

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



---

## Υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων για την Ιντερλευκίνη-33 ως αντιφλεγμονώδους φαρμακευτικού στόχου

---

*Διπλωματική εργασία*

**Θεοδωροπούλου Αναστασία**

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ 2019**



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την επίβλεψη της ερευνήτριας Γ' Δρ. Ζωής Κούρνια, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019. Η εργασία αυτή σηματοδοτεί το κλείσιμο του πενταετούς κύκλου σπουδών μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π και ως εκ τούτου νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω μερικούς σπουδαίους ανθρώπους, χωρίς τους οποίους δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί αυτή η προσπάθεια.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασία Δέτση, για την επίβλεψη της διπλωματικής εργασίας, την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές που μου προσέφερε απλόχερα όλο αυτό το διάστημα. Την ευχαριστώ για το χρόνο που διέθεσε για την παρακολούθηση της προόδου μου στην εκπόνηση της εργασίας, καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την εργασία στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών σε συνεργασία με την Δρ. Ζωή Κούρνια.

Ταυτόχρονα, ευχαριστώ βαθύτατα τη Δρ. Ζωή Κούρνια για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και που με δέχθηκε στο εργαστήριο της για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Είμαι ευγνώμων για τη δυνατότητα που μου έδωσε να γνωρίσω τον τομέα του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων και για την προσπάθειά της να έρθω σε επαφή με όσο το δυνατόν περισσότερες πτυχές αυτού του κλάδου μέσα από τη διαδικασία της διπλωματικής εργασίας. Η πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τον χρόνο που διέθεσε για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Δρ. Πάνο Βεργίνη και τους συνεργάτες του στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, για την αγαστή συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, για τη σωστή καθοδήγηση που μου έδωσε ώστε να κατανοήσω το βιολογικό υπόβαθρο της εργασίας αλλά και για τη βιολογική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της εργασίας μου που θα πραγματοποιηθεί στο εγγύς μέλλον.

Επιπλέον, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Αλέξη Χατζηγούλα από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια, ο οποίος με εισήγαγε στις υπολογιστικές μεθόδους που

χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία κατά τα πρώτα στάδια εκπόνησής της. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τη Γεωργία Στεργίου, την Υποψήφια Διδάκτορα Δώρα Αργυροπούλου και επιστημονικό συνεργάτη Βασίλη Γεωργιά από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια, οι οποίοι με συμβούλευαν στα καθημερινά προβλήματα που προέκυπταν και με βοηθούσαν με την εμπειρία τους ώστε να επιλυθούν. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω για την ανταλλαγή απόψεων και τη συμπαράστασή του το Δημήτρη Ντεκουμέ, με τον οποίο ξεκινήσαμε μαζί πριν λίγους μήνες την εκμάθηση των υπολογιστικών μεθόδων στο εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια. Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που με την παρουσία τους συντέιναν, ώστε η διαδικασία υλοποίησης της εργασίας να γίνει πιο διασκεδαστική.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τους φοιτητές του μαθήματος «Μοριακή Μοντελοποίηση Βιομορίων» στα πλαίσια του μεταπτυχιακού «Τεχνολογίες Πληροφορικής στην Ιατρική και τη Βιολογία» του Τμήματος Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο οποίο διδάσκει η Δρ. Ζωή Κούρνια. Οι φοιτητές πραγματοποίησαν ένα μέρος των προσομοιώσεων που αξιοποιήθηκαν στην πορεία της διπλωματικής μου εργασίας και με βοήθησαν μέσα από τις κρίσιμες απορίες τους να ερευνήσω και να καταλάβω σε βάθος τη θεωρία των προσομοιώσεων βιομορίων αλλά και να αποφύγω τυχόν λάθη κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Πάνω από όλα, ευχαριστώ τους γονείς μου Αντωνία και Χρήστο, καθώς και την αδερφή μου Λένια, για την αμέριστη αγάπη και τη στήριξή τους σε κάθε βήμα της πορείας των σπουδών μου. Εκτός από την οικογένειά μου δεν μπορώ να παραλείψω τους ανθρώπους στο κοντινό φιλικό μου περιβάλλον, οι οποίοι ήταν πολύ υποστηρικτικοί όλα αυτά τα χρόνια.

Αναστασία Θεοδωροπούλου

Αθήνα, 13 Ιουνίου 2019

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ιντερλευκίνη-33 (IL-33) αποτελεί ένα νέο μέλος της IL-1 οικογένειας των κυτοκινών καθώς εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινους ιστούς μόλις το 2005. Έκτοτε, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-33 εκφράζεται σε αφθονία κυρίως στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, τόσο κατά τη διάρκεια φλεγμονής, όσο και κατά την ομοιόσταση του οργανισμού. Χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη διττής λειτουργίας που μπορεί να δράσει ως ενδοκυτταρικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης αλλά και σαν σήμα κινδύνου, που ξεκινά τη φλεγμονή ως απάντηση στην κυτταρική καταστροφή από κάποιον ξένο προς το κύτταρο παράγοντα. Επιπρόσθετα, συσχετίζεται με πολλές ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το άσθμα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, αλλά και με πιο σοβαρές νόσους όπως ο καρκίνος και οι ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Κρίνεται λοιπόν επιτακτική η ανάγκη αναστολής της δράσης της IL-33 προκειμένου να βρεθούν νέοι τρόποι θεραπείας αυτών των ασθενειών. Ωστόσο, έως σήμερα δεν έχουν αναγνωριστεί μόρια αναστολής που αναστέλλουν τη δράση της IL-33 και κατ' επέκταση τη λειτουργία της. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστός ο τρόπος αλληλεπίδρασης της IL-33 με τους υποδοχείς της ST2 και IL-1RAcP, καθώς και η αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες όπως η Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης, ο πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ και το διμερές ιστονών H2A-H2B.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη στόχευση της IL-33 με τη χρήση τεχνικών του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων, ώστε να προσδιοριστούν μικρά μόρια που εμφανίζουν φαρμακολογική δράση ενάντια στην IL-33. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι τρεις πειραματικές πρωτεϊνικές δομές της IL-33 στην Protein Data Bank (PDB) με κωδικά ονόματα 2KLL, 4KC3 και 5VI4. Οι δομές αυτές προετοιμάστηκαν αρχικά για προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και στη συνέχεια έλαβαν χώρα οι προσομοιώσεις προκειμένου να εξαχθούν οι πιο αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης. Σε 13 από τις αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια πρόβλεψη κοιλοτήτων πρόσδεσης όπου μπορούν δυνητικά να προσδεθούν μικρά μόρια. Κατόπιν, οι κοιλοότητες μελετήθηκαν και σε αυτές που εμφανίζονταν ως πιο υποσχόμενες, σαρώθηκε εικονικά μία χημειοθήκη εμπορικά διαθέσιμων μορίων με φαρμακολογική δράση ώστε να αναγνωριστούν πιθανά μόρια-αναστολείς της IL-33. Στη συνέχεια, τα μόρια αυτά φιλτραρίστηκαν με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τα δομικά τους χαρακτηριστικά προκειμένου να απορριφθούν αυτά που πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία στις μετέπειτα φάσεις του σχεδιασμού φαρμάκων. Συγκεκριμένα, απορρίφθηκαν μόρια που εμφανίζουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, περιέχουν τοξικά ή καρκινογενή δομικά χαρακτηριστικά και δεν χαρακτηρίζονται από τις κατάλληλες ιδιότητες Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού και Απέκκρισης ώστε να αποτελέσουν δραστικά φάρμακα. Τέλος, επιλέχθηκαν πέντε πρότυπα μόρια για κάθε κοιλοτητα και μελετήθηκαν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τους με την πρωτεΐνη. Τα μόρια αυτά θα υποβληθούν μελλοντικά σε βιολογικές δοκιμές προκειμένου να εκτιμηθεί η δραστικότητά τους έναντι της IL-33.

**Λέξεις κλειδιά:** IL-33, Μοριακή Δυναμική, πρόβλεψη κοιλοτήτων πρόσδεσης, εικονική σάρωση χημειοθήκης, αναστολή πρωτεΐνης

## ABSTRACT

Interleukin-33 (IL-33) is a new member of the IL-1 family of cytokines, as it was identified for the first time in human tissues back in 2005. Since then, numerous studies have proved that IL-33 is abundantly expressed, mostly in endothelial and epithelial cells, both during inflammation and homeostasis. It is characterized as a dual function protein, exercising its role as an intracellular regulator of gene expression and also as an alarm signal that initiates inflammation in response to cellular destruction by a non-cellular agent. Furthermore, IL-33 is associated with many diseases of the immune system, such as asthma and rheumatoid arthritis, as well as with more serious conditions e.g. cancer and disorders of the central nervous system. Therefore, it is imperative to inhibit the function of IL-33 in order to identify new means of treating these diseases. Until now, no inhibitors have been recognized to inhibit the activity of IL-33 and to some extension, its function. In the literature, it is described the interaction of IL-33 with its receptors ST2 and IL-RAcP, as well as its association with other proteins such as Focal Adhesion Kinase, nuclear factor NF- $\kappa$ B and the histone dimer H2A-H2B.

In this context, this diploma thesis focuses on targeting IL-33 using computational drug design techniques to identify small molecules that exhibit pharmacological activity against IL-33. To this end, we studied the three experimentally determined protein structures of IL-33, available in the Protein Data Bank (PDB) with the code names 2KLL, 4KC3 and 5VI4. The systems were initially prepared for Molecular Dynamics simulations and proceeded to the simulations, in order to extract the most representative conformations of the protein. In 13 of these dominant protein configurations, we performed binding site identification in order to recognize cavities, where small molecules would possibly bind. The predicted sites were then studied and the ones that appeared to be the most promising, were screened against a library of commercially available molecules with pharmacological activity, in order to identify potent small molecule inhibitors of IL-33. Afterwards, these molecules were filtered according to their physicochemical properties and structural characteristics, thus discarding inhibitors that might lead to failure in later phases of drug design. More specifically, we dismissed molecules which exhibit steric clashes, encompass toxic or carcinogenic moieties and are not characterized by the desirable Absorption Distribution Metabolism and Excretion (ADME) properties. Finally, five exemplars were selected for each binding site and their intermolecular interactions with the protein were inspected. These molecules will advance in biological assays in order to assess their activity against IL-33.

**Keywords:** IL-33, Molecular Dynamics, Binding site identification, Virtual Screening, Protein inhibition

## Συντομογραφίες

Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartic Acid
CADD	Computer- Aided Drug Design
Cys	Cysteine
FAK	Focal Adhesion Kinase
FP	Fluorescence Polarization
FRC	Fibroblastic Reticular Cells
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic Acid
Gly	Glycine
His	Histidine
HTS	High Throughput Screening
IκBa	Inhibitor of kappa B
IL-33	Ιντερλευκίνη-33
IL-33 <sub>FL</sub>	Ιντερλευκίνη-33 πλήρους μήκους
Ile	Isoleucine
IRAK1, IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 or 4
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MAP	Mitogen-Activated Protein kinase
Met	Methionine
NAM	Negative Allosteric Modulators
NF-HEV	Nuclear Factor from High Endothelial Venules
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMA	Normal Mode Analysis
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPT	Ισόθερμη-Ισοβαρής Κατανομή
NVE	Μικρο-Κανονική Κατανομή
NVT	Κανονική Κατανομή
PDB	Protein Data Bank
Phe	Phenylalanine
Pro	Proline
RMSD	Root Mean Square Deviation
SBDD	Structure- Based Drug Design
SEMF	Subepithelial Myofibroblasts
Ser	Serine
SP	Standard Precision
SPR	Surface Plasmon Resonance

Thr	Threonine
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Ρυθμιστικά Τ κύτταρα
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
XP	Extra Precision
PAM	Positive Allosteric Modulators



“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.  
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

*Marie Curie, 1867-1934*



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT.....	v
Συνομογραφίες.....	vi
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	1
1.1 Η IL-33 ως μέλος της οικογένειας των κυτοκινών IL-1 .....	1
1.2 Κυτταρικές πηγές έκφρασης της IL-33.....	2
1.3 Η διττή λειτουργία της IL-33 .....	5
1.3.1 Κυτοκίνη.....	5
1.3.2 Πυρηνικός παράγοντας .....	7
1.4 Ρύθμιση της λειτουργίας της IL-33 από πρωτεάσες .....	8
1.5 Λειτουργικά τμήματα της IL-33 και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες .....	10
1.5.1 Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) .....	10
1.5.2 Πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ .....	12
1.5.3 Διμερές ιστονών H2A-H2B .....	12
1.6 Συσχέτιση της IL-33 με ασθένειες.....	14
1.6.1 Μολυσματικές ασθένειες .....	14
1.6.2 Φλεγμονώδεις ασθένειες .....	15
1.6.3 Καρκίνος.....	16
1.6.4 Ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) .....	16
1.7 Μοριακά χαρακτηριστικά της IL-33 .....	17
1.8 Δομή της IL-33 και των συμπλόκων της με τους υποδοχείς ST2 και IL-1RAcP.....	18
1.9 Η IL-33 ως φαρμακευτικός στόχος: Πιθανοί τρόποι στόχευσης .....	24
1.10 Το φαινόμενο του αλλοστερισμού .....	25
1.11 Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- αναστολέα.....	26
1.11.1 Δεσμοί υδρογόνου.....	27
1.11.2 π αλληλεπιδράσεις .....	27
1.11.3 van der Waals αλληλεπιδράσεις.....	29
1.11.4 Ιοντικές αλληλεπιδράσεις.....	29
1.11.5 Δεσμοί αλογόνου .....	30
1.11.6 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις .....	30

1.12 Σκοπός της εργασίας.....	31
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	33
2.1 Προσομοίωση μοριακού συστήματος.....	33
2.2 Ομόλογη Μοντελοποίηση .....	36
2.3 Βασικές αρχές προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.....	37
2.4 Σχεδιασμός φαρμάκων μέσω υπολογιστή με γνωστή τη δομή της πρωτεΐνης .....	41
2.5 Προετοιμασία της δομής της πρωτεΐνης για προσομοίωση .....	47
2.6 Αναγνώριση κοιλοτήτων πρόσδεσης στην πρωτεΐνη.....	48
2.7 Πρόβλεψη αλλοστερικών δικτύων πρωτεϊνών μέσω προσομοιώσεων .....	50
2.7.1 Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων σε πρωτεΐνες .....	50
2.7.2 Ανάλυση Δυναμικής Δικτύων σε πρωτεΐνες.....	54
2.8 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων μορίων και επιλογή μορίων για βιολογική αξιολόγηση .	56
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
3.1 Προετοιμασία της δομής της IL-33 για προσομοίωση .....	61
3.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής στην IL-33.....	65
3.3 Πρόβλεψη πιθανών κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33 .....	68
3.4 Αξιολόγηση των κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33 με Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων και Δυναμική Ανάλυση Δικτύων.....	70
3.4.1 Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων.....	70
3.4.2 Δυναμική Ανάλυση Δικτύων.....	71
3.4.3. Κριτήρια επιλογής κοιλοτήτων πρόσδεσης.....	73
3.5 Δημιουργία πλέγματος που περιλαμβάνει την κοιλοότητα πρόσδεσης στην IL-33 .....	73
3.6 Εικονική σάρωση χημειοθήκης για την εύρεση πιθανών μορίων- αναστολέων της IL-33.....	74
3.7 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων πιθανών μορίων-αναστολέων της IL-33 και επιλογή για βιολογική αξιολόγηση .....	75
3.7.1 Φιλτράρισμα μορίων για στερεοχημικές παρεμποδίσεις.....	75
3.7.2 Φιλτράρισμα μορίων για τοξικά δομικά χαρακτηριστικά.....	75
3.7.3 Φιλτράρισμα μορίων με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες .....	76
3.7.4 Ομαδοποίηση μορίων και εύρεση πρότυπων μορίων .....	76
3.7.5 Πειραματική αξιολόγηση.....	77
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	83
4.1 Αποτελέσματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής στην IL-33 .....	83
4.2 Αξιολόγηση των κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33 και επιλογή αυτών που δείχνουν αλλοστερική επίδραση .....	87

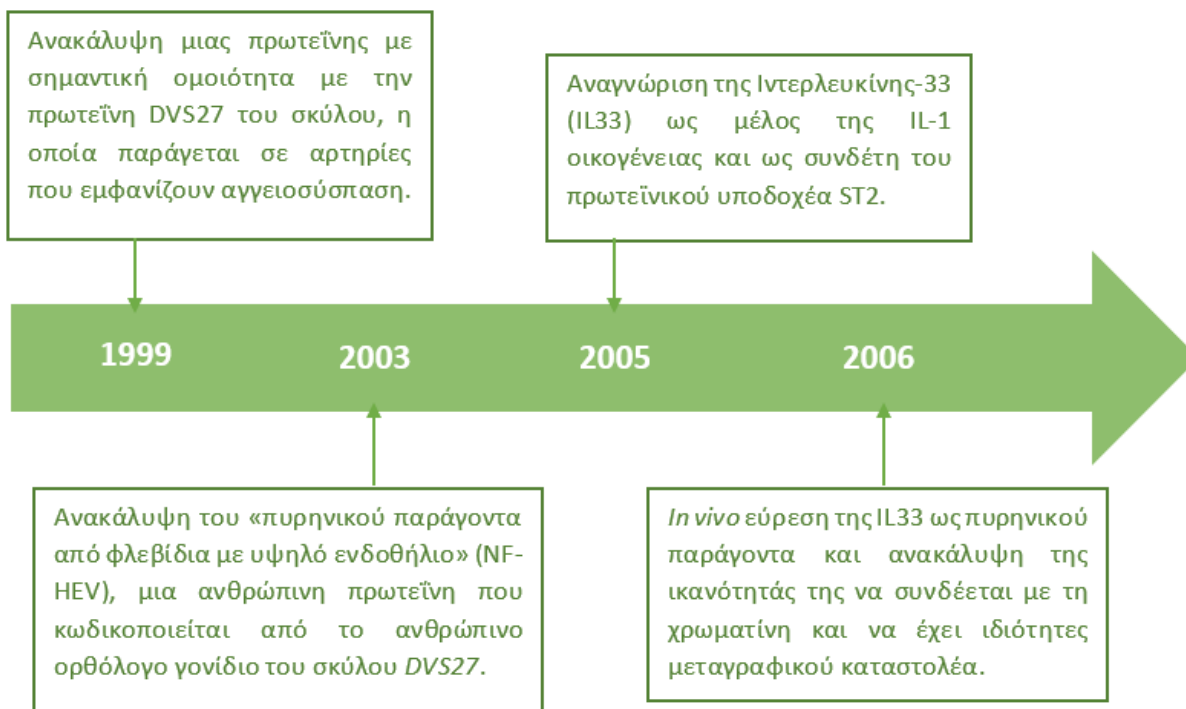
4.3 Αποτελέσματα εικονικής σάρωσης χημειοθήκης μορίων.....	103
4.4 Αποτελέσματα φιλτραρίσματος των μορίων .....	104
4.5 Πρότυπα μόρια και μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους με την IL-33.....	108
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ .....	127
Ευρετήριο σχημάτων .....	128
Ευρετήριο πινάκων .....	131
Βιβλιογραφία .....	132



## 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Η IL-33 ως μέλος της οικογένειας των κυτοκινών IL-1

Οι κυτοκίνες είναι μια ευρεία κατηγορία πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των οργανισμών. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ χημικών και κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων και ελέγχουν την ανάπτυξη και την ανταπόκριση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Περιλαμβάνουν κυρίως χημειοκίνες, λεμφοκίνες και ιντερλευκίνες. Οι τελευταίες έχουν μελετηθεί διεξοδικά από την επιστημονική κοινότητα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με πολλά αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα. Οι ιντερλευκίνες κατηγοριοποιούνται σε πολλές μικρότερες οικογένειες, ανάλογα με τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Μια τέτοια οικογένεια είναι η οικογένεια των Ιντερλευκινών-1 (IL-1), η οποία αποτελείται από 11 ιντερλευκίνες και δρα ρυθμίζοντας ή εκκινώντας φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η IL-1α και IL-1β είναι τα πλέον μελετημένα μέλη της οικογένειας των IL-1, διότι ανακαλύφθηκαν πρώτες και παρουσιάζουν έντονη προφλεγμονώδη δράση [1]. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί ένα νεότερο μέλος της IL-1 οικογένειας, η Ιντερλευκίνη-33 (IL-33). Ας δούμε αρχικά, πότε και με ποιο τρόπο ανακαλύφθηκε αυτό το νέο μέλος της IL-1 οικογένειας των κυτοκινών. (Σχήμα 1.1)



Σχήμα 1.1 Η χρονική πορεία ανακάλυψης της IL-33.

Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη της IL-33 δόθηκε το 1999 από τον Onda και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ανακάλυψαν μία πρωτεΐνη που παρουσίαζε σημαντική ομοιότητα με μία πρωτεΐνη σκύλου που κωδικοποιούνταν από το mRNA DVS27 [2]. Το mRNA αυτό βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα σε εγκεφαλικές αρτηρίες που εμφανίζουν αγγειοσύσπαση, έπειτα από υπαρχονοειδή αιμορραγία.

Λίγα χρόνια αργότερα, το 2003, ο Baekkevoild και η ομάδα του εντόπισαν για πρώτη φορά την ενδογενή πρωτεΐνη IL-33 και το mRNA που την κωδικοποιεί σε ανθρώπινους ιστούς [3]. Αρχικά, έδωσαν στην πρωτεΐνη IL-33 τον ορισμό «πυρηνικός παράγοντας από φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο» (“nuclear factor from high endothelial venules”, NF-HEV). Ο ορισμός αυτός δόθηκε διότι ανακάλυψαν ότι η IL-33 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε αφθονία σε φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (HEVs), τα οποία είναι εξειδικευμένα αιμοφόρα αγγεία που μεσολαβούν στην είσοδο των λεμφοκυττάρων σε λεμφαδένες και άλλα λεμφοειδή όργανα. Έπειτα, η ίδια ερευνητική ομάδα ανίχνευσε με την τεχνική του υβριδισμού *in situ* υψηλές ποσότητες mRNA που κωδικοποιεί την IL-33/NF-HEV σε HEVs, σε διάφορα ανθρώπινα λεμφοειδή όργανα όπως οι αμυγδαλές και οι λεμφαδένες. Τέλος, ο Baekkevoild και οι συνεργάτες του εντόπισαν τη θέση του ανθρώπινου γονιδίου της IL-33 στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 στο 9p24.1 και ταυτοποίησαν την ορθόλογη πρωτεΐνη IL-33/NF-HEV από ποντικό. Η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης IL-33/NF-HEV του ανθρώπου και του ποντικού, με την αλληλουχία της πρωτεΐνης DVS27 του σκύλου, απέδειξε ότι η σκυλίτσα DVS27 είναι η ορθόλογη πρωτεΐνη της IL-33/NF-HEV.

Περισσότερες γνώσεις σχετικά με την δομή και τη λειτουργία της IL-33 δόθηκαν το 2005, όταν ο Schmitz και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι το καρβοξυλικό άκρο της ανθρώπινης πρωτεΐνης NF-HEV (αμινοξέα 112 έως 270) παρουσιάζει μία τρισδιάστατη αναδίπλωση όμοια με αυτή των κυτοκινών της οικογένειας IL-1 [4]. Επίσης, διαπίστωσαν πως λειτουργεί ως μία κυτοκίνη, επάγοντας ανοσοαποκρίσεις τύπου 2 μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα ST2 (IL-1 receptor-like-1, IL1RL1), ενός «ορφανού» υποδοχέα προς αναζήτηση συνδέτη, ο οποίος ανήκει επίσης στην οικογένεια των IL-1. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, πρότειναν το όνομα Ιντερλευκίνη-33 (IL-33), ως ένα νέο μέλος της οικογένειας IL-1 των κυτοκινών. Ωστόσο, η πρωτεΐνη που ο Schmitz και οι συνεργάτες του παρουσίασαν ως νέα, ήταν στην πραγματικότητα 100% όμοια με την ανθρώπινη πρωτεΐνη NF-HEV που είχε ανιχνευθεί δύο χρόνια νωρίτερα.

Το 2006 ο Carriere και η ομάδα του κατέγραψαν την ομοιότητα μεταξύ της IL-33 και της NF-HEV και ανακάλυψαν μία ακόμα λειτουργία της IL-33, χαρακτηρίζοντας την πλέον ως μία πρωτεΐνη διττής λειτουργίας [5]. Συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι η IL-33 εκτός από το ρόλο της ως προφλεγμονώδης κυτοκίνη, είναι και ένας *in vivo* πυρηνικός παράγοντας που συνδέεται με τη χρωματίνη και έχει ιδιότητες μεταγραφικού καταστολέα.

## 1.2 Κυτταρικές πηγές έκφρασης της IL-33

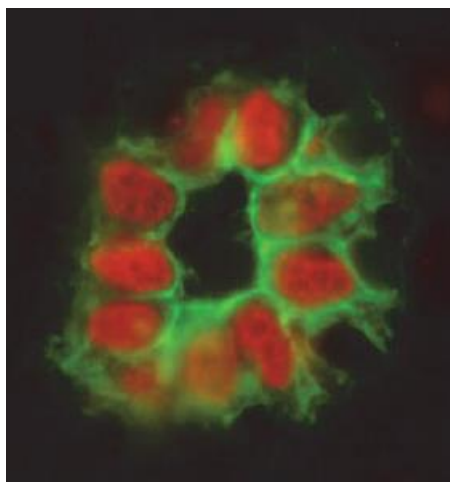
Μελέτες σε ιστούς ανθρώπου και ποντικού έχουν δείξει ότι η IL-33 είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται στα κύτταρα του ενδοθηλιακού, επιθηλιακού ιστού, σε κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και σε



μυοϊνοβλάστες, τόσο σε συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού, όσο και σε καταστάσεις φλεγμονής [6].

## ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Υπενθυμίζεται ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι κύτταρα που περιβάλλουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, σχηματίζοντας μια διεπιφάνεια μεταξύ του κυκλοφορούντος αίματος και των υπόλοιπων κυττάρων που περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό ίσως να αποτελούν την κυριότερη κυτταρική πηγή παραγωγής της IL-33 σε συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας [6]. Συγκεκριμένα, σε υγιείς ιστούς έχει παρατηρηθεί άφθονη έκφραση της IL-33 κατά μήκος του αγγειακού δέντρου, στους πυρήνες των ενδοθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τα μικρά και μεγάλα αιμοφόρα αγγεία [7]. (Σχήμα 1.2) Επιπρόσθετα, η IL-33 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων και υπό συνθήκες ασθένειας του οργανισμού. Για παράδειγμα, έχουν εντοπισθεί μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης IL-33 στα αιμοφόρα αγγεία ιστών που παρουσιάζουν χρόνια φλεγμονή σε ασθενείς που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα και νόσο του Crohn [5].

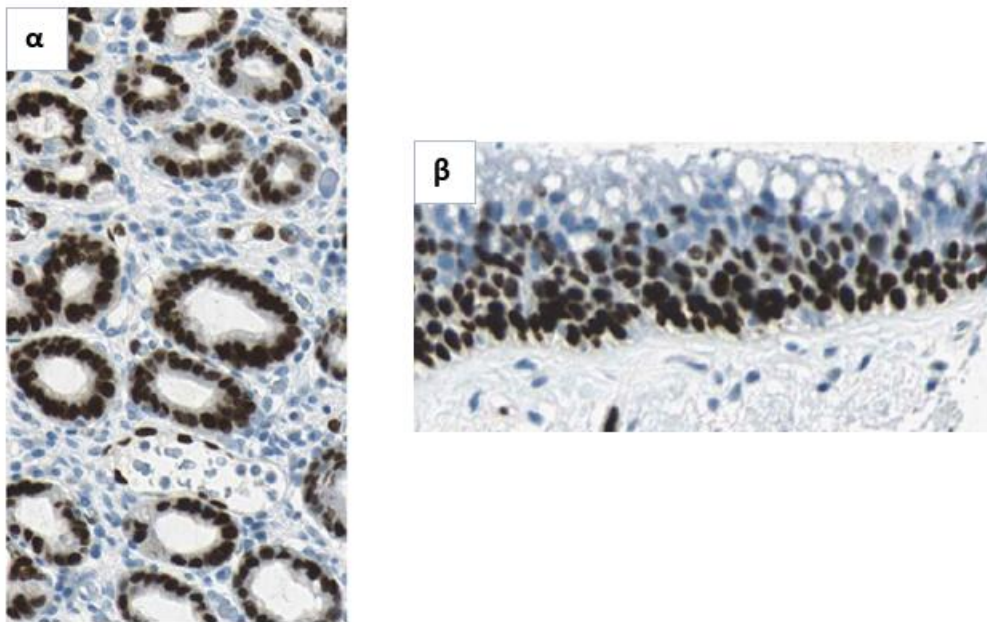


**Σχήμα 1.2** Έκφραση της IL-33 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ενός HEV αιμοφόρου αγγείου στις αμυγδαλές, υπό συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Η IL-33 απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, ενώ το HEV αιμοφόρο αγγείο με πράσινο. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [6].

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ποντικών, η IL-33 δεν παράγεται συνέχεια από τον οργανισμό, μπορεί ωστόσο να εκφραστεί κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί σημαντική υπερέκφραση της πυρηνικής IL-33 σε ενδοθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου που πάσχουν από κολίτιδα [8]. Επίσης, έχει αναφερθεί έκφραση της IL-33 σε καρδιακά ενδοθηλιακά κύτταρα έπειτα από υπερφόρτωση της πίεσης του μυοκαρδίου, με αποτέλεσμα να επάγεται η φλεγμονή. Το γεγονός αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση της καρδιάς απέναντι στην υπερφόρτωση της πίεσης [9].

## ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Παρόλο που η έκφραση της IL-33 είναι χαρακτηριστικό κυρίως των ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινων ιστών υπό φυσιολογικές συνθήκες, έχουν παρατηρηθεί αρκετές περιπτώσεις παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων IL-33 στον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων σε ιστούς που εκτίθενται στο περιβάλλον. Τα επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια των οργάνων και των αιμοφόρων αγγείων σε όλο το σώμα, καθώς και τις εσωτερικές κοιλότητες πολλών εσωτερικών οργάνων. Πράγματι, τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του ανθρώπου και του ποντικού αποτελούν σημαντικές πηγές παραγωγής IL-33 στις αναπνευστικές οδούς, πεπτικές οδούς και στο δέρμα [6]. (Σχήμα 1.3)



**Σχήμα 1.3** Έκφραση της IL-33 σε α) αδενικά επιθηλιακά κύτταρα του άνω στομάχου, β) επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα, υπό συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Η IL-33 απεικονίζεται με καφέ χρώμα. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [6].

Πιο συγκεκριμένα, το ρινικό επιθήλιο αποτελεί σημαντική πηγή IL-33 στην αναπνευστική οδό, γεγονός που σχετίζεται με ασθένειες όπως η αλλεργική ρινίτιδα και η αλλεργική φλεγμονή των αεραγωγών [10]. Στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων, οι κύριες πηγές IL-33 μπορεί διαφέρουν ανάλογα με το είδος. Στον άνθρωπο, κύρια πηγή παραγωγής IL-33 είναι τα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Αντίθετα, στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών του ποντικού, παρατηρείται παραγωγή της IL-33 μόνο έπειτα από μόλυνση σε ιό ή μετά από έκθεση του οργανισμού σε καπνό τσιγάρου [11]. Επίσης, στους πνεύμονες του ποντικού, έχει παρατηρηθεί έκφραση της IL-33 κατά τη διάρκεια της ομοιοστάσης, από πνευμονοκύτταρα τύπου II στις κυψελίδες των πνευμόνων τα οποία παράγουν επιφανειοδραστική πρωτεΐνη C [12].

## ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΜΟΙΑΖΟΥΝ ΜΕ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΚΑΙ ΜΥΟΪΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

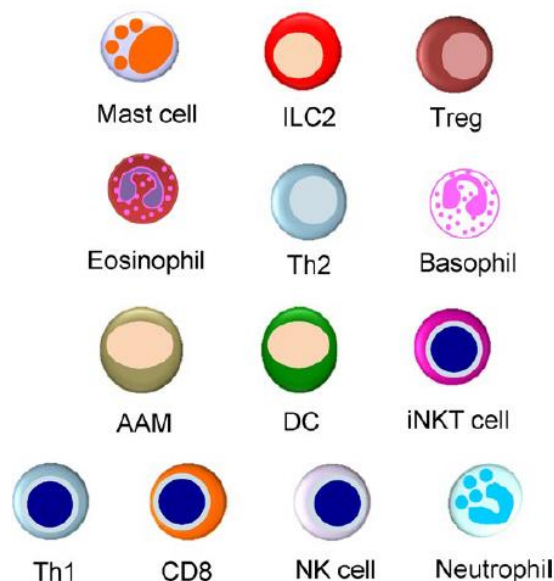
Μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-33 μπορεί να εκφραστεί σε μεγάλες ποσότητες, τόσο στον άνθρωπο όσο και στον ποντικό, στον πυρήνα των κυττάρων Fibroblastic Reticular Cells (FRCs), μια κατηγορία κυττάρων που μοιάζουν με τους ινοβλάστες και βρίσκονται στα λεμφοειδή όργανα. Χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι ότι μολύνονται συχνά από ιούς, επομένως η παραγωγή της IL-33 σε αυτά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις του οργανισμού απέναντι στον ιό [8]. Παρόμοια με τα FRCs, σε μια άλλη κατηγορία κυττάρων που ονομάζονται Subepithelial Myofibroblasts (SEMFs), εκφράζονται υψηλές συγκεντρώσεις της πυρηνικής IL-33 υπό συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Σε αντίθεση με τα FRCs και τα SEMFs, στους ινοβλάστες άλλων φυσιολογικών ιστών στον ανθρώπινο οργανισμό, δεν παράγεται IL-33 συνέχεια. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, ενεργοποιημένοι ινοβλάστες, κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, αποτελούν πηγές συνεχούς παραγωγής της IL-33, κυρίως κατά τη διάρκεια ασθενειών που σχετίζονται με την ίνωση ιστών, όπως η ηπατική ίνωση, η χρόνια παγκρεατίτιδα και η αποφρακτική νεφροπάθεια, ή σε ασθένειες που σχετίζονται με έλκος βλεννογόνων, όπως η ελκώδης κολίτιδα και τα έλκος στομάχου. Τέλος, οι ινοβλάστες της καρδιάς, οι αρθρικοί ινοβλάστες, οι ινοβλάστες του δέρματος και τα στρωματικά κύτταρα της μήτρας, έχουν αποδειχθεί ότι παράγουν πυρηνική IL-33 μετά από την ενεργοποίησή τους [6].

### 1.3 Η διττή λειτουργία της IL-33

Αρχικά η IL-33 προσδιορίστηκε ως ένα μέλος της οικογένειας IL-1 που δρα όπως μία κλασική κυτοκίνη μέσω της πρόσδεσής της στους υποδοχείς ST2 και IL-1RAcP. Όταν το 2005 ο Schmitz και οι συνεργάτες του [4] εντόπισαν *in vivo* την ύπαρξη της IL-33 στον πυρήνα στο εσωτερικό των κυττάρων, ανακαλύφθηκε και μία νέα λειτουργία της, αυτή του πυρηνικού παράγοντα. Έτσι, σήμερα η IL-33 αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως μια πρωτεΐνη διττής λειτουργίας που μπορεί να δράσει είτε ως πυρηνικός παράγοντας είτε ως κυτοκίνη, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται.

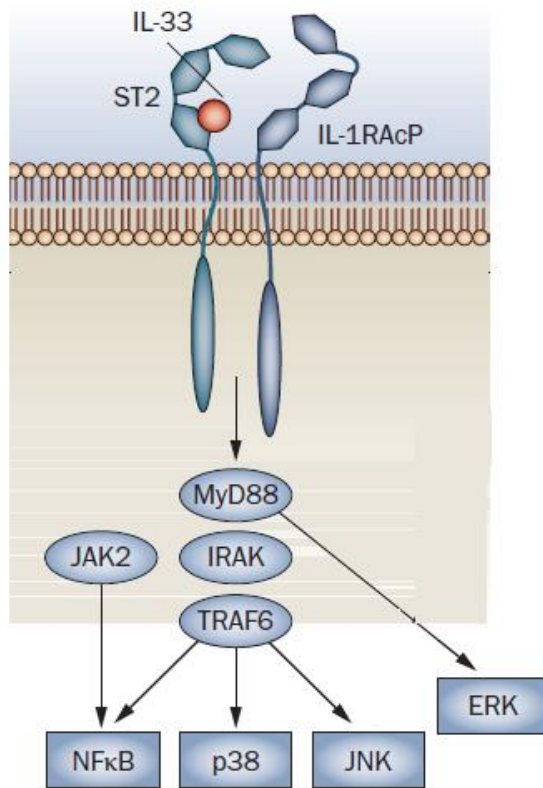
#### 1.3.1 Κυτοκίνη

Η λειτουργία της IL-33 σε αυτή την περίπτωση καθορίζεται από τη δημιουργία ενός ετεροτριμερούς συμπλόκου που αποτελείται από την πρωτεΐνη IL-33, τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL1RAcP. Και οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων των IL-1 κυτοκινών και μαζί με την IL-33 συνιστούν το σύμπλοκο IL-33R [6]. Το σύμπλοκο αυτό επιδρά σε διάφορα είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα μαστοκύτταρα, τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, όπου επάγει την παραγωγή διαφόρων κυτοκινών και ενεργοποιεί και άλλα είδη ανοσοκυττάρων. (Σχήμα 1.4)



**Σχήμα 1.4** Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία ενεργοποιούνται από την IL-33 και συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση τύπου 2. Τα μαστοκύτταρα (*mast cells*), τα τύπου 2 *innate lymphoid cells* (ILC2) και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (*Treg*) στα οποία εκφράζονται υψηλές ποσότητες του υποδοχέα ST2, αποτελούν τους κύριους κυτταρικούς στόχους της IL-33 *in vivo*. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [6].

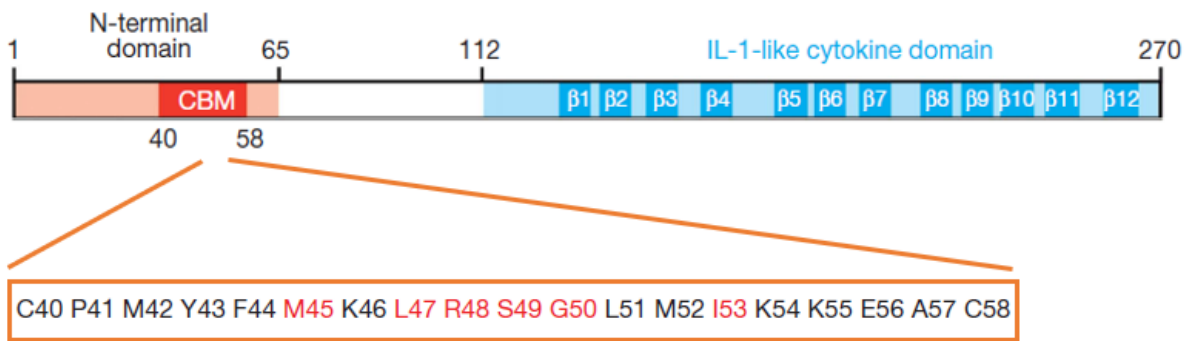
Η IL-33 προάγει τις ανοσολογικές αποκρίσεις που σχετίζονται με τα Th2 βοηθητικά λεμφοκύτταρα ή με τα μαστοκύτταρα, όπως το άσθμα και η αλλεργία. (Σχήμα 1.5) Συγκεκριμένα, οδηγεί τους δύο αυτούς πληθυσμούς κυττάρων προς την παραγωγή κυτοκινών. Αρχικά, η πρόσδεση της IL-33 στον πρωτεϊνικό υποδοχέα ST2 προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές οι οποίες επιτρέπουν στον IL-1RacP να προσδεθεί στον ST2. Στα κύτταρα που εκφράζεται ο ST2, η παρουσία της IL-33 οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός μονοπατιού σηματοδότησης που περιλαμβάνει τον πρωτεϊνικό προσαρμογέα MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Το τριπλό σύμπλοκο στη συνέχεια επάγει τη σηματοδότηση μέσω του προσαρμογέα MyD88 και των κινασών IRAK1 και IRAK4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 και 4), η οποία κορυφώνεται με την ενεργοποίηση των κινασών MAP (Mitogen-Activated Protein kinase) και τελικά του NF-κB. Αυτή η διαδικασία συμβάλλει στον έλεγχο της ανοσίας από εξωτερικούς παράγοντες και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού. Συνεπώς, η IL-33 είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής των κυττάρων και των κυτοκινών που εμπλέκονται στην ανοσία τύπου 2 [13].



**Σχήμα 1.5** Η λειτουργία της IL-33 ως κυτοκίνη. Η δέσμευση της IL-33 στον ST2 επάγει την πρόσδεση του IL-RAcP και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν την εξαρτώμενη από τον MyD88 και TRAF6 ενεργοποίηση των NF-κB, p38 και JNK καθώς και την εξαρτώμενη από τον MyD88 ενεργοποίηση της ERK. Η JAK2 έχει επίσης αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NFκB. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [13] και αποτελεί μέρος ενός πιο πολύπλοκου σχήματος.

### 1.3.2 Πυρηνικός παράγοντας

Η IL-33 ως πυρηνικός παράγοντας έχει την ικανότητα να συνδέεται με ιστόνες, δηλαδή πρωτεΐνες πλούσιες σε βασικά αμινοξέα που αποτελούν συστατικό του νουκλεοσώματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί ένα μικρό μοτίβο που περιλαμβάνει το κρίσιμο εξαπεπτίδιο MLRSGI (MET45, LEU47, ARG48, SER49, GLY50, ILE53) προκειμένου να προσδεθεί στην όξινη κοιλότητα που σχηματίζεται από το διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος, μια περιοχή ιδιαίτερα σημαντική για συμπύκνωση χρωματίνης. (Σχήμα 1.6) Η χρωματίνη αποτελεί βασικό συστατικό του πυρήνα των κυττάρων και ιδίως των χρωμοσωμάτων, ενώ το υλικό της συνίσταται από DNA, ιστόνες και μη ιστονικές πρωτεΐνες. Το μικρό αυτό πεπτίδιο της IL-33 μεταβάλλει την πυρηνική αρχιτεκτονική *in vivo* και ρυθμίζει την συμπύκνωση της χρωματίνης *in vitro* ενισχύοντας έτσι την αυτοσυσσωμάτωση και τον ολιγομερισμό του νουκλεοσώματος σε δομές χρωματίνης υψηλότερης τάξης [14].



**Σχήμα 1.6** Το εξαπεπτίδιο (M45 L47 R48 S49 G50 I53) της IL-33, απαραίτητο για την πρόσδεση στη χρωματίνη. Το γράμμα *M* αντιστοιχεί στην μεθειονίνη, το *L* στη λευκίνη, το *R* στην αργινίνη, το *S* στη σερίνη, το *G* στη γλυκίνη και το *I* στην ισολευκίνη. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [14].

Επιπρόσθετα, η IL-33 ως πυρηνικός παράγοντας συνδέεται με την ετεροχρωματίνη με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά η γονιδιακή μεταγραφή. Η ετεροχρωματίνη είναι μια μορφή χρωματίνης που παρουσιάζει υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και αντιπροσωπεύει το τμήμα του γενετικού υλικού που δεν μεταγράφεται. Έτσι, η IL-33 ασκεί τη δράση της ως ενδοκυτταρικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης. Για να γίνει αυτό, η IL-33 πρέπει αρχικά να συνδεθεί με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ο παράγοντας NF-κB εκτός από μία πολύ σημαντική πρωτεΐνη για την παραγωγή πολλών κυτοκινών, είναι επίσης και ένας κεντρικός διμεσολαβητής βιολογικών φαινομένων που περιλαμβάνουν κυτοκίνες. Όλοι οι κανονικοί επαγωγείς NF-κB οδηγούν στην πρωτεοσωμική εξάλειψη των αναστολέων IκB (inhibitor of kappa B) και έτσι απελευθερώνουν τις υπομονάδες πρόσδεσης DNA οι οποίες μεταναστεύουν στον πυρήνα και διεγείρουν την έκφραση των γονιδίων. Η IL-33<sub>FL</sub> (full length IL-33, πλήρους μήκους IL-33) αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που οδηγεί στη μείωση της δέσμευσης της πρωτεΐνης p65 της οικογένειας των NF-κB στο συγγενικό του DNA και εξασθενεί την ενεργοποίηση του από την p65. Συνεπώς, η IL-33 καταστέλλει τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κB και μειώνει την έκφραση των γονιδίων που πυροδοτούνται από τον NF-κB, προκειμένου να εμποδίσει την προφλεγμονώδη σηματοδότηση στα κύτταρα σε περιπτώσεις όπου αυτή είναι ανεπιθύμητη [15].

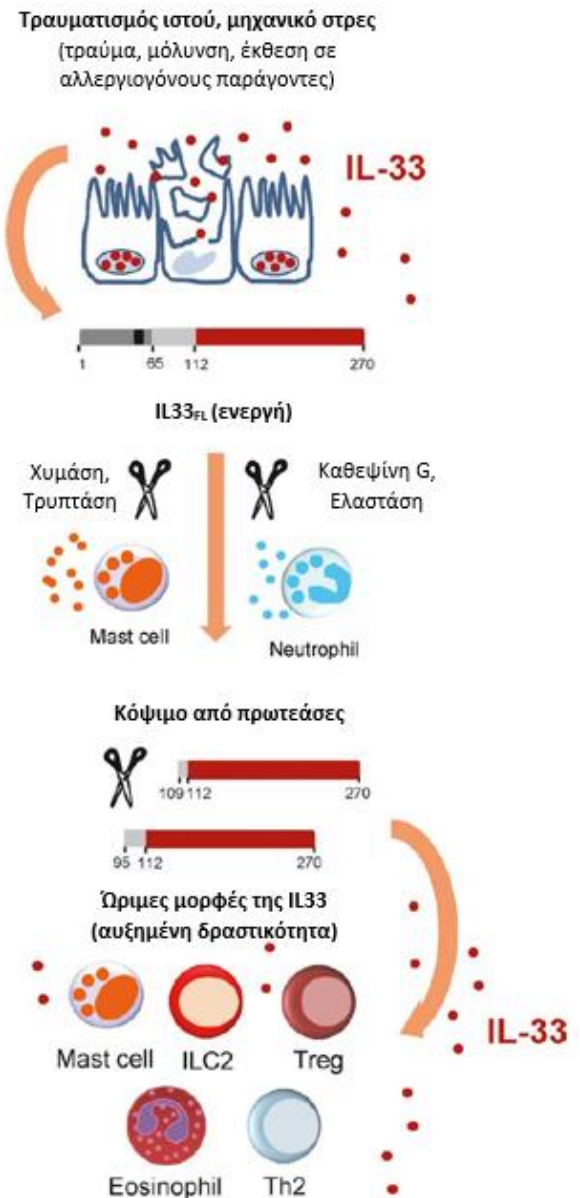
#### 1.4 Ρύθμιση της λειτουργίας της IL-33 από πρωτεάσες

Όταν το 2005 ο Schmitz και οι συνεργάτες του πρότειναν την ύπαρξη της πλήρους μήκους IL-33 (IL-33<sub>FL</sub>), υποστήριξαν ότι προκειμένου αυτή η πρωτεΐνη να είναι λειτουργική, απαιτείται η επεξεργασία της από άλλες πρωτεΐνες με σκοπό να παραχθούν μικρότερα, δραστικά πρωτεϊνικά κομμάτια [4]. Ωστόσο, μελέτες έχουν αποδείξει ότι ακόμα και η IL-33<sub>FL</sub> μπορεί να έχει βιολογική δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει όμως την ύπαρξη μικρότερων, ώριμων μορφών της IL-33 που να είναι δραστικές σε ίδιο ή μεγαλύτερο βαθμό από την IL-33<sub>FL</sub>. Αυτές οι ώριμες μορφές της IL-33 παράγονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και το δομικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιλαμβάνουν ολόκληρη την IL-1-like cytokine περιοχή (αμινοξέα 112-270). Οι πρωτεΐνες που οφείλονται για την ύπαρξη αυτών των ώριμων δομών

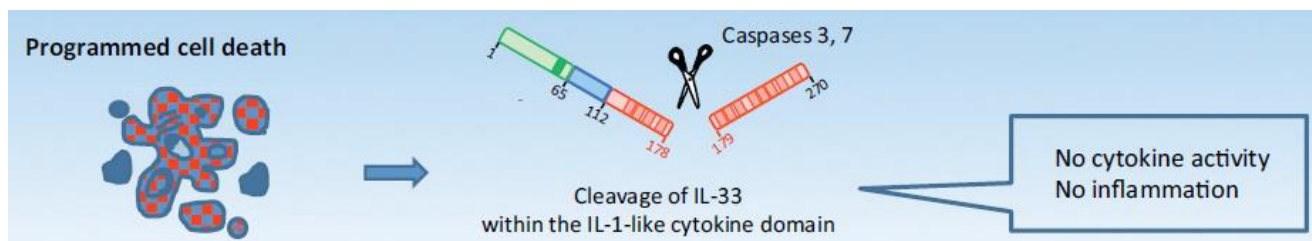
είναι οι πρωτεάσες σερίνης από τα ουδετερόφιλα και τα μαστοκύτταρα. Οι πρωτεάσες σερίνης είναι μια τάξη πρωτεολυτικών ενζύμων των οποίων ο καταλυτικός μηχανισμός βασίζεται σε μία σερίνη στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να κόψουν το πρόδρομο μόριο της IL-33<sub>FL</sub> και να απελευθερώσουν μικρότερες, ώριμες μορφές των 18-21 kDa. Έως σήμερα έχουν καταγραφεί έξι διαφορετικές φλεγμονώδεις πρωτεάσες σερίνης που να κόβουν την ανθρώπινη IL-33<sub>FL</sub>, συμπεριλαμβανομένων της καθεψίνης G από τα ουδετερόφιλα, της ελαστάσης, της πρωτεϊνάσης 3 (PR3), της χυμάσης, της τρυπτάσης και του γρανζύμου B των μαστοκυττάρων. Σημειώνεται ότι αυτή η επεξεργασία της IL-33<sub>FL</sub> διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο *in vivo*, ιδιαίτερα όταν η IL-33<sub>FL</sub> είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και δεν έχει καθόλου ή πολύ μικρή δραστηριότητα [6].

Μία ακόμα περίπτωση όπου είναι απαραίτητη η επεξεργασία της IL-33<sub>FL</sub> είναι έπειτα τον τραυματισμό κάποιου ιστού ή από το μηχανικό στρες που υφίστανται τα κύτταρα μετά από κάποιο τραύμα, μόλυνση ή έκθεση σε αλλεργιογόνους παράγοντες. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται νέκρωση και είναι μια μορφή βλάβης του κυττάρου η οποία οδηγεί στον πρόωρο θάνατό του μέσω τη διαδικασία της αυτόλυσης. Η νέκρωση προκαλείται από εξωτερικούς παράγοντες για το κύτταρο ή τον ιστό, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ακανόνιστη πέψη των κυτταρικών οργανιδίων. Υπό τέτοιες συνθήκες, η IL-33<sub>FL</sub> απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου λειτουργεί σαν σήμα συναγερμού (alarm signal, για το λόγο αυτό συχνά στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως *alarmin*) προκειμένου να προειδοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα. Για να αυξηθεί λοιπόν η δραστηριότητά της, η IL-33<sub>FL</sub> επεξεργάζεται από πρωτεάσες [6]. (Σχήμα 1.7)

**Σχήμα 1.7** Εξωκυττάρια απελευθέρωση της IL-33<sub>FL</sub> και ρύθμιση από πρωτεάσες. Μετά από τον τραυματισμό κάποιου κυττάρου ή από το μηχανικό στρες που υφίστανται τα κύτταρα μετά από κάποιο τραύμα, μόλυνση ή έκθεση σε αλλεργιογόνους παράγοντες, η IL-33<sub>FL</sub> απελευθερώνεται από τον πυρήνα. Έπειτα κόβεται από πρωτεάσες που παράγονται στα ουδετερόφιλα ή τα μαστοκύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ δραστικών, ώριμων μορφών που παρουσιάζουν από 10 έως 30 φορές υψηλότερη δραστηριότητα. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [6] και μεταφράστηκε στα ελληνικά.



Επιπρόσθετα, μια ακόμα κατηγορία πρωτεασών που ρυθμίζουν τη λειτουργία της IL-33 είναι οι κασπάσες. Οι κασπάσες αποτελούν μια εξειδικευμένη ομάδα πρωτεασών, που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο κατά την απόπτωση των κυττάρων. Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος και στοχευμένος θάνατος των κυττάρων, ο οποίος δεν προκαλείται από κάποιον εξωτερικό παράγοντα (π.χ. μόλυνση από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό). Σε κύτταρα τα οποία περνούν από τη διαδικασία της απόπτωσης, η IL-33 κόβεται και αδρανοποιείται από τις κασπάσες 3 και 7 προκειμένου να αποφευχθεί η άσκοπη προειδοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι οι ενδογενείς κασπάσες διασπούν την ανθρώπινη IL-33 στο αμινοξύ Asp178 (που αντιστοιχεί στο Asp175 σε κύτταρα ποντικού), στο σημείο που είναι γνωστό ότι δρα η κασπάση 3. (Σχήμα 1.8) Αυτό το σημείο βρίσκεται σε μία εύκαμπτη θηλιά μεταξύ των β4 και β5 πτυχωτών φύλλων, στη μέση της περιοχής IL-1-like cytokine, και είναι χαρακτηριστική της IL-33 καθώς δεν βρίσκεται σε άλλα μέλη της οικογένειας IL-1 [16].



**Σχήμα 1.8** Κόψιμο και αδρανοποίηση της IL-33 από τις κασπάσες 3 και 7 στη μέση της περιοχής IL-1-like cytokine κατά την διάρκεια της απόπτωσης των κυττάρων. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [16]

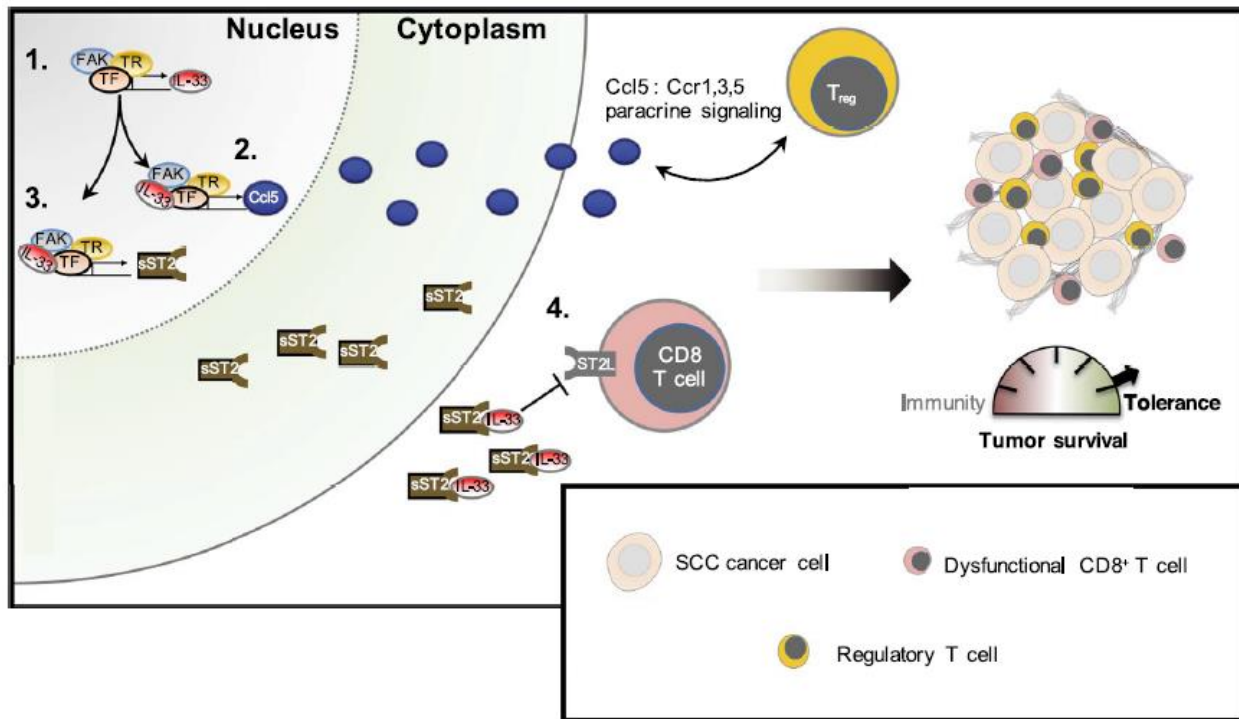
## 1.5 Λειτουργικά τμήματα της IL-33 και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες

### 1.5.1 Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK)

Η κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) εντοπίζεται στα σημεία εστιακής προσκόλλησης των κυττάρων και λειτουργεί ως διαμεσολαβητής στις ενδογενείς διεργασίες των κυττάρων ενός όγκου που προάγουν την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάστασή του. Η FAK δρα επίσης επάγοντας την έκφραση γονιδίων που προκαλούν φλεγμονή και αναστέλλουν την αντικαρκινική ανοσία στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Το μικροπεριβάλλον του όγκου συμπεριλαμβάνει τα αιμοφόρα αγγεία, τα ανοσοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα μόρια σηματοδότες και την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix) που περιβάλλουν τον όγκο. Τα καρκινικά κύτταρα συνεισφέρουν στην σύνθεση αυτού του μικροπεριβάλλοντος μέσω του εμπλουτισμού των πληθυσμών ανοσοκυττάρων με ενδογενή ανοσοκατασταλτική λειτουργία, αποτρέποντας έτσι την αντικαρκινική δραστηριότητα των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CD8T cells). Ο όγκος μπορεί να αλληλεπιδρά συνεχώς με το μικροπεριβάλλον του, απελευθερώνοντας εξωκυττάρια σήματα, προωθώντας την αγγειογένεση και προκαλώντας την έλλειψη της ανοσίας [17].



Ο Serrels και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η IL-33 εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από την FAK ανοσολογική απόκριση [18]. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα ποντικού που πάσχουν από ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Squamous Cell Carcinoma cells, SCCs), η ύπαρξη της πυρηνικής FAK ενισχύει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την IL-33, τη χημειοκίνη CCL5 και την διαλυτή μορφή του υποδοχέα ST2 (soluble ST2, sST2). Η IL-33 στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την FAK στον πυρήνα των κυττάρων, σχηματίζοντας το σύμπλοκο FAK-IL-33. Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με ένα δίκτυο ρυθμιστών χρωματίνης και μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των TAF9, WDR82 και BRD4, οι οποίοι προάγουν την δραστηριότητα του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ και την επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν χημειοκίνες, όπως η CCL5. Ωστόσο, ο Serrels και η ομάδα του δεν ανίχνευσαν την απευθείας έκκριση της IL-33 από SCCs που περιέχουν την FAK. Επομένως, πρότειναν ότι η αυξημένη παραγωγή και έκκριση του sST2 στα καρκινικά κύτταρα, πιθανώς να «έλκει» την IL-33 που παράγεται από άλλα κύτταρα στο εσωτερικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, μπλοκάροντας έτσι την διέγερση των ανοσολογικών κυττάρων του ξενιστή. (Σχήμα 1.9) Συνεπώς, η FAK ελέγχει το μικροπεριβάλλον του ανοσοποιητικού συστήματος του όγκου, μέσω ενός δικτύου μεταγραφικών ρυθμιστών το οποίο διαμεσολαβείται από την IL-33.



**Σχήμα 1.9** Μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο η IL-33 ελέγχει την εξαρτώμενη από την FAK ανοσολογική απόκριση στα καρκινικά κύτταρα. (1) Η πυρηνική FAK ρυθμίζει την έκφραση της IL-33 μέσω της αλληλεπίδρασής της με μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστές (TF, TR). (2) Η FAK συνεργάζεται με την IL-33 για να κατευθύνουν την έκφραση της CCL5 μέσω αλληλεπίδρασής TFs και TRs. (3) Η FAK συνεργάζεται με την IL-33 για να κατευθύνουν την έκφραση του ST2 μέσω αλληλεπίδρασής TFs και TRs. Η CCL5 και ο ST2 εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και αποτρέπουν την ανοσοαπόκριση. Η αύξηση της ποσότητας των CCL5 οδηγεί στην επιβίωση του όγκου ως αποτέλεσμα της διείσδυσής του στα Treg κύτταρα. (4) Η έκκριση του ST2 συμβάλλει επίσης στην έλλειψη

ανοσοαπόκρισης μέσω ανταγωνιστικής αναστολής στη σηματοδότηση IL-33/ST2 στα κυτταροτοξικά T κύτταρα (CD8 T cells). Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [18].

### 1.5.2 Πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, η IL-33 δρα ως πυρηνικός παράγοντας μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ. Οι φλεγμονώδεις διεργασίες σε έναν οργανισμό, ενισχύονται ταχύτατα από αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ενεργοποιεί την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους λειτουργούν ως ενεργοποιητές ειδικών υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι ενισχύουν τη σηματοδότηση και προειδοποιούν τα γειτονικά κύτταρα. Έτσι, ο NF-κΒ αποτελεί βασικό συστατικό για την παραγωγή πολλών κυτοκινών καθώς και έναν κεντρικό διαμεσολαβητή των διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται οι κυτοκίνες. Επιπρόσθετα, όλες οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια του NF-κΒ έχουν την ιδιότητα να ελέγχουν την μεταγραφή του DNA. Ωστόσο, μια κατηγορία πρωτεϊνών, οι αναστολείς IκΒ (inhibitor of kappa B) λειτουργούν αναστέλλοντας την πρόσδεση του NF-κΒ στο DNA και αποτρέποντας τη μεταγραφή του. Έχει αποδειχθεί ότι όλοι οι κανονικοί επαγωγείς NF-κΒ οδηγούν στην πρωτεοσωμική εξάλειψη των αναστολέων IκΒ (inhibitor of kappa B) και έτσι απελευθερώνουν τις υπομονάδες πρόσδεσης του DNA οι οποίες μεταναστεύουν στον πυρήνα και διεγείρουν την έκφραση των γονιδίων [19].

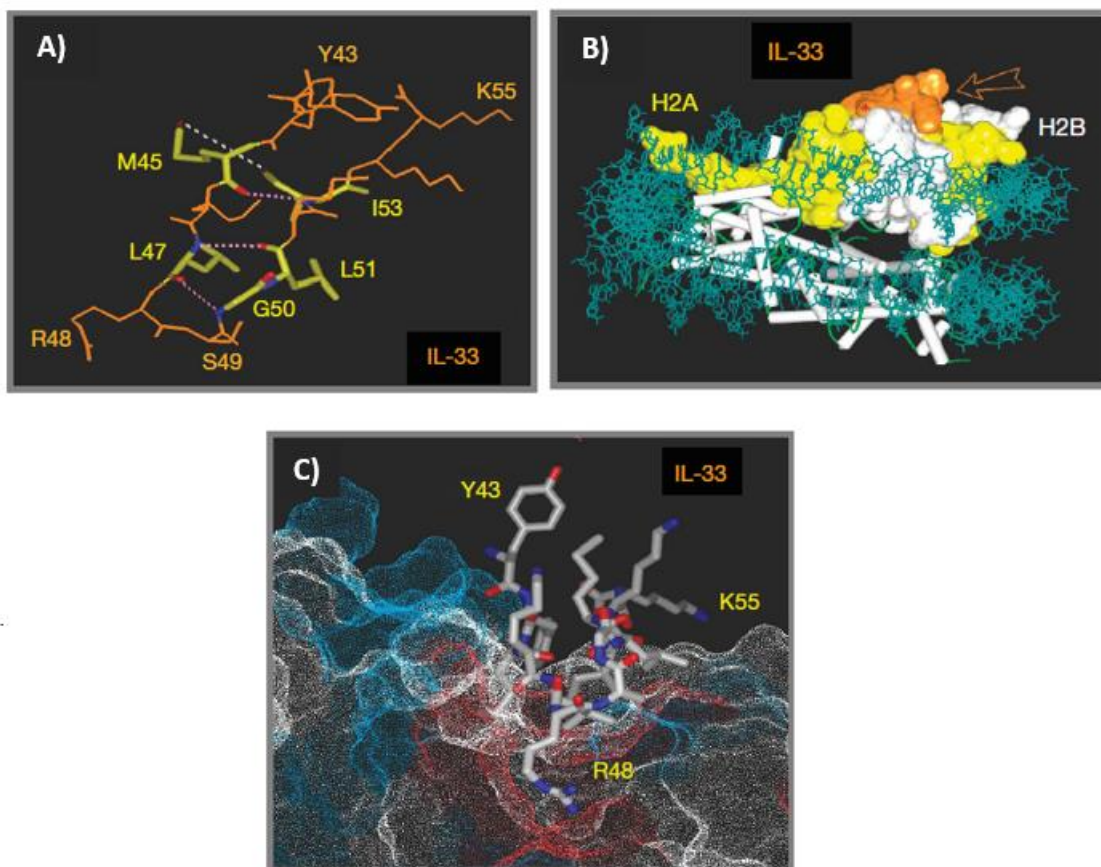
Ο Ali και οι συνεργάτες του κατέγραψαν ότι η πλήρους μήκους IL-33 (IL-33<sub>FL</sub>) αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ [15]. Συγκεκριμένα, η ενδοκυτταρική IL-33<sub>FL</sub> αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p65 της οικογένειας των NF-κΒ στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα του κυττάρου στο οποίο παράγεται. Αυτή η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται ανάμεσα στο αμινικό άκρο της IL-33 από τα αμινοξέα 66 έως 109 και στο αμινικό άκρο της Rel περιοχής ομολογίας (Rel homology domain) της πρωτεΐνης p65 της οικογένειας των NF-κΒ. Η φωσφορυλίωση της Rel περιοχής φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση ορισμένων παραγόντων μεταγραφής, όπως ο NF-κΒ, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους. Τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την IL-33 έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην IL-33 και την πρωτεΐνη p65 διεγείρεται από την IL-1β, και πώς η δέσμευση της πρωτεΐνης p50 της οικογένειας των NF-κΒ είναι ουσιώδης σε αυτή τη διαδικασία.

