εκτελείται μετατόπιση και περιστροφή σε κάθε γωνία στροφής. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε άκαμπτη δομή. Στη νέα θέση και διαμόρφωση υπολογίζεται η ενέργεια της αλληλεπίδρασης. Η νέα ενέργεια συγκρίνεται με την ενέργεια του προηγούμενου σταδίου, αν είναι μικρότερη το βήμα γίνεται αμέσως αποδεκτό. Αν όχι, το αποτέλεσμα αντιμετωπίζεται με πιθανότητες και εξαρτάται από μια καθορισμένη από τον χρήστη θερμοκρασία. Η διαμόρφωση που θα χρησιμοποιηθεί για τη πρόσδεση βελτιώνεται σταδιακά καθώς η προσομοίωση της πραγματοποιείται με έλεγχο της θερμοκρασίας. Η προσομοίωση διαχωρίζεται σε έναν αριθμό κύκλων. Ο κάθε κύκλος έχει σταθερή θερμοκρασία και αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μεμονωμένων βημάτων. Στην αρχή κάθε νέου κύκλου η θερμοκρασία μειώνεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$T_i = g \cdot T_{i-1}$$

όπου, T_i θερμοκρασία του βήματος i και g μια σταθερά μεταξύ του 0 και του 1. Ο κάθε κύκλος αρχίζει με το μόριο να έχει τη χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση του προηγούμενου κύκλου.[10]

2.7. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης ή Βαθμονόμησης

Στην προηγούμενη υποενότητα σχολιάστηκαν οι αλγόριθμοι αναζήτησης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή και τον προσδιορισμό των κατάλληλων διαμορφώσεων του προσδέτη. Το επόμενο βήμα είναι ο διαχωρισμός των ευνοϊκότερων διαμορφώσεων από τις λιγότερο ευνοϊκές με τη χρήση συναρτήσεων βαθμολόγησης. Ο βασικός στόχος των συναρτήσεων βαθμολόγησης είναι ο υπολογισμός της ενέργειας με την οποία εκτιμάται η συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα και εκφράζεται από την ελεύθερη ενέργεια (ΔG_{bind}):

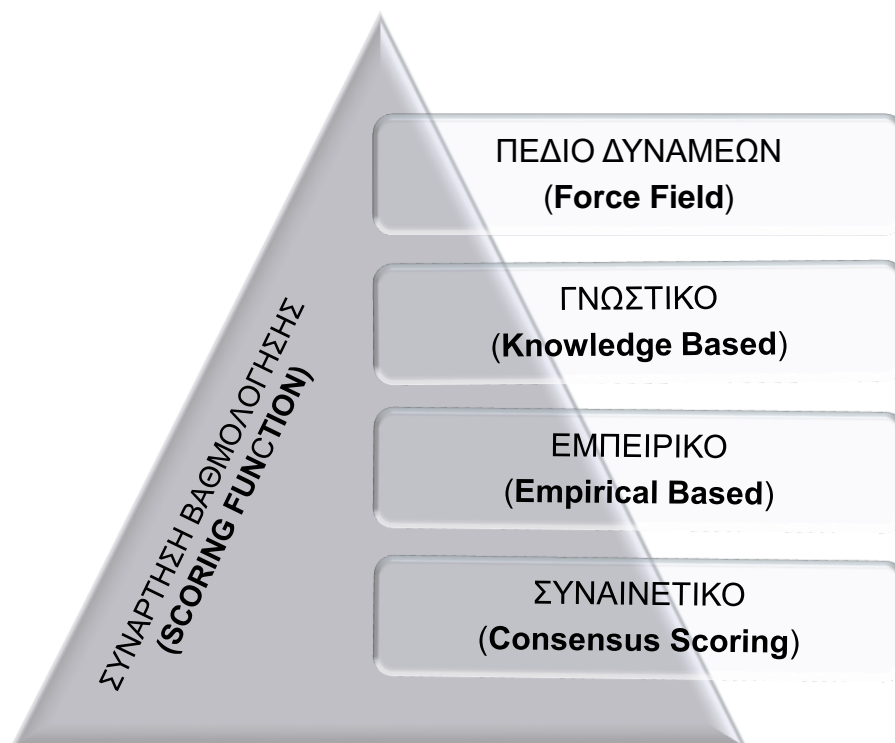
$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - G_{protein} - G_{ligand} = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

όπου, ΔG_{ligand} η ελεύθερη ενέργεια του προσδέτη, $\Delta G_{protein}$ η ελεύθερη ενέργεια του υποδοχέα και $\Delta G_{complex}$ η ελεύθερη ενέργεια του συμπλέγματος που προκύπτει από τη πρόσδεση των δύο μορίων. Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης είναι γνωστή και ως ελεύθερη ενέργεια Gibbs και μπορεί να υπολογιστεί με το προσδιορισμό της σταθεράς ισορροπίας δέσμευσης K_{eq} σύμφωνα με τη σχέση:

$$\Delta G_{bind} = -RT \ln(K_{eq}) \quad (2)$$

όπου, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η θερμοκρασία.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι οι οποίες είναι ικανές να υπολογίσουν την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ενός συμπλέγματος υπολογιστικά. Διαφέρουν σημαντικά στην ακρίβεια και τη ταχύτητα. Η συνάρτηση βαθμολόγησης θα πρέπει να πληρεί αρκετά κριτήρια ώστε να μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη σε εφαρμογές μοριακής πρόσδεσης. Εκτός από το γεγονός ότι θα πρέπει να είναι γρήγορη, η συνάρτηση βαθμολόγησης θα πρέπει να είναι ικανή να εκτιμήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του σχηματιζόμενου συμπλέγματος (ανάλογη της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης), να ταξινομήσει σωστά τις διαμορφώσεις (πόζες), να διακρίνει τις δεσμευτικές από τις μη δεσμευτικές ή τις δραστικές από τις αδρανείς ενώσεις, και όλα αυτά συγκρίνοντάς τες με τις τριδιάστατες δομές των συμπλεγμάτων που έχουν προσδιοριστεί πειραματικά. Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης περισσότερο εκτιμούν, παρά υπολογίζουν, τη συγγένεια της πρόσδεσης μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα υιοθετώντας διάφορες υποθέσεις και απλουστεύσεις. Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης διακρίνονται σε αυτές που βασίζονται στο πεδίο δυνάμεων (force-field based), στις εμπειρικές (empirical), σε αυτές που βασίζονται στη γνώση (knowledge-based) και τέλος στην επικρατέστερη ή συναινετική βαθμολόγηση (consensus scoring).[11-15] (Σχήμα 3)



Σχήμα 3: Κατηγορίες συναρτήσεων βαθμολόγησης.

2.7.1. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης Βασισμένες στο Πεδίο Δυνάμεων

Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης που βασίζονται στο πεδίο δυνάμεων ουσιαστικά λαμβάνουν υπόψη τους «μη δεσμευμένους/αδέσμευτους όρους» (non-bonded terms) του πεδίου ισχύος της μοριακής μηχανικής που σημαίνει ότι εκτιμούν την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσδέτη και του υποδοχέα. Οι μη δεσμευμένοι/αδέσμευτοι όροι στη συγκεκριμένη περίπτωση αντιπροσωπεύουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις vanderWaals, όπου ο ηλεκτροστατικός όρος υπολογίζεται από μια συνθήκη του Coulomb και ο όρος για της αλληλεπιδράσεις vanderWaals από τη συνάρτηση πιθανοτήτων Lennard-Jones[16, 17]:

$$\Delta G = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\mu (r_{ij}) r_{ij}} \right] \quad (3)$$

όπου, r_{ij} απόσταση μεταξύ ενός ατόμου i υποδοχέα και ενός ατόμου j του προσδέτη, A_{ij} και B_{ij} παράμετροι Lennard-Jones, q_i και q_j τα ατομικά φορτία και μ είναι η εξαρτώμενη από την απόσταση διηλεκτρική σταθερά στον όρο που αφορά τη συνθήκη Coulomb. Εκτός από τις «μη δεσμικές δυνάμεις» (non-bonded forces) υπάρχουν κι άλλες δυνάμεις που υφίστανται στη πρόσδεση υποδοχέα-προσδέτη, όπως ιοντικοί δεσμοί, δεσμοί υδρογόνου καθώς και

διαμορφωτικές αλλαγές μετά τη σύνδεση του προσδέτη, οι οποίες πρέπει να ληφθούν υπόψη στην εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας.[7]

2.7.2. Εμπειρικές Συναρτήσεις Βαθμολόγησης

Ένα δεύτερο είδος συναρτήσεων βαθμολόγησης είναι οι εμπειρικές. Οι εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολόγησης υπολογίζουν τη συγγένεια της δέσμευσης ενός συμπλέγματος βασιζόμενες σε ένα σύνολο σταθμισμένων ενεργειακών όρων σύμφωνα με το τύπο:

$$\Delta G = \sum_i W_i \cdot \Delta G_i \quad (4)$$

όπου το ΔG_i αντιπροσωπεύει διαφορετικούς ενεργειακούς όρους, όπως αλληλεπιδράσεις vanderWaals, ηλεκτροστατικές, δεσμούς υδρογόνου, εντροπία, υδροφιλικότητα κ.α. Ο συντελεστής W_i προσδιορίζεται με τη προσαρμογή των δεδομένων συγγένειας δέσμευσης ενός συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη με γνωστές τριδιάστατες δομές. Σε σύγκριση με τις συναρτήσεις βαθμολόγησης που βασίζονται στο πεδίο δυνάμεων οι εμπειρικές είναι πιο γρήγορες όσον αφορά τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης. Αυτό οφείλεται στους απλούστερους ενεργειακούς όρους από τους οποίους και αποτελούνται.[7, 15]

2.7.3. Συναρτήσεις Βαθμολόγησης Βασισμένες στη Γνώση

Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης βασισμένες στη γνώση (knowledgebased) είναι στατιστικές μέθοδοι όπου οι παράμετροι των δυναμικών συναρτήσεων εξάγονται από τις δομικές πληροφορίες των πειραματικά προσδιορισμένων ατομικών δομών. Η αρχή των συναρτήσεων αυτού του τύπου είναι βασισμένη στην αντίστροφη της σχέσης Boltzmann και χρησιμοποιείται με σκοπό τα δυναμικά των υποψήφιων ζευγών τόμων να λαμβάνονται απευθείας από τη συχνότητα εμφάνισης των ζευγών ατόμων από μια βάση δεδομένων.[18-20] Αυτή η προσέγγιση εμπεριέχει έμμεσα φυσικές αλληλεπιδράσεις (ηλεκτροστατικές, vanderWaals, κατιοντικές ή π-π αλληλεπιδράσεις), όπου η υψηλή συχνότητα εμφάνιση/μη εμφάνιση συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ατόμων θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ευνοϊκή/δυσμενή επαφή, αντίστοιχα. Όσον αφορά τις έρευνες πρωτεΐνης-προσδέτη οι πιθανότητες υπολογίζονται από τη σχέση:

$$w(r) = -k_B T \ln[g(r)], g(r) = \rho(r)/\rho^*(r) \quad (5)$$

όπου, k_B είναι η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία του συστήματος, $\rho(r)$ η αριθμητική πυκνότητα του ζεύγους των ατόμων πρωτεΐνης-προσδέτη σε απόσταση r και τέλος $\rho^*(r)$ είναι η πυκνότητα του ζεύγους σε μια κατάσταση αναφοράς όπου οι διατομικές αντιδράσεις είναι μηδέν.

Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης βασισμένες στη γνώση σε σύγκριση με τις συναρτήσεις βασισμένες στο πεδίο δυνάμεων και τις εμπειρικές, συμβιβάζουν την ακρίβεια και ταχύτητα, καθώς ο υπολογισμός είναι σχετικά απλός και τα υποψήφια ζεύγη εξάγονται από τις ήδη γνωστές δομές συμπλεγμάτων πρωτεϊνών-προσδετών. Επίσης, οι συναρτήσεις αυτές είναι ικανές να λάβουν υπόψη τις επιδράσεις της πρόσδεσης που είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν, όπως για παράδειγμα θειούχες/αρωματικές αλληλεπιδράσεις ή π-π/κατιοντικές αλληλεπιδράσεις. Το μειονέκτημα των συναρτήσεων αυτού του τύπου έγκειται στην ακρίβεια της κατάστασης αναφοράς (referencestate), όπου οι διατομικές αλληλεπιδράσεις θεωρούνται μηδέν. [7, 15]

2.7.4. Συναρτήσεις Επικρατέστερης Βαθμολόγησης

Παρά τον μεγάλο αριθμό συναρτήσεων βαθμολόγησης που έχουν αναπτυχθεί, καμιά από αυτές δεν είναι τέλεια όσον αφορά την ακρίβεια και την πρακτικότητά τους. Καθεμιά από τις ήδη υπάρχουσες συναρτήσεις βαθμολόγησης έχει μειονεκτήματα και περιορισμούς. Η συνάρτηση επικρατέστερης βαθμολόγησης (consensus scoring function) αναπτύχθηκε με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης βαθμολόγησης στη μοριακή πρόσδεση, αφού συνδυάζει τα αποτελέσματα από ποικίλες συναρτήσεις βαθμολόγησης, λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα και εξισορροπώντας τις ανεπάρκειές τους. Η συνάρτηση επικρατέστερης βαθμολόγησης συνδυάζει πολλαπλές συναρτήσεις βαθμολόγησης κατά την εκτίμηση της συγγένειας δέσμευσης (binding affinity). Το κρίσιμο βήμα σε αυτόν το τύπο συνάρτησης βαθμολόγησης είναι ο σχεδιασμός κατάλληλης στρατηγικής βαθμολόγησης των επιμέρους βαθμολογιών έτσι ώστε οι πραγματικοί προσδέτες να μπορούν να διακριθούν από τους υπόλοιπους. [7, 15]

2.8. Λογισμικό AutoDock

Η αυτοματοποιημένη πρόσδεση χρησιμοποιείται ευρέως για τη πρόβλεψη βιομοριακών συμπλεγμάτων στην ανάλυση δομής/λειτουργίας καθώς και στον μοριακό σχεδιασμό. Υπάρχουν πάρα πολλές αποτελεσματικές μέθοδοι διαθέσιμες, οι οποίες διαπραγματεύονται με διαφορετικό τρόπο τη μοριακή αναπαράσταση, την ενεργειακή αξιολόγηση και τη δειγματοληψία διαμόρφωσης με σκοπό τη παροχή προβλέψεων με λογικό υπολογιστικό υπόβαθρο.

Υπάρχουν πολλά λογισμικά τα οποία χρησιμοποιούνται για υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης. Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία έγινε χρήση ενός από αυτά το AutoDock. Βασικά πλεονεκτήματά του είναι η δωρεάν πρόσβαση (free access) και η ευκολία στη χρήση. Το πακέτο μοριακής πρόσδεσης AutoDock αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Έρευνας Scripps των ΗΠΑ.[21] Το AutoDock είναι ένα «πακέτο» εργαλείων μοριακής πρόσδεσης.

Έχει σχεδιαστεί για να προσδιορίσει τον τρόπο με τον οποίο οι τριδιάστατες δομές μικρών μορίων προσδένονται στο ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα (ή στο DNA), επίσης με γνωστή τριδιάστατη δομή. Το συγκεκριμένο λογισμικό περιέχει ποικιλία αλγορίθμων αναζήτησης, καθώς επίσης και μια συνάρτηση βαθμολόγησης που βασίζεται σε εκτεταμένο πεδίο δυνάμεων. Η διαφορά της συνάρτησης βαθμολόγησης που βασίζεται στο εκτεταμένο πεδίο δυνάμεων συγκριτικά με εκείνη που βασίζεται στο κλασσικό πεδίο δυνάμεων έγκειται στον τρόπο με τον οποίο αντιμετωπίζουν τα υδρογόνα ή το τύπο της συνάρτησης ενέργειας. Πιο κάτω, παρουσιάζεται η συνάρτηση βαθμολόγησης εκτεταμένου πεδίου δυνάμεων που χρησιμοποιεί το λογισμικό AutoDock. Για δύο άτομα i και j , η ενέργεια κατά ζεύγη υπολογίζεται από το άθροισμα της ενέργειας των δυνάμεων VanderWaals, των δεσμών υδρογόνου, της ενέργειας Coulomb και της επιδιάλυτωσης. Οι όροι « W » της εξίσωσης είναι σταθμισμένοι παράγοντες βαθμονόμησης της εμπειρικής ελεύθερης ενέργειας.[3]

$$V = W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} E(t) \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-r_{ij}^2 / 2\sigma^2}$$

Το πρόγραμμα AutoDock περιέχει δύο «γενιές» λογισμικού, το AutoDock4 και AutoDockVina.

Όσον αφορά το AutoDock4, χρησιμοποιεί το LamarckianGeneticAlgorithm ως κύριο αλγόριθμο αναζήτησης. Αρχικά, όπως έχει ήδη εξηγηθεί παραπάνω, δημιουργείται ένας πληθυσμός δοκιμαστικών διαμορφώσεων, στη συνέχεια αυτές οι διαμορφώσεις μεταλλάσσονται σε διαδοχικές γενιές, ανταλλάσσουν διαμορφωτικές παραμέτρους και ανταγωνίζονται με τρόπο ανάλογο της βιολογικής εξέλιξης. Τελικά, επιλέγονται εκείνες με τη χαμηλότερη ενέργεια δέσμευσης. Η «Λαμαρκιανή-Lamarckian» διάσταση είναι ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό στον συγκεκριμένο αλγόριθμο αναζήτησης, που επιτρέπει στις μεμονωμένες διαμορφώσεις να αναζητούν από μόνες τους τον διαμορφωτικό χώρο τους, βρίσκουν τα τοπικά ελάχιστα και στη συνέχεια μεταδίδουν την πληροφορία στην επόμενη γενιά. Στην έκδοση AutoDock 4 του προγράμματος, είναι διαθέσιμοι και άλλοι αλγόριθμοι αναζήτησης, όπως ο γενετικός αλγόριθμος και ο αλγόριθμος προσομοιωμένης απόπτωσης.

Το AutoDock 4 χρησιμοποιεί ένα ημι-εμπειρικό πεδίο δυνάμεων για να προβλέψει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μικρών μορίων σε μεγαλομόρια στόχους. Το πεδίο δυνάμεων βασίζεται σε ένα ολοκληρωμένο θερμοδυναμικό μοντέλο που επιτρέπει την ενσωμάτωση ενδομοριακών ενεργειών στην προβλεπόμενη ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιολόγηση των ενεργειών τόσο των δεσμευμένων (boundstates) όσο και των μη δεσμευμένων καταστάσεων (unboundstates). Επίσης, συμπεριλαμβάνει μια

νέα μέθοδο επιδιάλυψης βασισμένη στα φορτία, η οποία χρησιμοποιεί ένα τυπικό σύνολο τύπων ατόμων και φορτίων. Η μέθοδος αυτή βαθμονομήθηκε με ένα σύνολο 188 διαφορετικών συμπλεγμάτων πρωτεϊνών-προσδετών με γνωστές τριδιάστατες δομές και ενέργειες πρόσδεσης, παρουσιάζοντας σταθερό σφάλμα 2-3 kcal/mol στην πρόβλεψη της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε έρευνες διασταυρούμενης επαλήθευσης. [22]

Το AutoDock 4 επιτρέπει πλήρως ευέλικτη μοντελοποίηση συγκεκριμένων τμημάτων της πρωτεΐνης, με παρόμοιο τρόπο, όπως ο προσδέτης. Ο χρήστης επιλέγει να χρησιμοποιήσει συγκεκριμένες πλευρικές αλυσίδες της πρωτεΐνης, ως ευέλικτες. Με άλλα λόγια, επιλέγει ποιο τμήμα της πρωτεΐνης θα έχει ευελιξία και εκεί θα διεξαχθεί ο υπολογισμός. Κατά τη διάρκεια του υπολογισμού, επιτρέπει περιστροφή γύρω από τους περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας κάνοντας χρήση των ίδιων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για να εξερευνήσουν τον διαμορφωτικό χώρο του προσδέτη.

Έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί δύο μέθοδοι για πρόσδεση ομοιοπολικά συνδεδεμένων συμπλεγμάτων: η μία προσέγγιση βασίζεται στο πλέγμα (grid-based) και η άλλη στην τροποποίηση των ευέλικτων πλευρικών αλυσίδων. Η πρώτη προσέγγιση, αυτή του πλέγματος, υπολογίζει έναν ειδικό χάρτη για τον χώρο που θα συνδεθεί ο προσδέτης. Μια συνάρτηση Gaussian δημιουργείται με μηδενική ενέργεια στο σημείο πρόσδεσης και απότομες ενεργειακές απώλειες στις γύρω περιοχές. Ο υπολογισμός της μοριακής πρόσδεσης συνεχίζεται με την ανάθεση ειδικού τύπου ατόμου στον προσδέτη για τα άτομα που θα σχηματίσουν τον ομοιοπολικό δεσμό. Αυτή η προσέγγιση δεν περιορίζει τη γεωμετρία της πρόσδεσης σε λογικές γωνίες δεσμού, γεγονός που αποτελεί και περιορισμό. Ωστόσο, η διαμορφωτική ελευθερία που επιτυγχάνεται με ένα ενιαίο πλέγμα Gaussian αποτελεί πλεονέκτημα αν η μέθοδος μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιείται για περιπτώσεις όπου ο προσδέτης στοχεύει ενεργά κέντρα που περιέχουν μέταλλο. Στην περίπτωση της δεύτερης προσέγγισης, της ευέλικτης πλευρικής αλυσίδας, επιλέγεται το τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο θα έχει ευελιξία και στη συνέχεια δημιουργείται ένα αρχείο συντεταγμένων με τον προσδέτη να είναι συνδεδεμένος στην κατάλληλη πλευρική αλυσίδα στον υποδοχέα, επικαλύπτοντας ιδανικά τις συντεταγμένες του προσδέτη πάνω στον κατάλληλο δεσμό στη πρωτεΐνη. Αυτή η δομή πλευρικής αλυσίδας-προσδέτη αντιμετωπίζεται ως εύκαμπτη κατά τη διάρκεια του υπολογισμού μοριακής πρόσδεσης, αναζητώντας περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας με σκοπό τη βελτιστοποίηση της αλληλεπίδρασης με το υπόλοιπο δομικό τμήμα της πρωτεΐνης.[22]

2.8.1. AutoDockTools: Το γραφικό περιβάλλον του AutoDock

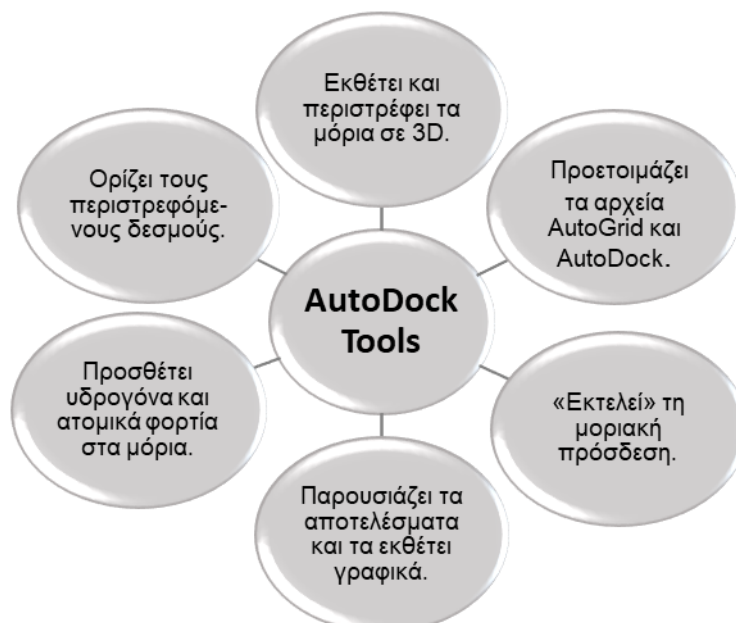
Το AutoDockTools αποτελεί το γραφικό περιβάλλον του AutoDock. Διευκολύνει τη μορφοποίηση των καταχωρημένων αρχείων, χρησιμοποιώντας ένα σύνολο μεθόδων που οδηγούν στη πρωτονίωση, υπολογισμό των φορτίων και τον

προσδιορισμό των περιστρεφόμενων δεσμών του προσδέτη και του υποδοχέα. Για να απλοποιηθεί περισσότερο ο σχεδιασμός και η προετοιμασία των υπολογιστικών πειραμάτων το AutoDockTools επιτρέπει στον χρήστη να εντοπίσει το ενεργό κέντρο και να καθορίσει οπτικά το μέγεθος του χώρου που αναζητήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Περιλαμβάνει επιπλέον, μεθόδους που βοηθούν τον χρήστη να καθορίσει τις παραμέτρους αναζήτησης και να ξεκινήσει τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης.

Το AutoDockTools περιλαμβάνει μια ποικιλία καινοτόμων μεθόδων για τη συγκέντρωση, παρουσίαση και ανάλυση των υπολογιστικών αποτελεσμάτων. Το συγκεκριμένο λογισμικό εφαρμόζεται στη γλώσσα προγραμματισμού Python και δημιουργήθηκε από επαναχρησιμοποιήσιμα στοιχεία λογισμικού. Τα επαναχρησιμοποιήσιμα στοιχεία λογισμικού έχουν σχεδιαστεί για να εφαρμόζουν την ισχύ και το πλεονέκτημα επαναχρησιμοποιήσιμων «εξαρτημάτων» στο πεδίο της δημιουργίας λογισμικού. Στην περίπτωση μας, επαναχρησιμοποιήσιμα στοιχεία λογισμικού μπορεί να είναι για παράδειγμα, γνωστά πλήκτρα, πεδία κειμένου, τα παράθυρα διαλόγου κ.α. Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιούνται για να αντιπροσωπεύσουν τον εύκαμπτο προσδέτη, τα σύνολα των παραμέτρων και τον υπολογισμό της μοριακής πρόσδεσης, επιτρέποντας ένα εύρος χρήσεων από ένα μόνο μέχρι χιλιάδες πειράματα μοριακής πρόσδεσης που περιλαμβάνουν πολλά διαφορετικά σύνολα μορίων, διευκολύνοντας τις αυτοματοποιημένες εφαρμογές υψηλής απόδοσης.[22]

Τα δύο βασικά εργαλεία του AutoDockTools είναι το autogrid και το autodock. Αρχικά, με το πρώτο υπολογίζονται τα πλέγματα (ως πλέγμα ή grid αναφέρεται ο ενεργειακός χώρος αλληλεπίδρασης για τους διάφορους τύπους ατόμων), χρησιμοποιώντας παραμέτρους που βασίζονται στο πεδίο δυνάμεων, τα οποία περιγράφουν τον υποδοχέα ή το ενεργό κέντρο του υποδοχέα (αυτό εξαρτάται από τη μελέτη). Επί της ουσίας, το πρόγραμμα παράγει ένα αρχείο το οποίο περιέχει ένα σύνολο χαρτών, χάρτες τύπων ατόμων για κάθε άτομο του υποδοχέα, ένα χάρτη επιδιалύτωσης και έναν ηλεκτροστατικό χάρτη (αυτοί είναι άσχετοι με τους χάρτες τύπων ατόμων του προσδέτη), και ένα χάρτη για κάθε τύπο ατόμου του προσδέτη. Στη συνέχεια το autodock διεξάγει τη μοριακή πρόσδεση του προσδέτη στα πλέγματα που έχουν δημιουργηθεί. Το autodock παράγει ένα αρχείο το οποίο περιλαμβάνει μέρη του πεδίου δυνάμεων που αφορούν τις ενδομοριακές ενέργειες.[23] Συνοψίζοντας, το AutoDockTools παρέχει τη δυνατότητα στον χρήστη να παρατηρεί και να περιστρέφει τα μόρια σε τριδιάστατη μορφή, να προσθέτει υδρογόνα, να προσθέτει μερικό ατομικό φορτίο τόσο στον υποδοχέα, όσο και στον προσδέτη και να ορίζει τους επιθυμητούς περιστρεφόμενους δεσμούς. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως παράγει και τα αρχεία παραμέτρων autogrid και autodock (grf:

autogridparameterfile, dpf: autodockparameterfile). Τέλος, διενεργεί τους υπολογισμούς AutoDock και AutoGrid, παρουσιάζει τα αποτελέσματα των υπολογισμών ενώ ταυτόχρονα τα εκθέτει γραφικά. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των εφαρμογών του Autodock Tools.

2.9. Μοριακή Δυναμική

Η μοριακή δυναμική είναι η υπολογιστική μέθοδος για την προσομοίωση της κίνησης ενός συστήματος πολλών σωματιδίων. Απαιτεί γνώση του δυναμικού αλληλεπίδρασης που δημιουργείται από τις δυνάμεις που ασκούνται στα σωματίδια και τις εξισώσεις κίνησης που ρυθμίζουν την δυναμική των σωματιδίων. Τα δυναμικά πεδία της μοριακής μηχανικής συχνά χρησιμοποιούνται στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η δύναμη που ασκείται σε κάθε άτομο i υπολογίζεται από τις παραγώγους της συνάρτησης δυναμικής ενέργειας (dE/dx_i , dE/dy_i , dE/dz_i) ως προς το άτομο j . Η εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα, $f_i = m_i \cdot a_i$, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των επιταχύνσεων κάθε ατόμου σε κάθε βήμα της προσομοίωσης.[24]

Για την πραγματοποίηση υπολογισμών μοριακής δυναμικής, εισάγονται στον υπολογιστή οι συντεταγμένες των ατόμων στον χώρο, οι ασκούμενες δυνάμεις που εξαρτώνται από το ενεργειακό πεδίο, καθώς επίσης και η θερμοκρασία που οδηγεί σε συμπεράσματα για τις ταχύτητες των ατόμων, καθώς επίσης και ο επιθυμητός χρόνος να γίνει η προσομοίωση. Το αποτέλεσμα της μοριακής δυναμικής υποδεικνύει την κίνηση του μορίου στον χώρο σε συνάρτηση με τον χρόνο πραγματοποίησης της προσομοίωσης. Το χρονικό εύρος πραγματοποίησης πειράματος μοριακής δυναμικής είναι 1ns-1μs (για μεγάλα και μικρά μόρια αντίστοιχα). Το χρονικό βήμα είναι συνήθως 1fs-1ps.

Μία από τις πρώτες προσεγγίσεις για την πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης αποτελεί η προσομοίωση της μοριακής δυναμικής (moleculardynamics – MD). Στη μοριακή δυναμική χρησιμοποιείται ένα πεδίο δυνάμεων για να υπολογιστούν οι δυνάμεις σε κάθε άτομο του προσομοιούμενου συστήματος. Στη συνέχεια, σύμφωνα με την Νευτώνεια μηχανική, υπολογίζονται οι ταχύτητες και οι επιταχύνσεις και τα άτομα μετακινούνται ελαφρά με συγκεκριμένο χρονικό βήμα. Η προσομοίωση γίνεται περισσότερο ακριβής, όσο μικρότερο είναι το χρονικό βήμα της μετακίνησης και όσο περισσότερα είναι τα άτομα που συμμετέχουν στην προσομοίωση. Στην ουσία η μοριακή δυναμική περιλαμβάνει τον υπολογισμό των λύσεων στις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα. Η χρησιμοποίηση των κλασικών MD τεχνικών για την εύρεση της συνολικά ελάχιστης ενέργειας ενός συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα είναι αρκετά δύσκολη. Συχνά μία τροχιά μοριακής δυναμικής παγιδεύεται σε κάποιο τοπικό ελάχιστο και δεν είναι δυνατό να υπερβεί τους υψηλούς ενεργειακούς φραγμούς μιας διαμόρφωσης. Έτσι, η ποιότητα των αποτελεσμάτων των κλασικών τεχνικών προσομοίωσης MD, είναι ισχυρά εξαρτώμενη από την αρχική διαμόρφωση. Μία άλλη χρήση των τεχνικών MD σε συνδυασμό με μεθόδους πρόσδεσης είναι η δημιουργία (υπό)συνόλου από καταστάσεις/δομές της ίδιας πρωτεΐνης, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη συνέχεια σε μελέτες πρόσδεσης. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί έναν τρόπο για την υιοθέτηση της ελαστικότητας των πρωτεϊνών με ένα σύνολο από διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης.

Τα βήματα μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής είναι τα εξής:

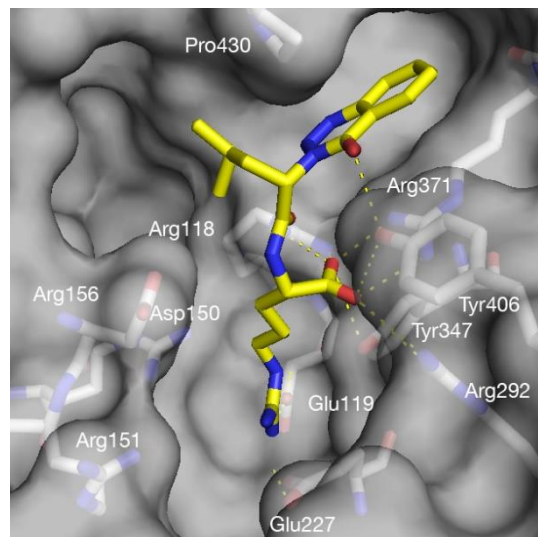
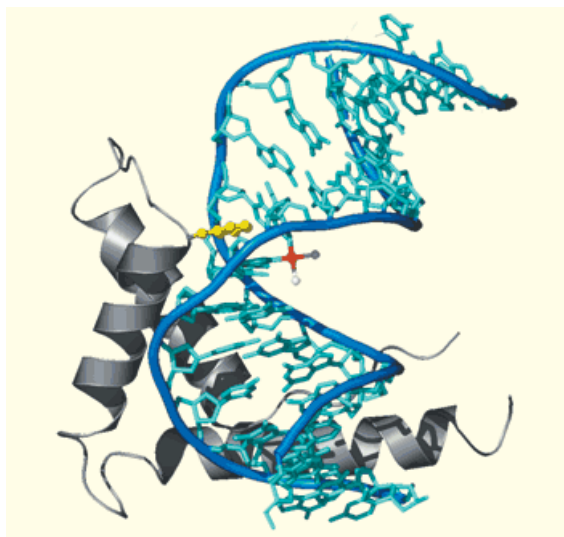
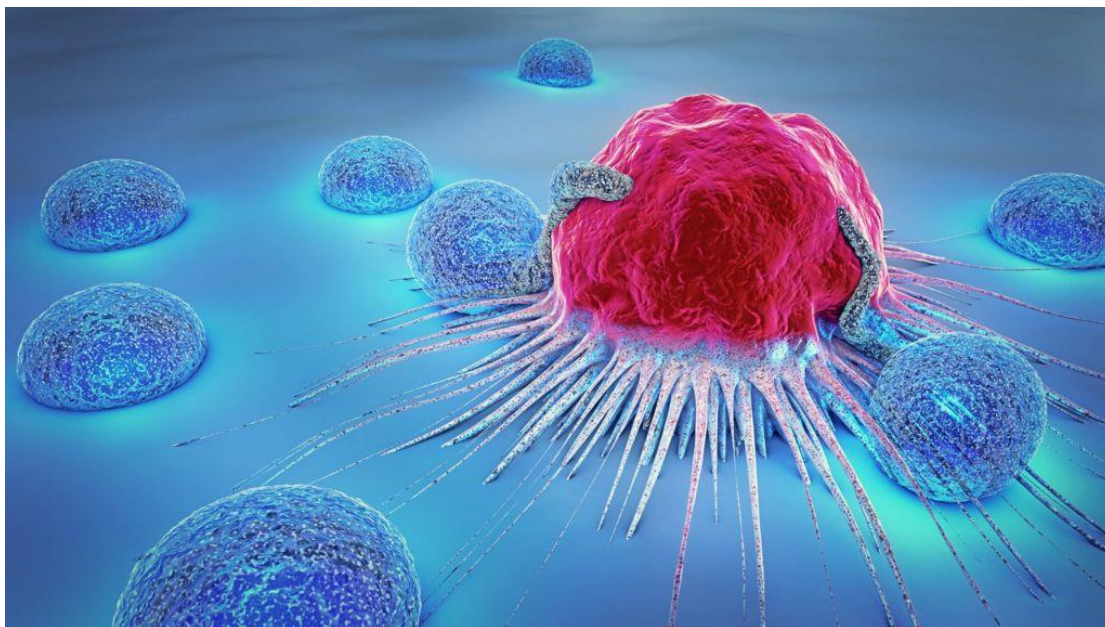
- 1) **Έναρξη:** Για να ξεκινήσει η προσομοίωση μοριακής δυναμικής, θα πρέπει να καθοριστεί η αρχική διαμόρφωση του συστήματος (κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού, μοντελοποίηση με βάση την ομολογία του μορίου με άλλα μόρια), κάτι που πρέπει να επιτευχθεί με ιδιαίτερη προσοχή, δεδομένου ότι μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της προσομοίωσης. Μια επιτυχής τακτική είναι να επιλεγεί μια δομή κοντά στην κατάσταση που θέλουμε να προσομοιώσουμε. Πριν την έναρξη της προσομοίωσης συνίσταται να εκτελεστεί ελαχιστοποίηση ενέργειας στην αρχική δομή, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές ισχυρές αλληλεπιδράσεις vanderWaals, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε τοπική παραμόρφωση και τελικά σε μη σταθερή εξομοίωση. Στο σημείο αυτό προστίθενται ξεχωριστά μόρια νερού στο σύστημα, ώστε να διαλυτοποιήσουν την πρωτεΐνη, με την κατάλληλη βέβαια επεξεργασία.
- 2) **Θέρμανση του συστήματος:** Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει καταχώρηση αρχικών ταχυτήτων σε χαμηλή θερμοκρασία, για κάθε άτομο του συστήματος και ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα, ώστε να εξελιχθεί το σύστημα στον χρόνο. Στην περίπτωση που στο σύστημα περιλαμβάνονται ξεχωριστά μόρια νερού, οι θέσεις της πρωτεΐνης σταθεροποιούνται αρχικά, ώστε να επιτραπεί στα μόρια νερού να προσαρμοστούν σε σχέση με την πρωτεΐνη. Από τη στιγμή που

τα μόρια νερού έρθουν σε ισορροπία αίρονται οι περιορισμοί και το όλο σύστημα μπορεί να εξελιχθεί στον χρόνο. Περιοδικά, κατά την εξέλιξη του συστήματος, νέες ταχύτητες καταχωρούνται σε ελαφρά υψηλότερες θερμοκρασίες και η διαδικασία συνεχίζεται, έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία.

- 3) **Εξισορρόπηση:** Από τη στιγμή που η επιθυμητή θερμοκρασία έχει επιτευχθεί, η προσομοίωση του συστήματος πρωτεΐνης/νερού συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης ελέγχονται διάφορες ιδιότητες, όπως η δομή, η πίεση, η θερμοκρασία και η ενέργεια. Το νόημα της συγκεκριμένης φάσης είναι να εκτελεστεί η προσομοίωση, έως ότου αυτές οι ιδιότητες σταθεροποιηθούν σε σχέση με το χρόνο. Αν η θερμοκρασία αυξομειώνεται σημαντικά, οι ταχύτητες θα πρέπει να διαβαθμιστούν έτσι ώστε η θερμοκρασία να επιστρέψει κοντά στην επιθυμητή τιμή.
- 4) **Φάση Παραγωγής:** Το τελευταίο βήμα της προσομοίωσης, περιλαμβάνει προσομοίωση σε φάση παραγωγής για το επιθυμητό μήκος χρόνου (από μερικές εκατοντάδες ps έως ns ή και περισσότερο). Στη διάρκεια της φάσης αυτής υπολογίζονται οι τιμές των θερμοδυναμικών παραμέτρων.[25]

Υπάρχουν πολλά προγράμματα για την προσομοίωση της μοριακής δυναμικής όπως τα AMBER [26], CHARMM [27], GROMACS [28], GROMOS [29], Desmond[30] κ.λπ., που έχουν ως στόχο την επίλυση του προβλήματος πρόσδεσης και υιοθετούν τρόπους για την αποφυγή παγίδευσης σε τοπικό ελάχιστο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



2.1. Καρκίνος

Καρκίνος είναι το όνομα που έχει δοθεί σε ένα σύνολο ασθενειών με κοινά χαρακτηριστικά. Σε όλους τους τύπους καρκίνου, μερικά κύτταρα του σώματος αρχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται στους γύρω ιστούς. Ο καρκίνος μπορεί να ξεκινήσει οπουδήποτε στο ανθρώπινο σώμα, το οποίο αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα. Υπό κανονικές συνθήκες, τα ανθρώπινα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται (μίτωση) για να σχηματίσουν τα νέα κύτταρα καθώς το σώμα τα χρειάζεται. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται με αλληλένδετο τρόπο, βασιζόμενα στη διαθεσιμότητα εξωτερικών παραγόντων ανάπτυξης. Όταν η παροχή αυτών των σημάτων ανάπτυξης είναι περιορισμένη ή τερματίζεται, τα κύτταρα παύουν να αναπαράγονται. Όταν τα κύτταρα γερνούν ή καταστραφούν, πεθαίνουν και αντικαθίστανται από νέα κύτταρα. Η ζωή ενός φυσιολογικού κυττάρου είναι προγραμματισμένη, το κάθε κύτταρο διαιρείται μόνο 50 φορές, και στη συνέχεια πεθαίνει από απόπτωση και αντικαθίσταται από νέο κύτταρο. [31] Όταν όμως αναπτύσσεται ο καρκίνος, αυτή η ομαλή διεργασία δεν υφίσταται. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου της τελομεράσης, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες, αντικαθιστά τα φθαρμένα άκρα του τελομερούς, επιτρέποντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα τελομερή προστατεύουν τα άκρα του χρωμοσώματος από το ανακάτεμα και από το να αναγνωρίζονται ως θέσεις βλάβης του DNA. Δυσλειτουργικά τελομερή, που προκύπτουν από «κόντεμα» των τελομερών σε φυσιολογικά κύτταρα κατά τη διάρκεια προοδευτικών κυτταρικών διαιρέσεων, προκαλούν βλάβες στο DNA, οι οποίες οδηγούν σε κυτταρική γήρανση. Τα κύτταρα που αποκτούν ογκογονικές αλλαγές παρακάμπτουν τη γήρανση και συνεχίζουν να διαιρούνται (παρατεταμένη διάρκεια ζωής). [32]

Αυτή η διεργασία είναι σύμφωνη με τη περιορισμένη αποτελεσματικότητα της αντιγραφής του DNA, καθώς η επαναλαμβανόμενη αντιγραφή οδηγεί σε κόντεμα των τελομερών. Το «κόντεμα» των τελομερών κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια και συμβάλλει σημαντικά στις γονιδιωματικές αναδιατάξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο. Με άλλα λόγια, καθώς τα κύτταρα γίνονται όλο και πιο ανώμαλα, τα παλιά ή κατεστραμμένα κύτταρα επιβιώνουν, ενώ θα έπρεπε κανονικά να πεθάνουν, και σχηματίζονται νέα κύτταρα ενώ δεν χρειάζονται. Αυτά τα επιπλέον κύτταρα μπορεί να διαιρεθούν χωρίς διακοπή σχηματίζοντας νεοπλάσματα τα οποία ονομάζονται όγκοι. Τα καρκινικά κύτταρα επιτυγχάνουν την «αθανασία» ενεργοποιώντας ή αναδιοργανώνοντας το φυσιολογικά σιωπηλό γονίδιο TERT, το οποίο κωδικοποιεί την τελομεράση. [33]

Η κυτταρική διαίρεση, όταν αναπτύσσεται ανεξέλεγκτα από τους αυξητικούς παράγοντες, σχηματίζει όγκους. Αυτή η διεργασία περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων. Στο πρώτο στάδιο, σχηματίζεται μια μεγάλη μάζα κυττάρων λόγω της

ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης, γνωστή και ως υπερπλασία. Στη συνέχεια, ακολουθεί η δυσπλασία. Στο στάδιο αυτό η ανάπτυξη των κυττάρων συνοδεύεται από ανωμαλίες. Στο επόμενο στάδιο, που ονομάζεται αναπλασία, εμφανίζονται πρόσθετες αλλαγές όταν αυτά τα άτυπα κύτταρα αρχίζουν να εξαπλώνονται σε μια περιορισμένη περιοχή του ιστού, χάνοντας την αρχική τους λειτουργία.[31]

Πολλοί καρκίνοι σχηματίζουν συμπαγείς όγκους, οι οποίοι είναι μάζες ιστών. Οι καρκίνοι του αίματος, όπως οι λευχαιμίες, δεν σχηματίζουν όγκους γενικά. Οι καρκινικοί όγκοι είναι κακοήθεις. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να εξαπλωθούν ή να εισβάλουν σε κοντινούς ιστούς. Επίσης, καθώς οι όγκοι αναπτύσσονται, ορισμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ταξιδέψουν στο σώμα μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος και να σχηματίσουν νέους όγκους, μακριά από τον αρχικό (μετάσταση).

