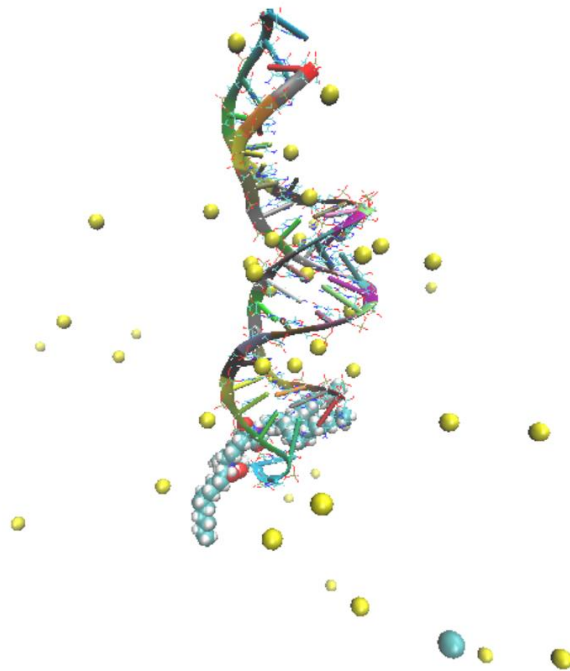




## Διπλωματική Εργασία

---

Υπολογιστική μελέτη της πρόσδεσης του λιποπεπτιδίου  
cKK-E12 στο siRNA με σκοπό το σχεδιασμό προηγμένων  
νανομεταφορέων για γονιδιακές θεραπείες



Κλειώ – Ήλια Τσανσίζη

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της ερευνητικής ομάδας ENGIMATER του Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος όσο και για την επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ευαγγελία Παντατοσάκη για την πολύτιμη καθοδήγησή της, καθώς και για τη συνεχή υποστήριξή της, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Κλειώ - Ήλια Τσανσίζη

Ιούλιος 2021

## Περίληψη

Το λιποπεπτίδιο cKK-E12 αποτελεί μόριο-κλειδί στη δομή των λιποπεπτιδικών νανοσωματιδίων (LPN), τα οποία έχουν επιδείξει εξαιρετικά αποτελέσματα ως νανομεταφορείς μικρών παρεμβατικών μορίων RNA (short interfering RNA - siRNA) στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου μπορούν να προκαλέσουν γονιδιακή σίγαση. Παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά των LPN, ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την εξαιρετική απόδοσή τους παραμένει ανεξερεύνητος. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση: 1) του μηχανισμού της πρόσδεσης του λιποπεπτιδίου cKK-E12 στο ολιγονουκλεοτίδιο siRNA, και 2) της επίδρασης της στερεοϊσομέρειας στο μηχανισμό δέσμευσης του siRNA. Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής βασισμένες στη στατιστική μηχανική και θερμοδυναμική για τα συστήματα siRNA – LP\_A και siRNA – LP\_B, σε υδατικό διάλυμα παρουσία ιόντων. Η επεξεργασία των παραγόμενων τροχιών για τα δύο συστήματα έδειξε ότι τα στερεοϊσομερή προσδέονται στο ολιγονουκλεοτίδιο μέσω της αποβολής μορίων νερού από το κέλυφος ενυδάτωσής του και η σύνδεση των βιομορίων διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της τροχιάς. Αναγνωρίστηκαν διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης για τα δύο στερεοϊσομερή κατά μήκος του επιμήκους άξονα της διπλής έλικας του siRNA, με το LP\_A να εμφανίζει πιο εκτεταμένη διαμόρφωση από το LP\_B, ενώ η διαμόρφωση του siRNA παραμένει ανεπηρέαστη και στα δύο συστήματα. Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων έδειξαν ότι οι δομικές χημικές ομάδες των λιποπεπτιδίων που παίζουν καταλυτικό ρόλο στην πρόσδεση είναι η πρωτονιωμένη αμίνη και οι ομάδες υδροξυλίου που ανήκουν στην ίδια υδρογονανθρακική αλυσίδα με την πρωτονιωμένη αμίνη. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα λιποπεπτίδια συμμετέχουν σε μία «διελκυστίδα» δημιουργίας δεσμών υδρογόνου τόσο με τα μόρια του νερού όσο και με το siRNA. Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων υποδεικνύουν ότι η χημική τροποποίηση των cKK-E12 λιποπεπτιδίων μέσω της εισαγωγής πολικών ομάδων στη δομή τους μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο και την ένταση της πρόσδεσής τους στο siRNA και επιπροσθέτως. Ακόμα τα αποτελέσματα αναγνωρίζουν τη στερεοϊσομέρεια ως μια σημαντική παράμετρο που επηρεάζει το μηχανισμό πρόσδεσης των βιομορίων, και υποστηρίζουν την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασής της στην αποτελεσματικότητα προηγμένων γονιδιακών νανομεταφορέων νέας γενιάς.

## Abstract

The lipopeptide cKK-E12 has been identified as a lead material in the design of a novel class of lipopeptide nanoparticles (LPN), which constitute effective siRNA nanocarriers intended for gene silencing. Despite the fact that the structural characteristics of LPN have been specified, the molecular mechanism that underlies their performance remains unexplored. The objective of this thesis is 1) the study of the mechanism of binding of the lipopeptide to the siRNA oligonucleotide, and 2) the study of the effect stereoisomerism upon binding. We conducted molecular dynamics (MD) simulations in atomistic detail of two stereoisomers of cKK-E12 (namely, LP\_A and LP\_B) upon their binding to siRNA within an ionic, aqueous environment. The MD trajectory post-processing demonstrates that the two stereoisomers bind directly to the siRNA molecule. The binding occurs after a short time period, whereas the complex remains intact throughout the whole examined trajectory. Furthermore, upon binding, water molecules are discarded from the hydration shell of the siRNA. For the two stereoisomers two different binding sites were identified. Additionally, the lipopeptides obtain different conformations upon binding to the siRNA. More precisely, LP\_A adopts an extended conformation while the LP\_B appears more compact. Contrarily, the siRNA conformation remains intact. Furthermore, the results demonstrate that the functional groups of cKK-E12 that play crucial role to its binding to the oligonucleotide are the protonated tertiary amine and the hydroxyl groups belonging to the hydrocarbon chain attached to the protonated amine. Moreover, due to their polar groups, the lipopeptides were found to form hydrogen bonds with both the siRNA and the water molecules. The simulation results reveal the structural characteristics of the promising cKK-E12 lipopeptide, and support further investigation of the effect of stereoisomerism, as it can serve as an important design parameter for the optimum efficiency of advanced nanocarriers.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
I. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	8
1. Το σύγχρονο Δόγμα της Βιολογίας.....	8
2. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.....	9
3. Γονιδιακή Σίγαση (Gene silencing) .....	9
3.1 Παρεμβολή του RNA.....	10
3.2 Θεραπευτικές δυνατότητες των siRNA .....	11
3.3 Εμπόδια κατά τη συστημική χορήγηση των siRNA.....	12
4. Συστήματα μεταφοράς γονιδιακού υλικού .....	12
4.1 Ιικοί νανομεταφορείς.....	13
4.2 Μη-ικοί νανομεταφορείς.....	14
4.3 Εγκεκριμένες φαρμακοδομές τεχνολογίας τύπου RNAi.....	15
4.4 Λιποπεπτιδικά Νανοσωματίδια (LPN) .....	17
II. ΘΕΩΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ.....	20
1. Περιγραφή μοριακών συστημάτων και δυναμικά αλληλεπίδρασης.....	20
1.1 Περιοδικές Οριακές Συνθήκες.....	21
1.2 Υπολογισμός αλληλεπιδράσεων μικρής εμβέλειας .....	22
1.3 Υπολογισμός Αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας.....	23
2. Στοιχεία κλασικής στατιστικής μηχανικής .....	23
2.1 Συνήθη Στατιστικά Σύνολα.....	24
3. Μοριακή Δυναμική.....	25
3.1 Εξισώσεις κίνησης για ατομικά συστήματα.....	25
3.2 Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής .....	25
3.2.1 Μέθοδος Πεπερασμένων Διαφορών.....	25
3.2.2 Αλγόριθμος Verlet.....	26
3.2.3 Αλγόριθμος Leap-Frog.....	27
3.2.4 Θερμοστάτηση συστήματος.....	28
3.2.5 Βαροστάτηση συστήματος.....	29
III. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	30
1. Δημιουργία Συστημάτων Μοριακής Προσομοίωσης.....	30
1.1 Μοριακή Μοντελοποίηση μορίων .....	30

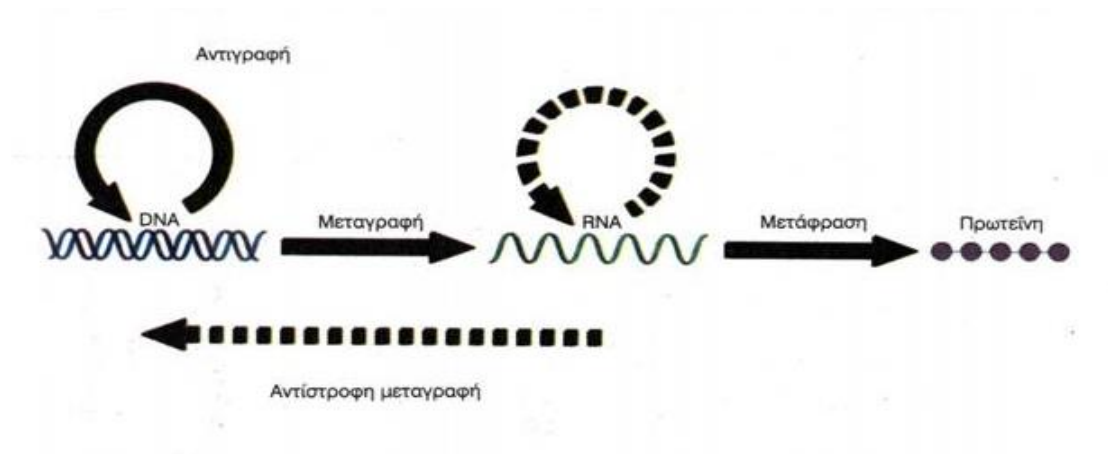
1.2	Συστήματα προσομοίωσης .....	35
1.2.1	Πεδίο δυνάμεων και παράμετροι μοριακής δυναμικής.....	35
1.2.2	Προσομοιούμενο χωρίο και Περιοδικές οριακές συνθήκες .....	36
1.3	Υπολογιστική Επίδοση Μοριακών Προσομοιώσεων (Performance) .....	39
2.	Αποτελέσματα Εξισορρόπησης Συστημάτων Προσομοίωσης.....	40
2.1	Ενεργειακή Ελαχιστοποίηση Συστημάτων .....	40
2.2	Εξισορρόπηση Συστημάτων στο NVT σύνολο .....	42
2.3	Εξισορρόπηση Συστημάτων στο NPT σύνολο .....	44
3.	Αποτελέσματα Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής .....	47
3.1	Απόσταση siRNA-LP .....	47
3.2	Γυροσκοπική ακτίνα.....	49
3.3	Κέλυφος Ενυδάτωσης Βιομορίων.....	56
3.4	Αριθμός Εγγυτέρων Επαφών Λιποπεπτιδίου-siRNA.....	59
3.5	Ελάχιστες Αποστάσεις Χαρακτηριστικών Χημικών Ομάδων .....	61
3.6	Δεσμοί υδρογόνου.....	71
IV.	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	76
	Βιβλιογραφία.....	81

# I. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Το σύγχρονο Δόγμα της Βιολογίας

Κάθε κύτταρο, και κατ' επέκταση κάθε οργανισμός, κατασκευάζει τις δομές του και πραγματοποιεί τις λειτουργίες του σύμφωνα με μια σειρά πληροφοριών τις οποίες έχει κληρονομήσει από τους προγόνους του. Οι πληροφορίες αυτές είναι καταγεγραμμένες στην αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων του DNA, του μορίου που αποτελεί το γενετικό υλικό των κυττάρων.

Οι Watson και Crick συνέστησαν το 1957 το “Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας”<sup>1</sup>, κατά το οποίο περιγράφεται η ροή της γενετικής πληροφορίας, που είναι καταγεγραμμένη στο μόριο του DNA, προς τις πρωτεΐνες. Η γενετική πληροφορία είναι η καθορισμένη σειρά των βάσεων με συγκεκριμένη ακολουθία που υπάρχει σε τμήματα του DNA, τα **γονίδια**. Αυτά, διά μέσου των διεργασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης, καθορίζουν τη σειρά των αμινοξέων στις συντιθέμενες πρωτεΐνες. Οι διεργασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης των γονιδίων αποτελούν τη **γονιδιακή έκφραση**. Το πρώτο στάδιο είναι η μεταγραφή ενός γονιδίου από το DNA σε ένα μόριο RNA, που σε αυτήν την περίπτωση λέγεται **αγγελιαφόρο RNA** ή **mRNA**. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου, της μετάφρασης, ο κυτταρικός μηχανισμός δημιουργεί μια πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας ως «συνταγή» το μόριο αυτό του mRNA. Αυτά τα στάδια αποτελούν το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας, το οποίο απεικονίζεται στο Σχήμα 1.1. Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν και άλλοι τρόποι ροής της γενετικής πληροφορίας, διότι μερικοί ιοί χρησιμοποιούν ως καλούπι το RNA για να συνθέσουν DNA ενώ σε άλλους το RNA έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται.<sup>2</sup>



Σχήμα 1.1 Σχηματική απεικόνιση του σύγχρονου Δόγματος της Βιολογίας.



## 2. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Η έκφραση των γονιδίων μπορεί να ρυθμιστεί σε πολλά επίπεδα κατά μήκος της οδού από το DNA διαμέσου του RNA προς τις πρωτεΐνες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα επίπεδα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης εντοπίζονται σε διαφορετικά στάδια<sup>3</sup>:

**1. Μεταγραφικός έλεγχος.** Καθορίζει την ποσότητα και το ρυθμό της μεταγραφής κάθε γονιδίου. Είναι το στάδιο κατά το οποίο γίνεται η σύνθεση και η ερμηνεία όλων των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων που θα καθορίσουν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης. Καθώς δρα στο πρώτο στάδιο έκφρασης της γενετικής πληροφορίας, ο μεταγραφικός έλεγχος αποτελεί το συνηθέστερο και πιο ποικιλόμορφο τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

**2. Μετά-μεταγραφικός έλεγχος.** Οι μετα-μεταγραφικοί έλεγχοι λειτουργούν αφ' ότου η RNA πολυμεράση έχει προσδεθεί στον υποκινητή ενός γονιδίου και έχει ξεκινήσει η σύνθεση του RNA. Ελέγχεται αρχικά ο τρόπος και ο ρυθμός επεξεργασίας των συντιθέμενων mRNA. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια περιέχουν εξόνια (τμήματα αλληλουχιών που μεταγράφονται σε RNA και κωδικοποιούν μία πρωτεϊνική αλληλουχία) τα οποία διακόπτονται από ιντρόνια (περιοχές που δεν κωδικοποιούν μία πρωτεϊνική αλληλουχία). Τα εξόνια και τα ιντρόνια μεταγράφονται σε ένα πρόδρομο αρχικό μετάγραφο RNA. Στη συνέχεια, τα ιντρόνια εκτέμνονται από τα μόρια του RNA με τον μηχανισμό της συρραφής του RNA (RNA splicing) ώστε να σχηματιστεί το ώριμο mRNA. Κατόπιν, το ώριμο mRNA ελέγχεται από ειδικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που επιτρέπουν -ή όχι- την έξοδό του από τον πυρήνα και το κατευθύνουν στον τόπο μετάφρασής του, σε συγκεκριμένο διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος.

**3. Μεταφραστικός έλεγχος.** Επιλέγει ποιο mRNA θα μεταφραστεί, από πόσα ριβοσώματα, και πόσες φορές. Ουσιαστικά, στο επίπεδο αυτό ελέγχεται ο χρόνος ζωής του κάθε mRNA και επομένως η διάρκεια κατά την οποία είναι διαθέσιμο για μετάφραση, καθώς και ο ρυθμός επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης.

**4. Μετά-μεταφραστικός έλεγχος.** Πολλές πρωτεΐνες χρειάζονται επιπρόσθετη επεξεργασία αφού ολοκληρωθεί η σύνθεσή τους προκειμένου να είναι λειτουργικές. Για παράδειγμα, για να ενεργοποιηθεί μία πρωτεΐνη που έχει μόλις συντεθεί συχνά απαιτούνται ομοιοπολικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση ή γλυκοζυλίωση, πρόσδεση μικρομοριακών συμπαραγόντων ή σύνδεση με άλλες πρωτεϊνικές υπομονάδες. Όλες αυτές οι τροποποιήσεις, στο στάδιο του μετα-μεταφραστικού ελέγχου, θα οδηγήσουν στην ωρίμανση και τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο.

## 3. Γονιδιακή Σίγαση (Gene silencing)

Γονιδιακή σίγαση ή αποσιώπηση είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει επιγενετικές διαδικασίες της γονιδιακής ρύθμισης και χρησιμοποιείται για να περιγράψει το «σβήσιμο» ενός γονιδίου, δηλαδή τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς οι οποίοι οδηγούν στην απενεργοποίηση ενός γονιδίου, το οποίο υπό κανονικές συνθήκες θα εκφραζόταν. Η γονιδιακή σίγαση συμβαίνει τόσο σε μεταγραφικό όσο και μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Σε μεταγραφικό επίπεδο, η καταστολή των γονιδίων μπορεί να προκληθεί από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αλλαγές στα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA και ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η χρωματίνη (σύμπλοκο DNA, ιστονών και άλλων πρωτεϊνών, το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου) να συρρικνώνεται και τα γονίδια να παύουν να έχουν πρόσβαση στο μηχανισμό της μεταγραφής. Η γονιδιακή σίγαση μπορεί να συμβεί και σε μετα-μεταγραφικό στάδιο και πριν το στάδιο της μετάφρασης εξαιτίας της αποδόμησης του mRNA ή/και της καταστολής της μετάφρασής του από μικρά μόρια RNA.<sup>4</sup>

### 3.1 Παρεμβολή του RNA

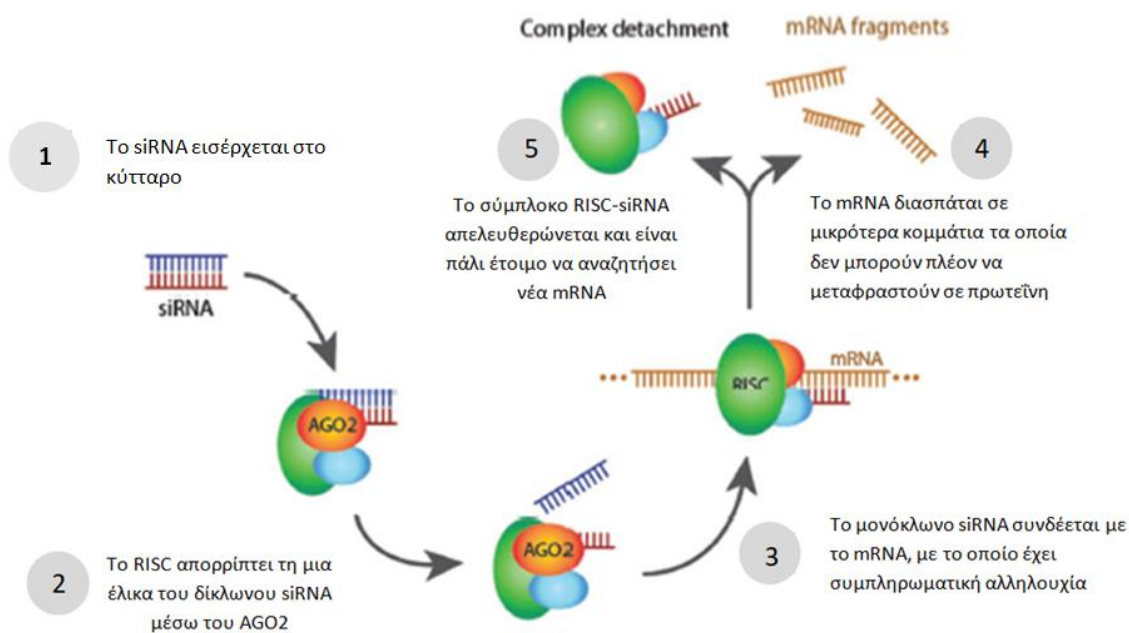
Ένας τρόπος να επιτευχθεί η γονιδιακή σίγαση σε μετα-μεταγραφικό στάδιο είναι μέσω μιας ενδογενούς κυτταρικής διεργασίας που ονομάζεται **παρεμβολή του RNA** (RNA interference, RNAi). Ο μηχανισμός RNAi πυροδοτείται από την παρουσία μικρών δίκλωνων μορίων RNA στο κύτταρο (μήκους περίπου 21-25 νουκλεοτιδικών ζευγών), τα οποία καλούνται **μικρά παρεμβατικά RNA** (small interfering RNA, siRNA). Τα siRNA μετά την εισαγωγή τους στο κύτταρο προσδένονται σε ένα εξειδικευμένο σύμπλοκο πρωτεϊνών που ονομάζεται RISC (RNA-induced silencing complex). Το RISC απορρίπτει τη μια έλικα του δίκλωνου siRNA χάρη στη μεσολάβηση ενός συστατικού του, του Argonaut 2 (AGO2), και στη συνέχεια περιπολεί στο κυτταρόπλασμα αναζητώντας μόρια mRNA τα οποία έχουν συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων με το siRNA που μεταφέρει. Όταν βρεθεί το συμπληρωματικό μόριο mRNA προσδένεται στο RISC και καταστρέφεται, καθώς διασπάται σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν σε λειτουργικό πολυπεπίδιο (πρωτεΐνη). Έπειτα, το RISC καθίσταται ξανά διαθέσιμο να επαναλάβει τη διαδικασία. Ένα μόνο μόριο siRNA, ως τμήμα του RISC, μπορεί να καταστρέφει το ένα μόριο mRNA μετά το άλλο, εμποδίζοντας έτσι αποτελεσματικά την παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης.<sup>5</sup>

Η παρεμβολή του RNA χρησιμοποιείται από μεγάλη ποικιλία οργανισμών και αποτελεί έναν φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε αρχικά τη δεκαετία του '90 στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* και το 1998 το πρώτο άρθρο που αφορούσε αυτό το φαινόμενο, δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό Nature με τίτλο "Potent and Specific genetic interference by double - stranded RNA in *C.elegans*". Το 2006 οι επιστήμονες Andrew Z. Fire και Craig C. Mello που ανακάλυψαν το φαινόμενο βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel.

Η ανακάλυψη αυτής της ενδογενούς διεργασίας έδωσε μετέπειτα σε ερευνητές τη δυνατότητα να εκμεταλλευτούν το φυσικό μηχανισμό RNAi προκειμένου να αδρανοποιήσουν την έκφραση ενός γονιδίου, χρησιμοποιώντας συνθετικά siRNA με αλληλουχία συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία ενός mRNA-στόχου. Στη συνέχεια το mRNA-στόχος κατακερματίζεται και αποτρέπεται αποτελεσματικά η μετάφρασή του σε λειτουργική πρωτεΐνη.

Αυτή η μέθοδος προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους γονιδιακής θεραπείας. Ένα από αυτά είναι πως τα siRNA δεν αλληλεπιδρούν με το

χρωμοσωμικό DNA -καθώς η παρεμβολή του RNA γίνεται σε μετα-μεταγραφικό στάδιο εκτός του κυτταρικού πυρήνα- γεγονός που μειώνει σημαντικά ανησυχίες σχετικά με πιθανές αλλοιώσεις του γονιδιώματος. Ακόμα, εάν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα σχεδιασμένα siRNA, θεωρητικά μπορεί ο μηχανισμός RNAi να αξιοποιηθεί για τη σίγαση σχεδόν οποιουδήποτε γονιδίου, προσφέροντας έτσι ένα πολύ ευρύ φάσμα θεραπευτικών δυνατοτήτων σε σχέση με τα κλασικά φάρμακα.<sup>6</sup>



**Σχήμα 3.1** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA.

### 3.2 Θεραπευτικές δυνατότητες των siRNA

Οι μελέτες γύρω από το μηχανισμό RNAi, έχουν δημιουργήσει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα ως προς τη χρήση συνθετικού siRNA σαν βασικού στρατηγικού μορίου στη βιοϊατρική έρευνα και στην ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων. Πράγματι, τα συνθετικά siRNA έχει βρεθεί πως προκαλούν τη σίγαση ενδογενών και ετερόλογων γονιδίων σε διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών<sup>7</sup>, τη μακροχρόνια σίγαση του γονιδίου-στόχου χωρίς να διαταράζουν άλλες ενδογενείς οδούς όπως αυτή του miRNA<sup>8</sup> και έχουν εξεταστεί εκτενώς για τη λειτουργική ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων. Ως αποτέλεσμα πολλές θεραπείες με βάση το siRNA έχουν φτάσει τα τελευταία χρόνια μέχρι το στάδιο των κλινικών δοκιμών με στόχο να θεραπεύσουν ασθένειες όπως η καθυστερημένη λειτουργία μοσχεύματος (delayed graft function, DGF)<sup>9</sup>, η πρόσθια ισχαιμική οπτική νευροπάθεια<sup>10</sup>, το διαβητικό οίδημα της ωχράς κηλίδας<sup>11</sup>, η υπερχοληστερολαιμία<sup>12</sup> και ο καρκίνος<sup>13</sup>.

### 3.3 Εμπόδια κατά τη συστημακή χορήγηση των siRNA

Παρόλο που το siRNA είναι ένα πολλά υποσχόμενο βιομόριο στη φαρμακευτική βιομηχανία, υπάρχουν αρκετά εμπόδια κατά την εισαγωγή του στον ανθρώπινο οργανισμό (συστημική χορήγηση, systemic administration) τα οποία πρέπει να ξεπεραστούν, προκειμένου η γονιδιακή θεραπεία να είναι επιτυχής. Προκειμένου ο μηχανισμός του RNAi να μπορεί να εφαρμοστεί κλινικά, πρέπει να είναι διασφαλισμένη η αποτελεσματική και ελεγχόμενη συστημακή παράδοση των siRNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και σε επαρκείς ποσότητες ώστε να επιτρέψουν την παρατεταμένη αναστολή του επιθυμητού στόχου.<sup>14</sup> Κάτι τέτοιο φέρει αρκετές προκλήσεις, καθώς τα siRNA καλούνται να αντιμετωπίσουν ορισμένα βιολογικά «φράγματα», δηλαδή εμπόδια, εάν χορηγηθούν συστηματικά στο σώμα.<sup>15</sup>

Τα siRNA χωρίς κάποια άλλη χημική τροποποίηση, δηλαδή «γυμνά», είναι πολύ ασταθή ενδοαγγειακά, με μικρό χρόνο ημιζωής λόγω της ευαισθησίας τους στην ταχεία νεφρική κάθαρση, την πιθανή αποικοδόμησή τους από νουκλεάσες ορού και φαγοκύτταρα -τόσο στην κυκλοφορία του αίματος όσο και στην εξωκυττάρια μήτρα. Επίσης, ένα ακόμη πρόβλημα που μπορεί να προκαλέσουν τα μη-τροποποιημένα siRNA είναι να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα και να προκαλέσουν πιθανή τοξικότητα. Ακόμη, το μέγεθός τους (συνήθως περίπου 8 nm σε μήκος) δυσχεραίνει την κινητική τους, καθώς μόρια διαμέτρου άνω των 5 nm δεν περνούν εύκολα το τριχοειδές ενδοθήλιο και συνεπώς παραμένουν στο σώμα εάν δεν εκκαθαριστούν. Ωστόσο, μεγαλύτερα μόρια έως 200 nm σε διάμετρο μπορούν να εισέλθουν σε ορισμένους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του σπλήνα, του συκωτιού και διάφορων τύπων όγκου, λόγω των διαφορετικών αγγείων τους. Τέλος, το μεγάλο μοριακό τους βάρος (περίπου 13 kDa) και το γεγονός ότι είναι αρνητικά φορτισμένα δυσχεραίνει τη διέλευσή τους από τις κυτταρικές μεμβράνες στο εσωτερικό του κυττάρου.<sup>16</sup>

Είναι λοιπόν προφανές ότι αυτά τα μόρια χωρίς κάποια άλλη τροποποίηση, δηλαδή «γυμνά», εμφανίζουν αρκετά προβλήματα που μειώνουν την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα.

## 4. Συστήματα μεταφοράς γονιδιακού υλικού

Για να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα εμπόδια που προκύπτουν *in vivo* κατά τη συστημακή χορήγηση του siRNA και να επιτευχθεί η ασφαλής και ελεγχόμενη μεταφορά του στο εσωτερικό των κυττάρων-στόχων διερευνώνται διάφορες τεχνικές, από τη χημική τροποποίηση των siRNA ως τη χρήση «οχημάτων» μεταφοράς (ή αλλιώς επονομαζόμενα πλατφόρμες ή συστήματα μεταφοράς), ή συνδυασμός και των δύο τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται εν γένει στην *in vivo* μεταφορά γονιδιακού υλικού, και αποτελούν αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας αιχμής για τη χρήση τους τόσο σε γονιδιακές θεραπείες όσο και σε γονιδιακά εμβόλια, όπως για παράδειγμα στα πρόσφατα εγκεκριμένα γονιδιακά εμβόλια για την ασθένεια COVID-19 που προκαλεί ο ιός SARS-CoV-2.

Αναλυτικότερα οι τεχνικές αυτές είναι:

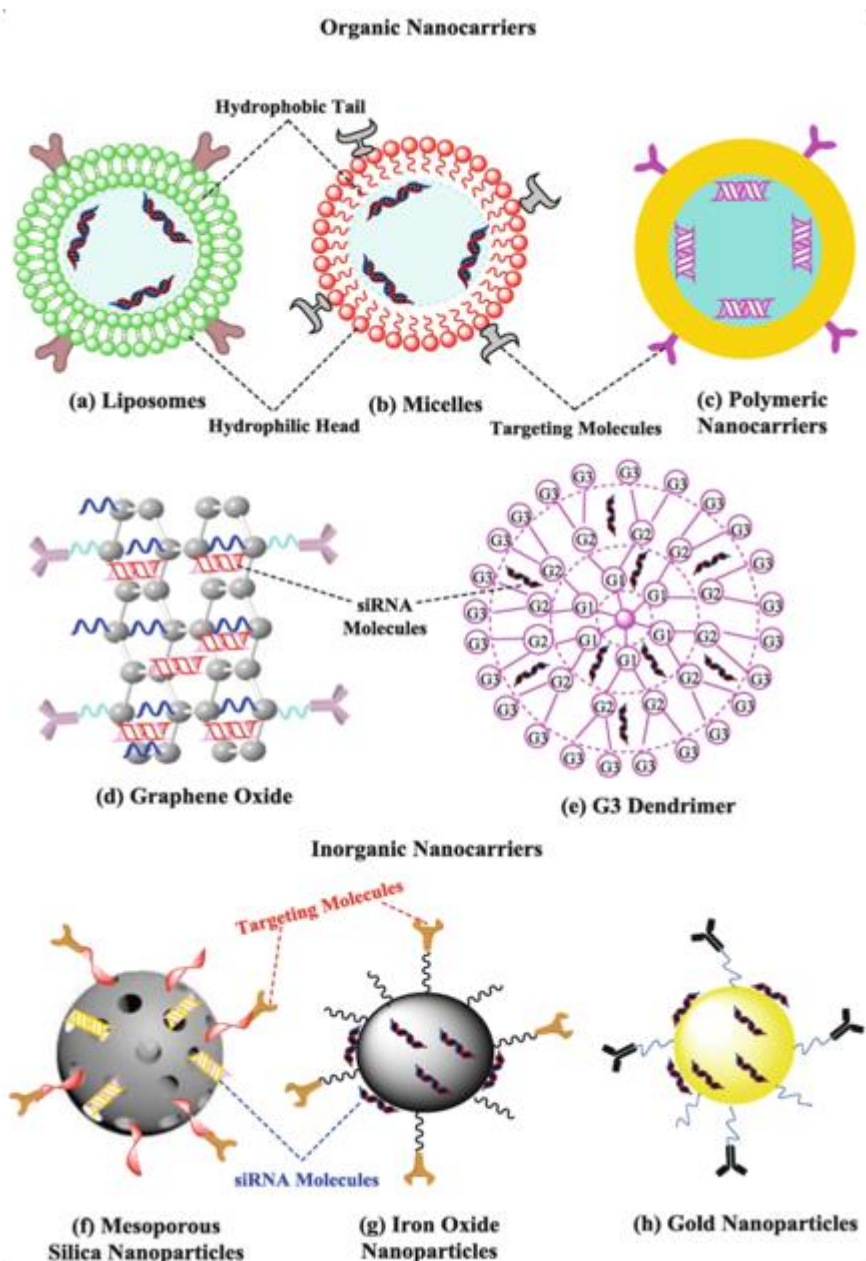
- i. Ο σχεδιασμός τεχνητών, χημικώς τροποποιημένων μορίων siRNA που συντίθενται με αντικατάσταση διάφορων χημικών ομάδων ή ατόμων σε διαφορετικές θέσεις (για παράδειγμα ο φωσφοδιεστέρας (PO4) μπορεί να αντικατασταθεί με φωσφοροθειοϊκό (PS) στο άκρο 3') ή με προσθήκη νέων χημικών ομάδων που αντιστέκονται στην ενζυματική αποδόμηση (όπως για παράδειγμα η προσθήκη ομάδων Ο-μεθυλ (2'-O-Me), φθορο (2'-F) ή μεθοξυαιθυλ (2'-O-MOE) ). Αυτές και περισσότερες χημικές τροποποιήσεις έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν τη μεταβολική σταθερότητα *in vivo* σε μόρια siRNA, και έχουν μελετηθεί εκτενώς.<sup>17</sup>
- ii. Ο σχεδιασμός ενός κατάλληλου **συστήματος μεταφοράς** (delivery system) το οποίο θα χρησιμοποιείται ως όχημα μεταφοράς του siRNA. Τα συστήματα μεταφοράς που θα επιλεγούν για την *in vivo* μεταφορά του siRNA στα κύτταρα-στόχους πρέπει να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια:
  - (α) να είναι βιοσυμβατά, βιοαποικοδομήσιμα και μη ανοσογόνα,
  - (β) πρέπει να μπορούν να δεσμεύουν επαρκώς το siRNA,
  - (γ) να το προστατεύουν από τις νουκλεάσες ορού και το ανοσοποιητικό σύστημα και να αποφεύγουν την ταχεία ηπατική ή νεφρική κάθαρση,
  - (δ) να επιτυγχάνουν εκλεκτική μεταφορά του siRNA στα κύτταρα-στόχους,
  - (ε) να μπορούν να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και
  - (στ) μετά την ενδοκυττάρωση τα συστήματα θα πρέπει να απελευθερώνουν το siRNA στο κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση του siRNA με το ενδογενές σύμπλεγμα RISC.<sup>18</sup>Επί του παρόντος, ως συστήματα μεταφοράς έχουν μελετηθεί δύο τύποι οχημάτων, οι **ικκοί νανομεταφορείς** (viral vectors) και οι **μη-ικκοί νανομεταφορείς** (non viral vectors).<sup>19</sup>

#### 4.1 Ικκοί νανομεταφορείς

Οι ικκοί μεταφορείς αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα μεταφοράς για γονιδιακή θεραπεία. Αδενοϊοί<sup>20</sup>, ρετροϊοί<sup>21</sup> και βραδυ-ιοί<sup>22</sup> έχουν μελετηθεί ευρέως ως πιθανά οχήματα μεταφοράς, αφού πρώτα διαγραφούν ορισμένες περιοχές των γονιδιωμάτων τους ώστε να μην μπορούν να αντιγραφούν μέσα στο κύτταρο και έτσι να είναι πιο ασφαλείς. Τα ικκά αυτά συστήματα παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα, τη μόνιμη ενσωμάτωση τους στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου, προκαλώντας έτσι συνεχόμενη γονιδιακή έκφραση. Ακόμα μπορούν να μεταφέρουν μεγάλη ποσότητα εξωγενούς DNA και σε διάφορους τύπους κυττάρων. Παρά την υψηλή αποτελεσματικότητά τους, οι ικκοί νανομεταφορείς παρουσιάζουν ορισμένα σοβαρά προβλήματα, όπως υψηλή ανοσογονικότητα, παραγωγή τοξινών και πιθανότητα μεταλλαξογένεσης, τα οποία πρέπει να αντιμετωπιστούν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια<sup>23</sup>. Αξίζει να σημειωθεί πως τέτοιου τύπου ικκοί νανομεταφορείς χρησιμοποιούνται και στα γονιδιακά εμβόλια AstraZeneca και Johnson & Johnson ενάντια του ιού SARS-CoV-2 για τη μεταφορά του γενετικού υλικού, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην Παράγραφο 4.3.

## 4.2 Μη-ικκοί νανομεταφορείς

Λόγω των ανησυχιών σχετικά με την ασφάλεια των ικκών συστημάτων, έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα και μη-ικκοί νανομεταφορείς, οι οποίοι σε σύγκριση με τους ικκούς είναι ευκολότερο να παραχθούν αλλά και ασφαλέστεροι για χορήγηση στο ανθρώπινο σώμα. Οι μη-ικκοί νανομεταφορείς είναι διαφορετικού τύπου μόρια ή νανοσωματίδια (nanoparticles-NP) που είναι σχεδιασμένα κατάλληλα ώστε να συνδέονται με τα siRNA ή να τα εγκλείουν στο εσωτερικό τους και να τα παραδίδουν με επιτυχία στο κύτταρο-στόχο.<sup>19</sup> Υπάρχουν πολλά είδη μη-ικκών νανομεταφορέων, τα οποία κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους **ανόργανους** και τους **οργανικούς** νανομεταφορείς.



Σχήμα 4.1 Σχηματική απεικόνιση ορισμένων ανόργανων και οργανικών νανομεταφορέων <sup>24</sup>

#### 4.2.1 Ανόργανοι Νανομεταφορείς

Τα ανόργανα νανοσωματίδια έχουν προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών τα τελευταία χρόνια λόγω των φυσικών ιδιοτήτων τους (π.χ. οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες) αλλά και των χημικών ιδιοτήτων τους (π.χ. χημική αδράνεια), οι οποίες εξαρτώνται από το υλικό του νανοσωματιδίου και το μέγεθός του. Οι ανόργανοι νανομεταφορείς που έχουν ερευνηθεί περισσότερο είναι τα μεσοπορώδη νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (MSN)<sup>25</sup>, τα nanoporous μαύρου φωσφόρου (BP)<sup>26</sup> και τα νανοσωματίδια χρυσού (GNP)<sup>27</sup>. Παρά τα πλεονεκτήματά τους, πολύ λίγα ανόργανα νανοσωματίδια έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζουν τοξικότητα, η οποία συνδέεται συνήθως με τη χαμηλή τους βιοσυμβατότητα<sup>28</sup>.

#### 4.2.2 Οργανικοί Νανομεταφορείς

Την τελευταία δεκαετία, αρκετοί επιστήμονες και ερευνητές έχουν ερευνήσει πλήθος οργανικών νανομεταφορέων ως προς τη δέσμευση και μεταφορά φαρμάκων και νουκλεϊκών οξέων. Οι οργανικοί νανομεταφορείς παρασκευάζονται από φυσικά ή συνθετικά οργανικά μόρια ή μείγμα και των δύο. Είναι συνήθως βιοσυμβατοί, βιοαποικοδομήσιμοι, λιγότερο τοξικοί από τους ανόργανους, μη ανοσογόνοι και χημικά σταθεροί. Ως οργανικοί νανομεταφορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα λιπιδικά νανοσωματίδια, τα πολυμερικά νανοσωματίδια<sup>29</sup>, τα νανομικύλλια<sup>30</sup>, τα δενδριμερή<sup>31</sup> και το οξειδίο του γραφενίου (graphene oxide-GO)<sup>32</sup>. Μη-υικοί νανομεταφορείς και συγκεκριμένα λιπιδικοί νανομεταφορείς χρησιμοποιούνται και στα νέα εμβόλια των Pfizer – BioNTech και Moderna κατά του ιού SARS-CoV-2 ως πλατφόρμες μεταφοράς του mRNA, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην Παράγραφο 4.3 που ακολουθεί.

### 4.3 Εγκεκριμένες φαρμακοδομές τεχνολογίας τύπου RNAi

Στο τρέχον κλινικό τοπίο, πολλοί από τους νανομεταφορείς που αναφέρθηκαν έχουν φτάσει σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών κατά τα οποία διερευνάται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους για μεγάλο εύρος θεραπευτικών και διαγνωστικών εφαρμογών.<sup>33</sup> Παρακάτω αναφέρονται δύο πολύ πρόσφατες επιτυχημένες εφαρμογές ιικών και μη-ιικών νανομεταφορέων σε φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση τόσο από τον FDA (U.S. Food and Drug Administration) στις Ηνωμένες Πολιτείες όσο και από τον EMA (European Medicines Agency) στην Ευρώπη.

#### **Patisiran**

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το φάρμακο Patisiran για τη θεραπεία της αμυλοείδωσης από τρανσθυρετίνη (hATTR), το οποίο αποτελεί το πρώτο εγκεκριμένο γονιδιακό φάρμακο βασισμένο στο μηχανισμό της παρεμβολής του RNA<sup>34</sup>. Επηρεάζοντας περίπου 50,000 ανθρώπους παγκοσμίως, η hATTR είναι μια κληρονομική, εξελικτική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο TTR. Η έκφραση του μεταλλαγμένου

γονιδίου οδηγεί στην παραγωγή και συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται αμυλοειδή και παρεμβαίνουν στην φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα το νευροεκφυλισμό. Προκειμένου να αποτραπεί η παραγωγή των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και να αντιστραφεί η εξέλιξη της νόσου, στόχος είναι η σίγαση του γονιδίου TTR. Το φάρμακο Patisiran εκμεταλλεύεται το μηχανισμό RNAi προκειμένου να «σβήσει» το συγκεκριμένου γονίδιο. Στη συγκεκριμένη φαρμακοδομή το siRNA είναι ενθυλακωμένο σε λιπιδικό νανομεταφορέα για την προστασία του από την αποικοδόμηση από ενδογενείς νουκλεάσες και για τη στοχευμένη απελευθέρωσή του σε ηπατοκύτταρα.<sup>34</sup>

### Γονιδιακά Εμβόλια κατά του SARS-CoV-2

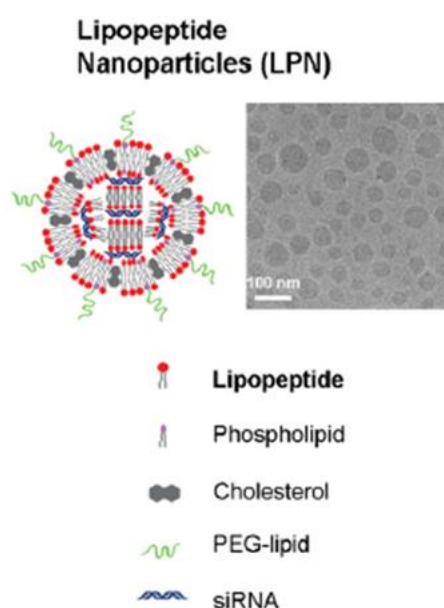
Η τεχνολογία των νανομεταφορέων ως οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού έχει αξιοποιηθεί και στη δημιουργία των καινούργιων γονιδιακών εμβολίων κατά του ιού SARS-CoV-2, παίζοντας καταλυτικό ρόλο στη διαχείριση της πανδημίας. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν δύο τύποι εμβολίων στα οποία χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά είδη νανομεταφορέων (μη-ικών και ικών). Συγκεκριμένα:

- i. Τα εμβόλια των Pfizer–BioNTech και Moderna χρησιμοποιούν μη-ικούς νανομεταφορείς προκειμένου να μεταφέρουν ένα τροποποιημένο μόριο mRNA στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, ώστε να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση. Πιο συγκεκριμένα, το μόριο mRNA που χρησιμοποιείται κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδα (S) του SARS-CoV-2, την οποία χρησιμοποιεί ο ιός προκειμένου να εισέλθει στα ανθρώπινα κύτταρα. Το mRNA εγκλείεται σε λιπιδικά νανοσωματίδια προκειμένου να προστατευτεί η δομή του και να ξεπεραστούν τα προβλήματα της συστημικής χορήγησης, που έχουν αναφερθεί στην Παράγραφο 3.3, ώστε να εισαχθεί επιτυχώς στα κύτταρα. Στη συνέχεια το mRNA μεταφέρεται στα ριβοσώματα του κυττάρου όπου εκφράζεται η πρωτεΐνη ακίδα. Η έκφρασή της διεγείρει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, ο οποίος την αναγνωρίζει ως ξένη και δημιουργεί αντισώματα. Ως αποτέλεσμα, τα αντισώματα αυτά προσφέρουν προστασία, αφού σε περίπτωση έκθεσης στον πραγματικό ιό, το ανοσοποιητικό σύστημα θα τον αναγνωρίσει και θα είναι έτοιμο να υπερασπιστεί τον οργανισμό εναντίον του.<sup>35</sup>
- ii. Τα εμβόλια των AstraZeneca και Johnson & Johnson χρησιμοποιούν άλλη τεχνολογία, αφού βασίζονται στη χρήση ικών νανομεταφορέων και περιέχουν μόρια DNA που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη ακίδα του ιού. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτό τον τύπο εμβολίων χρησιμοποιείται ως όχημα μεταφοράς ένας αδενοϊός που έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε: (α) να περιέχει το γονίδιο για την παραγωγή της πρωτεΐνης ακίδας και (β) να μην μπορεί ο ίδιος να αντιγραφεί μέσα στο κύτταρο. Μόλις χορηγηθεί το εμβόλιο, ο αδενοϊός εισέρχεται στα κύτταρα του σώματος, μεταφέροντας το επιθυμητό γονίδιο (DNA). Τα κύτταρα στη συνέχεια θα εκφράσουν το γονίδιο, μέσω των διεργασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης, για να παράγουν την πρωτεΐνη ακίδα και το ανοσοποιητικό σύστημα του ατόμου θα την αναγνωρίσει ως ξένη, παράγοντας και πάλι αντισώματα.<sup>36</sup>



#### 4.4 Λιποπεπτιδικά Νανοσωματίδια (LPN)

Ένα νέο, πολλά υποσχόμενο είδος οργανικών νανομεταφορέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως όχημα μεταφοράς μορίων siRNA αποτελούν τα **λιποπεπτιδικά νανοσωματίδια** (LPN).<sup>37</sup> Τα λιποπεπτιδικά νανοσωματίδια είναι σφαιρικού σχήματος νανοδομές με διάμετρο στο εύρος των 35-85 nm. Τα συστατικά τους είναι φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, PEG-λιπίδια και ένα συνθετικό λιποπεπτίδιο. Το συνθετικό αυτό λιποπεπτίδιο αποτελεί μόριο-κλειδί στη δομή των LPN, καθώς μπορεί να διαφοροποιήσει τις επιδόσεις και την αποτελεσματικότητά τους ως νανομεταφορείς του siRNA. Μία υποθετική απεικόνιση της δομής τους μπορεί να φανεί στο Σχήμα 4.1.



**Σχήμα 4.1** Υποθετική απεικόνιση (**αριστερά**) και μια εικόνα Cryo-TEM (**δεξιά**) των LPNs<sup>37</sup>. Τα LPN αποτελούνται από μόρια συνθετικού λιποπεπτιδίου, φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης, PEG-λιπιδίων και siRNA.

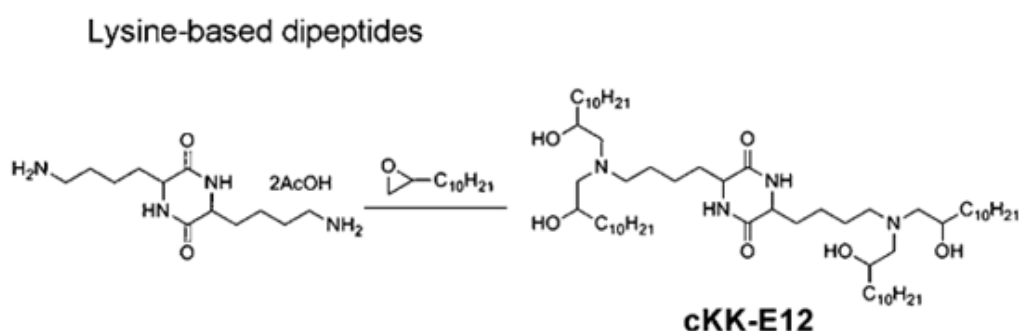
Ερευνητές από το Πανεπιστήμιο του MIT (Massachusetts Institute of Technology) στην προσπάθειά τους να κατασκευάσουν ένα σύστημα του οποίου θα μπορούσαν να συντονίσουν εύκολα τις χημικές και φυσικές ιδιότητες, επιτυγχάνοντας παράλληλα την ενθυλάκωση του siRNA, συνέθεσαν και αξιολόγησαν τρεις οικογένειες λιποπεπτιδίων με διαφορές στη χημική τους δομή. Πιο συγκεκριμένα, αμινοξέα αντέδρασαν με αλδεΐδες, ακρυλικά οξέα και εποξειδία δημιουργώντας τρεις οικογένειες λιποπεπτιδικών παραγώγων. Το καινούργια αυτά παράγωγα ονομάστηκαν από τις ενώσεις που αντέδρασαν μεταξύ τους (A: αμινοξέα-αλδεΐδες, O: αμινοξέα- ακρυλικά και E: αμινοξέα-εποξειδία) και από το μήκος των αλυσίδων άνθρακα. Για παράδειγμα, το K-E12 αντιπροσωπεύει την αντίδραση λυσίνης με 1,2-εποξιδωδεκάνιο.

Στη συνέχεια, τα λιποπεπτιδικά παράγωγα που συντέθηκαν αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να σιγήσουν τα ηπατικά γονίδια σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως τα εποξειδικά παράγωγα είχαν την καλύτερη επίδοση χωρίς όμως οι ερευνητές να γνωρίζουν το μικροσκοπικό μηχανισμό λειτουργίας τους. Επίσης, το μήκος

της ουράς της ένωσης φαίνεται πως επηρέαζε σημαντικά τη σίγαση των ηπατικών γονιδίων, με το βέλτιστο μήκος ουράς να κυμαίνεται στους 12–14 άνθρακες.

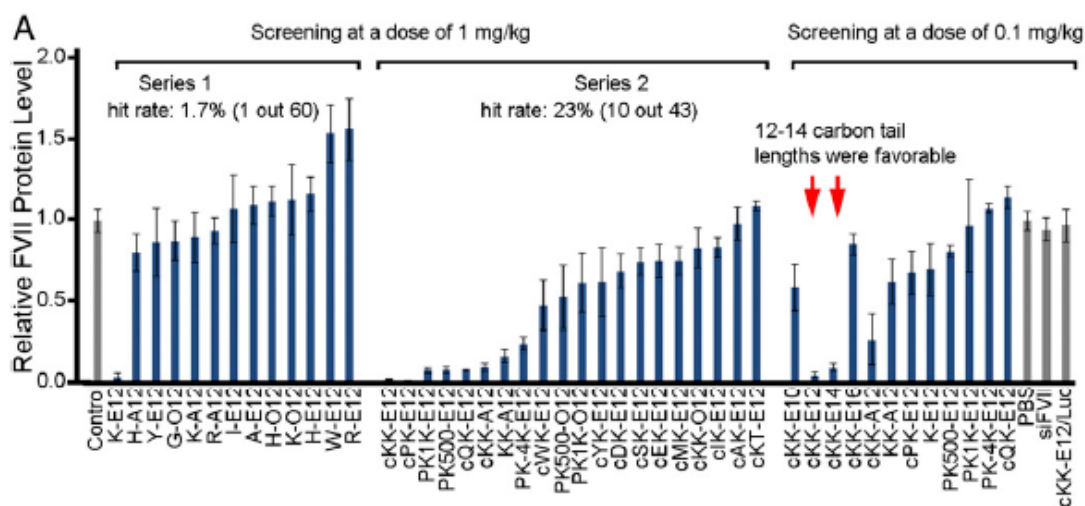
#### 4.4.1 Το λιποπεπτίδιο cKK-E12

Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων πειραμάτων έδειξαν πως το λιποπεπτίδιο με την κωδική ονομασία **cKK-E12** είχε συνεχώς καλύτερη επίδοση από τις αντίστοιχες αλδευδικές και ακρυλικές ενώσεις (cKK-A12 και cKK-O12). Η δομή του cKK-E12 αποτελείται από έναν δακτύλιο δικετοπιπεραζίνης, ο οποίος προέρχεται από δύο μόρια λυσίνης, και τέσσερις αμινο-αλκοολούχες λιπιδικές ουρές (Σχήμα 4.2).



**Σχήμα 4.2** Αντίδραση σύνθεσης του cKK-E12

Πιο συγκεκριμένα, όπως μπορεί να φανεί και από το Σχήμα 4.3, το cKK-E12 έδειξε εξαιρετικά αποτελέσματα σίγασης σε ηπατοκύτταρα ποντικών (ED50 ~ 0.002 mg / kg), αρουραίων (ED50 <0.01 mg / kg) και πρωτεύοντων θηλαστικών πλην του ανθρώπου (πάνω από 95% σίγαση στα 0.3 mg/ kg). Ακόμα, είναι τάξεις μεγέθους πιο επιλεκτικό ως προς τη σίγαση των ηπατοκυττάρων σε σύγκριση με άλλους τύπους κυττάρων σε διάφορα όργανα, δείχνοντας υψηλή επιλεκτικότητα.



**Σχήμα 4.3** Αναγνώριση του cKK-E12 ως της πιο αποτελεσματικής ένωσης σε πειράματα με διαφορετικά λιποπεπίδια ως συστατικά των LNPs<sup>37</sup>. **Σειρά 1:** Τα LPN δοκιμάστηκαν σε δόση 1 mg / kg σε ποντίκια, γεγονός που έδειξε ότι η λυσίνη είναι αποτελεσματικό αμινοξύ. **Σειρά 2:** Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν τα παράγωγα πεπτιδίου και πολυπεπτιδίων-λιπιδίων με βάση τη λυσίνη στην ίδια δόση. **Σειρά 3:** Τα πιο επιτυχημένα μέλη της Σειράς 2 και τα ανάλογά τους διερευνήθηκαν σε χαμηλότερη δόση, 0.1 mg / kg, γεγονός που οδήγησε στην επιλογή του cKK-E12 ως της ένωσης με την καλύτερη επίδοση.

Είναι επομένως φανερό πως το συγκεκριμένο νανοσωματίδιο με βάση το λιποπεπίδιο cKK-E12 αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο μη-ικό σύστημα μεταφοράς siRNA αφού έχει επιδείξει αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα και επιλεκτικότητα.

Παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά του λιποπεπτιδικού μορίου, όπως το μήκος του και οι χημικές ομάδες υδροξυλίου (εποξειδικό παράγωγο), τα οποία συμβάλλουν στην αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητά του cKK-E12 LNP, ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την εξαιρετική απόδοσή του ως νανομεταφορέας παραμένει ανεξερεύνητος.

Συμπληρωματικά με τα συμβατικά πειράματα, τα υπολογιστικά πειράματα που βασίζονται στη στατιστική μηχανική μπορούν να δώσουν πολύτιμες πληροφορίες σε μικροσκοπικό επίπεδο σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά και τον μηχανισμό δράσης αυτών των συστημάτων μεταφοράς, με σκοπό το σχεδιασμό βελτιωμένων και ακόμα αποτελεσματικότερων οχημάτων μεταφοράς για γονιδιακές θεραπείες και εμβόλια.

## II. ΘΕΩΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ

### 1. Περιγραφή μοριακών συστημάτων και δυναμικά αλληλεπίδρασης

Η μικροσκοπική κατάσταση ενός συστήματος προσδιορίζεται στην κλασική μηχανική από τις θέσεις και τις ορμές των ατόμων του μέσω της Χαμιλτονιανής  $\mathcal{H}$  (άθροισμα των συναρτήσεων της κινητικής και της δυναμικής ενέργειας του συστήματος) ενός συστήματος  $N$  σωματιδίων (**βαθμών ελευθερίας**)<sup>38</sup> ως:

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{q}) = K(\mathbf{p}) + V(\mathbf{q}) \quad [1.1]$$

όπου

$$\mathbf{q} = (q_1, q_2, \dots, q_N) \quad [1.2]$$

$$\mathbf{p} = (p_1, p_2, \dots, p_N) \quad [1.3]$$

Η **κινητική ενέργεια**,  $K$ , σε αρκετά φυσικά συστήματα παίρνει τη μορφή:

$$K = \sum_{i=1}^N \sum_{\alpha} p_{i\alpha}^2 / 2m_i \quad [1.4]$$

όπου  $m_i$  είναι η μάζα του μορίου, και  $\alpha = 1, 2, 3$  για  $x, y, z$  αντιστοίχως.

Η δυναμική ενέργεια  $V$  μπορεί να χωριστεί σε όρους ζευγών, τριάδων, και ούτω καθ' εξής, αλληλεπιδρώντων κέντρων:

$$V = \sum_i v_1(r_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2(r_i, r_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v_3(r_i, r_j, r_k) + \dots \quad [1.5]$$

Ο πρώτος όρος της εξίσωσης  $v_1(r_i)$  αναπαριστά την επίδραση εξωτερικού πεδίου στο σύστημα ενώ όλοι οι υπόλοιποι τις αλληλεπιδράσεις των σωματιδίων. Το διάλυμα μεταξύ των κέντρων αλληλεπίδρασης,  $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$  παριστά την απόσταση των διανυσμάτων θέσης των σωματιδίων  $i$  και  $j$  και αποτελεί τον συνήθη παραμένον όρο στη εξ. 1.5, ως  $v_2(r_{ij})$ .

Η προσομοίωση δυναμικών συστημάτων περιγράφεται ευχερέστερα μέσω γενικευμένων συντεταγμένων, αντί καρτεσιανών, συνεπώς η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας αποδίδεται από εξισώσεις της μορφής 1.6:

$$V = \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{improper} V_{imp} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{elec} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad [1.6]$$

όπου οι πρώτοι όροι αναφέρονται σε δεσμικές (ενδομοριακές) αλληλεπιδράσεις λόγω μεταβολών οφειλόμενες σε μήκη δεσμών, γωνίες δεσμών, διεδρες γωνίες, ενώ οι δύο τελευταίοι όροι περιγράφουν μη δεσμικές (διαμοριακές) αλληλεπιδράσεις όπως οι van der Waals και ηλεκτροστατικές (Coulomb).

Εκφράσεις αυτού του τύπου παραμετροποιούνται κατάλληλα ώστε να αναπαριστούν ρεαλιστικά τις θερμοδυναμικές ιδιότητες, τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά και τη δυναμική του υπό εξέταση συστήματος. Επιπρόσθετοι όροι μπορούν να εισαχθούν στην παραπάνω σχέση για την περιγραφή περισσότερων βαθμών ελευθερίας ανάλογα με το εκάστοτε σύστημα<sup>38</sup>.

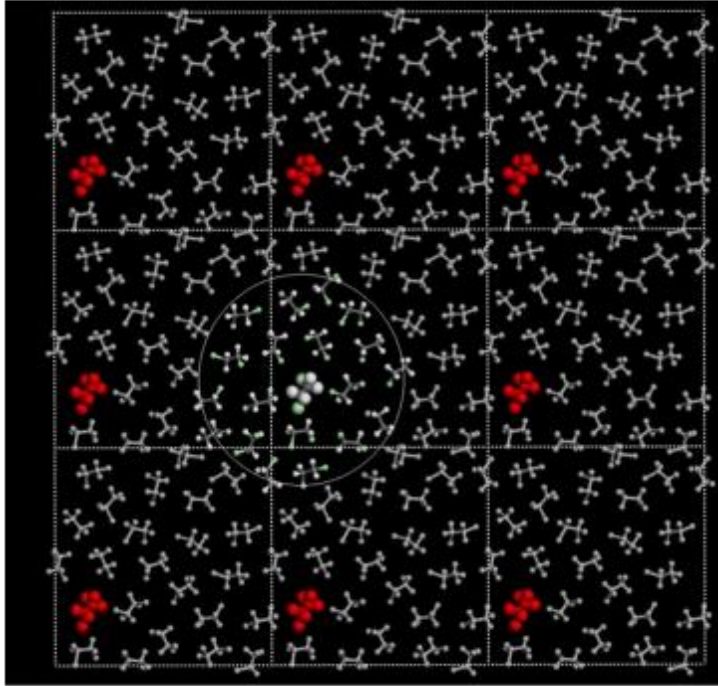
### 1.1 Περιοδικές Οριακές Συνθήκες

Οι υπολογιστικές προσομοιώσεις αφορούν ένα μικρό αριθμό συνήθως μερικών χιλιάδων μορίων, καθώς υπάρχουν περιορισμοί ως προς το μέγεθος του συστήματος που θα προσομοιωθεί λόγω της διαθέσιμης μνήμης του ηλεκτρονικού υπολογιστή και κυρίως της ταχύτητας εκτέλεσης των υπολογισμών.

Στην περίπτωση που θέλουμε να προσομοιώσουμε ένα φυσικώς μεγάλο σύστημα μέσω ενός πεπερασμένου αριθμού  $N$  σωματιδίων, επιβάλλουμε **περιοδικές οριακές συνθήκες** [Born and von Karman] στο πρωτογενές κυτίο της προσομοίωσης (simulation primary box) μέσω περατών τοιχωμάτων. Συγκεκριμένα το κυτίο προσομοίωσης περιβάλλεται από έναν άπειρο αριθμό αντιγράφων του, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1. Κατά την προσομοίωση, καθώς τα μόρια κινούνται στο κύριο χωρίο (κυτίο προσομοίωσης), οι περιοδικές τους εικόνες σε καθένα από τα γειτονικά χωρία κινούνται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο. Μόνο τα άτομα  $N$  μέσα στο κύριο κελί εξετάζονται, αλλά μόλις ένα από αυτά τα άτομα φεύγει από το κελί μια από τις περιοδικές του εικόνες θα εισέλθει σε αυτό από την αντίθετη πλευρά για να το αντικαταστήσει.

Ακόμα πρέπει να σημειωθεί πως έχει σημασία και το μέγεθος του κυτίου προσομοίωσης και χρειάζεται προσοχή όταν εξετάζεται οποιαδήποτε ιδιότητα η οποία εξαρτάται από συσχετίσεις μεγάλης εμβέλειας. Για παράδειγμα, οι μόνες επιτρεπόμενες διακυμάνσεις είναι αυτές που έχουν μήκη κύματος τα οποία είναι συμβατά με το μέγεθος του κουτιού. Έτσι το μεγαλύτερο επιτρεπόμενο μήκος κύματος που επιτρέπεται στο σύστημα θα είναι  $L$ , όπου  $L$  είναι το μήκος του κουτιού προσομοίωσης, και θα είναι προβληματικό να προσομοιωθεί οποιαδήποτε κατάσταση στην οποία είναι σημαντικές μεγαλύτερες διακυμάνσεις μήκους κύματος, όπως οι μεταβάσεις φάσης<sup>38</sup>.

Το κυβικό κυτίο αποτελεί το πλέον σύνηθες γεωμετρικό χωρίο. Ωστόσο, και άλλα χωροπληρωτικά πολύεδρα χρησιμοποιούνται σε υπολογιστικές προσομοιώσεις, καθώς, αν και πιο πολύπλοκα, έχουν μικρότερο όγκο σε σχέση με αντίστοιχα κυβικά χωρία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ρομβικό δωδεκάεδρο, που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, ή το κόλουρο οκτάεδρο.



**Σχήμα 1.1** Σχηματική αναπαράσταση των περιοδικών οριακών συνθηκών σε 2D

## 1.2 Υπολογισμός αλληλεπιδράσεων μικρής εμβέλειας

Η εφαρμογή των περιοδικών οριακών συνθηκών θα σήμαινε ότι για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας για ένα μόριο  $i$  του αρχικού κουτιού θα λαμβάνονται υπόψη και οι αλληλεπιδράσεις του με τα μόρια όλων των περιοδικών εικόνων του κουτιού. Όμως αν έχουμε ένα μεγάλο σύστημα δεν υπάρχει λόγος να υπολογιστούν όλες οι αλληλεπιδράσεις, καθώς το δυναμικό για αποστάσεις μικρότερες του  $L/2$  θεωρείται αμελητέο. Για την αποφευχθεί αυτό, εφαρμόζεται το **όριο αποκοπής**  $R_c$ , το οποίο ορίζεται από την απόσταση από τον κέντρο του μορίου πέρα από την οποία η αλληλεπίδρασή του με όλα τα υπόλοιπα μόρια θεωρείται ότι έχει μηδενική συνεισφορά στον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας, ισχύει δηλαδή:

$$V(r) = \begin{cases} V^{LJ}(r), & r \leq R_c \\ 0, & r > R_c \end{cases} \quad [1.7]$$

Όπου  $V^{LJ}$  είναι το δυναμικό Lennard-Jones που δίνεται από τη σχέση

$$V^{LJ}(r) = 4\epsilon \left[ \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right] \quad [1.8]$$

όπου τα  $\epsilon$  και  $\sigma$  είναι το βάθος πηγαδιού του δυναμικού Lennard-Jones, απόσταση στην οποία το δυναμικό μεταξύ των σωματιδίων είναι μηδέν (διάμετρος σκληρής σφαίρας).

Στην περίπτωση του δυναμικού Lennard-Jones μία συνήθης αποδεκτή τιμή για το  $R_c$  είναι η  $R_c \geq 2.5\sigma$ . Παρότι ενδέχεται το δυναμικό αλληλεπίδρασης  $r > R_c$  να είναι μικρό, η συνεισφορά των ατόμων αυτών στη συνολική ενέργεια δεν είναι αμελητέα καθώς η τιμή της αυξάνεται ασυμπτωτικά με την αύξηση του μεγέθους του συστήματος. Συνεπώς είναι δυνατόν να εφαρμοστεί μια διόρθωση αποκοπής του δυναμικού η οποία στην περίπτωση του δυναμικού Lennard-Jones υπολογίζεται ως:

$$V_{tail}(r) = \frac{8}{3}\pi\rho\epsilon\sigma^3 \left[ \frac{1}{3} \left( \frac{\sigma^9}{R_c^9} \right) - \left( \frac{\sigma^3}{R_c^3} \right) \right] \quad [1.9]$$

όπου  $\rho$  η πυκνότητα του συστήματος και  $R_c$  η ελάχιστη ακτίνα αποκοπής.

### 1.3 Υπολογισμός Αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας

Με την επιβολή της απόστασης αποκοπής το άθροισμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φορτισμένων ατόμων του συστήματος δεν συγκλίνει όπως αυτό των μικρής εμβέλειας αλληλεπιδράσεων.

Το δυναμικό Coulomb περιγράφεται από τη σχέση:

$$U_{coul}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad [1.10]$$

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την διαχείριση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι η μέθοδος Ewald.<sup>39,40</sup>

## 2. Στοιχεία κλασικής στατιστικής μηχανικής

Η Στατιστική Μηχανική είναι ο κλάδος της Φυσικής που διερευνά τη σχέση μακροσκοπικών – μικροσκοπικών ιδιοτήτων της ύλης. Η θεωρία αυτή αναπτύχθηκε στο δεύτερο μισό του 19ου αιώνα από τον Josiah Willard Gibbs, θεμελιωτή του στατιστικού συνόλου (Gibbs Ensemble), και τον Ludwig Eduard Boltzmann.

Σύμφωνα με τη θεώρηση Gibbs ένα μακροσκοπικό σύστημα θεωρείται μια ιδεατή συλλογή ενός συνόλου πολύ μεγάλου αριθμού,  $k$ , συστημάτων το οποίο καλείται **Στατιστικό Σύνοιο** (Gibbs Ensemble), αλλά όλα υποκείνεται στους ίδιους μακροσκοπικούς περιορισμούς. Το καθένα από αυτά τα συστήματα θεωρείται ως μία ξεχωριστή μικροσκοπική κατάσταση (μικροκατάσταση  $i$  με ιδιοτιμή ενέργειας  $E_i$ ). Για ένα σύστημα αποτελούμενο από  $N$  άτομα απαιτούνται  $3N$  συντεταγμένες θέσης  $q$  και  $3N$  συντεταγμένες ορμής  $p$ , δηλαδή ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας του συστήματος είναι  $6N$ .

Οι μικροκαταστάσεις του συστήματος μεταβάλλονται με τη πάροδο του χρόνου λόγω των μοριακών αλληλεπιδράσεων συνιστώντας έναν  $6N$ -διάστατο διανυσματικό χώρο, ο οποίος ονομάζεται "Χώρος Φάσεων". Εάν θεωρήσουμε  $\Gamma$  ένα τυχαίο σημείο στο χώρο φάσεων μπορούμε να περιγράψουμε τη στιγμιαία τιμή μίας ιδιότητάς του,  $A$ , (για παράδειγμα της δυναμικής ενέργειας) συναρτήσει της κατάστασής του στον υπερχώρο αυτό, δηλαδή  $A(\Gamma)$ . Καθώς το σύστημα εξελίσσεται στο χώρο  $\Gamma$  η πειραματικά μετρούμενη μακροσκοπική ιδιότητα  $A_{\text{πειρ}}$  (αίτημα κατά Gibbs) είναι η μέση τιμή όλων των  $A(\Gamma)$ . Η υπόθεση αυτή εκφράζεται από τη σχέση:

$$A_{\text{πειρ}} = \langle A \rangle_{\text{time}} = \langle A(\Gamma(t)) \rangle_{\text{time}} = \lim_{t_{\text{obs}} \rightarrow \infty} \frac{1}{t_{\text{obs}}} \int_0^{t_{\text{obs}}} A(\Gamma(t)) dt \quad [2.1]$$

## 2.1 Συνήθη Στατιστικά Σύνολα

Ονομάζουμε **Στατιστικό Σύνολο** (Ensemble) τη συλλογή ενός πολύ μεγάλου αριθμού όμοιων συστημάτων, που υπόκεινται στους ίδιους μακροσκοπικούς περιορισμούς, αλλά μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετική μικροκατάσταση. Το στατιστικό σύνολο περιγράφεται γεωμετρικά από μια κατανομή σημείων του χώρου φάσεων  $\Gamma$ . Η κατανομή αυτή δίνεται από την συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας  $p(q, p, t)$ , όπου  $(q, p)$  είναι το  $6N$ -διάστατο σύνολο όλων των θέσεων και ορμών που μπορεί να προσλάβει το σύνολο των σωματιδίων του συστήματος, δηλαδή ο χώρος φάσεων. Ανάλογα με τους περιορισμούς που θα τεθούν σε ένα υλικό σύστημα, σχηματίζονται τα εξής στατιστικά σύνολα: μικροκανονικό ( $NVE$ ), κανονικό ( $NVT$ ), μέγα κανονικό ( $\mu VT$ ), ισόθερμο-ισοβαρές ( $NPT$ ).

### Ισόθερμο-ισοβαρές Στατιστικό Σύνολο (Isothermal-Isobaric, $NPT$ )

Στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο, στο οποίο έγιναν τα υπολογιστικά πειράματα μοριακής δυναμικής της παρούσας εργασίας, τα μεγέθη που επιβάλλονται στο σύστημα είναι ο αριθμός μορίων  $N$ , η πίεση  $P$  και η θερμοκρασία  $T$ . Ο όγκος διακυμαίνεται και η μέση τιμή του καθορίζεται από τις τιμές των  $N$ ,  $P$  και  $T$  που διατηρούνται σταθερές.

Η πυκνότητα πιθανότητας για το ισόθερμο-ισοβαρές σύστημα, αποδεικνύεται ανάλογη του όρου:

$$\exp\left(-\frac{\mathcal{H}+PV}{k_B T}\right) \quad [2.2]$$

Η συνάρτηση μερισμού, που κανονικοποιεί τη συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας, δίνεται για ένα κλασικό  $NPT$ -σύστημα από την εξ. 2.3:

$$Q_{NPT} = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \frac{1}{V_0} \int dV \int dr dp \exp\left(-\frac{(\mathcal{H}+PV)}{k_B T}\right) \quad [2.3]$$

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs,  $G$ , δίνεται από τη σχέση:



$$\frac{G}{k_B T} = -\ln Q_{NPT} \quad [2.4]$$

### 3. Μοριακή Δυναμική

Η **Μοριακή Δυναμική** (Molecular Dynamics) αποτελεί μία ντετερμινιστική μέθοδο μοριακών προσομοιώσεων για την παραγωγή της δυναμικής τροχιάς ενός συστήματος στο χώρο φάσεων που αποτελείται από  $N$  σωματίδια, ολοκληρώνοντας τις εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα. Για να εφαρμόσει κανείς την τεχνική αυτή χρειάζεται να γνωρίζει τις αρχικές συνθήκες που αφορούν στις ταχύτητες και τις συντεταγμένες των ατόμων, το μοντέλο που περιγράφει τη δυναμική ενέργεια του συστήματος και τις οριακές συνθήκες που θα εφαρμοστούν<sup>38</sup>.

#### 3.1 Εξισώσεις κίνησης για ατομικά συστήματα

Στην προσομοίωση μοριακής δυναμικής, επιλύονται οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα για ένα σύστημα  $N$  σωματιδίων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Σύμφωνα με τον νόμο του Νεύτωνα ισχύει:

$$F = m a \quad [3.1]$$

όπου  $F$  είναι η δύναμη που ασκείται σε ένα σώμα μάζας  $m$  και  $a$  η επιτάχυνση που του προσδίδει.

Η κλίση της συνάρτησης του δυναμικού δίνει το αντίστοιχο μέγεθος της δύναμης που ασκείται στο σωματίδιο, η οποία με τη σειρά της καθορίζει την αρχική επιτάχυνση του σωματιδίου:

$$F = -\nabla V \quad [3.2]$$

#### 3.2 Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής

##### 3.2.1 Μέθοδος Πεπερασμένων Διαφορών

Μία τυπική μέθοδος επίλυσης στις συνήθεις διαφορικές εξισώσεις είναι η μέθοδος των πεπερασμένων διαφορών. Η γενική ιδέα της μεθόδου αυτής είναι η εξής: δεδομένων των μοριακών θέσεων και ταχυτήτων σε χρόνο  $t$  επιχειρείται η πρόβλεψη τους σε έναν επόμενο χρόνο  $t + \delta t$ . Οι εξισώσεις επιλύονται αριθμητικά και η επιλογή του βήματος του χρόνου ολοκλήρωσης  $\delta t$  εξαρτάται μερικώς από τη μέθοδο επίλυσης και την επιθυμητή ακρίβεια.

Όλοι οι αλγόριθμοι ολοκλήρωσης των διαφορικών εξισώσεων προσεγγίζουν τις θέσεις, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις των σωματιδίων στον χρόνο  $(t+\delta t)$  μέσω των σειρών Taylor:<sup>38</sup>

$$\begin{aligned}
r^p(t + \delta t) &= r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 b(t) + \dots \\
v^p(t + \delta t) &= v(t) + \delta t a(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 b(t) + \dots \\
a^p(t + \delta t) &= a(t) + \delta t b(t) + \dots \\
b^p(t + \delta t) &= b(t) + \dots
\end{aligned}
\tag{3.3}$$

Όπου οι  $r$  αντιπροσωπεύουν τις θέσεις, οι  $v$  τις ταχύτητες, οι  $a$  τις επιταχύνσεις και  $b$  όλες τις παραγώγους τρίτης τάξης του  $r$ .

Οι παραπάνω εξισώσεις, μετά από κάποια χρονικά βήματα, δεν θα υπολογίζουν σωστά τις τροχιές, διότι δεν είναι πλήρως συνεπείς με τις εξισώσεις κίνησης. Αυτό διορθώνεται εάν εισαχθεί στον αλγόριθμο ένα βήμα διόρθωσης. Από τις νέες θέσεις  $r^p$  υπολογίζονται οι δυνάμεις σε χρόνο  $(t + \delta t)$  και έτσι οι σωστές επιταχύνσεις  $a^c(t + \delta t)$ . Στη συνέχεια μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος του σφάλματος του βήματος πρόβλεψης ως:

$$\Delta a(t + \delta t) = a^c(t + \delta t) - a^p(t + \delta t) \tag{3.4}$$

Το σφάλμα και τα αποτελέσματα του βήματος πρόβλεψης εισάγονται στο **βήμα διόρθωσης**:

$$\begin{aligned}
r^c(t + \delta t) &= r^p(t + \delta t) + c_0 \Delta a(t + \delta t) \\
v^c(t + \delta t) &= v^p(t + \delta t) + c_1 \Delta a(t + \delta t) \\
a^c(t + \delta t) &= a^p(t + \delta t) + c_2 \Delta a(t + \delta t) \\
b^c(t + \delta t) &= b^p(t + \delta t) + c_3 \Delta a(t + \delta t)
\end{aligned}
\tag{3.5}$$

Όπου  $r^c(t + \delta t), v^c(t + \delta t)$  κτλ. αποτελούν καλύτερες προσεγγίσεις των πραγματικών θέσεων, ταχυτήτων, κτλ. Η επιλογή των συντελεστών  $c_0, c_1, c_2, c_3 \dots$  δίνεται από τον Gear προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη σταθερότητα και ακρίβεια.

Με γνώση των θέσεων, ταχυτήτων και επιταχύνσεων για κάθε χρονικό βήμα, μπορούν να υπολογιστούν βασικά μεγέθη του συστήματος, δυναμική ενέργεια, κινητική ενέργεια και πίεση.

### 3.2.2 Αλγόριθμος Verlet

Στη μοριακή δυναμική, ο πιο διαδεδομένος αλγόριθμος χρονικής ολοκλήρωσης είναι ο αλγόριθμος Verlet. Η βασική ιδέα είναι να γράψουμε δύο τρίτης τάξης αναπτύγματα Taylor για τις θέσεις  $r(t)$ , μία χρονική στιγμή μπροστά και μία χρονική στιγμή πίσω. Γράφοντας  $n$  τις ταχύτητες,  $a$  τις επιταχύνσεις, και  $b$  τη τρίτη παράγωγο του  $r$  ως προς  $t$  έχουμε:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \left(\frac{1}{2}\right) \delta t^2 a(t) + \dots \tag{3.6}$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \delta t \mathbf{v}(t) + \left(\frac{1}{2}\right) \delta t^2 \mathbf{a}(t) - \dots \quad [3.7]$$

Προσθέτοντας τις δύο σχέσεις έχουμε:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad [3.8]$$

Όπως φαίνεται από την εξίσωση οι ταχύτητες επαλείφθηκαν μέσω της πρόσθεσης του αναπτύγματος Taylor και δεν χρειάζονται για να υπολογισθεί η τροχιά. Ωστόσο τις χρειαζόμαστε προκειμένου να υπολογίσουμε την κινητική και την ολική ενέργεια. Μπορούμε να υπολογίσουμε τις ταχύτητες χρησιμοποιώντας τις θέσεις του ατόμου  $i$  τις χρονικές στιγμές  $t$  και  $t + \Delta t$ :

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t+\delta t) - \mathbf{r}(t-\delta t)}{2\delta t} \quad [3.9]$$

### 3.2.3 Αλγόριθμος Leap-Frog

Στον αλγόριθμο Verlet το σφάλμα στην έκφραση της ταχύτητας είναι της τάξης του  $\delta t^2$  και όχι  $\delta t^4$ . Αυτό μπορεί να φέρει κάποια αριθμητική ανακρίβεια στον υπολογισμό των τροχιών. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτό χρησιμοποιείται μία παραλλαγή του αλγόριθμου Verlet, ο αλγόριθμος “μισού βήματος” Leap-frog<sup>38</sup>, ο οποίος παίρνει τη μορφή:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) \quad [3.10]$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) + \delta t \mathbf{a}(t) \quad [3.11]$$

Αυτός ο τροποποιημένος αλγόριθμος Verlet χρειάζεται τις τρέχουσες θέσεις  $\mathbf{r}(t)$ , επιταχύνσεις  $\mathbf{a}(t)$  και τη μέση ταχύτητα  $\mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right)$ . Πρώτα εφαρμόζεται η εξίσωση των ταχυτήτων και μέσω των συντεταγμένων υπολογίζονται οι ταχύτητες για το επόμενο ενδιάμεσο βήμα  $\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right)$ . Οι τρέχουσες ταχύτητες υπολογίζονται ως:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2} \left[ \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) + \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) \right] \quad [3.12]$$

Έτσι μπορεί να υπολογιστεί η κινητική και κατ' επέκταση η συνολική ενέργεια σε χρόνο  $t$ .

### 3.2.4 Θερμοστάτηση συστήματος

Στη Μοριακή Δυναμική γίνεται επιλογή του στατιστικού συνόλου που θα χρησιμοποιηθεί. Εκτός του μικροκανονικού στατιστικού συνόλου, όλα τα υπόλοιπα έχουν ως περιορισμό την θερμοκρασία. Η στιγμιαία τιμή της θερμοκρασίας,  $T$ , συνδέεται με την κινητική ενέργεια μέσω της ορμής των σωματιδίων από τη σχέση:

$$\sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} = \frac{k_b T}{2} (3N - N_C) \quad [3.13]$$

όπου  $3N - N_C = N_{df}$ , είναι ο συνολικός αριθμός των βαθμών ελευθερίας. Όπως έχει αναφερθεί η μέση θερμοκρασία  $\langle T \rangle$  ταυτίζεται με την μακροσκοπική θερμοκρασία.

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας στην επιθυμητή τιμή γίνεται με την διαδικασία της θερμοστάτησης. Στην ουσία το σύστημα αφήνεται να εξελιχτεί για λίγο, χωρίς περιορισμό θερμοκρασίας, και σε τακτά χρονικά διαστήματα η θερμοκρασία επιβάλλεται να γίνει ίση με την επιθυμητή. Ο θερμοστάτης Berendsen<sup>41</sup>, που ονομάζεται επίσης αναλογικός θερμοστάτης, προσπαθεί να διορθώσει τις αποκλίσεις της πραγματικής θερμοκρασίας  $T$ . Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας το σύστημα συνδέεται με ένα εξωτερικό θερμαντικό λουτρό το οποίο έχει σταθερή θερμοκρασία  $T_0$ . Οι ταχύτητες κλιμακώνονται σε κάθε βήμα έτσι ώστε ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας να είναι ανάλογος με τη διαφορά:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_0 - T(t)) \quad [3.14]$$

όπου  $\tau$  είναι μία εμπειρική παράμετρος που ρυθμίζει τη ζεύξη λουτρού-συστήματος. Η μέθοδος δίνει μία εκθετική μείωση του συστήματος προς την επιθυμητή θερμοκρασία.

$$T = T_0 - C e^{-t/\tau} \quad [3.15]$$

Η αλλαγή θερμοκρασίας μεταξύ διαδοχικών χρονικών βημάτων είναι:

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau} (T_0 - T(t)) \quad [3.16]$$

Έτσι η ορμή τροποποιείται σε  $p_i \rightarrow \lambda p_i$  όπου  $\lambda$  είναι ο παράγοντας κλιμάκωσης:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left( \frac{T_0}{T(1 - \frac{\delta t}{2})} - 1 \right) \quad [3.17]$$

Πέρα από τον αλγόριθμο του Berendsen, έχουν αναπτυχθεί και άλλοι όπως Nose-Hoover, Lavengir, Gaussian.

### 3.2.5 Βαροστάτηση συστήματος

Στη περίπτωση που έχει επιλεγεί να προσομοιωθεί σύστημα που έχει τους περιορισμούς του ισοβαρούς-ισόθερμου στατιστικού συνόλου είναι αναγκαία μια ανάλογη επιβολή της επιθυμητής πίεσης. Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι βαροστάτησης για έλεγχο της πίεσης σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Ένας από τους πιο διαδομένους χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία, ο αλγόριθμος Berendsen<sup>41</sup>.

Όπως και στον έλεγχο θερμοκρασίας το σύστημα μπορεί να συζευχθεί με ένα λουτρό πίεσης το οποίο έχει πίεση αναφοράς  $P_0$ . Με την ίδια λογική ένας επιπλέον όρος θα προστεθεί στην εξίσωση κίνησης ώστε να επηρεάζει την μεταβολή της πίεσης:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{bath}} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad [3.18]$$

Η πίεση δίνεται από το θεώρημα Virial:

$$vir = \frac{1}{3} \sum_{i>j} \mathbf{f}(\mathbf{r}_{ij}) \cdot \mathbf{r}_{ij} \quad [3.19]$$

Όπου  $\mathbf{f}(\mathbf{r}_{ij})$  είναι η δύναμη που ασκείται στο  $i$  σωματίδιο από σωματίδιο  $j$ . Ο βαροστάτης Berendsen χρησιμοποιεί έναν συντελεστή κλιμάκωσης,  $\mu$ , ο οποίος είναι συνάρτηση του  $P$ :

$$\mu = \delta_{ij} - \frac{n_{PC} \beta_{ij} \Delta t}{3\tau_P} (P_{0ij} - P_{ij}(t)) \quad [3.20]$$

Όπου  $\beta$  είναι η ισοθερμική συμπιεστότητα του συστήματος και  $\delta_{ij}$  το δέλτα του Kronecker.

### III. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

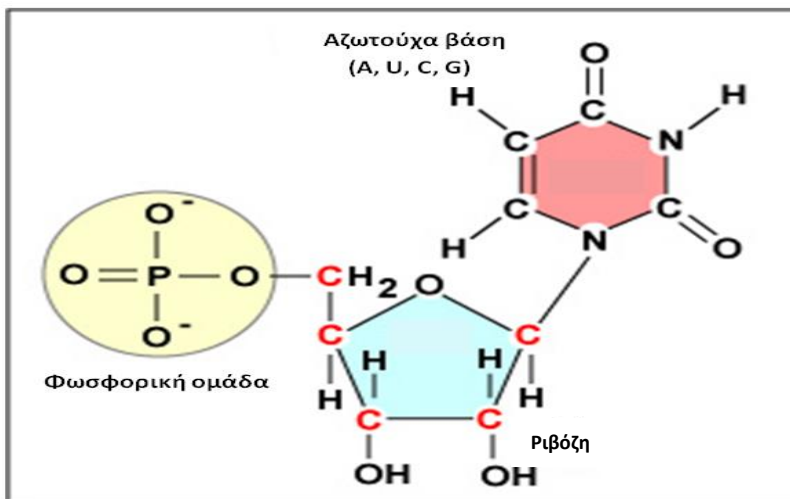
#### 1. Δημιουργία Συστημάτων Μοριακής Προσομοίωσης

Για την παρούσα μελέτη, εξετάζεται το σύστημα siRNA-λιποπεπτιδίου cKK-E12 προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός πρόσδεσης του λιποπεπτιδίου στο μόριο του siRNA. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν δύο συστήματα προσομοίωσης, το καθένα από τα οποία περιλαμβάνει ένα μόριο siRNA, ένα μόριο λιποπεπτιδίου, μόρια νερού, κατιόντα νατρίου και ανιόντα χλωρίου, όπως περιγράφονται αναλυτικά στις παρακάτω παραγράφους.

##### 1.1 Μοριακή Μοντελοποίηση μορίων

###### 1.1.1 Ψηφιακή Ανακατασκευή siRNA

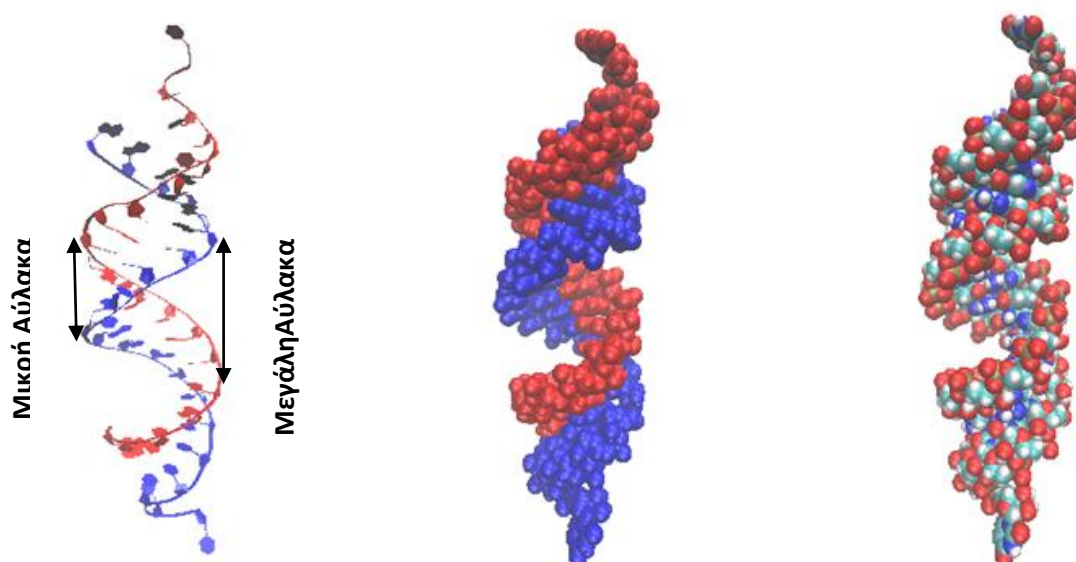
Το δίκλωνο μόριο siRNA που μελετήθηκε αποτελείται από μία αλληλουχία 22 νουκλεοτιδίων με προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων στο άκρο 3' των δύο κλώνων του. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία φωσφορική ομάδα, ένα σάκχαρο (ριβόζη) και μία αζωτούχα βάση. Η βάση καθορίζει τον τύπο του νουκλεοτιδίου. Στα μόρια ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) υπάρχουν τέσσερα είδη βάσεων: αδενίνη και γουανίνη (που ανήκουν στις πουρίνες) και κυτοσίνη και ουρακίλη (που ανήκουν στις πυριμιδίνες).



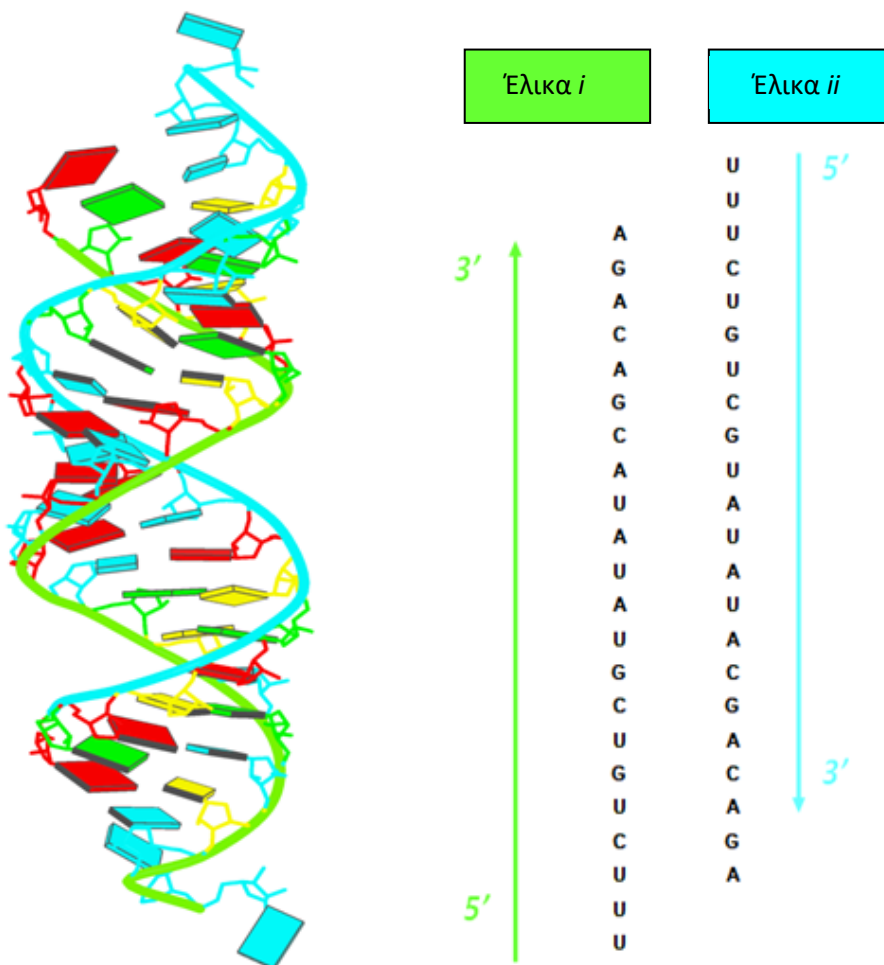
**Σχήμα 1.1** Παρουσιάζεται η δομή του νουκλεοτιδίου ουρακίλη. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία φωσφορική ομάδα, ένα σάκχαρο και μία αζωτούχα βάση.

Οι δύο κλώνοι του siRNA συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται ανάμεσα στις βάσεις Αδενίνη/ Ουρακίλη και Γουανίνη / Κυτοσίνη, οι οποίες και χαρακτηρίζονται ως συμπληρωματικές, με το πρώτο ζεύγος να δημιουργεί δύο (A = U) και το δεύτερο ζεύγος τρεις (G≡C) δεσμούς υδρογόνου.

Η αρχική δομή του υπό εξέταση siRNA λήφθηκε από δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank<sup>42</sup> (κωδικός: 2F8S). Ανακατασκευάστηκε μια απεικόνιση του ελεύθερου siRNA και τρεις διαφορετικές απεικονίσεις του, με χρήση του προγράμματος VMD<sup>43</sup>, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.2, ενώ η αλληλουχία των βάσεων στους δύο συμπληρωματικούς κλώνους μπορεί να παρατηρηθεί στο Σχήμα 1.3, το οποίο έγινε μέσω του προγράμματος Web 3DNA 2.0 Server<sup>44</sup>.



**Σχήμα 1.2** Τρεις διαφορετικές απεικονίσεις του siRNA. Οι δύο κλώνοι του μορίου απεικονίζονται με μπλε και κόκκινο χρώμα. Σύμβαση χρωμάτων στην τρίτη απεικόνιση: άζωτο (μπλε), οξυγόνο (κόκκινο), άνθρακας (κυανό), υδρογόνο (λευκό), φώσφορος (λαδί).



**Σχήμα 1.3** Το υπό εξέταση siRNA είναι ένα δίκλωνο μόριο RNA που αποτελείται από 22 νουκλεοτίδια. Οι δύο έλικες του siRNA, Έλικα *i* και Έλικα *ii*, συμβολίζονται με πράσινο και γαλάζιο χρώμα αντίστοιχα. Η Αδενίνη (A) συμβολίζεται με κόκκινο χρώμα, η Κυτοσίνη (C) με κίτρινο, η Γουανίνη (G) με πράσινο και η Ουρακίλη (U) με γαλάζιο.

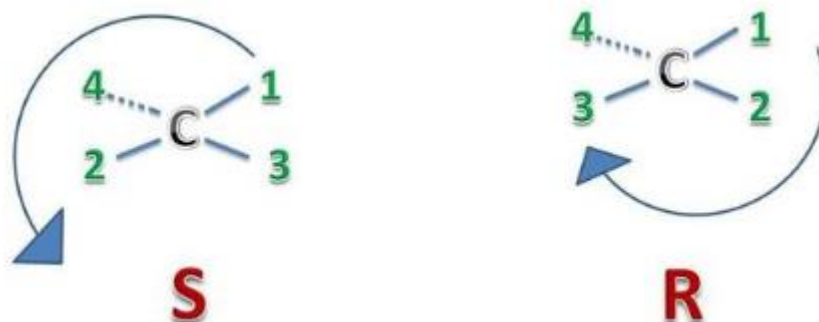
### 1.1.2 Ψηφιακή Ανακατασκευή του Λιποπεπτιδίου (LP)

Από την αντίδραση σύνθεσης του λιποπεπτιδίου cKK-E12, που παρουσιάστηκε στην Παράγραφο 1.4.4.1, λαμβάνουμε ένα μίγμα στερεοϊσομερών της επιθυμητής ένωσης. Με τον όρο **στερεοϊσομερή** περιγράφονται τα μόρια που είναι πανομοιότυπα ως προς την ατομική σύσταση και σύνδεση, αλλά διαφέρουν στην τρισδιάστατη διάταξη των ατόμων τους.

Επιπλέον, ένα μόριο που δεν είναι πανομοιότυπο με το κατοπτρικό του είδωλο αποτελεί μία ειδική κατηγορία στερεοϊσομερούς και καλείται εναντιομερές ή χειρόμορφο. Τα εναντιομερή σχετίζονται μεταξύ τους όπως το δεξί χέρι σχετίζεται με το αριστερό. Ο συνηθέστερος λόγος στον οποίο οφείλεται η εναντιομέρεια στα οργανικά μόρια είναι η παρουσία ενός ατόμου άνθρακα δεσμικά συνδεδεμένου με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες. Τέτοιου είδους άνθρακες αποτελούν τα ασύμμετρα ή στερεογονικά κέντρα



[John McMurry, 1996]. Ανάλογα την τρισδιάστατη διάταξη των ατόμων, ένα στερεογονικό κέντρο μπορεί να έχει απεικόνιση R ή S (Σχήμα 1.4).



**Σχήμα 1.4** Τετραεδρικό άτομο άνθρακα και το κατοπτρικό είδωλό του. Τα δύο είδωλα δεν συμπίπτουν μεταξύ τους για τον ίδιο λόγο που το αριστερό χέρι δεν συμπίπτει με το δεξί. Σύμφωνα με τους κανόνες προτεραιότητας για τον προσδιορισμό της απεικόνισης το αριστερό άτομο έχει στερεοαπεικόνιση S, ενώ το δεξί στερεοαπεικόνιση R.

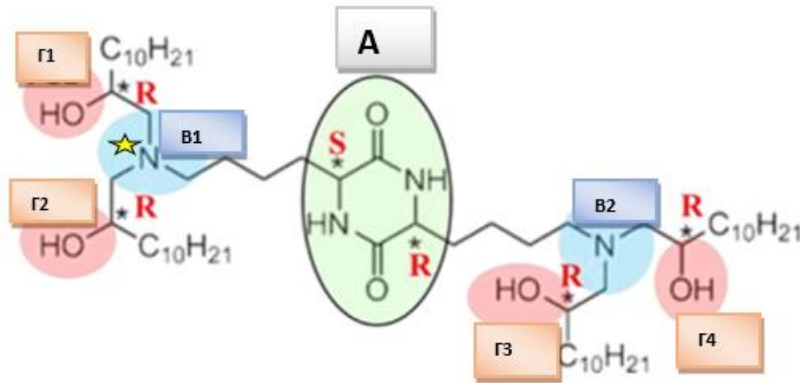
Τα στερεοϊσομερή έχουν ταυτόσημες φυσικές και χημικές ιδιότητες, όπως η διαλυτότητα και τα σημεία ζέσεως και τήξεως, αλλά μπορεί να έχουν διαφορετικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες (απορρόφηση, κατανομή, βιομετατροπή και απέκκριση) και διαφορετικά φαρμακολογικά ή τοξικολογικά αποτελέσματα.<sup>45</sup> Για παράδειγμα, η ιβουπροφαίνη περιέχει ένα στερεογονικό κέντρο αλλά μόνο το S εναντιομερές εμφανίζει αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, χρήσιμη στη θεραπεία των ρευματισμών.<sup>46</sup> Ακόμη, καθαρά εναντιομερή φαρμακευτικών παραγόντων που στοχεύουν τη διπλή έλικα του DNA παρουσιάζουν διαφορετική επίδοση ως προς την εκλεκτικότητα<sup>47</sup> και τη χημειοθεραπευτική<sup>48</sup> αποτελεσματικότητά τους. Επομένως, είναι προφανές πως η στερεοϊσομερεία έχει μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη των φαρμάκων και για αυτόν το σκοπό στην παρούσα εργασία αποφασίστηκε να μελετηθούν δύο διαφορετικά στερεοϊσομερή του λιποπεπτιδίου cKK-E12 για την διερεύνηση τυχόν διαφορών στην αλληλεπίδρασή του με το μόριο siRNA.

Το λιποπεπτίδιο (LP) cKK-E12 (μοριακός τύπος:  $C_{60}H_{120}N_4O_6$ ) περιλαμβάνει έναν κυκλικό δακτύλιο διπεπτιδίου (Σχήμα 1.5, **A**), που αποτελείται από έναν ετεροκυκλικό εξαμελή δακτύλιο, ο οποίος περιέχει δύο ομάδες πολικών αμιδίων. Στον δακτύλιο προσκολώνται δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες οι οποίες καταλήγουν σε μια ομάδα τριτοταγούς αμίνης (Σχήμα 1.5, **B1** και **B2**). Δύο λιπιδικές ουρές διακλαδίζονται από κάθε αμίνη. Οι ουρές τροποποιούνται χημικά μέσω των χαρακτηριστικών ομάδων υδροξυλίου (**G1**, **G2**, **G3**, **G4**). Στο ελεύθερο άκρο των ουρών εντοπίζονται ομάδες μεθυλίου.

Το λιποπεπτίδιο παρουσιάζει έξι στερεογονικά κέντρα και πιο συγκεκριμένα παρουσιάζει δύο ασύμμετρους άνθρακες στο δακτύλιο A και τέσσερις ασύμμετρους άνθρακες στις λιπιδικές ουρές (Σχήμα 1.5). Τα δύο στερεοϊσομερή του cKK-E12 που μοντελοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθούν στην παρούσα εργασία, κωδικοποιούνται εδώ ως εξής:

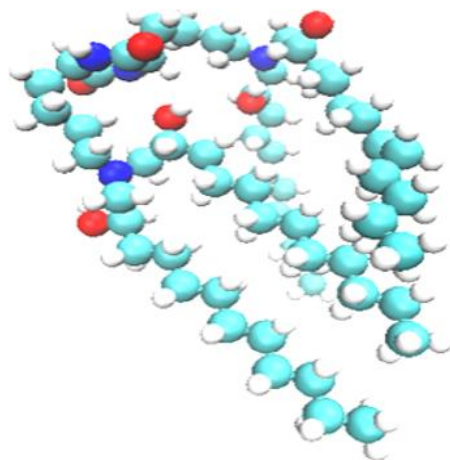
- i. LP\_A : απόλυτες διαμορφώσεις S, R για τους άνθρακες στο δακτύλιο και R για τους τέσσερις ασύμμετρους άνθρακες στις ουρές
- ii. LP\_B : απόλυτες διαμορφώσεις S και για τους έξι ασύμμετρους άνθρακες

Κατά την πειραματική διαδικασία<sup>37</sup>, η πρόσδεση του με το siRNA πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες, όπου οι μισές από τις τριτοταγείς αμίνες του λιποπεπτιδίου είναι πρωτονιωμένες. Για αυτόν το λόγο και στα δύο στερεοϊσομερή LP το άτομο αζώτου N3 είναι πρωτονιωμένο. Στο Σχήμα 1.5, η θετικά φορτισμένη αμίνη επισημαίνεται με κίτρινο αστερίσκο.



**Σχήμα 1.5** Δομή Λιποπεπτιδίου LP\_A με στερεοαπεικόνιση S και R για τους άνθρακες του δακτυλίου, και R στερεοδιαμόρφωση για τους τέσσερις άνθρακες στις ουρές. Με κίτρινο αστερίσκο επισημαίνεται η θετικά φορτισμένη αμίνη.

Για τις μοριακές προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το ψηφιακό μοντέλο του λιποπεπτιδίου, το οποίο δημιουργήθηκε *de novo* από την ερευνητική ομάδα ENGIMATER της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου<sup>49</sup>. Η οπτικοποίησή του μέσω του προγράμματος VMD φαίνεται στο Σχήμα 1.6:



**Σχήμα 1.6** Δομή του λιποπεπτιδίου cKK-E12. Με κυανό χρώμα απεικονίζονται οι άνθρακες, με λευκό τα υδρογόνα, με κόκκινο τα οξυγόνα και με μπλε τα άζωτα.

## 1.2 Συστήματα προσομοίωσης

Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για την καταγραφή της χρονικής εξέλιξης της διαμόρφωσης του siRNA και του λιποπεπτιδίου. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο  $(N, P, T)$ , όπου  $N$  ο συνολικός αριθμός των ατόμων του συστήματος,  $P$  η πίεση και  $T$  η θερμοκρασία. Προσομοιώθηκαν τα εξής συστήματα:

- i. **Σύστημα A:** siRNA – LP\_A σε νερό, παρουσία ιόντων  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$
- ii. **Σύστημα B:** siRNA – LP\_B σε νερό, παρουσία ιόντων  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$

Η θερμοκρασία και η πίεση των συστημάτων ρυθμίστηκαν ώστε να προσομοιώνουν τις συνθήκες στον ανθρώπινο οργανισμό,  $T = 310 \text{ K}$  και  $P = 1 \text{ bar}$ . Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας οι τροχιές της μοριακής δυναμικής είχαν χρονική διάρκεια 100 ns.

### 1.2.1 Πεδίο δυνάμεων και παράμετροι μοριακής δυναμικής

Στην στατιστικομηχανική θεώρηση η δυναμική ενέργεια  $V$  ενός συστήματος αλληλεπιδρώντων σωματιδίων (ατόμων) υπολογίζεται από μια συνάρτηση που περιλαμβάνει όρους για τον υπολογισμό των δεσμικών και των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Η μορφή της συνάρτησης αυτής και οι τιμές των παραμέτρων που περιέχει αναφέρονται ως **πεδίο δυνάμεων** (force field).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το πεδίο δυνάμεων AMBER το οποίο δίνεται από τη σχέση:

$$V = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left( \frac{4\epsilon\sigma_{ij}^{12}}{R_{ij}^{12}} - \frac{4\epsilon\sigma_{ij}^6}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right) \quad [1.1]$$

Στην παραπάνω εξίσωση οι πρώτοι τρεις όροι αναφέρονται σε δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Ο πρώτος όρος αποτελεί εξίσωση αρμονικού δυναμικού και περιγράφει τη δόνηση των δεσμών γύρω από τη θέση ισορροπίας. Ο δεύτερος όρος περιγράφει την κάμψη των γωνιών και ο τρίτος περιγράφει την ενέργεια από τις αλληλεπιδράσεις που προκύπτουν από τις μεταβολές των διέδρων γωνιών. Οι σταθερές  $K_r$ ,  $K_\theta$ ,  $V_n$  εξαρτώνται από τα άτομα που συμμετέχουν στο δεσμό, στη γωνία ή τη διέδρη γωνία αντιστοίχως. Ο τελευταίος όρος περιγράφει τις μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτοι όροι εκφράζουν το δυναμικό Lennard-Jones για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων van der Waals, και ο τελευταίος όρος αποτελεί έκφραση του νόμου Coulomb για την ηλεκτροστατική ενέργεια λόγω των μερικών φορτίων των ατόμων.

Συγκεκριμένα, για το μόριο siRNA χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων AMBERff94<sup>50</sup>, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε προσομοιώσεις με νουκλεϊκά οξέα, ενώ για το νερό χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων TIP3P, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε προσομοιώσεις ενυδάτωσης νουκλεϊκών οξέων μαζί με το πεδίο δυνάμεων AMBER<sup>51</sup>. Όσον αφορά το λιποπεπτίδιο cKK-E12, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμο πεδίο δυνάμεων ειδικά για λιποπεπτίδια, επιλέχθηκε το πεδίο δυνάμεων AMBER99sb-ildn για τους τύπους των ατόμων, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για προσομοιώσεις πεπτιδίων και νουκλεϊκών οξέων, ενώ για τα μερικά φορτία χρησιμοποιήθηκε το OPLS-AA. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην αναφορά (49).

Η διεξαγωγή των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο GROMACS 2016.1<sup>52</sup>, μέσω του οποίου έγινε αριθμητική ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης για όλους τους βαθμούς ελευθερίας των συστημάτων με τη χρήση των παραπάνω πεδίων δυνάμεων.

### 1.2.2 Προσομοιούμενο χωρίο και Περιοδικές οριακές συνθήκες

Όπως έχει αναφερθεί και στην Παράγραφο II.1.1, τα άτομα του προς προσομοίωση συστήματος τοποθετούνται σε ένα χωροπληρωτικό κουτί, το οποίο περιβάλλεται από αντίγραφα του εαυτού του με σκοπό την δημιουργία του συστήματος στο χώρο. Ως χωροπληρωτικά κουτιά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κουτιά διαφορετικού σχήματος, όπως ο κύβος, το κόλουρο οκτάεδρο ή το ρομβικό δωδεκάεδρο. Για τη συγκεκριμένη προσομοίωση επιλέχθηκε το ρομβικό δωδεκάεδρο το οποίο έχει μικρότερο όγκο και εξοικονομεί χρόνο στον επεξεργαστή.

Στη διάρκεια της προσομοίωσης, καθώς ένα μόριο κινείται στο αρχικό κουτί, η περιοδική του εικόνα σε κάθε ένα από τα γειτονικά κουτιά κινείται με ακριβώς τον ίδιο τρόπο. Κατά συνέπεια, όταν ένα μόριο φεύγει προς μια κατεύθυνση εκτός του κεντρικού κουτιού, μία από τις περιοδικές του εικόνες θα μπει μέσα στο αρχικό κεντρικό από την αντίθετη πλευρά.

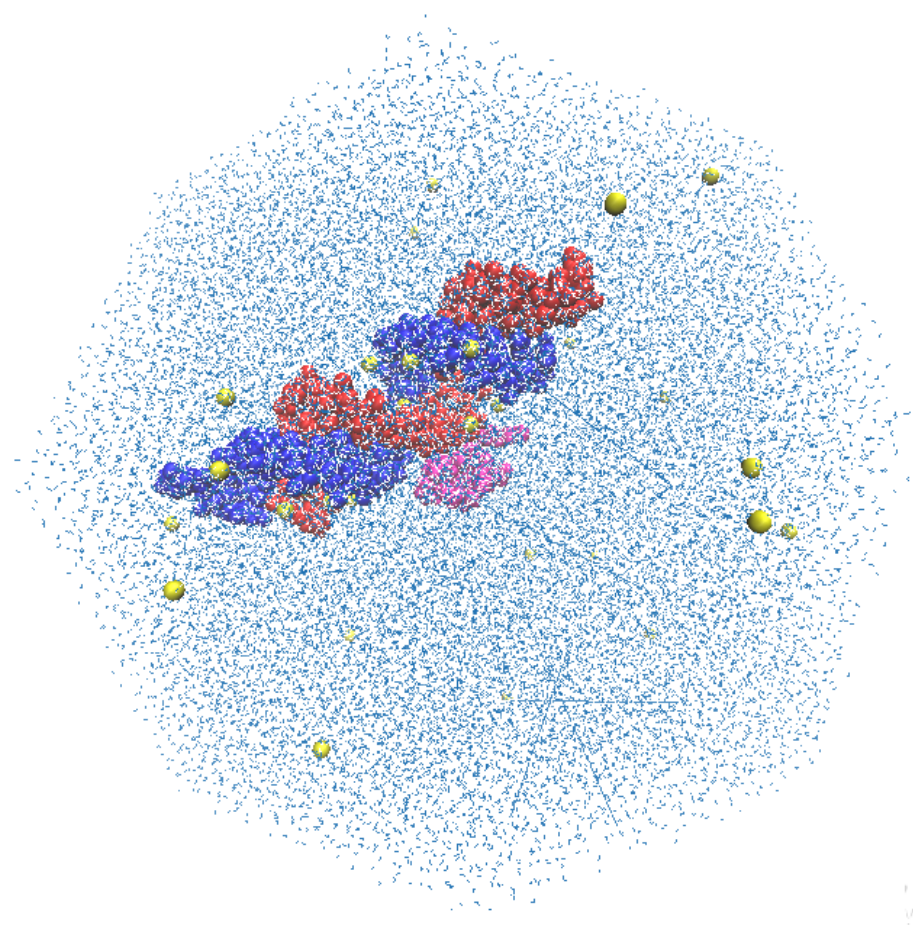
Αφού επιλεγθεί το σχήμα του κουτιού το οποίο περιέχει τα μόρια του siRNA και του λιποπεπτιδίου, στη συνέχεια προστίθεται νερό ως διαλύτης. Στο προσομοιούμενο σύστημα το λιποπεπτίδιο έχει θετικό φορτίο, ενώ το siRNA αρνητικό ως νουκλεϊκό οξύ. Ως αποτέλεσμα, το φορτίο του συστήματος δεν είναι ουδέτερο και μόρια νερού (που επιλέγονται τυχαία μέσω γεννήτριας τυχαίων αριθμών) αντικαθίστανται από τον κατάλληλο αριθμό ατόμων Na<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup> προκειμένου το συνολικό φορτίο του συστήματος να είναι ουδέτερο.

Η εφαρμογή των περιοδικών οριακών συνθηκών επιβάλλει τη χρήση της σύμβασης της ελάχιστης απόστασης για τον σωστό υπολογισμό της ενέργειας. Οι διαστάσεις του χωρίου καθορίστηκαν σε κάθε προσομοίωση έτσι ώστε τα μόρια siRNA και λιποπεπτιδίου να καλύπτονται από στρώμα νερού τουλάχιστον 2.0 nm προς κάθε κατεύθυνση. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η παρουσία του κελύφους ενυδάτωσης του δίκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος και η απαραίτητη ποσότητα περιβάλλοντος νερού. Τα δεδομένα για τα δύο προσομοιωμένα συστήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1** Αριθμός ατόμων και μέγεθος χωρίου προσομοίωσης

	Σύστημα A siRNA-LP_A	Σύστημα B siRNA-LP_B
Άτομα siRNA	1394	1394
Άτομα Λιποπεπτιδίου	191	191
Άτομα H <sub>2</sub> O	116868	116931
Άτομα Na <sup>+</sup>	42	42
Άτομα Cl <sup>-</sup>	1	1
Όγκος (nm <sup>3</sup> )	1213.16	1213.16
Πυκνότητα (g/l)	982.26	982.78

Παρακάτω ακολουθεί μια απεικόνιση του Συστήματος Β.



**Σχήμα 1.7** Απεικόνιση του χωρίου προσομοίωσης siRNA-LP σε νερό παρουσία ιόντων. Με γαλάζιες τελείες απεικονίζονται τα μόρια του νερού, με μωβ χρώμα το λιποπεπτίδιο, και με κόκκινο και μπλε οι δύο κλώνοι του siRNA. Με κίτρινες σφαίρες απεικονίζονται τα ιόντα.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα, για το κάθε σύστημα:

**ΒΗΜΑ 1<sup>ο</sup>:** Ελαχιστοποίηση ενέργειας μέσω της μεθόδου *steepest-descent*.

Κατά τη δημιουργία των συστημάτων, τα μόρια του νερού προστέθηκαν με τρόπο που δεν εξασφαλίζει ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με τα γειτονικά τους μόρια, ενώ και τα ιόντα προστέθηκαν μέσω γεννήτριας τυχαίων αριθμών χωρίς να ληφθούν υπόψη τα φορτία των κοντινών τους ατόμων. Ως αποτέλεσμα, το σύστημα πρέπει να φτάσει σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας, διαφορετικά οποιαδήποτε προσομοίωση στη συνέχεια πιθανότατα θα είναι ασταθής. Η μέθοδος ενεργειακής ελαχιστοποίησης που χρησιμοποιείται είναι η *steepest-descent*. Η μέθοδος τερματίζει όταν η μέγιστη δύναμη φτάσει ή ξεπεράσει τα  $10^3 \text{J/mol/nm}$  ή αν πραγματοποιηθούν 50000 δοκιμές με βήμα 0.01 nm .

**ΒΗΜΑ 2°:** Εξισορρόπηση στο κανονικό στατιστικό σύνολο NVT.

Πραγματοποιείται εξισορρόπηση της θερμοκρασίας στο κανονικό στατιστικό σύνολο *NVT* για 1ns με βήμα ολοκλήρωσης 2 fs. Χρησιμοποιήθηκε ο τροποποιημένος θερμοστάτης Berendsen (V-rescale), για τη σύζευξη της θερμοκρασίας, με θερμοκρασία αναφοράς 310 K. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης περιορισμοί κίνησης (restraints) εφαρμόζονται στα άτομα του λιποπεπτιδίου και τα βαριά άτομα του νουκλεϊκού οξέος.

**ΒΗΜΑ 3°:** Εξισορρόπηση στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο NPT.

Πραγματοποιείται εξισορρόπηση της πίεσης και της πυκνότητας του διαλύτη στο στατιστικό σύνολο *NPT* για 2 ns με βήμα ολοκλήρωσης 2 fs. Χρησιμοποιήθηκε ο τροποποιημένος θερμοστάτης Berendsen (V-rescale) για τη σύζευξη της θερμοκρασίας, με θερμοκρασία αναφοράς 310 K και ο βαροστάτης Berendsen για τη σύζευξη της πίεσης με πίεση αναφοράς 1 bar. Η συμπιεστότητα του νερού υπό σταθερή θερμοκρασία τέθηκε ίση με  $4.5e^{-5} \text{bar}^{-1}$ . Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης περιορισμοί κίνησης (restraints) εφαρμόζονται στα άτομα του λιποπεπτιδίου και τα βαριά άτομα του νουκλεϊκού οξέος.

**ΒΗΜΑ 4° :** Προσομοίωση μοριακής δυναμικής (ΜΔ).

Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής είχε χρονική διάρκεια 100 ns και το βήμα ολοκλήρωσης ήταν 2 fs. Χρησιμοποιήθηκε ο τροποποιημένος θερμοστάτης Berendsen (V-rescale) για τη σύζευξη της θερμοκρασίας με θερμοκρασία αναφοράς 310 K και ο βαροστάτης Berendsen για τη σύζευξη της πίεσης με πίεση αναφοράς 1 bar και η συμπιεστότητα του νερού υπό σταθερή θερμοκρασία τέθηκε ίση με  $4.5e^{-5} \text{bar}^{-1}$ . Στα τρεξίματα μοριακής δυναμικής οι περιορισμοί κίνησης που επιβλήθηκαν κατά την εξισορρόπηση αίρονται.

Η ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης έγινε με τον αλγόριθμο leap-frog.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα δεδομένα που αφορούν το χρόνο προσομοίωσης, το μέγεθος του κάθε συστήματος (αριθμός ατόμων), το βήμα ολοκλήρωσης (dt), ο αριθμός επαναληπτικών βημάτων της ολοκλήρωσης (n steps) και η συχνότητα καταγραφής της τροχιάς για τα δύο συστήματα.

**Πίνακας 1.2** Δεδομένα προσομοίωσης για τις εξισορροπήσεις του συστήματος A στο στατιστικό σύνολο NVT, NPT και για την κύρια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ) στο στατιστικό σύνολο NPT.

Σύστημα A siRNA-LP_A	NVT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	NPT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΔ
Χρόνος προσομοίωσης	1 ns	2 ns	100 ns
Μέγεθος Συστήματος	118496	118496	118496
Βήμα ολοκλήρωσης (dt)	0.002 ps = 2 fs	0.002 ps =2 fs	0.002 ps =2 fs
Αριθμός βημάτων (nsteps)	500000	1000000	50000000
Καταγραφή τροχιάς ανά	10 ps	10 ps	10 ps

**Πίνακας 1.3** Δεδομένα προσομοίωσης για τις εξισορροπήσεις του συστήματος B στο στατιστικό σύνολο NVT, NPT και για την κύρια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ) στο στατιστικό σύνολο NPT.

Σύστημα B siRNA-LP_B	NVT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	NPT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΔ
Χρόνος προσομοίωσης	1 ns	2 ns	100 ns
Μέγεθος Συστήματος	118559	118559	118559
Βήμα ολοκλήρωσης (dt)	0.002 ps = 2 fs	0.002 ps =2 fs	0.002 ps =2 fs
Αριθμός βημάτων (nsteps)	500000	1000000	50000000
Καταγραφή τροχιάς ανά	10 ps	10 ps	10 ps

### 1.3 Υπολογιστική Επίδοση Μοριακών Προσομοιώσεων (Performance)

Τα τρεξίματα των μοριακών προσομοιώσεων διεξήχθησαν στη συστοιχία υπολογιστών (cluster) “Pericles” της ερευνητικής ομάδας ENGIMATER του Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, με επικεφαλής τον Καθηγητή Γ. Κ. Παπαδόπουλο. Χρησιμοποιήθηκαν εξυπηρετητές 1950 Servers QUAD Core–Intel XEON E5430 @ 2.66 GHz, 64 Gb Memory. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα δεδομένα για την υπολογιστική επίδοση των προσομοιώσεων: ο χρόνος προσομοίωσης, οι κόμβοι, οι πυρήνες CPU ανά κόμβο και ο χρόνος εκτέλεσης (wall time).

**Πίνακας 1.4** Δεδομένα υπολογιστικής επίδοσης για την εκτέλεση της προσομοίωσης του συστήματος A.

Σύστημα A siRNA-LP_A	NVT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	NPT ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΔ
Χρόνος προσομοίωσης	1 ns	2 ns	100 ns
Κόμβοι (nodes)	6	6	6
Πυρήνες ανά κόμβο	8	8	8
Σύνολο πυρήνων	48	48	48
Wall time	3h 04min 32s	6h 23min 08s	13d 8h 50min 36s
Υπολογιστική επίδοση	7.803 ns/day 3.07 hours/ns	7.517 ns/day 3.19 hours/ns	7.480 ns/day 3.21 hours/ns

**Πίνακας 1.5** Δεδομένα υπολογιστικής επίδοσης για την εκτέλεση της προσομοίωσης του συστήματος B.

Σύστημα B siRNA-LP_B	NVTEΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	NPTEΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ	ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΔ
Χρόνος προσομοίωσης	1 ns	2 ns	100 ns
Κόμβοι (nodes)	5	5	5
Πυρήνες ανά κόμβο	8	8	8
Σύνολο πυρήνων	40	40	40
Wall time	3h 15min 11s	6h 29 min 00s	13d 11h 11min 23s
Υπολογιστική επίδοση	7.378 ns/day 3.25 hours/ns	7.403 ns/day 3.24 hours/ns	7.426 ns/day 3.23 hours/ns

## 2. Αποτελέσματα Εξισορρόπησης Συστημάτων Προσομοίωσης

### 2.1 Ενεργειακή Ελαχιστοποίηση Συστημάτων

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε ενεργειακή ελαχιστοποίηση των δύο συστημάτων στο νερό παρουσία ιόντων. Η **δυναμική ενέργεια**,  $V$ , έχει αρνητικό πρόσημο και η τάξη μεγέθους της κυμαίνεται ανάλογα με το σύστημα και τα εμπλεκόμενα μόρια. Ακόμα η μέγιστη δύναμη,  $F_{max}$ , έχει οριστεί στα  $1000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-1}$  και επομένως δεν μπορεί να ξεπεραστεί αυτή η τιμή.

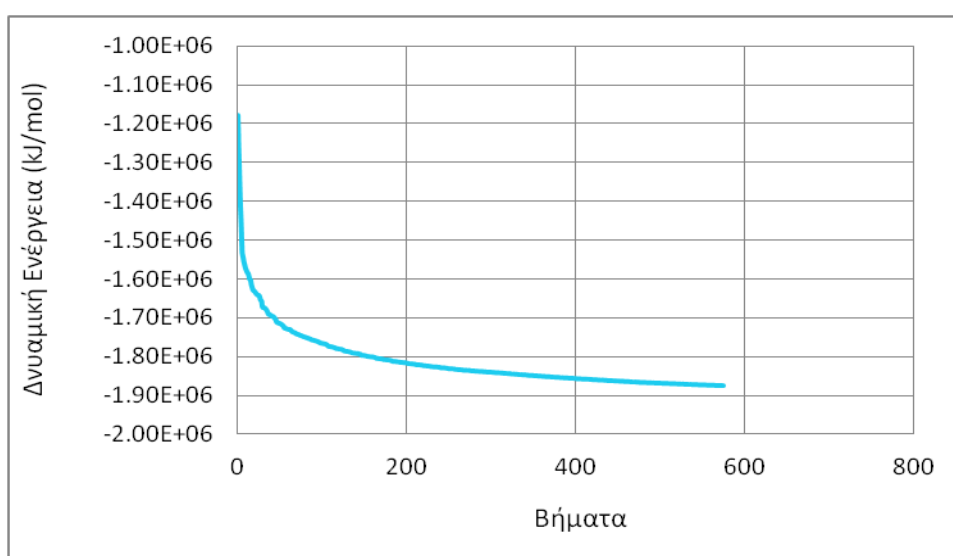
Τα αποτελέσματα της ενεργειακής ελαχιστοποίησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.



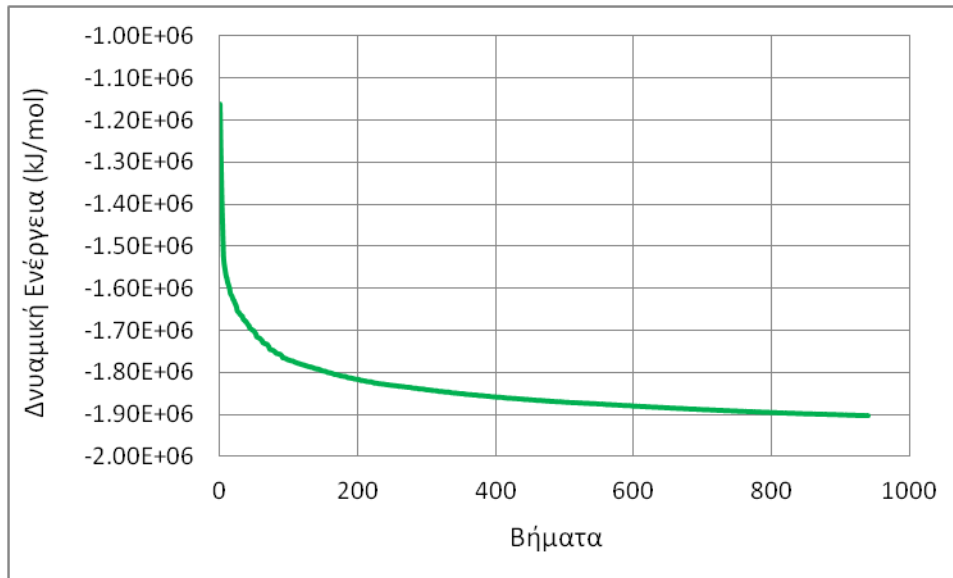
**Πίνακας 2.1** Αποτελέσματα ενεργειακής ελαχιστοποίησης για τα δύο συστήματα.

Ενεργειακή Ελαχιστοποίηση	Σύστημα A siRNA-LP_A	Σύστημα B siRNA-LP_B
Βήματα	576	941
Δυναμική Ενέργεια ( $\text{kJ/mol}$ )	-1.874e+06	-1.902e+06
Μέγιστη Δύναμη ( $\text{kJmol}^{-1}\text{nm}^{-1}$ )	849.9 στο άτομο 877	811.2 στο άτομο 434

Στη συνέχεια ακολουθούν το Σχήμα 2.1 και Σχήμα 2.2, στα οποία παρουσιάζεται η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας κατά την εξέλιξη της ενεργειακής ελαχιστοποίησης για τα δύο συστήματα.



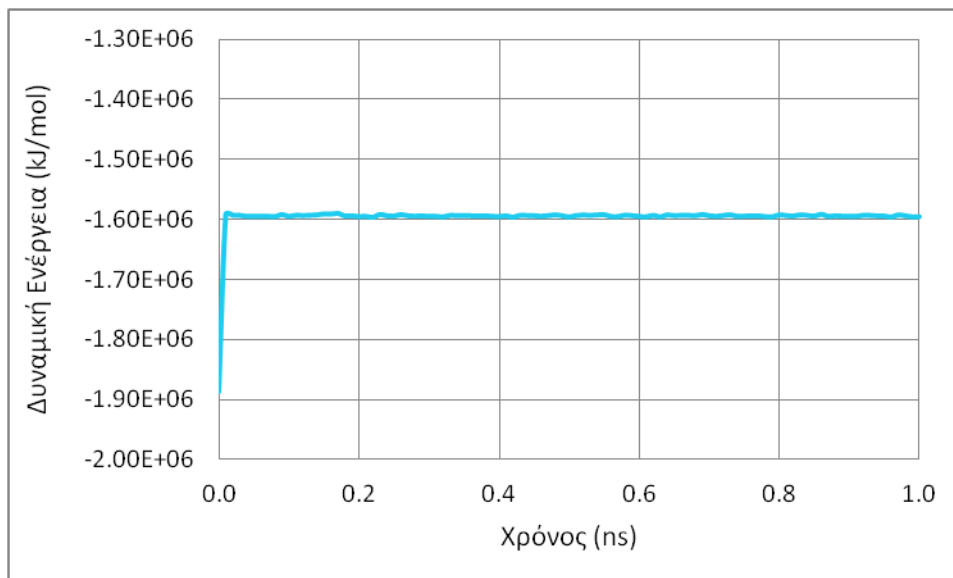
**Σχήμα 2.1** Μεταβολή της δυναμικής ενέργειας κατά την ενεργειακή ελαχιστοποίηση συστήματος siRNA-LP\_A.



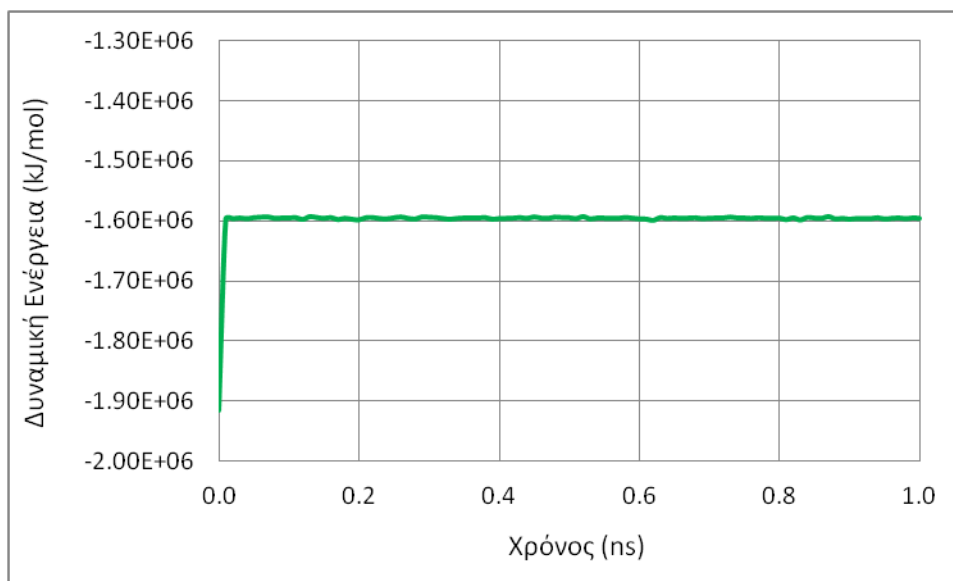
**Σχήμα 2.2** Μεταβολή της δυναμικής ενέργειας κατά την ενεργειακή ελαχιστοποίηση συστήματος siRNA-LP\_B.

## 2.2 Εξισορρόπηση Συστημάτων στο NVT σύνολο

Ακολούθησε εξισορρόπηση στο κανονικό στατιστικό σύνολο NVT. Η χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3 και Σχήμα 2.4 για τα δύο συστήματα. Τα δεδομένα έχουν καταγραφεί ανά 10ps της τροχιάς.



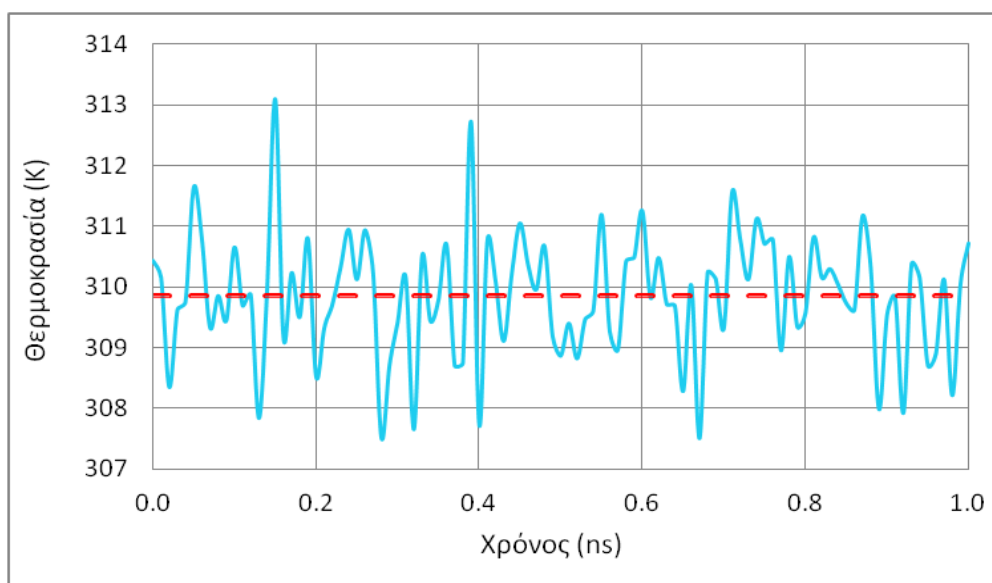
**Σχήμα 2.3** Χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας κατά την εξισορρόπηση NVT για το σύστημα siRNA-LP\_A.



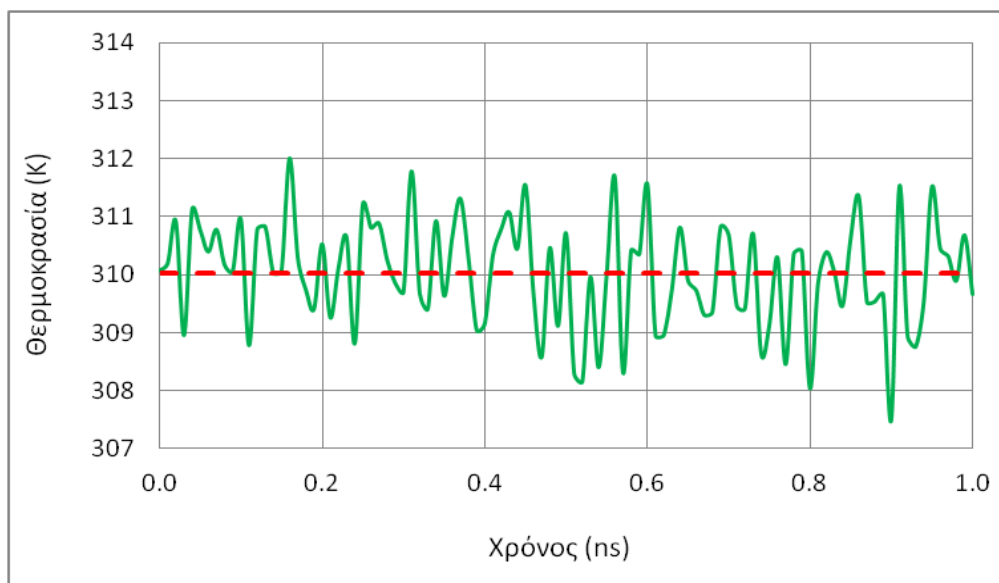
**Σχήμα 2.4** Χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας κατά την εξισορρόπηση NVT για το σύστημα siRNA-LP\_B.

Υπολογίζεται η μέση τιμή της δυναμικής ενέργειας για τα δύο συστήματα μετά τα 0.1 ns. Για το σύστημα siRNA-LP\_A η μέση δυναμική ενέργεια υπολογίστηκε στα  $-1593358.879 \pm 1263.98 \text{ kJ/mol}$ , ενώ για το δεύτερο στα  $-1594389.646 \pm 1215.82 \text{ kJ/mol}$ .

Ακόμα παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της θερμοκρασίας για τα δύο συστήματα στο Σχήμα 2.5 και Σχήμα 2.6. Η μέση τιμή της θερμοκρασίας για το πρώτο σύστημα υπολογίστηκε στα  $309.85 \pm 1.02 \text{ K}$ , ενώ για το δεύτερο στα  $310.02 \pm 0.93 \text{ K}$ .



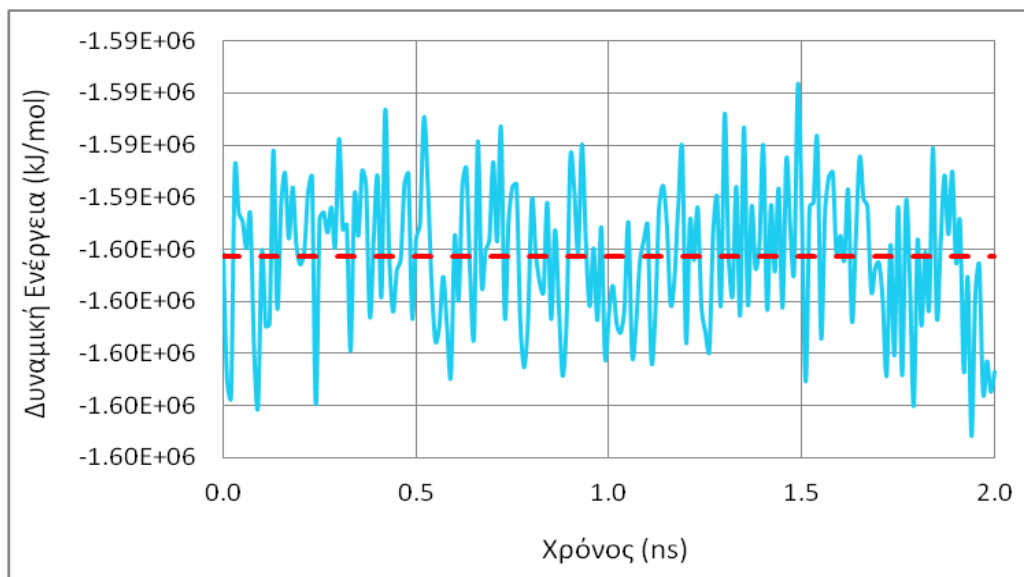
**Σχήμα 2.5** Χρονική εξέλιξη της θερμοκρασίας κατά την εξισορρόπηση NVT για το σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών θερμοκρασίας.



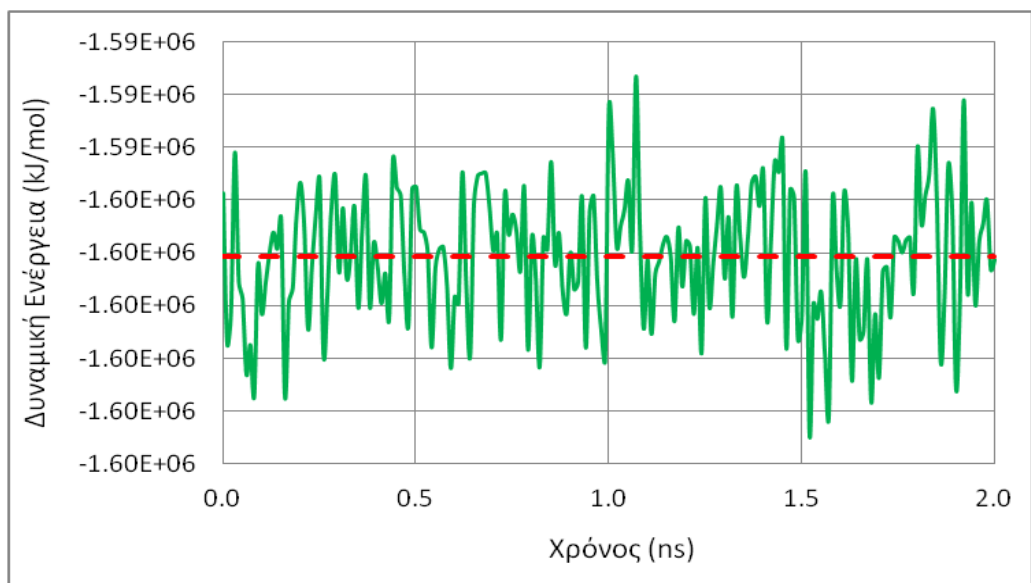
**Σχήμα 2.6** Χρονική εξέλιξη της θερμοκρασίας κατά την εξισορρόπηση NVT για το σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών θερμοκρασίας.

### 2.3 Εξισορρόπηση Συστημάτων στο NPT σύνολο

Η εξισορρόπηση των συστημάτων στο NPT σύνολο είχε χρονική διάρκεια 2 ns, για πίεση αναφοράς  $P=1$  bar και θερμοκρασία αναφοράς  $T=310$  K. Στο Σχήμα 2.7 και Σχήμα 2.8 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας. Η μέση τιμή της ενέργειας για το πρώτο σύστημα υπολογίστηκε στα  $-1595132.055 \pm 1366.22$  kJ/mol και για το δεύτερο  $-1596075.194 \pm 1243.43$  kJ/mol.

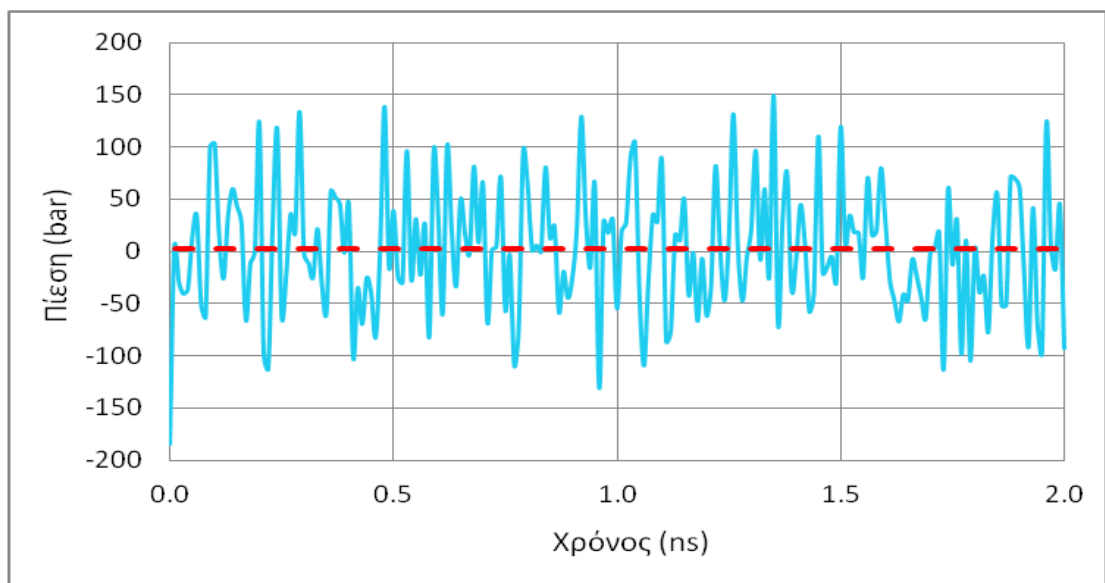


**Σχήμα 2.7** Χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών δυναμικής ενέργειας.

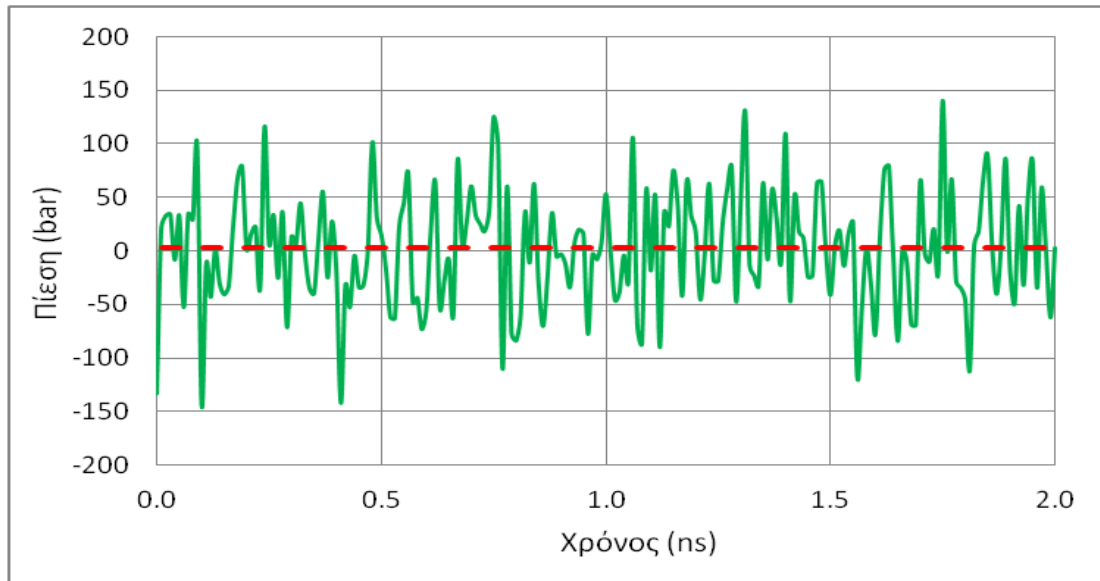


**Σχήμα 2.8** Χρονική εξέλιξη της δυναμικής ενέργειας κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών δυναμικής ενέργειας.

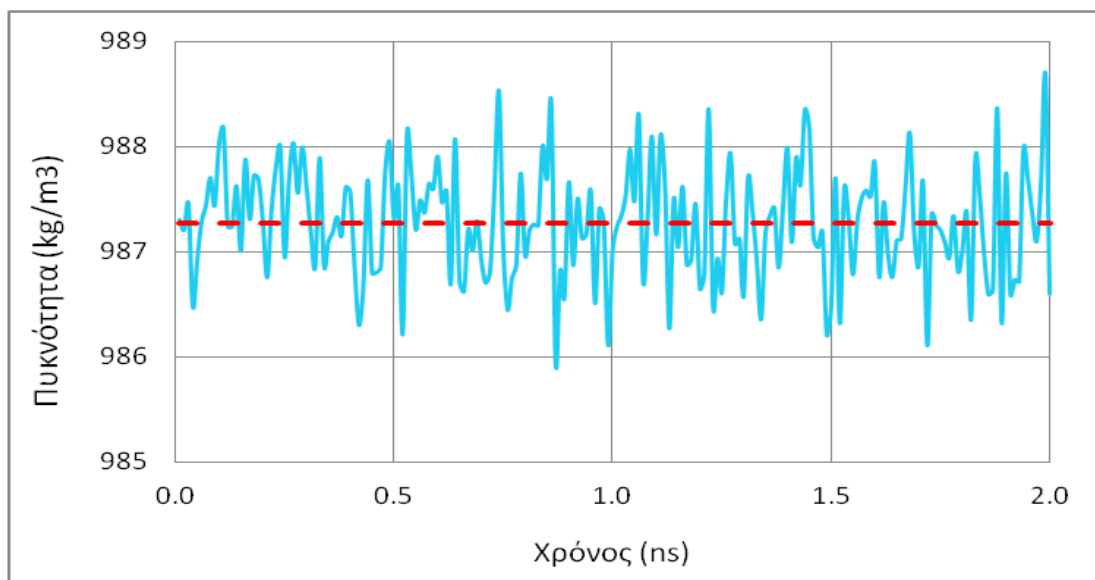
Ακόμα παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της πίεσης, αλλά και της πυκνότητας για τα δύο συστήματα στο Σχήμα 2.9 έως Σχήμα 2.12 που ακολουθούν. Η μέση πίεση για το πρώτο σύστημα υπολογίστηκε στα  $1.117 \pm 0.57$  bar, ενώ για το δεύτερο  $0.742 \pm 0.41$  bar. Η μέση πυκνότητα μετρήθηκε στα  $987.27 \pm 0.53$  kg/m<sup>3</sup> και  $987.37 \pm 0.54$  kg/m<sup>3</sup>, αντιστοίχως.



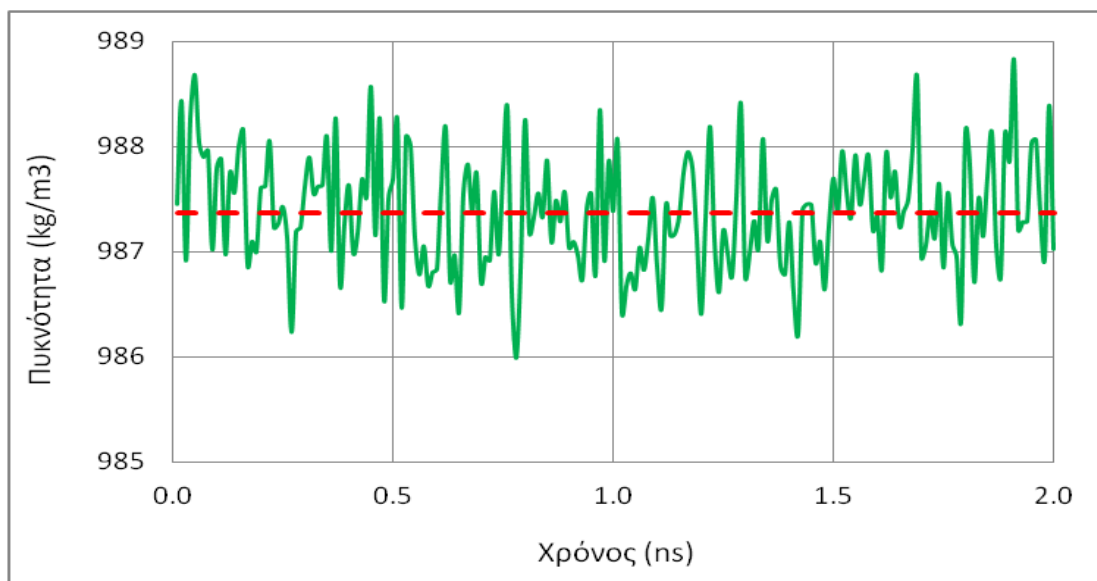
**Σχήμα 2.9** Χρονική εξέλιξη της πίεσης κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών πίεσης.



**Σχήμα 2.10** Χρονική εξέλιξη της πίεσης κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών πίεσης.



**Σχήμα 2.11** Χρονική εξέλιξη της πυκνότητας κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών πυκνότητας.



**Σχήμα 2.12** Χρονική εξέλιξη της πυκνότητας κατά την εξισορρόπηση NPT για το σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών πυκνότητας.

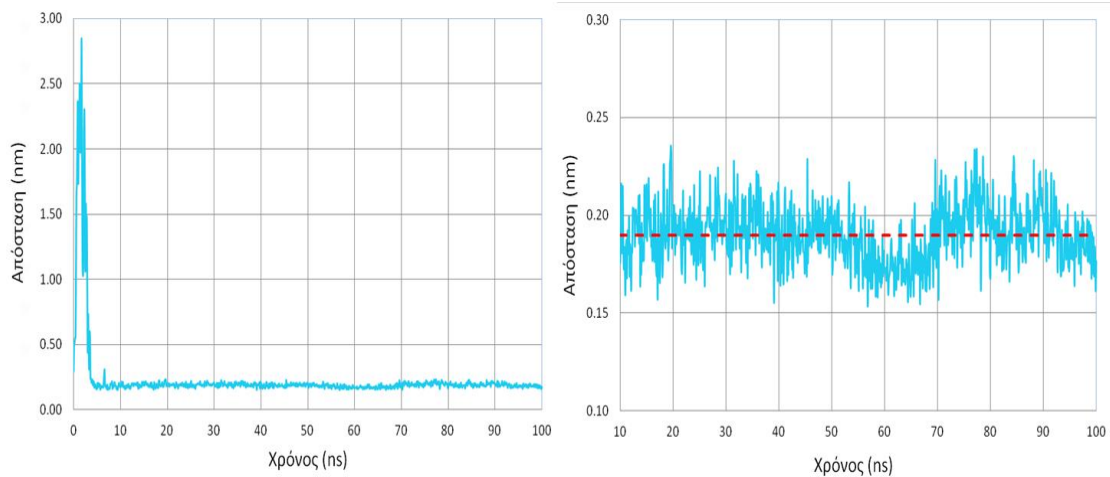
### 3. Αποτελέσματα Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μετεπεξεργασία και ανάλυση των τροχιών, οι οποίες παρήχθησαν από τις προσομοιώσεις ΜΔ, για τα δύο συστήματα. Οι τροχιές αυτές έχουν χρονική διάρκεια 100 ns και τα μεγέθη που παρουσιάζονται στις επόμενες παραγράφους έχουν εξαχθεί από την ανάλυση της τροχιάς για τιμές καταγραφής ανά 100 ps, οι οποίες αντιστοιχούν σε 1001 χρονικά στιγμιότυπα της τροχιάς.

#### 3.1 Απόσταση siRNA-LP

Αρχικά εξετάστηκε η σχετική θέση του λιποπεπτιδίου με το siRNA, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν επιτυγχάνεται η σύνδεση μεταξύ των δύο βιομορίων. Υπολογίστηκε η **ελάχιστη απόσταση** μεταξύ των ατόμων του siRNA και των ατόμων του λιποπεπτιδίου, για κάθε χρονική στιγμή της τροχιάς. Θεωρούμε ότι για αποστάσεις μικρότερες των 0.4 nm επιτυγχάνεται η σύνδεση.

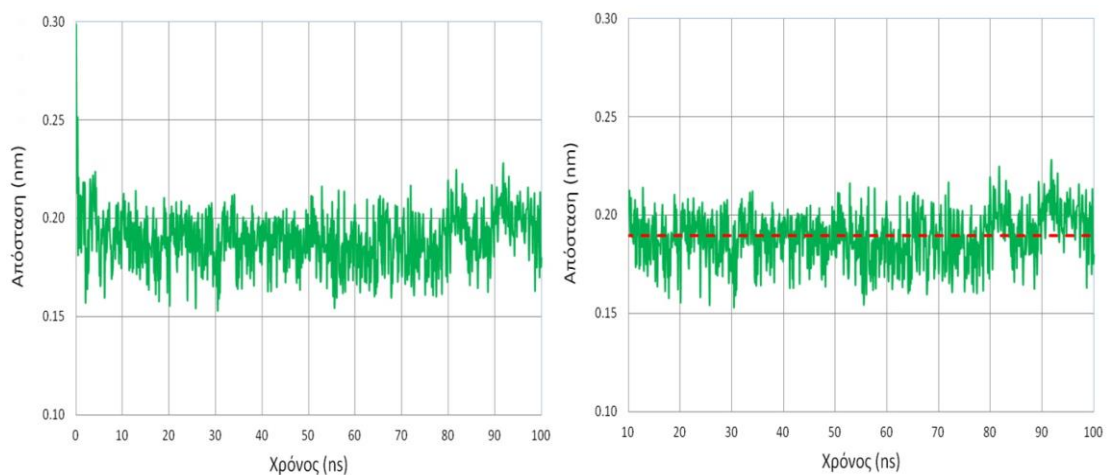
Τα αποτελέσματα για το πρώτο σύστημα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1, όπου απεικονίζεται η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ του λιποπεπτιδίου LP\_A και του μορίου siRNA για όλη τη διάρκεια της τροχιάς (αριστερά) και για χρόνο 10 έως 100 ns (δεξιά), διάστημα στο οποίο έχει επιτευχθεί η πρόσδεση των δύο βιομορίων.



**Σχήμα 3.1** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ του λιποπεπτιδίου LP\_A και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A για όλη τη διάρκεια της τροχιάς (αριστερά), και για χρόνο 10 έως 100 ns (δεξιά). Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται η μέση ελάχιστη απόσταση.

Από το Σχήμα 3.1 διαπιστώνεται ότι πραγματοποιείται η πρόσδεση των δύο βιομορίων. Το λιποπεπτίδιο ενώνεται απευθείας με το siRNA και η σύνδεση διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της τροχιάς. Όπως είναι φανερό, κατά την έναρξη της προσομοίωσης τα δύο βιομόρια είναι αρχικώς απομακρυσμένα και στη συνέχεια η ελάχιστη απόσταση μεταξύ τους μειώνεται δραματικά καθώς το λιποπεπτίδιο προσεγγίζει το siRNA. Θεωρούμε ότι η σύνδεση επιτυγχάνεται μετά τα 10 ns, οπότε υπολογίζεται η μέση ελάχιστη απόσταση από τα 10 ns και έπειτα. Η μέση ελάχιστη απόσταση βρέθηκε ίση με  $0.19 \pm 0.2$  nm.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ του λιποπεπτιδίου LP\_B και του μορίου siRNA στο Σχήμα 3.2.

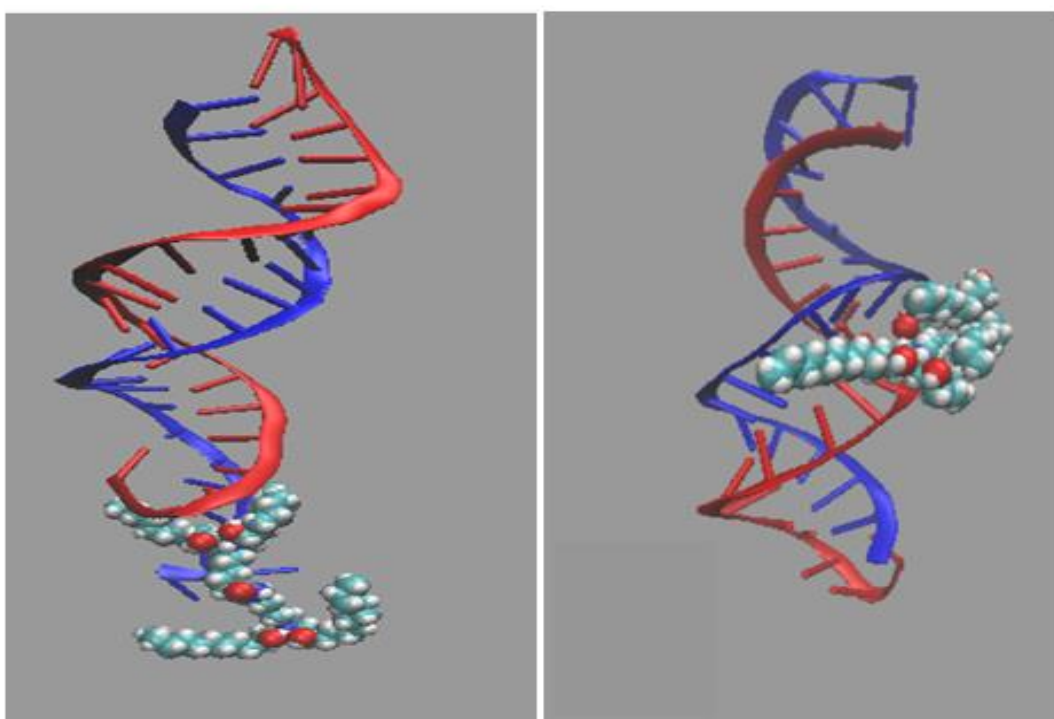


**Σχήμα 3.2** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ του λιποπεπτιδίου LP\_B και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_B για όλη τη διάρκεια της τροχιάς (αριστερά), και για χρόνο 10 έως 100 ns (δεξιά). Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται η μέση ελάχιστη απόσταση.



Σημειώνεται πως και στο δεύτερο σύστημα η πρόσδεση πραγματοποιείται επιτυχώς μεταξύ των δύο βιομορίων και μάλιστα επιτυγχάνεται σε μικρότερους χρόνους σε σχέση με το πρώτο σύστημα. Τα δύο βιομόρια παραμένουν συνδεδεμένα μέχρι το τέλος της τροχιάς. Η μέση τιμή της ελάχιστης απόστασης βρέθηκε ίση με  $0.19 \pm 0.01$  nm, υπολογισμένη στο χρονικό διάστημα 10-100 ns.

Ακόμα παρατηρήθηκε ότι τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια επιλέγουν διαφορετικές περιοχές του siRNA για πρόσδεση μαζί του. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως το πρώτο στερεοϊσομερές LP\_A προσεγγίζει το ελεύθερο 5' άκρο της Έλικας i, ενώ το στερεοϊσομερές LP\_B, προσδένεται στο μέσο του επιμήκους άξονα της διπλής έλικας του siRNA, από την πλευρά της μικρής αύλακας (Σχήμα 3.3). Και οι δύο περιοχές αποτελούν θέσεις πρόσδεσης και στις επόμενες παραγράφους εξετάζεται λεπτομερώς ο μηχανισμός της πρόσδεσης.



**Σχήμα 3.3** Διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης για το LP\_A (αριστερά) και το LP\_B (δεξιά) με το siRNA.

### 3.2 Γυροσκοπική ακτίνα

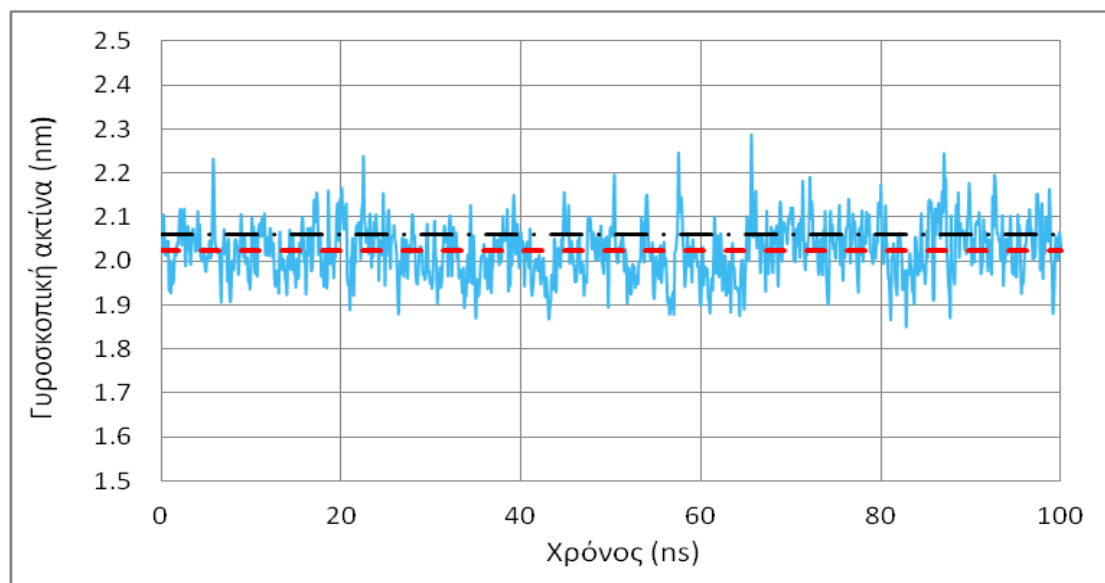
Η αλλαγή της διαμόρφωσης ενός μορίου κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής μπορεί να υπολογιστεί μέσω της **γυροσκοπικής ακτίνας**, η οποία παρέχει ένα μέτρο του πόσο εκτεταμένο ή συρρικνωμένο είναι ένα μόριο. Η γυροσκοπική ακτίνα για ένα μόριο αποτελούμενο από  $N$  άτομα, δίνεται από τη σχέση<sup>53</sup>:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i^N m_i |r_i|^2}{\sum_i^N m_i}} \quad [3.1]$$

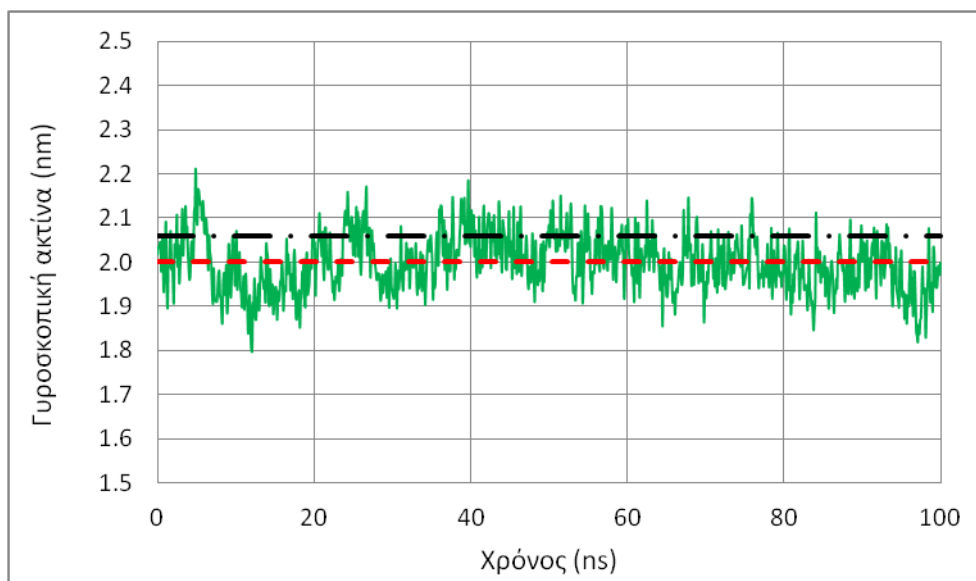
Όπου  $m_i$  είναι η μάζα του ατόμου  $i$  και  $r_i$  το διάνυσμα θέσεως αυτού από το κέντρο μάζας του μορίου σε μια συγκεκριμένη απεικόνιση.

### 3.2.1 Γυροσκοπική ακτίνα siRNA

Υπολογίστηκε η γυροσκοπική ακτίνα του μορίου siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A και siRNA-LP\_B. Στο Σχήμα 3.4 και Σχήμα 3.5 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της κατά τη διάρκεια της τροχιάς για τα δύο συστήματα.



**Σχήμα 3.4** Χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας ( $R_g$ ) του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος όρος της γυροσκοπικής ακτίνας στο σύστημα siRNA-LP\_A, ενώ με μαύρη γραμμή ο μέσος όρος της γυροσκοπικής ακτίνας όταν το siRNA είναι ελεύθερο<sup>49</sup>.



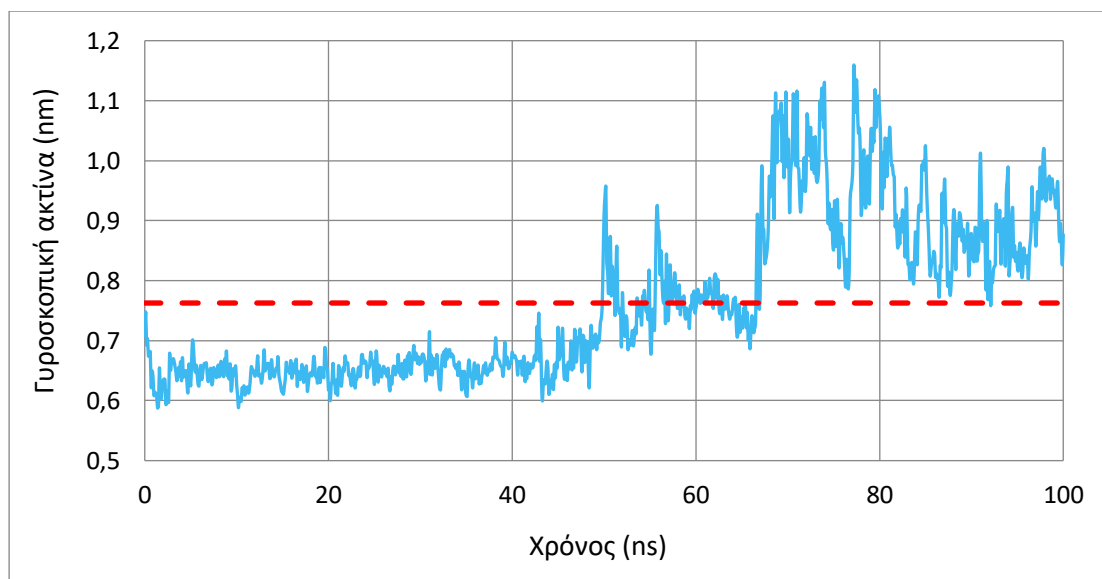
**Σχήμα 3.5** Χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας ( $R_g$ ) του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος όρος της γυροσκοπικής ακτίνας στο σύστημα siRNA-LP\_B, ενώ με μαύρη γραμμή ο μέσος όρος της γυροσκοπικής ακτίνας όταν το siRNA είναι ελεύθερο<sup>49</sup>.

Στο πρώτο σύστημα, siRNA-LP\_A, η μέση τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας είναι  $2.02 \pm 0.06$  nm. Η ελάχιστη τιμή που εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια της τροχιάς ήταν 1.85 nm και η μέγιστη 2.29 nm. Στο δεύτερο σύστημα, siRNA-LP\_B, η μέση γυροσκοπική ακτίνα του siRNA υπολογίζεται στα  $2.00 \pm 0.06$  nm. Η ελάχιστη τιμή που σημειώθηκε κατά τη διάρκεια της τροχιάς ήταν 1.80 nm και η μέγιστη 2.21 nm. Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται ακόμα η μέση τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας του ελεύθερου siRNA, η οποία έχει μετρηθεί από προηγούμενες μελέτες<sup>49</sup> στα  $2.06 \pm 0.08$  nm.

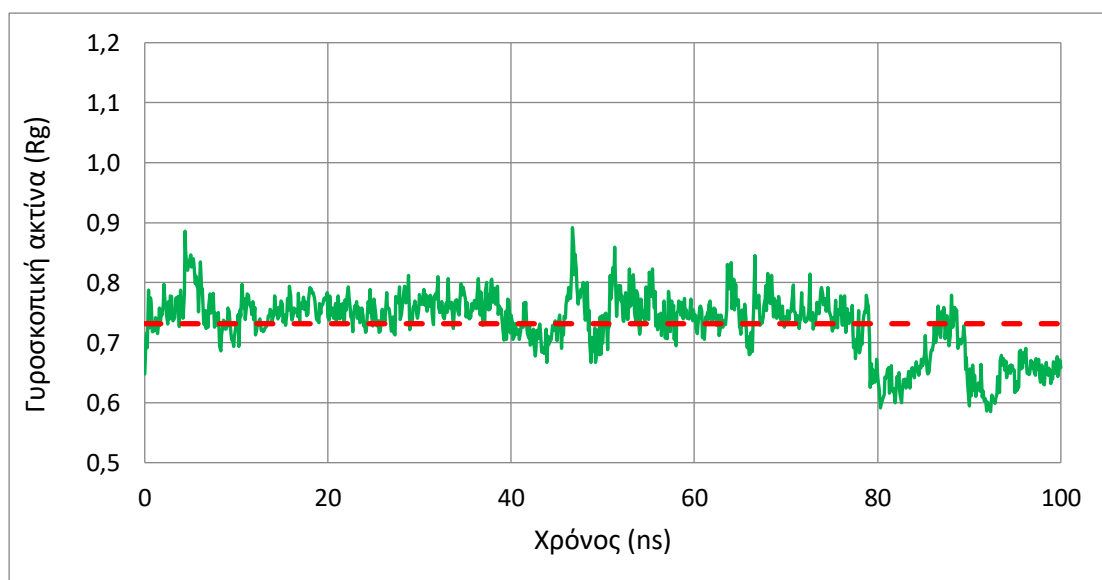
Η μέση τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας που υπολογίστηκε για το ολιγονουκλεοτίδιο ενώ είναι συνδεδεμένο με το λιποπεπτίδιο είναι παρόμοια και στα δύο συστήματα, όπως επίσης και στην περίπτωση που το λιποπεπτίδιο απουσιάζει, δηλαδή στην περίπτωση του ελεύθερου siRNA σε νερό και ιόντα. Αυτό υποδηλώνει ότι στο χρόνο που διαρκεί η προσομοίωση, η διαμόρφωση του siRNA δεν επηρεάζεται από την πρόσδεση του λιποπεπτιδίου και στα δύο συστήματα.

### 3.2.2 Γυροσκοπική ακτίνα λιποπεπτιδίων

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας για τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια LP\_A και LP\_B, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.6 και Σχήμα 3.7.



**Σχήμα 3.6** Χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας ( $R_g$ ) του LP\_A στο σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών.

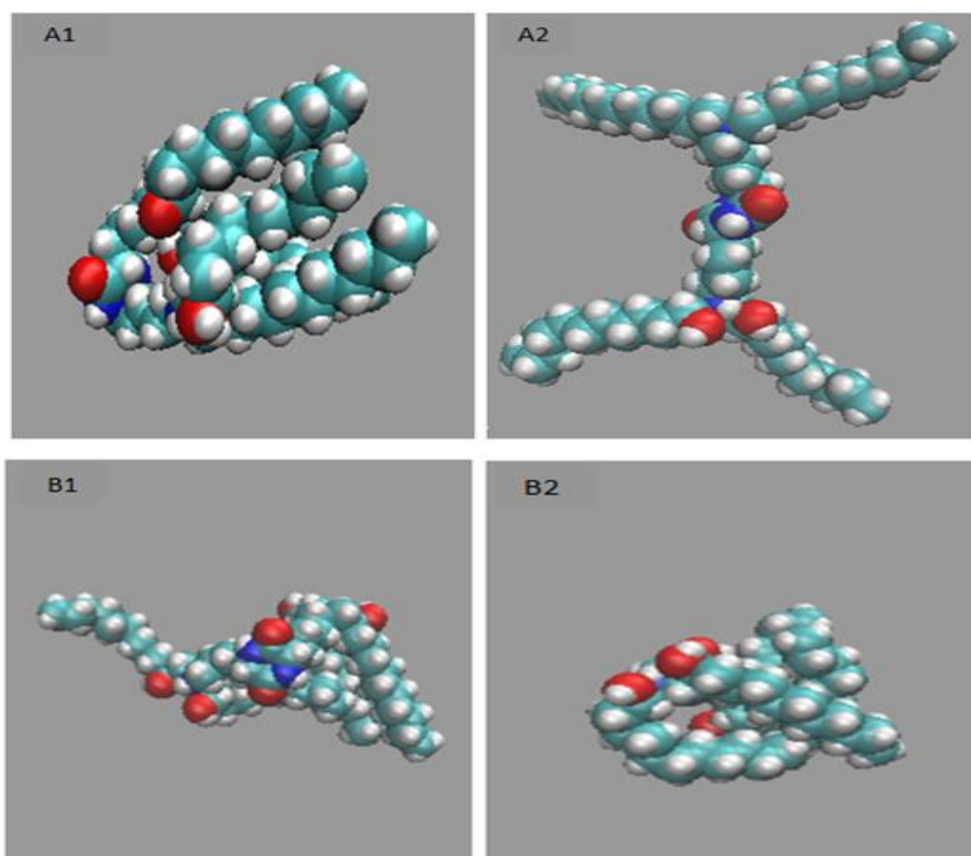


**Σχήμα 3.7** Χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας ( $R_g$ ) του LP\_B στο σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τιμών.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.6, η γυροσκοπική ακτίνα του λιποπεπτιδίου ξεκινάει από χαμηλές τιμές και στη συνέχεια αυξάνεται. Τα τελευταία 33 ns της τροχιάς παρατηρούνται έντονες διακυμάνσεις στην τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας, η μέση τιμή της οποίας αυξάνεται κατά 21% το διάστημα 67-100 ns σε σχέση με την τιμή της σε προηγούμενους χρόνους. Παρατηρήθηκε πως στο προαναφερθέν χρονικό διάστημα οι λιπιδικές ουρές του λιποπεπτιδίου παίρνουν μία πιο εκτεταμένη μορφή στο χώρο ενώ αυτό παραμένει προσδεμένο στο siRNA. Δύο χαρακτηριστικά στιγμιότυπα της τροχιάς φαίνονται στο Σχήμα 3.8, στο οποίο παρουσιάζονται δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του λιποπεπτιδίου LP\_A. Στην Εικόνα **A1** στο Σχήμα 3.8, παρουσιάζεται η διαμόρφωση του μορίου στα 21 ns όταν η γυροσκοπική ακτίνα έχει την ελάχιστη τιμή (0.59 nm), ενώ στην Εικόνα **A2** στο Σχήμα

3.8, παρουσιάζεται η απεικόνιση του μορίου σε χρόνο 74 ns όταν οι λιπιδικές ουρές «απλώνονται» στο χώρο και η γυροσκοπική ακτίνα αυξάνεται στα 1.13 nm.

Όσον αφορά το λιποπεπτίδιο LP\_B, ο μέσος όρος της γυροσκοπικής ακτίνας ήταν  $0.73 \pm 0.05$  nm. Η ελάχιστη τιμή της γυροσκοπικής υπολογίστηκε στα 0.58 nm και η μέγιστη στα 0.89 nm. Σε αντίθεση με το LP\_A, η γυροσκοπική ακτίνα του δεύτερου στερεοϊσομερούς δεν παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις μέχρι και τα 80 ns, μετά τα οποία όμως η μέση τιμή της μειώνεται κατά 10%. Η μείωση αυτή αντανακλά τη μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης του λιποπεπτιδίου, καθώς αυτό αποκτάει μία πιο συρρικνωμένη διαμόρφωση στο χώρο. Στο Σχήμα 3.8 παρουσιάζονται δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του LP\_B. Συγκεκριμένα στην Εικόνα **B1**, στο Σχήμα 3.8, παρατηρείται το λιποπεπτίδιο σε χρόνο 64.0 ns όταν η γυροσκοπική ακτίνα είχε μία μεγάλη τιμή (0.83 nm), ενώ στην Εικόνα **B2**, παρουσιάζεται το μόριο σε μεταγενέστερο χρόνο (80.3 ns) που αποκτάει μία πιο συρρικνωμένη διαμόρφωση και η γυροσκοπική του ακτίνα δεν ξεπερνάει τα 0.59 nm.

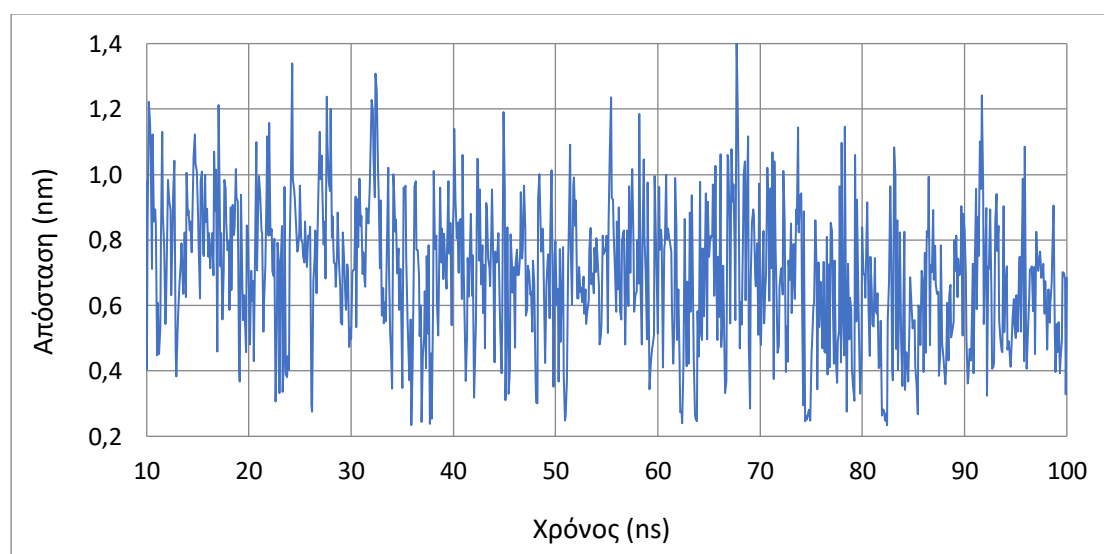


**Σχήμα 3.8** Διαμόρφωση των λιποπεπτιδίων LP\_A και LP\_B σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ενώ βρίσκεται συνδεδεμένο με το siRNA. **A1**: Διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου LP\_A στα 21 ns ( $R_g = 0.59$  nm). **A2**: Διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου LP\_A στα 74 ns ( $R_g = 1.13$  nm). **B1**: Διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου LP\_B στα 64 ns ( $R_g = 0.83$  nm). **B2**: Διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου LP\_B στα 80.3 ns ( $R_g = 0.59$  nm).

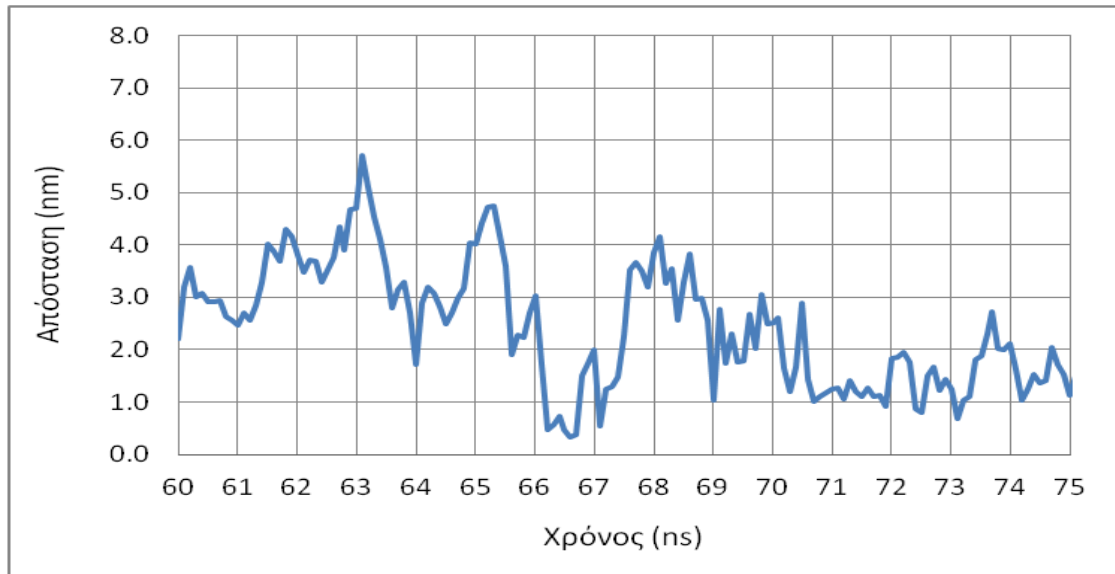
Πρέπει να σημειωθεί ότι η διαφορετική στερεοϊσομέρεια των δύο λιποπεπτιδίων μπορεί να είναι ένας παράγοντας στον οποίο οφείλεται η διαφορετική διαμόρφωση των μορίων κατά

τη διάρκεια της τροχιάς. Λόγω των διαφορετικών R και S απόλυτων διαμορφώσεων στα στερεογονικά κέντρα των δύο μορίων (βλ. Παράγραφο 1.1.2), οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες τοποθετούνται με ανόμοιο τρόπο στο χώρο καθώς αλληλεπιδρούν με το ολιγονουκλεοτίδιο. Ακόμη, οι διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης των δύο λιποπεπτιδίων κατά μήκος της διπλής έλικας του siRNA (με το LP\_A να συνδέεται στο άκρο της έλικας, ενώ το LP\_B περίπου στη μέση του επιμήκους άξονα του siRNA) επιβάλλουν διαφορετικές διαμορφώσεις στα δύο στερεοϊσομερή.

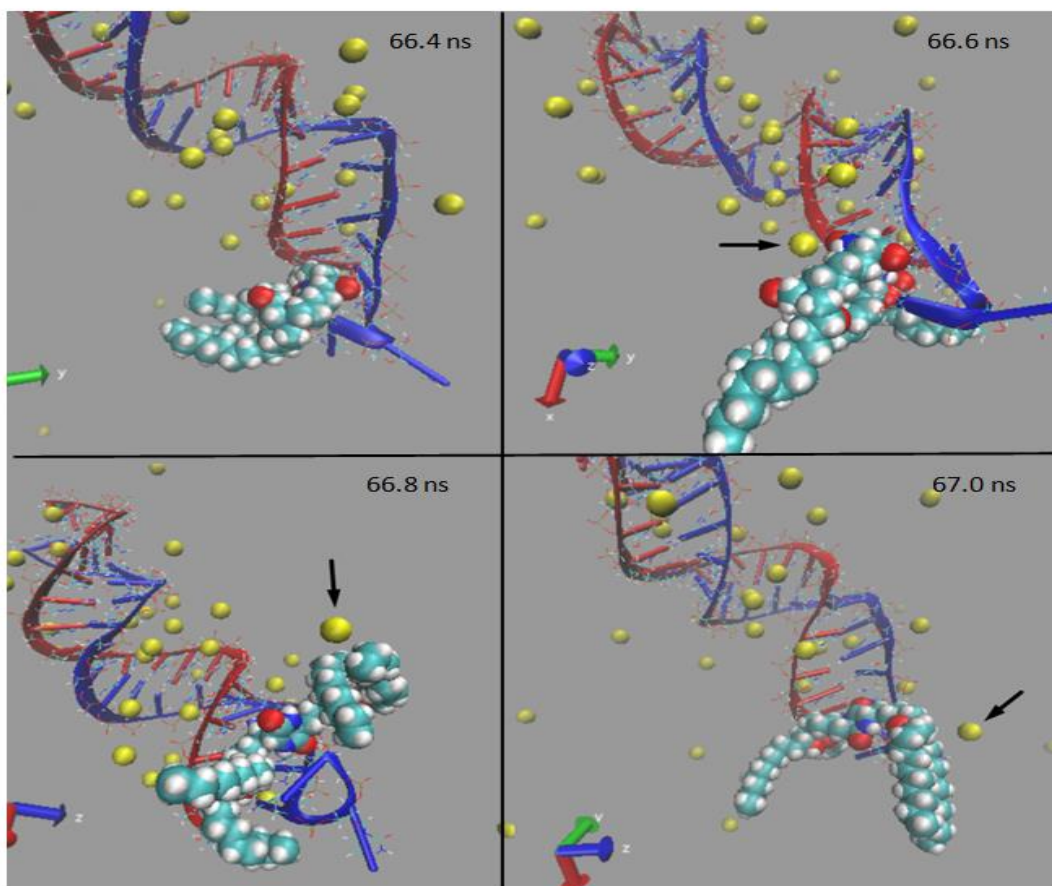
Σε περαιτέρω μετεπεξεργασία της τροχιάς διαπιστώθηκε ότι σε χρόνο 66.6 ns ο δακτύλιος του λιποπεπτιδίου προσεγγίζεται σε απόσταση 0.33 nm από ένα ιόν νατρίου (Na1). Η απόσταση αυτή αποτελεί μία από τις μικρότερες τιμές απόστασης ανάμεσα στο LP\_A και τα ιόντα νατρίου κατά τη διάρκεια της τροχιάς, όπως προκύπτει από τον υπολογισμό των ελάχιστων αποστάσεων μεταξύ των ιόντων νατρίου και του λιποπεπτιδίου καθ' όλη τη διάρκεια της τροχιάς (Σχήμα 3.9). Στο Σχήμα 3.10 εμφανίζεται η ελάχιστη απόσταση του λιποπεπτιδίου με το Na1 κατά το χρονικό διάστημα 60.0-75.0 ns, όπου φαίνεται πως πράγματι το χρονικό διάστημα 66.6-67.0 ns οι αποστάσεις παίρνουν την ελάχιστη τιμή. Ενδεχομένως το ιόν νατρίου λόγω του θετικού φορτίου και του μεγάλου μεγέθους του να επηρεάζει τη διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου LP\_A. Τις χρονικές στιγμές μετά τα 66.6 ns, το λιποπεπτίδιο φαίνεται πως ξεκινάει να παίρνει μία εκτεταμένη διαμόρφωση, η οποία αντανακλάται στην αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας μετά τα 67ns (Σχήμα 3.6).



**Σχήμα 3.9** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των ιόντων νατρίου και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A.



**Σχήμα 3.10** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ του ιόντος νατρίου Na1 και του λιποπεπτιδίου στο σύστημα siRNA-LP\_A.



**Σχήμα 3.11** Τέσσερα στιγμιότυπα από την τροχιά της Μοριακής Δυναμικής για το σύστημα A όπου στα τρία από αυτά διακρίνεται ένα άτομο νατρίου (Na1, σημειωμένο με βέλος) σε κοντινή απόσταση από το λιποπεπτίδιο.

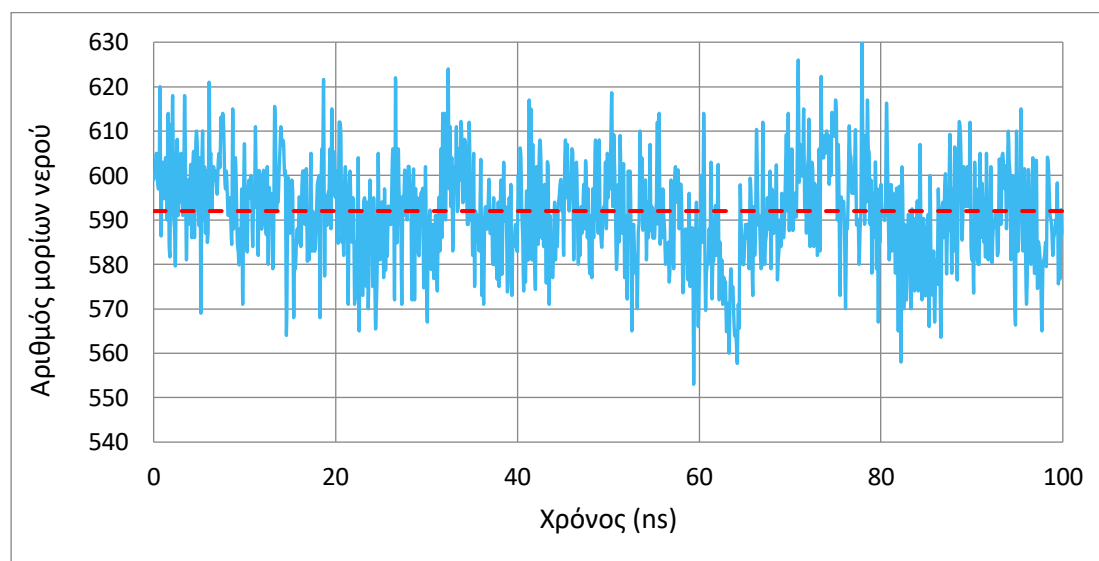
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.11 στα 66.4 ns το Na1 δεν βρίσκεται κοντά στο LP\_A και το λιποπεπτίδιο διατηρεί τη συμπαγή του διαμόρφωση. Στα 66.6 ns το ιόν νατρίου προσεγγίζει το δακτύλιο. Τα επόμενα 0.4 ns, το νάτριο δεν έχει απομακρυνθεί και η διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου αρχίζει και μεταβάλλεται έντονα.

### 3.3 Κέλυφος Ενυδάτωσης Βιομορίων

Τα μόρια νερού που βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις γύρω από βιολογικά μόρια (**κέλυφος ενυδάτωσης βιομορίων**) επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη διαμόρφωση και τη λειτουργία τους.<sup>54</sup> Υπολογίστηκε το κέλυφος ενυδάτωσης από τον αριθμό των μορίων νερού που βρίσκονται σε ακτίνα 0.35 nm από τα άτομα των βιομορίων. Η απόσταση αυτή επιλέχτηκε έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι συμπεριλαμβάνεται το πρώτο μονομοριακό στρώμα νερού που είναι ροφημένο στα βιομόρια.

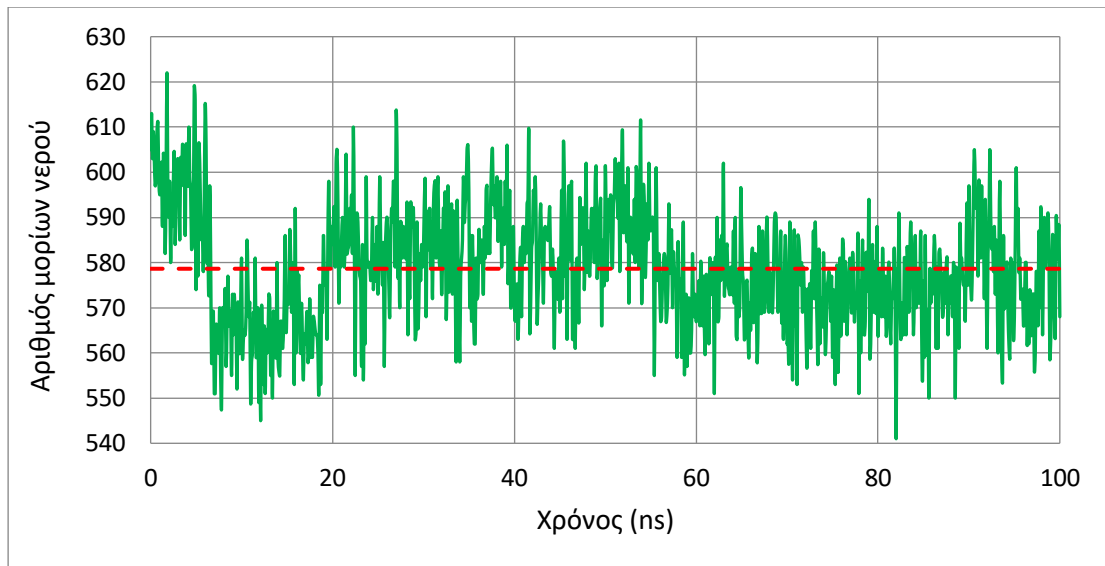
#### 3.3.1 Κέλυφος Ενυδάτωσης siRNA

Η χρονική εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που βρίσκονται στο κέλυφος ενυδάτωσης του siRNA στα δύο συστήματα παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12 και Σχήμα 3.13 που ακολουθούν.



**Σχήμα 3.12** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που βρίσκονται στο κέλυφος ενυδάτωσης του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός μορίων νερού στο σύστημα.



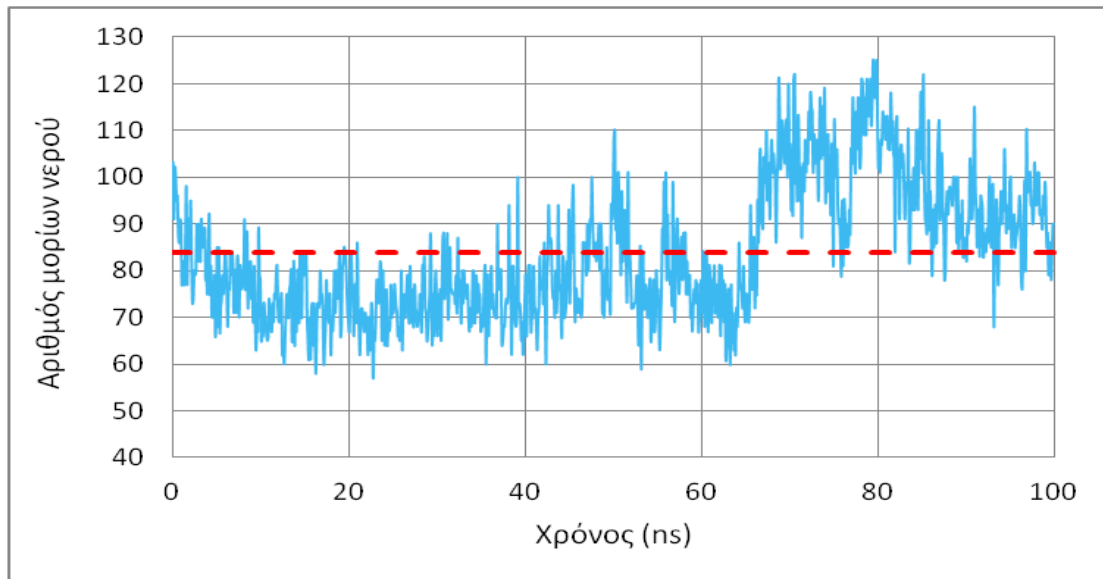


**Σχήμα 3.13** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που βρίσκονται στο κελύφος ενυδάτωσης του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_B. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός μορίων νερού στο σύστημα.

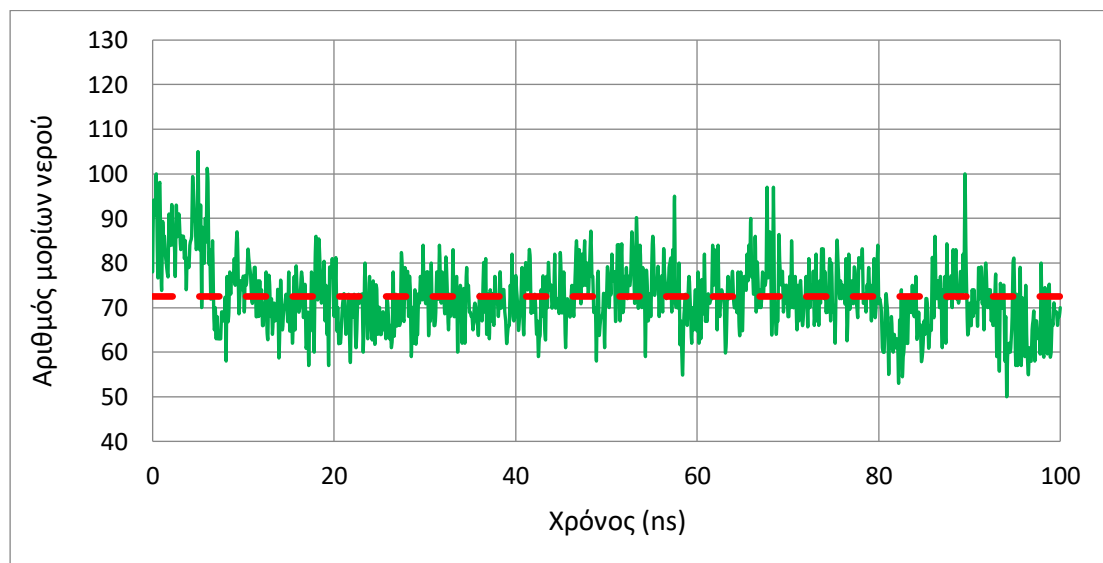
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.12 και Σχήμα 3.13, κατά τη σύνδεσή του siRNA με το λιποπεπτίδιο παρατηρείται μείωση του αριθμού των νερών στο κέλυφος ενυδάτωσης του siRNA και στα δύο συστήματα. Εφόσον η γυροσκοπική ακτίνα του siRNA δεν αλλάζει κατά τη σύνδεση με το λιποπεπτίδιο (βλ. παράγραφο 3.2.1), η μείωση αυτή οφείλεται στα -ροφημένα στο πρώτο μονομοριακό στρώμα- μόρια νερού του siRNA, τα οποία απομακρύνονται όταν το λιποπεπτίδιο προσεγγίζει το βιομόριο και συνδέεται μαζί του. Ο μέσος αριθμός μορίων νερού που περιβάλλουν το ολιγονουκλεοτίδιο κατά τη διάρκεια της τροχιάς υπολογίστηκε στα  $591 \pm 10$  και  $579 \pm 13$  μόρια νερού για το πρώτο και το δεύτερο σύστημα αντίστοιχα. Παρατηρείται πως τα μόρια νερού στο κέλυφος ενυδάτωσης του siRNA στο δεύτερο σύστημα είναι λιγότερα συγκριτικά με το πρώτο.

### 3.3.2 Λιποπεπτίδια και Μόρια Νερού

Υπολογίστηκε η χρονική εξέλιξη των μορίων νερού που περιβάλλουν τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια LP\_A και LP\_B και παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.14 και Σχήμα 3.15 που ακολουθούν:



**Σχήμα 3.14** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που περιβάλλουν το λιποπεπτίδιο LP\_A. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός μορίων νερού.



**Σχήμα 3.15** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που περιβάλλουν το λιποπεπτιδίου LP\_B. Με κόκκινη γραμμή παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός μορίων νερού.

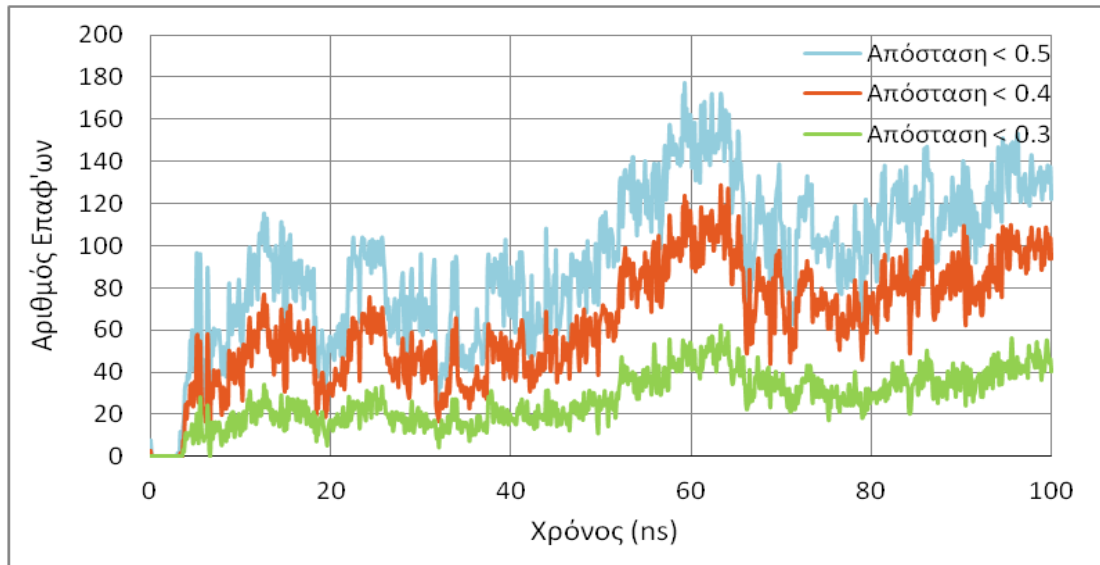
Ο μέσος όρος μορίων νερού στο κέλυφος ενυδάτωσης για το λιποπεπτίδιο LP\_A στο πρώτο σύστημα είναι  $80 \pm 14$  μόρια νερού, ενώ για το LP\_B στο δεύτερο σύστημα είναι  $72 \pm 7$  μόρια νερού. Για το LP\_A ο αριθμός των μορίων νερών που το περιβάλλουν μειώνεται μέχρι και τα  $\approx 10$  ns. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την ανάλυση της ελάχιστης απόστασης μεταξύ siRNA-LP (βλ. παράγραφο 3.1), καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα λαμβάνει χώρα η σύνδεση των δύο μορίων. Ο σταδιακά μειούμενος αριθμός μορίων νερού μέχρι αυτόν το χρόνο, υποδεικνύει πως μόρια νερού που περιβάλλουν το λιποπεπτίδιο απομακρύνονται, καθώς εκείνο προσεγγίζει το siRNA και

επιτυγχάνεται η σύνδεση. Ακόμα, παρατηρούμε πως το κέλυφος ενυδάτωσης αυξάνεται σημαντικά μετά τα 66.6 ns. Αυτή η αύξηση δεν συνεπάγεται αποσύνδεση των δύο μορίων, αφού σύμφωνα με την υπολογισθείσα ελάχιστη απόσταση μεταξύ τους αυτά παραμένουν συνδεδεμένα σε όλη τη διάρκεια της τροχιάς. Η αύξηση αυτή συμπίπτει χρονικά με τη σημαντική αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας του LP στους ίδιους χρόνους (Σχήμα 3.6), γεγονός που υποδεικνύει ότι, καθώς το μόριο αποκτάει μία πιο εκτεταμένη διαμόρφωση στο χώρο, αυξάνεται ο αριθμός των μορίων νερού που το περιβάλλουν.

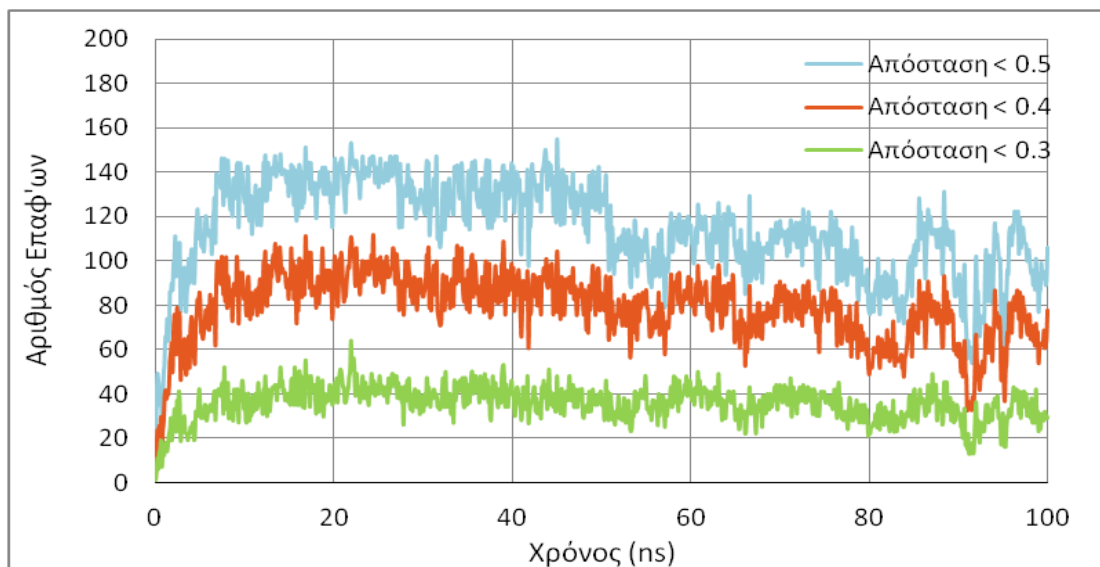
Για το δεύτερο στερεοϊσομερές LP\_B επίσης σημειώνεται μείωση του αριθμού των νερών που κείνται στο κέλυφος ενυδάτωσης του κατά τα πρώτα 10 ns της τροχιάς, η οποία ερμηνεύεται με τον ίδιο τρόπο όπως για το LP\_A. Εντούτοις, σε σχέση με το LP\_A τα μόρια νερού που περιβάλλουν το LP\_B είναι λιγότερα κατά τη χρονική εξέλιξη της τροχιάς και παρατηρούνται εμφανώς μικρότερες διακυμάνσεις, όπως διαπιστώνεται από τις τυπικές αποκλίσεις. Αυτό συνάδει με τις διαφορετικές διαμορφώσεις που παρατηρούνται για τα δύο στερεοϊσομερή (βλ. Παράγραφο 3.3.2), σύμφωνα με τις οποίες το LP\_A επιδεικνύει πιο εκτεταμένες διαμορφώσεις σε σχέση με το LP\_B. Ακόμα παρατηρείται μία περαιτέρω μείωση του αριθμού των νερών στο κέλυφος ενυδάτωσης για το LP\_B μετά τα 80 ns, η οποία συμβαδίζει με το γεγονός ότι το λιποπεπτιδίο LP\_B αποκτάει μία πιο συρρικνωμένη διαμόρφωση στο χώρο στους ίδιους χρόνους (Σχήμα 3.7), και άρα είναι λογικό να μειώνονται τα μόρια νερού που το περιβάλλουν.

### 3.4 Αριθμός Εγγυτέρων Επαφών Λιποπεπτιδίου-siRNA

Η σύνδεση των δύο βιομορίων μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω παρακολουθώντας τη χρονική εξέλιξη του **αριθμού εγγυτέρων επαφών** μεταξύ των δύο βιομορίων. Το μέγεθος αυτό αφορά στον αριθμό των επαφών μεταξύ των ατόμων τα οποία βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από μία ορισμένη τιμή και ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Υπολογίστηκε ο αριθμός επαφών του λιποπεπτιδίου με το siRNA για αποστάσεις μικρότερες των 0.5 nm ή 0.4 nm ή 0.3 nm, κατά τη διάρκεια της τροχιάς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.16 για το σύστημα siRNA-LP\_A και στο Σχήμα 3.17 για το σύστημα siRNA-LP\_B.



**Σχήμα 3.16** Χρονική εξέλιξη του αριθμού επαφών μεταξύ του λιποπεπτιδίου και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A. Με γαλάζιο, πορτοκαλί και πράσινο χρώμα παρουσιάζεται ο αριθμός των επαφών που υπάρχουν σε αποστάσεις μικρότερες των 0.5 nm, 0.4 nm και 0.3 nm.



**Σχήμα 3.17** Χρονική εξέλιξη του αριθμού επαφών μεταξύ του λιποπεπτιδίου και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A. Με γαλάζιο, πορτοκαλί και πράσινο χρώμα παρουσιάζεται ο αριθμός των επαφών που υπάρχουν σε αποστάσεις μικρότερες των 0.5 nm, 0.4 nm και 0.3 nm.

**Πίνακας 3.1** Μέσος Αριθμός Επαφών λιποπεπτιδίου-siRNA σε αποστάσεις μικρότερες των 0.5 nm, 0.4 nm και 0.3 nm, για τα δύο συστήματα.

Απόσταση	Μέσος Αριθμός Επαφών siRNA-LP_A	Μέσος Αριθμός Επαφών siRNA-LP_B
< 0.5 nm	93 ± 36	115 ± 21
< 0.4 nm	63 ± 27	79 ± 15
< 0.3 nm	27 ± 13	36 ± 8

Όπως είναι φανερό, τα δύο στερεοϊσομερή δημιουργούν πολλές επαφές με το μόριο του siRNA.

Στο πρώτο σύστημα, παρατηρείται μέχρι και τα  $\approx 66$  ns σταδιακή αύξηση των επαφών ανάμεσα στα δύο βιομόρια. Ωστόσο, το διάστημα 66-80 ns οι επαφές ανάμεσα στα δύο μόρια μειώνονται περίπου κατά 20%. Η μείωση των επαφών έρχεται σε συμφωνία με την εξέλιξη του αριθμού των μορίων νερού που περιβάλλουν το LP\_A και την εξέλιξη της γυροσκοπικής του ακτίνας. Όπως μαρτυρεί η αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας το διάστημα 66-80 ns, η διαμόρφωση του λιποπεπτιδίου αλλάζει καθώς αυτό αναζητεί τη βέλτιστη ενεργειακή διαμόρφωση κατά τη πρόσδεσή του στο siRNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χάνονται ορισμένες επαφές με το siRNA και το λιποπεπτίδιο να αποκτάει μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για αλληλεπίδραση με μόρια νερού. Μετά τα 80 ns, οι επαφές ανάμεσα στα δύο μόρια αυξάνονται σταδιακά.

Όσον αφορά το δεύτερο στερεοϊσομερές φαίνεται πως δημιουργεί περισσότερες επαφές με το siRNA σε σχέση με το LP\_A σε αρχικούς χρόνους, ενώ υπάρχουν λιγότερες διακυμάνσεις όπως διαπιστώνεται και από την τυπική απόκλιση των τιμών. Μετά τα 60 ns και τα δύο λιποπεπτίδια φαίνεται να συνάπτουν περίπου τον ίδιο αριθμό επαφών με το siRNA.

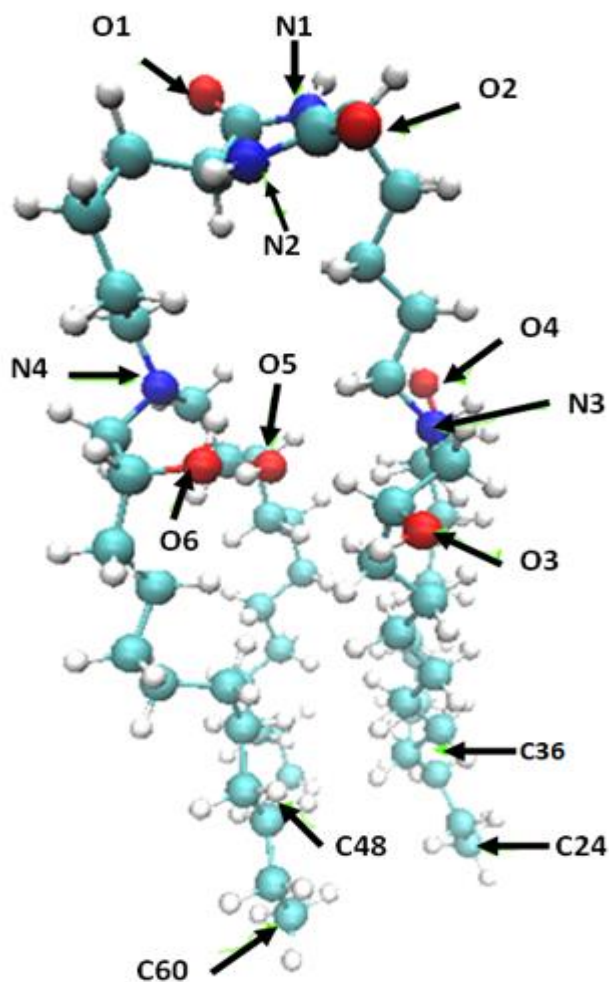
### 3.5 Ελάχιστες Αποστάσεις Χαρακτηριστικών Χημικών Ομάδων

Προκειμένου να διερευνησουμε τις περιοχές του λιποπεπτιδίου που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνδεσή του με το siRNA υπολογίστηκαν οι ελάχιστες αποστάσεις μεταξύ των ατόμων των χαρακτηριστικών ομάδων και του siRNA. Όπως αναφέρθηκε και στην στην Παράγραφο 1.1.2, το λιποπεπτίδιο περιλαμβάνει:

- Έναν ετεροκυκλικό εξαμελή δακτύλιο ο οποίος περιέχει δύο ομάδες πολικών αμιδίων.
- Δύο ομάδες τριτοταγούς αμίνης, εκ των οποίων η μία είναι πρωτονιομένη.
- Τέσσερις ομάδες υδροξυλίου.
- Τέσσερις ομάδες τερματικών μεθυλίων στα ελεύθερα άκρα.

Υπολογίστηκαν οι ελάχιστες αποστάσεις των βασικών ατόμων κάθε χαρακτηριστικής ομάδας, προκειμένου να εξάγουμε συμπεράσματα ως προς το πώς προσεγγίζει το λιποπεπτίδιο το siRNA κατά την σύνδεσή τους. Η ελάχιστη απόσταση αφορά τη μικρότερη

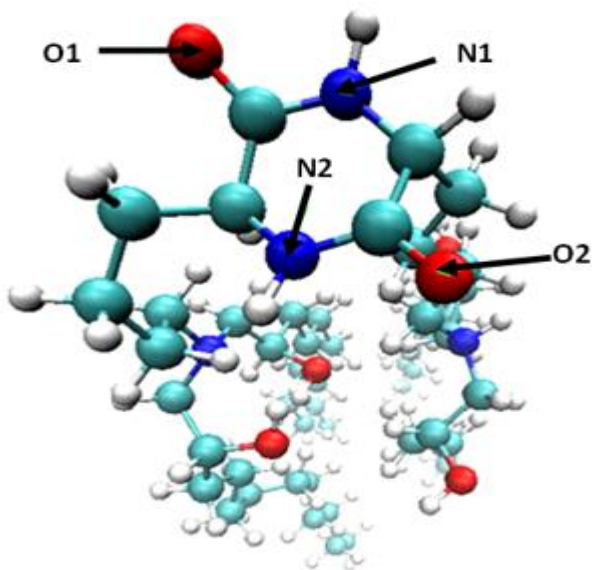
τιμή της απόστασης κάθε ατόμου της χαρακτηριστικής κάθε φορά ομάδας του λιποπεπτιδίου με όλα τα άτομα του siRNA. Στο Σχήμα 3.18 επισημαίνονται στη δομή του λιποπεπτιδίου τα προς εξέταση άτομα των χαρακτηριστικών χημικών ομάδων



**Σχήμα 3.18** Σημειολογία των βασικών ατόμων κάθε χαρακτηριστικής ομάδας του λιποπεπτιδίου cKK-E12.

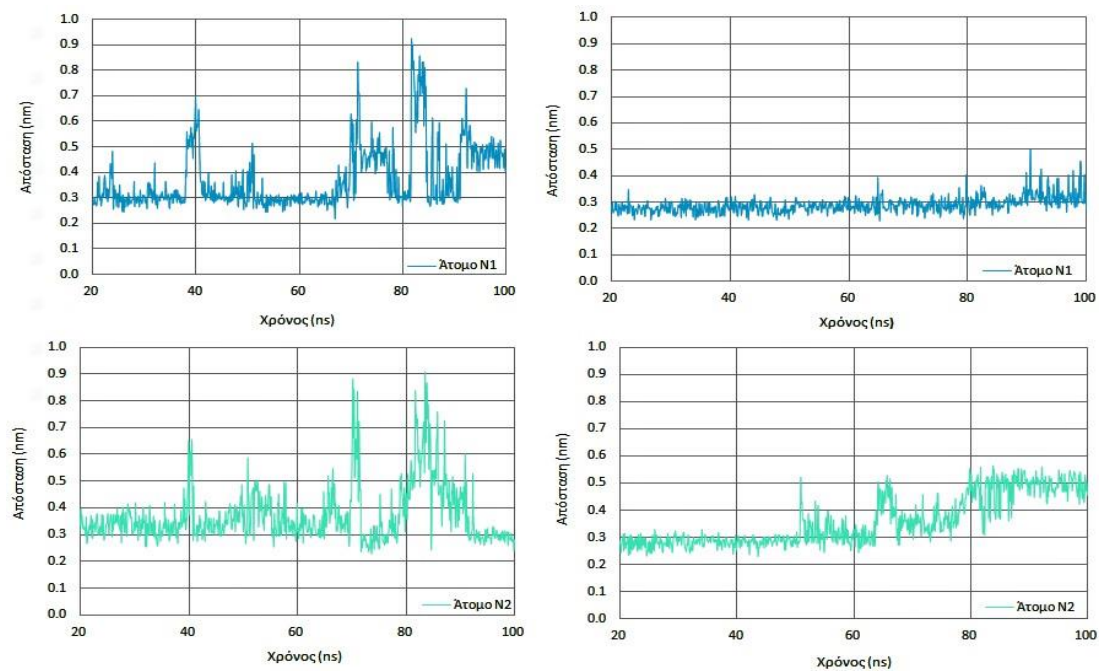
### 3.5.1 Εξαμελής δακτύλιος

Ο εξαμελής δακτύλιος του λιποπεπτιδίου περιέχει δύο ομάδες πολικών αμινών (N1, N2), και δύο ομάδες οξυγόνου (O1, O2), όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.19.

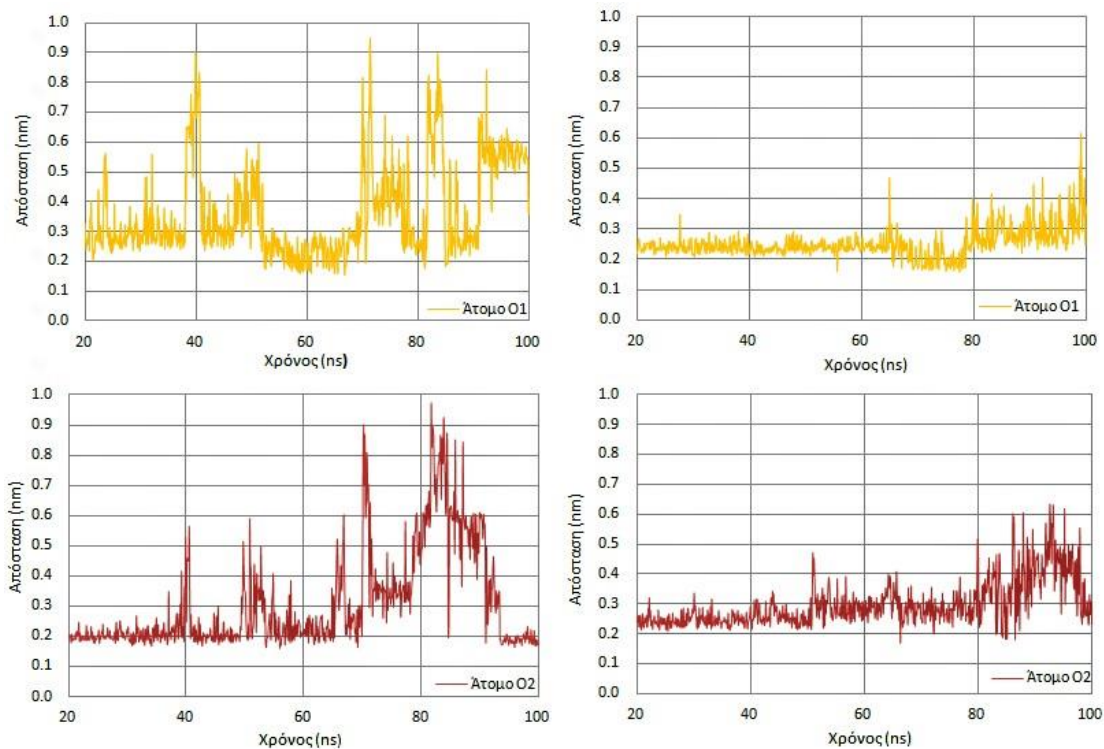


**Σχήμα 3.19** Επισήμανση των υπό-εξέταση ατόμων του εξαμελούς δακτυλίου

Υπολογίζεται η ελάχιστη απόσταση των ατόμων N1 και N2 του δακτυλίου με το siRNA, για το σύστημα A (Σχήμα 3.20, **αριστερή στήλη**) και για το σύστημα B (Σχήμα 3.20, **δεξιά στήλη**). Αντίστοιχα εμφανίζονται τα αποτελέσματα για τα άτομα O1 και O2 στο Σχήμα 3.21. Η ανάλυση έγινε μετά τα πρώτα 20 ns, ώστε να έχει επιτευχθεί η πρόσδεση των δύο βιομορίων. Ακόμα στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η μέση τιμή της ελάχιστης απόστασης κάθε ατόμου από το siRNA, στο προαναφερθέν χρονικό διάστημα.



**Σχήμα 3.20** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των ατόμων N1 και N2 του δακτυλίου και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (**αριστερά**) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (**δεξιά**).



**Σχήμα 3.21** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των ατόμων O1 και O2 του δακτυλίου και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (**αριστερά**) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (**δεξιά**).

**Πίνακας 3.2** Μέση Ελάχιστη Απόσταση των χαρακτηριστικών ατόμων του δακτυλίου του λιποπεπτιδίου για τα δύο σύστημα μετά τα πρώτα 20 ns της τροχιάς.

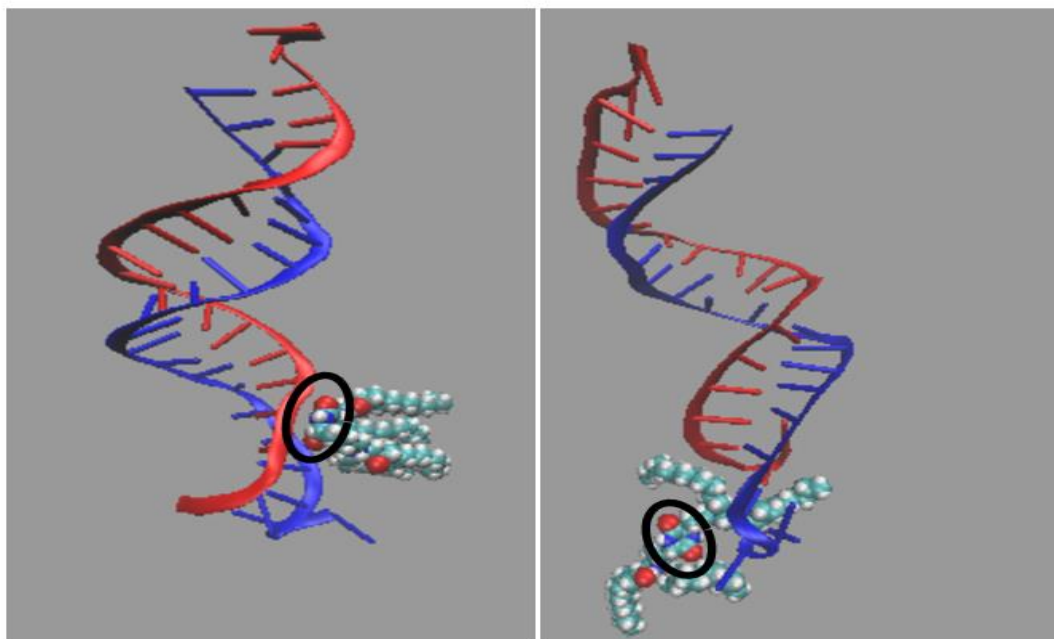
Άτομο	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_A	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_B
<b>N1</b>	$0.37 \pm 0.12$ nm	$0.29 \pm 0.03$ nm
<b>N2</b>	$0.37 \pm 0.11$ nm	$0.32 \pm 0.08$ nm
<b>O1</b>	$0.36 \pm 0.16$ nm	$0.29 \pm 0.05$ nm
<b>O2</b>	$0.31 \pm 0.17$ nm	$0.30 \pm 0.08$ nm

Στο πρώτο σύστημα, το χρονικό διάστημα 20-60 ns σημειώνονται χαμηλές ελάχιστες αποστάσεις και για τα τέσσερα χαρακτηριστικά άτομα. Ωστόσο, στη συνέχεια παρατηρούνται έντονες διακυμάνσεις στην ελάχιστη απόσταση με αποκορύφωμα το διάστημα 66-85 ns κατά το οποίο σημειώνεται σημαντική αύξηση των ελαχίστων αποστάσεων. Όσον αφορά το δεύτερο σύστημα φαίνεται πως τα χαρακτηριστικά άτομα του δακτυλίου βρίσκονται πιο κοντά στο siRNA το μεγαλύτερο μέρος της τροχιάς. Οι μικρότερες τιμές στις τυπικές αποκλίσεις των ελαχίστων αποστάσεων μαρτυρούν λιγότερες διακυμάνσεις και ενδεχομένως μία πιο σταθερή συμπεριφορά του συγκεκριμένου στερεοϊσομερούς το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

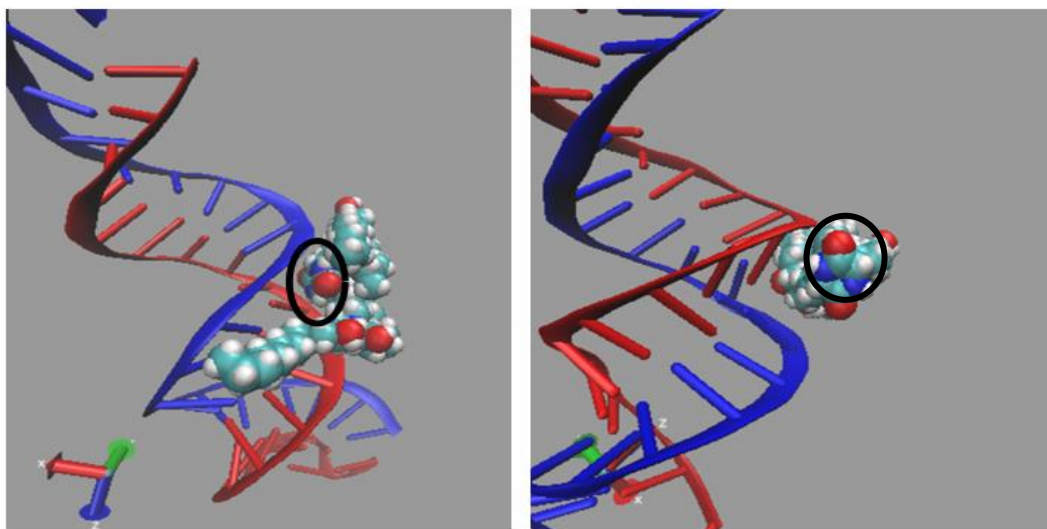
Και στα δύο συστήματα αρχικά τα λιποπεπτίδια προσεγγίζουν το siRNA με τον δακτύλιο, ωστόσο, στη συνέχεια ο δακτύλιος απομακρύνεται από το siRNA, ενώ η απόσταση των



ατόμων του δακτυλίου από το siRNA είναι μεγαλύτερη για το LP\_A σε σχέση με το LP\_B. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα της τροχιάς για τα δύο συστήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.22 και Σχήμα 3.23.



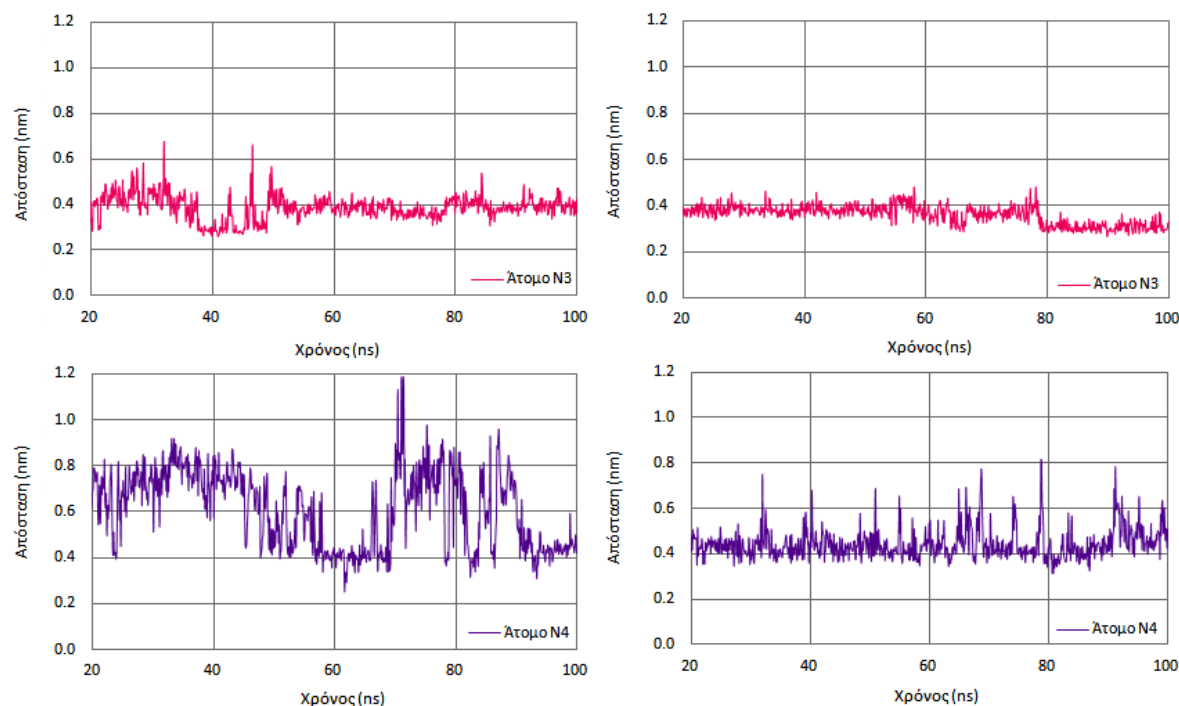
**Σχήμα 3.22** Θέση του δακτυλίου του λιποπεπτιδίου LP\_A στα 20 ns (αριστερά) και στα 87 ns (δεξιά). Ο δακτύλιος επισημαίνεται για ευκολία αναγνώρισής του με μαύρο κύκλο.



**Σχήμα 3.23** Θέση του δακτυλίου του λιποπεπτιδίου LP\_B στα 40 ns (αριστερά) και στα 83 ns (δεξιά). Ο δακτύλιος επισημαίνεται για ευκολία αναγνώρισής του με μαύρο κύκλο.

### 3.5.2 Τριτοταγείς Αμίνες

Όπως έχει αναφερθεί, στο δακτύλιο προσκολλώνται δύο υδρογονανθρακικοί κλάδοι οι οποίοι καταλήγουν σε ομάδα τριτοταγούς αμίνης. Δύο λιπιδικές ουρές διακλαδίζονται από κάθε αμίνη (N3, N4). Παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων για τα άτομα αζώτου N3 και N4, στα δύο υπό μελέτη συστήματα.

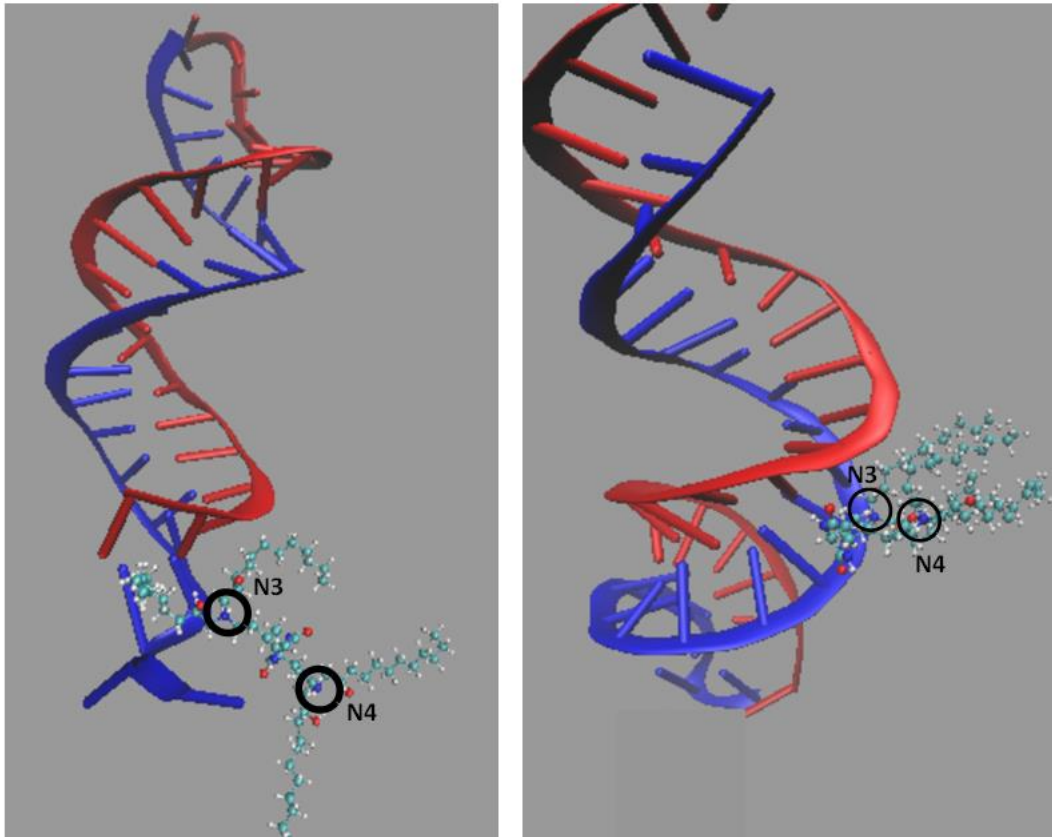


**Σχήμα 3.24** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των χαρακτηριστικών ατόμων N3 και N4 και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (αριστερά) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (δεξιά).

**Πίνακας 3.3** Μέση Ελάχιστη Απόσταση των τριτοταγών αμινών του λιποπεπτιδίου για τα δύο σύστημα μετά τα πρώτα 20 ns της τροχιάς.

Άτομο	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_A	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_B
<b>N3</b>	$0.39 \pm 0.05$ nm	$0.36 \pm 0.04$ nm
<b>N4</b>	$0.61 \pm 0.17$ nm	$0.44 \pm 0.07$ nm

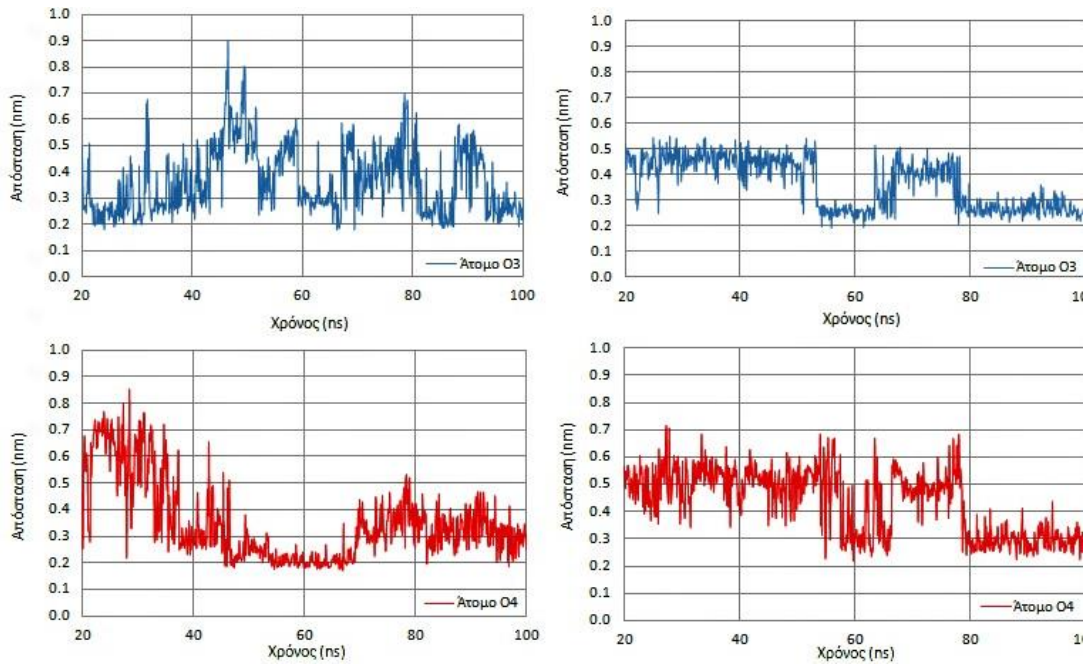
Όπως είναι εμφανές, η πρωτονιωμένη τριτοταγής αμίνη, N3, εμφανίζει πολύ διαφορετική συμπεριφορά από την ουδέτερη αμίνη, N4. Και τα δύο λιποπεπτιδία δημιουργούν θέσεις επαφής με το siRNA μέσω της αμίνης N3, η οποία είναι πολύ κοντά στο μόριο του siRNA καθ'όλη τη διάρκεια της τροχιάς, ενώ η απόστασή της από το ολιγονουκλεοτίδιο δε φαίνεται να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις. Επομένως συμπεραίνουμε ότι το γεγονός πως είναι θετικά φορτισμένη παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του λιποπεπτιδίου με το siRNA -το οποίο έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων. Στο Σχήμα 3.25 παρουσιάζεται η θέση τόσο της πρωτονιωμένης N3 όσο και της ουδέτερης αμίνης N4 για τα δύο συστήματα σε στιγμιότυπα της τροχιάς.



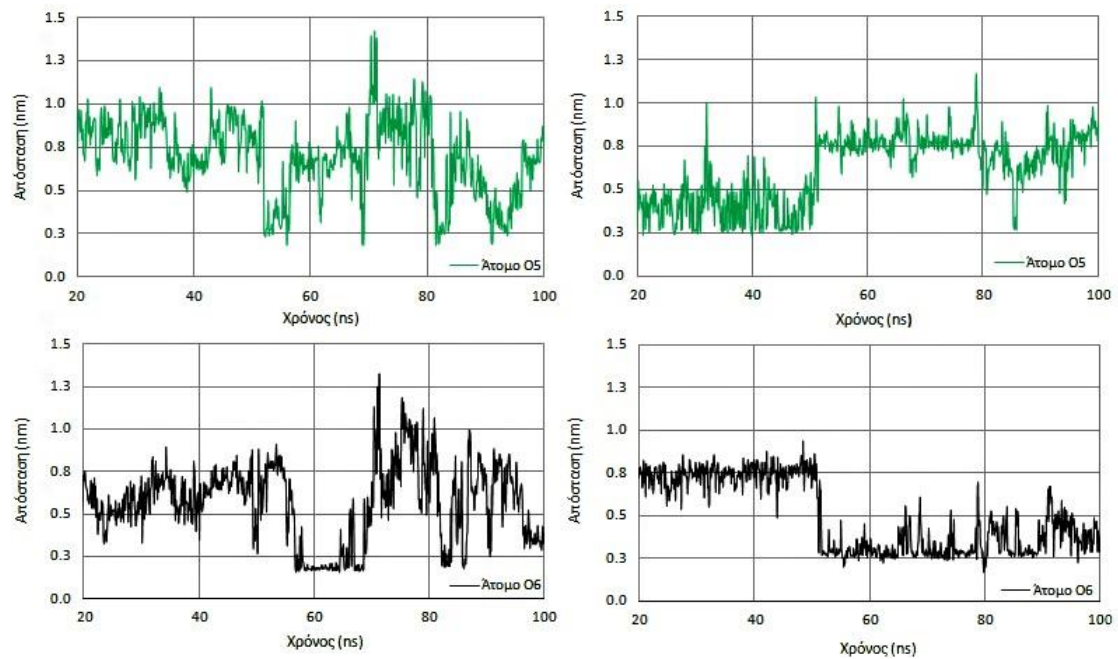
**Σχήμα 3.25** Θέση των τριτοταγών αμινών σε στιγμιότυπα της τροχιάς για το LP\_A στα 70 ns (αριστερά) και το LP\_B στα 83 ns (δεξιά).

### 3.5.3 Ομάδες υδροξυλίου

Παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων των οξυγόνων O3, O4, O5, O6 που ανήκουν στις τέσσερις χαρακτηριστικές υδροξυλομάδες του λιποπεπτιδίου (Γ1, Γ2, Γ3 και Γ4 αντίστοιχα) για τα δύο συστήματα. Υπενθυμίζεται ότι τα οξυγόνα O3, O4 και O5, O6 βρίσκονται στους ίδιους υδρογονανθρακικούς κλάδους.



**Σχήμα 3.26** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των ατόμων O3 και O4 και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (αριστερά) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (δεξιά).



**Σχήμα 3.27** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των ατόμων O5 και O6 και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (αριστερά) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (δεξιά).

**Πίνακας 3.4** Μέση Ελάχιστη Απόσταση των οξυγόνων των τεσσάρων υδροξυλομάδων του λιποπεπτιδίου για τα δύο σύστημα μετά τα πρώτα 20 ns της τροχιάς.

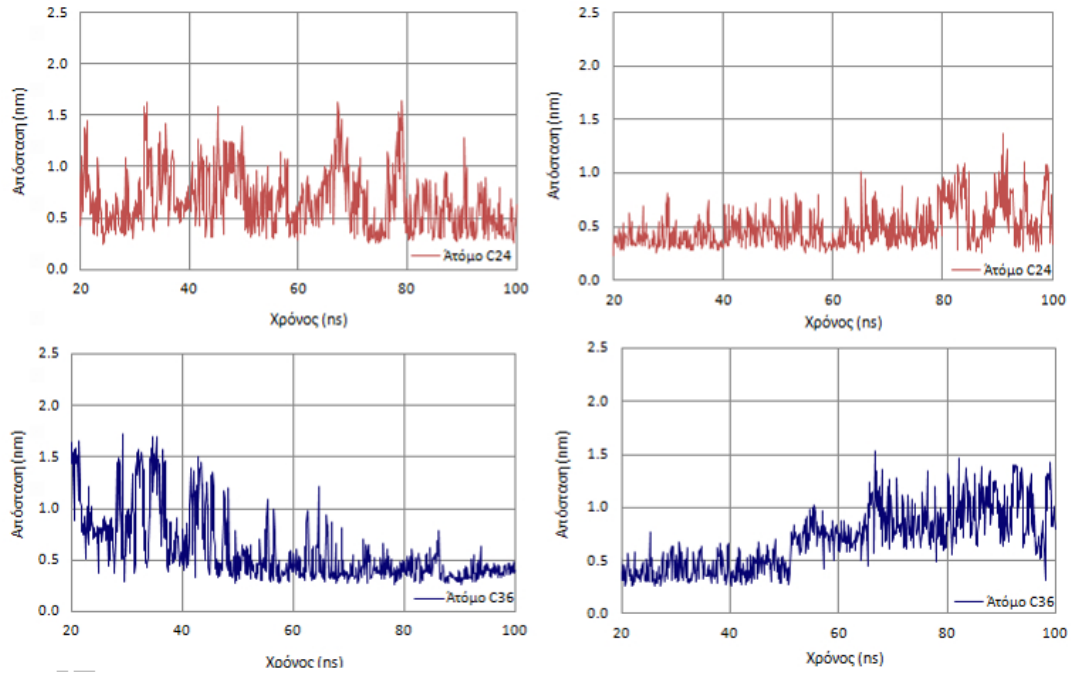
Άτομο	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_A	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_B
<b>O3</b>	0.36 ± 0.13nm	0.36 ± 0.10 nm
<b>O4</b>	0.35 ± 0.15 nm	0.40 ± 0.12 nm
<b>O5</b>	0.70 ± 0.22 nm	0.62 ± 0.20 nm
<b>O6</b>	0.56 ± 0.23 nm	0.50 ± 0.21 nm

Όπως παρατηρείται τόσο από τα διαγράμματα όσο και από τον Πίνακα, τα άτομα O3 και O4 των υδροξυλομάδων Γ1 και Γ2 (Σχήμα 3.5) εμφανίζουν κοντινότερη απόσταση με το siRNA, σε σχέση με τα άτομα O5 και O6 και στα δύο συστήματα. Υπενθυμίζεται ότι τα άτομα αυτά είναι στον ίδιο υδρογονανθρακικό κλάδο με την πρωτονιωμένη αμίνη N3, η οποία καθ' όλη τη διάρκεια της τροχιάς προσεγγίζει το siRNA. Αντίθετα, τα άτομα O5 και O6, τα οποία βρίσκονται στον ίδιο υδρογονανθρακικό κλάδο με την ουδέτερη τριτοταγή αμίνη N4, είναι πιο απομακρυσμένα από το siRNA και η μέση απόστασή τους παρουσιάζει μεγαλύτερες διακυμάνσεις.

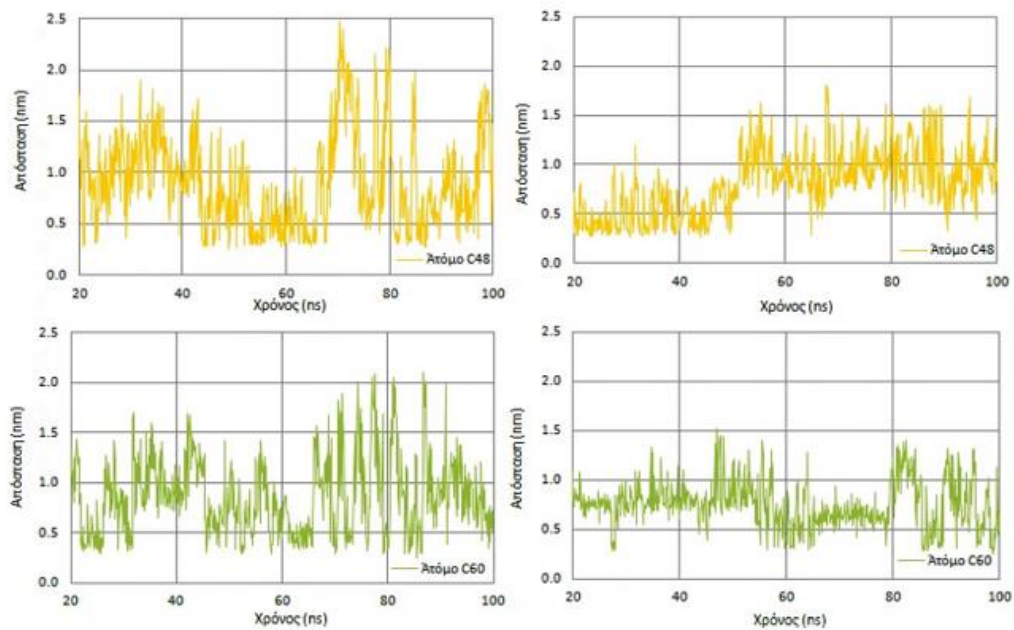
Ακόμα, διαπιστώνεται ότι η χρονική εξέλιξη και των τεσσάρων ατόμων έχει πολύ διαφορετική μορφή για το κάθε λιποπεπτίδιο. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη διαφορετική στερεοϊσομέρεια των μορίων. Υπενθυμίζεται ότι το LP\_A έχει απόλυτη διαμόρφωση R για τους άνθρακες στις λιπιδικές ουρές, ενώ το LP\_B απόλυτη διαμόρφωση S.

### 3.5.4 Τερματικά μεθύλια

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων των ανθράκων C24, C36, C48, C60 των τερματικών μεθυλίων που βρίσκονται στα ελεύθερα άκρα του λιποπεπτιδίου από το siRNA και για τα δύο συστήματα.



**Σχήμα 3.28** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των χαρακτηριστικών ατόμων C24 και C36 και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (**αριστερά**) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (**δεξιά**).



**Σχήμα 3.29** Χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων μεταξύ των χαρακτηριστικών ατόμων C48 και C60 και του siRNA στο σύστημα siRNA-LP\_A (**αριστερά**) και στο σύστημα siRNA-LP\_B (**δεξιά**).

**Πίνακας 3.5** Μέση Ελάχιστη Απόσταση για κάθε άνθρακα των τεσσάρων τερματικών μεθυλίων του λιποπεπτιδίου με στα δύο σύστημα μετά τα πρώτα 20 ns της τροχιάς.

Άτομο	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_A	Μέση Ελάχιστη Απόσταση siRNA-LP_B
<b>C24</b>	0.67 ± 0.29 nm	0.49 ± 0.19 nm
<b>C36</b>	0.59 ± 0.33 nm	0.70 ± 0.29 nm
<b>C48</b>	0.91 ± 0.46 nm	0.80 ± 0.33 nm
<b>C60</b>	0.86 ± 0.38 nm	0.75 ± 0.23 nm

Παρατηρείται ότι οι υδρόφοβες τερματικές ομάδες μεθυλίου των δύο μορίων παρουσιάζουν έντονη κινητικότητα και πως το μεγαλύτερο μέρος της τροχιάς οι άνθρακες των τερματικών μεθυλίων είναι αρκετά απομακρυσμένοι από το siRNA. Η μέση απόσταση των τερματικών μεθυλίων του λιποπεπτιδίου από το siRNA είναι αυξημένη σε σχέση με τα άτομα των υπόλοιπων χαρακτηριστικών ομάδων που εξετάστηκαν και η τυπική απόκλιση είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Συμπεραίνεται πως τα τερματικά μεθύλια δεν υποβοηθούν την πρόσδεση του λιποπεπτιδίου στο siRNA σε κανένα από τα δύο συστήματα.

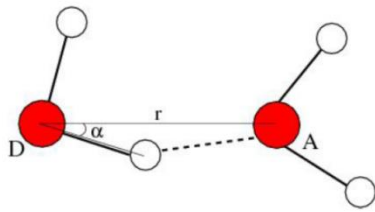
### 3.6 Δεσμοί υδρογόνου

Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond, HB) έχει αποδειχθεί κρίσιμη παράμετρος σε πληθώρα μικροσκοπικών θερμοδυναμικών διεργασιών, όπως σε φαινόμενα ρόφησης και διάχυσης μορίων σε πορώδη πολυμερή σύνταξης, αλλά και στην πρόσδεση οργανικών μορίων σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς.<sup>55-59</sup>

Ένας δεσμός υδρογόνου παρουσιάζεται ως D-H...A-Z, όπου οι τρεις τελείες υποδηλώνουν το δεσμό. Το D αντιπροσωπεύει τον δότη (Donor) που είναι ηλεκτραρνητικό στοιχείο και το H το άτομο υδρογόνου. Ο δέκτης A (Acceptor) μπορεί να είναι ένα άτομο, ένα ανιόν ή ένα θραύσμα ενός μορίου A-Z, όπου το A συνδέεται με το Z. Ο δεσμός υδρογόνου D-H...A-Z γίνεται ισχυρότερος όσο η απόσταση H...A γίνεται μικρότερη και η γωνία D-H...A πλησιάζει τις 180°, υποδηλώνοντας γραμμική διάταξη των ατόμων D-H...A.

Για τους υπολογισμούς μετρήθηκε η γωνία H-D-A (άτομο υδρογόνου-δότης-δέκτης), ώστε μία γραμμική διάταξη των ατόμων (και ως εκ τούτου, ένας ισχυρότερος δεσμός υδρογόνου) να εμφανίζεται όταν η γωνία H-D-A πλησιάζει το μηδέν. Το μήκος του δεσμού υπολογίστηκε ως η απόσταση D-A (δότης-δέκτης).

Για την ταξινόμηση ενός δεσμού ως δεσμού υδρογόνου επιβλήθηκαν τα ακόλουθα γεωμετρικά κριτήρια: η απόσταση D-A να είναι μικρότερη από 0.35 nm και η γωνία H-D-A μικρότερη από 30° (Σχήμα 3.30). Το εύρος των διαμερίσεων (bin width) για την απόσταση και τη γωνία των δεσμών υδρογόνου ορίστηκε στα 0.01 nm και 2 μοίρες αντίστοιχα.

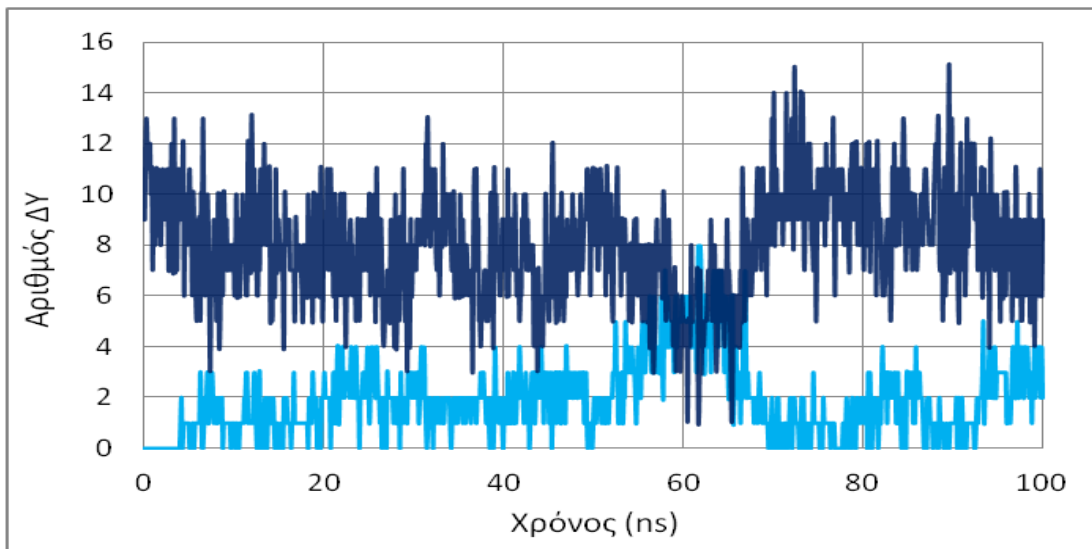


$$r \leq r_{\text{HB}} = 0.35 \text{ nm}$$

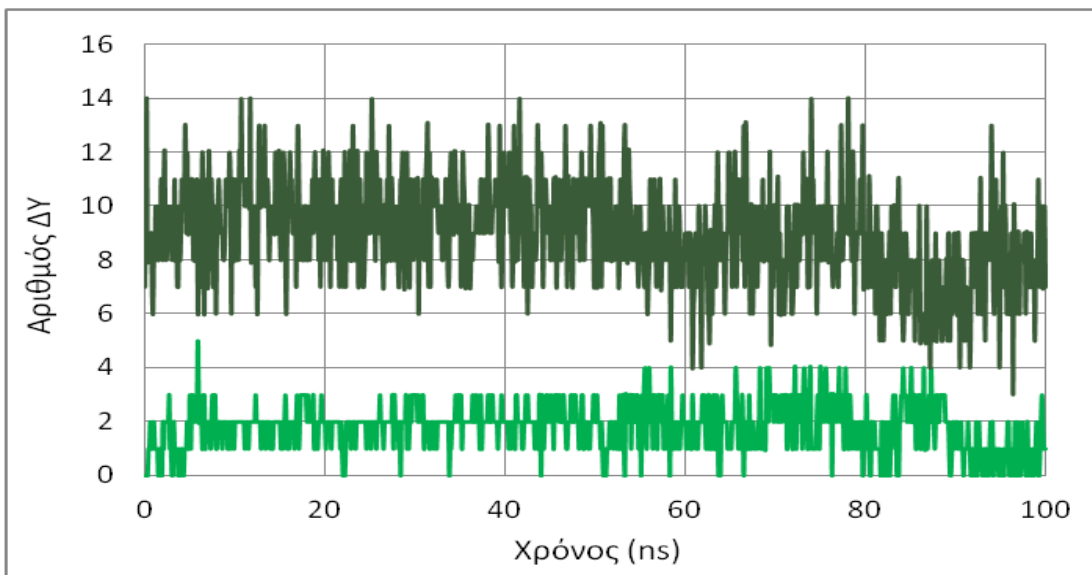
$$\alpha \leq \alpha_{\text{HB}} = 30^\circ$$

**Σχήμα 3.30** Γεωμετρικά κριτήρια για τον δεσμό υδρογόνου

Στο Σχήμα 3.31 και Σχήμα 3.32 που ακολουθούν παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου που δημιουργεί το λιποπεπτίδιο με το μόριο του siRNA, αλλά και με τα μόρια του νερού στα δύο συστήματα. Ακόμη παρουσιάζεται η κατανομή του μήκους και της γωνίας του δεσμού υπολογισμένες σε όλο το εύρος της τροχιάς.



**Σχήμα 3.31** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου (ΔΥ) που δημιουργεί το λιποπεπτίδιο με το μόριο του siRNA (γαλάζιο) και τα μόρια νερού (μπλε) στο σύστημα siRNA-LP\_A.





**Σχήμα 3.32** Χρονική εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου (ΔΥ) που δημιουργεί το λιποπεπτίδιο με το μόριο του siRNA (πράσινο) και τα μόρια νερού (πράσινο σκούρο) στο σύστημα siRNA-LP\_B.

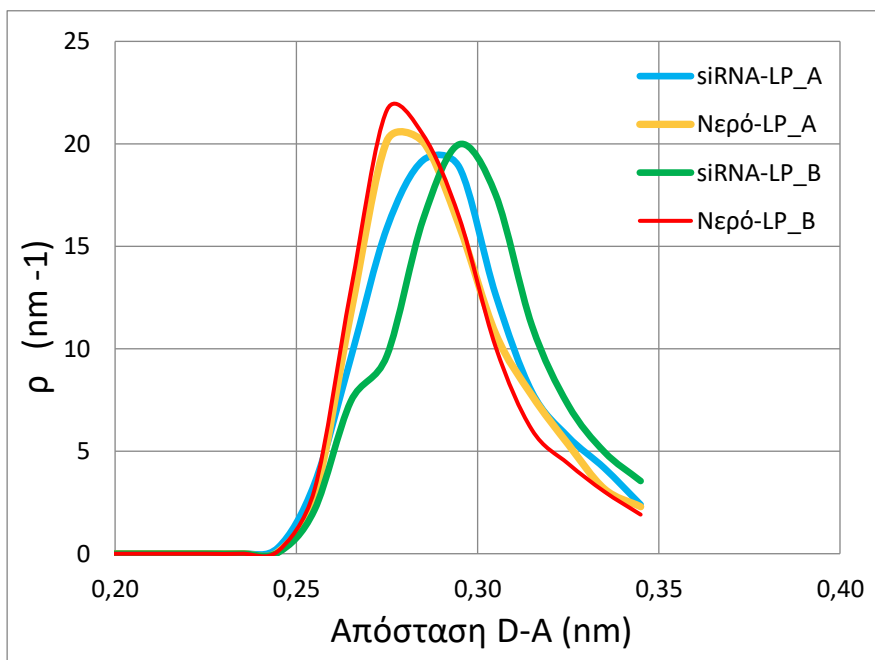
Όπως παρατηρείται τα στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια «διεκδικούνται» για σύνδεση δεσμών υδρογόνου τόσο από τα μόρια του νερού όσο και από το siRNA, αφού σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και με τα δύο μόρια. Ωστόσο, οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στο λιποπεπτίδιο και το νερό είναι σημαντικά περισσότεροι και στα δύο συστήματα.

Υπολογίστηκε πως στο πρώτο σύστημα, το LP\_A συνάπτει κατά μέσο όρο 3 δεσμούς υδρογόνου με το siRNA και 8 με τα μόρια του νερού. Όσον αφορά το δεύτερο σύστημα, οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ατόμων του λιποπεπτιδίου LP\_B και του siRNA είναι 2, ενώ κατά μέσο όρο 9 δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα σε αυτό και τα μόρια του νερού κατά τη διάρκεια της τροχιάς.

Ακόμη αξίζει να παρατηρηθεί ότι υπέρ των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του λιποπεπτιδίου με των μορίων του νερού λειτουργούν οι υδροξυλομάδες με τα άτομα οξυγόνου O5 και O6, καθώς, όπως παρατηρήθηκε στην ανάλυση ελαχίστων αποστάσεων, είναι απομακρυσμένες από το siRNA σε σχέση με τις άλλες δύο υδροξυλομάδες.

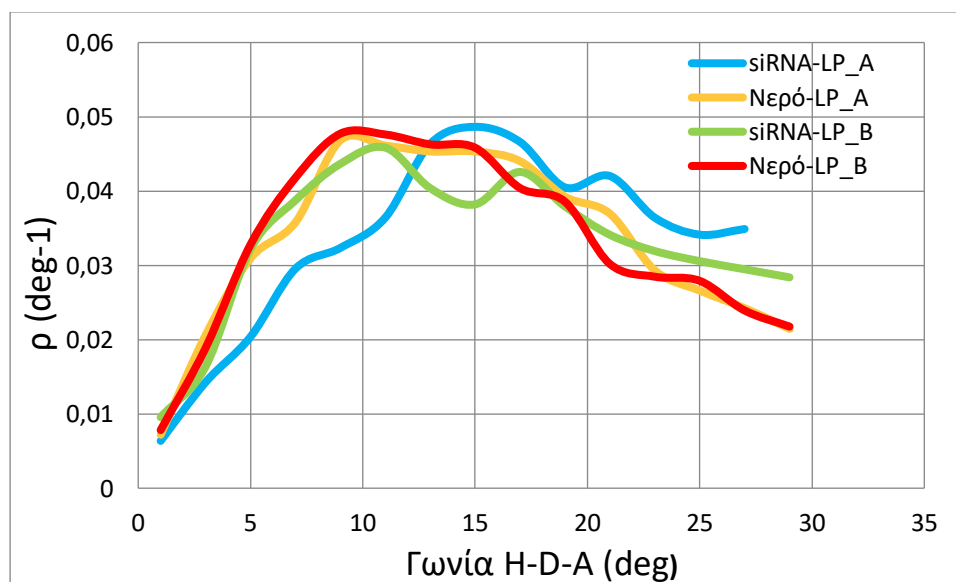
Ακόμη, παρατηρείται πως η χρονική εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου που δημιουργεί το λιποπεπτίδιο LP\_A με το siRNA συνάδει με τη χρονική εξέλιξη του αριθμού επαφών μεταξύ siRNA-LP\_A στο Σχήμα 3.16. Όταν οι επαφές LP\_A-siRNA αυξάνονται, ορισμένοι δεσμοί υδρογόνου «σπάνε» ανάμεσα στο λιποπεπτίδιο και τα μόρια του νερού και αντικαθίστανται από δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στα δύο βιομόρια. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως στο χρονικό διάστημα 50-67 ns, κατά το οποίο ο αριθμός επαφών παρουσιάζει σημαντική αύξηση, οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα δύο βιομόρια διπλασιάζονται.

Όσον αφορά το δεύτερο στερεοϊσομερές LP\_B σημειώνεται πως σχηματίζει κατά μέσο όρο ελαφρώς λιγότερους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού σε σχέση με όσους σχηματίζει το LP\_A και πως δεν εντοπίζονται έντονες διακυμάνσεις στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου κατά τη διάρκεια της τροχιάς.



**Σχήμα 3.33** Κατανομή μήκους της απόστασης D-A μεταξύ: siRNA - LP\_A (μπλε), siRNA-LP\_B (πράσινο), Νερό-LP\_A (πορτοκαλί), και Νερό-LP\_B (κόκκινο)

Όπως παρατηρείται από την καμπύλη κατανομής, και τα δύο λιποπεπτίδια αναπτύσσουν ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού από ότι με το siRNA (Σχήμα 3.33). Επισημαίνεται ακόμη πως το λιποπεπτίδιο LP\_B σχηματίζει ασθενέστερους δεσμούς υδρογόνου με το μόριο του siRNA, σε σχέση με το το LP\_A.



**Σχήμα 3.34** Κατανομή της γωνίας H-D-A μεταξύ: siRNA - LP\_A (μπλε), siRNA-LP\_B (πράσινο), Νερό-LP\_A (πορτοκαλί), και Νερό-LP\_B (κόκκινο).

Μέσω της κατανομής των γωνιών επιβεβαιώνεται πως οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα

λιποπεπτίδια και το νερό είναι πιο ισχυροί, ενώ ασθενέστεροι εμφανίζονται οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στο siRNA και το LP\_A.

Εν κατακλείδι, τα δύο λιποπεπτίδια παρουσιάζουν μικρές διαφορές τόσο στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου όσο και στην ένταση των δεσμών που δημιουργούν είτε με το siRNA είτε με το νερό. Δεδομένου ότι περιέχουν τα ίδια άτομα στη δομή τους, οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται ενδεχομένως στη διαφορετική στερεοϊσομέρεια των δύο μορίων η οποία επιβάλλει διαφορετικές διαμορφώσεις κατά τη σύνδεση με το siRNA.

## IV. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν ατομιστικές προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση ενός δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου siRNA και ενός συνθετικού λιποπεπτιδίου με την κωδική ονομασία cKK-E12, εμβαπτισμένα σε ιοντικό υδατικό διάλυμα. Το συγκεκριμένο λιποπεπτίδιο αποτελεί μόριο-κλειδί στη δομή λιποπεπτιδικών νανομεταφορέων, οι οποίοι προορίζονται να λειτουργήσουν ως οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού για νέας γενιάς θεραπείες, όπως οι στοχευμένες γονιδιακές θεραπείες, μέσω του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA ή για νέου τύπου γονιδιακά εμβόλια.

Δεδομένου ότι η στερεοϊσομέρεια ενός βιομορίου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επίδοσή του ως φαρμακευτική δραστική ουσία, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά στερεοϊσομερή του λιποπεπτιδίου cKK-E12 ως προς την πρόσδεσή τους με το siRNA, τα οποία κωδικοποιήθηκαν ως LP\_A και LP\_B. Σημειώνεται πως στο LP\_A εντοπίζεται απόλυτη διαμόρφωση R στους τέσσερις ασύμμετρους άνθρακες των λιπιδικών ουρών του μορίου, ενώ στο LP\_B απόλυτη διαμόρφωση S.

Προσομοιώθηκαν τα συστήματα (A) siRNA – LP\_A και (B) siRNA – LP\_B, σε υδατικό περιβάλλον παρουσία ιόντων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τα δύο συστήματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες σταθερής πίεσης  $P = 1 \text{ bar}$  και θερμοκρασίας  $T = 310\text{K} = 37^\circ\text{C}$  προκειμένου να προσομοιώνονται οι συνθήκες που επικρατούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Από τη μετεπεξεργασία των τροχιών, που παρήχθησαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για τα δύο συστήματα, εξήχθησαν πληροφορίες σχετικά με τη σύνδεση και τη διαμόρφωση των βιομορίων.

Αρχικά, εξετάστηκαν οι θέσεις των ατόμων του λιποπεπτιδίου σε σχέση με τα άτομα του siRNA και υπολογίστηκε η ελάχιστη απόσταση μεταξύ τους. Διαπιστώθηκε ότι και στα δύο συστήματα επιτυγχάνεται η επιθυμητή σύνδεση ανάμεσα στα δύο βιομόρια μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα ( $\approx 10 \text{ ns}$ ). Και τα δύο στερεοϊσομερή ενώνονται απευθείας με το ολιγονουκλεοτίδιο και η σύνδεση διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της τροχιάς, ενώ η μέση ελάχιστη απόσταση υπολογίστηκε  $0.19 \pm 0.01 \text{ nm}$  και στα δύο συστήματα.

Παρατηρήθηκε πως τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτιδία επιλέγουν διαφορετικές περιοχές του siRNA για πρόσδεση. Πιο συγκεκριμένα, το στερεοϊσομερές LP\_A προσεγγίζει το ελεύθερο 5' άκρο της Έλικας i, ενώ το στερεοϊσομερές LP\_B προσδένεται στο μέσο του επιμήκους άξονα της διπλής έλικας του siRNA, από την πλευρά της μικρής αύλακας. Συμπεραίνεται πως και οι δύο περιοχές αποτελούν πιθανές θέσεις πρόσδεσης ανάμεσα στα δύο βιομόρια και πως η διαφορετική συμπεριφορά των λιποπεπτιδίων ως προς το σημείο πρόσδεσης οφείλεται ενδεχομένως στη διαφορετική χωρική διάταξη των τεσσάρων ασύμμετρων ανθράκων στις λιπιδικές ουρές.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η γυροσκοπική ακτίνα για το μόριο του siRNA και του λιποπεπτιδίου. Η χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας του siRNA δεν παρουσίασε

έντονες διακυμάνσεις σε κανένα από τα δύο συστήματα. Ακόμη, η μέση τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας στο πρώτο και δεύτερο σύστημα ( $2.02 \pm 0.06$  και  $2.00 \pm 0.06$  nm αντίστοιχα) έχει παρόμοια τιμή με εκείνη που έχει το ολιγονουκλεοτίδιο όταν βρίσκεται ελεύθερο σε ιοντικό υδατικό διάλυμα στο σύστημα ( $2.06 \pm 0.08$  nm), υποδεικνύοντας πως η παρουσία του λιποπεπτιδίου δε φαίνεται να επηρεάζει τη διαμόρφωση του siRNA στο χρόνο που διαρκεί η προσομοίωση.

Όσον αφορά τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια, η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις ιδιαιτέρως για το λιποπεπτίδιο LP\_A, το οποίο υιοθετεί μία εκτεταμένη διαμόρφωση στο χώρο, μετά τα 67.0 ns, σε σύγκριση με το LP\_B. Η μετεπεξεργασία της τροχιάς έδειξε ότι το χρονικό διάστημα 66.6-67.0 ns ο δακτύλιος του λιποπεπτιδίου LP\_A προσεγγίζεται από ένα ιόν νατρίου (απόσταση 0.33 nm), το οποίο λόγω του μεγάλου μεγέθους και του θετικού φορτίου του ενδεχομένως επηρεάζει τη σταθερότητα της πρόσδεσης του δακτυλίου του λιποπεπτιδίου με το siRNA, συμβάλλοντας έτσι στην έντονη μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης του LP\_A. Επιπροσθέτως, η διαφορετική στερεοϊσομέρεια των λιποπεπτιδίων επιβάλλει διαφορετική στερεοδιάταξη των μορίων κατά την πρόσδεσή τους στο siRNA.

Οι έντονες διακυμάνσεις της γυροσκοπικής ακτίνας κατά τη διάρκεια των 100 ns της προσομοίωσης υποδηλώνουν πως (i) είτε το λιποπεπτίδιο, παρότι είναι ροφημένο στην επιφάνεια του siRNA, συνεχίζει να διατηρεί την κινητικότητά του, (ii) είτε πως το σύστημα δεν έχει εξισορροπήσει πλήρως στο χρόνο της προσομοίωσης και ότι το λιποπεπτίδιο, παρότι έχει προσδεθεί στο siRNA, αναζητά ανάμεσα σε πιθανές διαμορφώσεις εκείνες που εξασφαλίζουν την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Προκειμένου να εξακριβωθεί τι από τα δύο ισχύει θα ήταν χρήσιμο μελλοντικά να μελετηθεί το σύστημα σε μεγαλύτερους χρόνους προσομοίωσης.

Σε επόμενο στάδιο εξετάστηκε το κέλυφος ενυδάτωσης των βιομορίων, δηλαδή διερευνήθηκε ο αριθμός των μορίων νερού που βρίσκονται σε απόσταση 0.35 nm γύρω από τα βιομόρια του συστήματος. Παρατηρήθηκε πως τα μόρια νερού στο κέλυφος ενυδάτωσης του siRNA στο δεύτερο σύστημα είναι λιγότερα συγκριτικά με το πρώτο (διαφορά 12 μορίων νερού). Η διαφορά αυτή αποδίδεται τόσο στη διαφορετική στερεοδιάταξη των λιποπεπτιδίων όσο και στη διαφορετική θέση ρόφησης στην επιφάνεια του ολιγονουκλεοτιδίου, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής μεταξύ των βιομορίων στο σύστημα B.

Το κέλυφος ενυδάτωσης υπολογίστηκε ακολούθως για τα λιποπεπτίδια LP\_A και LP\_B. Παρατηρήθηκε πως και στα δύο λιποπεπτίδια ο αριθμός των μορίων νερού στο κέλυφος ενυδάτωσης μειώθηκε αισθητά τα πρώτα 10 ns της τροχιάς, δηλαδή το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η απόστασή τους από το siRNA μειώνεται και τελικά λαμβάνει χώρα η πρόσδεσή τους στο ολιγονουκλεοτίδιο. Συμπεραίνεται επομένως ότι η πρόσδεση με το siRNA με οποιοδήποτε από τα δύο λιποπεπτίδια LP\_A και LP\_B επιτυγχάνεται μέσω της αποβολής μορίων νερού από το κέλυφος ενυδάτωσης των βιομορίων. Ακόμα υπολογίστηκε πως το λιποπεπτίδιο LP\_A περιβάλλεται από 11% περισσότερα μόρια νερού σε σχέση με το LP\_B κατά τη διάρκεια της τροχιάς. Αυτή η διαφορά οφείλεται στην περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση που αποκτά το LP\_A σε σχέση με το LP\_B.

Σε επόμενο στάδιο εξετάστηκε και για τα δύο συστήματα ο αριθμός των εγγυτέρων επαφών μεταξύ των ατόμων του λιποπεπτιδίου και του siRNA, δηλαδή ο αριθμός των ζευγών ατόμων ανάμεσα στα δύο βιομόρια τα οποία βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους μικρότερη από 0.5 nm ή 0.4 nm ή 0.3 nm από τα μόρια του siRNA. Ο αριθμός των επαφών μεταξύ του λιποπεπτιδίου και του siRNA εξελίσσεται διαφορετικά με το χρόνο για τα δύο στερεοϊσομερή, και εμφανίζει μικρότερες διακυμάνσεις στην περίπτωση του LP\_B σε σχέση με το LP\_A. Μετά τα 60 ns και τα δύο λιποπεπτίδια φαίνεται να συνάπτουν περίπου τον ίδιο αριθμό επαφών με το siRNA.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθούν τα δομικά στοιχεία του λιποπεπτιδίου που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνδεσή του λιποπεπτιδίου με το siRNA, υπολογίστηκαν οι ελάχιστες αποστάσεις μεταξύ των ατόμων των χαρακτηριστικών χημικών ομάδων του και του ολιγονουκλεοτιδίου. Χαρακτηριστικές ομάδες του λιποπεπτιδίου αποτελούν ο ετεροκυκλικός εξαμελής δακτύλιος, ο οποίος περιέχει δύο άτομα αζώτου (N1,N2) και δύο άτομα οξυγόνου (O1,O2), οι δυο ομάδες τριτοταγούς αμίνης (N3,N4) εκ των οποίων η N3 είναι πρωτονιωμένη, οι τέσσερις ομάδες υδροξυλίου (O3,O4,O5,O6) και οι τέσσερις ομάδες τερματικών μεθυλίων στα ελεύθερα άκρα.

Στους αρχικούς χρόνους της προσομοίωσης τα δύο στερεοϊσομερή προσεγγίζουν το ολιγονουκλεοτίδιο με το δακτύλιο, ενώ στη συνέχεια ο δακτύλιος απομακρύνεται από το siRNA. Η ελάχιστη απόσταση μεταξύ δακτυλίου και siRNA παρουσιάζει μεγαλύτερες διακυμάνσεις για το LP σε σχέση με το LP\_B υποδεικνύοντας μία πιο σταθερή επιφάνεια επαφής του LP\_B με το siRNA.

Όσον αφορά τις δυο ομάδες τριτοταγούς αμίνης, το άζωτο της πρωτονιωμένης αμίνης, N3, εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά από το άζωτο της ουδέτερης αμίνης, N4, και στα δύο στερεοϊσομερή. Η μέση ελάχιστη απόσταση του N3 από το ολιγονουκλεοτίδιο δε ξεπερνά τα 0.39 nm στο LP\_A και τα 0.36 nm στο LP\_B, σε σχέση με τα 0.61 nm και τα 0.44 nm για το N4, αντιστοίχως. Επομένως, η πρωτονιωμένη αμίνη συμμετέχει στη δημιουργία εγγυτέρων επαφών με τα άτομα του siRNA, καθώς το γεγονός πως είναι θετικά φορτισμένη παίζει σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το siRNA, το οποίο έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων.

Σχετικά με τις ομάδες υδροξυλίου, παρατηρήθηκε και στα δύο συστήματα πως τα άτομα O3 και O4 είχαν εγγύτερη επαφή με το siRNA, σε σχέση με τα άτομα O5 και O6. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς τα άτομα O3 και O4 βρίσκονται στον ίδιο υδρογονανθρακικό κλάδο με την πρωτονιωμένη αμίνη N3, ενώ τα O5 και O6 βρίσκονται στον ίδιο κλάδο με την ουδέτερη αμίνη. Σημειώνεται επίσης πως η χρονική εξέλιξη των ελαχίστων αποστάσεων των ομάδων υδροξυλίου από το siRNA παρουσιάζει διαφορετική μορφή για τα δύο λιποπεπτίδια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις διαφορετικές θέσεις ρόφησης κατά μήκος του επιμήκους άξονα του siRNA και στη στερεοϊσομέρεια των μορίων, η οποία επάγει διαφορετική στερεοδιάταξη των δομικών μερών τους. Υπενθυμίζεται ότι το LP\_A έχει απόλυτη διαμόρφωση R για τους άνθρακες στις λιπιδικές ουρές ενώ το LP\_B απόλυτη διαμόρφωση S.

Όσον αφορά τους τέσσερις άνθρακες που ανήκουν στις ομάδες των τερματικών μεθυλίων, παρατηρήθηκε πως παρουσιάζουν έντονη κινητικότητα και στα δύο λιποπεπτίδια, ενώ η μέση απόστασή τους από το siRNA είναι αυξημένη σε σχέση με τα άτομα των υπόλοιπων χαρακτηριστικών ομάδων που εξετάστηκαν ξεπερνώντας κάποιες φορές την απόσταση των 0.90 nm. Συμπεραίνεται πως τα τερματικά μεθύλια δεν αποτελούν χημικές ομάδες μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η πρόσδεση του λιποπεπτιδίου στο siRNA.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι δεσμοί υδρογόνου που συνάπτουν τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια τόσο με το siRNA όσο και με τα μόρια του νερού. Παρατηρήθηκε πως τα λιποπεπτίδια σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου τόσο με το siRNA όσο και με το νερό, με τους τελευταίους να είναι περισσότεροι σε αριθμό και πιο ισχυροί και στα δύο συστήματα. Συμπεραίνεται πως το λιποπεπτίδιο λόγω των χαρακτηριστικών πολικών ομάδων που περιέχει στη δομή του «διεκδικείται» για δημιουργία δεσμών υδρογόνου τόσο από τα μόρια του νερού όσο και από το siRNA. Ακόμη, παρατηρείται πως στα χρονικά διαστήματα που ο αριθμός των εγγυτέρων επαφών ανάμεσα στο siRNA και το εκάστοτε λιποπεπτίδιο μειώνεται, σημειώνεται αύξηση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στο νερό και στο λιποπεπτίδιο. Επίσης, οι κατανομές του μήκους και της γωνίας των δεσμών υδρογόνου έδειξαν πως το λιποπεπτίδιο LP\_B σχηματίζει ασθενέστερους δεσμούς υδρογόνου με το μόριο του siRNA σε σχέση με το LP\_A, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου του λιποπεπτιδίου LP\_A με το νερό φαίνεται πως είναι μεγαλύτερης έντασης σε σχέση με του LP\_B.

Από την παραπάνω ανάλυση γίνεται φανερό ότι τα δύο στερεοϊσομερή λιποπεπτίδια εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά κατά την πρόσδεσή τους στο siRNA κατά το χρονικό διάστημα των 100 ns για το οποίο διεξήχθησαν οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν τα δομικά χαρακτηριστικά των cKK-E12 λιποπεπτιδίων, τα οποία εμπλέκονται και επηρεάζουν το μηχανισμό πρόσδεσης τους στο ολιγονουκλεοτίδιο. Επίσης, αναδεικνύουν και υποστηρίζουν την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της στερεοϊσομέρειας των μορίων που απαρτίζουν ένα λιπιδικό νανομεταφορέα στο μηχανισμό δέσμησης του siRNA, με σκοπό το σχεδιασμό γονιδιακών νανομεταφορέων με ακόμα καλύτερες επιδόσεις, οι οποίοι θα οδηγήσουν σε ασφαλέστερες και ακόμη πιο αποτελεσματικές γονιδιακές θεραπείες.

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έδειξαν πως για το χρόνο των 100ns το λιποπεπτίδιο συνεχίζει να διατηρεί την κινητικότητά του, παρ' ότι είναι ροφημένο στην επιφάνεια του siRNA και στα δύο συστήματα. Μελλοντικά θα ήταν σκόπιμο να μελετηθεί το σύστημα σε μεγαλύτερους χρόνους προσομοίωσης, ώστε να διαπιστωθεί αν η κινητικότητα αυτή των προσδεδεδμένων λιποπεπτιδίων διατηρείται σε βάθος χρόνου. Ακόμη θα ήταν χρήσιμο να γίνει και ενεργειακή ανάλυση των δύο συστημάτων προκειμένου να μελετηθεί ποιες αλληλεπιδράσεις είναι εκείνες που ευνοούν περισσότερο την πρόσδεση των δύο βιομορίων, όπως επίσης και να εξεταστεί αν υπάρχει διαφορά στην ένταση της πρόσδεσης για τα δύο στερεοϊσομερή με το siRNA. Επιπροσθέτως, δεδομένου ότι το λιποπεπτίδιο cKK-E12 διαθέτει έξι στερεογονικά κέντρα, ως μελλοντικός στόχος τίθεται η μελέτη και των υπόλοιπων στερεοϊσομερών ως προς την πρόσδεσή τους με το siRNA και η σύγκρισή τους με τα στεροϊσομερή LP\_A και LP\_B που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Τέλος, δεδομένου ότι, εκτός του cKK-E12, συμμετέχουν και άλλα μόρια στην αυτό-συγκρότηση του λιποπεπτιδικού νανοσωματιδιακού νανομεταφορέα, όπως αναφέρθηκε στην Παράγραφο 1.4.4, σε επόμενο στάδιο προτείνεται η προσομοίωση συστήματος που θα περιέχει το σύνολο των συστατικών του νανοσωματιδίου.



## Βιβλιογραφία

1. Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. 1970, 227, 561-563.
2. Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Essential Cell Biology* (3<sup>rd</sup> Edition). Garland Science. 2010, 292.
3. Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M.L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V.; Jackson, R. B. *Campbell Biology* (10<sup>th</sup> Edition). 2011, page 365.
4. Brenner, S.; Mille, J. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2<sup>nd</sup> Edition). 2013, 221-222.
5. Saurabh, S.; Vidyarthi, A.S.; Prasad, D. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*. 2014, 239, 543-564.
6. Fougerolles, A.; Vornlocher, H.P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007, 6, 443-453.
7. Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411, 494-498.
8. John, M.; Constien, R.; Akinc, A.; Goldberg, M.; Moon, Y.A.; Spranger, M.; Hadwiger, P.; Soutschek, J.; Vornlocher, H.P.; Manoharan, M.; Stoffel, M.; Langer, R.; Anderson, D.G.; Horton, J.D.; Kotliansky, V.; Bumcrot, D. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature*. 2007, 449, 745-747.
9. Peddi, V.; Ratner, L.; Cooper, M.; et al. Treatment with QPI-1002, a short interfering (SI) RNA for the prophylaxis of delayed graft function. *Transplantation*. 2014, 98, 153.
10. Solano, E.C.R.; Kornbrust, D.J.; Beaudry, A.; Foy, J.W.; Schneider, D.J.; Thompson, J.D. Toxicological and pharmacokinetic properties of QPI-1007, a chemically modified synthetic siRNA targeting caspase 2 mRNA, following intravitreal injection. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2014, 24, 258-266.
11. Lee, D.U.; Huang, W.; Rittenhouse, K.D.; Jessen, B. Retina expression and cross-species validation of gene silencing by PF-655, a small interfering RNA against RTP801 for the treatment of ocular disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2012, 28, 222-230.
12. Fitzgerald, K.; Frank-Kamenetsky, M.; Shulga-Morskaya, S.; et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet*. 2014, 383, 60-68.
13. Taberner, J.; Shapiro, G.I.; LoRusso, P.M.; et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discovery*. 2013, 3, 406-417.
14. Zhao, X.; Pan, F.; Holt, C.M.; Lewis, A.L.; Lu, J.R. Controlled delivery of antisense oligonucleotides: a brief review of current strategies. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009, 6, 673-686.

15. Pecot, C.V.; Calin, G.A.; Coleman, R.L.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A.K. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer*.2011, 11, 59-67.
16. Whitehead, K.A.; Langer, R.; Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews DrugDiscovery*. 2009, 2, 129-138.
17. Selvam, C.; Mutisya, D.; Prakash, S.; Ranganna, K.;Thilagavathic, R. Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends.*Chemical Biology & Drug Design*. 2017, 90, 665-678.
18. Aigner, A. Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs.*Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2007, 9, 345-352.
19. Chira, S.; Jackson, C.; Oprea, I.; et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*. 2015, 6, 30675-30703.
20. Alba,R.; Bosch,A.; Chillon, M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*.2005, 12, S18-S27.
21. Kotani, H.; NewtonIII,P.B.;Zhang, S.; Chiang, Y.L.; Otto, E.; Weaver, L.; Blaese, R.M.;Anderson, W.F.; McGarrity, G.J. Improved Methods of Retroviral Vector Transduction and Production for Gene Therapy.*Human Gene Therapy*.1994, 5, 19-28.
22. Copreni, E.; Penzo, M.; Carrabino, S.; Conese, M. Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. *Gene Therapy*. 2004, 11, S67-S75.
23. Thomas, C.E.; Ehrhardt, A.; Kay, M.A.Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2003, 4, 346-358.
24. Gupta, N.; Rai,D.V.; Jangid, A.K.; Pooja, D.; Kulhari, H. Nanomaterials-Based siRNA Delivery: Routes of Administration, Hurdles and Role of Nanocarriers. *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology*. 2019, 67-114.
25. Mearu, H.; Lu, J.; Tamanoi, F. Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, 95, 40-49.
26. Wang, H.; Zhong, L.; Li, Y.; Xu, X.; Xing, C.; Wang, M.; Bai S-M.; Lu C-H.; Yang, H-H.A black phosphorus nanosheet-based siRNA delivery system for synergistic photothermal and gene therapy. *Chemical Communication*. 2018, 54, 3142-3145.
27. Guo, S.; Huang, Y.; Jiang, Q.; Sun, Y.; Deng, L.; Liang, Z.; Du, Q.; Xing, J.; Zhao, Y.; Wang, P.C.; Dong, A.; Liang, X-J.Enhanced Gene Delivery and siRNA Silencing by Gold Nanoparticles Coated with Charge-Reversal Polyelectrolyte. *ACS Nano*. 2010, 4, 5505-5511.
28. Lamberti, M.; Zappavigna, S.; Sannolo, N.; Porto, S.; Caraglia, M. Advantages and risks of nanotechnologies in cancer patients and occupationally exposed workers. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014, 11, 1087-1101.
29. Malhotra, M.; Tomaro-Duchesneau, C.; Saha, S.; Prakash, S. Systemic SiRNA delivery via peptide-tagged polymeric nanoparticles, targeting PLK1 gene in a mouse xenograft model of colorectal cancer. *International Journal of Biomaterials*. 2013, 1-13.

30. Zhu, L.; Perche, F.; Wang, T.; Torchilin, V. P. Matrix metalloproteinase 2-sensitive multifunctional polymeric micelles for tumor-specific co-delivery of siRNA and hydrophobic drugs. *Biomaterials*. 2014, 35, 4213-4222.
31. Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N.K.; Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2014, 39, 268-307.
32. Ren, L.; Zhang, Y.; Cui, C.; Bi, Y.; Ge, X. Functionalized graphene oxide for anti-VEGF SiRNA delivery: Preparation, characterization and evaluation in vitro and in vivo. *RSC Advances*. 2017, 7, 20553-20566.
33. Dri, D.A.; Marianecci, C.; Carafa, M.; Gaucci, E.; Gramaglia, D. Surfactants, Nanomedicines and Nanocarriers: A Critical Evaluation on Clinical Trials. *Pharmaceutics* 2021, 13(3), 381.
34. Zhang X.; Goel V.; Robbie, G.J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2019, 60, 573-585.
35. <https://www.pfizer.com>
36. <https://www.astrazeneca.com>
37. Dong, Y.; Love, K.T.; Dorkin, J.R.; Sirirungruang, S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Bogorad, R.L.; Yin, H.; Chen, Y.; Vegas, A.J.; Alabi, C.A.; Sahay, G.; Olejnik, K.T.; Wang, W.; Schroeder, A.; Lytton-Jean, A.K.R.; Siegwart, D.J.; Akinc, A.; Barnes, C.; Barros, S.A.; Carioto, M.; Fitzgerald, K.; Hettinger, J.; Kumar, V.; Novobrantseva, T.I.; Qin, J.; Querbes, W.; Kotliansky, V.; Langer, R.; Anderson, D.G. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *National Academy of Sciences*. 2014, 111, 3955-3960.
38. Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press; Oxford, 1991.
39. Pantatosaki, E.; Papadopoulos, G. K. On the computation of long-range interactions in fluids under confinement: application to pore systems with various types of spatial periodicity. *J. Chem. Phys.* 2007, 127, 164723.
40. P. Ewald, *Ann. Phys.* 64, 253, 1921.
41. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Chem. Phys.* 1984, 81, 3684.
42. Yuan, Y.; Pei, Y.; Chen, H.Y.; Tuschl, T.; Patel, D.J. A Potential Protein-RNA Recognition Event along the RISC-Loading Pathway from the Structure of *A. aeolicus* Argonaute with Externally Bound siRNA. *Structure* 2006, 14, 1557-1565.
43. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* 1996, 14, 33–38.
44. Li, S.; Olson, W. K.; Lu, X.-J. Web 3DNA 2.0 for the analysis, visualization, and modeling of 3D nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, W26–W34
45. US Food and Drug Administration; Guidance Document. Development of New Stereoisomeric Drugs , 1992. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs>
46. Evans, A.M. Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clin Rheumatol.* 2001 20 Suppl 1:S9-14.

47. Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. Stereochemical Control of the DNA Binding Affinity, Sequence Specificity, and Orientation Preference of Chiral Hairpin Polyamides in the Minor Groove. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 1382–1391.
48. Arjmand, F.; Sayeed, F.; Parveen, S.; Tabassum, S.; Juvekar, A. S.; Zingde, S. M. Design and synthesis of (S)- and (R)-enantiomers of [4-(2-hydroxy-1-phenylethylimino)pent-2-ol]-dimethyltin(IV) and 2,2-dimethyl-4-phenyl-1,3,2-oxazastannolidine: in vitro antitumor activity against human tumor cell lines and in vivo assay of (S)-enantiomers. *Dalton Trans.* 2013, 42, 3390–3401.
49. Pantatosaki, E.; Papadopoulos, G. K. Binding Dynamics of siRNA with Selected Lipopeptides: A Computer-Aided Study of the Effect of Lipopeptides' Functional Groups and Stereoisomerism. *J. Chem. Theory Comput.* 2020, 16, 3842–3855.
50. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179–5197.
51. Kührová, P.; Otyepka, M.; Šponer, J.; Banáš, P. Are Waters around RNA More than Just a Solvent? –An Insight from Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* 2014, 10, 401–411.
52. Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015, 1–2, 19–25.
53. Flory, P. J.; Jackson-C, J. C.; