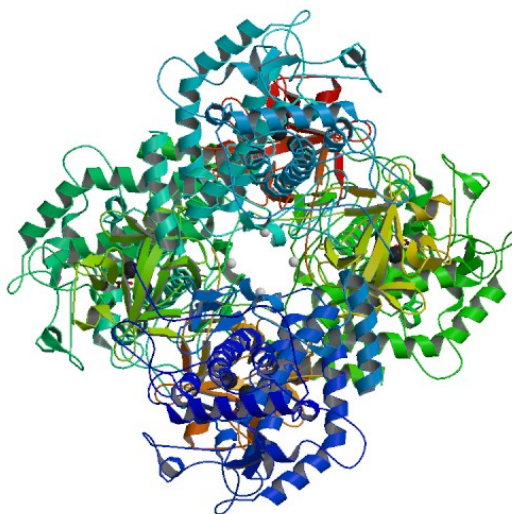


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μοριακή πρόσδεση ενώσεων με δράση στο ένζυμο της
τυροσινάσης με χρήση *in silico* τεχνικών
υπολογιστικής χημείας



Καλεμκερή Όλγα

Επιβλέπουσα:

Δρ Αναστασία Δέτση

Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2013-2014, υπό την επίβλεψη της Δρ. Α. Δέτση, Επίκουρης Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. και του Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ'.

Για την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την υπεύθυνη, Δρ. Αναστασία Δέτση Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την άψογη συνεργασία, και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τον Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ' στο ΕΙΕ, για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση πάνω στις *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τον κ. Δημήτρη Ξανθόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα, για την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές του και για την καθολική στήριξη του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τον κ. Κωνσταντίνο Ποταμίτη, μεταδιδακτορικό ερευνητή, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια του.

Την κα. Ευτυχία Κρίτση, υποψήφια διδάκτορα, για τη βοήθεια της κατά την εκπόνηση των *in silico* μελετών μοριακής πρόσδεσης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες που πλαισίωσαν την τριμελή επιτροπή, την κα. Ε. Παυλάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. και την κα. Σ. Βουγιούκα, Λέκτορα Ε.Μ.Π. για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση και παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ τέλος, σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την ψυχολογική υποστήριξη και για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ	13
1.1 Ενζυμική αμάρωση.....	13
1.2 Φαινολάσες.....	14
1.3 Το ένζυμο τυροσινάση	15
1.3.1 Γενικά περί τυροσινάσης.....	15
1.3.2 Καταλυτικός κύκλος μελανίνης	16
1.3.3 Δομή και λειτουργία τυροσινάσης	17
1.3.4 Στάδια οξείδωσης τυροσινάσης	21
1.3.4.1 Αλληλομετατροπή των τεσσάρων οξειδωτικών καταστάσεων της τυροσινάσης	22
1.3.4.1.1 oxy → deoxy- τυροσινάση: Οξείδωση των φαινολών σε όρθο-κινόνες... 22	
1.3.4.1.2 oxy → met-τυροσινάση: Οξείδωση κατεχολών σε όρθο-κινόνες..... 24	
1.3.4.1.3 Αυτοενεργοποίηση και περίοδος υστέρησης. met → deoxy- τυροσινάση 25	
1.3.4.1.4 oxy → deact- τυροσινάση: απενεργοποίηση από κατεχόλες και ρεσορκινόλες	30
1.4 Αναστολείς τυροσινάσης	33
1.4.1 Γενικά περί αναστολέων τυροσινάσης	33
1.4.2 Μεγάλες οικογένειες αναστολέων	38

1.4.2.1 Πολυφαινόλες	38
1.4.2.2 Βενζαλδεΐδικά και βενζοϊκά παράγωγα.....	40
1.4.2.3 Λιπίδια μακρίας αλυσίδας και στεροειδή	42
1.4.2.4 Άλλοι φυσικοί και συνθετικοί αναστολείς	43
1.4.2.5 Kojic acid (κοτζικό οξύ)	44
1.4.2.6 2-υδρόξυτυροσώλη	45
1.4.2.7 Βαρβιτουρικό	48
1.4.2.8 Μη αντιστρεπτοί αναστολείς - απενεργοποιητές	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΕΝΕΡΓΑ ΚΕΝΤΡΑ ΕΝΖΥΜΩΝ	52
2.1 Εισαγωγή	52
2.2 Υπολογιστικό πρόγραμμα Maestro, version 9.5, Schrödinger	57
2.2.1 Προετοιμασία Πρωτεΐνης.....	58
2.2.2 Προετοιμασία Υποκαταστατών	58
2.2.3 Glide Docking	59
2.2.4 Επιλογή Μεθόδου	60
2.2.5 KNIME Extensions 1.7	62
2.3 Σκοπός Διπλωματικής.....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	65
3.1 Εισαγωγή	65
3.2 Παράμετροι διεξαγωγής μελετών	66
3.3 Αποτελέσματα μελέτης μοριακής πρόσδεσης.....	68
3.3.1 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων.....	68
3.3.2 Διερεύνηση Αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.....	69
3.3.2.1 Διαδικασία	72
3.3.2.2 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων.....	73
3.3.2.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων HTVS και IFD.....	83
3.4 Επιπρόσθετη έρευνα - νέες προτάσεις συγκεκριμένα πάνω στα οξέα	86

3.4.1 Παράμετροι Διεξαγωγής Μελετών	90
3.4.2 Αποτελέσματα Μοριακής Πρόσδεσης	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Η αλληλεπίδραση μεταξύ των 4 οξειδωτικών καταστάσεων της τυροσινάσης.....	15
Σχήμα 2 Τα πρώτα βήματα στην παραγωγή μελανίνης.....	16
Σχήμα 3 Οι 2 τρόποι καταλυτικής οξείδωσης από τυροσινάση.....	19
Σχήμα 4 Οι 4 οξειδωτικές καταστάσεις της τυροσινάσης.....	21
Σχήμα 5 Αλληλομετατροπή μεταξύ oxy → deoxy- τυροσινάσης.....	22
Σχήμα 6 Μετατροπή oxy → met- τυροσινάση από κατεχόλες.....	24
Σχήμα 7 Μετατροπή met → deoxy- τυροσινάση από κατεχόλες.....	25
Σχήμα 8 Οξειδοαναγωγική ανταλλαγή που οδηγεί σε μη ενζυμικό σχηματισμό της ντόπας.....	28
Σχήμα 9 Η τεταρτογενής υποκατάσταση αποκλείει την οξειδοαναγωγική ανταλλαγή.....	28
Σχήμα 10 Η αναδιάταξη σε κινομεθανικό ανάλογο αποτρέπει το σχηματισμό μιας κατεχόλης που ενεργοποιεί το ένζυμο.....	29
Σχήμα 11 Η μετατροπή oxy → deact- τυροσινάση από κατεχόλες.....	30
Σχήμα 12 Ο μηχανισμός δράσης των αναστρέψιμων αναστολέων.....	36
Σχήμα 13 Διάγραμμα σύγκρισης ικανότητας αναστολής της 2-υδρόξυτυροσολης και του κοτζικού οξέος.....	46

Σχήμα 14 Ικανότητα αναστολής της 2- υδροξυτυροσόλης, του κοτζικού οξέος και της αρβουτίνης σε μελανοκύτταρα.....	47
Σχήμα 15 Ικανότητα αναστολής της 2-υδροξυτυροσόλης και του κοτζικού οξέος σε κύτταρα μελανώματος B16	47
Σχήμα 16 Μηχανισμός μη αντιστρεπτών αναστολέων. Το E και το E _i είναι το ένζυμο και το απενεργοποιημένο ένζυμο αντίστοιχα, το S, I, P είναι το υπόστρωμα, ο αναστολέας και το προϊόν αντίστοιχα.....	50
Σχήμα 17 Ο μηχανισμός του υποστρώματος αυτοκτονίας. Τα E και E _i είναι το ένζυμο και το απενεργοποιημένο ένζυμο, P είναι το προϊόν, X και Y τα ενδιάμεσα προϊόντα.....	51
Σχήμα 18 Διάγραμμα ροής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.....	17
Εικόνα 1 Η δομή του κοτζικού οξέος.....	37
Εικόνα 3 Χαρακτηριστικές δομές επιλεγμένων πολυφαινολικών αναστολέων της τυροσινάσης.....	39
Εικόνα 4 Χημικές δομές από επιλεγμένους αναστολείς τυροσινάσης που ανήκουν στις κατηγορίες: στιλβένια, βενζοϊκά παράγωγα, κουμαρίνες και βενζαλδεϊδικά παράγωγα.....	40
Εικόνα 5 Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν στις κατηγορίες λιπιδίων μακρικής αλυσίδας και στεροειδών.....	42
Εικόνα 6 Χημικές δομές επιλεγμένων φυσικών και συνθετικών αναστολέων της τυροσινάσης.....	43

Εικόνα 7 Αλληλεπιδράσεις και προσανατολισμός πρόσδεσης του μορίου.....	48
Εικόνα 8 Χημικές Δομές μη αντιστρεπτών αναστολέων.....	49
Εικόνα 9 Παραδείγματα κόμβων.....	64
Εικόνα 10 Επεξηγηματικό υπόμνημα στο δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.....	68
Εικόνα 11 Διάγραμμα ροής knime.....	72
Εικόνα 12 Πρόσδεση της ένωσης zinc00185722 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.....	74
Εικόνα 13 Πρόσδεση της ένωσης zinc12503731 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	75
Εικόνα 14 Πρόσδεση της ένωσης zinc00391975 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	76
Εικόνα 15 Πρόσδεση της ένωσης zinc01471036 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	77
Εικόνα 16 Πρόσδεση της ένωσης zinc04197177 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	78
Εικόνα 17 Πρόσδεση της ένωσης zinc04787311 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	79
Εικόνα 18 Πρόσδεση της ένωσης zinc0388428 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	80

Εικόνα 19 Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική HTVS.....	83
Εικόνα 20 Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική IFD.....	84
Εικόνα 21 Τρισδιάστατο μοντέλο της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική HTVS.....	84
Εικόνα 22 Τρισδιάστατο μοντέλο της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική IFD.....	85
Εικόνα 23 Πρόσδεση της ένωσης acid 9 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	91
Εικόνα 24 Πρόσδεση της ένωσης acid 3 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	92
Εικόνα 25 Πρόσδεση της ένωσης acid 1 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	93
Εικόνα 26 Πρόσδεση της ένωσης acid 26 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	94
Εικόνα 27 Πρόσδεση της ένωσης acid 10 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	95
Εικόνα 28 Πρόσδεση της ένωσης acid 2 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.....	96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Μόρια που συμμετέχουν στον καταλυτικό κύκλο της τυροσινάσης.....	20
Πίνακας 2. Χημικές δομές βασικών μορίων - αναστολέων της τυροσινάσης.....	45
Πίνακας 3. Docking score και ενέργειες πρόσδεσης των μορίων με τα καλύτερα αποτελέσματα.....	82
Πίνακας 4. Σύγκριση αποτελεσμάτων Docking Score και ενέργειας πρόσδεσης των τεχνικών HTVS και IFD.....	85
Πίνακας 5. Οι χημικές δομές των οξέων που υποβλήθηκαν σε <i>in silico</i> μελέτες.....	89
Πίνακας 6. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης οξέων.....	98

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αναφέρεται στο ένζυμο τυροσινάση, ένα ένζυμο που σχετίζεται με την αμαύρωση των τροφίμων αλλά και την εμφάνιση μελανών κηλίδων στο δέρμα και στοχεύει στην εύρεση πιθανών αναστολέων του. Στο πρώτο μέρος, η διπλωματική περιλαμβάνει μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σε σχέση με τις λειτουργίες της τυροσινάσης. Συγκεκριμένα περιγράφονται οι ιδιαιτερότητες του ενζύμου, η αλληλομετατροπή μεταξύ των 4 οξειδωτικών καταστάσεων του, η χαρακτηριστική περίοδος υστέρησης, και η δυνατότητα αυτοενεργοποίησης του ενζύμου από κατεχόλες. Ακολουθεί βιβλιογραφική ανασκόπηση των οικογενειών γνωστών αναστολέων της τυροσινάσης, καθώς και περιγραφή της διαδικασίας προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων. Στη συνέχεια, μελετώνται τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά καινούριων αναστολέων, που παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, και συγκρίνονται με αυτά γνωστών οικογενειών αναστολέων. Τα μόρια που εμφάνισαν ενδιαφέρουσα δράση ανασταλτική ή ενεργοποιητική είναι οι ρεσορκινόλες, οι κατεχόλες και τα καρβοξυλικά οξέα.

Στόχος της διπλωματικής εργασίας, ήταν η εύρεση νέων αναστολέων του ενζύμου της τυροσινάσης μέσω μελετών εικονικής σάρωσης (*virtual screening*) με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοριακής πρόσδεσης (*in silico docking*). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σάρωση της βιβλιοθήκης της Sigma Aldrich και επιλέχθηκαν ενώσεις (κατηγορία οξέων) που πληρούν τα κριτήρια για δυνητική αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου της τυροσινάσης. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν δομικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες ενώσεις με σκοπό την αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης.

Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2013-2014 στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Λέξεις κλειδιά: τυροσινάση, μοριακή πρόσδεση, *in silico* μελέτες, ενζυμική αμαύρωση, αναστολείς

ABSTRACT

This diploma thesis examines the tyrosinase enzyme, responsible for the browning of food and the appearance of black spots, and discusses potential inhibitors. The thesis begins by citing past research related to the functions of tyrosinase. It explains the characteristics of the enzyme, the interconversion between the four oxidation states, the characteristic lag period, and the ability of the enzyme to be autoactivated by catechols. A review of the main families of known tyrosinase inhibitors follows, as well as a description of the virtual screening procedure. Subsequently, the characteristics and promising results of new inhibitors are studied and compared to the characteristics of known inhibitors families. Such molecules that demonstrate promising inhibitory or activating action are resorcinols, catechols and carboxylic acids.

The goal of this thesis is to find new inhibitors of the enzyme tyrosinase through studies of virtual screening using molecular binding programs (*in silico* docking). Specifically, virtual screening of the Sigma Aldrich library was conducted and compounds (category of acids) meeting the criteria for potentially inhibiting the function of tyrosinase were selected. Additionally, structural changes were induced in specific compounds in order to increase their binding affinity.

The diploma thesis was conducted during the academic year 2013-2014 at the Institute of Biology, Pharmaceutical Chemistry, and Biotechnology at the National Hellenic Research Foundation.

Keywords: tyrosinase, molecular binding, *in silico* studies, enzymatic browning, inhibitors

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ

1.1 Ενζυμική αμαύρωση

Η ενζυμική αμαύρωση είναι μια χημική διαδικασία, κατά την οποία μέσω ενζύμων όπως οι οξειδάσες πολυφαινολών και κατεχολών παράγονται μελανίνες και βενζοκινόνες από φυσικές φαινόλες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία καστανού χρώματος. Σε γενικές γραμμές, η ενζυμική αμαύρωση απαιτεί έκθεση σε οξυγόνο, όπως για παράδειγμα η αμαύρωση που εμφανίζεται κατά τον τεμαχισμό των φρούτων (π.χ. μήλου). Η αντίδραση αυτή συμβαίνει κυρίως μετά την κοπή ή άλλη μηχανική επεξεργασία των προϊόντων καθώς οφείλεται σε θραύση των κυττάρων παράλληλα με επαφή με ατμοσφαιρικό οξυγόνο.

Η ενζυμική αμαύρωση μπορεί να είναι ευεργετική για:

- Ανάπτυξη γεύσης στο τσάι
- Ανάπτυξη χρώματος και γεύσης στα αποξηραμένα φρούτα (π.χ. σύκα, σταφίδες)

ενώ παράλληλα έχει αρνητικές συνέπειες για τα:

- Φρέσκα φρούτα και λαχανικά, ιδίως για μήλα, πατάτες, μπανάνες και αβοκάντο
- Θαλασσινά (π.χ. γαρίδες)

Η αμαύρωση μετά τη συγκομιδή είναι ένα κοινό φαινόμενο σε καλλιέργειες όπως τα μανιτάρια, το οποίο μειώνει την εμπορική αξία του προϊόντος.

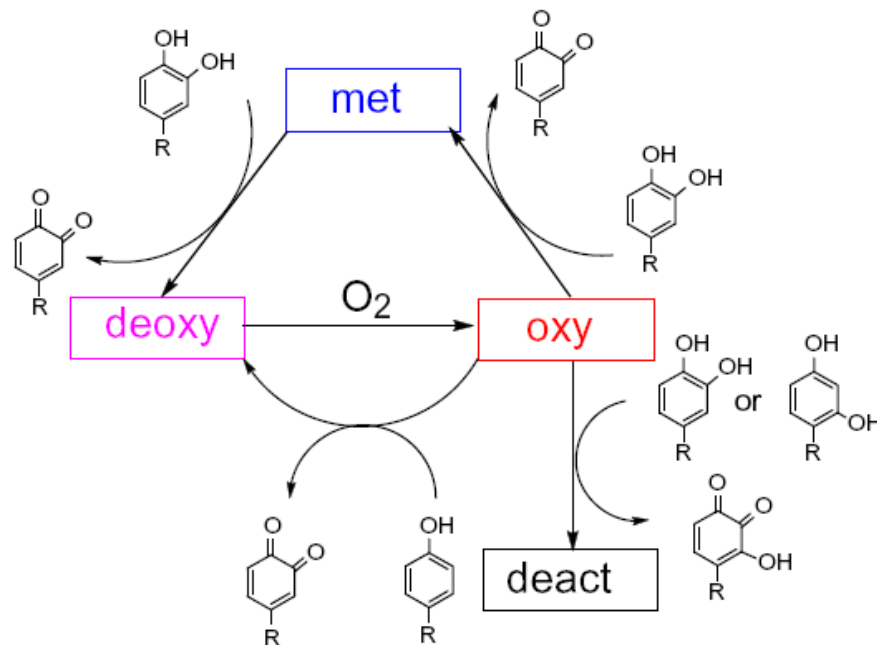
1.2 Φαινολάσες

Οι οξειδάσες πολυφαινόλης ή φαινολάσες (PPO) είναι ένζυμα με συμπάραγοντα ιόντα χαλκού, τα οποία δεσμεύουν το οξυγόνο φαινολικών υδροξυλίων και οξειδώνουν -σε επόμενη φάση- τη διφαινόλη στην αντίστοιχη κινόνη. Για την αντίδραση χρησιμοποιείται μοριακό οξυγόνο. Η δομή της δραστηρικής διαμόρφωσης των ενζύμων αυτών, στην οποία ο χαλκός δεσμεύεται από έξι ή επτά κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα μόνο κατάλοιπο κυστεΐνης διατηρείται σε μεγάλο βαθμό. Οι φαινολάσες ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα ζώα, τα φυτά, τους μύκητες και τα βακτήρια. Σε σχέση με τη βιολογική λειτουργία τους, ιδιαίτερα σε φυτά, αλλά και σε μύκητες, υπάρχει ακόμα πεδίο προς διερεύνηση.

1.3 Το ένζυμο τυροσινάση

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

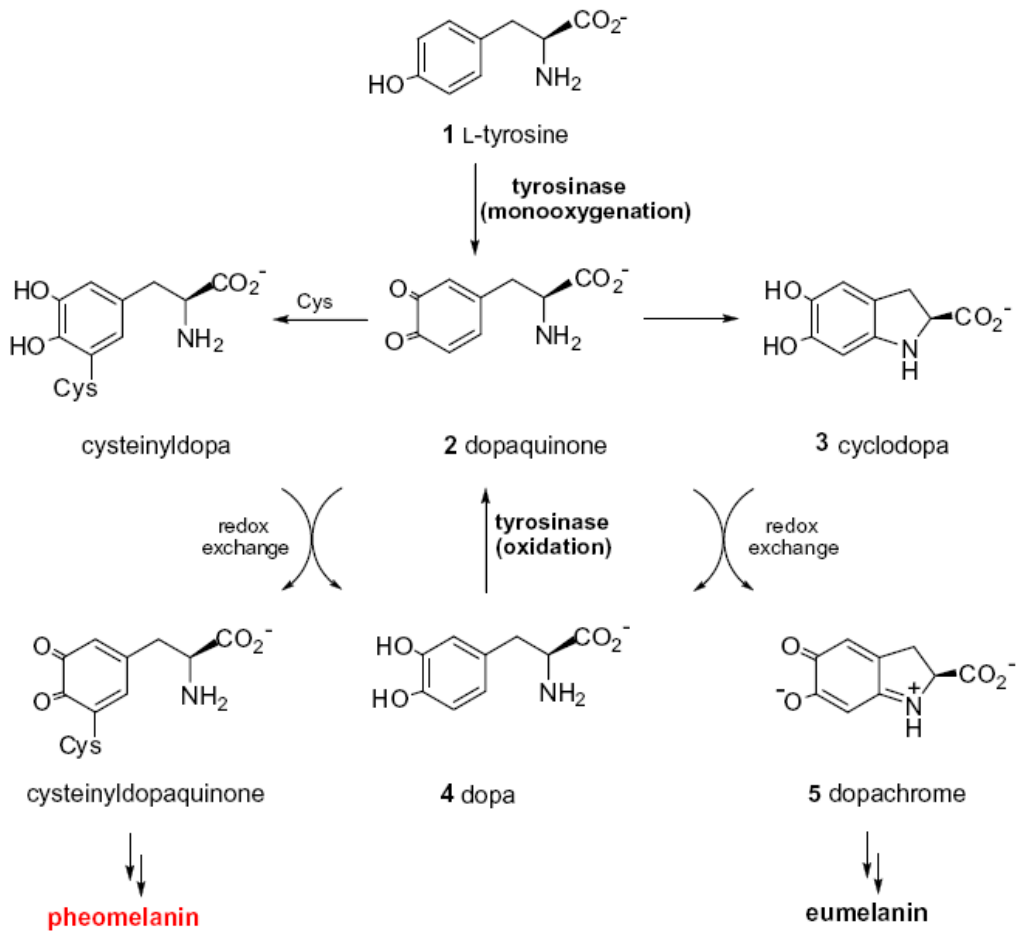
Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο που συναντάται ευρέως στη βίοςφαιρα. Είναι ένα ένζυμο με συμπάραγοντα χαλκού με πολλαπλή δραστικότητα, αυτή της μονοοξυγενάσης και της κατεχολικής οξειδάσης. Το ενεργό της κέντρο περιλαμβάνει 2 ιόντα χαλκού συνδεδεμένα με 3 ιστιδίνες έκαστο, τα οποία μεταβαίνουν κατά τη διάρκεια των καταλυτικών κύκλων στις οξειδωτικές καταστάσεις +2, +1 (και 0 όταν απενεργοποιείται το ένζυμο) - με τις αντίστοιχες ονομασίες met , oxy, deoxy, deact - tyrosinase [1].



Σχήμα 1: Η αλληλεπίδραση μεταξύ των 4 οξειδωτικών καταστάσεων της τυροσινάσης.

Το ένζυμο βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας όταν είναι σε met μορφή [Cu(II)₂] και ενεργοποιείται όταν πραγματοποιείται αναγωγή σε deoxy μορφή, οπότε υπάρχει η δυνατότητα δέσμευσης οξυγόνου για να σχηματίσει την oxy μορφή.

1.3.2 ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΜΕΛΑΝΙΝΗΣ

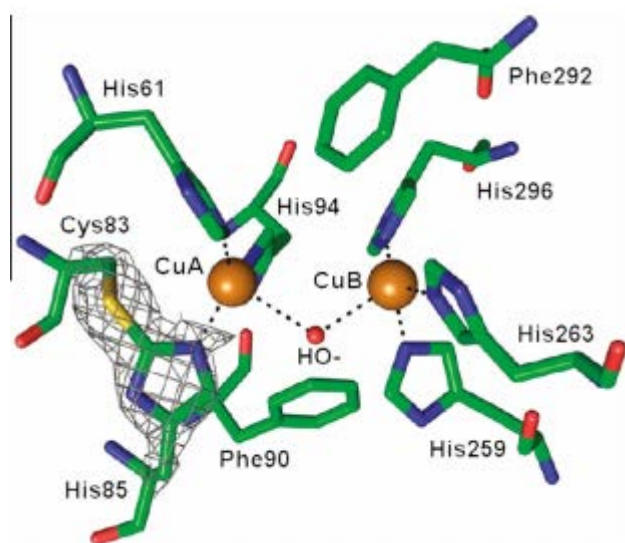


Σχήμα 2: Τα πρώτα βήματα στην παραγωγή μελανίνης.

Το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα είναι το αμινοξύ τυροσίνη. Και οι δύο λειτουργίες της τυροσινάσης φαίνεται να έχουν ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, αν και το ένζυμο έχει μια υψηλότερη συγγένεια για τα L-ισομερή των υποστρωμάτων απ'ότι για τα αντίστοιχα D-ισομερή. [2] Το αρχικό βήμα της μελανογένεσης είναι η μετατροπή της L-τυροσίνης (1) σε ντοπακινόνη (2) μέσω της δραστηριότητας της μονοοξυγενάσης. Έπειτα η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε κυκλοντόπα (3), η οποία οξειδώνεται με οξειδωτική αναγωγή σε ντοπάχρωμα (5). Κατόπιν, πραγματοποιούνται κάποιες δευτερεύουσες αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή ευ-μελανίνης (καφέ-μαύρο) και φαιο-μελανίνης (κόκκινο-κίτρινο) (Σχήμα 2).

Η δράση της τυροσινάσης είναι ιδιαίτερη όχι μόνο λόγω της διπλής της δραστηριότητας, μονοοξυγενάσης και κατεχολικής οξειδάσης, αλλά και γιατί (i) δρα με μια χαρακτηριστική περίοδο υστέρησης, όπως έχει φανεί στα *in vitro* πειράματα και (ii) γιατί τα κατεχολικά υποστρώματα πραγματοποιούν αργή απενεργοποίηση του ενζύμου, ενώ τα ρεσορκινολικά άμεση απενεργοποίηση του.

1.3.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ



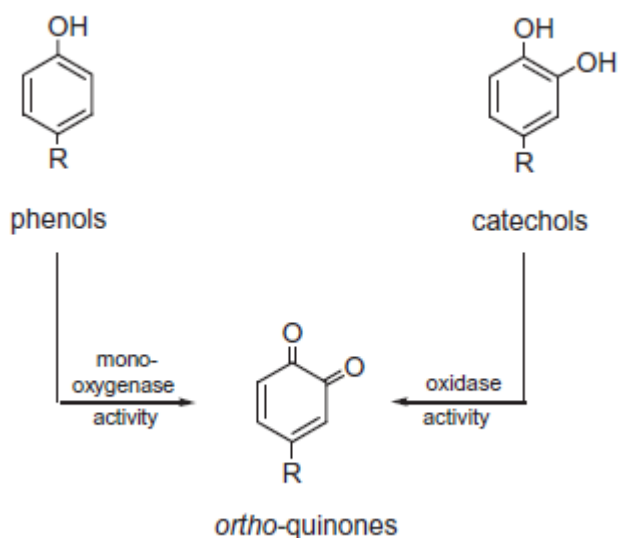
Εικόνα 1: Ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.

Οι πρωτεΐνες χαλκού είναι μια μεγάλη οικογένεια που περιλαμβάνει τυροσινάσες, οξειδάσες κατεχολών και αιμοκυανίνες (οι πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου στα ανθρωποειδή και μαλάκια). Τα ενεργά κέντρα αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν 2 ιόντα χαλκού συνδεδεμένα με 3 κατάλοιπα ιστιδίνης το καθένα, στα οποία δεσμεύεται μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει υπεροξείδιο (Εικόνα 1). Αυτές οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη μεταξύ των δύο μεταλλικών ιόντων λόγω της ομοιοπολικής σύνδεσής τους με έναν υποκαταστάτη γέφυρα. Και οι 2 λειτουργίες του ενζύμου, μονοοξυγενάση και κατεχολική οξειδάση, οφείλονται στην πρόσδεση μοριακού οξυγόνου στα 2 ιόντα χαλκού που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [3]. Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός τυροσινασών από φυτικές πηγές. Πιο πρόσφατα, αρκετές τυροσινάσες έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς

συμπεριλαμβανομένης της μονομερούς τυροσινάσης από *Streptomyces nigrifaciens*, *Streptomyces glaucescens*, *Bacillus thuringiensis* και *Pseudomonas putida*, και της διμερούς τυροσινάσης από *Bacillus megaterium*, *Vibrio tyrosinaticus* και *Thermomicrobium roseum*. [4-7] Το ένζυμο που απομονώνεται από το μανιτάρι *Agaricus bisporus* είναι εξαιρετικά ομόλογο με το αντίστοιχο των θηλαστικών, και αυτό το καθιστά κατάλληλο ως μοντέλο για μελέτες στη μελανογένεση. Στην πραγματικότητα, σχεδόν όλες οι μελέτες για την αναστολή τυροσινάσης που έχουν διεξαχθεί μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιήσει αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο, επειδή είναι εμπορικώς διαθέσιμο [2]. Η τυροσινάση από *Agaricus Bisporus* είναι ένα ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο αλυσίδες περίπου 48 kDa και δύο μικρότερες (14 kDa). Η λειτουργία των μικρών αλυσίδων δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί [8].

Κρυσταλλογραφικές μελέτες αιμοκυανίνης [9], κατεχολικής οξειδάσης [10] και τυροσινάσης [7, 8, 11] έχουν δείξει σημαντικές δομικές ομοιότητες μεταξύ των ενεργών τους κέντρων.

Τα υποστρώματα της τυροσινάσης είναι είτε φαινόλες που μέσω του μηχανισμού μονοοξυγενάσης δίνουν όρθο-κινόνες είτε κατεχόλες που μέσω του μηχανισμού της κατεχολικής οξειδάσης δίνουν επίσης όρθο-κινόνες (Σχήμα 3). Είναι σημαντική η εκτίμηση των δύο διακριτών μηχανισμών σχηματισμού όρθο-κινονών. Αν και στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται ακόμη ότι η οξειδωση της φαινόλης περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο βήμα υδροξυλίωσης ακολουθούμενο από οξειδωση κατεχόλης [12, 13], στην πραγματικότητα στον μηχανισμό της μονοοξυγενάσης η όρθο-κινόνη παράγεται απευθείας από τη φαινόλη χωρίς να πραγματοποιείται ενδιάμεσο βήμα σχηματισμού κατεχόλης [1].



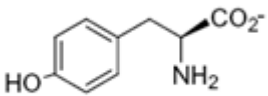
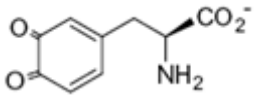
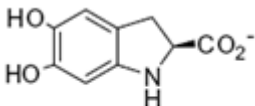
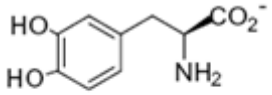
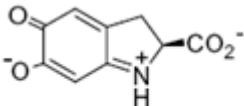
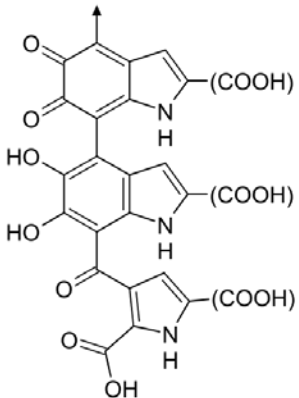
Σχήμα 3: Οι 2 τρόποι καταλυτικής οξειδωσης από τυροσινάση.

Κατά την διάρκεια των οξειδωτικών σταδίων οι οξειδωτικές καταστάσεις των ιόντων χαλκού αλλάζουν, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, για να προκύψουν οι διαφορετικές μορφές του ενζύμου. Αυτές οι ειδικές απαιτήσεις για την αλληλομετατροπή των οξειδωτικών καταστάσεων του ενζύμου οδηγούν σε ασυνήθιστα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, τα οποία μέχρι πρόσφατα δύσκολα μπορούσαν να ερμηνευθούν. Αυτές οι ασυνήθιστες ιδιότητες περιλαμβάνουν την λεγόμενη «περίοδο υστέρησης» που εμφανίζεται στις *in vitro* δοκιμές και την απενεργοποίηση του ενζύμου από το ίδιο το φυσικό υπόστρωμα του που σχετίζεται με την κατεχολική οξειδωση.

Οι τυροσινάσες συναντώνται σε μεγάλες ποσότητες στη φύση και ενεργούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες τα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι καθοριστικά για την ενζυμική αμαύρωση. Στα ζώα το φυσικό υπόστρωμα είναι η L-τυροσίνη και στα σπονδυλωτά η τυροσινάση είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στη μελανογένεση, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα σχεδόν αποκλειστικά σε εξειδικευμένα οργανίδια τα μελανοσώματα [14].

Η ρύθμιση της έναρξης της μελανογένεσης είναι εν μέρει συνέπεια της μεταφοράς της τυροσινάσης στα προμελανοσώματα και της πρόσβασης του

υποστρώματος στο εσωτερικό του οργανιδίου, αλλά ελέγχεται επίσης από παράγοντες που καθορίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του χαλκού, όπως η παροχή εξωτερικού αναγωγικού μέσου ή η μεταβολή του pH στο εσωτερικό του οργανιδίου που επηρεάζει τον μηχανισμό της περιόδου υστέρησης. Έτσι μεταβολές στο pH του οργανιδίου μπορούν να ρυθμίσουν την έναρξη παραγωγής μελανίνης.