Σε αντίθεση με τους κακοήθεις, οι καλοήθεις όγκοι δεν εξαπλώνονται ή δεν εισβάλλουν στους κοντινούς ιστούς. Παρ' όλα αυτά, οι καλοήθεις όγκοι μπορεί μερικές φορές να είναι αρκετά μεγάλοι. Όταν αφαιρούνται δεν αυξάνονται συνήθως, όπως συμβαίνει μερικές φορές σε κακοήθεις. Σε αντίθεση με όλους τους καλοήθεις όγκους που μπορεί να αναπτυχθούν στο ανθρώπινο σώμα, οι καλοήθεις όγκοι που αναπτύσσονται στον εγκέφαλο μπορεί να είναι απειλητικοί για τη ζωή.

Τα καρκινικά και τα κανονικά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους με πολλούς τρόπους, που επιτρέπουν στα πρώτα να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και να γίνονται επεμβατικά, δηλαδή να προσβάλλουν τους ιστούς και τα όργανα. Μια σημαντική διαφορά είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο εξειδικευμένα από τα κανονικά. Αυτό σημαίνει ότι ενώ τα κανονικά κύτταρα ωριμάζουν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων με συγκεκριμένες λειτουργίες, τα καρκινικά δεν το κάνουν, μπορούν να ωριμάσουν και να αναπτυχθούν οπουδήποτε. Αυτό εξηγεί γιατί τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται χωρίς διακοπή. Επίσης, μια άλλη διαφορά είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα αγνοούν σήματα που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα οδηγούσαν τα κύτταρα σε τερματισμό της διαίρεσής τους ή σε μια διεργασία η οποία είναι γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και χρησιμοποιείται από τον οργανισμό με στόχο την απαλλαγή περιττών κυττάρων.

Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να επηρεάσουν φυσιολογικά κύτταρα, μόρια καθώς επίσης και αιμοφόρα αγγεία που περιβάλλουν και τροφοδοτούν έναν όγκο. Αυτός ο χώρος γύρω από τον όγκο είναι γνωστός ως μικροπεριβάλλον. Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να «προσεγγίσουν» φυσιολογικά κύτταρα γύρω από έναν όγκο να δημιουργήσουν αιμοφόρα αγγεία ώστε να τροφοδοτούν τους όγκους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, προκειμένου να αναπτυχθούν. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία απομακρύνουν επίσης και τα απόβλητα από τους όγκους.

Συνήθως, το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει και αφαιρεί τα κατεστραμμένα ή ανώμαλα κύτταρα από το σώμα. Ορισμένες φορές όμως, τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ένα δίκτυο οργάνων, ιστών και εξειδικευμένων κυττάρων που προστατεύει το σώμα από λοιμώξεις και από άλλες καταστάσεις. Έτσι, ορισμένες φορές τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να «κρύβονται» από το ανοσοποιητικό σύστημα, γεγονός που ενισχύει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι όγκοι μπορούν να χρησιμοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να παραμείνουν ζωντανοί και να μεγαλώσουν. Με τη βοήθεια, για παράδειγμα, ορισμένων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία κανονικά παρεμποδίζουν τον εκτροχιασμό μιας ανοσοαπόκρισης, τα καρκινικά κύτταρα εμποδίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα από το να τα θανατώσει.

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια. Προκαλείται από αλλαγές στα γονίδια τα οποία ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων και ειδικά την ανάπτυξη και το πολλαπλασιασμό τους. Οι γενετικές αλλαγές οι οποίες οδηγούν σε καρκίνο μπορούν να κληρονομηθούν από τους γονείς μας ή να συμβούν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου. Στη δεύτερη περίπτωση ο καρκίνος προκαλείται ως αποτέλεσμα σφαλμάτων που συμβαίνουν κατά τη διαίρεση των κυττάρων ή λόγω βλάβης στο DNA η οποία προκαλείται από ορισμένες περιβαλλοντικές εκθέσεις. Οι περιβαλλοντικές εκθέσεις περιλαμβάνουν ουσίες, όπως για παράδειγμα χημικές ουσίες στον καπνό του τσιγάρου, και την ακτινοβολία, όπως τις υπεριώδεις ακτίνες του ήλιου.

Ο καρκίνος κάθε ανθρώπου έχει ένα μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών και καθώς ο καρκίνος αναπτύσσεται προκύπτουν επιπλέον αλλαγές. Ακόμα και εντός του ίδιου όγκου, διαφορετικά κύτταρα μπορεί να έχουν διαφορετικές αλλαγές. Γενικότερα όμως, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν περισσότερες γενετικές αλλαγές, όπως μεταλλάξεις στο DNA, από τα κανονικά κύτταρα. Ορισμένες από αυτές τις αλλαγές μπορεί να μην έχουν σχέση με τον καρκίνο, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του, παρά η αιτία του. Οι γενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στο καρκίνο τείνουν να επηρεάζουν τρεις κύριους τύπους γονιδίων:

- Τα πρωτο-ογκογονίδια (Proto-oncogenes)
- Τα γονίδια καταστολής όγκων (Tumorsuppressorgenes)
- Τα γονίδια επιδιόρθωσης DNA (DNArepairgenes)

Αυτές οι γενετικές αλλαγές συχνά αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως «οδηγοί» του καρκίνου.

Τα πρωτο-ογκογονίδια (Proto - oncogenes) εμπλέκονται στη φυσιολογική ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων. Ωστόσο, όταν αυτά τα γονίδια μεταβάλλονται με ορισμένους τρόπους ή είναι πιο ενεργά από το κανονικό, μπορεί να μετατραπούν σε γονίδια που προκαλούν καρκίνο, τα

ογκογονίδια(oncogenes), επιτρέποντας στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν ενώ δεν θα έπρεπε.

Τα γονίδια καταστολής όγκου (Tumorsuppressorgenes), επίσης εμπλέκονται στον έλεγχο ανάπτυξης και διαίρεσης των κυττάρων. Κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν μεταβολές στα γονίδια καταστολής όγκων ενδέχεται να διαιρεθούν με ανεξέλεγκτο τρόπο.

Τα γονίδια επιδιόρθωσης DNA (DNArepairgenes) αφορούν στην επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA. Κύτταρα με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια τείνουν να αναπτύσσουν επιπλέον μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια. Αυτές οι μεταλλάξεις σε συνδυασμό μπορεί να προκαλέσουν καρκινικά κύτταρα.

Καθώς η επιστημονική γνώση αυξάνεται και οι επιστήμονες είναι σε θέση να γνωρίζουν περισσότερα για τις μοριακές αλλαγές που οδηγούν σε καρκίνο, διαπίστωσαν ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου επισυμβαίνουν ορισμένες μεταλλάξεις. Κατά συνέπεια, ορισμένες φορές οι καρκίνοι χαρακτηρίζονται από τους τύπους γενετικών αλλοιώσεων που πιστεύεται ότι τους προκαλεί και όχι μόνο από το μέρος του σώματος που αναπτύσσονται ή από το πώς εμφανίζονται τα καρκινικά κύτταρα στο μικροσκόπιο.

Ο καρκίνος που έχει εξαπλωθεί σε μέρος του σώματος διαφορετικό από το μέρος που ξεκίνησε, ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος και η διεργασία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα «ταξιδεύουν» σε διαφορετικά μέρη του σώματος ονομάζεται μετάσταση. Ο μεταστατικός καρκίνος έχει το ίδιο όνομα και τον ίδιο τύπο καρκινικών κυττάρων με το πρωταρχικό καρκίνο. Για παράδειγμα ο καρκίνος του στήθους που υφίσταται μετάσταση και δημιουργεί έναν όγκο στους πνεύμονες, είναι μεταστατικός καρκίνος του στήθους, και όχι καρκίνος του πνεύμονα. Γενικά, όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα έχουν την ίδια όψη με τα καρκινικά κύτταρα του αρχικού όγκου. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα του αρχικού καρκίνου και αυτά του μεταστατικού έχουν μερικά κοινά μοριακά χαρακτηριστικά, όπως είναι η παρουσία ορισμένων χρωμοσωμικών αλλαγών.

Η θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στην παράταση της ζωής ορισμένων ατόμων με μεταστατικό καρκίνο. Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, ο στόχος των θεραπειών για τον μεταστατικό καρκίνο είναι ο έλεγχος ανάπτυξής του ή η ανακούφιση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από αυτόν. Οι μεταστατικοί όγκοι μπορεί να προκαλέσουν πολύ σοβαρές βλάβες στον τρόπο λειτουργίας του ανθρώπινου σώματος και οι περισσότεροι άνθρωποι που χάνουν τη ζωή τους από καρκίνο, πεθαίνουν από μεταστατικούς τύπους καρκίνου.[33]

2.1.1. Τύποι Καρκίνου

Υπάρχουν πάνω από 100 τύποι καρκίνου. Συνήθως, οι τύποι καρκίνου ονομάζονται σύμφωνα με τα όργανα ή τους ιστούς όπου σχηματίζονται. Πιο συγκεκριμένα, ένα παράδειγμα είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος ξεκινάει σε κύτταρα του πνεύμονα ή ένα άλλο, ο καρκίνος του εγκεφάλου που ξεκινάει σε κύτταρα του εγκεφάλου. Επίσης, οι καρκίνοι μπορούν να χαρακτηριστούν από το τύπο του κυττάρου που τους σχηματίζει, όπως για παράδειγμα ένα επιθηλιακό ή ένα πλακώδες κύτταρο. Στη συνέχεια αναφέρονται μερικοί τύποι καρκίνων οι οποίοι αναπτύσσονται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρου:

- **Καρκίνωμα (Carcinoma)**
Είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου. Σχηματίζεται από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν την εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Υπάρχουν πολλοί τύποι επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία έχουν σχήμα στήλης όταν προβάλλονται στο μικροσκόπιο. Άμεση συνέπεια, είναι η ύπαρξη διαφορετικών τύπων καρκινωμάτων, που ξεκινούν από διαφορετικά είδη επιθηλιακών κυττάρων. Το αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma) είναι ένας τύπος καρκινώματος που σχηματίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα που παράγουν βλέννα ή υγρά, οι ιστοί που σχηματίζουν αυτά τα κύτταρα, συχνά ονομάζονται αδενικοί ιστοί. Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη είναι αδενοκαρκινώματα. Επίσης, το καρκίνωμα των βασικών κυττάρων (Basalcellcarcinoma) είναι ένας τύπος καρκίνου που ξεκινάει στο κάτω ή βασικό στρώμα της επιδερμίδας, που είναι το εξωτερικό στρώμα του δέρματος ενός ατόμου. Ένας ακόμη τύπος καρκινώματος είναι το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (Squamouscellcarcinoma), τα οποία βρίσκονται ακριβώς από κάτω από την εξωτερική επιφάνεια του δέρματος. Τα καρκινώματα αυτού του τύπου κυττάρου συχνά αναφέρονται ως επιδερμοειδή. Τέλος, το μεταβατικό καρκίνωμα (Transitional cellcarcinoma) σχηματίζεται σε ένα τύπο επιθηλιακού ιστού που ονομάζεται μεταβατικό επιθήλιο ή ουροθήλιο. Ο ιστός αυτός βρίσκεται στις επενδύσεις της ουροδόχου κύστης, των ουρητήρων και σε ένα μέρος των νεφρών (νεφρική πύελος). Ορισμένοι τύποι καρκίνου της ουροδόχου κύστης, των ουρητήρων και των νεφρών είναι μεταβατικά καρκινώματα κυττάρων.
- **Σάρκωμα (Sarcoma)**
Τα σαρκώματα είναι καρκίνοι που σχηματίζονται σε οστά και μαλακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων μυών, λίπους, αιμοφόρων αγγείων, λεμφικών αγγείων και ινώδους ιστού (τένοντες και σύνδεσμοι). Είναι ο πιο κοινός καρκίνος των οστών. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι σαρκώματος μαλακών ιστών είναι το λιομυοσάρκωμα (leiomyosarcoma), το σάρκωμα Kaposi (Kaposisarcoma), το κακοήθες ινώδες ιστοσάρκωμα (malignantfibroushistiocytoma), το λιποσάρκωμα (liposarcoma) και τα

δερματοφιβροσάρκωμα
(dermatofibrosarcomaprotuberans).

που

προεξέχει

- Λευχαιμία (Leukemia)

Οι καρκίνοι που σχηματίζονται στον ιστό σχηματισμού του αίματος (μυελός των οστών) ονομάζονται λευχαιμίες. Οι καρκίνοι αυτού του τύπου δεν σχηματίζουν συμπαγείς όγκους. Αντ' αυτού, ένας μεγάλος αριθμός μη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων συσσωρεύονται στο αίμα και στον μυελό των οστών, εκτοπίζοντας τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος. Το χαμηλό επίπεδο φυσιολογικών αιμοσφαιρίων μπορεί να δυσκολέψει το σώμα να λαμβάνει οξυγόνο στους ιστούς, να ελέγχει την αιμορραγία ή να καταπολεμάει τις λοιμώξεις. Υπάρχουν τέσσερις συνηθισμένοι τύποι λευχαιμίας, οι οποίοι ομαδοποιούνται ανάλογα με τη ταχύτητα εξάπλωσης της ασθένειας (οξεία ή χρόνια) και τον τύπο των κυττάρων του αίματος από όπου ξεκινά ο καρκίνος (λεμφοβλαστικό ή μυελοειδές).

- Λέμφωμα (Lymphoma)

Λέμφωμα ονομάζεται ο τύπος του καρκίνου που ξεκινά από τα λεμφοκύτταρα (T- λεμφοκύτταρα ή B-λεμφοκύτταρα). Πρόκειται για τα λευκά αιμοσφαίρια που καταπολεμούν τις ασθένειες και αποτελούν μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος. Στο λέμφωμα, μη φυσιολογικά λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται τόσο στους λεμφαδένες, όσο και σε άλλα όργανα του σώματος. Υπάρχουν δύο τύποι λεμφώματος, το λέμφωμα Hodgkin (Hodgkinlymphoma) και το μη-λέμφωμα Hodgkin (Non-Hodgkinlymphoma). Στη πρώτη περίπτωση, τα άτομα με λέμφωμα Hodgkin έχουν μη φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, που ονομάζονται κύτταρα Reed-Sternberg και συνήθως σχηματίζονται από B-λεμφοκύτταρα. Στον τύπο του μη-λεμφώματος Hodgkin, οι καρκίνοι μπορούν να αναπτυχθούν αργά ή γρήγορα και μπορούν να σχηματιστούν είτε από B-λεμφοκύτταρα είτε από T-λεμφοκύτταρα. Το μη-λέμφωμα Hodgkin αποτελεί μια μεγάλη ομάδα καρκίνων που ξεκινούν από τα λεμφοκύτταρα.

- Πολλαπλό Μυέλωμα (Multiple Myeloma)

Το πολλαπλό μυέλωμα είναι ένας καρκίνος που ξεκινάει σε κύτταρα του πλάσματος, έναν άλλο τύπο ανοσοκυττάρων. Τα ανώμαλα κύτταρα του πλάσματος, που ονομάζονται κύτταρα μυελώματος, συσσωρεύονται στον μυελό των οστών και σχηματίζουν όγκους στα οστά σε όλο το σώμα. Το πολλαπλό μυέλωμα ονομάζεται και μυέλωμα κυττάρων του πλάσματος (plasmacellmyeloma) ή ασθένεια Kahler (Kahlerdisease).

- Μελάνωμα (Melanoma)

Το μελάνωμα είναι ένας άλλος τύπος καρκίνου ο οποίος ξεκινάει σε κύτταρα, τα οποία ονομάζονται μελανοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι εξειδικευμένα κύτταρα που παράγουν μελανίνη (είναι η χρωστική που

δίνει στο δέρμα το χρώμα του). Τα περισσότερα μελανώματα σχηματίζονται στο δέρμα, παρ' όλα αυτά, υπάρχει περίπτωση να αναπτυχθούν και σε άλλους ιστούς με χρωστική, όπως είναι το μάτι.

- Καρκίνος του Εγκεφάλου και του Νωτιαίου Μυελού (Brain and SpinalCordTumors)

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι όγκων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Οι όγκοι αυτοί ονομάζονται με βάση το τύπο των κυττάρων, όπου σχηματίστηκε για πρώτη φορά ο όγκος. Για παράδειγμα, ένας αστροκυτταρικός όγκος ξεκινάει σε εγκεφαλικά κύτταρα σε σχήμα αστεριού (αστροκύτταρα), τα οποία βοηθούν στη διατήρηση υγιών νευρικών κυττάρων. Οι όγκοι του εγκεφάλου μπορεί να είναι καλοήθεις (όχι καρκίνος) ή κακοήθεις (καρκίνος).

Οι τύποι καρκίνου που αναφέρθηκαν προηγουμένως αποτελούν τους βασικούς τύπους καρκίνου. Υπάρχουν και μερικοί άλλοι τύποι όγκων που αξίζει να αναφερθούν. Οι όγκοι των γεννητικών κυττάρων είναι ένας τύπος όγκου που ξεκινάει από τα κύτταρα που παράγουν σπέρμα. Αυτού του είδους οι όγκοι μπορούν να αναπτυχθούν σχεδόν σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος και μπορεί να είναι καλοήθεις ή και κακοήθεις. Οι νευροενδοκρινικοί όγκοι, επίσης ένα άλλο είδος όγκου, σχηματίζονται σε κύτταρα που απελευθερώνουν ορμόνες στο αίμα, ως απόκριση σε ένα σήμα του νευρικού συστήματος. Αυτοί οι όγκοι, οδηγούν στη παραγωγή ορμονών σε υψηλότερες ποσότητες από τις φυσιολογικές με αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων συμπτωμάτων. Οι νευροενδοκρινικοί όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Σε αυτή τη κατηγορία όγκων ανήκουν και οι καρκινοειδείς όγκοι. Πρόκειται για όγκους με αργή ανάπτυξη που συνήθως εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα (συχνότερα στο λεπτό έντερο και στο ορθό). Οι καρκινοειδείς όγκοι ενδέχεται να εξαπλωθούν στο ήπαρ, ή σε άλλες περιοχές του σώματος, και να εκκρίνουν ουσίες όπως η σεροτονίνη ή οι προσταγλανδίνες, προκαλώντας καρκίνο.[33]

Οι όγκοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, επιπλέον, με βάση τον βαθμό ανωμαλίας του όγκου. Πρόκειται για την ανωμαλία στα κύτταρα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς που τα περιβάλλουν. Η αύξηση της ανωμαλίας, αυξάνει τον βαθμό σε μια κλίμακα από το 1 μέχρι το 4. (Σχήμα 5) Τα επαρκώς διαφοροποιημένα κύτταρα (differentiatedcells) μοιάζουν αρκετά με τα φυσιολογικά και ανήκουν σε όγκους χαμηλού βαθμού. Τα ακατάλληλα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ανωμαλία σε σχέση με τους γύρω ιστούς (όγκοι υψηλού σταδίου).[31]



Σχήμα 5: Στάδια ανωμαλίας κυττάρων από το 1 μέχρι το 4.

2.1.2. Είδη Θεραπείας

Από τη στιγμή που παρουσιάστηκε η ασθένεια του καρκίνου, ως στόχος της επιστημονικής κοινότητας, τέθηκε η ανακάλυψη νέων ποιοτικών θεραπευτικών μεθόδων. Σύμφωνα με έρευνες, μεγαλύτερο από το 60% όλων των εν εξελίξει κλινικών δοκιμών θεραπειών (φαρμάκων), αφορά τον καρκίνο.[34] Η επιλογή της θεραπείας και η πρόοδος της εξαρτώνται από τον τύπο του καρκίνου, τη τοποθεσία του, καθώς επίσης και από το στάδιο της εξέλιξής του. Στη συνέχεια, αναφέρονται επιγραμματικά οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την καταπολέμηση των διάφορων τύπων καρκίνου:

- Χειρουργική αφαίρεση των όγκων
- Χειρουργική επέμβαση με χρήση ακτινοβολίας (Radiation-based surgical knife)
- Ακτινοθεραπεία
- Χημειοθεραπεία
- Ορμονοθεραπεία
- Ανοσοθεραπεία και ανοσοθεραπεία με βάση τα δενδριτικά κύτταρα
- Στοχευμένη Θεραπεία
- Θεραπεία μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων

Η χειρουργική επέμβαση, η χειρουργική επέμβαση με χρήση ακτινοβολίας, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία είναι μερικές από τις παραδοσιακές, κλασικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου. Η θεραπεία που βασίζεται στις ορμόνες, θεραπείες αντι-αγγειογενετικής, θεραπείες βλαστικών κυττάρων, ανοσοθεραπεία και ανοσοθεραπεία με βάση τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells) είναι μερικές από τις σύγχρονες

θεραπείες κατά της συγκεκριμένης νόσου. Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά οι βασικές μέθοδοι καταπολέμησης της ασθένειας του καρκίνου.

Οι παρενέργειες που σχετίζονται με τις παραδοσιακές μεθόδους θεραπείας υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα εύρεσης νέων αποτελεσματικών και με λιγότερες, ή και καθόλου παρενέργειες, μεθόδων καταπολέμησης της ασθένειας. [31]

2.2. Χημειοθεραπεία

Στην ιατρική, με την ευρύτερη έννοια του όρου χημειοθεραπεία, χαρακτηρίζεται η οποιαδήποτε θεραπεία νόσων με χρήση χημικών ουσιών (φαρμάκων), καλούμενων και ως χημειοθεραπευτικά.

Η χημειοθεραπεία σταματά την εξέλιξη του όγκου καταστρέφοντας την ικανότητα των κυττάρων να διαιρούνται και ενισχύει την απόπτωση. Η φυσιολογική λειτουργία του σώματος ανανεώνει τα κύτταρα του σώματος, αφαιρώντας τα πλεονάζοντα ή κατεστραμμένα κύτταρα, και με αυτό τον τρόπο σηματοδοτεί τον σχηματισμό νέων κυττάρων. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και αθανασίας καθώς δεν ελέγχονται, με απώτερο σκοπό την απόπτωση. Επομένως, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξισορροπείται από τον κυτταρικό θάνατο και ρυθμίζεται, στην περίπτωση των καρκινικών μαζών, ο λόγος πολλαπλασιασμού κυττάρων προς θάνατο έχει υψηλή τιμή. Η χημειοθεραπεία έχει ως στόχο, να επιφέρει αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να σταματήσουν να αναπτύσσονται ή να πεθαίνουν, έτσι, διαχωρίζεται σε δύο κλάδους, τα κυτταροστατικά (βιολογικά φάρμακα) και τα κυτταροτοξικά, αντίστοιχα.

Παρ' όλα αυτά, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στοχεύουν, εκτός από τα καρκινικά κύτταρα, και φυσιολογικά υγιή, γεγονός που οδηγεί σε ανεπιθύμητες παρενέργειες ανάλογα βέβαια με τη δοσολογία και το είδος του φαρμάκου. Τέτοιου είδους παρενέργειες θα μπορούσε να είναι η απώλεια μαλλιών, η ναυτία, η κόπωση κ.λπ. Επίσης αποτέλεσμα της έντονης χημειοθεραπείας, είναι η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος (ανοσοκαταστολή), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περίπλοκες λοιμώξεις και κατά συνέπεια, πολλές φορές στον θάνατο.

Από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που έχουν ανακαλυφθεί μόνο τα 132 έχουν εγκριθεί από τον FDA. Τα φάρμακα αυτά έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν κύτταρα του όγκου και να τα σκοτώνουν. Ωστόσο, και μέρος των φυσιολογικών κυττάρων επηρεάζεται από τη χημειοθεραπεία.

Η χημειοθεραπεία άρχισε να χρησιμοποιείται ως όπλο κατά του καρκίνου τον 20^ο αιώνα. Πριν το 1950, μόνο η χειρουργική αφαίρεση θεωρείτο ως προτιμώμενη θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου. Από το

1960 και έπειτα, άρχισε να χρησιμοποιείται και η θεραπεία με χρήση ακτινοβολίας. Με το πέρας του χρόνου, όμως, έγινε σαφές ότι η θεραπεία μεμονωμένα με χειρουργείο ή ακτινοβόληση δεν είναι αρκετά αποτελεσματική σε σχέση με τη χρήση τους συνδυαστικά. Τα αποτελέσματα μελετών φαρμάκων κατά τη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου αποτέλεσαν εφαλτήριο για μια εθνική προσπάθεια ανάπτυξης φαρμάκων περίπου στα μισά του 20^{ου} αιώνα, γνωστή ως Εθνικό Κέντρο Υπηρεσιών Χημειοθεραπείας του Καρκίνου (CancerChemotherapyNationalServiceCenter). Η θεραπεία οξείας παιδικής λευχαιμίας και προχωρημένης νόσου Hodgkin's με χρήση συνδυασμένης χημειοθεραπείας το 1960 και 1970, αντίστοιχα, οδήγησε στην αποδοχή της ικανότητας των φαρμάκων να θεραπεύουν πολύπλοκους καρκίνους.

Οι μοριακές μελέτες σχετικά με τις ανωμαλίες στα καρκινικά κύτταρα αποτελούν μια σημαντική διεργασία αξιολόγησης σήμερα, με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας νέων φαρμάκων και τον σχεδιασμό νέων στοχευμένων θεραπειών. Τα φάρμακα που είναι ήδη γνωστά και χρησιμοποιούνται στις χημειοθεραπείες ξεπερνούν τα 100 σε αριθμό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Το κάθε ένα από αυτά έχει διαφορετική δομή και σύσταση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η χημειοθεραπεία «ταξιδεύει» σε όλο το σώμα για να φτάσει στα κύτταρα, σε αντίθεση με τη χειρουργική επέμβαση και την ακτινοβολία που είναι επεμβατικές και στοχευμένες. Ο τρόπος δράσης, η χημική δομή, η σύσταση και η ομολογία με άλλα φάρμακα είναι μερικοί παράγοντες που βοηθούν στην κατηγοριοποίηση φαρμάκων χημειοθεραπείας. (Πίνακας 2)

Είδη Χημειοθεραπευτικών Φαρμάκων	Σύντομη Περιγραφή
• Αλκυλιωτικοί Παράγοντες	Άμεση βλάβη του DNA από αλκυλιωτικούς παράγοντες σταματά τη διαίρεση των καρκινικών κυττάρων .
• Αντιμεταβολίτες	Αυτά τα φάρμακα είναι ανάλογα των μονάδων DNA και RNA, και συνεπώς με ενσωμάτωση, σταματούν την ανάπτυξή τους.
• Ανθρακυκλίνες	Είναι αντιβιοτικά στη φύση τους και στοχεύουν ένζυμα αντιγραφής του DNA
• Αντικαρκινικά Αντιβιοτικά	Είναι αντιβιοτικά που δεν ανήκουν στις ανθρακυκλίνες αλλά έχουν ίδιο τρόπο δράσης (αναστολή της τοποϊσομεράσης II)
• Αναστολείς Τοποϊσομεράσης	Οι αναστολείς τοποϊσομεράσης αποτρέπουν το ξετύλιγμα του DNA και συνεπώς σταματούν την αντιγραφή του DNA.
• Μιτωτικοί Αναστολείς	Είναι φυτικά αλκαλοειδή και αναστέλλουν τη σύνθεση πρωτεϊνών απαραίτητων για τη κυτταρική διαίρεση.
• Διάφορα Χημειοθεραπευτικά Φάρμακα	Μη κατηγοριοποιημένα φάρμακα με ασυνήθιστους τρόπους δράσης (αναστολέας πρωτεασώματος, ένζυμο Lasparaginase)

Πίνακας 2: Σύντομη περιγραφή χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Ορισμένα φάρμακα μπορεί να ενταχθούν σε περισσότερες από μία κατηγορίες, καθώς δύνανται να παρουσιάζουν πολλούς τρόπους δράσης. Για να είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τις παρενέργειες ενός συγκεκριμένου φαρμάκου, θα πρέπει να μελετηθεί ο τρόπος δράσης του. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις πληροφορίες, οι ογκολόγοι στη συνέχεια είναι σε θέση να αξιολογήσουν την

αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου στην κάθε περίπτωση. Στις χημειοθεραπείες συνδυασμού, οι μελέτες φαρμάκων βοηθούν στον καθορισμό του χρόνου, της σειράς και των δόσεων του κάθε φαρμάκου που χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία.[31]

2.2.1. Οι ανταγωνιστές της BcL-xL ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα

2.2.1.1. Αγωνιστές-Ανταγωνιστές

Οι υποδοχείς (receptors) είναι πρωτεΐνες που είτε διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες ή βρίσκονται στους πυρήνες ζωντανών κυττάρων. Κάθε ενδογενής ή εξωγενής χημική ουσία που προσδένεται σε έναν υποδοχέα ονομάζεται προσδέτης (ligand). Η συγκεκριμένη περιοχή ενός υποδοχέα όπου συνδέεται ο προσδέτης ονομάζεται περιοχή πρόσδεσης (binding domain). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο όρος περιοχή πρόσδεσης (domain) χρησιμοποιείται για να καθορίσει οποιαδήποτε περιοχή ενός βιολογικού μακρομορίου που συνδέεται με συγκεκριμένη βιολογική δράση του μακρομορίου. Η σύνδεση ενός φαρμάκου σε έναν υποδοχέα, είτε αναστέλλει ή ενεργοποιεί τη δράση του υποδοχέα, γεγονός που στη συνέχεια έχει αποτέλεσμα τις φυσιολογικές αποκρίσεις που χαρακτηρίζουν τη δράση του φαρμάκου. Παραδείγματος χάρη, η αλληλεπίδραση ορισμένων προσδετών-υποδοχέων προκαλούν το άνοιγμα ή το κλείσιμο των ιοντικών καναλιών, ενώ κάποιες άλλες αλληλεπιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των δευτερογενών μεσολαβητών, οι οποίοι προωθούν μια αλληλουχία βιοχημικών διεργασιών που αποτελούν την αντίστοιχη φυσιολογική απόκριση. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το μήνυμα μεταφέρεται από τον προσδέτη, μεταφράζεται από τον υποδοχέα στην αντίστοιχη φυσιολογική απόκριση και ονομάζεται μεταγωγή σήματος (signaltransduction).

Φάρμακα που συνδέονται με τον υποδοχέα και παράγουν απόκριση αντίστοιχη με τον ενδογενή προσδέτη ονομάζονται αγωνιστές και συχνά παρουσιάζουν δομή παραπλήσια με τη δομή των ενδογενών προσδετών. Λογικά, επομένως, η δομή ενδογενών προσδετών, ή του φαρμακοφόρου τους, αποτελεί σύνηθες σημείο εκκίνησης για τον σχεδιασμό ενός νέου αγωνιστή.

Τα φάρμακα που συνδέονται με τον υποδοχέα αλλά δεν προκαλούν απόκριση καλούνται ανταγωνιστές. Οι ανταγωνιστές όταν χρησιμοποιηθούν, παρουσία αγωνιστή, αναστέλλουν τη δράση του, ενώ ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: στους ανταγωνιστικούς και στους μη ανταγωνιστικούς. Η διαφορά τους είναι ότι όταν η συγκέντρωση ενός ανταγωνιστικού ανταγωνιστή αυξάνει, η απόκριση που προκαλείται από τον αγωνιστή ελαττώνεται, αλλά η αύξηση της συγκέντρωσης του αγωνιστή εξισορροπεί το φαινόμενο. Στην περίπτωση των μη ανταγωνιστικών ανταγωνιστών η αύξηση της συγκέντρωσης του αγωνιστή δεν επαναφέρει την απόκριση του υποδοχέα, πιθανόν διότι η σύνδεση με τον

υποδοχέα είναι μη αντιστρεπτή ή προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στη θέση πρόσδεσης οπότε εμποδίζεται η πρόσδεση του αγωνιστή στον υποδοχέα.

Οι μερικοί αγωνιστές είναι ενώσεις που ενεργούν και ως αγωνιστές και ως ανταγωνιστές. Θεωρείται ότι ενεργούν ως ανταγωνιστές παρεμποδίζοντας τη πρόσδεση του ενδογενή προσδέτη στον υποδοχέα, αλλά συγχρόνως ενεργοποιούν ασθενώς τον υποδοχέα προκαλώντας μια ελαφριά απόκριση. Το καθαρό αποτέλεσμα αυτών των αντίθετων δράσεων είναι ότι απαιτείται πολύ υψηλότερη δόση αγωνιστή για να ληφθεί η μέγιστη απόκριση. [6]

Οι ανταγωνιστές εμποδίζουν τη δράση ενός αγωνιστή. Μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως ανταγωνιστικοί ή ως μη ανταγωνιστικοί. Οι ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές είναι πιο κοινοί από τους μη ανταγωνιστικούς ανταγωνιστές.

Ένας ανταγωνιστικός ανταγωνιστής δεσμεύεται στο ίδιο μόριο υποδοχέα με έναν αγωνιστή, αλλά δεν προκαλεί καμία απόκριση. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του ανταγωνιστή αυξάνεται, η απόκριση που οφείλεται στον αγωνιστή μειώνεται.

Το μέγεθος της απόκρισης σε έναν αγωνιστή παρουσία ενός ανταγωνιστή εξαρτάται από τις σχετικές συγγένειες του υποδοχέα για τον ανταγωνιστή και τον αγωνιστή. Η συγκέντρωση στην οποία ένας ανταγωνιστής προκαλεί το μισό της μέγιστης απόκρισης του είναι γνωστή ως IC_{50} . Αυτή η τιμή μπορεί να αναφέρεται είτε σε έναν ανταγωνιστή που εκτοπίζει έναν αγωνιστή ή σε έναν αγωνιστή που εκτοπίζει έναν ανταγωνιστή. Και στις δύο περιπτώσεις, η τιμή IC_{50} είναι το μέτρο της συγγένειας του φαρμάκου για τον υποδοχέα στις κατάλληλες συνθήκες. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} , τόσο ισχυρότερη είναι η συγγένεια του φαρμάκου για τον υποδοχέα.

Οι τιμές IC_{50} μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη φαρμάκων για να συγκρίνουν την ισχύ/συγγένεια μιας σειράς φαρμάκων που δεσμεύονται στον ίδιο υποδοχέα και αναστέλλουν την ίδια βιολογική απόκριση. Οι τιμές μπορούν να καθοριστούν *in vitro* ή *in vivo* και έτσι μπορούν επίσης να είναι χρήσιμες στον υπολογισμό της δόσης ενός φαρμάκου που απαιτείται στις προ-κλινικές δοκιμές.[6]

2.2.1.2. Η πρωτεΐνη BcL-xL

Σε οποιαδήποτε γενεαλογία, ο έλεγχος του αριθμού των κυττάρων καθορίζεται από μία ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου. Ο πολλαπλασιασμός τους είναι μια πολύ ρυθμιζόμενη διεργασία, με πολλούς ελέγχους και ισορροπίες.

Παραδείγματος χάρη, οι αυξητικοί παράγοντες και τα πρωτο-ογκογόνα είναι θετικοί ρυθμιστές της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, ενώ αντίθετα, τα γονίδια καταστολής όγκων δρουν κατά των ανεξέλεγκτων κυττάρων. Η ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου είναι εξίσου περίπλοκη και σημαντική με τη ρύθμιση του

πολλαπλασιασμού. Όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα πολυκυτταρικών οργανισμών έχουν την ικανότητα εκτέλεσης του θανάτου τους μέσω ενεργοποίησης ενός κωδικοποιημένου εσωτερικά προγράμματος θανάτου. Με την ενεργοποίηση αυτού του προγράμματος αυτοκτονίας ξεκινά μια χαρακτηριστική μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία ονομάζεται απόπτωση. [35]

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ή η απόπτωση, διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη, στην ομοίωση των ιστών και στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων ή μολυσμένων κυττάρων. Αυτός ο τύπος ρύθμισης, επιτρέπει την εξάλειψη των κυττάρων που έχουν παραχθεί υπερβολικά, που έχουν αναπτυχθεί ακατάλληλα ή που έχουν υποστεί γενετική βλάβη. Η διακοπή της φυσιολογικής αποπτωτικής διεργασίας οδηγεί σε μια ποικιλία ασθενειών. Για παράδειγμα, μια ανισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών (ενεργοποίηση της απόπτωσης) και αντι-αποπτωτικών (αναστολή της απόπτωσης) πρωτεϊνών οδηγεί στη συσσώρευση κυττάρων και στην αδυναμία σωστής απόκρισης σε αποπτωτικά σήματα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων μορφών καρκίνου. Η απορρύθμιση της απόπτωσης αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της νόσου του καρκίνου. [35, 36]

Η απόπτωση έχει γίνει πλέον ευρέως αποδεκτή ως εξέχων μηχανισμός καταστολής όγκων. Μεταλλάξεις σε ορισμένα ογκογόνα που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως η απορρυθμισμένη έκφραση MYC (Το MYC είναι μια οικογένεια γονιδίων ρύθμισης και πρωτο-ογκογονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής [37]), απαιτούν μια δεύτερη μετάλλαξη για την αναστολή της μηχανής απόπτωσης, έτσι ώστε η προαγωγή του όγκου να προχωρήσει αποτελεσματικά. Έτσι, η συνδυασμένη υπερέκφραση των Bcl-2 και MYC συνεργάζονται ισχυρά στην ανάπτυξη λεμφωμάτων, καθώς επίσης και ορισμένων άλλων τύπων καρκίνου. Επίσης, έχει καταστεί σαφές ότι, πέρα από τον ρόλο που διαδραματίζουν στη περίπτωση του καρκίνου, το γονίδιο Bcl-2 και άλλα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας πρωτεϊνών, είναι απαραίτητα για μια σειρά προγραμμάτων απόπτωσης, συμπεριλαμβανομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά την ανάπτυξη, της ανακύκλωσης των ιστών και της άμυνας του οργανισμού-ξενιστή κατά των παθογόνων.[38] Η απόπτωση επομένως, είναι σημαντική και για την καταπολέμηση μολυσματικών μικροοργανισμών καθώς επίσης και για την εκτέλεση σημάτων από κυτταροτοξικούς παράγοντες που χρησιμεύουν στη χημειοθεραπεία.

Η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοβολήση ή στη χημειοθεραπεία συχνά εντοπίζεται σε ελαττώματα στον μηχανισμό απόπτωσης ή στις οδούς σηματοδότησης που θα την ενεργοποιούσαν σε υγιή κύτταρα. Η διευκρίνιση αυτών των οδών αύξησε τη δυνατότητα ανάπτυξης θεραπειών που προκαλούν άμεση απόπτωση, και συνεπώς δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από τα

άνωθεν σήματα τα οποία συχνά είναι δυσλειτουργικά στα μετασχηματισμένα κύτταρα. Η στόχευση του μηχανισμού απόπτωσης θα μπορούσε να είναι χρήσιμη είτε για την αφαίρεση ανεπιθύμητων κυττάρων, όπως στη περίπτωση της θεραπείας κατά του καρκίνου ή φλεγμονώδους νόσου, ή στην προώθηση της επιβίωσης των κυττάρων, όπως στην περίπτωση εκφυλιστικών ασθενειών.[39]

Τα μιτοχόνδρια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ως απόκριση σε βλάβη του DNA.[40] Το “πολύ μεγάλο” λέμφωμα Β-κυττάρων (Bcl-xL) που κωδικοποιείται από το γονίδιο Bcl-2 είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο στα μιτοχόνδρια. Η Bcl-xL είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 και δρα ως αντι-απόπτωτικός παράγοντας, εμποδίζοντας την απελευθέρωση μιτοχονδριακών ουσιών, όπως το κυτόχρωμα C, το οποίο θα οδηγούσε υπό φυσιολογικές συνθήκες σε ενεργοποίηση της κασπάσης, και τελικά σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.[37]

Το γονίδιο Bcl-2 (λέμφωμα Β-κυττάρου 2) ανακαλύφθηκε στο σημείο μετατόπισης χρωμοσωμάτων t(14, 18) σε θυλακώδη λεμφώματα Β-κυττάρων, όπου η μεταγραφή καθοδηγείται υπερβολικά από τον προαγωγό και τον ενισχυτή βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης στο χρωμόσωμα 14.[38] Το θυλακώδες λέμφωμα είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα ανθρώπινα νεοπλάσματα Β-κυττάρων. Στους περισσότερους ασθενείς τα κύτταρα του λεμφώματος φέρουν μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 18.[41]

Η ανακάλυψη ότι το λέμφωμα Β-κυττάρων 2 (Bcl-2), μία πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων, προάγει την κυτταρική επιβίωση και όχι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μειωμένη απόπτωση αποτελεί κρίσιμο βήμα στη δημιουργία όγκων. Η υπερέκφραση του Bcl-2 δεν λειτουργεί όπως τα περισσότερα ογκογόνα που έχουν ανακαλυφθεί, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο.

Γενικά, υπάρχουν δύο πιθανοί οδοί πρόκλησης της απόπτωσης. Η απόπτωση εμφανίζεται μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων «θανάτου» της επιφάνειας των κυττάρων (εξωγενής οδός) ή έπειτα από διαταραχή των μιτοχονδρίων (ενδογενής οδός).[42, 43] Τα περισσότερα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των χημειοθεραπευτικών παραγόντων κατά του καρκίνου, των χημικών, της ακτινοβολήσης καθώς επίσης και της αφαίρεσης του αυξητικού παράγοντα, προκαλούν απόπτωση με ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού.