Η βιολογική συνέπεια της αλληλεπίδρασης και της δημιουργίας του συμπλόκου ανάμεσα στη IL-33 και τον NF-κΒ, είναι η μείωση της δέσμευσης της p65 στο συγγενές της DNA και η εξασθένιση της ενεργοποίησης του από την p65. Η υπερέκφραση της IL-33 οδηγεί σε μείωση και καθυστέρηση της έκφρασης ενδογενών γονιδίων στόχων του NF-κΒ που εξαρτάται από την IL-1β, όπως των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες IκBa (inhibitor of kappa B), TNF-α (tumor necrosis factor α) και C-REL. Συνεπώς, η πυρηνική IL-33 καταστέλλει τον παράγοντα NF-κΒ και μειώνει την έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από τον NF-κΒ προκειμένου να εμποδίσει την προ-φλεγμονώδη σηματοδότηση [15].

### 1.5.3 Διμερές ιστονών H2A-H2B

Είναι γνωστό ότι η IL-33 αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vivo*. Ο Roussel και οι συνεργάτες του μελετώντας αυτή την αλληλεπίδραση, ταυτοποίησαν ενός μικρό πεπτίδιο στην IL-33 που έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τη χρωματίνη. Συγκεκριμένα, είναι ένα κρίσιμο

εξαπεπτίδιο MLRSGI (Σχήμα 1.6) που επιτρέπει στην IL-33 να προσδεθεί στην όξινη κοιλότητα που σχηματίζεται από το διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος, μια περιοχή ιδιαίτερα σημαντική για συμπύκνωση χρωματίνης. Παρατήρησαν επίσης ότι το πεπτίδιο αυτό εμφανίζει εντυπωσιακές ομοιότητες με ένα αντίστοιχο μοτίβο που βρίσκεται στην πρωτεΐνη LANA (Latency-Associated Nuclear Antigen) του ερπητοϊού του σαρκώματος Karosi (Karosi Sarcoma Herpesvirus, KSHV), το οποίο είναι υπεύθυνο για την προσκόλληση των ιικών γονιδιωμάτων σε μιτωτικά χρωμοσώματα. Παρόμοια με το πεπτίδιο της LANA, το πεπτίδιο της IL-33 προσδέεται στην όξινη κοιλότητα που σχηματίζεται από το διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος και ρυθμίζει την συμπύκνωση της χρωματίνης προάγοντας αλληλεπιδράσεις νουκλεοσώματος- νουκλεοσώματος. (Σχήμα 1.10)



**Σχήμα 1.10** Αλληλεπίδραση της IL-33 με την όξινη κοιλότητα που σχηματίζεται από το διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος. Α) Απεικόνιση του πεπτιδίου της IL-33, όπου τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με την κοιλότητα παρουσιάζονται ως παχιές γραμμές, οι δεσμοί υδρογόνου ως διακεκομμένες ροζ γραμμές και οι υδρόφوبες αλληλεπιδράσεις ως διακεκομμένες λευκές γραμμές. Β) Απεικόνιση του μικρού πεπτιδίου της IL-33 προσδεμένου στο διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος. Γ) Κάτοψη της πρόσδεσης του πεπτιδίου στο διμερές ιστονών. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [14].

Συνεπώς, το μικρό αυτό πεπτίδιο της IL-33 μεταβάλλει την πυρηνική αρχιτεκτονική *in vivo* και ρυθμίζει την συμπύκνωση της χρωματίνης *in vitro* ενισχύοντας έτσι την αυτοσυσσωμάτωση και τον ολιγομερισμό του νουκλεοσώματος σε δομές χρωματίνης υψηλότερης τάξης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η όξινη κοιλότητα στο νουκλεόσωμα έχει αποδειχθεί ότι συσφίγγει τη συμπύκνωση της χρωματίνης με μεταγραφική καταστολή, που επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι κάποια μετάλλαξη σημείου στο πεπτίδιο της IL-33 αποτρέπει την αλληλεπίδρασή της με το διμερές ιστονών, μειώνοντας έτσι τις κατασταλτικές μεταγραφικές ιδιότητες της IL-33. Τέλος, αυτό αποτελεί ένα μοναδικό παράδειγμα στη βιβλιογραφία μοριακής μίμησης μιας κυτοκίνης συνδεδεμένης με χρωματίνη, με έναν DNA ιό που προκαλεί την παραγωγή όγκων [14].

## 1.6 Συσχέτιση της IL-33 με ασθένειες

Οι πολλαπλοί ρόλοι της IL-33 στη ρύθμιση της λειτουργίας των ανοσοποιητικών κυττάρων κατά την ανοσολογική απόκριση, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες του οργανισμού που αναλύθηκαν παραπάνω, έχουν οδηγήσει στην συσχέτιση της IL-33 με σοβαρές ασθένειες. Στη συνέχεια, θα παρουσιαστούν συνοπτικά ορισμένες ασθένειες στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται η IL-33.

### 1.6.1 Μολυσματικές ασθένειες

Η πρώτη ένδειξη του ρόλου της IL-33 στην άμυνα του ξενιστή απέναντι σε λοιμώξεις δόθηκε έπειτα από μία μόλυνση με παράσιτα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα του παχέος εντέρων ποντικών που είχαν μολυνθεί από το παράσιτο *Trichuris muris*, τα επίπεδα mRNA της IL-33 ήταν ανεβασμένα. Ωστόσο, ανασυνδυασμένες μορφές της IL-33 έδειξαν να παρέχουν προστασία απέναντι στην λοίμωξη από τον *T. muris*, γεγονός που συνοδεύτηκε από τις αυξημένες αποκρίσεις των κυτοκινών των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων τύπου 2 και από τη μειωμένη έκφραση των κυτοκινών των Τ βοηθητικών τύπου 1 και τύπου 17. Ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο η IL-33 παρέχει προστασία απέναντι στα παράσιτα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων και των τύπου 2 έμφυτων λεμφοειδών κυττάρων (κύριοι παραγωγοί των κυτοκινών IL-5, IL-6 και IL-13), τα οποία αυξάνουν την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης Α και προκαλούν ανοσοαπόκριση τύπου 2.

Στη συνέχεια, η IL-33 συσχετίζεται με ασθένειες που προκαλούνται από μόλυνση με πρωτόζωα, όπως είναι η λεισμανίαση και η εγκεφαλική ελονοσία. Αρχικά, βρέθηκε ότι ασθενείς με σοβαρά συμπτώματα λεισμανίασης παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή IL-33 και του υποδοχέα ST2 στα κοκκίωματα του ήπατος και είχαν αυξημένες τιμές ορού IL-33 που σχετίζονται με την προοδευτική σπλαχνική λεισμανίαση. Έτσι, η επίδραση της IL-33 στη λεισμανίαση σχετίζεται με την καταστολή των κυτοκινών τύπου 1 οι οποίες έχουν το ρόλο να προστατέψουν τον οργανισμό από την ασθένεια. Στην περίπτωση της εγκεφαλικής ελονοσίας, υπάρχει ισχυρή απόκριση των Τ1 βοηθητικών λεμφοκυττάρων που συμβάλλει στην αγγειακή διαρροή αιμοφόρων αγγείων στον εγκέφαλο. Η IL-33 σχετίζεται με την επέκταση του τύπου 2 έμφυτων λεμφοειδών κυττάρων που παράγουν κυτοκίνες τύπου 2, οδηγώντας στην πόλωση των αντιφλεγμονοδών μακροφάγων M2, τα οποία με τη σειρά τους καταστέλλουν την προφλεγμονώδη απόκριση.

Επιπρόσθετα, η IL-33 είναι παρούσα στα κύτταρα που πάσχουν από βακτηριακές λοιμώξεις, καθώς έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα ST2 στο πλάσμα ασθενών κατά τη διάρκεια πολυμικροβιακής σήψης. Έτσι, στις βακτηριακές λοιμώξεις η IL-33 ενεργοποιεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα τύπου 2 έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα ώστε να δράσουν ενάντια στη λοίμωξη. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα της IL-33 που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, ενεργοποιούν τα τύπου 2 έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα, τα οποία προάγουν την πόλωση των μακροφάγων M2 που ενισχύουν τη διαστολή των T ρυθμιστικών κυττάρων ( $T_{reg}$ ) μέσω της παραγωγής της IL10, οδηγώντας στην καταστολή της ανοσίας. Έτσι, η επαγωγή και η απελευθέρωση της IL-33 κατά τη διάρκεια της σήψης γίνεται για την προστασία των κυττάρων από τη μόλυνση, ωστόσο οδηγεί στην εκδήλωση της ανοσοκαταστολής.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η IL-33 εμπλέκεται σε διάφορες ιογενείς λοιμώξεις όπου μπορεί είτε να επιδεινώσει την κατάσταση της υγείας του ασθενή είτε να προστατεύσει τον ξενιστή από τη λοίμωξη. Επίσης, ο ρόλος της στις ιογενείς λοιμώξεις είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένος ανάλογα με τον ιό, γεγονός που περιορίζει την πιθανή χρήση της ως ανοσοενισχυτικού για την ανοσία του οργανισμού απέναντι στον ιό [20].

### 1.6.2 Φλεγμονώδεις ασθένειες

Οι φλεγμονώδεις νόσοι αποτελούν τη σκοτεινή πλευρά της ανοσίας ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η IL-33 που απελευθερώνεται μετά από τον κυτταρικό θάνατο ή το στρες, έπειτα από τη είσοδο μολυσματικών παραγόντων στον οργανισμό, μπορεί να προκαλέσει αυξημένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις προκαλώντας παράπλευρες βλάβες στους τοπικούς ιστούς. Ένας ακόμα ρόλος της IL-33 σε φλεγμονώδεις νόσους προκύπτει από την αποτυχία των ανοσοαποκρίσεων που ρυθμίζονται από την IL-33 (συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων  $T_{reg}$ , των τύπου 2 έμφυτων λεμφοειδών κυττάρων και των M2 μακροφάγων) στο να επιτελέσουν επιτυχώς την προ-φλεγμονώδη ικανότητα της IL-33.

Αρχικά, πολυάριθμες μελέτες δείχνουν την επίδραση της IL-33 στο άσθμα, που είναι μια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών, καθώς και την υποψία για συσχέτιση της IL-33 με την αλλεργική ρινίτιδα. Αυξημένες ποσότητες της IL-33 οδηγούν στη φλεγμονή των αεραγωγών μέσω ενεργοποίησης των τύπου 2 έμφυτων λεμφοειδών κυττάρων, τα οποία παράγουν κυτοκίνες τύπου 2 οι οποίες με τη σειρά τους κινητοποιούν τα ηωσινόφιλα και πολώνουν τα M2 μακροφάγα. Ένας παρόμοιος μηχανισμός εντοπίζεται και σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα IL-33 στα κύτταρα της επιδερμίδας. Συνεπώς, η IL-33 μπορεί να προκαλέσει παθολογία που διαμεσολαβείται από κυτοκίνες τύπου 2 σε περιοχές όπως οι πνεύμονες και το δέρμα. Συνεπώς, η στόχευση της IL-33 παραμένει μια θεραπευτική επιλογή για ασθένειες που σχετίζονται με την υπερευαισθησία των αεραγωγών και την αλλεργική νόσο [20].

Στη συνέχεια, σημαντικός είναι και ο σημαντικός ρόλος της IL-33 σε καρδιαγγειακά νοσήματα ο οποίος επισημάνθηκε αρχικά από τα αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα ST2 στον ορό αμέσως μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου, όπου οι συγκεντρώσεις ST2 συσχετίστηκαν με μειωμένη λειτουργία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς και κακή πρόγνωση της ασθένειας. Η έκκριση της IL-33 στα επιθηλιακά

κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να «μεταφράσει» την υπερφόρτωση της πίεσης του μυοκαρδίου σε μια εκλεκτική συστηματική φλεγμονώδη απόκριση. Ωστόσο, μέχρι σήμερα η IL-33 δεν έχει «εκμεταλλευτεί» πλήρως για την θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς η μόνη εφαρμογή είναι στη λειτουργία του ST2 ως προγνωστικού δείκτη για το έμφραγμα του μυοκαρδίου [9].

Τέλος, η IL-33 και ο υποδοχέας ST2 σχετίζονται με μυοσκελετικές παθήσεις, καθώς ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα στον αρθρικό υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η επίδραση της IL-33 στην ρευματοειδή αρθρίτιδα πιθανώς προκαλείται μέσω της επαγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (όπως οι ιντερφερόνες  $\gamma$ , ο  $\alpha$  παράγοντας νέκρωσης όγκων και η IL-17), της ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων και της κινητοποίησης των ουδετεροφίλων στις αρθρώσεις. Η ενεργοποίηση κυττάρων B1, από κυτοκίνες τύπου 2 που παράγονται από ενεργοποιημένα κύτταρα T βοηθητικά τύπου 2 και η παραγωγή αυτό-αντισώματος αυτών μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Επομένως, η στόχευση της IL-33 είναι μια πιθανή θεραπευτική επιλογή για τη θεραπεία μυοσκελετικών νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα [20].

### 1.6.3 Καρκίνος

Όσον αφορά στη σχέση της IL-33 με τον καρκίνο, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα mRNA IL-33 είναι αυξημένα στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου και ότι η έκφραση της πρωτεΐνης IL-33 επάγεται στα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου. Η IL-33 μπορεί να παραχθεί επίσης στα κύτταρα των εντερικών όγκων των ποντικών. Σήμερα πιστεύεται ότι κατά την ογκογένεση, η IL-33 πιθανώς δρα ενισχύοντας τη συσσώρευση των μαστοκυττάρων και τον σχηματισμό ενός μικροπεριβάλλοντος πριν τη δημιουργία του όγκου. Η επαγόμενη από την IL-33 σηματοδότηση στο εσωτερικό των κυττάρων φαίνεται επίσης να έχει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση των μυελοπλαστικών νεοπλασμάτων. Τα επίπεδα της πυρηνικής IL-33 βρέθηκαν να αυξάνονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ασθενών με μυελοπλαστικά νεοπλάσματα. Σε αυτή την περίπτωση η IL-33 επάγει την παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που προάγουν τη μυελοποίηση. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η προερχόμενη από στρωματικά κύτταρα IL-33 είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη της νόσου σε μοντέλα ποντικών. Επιπρόσθετα, η σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου IL-33-ST2 διευκολύνει την ανάπτυξη και την *in vivo* διατήρηση των προγονικών κυττάρων CD34<sup>+</sup> από ασθενείς που πάσχουν από χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Έτσι, η IL-33 φαίνεται να είναι μια προ-ογκογονική κυτοκίνη. Ωστόσο, η IL-33 μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη του όγκου σε άλλες περιπτώσεις, μέσω της ενεργοποίησης κυττάρων που εμπλέκονται στην αντικαρκινική ανοσία, όπως είναι τα NK κύτταρα (natural killer cells) και τα κυτοτοξικά CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα. Από όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της IL-33 στον καρκίνο [21], [20].

### 1.6.4 Ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)

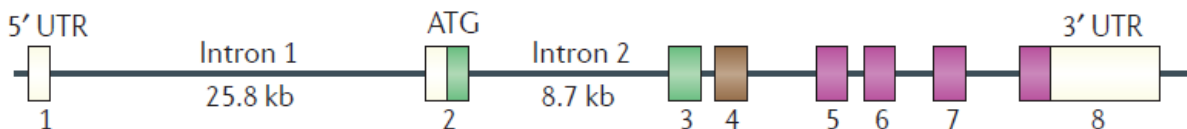
Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) εμφανίζει το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης της IL-33 σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα του οργανισμού. Ωστόσο, ο ρόλος της IL-33 στο ΚΝΣ παραμένει σχετικά ασαφής

μέχρι σήμερα. Η IL-33 εκφράζεται συνεχώς από μικρογλοία, αστρογλοιακά κύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ ο υποδοχέας ST2 εκφράζεται μόνο από μικρογλοία. Σε ποντικούς που πάσχουν από αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, η θεραπεία με IL-33 οδήγησε στην επιδείνωση της νόσου λόγω της αύξησης των T17 βοηθητικών κυττάρων στο νωτιαίο μυελό. Ωστόσο, η IL-33 προάγει επίσης τη διαφοροποίηση των μικρογλοίων τύπου M2 και των ρυθμιστικών T κυττάρων (T<sub>reg</sub>) που περιορίζουν τη φλεβοκομβική κάκωση σε περιπτώσεις εγκεφαλικού επεισοδίου και βλάβης του νωτιαίου μυελού.

Μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες του ΚΝΣ είναι η νόσος Alzheimer, που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο που προκαλεί χρόνια νευροφλεγμονή και οδηγεί στην ενεργοποίηση των μικρογλοίων και τελικά σε νευρωνική δυσλειτουργία. Η χορήγηση της IL-33 σε κύτταρα ποντικού που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer μειώνει τα επίπεδα διαλυτού β-αμυλοειδούς και την απόθεση αμυλοειδών πλακών προωθώντας την πρόσληψη β-αμυλοειδούς από τα μικρογλοία. Επιπλέον, η χορήγηση της IL-33 ρυθμίζει την έμφυτη ανοσοαπόκριση πολώνοντας τα μικρογλοία προς έναν αντιφλεγμονώδη φαινότυπο και μειώνοντας την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Σύμφωνα με αυτό το εύρημα, η έκφραση της IL-33 μειώθηκε στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο Alzheimer, ενώ τα επίπεδα του ST2 στον ορό είναι αυξημένα σε ασθενείς με ήπια νοητική εξασθένηση. Έτσι, η κινητοποίηση της έμφυτης ανοσίας από την IL-33 για την πρόληψη της συσσώρευσης β-αμυλοειδούς αντιπροσωπεύει ένα νέο θεραπευτικό παράδειγμα θεραπείας για τη νόσο του Alzheimer και αξίζει την ταχεία μεταφραστική έρευνα [22].

## 1.7 Μοριακά χαρακτηριστικά της IL-33

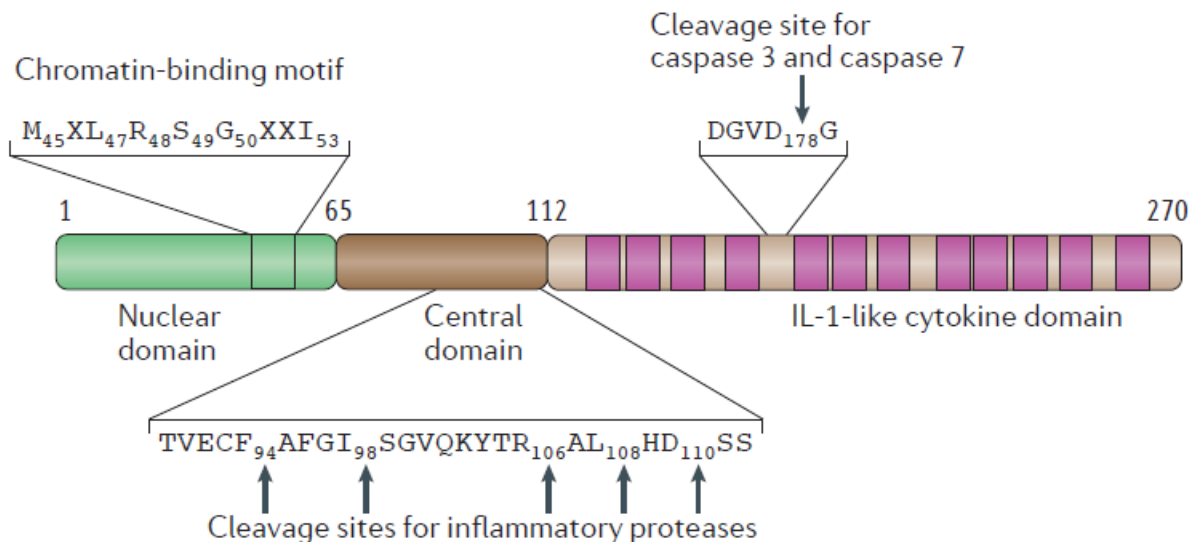
Το ανθρώπινο γονίδιο της Ιντερλευκίνης-33 (IL-33) εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 στο 9p24.1. (Σχήμα 1.11) Το γονίδιο IL-33 αποτελείται από οκτώ εξόνια που καλύπτουν περισσότερες από 42 kb του γενωμικού DNA. Ένα μεγάλο ιντρόνιο (περισσότερες από 25 kb, που ονομάζεται ιντρόνιο 1) διαχωρίζει το πρώτο εξόνιο που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη (εξόνιο 1) από το πρώτο εξόνιο το οποίο κωδικοποιεί (εξόνιο 2). Στο ιντρόνιο 1 και στην περιοχή του υποκινητή, έχουν ταυτοποιηθεί απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με το άσθμα [20].



**Σχήμα 1.11** Δομή του γονιδίου της ανθρώπινης IL-33. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [20].

Το ανθρώπινο mRNA IL-33 (2.7 kb) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 270 αμινοξέων (266 αμινοξέων στα ποντίκια). (Σχήμα 1.12) Η IL-33 αποτελείται από δύο εξελικτικά διατηρημένες περιοχές: τον πυρηνικό τομέα (nuclear domain) και την περιοχή κυτοκίνης τύπου IL-1 (IL-1-like cytokine domain), οι οποίες διαχωρίζονται από μια συνδετική περιοχή στο κέντρο, τον κεντρικό τομέα (central domain). Η περιοχή κυτοκίνης τύπου IL-1 είναι πολύ όξινη (αμινοξέα 112-270, Μοριακό Βάρος=17,994 Da, Ισοηλεκτρικό

σημίο  $pI = 4.80$ ), ενώ το αμινικό άκρο είναι εξαιρετικά βασικό (αμινοξέα 1-111,  $MB=12,783$  Da,  $pI = 10.28$ ) [6]. Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 112-270) έχει μία τρισδιάστατη δομή που είναι παρόμοια σε πολλά μέλη της οικογένειας IL-1 με 12 β πτυχωτά φύλλα τα οποία διατάσσονται σε σχήμα β-τριφυλλιού. Φυλογενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη IL-33 στα θηλαστικά συντηρείται εξελικτικά και, από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας IL-1, σχετίζεται στενότερα με την IL-18 [20].



**Σχήμα 1.12** Δομή της ανθρώπινης πρωτεΐνης IL-33. Στην εικόνα αναγράφονται οι περιοχές πρόσδεσης της IL-33 με την χρωματίνη καθώς και τα σημεία που κόβεται από τις πρωτεάσες. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [20].

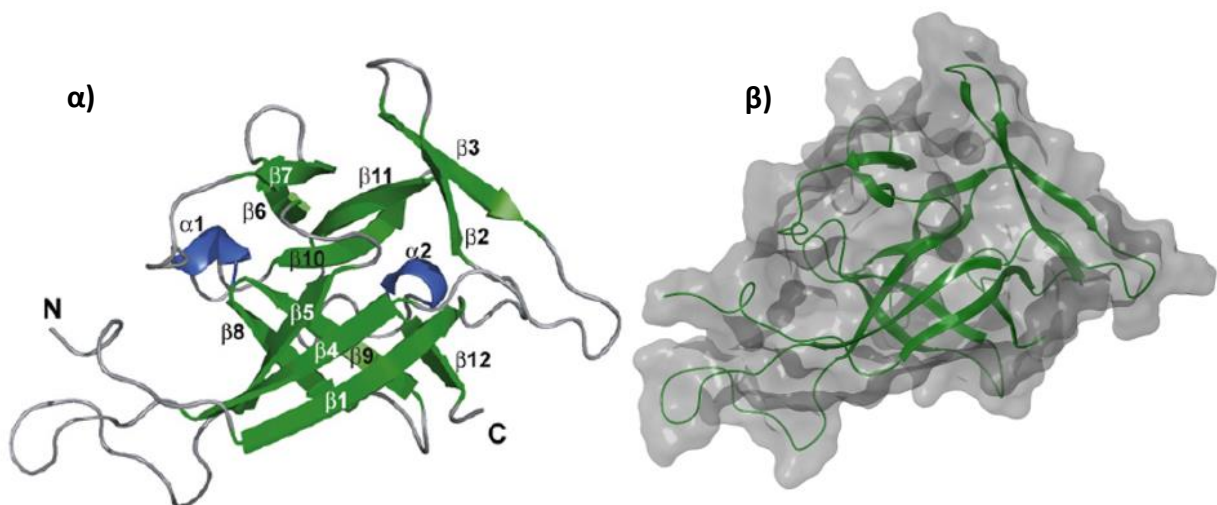
Η περιοχή του αμινικού άκρου της IL-33 συχνά αναφέρεται και ως το αμινικό προπεπτίδιο της περιοχής κυτοκίνης τύπου IL-1, καθώς μόνο η δομή της περιοχής κυτοκίνης τύπου IL-1 έχει επιλυθεί τόσο με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ όσο και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Συνεπώς, στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετηθεί μόνο το κομμάτι αυτό της IL-33 για το οποίο είναι διαθέσιμη η δομή της πρωτεΐνης. Στην επόμενη ενότητα, θα εξετασθούν οι διαθέσιμες δομές της IL-33 που έχουν προκύψει από NMR και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ενώ θα μελετηθούν και οι αλληλεπιδράσεις της IL-33 με τους υποδοχείς ST2 και IL-1RAcP.

## 1.8 Δομή της IL-33 και των συμπλόκων της με τους υποδοχείς ST2 και IL-1RAcP

### ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ IL-33

Αρχικά, στη βιβλιογραφία υπάρχει διαθέσιμη η δομή της ανθρώπινης IL-33 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 110 έως 270, προερχόμενη από φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα αμινοξέα που απαρτίζουν αυτή την πρωτεϊνική δομή αντιστοιχούν στην περιοχή κυτοκίνης τύπου IL-1 (IL-1-like cytokine domain). Το μοντέλο εμφανίζεται ως ένα σύνολο των δέκα διαμορφώσεων NMR σε διάλυμα με την χαμηλότερη ενέργεια και περιγράφηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Lingel [23].





**Σχήμα 1.13** Η δομή της ανθρώπινης IL-33 (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 2KLL). (α) Οι υπομονάδες φαίνονται σε αναπαράσταση κορδέλας και τα δευτεροταγή στοιχεία απεικονίζονται στο σχήμα. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [23]. (β) Απεικόνιση επιφάνειας της ανθρώπινης IL-33.

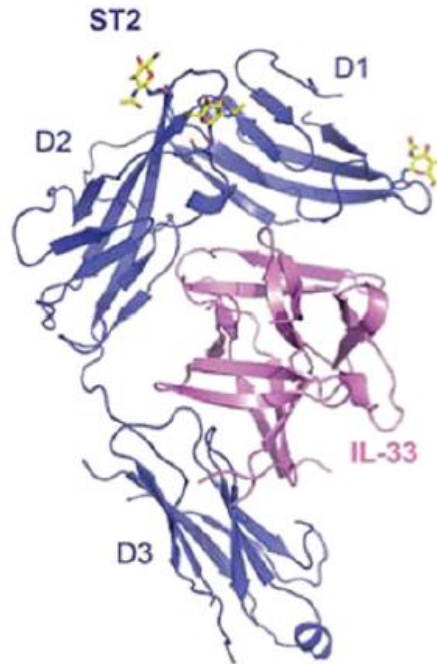
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.13, η IL-33 υιοθετεί μια δομή β-τριφυλλιού, όπου 12 β-πτυχωτά φύλλα (αριθμημένα με β1-β12) διατάσσονται σε τρεις ψευδοεπαναλήψεις. Κάθε τέτοια «επανάληψη» αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες β-πτυχωτών φύλλων, στις οποίες το πρώτο και το τέταρτο β-φύλλο είναι αντιπαράλληλες στοίβες σε μια δομή β-βαρελιού αποτελούμενου από 6 κλώνους, ενώ το δεύτερο και το τρίτο β-φύλλο έχουν τη μορφή β-φουρκέτας και εντοπίζονται πάνω από κάθε β-βαρέλι. Επιπρόσθετα, στη δομή αυτή δύο μικρές α-έλικες (α1, α2) προηγούνται των β8 και β12 πτυχωτών φύλλων [23].

Όπως είναι γνωστό, η IL-33 σηματοδοτεί μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP, όπου και οι δύο ανήκουν στην οικογένεια των κυτοκινών IL-1. Η αλληλεπίδραση της IL-33 με τους δύο υποδοχείς έχει μελετηθεί και έχουν προσδιοριστεί οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων τους.

#### ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ IL-33 ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ST2

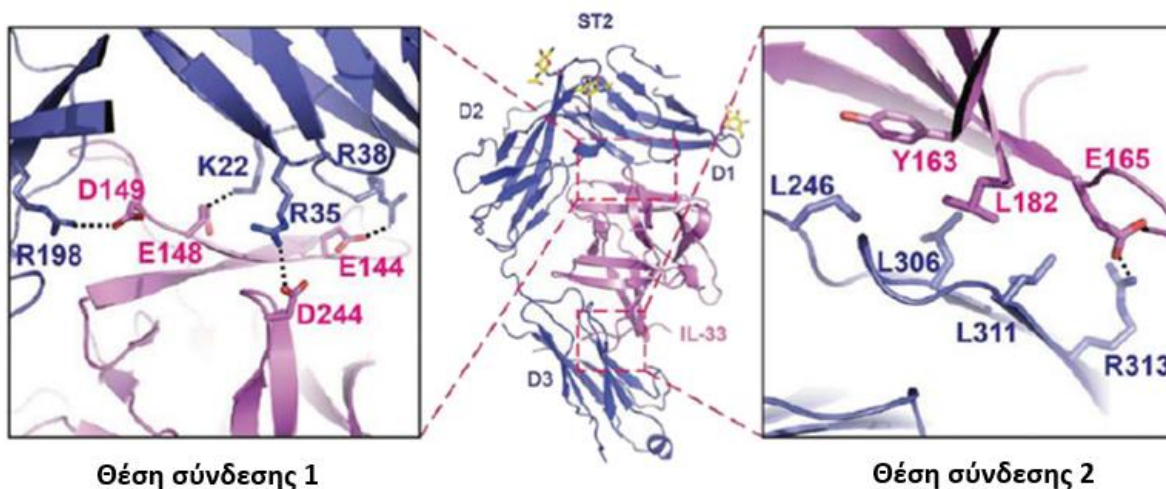
Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμη η κρυσταλλική δομή της IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2, μια δομή που βρέθηκε από τον Liu και τους συνεργάτες του [24]. Η δομή απομονώθηκε από τον ανθρώπινο οργανισμό με τη μέθοδο της διάθλασης ακτίνων Χ, σε ανάλυση 3.27 Å. Αποτελείται από δύο αλυσίδες, από τις οποίες η πρώτη αντιστοιχεί στην IL-33 και απαρτίζεται από 159 αμινοξέα, ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί στον υποδοχέα ST2 με 309 αμινοξέα. (Σχήμα 1.14) Το πρωτεϊνικό μοντέλο περιλαμβάνει τα αμινοξέα Ser117 έως Asn171, Gly179 έως Val252 και Glu261 έως Ser268 της IL-33 και τα αμινοξέα Ser21 έως Ser51, Ser56 έως Lys223, Asn232 έως Gly271 και Gly279 έως Arg317 του υποδοχέα ST2. Επίσης, τρεις γλυκάνες N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (NAG) συνδέονται με τα αμινοξέα Asn95, Asn140 και Asn191 του ST2, αντίστοιχα. Από την κρυσταλλική δομή απουσιάζουν ορισμένα αμινοξέα, λόγω μεγάλης

κινητικότητας που δεν επέτρεψε μεγάλη ευκρίνεια στο ηλεκτρονικό τους νέφος. Τέλος, η δομή του υποδοχέα ST2 αποτελείται από τρεις τομείς (D1 έως D3). Οι τομείς D1 και D2 ενώνονται και σχηματίζουν ένα ενιαίο δομικό στοιχείο (τομέας D1D2), στο οποίο η περιοχή D3 συνδέεται μέσω ενός μεγάλου μήκους συνδετικού τμήματος. Στο σύμπλοκο αυτό, ο ST2 αναδιπλώνεται γύρω από την IL-33 και μοιάζει σαν ένα χέρι όπου οι τρεις τομείς αγκαλιάζουν την IL-33.



**Σχήμα 1.14** Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 4KC3). Οι υπομονάδες φαίνονται σε αναπαράσταση κορδέλας, όπου η IL-33 απεικονίζεται με μωβ χρώμα και ο ST2 με μπλε. Οι γλυκάνες NAG φαίνονται με αναπαράσταση σωλήνα κίτρινου χρώματος. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [24].

Η IL-33 στο κρυσταλλικό σύμπλοκο υιοθετεί και σε αυτή την περίπτωση μια δομή β-τριφυλλίου με 12 β-πτυχωτά φύλλα. Η ευθυγράμμιση (superposition) της κρυσταλλικής δομής της IL-33 με τη δομή της IL-33 που προσδιορίστηκε από NMR, και ο υπολογισμός της τετραγωνικής ρίζας της μέσης τιμής των τετραγώνων της απόκλισης (Root Mean Square Deviation, RMSD) έδειξε ότι οι δύο δομές έχουν RMSD ίσο με 1.2 Å για 123 αντιστοιχισμένα άτομα α άνθρακα (Ca). Τα 12 β-πτυχωτά φύλλα διατηρούνται και στις δύο δομές, ενώ οι αλλαγές παρατηρούνται κυρίως στις θηλιές που συνδέουν τα β-φύλλα, ειδικά στις θηλιές που ενώνουν τα β2-β3, β3-β4, β4-β5, β10-β11 και β11-β12, τα οποία εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση της IL-33 με τον υποδοχέα. Τέλος, σημειώνεται ότι η θηλιά που ενώνει τα β4-β5 παρουσιάζει την περισσότερο διαφορετική διαμόρφωση ανάμεσα στις δύο δομές.



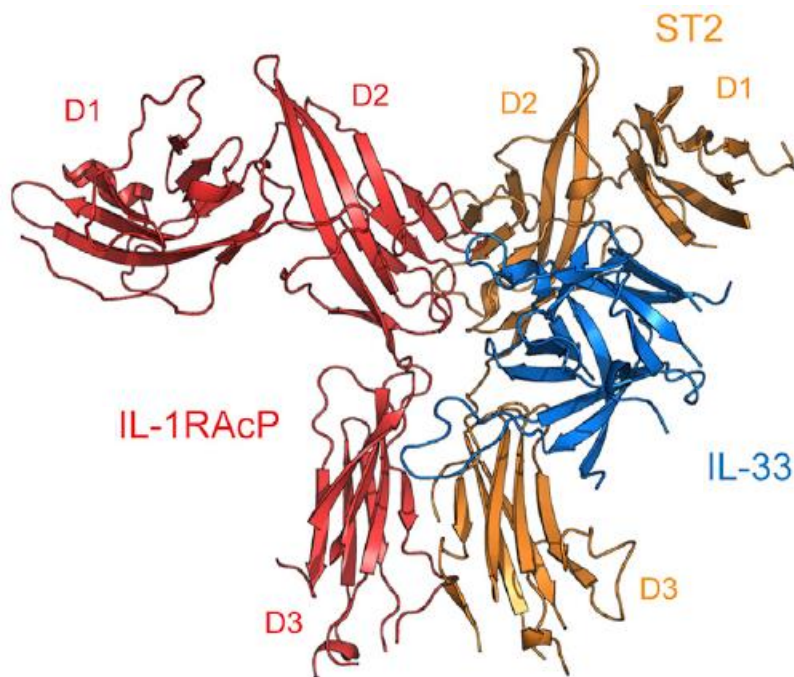
**Σχήμα 1.15** Η σύνδεση της IL-33 με τον υποδοχέα ST2, σε δύο διακριτές θέσεις σύνδεσης. Στη θέση 1, τα Glu144, Glu148, Asp149 και Asp244 της IL-33 σχηματίζουν γέφυρα άλατος με τα αμινοξέα Arg38, Lys22, Arg198 και Arg35 του ST2, αντίστοιχα. Τα Glu144 και Asp149 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του ST2. Στη θέση 2, το αμινοξύ Glu165 της IL-33 σχηματίζει γέφυρα άλατος με την Arg313 του ST2. Μία σημαντική υδρόφοβη κοιλότητα σχηματίζεται από τα αμινοξέα Tyr163 και Leu182 της IL-33 και τα Leu246, Leu306 και Leu311 του ST2. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [24]

Έπειτα, όπως είναι φανερό και από το Σχήμα 1.15, η IL-33 αλληλεπιδρά και με τους τρεις τομείς του ST2, ενώ μια μεγάλη επιφάνεια (περίπου  $1.798 \text{ \AA}^2$  επί της IL-33 και περίπου  $1.785 \text{ \AA}^2$  επί του ST2) «θάβεται» κατά την πρόσδεση. Αυτή η μεγάλη διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες αποτελείται από δύο ξεχωριστές θέσεις σύνδεσης. Στη θέση 1, δεκατρία αμινοξέα της IL-33, από το β3-φύλλο και τις θηλιές β1-β2, β2-β3, β3-β4 και β10-β11, αλληλεπιδρούν με τον D1D2 τομέα του υποδοχέα ST2. Μεταξύ αυτών των αμινοξέων, τα Glu144, Glu148, Asp149 και Asp244 της IL-33 σχηματίζουν γέφυρα άλατος με τα αμινοξέα Arg38, Lys22, Arg198 και Arg35 του ST2, αντίστοιχα. Τα Glu144 και Asp149 σχηματίζουν επίσης δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του ST2. Στη θέση 2, οκτώ αμινοξέα της IL-33 από τα β1, β4, β5 φύλλα και τη θηλιά β8-β9 αλληλεπιδρούν με τον D3 τομέα του ST2. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ένα μίγμα υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων. Μεταξύ των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με την IL-33, τέσσερα από αυτά είναι υδρόφοβα και μία σημαντική υδρόφοβη κοιλότητα σχηματίζεται από τα αμινοξέα Tyr163 και Leu182 της IL-33 και τα Leu246, Leu306 και Leu311 του ST2. Τέλος, το αμινοξύ Glu165 της IL-33 σχηματίζει γέφυρα άλατος με την Arg313 του ST2.

#### ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ IL-33 ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ST2 ΚΑΙ ΤΟΝ ΒΟΗΘΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ IL-1RAcP

Το τριπλό σύμπλοκο ανάμεσα στην IL-33, τον κύριο υποδοχέα της ST2 και ένα βοηθητικό υποδοχέα με το όνομα IL-1RAcP απομονώθηκε από τον οργανισμό *Mus musculus* με τη μέθοδο της διάθλασης ακτίνων X και με ανάλυση  $2.79 \text{ \AA}$  [25]. Η κρυσταλλική δομή αποτελείται από έξι αλυσίδες, ανά δύο πανομοιότυπες, δηλαδή κάθε πρωτεΐνη στο τριπλό σύμπλοκο βρίσκεται κρυσταλλωμένη δύο φορές. Ο Günther και οι συνεργάτες του κατέγραψαν ότι η IL-33 δεσμεύεται αρχικά στον ST2 για να

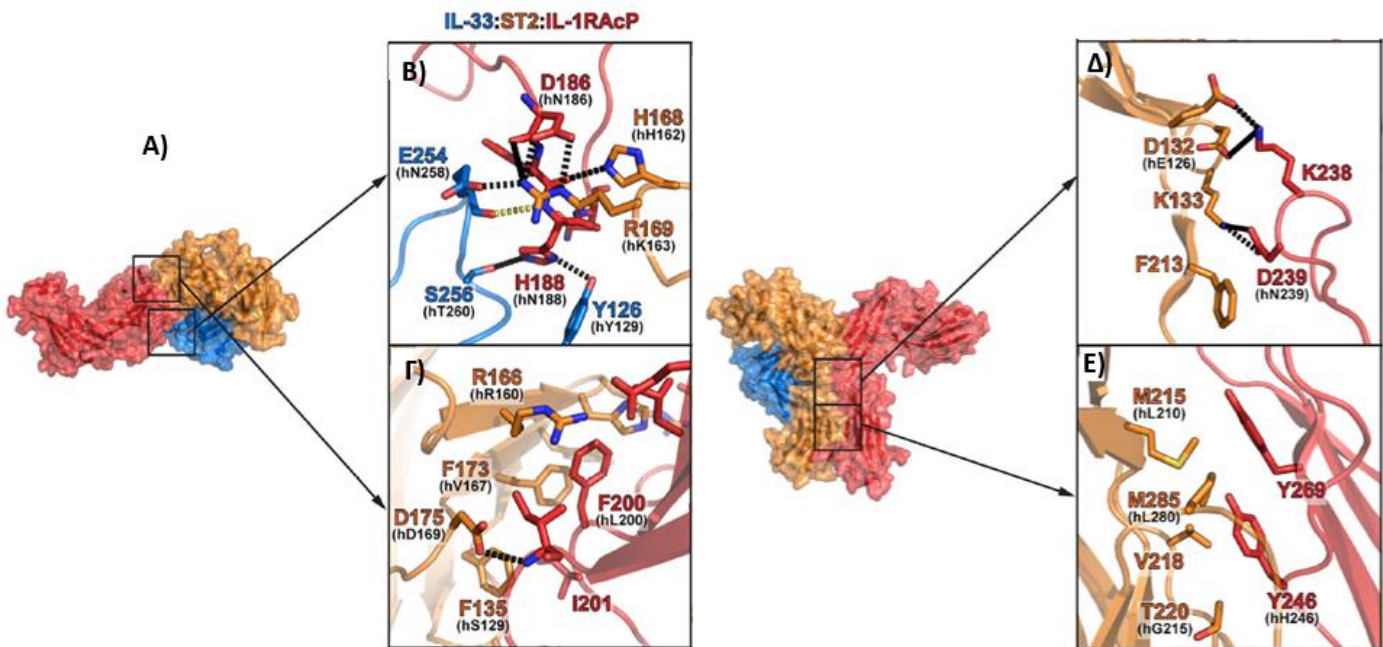
δημιουργήσουν μία κατάλληλη διαμόρφωση, ώστε να προσδεθεί στη συνέχεια ο υποδοχέας IL-1RAcP. Οι τρεις τομείς του ST2 (D1, D2, D3) τυλίγονται και σε αυτή την περίπτωση γύρω από την IL-33. Αυτό το διπλό σύμπλοκο στη συνέχεια συνδέεται με τον IL-1RAcP, του οποίου ο δεύτερος και ο τρίτος τομέας (D2 και D3, αντιστοίχως) αλληλεπιδρούν με την IL-33 και τον ST2. Τέλος, παρατηρείται ότι ο τομέας D1 από τον ST2 και ο D1 από τον IL-1RAcP δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό του τριπλού συμπλόκου. (Σχήμα 1.16)



**Σχήμα 1.16** Η κρυσταλλική δομή της IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 5VI4). Οι υπομονάδες φαίνονται σε αναπαράσταση κορδέλας, όπου η IL-33 απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ο ST2 με πορτοκαλί και ο IL-1RAcP με κόκκινο. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [25].

Αν και το τριπλό σύμπλοκο IL-33/ST2/IL-1RAcP έχει αρκετές ομοιότητες με το σύμπλοκο της ανθρώπινης IL-33 με τον ST2, εμφανίζουν RMSD ίσο με 1.46 Å, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν κάποιες διαφορές. Οι σημαντικότερες διαφορές εμφανίζονται στη διεπαφή ανάμεσα στην IL-33 και τον IL-1RAcP. Συγκεκριμένα, οι θηλιές που συνδέουν τα β4 και β5 φύλλα και τα β11 και β12, απουσίαζαν στη δομή IL-33/ST2. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει λόγω ευκαμψίας των θηλιών στην περίπτωση που απουσιάζει ο IL-1RAcP. Επίσης, οι θηλιές αυτές φαίνεται να μην υπάρχουν ούτε στη δομή της IL-33 που έχει προέλθει από NMR.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.17, οι τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες του συμπλόκου IL-33/ST2/IL-1RAcP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε διάφορες περιοχές. Αρχικά, παρατηρείται ότι η θηλιά που συνδέει τα c2 και d2 φύλλα του IL-1RAcP αλληλεπιδρά τόσο με την κυτοκίνη όσο και με τον υποδοχέα ST2, μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου. Επίσης, μια υδρόφοβη περιοχή στην πλευρά του υποδοχέα ST2 δεσμεύει την Ile155 του IL-1RAcP. Στο τριπλό σύμπλοκο, η πλευρική αλυσίδα του Asp175 του ST2 εμφανίζει van der Waals αλληλεπιδράσεις με την πλευρική αλυσίδα της Ile155 του IL-1RAcP και σχηματίζει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα του ίδιου αμινοξέος. Στη συνέχεια, η θηλιά που συνδέει τους τομείς D2 και D3 του IL-1RAcP αλληλεπιδρά με την αντίστοιχη θηλιά στον υποδοχέα ST2. Επιπρόσθετα, η Lys238 του IL-1RAcP σχηματίζει γέφυρα άλατος με το Asp132 και το Glu210 του ST2, ενώ γέφυρα άλατος σχηματίζεται και μεταξύ του Asp239 του IL-1RAcP και της Lys133 του ST2. Τέλος, παρατηρούνται van der Waals αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην πλευρική αλυσίδα του Asp239 του IL-1RAcP και της Phe213 του ST2.



**Σχήμα 1.17** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην IL-33, τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP. (Α) Αναπαράσταση επιφάνειας του συμπλόκου IL-33/ST2/IL-1RAcP, όπου η IL-33 απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ο ST2 με πορτοκαλί και ο IL-1RAcP με κόκκινο. (Β) Η θηλιά που συνδέει τα c2 και d2 φύλλα του IL-1RAcP αλληλεπιδρά με την IL-33 και τον ST2, μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου (μαύρες διακεκομμένες γραμμές). (Γ) Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον ST2 και τον IL-1RAcP. (Δ) Γέφυρες άλατος ανάμεσα στις θηλιές που συνδέουν τους τομείς D2 και D3 του IL-1RAcP και του ST2. (Ε) Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους D3 τομείς των υποδοχέων ST2 και IL-1RAcP. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [25].

## 1.9 Η IL-33 ως φαρμακευτικός στόχος: Πιθανοί τρόποι στόχευσης

Όπως παρουσιάστηκε και σε προηγούμενη ενότητα, κλινικά και πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η IL-33 είναι μια κυτοκίνη που εμφανίζει προφλεγμονώδεις δραστηριότητες σε οργανισμούς που πάσχουν από φλεγμονή των αεραγωγών. Το άσθμα, ως η πιο κοινή ασθένεια φλεγμονής των αεραγωγών φαίνεται να είναι ένα ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την εύρεση μορίων με φαρμακολογική δράση που θα στοχεύσουν την IL-33, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων κατά της IL-33 ή του θεραπευτικού ST2. Καθώς η IL-33 φαίνεται να δρα σε φλεγμονώδη συμβάντα, η αναστολή της θα μπορούσε να έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην εξασθένηση της εμφάνισης επεισοδίων επιδείνωσης άσθματος μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνα ή παθογόνα. Στη συνέχεια, τα αυξημένα επίπεδα της IL-33 στην ρευματοειδή αρθρίτιδα σε συνδυασμό με πειραματικά δεδομένα, δείχνουν ότι η αναστολή της IL-33 θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει ελκυστική επιλογή στη θεραπεία της φλεγμονώδους αρθρίτιδας. Παρομοίως, ασθένειες όπως η συστηματική σκλήρυνση και άλλες ινωτικές συνθήκες αντιπροσωπεύουν καταστάσεις στις οποίες θα μπορούσαν να μελετηθούν οι στοχευόμενες με IL-33 θεραπείες. Ωστόσο, με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, ο κατάλληλος χρόνος για την παρέμβαση είναι στα πρώιμα στάδια της νόσου, γεγονός που ίσως να αποτελέσει περιορισμό στην αποτελεσματικότητα των αναστολών της IL-33 σε κλινικές δοκιμές και στην πράξη [26]. Τέλος, η αναστολή της IL-33 μπορεί επίσης να παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας. Ωστόσο, η αναστολή της IL-33 μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης, ιδιαίτερα από παράσιτα και βακτήρια. Τέλος, τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά στη χρήση στρατηγικών αναστολής της δράσης της IL-33 σε ασθενείς με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου [27].

Η στόχευση της IL-33 μπορεί αρχικά να επικεντρωθεί στην πρόσδεση ενός μορίου-αναστολέα σε περιοχές της πρωτεΐνης που εμφανίζονται ως κοιλότητες πρόσδεσης. Η πρόσδεση ενός μικρού μορίου μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και ως αποτέλεσμα να μεταβάλλει τη λειτουργία της. Επίσης, μια εναλλακτική για την στόχευση της IL-33 αποτελεί η προσθήκη ενός μικρού μορίου στις επιφάνειες πρόσδεσης της IL-33 με τους υποδοχείς της, αλλά και στα σημεία που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να διευκρινιστεί ότι η στόχευση της IL-33 στην παρούσα εργασία θα διερευνηθεί μόνο για τις δομές της IL-33 που έχουν επιλυθεί, δηλαδή μόνο για την περιοχή των αμινοξέων 110 έως 270. Η στόχευση της περιοχής αμινοξέων 1 έως 109 που δεν έχει επιλυθεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X ή NMR μπορεί να μελετηθεί, αφού πρώτα κατασκευαστεί με τη μέθοδο της Ομόλογης Μοντελοποίησης (Homology Modeling). Η μέθοδος περιλαμβάνει τη δημιουργία της δομής της IL-33 χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την τρισδιάστατη δομή μίας σχετικής ομόλογης πρωτεΐνης από κάποιον άλλο οργανισμό, και θα αναλυθεί διεξοδικά σε επόμενο κεφάλαιο. Τέλος, εκτός από την κλασική μέθοδο στόχευσης της πρωτεΐνης στα πρωτογενή σημεία πρόσδεσης, μπορεί να εξεταστεί και η πρόσδεση ενός μορίου σε ένα δευτερογενές σημείο που θα προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση και τη λειτουργία της IL-33 μέσω αλλοστερικών επιδράσεων. Στη συνέχεια, θα παρουσιαστεί συνοπτικά η βασική θεωρία που διέπει τον αλλοστερισμό.

## 1.10 Το φαινόμενο του αλλοστερισμού

Με τον όρο ενεργό κέντρο, εννοεί κανείς την περιοχή του ενζύμου όπου τα μόρια ενός υποστρώματος δεσμεύονται και υφίστανται χημική αντίδραση. Το ενεργό κέντρο περιέχει καταλυτικές ομάδες που είναι αμινοξέα, τα οποία προάγουν το σχηματισμό και την αποδόμηση των δεσμών. Παρόλο που το ενεργό κέντρο καταλαμβάνει μία μικρή περιοχή του ενζύμου (περίπου το 10-20% του συνολικού όγκου), αποτελεί το πιο σημαντικό μέρος του ενζύμου καθώς καταλύει άμεσα τη χημική αντίδραση. Συνήθως αποτελείται από τρία έως τέσσερα αμινοξέα, ενώ άλλα αμινοξέα εντός της πρωτεΐνης απαιτούνται για να διατηρήσουν την πρωτεϊνική τριτοταγή δομή του ενζύμου [28].

Τα περισσότερα από τα σημερινά φάρμακα σχεδιάζονται για να συνδέονται άμεσα με τα ενεργά κέντρα, τα οποία είναι επίσης γνωστά ως ορθοστερικά κέντρα, των βιολογικών στόχων τους. Ένα φάρμακο προσδέεται στο ενεργό κέντρο ενός βιομορίου όπως ένα ένζυμο ή ένας υποδοχέας, και με τη σειρά του προκαλεί την αναστολή ή τροποποίηση της λειτουργίας του βιομορίου. Η δέσμευση ενός φαρμάκου στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου, εμποδίζει τα υποστρώματα να δεσμεύονται σε αυτή τη θέση και επομένως αναστέλλει τη λειτουργία αυτού του ενζύμου. Ομοίως, η δέσμευση ενός αγωνιστή ή ανταγωνιστή στο ορθοστερικό κέντρο των υποδοχέων μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των λειτουργιών του υποδοχέα [29]. Ο όρος αγωνιστής αναφέρεται σε μια χημική ουσία που δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα και ενεργοποιεί τον υποδοχέα για να παράγει μια βιολογική απόκριση. Αντίθετα, ο ανταγωνιστής είναι ένα μόριο το οποίο δεσμεύεται στον υποδοχέα, εμποδίζοντας έτσι τη δράση του αγωνιστή [30].

Έτσι, τα περισσότερα φάρμακα σχεδιάζονται για να ταιριάζουν στις πρωταρχικά ενεργά κέντρα των βιολογικών στόχων για να προκαλέσουν θεραπευτική δράση. Αυτή η κλασική προσέγγιση σχεδιασμού φαρμάκων έχει μελετηθεί εκτενώς και η αποτελεσματικότητά της έχει αποδειχθεί ότι εκτιμάται από τον μεγάλο αριθμό επιτυχημένων φαρμάκων στην αγορά. Πολλά φάρμακα έχουν υψηλή συγγένεια και υψηλή εξειδίκευση για περιοχές ορθοστερικής σύνδεσης για να στοχεύσουν μια συγκεκριμένη νόσο ή διαταραχή. Ωστόσο, μπορούν να εμφανισθούν δυσμενείς παρενέργειες, επειδή πολλά ένζυμα ή υποδοχείς με συναφείς λειτουργίες μπορεί να έχουν πολύ παρόμοιες ενεργές θέσεις. Επιπλέον, ένα ακόμη μειονέκτημα αυτών των φαρμάκων αφορά την ύπαρξη πλήρων αναστολέων ή ενεργοποιητών, παρά την ύπαρξη φαρμάκων τα οποία ρυθμίζουν τις διάφορες λειτουργίες των βιομορίων [31].

Μια νέα αναδυόμενη προσέγγιση στο σχεδιασμό φαρμάκων, βασίζεται σε δευτερογενείς επιδράσεις στο σημείο δέσμευσης. Στην προσέγγιση αυτή, μικρά φαρμακευτικά μόρια σχεδιάζονται για να δεσμεύονται σε δευτερογενείς θέσεις πρόσδεσης των βιολογικών στόχων, παρά στις κύριες ορθοστερικές θέσεις. Αυτά τα δευτερεύοντα κέντρα πρόσδεσης ονομάζονται αλλοστερικές θέσεις και το φαινόμενο αυτό καλείται αλλοστερισμός. Ένα επιτυχημένο πιθανό φάρμακο, αναφερόμενο ως ένας αλλοστερικό ρυθμιστής, θα είναι ικανό να δεσμεύεται σε μια αλλοστερική θέση και να μεταβάλλει (ή να τροποποιεί) εξ αποστάσεως τη διαμόρφωση του ορθοστερικού ενεργού κέντρου του βιολογικού στόχου. Αυτή η τροποποίηση διαμόρφωσης μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση των φυσικών προσδετών στην ορθοστερική θέση του ενζύμου ή της πρωτεΐνης υποδοχέα με έναν από τους δύο τρόπους [32]:

1. Η αλλοστερική τροποποίηση μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση της συγγένειας πρόσδεσης του συνδέτη με την ορθοστερική θέση προκαλώντας ενίσχυση ενός σήματος ή αυξημένη δραστηριότητα. Οι ενώσεις που παρουσιάζουν τέτοιες επιδράσεις αναφέρονται ως θετικοί αλλοστερικοί διαμορφωτές (Positive Allosteric Modulators, PAM).
2. Η αλλοστερική διαμόρφωση μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση ή αναστολή της πρόσδεσης προσδεμάτων στην ορθοστερική θέση σύνδεσης προκαλώντας εξασθένηση ενός σήματος ή μειωμένη δραστηριότητα. Οι ενώσεις που προκαλούν ένα τέτοιο αποτέλεσμα καλούνται αρνητικοί αλλοστερικοί διαμορφωτές (NAMs).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλές ενώσεις μπορεί να προσδένονται σε αλλοστερικές θέσεις χωρίς να επηρεάζουν τις ιδιότητες σύνδεσης των ορθοστερικών θέσεων. Έτσι, δεν είναι όλες οι αλλοστερικές θέσεις πρόσδεσης κατάλληλοι στόχοι για να προκαλέσουν ευνοϊκές μεταβολές στη διαμόρφωση. Ο σχεδιασμός αποτελεσματικών αλλοστερικών ρυθμιστών εξαρτάται από την ταυτοποίηση των αλλοστερικών θέσεων και στη συνέχεια τη σχεδίαση των μορίων που μπορούν να δεσμευτούν σε αυτές τις θέσεις και να προκαλέσουν τις επιθυμητές διαμορφωτικές αλλαγές στο επιθυμητό βιομόριο [29]. Ενώ αυτή η προσέγγιση για την ανακάλυψη φαρμάκων είναι πολύ νεότερη και εξακολουθεί να εμφανίζεται, υπάρχουν ήδη εγκεκριμένα φάρμακα που δρουν ως αλλοστερικοί ρυθμιστές όπως το Cinacalcet (Amgen) [33] για τη θεραπεία του υπερπαραθυρεοειδισμού και του Maraviroc (Pfizer) [34] για τη θεραπεία του AIDS, ενώ υπάρχουν πολλά υποψήφια φάρμακα σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Οι υποστηρικτές αυτής της προσέγγισης υποδεικνύουν πολλές πιθανές δυνατότητες και πλεονεκτήματα που μπορούν να υλοποιηθούν με την υιοθέτηση της αλλοστερικής διαμόρφωσης στο σχεδιασμό φαρμάκων. Μερικά από τα δυνητικά πλεονεκτήματα είναι τα εξής [29]:

1. Μοναδικές αλλοστερικές θέσεις μπορούν να αναγνωριστούν για να στοχεύουν τις διαταραχές στενά και πιο συγκεκριμένα μέσω νέων φαρμάκων που ενδεχομένως προκαλούν λιγότερες παρενέργειες.
2. Υπάρχουν σήμερα πολλές ασθένειες που στερούνται φαρμακευτικής θεραπείας εξαιτίας της δυσκολίας σχεδιασμού φαρμάκων για αλληλεπίδραση με τις ορθοστερικές θέσεις ή την έλλειψη εξειδίκευσης. Συνεπώς, η χρήση αλλοστερικών ρυθμιστών μπορεί να προσφέρει καλύτερες εναλλακτικές λύσεις στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία αυτών των διαταραχών.
3. Τέλος, οι αλλοστερικοί ρυθμιστές μπορούν να παρέχουν τη δυνατότητα ρύθμισης των επιδράσεων του φαρμάκου έτσι ώστε να μπορεί να συμπεριφέρεται σαν διακόπτης dimmer αντί να ενεργεί ως διακόπτης on/off με το να είναι ένας πλήρης αναστολέας ή ενεργοποιητής.

### 1.11 Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- αναστολέα

Η αναστολή της δράσης μια πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την πρόσδεση ενός μικρού μορίου (προσδέτης) στην κοιλότητα πρόσδεσής της. Το πόσο ισχυρά προσδένεται το μόριο στην πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος εξαρτάται από την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, η οποία δίνεται από την ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs:

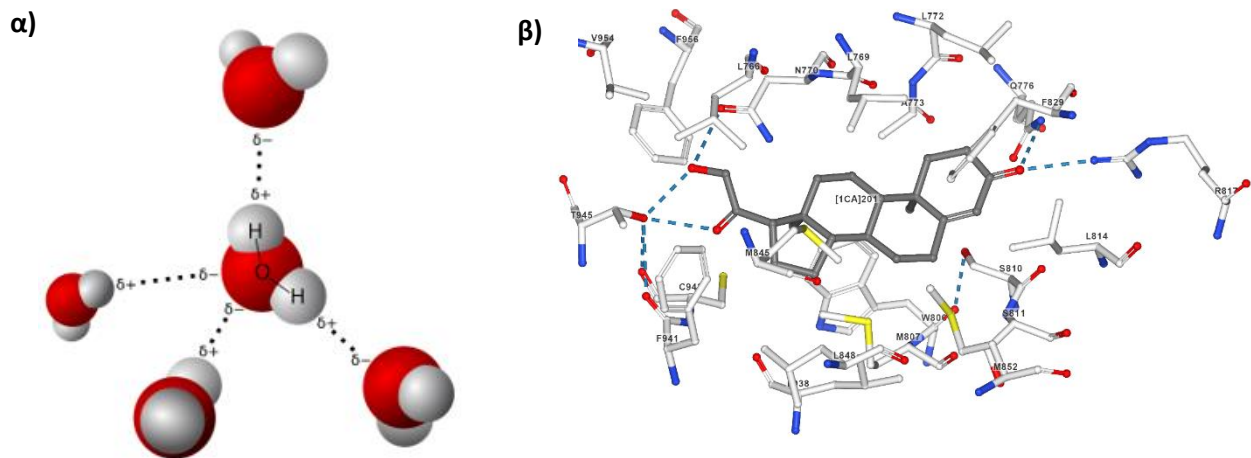
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [1.1]$$



Στην εξίσωση αυτή υπάρχει ο ενθαλπικός ( $\Delta H$ ) και ο εντροπικός όρος ( $\Delta S$ ). Ο εντροπικός όρος σχετίζεται με την μείωση της ελεύθερης ενέργειας από τη μείωση της εντροπίας ενός προσδέτη κατά την πρόσδεσή του στην κοιλότητα πρόσδεσης μίας πρωτεΐνης. Ο ενθαλπικός όρος σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και της πρωτεΐνης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ονομάζονται διαμοριακές, καθώς δημιουργούνται ανάμεσα στην πρωτεΐνη-στόχο και τον αναστολέα. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου,  $\pi$  αλληλεπιδράσεις, van der Waals αλληλεπιδράσεις, ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς αλογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, και θα παρουσιαστούν συνοπτικά στη συνέχεια [35].

### 1.11.1 Δεσμοί υδρογόνου

Ως δεσμός υδρογόνου ορίζεται η αλληλεπίδραση ενός ατόμου υδρογόνου (H) με ένα ηλεκτροαρνητικό άτομο, όπως είναι το φθόριο (F), το οξυγόνο (O), ή το άζωτο (N). Δημιουργείται λόγω της μετατόπισης του ζεύγους ηλεκτρονίων προς το ηλεκτραρνητικό άτομο, που οδηγεί στη δημιουργία ενός τοπικού θετικού φορτίου στο H. Έπειτα, το θετικό φορτίο του υδρογόνου αλληλεπιδρά με το ηλεκτραρνητικό άτομο ενός γειτονικού μορίου. Ο δεσμός υδρογόνου χαρακτηρίζεται ως ένας ισχυρός δεσμός και απαιτείται αρκετή ενέργεια για τη διάσπασή του. Αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα είδη αλληλεπιδράσεων καθώς συμμετέχει στη συγκρότηση, τη διαμόρφωση και τη σταθεροποίηση σύνθετων αρχιτεκτονικών δομών, όπως η δομή μιας πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με τον αναστολέα.



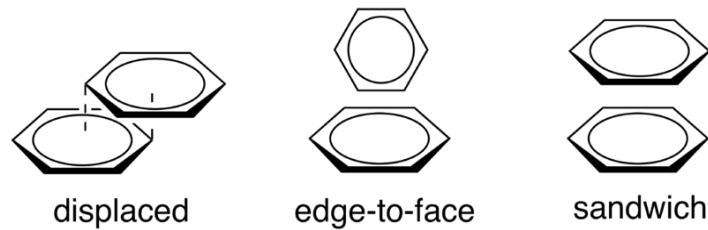
**Σχήμα 1.18** α) Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μορίων νερού. β) Οι δεσμοί υδρογόνου (μπλε διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ ενός μορίου προσδέτη (γκρι) και των διάφορων αμινοξέων του υποδοχέα (άσπρο) με κωδικό στην PDB: 2AA7 [36].

### 1.11.2 $\pi$ αλληλεπιδράσεις

Οι  $\pi$  αλληλεπιδράσεις αφορούν τις ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των  $\pi$ -συστημάτων συζευγμένων μορίων και συγκεκριμένα αρωματικών δακτυλίων. Μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των  $\pi$ - $\pi$ , κατιόν- $\pi$ , ανιόν- $\pi$  και διπόλου- $\pi$  αλληλεπιδράσεων.

## ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ π-π

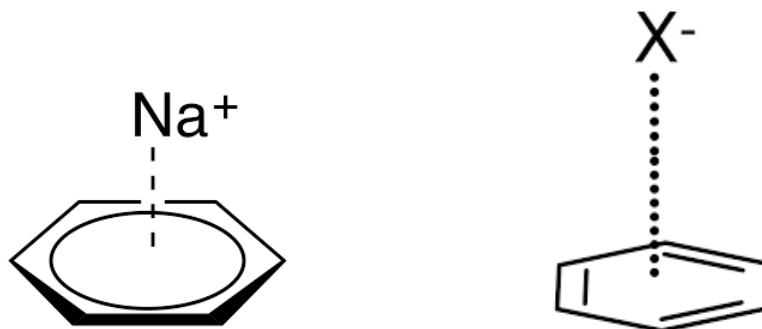
Οι π-π αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται μεταξύ των π-τροχιακών ενός μοριακού συστήματος. Για παράδειγμα, δύο γειτονικά άτομα βενζολίου μπορούν να διαταχθούν στο χώρο σε τρεις πιθανές διαμορφώσεις, σχηματίζοντας π-π αλληλεπιδράσεις. Οι δύο από αυτές είναι ενεργειακά ευνοϊκές και ονομάζονται *displaced* και *edge-to-face*, ενώ η τρίτη, διαμόρφωση *sandwich*, δεν είναι σταθερή. Αυτό συμβαίνει λόγω υψηλής ηλεκτροστατικής άπωσης των ηλεκτρονίων στα π τροχιακά των δύο δακτυλίων.



**Σχήμα 1.19** π-π αλληλεπιδράσεις. Από τις τρεις διαμορφώσεις μόνο οι δύο ευνοούνται ενεργειακά, η *displaced* και η *edge-to-face*. Η διαμόρφωση *sandwich* δεν συναντάται γιατί τα ηλεκτρονιακά νέφη στα κέντρα των βενζολικών δακτυλίων απωθούν το ένα το άλλο. Ανάμεσα στις δύο πρώτες διαμορφώσεις η *edge-to-face* είναι η πιο ευνοϊκή ενώ η *displaced* συναντάται μόνο όταν η *edge-to-face* δεν μπορεί να ληφθεί λόγω γεωμετρίας.

## ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ κατιόν-π και ανιόν-π

Οι αλληλεπιδράσεις κατιόν-π συναντώνται όταν το θετικό φορτίο ενός κατιόντος αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια του π-συστήματος ενός μορίου. Αυτό το είδος αλληλεπίδρασης είναι αρκετά ισχυρό, πιο ισχυρό και από το δεσμό υδρογόνου ανάμεσα σε δύο μόρια. Οι ανιόν-π αλληλεπιδράσεις αφορούν την περίπτωση όπου ένα ανιόν βρίσκεται πάνω από π-σύστημα φτωχό σε ηλεκτρόνια, που συνήθως δημιουργείται με την τοποθέτηση στο συζευγμένο μόριο υποκαταστατών που αποσύρουν ηλεκτρόνια.

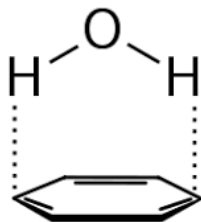


**Σχήμα 1.20** Κατιόν-π (αριστερά) και ανιόν-π (δεξιά) αλληλεπιδράσεις.

## ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ διπόλου-π

Οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-π, σχηματίζονται ανάμεσα σε πολικά μόρια όπως το νερό και σε π-συστήματα αρωματικών δακτυλίων, όπως το βενζόλιο. Είναι ισχυρές αλληλεπιδράσεις και σχετίζονται με

την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Στην πραγματικότητα, κάθε μόριο που έχει έναν δότη δεσμών υδρογόνου, σχηματίζει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το πλούσιο σε ηλεκτρόνια π-σύστημα ενός συζευγμένου μορίου.



**Σχήμα 1.21** Αλληλεπιδράσεις διπόλου -π μεταξύ ενός μορίου νερού και ενός βενζολίου.

### 1.11.3 van der Waals αλληλεπιδράσεις

Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals συνιστούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ουδέτερα φορτισμένων ατόμων ή μορίων, και είναι μια κατηγορία ηλεκτροστατικών δυνάμεων που περιλαμβάνουν μόνιμα ή επαγόμενα δίπολα. Διακρίνονται στις εξής επιμέρους κατηγορίες: δυνάμεις διπόλου-διπόλου, διπόλου-επαγόμενου διπόλου και στιγμιαίου διπόλου-επαγόμενου διπόλου. Αρχικά, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ή αλληλεπιδράσεις Keesom, είναι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται μεταξύ ατόμων με διπολική ροπή. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης με πολικές πλευρικές αλυσίδες και των πολικών μορίων-αναστολέων. Είναι οι ισχυρότερες ελκτικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Έπειτα, οι δυνάμεις διπόλου-διπόλου, ή δυνάμεις Debye, σχηματίζονται όταν ένα μη πολικό μόριο προσεγγίζεται από ένα πολικό με αποτέλεσμα την επαγωγή διπολικής ροπής στο μη πολικό μόριο. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις στιγμιαίου διπόλου-επαγόμενου διπόλου ονομάζονται και δυνάμεις διασποράς London και δημιουργούνται σε άπολα μόρια με τη στιγμιαία συσσώρευση ηλεκτρονίων σε ένα σημείο ενός μορίου έτσι ώστε το μόριο να αποκτά στιγμιαία διπολική ροπή. Αυτό το στιγμιαίο δίπολο επάγει διπολική ροπή σε γειτονικό, επίσης άπολο μόριο. Οι δυνάμεις διασποράς London είναι εξαιρετικά σημαντικές σε σχέση με τις άλλες καθώς όλα τα υλικά είναι πολώσιμα, ενώ οι δυνάμεις Keesom και Debye απαιτούν την ύπαρξη μόνιμων διπόλων. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τον ασθενή χαρακτήρα των δεσμών vdW καθώς η έντασή τους μειώνεται με την αύξηση της απόστασης μεταξύ των ατόμων, ο μεγάλος αριθμός των ατόμων που αλληλεπιδρούν οδηγεί σε σημαντική συνεισφορά των vdW αλληλεπιδράσεων στη σταθερότητα του συμπλόκου ανάμεσα στην πρωτεΐνη και το μόριο-προσδέτη.

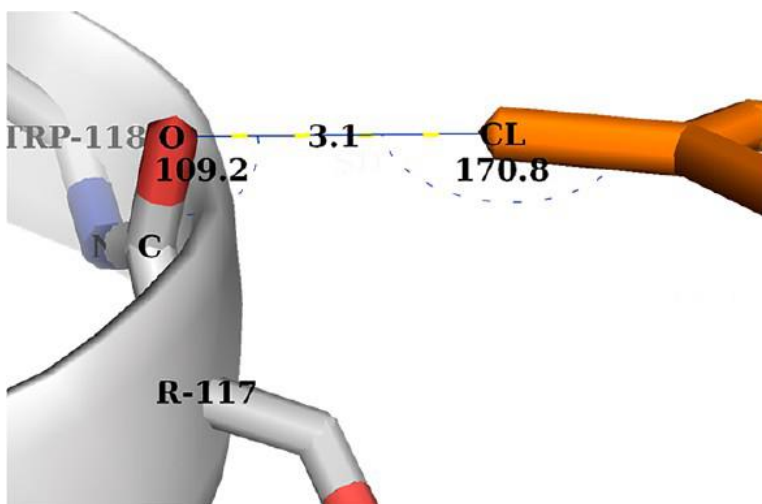
### 1.11.4 Ιοντικές αλληλεπιδράσεις

Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις συνιστούν τις δυνάμεις που δημιουργούνται ανάμεσα σε φορτισμένα μόρια ή ιόντα. Μαθηματικά μπορούν να περιγραφούν από το νόμο του Coulomb και η ισχύς τους είναι αρκετά μεγάλη. Ιοντικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να παρατηρηθούν μεταξύ φορτισμένων ατόμων του μορίου-προσδέτη και φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων της πρωτεΐνης όπως οι θετικά φορτισμένες

λυσίνη, ιστιδίνη και αργινίνη, και τα αρνητικά γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ. Μια κατηγορία ιοντικών αλληλεπιδράσεων είναι και οι γέφυρες άλατος οι οποίες είναι εξίσου ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις.

### 1.11.5 Δεσμοί αλογόνου

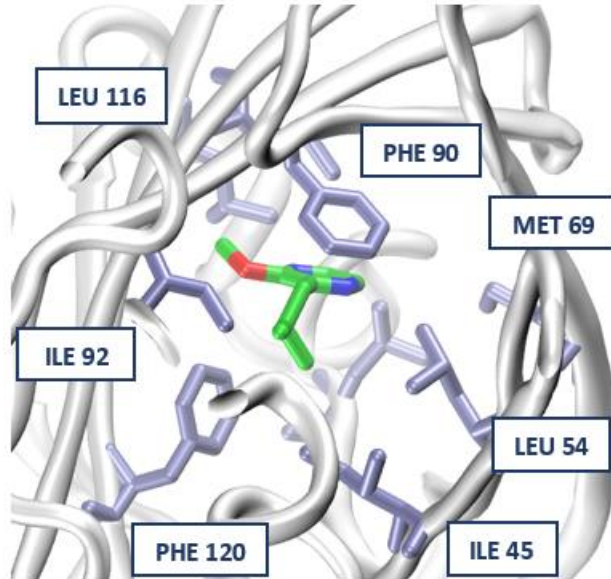
Οι δεσμοί αλογόνου μοιάζουν αρκετά με τους δεσμούς υδρογόνου καθώς χαρακτηρίζονται από έναν δότη και έναν δέκτη ηλεκτρονίων, μόνο που εδώ το ρόλο του δέκτη έχει το αλογόνο αντί για το υδρογόνο. Σε αυτή την κατηγορία αλληλεπιδράσεων ένα αλογόνο δρα ως ηλεκτρονιόφιλο και σχηματίζει μια ασθενή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με ένα πυρηνόφιλο άτομο. Το πυρηνόφιλο αυτό άτομο τείνει να είναι έντονα ηλεκτραρνητικό (όπως τα άτομα F, O, N) ή ακόμα και κάποιο ανιόν. Τα αλογόνα που συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών αλογόνου είναι το ιώδιο (I), το βρώμιο (Br), το χλώριο (Cl) και μερικές φορές το φθόριο (F). Αυτά τα αλογόνα μπορούν να δράσουν ως δότες δεσμού αλογόνου (δέκτες ηλεκτρονίου), ωστόσο ακολουθούν μια σειρά σχετικά με την ισχύ των δεσμών που σχηματίζουν σύμφωνα με την οποία ισχύει ότι  $F < Cl < Br < I$ , με το ιώδιο να σχηματίζει τους ισχυρότερους δεσμούς.



**Σχήμα 1.22** Απεικόνιση δεσμού αλογόνου σε σύμπλοκο πρωτεΐνης- προσδέτη. Το χλώριο σχηματίζει ένα δεσμό αλογόνου (μπλε γραμμή) με το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης. Ο προσδέτης (PDB code: 2B19) παρουσιάζεται ως πορτοκαλί και η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως μοντέλο cartoon και stick. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [37]

### 1.11.6 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις χαρακτηρίζονται ως η επιθυμία των μη-πολικών μορίων να συσσωματώνονται σε υδατικά διαλύματα προκειμένου να μην εκτεθούν στο νερό. Αυτό το φαινόμενο οδηγεί στην ύπαρξη μιας ελάχιστα εκτεθειμένης επιφάνειας των μη πολικών μορίων στα πολικά μόρια νερού και χρησιμοποιείται συνήθως στη βιοχημεία για να μελετήσει την πρόσδεση μικρών μορίων σε πρωτεΐνες. Οι πλευρικές αλυσίδες υδρόφοβων αμινοξέων μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Λόγω αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων, η αλληλουχία και η θέση των αμινοξέων σε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθορίζουν την αναδίπλωση αυτής της πρωτεΐνης.



**Σχήμα 1.23** Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Με γκρι απεικονίζονται τα υδρόφοβα αμινοξέα της κοιλότητας πρόσδεσης της πρωτεΐνης MUP (Major Urinary Protein), ενώ με πράσινο το μόριου-προσδέτης IBMP (2-methoxy-3-isobutylpyrazine). PDB code:1YP6 [38].

## 1.12 Σκοπός της εργασίας

Αν και η IL-33 ανακαλύφθηκε ως μέλος της οικογένειας των κυτοκινών IL-1 μόλις το 2005, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες πειραματικές μελέτες που αποδεικνύουν τη σημασία της σε διάφορες ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος. Κρίνεται λοιπόν επιτακτική η ανάγκη αναστολής της δράσης της IL-33 προκειμένου να βρεθούν νέοι τρόποι θεραπείας αυτών των ασθενειών. Ωστόσο, σήμερα δεν είναι γνωστή η ύπαρξη μορίων αναστολέων που δρουν μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση της IL-33 και κατ'επέκταση τη λειτουργία της. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστός ο τρόπος αλληλεπίδρασης της IL-33 με τους υποδοχείς της ST2 και IL-1RAcP, καθώς και η αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες όπως η κινάση εστιακής προσκόλλησης, ο πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ και το διμερές ιστονών H2A-H2B.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η στόχευση της IL-33 με τη χρήση υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων. Αρχικά, θα προβλεφθούν πιθανές κοιλότητες πρόσδεσης στην πρωτεΐνη, στις οποίες μπορούν να προσδεθούν μικρά μόρια που θα αναστείλουν τη δράση της. Οι κοιλότητες στη συνέχεια θα μελετηθούν και σε αυτές που εμφανίζονται ως πιο υποσχόμενες θα σαρωθεί εικονικά μία χημειοθήκη εμπορικά διαθέσιμων μορίων με φαρμακολογική δράση. Αυτό θα γίνει προκειμένου να βρεθούν πιθανά μόρια-αναστολείς της IL-33 που θα εμφανίζουν ισχυρή πρόσδεση στην κοιλότητα της πρωτεΐνης. Έπειτα, τα μόρια αυτά θα φιλτραριστούν με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τα δομικά τους χαρακτηριστικά προκειμένου να απορριφθούν αυτά που πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία στις μετέπειτα φάσεις του σχεδιασμού φαρμάκων. Τέλος, θα επιλεγούν κάποια πρότυπα μόρια τα οποία θα υποβληθούν περαιτέρω σε βιολογικές δοκιμές *in vitro*.



## 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

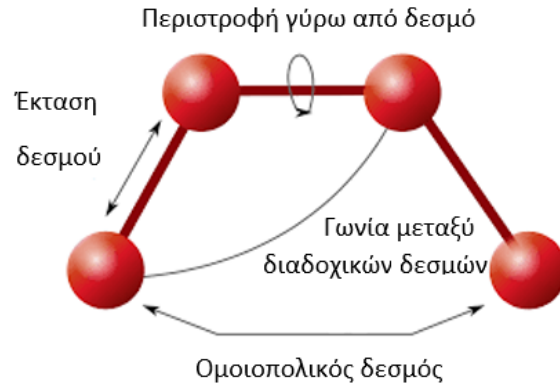
### 2.1 Προσομοίωση μοριακού συστήματος

Οι προσομοιώσεις μοριακών συστημάτων με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των μοριακών ιδιοτήτων της ύλης. Με τη χρήση του υπολογιστή καθίσταται δυνατή η μετάβαση από τη μικροσκοπική κλίμακα μήκους και χρόνου, στον μακρόκοσμο του εργαστηρίου, ενώ επιτυγχάνεται η προσομοίωση συνθηκών που είναι δύσκολο ή ακόμη και ακατόρθωτο να επιτευχθούν στο εργαστήριο [39]. Για το σκοπό αυτό, γίνεται χρήση θεωρητικών και υπολογιστικών μεθόδων οι οποίες μιμούνται ή αλλιώς μοντελοποιούν τη συμπεριφορά των μορίων. Το σύνολο αυτών των μεθόδων αποτελούν τη *Μοριακή Μοντελοποίηση* και μπορούν να μελετήσουν από μικρά χημικά μόρια έως μεγάλα βιολογικά συστήματα. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μεθόδων είναι ότι περιγράφουν τα μοριακά συστήματα σε ατομιστικό επίπεδο, δηλαδή αναγνωρίζουν τα άτομα ως τη μικρότερη αυτόνομη μονάδα (προσέγγιση Μοριακής Μηχανικής), ή μοντελοποιούν τα ηλεκτρόνια κάθε ατόμου (προσέγγιση Κβαντικής Μηχανικής) [40] [41].

Όπως είναι γνωστό, η ύλη απαρτίζεται από άτομα, τα οποία αποτελούνται από τα ηλεκτρόνια και από έναν πυρήνα πρωτονίων και νετρονίων. Η κίνηση των σωματιδίων ενός μοριακού συστήματος μπορεί να περιγραφεί από την Κλασική Μηχανική χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα και προβλέποντας μια ακριβή τροχιά για τα σωματίδια, με συγκεκριμένες συντεταγμένες και ορμή σε κάθε χρονική στιγμή. Ωστόσο, οι νόμοι της Κλασικής Μηχανικής αποτυγχάνουν να περιγράψουν την κίνηση σωματιδίων τόσο μικρών όσα τα ηλεκτρόνια. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται οι νόμοι και οι εξισώσεις της Κβαντικής Μηχανικής, η οποία αναγνωρίζει τον κυματοσωματιδιακό дуΐσμό της ύλης, θεωρώντας ότι ένα σωματίδιο, όπως το ηλεκτρόνιο, αντί να ταξιδεύει κατά μήκος μιας καθορισμένης τροχιάς, διανέμεται διαμέσου του χώρου σαν ένα κύμα [42]. Στην περίπτωση όμως που το μοριακό σύστημα που πρόκειται να μελετηθεί είναι ένα βιολογικό σύστημα, η Κβαντική Μηχανική αδυνατεί να το περιγράψει. Αυτό συμβαίνει λόγω του μεγάλου μεγέθους που χαρακτηρίζει τα βιολογικά συστήματα και της τάξης μεγέθους του χρόνου στον οποίο πραγματοποιούνται οι διάφορες βιολογικές δράσεις. Όλα αυτά σε συνδυασμό με τον δύσκολο υπολογιστικό χειρισμό βιολογικών συστημάτων με την Κβαντική Μηχανική, οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφόρων προσεγγιστικών μεθόδων οι οποίες υπακούν στις αρχές της *Μοριακής Μηχανικής* [43]. Σε αυτές ανήκει και η *Μοριακή Δυναμική*, μία μέθοδος που υπολογίζει την ενέργεια ενός συστήματος χρησιμοποιώντας εμπειρικές εξισώσεις που βασίζονται στις θέσεις των πυρήνων των σωματιδίων. Μέσω αριθμητικής ολοκλήρωσης των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα, παράγονται πληροφορίες του συστήματος σε μικροσκοπικό επίπεδο, οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται με μακροσκοπικές ιδιότητες μέσω της *Στατιστικής Μηχανικής*.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιτυχία και η ακρίβεια της Μοριακής Δυναμικής για τη μοντελοποίηση βιολογικών μοριακών συστημάτων, απαιτείται η χρήση απλοποιημένων εξισώσεων, που παρά τις όλες προσεγγίσεις, παρέχουν αποτελέσματα που συμφωνούν με τα πειραματικά. Μια τέτοια απλοποίηση που περιλαμβάνει η Μοριακή Δυναμική είναι η προσέγγιση των Born-Oppenheimer, η οποία διαχωρίζει τις κινήσεις των μορίων στο ηλεκτρονιακό (δονητικό) και στο πυρηνικό (περιστροφικό) μέρος. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι θέσεις των πυρήνων θεωρούνται πρακτικά αμετάβλητες σε σχέση με αυτές των ηλεκτρονίων, καθώς η ενέργεια περιστροφής τους είναι πολύ χαμηλή. Μια τέτοια προσέγγιση είναι

αποδεκτή καθώς οι πυρήνες είναι πολύ βαρύτεροι σε σχέση με τα ηλεκτρόνια και επομένως κινούνται πολύ αργά σε σχέση με αυτά [44]. Επιπρόσθετα, μια ακόμα απλοποίηση εφαρμόζεται προκειμένου να περιγραφούν οι ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των σωματιδίων του συστήματος. Σύμφωνα με αυτή την απλοποίηση, ένα μοριακό σύστημα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μικροσκοπικό μηχανικό σύστημα όπου τα άτομα προσομοιώνονται σαν σφαίρες και οι μεταξύ τους δεσμοί σαν μηχανικά ελατήρια που υπακούουν το νόμο του Hooke. Οι αλληλεπιδράσεις των ατόμων σε αυτή την περίπτωση συνιστούν τους ομοιοπολικούς δεσμούς, τις περιστροφές γύρω από δεσμούς, τις γωνίες κάμψης μεταξύ διαδοχικών δεσμών και την έκταση των δεσμών. (Σχήμα 2.1)



**Σχήμα 2.1** Απεικόνιση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων ενός μοριακού συστήματος. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [45] και μεταφράστηκε στα ελληνικά.

Οι ενδομοριακές και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ενός συστήματος, σε συνδυασμό με ένα σύνολο εμπειρικών παραμέτρων, συνιστούν το πεδίο δυνάμεων (*force field*) και χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την δυναμική ενέργεια του συστήματος [46]. Συγκεκριμένα, η δυναμική ενέργεια του συστήματος αποτελεί συνάρτηση των συντεταγμένων,  $U(r)$ , και μπορεί να εκφραστεί ως ένα άθροισμα των ενδομοριακών και διαμοριακών ενεργειακών όρων που συνιστούν το πεδίο δυνάμεων.

Το ενδομοριακό (bonded) κομμάτι της δυναμικής ενέργειας υπολογίζεται ως το κάτωθι άθροισμα:

$$\begin{aligned}
 U_{bonded}(r) &= U_{bonds}(b) + U_{angles}(\theta) + U_{dihedrals}(\varphi) + U_{improvers}(\omega) \\
 &= \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \frac{1}{2} k_\varphi (1 + \cos[n\varphi - \gamma]) \\
 &\quad + \sum_{improvers} \frac{1}{2} k_\omega (\omega - \omega_0)^2
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

Στην Εξίσωση 2.1 ο όρος  $U_{bonds}$  περιγράφει τις δυνάμεις που δρουν μεταξύ δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων με τη βοήθεια του νόμου του Hooke, όπου  $k_b$  η σταθερά δύναμης του ελατηρίου και  $b_0$  η τιμή ισορροπίας γύρω από την οποία ταλαντώνεται ο δεσμός. Ο δεύτερος όρος  $U_{angles}$  αναφέρεται στην ενέργεια των γωνιών κάμψης που σχηματίζονται μεταξύ τριών διαδοχικά ενωμένων ατόμων με ομοιοπολικό δεσμό, με  $k_\theta$  τη σταθερά κάμψης του δεσμού και  $\theta_0$  την απόκλιση από την



ιδανική γωνία κάμψης. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι οι δονητικές κινήσεις που περιλαμβάνουν την κάμψη γωνιών εμφανίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες από εκείνες των δονήσεων των δεσμών, και επομένως απαιτείται χαμηλότερη ενέργεια για να παραμορφωθεί μία γωνία από την τιμή ισορροπίας της σε σχέση με την ενέργεια που απαιτείται για την έκταση ενός δεσμού. Συνεπώς, οι σταθερές δύναμης των γωνιών κάμψης αναμένονται να είναι πολύ χαμηλότερες σε σχέση με τις σταθερές δύναμης των δεσμών. Έπειτα, ο τρίτος όρος  $U_{dihedrals}$  είναι μία συνάρτηση ταλάντωσης για τις δίεδρες γωνίες που σχηματίζονται μεταξύ τεσσάρων διαδοχικών ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικά επίπεδα, με  $\varphi$  τη δίεδρη γωνία,  $n$  την περιοδικότητα,  $\gamma$  τη γωνία με τη χαμηλότερη ενέργεια και  $k_\varphi$  την σταθερά δύναμης. Τέλος, ο όρος  $U_{impropers}$  περιγράφει τις εκτός επιπέδου κινήσεις των ατόμων με  $\omega$  τη γωνία ανάμεσα στο επίπεδο που ορίζουν το κεντρικό άτομο και δύο περιφερειακά άτομα και στο επίπεδο που ορίζουν τα περιφερειακά άτομα.

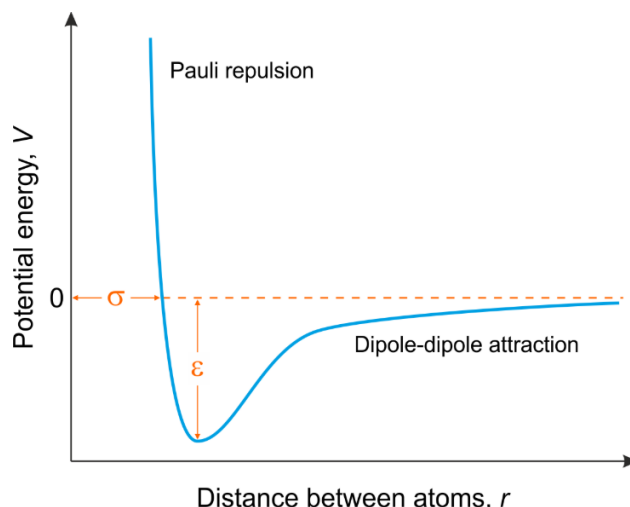
Το διαμοριακό (non-bonded) κομμάτι της δυναμικής ενέργειας ορίζεται ως το άθροισμα των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που περιγράφονται από το Νόμο του Coulomb και των δυνάμεων van der Waals που περιγράφονται από το δυναμικό Lennard-Jones. (Εξίσωση 2.2) Σημειώνεται ότι ο υπολογισμός αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι αρκετά χρονοβόρος καθώς περιέχουν τις αλληλεπιδράσεις μεγάλου εύρους των ατόμων του συστήματος.

$$U_{non-bonded} = U_{electrostatic} + U_{vdW}$$

$$= \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad [2.2]$$

Στον πρώτο όρο της Εξίσωσης 2.2 περιγράφονται οι μεγάλης εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (long-range electrostatic interactions) ανάμεσα σε άτομα που φέρουν καθαρό ή μερικό φορτίο. Έτσι, στον νόμο του Coulomb ως  $r_{ij}$  ορίζεται η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων που φέρουν φορτία  $q_i$  και  $q_j$  αντίστοιχα, ενώ ως  $\epsilon_0$  η διηλεκτρική σταθερά του κενού, ένα μέγεθος που σχετίζεται με την ικανότητα του συστήματος να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα.

Οι δυνάμεις van der Waals περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μικρού εύρους (short-range interactions) ανάμεσα σε άτομα που βρίσκονται κοντά. Περιγράφονται από το δυναμικό Lennard-Jones στο οποίο εμπεριέχεται ένα ελκτικό και ένα απωστικό κομμάτι. (Σχήμα 2.2) Συγκεκριμένα, οι ελκτικές δυνάμεις οφείλονται στις δυνάμεις London (αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου) και το απωστικό κομμάτι απορρέει από την απαγορευτική αρχή του Pauli. Έτσι, στον δεύτερο όρο της Εξίσωσης 2.2 το  $\epsilon$  είναι το φρέαρ (πηγάδι) του δυναμικού και  $\sigma$  είναι η απόσταση στην οποία το ενδο-μοριακό δυναμικό μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Με άλλα λόγια, το  $\sigma$  είναι μια μέτρηση του πόσο κοντά δύο μη-ενωμένα σωματίδια μπορούν να φτάσουν και για αυτό το λόγο αναφέρεται συχνά ως ακτίνα  $vdW$ .



**Σχήμα 2.2** Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού Lennard-Jones που περιγράφει τις δυνάμεις van der Waals. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [47].

## 2.2 Ομόλογη Μοντελοποίηση

Συχνά, η δομή μιας πρωτεΐνης δεν είναι γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ή ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας, επομένως πρέπει να κατασκευαστεί με τη χρήση άλλων μεθόδων. Ωστόσο, η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής μια πρωτεΐνης είναι μία δύσκολη διαδικασία καθώς δεν μπορεί να προσδιοριστεί με επιτυχία η δομή μιας ολόκληρης πρωτεΐνης με μόνη γνώση την αμινοξική αλληλουχία της. Μια υπολογιστική τεχνική που έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό είναι η Ομόλογη Μοντελοποίηση (Homology Modeling) που χρησιμοποιεί γνωστές πρωτεϊνικές δομές ως πρότυπα για τη δημιουργία μοντέλων των άγνωστων δομών. Οι βασικές αρχές της μεθόδου αυτής αναπτύσσονται παρακάτω.

Έχει αποδειχθεί ότι η πιο θεμελιώδης σχέση μεταξύ δύο βιολογικών μορίων σε βιοχημικό επίπεδο είναι η ομολογία, όπου δύο μόρια λέγεται ότι είναι ομόλογα εάν έχουν προκύψει από τον ίδιο πρόγονο. Η μελέτη της ομολογίας μεταξύ μορίων μπορεί να αποκαλύψει την εξελικτική ιστορία τους καθώς επίσης να παράσχει πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία τους. Επιπρόσθετα, επειδή η τριτοταγής δομή είναι περισσότερο συνδεδεμένη με τη λειτουργία από ότι η αμινοξική αλληλουχία, η τριτοταγής δομή είναι περισσότερο διατηρημένη κατά την εξέλιξη από ότι η πρωτοταγής δομή [48].

Η Ομόλογη Μοντελοποίηση αναφέρεται στην κατασκευή ενός μοντέλου της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης-στόχου σε ατομικό επίπεδο με βάση τη δομή κάποιας άλλης πρωτεΐνης της οποίας η δομή έχει ήδη επιλυθεί πειραματικά, και η πρωτεΐνη αυτή αναφέρεται ως πρότυπο. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή της πρωτεΐνης που θα λειτουργήσει ως πρότυπο είναι να παρουσιάζει ταύτιση στην αμινοξική αλληλουχία με την πρωτεΐνη-στόχο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 25% [49]. Έχει παρατηρηθεί πως σε ομόλογα μοντέλα στα οποία η ταύτιση φτάνει στο 35-40%, συνδυασμός νέων τεχνικών στη

μοντελοποίηση με βιοχημικές μελέτες και μελέτες QSAR (Quantitative structure–activity relationship) οδηγεί σε πρόβλεψη της δομής της πρωτεΐνης στόχου με ακρίβεια που προσεγγίζει την πειραματική [50].

Μετά την επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου, γίνεται χρήση της δομής της πρωτεΐνης-στόχου και της μεθόδου υπέρθεσης των αλληλουχιών (sequence alignment) ώστε να παραχθεί το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης-στόχου. Η ποιότητα του μοντέλου ομολογίας που προκύπτει εξαρτάται από την ποιότητα της υπέρθεσης των αλληλουχιών και της δομής της πρωτεΐνης-πρωτύπου. Η εύρεση της απόλυτης στερεοχημείας της πρωτεΐνης-στόχου μπορεί να περιπλέκεται από την παρουσία κενών κατά την υπέρθεση (alignment gaps, συνήθως ονομάζονται indels) που υποδεικνύουν μία δομική περιοχή που υπάρχει στο στόχο, αλλά όχι στο πρότυπο, καθώς επίσης και από διάκενα στη δομή της πρωτεΐνης-πρωτύπου που προκύπτουν από χαμηλή ευκρίνεια στην πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την επίλυση της δομής της πρωτεΐνης-πρωτύπου.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη του τελικού μοντέλου της πρωτεΐνης μετά την αναγνώριση του υποστρώματος (template recognition) από βιβλιοθήκες βάσεων δεδομένων συνοψίζεται στα εξής βήματα [49]:

1. Αναγνώριση υποστρώματος (Template recognition)
2. Διευθέτηση όμοιων δομικών τμημάτων (Alignment)
3. Δημιουργία σκελετού (Backbone generation)
4. Δημιουργία θηλιών (Loop generation)
5. Δημιουργία πλευρικών ομάδων (Side chain generation)
6. Βελτιστοποίηση μοντέλου (Model optimization)
7. Επαλήθευση μοντέλου (Model verification)

## 2.3 Βασικές αρχές προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Η *Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics)* είναι μια μέθοδος προσομοίωσης με τη χρήση υπολογιστή για τη μελέτη των κινήσεων των ατόμων και των μορίων ενός συστήματος με την πάροδο του χρόνου. Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του '70, ωστόσο σήμερα έχει εξελιχθεί σημαντικά αφού καθιστά δυνατή την προσομοίωση μεγάλων και πολύπλοκων συστημάτων. Αυτή η αξιοσημείωτη πρόοδος οφείλεται κυρίως στην χρήση υπολογιστών υψηλής απόδοσης (High Performance Computing, HPC) και στην απλότητα του βασικού αλγορίθμου πίσω από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής [51].

Για να ξεκινήσει μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής απαιτείται ένα αρχικό μοντέλο του συστήματος το οποίο λαμβάνεται από πειραματικές δομές και περιέχει τις αρχικές συντεταγμένες των ατόμων. Στην περίπτωση των βιολογικών συστημάτων, η αρχική δομή είναι μια τρισδιάστατη δομή που έχει επιλυθεί με διάθλαση ακτίνων Χ, ή φασματοσκοπία NMR και έχει κατατεθεί στην βάση δεδομένων PDB [52], ή μπορεί να είναι ένα θεωρητικό μοντέλο υπολογισμένο με συγκριτική προσομοίωση. Η αρχική δομή

επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την πορεία της προσομοίωσης και για το λόγο αυτό πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά.

Η Μοριακή Δυναμική βασίζεται στην επίλυση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα με σκοπό την παρακολούθηση της κίνησης κάθε ατόμου στο σύστημα. Στην περίπτωση της μεταφορικής κίνησης ενός συμμετρικά σφαιρικού μορίου, ο νόμος παίρνει την απλή μορφή  $F = m \cdot a$ , όπου  $F$  είναι η συνισταμένη των δυνάμεων που ασκούνται στο μόριο,  $m$  η μάζα του μορίου και  $a$  η επιτάχυνσή του. Αυτή η εξίσωση μπορεί να γραφεί και ως εξής:

$$F = m \cdot \frac{d^2r}{dt^2} \Leftrightarrow -\frac{dU}{dr} = m \cdot \frac{d^2r}{dt^2} \quad [2.3]$$

όπου  $r$  η μετατόπιση του μορίου,  $t$  ο χρόνος και  $U$  η δυναμική ενέργεια του συστήματος εκφρασμένη ως κλίση της συνάρτησης της δύναμης  $F$ . Η ολοκλήρωση της παραπάνω εξίσωσης παράγει τη χρονική εξέλιξη της θέσης των ατόμων του συστήματος, που ονομάζεται *τροχιά (trajectory)*. Η τροχιά περιγράφει τη μετατόπιση, την ταχύτητα και την επιτάχυνση κάθε ατόμου του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο της προσομοίωσης. Η γνώση της τροχιάς επιτρέπει τον υπολογισμό των μακροσκοπικών φυσικών ιδιοτήτων του βιολογικού συστήματος. Η μέθοδος αυτή είναι αιτιοκρατική (deterministic), δηλαδή αν είναι γνωστές η μετατόπιση και η ταχύτητα όλων των ατόμων σε μια χρονική στιγμή, η κατάσταση του συστήματος μπορεί να προβλεφθεί για οποιαδήποτε άλλη στιγμή. Επομένως, η ολοκλήρωση των εξισώσεων της κίνησης είναι αδύνατο να γίνει με τις γνωστές μεθόδους ολοκλήρωσης, και πρέπει να γίνει αριθμητικά [53].

Για αυτό το σκοπό έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι, ωστόσο ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος είναι ο αλγόριθμος Verlet λόγω της σταθερότητας που παρουσιάζει σε μεγάλες χρονικά προσομοιώσεις. Επίσης χαρακτηρίζεται από απλότητα και μειωμένες απαιτήσεις σε αποθηκευτικό χώρο. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο Verlet, η ολοκλήρωση γίνεται σε βήματα χρόνου  $\delta t$  [54]. Καθώς η ολοκλήρωση της κίνησης γίνεται αριθμητικά, για να αποφευχθεί η αστάθεια, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα χρονικό βήμα μικρότερο από τις ταχύτερες κινήσεις στο μόριο. Αυτό ορίζεται κανονικά μεταξύ 1 και 2 fs για ατομικές προσομοιώσεις, και είναι από τους βασικούς περιορισμούς της διαδικασίας προσομοίωσης. Ωστόσο, ένα πολύ μικρό βήμα, αυξάνει τον απαιτούμενο υπολογιστικό χρόνο. Μια συνήθης παραδοχή στη Μοριακή Δυναμική είναι η θεώρηση ότι οι ενδομοριακοί δεσμοί δεν ταλαντώνονται, αλλά έχουν σταθερό μήκος. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή περιορισμών στο μήκος του δεσμού και στη γωνία των δεσμών. Συγκεκριμένα, σε κάθε βήμα αρχικά λαμβάνεται μια μετατόπιση των ατόμων χωρίς περιορισμούς και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτή ένα διάνυσμα μετατόπισης ώστε να ικανοποιούνται οι συνθήκες των περιορισμών. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι, όπως ο SHAKE, η εφαρμογή των οποίων επιτρέπει την αύξηση του χρονικού διαστήματος  $\delta t$  και μειώνει τον απαιτούμενο υπολογιστικό χρόνο [55].

Στη συνέχεια, ένα από τα βασικά μειονεκτήματα που εμφανίζονται στις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής είναι ότι η θερμοκρασία του συστήματος πρέπει να επαναρρυθμίζεται περιοδικά, έτσι ώστε να προσομοιώνονται οι βιολογικές συνθήκες. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχουν αναπτυχθεί διάφορα σύνολα εξισώσεων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και της πίεσης του συστήματος [56]. Η βασική ιδέα πίσω από αυτά τα σύνολα είναι ότι η μελέτη των δυναμικών

παραμέτρων των σωματιδίων ενός συστήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό των μακροσκοπικών φυσικών μεγεθών του συστήματος, όπως πίεση και θερμοκρασία. Η μετατροπή των μικροσκοπικών παραμέτρων σε μακροσκοπικά φυσικά μεγέθη ακολουθεί τις αρχές της Στατιστικής Μηχανικής. Σύμφωνα με τη Στατιστική Μηχανική κάθε σύστημα χαρακτηρίζεται από τη θερμοδυναμική του κατάσταση, που αποτελείται από τα μακροσκοπικά μεγέθη πίεση, θερμοκρασία, αριθμός σωματιδίων, ενέργεια κ.α., και από τη μικροσκοπική του κατάσταση, που περιλαμβάνει την ατομική θέση και την ορμή των σωματιδίων του. Μια *στατιστική κατανομή* (*statistical ensemble*) είναι το σύνολο όλων των πιθανών μικροσκοπικών καταστάσεων του συστήματος που εμφανίζουν την ίδια θερμοδυναμική κατάσταση. Η Μοριακή Δυναμική μεταβάλλει τις μικροσκοπικές παραμέτρους του συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο, ακολουθώντας μία σταθερή κατανομή [57]. Οι σημαντικότερες κατανομές που χρησιμοποιούνται είναι:

#### ΜΙΚΡΟ-ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ (MICROCANONICAL -NVE)

Ο αριθμός σωματιδίων ( $N$ ), ο όγκος ( $V$ ) και η ενέργεια ( $E$ ) του συστήματος είναι σταθερά. Η κατανομή αυτή περιγράφει ένα απομονωμένο σύστημα.

#### ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ (CANONICAL -NVT)

Ο αριθμός σωματιδίων ( $N$ ), ο όγκος ( $V$ ) και η θερμοκρασία ( $T$ ) είναι οι σταθερές παράμετροι του συστήματος. Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με ένα θερμοστάτη για τη διατήρηση της θερμοκρασίας και επομένως η Χαμιλτονιανή του συστήματος μετατρέπεται στην Εξίσωση 2.4.

$$H = K + V + K_s + V_s \quad [2.4]$$

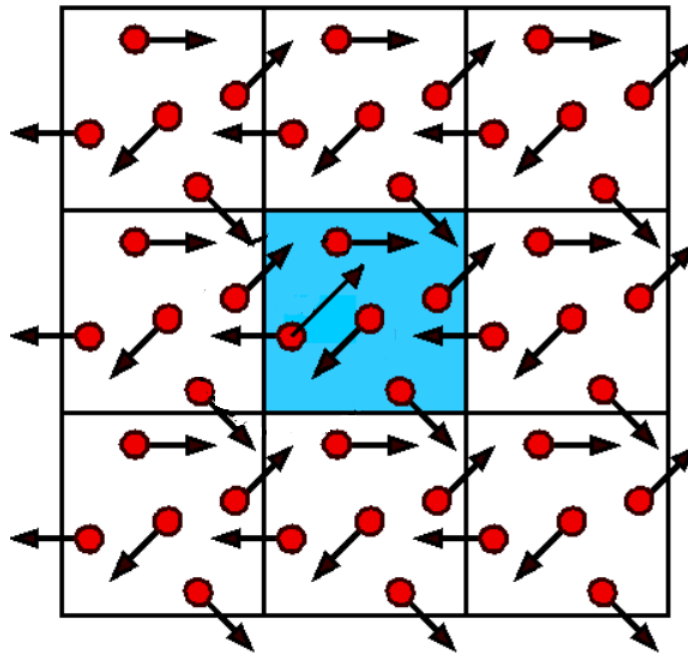
όπου  $K$  είναι η κινητική ενέργεια του συστήματος,  $V$  η δυναμική ενέργεια και  $K_s$ ,  $V_s$  η κινητική και δυναμική ενέργεια που συνδέεται με τον θερμοστάτη.

#### ΙΣΟΘΕΡΜΗ-ΙΣΟΒΑΡΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗ (ISOTHERMAL-ISOBARIC - NPT)

Ο αριθμός σωματιδίων ( $N$ ), η πίεση ( $P$ ) και η θερμοκρασία ( $T$ ) είναι σταθερά. Εκτός από θερμοστάτη, το σύστημα συνδέεται και με βαροστάτη ώστε η κατανομή να προσομοιάζει καλύτερα τις κανονικές πειραματικές συνθήκες.

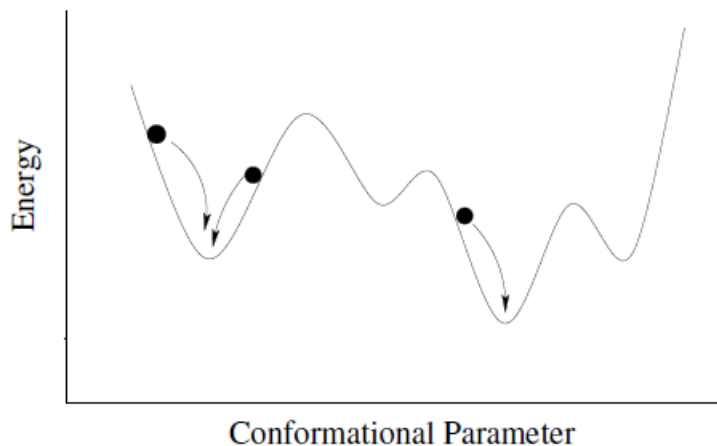
Ένα ακόμα θέμα που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι προκειμένου να αποφευχθούν τεχνητά οριακά φαινόμενα σε μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διεπιφανειών στα όρια του συστήματος με το περιβάλλον του, χρησιμοποιούνται *περιοδικές οριακές συνθήκες* (*periodic boundary conditions*). Έτσι, η μπροστά επιφάνεια του κουτιού προσομοίωσης είναι απολύτως ίδια με την πίσω, η δεξιά του απολύτως ίδια με την αριστερή του και η άνω του επιφάνεια απολύτως ίδια με την κάτω. Θεωρείται δηλαδή ότι το κουτί της προσομοίωσης είναι περιοδικά συνεχές, οπότε όταν ένα μόριο εγκαταλείπει το κεντρικό κουτί, τότε μια περιοδική του εικόνα εισέρχεται ακριβώς

από την απέναντι πλευρά. Κατά τις μετακινήσεις των μορίων, η αριθμητική πυκνότητα στο κεντρικό κουτί παραμένει σταθερή. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα άπειρο πλέγμα από κυβικά κουτιά, τα οποία «κλωνοποιούνται». Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.3, το κεντρικό κουτί είναι το μπλε από το οποίο κατασκευάζονται οκτώ κλώνοι του προς όλες τις κατευθύνσεις. Τα άτομα στα περιβάλλοντα εικονικά συστήματα αλληλεπιδρούν με τα άτομα στο πραγματικό σύστημα [58].



**Σχήμα 2.3** Διδιάστατη απεικόνιση του περιοδικού κουτιού που αντιπροσωπεύει τις περιοδικές οριακές συνθήκες που χρησιμοποιούνται σε μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής.

Τέλος, πριν ξεκινήσει μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής συνίσταται η ελαχιστοποίηση της ενέργειας (energy minimization) της επιλεγμένης αρχικής δομής, για την απομάκρυνση αλληλεπιδράσεων που τυχόν υπάρχουν στην δομή του βιομορίου, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν διαστρέβλωση της δομής. Το ενεργειακό διάγραμμα ενός βιομορίου χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο αριθμό ελαχίστων, που αντιστοιχούν σε ενδιαμέσες διαμορφώσεις του συστήματος. Έτσι, ο στόχος της ελαχιστοποίησης της δυναμικής ενέργειας του συστήματος είναι η εύρεση του τοπικού ελαχίστου της ενέργειας. (Σχήμα 2.4) Η ενέργεια σε αυτό το τοπικό ελάχιστο μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη από την ενέργεια στο ολικό ελάχιστο του συστήματος. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας «καταψύχει» τα άτομα του συστήματος στους 0 K. Οι γεωμετρίες του συστήματος που αντιστοιχούν στα σημεία τοπικού ελαχίστου υπολογίζονται μέσω αλγορίθμων ελαχιστοποίησης της επιφάνειας της ενέργειας. Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης είναι πολύ σημαντικοί για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής προκειμένου να βρεθεί μια δομή που να αντιστοιχεί στο τοπικό ελάχιστο προκειμένου να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις υψηλής ενέργειας [59].



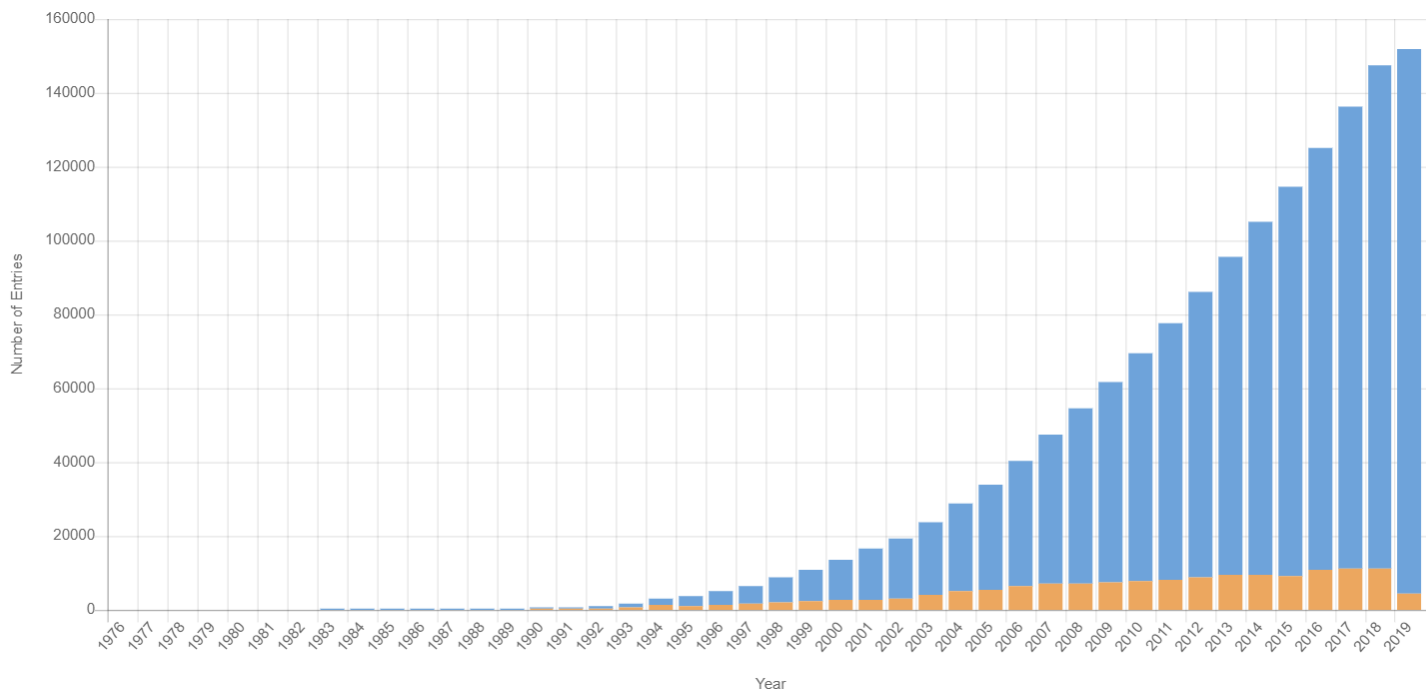
**Σχήμα 2.4** Απεικόνιση μιας μονοδιάστατης επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας στοχεύει στην εύρεση του κοντινότερου τοπικού ελαχίστου της ενέργειας. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [60].

Ωστόσο, η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ενός βιολογικού συστήματος απαιτεί τη χρήση αριθμητικών μεθόδων καθώς το σχήμα της επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας (*potential energy surface, PES*) δεν μπορεί να εκφραστεί από μία αναλυτική συνάρτηση. Με τη χρήση αριθμητικών μεθόδων που σταδιακά αλλάζουν τις συντεταγμένες, παράγονται διαμορφώσεις με φθίνουσες ενέργειες μέχρι να ικανοποιείται ένα κριτήριο σύγκλισης. Τέλος, σημειώνεται ότι κατά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας πρέπει να μελετηθούν με προσοχή η ταχύτητα σύγκλισης και οι απαιτήσεις σε μνήμη. Οι περισσότεροι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας μπορούν να εντοπίσουν μόνο το ελάχιστο που βρίσκεται πλησιέστερα στο σημείο εκκίνησης. Για να είναι εφικτός ο υπολογισμός περισσότερων ελαχίστα σε μία επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας, απαιτείται η επιλογή διαφορετικών σημείων εκκίνησης.

## 2.4 Σχεδιασμός φαρμάκων μέσω υπολογιστή με γνωστή τη δομή της πρωτεΐνης

Ο σχεδιασμός ενός καινοτόμου μορίου με φαρμακολογική δράση ενάντια σε έναν βιολογικό στόχο αποτελεί μια διαδικασία που απαιτεί τεράστια επένδυση χρόνου και χρημάτων. Εκτιμάται ότι για τη διάθεση ενός νέου φαρμάκου στην αγορά απαιτούνται 10-15 χρόνια κατά μέσο όρο. Ταυτόχρονα, ο ρυθμός αποτυχίας είναι υψηλός και οφείλεται κυρίως στην αποτυχία των φαρμάκων στο στάδιο των κλινικών δοκιμών ή στις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Σήμερα, για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων έχει υιοθετηθεί η μέθοδος που ονομάζεται High Throughput Screening (HTS), δηλαδή η πειραματική σάρωση μεγάλων χημειοθηκών ενάντια σε ένα φαρμακευτικό στόχο. Ωστόσο, παρά την καινοτομία αυτής της μεθόδου, ο προσδιορισμός φαρμάκων παραμένει χρονοβόρος και δαπανηρός. Προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία με πιο οικονομικά αποδοτικό τρόπο και να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό αποτυχίας, οι φαρμακοβιομηχανίες σήμερα έχουν στραφεί σε τεχνικές ανάπτυξης φαρμάκων με τη χρήση υπολογιστή (Computer- Aided Drug Design, CADD) [61].

Ταυτόχρονα, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αλματώδης πρόοδος στις τεχνολογίες για τον προσδιορισμό της δομής διαφόρων βιολογικών στόχων, όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). (Σχήμα 2.5) Έτσι, ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής διαφόρων βιολογικών μορίων έχει εδραιώσει μια μέθοδο που λέγεται *σχεδιασμός φαρμάκων με γνωστή την δομή του υποδοχέα (Structure- Based Drug Design, SBDD)*. Όπως μπορεί να υποθέσει κανείς από το όνομα της μεθόδου, είναι απαραίτητη η γνώση των 3D δομικών μοντέλων των στόχων (μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή άλλα βιομόρια), τα οποία λαμβάνονται από πειραματικά δεδομένα ή από μοντέλα ομολογίας. Το SBDD μπορεί έπειτα να απεικονίσει τη διαδικασία πρόσδεσης του μορίου στον στόχο και να προβλέψει τις κοιλότητες πρόσδεσης αλλά και τη συγγένεια μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό μορίων υψηλής συγγένειας με τον στόχο, που να περιέχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για επιθυμητά φαρμακολογικά και θεραπευτικά αποτελέσματα. Έτσι, το SBDD έχει αναδειχθεί ως το πιο πολλά υποσχόμενο υπολογιστικό εργαλείο για τη βιομηχανία φαρμάκων στο σχεδιασμό και την βελτιστοποίηση μορίων με φαρμακολογική δράση [62].



**Σχήμα 2.5** Ετήσια αύξηση δομών στην Protein Data Bank. (κίτρινες μπάρες: αριθμός δομών που εμφανίζονται ετησίως, μπλε μπάρες: συνολικός διαθέσιμος αριθμός) Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [52].

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων με γνωστή τη δομή της πρωτεΐνης είναι επαναληπτική και συχνά απαιτούνται πολλαπλοί κύκλοι προτού ένα μόριο φτάσει στη φάση I των κλινικών δοκιμών, όπου ελέγχεται σε υγιείς εθελοντές για την εύρεση κατάλληλης δοσολογίας. Ο πρώτος κύκλος περιλαμβάνει την επιλογή του φαρμακευτικού στόχου, δηλαδή της πρωτεΐνης, και τον προσδιορισμό της δομής της με μία από τις ακόλουθες μεθόδους: κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, NMR ή μοντελοποίηση ομολογίας. Έπειτα, με τη χρήση κατάλληλων αλγορίθμων, μία χημειοθήκη (εμπορικά

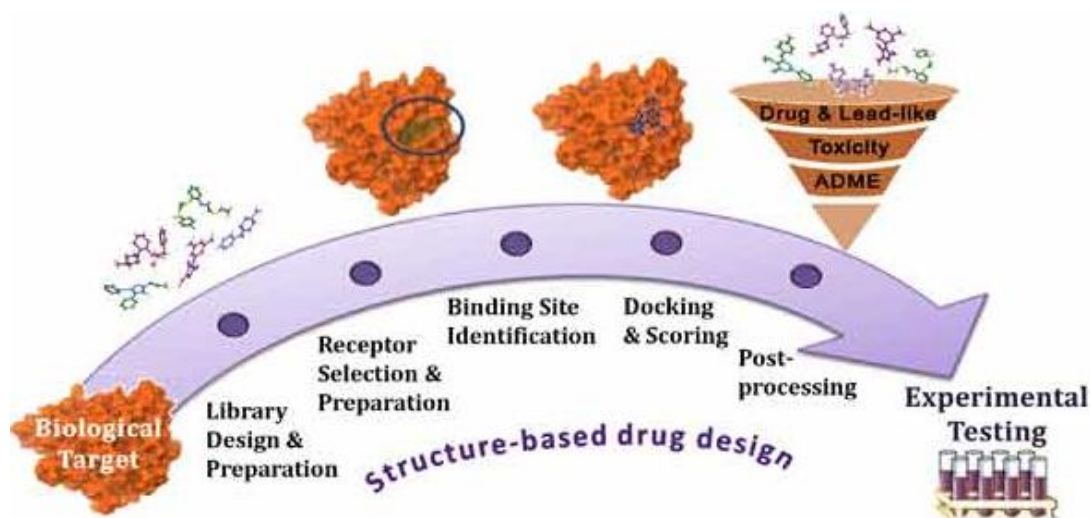


διαθέσιμων ή μη μορίων) σαρώνεται και τα ε τοποθετούνται σε επιλεγμένες θέσεις της πρωτεΐνης. Τα μόρια αυτά βαθμολογούνται και κατατάσσονται με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους με την πρωτεΐνη-στόχο και τα καλύτερα από αυτά ελέγχονται στη συνέχεια με βιοχημικές δοκιμές. Στο δεύτερο κύκλο, μόρια από τον πρώτο κύκλο που παρουσίασαν  $IC_{50}^1$  της τάξης των  $\mu M$  (μόρια οδηγού, lead compounds) επιλέγονται, και προσδιορίζεται η δομή τους σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη-στόχο. Η διαδικασία αυτή βοηθά στο να εντοπιστούν ποια στοιχεία του μορίου-οδηγού μπορούν να βελτιστοποιηθούν ώστε να παρουσιάσει μεγαλύτερη δραστικότητα. Οι επόμενοι κύκλοι περιλαμβάνουν τη σύνθεση του βελτιστοποιημένου μορίου, τον προσδιορισμό της δομής του νέου συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης και του βελτιστοποιημένου μορίου, καθώς και την επιπλέον βελτιστοποίηση του μορίου ώστε να βρεθούν μόρια με  $IC_{50}$  της τάξης των  $nM$  (lead optimization). Έπειτα από αρκετούς κύκλους, τα βελτιστοποιημένα μόρια εμφανίζουν μεγαλύτερη πρόσδεση και εξειδίκευση για την πρωτεΐνη-στόχο και μπορούν να προχωρήσουν στις κλινικές δοκιμές [63].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα επικεντρωθούμε στην εικονική σάρωση μιας χημειοθήκης εμπορικά διαθέσιμων μορίων για τη εύρεση πιθανών μορίων-αναστολέων της IL-33. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία *Virtual Screening* και η πορεία που ακολουθείται απεικονίζεται στο Σχήμα 2.6. Η εικονική σάρωση ξεκινά με την επεξεργασία της 3D δομής της πρωτεΐνης-στόχου. Υπάρχουν πολλά ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη σε αυτό το στάδιο όπως η επιλογή της θέσης πρόσδεσης του μορίου, την επιλογή της πιο κατάλληλης δομής της πρωτεΐνης, η ευελιξία της πρωτεΐνης να ενσωματώσει το μόριο, η αντιστοιχία των καταστάσεων πρωτονίωσης καθώς και η ύπαρξη μορίων νερού στη θέση πρόσδεσης. Μια ακόμα πτυχή για το *Virtual Screening* αποτελεί η προσεκτική επιλογή της χημειοθήκης μορίων ανάλογα με την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος. Το στάδιο αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς είναι απαραίτητο να αντιστοιχιστούν η κατάλληλη στοιχειομετρία και οι καταστάσεις ταυτομερίωσης και πρωτονίωσης [61]. Το στάδιο της προετοιμασίας της πρωτεΐνης θα εξηγηθεί διεξοδικά στην επόμενη ενότητα του κεφαλαίου.

---

<sup>1</sup> Το  $IC_{50}$  είναι το ποσοτικό μέτρο που δεικνύει την δραστικότητα μιας ουσίας και υποδηλώνει την ποσότητα της ουσίας η οποία είναι απαραίτητη για να προκαλέσει 50% αναστολή της δράσης ενός βιολογικού στόχου ή μιας βιολογικής λειτουργίας.



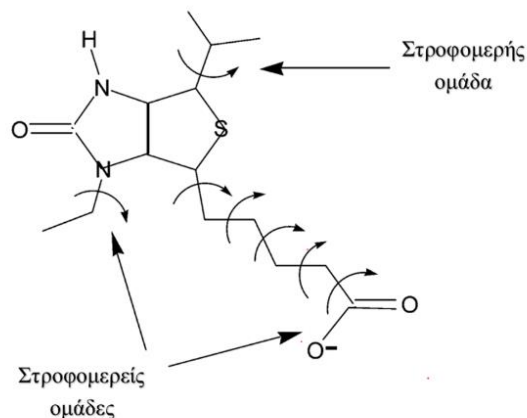
**Σχήμα 2.6** Μεθοδολογία που ακολουθείται στο Structure-Based Virtual Screening. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική αναφορά [61].

Μετά την προετοιμασία της πρωτεΐνης και της χημειοθήκης, κάθε μόριο στη χημειοθήκη προσδένεται εικονικά στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η πρόσδεση στοχεύει στην πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-μορίου με διερεύνηση των πιθανών διαμορφώσεων και προσανατολισμών του προσδέτη στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η μοντελοποίηση της μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιείται με λογισμικά τα οποία μπορούν να προβλέψουν, πέρα από τη δομή του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα, και την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, χρησιμοποιώντας εμπειρικές σχέσεις για την εκτίμησή της [63]. Αρχικά, στην πρωτεΐνη-στόχο δημιουργείται ένα πλέγμα που περιλαμβάνει την κοιλότητα πρόσδεσης και αναπαριστά το σχήμα και τις ιδιότητες της πρωτεΐνης σε εκείνο το σημείο. Οριοθετεί την περιοχή πρόσδεσης του αναστολέα μη επιτρέποντας την πρόσδεσή του σε κάποιο άλλο σημείο της πρωτεΐνης, μειώνοντας έτσι τον απαιτούμενο υπολογιστικό χρόνο. Ο ορισμός της κοιλότητας μπορεί να γίνει με την επιλογή των συντεταγμένων ενός σημείου που ανήκει στην κοιλότητα, αλλά και με την επιλογή ενός συν-κρυσταλλωμένου προσδέτη εάν αυτός είναι γνωστός. Έτσι, δημιουργείται το πλέγμα, ένας κύβος δηλαδή που έχει μια συγκεκριμένη απόσταση από το σημείο εντός της κοιλότητας που έχει οριστεί. Η απόσταση αυτή μπορεί να επιλεγεί από εμάς, ανάλογα με το μέγεθος της κοιλότητας της πρωτεΐνης-στόχου.

Τα λογισμικά μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιούν μια σειρά από ιεραρχικά κριτήρια για την αναζήτηση ανάμεσα σε πιθανές διαμορφώσεις και προσανατολισμούς ενός προσδέτη στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, ένα σύνολο αποτελούμενο από διαφορετικές διαμορφώσεις του μορίου σαρώνεται στον χώρο που έχει οριστεί από το πλέγμα. Αυτό γίνεται για να βρεθούν οι πιο πιθανές πόζες<sup>2</sup> (poses) του προσδέτη. Κάθε μόριο αποτελείται από τον κορμό και από έναν αριθμό στροφομερών ομάδων. (Σχήμα 2.7) Στον κορμό του μορίου ανήκει ό,τι απομένει όταν από κάθε «άκρο» του μορίου

<sup>2</sup> Ως πόζα ορίζεται ο πλήρης προσδιορισμός του προσδέτη, δηλαδή προσδιορισμός της θέσης του και του προσανατολισμού του σε σχέση με την πρωτεΐνη, αλλά και τη διαμόρφωση του κορμού (core) του και των στροφομερών ομάδων του (rotamer groups).

αποκόβεται ο τελευταίος περιστροφικός δεσμός, ενώ οι στροφομερείς ομάδες είναι τα «άκρα» του μορίου τα οποία μπορούν να κάνουν πλήρη περιστροφική κίνηση.



**Σχήμα 2.7** Απεικόνιση του κορμού και των στροφομερών ομάδων ενός μορίου. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [64] και μεταφράστηκε στα ελληνικά.

Ένας βασικός αλγόριθμος για την μοριακή πρόσδεση συνοψίζεται στα ακόλουθα οκτώ βήματα (Σχήμα 2.8):

1<sup>ο</sup> βήμα: Έλεγχος όλων των διαμορφωτικών καταστάσεων του μορίου μέσω μιας μεθόδου που απορρίπτει διαμορφώσεις μη κατάλληλες για πρόσδεση σε έναν υποδοχέα, όπως δεσμοί υδρογόνου μεταξύ απομακρυσμένων ατόμων του προσδέτη καθώς και διαμορφωμερή υψηλής ενέργειας.

2<sup>ο</sup> βήμα: Αναζήτηση των πιθανών θέσεων και των προσανατολισμών κάθε διαμόρφωσης του μορίου στην κοιλότητα πρόσδεσης. Η αναζήτηση ξεκινά με επιλογή συγκεκριμένων σημείων εντός της κοιλότητας, των οποίων οι αποστάσεις από τη επιφάνεια της πρωτεΐνης προς προκαθορισμένες διευθύνσεις, συγκρίνονται με τις αντίστοιχες αποστάσεις του κέντρου του προσδέτη από την επιφάνεια αυτού. Αν για κάθε ένα σημείο, οι αποστάσεις από την επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι ανάλογες με αυτές του κέντρου του προσδέτη από την επιφάνεια αυτού, τότε το κέντρο του προσδέτη τοποθετείται στο σημείο αυτό. Αλλιώς παραλείπεται και προχωράει στο επόμενο σημείο.

3<sup>ο</sup> βήμα: Τοποθέτηση των ατόμων που βρίσκονται εντός μιας προκαθορισμένης απόστασης από τη «διάμετρο» του προσδέτη, για κάποιους πιθανούς προσανατολισμούς της «διαμέτρου». Αν υπάρχουν πολλές στερεοχημικές παρεμποδίσεις με τον υποδοχέα τότε ο εκάστοτε προσανατολισμός απορρίπτεται.

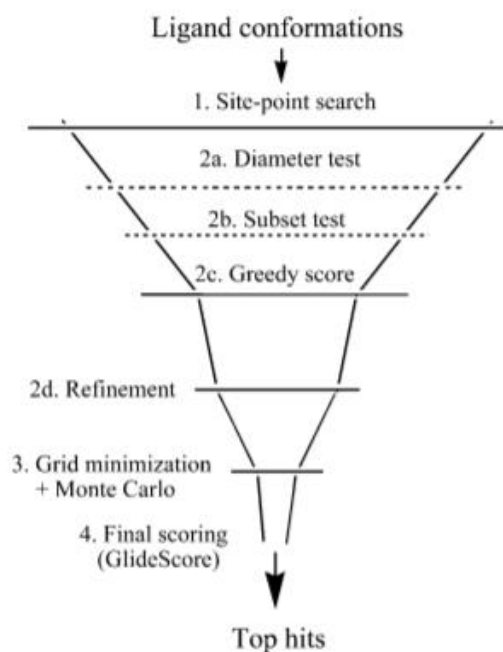
4<sup>ο</sup> βήμα: Το μόριο περιστρέφεται γύρω από τη «διάμετρο» του και για κάθε προσανατολισμό, μετράται το υποσύνολο των ατόμων ικανών να κάνουν δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις με μέταλλα μέσω μιας συνάρτησης.

5<sup>ο</sup> βήμα: Αν η τιμή της συνάρτησης είναι καλή για έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό, τότε εφαρμόζεται η ίδια συνάρτηση για όλες τις αλληλεπιδράσεις.

6<sup>ο</sup> βήμα: Διαδικασία βελτιστοποίησης κατά την οποία το μόριο στο σύνολό του αφήνεται άκαμπτα να κινηθεί κατά  $\pm 1 \text{ \AA}$  στον Καρτεσιανό χώρο.

7° βήμα: Ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου με τη βοήθεια μιας πρότυπης συνάρτησης ενέργειας της μοριακής μηχανικής σε σύζευξη με ένα διηλεκτρικό μοντέλο. Οι πόζες με την ελάχιστη ενέργεια επιλέγονται και μία Monte Carlo διαδικασία εφαρμόζεται σε αυτές, η οποία εξερευνά ενδεχόμενα κοντινά ελάχιστα.

8° βήμα: Το Glide για παράδειγμα, χρησιμοποιεί για την επιλογή των καλύτερων ενεργειακά διαμορφώσεων του μορίου, ένα συνδυασμό της συνάρτησης GlideScore, της ενέργειας αλληλεπίδρασης προσδέτη – υποδοχέα με βάση τη μοριακή μηχανική και της ενέργειας τάσης του προσδέτη. Ο συνδυασμός αυτός συνθέτει τη συνάρτηση Emodel.



**Σχήμα 2.8** Σειρά ιεραρχικών κριτηρίων για την εύρεση των πιθανών διαμορφώσεων και προσανατολισμών ενός μορίου στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [64].

Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μια συνάρτηση για την εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε κάθε πόζα του προσδέτη. Το Glide για παράδειγμα χρησιμοποιεί την εμπειρική συνάρτηση GlideScore για την πρόβλεψη της συγγένειας πρόσδεσης μεταξύ μορίου- πρωτεΐνη. Η συνάρτηση αυτή προκύπτει ως το άθροισμα των συνεισφορών όλων των αλληλεπιδράσεων στη δυναμική ενέργεια και δίνεται από τη σχέση:

$$\begin{aligned} \Delta G_{bind} = & C_{lipo-lipo} \sum f(r_{lr}) + \\ & C_{hbond-neut-neut} \sum g(\Delta r) h(\Delta\alpha) + \\ & C_{hbond-neut-charged} \sum g(\Delta r) h(\Delta\alpha) + \\ & C_{hbond-charged-charged} \sum g(\Delta r) h(\Delta\alpha) + \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& C_{max-metal-ion} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb} H_{rotb} + \\
& C_{polar-phob} + V_{polar-phob} + C_{coul} E_{coul} + \\
& C_{vdw} E_{vdw} + \text{solvation terms}
\end{aligned}
\tag{2.5}$$

Η Εξίσωση 2.5 αποτελεί τη συνάρτηση Standard Precision (SP) GlideScore. [64] Σημειώνεται ότι υπάρχει και η συνάρτηση Extra Precision (XP) με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί μια πιο σύνθετη διαδικασία επιλογής της καλύτερης πόζας ενός προσδέτη. Σε αρκετές περιπτώσεις η XP συνάρτηση θεωρείται ακριβέστερη από την SP, ωστόσο η άμεση σύγκρισή τους δεν είναι δυνατή λόγω των σημαντικών διαφορών που παρουσιάζουν [65].

Τέλος προκύπτει μια ταξινόμηση ενώσεων τα οποία επεξεργάζονται περαιτέρω με εξέταση των υπολογισμένων ποσοτών πρόσδεσης, την εγκυρότητα των παραχθεισών ποζών, την ύπαρξη ανεπιθύμητων τοξικών ικριωμάτων, επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Η επεξεργασία αυτή οδηγεί σε μικρό αριθμό επιλεγμένων ενώσεων, οι οποίες προχωρούν σε πειραματική ανάλυση [61].

## 2.5 Προετοιμασία της δομής της πρωτεΐνης για προσομοίωση

Για μία επιτυχημένη εικονική σάρωση, αλλά και γενικά για οποιονδήποτε υπολογισμό Μοριακής Μοντελοποίησης, είναι απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη της σωστής δομής της πρωτεΐνης- στόχου. Υπενθυμίζεται ότι στην Protein Data Bank (PDB) υπάρχουν καταχωρημένες δομές πρωτεϊνών που έχουν προέλθει από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ή φασματοσκοπία σκέδασης νετρονίων [52]. Ωστόσο, οι δομές αυτές δεν μπορούν να αξιοποιηθούν απευθείας λόγω αρκετών ελλείψεων και αποκλίσεων που παρουσιάζουν από την πραγματική δομή.

Αρχικά, σε μία δομή που έχει προέλθει από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, απουσιάζουν τα υδρογόνα. Αυτό συμβαίνει καθώς οι κρυσταλλικές δομές προσδιορίζονται με περίθλαση των ακτίνων Χ κατά την οποία μετράται η πυκνότητα των ηλεκτρονίων. Όσο βαρύτερο είναι ένα άτομο, τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έχει και τόσο ισχυρότερη είναι η συμβολή του στην περίθλαση. Το ελαφρύτερο άτομο είναι το υδρογόνο, με ένα μόνο ηλεκτρόνιο που εντοπίζεται μακριά από τον πυρήνα. Επομένως, τα άτομα υδρογόνου είναι δύσκολα ανιχνεύσιμα με τη μέθοδο της περίθλασης ακτίνων Χ και πρέπει να προστεθούν στην εκάστοτε πρωτεΐνη.

Πολλές φορές μια κρυσταλλογραφημένη πρωτεϊνική δομή περιέχει επιπλέον μόρια νερού, ιόντα μετάλλων, μικρά οργανικά μόρια ή ακόμα και ολόκληρες πρωτεϊνικές υπομονάδες. Αυτά τα επιπλέον στοιχεία αποκλίνουν από την πραγματική δομή της πρωτεΐνης που μελετάται και πρέπει να αφαιρεθούν. Σημειώνεται ωστόσο ότι σε κάποιες περιπτώσεις η ύπαρξη κάποιου «ξένου» στοιχείου για τη πρωτεΐνη προσφέρει αρκετές χρήσιμες πληροφορίες, όπως στην περίπτωση ύπαρξης μορίων νερού στην πρωτεϊνική δομή. Κατά κανόνα όμως πρέπει να απομακρύνονται από την δομή της πρωτεΐνης. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις η πρωτεΐνη βρίσκεται σε σύμπλοκο με το κρυσταλλικό της ταίρι και καθίσταται απαραίτητη η απομόνωσή της.

Επιπρόσθετα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους δεσμούς μεταξύ ατόμων, τα τοπολογικά χαρακτηριστικά της δομής και τα φορτία των ατόμων. Ορισμένα τερματικά αμινικά άκρα καθώς και αμινοξέα ασπαραγίνης μπορεί να είναι λάθος κατανεμημένα καθώς η κρυσταλλογραφία συχνά αδυνατεί να διακρίνει ξεκάθαρα το O και το NH<sub>2</sub>. Η προσθήκη αυτών των ελλείψεων είναι εύκολη για την περίπτωση των αμινοξέων, ωστόσο για μόρια όπως οι προσδέτες, είναι μια διαδικασία πιο περίπλοκη και απαιτεί την προσθήκη τους από τον χρήστη.

Από τις δομές συχνές απουσιάζουν οι σωστές καταστάσεις πρωτονίωσης και ταυτομέρειας των συν-κρυσταλλομένων μορίων. Πιο συγκεκριμένα, είναι απαραίτητο να προβλεφθούν οι καταστάσεις πρωτονίωσης αμινοξέων όπως η ιστιδίνη, το ασπαραγικό οξύ και το γλουταμινικό οξύ αλλά και τα ταυτομερή της ιστιδίνης. Επίσης, συνήθως παρατηρούνται στερεοχημικές παρεμποδίσεις μεταξύ κάποιων ατόμων με αποτέλεσμα να απαιτείται η διόρθωση της κρυσταλλικής δομής.

Σε πολλές πρωτεϊνικές δομές έχει παρατηρηθεί η έλλειψη ορισμένων πλευρικών αλυσίδων ή και ολόκληρων θηλιών της δευτεροταγούς δομής τους. Αυτό συμβαίνει καθώς είναι τα πιο ευκίνητα τμήματα της πρωτεΐνης και δεν μπορούν να εντοπισθούν οι ατομικές τους συντεταγμένες από την κρυσταλλογραφία. Η συμπλήρωση των πλευρικών αλυσίδων είναι σημαντική καθώς ένα μόριο μπορεί να αλληλεπιδρά με αυτές, και η προσθήκη των θηλιών είναι αναγκαία διότι αποτελούν σημαντικό κομμάτι της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης και δεν πρέπει να παραλείπονται [61] [62].

Τέλος, συνίσταται η ελαχιστοποίηση της ενέργειας των δομών για να βρεθούν σε ενεργειακά ευνοϊκή κατάσταση. Αυτό το βήμα διορθώνει λάθη όπως ατομικές αλληλεπικαλύψεις και λανθασμένες θέσεις πλευρικών αλυσίδων. Αναζητά το μονοπάτι που δίνει τη μεγαλύτερη μείωση στη συνολική ενέργεια του συστήματος σε ευνοϊκότερες καταστάσεις. Σημειώνεται ότι αναζητείται το τοπικό ενεργειακό ελάχιστο, μεταβάλλοντας συνεχώς τις θέσεις των ατόμων και υπολογίζοντας την ενέργεια του συστήματος [59].

## 2.6 Αναγνώριση κοιλοτήτων πρόσδεσης στην πρωτεΐνη

Η θέση πρόσδεσης ενός μορίου σε μία πρωτεΐνη είναι συνήθως γνωστή από την δομή του συμπλόκου της πρωτεΐνης συν-κρυσταλλωμένη με το μόριο. Σε μερικές περιπτώσεις ωστόσο, η θέση πρόσδεσης δεν είναι γνωστή εκ των προτέρων, παρόλο που η δομή της πρωτεΐνης- στόχου είναι διαθέσιμη. Σε αυτό έρχονται να συμβάλλουν οι υπολογιστικές μέθοδοι, οι οποίες υποδεικνύουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης και προβλέπουν ακόμα και την ισχύ της πρόσδεσης του μορίου στην πρωτεΐνη.

Ιδανικά, η θέση πρόσδεσης είναι μία κοιλότητα που περιέχει ποικιλία από πιθανούς δότες και δέκτες ηλεκτρονίων για να συμμετάσχουν σε δεσμούς υδρογόνου, αλλά και υδρόφοβα χαρακτηριστικά. Σήμερα, υπάρχουν τέσσερις διαθέσιμες προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση πιθανών θέσεων πρόσδεσης σε μια πρωτεΐνη. Αρχικά, υπάρχει η *Στατική προσέγγιση*, όπου πραγματοποιείται υπολογιστική χαρτογράφηση με χημικούς ανιχνευτές (μικρά οργανικά μόρια) για την αναγνώριση θέσεων σε μια 3D δομή. Έπειτα, η *Δυναμική προσέγγιση* κατά την οποία οι ανιχνευτές και η πρωτεΐνη εξελίσσονται δυναμικά με την πάροδο του χρόνου. Η ανάλυση τέτοιων προσομοιώσεων παρέχει άμεση πρόσβαση στις ελεύθερες ενέργειες αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης και του μικρού μορίου ανιχνευτή, οι

οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη θέσεων πρόσδεσης που θα προσφέρουν τη μέγιστη συγγένεια μεταξύ πρωτεΐνης και μορίου. Τρίτον, στην *μεικτή προσέγγιση*, η ανίχνευση θέσεων πρόσδεσης πραγματοποιείται με έναν χημικό ανιχνευτή όπως στην στατική προσέγγιση και επιπλέον, η υποθετική θέση πρόσδεσης αξιολογείται από τη σκοπιά της ευελιξίας. Η ευελιξία μπορεί να καθοριστεί με τη διεξαγωγή ανάλυσης Κανονικών Δονήσεων ή με την αναγνώριση ευέλικτων αμινοξέων εντός της θέσης πρόσδεσης και ανίχνευση εναλλακτικών διαμορφώσεων καταλοίπων χρησιμοποιώντας χημειοθήκη στροφομερών. Τέλος, υπάρχει μία ακόμα προσέγγιση που χρησιμοποιεί το *νερό ως ανιχνευτή* για τον εντοπισμό υποθετικών δεσμευτικών θέσεων στις πρωτεΐνες [61].

Ένας υπολογισμός με βάση τη στατική προσέγγιση, ξεκινά με την αναζήτηση μίας ή περισσότερων περιοχών πάνω ή κοντά της επιφάνειας πρωτεΐνης, οι οποίες πιθανόν να είναι κατάλληλες για πρόσδεση ενός μορίου. Κατά την αναζήτηση αυτή, δημιουργείται ένα πλέγμα σημείων και χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης. Αυτό το πρώτο βήμα, όσο απλό και αν ακούγεται, κρύβει από πίσω έναν αλγόριθμο που πραγματοποιεί τη διαδικασία προσδιορισμού θέσεων πρόσδεσης σε αρκετά βήματα. Πιο αναλυτικά, το πρώτο βήμα είναι η ταξινόμηση των σημείων σε «εσωτερικά» και «εξωτερικά» σε σχέση με την πρωτεΐνη με βάση την απόστασή τους από τα κοντινά άτομα της πρωτεΐνης. Στο δεύτερο στάδιο, τα «εξωτερικά» σημεία ελέγχονται για να διαπιστωθεί ποια από αυτά εμφανίζουν καλές van der Waals αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη και ποια περιβάλλονται ικανοποιητικά από την πρωτεΐνη. Τα σημεία που πληρούν και τα δύο κριτήρια προστίθενται στη λίστα με τα επιλεγμένα σημεία πρόσδεσης. Το τρίτο βήμα, ομαδοποιεί τα σημεία πρόσδεσης ανάλογα με την μεταξύ τους απόσταση και το τελικό βήμα συγχωνεύει τις ομάδες των σημείων όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι σχετικά μικρή και αντιστοιχεί σε μια περιοχή που εκτίθεται στο διαλύτη.

Στο δεύτερο στάδιο ενός υπολογισμού, παράγονται *χάρτες* των θέσεων πρόσδεσης (*maps*), που αποτελούνται από υδρόφοβες, υδρόφιλες περιοχές και περιοχές μικτού χαρακτήρα. Οι υδρόφοβοι χάρτες είναι περιοχές ευνοϊκές για την πρόσδεση μορίων με υδρόφοβες ομάδες. Οι υδρόφιλοι χάρτες αντίθετα, είναι περιοχές ευνοϊκές για την πρόσδεση μορίων με υδρόφιλες ομάδες και χωρίζονται περαιτέρω σε περιοχές δότη, δέκτη ηλεκτρονίων και σε περιοχές δέσμευσης μετάλλων. Τέλος, οι μικτοί χάρτες αποτελούνται από περιοχές που βρίσκονται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης, αλλά δεν αναγνωρίζονται ούτε ως υδρόφοβες ούτε ως υδρόφιλες.

Έπειτα, το στάδιο αξιολόγησης των θέσεων πρόσδεσης, το οποίο ολοκληρώνει τον υπολογισμό, αξιολογεί κάθε θέση, υπολογίζοντας διάφορες ιδιότητες που την χαρακτηρίζουν. Για παράδειγμα, ένα πρόγραμμα της σουίτας Schrödinger, το SiteMap [66] χρησιμοποιεί κάποιες από τις ιδιότητες που περιγράφονται παρακάτω.

Αρχικά, ίσως η πιο σημαντική ιδιότητα είναι το *SiteScore*, το οποίο υπολογίζεται ως το σταθμισμένο άθροισμα των παρακάτω όρων:

$$\text{SiteScore} = 0.0733 \sqrt{n} + 0.6688 e - 0.20 p \quad [2.6]$$

όπου,  $n$  είναι ο αριθμός των site points,  $e$  είναι το ποσοστό εγκλεισμού (enclosure score), και  $p$  είναι το ποσοστό υδροφιλικότητας. Μία περιοχή με τιμή SiteScore μεγαλύτερη της μονάδας είναι πολύ πιθανόν να μπορεί να λειτουργήσει ως θέση πρόσδεσης ενός μορίου.

Μία παρόμοια ιδιότητα είναι το *DScore*, που όπως φαίνεται και από την Εξίσωση 2.7 εμπεριέχει τους ίδιους όρους με το *SiteScore*, αλλά διαφορετικούς συντελεστές και χρησιμοποιείται προκειμένου να αξιολογήσει ένα μόριο σχετικά με την ικανότητά του παρουσιάσει φαρμακολογική δράση.

$$DScore = 0.094 \sqrt{n} + 0.60 e - 0.324 p \quad [2.7]$$

Τέλος, δύο μεγέθη που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση μιας θέσης πρόσδεσης είναι το *ποσοστό έκθεσης (exposure)* και το *ποσοστό εγκλεισμού (enclosure)*, τα οποία παρέχουν διαφορετικά μέτρα σχετικά με το πόσο ανοιχτή είναι μια θέση πρόσδεσης στο διαλύτη. Μια ανοιχτή περιοχή, επιτρέπει την προσθήκη πολλών περισσότερων site points, δίνοντας ένα υψηλό ποσοστό έκθεσης. Έτσι, όσο χαμηλότερο είναι αυτό το ποσοστό, τόσο το καλύτερο, με το μέσο όρο για θέσεις που παρουσιάζουν «σφιχτή» πρόσδεση με το μόριο να είναι 0.49. Όσον αφορά στο μέτρο εγκλεισμού της θέσης πρόσδεσης, τα υψηλότερα ποσοστά είναι καλύτερα, με το μέσο όρο σε αυτή την περίπτωση να ανέρχεται στο 0.78 [67].

## 2.7 Πρόβλεψη αλλοστερικών δικτύων πρωτεϊνών μέσω προσομοιώσεων

Σήμερα, έχει αποδειχτεί ότι η γνώση της δομής των πρωτεϊνών δεν είναι αρκετή για την πλήρη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις βιολογικές λειτουργίες. Είναι απαραίτητο να βρεθεί μία σύνδεση μεταξύ δομής και λειτουργίας και αυτό επιτυγχάνεται με τη μελέτη της δυναμικής των πρωτεϊνών. Έτσι, από την αλληλουχία των αμινοξέων περνάμε στη δομή, από τη δομή στη δυναμική και τελικά στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η μελέτη της δυναμικής των πρωτεϊνών εκτός των άλλων, προσφέρει τη δυνατότητα να εστιάσουμε στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και να ανακαλύψουμε τα μονοπάτια που συνδέουν τα διάφορα σημεία στην πρωτεΐνη. Αυτό βρίσκει άμεση εφαρμογή στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων, και συγκεκριμένα στην αναζήτηση αλλοστερικών κοιλοτήτων για την πρόσδεση φαρμάκων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιούνται δύο αναλύσεις για τη μελέτη της δυναμικής της IL-33, Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων και Ανάλυση Δυναμικής Δικτύων, στην προσπάθεια πρόβλεψης αλλοστερικών δικτύων. Παρακάτω θα παρουσιαστούν εν συντομία οι βασικές αρχές πίσω από αυτές τις δύο μεθόδους.

### 2.7.1 Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων σε πρωτεΐνες

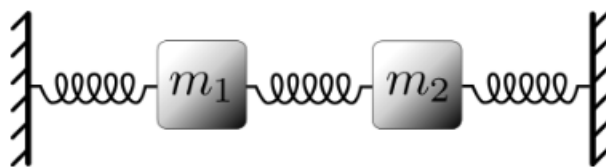
Η *Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων (Normal Mode Analysis, NMA)* είναι μία μέθοδος που μελετά τις δονήσεις ενός μορίου και βασίζεται στις αρχές της Κβαντικής Μηχανικής. Για την περιγραφή της δόνησης ενός μορίου, η Κβαντική Μηχανική χρησιμοποιεί μία αρκετά ρεαλιστική θεωρία. Σύμφωνα με αυτήν όλα τα άτομα ενός μορίου δονούνται με τέτοιο τρόπο ώστε οι αποστάσεις μεταξύ τους και οι εσωτερικές γωνίες που σχηματίζονται να μεταβάλλονται περιοδικά, χωρίς ωστόσο να προκαλείται κάποια μετατόπιση στο κέντρο μάζας του μορίου (μεταφορική κίνηση), ούτε να εισάγεται κάποια στροφορμή στο μόριο (περιστροφική κίνηση). Αυτή η συνολική κίνηση του δονούμενου μορίου μπορεί να αναλυθεί σε ένα γραμμικό συνδυασμό βασικών δονήσεων οι οποίες καλούνται *κανονικές δονήσεις (normal vibrations)* ή *κανονικοί τρόποι δόνησης (normal modes of vibration)* του μορίου. Μια κανονική δόνηση ενός ταλαντούμενου συστήματος είναι ένα μοτίβο κίνησης στο οποίο όλα τα μέρη του συστήματος



κινούνται ημιτονοειδώς, με την ίδια συχνότητα και σε φάση. Η ελεύθερη κίνηση που περιγράφεται από τις κανονικές δονήσεις πραγματοποιείται στις σταθερές συχνότητες. Αυτές οι σταθερές συχνότητες των κανονικών δονήσεων ενός συστήματος είναι γνωστές ως *φυσικές συχνότητες ή συχνότητες συντονισμού*. Ένα φυσικό αντικείμενο, όπως ένα κτίριο, μια γέφυρα ή μία πρωτεΐνη στη δική μας περίπτωση, έχει ένα σύνολο κανονικών δονήσεων και τις φυσικές τους συχνότητες που εξαρτώνται από τη δομή, τα υλικά και τις οριακές συνθήκες του. Επομένως, η συνολική δόνηση ενός μορίου δεν είναι παρά μια υπέρθεση των κανονικών τρόπων δόνησης του. Οι τρόποι δόνησης ονομάζονται κανονικοί με την έννοια ότι μπορούν να κινούνται ανεξάρτητα, δηλαδή ότι η διέγερση ενός τρόπου δόνησης δεν θα προκαλέσει ποτέ την κίνηση ενός διαφορετικού τρόπου δόνησης. Τέλος, κάθε κανονικός τρόπος δόνησης έχει τη δική του χαρακτηριστική συχνότητα, η οποία καλείται *ιδιοτιμή*, και τη χαρακτηριστική του κατεύθυνση δόνησης, το *ιδιοδιάνυσμα* [68].

Το πλήθος των κανονικών τρόπων δόνησης που περιγράφουν τη συνολική δόνηση ενός μορίου αποτελούμενου από  $N$  άτομα, μπορεί να προσδιορισθεί εύκολα. Όπως είναι γνωστό, το πλήθος των συντεταγμένων οι οποίες απαιτούνται για να καθορισθούν οι θέσεις των  $N$  ατόμων είναι 3 και συνεπώς το πλήθος των βαθμών ελευθερίας του μορίου είναι  $3N$ . Αυτοί αντιστοιχούν στις τρεις κινήσεις των ατόμων, μεταφορική, περιστροφική και δονητική. Από αυτές τις  $3N$  συντεταγμένες (βαθμοί ελευθερίας) οι τρεις απαιτούνται για να καθορισθεί η θέση του κέντρου μάζας του μορίου και κατά συνέπεια η μεταφορική του κίνηση κατά τους καρτεσιανούς άξονες  $x$ ,  $y$  και  $z$ . Επίσης, άλλοι τρεις βαθμοί ελευθερίας απαιτούνται για την περιγραφή της περιστροφικής κίνησης του μορίου γύρω από τους άξονες  $x$ ,  $y$  και  $z$ . Έτσι, μόνο  $3N-6$  βαθμοί ελευθερίας αφορούν τις κινήσεις δόνησης του μορίου και συνεπώς το πλήθος των κανονικών τρόπων δόνησης του είναι  $3N-6$ . Ωστόσο, για την περιγραφή της περιστροφικής κίνησης ενός γραμμικού μορίου απαιτούνται μόνο δύο συντεταγμένες (βαθμοί ελευθερίας) και έτσι οι κανονικοί τρόποι δόνησης τους είναι  $3N-5$ , αφού δε νοείται περιστροφική κίνηση περί τον έναν άξονα ο οποίος διατρέχει κατά μήκος το μόριο [69].

Για την εξαγωγή των κανονικών δονήσεων ενός μορίου με τη χρήση μαθηματικών, εφαρμόζεται η προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή. Συγκεκριμένα, θεωρούνται δύο ίδιες μάζες, ενωμένες μεταξύ τους και με τα άκρα του ταλαντωτή με ελατήρια, σχηματίζοντας ένα συμμετρικό σύστημα. (Σχήμα 2.9) Οι μάζες αυτές αντιστοιχούν σε δύο άτομα ενός μορίου και τα ελατήρια αντιπροσωπεύουν τους δεσμούς μεταξύ των ατόμων.



**Σχήμα 2.9** Αρμονικός ταλαντωτής. Οι δύο μάζες είναι ίσες και ενώνονται με ελατήρια. Τα άκρα των δύο ελατηρίων που είναι σε επαφή με τον τοίχο είναι σταθερά και δεν μπορούν να μετακινηθούν.

Η οριζόντια μετατόπιση της κάθε μάζας συμβολίζεται με  $x_1(t)$  και  $x_2(t)$  αντίστοιχα. Συμβολίζοντας την επιτάχυνση ως  $\ddot{x}$ , δηλαδή ως τη δεύτερη παράγωγο του  $x(t)$ , προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις κίνησης:

$$m\ddot{x}_1 = -kx_1 + k(x_2 - x_1) \quad [2.8]$$

$$m\ddot{x}_2 = -kx_2 + k(x_1 - x_2) \quad [2.9]$$

Επίσης, για την ταλαντωτική κίνηση των κανονικών δονήσεων, ισχύουν οι ακόλουθες εξισώσεις, στις οποίες το  $\omega$  είναι το ίδιο και για τις δύο μάζες:

$$x_1(t) = A_1 e^{i\omega t} \quad [2.10]$$

$$x_2(t) = A_2 e^{i\omega t} \quad [2.11]$$

Η αντικατάσταση των Εξισώσεων 2.10 και 2.11 στις εξισώσεις κίνησης δίνει το εξής αποτέλεσμα:

$$-\omega^2 m A_1 e^{i\omega t} = -2k A_1 e^{i\omega t} + k A_2 e^{i\omega t} \quad [2.12]$$

$$-\omega^2 m A_2 e^{i\omega t} = k A_1 e^{i\omega t} - 2k A_2 e^{i\omega t} \quad [2.13]$$

Παρατηρείται ότι ο εκθετικός παράγοντας είναι κοινός σε όλους τους όρους, επομένως μπορεί να παραληφθεί και να προκύψει:

$$(\omega^2 m - 2k)A_1 + kA_2 = 0 \quad [2.14]$$

$$kA_1 + (\omega^2 m - 2k)A_2 = 0 \quad [2.15]$$

Ο συνδυασμός των Εξισώσεων 2.14 και 2.15 μπορεί να γραφεί και ως πίνακας:

$$\begin{bmatrix} \omega^2 m - 2k & k \\ k & \omega^2 m - 2k \end{bmatrix} \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \end{pmatrix} = 0 \quad [2.16]$$

Γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η ορίζουσα της Εξίσωσης 2.16 πρέπει να ισούται με 0, δηλαδή να ισχύει η Εξίσωση 2.17:

$$(\omega^2 m - 2k)^2 - k^2 = 0 \quad [2.17]$$

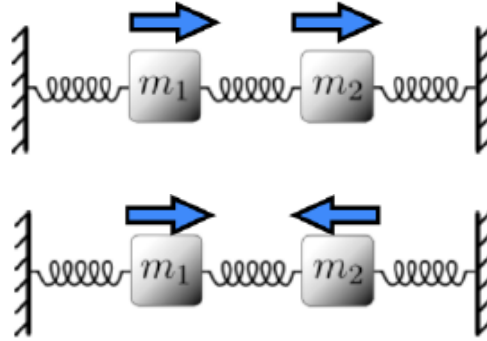
Η λύση της Εξίσωσης 2.17 ως προς  $\omega$ , δίνει δύο θετικές ρίζες:

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad [2.18]$$

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{3k}{m}} \quad [2.19]$$

Αντικαθιστώντας την ρίζα  $\omega_1$  στην Εξίσωση 2.16 και λύνοντας ως προς  $(A_1, A_2)$  παίρνουμε το διάνυσμα  $(1, 1)$ , ενώ αντικαθιστώντας την ρίζα  $\omega_2$  παίρνουμε το διάνυσμα  $(1, -1)$ . Τα διανύσματα αυτά είναι τα ιδιοδιανύσματα και οι συχνότητες  $\omega$  είναι οι ιδιοτιμές.

Συνεπώς, η πρώτη κανονική δόνηση είναι η  $(1, 1)$  που αντιστοιχεί στις δύο μάζες να κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση την ίδια χρονική στιγμή και ονομάζεται αντι-συμμετρική. Η δεύτερη κανονική δόνηση είναι η  $(1, -1)$  που αντιστοιχεί στις δύο μάζες να κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις ενώ το κέντρο μάζας παραμένει σταθερό και ονομάζεται συμμετρική. (Σχήμα 2.10)



**Σχήμα 2.10** Οι δύο κανονικές δονήσεις ενός συστήματος δύο μαζών

Η Ανάλυση των Κανονικών Δονήσεων αξιοποιεί την προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή για τη μελέτη της δονητικής κίνηση ενός αρμονικά ταλαντευόμενου συστήματος κοντά στην ισορροπία του. Εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στη μελέτη της δυναμικής των πρωτεϊνών και βασίζεται στην υπόθεση ότι οι κανονικές δονήσεις που εμφανίζουν τις χαμηλότερες συχνότητες, αντιστοιχούν στις μεγαλύτερες κινήσεις σε μια πρωτεΐνη και πιθανόν να αποτελούν λειτουργικές περιοχές. Η μέθοδος αυτή, προσπαθεί να επιλύσει την Εξίσωση 2.20 για όλα τα άτομα που απαρτίζουν μια πρωτεΐνη.

$$-\omega^2 mx = -kx \quad [2.20]$$

Στο πλαίσιο αυτό, η σταθερά  $k$  ορίζεται ως η δεύτερη παράγωγος της δυναμικής ενέργειας σύμφωνα με την Εξίσωση 2.21.

$$F = -\frac{dU}{dx} = -kx \Rightarrow U = \frac{1}{2}kx^2 \Rightarrow k = \frac{d^2U}{dx^2} \quad [2.21]$$

Ωστόσο, υπάρχουν πιθανές σταθερές  $k$  για το σύστημα  $N$  ατόμων και  $3N \times 3N$  αντίστοιχες δεύτεροι παράγωγοι της δυναμικής ενέργειας. Έτσι, το σύνολο των σταθερών  $k$  σχηματίζουν έναν  $3N \times 3N$  πίνακα, ο οποίος ονομάζεται Εσσιανός πίνακας (Hessian). (Εξίσωση 2.22)

$$H = \begin{bmatrix} \frac{d^2U}{dx_1x_1} & \frac{d^2U}{dx_1y_1} & \dots & \frac{d^2U}{dx_1z_N} \\ \frac{d^2U}{dx_2x_1} & \frac{d^2U}{dx_2y_1} & \dots & \frac{d^2U}{dx_2z_N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{d^2U}{dx_Nx_1} & \frac{d^2U}{dx_Ny_1} & \dots & \frac{d^2U}{dx_Nz_N} \end{bmatrix} \quad [2.22]$$

Επομένως, ισχύει ότι  $F=Hx$  ή πιο αναλυτικά,

$$\omega^2 \begin{pmatrix} m_1 x_1 \\ m_2 x_2 \\ \vdots \\ m_N x_N \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{d^2 U}{dx_1 x_1} & \frac{d^2 U}{dx_1 y_1} & \cdots & \frac{d^2 U}{dx_1 z_N} \\ \frac{d^2 U}{dx_2 x_1} & \frac{d^2 U}{dx_2 y_1} & \cdots & \frac{d^2 U}{dx_2 z_N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{d^2 U}{dx_N x_1} & \frac{d^2 U}{dx_N y_1} & \cdots & \frac{d^2 U}{dx_N z_N} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_N \end{pmatrix} \quad [2.23]$$

Οι κανονικές δονήσεις είναι καταστάσεις όπου οι δυνάμεις  $F$  ευθυγραμμίζονται με τις μετατοπίσεις  $x$ , δηλαδή ισχύει ότι:

$$Hx = \lambda x \quad [2.24]$$

Προκύπτει λοιπόν ότι το  $x$  είναι ένα ιδιοδιάνυσμα και ότι για τη λύση της Εξίσωσης 2.37 ως προς  $x$  πρέπει να την μετατρέψουμε στην εξής:

$$(H - \lambda I)x = 0 \quad [2.25]$$

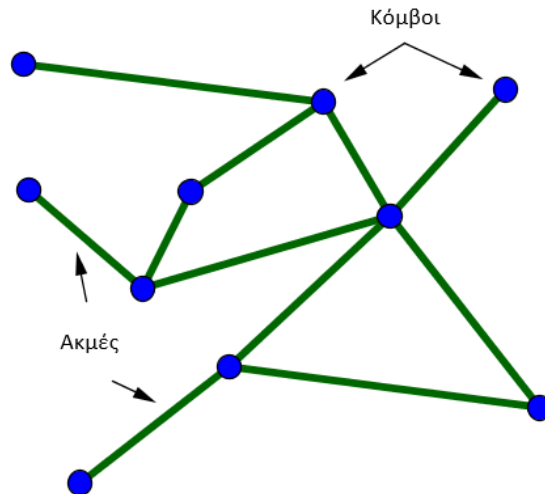
όπου  $I$  είναι ο μοναδιαίος πίνακας.

Η ορίζουσα της παραπάνω εξίσωσης πρέπει να ισούται με 0 και έτσι προκύπτουν οι λύσεις της, όπου κάθε λύση έχει ένα διάνυσμα  $x$  (Ιδιοδιάνυσμα) και μία τιμή  $\lambda$  (ιδιοτιμή). Συνεπώς, οι κανονικές δονήσεις είναι τα ιδιοδιανύσματα του Ερσιανού πίνακα. [70]

Συνοψίζοντας, η Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων είναι μία μέθοδος που μελετά τις δονήσεις των πρωτεϊνών, εξαγεί πιθανά αλλοστερικά μονοπάτια στην πρωτεϊνική δομή, υποθέτοντας ότι οι δονήσεις χαμηλής συχνότητας αντιστοιχούν σε περιοχές της πρωτεΐνης με κάποια βιολογική λειτουργία.

## 2.7.2 Δυναμική Ανάλυση Δικτύων σε πρωτεΐνες

Η θεωρία των δικτύων για τη μελέτη διαφόρων συστημάτων εφαρμόζεται σε πολλούς επιστημονικούς τομείς καθώς παρέχει χρήσιμες στρατηγικές για την ανάλυση και τη μελέτη μεγάλων συνόλων δεδομένων. Τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος της τεχνολογίας των υπολογιστών και η αλματώδης αύξηση των υπολογιστικών πόρων έχει εδραιώσει τη θεωρία αυτή στην μελέτη βιομοριακών συστημάτων. Η βασική σκέψη πίσω από τη θεωρία των δικτύων είναι αρκετά απλή, καθώς υποθέτει ότι όλα τα δίκτυα αποτελούνται από σύνολα κόμβων και ακμών που συνδέουν ζεύγη κόμβων. (Σχήμα 2.11) Για παράδειγμα, στα δίκτυα αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών, κάθε κόμβος μπορεί να αντιπροσωπεύει μία από τις δύο πρωτεΐνες και αν αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τότε οι δύο κόμβοι ενώνονται με μία ακμή. Στην περίπτωση που μελετώνται τα δίκτυα στο εσωτερικό μίας μόνο πρωτεΐνης, κάθε κόμβος μπορεί αντιστοιχεί σε κάθε άτομο  $\alpha$  άνθρακα (Ca) κάθε αμινοξέος στην πρωτεΐνη.



**Σχήμα 2.11** Δίκτυο, όπου τα μπλε σημεία είναι οι κόμβοι και οι πράσινες γραμμές είναι οι ακμές που ενώνουν τους κόμβους.

Για την μελέτη της δυναμικής των πρωτεϊνικών δομών, έχουν εφαρμοστεί διάφοροι τύποι αναλύσεων δικτύων τα τελευταία χρόνια. Για παράδειγμα, έχει αξιοποιηθεί ένα μέγεθος, το μήκος της διαδρομής επαφής (*contact path length, CPL*), το οποίο αντιστοιχεί στη συντομότερη μέση απόσταση μεταξύ όλων των ζευγών κόμβων σε ένα δίκτυο και αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο του μεγέθους του μορίου. Σύμφωνα με αυτή την ανάλυση, τα διατηρημένα άτομα α άνθρακα (Ca) των αμινοξέων που όταν αφαιρεθούν από μία πρωτεϊνική δομή επηρεάζουν πολύ το μέγεθος *CPL*, είναι σημαντικά για τη μετάδοση σημάτων μέσω αλλοστερικών δικτύων. Ωστόσο, εάν υπάρχουν πολλά μονοπάτια επικοινωνίας σχεδόν ίσου μήκους, τότε δεν θεωρείται ότι όλα τα αμινοξέα αυτού του μονοπατιού είναι σημαντικά στον αλλοστερισμό. Αντίθετα, μόνο τα άτομα α άνθρακα που εμφανίζονται πιο συχνά στο μεγαλύτερο αριθμό των υπο-βέλτιστων μονοπατιών πρέπει να διατηρηθούν στη δομή, ώστε να διαπιστωθεί ότι το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται σε αλλοστερικά δίκτυα.

Η συσχέτιση της κίνησης (*correlation, C*) μεταξύ δύο κόμβων είναι το μέγεθος που καθορίζει τις πληροφορίες που μεταφέρονται ανάμεσα στους δύο κόμβους καθώς η κίνηση του ενός μονομερούς χρησιμεύει για την πρόβλεψη της κατεύθυνσης κίνησης του άλλου μονομερούς.

Η χρονική μέση συνδεσιμότητα των κόμβων χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των υπο-ομάδων ή κοινοτήτων ενός δυναμικού δικτύου. Η βέλτιστη κατανομή των κοινοτήτων μπορεί να υπολογισθεί μέσω διαφόρων αλγορίθμων, όπως ο αλγόριθμος των Girvan-Newman. Σύμφωνα με αυτό τον αλγόριθμο, τα διατηρούμενα μονομερή που εμπλέκονται σημαντικά στην επικοινωνία μεταξύ των κοινοτήτων, ονομάζονται *κρίσιμοι κόμβοι* και εντοπίζονται στην πλειοψηφία των υπο-βέλτιστων μονοπατιών. Επίσης, θεωρεί ότι οι κόμβοι που ανήκουν σε μια κοινότητα έχουν περισσότερες και ισχυρότερες συνδέσεις με τους κόμβους σε αυτήν την κοινότητα παρά με κόμβους σε άλλες κοινότητες. Οι κοινότητες λοιπόν αντιστοιχούν σε σύνολα που η κίνηση του ενός επηρεάζεται από την κίνηση του άλλου. Κάθε κόμβος αποτελεί αναγκαστικά μέρος μιας κοινότητας, ακόμη και αν είναι ο μοναδικός σε αυτή την κοινότητα, ωστόσο υπάρχουν ακμές που συνδέουν τους κόμβους μιας κοινότητας με εκείνους μιας άλλης.

Ένα βασικό ερώτημα στη Δυναμική Ανάλυση Δικτύων είναι πώς οι κόμβοι συνδέονται με τις ακμές. Ένας πιθανός τρόπος είναι να συνδεθούν μόνο οι κόμβοι που παρουσιάζουν μια συγκεκριμένα απόσταση. Στην παρούσα περίπτωση, ενώνονται οι κόμβοι που βρίσκονται μέσα σε μια συγκεκριμένη απόσταση (4.5 Å) για τουλάχιστον 75% του χρόνου της τροχιάς μοριακής δυναμικής. Οι αποστάσεις των ακμών συμβολίζονται  $d_{ij}$  και υπολογίζονται από συσχετίσεις ζευγών που καθορίζουν την πιθανότητα μεταφοράς πληροφοριών διαμέσου μιας δεδομένης ακμής. (Εξίσωση 2.26)

$$d_{ij} = -\log(|C_{ij}|) \quad [2.26]$$

όπου,

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \vec{r}_i(t) \cdot \Delta \vec{r}_j(t) \rangle}{(\langle \Delta \vec{r}_i(t)^2 \rangle \langle \Delta \vec{r}_j(t)^2 \rangle)^{1/2}} \quad [2.27]$$

$$\Delta \vec{r}_i(t) = \vec{r}_i(t) - \langle \vec{r}_i(t) \rangle \quad [2.28]$$

και  $\vec{r}_i(t)$  είναι η θέση του ατόμου που αντιστοιχεί στον κόμβο  $i$ .

## 2.8 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων μορίων και επιλογή μορίων για βιολογική αξιολόγηση

Προκειμένου ένα μόριο να εξελιχθεί σε ένα αποτελεσματικό φάρμακο είναι απαραίτητο, εκτός από το να εμφανίζει συγγένεια με την πρωτεΐνη-στόχο, να χαρακτηρίζεται από μια σειρά από συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Για την περιγραφή αυτών των ιδιοτήτων χρησιμοποιείται ο όρος ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) που αναφέρεται στις ιδιότητες της Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού και Απέκκρισης των μορίων που προορίζονται για φάρμακα. Οι ιδιότητες ADME προσδιορίζονται στα αρχικά στάδια της ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου και ο υπολογισμός τους βοηθά στη μείωση των ποσοστών αποτυχίας στις μετέπειτα φάσεις. Κάποιες από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες που πρέπει να ελέγχονται είναι η υδατική διαλυτότητα, η λιποφιλία και η κυτταρική διαπερατότητα. Συγκεκριμένα, τα φάρμακα πρέπει να είναι τόσο υδατοδιαλυτά ώστε να διαλύονται με ευκολία και να μεταφέρονται στο πλάσμα του αίματος, όσο και λιπόφιλα ώστε να διαπερνούν την λιπιδική μεμβράνη των κυττάρων. Εκτός από αυτές τις ιδιότητες, βασική προϋπόθεση για ένα πιθανό φάρμακο είναι να μην είναι τοξικό το ίδιο ή τα προϊόντα του μεταβολισμού του. Έπειτα, το μόριο θα πρέπει να μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη ή άλλους φυσιολογικούς φραγμούς προκειμένου να φτάσει στην περιοχή πρόσδεσης με την πρωτεΐνη. Τέλος, το μόριο θα πρέπει να παραμένει στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού για όσο διάστημα απαιτείται ώστε να επιτελέσει τη δράση του, αλλά έπειτα θα πρέπει να μπορεί να αποβληθεί από το σώμα μέσω του μεταβολισμού ή της απέκκρισης [71], [72].

Για την μελέτη των ιδιοτήτων ADME ένα υπολογιστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται συχνά είναι το πρόγραμμα της σουίτας Schrodinger, το QikProp [73]. Το QikProp είναι ένα πρόγραμμα γρήγορης και αξιόπιστης πρόβλεψης της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης μορίων, που σχεδιάστηκε από τον καθηγητή William L. Jorgensen. Το QikProp προβλέπει τους μοριακούς περιγραφητές με φυσική σημασία και τις φαρμακολογικές ιδιότητες των οργανικών μορίων, είτε μεμονωμένα είτε σε παρτίδες. Τέλος, το QikProp παρέχει τα εύρη τιμών των ιδιοτήτων που προβλέπει σύμφωνα με το 95% των γνωστών φαρμάκων. Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται κάποιες από τις πιο βασικές ιδιότητες/μοριακοί περιγραφητές του QikProp και τα εύρη τιμών τους για το 95% των γνωστών φαρμάκων.

*Πίνακας 2.1 Ιδιότητες/μοριακοί περιγραφητές του QikProp και τα εύρη τιμών τους για το 95% των γνωστών φαρμάκων*

Ιδιότητα/ Μοριακός περιγραφητής	Περιγραφή ιδιότητας	Εύρος των προτεινόμενων τιμών για το 95% των γνωστών φαρμάκων
<b>mol_MW</b>	Μοριακό βάρος του μορίου	130.0 – 725.0 [g·mol <sup>-1</sup> ]
<b>QPlogPo/w</b>	Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού. Μέτρο της λιποφιλίας του μορίου	-2.0 -6.5
<b>QPlogS</b>	Λογάριθμος προβλεπόμενης υδατικής διαλυτότητας του μορίου	-6.5 -0.5 [mol·L <sup>-1</sup> ]
<b>QPPCaco2</b>	Προβλεπόμενη φαινόμενη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2. Τα κύτταρα Caco-2 αποτελούν ένα μοντέλο για τον αιματο-εντερικό φραγμό. Οι προβλέψεις αφορούν τη μη-ενεργητική μεταφορά.	<25 κακή, >500 εξαιρετική [nm·s <sup>-1</sup> ]
<b>Rule of Five</b>	Αριθμός παραβιάσεων στον κανόνα των πέντε του Lipinski. Οι κανόνες είναι: MW < 500 g/mol, QPlogPo/w < 5, δότες δεσμών υδρογόνου ≤ 5, δέκτες δεσμών υδρογόνου ≤ 10. Μόρια που ικανοποιούν αυτούς τους κανόνες μπορούν να θεωρηθούν ότι έχουν συμπεριφορά φαρμάκων. (Το «πέντε» αναφέρεται στα όρια τα οποία είναι παράγωγα του 5).	Μέγιστο 4

<b>Rule of Three</b>	Αριθμός παραβιάσεων στον κανόνα των τριών του Jorgensen. Οι κανόνες είναι: QPlogS > -5.7, QPPCaco > 22 nm/s, #πρωταρχικών_μεταβολιτών < 7. Μόρια με λίγες παραβιάσεις αυτών των κανόνων είναι πιθανόν να μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα.	Μέγιστο 3
<b>#metab</b>	Αριθμός πιθανών μεταβολικών αντιδράσεων	1 - 8

Έπειτα από την ανάλυση των μορίων σύμφωνα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, κάποια από τα μόρια επιλέγονται για να μελετηθούν σε βιολογικά πειράματα *in vitro*. Συνήθως, η επιλογή των πιο κατάλληλων μορίων για βιολογική αξιολόγηση γίνεται με την εφαρμογή κριτηρίων όπως τα ακόλουθα:

- Αριθμός περιστρεφόμενος δεσμών στο μόριο  $\leq 10$
- Λογάριθμος της υδατοδιαλυτότητας μορίου > -7
- Αριθμός χειρόμορφων κέντρων στο μόριο = 0 ή 1

Αρχικά, υπενθυμίζεται ότι ως περιστρεφόμενος δεσμός ορίζεται οποιοσδήποτε δεσμός που είναι απλός, δεν ανήκει σε δακτύλιο και είναι συνδεδεμένος με ένα μη τερματικό άτομο, εκτός του υδρογόνου. Οι αμιδικοί δεσμοί C-N δεν θεωρούνται ως περιστρεφόμενοι δεσμοί λόγω του υψηλού φραγμού περιστροφής τους. Ένα μόριο προκειμένου να προσδεθεί στην κοιλότητα μιας πρωτεΐνης, πρέπει να λάβει μία καθορισμένη διαμόρφωση. Ωστόσο, υπάρχει απώλεια εντροπίας κατά την πρόσδεση λόγω του περιορισμού του μορίου από το να λάβει διάφορες διαμορφώσεις στην κοιλότητα. Έτσι, όσο πιο άκαμπτο είναι ένα μόριο, δηλαδή όσο μικρότερο αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών έχει, τόσο λιγότερη εντροπία χάνεται κατά την πρόσδεση. Ωστόσο, ένας αρκετά μικρός αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών σε ένα μόριο αυξάνει τις πιθανότητες το μόριο να λάβει μια λάθος διαμόρφωση λόγω της μεγάλης ακαμψίας του. Επομένως, συμβιβάζομαστε στην επιλογή μορίων με αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών μικρότερο ή ίσο με 10 [74].

Όσον αφορά στην υδατοδιαλυτότητα του μορίου, τα μόρια πρέπει διαλύονται με ευκολία και να μεταφέρονται στο πλάσμα του αίματος. Εάν η υδατοδιαλυτότητα και ο ρυθμός διάλυσης είναι πολύ χαμηλά, τότε το φάρμακο που χορηγείται στον ασθενή το πιο πιθανό είναι να αποβληθεί χωρίς την δυνατότητα διέλευσης από τη γαστρεντερική οδό στο καρδιαγγειακό σύστημα και επομένως χωρίς να έχει επιτελέσει τη λειτουργία του. Έτσι, επιλέγεται ως κάτω όριο για τον λογάριθμο της υδατοδιαλυτότητας το -7 ώστε να διασφαλισθεί ότι θα μπορέσει και να διαλυθεί αλλά και να περάσει από τις μεμβράνες [71].

Το τρίτο και τελευταίο κριτήριο επιλέγει μόρια τα οποία παρουσιάζουν ένα ή κανένα ασύμμετρα (χειρόμορφα) κέντρα στη δομή τους. Χειρόμορφα ονομάζονται τα μόρια των οποίων οι απεικονίσεις έχουν σχέση ειδώλου προς αντικείμενο, χωρίς όμως οι κατοπτρικές εικόνες αυτών να συμπίπτουν ως προς τις στερεοαπεικονίσεις τους. Μόρια με ασύμμετρα κέντρα παρουσιάζουν διαφορετικές χημικές και βιολογικές ιδιότητες που συχνά είναι δύσκολο να προβλεφθούν. Για παράδειγμα, για την ισχυρή



πρόσδεση ενός μορίου σε μια πρωτεϊνική κοιλότητα απαιτείται μια συγκεκριμένη διάταξη του μορίου στο χώρο. Εάν το μόριο αυτό εμφανίζει χειρομορφία, τότε κάποια διαμόρφωσή του μπορεί να προκαλεί ασθενή πρόσδεση στην πρωτεΐνη. Τέλος, τα μόρια που εμφανίζουν περισσότερα από ένα χειρόμορφα κέντρα είναι δύσκολο να συνθεθούν στο εργαστήριο και για αυτό αποκλείονται από τις επιλογές μας.



### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Προετοιμασία της δομής της IL-33 για προσομοίωση

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και οι τρεις δομές της IL-33 που είναι διαθέσιμες στην RCSB Protein Data Bank με το κωδικό όνομα 2KLL, 4KC3 και 5VI4 [52]. Αρχικά, ο κωδικός 2KLL αντιστοιχεί στην δομή της ανθρώπινης IL-33, προερχόμενη από φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η δομή αυτή εμφανίζεται ως ένα σύνολο των δέκα διαμορφώσεων NMR σε διάλυμα με την χαμηλότερη ενέργεια [23]. Οι δέκα αυτές διαμορφώσεις απομονώθηκαν σαν ξεχωριστές δομές ώστε να μελετηθούν η κάθε μία ξεχωριστά.

Η επόμενη δομή, με το κωδικό όνομα 4KC3, αντιστοιχεί στην κρυσταλλική δομή της IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα της ST2. Η δομή αυτή απομονώθηκε από τον ανθρώπινο οργανισμό με τη μέθοδο της διάθλασης ακτίνων X, σε ανάλυση 3.27 Å. Αποτελείται από δύο αλυσίδες, από τις οποίες η πρώτη (chain A) αντιστοιχεί στην IL-33 και απαρτίζεται από 159 αμινοξέα, ενώ η δεύτερη (chain B) αντιστοιχεί στον υποδοχέα ST2 με 309 αμινοξέα [24]. Από το σύμπλοκο αυτό απομονώθηκε η πρώτη αλυσίδα προκειμένου να μελετηθεί μόνο η πρωτεΐνη IL-33.

Η τρίτη διαθέσιμη δομή αντιστοιχεί στο τριπλό σύμπλοκο ανάμεσα στην IL-33, τον κύριο υποδοχέα της ST2 και ένα βοηθητικό υποδοχέα με το όνομα IL-1RAcP. Απομονώθηκε από τον οργανισμό *Mus musculus* με τη μέθοδο της διάθλασης ακτίνων X και με ανάλυση 2.79 Å. Η κρυσταλλική δομή αποτελείται από έξι αλυσίδες, ανά δύο πανομοιότυπες, δηλαδή κάθε πρωτεΐνη στο τριπλό σύμπλοκο βρίσκεται κρυσταλλωμένη δύο φορές. Πιο συγκεκριμένα, οι αλυσίδες A και D αντιστοιχούν στην IL-33 με 158 αμινοξέα η καθεμία, οι αλυσίδες B και E αντιστοιχούν στον υποδοχέα ST2 με 309 αμινοξέα έκαστη, ενώ τέλος οι αλυσίδες C και F αντιστοιχούν στον IL-1RAcP με 339 αμινοξέα η καθεμία [25]. Από αυτή την κρυσταλλική δομή απομονώθηκαν οι αλυσίδες A και D ώστε να μελετηθούν ως δύο νέες δομές.

Σημειώνεται ότι για την απομόνωση των δέκα διαμορφώσεων της IL-33 που προέρχονται από NMR αλλά και τον διαχωρισμό της IL-33 από τις κρυσταλλικές δομές όπου βρισκόταν σε σύμπλοκο με τους υποδοχείς, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό VMD [75]. Μετά τη διαδικασία αυτή καταλήγουμε σε 13 δομές, οι οποίες ωστόσο πρέπει να επεξεργαστούν ώστε να διορθωθούν τυχόν λάθη και ελλείψεις προτού ξεκινήσουν οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.

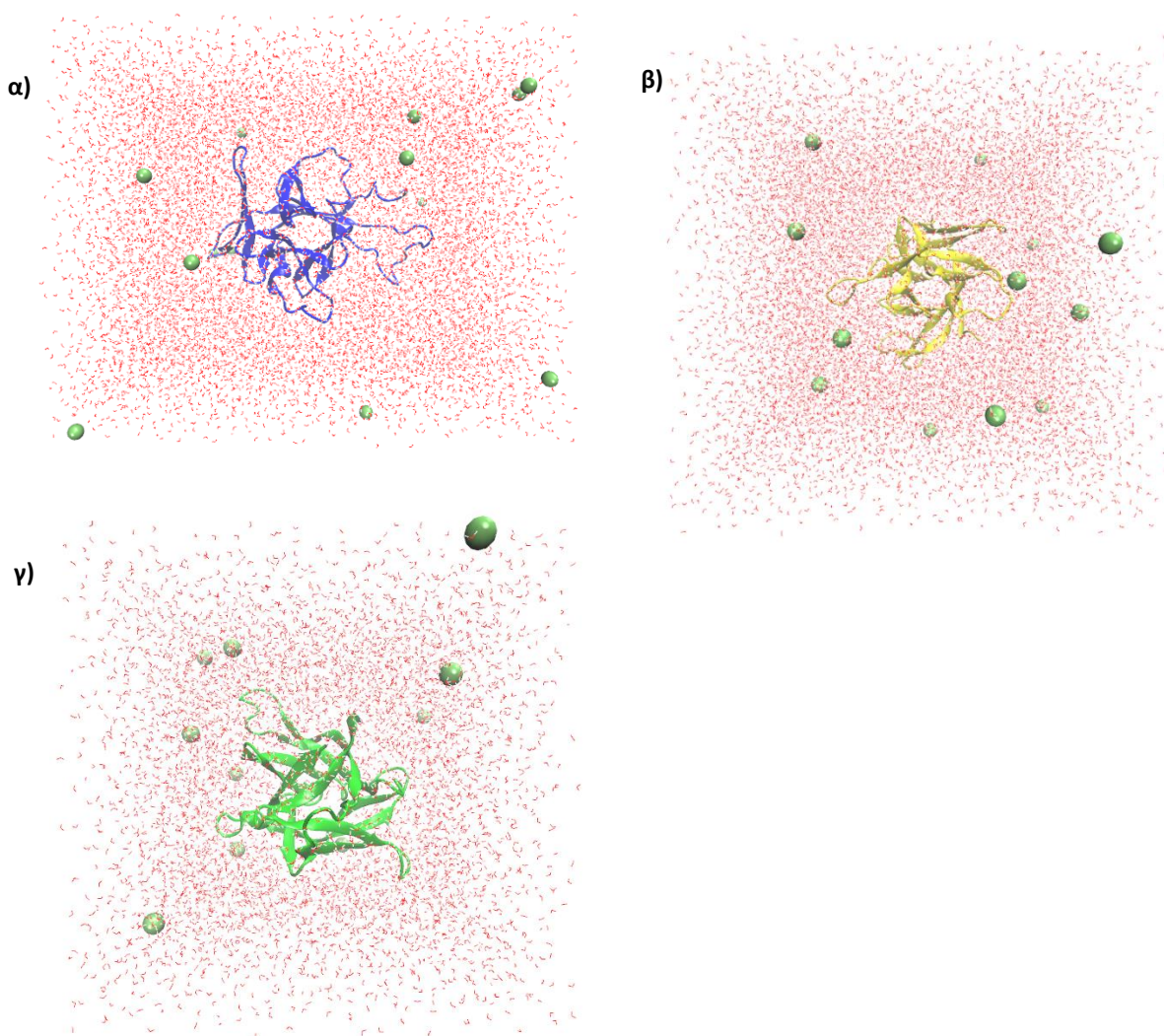
Αρχικά, οι δομές της IL-33 προετοιμάστηκαν με τη χρήση του υπολογιστικού εργαλείου Protein Preparation Wizard της σουίτας Schrödinger [76]. Συνοπτικά: 1) οριοθετήθηκαν οι δεσμοί όλων των ατόμων μέσω ανάθεσης των καταστάσεων πρωτονίωσης, 2) προστέθηκαν υδρογόνα στις δομές από τις οποίες απουσίαζαν, 3) δημιουργήθηκαν οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των ατόμων θείου της κυστεΐνης που βρέθηκαν σε απόσταση 3.2 Å, 4) τα αμινοξέα σελενομεθειονίνες μετατράπηκαν σε μεθειονίνες, 5) προστέθηκαν τα αμινοξέα που έλειπαν από τις δομές και 6) δημιουργήθηκαν οι πιθανές καταστάσεις ιονισμού και ταυτομερίωσης όλων των ετεροατόμων σε pH ίσο με  $7.0 \pm 2.0$  με τη χρήση του λογισμικού Erik [77]. Πιο συγκεκριμένα, στις δέκα δομές της IL-33 που απομονώθηκαν από τον κωδικό 2KLL, τα υδρογόνα ήταν παρόντα καθώς οι δομές προέρχονται από NMR, οπότε δεν χρειάστηκε να προστεθούν. Επίσης, στην αλληλουχία των αμινοξέων δεν εντοπίστηκε κάποια σελενομεθειονίνη, οπότε

δεν υπήρξε η ανάγκη να μετατραπεί σε μεθειονίνη. Τέλος, από τις δέκα αυτές δομές δεν έλειπε κάποιο αμινοξύ από την τριτοταγή δομή τους, με αποτέλεσμα να μην χρειαστεί η προσθήκη κάποιου αμινοξέος. Για τις δέκα αυτές δομές λοιπόν πραγματοποιήθηκαν τα υπόλοιπα βήματα της προετοιμασίας. Αντίθετα, στη μία δομή της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2, πραγματοποιήθηκαν όλα τα βήματα που περιγράφονται παραπάνω για την προετοιμασία της. Υπενθυμίζεται ότι η δομή είναι κρυσταλλική, επομένως έπρεπε να προστεθούν τα υδρογόνα. Επίσης, υπήρχαν τρεις σελενομεθειονίνες (Mse181, Mse183, Mse223) που μετατράπηκαν σε μεθειονίνες. Τέλος, από την τριτοταγή δομή απουσίαζαν 22 αμινοξέα (Ser112, Ile113, Thr114, Gly115, Ile116, Glu172, Ser173, Gly174, Asp175, Gly176, Val177, Asp178, Asp253, Ser254, Ser255, Glu256, Asn257, Leu258, Cys259, Thr260, Glu269, Thr270) πιθανόν λόγω μεγάλης κινητικότητας που δεν επέτρεψε μεγάλη ευκρίνεια στο ηλεκτρονικό τους νέφος. Τα αμινοξέα αυτά προστέθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Prime [78]. Στην τρίτη περίπτωση όπου οι δύο δομές προήλθαν από τον κωδικό 5V14, εφαρμόστηκαν όλα τα βήματα της προετοιμασίας εκτός από την μετατροπή της σελενομεθειονίνης σε μεθειονίνη καθώς δεν υπήρχε κανένα τέτοιο αμινοξύ στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Εκτός από τα υδρογόνα, προστέθηκαν και 12 αμινοξέα που απουσίαζαν από την τριτοταγή δομή (Ser109, Ile110, Gln111, Gly112, Thr113, Asn137, Gly138, Ser139, Gly207, Asp208, Val209, Ile266). Τέλος, στις δύο αυτές δομές προστέθηκαν και τα άτομα που έλλειπαν από κάποια αμινοξέα. Συγκεκριμένα, στην αλυσίδα A προστέθηκαν τα άτομα CG, CD, CE και NZ από το αμινοξύ LYS 198, ενώ στην αλυσίδα D προστέθηκαν τα άτομα CG, CD, OE1, OE2 από το GLU 136, όπου το αρχικό γράμμα κάθε ατόμου αντιστοιχεί στα εξής: C - άνθρακας, N - άζωτο, O - οξυγόνο.

Έπειτα, οι 13 προετοιμασμένες δομές εισάγονται στο λογισμικό VMD προκειμένου να παραχθούν τα αντίστοιχα αρχεία που να περιέχουν όλες τις μοριακές πληροφορίες που απαιτούνται προκειμένου να εφαρμοστεί το πεδίο δυνάμεων στο πρωτεϊνικό σύστημα. Το αρχείο αυτό ονομάζεται *PSF (Protein Structure File)* και περιέχει πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση και τη συνδεσιμότητα των ατόμων στο πρωτεϊνικό μόριο. Δίνει το συνολικό αριθμό των δεσμών και παρέχει πληροφορίες σχετικά με το ποια άτομα συνδέονται για να σχηματίσουν ένα συγκεκριμένο δεσμό. Το αρχείο PSF παράγεται και για τις 13 δομές με τη χρήση ενός πακέτου του VMD, το *psfgen*, γράφοντας μια σειρά εντολών στο εργαλείο Tk Console. Σημειώνεται ότι το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε είναι το CHARMM 36 (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) από το οποίο επιλέχθηκαν τα αρχεία τοπολογίας (topology file) και παραμετροποίησης (parameter file) [79]. Το αρχείο τοπολογίας περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες των αμινοξέων που συνθέτουν μία πρωτεΐνη, όπως τους τύπους των ατόμων, τις μάζες, τους δότες και δέκτες ηλεκτρονίων, καθώς και τα φορτία των ατόμων του συστήματος. Το αρχείο παραμετροποίησης περιέχει πληροφορίες απαραίτητες για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας του συστήματος, όπως τα μήκη των δεσμών, τις γωνίες έκτασης δεσμών, τις γωνίες κάμψης, τους όρους των διεδρων γωνιών, τις σταθερές δύναμης και τις παραμέτρους Lennard- Jones. Τα αρχεία PSF είναι απαραίτητα για το επόμενο στάδιο της προετοιμασίας των πρωτεϊνών, το οποίο περιλαμβάνει την προσθήκη μορίων νερού και ιόντων και θα αναλυθεί στην παρακάτω παράγραφο.

Οι δομές της IL-33 τοποθετήθηκαν σε ένα πλαίσιο μορίων νερού και ιόντων προκειμένου να προσομοιωθούν καλύτερα οι συνθήκες στο εσωτερικό του κυττάρου. (Σχήμα 3.1) Το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού VMD, όπου μια σειρά εντολών στο εργαλείο Tk Console τοποθετεί την πρωτεΐνη σε ένα κυβικό πλαίσιο μορίων νερού ακμής 10 Å. Αξίζει να αναφερθεί πώς το μέγεθος του πλαισίου νερού επιλέχθηκε ώστε να μην επιτρέπει στην πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά με την

«εικόνα» της στο δίπλα κουτί, καθώς χρησιμοποιούνται περιοδικές οριακές συνθήκες. Επιπρόσθετα, με τη χρήση εντολών του VMD τοποθετήθηκαν ιόντα στο πλαίσιο νερού. Η προσθήκη ιόντων είναι απαραίτητη στην περίπτωση που η πρωτεΐνη φέρει φορτίο, ώστε να γίνει το σύστημα ουδέτερο και πιο σταθερό. Τα ιόντα τοποθετήθηκαν σε περιοχές τοπικών ελαχίστων του δυναμικού, καθώς θα υποχρεωθούν να μεταβούν σε αυτές τις περιοχές κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ούτως η άλλως. Στην παρούσα περίπτωση, η πρωτεΐνη σταθεροποιείται με την προσθήκη ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ . Τέλος, σημειώνεται ότι για την προσθήκη μορίων νερού και ιόντων εφαρμόστηκε το πεδίο δυνάμεων CHARMM 36. Για την προσομοίωση των μορίων νερού, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points) [80].



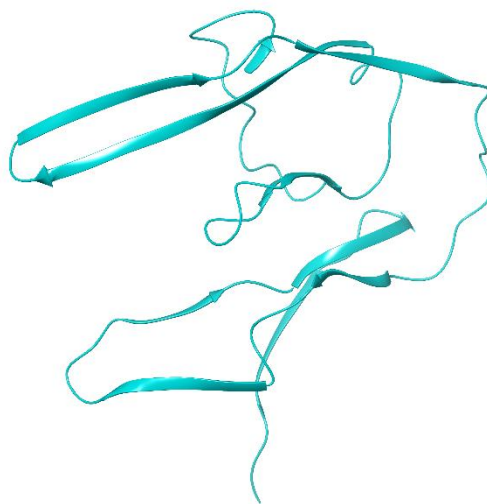
**Σχήμα 3.1** Οι δομές της IL-33 έπειτα από την προετοιμασία. (α) Ενδεικτικά παρουσιάζεται η προετοιμασμένη δομή της πρώτης διαμόρφωσης NMR της IL-33 που προήλθε από τον κωδικό PDB: 2KLL. (β) Η προετοιμασμένη δομή της IL-33 που προήλθε από τον κωδικό PDB: 4KC3. (γ) Η προετοιμασμένη δομή της A αλυσίδας της IL-33 που προήλθε από τον κωδικό PDB: 5VI4. Τα μόρια νερού περιβάλλουν με κόκκινο χρώμα την πρωτεΐνη, ενώ τα ιόντα απεικονίζονται ως σφαίρες χρώματος «lime».

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε μέσω Ομόλογης Μοντελοποίησης η δομή της IL-33 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 109, προκειμένου να μελετηθεί και αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης που δεν υπάρχει διαθέσιμο στην Protein Data Bank. Το μοντέλο δημιουργήθηκε με το εργαλείο Structure Prediction Wizard του Prime της σουίτας Schrödinger [78]. Ως δομή στόχος χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία της ανθρώπινης IL-33 (αμινοξέα 1 έως 270) σε μορφή αρχείου FASTA η οποία λήφθηκε από τη βάση δεδομένων NCBI. (Σχήμα 3.2) Για την εύρεση της κατάλληλης πρωτεΐνης-προτύπου χρησιμοποιήθηκε το BLAST Homology Search το οποίο αναζητά ομόλογες πρωτεΐνες της δομής στόχου που έχει οριστεί προηγουμένως. Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης BLAST επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως πρωτεΐνη-πρότυπο η αλυσίδα A της δομής με το κωδικό όνομα στην PDB 1CS6, που επιλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ σε ανάλυση 1.8 Å και παρουσιάζει ομοιότητα με την πρωτεΐνη-στόχο ίση με 30 %. Σημειώνεται ότι η δομή με τον κωδικό 1CS6 έχει επιλυθεί από τον οργανισμό *Gallus Gallus* [81].

```
>AAH47085.1 Interleukin 33 [Homo sapiens]
MKPKMKYSTNKKISTAKWKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCPMYFMKLRSGLMIKKEACYFRRETTKRPSL
KTGRKHKRHLVLAACQQQSTVECFAGFISGVQKYTRALHDSSITGISPITEYLAASLSTYNDQSITFALED
ESYEIYVEDLKKDEKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEK
PLPDQAFFVLHNMHSNCVSECKTDPGVFIGVKNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET
```

**Σχήμα 3.2** Η αλληλουχία αμινοξέων της ανθρώπινης IL-33 σε μορφή FASTA.

Το τελικό μοντέλο που κατασκευάστηκε περιλαμβάνει τα αμινοξέα Met1 έως His109 και αναπαρίσταται στο Σχήμα 3.3 με τη μορφή κορδέλας.



**Σχήμα 3.3** Η δομή της IL-33 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 109, όπως κατασκευάστηκε μέσω Ομόλογης Μοντελοποίησης από τον οργανισμό *Gallus Gallus*.

### 3.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής στην IL-33

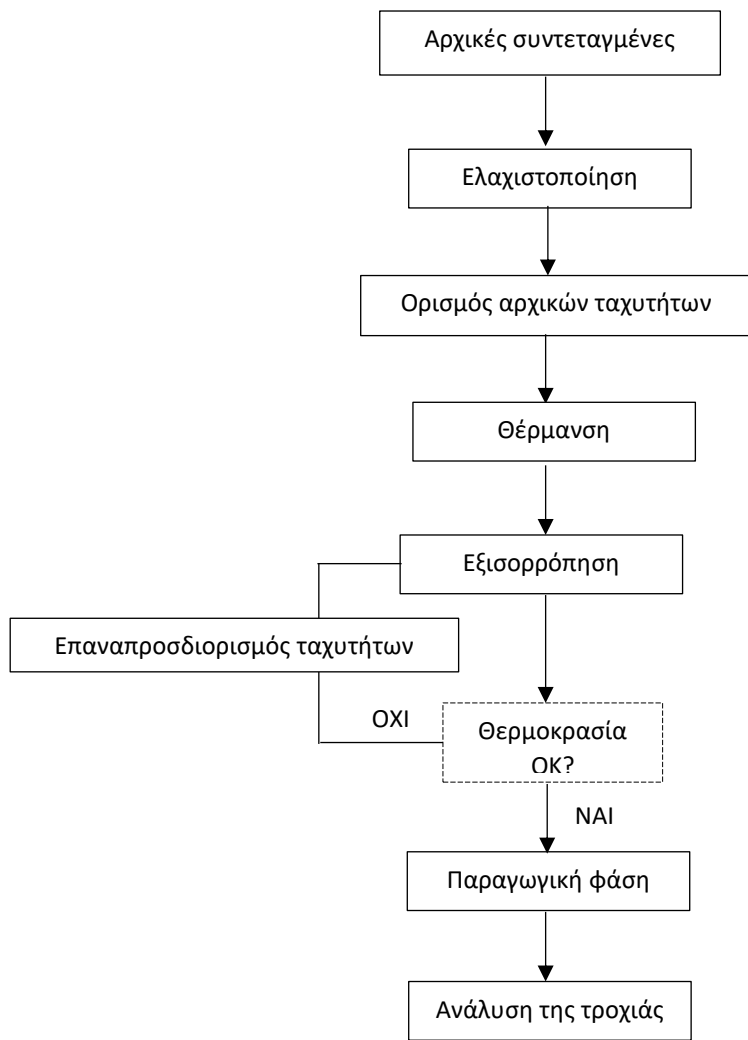
Μετά την επεξεργασία των πρωτεϊνικών δομών της IL-33 με τη χρήση του λογισμικού VMD και ορισμένων εργαλείων της σουίτας Schrödinger, ακολούθησαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής με σκοπό να εξαχθούν οι τροχιές κίνησης των ατόμων συναρτήσει του χρόνου. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος NAMD (NANoscale Molecular Dynamics), συγκεκριμένα με την έκδοση 2.13 του NAMD από το Theoretical and Computational Biophysics Group στο University of Illinois at Urbana-Champaign [82]. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CHARMM 36, από το οποίο ελήφθησαν τα αρχεία τοπολογίας και παραμετροποίησης του συστήματος [79]. Τα μόρια νερού που περιβάλλουν τις πρωτεϊνικές δομές προσομοιώθηκαν με το μοντέλο TIP3P [80]. Η συμπεριφορά των ατόμων κοντά στα όρια του κουτιού αναπαραστάθηκε με την εφαρμογή περιοδικών οριακών συνθηκών (periodic boundary conditions), ενώ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Particle Mesh Ewald (PME) για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεγάλου εύρους [83]. Επίσης, η ρουτίνα SHAKE εφαρμόστηκε για τον περιορισμό όλων των δεσμών που περιλάμβαναν άτομα υδρογόνου [55]. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό σταθερή πίεση (NPT), η οποία ρυθμίζεται με δυναμική προσαρμογή του μεγέθους της στοιχειώδους κυψελίδας (unit cell) αλλάζοντας την κλίμακα (rescaling) όλων σχεδόν των ατομικών συντεταγμένων κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Στο NAMD, αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της τροποποιημένης μεθόδου Nosé-Hoover, με την οποία χρησιμοποιείται η δυναμική Langevin για τον έλεγχο των διακυμάνσεων του βαρομέτρου [84]. Σημειώνεται ότι για την προσομοίωση σε NPT στατιστικό σύνολο με το NAMD, η μέθοδος του πιστονιού των Nosé-Hoover συνδυάζεται πάντα με τη μέθοδο ελέγχου της θερμοκρασίας της δυναμικής Langevin. Όλοι αυτοί οι παράμετροι προσομοίωσης συνοψίζονται στο αρχείο διαμόρφωσης (configuration file) του NAMD, το οποίο χρησιμοποιείται σε κάθε βήμα της προσομοίωσης με μικρές τροποποιήσεις.

Πριν την έναρξη των προσομοιώσεων, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας των 13 δομών της IL-33 προκειμένου να βρεθούν σε ενεργειακά ευνοϊκή κατάσταση. Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν τα αρχεία των δομών που προηγουμένως είχαν προετοιμαστεί και τοποθετηθεί σε ένα πλαίσιο μορίων νερού και ιόντων. Η θερμοκρασία του συστήματος ορίστηκε ίση με 0 K. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας πραγματοποιήθηκε για 1,000 βήματα προσομοίωσης. Ο αριθμός των βημάτων επιλέχθηκε τέτοιος ώστε να μπορέσει να συγκλίνει η ενέργεια του συστήματος. Αυτό μπορεί να ελεγχθεί από το αρχείο αποτελεσμάτων της ελαχιστοποίησης (minimization output file), απεικονίζοντας την συνολική ενέργεια του συστήματος ως συνάρτηση των βημάτων προσομοίωσης.

Έπειτα από το στάδιο ελαχιστοποίησης της ενέργειας, οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε θερμοκρασία 0 K, επομένως πρέπει να μεταβούν στη φυσιολογική θερμοκρασία των κυττάρων, δηλαδή στους 310 K. Για να μεταβεί το σύστημα από τους 0 στους 310 K, θερμαίνουμε ανά 10 K, επομένως η θέρμανση γίνεται σε συνολικά 32 διαστήματα. Επίσης, για να αυξηθεί η θερμοκρασία κατά 10 K, ορίστηκε χρόνος προσομοίωσης 1 ps για κάθε διάστημα, καταλήγοντας σε συνολικό χρόνο προσομοίωσης 32 ps. Το χρονικό βήμα για τη θέρμανση του συστήματος ορίστηκε ίσο με 2 fs/βήμα. Κατά το στάδιο της θέρμανσης, αποδίδονται νέες αρχικές ταχύτητες στα άτομα του συστήματος, έως ότου αυτό να φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία. Από το αρχείο αποτελεσμάτων της θέρμανσης (heating output file) μπορεί να ελεγχθεί αν το σύστημα έφτασε στους 310 K.

Μετά τη θέρμανση της πρωτεΐνης, η δομή μπορεί να έχει καταστεί ασταθής γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα επόμενα βήματα της προσομοίωσης. Για να αποφευχθεί αυτό, η προσομοίωση συνεχίζεται με στόχο την εξισορρόπηση του συστήματος. Αυτή η διαδικασία στις δομές της IL-33 πραγματοποιήθηκε για 100,000 βήματα, με χρονικό βήμα προσομοίωσης 2 fs/step. Έπειτα από την ολοκλήρωση του σταδίου της εξισορρόπησης, παρακολουθούνται οι ιδιότητες του συστήματος όπως η θερμοκρασία και η ενέργεια ως προς το χρόνο. Εάν υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές αυτών των ιδιοτήτων, τότε η εξισορρόπηση πρέπει να συνεχιστεί για κάποια βήματα ακόμα, ώσπου η συνολική ενέργεια του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης να παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι παραγωγικές προσομοιώσεις των δομών της IL-33, υπό συνθήκες 310 K, 1 atm και σε NPT κατανομή. Ο συνολικός χρόνος προσομοίωσης για κάθε δομή ήταν 10 ns. Το αποτέλεσμα της παραγωγικής φάσης των προσομοιώσεων ήταν οι τροχιές (trajectories), οι οποίες διαμορφώθηκαν καταγράφοντας τις ατομικές συντεταγμένες του συστήματος. Από την ανάλυση των τροχιών μπορούν να υπολογιστούν ιδιότητες του συστήματος, όπως η μεταβολή της μέσης απόκλισης της θέσης των ατόμων από την αρχική τους θέση (Root Mean Square Deviation, RMSD) ως προς το χρόνο.





**Σχήμα 3.4** Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.

Στη συνέχεια, από τις διαμορφώσεις που περιέχονται σε κάθε τροχιά Μοριακής Δυναμικής έπρεπε να επιλεγεί η πιο «αντιπροσωπευτική» διαμόρφωση, η οποία θα αποτελέσει τη δομή που θα προσπαθήσουμε να στοχεύσουμε με τον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων. Για την επιλογή της πιο αντιπροσωπευτικής διαμόρφωσης πραγματοποιήθηκε αρχικά μία ομαδοποίηση (clustering) παρόμοιων διαμορφώσεων, έτσι ώστε οι διαμορφώσεις μέσα σε μία ομάδα (cluster) να είναι πιο όμοιες μεταξύ τους σε σχέση με αυτές έξω από αυτή την ομάδα. Η ομοιότητα καθορίζεται από ένα μέτρο της απόστασης, σύμφωνα με το οποίο όσο μικρότερη είναι η απόσταση, τόσο περισσότερο μοιάζουν οι δομές. Το μέτρο απόστασης που χρησιμοποιείται στην παρούσα περίπτωση είναι το RMSD. Σημειώνεται ότι μια διαμόρφωση μπορεί να είναι μέλος μόνο σε μία ομάδα. Έτσι, η πιο αντιπροσωπευτική διαμόρφωση (cluster representative) είναι η δομή με τον μεγαλύτερο αριθμό «γειτόνων» (το κέντρο της ομάδας).

Για την ομαδοποίηση των διαμορφώσεων μιας τροχιάς υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί αλγόριθμοι και μέτρα απόστασης, ενώ σε πολλές περιπτώσεις συνίσταται η χρήση διαφορετικών συνδυασμών που να λειτουργούν καλύτερα για ορισμένα συστήματα. Για την ομαδοποίηση μιας τροχιάς Μοριακής Δυναμικής δεν υπάρχει ένας «τέλειος» αλγόριθμος, καθώς τα αποτελέσματα εξαρτώνται έντονα από την επιλογή των ατόμων για τη σύγκριση ανά ζεύγη [85]. Στην παρούσα περίπτωση, η ομαδοποίηση των τροχιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την έκδοση 4.10.8 του προγράμματος CPPTRAJ, το οποίο είναι σχεδιασμένο για να επεξεργάζεται και να αναλύει τροχιές Μοριακής Δυναμικής και τα συναφή σύνολα δεδομένων που προκύπτουν από την ανάλυσή τους [86]. Το CPPTRAJ επιλέχθηκε καθώς υποστηρίζει πολλά δημοφιλή πακέτα λογισμικού Μοριακής Δυναμικής, συμπεριλαμβανομένου του NAMD.

Κατά την ομαδοποίηση των τροχιών, οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις γράφονταν σε ξεχωριστές τροχιές. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος *hieraglo* που παρουσιάζεται ως προεπιλογή και αποτελεί μια ομάδα ιεραρχικών συσσωρευτικών αλγορίθμων. Στην παρούσα περίπτωση επιλέχθηκε η υποκατηγορία μέσης διασύνδεσης αυτής της ομάδας αλγορίθμων και ο αριθμός των ομάδων που θα δημιουργηθούν καθορίστηκε ίσος με 5. Ο αλγόριθμος ξεκινά από την κατάσταση «ένα στοιχείο-μια ομάδα» και στη συνέχεια συγχωνεύει μικρές ομάδες σε μεγαλύτερες, με ένα προκαθορισμένο κριτήριο διασύνδεσης, έως ότου ο αριθμός των ομάδων να φτάσει τις 5, όπως ορίσαμε. Η συγκεκριμένη υποκατηγορία αλγορίθμου που χρησιμοποιείται στην περίπτωσή μας είναι μέσης διασύνδεσης, δηλαδή η απόσταση μεταξύ δύο ομάδων ορίζεται από τον μέσο όρο όλων των αποστάσεων μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους (μέση απόσταση). Το κριτήριο σύνδεσης σε αυτή την περίπτωση είναι η ελάχιστη απόσταση μεταξύ δύο ομάδων.

Το αποτέλεσμα της ομαδοποίησης είναι μια δομή σε μορφή αρχείου PDB, που αποτελεί την πιο αντιπροσωπευτική δομή της τροχιάς από την οποία προήλθε. Συνεπώς, συνολικά καταλήγουμε σε 13 αρχεία δομών PDB, που το κάθε ένα αντιστοιχεί στην πιο αντιπροσωπευτική διαμόρφωση της πρωτεΐνης από την οποία προήλθε. Στο σημείο αυτό είναι ανάγκη να σημειωθεί ότι οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Δρ. Κούρνια στο IIBEA, από τους φοιτητές του μαθήματος «Μοριακή Μοντελοποίηση Βιομορίων» στα πλαίσια του μεταπτυχιακού «Τεχνολογίες

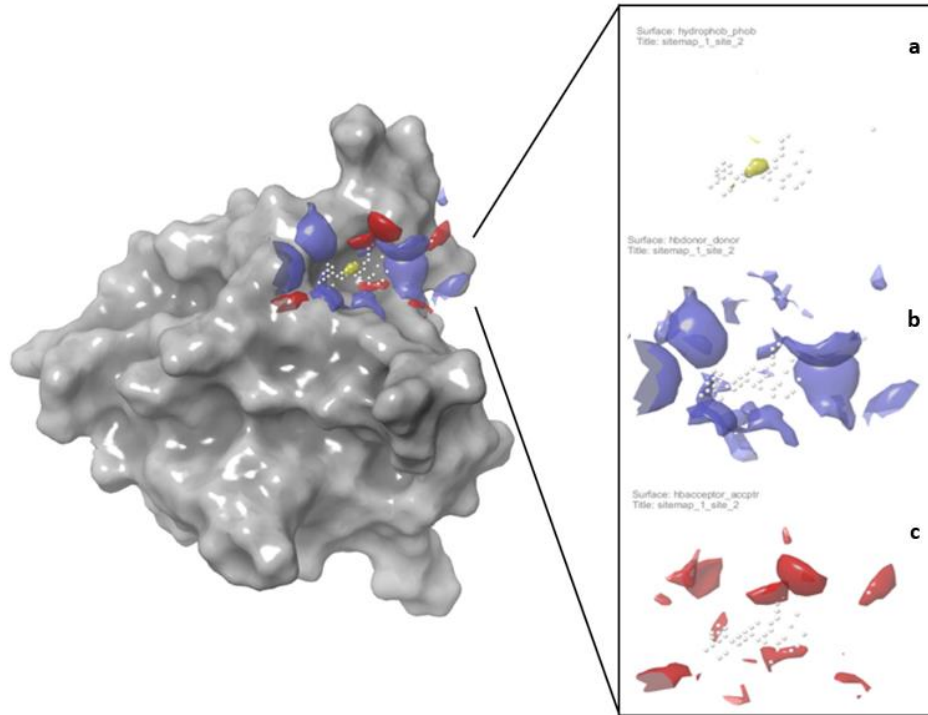
Πληροφορικής στην Ιατρική και τη Βιολογία» του Τμήματος Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο οποίο διδάσκει η Δρ. Ζωή Κούρνια.

### 3.3 Πρόβλεψη πιθανών κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33

Για την εύρεση πιθανών θέσεων πρόσδεσης στις δομές της IL-33 επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα πρόγραμμα της σουίτας Schrödinger, το SiteMap, το οποίο κατατάσσεται στην κατηγορία της στατικής προσέγγισης [67]. Είναι ένα πρόγραμμα που παράγει πληροφορίες σχετικά με τον χαρακτήρα των θέσεων πρόσδεσης στην πρωτεΐνη και παρέχει δεδομένα για την απεικόνιση των θέσεων στο Maestro [66].

Ο υπολογισμός με το SiteMap ξεκίνησε με την αναζήτηση περιοχών στην επιφάνεια πρωτεΐνης, που ονομάζονται *sites*, οι οποίες πιθανόν να είναι κατάλληλες για πρόσδεση ενός μορίου. Κατά την αναζήτηση αυτή, δημιουργήθηκε ένα πλέγμα σημείων, που ονομάζονται *site points*, και χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης. Τα *site points* ομαδοποιούνται ανάλογα με την μεταξύ τους απόσταση και οι ομάδες αυτές συγχωνεύονται όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι σχετικά μικρή και αντιστοιχεί σε μια περιοχή που εκτίθεται στο διαλύτη.

Στο δεύτερο μέρος του υπολογισμού με το SiteMap, παράγονται *χάρτες* των θέσεων πρόσδεσης (*site maps*), που αποτελούνται από υδρόφοβες, υδρόφιλες περιοχές και περιοχές μικτού χαρακτήρα. Οι υδρόφοβοι χάρτες είναι περιοχές ευνοϊκές για την πρόσδεση μορίων με υδρόφοβες ομάδες. Οι υδρόφιλοι χάρτες αντίθετα, είναι περιοχές ευνοϊκές για την πρόσδεση μορίων με υδρόφιλες ομάδες και χωρίζονται περαιτέρω σε περιοχές δότη, δέκτη ηλεκτρονίων και σε περιοχές δέσμευσης μετάλλων. Στο στάδιο αυτό παράγονται ορισμένα αρχεία με τα οποία απεικονίζονται οι χάρτες των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του Maestro. Ένα παράδειγμα κοιλότητας πρόσδεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5, όπου απεικονίζονται οι χάρτες της θέσεων πρόσδεσης της κοιλότητας.



**Σχήμα 3.5** Απεικόνιση της κοιλότητας πρόσδεσης της πρώτης διαμόρφωσης NMR της IL-33 σε διάλυμα (*pdb code: 2KLL, frame 1*). όπως βρέθηκε από το SiteMap. Με γκρι χρώμα και αναπαράσταση επιφάνειας συμβολίζεται η πρωτεΐνη, με κίτρινο χρώμα ο υδρόφοβος χάρτης (a), με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων (b) και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων (c).

Τέλος, πραγματοποιείται το στάδιο αξιολόγησης των θέσεων πρόσδεσης, το οποίο ολοκληρώνει τον υπολογισμό και αξιολογεί κάθε θέση πρόσδεσης, υπολογίζοντας διάφορες ιδιότητες που την χαρακτηρίζουν. Οι ιδιότητες αυτές προστίθενται στον πίνακα αποτελεσμάτων του Maestro και μπορούν να συγκριθούν. Στην παρούσα μελέτη οι ιδιότητες που αξιολογήθηκαν ήταν το *SiteScore* (Εξ. 2.6), το *DScore* (Εξ. 2.7), το ποσοστό έκθεσης (*exposure*), το ποσοστό εγκλεισμού (*enclosure*) και ο όγκος της κοιλότητας (*volume*).

Συνεπώς, για κάθε μία από τις 13 δομές της IL-33 που υποβλήθηκαν σε υπολογισμούς με το SiteMap, προέκυψε ένας αριθμός πιθανών κοιλότητων πρόσδεσης. Ο αριθμός αυτός ποικίλει ανάλογα με τη δομή, με αποτέλεσμα να είναι πιθανό σε μία δομή να βρεθεί μόνο μία κοιλότητα πρόσδεσης, ενώ σε κάποια άλλη να βρεθεί ένας μεγαλύτερος αριθμός. Για κάθε δομή της IL-33, μελετήθηκαν οι πιθανές κοιλότητες πρόσδεσης που υπολόγισε το SiteMap και αξιολογήθηκαν με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

1. Προτιμώνται κοιλότητες πρόσδεσης με υψηλές τιμές *SiteScore*, καθώς μια τιμή μεγαλύτερη της μονάδας υποδηλώνει μία κοιλότητα που είναι πολύ πιθανόν να μπορεί να λειτουργήσει ως θέση πρόσδεσης ενός μορίου.
2. Παρόμοια με το *SiteScore*, προτιμώνται κοιλότητες με υψηλό *DScore* που αντιστοιχούν σε περιοχές που μπορεί να προσδεθεί ένα μόριο και να παρουσιάσει φαρμακολογική δράση.
3. Το ποσοστό έκθεσης (*exposure*) παρέχει ένα μέτρο του πόσο ανοιχτή είναι η κοιλότητα στο διαλύτη που περιβάλλει την πρωτεΐνη. Όσο χαμηλότερο είναι αυτό το ποσοστό, τόσο καλύτερη

είναι η κοιλότητα, με το μέσο όρο για θέσεις που παρουσιάζουν «σφιχτή» πρόσδεση με το μόριο να είναι 0.49.

4. Αντίθετα, το ποσοστό εγκλεισμού (*enclosure*) είναι ένα μέτρο που δείχνει πόσο προστατευμένη είναι η κοιλότητα από τον διαλύτη. Προτιμώνται κοιλότητες με υψηλά ποσοστά, με το μέσο όρο σε αυτή την περίπτωση να ανέρχεται στο 0.78.
5. Αξιολογείται ο όγκος της κοιλότητας (*volume*), ένα μέγεθος που πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να αντιστοιχεί σε μια περιοχή στην οποία θα μπορεί το μόριο-προσδέτης να λάβει την κατάλληλη πόζα.
6. Οι κοιλότητες πρόσδεσης αξιολογήθηκαν έπειτα από οπτική παρατήρηση με βάση το σχήμα τους και τα δευτεροταγή στοιχεία της δομής της πρωτεΐνης που τις περιβάλλουν. Πιο συγκεκριμένα, προτιμώνται κοιλότητες που χαρακτηρίζονται από ένα σχήμα που μοιάζει με ένα μόριο, δηλαδή δεν είναι «απλωμένες» στο χώρο και πολύ στρογγυλεμένες, έτσι ώστε το μόριο να μπορεί να καταλάβει την κατάλληλη θέση μέσα στην κοιλότητα. Επίσης, προτιμώνται κοιλότητες που δεν περιβάλλονται από ευέλικτες θηλιές, καθώς δεν ευνοούν τη σταθερή πρόσδεση του μορίου.

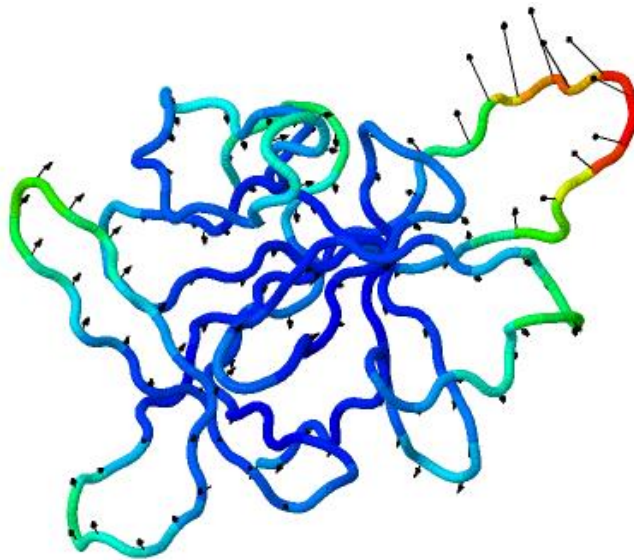
### **3.4 Αξιολόγηση των κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33 με Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων και Δυναμική Ανάλυση Δικτύων**

Οι κοιλότητες πρόσδεσης που προσδιορίστηκαν στις 13 δομές της IL-33 αξιολογήθηκαν στη συνέχεια με Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων και Δυναμική Ανάλυση Δικτύων, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη δυναμική της πρωτεΐνης στο σημείο που εντοπίζεται η κάθε κοιλότητα.

#### **3.4.1 Ανάλυση Κανονικών Δονήσεων**

Αρχικά, υπενθυμίζεται ότι με την ανάλυση Κανονικών Δονήσεων μελετώνται οι δονήσεις των πρωτεϊνών, και εξάγονται τα πιθανά αλλοστερικά μονοπάτια στην πρωτεϊνική δομή, υποθέτοντας ότι οι δονήσεις χαμηλής συχνότητας αντιστοιχούν σε περιοχές της πρωτεΐνης με κάποια βιολογική λειτουργία. Όπως έχει αποδειχθεί, οι κανονικές δονήσεις ενός βιολογικού συστήματος αποτελούν περιγραφητές της δυναμικής του και παρέχουν χρήσιμα αποτελέσματα σχετικά με τις εσωτερικές κινήσεις αυτού του συστήματος [87]. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η ανάλυση Κανονικών Δονήσεων πραγματοποιήθηκε με μία διαδικτυακή εφαρμογή που ονομάζεται iMODS [88]. Στην εφαρμογή εισάγεται η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση της εκάστοτε πρωτεϊνικής πρωτεϊνικής δομής, η οποία έχει εξαχθεί έπειτα από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και από την ομαδοποίηση (*clustering*). Το iMODS υπολογίζει σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα τις κανονικές δονήσεις της πρωτεΐνης που εμφανίζουν τις χαμηλότερες συχνότητες. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, είναι δυνατή η παρακολούθηση των συνολικών δονήσεων της πρωτεΐνης, μέσω οπτικοποίησης του τρόπου κίνησής της. Επιπρόσθετα, το iMODS δίνει τη δυνατότητα να μελετηθούν οι ιδιοτιμές και τα ιδιοδιανύσματα των κανονικών δονήσεων, δηλαδή η χαρακτηριστική συχνότητα και κατεύθυνση δόνησης, παρουσιάζοντάς τα με τη μορφή διανυσμάτων. Έτσι, η κατεύθυνση στην οποία δείχνει το διάνυσμα αντιστοιχεί στο ιδιοδιάνυσμα, ενώ το μήκος του

διανύσματος είναι η ιδιοτιμή της κανονικής δόνησης. (Σχήμα 3.6) Συγκεκριμένα, ένα διάνυσμα μεγάλου μήκους ερμηνεύεται ως μία περιοχή της πρωτεΐνης με μεγάλη κινητικότητα, ενώ ένα μικρό διάνυσμα ορίζει μία περιοχή που εμφανίζει μικρή κίνηση.



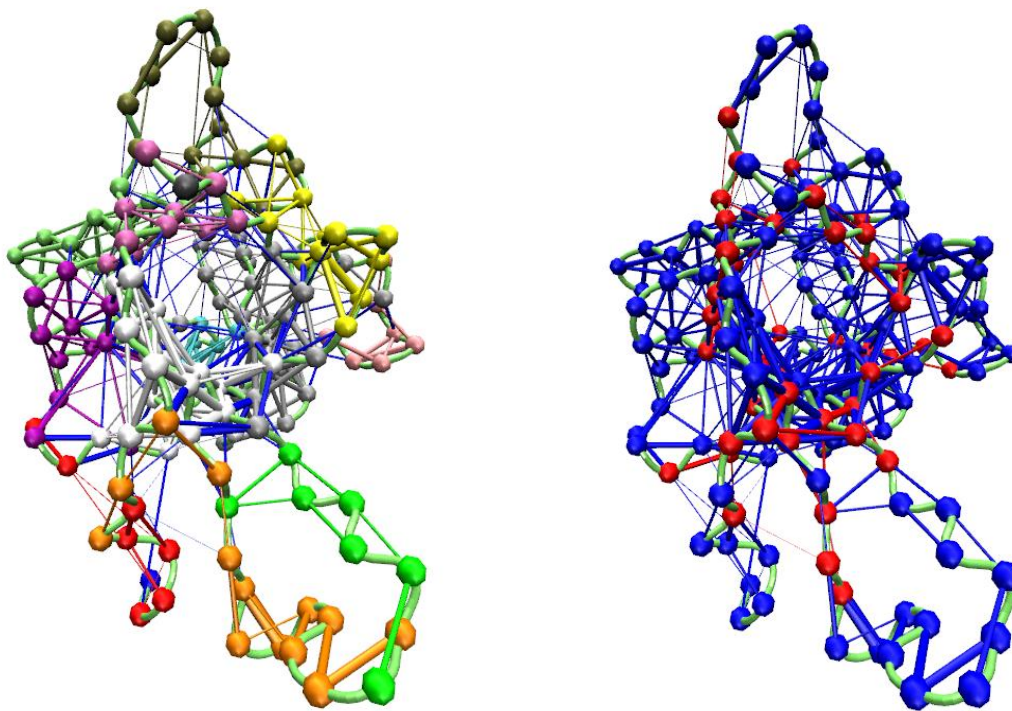
**Σχήμα 3.6** Απεικόνιση της πρώτης κανονικής δόνησης της πρώτης διαμόρφωσης NMR της IL-33 σε διάλυμα (pdb code: 2KLL, frame 1). Τα μαύρα διανύσματα αντιστοιχούν στις ιδιοτιμές και τα ιδιοδιανύσματα της κανονικής δόνησης. Η πρωτεΐνη είναι χρωματισμένη με βάση την κινητικότητα που βρέθηκε με την ανάλυση Κανονικών Δονήσεων (επιλογή «NMA-Mobility» στην εφαρμογή iMODS), όπου οι κόκκινες περιοχές υπονοούν μεγάλη κινητικότητα, ενώ οι μπλε μικρή κινητικότητα. Η εικόνα λήφθηκε με τη χρήση της εφαρμογής iMODS [87].

### 3.4.2 Δυναμική Ανάλυση Δικτύων

Στο επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε η δυναμική ανάλυση των δικτύων των 13 δομών της IL-33, προκειμένου να μελετηθεί εάν οι κοιλότητες πρόσδεσης της εκάστοτε πρωτεϊνικής δομής εντοπίζονται σε λειτουργικές -σύμφωνα με την ανάλυση- περιοχές της πρωτεΐνης. Έτσι, αν τα αμινοξέα που απαρτίζουν μία κοιλότητα ανήκουν σε λειτουργικές περιοχές, τότε πιθανόν η κοιλότητα αυτή να παρουσιάζει αλλοστερική επίδραση.

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου NetworkView του λογισμικού VMD [75]. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Carma για τον υπολογισμό της συσχέτισης μεταξύ ζευγών ατόμων στις τροχιές της Μοριακής Δυναμικής και για τον υπολογισμό του «βάρους» (weight) της ένωσης μεταξύ δύο κόμβων του δικτύου [89]. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CatDCD για την προετοιμασία των τροχιών Μοριακής Δυναμικής που απαιτείται για τους υπολογισμούς που πραγματοποιεί το Carma. Σημειώνεται ότι προκειμένου να υπολογιστούν τα δυναμικά δίκτυα στις πρωτεϊνικές δομές της IL-33 απαιτούνται τα εξής αρχεία που έχουν παραχθεί από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής: 1) η τροχιά της Μοριακής Δυναμικής, 2) το αρχείο PSF (Protein Structure File) της πρωτεΐνης και 3) το αρχείο συντεταγμένων PDB της δομής.

Με τη χρήση των παραπάνω προγραμμάτων και λογισμικών δημιουργήθηκε το δίκτυο σε κάθε πρωτεϊνική δομή, στο οποίο κάθε κόμβος αντιστοιχεί στο άτομο α άνθρακα (Ca) κάθε αμινοξέος στην δομή. Οι ακμές που ενώνουν τους κόμβους δημιουργήθηκαν σύμφωνα με την εξής συνθήκη: ενώθηκαν μόνο οι κόμβοι που βρίσκονται μέσα σε μια συγκεκριμένη απόσταση (4.5 Å) για τουλάχιστον το 75% του χρόνου του τροχιακού μοριακής δυναμικής. Έπειτα, για κάθε πρωτεϊνικό δίκτυο υπολογίστηκαν οι υποομάδες ή κοινότητες εντός του δυναμικού δικτύου. Ένα παράδειγμα κοινότητων του δυναμικού δικτύου μιας δομής της IL-33 παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7.α. Η βέλτιστη κατανομή των κοινότητων υπολογίστηκε μέσω του αλγορίθμου των Girvan-Newman, το θεωρητικό υπόβαθρο του οποίου παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 2.7.2. Με βάση τον αλγόριθμο αυτό, υπολογίστηκαν και οι κρίσιμοι κόμβοι των δικτύων, δηλαδή τα διατηρούμενα μονομερή που εμπλέκονται σημαντικά στην επικοινωνία μεταξύ των κοινότητων. (Σχήμα 3.7.β). Με τη χρήση του λογισμικού του VMD βρέθηκαν και καταγράφηκαν οι κρίσιμοι κόμβοι του δικτύου και έπειτα αντιστοιχίστηκαν στα αμινοξέα της πρωτεΐνης.



**Σχήμα 3.7** Απεικόνιση του δυναμικού δικτύου της πρώτης διαμόρφωσης NMR της IL-33 σε διάλυμα (pdb code: 2KLL, frame 1). Η πρωτεΐνη απεικονίζεται με τη μορφή «σωλήνα» χρώματος «lime». (α) Οι κοινότητες της πρωτεΐνης απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε μία. (β) Οι κρίσιμοι κόμβοι και οι ακμές που τους ενώνουν απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα στο δίκτυο.

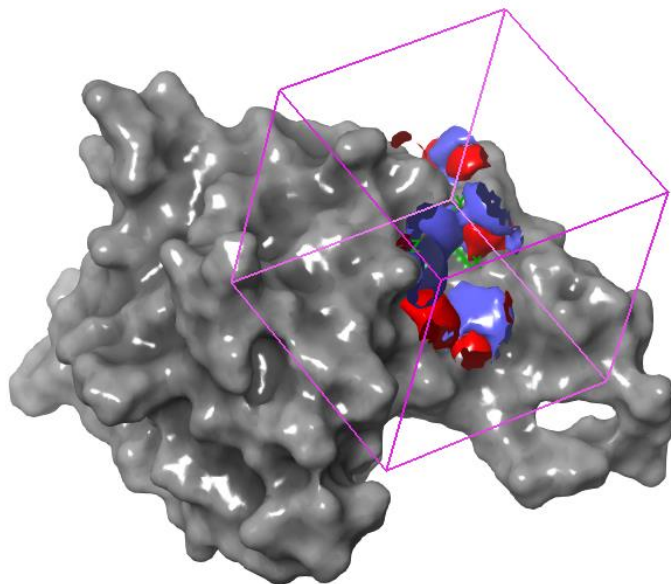
### 3.4.3. Κριτήρια επιλογής κοιλοτήτων πρόσδεσης

Μετά το πέρας της Ανάλυσης Κανονικών Δονήσεων και τη Δυναμική Ανάλυση Δικτύων, αξιολογήθηκαν όλες οι κοιλότητες σε όλες τις δομές της IL-33 και επιλέχθηκαν για να συνεχίσουν στην εικονική σάρωση αυτές που πληρούν τα εξής κριτήρια:

1. Παρουσιάζουν υψηλές τιμές *SiteScore*.
2. Παρουσιάζουν υψηλές τιμές *DScore*.
3. Χαρακτηρίζονται από χαμηλό ποσοστό έκθεσης (*exposure*) στο διαλύτη.
4. Χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό εγκλεισμού (*enclosure*).
5. Έχουν σχετικά μεγάλο όγκο (*volume*).
6. Έχουν σχήμα που μοιάζει με ένα μόριο και δεν περιβάλλονται από ευέλικτες θηλιές.
7. Εμπλέκονται σε περιοχές που εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα σύμφωνα με την ανάλυση Κανονικών Δονήσεων.
8. Να αντιστοιχούν σε περιοχές της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζονται ως λειτουργικές σύμφωνα με την Δυναμική Ανάλυση Δικτύων.

### 3.5 Δημιουργία πλέγματος που περιλαμβάνει την κοιλότητα πρόσδεσης στην IL-33

Προτού ξεκινήσει η εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων στις επιλεγμένες κοιλότητες πρόσδεσης των δομών της IL-33, απαιτείται αρχικά η δημιουργία ενός πλέγματος που να περιλαμβάνει την εκάστοτε κοιλότητα. Το πλέγμα αυτό δημιουργείται με τη βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου Glide της σουίτας Schrödinger [65], [90]. Δεδομένου ότι δεν υπήρχε διαθέσιμη η δομή της πρωτεΐνης με τον προσδέτη, ο ορισμός του πλέγματος έγινε με την επιλογή ενός σημείου που ανήκει στην κοιλότητα πρόσδεσης και είναι κοντά στο κέντρο της υδρόφοβης επιφάνειας της κοιλότητας. Έτσι, δημιουργήθηκε το πλέγμα, ένας κύβος δηλαδή του οποίου η απόσταση από το σημείο που ορίσαμε εντός της κοιλότητας είναι ίση με 10 Å. Η ακμή του κύβου επιλέχθηκε σύμφωνα με το μέγεθος της κοιλότητας της πρωτεΐνης της κάθε δομής της IL-33. Το πεδίο δυνάμεων με βάση το οποίο υπολογίστηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες της κοιλότητας είναι το OPLS3e [91]. Επομένως, στις επιλεγμένες κοιλότητες δημιουργήθηκαν τα πλέγματα που οριοθετούν την περιοχή πρόσδεσης των μορίων για την διαδικασία εικονικής πρόσδεσης που θα ακολουθήσει. Ένα παράδειγμα κοιλότητας πρόσδεσης με το πλέγμα που δημιουργήθηκε παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.8.



**Σχήμα 3.8** Κουτί μέσα στο οποίο ορίζεται το πλέγμα που αναπαριστά το σχήμα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κοιλότητας πρόσδεσης. Η εικόνα λήφθηκε για την κοιλότητα πρόσδεσης της πρώτης διαμόρφωσης NMR της IL-33 σε διάλυμα (pdb code: 2KLL, frame 1).

### 3.6 Εικονική σάρωση χημειοθήκης για την εύρεση πιθανών μορίων- αναστολέων της IL-33

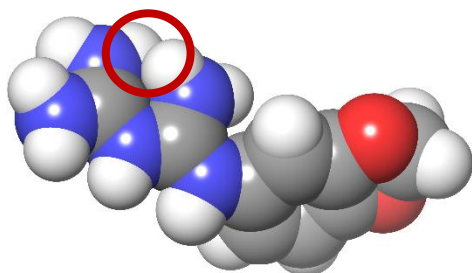
Στις επιλεγμένες κοιλότητες πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων Maybridge HitFinder, η οποία περιέχει 24,747 εμπορικά διαθέσιμα μόρια που μπορούν να δράσουν ως φάρμακα. Κάθε μόριο στη χημειοθήκη προσδένεται εικονικά στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η πρόσδεση στοχεύει στην πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης- μορίου μέσω της διερεύνησης των πιθανών διαμορφώσεων και προσανατολισμών του προσδέτη στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η μοντελοποίηση της μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Glide, το οποίο ανήκει στη σουίτα Schrödinger και πραγματοποιεί υπολογισμούς εικονικής μοριακής πρόσδεσης [90]. Για την εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε κάθε πόζα του προσδέτη, χρησιμοποιήθηκε η εμπειρική συνάρτηση *Standard Precision (SP) GlideScore* (Εξ. 2.5). Η εικονική σάρωση είναι μια χρονοβόρα υπολογιστική διαδικασία, στο τέλος της οποίας προκύπτει στον πίνακα αποτελεσμάτων του Maestro μια λίστα των μορίων της χημειοθήκης, ταξινομημένα κατά αύξουσα σειρά με βάση το *docking score* του Glide. Αυτό σημαίνει ότι το πρώτο μόριο στη λίστα έχει το πιο αρνητικό *docking score*, ενώ το τελευταίο μόριο στη λίστα έχει το πιο θετικό *docking score*. Από αυτή τη λίστα επιλέγονται τα 1000 πρώτα μόρια, τα οποία στη συνέχεια θα υποβληθούν σε μία σειρά φίλτρων προκειμένου να βρεθούν τα κατάλληλα που θα προχωρήσουν σε βιολογικές δοκιμές.



## 3.7 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων πιθανών μορίων-αναστολέων της IL-33 και επιλογή για βιολογική αξιολόγηση

### 3.7.1 Φιλτράρισμα μορίων για στερεοχημικές παρεμποδίσεις

Στα 1000 μόρια που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα της IL-33 έπειτα από την εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων, εφαρμόζεται ένα φίλτρο προκειμένου να απορριφθούν αυτά που εμφανίζουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις. (Σχήμα 3.9) Το φιλτράρισμα πραγματοποιείται με τη χρήση του ChemBioServer, μιας διαδικτυακής εφαρμογής για το φιλτράρισμα χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στο σχεδιασμό φαρμάκων [92]. Το φιλτράρισμα μορίων για στερεοχημικές παρεμποδίσεις ονομάζεται φιλτράρισμα van der Waals και εφαρμόζεται με τη χρήση δύο παραμέτρων: κατώφλι ενέργειας vdW (*vdW Energy Threshold*) και μέγιστο επιτρεπόμενο ποσοστό επικάλυψης ακτίνων vdW (*vdW Radii Tolerance*) [93]. Οι πόζες των μορίων που απέχουν πολύ από το ενεργειακό ελάχιστο, είναι απίθανο να υιοθετηθούν στη φύση και επομένως πρέπει να απορριφθούν. Στην εφαρμογή ChemBioServer, το κατώφλι ενέργειας vdW επιλέγεται ίσο με  $50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ενώ το μέγιστο επιτρεπόμενο ποσοστό επικάλυψης ακτίνων vdW ίσο με 75%. Έπειτα από αυτή τη διαδικασία, παράγεται ένα νέο αρχείο με λιγότερα μόρια από το αρχικό, καθώς έχουν απορριφθεί τα μόρια με στερεοχημικές παρεμποδίσεις.



*Σχήμα 3.9 Ένα παράδειγμα μορίου που απορρίπτεται από τον ChemBioServer λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων.*

### 3.7.2 Φιλτράρισμα μορίων για τοξικά δομικά χαρακτηριστικά

Τα μόρια που περνούν το φίλτρο για τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις, ελέγχονται στη συνέχεια για τοξικά δομικά χαρακτηριστικά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της διαδικτυακής εφαρμογής ChemBioServer, όπου φιλτράρονται και απορρίπτονται τα μόρια που περιέχουν τοξικά ή καρκινογενή δομικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, ο ChemBioServer περιέχει μία λίστα από 25 τοξικά οργανικά δομικά χαρακτηριστικά και όταν κάποιο μόριο περιέχει κάποιο από αυτά, τότε απορρίπτεται. Στο τέλος του φιλτραρίσματος, λαμβάνεται ένα αρχείο με τα μόρια που έχουν περάσει το «τεστ» των τοξικών χαρακτηριστικών στη δομή τους.

### 3.7.3 Φιλτράρισμα μορίων με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες

Επόμενο βήμα αποτελεί το φιλτράρισμα των μορίων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Αρχικά, απαιτείται ο υπολογισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, ένα στάδιο πολύ σημαντικό για τον έλεγχο της αναμενόμενης βιολογικής δράσης των μορίων, πριν αυτά οδηγηθούν σε πειραματικές δοκιμές. Υπενθυμίζεται ότι προκειμένου ένα μόριο να εξελιχθεί σε ένα αποτελεσματικό φάρμακο είναι απαραίτητο, εκτός από το να εμφανίζει συγγένεια με την πρωτεΐνη, να χαρακτηρίζεται και από μια σειρά συγκεκριμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Για την περιγραφή αυτών των ιδιοτήτων χρησιμοποιείται ο όρος ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) που αναφέρεται στις ιδιότητες της Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού και Απέκκρισης των μορίων που προορίζονται για φάρμακα. Στην παρούσα περίπτωση, η μελέτη των ιδιοτήτων ADME πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός υπολογιστικού προγράμματος της σουίτας Schrödinger, το QikProp [73]. Το QikProp είναι ένα πρόγραμμα γρήγορης και αξιόπιστης πρόβλεψης της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης μορίων, που σχεδιάστηκε από τον καθηγητή William L. Jorgensen [71]. Το QikProp παρέχει τα εύρη τιμών των ιδιοτήτων που προβλέπει σύμφωνα με το 95% των γνωστών φαρμάκων.

Αφού έχουν υπολογιστεί οι φυσικοχημικές ιδιότητες όλων των μορίων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης, τα μόρια φιλτράρονται ώστε να ικανοποιούν τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Ο λογάριθμος της προβλεπόμενης υδατικής διαλυτότητας του μορίου (QPlogS, όπου το S είναι σε μονάδες  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) πρέπει να είναι μεγαλύτερη από -6.5.
2. Η προβλεπόμενη φαινόμενη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2 (QPpCaco,  $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 22.
3. Ο αριθμός πιθανών μεταβολικών αντιδράσεων (#metab) πρέπει να είναι μικρότερος από 7.

Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα τρία φίλτρα θυμίζουν τον «κανόνα των τριών» του Jorgensen, με τη μόνη διαφορά ότι στον κανόνα αυτό, ο λογάριθμος της προβλεπόμενης υδατικής διαλυτότητας του μορίου, QPlogS πρέπει να είναι μεγαλύτερη από -5.7 [71].

Τα μόρια που ικανοποιούν και τα τρία κριτήρια αποθηκεύονται σε ένα νέο αρχείο, ενώ αυτά που δεν περνούν το φιλτράρισμα απορρίπτονται. Στη συνέχεια, στα μόρια που πέρασαν εφαρμόζεται ένα ακόμα φίλτρο σύμφωνα με το οποίο η ιδιότητα QPlogPo/w, δηλαδή ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού πρέπει να είναι μικρότερος από 5. Συνεπώς, τα μόρια που πέρασαν με επιτυχία όλα τα φίλτρα που αφορούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες είναι ικανά να προχωρήσουν σε πειραματική αξιολόγηση.

### 3.7.4 Ομαδοποίηση μορίων και εύρεση πρότυπων μορίων

Ωστόσο, τα μόρια που πέρασαν τη διαδικασία του φιλτραρίσματος είναι πολλά σε αριθμό και ορισμένα από αυτά παρουσιάζουν κάποιες ομοιότητες. Επομένως, πρέπει με κάποιο τρόπο να κατηγοριοποιηθούν σε μικρότερες ομάδες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται η διαδικτυακή εφαρμογή ChemBioServer που ομαδοποιεί τα μόρια σύμφωνα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, παρέχοντας τις «αντιπροσωπευτικές» ενώσεις για κάθε ομάδα, δηλαδή τα πρότυπα μόρια [92].

Αρχικά, τα μόρια ομαδοποιούνται με βάση τον ιεραρχικό αλγόριθμο (hierarchical clustering) [94]. Στον ChemBioServer επιλέγονται οι εξής τρεις παράμετροι: α) Distance selection: “Soergel (Tanimoto Coeficient)”, β) Clustering Linkage Selection: “Complete”, γ) Clustering Threshold: “0.95” ή “0.94” ή “0.93” ανάλογα με τη δομή της IL-33 και τον αριθμό των ομάδων που δημιουργούνται. Υπενθυμίζεται ότι προτιμάται ο αριθμός των ομάδων να είναι από 5 μέχρι 10. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, για τη δομή της 2KLL, frame 2 και της 5VI4, chain A επιλέχθηκε κατώφλι ίσο με 0.95, για την δομή της 4KC3, chain A επιλέχθηκε 0.94, ενώ για τη δομή της 5VI4, chain D επιλέχθηκε ίσο με 0.93.

Στη συνέχεια, με τη χρήση του μοντέρνου αλγορίθμου ομαδοποίησης που βασίζεται σε σχέσεις συγγένειας (affinity propagation) [95] εξάγονται οι αντιπροσωπευτικές ενώσεις για κάθε ομάδα. Εδώ η μόνη παράμετρος που επιλέγεται είναι το Distance selection: “Soergel (Tanimoto Coeficient)”.

Τέλος, έπειτα από την ομαδοποίηση των μορίων και την εύρεση των πρότυπων μορίων, κάποια από αυτά επιλέγονται για να μελετηθούν σε βιολογικά πειράματα *in vitro*. Η επιλογή των πιο κατάλληλων μορίων για βιολογική αξιολόγηση γίνεται με την εφαρμογή των ακόλουθων κριτηρίων:

- Αριθμός περιστρεφόμενος δεσμών στο μόριο  $\leq 10$
- Λογάριθμος της υδατοδιαλυτότητας του μορίου  $> -7$
- Αριθμός χειρόμορφων κέντρων στο μόριο = 0 ή 1

Στην παρούσα περίπτωση επιλέχθηκαν 5 πρότυπα μόρια για κάθε μία από τις τέσσερις κοιλότητες στην IL-33 τα οποία θα οδηγηθούν σε βιολογικά πειράματα.

### 3.7.5 Πειραματική αξιολόγηση

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-προσδέτη παίζει σπουδαίο ρόλο στην κατανόηση της βιολογίας σε μοριακό επίπεδο και είναι επίσης ένα σημαντικό κομμάτι της βιομηχανίας φαρμάκων και βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το πλαίσιο, εφαρμόζονται διάφορες πειραματικές και θεωρητικές μέθοδοι για να εκτιμηθεί η συγγένεια δέσμευσης πρωτεΐνης-προσδέτη και να μετρηθεί η αποτελεσματικότητα ενός πιθανού φαρμάκου. Σημειώνεται ότι η μέση ανασταλτική συγκέντρωση, που ονομάζεται  $IC_{50}$ , είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο και αξιόπιστο μέτρο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγγένειας και της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές δοκιμές που μπορούν να εφαρμοστούν για την εκτίμηση της συγγένειας ανάμεσα στην πρωτεΐνη και στο μόριο-προσδέτη, κάποιες από τις οποίες παρουσιάζονται στη συνέχεια.

#### 3.7.5.1 Δοκιμασίες χωρίς την ύπαρξη κυττάρων

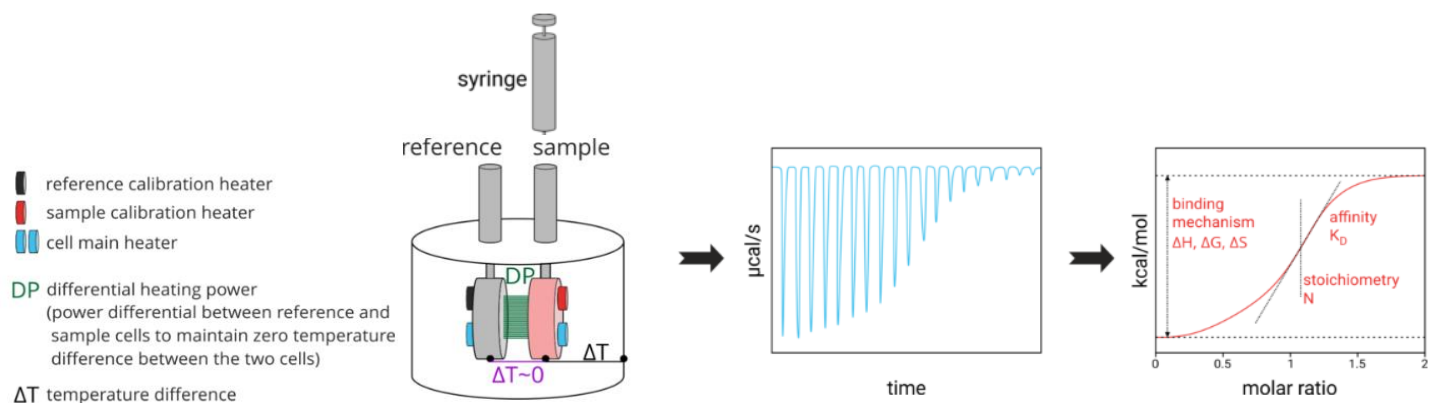
##### ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

Η Ισοθερμική Θερμιδομετρία Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) είναι μία φυσική, ποσοτική τεχνική που μετρά άμεσα την ανταλλαγή θερμότητας κατά τη διάρκεια σχηματισμού συμπλόκου ανάμεσα στην πρωτεΐνη και το μόριο, σε σταθερή θερμοκρασία. Αποτελείται από δύο κελιά (cells) που περικλείονται από ένα αδιαβατικό πλαίσιο. Οι ενώσεις που πρόκειται να μελετηθούν

τοποθετούνται στο κελί δείγματος (sample cell), ενώ το άλλο κελί (reference cell) χρησιμοποιείται ως control και περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο διαλύεται το δείγμα. Ένα τυπικό πείραμα ITC περιέχει τρία στάδια, με το πρώτο να είναι η τιτλοδότηση του μορίου-προσδέτη στο διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη, στην παρούσα περίπτωση την IL-33. Έπειτα, η θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται (ανάλογα με η φύση της αντίδρασης) κατά την πρόσδεση του μορίου στην πρωτεΐνη μετράται και τέλος τα δεδομένα της ITC επεξεργάζονται και προσαρμόζονται για να ληφθούν μεγέθη όπως η σταθερά πρόσδεσης ( $K_b$ ), η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης Gibbs ( $\Delta G$ ), η ενθαλπία πρόσδεσης ( $\Delta H$ ), η εντροπία πρόσδεσης ( $\Delta S$ ) και η στοιχειομετρία ( $n$ ) της αντίδρασης. (Σχήμα 3.10) Συγκεκριμένα, οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs και της εντροπίας μπορούν να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 3.1. Οι συνολικές μετρήσεις συνίστανται από την χρονικά εξαρτώμενη ισχύ που απαιτείται για τη διατήρηση ίσων θερμοκρασιών μεταξύ των δύο κελιών σε κάθε τιτλοδότηση [96].

$$\Delta G = -RT \ln(K_a) = \Delta H - T\Delta S \quad [3.1]$$

όπου  $R$  είναι η σταθερά των αερίων και  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία.

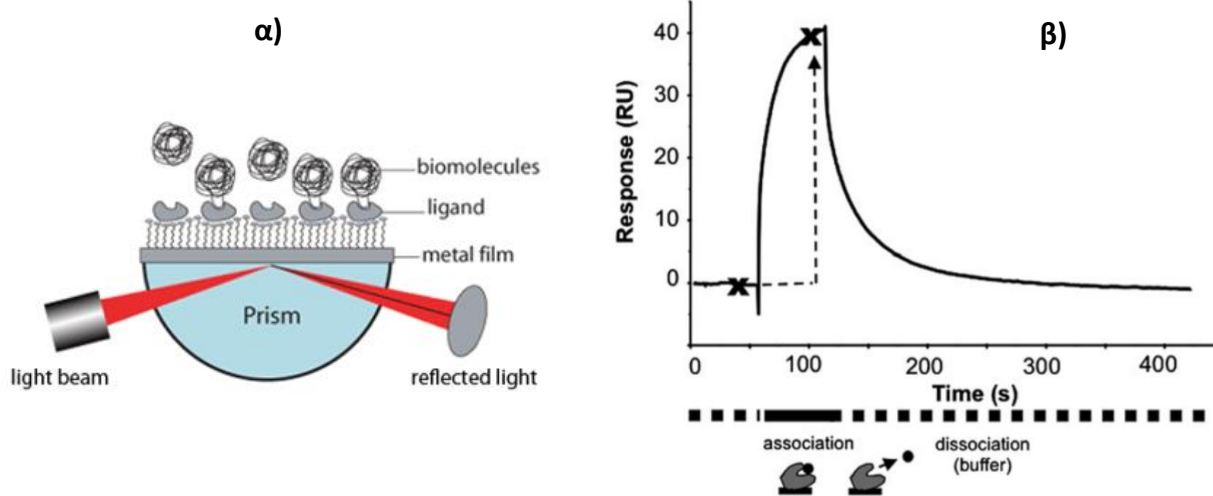


**Σχήμα 3.10** Η διαδικασία που ακολουθείται σε ένα πείραμα Ισοθερμικής Θερμιδομετρίας Τιτλοδότησης. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [45].

## ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ

Ο Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) είναι μία οπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε βιομόρια. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή μετρά τη μεταβολή του δείκτη διάθλασης κοντά σε μία επιφάνεια ενός αισθητήρα και είναι ικανή να ποσοτικοποιήσει την κινητική δέσμευσης ενός μορίου σε μία πρωτεΐνη σε πραγματικό χρόνο. Σε ένα όργανο SPR η επιφάνεια του αισθητήρα είναι συνήθως μία λεπτή μεμβράνη χρυσού, τοποθετημένη σε ένα γυάλινο στήριγμα, το οποίο σχηματίζει το επίπεδο ροής μιας κυψελίδας μέσω της οποίας ένα υδατικό διάλυμα ρέει συνεχώς. (Σχήμα 3.11.α) Τα μόρια της πρωτεΐνης είναι ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα και το μόριο-προσδέτης εγχέεται στο υδατικό διάλυμα για να ανιχνεύσει την αντίδραση δέσμευσης. Σε μία δοκιμή SPR, ένα φως προσπίπτει σε μία μεταλλική

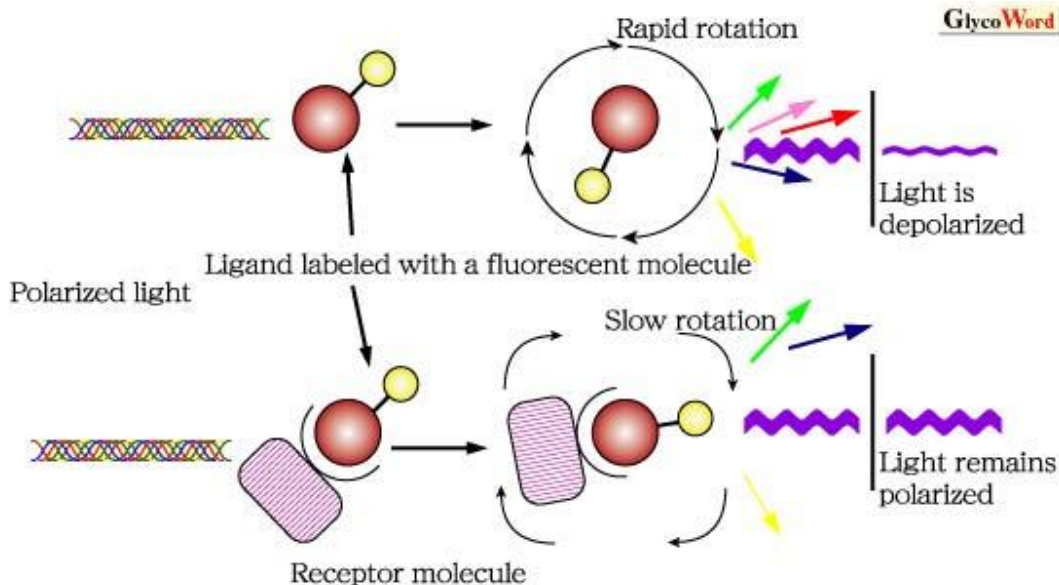
μεμβράνη μέσω ενός πρίσματος και η ανακλώμενη δέσμη συλλέγεται και αναλύεται. Καθώς τα μόρια προσδέονται στα ακινητοποιημένα μόρια της πρωτεΐνης, παρατηρείται αύξηση στο δείκτη διάθλασης (εκφραζόμενη σε μονάδες απόκρισης, response units, RU). Μετά από έναν επιθυμητό χρόνο αντίδρασης (δηλαδή όταν όλες οι θέσεις πρόσδεσης είναι κατειλημμένες), ένα διάλυμα που δεν περιέχει μόριο εγχύεται μέσω της κυψελίδας ώστε να διαχωριστεί το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-προσδέτη. Καθώς ο προσδέτης αποσυνδέεται από την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη, παρατηρείται μείωση στις RU. Όλα τα βήματα στην προετοιμασία και την ανάλυση της επιφάνειας παρακολουθούνται σε ένα σενογράφημα (sensogram), το οποίο κατγράφει τον σχηματισμό και διάσπαση συμπλοκών σε όλη την πορεία της αλληλεπίδρασης, με την κινητική (ταχύτητα σύνδεσης και αποσύνδεσης) να αποκαλύπτονται από το σχήμα της καμπύλης σύνδεσης [97].



**Σχήμα 3.11** α) Η διάταξη ενός οργάνου που χρησιμοποιείται κατά τον Συντονισμό Επιφανειακών Πλασμονίων [45].  
β) Σχηματική απεικόνιση ενός σενογραφήματος.

### ΠΟΛΩΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

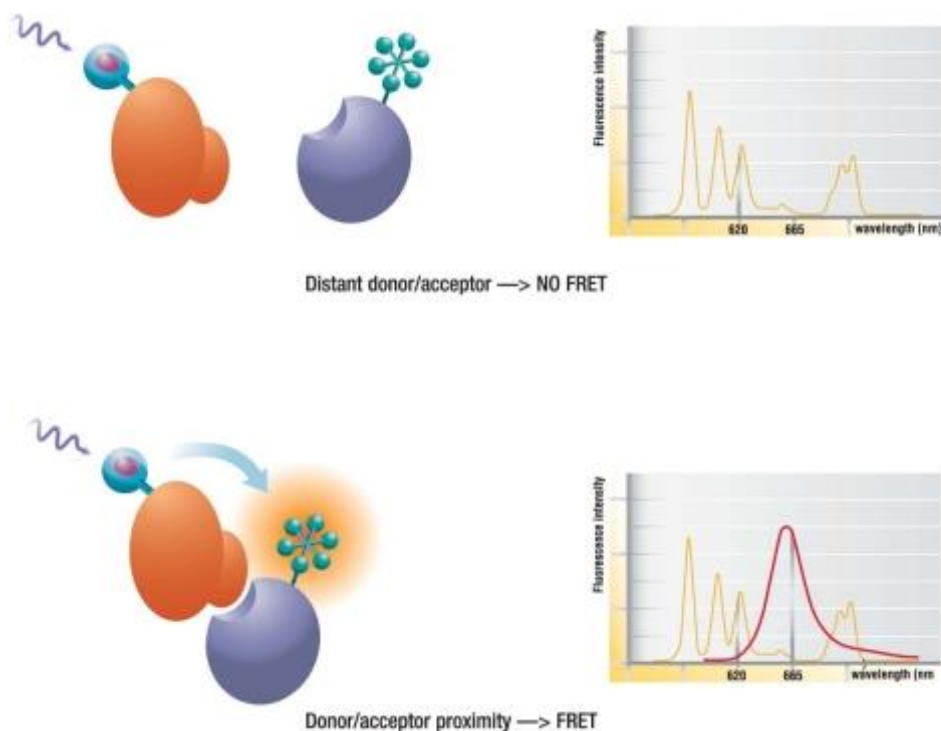
Η πόλωση φθορισμού (Fluorescence Polarization, FP) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Στις δοκιμές FP, η παρακολούθηση ενός συμβάντος πρόσδεσης ενός μορίου σε μια πρωτεΐνη είναι δυνατή κυρίως επειδή αυτή η τεχνική είναι ευαίσθητη στις μεταβολές του μοριακού βάρους. Η δοκιμή αυτή απαιτεί την ύπαρξη ενός φθορίζοντος μορίου (ανιχνευτής, probe) το οποίο διεγείρεται από ένα επίπεδο πολωμένο φως. Για μικρά μόρια, η αρχική πόλωση μειώνεται γρήγορα λόγω της περιστροφικής διάχυσης κατά τη διάρκεια ζωής του φθορισμού, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή πόλωση φθορισμού. Όταν το μικρό φθορίζον μόριο δεσμεύεται σε ένα μεγαλύτερο μόριο όπως είναι η πρωτεΐνη, κατά συνέπεια παρατηρείται βραδύτερη περιστροφή και ταυτόχρονα αυξημένη πόλωση φθορισμού [98]. (Σχήμα 3.12)



**Σχήμα 3.12** Η βασική αρχή που διέπει την δοκιμή Πόλωσης Φθορισμού. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική αναφορά [45].

#### ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Οι τεχνικές που βασίζονται σε μετρήσεις της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) ανάμεσα σε δύο φθορίζοντα μόρια μπορούν να μελετήσουν την πρόσδεση ενός μορίου σε μία πρωτεΐνη. Η FRET είναι ένα φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα όταν δύο διαφορετικά φθορίζοντα μόρια – δότης και δέκτης- βρίσκονται πολύ κοντά στο χώρο (σε απόσταση μικρότερη από 10 nm). Πιο συγκεκριμένα, όταν ένα μόριο που φθορίζει απορροφά ενέργεια υπό τη μορφή φωτονίων, τότε μεταπίπτει σε μια διεγερμένη κατάσταση, στην οποία παραμένει για σύντομο χρονικό διάστημα και από την οποία επανέρχεται στη θεμελιώδη κατάσταση με αποβολή της ενέργειας που απορρόφησε. Ο χρόνος παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση χαρακτηρίζεται ως φυσικός χρόνος ζωής του (natural lifetime), είναι της τάξης των ps ή ns και είναι χαρακτηριστικός για το φθορίζον μόριο. Όταν, όμως, σε κοντινή απόσταση υπάρχει ένα άλλο μόριο που φθορίζει, τότε μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό ενέργεια από τον φθορίζον-δότη. (Σχήμα 3.13) Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά ο χρόνος παραμονής του φθορίζον-δότη στη διεγερμένη κατάσταση και κατ' επέκταση να μειώνεται ο χρόνος ζωής του. Κατά τη διαδικασία αυτή, η ενέργεια που μεταφέρεται δεν είναι υπό μορφή φωτονίων αλλά ουσιαστικά πρόκειται για μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού των διπόλων του δότη με τα δίπολα του δέκτη για αυτό και χαρακτηρίζεται ως ενέργεια συντονισμού [99].



**Σχήμα 3.13** Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET).

### 3.7.5.2 Δοκιμασίες σε κύτταρα

#### ΚΙΤ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ-8

Μέσω της τεχνικής που χρησιμοποιεί το κιτ μέτρησης κυττάρων-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) μπορεί να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία του μορίου-προσδέτη, μέσω δοκιμασιών πολλαπλασιασμού των κυττάρων και δοκιμασιών κυτταροτοξικότητας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετράται σε κάθε μία από τις ημέρες που λαμβάνει χώρα το πείραμα. Κάποια μL του CCK-8 προστίθενται σε κάθε κυψελίδα της διάταξης και αφήνονται για κάποιο χρονικό διάστημα να αντιδράσουν. Έπειτα, μετράται η απορρόφηση για κάθε κυψελίδα και απεικονίζεται γραφικά ο % πολλαπλασιασμός των κυττάρων συναρτήσει των ημερών που λαμβάνει χώρα το πείραμα.

#### ΔΟΚΙΜΗ MTT

Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να εκτιμηθεί και με την τεχνική MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) που είναι μία χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, η χρήση του MTT βασίζεται στη δραστικότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων δεϋδρογενάσης σε κύτταρα. Το κίτρινο MTT ανάγεται σε μωβ φορμαζάνη στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα μόνο όταν τα ένζυμα μιτοχονδριακής ρεντουκτάσης είναι ενεργά και επομένως η μετατροπή μπορεί να συσχετισθεί άμεσα με

τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των κυττάρων κόβουν τον δακτύλιο του τετραζολίου, παράγοντας μοβ κρυστάλλους MTT φορμαζάνης οι οποίοι είναι αδιάλυτοι σε υδατικά διαλύματα. Οι κρύσταλλοι μπορούν να διαλυθούν σε οξινισμένη ισοπροπανόλη ή σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Το προκύπτον μοβ διάλυμα μετράται φασματοφωτομετρικά σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως μεταξύ 500 και 600 nm). Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ποσότητας της σχηματισμένης MTT φορμαζάνης και την αύξηση της απορρόφησης.

## ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι ένα τεχνική που μετρά τα φυσικά χαρακτηριστικά ενός στοιχείου, καθώς το κύτταρο ρέει σε εναιώρημα μέσω μιας συσκευής μέτρησης. Βασίζεται στα χαρακτηριστικά σκέδασης του φωτός των κυττάρων που ερευνώνται, τα οποία μπορεί να προέρχονται από χρωστικές. Αυτή η προσέγγιση καθιστά την κυτταρομετρία ροής ισχυρό εργαλείο για τη λεπτομερή ανάλυση σύνθετων πληθυσμών κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Μέσω της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων προκειμένου να διερευνηθεί η τοξικότητα ενώσεων, καθώς και οι επιδράσεις φαρμάκων στην ανάπτυξη κυττάρων όγκου. Οι μελέτες πολλαπλασιασμού κυττάρων σε κυτταρικούς πληθυσμούς υπολογίζουν τον αριθμό των ζωντανών και ολικών κυττάρων ή μετρούν τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτές οι δοκιμασίες χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μελέτη των T κυττάρων και της ανοσοαπόκρισης. Η κυτταρομετρία ροής είναι ιδανική για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων και τη μελέτη των μοναδικών κυτταρικών τύπων εντός ενός ετερογενούς πληθυσμού. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες, όπως ο διοξικός εστέρας καρβοξυφλουορεσκεΐνης (CFSE), που ενσωματώνονται στις κυτταρικές μεμβράνες και τις ενδοκυτταρικές δομές ζωντανών κυττάρων. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς οι χρωστικές αραιώνονται ομοιόμορφα σε θυγατρικά κύτταρα με επακόλουθες κυτταρικές διαιρέσεις που μετριοούνται ως ξεχωριστές κορυφές κατά την ανάλυση. Κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει μία διαδοχική γενιά κυτταρικής διαίρεσης [100].

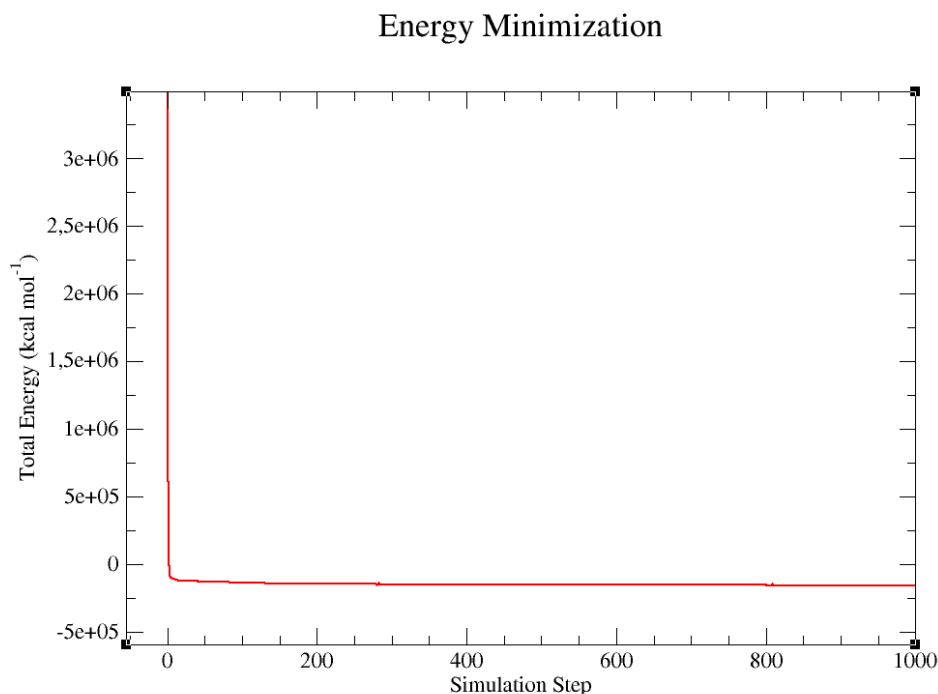


## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 4.1 Αποτελέσματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής στην IL-33

Οι δεκατρείς δομές της IL-33 που απομονώθηκαν από τις διαθέσιμες δομές στην RCSB Protein Data Bank με το κωδικό όνομα 2KLL, 4KC3 και 5VI4, υποβλήθηκαν σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, αφού πρώτα προετοιμάστηκαν με τη διαδικασία που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στην ενότητα αυτή υπενθυμίζονται συνοπτικά τα τέσσερα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν κατά τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, ενώ ταυτόχρονα παρατίθενται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων.

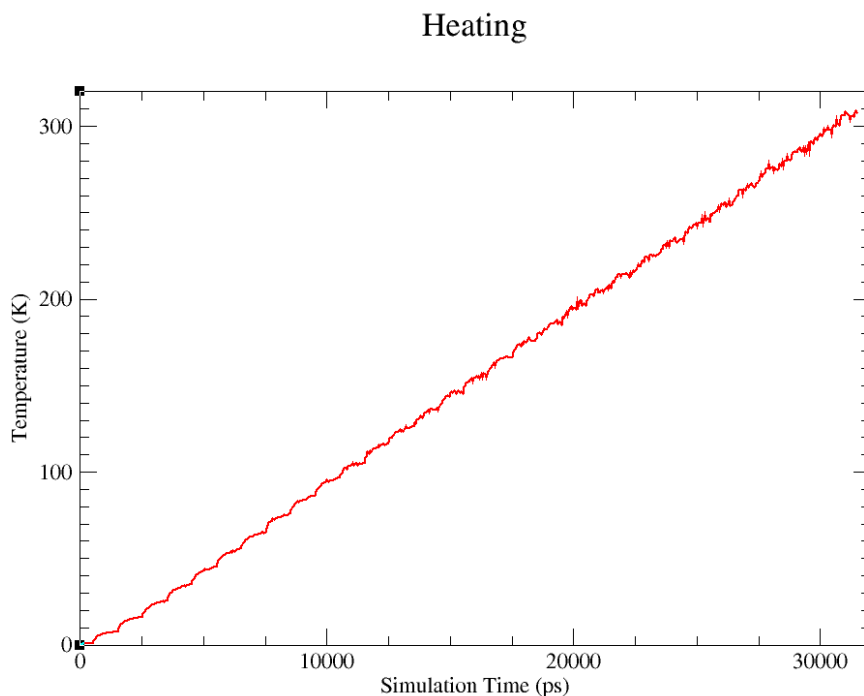
Αρχικά, σε κάθε δομή πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας για 1,000 βήματα προσομοίωσης. Ο αριθμός των βημάτων ήταν αρκετός ώστε να συγκλίνει η ενέργεια του κάθε συστήματος σε μία σταθερή τιμή. Η σύγκλιση επιβεβαιώνεται στο Σχήμα 4.1, όπου απεικονίζονται η συνολική ενέργεια του συστήματος ως συνάρτηση των βημάτων προσομοίωσης. Σημειώνεται ότι το Σχήμα 4.1 κατασκευάστηκε από τα αποτελέσματα της ελαχιστοποίησης ενέργειας της δέκατης διαμόρφωσης NMR της δομής 2KLL και αποτελεί ενδεικτικό παράδειγμα, καθώς και οι δεκατρείς δομές της IL-33 ακολουθούν το ίδιο μοτίβο σύγκλισης της ενέργειας κατά την ελαχιστοποίηση.



**Σχήμα 4.1** Διάγραμμα της συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει των βημάτων προσομοίωσης κατά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL.

Έπειτα από το στάδιο ελαχιστοποίησης της ενέργειας, πραγματοποιήθηκε θέρμανση των συστημάτων από τους 0 στους 310 K, σε συνολικό χρόνο προσομοίωσης 32 ps. Το βήμα για τη θέρμανση ορίστηκε ίσο

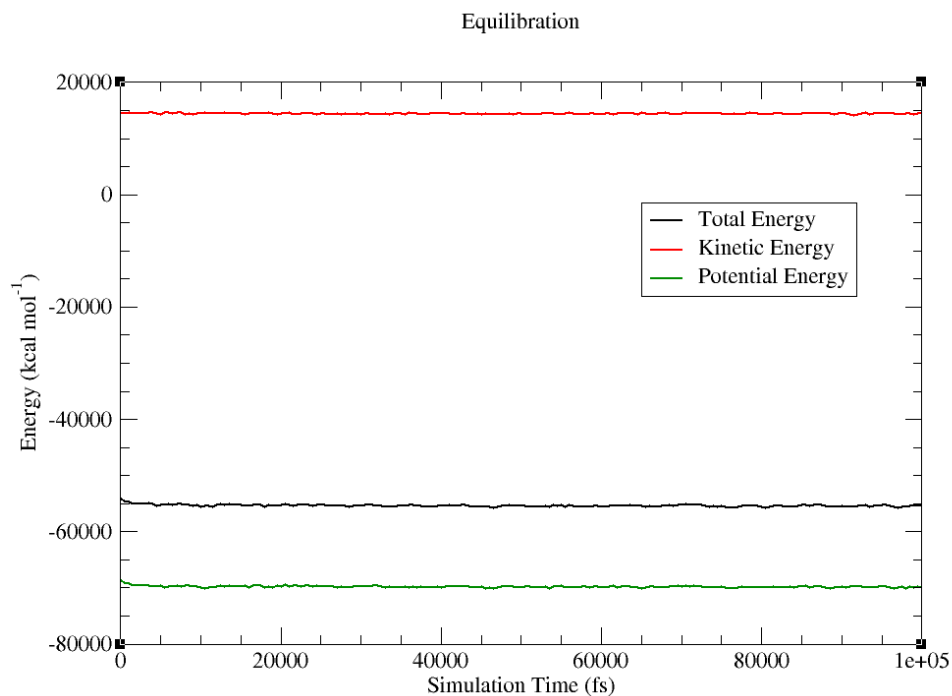
με 2 fs/βήμα. Η θέρμανση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και για τις δεκατρείς δομές, καθώς παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία ανεβαίνει ομαλά μέχρι να φτάσει στους 310K. Στο διάγραμμα 4.2 παρουσιάζεται ενδεικτικά το διάγραμμα θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL.



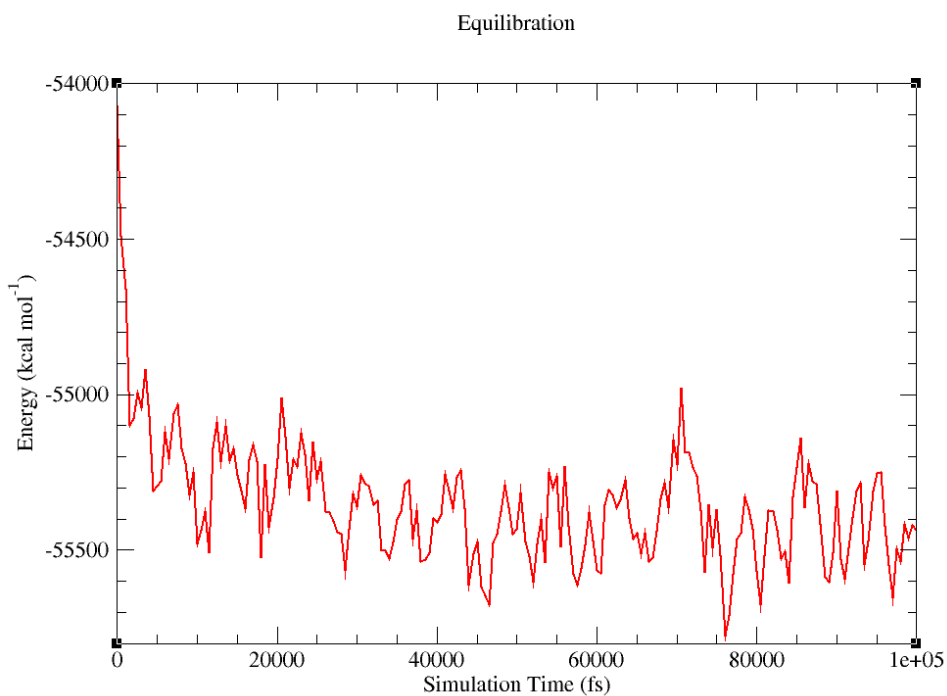
**Σχήμα 4.2** Διάγραμμα της θερμοκρασίας του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL.

Μετά τη θέρμανση της πρωτεΐνης, οι δομές εξισορροπήθηκαν προκειμένου να διορθωθούν «λάθη» που προκλήθηκαν από την απότομη θέρμανση. Αυτή η διαδικασία στις δομές της IL-33 πραγματοποιήθηκε για 100,000 βήματα, με χρονικό βήμα προσομοίωσης 2 fs/step. Έπειτα από την ολοκλήρωση του σταδίου της εξισορρόπησης, μελετήθηκαν ιδιότητες των συστημάτων όπως η θερμοκρασία και η ενέργεια ως προς το χρόνο και παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές τους. Επομένως, η εξισορρόπηση έγινε με επιτυχία και μπορούν να πραγματοποιηθούν οι παραγωγικές προσομοιώσεις για όλα τα συστήματα. Στο Διάγραμμα 4.3 παρουσιάζεται ενδεικτικά το διάγραμμα συνολικής, κινητικής και δυναμικής ενέργειας συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL. Παρατηρούνται μικρές διακυμάνσεις στις ενέργειες συναρτήσει του χρόνου, επομένως το σύστημα έφτασε σε θερμοδυναμική ισορροπία.

α)



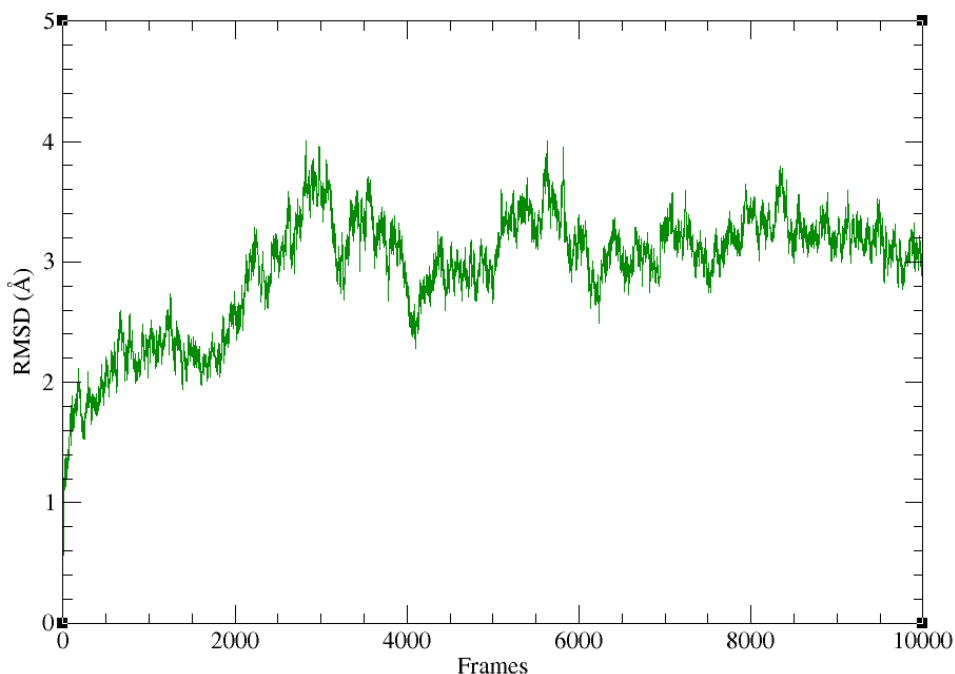
β)



**Σχήμα 4.3** (α) Διάγραμμα της κινητικής, δυναμικής και συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης. (β) Διάγραμμα της συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης όπου φαίνονται οι διακυμάνσεις της ενέργειας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Το διάγραμμα κατασκευάστηκε για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι παραγωγικές προσομοιώσεις των δομών της IL-33, για συνολικό χρόνο προσομοίωσης 10 ns για κάθε δομή. Το αποτέλεσμα της παραγωγικής φάσης των προσομοιώσεων ήταν οι τροχιές (trajectories), οι οποίες διαμορφώθηκαν καταγράφοντας τις ατομικές συντεταγμένες του συστήματος. Τα αποτελέσματα της παραγωγικής φάσης των προσομοιώσεων μελετήθηκαν παρατηρώντας στην τροχιά ποια κομμάτια της πρωτεΐνης είναι πιο ευέλικτα, όπου διαπιστώθηκε ότι οι θηλιές εμφανίζουν μεγαλύτερη ευκαμψία, ενώ τα β- πτυχωτά φύλλα και οι έλικες που απαρτίζουν τη δομή δεν χαρακτηρίζονται από κινητικότητα. Επιπρόσθετα, για τις δεκατρείς τροχιές που παρήχθησαν, απεικονίστηκαν γραφικά οι τιμές RMSD συναρτήσει των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης στη διάρκεια της προσομοίωσης (frames). Ένα ενδεικτικό διάγραμμα της διακύμανσης των τιμών RMSD παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4, το οποίο κατασκευάστηκε από τα αποτελέσματα της δέκατης διαμόρφωσης NMR της δομής 2KLL.

### RMSD distribution



**Σχήμα 4.4** Διακύμανση των τιμών RMSD συναρτήσει των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης στη διάρκεια της προσομοίωσης (frames). Το διάγραμμα κατασκευάστηκε για τη δέκατη διαμόρφωση NMR της δομής 2KLL.

Στο Σχήμα 4.4 παρατηρείται ότι το RMSD είναι σχετικά σταθερό κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης καθώς παρατηρείται ότι φτάνει σε ένα «πλατό» όπου οι τιμές δεν εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις.

## 4.2 Αξιολόγηση των κοιλοτήτων πρόσδεσης στην IL-33 και επιλογή αυτών που δείχνουν αλλοστερική επίδραση

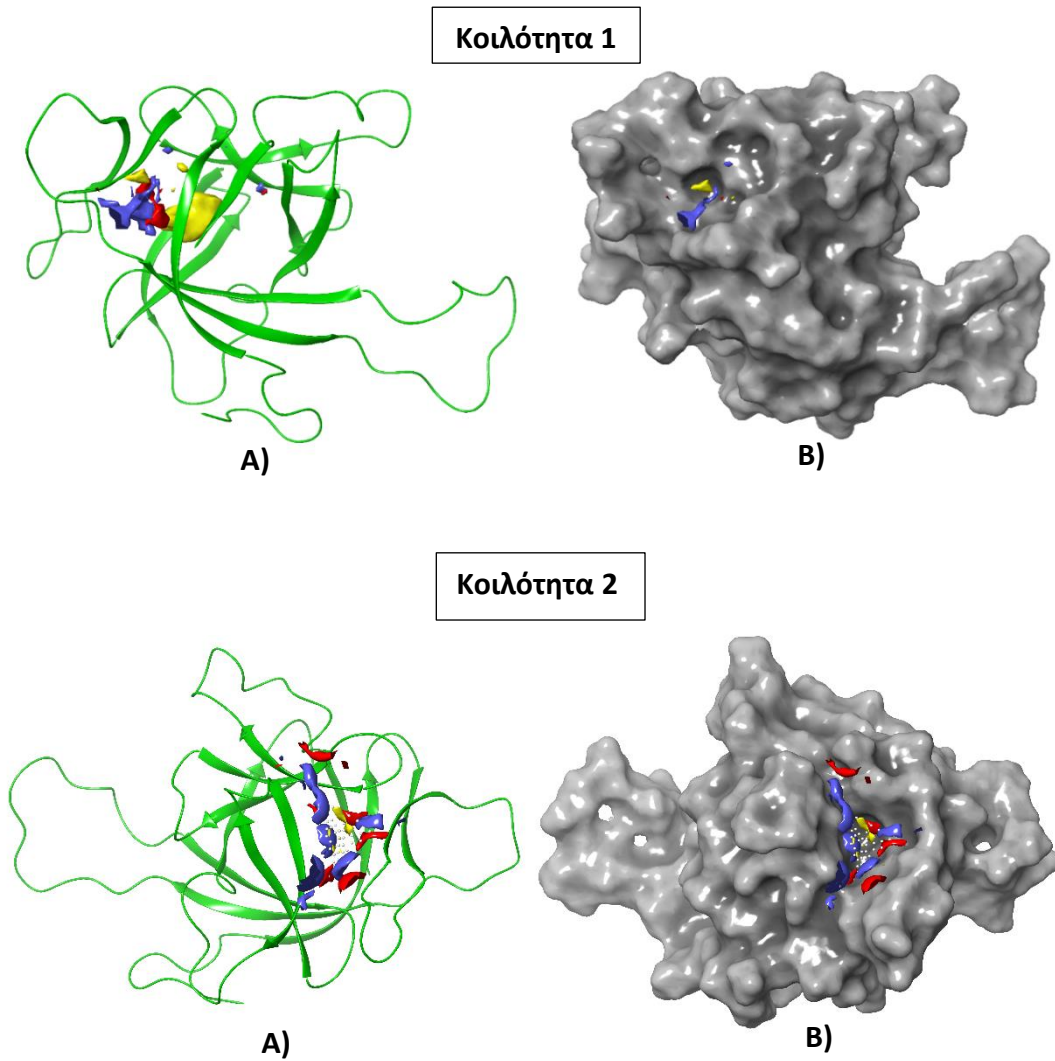
Στις 13 αντιπροσωπευτικές δομές της IL-33 που προέκυψαν έπειτα από την ομαδοποίηση (clustering), πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη κοιλοτήτων πρόσδεσης με το SiteMap της σουίτας Schrödinger [66]. Όλες οι κοιλότητες που πρόβλεψε το SiteMap εξετάστηκαν προσεκτικά και επιλέχθηκαν αυτές που πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

1. Χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές *SiteScore*, ώστε να μπορούν να λειτουργήσουν ως θέσεις πρόσδεσης ενός μορίου.
2. Χαρακτηρίζονται από υψηλό *DScore*, που πιθανόν αντιστοιχούν σε περιοχές που μπορεί να προσδεθεί ένα μόριο και να παρουσιάσει φαρμακολογική δράση.
3. Παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό έκθεσης (*exposure*) στο διαλύτη που περιβάλλει την πρωτεΐνη.
4. Παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό εγκλεισμού (*enclosure*).
5. Έχουν σχετικά μεγάλο όγκο (*volume*), ώστε να μπορεί το μόριο-προσδέτης να λάβει την κατάλληλη πόζα.
6. Χαρακτηρίζονται από ένα σχήμα που μοιάζει με ένα μόριο, δηλαδή δεν είναι «απλωμένες» στο χώρο και πολύ στρογγυλεμένες, έτσι ώστε το μόριο να μπορεί να καταλάβει την κατάλληλη θέση μέσα στην κοιλότητα. Επίσης, δεν περιβάλλονται από ευέλικτες θηλιές, καθώς κάτι τέτοιο δεν ευνοεί τη σταθερή πρόσδεση του μορίου.
7. Εμπλέκονται σε περιοχές που εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα σύμφωνα με την ανάλυση Κανονικών Δονήσεων.
8. Αντιστοιχούν σε περιοχές της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζονται ως λειτουργικές σύμφωνα με την Δυναμική Ανάλυση Δικτύων.

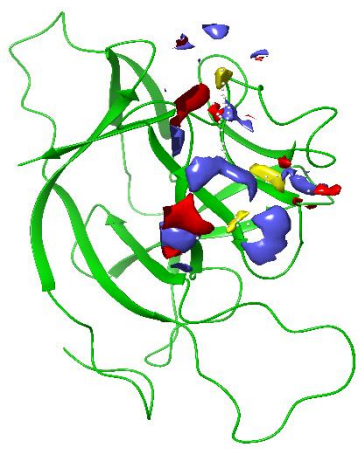
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι κοιλότητες που προβλέφθηκαν σε τέσσερις δομές της IL-33, αναλύονται οι ιδιότητές τους όπως υπολογίσθηκαν από το SiteMap και εξετάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης Κανονικών Δονήσεων και της Δυναμικής Ανάλυσης Δικτύων. Σημειώνεται ότι κρίθηκε σκόπιμο να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα μόνο για αυτές τις τέσσερις δομές της IL-33 καθώς από αυτές επιλέχθηκαν οι κοιλότητες οι οποίες υποβλήθηκαν σε εικονική σάρωση χημειοθήκης για την εύρεση πιθανών μορίων-αναστολέων.

## 2KLL, frame 2

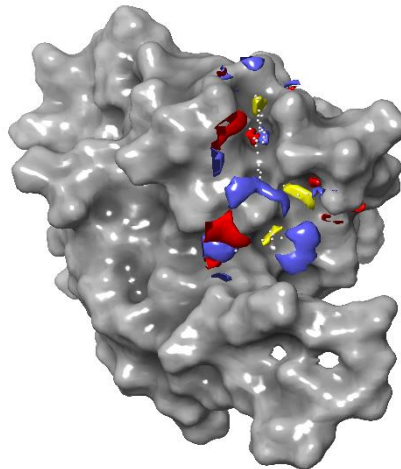
Η πρώτη δομή που μελετάται ανήκει στη δεύτερη διαμόρφωση της IL-33 από NMR (PDB code: 2KLL, frame 2), στην οποία προβλέφθηκαν οι πέντε ακόλουθες κοιλότητες πρόσδεσης με τη χρήση του SiteMap. (Σχήμα 4.5)



Κοιλότητα 3

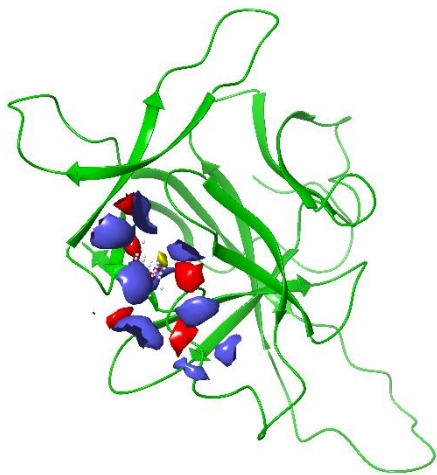


A)

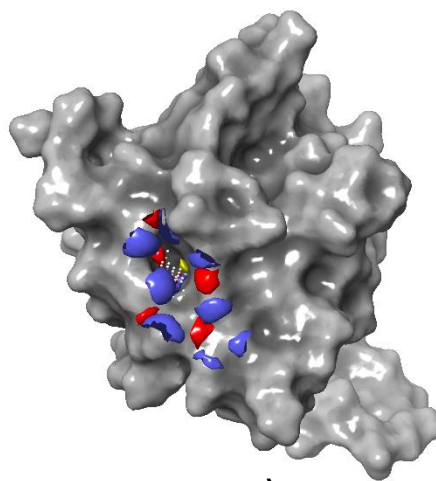


B)

Κοιλότητα 4

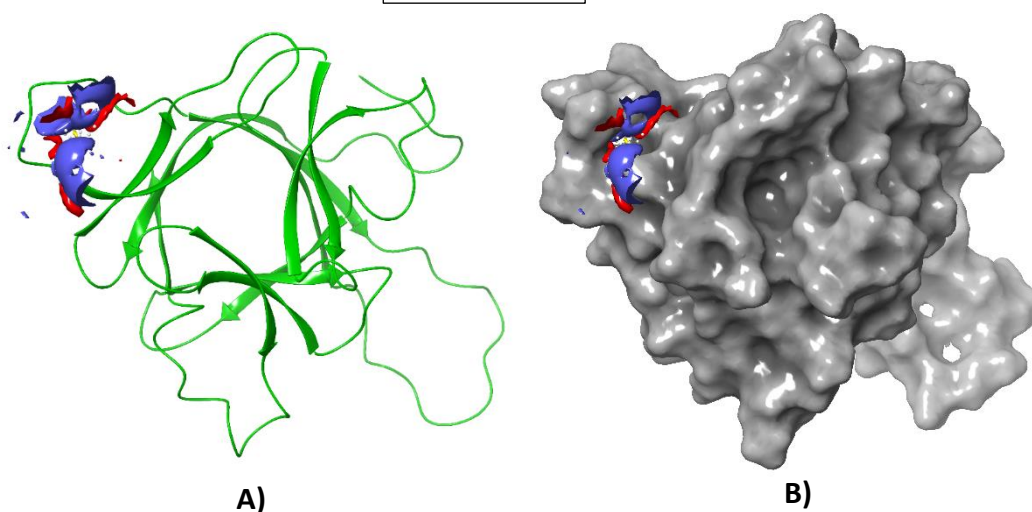


A)



B)

### Κοιλότητα 5



**Σχήμα 4.5** Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την δεύτερη διαμόρφωση της 2KLL δομής της IL-33. (A) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται με πράσινο χρώμα και με τη μορφή «κορδέλας», η κοιλότητα πρόσδεσης εμφανίζεται ως επιφάνεια όπου με κίτρινο συμβολίζεται ο υδρόφοβος χάρτης, με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων. (B) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως επιφάνεια γκρι χρώματος, η κοιλότητα πρόσδεσης ακολουθεί τον ίδιο τρόπο απεικόνισης.

Έπειτα από οπτική παρατήρηση των πέντε κοιλοτήτων, συμπεραίνεται αρχικά ότι η κοιλότητα 1 αντιστοιχεί σε μία μικρή επιφάνεια της πρωτεΐνης και έχει το σχήμα ενός μορίου-προσδέτη. Το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αυτής της κοιλότητας είναι η πολύ εσωτερική περιοχή στην οποία εντοπίζεται στην πρωτεΐνη, γεγονός που γίνεται αντιληπτό και από την απεικόνιση επιφάνειας της πρωτεΐνης στο Σχήμα 4.5.B. Στη συνέχεια, η κοιλότητα 2 αντιστοιχεί σε μία περιοχή της πρωτεΐνης που έχει επίσης το σχήμα ενός μορίου, ενώ δεν εντοπίζεται ανάμεσα σε ευέλικτες θηλιές. Η κοιλότητα 3 από την άλλη πλευρά παρουσιάζεται ως μια κοιλότητα μεγάλου μεγέθους, δείχνει να είναι αρκετά «διεσπαρμένη» στο χώρο και περιβάλλεται από στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης με μεγάλη ευκινησία. Η κοιλότητα 4 είναι επίσης μία μεγάλη επιφάνεια και δεν μπορεί να μείνει αγνοηθεί το γεγονός ότι βρίσκεται σε ένα πολύ εξωτερικό και εκτεθειμένο στο διαλύτη σημείο στην πρωτεΐνη. Τέλος, η κοιλότητα 5 είναι πολύ μικρή, με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι επιλογές των μορίων-προσδετών και καλύπτεται από μια πολύ ευέλικτη θηλιά, γεγονός που αποκλείει την κοιλότητα 5 από τις επιλογές μας.

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα μεγέθη που υπολογίστηκαν από το SiteMap για κάθε μία από τις κοιλότητες πρόσδεσης της δεύτερης διαμόρφωσης της IL-33 από NMR.



**Πίνακας 4.1** Αποτελέσματα αξιολόγησης των πέντε κοιλοτήτων της δεύτερης διαμόρφωσης της δομής 2KLL όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap.

Κοιλότητα	SiteScore	DScore	Volume (Å <sup>3</sup> )	Exposure	Enclosure
1	1.141	1.177	99.813	0.330	0.947
2	0.760	0.743	140.630	0.724	0.641
3	0.696	0.700	117.306	0.808	0.520
4	0.592	0.541	71.344	0.730	0.555
5	0.544	0.359	61.054	0.694	0.635

Η κοιλότητα 1 παρουσιάζει εξαιρετικές τιμές *SiteScore* και *DScore*, αφού υπενθυμίζεται ότι μία κοιλότητα με *SiteScore* και *DScore* μεγαλύτερα της μονάδας είναι κατάλληλη για την πρόσδεση ενός μικρού μορίου με φαρμακολογική δράση. Επιπλέον, η κοιλότητα 1 εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό έκθεσης στο διαλύτη και ταυτόχρονα το μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού. Τέλος, σημειώνεται ότι οι κοιλοότητες 4 και 5 εμφανίζουν πολύ χαμηλές τιμές όγκων (*volume*) σε σχέση με τις υπόλοιπες κοιλοότητες.

Με την ανάλυση των Κανονικών Δονήσεων της πρωτεΐνης παρατηρήθηκαν κινήσεις μεγάλου εύρους μόνο στις περιοχές που ανήκουν οι κοιλοότητες 1 και 2. Συγκεκριμένα, στην πολύ εσωτερική κοιλότητα 1, τα β-πτυχωτά φύλλα που την περιβάλλουν εμφανίζουν μια κίνηση προς την ίδια κατεύθυνση προκειμένου να επιτρέψουν την πρόσδεση ενός μορίου στην κοιλότητα και έπειτα να την ξανακλείσουν. Τα αμινοξέα που αποτελούν τις κοιλοότητες 1 και 2 συνοψίζονται παρακάτω.

*Κοιλότητα 1:* Ser125, Leu126, Ser127, Ser133, Ile134, Phe136, Ile145, Leu150, Lys156, Asp157, Lys158, Val159, Leu186, Pro188, Leu194, Val203, Phe230, Ile240, Leu247, Phe265

*Κοιλότητα 2:* Tyr143, Glu144, Ile155, Tyr146, Val147, Leu194, His2001, Ser202, Val203, Glu204, Leu205, His246, Leu247, Ala248

Τέλος, μέσω της Δυναμικής Ανάλυσης Δικτύων σε αυτή την πρωτεϊνική δομή υπολογίστηκαν οι κρίσιμοι κόμβοι του δικτύου και οι ακμές που τους ενώνουν, οι οποίες αντιστοιχίζονται στα εξής αμινοξέα της IL-33:

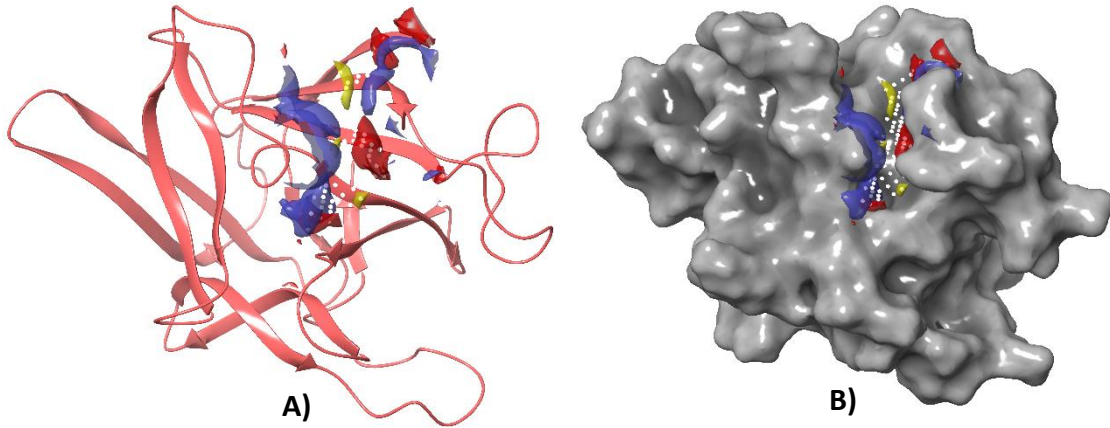
Ser125-Lys158, Leu126-Glu269, Ile119-Glu165, Tyr164-Ser166, Asp157-Val159, Phe136-Val159, Asp191-Trp193, Trp193-His195, Ile116-Tyr164, Met183-Val219, Cys259-Glu261, Gln132-Asp149, Glu144-Tyr146, Leu126-Phe265, Ser127-Phe265, Thr128-Phe265, Ile145-Val147, Val242-Asn262, Met181-Val219, Lys251-Asp253, Thr135-Ile145, Phe136-Ile145, Leu194-Leu201, Leu194-Leu205, Phe230-Phe265

Παρατηρείται ότι πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν την κοιλότητα 1 αντιστοιχούν σε κρίσιμους κόμβους του δικτύου της πρωτεΐνης. Στην κοιλότητα 2 υπάρχουν αμινοξέα που αντιστοιχούν σε κρίσιμους κόμβους, ωστόσο είναι λιγότερα σε αριθμό. Επομένως, από τη δομή αυτή επιλέγεται η κοιλότητα 1 για να προχωρήσει στην εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων.

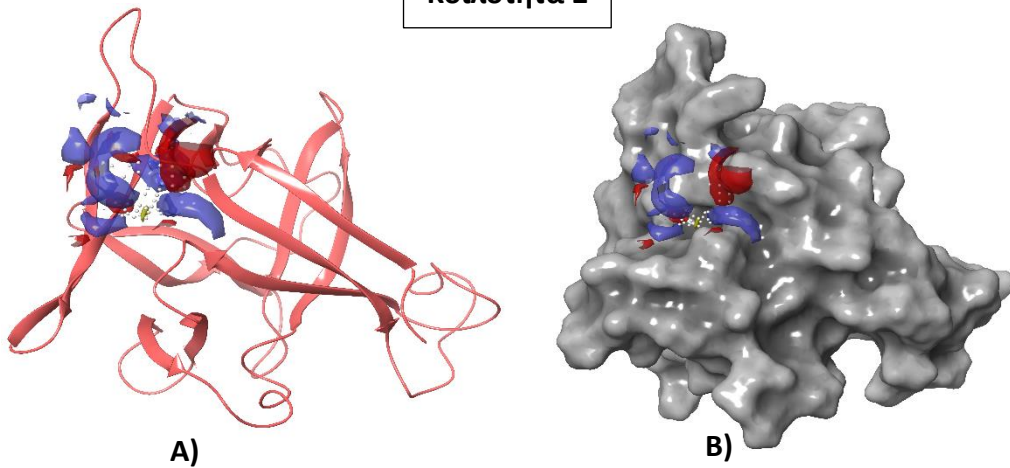
### **4KC3, Chain A**

Η δεύτερη δομή που μελετάται είναι η δομή της IL-33 που απομονώθηκε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 (PDB code: 4KC3, chain A) στην οποία προβλέφθηκαν πέντε κοιλότητες πρόσδεσης με τη χρήση του SiteMap. (Σχήμα 4.6)

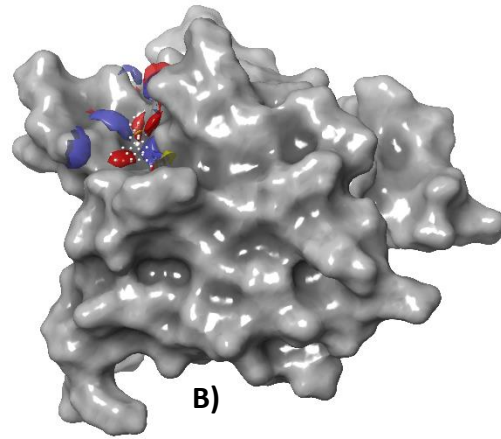
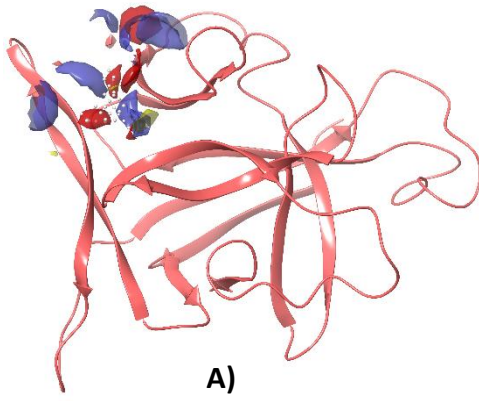
**Κοιλότητα 1**



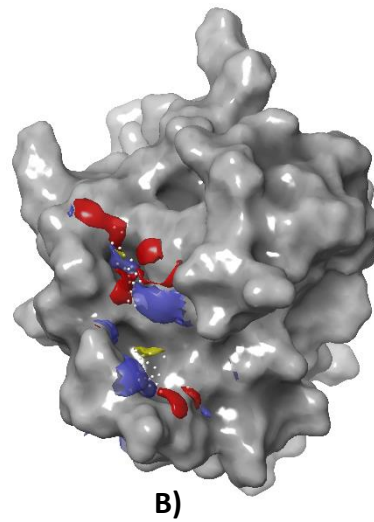
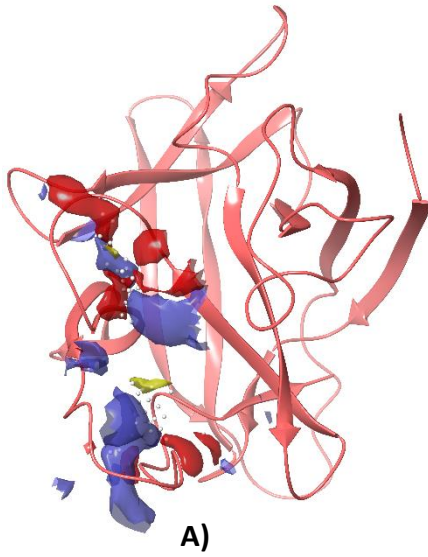
**Κοιλότητα 2**



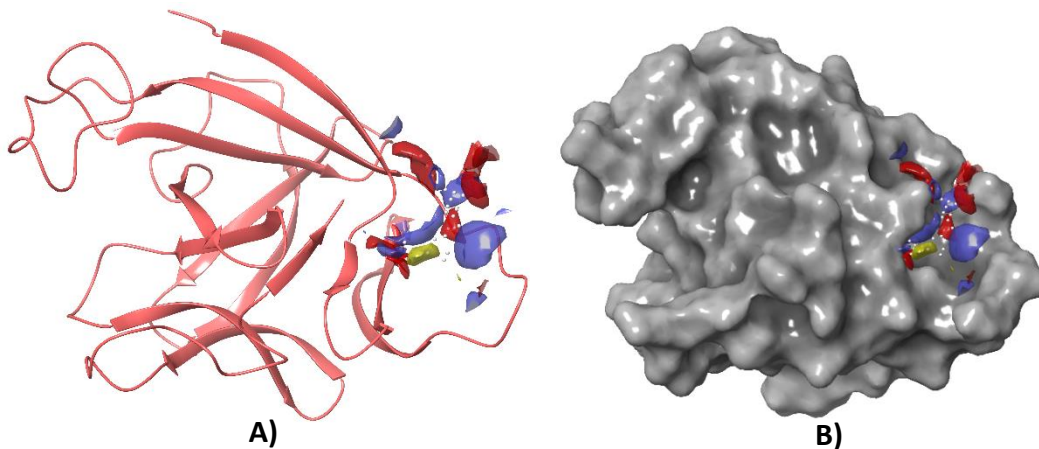
Κοιλότητα 3



Κοιλότητα 4



### Κοιλότητα 5



**Σχήμα 4.6** Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την δομή της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2. (A) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται με ροζ χρώμα και με τη μορφή «κορδέλας», η κοιλότητα πρόσδεσης εμφανίζεται ως επιφάνεια όπου με κίτρινο συμβολίζεται ο υδρόφοβος χάρτης, με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων. (B) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως επιφάνεια γκρι χρώματος, η κοιλότητα πρόσδεσης ακολουθεί τον ίδιο τρόπο απεικόνισης.

Στο Σχήμα 4.6 για την κοιλότητα 1 παρατηρείται ότι καλύπτει μια μεγάλη επιφάνεια της πρωτεΐνης και έχει το σχήμα ενός μορίου, γεγονός που διευκολύνει την πρόσδεση. Επίσης, η κοιλότητα 1 περιβάλλεται από τρεις θηλιές της πρωτεΐνης. Η δεύτερη κοιλότητα βρίσκεται σε μία πολύ εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης και χαρακτηρίζεται από ένα αρκετά στρογγυλό σχήμα, που την καθιστά μη κατάλληλη για την πρόσδεση κάποιου μορίου. Η κοιλότητα 3 παρόλο που εμφανίζει το σχήμα ενός μορίου, είναι μια μεγάλη κοιλότητα και αρκετά εκτεθειμένη στο διαλύτη που περιβάλλει την κοιλότητα. Έπειτα, η κοιλότητα 4 καλύπτει μια εμφανώς μεγάλη και εκτεθειμένη επιφάνεια της πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται ότι βρίσκεται ανάμεσα σε τρεις θηλιές της πρωτεΐνης. Τέλος, η κοιλότητα 5 έχει το σχήμα ενός μορίου-προσδέτη, ωστόσο εντοπίζεται στο εσωτερικό μιας ευέλικτης θηλιάς της πρωτεΐνης.

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα μεγέθη που υπολογίστηκαν από το SiteMap για κάθε μία από τις κοιλότητες πρόσδεσης της δομής 4KC3 της IL-33.

**Πίνακας 4.2** Αποτελέσματα αξιολόγησης των τεσσάρων κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από τη δομή 4KC3 όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap.

Κοιλότητα	SiteScore	DScore	Volume ( $\text{\AA}^3$ )	Exposure	Enclosure
1	0.870	0.783	181.104	0.532	0.663
2	0.712	0.567	94.325	0.639	0.605
3	0.612	0.569	90.209	0.764	0.566

4	0.689	0.569	101.185	0.717	0.610
5	0.601	0.481	92.953	0.722	0.649

Η κοιλότητα 1 εμφανίζει πολύ καλά αποτελέσματα SiteScore και DScore, καθώς τα μεγέθη αυτά είναι αρκετά κοντά στη μονάδα, σε σχέση με τις υπόλοιπες κοιλότητες. Επιπρόσθετα, οι κοιλότητες 1 και 2 εμφανίζουν τα μικρότερα ποσοστά έκθεσης στο διαλύτη για αυτό και προτιμώνται με βάση αυτό το κριτήριο, ενώ με βάση το ποσοστό εγκλεισμού διακρίνονται οι κοιλότητες 1 και 5. Τέλος, ο όγκος και για τις πέντε κοιλότητες εμφανίζει ικανοποιητικές τιμές.

Η ανάλυση των Κανονικών Δονήσεων της πρωτεΐνης έδειξε ότι οι περιοχές της πρωτεΐνης που περιλαμβάνουν τις κοιλότητες 2 και 3 δεν παρουσιάζουν καθόλου κινητικότητα. Αντίθετα, στις άλλες τρεις κοιλότητες παρατηρείται έντονη κίνηση, συγκεκριμένα οι ευέλικτες θηλιές που περιβάλλουν τις κοιλότητες 1, 4 και 5 κινούνται ώστε να «ανοιγοκλείνουν» την κοιλότητα και να διευκολύνουν την είσοδο του μορίου-προσδέτη. Τα αμινοξέα που αποτελούν τις κοιλότητες 1, 4 και 5 που εμφανίζουν μεγάλου εύρους κινήσεις συνοψίζονται παρακάτω.

*Κοιλότητα 1:* Ser117, Tyr164, Glu165, Ser166, Gln167, His168, Met181, Met183, Asp214, Gln215, Phe217, Phe218, Val219, Glu231, Cys232, Lys233

*Κοιλότητα 4:* Met223, Glu231, Cys232, Lys233, Thr234, Asp235, Pro236, Gly237, Val238, Phe239, Val252, Asp253, Ser254, Ser255, Glu256, Asn257, Leu258, Cys259, Thr260

*Κοιλότητα 5:* Ala124, Ser125, Ser127, Ser133, Leu150, Glu154, Lys155, Lys156, Lys158, Ser268

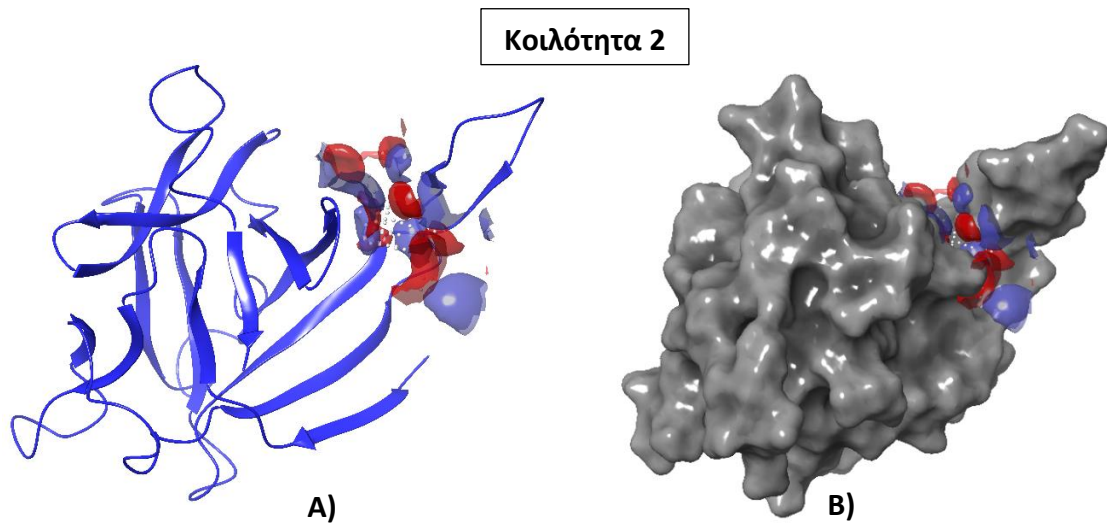
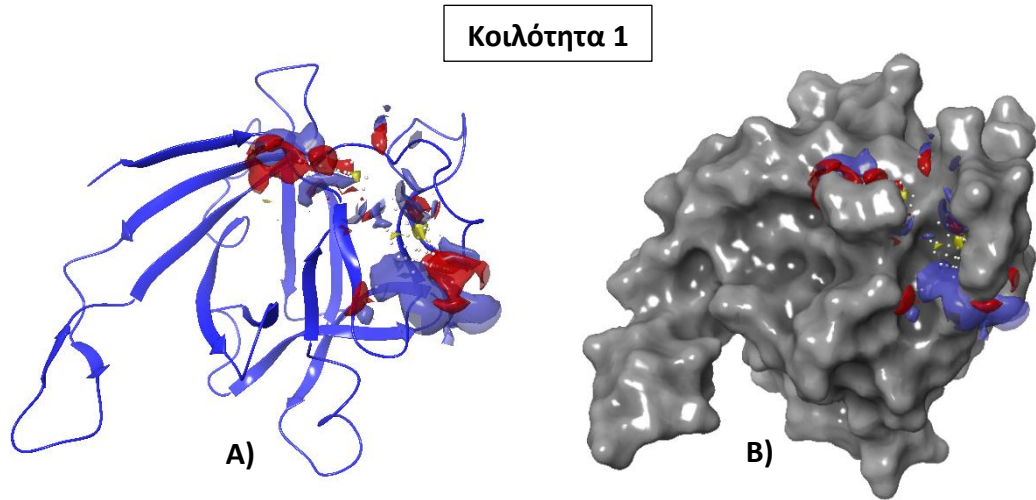
Τέλος, μέσω της Δυναμικής Ανάλυσης Δικτύων σε αυτή την πρωτεϊνική δομή υπολογίστηκαν οι κρίσιμοι κόμβοι του δικτύου και οι ακμές που τους ενώνουν, οι οποίες αντιστοιχίζονται στα εξής αμινοξέα της IL-33:

Ser166-His168, Leu123-Leu160, Ala196-Phe218, Phe218-Cys232, Cys232-Thr234, Leu160-Ser187, Ser162-Trp193, Leu194-Phe218, Leu220-Asn222, Met183-Val219, Phe218-Glu231, Ala137-Glu139, Ile145-Leu205, Gln132-Val147, Ile134-Val147, Cys227-Phe265, Gln132-Asp149, Glu154-Lys156, Ser125-Leu267, Val228-Phe265, Phe230-Phe265, Gly241-Leu247, His195-Asn197, Lys251-Asp253, Glu231-Val238, Val203-Ile240, His246-Ala248, Val228-Leu264

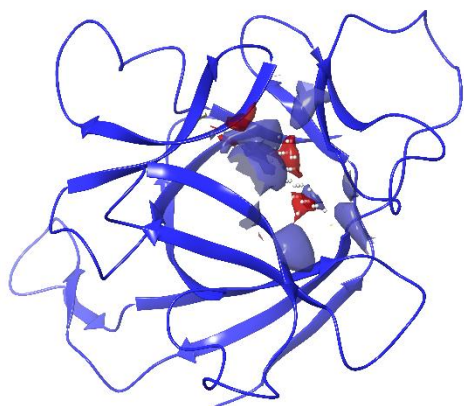
Έπειτα από την ανάλυση αυτή, παρατηρείται ότι πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν την κοιλότητα 1 αντιστοιχούν σε κρίσιμους κόμβους του δικτύου της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με αυτά των κοιλότητων 4 και 5 που είναι λιγότερα σε αριθμό. Επομένως, από τη δομή αυτή επιλέγεται η κοιλότητα 1 για να προχωρήσει στην εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων.

### 5VI4, Chain A

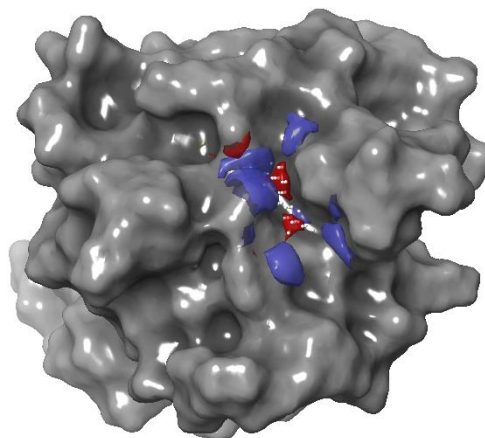
Στη δομή της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα A του συμπλόκου με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP (PDB code: 5VI4, chain A) προβλέφθηκαν πέντε κοιλότητες πρόσδεσης με τη χρήση του SiteMap. (Σχήμα 4.7)



### Κοιλότητα 3

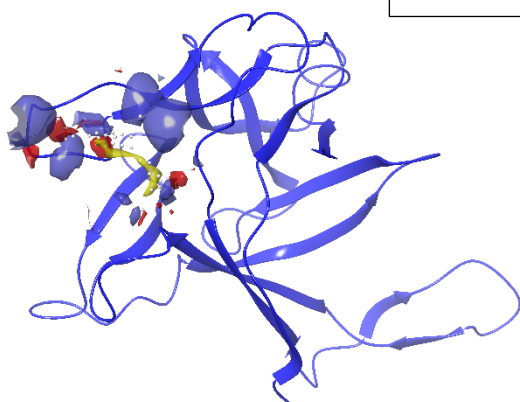


A)

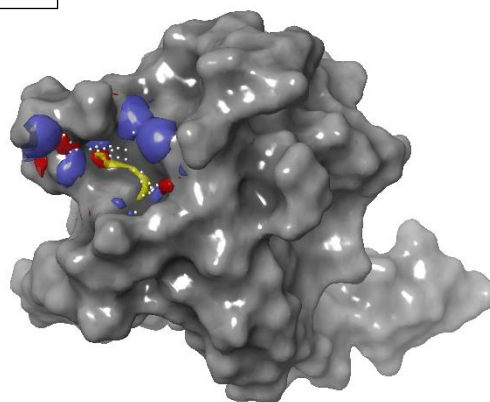


B)

### Κοιλότητα 4

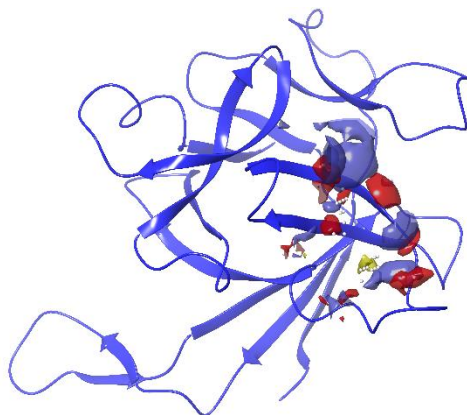


A)

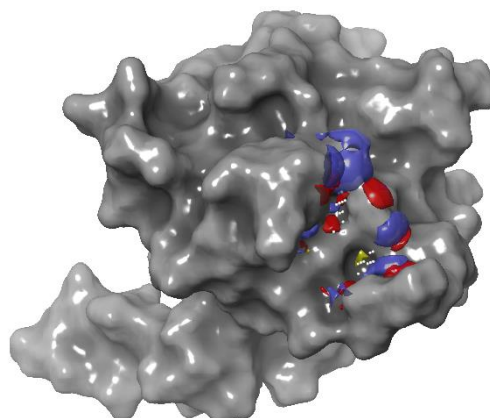


B)

### Κοιλότητα 5



A)



B)

**Σχήμα 4.7** Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την αλυσίδα A της δομής της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RACP. (A) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται με μπλε χρώμα και με τη μορφή «κορδέλας», η κοιλότητα πρόσδεσης εμφανίζεται ως επιφάνεια όπου με κίτρινο συμβολίζεται ο υδρόφοβος χάρτης, με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων. (B) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως επιφάνεια γκρι χρώματος, η κοιλότητα πρόσδεσης ακολουθεί τον ίδιο τρόπο απεικόνισης.

Στο Σχήμα 4.7 και για την κοιλότητα 1 παρατηρείται ότι είναι μια μεγάλη επιφάνεια της πρωτεΐνης, αρκετά εκτεθειμένη στο διαλύτη, ωστόσο έχει σχήμα που θα επέτρεπε την πρόσδεση μορίων με φαρμακολογική δράση. Η κοιλότητα 2 από την άλλη μεριά αντιστοιχεί σε μια πιο μικρή περιοχή, με σχήμα που προδιαθέτει την πρόσδεση ενός μορίου με μακριά αλυσίδα, ενώ περιβάλλεται από δύο θηλιές της πρωτεΐνης. Η κοιλότητα 3 είναι μια στρογγυλούς σχήματος και εξωτερική περιοχή της πρωτεΐνης που δεν προτιμάται για την πρόσδεση κάποιου μορίου. Η κοιλότητα 4 είναι μια κοιλότητα που τμήμα της περνά μέσα από μια ευέλικτη θηλιά της πρωτεΐνης, γεγονός που θα επηρεάζει αρνητικά την πρόσδεση κάποιου μορίου. Τέλος, η πέμπτη περιοχή της πρωτεΐνης που προέβλεψε το SiteMap είναι πάρα πολύ εξωτερική και από το Σχήμα 4.7B γίνεται αντιληπτό ότι δεν αποτελεί μια εσωτερική κοιλότητα.

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα μεγέθη που υπολογίστηκαν από το SiteMap για κάθε μία από τις κοιλότητες πρόσδεσης της αλυσίδας A της δομής 5VI4 της IL-33.

**Πίνακας 4.3** Αποτελέσματα αξιολόγησης των πέντε κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα A της δομής 5VI4, όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap.