 <p>1 L-tyrosine</p>	 <p>2 dopaquinone</p>
 <p>3 cyclodopa</p>	 <p>4 dopa</p>
 <p>5 dopachrome</p>	 <p>6 eumelanin</p>

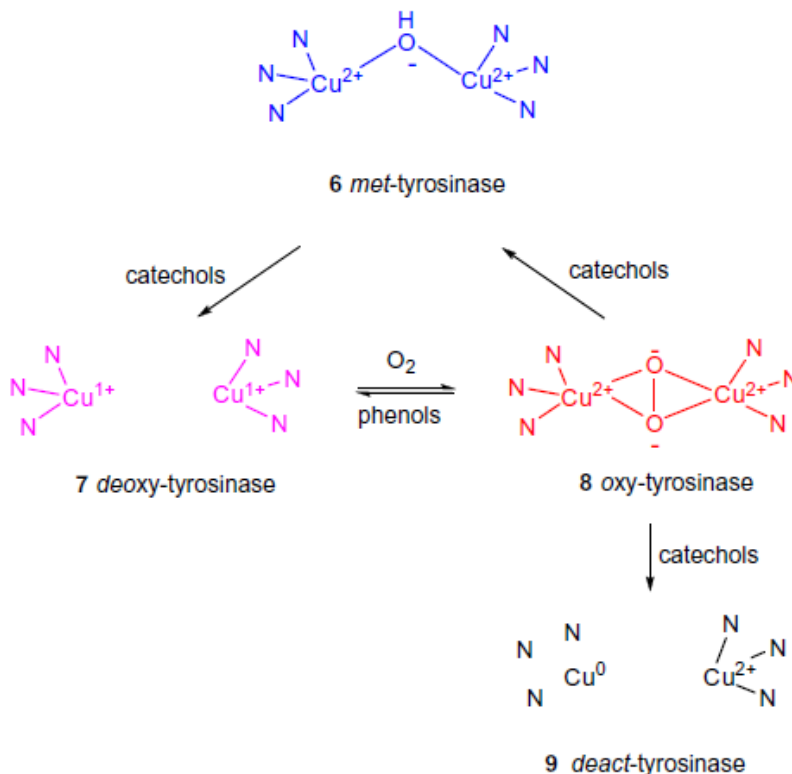
Πίνακας 1: Μόρια που συμμετέχουν στον καταλυτικό κύκλο της Τυροσινάσης

1.3.4 ΣΤΑΔΙΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Οι ιδιότητες της τυροσινάσης ποικίλουν ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση των δύο ιόντων χαλκού του ενεργού κέντρου (Σχήμα 4). Η τυροσινάση εντοπίζεται κυρίως ως *met*-τυροσινάση στην οποία ένα υδροξύλιο δεσμεύεται από τα δύο ιόντα χαλκού.

Οι φαινόλες συνδέονται με την *met*-τυροσινάση (6), αλλά δεν οξειδώνονται από αυτή τη μορφή του ενζύμου. Οι κατεχόλες, ωστόσο, οξειδώνονται από την *met*-τυροσινάση (6), η οποία στην συνέχεια ανάγεται σε *deoxy*-τυροσινάση (7) όπου και τα 2 ιόντα χαλκού βρίσκονται στην οξειδωτική κατάσταση +1.

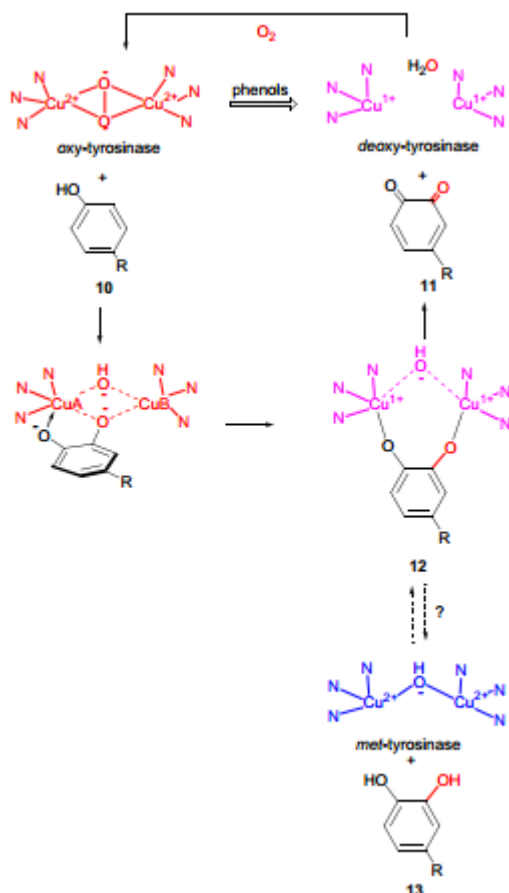
Η *deoxy*-τυροσινάση (7) δεσμεύει ταχέως μοριακό οξυγόνο για να μετατραπεί σε *oxy*-τυροσινάση (8) στην οποία τα δύο άτομα οξυγόνου συγκρατούνται μεταξύ των ιόντων χαλκού στο ενεργό κέντρο [1]



Σχήμα 4: Οι 4 οξειδωτικές καταστάσεις της τυροσινάσης.

1.3.4.1 Αλληλομετατροπή των τεσσάρων οξειδωτικών καταστάσεων της τυροσινάσης

1.3.4.1.1 oxy → deoxy- τυροσινάση: Οξείδωση των φαινολών σε όρθο-κινόνες



Σχήμα 5: Αλληλομετατροπή oxy → deoxy- τυροσινάσης.

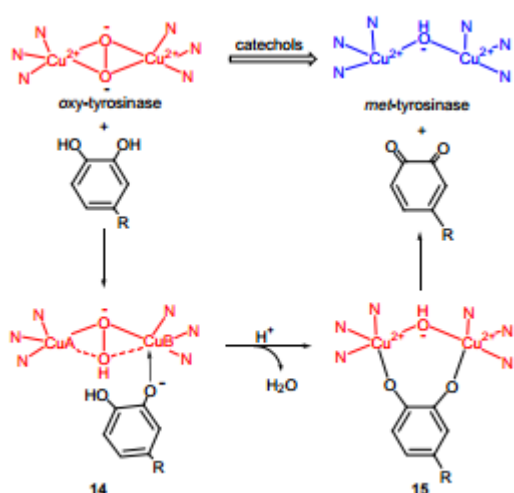
Η οξείδωση των φαινολών σε όρθο-κινόνες από την Oxy- τυροσινάση είναι η πιο σημαντική λειτουργία του ενζύμου και μέσω αυτής η τυροσίνη (1) μετατρέπεται σε ντοπακινόνη (2) κατά τη βιοσύνθεση της μελανίνης (Σχήμα 2). Από μηχανιστικής απόψεως, το οξυγόνο της φαινόλης (10) πιστεύεται ότι συντονίζει τον χαλκό CuA (Σχήμα 5), έπειτα ακολουθείται από ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη οξυγόνου στον δακτύλιο που οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκου (12), στο οποίο το υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο και με τα δύο ιόντα χαλκού. Το σύμπλοκο αυτό υποβάλλεται σε ομολυτική διάσπαση για να δώσει όρθο-κινόνη (11) και deoxy- τυροσινάση. Στη συνέχεια, η deoxy- τυροσινάση δεσμεύει οξυγόνο για να αναγεννήσει την

οxy- τυροσινάση και ο οξειδωτικός κύκλος της φαινόλης συνεχίζεται μέχρι τα υποστρώματα (φαινόλη και οξυγόνο) να εξαντληθούν.

Έχει αναφερθεί ότι η τυροσινάση οξειδώνει τις φαινόλες σε κατεχόλες οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνονται σε όρθο-κινόνες σε δεύτερο βήμα. Αυτό φαίνεται ότι τελικώς δεν ισχύει, όπως προκύπτει από την υπόθεση ότι η οξείδωση της L-τυροσίνης (1) από την τυροσινάση οδηγεί στο σχηματισμό της κατεχολικής ντόπας (4) (Σχήμα 2). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αυτή η ντόπα (4) σχηματίζεται έμμεσα από έναν μη-ενζυμικό μηχανισμό. Είναι πιθανό για κάποια υποστρώματα το σύμπλοκο (12) να μπορεί να υποστεί σε μικρό ποσοστό ετερολυτική διάσπαση σχηματίζοντας μια κατεχόλη (13) (Σχήμα 5).

Όμως αυτή η διαδικασία δίνει επίσης met- τυροσινάση (Σχήμα 4) που δεν οξειδώνει τις φαινόλες και ο κύκλος οξείδωσης της φαινόλης μπορεί να συνεχίσει μόνο αν το βήμα σχηματισμού κατεχόλης αντιστραφεί. Η απομάκρυνση από το ενεργό κέντρο του ενζύμου των σχηματισμένων κατεχολών μπορεί να οδηγήσει σε αργή κατανάλωση της διαθέσιμης oxy- τυροσινάσης.

1.3.4.1.2 oxy → met-τυροσινάση: Οξείδωση κατεχολών σε όρθο-κινόνες



Σχήμα 6: Μετατροπή oxy → met- τυροσινάση από κατεχόλες.

Η oxy- τυροσινάση οξειδώνει κατεχόλες (Σχήμα 6) καθώς και φαινόλες και συχνά επιδεικνύει υψηλότερη δραστηριότητα κατεχολικής οξειδάσης [15] σε σχέση με την δραστηριότητα φαινολικής οξυγενάσης (Σχήμα 5).

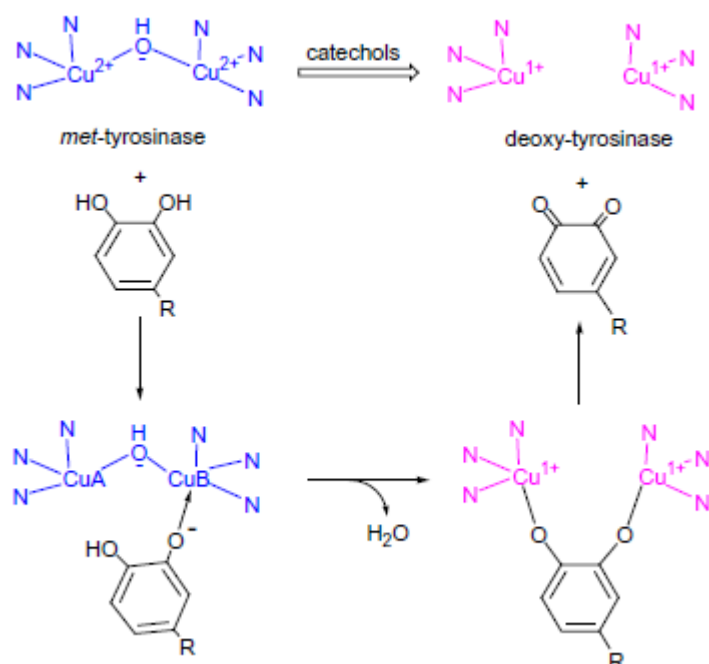
Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές στον προσανατολισμό του υποστρώματος κατά την πρόσδεση στον ενεργό κέντρο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι φαινόλες συνδέονται με τον CuA, οι κατεχόλες προσδένονται στο ενεργό κέντρο μέσω του CuB (14). Είναι σαφές ότι, με την ταυτόχρονη παρουσία φαινολικού υποστρώματος θα υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των λειτουργιών της μονοοξυγενάσης και της οξειδάσης.

Η σύνδεση του κατεχολικού υποστρώματος γίνεται μέσω αποπρωτονίωσης των παρακείμενων υδροξυλομάδων, έτσι ώστε τα οξυγόνα να συντονίζονται ταυτόχρονα με τα δύο ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου. Ο προσανατολισμός διαφέρει από αυτόν της δέσμευσης μονοϋδρικής φαινόλης και μπορεί να ευνοείται στερεοχημικά από την ύπαρξη μιας υδρόφοβης περιοχής στην οποία βρίσκεται το υπόστρωμα (Σχήματα 5 και 6).

Ο οξειδωτικός κύκλος των κατεχολών περιλαμβάνει δύο στάδια (Σχήματα 6 και 7). Στο πρώτο βήμα στο οποίο η oxy-τυροσινάση μετατρέπεται σε met-τυροσινάση (Σχήμα 6), το σύμπλοκο κατεχόλης/ενζύμου διασπάται

απελευθερώνοντας ένα από τα άτομα οξυγόνου του υπεροξειδίου με το δεσμευμένο διοξυγόνο καθώς και την αντίστοιχη όρθο-κινόνη και νερό. Η προκύπτουσα met μορφή του ενζύμου διατηρεί την κατάσταση οξείδωσης των δραστικών ιόντων χαλκού [Cu(II)], με την οποία συντονίζεται το εναπομείναν άτομο οξυγόνου, πιθανώς σε μια πρωτονιωμένη μορφή. Η κατεχόλη μειώνει την γέφυρα υπεροξειδίου μέσω σχηματισμού νερού και οξειδώνεται σε όρθο-κινόνη. Στο δεύτερο στάδιο του κατεχολικού κύκλου φαίνεται ότι ένα δεύτερο μόριο κατεχόλης μειώνει τη δραστηριότητα των χαλκών του ενεργού κέντρου σε Cu(I) δίνοντας deoxy-τυροσινάση και ένα δεύτερο μόριο όρθο-κινόνης (Σχήμα 7). Οι οξειδωτικές καταστάσεις των χαλκών του ενεργού κέντρου επανέρχονται μέσω της δέσμευσης μοριακού οξυγόνου (Σχήμα 5).

1.3.4.1.3 Αυτοενεργοποίηση και περίοδος υστέρησης. met → deoxy- τυροσινάση



Σχήμα 7: Η μετατροπή met → deoxy-τυροσινάση από κατεχόλες.

Ένα χαρακτηριστικό της τυροσινάσης είναι η λεγόμενη “περίοδος υστέρησης” στην οποία η μονοοξείδωση των φαινολικών υποστρωμάτων γίνεται πολύ αργά. Η οξείδωση επιταχύνεται βραδέως έως τη μέγιστη

ταχύτητα κατά τη διάρκεια μιας αρχικής περιόδου υστέρησης. Για να κατανοηθεί η περίοδος υστέρησης, είναι απαραίτητο να εκτιμηθούν οι απαιτήσεις για μετατροπή της met-τυροσινάσης σε deoxy-τυροσινάση (Σχήμα 1). Τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου πρέπει να βρίσκονται σε οξειδωτική κατάσταση Cu(I) για να ενεργοποιηθεί η δέσμευση μοριακού οξυγόνου ως προετοιμασία για την διαδικασία της μονοοξυγενάσης (Σχήμα 4 και 5) [16]. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του χαλκού ευνοεί μια «κατάσταση ηρεμίας» των ιόντων του ενεργού κέντρου στην οξειδωμένη μορφή Cu(II)₂. Γι' αυτό το λόγο η τυροσινάση συναντάται κυρίως ως met-τυροσινάση που βρίσκεται στην σταθερή οξειδωτική κατάσταση Cu(II)₂ κατά την οποία το ένζυμο δεν μπορεί να δεσμεύσει μοριακό οξυγόνο. Συνεπώς δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μονοοξυγενάσης, παρόλο που τα υποστρώματα της μονοοξυγενάσης (φαινόλες) μπορούν αντιστρεπτά να δεσμευθούν από το ενεργό κέντρο. Η ενεργοποίηση της λειτουργίας της μονοοξυγενάσης απαιτεί μείωση του φορτίου των ιόντων χαλκού του ενεργού κέντρου σε Cu(I)₂. Υπάρχουν 4 τρόποι με τους οποίους μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτό:

- Άμεση μείωση από υπεροξείδιο του υδρογόνου[17]
- Αναγωγή με αναγωγικό παράγοντα όπως το ασκορβικό οξύ[18]
- Οξειδοαναγωγή με άλλα μέταλλα[19, 20]
- Μείωση του φορτίου των ιόντων χαλκού από ένα κατεχολικό υπόστρωμα

Έχει αποδειχθεί σε *in vitro* πειράματα ότι ο τελευταίος είναι ο πιο σημαντικός δρόμος. Το Σχήμα 7 συνοψίζει την αλληλουχία κατά την οποία μια κατεχόλη δεσμεύεται από met-τυροσινάση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μιας όρθο-κινόνης και μιας deoxy-τυροσινάσης.

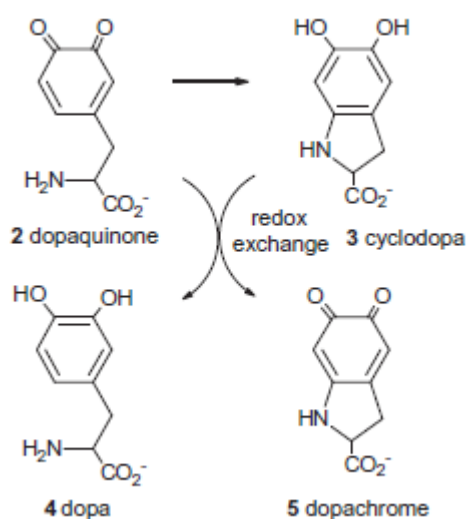
Με την παρουσία μόνο φαινολικών υποστρωμάτων, η αιτία ενεργοποίησης της κατεχόλης δεν είναι ξεκάθαρη. Στην πράξη, σχηματίζονται μέσω όρθο-κινονών. Η τυροσινάση που συναντάται στη φύση περιέχει μικρές ποσότητες οxy-τυροσινάσης που παράγουν αντίστοιχα μικρές ποσότητες όρθο-κινόνης.

Η προσθήκη ενός πυρηνόφιλου υποκαταστάτη στις όρθο-κινόνες παράγει μια κατεχόλη, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει περισσότερη met-τυροσινάση και η αλληλουχία συνεχίζεται μέχρι όλο το ένζυμο να είναι σε μορφή oxy.

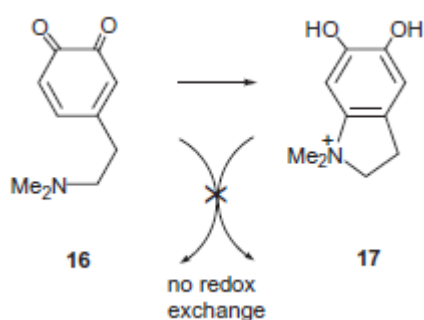
Ο μηχανισμός που ακολουθείται στην μετατροπή της L-τυροσίνης (1) έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Με τη δράση της μονοοξυγενάσης η τυροσίνη δίνει ντοπακινόνη (2) που μέσω ταχύτατης κυκλοποίησης μετατρέπεται σε κυκλοντόπα (3) (Σχήμα 8) [21]. Μέσω οξειδοαναγωγικής ανταλλαγής με μια ντοπακινόνη (2) παράγεται ντόπα (4) και ντοπάχρωμα (5). Έτσι, μικρές ποσότητες ενζύμου με δραστηριότητα μονοοξυγενάσης αρχικά, παράγουν ντόπα (4) από L-τυροσίνη και αυτό ενεργοποιεί μεγαλύτερο ποσοστό του met-ενζύμου. Αυτή η διαδικασία εξηγεί την *in vitro* κινητική της δράσης της τυροσινάσης στα μονο-υδρικά φαινολικά υποστρώματα, ένα από τα χαρακτηριστικά της οποίας είναι η περίοδος υστέρησης. Ο μηχανισμός αυτός (Σχήμα 7), δείχνει επίσης πως η ντόπα (4), η οποία προκύπτει από την κατάλυση του φυσικού μονοφαινολικού υποστρώματος L-τυροσίνη (1), σχηματίζεται από έναν έμμεσο μηχανισμό και όχι με απευθείας οξείδωση του ενζύμου [22]. Η κινητική της ταχύτατης οξειδοαναγωγικής ανταλλαγής έχει μελετηθεί με χρήση παλμικής ραδιόλυσης [23-25].

Απόδειξη ότι η ενεργοποιημένη κατεχόλη σχηματίζεται έμμεσα μέσω της οδού οξειδοαναγωγικής ανταλλαγής προέρχεται από πειράματα που χρησιμοποιούν τροποποιημένα μονο-υδρικά υποστρώματα. Η N, N-διμεθυλτυραμίνη οξειδώνεται στην αντίστοιχη όρθο-κινόνη (16) και υποβάλλεται σε κυκλοποίηση, αλλά δεν είναι σε θέση να λάβει μέρος στην οξειδοαναγωγική ανταλλαγή και συνεπώς δεν σχηματίζεται ενεργοποιημένη κατεχόλη (Σχήμα 9) [26]. Ο λόγος που το προϊόν (17) δεν μπορεί να λάβει μέρος στην αντίδραση οξειδοαναγωγικής ανταλλαγής είναι ότι πρόκειται για ένα κυκλικό άλας ινδολίου (17), το οποίο έχει ένα οξειδοαναγωγικό δυναμικό, δυσμενές για την οξειδοαναγωγική ανταλλαγή με πρόδρομο την όρθο-κινόνη (16) του [27]. Ο δακτύλιος που φέρει την ομάδα δέκτη ηλεκτρονίων Me_2N^+ απενεργοποιείται κατά την οξειδοαναγωγική ανταλλαγή,

σε αντίθεση με τον ενεργοποιημένο υποκαταστάτη δότη ηλεκτρονίων NH στην κυκλοντόπα (3).



Σχήμα 8: Οξειδοαναγωγική ανταλλαγή που οδηγεί σε μη ενζυμικό σχηματισμό της ντόπας.

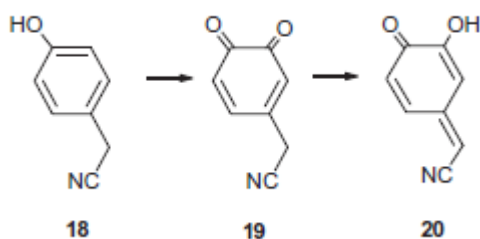


Σχήμα 9: Η τεταρτογενής υποκατάσταση αποκλείει την οξειδοαναγωγική ανταλλαγή.

Οι φαινόλες που δεν έχουν μια κατάλληλη πυρηνόφιλη πλευρική ομάδα υποβάλλονται επίσης σε δραστικότητα μονοοξειδάσης μετά από μία περίοδο υστέρησης και πολλές φαινόλες, όπως η 4-υδροξυανισόλη, οξειδώνονται με τον τρόπο αυτό. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αρχική όρθο-κινόνη μπορεί να υποστεί ενδομοριακή προσθήκη ενός πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου για να προκύψει μια κατεχόλη.

Εύκολες προσθήκες σε όρθο-κινόνες συμβαίνουν με θειόλες [28, 29] και αμινομάδες αμινοξέων σε πρωτεΐνες και πεπτίδια [30]. Αυτή η οδός αντιπροσωπεύει επίσης την παραγωγή ενεργοποιημένης κατεχόλης στην περίπτωση άλλων υποστρωμάτων όπως η N, N, N-τριμεθυλοτυραμίνη [26].

Στις περιπτώσεις όπου η πυρηνόφιλη προσθήκη στην κινόνη εξαρτάται από ένα εξωτερικό πυρηνόφιλο, έχει αποδειχθεί *in vitro* ότι το ίδιο το ένζυμο μπορεί να δράσει ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο [31] και ότι το επισημασμένο υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο με την τυροσινάση [30]. Το δεσμευμένο προϊόν μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε οξειδοαναγωγική ανταλλαγή με το μη δεσμευμένο πρόδρομο μόριο όρθο-κινόνης να μετατρέπεται σε ενεργοποιημένη κατεχόλη [26]. Η 4-κυανομεθυλοφαινόλη (18) παρουσιάζει ανώμαλες ιδιότητες και αδυνατεί να συμπεριφερθεί ως υπόστρωμα ενεργοποίησης. Αυτό έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει λόγω του ταχέως ταυτομερισμού της όρθο-κινόνης (19) σε παρα-κινόμεθάνιο (20) που εμποδίζει την παραγωγή της ενεργοποιημένης κατεχόλης (Σχήμα 10) [32]. Αρκετά υποστρώματα αποκλεισμού δακτυλίου έχουν επίσης ερευνηθεί και στην περίπτωση της 2,5,6-τριφθορο-4-υδροξυανισόλης σχηματίζεται η αντίστοιχη όρθο-κινόνη, αλλά δεν μπορεί να υποβληθεί σε πυρηνόφιλη προσθήκη και καμία ενεργοποίηση δεν συμβαίνει [33]. Οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ενεργοποιημένες κατεχόλες σχηματίζονται έμμεσα.

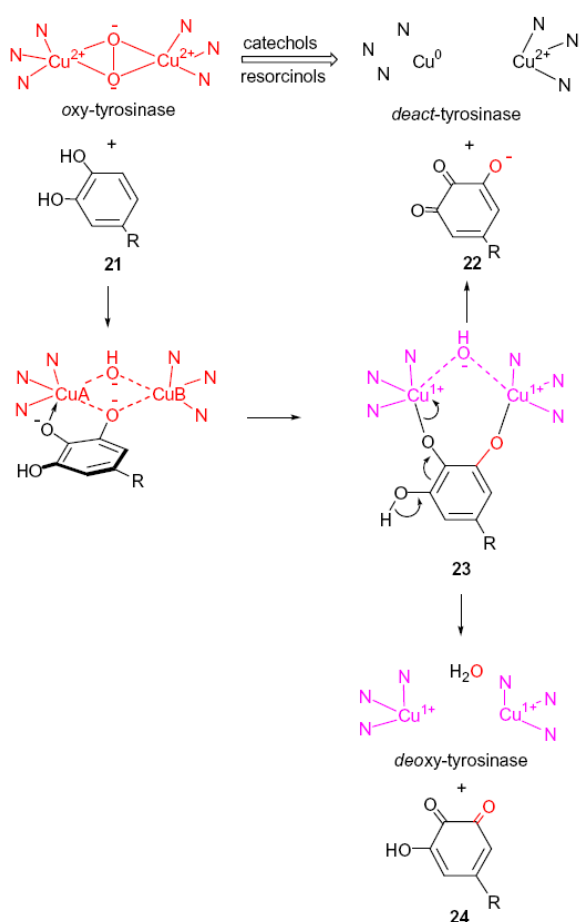


Σχήμα 10: Η αναδιάταξη σε κινόμεθάνιο ανάλογο αποτρέπει το σχηματισμό μιας κατεχόλης που ενεργοποιεί το ένζυμο.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εξήγηση της αυτοενεργοποίησης της τυροσινάσης που παρουσιάζεται εδώ ισχύει για ένα απλοποιημένο σενάριο.

Η μεταφορά των *in vitro* ευρημάτων στις φυσιολογικές συνθήκες των μελανοσωμάτων περιλαμβάνει φυσικά πολλές επιπλοκές, καθώς ο έλεγχος των αντιδράσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ενδομελανοσωματικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Ωστόσο, ο γενικός μηχανισμός που περιγράφεται είναι σύμφωνος με τα γνωστά βιοχημικά χαρακτηριστικά της μελανογένεσης [1].

1.3.4.1.4 oxy → deact- τυροσινάση: απενεργοποίηση από κατεχόλες και ρεσορκινόλες



Σχήμα 11: Η μετατροπή oxy → deact- τυροσινάση από κατεχόλες.

Για πάνω από εξήντα χρόνια είναι αναγνωρισμένο ότι η τυροσινάση αδρανοποιείται βραδέως κατά την οξείδωση των κατεχολών. Είναι γνωστό ότι τα ώριμα μελανοσώματα (κοκκία μελανίνης) στερούνται δραστηριότητας

του ενζύμου της τυροσινάσης και υπάρχει μία αμοιβαία σχέση μεταξύ δραστηριότητας τυροσινάσης και βαθμού μελανοποίησης.

Αρχικά εικάζεται ότι η *in vivo* απώλεια της δραστηριότητας προκύπτει όταν τα μελανογόνα ένζυμα επικαλύπτονται με το προϊόν τους και στη συνέχεια αδρανοποιούνται από αυτό το περίβλημα. Ωστόσο, η *in vitro* αδρανοποίηση της τυροσινάσης πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα μελανοσώματα όπου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η ντόπα. Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι η ταχύτητα απενεργοποίησης είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του προϊόντος [34], αλλά είναι συνάρτηση της αρχικής ποσότητας τυροσινάσης [35]. Υπάρχει η πιθανότητα η αδρανοποίηση τυροσινάσης να επιφέρεται από δραστικά είδη οξυγόνου, αλλά αυτό δεν μπόρεσε να επαληθευθεί πειραματικά καθώς δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθεί είτε μονήρες οξυγόνο είτε δισμουτάση που σχηματίζεται από οξειδωση ντόπας καταλυόμενης από τυροσινάση, ούτε επίσης ανιχνεύθηκαν ρίζες υδροξυλίου. Πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν μονήρες οξυγόνο και οξυ-περισυλλέκτες ριζών, καθώς και η προσθήκη της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης, όλα απέτυχαν να επηρεάσουν την κινητική της απενεργοποίησης. Δεν υπήρχε ικανοποιητική εξήγηση για το φαινόμενο της αδρανοποίησης μέχρι το 2007, όταν ο Land και οι συνάδελφοι του πρότειναν ότι τα κατεχολικά υποστρώματα μπορεί κάποιες φορές να λειτουργήσουν όπως οι φαινόλες και να οξειδωθούν με τη δραστηριότητα της μονοοξυγενάσης [36] (Σχήμα 11). Η μονοοξυγενάση μετατρέπει την κατεχόλη (21) στο υποτιθέμενο ενδιάμεσο (23), το οποίο κατά τη συνήθη πορεία δίνει 3-υδροξυκινόνη (24) και deoxy-τυροσινάση. Ωστόσο, η παρουσία ενός επιπλέον υποκαταστάτη υδροξυλίου παρέχει μία εναλλακτική μέθοδο διάσπασης του ενδιάμεσου (23). Η αποπρωτονίωση μπορεί να οδηγήσει σε αναγωγική απόσπαση ενός από τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου δίνοντας κινόνη (22). Αυτός ο μηχανισμός είναι συνεπής με το εύρημα των Dietler και Lerch [37] ότι ο ρυθμός αδρανοποίησης σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση τυροσινάσης και εξηγεί την παρατήρηση ότι η δραστηριότητα της οξειδάσης της τυροσινάσης μειώνεται δραστικά με την απώλεια των μισών ιόντων χαλκού

του ενεργού κέντρου. Επιπρόσθετες αποδείξεις που ευνοούν την ύπαρξη αυτού του μηχανισμού συνοψίζονται ως εξής:

- Ο μηχανισμός εξαρτάται από την αναλογία ενός κατεχολικού υποστρώματος που υφίσταται την δραστικότητα μονοοξυγενάσης υπό την παρουσία πυρογαλλόλης (1,2,3-τριυδροξυβενζόλιο), η οποία μπορεί να εμφανιστεί μόνο ως κατεχόλη, και δεν εμφανίζει κινητική απενεργοποίησης [36].
- Η αναστολή της δράσης της μονοοξυγενάσης από την παρεμπόδιση των γειτονικών ατόμων άνθρακα του δακτυλίου μιας κατεχόλης αποτρέπει την απενεργοποίηση από το μηχανισμό αυτό, όπως αποδείχθηκε στην περίπτωση της 3, 6-διφθοριοκατεχόλης [38].
- Μια οξειδάση κατεχόλης χωρίς δραστικότητα μονοοξυγενάσης, όπως το ένζυμο που εξάγεται από τις μπανάνες (*Musa cavendishii*), αποτυγχάνει να προκαλέσει αδρανοποίηση [39].
- Δεδομένου ότι η απενεργοποίηση είναι συνέπεια της δραστικότητας της μονοοξυγενάσης, ο ρυθμός αδρανοποίησης αναμένεται να μειωθεί με την εισαγωγή ενός ανταγωνιστικού μονοϋδρικού υποστρώματος φαινόλης [36].
- Επειδή ο μηχανισμός απαιτεί αποπρωτονίωση, η απενεργοποίηση πρέπει να καταστέλλεται από αυξημένη συγκέντρωση πρωτονίων και αυτό έχει παρατηρηθεί [36].
- Αναμένεται ότι ο προσανατολισμός σύνδεσης του υποστρώματος στην περίπτωση της οξειδάσης διαφέρει από αυτόν της ανασταλτικής δραστικότητας της μονοοξυγενάσης και ότι αυτό αντανakλάται με διακριτά χαρακτηριστικά συνάφειας, όταν συγκρίνεται η επίδραση των υποκαταστατών δακτυλίου [40].

Η πειραματική απόδειξη που περιγράφεται παραπάνω έχει αξιολογηθεί κριτικά [41]. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι αυτός ο μηχανισμός αδρανοποίησης μπορεί επίσης να ευθύνεται για την μη αναστρέψιμη

αναστολή της τυροσινάσης από ρεσορκινόλες [42], ενώ η υδροκινόνη δεν αποτελεί υπόστρωμα τυροσινάσης [43].

Μολονότι υπήρξε σημαντική πρόοδος στην αποκάλυψη της τρισδιάστατης δομής της τυροσινάσης και σχετικών πρωτεϊνών, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλές αδιευκρίνιστες λεπτομέρειες σε σχέση με την εξειδίκευση της δέσμευσης υποστρώματος, καθώς και την τροποποίηση του προ-ενζύμου και την διαδικασία της ενσωμάτωσης του μετάλλου. Ωστόσο, οι καταλυτικές ιδιότητες της τυροσινάσης καθορίζονται από τις εναλλακτικές οξειδωτικές καταστάσεις του ενεργού κέντρου των εν λόγω τύπου-3 πρωτεϊνών του χαλκού και τα γενικά κινητικά χαρακτηριστικά μπορούν να εξηγηθούν μέσω της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών καταστάσεων αυτών [44].

1.4 Αναστολείς τυροσινάσης

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, οι αναστολείς τυροσινάσης έχουν προκαλέσει μεγάλη ανησυχία, η οποία οφείλεται αποκλειστικά στο σημαντικό ρόλο της τυροσινάσης τόσο στη μελανογένεση των θηλαστικών όσο και στην ενζυμική αμαύρωση φρούτων ή μανιταριών. Η μελανογένεση έχει οριστεί ως το σύνολο της διαδικασίας που οδηγεί στο σχηματισμό της μελανίνης. Η μελανίνη σχηματίζεται από ένα συνδυασμό ενζυμικά καταλυόμενων και χημικών αντιδράσεων. Η μελανίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του δέρματος από τις βλαβερές συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας από τον ήλιο. Για παράδειγμα, η έλλειψη τυροσινάσης ή η δυσκολία μεταβολισμού της τυροσίνης με σκοπό την παραγωγή μελανίνης, προκαλεί την πάθηση Αλφισμός στον άνθρωπο. Η μελανίνη καθορίζει επίσης τη φαινοτυπική εμφάνισή μας.

Μολονότι η μελανίνη έχει κυρίως φωτοπροστατευτική λειτουργία στο ανθρώπινο δέρμα, η συσσώρευση παραπάνω από τη φυσιολογική ποσότητα μελανίνης σε διάφορα συγκεκριμένα σημεία του δέρματος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο σκούρων κηλίδων - πανάδων, το οποίο δημιουργεί αισθητικό πρόβλημα. Αυτά τα φαινόμενα οδήγησαν τους

ερευνητές στην έρευνα για την εύρεση νέων αναστολέων της τυροσινάσης με δυνητικές χρήσεις τόσο στα τρόφιμα όσο και στα καλλυντικά.