Όλοι οι βιοχημικοί οδοί που οδηγούν σε απόπτωση, συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των κασπασών. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες ασπαρτικούκυστεϊνυλίου (cysteinyl aspartate proteases) που συντονίζουν την αποτελεσματική λύση και αφανισμό των καταδικασμένων κυττάρων. Οι δύο οδοί κυτταρικού θανάτου διακρίνονται με βάση κατά πόσο

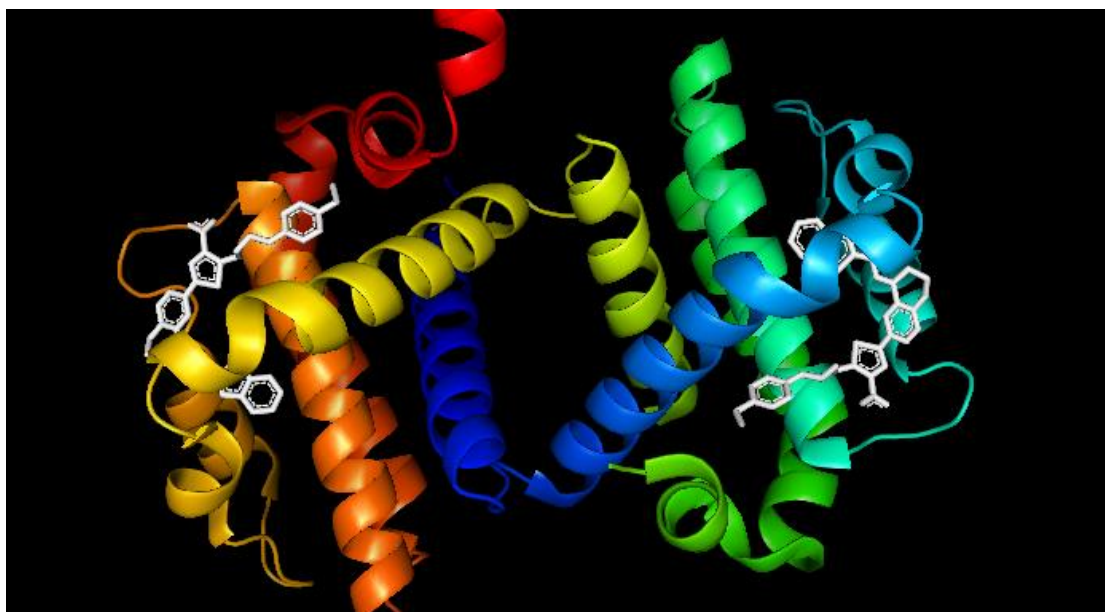
απαιτούν πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και με βάση τις κασπάσες που συμμετέχουν στη θανάτωση των κυττάρων. Η ενδογενής οδός, που ονομάζεται και οδός που ρυθμίζεται από τις Bcl-2 ή μιτοχονδριακός, ενεργοποιείται από διάφορα αναπτυξιακά σήματα ή κυτοτοξικές βλάβες, όπως ιογενής λοίμωξη, βλάβη στο DNA ή στέρηση αυξητικού παράγοντα και ελέγχεται αυστηρά από την οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2. Αυτή η οδός οδηγεί κυρίως στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9, όμως σε ορισμένους τύπους κυττάρων μπορεί να προχωρήσει και απουσία της κασπάσης-9 ή του ενεργοποιητή της (αποπτωτικός παράγοντας ενεργοποίησης πρωτεάσης 1). Η εξωγενής οδός ή οδός θανάτου του υποδοχέα προκαλείται από πρόσδεση των λεγόμενων (deathreceptors) υποδοχέων θανάτου (μέλη του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF)) που περιέχουν ένα ενδοκυτταρικό πεδίο «θανάτου», το οποίο μπορεί να επιστρατεύσει και να ενεργοποιήσει την κασπάση-8 μέσω της πρωτεΐνης-προσαρμογέα Fas που σχετίζεται με το πεδίο θανάτου στην επιφάνεια του κυττάρου.[38]

Στη μιτοχονδριακή οδό που οδηγεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο το σπουδαιότερο ρόλο τον έχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Ουσιαστικά, τα μέλη πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 ελέγχουν την ακεραιότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (OMM: OuterMitochondrialMembrane) και επομένως είναι κρίσιμα στον προσδιορισμό της ευπάθειας των κυττάρων στην απόπτωση που προκαλείται από την ενδογενή οδό.[44] Έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 25 μέλη της συγκεκριμένης κατηγορίας πρωτεϊνών και διακρίνονται κυρίως σε δύο κατηγορίες: στις πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (Bcl- 2, Bcl-xL, Bcl-W, MCL1, Bcl-B (επίσης γνωστή ως BCL - 2L10) και A1 (επίσης γνωστή ως BCL-2A1)) και σε αυτές που προάγουν την απόπτωση (BAX, BAK και BOK (επίσης γνωστό ως MTD)). Υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχουν μια διατηρημένη περιοχή BH3 (BAD, BIK (επίσης γνωστή ως BLK ή NBK), BID, HRK (επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη θανάτου-5 (DP5)), BIM (επίσης γνωστή ως BOD), BMF, NOXA και PUMA (επίσης γνωστή ως BBC3)) που μπορεί να δεσμεύσει και να ρυθμίσει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 με σκοπό τη προώθηση της απόπτωσης. Φαίνεται ότι τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, BAX και BAK, είναι ζωτικής σημασίας για τη πρόκληση διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και επακόλουθης απελευθέρωσης αποπτωτικών μορίων που οδηγεί σε ενεργοποίηση κασπάσης. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των BAX και BAK, ως απάντηση σε βλάβη του DNA, οδηγεί σε μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και ολιγομερισμό. Το ολιγομερές εισάγεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη με σκοπό την απελευθέρωση μικρών μορίων, τα οποία προκαλούν ενεργοποίηση του «καταρράκτη» κασπασών και τελικά, απόπτωση (ενδογενής οδός). Σε κύτταρα θηλαστικών, πέντε πρωτεΐνες προ-επιβίωσης (αναστολή απόπτωσης) BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL1 και A1-ανταγωνίζονται την προ-αποπτωτική λειτουργία των BAK και BAX. Η

δραστηριότητα θανάτωσης των BAK και BAX εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία καθίσταται διαπερατή σε απόκριση σε σήματα θανάτου, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπάσης και την επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.[38, 39]

Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, επιδιώχθηκε η ανάπτυξη αναστολέων της Bcl-xL, μιας πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται σε ορισμένους τύπους καρκίνου και εμπλέκεται ως «παράγοντας αντίστασης» στη χημειοθεραπεία. Όπως η Bcl-2, έτσι και η Bcl-xL δρα για τη καταπολέμηση της απόπτωσης και η υπερέκφραση της σε όγκους αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης καθώς ανταγωνίζεται σήματα που θα οδηγούσαν κανονικά σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bcl-xL διατηρούν τα κύτταρα ζωντανά, αποτρέποντας την ενεργοποίηση των διαμεσολαβητών κυτταρικού θανάτου BAK και BAX (το ένα από τα δύο ή και τα δύο ταυτόχρονα) τα οποία απαιτούνται στη διεργασία εκτέλεσης της απόπτωσης. Οι κυτταρικές πιέσεις (οργανικοί ή κυτταρικοί μηχανισμοί που περιορίζουν τη πίεση και αποκαθιστούν την ομοιόσταση σε περιπτώσεις αλλαγής συνθηκών), όπως αυτές που προκαλούνται από ογκογόνες πρωτεΐνες (oncogenic proteins) ή χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, πυροδοτούν απόπτωση, ενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες που αποτελούνται μόνο από δομές BH3 (BIM, BAD και NOXA). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν φυσικούς ανταγωνιστές της Bcl-xL, καθώς και συγγενικών της πρωτεϊνών, και ξεκινούν την απόπτωση δεσμεύοντας και αναστέλλοντας τους συγγενείς προ-επιβίωσης. Επίσης, μερικοί ενεργοποιούν άμεσα τις BAX και BAK, για να «απελευθερώσουν» την διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Οι πέντε πρωτεΐνες προ-επιβίωσης (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL1 και A1) και οι BAX και BAK μοιράζονται όλες τέσσερις περιοχές ομόλογης ακολουθίας, γνωστές και ως Bcl-2 ομόλογια BH1, BH2, BH3 και BH4. Επιπλέον, διαθέτουν μία ακραία C-τελική ακολουθία, η οποία «αγκυστρώνει» στη μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, άλλος ένας τύπος προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια, είναι οι πρωτεΐνες BH3 (BH3-only proteins). Το όνομά τους προκύπτει από το γεγονός ότι δεν διαθέτουν ομόλογες περιοχές BH1, BH2 και BH4. Η ομόλογη περιοχή BH3 των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι ο πρωταρχικός μεσολαβητής για την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες προ-επιβίωσης. Η τριδιάστατη δομή της Bcl-xL, ανταγωνίζεται τα BAX και BAK, δεσμεύοντας τις ομόλογες περιοχές BH3 του κάθε μορίου αντίστοιχα. Η Bcl-xL αποτελείται από οκτώ α-έλικες που συνδέονται με βρόγχους διαφόρων μηκών. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Τριδιάστατη δομή πρωτεΐνης 3ZLR.

Οι περιοχές αναλογίας BH1, BH2 και BH3 σχηματίζουν μια υδρόφοβη κοιλότητα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Αυτή είναι η θέση δέσμευσης των περιοχών BH3 των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και ο κύριος στόχος για μικρά μόρια που δρουν ως αναστολείς αυτών των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης- πρωτεΐνης (PPI).[45, 46]

Η περιοχή του σημείου επαφής των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – πρωτεΐνης είναι επίπεδη και εκτεταμένη και για αυτό τον λόγο αποτελεί πρόκληση για την ανάπτυξη μικρών μορίων που στοχεύουν το συγκεκριμένο βιολογικό στόχο. Παρ' όλο που έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ανάπτυξης μορίων που να στοχεύουν τη Bcl-xL, μόνο μία (Venetoclax, 2016) εγκρίθηκε από τον FDA (FoodandDrugAdministration = Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων) ως θεραπεία δεύτερης γραμμής κατά της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL). Συνεπώς, η αναζήτηση νέων ενώσεων που να στοχεύουν το συγκεκριμένο στόχο είναι υψίστης σημασίας.[45]

2.2.1.3. Φυσικά Προϊόντα ως αναστολείς της Bcl-xL

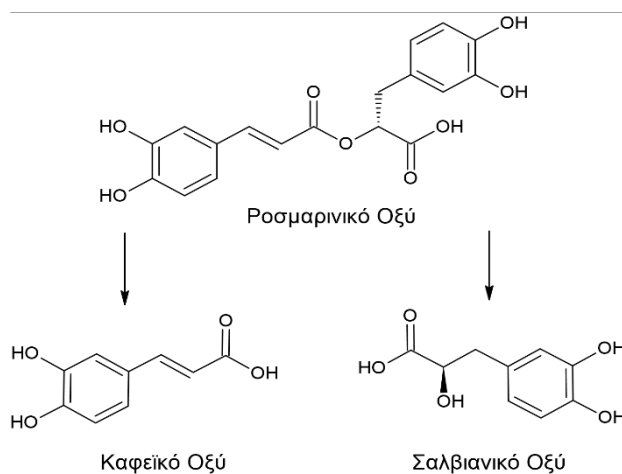
Ο όρος φυσικά προϊόντα χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις χημικές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά. Η φύση έχει μεριμνήσει για τις βασικές ανάγκες του ανθρώπου, παρέχοντας με διάφορους τρόπους, όπως μέσω των φυτών, φάρμακα για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Τα φυτά παίζουν διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία πολύπλοκων εμπειρικών φαρμάκων. Έρευνες έχουν δείξει ότι το 65% του παγκόσμιου πληθυσμού χρησιμοποιεί φάρμακα φυτικής προέλευσης για τη φροντίδα της υγείας του. Τα φυσικά

προϊόντα έχουν δείξει αξιοσημείωτη βιολογική δράση σε ενώσεις στόχους που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι η χρήση φυσικών προϊόντων ως ανεξάντλητη πηγή για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η ιδιότητα που τα κάνει να ξεχωρίζουν, είναι ότι μπορούν να αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων στόχων, πολλά από τα οποία ανήκουν σε βιοχημικούς οδούς μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με μια ποικιλία ασθενειών. Με την πάροδο του χρόνου, τα φυσικά προϊόντα έχουν ενισχυθεί εξελικτικά με ιδιότητες (drug-like properties) που τα καθιστούν θεραπευτικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να διαθέτουν τεράστιες θεραπευτικές δυνατότητες για μια σειρά διαφορετικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Άμεσα παραγόμενα, τροποποιημένα φυσικά προϊόντα, ή ακόμη και νέα φάρμακα που έχουν σχεδιαστεί αξιοποιώντας φυτοχημικά φαρμακοφόρα, έχουν εγκριθεί από τον FDA. Μάλιστα, τη χρονική περίοδο μεταξύ 1981-2010 αποτέλεσαν το 34% των νέων φαρμακευτικών καταχωρήσεων.[47, 48]

Ο σχεδιασμός μικρών μορίων που μιμούνται τον τομέα BH3 των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 αποτελεί επίκαιρο ερευνητικό θέμα και στοχεύει στην ανάπτυξη παραγόντων που αναστέλλουν τις αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα στην απόπτωση.

Ορμώμενοι από το γεγονός αυτό, στο εργαστήριό μας, σε συνεργασία με το εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Τζάκου Ανδρέα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μελετήσαμε την ανασταλτική δράση ενός συνόλου μορίων παραγώγων φυσικών προϊόντων.

Εστίασαμε, αρχικά, στη δράση του ροσμαρινικού οξέος ως ανταγωνιστή της Bcl-xL. Το ροσμαρινικό οξύ εντοπίζεται σε διάφορα φυτά, όπως για παράδειγμα στο θυμάρι, σε ένα είδος βασιλικού, στη μέντα και σε άλλα.[49] Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι το ροσμαρινικό, χημικά, είναι ένας εστέρας καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος.[50] Τόσο το καφεϊκό, όσο και το σαλβιανικό οξύ είναι επίσης δύο ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά.[51, 52] Το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε μια ποικιλία φυτών. Μερικά από αυτά είναι το φυτό του καφέ, το θυμάρι και τη μέντα, στο γλυκάνισο, στον ηλιόσπορο, στα σιτηρά, το κριθάρι, τα δημητριακά και τη σίκαλη. Το σαλβιανικό οξύ, επίσης φυτοχημική ένωση, εντοπίζεται στη κόκκινη φασκομηλιά. Η επιλογή του καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος για μελέτη των ίδιων καθώς και των παραγώγων τους ως αναστολείς, δεν ήταν τυχαία. Αν παρατηρήσουμε το ροσμαρινικό οξύ, θα μπορούσαμε να πούμε ότι πρόκειται για έναν εστέρα καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος (**Εικόνα 5**). Έχοντας αυτό σαν δεδομένο, επιδιώξαμε τη μελέτη της ανασταλτικής/ανταγωνιστικής τους δράσης (καθώς και των παραγώγων τους) και τον έλεγχο πιθανής συσχέτισης των ιδιοτήτων τους, ως «συστατικά» του ροσμαρινικού οξέος.



Εικόνα 5: Δομή ροσμαρινικού οξέος, ως εστέρας καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος.

2.2.2. Παρεμβολείς DNA (DNA-Intercalators)

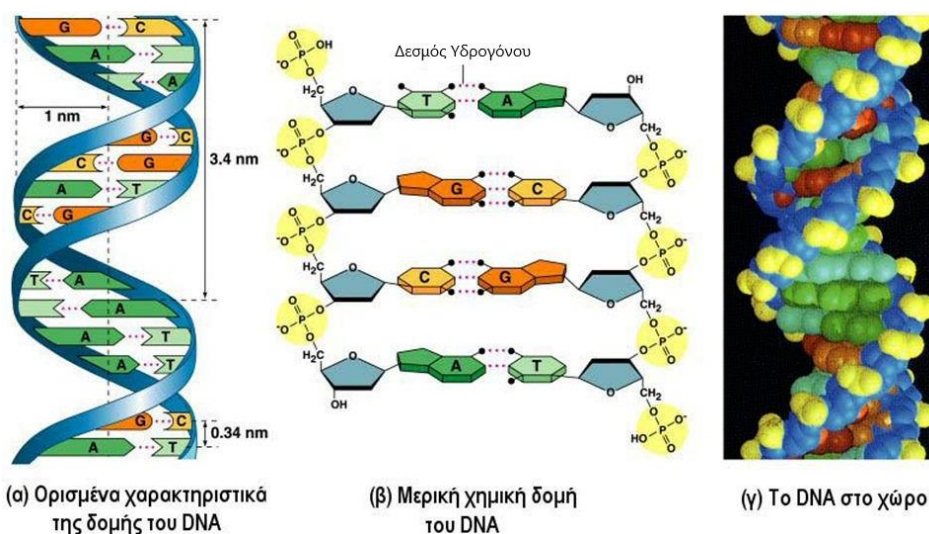
Το DNA είναι ένα γραμμικό πολυμερές, το οποίο αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων και εμφανίζεται συνήθως με τη μορφή διπλής έλικας. Το κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα σάκχαρο, μία φωσφορική ομάδα και μία βάση, και είναι επί της ουσίας ένας φωσφορικός εστέρας του αντίστοιχου νουκλεοζίτη, δηλαδή, ενός φουρανοζικού δακτυλίου, της β-D-2' δεοξυριβόζης συνδεδεμένου με μια επίπεδη αρωματική ετεροκυκλική αζωτούχο βάση. (Εικόνα 6)



Εικόνα 6: Δομή νουκλεοτιδίου.

Η δομή του DNA αποτελείται από δύο δεξιόστροφες ελικοειδείς πολυ-νουκλεοτιδικές αλυσίδες με αντίθετες κατευθύνσεις, δημιουργώντας τη διπλή

έλικα του DNA. Οι βάσεις καταλαμβάνουν το εσωτερικό της διπλής έλικας, δημιουργώντας ζεύγη βάσεων, ενώ τα σάκχαρα και τα φωσφορικά το εξωτερικό της. Υπάρχουν τέσσερα είδη βάσεων, η αδενίνη, η γουανίνη, η κυτοσίνη και η θυμίνη. Τα ζεύγη βάσεων αδενίνης-θυμίνης και γουανίνης-κυτοσίνης συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, και έτσι προκύπτει και η σύνδεση των δύο αλυσίδων μεταξύ τους. Οι δύο αλυσίδες παρουσιάζουν τον ίδιο προσανατολισμό, όμως είναι αντιπαράλληλες. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο της νουκλεοτίδιο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας έχει πάντα μια ελεύθερη φωσφορική ομάδα συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του και το τελευταίο νουκλεοτίδιο της έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3' άνθρακα της πεντόζης του, ανεξάρτητα από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που την απαρτίζουν. Για τον λόγο αυτό αναφέρεται ότι ο προσανατολισμός της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας είναι 5' -> 3'. Και οι δύο αλυσίδες παρουσιάζουν αυτόν τον προσανατολισμό και καθώς αυτές συσπειρώνονται με αντιπαράλληλο τρόπο σχηματίζουν τη διπλή έλικα στον χώρο. Η ακτίνα της διπλής έλικας είναι 1 nm και είναι σταθερή κατά μήκος της έλικας, η απόσταση μεταξύ των βάσεων είναι 0.34 nm και μια πλήρης στροφή είναι 3.4 nm (10 ζεύγη βάσεων ανά στροφή). Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζεται α) τα χαρακτηριστικά της δομής του DNA, που αναφέρθηκαν νωρίτερα, β) η χημική δομή του σε ένα μέρος της έλικας και γ) η δομή του στο χώρο.



Εικόνα 7: α) Χαρακτηριστικά δομής DNA, β) Μερική χημική δομή DNA, γ) Το DNA στο χώρο.

Ακόμη, στην επιφάνεια της διπλής έλικας του DNA σχηματίζεται μια μεγάλη (πλατειά) αύλακα (majorgroove) και μια μικρή (στενή) αύλακα (minorgroove), καθώς οι κλώνοι πλησιάζουν ή απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο κατά την περιέλιξη των αλυσίδων (**Εικόνα 7 (α)**). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι γλυκοζιτικοί δεσμοί που συνδέουν το ζεύγος βάσεων με κάθε δακτύλιο του σακχάρου δεν είναι απευθείας απέναντι ο ένας από τον άλλο. Λόγω αυτού οι δύο κορμοί σακχάρων φωσφορικών δεν είναι ισοδύναμα κατανομημένοι κατά μήκος της ελικοειδούς δομής.

Το DNA περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες που καθορίζουν την βιολογική ανάπτυξη και τα χαρακτηριστικά όλων των μορφών ζωής, αλλά και πολλών ιών. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν ιδανική κατασκευή για να είναι φορείς γενετικών πληροφοριών. Τα σάκχαρα συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες, με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, και δημιουργούν έναν κοινό κορμό. Γενικά, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι λιγότερο ευάλωτοι στην υδρόλυση σε σχέση με άλλους εστέρες. Αυτό απορρέει από το γεγονός ότι ο φωσφοδιεστερικός δεσμός φέρει αρνητικό φορτίο, γεγονός που «απωθεί» πυρηνόφιλες ομάδες, όπως π.χ. ιόντα υδροξειδίου. Το γεγονός αυτό αποτελεί βασικό πλεονέκτημα του DNA ως αποθήκη γενετικών πληροφοριών.[53-55]

Το DNA θεωρείται ένας εξαιρετικός στόχος για τη θεραπεία γενετικών ασθενειών, κυρίως του καρκίνου, εξαιτίας του ρόλου του στον έλεγχο των κυτταρικών λειτουργιών. Τα περισσότερα φάρμακα κατά του καρκίνου στοχεύουν τον κυτταρικό κύκλο, ως συνέπεια του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυτάρων. Σε αυτά τα φάρμακα συγκαταλέγονται και μικρά μόρια, τα οποία συνδέονται στη δίκλωνη έλικα του DNA και αποτελούν ένα πολύ σημαντικό ερευνητικό πεδίο.

Όταν ξένα μόρια συνδεθούν με το DNA, αλλάζουν τη δομή του νουκλεϊκού οξέος, το οποίο επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική ζωή, αφού καθορίζει τη δραστικότητα και τις λειτουργίες των ενζύμων και των μεταγραφικών παραγόντων. Το γεγονός αυτό, μπορεί να διαταράξει τον κυτταρικό κύκλο και να αναστείλει την αναπαραγωγή του DNA, τη κυτταρική διαίρεση και τη κυτταρική διαφοροποίηση. Συνεπώς, μόρια τα οποία μπορούν να συνδεθούν στο DNA μπορούν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα.

Η δέσμευση ενός προσδέτη στο δίκλωνο μόριο του DNA μπορεί να λάβει χώρα με δύο τύπους αλληλεπιδράσεων: ομοιοπολική και μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση.

Τα μεταλλικά ιόντα, τα οποία θεωρούνται καλά οξέα κατά Lewis, αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με τις βάσεις του DNA (π.χ. κατάλοιπα του N7 της G). Αν και η ομοιοπολική σύνδεση των μεταλλικών συμπλόκων με τα νουκλεϊκά οξέα γενικά ελέγχεται κινητικά, ο ρυθμός και η θέση της μεταλλείωσης μπορούν να διαμορφωθούν εύκολα από την αρχική αναστρέψιμη ετεροπολική συνδεδεμένη προ-ένωση. Καθώς το DNA είναι ένα πολυανιόν, το στάδιο πριν τη σύνδεση είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αν το μεταλλικό σύμπλοκο είναι κατιοντικού χαρακτήρα. Η ομοιοπολική αλληλεπίδραση είναι μη αντιστρέψιμη και οδηγεί στο σχηματισμό ενώσεων που εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η μεταλλείωση αυτού του τύπου περιλαμβάνει δύο στάδια: 1) την υδρόλυση του μεταλλικού συμπλόκου που οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών υδατικών ειδών και 2) την πυρηνόφιλη προσβολή των πουρινών από τα μεταλλοσύμπλοκα, κάτι που οδηγεί στη σύμπλεξη μεταλλικού ιόντος και βάσεων του DNA. Ο αριθμός και η γεωμετρία των ομάδων που απομακρύνονται, καθώς και η θέση σύμπλεξης καθορίζουν τις αλλαγές που

πιθανώς προκαλέσει η μεταλλείωση στη δευτεροταγή δομή του DNA (π.χ. κάμψη, στρέβλωση, σχηματισμός μόνο- και πόλυ- λειτουργικών ενώσεων προσθήκης ή δια- και ενδο- σταυροδεσμών (cross-linking) με την διπλή έλικα, τοπική χαλάρωση της έλικας κ.τ.λ.). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ομοιοπολικής σύνδεσης είναι η αλκυλίωση. Η περίπτωση της ομοιοπολικής σύνδεσης όπου ενώσεις αλκυλίωσης συνδέονται σε μία θέση στο μόριο του DNA, ονομάζεται μονοαλκυλίωση. Ωστόσο, τα αλκυλιωτικά φάρμακα μπορούν να συνδεθούν σε περισσότερες από μία θέσεις στο μόριο του DNA. Αν η δεύτερη θέση σύνδεσης βρίσκεται στον αντίθετο κλώνο από τη πρώτη, τότε πρόκειται για διασύνδεση μεταξύ των δυο κλώνων (interstrandcross-linking). Ο όρος ενδοκλωνική διασύνδεση αναφέρεται στη περίπτωση κατά την οποία η δεύτερη θέση σύνδεσης εντοπίζεται στον ίδιο κλώνο με τη πρώτη (intrastrandcross-linking). Οι ενώσεις που προκαλούν αλκυλίωση είναι έντονα ηλεκτρόφιλες ενώσεις που αντιδρούν χημικά με πυρηνόφιλες ομάδες του DNA, για να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα προϊόντα, που προκύπτουν από αυτήν την προσθήκη στο DNA, είναι μη αναστρέψιμοι αναστολείς της μεταγραφής και της μετάφρασης. Αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης μπορούν να λάβουν χώρα με δύο μηχανισμούς, τους SN1 και SN2. Οι πιο δραστικές θέσεις είναι εκείνες που είναι πυρηνόφιλες και βρίσκονται στις αύλακες της διπλής έλικας του DNA. Το N7 της γουανίνης και το N3 της αδενίνης πληρούν και τα δύο τα κριτήρια αυτά. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δεν δρουν σε κάποια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, παρ' όλα αυτά όμως είναι τοξικότεροι για τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της κυτταρικής διαίρεσης.[56, 57]

Ένα από τα πιο επιτυχημένα φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου ανήκει σε αυτή τη κατηγορία είναι το *cis*-διαμινοδιχλωρολευκόχρυσο ή σισπλατίνη (*cis*-platin). Το σύμπλοκο αυτό συμπλέκεται με το DNA μέσω των ατόμων αζώτου των πουρινικών βάσεων (αδενίνη και γουανίνη), τα οποία αντικαθιστούν τα δύο μόρια νερού του συμπλόκου. Πιο συγκεκριμένα, τα άζωτα δύο παρακείμενων βάσεων σχηματίζουν δύο δεσμούς συντονισμού με το μέταλλο (metal-coordinationbonds), εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αντιγραφή (ή τη πρόληψη της μεταγραφής) οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο.[58, 59]

Ένα μόριο-φάρμακο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA και με μη ομοιοπολικό τρόπο. Οι τρεις κυριότεροι τρόποι μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης είναι η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση (electrostaticinteraction), η συναρμογή στις αύλακες (groovebinding) και η παρεμβολή (intercalation), καθώς και ένας νέος τρόπος σύνδεσης που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, η σύζευξη μέσω φωσφορικών ομάδων (phosphateclamp). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προκύπτουν λόγω της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό της διπλής έλικας και στις θετικά φορτισμένες απολήξεις των υποκαταστατών των συμπλόκων του φορτίου του μετάλλου ή του συνολικού φορτίου του συμπλόκου. Η συναρμογή στις αύλακες περιλαμβάνει δύο ειδών αλληλεπιδράσεις: τη συναρμογή στη μεγάλη αύλακα (majorgroovebinding) και

τη συναρμογή στη μικρή αύλακα (minor groove binding). Και οι δύο περιπτώσεις περιλαμβάνουν ανάπτυξη δεσμών Υδρογόνου ή VanDerWaals αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με τις αζωτούχες βάσεις του DNA. Η παρεμβολή προκύπτει, όταν τα σύμπλοκα παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA. Πολλά γνωστά σύμπλοκα έχουν δείξει περισσότερους του ενός τρόπους αλληλεπίδρασης με το DNA. Αυτή τους η ικανότητα είναι ίσως ο λόγος της ικανοποιητικής θεραπευτικής τους ισχύος.

Οι **ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις** λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε ένα κατιοντικό σύμπλοκο και στον ανιοντικό φωσφορικό σκελετό του DNA. Η διπλή έλικα σταθεροποιείται μέσω εξουδετέρωσης του αρνητικού φορτίου οπότε και μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των γειτονικών φωσφορικών ομάδων. Σύμφωνα με προσεγγίσεις το θετικό φορτίο μπορεί να προκαλέσει μείωση στην ενέργεια των LUMO τροχιακών του υποκαταστάτη, ευνοώντας έτσι την αλληλεπίδραση με τα HOMO τροχιακά των βάσεων του DNA. Η εξωτερική συναρμογή αποτελεί έναν βασικό τρόπο ηλεκτροστατικού τύπου αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA.

Ένας άλλος τρόπος ομοιοπολικής σύνδεσης είναι η **συναρμογή στις αύλακες**. Σε αυτό το είδος συναρμογής τα σύμπλοκα προσεγγίζουν τις αύλακες και προσδένονται σε αυτές μέσω αλληλεπιδράσεων Van Der Waals (με τα τοιχώματα της αύλακας) και δεσμών Υδρογόνου (με τα ζεύγη A-T), αφού πρώτα ο υποκαταστάτης έχει μετακινηθεί υδρόφοβα από το διάλυμα στη διπλή έλικα του DNA. Η υδροφοβικότητα αυτή και ο πιθανός σχηματισμός δεσμών Υδρογόνου προσδίδει μεγάλη σταθερότητα στη διπλή έλικα. Υδρόφοβοι, μη επίπεδοι υποκαταστάτες ευνοούν τη συναρμογή στη μικρή αύλακα. Γεωμετρικοί και στερεοχημικοί παράγοντες παίζουν επίσης ρόλο στο είδος της αλληλεπίδρασης. Αν το σύμπλοκο που θα συνδεθεί με το DNA έχει πολύ μικρές αλκυλικές αλυσίδες, δεν θα συμβάλουν σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με το DNA, για να βελτιώσουν τη δέσμευση του συμπλόκου, ενώ αν οι αλκυλικές αλυσίδες που περιέχει το σύμπλοκο διαθέτει πάνω από τέσσερις ομάδες -CH₂-, είναι πολύ πιο εύκολο να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλεπίδραση.

Ο όρος **παρεμβολή** προέρχεται από τη λατινική λέξη «*intercalare*» που σημαίνει «να εισαχθεί» και αναφέρεται στο συγκεκριμένο τρόπο με τον οποίο συνδέονται ορισμένες ουσίες με το DNA. Οι αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών συμπλόκων με τα πολυνουκλεοτίδια δεν περιορίζονται σε εκείνες που αφορούν την άμεση πρόσδεση του μεταλλικού ιόντος στο κέντρο του βιοπολυμερούς. Αντιθέτως, μια αφθονία εξαιρετικά επιλεκτικών αλληλεπιδράσεων προκύπτει από ένα σύνολο ασθενέστερων μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συμπλόκων και του νουκλεϊκού οξέος. Τα μεταλλικά σύμπλοκα που δρουν με αυτόν τον τρόπο καλούνται μεταλλοπαρεμβολείς και φέρουν στους υποκαταστάτες τους επίπεδες αρωματικές ομάδες. Στην παρεμβολή το αρωματικό μέρος της ένωσης μετακινείται από το διάλυμα στην περιοχή που λαμβάνει χώρα η παρεμβολή, μια ευνοϊκή αλληλεπίδραση (υδρόφοβη), αφού ο

αρωματικός δακτύλιος του υποκαταστάτη παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επίσης υδρόφοβα ζεύγη βάσεων. Έτσι, έχουμε αύξηση της απόστασης των ζευγών βάσεων στις θέσεις παρεμβολής, ώστε να μπορέσουν να εισέλθουν αυτά τα μόρια. Υποκαταστάτες, όπως η φαιναθρολίνη, προσανατολίζονται παράλληλα στα ζεύγη βάσεων μακριά από το μεταλλικό κέντρο, στοιβάζονται εύκολα στη διπλή έλικα και σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων διπόλου – διπόλου μέσω σημαντικής αλληλοεπικάλυψης π – ηλεκτρονίων. Τα αντισταθμιστικά φορτία μπορούν και απομακρύνονται ευκολότερα, αφού καθώς ξετυλίγεται η διπλή έλικα, αυξάνεται η απόσταση των φωσφορικών ομάδων και μειώνεται η πυκνότητα του εντοπισμένου φορτίου. Όσο πιο εκτεταμένοι είναι οι αρωματικοί υποκαταστάτες, τόσο πιο πολύ ευνοείται η παρεμβολή.[57]

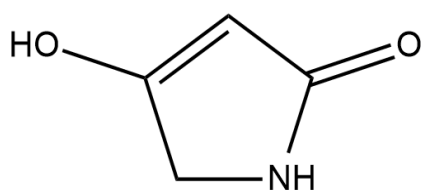
Υπάρχουν διάφορα είδη παρεμβολέων. Τυπικοί παρεμβολείς, είναι οι ενώσεις που διαθέτουν μια σειρά αρωματικών δακτυλίων οι οποίοι μπορούν να εισαχθούν μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων σε ένα δίκλωνο μόριο DNA. Εκτός από του τυπικούς παρεμβολείς υπάρχουν και ενώσεις με πιο περίπλοκες δομές, οι οποίες περιλαμβάνουν υποκαταστάτες που ποικίλουν στη χημική τους φύση, γεγονός που περιπλέκει τις αλληλεπιδράσεις των μορίων αυτών με το DNA. Αυτού του είδους οι παρεμβολείς ταξινομούνται ως εξής:

- Διπλοί παρεμβολείς ή δι-παρεμβολείς (Bis-intercalators): σχηματίζονται από δύο μονούς παρεμβολείς οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μια ένωση-συνδετήρα (linker).
- Σπειρωτοί παρεμβολείς (Threading intercalators): εκτός της αρωματικής ομάδας παρεμβολής, διαθέτουν και μεγάλους, βοηθητικούς, με παρεμβαλλόμενους υποκαταστάτες και στις δύο πλευρές του μορίου.
- Σπειρωτοί δι-παρεμβολείς (Threadingbis-intercalators): είναι συνήθως μακροκυκλικές ενώσεις που σχηματίζονται από δύο σειρές αρωματικών δακτυλίων, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με συνδέτες (linkers).
- Πολλαπλοί παρεμβολείς (Multi-intercalators): πρόκειται για ενώσεις με πολλαπλά αρωματικά συστήματα.

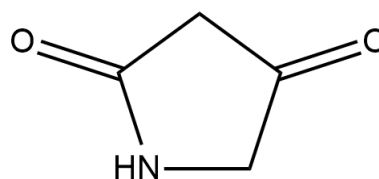
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας του DNA αναδιπλώνονται, σχηματίζουν δύο διαφορετικού μεγέθους αύλακες στη δομή B-DNA οι οποίες εντοπίζονται παράλληλα στη ραχοκοκαλιά και ονομάζονται μικρή και μεγάλη αύλακα. Οι αύλακες αυτές διαφέρουν τόσο ως προς το μέγεθος (μικρή και μεγάλη), όσο και ως προς τα στοιχεία που τις απαρτίζουν, άρα και ως προς το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Διάφορα μόρια συνδέονται με τις αύλακες του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου και μη ειδικών δεσμών. Μόρια υψηλού μοριακού βάρους, συνήθως συνδέονται με τη μεγάλη αύλακα, η οποία διαθέτει περισσότερο διαθέσιμες θέσεις δότη/δέκτη για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου σε σχέση με τη μικρή αύλακα. Ωστόσο, μικρά μόρια τα οποία αποτελούν και τη πλειοψηφία των αντικαρκινικών φαρμάκων και των αντιβιοτικών, τείνουν να συνδέονται με τη μικρή αύλακα. Ενώσεις

αυτού του τύπου, που αλληλεπιδρούν με τη μικρή αύλακα του DNA, περιλαμβάνουν συνήθως αρκετούς ετεροκυκλικούς ή αρωματικούς δακτυλίους υδρογονανθράκων, σε τέτοια θέση στο μικρό μόριο, ώστε να μπορούν να περιστρέφονται με σκοπό η ένωση να μπορεί να ταιριάξει στο σχήμα της αύλακας. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι αυτοί που καθορίζουν πρωτίστως τις αλληλεπιδράσεις των μορίων με το DNA, και σε κάποιο βαθμό, οι αλληλεπιδράσεις vanderWaals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ενώσεις που συνδέονται με τη μικρή αύλακα συνήθως προτιμούν περιοχές του μορίου, πλούσιες σε ζεύγη ΑΤ. Περιοχές πλούσιες σε ζεύγη GC δεν θεωρούνται καταλληλότερες θέσεις δέσμωσης λόγω των στερικά παρεμποδιστικών ομάδων αμίνης. [56, 58, 59]

Τα παράγωγα τετραμικού οξέος (Εικόνα 8) αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ετεροκυκλικών ενώσεων αζώτου, οι οποίες περιέχουν ένα σύστημα πυρρολιδινο-2,4-διόνης. (Εικόνα 9) Βρίσκονται συνήθως σε πολλά φυσικά προϊόντα και παρουσιάζουν αρκετές βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, αντιμυκητιακών, κυτταροτοξικών καθώς επίσης και ιδιοτήτων κατά του HIV.



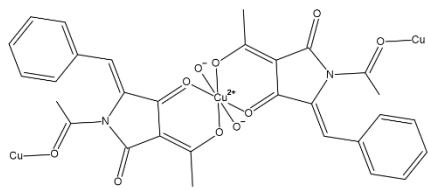
Εικόνα 8: Δομή τετραμικού οξέος.



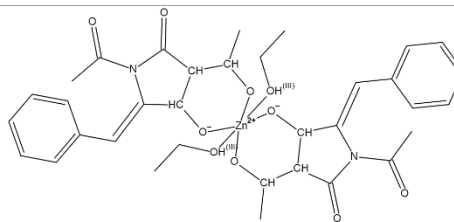
Εικόνα 9: Δομή πυρρολιδινο-2,4-διόνης.

Οι 3-ακέτυλο-υποκατεστημένοι τετραμικοί δακτύλιοι παρέχουν τη δυνατότητα σύνδεσης μετάλλου. Φυσικώς απαντώμενα ανάλογα τετραμικού οξέος, όπως τα «chaupolidines A – C», απομονωμένα από έναν θαλάσσιο μύκητα της Αυστραλίας, φάνηκε να σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα με μέταλλα όπως, Fe (III), Au (II), Cu (II), Mg (II), και Zn (II). Η βιολογική αξιολόγηση των συμπλόκων αυτής της κατηγορίας παρουσιάζει αντι-πολλαπλασιαστική δράση κατά διαφόρων καρκινικών κυττάρων.

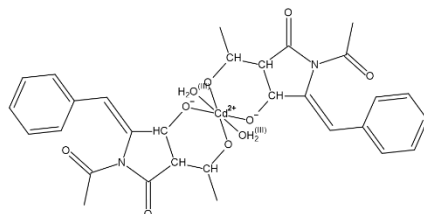
Τα δισθενή σύμπλοκα τετραμικού οξέος είναι πολύ ελκυστικά ως υποψήφια φάρμακα, λόγω της ικανότητάς τους να διαπερνούν τις μεμβράνες σε βιολογικούς ιστούς. Δεδομένου ότι οι ομάδες N-ακετυλίου, 3-ακυλίου και 3-αλκανουλίου συνδεδεμένες σε τετραμικά οξέα, καθώς και τα σύμπλοκα τους, εμφανίζονται να παρουσιάζουν πολύ ελπιδοφόρα δράση έναντι βιολογικών στόχων, στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η πρόσδεση τριών συμπλόκων N-ακετυλο-3-ακετυλο-5-βενζυλιδενοτετραμικού οξέος σε DNA θύμου αδένος μόσχου (calfthymusDNA), καθώς επίσης και του N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι δομές συμπλόκων Zn(II), Cu(II), Cd(II). (Εικόνα 10) [58, 59]



Σμπλοκο Cu



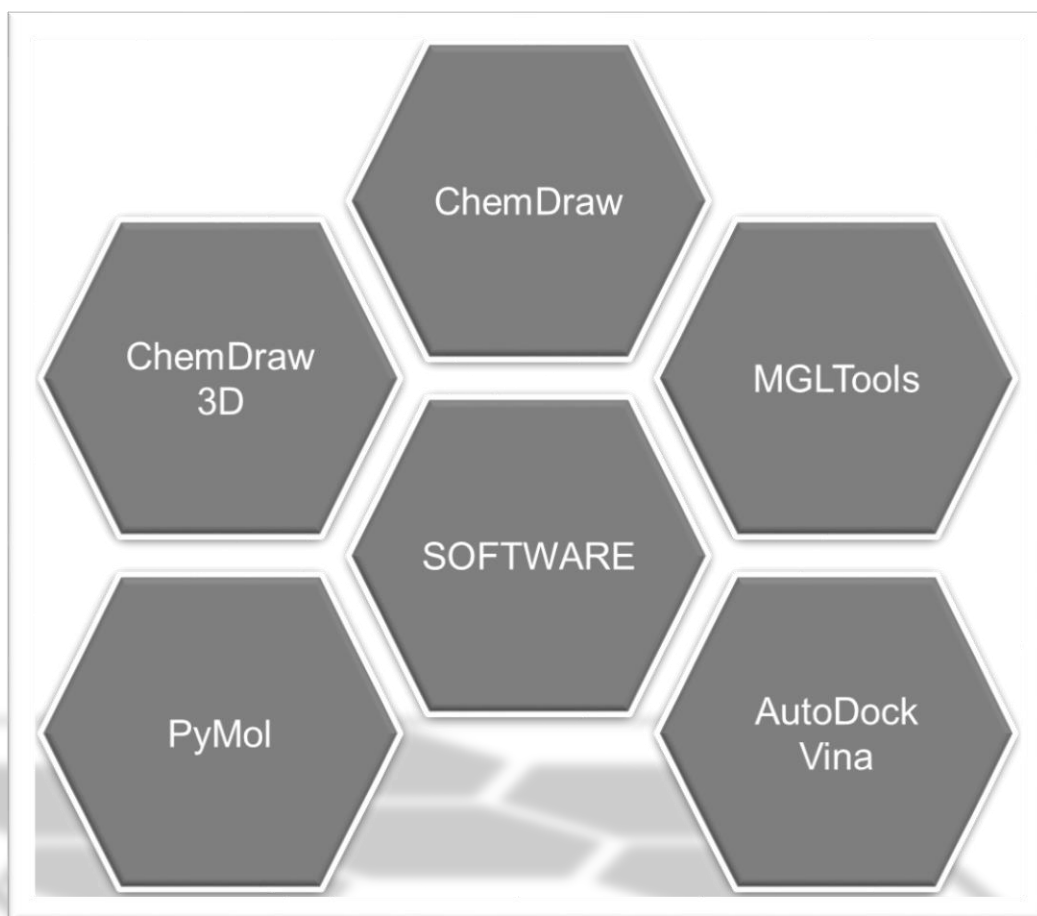
Σμπλοκο Zn



Σμπλοκο Cd

Εικόνα 10: Δομές των συμπλόκων N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενετετραμικού οξέος με τα τρία μέταλλα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

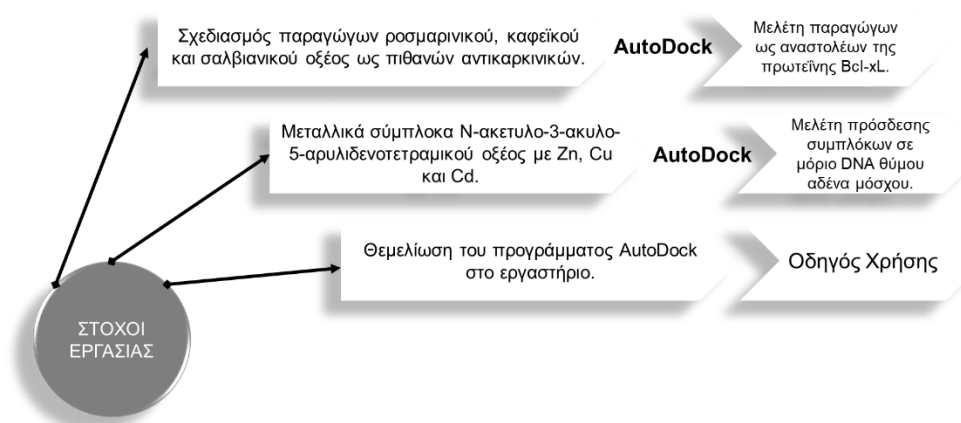


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Πειραματική Διαδικασία

1.1. Περιγραφή Σκοπού Πειραματικού Μέρους

Πρωταρχικός στόχος της εργασίας είναι η μελέτη δύο διαφορετικών υποστρωμάτων με χρήση του προγράμματος AutoDock. Σε αυτά τα πλαίσια, σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν παράγωγα τριών φυσικών προϊόντων, ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος ως πιθανοί αναστολείς της πρωτεΐνης Bcl-xL. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης συμπλόκων N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με Cu(II), Zn(II) και Cd(II), τα οποία χάρη συντομίας θα αναφέρονται ως σύμπλοκα τετραμικού οξέος. Τέλος, δημιουργήθηκε εγχειρίδιο χρήσης του προγράμματος με στόχο τη θεμελίωση του στο εργαστήριο. (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Σχεδιαγραμματική Απεικόνιση Στόχων Μεταπτυχιακής Εργασίας.

1.2. Υλικά και Μέθοδοι

1.2.1. Μοριακή Πρόσδεση

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, για τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AutoDock και πιο συγκεκριμένα ο Λαμαρκιανός-Γενετικός αλγόριθμος. Στη συνέχεια του κεφαλαίου η διαδικασία θα περιγραφεί αναλυτικά. Οι κρυσταλλικές δομές τόσο της πρωτεΐνης, όσο και του μορίου DNA, χρησιμοποιήθηκαν από τη διαδικτυακή βάση δεδομένων «ProteinDataBank - PDB» και μεταφορτώθηκαν απευθείας στο πρόγραμμα AutoDock προς μελέτη. Στη συνέχεια, για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PyMol.

