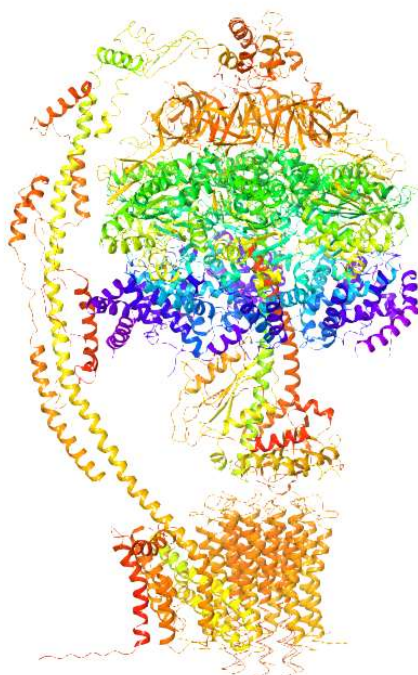




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

**Προσδιορισμός νέων αναστολέων της μιτοχονδριακής ATP
συνθάσης. In silico επιλογή και in vitro φαρμακολογική αξιολόγηση.**



Καραγιάννης Δημήτριος

Επιβλέπων: Εμμανουήλ Μικρός
Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας

Αθήνα, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας,
Τμήμα Φαρμακευτικής Αθηνών

Παπαπετρόπουλος Ανδρέας, Καθηγητής του τομέα Φαρμακευτικής
Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής Αθηνών

Ανδρεάδου Ιωάννα, Αναπλ. Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής
Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας Μικρό Εμμανουήλ, ο οποίος εξ αρχής παρείχε καθοδήγηση στην επιστημονική μου πορεία και στη συνέχεια ανέλαβε την ανάθεση αλλά και την επίβλεψη μου επί αυτής της εργασίας, ενώ με την εμπειρία, την υπομονή και τη γνώση του με βοήθησε στην ορθότερη διεκπεραίωσή της.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, του Τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών Ανδρεάδου Ιωάννα, για την ανάδειξη αυτού του πολύ σημαντικού και ενδιαφέροντος ερευνητικού έργου, αλλά και για το ενδιαφέρον της εξέλιξής του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών Παπαπετρόπουλο Ανδρέα, για την επίβλεψη και διόρθωση αυτής της εργασίας με την παροχή των πολύτιμων γνώσεων και εμπειρίας του.

Σημαντικότετος παράγοντας για την εξέλιξη και διεκπεραίωση αυτής της εργασίας καθ' όλη τη διάρκειά της είναι ο κ. Λαμπρινίδης Γεώργιος, υπεύθυνος των υπολογιστικών μελετών, ο οποίος με αμέριστη υπομονή και ενδιαφέρον βοήθησε σε κάθε βήμα της πορείας μου, παρέχοντας συνεχή επιστημονική αλλά και ηθική υποστήριξη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Εφεντάκη Παναγιώτη, αλλά και όλους τους υπόλοιπους ερευνητές των εργαστηρίων στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα *in vitro* και *in silico* πειράματα, οι οποίοι βοήθησαν με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών, παρέχοντας ένα ευχάριστο κλίμα κατά την ερευνητική διαδικασία.

Κλείνοντας, οφείλω να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους εκτός του πανεπιστημιακού χώρου, χωρίς την βοήθεια των οποίων το ερευνητικό αυτό έργο δεν θα ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί.

I. Περιεχόμενα

I.	ABSTRACT	6
I.1	IDENTIFICATION OF NOVEL ATP SYNTHASE INHIBITORS. IN SILICO SCREENING AND IN VITRO PHARMACOLOGICAL EVALUATION.	6
II.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
II.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ. IN SILICO ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ IN VITRO ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ.	8
III.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
III.1	ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΙ Η ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗ	10
III.2	ΤΟ 5'-ΑΔΕΝΟΣΙΝΟ-ΤΡΙΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΟΞΥ (ΑΤΡ)	11
III.3	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΑΤΡ	12
III.4	ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ ΑΤΡ	12
III.5	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΑΤΡ	13
III.6	ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ	17
III.7	ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ F_0	18
III.8	ΤΜΗΜΑ F_1 ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΑΤΡ	20
III.9	ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΚΑΙ Η ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ	20
III.10	Η ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗ IF_1 ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ	21
III.11	ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ	23
III.11.1	Αναστολή της ΑΤΡ συνθάσης μέσω της καταλυτικής περιοχής F_1	23
III.11.2	Αναστολή της ΑΤΡ συνθάσης μέσω της θέσης πρόσδεσης της ολιγομυκίνης	24
III.11.3	Αναστολή της ΑΤΡ συνθάσης μέσω της θέσης πρόσδεσης πολυφαινολών	26
III.12	ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ	29
III.12.1	BMS199264	30
III.12.2	BTB06584	32
IV.	ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	33
V.	ΜΕΘΟΔΟΙ	35
V.1	ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (IN SILICO)	35
V.1.1	Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων μέσω σύγχρονων υπολογιστικών μεθόδων	35
V.1.2	Μοριακή Μηχανική (Molecular Mechanics, MM)	38
V.1.3	Μοντέλο Ομολογίας (Homology Modeling)	40
V.1.4	Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics, MD)	42
V.1.5	Υπολογισμός προσδέματος (Docking)	43
V.1.6	Υπολογισμοί με βάση το πρόσδεμα (Ligand-based)	44
V.2	IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ	48
V.2.1	Αρχή της μεθόδου	48
V.2.2	Απομόνωση μιτοχονδρίων	50
V.2.3	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry	50
V.2.4	Μέθοδος in vitro αξιολόγησης αναστολέων της ΑΤΡ συνθάσης	52
V.2.5	Μέθοδος in vitro απόδοσης IC_{50} των αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ΑΤΡ συνθάσης	54
VI.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
VI.1	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ MUS MUSCULUS	56
VI.2	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ F_0 ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΑΤΡ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ	66
VI.3	ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΕΝΩΣΗΣ ΟΔΗΓΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ BMS-199264	67
VI.4	ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΚΑΙ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ BMS, BTB ΚΑΙ 1112	72

<u>VI.5</u>	<u>ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΚΑΙ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 1124 ΚΑΙ 1470</u>	76
<u>VI.6</u>	<u>ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΚΑΙ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ</u>	77
<u>VI.6.1</u>	<u>Υπολογισμοί πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της κερκετίνης</u>	78
<u>VI.6.2</u>	<u>Υπολογισμοί πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της ολιγομυκίνης</u>	86
<u>VI.6.3</u>	<u>Υπολογισμοί πρόσδεσης στη καταλυτική περιοχή του τμήματος F₁</u>	90
<u>VI.7</u>	<u>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC₅₀</u>	93
<u>VI.8</u>	<u>ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΗΚΗΣ NCI</u>	96
<u>VII.</u>	<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	98
<u>VIII.</u>	<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	102
<u>IX.</u>	<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	114

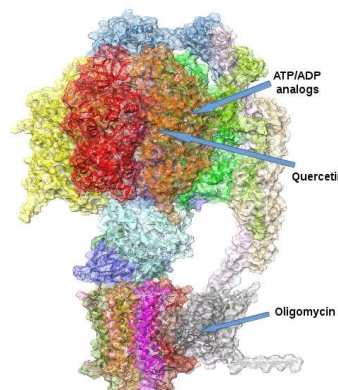
I. Abstract

I.1 Identification of novel ATP synthase inhibitors. In silico screening and in vitro pharmacological evaluation.

ATP synthase (also known as F-ATPase or F_1F_0 -ATPase) is a significant multiprotein complex, proven to be a small rotor machine, either producing or hydrolyzing adenosine triphosphate. During myocardial ischemia ATP synthase's rotor switch to hydrolyzing activity, wasting ATP and generating dysfunctional mitochondria. (1) Selective inhibition of ATP hydrolase, could be of major significance for cardioprotection and the discovery of new inhibiting agents is of particular interest for the development of new therapeutic schemes.

In this work, we present the identification of inhibitors of the hydrolytic activity of ATP synthase, based on virtual and experimental screening methods.

In a first step, we constructed for the first time a holistic model of ATP synthase of mus musculus based on homology modeling using all known subunits from Protein Data Bank (PDB). Based on this model, docking-scoring calculations have been performed targeting the three major inhibition sites already known from literature: a) the ATP-ADP catalytic site b) the oligomycin binding site and c) inside the surface of a groove made from loops in the 3α and 3β subunits where molecules like quercetin or resveratrol are known to bind. The workflow has been implemented on our in-house library of 2000 natural products and synthetic compounds (Pharmalab). Moreover, ligand-based virtual screening, has been carried out based on similarity calculations of the chemical library components against known binders like **BMS-199264**. (1)



Different steps of filtering through the in silico screening provided 48 molecules that were further tested in vitro on isolated murine heart mitochondrial fractions, evaluating ATP synthase hydrolytic activity. C57-BL-6 mice' hearts were cut to isolate mitochondria. In order ATP synthase to function hydrolyzing ATP, a freeze-thaw cycle of the sample was followed, while the production of PO_4^{3-} has been finally

evaluated. The results showed that 35 out of 48 (73%) tested compounds exhibited various inhibitory activities at 0.2 mM, validating our computer-based drug design method. Among 35 hits, 7 molecules appeared to have common scaffold displaying enhanced activity (48 – 82.5% inhibition). The IC₅₀ of these compounds has been further determined, providing confirmatory evidence of the inhibitory activity of the scaffold which can lead us to a novel agent against myocardial ischemia.

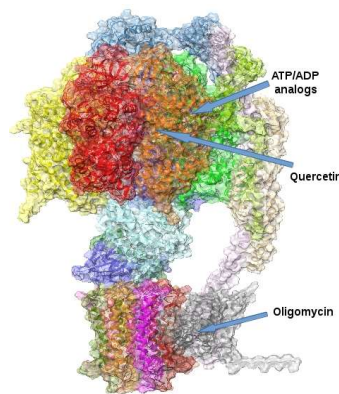
II. Περίληψη

II.1 Προσδιορισμός νέων αναστολέων της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης. In silico επιλογή και in vitro φαρμακολογική αξιολόγηση.

Η ATP συνθάση (επίσης γνωστή και ως F-ATPάση ή F_1F_0 -ATPάση) αποτελεί ένα σημαντικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το οποίο έχει αποδειχτεί ότι είναι μια μικρή μοριακή μηχανή τύπου ρότορα. Ανάλογα με τις συνθήκες, το σύμπλεγμα αυτό είτε παράγει, είτε υδρολύει τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Κατά την ισχαιμία του μυοκαρδίου, ο ρότορας της ATP συνθάσης αλλάζει φορά λειτουργώντας υδρολυτικά, καταναλώνοντας άσκοπα ATP και προκαλώντας δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια. (1) Εκλεκτική αναστολή της ATP υδρολάσης θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του μυοκαρδίου από βλάβες που οφείλονται στην ισχαιμία, με αποτέλεσμα η ανακάλυψη τέτοιων αναστολέων να κρίνεται ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα.

Σε αυτή την μελέτη, παρουσιάζεται ο προσδιορισμός νέων αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης, βασισμένος σε υπολογιστικές (εικονικές) και πειραματικές μεθόδους αξιολόγησης.

Για την πραγματοποίηση των εικονικών υπολογισμών αξιολόγησης κατασκευάστηκε για πρώτη φορά ένα ολιστικό μοντέλο της ATP συνθάσης των ποντικών (*mus musculus*) βασισμένο σε ομόλογο μοντέλο, χρησιμοποιώντας όλες τις γνωστές υπομονάδες από την Protein Data Bank (PDB). Βασισμένοι σε αυτό το μοντέλο πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί εικονικής αξιολόγησης πρόσδεσης-κατάταξης στοχεύοντας τα τρία κυρίαρχα ενεργά κέντρα αναστολέων, ήδη γνωστά από την βιβλιογραφία: α) το σημείο κατάλυσης του ATP-ADP β) τη θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης (oligomycin) γ) την επιφάνεια που σχηματίζει η αύλακα μεταξύ των υπομονάδων 3α και 3β όπου προσδένονται γνωστά μόρια όπως η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη εμφανίζοντας ανασταλτική δράση. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η συλλογή μορίων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ που περιέχει 2000 φυσικά και συνθετικά μόρια (Pharmalab). Εκτός από τους υπολογισμούς πρόσδεσης με την ATP συνθάση, πραγματοποιήθηκε και αξιολόγηση με βάση την ομοιότητα (similarity) του προσδέματος ως προς γνωστούς



αναστολείς όπως το **BMS-199264**.(1) Επελέγησαν 48 μόρια και εν συνεχεία έγινε in-vitro αξιολόγηση σε απομονωμένα κλάσματα μιτοχονδρίων, προσδιορίζοντας την υδρολυτική δράση της ATP συνθάσης από τα παραγόμενα PO_4^{3-} . Συγκεκριμένα, ιστοί καρδιάς από C57-BL-6 ποντίκια αποκόπηκαν αρχικά ώστε να απομονωθούν τα μιτοχόνδρια. Προκειμένου η ATP συνθάση να λειτουργήσει αντίστροφα υδρολύοντας ATP, ακολούθησε ένας κύκλος ψύξης-απόψυξης του δείγματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 35 από τις 48 (73%) υπό εξέταση ενώσεις εμφάνισαν ποικίλες ανασταλτικές δράσεις στα 0.2 mM, επαληθεύοντας τη συνολική υπολογιστική αξιολόγηση. Μεταξύ των 35 μορίων που εμφάνισαν αναστολή, 7 μόρια εμφάνισαν κοινό σκελετό, παρουσιάζοντας ενισχυμένη δράση (αναστολή 48 – 82.5%). Η τιμή IC_{50} των ενώσεων αυτών μελετήθηκε περαιτέρω, επιβεβαιώνοντας ότι αυτός ο μοριακός σκελετός είναι υπεύθυνος για την ανασταλτική δράση και μπορεί να οδηγήσει σε νέες ενώσεις με πιθανή προστατευτική δράση κατά της ισχαιμίας του μυοκαρδίου.

III. Εισαγωγή

III.1 Ισχαιμία του μυοκαρδίου και η ATP συνθάση (1)

Η ισχαιμία του μυοκαρδίου προκαλείται από την απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών που έχει ως αποτέλεσμα την ανισορροπία μεταξύ της παροχής/ζήτησης για οξυγόνο. Ο βαθμός της στεφανιαίας απόφραξης προσδίδει διαφορετική κλινική εικόνα και διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση. Η χρόνια σταθερή στηθάγχη οφείλεται σε ισχαιμία του μυοκαρδίου και σχετίζεται με την αυξημένη ζήτηση οξυγόνου (κατά την αυξημένη προσπάθεια), ενώ διακοπή των συμπτωμάτων συνήθως επέρχεται μετά από παύση της αυξημένης προσπάθειας. Για την σταθερή στηθάγχη υπάρχει μεγάλο εύρος ενώσεων ικανών να μειώσουν τα συμπτώματα όπως εστέρες νιτρικών, ανταγωνιστές ασβεστίου, β-αδενεργικοί αναστολείς. (2–4)

Για τις σοβαρές περιπτώσεις ισχαιμίας οι οποίες προκαλούνται κατά την διάρκεια εμφράγματος και έχουν ως αποτέλεσμα μερική νέκρωση του μυοκαρδίου, δεν υπάρχει επαρκής φαρμακολογική θεραπεία. Χειρουργικές επεμβάσεις αποτελούν τις πιο συχνές θεραπείες μαζί με φάρμακα όπως η ασπιρίνη που δευτερογενώς προλαμβάνουν τα καρδιακά εμφράγματα αναστέλλοντας την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και μειώνοντας την πιθανότητα δημιουργίας θρόμβου. Ποικίλες ενώσεις και θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως οι ανταγωνιστές ασβεστίου, οι β-αδρενεργικοί αναστολείς, η ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning), αλλά και ενώσεις που ανοίγουν ρυθμιζόμενους από το ATP διαύλους καλίου (ATP-sensitive potassium channels, K_{ATP}) έχουν δοκιμαστεί σε μοντέλα ζώων και έχουν δείξει αποτελεσματικότητα μέσω μείωσης του μεγέθους του εμφράγματος και καρδιοπροστασία. (2–7) Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις φαίνεται να σχετίζονται με την διατήρηση του ATP σε ισχαιμικά μυοκύτταρα ζώων (8,9), χωρίς όμως να έχει φανεί αντίστοιχη αποτελεσματικότητα αυτής της διατήρησης στον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, μελέτες σε υποδοχείς K_{ATP} υποδεικνύουν ότι τα μιτοχονδριακά κανάλια είναι εν μέρη υπεύθυνα για καρδιοπροστασία, γεγονός που αύξησε το ενδιαφέρον για τον ρόλο των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της ισχαιμίας. (8)

Η διατήρηση αυτή του ATP από τις παραπάνω ενώσεις δεν φάνηκε ικανή να

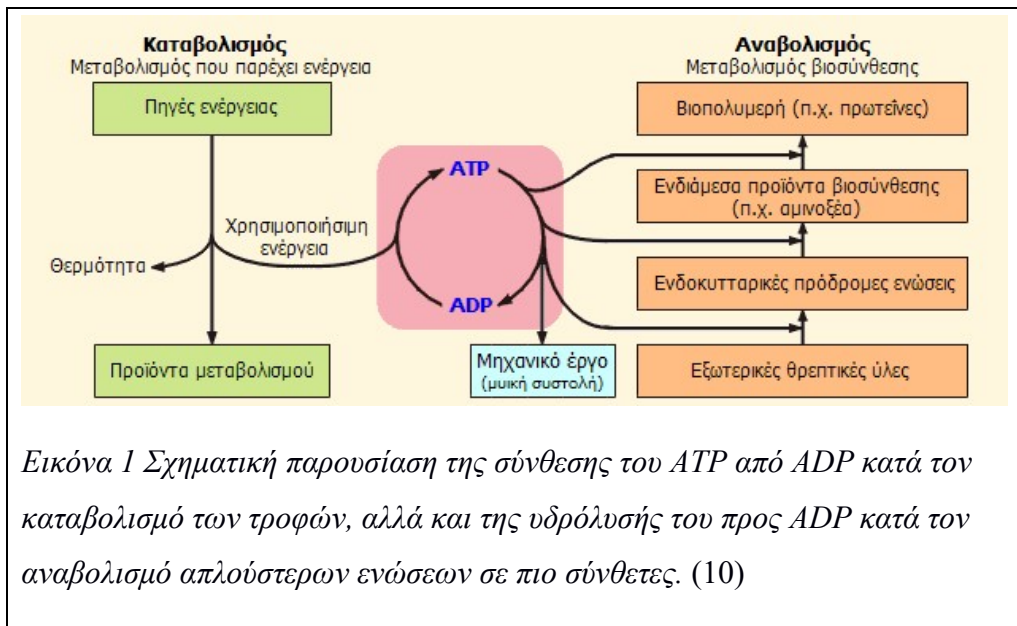
επιηρεάσει σημαντικά το μέγεθος της ισχαιμίας. Αντιθέτως, το ένζυμο ATP συνθάση το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ATP φάνηκε να σχετίζεται με την ισχαιμία μέσω της αλλαγής που επιφέρει στα επίπεδα ATP στον οργανισμό.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ATP συνθάση παράγει το ATP, αλλά σε ισχαιμικές καταστάσεις αντιστρέφει τη λειτουργία της και το υδρολύει, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί κάποιο όφελος από αυτή την αλλαγή. Η μείωση αυτή του ATP οδηγεί σε βλάβη του μυοκαρδίου και σε σοβαρά προβλήματα στον οργανισμό. Όπως αναφέρεται και στη συνέχεια, ενώσεις όπως η ολιγομυκίνη Β και η ουροβερτίνη Β που είναι μη-εκλεκτικοί αναστολείς της ATP συνθάσης και αναστέλλουν την υδρόλυση αλλά και την σύνθεση του ATP, φαίνεται ότι μειώνουν τον ρυθμό εξάντλησης των αποθεμάτων του ATP κατά την ισχαιμία. Η χρήση όμως αυτών των αναστολέων ως θεραπευτικά της μυοκαρδιακής ισχαιμίας κρίνεται ακατάλληλη καθώς μειώνουν την παραγωγή του ATP και στους υγιείς ιστούς.

III.2 Το 5'-αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ (ATP) (10)

Το 5'-αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ (5'-adenosine triphosphoric acid, ATP), είναι η βιοχημική ουσία η οποία συναντάται σε όλους του αερόβιους οργανισμούς και λειτουργεί ως “ενεργειακή νομισματική μονάδα”. Κατά το σχηματισμό του το ATP παραλαμβάνει ενέργεια, την οποία διατηρεί ως χημική ενέργεια και την οποία αποδίδει κατά την διάσπασή του σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού.

Κατά τον καταβολισμό θρεπτικών ουσιών που παραλαμβάνονται από την τροφή ή είναι αποθηκευμένες στον οργανισμό, μπορεί το ATP να δημιουργηθεί από το ADP ή το AMP, ενώ κατά τον αναβολισμό απλούστερων ενώσεων σε πιο σύνθετα μόρια, έχουμε την υδρόλυση του ATP και προσφορά ενέργειας σε αυτές τις αντιδράσεις, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 (10)



III.3 Δομή και χημικές ιδιότητες του ATP (10)

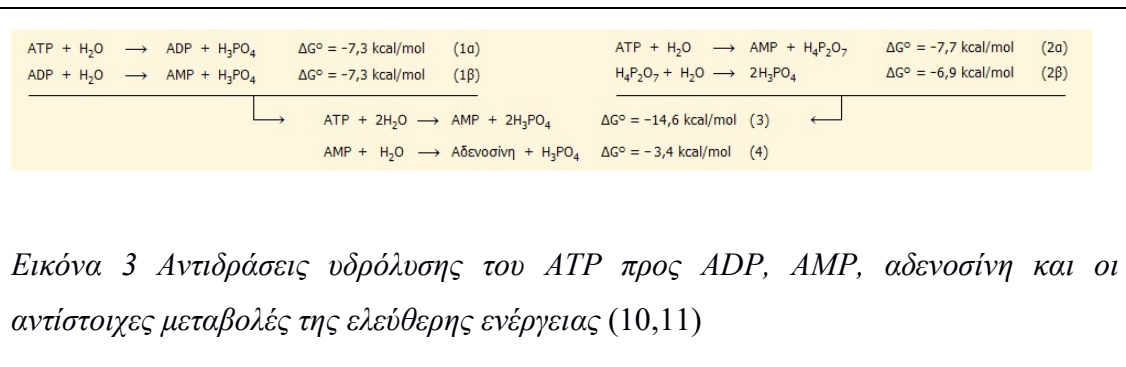
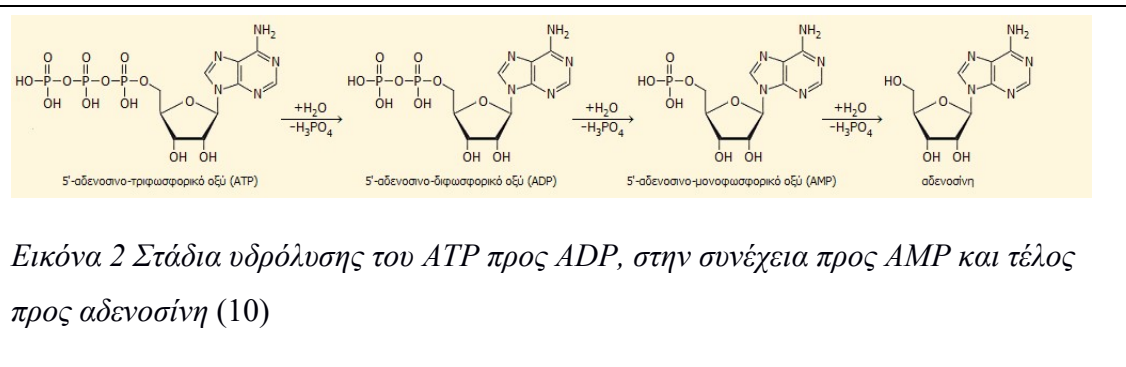
Το ATP αποτελείται από τρία τμήματα τα οποία είναι: μία πουρίνη την αδενίνη, ένα σάκχαρο την ριβόζη (πεντόζη) και μία τριφωσφορική ομάδα, της οποίας κάθε φωσφορικό υπόλοιπο ενώνεται με το άλλο με ομοιοπολικό δεσμό, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την εσωτερική ενέργεια που αποδίδεται κατά την υδρόλυση του ATP. Η αδενίνη συνδεδεμένη μαζί με την ριβόζη αποτελούν τον νουκλεοζίτη αδενοσίνη.

Το ATP είναι τετραπρωτικό οξύ, καθώς έχει τέσσερα υδροξύλια συνδεδεμένα με τα άτομα φωσφόρου και μπορούν να υποστούν διάσταση. Τα υδατικά διαλύματα του ATP (ελαφρώς όξινα ή σε διάλυμα τριχλωροξικού οξέος) αναφέρονται ως σταθερά στους 0°C, είναι σταθερά σε ρυθμιστικά διαλύματα pH 6.8 – 7.4 και πολύ ασταθή σε αλκαλικό pH, καθώς υδρολύεται το ATP.

III.4 Υδρόλυση του ATP (10)

Το ATP μπορεί να υδρολυθεί σύμφωνα με τον μηχανισμό στην Εικόνα 2 (10). Οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας κατά την πορεία της υδρόλυσης του ATP προς αδενοσίνη, φαίνονται στην Εικόνα 3 (10,11). Παρατηρούμε ότι είτε με απευθείας,

είτε με μερική υδρόλυση του ATP σε ADP και κατόπιν σε AMP, έχουμε την ίδια απελευθέρωση ενέργειας, (δεσμοί γ-P, β-P), ενώ η ενέργεια του α-P δεσμού είναι πολύ μικρότερη.

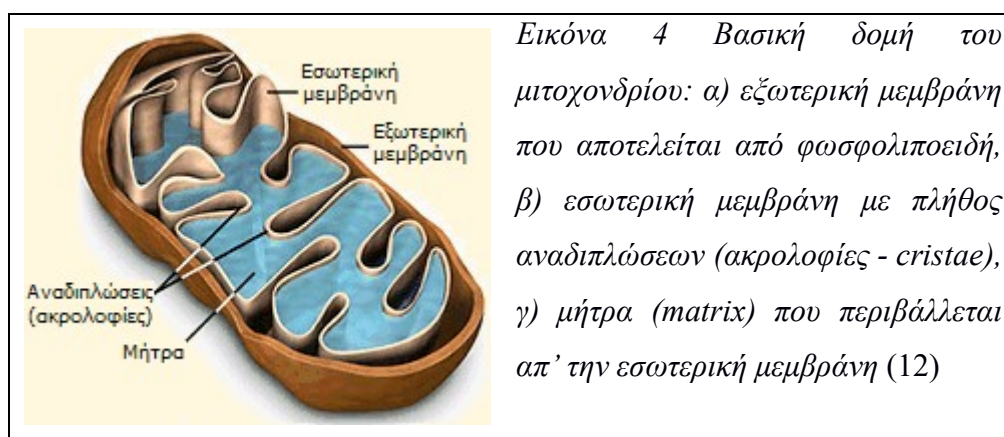


III.5 Σύνθεση του ATP (10)

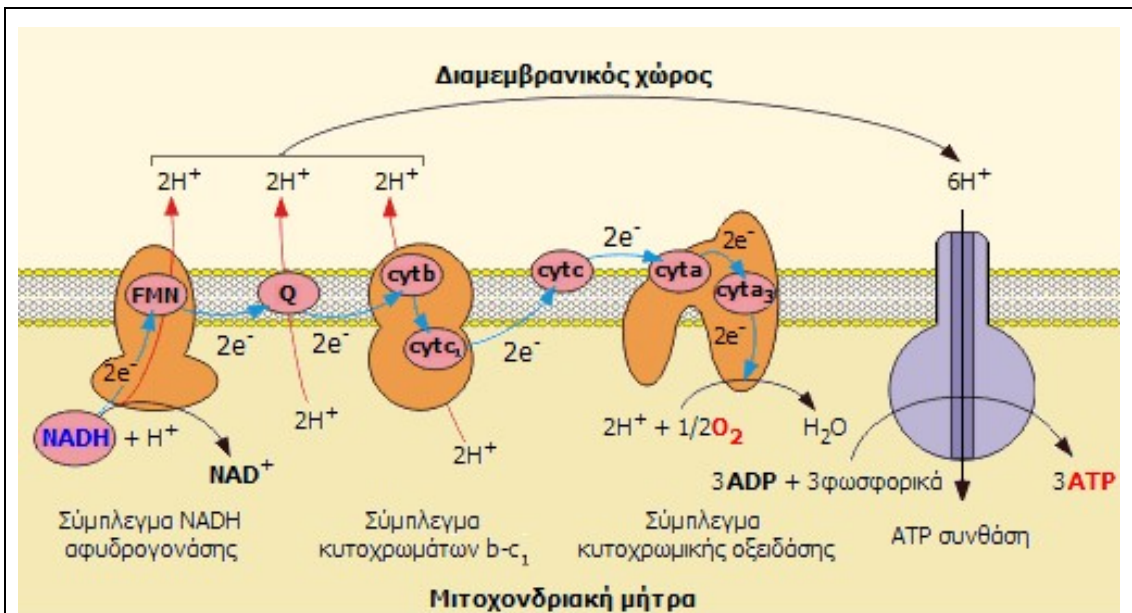
Η σύνθεση του ATP σε ζωντανούς οργανισμούς γίνεται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον ως υπόστρωμα σε ενζυματικές αντιδράσεις, όπου το ADP μέσω μιας ενδιάμεσης φωσφορυλιωμένης ένωσης αποκτά μια φωσφορική ομάδα. Η γλυκόλυση αποτελεί έναν κύριο τρόπο με τον οποίο η γλυκόζη μετατρέπεται σε 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος και στο τέλος της διεργασίας έχουν προκύψει 2 μόρια ATP, ενώ πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη οξυγόνου. Στη συνέχεια κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος, αφού μετατραπεί σε ακετυλο – συνένζυμο μέσω του κύκλου του Krebs, αποδίδει 1 μόριο ATP. Οπότε, συνολικά έχουμε 4 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Στη διάρκεια αυτής της διεργασίας παράγονται και τα οξειδοαναγωγικά συνένζυμα (NADH και FADH₂) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν κατά τον δεύτερο τύπο σύνθεσης ATP, που είναι η

οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 4 (12)), όπου το O_2 ανάγεται από τα ηλεκτρόνια που προσφέρουν τα οξειδοαναγωγικά συνένζυμα που αναφέρθηκαν πριν και με αυτό το τρόπο πραγματοποιείται η κύρια διεργασία παραγωγής ATP, που θα αποδώσει 32 μόρια ATP. Με βάση τις δύο προηγούμενες διεργασίες παραγωγής ATP, καταλήγουμε στην παραγωγή συνολικά 36 μορίων ATP.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση, αποτελείται από δύο επιμέρους μηχανισμούς, το μηχανισμό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain) και τον μηχανισμό της χημειώσμωσης, ενώ πραγματοποιείται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια.

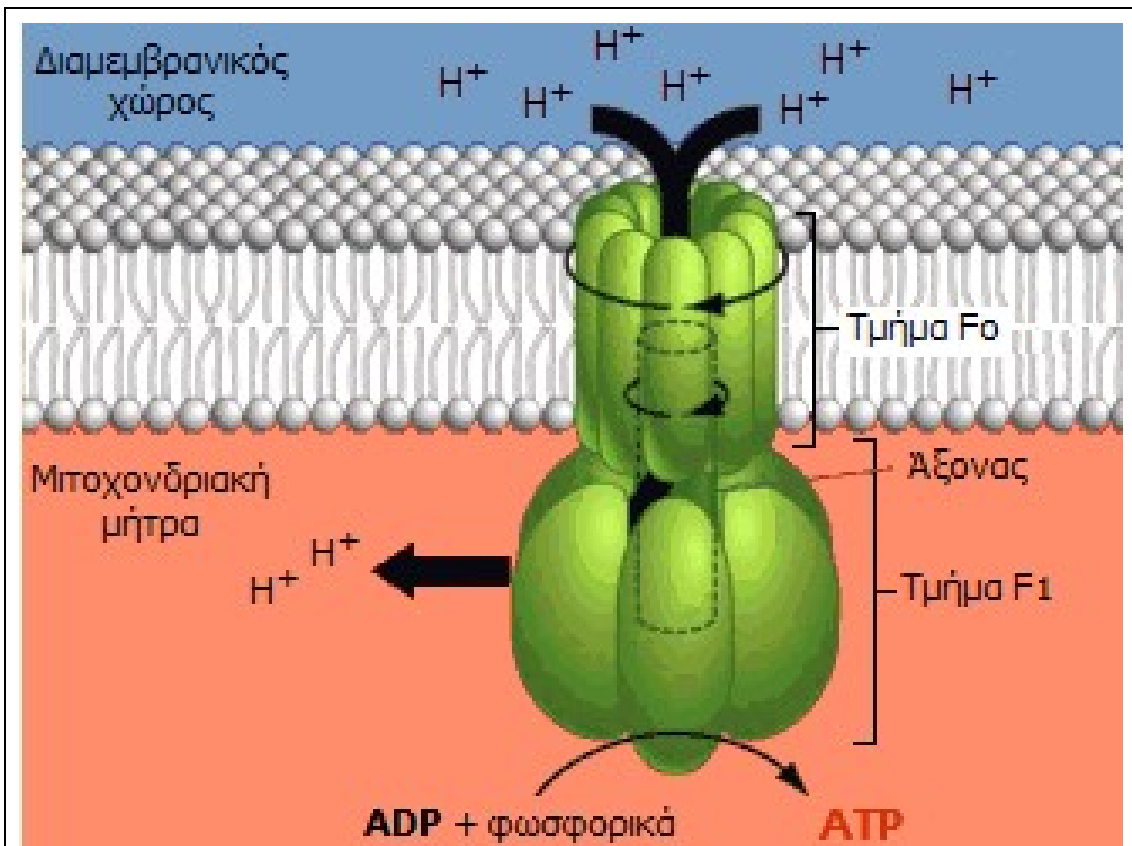


Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι ένα σύνολο ενζυμικών-ιοντικών διαύλων, που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ενώ η εξωτερική μεμβράνη έχει μεγάλους πόρους και επιτρέπει την εξισορρόπηση του υγρού μεταξύ του διαμεμβρανικού χώρου και του κυτταροπλάσματος. Σε αυτή την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάγεται το οξυγόνο και παράγει την απαραίτητη ενέργεια για την μετατροπή του ADP σε ATP. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται από τα NADH και $FADH_2$ που παρήχθησαν σε προηγούμενες διαδικασίες, όπως αναφέρθηκε πριν. Απελευθερώνεται ζεύγος ηλεκτρονίων των οποίων διέρχεται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και καταλήγει στα άτομα του μορίου O_2 , όπου το μετατρέπουν σε H_2O . Κατά την κίνηση όμως αυτή των ηλεκτρονίων, αντλούνται πρωτόνια από την μιτοχονδριακή μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο (Εικόνα 5 (10)). Αποτέλεσμα αυτής της κίνησης των πρωτονίων, είναι η αλλαγή της δυναμικής ενέργειας εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης των πρωτονίων (βαθμίδα συγκέντρωσης), ενώ ο χώρος της μήτρας αποκτά αρνητικό φορτίο σε σχέση με τον διαμεμβρανικό χώρο.



Εικόνα 5 Οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το οξειδοαναγωγικό ένζυμο NADH προκαλεί μέσω της κίνησης του ζεύγους των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, εξώθηση 6 πρωτονίων στην μιτοχονδριακή μήτρα, ενώ το FADH₂ με παρόμοιο τρόπο εξωθεί 4 πρωτόνια. (10)

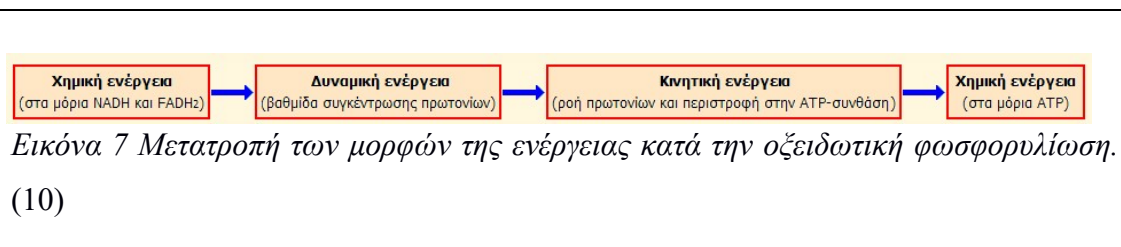
Τα πρωτόνια που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη, διέρχονται στη συνέχεια, λόγω της διαφοράς της συγκέντρωσης, μέσω ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που λέγεται ATP συνθάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ATP. Ο μηχανισμός αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ενώ οι επιστήμονες Paul D. Boyer και John E. Walker που τον περιέγραψαν τιμήθηκαν με βραβείο Nobel Χημείας το 1997. (13) Συγκεκριμένα, η ATP συνθάση, αποτελείται από δύο τμήματα: το λιπόφιλο F₀ που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη και το υδρόφιλο F₁ που βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μήτρα (Εικόνα 6 (10)).



Εικόνα 6 Τμήματα της ATP συνθάσης: το λιπόφιλο F_0 και το υδρόφιλο F_1 . Τμήμα του F_0 λειτουργεί ως ρότορας, ο οποίος με την περιστροφή του προκαλεί κίνηση της ασύμμετρης υπομονάδας που είναι ο κεντρικός άξονας, ο οποίος με τη σειρά του αλλάζει τη διαμόρφωση του τμήματος F_1 , προκαλώντας την κατάλυση του ATP. (10)

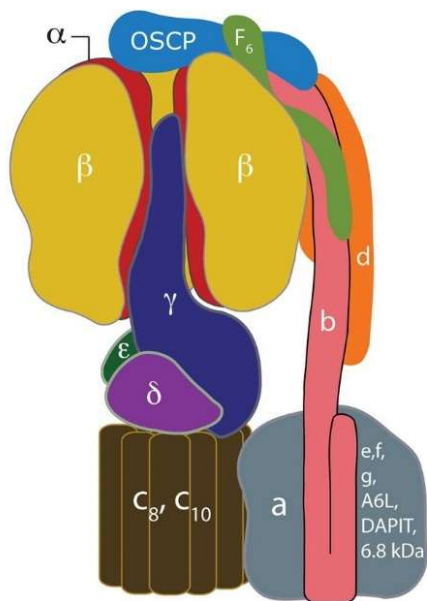
Κατά την είσοδο των πρωτονίων στην μιτοχονδριακή μήτρα μέσω ενός διαύλου, υπάρχει αλληλεπίδραση με τμήμα της υπομονάδας F_0 που δρα ως ρότορας, με αποτέλεσμα σε κάθε στροφή 120° να έχουμε την σύνθεση ενός μορίου ATP, ενώ με μια πλήρη περιστροφή έχουμε τη δημιουργία 3 μορίων ATP. Η περιστροφή του ρότορα προκαλεί την κίνηση μίας ασύμμετρης υπομονάδας, η οποία με τη σειρά της προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του τμήματος F_1 που αποτελεί και το καταλυτικό τμήμα της ATP συνθάσης. Η πιο σημαντική όμως για αυτή τη μελέτη ιδιότητα της ATP συνθάσης, είναι η αντίστροφη λειτουργία της κατά την οποία με κίνηση των πρωτονίων προς την αντίθετη κατεύθυνση έχουμε υδρόλυση του ATP και μετατροπή του σε ADP και P_i , με την οποία θα ασχοληθούμε εκτενέστερα στην συνέχεια. Συμπερασματικά, κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση έχουμε μετατροπή της μορφής της ενέργειας από χημική μέσω των μορίων NADH, $FADH_2$ σε δυναμική μέσω της αλλαγής στο δυναμικό της εσωτερική μεμβράνης των μιτοχονδρίων, σε

κινητική με την κίνηση του ρότορα και τέλος σε χημική ενέργεια ξανά με την δημιουργία του ATP από την ATP συνθάση. (Εικόνα 7 (10))



III.6 Δομή της ATP συνθάσης (14)

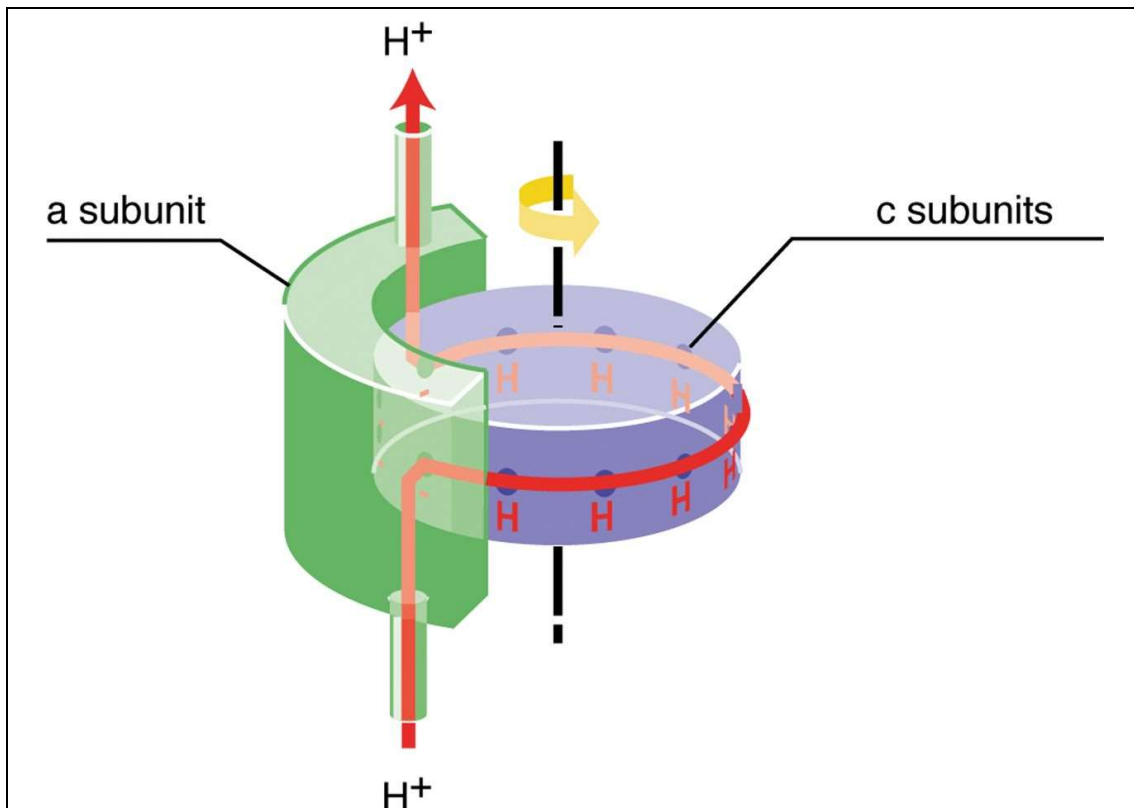
Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ATP συνθάση αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, την F₁ που βρίσκεται εκτός μεμβράνης, και την F₀ που βρίσκεται εντός μεμβράνης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με έναν κεντρικό και έναν περιφερικό άξονα. (Εικόνα 8 (14)). Η περιοχή F₁ είναι το καταλυτικό κομμάτι του ενζύμου όπου παράγεται το ATP από ADP, ενώ η F₀ περιέχει τον ρότορα ο οποίος περιστρέφεται χρησιμοποιώντας την διαφορά συγκέντρωσης των πρωτονίων. Η ενέργεια αυτής της περιστροφής μεταφέρεται μέσω του κεντρικού άξονα που είναι προσδεδεμένος στον ρότορα, στο καταλυτικό τμήμα, το οποίο αποτελείται από 3 υπομονάδες τύπου α και 3 υπομονάδες τύπου β. Ο περιφερικός άξονας συνδέει το α₃β₃ καταλυτικό τμήμα με την υπομονάδα α του τμήματος F₀, προσδίδοντας ένα σταθερό σημείο στην ATP συνθάση. Το τμήμα F₁ αποτελείται από 5 σφαιρικού τύπου πρωτεΐνες τις α, β, γ, δ και ε, με αναλογία α₃β₃γ₁δ₁ε₁. Οι υπομονάδες α και β είναι τοποθετημένες εναλλάξ γύρω από την επιμήκη α-έλικα γ υπομονάδα, της οποίας τμήμα περιβάλλεται εξ ολοκλήρου απ' το τμήμα α₃β₃. Οι συνδεδεμένες στην γ, υπομονάδες δ, ε είναι στενά προσδεδεμένες στο ένα άκρο του υδρόφοβου κυλίνδρου, που αποτελείται από υπομονάδες c στο τμήμα F₀ του ενζύμου (15,16) (σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι δεν πρέπει να γίνεται σύγχυση με την ονοματολογία των υπομονάδων της ATP συνθάσης των βακτηρίων καθώς είναι διαφορετική, ακόμα και σε κοινές υπομονάδες (17)). Η υπομονάδες γ, δ, ε και ο κύλινδρος αποτελούν τον ρότορα της ATP συνθάσης. Η δομή φαίνεται λεπτομερέστερα στην Εικόνα 8 (14)



Εικόνα 8 Δομή ATP συνθάσης. Το επάνω τμήμα, αποτελείται από τις υπομονάδες του καταλυτικού τμήματος F_1 . Μία α υπομονάδα (κόκκινο) έχει αφαιρεθεί ώστε να φαίνεται η επιμήκης α -έλικα γ υπομονάδα (σκούρο μπλε), ενώ στο κάτω μέρος της έρχεται σε επαφή με το τμήμα F_0 , το οποίο περιέχει τον δακτύλιο (καφέ) και την συνδεδεμένη υπομονάδα a (γκρι). Ο αριθμός των c υπομονάδων διαφέρει ανά είδος. Η πορεία των πρωτονίων διαμέσου του τμήματος F_0 βρίσκεται στην επιφάνεια μεταξύ του δακτυλίου υπομονάδων c και της υπομονάδας a . Ο περιφερειακός άξονας στα μιτοχόνδρια αποτελείται από ένα αντίγραφο των υπομονάδων OSCP, b , d και F_6 . Οι υπομονάδες e , f , g κτλ. δεν έχουν κάποια γνωστή λειτουργία στην δημιουργία του ATP. (14)

III.7 Μοντέλο του μηχανισμού δημιουργίας περιστροφής του τμήματος F_0 (14)

Στην Εικόνα 9 (14) βρίσκεται το μοντέλο περιστροφής του τμήματος F_0 της ATP συνθάσης, με το οποίο πραγματοποιείται η είσοδος των πρωτονίων στη μιτοχονδριακή μήτρα, με την οποία οδηγούμαστε σε αλλαγή της διαμόρφωσης του τμήματος F_1 και παραγωγής ATP.



