



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Εργασία με θέμα

**Υπολογιστικές μελέτες πρόσδεσης (docking) παραγώγων του
μποσγουελικού οξέος στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών – Λειτουργική
συσχέτιση.**

**Computational docking studies of boswellic acid's derivatives on the
glucocorticoid receptor - Relation to function**

**Μάκιου Ανθή – Στυλιανή
Λάρισα, Ιούνιος 2017**

“ The Biochemistry and Biophysics are the notes required for life; they conspire, collectively, to generate the real unit of life, the organism. The intermediate level, the chords and tempos, has to do with how the biochemistry and biophysics are organized, arranged, played out in space and time to produce a creature who grows and divides and is. ”

- Ursula Goodenough -
Professor, Department of Biology
Washington University

Στοιχεία διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην ομάδα Βιοφυσικής, του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2015 – Μάιος 2017 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου.

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

- Παπαδόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)
- Ψαρρά Άννα- Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια (Συνεπιβλέπουσα)
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Μέλος)

Ευχαριστίες

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παπαδόπουλο για την άριστη συνεργασία που είχαμε, τις πολύτιμες συμβουλές του και την έμπρακτη στήριξή του μέχρι να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία. Κυρίως όμως θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αστείρευτη υπομονή του, την αισιοδοξία και το χιούμορ με τα οποία αντιμετωπίσαμε μαζί τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν, αλλά και την κατανόηση που έδειξε στις δικές μου αδυναμίες. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ψαρρά για το θέμα της διπλωματικής, τη βοήθεια και τις συμβουλές της όταν είχα κάποιες απορίες. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που πάντα ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, με στήριζαν και με βοηθούσαν και τέλος ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στα παιδιά της ομάδας, Μεχμέτογλου Φεριδέ, Τσομπάνη Θεοδώρα, Παππά Ηλία και τον Διδάκτορα Φλώρο Στυλιανό που εκτός του ότι είμαστε καλοί φίλοι αποδειχτήκαμε και εξαιρετικοί συνεργάτες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σκοπός	7
Περίληψη.....	7
Abstract	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A) ΟΙ ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΟΥΣ	9
1) Τα γλυκοκορτικοειδή – Μηχανισμός Έκκρισης (Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια).....	10
2) Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών.....	12
2.1) Γενικά	12
2.2) Προσδέτες για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	12
2.3) Έκφραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	13
2.4) Λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	14
2.5) Σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	15
2.5.1) Κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης	15
2.5.2) Μη κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης.....	18
2.6) Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ως φαρμακευτικός στόχος.....	19
2.7) Εκλεκτικοί αγωνιστές υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (Selective, Glucocorticoid Receptor, Agonist, SEGRA)	19
B) ΤΑ ΜΠΟΣΓΟΥΕΛΙΚΑ ΟΞΕΑ (BOSWELLIC ACIDS – BA).....	22
1) Εισαγωγή	22
2) Ο θύλακας πρόσδεσης του DAC.....	24
ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	26
1) Πρόσδεση (Docking).....	26
2) Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.....	29
2.1) Το πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης (VMD)	32
2.2) Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής (NAMD).....	32
2.3) Υπολογισμός RMSD	33
3) Arguslab.....	34
4) Chimera	34

5) Raswin	34
6) Swiss – PdbViewer	35
7) Wordom	35
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
1) Σχεδιασμός προσδετών μέσω του προγράμματος Arguslab	36
2) Επιλογή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	38
3) Δοκιμαστικό Docking 1P93 – DEX	39
4) Docking του 3-ο-ακέτυλο-11-κετοβήτα μποςγουελικού οξέος στον GR 1P93	39
5) Προσομοίωση του υποδοχέα 1P93	41
5.1) Δημιουργία του αρχείου psf & pdb	41
5.2) Ενυδάτωση (solvate)	41
5.3) Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions)	42
5.4) Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Energy Minimization)	43
5.5) Εξισορρόπηση (Equilibration)	43
5.6) Συστάδες (Clustering)	44
6) Αυτοματοποιημένο docking σε πολλές δομές	45
7) Η ισομορφία GR - 3BQD	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
A) Ανάλυση RMSD	48
B) Αναζήτηση θέσης πρόσδεσης σε συστάδες (clustering)	49
Γ) Αυτοματοποιημένο εξαντλητικό docking σε πολλές δομές	50
Δ) Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του AKBA στον υποδοχέα 3BQD	51
Ε) Μελέτη των δομών 1P93, 3BQD καθώς και της περιοχής πρόσδεσης του AKBA στον υποδοχέα	52
ΣΤ) Επιπτώσεις της πρόσδεσης στη δευτεροταγή δομή	57
Ζ) Σχολιασμός αποτελεσμάτων docking και προσομοιώσεων για εύρεση της θέσης πρόσδεσης	58
Προοπτικές	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ & Scripts	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Σκοπός

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι να βρεθεί μέσω μεθόδων *in silico* η θέση πρόσδεσης του 3-ο-ακέτυλο-11-κετοβήτα μποςγουελικού οξέος (AKBA) στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και στη συνέχεια να υπολογισθεί η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης καθώς και να χαρακτηριστεί το γειτονικό περιβάλλον της θέσης αυτής.

Περίληψη

Τα μποςγουελικά οξέα διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες σε διάφορα βιολογικά μοντέλα με παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα των γλυκοκορτικοειδών, όπως για παράδειγμα καταστολή της απελευθέρωσης των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Ως εκ τούτου, ο υπεύθυνος μοριακός μηχανισμός των μποςγουελικών οξέων, υπεύθυνος για αντιφλεγμονώδη χαρακτηριστικά ίσως να οφείλεται στην παρεμβολή με τον ανθρώπινο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Λόγω εμφανών δομικών ομοιοτήτων με τα γλυκοκορτικοειδή, διεξήγαμε υπολογιστικές μελέτες εύκαμπτης πρόσδεσης (*flexible docking*) για να βρεθεί η θέση σύνδεσης του 3-ο-11-ακέτυλ-κετοβήτα μποςγουελικού οξέος στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, με αφετηρία τον θύλακα πρόσδεσης της δεξαμεθαζόνης και της διακυλοκορτιβαζόλης. Οι διαμορφώσεις του υποδοχέα ελήφθησαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Αποδείχθηκε ότι το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε (*vina*), παρά τις εξαντλητικές δοκιμές, δεν ήταν σε θέση να αναγνωρίσει τον θύλακα πρόσδεσης της δεξαμεθαζόνης ως υποψήφια θέση πρόσδεσης του 3-ο-11-ακέτυλ-κετοβήτα μποςγουελικού οξέος (AKBA). Αντίθετα αναγνωρίστηκε εύκολα ως τέτοια ο θύλακας πρόσδεσης της διακυλοκορτιβαζόλης, που εντοπίζεται στην ίδια θέση αλλά διαθέτει μεγαλύτερο όγκο. Εφαρμόζοντας την μέθοδο γραμμικής ενέργειας αλληλεπίδρασης (LIE) σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που ακολούθησαν τόσο για το σύμπλοκο όσο και για τον ελεύθερο προσδέτη, προέκυψε αρνητική ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης $\Delta G_b = -6,675 \text{ kcal/mol}$ ($K_d = 2\mu\text{M}$), που επιβεβαίωσε ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί να προσδέσει το μποςγουελικό οξύ.

Abstract

Boswellic acids (BAs) possess anti-inflammatory properties in various biological models with similar features to those of glucocorticoids (GCs), such as suppression of the release of pro-inflammatory cytokines. Hence, the molecular mechanism of BAs responsible for their anti-inflammatory features might be attributable to interference with the human glucocorticoid receptor (GR). Due to obvious structural similarities with GCs, we conducted studies to find out the binding site of 3-o-11-acetyl-ketobeta boswellic acid in the GR receptor, using in the beginning dexamethasone (DEX) and then Deacylcortivazol (DAC). The receptor's structures are taken by molecular dynamics simulations. It came out that the software used (vina), despite all the exhausting testing, it wasn't capable of recognizing the binding pocket of DEX as a candidate binding site of 3-o-11-acetyl-ketobeta boswellic acid (AKBA). In contrast, it was readily recognized as such a binding pocket the one of deacylcortivazol, which is located in the same binding site but it has larger volume. Applying the Linear Interaction Energy (LIE) method to molecular dynamics simulations in both the whole complex and the free ligand, there was negative free binding energy $\Delta G_b = -6,675$ kcal/mol ($K_d = 2\mu\text{M}$), which confirmed that the glucocorticoid receptor can bind the boswellic acid.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α) ΟΙ ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΟΥΣ

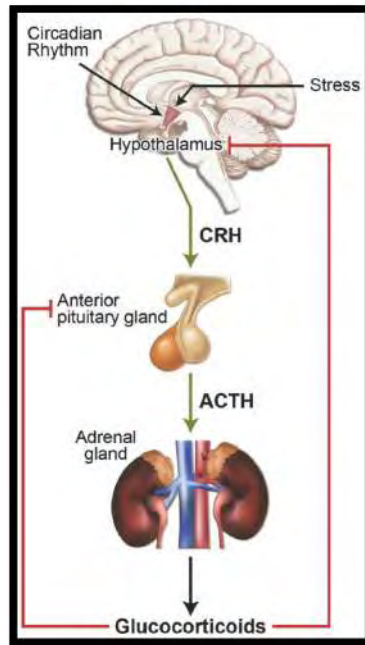
Οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ως απόκριση στη δέσμευση μικρών λιπόφιλων μορίων και μ' αυτόν τον τρόπο εμπλέκονται στον έλεγχο μιας μεγάλης ποικιλίας κυτταρικών διαδικασιών. Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του προσδέτη και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα. Οι προσδέτες ορμονικής φύσεως διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση και στη συνέχεια συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα ή στο εσωτερικό του πυρήνα. Με τη σύνδεση σε συγγενή στοιχεία του DNA, ο συνδεδεμένος με τον προσδέτη υποδοχέας, ενεργοποιεί γονίδια-στόχους και έτσι μεταφέρει το ορμονικό μήνυμα με την αλλαγή στην έκφραση γονιδίων.

Οι φυσικοί προσδέτες των πυρηνικών υποδοχέων είναι λιπόφιλες ορμόνες, μεταξύ των οποίων οι στεροειδείς, η θυρεοειδής ορμόνη T3, όπως επίσης και παράγωγα των βιταμινών A και D. Αυτές οι ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στην αύξηση, διαφοροποίηση, αναπαραγωγή και μορφογένεση. Ο κύριος ρυθμιστικός παράγοντας της μετάδοσης του μηνύματος μέσω πυρηνικών υποδοχέων είναι η ορμονική συγκέντρωση. Η ποσότητα μιας ορμόνης διαθέσιμη για ενδοκυτταρική σύνδεση στον υποδοχέα ελέγχεται από έναν αριθμό διαδικασιών, όπως η παραγωγή και έκκριση της ορμόνης από τον ενδοκρινή ιστό, από τη διαθεσιμότητα της ορμόνης στο κυτταρόπλασμα και από την τροποποίηση της ορμόνης στον ιστό-στόχο [1].

1) Τα γλυκοκορτικοειδή – Μηχανισμός Έκκρισης (Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια)

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες απαραίτητες για τη ζωή που συντίθεται και απελευθερώνονται από το φλοιό των επινεφριδίων κατά ένα κιρκαδικό τρόπο και σε απάντηση στο στρες. Η έκκριση των ορμονών αυτών ελέγχεται από τον άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα ενεργοποιούν τον υποθάλαμο να απελευθερώσει την ορμόνη κορτικοτροπίνη (CRH), η οποία δρα επί της πρόσθιας υπόφυσης για να διεγείρει την σύνθεση και έκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH στη συνέχεια δρα στον φλοιό των επινεφριδίων για να διεγείρει την παραγωγή και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Ενεργώντας σχεδόν σε κάθε ιστό και όργανο στο σώμα, τα γλυκοκορτικοειδή λειτουργούν για την διατήρηση της ομοιόστασης τόσο σε κανονικές ημερήσιες αλλαγές στον μεταβολισμό αλλά και καταστάσεις στρες.

Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν μια πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών, που περιλαμβάνουν τον ενδιάμεσο μεταβολισμό, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, τη σκελετική αύξηση, την καρδιαγγειακή λειτουργία, την αναπαραγωγή, και τη γνωστική λειτουργία. Επίσης, σε ένα κλασικό αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης, τα γλυκοκορτικοειδή στοχεύουν επίσης τον υποθάλαμο και την πρόσθια υπόφυση για να αναστείλουν την παραγωγή και την απελευθέρωση των CRH και ACTH και έτσι περιορίζουν τόσο την έκταση όσο και τη διάρκεια της αύξησης των γλυκοκορτικοειδών [2].



Εικόνα 1: Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών ορμονών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). [2]

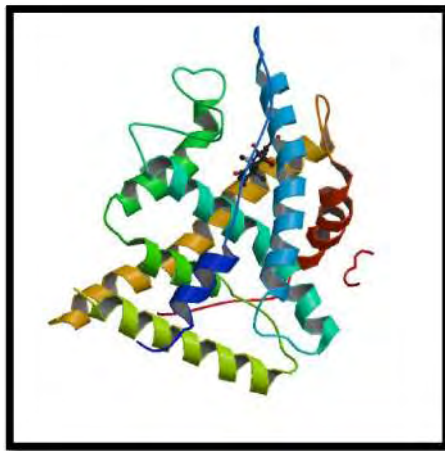
Λόγω των ισχυρών αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών δράσεών τους, τα γλυκοκορτικοειδή είναι ένα από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα στον κόσμο σήμερα. [3,4] Συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται τον τελευταίο μισό αιώνα για την αγωγή φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών όπως για παράδειγμα το άσθμα, αλλεργίες, ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.α. Είναι επίσης κοινώς συνταγογραφούμενα για την πρόληψη απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων και για τη θεραπεία καρκίνων του λεμφοειδούς συστήματος όπως λευχαιμίες, λεμφώματα, και μυελώματα. Δυστυχώς, τα θεραπευτικά οφέλη των γλυκοκορτικοειδών περιορίζονται από σοβαρές παρενέργειες που αναπτύσσονται σε ασθενείς με χρόνια θεραπεία αυτών των στεροειδών όπως για παράδειγμα οστεοπόρωση, γλαύκωμα, ατροφία του δέρματος, διαβήτης κλπ. Επιπλέον, οι ασθενείς που βρίσκονται σε μακροχρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή συχνά αναπτύσσουν ιστο-ειδική αντίσταση γλυκοκορτικοειδών.

Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR, NR3C1) για τον οποίο θα κάνουμε λόγο στη συνέχεια [3, 5, 6] .

2) Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

2.1) Γενικά

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι ένας ρυθμιστικός μεταγραφικός παράγοντας στεροειδών ορμονών που ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Στους ανθρώπους, η πρωτεΐνη GR κωδικοποιείται από το γονίδιο NR3C1 το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31). Με τη δέσμευση του προσδέτη, ο GR ρυθμίζει την έκφραση μίας συστοιχίας γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών στην ανανέωση των οστών, την ωρίμανση των πνευμόνων, και της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού, του καρδιαγγειακού και του κεντρικού νευρικού συστήματος [7].



Εικόνα 2: Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

2.2) Προσδέτες για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή εκτός του ότι ρυθμίζουν τις καταβολικές διαδικασίες, αναστέλλουν και έναν αριθμό φλεγμονωδών αποκρίσεων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συχνά χρησιμοποιούνται ως αντιφλεγμονώδη, ενώ η παρατεταμένη χρήση τους σε υψηλές δόσεις μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα διαφόρων παρενεργειών. Οι προσδέτες που μπορούν να αποσυνδέσουν την trans-ενεργοποίηση από τις ιδιότητες της trans-καταστολής του GR μπορούν δυνητικά να μειώσουν τις

δυσμενείς παρενέργειες της δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Τέτοιοι προσδέτες θα πρέπει να επιφέρουν μια διαφορετική απόκριση ανάλογα με την ικανότητά τους να επάγουν μια ειδική διαμόρφωση στον υποδοχέα και επιπλέον μια εξαρτώμενη από τη διαμόρφωση αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες, συν-ενεργοποιητές και συστατικά του βασικού μηχανισμού μεταγραφής. Εκτός από τα φυσικώς απαντώμενα γλυκοκορτικοειδή κορτιζόλη, κορτιζόνη και κορτικοστερόνη, υπάρχουν τεχνητά γλυκοκορτικοειδή όπως η δεξαμεθαζόνη, η πρεδνιζολόνη και η κλοβεταζόλη που διαφέρουν στην ικανότητά τους να επάγουν GRE-εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση και να καταστέλλουν *in trans* τον προ-φλεγμονώδη πυρηνικό παράγοντα μεταγραφής NF- κ B. Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή με αυξημένα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα έχουν ταυτόχρονα αυξημένη GRE εξαρτώμενη γονιδιακή ενεργοποίηση, και συνεπώς ισχυρότερες παρενέργειες.

Παρ' όλες τις μελέτες, η αναζήτηση τεχνητών γλυκοκορτικοειδών με βελτιωμένη θεραπευτική αναλογία έχει μέχρι στιγμής περιορισμένη επιτυχία [8].

2.3) Έκφραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Όπως αναφέραμε παραπάνω, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ανήκει στην οικογένεια των στεροειδών υποδοχέων και εκφράζεται παντού. Τα επίπεδα mRNA του GR είναι υψηλότερα στον πνεύμονα, στον σπλήνα, στον εγκέφαλο και στο ήπαρ. Αν και έχει ταυτοποιηθεί μόνο ένα γονίδιο, υπάρχουν πολλές ισομορφές του GR ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος και της χρήσης πολλαπλών εκκινητών. Η πυρηνική εισαγωγή του GR α (777 αμινοξέα), της κύριας ισομορφής GR, ελέγχεται και από την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη. Μόνο μετά τη σύνδεση του προσδέτη, σε αυτήν την περιοχή, ενεργοποιείται η εισαγωγή του υποδοχέα στον πυρήνα. Η δέσμευση ορμονών στον GR α καθορίζεται από την 12η έλικα της περιοχής σύνδεσης του προσδέτη. Στο GR β (742 αμινοξέα), αυτή η έκταση των 50 αμινοξέων αντικαθίσταται από μια μοναδική ουρά 15-αμινοξέων που διατηρεί την πρωτεΐνη μόνιμα εντοπισμένη στον πυρήνα. Ο φυσιολογικός ρόλος του GR β εξακολουθεί να αποτελεί θέμα συζήτησης. Έχει καταστεί σαφές ότι ο GR β δεν έχει καμία μεταγραφική δραστηριότητα. Ορισμένοι αναφέρουν ότι ο GR β μπορεί να λειτουργήσει ως κυρίαρχος αρνητικός καταστολέας μεταγραφής λόγω διμερισμού με τον GR α , ενώ

άλλοι δεν διαπίστωσαν σημαντική κατασταλτική δραστηριότητα. Στον άνθρωπο βρέθηκε μια 3^η ισομορφή GR α', οποία διαφέρει από την κύρια GRα ισομορφή, λόγω της παρουσίας ενός επιπλέον αμινοξέος στην περιοχή σύνδεσης του DNA ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος [8, 9, 10, 11].