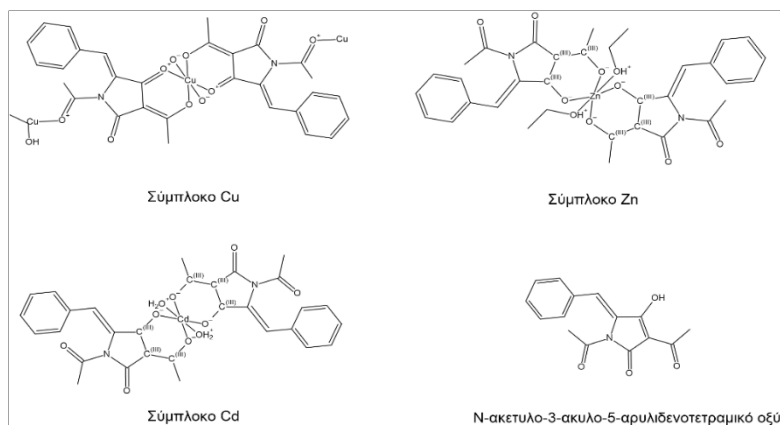
1.2.2. Σχεδιασμός και Προετοιμασία Παραγώγων Ροσμαρινικού, Καφεϊκού και Σαλβιανικού Οξέος

Οι πιθανοί αναστολείς της Bcl-xL που μελετήθηκαν (παράγωγα ροσμαρινικού, καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος) σχεδιάστηκαν στη σουίτα προγραμμάτων ChemBioOffice. Αρχικά, σχεδιάστηκαν οι διδιάστατες δομές τους στο ChemDraw, ενώ στη συνέχεια με χρήση του προγράμματος Chem3D προσδιορίστηκαν και οι τριδιάστατες δομές τους. Συνολικά, σχεδιάστηκαν 296 ενώσεις, 74 παράγωγα καφεϊκού οξέος, 74 παράγωγα σαλβιανικού οξέος και 147 για το ροσμαρινικό οξύ. Επιπρόσθετα, με χρήση του ίδιου προγράμματος έγινε ελαχιστοποίηση της ενέργειας τους. Για την ελαχιστοποίηση ενέργειας χρησιμοποιήθηκε πεδίο δυνάμεων MM2 (MM2 forcefield).

1.2.3. Προετοιμασία Συμπλόκων Τετραμικού Οξέος

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε το N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικό οξύ συμπλοκοποιημένο με τρία διαφορετικά δισθενή μέταλλα, Zn(II), Cu(II) και Cd(II). Οι δομές των συμπλόκων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, υπάρχουν κατατεθειμένες στο Ινστιτούτο Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων του Κέιμπριτζ (CambridgeCrystallographicDataCenter, <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/>). Οι κωδικοί (CCDCnumbers) που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής (Εικόνα 12):

- Παράγωγο τετραμικού οξέος (N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικό οξύ) (CCDCnumber: 965492)
- Σύμπλοκο N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με χαλκό (II) (CCDCnumber: 1837232)
- Σύμπλοκο N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με ψευδάργυρο (II) (CCDCnumber: 965493)
- Σύμπλοκο N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με κάδμιο (II) (CCDCnumber: 1871745)



Εικόνα 12: Δομές N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος καθώς επίσης και των συμπλόκων του με τα μέταλλα Zn(II), Cu(II) και Cd(II).

1.2.4. Προετοιμασία Υποστρωμάτων

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, με χρήση του προγράμματος AutoDock μελετήθηκαν δύο είδη υποστρωμάτων, ένα μόριο πρωτεΐνης και ένα μόριο DNA. Και στις δύο περιπτώσεις, τα μόρια χρησιμοποιήθηκαν όπως παρέχονται από τη βάση δεδομένων «ProteinDataBank- PDB». Οι κρυσταλλογραφημένες δομές τους επεξεργάστηκαν στο AutoDock και η διαδικασία περιγράφεται στη συνέχεια του κεφαλαίου. Το μόριο της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε έχει PDBID: 3ZLR, ενώ για τους υπολογισμούς με DNA χρησιμοποιήθηκε το δωδεκαμερές δίκλωνο μόριο με PDBID:1BNA.

1.2.5. Μοριακή Δυναμική των συμπλόκων, Προετοιμασία του συστήματος & Φάση Παραγωγής

Αρχικά, το σύστημα «ένζυμο-προσδέτης» επιδιαλυτώθηκε με μόρια νερού μοντέλου TIP3P και στο σύστημα προστέθηκαν ιόντα Na^+ και Cl^- , ώστε το σύστημα να γίνει ουδέτερο και η συγκέντρωση NaCl να γίνει ίση με τη βιολογική συγκέντρωση άλατος, (0,15M). Επιπλέον προστατεύτηκε το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης με ακέτυλο-ομάδα, ενώ το C-τελικό άκρο παρέμεινε ελεύθερο, διότι αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε ως πεδίο δυνάμεων το OPLS2005, ώστε να μοντελοποιηθούν όλες οι αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη, ενώ οι μεγάλοι εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προσομοιώθηκαν με τη μέθοδο Σωματιδιακού Πλέγματος Ewald (PME-Particle mesh Ewald method) και η απόσταση πλέγματος ρυθμίστηκε στα 0,8 Å. Οι Van der Waals και οι μικρού εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν με όριο στα 9,0 Å. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή χρησιμοποιώντας τον θερμοστάτη Nosé-Hoover, ενώ η μέθοδος Martyna-Tobias-Klein χρησιμοποιήθηκε ώστε να ρυθμιστεί η πίεση. Εφαρμόστηκαν περιοδικές συνθήκες και οι διαστάσεις του «κουτιού» της προσομοίωσης ήταν (10 x 10 x 10) Å. Οι εξισώσεις της κίνησης ενσωματώθηκαν στην προσομοίωση με τη χρήση του ολοκληρωτή πολλαπλών βημάτων (multistep RESPA

integrator) με εσωτερικό βήμα 2 fs για τις δεσμικές και τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις με όριο στα 9 Å. Εξωτερικό βήμα 6.0 fs χρησιμοποιήθηκε για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις που ξεπερνούν το όριο των 9 Å. Κάθε σύστημα εξισορροπήθηκε με το προκαθορισμένο πρωτόκολλο που προτείνεται από το Desmond. Το σύστημα ήρθε σε ηρεμία χρησιμοποιώντας αρχικά προσομοίωση Brownian δυναμικής στο κανονικό σύνολο NVT σε θερμοκρασία $T = 310$ K με περιορισμούς βαρέα άτομα του συστήματος με εξαίρεση τα άτομα του διαλύτη. Ακολούθησαν οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με το προκαθορισμένο πρωτόκολλο ισορροπίας του Desmond για ευδιάλυτες στο νερό πρωτεΐνες και εφαρμόστηκε βαθμιδωτή αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση των αρμονικών περιορισμών, αρχικά για τα άτομα του διαλύτη (H_2O) και έπειτα για τα υπόλοιπα βαρέα άτομα του υπό μελέτη συστήματος, δηλαδή τη Bcl-xL και τις τρεις ενώσεις (ροσμαρινικό, καφεϊκό και σαλβιανικό οξύ) και τα παράγωγα που εμφάνισαν τις ευνοϊκότερες καλύτερες ενέργειες πρόσδεσης. Πριν ξεκινήσει η φάση της παραγωγής, το σύστημα αφέθηκε να έρθει σε ισορροπία στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NPT ensemble) χωρίς περιορισμούς για 2ns. Η φάση της παραγωγής πραγματοποιήθηκε για 200ns, χρόνος που είναι αρκετός για να προσομοιωθεί επιτυχώς το σύστημα ανάλογου μεγέθους, ώστε να αναλυθεί ο τρόπος πρόσδεσης των προσδετών στη Bcl-xL.

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκαν σε υπολογιστή με διαθέσιμη κάρτα γραφικών GPU. Η ποιότητα και η επιτυχία των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής αξιολογήθηκε με βάση τη σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού την πρωτεΐνης. Η φάση της παραγωγής πραγματοποιήθηκε ώστε να ελεγχθεί η σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων του υποδοχέα με τον προσδέτη σε συνάρτηση με το χρόνο.

1.2.6. Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων

Μετά το τέλος των υπολογισμών έγινε χρήση των προγραμμάτων Chimera και PyMol, με σκοπό την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η σύνδεση μεταξύ των μορίων (προσδέτη/υποδοχέα).

1.3. AutoDock

Οδηγός Χρήσης/Πειραματική Διαδικασία

Το AutoDock χρησιμοποιήθηκε μέσω του γραφικού περιβάλλοντος (GUI: Graphical User Interface) AutoDock Tools. Τόσο το AutoDock όσο και τα υπόλοιπα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είναι εγκατεστημένα σε Windows 10.

Το AutoDock διαθέτει πολλές εφαρμογές, όμως στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη μοριακής πρόσδεσης στα συστήματα πρωτεΐνης/προσδέτη και DNA/παρεμβολέα. Όλα τα πειράματα μοριακής

πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές (3 επαναλήψεις) και η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια βήμα-βήμα. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σχεδόν ίδιοι και στα δύο υποστρώματα. Το μόνο που διέφερε ήταν ότι στην περίπτωση της πρωτεΐνης ήταν γνωστή η θέση του ενεργού κέντρου ενώ δεν ήταν γνωστή στην περίπτωση του μορίου DNA(blinddocking). Στη συνέχεια, περιγράφεται ξεχωριστά η πειραματική διαδικασία του υπολογισμού της μοριακής πρόσδεσης στις δυο διαφορετικές περιπτώσεις.

1.3.1. Μοριακή πρόσδεση συμπλόκων μετάλλου σε μόριο DNA με άγνωστη θέση πρόσδεσης (blinddocking)

- ❖ Άνοιγμα του προγράμματος ADT (AutoDockTools) κάνοντας κλικ στο κατάλληλο εικονίδιο στην επιφάνεια εργασίας.
- ❖ Ορισμός «φακέλου εργασίας» (startupdirectory)

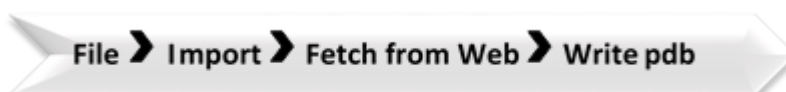


Σε αυτό το σημείο γίνεται επιλογή ενός συγκεκριμένου φακέλου (ή δημιουργία), όπου αποθηκεύονται όλα τα αρχεία που παράγει το πρόγραμμα (outputfiles). Σε αυτό το φάκελο επίσης, θα πρέπει να είναι αποθηκευμένα και τα αρχεία που θα εισάγονται στο πρόγραμμα (inputfiles).

- ❖ Εισαγωγή της τριδιάστατης δομής υποδοχέα (DNA) στο πρόγραμμα. Μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:
 - i. Εισαγωγή αποθηκευμένης τριδιάστατης δομής στον υπολογιστή:

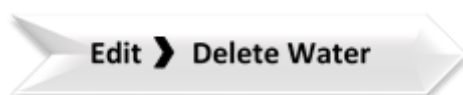


- ii. Εισαγωγή δομής μέσω διαδικτύου από το AutoDockTools:



- ❖ Η προετοιμασία του υποδοχέα περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✓ Διαγραφή νερών πριν τον υπολογισμό μοριακής πρόσδεσης.



- ✓ Προσθήκη υδρογόνων με σκοπό τη σωστή λειτουργία του πεδίου δυνάμεων του προγράμματος.



- ✓ Η προσθήκη φορτίων στο μόριο του υποδοχέα είναι σημαντικό βήμα, καθώς η συνάρτηση βαθμολόγησης (scoringfunction) εμπεριέχει ηλεκτροστατικές συνεισφορές.



- ✓ Επιλογή πολικών υδρογόνων και διαγραφή των υπόλοιπων, τα πολικά υδρογόνα είναι αυτά που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων και για αυτό το λόγο είναι χρήσιμα.



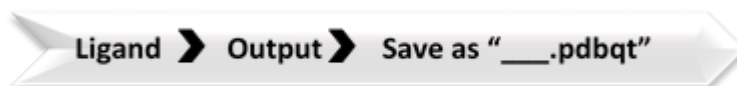
- ✓ Αποθήκευση της επεξεργασμένης δομής του υποδοχέα που θα χρησιμοποιηθεί για τη μοριακή πρόσδεση στη συνέχεια.



- ❖ Εισαγωγή και προετοιμασία του προσδέτη (ligand) στο πρόγραμμα.
 - ✓ Εισαγωγή του προσδέτη επιλέγοντας το κατάλληλο αρχείο



- ✓ Αποθήκευση του προσδέτη σε άλλη μορφή αρχείου (.pdbqt), αυτό το αρχείο θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα για να προσδιορίσει τις



διαμορφώσεις του προσδέτη.

- ❖ Προετοιμασία του GridBox (είναι ο χώρος που θα προσδεθεί το μόριο στον υποδοχέα). Πιο κάτω αναφέρονται οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για το προσδιορισμό του στο μόριο του DNA.
 - ✓ Στη περίπτωση μας ο υπολογισμός θα λάβει χώρα σε ολόκληρο το μόριο του υποδοχέα.
 - ✓ Για τα τρία διαφορετικά σύμπλοκα το «κουτί» (GridBox), το οποίο αποτελείται από κουκκίδες, είχε μέγεθος (numberofpoints):
 - X=54
 - Y=76
 - Z=98
 - ✓ Το διάστημα μεταξύ των κουκκίδων που συνθέτουν το «κουτί» ορίστηκε στο 1,00 Å (bydefault).
 - ✓ Το κέντρο του ορίστηκε με τις εξής συντεταγμένες:
 - X=14,78
 - Y=20,976
 - Z=9,395
 - ✓ Αποθήκευση των παραμέτρων που ορίστηκαν πιο πάνω έτσι ώστε να είναι διαθέσιμοι για χρήση κατά τη διάρκεια του υπολογισμού.

File > Close saving current

- ❖ Προετοιμασία του αρχείου «AutoGrid Parameter file (.gpf)». Το AutoDock δεν χρησιμοποιεί απευθείας τον υποδοχέα στη διαδικασία του υπολογισμού της μοριακής πρόσδεσης, αλλά ένα σύνολο χαρτών οι οποίοι παράγονται από το πρόγραμμα και αποθηκεύονται στο αρχείο «.gpf». Αυτό το σύνολο χαρτών περιλαμβάνει ένα χάρτη για τον κάθε τύπο ατόμου και δύο ακόμη, ένα χάρτη επιδιалύτωσης και ένα χάρτη που αφορά στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, οι τύποι των χαρτών που προκύπτουν εξαρτώνται από τον προσδέτη και έτσι, το AutoDock προετοιμάζει ένα ενεργειακό πλέγμα για κάθε άτομο του προσδέτη.[23, 60]
 - ✓ Επιλογή μακρομορίου: σε αυτό το βήμα αποθηκεύεται σε αρχείο της μορφής .pdbqt το μόριο που θα επιλεγεί ως υποδοχέας.

Grid > Macromolecule > Choose > 1BNA > Save

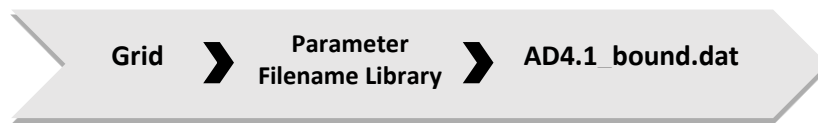
- ✓ Επιλογή προσδέτη: από τις δομές επιλέγεται ο επιθυμητός προσδέτης.

Grid > Set Map Types > Choose Ligand

- ✓ Εισαγωγή βιβλιοθήκης παραμέτρων «ParameterFilenameLibrary»: το πρόγραμμα θα χρησιμοποιήσει ατομικές παραμέτρους που εμπεριέχονται σε αυτό το αρχείο με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας του υπολογισμού.

Αρχείο «AD4.1_bound.dat»: Το συγκεκριμένο αρχείο περιέχει διάφορες παραμέτρους του πεδίου δυνάμεων, όπως για παράδειγμα παραμέτρους vanderWaals, και μπορεί να εξαχθεί από τον εξής σύνδεσμο:

http://autodock.scripps.edu/resources/parameters/AD4.1_bound.dat/view

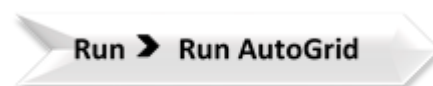


- ✓ Αποθήκευση του αρχείου AutoGrid (.gpf): αυτό το αρχείο περιέχει πληροφορίες για τις διαμοριακές πτυχές του πεδίου δυνάμεων. [23]

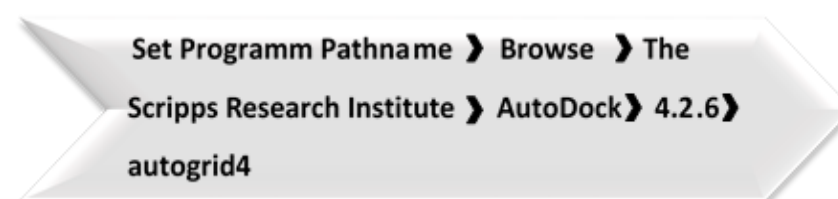


❖ Εκτέλεση AutoGrid4

- ✓ Επιλογή του πλήκτρου «RunAutoGrid» προκειμένου να γίνει εκτέλεση του AutoGrid.



- ✓ Ορισμός της «διαδρομής» του προγράμματος (programpathname): επιλογή του αρχείου με κατάληξη .exe που χρειάζεται το πρόγραμμα για να εκτελεστεί.



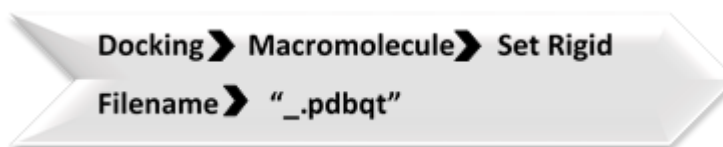
- ✓ Ορισμός του αρχείου που θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα για να εκτελέσει το AutoGrid (.gpf).



- ✓ Πατώντας **Launch** το πρόγραμμα εκτελείται.

❖ Προετοιμασία του αρχείου παραμέτρων για το AutoDock4

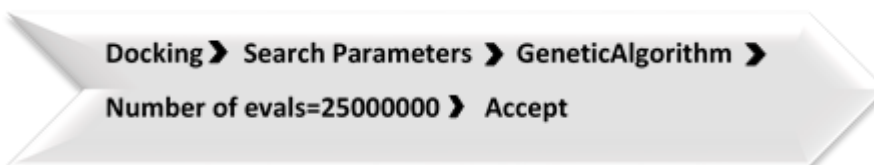
- ✓ Επιλογή μακρομορίου: επιλέγεται το αρχείο του υποδοχέα που αποθηκεύτηκε νωρίτερα κατά την προετοιμασία του αρχείου AutoGrid.



- ✓ Επιλογή προσδέτη: διαλογή της δομής που θα χρησιμοποιηθεί ως προσδέτης στον υπολογισμό της μοριακής πρόσδεσης. Σε αυτό το σημείο ανοίγει ένα παράθυρο στο οποίο μπορεί να ρυθμιστούν οι παράμετροι του προσδέτη, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ορίστηκαν «bydefault», δηλαδή αυτόματα.



- ✓ Αλγόριθμος Αναζήτησης: επιλογή του κατάλληλου για τον εκάστοτε υπολογισμό αλγορίθμου. Ομοίως, όπως και πριν, ανοίγει ένα παράθυρο από όπου μπορεί να ρυθμιστούν οι παράμετροι που αφορούν τον αλγόριθμο. Εδώ επιλέχθηκε ο γενετικός αλγόριθμος και οι παράμετροι ορίστηκαν αυτόματα (bydefault).



- ✓ Παράμετροι μοριακής πρόσδεσης: ρυθμίζονται ανάλογα με το πείραμα. Εδώ ρυθμίστηκαν αυτόματα (bydefault).



- ✓ Εισαγωγή βιβλιοθήκης παραμέτρων: το πρόγραμμα θα χρησιμοποιήσει ατομικές παραμέτρους που εμπεριέχονται σε αυτό το αρχείο με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας του

υπολογισμού. Να σημειωθεί ότι το «AD4.1_bound.dat» είναι το όνομα του αρχείου.

**Docking > Other Options > Click "yes" > Write
"AD4.1_bound.dat" > Accept**

- ✓ Αποθήκευση του αρχείου AutoDock: το αρχείο αυτό περιέχει μέρος των παραμέτρων του πεδίου δυνάμεων οι οποίες αφορούν τις

**Docking > Output > Lamarckian GA > "name".dpf >
Save**

ενδομοριακές ενέργειες και πρέπει να αποθηκευτεί αφού θα χρησιμοποιηθεί κατά την εκτέλεση του προγράμματος.[23]

- ❖ Στη περίπτωση εκτέλεσης του AutoDockVina ακολουθείται η εξής ροή:

Docking > Output > Vina .config > Save

- ❖ Εκτέλεση του AutoDock ή AutoDockVina

- ✓ Εκτέλεση του AutoDock4: σε αυτό το σημείο γίνεται άνοιγμα της καρτέλας «RunAutoDock» προκειμένου να εκτελεστεί το πρόγραμμα.

Run > Run AutoDock

- ✓ Ορισμός «διαδρομής» προγράμματος (programpathname): επιλογή του αρχείου .exe που χρειάζεται το πρόγραμμα για να εκτελεστεί.

**Set Programm Pathname > Browse > The
Scripps Research Institute > AutoDock >
4.2.6 > autodock4**

- ✓ Ορισμός του αρχείου που χρειάζεται το πρόγραμμα για να εκτελέσει το AutoDock.



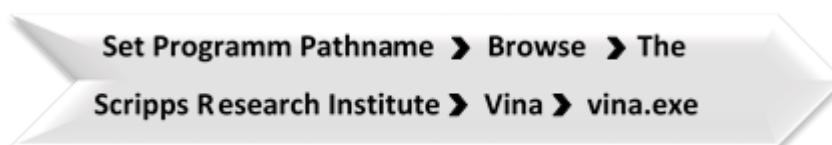
- ✓ Με την επιλογή **Launch** αρχίζει η εκτέλεση του υπολογισμού.

❖ Εκτέλεση του AutoDock Vina

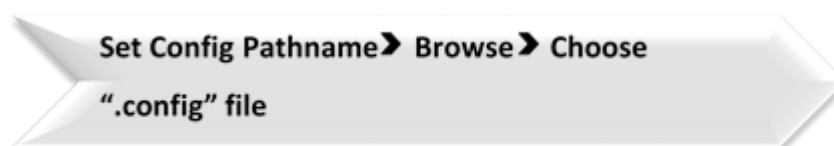
- ✓ Εκτέλεση του AutoDockVina: άνοιγμα της καρτέλας «RunAutoDockVina» προκειμένου να εκτελεστεί το πρόγραμμα.



- ✓ Ορισμός «διαδρομής» προγράμματος (programpathname): επιλογή του αρχείου .exe που χρειάζεται το πρόγραμμα για να εκτελεστεί.



- ✓ Επιλογή του αρχείου .config που χρειάζεται το πρόγραμμα για να εκτελεστεί το πρόγραμμα AutoDockVina.



- ✓ Εκτέλεση πατώντας **Launch**.

❖ Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων του AutoDock

- ✓ Εισαγωγή των αποτελεσμάτων (αρχείο «.dlg») μετά το πέρας της διαδικασίας της μοριακής πρόσδεσης (στην επιφάνεια του προγράμματος θα εμφανιστεί μια από τις διαμορφώσεις του προσδέτη)

Analyze > Dockings > Open > Choose “.dlg” file

- ✓ Εισαγωγή του μακρομορίου στην επιφάνεια του προγράμματος (είναι το αρχείο rdbqt που αποθηκεύτηκε κατά τη προετοιμασία του αρχείου AutoGrid)

Analyze > Macromolecule > Open

- ✓ Έλεγχος των διαμορφώσεων του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα: αυτή η επιλογή δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης των διαμορφώσεων του προσδέτη πατώντας πάνω στα βελάκια αριστερά και δεξιά του αριθμού της εκάστοτε διαμόρφωσης.

Analyze > Conformations > Play, ranked by energy

- ✓ Οπτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη.

Analyze > Dockings > Show Interactions

❖ Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων του AutoDockVina

- ✓ Εισαγωγή των διαμορφώσεων του προσδέτη που προέκυψαν μετά τον υπολογισμό της μοριακής πρόσδεσης (στην οθόνη όπου εμφανίζονται οι τριδιάστατες δομές των μορίων θα εμφανιστούν αυτές του προσδέτη).

**Analyze > Dockings > Open AutoDock
Vina result**

- ✓ Εισαγωγή του υποδοχέα στο πρόγραμμα (πρόκειται για το αρχείο rdbqt που αποθηκεύτηκε κατά την προετοιμασία του αρχείου του AutoGrid)

Analyze > Dockings > Macromolecule > Open

- ✓ Εμφάνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα.



1.3.2. Μοριακή πρόσδεση σε πρωτεΐνη γνωρίζοντας το ενεργό της κέντρο (συν-κρυσταλλωμένη με προσδέτη)

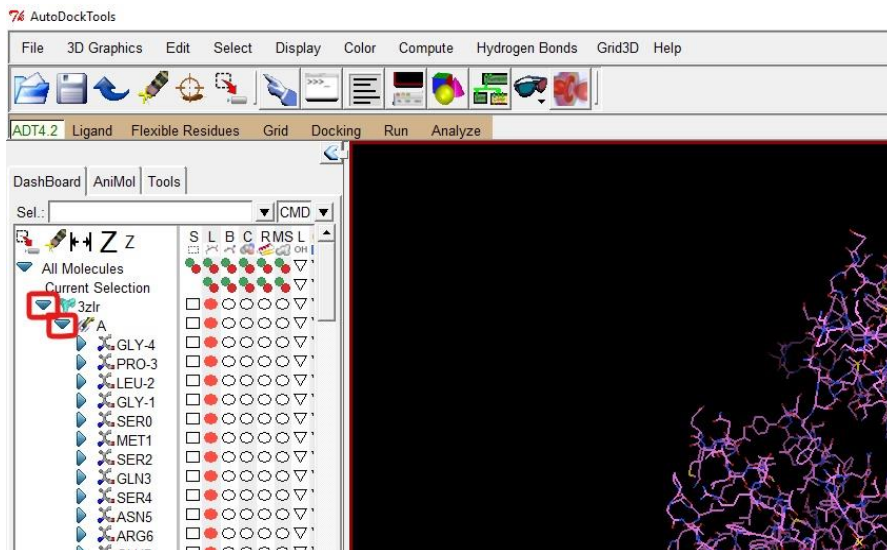
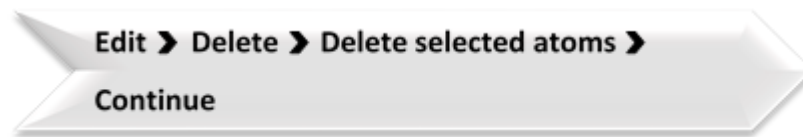
Σε αυτή την περίπτωση ο υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη με γνωστό ενεργό κέντρο. Συνεπώς, η ροή της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζει κάποιες αλλαγές σε σχέση με την περίπτωση που ο υποδοχέας ήταν ένα μόριο DNA. Οι βασικές διαφορές εντοπίζονται κατά τη προετοιμασία του υποδοχέα καθώς επίσης και κατά τον προσδιορισμό του πλέγματος (Grid Box). Τα υπόλοιπα βήματα είναι πανομοιότυπα με αυτά που περιγράφονται πιο πάνω λεπτομερώς. Στη συνέχεια περιγράφονται με λεπτομέρειες μόνο τα βήματα που είναι διαφορετικά στην περίπτωση του υποδοχέα με άγνωστο ενεργό κέντρο.

- ❖ Προετοιμασία του υποδοχέα
 - ✓ Διαγραφή νερών: πριν τον υπολογισμό της μοριακής πρόσδεσης διαγράφονται τα νερά που έχουν συν-κρυσταλλωθεί με το μόριο.

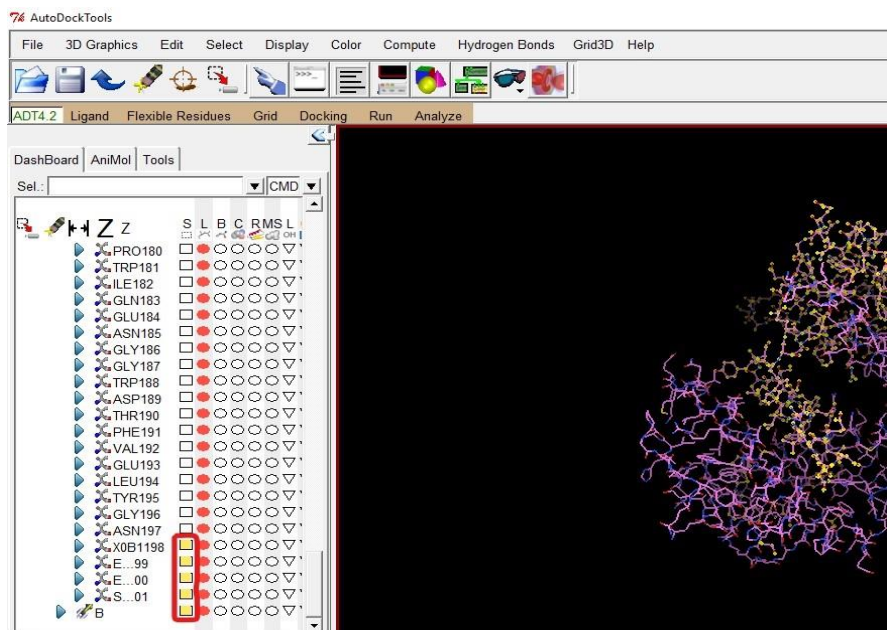


- ✓ Διαγραφή μορίων που δεν είναι χρήσιμα για τον υπολογισμό: διαγραφή του μορίου του προσδέτη που έχει συν-κρυσταλλωθεί μαζί με τη πρωτεΐνη στη περίπτωση που το μόριο της πρωτεΐνης που μεταφορτώνεται στο πρόγραμμα από τη βάση δεδομένων «Protein Data Bank», έχοντας προσδεμένο άλλο μόριο στο ενεργό της κέντρο. Αριστερά της επιφάνειας του προγράμματος, στην ενότητα «Dashboard» πατώντας το βελάκι στην αριστερή πλευρά του μορίου (στη περίπτωση μας της 3ZLR) και στη συνέχεια αριστερά της αλυσίδας A (ChainA), εμφανίζονται όλα τα αμινοξέα της αλυσίδας A, όπως και ο συν-κρυσταλλογραφημένος προσδέτης. Κάνοντας κλικ στο τετραγωνάκι (S), αριστερά του συν – κρυσταλλωμένου προσδέτη, γίνεται επιλογή του μορίου που επιθυμούμε να διαγράψουμε. Οι **Εικόνες 13 και 14** παρουσιάζουν τα βελάκια τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως καθώς επίσης και τα «τετράγωνα επιλογής». Με αυτόν τον τρόπο γίνεται επιλογή των

μορίων, ενώ στη συνέχεια διαγράφονται ακολουθώντας την πιο κάτω εντολή.



Εικόνα 13: Στιγμιότυπο της οθόνης που παρουσιάζει τα βελάκια τα οποία εμφανίζουν τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη πρωτεΐνη.



Εικόνα 14: Στιγμιότυπο της οθόνης που παρουσιάζει «τα τετράγωνα επιλογής».

❖ Προετοιμασία του Grid Box

- ✓ Στο συγκεκριμένο βήμα γίνεται προετοιμασία της περιοχής (πλέγματος) όπου θα εντοπίζεται ο προσδέτης. Στην προκειμένη περίπτωση η περιοχή ορίστηκε με βάση τις συντεταγμένες του αμινοξέος ARG139, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συμπεριλαμβάνεται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης.[36]
- ✓ Επιλογή ενός ατόμου το οποίο ανήκει στο αμινοξύ ARG139, ακολουθώντας τα βήματα που αναφέρθηκαν νωρίτερα.
- ✓ Άνοιγμα της καρτέλας Ομοιοπολικών Παραμέτρων Πλέγματος (covalentGridParametersTab) και επιλογή του τετραγώνου «UseselectionforAttachmentAtom». Με αυτόν τον τρόπο, στις συντεταγμένες x, y και z εμφανίζονται οι τιμές των συντεταγμένων του ατόμου που επιλέχθηκε.

Grid > Set Map Types > Set up Covalent Map

- ✓ Στη καρτέλα του GridBox ορίζονται οι τιμές για τον αριθμό των κουκκίδων του GridBox ως εξής:
X=41
Y= 41
Z=41
- ✓ Ορισμός της απόστασης των κουκκίδων στα 0,375 Å (προεπιλογή)
- ✓ Ορισμός του κέντρου του πλέγματος με χρήση των συντεταγμένων που προέκυψαν από προηγούμενο βήμα:
X= -18.737
Y= -15.853
Z= -49.069
- ✓ Αποθήκευση των παραμέτρων του πλέγματος πριν το κλείσιμο της καρτέλας.

File > Close saving current

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όλα τα υπόλοιπα βήματα είναι όμοια με την προηγούμενη περίπτωση όπου το ενεργό κέντρο του υποδοχέα ήταν άγνωστο. Εν κατακλείδι, η βασική διαφορά μεταξύ των δύο περιπτώσεων (υποδοχέα με γνωστό και άγνωστο ενεργό κέντρο) εντοπίζεται στον προσδιορισμό του χώρου-πλέγματος. Στη περίπτωση που το ενεργό κέντρο είναι γνωστό, είναι αναγκαίο να προσδιοριστούν οι συντεταγμένες του ενεργού κέντρου του

υποδοχέα. Επιπρόσθετα, στη περίπτωση που υπάρχει συν-κρυσταλλωμένο μόριο στην τριδιάστατη δομή του υποδοχέα, όπως συνηθίζεται σε πολλές περιπτώσεις, είναι σημαντικό να διαγραφεί πριν τον υπολογισμό της μοριακής πρόσδεσης.

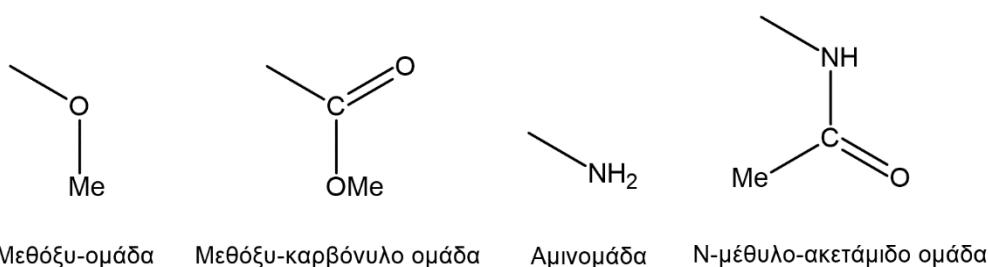
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έγινε αναφορά στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης τόσο των παραγώγων των τριών φυσικών προϊόντων, όσο και των τριών συμπλόκων του N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με χαλκό, ψευδάργυρο και κάδμιο. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα *in silico* αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών καθώς επίσης και εικόνες από τα συμπλέγματα ενώσεων που προέκυψαν μετά τη πρόσδεση με χρήση του προγράμματος PyMol και Chimera.

2.1. Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης Παραγώγων Καφεϊκού, Σαλβιανικού και Ροσμαρινικού οξέος ως ανταγωνιστές της Bcl-xL

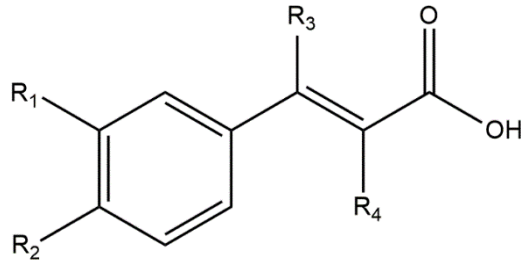
Τα παράγωγα των τριών φυσικών προϊόντων σχεδιάστηκαν με βάση το δομικό σκελετό τους. Οι ομάδες που αντικατέστησαν τις χαρακτηριστικές ομάδες των ενώσεων ώστε να προκύψουν παράγωγα είναι οι εξής: μεθόξυ ομάδα, μεθόξυ-καρβονυλομάδα, αμινο-ομάδα, φαινύλιο και N-μέθυλο-ακετάμιδο ομάδα. (Εικόνα 15) Ο υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης για το κάθε παράγωγο επαναλήφθηκε τρεις φορές σύμφωνα με τη διαδικασία που αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο και οι τιμές πρόσδεσης προκύπτουν από τον μέσο όρο των τιμών των τριών πειραμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια ως τρεις κατηγορίες ενώσεων: παράγωγα καφεϊκού οξέος, παράγωγα σαλβιανικού οξέος και παράγωγα ροσμαρινικού οξέος.



Εικόνα 15: Χαρακτηριστικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν στον σχεδιασμό των παραγώγων.

2.1.1. Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Καφεϊκού οξέος

Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται ο δομικός σκελετός του καφεϊκού οξέος με τις ομάδες (R₁, R₂, R₃ και R₄) που αντικαταστάθηκαν.



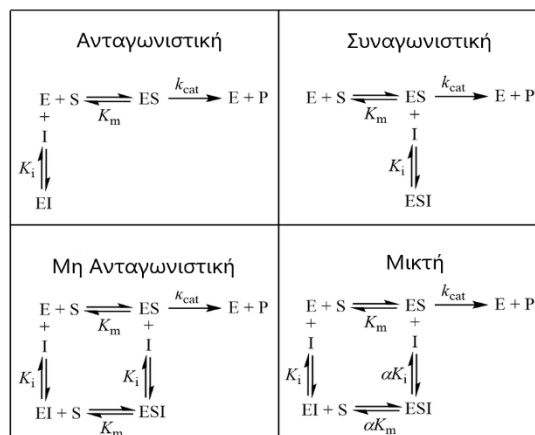
Εικόνα 16: Δομικός σκελετός παραγώγων καφεϊκού οξέος.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται κατά αύξουσα τιμή ενέργειας πρόσδεσης τα παράγωγα, τα οποία προσδέθηκαν ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η επιλογή τους έγινε με βάση τις ενέργειες πρόσδεσης. Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν ήταν εκείνες των οποίων η συγγένεια πρόσδεσης (bindingaffinity) είναι χαμηλότερη από -7 kcal/mol, ενώ λήφθηκε υπόψη και η σταθερά αναστολής όπως υπολογίστηκε από λογισμικό AutoDock.

Στη βιοχημεία και τη φαρμακολογία υπάρχει μία ποικιλία παραμέτρων οι οποίες αναφέρονται ως μέτρα της ισχύος των αναστολέων ενζύμων/φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των k_d και k_i .

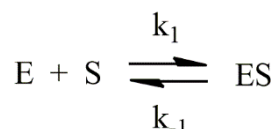
Η k_d αναφέρεται ως σταθερά αναστολής, ενώ το k_d ως σταθερά διάστασης. Και οι δύο όροι χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη συγγένεια δέσμευσης, που έχει ένα μικρό μόριο ή μακρομόριο σε σχέση με ένα ένζυμο/υποδοχέα. Η διαφορά τους εντοπίζεται στο ότι η k_d αποτελεί έναν ευρύτερο, γενικότερο, όρο σε σχέση με την k_i .

Η σταθερά αναστολής k_i αντιπροσωπεύει μια σταθερά διαχωρισμού κατά την αντιστρεπτή σύνδεση ενζύμου - αναστολέα. Η ισορροπία σύνδεσης που περιγράφεται από την τιμή της σταθεράς αναστολής εξαρτάται από τον κινητικό μηχανισμό της αναστολής. Εξαρτάται δηλαδή, από το αν η αναστολή είναι ανταγωνιστική (competitive inhibition), μη ανταγωνιστική (non-competitive inhibition), συναγωνιστική (uncompetitive inhibition) ή μικτή (mixed type inhibition). (Εικόνα 17) Οι όροι έχουν αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο.[61]



Εικόνα 17 : Κινητική ισορροπίας ειδών αντιστρεπτής αναστολής.

Κάθε αντίδραση στην οποία συμμετέχουν πρωτεϊνικά μακρομόρια, αρχίζει με την πρόσδεση του μορίου του υποκαταστάτη (ligand), όπως παραδείγματος χάρη ενός αναστολέα ή ενός υποστρώματος, επάνω στο πρωτεϊνικό μόριο του υποδοχέα (receptor). Και στις δύο περιπτώσεις η προσέγγιση της κινητικής των αντιδράσεων αρχίζει με το πρώτο μέρος της αντίδρασης Michaelis-Menten:



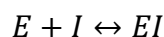
όπου, E τα μόρια του υποδοχέα και S του υποκαταστάτη. Είναι γνωστό ότι η σταθερά αστάθειας ή διάστασης του συμπλόκου ES μπορεί να γραφεί ως:

$$k_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

ενώ η σταθερά σχηματισμού του ES, [62]:

$$k_b = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

Η σταθερά k_i (σταθερά αναστολής) υπολογίζεται από το λογισμικό AutoDock4 μέσω της ενέργειας πρόσδεσης. Στην ισορροπία:



όπου E είναι το ένζυμο/υποδοχέας και I ο αναστολέας/προσδέτης ισχύει το εξής:



και για την αντίστροφη αντίδραση:



Η σχέση που συνδέει τις δύο σταθερές είναι η εξής:

$$k_b = \frac{1}{k_d}, \text{ άρα και } \ln k_b = -\ln k_d \quad (1)$$

Η σταθερά αναστολής k_i του συμπλέγματος ενζύμου - αναστολέα ισούται επί της ουσίας με τη σταθερά διάστασης k_d . Άραθα ισχύει:

$$k_i = \frac{[E][I]}{EI}$$

Από τη σχέση (1) και σε συνδυασμό με τη θερμοδυναμική σταθερά ισορροπίας προκύπτει:

$$\Delta G_{\text{σχηματισμού}} = -R * T * \ln k_b \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{αναστολής}} = R * T * \ln k_i \quad (3)$$

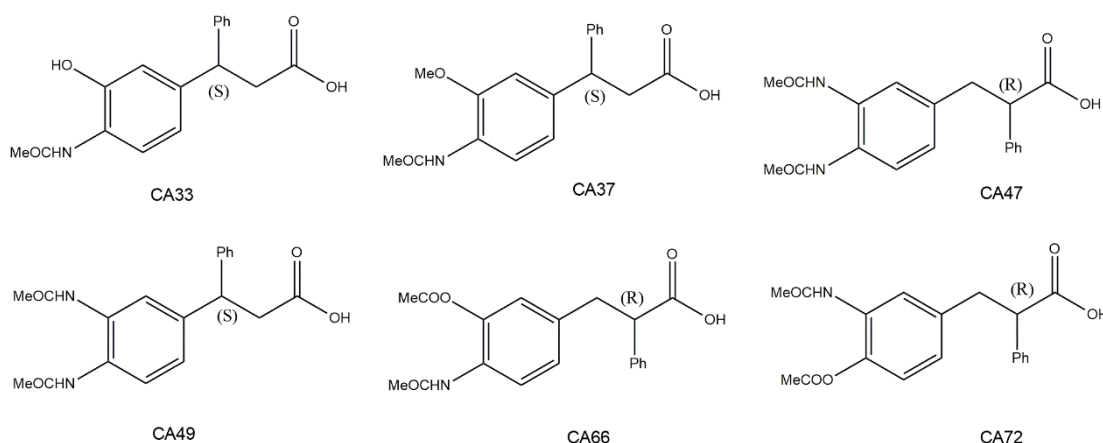
Το $\Delta G_{\text{αναστολής}}$ έχει θετικό πρόσημο αφού ο σχηματισμός και η διάσπαση (που είναι ταυτόσημη με την αναστολή) είναι δύο αντίστροφες διεργασίες.

Έτσι προκύπτει, :

$$\Delta G/R * T = \ln k_i,$$

$$k_i = e^{\Delta G/R * T}$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα παράγωγα πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης σε σχέση με το ίδιο το καφεϊκό οξύ, το οποίο παρουσίασε ενέργεια πρόσδεσης -5,45 kcal/mol. Από τα 74 παράγωγα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1), που σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση το καφεϊκό οξύ, τα 6 που παρουσίασαν τις ευνοϊκότερες τιμές ελεύθερης ενέργειας απεικονίζονται στην **Εικόνα 18**.



Εικόνα 18: Δομές των παραγώγων του καφεϊκού οξέος που παρουσίασαν την ενεργειακά ευνοϊκότερη πρόσδεση στη Bcl-xL.