Κοιλότητα	SiteScore	DScore	Volume (Å <sup>3</sup> )	Exposure	Enclosure
1	0.827	0.786	197.911	0.621	0.605
2	0.714	0.636	134.799	0.622	0.631
3	0.642	0.497	71.344	0.600	0.620
4	0.602	0.556	84.035	0.779	0.576
5	0.611	0.564	86.436	0.765	0.582

Οι υψηλότερες τιμές *SiteScore* και *DScore* παρατηρούνται στις κοιλότητες 1 και 2. Η κοιλότητα 3 σε αντίθεση με τις υπόλοιπες παρουσιάζει πολύ μικρό όγκο, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και έπειτα από την οπτική παρατήρηση του σχήματός της. Επιπρόσθετα, οι κοιλότητες 1 και 3 εμφανίζουν τα μικρότερα ποσοστά έκθεσης στο διαλύτη για αυτό και προτιμώνται με βάση αυτό το κριτήριο, ενώ με βάση το ποσοστό εγκλεισμού διακρίνονται οι κοιλότητες 2 και 3.

Η ανάλυση των Κανονικών Δονήσεων της πρωτεΐνης έδειξε ότι κινήσεις μεγάλου εύρους εντοπίζονται μόνο στις περιοχές που ανήκουν οι κοιλότητες 1 και 2. Συγκεκριμένα, στην κοιλότητα 1, η θηλιά της πρωτεΐνης που την «σκεπάζει» εμφανίζει αρκετή κινητικότητα, ενώ στην κοιλότητα 2 οι δύο θηλιές που την εμπεριέχουν «ανοιγοκλείνουν» ώστε να επιτρέπουν την είσοδο κάποιου μορίου. Τα αμινοξέα που αποτελούν τις κοιλότητες 1 και 2 συνοψίζονται παρακάτω.

*Κοιλότητα 1:* Pro120, Ala121, Ser122, Ser124, Asp128, Gln129, Ser130, Asp146, Ser147, Gly148, Lys149, Asp150, Gln151, Glu152, Gln153, Gln155, Lys262, Ser264, Lys265



**Κοιλότητα 2:** Leu116, Glu162, Ala167, Ser168, Gln169, Gly176, Lys177, Lys178, Leu179, Val218, Leu219, His220, Lys221

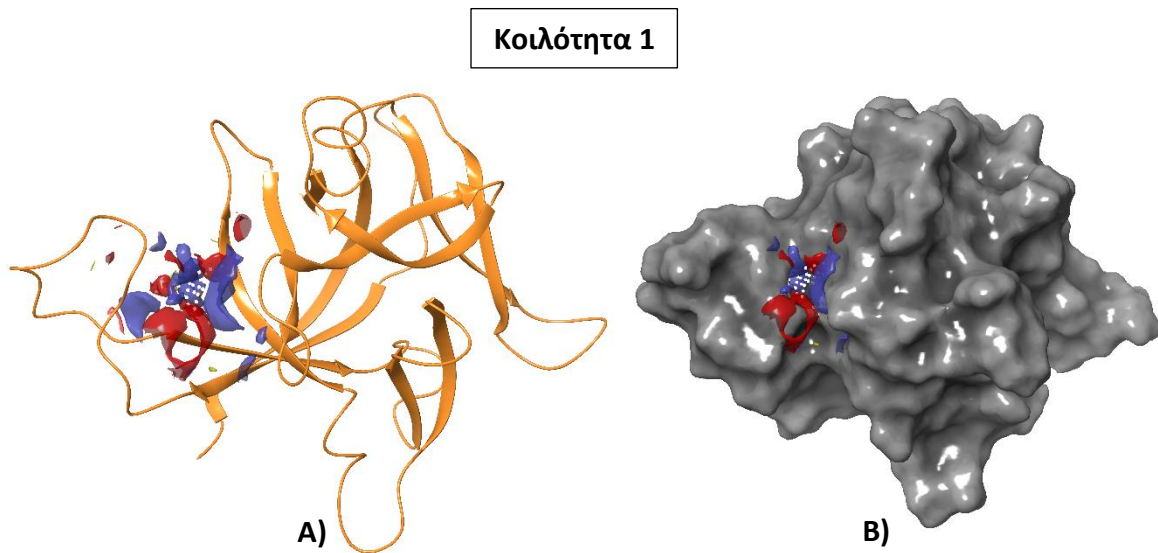
Τέλος, μέσω της Δυναμικής Ανάλυσης Δικτύων σε αυτή την πρωτεϊνική δομή υπολογίστηκαν οι κρίσιμοι κόμβοι του δικτύου και οι ακμές που τους ενώνουν, οι οποίες αντιστοιχίζονται στα εξής αμινοξέα της IL-33:

Ala167-Lys178, Leu123-Leu263, Gln155-Leu157, Leu157-Pro185, Ser184-Ile191, Arg159-Val181, Lys178-Val218, Asn182-Ala215, Ser184-Trp192, Thr125-Phe261, Ile186-Asp188, Leu123-Phe229, Leu123-Val131, Ser228-Ile259, Phe229-Phe261, Lys242-Asn244, Val202-Leu246, Tyr140-Ile142, Leu193-Leu204, Arg206-Pro212, Gln245-Ala247, Ala215-Phe217, Ile142-Leu193

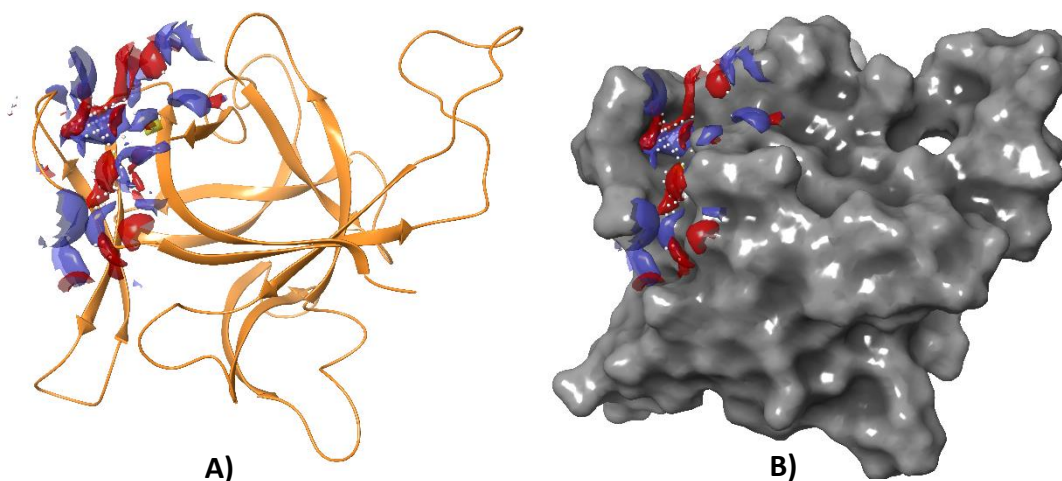
Από την ανάλυση αυτή, παρατηρείται ότι πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν την κοιλότητα 2 αντιστοιχούν σε κρίσιμους κόμβους του δικτύου της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με αυτά της κοιλότητας 1 που είναι λιγότερα σε αριθμό. Επομένως, από τη δομή αυτή επιλέγεται η κοιλότητα 2 για να προχωρήσει στην εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων.

#### **5VI4, Chain D**

Τέλος, στη δομή της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα D του συμπλόκου με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP (PDB code: 5VI4, chain D) προβλέφθηκαν δύο κοιλότητες πρόσδεσης με τη χρήση του SiteMap. (Σχήμα 4.8)



## Κοιλότητα 2



**Σχήμα 4.8** Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την αλυσίδα A της δομής της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP. (A) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται με μπλε χρώμα και με τη μορφή «κορδέλας», η κοιλότητα πρόσδεσης εμφανίζεται ως επιφάνεια όπου με κίτρινο συμβολίζεται ο υδρόφοβος χάρτης, με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων. (B) Η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως επιφάνεια γκρι χρώματος, η κοιλότητα πρόσδεσης ακολουθεί τον ίδιο τρόπο απεικόνισης.

Στο Σχήμα 4.8 παρατηρείται ότι η κοιλότητα 1 είναι μια επιφάνεια της πρωτεΐνης που εμφανίζει το σχήμα ενός μορίου, «καλύπτεται» από δύο μεγάλες θηλιές της πρωτεΐνης και είναι σε μία περιοχή που ευνοείται η σταθερή πρόσδεση ενός μορίου. Αντίθετα, η κοιλότητα 2 που προβλέφθηκε από το SiteMap είναι μια αρκετά μεγάλη επιφάνεια που εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης και είναι αρκετά εκτεθειμένη στο διαλύτη. Εντοπίζεται και αυτή ανάμεσα σε θηλιές της πρωτεΐνης.

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα μεγέθη που υπολογίστηκαν από το SiteMap για κάθε μία από τις κοιλότητες πρόσδεσης της αλυσίδας D της δομής 5VI4 της IL-33.

**Πίνακας 4.4** Αποτελέσματα αξιολόγησης των κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα D της δομής 5VI4, όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap

Κοιλότητα	SiteScore	DScore	Volume ( $\text{\AA}^3$ )	Exposure	Enclosure
1	0.776	0.690	123.823	0.553	0.677
2	0.808	0.674	154.007	0.551	0.651

Και οι δύο κοιλότητες εμφανίζουν ικανοποιητικές τιμές στα μεγέθη *SiteScore* και *DScore*. Παρόλο που η κοιλότητα 2 έχει μεγαλύτερο *SiteScore*, το μέγεθος *DScore* που την χαρακτηρίζει είναι μικρότερο από αυτό της κοιλότητας 1. Ο όγκος των δύο κοιλοτήτων δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Επίσης, διαφορές δεν παρατηρούνται και στα ποσοστά έκθεσης και εγκλεισμού, ωστόσο η κοιλότητα 1 δείχνει να έχει λίγο καλύτερη τιμή στο ποσοστό εγκλεισμού.

Η ανάλυση των Κανονικών Δονήσεων της πρωτεΐνης έδειξε κινήσεις μεγάλου εύρους στις περιοχές που ανήκουν οι κοιλότητες 1 και 2. Συγκεκριμένα, στην κοιλότητα 1, οι δύο θηλιές που την εμπεριέχουν «ανοιγοκλείνουν» ώστε να επιτρέπουν την είσοδο κάποιου μορίου, ενώ στην κοιλότητα 2 η θηλιά της πρωτεΐνης που την «σκεπάζει» εμφανίζει αρκετή κινητικότητα. Τα αμινοξέα που αποτελούν τις κοιλότητες 1 και 2 συνοψίζονται παρακάτω.

*Κοιλότητα 1:* Ala167, Ser168, Gln169, Lys177, Lys178, Leu179, Val218, Leu219, His220, Lys221, Glu230, Tyr238

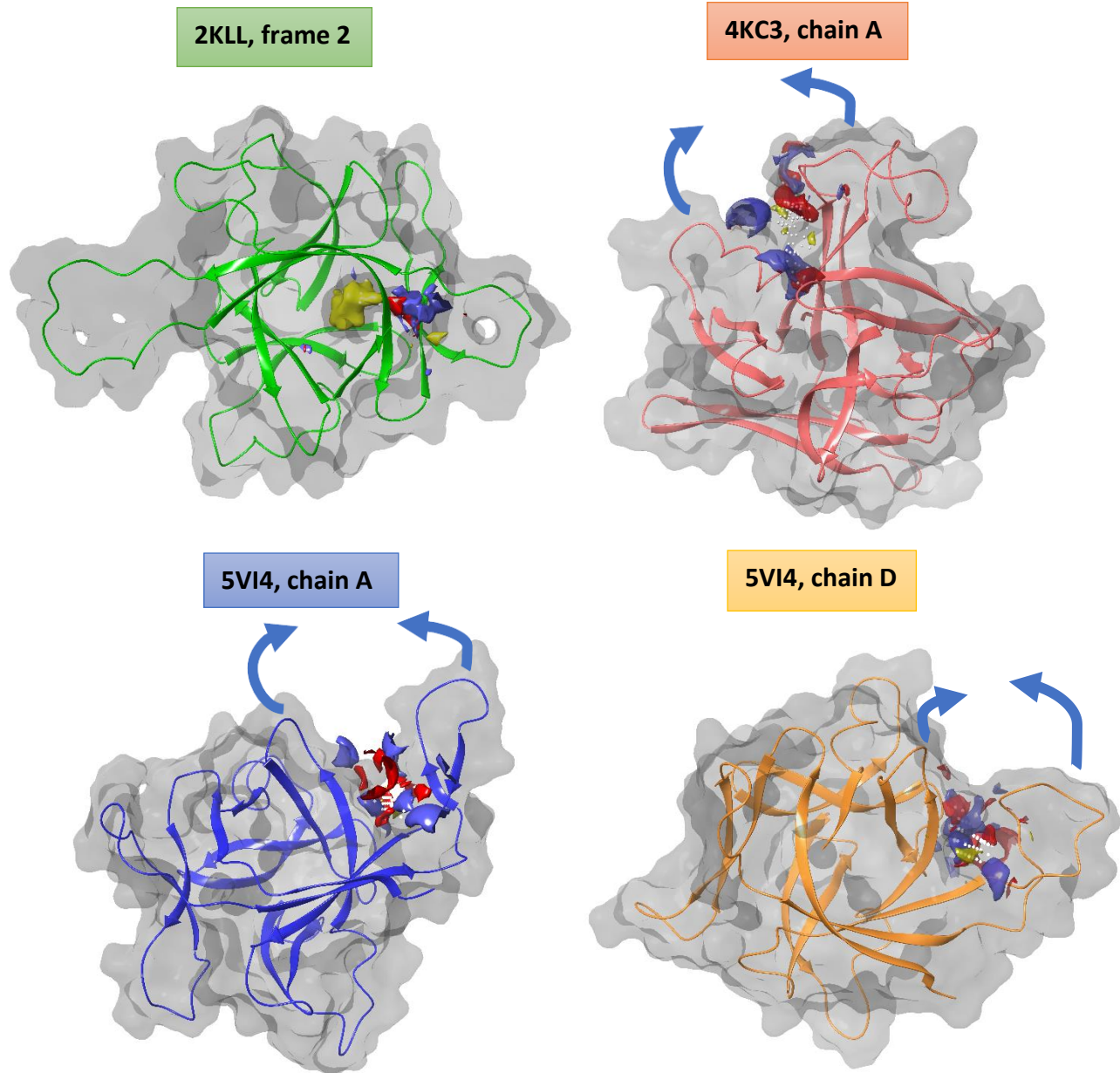
*Κοιλότητα 2:* Ser122, Leu123, Ser124, Asp128, Gln129, Ser130, Ser147, Gly148, Lys149, Asp150, Gln151, Glu152, Gln153, Asp154, Gln155, Ile186, Lys187, Asp225, Lys262, Leu263, Ser264, Lys265

Τέλος, μέσω της Δυναμικής Ανάλυσης Δικτύων σε αυτή την πρωτεϊνική δομή υπολογίστηκαν οι κρίσιμοι κόμβοι του δικτύου και οι ακμές που τους ενώνουν, οι οποίες αντιστοιχίζονται στα εξής αμινοξέα της IL-33:

Lys177-Leu179, Leu179-Val218, Leu116-Tyr160, Leu179-Phe217, Ser163-Ser165, Ala167-Lys178, Phe226-Lys262, Ala121-Leu158, Leu123-Val131, Leu123-Phe261, Ser124-Phe261, Pro120-Leu157, Val156-Ser184, Met180-Val218, Thr125-Asp128, Tyr126-Asp128, Val218-Glu230, Thr125-Phe261, Phe229-Ile239, Phe217-Leu219, Asp197-Leu234, Tyr200-Ala247, His194-Asn196, Tyr200-Leu248, Phe216-Lys232, Leu157-Arg159, Val181-Phe217, Lys242-Asn244, Tyr140-Leu204, Glu230-Tyr238, Phe217-Glu230, Tyr238-Leu248, Ser210-Pro212

Από την ανάλυση αυτή, παρατηρείται ότι πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν την κοιλότητα 1 αντιστοιχούν σε κρίσιμους κόμβους του δικτύου της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με αυτά της κοιλότητας 2 που είναι λιγότερα σε αριθμό. Επομένως, από τη δομή αυτή επιλέγεται η κοιλότητα 1 για να προχωρήσει στην εικονική σάρωση της χημειοθήκης μορίων.

Οι κοιλότητες που επιλέχθηκαν από τις παραπάνω δομές της IL-33 απεικονίζονται στο Σχήμα 4.9 και τα μεγέθη που τις χαρακτηρίζουν συνοψίζονται στον Πίνακα 4.5.



**Σχήμα 4.9** Οι κοιλότητες πρόσδεσης στην IL-33 που επιλέχθηκαν. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται ως επιφάνεια γκρι χρώματος και τα δευτεροταγή στοιχεία έχουν τη μορφή «κορδέλας». Οι κοιλότητες πρόσδεσης εμφανίζονται ως επιφάνειες όπου με κίτρινο συμβολίζεται ο υδρόφοβος χάρτης, με μπλε οι δότες ηλεκτρονίων και με κόκκινο οι δέκτες ηλεκτρονίων. Επιπρόσθετα, με μπλε βέλη συμβολίζονται οι κατευθύνσεις κίνησης των θηλιών της πρωτεΐνης όπως βρέθηκαν από την ανάλυση Κανονικών Δονήσεων.

**Πίνακας 4.5** Οι κοιλότητες πρόσδεσης στην IL-33 που επιλέχθηκαν και τα αποτελέσματα των υπολογισμών του SiteMap που τις χαρακτηρίζουν.

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	SiteScore	DScore	Volume (Å <sup>3</sup> )	exposure	enclosure
2KLL, frame 2	1	1.141	1.117	99.813	0.330	0.947
4KC3, chain A	1	0.870	0.783	181.104	0.532	0.663
5VI4, chain A	2	0.714	0.636	134.799	0.622	0.631
5VI4, chain D	1	0.776	0.690	123.823	0.553	0.677

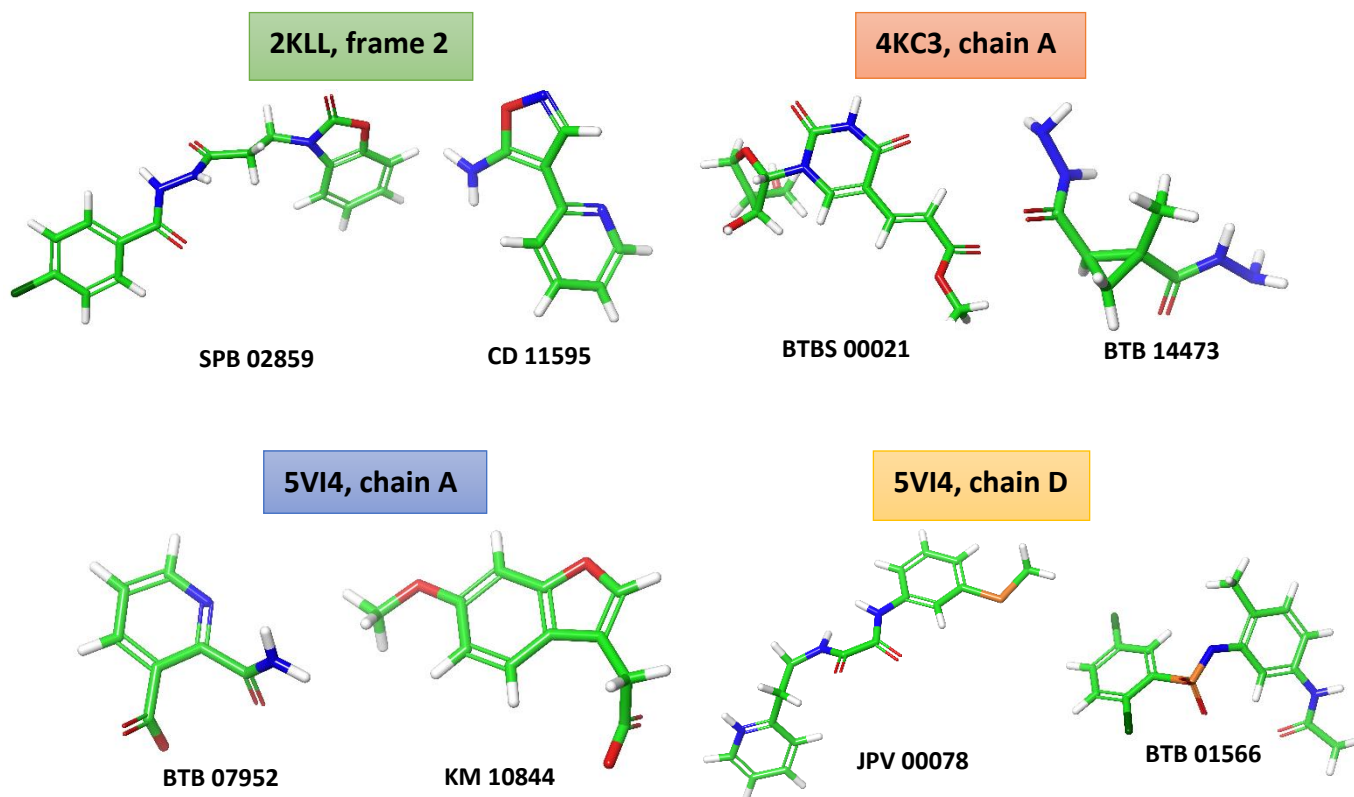
### 4.3 Αποτελέσματα εικονικής σάρωσης χημειοθήκης μορίων

Σε κάθε κοιλότητα πραγματοποιήθηκε εικονική σάρωση της χημειοθήκης Maybridge HitFinder η οποία περιέχει συνολικά 24,747 εμπορικά διαθέσιμα μόρια. Η μοντελοποίηση της μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Glide της σουίτας Schrödinger, με το οποίο πραγματοποιήθηκαν και οι υπολογισμοί της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης [90]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η εμπειρική συνάρτηση *Standard Precision (SP) GlideScore* (Εξ. 2.5) με την οποία εκτιμήθηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης σε κάθε πόζα του μορίου-προσδέτη στην εκάστοτε κοιλότητα. Τα μόρια ταξινομήθηκαν κατά αύξουσα σειρά με βάση το *docking score* του Glide, δηλαδή το πρώτο μόριο στη λίστα έχει το πιο αρνητικό *docking score*, ενώ το τελευταίο μόριο στη λίστα έχει το πιο θετικό *docking score*. Από αυτή τη λίστα επιλέχθηκαν τα 1000 πρώτα μόρια, τα οποία στη συνέχεια θα υποβληθούν σε μία σειρά φίλτρων προκειμένου να βρεθούν τα κατάλληλα που θα προχωρήσουν σε βιολογικές δοκιμές.

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται οι βαθμολογίες πρόσδεσης για το πρώτο και το τελευταίο μόριο που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης. Στο Σχήμα 4.10 απεικονίζονται τα μόρια αυτά.

**Πίνακας 4.6** Το 1<sup>ο</sup> και το 1000<sup>ο</sup> μόριο που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης και οι βαθμολογίες πρόσδεσής τους (*SP docking score*).

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	1 <sup>ο</sup> μόριο στη λίστα	SP docking score (kcal·mol <sup>-1</sup> ) του 1 <sup>ου</sup> μορίου	1000 <sup>ο</sup> μόριο στη λίστα	SP docking score (kcal·mol <sup>-1</sup> ) του 1000 <sup>ου</sup> μορίου
2KLL, frame 2	1	SPB 02859	-8.278	CD 11595	-5.776
4KC3, chain A	1	BTBS 00021	-7.996	BTB 14473	-5.739
5VI4, chain A	2	BTB 07952	-7.403	KM 10844	-5.419
5VI4, chain D	1	JPV 00078	-8.105	BTB 01566	-5.897



**Σχήμα 4.10** Σχηματική απεικόνιση του πρώτου (αριστερά) και το τελευταίου (δεξιά) μορίου που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.

#### 4.4 Αποτελέσματα φιλτραρίσματος των μορίων

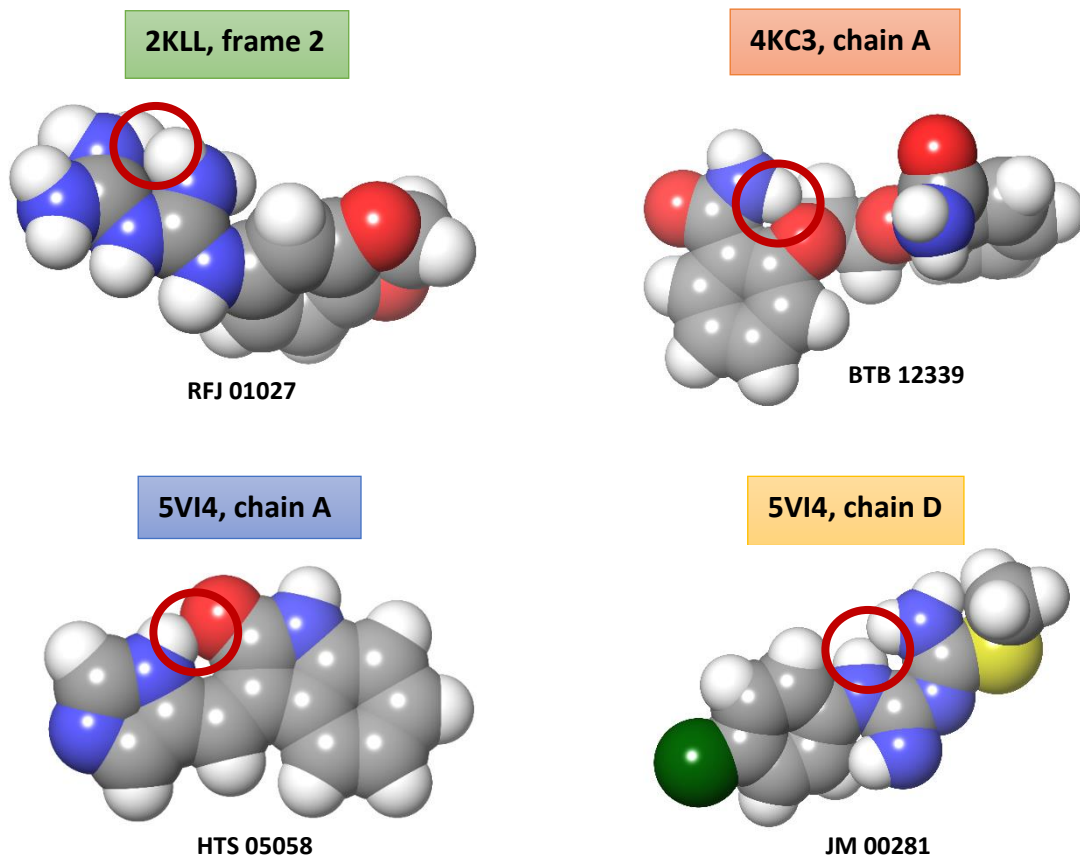
##### ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ

Στα 1000 μόρια-προσδέτες που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα εφαρμόστηκε ένα φίλτρο προκειμένου να απορριφθούν αυτά που εμφανίζουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Το φιλτράρισμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής εφαρμογής ChemBioServer και τα αποτελέσματα για κάθε κοιλότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7.

**Πίνακας 4.7** Τα μόρια που απορρίφθηκαν λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	Αριθμός μορίων που απορρίφθηκαν	Αριθμός μορίων που πέρασαν
2KLL, frame 2	1	41	959
4KC3, chain A	1	70	930
5VI4, chain A	2	42	958
5VI4, chain D	1	42	958

Στο Σχήμα 4.11 απεικονίζεται ένα παράδειγμα μορίου που απορρίφθηκε λόγω στεreoχημικών παρεμποδίσεων σε κάθε κοιλότητα πρόσδεσης της IL-33.



**Σχήμα 4.11** Σχηματική απεικόνιση μορίων που απορρίφθηκαν λόγω στεreoχημικών παρεμποδίσεων. Για κάθε κοιλότητα επιλέχθηκε να απεικονιστεί ένα ενδεικτικό μόριο.

#### ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΞΙΚΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα μόρια που πέρασαν το φίλτρο για στεreoχημικές παρεμποδίσεις φιλτράρονται εκ νέου προκειμένου να απορριφθούν αυτά που εμπεριέχουν τοξικά χαρακτηριστικά στη δομή τους. Το φιλτράρισμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διαδικτυακής εφαρμογής ChemBioServer και τα αποτελέσματα για κάθε κοιλότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

**Πίνακας 4.8** Τα μόρια που απορρίφθηκαν λόγω ύπαρξης τοξικών χαρακτηριστικών για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	Αριθμός μορίων που απορρίφθηκαν	Αριθμός μορίων που πέρασαν
2KLL, frame 2	1	101	858
4KC3, chain A	1	119	811

5VI4, chain A	2	98	860
5VI4, chain D	1	119	839

#### ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Υπενθυμίζεται ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων υπολογίστηκαν με το QikProp, που είναι ένα πρόγραμμα γρήγορης και αξιόπιστης πρόβλεψης της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης μορίων (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion, ADME). Έπειτα, τα μόρια που πέρασαν το φίλτρο για τοξικά δομικά χαρακτηριστικά φιλτραρίστηκαν επιπλέον ώστε να ικανοποιούν τα ακόλουθα κριτήρια: α) ο λογάριθμος της προβλεπόμενης υδατικής διαλυτότητας του μορίου ( $Q\log S$ , όπου το  $S$  έχει μονάδες  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) πρέπει να είναι μεγαλύτερη από  $-6.5$ , β) η προβλεπόμενη φαινόμενη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2 ( $QPP\text{Caco}$ ,  $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 22 και γ) ο αριθμός πιθανών μεταβολικών αντιδράσεων ( $\#metab$ ) πρέπει να είναι μικρότερος από 7. Τα αποτελέσματα του φιλτραρίσματος για κάθε κοιλότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.9.

**Πίνακας 4.9** Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν τα απαιτούμενα κριτήρια σχετικά με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	Αριθμός μορίων που απορρίφθηκαν	Αριθμός μορίων που πέρασαν
2KLL, frame 2	1	45	813
4KC3, chain A	1	83	728
5VI4, chain A	2	95	765
5VI4, chain D	1	81	758

Στη συνέχεια, στα μόρια που πέρασαν εφαρμόζεται ένα ακόμα φίλτρο σύμφωνα με το οποίο η ιδιότητα  $Q\log P_{o/w}$ , δηλαδή ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού πρέπει να είναι μικρότερος από 5. Τα αποτελέσματα του φιλτραρίσματος για κάθε κοιλότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.10.

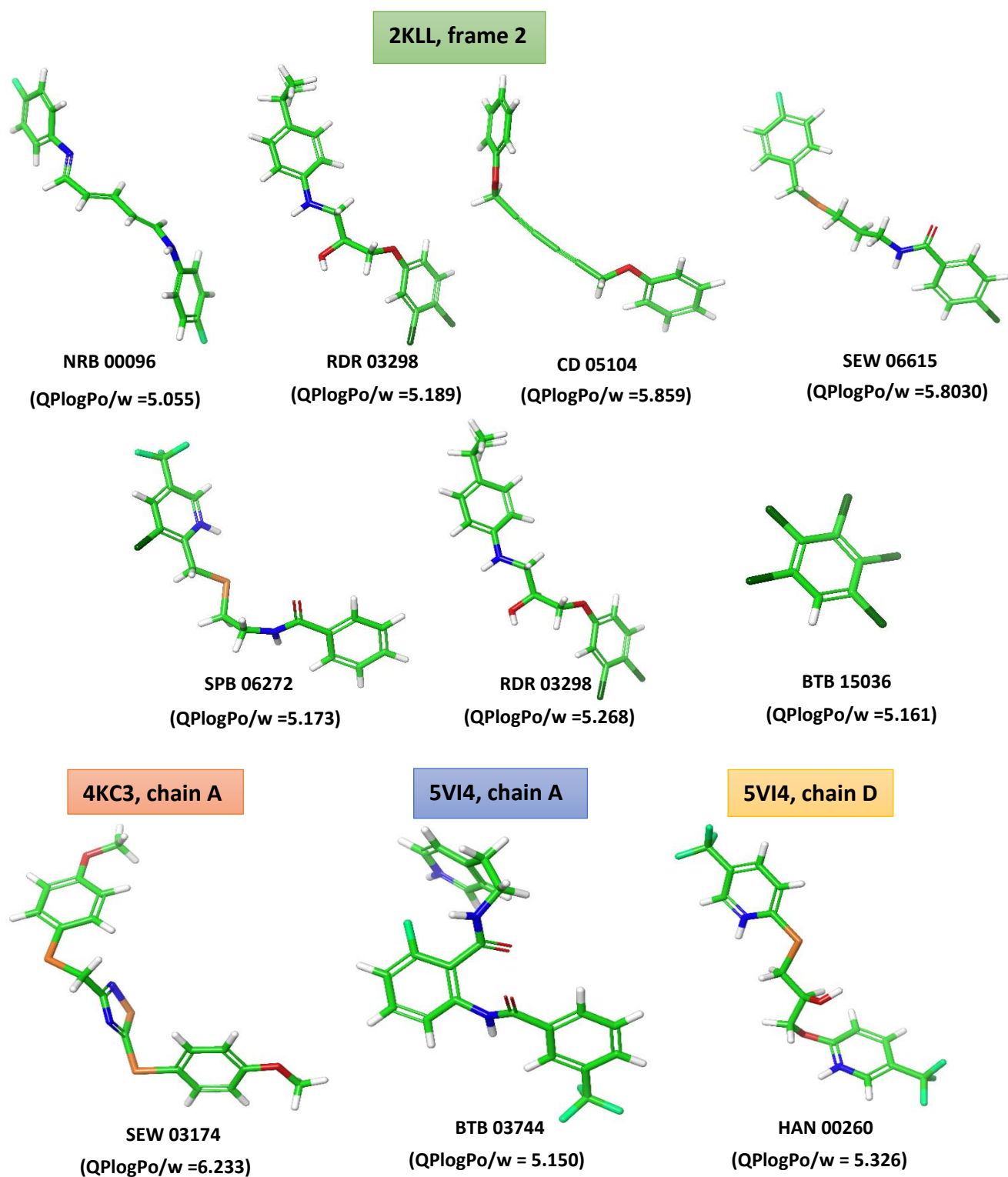
**Πίνακας 4.10** Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν το κριτήριο σχετικά με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	Αριθμός μορίων που απορρίφθηκαν	Αριθμός μορίων που πέρασαν
2KLL, frame 2	1	7	806
4KC3, chain A	1	1	727
5VI4, chain A	2	1	764



5VI4, chain D	1	1	757
---------------	---	---	-----

Στο Σχήμα 4.12 απεικονίζονται τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι εμφάνιζαν συντελεστή QPlogPo/w μεγαλύτερο από 5 σε κάθε κοιλότητα πρόσδεσης της IL-33.



**Σχήμα 4.12** Σχηματική απεικόνιση μορίων που απορρίφθηκαν λόγω υψηλού συντελεστή QPlogPo/w για όλες τις κοιλότητες.

#### 4.5 Πρότυπα μόρια και μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους με την IL-33

Τα μόρια που πέρασαν όλα τα φίλτρα ομαδοποιήθηκαν με τον ChemBioServer σύμφωνα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και έπειτα υπολογίστηκαν τα πρότυπα μόρια, δηλαδή οι «αντιπροσωπευτικές» ενώσεις για κάθε ομάδα. Στους Πίνακες 4.11 έως 4.14 παρουσιάζονται οι ομάδες για κάθε δομή της IL-33 και ο αριθμός των πρότυπων μορίων.

**Πίνακας 4.11** Οι ομάδες και τα πρότυπα μόρια την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 2KLL, frame 2.

Δομή της IL-33	Ομάδα	Αριθμός μορίων που ανήκουν στην ομάδα	Αριθμός πρότυπων μορίων
2KLL, frame 2	1	76	19
	2	59	14
	3	84	13
	4	39	9
	5	209	37
	6	77	15
	7	234	50
	8	19	6
	9	9	3
<b>Σύνολο</b>		<b>806</b>	<b>166</b>

**Πίνακας 4.12** Οι ομάδες και τα πρότυπα μόρια την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 4KC3, chain A.

Δομή της IL-33	Ομάδα	Αριθμός μορίων που ανήκουν στην ομάδα	Αριθμός πρότυπων μορίων
4KC3, chain A	1	161	39
	2	110	21
	3	67	14
	4	90	32

	5	136	27
	6	83	19
	7	54	14
	8	13	5
	9	13	4
<b>Σύνολο</b>		<b>727</b>	<b>175</b>

*Πίνακας 4.13 Οι ομάδες και τα πρότυπα μόρια την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 5VI4, chain A.*

Δομή της IL-33	Ομάδα	Αριθμός μορίων που ανήκουν στην ομάδα	Αριθμός πρότυπων μορίων
5VI4, chain A	1	122	25
	2	211	47
	3	62	25
	4	133	36
	5	175	35
	6	13	4
	7	41	10
	8	7	1
<b>Σύνολο</b>		<b>764</b>	<b>183</b>

*Πίνακας 4.14 Οι ομάδες και τα πρότυπα μόρια την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 5VI4, chain D.*

Δομή της IL-33	Ομάδα	Αριθμός μορίων που ανήκουν στην ομάδα	Αριθμός πρότυπων μορίων
5VI4, chain D	1	245	43
	2	188	44
	3	74	36
	4	40	11
	5	49	12

	6	19	6
	7	18	4
	8	41	9
	9	71	16
	10	12	4
<b>Σύνολο</b>		<b>757</b>	<b>185</b>

Υπενθυμίζεται ότι προκειμένου να επιλεχθούν τα κατάλληλα μόρια που θα προχωρήσουν σε βιοχημικές δοκιμές είναι απαραίτητο να απορριφθούν αυτά που χαρακτηρίζονται από περισσότερους από δέκα περιστρεφόμενους δεσμούς καθώς και αυτά που εμφανίζουν περισσότερα από ένα ασύμμετρα κέντρα. Η εφαρμογή αυτών των δύο κριτηρίων μειώνει ακόμη περισσότερο τον αριθμό των πρότυπων μορίων που μπορούν να μεταβούν σε βιολογικές δοκιμές, τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα 4.15.

**Πίνακας 4.15** Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν το κριτήριο σχετικά με τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών και των ασύμμετρων κέντρων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.

Δομή της IL-33	Κοιλότητα	Αριθμός μορίων που απορρίφθηκαν	Αριθμός μορίων που πέρασαν
2KLL, frame 2	1	10	156
4KC3, chain A	1	18	157
5VI4, chain A	2	30	153
5VI4, chain D	1	4	181

Τα τελικά πρότυπα μόρια μελετήθηκαν προσεκτικά με βάση τη χημική τους δομή αλλά και τις αλληλεπιδράσεις τους με την κοιλότητα της εκάστοτε πρωτεΐνης. Από αυτά επιλέχθηκαν πέντε μόρια για κάθε κοιλότητα που στη συνέχεια θα οδηγηθούν σε βιολογικές δοκιμές *in vitro*.

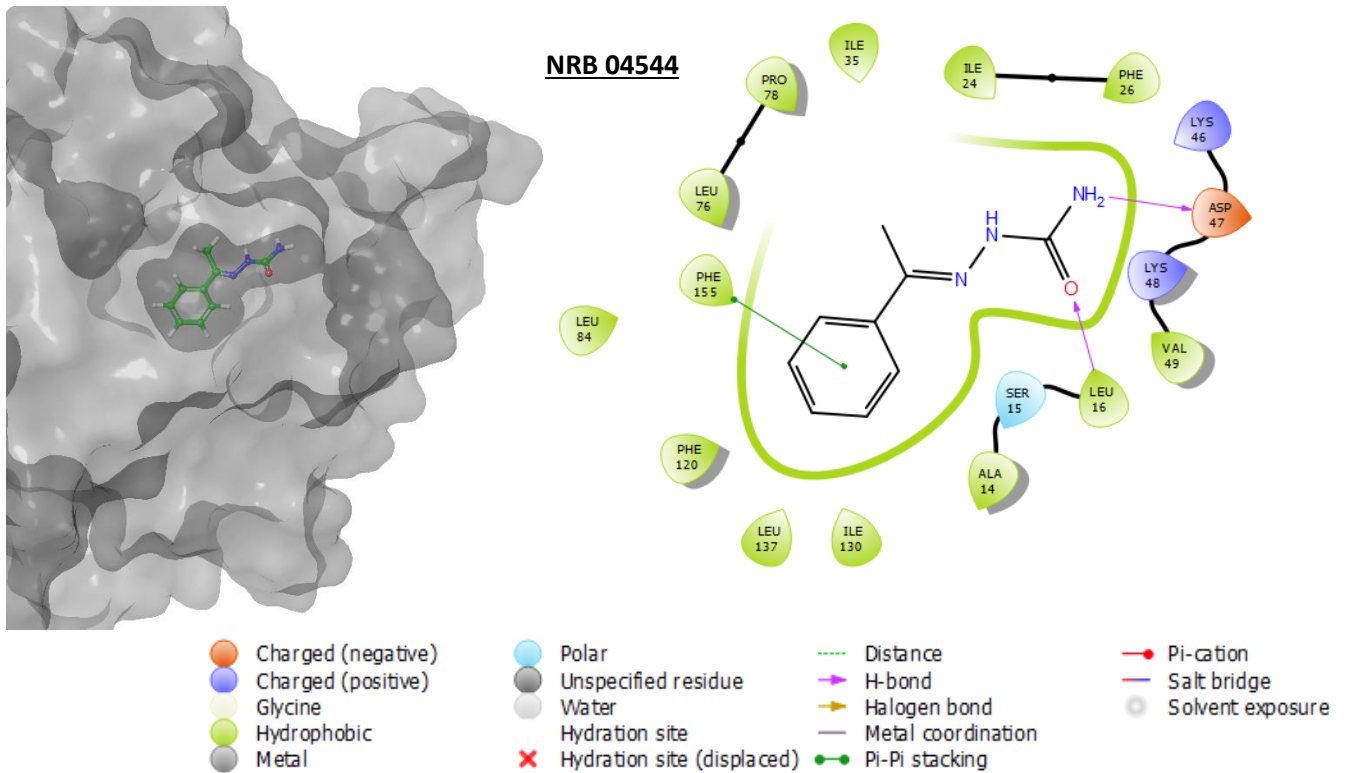
Αρχικά, για την κοιλότητα της δομής 2KLL, frame 2 επιλέχθηκαν τα ακόλουθα μόρια με τους κωδικούς: NRB 04544, S 10160, RH 01694, BTB 09392, RJC 02452 (Πίνακας 4.16).

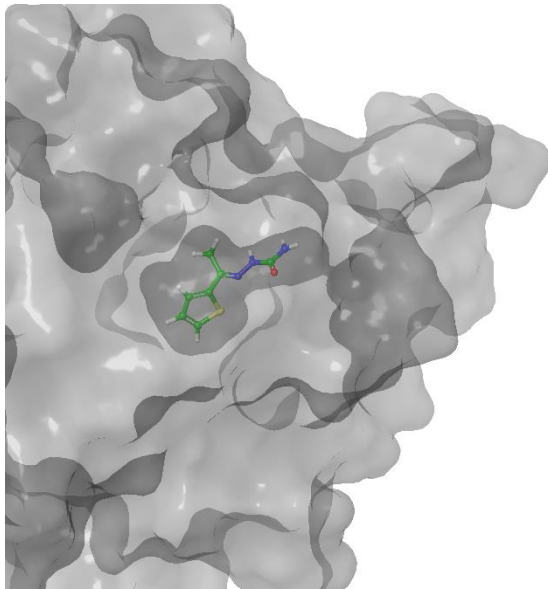
**Πίνακας 4.16** Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 2KLL, frame 2 και οι ιδιότητές τους.

Κωδικός μορίου	Βαθμολογία πρόσδεσης SP (kcal/mol)	Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών	Αριθμός ασύμμετρων κέντρων	QPIogS	QPPCaco	#metab
NRB 04544	-8.120	3	0	-0.827	189.774	2

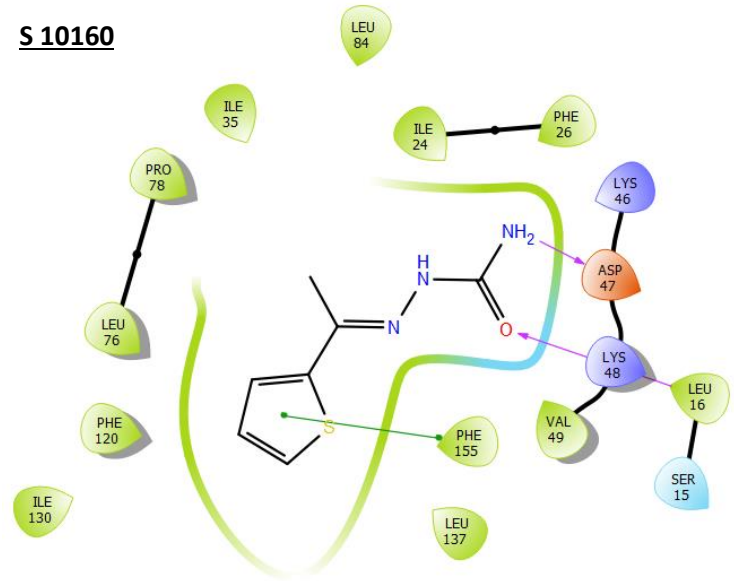
S 10160	-7.902	3	0	-0.853	180.392	3
RH 01694	-7.160	2	0	-1.917	289.067	0
BTB 09392	-7.047	2	0	-2.448	1809.009	0
RJC 02452	-7.035	3	0	-1.435	123.602	2

Στο Σχήμα 4.13 απεικονίζονται τα επιλεγμένα μόρια στο εσωτερικό της κοιλότητας πρόσδεσης και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.

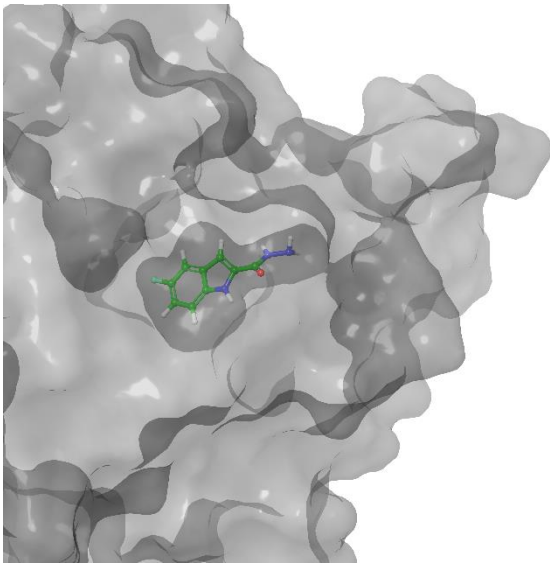




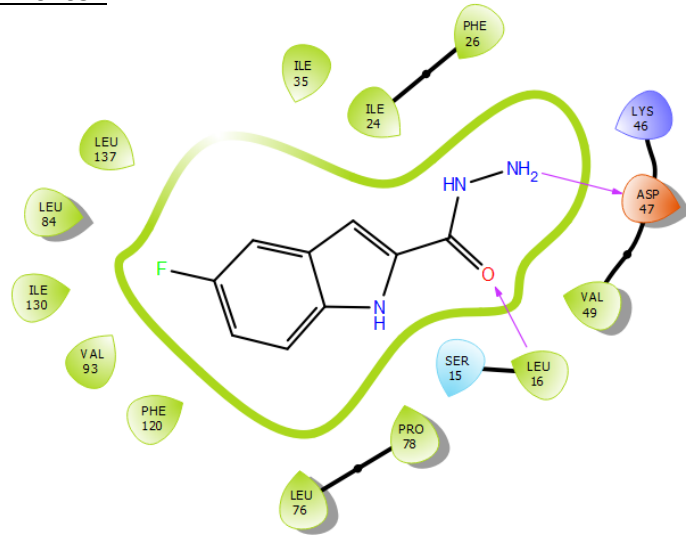
**S 10160**



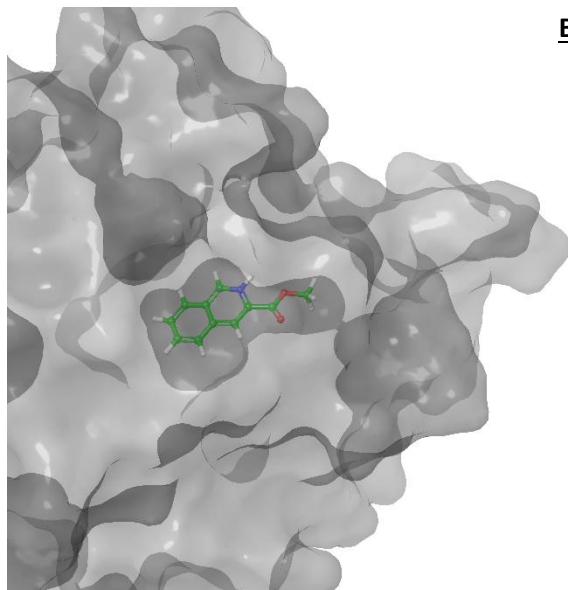
- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance          | <span style="color: red;">●</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">→</span> H-bond             | <span style="color: blue;">—</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">→</span> Halogen bond       | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | Hydration site  | <span style="color: purple;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">●—●</span> Pi-Pi stacking    |  |



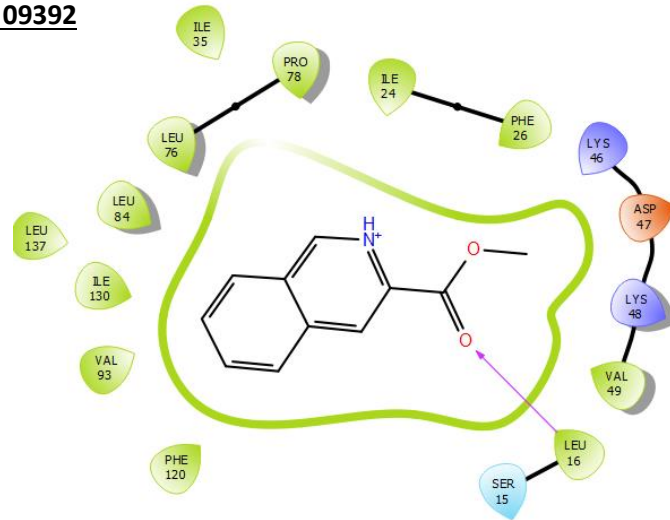
**RH 01694**



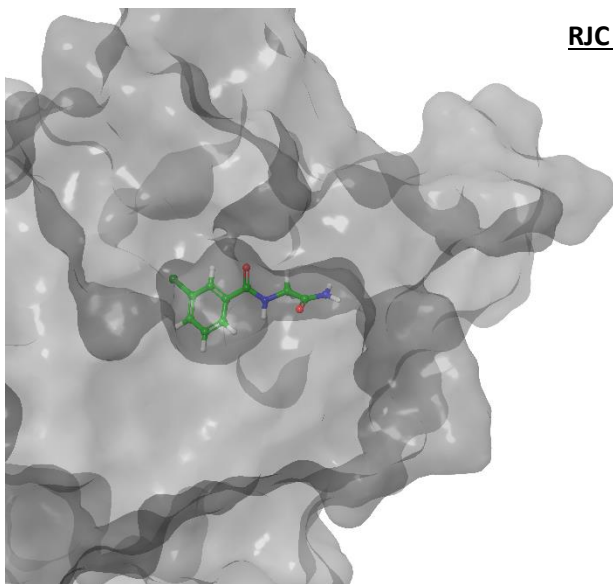
- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance          | <span style="color: red;">●</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">→</span> H-bond             | <span style="color: blue;">—</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">→</span> Halogen bond       | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | Hydration site  | <span style="color: purple;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">●—●</span> Pi-Pi stacking    |  |



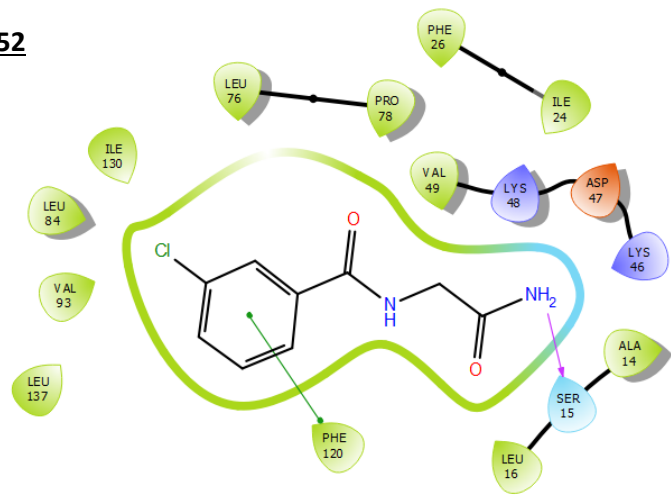
**BTB 09392**



- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance        | <span style="color: red;">—</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">—</span> H-bond           | <span style="color: blue;">—</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">—</span> Halogen bond     | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | <span style="color: lightgrey;">○</span> Hydration site       | <span style="color: grey;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">—</span> Pi-Pi stacking    |  |



**RJC 02452**



- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance        | <span style="color: red;">—</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">—</span> H-bond           | <span style="color: blue;">—</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">—</span> Halogen bond     | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | <span style="color: lightgrey;">○</span> Hydration site       | <span style="color: grey;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">—</span> Pi-Pi stacking    |  |

**Σχήμα 4.13** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 2KLL, frame 2.

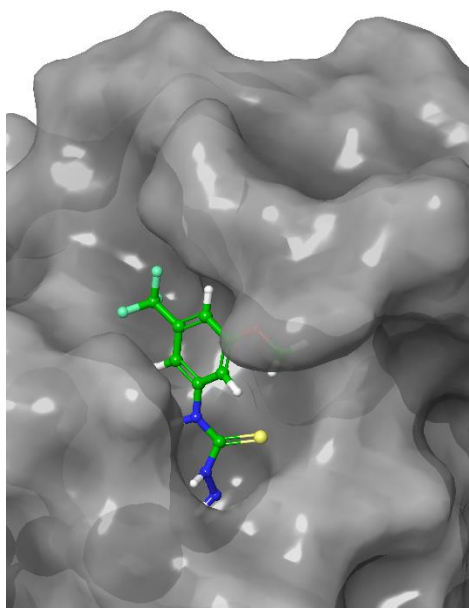
Σημειώνεται ότι για την κοιλότητα που μελετήθηκε από τη δομή 2KLL, frame 2 επιλέχθηκαν κυρίως μόρια που θα εμφανίζουν π-π αλληλεπιδράσεις με τους δακτυλίους των Phe155 και Phe120 της IL-33, καθώς και δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Leu16, Asp47 και Ser15 της κοιλότητας.

Στη συνέχεια, για την κοιλότητα της δομής 4KC3, chain A επιλέχθηκαν τα ακόλουθα μόρια με τους κωδικούς: S 04872, BTB 1448, TL 00757, PD 00722, RH 02194 (Πίνακας 4.17).

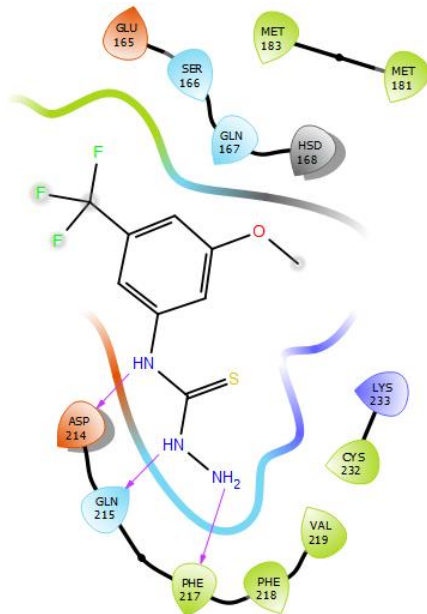
**Πίνακας 4.17** Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 4KC3, chain A και οι ιδιότητές τους.

Κωδικός μορίου	Βαθμολογία πρόσδεσης SP (kcal/mol)	Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών	Αριθμός ασύμμετρων κέντρων	QPIogS	QPPCaco	#metab
S 04872	-6.785	3	0	-3.165	773.361	3
BTB 14487	-6.732	4	0	-4.500	231.505	1
TL 00757	-6.609	1	0	-2.352	784.822	2
PD 00722	-6.590	4	0	-4.379	602.405	2
RH 02194	-6.319	3	0	-2.534	814.546	0

Στο Σχήμα 4.14 απεικονίζονται τα επιλεγμένα μόρια στο εσωτερικό της κοιλότητας πρόσδεσης και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.



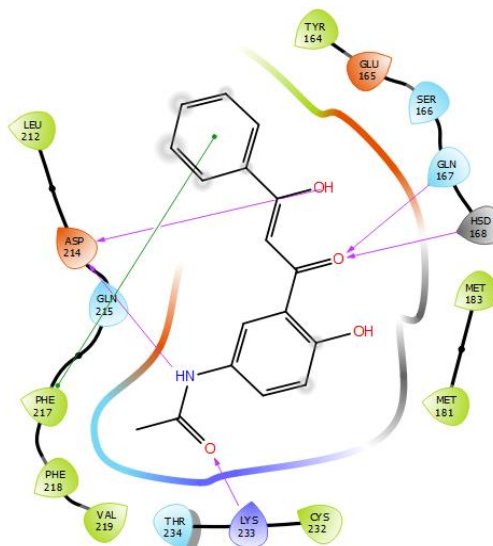
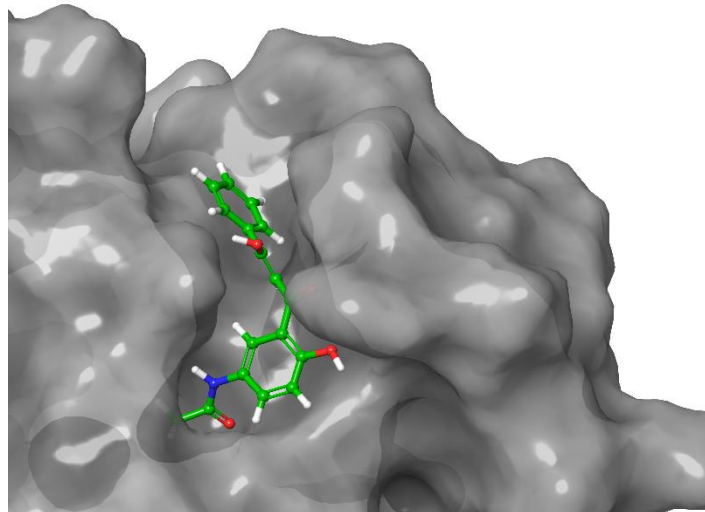
**S 04872**



- Charged (negative)
- Polar
- Distance
- Pi-cation
- Charged (positive)
- Unspecified residue
- H-bond
- Salt bridge
- Glycine
- Water
- Halogen bond
- Solvent exposure
- Hydrophobic
- Hydration site
- Metal coordination
- Metal
- ✗ Hydration site (displaced)
- Pi-Pi stacking

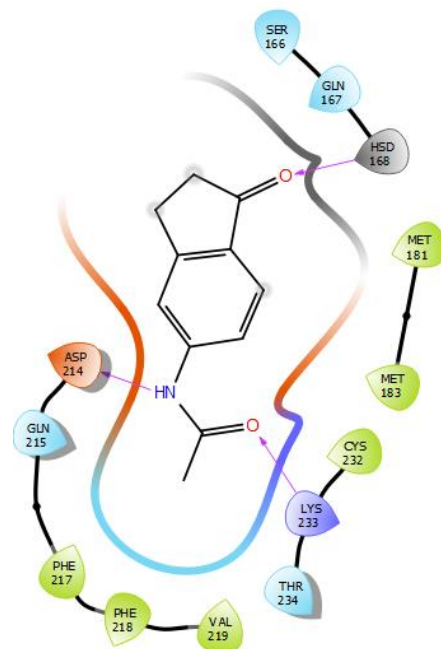
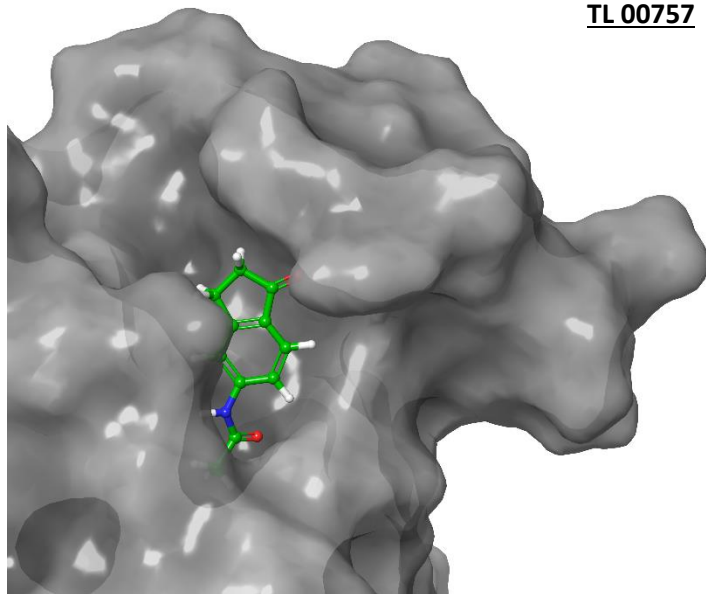


### BTB 14487

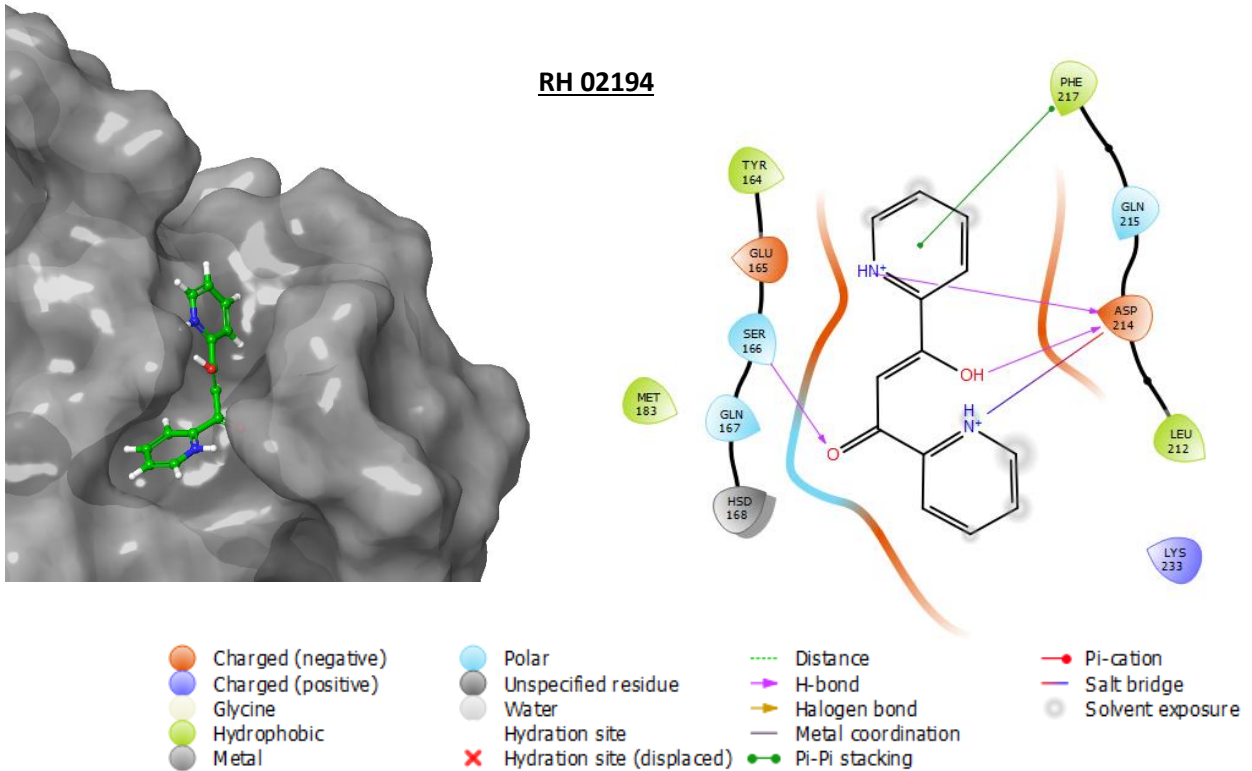
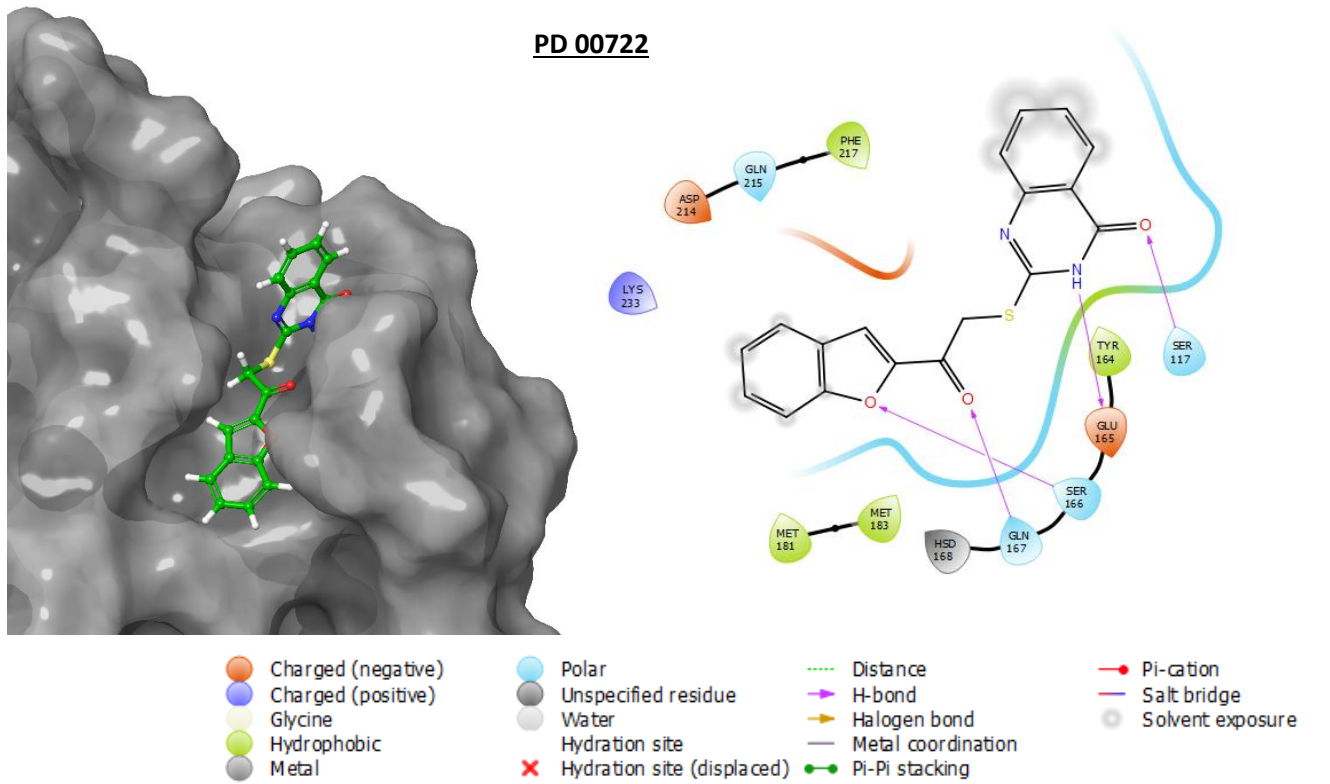


- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance          | <span style="color: red;">→</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">→</span> H-bond             | <span style="color: blue;">→</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">→</span> Halogen bond       | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | <span style="color: lightgrey;">○</span> Hydration site       | <span style="color: purple;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">○</span> Pi-Pi stacking      |  |

### TL 00757



- |  |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <span style="color: orange;">●</span> Charged (negative) | <span style="color: lightblue;">●</span> Polar                | <span style="color: green;">---</span> Distance          | <span style="color: red;">→</span> Pi-cation         |
| <span style="color: blue;">●</span> Charged (positive)   | <span style="color: grey;">●</span> Unspecified residue       | <span style="color: purple;">→</span> H-bond             | <span style="color: blue;">→</span> Salt bridge      |
| <span style="color: yellow;">●</span> Glycine            | <span style="color: lightgrey;">●</span> Water                | <span style="color: orange;">→</span> Halogen bond       | <span style="color: grey;">○</span> Solvent exposure |
| <span style="color: lightgreen;">●</span> Hydrophobic    | <span style="color: lightgrey;">○</span> Hydration site       | <span style="color: purple;">—</span> Metal coordination |  |
| <span style="color: grey;">●</span> Metal                | <span style="color: red;">✗</span> Hydration site (displaced) | <span style="color: green;">○</span> Pi-Pi stacking      |  |



**Σχήμα 4.14** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 4KC3, chain A.

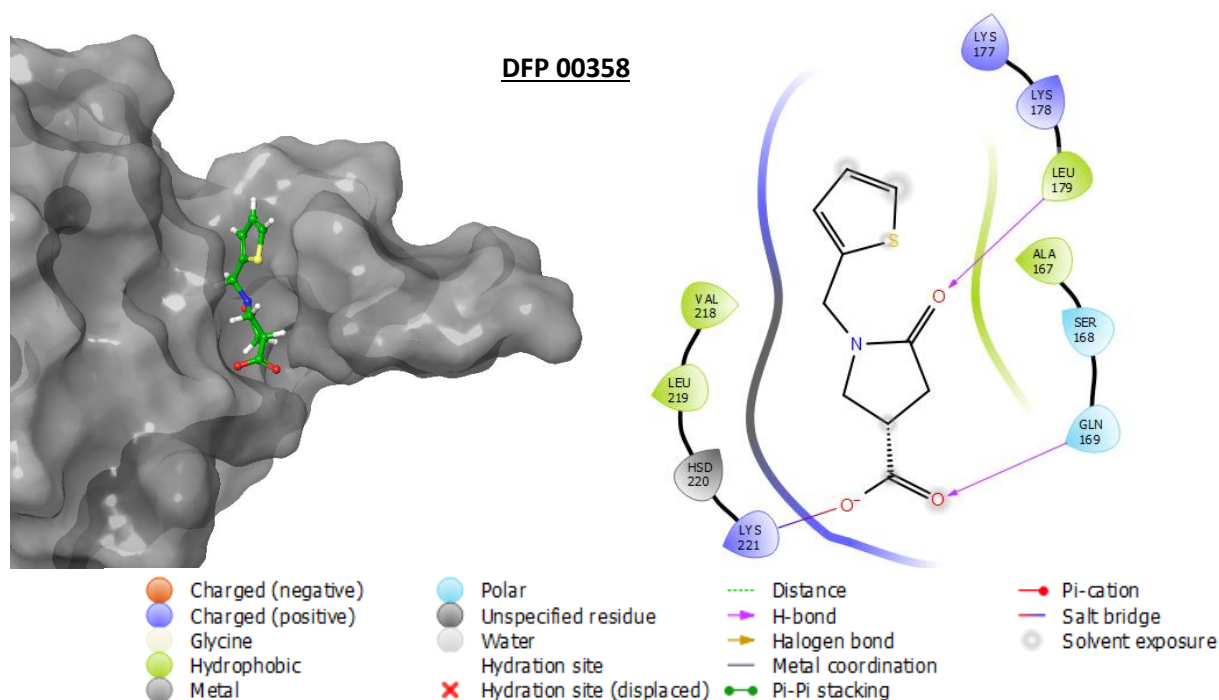
Σημειώνεται ότι για την κοιλότητα που μελετήθηκε από τη δομή 4KC3, chain A επιλέχθηκαν κυρίως μόρια που θα εμφανίζουν π-π αλληλεπιδράσεις με τον δακτύλιο της Phe217 της IL-33, γέφυρα άλατος με το αμινοξύ Asp214, καθώς και δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα όπως τα Asp214, Gln215, Glu15, Ser166, Gln167 της κοιλότητας.

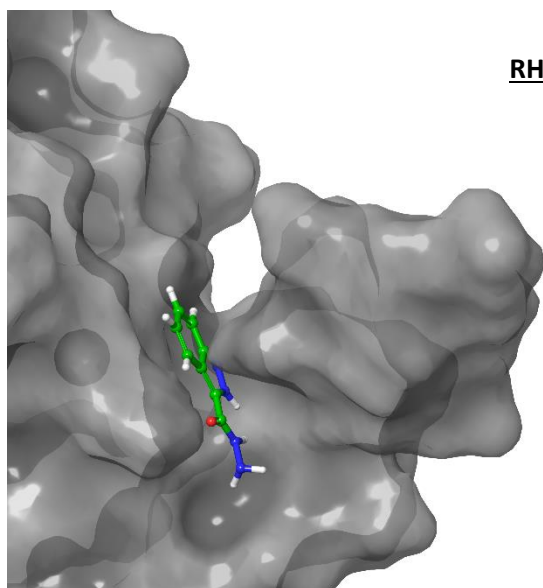
Στη συνέχεια, για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain A επιλέχθηκαν τα ακόλουθα μόρια με τους κωδικούς: DFP 00358, RH 01089, JFD 03187, JFD 01132, S 14078 (Πίνακας 4.18).

**Πίνακας 4.18** Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain A και οι ιδιότητές τους.

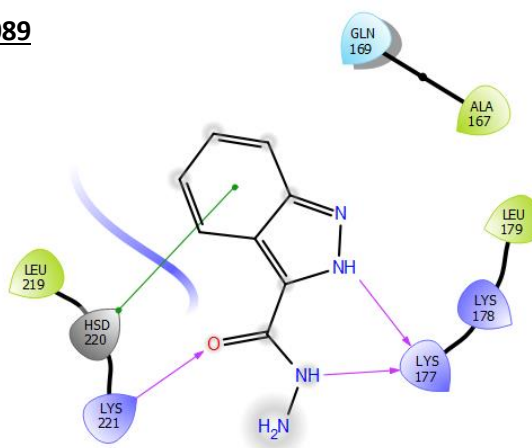
Κωδικός μορίου	Βαθμολογία πρόσδεσης SP (kcal/mol)	Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών	Αριθμός ασύμμετρων κέντρων	QPIogS	QPPCaco	#metab
DFP 00358	-6.842	3	1	-1.076	43.346	4
RH 01089	-6.673	2	0	-1.350	144.021	0
JFD 03187	-6.457	2	0	-1.442	120.211	1
JFD 01132	-6.134	0	1	-1.604	459.601	2
S 14078	-6.113	6	0	-4.513	100.071	1

Στο Σχήμα 4.15 απεικονίζονται τα επιλεγμένα μόρια στο εσωτερικό της κοιλότητας πρόσδεσης και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.

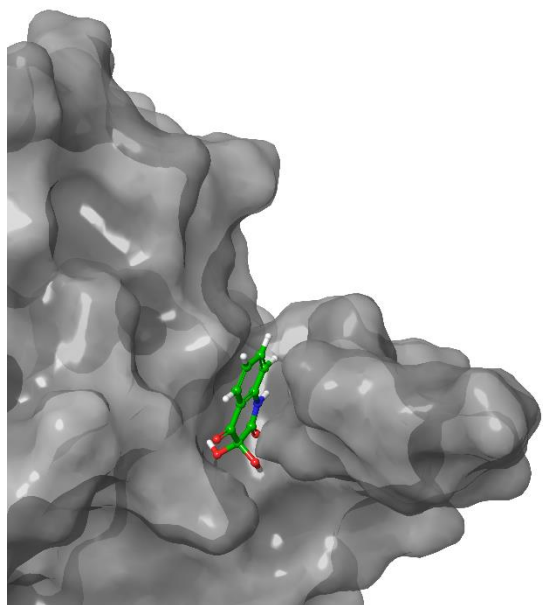




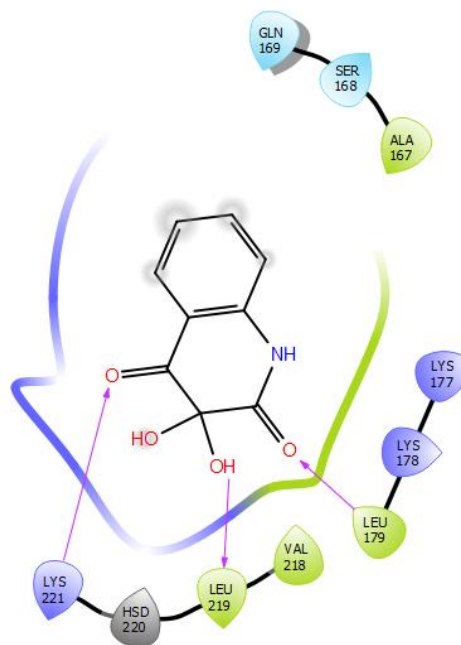
**RH 01089**



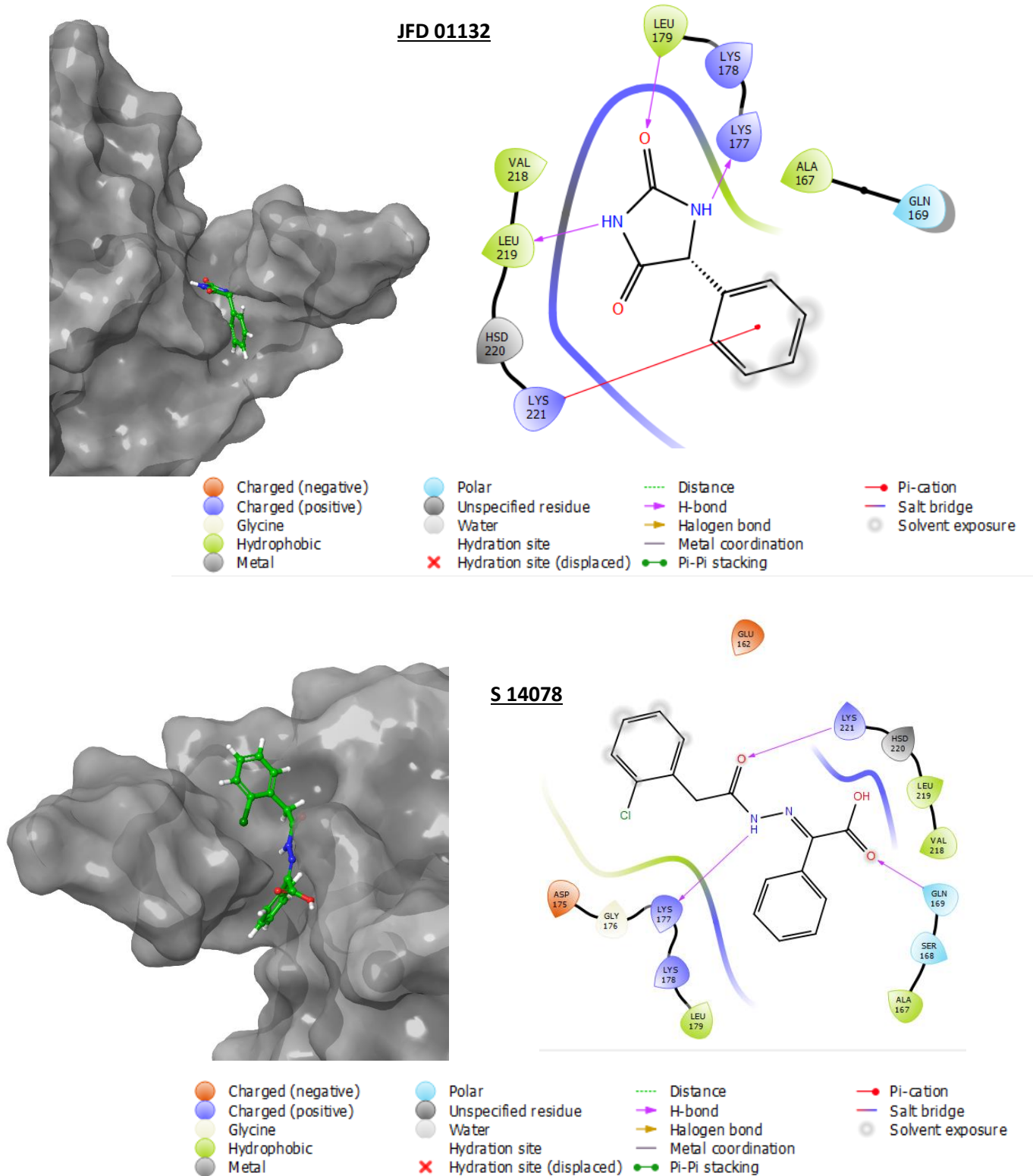
- |                    |                            |                    |                  |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar                      | Distance           | Pi-cation        |
| Charged (positive) | Unspecified residue        | H-bond             | Salt bridge      |
| Glycine            | Water                      | Halogen bond       | Solvent exposure |
| Hydrophobic        | Hydration site             | Metal coordination |                  |
| Metal              | Hydration site (displaced) | Pi-Pi stacking     |                  |



**JFD 03187**



- |                    |                            |                    |                  |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar                      | Distance           | Pi-cation        |
| Charged (positive) | Unspecified residue        | H-bond             | Salt bridge      |
| Glycine            | Water                      | Halogen bond       | Solvent exposure |
| Hydrophobic        | Hydration site             | Metal coordination |                  |
| Metal              | Hydration site (displaced) | Pi-Pi stacking     |                  |



**Σχήμα 4.15** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain A.

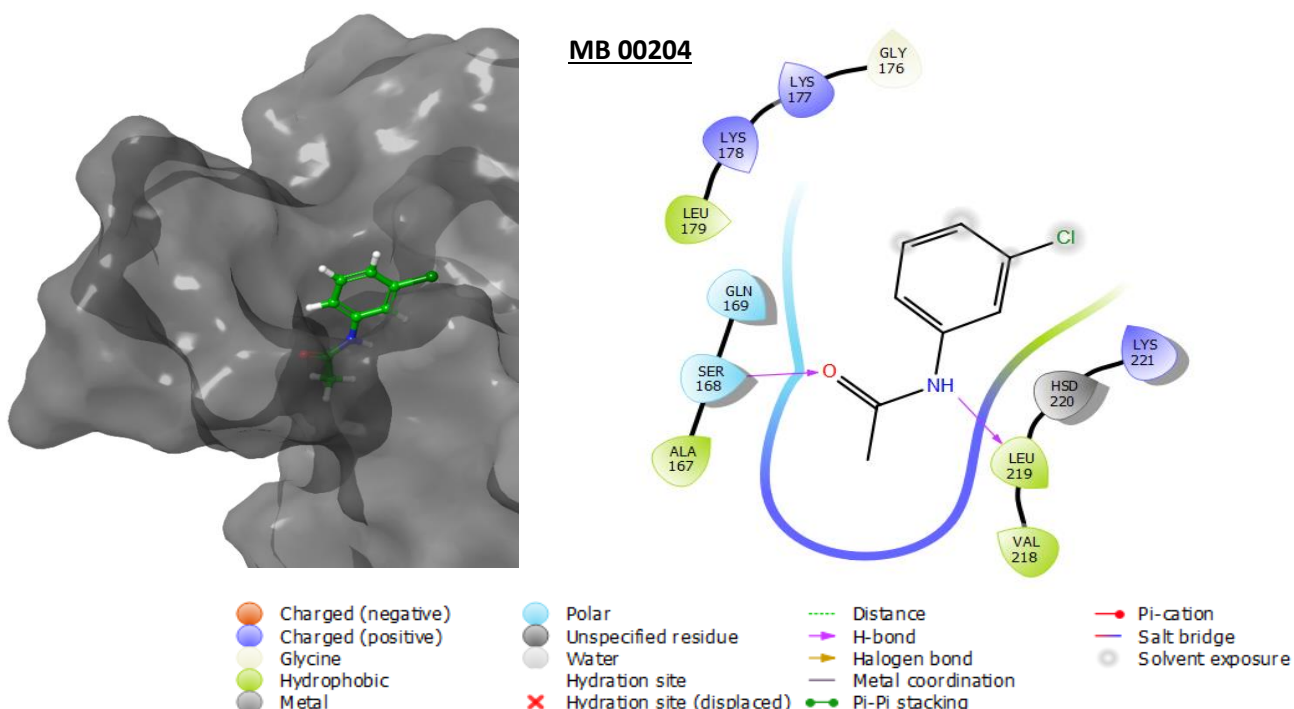
Σημειώνεται ότι για την κοιλότητα που μελετήθηκε από τη δομή 5VI4, chain A επιλέχθηκαν κυρίως μόρια που θα εμφανίζουν π αλληλεπιδράσεις με τους δακτυλίους των His220 και Lys221 της IL-33, γέφυρα άλατος με το αμινοξύ Lys221, καθώς και δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα όπως τα Leu179, Gln169, Lys177, Lys221 και Leu219 της κοιλότητας.

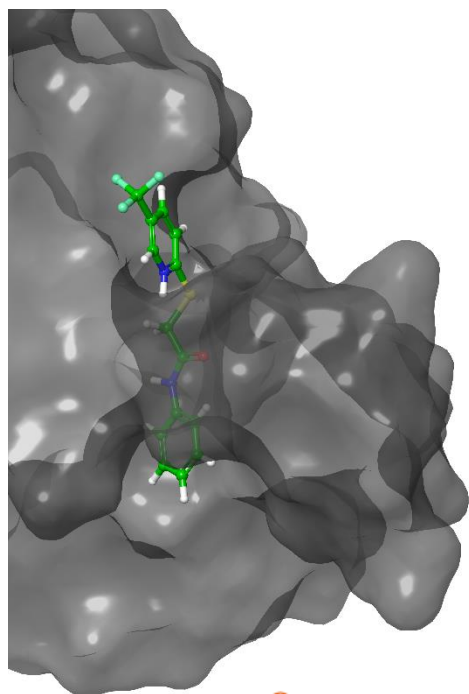
Τέλος, για την κοιλότητα που εντοπίστηκε στη δομή 5VI4, chain D επιλέχθηκαν τα ακόλουθα μόρια με τους κωδικούς: (Πίνακας 4.19).

**Πίνακας 4.19** Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain D και οι ιδιότητές τους.

Κωδικός μορίου	Βαθμολογία πρόσδεσης SP (kcal/mol)	Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών	Αριθμός ασύμμετρων κέντρων	QPIogS	QPPCaco	#metab
MB 00204	-7.412	1	0	-2.768	2814.183	1
SPB 02816	-7.015	4	0	-5.574	2581.970	2
S 00965	-6.983	1	0	-1.812	3223.178	1
HTS 05723	-6.903	4	1	-3.004	626.306	3
HAN 00212	-6.900	1	0	-4.740	1344.380	0

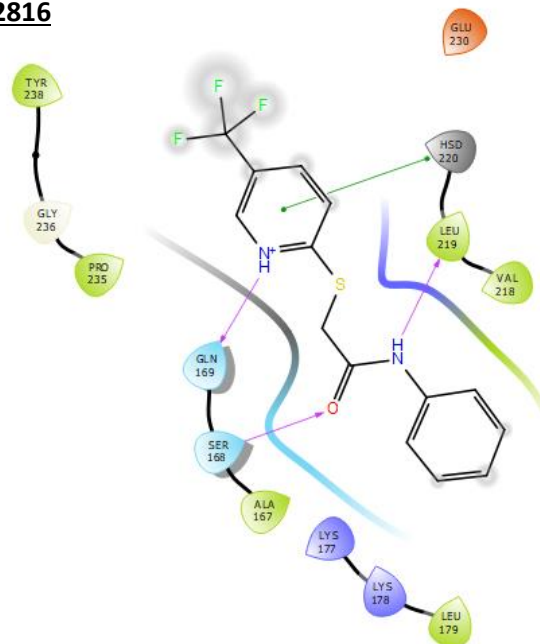
Στο Σχήμα 4.16 απεικονίζονται τα επιλεγμένα μόρια στο εσωτερικό της κοιλότητας πρόσδεσης και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τους με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.





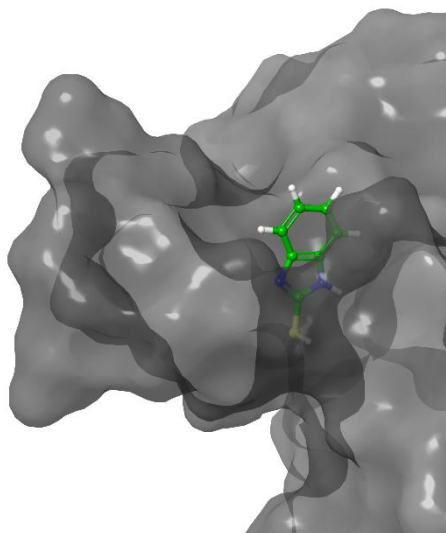
- Charged (negative)
- Charged (positive)
- Glycine
- Hydrophobic
- Metal

**SPB 02816**

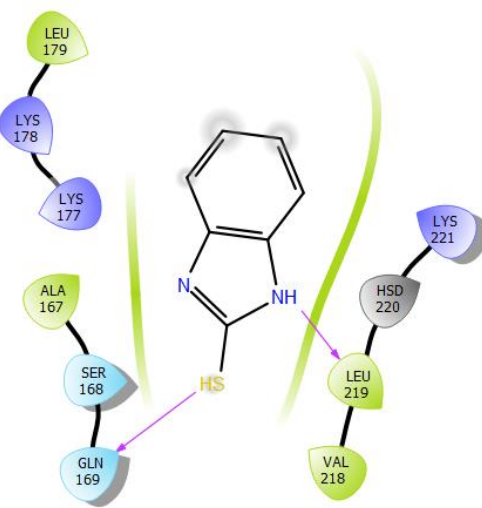


- Polar
- Unspecified residue
- Water
- Hydration site
- ✗ Hydration site (displaced)
- Distance
- H-bond
- Halogen bond
- Metal coordination
- Pi-Pi stacking
- Pi-cation
- Salt bridge
- Solvent exposure

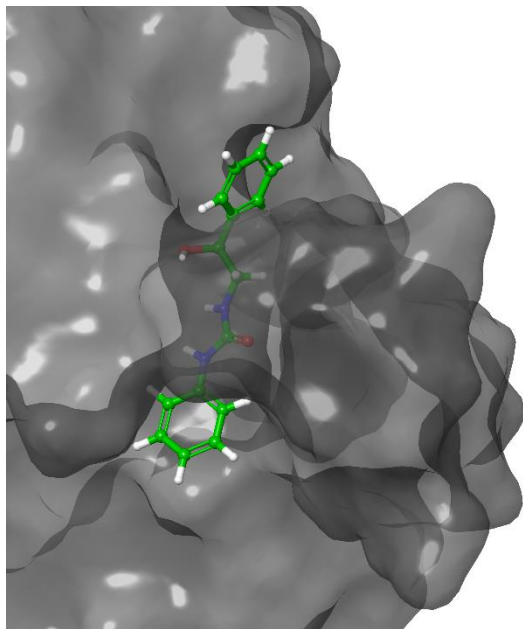
**S 00965**



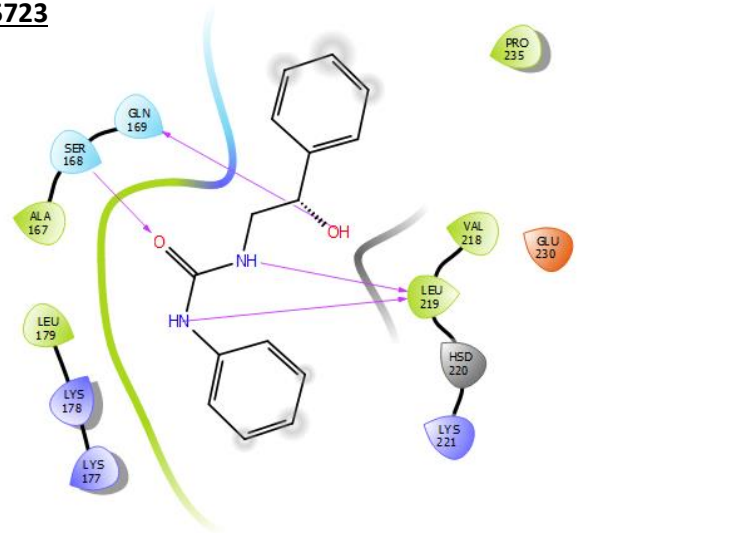
- Charged (negative)
- Charged (positive)
- Glycine
- Hydrophobic
- Metal



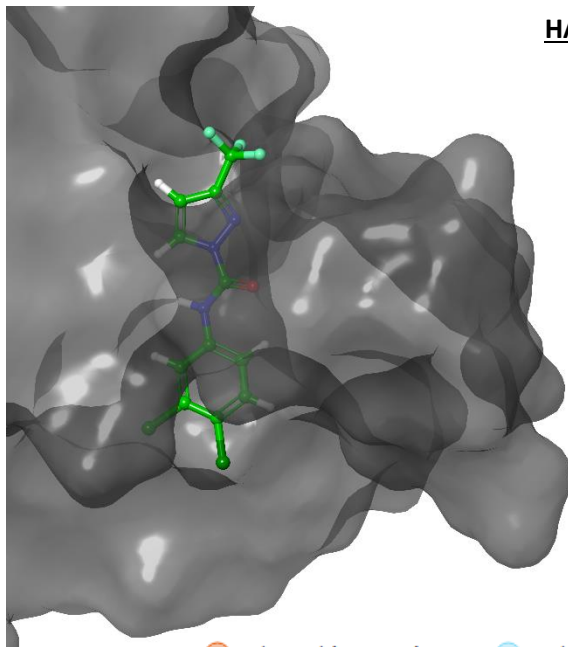
- Polar
- Unspecified residue
- Water
- Hydration site
- ✗ Hydration site (displaced)
- Distance
- H-bond
- Halogen bond
- Metal coordination
- Pi-Pi stacking
- Pi-cation
- Salt bridge
- Solvent exposure



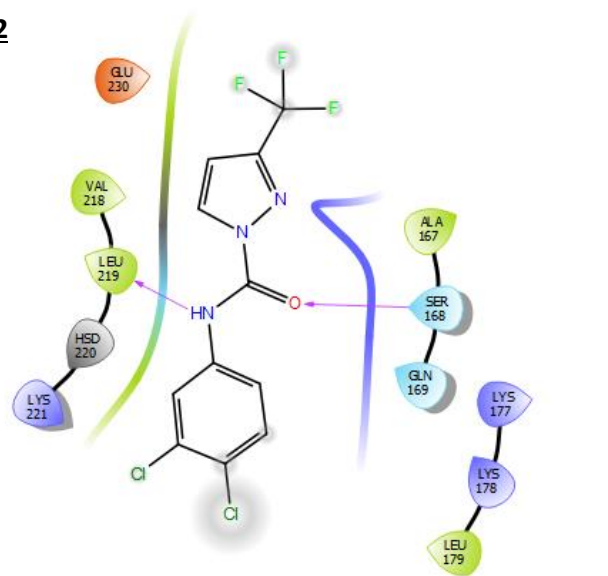
**HTS 05723**



- |                    |                            |                    |                  |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar                      | Distance           | Pi-cation        |
| Charged (positive) | Unspecified residue        | H-bond             | Salt bridge      |
| Glycine            | Water                      | Halogen bond       | Solvent exposure |
| Hydrophobic        | Hydration site             | Metal coordination |                  |
| Metal              | Hydration site (displaced) | Pi-Pi stacking     |                  |



**HAN 00212**



- |                    |                            |                    |                  |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar                      | Distance           | Pi-cation        |
| Charged (positive) | Unspecified residue        | H-bond             | Salt bridge      |
| Glycine            | Water                      | Halogen bond       | Solvent exposure |
| Hydrophobic        | Hydration site             | Metal coordination |                  |
| Metal              | Hydration site (displaced) | Pi-Pi stacking     |                  |

**Σχήμα 4.16** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain D.



Για την τελευταία κοιλότητα που μελετήθηκε από τη δομή 5VI4, chain D επιλέχθηκαν κυρίως μόρια που εμφανίζουν δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα όπως τα Ser168, Leu219, Gln169 και Leu219 της κοιλότητας.

Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί πώς τα μόρια που επιλέχθηκαν για κάθε μία από τις τέσσερις κοιλότητες της IL-33 θα υποβληθούν σε πειράματα στο εργαστήριο του Δρ. Παναγιώτη Βεργίνη, ερευνητή Γ στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, προκειμένου να μελετηθεί εάν κάποιο από αυτά είναι ενεργό και προσδέεται στην πρωτεΐνη ισχυρά.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη στιγμή που η IL-33 εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινους ιστούς πριν περίπου 15 χρόνια, περισσότερες από 2,000 δημοσιεύσεις έχουν εξαχθεί σχετικές με αυτή τη σπουδαία κυτοκίνη της οικογένειας των IL-1. Δεδομένου των πολλαπλών ρόλων που εμφανίζει η IL-33 στη ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και στις ανοσοαποκρίσεις των διαφόρων ιστών, καθώς και λόγω της συσχέτισής της με έναν συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ασθενειών, δεν υπάρχουν αμφιβολίες ότι ο αριθμός των δημοσιεύσεων θα εκτοξευτεί τα επόμενα χρόνια. Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήθηκε η στόχευση της IL-33 ως αντι-φλεγμονώδους φαρμακευτικού στόχου με τη χρήση τεχνικών υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων. Σκοπός της εργασίας ήταν λοιπόν να βρεθούν πιθανά μόρια-αναστολείς της IL-33, όπου η πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη θα μπορούσε να αποτελέσει την αρχή για την ανακάλυψη νέων τρόπων θεραπείας των ασθενειών που σχετίζονται με την IL-33.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής στις 13 δομές που εξήχθησαν από τις τρεις διαθέσιμες δομές της IL-33 στην PDB με κωδικούς 2KLL, 4KC3 και 5VI4. Επιλέχθηκε να προσομοιωθούν και οι 13 δομές προκειμένου να παραχθούν περισσότερα αποτελέσματα που θα βοηθήσουν στην πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της μελέτης. Τα βήματα της προσομοίωσης για όλες τις δομές πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την διαγραμματική απεικόνιση της ενέργειας και θερμοκρασίας του εκάστοτε συστήματος, συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης. Το αποτέλεσμα κάθε προσομοίωσης, η τροχιά Μοριακής Δυναμικής, μελετήθηκε προκειμένου να παρατηρηθεί η συμπεριφορά της πρωτεΐνης στην πορεία του χρόνου, και από αυτές εξήχθησε η πιο αντιπροσωπευτική δομή που οδηγήθηκε στην διαδικασία πρόβλεψης πιθανών κοιλοτήτων πρόσδεσης. Έτσι, σε κάθε μία δομή προσδιορίστηκαν πιθανές κοιλότητες στις οποίες θα μπορούσε να προσδεθεί ένα μικρό μόριο και να αναστείλει τη δράση της πρωτεΐνης. Οι κοιλότητες που προβλέφθηκαν μελετήθηκαν στη συνέχεια με βάση τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους και επιλέχθηκαν αυτές που εμφανίζονται ως πιο υποσχόμενες για να σαρωθεί εικονικά μία χημειοθήκη εμπορικά διαθέσιμων μορίων με φαρμακολογική δράση. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της πρόβλεψης κοιλοτήτων υπέδειξαν αρκετές περιοχές της πρωτεΐνης που έχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να μελετηθούν περαιτέρω, ωστόσο από αυτές επιλέχθηκαν μόνο οι τέσσερις πιο κατάλληλες. Στη συνέχεια, στις κοιλότητες αυτές σαρώθηκε εικονικά μία χημειοθήκη εμπορικά διαθέσιμων μορίων και έπειτα από μία υπολογιστικά χρονοβόρα διαδικασία, βρέθηκαν οι διαμορφωτικές πόζες των μορίων στην εκάστοτε κοιλότητα, υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης και τέλος επιλέχθηκαν ορισμένα μόρια που εμφάνιζαν την ισχυρότερη πρόσδεση στην κοιλότητα της πρωτεΐνης. Η διαδικασία της εικονικής σάρωσης πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και για τις τέσσερις κοιλότητες που μελετήθηκαν, καθώς παρατηρήθηκε ότι όλα τα μόρια λαμβάνουν σωστή θέση μέσα στην κοιλότητα της πρωτεΐνης και κανένα δεν αποκλίνει από αυτή την περιοχή. Τα μόρια αυτά ωστόσο, έπρεπε να φιλτραριστούν ώστε να απορριφθούν αυτά που πιθανόν να οδηγήσουν σε αποτυχία στις μετέπειτα φάσεις του σχεδιασμού φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, μία σειρά από φίλτρα εφαρμόστηκαν ώστε να απορριφθούν μόρια που εμφανίζουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, εμπεριέχουν τοξικά και καρκινογενή δομικά χαρακτηριστικά, αλλά και μόρια που χαρακτηρίζονται από φυσικοχημικές ιδιότητες που δεν τα καθιστούν κατάλληλα για φάρμακα. Η εφαρμογή των φίλτρων πραγματοποιήθηκε σταδιακά με επιτυχία, όπου έπειτα από κάθε

βήμα προέκυπτε ένας μικρότερος αριθμός μορίων. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, παρέμειναν περίπου 160 πρότυπα μόρια για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης της IL-33. Τα μόρια αυτά μελετήθηκαν προσεκτικά με βάση τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με τα αμινοξέα της κοιλότητας της πρωτεΐνης και από αυτά επιλέχθηκαν τα πέντε πιο υποσχόμενα για κάθε κοιλότητα ώστε να οδηγηθούν σε βιολογικές δοκιμές *in vitro*.

## 6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Αρχικά, τα μόρια που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης της IL-33 θα υποβληθούν σε πειραματικές δοκιμές προκειμένου να αξιολογηθεί η δραστικότητά τους. Συγκεκριμένα, τα μόρια-προσδέτες θα πρέπει να ελεγχθούν σε δοκιμές *in vitro* χωρίς την παρουσία κυττάρων όπως οι τεχνικές ITC, SPR και FRET που αναλύθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο. Με το τρόπο αυτό θα μπορέσουμε να διακρίνουμε ποια από τα μόρια είναι ενεργά και μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της πρωτεΐνης IL-33. Τα μόρια που θα αποδειχθούν ότι προσδένονται ισχυρά στην κοιλότητα και αναστέλλουν τη δράση της IL-33, θα πρέπει στη συνέχεια να μελετηθούν και με δοκιμές παρουσία κυττάρων προκειμένου να μελετηθεί η δράση τους σε ένα πιο πολύπλοκο περιβάλλον, όπως είναι το εσωτερικό ενός κυττάρου. Έτσι με τεχνικές όπως τα κιτ μέτρησης κυττάρων-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) μπορεί να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα του κυττάρου παρουσία του μορίου-προσδέτη μέσω δοκιμασιών πολλαπλασιασμού των κυττάρων και με δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να εκτιμηθεί και με την τεχνική MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) που είναι μία χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας. Τέλος, μπορεί να εφαρμοστεί και η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής ώστε να μελετηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία του μορίου-αναστολέα της IL-33.

Μια ακόμα πτυχή του θέματος που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω είναι η χρήση μιας συνάρτησης βαθμολόγησης της πρόσδεσης που προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια υπολογισμών. Υπενθυμίζεται ότι οι εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης των προσδετών πραγματοποιήθηκε με τη συνάρτηση SP (Standard Precision). Προτείνεται να επαναληφθούν οι υπολογισμοί με την συνάρτηση Extra Precision (XP), η οποία χρησιμοποιεί μια πιο σύνθετη διαδικασία επιλογής της καλύτερης πόζας του προσδέτη στην κοιλότητα της πρωτεΐνης. Αυτό το βήμα κρίνεται σκόπιμο σε περίπτωση δυσκολίας σύνθεσης των μορίων που επιλέχθηκαν, καθώς έτσι θα υπήρχε μία επιπλέον επιβεβαίωση και ένδειξη μεγαλύτερης αξιοπιστίας της δραστικότητάς τους.

Επιπρόσθετα, τα μόρια που θα χαρακτηριστούν ως δραστικά από τις παραπάνω μελέτες, μπορούν να υποβληθούν σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής όπου θα είναι προσδεδεμένα στην κοιλότητα πρόσδεσης και θα δημιουργούν ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη. Έτσι, θα μπορέσουμε να εξάγουμε την τροχιά της προσομοίωσης και να μελετήσουμε αν το μόριο-αναστολέας στη διάρκεια του χρόνου προσομοίωσης θα παραμείνει προσδεδεμένο στην κοιλότητα της πρωτεΐνης ή αν θα μετακινηθεί προς τα μόρια του διαλύτη που περιβάλλουν την πρωτεΐνη.

Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό μελλοντικό βήμα για την ολοκληρωμένη μελέτη της IL-33 θα ήταν η αξιοποίηση της δομής που κατασκευάστηκε μέσω Ομόλογης Μοντελοποίησης και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 109 που δεν είναι διαθέσιμα στην PDB. Για τη δομή αυτή μπορεί να επαναληφθεί όλη η διαδικασία που περιγράφηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, ώστε να βρεθούν μόρια που εμφανίζουν φαρμακολογική δράση και αναστέλλουν τη δράση της IL-33, αφού πρώτα προσδεθούν σε μία διαφορετική αμινοξική περιοχή από αυτή που έχει μελετηθεί ως τώρα.

## Ευρετήριο σχημάτων

<b>Σχήμα 1.1</b> Η χρονική πορεία ανακάλυψης της IL-33.....	1
<b>Σχήμα 1.2</b> Έκφραση της IL-33 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ενός HEV αιμοφόρου αγγείου στις αμυγδαλές, υπό συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού.....	3
<b>Σχήμα 1.3</b> Έκφραση της IL-33 σε α) αδενικά επιθηλιακά κύτταρα του άνω στομάχου, β) επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα, υπό συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού.....	4
<b>Σχήμα 1.4</b> Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία ενεργοποιούνται από την IL-33 και συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση τύπου 2.. ..	6
<b>Σχήμα 1.5</b> Η λειτουργία της IL-33 ως κυτοκίνη. ....	7
<b>Σχήμα 1.6</b> Το εξαπεπτίδιο (M45 L47 R48 S49 G50 I53) της IL-33, απαραίτητο για την πρόσδεση στη χρωματίνη. ....	8
<b>Σχήμα 1.7</b> Εξωκυττάρια απελευθέρωση της IL-33 <sub>FL</sub> και ρύθμιση από πρωτεάσες. ....	9
<b>Σχήμα 1.8</b> Κόψιμο και αδρανοποίηση της IL-33 από τις κασπάσες 3 και 7 στη μέση της περιοχής IL-1-like cytokine κατά την διάρκεια της απόπτωσης των κυττάρων .....	10
<b>Σχήμα 1.9</b> Μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο η IL-33 ελέγχει την εξαρτώμενη από την FAK ανοσολογική απόκριση στα καρκινικά κύτταρα. ....	11
<b>Σχήμα 1.10</b> Αλληλεπίδραση της IL-33 με την όξινη κοιλότητα που σχηματίζεται από το διμερές ιστονών H2A-H2B στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος.....	13
<b>Σχήμα 1.11</b> Δομή του γονιδίου της ανθρώπινης IL-33.....	17
<b>Σχήμα 1.12</b> Δομή της ανθρώπινης πρωτεΐνης IL-33.....	18
<b>Σχήμα 1.13</b> Η δομή της ανθρώπινης IL-33 (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 2KLL).. ....	19
<b>Σχήμα 1.14</b> Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 4KC3). ....	20
<b>Σχήμα 1.15</b> Η σύνδεση της IL-33 με τον υποδοχέα ST2, σε δύο διακριτές θέσεις σύνδεσης.....	21
<b>Σχήμα 1.16</b> Η κρυσταλλική δομή της IL-33 σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP (κωδικός από την Protein Data Bank (PDB): 5VI4). ....	22
<b>Σχήμα 1.17</b> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην IL-33, τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RAcP.....	23
<b>Σχήμα 1.18</b> α) Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μορίων νερού. β) Οι δεσμοί υδρογόνου (μπλε διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ ενός μορίου προσδέτη (γκρι) και των διάφορων αμινοξέων του υποδοχέα (άσπρο) με κωδικό στην PDB: 2AA7 [36].....	27
<b>Σχήμα 1.19</b> π-π αλληλεπιδράσεις.. ....	28
<b>Σχήμα 1.20</b> Κατιόν-π (αριστερά) και ανιόν-π (δεξιά) αλληλεπιδράσεις.....	28
<b>Σχήμα 1.21</b> Αλληλεπιδράσεις διπόλου -π μεταξύ ενός μορίου νερού και ενός βενζολίου.....	29
<b>Σχήμα 1.22</b> Απεικόνιση δεσμού αλογόνου σε σύμπλοκο πρωτεΐνης- προσδέτη.....	30
<b>Σχήμα 1.23</b> Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.....	31
<b>Σχήμα 2.1</b> Απεικόνιση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων ενός μοριακού συστήματος.....	34
<b>Σχήμα 2.2</b> Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού Lennard- Jones που περιγράφει τις δυνάμεις van der Waals.....	36

<b>Σχήμα 2.3</b> Διδιάστατη απεικόνιση του περιοδικού κουτιού που αντιπροσωπεύει τις περιοδικές οριακές συνθήκες που χρησιμοποιούνται σε μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής. ....	40
<b>Σχήμα 2.4</b> Απεικόνιση μιας μονοδιάστατης επιφάνειας της δυναμικής ενέργειας. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας στοχεύει στην εύρεση του κοντινότερου τοπικού ελαχίστου της ενέργειας.....	41
<b>Σχήμα 2.5</b> Ετήσια αύξηση δομών στην Protein Data Bank. (κίτρινες μπάρες: αριθμός δομών που εμφανίζονται ετησίως, μπλε μπάρες: συνολικός διαθέσιμος αριθμός).....	42
<b>Σχήμα 2.6</b> Μεθοδολογία που ακολουθείται στο Structure-Based Virtual Screening.....	44
<b>Σχήμα 2.7</b> Απεικόνιση του κορμού και των στροφομερών ομάδων ενός μορίου.....	45
<b>Σχήμα 2.8</b> Σειρά ιεραρχικών κριτηρίων για την εύρεση των πιθανών διαμορφώσεων και προσανατολισμών ενός μορίου στην κοιλότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης .....	46
<b>Σχήμα 2.9</b> Αρμονικός ταλαντωτής. Οι δύο μάζες είναι ίσες και ενώνονται με ελατήρια. Τα άκρα των δύο ελατηρίων που είναι σε επαφή με τον τοίχο είναι σταθερά και δεν μπορούν να μετακινηθούν.....	51
<b>Σχήμα 2.10</b> Οι δύο κανονικές δονήσεις ενός συστήματος δύο μαζών.....	53
<b>Σχήμα 2.11</b> Δίκτυο, όπου τα μπλε σημεία είναι οι κόμβοι και οι πράσινες γραμμές είναι οι ακμές που ενώνουν τους κόμβους.....	55
<b>Σχήμα 3.1</b> Οι δομές της IL-33 έπειτα από την προετοιμασία. ....	63
<b>Σχήμα 3.2</b> Η αλληλουχία αμινοξέων της ανθρώπινης IL-33 σε μορφή FASTA.....	64
<b>Σχήμα 3.3</b> Η δομή της IL-33 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 109, όπως κατασκευάστηκε μέσω Ομόλογης Μοντελοποίησης από τον οργανισμό Gallus Gallus. ....	64
<b>Σχήμα 3.4</b> Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.....	67
<b>Σχήμα 3.5</b> Απεικόνιση της κοιλότητας πρόσδεσης της πρώτης διαμόρφωσης της IL-33 σε διάλυμα NMR (pdb code: 2KLL, frame 1). όπως βρέθηκε από το SiteMap. ....	69
<b>Σχήμα 3.6</b> Απεικόνιση της πρώτης κανονικής δόνησης της πρώτης διαμόρφωσης της IL-33 σε διάλυμα NMR (pdb code: 2KLL, frame 1). ....	71
<b>Σχήμα 3.7</b> Απεικόνιση του δυναμικού δικτύου της πρώτης διαμόρφωσης της IL-33 σε διάλυμα NMR (pdb code: 2KLL, frame 1).. ....	72
<b>Σχήμα 3.8</b> Κουτί μέσα στο οποίο ορίζεται το πλέγμα που αναπαριστά το σχήμα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κοιλότητας πρόσδεσης.....	74
<b>Σχήμα 3.9</b> Ένα παράδειγμα μορίου που απορρίπτεται από τον ChemBioServer λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων.....	75
<b>Σχήμα 3.10</b> Η διαδικασία που ακολουθείται σε ένα πείραμα Ισοθερμικής Θερμιδομετρίας Τίτλοδοτήσης.....	78
<b>Σχήμα 3.11</b> α) Η διάταξη ενός οργάνου που χρησιμοποιείται κατά τον Συντονισμό Επιφανειακών Πλασμονίων [45]. β) Σχηματική απεικόνιση ενός σενσογραφήματος.....	79
<b>Σχήμα 3.12</b> Η βασική αρχή που διέπει την δοκιμή Πόλωσης Φθορισμού. ....	80
<b>Σχήμα 3.13</b> Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). ....	81
<b>Σχήμα 4.1</b> Διάγραμμα της συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει των βημάτων προσομοίωσης κατά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας.....	83
<b>Σχήμα 4.2</b> Διάγραμμα της θερμοκρασίας του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης.....	84
<b>Σχήμα 4.3</b> (α) Διάγραμμα της κινητικής, δυναμικής και συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει του χρόνου προσομοίωσης. (β) Διάγραμμα της συνολικής ενέργειας του συστήματος συναρτήσει του	

χρόνου προσομοίωσης όπου φαίνονται οι διακυμάνσεις της ενέργειας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.....	85
<b>Σχήμα 4.4</b> Διακύμανση των τιμών RMSD συναρτήσει των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης στη διάρκεια της προσομοίωσης (frames).....	86
<b>Σχήμα 4.5</b> Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την δεύτερη διαμόρφωση της 2KLL δομής της IL-33.....	90
<b>Σχήμα 4.6</b> Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την δομή της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2.....	94
<b>Σχήμα 4.7</b> Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την αλυσίδα A της δομής της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RacP.....	97
<b>Σχήμα 4.8</b> Οι κοιλότητες πρόσδεσης που πρόβλεψε το SiteMap για την αλυσίδα A της δομής της IL-33 που προήλθε από το σύμπλοκο με τον υποδοχέα ST2 και τον βοηθητικό υποδοχέα IL-1RacP.....	100
<b>Σχήμα 4.9</b> Οι κοιλότητες πρόσδεσης στην IL-33 που επιλέχθηκαν.....	102
<b>Σχήμα 4.10</b> Σχηματική απεικόνιση του πρώτου και το τελευταίου μορίου που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.....	104
<b>Σχήμα 4.11</b> Σχηματική απεικόνιση μορίων που απορρίφθηκαν λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων.....	105
<b>Σχήμα 4.12</b> Σχηματική απεικόνιση μορίων που απορρίφθηκαν λόγω υψηλού συντελεστή QPlogPo/w για όλες τις κοιλότητες.....	108
<b>Σχήμα 4.13</b> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 2KLL, frame 2.....	113
<b>Σχήμα 4.14</b> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 4KC3, chain A.....	116
<b>Σχήμα 4.15</b> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain A.....	119
<b>Σχήμα 4.16</b> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain D.....	122



## Ευρετήριο πινάκων

<b>Πίνακας 2.1</b> Ιδιότητες/μοριακοί περιγραφητές του QikProp και τα εύρη τιμών τους για το 95% των γνωστών φαρμάκων .....	57
<b>Πίνακας 4.1</b> Αποτελέσματα αξιολόγησης των πέντε κοιλοτήτων της δεύτερης διαμόρφωσης της δομής 2KLL όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap .....	91
<b>Πίνακας 4.2</b> Αποτελέσματα αξιολόγησης των τεσσάρων κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από τη δομή 4KC3 όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap .....	94
<b>Πίνακας 4.3</b> Αποτελέσματα αξιολόγησης των πέντε κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα A της δομής 5VI4, όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap .....	98
<b>Πίνακας 4.4</b> Αποτελέσματα αξιολόγησης των κοιλοτήτων της δομής της IL-33 που απομονώθηκε από την αλυσίδα D της δομής 5VI4, όπως υπολογίστηκαν από το SiteMap .....	100
<b>Πίνακας 4.5</b> Οι κοιλοότητες πρόσδεσης στην IL-33 που επιλέχθηκαν και τα αποτελέσματα των υπολογισμών του SiteMap που τις χαρακτηρίζουν. ....	103
<b>Πίνακας 4.6</b> Το 1 <sup>ο</sup> και το 1000 <sup>ο</sup> μόριο που επιλέχθηκαν για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης και οι βαθμολογίες πρόσδεσής τους (SP docking score).....	103
<b>Πίνακας 4.7</b> Τα μόρια που απορρίφθηκαν λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης. ....	104
<b>Πίνακας 4.8</b> Τα μόρια που απορρίφθηκαν λόγω ύπαρξης τοξικών ικριωμάτων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης. ....	105
<b>Πίνακας 4.9</b> Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν τα απαιτούμενα κριτήρια σχετικά με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης .....	106
<b>Πίνακας 4.10</b> Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν το κριτήριο σχετικά με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης.....	106
<b>Πίνακας 4.11</b> Οι ομάδες και τα μόρια υποδείγματα την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 2KLL, frame 2. ....	108
<b>Πίνακας 4.12</b> Οι ομάδες και τα μόρια υποδείγματα την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 4KC3, chain A. ....	108
<b>Πίνακας 4.13</b> Οι ομάδες και τα μόρια υποδείγματα την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 5VI4, chain A. ....	109
<b>Πίνακας 4.14</b> Οι ομάδες και τα μόρια υποδείγματα την κοιλότητα πρόσδεσης της δομής 5VI4, chain D. ....	109
<b>Πίνακας 4.15</b> Τα μόρια που απορρίφθηκαν διότι δεν πληρούσαν το κριτήριο σχετικά με τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών και των ασύμμετρων κέντρων για κάθε κοιλότητα πρόσδεσης. ....	110
<b>Πίνακας 4.16</b> Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 2KLL, frame 2 και οι ιδιότητές τους. ....	110
<b>Πίνακας 4.17</b> Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 4KC3, chain A και οι ιδιότητές τους. ....	114
<b>Πίνακας 4.18</b> Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain A και οι ιδιότητές τους. ....	117
<b>Πίνακας 4.19</b> Τα μόρια που επιλέχθηκαν για την κοιλότητα της δομής 5VI4, chain D και οι ιδιότητές τους. ....	120

## Βιβλιογραφία

1. Brocker, C., et al., *Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family*. Human genomics, 2010. **5**(1): p. 30.
2. Onda, H., et al., *Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1999. **19**(11): p. 1279-1288.
3. Baekkevold, E.S., et al., *Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules*. The American journal of pathology, 2003. **163**(1): p. 69-79.
4. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-490.
5. Carriere, V., et al., *IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(1): p. 282-287.
6. Cayrol, C. and J.P. Girard, *Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family*. Immunological reviews, 2018. **281**(1): p. 154-168.
7. Moussion, C., N. Ortega, and J.-P. Girard, *The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'?* PloS one, 2008. **3**(10): p. e3331.
8. Pichery, M., et al., *Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33–LacZ gene trap reporter strain*. The Journal of Immunology, 2012. **188**(7): p. 3488-3495.
9. Chen, W.-Y., et al., *Myocardial pressure overload induces systemic inflammation through endothelial cell IL-33*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(23): p. 7249-7254.
10. Haenuki, Y., et al., *A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012. **130**(1): p. 184-194. e11.
11. Byers, D.E., et al., *Long-term IL-33–producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(9): p. 3967-3982.
12. Mohapatra, A., et al., *Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis*. Mucosal immunology, 2016. **9**(1): p. 275.
13. Palmer, G. and C. Gabay, *Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases*. Nature Reviews Rheumatology, 2011. **7**(6): p. 321.
14. Roussel, L., et al., *Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket*. EMBO reports, 2008. **9**(10): p. 1006-1012.
15. Ali, S., et al., *The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-κB to dampen NF-κB–stimulated gene transcription*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(4): p. 1609-1616.
16. Cayrol, C. and J.-P. Girard, *IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy*. Current opinion in immunology, 2014. **31**: p. 31-37.

17. Spill, F., et al., *Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis*. Current opinion in biotechnology, 2016. **40**: p. 41-48.
18. Serrels, B., et al., *IL-33 and ST2 mediate FAK-dependent antitumor immune evasion through transcriptional networks*. Sci. Signal., 2017. **10**(508): p. ean8355.
19. Gilmore, T.D., *The Rel/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway: introduction*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6842.
20. Liew, F.Y., J.-P. Girard, and H.R. Turnquist, *Interleukin-33 in health and disease*. Nature Reviews Immunology, 2016. **16**(11): p. 676.
21. Maywald, R.L., et al., *IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(19): p. E2487-E2496.
22. Fu, A.K., et al., *IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(19): p. E2705-E2713.
23. Lingel, A., et al., *Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors—insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes*. Structure, 2009. **17**(10): p. 1398-1410.
24. Liu, X., et al., *Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(37): p. 14918-14923.
25. Günther, S., et al., *IL-1 family cytokines use distinct molecular mechanisms to signal through their shared co-receptor*. Immunity, 2017. **47**(3): p. 510-523. e4.
26. Miller, A.M., et al., *IL-33 reduces the development of atherosclerosis*. Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(2): p. 339-346.
27. Seki, K., et al., *Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling*. Circulation: Heart Failure, 2009. **2**(6): p. 684-691.
28. Bugg, T., W. Kuhl, and K.v. Pee, *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. 2004: Wiley Online Library.
29. Abdel-Magid, A.F., *Allosteric modulators: an emerging concept in drug discovery*. 2015, ACS Publications.
30. Pleuvry, B.J., *Receptors, agonists and antagonists*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2004. **5**(10): p. 350-352.
31. Nussinov, R. and C.-J. Tsai, *The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs*. Current pharmaceutical design, 2012. **18**(9): p. 1311-1316.
32. Grover, A.K., *Use of allosteric targets in the discovery of safer drugs*. Medical Principles and Practice, 2013. **22**(5): p. 418-426.
33. Iqbal, J., M. Zaidi, and A. Schneider, *Cinacalcet hydrochloride (Amgen)*. IDrugs: the investigational drugs journal, 2003. **6**(6): p. 587-592.
34. Kuritzkes, D., S. Kar, and P. Kirkpatrick, *Maraviroc*. 2008, Nature Publishing Group.
35. Anslyn, E.V. and D.A. Dougherty, *Modern physical organic chemistry*. 2006: University science books.
36. Bledsoe, R.K., et al., *A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(35): p. 31283-31293.
37. Sirimulla, S., et al., *Halogen interactions in protein–ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design*. Journal of chemical information and modeling, 2013. **53**(11): p. 2781-2791.

38. Barratt, E., et al., *Van der Waals interactions dominate ligand– protein association in a protein binding site occluded from solvent water*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(33): p. 11827-11834.
39. Allen, M.P., *Introduction to molecular dynamics simulation*. Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins, 2004. **23**: p. 1-28.
40. Leach, A.R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2001: Harlow.
41. Hinchliffe, A., *Molecular modelling for beginners*. 2005: John Wiley & Sons.
42. Atkins, P. and J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*. 2010: OUP Oxford.
43. Hehre, W.J., *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations*. Vol. 2. 2003: Wavefunction Irvine, CA.
44. Schlick, T., *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide: an interdisciplinary guide*. Vol. 21. 2010: Springer Science & Business Media.
45. ; Available from: <http://glycoforum.gr.jp/science/word/glycotecology/GT-C06E.html>.
46. Young, D.C., *Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists*. 2009: John Wiley & Sons.
47. Generalic, E. *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. 22 Feb. 2015 [cited 2 June 2019; Available from: <https://glossary.periodni.com>.
48. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Βιοχημεία*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2007. **49**.
49. Μαυρομούστακος, Θ. and Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή Μοντελοποίηση–Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*. Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, 2008.
50. Kufareva, I., et al., *Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment*. Structure, 2011. **19**(8): p. 1108-1126.
51. Hansson, T., C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren, *Molecular dynamics simulations*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(2): p. 190-196.
52. Berman, H.M., et al., *The protein data bank*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 235-242.
53. Rapaport, D.C. and D.C.R. Rapaport, *The art of molecular dynamics simulation*. 2004: Cambridge university press.
54. Verlet, L., *Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules*. Physical review, 1967. **159**(1): p. 98.
55. Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, and H.J. Berendsen, *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. Journal of computational physics, 1977. **23**(3): p. 327-341.
56. Tuckerman, M.E. and G.J. Martyna, *Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications*. 2000, ACS Publications.
57. Gibbon, P. and G. Sutmann, *Long-range interactions in many-particle simulation*. Quantum simulations of many-body systems: from theory to algorithm. Eds. J. Grotendorst, D. Marx and A. Muramatsu. NIC-series, 2002. **10**: p. 467-506.
58. Adams, D.J., E.M. Adams, and G.J. Hills, *The computer simulation of polar liquids*. Molecular Physics, 1979. **38**(2): p. 387-400.
59. Mackay, D., A. Cross, and A. Hagler, *The role of energy minimization in simulation strategies of biomolecular systems*, in *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*. 1989, Springer. p. 317-358.

60. Cournia, Z., *Structure and Dynamics of Biomembranes containing Cholesterol and other Biologically-Important Sterols: a computational perspective*. 2006.
61. Lionta, E., et al., *Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances*. Current topics in medicinal chemistry, 2014. **14**(16): p. 1923-1938.
62. Wang, X., et al., *Structure-based drug design strategies and challenges*. Current topics in medicinal chemistry, 2018. **18**(12): p. 998-1006.
63. Anderson, A.C., *The process of structure-based drug design*. Chemistry & biology, 2003. **10**(9): p. 787-797.
64. Friesner, R.A., et al., *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy*. Journal of medicinal chemistry, 2004. **47**(7): p. 1739-1749.
65. Friesner, R.A., et al., *Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes*. Journal of medicinal chemistry, 2006. **49**(21): p. 6177-6196.
66. *SiteMap, version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009*.
67. Halgren, T.A., *Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability*. Journal of chemical information and modeling, 2009. **49**(2): p. 377-389.
68. Sigalas, M., et al., *Εφαρμογές Συμμετρίας και Θεωρίας Ομάδων στην Κβαντική Χημεία και τη Φασματοσκοπία*. 2015.
69. Skjaerven, L., S.M. Hollup, and N. Reuter, *Normal mode analysis for proteins*. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 2009. **898**(1-3): p. 42-48.
70. Cui, Q. and I. Bahar, *Normal mode analysis: theory and applications to biological and chemical systems*. 2005: CRC press.
71. Jorgensen, W.L. and E.M. Duffy, *Prediction of drug solubility from structure*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**(3): p. 355-366.
72. Hodgson, J., *ADMET—turning chemicals into drugs*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(8): p. 722.
73. *Schrödinger Release 2016-2: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016*.
74. Di, L. and E.H. Kerns, *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*. 2015: Academic press.
75. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. Journal of molecular graphics, 1996. **14**(1): p. 33-38.
76. Sastry, G.M., et al., *Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments*. Journal of computer-aided molecular design, 2013. **27**(3): p. 221-234.
77. Greenwood, J.R., et al., *Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution*. Journal of computer-aided molecular design, 2010. **24**(6-7): p. 591-604.
78. Jacobson, M.P., et al., *A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004. **55**(2): p. 351-367.
79. Huang, J. and A.D. MacKerell Jr, *CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data*. Journal of computational chemistry, 2013. **34**(25): p. 2135-2145.
80. Jorgensen, W., et al., *Refined TIP3P model for water*. J. Chem. Phys, 1983. **79**: p. 926-935.
81. Freigang, J., et al., *The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion*. Cell, 2000. **101**(4): p. 425-433.

82. Phillips, J.C., et al., *Scalable molecular dynamics with NAMD*. Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1781-1802.
83. Darden, T., D. York, and L. Pedersen, *Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems*. The Journal of chemical physics, 1993. **98**(12): p. 10089-10092.
84. Hoover, W.G., *Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions*. Physical review A, 1985. **31**(3): p. 1695.
85. Peng, J.-h., et al., *Clustering algorithms to analyze molecular dynamics simulation trajectories for complex chemical and biological systems*. Chinese Journal of Chemical Physics, 2018. **31**(4): p. 404.
86. Roe, D.R. and T.E. Cheatham III, *PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data*. Journal of chemical theory and computation, 2013. **9**(7): p. 3084-3095.
87. Kurkal-Siebert, V. and J.C. Smith, *Low-temperature protein dynamics: a simulation analysis of interprotein vibrations and the boson peak at 150 K*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(7): p. 2356-2364.
88. López-Blanco, J.R., et al., *iMODS: internal coordinates normal mode analysis server*. Nucleic acids research, 2014. **42**(W1): p. W271-W276.
89. Glykos, N.M., *Software news and updates carma: A molecular dynamics analysis program*. Journal of computational chemistry, 2006. **27**(14): p. 1765-1768.
90. *Glide, version 7.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016*.
91. Harder, E., et al., *OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins*. Journal of chemical theory and computation, 2015. **12**(1): p. 281-296.
92. Athanasiadis, E., Z. Cournia, and G. Spyrou, *ChemBioServer: a web-based pipeline for filtering, clustering and visualization of chemical compounds used in drug discovery*. Bioinformatics, 2012. **28**(22): p. 3002-3003.
93. Jorgensen, W.L., D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, *Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(45): p. 11225-11236.
94. Backman, T.W., Y. Cao, and T. Girke, *ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules*. Nucleic acids research, 2011. **39**(suppl\_2): p. W486-W491.
95. Frey, B.J. and D. Dueck, *Clustering by passing messages between data points*. science, 2007. **315**(5814): p. 972-976.
96. Pierce, M.M., C. Raman, and B.T. Nall, *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. Methods, 1999. **19**(2): p. 213-221.
97. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chemical reviews, 2008. **108**(2): p. 462-493.
98. Hall, M.D., et al., *Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review*. Methods and applications in fluorescence, 2016. **4**(2): p. 022001.
99. Ξουρή, Γ., *In vivo χαρακτηρισμός του ανθρώπινου παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 και του αρνητικού ρυθμιστή αυτού, Geminin, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου*. 2005.
100. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Critical reviews in biotechnology, 2017. **37**(2): p. 163-176.