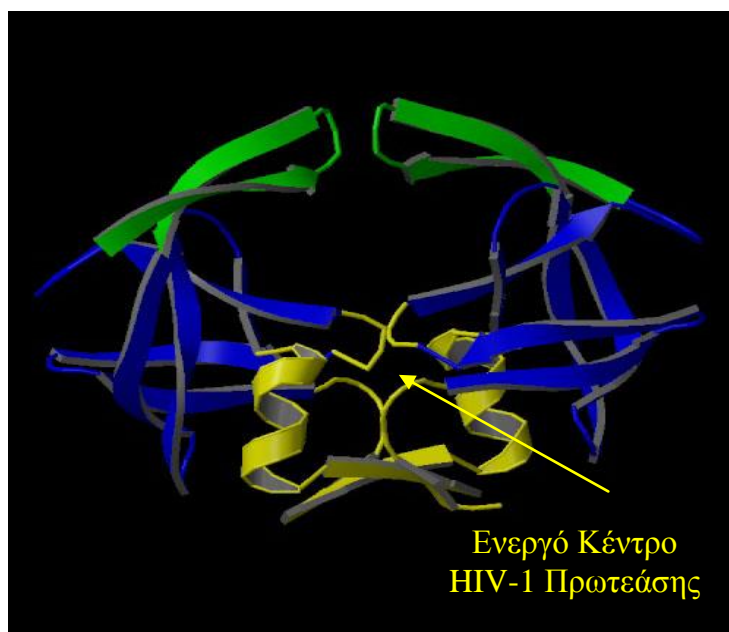


Η πρόσδεση με τον υποδοχέα κάποιου προσδέτη μοιάζει με τη σύνδεση δύο τμημάτων του παζλ. Τα δύο τμήματα του παζλ πρέπει να έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό, για να προσαρμόσουν. Έτσι και ο υποδοχέας με τον προσδέτη, για να προσαρμοσθούν, πρέπει να προσανατολιστούν με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασκήσουν τις ευνοϊκότερες στερεοηλεκτρονικές αλληλεπιδράσεις.

# I. Μοριακή Πρόσδεση

## 1. Εισαγωγή

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) ορίζεται ως η πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα (Y). Συνήθως ο υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη και ο προσδέτης είναι κάποιο μικρότερο μόριο, όχι αναγκαία πρωτεΐνη. Στους τομείς της βιολογίας και της βιοχημείας, η πρόσδεση του μορίου προσδέτη στον υποδοχέα επάγει συγκεκριμένο σήμα, που μεταφράζεται σε βιολογικό αποτέλεσμα. Έτσι, όταν μιλάμε για μόριο προσδέτη, εννοούμε κάποια ένωση, που συντίθεται από τον οργανισμό είτε κάποιο άλλο βιομόριο. Ωστόσο, στον τομέα της φαρμακοχημείας, ο προσδέτης περιορίζεται σε φαρμακευτικά μόρια (ΦΜ) ή εν δυνάμει φαρμακευτικά μόρια. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα σε μοριακό επίπεδο είναι ουσιαστική, προκειμένου να σχεδιασθούν καινοτόμα προϊόντα με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Δεδομένου ότι ο υποδοχέας είναι ένα μεγάλο μόριο (συνήθως πρωτεΐνη), είναι λογικό πως το ΦΜ θα προσδέεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του, η οποία ονομάζεται θήκη πρόσδεσης ή ενεργό κέντρο του υποδοχέα (Σχήμα 1).



**Σχήμα 9. 1:** Το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης HIV-1 ορίζεται ως μια συγκεκριμένη περιοχή στο κέντρο του υποδοχέα.

Η κινητήρια δύναμη, που ωθεί την πρόσδεση των φαρμακευτικών μορίων στον υποδοχέα, είναι οι στερεοηλεκτρονιακές τους ιδιότητες. Αυτές είναι που προσδιορίζουν εάν θα εξασκηθούν ελκτικές/απωστικές, στερικές ή ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Οι διάφορες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται, όταν τα φαρμακευτικά μόρια προσεγγίζουν τον υποδοχέα, είναι σημαντικές, γιατί στοχεύουν στη θεωρητική μελέτη και στο σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων, μέσω γνώσης της μοριακής βάσης μίας ασθένειας.

Στον τομέα της φαρμακοχημείας, έχουν αναπτυχθεί δύο ερευνητικές, δραστηριότητες, που μελετούν τις φυσικοχημικές παραμέτρους μεταξύ Υ-ΦΜ.

Η πρώτη ερευνητική δραστηριότητα αναφέρεται σε στατιστική επεξεργασία και εφαρμογή αλγόριθμων μοριακής υπέρθεσης και διαμορφωτικής ανάλυσης βάσεων δεδομένων, σχέσεων δομής δράσης, κατά τις οποίες ο υποδοχέας δεν είναι γνωστός. Με γνώση τη βιοδραστικότητα των υπό μελέτη φαρμακευτικών μορίων, εξάγονται συμπεράσματα για τα φαρμακοφόρα τους τμήματα, εφαρμόζοντας ένα συνδυασμό υπερθετικών και στατιστικών κριτηρίων. Αφού καθορισθούν οι κρίσιμοι φυσικοχημικοί παράμετροι αλληλεπίδρασης και οι δομικές απαιτήσεις του άγνωστου υποδοχέα, προτείνονται νέες δομές, οι οποίες θα πληρούν καλύτερα τις φυσικοχημικές απαιτήσεις πρόσδεσης.

Η δεύτερη ερευνητική δραστηριότητα αφορά την περίπτωση, όπου είναι γνωστή η διαμόρφωση του υποδοχέα από πειραματικές μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, μελέτες μοντελοποίησης με βάση κάποιο άλλο πρωτεϊνικό υποδοχέα ομολόγου σειράς. Η τελευταία περίπτωση εφαρμόζεται κυρίως σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς (π.χ. G-Protein Coupled Receptors, GPCRs), οι οποίοι είναι κατά κανόνα δύσκολο να κρυσταλλωθούν πειραματικά. Στην περίπτωση αυτή, η μελέτη πρόσδεσης πρέπει να γίνει σε ένα περιβάλλον, που προσομοιώνει τόσο τη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης, όσο και τον υποδοχέα. Η απουσία δεδομένων κρυστάλλωσης των συμπλόκων Υ-ΦΜ έχει ως αποτέλεσμα να αγνοούμε την ακριβή θέση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Στην περίπτωση αυτή, οι πληροφορίες που αντλούνται είναι μέσω *in vitro* πειραμάτων μετάλλαξης των αμινοξέων της πρωτεΐνης του υποδοχέα και μέσω λογισμικών ανίχνευσης πιθανών θέσεων πρόσδεσης πάνω σε έναν υποδοχέα.

Η εφαρμογή ενεργειακών υπολογισμών μπορεί να επιβεβαιώσει τις *in vitro* και *in vivo* βιολογικές μελέτες ή ακόμη και να εξηγήσει τα αποτελέσματά τους. Η γνώση του δραστικού κέντρου και των ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων Υ-ΦΜ βοηθάει

στον ορθολογικό σχεδιασμό μορίων, δηλαδή το σχεδιασμό που βασίζεται στην κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας.

Στο κεφάλαιο αυτό θα μελετήσουμε αρχικά τις δυνάμεις, που υφίστανται μεταξύ των μορίων του υποδοχέα και του προσδέτη και μπορούν να προκαλέσουν την αυθόρμητη σύμπλεξή τους. Στη συνέχεια, θα δούμε τα λογισμικά ανίχνευσης ενεργών κέντρων σε υποδοχείς. Τέλος θα αναφερθούμε στις βασικότερες κατηγορίες των λογισμικών πρόσδεσης. Θα μελετήσουμε τους μηχανισμούς λειτουργίας τους, τις ομοιότητες, αλλά και τις διαφορές τους.

## 2. Φυσικοχημική βάση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ), που χαρακτηρίζει την αλληλεπίδραση ενός φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα, είναι το άθροισμα των ηλεκτροστατικών (*EI-Electrostatic Interactions*), των επαγωγικών (*II-Inductive Interactions*), των μη-πολικών (*NPI-Non Polar Interactions*), και των υδροφοβικών (*HI-Hydrophobic Interactions*) αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μορίων, ελαττωμένο κατά τον όρο που εκφράζει την απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά τη σύνδεση των μορίων ( $\Delta G^*$ ).

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{EI} + \Delta G_{II} + \Delta G_{NPI} + \Delta G_{HI} - \Delta G^*$$

Ακολουθεί ανάλυση των αλληλεπιδράσεων, οι οποίες καθορίζουν την ελεύθερη ενέργεια μιας πρόσδεσης Υ-ΦΜ.

### 2.α. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Σε πρώτο στάδιο, όταν τα μόρια βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους, η δύναμη που τα έλκει είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Προκύπτει, δηλαδή, ως το αποτέλεσμα της έλξης μεταξύ των πυρήνων και των ηλεκτρονίων των δύο μορίων. Η ελκτική αυτή δύναμη οδηγεί σε δημιουργία τριών βασικών τύπων αλληλεπιδράσεων (μη-ομοιοπολικών), όπως η φορτίου-φορτίου, φορτίου-διπόλου και διπόλου-διπόλου. Από αυτές, οι φορτίου – φορτίου είναι οι πιο σημαντικές, αφού τα περισσότερα φαρμακευτικά μόρια περιέχουν ανιοντικά (καρβοξυλομάδες, ομάδες φωσφόρου), αλλά και κατιοντικά (αλειφατικές αμινομάδες) φαρμακοφόρα τμήματα σε φυσιολογικό pH, τα οποία αλληλεπιδρούν πολύ ισχυρά με αντίθετα φορτισμένες

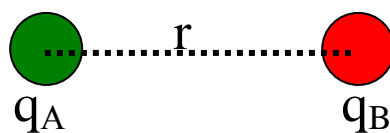
ομάδες του υποδοχέα. Οι αλληλεπιδράσεις φορτίου – φορτίου είναι όμως οι λιγότερο διαδεδομένες, αφού τα ελεύθερα φορτία τείνουν να εξουδετερωθούν από αντίθετα φορτισμένα ιόντα.

Οι αλληλεπιδράσεις φορτίου – διπόλου και διπόλου – διπόλου είναι ασθενέστερες από τους ιοντικούς δεσμούς, αλλά περισσότερο διαδεδομένες, γιατί εφαρμόζονται σε κάθε μόριο, του οποίου τα άτομα έχουν διαφορετική τιμή ηλεκτραρνητικότητας.

Μια ποσοτική εκτίμηση της δυναμικής ενέργειας σε οποιαδήποτε αλληλεπίδραση ηλεκτροστατικής φύσης, δίνεται από τη σχέση (9.1), η οποία παράγεται με χρήση του νόμου του Coulomb (Σχήμα 9.2). Η σχέση αυτή μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και σε πολικές αλληλεπιδράσεις.

$$E \propto \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad \text{Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση.} \quad (9.1)$$

$q_i$  και  $q_j$  είναι δύο φορτία σε απόσταση  $r_{ij}$  και  $D$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, που παρεμβάλλεται μεταξύ των φορτίων.



**Σχήμα 9.2:** Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση φορτίου – φορτίου

Από την εξίσωση (1) προκύπτει ότι η δύναμη της ιοντικής αλληλεπίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογη της απόστασης μεταξύ των δύο φορτίων και ανεξάρτητη από τον προσανατολισμό των δύο ιόντων, κάτι που δεν συμβαίνει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διπόλων, αφού ο προσανατολισμός τους καθορίζει, αν η δύναμη θα είναι ελκτική ή απωστική.

Από την ίδια εξίσωση προκύπτει επίσης ότι αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από τη διηλεκτρική σταθερά  $D$  του περιβάλλοντος μέσου. Οι χαρακτηριστικές τιμές της σταθεράς αυτής δίνονται στον Πίνακα I.

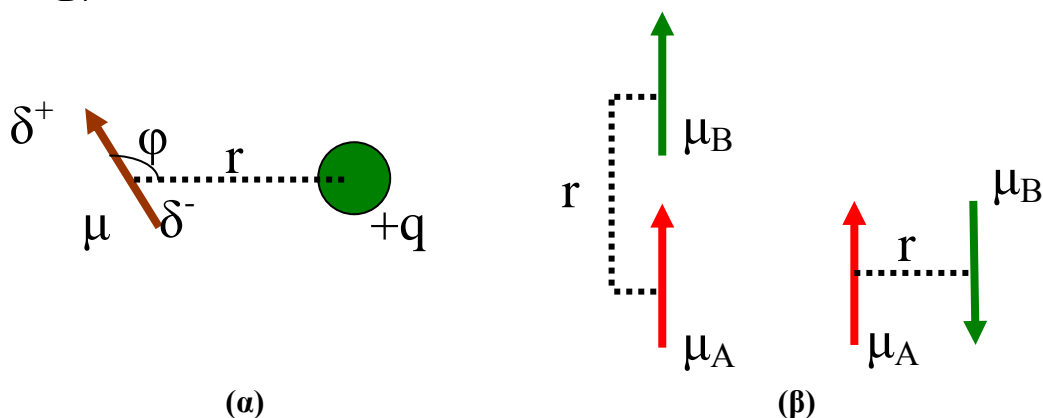
**Πίνακας 9.1:** Διηλεκτρικές σταθερές για περιβάλλοντα μέσα

<i>Διηλεκτρική σταθερά D</i>	<i>Περιβάλλον μέσο</i>
1	Αέρια φάση
4	Υδρόφοβο περιβάλλον
28	Αλληλεπιδράσεις στην επιφάνεια πρωτεΐνης.
80	Υδατικό περιβάλλον

Στην περίπτωση αλληλεπίδρασης φορτίου - διπόλου, η σχέση (9.1) μετασχηματίζεται στην (9.2), όπου  $z$  είναι το σθένος του ιόντος,  $\mu$ : η διπολική ροπή,  $r$ : η απόσταση μεταξύ του ιόντος και του κέντρου του διπόλου και  $\phi$ : η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ του διπόλου και της ευθείας, που ενώνει το ιόν με το κέντρο του διπόλου (Σχήμα 9.2(α)). Η αντίστοιχη σχέση για τις αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου είναι η (9.3), όπου  $r$ : η απόσταση μεταξύ των κέντρων των διπόλων και  $A$ : μια γεωμετρική σταθερά, που εξαρτάται από τον σχετικό προσανατολισμό των δύο διπόλων. Η ελκτική αλληλεπίδραση μεταξύ δύο διπόλων, προσανατολισμένων στην ίδια ευθεία (head to tail), είναι δύο φορές ισχυρότερη ( $A=2$ ), σε σχέση με την περίπτωση προσανατολισμού τους σε παράλληλες θέσεις.

$$E \propto \frac{z\mu}{Dr^2} \cos \phi \quad \text{Αλληλεπίδραση Φορτίου-Διπόλου} \quad (9.2)$$

$$E \propto \frac{A\mu_A\mu_B}{Dr^3} \quad \text{Αλληλεπίδραση Διπόλου-Διπόλου} \quad (9.3)$$



**Σχήμα 9.3:** (α) Αλληλεπίδραση φορτίου – διπόλου και (β) αλληλεπίδραση διπόλου – διπόλου, αριστερά στην περίπτωση που τα δίπολα βρίσκονται στην ίδια ευθεία (head to tail) και δεξιά σε παράλληλες θέσεις.

## 2.β. Επαγόμενες αλληλεπιδράσεις

Ο σχηματισμός του συμπλέγματος μεταξύ του φαρμάκου και του υποδοχέα, συνήθως ακολουθείται από ανακατανομή φορτίου, είτε στο φαρμακευτικό μόριο ή στον υποδοχέα (φαινόμενο επαγόμενης πόλωσης), ή μεταξύ των δύο μορίων (φαινόμενο μεταφοράς φορτίου). Και στις τρεις περιπτώσεις η προκαλούμενη αλληλεπίδραση είναι πάντα ελκτική.

Η επαγόμενη πόλωση εμφανίζεται τη στιγμή, που ένα άπολο (ουδέτερο) άτομο ή μόριο βρεθεί στο πεδίο, που δημιουργείται από ένα μονίμως φορτισμένο ιόν ή δίπολο. Τότε ισχύει η σχέση  $\mu_{\text{επ}} = \alpha \mathbf{E}$  (9.4),

όπου  $\mu_{\text{επ}}$  η επαγόμενη διπολική ροπή,  $\alpha$  η σταθερά της μοριακής πολωσιμότητας και  $\mathbf{E}$  το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

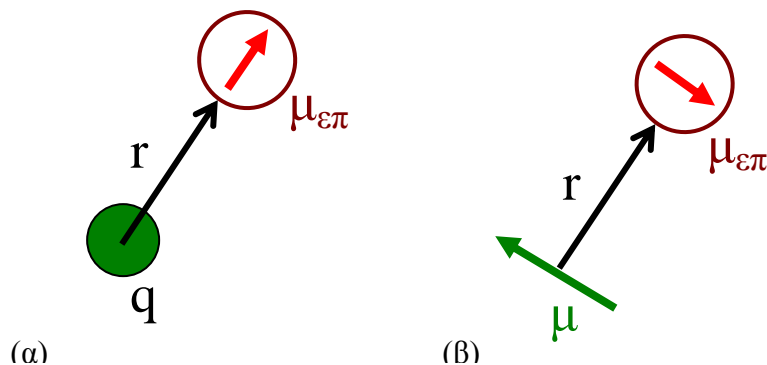
Για τα απομονωμένα άτομα, η σταθερά πολωσιμότητας είναι ισοτροπική. Δεν εξαρτάται από τον προσανατολισμό του ατόμου σε σχέση με το πεδίο. Έτσι το επαγόμενο δίπολο βρίσκεται στην κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. Ωστόσο, η σταθερά πολωσιμότητας ενός μορίου είναι συνήθως ανισοτροπική. Αυτό σημαίνει ότι ο προσανατολισμός του επαγόμενου διπόλου δεν είναι απαραίτητα στην ίδια διεύθυνση με του ηλεκτρικού πεδίου. Η πολωσιμότητα ενός μορίου συνήθως θεωρείται ως σύστημα ισοτροπικών πολωμένων ατόμων ή ως ένα ισοτροπικό πολωμένο κέντρο.

Η συνεισφορά της επαγόμενης πόλωσης στη συνολική δυναμική ενέργεια δίνεται από την εξίσωση (9.5), στην περίπτωση που η πόλωση προκαλείται από ιόν και από την εξίσωση (9.6), όταν προκαλείται από δίπολο (Σχήμα 9.4).

$$E \propto \frac{\alpha z^2}{D^2 r^4} \quad \text{Επαγόμενη αλληλεπίδραση από ιόν} \quad (9.5)$$

$$E \propto \frac{A \alpha \mu^2}{D^2 r^6} \quad \text{Επαγόμενη αλληλεπίδραση από δίπολο} \quad (9.6)$$

όπου A: γεωμετρικός παράγοντας που σχετίζεται με τον προσανατολισμό των διπόλων.



**Σχήμα 9.4:** Επαγόμενη αλληλεπίδραση (α) φορτίου - διπόλου και (β) διπόλου – διπόλου

Η τιμή της μοριακής πολωσιμότητας (molecular polarizability), και στις δύο εξισώσεις, καθορίζεται με μετρήσεις της μοριακής διάθλασης, και ο γεωμετρικός παράγοντας εξαρτάται από τον σχετικό προσανατολισμό των διπόλων.

Το φαινόμενο μεταφοράς φορτίου λαμβάνει χώρα, όταν ένας δότης ηλεκτρονίων πλησιάσει αρκετά έναν δέκτη, ώστε να πραγματοποιηθεί μεταφορά ηλεκτρονίου από το μοριακό τροχιακό υψηλότερης ενέργειας (του δότη) σε κενό μοριακό τροχιακό χαμηλότερης ενέργειας (του δέκτη). Η ενέργεια αυτή εξαρτάται – σε εκθετικό βαθμό- από την απόσταση μεταξύ των ατόμων και σχετίζεται με τον προσανατολισμό της αλληλεπικάλυψης των τροχιακών.

## 2.γ. Μή-πολικές αλληλεπιδράσεις

Συνήθως οι ηλεκτροστατικές και οι επαγωγικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε πολικά μόρια. Ισχυρές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται και μεταξύ άπολων μορίων, ιδιαίτερα όταν αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρές αποστάσεις μεταξύ τους.

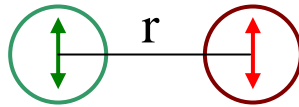
Οι δυνάμεις London ή διασποράς, είναι ατομικές ελκτικές δυνάμεις, οι οποίες συγκρατούν τα μη πολικά μόρια στην υγρή φάση. Η ύπαρξή τους οφείλεται στο γεγονός ότι ακόμη και τα άπολα μόρια, σε δεδομένες στιγμές, εμφανίζουν διπολική ροπή, λόγω της κίνησης των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα. Τέτοια στιγμιαία δίπολα επηρεάζουν τα γειτονικά μόρια, δημιουργώντας αντίθετα φορτισμένα δίπολα με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ελκτική δύναμη. Οι δυνάμεις αυτές (διασποράς), αν και είναι ασθενείς από μόνες τους, συνεισφέρουν συνολικά σε σημαντικό βαθμό στην πρόσδεση του φαρμάκου στον υποδοχέα, όταν η απόσταση μεταξύ των δύο μορίων είναι πολύ μικρή (Σχήμα 9.5). Συγκεκριμένα, η ενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκτης δύναμης της απόστασης μεταξύ των άπολων μορίων. Μια ποσοτική



εκτίμηση της ενέργειας αυτού του είδους της αλληλεπίδρασης, δίνεται από τη σχέση (6).

$$E \propto \frac{a_1 a_2}{r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \quad \text{Μή πολικές αλληλεπιδράσεις} \quad (9.7)$$

όπου  $I_1$  και  $I_2$  είναι τα δυναμικά ιονισμού των ομάδων, που αλληλεπιδρούν, και  $a_1, a_2$  οι σταθερές μοριακής πολωσιμότητας των μορίων.



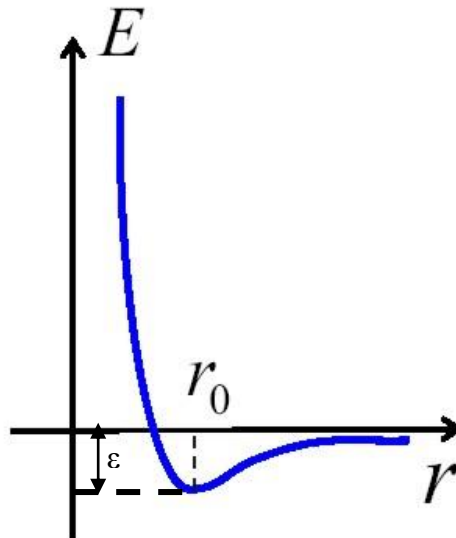
**Σχήμα 9.5:** Δημιουργία επαγόμενου διπόλου

Για τα άπολα μόρια, η ισορροπία μεταξύ των ελκτικών δυνάμεων διασποράς και των απωστικών δυνάμεων μικρού βεληνεκούς, προσδιορίζεται από το δυναμικό Buckingham (6-exp), που δίνεται από την εξίσωση (9.8), αλλά και από το δυναμικό Lennard-Jones, που δίνεται από την εξίσωση (Γ), (Σχήμα 9.6).

$$E = \frac{Ae^{(Br)}}{r^D} - \frac{C}{r^6} \quad \text{Δυναμικό Buckingham} \quad (9.8)$$

$$E = \frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6} \quad \text{Δυναμικό Lennard-Jones} \quad (9.9)$$

όπου  $A = \epsilon r_0^{12}$  και  $C = 2\epsilon r_0^6$ ,  $\epsilon$ : βάθος του φρέατος δυναμικού και  $r_0$ : απόσταση ισορροπίας.



**Σχήμα 9.6:** Γραφική παράσταση του δυναμικού Lennard-Jones σε συνάρτηση με την απόσταση. Με  $r_0$  συμβολίζεται η απόσταση ισορροπίας και  $\epsilon$ , το βάθος του φρέατος δυναμικού.

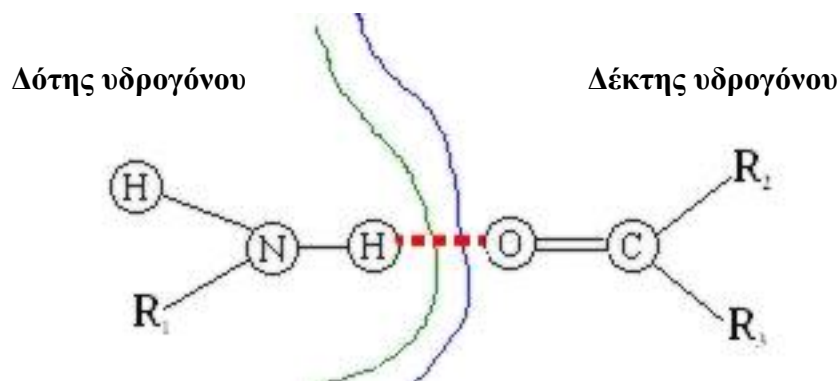
Η εξισορρόπηση των ελκτικών δυνάμεων, που περιγράφηκαν παραπάνω, γίνεται από τις απωστικές δυνάμεις μικρού βεληνεκούς, που αναπτύσσονται από την επικάλυψη των ηλεκτρονιακών νεφών δύο οποιωνδήποτε ατόμων ή μορίων. Η δυναμική ενέργεια αυξάνει εκθετικά όσο οι πυρήνες των ατόμων πλησιάζουν, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια απόσταση ισορροπίας ( $r_0$ ) ενεργειακά ευνοούμενη. Η απόσταση αυτή μπορεί να υπολογιστεί από κρυσταλλογραφικά δεδομένα και αντιπροσωπεύει το άθροισμα των Van der Waals ακτίνων των δύο εμπλεκόμενων ατόμων (Πίνακας II).