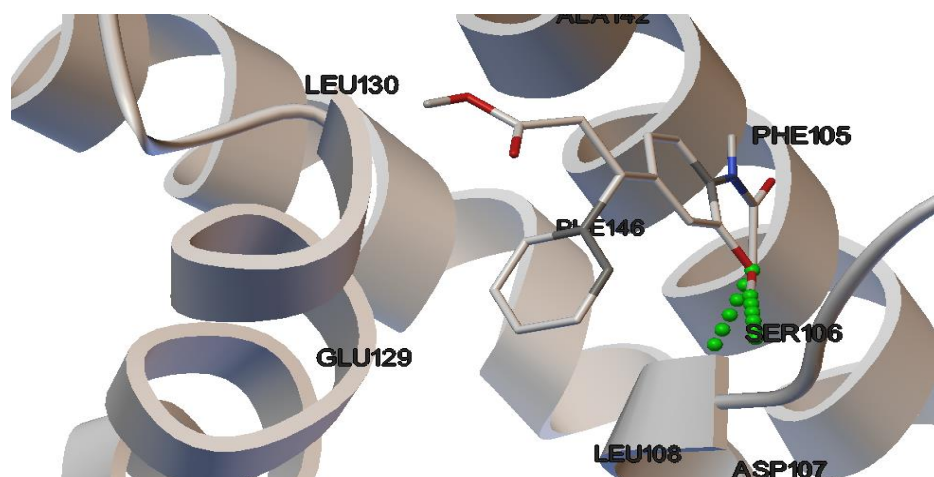
Παρατηρείται πως όλες οι ενώσεις με την ευνοϊκότερη πρόσδεση (σε σχέση με το καφεϊκό και τα υπόλοιπα παράγωγα) διαθέτουν φαινύλιο, το οποίο αντικαθιστά είτε την ομάδα R₃ είτε την ομάδα R₄, ενισχύοντας τη πρόσδεση στην υδρόφοβη κοιλότητα της πρωτεΐνης. (Πίνακας 3) Επίσης, παρατηρείται ότι μία, ή και οι δυο, από τις ομάδες R₁ και R₂, και στις έξι περιπτώσεις, έχει αντικατασταθεί από τη N-μέθυλο-ακετάμιδοομάδα, η οποία κατά συνέπεια λειτουργεί ως σταθεροποιητικός παράγοντας για τα παράγωγα. Το παράγωγο CA33 παρουσιάζει τις ευνοϊκότερες τιμές τόσο ελεύθερης ενέργειας όσο και σταθεράς αναστολής (όσο μικρότερη η τιμή της τόσο ισχυρότερη η πρόσδεση).

Πίνακας 3: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων καφεϊκού οξέος που παρουσιάζουν τις

ευνοϊκότερες τιμές συγγένειας πρόσδεσης.

<i>Ένωση</i>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Binding Affinity	Inhibition Constant
<i>Caffeic acid</i>	-OH	-OH	-H	-H	-5.45±0.5 kcal/mol	102.1±0.5 μM
CA33	-OH	-NHCOMe	-Ph	-H	-7.83±0.5 kcal/mol	1.87±0.5 μM
CA49	-NHCOMe	-NHCOMe	-Ph	-H	-7.33±0.5 kcal/mol	4.25±0.5 μM
CA72	-NHCOMe	-OOCMe	-H	-Ph	-7.09±0.5 kcal/mol	7.41±0.5 μM
CA37	-OMe	-NHCOMe	-Ph	-H	-7.08±0.5 kcal/mol	6.44±0.5 μM
CA47	-NHCOMe	-NHCOMe	-H	-Ph	-7.06±0.5 kcal/mol	6.73±0.5 μM

Το παράγωγο CA33, το οποίο παρουσιάζει την ευνοϊκότερη πρόσδεση, δείχνει να σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα της υδρόφοβης κοιλότητας της Bcl-xL, έναν με το αμινοξύ SER106 και έναν με το αμινοξύ LEY108, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζει και μια αλληλεπίδραση *π-π* με το αμινοξύ PHE146. (Εικόνα 19)



Εικόνα 19: Στιγμιότυπο ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του παραγώγου CA33 και αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Το παράγωγο με την επόμενη ευνοϊκότερη ενέργεια πρόσδεσης είναι το CA49. Το CA49 σχηματίζει συνολικά πέντε δεσμούς υδρογόνου, τρεις με τα αμινοξέα TYR195, GLY138, ASN136 και δύο με την ARG139. Στη συνέχεια, το CA72 φαίνεται να σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου (ASN136, ARG139, ARG132). Το CA37 προσδένεται στη κοιλότητα της πρωτεΐνης μέσω τριών δεσμών υδρογόνου (SER106, LEY108, ARG139) και δύο αλληλεπιδράσεων π - π με τους αρωματικούς δακτυλίους των αμινοξέων PHE105 και PHE97. Μέσω τεσσάρων δεσμών υδρογόνου (ASN136, ARG139(2), ARG132) και μιας αλληλεπίδρασης π - π με τον αρωματικό δακτύλιο του αμινοξέος PHE105 προσδένεται στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL το παράγωγο CA47. Συνοπτικά, οι αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Τα υπόλοιπα παράγωγα που σχεδιάστηκαν για το καφεϊκό οξύ παρουσίασαν υψηλότερες ενέργειες πρόσδεσης.

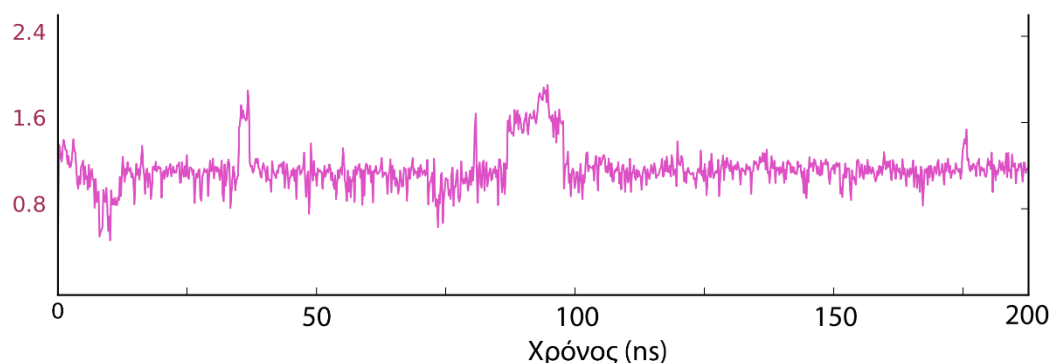
Πίνακας 4: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων καφεϊκού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Ένωση	Δεσμοί Υδρογόνου	Αλληλεπιδράσεις
		π - π
CA33	SER106	-
	ASP107	-
CA37	SER106	PHE97
	LEY108	PHE105
	ARG139	

CA47	ARG139 (2)	
	ASN136	PHE105
	ARG132	
CA49	ARG139 (2)	
	ASN136	
	GLY138	-
	TYR195	
	ARG132	
CA72	ASN136	-
	ARG139	

Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής του συμπλόκου «πρωτεΐνης-προσδέτη» ($\Delta G_{\text{bind}} = -7.83 \pm 0.5$ kcal/mol) υποδεικνύει τη σταθερότητα του συμπλόκου στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί με μετρήσεις η σταθερότητα αυτή, υπολογίσθηκε το RMSD του προσδέτη, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς τις συντεταγμένες της αρχικής πόζας του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (200ns), το παράγωγο του καφεϊκού οξέος CA33 παραμένει προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL, προσαρμόζοντα στον ίδιο τρόπο πρόσδεσης σε αυτό. Το αποτέλεσμα που προέκυψε από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, επιβεβαιώνει ότι το συγκεκριμένο παράγωγο προσδένεται ισχυρά στη πρωτεΐνη, όπως είχε ήδη παρατηρηθεί από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης. Η ευνοϊκότερη πόζα του συμπλόκου «Bcl-xL-παραγώγου CA33», η οποία προήλθε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, θεωρήθηκε ως πόζα αναφοράς, ώστε να μετρηθεί το RMSD των ατόμων του προσδέτη. Η πρόσδεση «πρωτεΐνης-παραγώγου» είναι ιδιαίτερα σταθερή, καθώς το $\text{RMSD}_{(\text{προσδέτη})} < 1.6$ Å, καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. (Εικόνα 20)

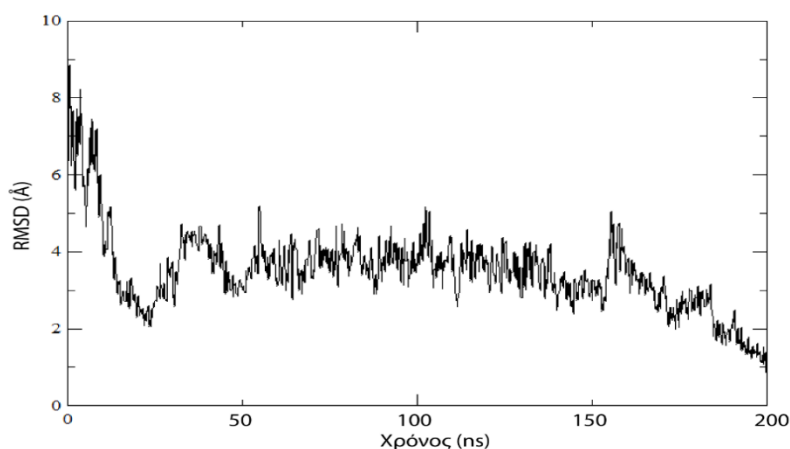
RMSD (Å) Παράγωγου 33 του Καφεϊκού Οξέος



Εικόνα 20: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στα άτομα του προσδέτη.

Στην **Εικόνα 21** παρατίθεται το διάγραμμα RMSD (Å) της πρωτεΐνης, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς την αρχική δομή της πρωτεΐνης, όπως προκύπτει από το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης Autodock. Παρατηρείται ότι η αρχική δομή της πρωτεΐνης μεταβάλλεται αρκετά κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (RMSD έως 8 (Å)), ενώ σταθεροποιείται και παραμένει στο μεγαλύτερο ποσοστό του υπολογιστικού χρόνου περίπου στα 3,5 Å. Η απόκλιση που παρατηρείται στη δομή της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική πόζα οφείλεται στο γεγονός ότι το χρησιμοποιούμενο υπολογιστικό πρόγραμμα (Autodock) δεν πραγματοποιεί ενδεδειγμένη προετοιμασία της πρωτεΐνης πριν την πραγματοποίηση του πειράματος μοριακής πρόσδεσης. Επομένως, στα πρώτα ns της προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής, η δομή

Παράγωγο Καφεϊκού Οξέος 33

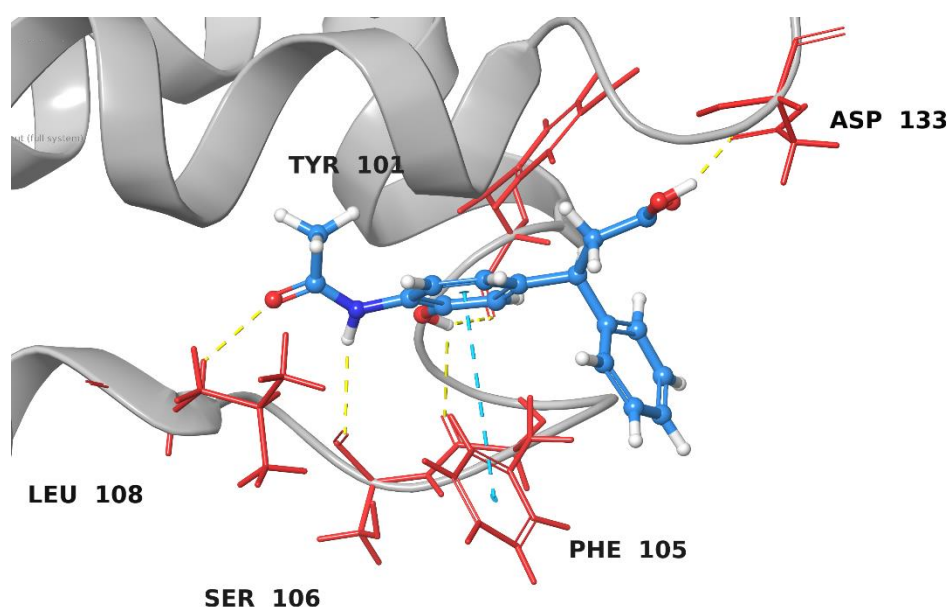


Εικόνα 21: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης και έχοντας ως σημείο αναφοράς την διαμόρφωσή της όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock

της πρωτεΐνης αλλάζει αρκετά έως ότου σταθεροποιηθεί (50ns έως το τέλος της προσομοίωσης).

Με στόχο την περαιτέρω έρευνα της επιλεγμένης πόζας του συμπλόκου ως προς τη σταθερότητά του, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ομαδοποίησης των διαμορφώσεων που προσαρμόζει ο προσδέτης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης (clustering στο MD trajectory). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή “RMSD Based Clustering of Frames από τη τροχιά του Desmond. Επιλέχθηκε να χωριστεί η τροχιά (trajectory) σε δέκα ομάδες με βάση τον χρόνο που ο προσδέτης υιοθετεί την κάθε διαμόρφωση.

Στην **Εικόνα 22** υποδεικνύεται η τριδιάστατη πόζα που προσαρμόζει ο προσδέτης κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του υπολογιστικού χρόνου και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, όπως προέκυψε από την ομαδοποίηση των διαμορφώσεων του κατά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Όπως υποδεικνύεται στην εικόνα το παράγωγο 33 του καφεϊκού οξέος αλληλεπιδρά με την κοιλότητα του ενεργού κέντρου σχηματίζοντας 5 δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Asp133, Tyr101, Leu108, Ser106 και Phe105, ενώ παρατηρείται και π-π επιστίβαξη μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου του μορίου με τον αρωματικό δακτύλιο της Phe105 ενισχύοντας την πρόσδεση.

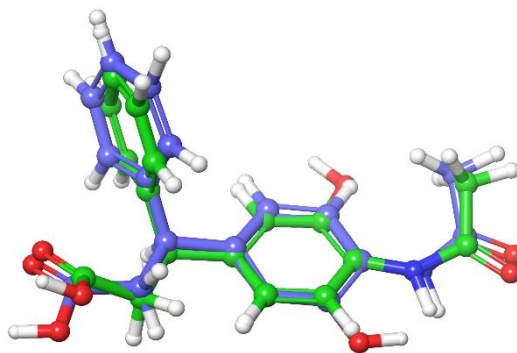


Εικόνα 22: Σταθερότερες αλληλεπιδράσεις παραγώγου CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 46.53% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

Στην **Εικόνα 23** υποδεικνύεται η υπέρθεση δύο διαμορφώσεων του παραγώγου CA33 του καφεϊκού οξέος. Η διαμόρφωση με τον πράσινο σκελετό

είναι η διαμόρφωση του προσδέτη, όπως προέκυψε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, ενώ η διαμόρφωση του προσδέτη με το μπλε σκελετό είναι αυτή που προσαρμόζεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Παρατηρείται ότι οι δύο διαμορφώσεις του προσδέτη δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές κατά την υπέρθεσή τους, ενώ η μεγαλύτερη αλλαγή παρατηρείται στον φαινυλικό δακτύλιο του μορίου, ο οποίος έχει στραφεί ελάχιστα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

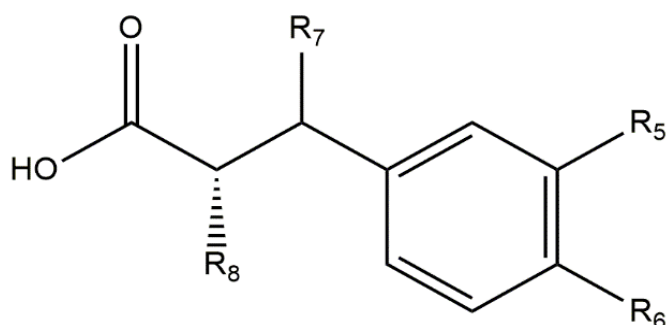
Η μία διαμόρφωση είναι αυτή που παρουσιάζει την ευνοϊκότερη ενέργεια μοριακής πρόσδεσης και η άλλη είναι αυτή που προσαρμόζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό (46.53%) του χρόνου της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.



Εικόνα 23: Υπέρθεση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του CA33 στο 46.53% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

2.1.2. Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Σαλβιανικού οξέος

Τα παράγωγα του σαλβιανικού οξέος σχεδιάστηκαν, έχοντας ως βάση το δομικό σκελετό που απεικονίζεται στην **Εικόνα 24** και αντικαθιστώντας τις ομάδες R₅, R₆, R₇ και R₈ με τις ίδιες ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν στον σχεδιασμό των παραγώγων του σαλβιανικού οξέος, στην προηγούμενη υπό-ενότητα.



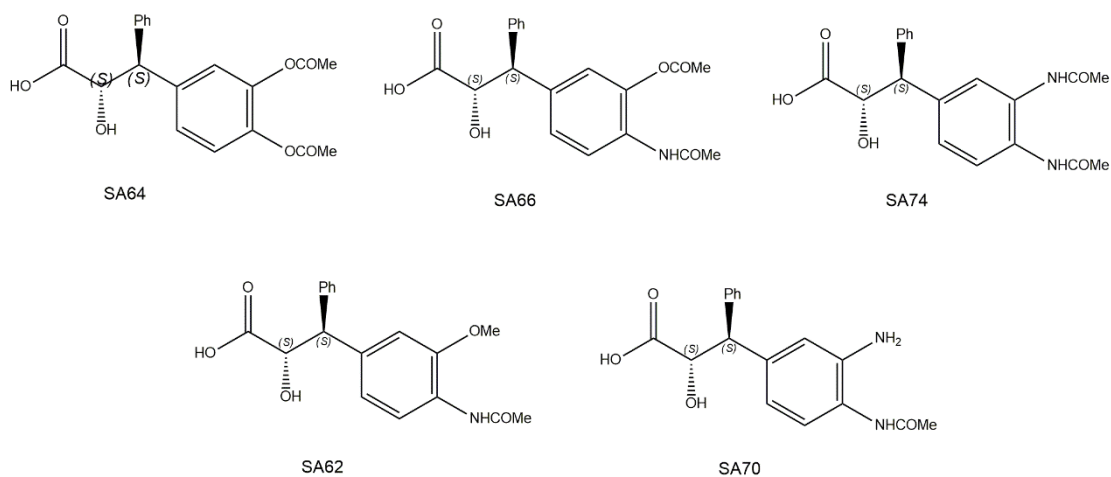
Εικόνα 24: Δομικός σκελετός παραγώγων σαλβιανικού οξέος.

Στον Πίνακα 5, όπως και στη περίπτωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος, παρουσιάζονται κατά αύξουσα ενέργεια πρόσδεσης τα παράγωγα του σαλβιανικού οξέος που προσδέθηκαν ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Ομοίως, η επιλογή τους έγινε με βάση τις ενέργειες ενεργειών πρόσδεσης και οι ενώσεις που επιλέχθηκαν ήταν εκείνες των οποίων η συγγένεια πρόσδεσης (bindingaffinity) είναι χαμηλότερη από -7 kcal/mol.

Πίνακας 5: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων σαλβιανικού οξέος που παρουσιάζουν τις ευνοϊκότερες τιμές συγγένειας πρόσδεσης.

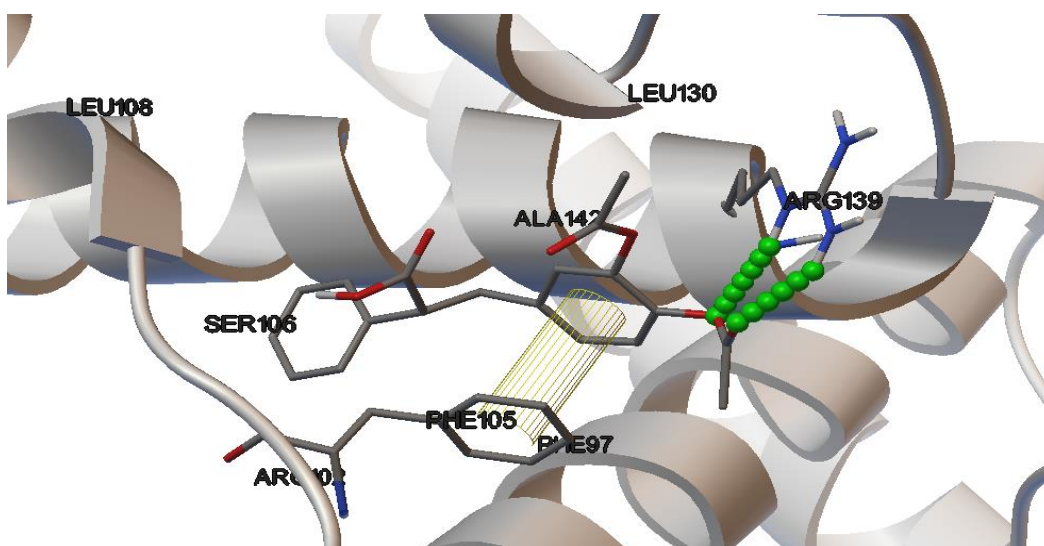
Ένωση	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	BindingAffinity	InhibitionConstant
<i>Salvianicacid</i>	-OH	-OH	-H	-Ph	-4.27±0.5 kcal/mol	748,17±0.5 μM
SA64	-OCOMe	-OCOMe	- Ph	- OH	-7.37±0.5 kcal/mol	3.97±0.5 μM
SA66	-OCOMe	-NHCOMe	- Ph	- OH	-7.2±0.5 kcal/mol	2.86±0.5 μM
SA74	-NHCOMe	-NHCOMe	- Ph	- OH	-7.36±0.5 kcal/mol	4.24±0.5 μM
SA62	-OMe	-NHCOMe	- Ph	- OH	-7.36±0.5 kcal/mol	4.48±0.5 μM
SA70	-NH ₂	-NHCOMe	- Ph	- OH	-7.07±0.5 kcal/mol	6.57±0.5 μM

Στη περίπτωση, του σαλβιανικού οξέος μόνο πέντε παράγωγα εμφάνισαν ευνοϊκότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης σε σχέση με το σαλβιανικό οξύ (-4,27 kcal/mol). Συνολικά, για το σαλβιανικό οξύ, σχεδιάστηκαν 74 παράγωγα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II). Τα πέντε παράγωγα παρουσίασαν ενέργειες πρόσδεσης χαμηλότερες από -7 kcal/mol. (Πίνακας 5). Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται οι δομές των παραγώγων με την ευνοϊκότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Παρατηρείται ότι όλες οι δομές των παραγώγων εμπεριέχουν φαινύλιο, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το φαινύλιο λειτουργεί ως σταθεροποιητικός παράγοντας στο σύμπλοκο της πρωτεΐνης με το εκάστοτε παράγωγο. Επιπλέον, μια από τις δύο, ή και οι δύο ομάδες R₅ και R₆ έχουν αντικατασταθεί από τις N-μέθυλο-ακετάμιδο και μεθόξυ-καρβόνυλο ομάδα, σταθεροποιώντας περισσότερο το «σύστημα» πρωτεΐνη/παράγωγο.



Εικόνα 25: Δομές των παραγώγων του σαλβιανικού οξέος που παρουσίασαν ευνοϊκότερη πρόσδεση στη πρωτεΐνη.

Την ικανοποιητικότερη πρόσδεση στην υδρόφοβη κοιλότητα της Bcl-xL παρουσιάζει το παράγωγο SA64 με ενέργεια πρόσδεσης -7.37 kcal/mol, όπως περιγράφεται και στον **Πίνακα 5**. Η διαμόρφωση με την ευνοϊκότερη ενέργεια πρόσδεσης σταθεροποιείται με δύο δεσμούς υδρογόνου με την ARG139 και μια αλληλεπίδραση π-π με τη PHE105. (**Εικόνα 26**) Το SA66 είναι το παράγωγο με τη δεύτερη ευνοϊκότερη τιμή ενέργειας πρόσδεσης και η πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης σταθεροποιείται με τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα ARG132, ARG139 και GLY138. Δύο δεσμούς υδρογόνου (ARG139, ASN136) και μια αλληλεπίδραση π-π σχηματίζει η ευνοϊκότερη διαμόρφωση του παραγώγου SA74 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcl-xL. Ομοίως, δυο δεσμούς υδρογόνου και μια αλληλεπίδραση π-π σχηματίζει και το παράγωγο SA62, με τα αμινοξέα ARG139, SER106 και PHE105, αντίστοιχα. Από τα πέντε παράγωγα του **Πίνακα 5**, την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης παρουσίασε το SA70, το οποίο σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα ARG139, SER106 και LEY108 και μια αλληλεπίδραση π-π με το αμινοξύ PHE105. Συνοπτικά, οι αλληλεπιδράσεις των παραγώγων με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.



Εικόνα 26: Στιγμιότυπο ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του παραγώγου SA64 και αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

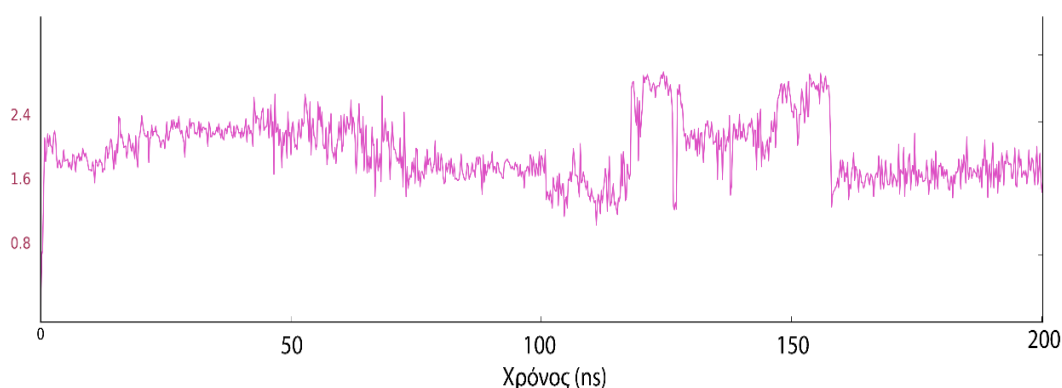
Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων σαβιανικού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Ένωση	Δεσμοί Υδρογόνου	Αλληλεπιδράσεις π-π
SA64	ARG139 (2)	PHE105
SA66	ARG132 ARG139 GLY138	-
SA74	ARG139 (2) ASN136	PHE105
SA62	ARG139 SER106	PHE105
SA70	ARG139 SER106 LEY108	PHE105

Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής του συμπλόκου «πρωτεΐνης-προσδέτη» ($\Delta G_{\text{bind}} = -7.37 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$) υποδεικνύει τη σταθερότητα του συμπλόκου στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Για να επιβεβαιωθεί με μετρήσεις η σταθερότητα

αυτή, μετρήθηκε το RMSD του προσδέτη, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς τις συντεταγμένες της αρχικής πόζας του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (200ns), το παράγωγο του σαλβιανικού οξέος SA64 παραμένει προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL, χωρίς να προσαρμόζεται διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης σ' αυτό. Το αποτέλεσμα αυτό, που δόθηκε από τη μοριακή δυναμική, επιβεβαιώνει ότι το συγκεκριμένο παράγωγο προσδέεται ισχυρά στη πρωτεΐνη, γεγονός που είχε ήδη παρατηρηθεί από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης. Η ευνοϊκότερη πόζα του συμπλόκου «Bcl-xL-παραγώγου SA64» που προήλθε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, θεωρήθηκε ως πόζα αναφοράς, ώστε να μετρηθεί το RMSD των ατόμων του προσδέτη (**Εικόνα 27**). Η πρόσδεση «πρωτεΐνης-παραγώγου» είναι σχετικά σταθερή, καθώς το $RMSD_{(προσδέτη)} < 2.4 \text{ \AA}$, στο

RMSD (Å) του Παραγώγου 64 του Σαλβιανικού Οξέος

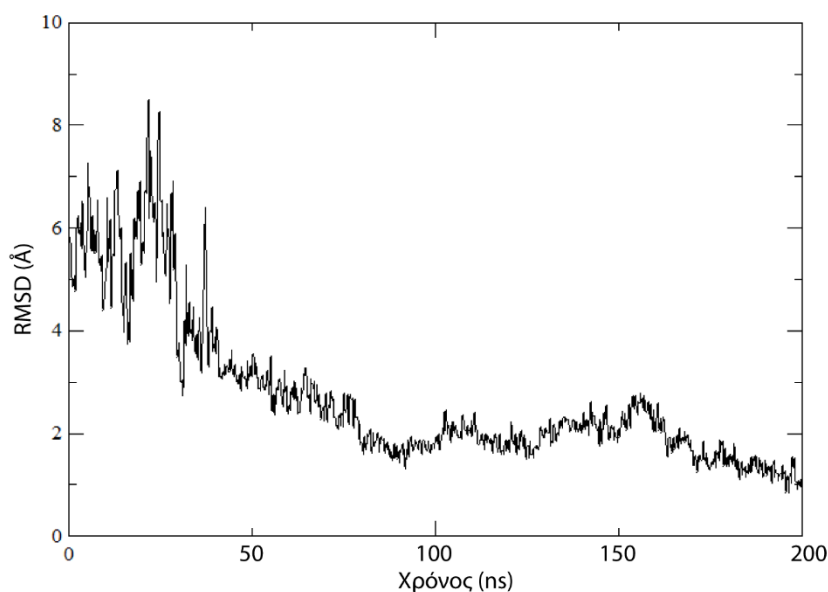


Εικόνα 27: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στα άτομα του προσδέτη.

μεγαλύτερο μέρος της προσομοίωσης.

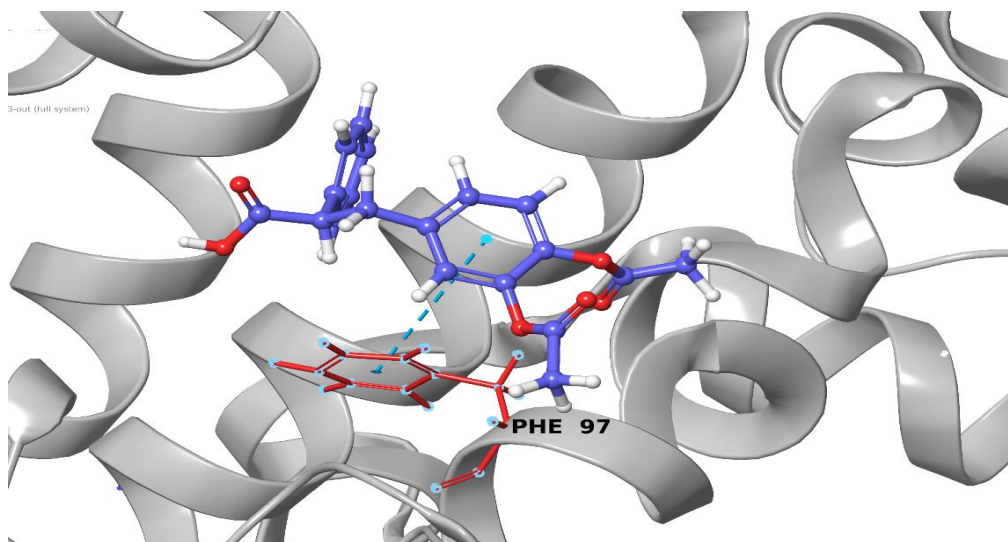
Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 28**) παρατίθεται το διάγραμμα RMSD (Å) της πρωτεΐνης, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς την αρχική δομή της πρωτεΐνης, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης Autodock. Παρατηρείται ότι η αρχική δομή της πρωτεΐνης μεταβάλλεται αρκετά κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (RMSD έως 8.75 (Å)), ενώ κατά τη διάρκεια του υπολογισμού τείνει να σταθεροποιηθεί (2-3 (Å)). Η απόκλιση αυτή της δομής της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική πόζα οφείλεται στο ότι το Autodock δεν πραγματοποιεί ενδεδειγμένη προετοιμασία της πρωτεΐνης πριν την πραγματοποίηση του πειράματος μοριακής πρόσδεσης, επομένως κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής στα πρώτα ns της προσομοίωσης η δομή της πρωτεΐνης μεταβάλλεται σημαντικά.

Παράγωγο Σαλβιανικού Οξέος 64



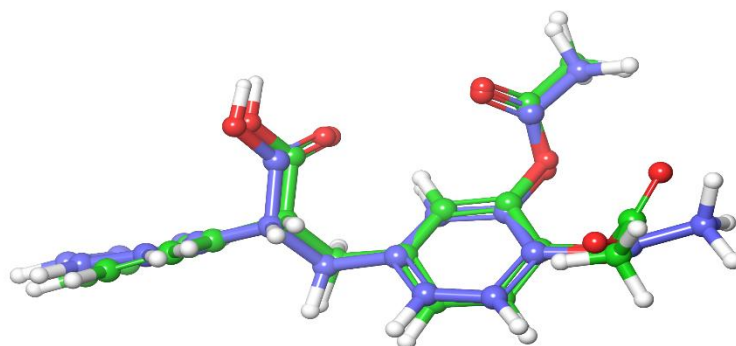
Εικόνα 28: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Cα άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης έχοντας ως σημείο αναφοράς τη διαμόρφωσή της όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης ομαδοποίησης των διαμορφώσεων του προσδέτη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης (clustering στο MD trajectory). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή "RMSD Based Clustering of Frames από τη τροχιά του Desmond, όπως και στη περίπτωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος προηγουμένως. Επιλέχθηκε να χωριστεί η τροχιά (trajectory) σε δέκα ομάδες με βάση τον χρόνο που ο προσδέτης προσαρμόζει την κάθε διαμόρφωση. Στην **Εικόνα 29** παρουσιάζεται η τριδιάστατη πόζα που υιοθετεί ο προσδέτης κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του υπολογιστικού χρόνου, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης Bcl-xL, όπως προέκυψε από την ομαδοποίηση των διαμορφώσεων του κατά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Στην **Εικόνα 26** παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση του παραγώγου SA64 με τη PHE97, σχηματίζοντας μια π-π αλληλεπίδραση.



Εικόνα 29: Σταθερότερη αλληλεπίδραση του παραγώγου CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

Στην **Εικόνα 30** υποδεικνύεται η υπέρθεση δύο διαμορφώσεων του παραγώγου SA64 του σαλβιανικού οξέος. Η διαμόρφωση με τον πράσινο σκελετό είναι η διαμόρφωση του προσδέτη, όπως προέκυψε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, ενώ η διαμόρφωση του προσδέτη με το μπλε σκελετό είναι αυτή που προσαρμόζεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Παρατηρείται ότι οι δύο διαμορφώσεις του προσδέτη παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα κατά την υπέρθεσή τους, ενώ μια μικρή αλλαγή παρατηρείται στους υποκαταστάτες του βενζοϊκού δακτυλίου του μορίου, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετικό προσανατολισμό σε σχέση με την αρχική τους θέση, κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

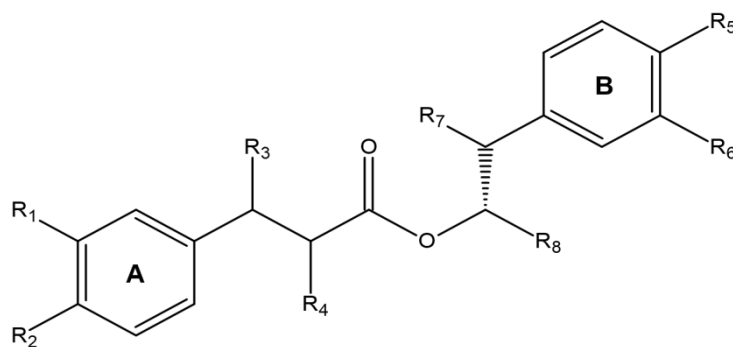


Εικόνα 30: Υπέρθεση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του SA64 στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

Η μία διαμόρφωση είναι αυτή που παρουσιάζει την ευνοϊκότερη ενέργεια μοριακής πρόσδεσης και η άλλη είναι αυτή που υιοθετείται στο μεγαλύτερο ποσοστό (37.62%) του χρόνου της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

2.1.3. Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης και Μοριακής Δυναμικής Παραγώγων Ροσμαρινικού οξέος

Τα παράγωγα που σχεδιάστηκαν, είχαν ως βάση τον δομικό σκελετό της ένωσης του ροσμαρινικού οξέος, ο οποίος απεικονίζεται στην **Εικόνα 31**. Όπως και στις προηγούμενες δύο περιπτώσεις, τα παράγωγα προέκυψαν αντικαθιστώντας τις ομάδες R1 έως R8 με τις τέσσερις ομάδες που αναφέρθηκαν στην αρχή της ενότητας και χρησιμοποιήθηκαν επίσης στον σχεδιασμό των παραγώγων του καφεϊκού και σαλβιανικού οξέος.

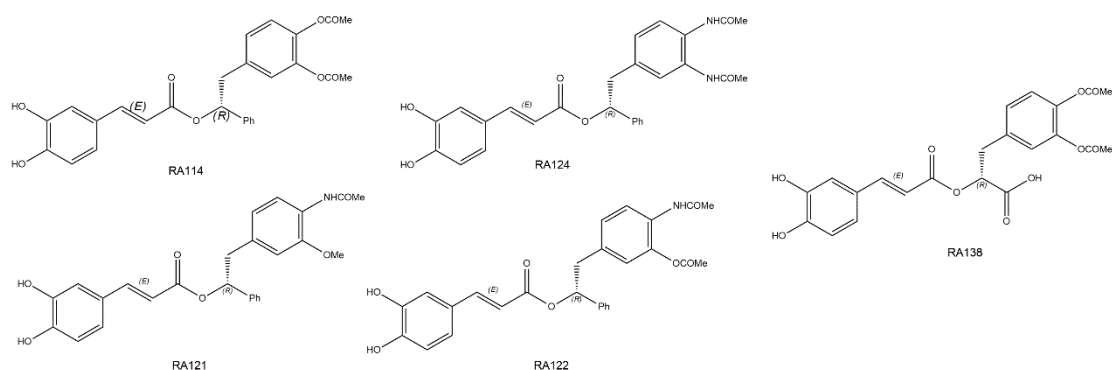


Εικόνα 31: Δομικός σκελετός παραγώγων ροσμαρινικού οξέος.

Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζονται, κατά αύξουσα σειρά, τα αποτελέσματα των τιμών πρόσδεσης, αλλά και των σταθερών αναστολής, των παραγώγων έπειτα από τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης με την πρωτεΐνη Bcl-xL. Όσον αφορά το ροσμαρινικό οξύ, προέκυψαν 147 παράγωγα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III) έπειτα από τροποποιήσεις στο δομικό σκελετό της ένωσης, ενώ στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα 6 με τις ευνοϊκότερες ενέργειες πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Επιλέχθηκαν τα αποτελέσματα με την ευνοϊκότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, δηλαδή εκείνα που διαθέτουν τιμές ενέργειας πρόσδεσης χαμηλότερες από -8 kcal/mol. Σε σχέση με τη τιμή της ενέργειας πρόσδεσης του ροσμαρινικού οξέος, όλα τα παράγωγα υπέδειξαν χαμηλότερες τιμές ενέργειας πρόσδεσης, γεγονός που αποτελεί δείκτη ισχυρότερης πρόσδεσης στην υδρόφοβη κοιλότητα της πρωτεΐνης, έπειτα από τις τροποποιήσεις στη δομή του αρχικού δομικού σκελετού του ροσμαρινικού οξέος. Στην **Εικόνα 32** παρουσιάζονται οι δομές που διαθέτουν ενέργεια πρόσδεσης μικρότερη από -8 kcal/mol.

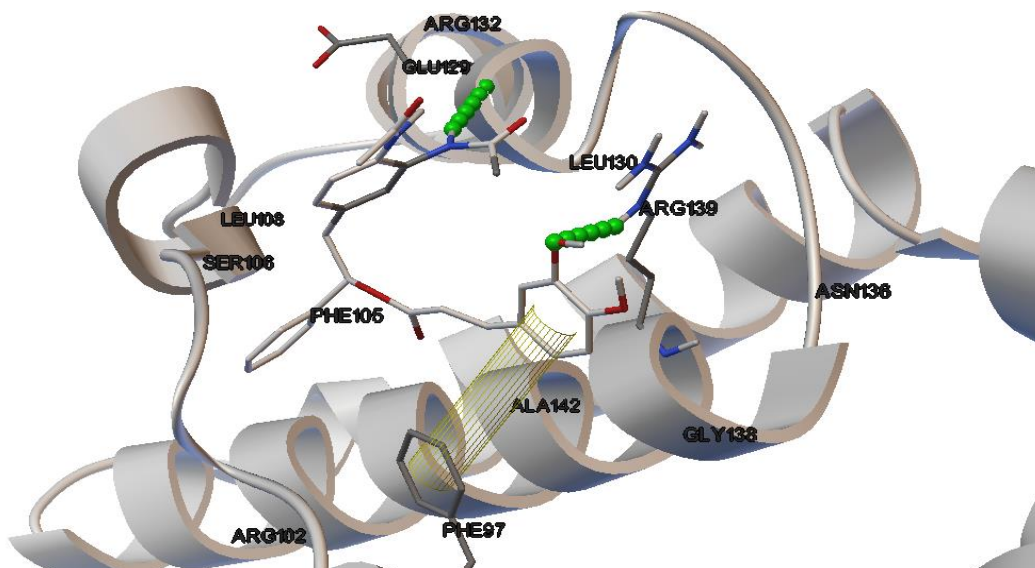
Πίνακας 7: Πίνακας αποτελεσμάτων παραγώγων ροσμαρινικού οξέος που παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές ενέργειας πρόσδεσης.

Ένωση	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	Binding Affinity	Inhibition Constant
Rosmarinic Acid	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	-COOH	- 6.69±0.5 kcal/mol	12.52±0.5 μM
RA124	-OH	-OH	-H	-H	-NHCOMe	-NHCOMe	-H	-Ph	-9.26±0.5 kcal/mol	0.19±0.5 μM
RA121	-OH	-OH	-H	-H	-NHCOMe	-OMe	-H	-Ph	-9.07±0.5 kcal/mol	0.26±0.5 μM
RA138	-OH	-OH	-H	-H	-OOCMe	-OOCMe	-H	-COOH	-9.06±0.5 kcal/mol	0.4±0.5 μM
RA122	-OH	-OH	-H	-H	-NHCOMe	-OOCMe	-H	-Ph	-8.81±0.5 kcal/mol	0.36±0.5 μM
RA114	-OH	-OH	-H	-H	-OOCMe	-OOCMe	-H	-Ph	-8.75±0.5 kcal/mol	0.38±0.5 μM



Εικόνα 32: Δομές παραγώγων ροσμαρινικού οξέος με 5 χαμηλότερες ενέργειες πρόσδεσης.

Παρατηρώντας τις τιμές του **Πίνακα 7**, το παράγωγο που παρουσιάζει την ευνοϊκότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL είναι το RA124 με τιμή ενέργειας πρόσδεσης ίση με -9.26 kcal/mol. Το συγκεκριμένο παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου, με τα αμινοξέα GLU129 και ARG139, και μια αλληλεπίδραση π-π με το αμινοξύ PHE97 της υδρόφοβης αύλακας της πρωτεΐνης, όπου και εντοπίζεται το ενεργό της κέντρο. (Εικόνα 33)



Εικόνα 33: Αλληλεπιδράσεις παραγώγου RA124 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcl-xL.