2.4) Λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Όπως και οι άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς στεροειδών ορμονών, ο GR είναι μια αρθρωτή πρωτεΐνη με διακριτές λειτουργικές και δομικές περιοχές, που περιλαμβάνουν μια περιοχή πρόσδεσης DNA, μια περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και 2 περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF1 & AF2).

Η περιοχή πρόσδεσης DNA (DBD) έχει την ικανότητα να δένει DNA. Το «P-box» εντός αυτής της περιοχής περιέχει τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την ειδική αναγνώριση του στοιχείου απόκρισης. Τα αμινοξέα στην περιοχή δέσμευσης DNA του επίμυος GR αλληλεπιδρούν με ειδικά νουκλεϊνικά οξέα στην κύρια αυλάκωση της DNA έλικας, ορμονο-αποκρινόμενες αλληλουχίες (GRE). Ένα «D-box» στην περιοχή πρόσδεσης DNA εμπλέκεται στον διμερισμό της πρωτεΐνης. Μολονότι είναι μονομερές σε διάλυμα, η περιοχή δέσμευσης DNA σχηματίζει ένα διμερές όταν αλληλεπιδρά με το στοιχείο απόκρισής του. Η περιοχή δέσμευσης DNA δεν μπορεί να διμεριστεί, αλλά η αλληλεπίδραση με GRE δρα ως ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής παρέχοντας ένα ικρίωμα για να δεσμεύσει τις υπομονάδες σε σωστή θέση για διμερισμό. Έτσι, η δέσμευση της πρώτης υπομονάδας ευνοεί τη δέσμευση της δεύτερης. Εκτός από το «D-box» στην περιοχή πρόσδεσης DNA, μια νέα θέση διμερισμού βρίσκεται στη θέση δέσμευσης του προσδέτη του GR. Η θέση σύνδεσης του προσδέτη αποτελείται από α-έλικες και β-ελάσματα που σχηματίζουν ένα υδρόφοβο θύλακα και ένα επιπλέον πλευρικό θυλάκιο. Αυτός ο πλευρικός θύλακας πιστεύεται ότι επιτρέπει την επιλεκτική δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών και ορισμένων μεταλλοκορτικοειδών που έχουν μεγαλύτερους υποκαταστάτες στη θέση C17a από ό,τι άλλα στεροειδή. Αρκετά μοντέλα υποδεικνύουν ότι μετά τη δέσμευση του προσδέτη, η θέση δέσμευσης υφίσταται μια μεταβολή διαμορφώσεως κλείνοντας έτσι τον θύλακα. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στους συν-ενεργοποιητές και τον GR είναι πολύ ευαίσθητη στη δομή του προσδέτη, που είναι προσδεδεμένος στο θύλακα.

Η ευαισθησία διαμόρφωσης της αλληλεπίδρασης του συν-ενεργοποιητή με τον GR οφείλεται στις μεταβολές στη δομή του υποδοχέα που προκαλούνται από τη δομή του προσδέτη, ο οποίος συνδέεται στον θύλακα της περιοχής δέσμευσης (LBD). Έχει προταθεί ότι ο υποδοχέας συμπυκνώνεται γύρω από τον προσδέτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δέσμευσης, μεταδίδοντας έτσι δομικές αλλαγές στον προσδέτη, απευθείας στον υποδοχέα και στις επιφάνειες του υποδοχέα που αλληλεπιδρούν με τους συν-ενεργοποιητές. Έτσι, οι προσδέτες μπορεί να αλλάξουν την ικανότητα του υποδοχέα να δεσμεύεται στους συν-ενεργοποιητές. Το N- τελικό άκρο του GR περιέχει την μη εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή AF-1 περιοχή trans-ενεργοποίησης. Η περιοχή αυτή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TFIIID και το TBP του γενικού μηχανισμού μεταγραφής. Έχει προταθεί ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες, αυτή η περιοχή σχηματίζει μία α-ελικοειδή διαμόρφωση η οποία είναι απαραίτητη για trans-ενεργοποίηση. Η δεύτερη περιοχή trans-ενεργοποίησης, περιέχεται εντός του LBD στο C-τελικό άκρο του GR. Σε αντίθεση με την AF-1, η trans-ενεργοποίηση της AF-2 εξαρτάται από τη δέσμευση του προσδέτη. Τέλος, οι AF-1 και AF-2 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ορισμένους συνενεργοποιητές [8].

2.5) Σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

2.5.1) Κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης

Σε περίπτωση απουσίας της ορμόνης, ο GR βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως μέρος ενός μεγάλου συμπλόκου πολλαπλών πρωτεϊνών που περιλαμβάνει πρωτεΐνες συνοδούς (hsp90, hsp70, και p23) και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506 (FKBP51 και FKBP52). Αυτές οι πρωτεΐνες διατηρούν τον υποδοχέα σε μια διαμόρφωση που είναι μεταγραφικώς ανενεργή αλλά ευνοεί τη δέσμευση προσδέτη. Η κορτιζόλη, το πιο άφθονο ενδογενώς γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο, μεταφέρεται στο αίμα κατά κύριο λόγο συνδεδεμένο με σφαιρίνη που δεσμεύει τα κορτικοστεροειδή (CBG). Η CBG διευκολύνει όχι μόνο τη διανομή της κορτιζόλης, αλλά παίζει επίσης ρόλο στην απελευθέρωσή της στους ιστούς. Σε

αντίθεση με την κορτιζόλη, τα περισσότερα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεν δεσμεύουν CBG και δεν μεταβολίζονται. Κατά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, ο GR υφίσταται μία διαμορφωτική αλλαγή με αποτέλεσμα την αποδέσμευση των πρωτεϊνών που συνδέονται. Αυτή η δομική αναδιάταξη εκθέτει τα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού, και ο GR ταχέως μετατοπίζεται εντός του πυρήνα μέσω πυρηνικών πόρων [12].

Μόλις μπει στο εσωτερικό του πυρήνα, ο GR συνδέεται άμεσα με GREs και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων (Εικόνα 3). Η συναινετική αλληλουχία GRE, GGAACA_nnnTGGTTCT, είναι μια ατελής παλίνδρομη αλληλουχία που αποτελείται από δύο ημι-θέσεις 6 bp. Ο GR δεσμεύει αυτό το στοιχείο ως ένα ομοδιμερές, με κάθε μισή πλευρά να καταλαμβάνεται από μια υπομονάδα του υποδοχέα. Η απόσταση τριών νουκλεοτιδίων μεταξύ των δύο ημι-θέσεων απαιτείται αυστηρά για να διμερίζεται ο GR σε αυτό το στοιχείο. Το στοιχείο GRE έχει δείχθει ότι διαμεσολαβεί στην γλυκοκορτικοειδο-εξαρτώμενη επαγωγή πολλών γονιδίων και ως εκ τούτου, συχνά αναφέρεται ως ένα ενεργοποιητικό ή θετικό GRE. Ένα αρνητικό στοιχείο GRE (nGRE) έχει επίσης περιγραφεί ότι μεσολαβεί στη γλυκοκορτικοειδο-εξαρτώμενη καταστολή ειδικών γονιδίων. Η συναινετική αλληλουχία nGRE, CTCC (n)₀₋₂ GGAGA, είναι παλίνδρομη αλλά διαφέρει από την κλασική GRE στην ακολουθία, έχοντας ένα μεταβλητό αποστάτη που κυμαίνεται από 0 έως 2 νουκλεοτίδια, καθώς και στο ότι καταλαμβάνεται από δύο μονομερή GR που δεν ομοδιμερίζονται [2].

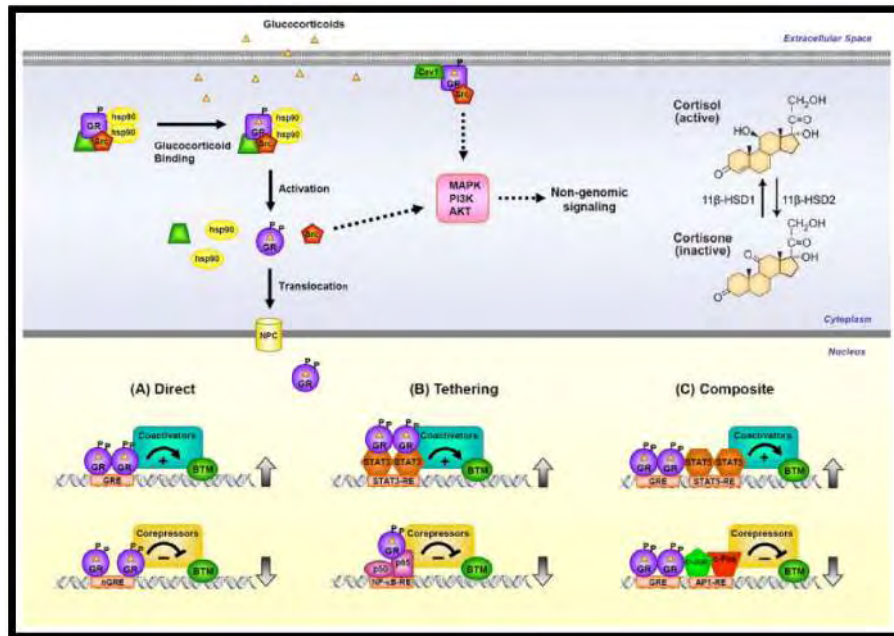
Παγκόσμιες μελέτες του GR δείχνουν ότι μόνο ένα μικρό κομμάτι των GREs πράγματι καταλαμβάνεται από τον υποδοχέα, και οι ειδικές θέσεις δέσμευσης του GR ποικίλουν με έναν ιστό-ειδικό τρόπο λόγω των διαφορών στην προσβασιμότητα της χρωματίνης και την έκθεση του GRE. Ακόμη, η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών στην οποία ο GR δεσμεύει GREs και ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου ποικίλλει σε όλο το γονιδίωμα. Μερικά GREs καταλαμβάνονται από τον GR σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών (υπερευαισθησία) ενώ άλλα απαιτούν υψηλές δόσεις του προσδέτη για να λάβει χώρα η πρόσδεση με τον GR. Τόσο η προσβασιμότητα χρωματίνης όσο και άλλες πρωτεΐνες που δεσμεύονται με DNA φαίνεται να ρυθμίζουν την ευαισθησία των συγκεκριμένων GREs [14, 15].

Ευρείες γονιδιωματικές αναλύσεις έχουν επίσης βρει ότι η πλειονότητα των θέσεων δέσμευσης GR βρίσκονται έξω από τον εκκινητή των γονιδίων που αποκρίνονται σε γλυκοκορτικοειδή σε διαγονιδιακές ή ενδογονιδιακές περιοχές, συχνά μακριά από τη θέση έναρξης μεταγραφής.

Η αλληλεπίδραση του GR με το DNA είναι ιδιαίτερα δυναμική, με τον GR να εναλλάσσεται μεταξύ δεσμευμένης και μη δεσμευμένης κατάστασης κάθε λίγα δευτερόλεπτα . Μόλις συνδεθεί με το GRE, ο υποδοχέας υφίσταται πρόσθετες διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν στην πρόσληψη συρρυθμιστών και συμπλοκών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, που ρυθμίζουν τους ρυθμούς μεταγραφής του γονιδίου επηρεάζοντας τη δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II.

Ο GR μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων με φυσική αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες μεταγραφής (Εικόνα 3). Η συσχέτιση του GR με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας STAT, είτε εκτός από είτε σε συνδυασμό με τη δέσμευση GRE, έχει δειχθεί ότι ενισχύει τη μεταγραφή των αποκρινόμενων γονιδίων. Σε αντίθεση, η αλληλεπίδραση του GR με τους προφλεγμονώδεις παράγοντες μεταγραφής, AP1 και NF-κB, ανταγωνίζεται τη δραστηριότητά τους και θεωρείται ότι είναι ένας κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή. Ο GR δεσμεύεται άμεσα στην Jun υπομονάδα του AP1 και στην p65 υπομονάδα του NF-κB και παρεμβαίνει στη λειτουργία ενεργοποίησης αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Για μερικά γονίδια, η καταστολή επιτυγχάνεται από την ίδια πρόσδεση του GR σε αυτές τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA χωρίς ο ίδιος να αλληλεπιδρά απευθείας με το DNA. Για άλλα γονίδια, ωστόσο, ο GR παρουσιάζει έναν σύνθετο τρόπο λειτουργίας, με δέσμευσης απευθείας σε ένα GRE και φυσική συσχέτιση με AP1 ή NF-κB δεσμευμένα σε γειτονικές θέσεις επί του DNA [2] .

2.5.2) Μη κλασσικό μονοπάτι σηματοδότησης



Εικόνα 3: Μονοπάτια σηματοδότησης GR. Ο ενεργοποιημένος από γλυκοκορτικοειδή GR ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με 3 βασικούς τρόπους: με δέσμευση απευθείας σε DNA (A), με αλληλεπίδραση του ίδιου με άλλους παράγοντες μεταγραφής που δένουν DNA (B), ή με δέσμευση απευθείας σε DNA και αλληλεπίδραση με γειτονικούς παράγοντες μεταγραφής που προσδένουν DNA (C), ο GR μπορεί επίσης να δώσει σήμα μέσω ενός μη-γονιδιωματικού τρόπου με μεταβολές στη δραστηριότητα διαφόρων κινασών [2].

Φαίνεται ότι ο GR μπορεί επίσης να δράσει μέσω μη γονιδιωματικών μηχανισμών (Εικόνα 3) για την πρόκληση ταχέως κυτταρικών αποκρίσεων που συμβαίνουν μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά και δεν απαιτούν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Πολλαπλοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτά τα γεγονότα σηματοδότησης που τελικά προσκρούουν στη δράση των διαφόρων κινασών, όπως η PI3K, AKT, και MAPK [2, 16].

2.6) Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ως φαρμακευτικός στόχος

Η εμπλοκή του υποδοχέα στη ρύθμιση πληθώρας βιολογικών δράσεων στον οργανισμό τον καθιστά φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων όπως διαβήτη, διαταραχές ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνος. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αποτέλεσε έναν από τους πρώτους φαρμακευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη, μέσω της ρύθμισης της δράσης του όσο αφορά τη σύνθεση των γλυκονογεννητικών ενζύμων, άρα και ρύθμιση της διατήρησης της ομοιόστασης της γλυκόζης. Επιπλέον, οι αντιφλεγμονώδεις ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους, καθιστούν τα γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόλη) ως τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση αλλεργιών, φλεγμονών, διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος και αποφυγής απόρριψης μοσχευμάτων. Επίσης τα γλυκοκορτικοειδή συνταγογραφούνται ευρέως για την αντιμετώπιση διάφορων αιματολογικών καρκίνων λόγω των ιστοειδικών αποπτωτικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους.

2.7) Εκλεκτικοί αγωνιστές υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (Selective, Glucocorticoid Receptor, Agonist, SEGRA)

Η κατανόηση της μοριακής βάσης που αποτελεί τη βάση των θεραπειών και παρενεργειών έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια από τον συνδυασμό μοριακής βιολογίας και την ανάλυση διαγονιδιακών ποντικών με ειδικούς τύπους κυττάρων ή μεταλλάξεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με επιλεκτική λειτουργία. Με βάση αυτά τα ευρήματα, οι πρώτες προσπάθειες σχεδιασμού επιλεκτικών αγωνιστών GR (SEGRA) έχουν διεξαχθεί και δοκιμαστεί με σκοπό να βρεθεί η θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα αλλά και τυχόν παρενέργειες από τη χρήση τους. Οι SEGRA είναι μια κατηγορία πειραματικών φαρμάκων με αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτική ή αντικαρκινική δράση των κλασσικών γλυκοκορτικοειδών,

αλλά με λιγότερες παρενέργειες, όπως πχ η ατροφία του δέρματος και η επαγωγή σύνθεσης γλυκόζης.

Αρκετές φαρμακευτικές εταιρείες και πανεπιστημιακές ομάδες έχουν εργαστεί για την αναγνώριση συγκεκριμένων προσδετών GR με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και μειωμένες παρενέργειες. Οι πρώτοι διαχωρισμένοι προσδέτες GR δημοσιεύθηκαν από τον Roussel-Uclaf: RU 24782, RU 24858 και RU 40066. Όλες αυτές οι ενώσεις έχουν μια στεροειδή δομή και δείχνουν μια καλή *in vitro* διάσταση. Δυστυχώς, αυτή η *in vitro* διάσταση δεν διατηρούνταν στην *in vivo* κατάσταση. Ενώ το RU 24858 ήταν ως αντιφλεγμονώδες ενεργό, ως πρεδνιζολόνη σε μοντέλο άσθματος αρουραίου προκάλεσε παρενέργειες όπως αυτές του ίδιου του στεροειδούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη στεροειδή δομή της ένωσης. Είναι πιθανό αυτό το παράγωγο να μεταβολίζεται *in vivo* με τέτοιο τρόπο ώστε να αποδίδει μια ένωση που συμπεριφέρεται σαν ένα κλασικό γλυκοκορτικοειδές [18].

Η κατάσταση άλλαξε με την ανακάλυψη δύο νέων δομικά διακριτών μη στεροειδών προσδετών του GR: των AL-438 και ZK 216348. Το AL-438, ένα παράγωγο της βενζοπυρανο [3,4-f] κινολίνης, βρέθηκε να αναστέλλει αποτελεσματικά την παραγωγή της IL-6 και της E-σελεκτίνης, μέσω *trans* καταστολής, ενώ παρουσιάζει λιγότερη δραστικότητα σε πειράματα *trans* ενεργοποίησης. Αυτή η διάσταση επιβεβαιώθηκε επίσης *in vivo*. Το AL-438 αναστέλλει τη φλεγμονή σε ένα μοντέλο άσθματος αρουραίου, ενώ παρουσιάζει μειωμένη πιθανότητα επαγωγής γλυκόζης στο αίμα, ενός αντιπροσωπευτικού δείκτη για την πρόκληση διαβήτη, η οποία είναι μια παρενέργεια που είναι γνωστό ότι συνδέεται με μηχανισμούς *trans* ενεργοποίησης. Όσον αφορά στο ZK 216348, αυτό αναστέλλει την παραγωγή IL-8 και επάγει λιγότερα μεσολαβούμενα από διενεργοποίηση αποτελέσματα, όπως την επαγωγή της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (TAT), ενός από τα βασικά ένζυμα που συμμετέχουν στη γλυκονεογένεση. Αυτό το προφίλ φαίνεται πως διατηρείται σε *in vivo* πειράματα ενώ παράλληλα φάνηκε ότι παρουσιάζει λιγότερη ατροφία του δέρματος από ό,τι τα GC μετά από μακροχρόνια τοπική αγωγή. Εκτός από τα παραπάνω, υπάρχουν και άλλα τέτοια μόρια που μελετήθηκαν, τα οποία όμως δε θα εξετάσουμε εδώ [18].