**Πίνακας 9.2:** Απόσταση μεταξύ δύο ατόμων όπως υπολογίζεται από κρυσταλλογραφικά δεδομένα

<i>Αλληλεπίδραση</i>	<i>A (kJ-nm<sup>12</sup>/mol)</i>	<i>C (kJ-nm<sup>6</sup>/mol)</i>	<i>r<sub>0</sub> (nm)</i>
H·····H	$1,84 \times 10^{-8}$	$1,92 \times 10^{-4}$	0,240
H·····C	$1,57 \times 10^{-7}$	$5,27 \times 10^{-4}$	0,290
H·····N	$1,11 \times 10^{-7}$	$5,15 \times 10^{-4}$	0,275
H·····O	$1,03 \times 10^{-7}$	$5,11 \times 10^{-4}$	0,272
H·····P	$6,35 \times 10^{-7}$	$1,43 \times 10^{-3}$	0,310
C·····C	$1,18 \times 10^{-6}$	$1,52 \times 10^{-3}$	0,340
C·····N	$8,90 \times 10^{-7}$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,325
C·····O	$8,49 \times 10^{-7}$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,322
C·····P	$4,49 \times 10^{-6}$	$4,12 \times 10^{-3}$	0,360
N·····N	$6,63 \times 10^{-7}$	$1,50 \times 10^{-3}$	0,310
N·····O	$6,30 \times 10^{-7}$	$1,50 \times 10^{-3}$	0,307
N·····P	$3,44 \times 10^{-6}$	$4,08 \times 10^{-3}$	0,345
O·····O	$5,97 \times 10^{-7}$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,304
O·····P	$3,28 \times 10^{-6}$	$4,10 \times 10^{-3}$	0,342
P·····P	$1,68 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-2}$	0,380

## 2.δ. Δεσμοί Υδρογόνου

Αυτό το είδος των δεσμών ουσιαστικά σταθεροποιεί το σύμπλεγμα Υ-ΦΜ, όταν ένας δέκτης υδρογόνου του ενός μορίου βρεθεί κοντά σε έναν δότη υδρογόνου του άλλου μορίου (Σχήμα 9.7).



**Σχήμα 9.7:** Όταν η πρόσδεση των μορίων επιτευχθεί, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του δότη υδρογόνου του ενός μορίου (N στο Σχήμα) και του δέκτη υδρογόνου (O στο Σχήμα), του άλλου μορίου.

Ορισμένες ενώσεις, που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, όπως η περίπτωση του ιόντος  $\text{HF}_2^-$ , μπορούν να θεωρηθούν ως δομές, στις οποίες και τα δύο ηλεκτραρνητικά άτομα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με ένα άτομο υδρογόνου. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, μόνο ένα από τα ηλεκτραρνητικά άτομα είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το υδρογόνο, και το συνολικό φαινόμενο εξηγείται ως ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Επομένως, η συνεισφορά του κάθε δεσμού υδρογόνου ξεχωριστά μπορεί να υπολογιστεί από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή από τη διπολική ροπή των ομάδων, που αλληλεπιδρούν χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις (9.1) ή (9.3). Ενεργειακές μελέτες με εμπειρικούς υπολογισμούς πειραματικών δομών αμιδίων και καρβοξυλικών οξέων δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση των δεσμών υδρογόνου σε κρυστάλλους, υπολογίζεται επαρκώς από τις ηλεκτροστατικές και τις van der Waals δυνάμεις. Έτσι, δεν απαιτείται κάποιος επιπλέον όρος στη συνολική εξίσωση για την συνεισφορά τους. Ορισμένα θεωρητικά μοντέλα συμπεριλαμβάνουν, ωστόσο, μια πιο περίπλοκη συνάρτηση για τον δεσμό υδρογόνου, η οποία εξαρτάται από τις γεωμετρικές συντεταγμένες του δέκτη και δότη υδρογόνου [105,106].

Στα βιολογικά συστήματα, οι πιο σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου αφορούν τα άτομα οξυγόνου των καρβοξυλομάδων, των υδροξυλομάδων και των

καρβονυλομάδων, καθώς και του αζώτου των αμινομάδων, των ιμινο- και αμιδομάδων. Τέτοιοι δεσμοί υδρογόνου είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων, καθώς και για την πρόσδεση πολλών φαρμακευτικών μορίων σε υποδοχείς. Οι ισχυρότεροι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μεταξύ ομάδων με ισχυρή ηλεκτροστατική συμπεριφορά. Έτσι για παράδειγμα, τα καρβοξύλια αποτελούν καλύτερους δέκτες από τα αμίδια, τις κετόνες ή τα μή ιονισμένα καρβοξύλια, ενώ τα υποκατεστημένα ιόντα αμμωνίου είναι καλύτεροι δότες από τα μή υποκατεστημένα.

Όπως προκύπτει από ανασκόπηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων για αμινοξέα και μικρά πεπτίδια, οι πρωτονιομένες ιστιδίνες σχηματίζουν εξαιρετικά ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, ενώ αρνητικά φορτισμένα ασπαραγινικά και γλουταμινικά τμήματα σχηματίζουν το καθένα κατά μέσο όρο 4 δεσμούς υδρογόνου.

Σε μια ανάλυση της πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων (Brookhaven Protein Databank) αναφορικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων, αποδεικνύεται πως οι καρβοξυλομάδες προσδέονται στον υποδοχέα με 2 τρόπους. Ο πρώτος, περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με τη γουανιδινομάδα της αργινίνης και ο δεύτερος, μια πλευρική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ατόμου οξυγόνου του καρβοξυλίου και ενός ατόμου αζώτου από τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε ταύτιση με άλλες μελέτες, που αποδεικνύουν τη σπουδαιότητα της σχέσης καρβοξυλομάδων-αργινίνης στην αλληλεπίδραση φαρμακευτικού μορίου-υποδοχέα.

## **2.ε. Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις**

Όταν ένα άπολο μόριο τοποθετηθεί σε νερό, δημιουργούνται δυνάμεις μεταξύ των μορίων του νερού γύρω από το διαλυμένο μόριο, οι οποίες αντισταθμίζουν τις πιο αδύναμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του νερού και της διαλυμένης σε αυτό ουσίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξανόμενη συγκέντρωση μορίων νερού γύρω από την διαλυμένη ουσία, που –συμπερασματικά- οδηγεί σε αρνητική εντροπία διάλυσης. Η ελάττωση της εντροπίας είναι ανάλογη της μη πολικής επιφάνειας του μορίου. Η σύνδεση δύο μη πολικών μορίων στο νερό ελαττώνει τη συνολική επιφάνεια, που έρχεται σε επαφή με το διαλύτη, παρέχοντας μια ευνοϊκή εντροπία για τη σύνδεσή τους.

Η υδρόφοβη επίδραση μπορεί να υπολογιστεί με θεωρητικούς υπολογισμούς στατιστικής μηχανικής ή με προσομοιώσεις της ελεύθερης ενέργειας, αλλά και με εμπειρικό τρόπο από μετρήσεις της διαλυτότητας απλών υδρογονανθράκων σε νερό, των οποίων οι δομές αποτελούν τμήματα των περισσότερων φαρμακευτικών μορίων.

Η ελεύθερη ενέργεια, που απαιτείται για τη μεταφορά υδρογονανθράκων από υδατικό σε υδρόφοβο περιβάλλον κατά την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα, κυμαίνεται μεταξύ 0,1 - 0,2 kJ mol<sup>-1</sup> για κάθε τετραγωνικό Å της προσβάσιμης από τα μόρια του διαλύτη επιφάνειας υδρογονάνθρακα. Αν και η ενέργεια αυτή είναι ιδιαίτερος μικρή, η συνολική συνεισφορά των υδρόφοβων δεσμών στην αλληλεπίδραση φαρμακευτικού μορίου- υποδοχέα είναι ουσιαστική.

## **2.στ. Παράγοντες που συντελούν στην ελάττωση της αυθόρμητης σύμπλεξης Υ-ΦΜ**

Εκτός από τις ελκτικές δυνάμεις που συζητήθηκαν πιο πάνω και συντελούν στην συνολική ενέργεια της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-υποδοχέα, υπάρχουν και διεργασίες, οι οποίες ελαττώνουν το αυθόρμητο της αλληλεπίδρασης αυτής. Οι διεργασίες, αυτές μπορούν να είναι εντροπικές ή ενθαλπικές. Συγκεκριμένα, μερικές από αυτές βασίζονται στην μείωση της εντροπίας ( $\Delta S < 0$ ), όπως από την απώλεια της ελευθερίας της περιστροφής, της μεταφοράς και της διαμόρφωσης, που συνοδεύουν τον υποδοχέα και το φαρμακευτικό μόριο, που συμπλέκονται. Άλλες βασίζονται στην αύξηση της ενθαλπίας ( $\Delta H > 0$ ), όπως αυτές που εμπλέκονται στην επίτευξη της διαμόρφωσης με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης, ή στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ των μορίων του διαλύτη και των πολικών φαρμακοφόρων τμημάτων του φαρμάκου.

Ο σχηματισμός οποιουδήποτε συμπλέγματος φαρμάκου-υποδοχέα ακολουθείται από την αντικατάσταση των τριών βαθμών ελευθερίας περιστροφής και των τριών βαθμών ελευθερίας μεταφοράς του φαρμακευτικού μορίου με τους έξι βαθμούς ελευθερίας δόνησης του συμπλέγματος. Για ένα τυπικό σύμπλεγμα, η εκτιμώμενη αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια, λόγω της απώλειας της εντροπίας κατά την πρόσδεση στους 37 °C, κυμαίνεται από 12 kJ mol<sup>-1</sup> για μια χαλαρή πρόσδεση, έως τα 60 kJ mol<sup>-1</sup> για ένα ιδιαίτερα σταθερό σύμπλεγμα.

Από παρατηρήσεις της μεταβολής της εντροπίας σε αντιδράσεις κυκλοποίησης, υπολογίζεται πως ο βαθμός συνεισφοράς των διαμορφωτικών περιορισμών στην ελάττωση της εντροπίας είναι 5-6 kJ mol<sup>-1</sup> για κάθε εσωτερική περιστροφή, και εξαρτάται από το πόσο σταθερό είναι το σχηματισμένο σύμπλεγμα μεταξύ του φαρμάκου και του υποδοχέα. Στην περίπτωση άκαμπτων μορίων, για τα οποία δεν υπάρχει απώλεια εντροπίας λόγω διαμορφωτικών περιορισμών κατά την πρόσδεση, η σύμπλεξη είναι πιο αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ).

Οι διαμορφώσεις του υποδοχέα ή του φαρμακευτικού μορίου κατά την πρόσδεση μπορεί να είναι:

- (i) Υψηλής ενέργειας,
- (ii) Χαμηλής ενέργειας (τοπικό ελάχιστο),
- (iii) Χαμηλότερης ενέργειας (ολικό ελάχιστο).

Στις πρώτες δύο περιπτώσεις, όπως είναι κατανοητό, θα παρατηρηθεί ελάττωση στο αυθόρμητο της ικανότητας σύμπλεξης σε σχέση με την τελευταία περίπτωση, όπου ο παράγοντας της διαμόρφωσης δεν αποτελεί συντελεστή ελάττωσης του αυθόρμητου της σύμπλεξης Y-ΦΜ. Τα παραπάνω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα III.

**Πίνακας 9.3:** Περιπτώσεις ελάττωσης του βαθμού αυθόρμητης σύμπλεξης Y-ΦΜ

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$	
<b>Ενθαλπικοί παράγοντες που οδηγούν στη <math>\Delta H &gt; 0</math></b>	<b>Εντροπικοί παράγοντες που οδηγούν στη <math>T\Delta S &lt; 0</math></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τα μόρια συμπλέκονται με διαμορφώσεις υψηλής ενέργειας.</li> <li>• Διάσπαση δεσμού διαλύτη ή φαρμακοφόρων τμημάτων του μορίου.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περιστροφικοί περιορισμοί διαλύτη ή φαρμακοφόρων τμημάτων που συμπλέκονται.</li> <li>• Μεταφορικοί περιορισμοί διαλύτη ή φαρμακοφόρων τμημάτων που συμπλέκονται.</li> <li>• Διαμορφωτικοί περιορισμοί διαλύτη ή φαρμακοφόρων τμημάτων που συμπλέκονται.</li> </ul>

### 3. Η ολική ενέργεια της διαμοριακής αλληλεπίδρασης

Όπως προαναφέρθηκε, η ολική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G$ , που προκύπτει από μια αλληλεπίδραση φαρμάκου – υποδοχέα, είναι το άθροισμα των μεταβολών των ελεύθερων ενεργειών που σχετίζονται με όλες τις ηλεκτροστατικές, επαγωγικές, μη πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μείον τις απώλειες ενέργειας, οι οποίες οφείλονται σε ενθαλπικούς ή εντροπικούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να υπολογιστούν συγκριτικά, με χρήση των εξισώσεων που δόθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους. Άλλοι, όπως είναι οι εντροπικοί, είναι πιο πολύπλοκοι και συνήθως υπολογίζονται εμπειρικά.

Υπολογισμοί της συνολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης, πραγματοποιούνται σχεδόν σε κάθε επίπεδο σύμπλεξης του μορίου με τον υποδοχέα. Οι υπολογισμοί αυτοί μπορούν να βασίζονται στην υπόθεση ότι οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ατόμων του φαρμάκου και του υποδοχέα γίνονται απαγορευτικές, όταν η απόσταση μεταξύ των ατόμων είναι μικρότερη από το άθροισμα των van der Waals ακτίνων τους. Τα άτομα στους υπολογισμούς αυτούς θεωρούνται ως άκαμπτες σφαίρες (*hard sphere calculations*) και παρέχουν μια στατική εικόνα της ηλεκτροστατικής διασποράς και άπωσης, μεταξύ των θεωρούμενων άκαμπτων ατόμων ή μορίων (*rigid body calculations*). Μπορεί επίσης στους υπολογισμούς να λαμβάνονται υπόψη οι διαμορφωτικές μεταβολές (ύπαρξη ευκαμψίας στα άτομα του μορίου) κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης και να συμπεριλαμβάνουν πληροφορίες για τον ρόλο των μορίων του διαλύτη στην αλληλεπίδραση (*flexible body calculations*).

Στο επόμενο στάδιο της σύμπλεξης του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα, πραγματοποιούνται υπολογισμοί μοριακής δυναμικής, σε μια προσπάθεια κάλυψης του εύρους των εναλλακτικών προσδέσεων. Παρέχεται με αυτόν τον τρόπο εκτίμηση των αντίστοιχων εντροπιών της αλληλεπίδρασης. Τεχνικές διατάραξης της ελεύθερης ενέργειας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μεταξύ δύο φαρμακευτικών μορίων και ενός κοινού υποδοχέα ή μεταξύ των ίδιων φαρμακευτικών μορίων και του διαλύτη.

Μια ολοκληρωμένη θεωρητική περιγραφή όλων των ενεργειών, που συμμετέχουν και περιγράφηκαν παραπάνω, θα απαιτούσε κβαντομηχανική προσέγγιση όλου του συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της επίλυσης της χρονικά

εξαρτώμενης εξίσωσης Schrödinger για το φαρμακευτικό μόριο, τον υποδοχέα, τον περιβάλλοντα διαλύτη και όποιες άλλες τυχόν διαλυμένες ουσίες. Η τελική ελεύθερη ενέργεια της αλληλεπίδρασης θα ήταν άμεσα συγκρίσιμη με την παρατηρούμενη σταθερά διαχωρισμού (dissociation constant) για την αλληλεπίδραση φαρμάκου-υποδοχέα. Είναι αμφίβολο ωστόσο, εάν υπάρχει πραγματικό όφελος, στην εφαρμογή του 3D QSAR ή του Μοριακού Σχεδιασμού, η επιδίωξη του υπολογισμού των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων σε τόσο προχωρημένο επίπεδο πολυπλοκότητας. Στην πραγματικότητα δεν ενδιαφέρει το πόσο συνεισφέρει ο ένας ή ο άλλος τύπος δεσμού στην διαμοριακή αλληλεπίδραση, αλλά το πόσο αυξάνεται η ικανότητα πρόσδεσης του φαρμάκου στον υποδοχέα, κατά την τροποποίηση των φαρμακοφόρων τμημάτων του φαρμακευτικού μορίου.

## **II. Λογισμικά χαρτογράφησης των ενεργών κέντρων του υποδοχέα**

### **1. Εισαγωγή**

Για τον προσδιορισμό των ενεργών κέντρων του υποδοχέα, έχουν αναπτυχθεί αρκετά λογισμικά, τα οποία στηρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες. Στην πρώτη, η δομή της πρωτεΐνης είναι γνωστή, αλλά η ενεργός θέση πρόσδεσης είναι άγνωστη. Στη δεύτερη και πολύ πιο περίπλοκη περίπτωση, γίνεται αναζήτηση μιας εναλλακτικής θέσης, διαφορετικής από τη γνωστή θέση πρόσδεσης, η οποία προσφέρει έναν πιθανό νέο στόχο πάνω στην ίδια πρωτεΐνη.

Συνοπτικά, για την αναγνώριση των πιθανών ενεργών κέντρων του υποδοχέα χρησιμοποιούνται τεχνικές ώστε:

- Να αναγνωρισθούν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.
- Να υπολογισθεί η επιφάνεια επαφής των μορίων του διαλύτη με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα.
- Να υπολογισθεί ο όγκος και το βάθος της κοιλότητας ή σχισμής των τμημάτων πρόσδεσης.
- Να απεικονισθούν στο χώρο τα τμήματα πρόσδεσης.



## 2. Μέθοδοι υπολογισμού του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικών υποδοχέων

Υπάρχουν τέσσερις κυρίως τρόποι για την ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης των υποδοχέων. Ο *πρώτος* (αναλύεται εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα) βασίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων του υποδοχέα (homology-based) και έχουν ήδη συσταθεί πολλές βάσεις δεδομένων (Πίνακας IV), ο *δεύτερος* στη μέθοδο της *επιδιαλύτωσης* (solvation-based), ο *τρίτος* στην μέθοδο *πλέγματος* (grid-based) και ο *τέταρτος* στη μέθοδο των *ψευδοϋποδοχέων* (pseudoreceptor). Ο Πίνακας V παρέχει συνοπτικά τα λογισμικά, που διατίθενται για την εύρεση των θέσεων πρόσδεσης του υποδοχέα, ανάλογα με τη μέθοδο που εκτελούν.

**Πίνακας 9.4:** Πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων για την εύρεση των δραστικών κέντρων των υποδοχέων

<i>Βάση δεδομένων</i>	<i>Σύγκριση</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>
CATH	Πρωτεϊνική λειτουργία	[111]
CAVBASE	Πρωτεϊνικές κοιλότητες	[107]
Entrez Structure	Πρωτεϊνική αλληλουχία και δομή	[112]
FSSP	Πρωτεϊνική δομή	[113]
ProMax	Πρωτεϊνική δομή	[114]
RELIBASE	Σύμπλεγμα πρωτεΐνης-μορίου προσδέτη	[115]

**Πίνακας 9.5:** Λογισμικά μοντελοποίησης του ενεργού κέντρου του υποδοχέα

<i>Μέθοδος</i>	<i>Λογισμικό</i>
<i>Επιδιαλύτωσης</i>	DynaPharm MOLCAD PASS (Putative Active Site with Spheres) SiteID
<i>Πλέγματος</i>	Cerius-LigandFit

	<p>LigSite (Ligand Site)</p> <p>Site Finder</p> <p>SiteID</p>
<i>Ψευδο-υποδοχέα</i>	<p>Cerius-Receptor</p> <p>GERM (Genetically Evolved Receptor Models)</p> <p>HASL (Hypothetical Active Site Lattice)</p> <p>PARM (Pseudoatomic Receptor Model)</p> <p>Quasi-atomistic receptor surface models</p>

## 2.α. Μέθοδοι που στηρίζονται σε πρωτεϊνικές βάσεις και στη μοριακή μοντελοποίηση

Στις περισσότερες γονιδιακές και πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων περιέχονται όλες οι απαιτούμενες πληροφορίες, για τον προσδιορισμό του ενεργού κέντρου πρόσδεσης ενός υποδοχέα.

Στην περίπτωση που αναζητείται η θέση πρόσδεσης ενός φυσικού μορίου, είναι λογικό τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην πρόσδεση αυτή, να διατηρούνται στα διάφορα είδη, όπως και κατά τη φυσική τους εξέλιξη. Έτσι, κατά την σύγκριση των αλληλουχιών των αμινοξέων του υποδοχέα, απομονώνονται τα συγκεκριμένα τμήματα, που διατηρούνται στους υπό εξέταση υποδοχείς και τα οποία πιθανώς αποτελούν τμήματα των θέσεων πρόσδεσης. Παράδειγμα αποτελεί η τριάδα των αμινοξέων Ser-His-Asp, τα οποία απαρτίζουν τη θέση κατάλυσης των σερινοπρωτεασών.

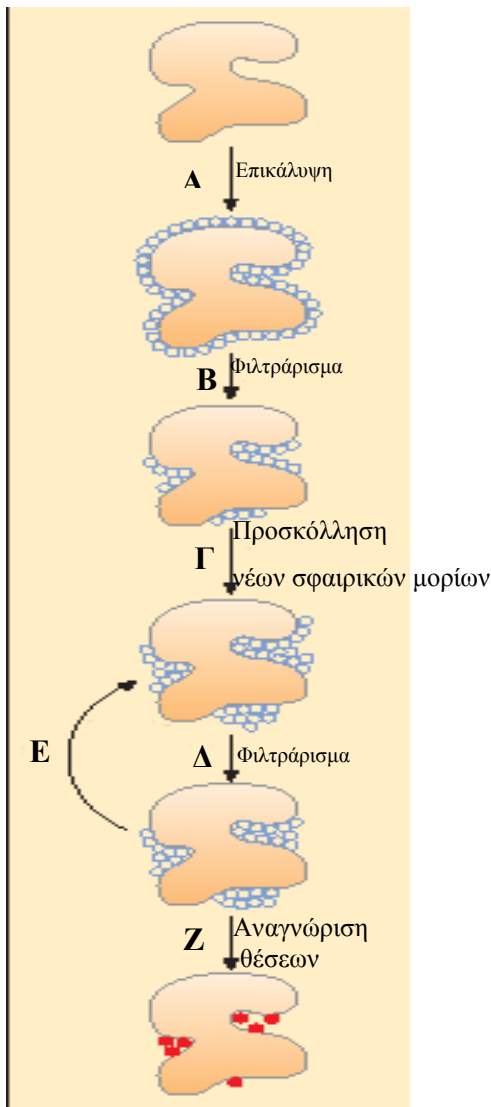
Αν η διαμόρφωση της πρωτεΐνης που μελετάται είναι άγνωστη, η μοριακή μοντελοποίησή της μπορεί να γίνει με βάση τη γνωστή διαμόρφωση μιας άλλης πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση της αλληλουχίας των αμινοξέων της υπό εξέταση πρωτεΐνης πάνω σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα ομόλογης πρωτεΐνης, της οποίας η διαμόρφωση είναι γνωστή (τεχνική threading). Η μέθοδος αυτή παρέχει μοριακή μοντελοποίηση, στην οποία η θέση πρόσδεσης προσδιορίστηκε από τη γνωστή πρωτεΐνη (π.χ. G-συζευγμένες πρωτεΐνες μοντελοποιούνται με βάση τη ροδοψίνη).

Ένα λογισμικό πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων Promax (Structural Bioinformatics-San Diego) εκτελεί μια παρόμοια λειτουργία, χρησιμοποιώντας την κρυσταλλική δομή μέλους μιας οικογένειας πρωτεϊνών για τον σχεδιασμό της δομής οποιουδήποτε άλλου μέλους της οικογένειας. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι προστιθέμενες ή υπολειπόμενες αλληλουχίες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την καλή υπέρθεση των δύο πρωτεϊνών.

Ένα ακόμη πρόβλημα στην μοντελοποίηση προκύπτει από το γεγονός ότι δύο πρωτεΐνες με ίδια λειτουργία δεν είναι απαραίτητα ομόλογες στην αλληλουχία τους. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η εύρεση της θέσης πρόσδεσης πάνω σε τέτοιες πρωτεΐνες, αφού πολλοί αλγόριθμοι και βάσεις δεδομένων έχουν αναπτυχθεί και λειτουργούν με βάση τη διαμόρφωση της πρότυπης πρωτεΐνης και όχι την αλληλουχία της.

## **2.β. Η μέθοδος της επιδιалύτωσης**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχική επικάλυψη της επιφάνειας της πρωτεΐνης με σφαιρικά μόρια νερού ή άλλο διαλύτη και στη συνέχεια σταδιακή απομάκρυνση όσων δεν πληρούν ορισμένα κριτήρια, τα οποία και θα αναφερθούν παρακάτω. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζονται οι περιοχές, όπου παραμένουν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των σφαιρικών μορίων. Ένα γενικό διάγραμμα της μεθόδου παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.8.



**Σχήμα 9.8:** Πορεία αναγνώρισης των ευνοϊκών θέσεων πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης με τη μέθοδο της επιδιалύτωσης: (Α) Επικάλυψη της επιφάνειας της πρωτεΐνης με ένα στρώμα σφαιρών του διαλύτη, (Β) Απομάκρυνση ορισμένων σφαιρών που βρίσκονται σε επιφανειακές θέσεις (φιλτράρισμα), (Γ) Προσκόλληση νέων σφαιρικών μορίων σε στρώματα περισσότερο απομακρυσμένα από την πρωτεΐνη, (Δ) Φιλτράρισμα των νέων σφαιρικών μορίων, (Ε) Επαναληπτική διαδικασία των σταδίων Γ και Δ, (Ζ) Αναγνώριση των θέσεων πρόσδεσης του υποδοχέα.

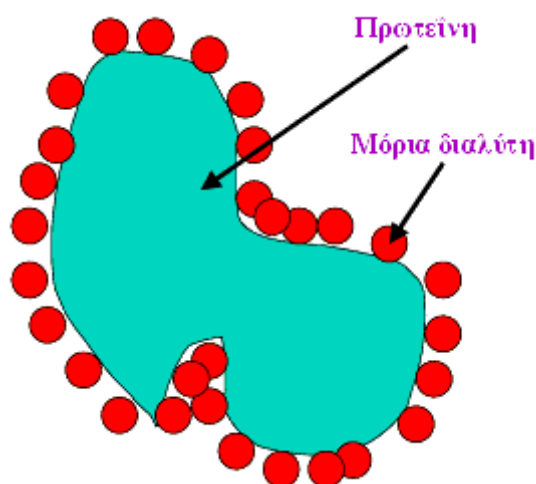
Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, οι Brady και Stouten αναγνώρισαν τα ενεργά κέντρα σε 29 από 32 πρωτεΐνες, των οποίων οι δομές είχαν εξαχθεί από πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Τα βήματα της μεθόδου του Σχήματος 9.8 περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω. Οι προεπιλεγμένες τιμές διαφόρων σταθερών αναφέρονται στο λογισμικό Sybyl της εταιρείας TRIPOS

**Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Η πρωτεΐνη αρχικά διαλύεται σε ένα στρώμα νερού. Για το σκοπό αυτό, αρκετά λογισμικά χρησιμοποιούν τον αλγόριθμο Molecular Silverware (Σχήμα 9.9).