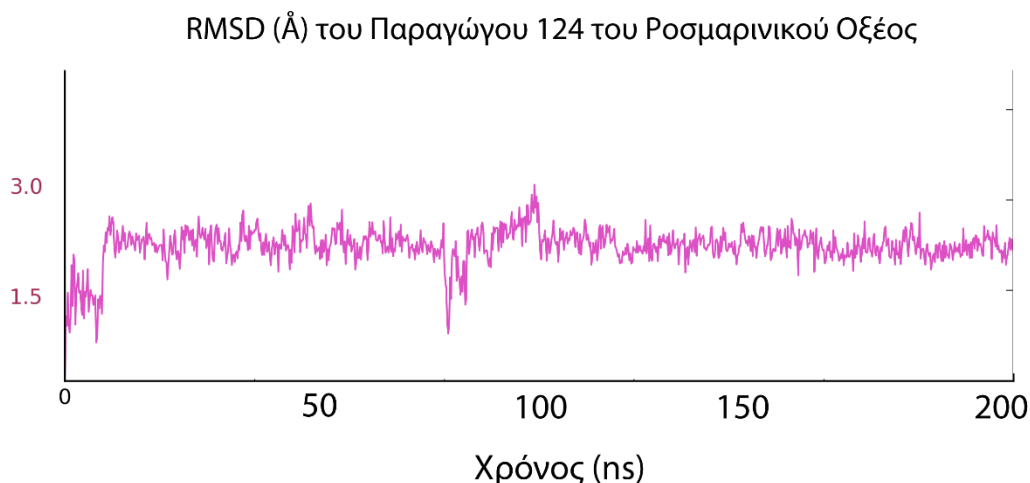
Το παράγωγο με την αμέσως ευνοϊκότερη ενέργεια πρόσδεσης είναι το RA121 (-9.07 kcal/mol), το οποίο σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου (SER106, ARG139, GLY138) και μια αλληλεπίδραση π - π (PHE105) με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Το παράγωγο RA138 σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου, δύο με το αμινοξύ ASP133 (-9.06 kcal/mol) και έναν με την ARG 139, καθώς επίσης και μία αλληλεπίδραση π - π με το αμινοξύ PHE105. Γενικότερα, σχεδόν όλα τα παράγωγα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7, εκτός των RA141 και RA117, σχηματίζουν αλληλεπίδραση π - π με τη PHE105, ενώ σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου κυρίως με τα αμινοξέα ARG139, ARG132, ASP133, LEY108, GLY138. Συνοπτικά, οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αλληλεπιδράσεις παραγώγων ροσμαρινικού οξέος με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Ένωση	Δεσμοί Υδρογόνου	Αλληλεπιδράσεις π - π
RA124	ARG139 GLU129	PHE97
RA121	SER106 ARG139 GLY138	PHE105
RA138	ASP133 (2) ARG139	PHE105
RA122	ARG132	-

RA114	-	PHE105
--------------	---	--------

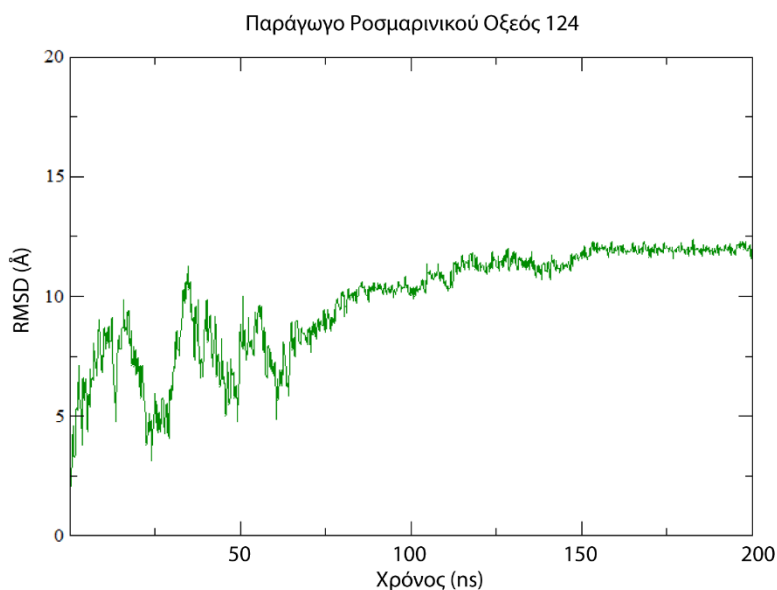
Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής του συμπλόκου «πρωτεΐνης-προσδέτη» ($\Delta G_{bind} = -9.26$ kcal/mol) υποδεικνύει υψηλή σταθερότητα του συμπλόκου στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL. Για να επιβεβαιωθεί με μετρήσεις η σταθερότητα αυτή, μετρήθηκε το RMSD του προσδέτη, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς τις συντεταγμένες της αρχικής πόζας του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (200ns), το παράγωγο του ροσμαρινικού οξέος RA124 παραμένει προσδεμένο στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL, χωρίς να προσαρμόζει διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης. Το αποτέλεσμα της μοριακής δυναμικής, επιβεβαιώνει ότι το συγκεκριμένο παράγωγο προσδέεται ισχυρά στη πρωτεΐνη, παρουσιάζοντας μάλιστα ιδιαίτερη σταθερότητα. Η ευνοϊκότερη πόζα του συμπλόκου «Bcl-xL-παραγώγου RA124» που προήλθε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, θεωρήθηκε ως πόζα αναφοράς, ώστε να μετρηθεί το RMSD των ατόμων του προσδέτη. Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα της **Εικόνας 34**, η πρόσδεση «πρωτεΐνης-παραγώγου» είναι ιδιαίτερα σταθερή, καθώς το $RMSD_{(προσδέτη)} < 3\text{\AA}$, σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 34: Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού της πρωτεΐνης και στα άτομα του προσδέτη.

Στην **Εικόνα 35** παρατίθεται το διάγραμμα RMSD (Å) της πρωτεΐνης, λαμβάνοντας ως σημείο αναφοράς την αρχική δομή της πρωτεΐνης, όπως προέκυψε από το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης Autodock. Παρατηρείται, ότι η αρχική διαμόρφωση της πρωτεΐνης μεταβάλλεται αρκετά στην αρχή της προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής (RMSD έως 12,5 (Å)), ενώ παραμένει σχετικά σταθερή στο μεγαλύτερο ποσοστό του υπολογιστικού χρόνου στην

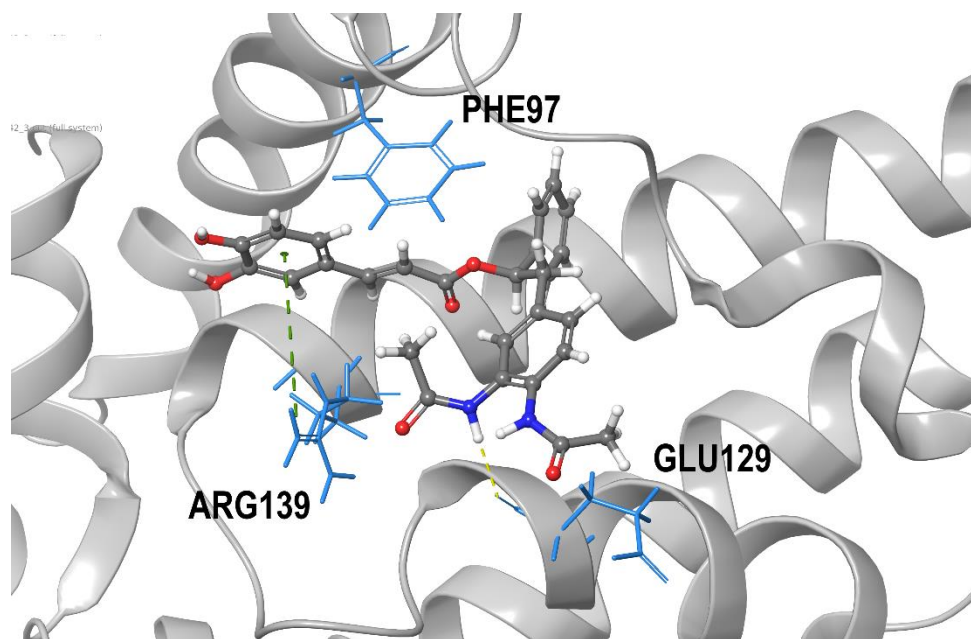
περιοχή των 12,5 Å. Η απόκλιση που παρατηρείται στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική πόζα οφείλεται στο γεγονός ότι το χρησιμοποιούμενο υπολογιστικό πρόγραμμα (Autodock) δεν πραγματοποιεί ενδεδειγμένη προετοιμασία της πρωτεΐνης πριν την πραγματοποίηση του πειράματος μοριακής πρόσδεσης. Επομένως, στα πρώτα ns της προσομοίωσης της μοριακής δυναμικής, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης αλλάζει αρκετά έως ότου σταθεροποιηθεί (50ns έως το τέλος της προσομοίωσης).



Εικόνα 35: Διάγραμμα RMSD της πρωτεΐνης έχοντας ως σημείο αναφοράς τη δομή της, όπως προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση με το πρόγραμμα AutoDock.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης ομαδοποίησης των διαμορφώσεων που υιοθετεί ο προσδέτης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης (clustering στο MD trajectory). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή “RMSD Based Clustering of Frames από τη τροχιά του Desmond.. Επιλέχθηκε να χωριστεί η τροχιά (trajectory) σε δέκα ομάδες με βάση τον χρόνο που ο προσδέτης προσαρμόζει την κάθε διαμόρφωση.

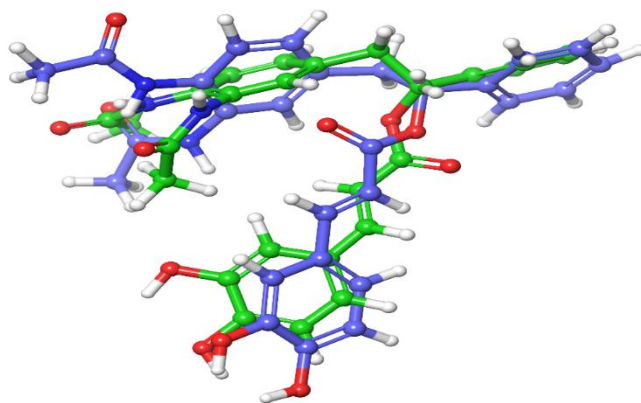
Στην **Εικόνα 36** υποδεικνύεται η τριδιάστατη πόζα που προσαρμόζει ο προσδέτης κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του υπολογιστικού χρόνου και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, όπως προέκυψε από την ομαδοποίηση των διαμορφώσεων του κατά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Όπως υποδεικνύεται στην εικόνα το παράγωγο 124 του ροσμαρινικού οξέος αλληλεπιδρά με την κοιλότητα του ενεργού κέντρου σχηματίζοντας μια π-π αλληλεπίδραση με το αμινοξύ ARG139, ενισχύοντας την πρόσδεση.



Εικόνα 36: Σταθερότερη αλληλεπίδραση του παραγώγου CA33 - ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

Στην **Εικόνα 37** παρουσιάζεται η υπέρθεση δύο διαμορφώσεων του παραγώγου RA33 του ροσμαρινικού οξέος. Η διαμόρφωση με τον πράσινο σκελετό είναι η διαμόρφωση του προσδέτη, όπως προέκυψε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης, ενώ η διαμόρφωση του προσδέτη με το μπλε σκελετό είναι αυτή που προσαρμόζεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Παρατηρείται ότι η διαμόρφωση του προσδέτη που υιοθετείται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης μοριακής δυναμικής φαίνεται να παρουσιάζει μικρή διαμορφωτική αλλαγή, συγκριτικά με αυτή που προέκυψε από το πείραμα μοριακής πρόσδεσης. Σύμφωνα με την **Εικόνα 36**, οι δακτύλιοι του παραγώγου έχουν στραφεί ελάχιστα και παρουσιάζουν μια μικρή κλίση σε σχέση με τη διαμόρφωση που προέκυψε από τη μοριακή πρόσδεση. Επίσης, παρατηρείται αλλαγή και στη πόζα του σκελετού της ένωσης, καθώς η ανθρακική αλυσίδα μεταξύ των δακτυλίων και οι υποκαταστάτες του δακτυλίου B παρουσιάζουν διαφορετικό προσανατολισμό.

Η μία διαμόρφωση είναι αυτή που παρουσιάζει την ευνοϊκότερη ενέργεια μοριακής πρόσδεσης και η άλλη είναι αυτή που υιοθετείται στο μεγαλύτερο ποσοστό (37.62%) του χρόνου της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.



Εικόνα 37: Υπέρθεση ευνοϊκότερης διαμόρφωσης του CA33 που προήλθε από τη μοριακή πρόσδεση με τη διαμόρφωση του SA64 στο 37.62% του χρόνου προσομοίωσης μοριακής

2.1.4. Συμπεράσματα Πειραμάτων

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στη προηγούμενη ενότητα, όσον αφορά τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων καφεϊκού, σαλβιανικού και ροσμαρινικού οξέος στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης Bcl-xL προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Τα παράγωγα τα οποία τροποποιήθηκαν προσθέτοντας στο σκελετό της δομής τους φαινύλιο (-Ph), μεθόξυ-καρβονυλομάδα (-OOCMe) και N-μέθυλο-ακετάμιδο ομάδα (-NHCOMe), όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενη ενότητα, έδειξαν ευνοϊκότερη πρόσδεση στην υδρόφοβη κοιλότητα της πρωτεΐνης-υποδοχέα. Παρατηρώντας τους Πίνακες 3, 5 και 7 των αποτελεσμάτων είναι εμφανές ότι τα παράγωγα με τις χαμηλότερες ενέργειες πρόσδεσης ανά κατηγορία φέρουν αυτές τις ομάδες στη δομή τους.
- ✓ Οι ενώσεις που προέκυψαν έπειτα από την τροποποίηση των ενώσεων: καφεϊκό, σαλβιανικό και ροσμαρινικό οξύ, έδειξαν να προσδένονται ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο της Bcl-xL, σε σχέση με τις αρχικές τρεις ενώσεις. Μάλιστα, οι ενώσεις που έδειξαν να παρουσιάζουν ισχυρότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, ανήκουν στην κατηγορία παραγώγων που προέκυψαν από την τροποποίηση του ροσμαρινικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα το παράγωγο RA124 παρουσίασε την ικανοποιητικότερη πρόσδεση με ενέργεια -9.26 kcal/mol και σταθερά αναστολής 0.19 μ M.

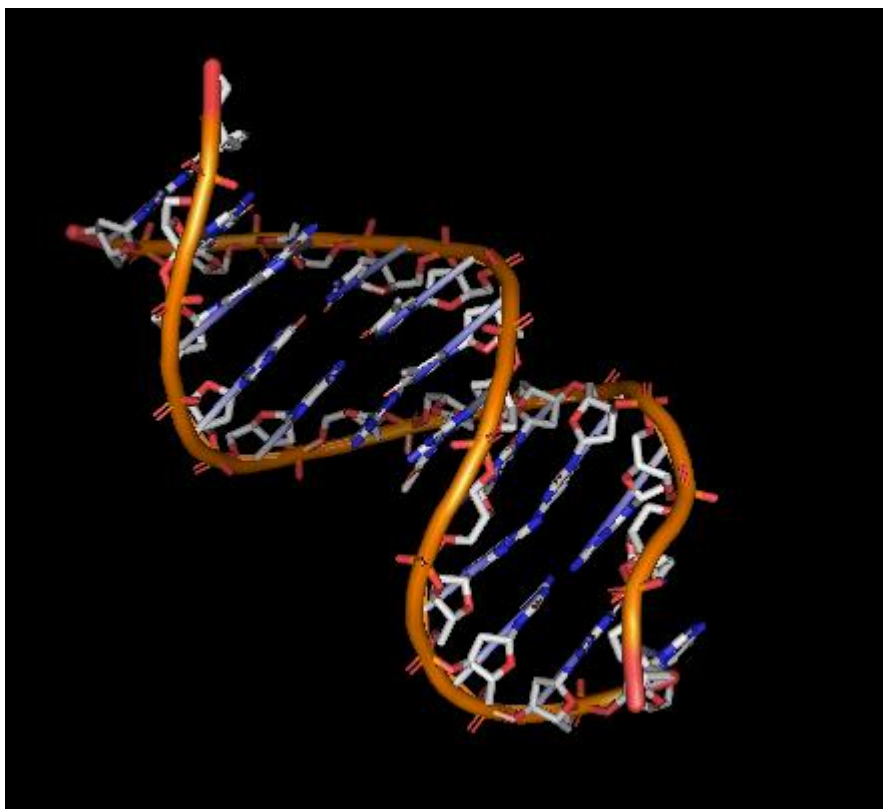
- ✓ Όσον αφορά τα παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος, παρατηρώντας τον Πίνακα 7, γίνεται αντιληπτό ότι τις ευνοϊκότερες ενέργειες πρόσδεσης, και κατ' επέκταση την ικανοποιητικότερη πρόσδεση, εμφανίζουν οι ενώσεις που έχουν τροποποιηθεί από τη πλευρά του δακτυλίου Β της ένωσης. (Εικόνα 20) Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις που φέρουν μεθόξυ-καρβονυλομάδα (-OOCMe) και N-μέθυλο-ακετάμιδο ομάδα (-NHCOMe) στον δακτύλιο Β της ένωσης καθώς επίσης και φαινύλιο προσδένονται ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο αλληλεπιδρώντας ισχυρά με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης, λόγω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων π-π.
- ✓ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής δυναμικής, τα παράγωγα που προσδένονται ισχυρότερα, όπως προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης, των τριών αρχικών ενώσεων (σαλβιανικό οξύ, καφεϊκό οξύ και ροσμαρινικό οξύ) παρουσιάζουν ιδιαίτερη σταθερότητα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα της Bcl-xL και παραμένουν στο εσωτερικό της κοιλότητας καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. Οι διαμορφώσεις τους παρουσιάζουν μικρή απόκλιση σε σχέση με τις αρχικές που προέκυψαν από τη μοριακή πρόσδεση, ενώ οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου που προβλέφθηκαν από τη μοριακή πρόσδεση διατηρούνται κατά την προσομοίωση μοριακής δυναμικής.

Είναι σαφές από τα γενικά αυτά συμπεράσματα ότι η φύση προέβη στη σύνθεση του ροσμαρινικού οξέος από το καφεϊκό και σαλβιανικό ώστε να βελτιστοποιήσει την αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη Bcl-xL.[50] Έτσι, το ίδιο, καθώς και τα παράγωγά του παρουσιάζουν ευνοϊκότερη συγγένεια πρόσδεσης συγκριτικά με τα δύο συστατικά του, καφεϊκό και σαλβιανικό. Επομένως, ένας μελλοντικός σχεδιασμός μορίων, τα οποία παρουσιάζουν βιολογική δράση στην πρωτεΐνη Bcl-xL θα πρέπει να αναζητηθεί από το ροσμαρινικό οξύ, και όχι το καφεϊκό ή σαλβιανικό.

Τα αποτελέσματα αυτά φυσικά δεν εκπλήσσουν καθώς μόρια μοριακού βάρους με αυξημένο αριθμό λειτουργικών ομάδων, έχουν περισσότερες πιθανότητες για ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις. Η φύση λοιπόν καθοδηγείται στη σύνθεση περιπλοκότερων ενώσεων, έχοντας ως οδηγό ότι τα ενεργά κέντρα δράσης των μορίων θα είναι ισχυρότεροι αποδέκτες και επομένως η συγγένεια πρόσδεσης θα είναι αυξημένη.

2.2. Αποτελέσματα Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης των Τριών Συμπλόκων του Ν-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικού οξέος με Χαλκό, Ψευδάργυρο και Κάδμιο

Τα σύμπλοκα των τριών μετάλλων, που εξετάστηκαν ως προς τη πρόσδεση τους σε μόριο δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος θύμου αδένου (CT-DNA), και πιο συγκεκριμένα στο δωδεκαμερές μόριο DNA με PDBID: 1BNA [64], συντέθηκαν και κρυσταλλώθηκαν από την ερευνητική ομάδα του κ. Ιωάννη Μαρκόπουλου. Το συγκεκριμένο δωδεκαμερές επιλέχθηκε μεταξύ άλλων 19 δομών DNA, οι οποίες εξετάστηκαν ως προς τη πρόσδεση του συμπλόκου του χαλκού και συγκρίθηκαν οι τιμές πρόσδεσής τους με τις τιμές της δομής με PDBID: 1BNA (Εικόνα), η οποία παρουσίασε και τα πιο συμβατά αποτελέσματα με τα πειραματικά (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III) Το γεγονός αυτό, επιβεβαιώνει την ευρεία χρήση της συγκεκριμένης δομής σε πειράματα υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης σε DNA.[65, 66]



Εικόνα 38: Τριδιάστατη δομή μορίου DNA με PDB ID: 1BNA.

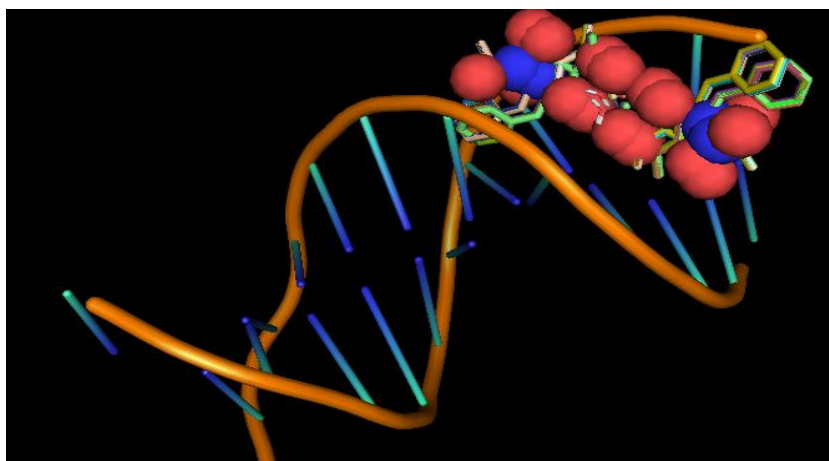
Τα πειράματα υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης του μορίου DNA με το κάθε σύμπλοκο διενεργήθηκαν τρεις φορές για το κάθε σύμπλοκο, και οι τιμές ενέργειας πρόσδεσης προκύπτουν από τον μέσο όρο των τιμών του κάθε υπολογισμού. Στη συγκεκριμένη ενότητα πειραμάτων, τα σύμπλοκα δεν εξετάστηκαν μόνο ως προς το αν προσδένονται στο μόριο του DNA, αλλά και

ως προς τη θέση πρόσδεσής τους. Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται οι τιμές ενέργειας πρόσδεσης των υπολογισμών της συγκεκριμένης ενότητας, καθώς επίσης και οι σταθερές αναστολής για τα πειράματα αυτά. Εδώ, οι σταθερές αναστολής υποδεικνύουν αρκετά ισχυρή πρόσδεση στο μόριο του DNA.

Πίνακας 9: Τιμές ενέργειας πρόσδεσης, σταθερών αναστολής και αριθμοί CCDC για τα τρία σύμπλοκα μετάλλων με το N-ακετυλο-3-ακυλο-5-αρυλιδενοτετραμικό οξύ.

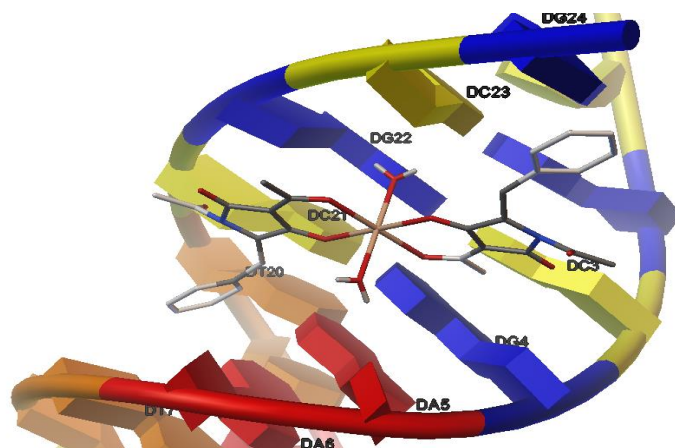
Σύμπλοκα DNA/DNA- παρεμβολέων	Αριθμοί CCDC	Ενέργεια Πρόσδεσης	Σταθερά k_b
<i>IBNA/Cd-complex</i>	1871745	-9.99±0.5 kcal/mol	$(1.31 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
<i>IBNA/Zn-complex</i>	965493	-8.19±0.5 kcal/mol	$(9.2 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
<i>IBNA/Cu-complex</i>	1837232	-8.01±0.5 kcal/mol	$(7.3 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

Μετά το πέρας των υπολογισμών, το σύμπλοκο που παρουσίασε την ευνοϊκότερη πρόσδεση στο μόριο του DNA ήταν εκείνο του καδμίου, με ενέργεια πρόσδεσης -9,99 kcal/mol. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο, έπειτα από τις τρεις επαναλήψεις υπολογισμών, έδειξε να προσδένεται σε ένα συγκεκριμένο σημείο του μορίου. Η **Εικόνα 39** απεικονίζει όλες τις διαμορφώσεις που προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης (30 διαμορφώσεις).



Εικόνα 39: Σύνολο 30 διαμορφώσεων του συμπλόκου του καδμίου, όπως προσδέθηκαν στη δίκλινη έλικα του μορίου DNA.

Όλες οι διαμορφώσεις παρεμβάλλονται σε ένα συγκεκριμένο μέρος στη μικρή αύλακα του μορίου του DNA, μεταξύ των βάσεων 3'-T₂₀C₂₁G₂₂C₂₃-5' και 5'-T₇A₆A₅G₄C₃-3' στο δίκλωνο μόριο (Εικόνα 40). Στην εικόνα παρατηρούνται μικρές διαμορφωτικές αλλαγές μεταξύ των διαμορφώσεων.

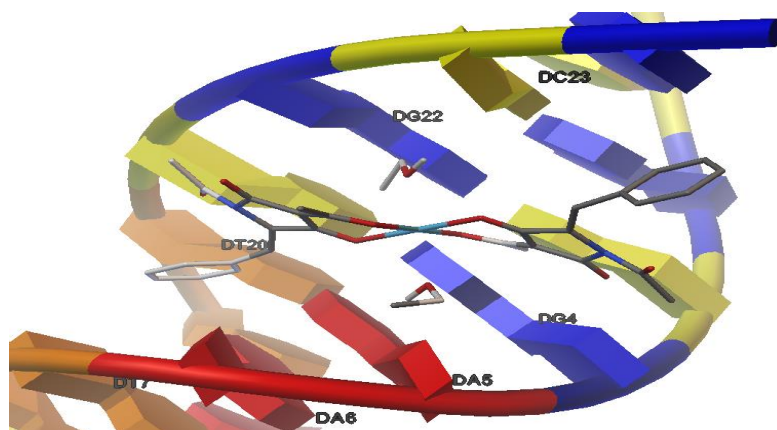


Εικόνα 40: Στιγμιότυπο καλύτερης διαμόρφωσης συμπλόκου του καδμίου στο μόριο DNA.

Η σταθερά αναστολής (k_i) για το συγκεκριμένο σύμπλοκο υπολογίστηκε από το πρόγραμμα, κατά μέσο όρο από τα τρία πειράματα, στα $0,759 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

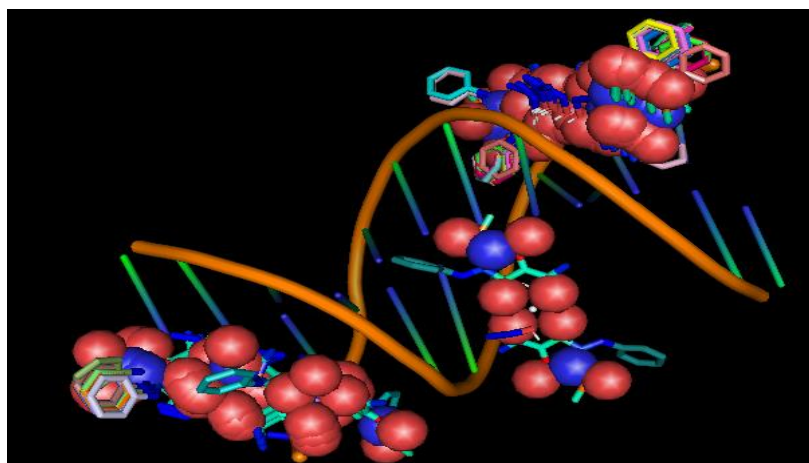
Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν ένα μόριο συνδέεται στο DNA και η σταθερά σχηματισμού (k_b) υπολογίζεται σε ένα εύρος τιμών από 10^5 έως και 10^{11} , τότε η σύνδεση πιθανότατα γίνεται με παρεμβολή. [67] Σε προηγούμενη ενότητα, αναφέρθηκε ότι η σταθερά αναστολής (k_i) είναι αντίστροφη της k_b , έτσι, με ένα γρήγορο υπολογισμό η τιμή της σταθεράς k_b υπολογίστηκε στα $(1.31 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο πιθανότατα παρεμβάλλεται στο μόριο DNA. Στο εργαστήριο του κ. Μεθενίτη, βρέθηκε πειραματικά, από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Παππά Χριστόφορο, η σταθερά σύνδεσης k_b του συμπλόκου του ψευδαργύρου σε μόριο DNA θύμου αδένος. Η τιμή της υπολογίστηκε στα $4,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από τη σταθερά, όπως υπολογίστηκε από το λογισμικό AutoDock. Η διαφορά στη τιμή πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες, των πειραμάτων *in vitro* και *in silico*, αντίστοιχα, καθώς στη δεύτερη περίπτωση όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο το πρόγραμμα χρησιμοποιεί κάποιους «τυχαίους» (random) υπολογισμούς. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις οι μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο παρεμβάλλεται στο μόριο του DNA, καθώς η τάξη μεγέθους της σταθεράς κυμαίνεται από 10^5 M^{-1} έως 10^{11} M^{-1} .

Το σύμπλοκο του ψευδαργύρου είναι το επόμενο με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης. Η τιμή της υπολογίστηκε από το πρόγραμμα στα -8.19 ± 0.5 kcal/mol κατά μέσο όρο. Στην **Εικόνα 41** παρουσιάζεται η περιοχή στην οποία προσδένεται η διαμόρφωση του συμπλόκου με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης. Η περιοχή είναι ίδια με τη περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου του καδμίου στη προηγούμενη περίπτωση, μεταξύ των βάσεων 3'- A₁₉T₂₀G₂₂C₂₃-5' και 5'-T₇A₆A₅G₄-3'.



Εικόνα 41: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του συμπλόκου του ψευδαργύρου με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης.

Με χρήση του προγράμματος PyMol προέκυψε η **Εικόνα 42**, στην οποία απεικονίζεται η δομή του DNA με όλες τις διαμορφώσεις του συμπλόκου του ψευδαργύρου. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα, στην περίπτωση αυτή η θέση πρόσδεσης του συμπλόκου στο δίκλωνο μόριο δεν είναι σταθερή. Το σύμπλοκο παρουσιάζεται να προσδένεται και σε δύο άλλα σημεία, όμως οι περισσότερες δομές (21 από τις 30) εμφανίζονται να αλληλεπιδρούν ισχυρά στην ίδια περιοχή με αυτή που αλληλεπιδρά το σύμπλοκο του καδμίου. Παρατηρώντας την εικόνα, το σύμπλοκο προσδένεται κυρίως στις μικρές

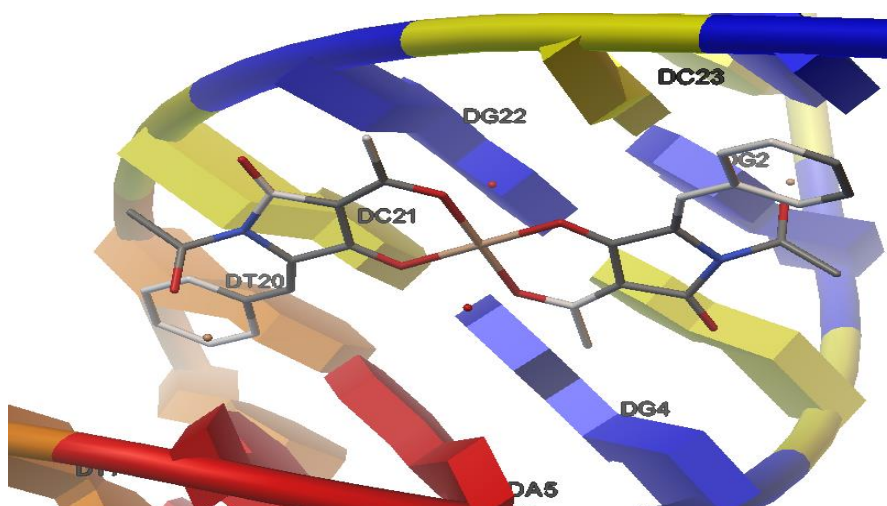


Εικόνα 42: Σύνολο διαμορφώσεων του συμπλόκου του ψευδαργύρου, όπως προσδέθηκαν στη δίκλινη έλικα του μορίου DNA.

αύλακες του μορίου, και μόνο μία δομή από τις τριάντα που προέκυψαν από τους τρεις υπολογισμούς, προσδέθηκε στη μεγάλη αύλακα.

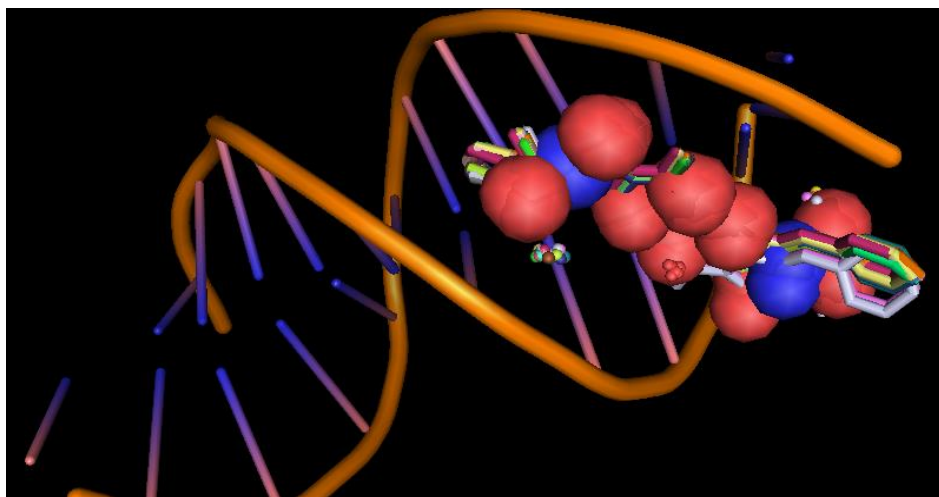
Η σταθερά αναστολής, όπως υπολογίστηκε από το AutoDock, παρουσιάζει την τιμή $1.084 \pm 0.5 \mu\text{M}$ κατά μέσο όρο, υποδηλώνοντας ικανοποιητική παρεμβολή στη μικρή αύλακα της δίκλωνης έλικας ($k_b=(9.2 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει έπειτα από σύγκριση με τις πειραματικές τιμές, οι οποίες υποδηλώνουν παρεμβολή σε για το εύρος τιμών $k_b 10^5\text{-}10^{11} \text{ M}^{-1}$. [67] Η σταθερά σύνδεσης k_b υπολογίστηκε πειραματικά από τον Αλέξανδρο Μαγιάκο στο εργαστήριο του κ. Μεθενίτη και η τιμή της ισούται με $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, ίδια τάξη μεγέθους με τις *insilico* μελέτες. Και στις δύο διαφορετικές μελέτες προκύπτει ότι το είδος αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA είναι η παρεμβολή, αποτέλεσμα ενθαρρυντικό στη διαδικασία κατανόησης του τρόπου/«μηχανισμού» αλληλεπίδρασης των δύο μορίων.

Τη χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης παρουσίασε το σύμπλοκο του χαλκού μετά τη παρεμβολή του στο μόριο του DNA. Μετά τον υπολογισμό, η συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity) υπολογίστηκε στα $-8.01 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$. Η διαμόρφωση με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης φαίνεται να προτιμάει τη παρεμβολή στο ίδιο μέρος της δίκλωνης έλικας του DNA, όπου παρεμβάλλονται και οι διαμορφώσεις με τη χαμηλότερη ενέργεια για τα άλλα δύο σύμπλοκα, του καδμίου και του ψευδαργύρου, στους προηγούμενους υπολογισμούς. Στην **Εικόνα 43** παρουσιάζεται το σημείο πρόσδεσης της διαμόρφωσης με τη χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης για το σύμπλοκο του χαλκού. Και σε αυτή τη περίπτωση το σύμπλοκο προτιμάει τη παρεμβολή στη μικρή αύλακα του μορίου του DNA.



Εικόνα 43:Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του συμπλόκου του χαλκού με την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης.

Προκειμένου να εξακριβωθεί η θέση πρόσδεσης του συμπλόκου στη δίκλωνη έλικα του DNA, έγινε χρήση του προγράμματος PyMol. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών πρόσδεσης έδειξαν ότι το σύμπλοκο παρεμβάλλεται σε συγκεκριμένη θέση στη μικρή αύλακα στο δίκλωνο μόριο με πολύ μικρές διαμορφωτικές αλλαγές. (Εικόνα 44)



Εικόνα 44: Σύνολο διαμορφώσεων του συμπλόκου του χαλκού όπως προσδέθηκαν στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου.

Η σταθερά αναστολής για το συγκεκριμένο σύμπλοκο φέρει επίσης χαμηλή τιμή ($1.37 \pm 0.5 \mu\text{M}$) υποδηλώνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση του συμπλόκου του χαλκού με τις βάσεις της δίκλωνης έλικας του μορίου DNA ($k_b = (7.3 \pm 0.5) \times 10^5 \text{M}^{-1}$). Το σύμπλοκο φαίνεται να παρεμβάλλεται στη μικρή αύλακα, συμπέρασμα το οποίο προκύπτει έπειτα από σύγκριση με πειραματικές τιμές, οι οποίες υποδηλώνουν παρεμβολή για το εύρος τιμών $k_b = 10^5 - 10^{11} \text{M}^{-1}$. [67] Και για αυτή τη περίπτωση στο εργαστήριο του κ. Μεθενίτη υπολογίστηκε πειραματικά η σταθερά σύνδεσης από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ραφαηλία Παππά. Η τιμή της βρέθηκε $5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, μία τάξη μεγέθους πιο κάτω από τη τιμή της σταθεράς k_b που υπολογίστηκε από τη σταθερά k_i , όπως υπολογίστηκε από το AutoDock.

2.2.1. Συμπεράσματα πειραμάτων

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης των τριών συμπλόκων μετάλλων, καδμίου, ψευδαργύρου και χαλκού, στο μόριο DNA θύμου αδένος μόσχου (CT-DNA), προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Τα τρία σύμπλοκα έδειξαν να παρεμβάλλονται στο μόριο DNA σε ικανοποιητικό βαθμό και παρουσίασαν αρκετά χαμηλές ενέργειες

πρόσδεσης, με το σύμπλοκο του καδμίου να κατέχει τη χαμηλότερη τιμή (-9.99 Kcal/mol).

- ✓ Οι σταθερές σχηματισμού, οι οποίες αποτελούν κριτήριο για την ισχύ της πρόσδεσης του εκάστοτε συμπλόκου στον αντίστοιχο υποδοχέα DNA, φέρουν ικανοποιητικά υψηλές τιμές υποδηλώνοντας ότι η παρεμβολή των τριών συμπλόκων στο DNA είναι ισχυρή/σταθερή. Στο μέλλον ίσως ελεγχθούν και με μοριακή δυναμική, με σκοπό τον περαιτέρω έλεγχο της σταθερότητας τους.
- ✓ Συγκρίνοντας τις τιμές k_b που υπολογίστηκαν μέσω της τιμής k_i που προέκυψε από το πρόγραμμα AutoDock για το κάθε σύμπλοκο, και τις τιμές k_b , οι οποίες προέκυψαν από πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι οι υπολογιστικές μελέτες έρχονται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα συνδέονται με το DNA πιθανώς με παρεμβολή. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο του ψευδαργύρου φέρει τιμή k_b τάξης πειραματικά και υπολογιστικά, ενώ για τα άλλα δύο σύμπλοκα οι πειραματικές τιμές είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερη από τις τιμές της υπολογιστικής μελέτης, χωρίς αυτή η διαφορά να κρίνεται αξιοσημείωτη. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι πειραματικές και οι υπολογιστικές τιμές της k_b για τα τρία σύμπλοκα.

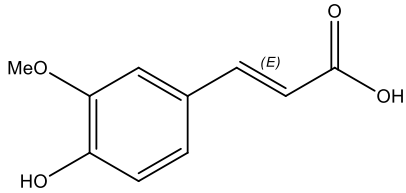
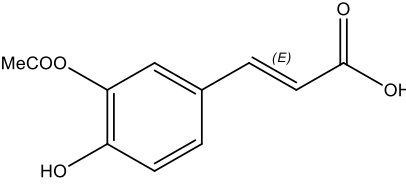
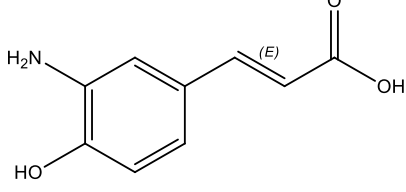
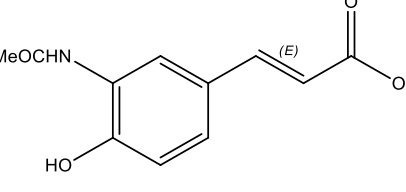
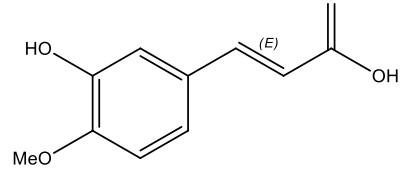
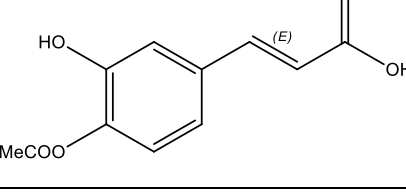
Πίνακας 10: Τιμές σταθεράς k_b υπολογιστικής και πειραματικής μελέτης.

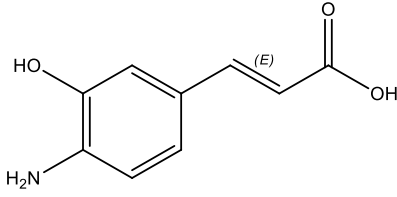
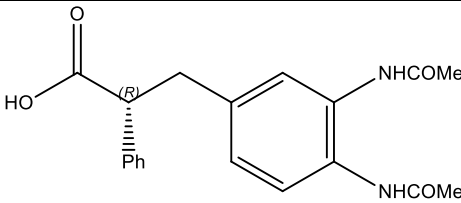
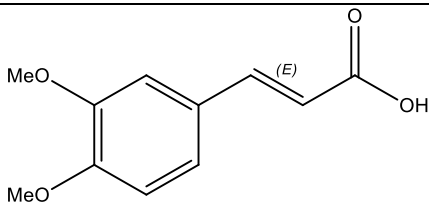
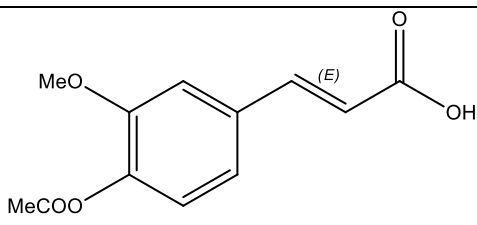
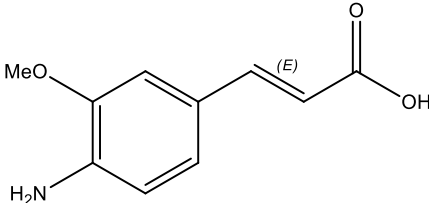
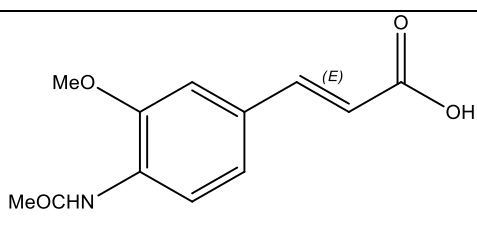
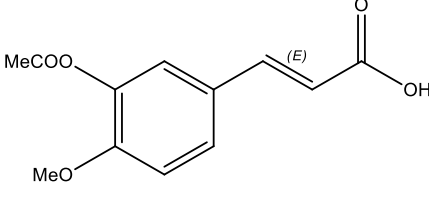
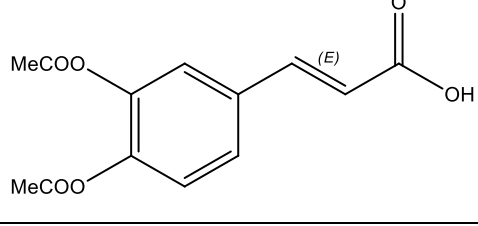
Σύμπλοκα DNA/DNA- παρεμβολέων	Σταθερά k_b Υπολογιστικής Μελέτης	Σταθερά k_b Πειραματικής Μελέτης
IBNA/Cd-complex	$(1.31 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$4,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
IBNA/Zn-complex	$(9.2 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
IBNA/Cu-complex	$(7.3 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

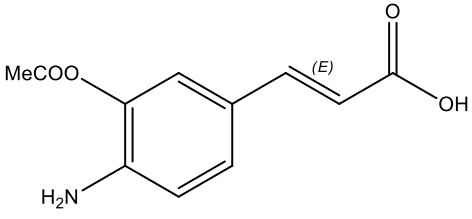
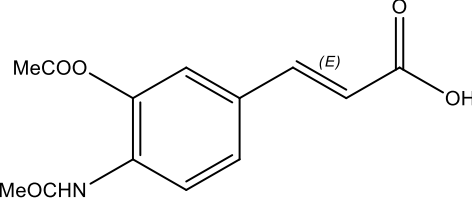
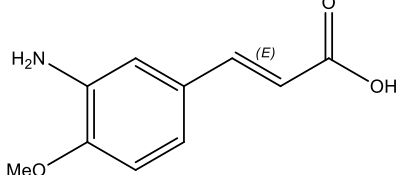
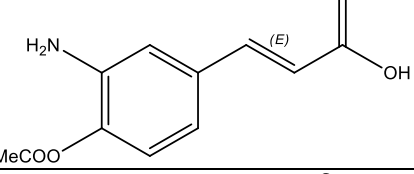
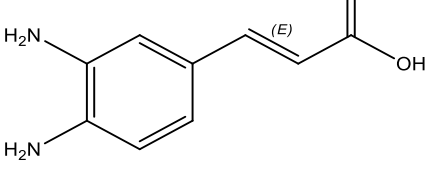
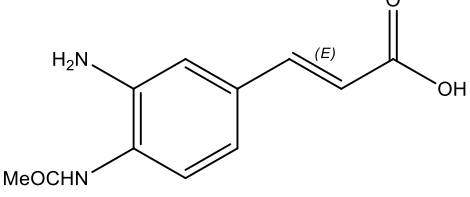
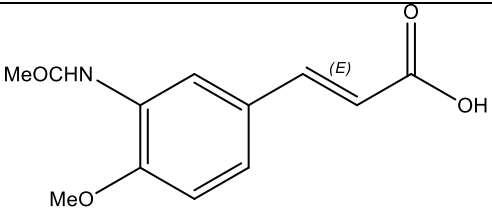
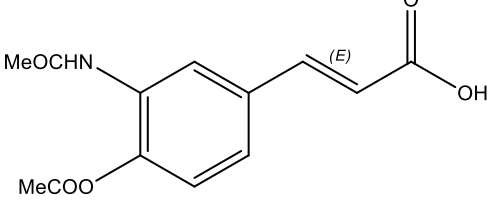
- ✓ Όσον αφορά τις θέσεις πρόσδεσης των συμπλόκων πάνω στο μόριο του DNA, τα τρία σύμπλοκα φαίνεται να προτιμούν κυρίως μια συγκεκριμένη θέση στη δίκλινη έλικα. Η θέση αυτή βρίσκεται μεταξύ των βάσεων 3'-T₂₀C₂₁G₂₂C₂₃G₂₄-5' και 5'-T₇A₆A₅G₄C₃G₂-3' στη δίκλινη έλικα. Ωστόσο, το σύμπλοκο του ψευδαργύρου έδειξε να προτιμάει, σε ένα ποσοστό της τάξεως του 26,67%, τη παρεμβολή σε ένα άλλο σημείο της δίκλινης έλικας, μεταξύ των βάσεων 3'-G₁₄C₁₅G₁₆-5' και 5'-G₁₂C₁₁C₁₀-3'. Το γεγονός αυτό προέκυψε έπειτα από αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με χρήση του προγράμματος PyMol, καθώς οπτικοποιήθηκε η δομή του DNA με όλες τις διαμορφώσεις του εκάστοτε

συμπλόκου, που προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης.

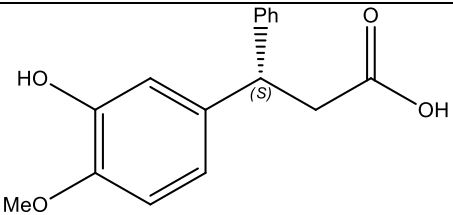
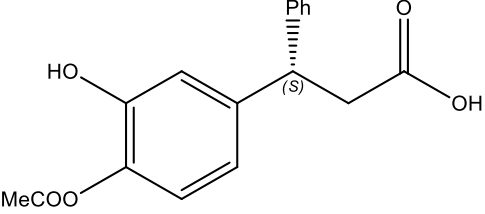
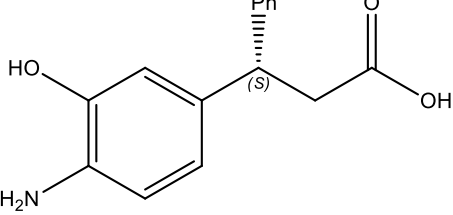
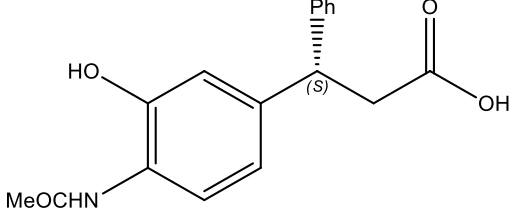
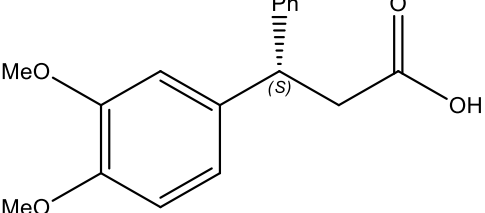
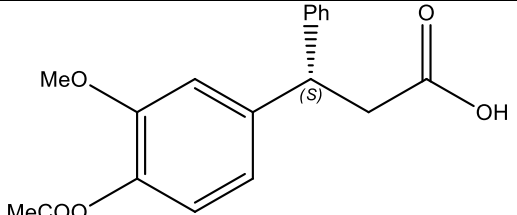
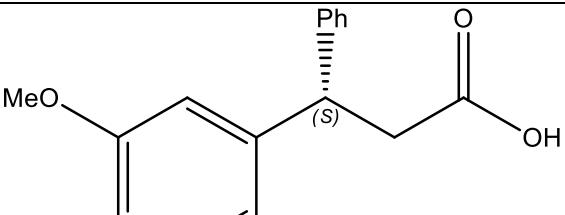
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Όνομασία Παραγώγου	Δομή Παραγώγου	Ενέργεια Πρόσδεσης (kcal/mol)	Σταθερά Αναστολής (μM)
CA1		-5.46	78.62
CA2		-6.26	33.06
CA3		-5.9	48.51
CA4		-6.86	9.34
CA5		-5.41	112.03
CA6		-5.73	63.57

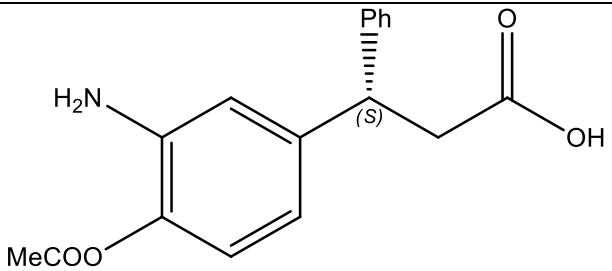
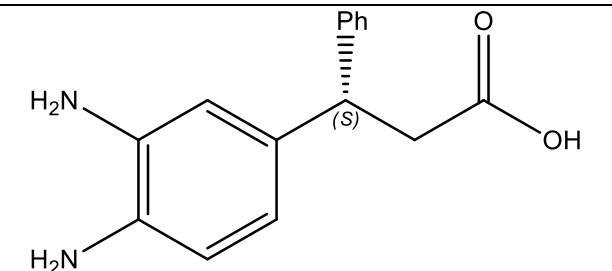
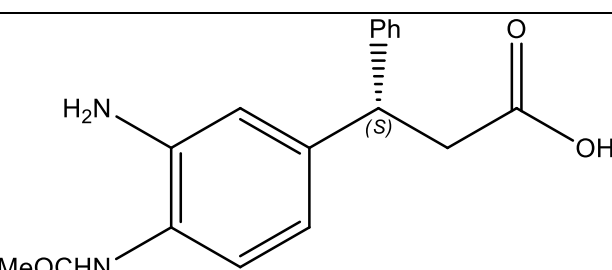
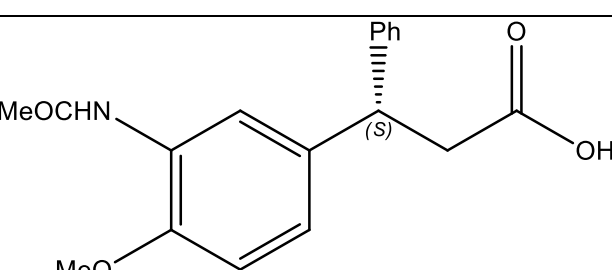
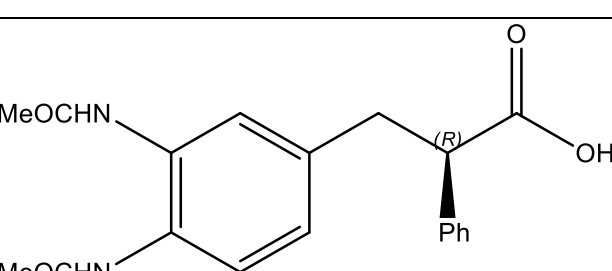
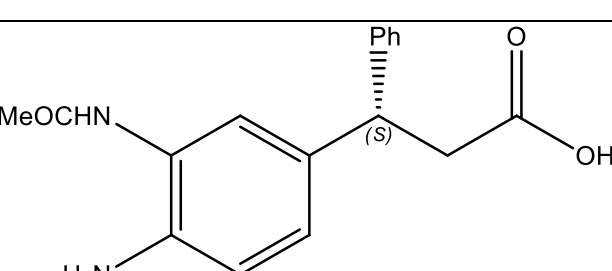
CA7		-5.41	107.39
CA8		-6.81	10.35
CA9		-5.48	98.03
CA10		-5.97	43.07
CA11		-4.81	307.24
CA12		-6.5	18.37
CA13		-5.72	68.67
CA14		-5.97	51.47

CA15		-5.36	126.5
CA16			
CA17		-5.22	150.52
CA18		-5.87	49.70
CA19		-4.59	461.77
CA20		-5.96	42.51
CA21		-5.63	65.43
CA22		-6.10	33.73

CA23		-6.5	17.60
CA24		-5.29	128.58
CA25		-6.40	24.26
CA26		-6.14	44.58
CA27		-6.38	22.34
CA28		-6.65	13.95
CA29		-6.97	7.78

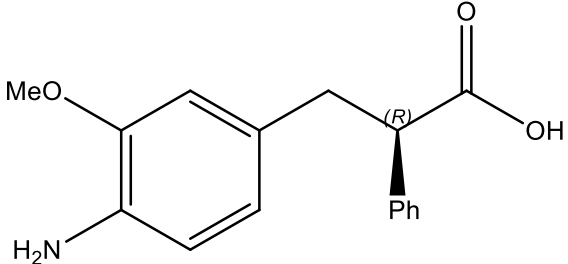
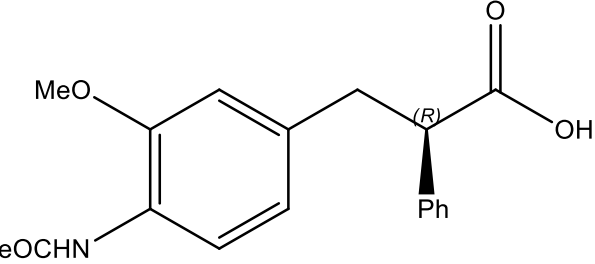
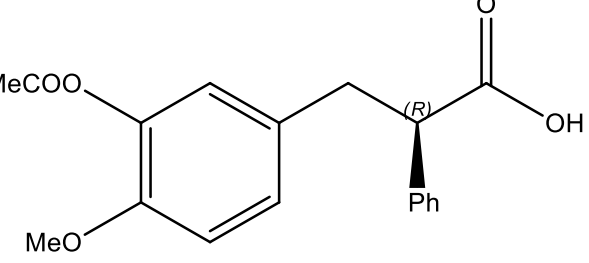
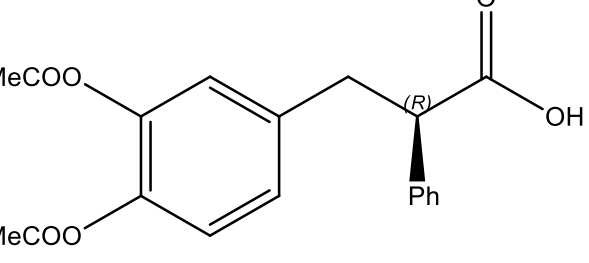
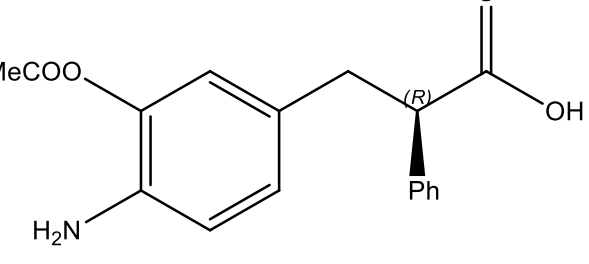
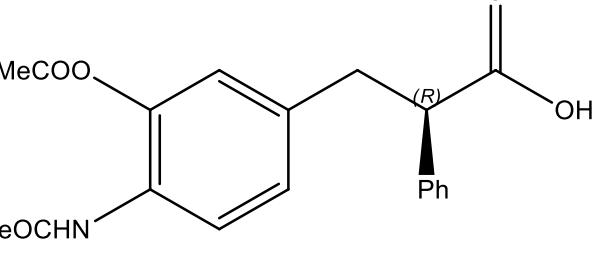
CA30		-6.21	36.04
CA31		-6.56	17.96
CA32		-5.59	80.89
CA33		-7.83	1.87
CA34		-6.18	29.35
CA35		-6.53	16.45
CA36		-5.77	66.69

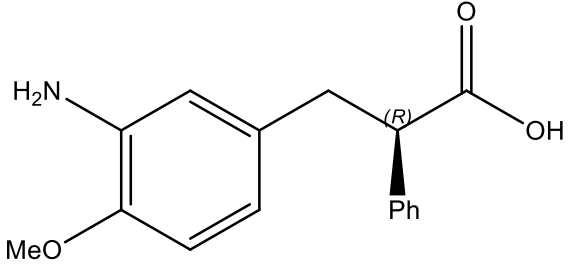
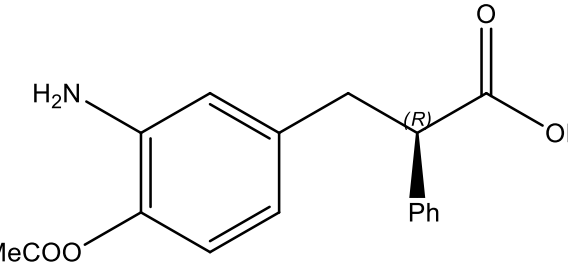
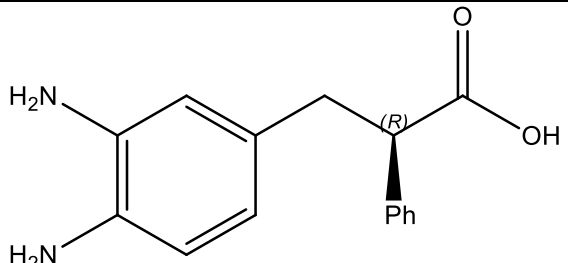
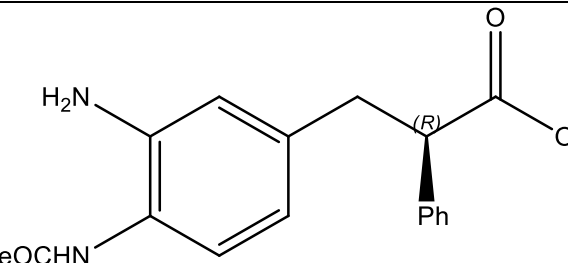
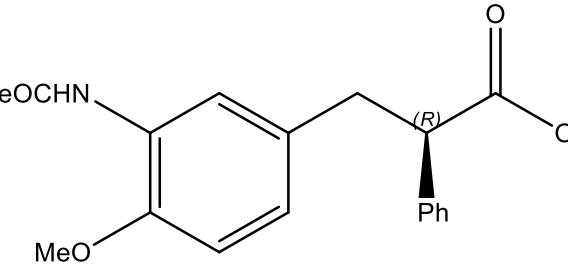
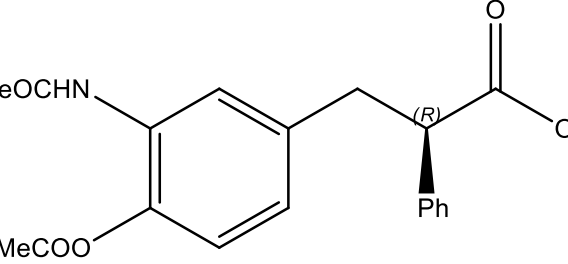
CA37		-7.08	6.44
CA38		-6.09	34.35
CA39		-6.63	14.00
CA40		-5.98	53.32
CA41		-6.63	16.30
CA42		-6.13	33.51

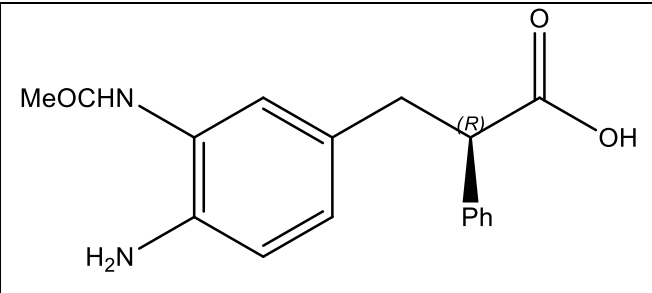
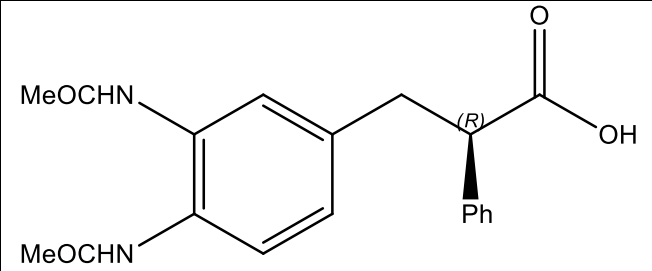
CA43		-6.59	16.35
CA44		-5.61	78.99
CA45		-6.75	11.83
CA46		-6.72	12.17
CA47		-7.06	6.73
CA48		-6.65	13.65

CA49		-7.33	4.25
CA50		-6.23	29.70
CA51		-5.89	50.45
CA52		-6.51	17.79
CA53		-6.54	24.81
CA54		-6.74	11.68

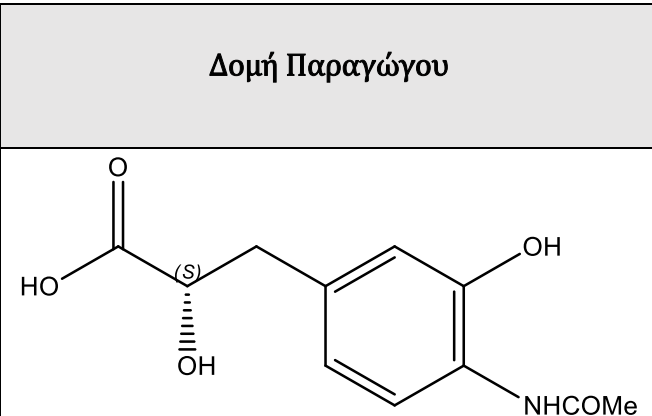
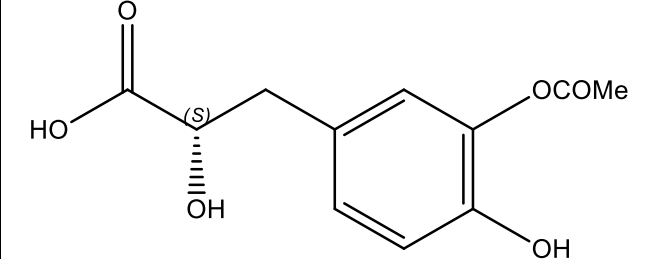
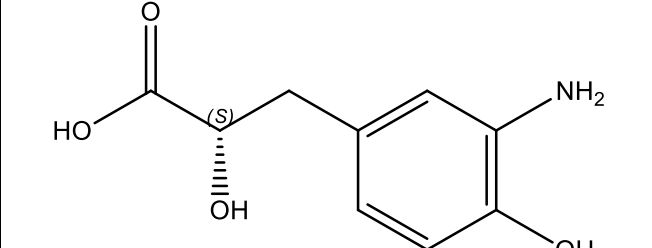
CA55		-6.45	18.50
CA56		-6.13	33.79
CA57		-6.07	35.65
CA58		-6.61	14.45
CA59		-6.59	14.88
CA60		-6.51	17.27

CA61		-5.92	46.71
CA62		-6.85	11.71
CA63		-6.58	15.17
CA64		-6.75	12.77
CA65		-6.47	22.51
CA66		-7.04	7.70

CA67		-5.94	44.23
CA68		-6.12	34.92
CA69		-5.88	53.60
CA70		-6.68	12.61
CA71		-6.74	12.62
CA72		-7.09	7.41

CA73			
CA74		-6.86	7.40

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Όνομασία Παραγώγου	Δομή Παραγώγου	Ενέργεια Πρόσδεσης (kcal/mol)	Σταθερά Αναστολής (μM)
SA1		-4.11	1088.16
SA2		-4.69	378.35
SA3		-4.33	670.32

SA4		-4.89	258.11
SA5		-4.52	489.17
SA6		-5.11	179.68
SA7		-4.34	660.49
SA8		-5.6	84.73
SA9		-4.74	332.69

SA10		-5.25	143.13
SA11		-4.17	879.75
SA12		-5.25	140.19
SA13		-5.59	81.12
SA14		-5.62	76.35
SA15		-4.83	304.99

SA16		-5.68	68.23
SA17		-4.91	258.86
SA18		-5.38	112.63
SA19		-4.06	1050.31
SA20		-5.70	67.93
SA21		-5.38	114.1

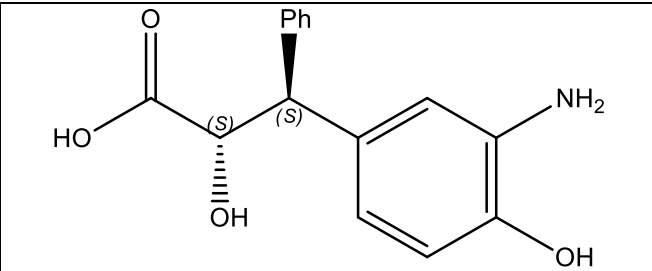
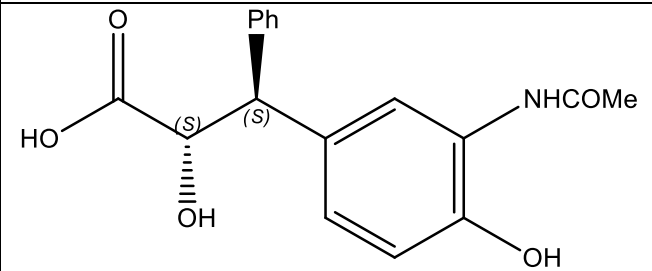
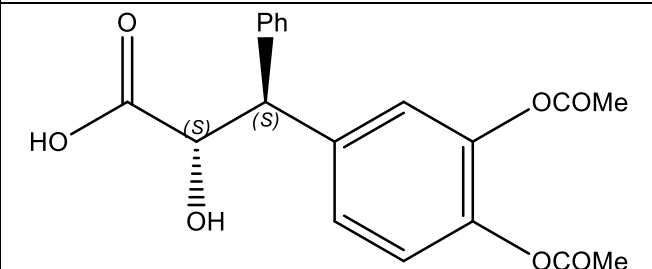
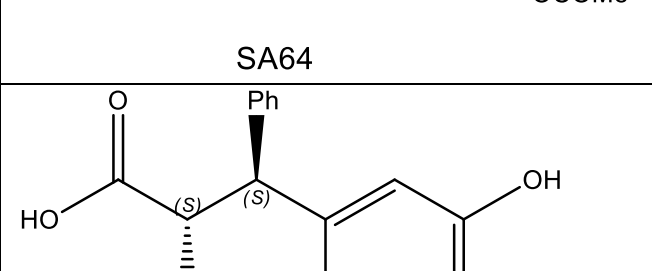
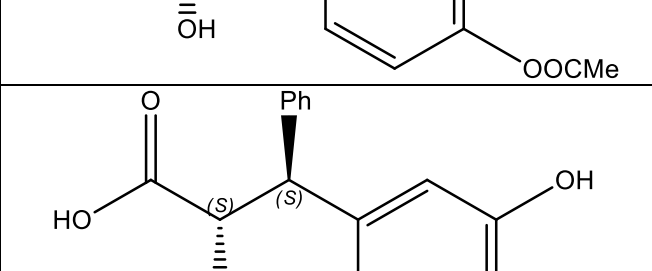
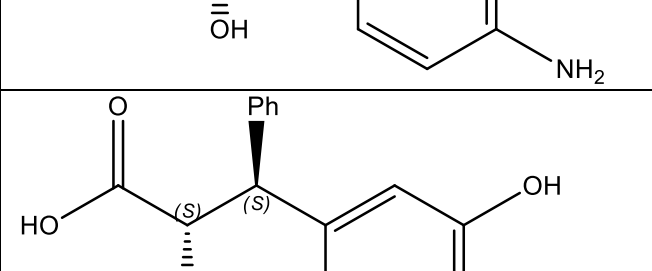
SA22		-5.37	132.18
SA23		-4.82	291.67
SA24		-6.01	39.21
SA25		-5.18	260.06
SA26		-5.11	223.61
SA27		-5.38	127.15

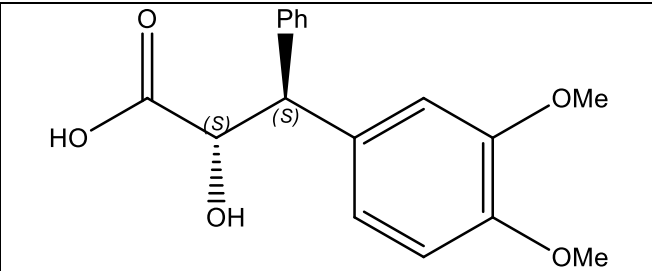
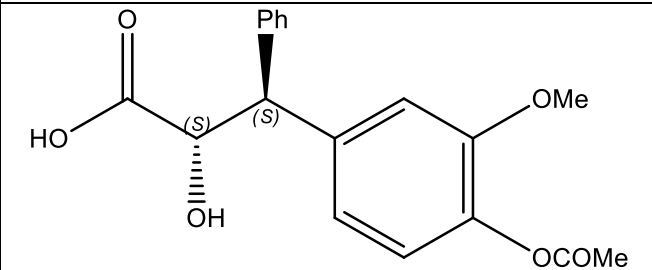
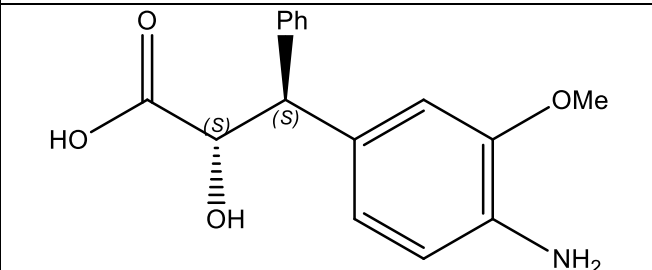
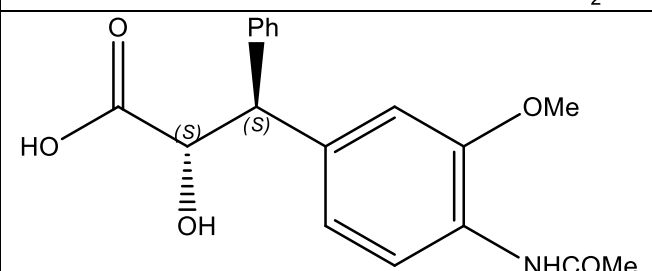
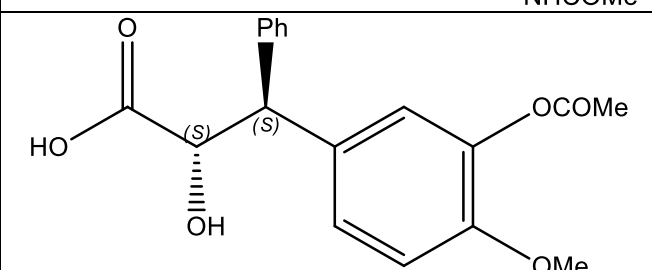
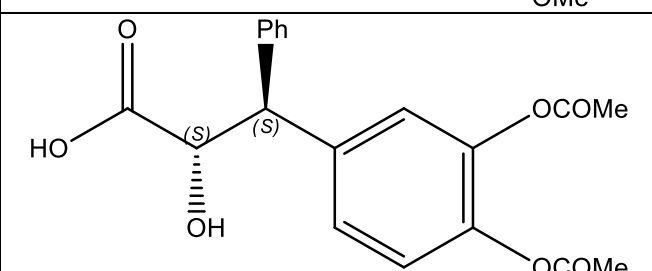
SA28		-5.4	114.9
SA29		-5.84	53.25
SA30		-5.31	132.39
SA31		-5.42	117.62
SA32		-5.29	137.97
SA33		-6.45	23.26

SA34		-6.11	37.62
SA35		-5.88	50.19
SA36		-4.37	710.12
SA37		-5.98	55.46
SA38		-5.52	90.25
SA39		-6.25	28.29

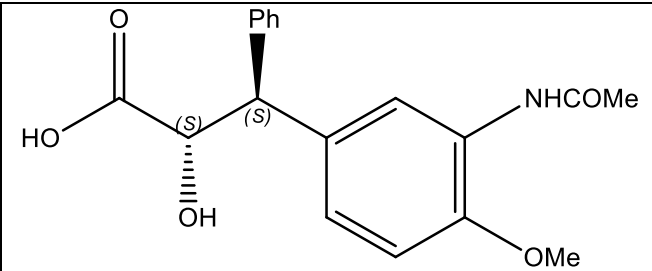
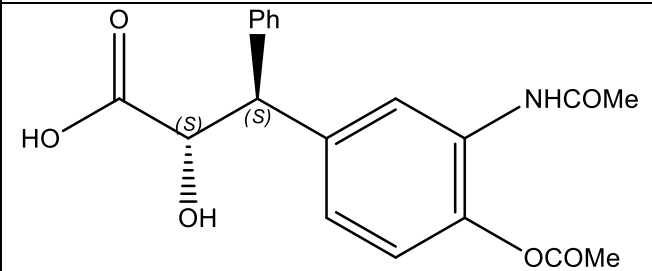
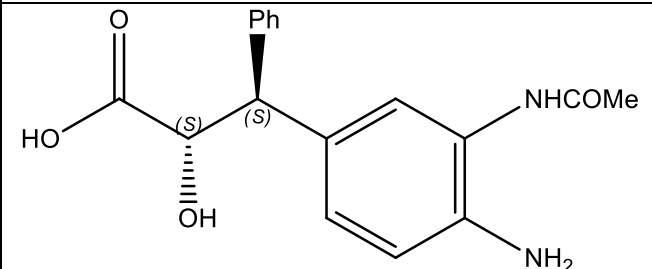
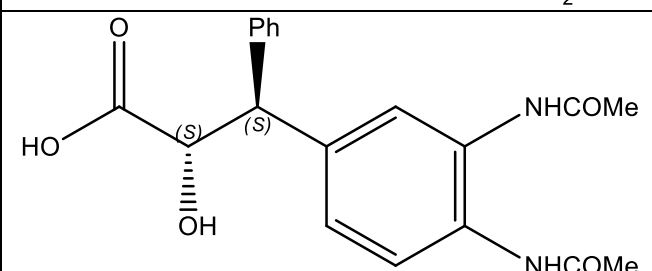
SA41		-5.79	59.62
SA42		-5.75	117.21
SA43		-6.24	27.99
SA44		-5.25	141.18
SA45		-6.54	16.37
SA46		-5.7	75.11

SA47		-6.45	21.77
SA48		-6.05	42.61
SA49		-6.51	17.33
SA50		-6.25	26.10
SA51		-6.21	28.21
SA52		-6.27	26.88

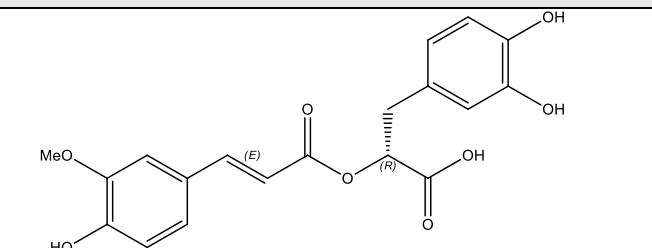
SA53		-6.28	25.07
SA54		-6.65	13.65
SA55	 <p style="text-align: center;">SA64</p>	-6.05	13.65
SA56		-6.25	27.95
SA57		-6.15	31.66
SA58		-6.76	11.87

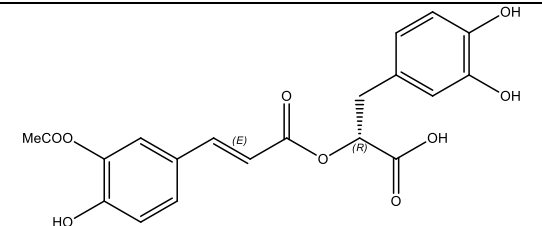
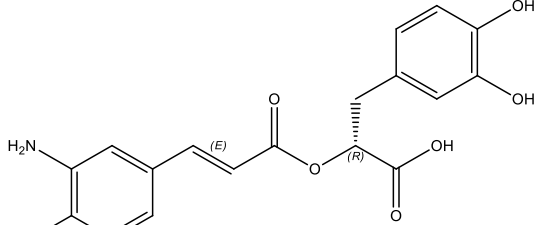
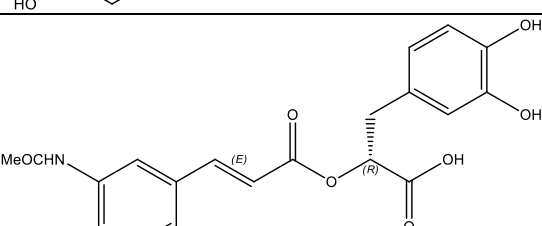
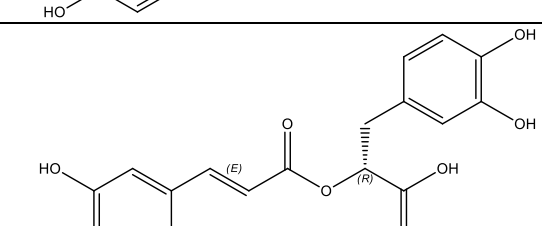
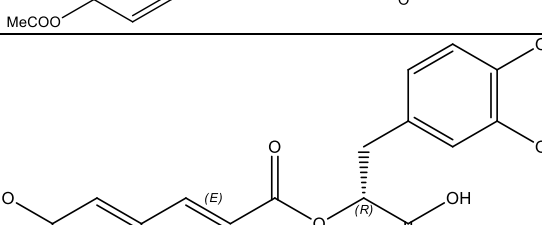
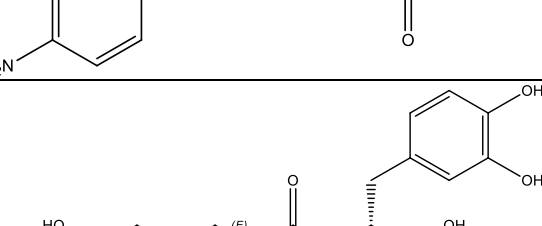
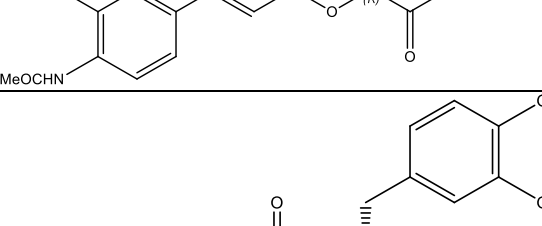
SA59		-6.42	20.20
SA60		-6.46	19.92
SA61		-5.85	51.91
SA62		-7.36	4.84
SA63		-6.71	12.66
SA64		-7.37	3.96

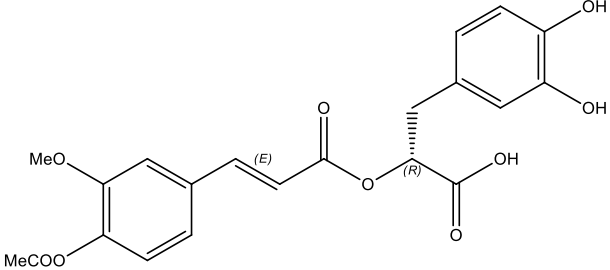
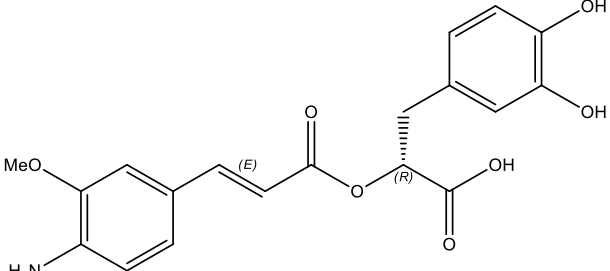
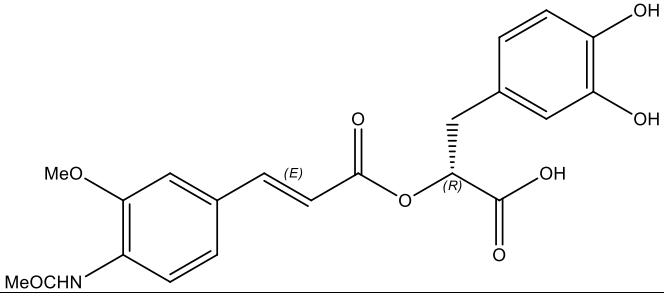
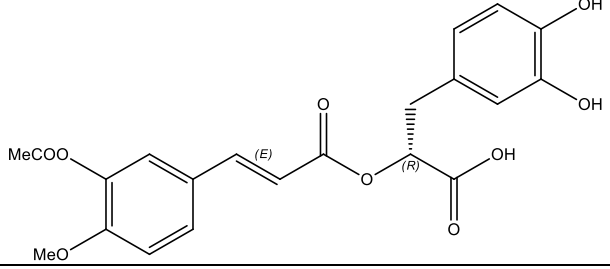
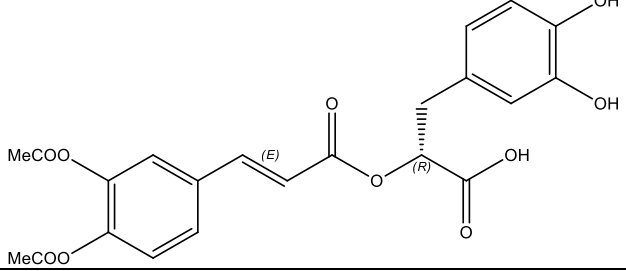
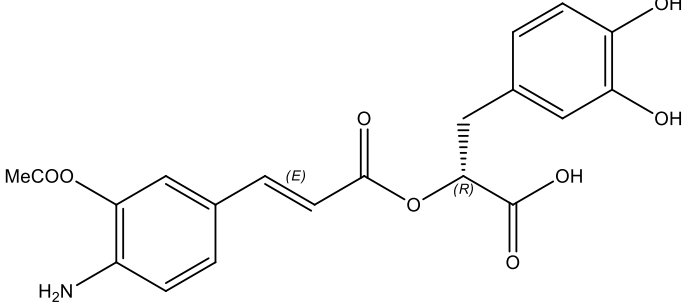
SA65		-6.58	15.29
SA66		-7.67	2.85
SA67		-5.83	53.81
SA68		-6.58	15.15
SA69		-5.99	42.26
SA70		-7.07	6.57

SA71		-6.61	14.66
SA72		-6.82	10.75
SA73		-6.76	11.08
SA74		-7.36	4.24

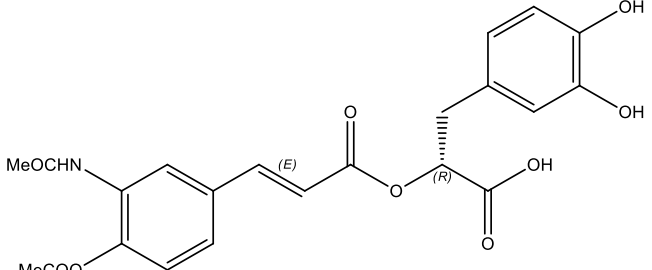
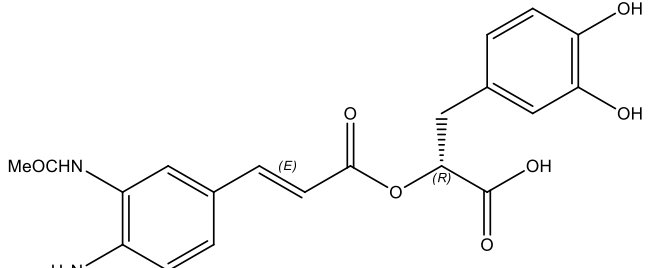
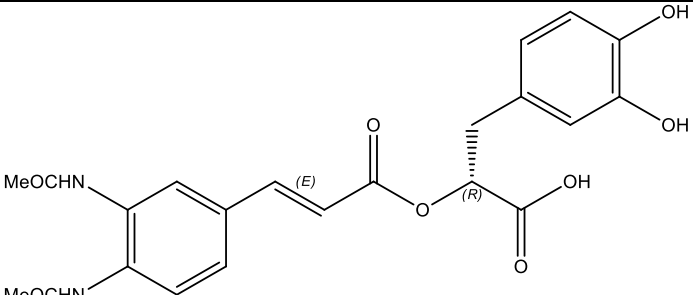
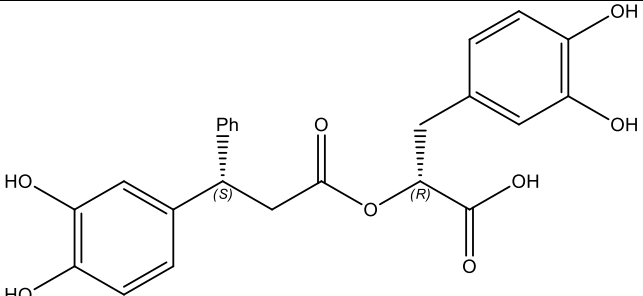
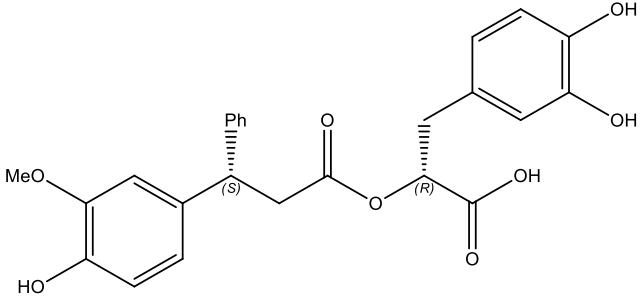
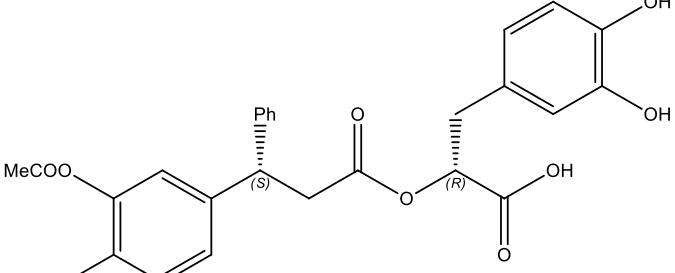
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

<i>Όνομασία Παραγώγου</i>	<i>Δομή Παραγώγου</i>	<i>Ενέργεια Πρόσδεσης (kcal/mol)</i>	<i>Σταθερά Αναστολής (μΜ)</i>
RA1		-7.75	2.21