Εικόνα 9 Μοντέλο του μηχανισμού δημιουργίας περιστροφής του τμήματος F_0 . Η υπομονάδα a (πράσινο) επικοινωνεί με το δακτύλιο υπομονάδων c (μπλε). Το καρβοξυτελικό άκρο της a -έλικας κάθε υπομονάδας c περιέχει μία καρβοξυλομάδα (στην πλευρική αλυσίδα ασπαραγινικού ή γλουταμινικού οξέος, όπου στο σχήμα την αναπαριστούν οι σκούροι μπλε κύκλοι) η οποία βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά του κυλίνδρου. Τα πρωτόνια που προέρχονται από την πλευρά της μεμβράνης που δεν βρίσκεται η F_1 υπομονάδα αλλά είναι ο διαμεμβρανικός χώρος, διέρχονται μέσω ενός ημι-καναλιού, που βρίσκεται μεταξύ των υπομονάδων c και a , μετατρέποντας το φορτίο των αρνητικών καρβοξυλομάδων σε ουδέτερο. (18) Όταν εξουδετερωθούν, προκαλούν μία μεταβολή της δομής περιστρεφόμενα κατά τη φορά του βέλους, ενώ κάποια άλλη καρβοξυλομάδα εισέρχεται σε μια δεύτερη περιοχή μεταξύ της a υπομονάδας και του κυλίνδρου όπου και ιονίζεται ξανά, ενώ ένα πρωτόνιο απελευθερώνεται σε ένα δεύτερο ημι-κάνάλι προς την αντίθετη κατεύθυνση από αυτή που είχε εισέλθει. Αποτέλεσμα αυτού του μηχανισμού είναι να έχουμε μονής κατεύθυνσης κίνηση ανάλογα με την κατεύθυνση και τη διαφορά συγκέντρωσης των πρωτονίων, ενώ τα απαραίτητα πρωτόνια για μία πλήρη περιστροφή 360° είναι ίσα με τον αριθμό των υπομονάδων c , με την οποία θα έχουμε και την παραγωγή 3 μορίων ATP . (14)

III.8 Τμήμα F_1 και κατάλυση του ATP (14)

Η καταλυτική περιοχή του τμήματος F_1 αποτελείται από τρεις μη-καταλυτικές α υπομονάδες και από τρεις καταλυτικές β υπομονάδες, οι οποίες είναι διευθετημένες εναλλάξ γύρω από ένα τμήμα της γ υπομονάδας η οποία είναι α -έλικα, ενώ η δομή της είναι ασύμμετρη. Η περιστροφή της γ υπομονάδας μαζί με το ρότορα προκαλεί διαφορετικές διαμορφώσεις σε κάθε μία από τις καταλυτικές β -υπομονάδες, οι οποίες θα τους προσδίδουν διαφορετικές ικανότητες κατάλυσης και σύνδεσης με νουκλεοτίδια. Οι διαμορφώσεις αυτές των β υπομονάδων που δημιουργούνται, ονομάζονται β_{TP} , β_{DP} και β_E και έχουν διαφορετική συγγένεια με τα νουκλεοτίδια. Το β_{TP} , β_{DP} μπορούν το καθένα να προσδέσει είτε ATP ή ADP, ενώ η β_E δεν έχει την ικανότητα να συνδεθεί με κάποιο νουκλεοτίδιο, για αυτό και ορίζεται ως άδειο (Empty) ή ανοιχτής κατάστασης. Οι υπομονάδες α δεν έχουν αντίστοιχες διαμορφώσεις, αλλά παραμένουν κλειστές, συνδεόμενες με ένα ιόν Mg^{+2} και ένα νουκλεοτίδιο, παραμένοντας συνδεδεμένα καθ' όλη τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Κατά την σύνθεση ή την υδρόλυση του ATP, έχουμε την περιστροφή του κεντρικού άξονα, ο οποίος αλλάζει την διαμόρφωση των β υπομονάδων σε κάθε μία απ' τις τρεις διαμορφώσεις (β_{TP} , β_{DP} και β_E). Στην διαμόρφωση β_{DP} σχηματίζεται το ATP, απελευθερώνεται στην β_{TP} καθώς αυτή ανοίγει και μετατρέπεται στην β_E . Σε μία πλήρη δεξιόστροφη περιστροφή (όπως φαίνεται το ένζυμο από την πλευρά της μεμβράνης) έχουμε την παραγωγή 3 μορίων ATP, ένα από κάθε β -υπομονάδα. Αντιθέτως, σε μία αριστερόστροφη περιστροφή έχουμε υδρόλυση του ATP (19,20), με την αλλαγή διαμόρφωσης των β υπομονάδων στις 3 καταστάσεις και την υδρόλυση 3 μορίων ATP. (21)

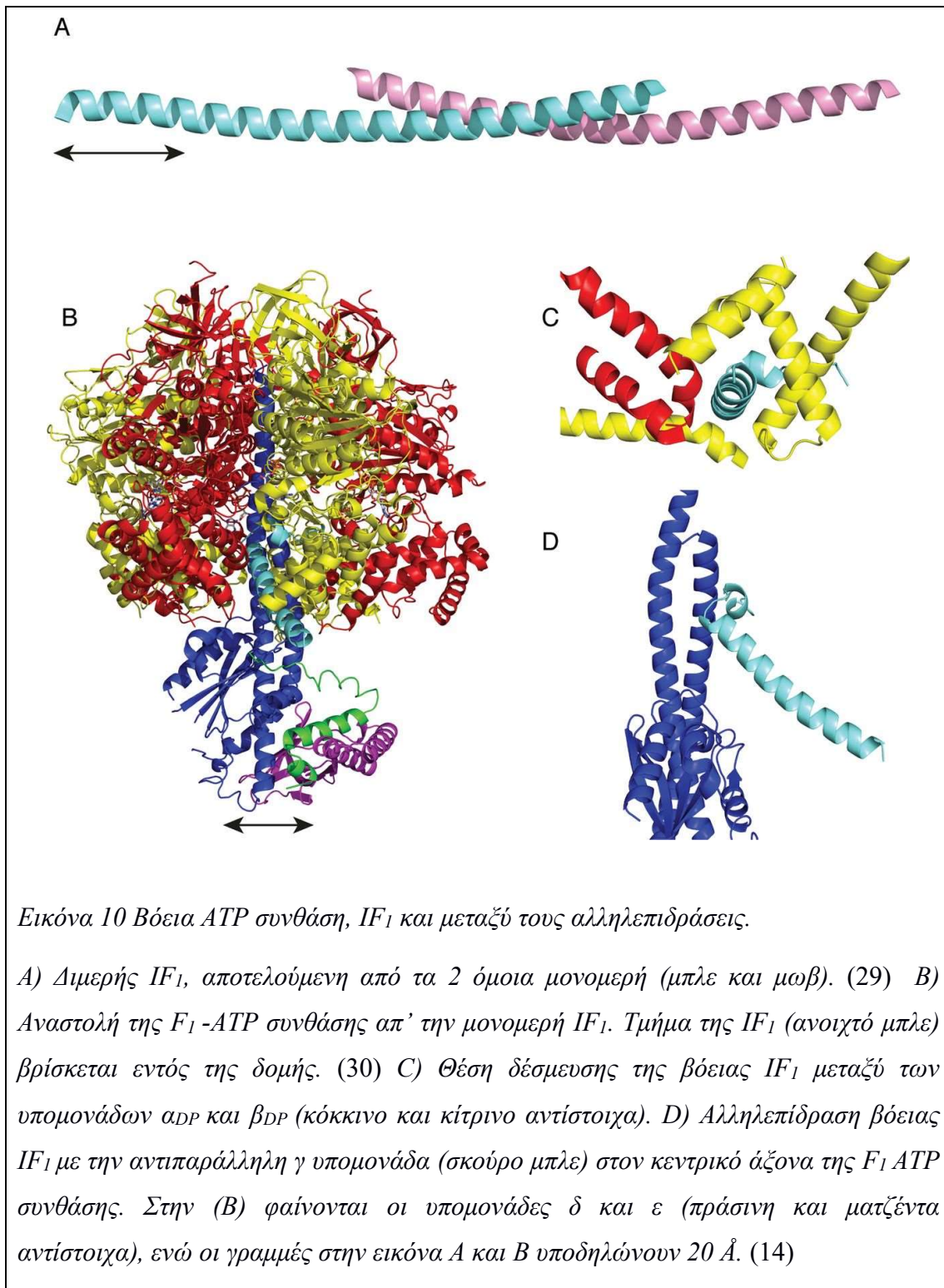
III.9 Θέσεις πρόσδεσης αναστολέων της ATP συνθάσης και η χρησιμότητά τους ως φαρμακολογικός στόχος

Η ATP συνθάση είναι ένα πολύπλοκο ένζυμο, με πολλές θέσεις δράσης αναστολέων και με πιθανές θεραπευτικές χρήσεις για τη στόχευση αναστολέων, όπως το αντιφυματικό Bedaquiline (22). Από τις διαθέσιμες θέσεις δράσης αναστολέων

τρεις έχουν περιγραφεί πολύ καλά στην βιβλιογραφία: 1) Η καταλυτική θέση πρόσδεσης της περιοχής F_1 , στην οποία έχει φανεί ότι η πρόσδεση αζιδίου, μπορεί να προκαλέσει αναστολή της υδρόλυσης του ATP που προκαλεί η ATP συνθάση και όχι της σύνθεσης. Η ιδιότητα αυτή θα μπορούσε να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη κατά την ανακάλυψη ενώσεων που εμφανίζουν καρδιοπροστασία, γιατί η εκλεκτική αναστολή αυτής της λειτουργίας της ATP συνθάσης, θα μπορούσε να παρέχει μείωση του ρυθμού εξάντλησης των αποθεμάτων κατά την ισχαιμία και μειωμένο κυτταρικό θάνατο. 2) Η θέση πρόσδεσης της κερκετίνης και άλλων πολυφαινολών. Η κερκετίνη δρα στο τμήμα F_1 της ATP συνθάσης αναστέλλοντας μόνο την υδρόλυση, παρόλο που συνδέεται με παρόμοιο τρόπο με την ρεσβερατρόλη (η οποία αναστέλλει και την σύνθεση και την υδρόλυση του ATP). (23,24) 3) Η θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης. Η ολιγομυκίνη προσδένεται στο ρότορα που βρίσκεται στο τμήμα F_0 της ATP συνθάσης, προκαλώντας αναστολή τόσο της υδρόλυσης, αλλά και της σύνθεσης του ATP. Αν και δεν είναι εκλεκτική, έχει την ικανότητα να μειώνει το ρυθμό εξάντλησης των αποθεμάτων ATP κατά την ισχαιμία. (1) Ως εκ τούτου η ολιγομυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για ανακάλυψη ενώσεων με αντίστοιχη δράση και ίσως μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, αλλά και ως ένωση μέσω της οποίας θα μελετηθεί ο τρόπος δράσης της ATP συνθάσης κυρίως στην περιοχή του ρότορα.

III.10 Η ενδογενής πρωτεΐνη IF_1 και η λειτουργία της

Η ανασταλτική πρωτεΐνη του τμήματος F_1 (Εικόνα 10 (14)), IF_1 (inhibitor protein of F_1) είναι μία μικρή ενδογενής πρωτεΐνη, η οποία έχει υψηλή ειδικότητα για την υδρολυτική δράση της ATP συνθάσης, δρώντας ως αντιστρεπτός μη-συναγωνιστικός αναστολέας. (25) Η αναστολή αυτή προϋποθέτει όξινο pH (~6.7), που προάγει την σύνδεση του IF_1 με την ATP συνθάση, το οποίο αποτελεί μία κατάσταση που συναντάται κατά την ισχαιμία. (25–28)



Η IF₁ διακόπτει την σύνδεση μεταξύ της κεντρικής υπομονάδας γ και των β υπομονάδων, αναστέλλοντας την υδρολυτική λειτουργία της F₁. (25,29) Κατά την μείωση της παροχής οξυγόνου, όπως κατά την ισχαιμία, η ATP συνθάση όπως αναφέρθηκε, δρα με αντίθετη κατεύθυνση, υδρολύοντας ATP και με αυτό το τρόπο

διατηρεί την διαφορά συγκέντρωσης πρωτονίων και κατά συνέπεια το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, δαπανώντας ATP. (25,30,31) Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άσκοπη κατανάλωση του ATP (wastage), το οποίο συμβάλει στον κυτταρικό θάνατο. (25,32,33) Η λειτουργία αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ουσίες όπως η F_1 , ενδεχομένως να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ισχαιμίας, καθώς μειώνουν την κατανάλωση του ATP απ' την ATP συνθάση, η οποία ευθύνεται για τα μεγάλα κλάσματα κατανάλωσης ATP στα καρδιομυοκύτταρα των τρωκτικών. (25)

III.11 Θέσεις πρόσδεσης αναστολέων της ATP συνθάσης

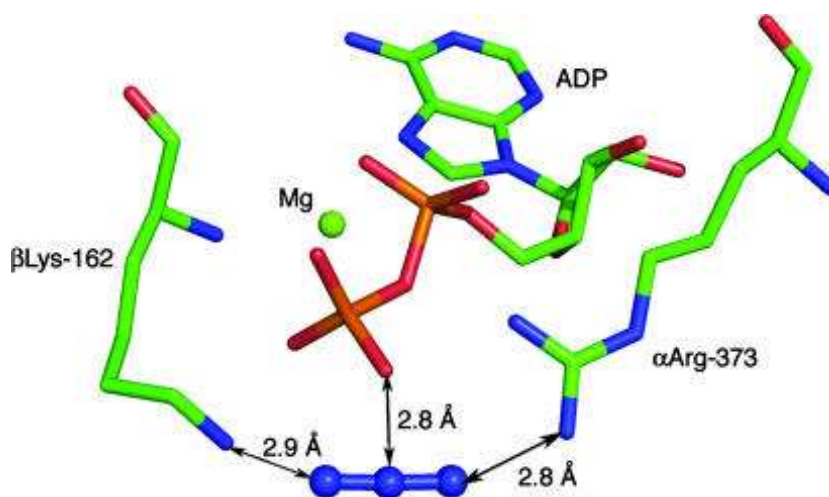
III.11.1 Αναστολή της ATP συνθάσης μέσω της καταλυτικής περιοχής F_1 (31)

Μερικές φορές κατά την υδρόλυση, η F_1 -ATP συνθάση αναστέλλεται από $ADP \cdot Mg^{+2}$ που παγιδεύεται σε κάποιο καταλυτικό κέντρο, είτε επειδή δεν μπορεί να απελευθερωθεί το ADP κατά την υδρόλυση, είτε γιατί το ADP προσδέεται στο μέσο. (32–36) Έχει προταθεί ότι η δράση αυτή του $ADP \cdot Mg^{+2}$ ενισχύεται απ' το αζίδιο. (33,35,37,38) Μια άλλη ερμηνεία της ανασταλτικής δράσης του αζιδίου, είναι ότι μπλοκάρει την συνεργασία μεταξύ των καταλυτικών κέντρων. (39,40) Η περιστροφή όμως της ATP συνθάσης κατά την συνθετική φορά εξωθεί το ADP και το αζίδιο (41), οπότε το ADP με το αζίδιο δεν αναστέλλουν την σύνθεση. (42)

Όπως προσδιορίστηκε από ανάλυση κρυστάλλων (1.95 \AA) που αναπτύχθηκαν με την παρουσία ADP, 5'-adenylyl-imidodiphosphate και αζιδίου, το αζίδιο φάνηκε να αλληλεπιδρά με το β-φώσφορο του ADP και με αμινοξικά κατάλοιπα στην καταλυτική υπομονάδα που προσδέεται το ADP, β_{DP} . Συγκεκριμένα, καταλαμβάνει την περιοχή μεταξύ των απαραίτητων αμινοξέων, της Λυσίνης 162 στη β υπομονάδα (β -Lys-162) στην P-loop (περιοχή πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων) και στην Αργινίνη 373 (α -Arg-373), θέση παρόμοια με αυτήν που καταλαμβάνει ο γ-φώσφορος στη υπομονάδα πρόσδεσης του ATP, β_{TP} . (Εικόνα 11 (31)) Η θέση του αυτή σταθεροποιεί και ενισχύει τη σύνδεση του συνδεδεμένου ADP, ενώ το αζίδιο φάνηκε

να αναστέλλει μόνο την υδρόλυση του ATP και όχι την σύνθεσή του.

Δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδεικνύουν συνδεδεμένο αζίδιο κάπου αλλού στον χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών των α υπομονάδων, κάτι που αποδυναμώνει την υπόθεση ότι το αζίδιο μπλοκάρει την συνεργασία μεταξύ των καταλυτικών κέντρων. (39,40) Το συνολικό φορτίο του αζιδίου είναι -1, καθώς έχει -1 στα εξωτερικά άτομα αζώτου και +1 στο κεντρικό άτομο αζώτου, ενώ οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιόντος, του ενζύμου και του ADP, ακολουθούν αυτήν την κατανομή του φορτίου. Τέλος η δομή αζιδίου-F₁ είναι ξεχωριστή καθώς η σύνδεση του αζιδίου με το ένζυμο βασίζεται σε δεσμούς υδρογόνου παρά σε απευθείας σύνδεση με μεταλλικό κέντρο.



Εικόνα 11 Αλληλεπιδράσεις αζιδίου με τις πλευρικές αλυσίδες της βόειας ATP συνθάσης. Τα αρνητικά φορτισμένα άκρα του αζιδίου κάνουν δεσμούς υδρογόνου με τα α-Arg-373 και Lys-162, ενώ το κεντρικό άζωτο που είναι θετικά φορτισμένο αλληλεπιδρά ιοντικά με το οξυγόνο του β- φωσφόρου του ADP. Αυτές οι συνδέσεις αποτρέπουν την αλλαγή της διαμόρφωσης και κατά συνέπεια της απελευθέρωσης του ADP. (31)

III.11.2 Αναστολή της ATP συνθάσης μέσω της θέσης πρόσδεσης της ολιγομυκίνης (43)

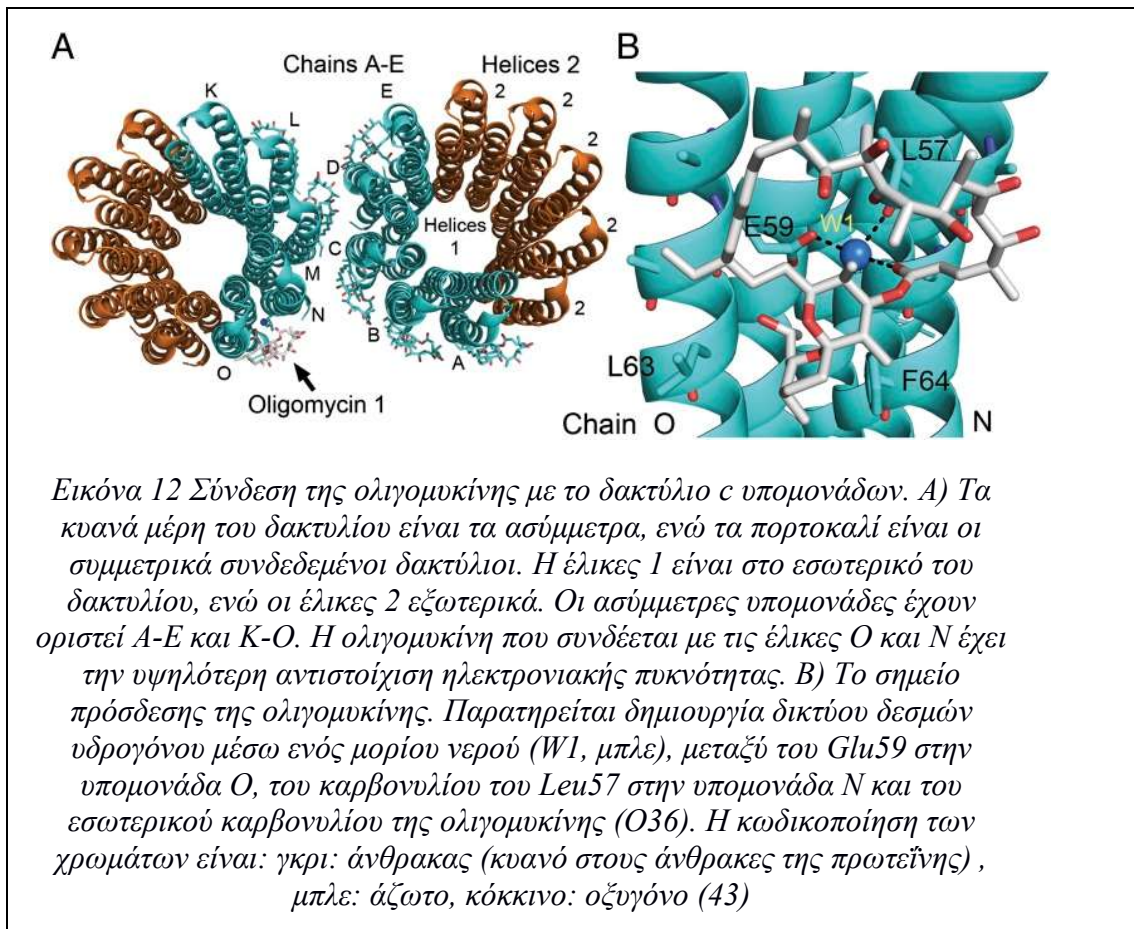
Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας γνωρίζουμε ότι η ολιγομυκίνη (oligomycin) συνδέεται στην επιφάνεια του κυλίνδρου (αποτελούμενου από 10

υπομονάδες c) της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης του ζυμομύκητα. Η πλευρική ομάδα του αμινοξέος Glu59 που φέρει καρβοξυλική ομάδα και είναι απαραίτητη για την μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης, συνδέεται με την ολιγομυκίνη μέσω δικτύου δεσμών υδρογόνου με ένα μόριο νερού που παρεμβάλλεται ανάμεσά τους, διαφορετικά είναι προστατευμένο απ' το υδατικό περιβάλλον. Οι υπόλοιπες επαφές μεταξύ ολιγομυκίνης και υπομονάδων c είναι κυρίως υδρόφοβες, ενώ τα σημαντικά αμινοξέα σε αυτό το κέντρο σύνδεσης της ολιγομυκίνης είναι συντηρημένα μεταξύ ανθρώπων και μυκήτων, αλλά διαφέρουν απ' τα ομόλογα βακτήρια, με αποτέλεσμα να διαφέρει και η δράση της ολιγομυκίνης σε αυτά. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι η θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης επικαλύπτει την θέση δράσης ορισμένων άλλων αντιβιοτικών, ειδικά όσον αφορά το μυκοβακτήριο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*), με αποτέλεσμα να αποτελεί συχνό φαρμακευτικό στόχο.

Όπως φαίνεται και στη Εικόνα 12 (43), οι υπομονάδες c αποτελούνται από 2 έλικες, ενώ το απαραίτητο αμινοξύ Glu59 στην έλικα 2 υποθέτουμε ότι συμμετέχει άμεσα στην μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης κατά την σύνθεση του ATP. Η πλευρική του αλυσίδα με την καρβοξυλική ομάδα βρίσκεται στη μέση της έλικας 2, τοποθετημένη στην λιπιδική διπλοστιβάδα, σε μία “κλειστή” πρωτονιωμένη διαμόρφωση. (44)

Η υπομονάδα a σχηματίζει 2 ημι-κανάλια τα οποία επιτρέπουν την πρόσβαση των πρωτονίων στο καρβοξύλιο του Glu59 σε μία “ανοιχτή” διαμόρφωση, δίνοντας τη δυνατότητα για αντίδραση πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης. (44) Τα αποτελέσματα της μελέτης των Symersky et al. (43) προτείνουν ότι η ολιγομυκίνη προσδέεται στο κύλινδρο υπομονάδων c μπλοκάροντας αυτό το απαραίτητο αμινοξύ και με αυτό το τρόπο την είσοδο πρωτονίων. Εικόνα 12

Όπως προαναφέρθηκε το Glu59 δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την ολιγομυκίνη μέσω ενός μορίου νερού. Συγκρινόμενα, απουσία προσδέματος ολιγομυκίνης, η διαμόρφωση του Glu59 είναι προς τα μέσα ώστε να δημιουργηθεί ο δεσμός υδρογόνου με το νερό, ενώ βασιζόμενοι στο pH και στα εμπλεκόμενα άτομα, υποθέτουμε ότι το Glu59 βρίσκεται σε πρωτονιωμένη κατάσταση. Προτείνεται έτσι, ότι η ολιγομυκίνη κλειδώνει αυτό το αμινοξύ στη συγκεκριμένη διαμόρφωση, εμποδίζοντάς την επαφή του με το υδατικό περιβάλλον του ημι-καναλιού.

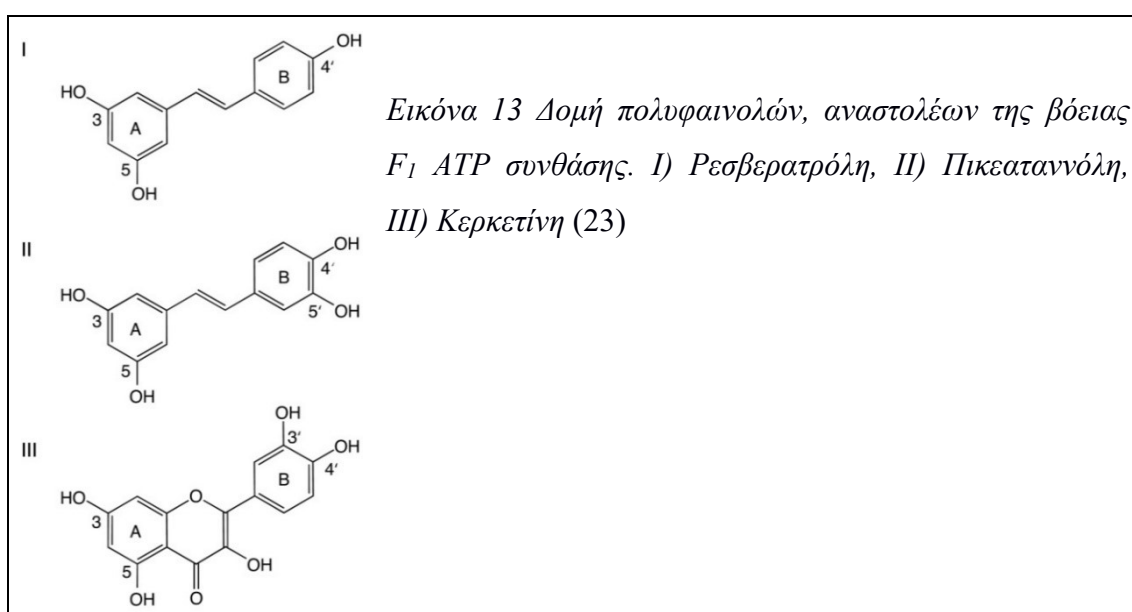


Παράλληλα, ο τρόπος σύνδεσης της ολιγομυκίνης η οποία καλύπτει την υδρόφοβη επιφάνεια των υπομονάδων c με την υδρόφιλη πλευρά της (45) προτείνει ότι το μόριο συνδέεται **μόνο** στις υπομονάδες c οι οποίες έρχονται σε επαφή με τα ημι-κανάλια που σχηματίζονται απ' την υπομονάδα a. Παρόλο λοιπόν, που σχηματικά φαίνεται να συνδέονται 7 μόρια ολιγομυκίνης στο δακτύλιο c υπομονάδων της κρυσταλλικής δομής, πιστεύεται ότι στην φυσιολογική λειτουργία της ATP συνθάσης θα συνδέονται μόνο τόσα μόρια όσα και οι περιοχές που εκτίθενται στα ημι-κανάλια από όπου διέρχονται τα πρωτόνια.

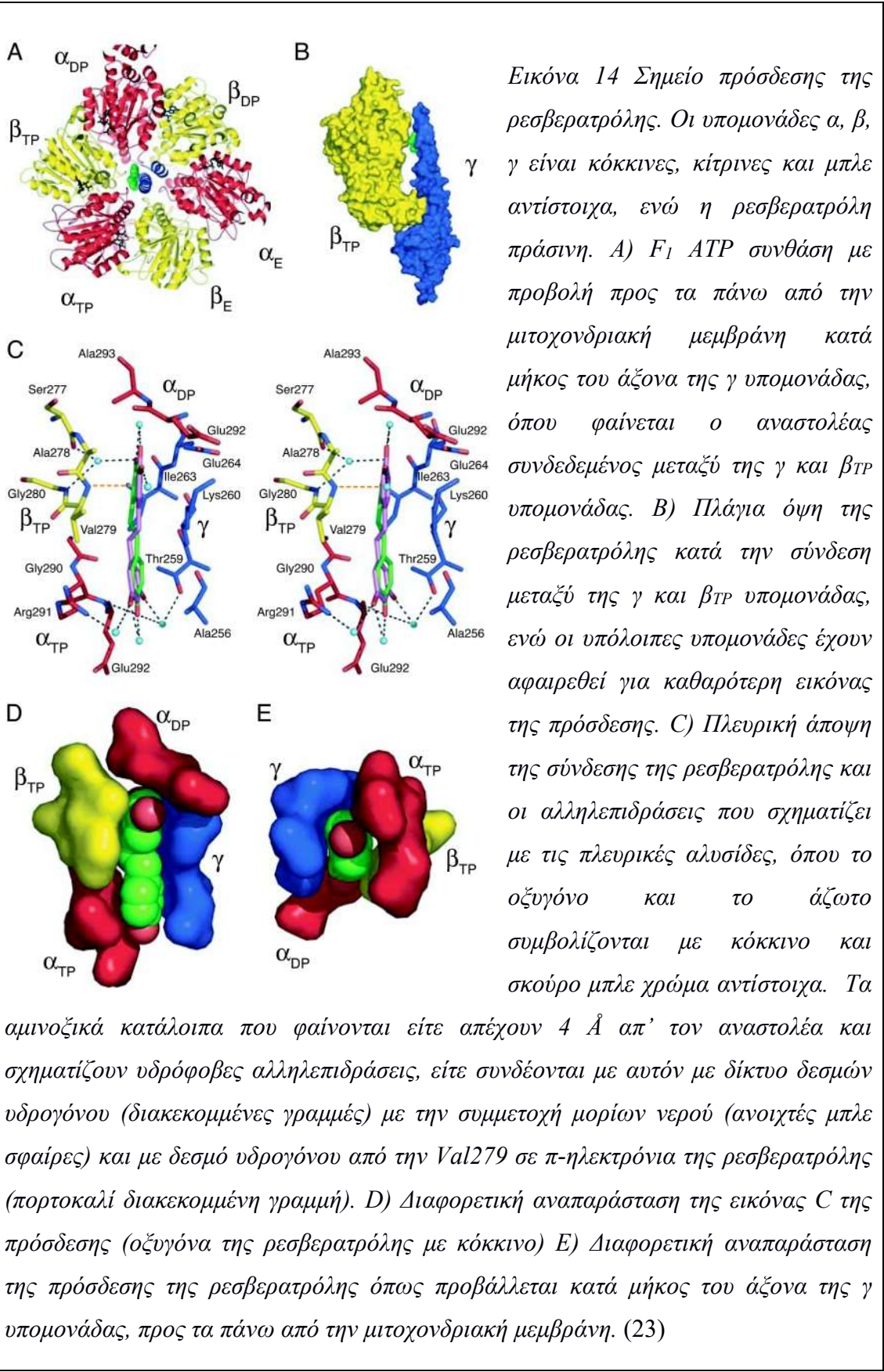
III.11.3 Αναστολή της ATP συνθάσης μέσω της θέσης πρόσδεσης πολυφαινολών (23)

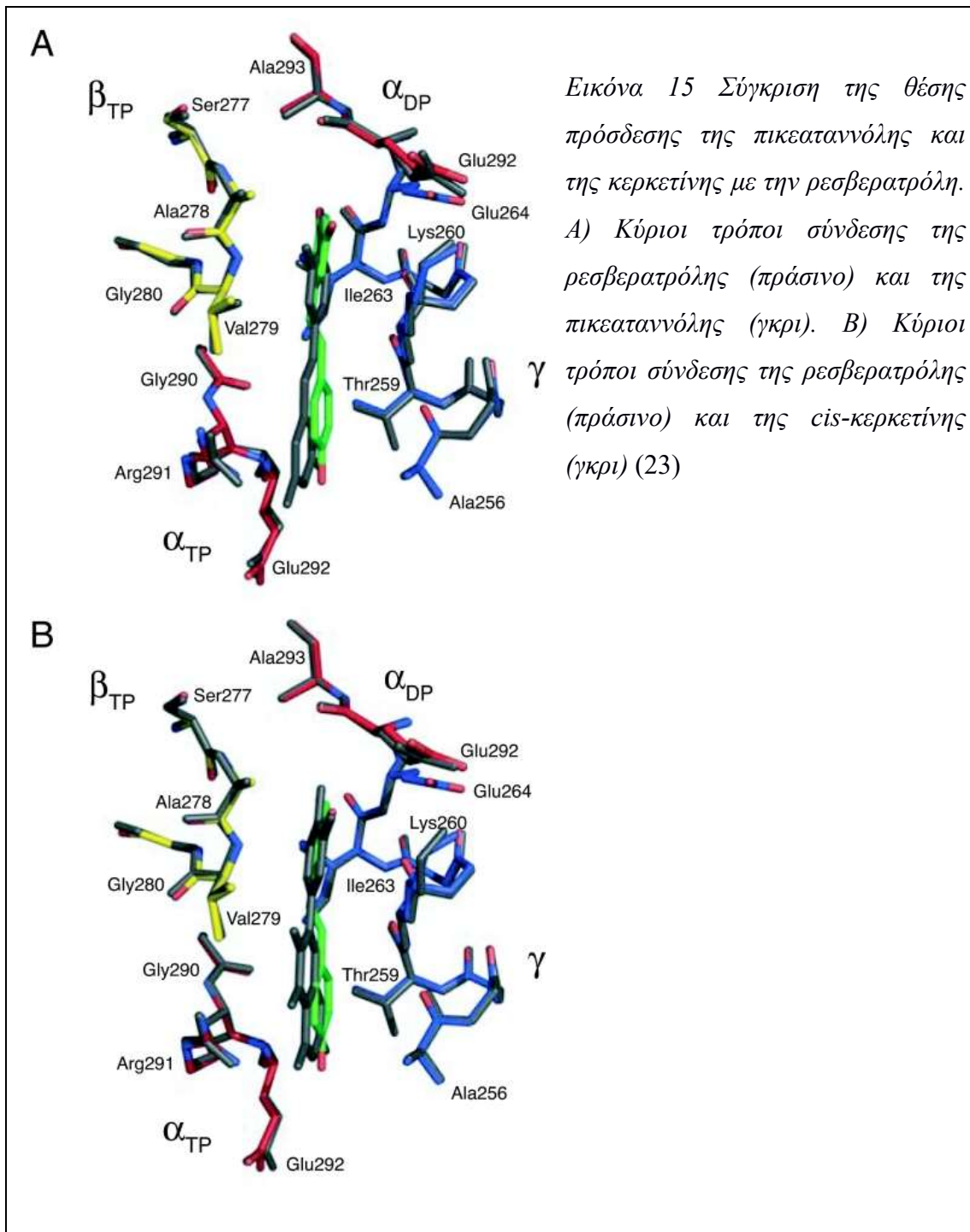
Πολυφαινολικές ενώσεις (Εικόνα 13 (23)) όπως η ρεσβερατρόλη (resveratrol), η κερκετίνη (quercetin) και η πικεαταννόλη (piceatannol) λειτουργούν ανασταλτικά,

συνδεόμενες σε ένα κοινό σημείο στην εσωτερική επιφάνεια της αύλακας που σχηματίζεται από ακανόνιστου τύπου δομές (loops) στις 3 α και 3 β υπομονάδες της ATP συνθάσης. Η περιοχή αυτή του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης κατά την κατάλυση δρα ως στήριγμα όπου επιτρέπει την περιστροφή της υπομονάδας γ μέσα στην κοιλότητα. Το σημείο πρόσδεσης αυτών των αναστολέων, είναι ένας υδρόφοβος θύλακας μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της γ υπομονάδας και της β_{DP} υπομονάδας, μέσω δεσμών υδρογόνου που προσφέρουν δεσμευμένα μόρια νερού, με τα υδροξυλικά τους τμήματα και μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. (Εικόνα 14 (23) Εικόνα 15 (23)) Μεταξύ της γ υπομονάδας και της β_{DP} ή της β_E δεν υπάρχουν αντίστοιχες θέσεις. Η κερκετίνη και η πικεατανόλη συνδέονται με παρόμοιο τρόπο με την ρεσβερατρόλη.



Ο μηχανισμός δράσης της αναστολής που προκαλούν οι πολυφαινόλες βασίζεται στον αποκλεισμό της περιστροφής του κεντρικού άξονα, μέσω της θέσης πρόσδεσης που καταλαμβάνουν. Η ρεσβερατρόλη έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την υδρόλυση αλλά και τη σύνθεση του ATP (46) , ενώ η παρουσία της αποτρέπει και τις δύο περιστροφικές κινήσεις (αριστερόστροφα και δεξιόστροφα). Η κερκετίνη εμποδίζει την υδρόλυση του ATP αλλά όχι την σύνθεση (24). Αυτή η ιδιότητα χρήζει διερεύνησης, δεδομένου τις κοντινές ομοιότητες μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης της κερκετίνης και της ρεσβερατρόλης.