Ο αλγόριθμος Molecular Silverware χρησιμοποιείται για την επιδιалύτωση ενός μορίου με μόρια διαλύτη, ή για τον υπολογισμό του καλύτερου τρόπου

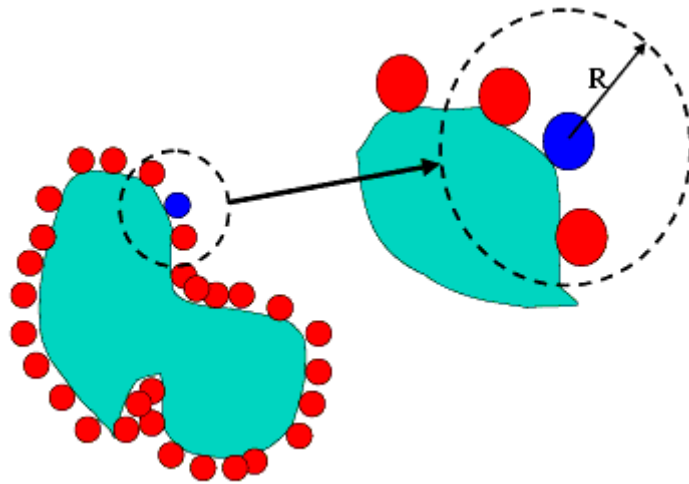
σύμπλεξης δύο μορίων. Με αυτόν κατασκευάζεται ένα σύμπλεγμα μορίων (drop solvation) ή ένας κύβος περιοδικών διαστάσεων (periodic box solvation), με συνεχή προσθήκη μορίων του διαλύτη σε ένα υπό διαλυτοποίηση μόριο (π.χ. πρωτεΐνη). Κάθε μόριο διαλύτη προστίθεται, έτσι ώστε η επιφάνεια van der Waals του να μην επικαλύπτει την επιφάνεια van der Waals των ατόμων του συμπλέγματος. Κάθε φορά προστίθεται ένα μόριο διαλύτη, με αποτέλεσμα η σύμπλεξη να είναι αρκετά αποτελεσματική.



**Σχήμα 9.9:** *Επιδιαλύτωση της πρωτεΐνης με ένα στρώμα διαλύτη (νερού)*

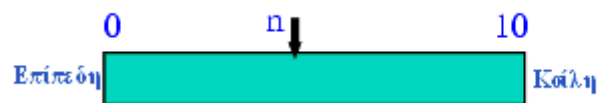
**Βήμα 2<sup>ο</sup>:** Για κάθε μόριο διαλύτη που καλύπτει την επιφάνεια της πρωτεΐνης, προσδιορίζεται ο αριθμός των μη υδρογονικών ατόμων, που βρίσκονται εντός μιας συγκεκριμένης ακτίνας (προεπιλεγμένη τιμή:  $8\text{\AA}$ ). Μόνο στην περίπτωση που ο αριθμός αυτός υπερβαίνει ένα όριο (προεπιλεγμένη τιμή: 75), το μόριο αυτό του διαλύτη διατηρείται, αλλιώς διαγράφεται. Η προεπιλεγμένη τιμή 75 προκύπτει από υπολογισμούς των μορίων του νερού με ακτίνα περίπου  $1.5\text{\AA}$ , που χωρούν σε σφαίρα ακτίνας  $8\text{\AA}$ .

Στο Σχήμα 9.10 φαίνεται η πρωτεΐνη με τα επιλεγμένα μόρια του διαλύτη στην επιφάνειά της.



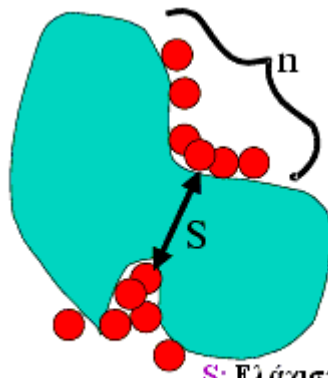
**Σχήμα 9.10:** Διατήρηση ορισμένων μορίων διαλύτη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης

Μια σημαντική γεωμετρική παράμετρος, η οποία εμπλέκεται στην εύρεση θέσεων πρόσδεσης, είναι η μεταβλητή “ $n$ ”, η οποία ρυθμίζει την κοιλότητα μιας θέσης. Είναι ένας ακέραιος αριθμός μεταξύ του 0 και του 10 και ορίζεται συνήθως από το χρήστη, (Σχήμα 9.11).



**Σχήμα 9.11:** Παράμετρος κοιλότητας

**Βήμα 3<sup>ο</sup>:** Στη συνέχεια διακρίνονται τα μόρια του διαλύτη, τα οποία απαρτίζουν μια θήκη. Ο αριθμός αυτός κυμαίνεται από το 3 έως το 15. Τα μόρια του διαλύτη, που τελικώς παραμένουν, είναι αυτά που τυπικά βρίσκονται εντός των θηκών (Σχήμα 9.12).

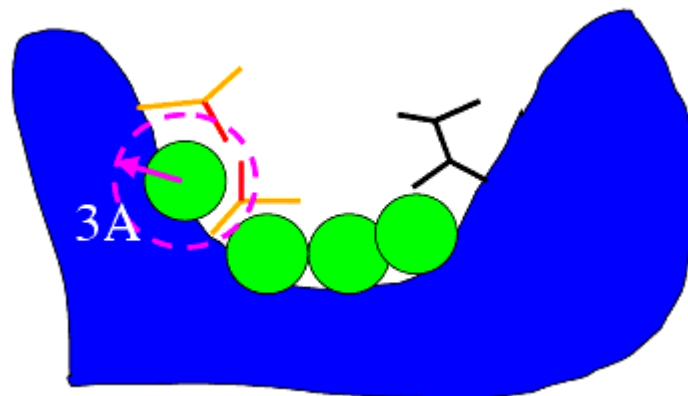


**S:** Ελάχιστη διαχωριστικότητα μεταξύ των ομάδων.  
**n:** Ελάχιστος αριθμός σφαιρών διαλύτη

**Σχήμα 9.12:** Διαχωρισμός θέσεων πρόσδεσης

**Βήμα 4<sup>ο</sup>:** Τελικά, τα διαπερατά από το διαλύτη μόρια της πρωτεΐνης, μέσα σε μια συγκεκριμένη θήκη, προσδιορίζονται ως ακολούθως:

Για κάθε μόριο διαλύτη, μέσα στη θήκη, μελετώνται όλα τα άτομα της πρωτεΐνης που βρίσκονται εντός μιας συγκεκριμένης ακτίνας ( $3 \text{ \AA}$  από προεπιλογή). Η ένωση όλων αυτών των ατόμων σχηματίζει το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (Σχήμα 9.13).



**Σχήμα 9.13:** Προσδιορισμός των προσβάσιμων πρωτεϊνικών ατόμων από το διαλύτη, εντός μιας θήκης

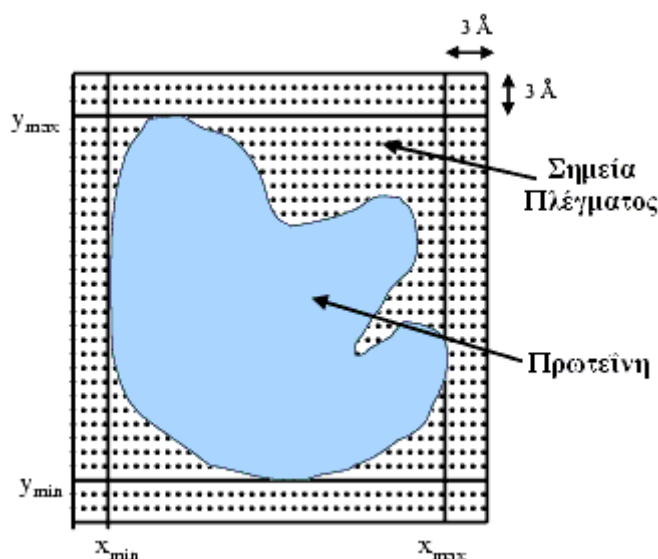
Πρέπει να σημειωθεί πως η μέθοδος της επιδιαλύτωσης εμφανίζει τρία σοβαρά μειονεκτήματα:

1. Ανομοιογενή επιδιαλύτωση
2. Αδυναμία ανίχνευσης εσωτερικών θηκών ή άλλων αδιαπέραστων χώρων από τον διαλύτη
3. Εξάρτηση της ανίχνευσης των θηκών από τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

## 2.γ. Μέθοδος πλέγματος

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση ενός τρισδιάστατου πλέγματος, πάνω στο οποίο τοποθετείται η πρωτεΐνη. Στόχος της διαδικασίας, όπως θα διαφανεί και στη συνέχεια, είναι ο διαχωρισμός κάποιων σημείων του πλέγματος με βάση συγκεκριμένες ιδιότητές τους. Τα βήματα που απαρτίζουν την τεχνική αυτή είναι έξι.

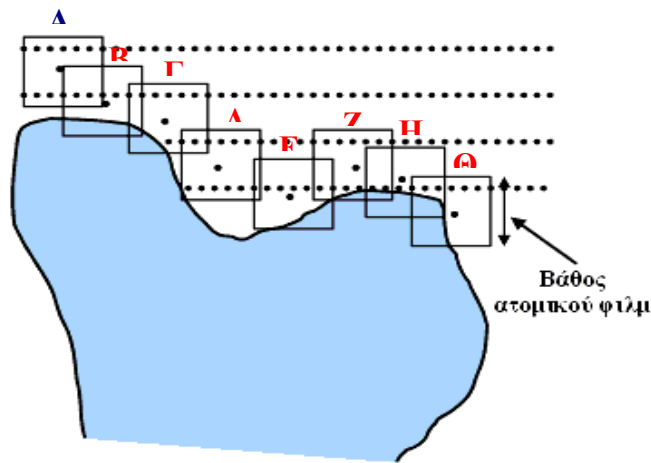
**Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Ο πρωτεϊνικός υποδοχέας τοποθετείται μέσα σε πλέγμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.14.



**Σχήμα 9.14:** Τοποθέτηση της πρωτεϊνικής μονάδας μέσα στο πλέγμα

**Βήμα 2<sup>ο</sup>:** Στο στάδιο αυτό διατηρούνται τα σημεία του πλέγματος, που βρίσκονται κοντά στον υποδοχέα, αλλά δεν επικαλύπτονται από τα άτομά του. Όλα τα υπόλοιπα σημεία διαγράφονται. Κατά τη διαδικασία αυτή, ορίζεται η παράμετρος του “βάθους του ατομικού φιλμ” (atomic film depth) ως μια καθορισμένη απόσταση μεταξύ συγκεκριμένου σημείου του υποδοχέα και συγκεκριμένου σημείου του πλέγματος. Παράλληλα ορίζεται και η “ακτίνα αποκλεισμού” (exclusion radius), όπως καλείται η ελάχιστη τιμή της απόστασης μεταξύ των προαναφερθέντων σημείων (Σχήμα 14).

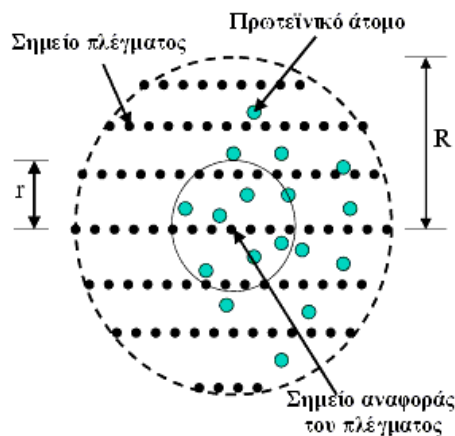




**Σχήμα 9.15:** Διαχωρισμός των σημείων του πλέγματος που βρίσκονται κοντά στον υποδοχέα (βήμα 2). Κατά το 3<sup>ο</sup> βήμα απορρίπτονται σημεία, όπως το Α.

**Βήμα 3<sup>ο</sup>:** Από τα σημεία του πλέγματος, που διατηρήθηκαν στο Βήμα 2, επιλέγονται αυτά που περιλαμβάνουν και επιπλέον άτομα της πρωτεΐνης μέσα σε συγκεκριμένη ακτίνα  $n$  (σε Å).

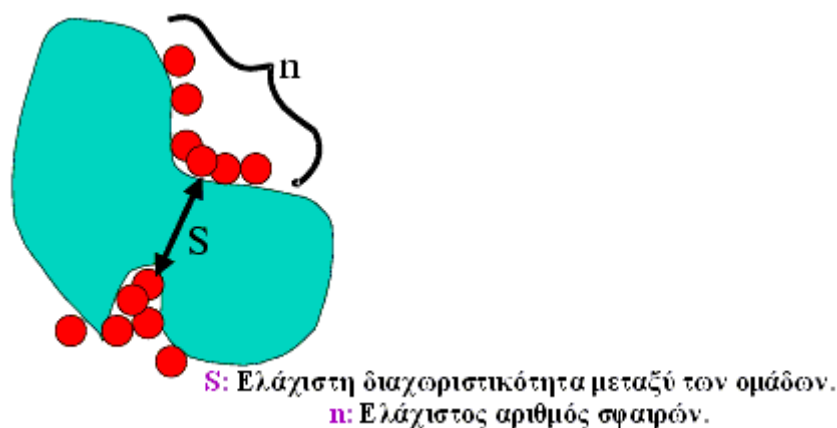
**Βήμα 4<sup>ο</sup>:** Εκτός από τα σημεία του πλέγματος, που επιλέχθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, συνυπολογίζονται και τα γειτονικά τους που βρίσκονται σε καθορισμένη ακτίνα. Η ακτίνα αυτή καλείται συνυπολογιζόμενη ακτίνα ( $r$ ) (inclusion radius) (Σχήμα 9.16).



**Σχήμα 9.16:** Προσδιορισμός των σημείων του πλέγματος που βρίσκονται εντός της συνυπολογιζόμενης ακτίνας ( $r$ )

**Βήμα 5<sup>ο</sup>:** Η περιοχή του υποδοχέα, που ορίστηκε στο προηγούμενο βήμα, υφίσταται ένα είδος σάρωσης, ώστε να διακριθούν τα συμπλέγματα των σημείων εκείνων, που σχηματίζουν θήκες. Ο διαχωρισμός των σημείων αυτών γίνεται με βάση ένα

κριτήριο, που αφορά την ελάχιστη απόσταση, που μπορεί να υπάρχει μεταξύ δύο συσσωματωμάτων, (προεπιλεγμένη τιμή απόστασης: 3Å) (Σχήμα 16).



**Σχήμα 9.17:** Διάκριση των σχηματιζόμενων συμπλεγμάτων

**Βήμα 6<sup>ο</sup>:** Τελικά, προσδιορίζονται τα άτομα του υποδοχέα, που απαρτίζουν μια συγκεκριμένη θήκη και είναι προσβάσιμα στο διαλύτη. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται συγκεκριμένος αλγόριθμος (CAVITY). Για κάθε μόριο, διαλύτη εντός της θήκης, επιλέγονται όλα τα διπλανά άτομα της πρωτεΐνης (προεπιλεγμένη απόσταση: 3Å). Όλα τα παραπάνω άτομα θεωρούνται πως ανήκουν στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

## 2.δ. Μέθοδος ψευδοϋποδοχέων

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μοναδικές διαθέσιμες πληροφορίες για έναν άγνωστο πρωτεϊνικό υποδοχέα είναι οι δομές των μορίων, που συμπλέκονται και ο βαθμός σύμπλεξής τους. Ακόμη και στην περίπτωση αυτή, που δεν υπάρχουν πληροφορίες για την πρωτεΐνη, μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία μοντελοποίησης του ενεργού κέντρου του υποδοχέα.

Πολλοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι τα άτομα ενός υποδοχέα, που δεν αποτελούν τμήμα του ενεργού του κέντρου, καταναλώνουν απλά υπολογιστικό χώρο

και χρόνο, και μπορούν να παραλειφθούν. Με το σκεπτικό αυτό, οι έρευνές τους εστιάζονται στον υπολογισμό ψευδο- ή μινι- υποδοχέων.

Υπάρχουν πολλά λογισμικά, που σχεδιάζουν ψευδοϋποδοχείς. Όλα στηρίζονται σε τρεις βασικές προϋποθέσεις:

1. Όλα τα φαρμακευτικά μόρια, με την ίδια βιολογική δράση, προσδένουν στο ίδιο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης
2. Η βιολογική δράση είναι ανάλογη της συγγένειας φαρμάκου-υποδοχέα
3. Όλα τα φαρμακευτικά μόρια προσδένονται στον υποδοχέα με διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας – όχι απαραίτητα της χαμηλότερης ενέργειας.

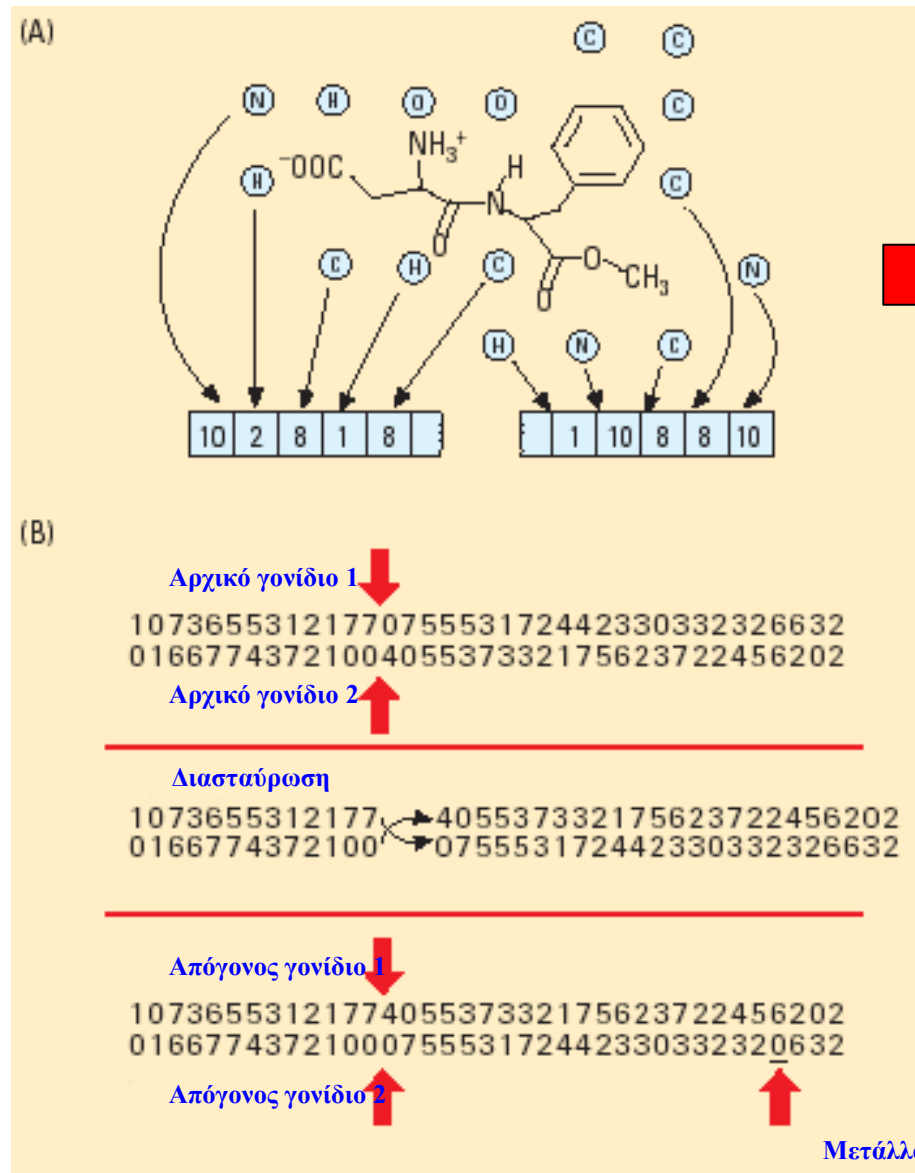
Παράδειγμα τέτοιου αλγόριθμου αποτελεί η μέθοδος GERM (genetically evolved receptor models). Με τη μέθοδο αυτή, όλα τα φαρμακευτικά μόρια ελαχιστοποιούνται ενεργειακά και στη συνέχεια γίνεται υπέρθεση των διαμορφώσεών τους, ώστε να βρεθούν οι ομάδες, που εμπλέκονται στην πρόσδεση. Απαραίτητο είναι όλες αυτές οι φαρμακευτικές ενώσεις, που χρησιμοποιούνται, να έχουν δομική ποικιλία και ευρύ φάσμα βιολογικής δράσης.

Στη συνέχεια γύρω από κάθε φαρμακευτικό μόριο, που υπερτίθεται, δημιουργείται μια επιφάνεια από 45-60 άτομα, τα οποία θεωρητικά ανήκουν στον ψευδοϋποδοχέα και ομαδοποιούνται ανάλογα με τις χημικές τους ιδιότητες (πχ. ένας δότης δεσμού υδρογόνου του ψευδοϋποδοχέα τοποθετείται δίπλα σε έναν δέκτη δεσμού υδρογόνου του φαρμακευτικού μορίου). Επειδή τα άτομα τοποθετούνται τυχαία και καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις, δημιουργείται μια σειρά από σχηματιζόμενες επιφάνειες. Τα άτομα των επιφανειών αυτών χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ενός τύπου «γονιδίου», που περιέχει δεδομένα για τον τύπο του ατόμου (αλειφατικό H, καρβονυλικός C, υδροξυλικό O κλπ), και τη θέση του στον χώρο (Σχήμα 9.18). Έτσι σε κάθε επιφάνεια αντιστοιχεί ένα συγκεκριμένο γονίδιο.

Καθένα από αυτά τα γονίδια εισέρχεται σε έναν γενετικό αλγόριθμο, ο οποίος επιτρέπει στα ζευγάρια των αρχικών γονιδίων να εναλλάσσουν τα δεδομένα τους, αλλά και να τα μεταλλάξουν. Κάθε νέος απόγονος των αρχικών γονιδίων δοκιμάζεται για την ικανότητά του να προσδένεται σε μια συγκεκριμένη ομάδα του φαρμακευτικού μορίου. Εάν προσδένεται καλύτερα από τα αρχικά γονίδια, τότε χρησιμοποιούνται τα νέα γονίδια και τα αρχικά απομακρύνονται από τον αλγόριθμο. Αντίγραφα του ίδιου γονιδίου δεν επιτρέπεται να λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία.

Ο αλγόριθμος επαναλαμβάνεται, μέχρι που τα νέα παραγόμενα γονίδια να μην ικανοποιούν τα κριτήρια της πρόσδεσης.

Στο τέλος της διαδικασίας σχηματίζεται ένας ψευδοϋποδοχέας, ο οποίος ταιριάζει στα χαρακτηριστικά πρόσδεσης των γνωστών φαρμακευτικών μορίων. Αυτός ο ψευδοϋποδοχέας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, για τον σχεδιασμό νέων μορίων με μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης.



Ψηφιοποίηση των χαρακτηριστικών του κάθε ατόμου (χημικός τύπος, θέση στο χώρο κλπ)

**Σχήμα 9.18:** Κατασκευή ψευδοϋποδοχέα με τον αλγόριθμο GERM: (A) Δημιουργία σειράς επιφανειών από διαφορετικά άτομα, γύρω από φαρμακευτικά μόρια που προσδέονται στον υποδοχέα, (B) Δημιουργία κωδικοποιημένων “γονιδίων” τα οποία πολλαπλασιάζονται με διασταυρώσεις και μεταλλάξεις. Τα γονίδια απόγονοι, μπορούν να κωδικοποιούν νέους υποδοχείς, που δύνανται να προσδέονται καλύτερα με τα φαρμακευτικά μόρια.

## 2.ε. Άλλες μέθοδοι

Οι μέθοδοι του πλέγματος και της επιδιάλυτωσης ενδείκνυνται, όταν ο προσδέτης είναι μικρό μόριο (π.χ. οργανικό πεπτιδομιμητικό μόριο).

Εκτός από αυτές τις μεθόδους, ορισμένα λογισμικά (π.χ. SiteID) εφαρμόζουν και μια άλλη διαδικασία, στην οποία περιγράφονται τα άτομα του υποδοχέα με βάση τις φυσικές και δομικές ιδιότητές τους. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάζεται ένας πίνακας, του οποίου οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα άτομα της πρωτεΐνης και οι στήλες περιλαμβάνουν πληροφορίες των ατόμων αυτών, όπως: η προσβασιμότητά τους από μόρια του διαλύτη, η απόστασή τους από το κέντρο της πρωτεΐνης, η λιποφιλικότητά τους, η υδροφιλικότητα, κτλ. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει τη γρήγορη διάκριση των δυναμικών θέσεων πρόσδεσης και είναι κατάλληλη για πιο πολύπλοκα μόρια, όπως οι θέσεις μεταξύ υποδοχέων και του DNA.

## III. Λογισμικά Πρόσδεσης Μορίων σε Υποδοχείς

### Εισαγωγή

Όπως είδαμε και προηγουμένως, τα φαρμακευτικά μόρια έχουν την δυνατότητα να προσδένονται σε τοπογραφικές περιοχές βιολογικών μακρομορίων, με αποτέλεσμα να λαμβάνουν μέρος σε βιοχημικές διεργασίες, όπως, για παράδειγμα σε αναστολές ενζυμικής δράσης ή σε διαδικασίες μετάδοσης σήματος. Η γνώση της τρισδιάστατης δομής και των ευνοϊκά ενεργειακών διαμορφωμένων των υποδοχέων, ώθησε τους θεωρητικούς φαρμακοχημικούς στην ανάπτυξη αλγορίθμων, για την προσομοίωση της πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων στα ενεργά κέντρα των υποδοχέων, ως ένα σημαντικό βήμα για τον μοριακό σχεδιασμό καινοτόμων φαρμάκων.

Για τις μελέτες αυτές, εκτός του κατάλληλου λογισμικού, απαιτείται και η χρήση ισχυρού ηλεκτρονικού υπολογιστή με περιβάλλον Μοριακών Γραφικών. Οι μεγάλες απαιτήσεις σε μαθηματικές επεξεργασίες, βιολογικές γνώσεις και υπολογιστική ισχύ, δικαιολογούν την ανάπτυξη των μελετών αυτών στις τελευταίες δεκαετίες.

Για τη μελέτη της πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων (ΦΜ) στον υποδοχέα (Υ), έχουν αναπτυχθεί αρκετά προγράμματα για ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Αυτά

αποτελούν μεθοδολογία Υπολογιστικής Χημείας και Μοριακής Μοντελοποίησης. Την επιτυχία των λογισμικών προγραμμάτων μοριακής πρόσδεσης, την έχουν ανάγει σε εργαλείο πρόβλεψης της δράσης «πραγματικών» ή «θεωρητικών» μορίων.

Με δεδομένες τις διαμορφώσεις του ΦΜ και της θήκης πρόσδεσης του υποδοχέα, ένας αλγόριθμος πρόσδεσης μπορεί να δώσει 3 βασικές πληροφορίες:

1. Το κατά πόσο μπορεί να γίνει αυθόρμητα η πρόσδεση του ΦΜ σε συγκεκριμένη θήκη του υποδοχέα,
2. Την ενέργεια της πρόσδεσης,
3. Τη διαμόρφωση του συμπλόκου Υ-ΦΜ.

Τα λογισμικά πρόσδεσης μπορούν να διαιρεθούν σε δύο βασικά τμήματα: Το πρώτο αφορά την ανίχνευση της σωστής γεωμετρίας -πρόσδεσης του ΦΜ, και εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας του. Το δεύτερο μέρος αφορά τη βαθμολόγηση της πρόσδεσης. Η συνάρτηση βαθμολόγησης της πρόσδεσης, πρέπει να είναι αρκετά ρεαλιστική και συνήθως υπολογίζει τη στερική και χημική συμπληρωματικότητα μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα, όπως είδαμε και παραπάνω.

Ο αλγόριθμος της πρόσδεσης, όσον αφορά το πρώτο μέρος, πρέπει να αναλύσει εξονυχιστικά την επιφάνεια δυναμικής ενέργειας και να βρει το ολικό ελάχιστο. Γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η διαμόρφωση τόσο του ΦΜ, όσο και της θήκης του υποδοχέα κατά την πρόσδεση, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα της διαδικασίας. Σε σχέση με αυτό, οι αλγόριθμοι πρόσδεσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες. (α) Άκαμπτη πρόσδεση (rigid body): τόσο η πρωτεΐνη-υποδοχέας, όσο και το ΦΜ θεωρούνται άκαμπτα κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης (β) Ημι-εύκαμπτη πρόσδεση (semi-flexible): μόνο ο προσδέτης θεωρείται εύκαμπτος κατά την πρόσδεση (γ) Εύκαμπτη πρόσδεση (fully flexible): η πρωτεΐνη και ο προσδέτης είναι εύκαμπτα μόρια κατά την πρόσδεση.

Στην περίπτωση που το ΦΜ διατηρεί σταθερή γεωμετρία, ο αλγόριθμος περιορίζεται στο να μελετήσει διαφορετικές θέσεις του ΦΜ εντός της θήκης του υποδοχέα, χρησιμοποιώντας μόνο τους βαθμούς ελευθερίας, που αφορούν τη μεταφορά και την περιστροφή. Αντίθετα, στην περίπτωση που ο προσδέτης υιοθετεί διαφορετικές διαμορφώσεις κατά την πρόσδεση, το λογισμικό προσθέτει και τους βαθμούς ελευθερίας, που αφορούν τις διέδρες γωνίες του μορίου. Τέλος, στην περίπτωση που λαμβάνεται υπ' όψη, τόσο η διαμορφωτική ευκαμψία του ΦΜ, όσο και του υποδοχέα, η διαδικασία γίνεται αρκετά πιο περίπλοκη, δεδομένου του μεγάλου αριθμού ατόμων της πρωτεΐνης του υποδοχέα.

Τα προγράμματα μελέτης της πρόσδεσης συμβάδισαν με την ανάπτυξη των προγραμμάτων των μοριακών γραφικών, τα οποία επέτρεπαν τη διευθέτηση δύο μορίων, προκειμένου να βρεθούν διαφορετικές διαμορφώσεις τους με βάση τη συμπληρωματικότητά τους, γεωμετρική και χημική.

Ο αριθμός των πιθανών τρόπων, με τους οποίους συνδέονται τα δύο μόρια, είναι μεγάλος και προκειμένου να καταστεί δυνατή η αναζήτηση, το πρόγραμμα απλοποιείται και χρησιμοποιούνται μόνο συγκεκριμένοι βαθμοί ελευθερίας.

Τα πρώτα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιούσαν αλγόριθμους άκαμπτης πρόσδεσης, διατηρώντας σταθερούς όλους τους εσωτερικούς βαθμούς ελευθερίας, εκτός από τους τρεις της μεταφοράς και τους τρεις της περιστροφής. Τα άτομα της πρωτεΐνης αναπαρίστανται αναλυτικά, ενώ γίνεται χρήση απλών εξισώσεων δυναμικής ενέργειας για τον προσδιορισμό της συμπληρωματικότητας του συμπλόκου μορίου-υποδοχέα.

Η προσέγγιση της σταθερής γεωμετρίας του ΦΜ είχε πολλά προβλήματα και περιορισμούς, κυρίως στις περιπτώσεις εκείνες όπου η διαμόρφωση της θήκης του υποδοχέα μεταβαλλόταν κάτω από την πρόσδεση του ΦΜ. Αυτό γίνεται ευκολότερα αντιληπτό σε περιπτώσεις, όπου το μόριο του προσδέτη έχει κρυσταλλωθεί ξεχωριστά από το μόριο του υποδοχέα και όχι και τα δύο μαζί με τη μορφή συμπλόκου. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι πολύ πιθανές οι διαμορφωτικές αλλαγές κατά την πρόσδεση του προσδέτη στον υποδοχέα. Η πρώτη προσέγγιση, που περιλάμβανε τις μεταβολές ορισμένων βαθμών ελευθερίας του ΦΜ, περιγράφηκε από τον DesJarlais. Από τότε, έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι, που ερευνούν τη διαμόρφωση του ΦΜ κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης. Τέλος, κάποιοι άλλοι συμπεριλαμβάνουν και την ευκαμψία του μορίου του υποδοχέα.

## Ανάπτυξη αλγορίθμων

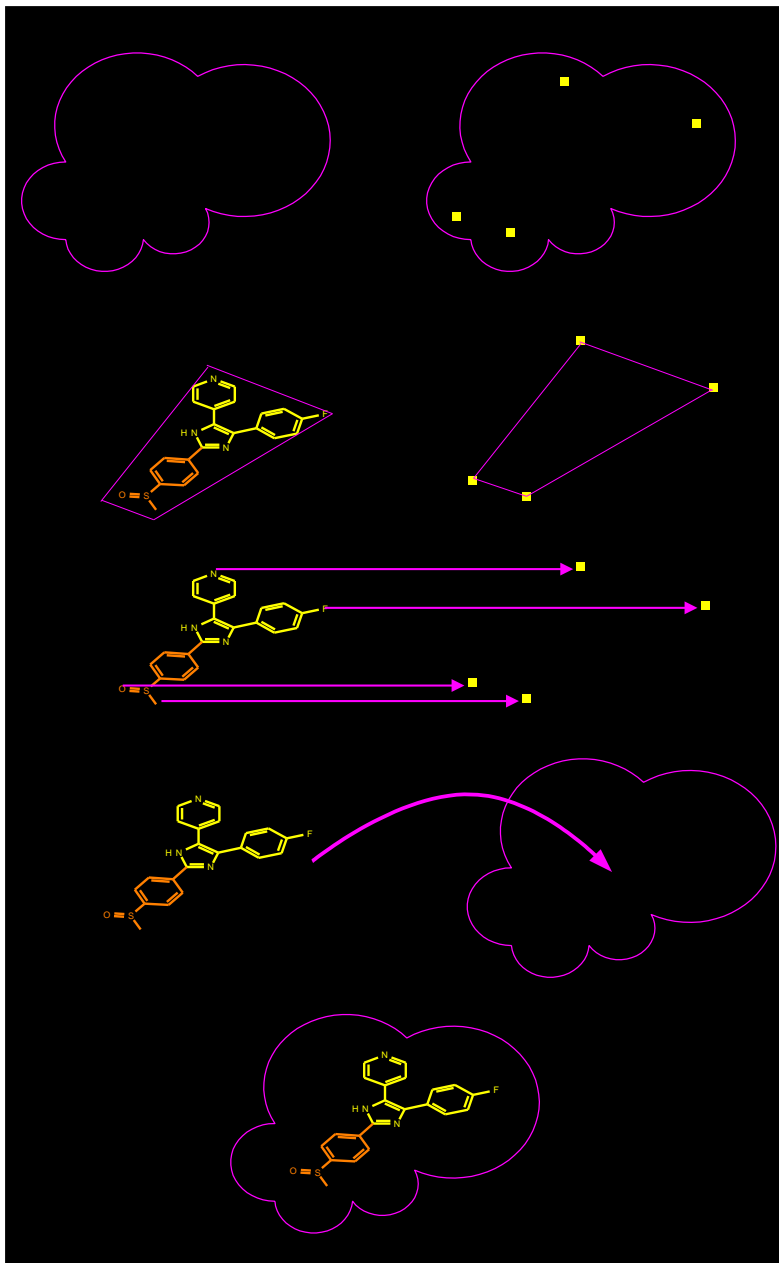
Δύο είναι οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται, προκειμένου τα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης να αποτελούν χρήσιμη μεθοδολογία στο σχεδιασμό φαρμάκων. Η πρώτη είναι η ακρίβεια και η δεύτερη η ταχύτητα. Για την επίτευξη και των δύο αυτών αντιθετικών παραμέτρων χρειάζονται ορισμένοι συμβιβασμοί. Η ταχύτητα διεκπεραίωσης των προγραμμάτων έχει εκ των πραγμάτων αυξηθεί σημαντικά, εξαιτίας των υψηλότερων ταχυτήτων που χρησιμοποιούν οι επεξεργαστές των σύγχρονων Η/Υ. Σημαντικό ρόλο έπαιξε και η δυνατότητα αναπαράστασης της επιφάνειας των πρωτεϊνών με χρήση των μοριακών γραφικών.

Αρχικά, τα προγράμματα πρόσδεσης αναπαριστούσαν, τόσο τον υποδοχέα, όσο και το ΦΜ με αναλυτικό τρόπο, περιγράφοντας όλα τους τα άτομα. Αυτό όμως είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολύπλοκα συστήματα, τα οποία ήταν δύσκολο να εκτιμηθούν. Η ανάπτυξη των μοριακών γραφικών για την αναπαράσταση των μοριακών επιφανειών και η χρήση τους σε εφαρμογές πρόσδεσης ελαττώνει σημαντικά τον αριθμό των πιθανών προσδέσεων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ταχύτητα των αλγορίθμων.

Το επόμενο μεγάλο βήμα, στην μοριακή πρόσδεση, ήταν η χρήση του προγράμματος πλέγματος (GRID) για την αποθήκευση φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υποδοχέα. Το πλέγμα αρκεί να υπολογιστεί μόνο στην αρχή, δεδομένου ότι ο υποδοχέας παραμένει σταθερός. Παράδειγμα αποτελεί το λογισμικό DOCKER, το οποίο αποθηκεύει τις τιμές των ακτίνων van der Waals πάνω σε ένα πλέγμα, που χρησιμοποιείται για την εξερεύνηση των ελεύθερων επιφανειών πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης. Το πρόγραμμα GRID για κάθε σημείο του πλέγματος υπολογίζει τη δυναμική ενέργεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ατόμου ή ομάδας του υποδοχέα και ενός ατόμου ή ομάδας αισθητήρα (probe), που τοποθετείται σε διαφορετικά σημεία του πλέγματος. Τα άτομα αισθητήρες, που συνήθως χρησιμοποιούνται, είναι οι αμινο-, μεθυλ- και υδροξυλ- ομάδες. Το πλέγμα απεικονίζει το είδος των αλληλεπιδράσεων (πολικές/ μη πολικές), που υφίστανται σε κάθε σημείο της θήκης πρόσδεσης του υποδοχέα. Τα μειονεκτήματα των εφαρμογών DOCKER και GRID είναι ότι οι ενέργειες αλληλεπίδρασης μεταξύ υποδοχέα και ΦΜ δεν μπορούν να υπολογιστούν με ευκολία. Ωστόσο, δύο διαφορετικές εφαρμογές επιτρέπουν τον



άμεσο υπολογισμό της ενέργειας κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης. Το πρόγραμμα του Langridge χαρτογραφεί τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και Coulomb του υποδοχέα πάνω στο πλέγμα. Μια άλλη εφαρμογή βασισμένη στο GRID του Goodford χαρτογραφεί τις αλληλεπιδράσεις διαφορετικών ατόμων αισθητήρων με τον υποδοχέα πάνω στο πλέγμα και τα δεδομένα δίνονται σε σχετικό πίνακα. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης του ΦΜ με τον υποδοχέα υπολογίζεται αθροίζοντας τις ενέργειες αλληλεπίδρασης κάθε ατόμου αισθητήρα, που αντιστοιχεί σε άτομο του ΦΜ. Εκτός από τις υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, γίνεται χρήση ενός πλέγματος για τη χαρτογράφηση των δεσμών υδρογόνου. Τα πρώτα προγράμματα, που εφάρμοσαν τη χρήση πλεγμάτων με αυτοματοποιημένη διαδικασία, ήταν το AUTODOCK και το DOCK (σχήμα. 9.19). Η σημαντική ελάττωση του χρόνου, που προήλθε από τη χρήση του πλέγματος, είχε ως αποτέλεσμα την εφαρμογή περισσότερο προηγμένων μεθόδων βαθμολόγησης της πρόσδεσης.



1. Προσδιορισμός των σημείων πρόσδεσης στη θήκη του υποδοχέα
  
2. Ταίριασμα των αποστάσεων στο ΦΜ
  
3. Ταίριασμα των αποστάσεων του ΦΜ με τις αποστάσεις των σημείων πρόσδεσης του υποδοχέα
  
4. Πρόσδεση ΦΜ στη θήκη του υποδοχέα
  
5. Υπολογισμός της ενέργειας πρόσδεσης

**Σχήμα 9.19** Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του αλγορίθμου DOCK

### **Διαμορφωτική ευκαμψία του ΦΜ.**

Η διαμορφωτική ανάλυση του ΦΜ, κατά τη διάρκεια τη πρόσδεσής του στον υποδοχέα, είναι μια απαραίτητη διαδικασία, αφού συνήθως δεν είναι γνωστή η διαμόρφωση, με την οποία προσδένει.

Η απλούστερη μέθοδος για τη μελέτη της διαμόρφωσης του ΦΜ κατά την πρόσδεση, είναι η δημιουργία πολλών διαφορετικών διαμορφωμερών του ΦΜ, αποθήκευσή τους σε μια βάση δεδομένων και στη συνέχεια πραγματοποίηση άκαμπτης πρόσδεσης κάθε μίας από αυτές στον υποδοχέα. Έτσι όμως, η διαδικασία της πρόσδεσης πραγματοποιείται ξεχωριστά για κάθε διαμόρφωση, ως να ήταν διαφορετικό μόριο. Ο Lorber και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ωστόσο και μια πιο γρήγορη μέθοδο, η οποία εκτελούσε την πρόσδεση έχοντας όλες τις διαμορφώσεις μαζί σαν μια ομάδα, μέσα στη θήκη πρόσδεσης του υποδοχέα. Για μια ομάδα  $n$  διαμορφώσεων του ίδιου ΦΜ, η διευθέτηση μέσα στη θήκη πρόσδεσης υπολογίζεται μόνο μία φορά, ενώ η αξιολόγηση της πρόσδεσης πραγματοποιείται  $n$  φορές αφού εξαρτάται από τη διαμόρφωση του ΦΜ. Το FLOG είναι επίσης ένα πρόγραμμα πρόσδεσης, που δημιουργεί και προσδένει διαμορφωτικές βάσεις δεδομένων, οι οποίες ονομάζονται Flexibases. Ο αλγόριθμος, που χρησιμοποιεί το FLOG για την πρόσδεση είναι ίδιος με αυτόν του DOCK 965, 94.

Πολλοί είναι πλέον οι αλγόριθμοι, που εξερευνούν διαμορφωτικά το ΦΜ κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης. Αυτοί διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό διερεύνησης της διαμόρφωσης του ΦΜ:

- α) Συστηματικής αναζήτησης,
- β) Στοχαστικής αναζήτησης και
- γ) Ντετερμινιστικής (αιτιοκρατικής) αναζήτησης.

Ορισμένα προγράμματα πρόσδεσης, ωστόσο, κάνουν χρήση περισσότερων από μίας κατηγορίας. Οι αλγόριθμοι **συστηματικής αναζήτησης** βασίζονται σε ένα πλέγμα τιμών για κάθε βαθμό ελευθερίας του προσδέτη, και κάθε μία από αυτές τις τιμές ερευνάται με συστηματικό τρόπο κατά τη διάρκεια της αναζήτησης. Όσο αυξάνεται όμως ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας, αυξάνεται και ο αριθμός των πιθανών διαμορφώσεων, που εξετάζονται από το λογισμικό. Το πρόβλημα αυτό, όπως είδαμε και στο Κεφάλαιο 7, καλείται **συνδυαστική έκρηξη** και αντιμετωπίζεται με κριτήρια τερματισμού, που εμποδίζουν τον αλγόριθμο να μελετά περιπτώσεις διαμορφώσεων, που εκ των προτέρων γνωρίζουμε πως δεν αποτελούν λύση.

Παράδειγμα αλγόριθμου συστηματικής αναζήτησης αποτελούν οι αλγόριθμοι σταδιακής κατασκευής (incremental construction algorithms).

Οι αλγόριθμοι **στοχαστικής αναζήτησης** εκτελούν τυχαίες αλλαγές, συνήθως σε έναν βαθμό ελευθερίας του μορίου κάθε φορά. Το κυριότερο πρόβλημα με τους αλγόριθμους της κατηγορίας αυτής είναι η αμφιβολία του σημείου σύγκλισης. Προκειμένου να βελτιωθεί το πρόβλημα αυτό, μπορούν να γίνονται πολλές παράλληλες αναζητήσεις από το πρόγραμμα. Παράδειγμα στοχαστικής αναζήτησης αποτελεί η μέθοδος (και οι αλγόριθμοι που στηρίζονται σε αυτή) Monte Carlo.

Η **ντετερμινιστική αναζήτηση** στο αρχικό στάδιο προσδιορίζει το βήμα εκείνο, που θα δώσει την επόμενη διαμόρφωση με ενέργεια ίση ή μικρότερη από την προηγούμενη. Αν οι αλγόριθμοι αυτής της κατηγορίας εφαρμοστούν στην ίδια ακριβώς εναρκτήρια διαμόρφωση και με τις ίδιες παραμέτρους, θα φτάσουν ακριβώς στο ίδιο αποτέλεσμα. Ένα πρόβλημα της κατηγορίας αυτής των αλγορίθμων είναι ότι πολύ συχνά παγιδεύονται σε ένα τοπικό ελάχιστο, επειδή δεν μπορούν να ξεπεράσουν ενεργειακά φράγματα. Υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις, προκειμένου να αυξηθεί η ικανότητα υπερπήδησης ενεργειακών φραγμάτων ή ελάττωσης του ύψους αυτών. Παραδείγματα ντετερμινιστικών μεθόδων αποτελούν η πρόσδεση με χρήση ελαχιστοποίησης της ενέργειας και της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής.

Στη συνέχεια θα δούμε περιληπτικά ορισμένα λογισμικά από κάθε προαναφερθείσα κατηγορία.

### **Αλγόριθμοι σταδιακής ανοικοδόμησης (Incremental construction)**

Οι αλγόριθμοι σταδιακής ανοικοδόμησης διαιρούν το ΦΜ σε μικρότερα άκαμπτα τμήματα, «κόβοντας» όλους τους δεσμούς με ικανότητα περιστροφής. Στη συνέχεια επιλέγεται ένα τμήμα του ΦΜ, που ονομάζεται τμήμα βάσης και το οποίο είναι το πρώτο που προσδένεται μέσα στη θήκη του υποδοχέα. Πάνω σε αυτό τοποθετούνται ένα-ένα όλα τα υπόλοιπα άκαμπτα τμήματα του ΦΜ. Με κάθε νέο τμήμα, που τοποθετείται πάνω στο προηγούμενο, μεταβάλλονται οι δίεδρες γωνίες (οι απλοί δεσμοί με ικανότητα περιστροφής που συνδέουν τα μικρά τμήματα μεταξύ τους), ούτως ώστε να προσδιοριστεί η διαμόρφωση, που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα πρόσδεσης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αλγορίθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας. Παραδείγματα λογισμικών, που κάνουν χρήση της μεθόδου αυτής, είναι το FlexX και το Dock . Περισσότερα για αυτή την κατηγορία

αλγορίθμων θα αναφερθούν στη συνέχεια με την παρουσίαση του λογισμικού πρόσδεσης FlexX.

### **Αλγόριθμοι Monte Carlo**

Οι αλγόριθμοι της κατηγορίας αυτής τοποθετούν ολόκληρο το ΦΜ εντός της θήκης του υποδοχέα και εκτελούν τυχαίες αλλαγές στη μεταφορά, στην περιστροφή και στις διέδρες γωνίες του. Μετά από κάθε βήμα ελαχιστοποιείται η ενέργεια της διαμόρφωσης του ΦΜ και υπολογίζεται η νέα τιμή της. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον αλγόριθμο Monte Carlo δίνονται στο Κεφάλαιο 8 της προσομοίωσης των μοριακών συστημάτων.

Συγκεκριμένα, το ΦΜ τοποθετείται με τυχαίο τρόπο μέσα στη θήκη του υποδοχέα. Προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα εύρεσης του ολικού ελαχίστου, η διαδικασία μπορεί να αποτελείται από αρκετούς κύκλους. Ο πρώτος κύκλος λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία, ενώ οι επόμενοι κύκλοι πραγματοποιούνται σε σταδιακά χαμηλότερες θερμοκρασίες (προσομοιώσεις ανόπτωσης με χρήση Monte Carlo). Συνήθως κάθε κύκλος ξεκινά με τη διαμόρφωση χαμηλότερης ενέργειας από τον προηγούμενο κύκλο.

Το πρώτο πρόγραμμα πρόσδεσης, που χρησιμοποιεί προσομοιώσεις ανόπτωσης με χρήση Monte Carlo μεθόδους, ήταν το AutoDock. Δεκάδες χιλιάδες βήματα πραγματοποιούνται συνήθως σε κάθε κύκλο, ενώ στην αρχή κάθε νέου κύκλου η θερμοκρασία ελαττώνεται.

### **Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic algorithms-GA)**

Στην κατηγορία αυτή, η ευκαμψία του ΦΜ (γύρω από τους δεσμούς περιστροφής του) κωδικοποιείται σε γονίδια. Οι γενετικές λειτουργίες της διασταύρωσης και της μετάλλαξης, που στοχεύουν εκλεκτικά στα γονίδια αυτά, αντιπροσωπεύουν την ευκαμψία του μορίου *per se*. Οι αλγόριθμοι αυτοί προϋποθέτουν ότι οι καλύτερες λύσεις του προχωρούν στο επόμενο στάδιο (επόμενη γενιά). Πάνω σε αυτές πραγματοποιούνται τυχαίες ή μη μεταλλάξεις και διασταυρώσεις προκειμένου να αυξηθεί η γενετική διαφοροποίηση και να αποφευχθεί η πρόωρη σύγκλιση. Το μέγεθος του πληθυσμού, η συχνότητα διασταυρώσεων και μεταλλάξεων, όπως επίσης και ο αριθμός των επαναλήψεων είναι παράμετροι, που επηρεάζουν το αποτέλεσμα της πρόσδεσης. Συνήθως δεν πραγματοποιείται ελαχιστοποίηση της ενέργειας, μέχρι να γίνει σύγκλιση. Παραδείγματα

προγραμμάτων πρόσδεσης, που χρησιμοποιούν γενετικούς αλγόριθμους, είναι το Gold και το Autodock. Ο αλγόριθμος GOLD ήταν ο πρώτος αλγόριθμος πρόσδεσης, που δοκιμάστηκε με επιτυχία σε ένα μεγάλο σετ (>100) συμπλόκων πρωτεΐνης-προσδέτη.

### **Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής**

Η μέθοδος της Μοριακής Δυναμικής MD αντίθετα με τους αλγόριθμους MC δε μπορεί να υπερπηδήσει ενεργειακά φράγματα μεγαλύτερα από 1-2 kT εντός λογικών χρόνων προσομοίωσης. Το αποτέλεσμα είναι η εφαρμογή της να οδηγεί εύκολα σε παγίδευση σε τοπικά ελάχιστα. Έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι, που επιτρέπουν βελτιωμένη διερεύνηση της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας πρόσδεσης. Θεωρητικά μπορούν να διερευνηθούν όλοι οι βαθμοί ελευθερίας του υποδοχέα. Ωστόσο, ο χρόνος προσομοίωσης για κάθε σύμπλοκο περιορίζει τη χρήση της μεθόδου για ένα μόνο σύμπλοκο κάθε φορά.

### **Διαμορφωτική ευκαμψία του υποδοχέα**

Οι πρωτεΐνες είναι πολύ εύκαμπτα μόρια. Οι διαμορφώσεις τους στην επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας διαχωρίζονται μεταξύ τους από χαμηλής ενέργειας φράγματα. Οι πρωτεϊνικές κινήσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: (α) Μικρής κλίμακας γρήγορες κινήσεις που περιλαμβάνουν κυρίως τις κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, αλλά και κάποιες κινήσεις των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού. Εξ αιτίας των κινήσεων αυτών, οι θήκες πρόσδεσης συχνά εμφανίζουν ιδιαίτερη ευκαμψία, σε σχέση με άλλες περιοχές της επιφάνειας της πρωτεΐνης. (β) Μεγάλης κλίμακας αργές κινήσεις, όπως οι κάμψεις των αρθρώσεων (hinge bending). Αρθρώσεις είναι οι εύκαμπτοι σύνδεσμοι μεταξύ των άκαμπτων τομέων της πρωτεΐνης. Οι σύνδεσμοι αυτοί σταθεροποιούν και περιορίζουν τις κινήσεις των τομέων. Η κάμψη των αρθρώσεων πιστεύεται πως είναι η αιτία της επαγόμενης πρόσδεσης (induced fit) του ΦΜ. (γ) Αλλαγή της διαμόρφωσης (renaturation) κατά την πρόσδεση του μορίου προσδέτη. Η πρόσδεση σταθεροποιεί την τελική διαμόρφωση. Οι διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση μπορούν να περιλαμβάνουν κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων μέχρι μεγάλες κάμψεις των αρθρώσεων. Από τα παραπάνω γίνεται ξεκάθαρο πως οι πρωτεΐνες θα έπρεπε να θεωρούνται εύκαμπτα μόρια κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης, ιδίως όταν γίνεται χρήση ενός πρωτεϊνικού μοντέλου του υποδοχέα,

στου οποίου το ενεργό κέντρο δεν έχει προσδεθεί κάποιο μόριο (από κρυσταλλογραφικές μελέτες). Η ανάπτυξη αλγορίθμων πρόσδεσης, που λαμβάνουν υπόψη τη διαμορφωτική ευκαμψία των πρωτεϊνικών υποδοχέων, ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα, υποβοηθούμενη από τις νέες γενιές επεξεργαστών με μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ και ταχύτητα, καθώς και τη χωρητικότητα των ολοκληρωμένων κυκλωμάτων μνήμης και των σκληρών δίσκων.

Ένας τρόπος να ληφθεί υπόψη η διαμορφωτική ευκαμψία των πρωτεϊνών είναι να ξεκινήσουμε με μια αρχική διαμόρφωση και στη συνέχεια να επιτραπεί η κίνηση μόνο σε συγκεκριμένα αμινοξέα της θήκης του υποδοχέα κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης. Αυτό επιτεύχθηκε από τον Leach και τους συνεργάτες του, οι οποίοι χρησιμοποίησαν μια μέθοδο, που εξερευνά το διαμορφωτικό χώρο των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης, λαμβάνοντας τιμές για τις διέδρες γωνίες τους από μια βάση δεδομένων (rotamer library). Διατηρώντας τον πεπτιδικό σκελετό σταθερό, ο αλγόριθμος επιχειρεί να βρει το ολικό ελάχιστο της ενέργειας, μεταβάλλοντας τις διαμορφώσεις των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης και του ΦΜ. Ο Sandak και οι συνεργάτες του εισήγαγαν μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση, που δεν λαμβάνει υπόψη τις κινήσεις των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, αλλά επιτρέπει τις κινήσεις των σταθερών τμημάτων των πρωτεϊνών μέσω των κάμψεων των αρθρώσεών τους, που συνεισφέρουν σημαντικά στη συνολική πρόσδεση. Έτσι, κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης επιτρέπεται η σχετική κίνηση των σταθερών τμημάτων – του ενός σε σχέση με τον άλλο. Εντούτοις το ίδιο το τμήμα διατηρείται σταθερό στη διαμόρφωσή του. Ο Schnecke και οι συνεργάτες του περιέγραψαν μία μεθοδολογία (SLIDE), που λαμβάνει υπ' όψη την ευκινησία του ΦΜ και του υποδοχέα, όταν άτομα του ενός προσδεθούν στα άτομα του άλλου. Αυτό επιτυγχάνεται με κατευθυνόμενη περιστροφή του ΦΜ ή των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα από τέτοιες μελέτες δείχνουν ότι η επιλογή της αρχικής διαμόρφωσης του ΦΜ είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την πρόσδεση.

Μια άλλη κατηγορία μεθόδων χρησιμοποιεί ένα σύνολο πιθανών διαμορφώσεων, που έχουν προκύψει από πειραματικά δεδομένα: π.χ. περίθλασης ακτίνων-X, NMR, ή ακόμα και από προσομοίωση του μοριακού συστήματος με χρήση αλγορίθμων Μοριακής Δυναμικής ή Monte Carlo. Μία από τις πρώτες μεθόδους που έκαναν χρήση των πιθανών διαμορφωμένων, περιγράφηκε από τον Knegtel και τους συνεργάτες του, που χρησιμοποίησαν ένα σύνθετο πλέγμα (energy-weighted average ή geometry weighted average), που χρησιμοποιούσε διαμορφώσεις

του συμπλόκου Υ-ΦΜ, προερχόμενες από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ ή NMR. Αυτή η μέση διαμόρφωση από τα πειραματικά δεδομένα (αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των διαμορφώσεων) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ενέργειας αλληλεπίδρασης μέσα στο σύνθετο πλέγμα για κάθε «άτομο αισθητήρα». Το πλέγμα, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για τη μοριακή πρόσδεση με μια απλή ανάγνωση των τιμών της ενέργειας αλληλεπίδρασης, που αποθηκεύτηκαν προηγουμένως.

Ο Glaussen και οι συνεργάτες του εισήγαγαν σχετικά πρόσφατα το εργαλείο εύκαμπτης πρόσδεσης FlexE, που χρησιμοποιεί υπερτιθέμενα τμήματα της πρωτεΐνης, για να μεταβάλλει τη διαμόρφωσή της. Όλα τα βασικά τμήματα του αλγορίθμου, που αφορούν την αναπαράσταση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, τη σταδιακή ανοικοδόμηση και τη βαθμολόγηση της πρόσδεσης, προέρχονται από τον αρχικό κώδικα του FlexX μετά από κατάλληλη προσαρμογή τους.

Η ευκαμψία των πρωτεϊνών στη διαδικασία της πρόσδεσης είναι πολύ σημαντικό να συμπεριληφθεί, ιδίως όταν τα μοντέλα των μορίων έχουν χαμηλή ανάλυση. Αυτό συμβαίνει κυρίως σε περιπτώσεις, που ο υποδοχέας έχει μοντελοποιηθεί με βάση τη διαμόρφωση ενός άλλου υποδοχέα ομόλογης σειράς. Μια πιο νέα προσέγγιση εισήχθη από τον Wojciechowski και τους συνεργάτες του [29], στην οποία τόσο το ΦΜ, όσο και ο υποδοχέας αναπαραστώνται με προσεγγιστικά μοντέλα, αντισταθμίζοντας τις δομικές ανακρίβειες, που προκύπτουν από τη θεωρητική πρόβλεψη του υποδοχέα. Με χρήση εξονυχιστικής μελέτης στις 6 διαστάσεις του μορίου προσδέτη (βαθμοί ελευθερίας μεταφοράς και περιστροφής), η καλύτερη σχετική διευθέτηση των δύο μορίων υπολογίζεται με βάση τη στερική και χημική συμπληρωματικότητα.

## **Ανάλυση αλγόριθμου σταδιακής ανοικοδόμησης (FlexX-Sybyl)**

### **1. Φυσικοχημική προσέγγιση**

Το λογισμικό FlexX αποτελεί μεθοδολογία προσομοίωσης της πρόσδεσης των φαρμακευτικών μορίων σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Η φυσικοχημική προσέγγιση, που χρησιμοποιεί το λογισμικό, συνίσταται:

- (i) Στην ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του φαρμακευτικού μορίου,
- (ii) Μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-υποδοχέα, και

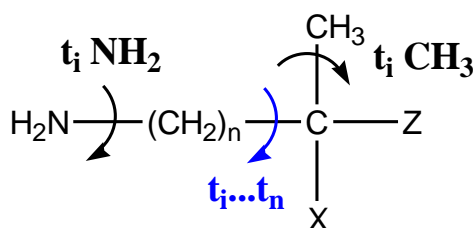


- (iii) Εφαρμογή κριτηρίων βαθμολόγησης της πρόσδεσης του φαρμακευτικού μορίου – υποδοχέα, για τη σύγκριση των παραγόμενων αποτελεσμάτων.

(i) *Ανάλυση διαμορφωτικού χώρου του φαρμακευτικού μορίου*

Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου για ένα φαρμακευτικό μόριο, δηλαδή η εύρεση διαμορφωμένων χαμηλής ενέργειας, επιτελείται από τον αλγόριθμο MIMUMBA. Για κάθε αλκυλικό απλό δεσμό (t) του φαρμακευτικού μορίου ορίζεται μια ομάδα τιμών των διεδρων γωνιών του. Εξαιρέση αποτελούν οι δεσμοί ( $t_i$ ), που είναι γειτονικοί σε μεθυλομάδες ή σε επίπεδες αμινομάδες. Οι δεσμοί αυτοί παραμένουν ίδιοι, όπως δίνονται στην αρχική διαμόρφωση (Σχήμα 9.20). Όλοι οι υπόλοιποι δεσμοί αποτιμώνται αυτόματα από βάση δεδομένων, που περιέχει περισσότερα από 900 τμήματα μορίων με ένα κεντρικό απλό δεσμό. Εκτός από την αναγνώριση κάθε τμήματος του μορίου, παρέχεται και ένα ιστόγραμμα για τις τιμές των διεδρων γωνιών από τη Δομική Βάση Δεδομένων του Cambridge (Cambridge Structural Database) [148]. Οι τιμές των διεδρων γωνιών με τη μεγαλύτερη επαναληπτικότητα στο ιστόγραμμα, επιλέγονται για την εύρεση των διαμορφώσεων χαμηλής ενέργειας.

Για τα συστήματα των δακτυλίων παράγονται πολλαπλές διαμορφώσεις με το λογισμικό SCA. Το πρόγραμμα αυτό υπολογίζει εναλλακτικές διαμορφώσεις των πολυκυκλικών συστημάτων, που περιέχουν πενταμελείς έως επταμελείς δακτυλίους.



**Σχήμα 9.20:** Οι διεδρες γωνίες που παραμένουν σταθερές  $t_i$  ( $t_i = \text{initial value}$ ) και οι μεταβαλλόμενες  $t_i \dots t_n$  ενός μορίου κατά την πρόσδεσή του στον υποδοχέα. Τα X, Z παριστάνουν το υπόλοιπο τμήμα του μορίου.

(ii) *Μοντελοποίηση της αλληλεπίδρασης φαρμακευτικού μορίου – υποδοχέα*

Κατά την αλληλεπίδραση του φαρμακευτικού μορίου ή τμήματός του στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα υπάρχουν πολλοί τοπογραφικοί περιορισμοί. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το ακόλουθο μοντέλο που περιγράφει τις μοριακές

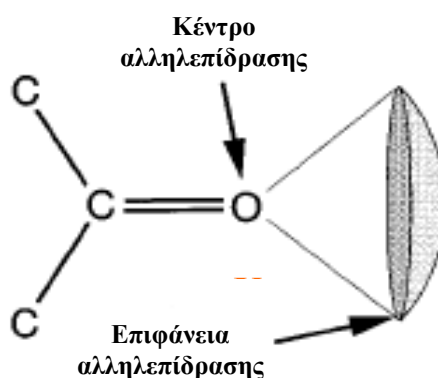
αλληλεπιδράσεις, βασισμένο σε σφαιρικές επιφάνειες. Για κάθε τμήμα του μορίου, που αλληλεπιδρά, ορίζεται ο *τύπος αλληλεπίδρασης* και η *τοπογραφική επιφάνεια αλληλεπίδρασης*.

Οι τύποι της αλληλεπίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.6.

**Πίνακας 9.6:** Τύποι αλληλεπίδρασης Υ-ΦΜ

<i>Τύπος αλληλεπίδρασης</i>	<i>Παράδειγμα</i>
Δότες υδρογόνου για δεσμούς H	O-H, N-H
Ιόντα μετάλλων	Zn <sup>2+</sup>
Δέκτες δεσμών υδρογόνου ή ιόντων μετάλλων	C=O καρβοξυλομάδων C=O, S=O, V=O, R-O-H, R <sub>2</sub> O, R <sub>3</sub> N
Αρωματικά συστήματα	Ph-
Ομάδες που αλληλεπιδρούν με αρωματικά συστήματα	Αρωματικές ομάδες Μεθυλομάδες Αμιδομάδες

Η τοπογραφική επιφάνεια της αλληλεπίδρασης περιλαμβάνει ένα κέντρο αλληλεπίδρασης K και μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης, η οποία ορίζεται από το τόξο της σφαιρικής επιφάνειας με κέντρο K και ακτίνα ρ. Οι πιθανοί τύποι των επιφανειών αλληλεπίδρασης είναι οι σφαίρες, οι κώνοι, τμήματα κόλυρων κώνων και τετραγωνικά τμήματα κωνικών επιφανειών (Σχήμα 9.21).

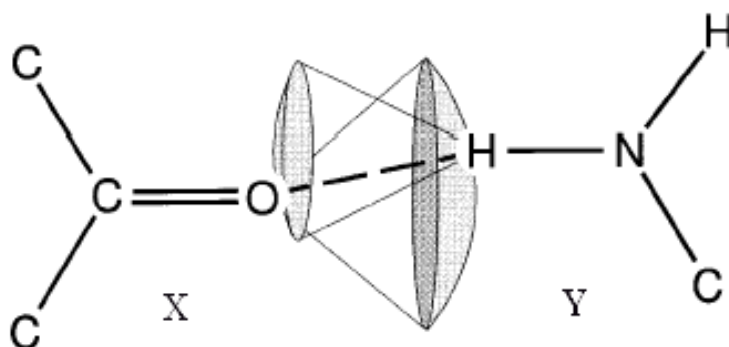


**Σχήμα 9.21:** Ορισμός τοπογραφικής επιφάνειας αλληλεπίδρασης για την καρβονυλομάδα.

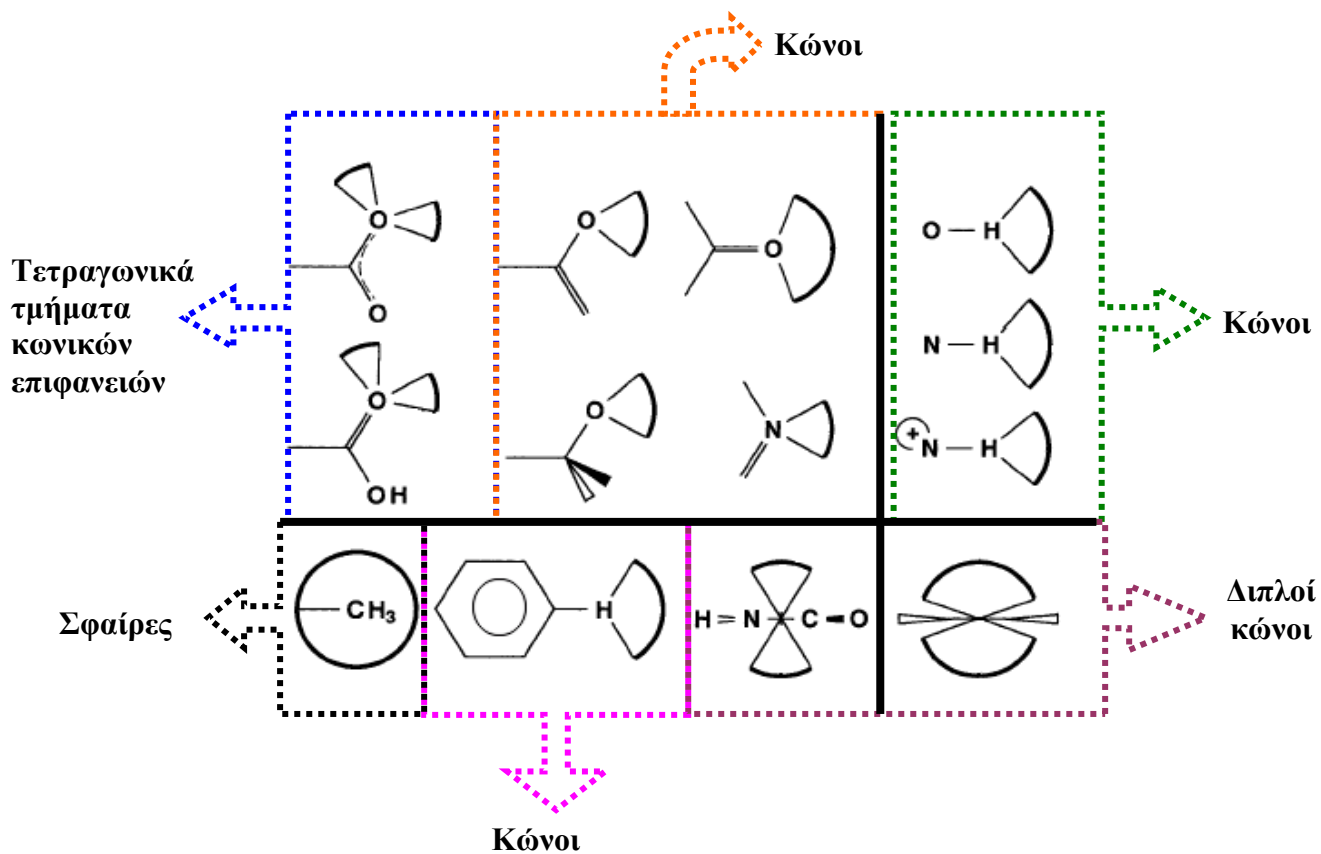
Η αλληλεπίδραση μιας ομάδας X του φαρμακευτικού μορίου με μια ομάδα Y του υποδοχέα επιτυγχάνεται, όταν:

- Ο τύπος αλληλεπίδρασης μεταξύ των ομάδων X και Y είναι συμβατός,
- Το κέντρο αλληλεπίδρασης της ομάδας X, βρίσκεται σχεδόν πάνω στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης της ομάδας Y και αντίστροφα (Σχήμα 9.22).

Τα γεωμετρικά σχήματα των επιφανειών αλληλεπίδρασης, που χρησιμοποιούνται στο λογισμικό FlexX, παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.23. Για τα μέταλλα η επιφάνεια αλληλεπίδρασης θεωρείται ότι είναι πάντα σφαιρική.



**Σχήμα 9.22:** Προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση, μέσω δεσμού υδρογόνου του οξυγόνου της καρβονυλομάδας και του αζώτου της αμινομάδας, είναι να βρίσκεται το κέντρο αλληλεπίδρασης της μιας ομάδας στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης της άλλης ομάδας.



**Σχήμα 9.23:** Γεωμετρικά σχήματα αλληλεπίδρασης που χρησιμοποιούνται στο λογισμικό FlexX. Το επάνω αριστερά τεταρτημόριο περιλαμβάνει δέκτες δεσμών υδρογόνου, το επάνω δεξιά δότες δεσμών υδρογόνου, το κάτω αριστερά άτομα υδρογόνου αρωματικών δακτυλίων, μεθυλίων και αμιδίων, ενώ το κάτω δεξιά περιλαμβάνει κέντρα αρωματικών δακτυλίων.

(iii) Βαθμολόγηση της πρόσδεσης

Πριν από την πρόσδεση, το μόριο έχει αυξημένη εντροπία. Μπορεί δηλαδή θεωρητικά να προσδεθεί σε διάφορες θέσεις του υποδοχέα. Όταν όμως προσδεθεί, η εντροπία ελαττώνεται ( $\Delta S < 0$ ). Δεν έχει πια την ευελιξία να προσεγγίσει οποιοσδήποτε θέσεις του υποδοχέα. Η πρόσδεση στον υποδοχέα επιφέρει ελάττωση στην  $\Delta H$ , επειδή δημιουργούνται ισχυρότεροι δεσμοί ( $\Delta H < 0$ ). Η πρόσδεση θα είναι εφικτή ( $\Delta G < 0$ ), μόνο εάν ο ενθαλπικός παράγοντας ( $\Delta H$ ) είναι κατά απόλυτη τιμή μικρότερος του εντροπικού ( $\Delta H < T\Delta S$ ). Η βαθμολόγηση των παραγόμενων αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση συνάρτησης, που υπολογίζει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης  $\Delta G$  για το σύμπλεγμα φαρμάκου – υποδοχέα.

$$\begin{aligned}
\Delta G &= \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}} \quad (1) && \text{Πρώτο σκέλος} \\
&+ \Delta G_{\text{hb}} \times \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (2) \\
&+ \Delta G_{\text{io}} \times \sum_{\text{ionic interactions}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (3) && \text{Δεύτερο σκέλος} \\
&+ \Delta G_{\text{aro}} \times \sum_{\text{aromatic interactions}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (4) && (9.10) \\
&+ \Delta G_{\text{lipo}} \times \sum_{\text{lipo.con.}} f^*(\Delta R) \quad (5) && \text{Τρίτο σκέλος}
\end{aligned}$$

Η παραπάνω συνάρτηση (9.10) χωρίζεται σε τρία σκέλη. Το πρώτο (1) αποτελείται από τη σταθερά  $\Delta G_0$  και τον όρο  $\Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}}$  ( $N_{\text{rot}}$  είναι ο αριθμός των δεσμών με δυνατότητα περιστροφής), που λαμβάνει υπόψη την ελάττωση της εντροπίας κατά την πρόσδεση του φαρμακευτικού μορίου.

Το δεύτερο σκέλος περιλαμβάνει τις ενεργειακές συνεισφορές των ομάδων, που αλληλεπιδρούν, όπως οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ ουδέτερων ατόμων (2), οι γέφυρες άλατος, φορτισμένοι δεσμοί υδρογόνου (3), καθώς και οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις (4). Καθένας από τους παραπάνω όρους αποτελείται από μια καθορισμένη συνεισφορά για κάθε αλληλεπίδραση (π.χ  $\Delta G_{\text{hb}}$ ), πολλαπλασιασμένη με μία συνάρτηση απόκλισης από την ιδανική συμπεριφορά (penalty function)  $f(\Delta R, \Delta \alpha)$ . Η παράμετρος  $\Delta \alpha$  αναφέρεται στην απόκλιση από την ιδανική γεωμετρία του συστήματος. Η παραπάνω είναι μια γραμμική συνάρτηση, στην οποία υπολογίζονται οι αποκλίσεις από την ιδανική τοπογραφική προσέγγιση, που προκύπτει από την ιδανική απόσταση μεταξύ των κέντρων των ατόμων. Πιο συγκεκριμένα:

$$\Delta R = R - R_0 \quad (9.11), \text{ όπου:}$$

$R$ : η απόσταση μεταξύ των κέντρων των ατόμων, και  $R_0$ : η ιδανική τιμή της απόστασης, υπολογισμένη ως το άθροισμα των δύο ακτίνων van der Waals, η καθεμία από αυτές αυξημένη κατά  $0.3 \text{ \AA}$ .

Δηλαδή, στο δεύτερο σκέλος βαθμολογείται, η απόκλιση από την ιδανική τοπογραφία (match score).

Το τρίτο σκέλος, βαθμολογεί την επαφή μεταξύ ενός ατόμου του φαρμακευτικού μορίου και ενός ατόμου του υποδοχέα. Παρακάτω δίνονται οι τιμές του παράγοντα  $f^*(\Delta R)$  ως άθροισμα όλων των ζευγών επαφών ατόμου – ατόμου. Ο παράγοντας αυτός συνεισφέρει θετικά για επαφές σε ιδανική απόσταση, και αρνητικά

για απαγορευτικά κοντινές αποστάσεις. Στο τρίτο σκέλος βαθμολογείται, δηλαδή, η αποτελεσματική επαφή μεταξύ των ατόμων (contact score).

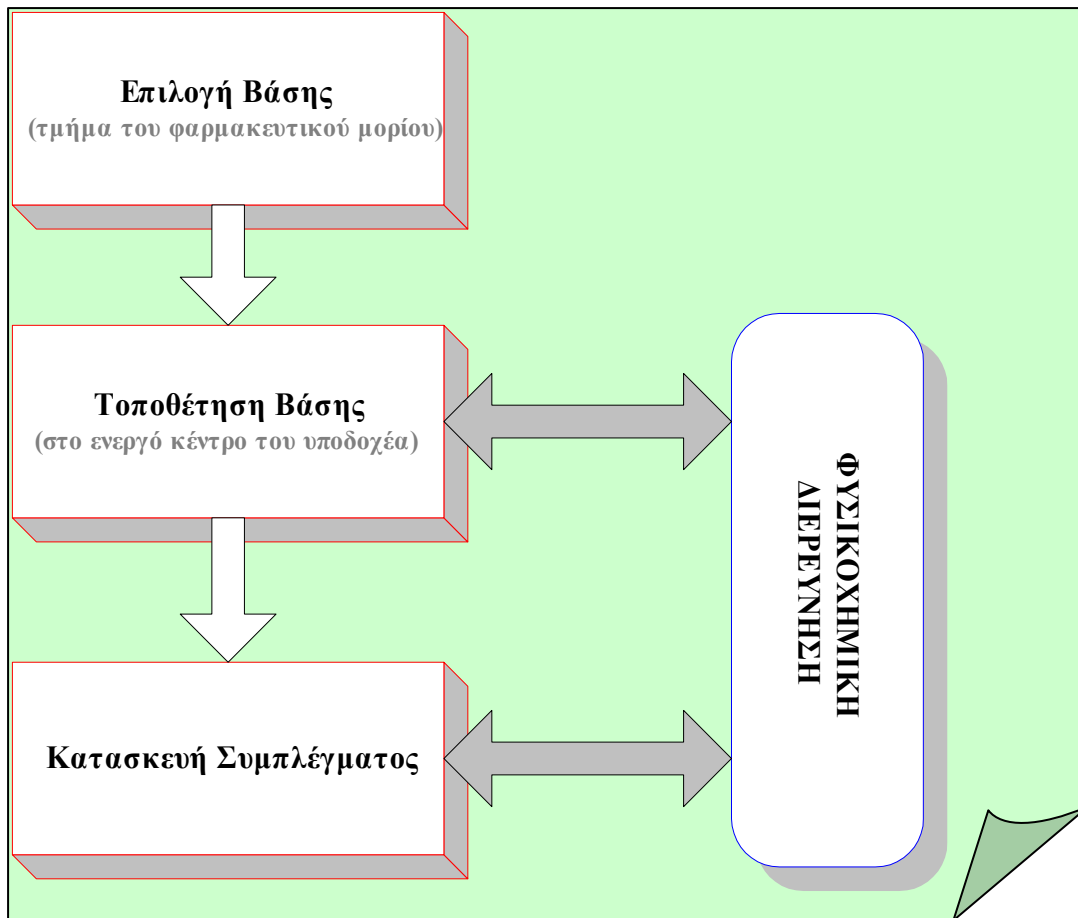
$$f^*(\Delta R) = \begin{cases} 0 & \Delta R > 0.6 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{\Delta R - 0.2}{0.4} & 0.2 \text{ \AA} < \Delta R \leq 0.6 \text{ \AA} \\ 1 & -0.2 \text{ \AA} < \Delta R \leq 0.2 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{-\Delta R - 0.2}{0.4} & -0.6 \text{ \AA} < \Delta R \leq -0.2 \text{ \AA} \\ \frac{\Delta R + 0.6}{0.2} & \Delta R \leq -0.6 \text{ \AA} \end{cases} \quad (9.12)$$

## Αλγόριθμος πρόσδεσης

Η παραπάνω φυσικοχημική προσέγγιση αποτελεί ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα του συνολικού αλγορίθμου πρόσδεσης, που παριστάνεται στο Διάγραμμα 9.1.

Ο αλγόριθμος πρόσδεσης του λογισμικού FlexX βασίζεται σε μια στρατηγική σταδιακής κατασκευής, η οποία αποτελείται από τρεις φάσεις:

- (1) *Επιλογή της βάσης.* Η πρώτη φάση του αλγορίθμου εστιάζεται στην επιλογή ενός τμήματος του φαρμακευτικού μορίου, το οποίο ονομάζεται βάση.
- (2) *Τοποθέτηση της βάσης.* Στη δεύτερη φάση, το τμήμα της βάσης τοποθετείται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, ανεξάρτητα από το υπόλοιπο τμήμα του μορίου του φαρμάκου.
- (3) *Σύμπλεξη φαρμακευτικού μορίου - υποδοχέα.* Στην τελευταία φάση, το φαρμακευτικό μόριο ανοικοδομείται και προσδένεται σταδιακά, ξεκινώντας από διαφορετικές τοποθετήσεις της βάσης.



**Διάγραμμα 9.1:** Σχηματική απεικόνιση του αλγόριθμου προσομοίωσης

Στη συνέχεια θα αναλυθούν τα τρία στάδια του αλγόριθμου πρόσδεσης.

### **A) Επιλογή της βάσης**

Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό στην περαιτέρω διεξαγωγή της μελέτης της πρόσδεσης. Λανθασμένη επιλογή βάσης οδηγεί τον αλγόριθμο σε λάθος εκτιμήσεις για την πρόσδεση του φαρμακευτικού τμήματος στον υποδοχέα.

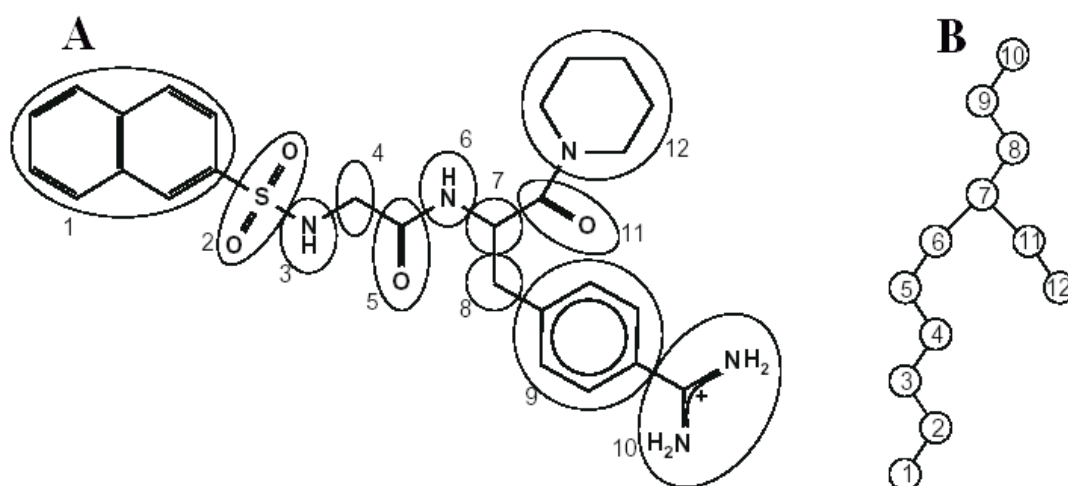
Σε γενικές γραμμές, η βάση πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη, και να μπορεί να προσδιοριστεί ο βέλτιστος προσανατολισμός της. Όσο το μέγεθος του τμήματος της βάσης αυξάνεται, οι αλληλεπιδράσεις του με την πρωτεΐνη αυξάνονται, και συνεπώς μεγαλώνει και η πιθανότητα εύρεσης του ορθού τρόπου πρόσδεσης πάνω σε αυτή. Ταυτόχρονα όμως μεγαλώνει και ο αριθμός δεσμών με ικανότητα περιστροφής, με συνέπεια να

αυξάνεται ο αριθμός των πιθανών διαμορφώσεων του τμήματος της βάσης και ο χρόνος της διαδικασίας πρόσδεσης. Συνεπώς, το ιδανικότερο τμήμα βάσης αποτελείται από πολλές άκαμπτες ομάδες.

Μετά την επιλογή της βάσης, το υπόλοιπο τμήμα του φαρμακευτικού μορίου διαιρείται σε τμήματα. Όσο μικρότερα είναι τα τμήματα, τόσο καλύτερα είναι τα αποτελέσματα.

Σε ένα πρώτο στάδιο, το φαρμακευτικό μόριο διαιρείται σε κάθε αλκυλικό δεσμό με ελευθερία περιστροφής (Σχήμα 9.23). Δεσμοί με ελευθερία περιστροφής θεωρούνται όλοι οι δεσμοί, εκτός των διπλών, τριπλών, και δεσμών ενωμένων σε μεθυλομάδες και αμινομάδες, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Τα συστήματα δακτυλίων παραμένουν αδιαίρετα και τοποθετούνται πάντα μέσα στο ίδιο τμήμα.

Τα τμήματα του μορίου αποτελούν τα δομικά συστατικά για τη μετέπειτα ανοικοδόμηση του μορίου πάνω στη βάση.



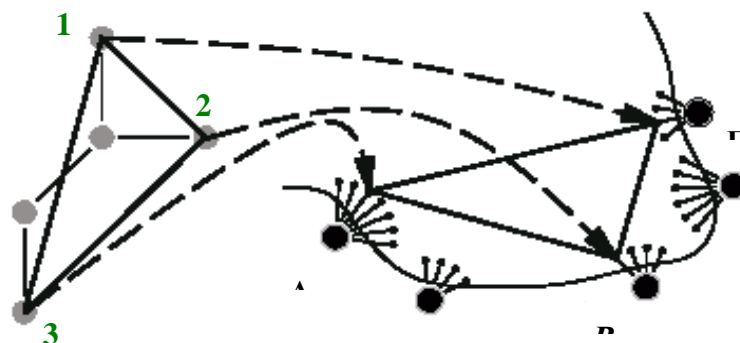
**Σχήμα 9.23:** (A) Αποικοδόμηση του αναστολέα της θρομβίνης NAPAP σε 12 τμήματα και (B) Παράσταση των τμημάτων του μορίου υπό τη μορφή δένδρουγραμματος

## B) Τοποθέτηση της βάσης στο χώρο σύμπλεξης

Ο στόχος του αλγόριθμου “τοπογραφίας σύμπλεξης” της βάσης (pose clustering), είναι η εύρεση θέσεων της βάσης μέσα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, στις οποίες υφίστανται ταυτόχρονα πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίου και



της πρωτεΐνης. Η κύρια λειτουργία του αλγόριθμου είναι να σχηματίζει ταυτόχρονα τριάδες αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φαρμάκου και της πρωτεΐνης (Σχήμα 9.24).



**Σχήμα 9.24:** Ο αλγόριθμος “τοπογραφίας σύμπλεξης” βασίζεται στη δημιουργία τριών κέντρων αλληλεπίδρασης της βάσης του φαρμακευτικού μορίου (γκρι σφαίρες 1,2,3) πάνω σε τρία συγκεκριμένα σημεία αλληλεπίδρασης του ενεργού κέντρου του υποδοχέα (μαύρα μικρά σφαιρίδια A,B,Γ), για να οριστεί ένας μοναδικός τρόπος πρόσδεσης ( $1\Gamma$   $2B$ ,  $3A$ ).

Για το λόγο ότι το τμήμα της βάσης μπορεί να σχηματίσει περισσότερες από τρεις αλληλεπιδράσεις, αυτές ομαδοποιούνται διαδοχικά. Εάν το τμήμα της βάσης είναι πολύ μικρό, ενδέχεται να μην σχηματίζονται τρεις αλληλεπιδράσεις ταυτόχρονα. Τότε, το λογισμικό χρησιμοποιεί μια διαφορετική ρουτίνα, η οποία υπολογίζει μόνο ζεύγη αλληλεπιδράσεων.

### Γ) Κατασκευή του συμπλέγματος μορίου-υποδοχέα

Μετά από μια σειρά υπολογισμών για την εύρεση της ενεργειακά ευνοϊκότερης τοπογραφικής σύμπλεξης της βάσης, αρχίζει η διαδικασία σταδιακής ανοικοδόμησης, η οποία προσθέτει διαδοχικά τα υπολειπόμενα τμήματα του φαρμακευτικού μορίου πάνω στη βάση με επαναληπτικό τρόπο. Η μέθοδος αυτή ανάγεται σε μια δενδροειδή αναζήτηση. Κάθε σημείο διακλάδωσης του δενδρογράμματος αντιπροσωπεύει την τοποθέτηση του επόμενου τμήματος του φαρμακευτικού μορίου.

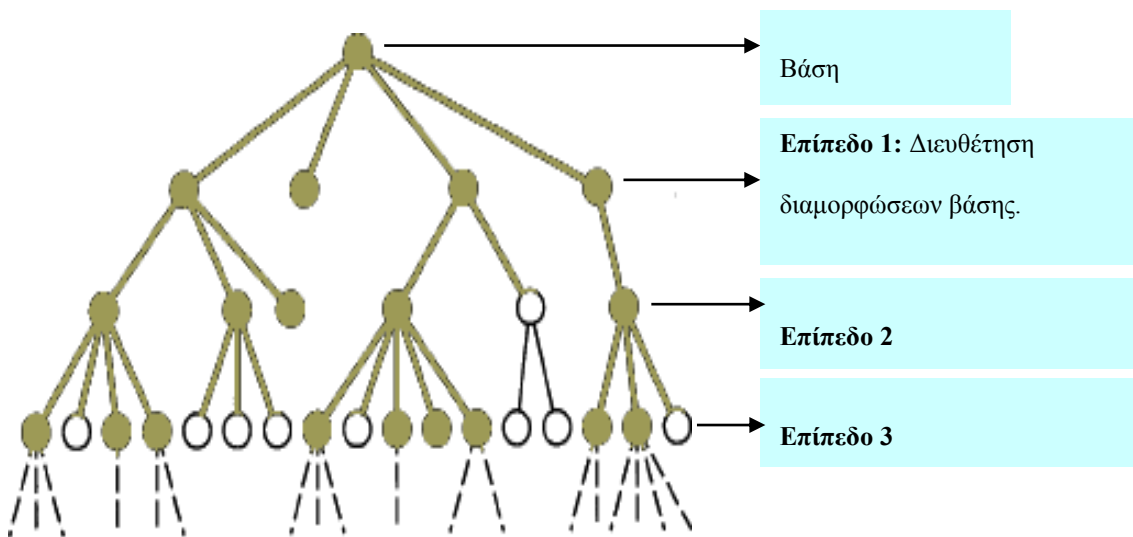
Η επαναληπτική αυτή διαδικασία συγκροτείται από τα επόμενα στάδια:

- (i) Προσθήκη του επόμενου τμήματος του μορίου σε όλες τις πιθανές διαμορφώσεις,

- (ii) Αναζήτηση των νέων αλληλεπιδράσεων,
- (iii) Βελτιστοποίηση των θέσεων του τμήματος του μορίου και
- (iv) Επιλογή μιας νέας ομάδας λύσεων. Ως ομάδα λύσεων θεωρείται κάθε τμήμα του δενδρογράμματος, που ξεκινά από τη βάση και καταλήγει στο  $i-1$  τμήμα του φαρμακευτικού μορίου, όπου  $i$  ο αριθμός των τμημάτων του φαρμακευτικού μορίου.

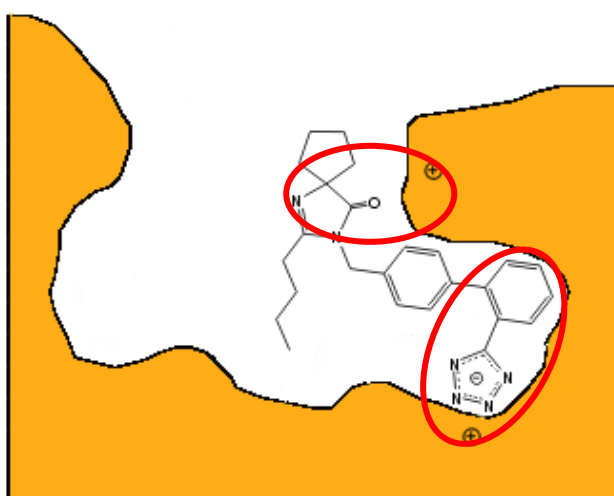
Στο πρώτο επίπεδο του δενδρογράμματος διευθετούνται οι διαφορετικές διαμορφώσεις του τμήματος της βάσης. Κάθε ένα από τα υπόλοιπα επίπεδα αντιπροσωπεύει μία εναλλακτική τοποθέτηση του επόμενου τμήματος του μορίου στο προηγούμενο τμήμα (Σχήμα 24). Η σειρά, με την οποία προστίθενται τα τμήματα, διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια της δενδροειδούς αναζήτησης.

Εάν υπάρχουν εναλλακτικές τοποθετήσεις του ίδιου τμήματος, προστίθενται πρώτα τα τμήματα που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου ή γέφυρες άλατος, αφού οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πιο άμεσες και μπορεί να προσδιοριστεί η γεωμετρία τους με ακρίβεια (Σχήμα 25). Η τοπογραφία της προσθήκης ενός τμήματος εξαρτάται από την τοπογραφία του προηγούμενου τμήματος.



**Σχήμα 9.25:** Δενδρογράμμα του αλγόριθμου σταδιακής ανοικοδόμησης του φαρμακευτικού μορίου. Το πρώτο επίπεδο περιλαμβάνει τις διαφορετικές διευθετήσεις των διαμορφώσεων της βάσης. Τα υπόλοιπα περιλαμβάνουν τις διευθετήσεις των υπόλοιπων τμημάτων του μορίου έως το τμήμα  $i-1$ . Οι έγχρωμες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις διευθετήσεις, που συνεχίζουν στην επόμενη επανάληψη.

Ο στόχος της δενδροειδούς αναζήτησης είναι η εύρεση διαμορφωμένων με ευνοϊκές ενέργειες πρόσδεσης, οι οποίες υπολογίζονται από τη διαδικασία της βαθμολόγησης. Μια εξαντλητική δενδροειδής αναζήτηση είναι αδύνατη, αφού το δέντρο μεγαλώνει εκθετικά, όσο αφορά τους βαθμούς ελευθερίας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται μια τεχνική, όπου μόνο οι  $k$ , καλύτερες ενεργειακά δομές από κάθε επίπεδο, συνεχίζουν την επαναληπτική διαδικασία ανοικοδόμησης [120]. Ο αριθμός  $k$  δε μπορεί να πάρει μεγάλες τιμές, αφού μεγάλος αριθμός δομών επιφέρει αύξηση στον υπολογιστικό χρόνο.



**Σχήμα 9.26:** Πρόσδεση τμημάτων του φαρμακευτικού μορίου ιριπεςαρτάνη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, τα οποία προσδιορίζουν άμεσα την τοπογραφία της συνολικής σύμπλεξης εξαιτίας των αλληλεπιδράσεών τους

#### 4 Λογισμικό DOCK

Η θεωρητική βάση του λογισμικού DOCK είναι παρόμοια με αυτή των προγραμμάτων GRID και GRIN, που αναπτύχθηκαν από τον P. Goodford.

Τα πεδία των πιθανών μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων, που αναπτύσσονται στο περιβάλλον του υποδοχέα, υπολογίζονται πάνω σε ένα πλέγμα σημείων, που μεταξύ τους απέχουν  $0,25\text{\AA}$ .

Οι συντεταγμένες κάθε ατόμου του μορίου προσδέτη προσεγγίζονται από τις αντίστοιχες του εγγύτερου χωρικά σημείου του πλέγματος. Με τον τρόπο αυτό παράγεται μια απλή έκφραση για τον υπολογισμό της ενέργειας αλληλεπίδρασης.

Πιο συγκεκριμένα, η ολική ενέργεια από τις στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δίνεται από την σχέση:

$$E_{LS} = \sum_i Q_G q_i - A_G a_i + B_G b_i \quad (9.13)$$

όπου  $q_i$  είναι το φορτίο του ατόμου  $i$  του μορίου προσδέτη,

$$a_i = 2.0\sqrt{k} (\sqrt{2.0R})^3 \quad (9.14)$$

$$b_i = \sqrt{k} (\sqrt{2.0R})^6 \quad (9.15)$$

$Q_G$  είναι το ηλεκτροστατικό δυναμικό του σημείου του πλέγματος, που βρίσκεται εγγύτερα στο άτομο  $i$  και δίνεται από την ακόλουθη σχέση (13):

$$Q_G = \sum_s \frac{q_s}{r_{Gs}^2} \quad (9.16)$$

$A_G$  και  $B_G$  είναι η ελκτική και απωστική συνεισφορά στο δυναμικό Lennard-Jones και αναφέρεται στο σημείο του πλέγματος, που βρίσκεται εγγύτερα στο άτομο  $i$ , και υπολογίζεται ως:

$$A_G = \sum_s \frac{a_s}{r_{Gs}^6} \quad (9.17)$$

$$B_G = \sum_s \frac{b_s}{r_{Gs}^{12}} \quad (9.18)$$

Οι αθροίσεις εκτελούνται στα άτομα ( $s$ ) του υποδοχέα, τα οποία περιλαμβάνονται στο καθορισμένο πλέγμα,

$q_s$  είναι το φορτίο του ατόμου  $s$

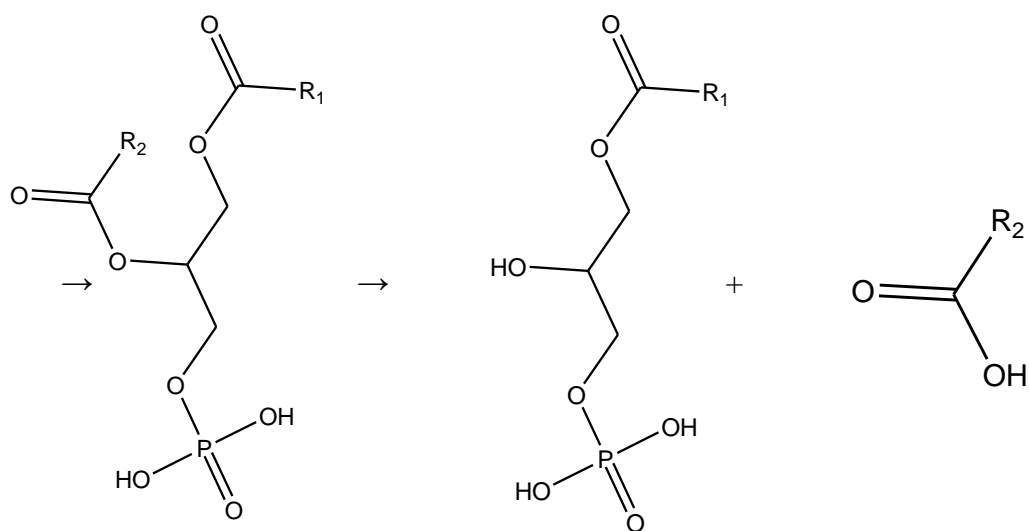
$r_{Gs}$  είναι η απόσταση μεταξύ του κάθε σημείου  $G$  του πλέγματος και του ατόμου  $s$

Οι τιμές για τα  $R$ ,  $k$  αναφέρονται στον τύπο του ατόμου και προκύπτουν από σχετικούς πίνακες.

### **Παράδειγμα**

Η φωσφολιπάση  $A_2$  καταλύει την sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων, παράγοντας αραχιδονικό οξύ. Αυτό μεταβολίζεται σε εικοσανοειδή, στα οποία περιλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες, τα λευκοτριένια και ενεργοποιητές αιμοπεταλίων. Τα μεταβολικά αυτά παράγωγα ενοχοποιούνται για την πρόκληση ρευματοειδούς αρθρίτιδας και βρογχικού άσθματος.

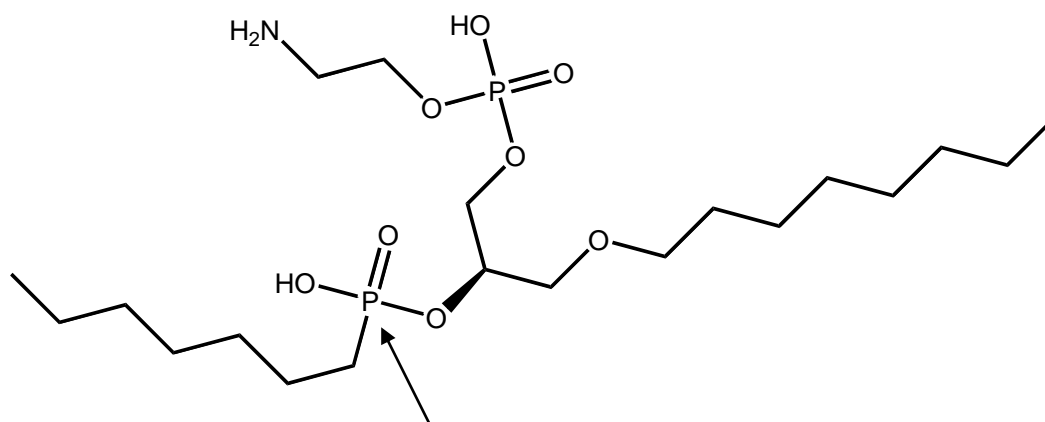
Η ανθρώπινη μη παγκρεατική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> φέρει το όνομά της, γιατί απομονώθηκε από το μη παγκρεατικό, αρθρικό υγρό ασθενών, που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στο όνομά της περιλαμβάνεται επίσης και ο συμβολισμός A<sub>2</sub>, επειδή υδρολύει την *sn*-2 θέση του φωσφογλυκερολικού σκελετού (Βλ. Σχήμα 9.27).



**Σχήμα 9.27:** Υδρολύση φωσφολιπιδίου από την *hnp*s-PLA<sub>2</sub> στη θέση *sn*-2, η οποία υποδεικνύεται από το βέλος

Παρακάτω, περιγράφεται ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου, ο οποίος επιτρέπει την κατανόηση του τρόπου, με τον οποίο το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων. Επίσης παρέχει πληροφορίες για τα σημαντικότερα αμινοξέα, που λαμβάνουν μέρος σε αυτόν. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων του υποστρώματος με το ένζυμο χρησιμοποιείται στη μελέτη αυτή, για τον ορθολογικό σχεδιασμό ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων της *hnp*s-PLA<sub>2</sub>. Ο μηχανισμός αυτός βασίστηκε στη δομή της *hnp*s-PLA<sub>2</sub>, συμπλεγμένης με ένα ανάλογο μεταβατικής κατάστασης, αναφερόμενο στη βιβλιογραφία ως TSA. Η μοριακή δομή του αναλόγου αυτού παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.28. Θεωρήθηκε από τους ερευνητές που παρασκεύασαν το προϊόν, ότι η φωσφονική ομάδα και ειδικότερα οι αλληλεπιδράσεις της με το ένζυμο είναι ίδιες με αυτές του τετραεδρικού ενδιάμεσου, που σχηματίζεται κατά την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων. Με βάση, λοιπόν, τον

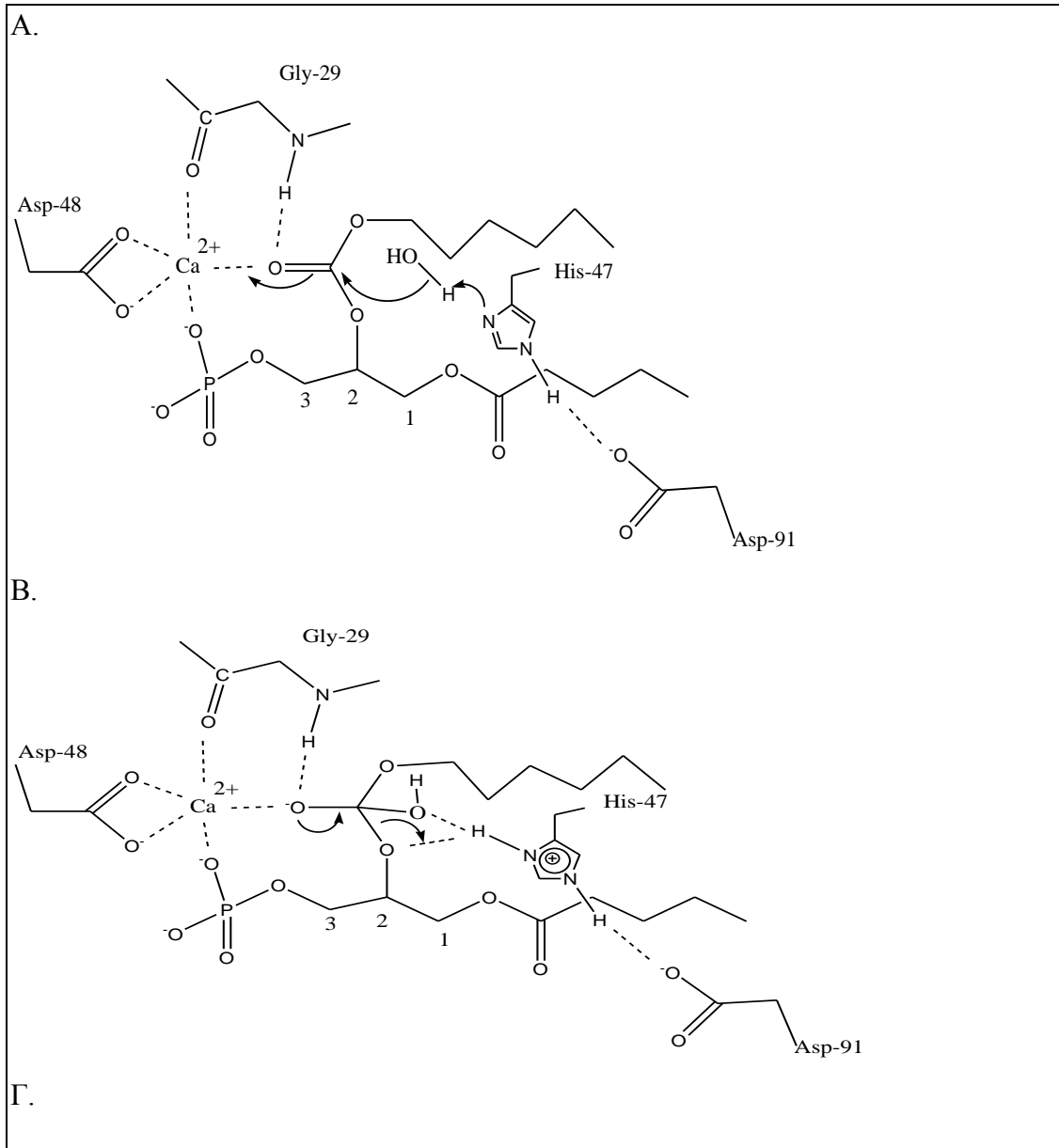
τρόπο αλληλεπίδρασης του TSA με το ένζυμο, προτάθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης του, που περιγράφεται πιο κάτω.

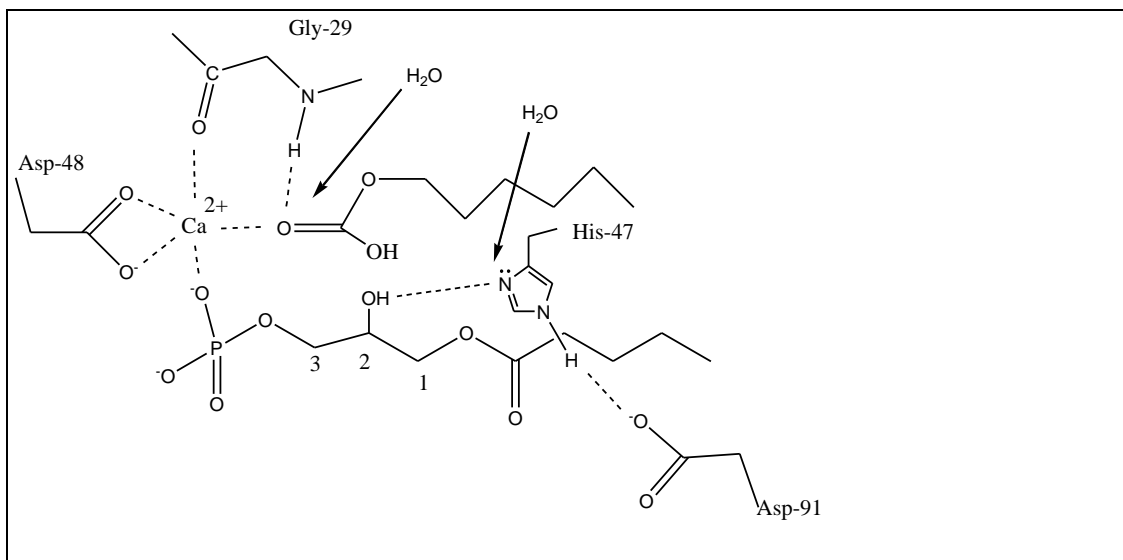


**Σχήμα 9.28:** Μοριακή δομή του αναστολέα TSA

Στο μηχανισμό δράσης προτείνεται ότι η His-47, που αποτελεί αμινοξύ τμήμα του ενεργού κέντρου, αποσπά ένα υδρογόνο από ένα μόριο νερού, που εντοπίζεται στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Το αποσπώμενο πρωτόνιο προσανατολίζεται με τέτοιο τρόπο προς το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, ώστε να ευνοείται ενεργειακά η δημιουργία των προϊόντων της υδρόλυσης. Το θετικό φορτίο που αποκτά το ένζυμο από την απόσπαση του πρωτονίου, πιθανό να σταθεροποιείται από ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου, που περιλαμβάνει την His-47 και το Asp-91. Το φορτίο αυτό μπορεί εύκολα να ανακληθεί, για να γίνει η πρωτονίωση του αλκοξειδίου. Το κατιόν ασβεστίου, από την άλλη, είναι απαραίτητο και για την πρόσδεση του υποστρώματος αλλά και για την υδρόλυση του. Το κατιόν ασβεστίου σταθεροποιείται από τα πέντε οξυγόνα των αμινοξέων His-27, Asp-48, Gly-29 και Gly-31. Το σύμπλεγμα ασβεστίου με τα πέντε οξυγόνα παρουσιάζει γεωμετρική δομή τριγωνικής διπυραμίδας. Το κατιόν ασβεστίου ενοποιεί την κατάλυση και τη σταθεροποίηση του υποστρώματος, παρέχοντας δύο θέσεις πρόσδεσης, μία ισημερινή για το τετραεδρικό ενδιάμεσο και μία αξονική για το οξυγόνο της φωσφορικής ομάδας της *sn-3* θέσης του φωσφολιπιδίου. Σταθεροποιητικό ρόλο παίζει και η Gly-29 με το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου, του υδρογόνου του αζώτου της, με το οξυγόνο του τετραεδρικού ενδιάμεσου. Αναλυτικά ο μηχανισμός παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.29.

Έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά ότι κατά το μηχανισμό δράσης του ενζύμου sPLA<sub>2</sub> εμπλέκονται δύο μόρια νερού, τα οποία βοηθούν στην απομάκρυνση των προϊόντων της ενζυματικής υδρόλυσης. Κατά τη δράση των αναστολέων τα δύο αυτά νερά εκτοπίζονται.





**Σχήμα 9.29:** Πιθανός μηχανισμός δράσης της *sPLA<sub>2</sub>*

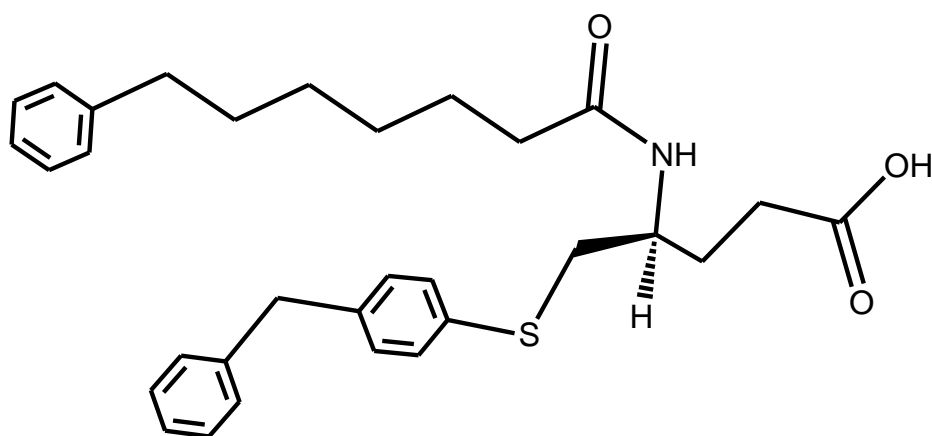
Για τον ορθολογικό σχεδιασμό ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων της *hnpS-PLA<sub>2</sub>* χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FlexX, το οποίο πραγματοποιεί μοριακή πρόσδεση (Docking) ενός μικρού μορίου, που ονομάζεται προσδέτης (ligand) σε ένα μεγαλύτερο μόριο, που ονομάζεται υποδοχέας (receptor). Το λογισμικό FlexX πραγματοποιεί πρόσδεση του προσδέτη στον υποδοχέα και υπολογίζει την ενέργεια πρόσδεσης. Βαθμολόγηση της πρόσδεσης από το FlexX γίνεται ως εξής: Πριν από την πρόσδεση, το μόριο έχει αυξημένη εντροπία. Μπορεί δηλαδή θεωρητικά να προσδεθεί σε διάφορες θέσεις του υποδοχέα. Όταν όμως προσδεθεί, η εντροπία ελαττώνεται ( $\Delta S < 0$ ). Δεν έχει πια την ευελιξία να προσεγγίσει οποιοσδήποτε θέσεις του υποδοχέα. Η πρόσδεση στον υποδοχέα επιφέρει ελάττωση στη  $\Delta H$ , επειδή δημιουργούνται ισχυρότεροι δεσμοί ( $\Delta H < 0$ ). Η πρόσδεση θα είναι εφικτή ( $\Delta G < 0$ ), μόνο εάν ο ενθαλπικός παράγοντας ( $\Delta H$ ) είναι κατά απόλυτη τιμή μεγαλύτερος του εντροπικού ( $\Delta H > T\Delta S$ ). Η βαθμολόγηση των παραγόμενων αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση συνάρτησης, που υπολογίζει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης  $\Delta G$  για το σύμπλεγμα προσδέτη – υποδοχέα.

Κατ' αρχή έγινε επικύρωση της αξιοπιστίας του λογισμικού FlexX. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν έξι μοριακές δομές αναστολέων, που αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι είναι ισχυροί αναστολείς της *hnpS-PLA<sub>2</sub>* και κρυσταλλώνονται μαζί με το ένζυμο, άρα μπορούμε να παρατηρήσουμε τον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με αυτό, καθώς και τη διαμόρφωση που έχουν μέσα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



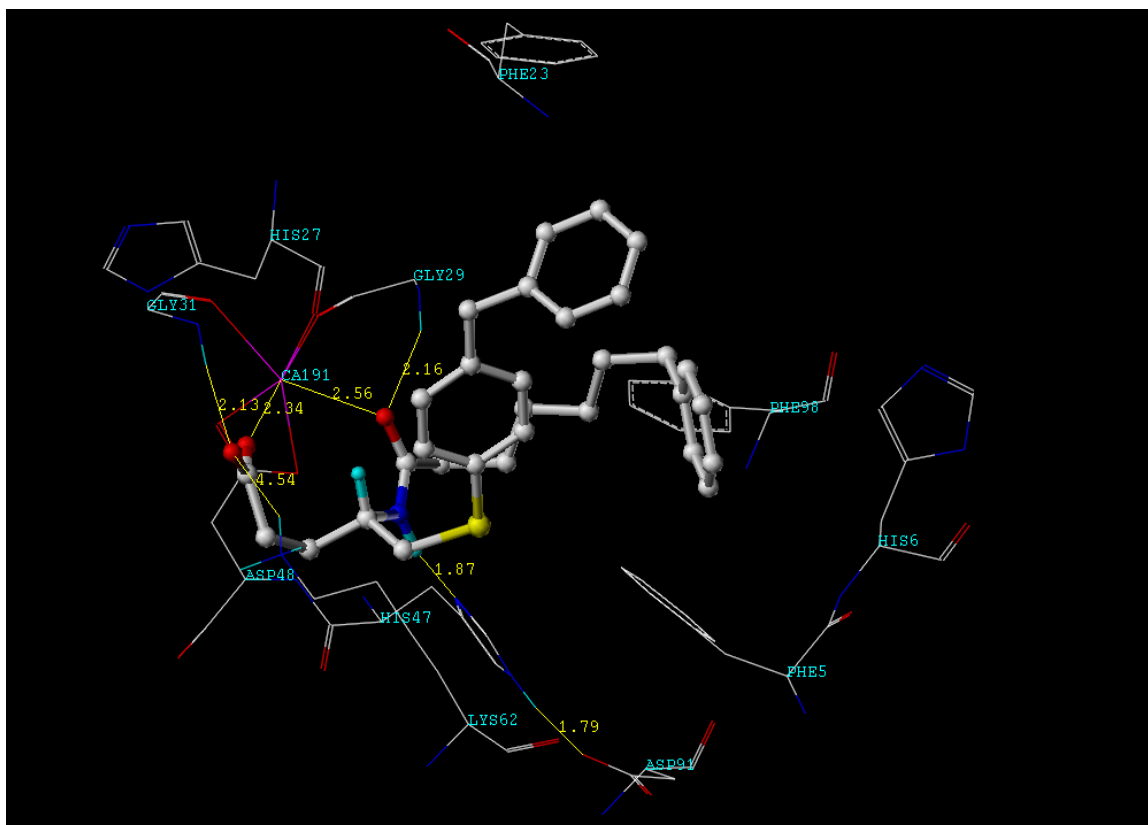
Πραγματοποιώντας πρόσδεση των μορίων αυτών στην hnpS-PLA<sub>2</sub> με το FlexX, το πρόγραμμα αναπαράγει τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ενδεικτικά εδώ, αναφέρεται ο αναστολέας FPL67047XX (Σχήμα 9.30), τον οποίο και μελετάμε διεξοδικότερα στην παρούσα εργασία. Ο αναστολέας αυτός αποτελεί εκτεταμένη τροποποίηση των φωσφολιπιδίων, που είναι το φυσικό υπόστρωμα της hnpS-PLA<sub>2</sub> και το στερεογονικό του κέντρο έχει διαμόρφωση S.



**Σχήμα 9.30:** Δομή του αναστολέα FPL67047XX

Στο Σχήμα 9.31 παριστάνονται οι αλληλεπιδράσεις του παραπάνω αναστολέα με την hnpS-PLA<sub>2</sub>, όπως προέκυψαν από κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

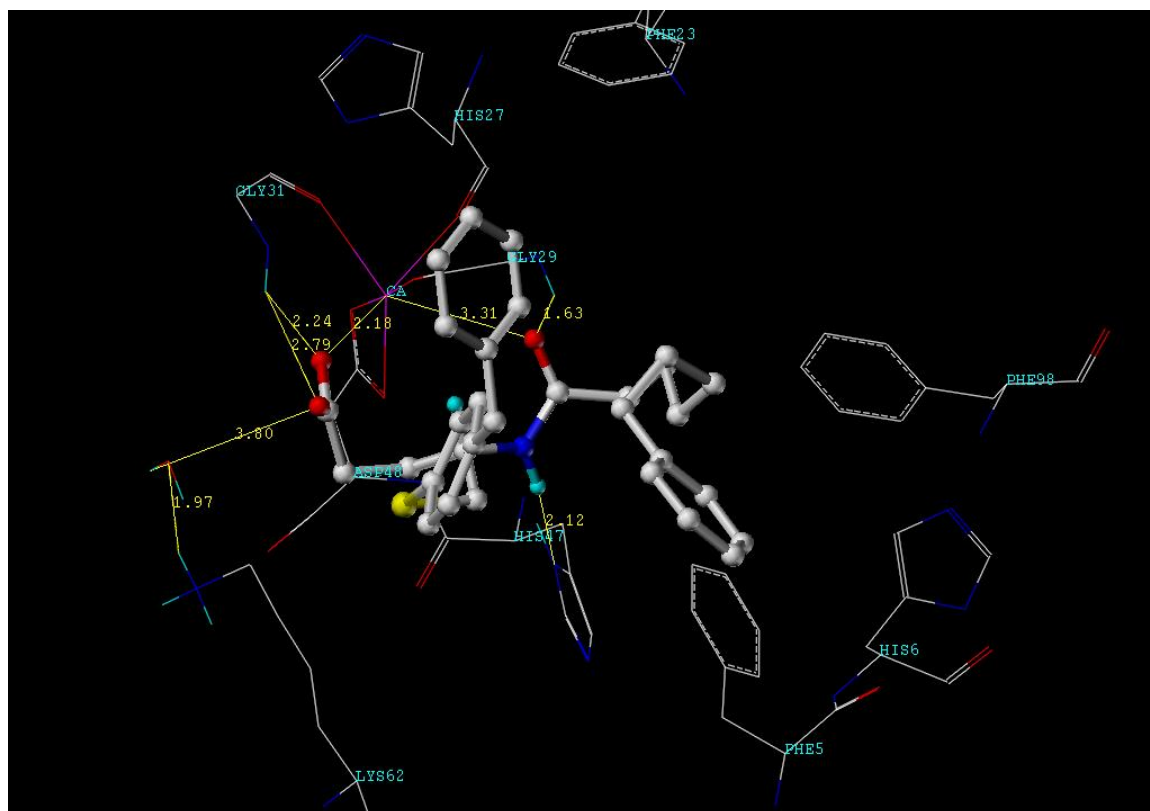


**Εικόνα 9.31:** Ο αναστολέας FPL67047XX κρυσταλλωμένος με την hnpS-PLA<sub>2</sub> από το PDB αρχείο με κωδικό 1KVO, διακριτικής ικανότητας 2,0Å

Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις του αναστολέα με την hnpS-PLA<sub>2</sub> αποτελούν: Δεσμό υδρογόνου του αζώτου του αμιδίου με την His-47, και δύο ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο οξυγόνων, αμιδικού και καρβοξυλίου, με το κατιόν του ασβεστίου. Επίσης παρατηρούνται δύο σταθεροποιητικές αλληλεπιδράσεις, ένας δεσμός υδρογόνου της Gly-29 με το οξυγόνο του αμιδίου και ένας δεσμός υδρογόνου της Gly-31 με το οξυγόνο του καρβοξυλίου, που δεν αλληλεπιδρά με το ασβέστιο. Οι φαινολικοί δακτύλιοι συμμετέχουν σε εκτεταμένες αρωματικές/αλειφατικές και αρωματικές/αρωματικές αλληλεπιδράσεις με τα υδρόφοβα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της hnpS-PLA<sub>2</sub>. Επίσης αλληλεπιδρούν και ενδομοριακά μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα αρωματικό πυρήνα, και ειδικότερα ο φαινολικός δακτύλιος της *sn*-2 αλυσίδας είναι σχεδόν κάθετος προς τους δύο φαινολικούς δακτυλίους της *sn*-1 αλυσίδας. Αν και ογκώδεις, οι αλυσίδες *sn*-1 και *sn*-2, εντούτοις διευθετούνται μέσα στο υδρόφοβο ενεργό κέντρο του ενζύμου, χωρίς η hnpS-PLA<sub>2</sub> να υφίσταται σημαντικές διαμορφωτικές μεταβολές, εκτός από την περιστροφή της πλευρικής αλυσίδας της His-6 εξαιτίας της

μετατόπισής της από τον φαινολικό δακτύλιο *sn*-2 αλυσίδας. Όπως σημειώνεται στη βιβλιογραφική παραπομπή, στην οποία περιγράφεται η κρυσταλλογραφική αυτή δομή, δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση με τη Lys-62, όπως παρατηρείται σε κρυσταλλογραφικές του ίδιου ενζύμου με άλλες δομές αναστολέων. Με βάση λοιπόν την παραπάνω βιβλιογραφική παραπομπή, η κοιλότητα του ενεργού κέντρου, που προσδιορίζεται μεταξύ Lys-62 και του καρβοξυλίου, στερείται αλληλεπιδράσεων. Επομένως αντικατάσταση του καρβοξυλίου με μία εκτεταμένη ομάδα, που να προκαλεί αλληλεπιδράσεις, αναμένεται να αυξάνει την ισχύ του αναστολέα.

Το λογισμικό FlexX αναπαράγει πολύ καλά τις αλληλεπιδράσεις, που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Στο Σχήμα 9.32 παριστάνονται οι αλληλεπιδράσεις και η διαμόρφωση του αναστολέα, μετά από πρόσδεση του στο ένζυμο με το λογισμικό FlexX.



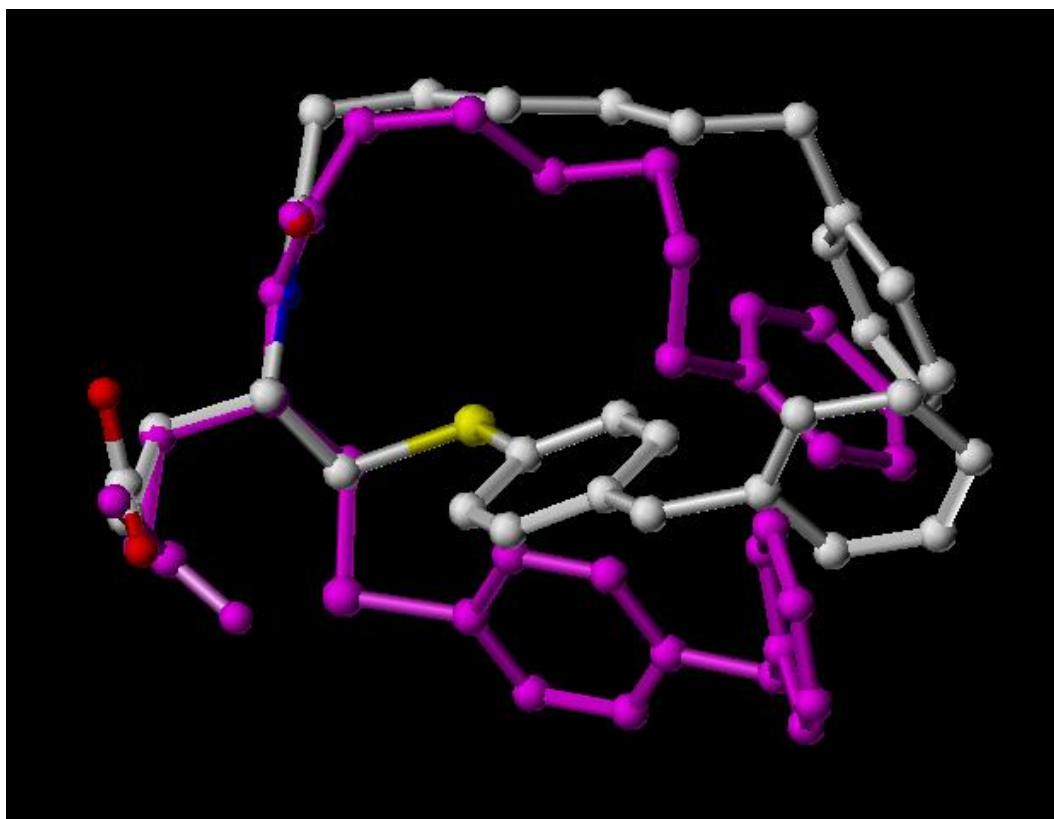
**Σχήμα 9.32:** Ο αναστολέας FPL67047XX μετά από πρόσδεση στη *hnpS*-PLA<sub>2</sub> με το λογισμικό FlexX

Στον πίνακα 9.7 παριστάνονται οι αποστάσεις, που μετρούνται από την κρυσταλλογραφική δομή και αυτές που μετρούνται μετά από πρόσδεση με το FlexX. Όπως παρατηρείται, οι αποκλίσεις είναι μικρότερες του 1 Å. Η Lys-62, όπως σημειώνεται σε μερικά άρθρα που αναφέρονται σε άλλες κρυσταλλικές δομές, αλληλεπιδρά με τον αναστολέα μέσω ενός μορίου νερού. Τέτοια πληροφορία δεν παρέχεται στη βιβλιογραφική παραπομπή με το FPL67047XX – hnpS-PLA<sub>2</sub>. Για τη μελέτη με χρήση του λογισμικού FlexX έγινε χρήση του PDB αρχείου με κωδικό 1DB4, που περιέχει το μόριο νερού, το οποίο αλληλεπιδρά με τη Lys-62 (Βλ. Εικόνα 9.33, στην εικόνα 9.32 δεν υπάρχει αυτή η αλληλεπίδραση). Το οξυγόνο του καρβοξυλίου δεν βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με το μόριο του νερού και δεν συμμετέχει στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου Lys-62 - H<sub>2</sub>O - λειτουργική ομάδα αναστολέα.

**Πινάκας 9.7**

Κυριότερες αλληλεπιδράσεις αναστολέα FPL67047XX – hnpS-PLA <sub>2</sub>	Αποστάσεις Κρυσταλλογραφίας	Αποστάσεις FlexX
Ca <sup>+2</sup> – C-O <sup>-</sup>	2.34Å	2.18Å
Ca <sup>+2</sup> - C=O	2.56Å	3.31Å
His-47 – N-H	1.87Å	2.12Å
Gly-29 - C=O	2.16Å	1.63Å
Gly-31 - C=O	2.13Å	2.79Å
H <sub>2</sub> O - C=O	.....	3.80Å
H <sub>2</sub> O – Lys-62	.....	1.97Å
Lys-62 - C=O	4.54 Å	.....

Στη συνέχεια έγινε υπέρθεση της κρυσταλλογραφικής δομής και της προβλεπόμενης μοριακής δομής, που δίνει το FlexX, όταν πραγματοποιεί την πρόσδεση. Στην Εικόνα 3 παριστάνεται η υπέρθεση των δύο δομών. Το R.M.S.D. (Root-Mean Squared Deviation) μεταξύ της κρυσταλλογραφικής δομής και της υπολογισμένης σε κατάσταση αλληλεπίδρασης με το ένζυμο (πορφυρό χρώμα) είναι 0,081Å. Η μικρή τιμή του R.M.S.D. αποδεικνύει ότι έχουν μικρές διαμορφωτικές αλλαγές.



**Σχήμα 9.33:** Υπέρθεση κρυσταλλογραφικής και υπολογιζόμενης από το λογισμικό FlexX δομής του μορίου FPL67047XX

### 3. Μοντελοποίηση Υποδοχέων

Έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι που βασίζονται στην εξεύρεση δομικών ομοιοτήτων μεταξύ του εξεταζόμενου υποδοχέα και άλλων πρωτεϊνών που έχουν κρυσταλλωθεί και έχουν παρόμοια βιολογική δράση ή μεγάλη ομολογία αμινοξέων.

Η εξεύρεση της πρωτεΐνης με χρήση αλγόριθμων ομοιότητας (similarity algorithms), η οποία θα έχει μεγάλη ομοιότητα με τον εξεταζόμενο υποδοχέα, θα αποτελέσει το υπόστρωμα για τη μοντελοποίηση. Η ίδια διαδικασία μπορεί να ακολουθηθεί και για τα νουκλεϊνικά οξέα. Το υπόστρωμα θα χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθεί μία εναρκτήρια στερεοδομή (μοντέλο) για τον υποδοχέα που μελετάται.

Οι αλγόριθμοι ομοιότητας πλεονεκτούν έναντι των άλλων μεθοδολογιών διαμορφωτικής ανάλυσης, γιατί είναι λιγότερο χρονοβόροι συγκριτικά με άλλες μεθοδολογίες και μπορούν να δώσουν με επιτυχία τριτοταγείς δομές. Υπάρχουν και μειονεκτήματα στους αλγορίθμους, όπως το ότι δεν είναι πλήρως αυτοματοποιημένοι, δεν καθορίζουν τις πλευρικές αλυσίδες και θηλιές του υποδοχέα και δεν μπορούν να εφαρμοσθούν εάν δεν είναι γνωστή η διαμόρφωση πρωτεΐνης που έχει κρυσταλλωθεί.

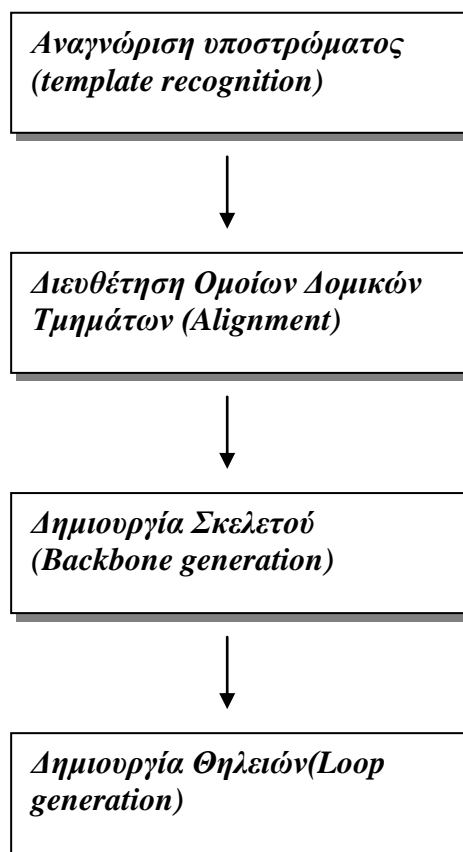
Το ποσοστό ομολογίας για τη μοντελοποίηση είναι καθοριστικό. Εάν η ομολογία είναι μεγαλύτερη από 90% τότε τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με τα κρυσταλλογραφικά. Διαφορές παρατηρούνται μόνο στις πλευρικές αλυσίδες. Εάν η ομολογία είναι μεταξύ 75-90% τα αποτελέσματα συνήθως είναι επιτυχή αλλά εξαρτώνται και από τον υπολογιστικό χρόνο. Ομολογία η οποία κυμαίνεται μεταξύ 50-75% δίνει RMS της τάξεως των 1,5 Å και σημαντικά λάθη σε μερικά τμήματα του υποδοχέα. Χρήση ομολογιών 25-50% δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα εάν δεν γίνεται αυτοποιημένη χρήση. Σε ποσοστά μικρότερα των 25% δεν είναι χρήσιμη και προτιμάται η Γεωμετρία Απόστασης.

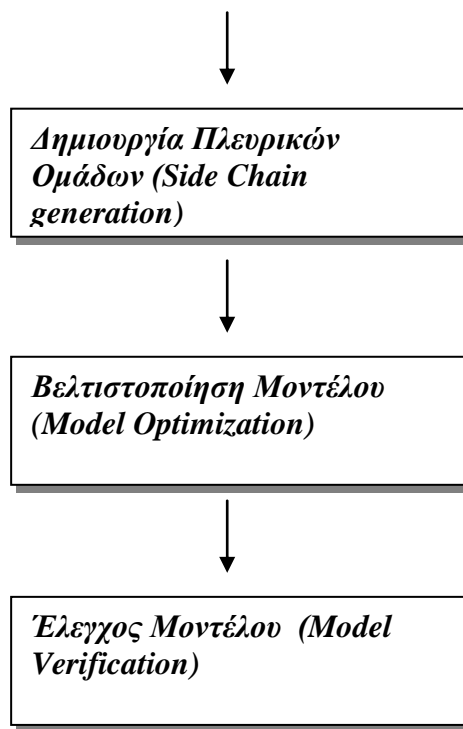
Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη τελικού μοντέλου του υποδοχέα μετά την αναγνώριση του υποστρώματος (template recognition), η οποία γίνεται από βιβλιοθήκες βάσεων δεδομένων, είναι η ακόλουθη (Σχήμα 9.34):

Η αρχική δομή ελαχιστοποιείται ενεργειακά με χρήση μεθόδων ενέργειας ελαχιστοποίησης και με περιορισμένες μεθοδολογίες εξερεύνησης του διαμορφωτικού χώρου. Γίνεται διευθέτηση ομοίων δομικών τμημάτων (alignment)

και δίνεται κάποιο σκορ που εκφράζει την ομοιότητα μεταξύ των συγκρινόμενων τμημάτων. Υψηλό σκορ σημαίνει ότι υπάρχουν ταυτόσημα τμήματα. Ενδιάμεσο σκορ σημαίνει ότι υπάρχουν όμοια τμήματα και χαμηλό σκορ ότι τα τμήματα που συγκρίνονται είναι ανόμοια. Οι αλγόριθμοι διευθέτησης βασίζονται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Το επόμενο βήμα είναι η δημιουργία του τρισδιάστατου μοντέλου. Ανιχνεύονται πρώτα δομικές ομοιότητες στον σκελετό του μελετούμενου υποδοχέα και εξευρίσκεται ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση του, ώστε να ομοιάζει με αυτό του υποστρώματος. Απλές αλλαγές στα αμινοξέα θεωρείται ότι δεν επηρεάζουν την τριτοταγή δομή. Το επόμενο βήμα είναι να δημιουργηθεί η διαμόρφωση των θηλιών, η οποία επιτυγχάνεται με χρήση βάσεων δεδομένων πρωτεϊνών, που έχουν θηλιές με παρόμοια αμινοξική αλληλουχία. Αφού καθορισθεί η διαμόρφωση των θηλιών διευθετείται η διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων. Για τη διευθέτηση των





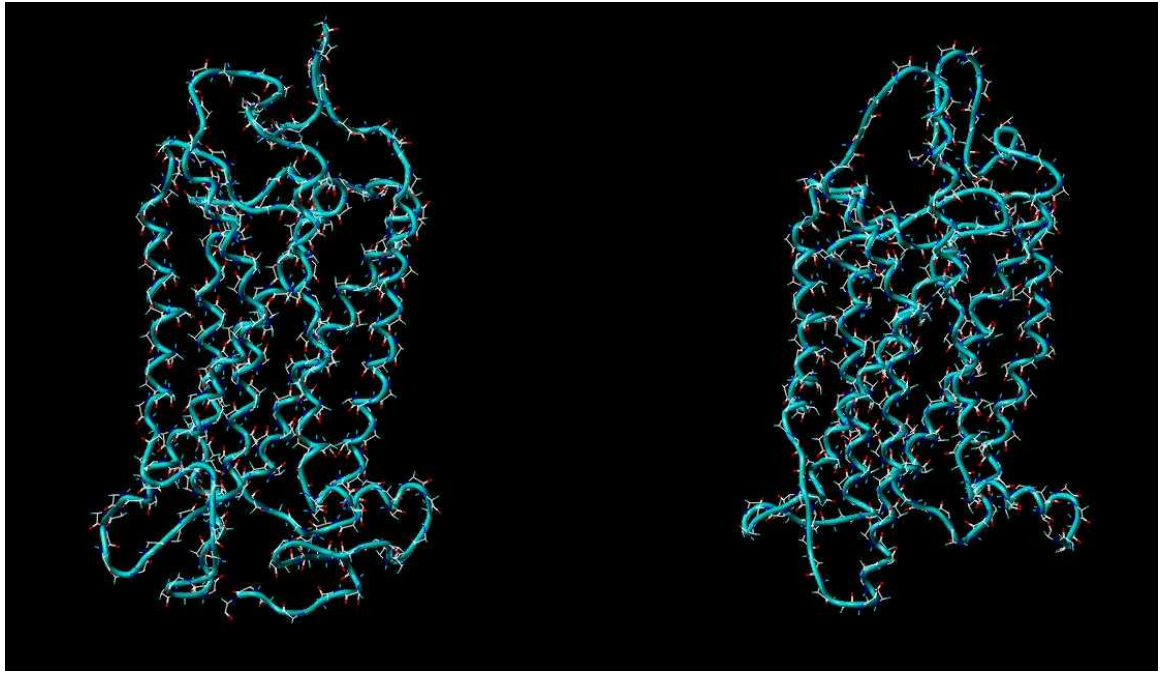
**Σχήμα 9.34:** Αναλυτική παρουσίαση βημάτων που ακολουθούνται για τη μοντελοποίηση υποδοχέων

πλευρικών αλυσίδων, οι οποίες μπορούν να έχουν ποικίλες διαμορφώσεις, λαμβάνονται υπόψη πρώτα οι πλευρικές αλυσίδες, οι οποίες έχουν σταθερή διαμόρφωση. Οι πλευρικές αλυσίδες με μεταβαλλόμενη διαμόρφωση θα καθορισθούν σύμφωνα με αυτές που έχουν σταθερές διαμορφώσεις. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μέσω χρήσης Μοριακής Μηχανικής (Ελαχιστοποίηση Ενέργειας και χρήση Μοριακής Δυναμικής και ιδιαίτερα μεθοδολογίας προσομοίωσης με ανόπτηση). Γίνεται έλεγχος του μοντέλου με δύο τρόπους. Κατ' αρχή η ενέργεια του πρέπει να συμφωνεί μ' αυτή των ομόλογων προωτεινών και δεύτερο θα πρέπει να εξηγεί βιολογικά δεδομένα όσο αφορά το ενεργό του κέντρο.

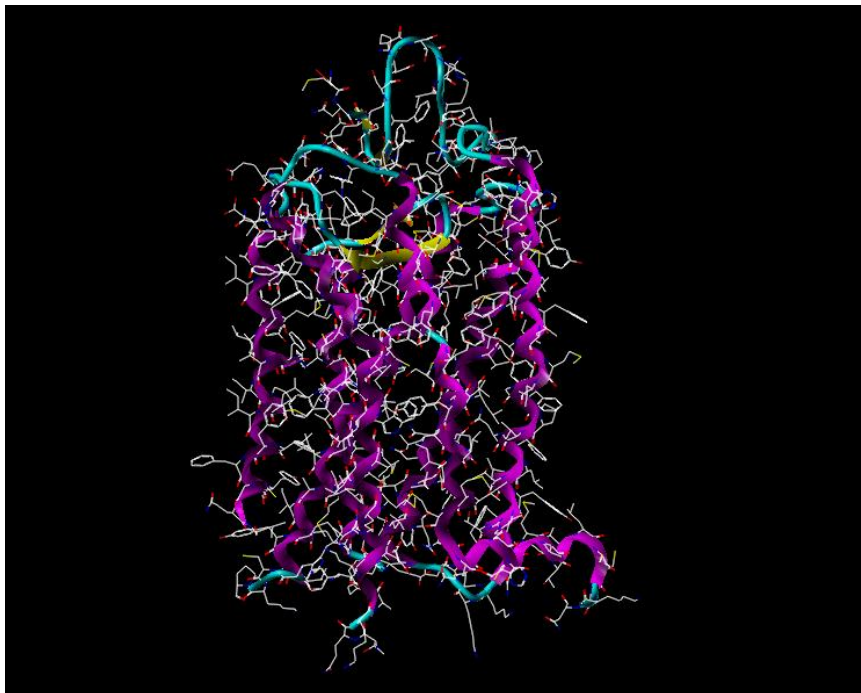


Πολλοί διαμεμβρανικοί υποδοχείς δεν έχουν κρυσταλλωθεί. Η Μοριακή Μοντελοποίηση α' αυτή την περίπτωση αποτελεί τη μόνη μεθοδολογία για την ανάπτυξη μοντέλων υποδοχέων που δεν έχουν κρυσταλλωθεί. Ο  $AT_1$  υποδοχέας αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα (Σχήμα 9.35). Η Μοντελοποίηση του βασίστηκε στη χοίρεια ροδοψίνη η οποία έχει κρυσταλλωθεί. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι οι 7 διαμεμβρανικοί έλικες. Η μοντελοποίηση του βασίζεται στην χοίρεια ροδοψίνη (Σχήμα 9.36).

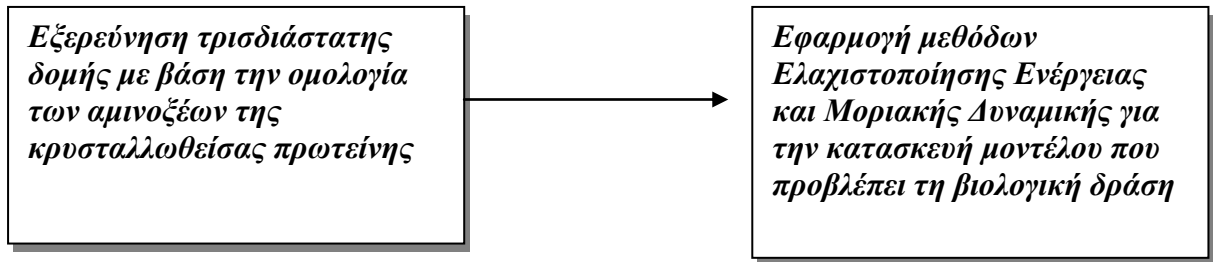
Η βελτιστοποίηση του μοντέλου έγινε με τη χρήση προσδετών  $AT_1$  ανταγωνιστών. Ένα ικανοποιητικό μοντέλο είναι αυτό που μπορεί να προβλέψει τη βιολογική δράση ήδη συντιθεμένων ουσιών. Έτσι με βάση το προτεινόμενο μοντέλο θα σχεδιασθούν και συντεθούν καινοτόμα φαρμακευτικά προϊόντα, τα οποία θα εξασκούν βελτιωμένη βιολογική δράση. Συνοπτικότερα λοιπόν η διαδικασία έχει ως περιγράφεται στο Σχήμα 9.37.



**Σχήμα 9.35:** Μοντέλα του AT<sub>1</sub> υποδοχέα που έχουν δομηθεί με βάση τις διαμορφώσεις του υποδοχέα της ροδοψίνης που έχουν προκύψει από κρυσταλλογραφικά δεδομένα



**Σχήμα 9.36:** Υποδοχέας της ροδοψίνης από κρυσταλλογραφικά δεδομένα



**Σχήμα 9.37:** Συνοπτική παρουσίαση σταδίων μοντελοποίησης υποδοχέα

## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-ΑΣΚΗΣΕΙΣ-ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

### Ερωτήσεις

1. Ποιο άθροισμα αλληλεπιδράσεων χαρακτηρίζει τη  $\Delta G$  μίας αλληλεπίδρασης;
2. Από τι εξαρτάται η δυναμική ενέργεια σε οποιαδήποτε αλληλεπίδραση ηλεκτροστατικής φύσης;
3. Ποια σχέση καθορίζει την αλληλεπίδραση φορτίου-διπόλου;
4. Τι καλούμε επαγόμενη πόλωση;
5. Από ποια εξίσωση δίνεται η συνεισφορά της επαγόμενης πόλωσης στη συνολική δυναμική ενέργεια;
6. Τι καλούμε μεταφορά φορτίου και πότε λαμβάνει χώρα;
7. Ποιες καλούνται δυνάμεις διασποράς και ποια είναι η σημασία τους στις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-φαρμάκου;
8. Ποια είναι η σημασία των υδρογονικών δεσμών στα βιολογικά συστήματα;
9. Τι καλούμε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις;
10. Ποιες διεργασίες ελαττώνουν το αυθόρμητο μίας αντίδρασης;
11. Ποιοί τρόποι υπάρχουν για την ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης στους υποδοχείς;
12. Να περιγράψετε τη μέθοδο επιδιάλυψης.

13. Να περιγράψετε τα βήματα που ακολουθούνται, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος πλέγματος.
14. Που βασίζεται η μέθοδος του ψευδοποδοχέα και πώς κατασκευάζεται;
15. Πού βασίζεται ο αλγόριθμος πρόσδεσης του λογισμικού Flex X; Από ποιές φάσεις αποτελείται;
16. Να επεξηγήσετε τη σημασία του “docking” στον ορθολογικό σχεδιασμό.
17. Να περιγράψετε τα βήματα που ακολουθούνται για τη μοντελοποίηση των υποδοχέων.

**Να κυκλώσετε με Σ αν είναι ορθές ή με Λ αν είναι λανθασμένες οι προτάσεις που ακολουθούν:**

1. Η διηλεκτρική σταθερά είναι μεγαλύτερη σε πολικό μέσο συγκριτικά με το υδρόφοβο.

Σ            Λ

2. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση αυξάνεται, όσο ελαττώνεται η απόσταση μεταξύ των φορτίων που αλληλεπιδρούν.

Σ            Λ

3. Η υδρόφοβη επίδραση μπορεί να υπολογιστεί με θεωρητικούς υπολογισμούς στατιστικής μηχανικής ή με προσομοιώσεις της ελεύθερης ενέργειας.

Σ            Λ

4. Ο αλγόριθμος Molecular Silverware χρησιμοποιείται για την επιδιάλυψη ενός μορίου με μόρια διαλύτη και για τον υπολογισμό του καλύτερου τρόπου σύμπλεξης δύο μορίων.

Σ            Λ

5. Κατά την πρόσδεση ενός μορίου στον υποδοχέα η διαμόρφωση του δεν μπορεί να μεταβληθεί.

Σ Λ

6. Κατά την πρόσδεση ενός μορίου στον υποδοχέα η διαμόρφωση του υποδοχέα μεταβάλλεται.

Σ Λ

7. Το λογισμικό FlexX αποτελεί μεθοδολογία προσομοίωσης της πρόσδεσης ΦΜ σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς.

Σ Λ

8. Μία πρόσδεση θεωρείται αυθόρμητη όταν  $\Delta H < 0$ .

Σ Λ

9. Οι πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων είναι χρήσιμες για την εύρεση των δραστικών κέντρων των υποδοχέων.

Σ Λ

10. Οι συζευγμένες G πρωτείνες μοντελοποιούνται, καθώς είναι διαμεμβρανικές και είναι δύσκολο να κρυσταλλωθούν με το ΦΜ προσδέτη.

11. Το ποσοστό ομολογίας για τη μοντελοποίηση υποδοχέα δεν είναι καθοριστικό.

Σ Λ

### Ερωτήσεις Πολλαπλής Επιλογής

Να επιλέξετε την ορθή απάντηση

1. Το λογισμικό που δεν χρησιμοποιείται στην ανίχνευση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα είναι:

α) MOLCAD

β) SiteID

γ) PARM

δ) CAT

2. Ποια από τα κάτωθι αποτελούν μειονεκτήματα στη μέθοδο επιδιалυτώσεως:

α) Ανομοιογενής επιδιалυτώση

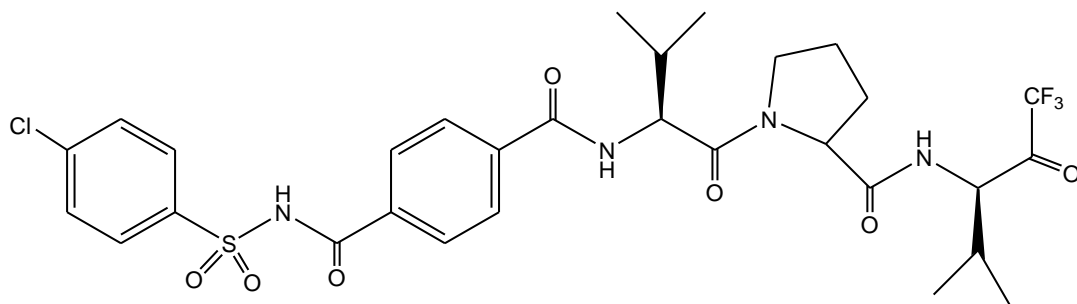
β) Αμοιογενής επιδιалυτώση

- γ) Αδυναμία ανίχνευσης θειϊκού ή άλλων αδιαπέραστων από το διαλύτη χώρων
- δ) Εξάρτηση της ανίχνευσης των θηκών από τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.
3. Οι ορισμοί της «παραμέτρου του βάθους» και του «ατομικού φίλμ» χρησιμοποιούν τη μέθοδο
- α) πλέγματος
  - β) ψευδοϋποδοχέων
  - γ) επιδιαλύτωσης
  - δ) καμμία από τις παραπάνω
4. Η Μέθοδος Germ είναι παράδειγμα αλγορίθμου
- α) πλέγματος
  - β) ψευδοϋποδοχέων
  - γ) επιδιαλύτωσης
  - δ) καμμία από τις παραπάνω
5. Το Promax είναι λογισμικό
- α) πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων
  - β) νουκλεϊνικής βάσης δεδομένων
  - γ) και τα δύο
  - δ) κανένα από τα δύο
6. Οι αλγόριθμοι πρόσδεσης μπορεί
- α) να επιτρέπουν διαμορφωτική αλλαγή στο ΦΜ
  - β) να επιτρέπουν διαμορφωτική αλλαγή στον Υ
  - γ) να επιτρέπουν διαμορφωτική αλλαγή στο Φ και Υ
  - δ) όλα τα παραπάνω είναι ορθά
7. Στο λογισμικό GRID γίνεται η θεώρηση ότι οι αλληλεπιδράσεις
- α) γίνονται σε πλέγμα καθορισμένων διαστάσεων
  - β) απαιτείται η εισαγωγή του όρου αισθητήρα (probe)
  - γ) α και β ορθά
  - δ) α και β λάθος
8. Στο λογισμικό FlexX χρησιμοποιούνται
- α) κριτήρια βαθμολόγησης πρόσδεσης του ΦΜ-Υ για τη σύγκριση των παραγόμενων αποτελεσμάτων

- β) μοντελοποίηση αλληλεπιδράσεων ΦΜ-Υ
  - γ) α και β λάθος
  - δ) α και β ορθά
9. Μία πρόσδεση είναι αυθόρμητη όταν:
- α)  $\Delta G < 0$
  - β)  $\Delta H$  είναι κατά απόλυτη τιμή μικρότερη της  $T\Delta S$
  - γ) α και β ορθά
  - δ) α και β λανθασμένα
10. Η χρήση του αλγορίθμου MIMUBA
- α) δεν επιτρέπει τη διερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου
  - β) επιτρέπει τη διερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου
  - γ) είναι λογισμικό το οποίο δεν χρησιμοποιείται κατά τις αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με υποδοχείς
  - δ) κανένα από τα παραπάνω είναι ορθό
11. Εάν η ομολογία είναι μεγαλύτερη από 50% και μικρότερη από 70%
- α) τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με τα κρυσταλλογραφικά
  - β) είναι συνήθως επιτυχή
  - γ) δίνει RMS της τάξεως των 1,5 Å
  - δ) δεν δίνει σημαντικά λάθη σε όλα τα τμήματα του υποδοχέα.

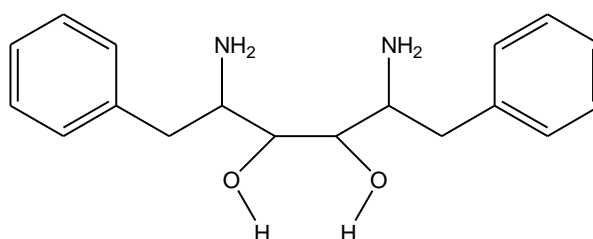
## **ΑΣΚΗΣΕΙΣ**

1. Η ανθρώπινη ελαστάση λευκοκυττάρων είναι μια πρωτεάση σερίνης, η οποία απελευθερώνεται από πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα σε ανταπόκριση φλεγμονώδους διέγερσης. Ανταγωνιστές της ελαστάσης λευκοκυττάρων μπορεί να έχουν θεραπευτική χρησιμότητα σε ασθένειες, όπως είναι το εμφύσημα. Το παρακάτω μόριο είναι ανταγωνιστής. Τι αλληλεπιδράσεις αναμένετε να έχει με τον υποδοχέα;



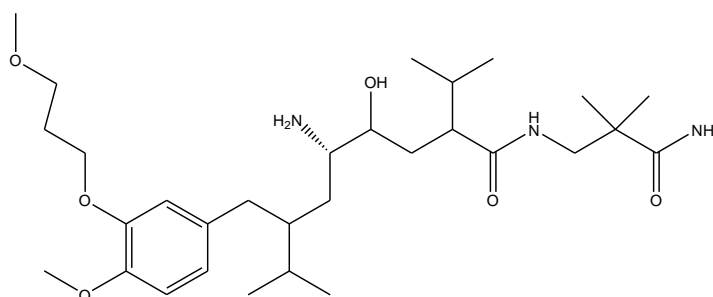
**ICI - 200880**

2. Πειράματα ακτίνων – X έδειξαν ότι στο σύμπλοκο της HIV-1 πρωτεάσης με το παρακάτω μόριο, τα δύο υδροξύλια του συνάπτουν υδρογονικό δεσμό με δύο καρβοξύλια των Asp25 και Asp25' οξέων.



Μπορείτε να σκεφτείτε μια δομική αλλαγή του υποστρώματος, ώστε να διατηρείται ο αριθμός των υδρογονικών δεσμών και η απόσταση των δύο φαινυλίων να παραμένει σταθερά;

3. Ποιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να έχει το Aliskiren με ένα πιθανό υποδοχέα;



**Aliskiren**



Να αντιστοιγήσετε

1.

$$E \propto \frac{q_i q_j}{Dr_{ij}}$$

Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις

$$E \propto \frac{a_1 a_2}{r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$$

Επαγόμενου διπόλου από ιόν

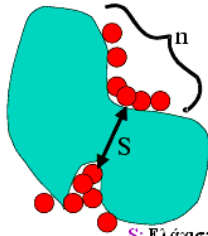
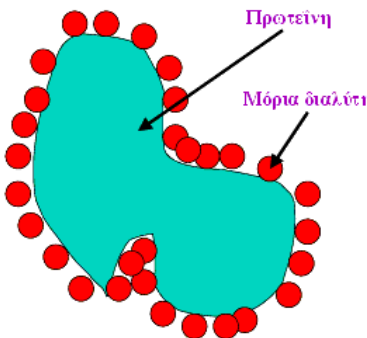
$$E = \frac{Ae^{(Br)}}{r^D} - \frac{C}{r^6}$$

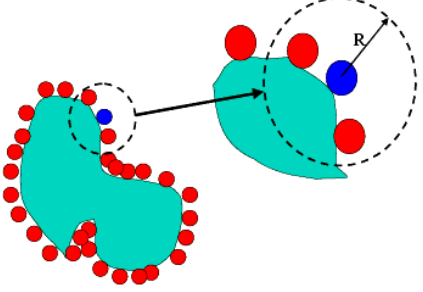
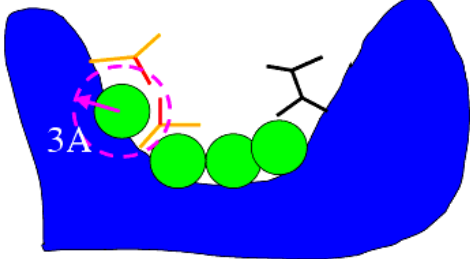
Δυνάμεις Lennard-Jones

$$E \propto \frac{z\mu}{Dr^2} \cos \phi$$

Μη πολικές αλληλεπιδράσεις

2.

 <p>S: Ελάχιστη διαχωριστικότητα μεταξύ των ομάδων. n: Ελάχιστος αριθμός σφαιρών διαλύτη</p>	<p>Βήμα 4°</p>
 <p>Πρωτεΐνη Μόρια διαλύτη</p>	<p>Βήμα 3°</p>

	<p>Βήμα 2<sup>ο</sup></p>
	<p>Βήμα 1<sup>ο</sup></p>