RA2		-8	1.37
RA3		-7.56	3.27
RA4		-7.78	2.59
RA6		-7.7	3.35
RA7		-6.66	14.22
RA8		-7.8	2.25
RA9		-7.1	8.06

RA10		-7.31	4.43
RA11		-7.4	4.41
RA12		-7.96	2.8
RA13		-6.82	10.08
RA14		-6.28	28.15
RA15		-7.16	6.04

RA16		-6.75	12.40
RA17		-7.48	3.68
RA18		-6.25	30.60
RA19		-5.94	54.10
RA20		-6.39	29.38
RA21		-7.72	3.12

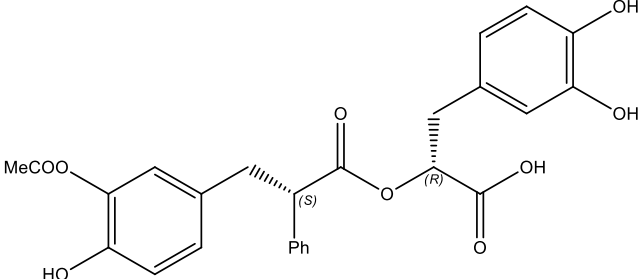
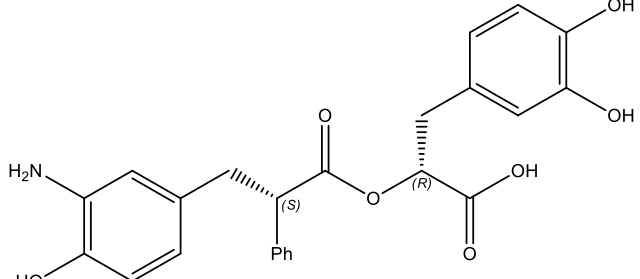
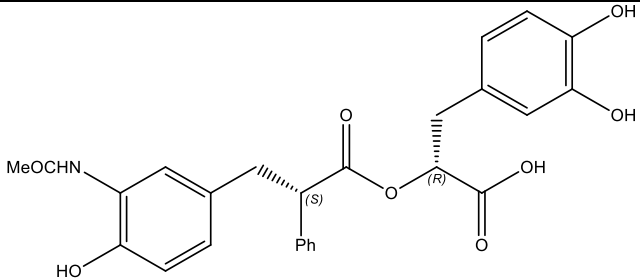
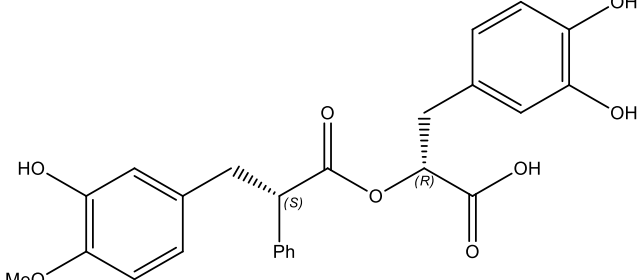
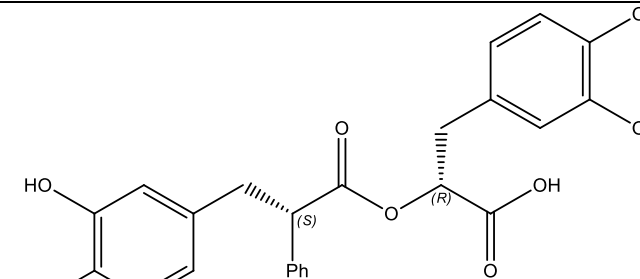
RA22		-7.20	5.59
RA23		-7.36	4.48
RA24		-7.23	5.81
RA25		-6.48	18.22
RA26		-7.03	8.65
RA27		-6.67	13.36

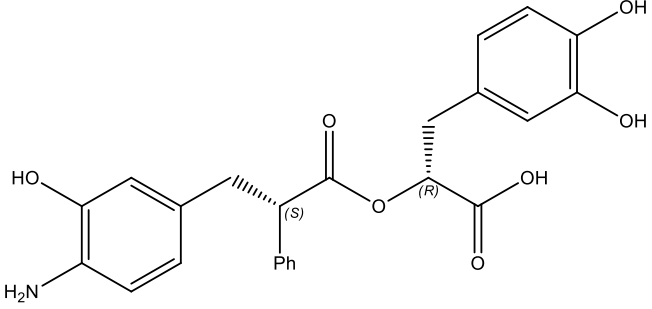
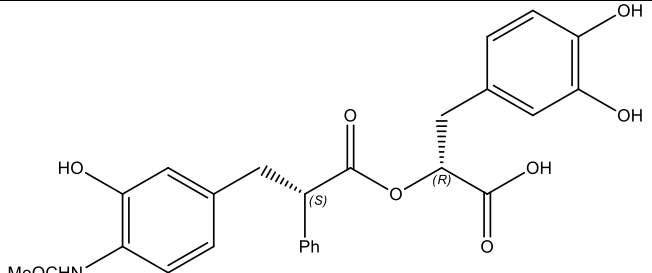
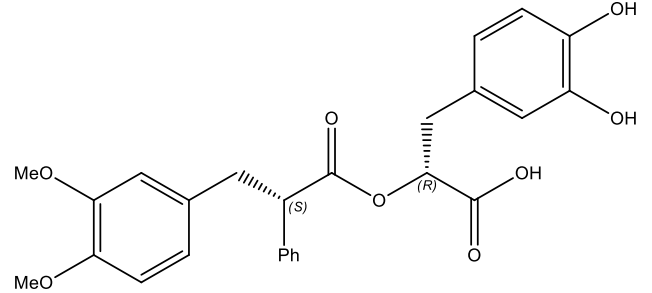
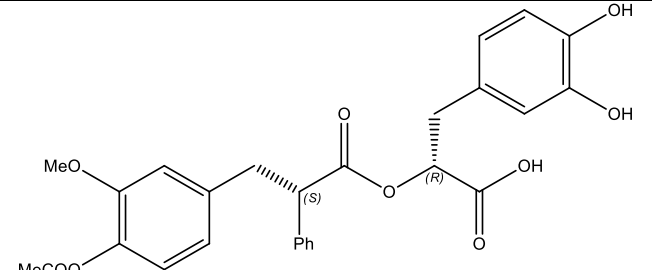
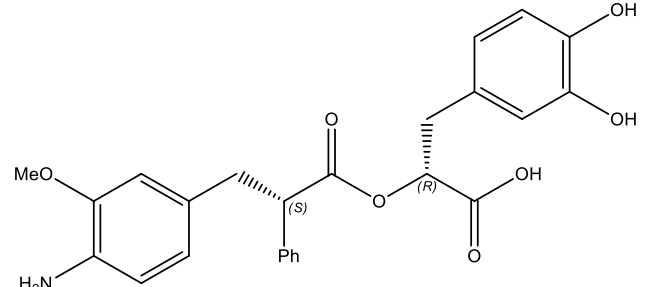
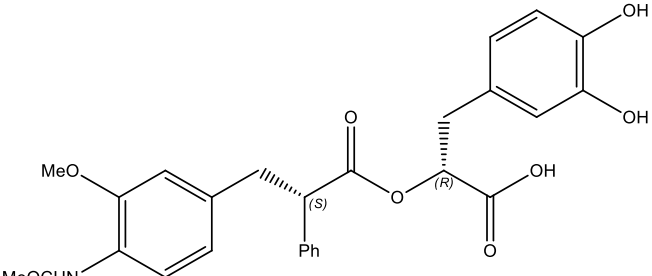
RA29		-7.44	3.55
RA30		-6.78	18.3
RA31		-5.35	326.01
RA32		-5.95	69.52
RA33		-6.32	46.06

RA34		-7.59	3.59
RA35		-5.89	71.1
RA36		-6.55	32.53
RA37		-6.8	19.76
RA38		-6.57	69.86
RA39		-6.95	19.12

RA40		-6.60	16.99
RA41		-6.4	25.35
RA42		-6.71	12.02
RA43		-7.04	9.67
RA44		-6.35	50.01
RA45		-6.78	11.83

RA46		-7.23	6.4
RA47		-6.47	26.96
RA48		-7.28	5.48
RA49		-7.49	7.90
RA50		-5.68	136.27
RA51		-7.62	6.34

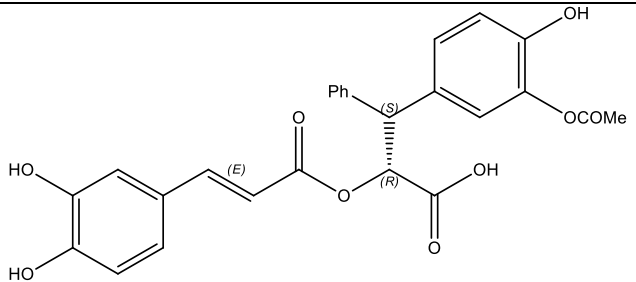
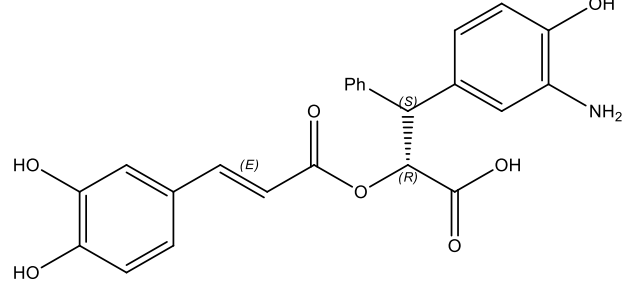
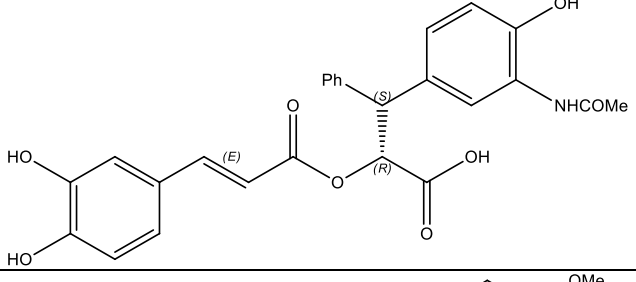
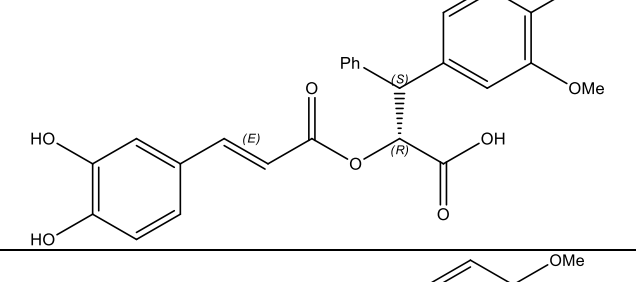
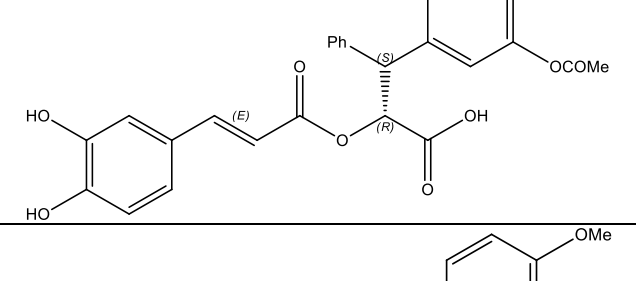
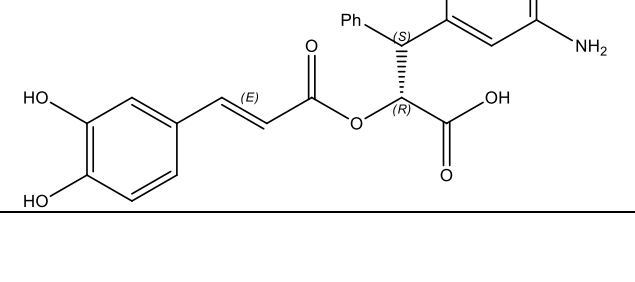
RA52		-7.03	10.82
RA53		-6.07	37.73
RA54		-5.87	152.73
RA55		-6.51	33.67
RA56		-6.34	27.04

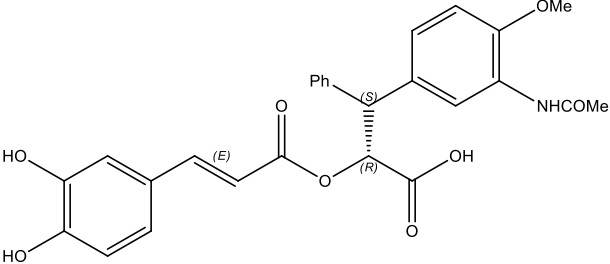
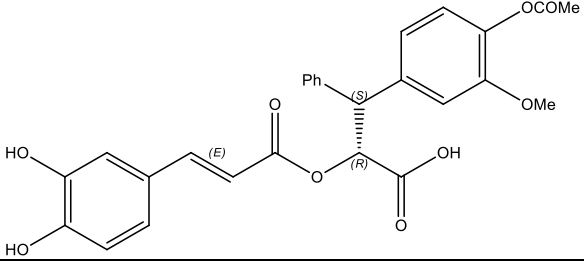
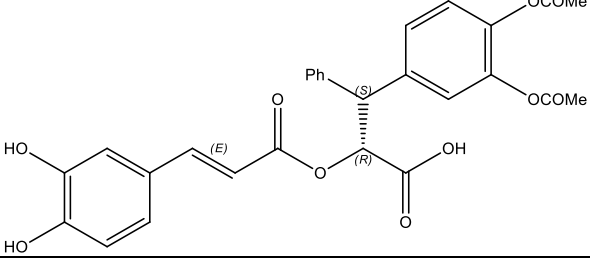
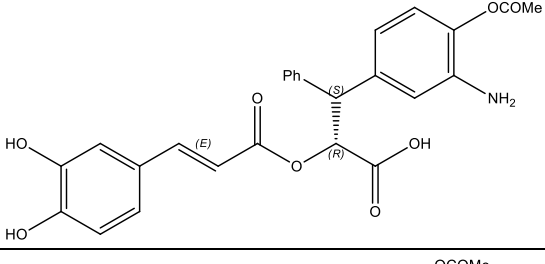
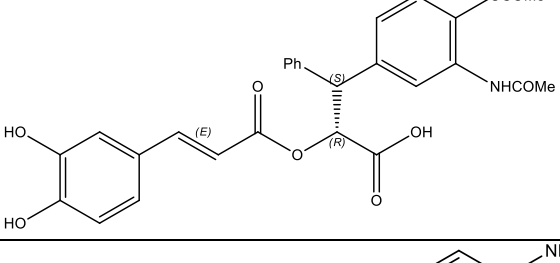
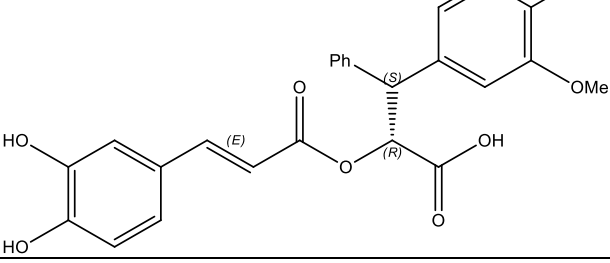
RA57		-6.46	45.9
RA58		-7.17	5.87
RA59		-6.62	18.39
RA60		-6.38	38.17
RA61		-6.60	25.51
RA62		-5.96	50.85

RA63		-7.01	7.71
RA64		-6.69	12.60
RA65		-5.99	130.54
RA66		-6.94	8.71
RA67		-6.42	35.09
RA68		-6.69	16.98

RA69		-6.86	15.69
RA70		-7.9	1.91
RA71		-7.38	4.38
RA72		-5.6	13.92
RA73		-6.61	16.45
RA74		-7.15	7.09

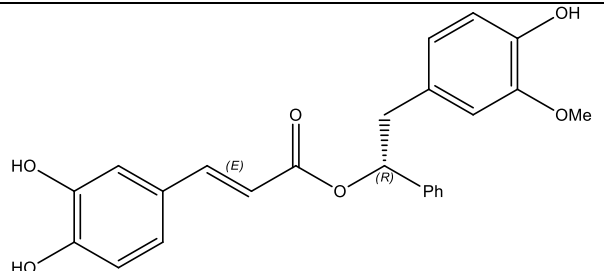
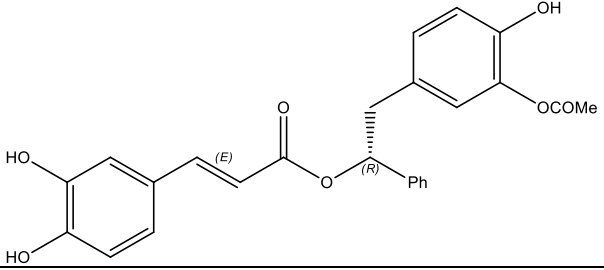
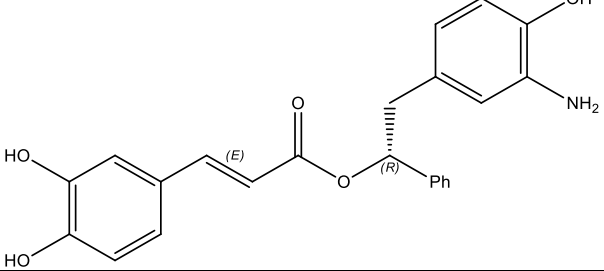
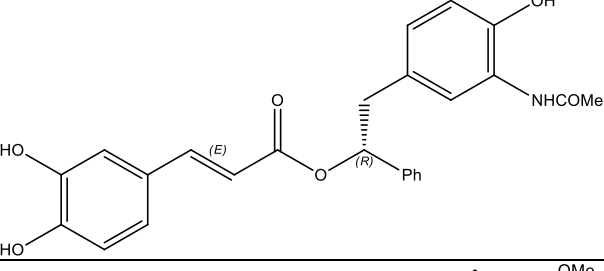
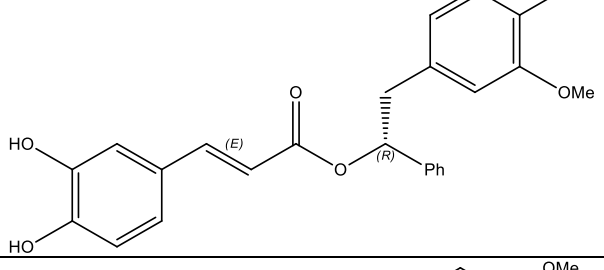
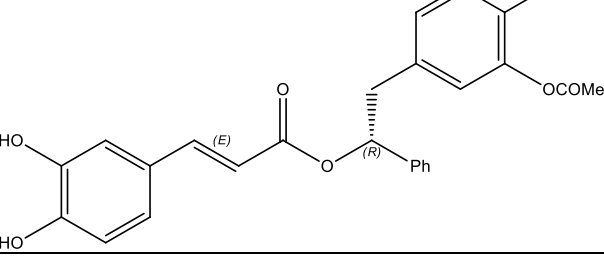
RA75		-5.54	102.79
RA76		-6.46	18.75
RA77		-5.48	187.17
RA78		-5.76	73.89
RA79		-6.12	58.61
RA80		-7.24	7

RA81		-5.27	137.97
RA82		-5.27	168.37
RA83		-6.22	105.68
RA84		-5.59	82.03
RA85		-6.79	37.17
RA86		-7.17	15.50

RA87		-6.03	43.12
RA88		-6.25	28.37
RA89		-6.45	23.94
RA90		-6.01	49.7
RA91		-6.05	61.81
RA92		-5.04	274.3

RA93		-6.01	71.78
RA94		-5.85	53.96
RA95		-6.72	21.8
RA96		-6.61	24.75
RA97		-5.97	92.57
RA98		-2.06	32

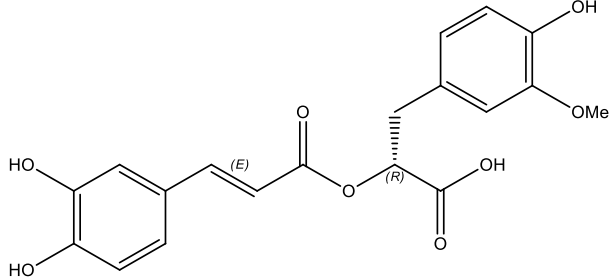
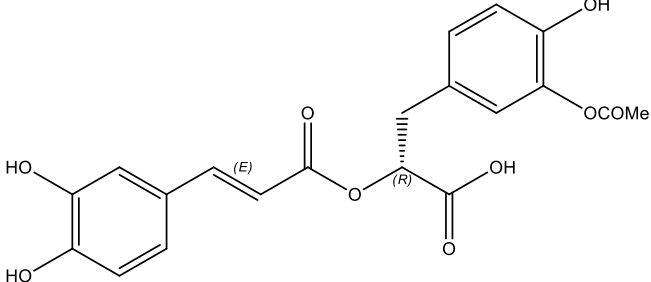
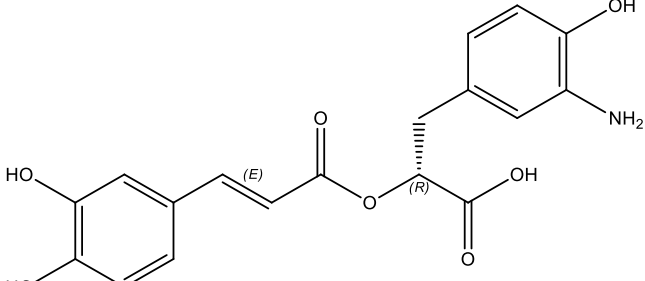
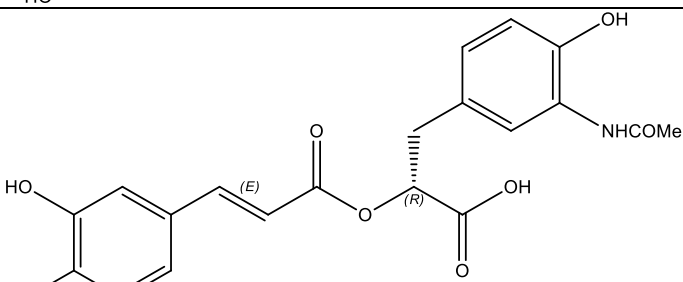
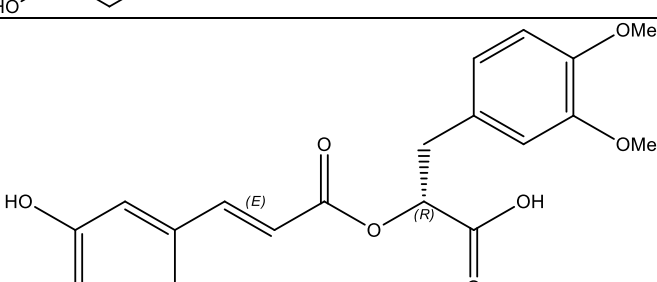
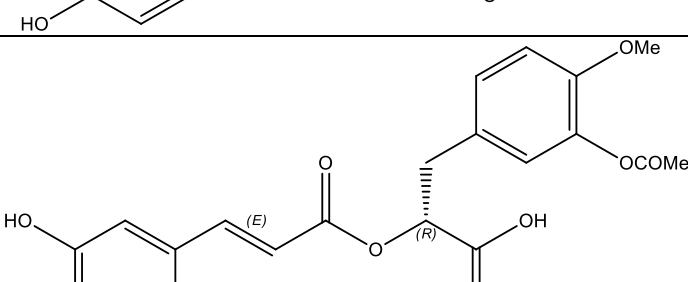
RA99		-6.27	27.22
RA100		-6.22	30.88
RA101		-7.06	10.28
RA102		-7.12	6.93
RA103		-7.77	19.23
RA104		-7.64	6

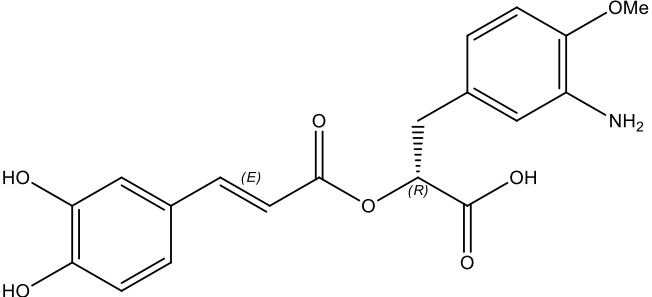
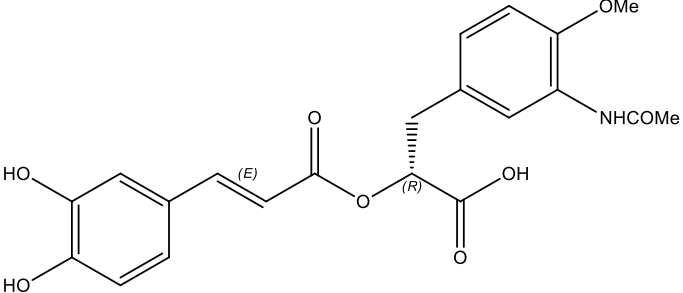
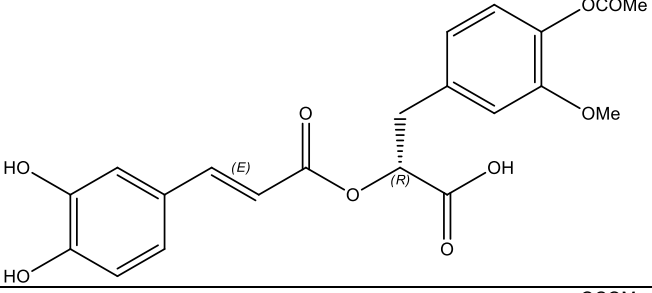
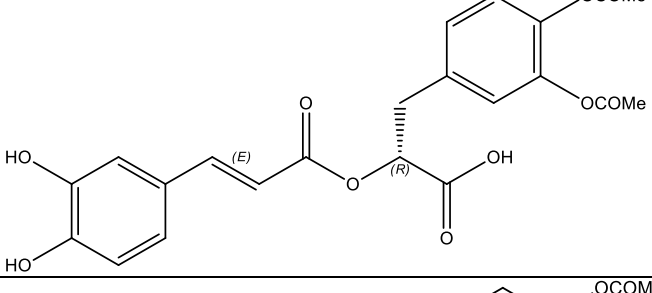
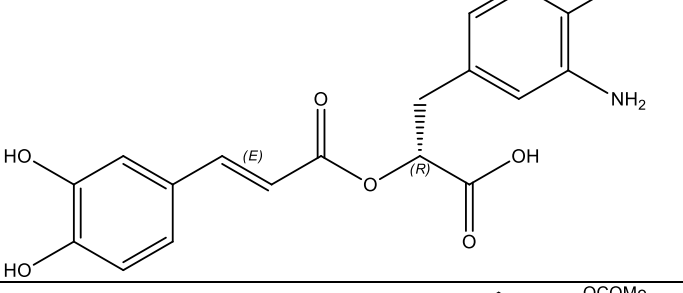
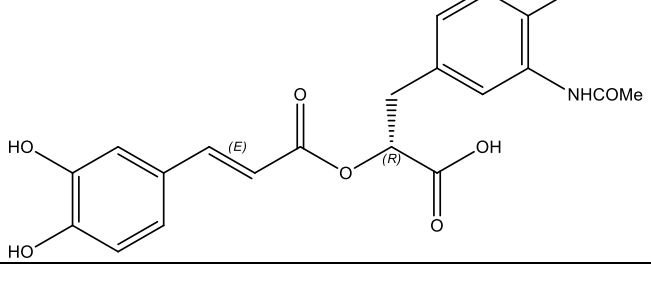
RA105		-6.37	22.48
RA106		-7.02	7.50
RA107		-6.17	31.9
RA108		-7.01	12.37
RA109		-7.47	3.76
RA110		-7.62	7.09

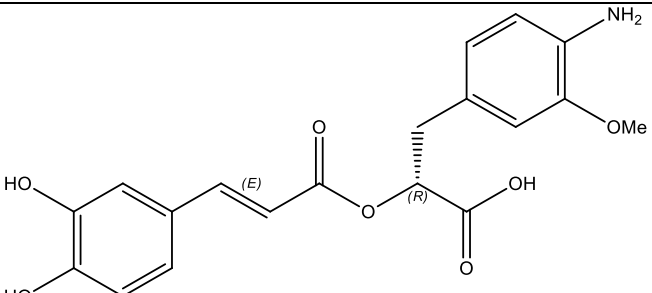
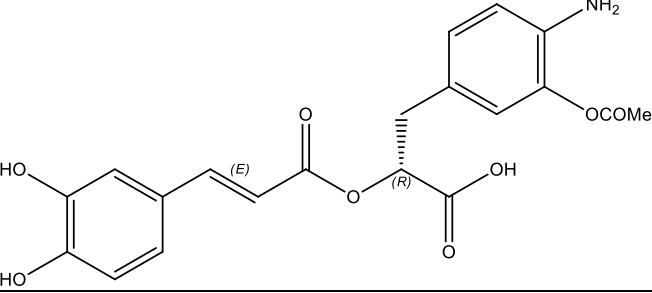
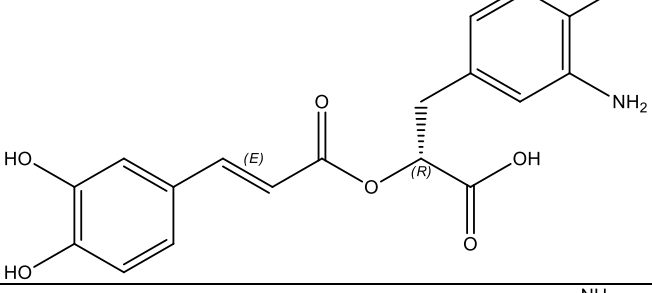
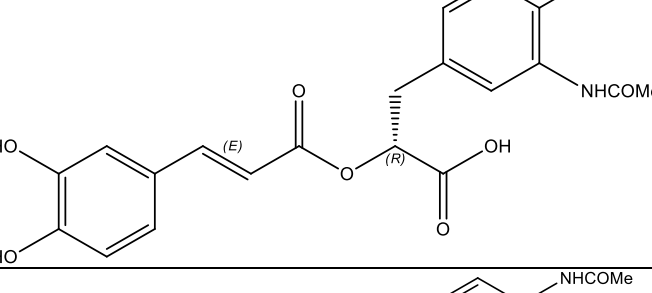
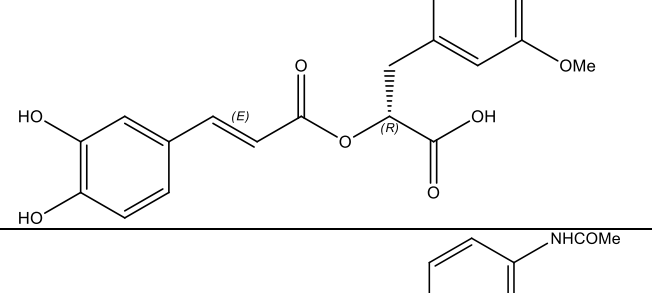
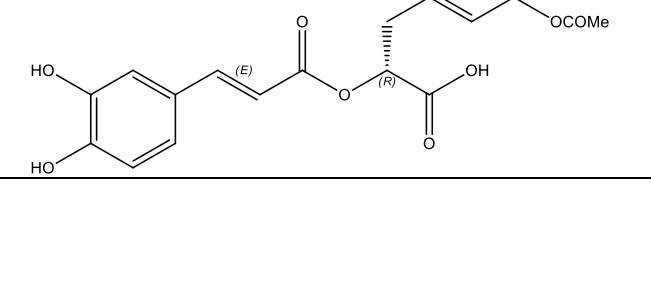
RA111		-6.68	14.74
RA112		-8.08	2.85
RA113		-7.66	2.6
RA114		-8.75	0.386
RA115		-8.07	1.48
RA116		-7.71	1.97

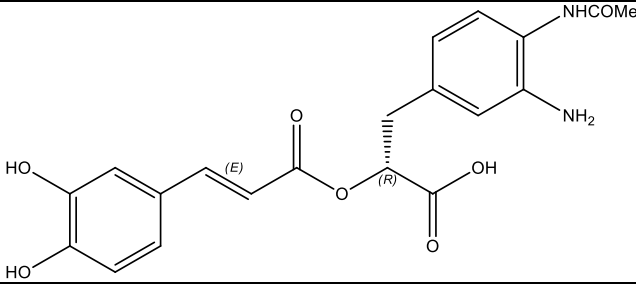
RA117		-8.04	2.69
RA118		-7.89	1.68
RA119		-7.59	3.08
RA120		-8.51	0.60
RA121		-9.07	0.267
RA122		-8.81	0.36

RA123		-8.46	0.642
RA124		-9.26	0.197
RA125		-7.14	6
RA126		-7.41	4.26
RA127		-7.06	9.62
RA128		-8.08	1.82

RA129		-6.58	21.21
RA130		-6.75	12.31
RA131		-7.19	11.02
RA132		-6.87	6.54
RA133		-7.18	12.34
RA134		-6.32	32.02

RA135		-5.89	55.52
RA136		-7.71	2.18
RA137		-6.25	57.33
RA138		-9.06	0.401
RA139		-6.96	11.41
RA140		-7.74	2.67

RA141		-8.18	3.32
RA142		-7.53	7.73
RA143		-7.91	1.73
RA144		-7.59	2.85
RA145		-8.26	1.54
RA146		-8.14	1.27

RA147		-6	73.83
--------------	--	-----------	--------------

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

DNA PDB ID	Binding Affinity (kcal/mol)	Inhibition Constant(μ M)
101D	-7.97	1.43
1AU5	-6.77	17.81
367D	-6.74	11.74
1N37	-6.99	7.54
1FD5	-5.67	102.55
1FDG	-5.7	66.53
1XCS	-6.53	22.17
1XCU	-6.14	32.33
2DES	-6.43	19.56
308D	-2.85	14.27
1QCH	-7.36	4.78
1FN1	-5.51	97.51
1FN2	-6.43	19.46
1RQY	-5.72	65.36
182D	-7.17	5.57
1D21	-3.16	4.85
1D22	-6.19	28.97
224D	-7.2	5.44
245D	-6.91	8.64
2GB9	-6.56	15.85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Βιβλιογραφία

- [1] S. P. Leelananda and S. Lindert, "Computational methods in drug discovery," *Beilstein J Org Chem*, vol. 12, pp. 2694-2718, 2016.
- [2] S. Mandal, M. Moudgil, and S. K. Mandal, "Rational drug design," *Eur J Pharmacol*, vol. 625, pp. 90-100, Dec 25 2009.
- [3] X. Y. Meng, H. X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery," *Curr Comput Aided Drug Des*, vol. 7, pp. 146-57, Jun 2011.
- [4] V. S. a. M. E. Brendan J. McConkey, "The performance of current methods in ligand–protein docking," *Current Science*, vol. 83, 2002.
- [5] I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, and T. E. Ferrin, "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions," *J Mol Biol*, vol. 161, pp. 269-88, Oct 25 1982.
- [6] Β. Μαγκριώτη, "Ενώσεις με Φαρμακολογικό Ενδιαφέρον," 2018.
- [7] S. Dastmalchi, M. Hamzeh-Mivehroud, and B. Sokouti, *Methods and algorithms for molecular docking-based drug design and discovery*.
- [8] E. Katchalski-Katzir, I. Shariv, M. Eisenstein, A. A. Friesem, C. Aflalo, and I. A. Vakser, "Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp. 2195-9, Mar 15 1992.
- [9] T. N. Hart and R. J. Read, "A multiple-start Monte Carlo docking method," *Proteins*, vol. 13, pp. 206-22, Jul 1992.
- [10] D. S. Goodsell and A. J. Olson, "Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing," *Proteins*, vol. 8, pp. 195-202, 1990.
- [11] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, and J. Bajorath, "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, pp. 935-49, Nov 2004.
- [12] N. Brooijmans and I. D. Kuntz, "Molecular recognition and docking algorithms," *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 32, pp. 335-73, 2003.
- [13] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko, and W. P. Walters, "Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins," *J Med Chem*, vol. 42, pp. 5100-9, Dec 16 1999.
- [14] H. Gohlke and G. Klebe, "Statistical potentials and scoring functions applied to protein-ligand binding," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 11, pp. 231-5, Apr 2001.

- [15] S. Y. Huang, S. Z. Grinter, and X. Zou, "Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 12, pp. 12899-908, Oct 28 2010.
- [16] B. K. S. Elaine C. Meng, and Irwin D. Kuntz, "Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation " *Journal of Computational Chemistry*, vol. 13, pp. 505-524, 1991.
- [17] T. Solmajer and E. L. Mehler, "Electrostatic screening in molecular dynamics simulations," *Protein Eng*, vol. 4, pp. 911-7, Dec 1991.
- [18] J. W. Mullinax and W. G. Noid, "Recovering physical potentials from a model protein databank," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, pp. 19867-72, Nov 16 2010.
- [19] P. D. Thomas and K. A. Dill, "An iterative method for extracting energy-like quantities from protein structures," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 11628-33, Oct 15 1996.
- [20] P. D. Thomas and K. A. Dill, "Statistical potentials extracted from protein structures: how accurate are they?," *J Mol Biol*, vol. 257, pp. 457-69, Mar 29 1996.
- [21] T. S. R. Institute. *AutoDock*. Available: <http://autodock.scripps.edu/>
- [22] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, *et al.*, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J Comput Chem*, vol. 30, pp. 2785-91, Dec 2009.
- [23] A. D. Hill and P. J. Reilly, "Scoring functions for AutoDock," *Methods Mol Biol*, vol. 1273, pp. 467-74, 2015.
- [24] M. Δ. E. Βιοπληροφορικής. *Ενεργειακή ανάλυση βιομορίων*. Available: https://mediasrv.aua.gr/eclass/modules/document/file.php/BIOTECH139/Ch6_%CE%95%CE%BD%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AE%20%CE%B1%CE%BD%CE%AC%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B7.pdf
- [25] *Desmond-User Manual*: Schrödinger Press, 2009.
- [26] G. Poinar, "Amber," in *Encyclopedia of Insects*, V. H. R. a. R. T., Ed., ed Academic Press, 2009.
- [27] R. E. B. Bernard R. Brooks, Barry D. Olafson, David J. States; S. Swaminathan, and Martin Karplus, "CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 4, pp. 187-217, 1982
- [28] Gromacs. *About GROMACS*. Available: http://www.gromacs.org/About_Gromacs
- [29] P. H. H. n. Walter R. P. Scott, Ilario G. Tironi, Alan E. Mark, Salomon R. Billeter, Jens Fennen, Andrew E. Torda, Thomas Huber, Peter Kru1ger, and Wilfred F. van Gunsteren, "The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package," *J. Phys. Chem. A*, vol. 103, pp. 3596-3607, 1999.
- [30] "Desmond Tutorial " 2011.
- [31] Z. A. a. S. Rehman, "An Overview of Cancer Treatment Modalities," *Neoplasia*, 2018.
- [32] M. A. Jafri, S. A. Ansari, M. H. Alqahtani, and J. W. Shay, "Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies," *Genome Med*, vol. 8, p. 69, Jun 20 2016.
- [33] N. C. INSTITUTE. *What Is Cancer?* Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [34] D.-K. C. Han-Chung Wu, and Chia-Ting Huang, "Targeted Therapy for Cancer," *Journal of Cancer Molecules* pp. 57-66, 2006.
- [35] C. B. Thompson, "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease," *Science*, vol. 267, pp. 1456-62, Mar 10 1995.
- [36] A. M. Petros, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik, "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1644, pp. 83-94, Mar 1 2004.
- [37] T. F. E. Wikipedia. *MYC*. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Myc>
- [38] R. J. Youle and A. Strasser, "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, pp. 47-59, Jan 2008.

- [39] G. Lessene, P. E. Czabotar, and P. M. Colman, "BCL-2 family antagonists for cancer therapy," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, pp. 989-1000, Dec 2008.
- [40] R. Kim, "Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 333, pp. 336-43, Jul 29 2005.
- [41] Y. Tsujimoto, J. Cossman, E. Jaffe, and C. M. Croce, "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma," *Science*, vol. 228, pp. 1440-3, Jun 21 1985.
- [42] S. B. B. a. G. M. Cohen, "Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?," *TRENDS in Pharmacological Sciences*, vol. 22, 2001.
- [43] N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, "Cell death: critical control points," *Cell*, vol. 116, pp. 205-19, Jan 23 2004.
- [44] M. Vogler, D. Dinsdale, M. J. Dyer, and G. M. Cohen, "Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy," *Cell Death Differ*, vol. 16, pp. 360-7, Mar 2009.
- [45] T. F. Kellici, M. V. Chatziathanasiadou, M. S. Lee, N. Sayyad, E. G. Geromichalou, E. I. Vrettos, *et al.*, "Rational design and structure-activity relationship studies of quercetin-amino acid hybrids targeting the anti-apoptotic protein Bcl-xL," *Org Biomol Chem*, vol. 15, pp. 7956-7976, Sep 26 2017.
- [46] G. Lessene, P. E. Czabotar, B. E. Sleebs, K. Zobel, K. N. Lowes, J. M. Adams, *et al.*, "Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor," *Nat Chem Biol*, vol. 9, pp. 390-7, Jun 2013.
- [47] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010," *J Nat Prod*, vol. 75, pp. 311-35, Mar 23 2012.
- [48] E. Stylos, M. V. Chatziathanasiadou, A. Syriopoulou, and A. G. Tzakos, "Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1047, pp. 15-38, Mar 15 2017.
- [49] M. Petersen, Y. Abdullah, J. Benner, D. Eberle, K. Gehlen, S. Hucherig, *et al.*, "Evolution of rosmarinic acid biosynthesis," *Phytochemistry*, vol. 70, pp. 1663-79, Oct-Nov 2009.
- [50] C. Papaemmanouil, M. V. Chatziathanasiadou, C. Chatzigiannis, E. Chontzopoulou, T. Mavromoustakos, S. G. Grdadolnik, *et al.*, "Unveiling the interaction profile of rosmarinic acid and its bioactive substructures with serum albumin," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 35, pp. 786-804, Dec 2020.
- [51] L. R. Neli-Kinga Olah, Cristina Mogos, Daniela Hanganu, Simion Gocan "Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, pp. 117-123, 2003.
- [52] X. J. Wang and J. X. Xu, "Salvianic acid A protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+-induced cytotoxicity," *Neurosci Res*, vol. 51, pp. 129-38, Feb 2005.
- [53] T. J. Berg JM, Stryer L, "DNA Illustrates the Relation between Form and Function," in *Biochemistry, 5th edition*, ed New York: W H Freeman, 2002.
- [54] M. M. C. David L. Nelson, "Βασικές Αρχές Βιοχημείας (Lehninger)," *BROKEN HILL PUBLISHING LTD*, 2005.
- [55] Α. Καθ. Δ. Τσουκάτος, Καθ. Α.-Ε. Κούκκου, "Βιοχημεία, ΣΥΝΘΕΣΗ DNA," ed: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ.
- [56] A. P. a. S. Bhattacharya, "Chemistry and biology of DNA-binding small molecules," *CURRENT SCIENCE*, vol. VOL. 102, 2012.
- [57] Ρ. Παππά, "ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ Cu (II) ΜΕ ΤΟ Ν-ΑΚΕΤΥΛΟ-3-ΑΚΕΤΥΛΟ-5- ΒΕΝΖΥΛΙΔΕΝΟΤΕΤΡΑΜΙΚΟ ΟΞΥ ΜΕ CalfThymusDNA," Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2017.
- [58] O. I.-M. Dimitris Matiadis, Vickie McKee, John Markopoulos, "N-Acetyl-5-arylidenetetramic acids: synthesis, X-ray structure elucidation and application to the

- preparation of zinc(II) and copper(II) complexes," *Elsevier Ltd*, vol. 70, pp. 2439-2443, 2014.
- [59] D. Matiadis, D. Tsironis, V. Stefanou, O. Igglessi-Markopoulou, V. McKee, Y. Sanakis, *et al.*, "X-Ray Crystallographic Analysis, EPR Studies, and Computational Calculations of a Cu(II) Tetramic Acid Complex," *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2017, p. 7895023, 2017.
- [60] G. M. M. a. S. F. Ruth Huey, "Using AutoDock with AutoDockTools: A Tutorial," *The Scripps Research Institute* 2012.
- [61] T. S. Snail. *The difference between Ki, Kd, IC50, and EC50 values*. Available: <https://www.sciencesnail.com/science/the-difference-between-ki-kd-ic50-and-ec50-values#>
- [62] E. M. Παπαμιχαήλ, "Ενζυμολογία," ed.
- [63] T. S. R. Institute. *How Autodock 4 converts binding energy (kcal/mol) into Ki*. Available: <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/faq/how-autodock-4-converts-binding-energy-kcal-mol-into-ki>
- [64] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, *et al.*, "Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 78, pp. 2179-83, Apr 1981.
- [65] T. Sarwar, M. A. Husain, S. U. Rehman, H. M. Ishqi, and M. Tabish, "Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA," *Mol Biosyst*, vol. 11, pp. 522-31, Feb 2015.
- [66] J. H. Shi, J. Chen, J. Wang, and Y. Y. Zhu, "Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 136 Pt B, pp. 443-50, Feb 5 2015.
- [67] R. Palchaudhuri and P. J. Hergenrother, "DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 18, pp. 497-503, Dec 2007.