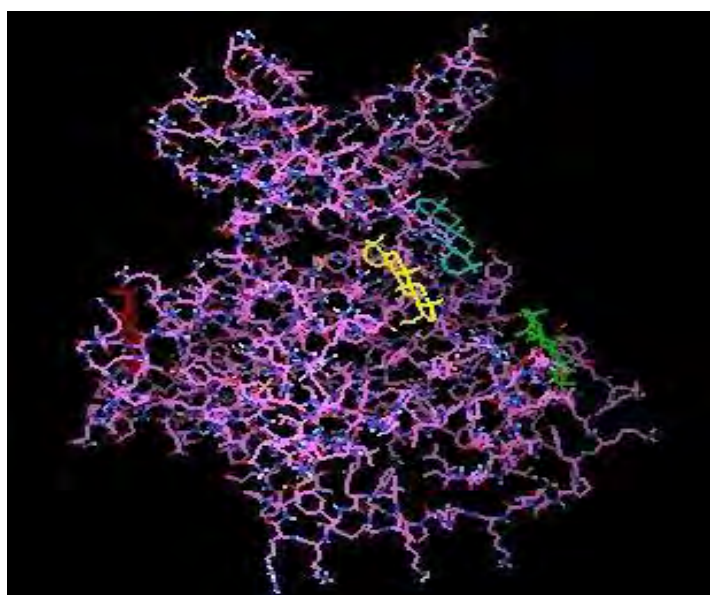




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόσδεση της λουπεόλης στην κινάση-3β της συνθάσης του γλυκογόνου (LSK1)
του *Lotus japonicus*

Docking of lupeol with protein glycogen synthase kinase-3beta (LSK1) in *Lotus
japonicus*



Διπλωματική εργασία
Γκιουλέκας Απόστολος
2015

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Παπαδόπουλος Γεώργιος, Επιβλέπων

Επίκουρος Καθηγητής Βιοφυσικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Μέλος

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Λεωνίδας Δημήτριος, Μέλος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή Παπαδόπουλο Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, δίνοντας μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα άκρως ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο. Παράλληλα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την υπομονή και την κατανόηση που επέδειξε σε όποιες προσωπικές δυσκολίες παρουσιάστηκαν στη διαδρομή αυτής της εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της επιτροπής για την από μέρους τους βοήθεια και κατανόηση.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους φίλους που έκανα μες τη σχολή για όσα περάσαμε όλα αυτά τα χρόνια και μέσα σ' αυτούς ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον φίλο και υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Αθανάσιο Κυρίτση για τις συμβουλές και την βοήθειά του στην ολοκλήρωση της εργασίας αλλά και για όσα συνεχίζουμε να περνάμε παρέα.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ θέλω να δώσω στους γονείς μου για την αγάπη τους και για όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια και που μαζί με τον αδερφό μου είναι δίπλα μου και με στηρίζουν ώστε να ξεπερνάω με θάρρος, δύναμη και υπομονή τις όποιες δυσκολίες παρουσιάζονται κατά την καθημερινότητα μου με την Σκλήρυνση κατά Πλάκας.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ, GSK-3β ΚΑΙ ΛΟΥΠΕΟΛΗ	
1.1 Εισαγωγή στις πρωτεϊνικές κινάσες	8
1.2 Πρωτεϊνικές κινάσες που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Lotus japonicus</i>	8
1.3 Λειτουργία και εξέλιξη των κινασών GSK3/Shaggy-like	9
1.3.1 Χαρακτηρισμός και λειτουργίες πρωτεϊνών GSK3	9
1.3.2 GSK3 και σηματοδότηση ορμονών στα ανθοφόρα φυτά	11
1.3.3 Η λειτουργία των GSK3 στα ανθικά όργανα και την κυτταρική επέκταση	12
1.3.4 Ρόλοι των GSK3 στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις	13
1.4 Λουπεόλη και τερπενοειδή	14
1.4.1 Λουπεόλη και καρκίνος	15
1.4.2 Λουπεόλη και φλεγμονή	17
1.5 Πρόσδεση της λουπεόλης στην GSK3-β και επούλωση τραύματος	19
1.6 Σκοπός της Εργασίας	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Σχεδιασμός φαρμάκων με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών	22
2.2 Μοριακή Μοντελοποίηση	22
2.3 Κβαντομηχανική και Μοριακή Μηχανική	23
2.3.1 Κβαντομηχανική	24
2.3.2 Μοριακή Μηχανική	24
2.4 Ελαχιστοποίηση δυναμικής ενέργειας	25
2.5 Μοριακή Δυναμική	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ (PROTEIN DOCKING)	
3.1 Αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη κατά το docking	28

3.2 Διαδικασία του Docking	30
3.2.1 Αλγόριθμοι αναζήτησης (Search Algorithms)	31
3.2.2 Συναρτήσεις Βαθμολόγησης	35
3.3 Σύνοψη και συμπεράσματα	37
3.4 Διάφορα προγράμματα Docking	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	
4.1 AutoDock Vina	42
4.2 UCSF Chimera	46
4.3 VMD	46
4.4 Swiss-PdbViewer	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
Στάδια της εργασίας	
1) Συγκριτικός σχεδιασμός της GSK3-β από Lotus japonicus (LSK1)	47
2) Προσομοίωση μοριακής δυναμικής της LSK1	48
3) Επιλογή δομών από την τροχιά της προσομοίωσης	48
4) Μοντέλο της λουπεόλης	51
5) Docking της λουπεόλης στην LSK1	52
6) Αξιολόγηση και ανάλυση των υποψήφιων θέσεων πρόσδεσης	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
Βιβλιογραφία	71

Περίληψη

Η κινάση-3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3-β) αποτελεί μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία φωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το τελικό βήμα στη σύνθεση του γλυκογόνου. Η GSK3-β δρα σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, με εκτός των άλλων εμπλοκή σε ανθρώπινες ασθένειες. Η λουπεόλη αποτελεί ένα τριτερπένιο που έχει δειχθεί ότι παρουσιάζει διάφορες φαρμακολογικές δράσεις τόσο σε συνθήκες *in vitro* όσο και *in vivo*, με δράση ενάντια στον καρκίνο και την φλεγμονή. Η λουπεόλη είναι ένας δραστικός παράγοντας επώλωσης τραυμάτων, ιδιότητα που επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της GSK3-β και παρεμπόδισης του εξαρτώμενου από τη β-κατενίνη σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Κατά την παρούσα εργασία διενεργήθηκαν *in silico* δοκιμές docking του μορίου της λουπεόλης με ένα μοντέλο της πρωτεΐνης GSK3-β του *Lotus japonicus*, σε διαμορφώσεις που προέκυψαν από προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Σκοπός ήταν η αναζήτηση της πιθανής θέσης (ή θέσεων) δέσμευσης της λουπεόλης στην GSK3-β, των στερεοδιαμορφώσεων δέσμευσης της λουπεόλης και τον υπολογισμό της συγγένειας δέσμευσης. Οι δοκιμές docking, η απεικόνιση των αποτελεσμάτων πρόσδεσης και η περαιτέρω διερεύνηση της περιοχής δέσμευσης, πραγματοποιήθηκαν με λογισμικά σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μια διαδικασία που ακολουθείται στον σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή. Αυτή η διαδικασία απέδωσε τέσσερις πιθανές περιοχές δέσμευσης. Ακολούθησαν στοχευμένες μεταλλάξεις στα αμινοξέα που περιβάλλουν την περιοχή δέσμευσης και εκ νέου δοκιμές docking, που έδειξαν ότι το αμινοξύ Asp282 φαίνεται να επηρεάζει τη δέσμευση, υποδεικνύοντας έναν πιθανώς καθοριστικό ρόλο σε αυτή.

Λέξεις κλειδιά: GSK3β, λουπεόλη, docking, στερεοδιαμόρφωση, σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή, αλγόριθμοι αναζήτησης, συναρτήσεις βαθμολόγησης, AutoDock Vina.

Abstract

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3- β) is a ser/thr kinase that phosphorylates glycogen synthase, the enzyme responsible for the final step in glycogen synthesis. GSK3- β is involved in many developmental processes and human diseases. Lupeol constitutes a triterpenoid which is shown to have various pharmacological properties *in vitro* and *in vivo* with action against cancer and inflammation. Lupeol is a strong wound healing factor, an attribute that is achieved through β -catenin-dependent Wnt signaling pathway by inhibiting GSK3- β . In this work *in silico* docking trials of lupeol molecule with a model of GSK3- β in *Lotus japonicus* were conducted, using conformations taken from a molecular dynamics simulation. Purpose of this study was the search of potential lupeol binding site (or sites) into GSK3- β , lupeol binding conformations and calculation of binding affinity. Docking trials, visualization of bindings and further investigation of binding sites, were performed with computer programs, a process common in structure-based drug design. This process led to four potential binding sites. Further, we produced specific site-directed mutations of the amino-acids surrounding the binding site and examined their effect in a new series of docking trials. The results revealed that Asp 282 influences the binding of lupeol, indicating a decisive role in this interaction.

Key words: GSK3- β , lupeol, docking, conformation, structure-based drug design, search algorithms, scoring functions, AutoDock Vina.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ, GSK-3β ΚΑΙ ΛΟΥΠΕΟΛΗ

1.1 Εισαγωγή στις πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες (φωσφορυλίωση), διαδραματίζοντας έτσι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες, ρυθμίζοντας την πλειοψηφία των κυτταρικών μονοπατιών, ειδικά εκείνων που περιλαμβάνονται στη σηματοδότηση. Η φωσφορυλίωση οδηγεί συνήθως σε μια λειτουργική αλλαγή της πρωτεΐνης στόχου (υπόστρωμα) με αλλαγή της ενζυμικής δραστηριότητας, της κυτταρικής θέσης, ή της ένωσης με άλλες πρωτεΐνες. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 500 γονίδια πρωτεϊνικών κινασών και αποτελούν περίπου 2% όλων των ανθρώπινων γονιδίων.[1] Πάνω από το 30% όλων των ανθρώπινων πρωτεϊνών μπορεί να τροποποιηθεί από τη δραστηριότητα κινασών. Πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται επίσης στα βακτήρια και τα φυτά. Οι περισσότερες κινάσες ενεργούν και στη σερίνη και στη θρεονίνη (κινάσες σερίνης/θρεονίνης), άλλες ενεργούν στη τυροσίνη (κινάσες τυροσίνης), και ένας αριθμός και στα τρία.[2] Υπάρχουν επίσης πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων των κινασών ιστιδίνης οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα ιστιδίνης. [3]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες στους ευκαρυώτες καλύπτουν μεγάλες οικογένειες ομόλογων πρωτεϊνών και οι καταλυτικές τους περιοχές αποτελούνται από 250-300 κατάλοιπα αμινοξέων που μπορούν να διαιρεθούν σε 12 δομικές υποεπικράτειες (subdomains), ουσιαστικές για τη δραστηριότητα κίνησης. Προκειμένου να ανιχνευθεί μια ευρεία ποικιλία των πρωτεϊνικών κινασών που εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς, παράχθηκαν μοναδικά αντισώματα που κατευθύνθηκαν στην ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή VIB (subdomain VIB) των πρωτεϊνικών κινασών [4, 5]. Με τη χρησιμοποίηση μιας τεχνικής κλωνοποίησης-έκφρασης που περιλαμβάνει αυτά τα αντισώματα, απομονώθηκαν διάφορες γνωστές και νέες πρωτεϊνικές κινάσες από τον εγκέφαλο ποντικών [4] καθώς και από έμβρυα του *Xenopus laevis*.

1.2 Πρωτεϊνικές κινάσες που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus japonicus*

Στα φυτά, οι πρωτεϊνικές κινάσες έχει αναφερθεί πως εμπλέκονται στην προσαρμογή στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ξηρασία, η θερμοκρασία, το φως, η αλατότητα, οι ορμόνες, τα παθογόνα, ή η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών. Επομένως, τα ανώτερα φυτά είναι γνωστά ότι διαθέτουν μοναδικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, διαφορετικές

από εκείνες που βρίσκονται στους περισσότερους ευκαρυώτες.

Σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού των πρωτεϊνικών κινασών που εκφράζονται στο φυτό *Lotus japonicus*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ακατέργαστα εκχυλίσματα από τα φύλλα και το μίσχο, τη ρίζα και τον κόνδυλο του *L. japonicus* τα οποία πρότειναν ότι μοναδικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε αυτούς τους ιστούς, δείχνοντας έτσι ότι οι διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες ή οι ακόμη και οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις κινάσες (kinase-like proteins) παρουσιάζουν ιστο-ειδική έκφραση στο *L. japonicus*.

Φυλογενετική ανάλυση [6] πρότεινε ότι οι κινάσες που λήφθηκαν μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε διαφορετικές οικογένειες κινασών Ser/Thr που είναι: α) Οι κινάσες της οικογένειας RLK που προσδέονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι μεταβιβάζουν εξωκυττάρια ερεθίσματα μετατρέποντάς τα σε ενδοκυτταρικά σήματα. β) Οι κινάσες της οικογένειας SnRK οι οποίες εμφανίζονται να εμπλέκονται στις κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω ρύθμισης βασικών μεταβολικών μονοπατιών. γ) Η οικογένεια Ndr των κινασών Ser/Thr η οποία πιστεύεται ότι συμμετέχει στον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και της μορφογένεσης. δ) Οι κινάσες της οικογένειας Gsk-3 που είναι πολυλειτουργικές κινάσες Ser/Thr εμπλεκόμενες στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την ανάπτυξη, την απόκριση σε καταπονήσεις και τη σηματοδότηση ορμονών. ε) Η οικογένεια Ark που περιλαμβάνει τις φυτικές AAK1, των οποίων οι χαρακτηριστικές ιδιότητες και οι φυσιολογικές λειτουργίες δεν είναι γνωστές ακόμα.

1.3 Λειτουργία και εξέλιξη των κινασών GSK3/Shaggy-like

Οι πρωτεϊνικές κινάσες-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3), που είναι γνωστές επίσης ως κινάσες Shaggy-like, έχουν πολλούς σημαντικούς ρόλους στην κυτταρική σηματοδότηση στα ζώα, τους μύκητες και τις αμοιβάδες. Ειδικότερα, οι κινάσες GSK3 συμμετέχουν σε βασικά αναπτυξιακά σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμίζουν επίσης τον κυτταροσκελετό. Γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες GSK3 είναι επίσης παρόντα σε όλα τα φυτά εδάφους, στα φύκια και τα πρώτιστα, γεγονός που εγείρει ερωτήματα για πιθανούς αρχέγονους ρόλους στους ευκαρυώτες. Πρόσφατες μελέτες [7] έχουν δείξει πως οι φυτικές πρωτεΐνες GSK3 εμπλέκονται ενεργά στα ορμονικά σηματοδοτικά δίκτυα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπως επίσης σε βιοτικές και αβιοτικές αποκρίσεις στο stress.

1.3.1 Χαρακτηρισμός και λειτουργίες πρωτεϊνών GSK3

Η κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3) χαρακτηρίστηκε αρχικά στο

σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης στα ζώα ως μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία φωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το τελικό βήμα στη σύνθεση του γλυκογόνου. Η GSK3 δρα σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαφοροποίησης, της κίνησης του κυτταροσκελετού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με εκτός των άλλων εμπλοκή σε ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και της νόσου του Alzheimer.

Συγκεκριμένα, η GSK3 αποτελεί κομβικό παράγοντα στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στα ζώα, όπου τα εξωκυττάρια σήματα Wnt οδηγούν στην απενεργοποίηση της GSK3. Αυτό εμποδίζει τη δραστηριότητα της GSK3 ως προς την β-κατενίνη, η οποία ως αποτέλεσμα δεν αποικοδομείται πλέον από το πρωτεόσωμα, αλλά μπορεί να συγκεντρωθεί στον πυρήνα και να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων-στόχων.

Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ισομορφές της GSK3 (GSK3α και GSK3β) που κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια και έχουν μια συντηρημένη περιοχή κινάσης αλλά διακριτές καρβοξυτελικές και αμινοτελικές δομικές περιοχές με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας τους.

Τα υποστρώματα για την GSK3 είναι ποικίλα και τα περισσότερα από αυτά απαιτούν φωσφορυλίωση από μια άλλη κινάση προτού φωσφορυλιωθούν από την GSK3. Αυτή η πρωταρχική φωσφορυλίωση τοποθετεί το υπόστρωμα στην κατάλληλη διαμόρφωση για φωσφορυλίωση από την GSK3. Ένας πρωτεϊνικός θύλακος πρόσδεσης φωσφορικής ομάδας της GSK3 στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την περιοχή της πρωταρχικής φωσφορυλίωσης. Στην GSK3β, ο συγκεκριμένος θύλακος καθορίζεται από την Arg96, την Arg180 και τη Lys205. Η GSK3 είναι μια αρχαία κινάση, με ομόλογα της να βρίσκονται σε όλους τους ευκαρυώτες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα ζώα και το *Dictyostelium*, οι GSK3 στα φυτά κωδικοποιούνται από τις σχετικά μεγάλες πολυγονιδιακές οικογένειες των οποίων τα μέλη μοιράζονται υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία τους. Σε όλες τις GSK3 στα αγγειόσπερμα που αναλύθηκαν μέχρι στιγμής, τα αμινοξέα που απαρτίζουν τον θύλακο πρόσδεσης φωσφορικής ομάδας είναι ίδια με αυτά της GSK3β. [7,8]

Στο *Arabidopsis* υπάρχουν δέκα ομόλογες GSK3, που καλούνται επίσης κινάσες Shaggy (AtSK ή ASK) σε αντιστοιχία με την ομόλογη της GSK3 στη *Drosophila*. Η ονοματολογία των GSK3 του *Arabidopsis* μπορεί να είναι συγκεχυμένη. Μία πλήρης λίστα ονομάτων για την κάθε πρωτεΐνη του *Arabidopsis*, μαζί με τα ονόματα για άλλες φυτικές GSK3s που έχουν μελετηθεί, δίνεται στον πίνακα 1. Την τελευταία δεκαετία, σημαντική πρόοδος έχει γίνει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι φυτικές GSK3 εκτελούν τις διαφορετικές λειτουργίες τους.

Πίνακας 1.1: Φυτικές GSK3

<i>Arabidopsis</i> GSK3 clade	<i>Arabidopsis</i> GSK3	Gene identifier	Function/remark
I	AtSK11/ASK α	At5g26750	Flower development/brassinosteroid signalling
	AtSK12/ASK γ	At3g05840	Flower development/brassinosteroid signalling
	AtSK13/ASK ϵ	At5g14640	Osmotic stress induced/brassinosteroid signalling
II	AtSK21/ASK η /BIN2/UCU1	At4g18710	Brassinosteroid signalling
	AtSK22/ASK ν /BIL1/AtGSK1	At1g06390	Brassinosteroid signalling/salt stress
	AtSK23/ASK ζ /BIL2	At2g30980	Brassinosteroid signalling
III	AtSK31/ASK θ	At4g00720	Brassinosteroid signalling/osmotic stress induced
	AtSK32/ASK β	At3g61160	Flower development
IV	AtSK41/ASK ω /AtK-1	At1g09840	Unknown
	AtSK42/ASK δ	At1g57870	Osmotic stress induced
Plant species	GSK3 gene	Highest similarity to	Function/remark
<i>Medicago sativa</i>	MsK1	AtSK11	Pathogen response
	MsK4	AtSK41	Carbohydrate metabolism/salt stress
	WIG	AtSK31	Wound response
<i>Oryza sativa</i>	OsGSK1	AtSK21/BIN2	Brassinosteroid signalling/salt stress
<i>Triticum aestivum</i>	TaGSK1	AtSK12	Salt stress
<i>Gossypium</i> sp.	BIN2	AtSK21/BIN2	Brassinosteroid signalling
<i>Saccharum officinarum</i>	SuSK	AtSK42	Salt/osmotic stress
<i>Physcomitrella patens</i>	PpSK2 and PpSK4	AtSK13	Osmotic stress induced

Πηγή: Younouss Saidi, Timothy J. Hearn and Juliet C. Coates. "Function and evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like kinases". Trends in Plant Science January 2012, Vol. 17, No. 1

1.3.2 GSK3 και σηματοδότηση ορμονών στα ανθοφόρα φυτά

Η σηματοδότηση μέσω στεροειδών ορμονών έχει βρεθεί στα φυτά, τα ζώα και τους μύκητες, και επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει μια αρχαία εξελικτική προέλευση [9]. Εντούτοις, οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη στεροειδική σηματοδότηση στα φυτά ανήκουν σε εξειδικευμένες φυτικές πρωτεϊνικές οικογένειες. Η σηματοδότηση μέσω των βρασσινοστεροειδών (BR) ρυθμίζει μια σειρά φυσιολογικών αποκρίσεων στα ανθίζοντα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της επιμήκυνσης των κυττάρων, του πρασινίσματος, του χρόνου άνθησης, της γονιμότητας και της διαφοροποίησης του αγγειακού ιστού.

Στο *Arabidopsis*, τα BR αναγνωρίζονται από μια κίνηση-υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης, την BRI1. Η επακόλουθη μεταγωγή σήματος περιλαμβάνει ένα γονίδιο το BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (*bin2*). Κυρίαρχες μεταλλάξεις στο *bin2* έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή φυτών-νάνων ανθεκτικών στα βρασσινοστεροειδή. Το *bin2* κωδικοποιεί για μια GSK3 με μια καταλυτική περιοχή που παρουσιάζει 70% ταυτότητα με τη ζωική GSK3 β . Σημειακές μεταλλάξεις ανάκτησης λειτουργίας του *bin2* και υπερέκφραση της BIN2 προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο ανθεκτικότητας στα BRs, γεγονός που επιβεβαιώνει τον ανασταλτικό ρόλο της BIN2 στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BR. [9-12]

Οι GSK3 μπορούν να μεσολαβήσουν στη διασύνδεση της σηματοδότησης μέσω βρασσινοστεροειδών με άλλα ορμονικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Το αμπισισικό οξύ (ABA) εμποδίζει τη σηματοδότηση BR, ενισχύοντας έτσι την έκφραση των BR-κατεσταλμένων γονιδίων. Είναι επίσης δυνατόν η ορμονική σηματοδότηση να εμπλέκεται με τις φυτικές GSK3 με πρόσθετους τρόπους. Παραδείγματος χάριν, η έκφραση του γονιδίου *AtSK31* αυξάνεται χάρη

στην αυξίνη στις ρίζες, παρά το γεγονός η AtSK31 δεν έχει καταδειχθεί ρόλο στη σηματοδότηση μέσω BR ή αυξίνης.

1.3.3 Η λειτουργία των GSK3 στα ανθικά όργανα και την κυτταρική επέκταση

Μοριακή και γενετική ανάλυση έχει επιβεβαιώσει αρκετούς ρόλους των GSK3s του *Arabidopsis* στην ανάπτυξη των ανθέων και των αναπαραγωγικών οργάνων. Τα γονίδια *AtSK11* και *AtSK12* παρουσιάζουν ισχυρή ειδική έκφραση στα πρώιμα ανθικά μεριστώματα, η οποία αργότερα περιορίζεται στα πρώιμα σέπαλα, τα πέταλα, τους καρπούς και τους περιέχοντες γύρη ανθήρες. Εντός των καρπών, η έκφραση των *AtSK11* και *AtSK12* εντοπίζεται κυρίως στις κοιλιακές πλευρές (πλησιέστερα στον κεντρικό άξονα) των καρπών και στα πρώιμα ωάρια, και πιο συγκεκριμένα στα περιβλήματα και το μητρικό μεγασπόριο. Μελέτη με τη βοήθεια ποσοτικής RT-PCR και των δέκα GSK3 του *Arabidopsis* αποκάλυψε ότι και μια τρίτη GSK3, η *AtSK31*, παρουσίαζε επίσης σχετικά υψηλή έκφραση στα ανθικά όργανα. Επιπλέον, η πρωτεΐνη *AtSK31* εντοπίζεται στους πυρήνες των αναπτυσσόμενων ιστών, ιδιαίτερα στα ανθικά όργανα, τα γαμετόφυτα και τα έμβρυα.

Σε συμφωνία με τα δεδομένα έκφρασης, πειράματα αντινοηματικής (antisense) μείωσης στα επίπεδα των μεταγράφων είτε της *AtSK11* είτε της *AtSK12* έχουν ως αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης στο ανθικό μερίστωμα, την παραγωγή ανθέων με αυξημένο αριθμό σεφάλων και πετάλων, καθώς και ανώμαλη ανάπτυξη καρπών. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η υπερέκφραση διαφορετικών ισομορφών της *AtSK32* στα *Arabidopsis* άγριου-τύπου προκαλεί ποικίλα αποτελέσματα. Η υπερέκφραση μιας άγριου-τύπου *AtSK32* οδήγησε σε μη ανιχνεύσιμο φαινότυπο. Ωστόσο, υπερέκφραση ενός ειδικού μεταλλάγματος ανέκταν να φωσφορυλιώσει πρωταρχικώς φωσφορυλιωμένα υποστρώματα GSK3 οδήγησε στην παραγωγή φυτών με βραχείες υποκοτυληδόνες και μειωμένη κυτταρική επιμήκυνση στα ανθικά όργανα. Αναλόγως, τα φυτά που υπερέκφραζαν την *AtSK32*, έδειξαν αξιοσημείωτη μείωση στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για διάφορα τροποποιητικά του κυτταρικού τοιχώματος ένζυμα που εμπλέκονται στην κυτταρική επιμήκυνση. Τα παραπάνω προτείνουν ότι οι μεσολαβούμενες από GSK3 αποκρίσεις στην κυτταρική επιμήκυνση πιθανότατα απαιτούν τη δράση προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων της GSK3. Είναι πιθανόν ότι εκτός από την επέκταση των ανθικών κυττάρων, οι GSK3 μπορεί να έχουν έναν γενικότερο ρόλο στην επιμήκυνση κυττάρων στα φυτά δεδομένου ότι οι BRs έχουν ενορχηστρωτικό ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής επιμήκυνσης.

1.3.4 Ρόλοι των GSK3 στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις

Η έρευνα σε διάφορα είδη φυτών έχει εμπλέξει τις GSK3s σε αποκρίσεις υπό συνθήκες αβιοτικού stress, αν και μερικές φορές με αντιφατικούς τρόπους. Μια αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων της GSK3 ως απόκριση στο stress αλατότητας έχει αναφερθεί για το *Arabidopsis* (*AtSK13*, *AtSK31* και *AtSK42*), το σιτάρι (*Triticum aestivum*) (*TaGSK1*), το ρύζι (*OsGSK1*) και το ζαχαροκάλαμο (*Saccharum officinarum*) (*SuSK*). Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες GSK3 του *Arabidopsis* επάγονται επίσης από το ωσμωτικό stress, ενώ τα μετάγραφα του *OsGSK1* του ρυζιού παρουσιάζουν σημαντική μείωση σε συνθήκες ξηρασίας. Επιβεβαιώνοντας τον ρόλο των GSK3 ως ενεργού συστατικού του σηματοδοτικού μονοπατιού που σχετίζεται με το stress αλατότητας, φυτά *Arabidopsis* που υπερεκφράζουν την *AtGSK1* (*AtSK22*) παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αύξηση στην έκφραση αρκετών γονιδίων απόκρισης στο stress αλατότητας, ακόμη και απουσία συνθηκών υψηλής αλατότητας. Στο *Medicago sativa* (αλφάλφα), η δραστηριότητα κινάσης σε μια GSK3 των πλαστιδίων (*MsK4*) αυξήθηκε ταχύτατα κάτω από υπεροσμωτικές συνθήκες. Η υπερέκφραση της *MsK4* στο *Arabidopsis* βελτίωσε την αντοχή στην αλατότητα μέσω αλλαγών στον μεταβολισμό των υδατανθράκων.