Έχει ταυτοποιηθεί ένας αριθμός αναστολέων τυροσινάσης, τόσο από φυσικές όσο και από συνθετικές πηγές. Ωστόσο, ο ορισμός “αναστολέας της τυροσινάσης” μερικές φορές είναι παραπλανητικός: πολλοί συγγραφείς χρησιμοποιούν αυτή την ορολογία σε σχέση με τους αναστολείς μελανογένεσης, των οποίων η δράση έγκειται κυρίως σε κάποια παρέμβαση στο σχηματισμό μελανίνης, ανεξάρτητα από οποιαδήποτε άμεση αλληλεπίδραση αναστολέα / ενζύμου. Πολλοί δυνητικοί αναστολείς εξετάζονται παρουσία τυροσίνης ή ντόπας ως υπόστρωμα του ενζύμου και η δραστηριότητα αξιολογείται από τον σχηματισμό ντοπαχρώματος. Έτσι, η πειραματική παρατήρηση αναστολής της δραστηριότητας της τυροσινάσης εξαρτάται από τις παρακάτω ομάδες ενώσεων:

(1) Παράγοντες που προκαλούν χημική αναγωγή της ντοπακινόνης, όπως το ασκορβικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ως αναστολέας μελανογένεσης λόγω της ικανότητάς του να μειώνει την L-ντοπακινόνη σε ντόπα, αποφεύγοντας έτσι το σχηματισμό ντοπαχρώματος και μελανίνης.

(2) Δεσμευτές ντοπακινόνης, όπως οι περισσότερες ενώσεις που περιέχουν θείο, και είναι γνωστοί αναστολείς μελανογένεσης, που αντιδρούν με ντοπακινόνη για να σχηματίσουν άχρωμα προϊόντα. Η διαδικασία μελανογένεσης, ως εκ τούτου επιβραδύνεται μέχρι να καταναλωθεί όλος ο αποικοδομητής και στη συνέχεια επιστρέφει στον αρχικό ρυθμό της.

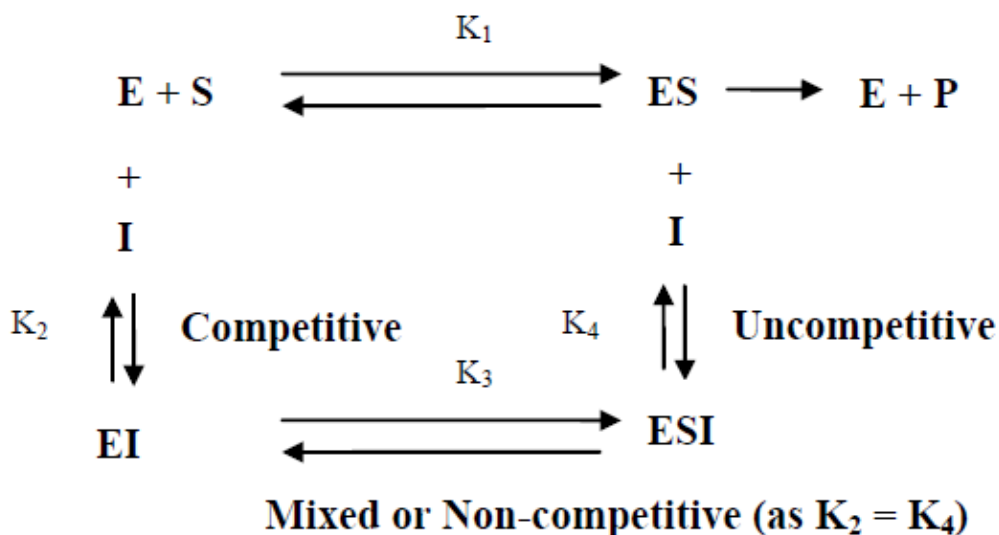
(3) Εναλλακτικά υποστρώματα ενζύμων, όπως ορισμένες φαινολικές ενώσεις, των οποίων τα κινονοειδή προϊόντα της αντίδρασης απορροφούν σε ένα φασματικό εύρος διαφορετικό από εκείνο του ντοπαχρώματος. Όταν αυτές οι ενώσεις εμφανίζουν μια καλή χημική συγγένεια για το ένζυμο, ο σχηματισμός ντοπαχρώματος αποτρέπεται.

(4) Μη ειδικούς απενεργοποιητές ενζύμων όπως οξέα ή βάσεις, οι οποίοι, χωρίς να γνωρίζουμε τον ακριβή τρόπο, μετουσιώνουν το ένζυμο αναστέλλοντας έτσι τη δράση του.

(5) Ειδικούς απενεργοποιητές τυροσινάσης, όπως οι αναστολείς που βασίζονται στον μηχανισμό, οι οποίοι καλούνται επίσης υποστρώματα αυτοκτονίας. Αυτοί οι αναστολείς μπορεί να καταλύονται από την τυροσινάση και να σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο. Με αυτόν τον τρόπο αδρανοποιούν μη αντιστρεπτά το ένζυμο κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αντιδράσεως. Αναστέλλουν τη δραστικότητα της τυροσινάσης, επάγοντας την καταλυόμενη "αντίδραση αυτοκτονίας" του ενζύμου.

(6) Εξειδικευμένους αναστολείς της τυροσινάσης που συνδέονται αντιστρεπτά με την τυροσινάση και μειώνουν την καταλυτική ικανότητα της.

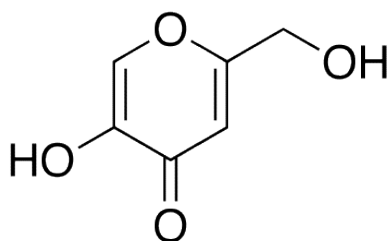
Μεταξύ των έξι τύπων των ενώσεων που περιγράφονται ανωτέρω, μόνο συγκεκριμένοι απενεργοποιητές τυροσινάσης (5) και αναστολείς (6) θεωρούνται ως "πραγματικοί" αναστολείς, οι οποίοι συνδέονται με το ένζυμο και αναστέλλουν την δραστικότητά του. Γενικά, οι ψεύδο-αναστολείς εμφανίζουν μόνο ασθενή ανασταλτική δράση, λόγω της ιδιότητά τους να αντιδρούν και να αναλώνονται με το ένζυμο ή τα προϊόντα κίνησης. Αν και ορισμένοι αναστολείς τυροσινάσης παρουσιάζουν πολυλειτουργικές ιδιότητες, οι ενώσεις, οι οποίες είναι γνωστά αναγωγικά μέσα είτε δεσμευτές της ντοπακινόνης, είτε υποστρώματα τυροσινάσης, προφανώς δεν είναι κατάλληλα για σύγκριση με τους πραγματικούς αναστολείς [2].



Σχήμα 12: Ο μηχανισμός δράσης των αντιστρεπτών αναστολέων. Τα E, S, I και P είναι το ένζυμο, το υπόστρωμα, ο αναστολέας και το προϊόν αντίστοιχα. Το ES είναι το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, και τα EI και ESI είναι τα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα και ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα, αντίστοιχα.

Συνήθως, οι αναστολείς ταξινομούνται σε τέσσερις τύπους: (i) ανταγωνιστικοί, (ii) συναγωνιστικοί, (iii) μικτού τύπου (μη ανταγωνιστικοί/συναγωνιστικοί), και (iv) μη-ανταγωνιστικοί (Σχήμα 11). Ένας ανταγωνιστικός αναστολέας είναι αυτός που συνδέεται με ένα ελεύθερο ένζυμο με τρόπο που αποτρέπει την δέσμευση του υποστρώματος, ανταγωνίζεται δηλαδή τη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν αποκλειστικά μεταξύ τους, συχνά λόγω του πραγματικού ανταγωνισμού για την ίδια θέση. Ένας ανταγωνιστικός αναστολέας μπορεί να είναι μια χηλική ένωση η οποία σχηματίζει χηλικό σύμπλοκο χαλκού, μη μεταβολιζόμενα ανάλογα ή παράγωγα του πραγματικού υποστρώματος. Σε αντίθεση, ένας συναγωνιστικός αναστολέας μπορεί να συνδεθεί μόνο με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Ένας μικτού τύπου (ανταγωνιστικός και συναγωνιστικός) αναστολέας μπορεί να συνδεθεί όχι μόνο με ένα ελεύθερο ένζυμο, αλλά και με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Για τους περισσότερους αναστολείς μικτού τύπου, οι σταθερές ισορροπίας τους για το

ελεύθερο ένζυμο και το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, αντίστοιχα, είναι διαφορετικές. Ωστόσο, μια ειδική περίπτωση μεταξύ των μικτών αναστολέων είναι οι μη-ανταγωνιστικοί αναστολείς, οι οποίοι δεσμεύονται από ένα ελεύθερο ένζυμο και ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος με την ίδια σταθερά ισορροπίας. Επιπλέον του ανασταλτικού μηχανισμού, η ανασταλτική δύναμη είναι το πρωταρχικό κριτήριο ενός αναστολέα. Η δύναμη ενός αναστολέα ορίζεται συνήθως από την τιμή IC₅₀, που είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται για να αναστείλει το ήμισυ της δραστηριότητας του ενζύμου. Ωστόσο, για τους αναστολείς τυροσινάσης στη βιβλιογραφία, οι τιμές IC₅₀ είναι μη συγκρίσιμες λόγω των διαφορετικών συνθηκών των αντίστοιχων πειραμάτων, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος, ποικίλων χρόνων επώασης και διαφορετικών παρτίδων εμπορικής τυροσινάσης.



Εικόνα 2: Η δομή του κοτζικού οξέος.

Στις περισσότερες μελέτες που διεξάγονται για την ανακάλυψη νέων αναστολέων τυροσινάσης, ένας γνωστός αναστολέας της τυροσινάσης όπως το κοτζικό οξύ (kojic acid) συχνά παρουσιάζεται στο ίδιο διάγραμμα για να συγκριθούν οι ικανότητες αναστολής των δύο αναστολέων. Το κοτζικό οξύ (Εικόνα 2), ο πιο πολυμελετημένος αναστολέας τυροσινάσης, είναι ένας μεταβολίτης που ανευρίσκεται σε διάφορα είδη μανιταριών κυρίως στο *Aspergillus oryzae*, και που χρησιμοποιείται στην κοσμητολογία ως λευκαντικό δέρματος και ως ενισχυτικό τροφίμων για να αποτρέπεται η ενζυμική αμαύρωση [45]. Κατά τη δραστηριότητα της μονοφαινολάσης παρουσιάζει ανταγωνιστική αναστολή και κατά τη δραστηριότητα της διφαινολάσης παρουσιάζει μικτή αναστολή. Η ικανότητα του κοτζικού οξέος να συνδέεται χηλικά με το ιόν χαλκού του ενεργού κέντρου του ενζύμου

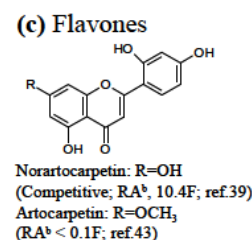
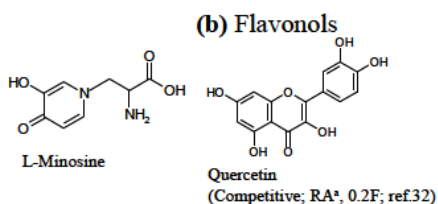
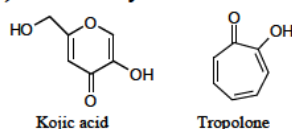
μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη ανταγωνιστική ανασταλτική δράση. Επιπλέον, το κοτζικό οξύ έχει αναφερθεί ότι είναι ένας αργής σύνδεσης αναστολέας της δραστηριότητας της διφαινολάσης [46]. Αυτό σημαίνει ότι η δραστική μορφή της τυροσινάσης, που δημιουργείται στον καταλυτικό κύκλο με την παρουσία του υποστρώματος, απαιτείται πριν από την πρόσδεση του αναστολέα στο ένζυμο. Άλλοι αργής σύνδεσης αναστολείς της τυροσινάσης είναι ο πολύ ισχυρός αναστολέας τροπολόνη [47] και το ανάλογο υποστρώματος L-mimosine.

1.4.2 ΜΕΓΑΛΕΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

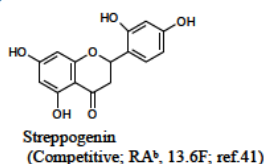
Οι σημαντικότεροι αναστολείς τυροσινάσης χωρίζονται σε 5 βασικές κατηγορίες: (i) πολυφαινόλες, (ii) βενζαλδεϋδικά και βενζοϊκά παράγωγα, (iii) λιπίδια μακρικής αλυσίδας και στεροειδή, (iv) φυσικοί και συνθετικοί αναστολείς και (v) μη αντιστρεπτοί απενεργοποιητές.

1.4.2.1 Πολυφαινόλες

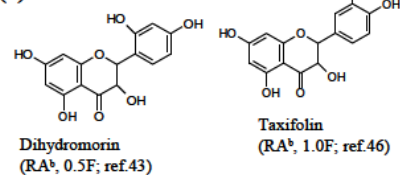
(a) Standard tyrosinase inhibitors



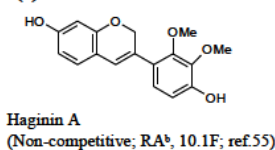
(d) Flavanones



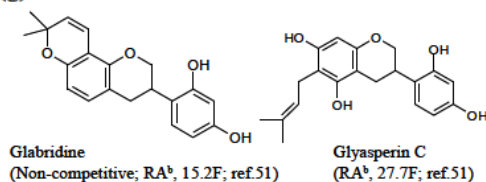
(e) Flavanols



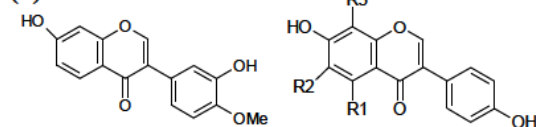
(f) Isoflav-3-en



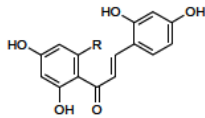
(g) Isoflavans



(h) Isoflavones



(i) Chalcones

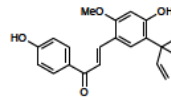


2,4,2',4'-Tetrahydroxychalcone: R=H
(Competitive; RA^b, 2.5F; ref.66)
2,4,6,2',4'-Pentahydroxychalcone: R=OH
(Competitive; RA^b, 12.0F; ref.66)

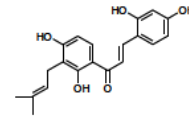
Calycosin
(RA^b, 1.3F; ref.57)

6-Hydroxydaidzein: R1=R3=H, R2=OH
(Competitive; RA^b, 6.0F; ref.53)
8-Hydroxydaidzein: R1=R2=H, R3=OH
(Suicide substrate; ref.54)
8-Hydroxygenistein: R1=R3=OH, R2=H
(Suicide substrate; ref.54)

(j) Prenylated Chalcones

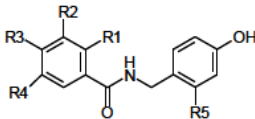


Licochalcone A
(Competitive; RA^b, 5.4F; ref.58)

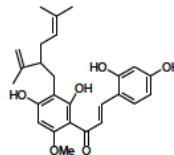


TMBC
(Competitive; RA^b, 26.1F; ref.61)

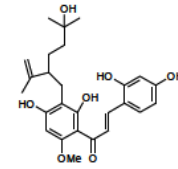
(k) N-Benzylbenzamides



3,5,2',4'-Tetrahydroxyl derivatives: R1=R3=H,
R2=R4=R5=OH (RA^a, 7.4F; ref.67)
2,4,2',4'-Tetrahydroxyl derivatives: R1=R3=R5=OH,
R2=R4=H (RA^a, 0.6F; ref.67)
3,5,4'-Trihydroxyl derivatives: R1=R3=R5=H,
R2=R4=OH (RA^a<<0.1F; ref.67)
2,4,4'-Trihydroxyl derivatives: R1=R3=OH,
R2=R4=R5=H (RA^a<<0.1F; ref.67)



Kuraridin
(RA^b, 34.1F; ref.59)



Kuraridinol
(Non-competitive; RA^b, 18.4F; ref.60)

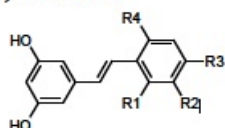
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικές δομές επιλεγμένων πολυφαινολικών αναστολέων της τυροσινάσης

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα αναστολέων της τυροσινάσης μέχρι σήμερα (Εικόνα 3). Οι πολυφαινόλες μπορούν να χωριστούν σε πολλές διαφορετικές υποκατηγορίες, όπως ανθοκυάνες (χρώματα στα φρούτα), φλαβονοειδή (κατεχίνες, τανίνες στο τσάι και στο κρασί) και μη-φλαβονοειδή συστατικά (γαλλικό οξύ στα φύλλα τσαγιού). Τα φλαβονοειδή σχηματίζονται στα φυτά από τα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Επειδή διάφορες πολυφαινόλες γίνονται αποδεκτές ως υποστρώματα τυροσινάσης, εξαρτάται από την παρουσία και τη θέση των υποκαταστατών για το αν μια πολυφαινόλη μπορεί να λειτουργήσει ως αναστολέας. Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο πολυάριθμων και καλύτερα μελετημένων πολυφαινολών, και συγκεκριμένα τα παράγωγα βενζο-γ-πυρόνης που αποτελούνται από φαινολικά και δακτυλίους πυρενίου [48]. Η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων συναντάται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, στους σπόρους, στους φλοιούς, και στα άνθη των φυτών. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή. Στα φυτά, οι ενώσεις αυτές παρέχουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, τα παθογόνα, και τα φυτοφάγα ζώα. Είναι επίσης υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά κόκκινα και μπλε χρώματα των μούρων, των κρασιών,

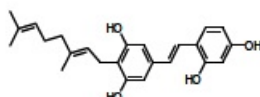
καθώς και ορισμένων λαχανικών. Τα φλαβονοειδή μπορούν να υποδιαιρεθούν σε επτά μεγάλες ομάδες τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ισοφλαβονοειδή, χαλκόνες και κατεχίνες.

1.4.2.2 Βενζαλδεϊδικά και βενζοϊκά παράγωγα

(a) Stilbenes

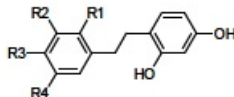


Oxyresveratrol: R1=R3=OH, R2=R4=H
(Non-competitive; RA^b, 33.4F; ref.69)
Gnetol: R1=R4=OH, R2=R3=H
(RA^b, 29.2F; ref.71)
Piceatannol: R1=R4=H, R2=R3=OH
(RA^b, 32.7F; ref.72)

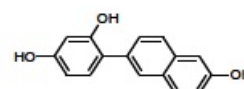


Chloropirin
(RA^b, 14.8F; ref.70)

(b) Bibenzyl derivatives

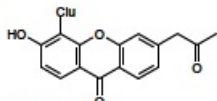


2,4,3',5'-Tetrahydroxybibenzyl:
R1=R3=H, R2=R4=OH
(RA^a, 83.4F; ref.75)
2,4,2',4'-Tetrahydroxybibenzyl:
R1=R3=OH, R2=R4=H
(RA^a, 20.1F; ref.76)
2,4,2'-Trihydroxybibenzyl:
R1=OH, R2=R3=R4=H
(RA^a, 22.3F; ref.77)

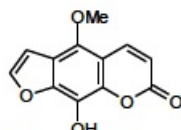


HNB
(Competitive; RA^b, 546F; ref.79)

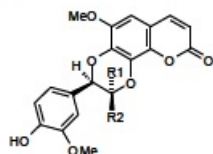
(c) Coumarins



Aloesin
(Competitive; RA^b, 0.2F; ref.80)

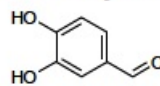


9-Hydroxy-4-methoxypsoralen
(Non-competitive; RA^b, 6.4F; ref.84)

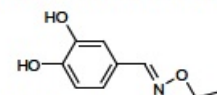


8'-epi-cleomiscosin A: R1=H, R2=CH₂OH
(RA^a, 12.8F; ref.85)
Cleomiscosin A: R1=CH₂OH, R2=H
(RA^a, 0.8F; ref.85)

(d) Benzaldehyde derivatives



Protocatechualdehyde
(Competitive; RA^b, 7.8F; ref.100)



3,4-Dihydroxybenzaldehyde-O-ethylloxime
(RA^a, 73.1F; ref.106)

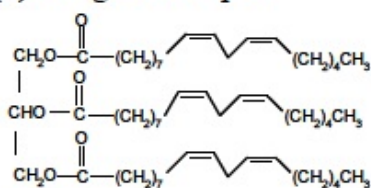
Εικόνα 4: Χημικές δομές από επιλεγμένους αναστολείς τυροσινάσης που ανήκουν στις κατηγορίες στυλβένια, βενζοϊκά παράγωγα, κουμαρίνες και βενζαλδεϊδικά παράγωγα.

Κατά την τελευταία δεκαετία, ένας μεγάλος αριθμός των βενζαλδεϊδικών και βενζοϊκών παραγώγων (Εικόνα 4) έχουν απομονωθεί από φυτά και προσδιορίζονται ως αναστολείς της τυροσινάσης, συμπεριλαμβανομένων των: βενζοϊκό οξύ, βενζαλδεΐδη, ανισικό οξύ, ανισαλδεΐδη, κινναμικό οξύ, και μεθοξυκινναμωμικό οξύ από τις ρίζες του *Pulsatilla cernua* [49], υποκατεστημένες βενζαλδεΐδες από κύμινο [50], 2-υδροξυ-4-μεθοξυβενζαλδεΐδη από τις ρίζες του *Mondia whitei* [51], p-κουμαρικό οξύ από τα φύλλα του *Panax ginseng* [52], υδροξυκινναμυλο-παράγωγα από πράσινους κόκκους καφέ [53], και βανιλλικό οξύ και τα παράγωγά του από

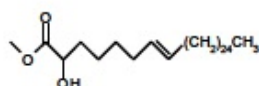
το μαύρο πίτουρο ρυζιού [54]. Η ομάδα αλδεΐδης είναι γνωστό ότι αντιδρά με πυρηνόφιλες ομάδες όπως σουλφυδρύλ-, αμινο-, και ομάδες υδροξυλίου. Ο μηχανισμός αναστολής τυροσινάσης των αναστολέων τύπου-βενζαλδεΐδης προέρχεται από την ικανότητά τους να σχηματίσουν μια βάση του Schiff με μία πρωτοταγή αμινομάδα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [55]. Σε αντίθεση, το βενζοϊκό οξύ αναστέλλει την τυροσινάση με ένα μηχανισμό χηλικής δέσμευσης χαλκού και ανήκει σε ένα τυπικό αναστολέα τύπου-HA οξύ τυροσινάσης, του οποίου ο ανασταλτικός μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της μη ιονισμένης μορφής του αναστολέα και του ιόντος χαλκού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Από την άποψη της ανασταλτικής δύναμης, όλα τα φυσικώς ενυπάρχοντα βενζαλδεΐδικά και βενζοϊκά παράγωγα που αναφέρονται παραπάνω έχουν δείξει ασθενή έως μέτρια αναστολή τυροσινάσης, ενώ κανένα δεν είχε ισχυρότερη από αυτήν του κοτζικού οξέος. Ο πιο ισχυρός φυσικός αναστολέας τύπου βενζαλδεΐδης δεν εντοπίστηκε σε φυτά, αλλά σε ένα μύκητα. Η Protocatechualdehyde απομονώθηκε από το σώμα καρποφορίας του *Phellinus linteus* και παρουσίασε 7.8 φορές πιο μεγάλη ανασταλτική δραστηριότητα τυροσινάσης από εκείνη του κοτζικού οξέος [56].

1.4.2.3 Λιπίδια μακρικής αλυσίδας και στεροειδή

(a) Long-chain lipids

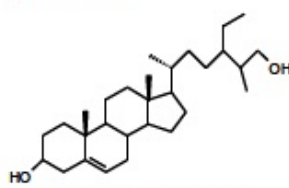


(Non-competitive; RA^a, 1.7F; ref.116)

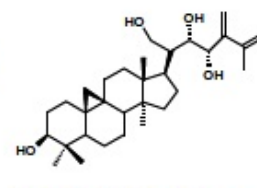


(RA^a, 12.3F; ref.120)

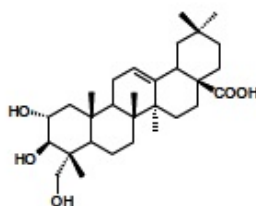
(b) Steroids



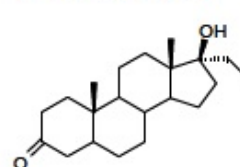
(RA^a, 7.2F; ref.119)



(RA^a, 12.6F; ref.121)



(RA^a, 16.7F; ref.123)



(RA^a, 9.8F; ref.129)

Εικόνα 5: Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν στις κατηγορίες λιπιδίων μακρικής αλυσίδας και στεροειδών.

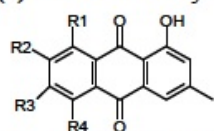
Πρόσφατα, αρκετά λιπίδια απομονώθηκαν από φυσικές πηγές και επέδειξαν ανασταλτική δραστηριότητα τυροσινάσης. Μια τριακυλογλυκερόλη, η τριλινολεΐνη (Εικόνα 5a), απομονώθηκε από κατακάθια sake, τα οποία είναι υποπροϊόντα της παραγωγής sake, και αποδείχθηκε ότι είναι τόσο ισχυρός αναστολέας όσο το κοτζικό οξύ στην αναστολή της δραστηριότητας της διφαινολάσης της τυροσινάσης [57]. Ένα γλυκοσφιγγολίπδιο, το soyacerebroside I, το οποίο αποτελείται από μία σφιγγοειδή βάση σκελετού, ένα αμιδικό αλειφατικό λιπαρό οξύ μακρικής αλύσου και ένα τμήμα β-γλυκοπυρανόζης, απομονώθηκε από τα φύλλα του *Guioa villosa* και βρέθηκε να αναστέλλει τις δραστηριότητες της μονοφαινολάσης και της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού με τη μισή δραστηριότητα αναστολής σε σχέση με το κοτζικό οξύ [58].

Επιπροσθέτως, μερικά στεροειδή προσδιορίστηκαν ως αναστολείς τυροσινάσης. Πολλές μελέτες στον τομέα αυτό προέρχονταν από την ερευνητική ομάδα των Choudhary και Khan. Τρία στεροειδή απομονώθηκαν από αυτούς τους ερευνητές από τα εναέρια μέρη του *Trifolium balansae* και

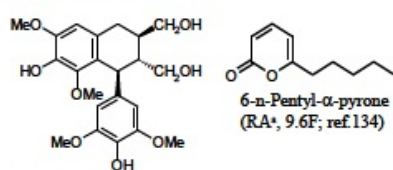
έδειξαν ισχυρότερη αναστολή διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού από εκείνη του κοτζικού οξέος [59]. Μεταξύ των στεροειδών, η ένωση stigmast-5-ene -3 β , 26-diol (Εικόνα 5b) ήταν 7 φορές περισσότερο δραστική. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν επίσης ότι ένας εστέρας μακράς αλυσίδας, ο 2 β (2S) -hydroxyl -7 (E) -tritriacontenoate (Εικόνα 5a), από *Amberboa ramose* εμφάνισε 12,3 φορές μεγαλύτερη αναστολή στην δραστικότητα διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού σε σύγκριση με το κοτζικό οξύ [60].

1.4.2.4 Άλλοι φυσικοί και συνθετικοί αναστολείς

(a) Other natural tyrosinase inhibitors



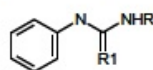
Phycion: R1=OH, R2=R4=H, R3=OCH₃
(RA*, 1.0F; ref.130)
Phycion Analog: R1=R3=H, R2=OCH₃, R4=OH
(RA*, 72.4F; ref.131)



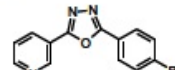
(+)-Lyonesinol
(RA*, 5.2F; ref.132)

6-n-Pentyl- α -pyrone
(RA*, 9.6F; ref.134)

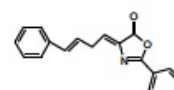
(b) Other synthetic tyrosinase inhibitors



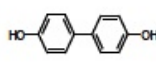
PTU: R=H, R1=H
(RA*, 41.7F; ref.137)
PTU Analog: R=OH, R1=S
(RA*, 259F; ref.137)



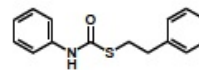
Oxadiazole derivative 3e
(RA*, 7.6F; ref.145)



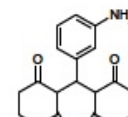
Oxazolone derivative 7
(RA*, 13.6F; ref.146)



4,4-Dihydroxybiphenyl
(Competitive; RA*,
12.6F; ref.151)



S-Phenetyl N-phenylthiocarbamate
(RA*, 43.6F; ref.154)



Tetraketone derivative 11
(RA*, 8.3F; ref.147)

Εικόνα 6: Χημικές δομές επιλεγμένων φυσικών και συνθετικών αναστολέων της τυροσινάσης.

Άλλοι αναστολείς από φυσικές πηγές:

Οι ανθρακινόνες έχουν δείξει μια μεγάλη ποικιλία από φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη, επούλωση πληγών, αναλγητική, αντιπυρετική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση. Πρόσφατα, μια ανθρακινόνη, η phycion (1,8-διυδροξυ-2-μεθοξυ-3-μεθυλανθρακινόνη, Σχήμα 6), βρέθηκε να έχει παρόμοια ανασταλτική δράση στην τυροσινάση με εκείνη του κοτζικού οξέος.

Άλλοι αναστολείς από συνθετικές πηγές:

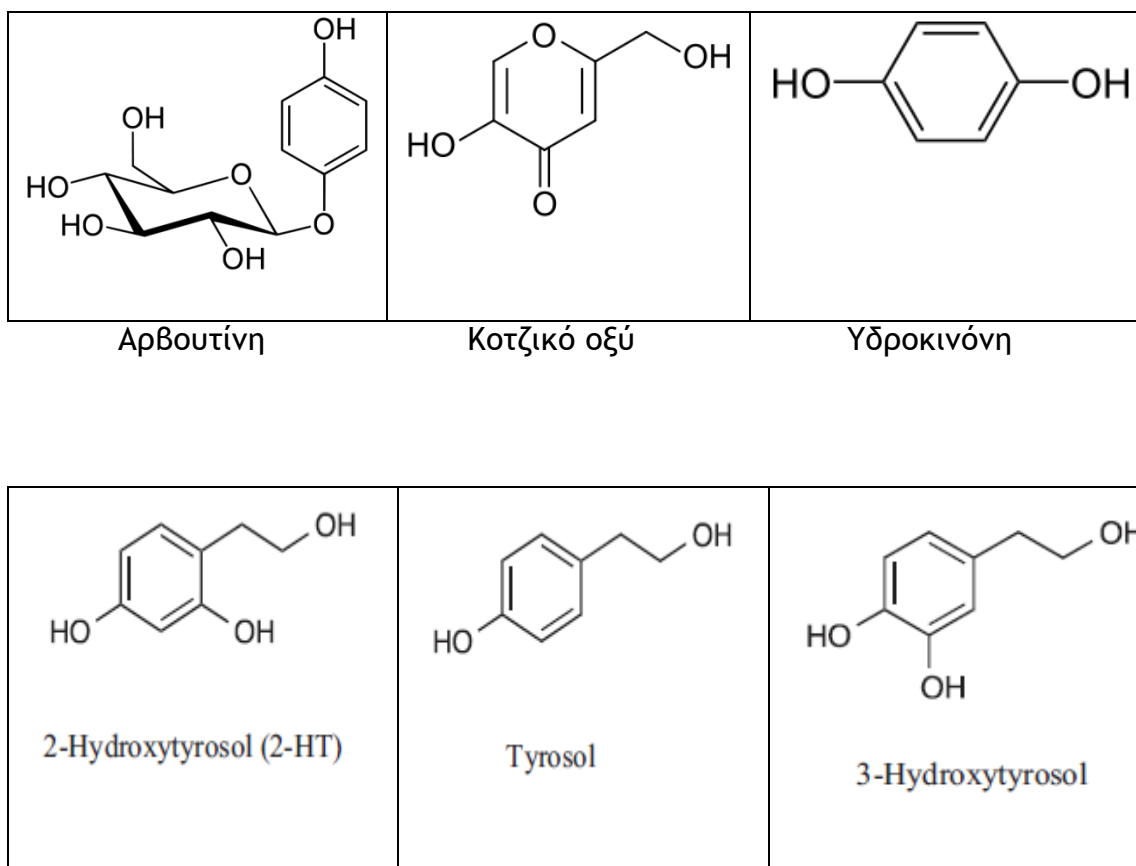
Μερικές απλές φαίνυλο και διφαίνυλο ενώσεις έχουν συντεθεί και ταυτοποιηθεί ως ισχυροί αναστολείς τυροσινάσης. Η 4,4-διϋδροξυδιφαινόλη (Σχήμα 6b) προκάλεσε 12-πλάσια αναστολή της δραστηριότητας μονοφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού σε σχέση με το κοτζικό οξύ με ανταγωνιστικό τρόπο [61], ενώ τα παράγωγα του γλυκοζίτη από τον καρπό του *Pyracantha fortuneana* εμφανίζουν μόνο χαμηλή ανασταλτική δραστηριότητα [62]. Εκτός από την άμεση αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης, βρέθηκε ότι η 4,4-διϋδροξυδιφαινόλη (dihydroxybiphenyl) καταστέλλει επίσης διάφορες κυτταρικές βασικές παραμέτρους στην μελανογένεση [63]. Επιπλέον, βρέθηκε πρόσφατα ότι οι ενώσεις S-phenyl-N-phenylthiocarbamate (Εικόνα 6b) και 4-(2', 4'-διϋδροξυφαινυλ) - (E) -3-βουτεν-2-όνη [64] είναι 44 και 6 φορές, αντίστοιχα, πιο δραστικές από το κοτζικό οξύ στην αναστολή της δραστηριότητας της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού. Ωστόσο, αν και τεράστιοι αριθμοί συνθετικών αναστολέων ήταν επιτυχείς στην αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης, λίγοι έχουν επιβεβαιωθεί ως αναστολείς της μελανογένεσης σε κύτταρα του δέρματος.

1.4.2.5 Kojic acid (κοτζικό οξύ)

Το κοτζικό οξύ είναι ένας παράγων χηλικής σύμπλεξης που παράγεται από διάφορα είδη μυκήτων, ιδιαίτερα από *Aspergillus oryzae*, το οποίο έχει την κοινή ιαπωνική ονομασία κότζι. Το κοτζικό οξύ είναι ένα υποπροϊόν της διαδικασίας της ζύμωσης κατά την παρασκευή του σάκε στη ζυθοποιία ρυζιού. Είναι ένας ήπιος αναστολέας του σχηματισμού μελανίνης σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς και χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και καλλυντικά για να διατηρήσει ή να αλλάξει τα χρώματα των ουσιών.