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι επιβλαβείς παρενέργειες των φαρμακευτικών γλυκοκορτικοειδών παραμένουν απογοητευτικές για τους κλινικούς ιατρούς και τους

ασθενείς τους. Ως εκ τούτου, έγιναν έντονες προσπάθειες όπως είδαμε και παραπάνω για την ανάπτυξη SEGRA, οι οποίοι διατηρούν την αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που θεωρείται σημαντική για πολλές από τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών αλλά χάνουν τη θετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που θεωρείται ότι στηρίζεται σε πολλές από τις δυσμενείς επιπτώσεις τους. Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί SEGRA, αλλά λίγοι χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές και αρκετές πρόσφατες μελέτες αμφισβήτησαν τόσο την πρόταση όσο και τη χρησιμότητα αυτών των αναλόγων ως θεραπευτικών παραγόντων. Είναι σαφές ότι απαιτούνται περισσότερες έρευνες για να ξεπεραστεί η έλλειψη πληροφοριών σε μοριακό επίπεδο για το πώς τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την φλεγμονώδη απόκριση και προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες [17].

B) ΤΑ ΜΠΟΣΓΟΥΕΛΙΚΑ ΟΞΕΑ (BOSWELLIC ACIDS – BA)

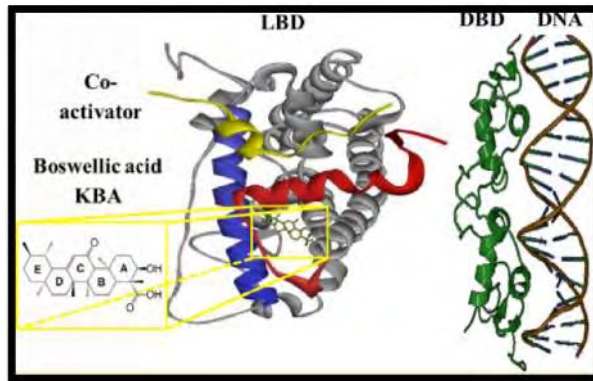
1) Εισαγωγή

Τα Μποσγουελικά οξέα (BAs) είναι πεντακυκλικά τριτερπένια που είναι φαρμακολογικά δραστικά συστατικά του ελαστικού ελαίου της ρητίνης του είδους *Boswellia* παραδοσιακά γνωστό ως λιβάνι. Έχουν εντοπιστεί 12 διαφορετικά πεντακυκλικά τριτερπένια, συμπεριλαμβανομένων και μποσγουελικών οξέων (BA) στη ρητίνη του λιβανιού. Πάνω από χιλιάδες χρόνια, το λιβάνι έχει χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικούς πολιτισμούς ως απολυμαντικό, για να αναζωογονήσει τον αέρα και να καταπολεμήσει τις δυσάρεστες οσμές αλλά και για τελετουργικούς σκοπούς. Η ρητίνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως πολύτιμη θεραπεία για ποικίλες ασθένειες. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου τμήματος του 20ού αιώνα, η ρητίνη έλαβε επιστημονικό ενδιαφέρον ως αντιφλεγμονώδες φυτικό φάρμακο, και εκχυλίσματα της ρητίνης έχουν εφαρμοστεί για τη θεραπεία μιας ποικιλίας χρόνιων φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών. Στην πραγματικότητα, πολυάριθμες κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα των παρασκευασμάτων λιβανιού στη θεραπεία του άσθματος, των φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου, του καρκίνου και της αρθρίτιδας [19]. Φαρμακολογικές μελέτες αποκάλυψαν ανασταλτικές δράσεις των εκχυλισμάτων λιβανιού στον καταρράκτη αντιδράσεων του αραχιδονικού οξέος, δηλαδή στη σύνθεση των προσταγλαδινών (αναστολή της κυκλοοξυγενάσης (COX) και μικροσωμικής συνθάσης της προσταγλαδίνης E2 (mPGES)-1) και στα λευκοτριένια (αναστολή της 5-λιποξυγενάσης (5-LO)) [19]. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα της ρητίνης και μερικά από τα δραστικά της συστατικά αναστέλλουν την απελευθέρωση κυτταροκινών από μονοκύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των προφλεγμονωδών ιντερλευκινών (IL-1, IL-2, IL-6) καθώς και των INF-γ και TNF-α. Τα πεντακυκλικά τριτερπένια BA πιστεύεται ότι είναι οι φαρμακολογικά δραστικοί παράγοντες-κλειδιά των παρασκευασμάτων λιβανιού και υπάρχουν συσσωρευμένα στοιχεία για αντιφλεγμονώδεις και αντινεοπλασματικές δράσεις τους σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα. Οι φαρμακολογικές δράσεις των BA αποδίδονται σε μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν τη διαδρομή NFκB, το μονοπάτι των MAPK και τη σηματοδότηση Ca²⁺, όπως επίσης στη στόχευση πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη φλεγμονή με παραδείγματα τις 5-LO, COX-1,

mPGES-1, τύπου αιμοπεταλίων 12-λιποξυγενάση (p12-LO), καθρεψίνη G, και ελαστάση ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLE) [19].

Η κλινική εφαρμογή των εκχυλισμάτων λιβανιού συμπίπτει ευρέως με εκείνη των γλυκοκορτικοειδών (GCs) και οι δομικές ομοιότητες μεταξύ GCs και BA είναι εμφανείς. Αυτή η παρατήρηση φαίνεται να δείχνει ότι τα BA θα μπορούσαν να δρουν ως προσδέματα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR συμβάλλει στις ανοσοκατασταλτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των GC με διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς. Σε σχέση με τα προηγούμενα οι δομές των BA και των GC μελετήθηκαν με βάση το ότι οι δομικές ομοιότητες φαρμάκων αντικατοπτρίζουν έναν κοινό μοριακό μηχανισμό δράσης.

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με την πρόσδεση ενός BA, του 3-o-acetyl-11-ketobeta BA (AKBA), στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [19].

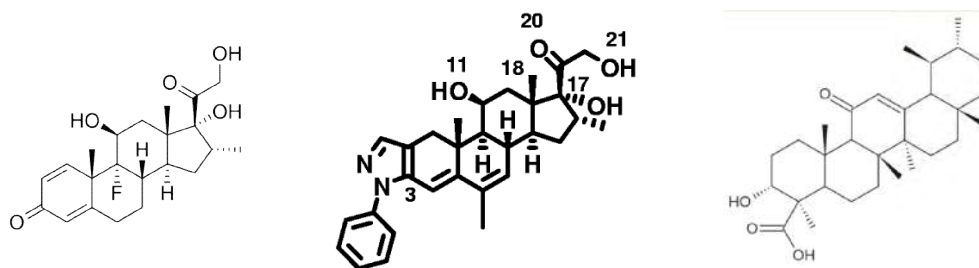


Εικόνα 4: Πρόσδεση BA στον υποδοχέα GR [19]

2) Ο θύλακας πρόσδεσης του DAC

Για να κατανοηθούν οι σχέσεις δομής - δραστηριότητας για διάφορα συνθετικά στεροειδή υπάρχουν διάφορες δομές της περιοχής LBD του GR που προσδένει το DEX και τον ανταγωνιστή RU486 προσφέροντας μια πρώτη εικόνα. Και στις δύο δομές, το GR LBD υιοθετεί μια ελικοειδή δέσμη που ενσωματώνει μια κοιλότητα στο κάτω μισό της επικράτειας για δέσμευση του προσδέτη. Στη δεσμευμένη με DEX δομή, ο θύλακας δέσμευσης του προσδέτη είναι εντελώς κλειστός, με όγκο περίπου 540 \AA^3 .

Η κετόνη C-3 από τον δακτύλιο A του στεροειδούς δημιουργεί ένα ζεύγος δεσμών υδρογόνου με δύο συντηρημένα αμινοξέα, τα R611 και Q570, τα οποία σφραγίζουν τη μία πλευρά του θύλακα κατά μήκος των ελίκων H3 και H7. Η άλλη πλευρά του θύλακα σφραγίζεται από την έλικα H12 (ή έλικα AF-2), η οποία κάνει άμεση επαφή με το υδροξύλιο C-11 και το μεθύλιο C-18 του δεσμευμένου στεροειδούς. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις με το DEX κλειδώνουν την έλικα AF-2 στην ενεργή διαμόρφωση που είναι ικανή για τη δέσμευση του μοτίβου LXXLL του συν-ενεργοποιητή TIF2. Αντίθετα, ο μεγάλος υποκαταστάτης C-11 στη δομή RU486 ωθεί το AF-2 εκτός της ενεργού θέσης, απενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφική λειτουργία του υποδοχέα.



Εικόνα 5: Συντακτικοί τύποι των μορίων δεξαμεθαζόνη (DEX), διακυλοκορτιβαζόλη (DAC) και 3-ο-11-ακετυλο-κετοβήτα μποςγουελικό οξύ (AKBA)

*Από αριστερά προς τα δεξιά.

Αν και οι δομές DEX και RU486 παρέχουν έναν λεπτομερή μηχανισμό για την εξαρτώμενη από προσδέτη ρύθμιση του υποδοχέα, αποτυγχάνουν για έναν μεγάλο αριθμό στεροειδών και μη στεροειδών προσδετών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η δεακυλοκορτιζόλη (DAC), ένα γλυκοκορτικοειδές υψηλής συγγένειας. Εξαιτίας του

μεγέθους του, το οποίο οφείλεται στη μεγάλη ομάδα φαινυλοπυραζολίου του DAC, η δομή GR που συνδέεται με DEX δεν εμφανίζει αρκετό χώρο στην περιοχή δέσμευσης του προσδέτη με αποτέλεσμα να υπάρχει πρόβλημα στη σύνδεσή τους. Επομένως, πρέπει να συμβεί κάποια αναδιάταξη του GR LBD κατά τη σύνδεση του με DAC.

Σε μια μελέτη προσδιορίστηκε λοιπόν η δομή GR LBD με πρόσδεση του DAC, η οποία αποκαλύπτει ένα εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος του θύλακα δέσμευσης του προσδέτη στον GR που επεκτείνεται στο άνω μισό του LBD. Να σημειωθεί ότι η δομή της θέσης σύνδεσης του συνενεργοποιητή παραμένει αμετάβλητη. Ο διευρυμένος θύλακας GR επιτρέπει την προσάρτηση διαφόρων στεροειδών και μη στεροειδών προσδετών GR που περιέχουν μια ομάδα φαινυλοπυραζολίου. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε τελικά αυτόν τον υποδοχέα για να μπορέσουμε να προσδέσουμε το 3-ο-ακέτυλο-11-κετοβήτα μποςγονελικό οξύ, το οποίο είναι επίσης ένα μεγάλο μόριο [7].

ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Στο μέρος αυτό θα αναφερθούν τα χαρακτηριστικά και ο τρόπος λειτουργίας του λογισμικού και των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανά χειρας διπλωματική εργασία.

1) Πρόσδεση (Docking)

Τα προγράμματα docking χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την δομή των διαμοριακών συμπλόκων που δημιουργούνται μεταξύ δύο ή περισσότερων μορίων. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών υποδοχέων (receptors) και προσδετών (ligands). Η μελέτη συμπλόκων πρωτεϊνών είναι βασική στην βιοχημεία καθώς τέτοια σύμπλοκα έχουν συνήθως λειτουργικό ρόλο. Ακριβείς μέθοδοι πρόβλεψης docking θα μπορούσαν να δώσουν βασική γνώση για την δομή και την λειτουργία τέτοιων συμπλόκων και κατ' επέκταση τον ρόλο τους στους μηχανισμούς που συμμετέχουν. Ο πιο απλός και αποτελεσματικός τρόπος πρόβλεψης που χρησιμοποιείται και σήμερα βασίζεται στην συμπληρωματικότητα των προσδετών με τα μόρια που αλληλεπιδρούν.

Γενικά όταν μελετάται ο τρόπος αλληλεπίδρασης, ο πιο ορθός τρόπος θα ήταν η εφαρμογή της κβαντομηχανικής. Μια τέτοια προσέγγιση όμως δεν είναι καθόλου αποτελεσματική καθώς, προς το παρόν, η χρήση της κβαντομηχανικής περιορίζεται σε συστήματα λίγων μόνο ατόμων.

Έτσι λοιπόν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι δυνάμεις που δημιουργούνται κατά την αλληλεπίδραση καθώς και το μέγεθος των μορίων που αλληλεπιδρούν. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως η αλληλεπίδραση μιας πρωτεΐνης με έναν προσδέτη (ligand) διαφέρει σε σχέση με αυτήν μεταξύ δύο πρωτεϊνών και αυτό γιατί ένας προσδέτης είναι πολύ μικρό μόριο σε σχέση με μία πρωτεΐνη [21]. Λόγω του μεγέθους τους οι πρωτεΐνες αντιμετωπίζονται στους αλγόριθμους docking ως άκαμπτα μόρια. Ωστόσο πολλές φορές δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες ή στους προσδέτες είναι απαραίτητες για να έχουμε ένα αποτελεσματικό docking. Ένας

στόχος τα τελευταία χρόνια είναι να μπορέσουν οι πρωτεΐνες να αντιμετωπισθούν ως εύκαμπτα μόρια [20].

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας έγινε προσπάθεια να λυθεί το πρόβλημα του εύκαμπτου docking αναζητώντας την κατάλληλη διαμόρφωση του υποδοχέα ανάμεσα σε διαμορφώσεις που προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

➤ Βήματα docking (protein-ligand)

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε για το docking είναι το Autodock. Πρόκειται για ένα ευέλικτο πρόγραμμα πρόσδεσης πρωτεΐνης προσδέματος που βασικά λειτουργεί ως διαδικασία δύο σταδίων: ο υπολογισμός του χάρτη των αλληλεπιδράσεων της θέσης πρόσδεσης με ορισμένους γενικούς τύπους ατόμων (που εκτελούνται με αυτόματο πλέγμα) και η παρουσίαση του προσδέτη σε σχέση με αυτόν τον χάρτη αλληλεπίδρασης (που εκτελείται με το autodock). Τα διάφορα βήματα που ακολουθούνται συνοψίζονται παρακάτω:

i. Προετοιμασία πρωτεΐνης και προσδέτη

Η λειτουργία βαθμολόγησης Autodock εφαρμόζεται με τη χρήση προσαρμοσμένου πεδίου ισχύος AMBER, επομένως τα άτομα της πρωτεΐνης και του προσδέτη πρέπει να ρυθμιστούν σύμφωνα με αυτό το force field. Τα αρχεία φορτώνονται τροποποιούνται με προσθήκη υδρογόνων και προετοιμάζονται για docking.

ii. Χαρτογράφηση της θέσης δέσμευσης

Το Autodock υπολογίζει τα πιθανά σημεία αλληλεπίδρασης στη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης πριν από την εξερεύνηση των διαμορφώσεων. Το επόμενο βήμα είναι λοιπόν η δημιουργία του δικτύου. Αυτό γίνεται ορίζοντας τα κατάλληλα πεδία στην επιλογή του grid box. Αυτό μπορεί να διαρκέσει λίγη ώρα.

iii. Docking

Μόλις υπολογιστούν τα πλέγματα μπορεί να γίνει το docking. Πρώτα γίνεται η επιλογή του υποδοχέα και έπειτα του προσδέτη. Χρησιμοποιείται ο κατάλληλος αλγόριθμος και προκύπτουν οι θέσεις πρόσδεσης.

iv. Ανάλυση

Μόλις τελειώσει ο υπολογισμός, μπορούν να αναλυθούν οι διαμορφώσεις που έχουν προκύψει και η ενέργειά τους μέσω του adt.

➤ Προσεγγίσεις

Έχει συντελεστεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά τις διάφορες μεθόδους docking. Μία προσέγγιση είναι αυτήν της μοριακής δυναμικής. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει υπολογισμούς και λύσεις των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα. Μία δεύτερη προσέγγιση είναι αυτή με τις μεθόδους Monte Carlo, οι οποίες είναι μέθοδοι προσομοίωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλόκων [8]. Η έκφραση Monte Carlo χρησιμοποιείται για να περιγράψει αλγορίθμους οι οποίοι προσεγγίζουν στοχαστικά ή μέσω τυχαίας δειγματοληψίας τα σύμπλοκα πρωτεϊνών. Μία ακόμη προσέγγιση είναι αυτήν που χρησιμοποιεί γενετικούς αλγορίθμους. Η κεντρική ιδέα αυτού είναι η προσέγγιση μιας λύσεις στα προβλήματα που παρουσιάζονται στο docking μέσω γενετικών προσεγγίσεων (μεταλλάξεις, αποσιωπήσεις κλπ). Άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι αυτήν του Fragment-based methods. Με αυτόν τον τρόπο τα μόρια αντιμετωπίζονται τμηματικά ως κομμάτια και κάθε μέλος μελετάτε ξεχωριστά καταλήγοντας σε συνδυασμό των αποτελεσμάτων.

Ακόμη μια προσεγγιστική μέθοδος είναι η Point complementary που βασίζεται στην αξιολόγηση της μορφής ή/και της χημικής συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλεπιδρώντας μορίων. Άλλες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιήσει την γεωμετρική απόσταση για την μελέτη τέτοιων συμπλόκων. Τέλος δύο ακόμα μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι Tabu και Systematic researches με την πρώτη να είναι μια στοχαστική προσέγγιση ενώ η δεύτερη ελέγχει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς [20].

2) Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Μία από τις θεωρητικές μεθόδους με τις οποίες μπορούμε να μελετήσουμε πρωτεΐνες, και γενικότερα μακρομόρια, είναι οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations). Όπως υποδηλώνει και το όνομα, ουσιαστικά πραγματοποιείται μία προσομοίωση των μεταβολών των ιδιοτήτων (θέσεις ατόμων, ταχύτητες, κτλ.) ενός μοριακού συστήματος, ως συνάρτηση του χρόνου. Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής έγιναν δυνατές χάρη στην ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών.

Ουσιαστικά, όλη η εργασία γίνεται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται στον υπολογιστή, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ της μικροσκοπικής θεώρησης και του μακροσκοπικού κόσμου του εργαστηρίου. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος [23].

Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς και ένα ενεργειακό εύρος. Τα μακρομόρια, και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες, εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών κινήσεων, από τις ατομικές ταλαντώσεις που είναι πολύ γρήγορες (fs) και πολύ εντοπισμένες, έως τις αργές κινήσεις που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου, όπως μία αναδίπλωση (μs-ms). Αρκετές από αυτές τις κινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία μιας πρωτεΐνης.

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αναλύσεων Μοριακής Δυναμικής, ανάλογα με το μοντέλο (και κατ' επέκταση τον μαθηματικό φορμαλισμό) που επιλέγεται για να αναπαραστήσει ένα φυσικό σύστημα: Οι αναλύσεις που χρησιμοποιούν τους νόμους της κλασικής μηχανικής και οι αναλύσεις που λαμβάνουν υπ' όψιν τους την κβαντομηχανική φύση του χημικού δεσμού. Προς το παρόν, μόνο η «κλασική» Μοριακή Δυναμική, αυτή δηλαδή που χρησιμοποιεί τους νόμους της κλασικής μηχανικής, είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων [24].

Μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελείται από την αριθμητική, βήμα προς βήμα, επίλυση των κλασικών εξισώσεων της κίνησης [23]:

$$m_i \ddot{r}_i = f_i \quad f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} U$$

Η πρώτη εξίσωση είναι η γνωστή εξίσωση του 2ου Νόμου του Νεύτωνα, που μας λέει ότι η δύναμη f ισούται με τη μάζα m επί την επιτάχυνση (δεύτερη παράγωγος του r ως προς τον χρόνο). Η δεύτερη εξίσωση μας λέει ότι η δύναμη είναι η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας u συναρτήσει της θέσης r .

Όπως γίνεται αντιληπτό, τα άτομα ενός βιομορίου δέχονται ένα σύνολο δυνάμεων λόγω της θέσης τους, για τον υπολογισμό των οποίων χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν το δυναμικό συναρτήσει της θέσης (συναρτήσεις δυναμικού ή force fields), όπως είναι το AMBER και το CHARMM. Στις προσομοιώσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικού CHARMM, όπως θα δούμε πιο αναλυτικά παρακάτω. Μια μαθηματική συνάρτηση δυναμικού, περιλαμβάνει εξισώσεις που περιγράφουν την μεταβολή της δυναμικής ενέργειας που οφείλεται α) σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό και β) σε αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εξισώσεις αυτές:

Η εξίσωση :

$$v^{LJ}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals [25]. Το δυναμικό αυτό καλείται δυναμικό Lennard-Jones. Το σ είναι η απόσταση κατά την οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Το ϵ έχει διαστάσεις ενέργειας. Το r είναι η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων.

Η εξίσωση :

$$v^{\text{Coulomb}}(r) = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 r}$$

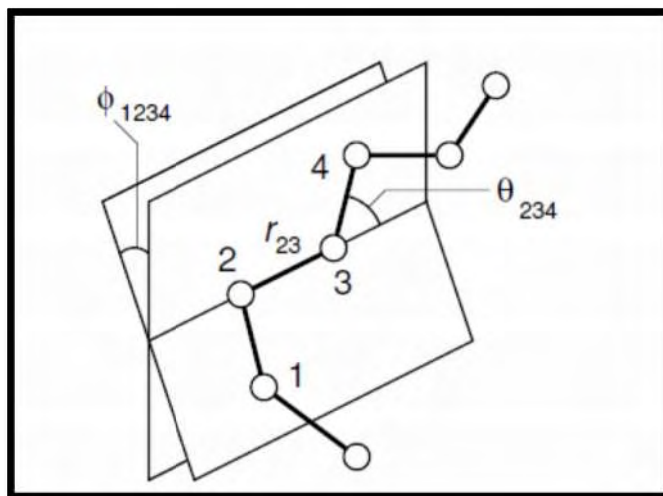
αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, και οι οποίες διέπονται από τον νόμο του Coulomb. Τα Q_1 και Q_2 είναι τα φορτία

δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού και το π είναι η γνωστή σταθερά που ισούται με 3,1416.

Τέλος, η εξίσωση:

$$\begin{aligned}
 U_{\text{intramolecular}} = & \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{\text{eq}})^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{bend angles}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{\text{eq}})^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsion angles}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m))
 \end{aligned}$$

αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Το δυναμικό αυτό αποτελείται από τρεις όρους: Ο πρώτος όρος περιγράφει την δυναμική ενέργεια λόγω απομάκρυνσης των ατόμων από την θέση ισορροπίας σε ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στην δυναμική ενέργεια λόγω κάμψεων και ο τρίτος στην δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων. Τα παραπάνω γίνονται κατανοητά με την βοήθεια της **εικόνας 6**:



Εικόνα 6

Το r_{23} συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με χημικό δεσμό. Η θ_{234} συμβολίζει την γωνία μεταξύ των φορέων 2 διαδοχικών χημικών δεσμών. Τέλος, η γωνία ϕ_{1234} συμβολίζει την γωνία στρέψης [23].

Συνοψίζοντας λοιπόν, ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, χρησιμοποιεί μια συνάρτηση δυναμικού και υπολογίζει από τις τρέχουσες συντεταγμένες των ατόμων σε κάθε βήμα της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, την συνισταμένη δύναμη που ασκείται πάνω του. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και ακολούθως οι νέες θέσεις και ταχύτητες για χρονικό βήμα Δt (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα.

2.1) Το πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης (VMD)

Το VMD [26] είναι ένα πρόγραμμα γραφικών σχεδιασμένο για τη διαδραστική οπτικοποίηση και ανάλυση των βιοπολυμερών, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, και μεμβράνες. Το VMD τρέχει σε όλα τα είδη Unix (όπως είναι τα linux), σε Apple MacOS X, και σε Microsoft Windows. Το πρόγραμμα αυτό μπορεί να φορτώσει τροχιές συντεταγμένων ατόμων, από προγράμματα μοριακών προσομοιώσεων όπως AMBER, Charmm, DLPOLY, Gromacs, MMTK, NAMD, X-PLOR, και πολλά άλλα. Το VMD ενσωματώνει διερμηνευτές (interpreters) για τις γλώσσες scripting Python και Tcl, με την βοήθεια των οποίων μπορούμε να επεξεργασθούμε τα δεδομένα (θέσεις ατόμων και ταχύτητες) που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις ως συνάρτηση του χρόνου.

2.2) Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής (NAMD)

Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΠΜΔ) υπολογίζουν τις ατομικές τροχιές με την επίλυση των εξισώσεων κίνησης χρησιμοποιώντας εμπειρικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας (Force Fields, FF), όπως το πεδίο δυνάμεων CHARMM, που προσεγγίζει τα πραγματικά ατομικά δυναμικά στα συστήματα βιοπολυμερών. Για τη διεξαγωγή ΠΜΔ έχουν αναπτυχθεί διάφορα προγράμματα υπολογιστών. Αυτά τα προγράμματα αναπτύχθηκαν αρχικά για σειριακές μηχανές. Η προσομοίωση μεγάλων μορίων, όμως, απαιτεί τεράστια υπολογιστική ισχύ. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί η προσομοίωση είναι η αξιοποίηση παράλληλων υπολογιστών. Για τις ανάγκες της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NAMD που είναι σχεδιασμένο να λειτουργεί αποτελεσματικά σε παράλληλους επεξεργαστές για την προσομοίωση

μεγάλων μορίων. Το FF που χρησιμοποιείται από το NAMD είναι το ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιείται από τα προγράμματα CHARMM και X-PLOR. Το NAMD ενσωματώνει τον αλγόριθμο Particle Mesh Ewald (PME), ο οποίος λαμβάνει υπόψη όλες τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Αυτός ο αλγόριθμος μειώνει την υπολογιστική πολυπλοκότητα από $O(N^2)$ σε $O(N \log n)$. Ένα ακόμη πλεονέκτημα του NAMD είναι ότι λειτουργεί σε συνεργασία με το VMD. Δηλαδή, ένα σύστημα που υποβάλλεται σε προσομοίωση με το NAMD μπορεί να προβληθεί και να τροποποιηθεί με το VMD [27].

2.3) Υπολογισμός RMSD

Μια από τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της μεταβολής της δομής σε σχέση με την αρχική δομή συναρτήσει του χρόνου, είναι το RMSD (root mean square deviation) [Εξίσ. 1]. Μπορούμε σε ένα διάγραμμα, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης.

$$RMS = \left\langle \left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i \left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2}$$

Εξίσ.1: Εδώ r_i^α είναι η θέση του ατόμου i στην δομή α , ενώ το r_i^β είναι η θέση του ίδιου ατόμου στην δομή β και N είναι το πλήθος των ατόμων.

3) Arguslab

Το **Arguslab** [28] είναι ένα πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για σχεδιασμό μοριακών μοντέλων (π.χ για πρωτεΐνες και διάφορα άλλα μόρια μικρά ή μεγάλα) και δημιουργήθηκε από τον Mark Thompson. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί αλγόριθμους για τη μοντελοποίηση που συνδυάζουν την κβαντική με την κλασσική μηχανική. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση μορίων τα οποία συνδέουν ραδιονουκλεΐδια από σύμπλοκα αποβλήτων. Επίσης, υπάρχουν αλγόριθμοι για την αυτοματοποίηση του σχεδιασμού μορίων με στοχευμένες ιδιότητες, χρήσιμες για το σχεδιασμό φαρμάκων.

4) Chimera

Το **UCSF Chimera** [29] είναι ένα εξαιρετικά επεκτάσιμο πρόγραμμα για διαδραστική οπτικοποίηση και ανάλυση μοριακών δομών και συναφών δεδομένων, συμπεριλαμβανομένων των χαρτών πυκνοτήτων, υπερμοριακών συγκροτημάτων, στοιχίσεων αλληλουχιών, αποτελεσμάτων docking, τροχιών και στερεοχημικών συνόλων. Από το πρόγραμμα μπορούν να παραχθούν εικόνες υψηλής ποιότητας και κινούμενα γραφικά καθώς και να αποθηκευτούν αρχεία σε μορφή pdb, mol2 κλπ. Το πρόγραμμα αναπτύχθηκε από το Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI), χρηματοδοτούμενο από το National Institutes of Health.

5) Raswin

Το πρόγραμμα **Raswin (Rasmol)** [30] χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των μοριακών δομών και δημιουργήθηκε από τον Roger Sayle το 1992. Χρησιμοποιείται από χιλιάδες χρήστες για την προβολή μορίων και για την δημιουργία εικόνων για δημοσιεύσεις.

6) Swiss – PdbViewer

Το **Swiss – PdbViewer** [31] είναι μια εφαρμογή που παρέχει μια φιλική προς το χρήστη πλατφόρμα επιτρέποντας να αναλύσει διάφορα μακρομόρια συγχρόνως. Το πρόγραμμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δομική επαλληλία πρωτεϊνών προκειμένου να συγκριθούν οι ενεργές περιοχές τους ή οποιαδήποτε άλλα μέρη που αλληλεπιδρούν. Μεταλλάξεις, δεσμοί υδρογόνου, γωνίες και αποστάσεις μεταξύ των ατόμων είναι εύκολο να ληφθούν. Με τη χρήση αυτού του προγράμματος προσθέσαμε αμινοξέα που έλλειπαν από τον υποδοχέα κρυσταλλικής δομής κάνοντας και το κατάλληλο fit των πρωτεϊνών.

7) Wordom

Το πρόγραμμα **wordom** [32] είναι εργαλείο ανάλυσης τροχιών από ΠΜΔ. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε για την ομαδοποίηση σε συστάδες (clusters) των διαμορφώσεων του GR από προσομοιώσεις ανάλογα με την ομοιότητα στη δομή τους.

Τέλος, μπορούμε να αναφέρουμε και τη χρήση **script**. Το script είναι ένα αρχείο με οδηγίες για εκτέλεση εντολών που διαβάζεται από τον υπολογιστή – στην περίπτωση μας μέσα από το πρόγραμμα VMD- το οποίο διαθέτει διερμηνευτή για την γλώσσα προγραμματισμού tcl. Εκτός από τα script σε Tcl χρησιμοποιήθηκαν και scripts του κελύφους Bash. Τα script που χρησιμοποιήσαμε παρατίθενται στο **Παράρτημα - Scripts**.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

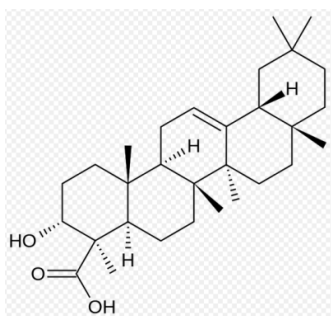
1) Σχεδιασμός προσδετών μέσω του προγράμματος Arguslab

Ξεκινώντας την υπολογιστική διαδικασία ήταν απαραίτητο να σχεδιάσουμε με τη βοήθεια του προγράμματος Arguslab τις τριδιάστες δομές των προσδετών που θα χρησιμοποιούσαμε. Οι προσδέτες ήταν οι ακόλουθοι:

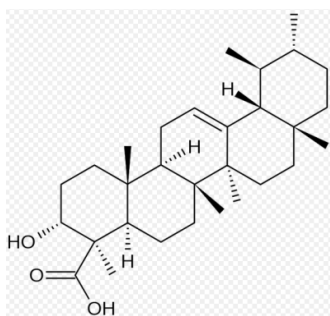
- 3-o-acetyl-11-ketobeta boswellic acid (ενεργή μορφή ως προς την ενεργοποίηση της GR σηματοδότησης)
 - Acetyl alpha boswellic acid
 - Acetyl beta boswellic acid
- Λιγότερο ενεργές μορφές

Όπως φάνηκε στην πράξη, ο διαθέσιμος χρόνος δεν επαρκούσε για να μελετηθούν όλοι οι προαναφερθέντες προσδέτες στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, γι' αυτό και επιλέξαμε να ασχοληθούμε μόνο με τον πρώτο, το 3-o-acetyl-11-ketobeta boswellic acid (AKBA).

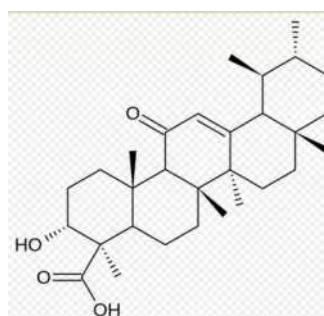
Εικόνα 7: Τα μποςγουελικά οξέα



α-boswellic acid



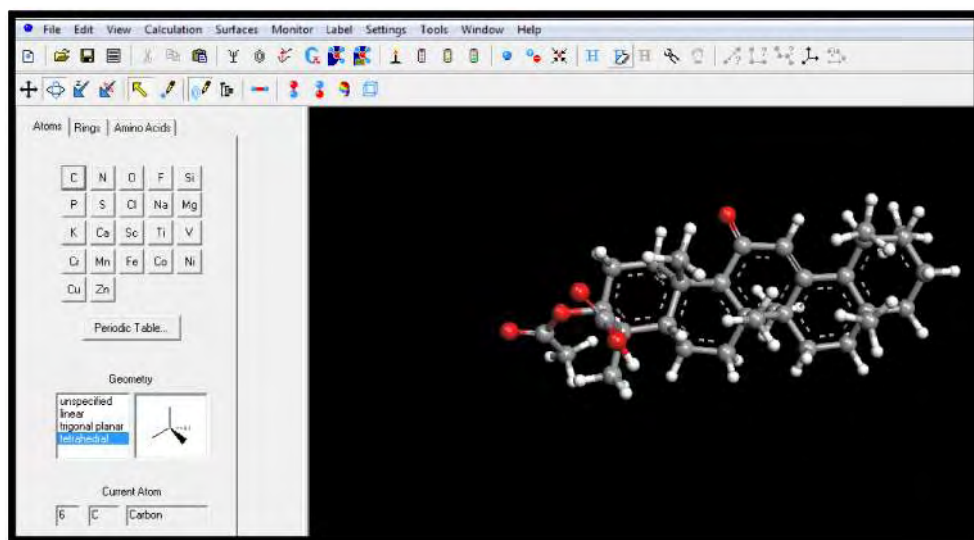
β-boswellic acid



AKBA

Η πρακτική διαδικασία για τον σχεδιασμό της δομής του AKBA περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα.

Η τριδιάστατη δομή του ΑΚΒΑ φαίνεται στην παρακάτω εικόνα ολοκληρωμένη.



Εικόνα 8: Τριδιάστατη απεικόνιση του 3-ο-acetyl-11-ketobeta boswellic acid μέσω του προγράμματος Arguslab

2) Επιλογή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Στη συνέχεια για να βρούμε τον κατάλληλο τύπο GR που θα χρησιμοποιήσουμε καταφύγαμε στη Β.Δ NCBI για να βρούμε την ακριβή ακολουθία και στην PDB (Protein Data Bank) και αναζητήσαμε ισομορφές του υποδοχέα στον άνθρωπο. Στη βάση δεδομένων PDB καταχωρούνται δομές βιολογικών μακρομορίων που έχουν επιλυθεί είτε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είτε με τη μέθοδο του NMR.

Η πλήρης ακολουθία του υποδοχέα είναι η εξής:

```
>sp|P04150|GCR_HUMAN  Glucocorticoid  receptor  OS=Homo  sapiens
GN=NR3C1  PE=1  SV=1
MDSKESLTPGREENPSSVLAQERGDVMDIFYKTLRGGATVKVSASSPSLAVASQSDSKQRR
LLVDFPKGSVSNAAQPPDLKAVSLSMGLYMGETETKVMGNDLGFPPQQQISLSSGETDLK
LLEESIANLNRSTSVPENPKSSASTAVSAAPTEKEFPKTHSDVSSEQQHLKGQTGTNGGN
VKLYTTDQSTFDILQDLEFSSGSPGKETNESPWRSDLLIDENCLLSPLAGEDDSFLLEGN
SNEDCKPLILPDTKPKIKDNGDLVLSPPSNVTLRPQVKEKEDFIELCTPGVIKQEKLGTV
YCQASFPGANIIGNKMSAISVHGVSTSGGQMYHYDMNTASLSQQQDQKPIFNVIPPIPVG
SENWNRCQSGDDNLTSLGTLNFPGRITVFSNGYSSPSMRPDVSSPPSSSSTATTGPPPKL
CLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRAVEGQHNYLCAGRNDICIIDKIRRKNCPCACRYRK
CLQAGMNLEARKTKKKIKIGIQQATTGVSQETSENPKNKTIVPATLPQLTPTLVSLLEVIE
PEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKAKAIPGFRNLHLLDDQMTLLQYSW
MFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTLPCMYDQCKHMLYVSSELHRLQVSY
EEYLCMKTLNLLSSVPKDLKLSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGNSSQNWQRFYQLTK
LLDSMHEVVENLLNYCFQTFLDKTMSEIEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKLLLFHQK
(πηγή: http://www.uniprot.org/uniprot/P04150.fasta)
```

Καταλήξαμε στις δομές με κωδικούς PDB: 1NHZ, 3BQD, 1P93, 3H52

Μεγαλύτερη ομοιότητα στην ακολουθία με την sp|P04150|GCR_HUMAN παρουσίασε το αρχείο PDB:1P93. Το αρχείο αυτό περιλαμβάνει τέσσερις αλυσίδες (A, B, C, D) της κρυσταλλικής δομής του GR LBD στην μορφή του αγωνιστή, τέσσερις αλυσίδες (E, F, G, H) του συνενεργοποιητή 2 καθώς και τον προσδέτη δεξαμεθαζόνη (DEX). Στη συνέχεια με αφετηρία το 1P93.pdb και με τη βοήθεια του προγράμματος SPDBV απομονώθηκε η αλυσίδα A από το 1P93.pdb και συμπληρώθηκε το κομμάτι της δομής που λείπει στη θέση 704 – 708. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα.