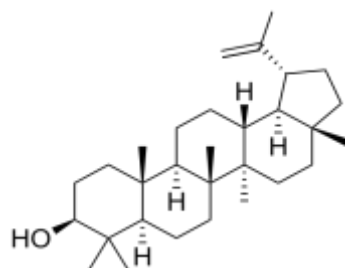
Οι GSK3 είναι επίσης σημαντικές στην απόκριση των φυτών σε συνθήκες βιοτικού stress. Η *MsK1* στο *M. sativa* παρουσιάζει μια μεταβολή στη δραστηριότητα της ως απάντηση σε διεγέρτες του φυτικού αμυντικού μηχανισμού. Ο ρόλος της GSK3 στην απόκριση σε ασθένειες καταδείχθηκε όταν η υπερέκφραση της *MsK1* στο *Arabidopsis* μείωσε την μεσολαβούμενη από παθογόνα ενεργοποίηση των MAP κινασών *AtMPK3* και *AtMPK6* και επιδείνωσε την ευπάθεια του φυτού στο *Pseudomonas syringae*. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσε να υπαινιχτεί ο πιθανός ρόλος της *MsK1* ως αρνητικού ρυθμιστή της βασικής αμυντικής απάντησης και ότι η προκαλούμενη από διεγέρτες ρύθμισή του είναι ουσιαστική για την ενεργοποίηση σημαντικών συστατικών των μονοπατιών άμυνας στα φυτά. Μια άλλη GSK3 στο *M. sativa*, η WIG (wound-induced gene) παρουσιάζει δραστηριότητα κινάσης που επάγεται παροδικά μετά από τον τραυματισμό φύλλων. Αν και καμία από τις GSK του *Arabidopsis* δεν φαίνεται να επάγεται μεταγραφικά από τραυματισμό, η δραστηριότητα κινάσης τους κάτω από συνθήκες μηχανικού τραυματισμού δεν έχει εξεταστεί ποτέ μέχρι σήμερα. Συμπερασματικά, τα μέλη της οικογένειας των GSK3 φαίνεται να έχουν διακριτές ρυθμιστικές λειτουργίες με τη δραστηριότητά τους να ελέγχεται από ποικίλα ερεθίσματα.

Η φύση των GSK3 να αποκρίνονται σε καταπονήσεις είναι εξελικτικά αρχαία. Γονίδια GSK3 στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, ιδιαίτερα το *MCK1*, εμπλέκονται σε απαντήσεις σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένης της θερμότητας, του ψύχους, του

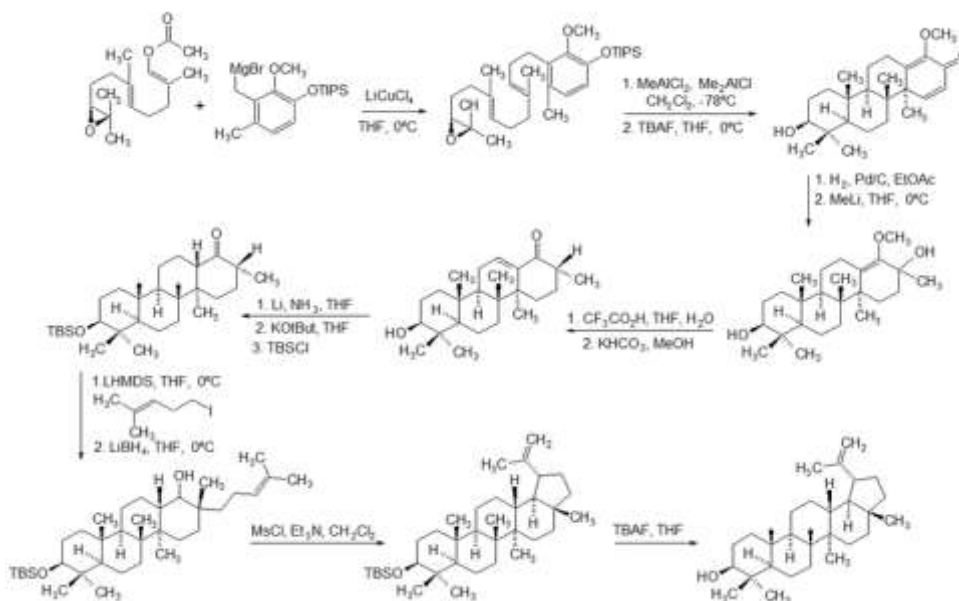
ωσμωτικού stress, του stress αλατότητας, του stress έλλειψης θρεπτικών συστατικών, του οξειδωτικού stress και του stress μεταλλικών ιόντων. Ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος ενός *gsk3* μεταλλάγματος της ζύμης αντιστρέφεται από την έκφραση της GSK3β των θηλαστικών, προτείνοντας έτσι την ύπαρξη ακόμη εκτενέστερης συντήρησης μεταξύ των βασιλείων των ζωντανών οργανισμών όσον αφορά την δραστικότητα.

1.4 Λουπεόλη και τερπενοειδή

Η Lup-20(29)-en-3β-ol, [13,14] γνωστή ως λουπεόλη, ανήκει στους δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελεί ένα τριτερπένιο (30 άτομα άνθρακα). Παράγεται από το εποξειδίο του σκουαλενίου μέσω ενός πολύπλοκου βιοσυνθετικού μονοπατιού, στο οποίο κεντρικό καταλυτικό ρόλο διαδραματίζει η συνθάση της λουπεόλης. Η χημική δομή της λουπεόλης και η πορεία της βιοσύνθεσής της παρουσιάζονται στις εικόνες 1.1 και 1.2. Ο χημικός της τύπος είναι $C_{30}H_{50}O$ και το σημείο τήξης της είναι 215-216 °C. Έχει μοριακό βάρος 426.7174 [g/mol].



Εικόνα1.1 Χημική δομή της λουπεόλης



Εικόνα 1.2 Βιοσύνθεση της λουπεόλης

Η λουπεόλη, έχει βρεθεί στα λαχανικά, όπως το άσπρο λάχανο, η πιπεριά, το αγγούρι, η ντομάτα, η ελιά, στα φρούτα, όπως το σύκο, το μάγκο, η φράουλα, τα κόκκινα σταφύλια και σε ιατρικά φυτά όπως το αμερικανικό ginseng, *Tamarindus indica*, *Allanblackia monticola*, *Himatanthus sucuuba*, *Celastrus paniculatus*, *Zanthoxylum riedelianum*, *Leptadenia hastata*, *Crataeva nurvala*, *Bombax ceiba* [14].

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φυσικά τριτερπενοειδή λόγω του ευρέος φάσματος των βιολογικών δραστηριοτήτων τους. Τα τριτερπένια είναι μια ευρεία ομάδα φυσικών ενώσεων με ιδιαίτερη πρακτική σημασία που παράγονται από το εποξειδίο του σκουαλενίου. Τα τριτερπένια είναι σημαντικά δομικά συστατικά των μεμβρανών στα φυτά και λειτουργούν ως σταθεροποιητές στις φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες των φυτικών κυτταρικών μεμβρανών, όπως ακριβώς κάνει η χοληστερόλη στις κυτταρικές μεμβράνες των ζώων. Τα περισσότερα τριτερπένια περιέχουν 28 ή 29 άνθρακες και έναν ή δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα, χαρακτηριστικά έναν στον πυρήνα στερόλης και μερικές φορές έναν δεύτερο στην αλκυλική πλευρική αλυσίδα. Τα τριτερπένια είναι φυσικά συστατικά στην ανθρώπινη διατροφή. Στη δύση, καταναλώνεται ένας μέσος όρος 250 mg τριτερπενοειδών ανά ημέρα, που προέρχεται κατά ένα μεγάλο μέρος από φυτικά έλαια, δημητριακά, φρούτα και λαχανικά.

Η λουπεόλη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει διάφορες φαρμακολογικές δράσεις τόσο σε συνθήκες *in vitro* όσο και *in vivo*. Αυτές περιλαμβάνουν την ευεργετική της δράση ενάντια στην φλεγμονή, τον καρκίνο, την αρθρίτιδα, τον διαβήτη, σε καρδιακές παθήσεις, τη νεφρική και ηπατική τοξικότητα.

1.4.1 Λουπεόλη και καρκίνος

Πρόσφατες μελέτες [15-17] έχουν δείξει, ότι μια δίαιτα πλούσια σε φωτοχημικά μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά τουλάχιστον 20%. Μάλιστα επιδημιολογικά στοιχεία προτείνουν ότι διατροφή που περιέχει φυτοστερόλες συνδέεται με μια μείωση εμφάνισης κοινών καρκίνων συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη. Με βάση στοιχεία προερχόμενα από μοριακές μελέτες σε διάφορα ογκογόνα μοντέλα, οι φυτοστερόλες φαίνεται ενδεχομένως να ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού εναντίον των όγκων, ενισχύοντας την ανοσολογική αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων, τροποποιώντας την ορμονο-εξαρτώμενη ανάπτυξη των ενδοκρινικών όγκων και ελέγχοντας τη βιοσύνθεση των στερολών. Μελέτες προτείνουν, ότι ο μειωμένος κίνδυνος για διάφορους καρκίνους που συνδέεται με υψηλή κατανάλωση ελαιόλαδου, πιθανότατα οφείλεται

στο πλούσιο περιεχόμενό του σε τριτερπένια. Διάφορα τριτερπενοειδή είναι υποσχόμενα όσον αφορά τη χρήση τους ως αντινεοπλασματικοί παράγοντες, καθώς επιδεικνύουν σημαντική αντιμιτωτική δράση όταν εφαρμόζονται σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι κάποια τριτερπένια αναστέλλουν άμεσα την ανάπτυξη του όγκου, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, και επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες *in vitro* και *in vivo*. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν ως συνέπεια θραύσεων στους κλώνους του DNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης, ενώ από την άλλη κύτταρα στα οποία συσσωρεύονται μεταλλάξεις βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο απόκτησης νεοπλασματικού φαινότυπου. Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης, οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται μετασχηματίζοντας έτσι τα νεοπλασματικά κύτταρα σε κακοήθη καρκινώματα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η λουπεόλη παρουσιάζεται να έχει ισχυρή αντι-μεταλλαξιγόνο δράση σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Παλαιότερες εργασίες είχαν δείξει ότι η λουπεόλη αναστέλλει τις βλάβες του DNA που επάγονται από χημικές ενώσεις (όπως το DMBA και το βενζοπυρένιο) σε συνθήκες *in vitro*.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, οι αντικαρκινικές ιδιότητες της λουπεόλης συνδέονται με τη δυνατότητά της να ελέγχει σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το μονοπάτι των nuclear factor kappa B (NFκB) και της κινάσης της 3-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης [PI3K] /Akt (μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης B), τα οποία φέρονται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ογκογένεση. Οι επαγωγείς των όγκων [όπως το 12-O-τετραδεκανουλφορβολ-13-οξικό (TPA)] είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω NFκB, συντελώντας έτσι στη μετακίνηση του ενεργοποιημένου NFκB στον πυρήνα όπου και δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας. Ο NFκB ενεργοποιεί διάφορα γονίδια-στόχους, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη όγκων. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με όγκους του δέρματος η λουπεόλη δείχθηκε ότι αναστέλλει σημαντικά τη δυνατότητα μετακίνησης του NFκB στον πυρήνα και τη δυνατότητα πρόσδεσής του στο DNA. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις πως η λουπεόλη ενισχύει την επαγόμενη από το TPA σηματοδότηση μέσω PI3K/Akt, καθιστώντας το συγκεκριμένο μονοπάτι ένα εν δυνάμει μοριακό στόχο καινοτόμων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση των σχέσεων δομής-δραστικότητας σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Aratanchemuge [18], έδειξε ότι η λουπεόλη επάγει την απόπτωση σε κύτταρα ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμικής κυτταρικής σειράς. Αυτό το επιτυγχάνει επάγοντας τον σχηματισμό υποδιπλοειδικών πυρήνων και τον κατακερματισμό του DNA (χαρακτηριστικά γνωρίσματα της απόπτωσης) και μάλιστα με τρόπο δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο. Ο Cmoeh και οι συνεργάτες του [19], έδειξαν ότι η λουπεόλη

προκαλεί το θάνατο καρκινικών κυτταρικών σειρών ποικίλης ιστοπαθολογικής προέλευσης, όταν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αυτή για τουλάχιστον 72 ώρες. Εκτός των άλλων η λουπεόλη επιδρά και στη διεργασία της νέο-αγγειογένεσης, η οποία είναι καίριας σημασίας για τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων. Συγκεκριμένα, η λουπεόλη παρουσιάζεται να αναστέλλει *in vitro* τον σχηματισμό σωληνίσκων σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφαλική φλέβα, επιδεικνύοντας έτσι σημαντική αντι-αγγειογενετική δράση. Σύμφωνα με αποτελέσματα άλλων μελετών [20], η λουπεόλη επάγει την απόπτωση σε καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα, φέροντα μεταλλάξεις στο γονίδιο *K-ras*. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η ογκοπρωτεΐνη *ras* ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι NF- κ B/PI3K/Akt/MAPK προσδίδοντας χημειο-ανθεκτικότητα στα καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα. Η λουπεόλη όμως δείχθηκε πως αναστέλλει το εν λόγω μονοπάτι. Τέλος, η λουπεόλη φέρεται να εξουδετερώνει επιλεκτικά καρκινικά κύτταρα του προστάτη και να μειώνει τα επίπεδα του PSA (Prostate Specific Antigen) στον ορό ζωικών μοντέλων. Αυτό πιθανότατα το επιτυγχάνει μέσω πρόσδεσης στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του υποδοχέα ανδρογόνων των κυττάρων του προστάτη (τα ανδρογόνα διαδραματίζουν ρόλο-κλειδί στην εξέλιξη του συγκεκριμένου καρκίνου), όπως δείχθηκε σε *in silico* προκαταρκτικές μελέτες. Σύμφωνα με τις ίδιες μελέτες, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που προσβάλλονται από την λουπεόλη στον καρκίνο του προστάτη είναι αυτό της Wnt/ β -κατενίνης και η αποπτωτική μηχανή μέσω της πρωτεΐνης Fas.

1.4.2 Λουπεόλη και φλεγμονή

Η λουπεόλη έχει μελετηθεί εκτενώς για την ανασταλτική της δράση στην φλεγμονή σε συνθήκες *in vitro* καθώς και σε ζωικά μοντέλα. Μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι η τοπική εφαρμογή λουπεόλης μειώνει τα επίπεδα της μυελοϋπεροξειδάσης των ουδετεροφίλων προκαλώντας έτσι μείωση της διήθησης κυττάρων σε φλεγμαίνοντες ιστούς. Μια μελέτη των Fernandez et al.,[21] έχει δείξει ότι το πλούσιο σε λουπεόλη εκχύλισμα του φυτού *Pimenta racemosa* (που χρησιμοποιείται ευρέως από τους γιατρούς χωρών στην περιοχή της Καραϊβικής στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών νοσημάτων) επιδεικνύει υψηλή αντιφλεγμονώδη δράση σε ζωικά μοντέλα.

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη σύγκριση της αντιφλεγμονώδους αποτελεσματικότητας της λουπεόλης με την αντίστοιχη γνωστών αντιφλεγμονωδών παραγόντων. Σε μία εξ αυτών δείχθηκε πως η λουπεόλη και τα παράγωγα της παρουσιάζουν υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση ακόμη και από το κοινώς χρησιμοποιούμενο στην κλινική πράξη μη-στεροειδές αντιφλεγμονώδες, ινδομεθακίνη, σε ζωικά μοντέλα φλεγμονής.

Οι Geetha et al., [22] ανέφεραν για πρώτη φορά τη χρησιμότητα της λουπεόλης στη θεραπεία ή τη μείωση της φλεγμονής σε ένα μοντέλο της αρθρίτιδας στα ποντίκια. Η αρθρίτιδα είναι μια ασθένεια στην παθογένεση της οποίας κατέχει κεντρική θέση η φλεγμονή. Η ευεργετική επίδραση της λουπεόλης στη θεραπεία της φλεγμονής στα ποντίκια με αρθρίτιδα συνδέθηκε με τη δυνατότητά της να ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα και την παραγωγή παραγόντων που προάγουν τη φλεγμονή. Η λουπεόλη δείχθηκε ότι καταστέλλει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων και των T-λεμφοκυττάρων, καθώς και την μεσολαβούμενη από τα CD4+ T-κύτταρα παραγωγή κυτοκινών σε ποντίκια. Η από του στόματος χορήγηση λουπεόλης (12.5-200 mg/kg) οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων και των επιπέδων των κυτοκινών (IL-2, IFN- γ και IL-4) στα ποντίκια με αρθρίτιδα. Μια παρόμοια εργασία από τους Latha et al, [23] έδειξε τα αυξημένα επίπεδα λυσοσωμικών ενζύμων και γλυκοπρωτεϊνών σε συνδυασμό με μειωμένα επίπεδα κολλαγόνου σε ζώα με αρθρίτιδα που συνδέθηκαν με το μειωμένο κολλαγόνο στα αρθρικά ζώα, μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά από σίτιση με λουπεόλη (50 mg/kg).

Μια άλλη σημαντική έρευνα στην καθιέρωση της αντιφλεγμονώδους ικανότητας της λουπεόλης ήταν μια πρόσφατη μελέτη (Vasconcelos et al. [24]), όπου η λουπεόλη εξετάστηκε για την αντιμετώπιση της φλεγμονής σε ένα μοντέλο βρογχικού άσθματος στα ποντίκια. Το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πάθηση των αεραγωγών που συνδέεται με μια Th2 ανοσοαπάντηση. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση λουπεόλης προκαλεί μια σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων γενικότερα και των ηωσινοφίλων ειδικότερα, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. Θεραπεία με λουπεόλη βρέθηκε επίσης ότι μειώνει την παραγωγή της βλέννας και τη γενικότερη φλεγμονή στους πνεύμονες. Μάλιστα η αντιφλεγμονώδης δράση της λουπεόλης παρατηρήθηκε πως είναι ισοδύναμη της δράσης της δεξαμεθαζόνης.

Η αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο η λουπεόλη αναστέλλει ή καταργεί τις διεργασίες φλεγμονής κάτω από συνθήκες *in vitro* και *in vivo* αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων. Η λουπεόλη φαίνεται πως ρυθμίζει αρκετά μόρια που άμεσα ή έμμεσα εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής. Δείχθηκε ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της λιποξυγενάσης-1 της σόγιας και επιπλέον μειώνει την παραγωγή κυτοκινών (όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α , TNF α) που προάγουν τη φλεγμονή σε μακροφάγα επεξεργασμένα με λιποπολυσακχαρίδη (LPS). Εκτός των άλλων, προσφάτως, δείχθηκε σε μοντέλο ποντικίου ότι η λουπεόλη παρουσιάζει αξιοσημείωτη δυνατότητα επούλωσης τραυμάτων και ότι ασκεί τη δράση της αυτή μέσω μείωσης των επιπέδων των μονοκυττάρων και σύνδεσης με την πρωτεΐνη GSK3 β (συγκεκριμένα με την περιοχή ενεργοποίησης της GSK3 β που αποτελείται από την Tyr216 και τα αμινοξέα Asn64,

Gly65, Ser66, Phe67, Gly68, Val70, Lys85, Leu132, Val135, Asp181 στο ενεργό κέντρο).

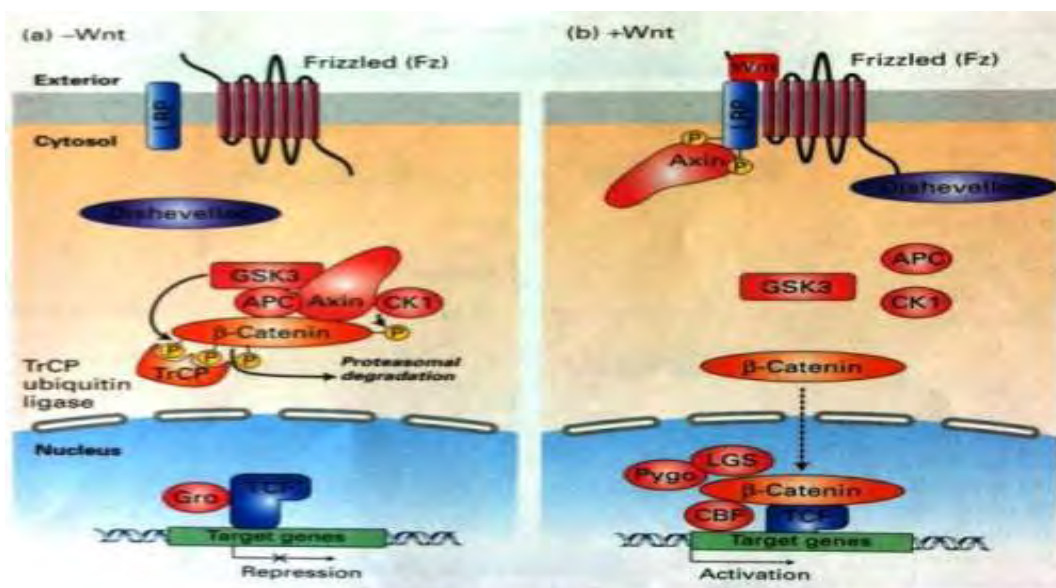
1.5 Πρόσδεση της λουπεόλης στην GSK3-β και επούλωση τραύματος

Η επούλωση τραυμάτων είναι μια ακριβής και ιδιαίτερα συντονισμένη διαδικασία που περιλαμβάνει την φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, την απόθεση εξωκυττάριας ουσίας, την αναδιαμόρφωση ιστού, τη σύνθεση κολλαγόνου και την επιθηλιοποίηση. Πολλοί ερευνητές κατά καιρούς προχώρησαν σε εκτίμηση των ιδιοτήτων επούλωσης διαφόρων φαρμακευτικών βοτάνων σε ζωικά πειραματικά μοντέλα (Angela et al., 2001 Kumara Swamy et al., 2007). Μια από τις ουσίες που εξετάστηκαν ήταν και η λουπεόλη, που απομονώθηκε από φύλλα του *Celastrus paniculatus*, της οποίας η επουλωτική δραστηριότητα εκτιμήθηκε μέσω πειραμάτων τομής, εκτομής και νεκρού χώρου σε αρουραίους Swiss Albino. Συγκεκριμένα, τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε λουπεόλη, παρουσίασαν ταχύτερη επούλωση και υψηλότερο ρυθμό κολλαγονοποίησης και επιθηλιοποίησης στα τραύματα σε σχέση τόσο με τα ζώα ελέγχου, όσο και με αυτά στα οποία χορηγήθηκε η κοινή αλοιφή δέρματος νιτροφουραζόνη. Σε μια προσπάθεια να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης του μορίου της λουπεόλης και να αποσαφηνισθούν οι επουλωτικές της ιδιότητες έγινε *in silico* docking για το εν λόγω μόριο στην πρωτεΐνη της GSK3-β. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν πως η λουπεόλη είναι ένας δραστικός παράγοντας επούλωσης τραυμάτων, ιδιότητα που επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της GSK3-β και παρεμπόδισης του εξαρτώμενου από τη β-κατενίνη σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt.

Οι Wnts αποτελούν μια οικογένεια εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών με διακριτά πρότυπα έκφρασης στο έμβρυο και στον ενήλικο οργανισμό. Οι Wnts συμμετέχουν στη διαδικασία της διαφοροποίησης ελέγχοντας την πολικότητα της κυτταροδιαίρεσης και της κυτταρικής αύξησης. Είναι σαφές ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για Wnts και άλλα συστατικά του μονοπατιού εκφράζονται κατά τη διάρκεια της αναγέννησης του δέρματος (Fathke et al., 2004). Επίσης, η GSK3-β είναι ένα σημαντικό ρυθμιστικό ένζυμο, η αναστολή του οποίου δείχθηκε πως προάγει την διεργασία επούλωσης μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των Wnts και της β-κατενίνης. Η β-κατενίνη είναι το μόριο που σηματοδοτεί τη δραστηριότητα του μονοπατιού Wnt και επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα πολλών γονιδίων.[25]

Οι πρωτεΐνες Wnt δεσμεύονται στους αντίστοιχους υποδοχείς Frizzled. Το Wnt ρυθμίζει τουλάχιστον τρία διαφορετικά μονοπάτια, αλλά το καλύτερα μελετημένο είναι εκείνο της β-κατενίνης. Έχει δειχθεί πως ανωμαλίες αυτής της οδού οδηγούν σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. Σύμφωνα με το μοντέλο που είναι αποδεκτό για το μονοπάτι της β-κατενίνης, όταν το Wnt δεν δρά στα κύτταρα, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες CKIα

(κινάση Ια καζεΐνης), GSK-3β (κινάση-3β της συνθάσης του γλυκογόνου), APC (πρωτεΐνη της αδενωματώδους πολυποδίασης) και AXIN (αξίνη). Το σύμπλοκο αυτό φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη με επακόλουθο την αποικοδόμησή της στο κυτταρόπλασμα. (Εικόνα 1.3)



Εικόνα 1.3 Το μονοπάτι Wnt/β-catenin. Ο ελεύθερος μεταγραφικός παράγοντας β-catenin δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη Axin όπου φωσφορυλιώνεται, συνδέεται με ubiquitin και πρωτεολύεται. Όταν ενεργοποιείται ο υποδοχέας (σύμπλοκο Fz/LRL/Wnt) το προηγούμενο σύμπλοκο Axin/APC/GSK3/CK1/β-cat καταστρέφεται μετά από φωσφορυλίωση της Axin και η β-catenin οδηγείται στον πυρήνα.

1.6 Σκοπός της Εργασίας

Στην έρευνα για την ανάπτυξη μικρών μορίων με θεραπευτική δράση έναντι ασθενειών, η αναστολή πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί μια αρκετά υποσχόμενη προσέγγιση μιας και ορισμένες από αυτές έχει δειχθεί ότι συμβάλουν στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η φλεγμονή κ.ά. Κατά την παρούσα εργασία διενεργήθηκαν *in silico* δοκιμές docking του μορίου της λουπεόλης σε ένα μοντέλο της πρωτεΐνης GSK3-β του *Lotus Japonicus*, με σκοπό την αναζήτηση της πιθανής θέσης (ή θέσεων) δέσμευσης της λουπεόλης στην GSK3-β, των στερεοδιαμορφώσεων που επιτυγχάνονται κατά τη δέσμευση της λουπεόλης, τον υπολογισμό της συγγένειας δέσμευσης και την περαιτέρω διερεύνηση της περιοχής δέσμευσης στην πρωτεΐνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απέβλεπε στην συγκέντρωση πληροφοριών και δεδομένων που θα βοηθήσουν σε μια πιο στοχευμένη μελλοντική βιολογική έρευνα σε επίπεδο εργαστηρίου, αποτελώντας ουσιαστικά τη “γέφυρα” μεταξύ θεωρίας και πειράματος.

Προκειμένου να παρακαμφθεί το εμπόδιο της θεώρησης του μορίου του υποδοχέα κατά την δοκιμή πρόσδεσης ως άκαμπτης οντότητας (rigid body docking), χρησιμοποιήθηκαν προς τούτο διαμορφώσεις από προσομοίωση μοριακής δυναμικής ενός μοντέλου της GSK3-β από το φυτό *Lotus japonicus* το οποίο προέκυψε από συγκριτικό σχεδιασμό (homogy modeling).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σχεδιασμός φαρμάκων με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών

Η συνεχής αύξηση των δυνατοτήτων των ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει συμβάλει στην έρευνα για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες μορίων, αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων προς σχηματισμό συμπλόκων.[26]

Σε αυτήν την έρευνα αρχικά απαιτείται μια αποτελεσματική απεικόνιση των δομών κανονικών και παθολογικών μορίων. Έτσι αν είναι γνωστά η δομή μιας πρωτεΐνης και του ενεργού της κέντρου μαζί με τη δομή ενός μορίου προσδέτη με πιθανές φαρμακευτικές ιδιότητες, μπορεί να προσομοιωθεί η πρόσδεσή τους στην θόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή δίνοντας πληροφορίες για αντίστοιχες πειραματικές αναζητήσεις εξοικονομώντας έτσι τον χρόνο και το κόστος που αυτές θα απαιτούσαν στο εργαστήριο.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων [26-28] (rational drug design) ξεκινά με την εικονική διαλογή (virtual screening) ενός γονιδίου και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Με την ακολουθία ενός γονιδίου, μπορεί να καθοριστεί η αντίστοιχη ακολουθία μιας πρωτεΐνης με μεγάλη αξιοπιστία και στη συνέχεια με χρήση αλγορίθμων πρόβλεψης, η δομή που αποκτά. Γεωμετρικοί υπολογισμοί μπορούν να υπολογίσουν το σχήμα της επιφάνειας της πρωτεΐνης και οι μοριακές προσομοιώσεις να καθορίσουν τις δυνάμεις που αναπτύσσονται γύρω από το μόριό της. Τέλος με χρήση αλγορίθμων πρόσδεσης (docking) μπορεί να προσομοιωθεί η δέσμευση μεταξύ μορίων και με ανάλυση των δοκιμών πρόσδεσης, μπορούν να σχεδιαστούν προσδέτες που δεσμεύονται με την πρωτεΐνη (lead optimization), δημιουργώντας φάρμακα που επιδρούν στη λειτουργία της.

2.2 Μοριακή Μοντελοποίηση

Η Μοριακή Μοντελοποίηση, αποτελεί έναν νέο επιστημονικό κλάδο που συνδυάζει σε μεγάλο βαθμό τις επιστήμες της Βιολογίας, της Χημείας και της Πληροφορικής. Η Μοριακή μοντελοποίηση είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται για την κατασκευή και αναπαράσταση τριδιάστατων μοντέλων μοριακών συστημάτων, καθώς και για τον υπολογισμό ή πρόβλεψη των φυσικοχημικών και βιοχημικών τους ιδιοτήτων με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το

σύνολο των βιολογικών μορίων που μελετούνται στη μοριακή σχεδίαση καλύπτει από απλά μεμονωμένα μόρια έως βιολογικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και το DNA καθώς και σύμπλοκα αυτών.

Η Μοριακή Μοντελοποίηση ακολουθεί τα εξής 3 βασικά στάδια: α) επιλογή του κατάλληλου μοντέλου που περιγράφει ικανοποιητικά τη δομή και τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του μορίου. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι για την επιλογή αυτή είναι η Μοριακή Μηχανική και η Κβαντική Μηχανική. β) υπολογισμοί όπως είναι η ελαχιστοποίησή της ενεργειακής κατάστασης του συστήματος και η μοριακή δυναμική (Molecular Dynamics) και γ) ανάλυση των παραπάνω υπολογισμών και έλεγχος της τελικής διαμόρφωσης ώστε να αξιολογηθεί η ορθότητα των υπολογισμών.[29]

Αρχικά ο καθορισμός του συνόλου των συντεταγμένων (καρτεσιανό σύστημα x,y,z) παρέχει μια χρήσιμη απεικόνιση του μορίου σε τριδιάστατο επίπεδο, αλλά είναι αναγκαία και η χρήση συμπληρωματικών πληροφοριών προκειμένου να αναπαρασταθούν και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου.

Οι σύγχρονες τεχνικές των μοριακών γραφικών (molecular graphics) [30] επιτρέπουν την οπτικοποίηση της τριδιάστατης αρχιτεκτονικής των μορίων στην ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση. Στη δομή αυτή υπάρχει η δυνατότητα να γίνει επεξεργασία με απομόνωση τμημάτων των μορίων, αλλαγή στον προσανατολισμό ορισμένων ομάδων ή αναζήτηση για άλλες πιθανές διαμορφώσεις. Τα μοριακά αυτά μοντέλα επιτρέπουν επίσης την απεικόνιση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων. Υπάρχει π.χ. η δυνατότητα να αναπαρασταθούν οι ακτίνες Van der Waals των ατόμων, η μοριακή επιφάνεια ή ο μοριακός όγκος, το ηλεκτροστατικό δυναμικό, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα κ.ά. Η κατασκευή μοριακών μοντέλων επιτρέπει εξάλλου τη σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικά μόρια προσδιορίζοντας περιοχές ομοιοτήτων και διαφορών. Παράλληλα είναι δυνατή η απεικόνιση της τριδιάστατης προσαρμογής ενός μικρού μορίου σε ένα μακρομόριο. Σε αυτή την κατεύθυνση είναι δυνατό να σχεδιαστούν και απεικονιστούν στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή νέα μόρια τα οποία μιμούμενα το σχήμα μιας δραστικής ένωσης ή του φυσιολογικού υποστρώματος έχουν θεωρητικά τη δυνατότητα να καταλάβουν το ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα.

2.3 Κβαντομηχανική και Μοριακή Μηχανική

Υπάρχουν δύο τύποι μεθόδων για ενεργειακούς υπολογισμούς: α) η Κβαντομηχανική και β) η Μοριακή Μηχανική

2.3.1 Κβαντομηχανική

Για μικρά σχετικά μόρια (μέχρι 100 άτομα περίπου) υπολογισμοί από πρώτες αρχές (ab initio) με κβαντομηχανικές μεθόδους είναι εφικτοί.[31] Οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί περιλαμβάνουν την ab initio κβαντομηχανική μέθοδο και τις ημί-εμπειρικές κβαντομηχανικές μεθόδους. Στην πρώτη επιχειρείται επίλυση της εξίσωσης Schrödinger χωρίς να γίνονται απλοποιήσεις στη διαφορική εξίσωση, ενώ στις ημί-εμπειρικές κβαντομηχανικές μεθόδους γίνονται απλοποιήσεις στην επίλυση της εξίσωσης. Γι' αυτό οι ημί-εμπειρικές μέθοδοι είναι ταχύτερες και προσπελάσιμες σε μεγαλύτερα μόρια συγκριτικά με την ab initio κβαντομηχανική μέθοδο. Παρ' όλες δε τις προσεγγίσεις τις οποίες χρησιμοποιούν οι ημί-εμπειρικές μέθοδοι παρέχουν αποτελέσματα τα οποία πλησιάζουν πολύ τα πειραματικά.

Τα μόρια αποτελούνται από ηλεκτρόνια και πυρήνες. Σύμφωνα με την παραδοχή Born-Oppenheimer, στη κβαντική χημεία σε πολλές εφαρμογές διαχωρίζεται η κίνηση των πυρήνων από αυτή των ηλεκτρονίων. Το αποτέλεσμα της παραδοχής αυτής είναι ένα μοντέλο με κινούμενους πυρήνες πάνω σε μία ενεργειακή επιφάνεια και με στιγμιαία προσαρμογή ηλεκτρονίων στις μεταβολές των θέσεων των πυρήνων. Σε κάθε σταθερή θέση του πυρήνα, η δυναμική ενέργεια είναι το άθροισμα των απώσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων πυρήνων και των έλξεων τους με τα ηλεκτρόνια. Με τον τρόπο αυτό τα ηλεκτρόνια βοηθούν στην συγκράτηση των πυρήνων.

2.3.2 Μοριακή Μηχανική

Η Μοριακή Μηχανική χειρίζεται τα μόρια ως σύνολα μαζών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αρμονικές (ή περισσότερο πολύπλοκες) δυνάμεις μεταξύ δεσμευμένων ατόμων και με van der Waals και ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ μη δεσμευμένων ατόμων. Με τον όρο αυτό ουσιαστικά εννοούμε την κατασκευή μοριακών δυναμικών ή πιο επιστημονικά Δυναμικών Ενεργειακών (Υπερ)Επιφανειών και τον εντοπισμό των ακροτάτων τους, δηλαδή των ελαχίστων, σαγμάτων, και μεγίστων. Μαθηματικές συναρτήσεις των ατομικών συντεταγμένων ή άλλων δομικών παραμέτρων, (force fields), χρησιμοποιούνται για την αναλυτική περιγραφή αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η παραμετροποίηση αυτών των συναρτήσεων γίνεται με βάση πειραματικές παρατηρήσεις ή με κβαντικούς υπολογισμούς.

Σε σχέση με τις κβαντομηχανικές μεθόδους, για μεγάλα μόρια όπως τα βιομόρια τα εμπειρικά δυναμικά είναι πιο διαδεδομένα και παρουσιάζουν αρκετή αξιοπιστία. Τα εμπειρικά δυναμικά συνήθως περιλαμβάνουν δύο μέρη, ένα που περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις των

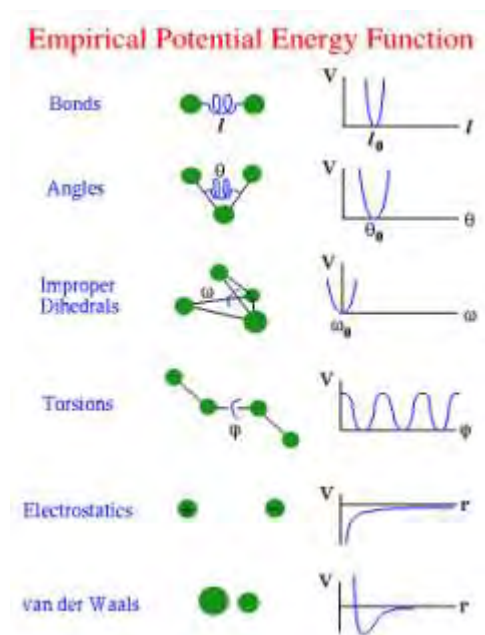
ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς, και ένα άλλο που περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μακράς εμβέλειας. Αποδίδονται με μια εμπειρική συνάρτηση δυναμικής ενέργειας $V(\vec{R})$ στην οποία έχουμε:

$$V(\vec{R}) = V_{bonded}(\vec{R}) + V_{nonbonded}(\vec{R}) \quad (1)$$

όπου \vec{R} συμβολίζει το σύνολο των Καρτεσιανών συντεταγμένων όλων των ατόμων του συστήματος που μελετάμε ως προς ένα σταθερό στον χώρο σύστημα συντεταγμένων (x, y, z).

V_{bonded} είναι η ενεργειακή συμμετοχή που προσφέρουν οι παραμορφώσεις από την θέση ισορροπίας των διαφόρων γεωμετρικών στοιχείων ενός μορίου όπως άνοιγμα/κλείσιμο γωνιών, έκταση/συμπίεση δεσμών, απομάκρυνση ατόμων από επίπεδο και περιστροφές γύρω από διέδρες γωνίες. Οι όροι αυτοί αναπαρίστανται συνήθως από αρμονικούς ταλαντωτές γύρω από μια θέση ισορροπίας.

Η $V_{nonbonded}$ περιλαμβάνει τις α) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο φορτίων όπως αυτές περιγράφονται από τον νόμο του Coulomb, β) τις δυνάμεις van der Waals και γ) τους δεσμούς υδρογόνου.[31,32]



Εικόνα 2.1 Οι αλληλεπιδράσεις που περιέχονται σε μια αντιπροσωπευτική συνάρτηση δυναμικής ενέργειας

2.4 Ελαχιστοποίηση δυναμικής ενέργειας

Μετά την επιλογή της δυναμικής συνάρτησης (force field) ένας βασικός παράγοντας της μοριακής μηχανικής είναι ο προσδιορισμός της στερεοδιαμόρφωσης ελάχιστης ενέργειας. Η δυναμική επιφάνεια ως συνάρτηση των καρτεσιανών συντεταγμένων των ατόμων έχει πολλές κορυφές (ενεργειακά τοπικά μέγιστα) και κοιλάδες (ενεργειακά τοπικά ελάχιστα). Κάθε κοιλάδα αντιπροσωπεύει μία σταθερή ή τοπικά σταθερή κατάσταση του συστήματος. Για την πρωτεΐνη η στερεοδομή που σχετίζεται με μία σταθερή κατάσταση λέγεται στερεοδιαμόρφωση (conformation). Έτσι οι στερεοδιαμορφώσεις μπορούν να προσδιοριστούν με τον εντοπισμό των ενεργειακών ελαχίστων της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας. Η διαδικασία υπολογισμού των ελαχίστων της δυναμικής

ενέργειας ενός συστήματος μορίων ως συνάρτησης των μεταβλητών του συστήματος (π.χ. διέδρες γωνίες, αποστάσεις κλπ.) καλείται ελαχιστοποίηση της ενέργειας.

Η βασική ιδέα της πρόβλεψης της δομής μιας πρωτεΐνης βασίζεται στην υπόθεση ότι η στερεοδιαμόρφωση με την χαμηλότερη δυναμική ενέργεια είναι η φυσική στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης. Έτσι ο προσδιορισμός της φυσικής στερεοδιάταξης ανάγεται στην αναζήτηση του ενεργειακά χαμηλότερου ελάχιστου. Οι περισσότερες μέθοδοι ελαχιστοποίησης όμως δεν μπορούν να υπερβούν ενεργειακά φράγματα που σχηματίζονται γύρω από ενεργειακά ελάχιστα.

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το CHARMM force field που έχει την μορφή.

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{\text{bonds}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 & + \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u (u - u_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{nonbonded}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{2}$$

Ο πρώτος όρος στην ενεργειακή συνάρτηση αναφέρεται σε ομοιοπολικά συνδεδεμένα ατομικά ζεύγη όπου k_b είναι η σταθερά ισχύος δεσμού και $b-b_0$ η απόκλιση από το μήκος δεσμού ισορροπίας. Ο δεύτερος όρος αντιστοιχεί στις γωνίες που ορίζονται από τρία άτομα, όπου k_θ η σταθερά δύναμης γωνίας και $\theta-\theta_0$ η απόκλιση από την γωνία ισορροπίας μεταξύ τριών δεσμευμένων ατόμων. Ο τρίτος όρος αναφέρεται στο άθροισμα των διέδρων (γνωστών και ως γωνιών περιστροφής), όπου k_ϕ η σταθερά ισχύος διέδρων, ϕ η διέδρη γωνία και δ η διαφορά φάσης. Ο τέταρτος όρος αναφέρεται στις διέδρες εκτός επιπέδου όπου k_ω η δυναμική σταθερά και $\omega-\omega_0$ η γωνία εκτός επιπέδου. Ο πέμπτος όρος αναφέρεται στον όρο Urey-Bradley και έχει να κάνει με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μη δεσμευμένων ατόμων 1 και 3, όπου k_u η αντίστοιχη σταθερά δύναμης και u η απόσταση μεταξύ των ατόμων 1 και 3 στο αρμονικό δυναμικό. Οι τελευταίοι δύο όροι αντιπροσωπεύουν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζευγών ατόμων (i, j) που απέχουν τουλάχιστον τρεις δεσμούς μεταξύ τους. Όπου $i < j$ εξασφαλίζει ότι κάθε αλληλεπίδραση υπολογίζεται μόνο μία φορά. Η ενέργεια van Der Waals (VDW) υπολογίζεται από το δυναμικό Lennard-Jones όπου με το πρώτο κλάσμα προσομοιάζει τις απωστικές και με το δεύτερο τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις. Η ηλεκτροστατική ενέργεια υπολογίζεται από την εξίσωση του Coulomb.

Όταν η δυναμική ενέργεια του μορίου χαρτογραφηθεί για μία ή περισσότερες από τις παραμέτρους που αλλάζουν (π.χ. δίεδρες γωνίες) κατασκευάζεται μία επιφάνεια δυναμικής ενέργειας.

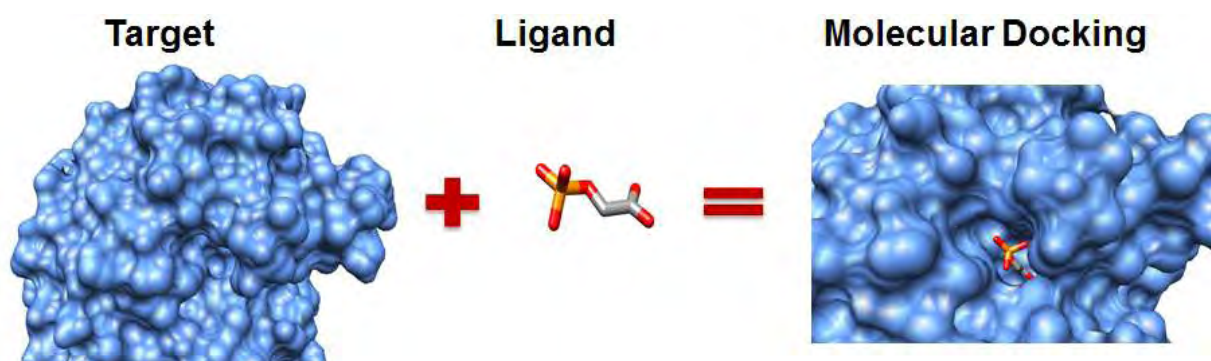
2.5 Μοριακή Δυναμική

Η μοριακή δυναμική είναι η υπολογιστική μέθοδος για την προσομοίωση της κίνησης ενός συστήματος πολλών σωματιδίων. Απαιτεί γνώση του δυναμικού αλληλεπίδρασης που δημιουργείται από τις δυνάμεις που ασκούνται στα σωματίδια και τις εξισώσεις κίνησης που ρυθμίζουν την δυναμική των σωματιδίων. Τα δυναμικά πεδία (force fields) της μοριακής μηχανικής συχνά χρησιμοποιούνται στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Η εξίσωση κίνησης του Newton, $f_i = m_i a_i$, (3) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των επιταχύνσεων κάθε ατόμου σε κάθε βήμα της προσομοίωσης, όπου f_i είναι η συνισταμένη δύναμης για το άτομο i και m_i η μάζα του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ (PROTEIN DOCKING)

Μία διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική έρευνα για τον σχεδιασμό φαρμάκων με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή, είναι το docking.[33] Το docking αποτελεί μια διαδικασία προσομοίωσης σε υπολογιστή, η οποία επιχειρεί να προβλέψει τη θέση και τον προσανατολισμό ενός προσδέτη-ligand, όταν αυτός δεσμευθεί με έναν υποδοχέα. (εικόνα 3.1) Ο υποδοχέας είναι συνήθως μια πρωτεΐνη ή ένα μόριο νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA), ενώ ο προσδέτης είναι είτε ένα μικρό μόριο (protein-ligand docking), είτε μία άλλη πρωτεΐνη (protein-protein docking).



Εικόνα 3.1 Στοιχεία στο μοριακό Docking

3.1 Αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη κατά το docking

Στους προσδέτες περιλαμβάνονται αναστολείς, ενεργοποιητές, υποστρώματα ενζύμων και νευροδιαβιβαστές. Τα δύο μόρια (υποδοχέας και προσδέτης) όταν δεσμεύονται δημιουργούν ένα σύμπλοκο που εξυπηρετεί έναν βιολογικό σκοπό. Η ισχύς της πρόσδεσης αυτής ονομάζεται συγγένεια δέσμευσης (binding affinity) και αποτελεί έναν δείκτη του πόσο καλά ο υποδοχέας μπορεί να ταιριάζει με έναν προσδέτη. Η ενέργεια αυτής της δέσμευσης περιγράφεται από την θερμοδυναμική εξίσωση $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (4). Όπου ΔG είναι η ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης του Gibbs και είναι η ενέργεια που ελευθερώνεται κατά τη δέσμευση. Όπου ΔH είναι η ενθαλπία και ΔS η εντροπία της δέσμευσης. Κάθε υποδοχέας αναγνωρίζει και συνεπώς προσδένεται με συγκεκριμένους μόνο ligands με βάση γεωμετρικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (σε ένα μοτίβο που παρομοιάζεται σαν τη σχέση κλειδιού-κλειδαριάς, όπου η κλειδαριά αναπαριστά τον υποδοχέα και το κλειδί τον ligand).[34]

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η παλαιά ιδέα της αλληλεπίδρασης «κλειδιού-κλειδαριάς»

μεταξύ ενός ligand και του πρωτεϊνικού υποδοχέα δεν είναι μια ακριβής περιγραφή των περισσότερων βιολογικών συμπλόκων. Οι αλληλεπιδράσεις ligand-πρωτεΐνης μοιάζουν περισσότερο με μία ένωση του τύπου «χέρι και γάντι», [35] όπου και τα δύο μέρη είναι εύκαμπτα και προσαρμόζονται για να συμπληρώσουν τη μεταξύ τους προσαρμογή. Μπορούν να τροποποιήσουν το σχήμα τους και να βελτιστοποιήσουν τη συμπληρωματικότητά τους ώστε να αυξηθούν οι επαφές που ευνοούνται και να μειωθούν οι δυσμενείς αλληλεπιδράσεις, μεγιστοποιώντας τη συνολική (αρνητική) ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης. Έχει διαπιστωθεί ότι οι περιοχές του ενεργού κέντρου των ενζύμων εμφανίζονται να παρουσιάζουν περιοχές τόσο υψηλής, όσο και χαμηλής διαμορφωτικής σταθερότητας. Κινητοί βρόγχοι που περικλείουν τον ligand κατά τη δέσμευση, συμπεριλαμβάνονται μέσα στα εύκαμπτα μέρη, ενώ τα καταλυτικά κατάλοιπα, παραδείγματος χάριν, είναι συνήθως δομικά σταθερά. Αυτός ο διπλός χαρακτήρας του περιβάλλοντος στο ενεργό κέντρο εμφανίζεται σημαντικός για τη βέλτιστη δέσμευση.

Οι περιοχές δέσμευσης είναι συνήθως περιοχές στην πρωτεϊνική επιφάνεια στις οποίες υπάρχει μια μεγαλύτερη του μέσου βαθμού, έκθεση των υδροφοβικών ομάδων. Περιέχουν δεσμευμένα μόρια νερού που δεν συγκρατούνται ισχυρά αλλά που κάνουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με τις πολικές ομάδες που είναι στην περιοχή. Τέτοια μόρια νερού μετατοπίζονται εύκολα, επιτρέποντας στις πολικές λειτουργικές ομάδες του ligand να κάνουν το ίδιο είδος αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη στόχο. Αν και η μορφή και η συμπληρωματικότητα φορτίων είναι προφανώς σημαντικές, δεν είναι ολόκληρη η ιστορία. Οι πρωτεΐνες είναι εύκαμπτα μόρια και πολλές περιοχές στις επιφάνειές τους μπορούν να προσαρμόσουν τις μορφές τους σε εκείνες των εισερχόμενων ligands. Καλύτερη κατανόηση των δυνάμεων που κυβερνούν τη μοριακή αναγνώριση πρέπει να προέλθει από μια διαπίστωση ότι η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα σε νερό.

Η επιφάνεια οποιουδήποτε βιομορίου καλύπτεται με μόρια νερού. Αυτά είναι δεσμευμένα με ποικίλους βαθμούς ισχύος. Τα περισσότερα, εάν όχι όλα, είναι ελεύθερα ανταλλάξιμα, αν και οι ρυθμοί ανταλλαγής μπορούν να ποικίλουν αρκετά. Όταν ένας ligand δεσμεύεται σε μια περιοχή στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης, πρέπει να μετατοπίσει ένα ή περισσότερα από αυτά τα μόρια νερού. Αυτός ο ανταγωνισμός για την πρωτεΐνη μεταξύ του διαλύτη και ligand είναι ο λόγος που, από τις δεκάδες των «πιθανών» περιοχών συνδέσεων που βρίσκονται από τις υπολογιστικές αναζητήσεις, μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός εμφανίζεται και πειραματικά. [36]

Η προσπάθεια εντοπισμού του ενεργού κέντρου και της κατανόησης με ακρίβεια της διαδικασίας πρόσδεσης αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα στην προσπάθεια

αποκρυπτογράφησης των περισσότερων μεταβολικών αντιδράσεων.

Με την κατανόηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας ο σχεδιασμός φαρμάκων μπορεί να αναπτυχθεί σημαντικά. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου η πρωτεΐνη να βρεθεί σε μια ενεργειακή ισορροπία, ιδανική για την πρόσδεση της, περνά από ένα σύνολο στεροδιαμορφώσεων. Υπάρχουν εκατομμύρια θερμοδυναμικά συμβατές διαμορφώσεις οι οποίες μπορούν να διαφέρουν σημαντικά.

Τα προγράμματα docking αξιολογούν και ταξινομούν τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης με την βοήθεια συναρτήσεων βαθμολόγησης (scoring functions). Στην πράξη, η προτεινόμενη από τα προγράμματα docking ιεράρχηση των λύσεων του προβλήματος δεν εγγυάται ότι η ορθή λύση θα είναι η πρώτη ή μεταξύ των πρώτων. Πρόσθετες βιοχημικές πληροφορίες πρέπει να αξιοποιηθούν προκειμένου να επιλεγεί η σωστή λύση.

Το docking συντίθεται: (1) από την αντιπροσώπευση του συστήματος, (2) από την αναζήτηση στον χώρο των διατάξεων και (3) από την ταξινόμηση των πιθανών λύσεων. Το docking προσομοιώνει ουσιαστικά την αλληλεπίδραση της πρωτεϊνικής επιφάνειας. Επομένως, η πρώτη ερώτηση είναι το πώς να καθορισθεί μια πρωτεϊνική επιφάνεια. Η επιφάνεια μπορεί να περιγραφεί από μαθηματικά μοντέλα, όπως, παραδείγματος χάριν με την βοήθεια γεωμετρικών περιγραφών (descriptors) ή με την βοήθεια πλέγματος (grid). Εναλλακτικά, μπορεί να περιλάβει την επεξεργασία (στατική ή δυναμική) του πρωτεϊνικού πλαισίου, όπως, παραδείγματος χάριν, άκαμπτο ή εύκαμπτο (rigid vs flexible docking). Όπου κατά το rigid docking η πρωτεΐνη και ο ligand είναι άκαμπτα (κλειδί-κλειδαριά), ενώ το flexible docking επιτρέπει ευλυγισία είτε της πρωτεΐνης, είτε του ligand, είτε και των δύο.

Οι δύο επόμενες συνιστώσες περιλαμβάνουν μια αποδοτική διαδικασία αναζήτησης και μια καλή συνάρτηση βαθμολόγησης. Τα δύο κρίσιμα στοιχεία σε μια διαδικασία αναζήτησης είναι η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα στην κάλυψη του σχετικού χώρου των διατάξεων. Αφ' ετέρου, η συνάρτηση βαθμολόγησης πρέπει να είναι αρκετά γρήγορη ώστε να επιτρέψει την εφαρμογή της σε έναν μεγάλο αριθμό πιθανών λύσεων και πρέπει να περιλαμβάνει και να ζυγίζει κατάλληλα όλες τις ενεργειακές συνεισφορές.

3.2 Διαδικασία του Docking

Η διαδικασία του docking απαιτεί πρώτα απ' όλα τις δομές του υποδοχέα και του προσδέτη. Συνήθως η δομή έχει προσδιορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ή λιγότερο συχνά με φασματοσκοπία NMR. Εάν η δομή του υποδοχέα δεν είναι γνωστή μπορεί να

προβλεφθεί με μοντελοποίηση, με πρότυπο την γνωστή δομή μιας ομόλογης πρωτεΐνης. Η δομή της πρωτεΐνης και του προσδέτη αποτελούν τα δεδομένα εισόδου για ένα πρόγραμμα docking. Η επιτυχία ενός τέτοιου προγράμματος εξαρτάται από δύο συστατικά: τον αλγόριθμο αναζήτησης (search algorithm) και την συνάρτηση βαθμολόγησης (scoring function).[37]

3.2.1 Αλγόριθμοι αναζήτησης (Search Algorithms)

Στην θεωρία, ο χώρος αναζήτησης αποτελείται από όλους τους δυνατούς προσανατολισμούς και τις διαμορφώσεις της πρωτεΐνης που συνδέεται με τον προσδέτη. Ωστόσο στην πράξη με τις σημερινές υπολογιστικές τεχνικές, είναι απίθανο να εξερευνήσουμε εξαντλητικά όλο τον χώρο αναζήτησης. Αυτό θα περιλάμβανε την απαρίθμηση των συνδυασμών όλων των πιθανών παραμορφώσεων του κάθε μορίου (τα μόρια είναι δυναμικά) και όλων των πιθανών περιστροφικών προσανατολισμών του προσδέτη. Τα περισσότερα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για docking βασίζονται σε έναν ευλύγιστο προσδέτη και αρκετά προσπαθούν να μοντελοποιήσουν έναν ευλύγιστο πρωτεϊνικό υποδοχέα.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εύρεση του χώρου των διαμορφώσεων (conformational space). Αυτές περιλαμβάνουν:

- **Συστηματικές Αναζητήσεις (Systematic Searches)**

Οι αλγόριθμοι συστηματικής αναζήτησης [38] χρησιμοποιούνται κανονικά για flexible-ligand docking, οι οποίοι παράγουν όλες τις πιθανές διαμορφώσεις δέσμευσης του ligand ερευνώντας όλους τους βαθμούς ελευθερίας του. Δύο από τους τύπους μεθόδων συστηματικής αναζήτησης είναι: διεξοδική αναζήτηση και τεμαχισμός.

Οι απλούστεροι συστηματικοί αλγόριθμοι είναι διεξοδικές μέθοδοι αναζήτησης, στις οποίες το flexible-ligand docking εκτελείται περιστρέφοντας συστηματικά όλους τους πιθανούς περιστρέψιμους δεσμούς του ligand σε ένα δεδομένο χώρο. Παρά την πληρότητα δειγματοληψίας του για τις διαμορφώσεις των ligand, ο αριθμός των συνδυασμών μπορεί να είναι τεράστιος με την αύξηση των περιστρέψιμων δεσμών. Επομένως, για να γίνει η διαδικασία πρόσδεσης πρακτική, εφαρμόζονται γεωμετρικοί και χημικοί περιορισμοί στην αρχική διαλογή της διαμόρφωσης του ligand, και οι φιλτραρισμένες διαμορφώσεις έπειτα υποβάλλονται σε ακριβέστερες διαδικασίες βελτιστοποίησης. Τα GLIDE και FRED είναι δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτού του τύπου ιεραρχικών δειγματοληπτικών μεθόδων.

Στις μεθόδους τεμαχισμού, ο ligand διαιρείται πρώτα σε διαφορετικά άκαμπα

μέρη/τεμάχια. Κατόπιν, η διαμόρφωση δέσμευσής του δομείται επαυξητικά με την τοποθέτηση ενός τεμαχίου τη φορά στη περιοχή δέσμευσης ή προσδένοντας όλα τα τεμάχια στην περιοχή δέσμευσης και συνδέοντας τα με ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα DOCK και FlexX, είναι παραδείγματα προγραμμάτων docking που χρησιμοποιούν την μέθοδο τεμαχισμού.

- **Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations)**

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 η μοριακή δυναμική είναι μια τεχνική προσομοίωσης που παρουσιάζει την κίνηση των ατόμων και των μορίων σε ένα φυσικό σύστημα. Σε αυτήν την προσέγγιση, η πρωτεΐνη παραμένει σταθερή και ο προσδέτης είναι ελεύθερος να εξερευνήσει την διαμόρφωσή της. Οι διατάξεις (θέσεις και προσανατολισμοί) του προσδέτη που παράγονται τοποθετούνται διαδοχικά στην πρωτεΐνη και εκτελείται μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής αποτελούμενη από ένα πρωτόκολλο προσομοιωμένης ανόπτωσης (simulated annealing). Η τεχνική της προσομοίωσης της ανόπτωσης τοποθετεί το προσομοιούμενο πρωτεϊνικό σύστημα σε υψηλή θερμοκρασία και μετά το αφήνει να ψυχθεί σταδιακά. Θερμαίνοντας την πρωτεΐνη σε υψηλή θερμοκρασία η προσομοίωση την υποβοηθά να ξεπεράσει υψηλά ενεργειακά φράγματα και έτσι να δοκιμάσει υπολογισμούς σε περισσότερες διαμορφώσεις. Όπως το σύστημα ψύχεται προς τους 0^o K, η πρωτεΐνη εγκλωβίζεται στο γενικό ενεργειακό ελάχιστο (global energy minimum). Εάν το δυναμικό πεδίο έχει αρκετή ακρίβεια τότε τη στερεοδιάταξη του γενικού ενεργειακού ελαχίστου θα πρέπει να είναι η φυσική στερεοδομή της πρωτεΐνης. Μετά από την εφαρμογή της προσομοίωσης ανόπτωσης, πραγματοποιούνται μικρά βήματα ελαχιστοποίησης ενέργειας και οι ενέργειες που καθορίζονται από τις επαναλήψεις των προσομοιώσεων χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της συνολικής απόδοσης. Παρόλο που πρόκειται για μια δαπανηρή και πολύπλοκη υπολογιστικά μέθοδο (περιλαμβάνει εκατοντάδες επαναλήψεις των προσομοιώσεων), έχει κάποια πλεονεκτήματα όπως ότι δεν απαιτούνται εξειδικευμένες συναρτήσεις ενέργειας.

Υπάρχουν διάφορα προγράμματα που εκτελούν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD) όπως το AMBER, το CHARMM, το NAMD κ.ά.

- **Γενετικοί Αλγόριθμοι (Genetic Algorithms)**

Ο γενετικός αλγόριθμος (GA) είναι προσαρμοστική ευρετική (δεν εγγυάται την άριστη λύση) τεχνική αναζήτησης που βασίζεται στις εξελικτικές ιδέες της φυσικής επιλογής και της γενετικής. Η βασική έννοια του GA έχει ως σκοπό να προσομοιώσει τις διαδικασίες που είναι απαραίτητες σε ένα φυσικό σύστημα για την εξέλιξη, και ακολουθεί τις αρχές που καθορίστηκαν

αρχικά από τον Δαρβίνο. Σε έναν γενετικό αλγόριθμο, υπάρχει ένας πληθυσμός λύσεων που υποβάλλονται σε μετασχηματισμούς μεταλλάξεων και διασταυρώσεων. Οι προκύπτουσες νέες λύσεις υποβάλλονται σε επιλογή, με βάση το μεταξύ τους ταίριασμα. Ο αλγόριθμος διατηρεί μια εκλεκτική πίεση προς μια βέλτιστη λύση, με τυχαία ανταλλαγή πληροφοριών που επιτρέπει την εξερεύνηση του χώρου αναζήτησης. Μια σειρά προγραμμάτων εφαρμόζει τον GA για το docking, συμπεριλαμβανομένων των GOLD, AutoDock, και DARWIN.

Οι γενετικοί αλγόριθμοι είναι αρκετά επιτυχείς στη διαλογή για πολύ μεγάλο χώρο διαμορφώσεων, αλλά αρκετά προγράμματα docking εκτελούν δοκιμές για άκαμπτη πρωτεΐνη, επιτρέποντας ευλυγισία μόνο στον προσδέτη ώστε να προσαρμόζεται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης.

Ένα μειονέκτημά τους είναι ότι απαιτούν πολλές επαναλήψεις προκειμένου να εξαχθούν αξιόπιστες λύσεις. Έτσι ο χρόνος που απαιτείται για να τρέξει ένας γενετικός αλγόριθμος ώστε να προβλέψει μια κατάλληλη διαμόρφωση μπορεί να είναι σχετικά μεγάλος, και έτσι αυτές οι μέθοδοι μπορεί να μην είναι τόσο αποτελεσματικές σε σύγκριση με άλλες. Ωστόσο, πρόσφατες βελτιώσεις στην χρήση της εκτίμησης ενεργειών με βάση πλέγματα (grid), που περιορίζουν την εξερεύνηση των μεταβολών των διαμορφώσεων μόνο σε ενεργειακά τοπικές περιοχές ενδιαφέροντος, έχουν ενισχύσει σημαντικά την απόδοση των γενετικών αλγορίθμων.

- **Μέθοδοι Monte Carlo**

Η μέθοδος Monte Carlo ήταν που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της πρώτης προσομοίωσης ενός μοριακού συστήματος με τη βοήθεια υπολογιστή. Ο όρος Monte Carlo συνήθως είναι πολύ γενικός και πολλοί αλγόριθμοι χαρακτηρίζονται έτσι όποτε περιέχουν μια στοχαστική διαδικασία ή ένα είδος τυχαίας διαλογής. Η ανάγκη εντοπισμού του γενικού ενεργειακού ελαχίστου οδήγησε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου για την τυχαία διερεύνηση του στερεοδιατακτικού χώρου που συνδέεται με το μοριακό σύστημα τροποποιώντας τυχαία την στερεοδιάταξή του. Στο μοριακό docking ο όρος Monte Carlo συνήθως σημαίνει δειγματοληψία σημαντικότητας γνωστή ως μέθοδος Metropolis. Η μέθοδος Metropolis παράγει τυχαίες κινήσεις στο σύστημα. Η ενέργεια κάθε τυχαίας στερεοδιάταξης συγκρίνεται με την προηγούμενη. Εάν είναι χαμηλότερη τότε αυτή είναι η νέα στερεοδιάταξη. Εάν είναι υψηλότερη τότε τυχαία επιλέγεται μία άλλη. Αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός διαμορφώσεων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το τυχαίο που εισάγει μπορεί να υπερβεί πολλά ενεργειακά φράγματα. Οι μέθοδοι Monte Carlo συνήθως συγκλίνουν αργότερα από τις μεθόδους μοριακής δυναμικής και διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στο docking.[33,39,40]

- **Μέθοδοι Συμπληρωματικότητας Σημείου (Point Complementary Methods)**

Σε αυτές τις μεθόδους η πρόσδεση των ligands στην περιοχή δέσμευσης ενός υποδοχέα συχνά διενεργείται χρησιμοποιώντας σημεία συμπληρωματικότητας μεταξύ πρωτεΐνης και ligand. Τα μόρια αυτά μοντελοποιούνται συνήθως με έναν απλοποιητικό τρόπο, π.χ. χρησιμοποιώντας σφαίρες ή κύβους σαν άτομα. Έπειτα, η αναπαράσταση του ligand περιστρέφεται και μετακινείται για να εξασφαλίσει τον μέγιστο αριθμό ταιριασμάτων μεταξύ προσδετών και πρωτεϊνών. Επιπρόσθετοι περιορισμοί μπορεί να είναι παρόντες, όπως για παράδειγμα μια απαίτηση για τις κάθετες επιφάνειες που αλληλεπιδρούν να είναι περίπου σε αντίθετες κατευθύνσεις.

- **Μέθοδοι Γεωμετρίας Απόστασης (Distance Geometry Methods)**

Αυτή η μέθοδος αναζήτησης χρησιμοποιεί τις πληροφορίες που μπορούν να εκφραστούν μέσω των ενδό- και διαμοριακών αποστάσεων. Αυτές οι αποστάσεις μπορούν να συνδυασθούν και επιτρέπουν τον υπολογισμό δομών ή διαμορφώσεων. Το ενεργό κέντρο αντιπροσωπεύεται ως σύνολο σφαιρών και οι διαμορφώσεις των ligand παράγονται μέσα σε αυτήν την περιοχή χρησιμοποιώντας τη γεωμετρία απόστασης. Οι προκύπτουσες δομές καταχωρούνται και έπειτα βαθμολογούνται με συναρτήσεις βαθμολόγησης. Οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν γρήγορη διαλογή του χώρου των διαμορφώσεων αν και δεν καταλήγουν πάντα σε αξιόπιστα αποτελέσματα.

- **Αναζητήσεις Tabu (Tabu Searches)**

Η αναζήτηση tabu (TS) [33,39] είναι μια επαναληπτική διαδικασία που σχεδιάστηκε για τη λύση στα προβλήματα βελτιστοποίησης. Αυτή η διαδικασία μπορεί να οριστεί ως μια “μετά-ευρετική” μεθοδολογία που μπορεί να κινηθεί από μια λύση προς μία άλλη. Για τους αλγορίθμους μοριακού docking ο χώρος αναζήτησης αναφέρεται σε όλες τις πιθανές διαμορφώσεις μεταξύ δύο μορίων. Σε μια TS παράγονται τυχαία νέες διαμορφώσεις από μια αρχική διαμόρφωση. Στη συνέχεια αξιολογείται η κάθε αλλαγή σύμφωνα με την τιμή μιας επιλεγμένης συνάρτησης και καθορίζεται ποιες αλλαγές είναι tabu, δηλαδή έχουν απορριφθεί νωρίτερα. Αν η καλύτερη τροποποίηση έχει μικρότερη τιμή από οποιαδήποτε άλλη που έχει γίνει δεκτή, τότε γίνεται και αυτή δεκτή. Οι TS κάνουν χρήση μίας δομής μνήμης (tabu list) που αποφεύγει τις ήδη εξεταζόμενες λύσεις και προωθεί την αναζήτηση των νέων λύσεων.

3.2.2 Συναρτήσεις Βαθμολόγησης (Scoring Functions)

Η συνάρτηση βαθμολόγησης [33,38-41] αποτελεί καίριο κομμάτι του συνολικού αλγορίθμου docking. Κατ' αρχάς, λειτουργεί σαν μια συνάρτηση για την διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών διατάξεων ενός συγκεκριμένου ligand στη περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα. Δεύτερον, μετά από το docking πρέπει να εκτιμηθούν οι συγγένειες δέσμευσης (binding affinities) των διαφορετικών συμπλόκων υποδοχέα-ligand και να ταξινομηθούν σε σειρά οι υποψήφιες λύσεις. Οι αλληλεπιδράσεις υδροφοβικότητας, van der Waal's, οι στερικές και οι ηλεκτροστατικές, οι δεσμοί υδρογόνου, καθώς και οι ενέργειες διαλυτοποίησης είναι μεταξύ των παραγόντων που συμβάλλουν στη δέσμευση του ligand, και οι οποίοι με τη σειρά τους περιγράφονται από κινητικές και θερμοδυναμικές αρχές. Η συγγένεια δέσμευσης εκφράζεται συνήθως σε μονάδες ελεύθερης ενέργειας.

Οι διαθέσιμες συναρτήσεις βαθμολόγησης μπορούν να ταξινομηθούν ως: α) μοντέλα δυναμικών πεδίων, β) εμπειρικές, γ) βασιζόμενες στη γνώση και δ) συναινετικής βαθμολόγησης.

● Μοντέλα Δυναμικών Πεδίων (Force-Field Models)

Οι βασισμένες σε δυναμικά πεδία συναρτήσεις βαθμολόγησης συνοψίζουν τις συνεισφορές από διαφορετικές κατηγορίες ενεργειακής αλληλεπίδρασης μεταξύ του ligand και των πρωτεϊνικών ατόμων, όπως είναι: α) οι δεσμοί υδρογόνου, β) η ηλεκτροστατική ενέργεια (όπως περιγράφεται από μια διατύπωση του νόμου του Coulomb) και γ) η ενέργεια van der Waals (άθροισμα δυνάμεων μεταξύ μορίων). Μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις στις συναρτήσεις βαθμολόγησης δυναμικών πεδίων είναι πώς να υπολογίσει την επίδραση του διαλύτη. Η απλούστερη μέθοδος είναι να χρησιμοποιηθεί μια εξαρτώμενη από την απόσταση διηλεκτρική σταθερά ($\epsilon(r_{ij})$) όπως για παράδειγμα η συνάρτηση βαθμολόγησης δυναμικών πεδίων του DOCK:

$$E = \sum_i \sum_j \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right) \quad (5)$$

όπου r_{ij} αντιπροσωπεύει την απόσταση μεταξύ του πρωτεϊνικού ατόμου i και του ατόμου j του ligand, A_{ij} και B_{ij} είναι οι παράμετροι VDW, και q_i και q_j είναι τα ατομικά φορτία. Ο $\epsilon(r_{ij})$ συνήθως ορίζεται ως $4r_{ij}$, απεικονίζοντας την προάσπιση του νερού στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

- **Εμπειρικές Συναρτήσεις (Empirical Functions)**

Ο σχεδιασμός των εμπειρικών συναρτήσεων βαθμολόγησης είναι βασισμένος στην ιδέα ότι οι ενέργειες δέσμευσης μπορούν να προσεγγιστούν από ένα άθροισμα μεμονωμένων ασύνδετων όρων (ενέργεια VDW, ηλεκτροστατική ενέργεια, δεσμοί υδρογόνου, εντροπία, υδροφοβικότητα).

$$\Delta G = \sum_i W_i \cdot \Delta G_i \quad (6)$$

όπου ΔG_i αντιπροσωπεύει μεμονωμένους εμπειρικούς ενεργειακούς όρους, και οι αντίστοιχοι συντελεστές W_i καθορίζονται με αναπαραγωγή των δεδομένων συγγενειών δέσμευσης ενός πειραματικού συνόλου συμπλόκων πρωτεΐνης-ligand με γνωστές τριδιάστατες δομές. Το παράδοξο των εμπειρικών συναρτήσεων είναι ότι οι όροι τους είναι συχνά εύκολοι στην εκτίμηση τους, αλλά βασίζονται σε προσεγγίσεις παρόμοιες με τις συναρτήσεις δυναμικών πεδίων. Οι συντελεστές των διαφόρων όρων λαμβάνονται από ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας πειραματικά προσδιορισμένες ενέργειες δέσμευσης και, ενδεχομένως από πληροφορίες δομής από ακτίνες X. Ένα μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η εξάρτηση τους από τα σύνολα μοριακών δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση της παλινδρόμησης. Αυτό συνήθως αποδίδει διαφορετικούς συντελεστές στάθμισης για τους διάφορους όρους. Σαν αποτέλεσμα αυτού, όροι από διαφορετικές συναρτήσεις βαθμολόγησης δεν μπορούν εύκολα να ανασυνδυαστούν σε μια νέα συνάρτηση βαθμολόγησης. Τα GlideScore, X-Score, ChemScore είναι μερικά παραδείγματα εμπειρικών συναρτήσεων βαθμολόγησης.

- **Συναρτήσεις βασισμένες στη γνώση (Knowledge-based Functions)**

Οι συναρτήσεις αυτές πιο πολύ έχουν ως σκοπό να αναπαραγάγουν τις πειραματικές δομές παρά τις ενέργειες δέσμευσης. Σε αυτές τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-ligand μοντελοποιούνται χρησιμοποιώντας σχετικά απλές ατομικές δυνατότητες αλληλεπίδρασης ενός ζεύγους ατόμων. Διάφορες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε άτομα ανάλογα με τον τύπο τους, προσδιορίζονται ανάλογα με το μοριακό τους περιβάλλον. Έτσι, από κοινού με τις εμπειρικές, οι συναρτήσεις αυτές προσπαθούν να κατανοήσουν τις αλληλεπιδράσεις δέσμευσης που είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν με ακρίβεια. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι η υπολογιστική τους απλότητα, η οποία επιτρέπει αποτελεσματική διαλογή μεγάλων βάσεων δεδομένων από χημικές ενώσεις. Ένα μειονέκτημα είναι ότι η παραγωγή τους βασίζεται κυρίως σε πληροφορίες που

κωδικοποιούνται σε περιορισμένα σύνολα από σύμπλοκα πρωτεΐνης-ligand.

Η αρχή πίσω από τις βασισμένες στη γνώση συναρτήσεις βαθμολόγησης είναι το δυναμικό μέσης δύναμης, το οποίο καθορίζεται από την αντίστροφη σχέση του Boltzmann [38]

$$w(r) = -k_B T \ln[\rho(r)/\rho^*(r)] \quad (7)$$

όπου k_B είναι η σταθερά Boltzmann, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία του συστήματος, $\rho(r)$ είναι η αριθμητική πυκνότητα του ζεύγους ατόμων πρωτεΐνης-ligand σε απόσταση r στο σύνολο εκπαίδευσης (training set), και $\rho^*(r)$ είναι η πυκνότητα των ζευγών σε μια κατάσταση αναφοράς όπου οι διατομικές αλληλεπιδράσεις είναι μηδενικές. Μερικά παραδείγματα για τις συναρτήσεις βασισμένες στη γνώση είναι τα DrugScore, MScore, KScore.

● Συναρτήσεις Συναινετικής Βαθμολόγησης (Consensus Scoring Functions)

Η συναινετική βαθμολόγηση ουσιαστικά δεν αποτελεί έναν τύπο συνάρτησης βαθμολόγησης αλλά μια τεχνική για docking. Λαμβάνοντας υπόψη τις ατέλειες των τρεχουσών συναρτήσεων βαθμολόγησης, μια πρόσφατη τάση σε αυτόν τον τομέα είναι η εισαγωγή των μεθόδων συναινετικής βαθμολόγησης και περιλαμβάνει ιδιαίτερα ανόμοιες ιδιότητες προκειμένου να βελτιωθεί η απόδοση στην εικονική διαλογή. Η συναινετική βαθμολόγηση συνδυάζει πληροφορίες από διαφορετικά αποτελέσματα για να ισορροπήσει τα λάθη σε μια ενιαία βαθμολόγηση και να βελτιώσει την πιθανότητα του προσδιορισμού των «αληθινών» ligands. Επομένως, το πρωτεύον σε μια βαθμολόγησης συναίνεσης είναι το πως θα συνδιάσει αυτά τα αποτελέσματα ώστε οι σωστά δεσμευμένοι ligands να μπορούν να διακριθούν από άλλους σύμφωνα με τον κανόνα συναίνεσης. Τα MultiScore και X-Cscore είναι δύο παραδείγματα μεθόδων συναίνεσης.

3.3 Σύνοψη και συμπεράσματα

Μετά την εκτεταμένη χρήση των τελευταίων ετών και τα πειραματικά δεδομένα που έχει παρουσιάσει η χρήση διαφόρων προγραμμάτων docking, μια σύγκριση μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούν μπορεί να οδηγήσει σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα.

Για τον αλγόριθμο αναζήτησης η σύγκριση προτείνει ότι ο καλύτερος είναι πιθανώς ένας υβριδικός που θα καλύπτει νέες αναζητήσεις και στρατηγικές βαθμολόγησης. Η πιο χρήσιμη μέθοδος docking όχι μόνο θα πρέπει να αποδίδει πολύ καλά, αλλά και να είναι εύκολη στη

χρήση και στη παραμετροποίηση, και επαρκώς προσαρμόσιμη έτσι ώστε να μπορεί να επιλεγεί διαφορετική λειτουργικότητα που θα βασίζεται στον αριθμό των δομών που θα υποστούν docking, τους διαθέσιμους υπολογιστικούς πόρους και την πολυπλοκότητα του προβλήματος. Αν οι παράμετροι δεν μπορούν να παραχθούν γρήγορα τότε παρόλο που ο αλγόριθμος μπορεί να είναι υπολογιστικά αποτελεσματικός, πρακτικά θα είναι περιορισμένος.

Για την συνάρτηση βαθμολόγησης, ανάλογα θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι συνδυασμός μεταξύ διαφορετικών τύπων θα μπορούσε να παράγει αρκετά αξιόπιστα αποτελέσματα. Ιδανικά μια γρήγορη και εμπειρική συνάρτηση για την αρχική διαλογή των στόχων, θα μπορούσε να ακολουθείται από ένα μοντέλο δυναμικών πεδίων που θα περιγράφει με μεγαλύτερη λεπτομέρεια και ακρίβεια τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια.

Αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν την προσέγγιση σταθερός υποδοχέας/ευλύγιστος ligand είναι αρκετά διαδεδομένοι και τα πιο επιτυχή προγράμματα έχουν φτάσει σε επίπεδο επιτυχίας 70-80%. Ωστόσο, στα λίγα παραδείγματα όπου η ευλυγισία της πρωτεΐνης περιλαμβάνεται μέσα στον αλγόριθμο docking, δεν είναι σαφές αν οι καταστάσεις διαμόρφωσης της πρωτεΐνης επιλέγονται εκτενώς. Επιπλέον, η παρουσία μορίων του διαλύτη σε μια μέθοδο docking είναι ένα πρόβλημα που μόνο πρόσφατα έχει εξεταστεί με ποικιλία βαθμών στην επιτυχία.

Επιπλέον, παρόλο που οι τωρινές μέθοδοι docking που βασίζονται στην συγγένεια δέσμευσης υπόσχονται πολλά, η γρήγορη και ακριβής διάκριση μεταξύ των διάφορων ligands, συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.

3.4 Διάφορα προγράμματα Docking

Το λογισμικό UCSF **DOCK** ήταν το πρώτο που αναπτύχθηκε για εκτέλεση docking. Το DOCK περιγράφει συστηματικά τη γεωμετρία των ligands και των περιοχών δέσμευσης με σύνολα σφαιρών και χρησιμοποιεί γεωμετρικούς αλγόριθμους για να προβλέψει τους τρόπους δέσμευσης μικρών μορίων. Οι δειγματοληπτικές μέθοδοι που χρησιμοποιεί επιτρέπουν και για άκαμπτο docking αλλά και με ευελιξία για τον ligand. Η πρόσφατη έκδοση του DOCK, εφαρμόζει μια μηχανή μοριακής δυναμικής για να εξετάσει τις ηλεκτροστατικές ενέργειες αλληλεπίδρασης για το σύμπλοκο ligand-υποδοχέα.

Το **GOLD** χρησιμοποιεί έναν τρόπο εύκαμπτου docking μικρών μορίων στην πρωτεϊνική περιοχή δέσμευσης κάνοντας χρήση γενετικού αλγορίθμου για τη αναζήτηση διαμορφώσεων αποτελώντας ένα ισχυρό εργαλείο για τη διαλογή και τον προσδιορισμό των νέων οδηγιών ενώσεων. Το GOLD θεωρείται πολύ ιδιαίτερο εντός της κοινότητας μοριακής μοντελοποίησης

για την ακρίβεια και την αξιοπιστία του και οι παράμετροι γενετικού αλγορίθμου της εφαρμόζονται για ευρύ φάσμα εφαρμογών εικονικής διαλογής.

Το **Darwin**, είναι ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιεί τον γενετικό αλγόριθμο για να βελτιστοποιήσει τη διαμόρφωση και τον προσανατολισμό του μορίου, υπό την εκλεκτική πίεση της ελαχιστοποίησης της πιθανής ενέργειας του συμπλόκου. Επικοινωνεί με το πρόγραμμα μοριακής μηχανικής CHARMM για να κάνει τους ενεργειακούς υπολογισμούς, επιτρέποντας ταχύτατη αξιολόγηση μεγάλου αριθμού πιθανών λύσεων.

Το **FlexX** πριν από το docking, κόβει σε κομμάτια τον ligand στους περιστρέψιμους δεσμούς, τοποθετεί αρχικά ως βάση ένα τεμάχιο (fragment) στο ενεργό κέντρο, και δομεί πάλι τον ligand επαυξητικά, χρησιμοποιώντας τα άλλα κομμάτια. Για μια πρωτεΐνη με γνωστή την τριδιάστατη δομή και ένα μικρό μόριο ligand, το FlexX προβλέπει τη γεωμετρία του συμπλόκου πρωτεΐνης-ligand και υπολογίζει τη συγγένεια δέσμευσης με χρήση αλγορίθμου ομαδοποίησης (clustering).

Το **GLIDE** (Grid Based Ligand Docking with Energetics), προσεγγίζει μια συστηματική αναζήτηση του χώρου των διαμορφώσεων, του προσανατολισμού και της θέσης του προσδεμένου ligand. Σε αυτήν την αναζήτηση, μια αρχική φάση προσδιορισμού θέσης και βαθμολόγησης που στενεύει εντυπωσιακά τον χώρο αναζήτησης, ακολουθείται από μια ενεργειακή βελτιστοποίηση για μερικές εκατοντάδες υποψηφίων δομών πρόσδεσης. Μια Monte Carlo δειγματοληψία για διαμόρφωση δομής καθορίζει τις υποψήφιες δομές. Η καλύτερη δομή πρόσδεσης καθορίζεται από μία ενεργειακή συνάρτηση που συνδυάζει όρους εμπειρικούς και δυναμικών πεδίων.

Το **SLIDE** (Screening for Ligands by Induced-fit Docking), αντιπροσωπεύει μια γενική προσέγγιση στην διαλογή οργανικών βάσεων δεδομένων. Μπορεί να χειριστεί μεγάλα μοντέλα περιοχών δέσμευσης και χρησιμοποιεί μια αναζήτηση σε πολλά στάδια για να προσδιορίσει τα σημεία στον υποδοχέα για το docking των ligand. Μια προσέγγιση βελτιστοποίησης εφαρμόζεται για να διαμορφώσει τις επαγόμενες συμπληρωματικότητες, ισορροπώντας την ευελιξία μεταξύ του ligand και των πρωτεϊνικών πλευρικών αλυσίδων. Το SLIDE μπορεί να καλύψει 100.000 ενώσεις μέσα σε μερικές ημέρες και επιστρέφει έναν ταξινομημένο κατάλογο στερικά εφικτών υποψηφίων ligand, που ταξινομούνται με βάση τις συμπληρωματικότητες στην περιοχή δέσμευσης της πρωτεΐνης.

Το **FRED** παίρνει μια βάση δεδομένων ενός ή περισσοτέρων ligands, μια πρωτεϊνική δομή στόχο, ένα πλέγμα που καθορίζει το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και διάφορες προαιρετικές παραμέτρους. Ποικίλες επιλογές είναι διαθέσιμες για τη βελτιστοποίηση όσον αφορά τις ενσωματωμένες συναρτήσεις επιτυχίας: η βελτιστοποίηση των περιστρεφόμενων

υδροξυλικών ομάδων, του άκαμπτου σώματος, η περιστροφή, και η μείωση του αριθμού των διαμορφώσεων που περνούν στην επόμενη συνάρτηση βαθμολόγησης. Οι διαμορφώσεις των ligand και η πρωτεϊνική δομή αντιμετωπίζονται σαν άκαμπτες στο μεγαλύτερο μέρος της διαδικασίας docking. Η στρατηγική του Fred είναι να βαθμολογεί εξαντλητικά όλες τις πιθανές θέσεις του κάθε ligand στο ενεργό κέντρο. Αυτή η νέα στρατηγική αποφεύγει εντελώς τα ζητήματα δειγματοληψίας που συνδέονται με τις πιθανολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται από τα περισσότερα άλλα προγράμματα (όπως τα Gold, FlexX, Dock and Glide).

Το **Hammerhead** είναι κατάλληλο για τη διαλογή μεγάλων βάσεων δεδομένων από ευέλικτα μόρια για τη δέσμευση σε μια πρωτεΐνη γνωστής δομής. Προσδένει με ακρίβεια ποικίλα γνωστά ευέλικτα ligands, και χρειάζεται κατά μέσο όρο μόνο μερικά δευτερόλεπτα για κάθε ένωση κατά τη διάρκεια μιας διαλογής. Η προσέγγιση είναι εντελώς αυτοματοποιημένη, περνώντας από τη διευκρίνιση των πρωτεϊνικών περιοχών δέσμευσης, μέσω του docking των μορίων, στην τελική επιλογή των ενώσεων για δοκιμή.

Το **AutoDock** [42] είναι το πιο διαδεδομένο μεταξύ των προγραμμάτων για docking και έχει εφαρμογές: στη κρυσταλλογραφία ακτίνων X, στον σχεδιασμό φαρμάκων που βασίζεται στη δομή, lead optimization, στην εικονική διαλογή (virtual screening), στο docking πρωτεΐνης με πρωτεΐνη, στις μελέτες χημικών μηχανισμών.

Οι αλγόριθμοι αναζήτησης τους οποίους χρησιμοποιεί η παρούσα έκδοση του AutoDock είναι οι :

- SA (Simulated Annealing), ο αυθεντικός αλγόριθμος Monte Carlo με προσομοιωμένη απόπτωση
- LS (Local Search), ένας αλγόριθμος τοπικής αναζήτησης
- GA (Genetic Algorithm) ένας γενετικός αλγόριθμος του Δαρβίνου
- GALS (Genetic Algorithm Local Search), ένας υβριδικός γενετικός αλγόριθμος με τοπική αναζήτηση. Αλλιώς ονομάζεται γενετικός αλγόριθμος του Λαμάρκ.

Και οι τέσσερις αλγόριθμοι περιλαμβάνουν στοχαστικές διαδικασίες, βασίζονται δηλαδή σε τυχαίες κινήσεις που γίνονται από μια τωρινή κατάσταση σε μια επόμενη, σύμφωνα με τις συναρτήσεις και τις παραμέτρους για τον καθένα. Στόχος είναι να βρεθεί η κατάσταση με την ελάχιστη ενέργεια συστήματος.

Όσον αφορά στην συνάρτηση βαθμολόγησης, η πρόσφατη έκδοση του AutoDock χρησιμοποιεί ένα ημιεμπειρικό μοντέλο δυναμικού πεδίου το οποίο παραμετροποιήθηκε με τη χρήση μεγάλου αριθμού πειραματικά γνωστών συμπλόκων πρωτεΐνης-προσδέτη, για τα οποία είναι γνωστά τόσο η δομή όσο και η σταθερά K_d που μετράει την ισχύ της δέσμευσης μεταξύ τους (συνδυάζει και τις τρεις κατηγορίες συναρτήσεων βαθμολόγησης που περιγράφηκαν).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟ- ΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Το κύριο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των δοκιμών docking της λουπεόλης (ligand), στην GSK3β (υποδοχέας), ήταν το AutoDock Vina. Το πρόγραμμα αυτό έχει να επιδείξει αρκετά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής και αυτό οφείλεται στην ευκολία χρήσης και τις δυνατότητες που προσφέρει στον χρήστη παράλληλα με την ταχύτητα και την ακρίβεια με την οποία προβλέπει τις διαμορφώσεις δέσμησης. Επίσης μπορεί να προβλέψει τη θέση δέσμησης του ligand ακόμα και όταν δεν είναι γνωστό το ενεργό κέντρο παρά μόνο οι δομές των μορίων.

Ακόμα έγινε χρήση των προγραμμάτων UCSF Chimera, VMD (Visual Molecular Dynamics), namd και Swiss-PdbViewer με σκοπό την προετοιμασία των αρχείων που απαιτεί το Vina αρχικά και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του docking μετέπειτα.

4.1 AutoDock Vina

Το AutoDock είναι μια ακολουθία αυτοματοποιημένων εργαλείων για την εκτέλεση του docking. Έχει ως σκοπό να προβλέψει πώς τα μικρά μόρια, όπως προσδότες ή οι υποψήφια φάρμακα, δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα γνωστής τριδιάστατης δομής. Οι τρέχουσες διανομές του AutoDock αποτελούνται από δύο γενεές του λογισμικού: Το AutoDock 4.2 και το AutoDock Vina.

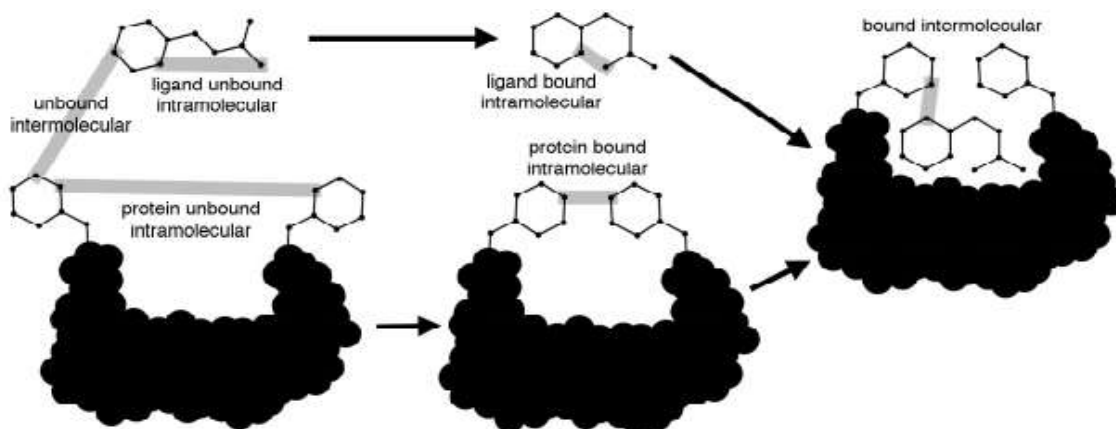
Το AutoDock 4.2 ουσιαστικά αποτελείται από δύο κύρια προγράμματα: το AutoDock εκτελεί το docking του ligand σε ένα σύνολο πλεγμάτων που περιγράφουν την πρωτεΐνη στόχο και το AutoGrid προϋπολογίζει αυτά τα πλέγματα. Εκτός από τη χρησιμοποίησή τους για το docking, μπορούν να απεικονιστούν τα ατομικά ενεργειακά πλέγματα. Αυτό μπορεί να βοηθήσει, παραδείγματος χάριν, για να καθοδηγήσει αυτούς που ασχολούνται με την συνθετική οργανική χημεία, να σχεδιάσουν καλύτερους προσδότες.

Το AutoDock Vina [43] δεν απαιτεί επιλογή των τύπων ατόμων και προ-υπολογισμό των χαρτών πλέγματος για αυτά. Αντ' αυτού, υπολογίζει τα πλέγματα εσωτερικά, για τους τύπους ατόμων που απαιτούνται, και ουσιαστικά το κάνει αυτό άμεσα. Έχει αναπτυχθεί επίσης μια γραφική διεπαφή για τον χρήστη που αποκαλείται AutoDockTools, ή ADT για συντομία, το οποίο βοηθά μεταξύ άλλων στην επιλογή των δεσμών του ligand που θα αντιμετωπισθούν ως περιστρέψιμοι και την ανάλυση των διατάξεων πρόσδεσης. Αυτό συμβάλει σε μια ικανοποιητική αξιοπιστία της διαδικασίας σε σχέση με τις με τις υπολογιστικές δαπάνες που αυτή απαιτεί.

Το AutoDock Vina είναι μια νέα γενιά λογισμικού για docking που αναπτύχθηκε από το Molecular Graphics Lab. Επιτυγχάνει σημαντικές βελτιώσεις στη μέση ακρίβεια της πρόβλεψης του τρόπου δέσμευσης, ενώ είναι πάνω από δύο φορές γρηγορότερο από AutoDock 4.2.

- **Αλγόριθμοι Αναζήτησης και Συνάρτηση Βαθμολόγησης του AutoDock Vina**

Η συνάρτηση που χρησιμοποιούν τα AutoDock και AutoDock Vina εκτιμά την πρόσδεση σε δύο βήματα. Ο ligand και η πρωτεΐνη αρχικά βρίσκονται σε μια αδέσμευτη διαμόρφωση. Στο πρώτο βήμα, εκτιμούνται οι ενδομοριακές ενέργειες για τη μετάβαση από αυτή την διαμόρφωση στη διαμόρφωση όπου τα μόρια προσδέονται. Στο δεύτερο βήμα εκτιμούνται οι διαμοριακές ενέργειες μεταξύ ligand και πρωτεΐνης στην διαμόρφωση πρόσδεσης και σε κατάσταση συμπλόκου. (εικόνα 4.1)



Εικόνα 4.1: Βήματα υπολογισμού ενέργειας από τη συνάρτηση βαθμολόγησης

Η γενική μορφή της συνάρτησης βαθμολόγησης που χρησιμοποιεί το AutoDock Vina για τη λειτουργία του είναι

$$c = \sum_{i < j} f_{i,t_j}(r_{ij}), \quad (8)$$

όπου το άθροισμα είναι για όλα τα ζεύγη των ατόμων που μπορούν να κινηθούν το ένα σε σχέση με το άλλο, κανονικά αποκλείοντας 1-4 αλληλεπιδράσεις, π.χ άτομα που διαχωρίζονται από 3 διαδοχικούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Εδώ, σε κάθε άτομο i ορίζεται ένας τύπος t_j . Πρέπει επίσης να καθοριστεί ένα συμμετρικό σύνολο συναρτήσεων αλληλεπίδρασης f_{iij} για την διατομική απόσταση r_{ij} που μπορεί να εκφραστεί σαν το σύνολο των διαμοριακών και ενδομοριακών

συνεισφορών:

$$c = c_{\text{inter}} + c_{\text{intra}} \quad (9)$$

Ο αλγόριθμος βελτιστοποίησης, όπως περιγράφεται, προσπαθεί να βρει το γενικό ελάχιστο του c και άλλων διαμορφώσεων με χαμηλή βαθμολόγηση, τις οποίες έπειτα ταξινομεί. Η ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης υπολογίζεται από το διαμοριακό μέρος της διάταξης πρόσδεσης, με τη χαμηλότερη τιμή να παίρνει την πρώτη θέση στο εξαγόμενο (output).

$$s_1 = g(c_1 - c_{\text{intra}1}) = g(c_{\text{inter}1}) \quad (10)$$

Όπου η συνάρτηση g μπορεί να είναι μια αυθαίρετη, ομαλή, μονότονα αύξουσα, ενδεχομένως μη γραμμική συνάρτηση.

Στο output, τυπικά δίνονται επίσης οι τιμές του s για άλλες διατάξεις χαμηλής βαθμολόγησης, αλλά χρησιμοποιείται η c_{intra} της καλύτερης δομής δέσμευσης:

$$s_i = g(c_i - c_{\text{intra}}) \quad (11)$$

Η συνάρτηση βαθμολόγησης του Vina συνδυάζει ορισμένα πλεονεκτήματα των βασισμένων στη γνώση δυναμικών και των εμπειρικών συναρτήσεων βαθμολόγησης: εξάγει τις εμπειρικές πληροφορίες τόσο από τις διαμορφωτικές προτιμήσεις των συμπλόκων υποδοχέα-ligand όσο και από τις πειραματικές μετρήσεις συγγένειας.

Οι συναρτήσεις αλληλεπίδρασης f_{ij} καθορίζονται ως προς την απόσταση των ατομικών επιφανειών $d_{ij} = r_{ij} - R_{i_t} - R_{j_t}$ στην συνάρτηση:

$$f_{i_t j_t}(r_{ij}) \equiv h_{i_t j_t}(d_{ij}), \quad (12)$$

όπου R_t είναι η ακτίνα van der Waals του ατόμου τύπου t .

Στη συνάρτηση βαθμολόγησης του Vina, το h_{ij} είναι ένα σταθμισμένο άθροισμα των στερικών αλληλεπιδράσεων (οι πρώτοι τρεις όροι), όμοιων για όλα τα ζεύγη ατόμων, της υδροφοβικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υδροφοβικών ατόμων, και, ανάλογα με την περίπτωση, των δεσμών υδρογόνου.

Οι στερικοί όροι είναι:

$$\text{gauss}_1(d) = e^{-(d/0.5\text{\AA})^2} \quad (13)$$

$$\text{gauss}_2(d) = e^{-((d-3\text{\AA})/2\text{\AA})^2} \quad (14)$$

$$\text{repulsion}(d) = \begin{cases} d^2, & \text{if } d < 0 \\ 0, & \text{if } d \geq 0 \end{cases}$$

Ο όρος υδροφοβικότητας είναι ίσος με 1 όταν $d < 0.5\text{\AA}$, 0 όταν $d > 1.5\text{\AA}$ και υπολογίζεται με γραμμική παρεμβολή για d μεταξύ αυτών των τιμών. Ο όρος για δεσμό υδρογόνου είναι ίσος με 1 όταν $d < -0.7\text{\AA}$, 0 όταν $d > 0\text{\AA}$, και ομοίως υπολογίζεται με γραμμική παρεμβολή στο ενδιάμεσο. Σε αυτήν την εφαρμογή, όλες οι συναρτήσεις αλληλεπίδρασης f_{ij} αποκόπτονται στο $r_{ij} = 8\text{\AA}$.

Η ανεξάρτητη της διαμόρφωσης συνάρτηση g επελέγη να έχει την μορφή:

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}}, \quad (15)$$

Όπου N_{rot} είναι ο αριθμός των περιστρέψιμων δεσμών μεταξύ βαρέων ατόμων του προσδέτη και w είναι ο αντίστοιχος συντελεστής βαρύτητας.

Στην ανάπτυξη του Vina, εξερευνήθηκαν ποικίλες στοχαστικές γενικές προσεγγίσεις βελτιστοποίησης, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών αλγορίθμων, της προσομοιωμένης απόπτωσης και άλλων, που συνδυάστηκαν με διάφορες διαδικασίες τοπικής βελτιστοποίησης και ειδικά «τεχνάσματα» για να επιταχυνθεί η βελτιστοποίηση. Τελικά, εγκαταστάθηκε ο αλγόριθμος Iterated Local Search global optimizer, παρόμοιος με εκείνον που χρησιμοποίησαν οι Abagyan et al. [44]

Σε αυτόν τον αλγόριθμο, λαμβάνεται μια διαδοχή βημάτων που αποτελούνται από μια μετάλλαξη και μια τοπική βελτιστοποίηση, με κάθε βήμα να γίνεται αποδεκτό σύμφωνα με το κριτήριο Metropolis. Εφαρμογή προσομοιωμένης απόπτωσης διασφαλίζει σημαντική αξιοπιστία στα αποτελέσματα. Η τοπική αναζήτηση είναι τύπου tabu, και είναι κατάλληλη για μεγάλους χώρους αναζήτησης. Όσον αφορά στους γενετικούς αλγορίθμους η διαφοροποίηση τους προέρχεται από τις διαφορές που εκφράστηκαν στην θεωρία της εξέλιξης από τον Δαρβίνου και τον Λαμάρκ. Έτσι με τον γενετικό αλγόριθμο του Λαμάρκ που χρησιμοποιεί το λογισμικό, οι απόγονοι κληρονομούν τις προσαρμογές τοπικής αναζήτησης των γονιών του.

4.2 UCSF Chimera

Το UCSF Chimera [45] είναι ένα ιδιαίτερα επεκτάσιμο πρόγραμμα για την απεικόνιση σε υπολογιστή και την ανάλυση των μοριακών δομών και σχετιζόμενων με αυτά δεδομένων. Μεταξύ άλλων παρέχει την δυνατότητα χειρισμού χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας, υπερμοριακών συμπλεγμάτων, ομοπαράθεσεων ακολουθιών, αποτελεσμάτων docking, παραγωγή εικόνων κατάλληλων για δημοσίευση καθώς και τροχιών (trajectories) από προσομοιώσεις.

4.3 VMD

Το VMD [46] σχεδιάστηκε για τη μοντελοποίηση, την απεικόνιση, και την ανάλυση βιολογικών συστημάτων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, σύμπλοκα λιπιδικής διπλοστοιβάδας, κ.λπ. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για οπτικοποίηση όσο και για ανάλυση των τροχιών από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής .

4.4 Swiss-PdbViewer

Το Swiss-PdbViewer (aka DeepView) [47] είναι μια εφαρμογή που παρέχει μια φιλική προς το χρήστη διεπαφή επιτρέποντας του να αναλύσει διάφορα μοντέλα πρωτεϊνών συγχρόνως. Οι πρωτεΐνες μπορούν να στοιχηθούν στον χώρο και να συγκριθούν τα ενεργά κέντρα τους ή οποιαδήποτε άλλα σχετικά μέρη. Μεταλλάξεις αμινοξέων, δεσμοί υδρογόνου, γωνίες και αποστάσεις μεταξύ των ατόμων είναι εύκολο να ληφθούν χάρη στο εύχρηστο γραφικό περιβάλλον.

Το πρόγραμμα αναπτύχθηκε το 1994 από το Nicolas Guex. Το Swiss-PdbViewer συνδέεται στενά με το SWISS-MODEL [48,49], έναν αυτοματοποιημένο κεντρικό server συγκριτικού σχεδιασμού (homology modeling) δομής πρωτεϊνών που αναπτύσσεται από Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) στο Biozentrum στη Βασιλεία .

Μία πιο αναλυτική περιγραφή και απεικόνιση των δυνατοτήτων και της χρήσης των ανωτέρω προγραμμάτων, ακολουθεί στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η στρατηγική εύκαμπτου docking που ακολουθήθηκε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας επιδιώκει να αξιολογήσει τις πιθανότερες διαμορφώσεις από τις οποίες περνά ο υποδοχέας GSK3-β κατά την διάρκεια μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως πιθανές εναλλακτικές δομές του κατά την διαδικασία του docking. Ως τέτοιες διαμορφώσεις θεωρήθηκαν οι αντιπροσωπευτικές δομές των σημνών (clusters) που προέκυψαν από ομαδοποίηση των δομών της πρωτεΐνης με κριτήριο την ομοιότητά τους.

Στάδια της εργασίας

- 1) Σχεδιασμός 3Δ μοντέλου της GSK3-β από *Lotus japonicus* (LSK1)
- 2) Προσομοίωση μοριακής δυναμικής της LSK1
- 3) Επιλογή δομών από την τροχιά της προσομοίωσης μέσω clustering
- 4) Μοντέλο της λουπεόλης
- 5) Docking της λουπεόλης στην LSK1
- 6) Αξιολόγηση και ανάλυση των υποψήφιων θέσεων πρόσδεσης

Αναλυτικά τα στάδια της εργασίας έχουν ως εξής:

1) Συγκριτικός σχεδιασμός της GSK3-β από *Lotus japonicus* (LSK1)

Για την κατασκευή του μοντέλου της GSK3-β από *Lotus Japonicus* χρησιμοποιήθηκε ο server συγκριτικού σχεδιασμού (homology modeling)

<http://swissmodel.expasy.org/interactive> [49] και η ακολουθία:

```
>gi|62857012|dbj|BAD95891.1| Ser/Thr protein kinase [Lotus japonicus]  
MNMRRRLKSIASGRTSISSDPGGDSNSKRAKLDQETEKKVNEETKTLGGKDQEQHVDASK  
ESTVGTSDVSTVAKTEKSGFDELPKELHEMKIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQI  
ITTAIGGRDQPKQTISYMAERVVGTGSFGVVFQAKCLETGEAVAIKKVLQDKRYKNREL  
QVMRTVDHPNIVKCLKHCFSTTDKDELYLNLVLEFVPEVTVYKVSQYIRVHQHMPRIIYVQ  
LYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGS AKMLVPGEPNISYIC  
SRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLLGHPLFPGESGVDQLVEI IKVLGTPTR  
EEIRCMNPHYNEFKFPQIKAHFWHKVIFYKRMPEAVDLVSRLQLQYSPNLRCTALAACAHP  
FFNDLRDPNASLPNGQPLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRLIPEHARS
```

Το μοντέλο που κατασκευάστηκε βασίστηκε στην δομή της ανθρώπινης GSK3-β (PDB:1j1b:A) και περιέχει τα κατάλοιπα 121-466. Στα 346 αμινοξέα που μοντελοποιήθηκαν υπάρχει 66% ταυτότητα και 85.5% ομοιότητα στην ακολουθία με αυτήν της πρότυπης. Αυτό εξασφαλίζει έναν επιτυχή συγκριτικό σχεδιασμό.

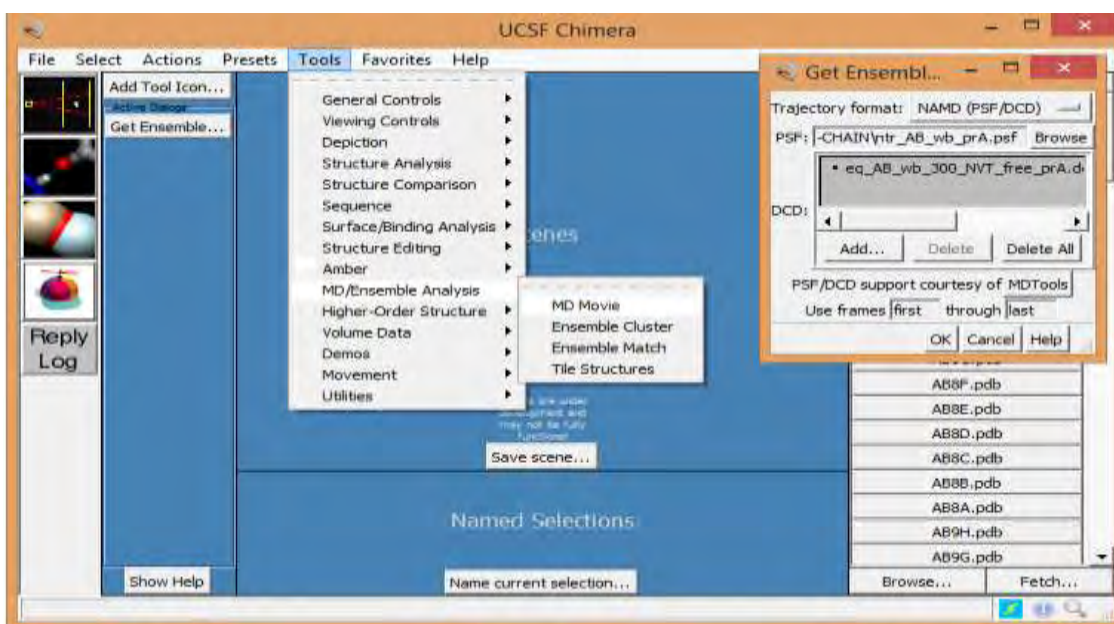
2) Προσομοίωση μοριακής δυναμικής της LSK1

Το σύστημα προσομοίωσης περιλαμβάνει ένα διμερές του μοντέλου της GSK3-β, 26992 μόρια νερού TIP3 καθώς και 76 ιόντα Na⁺ και 83 ιόντα Cl⁻. Μετά από ελαχιστοποίηση ενέργειας και σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στους 300K ακολούθησε προσομοίωση 2 ns υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (300K) και σταθερού όγκου. Το εξαγόμενο της προσομοίωσης είναι το αρχείο τροχιάς (.dcd) στο οποίο έχουν καταγραφεί ανά 1 ps τα διαδοχικά στιγμιότυπα της προσομοίωσης. Η προσομοίωση έγινε με το πρόγραμμα namd [50] Με την βοήθεια του προγράμματος VMD δημιουργήθηκε από τα τελευταία 1000 στιγμιότυπα της προσομοίωσης ένα αρχείο τροχιάς DCD που περιέχει μόνο ένα μονομερές της πρωτεΐνης (χωρίς νερά και ιόντα).

3) Επιλογή δομών από την τροχιά της προσομοίωσης

Η επιλογή των αντιπροσωπευτικών δομών της GSK-3β που είναι προσβάσιμες στην θερμοκρασία των 300K έγινε με ομαδοποίηση σε σμήνη (clusters) των δομών της πρωτεΐνης από τα διαδοχικά στιγμιότυπα της προσομοίωσης του προηγούμενου σταδίου. Για τον σκοπό αυτό έγινε χρήση του λογισμικού UCSF Chimera 1.7.

Το πρώτο βήμα προκειμένου να φορτωθεί η τροχιά της προσομοίωσης (αρχείο DCD) είναι να φορτωθεί ένα αρχείο PSF (protein structure file), το οποίο περιέχει πληροφορίες συνδεσιμότητας μεταξύ των ατόμων, τα μερικά ηλεκτρικά φορτία τους και ατομικές μάζες. (Εικόνα 5.1)



Εικόνα 5.1 Βήματα φόρτωσης της προσομοίωσης

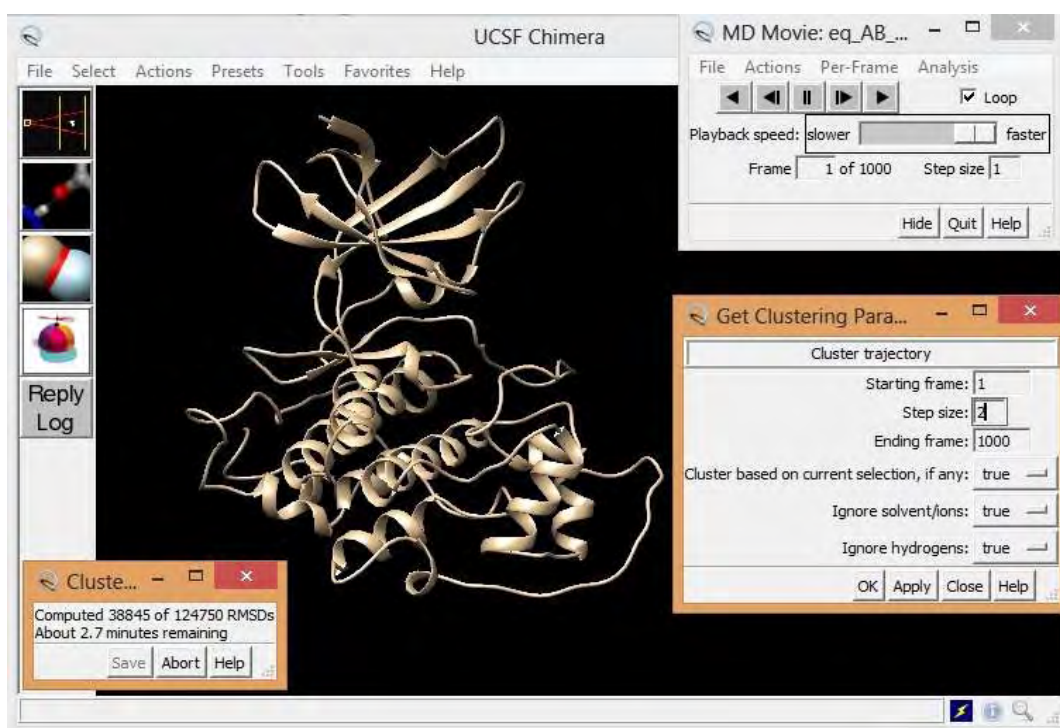
Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Άνοιγμα του Chimera → tools → MD/Ensemble analysis → MD movie και εμφανίζεται ένα νέο παράθυρο.

Εκεί φορτώθηκαν τα αρχεία ntr_AB_wb_prA.psf και έπειτα το eq_AB_wb_300_NVT_free_prA.dcd → OK

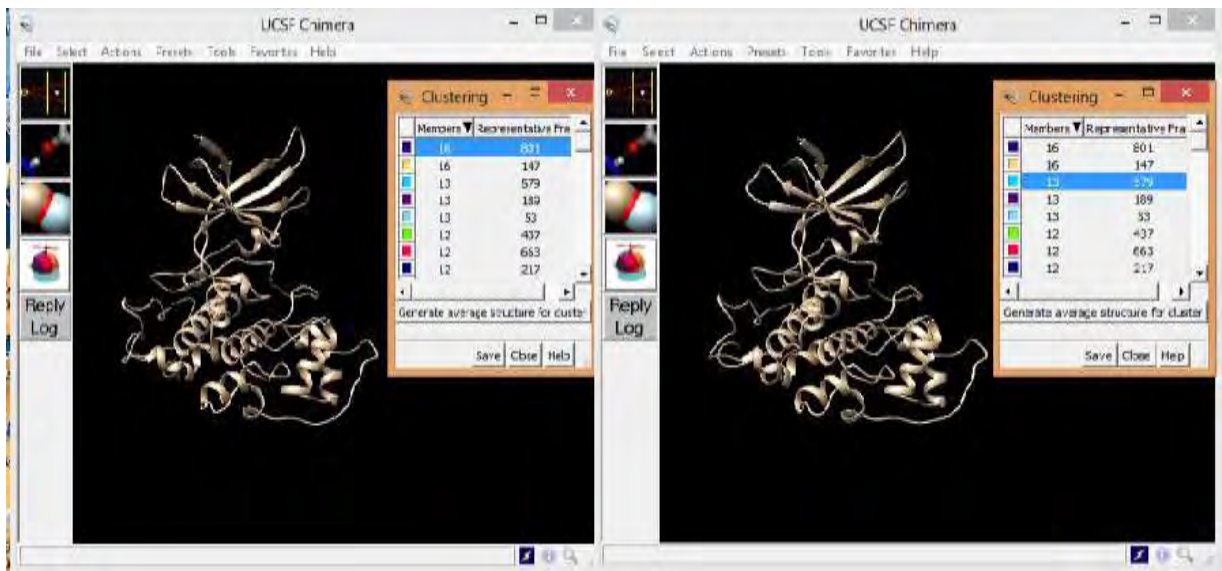
Αφού έχει φορτωθεί η προσομοίωση, παρουσιάζεται η τριδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, η οποία έχει επιλεγεί να απεικονίζεται σε μορφή κορδέλας (ribbon) και εμφανίζεται ένα πλαίσιο σχετικό με την ομαδοποίηση και έπειτα ένα δεύτερο για την προσομοίωση. Σαρώθηκε η προσομοίωση των 1000 στιγμιότυπων (frames) (1-1000) με εντολή να απομονώνεται μία δομή ανά δύο βήματα (step size 2).

Στο πρώτο πλαίσιο ακολουθήθηκαν τα βήματα: analysis → cluster. Με την εμφάνιση του δεύτερου ρυθμίζουμε: step size 2 → OK (Εικόνα 5.2)



Εικόνα 5.2 Παρουσίαση της δομής της πρωτεΐνης και βήματα για την ομαδοποίηση/απομόνωση δομών

Η διαδικασία ομαδοποίησης απέδωσε 55 σμήνη δομών της πρωτεΐνης, όπου κάθε σμήνος περιέχει έναν αριθμό μελών στα οποία περιλαμβάνεται μια κεντρική αντιπροσωπευτική δομή. Η αντιπροσωπευτική δομή του κάθε σμήνους ταυτοποιείται με τον αριθμό της θέσης της στην τροχιά της προσομοίωσης. (Εικόνα 5.3)



Εικόνα 5.3 Παρουσίαση δύο αντιπροσωπευτικών δομών

Τα clusters συγκεντρώθηκαν και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1 Ταξινόμηση των σημείων

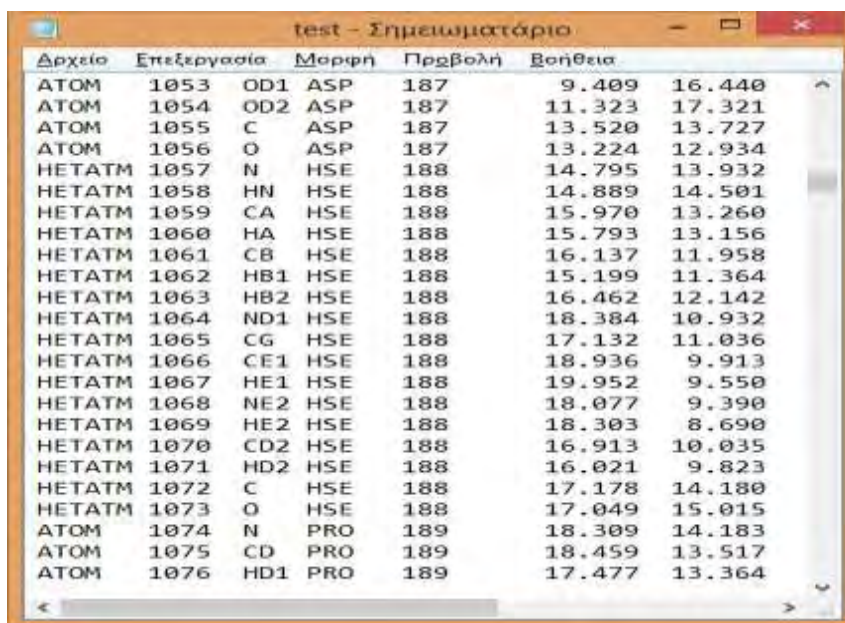
Cluster	Repres. Frame	Members
1	801 787 789 791 793 795 797 799 803 805 807 809 811 813 815 817	16
2	147 125 127 129 131 133 135 137 139 141 143 145 149 151 153 155	16
3	579 567 569 571 573 575 577 581 583 585 587 589 591	13
4	189 179 181 183 185 187 191 193 195 197 199 201 203	13
5	53 39 41 43 45 47 49 51 55 57 59 61 63	13
6	663 649 651 653 655 657 659 661 665 667 669 671	12
7	217 205 207 209 211 213 215 219 221 223 225 227	12
8	951 943 945 947 949 953 955 957 959 961 963 965	12
9	437 431 433 435 439 441 443 445 447 449 451 453	12
10	483 469 471 473 475 477 479 481 485 487 489	11
11	557 545 547 549 551 553 555 559 561 563 565	11
12	405 395 397 399 401 403 407 409 411 413 415	11
13	335 325 327 329 331 333 337 339 341 343 345	11
14	293 287 289 291 295 297 299 301 303 305 307	11
15	283 255 257 259 261 265 267 269 271 273 275	11
16	789 749 751 753 755 757 761 763 765 767 769	11
17	863 849 851 853 855 857 859 861 865 867 869	11
18	93 85 87 89 91 95 97 99 101 103 105	11
19	935 921 923 925 927 929 931 933 937 939 941	11
20	383 375 377 379 381 383 387 389 391 393	10
21	623 611 613 615 617 619 621 625 627 629	10
22	683 673 675 677 679 681 685 687 689 691	10
23	71 65 67 69 73 75 77 79 81 83	10
24	907 901 903 905 909 911 913 915 917 919	10
25	977 967 969 971 973 975 979 981 983 985	10
26	601 593 595 597 599 603 605 607 609	9
27	637 631 633 635 639 641 643 645 647	9
28	829 819 821 823 825 827 831 833 835	9
29	113 107 109 111 115 117 119 121 123	9
30	877 871 873 875 879 881 883 885 887	9
31	29 21 23 25 27 31 33 35 37	9
32	519 513 515 517 521 523 525 527	8
33	537 529 531 533 535 539 541 543	8
34	317 309 311 313 315 319 321 323	8
35	741 733 735 737 739 743 745 747	8
36	777 771 773 775 779 781 783 785	8
37	461 455 457 459 463 465 467	7
38	423 417 419 421 425 427 429	7
39	367 361 363 365 369 371 373	7
40	353 347 349 351 355 357 359	7
41	699 693 695 697 701 703 705	7
42	715 707 709 711 713 717 719	7
43	237 229 231 233 235 239 241	7
44	995 987 989 991 993 997 999	7
45	497 491 493 495 499 501	6
46	725 721 723 727 729 731	6
47	245 243 247 249 251 253	6
48	171 167 169 173 175 177	6
49	843 837 839 841 845 847	6
50	893 889 891 895 897 899	6
51	509 503 505 507 511	5
52	281 277 279 283 285	5
53	161 157 159 163 165	5
54	15 11 13 17 19	5
55	3 1 5 7 9	5

31 clusters με

9,166666667

Από τα 55 clusters απομονώθηκαν προς επεξεργασία τα 31, αυτά δηλαδή που περιλαμβάνουν έναν αριθμό μελών (members) ίσο ή μεγαλύτερο του εννιά που αποτελεί και τον μέσο όρο.

Οι 31 αντιπροσωπευτικές δομές αποθηκεύτηκαν έπειτα μία προς μία ως αρχεία PDB (file → save PDB) και ακολουθήθηκε μία ονοματολογία με αύξουσα σειρά (1 έως 31) με βάση τον αριθμό μελών και τον αριθμό του frame μέσα στην προσομοίωση. (πχ 1_gsk_801.pdb... 31_gsk_29.pdb)



The image shows a screenshot of a PDB file viewer window titled "test - Σημειωματάριο". The window displays a table with columns: Αρχείο, Επεξεργασία, Μορφή, Προβολή, and Βοήθεια. The data rows are as follows:

Αρχείο	Επεξεργασία	Μορφή	Προβολή	Βοήθεια		
ATOM	1053	OD1	ASP	187	9.409	16.440
ATOM	1054	OD2	ASP	187	11.323	17.321
ATOM	1055	C	ASP	187	13.520	13.727
ATOM	1056	O	ASP	187	13.224	12.934
HETATM	1057	N	HSE	188	14.795	13.932
HETATM	1058	HN	HSE	188	14.889	14.501
HETATM	1059	CA	HSE	188	15.970	13.260
HETATM	1060	HA	HSE	188	15.793	13.156
HETATM	1061	CB	HSE	188	16.137	11.958
HETATM	1062	HB1	HSE	188	15.199	11.364
HETATM	1063	HB2	HSE	188	16.462	12.142
HETATM	1064	ND1	HSE	188	18.384	10.932
HETATM	1065	CG	HSE	188	17.132	11.036
HETATM	1066	CE1	HSE	188	18.936	9.913
HETATM	1067	HE1	HSE	188	19.952	9.550
HETATM	1068	NE2	HSE	188	18.077	9.390
HETATM	1069	HE2	HSE	188	18.303	8.690
HETATM	1070	CD2	HSE	188	16.913	10.035
HETATM	1071	HD2	HSE	188	16.021	9.823
HETATM	1072	C	HSE	188	17.178	14.180
HETATM	1073	O	HSE	188	17.049	15.015
ATOM	1074	N	PRO	189	18.309	14.183
ATOM	1075	CD	PRO	189	18.459	13.517
ATOM	1076	HD1	PRO	189	17.477	13.364

Εικόνα 5.4 Απόσπασμα αρχείου pdb

Στα αρχεία PDB των αντιπροσωπευτικών δομών που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία η ιστιδίνη εμφανίζεται ως HSE (και όχι ως HIS) και γι αυτό οι εγγραφές της ξεκινούν με HETATM και όχι με ATOM όπως θα έπρεπε. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την διάρκεια της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκε η εν λόγω εναλλακτική μορφή πρωτονίωσης της ιστιδίνης που συμβολίζεται με HSE. Προκειμένου λοιπόν να είναι αναγνωρίσιμες οι ιστιδίνες αντικαταστάθηκε με την βοήθεια επεξεργαστή κειμένου το «HSE» από το «HIS» και το «HETATM» από το «ATOM».

4) Μοντέλο της λουπεόλης

Το 3Δ μοντέλο της λουπεόλης ελήφθη από τον ιστότοπο της πλατφόρμας για χημικά Guidechem.com (<http://www.guidechem.com/cas-545/545-47-1.html>).

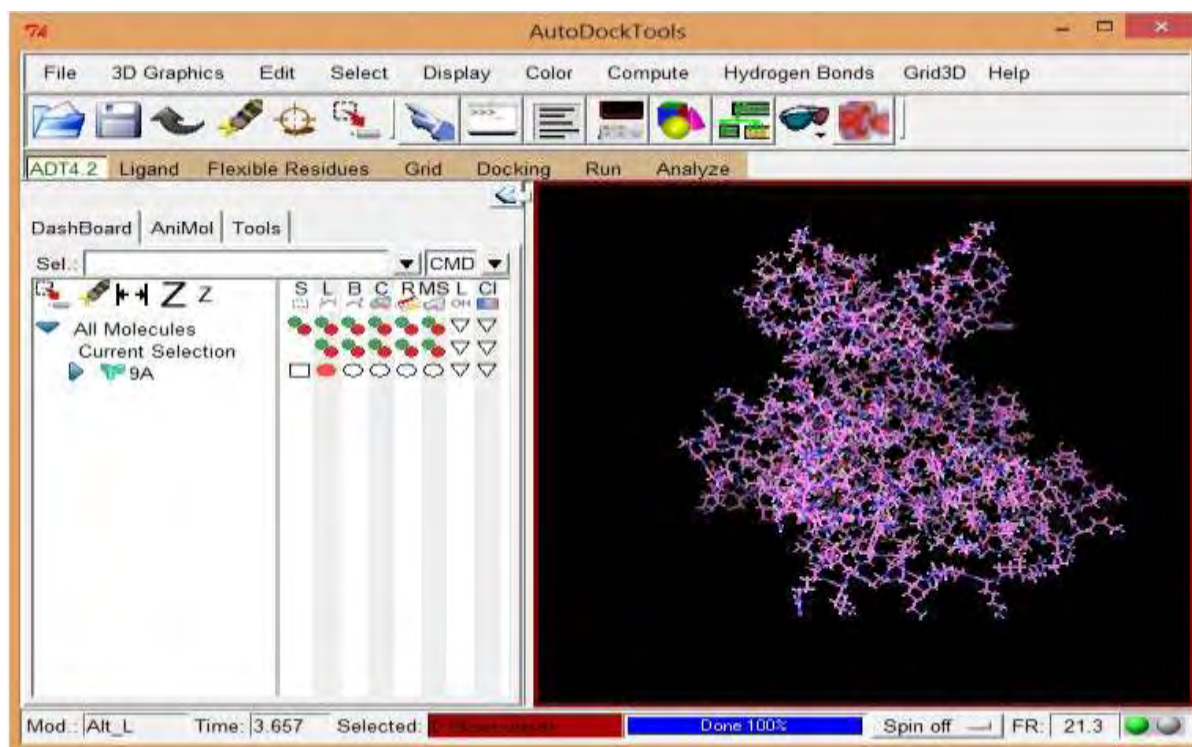
5) Docking της λουπεόλης στην GSK-3β

Έχοντας κάνει τις παραπάνω ενέργειες και έχοντας απομονώσει τα 31 αρχεία pdb με την διορθωμένη κατάλληλη μορφή μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία του docking. Θα ακολουθήσει μια παρουσίαση των βημάτων που εκτελέστηκαν με το λογισμικό AutoDockTools 1.5.6 και το AutoDock Vina για τις δοκιμές της πρόσδεσης του μορίου της λουπεόλης στο μόριο της πρωτεΐνης-υποδοχέα (GSK-3β).

• Προετοιμασία της πρωτεΐνης

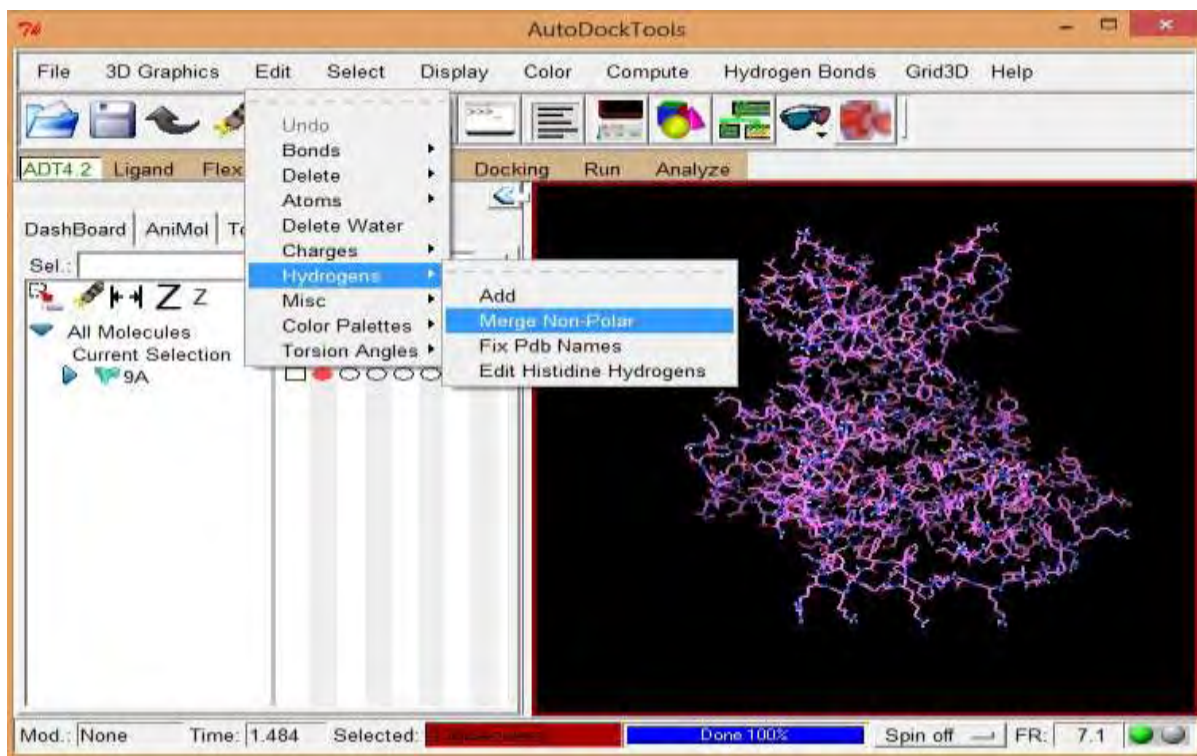
Μετά την εκκίνηση του AutoDockTools φορτώνουμε το αρχείο pdb της πρωτεΐνης-υποδοχέα. Ακολουθήθηκαν τα βήματα: File → Read Molecule → επιλογή ενός από τα 31 αρχεία pdb του υποδοχέα.

Εμφανίζεται πλέον η τριδιάστατη μορφή της πρωτεΐνης. (Εικόνα 5.5)



Εικόνα 5.5 Τριδιάστατη δομή της πρωτεΐνης

Ένα επόμενο απαραίτητο βήμα είναι η συγχώνευση των φορτίων των μη πολικών υδρογόνων με αυτά των αντιστοίχων ατόμων άνθρακα και η επακόλουθη αφαίρεση αυτών των υδρογόνων. (Εικόνα 5.6) Ακολουθήθηκε η διαδρομή: Edit → Hydrogenes → Merge Non-Polar



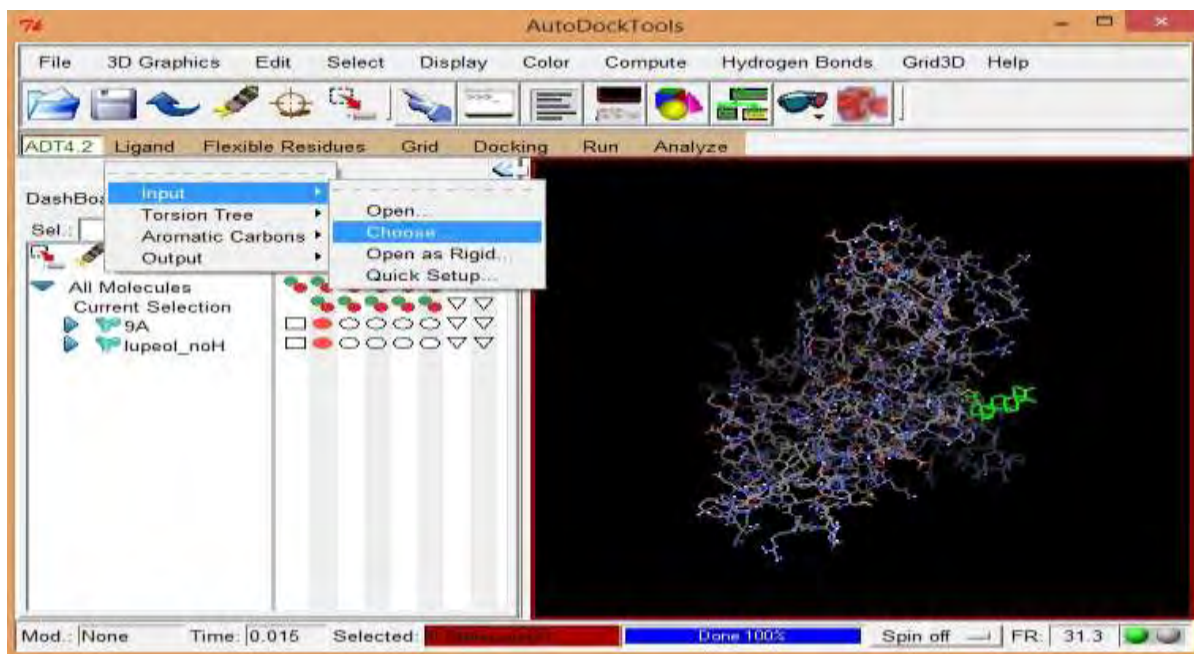
Εικόνα 5.6 Εμφάνιση της δομής πρωτεΐνης μετά την συγχώνευση των μη πολικών υδρογόνων

Τέλος έγινε αποθήκευση της πρωτεΐνης σε αρχείο `pdbqt` που είναι η μορφή αρχείων που απαιτεί το λογισμικό για να εκτελέσει την διαδικασία `docking`. Τα αρχεία `pdbqt` περιλαμβάνουν και τα μερικά ηλεκτρικά φορτία των ατόμων. Ακολουθήθηκε η διαδρομή: `Grid` → `Macromolecule` → `Choose` → (εμφανίζεται ένα παράθυρο) → `Select Molecule` → `Save`

- **Προετοιμασία του αρχείου του προσδέτη (λουπεόλης)**

Ακολουθώντας τα βήματα `Ligand` → `Input` → `Open...` επιλέχθηκε το αρχείο `lupeol_noH.pdb` που αποτελεί ένα μοντέλο της δομής της λουπεόλης, του μορίου που αποτελεί τον προσδέτη (`ligand`).

Με την φόρτωση του αρχείου της λουπεόλης το λογισμικό μας ενημερώνει ότι έχει προσθέσει στα άτομα μερικά ηλεκτρικά φορτία τύπου `gasteiger`, έχει συγχωνεύσει τα μη-πολικά υδρογόνα και έχει εντοπίσει έναν δεσμό με ικανότητα περιστροφής. Το τελευταίο δείχνει την ευκαμψία του προσδέτη, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της αλλαγής στην ενέργεια που υφίσταται κατά την σύνδεση μορίων. (Εικόνα 5.7)



Εικόνα 5.7 Εμφάνιση δομών μετά την εισαγωγή του ligand

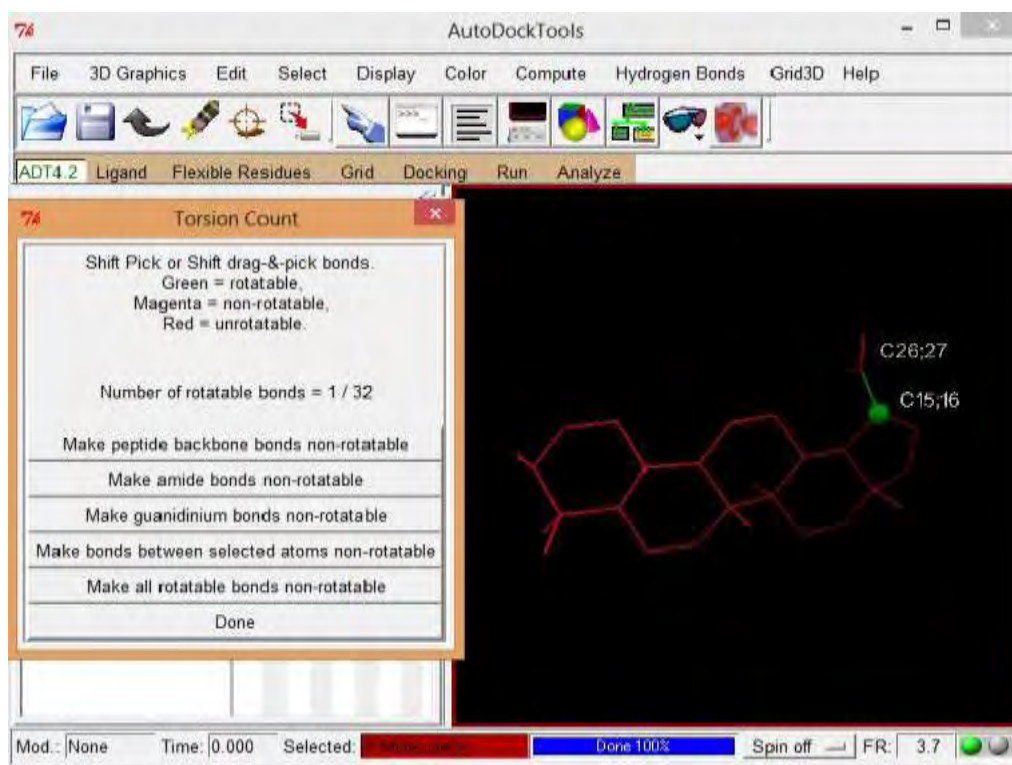
Έχοντας την δυνατότητα να αποκρύψουμε την εμφάνιση της πρωτεΐνης μπορούμε να έχουμε μια απομονωμένη εικόνα του μορίου της λουπεόλης και να εντοπίσουμε τη ρίζα του μορίου, που αποτελεί ένα σημείο στο οποίο συνδέονται άτομα που μπορούν να περιστραφούν. Το λογισμικό δίνει στον χρήστη τη δυνατότητα να επιλέξει ο ίδιος τη ρίζα ή να επιτρέψει να καθοριστεί αυτόματα η καλύτερη δυνατή ρίζα. Στην εικόνα 5.8, με το πράσινο σφαιρίδιο απεικονίζεται η ρίζα όπως επιλέχθηκε από το λογισμικό, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι μη περιστρέψιμοι δεσμοί και με πράσινο ο ένας περιστρέψιμος δεσμός όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Ακολουθήθηκαν τα βήματα: Ligand → Torsion Tree → Detect Root... / Choose Torsions...

Στο τέλος έγινε αποθήκευση του αρχείου σε μορφή pdbqt: Ligand → Output → save as pdbqt...

- **Προετοιμασία Παραμέτρων Πλέγματος**

Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να οριστεί το ορθογώνιο πλέγμα (Grid Box) μέσα στο οποίο θα κινηθεί το μόριο της λουπεόλης για να εντοπίσει περιοχές πρόσδεσης με την πρωτεΐνη-υποδοχέα. Σε αυτό το σημείο απαιτείται είτε η επιλογή του pdbqt αρχείου της λουπεόλης ως ligand, αν αυτό παρουσιάζεται ακόμα στο λογισμικό, ή να φορτωθεί εκ νέου από τον φάκελο που έχει αποθηκευτεί. Πλέον μπορούμε να καθορίσουμε τις διαστάσεις του



Εικόνα 5.8 Εμφάνιση της ρίζας και του περιστρέψιμου δεσμού της λουπεόλης

πλέγματος. Οι αριθμοί που επιλέγονται αφορούν τις 3 διαστάσεις x, y, z καθώς και τις συντεταγμένες του κέντρου για κάθε διάσταση. Οι προεπιλεγμένες τιμές του λογισμικού είναι 40,40,40 και μπορούμε να επιλέξουμε και που θα βρίσκεται ακριβώς το κέντρο του πλέγματος πάνω στους άξονες. Η αρχική απόσταση μεταξύ των πλευρών καθορίζεται αρχικά στα 0.375 Å και μπορεί να φτάσει μέχρι και το 1.0 Å ανάλογα με τον χώρο που επιθυμούμε να ερευνηθεί. Τέλος γίνεται αποθήκευση του αρχείου σε μορφή grf (grid parameter file).

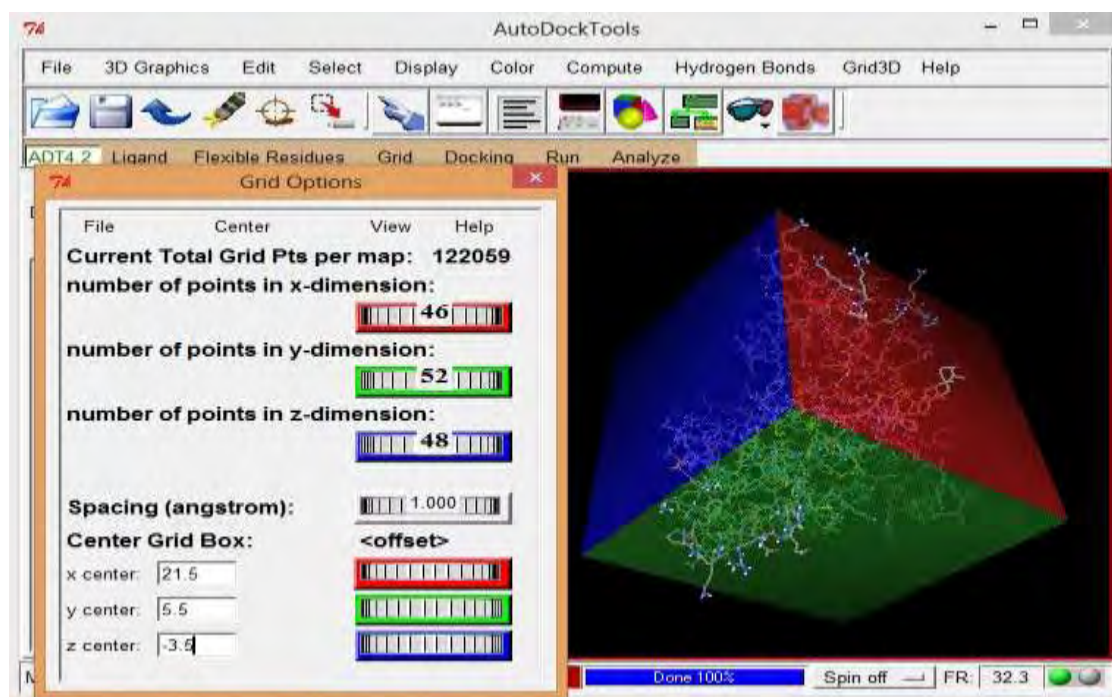
Στην περίπτωση μας αρχικά για τις δοκιμές πρόσδεσης δημιουργήσαμε ένα πλέγμα που περιλαμβάνει όλη την πρωτεΐνη. (εικόνα 5.9)

Ακολουθήθηκαν τα βήματα:

Grid → Set Map Types → Choose Ligand → Select Ligand → lupeol_noH.pdbqt

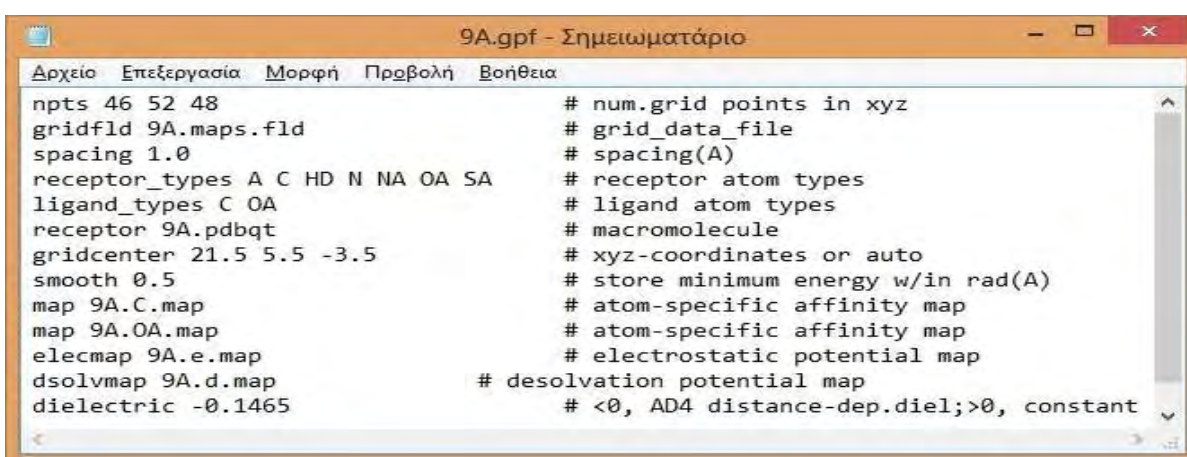
Grid → Grid Box → επιλογή/ρύθμιση διαστάσεων

Grid → Output → Save GPF



Εικόνα 5.9 Απεικόνιση του πλέγματος αναζήτησης

Το αρχείο αυτό δείχνει τους τύπους των χαρτών που πρέπει να υπολογιστούν, την τοποθεσία και το μέγεθος αυτών των χαρτών και καθορίζει πιθανές ενεργειακές παραμέτρους. Σε γενικές γραμμές, υπολογίζεται ένας χάρτης για κάθε στοιχείο του προσδέτη καθώς και ένας ηλεκτροστατικός χάρτης (Εικόνα 5.10)



Εικόνα 5.10 Αρχείο GPF

- **Εκτέλεση του Docking**

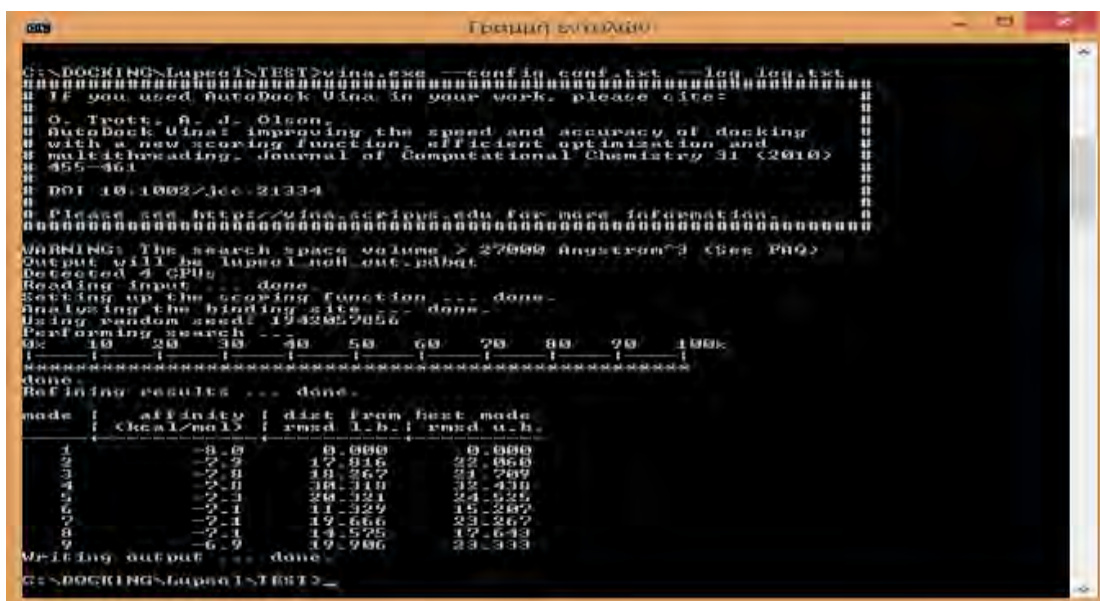
Τα αρχεία που προετοιμάστηκαν στα παραπάνω βήματα (pdbqt μακρομορίου και υποστρώματος, grf) απαιτείται να βρίσκονται αποθηκευμένα σε έναν κοινό φάκελο μαζί με ένα αντίγραφο του λογισμικού vina.exe (AutoDock Vina). Το Vina είναι το πρόγραμμα που πραγματοποιεί τους υπολογισμούς και εκτελεί την διαδικασία του docking πρωτεΐνης-ligand.

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός εγγράφου κειμένου (.txt) που θα περιλαμβάνει τα προς ανάγνωση στοιχεία για το Vina. Αυτά είναι τα ονόματα των αρχείων pdbqt υποδοχέα και υποστρώματος, οι θέσεις των κέντρων των αξόνων και οι διαστάσεις του πλέγματος καθώς και η διεξοδικότητα (exhaustiveness). Η διεξοδικότητα δείχνει την πληρότητα της αναζήτησης και κατά προσέγγιση είναι ανάλογη του απαιτούμενου χρόνου της αναζήτησης. Η προεπιλεγμένη τιμή της είναι 8 και η μέγιστη της το 16. Το αρχείο ονομάστηκε conf.txt

Το λογισμικό παρέχει και κάποιες πρόσθετες επιλογές παραμέτρων, όπως τον μέγιστο αριθμό των διατάξεων δέσμευσης που θα παραγάγει ως εξαγόμενο (από το 1-10, με default 9) και την μέγιστη ενεργειακή διαφορά (1-3 kcal/mol, default 3) μεταξύ αυτών των διατάξεων. Δομές με τιμές δέσμευσης εκτός του εύρους σε σχέση με την καλύτερη θα αποκλείονται από το αρχείο των εξαγομένων (output).

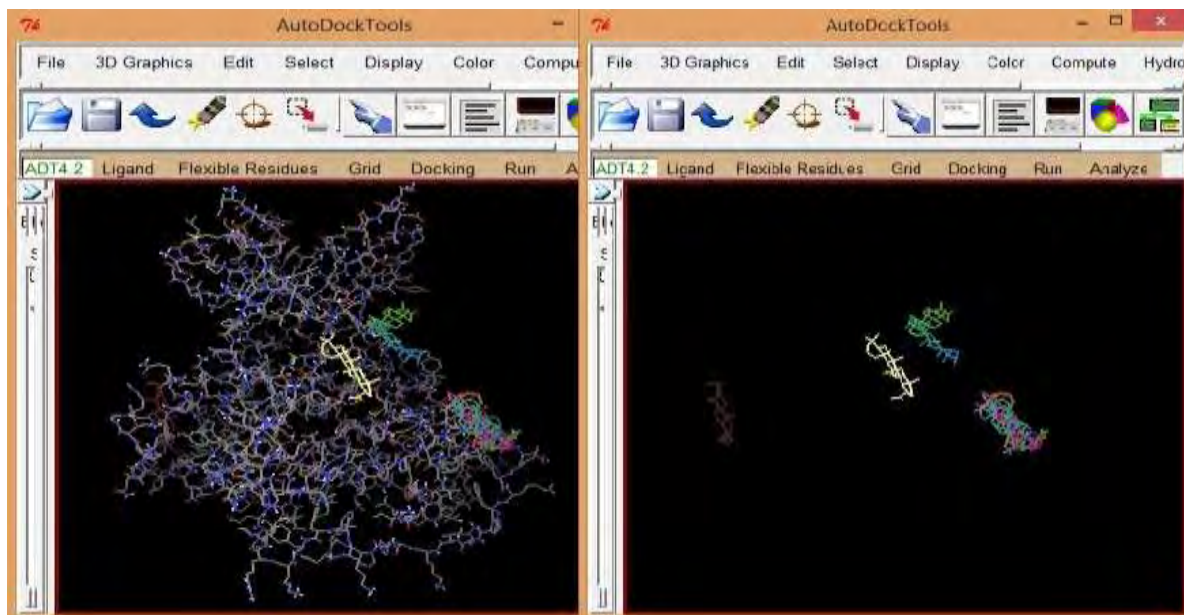
Πλέον μπορεί να προχωρήσει η διαδικασία του docking. Αρχικά απαιτείται το άνοιγμα της γραμμής εντολών του υπολογιστή και αλλαγή του προορισμού προς τον φάκελο που περιέχει τα αρχεία μαζί με το λογισμικό. (Εικόνα 5.11) Εκεί πληκτρολογούμε:

vina.exe -config conf.txt -log log.txt



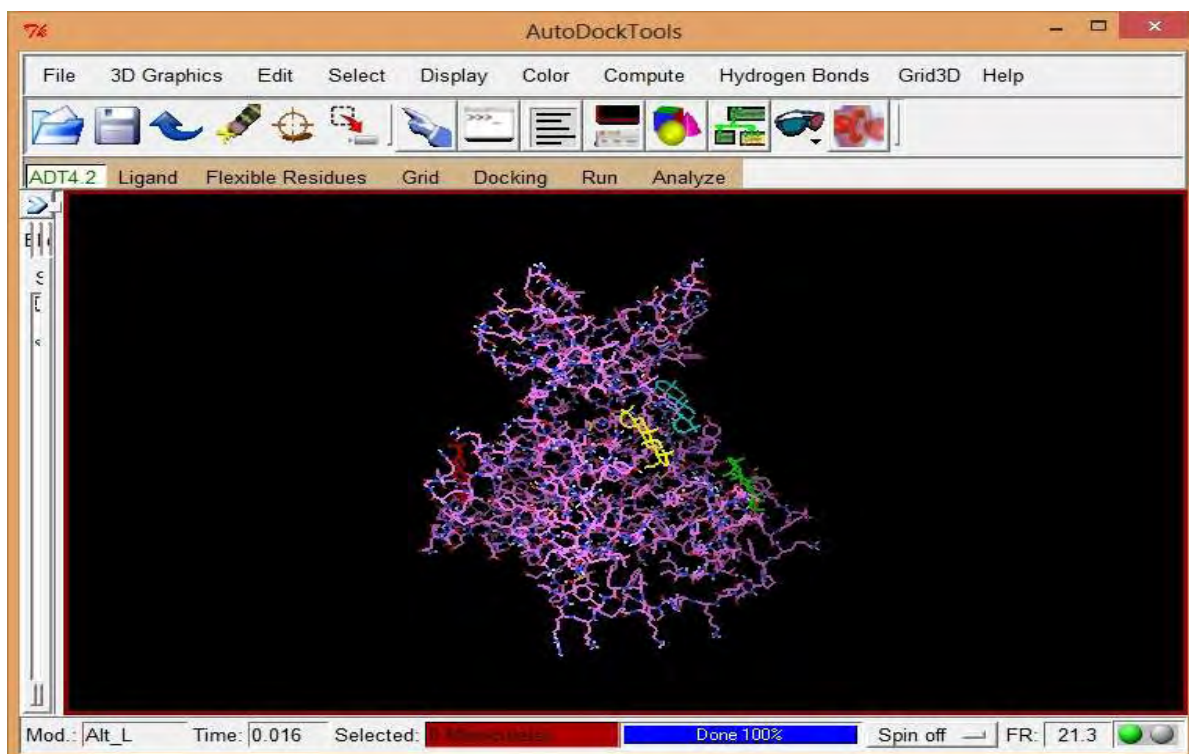
Εικόνα 5.11 Εκτέλεση του Vina και εμφάνιση αποτελεσμάτων του docking

Τελικό αποτέλεσμα με την εκτέλεση της διαδικασίας είναι η απόδοση των εννιά ευνοϊκότερων διατάξεων (θέσεις και προσανατολισμοί) δέσμευσης του προσδέτη με πρώτη εκείνη με την μικρότερη (αρνητικότερη), ενέργεια πρόσδεσης (docking affinity). Οι διαμορφώσεις αποθηκεύονται ομαδικά σε ένα αρχείο pdbqt που βρίσκεται στον φάκελο από όπου έτρεξε όλη η διαδικασία του docking και μπορούν να οπτικοποιηθούν στο AutoDockTools. (εικόνα 5.12)



Εικόνα 5.12 Παρουσίαση των διατάξεων που προέκυψαν από μια δοκιμή docking

Η διαδικασία για το docking του μορίου της λουπεόλης στο μακρομόριο της GSK-3β, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ακολουθήθηκε έπειτα και για τις 31 αντιπροσωπευτικές δομές που απομονώθηκαν αρχικά. Γι αυτές χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες παράμετροι, το ίδιο αρχείο pdb της λουπεόλης και έγινε αναζήτηση που περιελάμβανε πλέγμα για όλη την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα αυτών των δοκιμών ήταν η εμφάνιση διαφόρων θέσεων δέσμευσης του μορίου της λουπεόλης για κάθε cluster, με επικρατέστερες τέσσερις θέσεις, με βάση την συχνότητα εμφάνισης και την ενέργεια πρόσδεσης. Οι θέσεις αυτές ονοματίστηκαν αυθαίρετα A, B, C και TMU (όπου TMU πήρε το όνομα εξαιτίας του γεγονότος ότι βιβλιογραφικά ήταν γνωστό ότι σε αυτή τη περιοχή στις GSK-3β δεσμεύεται το μόριο τετραμεθυλ-ουρία που αποτελεί ανάλογο του ATP και σε αυτή τη περιοχή αναμενόταν αρχικά να παρουσιαστεί δέσμευση του μορίου της λουπεόλης) (Εικόνα 5.13)



Εικόνα 5.13 Απεικόνιση των θέσεων δέσμευσης του μορίου της λουπεόλης. Η δομή με το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει τη θέση TMU, με το πράσινο τη θέση A, με το γαλάζιο τη θέση B και με το κόκκινο τη θέση C

Επόμενο στάδιο της μελέτης ήταν η καταγραφή των θέσεων δέσμευσης για κάθε ένα από τα 31 clusters και η εκτέλεση πρόσδεσης για κάθε ένα από αυτά σε μικρότερο πλέγμα αναζήτησης στοχευμένο για κάθε περιοχή δέσμευσης αντίστοιχα.

6) Αξιολόγηση και ανάλυση των υποψήφιων θέσεων πρόσδεσης

Με την εκτέλεση των δοκιμών πρόσδεσης, έγινε απομόνωση και αποθήκευση σε αρχεία pdb, της ευνοϊκότερης διαμόρφωσης κάθε μορίου της λουπεόλης, για την αντίστοιχη αντιπροσωπευτική δομή, με σκοπό την περαιτέρω μελέτη των μορίων στη μορφή της δομής συμπλόκου πρωτεΐνης-ligand. Ακολουθήθηκε μια ονοματολογία με βάση το cluster και την αντίστοιχη θέση δέσμευσης. (1_gsk_801_A_lup.pdb, 1_gsk_801_TMU_lup.pdb... 31_gsk_29_C_lup.pdb)

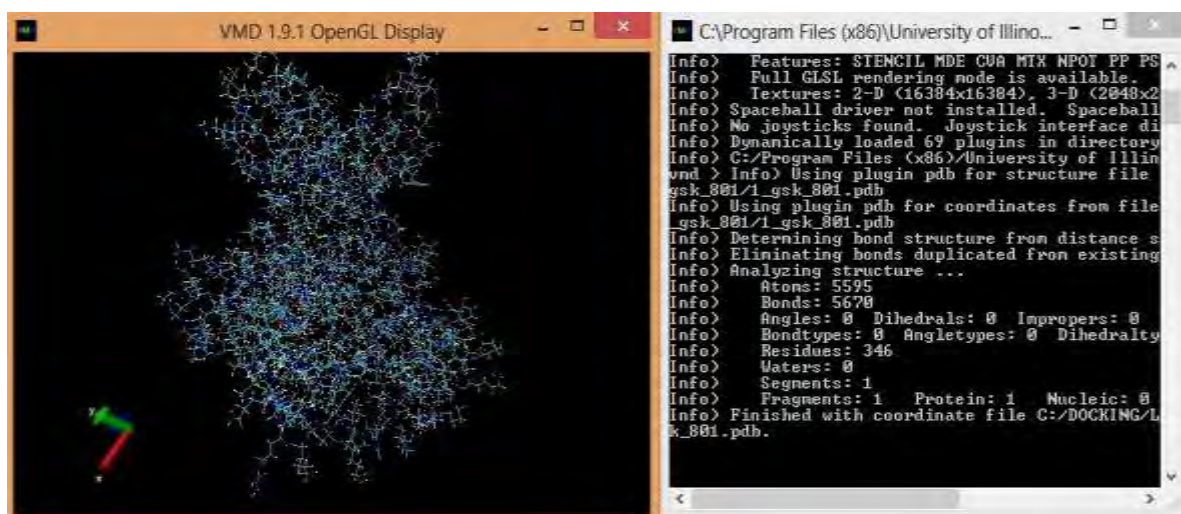
- **Οπτικοποίηση και υπολογισμός αποστάσεων (VMD)**

Με τη χρήση του λογισμικού οπτικοποίησης μοριακών δυναμικών (VMD) υπήρξε η δυνατότητα να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα των δοκιμών του docking με την παρουσίαση

συνολικά του συμπλόκου κινάσης-λουπεόλης και να γίνει υπολογισμός σημαντικών δεδομένων όπως η θέση του κέντρου μάζας και η συνολική ενέργεια του συμπλόκου.

Ακολουθεί παράδειγμα παρουσίασης του αρχείου της αντιπροσωπευτικής δομής 1_gsk_801.pdb και η πρόσδεση στην περιοχή TMU της δομής του αρχείου 1_gsk_801_TMU_lup.pdb. Με το άνοιγμα του λογισμικού φορτώθηκε αρχικά η δομή του μακρομορίου. Ακολουθήθηκε η διαδρομή : File → New Molecule → Filename... Browse → Load.

Το λογισμικό αφού φορτώσει το μόριο παραθέτει και πληροφορίες για αυτό όπως είδος μορίου, αριθμό ατόμων και δεσμών, αριθμό καταλοίπων κ.ά. (εικόνα 5.14)

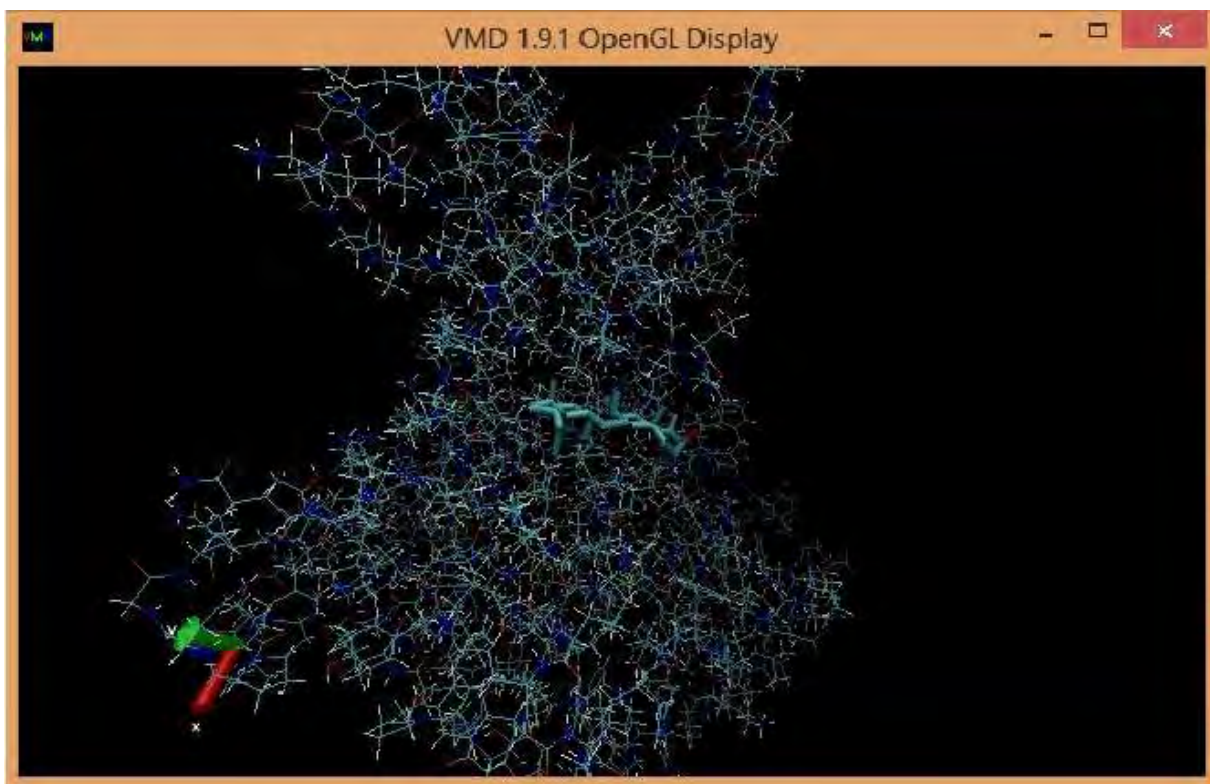


Εικόνα 5.14 Παρουσίαση δομής και παράθεση πληροφοριων για την πρωτεΐνη με το λογισμικό VMD

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται φόρτωση του μορίου του προσδέτη και εμφανίζεται η διαμόρφωση που επιτεύχθηκε για τη δέσμευση στη θέση αυτή. (εικόνα 5.15)

Έχοντας επιτευχθεί η παρουσίαση των δομών στη μορφή συμπλόκου υπήρξε η δυνατότητα υπολογισμού γεωμετρικού κέντρου των ατόμων του προσδέτη για κάθε μια διάταξη πρόσδεσης. Οι υπολογισμοί για κάθε σύμπλοκο κινάσης-λουπεόλης, για κάθε θέση δέσμευσης, πραγματοποιήθηκαν με το VMD το οποίο αποδίδει τις συντεταγμένες x,y,z του εκάστοτε γεωμετρικού κέντρου. Με χρήση της εξίσωσης $R = \sqrt{(x-xI)^2 + (y-yI)^2 + (z-zI)^2}$ υπολογίστηκε η απόσταση της λουπεόλης σε κάθε διάταξη δέσμευσης από την θέση του TMU. Ακολουθήθηκε η πορεία:

Extensions → Tk Console και γίνεται εμφάνιση μιάς γραμμής εντολών. Πληκτρολογήθηκαν οι εντολές: set sel [atomselect top all] → measure center \$sel



Εικόνα 5.15 Διαμόρφωση πρόσδεσης της λουπεόλης στην περιοχή TMU

Επόμενο στάδιο ήταν η καταγραφή και η απομόνωση για κάθε αντιπροσωπευτική δομή της πρωτεΐνης, της διαμόρφωσης του μορίου εκείνου της λουπεόλης που απέδωσε την ισχυρότερη ενέργεια πρόσδεσης συνολικά, και ο υπολογισμός μέσω του λογισμικού, της ενέργειας διαμόρφωσης της πρωτεΐνης και της συνολικής ενέργειας του συμπλόκου. Η ενέργεια διαμόρφωσης περιγράφει την ομοιοπολική ενέργεια δεσμών όπως αυτή προκύπτει από το άθροισμα της ενέργειας όλων των ομοιοπολικών δεσμών στη δομή του μορίου, οι οποίοι επιλέχθηκαν βάσει συγκεκριμένων περιορισμών στις αλληλεπιδράσεις.

Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην επιλογή τριών αντιπροσωπευτικών δομών (5_gsk_53.pdb/5_gsk_53_A_lup.pdb, 21_gsk_623.pdb/21_gsk_623_TMU_lup.pdb και 25_gsk_977.pdb/25_gsk_977_TMU_lup.pdb), δύο με βάση την μικρότερη συνολική ενέργεια και ενέργεια διαμόρφωσης αντίστοιχα, και μια με βάση την μικρότερη ενέργεια πρόσδεσης που απέδωσε το docking με το μόριο της λουπεόλης. Στην συνέχεια οι τρεις αυτές διατάξεις μπορούν να αναλυθούν προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος που διαδραματίζουν τα αμινοξέα των αντιστοίχων περιοχών στην πρόσδεση του μορίου της λουπεόλης.

- **Εντοπισμός αμινοξέων της περιοχής δέσμευσης και στοχευμένες μεταλλάξεις (Swiss-PdbViewer)**

Με το άνοιγμα του λογισμικού φορτώθηκαν τα αρχεία των δομών της πρωτεΐνης και

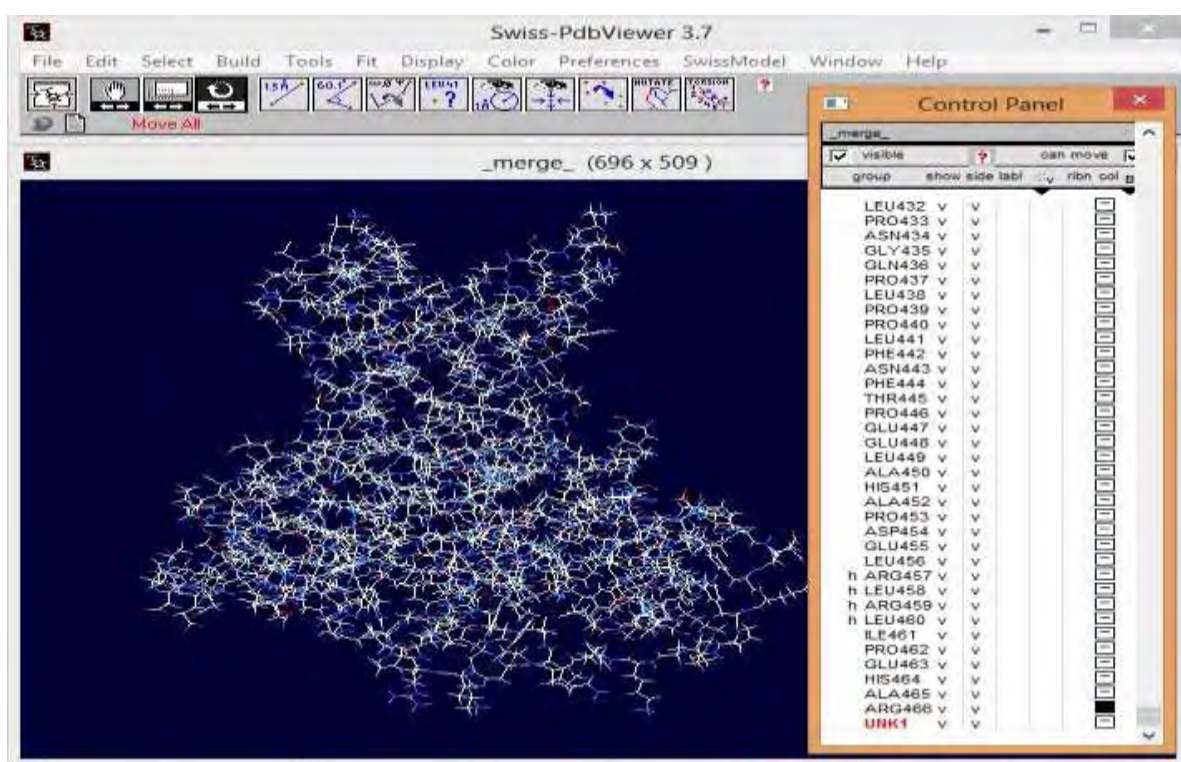
του προσδέτη αντίστοιχα, αλλά επειδή αναγνωρίζονται αρχικά σαν ξεχωριστές δομές γίνεται επιλογή συγχώνευσης τους για να γίνει επεξεργασία τους σαν σύμπλοκο. (εικόνα 5.16) Ακολούθησαν τα βήματα:

SPDBV: Open pdb file → επιλογή αρχείων πρωτεΐνης και λουπεόλης αντίστοιχα. Αφού γίνει επιλογή όλων των αμινοξέων και του μορίου της λουπεόλης για να επιτευχθεί η συγχώνευση: Edit → Create Merged Layer from Selection.

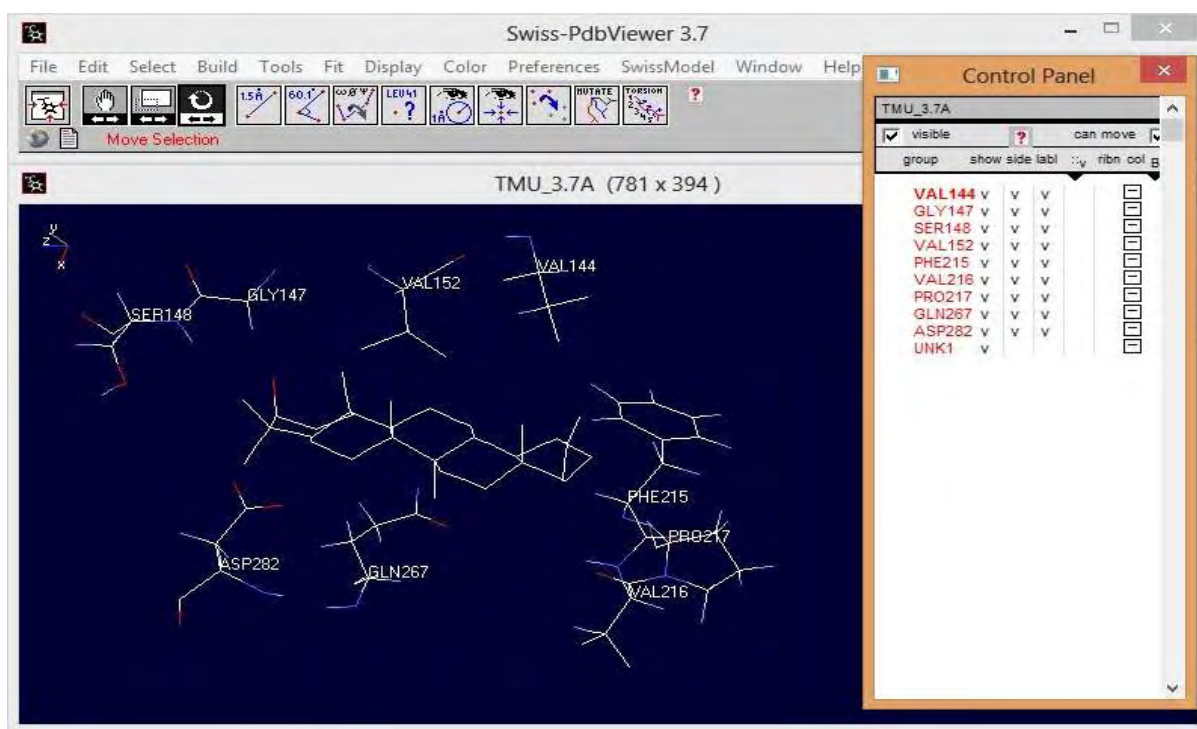
Το λογισμικό παραθέτει αναλυτικά την σειρά των αμινοξέων στη δομή της πρωτεΐνης καθώς αναφέρει και ποιά αυτά βρίσκονται σε διαμόρφωση α-έλικας ή β-πτυχωτής επιφάνειας.

Στη συγχωνευμένη πλέον δομή υπήρξε η δυνατότητα επιλογής και παρουσίασης των αμινοξέων των πιο κοντινών στην περιοχή δέσμευσης του μορίου της λουπεόλης, που βρίσκονται στην ελάχιστη δυνατή απόσταση των 3.7Å. (εικόνα 5.17)

Ακολούθησαν τα βήματα: Επιλογή στο Control Panel του μορίου της λουπεόλης → Select → Neighbors of Selected aa... → Select groups that are within και ρύθμιση στα 3.7Å → OK



Εικόνα 5.16 Παρουσίαση της συγχωνευμένης δομής κινάσης-λουπεόλης και παράθεση της λίστας των αμινοξέων με το λογισμικό Swiss-PdbViewer



Εικόνα 5.17 Απεικόνιση και παράθεση των αμινοξέων πιο κοντινών στη περιοχή δέσμευσης

Γι αυτές τις τρεις αντιπροσωπευτικές δομές τα αμινοξέα στην περιοχή δέσμευσης σε απόσταση 3.7Å είχαν ως εξής:

[5_gsk_53.pdb](#): Arg305, Ile310 , Phe311, Gly344, Val345, Gln347, Tyr370, Glu372, Phe373

[21_gsk_623.pdb](#): Val144, Gly147, Ser148, Phe215, Val216, Pro217, Gln267, Asp282

[25_gsk_977.pdb](#): Gly147, Phe149, Tyr221, Lys265, Gln267, Asn268, Asp282, Ser301

Σε κάθε μια από τις παραπάνω περιοχές δέσμευσης ήταν σκόπιμο να γίνουν στοχευμένες μεταλλάξεις και έπειτα να πραγματοποιηθούν εκ νέου δοκιμές docking για να παρατηρηθεί πιθανή συσχέτιση τους με τη δέσμευση της λουπεόλης. Αποκλείστηκαν μεταλλάξεις που θα διατάρασσαν α-έλικες ή β-ελάσματα του υποδοχέα. Έγιναν αντικαταστάσεις είτε διατηρώντας τον πολικό ή μη πολικό χαρακτήρα των αμινοξέων όσο και το αντίθετο. Για κάθε μετάλλαξη αμινοξέος απαιτήθηκε μια ελαχιστοποίηση της ενέργειας με το spdbv ώστε να επιτευχθεί η μικρότερη δυνατή ενέργεια του μορίου για τη δοκιμή docking.

Ακολουθήθηκε η πορεία:

Επιλογή του επιθυμητού αμινοξέος και πατώντας στο πλαίσιο που γράφει mutate γίνεται αντικατάσταση με το αντίστοιχο που έχει επιλεγεί για αλλαγή. Έπειτα στο Control

Panel μαζί με το αλλαγμένο αμινοξύ γίνεται επιλογή του προηγούμενου και του επόμενου του στη σειρά (για τον υπολογισμό του τοπικού ενεργειακού ελαχίστου) και ακολουθεί η εντολή: Tools → Energy Minimization. Τέλος αφού γίνει επιλογή όλων των αμινοξέων και αποκλειστεί το μόριο της λουπεόλης ακολουθεί η εντολή: File → Save → Save Selected Residues. Έτσι απομονώθηκε η τελική δομή της πρωτεΐνης για να επακολουθήσουν δοκιμές docking.

Για κάθε αντιπροσωπευτική δομή με την ανάλογη επιλεγμένη μετάλλαξη, έγιναν δοκιμές docking με το αρχείο lupeol_noH.pdb και με πλέγμα αναζήτησης στην περιοχή δέσμευσης. Οι μεταλλάξεις που επιλέχθηκαν καθώς και οι ενέργειες πρόσδεσης που αποδόθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 6.3:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των δοκιμών πρόσδεσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6.1) με βάση τις θέσεις δέσμωσης για κάθε αντιπροσωπευτική δομή και την ανάλογη μικρότερη ενέργεια δέσμωσης του μορίου της λουπεόλης που αντιπροσωπεύει την ευνοϊκότερη ενεργειακά διάταξη πρόσδεσης.

Πίνακας 6.1 Ενέργειες πρόσδεσης της λουπεόλης με βάση τη θέση για κάθε cluster

Cluster	D.Af kcal/mol A	TMU	B	C	I
1_gsk_801	-7.7	-8.2			
2_gsk_147	-7.2		-7.5	-7.4	
3_gsk_579	-7.5		-7.4	-7.8	
4_gsk_189	-8.0		-7.5	-7.5	
5_gdk_53	-8.0		-7.5	-8.0	
6_gsk_663	-7.8		-7.4	-7.4	
7_gsk_217	-8.2	-7.9	-7.8		
8_gsk_951	-8.0		-7.8	-7.3	
9_gsk_437	-8.8	-8.4	-7.5	-8.5	
10_gsk_483	-7.6	-7.0	-6.9		
11_gsk_557			-7.4	-8.0	
12_gsk_405	-8.1	-7.2	-7.1		
13_gsk_335	-8.8		-7.7		
14_gsk_293	-7.7		-7.5	-7.6	
15_gsk_263	-8.0	-7.1	-7.5	-7.2	
16_gsk_759	-8.0		-8.0	-7.5	
17_gsk_863	-7.5	-8.2	-7.3	-7.7	
18_gsk_93	-7.4		-7.7	-8.0	
19_gsk_935	-8.2	-8.5	-7.9		
20_gsk_383	-7.6	-7.1	-6.9		
21_gsk_623	-7.9	-9.7	-7.9		
22_gsk_683	-7.8		-7.8		
23_gsk_71	-7.7		-7.7	-7.2	
24_gsk_907		-7.9	-8.1	-8.3	
25_gsk_977	-7.8	-7.9		-7.8	
26_gsk_601	-7.8	-8.1	-7.4	-6.7	
27_gsk_637	-8.0	-8.1	-7.5	-7.8	
28_gsk_829	-9.2		-7.3	-7.6	
29_gsk_113	-8.0		-7.4	-7.5	
30_gsk_877	-7.7	-8.5	-7.4		
31_gsk_29	-7.8	-7.0	-7.3	-7.9	

Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι εμφανίζεται μια αυξημένη συχνότητα για τη δέσμωση του μορίου της λουπεόλης στις περιοχές A και B της πρωτεΐνης, αλλά κατά μέσο όρο η πρόσδεση στις περιοχές A και TMU παρουσιάζει μικρότερη ενέργεια πρόσδεσης και κατά συνέπεια ισχυρότερη δέσμωση (η μικρότερη εμφανίστηκε στην αντιπροσωπευτική δομή 21_gsk_623 για την περιοχή TMU και ήταν ίση με -9.7 kcal/mol). Οπότε φαίνεται να ευνοείται αρχικά η δέσμωση σε αυτές τις δύο περιοχές.

Πίνακας 6.2 Απόσταση κάθε διάταξης δέσμευσης της λουπεόλης από την θέση του TMU

CLUSTER	LUPEOL	Απόσταση από TMU [Å]
1_gsk_801	1_gsk_801_A_lup	23.0555
	1_gsk_801_TMU_lup	14.4408
2_gsk_147	2_gsk_147_A_lup	23.7877
	2_gsk_147_B_lup	18.5350
	2_gsk_147_C_lup	22.5909
3_gsk_579	3_gsk_579_A_lup	24.0239
	3_gsk_579_B_lup	16.8091
	3_gsk_579_C_lup	22.6629
4_gsk_189	4_gsk_189_A_lup	26.0849
	4_gsk_189_B_lup	20.4880
	4_gsk_189_C_lup	24.0374
5_gsk_53	5_gsk_53_A_lup	23.9259
	5_gsk_53_B_lup	20.4034
	5_gsk_53_C_lup	22.2365
6_gsk_663	6_gsk_663_A_lup	23.9949
	6_gsk_663_B_lup	17.0846
	6_gsk_663_C_lup	23.6439
7_gsk_217	7_gsk_217_A_lup	27.1048
	7_gsk_217_B_lup	16.3840
	7_gsk_217_TMU_lup	13.4108
8_gsk_951	8_gsk_951_A_lup	24.0437
	8_gsk_951_B_lup	17.0191
	8_gsk_951_C_lup	22.6699
9_gsk_437	9_gsk_437_A_lup	27.0189
	9_gsk_437_B_lup	15.7942
	9_gsk_437_C_lup	22.8042
	9_gsk_437_TMU_lup	13.2373
10_gsk_483	10_gsk_483_A_lup	23.4186
	10_gsk_483_B_lup	18.2416
	10_gsk_483_TMU_lup	26.1459
11_gsk_557	11_gsk_557_B_lup	15.8462
	11_gsk_557_C_lup	23.6216
12_gsk_405	12_gsk_405_A_lup	23.6787
	12_gsk_405_B_lup	20.9100
	12_gsk_405_TMU_lup	14.5600
13_gsk_335	13_gsk_335_A_lup	29.4490
	13_gsk_335_B_lup	17.4193
14_gsk_293	14_gsk_293_A_lup	25.5346
	14_gsk_293_B_lup	18.0248

	14_gsk_293_C_lup	23.8505
15_gsk_263	15_gsk_263_A_lup	25.7178
	15_gsk_263_B_lup	17.1153
	15_gsk_263_C_lup	22.4308
	15_gsk_263_TMU_lup	16.1831
16_gsk_759	16_gsk_759_A_lup	23.1514
	16_gsk_759_A1_lup	27.2736
	16_gsk_759_B_lup	20.2163
	16_gsk_759_C_lup	24.3435
17_gsk_863	17_gsk_863_A_lup	27.0946
	17_gsk_863_A1_lup	28.6327
	17_gsk_863_B_lup	16.1263
	17_gsk_863_C_lup	23.6324
	17_gsk_863_TMU_lup	13.4327
	17_gsk_863_TMU1_lup	13.1972
18_gsk_93	18_gsk_93_A_lup	25.6077
	18_gsk_93_B_lup	18.0211
	18_gsk_93_C_lup	22.6090
19_gsk_935	19_gsk_935_A_lup	27.1412
	19_gsk_935_A1_lup	27.5640
	19_gsk_935_B_lup	19.2534
	19_gsk_935_TMU_lup	12.6896
20_gsk_383	20_gsk_383_A_lup	23.4144
	20_gsk_383_B_lup	18.2962
	20_gsk_383_TMU_lup	26.1267
21_gsk_623	21_gsk_623_A_lup	23.0300
	21_gsk_623_B_lup	17.2562
	21_gsk_623_TMU_lup	14.3969
22_gsk_683	22_gsk_683_A_lup	21.8617
	22_gsk_683_A1_lup	24.3220
	22_gsk_683_B_lup	16.3009
23_gsk_71	23_gsk_71_A_lup	24.7087
	23_gsk_71_B_lup	18.4630
	23_gsk_71_B1_lup	19.7599
	23_gsk_71_C_lup	21.8521
24_gsk_907	24_gsk_907_B_lup	19.1733
	24_gsk_907_C_lup	23.2603
	24_gsk_907_C1_lup	23.4563
	24_gsk_907_TMU_lup	13.7561
	24_gsk_907_TMU1_lup	13.5055
25_gsk_977	25_gsk_977_A_lup	27.1704
	25_gsk_977_C_lup	23.6666
	25_gsk_977_TMU_lup	12.5566

26_gsk_601	26_gsk_601_A_lup	22.4013
	26_gsk_601_A1_lup	23.4854
	26_gsk_601_A2_lup	23.5589
	26_gsk_601_B_lup	16.5517
	26_gsk_601_C_lup	22.2949
	26_gsk_601_TMU_lup	13.9191
27_gsk_637	27_gsk_637_A_lup	28.0775
	27_gsk_637_B_lup	15.8893
	27_gsk_637_C_lup	23.1300
	27_gsk_637_TMU_lup	13.6654
28_gsk_829	28_gsk_829_A_lup	27.0359
	28_gsk_829_B_lup	18.8109
	28_gsk_829_C_lup	24.0751
29_gsk_113	29_gsk_113_A_lup	23.4173
	29_gsk_113_B_lup	18.8682
	29_gsk_113_C_lup	21.4653
30_gsk_877	30_gsk_877_A_lup	28.3840
	30_gsk_877_B_lup	15.4365
	30_gsk_877_TMU_lup	13.1133
31_gsk_29	31_gsk_29_A_lup	22.7839
	31_gsk_29_B_lup	20.3537
	31_gsk_29_C_lup	21.4930
	31_gsk_29_TMU_lup	14.3070

Πίνακας 6.3: Παράθεση των μεταλλάξεων που επιλέχθηκαν για κάθε αμινοξύ και των αντίστοιχων ενεργειών δέσμευσης που απέδωσαν οι εκ νέου δοκιμές docking

	Mutation	D. Af [kcal/mol]	Mutation	D. Af [kcal/mol]
5_gsk_53.pdb	Arg305->Lys	-7.4	->Gly	-7.5
D.Af=-8 kcal/mol	Ile310->Val	-7.8	->Ala	-7.5
	Phe311->Met	-7.8	->Asn	-7.8
(Περιοχή A)	Gly344->trp	-7.8	->Ser	-7.6
	Val345->Ile	-8.4	->Thr	-7.9
	Gln347->asn/thr	-8.0	->Phe	-8.0
	Tyr370->ser	-7.4	->Trp	-7.8
	Glu372->asp	-7.9	->His	-8.0
	Phe373->met	-7.4	->Gln	-7.4
21_gsk_623.pdb	val144->Ile	-9.8	->Thr	-9.4
D.Af=-9.7 kcal/mol	Gly147->Trp	-8.9	->Ser	-8.2
	Ser148->Thr	-9.6	->Gly	-9.5
(Περιοχή TMU)	Val152->Ile	-7.3	->Thr	-9.0
	Phe215->Met	-9.2	->Asn	-9.2
	Val216->Ile	-9.7	->Thr	-9.7
	Pro217->Gly	-9.5	->Asn	-9.7
	Gln267->Asn	-9.3	->Cys	-9.2
	Asp282->Glu	-10.0	->Arg	-8.4
25_gsk_977.pdb	Gly147->Trp	-7.0	->Asp	-7.0
D.Af=-7.9 kcal/mol	Phe149->Met	-7.6	->Ala	-7.4
	Tyr221->Ser	-7.6	->Trp	-7.6
(Περιοχή TMU)	Lys265->His	-7.9	->Tyr	-8.1
	Asn268->Gln/Ser	-7.9	->Pro	-7.7
	Gln267->Asn	-8.2	->Cys	-7.8
	Asp282->Glu	-8.1	->Thr	-9.3
	Ser301->Thr	-7.8	->Cys	-8.0

Από τις δοκιμές δεν παρατηρήθηκαν συνολικά μεγάλες αποκλίσεις στην ενέργεια πρόσδεσης που απέδωσαν οι δομές με μετάλλαξη εκτός από 2-3 περιπτώσεις, όπου φάνηκε να επηρεάζουν σε έναν βαθμό τη πρόσδεση της λουπεόλης. Υπήρξε όμως και μια περίπτωση, όπως το αμινοξύ Asp282, το οποίο για δύο διαφορετικές αντιπροσωπευτικές δομές έδειξε να επηρεάζει εμφανώς τη δέσμευση, αποδίδοντας εμφανή, είτε αύξηση είτε μείωση, στην ενέργεια πρόσδεσης. Αυτό υποδεικνύει έναν πιθανώς καθοριστικό ρόλο του συγκεκριμένου αμινοξέος στη πρόσδεση και θα μπορούσε να αποτελέσει “στόχο” για διερεύνηση σε επίπεδο εργαστηριακής πειραματικής διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι η λουπεόλη όντως μπορεί να δρα μέσω πρόσδεσής της στην GSK3-β κινάση στα φυτά, με τον παρόμοιο τρόπο με τον οποίο προσδέεται στην ομόλογη πρωτεΐνη από άνθρωπο. Τα αμινοξέα που εντοπίστηκαν ως σημαντικά για την πρόσδεση αυτή, θα αποτελέσουν στόχο για ένα πρόγραμμα σημειακών

μεταλλάξεων της πρωτεΐνης και διερεύνησης της ικανότητας σύνδεσης της λουπεόλης σε *in vitro* δοκιμές δραστηριότητας κινάσης. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία κατάλληλων μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης και υπερέκφρασής της σε φυτά.

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η λουπεόλη συμμετέχει σε σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού και πιο συγκεκριμένα δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της δημιουργίας φυματίων στις ρίζες του *Lotus japonicus* κατά την αλληλεπίδραση του φυτού με τον μικροσυμβιωτή *Mesorhizobium loti*. Διαγονιδιακά φυτά με μεταλλάξεις στην LSK1 (GSK3-β) θα χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση του πιθανού σηματοδοτικού ρόλου που έχει η λουπεόλη μέσω της πρόσδεσης της στην κινάση.

Βιβλιογραφία

- [1] Manning G, Whyte DB. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science* 298(5600): 1912–1934
- [2] Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E (1998). "Signaling by dual specificity kinases". *Oncogene* 17 (11 Reviews): 1447–55
- [3] Besant PG, Tan E, Attwood PV (2003). "Mammalian protein histidine kinases". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35(3): 297–309
- [4] Kameshita, I., Tsuge, T., Kinashi, T., Kinoshita, S., Sueyoshi, N., Ishida, A., Taketani, S., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Okazaki, K. (2003) "A new approach for the detection of multiple protein kinases using monoclonal antibodies directed to the highly conserved region of protein kinases". *Anal. Bio-chem.* 322, 215–224
- [5] Kameshita, I., Kinoshita, S., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Ishida, A., (2004) "Generation of a polyclonal antibody that simultaneously detects multiple Ser/Thr protein kinases". *J. Biochem. Biophys. Methods* 60, 13–22
- [6] Isamu Kameshita, Tetsuyuki Nishida, Satoko Nakamura, Yasunori Sugiyama, Noriyuki Sueyoshi, Yosuke Umehara, Mika Nomura and Shigeyuki Tajima. "Expression Cloning of a Variety of Novel Protein Kinases in *Lotus japonicus*". *J. Biochem.* 137, 33–39 (2005)
- [7] Younoussé Saidi, Timothy J. Hearn and Juliet C. Coates. "Function and evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like kinases". *Trends in Plant Science* January (2012), Vol. 17, No. 1
- [8] Peng Peng, Jun Zhao, Yongyou Zhu, Tadao Asami, and Jianming Li. "A Direct Docking Mechanism for a Plant GSK3-like Kinase to Phosphorylate Its Substrates" *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 285, NO. 32, pp. 24646–24653, August 6, (2010)
- [9] Li, J. et al. (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 14–22
- [10] Li, J. and Nam, K.H. (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295, 1299–1301
- [11] Perez-Perez, J.M. et al. (2002) The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Dev. Biol.* 242, 161–173
- [12] Choe, S. et al. (2002) *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3β-like kinase. *Plant Physiol.* 130, 1506–1515
- [13] Claudia Jonak, Dieter Beisteiner, John Beyerly, and Heribert Hirt. "Wound-Induced Expression and Activation of WIG, a Novel Glycogen Synthase Kinase 3" *The Plant Cell*, Vol. 12, 1467–1475, August (2000)

- [14] Margareth B. C. Gallo, Miranda J. Sarachine. "Biological Activities of Lupeol" *International Journal of Biochemical and Pharmaceutical Sciences* 3 (Special Issue 1), 46-66 (2009)
- [11] Mohammad Saleem "Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene" *Cancer Lett.* (2009) November 28; 285(2): 109–115
- [12] Mohammad Saleem, Farrukh Afaq, Vaqar Mustafa Adhami and Hasan Mukhtar. "Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice" *Oncogene* (2004) 23, 5203–5214 (2004)
- [13] Mohammad Saleemy, Imtiyaz Murtaza, Rohinton S. Tarapore, Yewseok Suh, Vaqar Mustafa Adhami, Jeremy James Johnson, Imtiaz Ahmad Siddiqui, Naghma Khan, Mohammad Asim, Bilal Bin Hafeez, Mohammed Talha Shekhani, Benyi Li and Hasan Mukhtar. "Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling". *Carcinogenesis* vol.30 no.5 pp.808–817, (2009)
- [14] Sahdeo Prasad, Nidhi Nigam, Neetu Kalra, and Yogeshwer Shukla. "Regulation of Signaling Pathways Involved in Lupeol Induced Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells" *MOLECULAR CARCINOGENESIS* 47:916–924 (2008)
- [15] Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* (2007);7:357–369. [PubMed: 17446857]
- [16] Setzer WN, Setzer MC. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem* (2003);3:540–56. [PubMed: 12871157]
- [17] Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* (2007);51:161–70. [PubMed: 17266177]
- [18]. Aratanechemuge Y, Hibasami H, Sanpin K, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T. Induction of apoptosis by Lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L.Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol Rep* (2004);11:289–292. [PubMed: 14719056]
- [19]. Cmoch P, Pakulski Z, Swaczynová J, Strnad M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr Res* (2008);343:995–1003. [PubMed: 18328468]
- [20]. Murtaza I, Saleem M, Adhami VM, Hafeez BB, Mukhtar H. Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* (2009);69:1156–65. [PubMed: 19176377]

- [21]. Fernández MA, de las Heras B, García MD, Sáenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol* (2001);53:1533–1539. [PubMed: 11732756]
- [22]. Geetha T, Varalakshmi P. Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *Gen Pharmacol* (1999);32:495–497. [PubMed: 10323491]
- [23]. Latha RM, Lenin M, Rasool M, Varalakshmi P. A novel derivative pentacyclic triterpene and omega 3 fatty acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2001);64:81–85. [PubMed: 11237474]
- [24]. Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Almeida JR, de Queiroz LP. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol* (2008);8:1216–1221. [PubMed: 18602067]
- [25] B.G. Harish, V. Krishna, H.S. Santosh Kumar, B.M. Khadeer Ahamed, R. Sharath, H.M. Kumara Swamy. "Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-b-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats". *Phytomedicine* 15 (2008) 763–767
- [26] I.D. Kuntz, *Structure- Based Strategies for Drug Design and Discovery*, Science Vol. 257, (1992)
- [27] J.S.Mason, *Computational screening: large-scale drug discovery, pharmainformatics*, Elsevier Science Ltd, (1999)
- [28] P.G. Mezey, *Computer Aided Drug Design: Some Fundamental Aspects*, *J.Mol.Model.*, Vol 6, pp. 150-157, (2000)
- [29] A.R.Leach, *Molecular Modelling: principles and applications*, Essex Longman, (1998)
- [30] J.Brickmann, T.E.Exner, M. Keil, R.J. Marhofer, *Molecular Graphics - Trends and Perspectives* , *J.Mol.Model.*, Vol 6, pp. 328-340, (2000)
- [31] Κυρίκου, Α.Κάπου, Θ.Μαυρομούστακος, Κ.Πούλος. "Μοριακά Μοντέλα: Ένα Ανεκτίμητο Εργαλείο στον Ορθολογιστικό Σχεδιασμό Φαρμάκων". *PHARMAKEFTTKI* 14, III, 109-123, (2001)
- [32] Christophe Chipot and Adrew Pohorille (Eds), "Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology", Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, (2007)
- [33] Raquel Dias and Walter Filgueira de Azevedo Jr. "Molecular Docking Algorithms" *Current Drug Targets*, (2008), 9, 1040-1047
- [34] Pierre Bongrand, "LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS" *Reports on Progress in Physics* 62:921-968 (1999)

- [35] Hernan Alonso, Andrey A. Bliznyuk, Jill E. Gready. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. Wiley InterScience (2006)
- [36] Dagmar Ringe. "What makes a binding site a binding site?" *Current Opinion in Structural Biology* 1995, 5:825-829
- [37] Inbal Halperin, Buyong Ma, Haim Wolfson, and Ruth Nussinov "Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions" *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 47:409–443(2002)
- [38] Sheng-You Huang, Xiaoqin Zou. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* (2010), 11, 3016-3034
- [39] R. D. Taylor, P.J. Jewsbury & J. W. Essex. "A review of protein-small molecule docking methods" *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16: 151–166, (2002).
- [40] A. Srinivas Reddy, S. Priyadarshini Pati, P. Praveen Kumar, H.N. Pradeep and G. Narahari Sastry. "Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective" *Current Protein and Peptide Science*, (2007), 8, 329-351
- [41] Douglas B. Kitchen, H?l?ne Decornez, John R. Furr and J?rgen Bajorath. "Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications" *NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY VOLUME 3* (2004)
- [42] Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William "Lindy" Lindstrom, Ruth Huey, Stefano Forli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson. "AutoDock Version 4.2, Updated for version 4.2.5, Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors" (2012)
- [43] O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461
- [44]. Abagyan R, Totrov M, Kuznetsov D. ICM - A new method for protein modeling and design -applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry* (1994) May;vol. 15:488–506.
- [45] UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem.* (2004) Oct;25(13):1605-12.
- [46] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten: VMD: Visual Molecular Dynamics *Journal of Molecular Graphics* (1996) 14:33-38.
- [47] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723

- [48] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003). "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server". *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3381–3385 [35]
- [49] Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201
- [50] Mark Nelson, William Humphrey, Attila Gursoy, Andrew Dalke Laxmikant Kale, Robert D. Skeel, Klaus Schulten: NAMD -a Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program. *The international Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*, Volume 10, No.4, (1996), pp.251-268