Οι αναστολείς τυροσινάσης όπως η αρβουτίνη, το κοτζικό οξύ και οι υδροκινόνες (Πίνακας 2) έχουν χρησιμοποιηθεί ως λευκαντικοί παράγοντες λόγω της ικανότητάς τους να καταστέλλουν την παραγωγή μελανίνης στο δέρμα [65]. Ωστόσο, η αρβουτίνη και το κοτζικό οξύ δύσκολα έδειξαν

ανασταλτική δράση έναντι μελάγχρωσης σε ακέραια μελανοκύτταρα ή σε κλινικές δοκιμές [66] και οι υδροκινόνες θεωρούνται κυτταροτοξικές σε μελανοκύτταρα και δυνητικά μεταλλαξιογόνες γονιδιακά σε κύτταρα θηλαστικών [65]. Ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι αναγκαίο να αναζητηθούν νέοι αναστολείς τυροσινάσης χωρίς παρενέργειες.

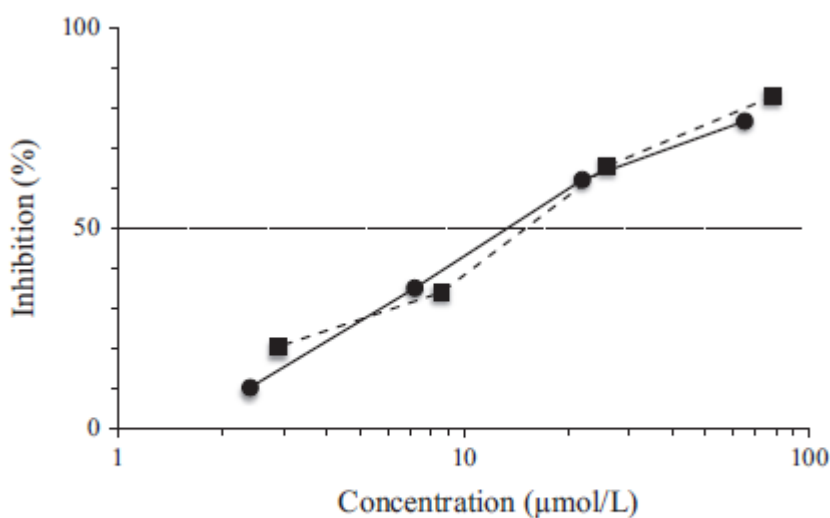


Πίνακας 2. Χημικές δομές βασικών μορίων - αναστολέων της τυροσινάσης

1.4.2.6 2-υδρόξυτυροσόλη

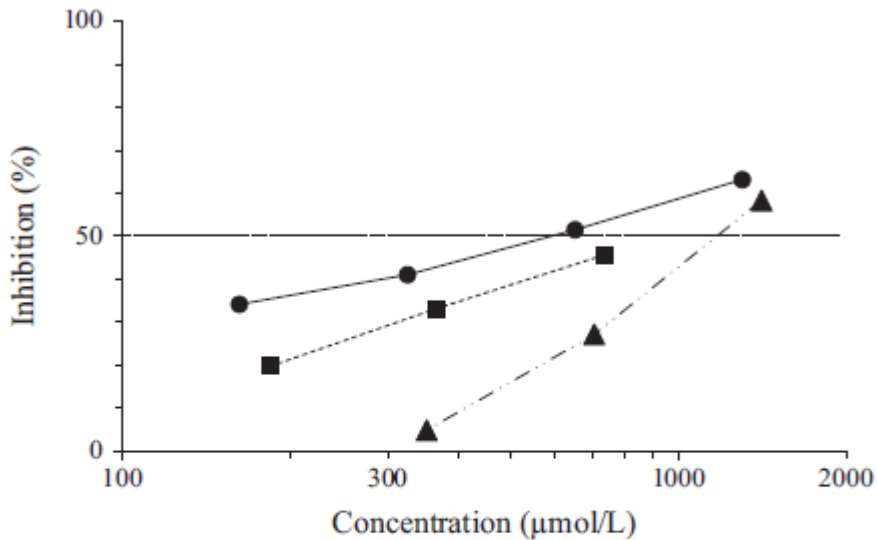
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η 2- υδρόξυτυροσόλη (2-HT) αναστέλλει την δράση της τυροσινάσης μανιταριού (Σχήμα 13) με $IC_{50}=13,0$ $\mu\text{mol/L}$, δηλαδή με ανασταλτική δράση σχεδόν ίση με του κοτζικού οξέος

($IC_{50}=14,8$ $\mu\text{mol/L}$). Επίσης, η 2-HT προκαλεί αναστολή μελάγχρωσης σε κύτταρα μελανώματος B16 (Σχήμα 14) με $IC_{50}=571$ $\mu\text{mol/L}$, ενώ το κοτζικό οξύ και η αρβουτίνη στις ίδιες συνθήκες προκαλούν αναστολή με $IC_{50}=735$ $\mu\text{mol/L}$ και $1130\mu\text{mol/L}$ αντίστοιχα. Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις είναι αντίστοιχα 1.3 , 8.0 και 1.8 mmol/L [67].



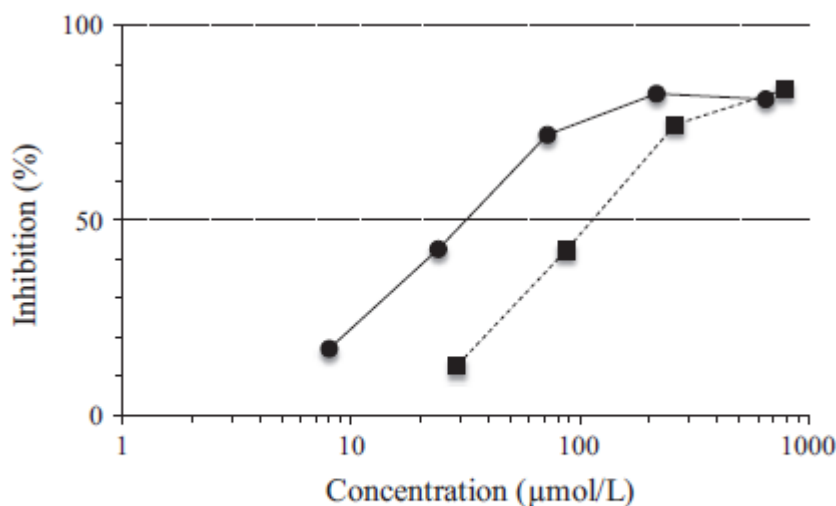
Inhibitory effects of 2-HT(●) and kojic acid (■) against mushroom tyrosinase.

Σχήμα 13: Διάγραμμα σύγκρισης της ικανότητας αναστολής της τυροσινάσης μανιταριού από την 2-υδρόξυτυροσώλη (●) και το κοτζικό οξύ (■).



Inhibitory effects of 2-HT, kojic acid and arbutin on α -MSH-induced melanin production in B16 melanoma cells. The pellets were resuspended in 2 mol/L NaOH solution and absorbance of supernatants was measured at 450 nm using a microplate reader. (●) 2-HT, (■) kojic acid and (▲) arbutin.

Σχήμα 14: Ικανότητα αναστολής της 2- υδροξυτυροσόλης (●) , του κοτζικού οξέος (■) και της αρβουτίνης (▲) σε μελανοκύτταρα.



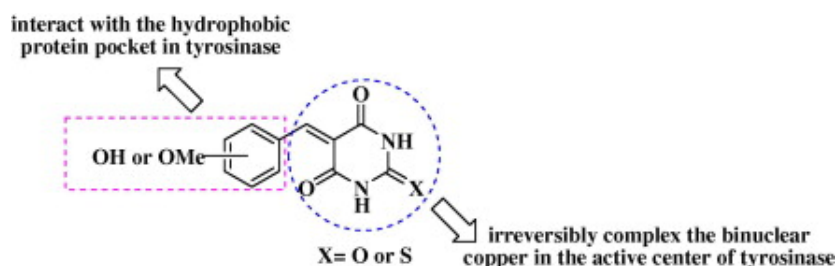
Inhibitory effects of 2-HT (●) and kojic acid (■) against tyrosinase in B16 melanoma cell crude lysates.

Σχήμα 15: Ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης από τη 2-υδροξυτυροσόλη (●) και το κοτζικό οξύ (■) σε κύτταρα μελανώματος B16.

Βρέθηκε λοιπόν ότι η 2-ΗΤ, που είναι ρεσορκινόλη, έχει ανταγωνιστικά αποτελέσματα αναστολής σε σχέση με το κοτζικό οξύ και όχι η 3-ΗΤ, που είναι μια κατεχόλη.

1.4.2.7 Βαρβιτουρικό

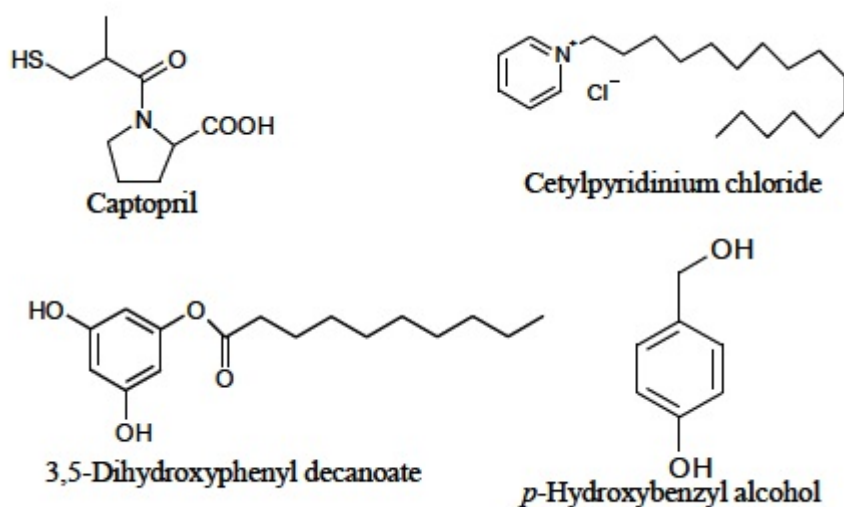
Μια νέα κατηγορία υδροξυ-ή μεθοξυ-υποκατεστημένων 5-βενζυλιδENO (θειο) βαρβιτουρικών σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν. Κατόπιν αξιολογήθηκαν οι ανασταλτικές επιδράσεις τους επί της δραστηριότητας της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολλές ενώσεις προκάλεσαν πιο ισχυρή αναστολή τυροσινάσης από τον ευρέως χρησιμοποιούμενο αναστολέα τυροσινάσης κοτζικό οξύ (IC₅₀ = 18,25 μΜ). Ειδικότερα, ο πιο ισχυρός αναστολέας είχε τιμή IC₅₀ 1,52 μΜ. Η ανάλυση του μηχανισμού αναστολής αποκάλυψε ότι κάποιες ενώσεις επέδειξαν τόσο ανασταλτικά αποτελέσματα επί της τυροσινάσης δρώντας ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς [68].



Εικόνα 7: Αλληλεπιδράσεις και προσανατολισμός πρόσδεσης του μορίου.

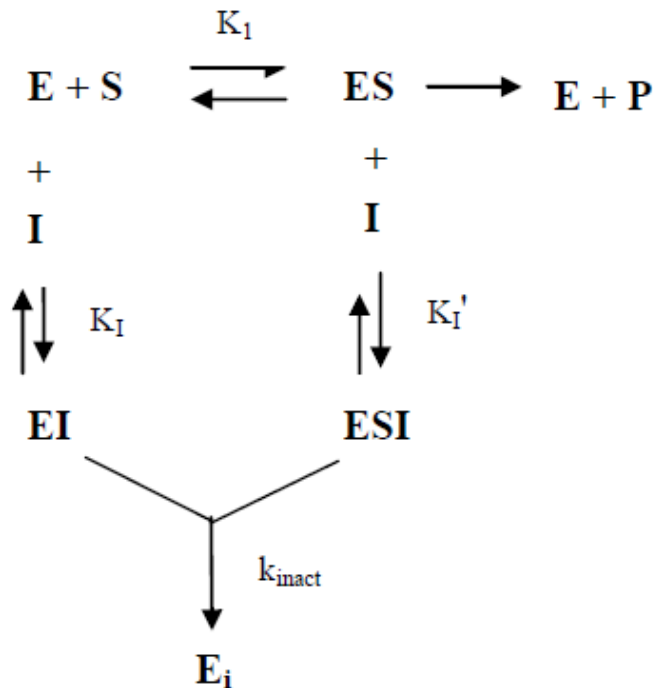
Από τα πειράματα αυτά δείχθηκε ότι οι υδρόξυ και μεθόξυ ομάδες δημιουργούν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενώ η άλλη πλευρά του μορίου δεσμεύει μη αντιστρεπτά τους χαλκούς του ενεργού κέντρου παραμένοντας προσκολλημένο εκεί και «μπλοκάροντας» τη διαδικασία παραγωγής μελανίνης (Εικόνα 7).

1.4.2.8 Μη αντιστρεπτοί αναστολείς - απενεργοποιητές



Εικόνα 8: Χημικές Δομές μη αντιστρεπτών αναστολέων.

Σε αντίθεση με τον τεράστιο αριθμό των αντιστρεπτών αναστολέων που έχουν εντοπιστεί, πολύ λίγοι μη αντιστρεπτοί αναστολείς τυροσινάσης έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα (Εικόνα 8). Αυτοί οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς, οι οποίοι ονομάζονται επίσης ειδικοί απενεργοποιητές, σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό μη αντιστρεπτά με το ένζυμο-στόχο και στη συνέχεια το απενεργοποιούν (Σχήμα 15). Ωστόσο, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς της τυροσινάσης είναι διαφορετικοί από τους μη-ειδικούς μη αντιστρεπτούς απενεργοποιητές ενζύμων, όπως οξέα ή βάσεις, οι οποίοι καταστρέφουν όλες τις δομές της πρωτεΐνης. Αντ'αυτού, δεν καταστρέφουν την πρωτεΐνη, αλλά λειτουργούν μεταβάλλοντας το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Η κινητική της αντίδρασης υποστρώματος που περιγράφεται από τον Tso έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες διαφορετικών τύπων αδρανοποίησης ή αναστολής διαφόρων ενζύμων [69]. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας, σε γενικές γραμμές, είναι μια ένωση που προκαλεί μη αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου, δηλαδή, αποτρέπει μη αντιστρεπτά την κατάλυση μιας αντίδρασης από αυτό το ένζυμο. "Μη αντιστρεπτό" σε αυτό το πλαίσιο, ωστόσο, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η δραστηριότητα του ενζύμου δεν επανέρχεται ποτέ, απλώς ότι το ένζυμο καθίσταται δυσλειτουργικό για μια εκτεταμένη (αλλά απροσδιόριστη) χρονική περίοδο.

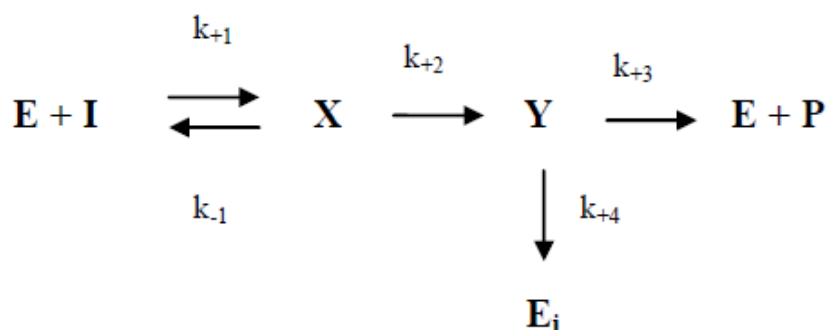


Σχήμα 16: Μηχανισμός μη αντιστρεπτών αναστολέων. Το E και το E_i είναι το ένζυμο και το απενεργοποιημένο ένζυμο αντίστοιχα, το S, I, P είναι το υπόστρωμα, ο αναστολέας και το προϊόν αντίστοιχα.

Μία ένωση, όταν σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο, συχνά καταστρέφει την ενζυμική δραστηριότητα επ' αόριστον, ωστόσο, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις, όπου ο σχηματισμός του ομοιοπολικού δεσμού είναι αναστρέψιμος και η δραστηριότητα του ενζύμου επιστρέφει με αργό ρυθμό. Υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις μη αντιστρεπτής αναστολής στις οποίες δεν υπάρχει σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού, αλλά η ένωση συνδέεται πολύ σταθερά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με σταθερά αποδέσμευσης της ένωσης (k_{off}) από το ένζυμο εξαιρετικά μικρή. Αυτό, στην πράξη, παράγει μη αντιστρεπτή αναστολή. Τέλος, ένας άλλος τύπος μη αντιστρεπτού αναστολέα είναι αυτός που μετατρέπεται από το ένζυμο σε προϊόν, το οποίο δεσμεύεται πολύ στενά με το ένζυμο και, ως εκ τούτου, έχει ένα πολύ αργό ρυθμό αποσύνδεσης από αυτό [70].

Μεταξύ των μη αντιστρεπτών αναστολέων, τα υποστρώματα αυτοκτονίας ανήκουν σε μια ειδική κατηγορία. Είναι γνωστό ότι η τυροσινάση θα μπορούσε να ανασταλεί μη αντιστρεπτά από τα διφαινολικά υποστρώματα

της, όπως η L-dopa και η κατεχόλη [71]. Αυτά τα υποστρώματα ονομάζονται επίσης υποστρώματα αυτοκτονίας ή αναστολείς με βάση τον μηχανισμό. Ο μηχανισμός του υποστρώματος αυτοκτονίας έχει μελετηθεί εκτενώς από τον Waley [72], ο οποίος πρότεινε ένα απλό διακλαδισμένο μονοπάτι αντίδρασης στο οποίο ένα ενδιάμεσο Y μπορεί να δώσει είτε ένα δραστικό ένζυμο και το προϊόν, είτε ένα ανενεργό ένζυμο (Σχήμα 17).



Σχήμα 17: Ο μηχανισμός του υποστρώματος αυτοκτονίας. Τα E και E_i είναι το ένζυμο και το απενεργοποιημένο ένζυμο, P είναι το προϊόν, X και Y τα ενδιάμεσα προϊόντα.

2. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ **ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΕΝΕΡΓΑ ΚΕΝΤΡΑ** **ΕΝΖΥΜΩΝ**

2.1 Εισαγωγή

Η μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking-MD) ορίζεται ως η *in silico* πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα (Y). Συνήθως ο υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη και ο προσδέτης είναι κάποιο μικρότερο μόριο, όχι αναγκαία πρωτεΐνη. Στους τομείς της βιολογίας και της βιοχημείας, η πρόσδεση του μορίου προσδέτη στο υποδοχέα επάγει συγκεκριμένο σήμα, που μεταφράζεται σε βιολογικό αποτέλεσμα. Το μόριο προσδέτης είναι συνήθως κάποια ένωση που συντίθεται από τον οργανισμό, πολυπεπτίδιο (π.χ. ορμόνη) ή μη πολυπεπτίδιο (π.χ. στεροειδές), είτε κάποιο άλλο βιομόριο. Στον τομέα της φαρμακοχημείας, ο προσδέτης περιορίζεται σε φαρμακευτικά μόρια (ΦΜ) ή εν δυνάμει φαρμακευτικά μόρια. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα σε μοριακό επίπεδο είναι ουσιαστική, προκειμένου να σχεδιασθούν καινοτόμα προϊόντα με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Δεδομένου ότι ο υποδοχέας είναι ένα μεγάλο μόριο, το ΦΜ προσδέεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του, η οποία ονομάζεται θήκη πρόσδεσης ή ενεργό κέντρο του υποδοχέα [73].

Με την αύξηση του αριθμού των θεραπευτικών στόχων/υποδοχέων, η ανάγκη για γρήγορη αναζήτηση για μικρά μόρια, που μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς αυτούς, είναι καθοριστικής σημασίας στην διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η *in silico* ή εικονική διαλογή (virtual screening-VS) μεγάλων συλλογών από ενώσεις. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι η δομή του στόχου παρέχει ένα πρότυπο για την ανακάλυψη νέων προσδετών. Η ουσία της τεχνικής είναι πως μπορεί να ξεκινήσει κανείς με μια βάση δεδομένων που περιέχει χημικές ενώσεις και γνωρίζοντας τη δομή ενός υποδοχέα να απαντήσει το ακόλουθο ερώτημα: "Από τις ενώσεις στη βάση δεδομένων, ποιά είναι πιο πιθανό να

συνδέεται με τον υποδοχέα;" Χρησιμοποιείται ένα πρόγραμμα πρόσδεσης για να τοποθετήσει ένα μικρό μόριο σε μια δομή-στόχο (ή σε ένα τμήμα αυτού, π.χ., το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου) σε μία ποικιλία θέσεων και προσανατολισμών. Κάθε τέτοιος τρόπος πρόσδεσης ονομάζεται «πόζα» [74]. Ο καθορισμός του σωστού τρόπου πρόσδεσης ενός μορίου περιλαμβάνει την εύρεση του σωστού προσανατολισμού, καθώς τα περισσότερα μόρια-προσδέτες είναι εύκαμπτες ενώσεις. Αυτό σημαίνει ότι οι βαθμοί ελευθερίας, που πρέπει να αναζητηθούν, περιλαμβάνουν τους βαθμούς ελευθερίας μετακίνησης και περιστροφής του προσδέτη στο σύνολό του, καθώς και τους εσωτερικούς του βαθμούς ελευθερίας, που κατά κύριο λόγο είναι οι δεσμοί με ικανότητα περιστροφής. Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιο ευνοϊκή πόζα, κάθε πόζα βαθμολογείται (scoring) με βάση την συμπληρωματικότητα της ως προς τον στόχο, όσον αφορά το σχήμα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως οι ηλεκτροστατικές. Μια καλή βαθμολογία δείχνει ότι το μόριο είναι πιθανώς ένας καλός προσδέτης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλα τα μόρια της βιβλιοθήκης, τα οποία στη συνέχεια κατατάσσονται με βάση τις βαθμολογίες τους (τις προβλεπόμενες συγγένειες τους προς τον στόχο). Αυτή η λίστα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για βιολογικές δοκιμές μόνον εκείνων των ενώσεων, που έχουν προβλεφθεί πως είναι οι πιο δραστικές. Υποθέτοντας ότι τόσο οι πόζες όσο και τα docking score έχουν προβλεφθεί με ακρίβεια, αυτή η επιλογή θα περιέχει ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό ενεργών μορίων, δηλαδή θα είναι «εμπλουτισμένη» με δραστικά μόρια σε σύγκριση με μια τυχαία επιλογή μορίων [75]. Πριν γίνει η προσομοίωση της πρόσδεσης, είναι απαραίτητο οι δομές τόσο του μακρομορίου/υποδοχέα όσο και του προσδέτη να είναι κατάλληλα προετοιμασμένες. Οι λεπτομέρειες της προετοιμασίας του υποδοχέα εξαρτώνται από το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται, ωστόσο υπάρχουν αρκετές γενικές αρχές. Αυτές περιλαμβάνουν την κατάσταση πρωτονίωσης της πρωτεΐνης και των αμινοξέων, την ορθή αντιμετώπιση των όποιων μη συνήθων αμινοξέων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, καθώς και τη συμπερίληψη των τυχόν απαιτούμενων συνδετικών μορίων, νουκλεοτιδίων, ιόντων, και ούτω καθεξής. Εάν οι θέσεις αυτών των τροποποιήσεων είναι

γνωστές ή πιστεύεται ότι είναι κοντά στην θέση σύνδεσης, αυτές μπορεί να είναι κρίσιμες για την επιτυχία της πρόσδεσης, ενώ εάν είναι πιο απομακρυσμένες από τη θέση σύνδεσης, μπορούν να αγνοηθούν. Προσδέτες, όπως τα ΦΜ και τα μικρά πεπτίδια, τείνουν να έχουν πιο περιορισμένους βαθμούς ελευθερίας και συνεπώς μπορούν να αντιμετωπίζονται με μια πιο συστηματική προσέγγιση. Με λίγα λόγια, όσο λιγότεροι είναι οι περιστρεφόμενοι δεσμοί, τόσο πιο εύκολο είναι να ληφθούν όλες οι απαιτούμενες πόζες πρόσδεσης. Ανάλογα με το λογισμικό μοριακής πρόσδεσης, επιτρέπεται στο χρήστη να ορίσει σταθερούς ή περιστρεφόμενους δεσμούς, συνήθως όμως αυτό γίνεται αυτόματα, αν και είναι σημαντικό να βεβαιωθεί εάν κάποιες διαμορφώσεις που χρησιμοποιούνται δεν είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένες. Ακριβώς όπως και για τα μακρομόρια, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προσδέτη-υποδοχέα είναι οι πιο σημαντικές και, αν δεν υπολογίζονται σωστά, τα αποτελέσματα επηρεάζονται δραστικά [76]. Η συνάφεια πρόσδεσης μπορεί να εκτιμηθεί πειραματικά με κινητικά πειράματα, που μετρούν την αναστολή της πρωτεΐνης ή του ενζύμου με την παρουσία τόσο του αναστολέα όσο και του υποστρώματος, και αναφέρεται ως σταθερά αναστολής K_i . Κάτω από συνθήκες ισορροπίας, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης δίδεται ως σταθερά διάστασης K_d , η οποία είναι ο λόγος της συγκέντρωσης των αντιδρώντων (πρωτεΐνης-P και προσδέτη-L) προς αυτήν των προϊόντων (σύμπλοκο-PL): $K_d = [P][L]/[PL]$. Η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης σχετίζεται με την διάσταση του [PL] με την εξίσωση $\Delta G = \Delta G_0 - RT \cdot \ln(K_d)$, όπου η ΔG είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια για την αντίδραση, το R η σταθερά των αερίων και T η θερμοκρασία. ΔG_0 είναι η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια που σχετίζεται με αντίδραση σε πρότυπες συνθήκες όπου όλες οι συγκεντρώσεις είναι 1 M, η θερμοκρασία είναι 298 K και η πίεση είναι 1 atm. Ως εκ τούτου, η ελεύθερη ενέργεια της αντίδρασης που υπολογίζεται από την σταθερά διάστασης K_d μπορεί να συγκριθεί με τις θεωρητικά υπολογισμένες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης. Η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης μπορεί να υπολογιστεί ως η διαφορά μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας των αντιδρώντων (πρωτεΐνης και προσδέτη) και της ελεύθερης

ενέργειας του προϊόντος, δηλαδή ως $\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - (\Delta G_{\text{protein}} + \Delta G_{\text{ligand}})$ όπου ΔG_{bind} είναι η ελεύθερη ενέργεια της πρόσδεσης, $\Delta G_{\text{complex}}$ η ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη και $\Delta G_{\text{protein}}$, ΔG_{ligand} οι ελεύθερες ενέργειες της πρωτεΐνης και του προσδέτη, αντίστοιχα. Υπολογιστικά, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης συνήθως διακρίνεται σε διαφορετικές συνιστώσες ελεύθερης ενέργειας που είναι αθροιστικές και εκπροσωπούνται από μια ενιαία εξίσωση [77]. Μια τέτοια ενιαία εξίσωση στηρίζεται στην φυσικοχημική βάση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που χαρακτηρίζουν την αλληλεπίδραση φαρμακευτικού μορίου και υποδοχέα και μπορεί να γραφεί ως το άθροισμα των ηλεκτροστατικών (EI), επαγωγικών (II), μη-πολικών (NPI) και υδροφοβικών (HI) αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυο μορίων, ελαττωμένο κατά τον όρο που εκφράζει την απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά την σύνδεσή τους (ΔG^*): $\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_{\text{EI}} + \Delta G_{\text{II}} + \Delta G_{\text{NPI}} + \Delta G_{\text{HI}} - \Delta G^*$ [73]. Οι ενιαίες εξισώσεις χρησιμοποιούνται για να κατευθύνουν την ανάπτυξη συναρτήσεων βαθμολόγησης. Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης έχουν επίσης σχεδιαστεί για να προβλέπουν τρόπους δέσμησης των αναστολέων και να διακρίνουν τον πραγματικό από έναν λανθασμένο τρόπο δέσμησης [77]. Αυτές οι συναρτήσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: (α) μέθοδοι δυναμικού πεδίου (force-field methods), (β) μέθοδοι με βάση τη γνώση (knowledge-based) και (γ) εμπειρικές μέθοδοι - παλινδρόμησης (empirical-regression).

Οι μέθοδοι δυναμικού πεδίου χρησιμοποιούν δυναμικά παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στη μοριακή μηχανική και συνδέονται με πιο αξιόπιστες τεχνικές όπως η μοριακή δυναμική και η θερμοδυναμική ολοκλήρωση. Στις συναρτήσεις βαθμολόγησης δυναμικού πεδίου έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα στην ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την ενσωμάτωση πηγών ενέργειας ενυδάτωσης στο σκορ πρόσδεσης. Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούν ένα γενικευμένο μοντέλο Born/επιφάνειας ή άλλες ηλεκτροστατικές προσεγγίσεις. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μελέτες πρόσδεσης μπορούν να βελτιωθούν με τη χρήση πιο ακριβών τιμών μερικών φορτίων για τους προσδέτες. Οι πρόσφατες βελτιώσεις τόσο στις εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολόγησης όσο και σε αυτές που βασίζονται στη γνώση

έχουν επικεντρωθεί στη βελτίωση της ισορροπίας μεταξύ πολικών και μη πολικών αλληλεπιδράσεων, λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του διαλύτη, και τη διόρθωση για τις επαφές μεταξύ προσδετών. Δεν υπάρχει, προς το παρόν, ομοφωνία ως προς την καλύτερη συνάρτηση βαθμολόγησης της πρόσδεσης, καθώς καλά αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί και με τις τρεις προσεγγίσεις ανάλογα με την περίπτωση της μελέτης. Επίσης, ενώ και τα τρία μοντέλα μπορούν να αποκλείσουν "παράλογα" μόρια από τα αποτελέσματα πρόσδεσης, κανένα δεν μπορεί να ταξινομήσει αξιόπιστα τις "λογικές" πόζες πρόσδεσης για μόρια που είναι π.χ. πάρα πολύ μεγάλα ή πολύ φορτισμένα για μια περιοχή-στόχο, εκτός από ειδικές περιπτώσεις [78].

Εν κατακλείδι, σημειώνεται πως η μοριακή πρόσδεση έχει χρησιμοποιηθεί για να ανακαλυφθούν νέοι προσδέτες για πάνω από 30 στόχους, οι οποίοι είναι συνήθως ένζυμα. Οι αναστολείς που ανακαλύφθηκαν ήταν νέα μόρια με μικρή ομοιότητα με τους ως τότε γνωστούς προσδέτες. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης ακολουθούνται και από βιολογικές μελέτες [78].

2.2 Υπολογιστικό πρόγραμμα Maestro, version 9.5, Schrödinger

Όπως και στα υπόλοιπα υπολογιστικά πακέτα, έτσι και στο Maestro ακολουθείται μια συγκεκριμένη διαδικασία για την πρόσδεση μιας σειράς ενώσεων (προσδέτες) από μια βιβλιοθήκη μορίων σε ένα γνωστό στόχο. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία της πρωτεΐνης, την προετοιμασία των υπό μελέτη ενώσεων, τον καθορισμό της θήκης πρόσδεσης μέσω δημιουργίας ενός πλέγματος και, τέλος, την πρόσδεση των ενώσεων.

Η προεπεξεργασία είναι απαραίτητη τόσο για την πρωτεΐνη στόχο όσο και για τις ενώσεις - προσδέτες.

Η προεπεξεργασία της πρωτεΐνης μπορεί να περιλαμβάνει την απλούστευση των αμινοξικών πολυμερικών συμπλεγμάτων, διαγράφοντας για παράδειγμα τα ανεπιθύμητα μόρια νερού που βρίσκονται μακριά από τη θήκη πρόσδεσης ή άλλους συμπαράγοντες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της κρυστάλλωσης, τη διόρθωση σοβαρών λαθών στη δομή της πρωτεΐνης, την προσαρμογή ομόλογων δομών, καταστάσεων ιονισμού, και πιθανές επιβαρύνσεις της πρωτεΐνης από ιόντα μετάλλων. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη, περιλαμβάνεται η πρόσθήκη ατόμων υδρογόνου, ο επαναπροσανατολισμός υδροξυλίων των πλευρικών αλυσίδων και ομάδων θειόλης, και ο έλεγχος των αλλοστερικών δομών. Το αρχείο πρέπει να είναι σε μορφή Maestro (.mae), SD (.sd ή .sdf) ή SMILES (.smi). Οι δομές αρχικά λαμβάνονται σε 2 διαστάσεις (2D) και μετατρέπονται σε τρισδιάστατες (3D) δομές κατά την προετοιμασία των υποκαταστατών. Η διαδικασία προετοιμασίας των προσδετών κατά τη μετατροπή από 2D σε 3D ελέγχει τις καταστάσεις ιονισμού και τις ταυτομέρειες και, επίσης, διευρύνει την στερεοχημεία. Εάν οι δομές βρίσκονται ήδη σε 3D μορφή στην κατάλληλη κατάσταση ιονισμού, ταυτομέρειας και στερεοχημικής μορφής, ίσως δεν χρειάζεται να δημιουργηθούν άλλες ταυτομερείς δομές.

2.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η τυπική δομή των πρωτεϊνών που λαμβάνονται από τα αρχεία PDB δεν είναι κατάλληλη για άμεση χρήση στους υπολογισμούς της μοριακής πρόσδεσης. Ένα τυπικό αρχείο PDB αποτελείται μόνο από τα βαρέα άτομα και μπορεί να περιλαμβάνει ένα συγκρυσταλλωμένο υποκαταστάτη, άτομα οξυγόνου (των μορίων H₂O), μεταλλικά ιόντα και συμπαραγόντες. Ορισμένες δομές είναι πολυμερικές και μπορεί να χρειαστεί να μειωθούν σε μια ενιαία μονάδα. Λόγω της περιορισμένης ανάλυσης των πειραμάτων με ακτίνες-Χ, μπορεί να είναι δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ ατόμων όπως NH και O και, συνεπώς, η τοποθέτηση των ομάδων αυτών θα πρέπει να ελέγχεται. Στις δομές PDB μπορεί να λείπουν πληροφορίες σχετικά με τους δεσμούς. Η προετοιμασία της πρωτεΐνης γίνεται με χρήση του προγράμματος: Protein Preparation Wizard 2013-2; EpiK version 2.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; Impact version 5.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013; Prime version 3.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013 [79].