Ακολούθως εξετάστηκε οπτικά το τελικό μοντέλο του GR με την βοήθεια του προγράμματος RASMOL για το εάν υπάρχουν δισουλφιδικοί δεσμοί (κυστεΐνες σε άμεση εγγύτητα) και διαπιστώθηκε ότι δεν συμβαίνει αυτό.

3) Δοκιμαστικό Docking 1P93 – DEX

Για να βεβαιωθούμε ότι ο υποδοχέας μας είναι έτοιμος για χρήση, πραγματοποιήσαμε ένα δοκιμαστικό docking. Ως υποδοχέας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο που κατασκευάστηκε σύμφωνα με την διαδικασία της προηγούμενης ενότητας και ως προσδέτης η δεξαμεθαζόνη (DEX) της οποίας η δομή απομονώθηκε από το αρχείο 1P93.pdb. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Autodock Vina. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο Παράρτημα.

Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, τη δοκιμαστική αυτή προσπάθεια είδαμε ότι όντως ο υποδοχέας έχει τη θέση σύνδεσης για τον προσδέτη του DEX και είναι ίδια με αυτή της κρυσταλλικής δομής. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε αυτόν τον υποδοχέα αλλά αυτή τη φορά κάνοντας docking με το μωσγουελικό οξύ, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

4) Docking του 3-ο-ακέτυλο-11-κετοβήτα μωσγουελικού οξέος στον GR 1P93

Εφόσον είδαμε ότι το δοκιμαστικό docking στέφθηκε με επιτυχία, προχωρήσαμε αυτή τη φορά στην αναζήτηση της θέσης πρόσδεσης του μωσγουελικού οξέος. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε στην ενότητα 3 αυτή τη φορά με προσδέτη το μωσγουελικό οξύ, πραγματοποιήσαμε το 2^ο docking. Ωστόσο, το τελικό αποτέλεσμα δεν ήταν το επιθυμητό. Παρόλο που τα αρχεία out και log έδιναν φαινομενικά καλά αποτελέσματα πρόσδεσης με 9 πιθανές θέσεις (το ΔG να κυμαίνεται περίπου μεταξύ -7 και -5), όταν φορτώσαμε τα αρχεία στο Autodock Tools για οπτικοποίηση, διαπιστώσαμε ότι καμία από τις προτεινόμενες θέσεις δεν τοποθετούσε τον προσδέτη στο εσωτερικό της πρωτεΐνης (Εικόνα 9). Στη συνέχεια, υποθέτοντας ότι το vina θα επιτύγχανε καλύτερα αποτελέσματα εάν τοποθετούσαμε το πλέγμα αναζήτησης (grid box) διαδοχικά σε όλη την έκταση της πρωτεΐνης, πραγματοποιήσαμε εξαντλητικό docking, αφού πρώτα δημιουργήσαμε με το script E (παράρτημα) μια σειρά από configuration files με τις θέσεις και διαστάσεις του πλέγματος αναζήτησης. Το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με αυτό της προηγούμενης προσπάθειας.

Αυτό μας έκανε να υποθέσουμε ότι ενδεχομένως η συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή του υποδοχέα να μην ευνοεί την πρόσδεση και ίσως υπάρχουν άλλες που να είναι περισσότερο δεκτικές. Ένα υδατικό διάλυμα του υποδοχέα σε θερμοδυναμική ισορροπία αποτελείται από πολλές διαμορφώσεις συμβατές με τις επιβαλλόμενες μακροσκοπικές συνθήκες, οι οποίες υφίστανται διαρκείς μεταβολές λόγω της θερμικής κίνησης. Έτσι τα μόρια του προσδέτη έχουν την ευκαιρία να διαλέξουν (εάν υπάρχει) την καταλληλότερη δομή για πρόσδεση. Ένας τρόπος για να μιμηθούμε αυτήν την διαδικασία είναι να αναζητήσουμε πιθανές διαμορφώσεις για docking από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.



Εικόνα 9: Οι προτεινόμενες από το νίνα θέσεις πρόσδεσης του ΑΚΒΑ (παράσταση λευκών σφαιρών) στην κρυσταλλική δομή του GR (1P93.pdb)

5) Προσομοίωση του υποδοχέα 1P93

Συνεχίσαμε τη μελέτη μας, αυτή τη φορά ετοιμάζοντας τον υποδοχέα για προσομοίωση παρουσία νερού και ιόντων. Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης θα είναι μια διαδοχή από πολλές διαμορφώσεις του υποδοχέα συμβατές με τις επιβαλλόμενες μακροσκοπικές συνθήκες. Αυτός είναι ένας τρόπος για να εντοπισθούν διαμορφώσεις που πιθανόν να προσδένουν τον προσδέτη. Είναι δηλαδή ένα είδος εύκαμπτου docking. Για να γίνει αυτό, ακολουθήσαμε μια σειρά από συγκεκριμένα βήματα, όπως περιγράφονται παρακάτω.

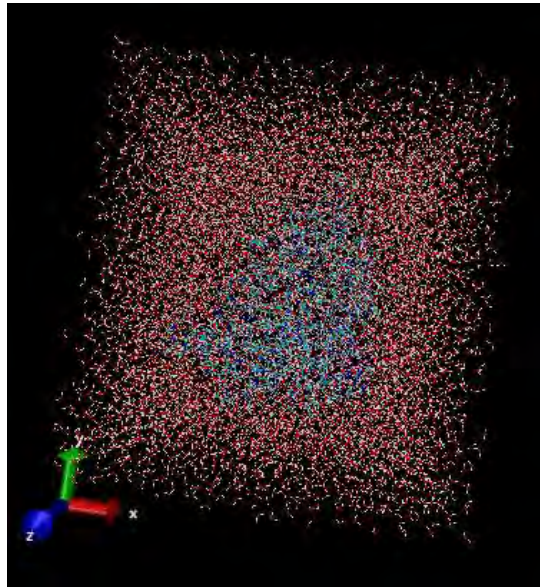
5.1) Δημιουργία του αρχείου psf & pdb

Ένα αρχείο pdb, δεν περιέχει καμία πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων, των οποίων τις συντεταγμένες περιέχει. Για να πραγματοποιηθεί όμως μία προσομοίωση, είναι απαραίτητη αυτή η πληροφορία. Έτσι πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο psf, που περιέχει αυτήν την πληροφορία. Το αρχείο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί από το πρόγραμμα psfgen με βάση το αρχικό αρχείο pdb και ένα αρχείο τοπολογίας (topology file), το οποίο στην δική μας ανάλυση είναι το top_all27_prot_na.inp. Το αρχείο παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα αρχείο που περιέχει τις σταθερές της συνάρτησης δυναμικού για κάθε τύπο ατόμου και είναι το par_all27_prot_na.inp για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Ακολουθώντας τις οδηγίες του tutorial του προγράμματος NAMD, συντάξαμε ένα tcl script, δηλαδή ένα σύνολο εντολών βάσει των οποίων το psfgen δημιουργεί το αρχείο psf καθώς και ένα νέο αρχείο pdb.

5.2) Ενυδάτωση (solvate)

Πριν από την ενεργειακή ελαχιστοποίηση (energy minimization), πρέπει να διαμορφωθεί το κατάλληλο περιβάλλον γύρω από το μόριο της πρωτεΐνης ώστε να προσεγγίζει όσο γίνεται πιστότερα την πραγματικότητα. Επειδή το άμεσο περιβάλλον της πρωτεΐνης που μελετάμε είναι υδατικό, αυτό που πρέπει να κάνουμε είναι να τροποποιήσουμε το μοντέλο του συστήματος προσθέτοντας νερό. Το μοντέλο νερού

που χρησιμοποιήσαμε είναι το TIP3. Συνήθως δημιουργούμε μία σφαίρα που στο εσωτερικό της βρίσκεται η πρωτεΐνη ή έναν κύβο. Το μέγεθός τους εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος της πρωτεΐνης αλλά και από το είδος της μελέτης που θέλουμε να διεξαγάγουμε. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την προσθήκη του διαλύτη περιγράφεται λεπτομερώς στο παράρτημα.



Εικόνα 10: Το solvation box που δημιουργήθηκε γύρω από τον υποδοχέα

5.3) Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions)

Τα αρχεία psf και pdb που λάβαμε από το solvation περιέχουν το σύστημα πρωτεΐνης-νερού. Στις προσομοιώσεις μας χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων η μέθοδος PME, η οποία απαιτεί το σύστημα να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Για αυτόν τον λόγο προσθέτουμε έναν αριθμό ιόντων θετικών ή/και αρνητικών (Na^+ , Cl^-), έτσι ώστε να εξασφαλισθεί τόσο η ηλεκτρική ουδετερότητα όσο και μια τυπική συγκέντρωση ιόντων (0.15 mol/L) στο διάλυμα.

Αυτό έγινε ως εξής: *Extensions* → *Modeling* → *Add Ions* → *Neutralize and set NaCl concentration to 0.15 mol/L* → *Autoionize* και πήραμε τον υποδοχέα με νερά και ιόντα.

5.4) Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Energy Minimization)

Πριν από την εξισορρόπηση της πρωτεΐνης πρέπει να ελαχιστοποιήσουμε την δυναμική ενέργεια του συστήματος πρωτεΐνης-νερού-ιόντων. Για να τρέξουμε την ελαχιστοποίηση χρειάζεται να συντάξουμε ένα configuration script. Σε αυτό θα καθορίζονται οι συνθήκες στις οποίες θα γίνει η διαδικασία αλλά και τα αρχεία που θα διαβάσει το namd καθώς επίσης και ένα αρχείο με τις παραμέτρους (par_all27_prot_na.inp). Πρέπει να προσέξουμε όλα αυτά να περιέχονται μέσα στον φάκελο εργασίας που βρίσκεται και το script. Στο πεδίο *coordinates* βάζουμε το αρχείο *psf* που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων, ενώ στο πεδίο *structure* το αντίστοιχο αρχείο *psf*. Ορίζουμε το όνομα που επιθυμούμε για το αρχείο που θα προκύψει στο πεδίο *output name*.

Τρέξαμε την ελαχιστοποίηση ενέργειας για 3000 steps με την εντολή `namd2.exe +p8 min_GR.txt > log_min_GR.txt`. Κατά την διάρκεια της ελαχιστοποίησης ενέργειας το πρόγραμμα namd ενημερώνει περιοδικά ένα αρχείο κειμένου (logfile) που περιέχει τις τρέχουσες ενέργειες καθώς και το «gradient tolerance». Θα έχουμε μία ικανοποιητική ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος όταν αυτός ο δείκτης είναι μονοψήφιος (<9) και όσο το δυνατόν μικρότερος, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας τα βήματα.

Όταν τελειώσει η διαδικασία θα δημιουργηθούν στο φάκελο τρία νέα αρχεία τύπου: *.coor*, *.vel*, *.xsc*, με όνομα αυτό που ορίσαμε σαν *output name* στο script του minimization. Το αρχείο *.coor* θα το χρησιμοποιήσουμε αργότερα για την εξισορρόπηση.

5.5) Εξισορρόπηση (Equilibration)

Μετά από την ολοκλήρωση της ελαχιστοποίησης της ενέργειας προχωρήσαμε στην εξισορρόπηση. Εδώ χρησιμοποιήσαμε δυο configuration scripts ~~τύπου txt~~ με την ίδια λογική όπως και στο minimization, ένα NPT (σταθερός αριθμός σωματιδίων, σταθερή πίεση, σταθερή θερμοκρασία) και ένα NVT (σταθερός αριθμός σωματιδίων, σταθερός όγκος, σταθερή θερμοκρασία) (Παράρτημα, script A). Στο structure δώσαμε το όνομα του αρχείου *psf* ενώ στο *coordinates* το όνομα του αρχείου με τις συντεταγμένες

που προέκυψε από την ελαχιστοποίηση της ενέργειας και έχει κατάληξη .coor. Η θερμοκρασία ορίζεται στους 310K. Στο `set outputname` ορίσαμε το όνομα που θα έχει το αρχείο που θα προκύψει.

Στη συνέχεια του script συναντάμε το `#continuing a job from the restart files` αυτό για τα αρχικά NPT & NVT είναι απενεργοποιημένο καθώς ορίζουμε εμείς τις τιμές της θερμοκρασίας. Αν όμως πραγματοποιήσουμε έναν δεύτερο κύκλο NPT / NVT ενεργοποιούμε το συγκεκριμένο κομμάτι και πλέον η θερμοκρασία θα καθορίζεται από τις ταχύτητες των μορίων. Ορίζουμε ξανά τις παραμέτρους με το `par_all27_prot_na.inp` καθώς και τις συντεταγμένες του παραλληλεπίπεδου (κελίου προσομοίωσης) με τη βοήθεια του Tcl script `Conf_PBC.tcl` το οποίο το τρέχουμε μέσω του VMD έχοντας προηγουμένως φορτώσει τον υποδοχέα μας. Ενεργοποιούμε ή απενεργοποιούμε τις επιλογές με τα `fixed atoms` ανάλογα με το είδος της προσομοίωσης που θέλουμε να τρέξουμε και τρέχουμε το script από το τερματικό όπως και στην ελαχιστοποίηση ενέργειας.

Μετά το πέρας της εξισορρόπησης δημιουργούνται στον φάκελο τέσσερα νέα αρχεία τύπου: `.dcd`, `.coor`, `.vel`, `.xsc`, και έξι νέα αρχεία τύπου `.restart.xsc.old`, `.restart.xsc`, `.restart.vel.old`, `.restart.vel`, `.restart.coor.old`, `.restart.coor`, με όνομα αυτό που ορίσαμε σαν output name στο script. Εμείς τρέξαμε δυο NPT μικρής διάρκειας για να ρυθμιστούν πρώτα οι διαστάσεις του κελιού της προσομοίωσης σε συνθήκες πίεσης 1 Atm, και ακολούθως έξι NVT με 5000000 steps το καθένα, που αντιστοιχούν συνολικά σε 60 ns.

5.6) Συστάδες (Clustering)

Έπειτα, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα `wordom` για να ομαδοποιήσουμε με βάση την ομοιότητα (clustering) τις δομές που προέκυψαν από την παραπάνω προσομοίωση. Από την ομαδοποίηση αυτή προέκυψαν συστάδες (clusters) διαφορετικών πληθυσμών, κάθε μια από τις οποίες αντιπροσωπεύεται από κάποια δομή. Τις αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των πέντε συστάδων που προέκυψαν τις στοίχισαμε δομικά με την κρυσταλλική δομή του GR μέσω του προγράμματος SPDBV. Μετά από την δομική στοίχιση κάναμε docking σε καθεμιά από αυτές.

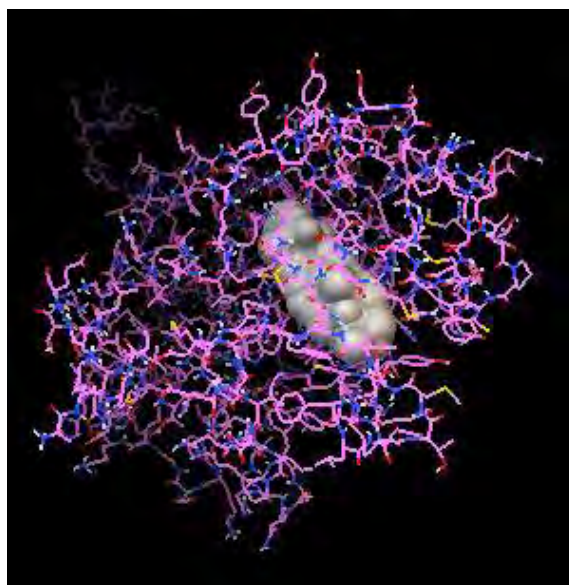
6) Αυτοματοποιημένο docking σε πολλές δομές

Προκειμένου να γίνει σχεδόν εξαντλητική διαλογή έπρεπε πρώτα να εξαχθούν από την τροχιά της προσομοίωσης οι διαμορφώσεις του GR σε μορφή pdb. Αυτό έγινε φορτώνοντας το αρχείο ded που προέκυψε μετά την προσομοίωση στο VMD και σώζοντας από τις επιλογές κάθε 20 frames (σώσαμε δηλαδή συνολικά 1000 δομές). Τα αρχεία αυτά ταυτοποιούνται από την αρίθμηση. Σε αυτές τις δομές κάναμε αυτοματοποιημένο docking με το AKBA χρησιμοποιώντας κατάλληλα scripts που ορίζουν τις απαιτούμενες παραμέτρους (παράρτημα). Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τις ακόλουθες ενέργειες:

- i. Αποθήκευση 1000 διαμορφώσεων του GR από την τροχιά της προσομοίωσης (VMD)
- ii. Μαζική προετοιμασία για docking των αρχείων pdb (δημιουργία αρχείων .pdbqt) με το script ΣΤ που τρέχει το πρόγραμμα adt (python scripts).
- iii. Προετοιμασία του ligand με το πρόγραμμα adt
- iv. Μαζική εκτέλεση του docking με το script Z. Δημιουργήθηκαν για κάθε μία από τις 1000 διαμορφώσεις προτεινόμενες διατάξεις του AKBA. Επίσης παρήχθησαν 1000 logfiles με άτυπες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης (ΔG , affinities).
- v. Εξαγωγή των ΔG από αυτά τα logfiles σε ένα αρχείο κειμένου με το script H.
- vi. Δημιουργία αρχείου κειμένου με τις αποστάσεις του κέντρου μάζας των προτεινόμενων διατάξεων του AKBA από την θέση του DEX στον GR με το script Θ.

7) Η ισομορφή GR - 3BQD

Σε μια επόμενη προσπάθεια χρησιμοποιήσαμε ως στόχο πρόσδεσης του AKBA και άλλες ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Από τις δομές που δοκιμάσαμε (3BQD, 4CSJ, 4LSJ, 4P6W) απομονώνοντας μια αλυσίδα από αυτές, μιας και βρίσκονταν σε μορφή διμερών ή τετραμερών, μόνο η δομή 3BQD έδωσε μετά από docking την ακριβή θέση πρόσδεσης του μποςγουελικού οξέος. Μελετώντας και την αντίστοιχη βιβλιογραφία σχετικά με το 3BQD [7] διαπιστώσαμε ότι στη δομή αυτή ο GR κρυσταλλώθηκε μαζί με τον προσδέτη η δεακυλοκορτιβαζόλη (DAC), που είναι σαφώς πιο ογκώδης από την δεξαμεθαζόνη (DEX). Το αρχείο log που προέκυψε δίνει δυο πιθανές θέσεις πρόσδεσης με $\Delta G = -2.9$ και 0.0 kcal/mol. Επειδή όσο πιο αρνητική τιμή τόσο ευσταθέστερη και η πρόσδεση, απορρίψαμε τη δεύτερη τιμή και απομονώσαμε τον προσδέτη με την πρώτη τιμή. Στόχος μας ήταν, αφού πρώτα σταθεροποιήσουμε το σύμπλοκο με ΠΜΔ, να υπολογίσουμε την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του AKBA στον GR.