III.12 Εκλεκτικοί αναστολείς της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης

Όπως προαναφέρθηκε, η ATP συνθάση κατά την ισχαιμία αντιστρέφει τη δράση

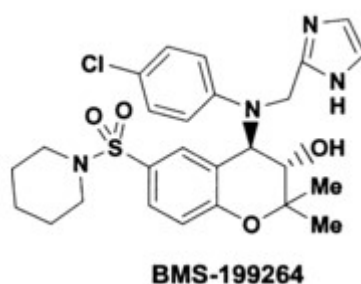
της υδρολύοντας ATP, καταστρέφοντας τα αποθέματά της και οδηγώντας στο κυτταρικό θάνατο. (25) Οι ενώσεις **BMS199264** και **BTB06584** που μελετήθηκαν στην ισχαιμία του μυοκαρδίου (1,25) είναι **εκλεκτικοί** αναστολείς της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης και ως εκ τούτου, αποτελούν ιδανικές ενώσεις οδηγούς για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων με καρδιοπροστατευτική δράση. Πρόβλημα κατά τη μελέτη των αναστολέων αυτών αποτελεί η έλλειψη γνώσης του ακριβούς μηχανισμού δράσης και του τρόπου πρόσδεσης στην ATP συνθάση σε περίπτωση που δρουν απευθείας σε κάποιο ενεργό της κέντρο. Δεδομένα κατά τη μελέτη της ένωσης BTB06584 υποδεικνύουν συσχέτιση με την πρωτεΐνη IF₁. (25)

III.12.1 **BMS199264** (1)

Όπως έχει προαναφερθεί, η ATP συνθάση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του ATP στα θηλαστικά. Κάτω όμως από συνθήκες μυοκαρδιακής ισχαιμίας μπορεί η συνθάση να μετατραπεί σε υδρολάση, ενώ ο βαθμός αυτής της αναποτελεσματικής υδρόλυσης του ATP, η οποία δεν προσφέρει κάποιο έργο, μπορεί να φτάσει μέχρι 50–90% του συνολικού. Η ανασταλτική πρωτεΐνη του τμήματος F₁,IF₁ (inhibitor protein of F₁) αποτελεί έναν ενδογενή αντιστρεπτό αναστολέα της υδρολυτικής αυτής δράσης στα μιτοχόνδρια. Μελέτες όμως έδειξαν ότι **μη** εκλεκτικοί αναστολείς όπως η ολιγομυκίνη B και η αουροβερτίνη B, όπου αναστέλλουν και την σύνθεση αλλά και την υδρόλυση του ATP, έχουν την ικανότητα να μειώνουν τον ρυθμό εξάντλησης των αποθεμάτων του ATP κατά την ισχαιμία, γεγονός που καταδεικνύει ότι η IF₁ **δεν παρεμποδίζει τελείως** την υδρολυτική δράση της ATP συνθάσης. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός ότι αυτοί οι μη εκλεκτικοί αναστολείς (ολιγομυκίνη και αουροβερτίνη), δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία της μυοκαρδιακής ισχαιμίας καθώς θα μειώσουν την παραγωγή του ATP και στους υγιείς ιστούς. Μελέτες σχέσης δομής-δράσης που πραγματοποιήθηκαν κατέληξαν στη δημιουργία ενώσεων οι οποίες μπορούν **εκλεκτικά** να αναστέλλουν την υδρολυτική δράση της ATP συνθάσης, χωρίς όμως να έχουν επίδραση στην συνθετική δράση. Μία από αυτές τις ενώσεις, το μόριο με το όνομα **BMS-199264** (εφεξής **BMS**), σε υπομιτοχονδριακά σωματίδια δεν είχε καμία επίδραση στην συνθετική δράση, αλλά προκαλούσε αναστολή της υδρόλυσης, σε αντίθεση με την ολιγομυκίνη που

αναστέλλει και τις δύο. Το **BMS** μπορούσε να δρα εκλεκτικά και κατά την ισχαιμία, με αναστολή της εξάντλησης του ATP, χωρίς να επηρεάζει την σύνθεση του ATP σε φυσιολογικές και επαναιματούμενες καρδιές. Τέλος είχε την ικανότητα να μειώσει την καρδιακή νέκρωση και να ενισχύσει την ανάκτηση της συστολικής λειτουργίας κατά την ακολουθούμενη επαναιμάτωση.

Το **BMS** είναι ένα βενζοπυρανίο (Εικόνα 16 (1)), ανάλογο του cromakalim το οποίο σχετίζεται με την διάνοιξη ευαίσθητων σε ATP διαύλων καλίου. Όμως, το **BMS** δεν έχει επίδραση σε αυτούς τους διαύλους, ενώ η στερεοχημεία του είναι η αντίθετη από αυτή μορίων που προκαλούν τη διάνοιξη τους. (47) Μέσω των σχέσεων δομής-δράσης που πραγματοποιήθηκαν, προκύπτει ότι οι ενώσεις με 3S, 4R διαμόρφωση όπως το **BMS** έχουν προτίμηση στην υδρολυτική δράση, σε σχέση με τα 3R, 4S ανάλογα. Συγκεκριμένα, η τιμή IC₅₀ για την υδρολυτική δράση ήταν 0.5 μM, ενώ δεν εντοπίστηκε επίδραση στην συνθετική δράση ακόμα και στα 100 μM **BMS**.

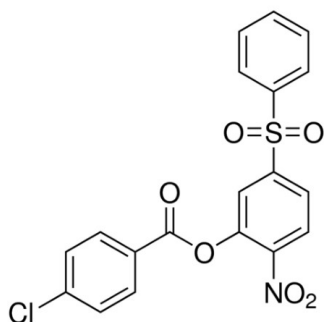


Εικόνα 16 Χημική Δομή του **BMS-199264** (3S, 4R), εκλεκτικού αναστολέα της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης (1)

Ο μηχανισμός δράσης αυτού του μορίου είναι άγνωστος, ενώ η στερεοεκλεκτικότητά του προτείνει συγκεκριμένο “κλειδί και κλειδαριά” μηχανισμό, άρα και υψηλή εκλεκτικότητα. (47) Εφόσον η IF₁ είναι εκλεκτική μόνο για την υδρολυτική δράση, ο μόνος ως τώρα τρόπος για να αιτιολογήσουμε τη δράση του **BMS**, είναι βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι η αλλαγή της ATP συνθάσης σε ATP υδρολάση, δεν είναι μια χημική αντίδραση η οποία λειτουργεί αντίστροφα, αλλά αλλαγή στην διαμόρφωση του ενζύμου, όπως έχει προταθεί και απ’ τον Vinogradov. (48) Καταλήγοντας, δημιουργείται η υπόθεση ότι το **BMS** προσδένεται μόνο στη διαμόρφωση της ATP συνθάσης κατά την υδρολυτική της δράση.

III.12.2 BTB06584 (25)

Βασιζόμενοι πάνω στο καρδιοπροστατευτικό **BMS** οι Ivanes et al. (25) εκτέλεσαν σάρωση χημειοθήκης και κατέληξαν στο μόριο **BTB06584**, εφεξής **BTB**, (Εικόνα 17 (49)), με το οποίο διερεύνησαν το μηχανισμό δράσης του σε σχέση με την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη IF_1 . Το BTB προκαλεί αναστολή της ATP συνθάσης, χωρίς όμως επίδραση στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην κατανάλωση του οξυγόνου. Η κατανάλωση του ATP μειώθηκε μετά από αναστολή της αναπνοής, ενώ μειώθηκε και ο ισχαιμικός κυτταρικός θάνατος. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι η αποδοτικότητα του BTB αυξήθηκε με την υπερέκφραση της IF_1 , ενώ μειώθηκε με την αποσιώπηση της πρωτεΐνης. Ο κυτταρικός θάνατος που ακολουθούσε της ισχαιμίας ήταν χαμηλότερος στα $+IF_1$ κύτταρα και σημαντικά υψηλότερος στα $-IF_1$ κύτταρα όταν χορηγούταν το BTB. Το **BTB** όπως και το **BMS** είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, οπότε ο τρόπος με τον οποίο μπορούν εκλεκτικά να αναστέλλουν μόνο την υδρόλυση και όχι τη σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση αποτελεί ερώτημα. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι αυτό είναι εφικτό, αν τα μόρια αυτά δρουν μέσω του ενδογενούς αναστολέα IF_1 .



Εικόνα 17 Χημική Δομή του **BTB06584**, εκλεκτικού αναστολέα της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης (53)

IV. Στόχος εργασίας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μη-εκλεκτικοί αναστολείς της ATP συνθάσης όπως η ολιγομυκίνη και η αουροβερτίνη μειώνουν την υδρόλυση του ATP κατά την ισχαιμία του μυοκαρδίου (1,50–52), ενώ εκλεκτικοί αναστολείς όπως το **BMS-199264**, αναστέλλουν μόνο την υδρολυτική δράση της ATP συνθάσης και εμφανίζουν καρδιοπροστατευτική δράση. (25) Η ανακάλυψη τέτοιων εκλεκτικών αναστολέων απασχολεί την ερευνητική κοινότητα και μπορεί να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές μορφές.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη της δομής της ATP συνθάσης με τη χρήση μοριακών υπολογισμών για την εύρεση νέων μορίων οδηγών (lead compounds) με ανασταλτική δράση της υδρόλυσης του ATP. Για την επίτευξη του στόχου, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί εικονικής αξιολόγησης για την επιλογή των μορίων από την χημειοθήκη του εργαστηρίου και στην συνέχεια η πειραματική τους αξιολόγηση. Αρχικό βήμα είναι η δημιουργία τρισδιάστατου μοντέλου της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης του *mus musculus* με τη χρήση ομόλογων πρωτεϊνών για τις οποίες έχουμε διαθέσιμες τις τρισδιάστατες δομές (homology modeling). Η επικύρωση του μοντέλου πραγματοποιείται με την σύγκριση των θεωρητικών αποτελεσμάτων των υπολογισμών πρόσδεσης (docking) γνωστών αναστολέων, ως προς τα πειραματικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για τους αναστολείς αυτούς. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί πρόσδεσης ενώσεων της χημειοθήκης του εργαστηρίου (Pharmalab), η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερη χρησιμότητα, καθώς περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό φυσικών προϊόντων όπως το φλαβονοειδές κερκετίνη του οποίου η δομή σε σύμπλοκο με τη ATP συνθάση είναι γνωστή. Παράλληλα, χρησιμοποιήσαμε υπολογισμούς ομοιότητας (similarity) ως προς αναστολείς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, οι οποίοι έχουν άγνωστο μηχανισμό δράσης και θέση με την οποία προσδένονται στην πρωτεΐνη στόχο. Με την βοήθεια αυτών των υπολογιστικών μεθόδων, είναι δυνατή η χρήση της δομής των ενώσεων αυτών για ανακάλυψη και βελτιστοποίηση νέων αναστολέων, χωρίς να είναι απαραίτητη η γνώση της θέσης πρόσδεσης στην οποία δρουν.

Οι ενώσεις που προκύπτουν από τις παραπάνω διαδικασίες ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων, ελέγχονται με *in vitro* πειραματικές διατάξεις και εκτιμάται η

βιολογική τους δράση ως αναστολείς της μιτοχονδριακής ATP συνθάσης κατά την υδρολυτική της δράση. Τέλος, προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} των δραστικότερων αναστολέων με την ίδια *in vitro* δοκιμασία. Οι ενώσεις αυτές θα μελετηθούν διεξοδικά πέραν της παρούσας εργασίας για την βελτιστοποίηση των δομών τους.

V.Μέθοδοι

V.1 Υπολογιστικές Μέθοδοι (in silico)

V.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων μέσω σύγχρονων υπολογιστικών μεθόδων (53)

Στην σύγχρονη προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων χρησιμοποιούνται νέα εργαλεία όπως η χημική βιολογία και ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων με σκοπό τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση νέων ενώσεων οδηγών όσο και την βελτιστοποίησή τους. Η χημική βιολογία χρησιμοποιείται κυρίως για να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης του βιολογικού στόχου και να αποδοθεί ο τρόπος λειτουργίας του. Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί σημαντικές τεχνικές τόσο από πλευράς εταιρειών αλλά και ακαδημαϊκών ομάδων ώστε να μειωθεί το κόστος και ο χρόνος που απαιτείται για την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου. Παρ' όλες όμως αυτές τις προσπάθειες, οι βελτιώσεις αυτών των εργαλείων και μεθόδων κρίνονται μείζονος σημασίας. Οι διαδικασίες ανακάλυψης φαρμάκων είτε βασισμένες στους στόχους των φαρμάκων (structure-based), είτε βασισμένες στις δομές των δραστικών ενώσεων/προσδεμάτων (ligand-based), σε συνδυασμό με πειραματικές διαδικασίες, προσφέρουν σημαντική βάση για την δημιουργία νέων φαρμάκων μέσω ορθολογικού σχεδιασμού.

Τα βήματα που ακολουθούνται κατά την ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι τα εξής: α) Η αναγνώριση του στόχου, όπου περιλαμβάνεται η ανακάλυψη του στόχου και η διερεύνηση της λειτουργίας του και ο συσχετισμός τους με συγκεκριμένη ασθένεια. (54) β) Επικύρωση του στόχου, όπου υποδεικνύεται η δυνατότητα να ρυθμίσει βιολογικές λειτουργίες με πιθανά θεραπευτικά αποτελέσματα, κατά την αλληλεπίδραση με ένα μικρού μοριακού βάρους μόριο. γ) Αναγνώριση της ένωσης οδηγού, κατά την οποία έχουμε την ταυτοποίηση χημικής ένωσης με δραστηριότητα και ειδικότητα έναντι του βιολογικού στόχου, που οδηγεί στην υπόθεση ότι μπορεί να θεραπεύσει την υπό μελέτη ασθένεια. (55) δ) Βελτιστοποίηση της ένωσης οδηγού με

την βελτίωση της δράσης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της, με παράλληλη πραγματοποίηση επαναληπτικών κύκλων αξιολόγησης των αναλόγων της ένωσης οδηγού μέσω *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων ώστε να ταξινομηθούν οι δυνητικά ισχυρότερες ενώσεις, που θα αναπτυχθούν περαιτέρω. Επιπλέον, υπολογίζονται φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες μέσω σχέσεων δομής-δράσης, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν σε ανάλογα στα οποία θα γίνει σύνθεση για περαιτέρω αξιολόγηση. (56) ε) Προκλινικές μελέτες που περιλαμβάνουν τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης αλλά και μελέτες μορφοποίησης. Πραγματοποιούνται *in vivo* μελέτες σε ζώα για προσδιορισμό της δραστηριότητας και της τοξικότητας, ενώ χαρακτηρίζεται και η μηχανιστική τοξικότητα. (57,58) στ) Κλινικές δοκιμές τριών φάσεων σε ανθρώπους στις οποίες μελετάται η ασφάλεια, οι ανεπιθύμητες ενέργειες, η δόση, η αποτελεσματικότητα, αλλά και οι φαρμακοκινητικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του υπό μελέτη φαρμάκου. (58)

Κατά την ανακάλυψη νέων ενώσεων με τη χρήση θεωρητικών μοντέλων με τη χρήση υπολογιστή, χρησιμοποιούμε δύο κύριες μεθόδους (Εικόνα 18 (53)):

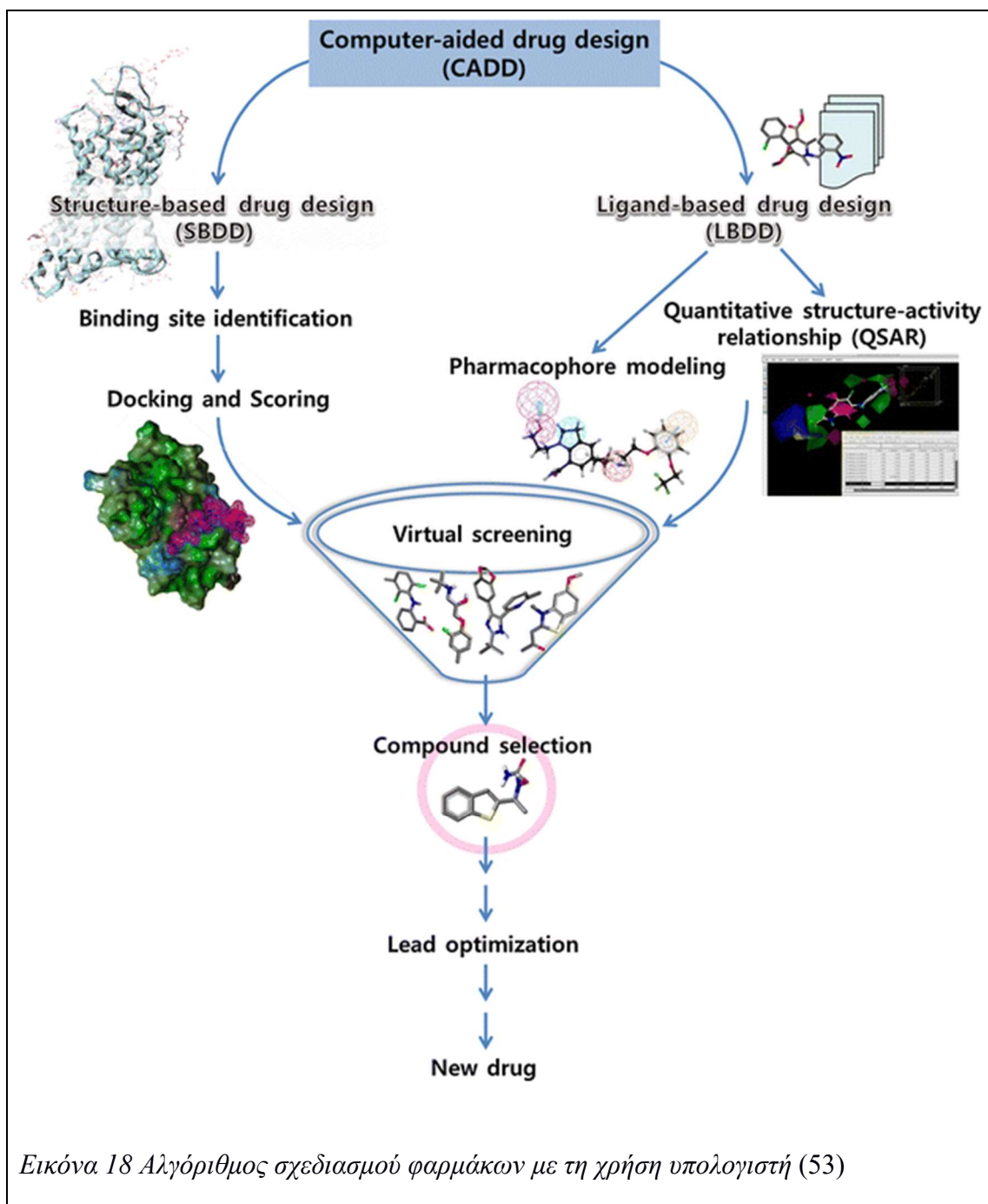
1) η πρώτη μέθοδος είναι βασισμένη στη δομή του βιολογικού στόχου (structure-based) εφόσον είναι γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR). Χρησιμοποιώντας αυτό το στόχο (ένζυμο/υποδοχέα) σχεδιάζονται *de novo* νέες ενώσεις (συνήθως χρησιμοποιώντας θραύσματα-fragments) ή πραγματοποιείται εικονική σάρωση χημειοθηκών για να βρεθούν δραστικές ενώσεις. Ακολούθως, πραγματοποιείται σύνθεση τους και αναλόγων τους και βιολογική αποτίμηση της δράσης τους.

2) η δεύτερη μέθοδος, βασίζεται στην χρήση συνόλου ενώσεων με ποικίλες δομές και γνωστή βιολογική δράση (IC_{50} , EC_{50} , K_i , K_d κλπ.), Ακολουθεί ανάπτυξη θεωρητικών μοντέλων πρόβλεψης της δράσης (δημιουργία φαρμακοφόρου). Τα θεωρητικά αυτά μοντέλα δημιουργούν ένα πλέγμα φυσικοχημικών ιδιοτήτων που πρέπει να έχει ένα μόριο για να είναι δραστικό. Με βάση αυτό, πραγματοποιείται εικονική σάρωση ενώσεων μεγάλων χημειοθηκών, ώστε να βρεθούν νέες ενώσεις οδηγού, οι οποίες στη συνέχεια θα βελτιστοποιηθούν με την διαδικασία που αναφέρθηκε, δηλαδή σχεδιασμός-σύνθεση-βιολογική αποτίμηση.

Οι δύο κύριες αυτές μέθοδοι συνεχώς εξελίσσονται με τα χρόνια και αναβαθμίζονται με νέους αλγορίθμους αφενός για την πρόβλεψη της θεωρητικής

ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης αλλά και για την στατιστική τους επεξεργασία (νευρωνικά δίκτυα, machine learning κ.ά.). Για βέλτιστα όμως αποτελέσματα απαιτείται συνδυασμός και των δύο μεθόδων (consensus models), καθώς τα δυνατά και αδύνατα σημεία της κάθε μίας θα αλληλοσυμπληρωθούν και θα δοθεί μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση. (59–61)

Κατά το σχεδιασμό φαρμάκων βάσει της δομής του βιολογικού στόχου (structure-based) χρησιμοποιούμε την κοιλότητα πρόσδεσης του μακρομοριακού στόχου και βασιζόμενοι σε αυτήν σχεδιάζουμε και αξιολογούμε τις υπό μελέτη ενώσεις, προβλέποντας τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. (60,62) Απαραίτητο στοιχείο για αυτή τη μέθοδο σχεδιασμού είναι η ύπαρξη της τρισδιάστατης δομής του στόχου. Άλλες διαθέσιμες μέθοδοι για την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνικών δομών εκτός της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, είναι η κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-electron microscopy, EM) και η μοντελοποίηση με βάση την ομολογία πρωτεϊνών (homology modeling). (54,55) Η μέθοδος αυτή σχεδιασμού βάσει της δομής του βιολογικού στόχου χωρίζεται σε δύο κατηγορίες (55,61) : στον de novo σχεδιασμό και στην εικονική σάρωση (virtual screening, VS). Ο de novo σχεδιασμός εκμεταλλεύεται της πληροφορίες που προκύπτουν απ' την τρισδιάστατη διαμόρφωση του βιολογικού στόχου και δημιουργεί θραύσματα (fragments) τα οποία ταιριάζουν στην διαμόρφωση του χώρου πρόσδεσης. Τα θραύσματα αυτά στη συνέχεια θα πρέπει να συνδεθούν ώστε να προκύψει ένα καινοτόμο πρόσδεμα που θα μπορεί στη συνέχεια να συντεθεί και αξιολογηθεί. (63,64) Η εικονική αξιολόγηση χρησιμοποιεί άλλο μηχανισμό, αφού χρησιμοποιεί βιβλιοθήκες μικρών μορίων τα οποία θα αντικαταστήσουν τα ήδη υπάρχοντα προσδέματα ή θα γίνει χρήση της δομής γνωστού βιολογικού στόχου ο οποίος δεν έχει κάποιο γνωστό πρόσδεμα. (56,62)



Εικόνα 18 Αλγόριθμος σχεδιασμού φαρμάκων με τη χρήση υπολογιστή (53)

V.1.2 Μοριακή Μηχανική (Molecular Mechanics, MM) (65)

Κατά την χρήση υπολογιστή για ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων είναι απαραίτητη η προσομοίωση της δομής των πρωτεϊνών. Εργαλεία επιλογής για την διερεύνηση της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης είναι οι προσομοιώσεις με την προσέγγιση της Μοριακής Μηχανικής και η αποτίμηση της ενέργειας με τη βοήθεια

των πεδίων δυνάμεων. Κατά την μελέτη μικρών απομονωμένων μορίων ή απλών πρωτεϊνικών δομών και ενζυμικών διαδικασιών είναι χρήσιμες οι μέθοδοι Κβαντικής Μηχανικής (Quantum Mechanics, QM), αλλά στις περιπτώσεις διερεύνησης ολόκληρων πρωτεϊνών παρουσία νερού μέθοδος εκλογής είναι οι υπολογισμοί Μοριακής Μηχανικής. Οι μέθοδοι αυτοί προσεγγίζουν την ενέργεια ενός πολυατομικού συστήματος με κλασικά μηχανικά μοντέλα, γεγονός που μειώνει κατά πολύ το υπολογιστικό κόστος σε μεγάλα συστήματα.

Οι πλειοψηφία ενεργειακών συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται στα πεδία δυνάμεων του σχεδιασμού φαρμάκων μέσω των διαμορφώσεων του βιολογικού στόχου είναι προσθετικές, οι οποίες είναι το σύνολο των δεσμικών (bonded) (Εικόνα 19 (65)) και μη-δεσμικών (nonbonded) (Εικόνα 20 (65)) ενεργειακών όρων.

$$E_{bonded} = \sum_{bonds} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\substack{improper \\ dihedrals}} K_\varphi(\varphi - \varphi_0)^2 \\ + \sum_{dihedrals} \sum_{n=1}^6 K_{\phi,n}(1 + \cos(n\phi - \delta_n))$$

Εικόνα 19 Ενεργειακές δεσμικές συναρτήσεις. Οι ενεργειακές συναρτήσεις περιλαμβάνουν 4 τύπους αλληλεπιδράσεων δεσμών: α) όρους δεσμών τάσης (bonds), β) όρους κάμψης γωνίας (angles), γ) όρους διέδρης εκτός επιπέδου (improper dihedrals) και δ) όρους περιστροφής διέδρων γωνιών (dihedrals) (65)

Όπως φαίνεται και στην συνάρτηση η προσέγγιση των δεσμών τάσης και γωνίας θεωρούνται ως αρμονικές ταλαντώσεις που λειτουργούν συναρτήσει του μήκους δεσμού (b) και της γωνίας (θ) αντίστοιχα. Τέλος, οι όροι περιστροφής διέδρης εκφράζονται ως άθροισμα συναρτήσεων συνημιτόνου.

$$E_{nonbonded} = \sum_{\substack{\text{nonbonded} \\ \text{pairs } ij}} \frac{q_i q_j}{4\pi D r_{ij}} + \sum_{\substack{\text{nonbonded} \\ \text{pairs } ij}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

Εικόνα 20 Ενεργειακές μη-δεσμικές συναρτήσεις. Περιλαμβάνει της ηλεκτροστατικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις. (65)

Για την προσέγγιση των μη-δεσμικών ενεργειακών όρων στα πεδία δυνάμεων, χρησιμοποιούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb μεταξύ των σταθερών φορτίων q_i και q_j στο κέντρο των ατόμων, που λέγονται «μερικά φορτία». Όπως προαναφέρθηκε αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι προσθετικές, καθώς λαμβάνονται υπόψιν οι επιμέρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αθροίζονται, χωρίς να αλληλοεπιηρεάζονται τα φορτία. Τέλος για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals τυπικά χρησιμοποιείται ένα κλασικό δυναμικό Lennard-Jones (LJ) 6-12 που ορίζεται από την ακτίνα $R_{\min,ij}$.

V.1.3 Μοντέλο Ομολογίας (Homology Modeling) (66)

Όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, μπορούμε να πραγματοποιήσουμε μελέτη εικονικής αξιολόγησης με την χρήση της δομής του βιολογικού στόχου. Για να είναι αυτή η μέθοδος εφικτή πρέπει να είναι διαθέσιμη η τρισδιάστατη δομή του βιολογικού στόχου. Στην περίπτωση της ATP συνθάσης για το είδος *mus musculus*, η δομή αυτή δεν ήταν διαθέσιμη οπότε δημιουργήθηκε εξ αρχής με την μέθοδο της ομολογίας πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η δομική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης είναι πολύ περισσότερο συντηρημένη από την αλληλουχία των αμινοξέων της, ενώ μικρές ή μέτριες μεταβολές της αλληλουχίας συνήθως οδηγούν σε μικρή αλλαγή της τρισδιάστατης δομής. (67) Τα βήματα που ακολουθούνται κατά την ομολογία πρωτεϊνών είναι:

- 1) αναζήτηση και εύρεση της πρότυπης (ομόλογης) πρωτεΐνης (query sequence)
- 2) αναζήτηση ομολόγων

- 3) απλή η πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των ομολόγων
- 4) δημιουργία του μοντέλου του υπό μελέτη στόχου βασιζόμενο στην τρισδιάστατη δομή του προτύπου
- 5) βελτιστοποίηση του μοντέλου, ανάλυση των αλληλουχιών, εντοπισμός των κενών και προσθήκες
- 6) επικύρωση του μοντέλου (68)

Η κατασκευή της ATP συνθάσης του *mus musculus* έγινε με τη χρήση του λογισμικού Prime (69–71) μέσα από το γραφικό περιβάλλον του λογισμικού Maestro (72). Το Prime μπορεί να δημιουργεί την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης μέσα από μια διαδικασία που ακολουθεί, όπου αναγνωρίζει πρότυπα, στοιχίζει τις αλληλουχίες δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών και τέλος χτίζει το μοντέλο. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να δημιουργηθούν οι επί μέρους πρωτεΐνες της ATP συνθάσης είναι η εξής:

- 1) η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης προς μοντελοποίηση, χρησιμοποιείται σε μορφή FASTA όπου κάθε αμινοξύ συμβολίζεται με ένα γράμμα
- 2) η ακολουθία FASTA εισάγεται στο λογισμικό Prime και στη συνέχεια με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLAST (73) γίνεται αναζήτηση για πρωτεΐνες με αντίστοιχες ακολουθίες, ενώ δίνονται ποσοστά % (Identities, Positives, Gaps) τα οποία αποτελούν δείκτες επί της ομοιότητας των δύο αλληλουχιών. Το Identities δηλώνει το ποσοστό των πανομοιότυπων αμινοξέων, το Positives το ποσοστό των θετικών αντιστοιχίσεων κατά τον πίνακα ομοιότητας (similarity matrix) που έχει τεθεί στο πρόγραμμα, ενώ το Gaps δηλώνει το ποσοστό των κενών που εντοπίζει το BLAST στην υπό μελέτη και στην ομόλογη αλληλουχία.
- 3) ως μέθοδος στοίχισης (alignment method) επιλέγεται το ClustalW καθώς είναι καλύτερο για αλληλουχίες υψηλής ομοιότητας. Στην περίπτωση της ATP συνθάσης του *mus musculus* όλες οι υπομονάδες εμφάνιζαν υψηλή συγγένεια με αντίστοιχες ATP συνθάσεις των οποίων η τρισδιάστατη δομή είναι γνωστή.
- 4) επιλέγεται η δημιουργία του μοντέλου βασισμένο στην ενέργεια (energy-based), με το οποίο κατασκευάζονται δομικές ασυνέχειες και πραγματοποιούνται βελτιστοποιήσεις των πλευρικών αλυσίδων για τα τμήματα που δεν προέρχονται από την πρότυπη πρωτεΐνη.

V.1.4 Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics, MD) (74)

Τα μόρια υιοθετούν διαφορετικές διαμορφώσεις μεταβαίνοντας συνεχώς απ' τη μία στην άλλη. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, ένα μεγάλος εύρος κινήσεων είναι απαραίτητο για την λειτουργία τους. Κατά τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων πολλές διεργασίες όπως οι υπολογισμοί πρόσδεσης που αναφέρονται στη συνέχεια, πραγματοποιούνται σε μία μόνο διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Ενώ όμως η χρήση μίας μόνο δομής έχει το προβάδισμα, είναι γενικώς αποδεκτό ότι οι δομές που παρέχονται μέσω των κρυσταλλογραφικών μοντέλων της Protein Data Bank (PDB) δεν επαρκούν για την αναπαράσταση της ανομοιογένειας των δομών ενός μακρομορίου. (75,76) Παρόλο που αυτές οι κρυσταλλογραφικές δομές παρέχουν πολλές πληροφορίες, είναι αναγκαίες δυναμικές πληροφορίες σε κάποιες πιο περίπλοκες αλληλεπιδράσεις. Η Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics, MD) είναι μια τεχνική προσομοίωσης της κίνησης ενός συστήματος στην εξέλιξη του χρόνου. Το σύστημα λαμβάνει κινητική ενέργεια που σχετίζεται με την Θερμοκρασία του συστήματος. Οι δομικές συντεταγμένες μεταδίδονται στο χρόνο με την χρήση μικρών βημάτων (συνήθως 1 ή 2 fs), ανάλογα με τις δυνάμεις του συστήματος. Στη συνέχεια, επανυπολογίζονται οι δυνάμεις που ασκούνται στα άτομα και συνδυάζονται με την τρέχουσα ταχύτητα και θέση, με αποτέλεσμα νέες ταχύτητες και θέσεις. Οι υπολογιζόμενες θέσεις αποθηκεύονται σε περιοδικά διαστήματα δημιουργώντας μια τροχιά από στιγμιότυπα στο χρόνο, τα οποία υποδεικνύουν ένα στατιστικό δείγμα από ένα σύνολο διαμορφώσεων της πρωτεΐνης σε θερμική ισορροπία. Οι υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής είναι υπολογιστικά πολύ απαιτητικοί και για αυτό προσομοιώνονται μόνο κινήσεις της τάξεως εκατοντάδων ns ή 1-2 ms.

Για τους υπολογισμούς μοριακής δυναμικής σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Desmond (77–80). Αρχικά επιλέξαμε από το συνολικό μοντέλο της ATP συνθάσης μόνο το τμήμα του ρότορα μαζί με την συνδεδεμένη υπομονάδα a. Το αμινοξύ Glu119 που βρίσκεται σε επαφή με την υπομονάδα a και ιδιαίτερα κοντά στην Arg159 είναι πρωτονιωμένο. Το σύμπλοκο ενσωματώθηκε σε λιπιδική διπλοστιβάδα με Φωσφολιπίδια τύπου POPC, και διαλυτοποιήθηκε με μόρια νερού τύπου TIP3P. Για τη θέση της λιπιδικής διπλοστιβάδας χρησιμοποιήσαμε της

συντεταγμένες της κρυσταλλογραφικής δομής 4F4S (43) έπειτα από υπέρθεση. Το συνολικό φορτίο ουδετεροποιήθηκε με την προσθήκη αντισταθμιστικών φορτίων και έγινε προσθήκη ιόντων NaCl συγκέντρωσης 150mM. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο εξισορρόπησης του συστήματος όπως αυτό έχει αναπτυχθεί και προταθεί από την εταιρεία Desmond για μεμβρανικά συστήματα με το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005, το οποίο σε όλους τους υπολογισμούς χρησιμοποιείται όπως είναι προσαρμοσμένο στο λογισμικό Schrodinger Suite. Ακολούθησαν 60ns Μοριακής Δυναμικής με χρήση του πρωτοκόλλου NPT, ενώ η θερμοκρασία και η πίεση προσαρμόστηκαν με τον αλγόριθμο Langevin.

V.1.5 Υπολογισμός προσδέματος (Docking) (53)

Με την μέθοδο ομόλογης πρωτεΐνης που περιγράφηκε πριν, έγινε δυνατή η δημιουργία του τρισδιάστατου μοντέλου της ATP συνθάσης, ώστε στη συνέχεια να πραγματοποιηθούν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking), οι οποίοι αποτελούν ένα από τους πιο γνωστούς τρόπους σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη δομή της πρωτεΐνης στόχου (structure based drug design). Αυτή η μέθοδος προβλέπει τις πιθανές διαμορφώσεις μίας ένωσης στο σημείο πρόσδεσης μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης στόχου, ενώ εκτιμά την συγγένεια υπολογίζοντας ενεργειακούς όρους με βάση τη διαμόρφωση της ένωσης, αλλά και τη συμπληρωματικότητα με την θέση πρόσδεσης. (81,82) Μείζονος σημασίας βήμα για αυτή τη μέθοδο εικονικής σάρωσης αποτελεί η όσο το δυνατόν ακριβέστερη κατάταξη των ενώσεων με βάση τη χημική συγγένεια.

Οι πιο συχνές συναρτήσεις ταξινόμησης έχουν αναφερθεί σε αρκετές δημοσιεύσεις (62,81,83,84) και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) Συναρτήσεις που χρησιμοποιούν το πεδίο δυνάμεων (force field-based), οι οποίες υπολογίζουν την πρόσδεση με βάση τις φυσικές ατομικές επαφές μεταξύ της πρωτεΐνης στόχου και του προσδέματος, ενώ μπορούν να εκτιμήσουν την ενέργεια διαλυτοποίησης και την μεταβολή της εντροπίας. Σε αυτές ανήκουν οι απαιτητικές συναρτήσεις FEP (Free Energy Perturbation) και LIE (Linear Interaction Energy) που υπολογίζουν με *ab initio* προσεγγίσεις τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης (ΔG). (85–87) β) Εμπειρικές συναρτήσεις (Empirical-based) που χρησιμοποιούν πιο απλούς ενεργειακούς όρους όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

και τις προσαρμόζουν σε πειραματικά δεδομένα πρόσδεσης. γ) Συναρτήσεις βασιζόμενες σε προγενέστερη γνώση (Knowledge-based), οι οποίες λαμβάνουν δεδομένα ενέργειας πρόσδεσης από στατιστικές αναλύσεις οι οποίες προέρχονται από συχνότητες ζευγών ατόμων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέματος.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήσαμε την τρισδιάστατη δομή της ATP συνθάσης του *mus musculus* που κατασκευάσαμε και δεδομένα από κρυσταλλογραφικές δομές τα οποία είναι διαθέσιμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε μελέτη πρόσδεσης αφότου συνδυάσαμε τις δύο αυτές δομές.

Για τους υπολογισμούς πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Glide (88–91), το οποίο ψάχνει τις ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός ή περισσότερων προσδεμάτων και ενός υποδοχέα. Τα προσδέματα μπορούν να έχουν άκαμπτες (rigid) ή εύκαμπτες (flexible) διαμορφώσεις, αλλά στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήσαμε τη ρύθμιση για εύκαμπτα μόρια, με την οποία οι διαμορφώσεις του προσδέματος δημιουργούνται αυτόματα. Ο συνδυασμός της θέσης και του προσανατολισμού ενός προσδέματος σε σχέση με τον υποδοχέα, μαζί με την διαμόρφωση του κατά την εύκαμπτη πρόσδεση, αναφέρεται ως «προσανατολισμός» (ligand pose). Στη συνέχεια, εφαρμόζονται ιεραρχικά φίλτρα στους προσανατολισμούς, τα οποία αξιολογούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέματος και υποδοχέα, ενώ όσοι περνάνε προχωράνε στο τελευταίο στάδιο του αλγορίθμου, που περιλαμβάνει την αξιολόγηση και ελαχιστοποίηση μίας προσέγγισης του Grid στην OPLS ενέργεια αλληλεπίδρασης προσδέματος-υποδοχέα. Το Grid αναπαριστά το σημείο πρόσδεσης του υποδοχέα και είναι απαραίτητο για τους υπολογισμούς πρόσδεσης μέσω του λογισμικού Glide. Η τελική κατάταξη πραγματοποιείται στους ενεργειακά ελαχιστοποιημένους προσανατολισμούς.

V.1.6 Υπολογισμοί με βάση το πρόσδεμα (Ligand-based) (53)

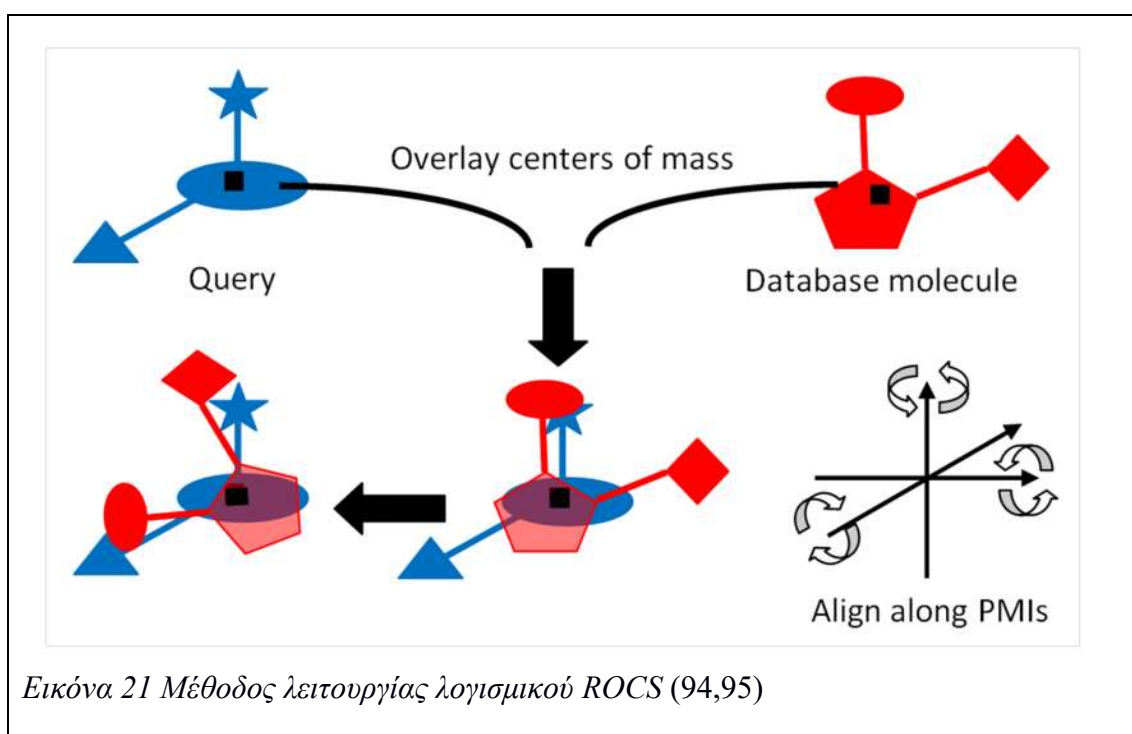
Σε περιπτώσεις που η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης δεν είναι γνωστή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληροφορίες γνωστών ενώσεων που έχουν δράση στον υπό μελέτη στόχο (Ligand-based drug design). Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται μέσω σημαντικών δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (molecular descriptors) που είναι υπεύθυνα για την δράση τους. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι

ενώσεις με παρόμοια δομή να θεωρείται ότι παρουσιάζουν και παρόμοια βιολογική δράση κατά την αλληλεπίδρασή τους με τη πρωτεΐνη στόχο. (59) Κοινές στην κατηγορία αυτών των μεθόδων τεχνικές είναι οι ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης (quantitative structure-activity relationships, QSARs), οι οποίες βασίζονται στην υπόθεση ότι οι δομικές και μοριακές αλλαγές σε ένα σύνολο ενώσεων προκαλούν αλλαγές και στην βιολογική τους δράση (62,92). Για να αναπτυχθεί και προβλεφθεί μαθηματικά η βιολογική δράση αυτών των νέων ενώσεων, παράγεται στατιστικό μοντέλο. (92) Αρχικά επιλέγεται μια ομάδα ενώσεων εκμάθησης (training set) και δημιουργείται μια εξίσωση συσχέτισης με την βιολογική δράση και ακολούθως προβλέπεται η δράση της ομάδας ελέγχου (test set). Δεύτερη κοινή τεχνική στη κατηγορία αυτή είναι η σάρωση φαρμακοφόρου μέσω της οποίας αναγνωρίζονται μόρια με διαφορετικούς σκελετούς αλλά με παρόμοια τρισδιάστατη ταξινόμηση σημαντικών δραστικών ομάδων (similarity). (93) Σε περίπτωση που είναι διαθέσιμες πληροφορίες για την θέση πρόσδεσης μπορεί να γίνει προσαρμογή τους στο φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κατά την φάση στοίχισης ενός μοντέλου σχέσης δομής-δράσης. (92) Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήσαμε τα προαναφερόμενα μόρια **BMS** και **BTB** με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί ομοιότητας (similarity) με τη χημειοθήκη του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ που περιέχει 2.000 φυσικά και συνθετικά μόρια (Pharmalab) και την χημειοθήκη του National Cancer Institute (NCI) που περιέχει 266.151 ενώσεις.

Για τις μελέτες ομοιότητας χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά ROCS (94,95) και Canvas (96–98). Όμως για να είναι δυνατή η επεξεργασία της βιβλιοθήκης ενώσεων που χρησιμοποιούμε, είναι απαραίτητη η προετοιμασία της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων των ενώσεων αυτών. Αυτή η προετοιμασία οδηγεί σε κατάλληλα προσαρμοσμένη βιβλιοθήκη ενώσεων, για περαιτέρω διεργασίες με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή μέσω διαφόρων λογισμικών. Αυτή η διεργασία πραγματοποιείται με το LigPrep. (99) Το λογισμικό αυτό προετοιμάζει την υψηλής ποιότητας τρισδιάστατη δομή για μεγάλο αριθμό ενώσεων που είναι φαρμακοόμοια (drug-like) ξεκινώντας είτε από δισδιάστατη είτε τρισδιάστατη δομή. Με την πιο απλή χρήση του Ligprep παράγεται μία ένωση, χαμηλής ενέργειας, τρισδιάστατης δομής με σωστά χειρόμορφα κέντρα, ενώ μπορεί να παράγει ενώσεις με ποικίλες καταστάσεις ιονισμού, ταυτομέρειες, στερεοχημεία, διαμορφώσεις δακτυλίων ή να εφαρμόσει διάφορα κριτήρια με βάση τα οποία θα μειώσει τον αριθμό των

αποτελεσμάτων. Οι δομές των μορίων της χημειοθήκης Pharmalab σε ηλεκτρονική μορφή (μορφή αρχείου sdf) εισήχθησαν στο λογισμικό Maestro και στη συνέχεια μέσω του LigPrep παρήχθησαν διαφορετικές δομές και διαμορφώσεις σε κατάσταση ιονισμού στο $\text{pH } 7.0 \pm 2.0$, ταυτομερή, , στερεοϊσομερή για τα μη καθορισμένα ασύμμετρα κέντρα, απομάκρυνση αλάτων και τέλος γίνεται η παραγωγή μίας δομής ανά διαμόρφωση δακτυλίου χαμηλής ενέργειας (με χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005). Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι η παραγωγή ~ 10.000 καταχωρήσεων.

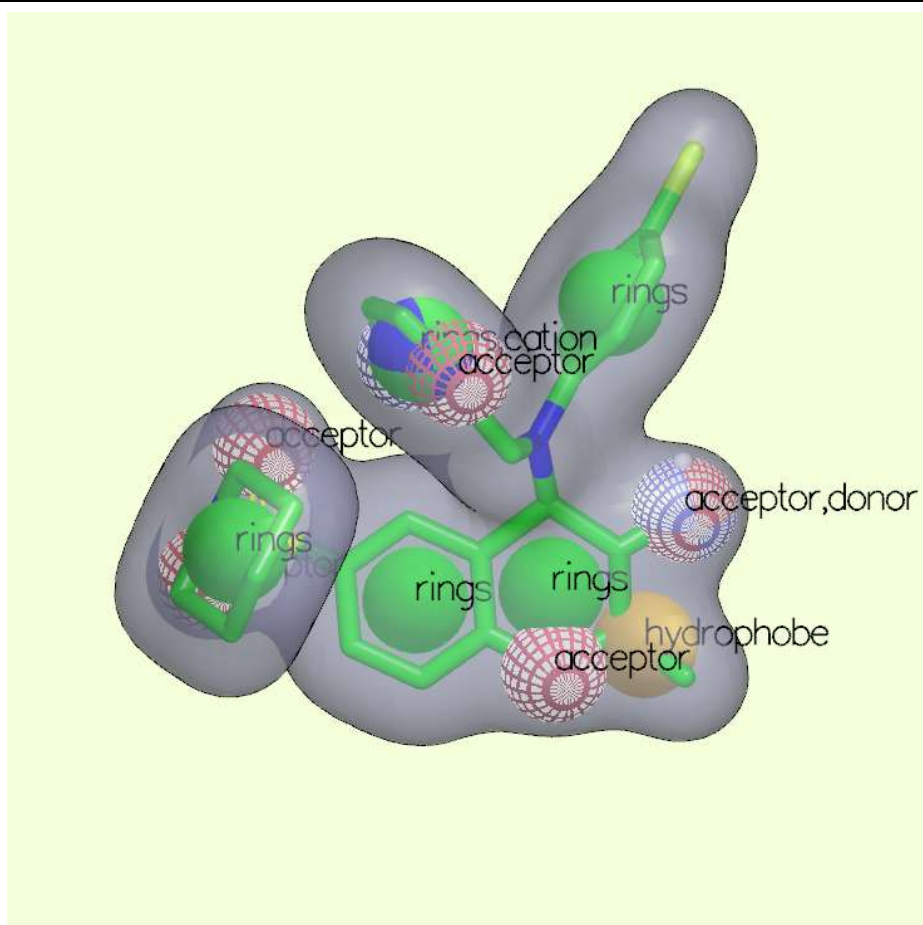
Στη συνέχεια οι ενώσεις αυτές, μαζί με την ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν από το λογισμικό ROCS, το οποίο εφαρμόζει υπέρθεση μορίων με βάση το σχήμα. Τα μόρια δηλαδή στοιχίζονται βάση μιας διεργασίας βελτιστοποίησης του στερεού σώματος, η οποία μεγιστοποιεί τον όγκο αλληλεπικάλυψης μεταξύ τους. Εικόνα 21 (94,95)



Εικόνα 21 Μέθοδος λειτουργίας λογισμικού ROCS (94,95)

Με την ρουτίνα ROCS επιλέχθηκε η απλή λειτουργία (Simple run) κατά την οποία πραγματοποιείται στοιχίση μίας βιβλιοθήκης προϋπολογισμένων διαμορφώσεων των μορίων πάνω στο πρότυπο μόριο. Κατά τη ρουτίνα αυτή, για κάθε μόριο της βιβλιοθήκης το λογισμικό αλληλεπικαλύπτει κάθε διαμόρφωση βασισμένο σε ένα μοριακό σχήμα, με την επιλογή να συμπεριλάβει χρωματικά πεδία

δυνάμεων (color force fields). Τα χρωματικά πεδία δυνάμεων χρησιμοποιούνται για να μετρήσουν την χημική ομοιότητα μεταξύ του πρότυπου μορίου (query) και του μορίου της βιβλιοθήκης (database) και να βελτιστοποιήσουν τις αλληλεπικαλύψεις σχήματος. Στη παρούσα εργασία επιλέχθηκε το χρωματικό πεδίο δυνάμεων Implicit Mills Dean το οποίο περιλαμβάνει λειτουργικές ομάδες οι οποίες μπορούν να δρουν ως: α) δότες δεσμών υδρογόνου, β) δέκτες δεσμών υδρογόνου, γ) ανιόντα, δ) κατιόντα, ε) υδρόφοβα στ) δακτύλιοι και χρωματίζονται κατάλληλα (color force field). (Εικόνα 22)



Εικόνα 22 Λογισμικό ROCS. Η ένωση BMS μαζί με τις λειτουργικές ομάδες τις οποίες χρησιμοποιεί το λογισμικό προκειμένου να συγκρίνει το υπό μελέτη μόριο, με μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων.

Τέλος γίνεται κατάταξη των μορίων βάση του σκορ τους, το οποίο στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το TanimotoCombo σκορ, που βασίζεται στο χρώμα (color force field) και στο σχήμα των μορίων (για να έχουν δύο μόρια ίδιο σχήμα

πρέπει οι όγκοι τους να ανταποκρίνονται ακριβώς). Το σκορ Tanimoto (94) προτιμήθηκε του Tversky, καθώς θεωρείται πιο χρήσιμο στις περιπτώσεις που το μόριο αναφοράς είναι παρόμοιου μεγέθους με της βιβλιοθήκης, σε αντίθεση με το Tversky το οποίο περιλαμβάνει παράγοντα βάρους και είναι πιο χρήσιμο σε περιπτώσεις που το μόριο αναφοράς είναι μικρό και τα μόρια της βιβλιοθήκης είναι μεγάλα, ή αντίστροφα.

Σε μεταγενέστερους υπολογισμούς ομοιότητας, έγινε διεύρυνση των δομών της χημειοθήκης Pharmalab με το λογισμικό OMEGA (100,101), το οποίο μας έδωσε ~770.000 διαμορφώσεις, ταυτομερή και πρωτονιώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια από το λογισμικό ROCS.

Μέσω του λογισμικού Canvas πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω υπολογισμοί ομοιότητας. Στο Canvas χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά Fingerprints, δηλαδή μέθοδοι κωδικοποίησης των δομών και μετατροπή τους σε ψηφιοποιημένη πληροφορία (binary digits). Τα Fingerprints που χρησιμοποιήθηκαν είναι το γραμμικό Binary Fingerprint (Linear Binary Fingerprint) και στη συνέχεια το 3D Pharmacophore τριών σημείων (3-point pharmacophores). Το Linear Fingerprint (γραμμικά θραύσματα και κλείσιμο δακτυλίων) προκύπτει από τη δομή της ένωσης, ενώ το 3D Fingerprint από την τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής της ένωσης, επιλέγοντας να χρησιμοποιεί τις ήδη υπάρχουσες 3D δομές για τα φαρμακοφόρα μοντέλα. Τέλος, πραγματοποιήσαμε σάρωση ομοιότητας κατά Tanimoto (similarity/distance screen) μεταξύ των ενώσεων της Pharmalab, με τη χρήση των Fingerprints που δημιουργήθηκαν.

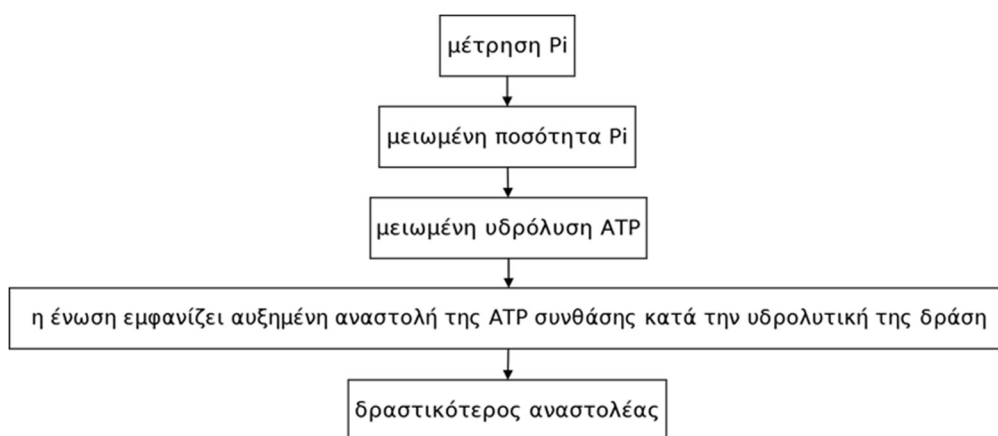
V.2 In vitro μέθοδος αξιολόγησης των αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης

V.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μιτοχονδριακή ATP συνθάση είναι το ενζυμικό σύμπλεγμα που ρυθμίζει την ηλεκτροχημική κλίση που δημιουργείται από την αναπνευστική αλυσίδα και

προκαλεί την φωσφορυλίωση του ADP. (102) Το δυναμικό αυτό χρησιμοποιείται για τη δημιουργία δεσμού μεταξύ του ADP και μιας ελεύθερης φωσφορικής ομάδας, ενώ τα πρωτόνια κινούνται προς την μιτοχονδριακή μήτρα. (102) Όταν όμως το δυναμικό της μεμβράνης διαταραχτεί, η ATP συνθάση αντιστρέφει την λειτουργία της, χρησιμοποιώντας ATP για να αντλήσει πρωτόνια, εκτός της μιτοχονδριακής μήτρας, μία ιδιότητα που μπορεί να μετρηθεί για να εκτιμηθεί η δραστηριότητα του ενζυμικού αυτού συμπλέγματος. (102,103)

Κατά την υδρόλυση του ATP προς ADP έχουμε την απελευθέρωση μίας φωσφορικής ομάδας (Pi). Αυτές οι φωσφορικές ομάδες, αποτελούν σημαντικό δείκτη καθώς μετρώντας τα nmol Pi που προκύπτουν σε κάθε φιαλίδιο στο τέλος της μεθόδου, μπορούμε να έχουμε μία εκτίμηση της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ώστε προστιθέμενης μιας ποσότητας πιθανών ενώσεων που προκαλούν αναστολή της υδρόλυσης, θα παρατηρήσουμε μειωμένη ποσότητα nmol Pi, καθώς θα είναι μειωμένη και η υδρόλυση του ATP. Παράλληλα, μπορούμε μετρώντας τα nmol Pi σε δείγματα διαφορετικών ενώσεων, να εκτιμήσουμε την ανασταλτική τους δράση, αλλά και να τις κατατάξουμε από την πιο ασθενή στην πιο δραστική βάση αυτής.



Σχηματικά συνοψίζοντας:



V.2.2 Απομόνωση μιτοχονδρίων

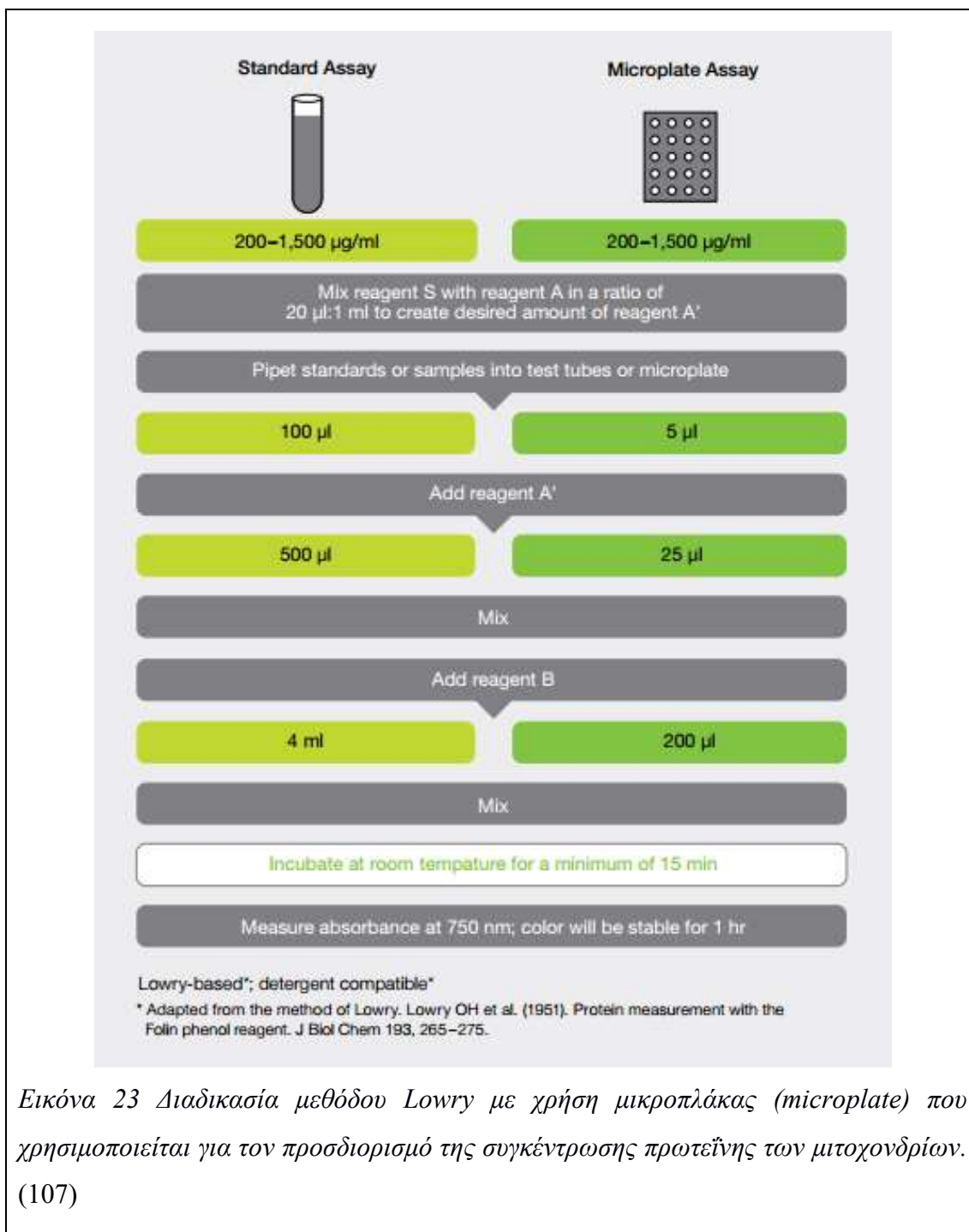
Αρχικά ποντίκια C57BL/6, βάρους 25-30 γραμμαρίων θυσιάζονται με απεξάρθρωση του τραχήλου και οι καρδιές τους εκτέμνονται ταχέως, ξεπλένονται και κόβονται στο ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (isolation buffer, 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, ενώ το pH ρυθμίζεται με Tris στο 7,4, διατήρηση σε ψυγείο στους 4°C). (104)

Ακολούθως, ο ιστός ομογενοποιείται στο isolation buffer με την προσθήκη 0,1 mg/ml Nagarse με τη χρήση υάλου – τεφλόν ομογενοποιητή. (104) Το ομογενοποίηση, αραιώνεται με την προσθήκη 0,2 % w/v BSA σε isolation buffer, φυγοκεντρείται στα 500 xg στους 4°C. (104) Το υπερκείμενο στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 4000 xg 20min για παραλαβή του μιτοχονδριακού κλάσματος . (104) Το ίζημα ξεπλένεται με isolation buffer, χωρίς BSA και φυγοκεντρείται και πάλι στα 4000 xg 20min. Το τελικό ίζημα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης και αναλύεται περαιτέρω. (104)

V.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry (105,106)

Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ακολουθείται το πρωτόκολλο Lowry, όπου κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς μέσω διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA) και μετρούνται δείγματα του υπό εξέταση διαλύματος μιτοχονδρίων. (Εικόνα 23 (107)) Αρχικά, λαμβάνονται δείγματα 5 μL, 2,5 μL, 1,25 μL, 0,625 μL από το μητρικό διάλυμα μιτοχονδρίων και δείγματα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς BSA και τοποθετούνται πάνω στην ίδια μικροπλάκα (plate). Για να κατασκευαστεί η καμπύλη, αρχικά λαμβάνουμε από το stock BSA (40mg/ml) 5 μL και τα τοποθετούμε σε άδειο eppendorf μαζί με 45 μL isolation buffer (προκύπτει διάλυμα 4 mg/ml BSA). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις λαμβάνοντας 25 μL από την πιο πυκνή αραιώση και προστίθενται 25 μL isolation buffer. Με αυτό το τρόπο, δημιουργούνται οι εξής αραιώσεις BSA: 4 mg/ml(αρχικό διάλυμα), 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml,

0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml (χωρίς BSA). Από αυτά τα διαλύματα λαμβάνουμε 5 μ L τα οποία τοποθετούμε πάνω στις κυψελίδες (well) της μικροπλάκας.



Στη συνέχεια, παρασκευάζεται αντιδραστήριο το οποίο περιέχει το αντιδραστήριο A (Reagent A) το οποίο είναι ένα αλκαλικό διάλυμα τρυγικού

χαλκού, μαζί με το αντιδραστήριο S (Reagent S) το οποίο είναι ένα επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις με αναλογία 20 μl αντιδραστηρίου S ανά ml αντιδραστηρίου A, από το οποίο τοποθετούνται 25 μL σε κάθε κυψελίδα δείγματος. Ακολούθως, τοποθετούνται 200 μL αντιδραστηρίου B (Reagent B) σε κάθε κυψελίδα το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς μέσω των δειγμάτων του BSA και υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων που απομονώθηκαν.

V.2.4 Μέθοδος in vitro αξιολόγησης αναστολέων της ATP συνθάσης (102)

Αρχικά παρασκευάζονται:

- 1) ATPase reaction buffer (Sucrose 125 mM, KCl 65 mM, MgCl_2 2,5 mM, HEPES 50 mM, ρύθμιση pH 7,2)
- 2) Trichloroacetic acid (TCA) 40% w/v
- 3) KH_2PO_4 0,5 mM
- 4) Molybdate Reagent 10% (διάλυση 5g ferrous sulfate (FeSO_4) σε 60 mL νερό και στη συνέχεια προσθήκη 10 mL από διάλυμα 10% ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και ρύθμιση του όγκου στα 100 mL με νερό)
- 5) Διάλυμα ATP 25 mM

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα δείγματα των υπό μελέτη ενώσεων ώστε κάνοντας κατάλληλες αραιώσεις να προκύψει τελική συγκέντρωση 10 mM, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων της χημειοθήκης, χρησιμοποιώντας τον νόμο της αραιώσης. Με τη μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται η λήψη ίδιας ποσότητας (10 μL) από όλα τα δείγματα ασχέτως αρχικής συγκέντρωσης (χημειοθήκης), η οποία μεταφέρεται σε άδεια erpendorf. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ένας κύκλος ψύξης-απόψυξης των μιτοχονδρίων ο οποίος αντιστρέφει τη δράση της ATP συνθάσης.

Με βάση την συγκέντρωση της πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων από την μέθοδο Lowry που έχει ήδη γίνει και με την βοήθεια του νόμου αραιώσης, υπολογίζουμε τον όγκο των μιτοχονδρίων που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε σε κάθε δείγμα, ώστε στον τελικό όγκο 500 μL να έχουμε 0,125 mg/mL μιτοχονδρίων.

Ακολούθως, προστίθεται σε κάθε eppendorf (στα οποία υπάρχουν ήδη 10 μL διαλύματος από κάθε μία ένωση όπως ήδη περιγράφηκε και ένα control διάλυμα), 50 mM διάλυμα ATP (προκύπτει τελική συγκέντρωση ATP 2,5 mM), 440 μL ATPase Reaction Buffer και τα μL των μιτοχονδρίων που υπολογίστηκαν προηγουμένως. Στη συνέχεια, τοποθετούνται όλα τα eppendorf σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 λεπτά ακριβώς και η αντίδραση σταματάει με προσθήκη σε κάθε δείγμα 250 μL διαλύματος TCA που έχει παρασκευαστεί και γίνεται ανακίνηση σε vortex. Στα 10 λεπτά που πραγματοποιείται η αντίδραση στο vortex, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς (scaled down) των nmol Pi στη μικροπλάκα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

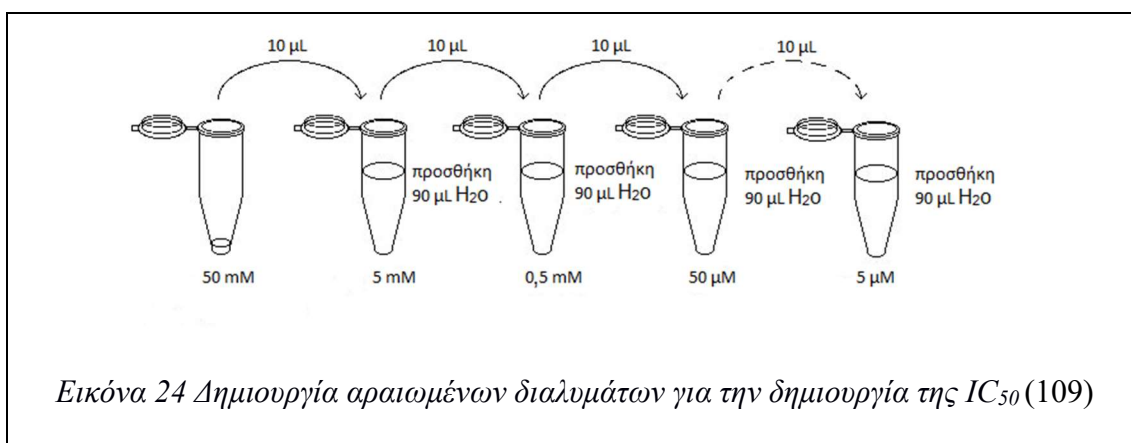
Πίνακας 1 Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των nmol Pi.

Δείγμα	KH_2PO_4 0,5 mM (μL)	H_2O (μL)	nmol Pi
0	0	150	0
1	12,5	137,5	125
2	25	125	250
3	50	100	500

Τέλος, τοποθετούνται στις κυψελίδες της μικροπλάκας 150 μL από κάθε δείγμα και 100 μL Molybdate Reagent στο κάθε ένα, μαζί με τα 4 δείγματα της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος ολοκληρώνεται με την μέτρηση της απορρόφησης των κυψελίδων της μικροπλάκας στα 600 nm. Οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με το λογισμικό GraphPad Prism 5 (108), όπου με την χρήση της καμπύλης αναφοράς προκύπτουν τα nmol Pi σε κάθε δείγμα. Στις τιμές των απορροφήσεων της καμπύλης αναφοράς του παραπάνω πίνακα πραγματοποιείται ανάλυση “Nonlinear regression (curve fit) > Third order polynomial (cubic)” και οι τιμές των nmol Pi των υπό μελέτη δειγμάτων, παρεμβάλλονται με βάση τη καμπύλη με διάστημα εμπιστοσύνης 99%, που πραγματοποιείται με το λογισμικό GraphPad Prism έκδοση 5 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

V.2.5 Μέθοδος in vitro απόδοσης IC₅₀ των αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης (102)

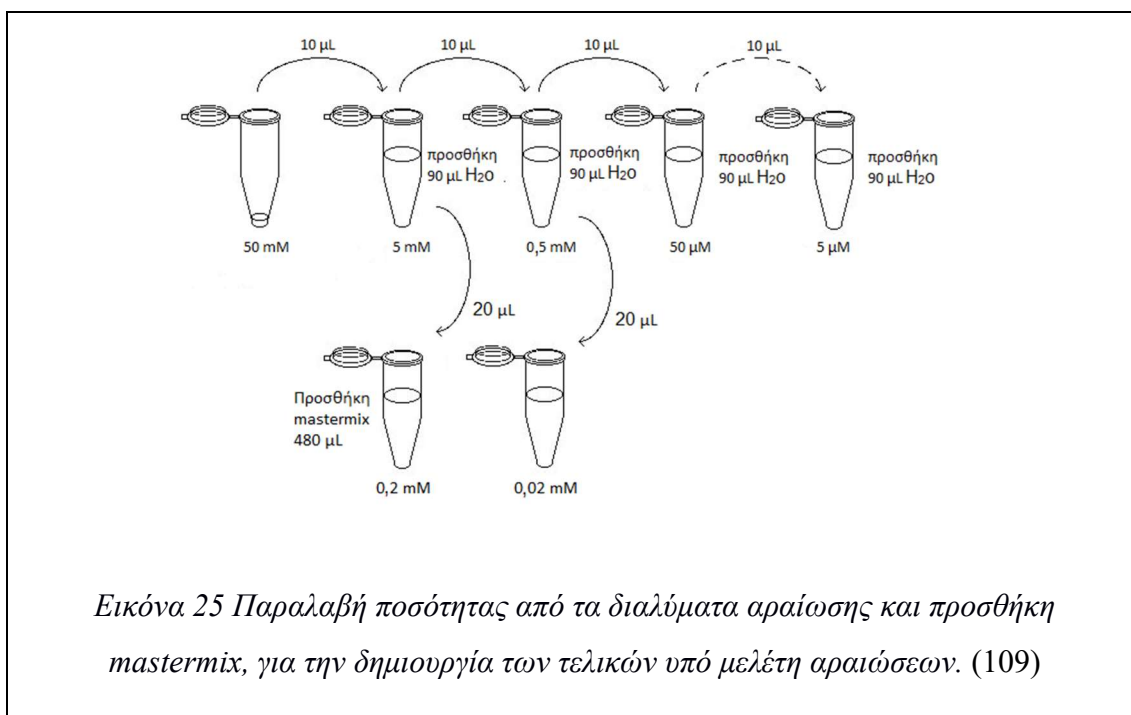
Για την απόδοση των τιμών IC₅₀ των αναστολέων, η πορεία της μεθόδου είναι παρόμοια με την παραπάνω. Η διαφορά έγκειται στην διαδικασία παρασκευής των υπό μελέτη δειγμάτων. Αρχικά, παραλαμβάνονται 10 μL από το κάθε υπό εξέταση αρχικό διάλυμα (πχ τα διαλύματα της χημειοθήκης Pharmalab) και μεταφέρονται σε νέο erpendorf, στο οποίο προστίθενται 90 μL H₂O. Με αυτό το τρόπο προκύπτει η πρώτη αραιώση (πχ. αν το αρχικό διάλυμα είναι 50 mM, η πρώτη αραιώση είναι 5 mM). Στη συνέχεια, από αυτή τη πρώτη αραιώση, μεταφέρονται 10 μL σε ένα νέο erpendorf και προστίθενται 90 μL H₂O, οπότε προκύπτει η δεύτερη αραιώση και η διαδικασία συνεχίζεται με τον ίδιο τρόπο μέχρι να προκύψουν όλες οι αραιώσεις. Στην Εικόνα 24 (109) φαίνεται η διαδικασία αραιώσης του αρχικού διαλύματος.



Ακολούθως, από αυτά τα διαλύματα των αραιώσεων, παραλαμβάνεται η απαραίτητη ποσότητα σε νέα erpendorf, ώστε με την προσθήκη των υπολοίπων διαλυμάτων (ATP, ATP reaction buffer και μιτοχονδρίων) να προκύψει τελικός όγκος 500 μL και τελικά διαλύματα συγκεντρώσεως 0,2 mM, 0,02 mM, 0,002 mM αντίστοιχα για κάθε ένωση, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραιώσης.

Για κάθε κατηγορία ενώσεων (με αρχικές συγκεντρώσεις πχ 10 mM, 20 mM, 50 mM) και τις αραιώσεις αυτών, είναι απαραίτητη η παρασκευή διαφορετικών mastermix αντίστοιχα, τα οποία έχουν υπολογισμένη την ποσότητα ATPase reaction buffer, ATP και μιτοχονδρίων ώστε να προκύψουν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις τους (ATP 2,5 mM, συγκέντρωση μιτοχονδρίων 0,125 mg/mL και ATPase reaction

buffer μέχρι τελικού όγκου 500 μL). Για παράδειγμα, με την προσθήκη 480 μL mastermix στην πρώτη αραιώση της ένωσης με αρχική συγκέντρωση 50 mM (της οποίας όπως προαναφέρθηκε έχουμε erpendorf με ποσότητα 20 μL), θα προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,2 mM, όπως φαίνεται και Εικόνα 25 (109) Τα τελικά αυτά διαλύματα των 0,2 mM, 0,02 mM, 2 μM , 0,2 μM κ.ο.κ για κάθε ένωση, θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της αναστολής της ATP συνθάσης, με τον τρόπο που προαναφέρθηκε, και θα αποτιμηθεί η IC_{50} της κάθε ένωσης με το λογισμικό Graphpad.



Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιήσουμε τις απορροφήσεις της καμπύλης αναφοράς, για να παρεμβάλουμε τα nmol Pi όλων των υπό εξέταση δειγμάτων. Στη συνέχεια, λογαριθμούμε τις τιμές των συγκεντρώσεων των αραιώσεων που αποτελούν τον άξονα X του γραφήματος της IC_{50} και στον άξονα Y τοποθετούμε οι τιμές των nmol Pi που υπολογίσαμε με τη βοήθεια της καμπύλης. Τέλος, αναλύουμε τα δεδομένα με “[Nonlinear regression (curve fit), log(inhibitor) vs. response (three parameters)]” χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism έκδοση 5 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com και προκύπτει το γράφημα της IC_{50} των υπό μελέτη ενώσεων.

VI. Αποτελέσματα

VI.1 Δημιουργία της τρισδιάστατης δομής της ATP συνθάσης του είδους *mus musculus*

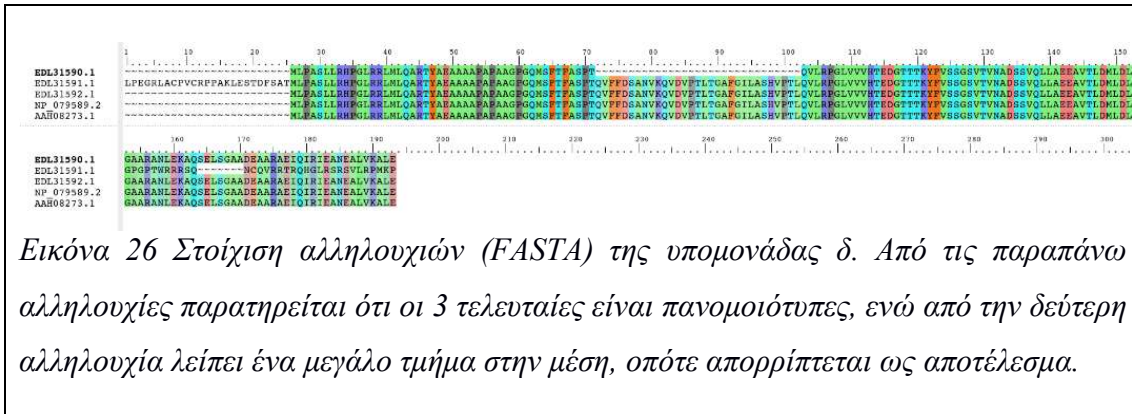
Ξεκινώντας την εύρεση πληροφοριών για αυτή την εργασία, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση της τρισδιάστατης δομής της ATP συνθάσης, στην οποία θα πραγματοποιούνταν όλες οι υπολογιστικές μέθοδοι για την ανακάλυψη νέων μορίων οδηγών με καρδιοπροστατευτική δράση. Επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση της τρισδιάστατης αυτής δομής στην ιστοσελίδα <http://www.rcsb.org/> της Protein Data Bank (110) για το είδος *mus musculus*, καθώς όλες οι *in vitro* πειραματικές διαδικασίες θα πραγματοποιούνταν στα μιτοχόνδρια αυτού του είδους. Δυστυχώς, δεν βρέθηκε καμία δομή των πρωτεϊνών γεγονός που μας οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας ομόλογου μοντέλου. Η διεργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση των αλληλουχιών των υπομονάδων της ATP συνθάσης του είδους *mus musculus*, οι οποίες μπορούσαν να βρεθούν στην ιστοσελίδα της National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

Στην πορεία της δημιουργίας της τρισδιάστατης δομής της ATP συνθάσης εμφανίστηκαν αρκετές δυσκολίες. Αρχικά, οι καταχωρήσεις στην PubMed για αλληλουχίες της “ATP synthase” με φίλτρο για το είδος “*mus musculus*” ήταν περίπου 1700, από τις οποίες έπρεπε να γίνει προσεκτική επιλογή ώστε να προκύψει η σωστή τελική δομή. Στη συνέχεια, χρειάστηκε αναζήτηση των καταχωρήσεων ξεχωριστά κατά υπομονάδα, με ιδιαίτερη προσοχή στο τρόπο με τον οποίο δίνεται το όνομα. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο III.6 η υπομονάδα *a* που βρίσκεται γειτονικά του δακτυλίου στο τμήμα F_0 είναι τελείως διαφορετική από την υπομονάδα *a* (*alpha*) που βρίσκεται στο F_1 καταλυτικό τμήμα της ATP συνθάσης, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και σε άλλες υπομονάδες. Δευτερευόντως, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και επιλογή μίας μόνο αλληλουχίας ανά υπομονάδα. Πρακτικά, η επιλογή αυτή εμφάνισε μεγάλη δυσκολία καθώς για την ίδια υπομονάδα υπήρχαν πολλές διαφορετικές καταχωρήσεις - ισομορφές - των οποίων οι αλληλουχίες ήταν πανομοιότυπες ή διαφορετικού μεγέθους (παρουσίαζαν ένα κοινό τμήμα, αλλά είχαν

κάποια επιπλέον αμινοξέα) ή είχαν πάρα πολύ μικρές διαφορές (πχ μερικών αμινοξέων, συνήθως στην αρχή ή στο τέλος της αλληλουχίας). Ως παράδειγμα, θα αναφερθεί η κατασκευή της υπομονάδας δ (delta) για την οποία συλλέχθηκαν 5 διαφορετικές καταχωρήσεις στην ιστοσελίδα της National Center for Biotechnology Information. Οι κωδικοί των αλληλουχιών, μαζί με τα ονόματα των καταχωρήσεων φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Διαφορετικές καταχωρήσεις αλληλουχιών της υπομονάδας δ (delta) της ATP συνθάσης για το είδος mus musculus που βρέθηκαν κατά την κατασκευή του μοντέλου ομολογίας

Κωδικός αλληλουχίας	Όνομα καταχώρησης
EDL31590.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit, isoform CRA_a [Mus musculus]
EDL31591.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit, isoform CRA_b, partial [Mus musculus]
EDL31592.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit, isoform CRA_c [Mus musculus]
NP_079589.2	ATP synthase subunit delta, mitochondrial isoform 1 precursor [Mus musculus]
AAH08273.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit [Mus musculus]



Εικόνα 26 Στοιχισή αλληλουχιών (FASTA) της υπομονάδας δ. Από τις παραπάνω αλληλουχίες παρατηρείται ότι οι 3 τελευταίες είναι πανομοιότυπες, ενώ από την δεύτερη αλληλουχία λείπει ένα μεγάλο τμήμα στην μέση, οπότε απορρίπτεται ως αποτέλεσμα.

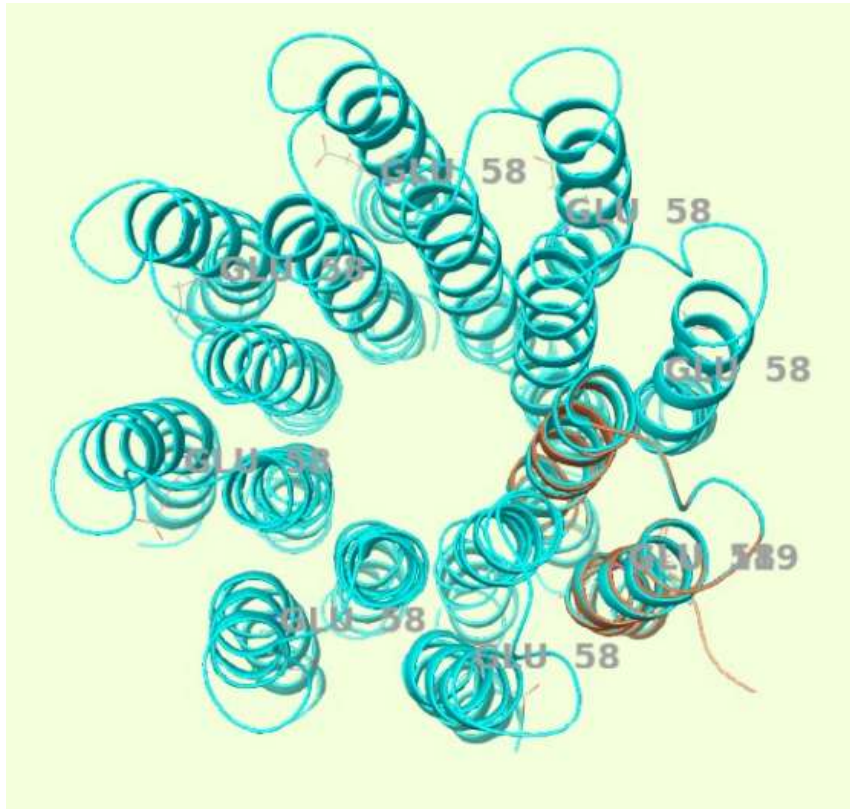
Η έλλειψη της πληροφορίας για το πλήθος των c υπομονάδων του δακτυλίου του είδους *mus musculus*, αποτέλεσε τη δεύτερη δυσκολία που χρειάστηκε να αντιμετωπιστεί. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8 ο δακτύλιος της ATP συνθάσης στα μιτοχόνδρια μπορεί να έχει 8-10 υπομονάδες ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Κατά την κατασκευή του μοντέλου της ATP συνθάσης του *mus musculus*, έγινε η υπόθεση ότι ο δακτύλιος αποτελείται από 8 υπομονάδες c. Σε αυτή την υπόθεση συνετέλεσε το γεγονός ότι κατά την χρήση του αλγορίθμου BLAST, το υψηλότερο σκορ στην στοιχισή της αλληλουχίας του *mus musculus* με τρισδιάστατες c υπομονάδες προερχόταν από το είδος *bos taurus* το οποίο αποτελείται από 8 υπομονάδες (Identities 100%, Positives 100%, Gaps 0%). Παράλληλα, σύμφωνα με τους Ian N. Watt et al. (16) για τον σχηματισμό του c8 δακτυλίου, είναι απαραίτητα αμινοξέα αλανίνης στις θέσεις 13, 19 και 23 (αρίθμηση κατά το είδος *bos*) σε διαφορετική περίπτωση ο δακτύλιος εμφανίζεται ασταθής.