2.2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ

Η σωστή προετοιμασία των 3D δομών των υποκαταστατών είναι κρίσιμη για τις εργασίες μοντελοποίησης. Η προετοιμασία περιλαμβάνει τις ακόλουθες εργασίες:

- Προσθήκη ατόμων υδρογόνου.
- Φιλτράρισμα των ακατάλληλων μορίων με βάση τις ιδιότητές τους.
- Απομάκρυνση των ανεπιθύμητων μορίων, όπως πχ μορίων νερού και ιόντων.
- Εξουδετέρωση φορτισμένων ομάδων, καθώς και δημιουργία ιονισμού και ταυτομερών με χρήση του πακέτου EpiK.
- Δημιουργία στερεοϊσομερών, ιδιαίτερα αν λείπουν στερεοχημικές πληροφορίες.
- Δημιουργία διαμορφώσεων χαμηλής ενέργειας.
- Αφαίρεση τυχόν κακώς προετοιμασμένων δομών.
- Βελτιστοποίηση της γεωμετρίας των ενώσεων.

Η προετοιμασία υποκαταστατών γίνεται με χρήση των προγραμμάτων LigPrep, version 2.7, Schrödinger και EriK, version 2.5, Schrödinger. Το EriK είναι ένα πρόγραμμα για την πρόβλεψη των τιμών ρ_{Ka} των ιονιζόμενων ομάδων των ενώσεων - προσδετών και για την παραγωγή των πιθανών ιονισμένων και ταυτομερών δομών μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος pH. Το EriK προβλέπει τις τιμές των ρ_{Ka} , χρησιμοποιώντας τις ευρέως χρησιμοποιούμενες και ακριβείς εμπειρικές εξισώσεις των Hammett και Taft [80]. Οι τιμές των παραμέτρων σε αυτές τις εξισώσεις προσδιορίζονται από πειραματικά δεδομένα ή από τη βιβλιογραφία. Οι πιθανότητες για ταυτομέρεια υπολογίζονται χρησιμοποιώντας μια βάση δεδομένων, τα οποία προέρχονται από πειράματα και κβαντοχημικούς υπολογισμούς. Τόσο ο ιονισμός όσο και η ταυτομέρεια χρησιμοποιούν βάσεις δεδομένων των παραμέτρων που μπορούν να τροποποιηθούν από τον χρήστη Επιπλέον, το EriK μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει δομές κατάλληλες για μελέτες που αφορούν μεταλλοπρωτεΐνες. Καθώς το EriK είναι γρήγορο και, επιπλέον, έχει μια σειρά από επιλογές και ρυθμίσεις, είναι κατάλληλο για την επεξεργασία μεγάλων βιβλιοθηκών μορίων [80], [81].

2.2.3 GLIDE DOCKING

Το Glide είναι το πρόγραμμα υπολογισμού του τρόπου και της ενέργειας πρόσδεσης. Χρησιμοποιεί μια ιεραρχική σειρά φίλτρων για την αναζήτηση πιθανών θέσεων του υποκαταστάτη στη θήκη πρόσδεσης των πρωτεϊνών (ενζύμων ή υποδοχέων). Το σχήμα και οι ιδιότητες της θήκης εκπροσωπούνται σε πλέγμα από πολλά διαφορετικά σύνολα πεδίων που παρέχουν ακριβή βαθμολόγηση του τρόπου πρόσδεσης («πόζας») του υποκαταστάτη. Η διαμορφωτική ευελιξία αντιμετωπίζεται στο Glide από μια εκτεταμένη διαμορφωτική έρευνα, που μπορεί να εξαλείφει γρήγορα ακατάλληλες διαμορφώσεις, όπως π.χ. διαμορφώσεις που έχουν σε μεγάλη απόσταση εσωτερικούς δεσμούς υδρογόνου [82].

2.2.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Υπάρχουν μέθοδοι άκαμπτου μοντέλου (HTVS, SP και XP), που δεν εισάγουν διαμορφωτική ευκαμψία και, αντίθετα, η τεχνική IFD που ακολουθεί το μοντέλο επαγόμενης πρόσδεσης [82, 83]. Πιο αναλυτικά οι μέθοδοι με σειρά αυξανόμενης ακρίβειας είναι οι εξής:

- HTVS-υψηλής απόδοσης εικονική σάρωση (high throughput virtual screening): προορίζεται για την ταχεία επιλογή ενώσεων από μεγάλες βάσεις χημειοθηκών (βιβλιοθηκών μορίων). Το HTVS έχει πολύ πιο περιορισμένη διαμορφωτική δειγματοληψία σε σχέση με το SP. Προηγμένες ρυθμίσεις δεν είναι διαθέσιμες στο HTVS, καθώς είναι προκαθορισμένες.
- SP-απλής ακρίβειας (standard precision): είναι κατάλληλο για τον έλεγχο υποκαταστατών άγνωστης ποιότητας σε μεγάλους αριθμούς. Αυτή η μέθοδος είναι συνήθως προεπιλεγμένη από το πρόγραμμα.
- XP-αυξημένης ακρίβειας (extra precision): είναι μια πιο ισχυρή διαδικασία, η οποία διαρκεί περισσότερο χρόνο από το SP. Το XP έχει σχεδιαστεί για να χρησιμοποιείται σε πόζες υποκαταστατών που έχουν υψηλή βαθμολόγηση χρησιμοποιώντας αρχικά την τεχνική του SP. Συνιστάται να τρέχει κανείς τη βάση δεδομένων του πρώτα με την τεχνική SP και στη συνέχεια να λαμβάνει τα καλύτερα 10% έως 30% από τις τελικές πόζες και να χρησιμοποιεί σε αυτές την τεχνική XP, έτσι ώστε να εκτελεί την πιο ακριβή προσομοίωση πρόσδεσης σε υποκαταστάτες που μπορεί να παρουσιάσουν καλά αποτελέσματα. Το XP κάνει πιο εκτεταμένη δειγματοληψία από το SP. Επίσης, χρησιμοποιεί μια πιο εξελιγμένη λειτουργία βαθμολόγησης που είναι "πιο απαιτητική" από το SP GlideScore, με μεγαλύτερες απαιτήσεις για τη συμπληρωματικότητα του προσδέτη και του υποδοχέα. Με αυτόν τον τρόπο αποτρέπονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα που το SP επιτρέπει. Επειδή το XP μπορεί να εξαιρέσει προσδέτες που δεν ταιριάζουν καλά με τη συγκεκριμένη διαμόρφωση του υποδοχέα που χρησιμοποιείται, συνιστάται πρόσδεση σε πολλαπλές διαμορφώσεις υποδοχέων, αν είναι δυνατόν. Ο κύριος στόχος της μεθόδου XP είναι

να εξαλείψει τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και να προσφέρει μια καλύτερη συσχέτιση ανάμεσα στη γεωμετρία της πρόσδεσης (πόζας) και της βαθμολόγησής της. Επιπλέον το ΧΡ είναι ένα εργαλείο βελτίωσης που έχει σχεδιαστεί για χρήση μόνο σε καλές πόζες υποκαταστατών. Επειδή η τεχνική ΧΡ απαιτεί πολύ μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ, για μεγάλα σύνολα υποκαταστατών θα πρέπει να χρησιμοποιείται αρχικά η τεχνική SP ή HTVS [84].

- IFD (Induced Fit Docking): Το πρόγραμμα Glide χρησιμοποιεί τη βασική παραδοχή ενός άκαμπτου υποδοχέα (χωρίς διαμορφωτική ευκαμψία). Η κλιμάκωση των δυνάμεων van der Waals σε μη πολικά άτομα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επάγει μια μικρή "βελτίωση" στον υποδοχέα ή στον υποκαταστάτη ή και στους δύο. Έτσι, μπορεί να επιτραπεί σε ομάδες υδροξυλίου να αναπροσανατολιστούν για να βελτιστοποιηθούν οι δεσμοί υδρογόνου. Αυτό μπορεί να μην είναι επαρκής λύση για την αντιμετώπιση συστημάτων, όπου η πρόσδεση των υποκαταστατών επάγει ουσιαστικές αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα («induced fit»). Το λογισμικό Schrödinger έχει αναπτύξει μια διαδικασία για τις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Prime και Glide για να εκτελέσει την τεχνική της επαγόμενης πρόσδεσης (IFD) [85], [86].

Σε πρότυπες μελέτες εικονικής πρόσδεσης, οι υποκαταστάτες βρίσκονται στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης ενός υποδοχέα, όπου ο υποδοχέας είναι άκαμπος και ο υποκαταστάτης ελεύθερος να κινηθεί. Ωστόσο, η υπόθεση ενός άκαμπτου υποδοχέα μπορεί να δώσει παραπλανητικά αποτελέσματα, δεδομένου ότι, στην πραγματικότητα, πολλές πρωτεΐνες υφίστανται κινήσεις πλευρικής αλυσίδας ή πρωτεϊνικού σκελετού, ή και τα δύο, κατόπιν δέσμευσης του υποκαταστάτη. Αυτές οι αλλαγές επιτρέπουν στον υποδοχέα να μεταβάλει το ενεργό του κέντρο, έτσι ώστε να ταιριάζει πιο σωστά με το σχήμα και τις αλληλεπιδράσεις με τον υποκαταστάτη. Αυτό συχνά αναφέρεται ως «επαγόμενη πρόσδεση» και είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που ανεβάζουν τον συντελεστή δυσκολίας και πολυπλοκότητας στον σχεδιασμό φαρμάκων.

Το μοντέλο Induced Fit Docking έχει δύο κύριες εφαρμογές:

- Δημιουργία μιας ακριβούς δομής για έναν υποκαταστάτη που είναι γνωστό ότι είναι ενεργός, αλλά δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί αυτό χρησιμοποιώντας τους τρόπους διαμορφωτικής ανάλυσης άκαμπτου υποδοχέα.
- Αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (άσχημα docking score πραγματικών αναστολέων) σε εικονικά πειράματα διαλογής, όπου αντί της μιας μόνο διαμόρφωσης του υποδοχέα, χρησιμοποιούνται επιπλέον διαμορφώσεις.

2.2.5 KNIME EXTENSIONS 1.7

Το KNIME, ή Konstanz Informations Miner, είναι ένα αρθρωτό πλαίσιο (ή πλατφόρμα) για τη δημιουργία σε γραφικό περιβάλλον ροών εργασίας για εκτέλεση αλγορίθμων και ανάλυση στοιχείων αγωγών από προκαθορισμένα περιεχόμενα, που ονομάζονται κόμβοι (Εικόνα 9). Το KNIME έχει αναπτυχθεί από την ομάδα του καθηγητή Michael Berthold στο Πανεπιστήμιο του Konstanz στη Γερμανία. Με το KNIME διανέμεται ένας σημαντικός αριθμός από τυποποιημένα δεδομένα ανάλυσης και εργαλεία, τα οποία περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

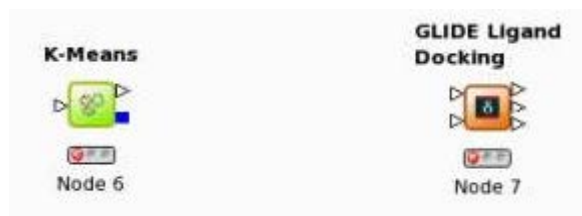
- κόμβους για την ανάγνωση και εγγραφή δεδομένων από αρχεία και βάσεις δεδομένων
- κόμβους για τη διαχείριση των εσωτερικών πινάκων δεδομένων που χρησιμοποιούνται για να περάσουν πληροφορίες μεταξύ των στοιχείων (π.χ. σειρές φιλτραρίσματος και στήλες, ένωση πινάκων και ούτω καθεξής)
- εργαλεία χαρτογράφησης και αποτύπωσης
- στατιστικά στοιχεία και εργαλεία εύρεσης δεδομένων, όπως η ομαδοποίηση, τα νευρωνικά δίκτυα και τα δέντρα απόφασης

Επιπλέον χαρακτηριστικά και λειτουργίες μπορεί να παρέχονται ως επεκτάσεις του KNIME. Οι επεκτάσεις του KNIME είναι συλλογές κόμβων που παρέχουν πρόσθετες δυνατότητες οι οποίες δεν υπάρχουν στον πυρήνα του

περιβάλλοντος του KNIME. Μπορούν πολύ εύκολα να προστεθούν σε μια υπάρχουσα εγκατάσταση του KNIME. Για παράδειγμα, οι επεκτάσεις του KNIME στη χημεία παρέχουν λειτουργίες που σχετίζονται με τη βασική χημεία, όπως η ανάγνωση και η γραφή των κοινών μορφών δεδομένων και η διαμόρφωση 2D δομών μέσω του open source Chemistry Development Kit (CDK).

Μερικές από τις σημαντικές λειτουργίες που είναι διαθέσιμες μέσω των επεκτάσεων του KNIME είναι:

- Δυνατότητα να συγκεντρώνει, να επεξεργάζεται και να εκτελεί τις ροές εργασίας χρησιμοποιώντας ένα γραφικό εργαλείο.
- Πρόσβαση σε περισσότερα εργαλεία μοντελοποίησης και cheminformatics του Schrödinger.
- Δυνατότητα να ενσωματώνει τα υπάρχοντα εργαλεία της γραμμής εντολών.
- Συμβατότητα με άλλα προγράμματα.
- Υποστήριξη για εργασίες μοντελοποίησης με υψηλής απόδοσης υπολογιστική ισχύ.
- Δυνατότητα για απεικόνιση και αλληλεπίδραση με τα δεδομένα σε κάθε βήμα της ροής εργασίας.
- Ικανότητα να κατανέμει τις ροές εργασίας.



Εικόνα 9: Παραδείγματα κόμβων.

2.3 Σκοπός Διπλωματικής

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση ικανών μορίων-αναστολέων του ενζύμου τυροσινάση με χρήση μοριακής μοντελοποίησης μέσω του προγράμματος Maestro Schrodinger 9.5. Αρχικά προσδιορίστηκε το αποτελεσματικό μοντέλο μέσω μελέτης της βιβλιογραφίας, και επιλέχθηκαν τα κατάλληλα μόρια. Ακολούθησε το φιλτράρισμα όλων των ενώσεων από μια ηλεκτρονική βάση με επιλογή των κατάλληλων βάσει μοριακού βάρους,

καθώς και το φιλτράρισμα των μορίων με βάση τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις. Κατόπιν έγινε η τελική επιλογή, βασιζόμενη στη βιβλιογραφία, στους γνωστούς αναστολείς και σε προηγούμενα πειράματα μοντελοποίησης. Τέλος, η δυνατότητα αναστολής, που έδειξε η μοριακή μοντελοποίηση επιβεβαιώθηκε με πειράματα *in vitro*.

Μετά από πολλές δοκιμές μοριακής πρόσδεσης βρέθηκε ότι πολλά από τα μόρια που φαίνονταν να έχουν αποτελεσματική πρόσδεση, βρίσκονταν στη βιβλιοθήκη της γνωστής εταιρίας φαρμάκων και χημικών αντιδραστηρίων Sigma Aldrich. Έτσι, αποφασίστηκε η σάρωση όλης της βιβλιοθήκης της εταιρίας για την εύρεση περισσότερων μορίων που μπορούν να λειτουργήσουν ως αναστολείς τυροσινάσης και για τα οποία υπάρχει δυνατότητα αγοράς και πραγματοποίησης βιολογικών δοκιμών. Τέλος, αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και ο πειραματικός έλεγχος καρβοξυλικών οξέων αφού παρατηρήθηκε ο τρόπος που προσδένεται η καρβοξυλομάδα στα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου, με στόχο την εύρεση φθηνών και αποτελεσματικών αναστολέων τυροσινάσης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Εισαγωγή

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν *in silico* μελέτες της ικανότητας πρόσδεσης (docking) των μορίων της βιβλιοθήκης Sigma Aldrich για την εύρεση μορίων με ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.

3.2 Παράμετροι διεξαγωγής μελετών

Στις μελέτες χρησιμοποιήθηκε ως υποδοχέας η τυροσινάση από το μανιτάρι *Agaricus Bisporus* κρυσταλλωμένη (κρυσταλλική δομή μέσω XRD, ανάλυση 2,78Å, PDB ID: 2Y9X) με τον αναστολέα τροπολόνη προσκολλημένο πάνω της . Η τυροσινάση αυτή κρυσταλλώνεται ως διμερές και το κάθε μονομερές αποτελείται από 4 υπομονάδες , δύο H, που είναι υπεύθυνες για την ενζυμική δράση και δύο L που δεν έχει αποσαφηνιστεί η δραστηριότητά τους ακόμη. Επίσης έχει συγκρυσταλλωθεί με ιόντα Ho (ολμίου) που αντικαθιστούν τα ιόντα Zn (ψευδαργύρου) στη φυσική δομή της πρωτεΐνης [2, 8].

Αρχικά προετοιμάστηκε η πρωτεΐνη δηλαδή τροποποιήθηκε η αρχική δομή που παραλήφθηκε από το PDB αφαιρώντας τον αναστολέα, το ένα μονομερές, τις δύο υπομονάδες L και τη μία H από το δεύτερο μονομερές. Έπειτα έγινε ρύθμιση του pH (6.5+/- 0.5), ώστε να προσομοιάζει καλά τις συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου, στις οποίες πραγματοποιούνται τα *in vitro* πειράματα, προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση της δομής και ελαχιστοποίηση της ενέργειας. Όλα τα ένζυμα της τυροσινάσης, καθώς και το εξεταζόμενο, περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο δύο ιόντα χαλκού συνδεδεμένα το καθένα με τρία κατάλοιπα ιστιδίνης [8].

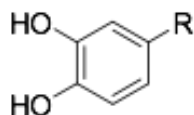
Οι μελέτες έγιναν μέσω χρήσης των προγραμμάτων LigPrep 2.7 και Glide 6.0 της οικογενείας προγραμμάτων Maestro 9.5 - Schrödinger Suite 2013. Οι ενώσεις προετοιμάστηκαν για πρόσδεση σε pH βέλτιστης δράσης της τυροσινάσης (6.5+-0.5). Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας παρήχθησαν και ισομερείς δομές. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες τεχνικές πρόσδεσης με σειρά αυξανόμενης ακρίβειας: i) υψηλής απόδοσης εικονική σάρωση (HTVS-high throughput virtual screening) ii) απλής ακρίβειας (SP-standard precision), iii) αυξημένης ακρίβειας (XP-extra precision) και iv) επαγόμενης πρόσδεσης (IFD-induced fit docking). Η τελευταία τεχνική εισάγει διαμορφωτική ευκαμψία στο μόριο του υποδοχέα σε αντίθεση με τις άλλες τρεις και γι' αυτό παρουσιάζει και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι τεχνικές XP και IFD λόγω του μεγάλου υπολογιστικού κόστους συνήθως

χρησιμοποιούνται κατ' επιλογή στα καλύτερα μόρια που προέκυψαν από τις τεχνικές HTVS και SP [82, 84].

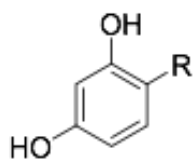
Ένα μόριο μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει καλή ικανότητα πρόσδεσης, όταν κάποια ομάδα του μπορεί να προσεγγίσει τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου σε τέτοια απόσταση ώστε να δημιουργήσει αλληλεπίδραση - σύμπλοκο με το μεταλλοκατιόν παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση του μετάλλου και την πρόσδεση του βιολογικού υποστρώματος του ενζύμου. Εκτός από την απόσταση από τα ιόντα χαλκού σημαντική επίσης είναι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs, που περιλαμβάνει κυρίως τις υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου μεταξύ αμινοξέων της πρωτεΐνης και των μορίων προσδετών. Αυτοί οι δεσμοί ενισχύουν την σταθερότητα του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη κάνοντας πιθανώς καλύτερη την αναστολή του ενζύμου.

Από τις ενώσεις που υποβλήθηκαν σε μελέτες πρόσδεσης, οι κατηγορίες αυτών που παρουσίασαν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι:

i) παράγωγα κατεχόλης



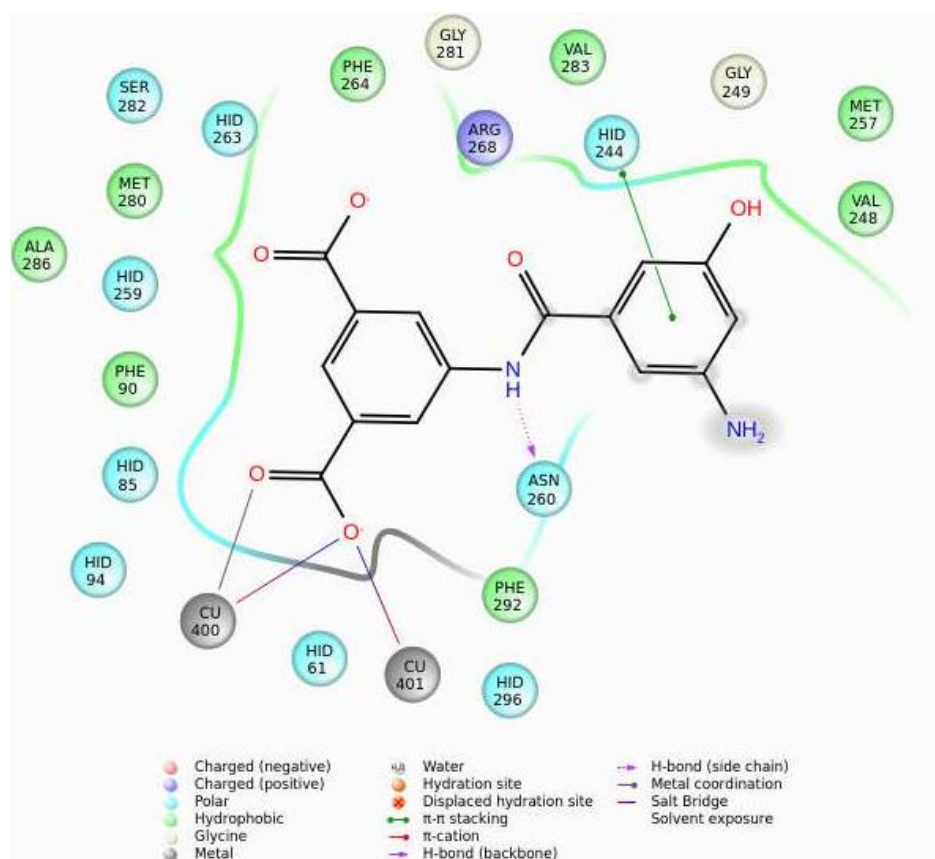
ii) παράγωγα ρεσορκινόλης



- iii) παράγωγα καρβοξυλικών οξέων γραμμικής αλυσίδας, μονοκυκλικά και δικυκλικά. Τα παράγωγα αυτά δεσμεύουν τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου με την αποπρωτονιωμένη τους μορφή.

3.3 Αποτελέσματα μελέτης μοριακής πρόσδεσης

3.3.1 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



Εικόνα 10: Επεξηγηματικό υπόμνημα στο δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.

A) Τρισδιάστατο μοντέλο

Στα τρισδιάστατα μοντέλα παρουσιάζεται το μόριο-προσδέτης στην διαμόρφωση που προβλέπεται ότι θα λάβει κατά την πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Με ροζ διακεκομμένες γραμμές

παρουσιάζονται οι αποστάσεις μεταξύ δύο ατόμων, ενός ατόμου χαλκού του υποδοχέα και ενός ατόμου στον προσδέτη, η δε απόστασή τους παρουσιάζεται με γράμματα του ίδιου χρώματος. Με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ ομάδων του προσδέτη και αμινοξέων του υποδοχέα.

B) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων

Στα δισδιάστατα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 10) παρουσιάζεται ο προσδέτης και τα αμινοξέα με τα οποία αλληλεπιδρά σε απόσταση μέχρι 5Å. Με σφαίρες παρουσιάζονται τα αμινοξέα και τα ιόντα χαλκού. Η διεπιφάνεια προσδέτη-υποδοχέα παρουσιάζεται με συνεχή γραμμή. Τα μόρια του προσδέτη που εκτίθενται στον διαλύτη κατά την πρόσδεση παρουσιάζονται με γκρι σφαίρες. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με ροζ γραμμή ή ροζ διακεκομμένη γραμμή, ανάλογα με το αν ο δεσμός είναι με τον πρωτεϊνικό σκελετό ή με πλευρική αλυσίδα, ενώ με πράσινες γραμμές υποδηλώνονται οι αλληλεπιδράσεις π-π. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπου η απόσταση μιας ομάδας του προσδέτη από ένα ιόν χαλκού είναι μικρότερη των 2,6Å μπορεί να σχηματιστεί σύμπλοκο με το ιόν χαλκού, το οποίο υποδηλώνεται μέσω γκρι γραμμής μεταξύ της ομάδας και του ιόντος. Τέλος, η μωβ γραμμή υποδεικνύει τη γέφυρα άλατος που μπορεί να σχηματιστεί και με τα ιόντα χαλκού και με κάποια άλλη ομάδα - αμινοξύ.

3.3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

Μετά από πολλές δοκιμές μορίων και εκτενή μελέτη της βιβλιογραφίας παρατηρήθηκε ότι, επειδή το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης είναι πολύ

ανοιχτό, τα μόρια με αρωματικό δακτύλιο παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης σε σχέση με τα ευθύγραμμα τμήματα αλυσίδων μορίων, διότι αυτές δεν είναι σταθερές και τα μόρια εκτίθενται πολύ στον διαλύτη. Συγκεκριμένα, οι αρωματικοί δακτύλιοι πραγματοποιούν π-π αλληλεπιδράσεις, συνήθως με τις ιστιδίνες που συνδέονται με τα ιόντα χαλκού, γεγονός που σταθεροποιεί πολύ τους προσδέτες. Επίσης, παρατηρήθηκαν κάποιες κρίσιμες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες εμφανίζονται επαναλαμβανόμενα στα μόρια που παρουσιάζουν καλές ανασταλτικές ιδιότητες. Αυτές οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις είναι:

- ο σχηματισμός συμπλόκου με τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου όταν το μόριο τα πλησιάζει σε απόσταση μικρότερη των 2.6\AA , καθώς αυτό απενεργοποιεί τη δράση των μεταλλοκατιόντων και ταυτόχρονα συγκρατεί το μόριο μέσα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου
- η αλληλεπίδραση με το αμινοξύ ασπαραγίνη (ASN 260), το οποίο βρίσκεται σε καίρια θέση, οπότε ο δεσμός με αυτό σταθεροποιεί πολύ την πρόσδεση και, σε συνδυασμό με κάποιες άλλες αλληλεπιδράσεις, κάνει αξιόπιστα τα αποτελέσματα των μοριακών μελετών

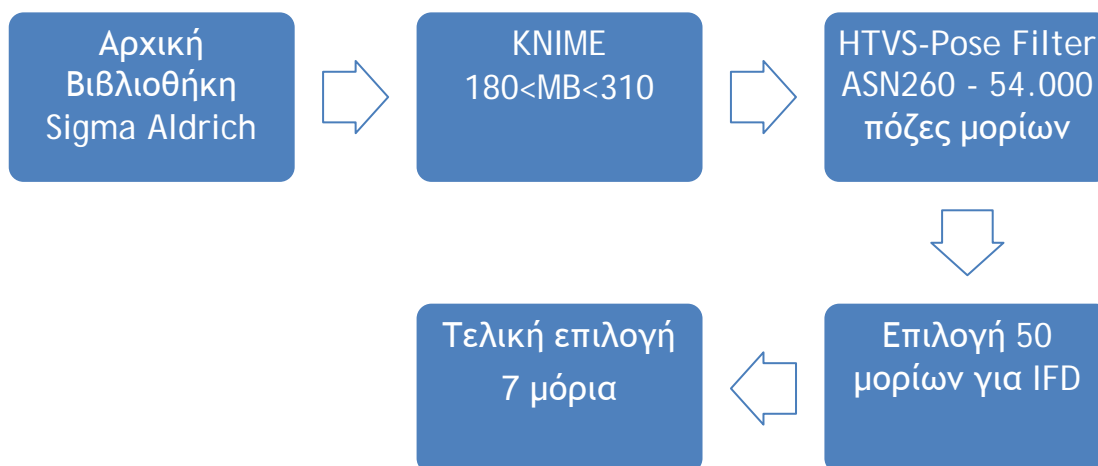
Στην περίπτωση που το μόριο που μελετάται είναι οξύ, προσεγγίζει τα ιόντα χαλκού με την καρβοξυλομάδα και πολύ συχνά φτάνει στη ζητούμενη απόσταση για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο στο ενεργό κέντρο. Τα οξέα δεσμεύουν τα ιόντα χαλκού όταν βρίσκονται στην αποπρωτονιωμένη μορφή τους.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι οι ρεσορκινόλες μπορούν να λειτουργήσουν ως αναστολείς ενώ οι κατεχόλες ως ενεργοποιητές τυροσινάσης. Παρόλ' αυτά στις υπολογιστικές δοκιμές παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα και docking score.

Το πρόγραμμα KNIME χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία μιας ροής εργασίας και ουσιαστικά για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας σάρωσης της βιβλιοθήκης της Sigma Aldrich. Η ροή περιλάμβανε (Σχήμα 18):

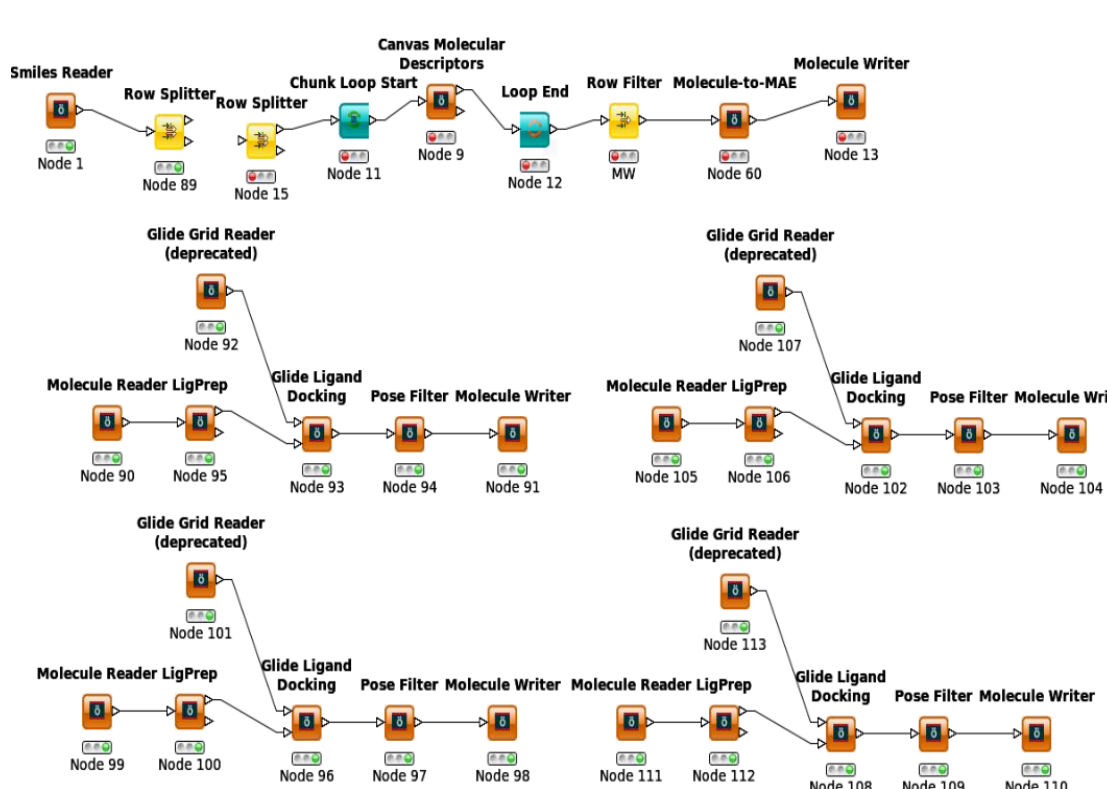
1. εισαγωγή των μορίων
2. μετατροπή σε μορφή SMI
3. εισαγωγή κριτηρίου Μοριακού Βάρους (180 - 310)
4. εισαγωγή στο πρόγραμμα Maestro Schrodinger 9.5
5. φιλτράρισμα των μορίων με την τεχνική HTVS
6. φιλτράρισμα των μορίων με χρήση του pose filter που κάνει μια διαλογή μόνο των μορίων που κάνουν δεσμό με την ασπαραγίνη (ASN 260)
7. αποθήκευση των αποτελεσμάτων στο Maestro.

Μετά έγινε μια επιλογή των 50 καλύτερων μορίων τα οποία δοκιμάστηκαν με την τεχνική του Induced Fit Docking που εισάγει διαμορφωτική ευκαμψία και είναι η τεχνική με την μεγαλύτερη ακρίβεια. Τέλος, η τελική επιλογή των μορίων που πιστεύεται ότι μπορεί να παρουσιάσουν καλή αναστολή της τυροσινάσης και αξίζει να δοκιμασθούν σε *in vitro* πειράματα έγινε με βάση το docking score, τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις και γενικότερα τον τρόπο που προσδένεται το μόριο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



Σχήμα 18: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

3.3.2.1 Διαδικασία



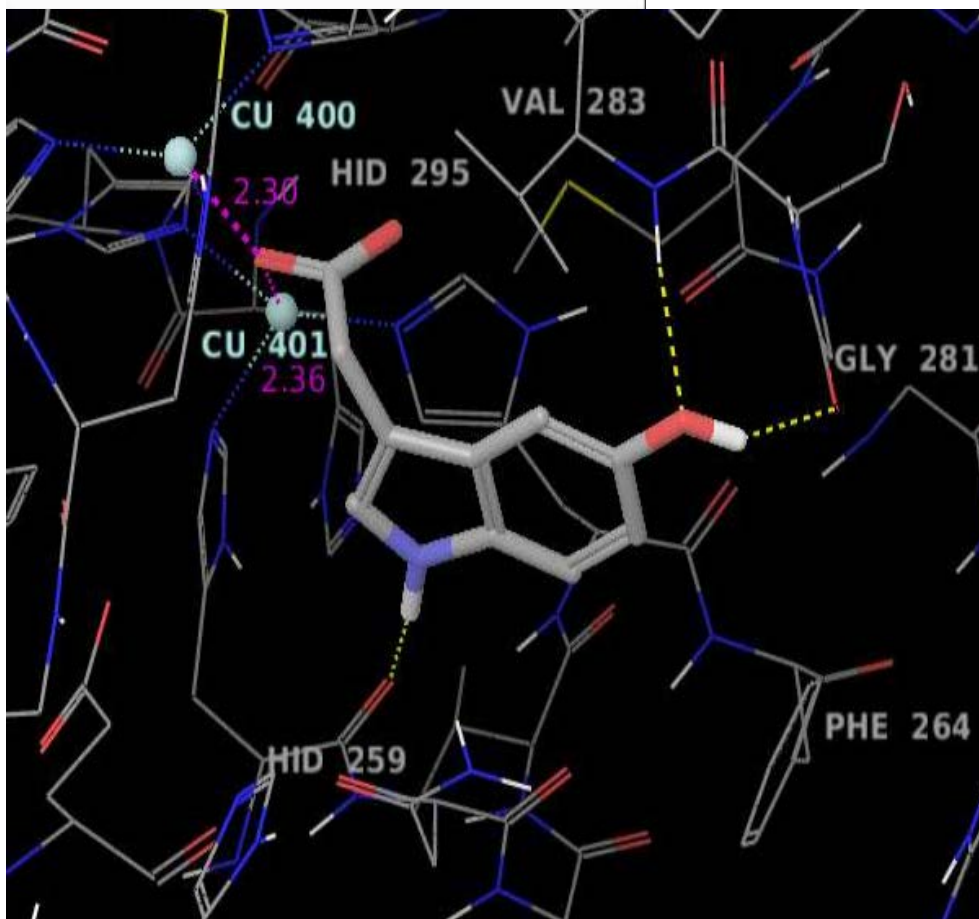
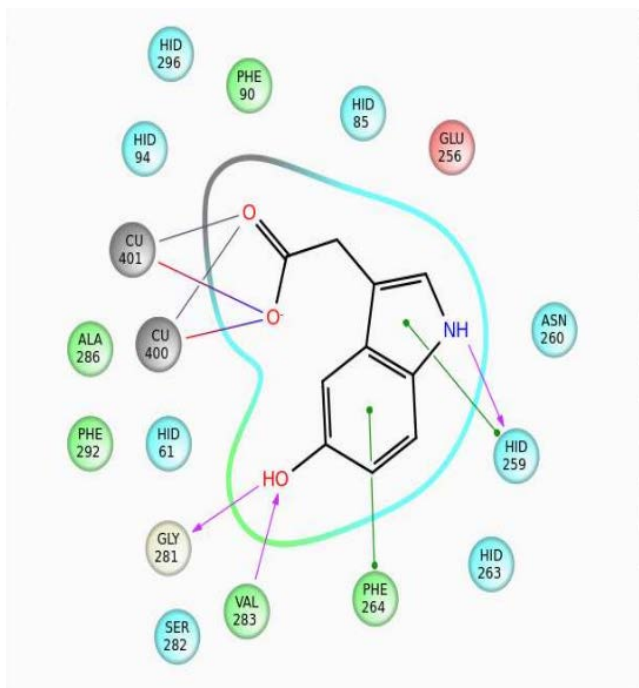
Εικόνα 11: Διάγραμμα ροής KNIME.

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής του προγράμματος KNIME. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: αρχικά διαβάζονται τα μόρια

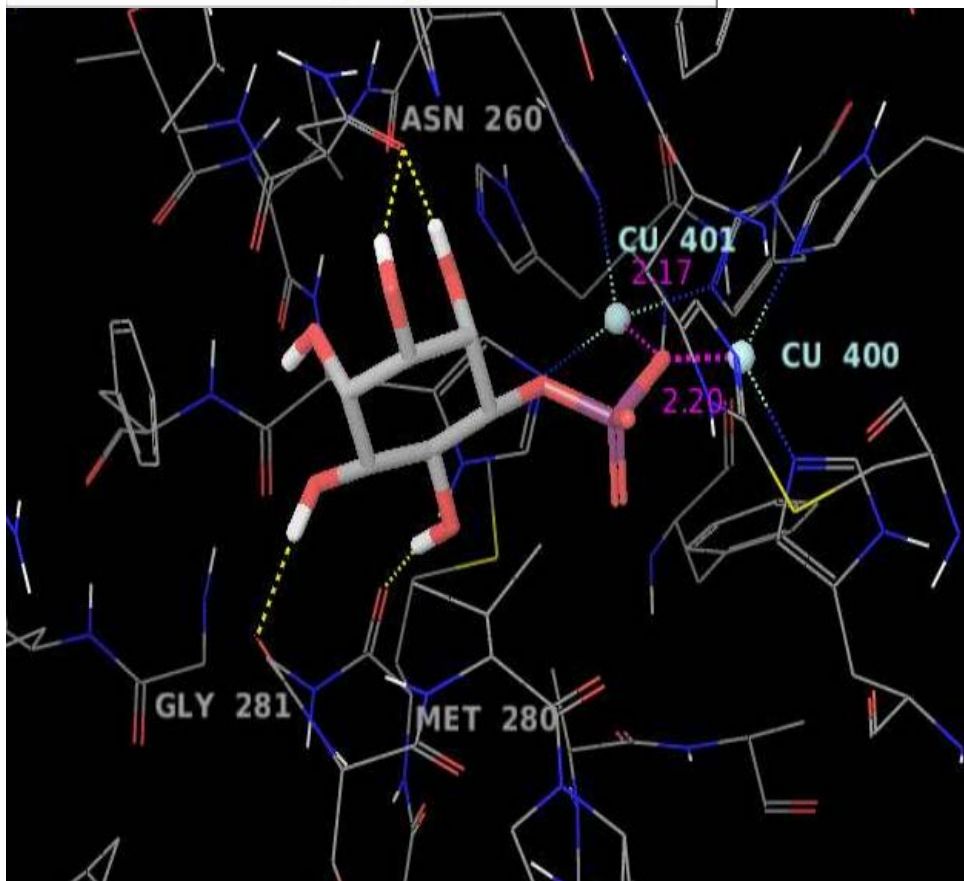
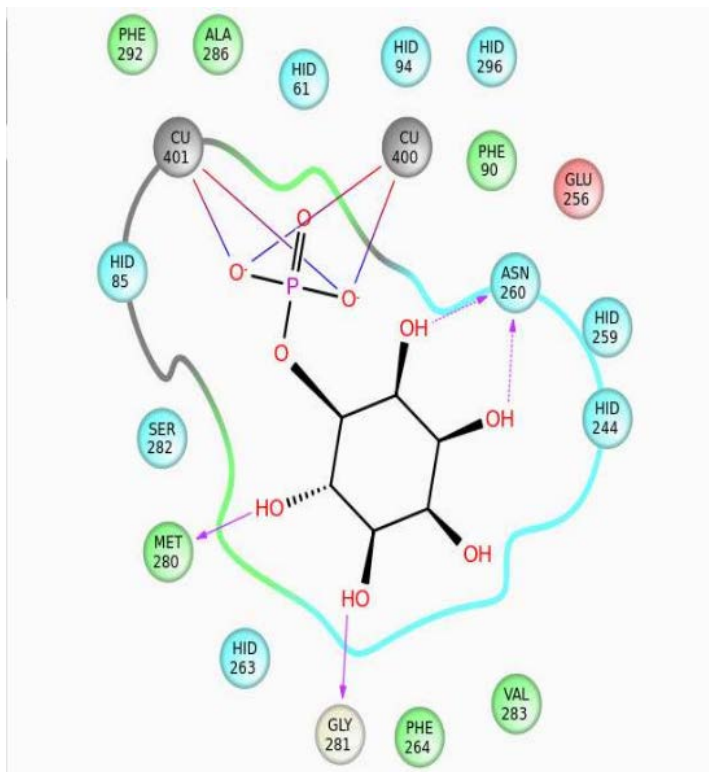
σε μορφή smiles (SMI) και εισάγονται στη ροή εργασίας. Έπειτα καθορίζονται τα κριτήρια φιλτραρίσματος όπως για παράδειγμα δότες και δέκτες ηλεκτρονίων, ο αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών, το μοριακό βάρος (τα ζητούμενα μόρια πρέπει να είναι μοριακού βάρους από 180 μέχρι 310). Στη συνέχεια μετατρέπονται τα μόρια σε μορφή .mae, εισάγονται στο πρόγραμμα Maestro Schrodinger 9.3, προετοιμάζονται μέσω Ligprep, έπειτα γίνεται η σάρωση των μορίων σε docking με την τεχνική του HTVS, μετά γίνεται επιλογή των μορίων που δημιουργούν δεσμό με την ασπαραγίνη (ASN 260) μέσω του pose filter και τέλος, αποθηκεύονται τα αποτελέσματα. Το πρόγραμμα KNIME ουσιαστικά βοηθάει στην αυτοματοποίηση αυτής της διαδικασίας, είναι η δημιουργία μιας λούπας που αυτόματα μπορεί να σαρώσει εκατομμύρια μόρια.

3.3.2.2 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

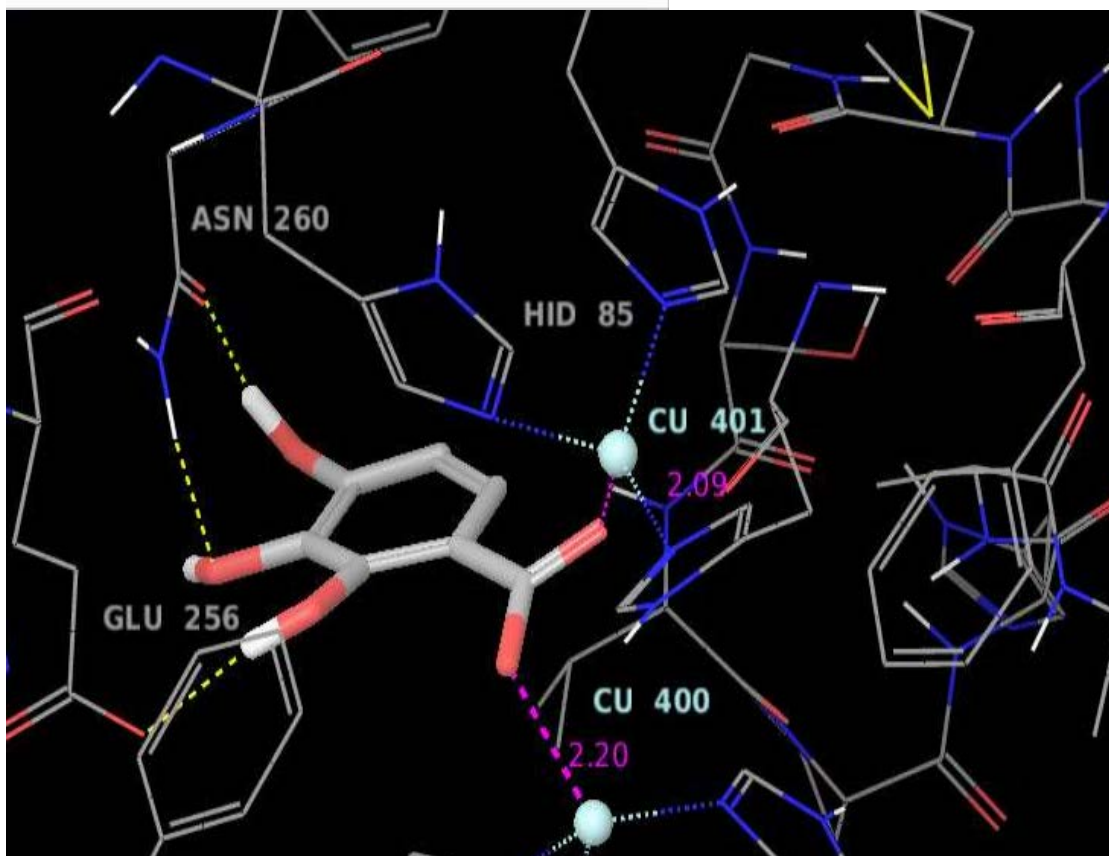
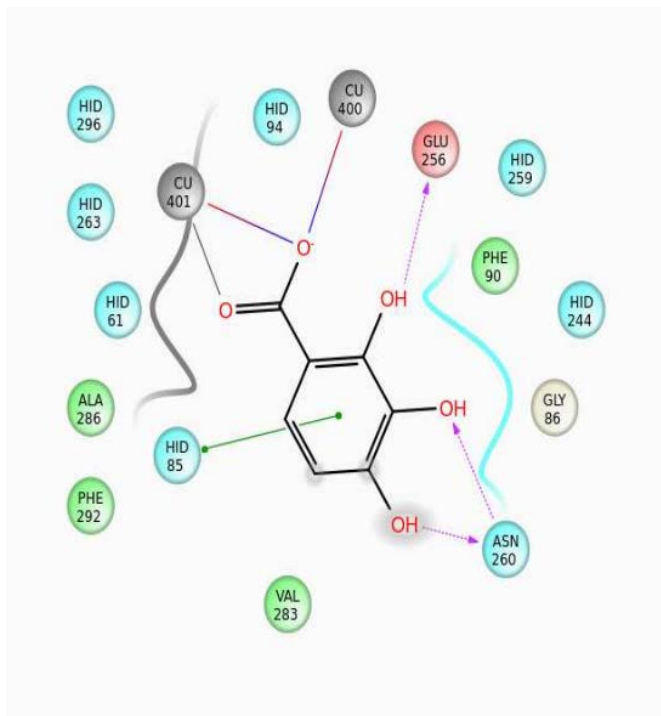
Οι πενήντα καλύτερες ενώσεις υποβλήθηκαν σε μελέτες πρόσδεσης με την τεχνική IFD και οι επτά καλύτερες που προέκυψαν παρουσιάζονται σε τρισδιάστατο μοντέλο και σε δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων (Εικόνες 12-18).



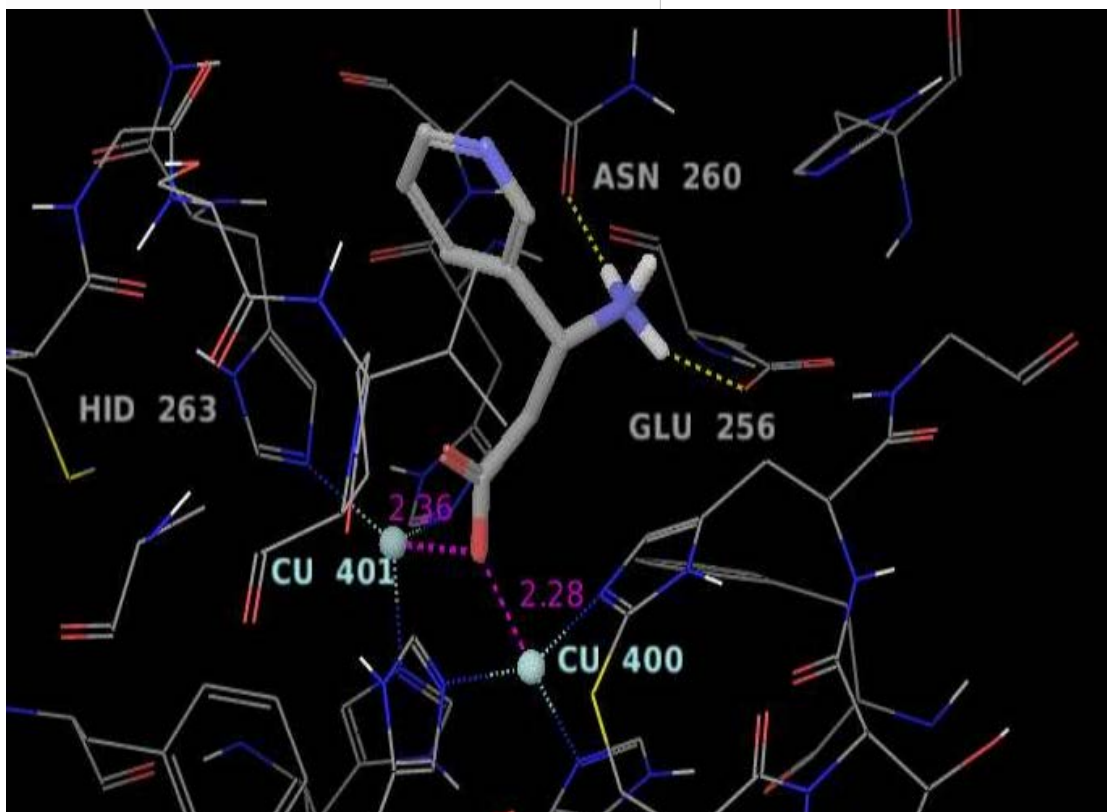
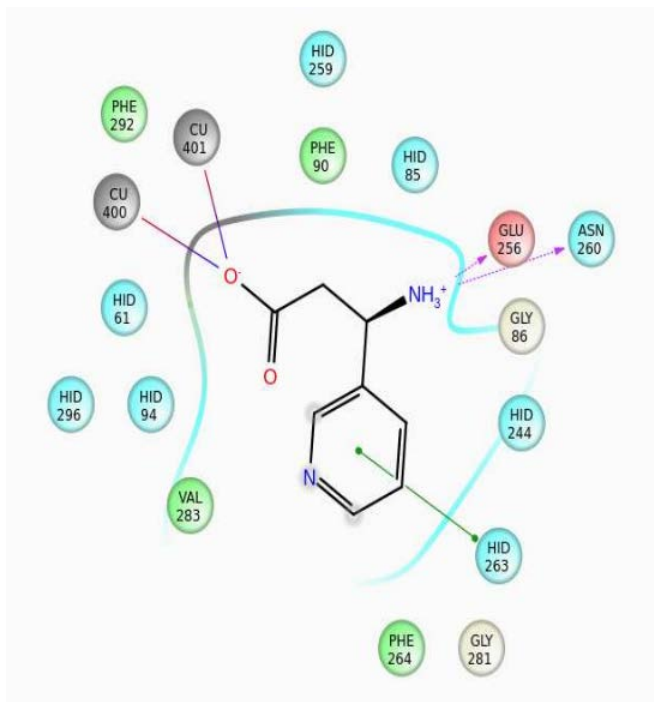
Εικόνα 12: Πρόσδεση της ένωσης zinc00185722 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Τρισδιάστατο μοντέλο και δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων.



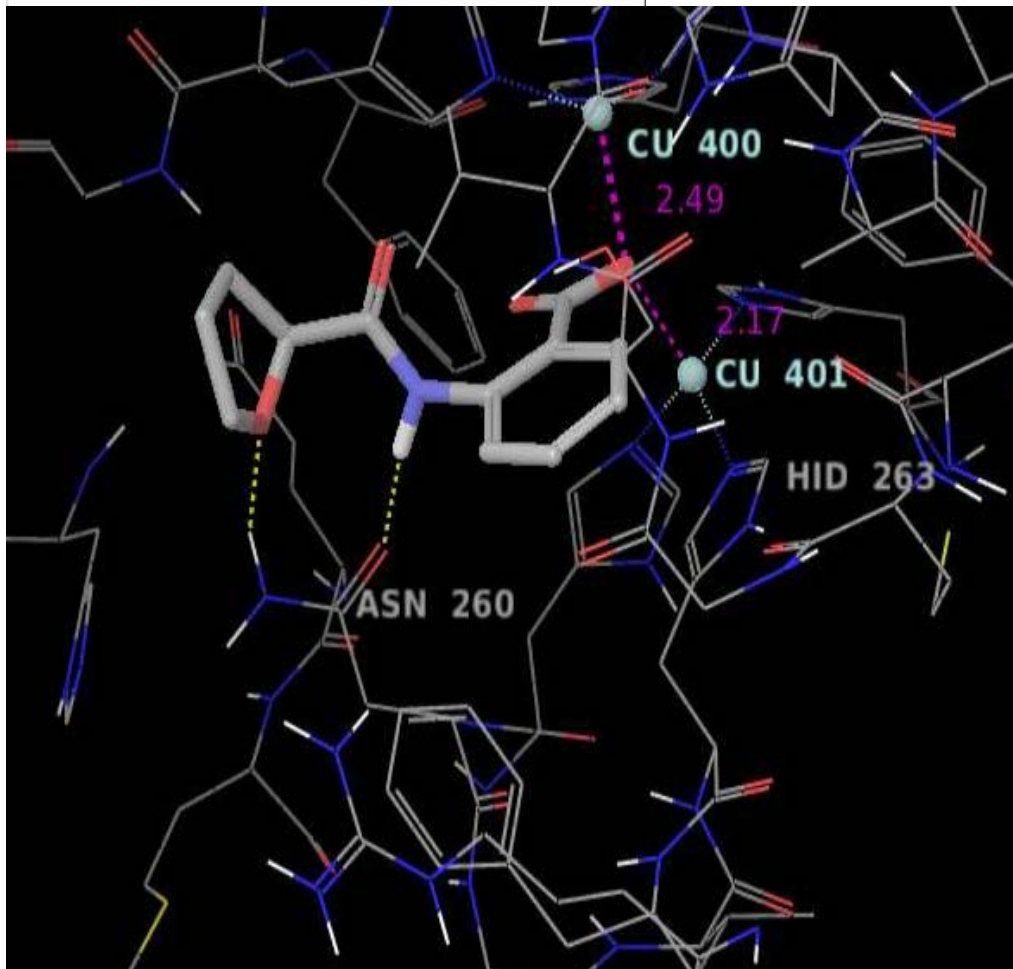
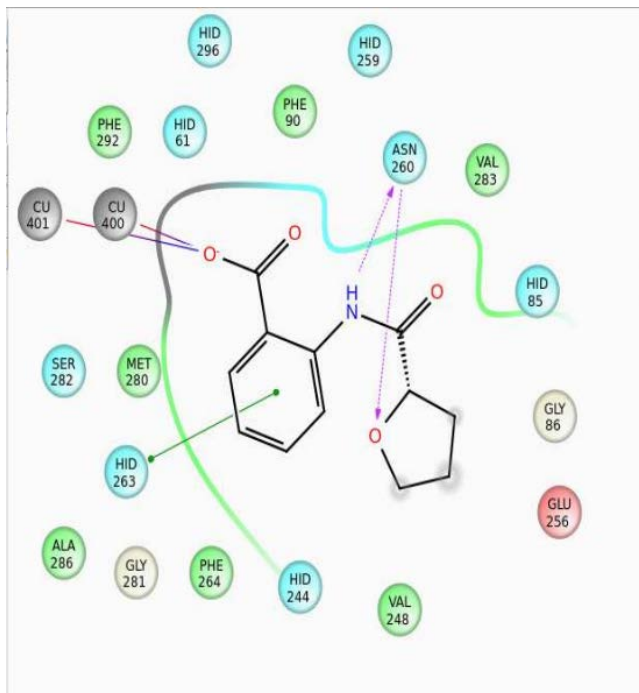
Εικόνα 13: Πρόσδεση της ένωσης zinc12503731 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



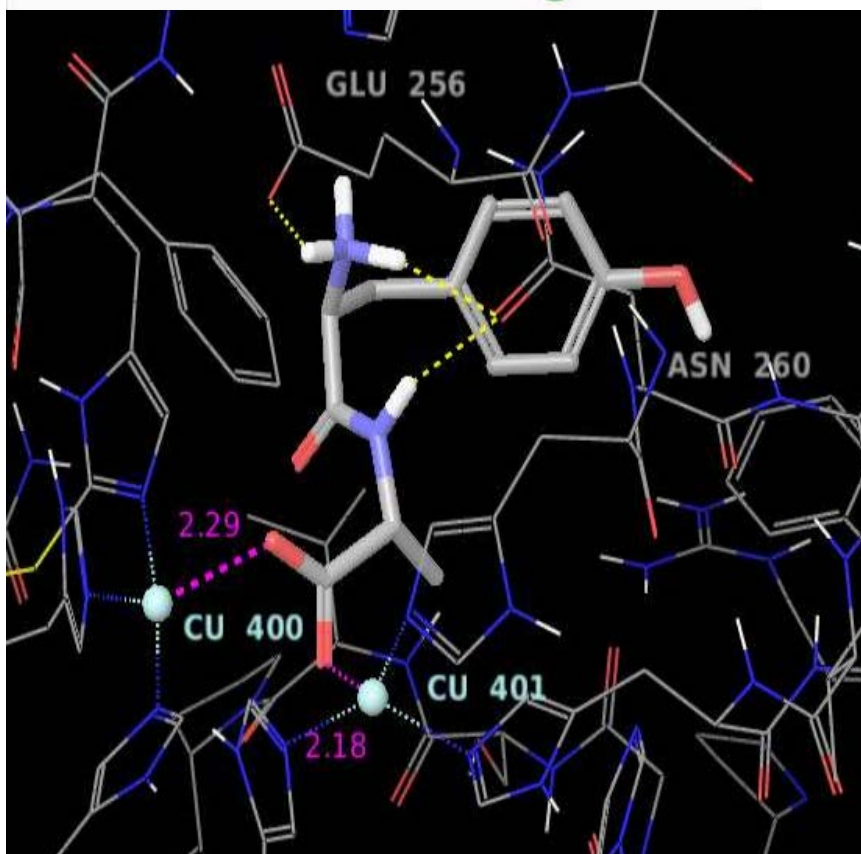
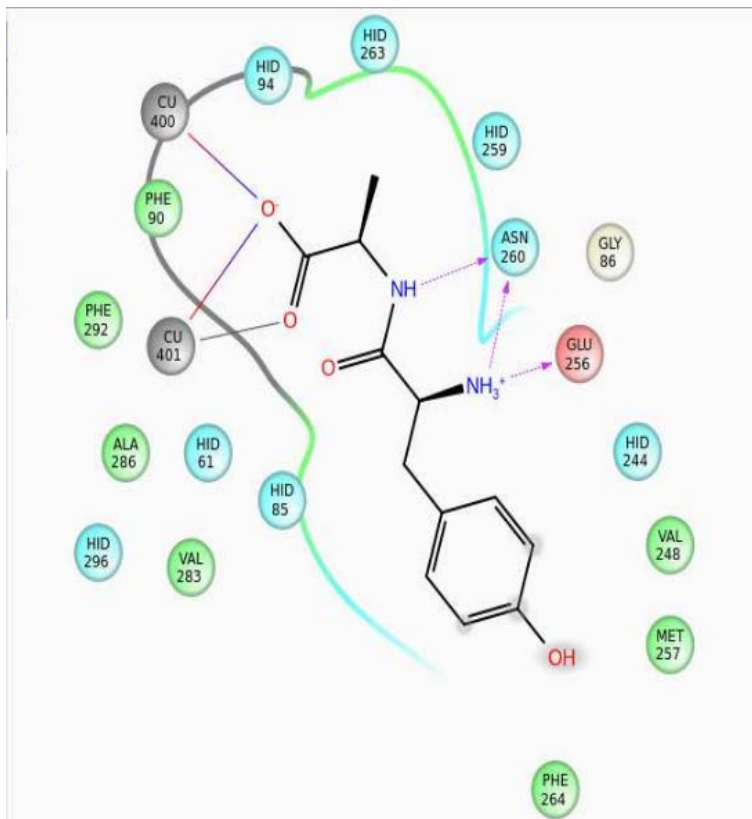
Εικόνα 14: Πρόσδεση της ένωσης zinc00391975 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



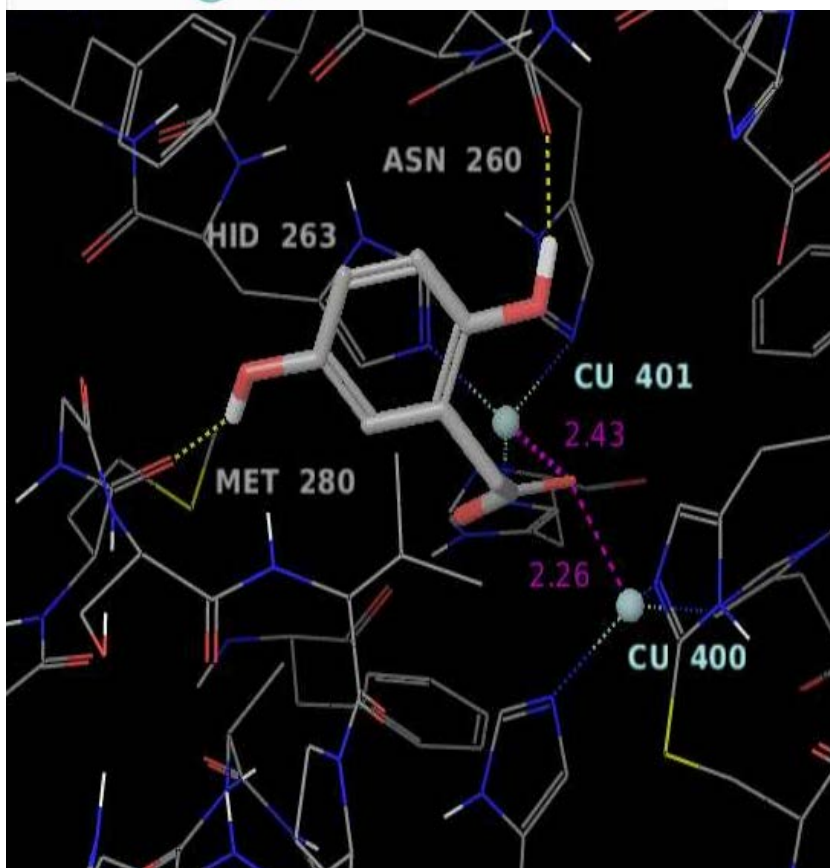
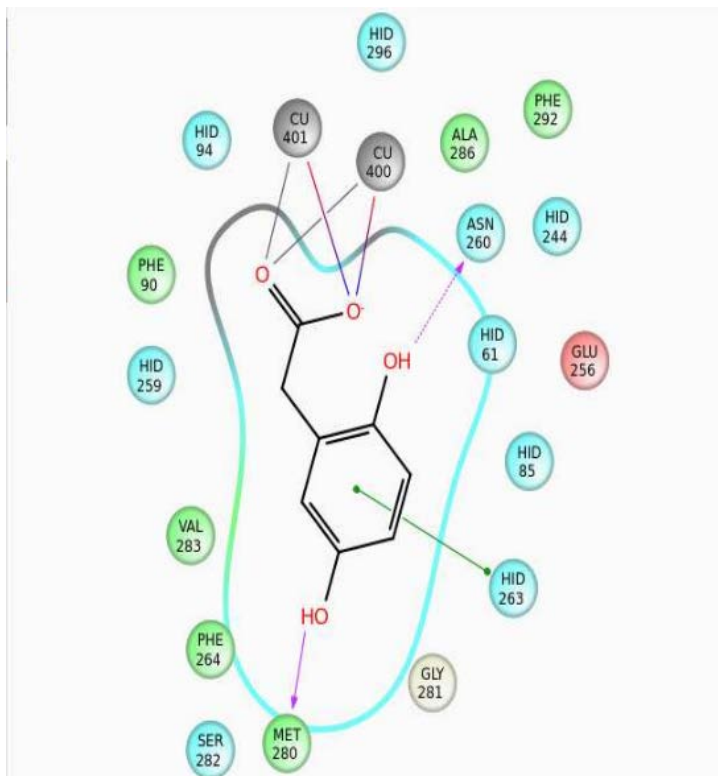
Εικόνα 15: Πρόσδεση της ένωσης zinc01471036 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο



Εικόνα 16: Πρόσδεση της ένωσης zinc04197177 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.

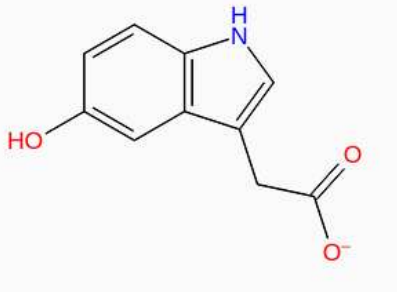
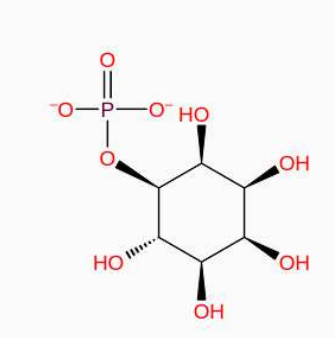
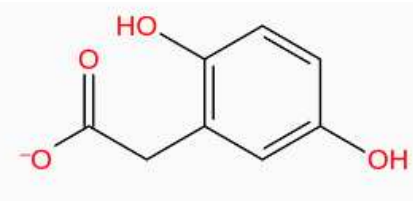
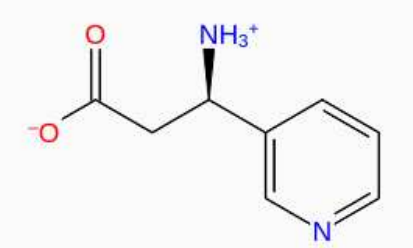


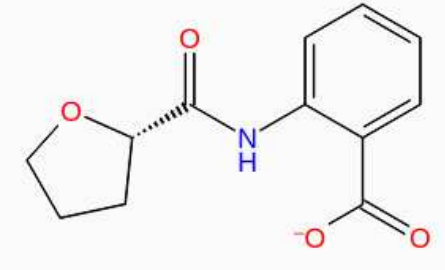
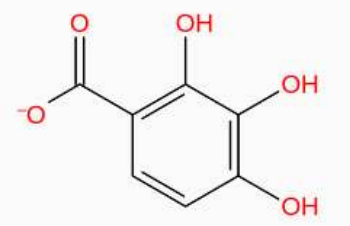
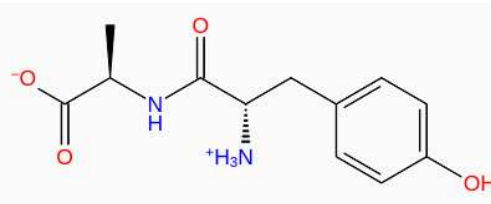
Εικόνα 17: Πρόσδεση της ένωσης zinc04787311 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



Εικόνα 18: Πρόσδεση της ένωσης zinc0388428 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3:

Κωδικός/Όνομα	Docking score	Glide emodel	Αλληλεπιδράσεις	Δομή
Zinc00185722	-124.314	-10.564	Cu 400, Cu 401, HID 259, PHE 264, GLY 281, VAL 283	 <p>The structure shows a tryptophan molecule with a hydroxyl group at the 5-position of the indole ring. The amino group is highlighted in blue, and the carboxylate group is highlighted in red.</p>
Zinc12503731	-134.921	-10.315	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLY 281, MET 280	 <p>The structure shows a glucose molecule in its cyclic form with a phosphate group attached to the C1 position. The phosphate group is highlighted in red.</p>
Zinc00388428	-94.675	-10.117	Cu 400, Cu 401, ASN 260, HID 263, MET 280	 <p>The structure shows a phenyl ring with hydroxyl groups at the 3 and 5 positions, and a carboxymethyl group at the 1 position. The hydroxyl groups and the carboxylate group are highlighted in red.</p>
Zinc01471036	-85.990	-9.483	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLU 256, HID 263	 <p>The structure shows a tryptophan molecule with a carboxylate group at the alpha position and an indole ring at the beta position. The amino group is highlighted in blue, and the carboxylate group is highlighted in red.</p>

Zinc04197177	-83.072	-8.932	Cu 400, Cu 401, ASN 260, HID 263	
Zinc00391975	-88.253	-8.843	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLU 256, HID 85	
Zinc04787311	-101.825	-8.820	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLU 256	

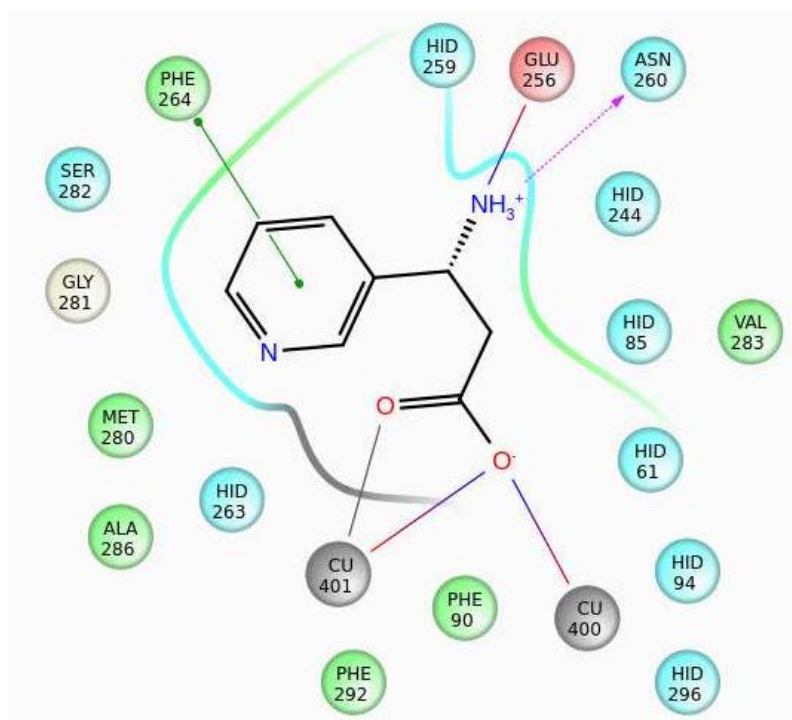
Πίνακας 3. Docking score και ενέργειες πρόσδεσης των μορίων με τα καλύτερα αποτελέσματα.

Από τα αποτελέσματα των μελετών προέκυψε το συμπέρασμα ότι είναι πολύ σημαντική η παρουσία του αρωματικού δακτυλίου, καθώς οι π-π αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν το μόριο στη θέση πρόσδεσης ενισχύοντας έτσι την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης. Ο αρωματικός δακτύλιος καθιστά λιγότερο ευέλικτο το μόριο σε σχέση με ένα μόριο μακριάς ανθρακικής αλυσίδας. Η παρουσία υδρόξυ ομάδων είναι μεγάλης σημασίας καθώς βλέπουμε ότι σε όλα τα μόρια δημιουργούν αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς υδρογόνου με κρίσιμα αμινοξέα, που σταθεροποιούν το μόριο και βελτιώνουν την ικανότητα πρόσδεσης. Επίσης, όταν υπάρχουν καρβοξυλομάδες, μπορούν δυνητικά να συντονίσουν τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου με την αποπρωτονιωμένη τους μορφή, πλησιάζοντας σε απόσταση μικρότερη από 2.6Å και δημιουργώντας σύμπλοκο. Τέλος, η

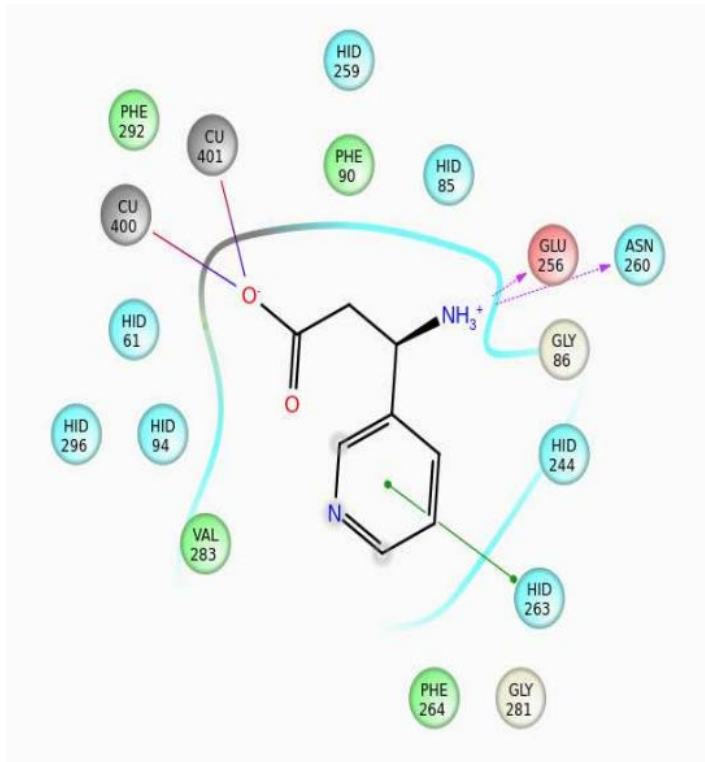
παρουσία του φωσφορικού οξέος δίνει, επίσης, τη δυνατότητα στο μόριο να πλησιάσει τα ιόντα χαλκού σε απόσταση μικρότερη των 2.6Å και να δημιουργήσει σύμπλοκο.

3.3.2.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων HTVS και IFD

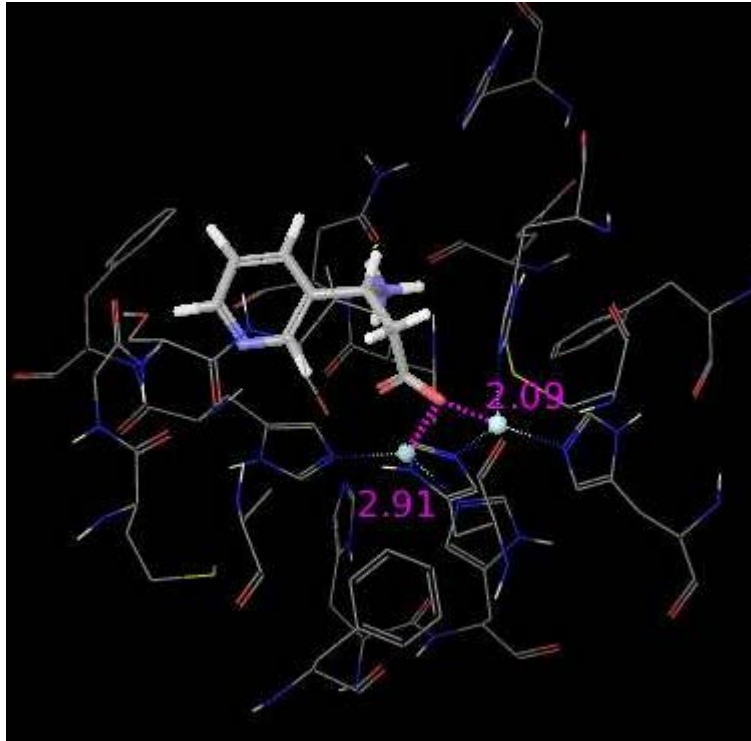
Παρακάτω παρουσιάζεται μια σύγκριση των τεχνικών HTVS και IFD για ένα από τα τελικά μόρια που επιλέχθηκαν (Εικόνες 19-22, Πίνακας 4). Παρατηρείται ότι το docking score και η ενέργεια Glide emodel έχουν αρκετά μεγαλύτερες τιμές με την τεχνική IFD. Επίσης, κάποιες αλληλεπιδράσεις στο δισδιάστατο διάγραμμα διαφέρουν, καθώς και ο τρόπος που είναι τοποθετημένο το μόριο μέσα στο ενεργό κέντρο. Αυτό είναι λογικό, αφού η τεχνική HTVS χρησιμοποιεί άκαμπτο μοντέλο ενώ το IFD στηρίζεται στην επαγόμενη πρόσδεση, δηλαδή παρατηρείται μερική ευκαμψία των ομάδων-αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Παράλληλα γνωρίζουμε ότι η τεχνική HTVS δίνει πολύ ταχέα αποτελέσματα για μεγάλο αριθμό μορίων, πράγμα που συνεπάγεται λιγότερο αξιόπιστα αποτελέσματα.



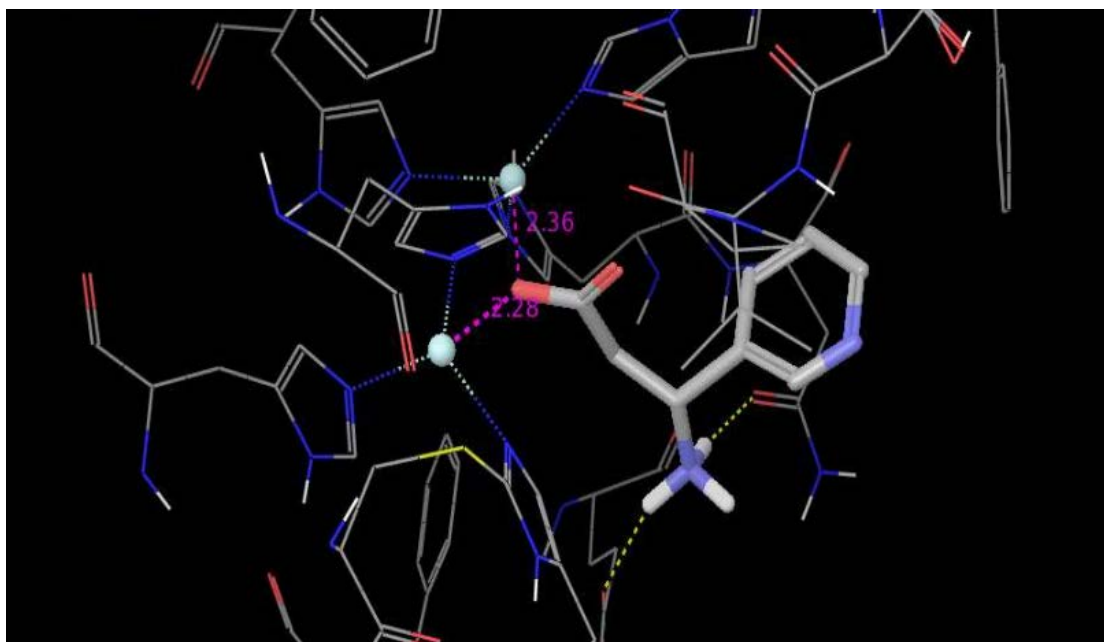
Εικόνα 19: Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική HTVS.



Εικόνα 20: Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική IFD.



Εικόνα 21: Τρισδιάστατο μοντέλο της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική HTVS.



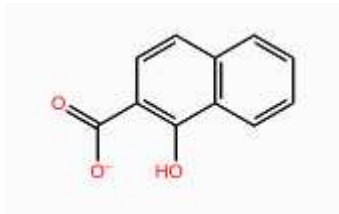
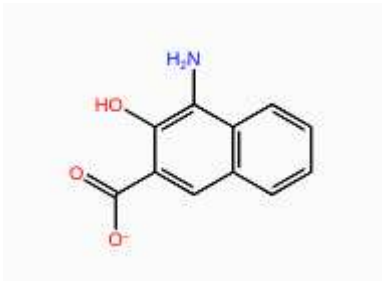
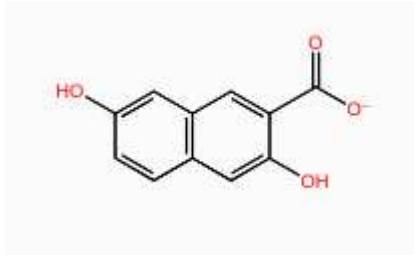
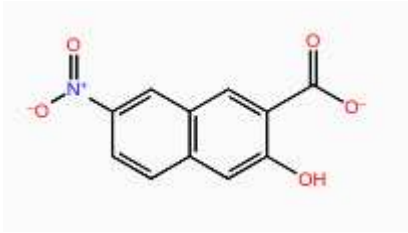


Εικόνα 22: Τρισδιάστατο μοντέλο της ένωσης zinc01471036 με την τεχνική IFD.

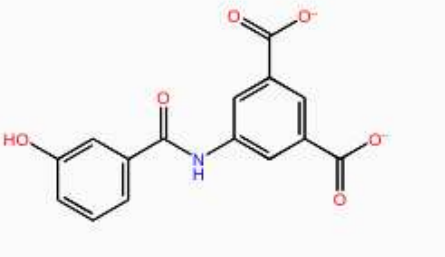



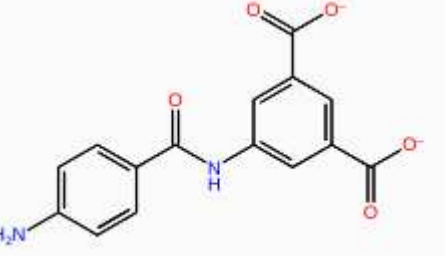
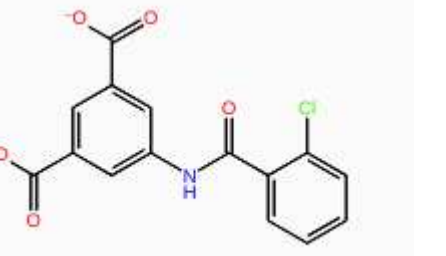
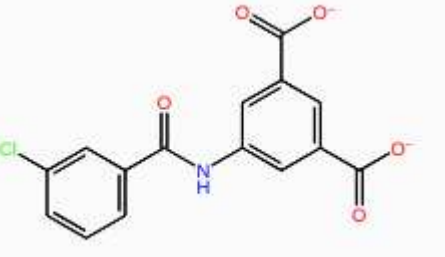
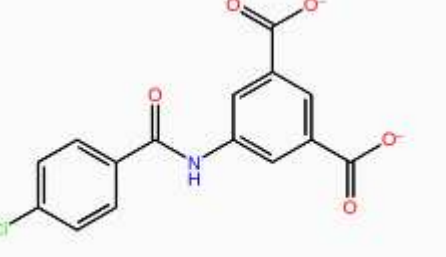
HTVS			IFD		
Docking score	Glide emodel	Αλληλεπιδράσεις	Docking score	Glide emodel	Αλληλεπιδράσεις
-8.127	-50.707	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLU 256, PH264	-9.483	-85.990	Cu 400, Cu 401, ASN 260, GLU 256, HID 263

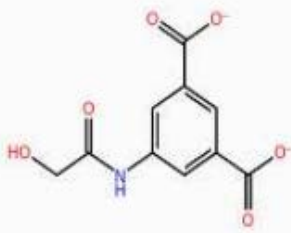
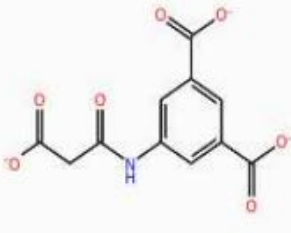
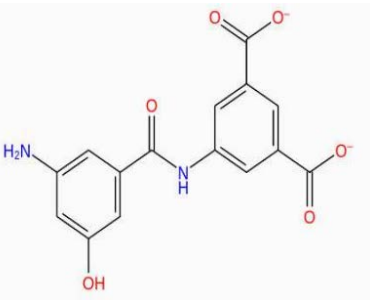
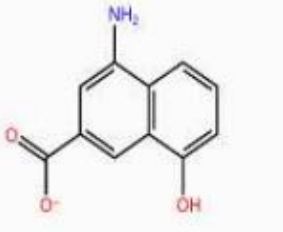
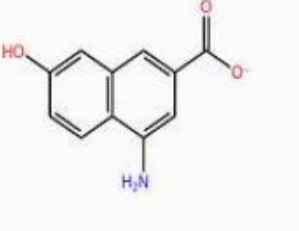
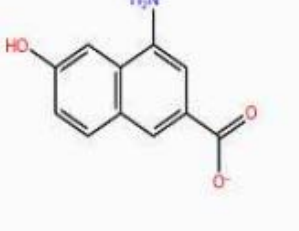
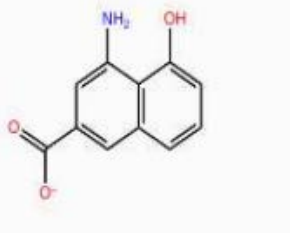
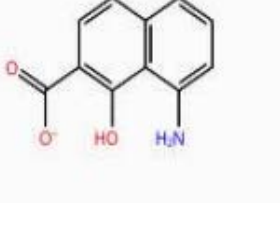
Πίνακας 4. Σύγκριση αποτελεσμάτων Docking Score και ενέργειας πρόσδεσης των τεχνικών HTVS και IFD

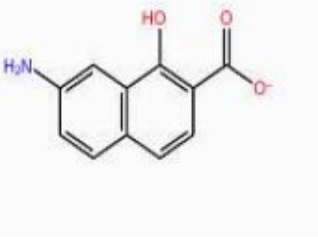
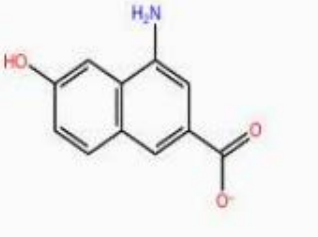
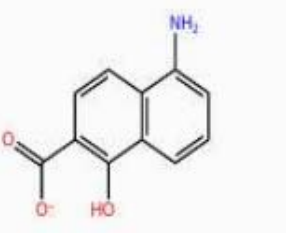
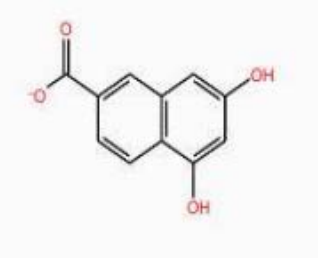
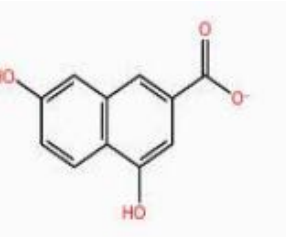
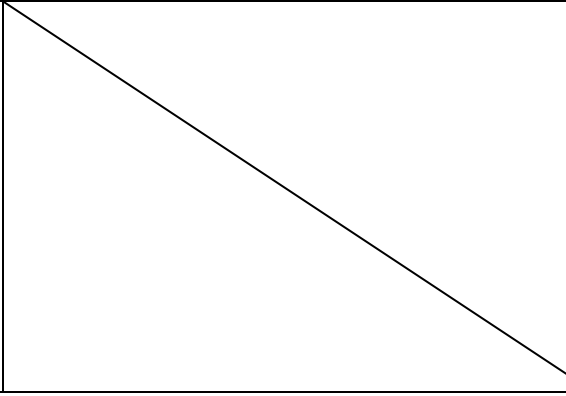
3.4 Επιπρόσθετη έρευνα - νέες προτάσεις συγκεκριμένα πάνω στα οξέα

Με βάση όλα τα δεδομένα του θεωρητικού μέρους, αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η δοκιμή με μοριακή πρόσδεση κάποιων οξέων καθώς τα οξέα είναι μια ομάδα μορίων που φαίνεται ότι μπορεί να δώσει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα μόρια που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5:

Acid1 	Acid2 
Acid3 	Acid4 
Acid5 	Acid6 
Acid7	Acid8

	
<p>Acid9</p> 	<p>Acid10</p> 
<p>Acid11</p> 	<p>Acid12</p> 
<p>Acid13</p> 	<p>Acid14</p> 
<p>Acid15</p>	<p>Acid16</p>

	
<p>Acid17</p> 	<p>Acid18</p> 
<p>Acid19</p> 	<p>Acid20</p> 
<p>Acid21</p> 	<p>Acid22</p> 
<p>Acid23</p>	<p>Acid24</p>

	
<p>Acid25</p> 	<p>Acid26</p> 
<p>Acid27</p> 	

Πίνακας 5. Οι χημικές δομές των οξέων που υποβλήθηκαν σε *in silico* μελέτες.

Τα μόρια αυτά υποβλήθηκαν σε μια νέα σειρά *in silico* μελετών πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης (2Y9X). Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να βρεθούν ποιά από τα μόρια προσδένονται καλύτερα στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, με το σκεπτικό πως τα μόρια που παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα πρόσδεσης θα δράσουν και ως παρεμποδιστές της δράσης του ενζύμου. Οι απώτεροι σκοποί αυτών των μελετών ήταν κατ'αρχάς η διαλογή από την λίστα των ενώσεων που παρουσίαζαν καλή ικανότητα πρόσδεσης ούτως ώστε να προσδιοριστούν οι καλύτερες υποψήφιες ενώσεις για υποβολή σε περαιτέρω *in vitro* μελέτες, αλλά και κατά δεύτερον, ο

σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων προτεινόμενων προς σύνθεση μορίων, βασιζόμενοι στην βελτίωση ή παραλλαγή της δομής των ενώσεων που θα παρουσίαζαν τα καλύτερα αποτελέσματα πρόσδεσης.

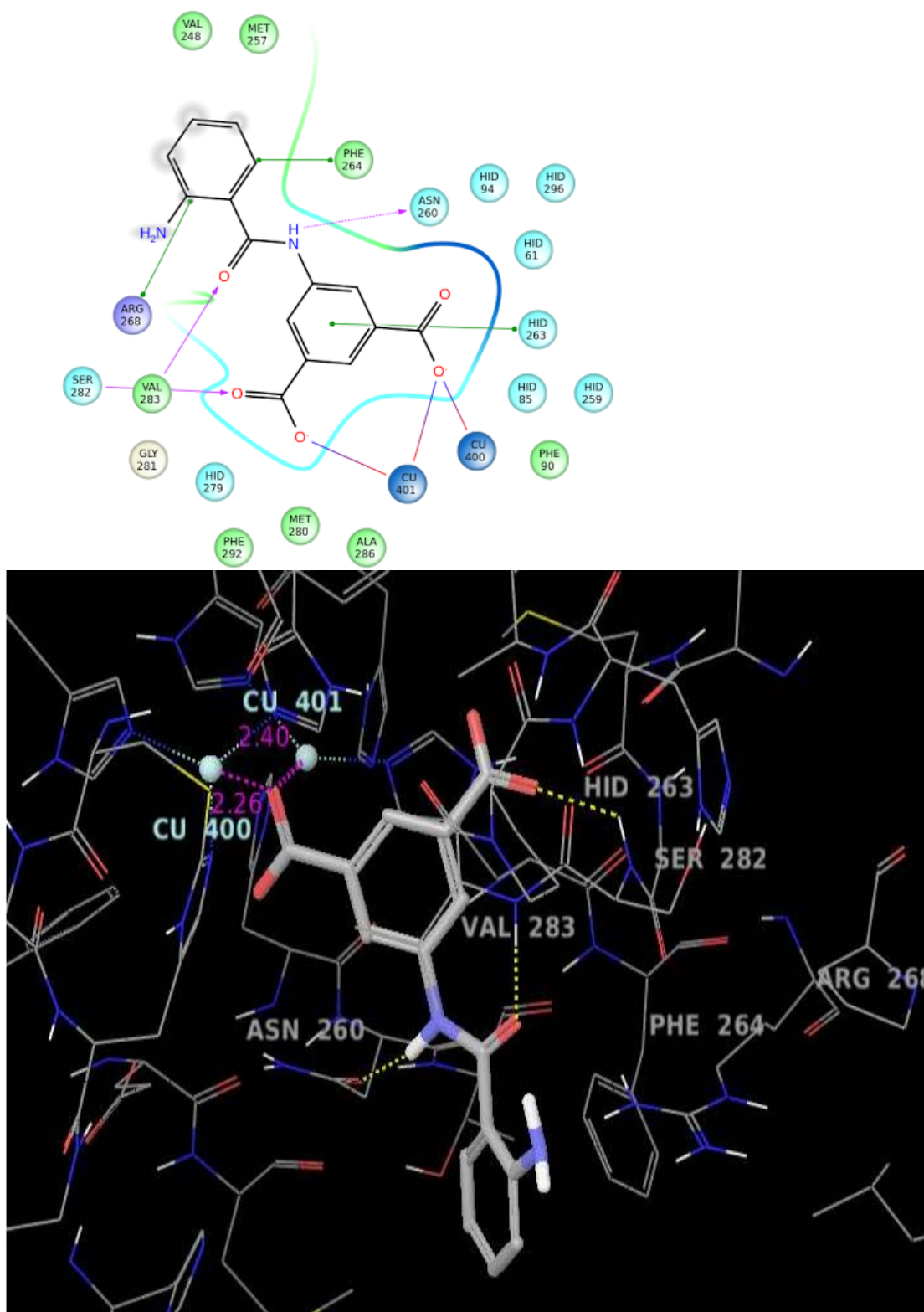
3.4.1 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΜΕΛΕΤΩΝ

Οι μελέτες πρόσδεσης έγιναν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε αναλυτικά προηγούμενα, μέσω χρήσης των προγραμμάτων LigPrep 2.7 και Glide 5.9 της οικογένειας προγραμμάτων Maestro 9.5 - Schrödinger Suite 2013. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν αρχικά προετοιμάστηκαν για πρόσδεση κοντά στο pH βέλτιστης δράσης της τυροσινάσης (pH=6.5) στο πεδίο δυνάμεων OLPS 2005. Κατά την διαδικασία προετοιμασίας τους παρήχθησαν και ισομερείς δομές [79].

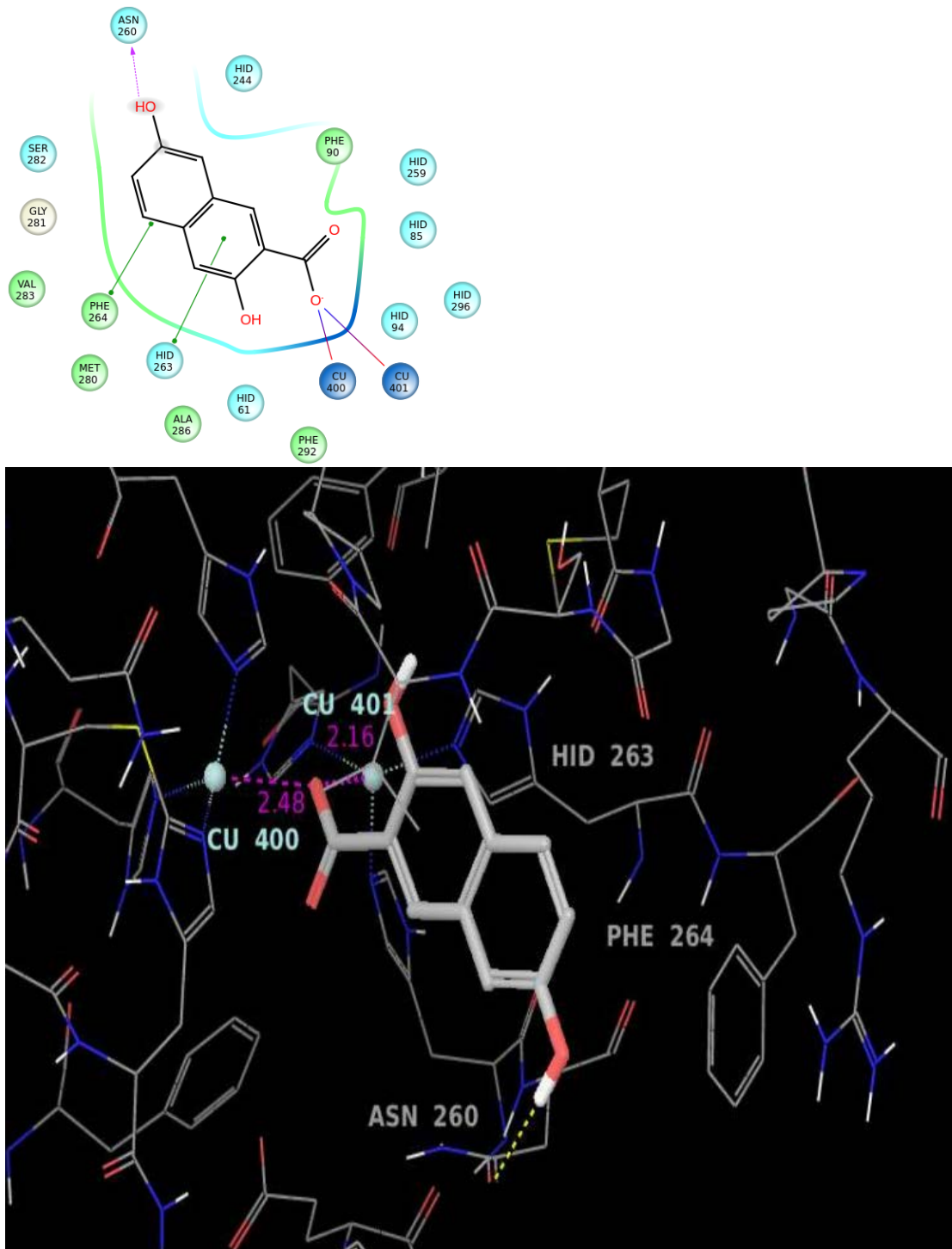
Τα μόρια αυτά δοκιμάστηκαν κατευθείαν με την τεχνική IFD, δηλαδή του μοντέλου επαγόμενης πρόσδεσης κατά την οποία οι ομάδες-αμινοξέα που ευρίσκονται περί το ενεργό κέντρο επιδεικνύουν μερική ευκαμψία κατά την πρόσδεση του φαρμακευτικού μορίου, που είναι και η τεχνική με την μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα μόρια ήταν λίγα οπότε η υπολογιστική ισχύς που κατανάλωσαν δεν ήταν απαγορευτική για την πραγματοποίηση αυτής της ενέργειας [85, 86].

3.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

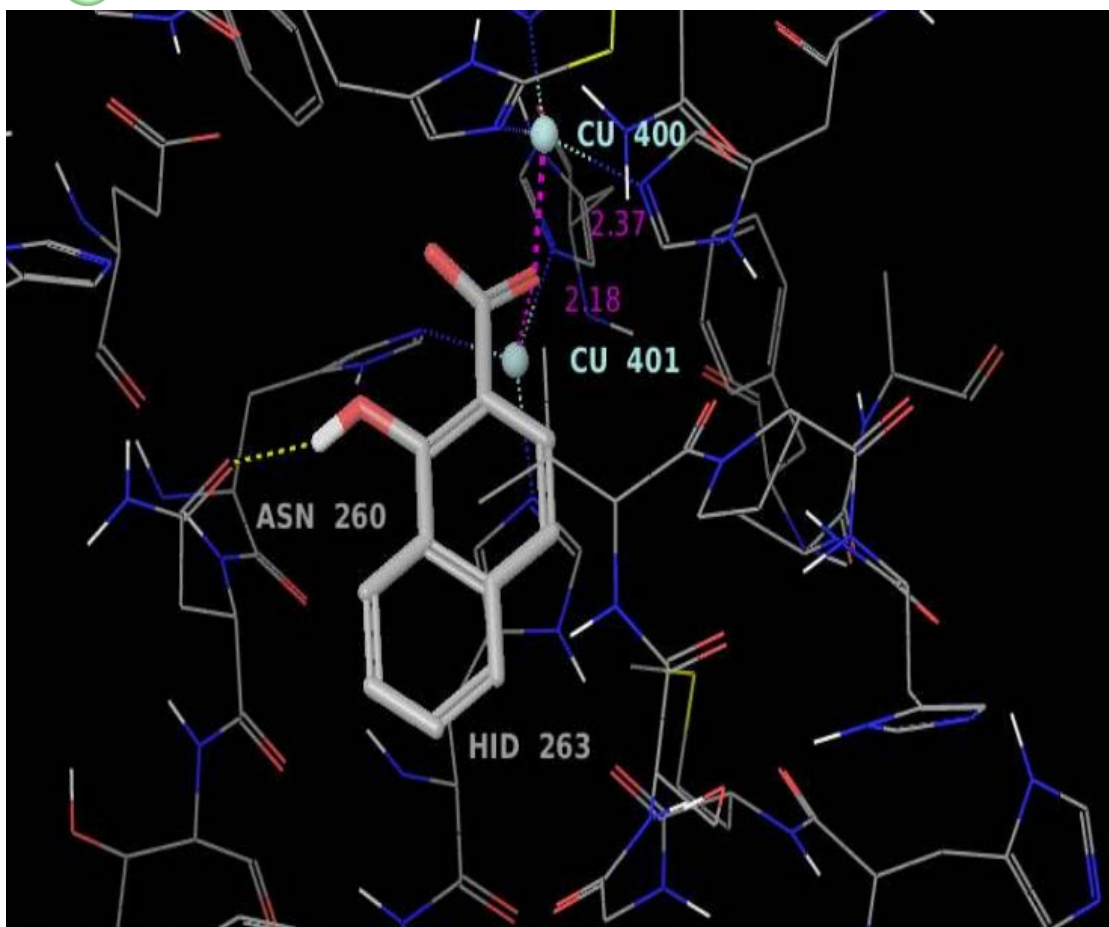
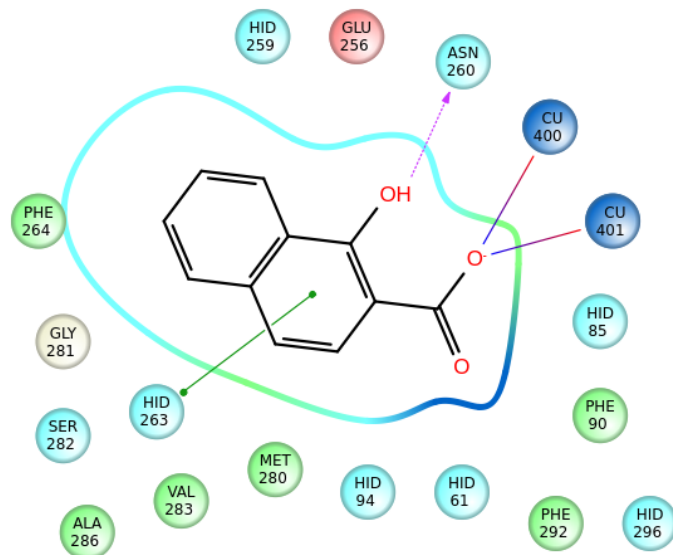
Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά για την πιθανότητα εύρεσης ενός καλού αναστολέα τυροσινάσης και παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά (Εικόνες 23-28):



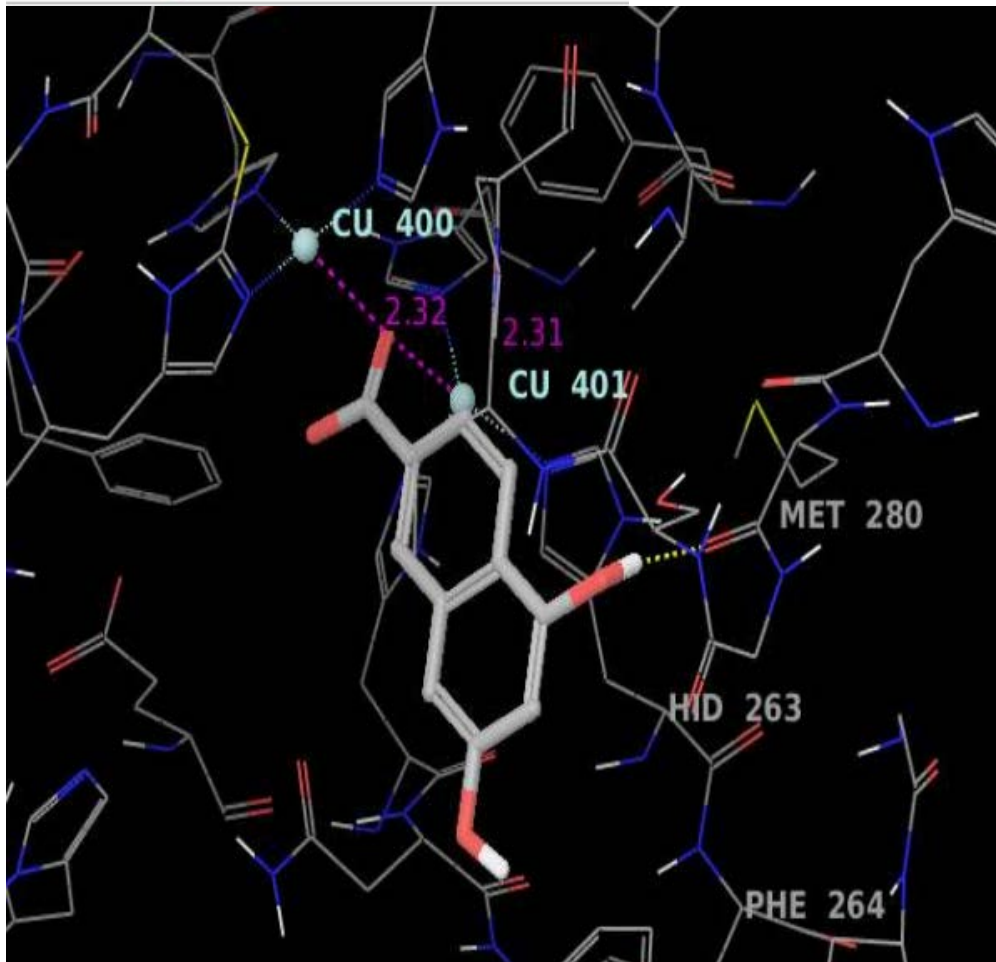
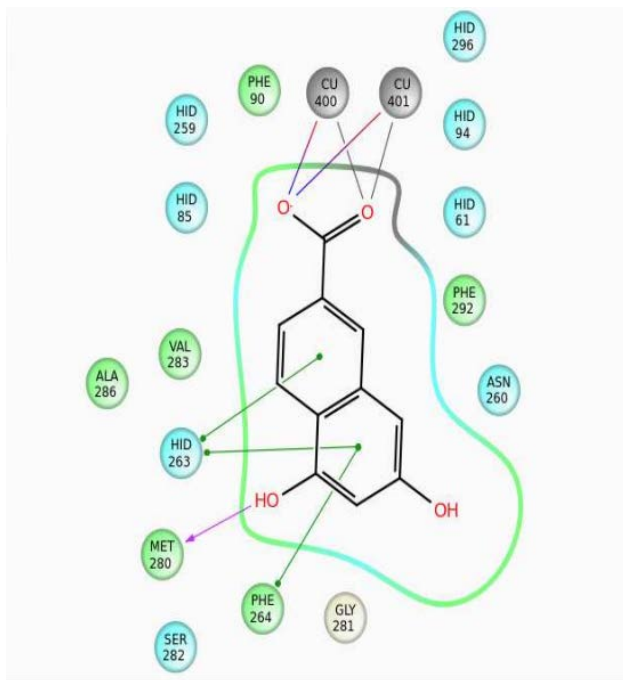
Εικόνα 23: Πρόσδεση της ένωσης acid 9 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



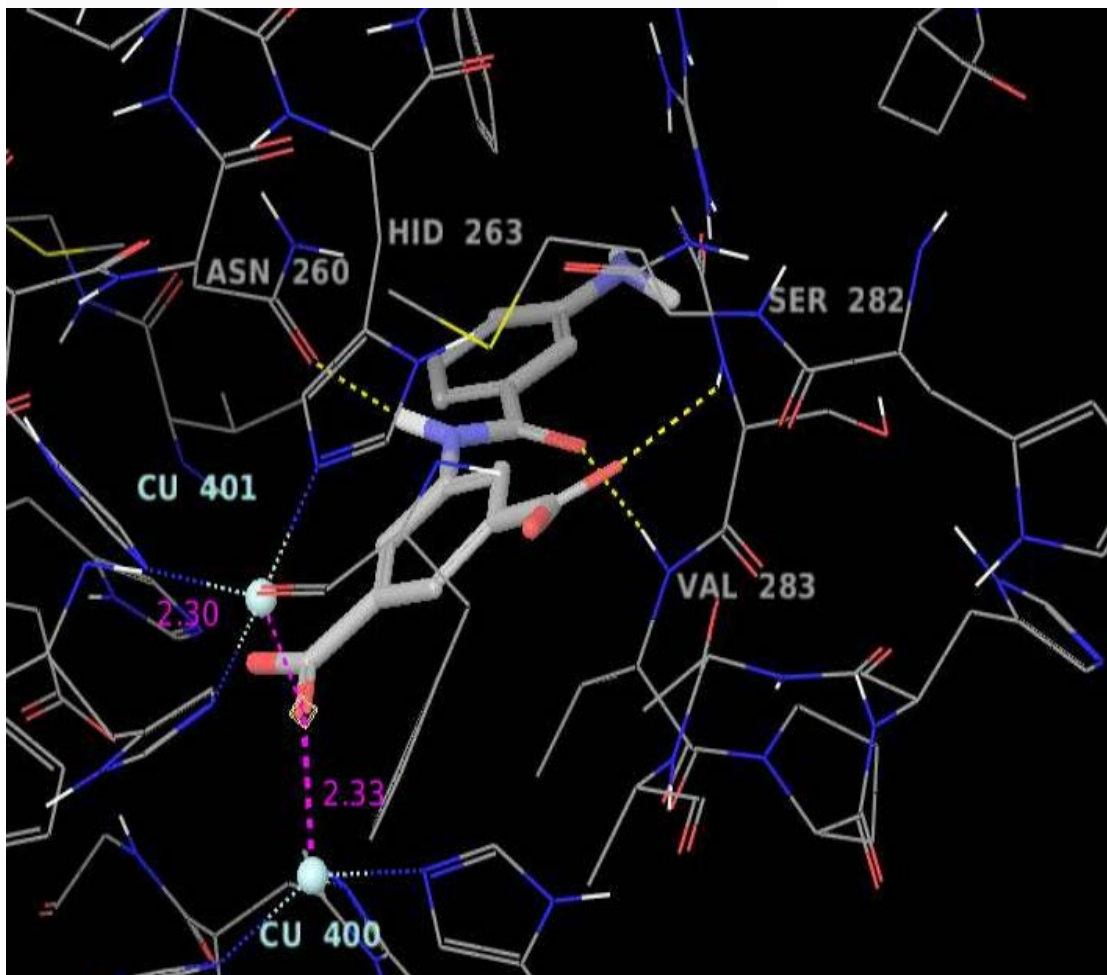
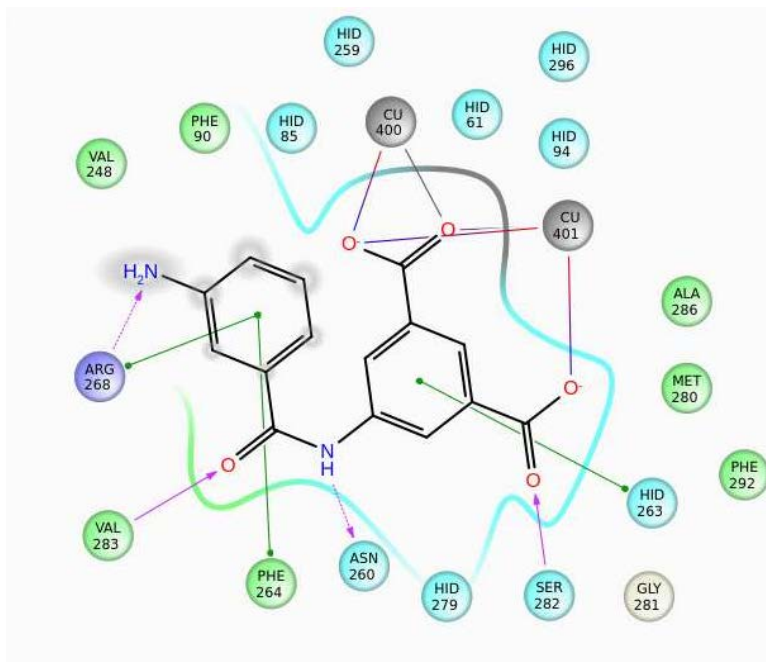
Εικόνα 24: Πρόσδεση της ένωσης acid 3 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



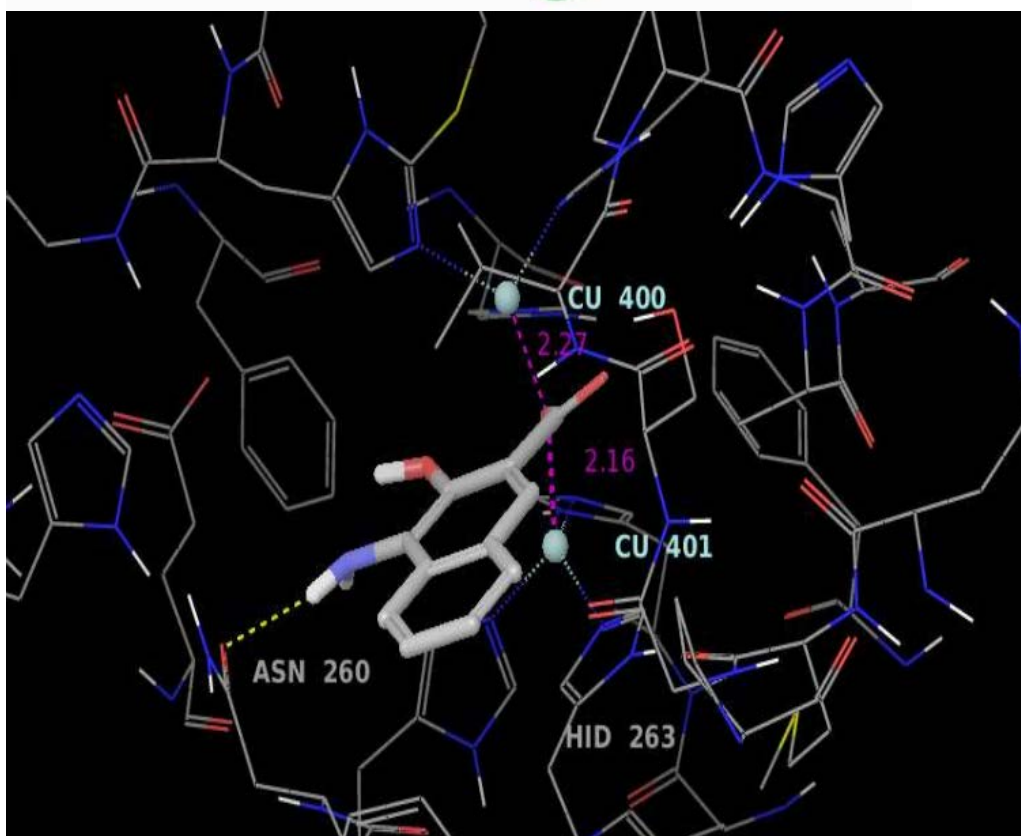
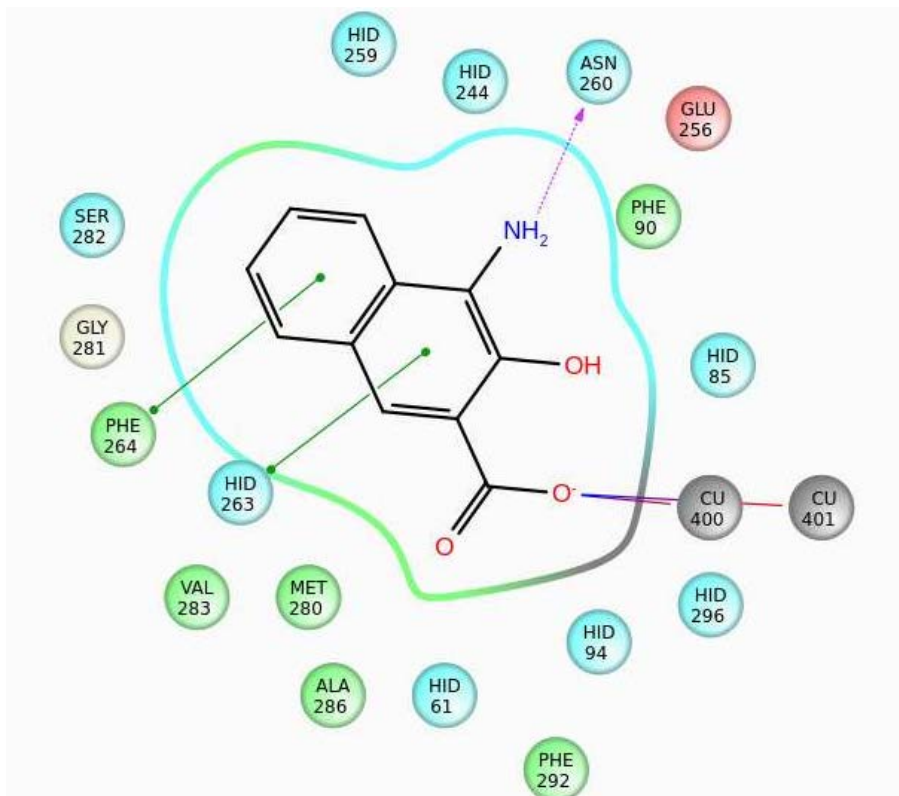
Εικόνα 25: Πρόσδεση της ένωσης acid 1 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



Εικόνα 26: Πρόσδεση της ένωσης acid 26 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.

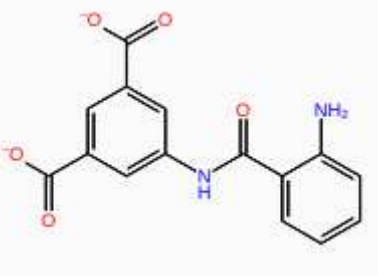
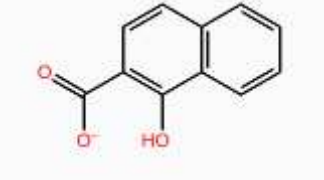

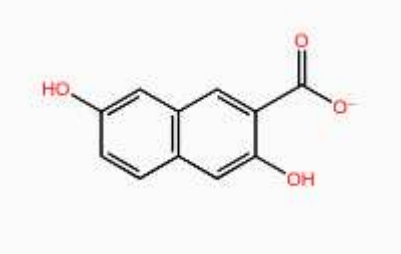



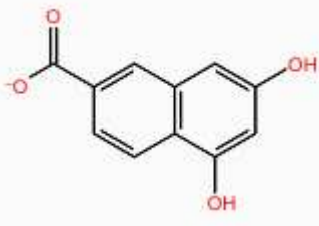
Εικόνα 27: Πρόσδεση της ένωσης acid 10 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.



Εικόνα 28: Πρόσδεση της ένωσης acid 2 στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης 2Y9X. Δισδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατο μοντέλο.

Τα αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6:

Κωδικός Όνομα	Docking score	Glide emodel	Αλληλεπιδράσεις	Δομή
Acid9	-10.050	-124.314	Cu 400, Cu 401, ASN 260, PHE 264, HID 263, VAL 283, SER 282, ARG 268	
Acid1	-10.207	-94.370	Cu 400, Cu 401, HID 263, ASN 260	
Acid2	-10.316	-103.316	Cu 400, Cu 401, PHE 264, HID 263, ASN 260	
Acid3	-10.083	-97.155	Cu 400, Cu 401, ASN 260, HID 263, PHE 264	

Acid10	-9.889	-116.822	Cu 400, Cu 401, ARG 268, VAL 283, ASN 260, SER 282, HID 263	
Acid26	-10.139	-92.728	Cu 400, Cu 401, HID 263, MET 280, PHE 264	

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης οξέων.

Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης των παραπάνω οξέων είναι πολύ ενθαρρυντικά για την εύρεση ικανοποιητικών αναστολέων τυροσινάσης. Τα καλύτερα μόρια που παρουσιάζονται παραπάνω, δημιουργούν σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού, οι πολικές ομάδες τους, όπως οι υδρόξυ-ομάδες σχηματίζουν πολλούς δεσμούς υδρογόνου με διπλανά αμινοξέα και οι δακτύλιοι τους συμμετέχουν σε π-π αλληλεπιδράσεις, συνήθως με τις ιστιδίνες που συνδέονται με τα ιόντα χαλκού. Γενικά δημιουργούνται γύρω από όλο το μόριο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που περικλείουν το μόριο καθιστώντας έτσι πιο δύσκολη την απομάκρυνση του από το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης, καθώς δεν έρχεται καθόλου σε επαφή με τον διαλύτη. Επίσης, σε κάποιες από τις καλύτερες πόζες μπορεί να παρατηρηθεί ότι το μόριο-πιθανός αναστολέας προστατεύεται, καθώς ένα κατάλοιπο φαινυλαλανίνης κλείνει μερικώς την είσοδο, καθιστώντας έτσι δύσκολη την είσοδο σε άλλα μόρια. Βλέποντας και αξιολογώντας το κάθε μόριο και με το μάτι, μπόρεσαν να προσδιορισθούν και κάποια στοιχεία που δεν βοηθούν το μόριο να προσκολληθεί στο ενεργό κέντρο. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες βρωμίου, χλωρίου ή άλλων αλογόνων δεν φάνηκαν να συμμετέχουν σε κάποια σημαντική αλληλεπίδραση, βρίσκονταν μακριά από το ενεργό κέντρο και συνήθως σε επαφή με τον διαλύτη. Αντίστοιχα, οι μεθόξυ-ομάδες, τα

μεθύλια πάνω σε βενζολικούς δακτυλίους και, γενικά, οι μη πολικές ενώσεις δεν δημιουργούσαν αλληλεπιδράσεις και έρχονταν σε επαφή με τον διαλύτη. Τα μόρια με μεθόξυ-ομάδες παρουσίαζαν χειρότερο docking score και γενικότερα χειρότερη πρόσδεση σε σχέση με τα αντίστοιχα μόρια, που στις ίδιες θέσεις είχαν υδρόξυ-ομάδες. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε η αναγκαιότητα ύπαρξης κάποιου δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων στο δοκιμαζόμενο μόριο, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών και αλληλεπιδράσεων μέσα στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας για την τελική επιλογή μορίων που προτείνονται για περαιτέρω μελέτη και *in vitro* πειράματα, διαπιστώθηκε ότι οι 2 βενζολικοί δακτύλιοι που υπάρχουν στις ενώσεις acid1, acid2, acid3 και acid26 μπορεί να είναι τοξικοί, γεγονός που καθιστά απαγορευτική τη χρήση τους ως συντηρητικά τροφίμων ή σε καλλυντικά για το δέρμα. Συνεπώς, αυτές οι ενώσεις, παρόλο που πιστεύεται ότι μπορεί να προκαλούν πολύ ισχυρή αναστολή της τυροσινάσης, προσωρινά εγκαταλείφθηκαν. Για *in vitro* πειράματα προτείνεται η ένωση acid9, που παρουσιάζει πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα στη μοριακή πρόσδεση και πιστεύεται ότι θα μπορούσε να είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας της τυροσινάσης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τις *in silico* μελέτες εικονικής σάρωσης που πραγματοποιήθηκαν στη βιβλιοθήκη μορίων της Sigma Aldrich, καθώς και σε μικρότερη βιβλιοθήκη μορίων του IBΦΧΒ έγινε δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την εξάρτηση της ικανότητας πρόσδεσης μιας ένωσης στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης από τα χαρακτηριστικά της δομής της. Φάνηκε ότι, όταν το μόριο - προσδέτης έχει μια καρβοξυλομάδα, αυτή μπορεί να προσεγγίσει σε τέτοια απόσταση και γωνία τα ιόντα χαλκού, ώστε να δημιουργηθεί σύμπλοκο, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο πολύ ισχυρότερη την πρόσδεση. Επιπλέον, όταν υπάρχει καρβοξυλομάδα στο μόριο - προσδέτη, το μόριο προσανατολίζεται με την καρβοξυλομάδα προς τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου, όπως παρατηρήθηκε στις ενώσεις zinc00185722, zinc01471036, zinc0388428 και zinc04197177 . Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη κάποιων αλληλεπιδράσεων είναι κρίσιμη για τα αποτελέσματα και την αξιοπιστία της μοριακής πρόσδεσης. Η πιο σημαντική ίσως αλληλεπίδραση, πέρα από αυτήν με τα ιόντα χαλκού, είναι εκείνη με την ασπαραγίνη (ASN 260). Πολύ σημαντική είναι και η παρουσία αρωματικού δακτυλίου στην κατάλληλη θέση, ώστε να δημιουργεί π-π αλληλεπίδραση με τις ιστιδίνες των ιόντων χαλκού, όπως συμβαίνει στις ενώσεις zinc00185722, zinc00391975, zinc01471036, zinc04197177 και zinc0388428. Επιπροσθέτως, σε όποιες από τις ενώσεις υπάρχει αμινομάδα (NH₂) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου σταθεροποιώντας την πρόσδεση. Συνεπώς συμπεραίνεται ότι είναι απαραίτητο να υπάρχει δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων στο μόριο - προσδέτη προκειμένου να δημιουργηθούν αλληλεπιδράσεις με τις ομάδες -αμινοξέα του ενζύμου. Τέλος, φαίνεται ότι η κατηγορία των οξέων μπορεί να δώσει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αναστολή τυροσινάσης. Συγκεκριμένα, παρατηρώντας το μόριο acid9 και συγκρίνοντάς το με κάθε άλλο γνωστό αναστολέα, μπορεί να ειπωθεί ότι επιτυγχάνει την ιδανική πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ramsden, C.A. and P.A. Riley, *Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(8): p. 2388-2395.
2. Chang, T.S., *An updated review of tyrosinase inhibitors*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2440-75.
3. Claus, H. and H. Decker, *Bacterial tyrosinases*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(1): p. 3-14.
4. Kong, K.H., et al., *Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from Thermomicrobium roseum*. Biotechnol Appl Biochem, 2000. **31 (Pt 2)**: p. 113-8.
5. Liu, N., et al., *A heat inducible tyrosinase with distinct properties from Bacillus thuringiensis*. Lett Appl Microbiol, 2004. **39**(5): p. 407-12.
6. McMahon, A.M., et al., *Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium Pseudomonas putida F6*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(5): p. 1435-1441.
7. Sendovski, M., et al., *First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity*. Journal of Molecular Biology, 2011. **405**(1): p. 227-237.
8. Ismaya, W.T., et al., *Crystal structure of Agaricus bisporus mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone*. Biochemistry, 2011. **50**(24): p. 5477-86.
9. Cuff, M.E., et al., *Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin*. Journal of Molecular Biology, 1998. **278**(4): p. 855-870.
10. Virador, V.M., et al., *Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (Vitis vinifera) Polyphenol Oxidase (vol 58, pg 1189, 2010)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(6): p. 3867-3867.
11. Matoba, Y., et al., *Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8981-90.

12. Citek, C., et al., *Self-assembly of the oxy-tyrosinase core and the fundamental components of phenolic hydroxylation*. Nat Chem, 2012. **4**(4): p. 317-22.
13. Fujieda, N., et al., *Crystal Structures of Copper-depleted and Copper-bound Fungal Pro-tyrosinase INSIGHTS INTO ENDOGENOUS CYSTEINE-DEPENDENT COPPER INCORPORATION*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(30): p. 22128-22140.
14. Borovansky, J., Riley, P. A., *In Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological and Pathological Functions*. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2011: p. 343-381.
15. Hernandez-Romero, D., A. Sanchez-Amat, and F. Solano, *A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio - Role of the seventh histidine and accessibility to the active site*. Febs Journal, 2006. **273**(2): p. 257-270.
16. K., L., *Metal Ions in Biological Systems*. Sigel, Ed. Marcel-Dekker, 1981. **13**(Copper Proteins): p. 143.
17. Makino, N. and H.S. Mason, *Reactivity of Oxytyrosinase toward Substrates*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **248**(16): p. 5731-5735.
18. Ros, J.R., J.N. Rodriguezlopez, and F. Garcacianovas, *Effect of L-Ascorbic-Acid on the Monophenolase Activity of Tyrosinase*. Biochemical Journal, 1993. **295**: p. 309-312.
19. Palumbo, A., et al., *Effect of Metal-Ions on the Kinetics of Tyrosine Oxidation Catalyzed by Tyrosinase*. Biochemical Journal, 1985. **228**(3): p. 647-651.
20. Palumbo, A., et al., *Activation of Mammalian Tyrosinase by Ferrous-Ions*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1990. **1033**(3): p. 256-260.
21. Land, E.J., C.A. Ramsden, and P.A. Riley, *ortho-Quinone amines and derivatives: the influence of structure on the rates and modes of intramolecular reaction*. Arkivoc, 2007: p. 23-36.
22. Land, E.J., C.A. Ramsden, and P.A. Riley, *Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines*. Accounts of Chemical Research, 2003. **36**(5): p. 300-308.
23. Thompson, A., et al., *A Pulse-Radiolysis Investigation of the Oxidation of the Melanin Precursors 3,4-Dihydroxyphenylalanine (Dopa) and the CysteinylDopas*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1985. **843**(1-2): p. 49-57.

24. Land, E.J. and P.A. Riley, *Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways*. Pigment Cell Research, 2000. **13**(4): p. 273-277.
25. Land, E.J., et al., *Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis*. Pigment Cell Research, 2003. **16**(5): p. 487-493.
26. Cooksey, C.J., et al., *Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(42): p. 26226-26235.
27. Clews, J., et al., *Novel heterocyclic betaines relevant to the mechanism of tyrosinase-catalysed oxidation of phenols*. Chemical Communications, 1998(1): p. 77-78.
28. Cooksey, C.J., et al., *Tyrosinase-mediated cytotoxicity of 4-substituted phenols: Use of QSAR to forecast reactivities of thiols towards the derived ortho-quinones*. Quantitative Structure-Activity Relationships, 1996. **15**(6): p. 498-503.
29. Cooksey, C.J., et al., *Tyrosinase-Mediated Cytotoxicity of 4-Substituted Phenols - Quantitative Structure Thiol-Reactivity Relationships of the Derived O-Quinones*. Anti-Cancer Drug Design, 1995. **10**(2): p. 119-129.
30. Naish-Byfield, S. and P.A. Riley, *Tyrosinase autoactivation and the problem of the lag period*. Pigment Cell Research, 1998. **11**(3): p. 127-133.
31. Naish-Byfield, S. and P.A. Riley, *Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study*. Biochem J, 1992. **288 (Pt 1)**: p. 63-7.
32. Cooksey, C.J., et al., *Tyrosinase kinetics: failure of the auto-activation mechanism of monohydric phenol oxidation by rapid formation of a quinomethane intermediate*. Biochemical Journal, 1998. **333**: p. 685-691.
33. Naish-Byfield, S. and P.A. Riley, *Tyrosinase kinetics: Failure of acceleration in oxidation of ring-blocked monohydric phenol substrate*. Pigment Cell Research, 1998. **11**(2): p. 94-97.
34. Tomita, Y., et al., *Inactivation of Tyrosinase by Dopa*. Journal of Investigative Dermatology, 1980. **75**(5): p. 379-382.
35. Seiji, M., M. Sasaki, and Y. Tomita, *Nature of Tyrosinase Inactivation in Melanosomes*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 1978. **125**(3): p. 233-245.

36. Land, E.J., C.A. Ramsden, and P.A. Riley, *The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: A substrate structure investigation*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2007. **212**(4): p. 341-348.
37. Dietler, C., Lerch, K., *Oxidases and Related Redox Systems*. King, T. E., Mason, H. S., Morrison M., Eds.; Pergamon Press: New York, 1982: p. 305.
38. Ramsden, C.A., M.R.L. Stratford, and P.A. Riley, *The influence of catechol structure on the suicide-inactivation of tyrosinase*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2009. **7**(17): p. 3388-3390.
39. Land, E.J., et al., *Evidence Consistent with the Requirement of Cresolase Activity for Suicide Inactivation of Tyrosinase*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2008. **216**(3): p. 231-238.
40. Ramsden, C.A. and P.A. Riley, *Studies of the competing rates of catechol oxidation and suicide inactivation of tyrosinase*. Arkivoc, 2010: p. 248-254.
41. Ramsden, C.A. and P.A. Riley, *Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation*. Arkivoc, 2010: p. 260-274.
42. Stratford, M.R., C.A. Ramsden, and P.A. Riley, *Mechanistic studies of the inactivation of tyrosinase by resorcinol*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(5): p. 1166-73.
43. Chang, T.-S., *Two Potent Suicide Substrates of Mushroom Tyrosinase: 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavone*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(5): p. 2010-2015.
44. Jawaid, S., et al., *Tyrosinase Activated Melanoma Prodrugs*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009. **9**(7): p. 717-727.
45. Chen, J.S., C.I. Wei, and M.R. Marshall, *Inhibition-Mechanism of Kojic Acid on Polyphenol Oxidase*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(11): p. 1897-1901.
46. Cabanes, J., S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, *Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(12): p. 982-5.
47. Espin, J.C. and H.J. Wichers, *Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(7): p. 2638-44.

48. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 2000. **55**(6): p. 481-504.
49. Lee, H.S., *Tyrosinase inhibitors of Pulsatilla cernua root-derived materials*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(6): p. 1400-3.
50. Jimenez, M., et al., *Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(8): p. 4060-4063.
51. Kubo, I. and I. Kinst-Hori, *2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants*. Planta Medica, 1999. **65**(1): p. 19-22.
52. Lim, J.Y., K. Ishiguro, and I. Kubo, *Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves*. Phytotherapy Research, 1999. **13**(5): p. 371-375.
53. Iwai, K., et al., *In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(15): p. 4893-4898.
54. Miyazawa, M., et al., *Tyrosinase inhibitor from black rice bran*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(24): p. 6953-6956.
55. Kubo, I. and I. Kinst-Hori, *Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(11): p. 4574-4578.
56. Kang, H.S., et al., *A sphingolipid and tyrosinase inhibitors from the fruiting body of Phellinus linteus*. Archives of Pharmacal Research, 2004. **27**(7): p. 742-750.
57. Jeon, H.J., et al., *Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(26): p. 9827-33.
58. Magid, A.A., et al., *Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from Guioa villosa*. Planta Medica, 2008. **74**(1): p. 55-60.
59. Sabudak, T., et al., *Potent tyrosinase inhibitors from Trifolium balansae*. Natural Product Research, 2006. **20**(7): p. 665-670.
60. Khan, S.B., et al., *Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from Amberboa ramosa*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(1): p. 86-89.
61. Kim, Y.J., et al., *4,4'-dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **28**(2): p. 323-327.
62. Dai, Y., et al., *Biphenyl glycosides from the fruit of Pyracantha fortuneana*. Journal of Natural Products, 2006. **69**(7): p. 1022-1024.

63. No, J.K., et al., *Inhibition of melanogenic activity by 4,4'-dihydroxybiphenyl in melanoma cells*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006. **29**(1): p. 14-16.
64. Kuo, P.C., et al., *Isolation of a natural antioxidant, dehydrozingerone from Zingiber officinale and synthesis of its analogues for recognition of effective antioxidant and antityrosinase agents*. Archives of Pharmacal Research, 2005. **28**(5): p. 518-528.
65. Jimbow, K., et al., *Mechanism of depigmentation by hydroquinone*. J Invest Dermatol, 1974. **62**(4): p. 436-49.
66. Curto, E.V., et al., *Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(6): p. 663-72.
67. Uchida, R., S. Ishikawa, and H. Tomoda, *Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2014. **4**(2): p. 141-145.
68. Chen, Z., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy- or methoxy-substituted 5-benzylidene(thio) barbiturates as novel tyrosinase inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014. **22**(13): p. 3279-3284.
69. Tsou, C.L., *Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1988. **61**: p. 381-436.
70. Silverman, R.B., *Mechanism-based enzyme inactivators*. Methods Enzymol, 1995. **249**: p. 240-83.
71. Haghbeen, K., A.A. Saboury, and F. Karbassi, *Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1675**(1-3): p. 139-46.
72. Waley, S.G., *Kinetics of suicide substrates. Practical procedures for determining parameters*. Biochem J, 1985. **227**(3): p. 843-9.
73. Μαυρομούστακος, Θ., Ζουμπουλάκης, Π., *Μοριακή Μοντελοποίηση - Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*. Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, 2008.
74. Shoichet, B.K., et al., *Lead discovery using molecular docking*. Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(4): p. 439-446.
75. Stouten P.F.W., K.R.T., *Docking and Scoring*. Comprehensive Medicinal Chemistry II, 2007: p. 255-281.
76. Saxena, A., et al., *The basic concepts of molecular modeling*. Methods Enzymol, 2009. **467**: p. 307-34.

77. Kaushik Raha, K.M.M.J., *Calculating binding free energy in protein–ligand interaction*. Annual reports in computational chemistry, 2005. 1: p. 113-130.
78. Shoichet, B.K., et al., *Lead discovery using molecular docking*. Curr Opin Chem Biol, 2002. 6(4): p. 439-46.
79. Sastry, G.M., et al., *Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments*. J Comput Aided Mol Des, 2013. 27(3): p. 221-34.
80. Shelley, J.C., et al., *Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules*. J Comput Aided Mol Des, 2007. 21(12): p. 681-91.
81. Greenwood, J.R., et al., *Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution*. J Comput Aided Mol Des, 2010. 24(6-7): p. 591-604.
82. 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, 2004. 47(7): p. 1739-49.
83. Halgren, T.A., et al., *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening*. J Med Chem, 2004. 47(7): p. 1750-9.
84. Friesner, R.A., et al., *Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes*. J Med Chem, 2006. 49(21): p. 6177-96.
85. Sherman, W., et al., *Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects*. J Med Chem, 2006. 49(2): p. 534-53.
86. Sherman, W., H.S. Beard, and R. Farid, *Use of an induced fit receptor structure in virtual screening*. Chem Biol Drug Des, 2006. 67(1): p. 83-4.