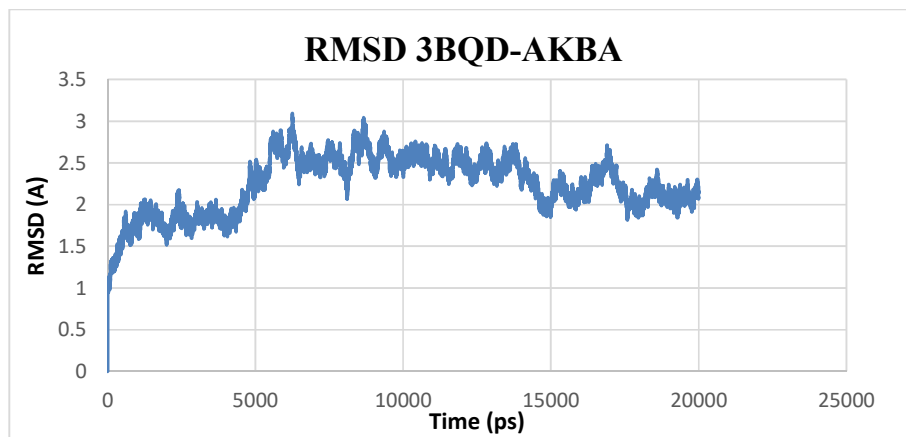
Εικόνα 11: Η θέση πρόσδεσης του AKBA στον GR 3BQD όπως βρέθηκε με το πρόγραμμα Autodock Vina.

Επειδή ο υποδοχέας στο 3BQD εμφανίζεται με μετάλλαξη σε ένα αμινοξύ (F602S) και δεδομένου του ότι τα εργαστηριακά δεδομένα αφορούν στην αγρίου τύπου μορφή, χρησιμοποιήσαμε τις δυνατότητες του VMD και αλλάξαμε τη Ser στη θέση 602 σε Phe πριν προχωρήσουμε στην προσομοίωση. Ακόμη χρειάστηκε να μελετήσουμε με το πρόγραμμα PropKa [33] και το pKa του GR για να δούμε ποια αμινοξέα αναμένεται να είναι ιοντισμένα. Βρέθηκαν λοιπόν ορισμένες διαφορές στο φορτίο κάποιων HIS, τις οποίες μετατρέψαμε σε HSP δηλ. πρωτονιομένες με την ειδική εντολή mutate (π.χ mutate 726 HSP) στο script για το psfgen, όταν ξεκινάμε να δημιουργούμε τα αρχεία μας για την προσομοίωση. Έπειτα ακολουθώντας τα βήματα της προσομοίωσης όπως περιγράφηκαν και παραπάνω, πήραμε την τελική μορφή με προσδεδεμένο το AKBA στο LBD του υποδοχέα. Ο σχολιασμός αυτών των αποτελεσμάτων θα δοθεί στο επόμενο κεφάλαιο. Να σημειωθεί εδώ πως όταν κάνουμε προσομοίωση χρησιμοποιώντας δυο μόρια (προσδέτη – υποδοχέα) και συνεπώς δυο ξεχωριστά αρχεία, θα πρέπει να προσέξουμε στα script να βάλουμε δυο segments και να πάρουμε ξεχωριστές παραμέτρους για το καθένα. Για τον υποδοχέα χρησιμοποιούμε το par_all27_prot_na.inp, ενώ για τον προσδέτη αναζητήσαμε τις παραμέτρους ~~από~~ στην ιστοσελίδα swissparam, δίνοντας τον προσδέτη σε μορφή mol2..

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

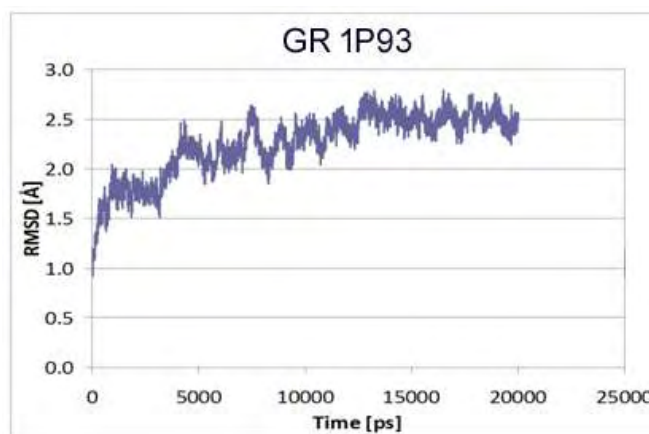
A) Ανάλυση RMSD

Ο έλεγχος της σταθεροποίησης του GR, με και χωρίς το AKBA, στις προσομοιώσεις που εκτελέσαμε έγινε υπολογίζοντας την χρονική εξέλιξη του RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions - Μέση τετραγωνική απόκλιση των ατομικών θέσεων) με τη βοήθεια του "RMSD Trajectory Tool" του VMD. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στα γραφήματα 1 και 2.



Γράφημα 1: Η εξέλιξη του RMSD δείχνει ότι το σύμπλοκο υποδοχέα–προσδέτη σταθεροποιείται μετά από τα 10.000 ps

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ίδια διαδικασία έγινε και κατά τα αρχικά στάδια για υπολογισμό του RMSD στην αρχική ισομορφή του GR που χρησιμοποιήσαμε, το 1P93:



Γράφημα 2: Η εξέλιξη του RMSD δείχνει ότι η διαμόρφωση του υποδοχέα (ελεύθερου) σταθεροποιείται μετά από τα 10.000 ps.

Από την ανάλυση του RMSD γίνεται φανερό ότι η αναζήτηση υποψήφιων διαμορφώσεων για πρόσδεση του AKBA είναι σκόπιμο να γίνει στο μέρος της τροχιάς μετά από τα 10 ns. Αυτές οι διαμορφώσεις εξετάστηκαν πρώτα κατά συστάδες και ακολούθως εξαντλητικά.

B) Αναζήτηση θέσης πρόσδεσης σε συστάδες (clustering)

Όπως και στην πρώτη προσπάθεια με την κρυσταλλική δομή, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του vina, καμία από τις αντιπροσωπευτικές δομές των πέντε πολυπληθέστερων συστάδων της προσομοίωσης δεν πρόσδεσε το AKBA στην προβλεπόμενη για την δεξαμεθαζόνη θέση. Δεδομένου ότι πειραματικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι ο GR προσδένει το AKBA, έπρεπε να υποθέσουμε ότι πιθανόν οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των πέντε συστάδων δεν επαρκούσαν. Έτσι συνεχίσαμε την προσπάθεια με σχεδόν εξαντλητική διαλογή μεταξύ των στιγμιotypών της προσομοίωσης.

```

# Clustering run on GR_pr.pdb and eq_GR_3-6_pr_every_4th.dcd (250 frames)
# Clustering using method 1, distance 1, cutoff 1.500 on 750 selected atoms (/A*)@(CA|C|N))
# Nclusters (method 1): 19 (cluster #0 => unclustered conformations)
./wordom_0_22-rc3.386 -ia cluster -TITLE cl7 -SELE "/A*/@(CA|C|N)" -DISTANCE rmsd -METHOD hiero -CUTOFF 1.5 -STEP 40 -imol GR_pr.pdb -itry eq_GR_3-6_pr_every_4th.dcd

```

Cluster#	8	structures:	77	center:	9281	77	
Cluster#	2	structures:	46	center:	7921	123	
Cluster#	12	structures:	23	center:	9721	146	70%
Cluster#	1	structures:	15	center:	4841	161	
Cluster#	10	structures:	13	center:	8881	174	
Cluster#	15	structures:	11	center:	4281	185	
Cluster#	4	structures:	9	center:	2401	194	
Cluster#	13	structures:	8	center:	5681	202	
Cluster#	11	structures:	7	center:	681	209	
Cluster#	7	structures:	7	center:	3521	216	
Cluster#	3	structures:	7	center:	1521	223	
Cluster#	16	structures:	6	center:	6001	229	
Cluster#	9	structures:	4	center:	2961	233	
Cluster#	5	structures:	4	center:	3641	237	
Cluster#	6	structures:	4	center:	2081	241	
Cluster#	14	structures:	3	center:	951	244	
Cluster#	17	structures:	2	center:	3801	246	
Cluster#	18	structures:	2	center:	1401	248	
Cluster#	0	structures:	2	center:	9961	250	

Εικόνα 12: Οι 5 πολυπληθέστερες συστάδες της προσομοίωσης του GR

Γ) Αυτοματοποιημένο εξαντλητικό docking σε πολλές δομές

Η εξέταση των αρχείων από το βήμα ν) και νι) της ενότητας 6 έδειξε ότι το vina δεν πρότεινε καμία θέση κοντά στον θύλακα πρόσδεσης του DEX ανάμεσα στις 1000 διαμορφώσεις που επελέγησαν από την προσομοίωση.

Ωστόσο, υπήρξε μια δομή, το Frame_3065 που έδωσε καλό ΔG γι' αυτό το απομονώσαμε και ξανακάναμε docking μόνο σ' αυτό. Το δοκιμαστικό docking με το DEX αποκάλυψε επιτυχώς τη θέση πρόσδεσης, κάτι που δεν επαναλήφθηκε με την προσπάθεια για σύνδεση του μποςγουελικού.

Δ) Υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του ΑΚΒΑ στον υποδοχέα 3BQD

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την σταθερότητα της δέσμευσης του ΑΚΒΑ στον θύλακα πρόσδεσης του DEX στον GR, υπολογίσαμε την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG_{bind} με τη μέθοδο της Γραμμικής Ενέργειας Αλληλεπίδρασης (LIE) [34]. Η μέθοδος αυτή κάνει μια εκτίμηση της ΔG_{bind} από την διαφορά στις ενέργειες αλληλεπίδρασης του προσδέτη με το άμεσό του περιβάλλον τόσο στην δεσμευμένη (b) όσο και στην ελεύθερή του (f) κατάσταση.

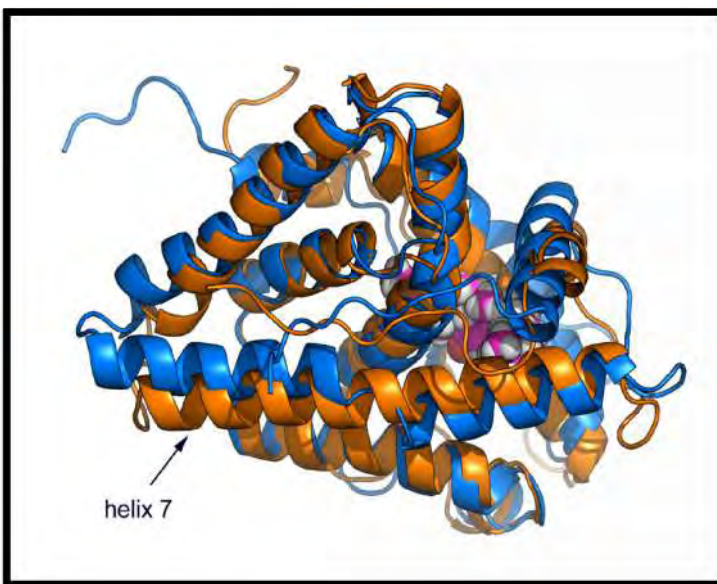
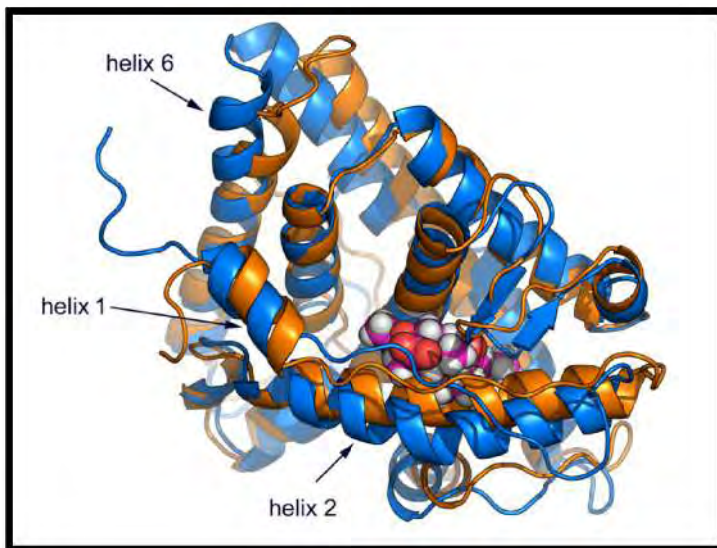
$$\Delta G_{\text{bind}} = \beta \left(\langle E_b^{el} \rangle - \langle E_f^{el} \rangle \right) + \alpha \left(\langle E_b^{vdw} \rangle - \langle E_f^{vdw} \rangle \right) + \gamma$$

Όπου $\langle E_b^{el} \rangle$, $\langle E_f^{el} \rangle$, $\langle E_b^{vdw} \rangle$ και $\langle E_f^{vdw} \rangle$ είναι οι μέσες τιμές της ηλεκτροστατικής ενέργειας αλληλεπίδρασης και της αντίστοιχης van der Waals μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη στην δεσμευμένη (b) και ελεύθερη (f) κατάσταση αντιστοίχως, όπως προκύπτουν από ΠΜΔ. Οι τιμές των παραμέτρων α , β και γ εξαρτώνται από το force field, την πολικότητα του προσδέτη καθώς και από την υδροφοβικότητα του θύλακα πρόσδεσης στον υποδοχέα. Από τη βιβλιογραφία [34] οι τιμές των παραμέτρων είναι: $\alpha=0,448$, $\beta=0,09$ και $\gamma=0$. Οι υπολογισμοί έδωσαν αρνητική ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{bind}} = -6,675$ kcal/mol, switch: 14 / cut off: 16) που δηλώνει ευσταθή πρόσδεση. Το vina για το ίδιο σύμπλοκο έδωσε -14,6 kcal/mol.

Ε) Μελέτη των δομών 1P93, 3BQD καθώς και της περιοχής πρόσδεσης του AKBA στον υποδοχέα

Στη συνέχεια συγκρίναμε την εξισορροπημένη δομή του GR 1P93 χωρίς προσδέτη με την εξισορροπημένη δομή του GR 3BQD που περιέχει και το AKBA, καθώς και το γειτονικό περιβάλλον πρόσδεσης του AKBA με τη βοήθεια του προγράμματος SPDBV. Για να γίνει αυτό χρειάστηκε να προσδιορίσουμε πρώτα τις μέσες δομές από τα τελευταία 500 στιγμιότυπα των προσομοιώσεων των δυο πρωτεϊνών. εφαρμόζοντας το script I και να ακολουθήσει ελαχιστοποίηση της ενέργειας. Η δομική στοίχιση των δύο διαμορφώσεων έδωσε RMSD = 3,355 Å σε άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης, που μαρτυρά σημαντικές δομικές διαφορές.

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι δομικές αυτές διαφορές μεταξύ των ισομορφών. Με μπλε χρώμα είναι η νέα δομή μετά την πρόσδεση του AKBA, ενώ με πορτοκαλί η δομή του 1P93 χωρίς προσδέτη. Όπως βλέπουμε, αυτές εντοπίζονται κυρίως στις έλικες 1, 2, 6, 7 (η αρίθμηση των ελίκων έγινε με βάση το 1P93), τόσο κοντά όσο και απομακρυσμένα από τον θύλακα πρόσδεσης. Παρατηρούμε πως μετά την είσοδο του μπουγουελικού οξέος οι έλικες μετατοπίζονται προς τα έξω. Η δομική αυτή αλλαγή ενδεχομένως να έχει ως συνέπεια την πιο αποτελεσματική ενεργοποίηση του GR πριν την είσοδό του στον πυρήνα.



Εικόνα 13: Οι δομικές διαφορές των ισομορφών 1P93 χωρίς προσδέτη (πορτοκαλί ταινία) και 3BQD – AKBA (μπλε ταινία). Το AKBA φαίνεται σε παράσταση σφαιρών. Οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα rymol [35].

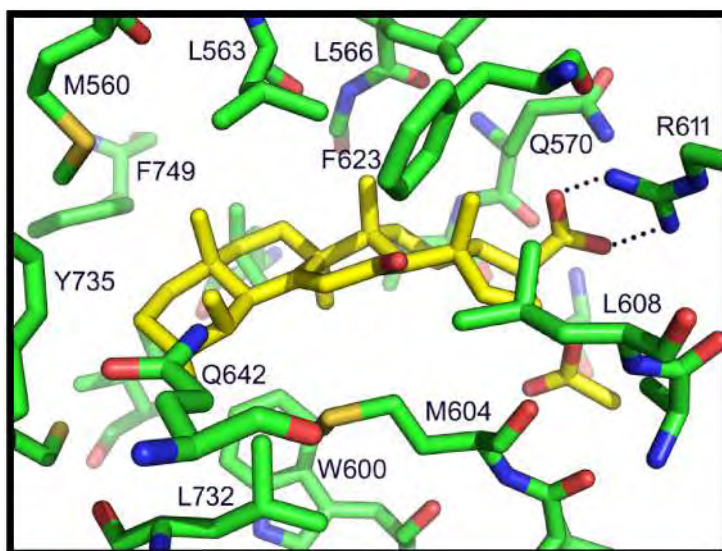
➤ Χαρακτηρισμός της περιοχής πρόσδεσης του AKBA

Ως περιοχή πρόσδεσης του AKBA ορίσαμε με το SPDBV όλα τα αμινοξέα του GR τα οποία βρίσκονται σε απόσταση $\leq 4,0 \text{ \AA}$ από τα άτομα του προσδέτη. Στον πίνακα 1 παραθέτουμε για σύγκριση εκτός από τα αμινοξέα της άμεσης γειτονιάς του AKBA επίσης και αυτά για δεακυλοκορτιβαζόλη-DAC και δεξαμεθαζόνη-DEX όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία [7,19].

Πίνακας 1: Αμινοξέα του θύλακα πρόσδεσης των AKBA, DAC και DEX (Απόσταση $\leq 4.0 \text{ \AA}$ από τον προσδέτη)

3BQD – AKBA	3BQD – DAC	1P93 – DEX
Met 560	Met 560	Met 560
Leu 563	Leu 563	Leu 563
Leu 566	Asn 564	Asn 564
Gly 567	Leu 566	Leu 566
Gln 570	Gly 567	Gly 567
Val 571	Gln 570	Gln 570
Ala 574	Met 601	Met 601
Trp 600	Met 604	Met 604
Leu 603	Ala 605	Arg 611
Met 604	Ala 607	Phe 623
Ala 607	Leu 608	Met 642
Leu 608	Arg 611	Leu 732
Arg 611	Phe 623	Tyr 735
Phe 623	Gln 642	Cys 736
Gln 642	Leu 732	Thr 739
Leu 732	Tyr 735	Ile 747
Tyr 735	Cys 736	-
Cys 736	Thr 739	-
Phe 749	Ile 747	-
Leu 753	Phe 749	-
Ile 757	-	-

Μελετώντας την περιοχή πρόσδεσης παρατηρήσαμε ότι το AKBA σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της ομάδας $-\text{COOH}$ και της $-\text{NH}_2$ της Arg 611 (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Απεικόνιση του θύλακα πρόσδεσης του ΑΚΒΑ στον GR. Με (...) παριστάνονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του ΑΚΒΑ και της Arg 611. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα rymol [35].