Για να κατασκευαστεί ο δακτύλιος των c υπομονάδων με το λογισμικό Prime όπως περιγράφηκε παραπάνω χρησιμοποιήθηκε ο κωδικός αλληλουχίας (NCBI Reference Sequence): NP_001154891.1. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST ο οποίος έδωσε ως κορυφαίο σκορ την πρωτεΐνη με PDB ID 2XND_J (16), δηλαδή με την πρωτεΐνη 2XND και συγκεκριμένα με την υπομονάδα J (εφεξής το γράμμα μετά την κάτω παύλα, θεωρείται η υπομονάδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης). Με αυτή την πρωτεΐνη το BLAST έδωσε τιμές 100% Identities, 100% Positives και 0% Gaps. Στη συνέχεια επιλέγουμε ως μέθοδος στοιχισής (alignment method) το ClustalW και τέλος την δημιουργία του τρισδιάστατου μοντέλου με βάση την ενέργεια (energy-based). Με την παραπάνω μεθοδολογία δημιουργείται η τρισδιάστατη δομή **μίας** c υπομονάδας, με χρήση της αλληλουχίας αμινοξέων

(FASTA) του *mus musculus* και πρότυπη τρισδιάστατη πρωτεΐνη την 2XND_J του είδους *bos taurus*. Στη συνέχεια για τη δημιουργία ολόκληρου του δακτυλίου 8 υπομονάδων c (c8) χρησιμοποιούμε την δομή 2XND μέσω του λογισμικού Maestro. Συγκεκριμένα:

1) Δημιουργούμε 8 αντίγραφα της μοντελοποιημένης υπομονάδας c του *mus musculus*.

2) Χρησιμοποιούμε την 2XND ως πρότυπη δομή, πάνω στην οποία πραγματοποιούμε πρωτεϊνική στοίχιση (Protein Structure Alignment) του λογισμικού Maestro. Στο σημείο αυτό, πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε η δομή πάνω στην οποία θα βασιστεί (reference) η στοίχιση θα είναι η 2XND η οποία και περιέχει όλες τις υπομονάδες σε μία τρισδιάστατη δομή. Η διαδικασία της στοίχισης δεν είναι πάντα εύκολη, καθώς υπάρχει πιθανότητα κάποιες μοντελοποιημένες υπομονάδες να μην στοιχίζονται επακριβώς πάνω στην πρότυπη πρωτεΐνη παρόλο που οι τρισδιάστατες δομές τους μοιάζουν. Σε αυτή τη περίπτωση κάνουμε διαχωρισμό κατά αλυσίδα της πρότυπης πρωτεΐνης (εδώ 2XND), δηλαδή αντί να υπάρχει μία δομή που υπάρχουν όλες οι υπομονάδες, έχουμε 8 διαφορετικές υπομονάδες c ξεχωριστά. Στη συνέχεια στοιχίζουμε μία προς μία τις υπομονάδες (δηλαδή τα αντίγραφα της c υπομονάδας του *mus musculus* που δημιουργήσαμε, με τις 8 υπομονάδες της 2XND). Στο τέλος ενοποιούμε (δημιουργία μίας καταχώρησης συνδυάζοντας πολλές καταχωρήσεις, μέσω του λογισμικού Maestro) και τις 8 υπομονάδες του *mus musculus*, οι οποίες είναι στοιχισμένες σύμφωνα με την 2XND, δημιουργώντας έναν ολοκληρωμένο c8 κύλινδρο. (Εικόνα 27)



*Εικόνα 27 Δημιουργία της τρισδιάστατης δομής μίας υπομονάδας c (καφέ) του *mus musculus*, βασισμένη στην ομόλογη πρωτεΐνη 2XND (κυανό). Ιδιαίτερης σημασίας είναι τα αμινοξέα γλουταμινικού οξέος που βρίσκονται στο μέσο των ελίκων, τα οποία θα πρέπει να βρίσκονται στοιχισμένα μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών.*

Πριν γίνει χρήση της πρότυπης δομής (εδώ 2XND), πρέπει να ακολουθήσουν τα κατάλληλα βήματα μέσω του “Οδηγού Προετοιμασίας Πρωτεϊνών” (Protein Preparation Wizard (111,112)) στο λογισμικό Maestro το οποίο μετατρέπει μία δομή από την αρχική της ελλιπή κατάσταση (πχ έλλειψη ατόμων υδρογόνου, διευθετήσεις ομάδων κ.ά.) σε μία μορφή κατάλληλη για χρήση από τα υπόλοιπα λογισμικά που προσφέρονται στη συνέχεια.

Τα βήματα που πραγματοποιούνται με βάση τον οδηγό αυτό είναι:

- α) Αρχικά διόρθωση των δομών (πχ με προσθήκη υδρογόνων)
- β) Βελτιστοποίηση της δομής μέσω: i) της αντιστοίχισης των δεσμών υδρογόνου, ii) την διαγραφή των μορίων νερού, βασιζόμενοι στους δεσμούς υδρογόνου και iii) την πραγματοποίηση μιας υπό περιορισμούς ελαχιστοποίησης με χρήση του πεδίου

δυνάμεων OPLS_2005. (κατά τη δημιουργία του δακτυλίου c8 του mus musculus πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση με RMSD = 0.5 Å ως το όριο μετακίνησης βαρέων ατόμων)

3) Αφού δημιουργηθεί η τελική δομή (με όλες τις υπομονάδες) πρέπει να ξαναχρησιμοποιηθεί ο “Οδηγός Προετοιμασίας Πρωτεϊνών” για να έχουμε ένα τελικό αποτέλεσμα συμβατό με τα προγράμματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω μεθοδολογία, δημιουργήθηκαν όλες οι υπομονάδες της ATP συνθάσης του mus musculus. Ο Πίνακας 3 περιέχει: α) τις αλληλουχίες αμινοξέων (FASTA) του mus musculus που χρησιμοποιήθηκαν, β) τα ονόματα καταχώρησης των αλληλουχιών αυτών στην ιστοσελίδα <http://www.rcsb.org/>, γ) τα PDB ID που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για να δημιουργηθεί η τρισδιάστατη δομή (ομόλογες πρωτεΐνες), δ) τα σκορ Identities, Positives, Gaps, τα οποία υποδεικνύουν την ομοιότητα των αλληλουχιών της πρότυπης και της υπό εξέταση πρωτεΐνης.

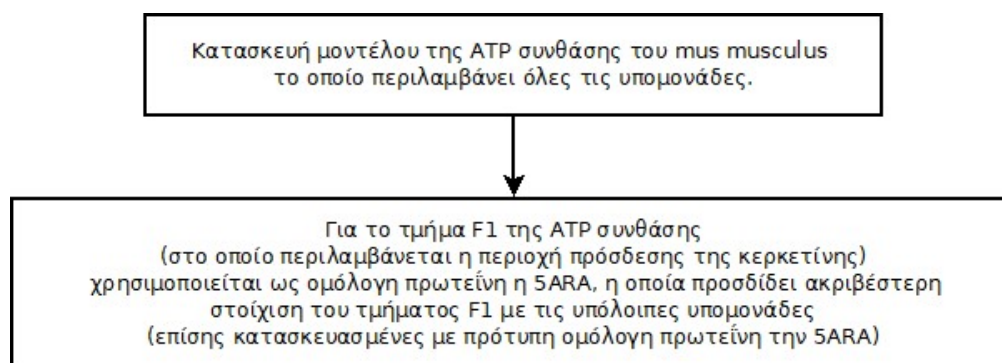
Όπως εύκολα διακρίνεται απ’ τον πίνακα, το σύνολο των υπομονάδων βασίστηκε σε 2 ομόλογες πρωτεΐνες, την 2XND (16) και την 5ARA (113). Παρόλο που αυτές οι δύο δομές δεν είχαν πάντα το υψηλότερο σκορ σύμφωνα με το BLAST κατά τη μελέτη της κάθε υπομονάδας, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες με σκοπό να έχουμε όσο το δυνατόν λιγότερες πρότυπες πρωτεΐνες, ώστε σε μεταγενέστερο βήμα της διαδικασίας, να υπάρχει η δυνατότητα να στοιχίσουμε κάθε μία υπομονάδα πάνω σε μία και μόνο δομή του συμπλέγματος πρωτεϊνών της ATP συνθάσης. Με αυτή τη μέθοδο καταφέρνουμε καλύτερη διευθέτηση των υπομονάδων μεταξύ τους και ένα πιο ισχυρό συνολικό μοντέλο.

Μετά την δημιουργία όλων των επί μέρους πρωτεϊνών, ελέγχουμε ότι οι υπομονάδες δ και c8, οι οποίες είναι βασισμένες στην δομή 2XND (Εικόνα 29), είναι στοιχισμένες σωστά με αυτήν και όλες οι υπόλοιπες που είναι βασισμένες στην 5ARA (Εικόνα 28, Εικόνα 30) είναι στοιχισμένες σωστά πάνω σε αυτήν αντίστοιχα.

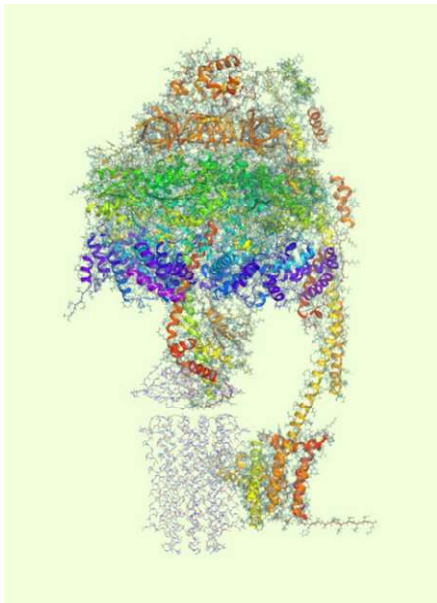
Πίνακας 3 Κατασκευή της τρισδιάστατης δομής της ATP συνθάσης του *mus musculus* και αντιστοιχία των επιμέρους αλληλουχιών (FASTA) των αμινοξέων με αντίστοιχες τρισδιάστατες δομές ομόλογων πρωτεϊνών.

υπομονάδα	FASTA ID	Όνομα καταχώρησης	PDB ID	Identities	Positives	Gaps
c	NP_001154891.1	ATP synthase F(0) complex subunit C1, mitochondrial [Mus musculus]	2XND_J (16)	100%	100%	0%
OSCP	NP_613063.1	ATP synthase subunit O, mitochondrial precursor [Mus musculus]	5ARA_S (113)	80 %	93 %	0 %
d	NP_082138.1	ATP synthase subunit d, mitochondrial [Mus musculus]	5ARA_U	79%	91%	0%
a	ABH09674.1	ATP synthase F0 subunit 6 (mitochondrion) [Mus musculus musculus]	5ARA_W	77%	89%	0%
b	AAH89574.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 [Mus musculus]	5ARA_T	84%	93%	0%
delta (δ)	AAH08273.1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit [Mus musculus]	2XND_H	93%	96%	0%

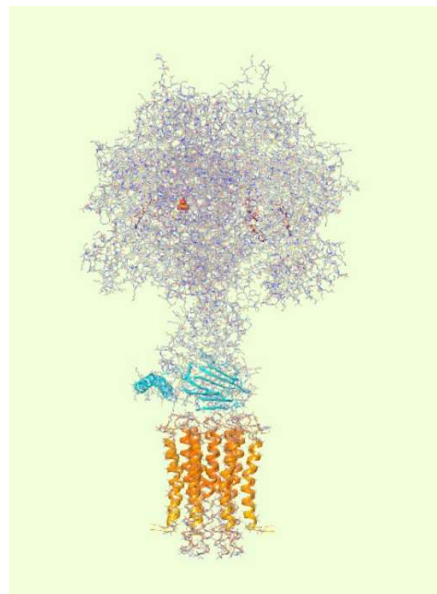
epsilon (ϵ)	NP_080259.1	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial [Mus musculus]	5ARA_I	90%	96%	0%
F6	AAB19213.1	mitochondrial ATP synthase coupling factor 6 [Mus musculus]	5ARA_V	83%	93%	0%
alpha (α)	NP_031531.1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor [Mus musculus]	5ARA_A 5ARA_B 5ARA_C	98%	99%	0%
beta (β)	NP_058054.2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [Mus musculus]	5ARA_D 5ARA_E 5ARA_F	97%	99%	0%
gamma (γ)	NP_065640.2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial isoform a [Mus musculus]	5ARA_G	90%	97%	0%



Εικόνα 28 Κατασκευή του τμήματος F1 της ATP συνθάσης του *mus musculus* βασισμένο στην πρωτεΐνη 5ARA. (114)

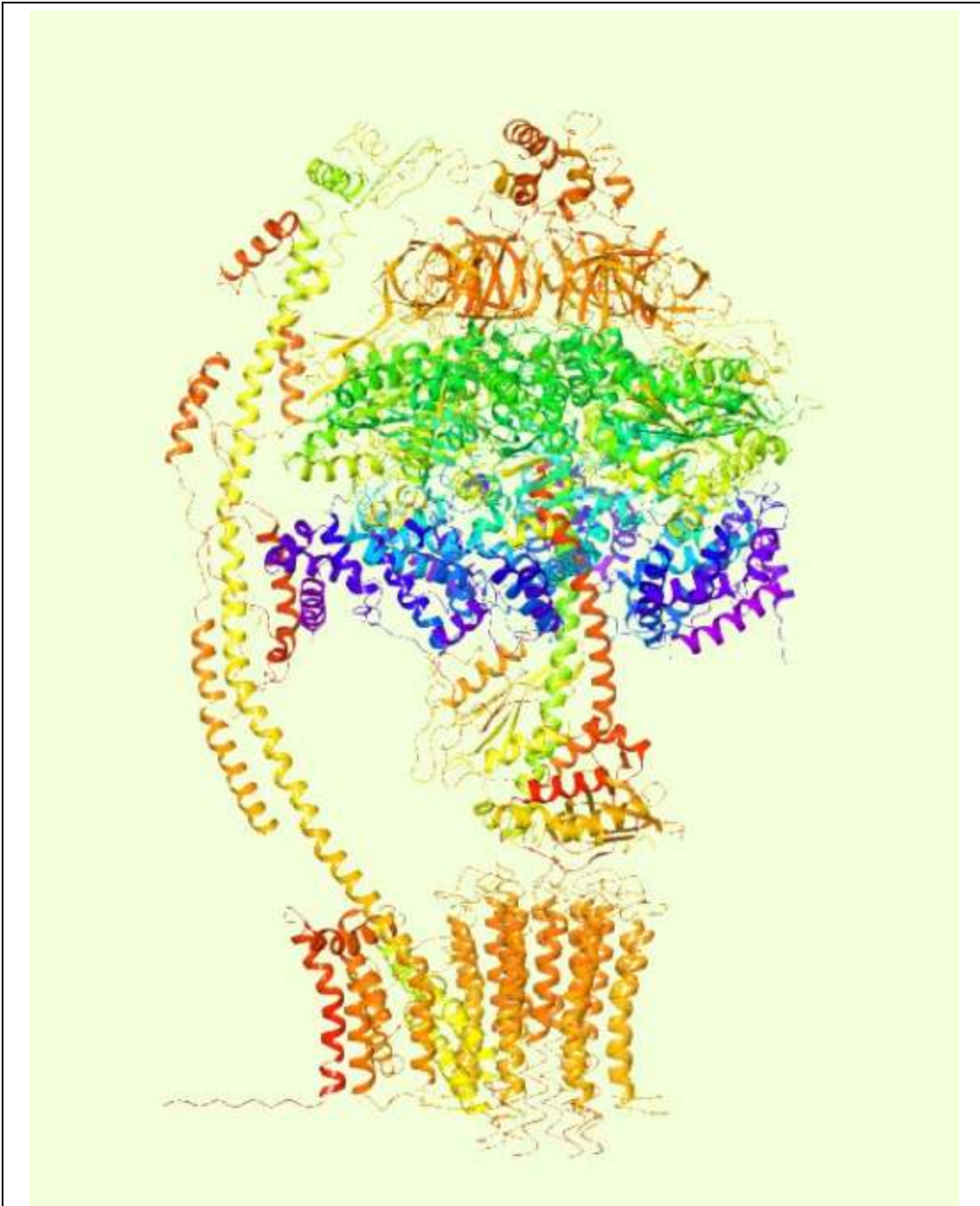


*Εικόνα 30 Δημιουργία της τρισδιάστατης δομής υπομονάδων της ATP συνθάσης του *mus musculus*, οι οποίες είναι βασισμένες στην ομόλογη πρωτεΐνη 5ARA. Οι υπομονάδες με αναπαράσταση κορδέλας (ribbons) είναι αυτές οι οποίες μοντελοποιήθηκαν βασισμένες στην 5ARA, ενώ το υπόλοιπο τμήμα της 5ARA στο οποίο φαίνονται μόνο τα άτομα και όχι ribbons δεν χρησιμοποιήθηκε.*



*Εικόνα 29 Δημιουργία της τρισδιάστατης δομής υπομονάδων της ATP συνθάσης του *mus musculus*, οι οποίες είναι βασισμένες στην ομόλογη πρωτεΐνη 2XND. Οι υπομονάδες με αναπαράσταση κορδέλας (ribbons) είναι αυτές οι οποίες μοντελοποιήθηκαν βασισμένες στην 2XND, ενώ το υπόλοιπο τμήμα της 2XND στο οποίο φαίνονται μόνο τα άτομα και όχι ribbons δεν χρησιμοποιήθηκε.*

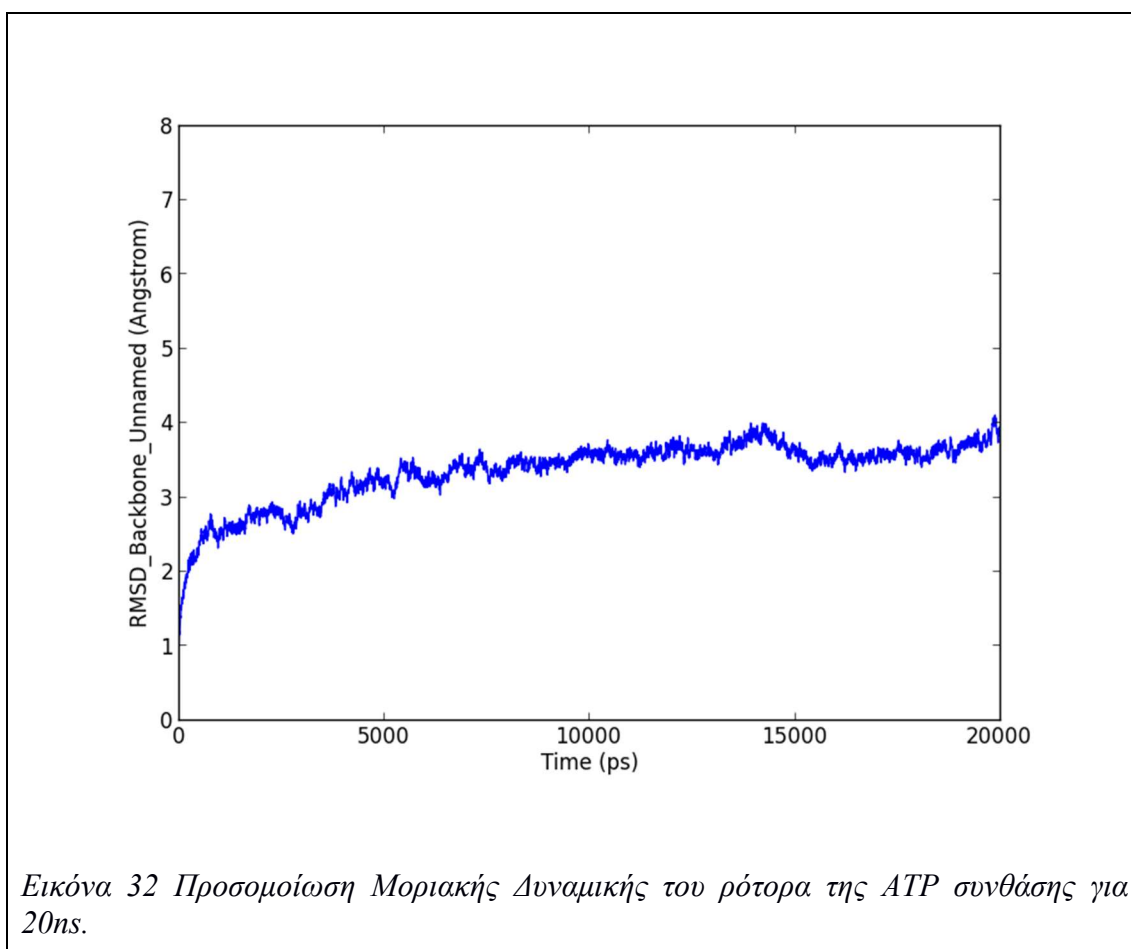
Τέλος, στοιχίζουμε το σύμπλεγμα δ - c8 (Εικόνα 29) πάνω στην 5ARA (Εικόνα 30) και τις ενοποιούμε με όλες τις υπόλοιπες υπομονάδες. Σημαντικό τελευταίο βήμα αποτελεί η αλλαγή του ονόματος κάθε υπομονάδας (σύμφωνα με την 5ARA), καθώς διπλότυπες ονομασίες υπομονάδων μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα σε περαιτέρω διεργασία. Αυτή η μεθοδολογία μας επιτρέπει να έχουμε την καλύτερη δυνατή δομή της κάθε μίας υπομονάδας ξεχωριστά, αλλά και της ATP συνθάσης ως σύμπλεγμα πρωτεϊνών, την οποία και θα χρησιμοποιήσουμε στα υπόλοιπα υπολογιστικά πειράματα. (Εικόνα 31)



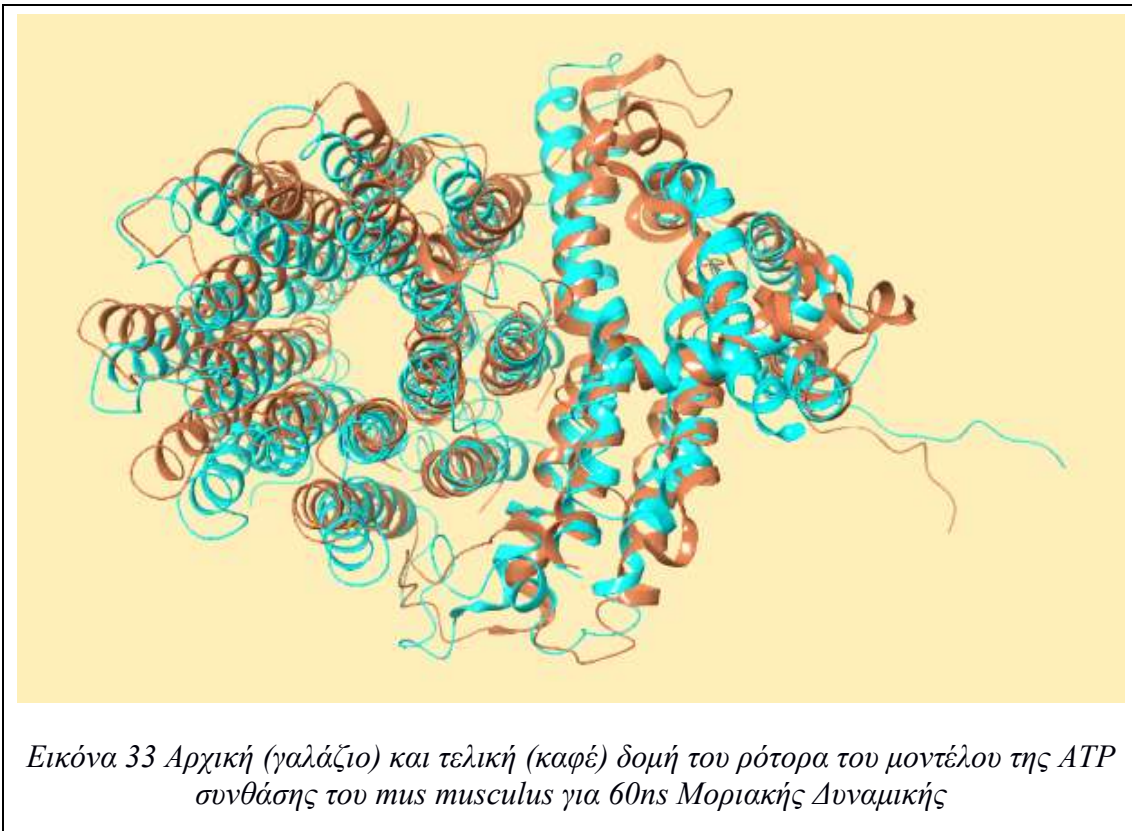
Εικόνα 31 Ολοκληρωμένο τρισδιάστατο μοντέλο της ATP συνθάσης του *mus musculus*.

VI.2 Μελέτη της Fo υπομονάδας του μοντέλου της ATP συνθάσης με υπολογισμούς Μοριακής Δυναμικής

Η μοριακή δυναμική πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Desmond, σύμφωνα με την ενότητα V.1.4 για διάστημα 60ns. Τα αποτελέσματα του RMSD σε σχέση με την αρχική δομή για τα πρώτα 20ns βρίσκονται στην Εικόνα 32.



Παρατηρούμε ότι μετά τα πρώτα 5ns το RMSD του σκελετού (backbone) του συμπλόκου της πρωτεΐνης έχει σταθεροποιηθεί. Στη συνέχεια παρατηρούνται μικρές διακυμάνσεις που οφείλονται στην έναρξη περιστροφής του ρότορα, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 33.



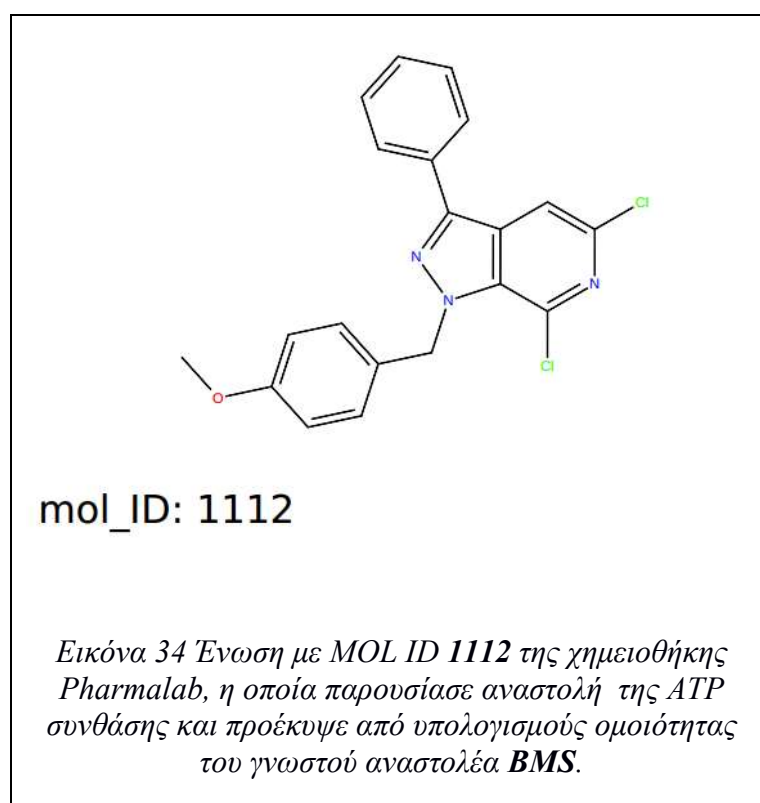
Από τη διαφορά της αρχικής και τελικής δομής του ρότορα, παρατηρούμε ότι το σύστημα έχει αρχίσει να περιστρέφεται πιθανόν εξαιτίας της διάσπασης δεσμού άλατος μεταξύ Glu119 και Arg159.

Τα αποτελέσματα που προήλθαν απ' τους υπολογισμούς Μοριακής Δυναμικής υποδεικνύουν αφενός ότι το θεωρητικό μας μοντέλο του ρότορα είναι σταθερό και αφετέρου ότι εμφανίζει τάση για περιστροφή εξαιτίας της πρωτονίωσης του Glu119 που είναι σε επαφή με την υπομονάδα a.

VI.3 Ανακάλυψη ένωσης οδηγού με βάση την ομοιότητα ως προς τον εκλεκτικό αναστολέα **BMS-199264**

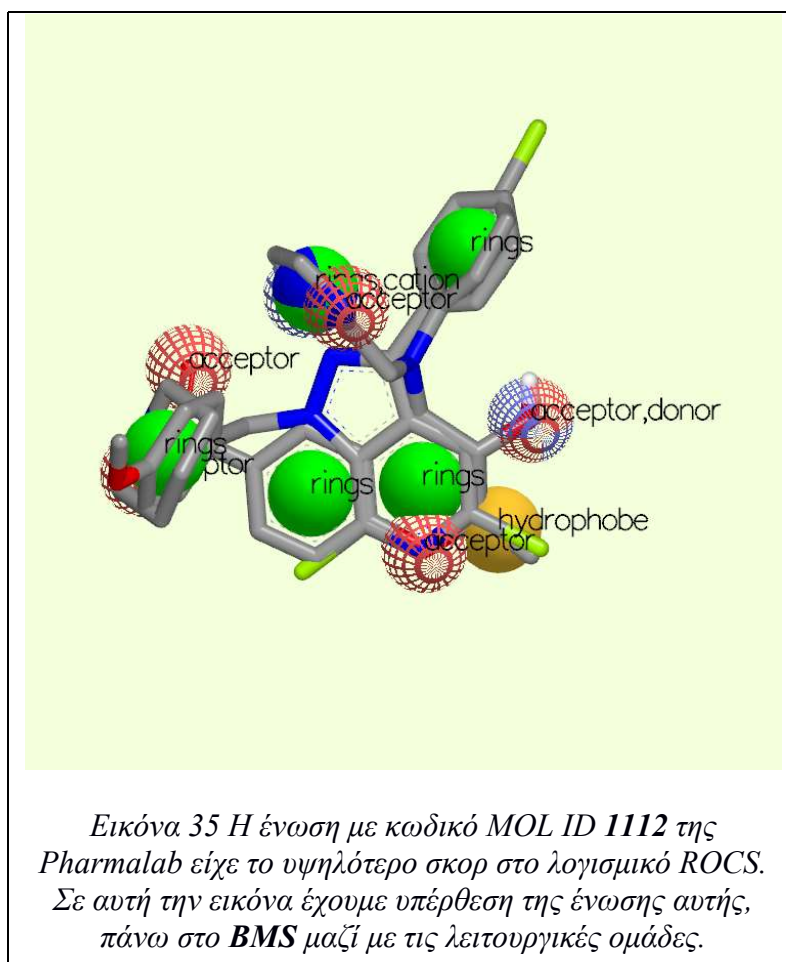
Όπως έχει αναλυθεί εκτενέστερα στην ενότητα III.12.1, η ένωση **BMS** αποτελεί έναν εκλεκτικό αναστολέα της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης. Ο μηχανισμός δράσης του όμως παραμένει άγνωστος, με αποτέλεσμα υπολογιστικές τεχνικές όπως ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή της πρωτεΐνης

στόχου (Structure Based Drug Design) να μην μπορούν να εφαρμοστούν. Χρήσιμες σε τέτοιες περιπτώσεις είναι οι τεχνικές σχεδιασμού βάση ομοιότητας (Ligand Based Drug Design). Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιούνται λογισμικά τα οποία αναγνωρίζουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ της ένωσης-πρότυπο και ενός μεγάλου όγκου ενώσεων (χημειοθήκες), διαθέσιμων είτε μέσω του εργαστηρίου (in-house), είτε με δυνατότητα παραγγελίας από άλλους ερευνητικούς χώρους. Στη περίπτωση αυτής της μελέτης, υπάρχει διαθέσιμη η χημειοθήκη Pharmalab με 2000 ενώσεις, τόσο σε ηλεκτρονική όσο και σε φυσική μορφή, η οποία μετά από επεξεργασία με το λογισμικό Ligprep όπως περιγράφηκε στην ενότητα V.1.6, προκύπτει να έχει ~10.000 καταχωρήσεις. Με το σύνολο αυτών των ενώσεων πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς ομοιότητας με τη χρήση του λογισμικού ROCS, με πρότυπη ένωση το **BMS**.

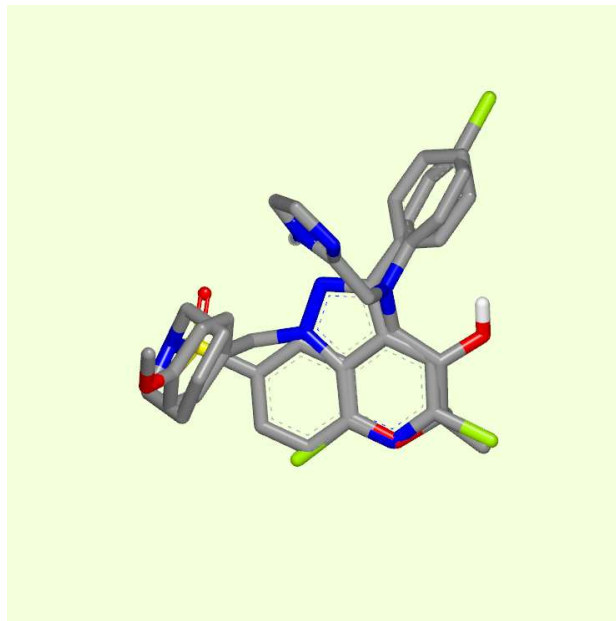


Η ένωση της χημειοθήκης Pharmalab με τον κωδικό (MOL ID) **1112** είχε το υψηλότερο σκορ σε αυτή τη μελέτη ομοιότητας και χρησιμοποιήθηκε για την πρώτη in vitro δοκιμασία. (Εικόνα 34, Εικόνα 35, Εικόνα 36) Στο ίδιο in vitro πείραμα

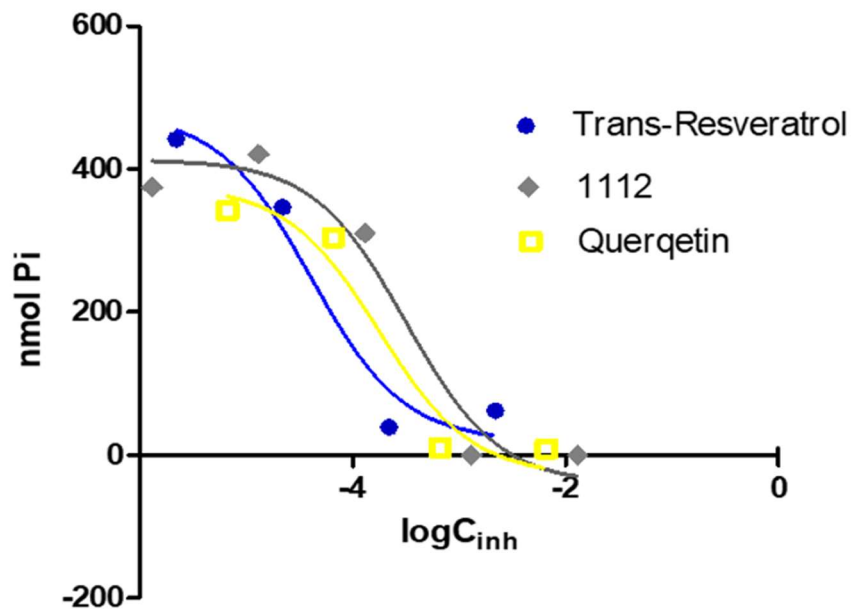
συμπεριλάβαμε τις ενώσεις: κερκετίνη, ολιγομυκίνη και trans-ρεσβερατρόλη και πραγματοποιήσαμε τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στην ενότητα V.2.5. Η κερκετίνη, η ρεσβερατρόλη και η ολιγομυκίνη είναι γνωστοί αναστολείς της ATP συνθάσης (ενότητα III.11.3 και III.11.2 αντίστοιχα). Στην Εικόνα 37 βρίσκονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού και ο Πίνακας 4 περιέχει τις τιμές IC₅₀ που υπολογίστηκαν.



Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν μία νέα ένωση με ελαττωμένη αλλά σημαντική αναστολή της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης, παρόμοιας ισχύος με τους γνωστούς, όπως προαναφέρθηκε, αναστολείς κερκετίνη και ρεσβερατρόλη. Η κερκετίνη έχει παρουσιάσει αναστολή 180μM σε μιτοχόνδρια βόειας καρδιάς (115,116), ενώ η ρεσβερατρόλη 6,4 μM (115,117).



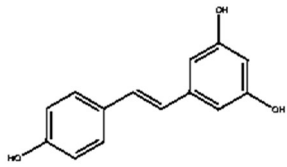
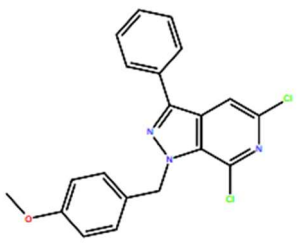
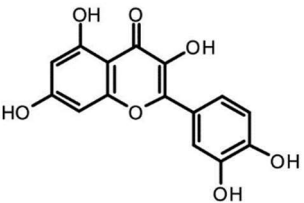
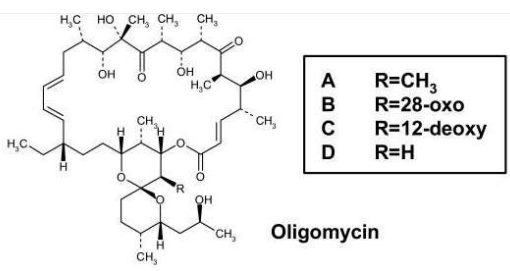
Εικόνα 36 Η ένωση με κωδικό MOL ID 1112 της Pharmalab μαζί με την ένωση BMS.



Εικόνα 37 Αποτελέσματα του πρώτου *in vitro* πειράματος. Παρατηρούμε ότι η IC₅₀ της ένωσης με κωδικό 1112 της χημειοθήκης Pharmalab έχει αντίστοιχη δραστηριότητα με τους γνωστούς αναστολείς κερκετίνη και ρεσβερατρόλη.

Οι τιμές IC₅₀ των δύο αυτών ενώσεων (κερκετίνη 180μM και ρεσβερατρόλη 6,4μM) έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης που πραγματοποιήσαμε. Ευνοϊκό αποτέλεσε το γεγονός ότι η ένωση **1112** περιέχει σκελετό πυραζολοπυριδίνης, όπως πολλές άλλες διαθέσιμες ενώσεις στη χημειοθήκη Pharmalab, αρκετές απ' τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια.

Πίνακας 4 Πίνακας τιμών IC₅₀ όπως υπολογίστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων του πρώτου *in vitro* πειράματος.

Ένωση	Δομή	IC ₅₀ (μM)
Trans-Ρεσβερατρόλη		40,5
1112		316,3
Κερκετίνη (115)		176,4
Ολιγομυκίνη (115)		Η σύγκριση της τιμής IC ₅₀ (0,02783 mg/ml) της ολιγομυκίνης με τις υπόλοιπες ενώσεις δεν είναι δυνατή καθώς είναι μείγμα ενώσεων.

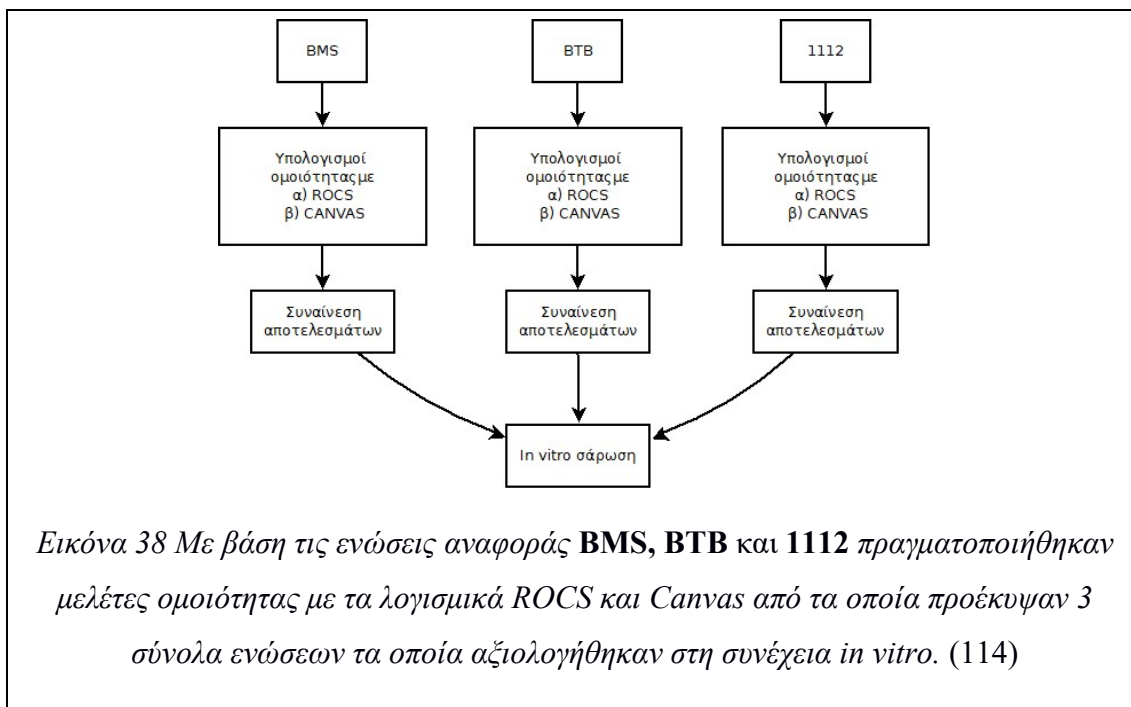
VI.4 Εικονική και in vitro αξιολόγηση βασισμένη σε υπολογισμούς ομοιότητας των ενώσεων **BMS**, **BTB** και **1112**.