Χρησιμοποιώντας το website PLIP [36], το οποίο εντοπίζει τις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων ενός προσδέτη και του υποδοχέα του, βρήκαμε και τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ΑΚΒΑ και του GR

Hydrophobic Interactions ---

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	563A	LEU	3.87	4213	603
2	566A	LEU	3.77	4208	656
3	571A	VAL	3.70	4192	729
4	600A	TRP	3.77	4210	1206
5	603A	LEU	3.72	4218	1259
6	608A	LEU	3.92	4186	1338
7	753A	LEU	3.79	4198	3758

Η ίδια διαδικασία έδωσε για το DAC, που διαθέτει περισσότερες πολικές ομάδες, τρεις υδρογονικούς δεσμούς:

O1 - ASN 564 OD1

O3 - TYR 735 O

O2 - GLN 642 OE1

Πίνακας 3: Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DAC και του GR

Hydrophobic Interactions ---

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	604A	MET	3.95	2186	630
2	607A	ALA	3.65	2183	654
3	608A	LEU	3.57	2182	659
4	623A	PHE	3.61	2154	784
5	623A	PHE	3.98	2156	786
6	642A	GLN	3.85	2187	937
7	735A	TYR	3.09	2187	1707

ΣΤ) Επιπτώσεις της πρόσδεσης στη δευτεροταγή δομή

Τέλος θεωρήσαμε ενδιαφέρον να προσδιορίσουμε την επίδραση των προσδετών DEX, DAC και AKBA στην δευτεροταγή δομή του GR με το πρόγραμμα VMD και χρησιμοποιώντας το κατάλληλο script υπολογισμού δευτεροταγούς δομής, το οποίο παρατίθεται στο παράρτημα (script K). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής του GR και των συμπλόκων του με DEX, DAC και AKBA

	Αριθμός αμινοξέων	Συμμετογή αμινοξέων σε α-έλικα	Συμμετογή αμινοξέων σε β-φύλλα
1P93 – κρυστ. δομή	250	162 (64,8%)	11 (4,4%)
1P93 – Μετά την προσομοίωση	250	160 (64,0%)	4 (1,6%)
3BQD – DAC	253	168 (66,4%)	13 (5,1%)
3BQD – AKBA	253	165 (65,2%)	10 (4,0%)

Παρατηρούμε ότι στις κρυσταλλικές δομές ο μεγαλύτερος προσδέτης (DAC) σταθεροποιεί τόσο την α-έλικα όσο και το β-φύλλο. Μετά από την προσομοίωση φαίνεται ότι ο προσδέτης (AKBA) σταθεροποιεί επίσης τη δευτεροταγή δομή.

Z) Σχολιασμός αποτελεσμάτων docking και προσομοιώσεων για εύρεση της θέσης πρόσδεσης

Είναι γνωστό ότι στη φύση (και εργαστηριακά αποδεδειγμένο) το AKBA βρίσκει την κατάλληλη θέση πρόσδεσης μέσα στον GR. Ωστόσο, οι αρχικές μας προσπάθειες για εύρεση της κατάλληλης θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα 1P93 ήταν αποτυχημένες, γεγονός που μας οδήγησε στο να αναλογιστούμε για τις πιθανές αιτίες. Μερικές από αυτές είναι οι παρακάτω:

- i. Ορισμένοι ερευνητές αναφερόμενοι στην εμπειρία τους με το πρόγραμμα Vina διατύπωσαν την απαισιοδοξία τους για το κατά πόσο το πρόγραμμα αυτό είναι αποτελεσματικό στην εύρεση θέσης πρόσδεσης με σχετικά μεγάλα μόρια όπως το AKBA.
- ii. Οι προσομοιώσεις που κάναμε μπορεί να μη μας δίνουν όλες τις πιθανές δομές που μπορεί να έχει ο υποδοχέας σε κανονικό – φυσικό περιβάλλον λόγω μη επαρκούς χρόνου προσομοίωσης.
- iii. Το force field που χρησιμοποιήσαμε ενδεχομένως να μην επιτρέπει επαρκή δειγματοληψία στον χώρο των διαμορφώσεων.
- iv. Έχουμε μόνο το LBD του υποδοχέα (αμινοξέα 527-777) και όχι ολόκληρη τη δομή του.

Θα προτείναμε σε αυτό το σημείο χρήση άλλων προγραμμάτων docking που ενδεχομένως εντοπίζουν αποτελεσματικότερα τη θέση πρόσδεσης του AKBA στο GR 1P93.


Προοπτικές




- A. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι το 3-ο-ακέτυλο-11-κετοβήτα μποςγουελικό οξύ μπορεί να δημιουργήσει ευσταθές σύμπλοκο με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών επάγοντας όμως αλλαγές στην τριτοταγή του διαμόρφωση. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να προάγουν την εκλεκτική αλληλεπίδραση του υποδοχέα με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά μόρια, ενεργοποιώντας έτσι εκλεκτικά κάποιες από τις επιθυμητές δράσεις του υποδοχέα χωρίς να επηρεάζουν ή να καταστέλλουν άλλες δράσεις, υπεύθυνες για την εμφάνιση παρενεργειών, σε περιπτώσεις χρόνιας και υψηλής δόσης χορήγησης κορτιζόλης για θεραπευτικούς σκοπούς. Με αυτόν τον τρόπο το μποςγουελικό οξύ και τα παράγωγά του καθίστανται εν δυνάμει εκλεκτικοί αγωνιστές των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από πειραματικά δεδομένα σε ex vivo σύστημα κυττάρων (Ψαρρά και συνεργάτες, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).
- Η εκτενέστερη διερεύνηση των τροποποιημένων αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μιας επόμενης μελέτης.


- B. Με αφετηρία την ταυτότητα των αμινοξέων που αποτελούν τον θύλακα πρόσδεσης του μποςγουελικού οξέος:
- i) μπορούν να γίνουν πειράματα σημειακών μεταλλάξεων στην Arg 611 σε αμινοξύ που δεν δημιουργεί υδρογονικούς δεσμούς προκειμένου να ελεγχθεί / επιβεβαιωθεί η θέση πρόσδεσης.
 - ii) μπορούν να σχεδιαστούν φαρμακευτικές ουσίες που να είναι αποτελεσματικότερες από τα μποςγουελικά οξέα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ & Scripts

Σχεδιασμός δομής του AKBA με τη βοήθεια του προγράμματος Arguslab

Από την έναρξη → όλα τα προγράμματα, ανοίγουμε το πρόγραμμα Arguslab. Με *File* → *New*, ανοίγουμε την οθόνη σχεδιασμού του μορίου μας. Ξεκινήσαμε τον σχεδιασμό προσθέτοντας τους δακτυλίους. Πατώντας το εικονίδιο  εμφανίζονται οι καρτέλες απ' όπου επιλέγουμε τα δομικά στοιχεία του σχεδιαζόμενου μορίου. Από την καρτέλα *Rings* επιλέγουμε τους δακτυλίους και τους μετακινούμε στη θέση που θέλουμε, έναν – έναν κάθε φορά, σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα που έχουμε ως πρότυπο. Οι μετακινήσεις και περιστροφές των δακτυλίων γίνονται σύρνοντας το ποντίκι με αριστερό κλικ και πατημένο είτε το πλήκτρο *Shift* είτε το πλήκτρο *Ctrl*. Επειδή ο δακτύλιος καταλαμβάνει μεγάλο μέρος τις οθόνης, μπορούμε να τον σμικρύνουμε με πατημένο το πλήκτρο *Shift* και σύρνοντας το ποντίκι με αριστερό κλικ κάπου στο μαύρο τις οθόνης.

Για να προσθέσουμε διάφορα άτομα π.χ άτομα οξυγόνου, χρησιμοποιούμε τη λειτουργία πρόσθεσης ατόμου πατώντας το εικονίδιο  ή πιο απλά μπορούμε να αξιοποιήσουμε τη λειτουργία αντικατάστασης ατόμου. Καταρχάς, αλλάζουμε τη λειτουργία του δείκτη σε «Επιλογή» με το , και στη συνέχεια είμαστε σε θέση να προσθέσουμε τα άτομα οξυγόνου, άνθρακα (ή ο,τι άλλο χρειαζόμαστε κάθε φορά). Επιπλέον, αν θέλουμε να αλλάξουμε έναν απλό δεσμό και να τον κάνουμε διπλό, κάνουμε δεξί κλικ πάνω του και επιλέγουμε τον δεσμό που επιθυμούμε. Όσον αφορά τα υδρογόνα που λείπουν, αυτά προστίθενται πατώντας το κουμπί  της μπάρας εργαλείων. Μπορούμε να αλλάξουμε κάποιο υδρογόνο σε άλλο άτομο κάνοντας αριστερό κλικ πάνω του όπως είπαμε και παραπάνω με τη μέθοδο της αντικατάστασης ατόμου.

Για να διορθώσουμε τυχόν λανθασμένα μήκη δεσμών και γωνίες πατάμε στο εικονίδιο , ενώ παράλληλα μας ζητάει να αποθηκεύσουμε το αρχείο με το όνομα

που επιθυμούμε ως αρχείο *Arguslab File (.agl)*. Μπορούμε ακόμη να σώσουμε μια εικόνα της τρέχουσας μορφής του μορίου με *File → Export*.

Για να τελειοποιήσουμε τη γεωμετρία του μοντέλου πρώτα με το Force Field Μοριακής Μηχανικής UFF και μετά με την ημιεμπειρική κβαντομηχανική μέθοδο PM3 ακολουθούμε την εξής πορεία: α) Ανοίγουμε την καρτέλα *Calculation → Optimize Geometry* και επιλέγουμε το *UFF*. Στο μέρος *Geometry Search* της καρτέλας ορίζουμε *Maximum Steps Taken = 500* και κάνουμε κλικ στο *Start*. β) Επιλέγουμε το *PM3*, *Max Iterations = 400*, *Maximum Steps Taken = 4000* και κάνουμε κλικ στο *Start*. Αν δούμε ότι το μόριο μας δεν έχει πάρει σωστή μορφή επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία. Σώζουμε το τελειοποιημένο μοντέλο με *File → Save as Arguslab File* καθώς και ως *PDB file (.pdb)*. Να σημειώσουμε εδώ ότι στο αρχείο *.out* που προκύπτει βρίσκουμε την ενέργεια του μορίου σε kcal/mol ως *Final Geom Energy*.

Απομόνωση της αλυσίδας A και του DEX από το 1P93.pdb – Συμπλήρωση του χάσματος στη θέση 704 – 708 με το πρόγραμμα SPDBV (Swiss-PdbViewer)

Σε πρώτη φάση έγινε στοίχιση της ακολουθίας από το αρχείο 1P93.pdb με την πλήρη ακολουθία του GR (*homo sapiens*) και διαπιστώσαμε την ταυτότητα του LBD. Βρέθηκε επίσης ότι η δομή 1P93 εμφανίζει χάσμα 3 αμινοξέων (Glu 705, Gly 706, Asn 707). Μέσω του προγράμματος SPDBV απομονώσαμε απευθείας την αλυσίδα που χρειαζόμαστε (chain A) με: *wind → control panel* διαλέγουμε τα αμινοξέα από A αλυσίδα και μετά *File → Save as pdb file* με το όνομα που θέλουμε (εδώ με το όνομα 1P93_A.pdb). Από το pdb αρχείο που δημιουργήθηκε κρατάμε όλα τα άτομα (διαγραφή των ετεροατόμων και άλλων άσχετων ατόμων που βρίσκονται κάτω από τις εγγραφές ATOM). Προκειμένου να συμπληρώσουμε την δομή χρησιμοποιήσαμε ένα άλλο αρχείο GR PDB, και συγκεκριμένα το 1NHZ_A, στο οποίο δεν εμφανίζεται το χάσμα. Από αυτό απομονώθηκαν τα συγκεκριμένα αμινοξέα σε ένα νέο αρχείο κειμένου με όνομα loop.pdb. Έπειτα κάναμε επαναρίθμηση στα άτομα και copy paste αυτών στο κανονικό μας αρχείο 1P93_A.pdb στο μέρος όπου έχει το χάσμα. Έτσι,

προστίθενται τα αμινοξέα που έλειπαν στη σωστή σειρά. Έπειτα φτιάχνουμε το loop ακολουθώντας τις οδηγίες του spdb και το προσαρμόζουμε κατάλληλα.

Διαδικασία docking με το Vina

Προετοιμασία του υποδοχέα και του προσδέτη

Το πρόγραμμα Vina [37] χρησιμοποιεί τόσο για τον υποδοχέα όσο και για τον προσδέτη αρχεία τύπου `pdbqt`. Τα αρχεία αυτά περιέχουν εκτός από τις συντεταγμένες των ατόμων, τα μερικά ηλεκτρικά τους φορτία καθώς και τους τύπους των ατόμων για το Force Field του προγράμματος Autodock 4 [38].

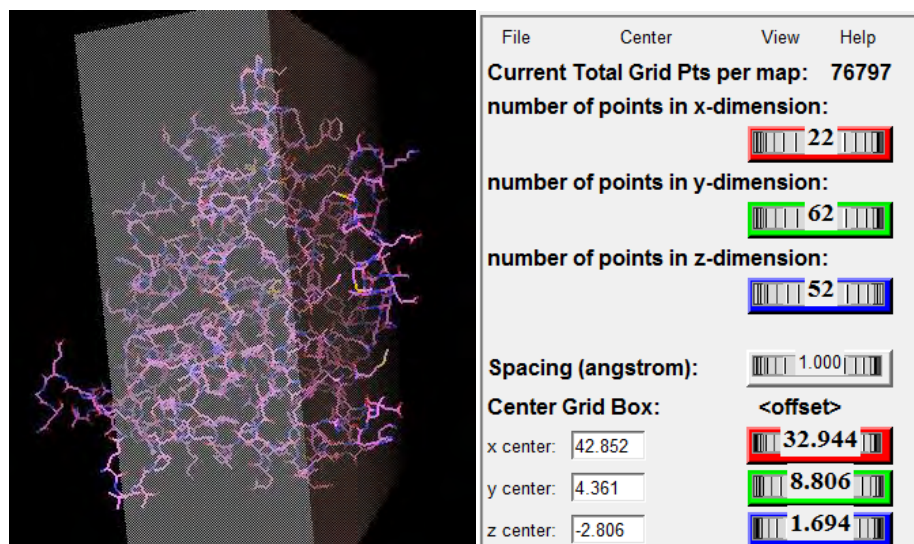
A) Δημιουργία αρχείου `pdbqt` για τον υποδοχέα

- Από την Έναρξη → Όλα τα προγράμματα, ανοίξαμε το πρόγραμμα AutodockTools.
- Φορτώσαμε στη συνέχεια το αρχείο του υποδοχέα με *File* → *Read Molecule* *IP93.pdb* από το φάκελό μας.
- Αφαιρέσαμε όλα τα υδρογόνα με *Edit* → *Delete* → *Hydrogens* → *Continue* και έπειτα προσθέσαμε μόνο τα πολικά υδρογόνα με *Edit* → *Hydrogens* → *Add* → *Polar only*. Επιλέξαμε *NoBindOrder*, *Yes* και πατήσαμε *OK*.
- Αποθηκεύουμε τον υποδοχέα στο φάκελο εργασίας με: *Grid* → *Macromolecule* → *Choose* → *IP93* → *Select Molecule* → *OK* → Αποθήκευση.

B) Ορισμός θέσης και διαστάσεων πλέγματος

Το Vina αναζητά την κατάλληλη θέση πρόσδεσης του προσδέτη σε ένα πλέγμα (Grid). Ορίσαμε λοιπόν αυτή τη θέση ως εξής:

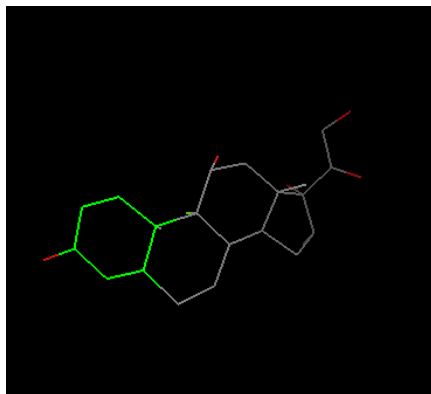
- *Grid* → *Grid Box*. Στην καρτέλα που ανοίγει ορίζουμε τις τιμές για *Center Grid Box*, *Spacing (A)* & *Number of points*. Αυτό έγινε σέρνοντας το «κουτί» πάνω στον υποδοχέα, φροντίζοντας να περικλείει την εσωτερική περιοχή που προσδένεται ο υποδοχέας μας. Κρατήσαμε σε ένα απλό αρχείο κειμένου αυτές τις τιμές καθώς θα τις χρειαστούμε αργότερα.



Εικόνα Π1: Καθορισμός του Grid Box μέσω των επιλογών από το Grid Options

Γ) Δημιουργία αρχείου pdbqt για το DEX

- Με *Ligand* → *Input* → *Open IP93_DEX.pdb*, εμφανίστηκε στην οθόνη το μοντέλο της δεξαμεθαζόνης που χρησιμοποιήθηκε στο δοκιμαστικό αυτό docking.
- Για να είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί εύκαμπτο (flexible) docking, θα πρέπει στο αρχείο pdbqt του προσδέτη να είναι ταυτοποιημένοι οι δεσμοί που επιτρέπουν περιστροφές. Αυτό το κάναμε με *Ligand* → *Torsion Tree* → *Choose Torsions* → *Done*. Το AutodockTools εμφανίζει έτσι με πράσινο χρώμα τους δεσμούς που επιτρέπουν περιστροφές, ενώ με κόκκινο αυτούς που δεν επιτρέπουν περιστροφές.
- Σώσαμε ένα αρχείο pdbqt για το DEX με *Ligand* → *Output* → *Save as PDBQT*, *IP93_DEX.pdbqt*.



Εικόνα 15: Το DEX μετά από εφαρμογή Torsion Tree

Docking του DEX στον υποδοχέα 1P93

Το πρόγραμμα Vina χρειάζεται ως εισαγόμενα τρία αρχεία, δυο αρχεία pdbqt, δηλ. του υποδοχέα και του προσδέτη και ένα αρχείο που περιέχει στοιχεία για τη θέση και τις διαστάσεις του χώρου αναζήτησης και ονομάζεται «configuration file». Το αρχείο αυτό, με όνομα «config_dex.txt», το φτιάξαμε εμείς και έχει την ακόλουθη μορφή:

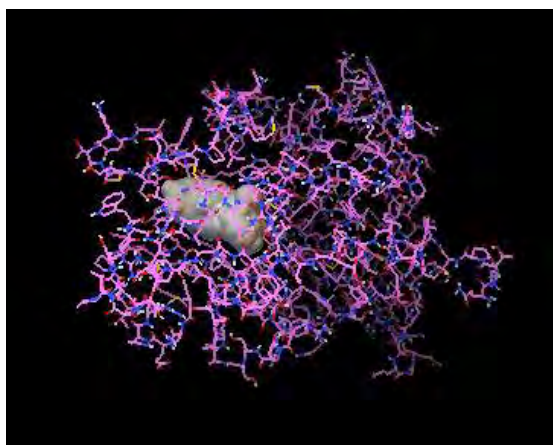
```
receptor = 1P93.pdbqt
ligand = 1P93_DEX.pdbqt

center_x = 42.852
center_y = 4.361
center_z = -2.806

size_x = 22
size_y = 62
size_z = 52
```

Στη συνέχεια τρέξαμε το πρόγραμμα Vina με διπλό κλικ στο αρχείο run_vina_dex.bat εφόσον χρησιμοποιούσαμε τα windows. Αυτό μας έδωσε δυο αρχεία, ένα αρχείο 1P93_DEX.out & ένα log_dex.txt. Στο πρώτο αρχείο υπάρχουν 2 προτεινόμενες θέσεις σύνδεσης του προσδέτη ενώ στο δεύτερο για κάθε μια από αυτές τις θέσεις υπάρχουν καταγεγραμμένες οι ενέργειες πρόσδεσης ($\Delta G_1 = -11$ kcal/mol, $\Delta G_2 = -8,7$ kcal/mol).

Φορτώσαμε ξανά το αρχείο του υποδοχέα μαζί με το αρχείο out που προέκυψε και πήραμε τις 2 θέσεις πρόσδεσης του DEX, όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα. Αλλάξαμε τη μορφή του προσδέτη έτσι ώστε να είναι εμφανής μέσα στον θύλακα του υποδοχέα.



Εικόνα Π3: Η θέση πρόσδεσης του DEX έπειτα από docking

Ενυδάτωση

α) Ανοίξαμε το VMD και αλλάξαμε τη directory ώστε να βρισκόμαστε μέσα στο φάκελό μας. Αυτό έγινε με: *extensions* → *TK console* → *cd* “διεύθυνση φακέλου”

β) Φορτώνουμε τα αρχεία με: *File* → *new molecule* → *GR.psf* και έπειτα στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε *Load Data IntoMolecule*. Διαλέγουμε το αντίστοιχο αρχείο *pdb* της πρωτεΐνης.

γ) Έχοντας φορτώσει τον υποδοχέα, πατήσαμε: *Extensions* → *Modeling* → *Add Solvation Box* → στο *Box Size & Box Padding* δώσαμε την τιμή 8 → *Solvate* και με αυτόν τον τρόπο προστέθηκαν τα νερά.

SCRIPTS

Στο μέρος αυτό αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένα script που χρησιμοποιήθηκαν για να αυτοματοποιήσουμε τις εργασίες.

A) NVT configuration file

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
  
structure          ionized.psf  
coordinates        min_ionized.coor  
bincoordinates     eq_3BQD_AKBA_NPT_1.coor  
set temperature    310  
set outputname     eq_3BQD_AKBA_1  
  
firsttimestep      0  
  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
  
# Input  
paraTypeCharmm     on  
parameters         AKBA.par  
parameters         par_all27_prot_na.inp  
temperature        $temperature  
  
# Force-Field Parameters  
exclude            scaled1-4  
1-4scaling         1.0  
cutoff             12.0  
switching          on  
switchdist         10.0  
pairlistdist       14.0  
  
# Integrator Parameters  
timestep           2.0 ;# 2fs/step  
rigidBonds         all ;# needed for 2fs steps  
nonbondedFreq      1  
fullElectFrequency 2  
stepspercycle      10  
  
# Constant Temperature Control  
  
langevin           on ;# do langevin dynamics
```

```

langevinDamping      5      ;# damping coefficient (gamma) of
5/ps
langevinTemp          $temperature
langevinHydrogen     off     ;# don't couple langevin bath to
hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1     76.8718  0.  0.
cellBasisVector2     0.  71.3229  0.
cellBasisVector3     0.  0  117.7401
cellOrigin            18.2559 30.9643 4.7386
wrapAll              on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME                  yes
# let NAMD determine grid
#PMEGridSpacing      1.0

PMEGridSizeX         80
PMEGridSizeY         72
PMEGridSizeZ         120

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure     yes ;# needed for rigidBonds
useFlexibleCell      no
useConstantArea      no

#langevinPiston      on
#langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
#langevinPistonPeriod 100.
#langevinPistonDecay 50.
#langevinPistonTemp  $temperature

# Output
outputName           $outputname

restartfreq           500      ;# 500steps = every 1ps
#velDCDfile          vel0.1
#velDCDfreq          50
dcdfreq              500
xstFreq              500
outputEnergies       100
#outputPressure      100

#fixedAtoms          on
#fixedAtomsForces    on
#fixedAtomsFile      ref_DQA0.pdb
#fixedAtomsCol       B

#####
## EXTRA PARAMETERS ##
#####

#reinitvels          $temperature
# For heating, use temperature reassignment.

```

```
#reassignFreq 100
#reassignTemp 0
#reassignIncr 10
#reassignHold 310
reinitvels 310

run      5000000      ;# 10ns
```

```
#####
## EXECUTION SCRIPT ##
#####
```

B) Bash script για αντικατάσταση ονομάτων ατόμων και αμινοξέων από αρχεία pdb

```
#!/bin/bash
cd Desktop/PDBs
for i in {0..0}
do
sed 's/HSE/HIS/g' $i.pdb > 1_$i.pdb
sed 's/HT1/HN3/g' 1_$i.pdb > 2_$i.pdb
rm 1_$i.pdb
sed 's/HT2/HN2/g' 2_$i.pdb > 3_$i.pdb
rm 2_$i.pdb
sed 's/HT3/HN1/g' 3_$i.pdb > 4_$i.pdb
rm 3_$i.pdb
sed 's/HE21/1HE2/g' 4_$i.pdb > 5_$i.pdb
rm 4_$i.pdb
sed 's/HE22/2HE2/g' 5_$i.pdb > R_$i.pdb
rm 5_$i.pdb
done
```

Γ) Tcl script για δημιουργία αρχείων pdb της πρωτεΐνης με μόνο πολικά υδρογόνα (φορτίο > 0.12)

```
mol load psf GR_ionized_pr.psf dcd eq_GR_3-6_pr_every_2nd.dcd
set nf [molinfo top get numframes]
for {set i 0} {$i < $nf} { incr i } {
set prot [atomselect top "protein and not hydrogen or
(hydrogen and charge > 0.12) and not serial 976 1900 2046 3259
4072" frame $i]
$prot writepdb $i.pdb
}
```

Δ) Bash script για αντικατάσταση στηλών σε αρχεία pdb

```
#!/bin/bash

for i in {0..4}
do
#Save from column 1 to 70 from file test.pdb to file test1.pdb
cut -c1-70 $i.pdb > test$i.pdb

#Save from column 71 to the end of line from file test.pdbqt
to file test1.pdbqt
cut -c71- test.pdbqt > test1.pdbqt

#Save combine lines from file test1.pdb with test1.pdbqt and
save to new.pdbqt
paste -d "" test$i.pdb test1.pdbqt > new$i.pdbqt

done
```

Ε) Bash script για παραγωγή πολλών configuration files του vina με ποικίλα κέντρα

```
#!/bin/bash

#produce many config files with various centers x,y,z

x0=-18
y0=-25
z0=-25

for i in {0...24}
for j in {0...35}
for k in {0...35}

do

x=x0+1*i
y=y0+1*j
z=z0+1*k

echo 'size_x=16'
echo 'size_y=12'
echo 'size_z=18'
echo 'center_x=$x'
echo 'center_y=$y'
echo 'center_z=$z'

done > config$x$y$z.txt
```

ΣΤ) Bash script για μετατροπή πολλών αρχείων pdb του υποδοχέα σε pdbqt

```
#!/bin/bash

for i in {0..9999}
do
  pythonsh ./prepare_receptor4.py -r HIS_$(i).pdb -o
  receptors_pdbqts/$(i).pdbqt -A hydrogens -U nphs
done
```

Z) Bash script για να τρέξει το vina

```
#!/bin/bash

for i in {0..9999}
do
  ./vina --config conf.txt --receptor receptors_pdbqts/$(i).pdbqt
  --out out/out$(i).pdbqt
done
```

H) Bash script για την εξαγωγή των ΔG στο αρχείο DG.txt

```
#!/bin/bash
# Remove preexisting DG.txt
rm DG.txt
for i in {0..9999}
do
  # Copy the second line of out/out$(i).pdbqt to variable line
  line=$(sed '2q;d' out/out$(i).pdbqt)
  # Export line to the temporary file test.txt
  echo $line > test.txt
  # Copy from test.txt columns 20-25 into variable dG
  dG=$(cut -c 20-25 test.txt)
  # Export DG values to a file DG.txt
  echo $i ' ' $dG >> DG.txt
  echo $i $dG
  # Remove temporary file test.txt
  rm test.txt
done
```

Θ) Tcl script για τον υπολογισμό των αποστάσεων από την θέση πρόσδεσης του DEX

```
# Create a list of *.pdbqt files in directory out.
set outlist [glob config/out/*.pdbqt]
# Open outfile
set outfile [open dist_out_lig-dex.txt w]
# Define a list with the center of mass of DEX
set comdex {52.0913200378418 12.64417839050293 -
1.3038572072982788}
# Assign to variable ligand a name from outlist and load the
correspong pdbqt file
foreach ligand $outlist {
mol load pdb $ligand
set outlig [atomselect top all]
# Measure the center of mass from ligand
set comlig [measure center $outlig]
# Determine the distance between ligand and DEX
set dist($ligand.r) [veclength [vecsub $comdex $comlig]]
# Remove current molecule
mol delete top
# Write distance into outfile
puts $outfile "$ligand $dist($ligand.r)"
}
close $outfile
```

I) Tcl script για υπολογισμό μέσης δομής (Average Structure) από τροχιά

```
set ref [atomselect top "protein and backbone" frame 0]
set nf [molinfo top get numframes]
set sel [atomselect top "protein and backbone"]

#align
for {set i 0 } {$i < $nf } { incr i } {
$sel frame $i
$sel move [measure fit $sel $ref]
$sel frame $i
}

# calculate average structure
set sell [atomselect top all]
set nf [molinfo top get numframes]
set nfirst 0
set nlast 499
#set nfirst [expr $nf - 400]
#set nlast [expr $nf - 1]
set newpos [measure avpos $sell first $nfirst last $nlast step
1]
$sell set {x y z} $newpos
$sell writepdb "test_aver.pdb"
```

K) Tcl script για υπολογισμό ποσοστών δευτεροταγούς δομής

```
# Count total number of residues in chain ?
set selp [atomselect top "protein and chain A"]
set res [$selp get residue]
foreach element $res {dict set tmp $element 1}
# collect only unique elements:
set un_nr [dict keys $tmp]
set rn [llength $un_nr]
puts $rn
unset tmp
unset res

# Count residues in helices
set selh [atomselect top "protein and chain A and helix"]
set res [$selh get residue]
foreach element $res {dict set tmp $element 1}
set un_h [dict keys $tmp]
set hn [llength $un_h]
set hpc [expr {double($hn)/$rn}]
unset tmp
unset res

# Count residues in sheets
set sels [atomselect top "protein and chain A and sheet"]
set res [$sels get residue]
foreach element $res {dict set tmp $element 1}
set un_s [dict keys $tmp]
set sn [llength $un_s]
set spc [expr {double($sn)/$rn}]
unset tmp
unset res

puts "$rn $hn $hpc $sn $spc"
```

A) PSF generator script

```
#package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
topology AKBA.rtf

#topology mag243.rtf

#alias residue A ADE
#alias residue G GUA
#alias residue C CYT
#alias residue U URA
alias residue HIS HSE
alias residue MG MG
alias residue CL CLA
alias residue HOH TIP3
```



```

#set reslist "CYT GUA ADE THY URA"
#foreach resid $reslist {
# alias atom $resid O5* O5'
# alias atom $resid C5* C5'
# alias atom $resid C4* C4'
# alias atom $resid O4* O4'
# alias atom $resid C3* C3'
# alias atom $resid O3* O3'
# alias atom $resid C2* C2'
# alias atom $resid C1* C1'
#}
#alias atom ILE CD1 CD
#alias atom ALA 1HB HB1
#alias atom ALA 2HB HB2
#alias atom ALA 3HB HB3
#alias atom ALA 1H HT1
#alias atom ALA 2H HT2
#alias atom ALA 3H HT3
#alias atom ALA O OT1
#alias atom ALA OXT OT2
#alias atom ALA H HN
#alias atom CL CL CLA
alias atom TIP3 O OH2

```

```

segment A {
pdb 3BQD_wt.pdb
mutate 645 HSP
mutate 726 HSP
mutate 775 HSP
#first none
#last none
}
#patch DISU A:no A:no
coordpdb 3BQD_wt.pdb A
guesscoord

```

```

segment B {
pdb AKBA.pdb
#first none
#last none
}
#patch DISU A:107 A:163
coordpdb AKBA.pdb B
guesscoord

```

```

writepdb 3BQD_AKBA_wt.pdb
writepsf 3BQD_AKBA_wt.psf

```

```

resetpsf

```

```

exit

```

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Διακυτταρική Επικοινωνία – Μεταγωγή Σήματος**, Ζίφα Αιμιλία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Φεβρουάριος 2014.
- [2] **The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease**, Robert H. Oakley, PhD and John A. Cidlowski, PhD, Laboratory of Signal Transduction, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 111 TW Alexander Drive, Research Triangle Park, North Carolina, 27709
- [3] **Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs**, Rhen T. , Cidlowski JA, *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.
- [4] **The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve and restore**, Busillo JM, Cidlowski JA, *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:109-19.
- [5] **New and improved glucocorticoid receptor ligands**, Miner JN, Hong MH, Negro-Vilar A, *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:1527-45.
- [6] **The steroid and thyroid hormone receptor superfamily**, Evans RM, *Science* 1988; 240:889-95.
- [7] **Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by Deacylocortivazol**, Kelly Suino – Powell, Yong Xu, Chenghai Zhang, Yong – guang Tao, W. David Tolbert, S. Stoney Simons, Jr., and . Eric Xu. Laboratory of Structural Sciences, Van Andel Research Institute, 333 Bostwick Avenue, Grand Rapids, Michigan 49503, and Steroid Hormones Section, NIDDK/CEB, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-1772.
- [8] **Mechanisms of glucocorticoid signaling**, Onar J.L.M Schoneveld, Ingrid C. Gaemers, Wouter H. Lamers. AMC Liver Center, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 69-71, 1105 BK, Amsterdam, The Netherlands.

- [9] **Tissue - specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone**, J.E. Kalinyak, R.I. Dorin, A.R. Hoffman, A.J. Perlman. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10441.
- [10] **Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta**, M.R. Yudt, C.M. Jewell, R.J. Bienstock, J.A. Cidlowski, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 4319.
- [11] **The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform**, R.H. Oakley, C.M. Jewell, M.R. Yudt, D.M. Bofetiado, J.A. Cidlowski. *Specificity and mechanisms of action*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27857.
- [12] **The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones**, Grad I., Picard D, *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:2-12.
- [13] **Steroid receptor interactions with heat shock proteins and immunophilin chaperons**, Pratt WB, Toft DO, *Endocr Rev* 1997;18:306-60.
- [14] **Anatomy of the steroid receptor zinc finger region**, Freedman LP, *Endocr Rev* 1992;13:129-45.
- [15] **Gene regulation by steroid hormones**, Beato M, *Cell* 1989;56:335-44.
- [16] **Cooperativity and complementarity: synergies in non – classical and classical glucocorticoid signaling**, Samarasinghe RA, Witchell SF, DeFranco DB, *Cell Cycle* 2012;11:2819-27.
- [17] **Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice**, Anna Kleiman, Jan P. Tuckermann, *Molecular and Cellular Endocrinology* 275 (2007) 98-108.
- [18] **Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index**, Heike Schacke, Markus Berger, Hartmut Rehwinkel, Khusru Asadullah. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275 (2007) 109–117.
- [19] **Interference of Boswellic Acids with the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor**, Scior T, Verhoff M, Gutierrez-Aztatzi I, Ammon HP, Laufer S, Werz O.
- [20] **Protein docking**, Aatu Kaapro Janne Ojanen November 27,2002.

- [21] **Prediction of protein – protein interactions by docking methods**, *Graham R Smith and Michael JE Sternberg. Curr Opin Struct Biol. 2002 Feb;12(1):28-35.*
- [22] **Solvated docking: introducing water into the modelling of biomolecular complexes**, *Aalt D. J. van Dijk and Alexandre M. J. J. Bonvin, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Science Faculty, Utrecht University, 3584CH, Utrecht, The Netherlands.*
- [23] **Computational Soft Matter. From Synthetic Polymers to Proteins, Lecture Notes**, *Michael P. Allen, Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmuller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. Institute for Computing, Juelich, NIC Series. 2004;23:1-28.*
- [24] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>
- [25] **Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease**, *PNAS. Weiqiang Gao, P.J. Anderson, E.M. Majerus, E.A. Tuley and J.E. Sandler, December 12, 2006;103:19099-19140.*
- [26] **Visual Molecular Dynamics**. *Humphrey W, Dalke A and Schulten K (1996) VMD - J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.*
- [27] **Scalable molecular dynamics with NAMD**. *Phillips J.C, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel R.D, Kalé L and Schulten K (2005) Journal of Computational Chemistry, Volume 26, Issue 16, pages 1781–1802. DOI: 10.1002/jcc.20289.*
- [28] **Molecular docking using ArgusLab, an efficient shape-based search algorithm and the AScore scoring function**. *Thompson, M. A. (2004) ACS meeting, Philadelphia, 172, CINF 42, PA.*
- [29] **UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis**. *Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) J Comput Chem. 2004 Oct;25(13):1605-12.*
- [30] **RasMol: Biomolecular graphics for all**, *Trends in Biochemical Sciences (TIBS). Roger S and Milner-White E.J (1995), September 1995, Vol. 20, No. 9, p. 374.*

- [31] **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.** Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- [32] **Wordom: a program for efficient analysis of molecular dynamics simulations.** Seeber M, Cecchini M, Rao F, Settanni G and Caflisch A (2007). *Bioinformatics* **23** (19): 2625-2627.
DOI:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm378>
- [33] <http://propka.org/>
- [34] **Improving the iterative Linear Interaction Energy approach using automated recognition of configurational transitions.** C. Ruben Vosmeer¹ · Derk P. Kooi¹ · Luigi Capoferri¹ · Margreet M. Terpstra¹ Nico P. E. Vermeulen¹ · Daan. P. Geerke¹. Published online: 12 January 2016.
- [35] **The PyMOL Molecular Graphics System.** DeLano, W.L. (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- [36] <https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip>
- [37] **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.** Trott O, Olson A.J (2010), *Journal of Computational Chemistry* **31** (2010) 455-461.
- [38] **Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility.** Morris G.M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M.F, Belew R.K, Goodsell D.S and Olson A.J (2009) *J. Computational Chemistry* 2009, **16**: 2785-91.