Κατά την πρώτη μελέτη ομοιότητας με βάση τον γνωστό εκλεκτικό αναστολέα **BMS** χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των ενώσεων της Pharmalab όπως είχαν διαμορφωθεί από το λογισμικό Ligprep (~10.000 δομές). Κατά την επιλογή ενώσεων για το δεύτερο in vitro πείραμα, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω διεύρυνση των πιθανών δομών των ενώσεων της χημειοθήκης Pharmalab μέσω του λογισμικού OMEGA, η οποία μας έδωσε ~770.000 διαμορφώσεις, ταυτομερή και πρωτονιώσεις, όπως προαναφέρθηκε. Το σύνολο όλων αυτών των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε εφεξής για τους υπολογισμούς ομοιότητας μέσω του λογισμικού ROCS. Αναλυτικότερα, οι υπολογισμοί ομοιότητας με βάση τον γνωστό αναστολέα **BMS** πραγματοποιήθηκαν ξανά με το λογισμικό ROCS αλλά με τη χρήση των διαμορφώσεων που είχαν προκύψει από το OMEGA, σε αντίθεση με τον περιορισμένο αριθμό διαμορφώσεων της Pharmalab (μέσω του Ligprep ~10.000 διαμορφώσεις) που είχε χρησιμοποιηθεί στους πρώτους υπολογισμούς ομοιότητας, όπου έγινε αναφορά στην προηγούμενη ενότητα.

Επιπροσθέτως, με το ίδιο σύνολο διαμορφώσεων της Pharmalab (~770.000), πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί ομοιότητας με το λογισμικό ROCS με πρότυπες ενώσεις εκτός του **BMS**, και του **BTB** που είναι επίσης γνωστός αναστολέας, και της ένωσης με MOL ID **1112** της Pharmalab η οποία εμφάνισε ανασταλτική δράση της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση σύμφωνα με το πρώτο in vitro πείραμα.

Τέλος, για συναίνεση των μελετών ομοιότητας που πραγματοποιήθηκαν μέσω του ROCS στις 3 παραπάνω ενώσεις, έγινε χρήση του λογισμικού Canvas, μιας άλλης προσέγγισης για υπολογισμούς ομοιότητας. Δηλαδή έγινε συναίνεση των αποτελεσμάτων της μελέτης ομοιότητας για την ένωση **BMS**, μεταξύ των αποτελεσμάτων των λογισμικών ROCS και Canvas και επιλέχθηκαν ενώσεις για το in vitro πείραμα. Η ίδια μέθοδος συναίνεσης πραγματοποιήθηκε και για το **BTB** και τέλος για το **1112**, οπότε προκύπτουν 3 σύνολα ενώσεων, ένα για κάθε πρότυπη ένωση. (Εικόνα 38) Τέλος στο σύνολο ενώσεων της **1112** προστέθηκαν και ενώσεις οι οποίες είχαν ίδιο σκελετό, αλλά διαφορετικούς υποκαταστάτες μέσα από το σύνολο της χημειοθήκης Pharmalab, ώστε να υπάρχει μία συνολικότερη εικόνα του φαρμακοφόρου. Στο Canvas χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά Fingerprints (Linear

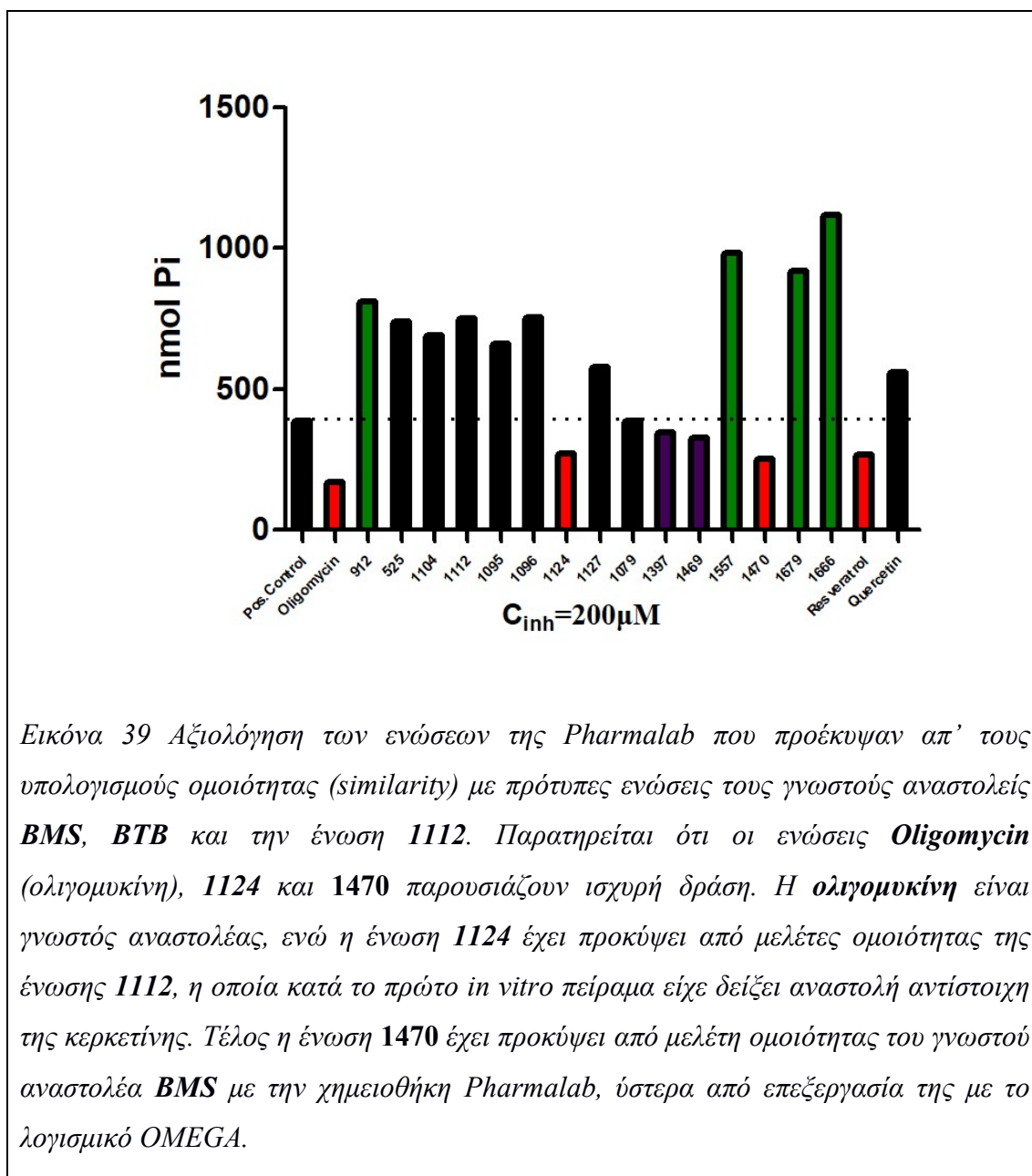
και 3D Pharmacophore τριών σημείων), όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα V.1.6 και οι δομές της Pharnalab όπως προκύπτουν απ' το Ligprep, για υπολογισμούς ομοιότητας με ενώσεις αναφοράς τις 3 δομές (**BMS**, **BTB**, **1112**).



*Πίνακας 5 Μελέτες ομοιότητας που πραγματοποιήθηκαν συνολικά, με ενώσεις αναφοράς τα **BMS**, **BTB** και **1112**.*

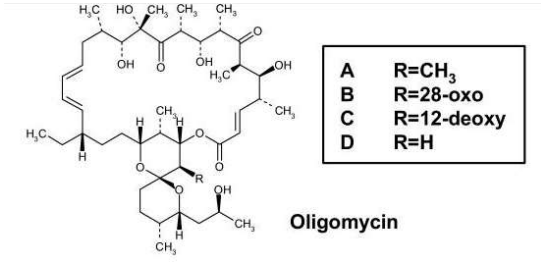
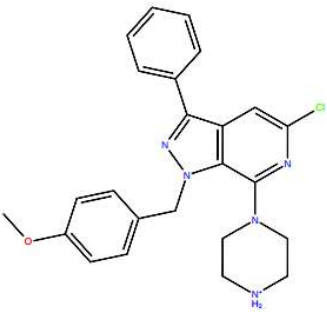
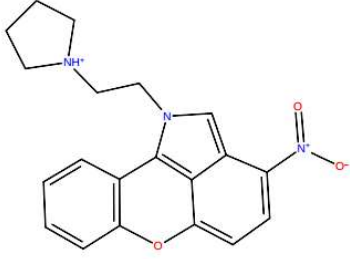
Λογισμικό	Ένωση αναφοράς	Fingerprint
ROCS	BMS	-
ROCS	BTB	-
ROCS	1112	-
CANVAS	BMS	Linear
CANVAS	BTB	Linear
CANVAS	1112	Linear
CANVAS	BMS	3D Pharmacophore
CANVAS	BTB	3D Pharmacophore
CAVNAS	1112	3D Pharmacophore

Τέλος, τα 3 υποσύνολα ενώσεων της Pharmalab που προέκυψαν από τις μελέτες ομοιότητας του **BMS**, του **BTB** και του **1112** (Παράρτημα 1), αξιολογήθηκαν *in vitro* σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα V.2.4 και τα αποτελέσματα βρίσκονται στην *Εικόνα 39*.



Η **ολιγομυκίνη** είναι μείγμα ενώσεων και χρησιμοποιείται 0,1 μg/ml για την πραγματοποίηση τους πειράματος, ενώ η συγκέντρωση σε μg/ml της ένωσης **1124** υπολογίζεται 86,8 μg/ml, ενώ η **1470** 69,9 μg/ml στα 200μM που πραγματοποιείται η *in vitro* αξιολόγηση.

Πίνακας 6 Ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν ισχυρή δράση κατά την *in vitro* αξιολόγηση και προέκυψαν από υπολογισμούς ομοιότητας των ενώσεων **BMS**, **BTB** και **1112**

Ένωση	Δομή
Ολιγομυκίνη	 <p style="text-align: center;">Oligomycin</p>
1124	
1470	

VI.5 Εικονική και in vitro αξιολόγηση βασισμένη σε υπολογισμούς ομοιότητας των ενώσεων **1124** και **1470**

Σύμφωνα με το προηγούμενο in vitro πείραμα (*Εικόνα 39*) οι ενώσεις **1124** (πυραζολοπυριδίνη) και **1470** (συμπυκνωμένο παράγωγο ξανθόνης) εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση. Με σκοπό να βρούμε ισχυρότερους αναστολείς βασιζόμενοι σε αυτές, πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς ομοιότητας (similarity) με τη χημειοθήκη Pharmalab, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 7 Μελέτες ομοιότητας που πραγματοποιήθηκαν συνολικά, με ενώσεις αναφοράς τα **1124** και **1470**.*

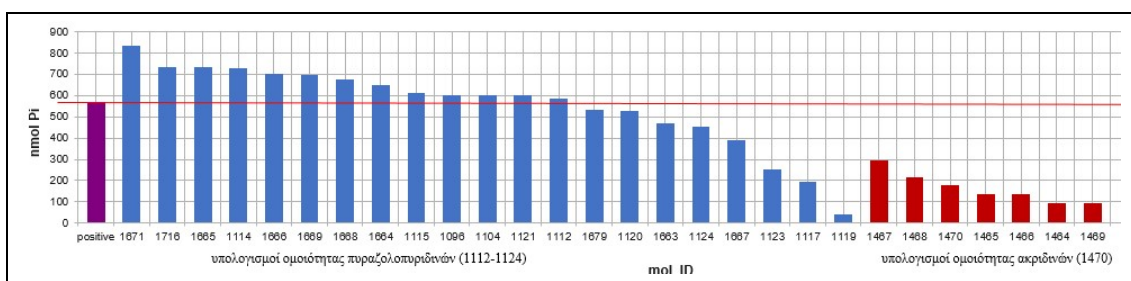
Λογισμικό	Ένωση αναφοράς	Fingerprint
ROCS	1124	-
ROCS	1470	-
CANVAS	1124	Linear
CANVAS	1470	Linear
CANVAS	1124	3D Pharmacophore
CANVAS	1470	3D Pharmacophore

Τέλος, οι ενώσεις της Pharmalab που επιλέχθηκαν από τις παραπάνω διαδικασίες (μελέτες ομοιότητας των 1124 και 1470), μαζί με ενώσεις οι οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί στο προηγούμενο in vitro πείραμα και ανήκουν στις πυραζολοπυριδίνες όπως οι ενώσεις 1124 και 1112, αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που βρίσκεται στην ενότητα V.2.4 ως προς την ανασταλτική τους δράση. Το σύνολο των ενώσεων αυτών βρίσκεται στο Παράρτημα 2 και τα αποτελέσματα βρίσκονται στην *Εικόνα 40*.

Από την in vitro αξιολόγηση γίνεται αντιληπτό, ότι όλες οι ενώσεις που έχουν προκύψει από τις μελέτες ομοιότητας της ένωσης **1470** εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν αναστολή 48 – 82.5% (ένωση 1467 και 1469 αντίστοιχα). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο σκελετός των

ενώσεων αυτών πιθανόν σχετίζεται με αυξημένη αναστολή της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση.

Συνοπτικά, αρχικά πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση ενώσεων της χημειοθήκης Pharmalab οι οποίες είχαν προκύψει από μελέτες ομοιότητας των ενώσεων **BMS**, **BTB**, **1112**. Από το *in vitro* πείραμα, οι ενώσεις της Pharmalab που εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση ήταν η **1124** και η **1470**. Η **1124** είχε προκύψει από την μελέτη ομοιότητας του **1112** και η ένωση **1470** έχει προκύψει από μελέτη ομοιότητας του **BMS** με την χημειοθήκη Pharmalab η οποία είχε υποστεί περαιτέρω επεξεργασία με το λογισμικό OMEGA. Η *in vitro* αξιολόγηση που ακολούθησε υπέδειξε ότι οι ενώσεις με σκελετό ανάλογης δομής με το συμπυκνωμένο παράγωγο ξανθόνης **1470**, οι οποίες προέκυψαν από υπολογισμούς ομοιότητας, παρουσιάζουν ισχυρή αναστολή.



Εικόνα 40 *In vitro* αξιολόγηση ($C=200\mu M$) των ενώσεων που προέκυψαν από υπολογισμούς ομοιότητας (*similarity*), τοποθετημένοι κατά σειρά δραστηριότητας. Η κόκκινη κάθετη γραμμή υποδεικνύει τα *nmol Pi* του δείγματος ελέγχου, ενώ ενώσεις με στήλη κάτω από την γραμμή αυτή εμφάνισαν ανασταλτική δράση. Με τα διαφορετικά χρώματα στηλών, υποδηλώνεται η μέθοδος από την οποία προέκυψε κάθε ένωση. Οι μπλε στήλες, έχουν προκύψει από τους υπολογισμούς ομοιότητας (*similarity*) των πυραζολοπυριδινών με MOL ID 1112 και 1124, ενώ οι κόκκινες από την δομή του συμπυκνωμένου παραγώγου ξανθόνης με MOL ID 1470.

VI.6 Εικονική και *in vitro* αξιολόγηση βασισμένη σε υπολογισμούς πρόσδεσης

Για την περαιτέρω διερεύνηση αναστολέων της ATP συνθάσης, εκτός των μελετών ομοιότητας, πραγματοποιήθηκαν 3 μελέτες πρόσδεσης, στα 3 διαφορετικά ενεργά κέντρα όπου δρουν αναστολείς της υδρόλυσης της ATP συνθάσης.

Συγκεκριμένα, είναι η θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης, της κερκετίνης και η καταλυτική περιοχή του τμήματος F₁.

VI.6.1 Υπολογισμοί πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της κερκετίνης

Πολύ χρήσιμες μέθοδοι κατά τον *in silico* ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων είναι οι υπολογισμοί πρόσδεσης με βάση γνωστές τρισδιάστατες δομές της πρωτεΐνης στόχου. Στη ηλεκτρονική βάση δεδομένων των τρισδιάστατων πρωτεϊνών στην ιστοσελίδα Protein Data Bank στην οποία προαναφερθήκαμε, υπάρχει η τρισδιάστατη δομή του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης του είδους *Bos taurus* η οποία αναστέλλεται από την κερκετίνη, ιδιότητα που αναφέρεται στην ενότητα III.11.3. Η κρυσταλλογραφία αυτή (PDB ID 2JJ2 (23)) μπορεί να μας παρέχει ιδιαίτερα χρήσιμα δεδομένα με την μεθοδολογία που θα αναφερθεί στη συνέχεια.

Αρχικά δημιουργήσαμε την τρισδιάστατη δομή του τμήματος F₁ (που περιέχει τη θέση πρόσδεσης της κερκετίνης) της ATP συνθάσης του *mus musculus*. Τη διεργασία αυτή την πραγματοποιήσαμε με την ίδια μεθοδολογία που αναφέρθηκε στην ενότητα VI.1 με τη χρήση του λογισμικού Prime. Σε αυτό το σημείο κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ο λόγος που το μοντέλο του τμήματος F₁ δημιουργήθηκε δύο φορές, την πρώτη φορά κατά το σχηματισμό της συνολικής ATP συνθάσης και σε αυτό το σημείο δεύτερη φορά για τη μελέτη πρόσδεσης της κερκετίνης (Εικόνα 41). Κατά το σχεδιασμό της συνολικής ATP συνθάσης υπήρχε ως προτεραιότητα η δημιουργία των υπομονάδων με βάση τρισδιάστατες πρότυπες δομές που περιέχουν όσο το δυνατόν περισσότερες υπομονάδες της υπό κατασκευή μοντελοποιημένης πρωτεΐνης. Με αυτό το τρόπο θα ήταν πιο εύκολος και πιο ασφαλής ο σχεδιασμός ολόκληρου του ενζύμου, καθώς θα προκύπτουν λιγότερα σφάλματα στην στοίχιση των επί μέρους μοντελοποιημένων υπομονάδων της ATP συνθάσης σε ένα ολοκληρωμένο μοντέλο. Κατά την μέθοδο πρόσδεσης (*docking*) που επιχειρήθηκε σε αυτό το σημείο, στο οποίο δεν είναι αναγκαία ολόκληρη η τρισδιάστατη δομή της ATP συνθάσης παρά μόνο το τμήμα F₁, είχαμε την δυνατότητα χρησιμοποίησης μιας ομόλογης τρισδιάστατης δομής του τμήματος F₁ το οποίο έχει υψηλότερη ανάλυση (*Resolution*). Η δομή 5ARA που χρησιμοποιήθηκε για το συνολικό μοντέλο της ATP

συνθάσης έχει ανάλυση 7.4 Å και έχει προκύψει με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η δομή αυτή περιλαμβάνει και τη μονάδα πρόσδεσης της κερκετίνης. Η δομή της υπομονάδας αυτής υφίσταται σε λίγο καλύτερη ανάλυση (6,5 Å) στην πρωτεΐνη με PDB ID 2W6E (118). Ο Πίνακας 8 περιέχει την ομολογία της αλληλουχίας της 2W6E με την αλληλουχία του *mus musculus*. Η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεση μήτρα για την δημιουργία μοντέλου ομολογίας. Τελικά χρησιμοποιήθηκε σε τρίτο στάδιο η δομή της πρωτεΐνης 2JJ2 η οποία περιέχει την κερκετίνη προσδεσμένη στο ενεργό κέντρο. Η αλληλουχία αυτή είχε μικρότερο σκορ κατά τη στοίχιση των αλληλουχιών στο Prime και για αυτό χρησιμοποιήθηκε στο τελευταίο στάδιο.

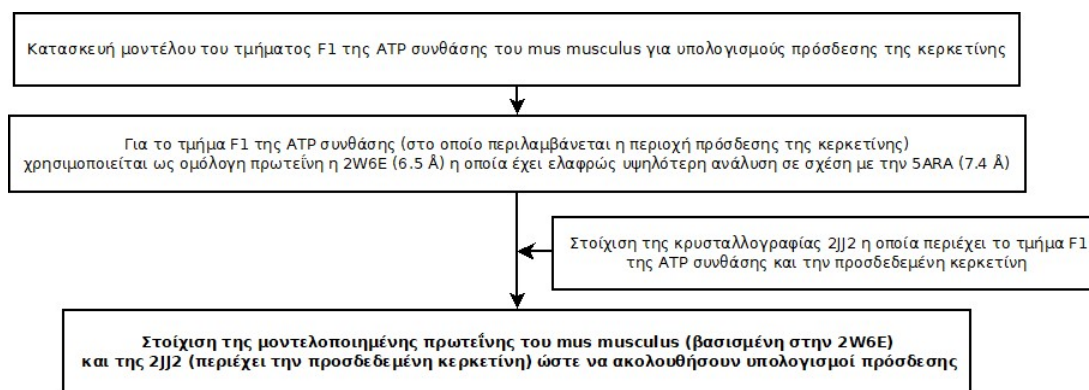
Πίνακας 8 Κατασκευή της τρισδιάστατης δομής του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης του mus musculus και αντιστοιχία των επιμέρους αλληλουχιών (FASTA) των αμινοξέων με αντίστοιχες τρισδιάστατες δομές ομόλογων πρωτεϊνών. Χρήση αυτού του μοντέλου για περαιτέρω υπολογισμούς πρόσδεσης της χημειοθήκης Pharamalab στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης της κερκετίνης.

Υπομονάδα	FASTA ID	Όνομα καταχώρησης	PDB ID	Identities	Positives	Gaps
alpha (α)	NP_031531.1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor [Mus musculus]	2W6E_A (118)	97%	99%	0%
beta (β)	NP_058054.2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [Mus musculus]	2W6E_D	96%	98%	0%
gamma (γ)	NP_065640.2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial isoform a [Mus musculus]	2W6E_G	90%	96%	0%

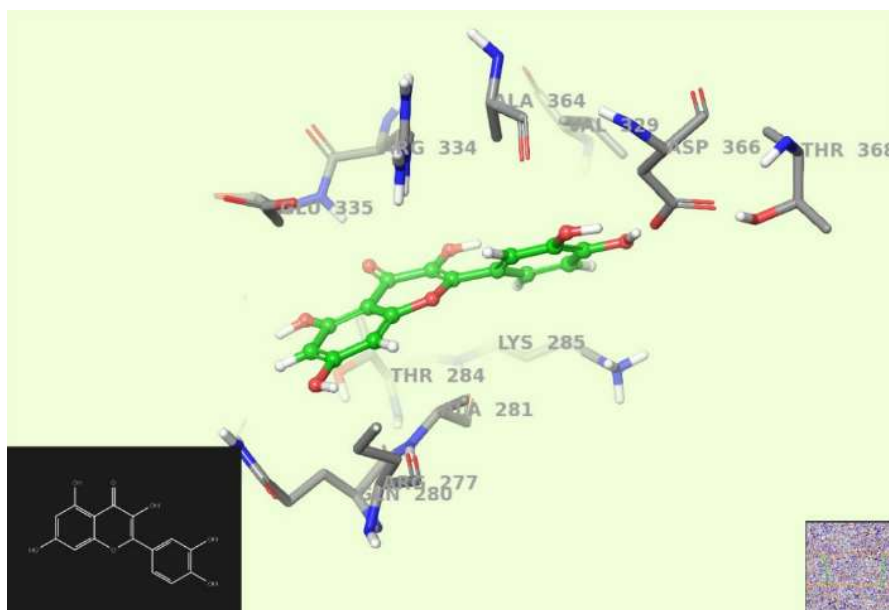
Η δημιουργία της υπομονάδας α , β και γ επιτεύχθηκε με το λογισμικό Prime και είναι αντίστοιχη με αυτή που προαναφέρθηκε στην ενότητα δημιουργίας του συνολικού μοντέλου της ATP συνθάσης. (ενότητα VI.1) Στη συνέχεια δημιουργήσαμε 3 αντίγραφα της υπομονάδας α και την στοιχίσαμε (Protein Structure Alignment) με τις 3 αντίστοιχες υπομονάδες α της 2W6E. Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις 3 υπομονάδες β . Τέλος δημιουργήθηκε και η υπομονάδα γ και ενοποιήθηκαν όλες οι δομές, ώστε να προκύψει το συνολικό F_1 τμήμα της ATP συνθάσης του *mus musculus* βασισμένο στην 2W6E.

Στη συνέχεια στοιχίσαμε τη δομή αυτή (του μοντέλου της F_1 του *mus musculus*) με την δομή της κρυσταλλογραφίας 2JJ2, ώστε το σημείο πρόσδεσης της κρυσταλλογραφημένης πρωτεΐνης μαζί με το προσδεμένο μόριο (κερκετίνη) να βρίσκεται πάνω στο αντίστοιχο τμήμα του μοντέλου της πρωτεΐνης του *mus musculus* που δημιουργήσαμε. (Εικόνα 41)

Σε αυτό το σημείο, πραγματοποιήθηκε η δημιουργία του αρχείου Grid το οποίο είναι απαραίτητο για τους υπολογισμούς πρόσδεσης μέσω του λογισμικού Glide. Αρχικά, από την δομή της κρυσταλλογραφίας 2JJ2 διαγράψαμε όλα τα άτομα εκτός αυτών του προσδέματος (κερκετίνη) και την ενοποιήσαμε με την δομή του μοντέλου του τμήματος F_1 που έχουμε προηγουμένως δημιουργήσει. Εφόσον, οι δύο δομές έχουν ήδη μεταξύ τους στοιχιστεί, η κερκετίνη βρίσκεται τώρα στο σημείο πρόσδεσης της μοντελοποιημένης πρωτεΐνης. Τέλος, επιλέξαμε το πρόσδεμα κερκετίνη και μέσω αυτού δημιουργήθηκε το αρχείο Grid, το οποίο χρησιμοποιήσαμε για την πρόσδεση της κερκετίνης στη μοντελοποιημένη πρωτεΐνη.



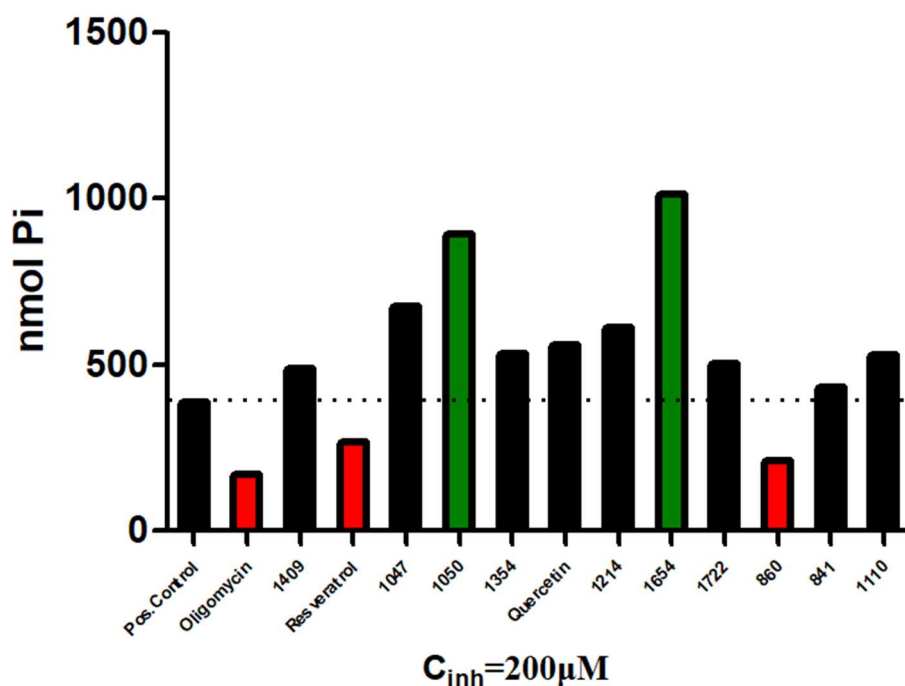
Εικόνα 41 Κατασκευή του τμήματος F_1 της ATP συνθάσης του *mus musculus* βασισμένο στην 2W6E και στοιχισμός με την 2JJ2. (114)



Εικόνα 42 Πρόσδεση της κερκετίνης όπως προέκυψε απ' τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο μοντέλο του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης του *mus musculus*.

Στην Εικόνα 42 φαίνεται ο τρόπος πρόσδεσης της κερκετίνης στο μοντέλο της υπομονάδας F₁ της ATP συνθάσης του *mus musculus* που κατασκευάσαμε, με τη χρήση του Grid, επιλέγοντας την δοκιμασία πρόσδεσης με τυπική ακρίβεια (Standard Precision, SP) και εύκαμπτη πρόσδεση (Flexible ligand sampling), κατά την οποία το Glide παράγει διαμορφώσεις εσωτερικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρόσδεσης (flexible docking). Στη συνέχεια, με τις ίδιες ρυθμίσεις, πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης της χημειοθήκης Pharnalab. Με τη χρήση του εργαλείου Ligand Filtering του Maestro μπορέσαμε να διαχωρίσουμε τα αποτελέσματα ώστε να απομονώσουμε όλα τα σάκχαρα από τις υπόλοιπες ενώσεις, αφαιρώντας όσες δομές είχαν εξαμελή δακτύλιο με οξυγόνο.

Από αυτούς τους υπολογισμούς πρόσδεσης επιλέχθηκαν οι ενώσεις που βρίσκονται στο Παράρτημα 3. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα V.2.4 και τα αποτελέσματα της αξιολόγησης αυτής βρίσκονται στην Εικόνα 43.



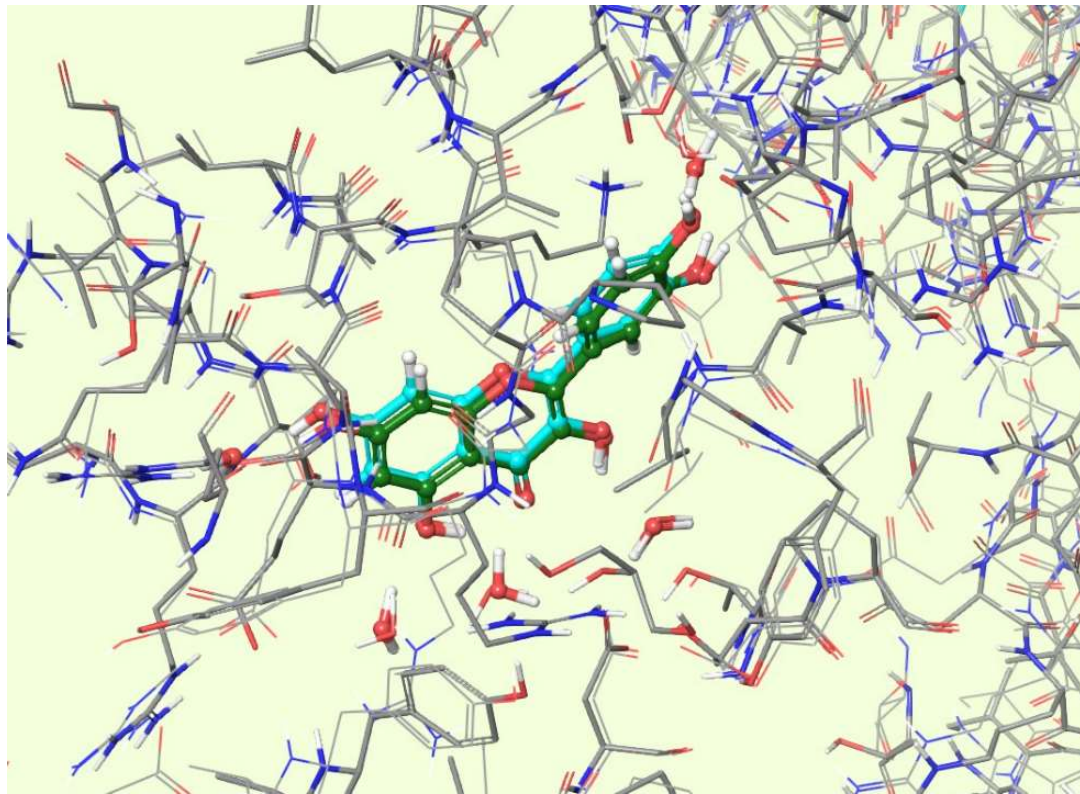
Εικόνα 43 Αξιολόγηση των ενώσεων της Pharmalab που προέκυψαν απ' τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της κερκετίνης. Παρατηρείται ότι οι ενώσεις **Oligomycin** (ολιγομυκίνη), **198** και **860** παρουσιάζουν ισχυρή δράση. Η **ολιγομυκίνη** και η **198** (trans-resveratrol) είναι γνωστοί αναστολείς, ενώ η **860** ανήκει στις ιντιρουμπίνες και έχει εμφανίσει in vivo καρδιοπροστατευτική δράση.

Η **ολιγομυκίνη** είναι μείγμα ενώσεων και χρησιμοποιείται 0,1 μg/ml για την πραγματοποίηση τους πειράματος, ενώ η συγκέντρωση σε μg/ml της ένωσης **198** (trans-ρεσβερατρόλη) υπολογίζεται 45,6 μg/ml, ενώ της **860** 96,5 μg/ml στα 200μM που πραγματοποιείται η in vitro αξιολόγηση.

Τα αποτελέσματα του in vitro πειράματος δεν έδειξαν κάποια ένωση που να προκαλεί ισχυρή αναστολή της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης των υπολογισμών πρόσδεσης στη θέση πρόσδεσης της κερκετίνης με σκοπό την βελτιστοποίηση της μεθόδου και την αποτελεσματικότερη in vitro αξιολόγηση.

Κατά την περαιτέρω διερεύνηση του μοντέλου πρόσδεσης, έγινε εμφανές ότι η

κερκετίνη δεν προσδένεται στη θέση πρόσδεσης της μοντελοποιημένης πρωτεΐνης με παρόμοιο τρόπο με αυτό που την συναντάμε στην κρυσταλλογραφία της PDB ID 2JJ2. (Εικόνα 44) Για την περαιτέρω διερεύνηση του διαφορετικού προσανατολισμού της κερκετίνης χρησιμοποιήθηκαν αρχικά υπολογισμοί πρόσδεσης της κερκετίνης στην ίδια την κρυσταλλογραφία από την οποία προέρχεται. Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός πρόσδεσης εξαιρετικής ακρίβειας (Extra Precision, XP) του λογισμικού Glide ο οποίος συνδυάζει πρωτόκολλο δειγματοληψίας με τον οποίο αναγνωρίζονται προσανατολισμοί των προσδεμάτων που αναμένεται να έχουν μη ευνοϊκές ενέργειες, με βάση γνωστές αρχές της φυσικής χημείας. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι μόνο ένα ενεργό πρόσδεμα θα έχει τον κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να έχει τη δυνατότητα να προσπεράσει αυτές τις βασικές αρχές, μέσω της ευνοϊκής του πρόσδεσης με την πρωτεΐνη, δημιουργώντας για παράδειγμα κατάλληλες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή δεσμούς υδρογόνου κτλ. Εκτός όμως του Glide, χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα το λογισμικό Induced Fit Docking (119–122). Με τη χρήση του λογισμικού Glide, η διαμόρφωση του υποδοχέα παραμένει άκαμπτη, ενώ το πρόσδεμα πραγματοποιεί ελεύθερες κινήσεις. Στην πραγματικότητα όμως ο υποδοχέας κινείται κατά την πρόσδεση ενώσεων, επιτρέποντας αλλαγή της θέσης πρόσδεσης με τρόπο που επιτρέπει καλύτερη προσαρμογή στο σχήμα και στον τρόπο σύνδεσης του προσδέματος. Στη θέση πρόσδεσης της κερκετίνης, χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό Induced Fit Docking, το οποίο όμως και αυτό δεν απέδωσε κάποια διαμόρφωση πρόσδεσης της κερκετίνης, αντίστοιχη με την κρυσταλλογραφία. Η μελέτη αυτή μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αφαίρεση των μορίων νερού κατά την χρήση του “Οδηγού Προετοιμασίας Πρωτεϊνών” που είχε χρησιμοποιηθεί θα έπρεπε να αποφευχθεί. Αυτά τα μόρια νερού στη θέση πρόσδεσης αποδεικνύονται μείζονος σημασίας για τη σωστή αλληλεπίδραση της κερκετίνης. Συνεχίζοντας, επιβεβαιώσαμε μέσω υπολογισμών πρόσδεσης ότι η κερκετίνη προσδένεται στην ίδια την πρωτεΐνη της κρυσταλλογραφίας με τον ίδιο τρόπο που βρίσκεται στην κρυσταλλογραφία. Ακολούθως, προχωρήσαμε στη στοίχιση του μοντέλου του F₁ τμήματος του mus musculus που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως, πάνω στην κρυσταλλογραφία της F₁ υπομονάδας που είναι προσδεμένη η κερκετίνη (PDB ID 2JJ2). Αφαιρέσαμε τα άτομα της πρωτεΐνης που προέρχονται απ' την κρυσταλλογραφία, ώστε να προκύψει μία τελική καταχώρηση η οποία αποτελείται από το μοντέλο του τμήματος F₁ του mus musculus, την κερκετίνη και τα μόρια νερού που προέρχονται απ' την



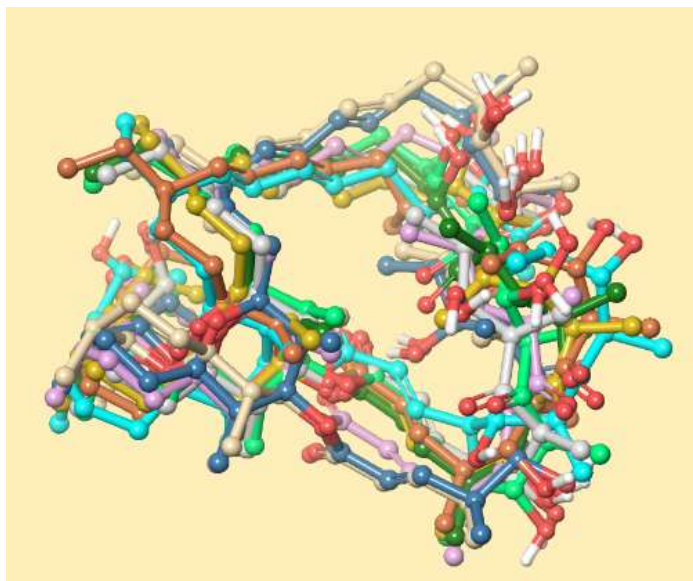
*Εικόνα 45 Πρόσδεση της κερκετίνης όπως προκύπτει από τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο μοντέλο του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης του *mus musculus*, με διατήρηση των μορίων νερού από την κρυσταλλογραφία. Η διαμόρφωση των υπολογισμών, έρχεται σε συμφωνία με την διαμόρφωση της κρυσταλλογραφίας, γεγονός που επιβεβαιώνει το μοντέλο πρόσδεσης. Με πράσινο η κερκετίνη προσδεδεμένη στο μοντέλο και με γαλάζιο στην κρυσταλλογραφία.*

VI.6.2 Υπολογισμοί πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της ολιγομυκίνης

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα III.11.2 η ολιγομυκίνη είναι γνωστός αναστολέας του κυλίνδρου c υπομονάδων της ATP συνθάσης. Η κρυσταλλογραφία με PDB ID 4F4S (43) αποτελείται από ένα κύλινδρο 10 c υπομονάδων της ATP συνθάσης ζυμομύκητα στον οποίο είναι προσδεδεμένα μόρια ολιγομυκίνης. Για να εκμεταλλευτούμε τα δεδομένα που μας παρέχει αυτή η κρυσταλλογραφία, χρησιμοποιήσαμε το μοντέλου του δακτυλίου c υπομονάδων του *mus musculus* που έχουμε κατασκευάσει με το λογισμικό Prime (ενότητα VI.1).

Συνεχίσαμε, χρησιμοποιώντας την κρυσταλλογραφική δομή με PDB ID 4F4S την οποία στοιχίσαμε πάνω στο μοντέλο του δακτυλίου c υπομονάδων του *mus musculus* που δημιουργήσαμε. Η στοίχιση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα αμινοξέα γλουταμινικού οξέος (ενότητα III.11.2) που βρίσκονται στο μέσο των c υπομονάδων και θεωρούνται σημαντικά για τη δράση του ρότορα να συμπίπτουν. Ιδιαιτερότητα της μοντελοποιημένης c υπομονάδας του *mus musculus* που κατασκευάστηκε, αποτελεί το γεγονός ότι περιέχει και την **υπομονάδα a**, η οποία δεν υπάρχει στην 4F4S. (Εικόνα 48 και Εικόνα 49)

Εργαστήκαμε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που διαχειριστήκαμε την περιοχή πρόσδεσης της κερκετίνης. Αναλυτικότερα, διαγράψαμε την πρωτεΐνη της κρυσταλλογραφίας 4F4S, διατηρώντας τις δομές της ολιγομυκίνης αλλά και τα μόρια νερού (εκ των οποίων ένα μόριο νερού βρίσκεται στον χώρο μεταξύ της c υπομονάδας και της ολιγομυκίνης και δρα ως γέφυρα δεσμών υδρογόνου) τα οποία στη συνέχεια ενοποιήσαμε με τον μοντελοποιημένο δακτύλιο c υπομονάδων του *mus musculus*. Για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε δοκιμασία πρόσδεσης στη δομή αυτή, χρησιμοποιήσαμε το “Οδηγό Προετοιμασίας Πρωτεϊνών” (Protein Preparation Wizard) χωρίς όμως να αφαιρέσουμε τα μόρια νερού και δημιουργούμε το κατάλληλο Grid αρχείο. Στη συνέχεια, δημιουργήσαμε τις πιθανές διαμορφώσεις (conformational search) χαμηλής ενέργειας της ολιγομυκίνης με το λογισμικό MacroModel (123) με πεδίο δυνάμεων OPLS_2005, χωρίς χρήση διαλύτη με διηλεκτρική σταθερά για την ηλεκτροστατική διεργασία. (Εικόνα 46, Εικόνα 47)

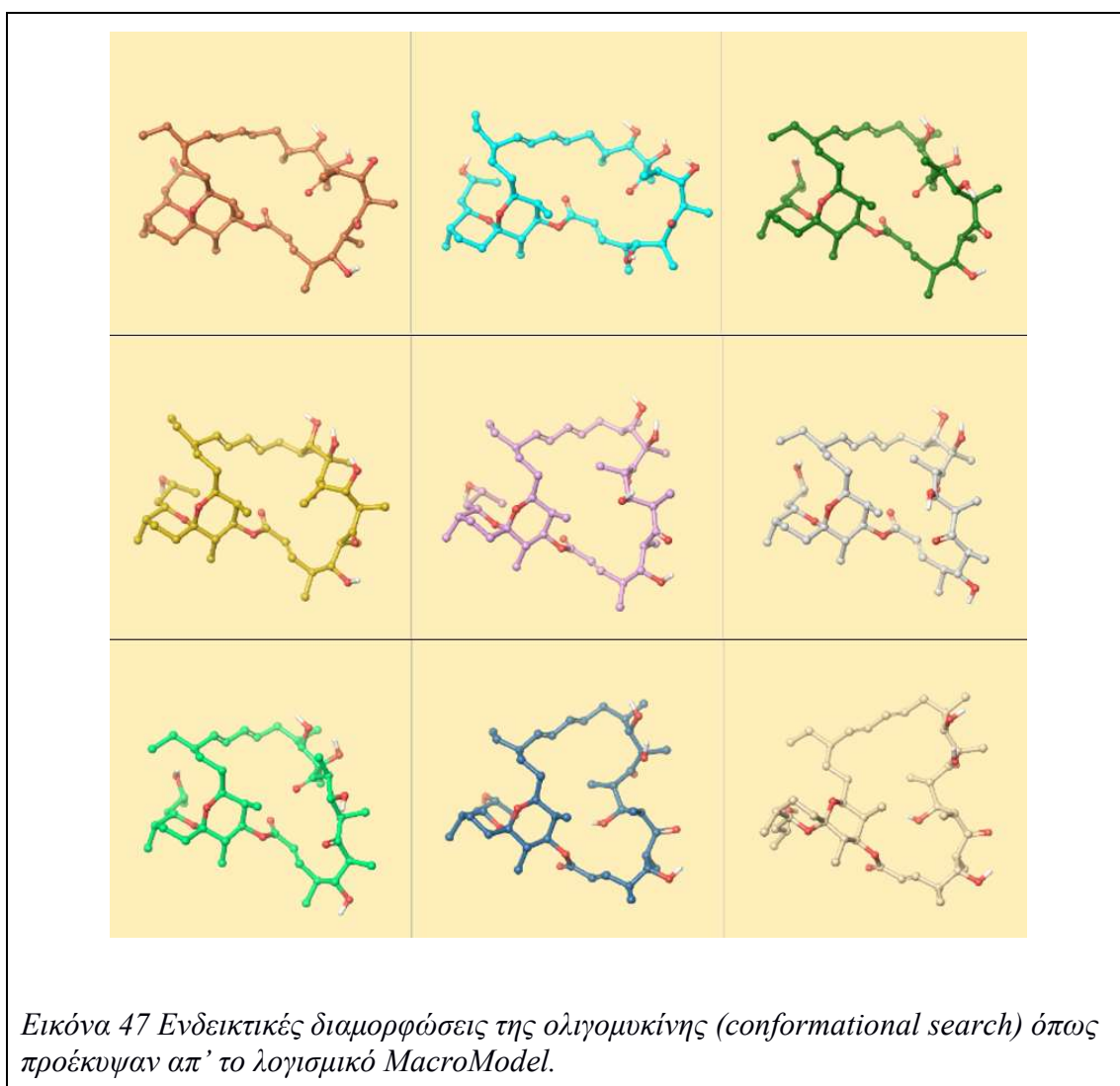


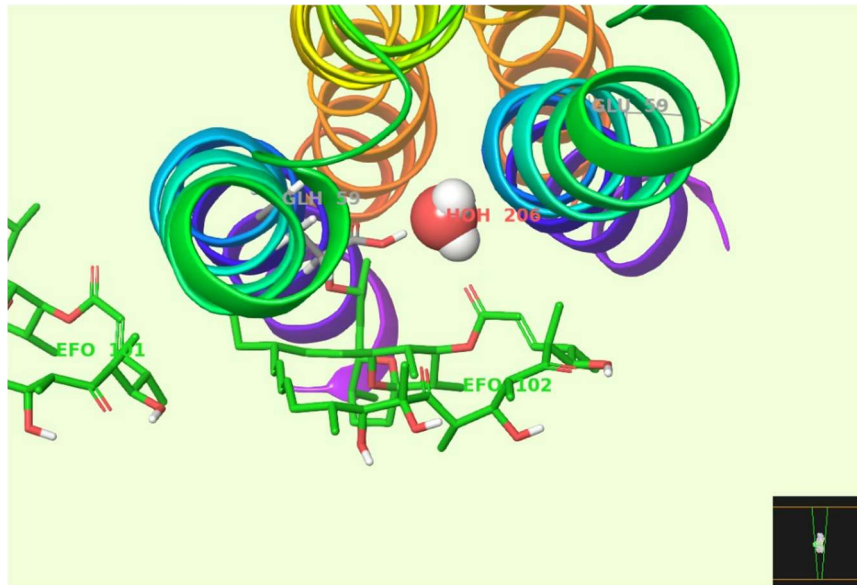
Εικόνα 46 Ενδεικτικές διαμορφώσεις της ολιγομυκίνης (conformational search) σε υπέρθεση όπως προέκυψαν απ' το λογισμικό MacroModel.

Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός πρόσδεσης των διαμορφώσεων της ολιγομυκίνης χρησιμοποιώντας το λογισμικό Glide με τυπική ακρίβεια (Standard Precision, SP) και εύκαμπτη πρόσδεση (Flexible ligand sampling) στην κοιλότητα μεταξύ κυλίνδρου c υπομονάδων και υπομονάδας a , ώστε να γίνει επικύρωση του μοντέλου μας. Σε περίπτωση που καμία διαμόρφωση της ολιγομυκίνης δεν κατάφερε να προσδεθεί, λόγω μεγάλου μεγέθους της, με τη χρήση του εργαλείου Transform του Maestro πραγματοποιούσαμε σταδιακές μετακινήσεις στον x άξονα της υπομονάδας a σε σχέση με τον δακτύλιο. Τέλος, ύστερα από σταδιακές δοκιμασίες μετακινήσεων ($x= 2, 3, 4, 4.5, 5 \text{ \AA}$) φάνηκε ότι κατά την μετακίνηση 5 \AA της υπομονάδας a κατά τον x άξονα, η ολιγομυκίνη μπορεί να προσδεθεί. (Εικόνα 49) Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω υπολογισμοί πρόσδεσης της ολιγομυκίνης στην μοντελοποιημένη πρωτεΐνη, ώστε να διερευνηθεί αν η πρόσδεσή της μπορεί να είναι ακριβέστερη σε σχέση με τη διαμόρφωση της κρυσταλλογραφίας, σε σύγκριση με τους υπολογισμούς τυπικής ακρίβειας (Standard Precision, SP) που είχαν πραγματοποιηθεί. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πρόσδεση εξαιρετικής ακρίβειας (Extra Precision, XP), με επιλογή την έξοδο 10 διαμορφώσεων ανά δομή ολιγομυκίνης, την οποία είχαμε προηγουμένως επεξεργαστεί το λογισμικό Ligprep.

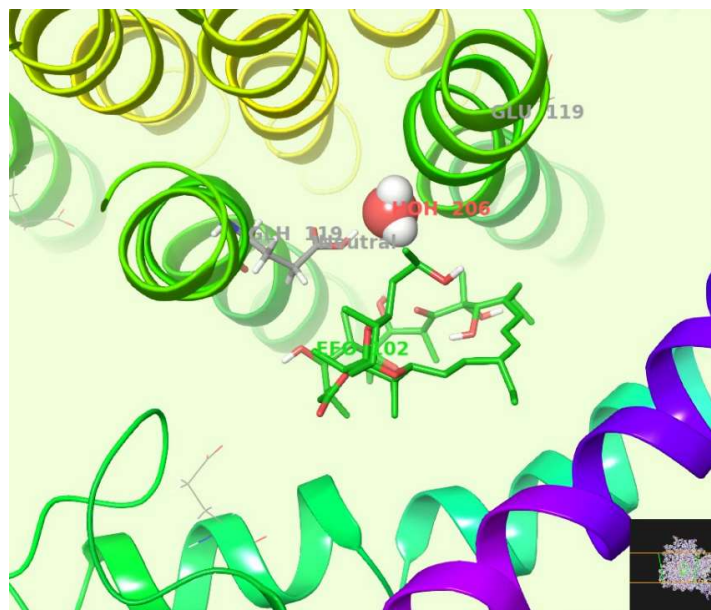
(Εικόνα 50) Η διαμόρφωση της ολιγομυκίνης μεταξύ της κρυσταλλογραφίας (μόνο δακτύλιος c υπομονάδων, Εικόνα 48) και των υπολογισμών πρόσδεσης στην μοντελοποιημένη πρωτεΐνη εμφανιζόταν ελαφρώς διαφορετικός, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη της a υπομονάδας του μοντέλου, η οποία αναγκάζει την ένωση να προσδεθεί με διαφορετικό τρόπο.

Συνεχίζοντας με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθήσαμε για την θέση πρόσδεσης της κερκετίνης, η μοντελοποιημένη αυτή δομή (απόσταση 5 Å της υπομονάδας a κατά τον x άξονα από τον δακτύλιο c υπομονάδων, στην οποία μπορεί να προσδεθεί η ολιγομυκίνη) χρησιμοποιήθηκε για υπολογισμούς πρόσδεσης της χημειοθήκης Pharmalab, ενώ με τη χρήση του Ligand Filtering επιλέχθηκαν οι 5 ενώσεις με το υψηλότερο σκορ, για να αξιολογηθούν in vitro.

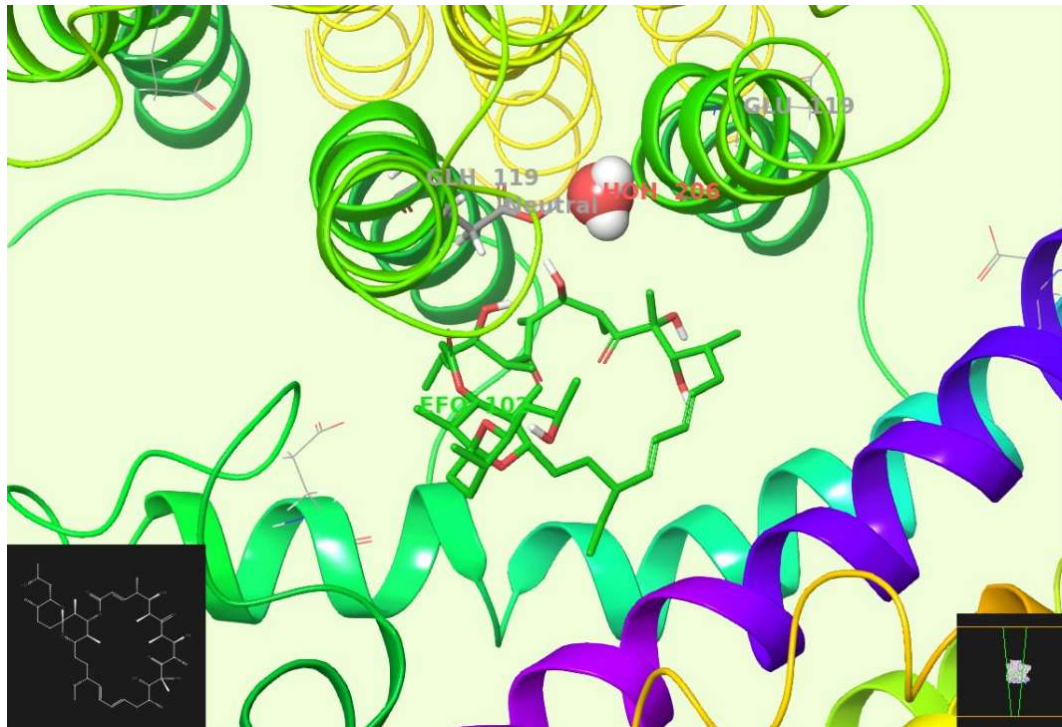




Εικόνα 48 Τρόπος πρόσδεσης της ολιγομυκίνης (πράσινο) στην *c* υπομονάδα του δακτυλίου της ATP συνθάσης όπως εμφανίζεται στην κρυσταλλογραφία. Με γκρι είναι το γλουταμινικό οξύ, το οποίο θεωρείται απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου.



Εικόνα 49 Τρόπος πρόσδεσης της δομής της ολιγομυκίνης με το υψηλότερο σκορ με υπολογισμούς τυπικής ακρίβειας (*Standard Precision, SP*) και εύκαμπτης πρόσδεσης (*Flexible ligand sampling*) στο μοντελοποιημένο *F₀* τμήμα της ATP συνθάσης του *mus musculus*. Η θέση της *a* υπομονάδας (κάθετες πρωτεϊνικές έλικες) βρίσκεται σε απόσταση $x=5 \text{ \AA}$ ώστε να μπορεί να προσδεθεί η ολιγομυκίνη.

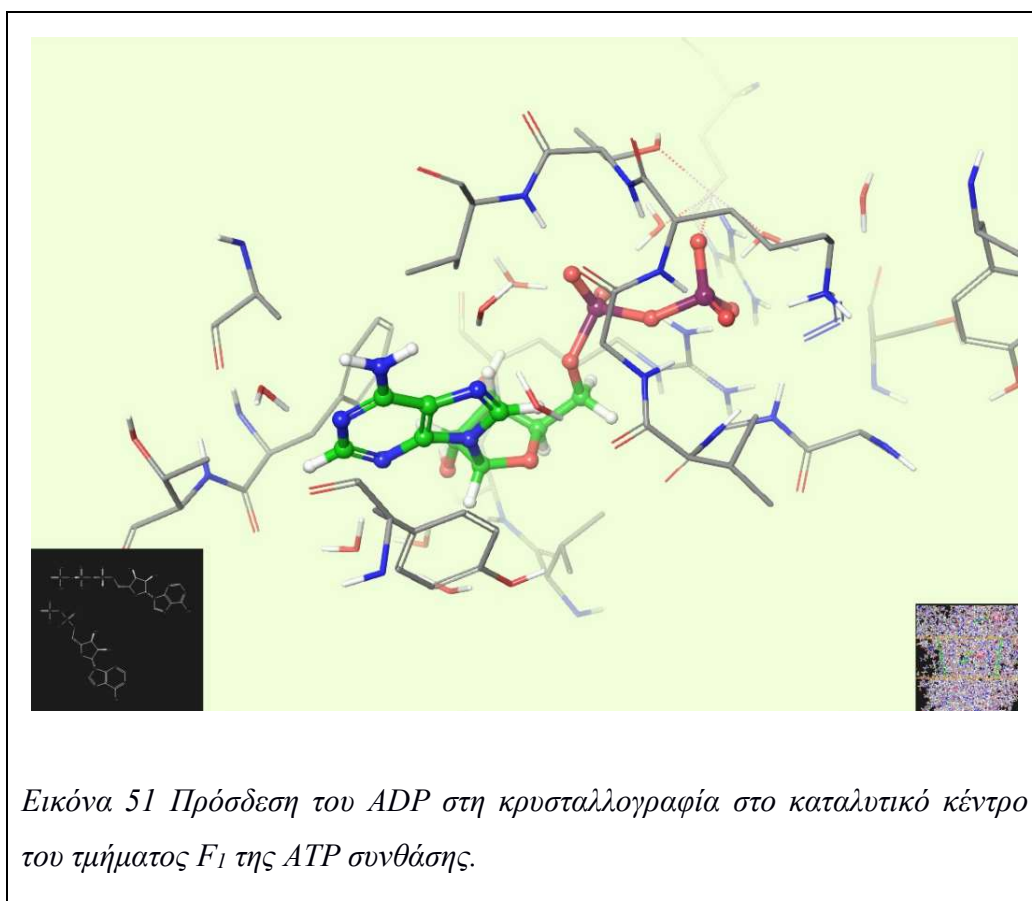


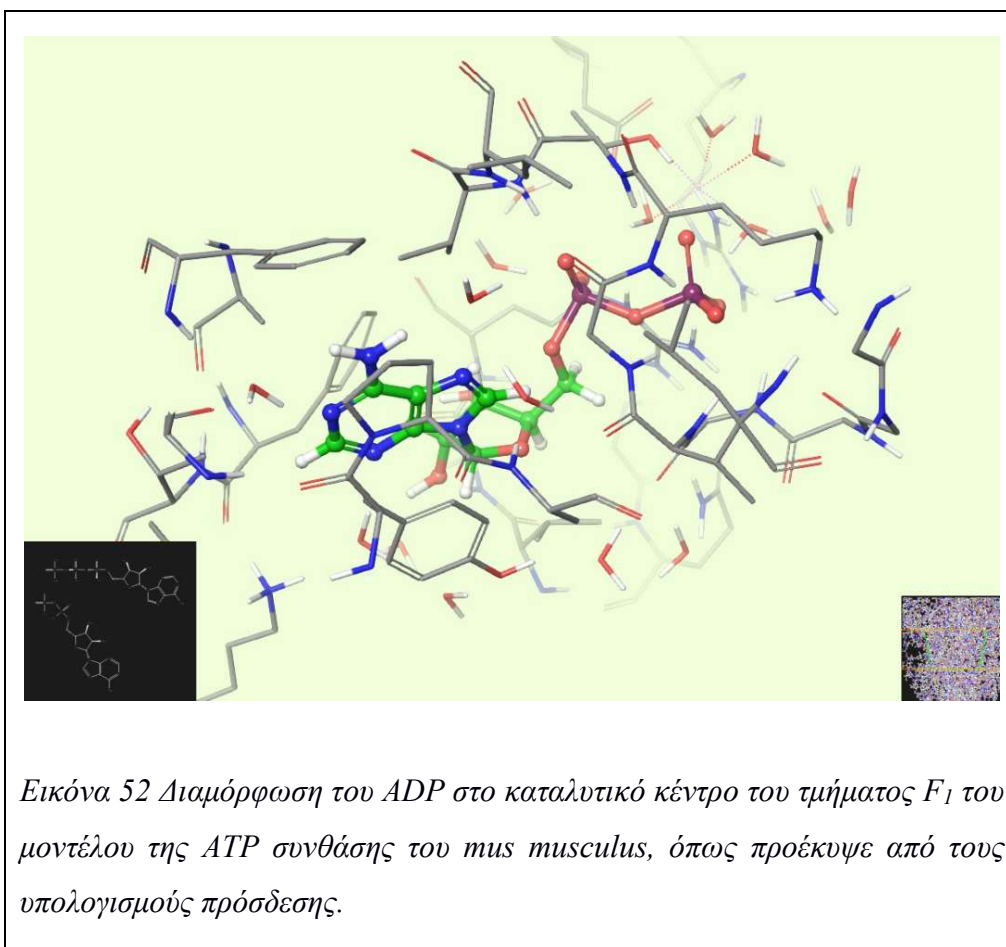
Εικόνα 50 Θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης όπως προέκυψε από υπολογισμούς πρόσδεσης εξαιρετικής ακρίβειας (Extra Precision, XP) στο μοντελοποιημένο F_0 τμήμα της ATP συνθάσης του *mus musculus*.

VI.6.3 Υπολογισμοί πρόσδεσης στη καταλυτική περιοχή του τμήματος F_1

Στη ενότητα III.11.1 αναφερθήκαμε στην πρόσδεση του αζιδίου στο καταλυτικό κέντρο της ATP συνθάσης, μέσω του οποίου γίνεται αναστολή της υδρόλυσης του ATP το οποίο μπορούμε να παρατηρήσουμε και στην κρυσταλλογραφία με PDB ID 2CK3 (31). Από την κρυσταλλογραφία αυτή αφαιρέσαμε το αζίδιο και στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης του ADP πάνω στην ίδια την πρωτεΐνη (χωρίς όμως αζίδιο). Το ADP βρισκόταν στην ίδια θέση, με τη θέση που καταλάμβανε στην κρυσταλλογραφία, οπότε προκύπτει το συμπέρασμα ότι έχουμε ένα επικυρωμένο μοντέλο. Στη συνέχεια, στοιχίσαμε το τμήμα F_1 της μοντελοποιημένης πρωτεΐνης του *mus musculus* που έχουμε δημιουργήσει, πάνω στην δομή της κρυσταλλογραφίας με PDB ID 2CK3 και διαγράψαμε τα άτομα της

πρωτεΐνης, κρατώντας όμως τα μόρια νερού και το ADP. Τέλος ενοποιήσαμε το ADP, το αζίδιο και τα μόρια νερού της κρυσταλλογραφημένης πρωτεΐνης, με το μοντέλο του τμήματος F₁ του *mus musculus*. Προετοιμάσαμε την δομή για περαιτέρω υπολογισμούς με τον “Οδηγό Προετοιμασίας Πρωτεϊνών” και τέλος αφαιρέσαμε το μόριο αζιδίου. Συνεχίζοντας, δημιουργήσαμε το Grid με βάση το μόριο ADP στην καταλυτική θέση και πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης του ίδιου του ADP με επιλογή πρόσδεσης εξαιρετικής ακρίβειας (Extra Precision, XP) ώστε να επικυρώσουμε το μοντέλο πρόσδεσης. Παρατηρήθηκε ότι το ADP προσδένεται στην ίδια θέση του μοντέλου της ATP συνθάσης του *mus musculus* με την κρυσταλλογραφία. (Εικόνα 51, Εικόνα 52) Τέλος πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης της χημειοθήκης Pharnalab (SP) στο καταλυτικό κέντρο της ATP συνθάσης, με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε προηγουμένως. Οι ενώσεις με τα 5 καλύτερα σκορ πρόσδεσης επιλέχθηκαν για να αξιολογηθούν *in vitro*.

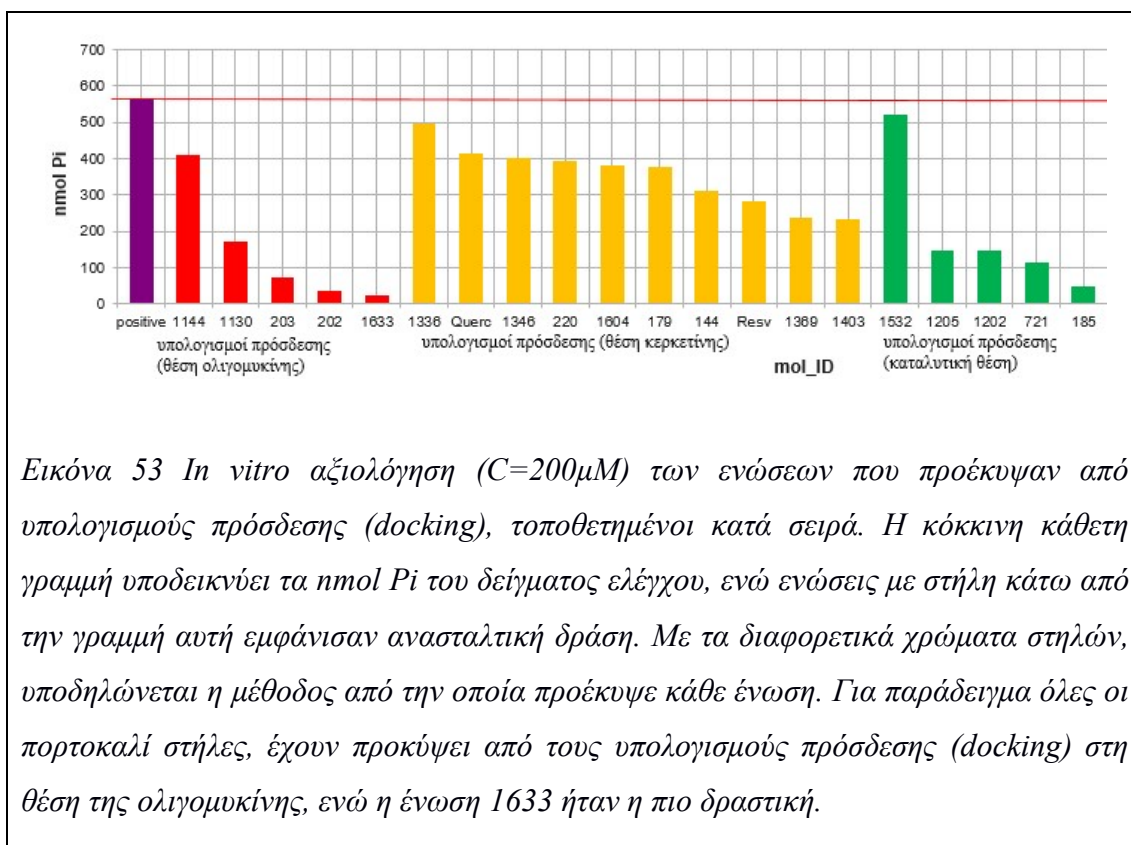




Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς, προέκυψε η τελική λίστα ενώσεων της Pharnalab, που αξιολογήθηκε *in vitro*, η οποία βρίσκεται στο Παράρτημα 4 και περιλαμβάνει τις ενώσεις με κορυφαίο σκορ κατά τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο:

- 1) της κερκετίνης
- 2) της ολιγομυκίνης
- 3) του καταλυτικού κέντρου του τμήματος F₁

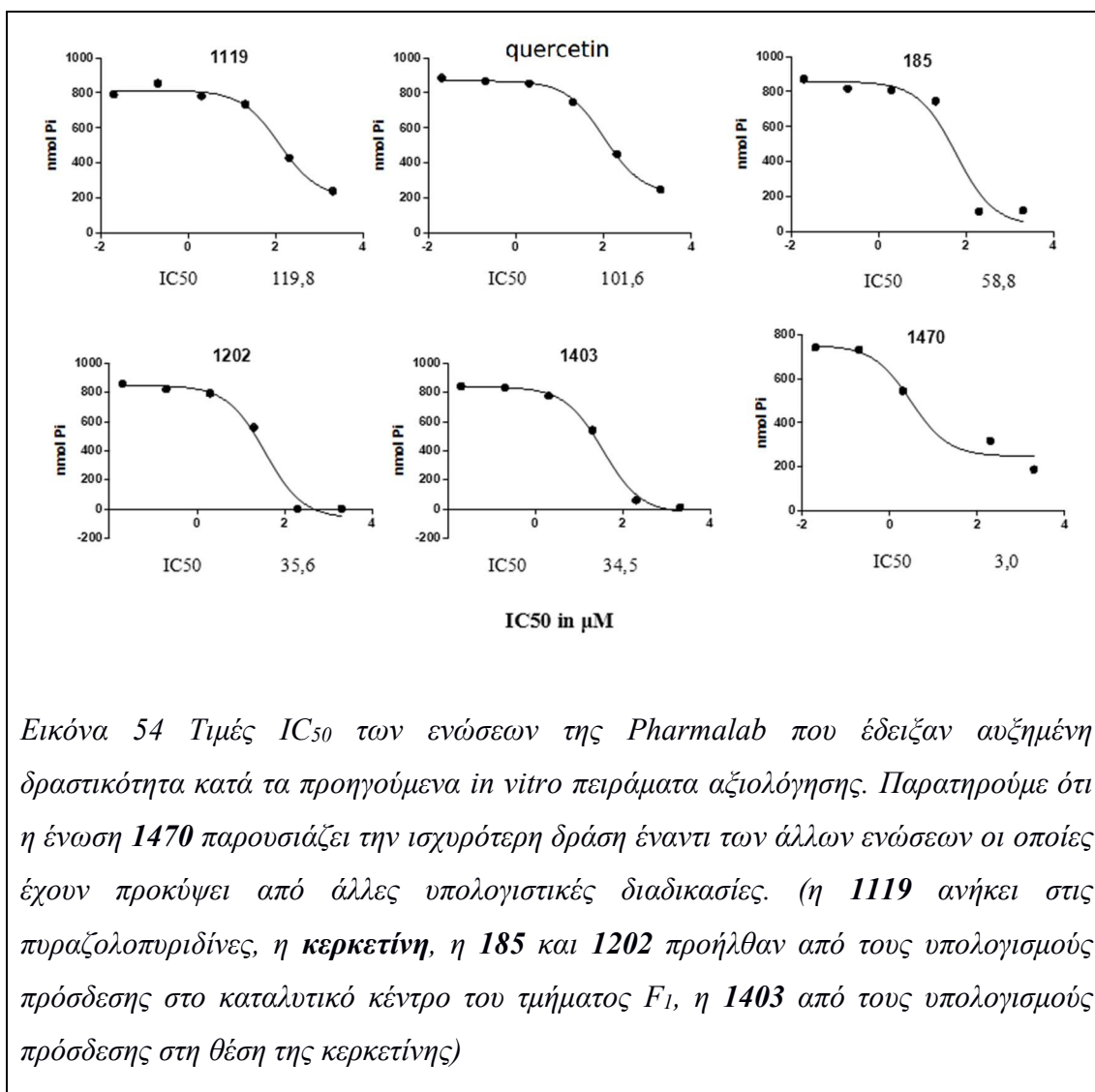
Το *in vitro* πείραμα έγινε σύμφωνα με την διάταξη που βρίσκεται στην ενότητα V.2.4 και τα αποτελέσματα αυτής βρίσκονται στην *Εικόνα 53*.



Συμπερασματικά, τα μοντέλα που είχαν δημιουργηθεί για τους υπολογισμούς πρόσδεσης στη θέση της ολιγομυκίνης, της κερκετίνης και της καταλυτικής θέσης του τμήματος F₁ επαληθεύτηκαν, εφόσον όλες οι ενώσεις που προέκυψαν από αυτούς εμφάνισαν δράση (κόκκινες, κίτρινες και πράσινες στήλες στην *Εικόνα 53*).

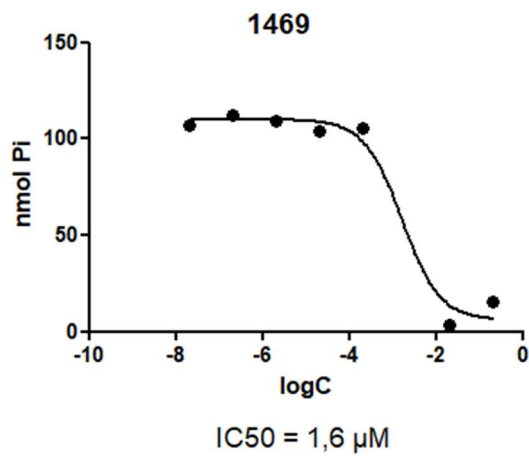
VI.7 Προσδιορισμός IC₅₀

Στις προηγούμενες ενότητες πραγματοποιήθηκαν αξιολογήσεις των ενώσεων της χημειοθήκης Pharmlab που είχαν προέλθει από ποικίλες υπολογιστικές μεθόδους (υπολογισμούς πρόσδεσης και ομοιότητας). Για περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων αυτών, πραγματοποιήθηκε *in vitro* πείραμα για τον καθορισμό της τιμής IC₅₀ των κορυφαίων αποτελεσμάτων των αξιολογήσεων αυτών σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα V.2.5 Τα αποτελέσματα αυτού του *in vitro* πειράματος των ενώσεων που βρίσκονται στο Παράρτημα 5 παρουσιάζονται στην *Εικόνα 54*.



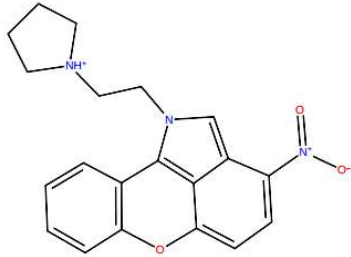
Εικόνα 54 Τιμές IC_{50} των ενώσεων της Pharmalab που έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα κατά τα προηγούμενα *in vitro* πειράματα αξιολόγησης. Παρατηρούμε ότι η ένωση **1470** παρουσιάζει την ισχυρότερη δράση έναντι των άλλων ενώσεων οι οποίες έχουν προκύψει από άλλες υπολογιστικές διαδικασίες. (η **1119** ανήκει στις πυραζολοπυριδίνες, η **κερκετίνη**, η **185** και **1202** προήλθαν από τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο του τμήματος F_1 , η **1403** από τους υπολογισμούς πρόσδεσης στη θέση της κερκετίνης)

Με αυτό το *in vitro* πείραμα επιβεβαιώθηκε ότι οι ενώσεις με σκελετό ανάλογης δομής με την ένωση 1470 έχουν αυξημένη δράση ως αναστολείς της ATP συνθάσης σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες αναστολέων. Ως συνέχεια της διερεύνησης της δράσης των ενώσεων αυτών πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς των τιμών της IC_{50} της ένωσης 1469 (ακριδίνη) σύμφωνα με την ενότητα V.2.5 η οποία εμφανίζει αυξημένη δράση στα μέχρι τώρα πραγματοποιηθέντα πειράματα. Αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνονται στην Εικόνα 55.



Εικόνα 55 IC₅₀ της δομής με MOL ID 1469

Ύστερα από την αποτίμηση της IC₅₀ των δομών αυτών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις με σκελετό ανάλογης δομής με την ένωση 1470 με IC₅₀ 3,0 μM όπως η ακριδίνη 1469 με IC₅₀ 1,6 μM εμφανίζουν ισχυρή αναστολή της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης.

Ένωση	Δομή	IC ₅₀ (μM)
1470		3,0
1469	- (μη δημοσιοποιημένο)	1,6

VI.8 Υπολογισμοί πρόσδεσης και ομοιότητας της χημειοθήκης NCI

Η χημειοθήκη της NCI (National Cancer Institute) περιλαμβάνει 266.151 ενώσεις. Χρησιμοποιώντας τον υπερυπολογιστή ARIS (Advanced Research Information System) του Εθνικού Δικτύου Έρευνας και Τεχνολογίας έχουμε τη δυνατότητα να πραγματοποιούμε σε σύντομο χρονικά διάστημα υπολογισμούς σε χημειοθήκες μεγάλου όγκου όπως της NCI. Ενώσεις οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη δράση *in silico* και βρίσκονται σε διαθεσιμότητα, θα μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* πειράματα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό ROCS για να πραγματοποιήσουμε υπολογισμούς ομοιότητας με πρότυπο (query): 1) την ένωση **BMS** η οποία έχει αναφερθεί στην ενότητα III.12.1, τις ενώσεις με MOL ID 2) **1112**, 3) **1124**, 4) **1470** της χημειοθήκης Pharmalab, οι οποίες έχουν δείξει *in vitro* δράση, 5) την ένωση με MOL ID **198** που είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, ενώ ως βιβλιοθήκη (database) σάρωσης χρησιμοποιήθηκε η χημειοθήκη NCI ύστερα από επεξεργασία με το λογισμικό OMEGA, με το οποίο προκύπτουν περαιτέρω διαμορφώσεις των ενώσεων, όπως προαναφέρθηκε. Τα αποτελέσματα όλων αυτών των υπολογισμών (5000 ενώσεις με το υψηλότερο σκορ ομοιότητας ανά πρότυπη ένωση – query) έγιναν μετατροπή σε αρχείο csv μέσω του λογισμικού VIDA (124) της OPEN EYE. Στη συνέχεια με το λογισμικό LibreOffice Calc δημιουργήθηκε ένας αλγόριθμος με τον οποίο γίνεται η συναίνεση όλων των παραπάνω καταχωρήσεων (5000 κωδικοί ενώσεων ανά πρότυπη ένωση). Χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία όπως η συνάρτηση VLOOKUP, ο μέσος όρος (AVERAGE), η τυπική απόκλιση (STDEV) και η λειτουργία λογικού ελέγχου (IF). Ως τελικό αποτέλεσμα προέκυψαν οι ενώσεις οι οποίες βρίσκονται ως κοινή καταχώρηση πολλαπλές φορές (για παράδειγμα η ένωση με κωδικό 754811 βρίσκεται στα πρώτα 5000 αποτελέσματα των μελετών ομοιότητας των **BMS**, **1112**, **1124**, **1470** και **198**). Ταυτόχρονα εξετάστηκε η σειρά κατάταξης από τους υπολογισμούς ομοιότητας, ώστε να προτιμώνται οι ενώσεις με την συνολικά υψηλότερη κατάταξη (υψηλή κατάταξη σε όλες τις πρότυπες ενώσεις και όχι πολύ υψηλή κατάταξη σε μία πρότυπη ένωση και πολύ κατώτερη σε μία άλλη). Τέλος, σε αυτές τις ενώσεις (οι οποίες είχαν το υψηλότερο σκορ λόγω συναίνεσης των

αποτελεσμάτων) προστέθηκαν και αυτές με την υψηλότερη κατάταξη στους επί μέρους υπολογισμούς ομοιότητας των πρότυπων ενώσεων. Επιπλέον προστέθηκαν ενώσεις που προέκυψαν από μελέτη ομοιότητας της ένωσης 1469 που είχε εμφανίσει σημαντική δράση, ώστε να προκύψει ένα τελικό σετ μορίων εκ των οποίων τα πλέον διαθέσιμα θα δοκιμαστούν in vitro. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στο Παράρτημα 6.

Επιπροσθέτως, με βάση τα Grid που είχαν δημιουργηθεί για τους υπολογισμούς πρόσδεσης των ενώσεων της χημειοθήκης Pharmalab στα οποία αναφερθήκαμε εκτενέστερα στις ενότητες VI.6.1, VI.6.2, VI.6.3 και με τη βοήθεια του υπερυπολογιστή ARIS, έγιναν υπολογισμοί πρόσδεσης της χημειοθήκης NCI στις 3 περιοχές πρόσδεσης: α) της ολιγομυκίνης, β) της κερκετίνης, γ) του καταλυτικού κέντρου του τμήματος F₁ της ATP συνθάσης. Οι ενώσεις με τα 10 υψηλότερα σκορ πρόσδεσης σε κάθε θέση βρίσκονται στο Παράρτημα 7, στο Παράρτημα 8 και στο Παράρτημα 9.

VII. Συμπεράσματα

Η ATP συνθάση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του ATP στα μιτοχόνδρια. Κάτω όμως από συγκεκριμένες συνθήκες μειωμένης παροχής οξυγόνου, όπως στην ισχαιμία, παρατηρείται αντιστροφή της δράσης της ATP συνθάσης κατά την οποία υδρολύει το ATP. Η αλλαγή αυτή της δράσης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αποθεμάτων του ATP, με σκοπό την διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. (25,51,125) Η μείωση όμως αυτή οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων του ATP και κυτταρικό θάνατο. (25,50,126)

Εκλεκτικοί αναστολείς αυτής της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση, όπως οι ενώσεις **BMS** (1) και **BTB** (25), αναστέλλουν την ελάττωση των αποθεμάτων του ATP, χωρίς να επιδρούν στην σύνθεσή του, με αποτέλεσμα την μείωση της καρδιακής νέκρωσης κατά την ισχαιμία. Παράλληλα, ενώσεις που δρουν σε θέσεις πρόσδεσης της ATP συνθάσης έχουν την ικανότητα να την αναστέλλουν. Είναι γνωστά τρία τουλάχιστον κέντρα πρόσδεσης αναστολέων: α) το κέντρο που προσδέεται η κερκετίνη στο τμήμα F_1 της ATP συνθάσης, β) η θέση κατάλυσης του ATP-ADP, και γ) η θέση που προσδέεται η ολιγομυκίνη πάνω στο ρότορα του τμήματος F_0 .

Με σκοπό την ανακάλυψη νέων αναστολέων της ATP συνθάσης, κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία του τρισδιάστατου μοντέλου της πρωτεΐνης για το είδος *mus musculus* βασισμένο στην ύπαρξη τρισδιάστατων δομών άλλων ειδών. Για τη δημιουργία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες δύο πρωτεΐνες: η 5ARA και η 2XND, με βάση τις οποίες έγινε εφικτή η κατασκευή αλλά και η στοίχιση των υπομονάδων της ATP συνθάσης του *mus musculus*.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική μέθοδος ομοιότητας (similarity) της χημειοθήκης Pharmalab του Πανεπιστημίου Αθηνών με βάση τον γνωστό εκλεκτικό αναστολέα **BMS**. Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε δεδομένα που προκύπτουν από τη δομή ενός γνωστού προσδέματος (πχ. του αναστολέα **BMS**), χωρίς να είναι απαραίτητη η γνώση του μηχανισμού δράσης και η θέση πρόσδεσής του. Από τους υπολογισμούς ομοιότητας με βάση το **BMS**, προέκυψε η ένωση **1112** της χημειοθήκης Pharmalab, ενώ η δράση της στην υδρόλυση της ATP συνθάσης προσδιορίστηκε *in vitro*, με καθορισμό της τιμής IC_{50} (316,3 μ M). Η τιμή αυτή της IC_{50} είναι αντίστοιχη με τιμές άλλων γνωστών αναστολέων της ATP συνθάσης όπως η κερκετίνη (115,116) και η ρεσβερατρόλη

(115,117) οι οποίες συνεκτιμήθηκαν στο ίδιο *in vitro* πείραμα. Το αποτέλεσμα αυτό, μας οδήγησε στον προσδιορισμό της ένωσης **1112** (πυραζολοπυριδίνη) ως ένωση-οδηγός, στην οποία θα μπορούσαμε να βασιστούμε για την ανακάλυψη πιο δραστικών αναλόγων, τα οποία είναι διαθέσιμα στην χημειοθήκη Pharmalab.

Συνεχίζοντας, διευρύνουμε τις πιθανές διαμορφώσεις των ενώσεων της Pharmalab με τη βοήθεια κατάλληλων λογισμικών, τις οποίες ακολούθως χρησιμοποιήσαμε για μελέτες υπολογισμού ομοιότητας (similarity) με πρότυπες ενώσεις τους γνωστούς αναστολείς **BMS** και **BTB**, αλλά και την ένωση-οδηγό **1112** η οποία προέκυψε από το *in vitro* πείραμα που προηγήθηκε. Στο σύνολο των ενώσεων που οδήγησαν αυτές οι διεργασίες, πραγματοποιήθηκε *in vitro* αξιολόγηση στα 200μM, από την οποία 2 ενώσεις παρουσίασαν ισχυρή δράση. Η ένωση **1124** (πυραζολοπυριδίνη) η οποία είναι ανάλογο της **1112** και το συμπυκνωμένο παράγωγο ξανθόνης **1470** το οποίο προέκυψε από μελέτη ομοιότητας του γνωστού αναστολέα **BMS**.

Κατά τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων μπορούμε να εκμεταλλευτούμε την δομή μιας πρωτεΐνης στην οποία είναι γνωστή η θέση πρόσδεσης αναστολέων. Στην ATP συνθάση είναι διαθέσιμες οι δομές που περιέχουν τη θέση πρόσδεσης της κερκετίνης και της ολιγομυκίνης, αλλά και του ATP-ADP στη καταλυτική περιοχή. Για τους υπολογισμούς πρόσδεσης (docking) στις θέσεις αυτές, χρησιμοποιήσαμε μοντελοποιημένη πρωτεΐνη του *mus musculus* που κατασκευάσαμε με ομόλογες πρωτεΐνες, την οποία στη συνέχεια στοιχίσαμε με την πρωτεΐνη που περιέχει το ενεργό κέντρο όπου προσδέεται ο αναστολέας και τέλος, αφαιρέσαμε την πρωτεΐνη που περιέχει τον αναστολέα. Με αυτή τη μεθοδολογία καταλήγουμε σε μία τελική δομή στην οποία το πρόσδεμα βρίσκεται στην αντίστοιχη κοιλότητα πρόσδεσης της ATP συνθάσης του *mus musculus*. Πιο συγκεκριμένα, μελετώντας με αυτό το τρόπο τη περιοχή πρόσδεσης της κερκετίνης, επαληθεύτηκε και *in vitro* η σημαντικότητα της χρήσης των μορίων νερού στο ενεργό κέντρο. Επιπλέον, έγινε δυνατή η χρήση της κρυσταλλογραφημένης δομής του τμήματος F₀ του ζυμομύκητα η οποία περιέχει την ολιγομυκίνη, αλλά δεν περιέχει την υπομονάδα a. Η υπομονάδα όμως αυτή, είχε κατασκευαστεί στο μοντέλο της συνολικής ATP συνθάσης του *mus musculus*, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η διερεύνηση του τρόπου πρόσδεσης της ολιγομυκίνης παρουσία αυτής. Ειδικότερα, φάνηκε ότι για να είναι δυνατή η πρόσδεση της ολιγομυκίνης, η ελάχιστη απόσταση της υπομονάδας a από τον ρότορα c υπομονάδων είναι 5 Å. Τέλος, μελετήθηκε η καταλυτική περιοχή του ATP-ADP, με αντίστοιχη

μεθοδολογία με αυτήν που περιγράφηκε. Συνεπώς, με βάση τις 3 παραπάνω περιοχές πρόσδεσης που αναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί πρόσδεσης (Docking) της χημειοθήκης Pharmalab στο είδος *mus musculus*. Παράλληλα με τους υπολογισμούς πρόσδεσης, έγιναν οι τελευταίοι υπολογισμοί ομοιότητας με πρότυπες ενώσεις τις **1124** και **1470** οι οποίες παρουσίασαν ανασταλτική δράση της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση κατά το *in vitro* πείραμα που είχε προηγηθεί. Το σύνολο των ενώσεων που επιλέχθηκαν από τις παραπάνω διεργασίες (υπολογισμοί πρόσδεσης των 3 θέσεων και ομοιότητας με βάση τις ενώσεις **1124**, **1470**) αξιολογήθηκαν *in vitro*.

Τα αποτελέσματα των *in vitro* μεθόδων μπόρεσαν όχι μόνο να αναδείξουν τις πιο δραστικές ενώσεις αλλά και να επαληθεύσουν ως ένα βαθμό τα μοντέλα των *in silico* υπολογισμών. Συγκεκριμένα, 35 στις 48 (73%) ενώσεις εμφάνισαν αναστολή (σε συγκέντρωση 0,2 mM), επαληθεύοντας το υπολογιστικό μοντέλο σχεδιασμού φαρμάκων (υπολογισμοί πρόσδεσης και ομοιότητας, ενότητες VI.5 και VI.6). Σημαντικότερο όμως είναι το γεγονός ότι μεταξύ των 35 μορίων που εμφάνισαν αναστολή, 7 μόρια είχαν σκελετό ανάλογης δομής (συμπυκνωμένο παράγωγο ξανθόνης και ακριδίνες), παρουσιάζοντας ενισχυμένη δράση (48 – 82.5% αναστολή της υδρόλυσης του ATP από την ATP συνθάση). Παρόμοιες δομές ακριδινών με τις υπό μελέτη ακριδίνες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως αναστολείς της ATP συνθάσης, (115,127) με διαφορετικό όμως σκελετό. Αντιθέτως, δεν βρέθηκαν αντίστοιχα δεδομένα για τις πυραζολοπυριδίνες (όπως οι υπό μελέτη ενώσεις που είναι ανάλογες των **1112** και **1124**).

Από τις ενώσεις που αξιολογήθηκαν, διερευνήθηκαν περαιτέρω αυτές με την ισχυρότερη δράση για προσδιορισμό της τιμής IC_{50} μέσω *in vitro* πειραμάτων. Τα αποτελέσματα των τιμών IC_{50} υποδεικνύουν ότι η ένωση **1470** και η **1469** με σκελετό ανάλογης δομής, παρουσιάζουν ισχυρή δράση συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες ενώσεων. (ανάλογα πυραζολοπυριδινών, προσδέτες στη θέση της κερκετίνης, ολιγομυκίνης, ATP-ADP). Χαρακτηριστικές είναι οι τιμές IC_{50} που προσδιορίστηκαν για τις ενώσεις αυτές, με 3,0 μ M για την **1470** και 1,6 μ M για την **1469**, οι οποίες δρουν ανασταλτικά στην υδρόλυση του ATP από την ATP συνθάση. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές τα επόμενα βήματα που κρίνονται απαραίτητα είναι:

A) η περαιτέρω διερεύνηση των σχέσεων δομής-δράσης αυτής της κατηγορίας ενώσεων και του μηχανισμού δράσης τους, αλλά και της βελτιστοποίησής τους, μέσω

της σύνθεσης αναλόγων,

Β) ο καθορισμός της εκλεκτικότητας της δράσης τους σε σχέση με την σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση,

Γ) η μελέτη της καρδιοπροστατευτικής τους δράσης σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

VIII. Βιβλιογραφία

1. Grover, G. J. & Malm, J. Pharmacological Profile of the Selective Mitochondrial F_1F_0 ATP Hydrolase Inhibitor BMS-199264 in Myocardial Ischemia. *Cardiovasc. Ther.* **26**, 287–296 (2008).
2. Kedem, J., Grover, G. J. & Weiss, H. R. Nitroglycerin improves the distribution of regional oxygenation in partially ischemic canine myocardium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **7**, 760–6 (1985).
3. Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Adrenergic receptor antagonists. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. The pharmacological basis of therapeutics, 8th ed; 221–243. (1990).
4. Triggle DJ. Calcium antagonists. In: Antonaccio M, editor. Cardiovascular pharmacology, 3rd ed.; 107–160. (1990).
5. Murry, C. E., Richard, V. J., Reimer, K. A. & Jennings, R. B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ. Res.* **66**, 913–31 (1990).
6. Grover, G. J. & Sleph, P. G. Dissociation of cardiodepression from cardioprotection with calcium antagonists: diltiazem protects ischemic rat myocardium with a lower functional cost as compared with verapamil or nifedipine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **14**, 331–40 (1989).
7. Garlid, K. D. *et al.* Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* **81**, 1072–82 (1997).
8. Grover, G. J. *et al.* Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim: stereoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**, 156–62 (1991).
9. McPherson, C. D., Pierce, G. N. & Cole, W. C. Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K^+ channels involves high-energy phosphate preservation. *Am. J. Physiol.* **265**, H1809-18 (1993).
10. Κών/νος Ευσταθίου και Αθανάσιος Βαλαβανίδης . Η χημική ένωση του μήνα , website: www.chem.uoa.gr , Τμήμα Χημείας , ΕΚΠΑ

- http://195.134.76.37/chemicals/chem_ATP.htm.
11. Δημόπουλος ΚΑ, Αντωνοπούλου Σ: ‘Βασική Βιοχημεία’ (Κεφ. ‘Εισαγωγή στο μεταβολισμό’, σελ. 321-334), 2η έκδοση, 2009.
 12. Molecular Expressions Cell Biology: Mitochondria.
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria/mitochondria.html>.
 13. The Nobel Prize in Chemistry 1997.
https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/.
 14. Walker, J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, (2013).
 15. Stock, D., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science (80-.)*. **286**, (1999).
 16. Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16823–7 (2010).
 17. Walker, J. E., Runswick, M. J. & Saraste, M. Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F₁F₀ ATPases. *FEBS Lett.* **146**, 393–6 (1982).
 18. Junge, W. ATP synthase and other motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4735–7 (1999).
 19. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**, 299–302 (1997).
 20. Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M. & Capaldi, R. A. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₁F_o ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 898–902 (2001).
 21. Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621–628 (1994).
 22. Preiss, L. *et al.* Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci. Adv.* **1**, e1500106 (2015).

23. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13632–7 (2007).
24. Lang, D. R. & Racker, E. Effects of quercetin and F1 inhibitor on mitochondrial ATPase and energy-linked reactions in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **333**, 180–6 (1974).
25. Ivanov, F. *et al.* The compound BTB06584 is an IF1 -dependent selective inhibitor of the mitochondrial F1 Fo-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 4193–4206 (2014).
26. Power, J., Cross, R. L. & Harris, D. A. Interaction of F1-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. Studies using radioiodinated inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 128–41 (1983).
27. Rouslin, W., Erickson, J. L. & Solaro, R. J. Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. *Am. J. Physiol.* **250**, H503–8 (1986).
28. Cabezon, E., Butler, P. J. G., Runswick, M. J. & Walker, J. E. Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH. *J. Biol. Chem.* **275**, 25460–25464 (2000).
29. Cabezón, E., Runswick, M. J., Leslie, A. G. & Walker, J. E. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J.* **20**, 6990–6 (2001).
30. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15671–6 (2007).
31. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8646–9 (2006).
32. Hirono-Hara, Y. *et al.* Pause and rotation of F(1)-ATPase during catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13649–54 (2001).
33. Jault, J. M. *et al.* The alpha 3 beta 3 gamma complex of the F1-ATPase from

- thermophilic *Bacillus* PS3 containing the alpha D261N substitution fails to dissociate inhibitory MgADP from a catalytic site when ATP binds to noncatalytic sites. *Biochemistry* **34**, 16412–8 (1995).
34. Vasilyeva, E. A., Minkov, I. B., Fitin, A. F. & Vinogradov, A. D. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics. *Biochem. J.* **202**, 9–14 (1982).
 35. Vasilyeva, E. A., Minkov, I. B., Fitin, A. F. & Vinogradov, A. D. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. *Biochem. J.* **202**, 15–23 (1982).
 36. Zhou, J. M., Xue, Z. X., Du, Z. Y., Melese, T. & Boyer, P. D. Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase. *Biochemistry* **27**, 5129–35 (1988).
 37. Hyndman, D. J., Milgrom, Y. M., Bramhall, E. A. & Cross, R. L. Nucleotide-binding sites on *Escherichia coli* F1-ATPase. Specificity of noncatalytic sites and inhibition at catalytic sites by MgADP. *J. Biol. Chem.* **269**, 28871–7 (1994).
 38. Murataliev, M. B., Milgrom, Y. M. & Boyer, P. D. Characteristics of the combination of inhibitory Mg²⁺ and azide with the F1 ATPase from chloroplasts. *Biochemistry* **30**, 8305–10 (1991).
 39. Weber, J. & Senior, A. E. Effects of the inhibitors azide, dicyclohexylcarbodiimide, and aurovertin on nucleotide binding to the three F1-ATPase catalytic sites measured using specific tryptophan probes. *J. Biol. Chem.* **273**, 33210–5 (1998).
 40. Wise, J. G., Latchney, L. R., Ferguson, A. M. & Senior, A. E. Defective proton ATPase of *uncA* mutants of *Escherichia coli*. 5'-Adenylyl imidodiphosphate binding and ATP hydrolysis. *Biochemistry* **23**, 1426–32 (1984).
 41. Hirono-Hara, Y. *et al.* Activation of pausing F1 motor by external force. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4288–93 (2005).
 42. Bald, D. *et al.* ATP synthesis by F0F1-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *J. Biol. Chem.* **273**, 865–70 (1998).

43. Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E. & Mueller, D. M. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13961–5 (2012).
44. Pogoryelov, D. *et al.* Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the Fo complex of ATP synthases. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 891–899 (2010).
45. Tuñón, I., Silla, E. & Pascual-Ahuir, J. L. Molecular surface area and hydrophobic effect. *Protein Eng.* **5**, 715–6 (1992).
46. Zheng, J. & Ramirez, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1115–23 (2000).
47. Atwal, K. S. *et al.* Small Molecule Mitochondrial F₁F₀ ATPase Hydrolase Inhibitors as Cardioprotective Agents. Identification of 4-(N-Arylimidazole)-Substituted Benzopyran Derivatives as Selective Hydrolase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **47**, 1081–1084 (2004).
48. Capaldi, R. A., Schulenberg, B., Murray, J. & Aggeler, R. Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the Escherichia coli ATP synthase. *J. Exp. Biol.* **203**, 29–33 (2000).
49. BTB06584 ≥98% (HPLC) | Sigma-Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1122?lang=en®ion=GR>.
50. Jennings, R. B., Reimer, K. A. & Steenbergen, C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**, 1383–95 (1991).
51. Rouslin, W., Broge, C. W. & Grupp, I. L. ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *Am. J. Physiol.* **259**, H1759-66 (1990).
52. Grover, G. J. *et al.* Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F₁F₀-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **287**, H1747–H1755 (2004).

53. Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S. & Choi, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 1686–1701 (2015).
54. Anderson, A. C. The process of structure-based drug design. *Chem. Biol.* **10**, 787–97 (2003).
55. Kalyaanamoorthy, S. & Chen, Y.-P. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov. Today* **16**, 831–839 (2011).
56. Andricopulo, A. D., Salum, L. B. & Abraham, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 771–90 (2009).
57. Cavagnaro, J. A. Outlook: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 469–475 (2002).
58. Silverman, R. B. & Holladay, M. W. *The organic chemistry of drug design and drug action, 2nd ed.* Amsterdam: Elsevier Academic Press. (2004).
59. Prathipati, P., Dixit, A. & Saxena, A. Computer-Aided Drug Design: Integration of Structure-Based and Ligand-Based Approaches in Drug Design. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **3**, 133–148 (2007).
60. Grinter, S. & Zou, X. Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. *Molecules* **19**, 10150–10176 (2014).
61. Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. & Cournia, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1923–1938 (2014).
62. Lavecchia, A. & Di Giovanni, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Curr. Med. Chem.* **20**, 2839–60 (2013).
63. Kutchukian, P. S. & Shakhnovich, E. I. *De novo* design: balancing novelty and confined chemical space. *Expert Opin. Drug Discov.* **5**, 789–812 (2010).
64. Rodrigues, T. & Schneider, G. Flashback Forward: Reaction-Driven De Novo Design of Bioactive Compounds. *Synlett* **25**, 170–178 (2013).
65. Vanommeslaeghe, K., Guvench, O., MacKerell, A. D. & Jr. Molecular

- mechanics. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 3281–92 (2014).
66. Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M. & Chintha, C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* **74**, 1–17 (2012).
 67. Lesk AM, C. C. The response of protein structures to amino-acid sequence changes. *Philos Trans R Soc London Ser B.* **317**, 345–56 (1986).
 68. Joo, K., Lee, J. & Lee, J. Methods for Accurate Homology Modeling by Global Optimization. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **857**, 175–188 (2011).
 69. Jacobson, M. P. *et al.* A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **55**, 351–367 (2004).
 70. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z. & Honig, B. On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations. *J. Mol. Biol.* **320**, 597–608 (2002).
 71. Schrödinger Release 2017-2: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 72. Schrödinger Release 2017-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 73. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
 74. Nichols, S. E., Swift, R. V & Amaro, R. E. Rational prediction with molecular dynamics for hit identification. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 2002–12 (2012).
 75. Furnham, N., Blundell, T. L., DePristo, M. A. & Terwilliger, T. C. Is one solution good enough? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 184–5; (2006).
 76. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–42 (2000).
 77. Shivakumar, D. *et al.* Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 1509–1519 (2010).
 78. Guo, Z. *et al.* Probing the α -Helical Structural Stability of Stapled p53

- Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chem. Biol. Drug Des.* **75**, 348–359 (2010).
79. SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing. in (ACM, 2006).
80. Schrödinger Release 2017-2: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2017.
81. Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y. & Bryant, S. H. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. *AAPS J.* **14**, 133–141 (2012).
82. Hung, C.-L. & Chen, C.-C. Computational Approaches for Drug Discovery. *Drug Dev. Res.* **75**, 412–418 (2014).
83. Huang, S.-Y., Grinter, S. Z. & Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 12899 (2010).
84. Liu, J. & Wang, R. Classification of Current Scoring Functions. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 475–482 (2015).
85. Vosmeer, C. R. *et al.* Towards automated binding affinity prediction using an iterative linear interaction energy approach. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 798–816 (2014).
86. Acevedo, O. *et al.* Identification of HIV inhibitors guided by free energy perturbation calculations. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 1199–216 (2012).
87. Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* **22**, 1420–1426 (1954).
88. Friesner, R. A. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **49**, 6177–6196 (2006).
89. Halgren, T. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **47**, 1750–1759 (2004).

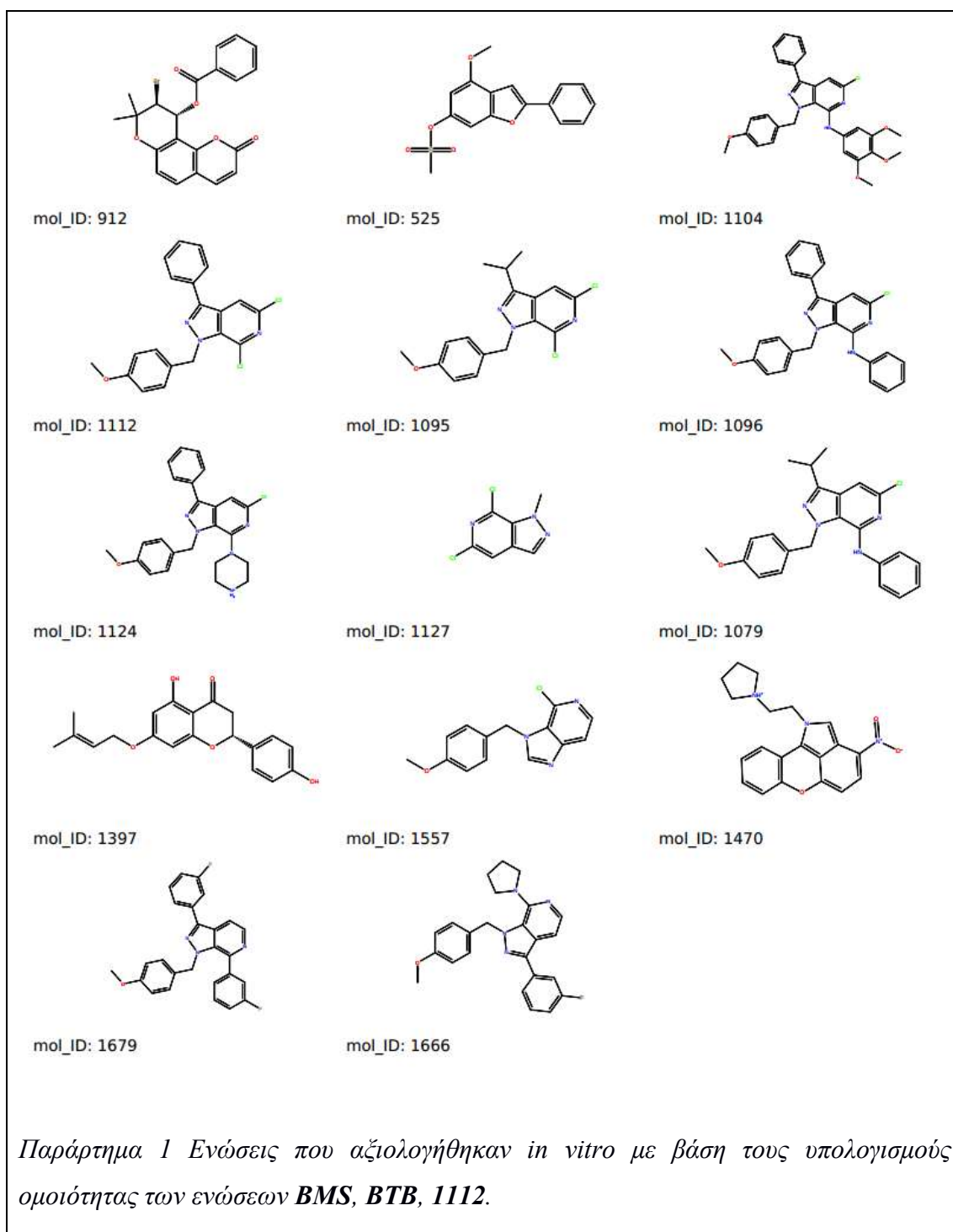
90. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **47**, 1739–1749 (2004).
91. Schrödinger Release 2017-2: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
92. Melo-Filho, C., Braga, R. & Andrade, C. 3D-QSAR Approaches in Drug Design: Perspectives to Generate Reliable CoMFA Models. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **10**, 148–159 (2014).
93. Vuorinen, A. & Schuster, D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. *Methods* **71**, 113–134 (2015).
94. Hawkins, P. C. D., Skillman, A. G. & Nicholls, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *J. Med. Chem.* **50**, 74–82 (2007).
95. ROCS 3.2.1.4: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM.
<http://www.eyesopen.com>.
96. Duan, J., Dixon, S. L., Lowrie, J. F. & Sherman, W. Analysis and comparison of 2D fingerprints: Insights into database screening performance using eight fingerprint methods. *J. Mol. Graph. Model.* **29**, 157–170 (2010).
97. Sastry, M., Lowrie, J. F., Dixon, S. L. & Sherman, W. Large-Scale Systematic Analysis of 2D Fingerprint Methods and Parameters to Improve Virtual Screening Enrichments. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 771–784 (2010).
98. Schrödinger Release 2017-2: Canvas, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
99. Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
100. OMEGA 2.5.1.4: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM.
<http://www.eyesopen.com>.
101. Hawkins, P. C. D., Skillman, A. G., Warren, G. L., Ellingson, B. A. & Stahl, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural

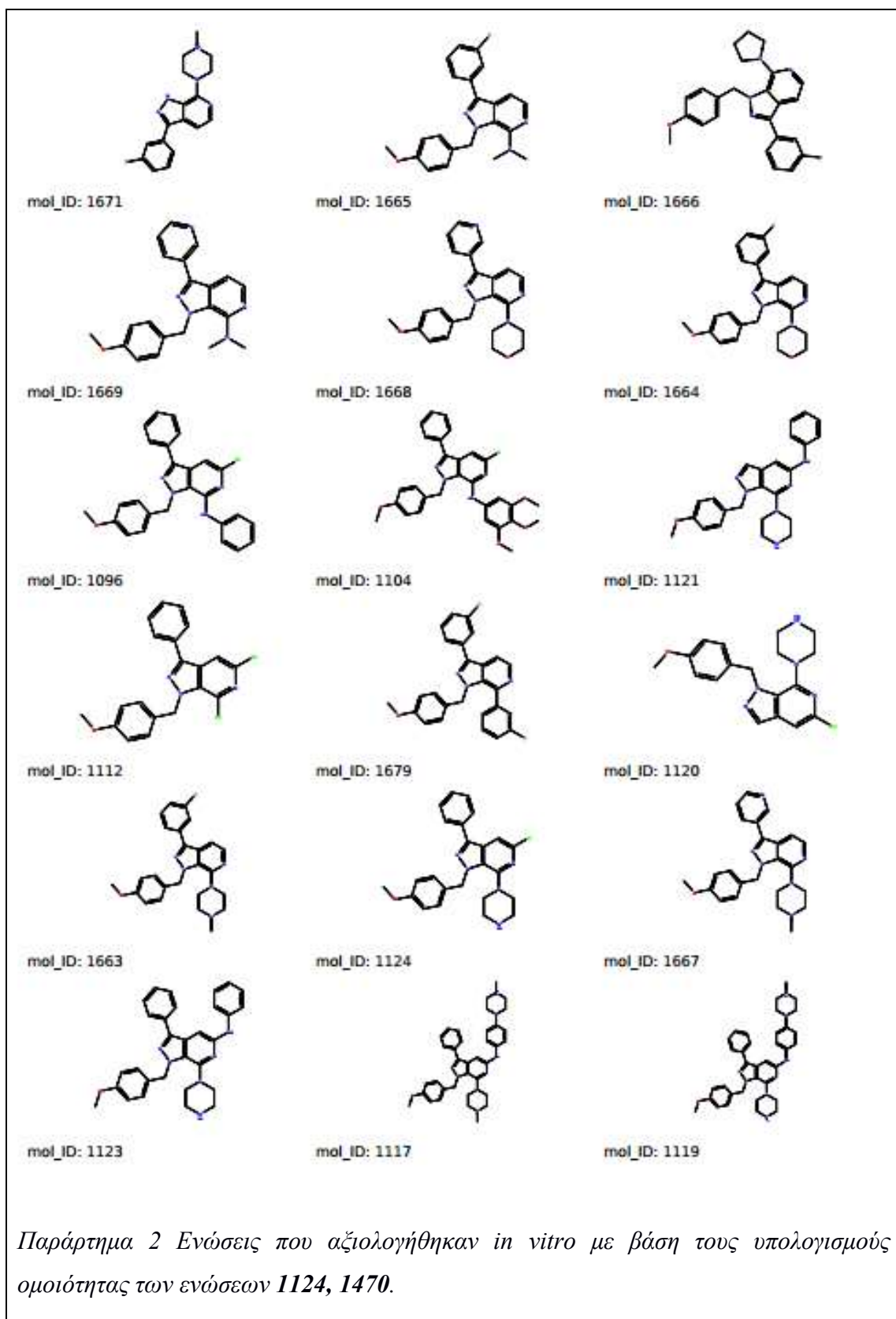
- Database. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 572–584 (2010).
102. Teodoro, J. S., Palmeira, C. M. & Rolo, A. P. Determination of Oxidative Phosphorylation Complexes Activities. in 71–84 (2015).
 103. Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M. & Rodenburg, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 211–25 (2012).
 104. Chatzianastasiou, A. *et al.* Cardioprotection by H₂S Donors: Nitric Oxide-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **358**, (2016).
 105. DC Protein Assay | Life Science Research | Bio-Rad. http://www.bio-rad.com/en-uk/product/dc-protein-assay?pcp_loc=lnav.
 106. DC Protein Assay Instruction Manual. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>.
 107. DC Protein Assay Quick Guide. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6837.pdf.
 108. GraphPad Prism version 5.03 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.
 109. Team:Evry/Notebook/Sensing/PCBs/08-15-2014 - 2014.igem.org. <http://2014.igem.org/Team:Evry/Notebook/Sensing/PCBs/08-15-2014>.
 110. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. www.rcsb.org.
 111. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
 112. Schrödinger Release 2017-2: Schrödinger Suite 2017-2 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 113. Zhou, A. *et al.* Structure and conformational states of the bovine mitochondrial

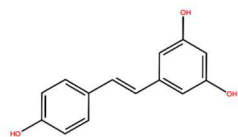
- ATP synthase by cryo-EM. *Elife* **4**, e10180 (2015).
114. Dia Diagram Editor. <http://dia-installer.de/>.
 115. Hong, S. & Pedersen, P. L. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 590–641, Table of Contents (2008).
 116. Saishu, T., Kagawa, Y. & Shimizu, R. Resistance of thermophilic atpase (TF1) to specific F1-atpase inhibitors including local anesthetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 822–826 (1983).
 117. Gledhill, J. R. & Walker, J. E. Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **386**, 591–8 (2005).
 118. Sanchez-Weatherby, J. *et al.* Improving diffraction by humidity control: a novel device compatible with X-ray beamlines. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **65**, 1237–46 (2009).
 119. Farid, R., Day, T., Friesner, R. A. & Pearlstein, R. A. New insights about HERG blockade obtained from protein modeling, potential energy mapping, and docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3160–3173 (2006).
 120. Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A. & Farid, R. Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects. *J. Med. Chem.* **49**, 534–553 (2006).
 121. Sherman, W., Beard, H. S. & Farid, R. Use of an Induced Fit Receptor Structure in Virtual Screening. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 83–84 (2006).
 122. Schrödinger Release 2017-2: Schrödinger Suite 2017-2 Induced Fit Docking protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 123. Schrödinger Release 2017-1: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 124. <https://www.eyesopen.com/vida>.
 125. Vinogradov, A. D. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the mitochondrial F(1)F(o) ATPase: is ATP synthase a reversible molecular

- machine? *J. Exp. Biol.* **203**, 41–9 (2000).
126. Harris, D. A. & Das, A. M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* 561–73 (1991).
127. Bullough, D. A., Ceccarelli, E. A., Roise, D. & Allison, W. S. Inhibition of the bovine-heart mitochondrial F1-ATPase by cationic dyes and amphipathic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 377–83 (1989).

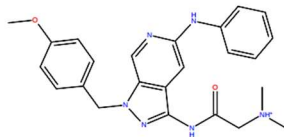
IX. Παράρτημα



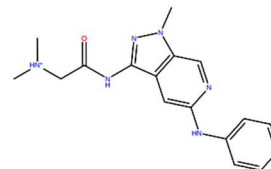




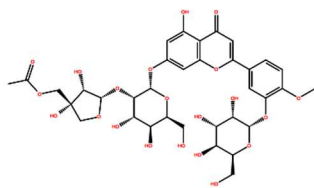
mol_ID: resveratrol



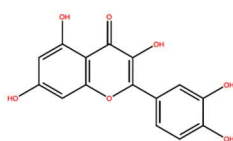
mol_ID: 1047



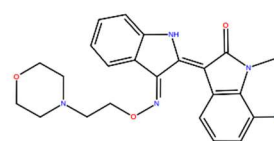
mol_ID: 1050



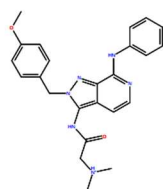
mol_ID: 1354



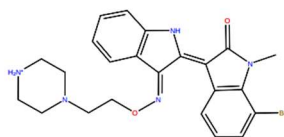
mol_ID: quercetin



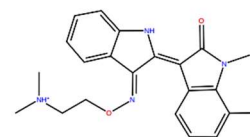
mol_ID: 1214



mol_ID: 1654

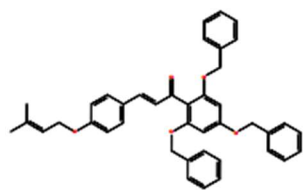


mol_ID: 860

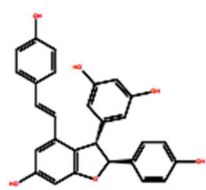


mol_ID: 841

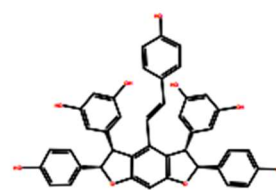
Παράρτημα 3 Ενώσεις που αξιολογήθηκαν *in vitro* με βάση τους αρχικούς υπολογισμούς πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης της κερκετίνης.



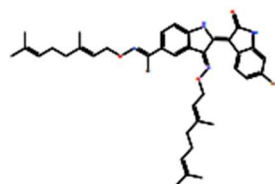
mol_ID: 1130



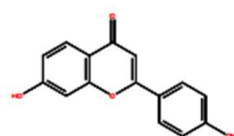
mol_ID: 203



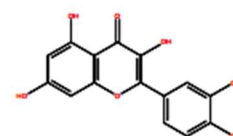
mol_ID: 202



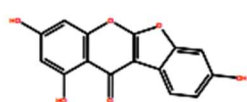
mol_ID: 1633



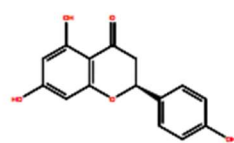
mol_ID: 1336



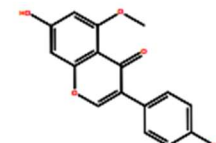
mol_ID: quercetin



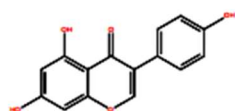
mol_ID: 1346



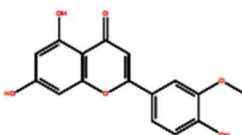
mol_ID: 220



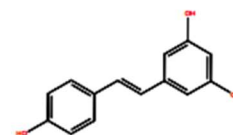
mol_ID: 1604



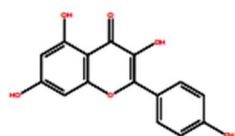
mol_ID: 179



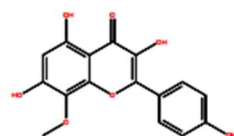
mol_ID: 144



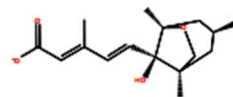
mol_ID: resveratrol



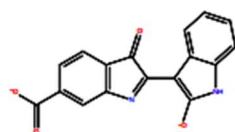
mol_ID: 1369



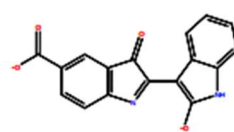
mol_ID: 1403



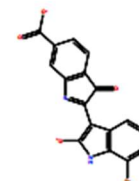
mol_ID: 1532



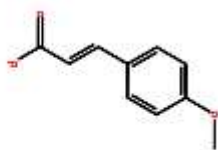
mol_ID: 1205



mol_ID: 1202

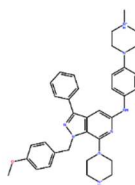


mol_ID: 721

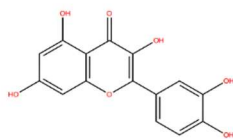


mol_ID: 185

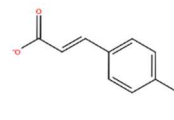
Παράρτημα 4 Ενώσεις που αξιολογήθηκαν *in vitro* με βάση τους υπολογισμούς πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης της κερκετίνης με τη χρήση μορίων νερού, στο ενεργό κέντρο της ολιγομυκίνης και του καταλυτικού κέντρου του ATP-ADP.



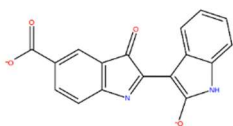
mol_ID: 1119



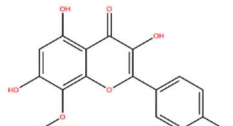
mol_ID: quercetin



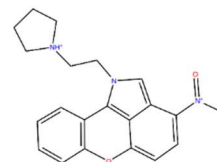
mol_ID: 185



mol_ID: 1202



mol_ID: 1403



mol_ID: 1470

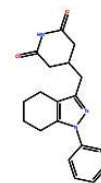
Παράρτημα 5 Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της τιμής IC_{50}



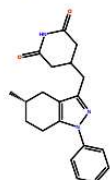
title: NSC 109328



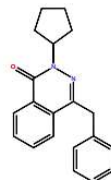
title: NSC 186066



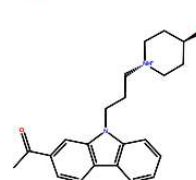
title: NSC 112143



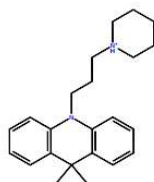
title: NSC 127713



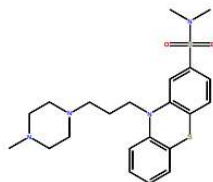
title: NSC 63284



title: NSC 170485

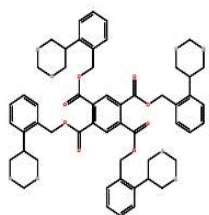


title: NSC 109698

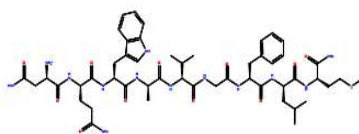


title: NSC 33232

Παράρτημα 6 Ενώσεις που έχουν προκύψει από μελέτες ομοιότητας της χημειοθήκης NCI και βρίσκονται σε διαθεσιμότητα.



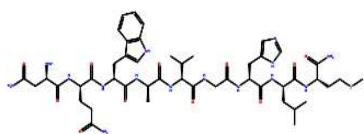
title: 653152



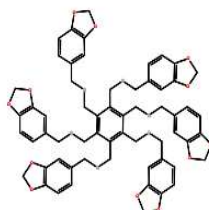
title: 617347



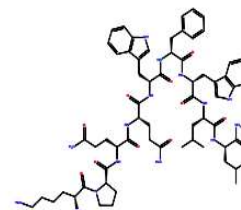
title: 617348



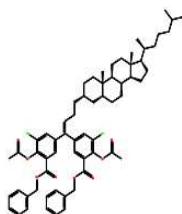
title: 613529



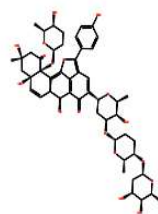
title: 323751



title: 615832



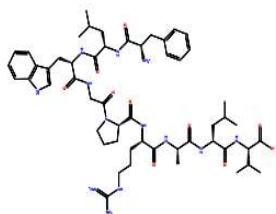
title: 684652



title: 636855

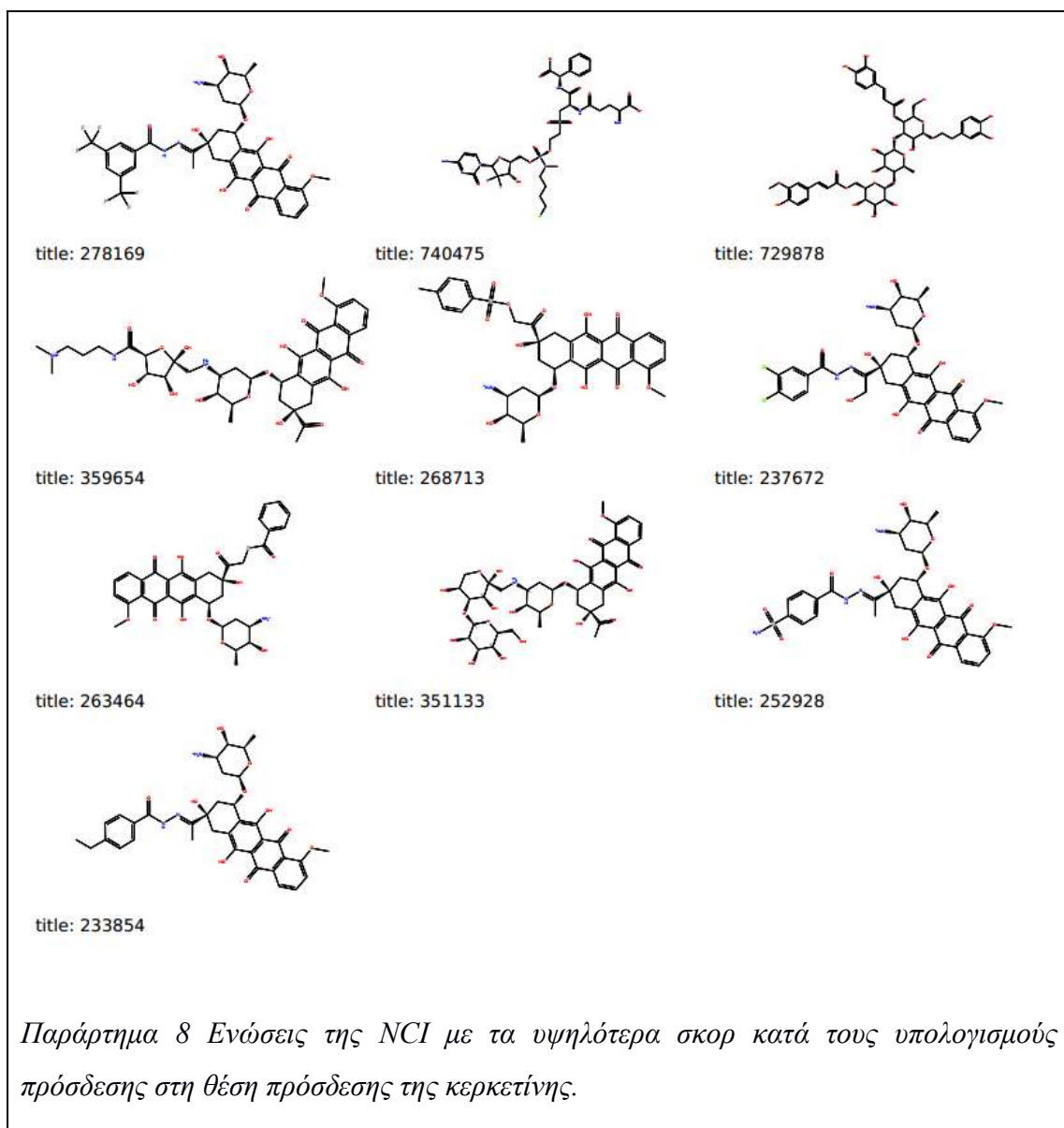


title: 68660



title: 724849

Παράρτημα 7 Ενώσεις της NCI με τα υψηλότερα σκορ κατά τους υπολογισμούς πρόσδεσης στη θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης.

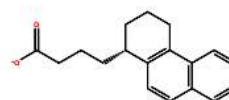




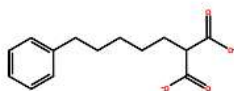
title: 251946



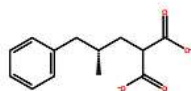
title: 295562



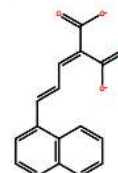
title: 401518



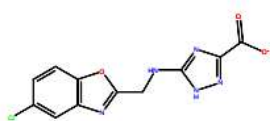
title: 401489



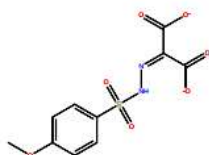
title: 243729



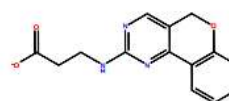
title: 46671



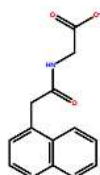
title: 715272



title: 363041



title: 688105



title: 34872

Παράρτημα 9 Ενώσεις της NCI με τα υψηλότερα σκορ κατά τους υπολογισμούς πρόσδεσης στη θέση πρόσδεσης του ATP-ADP.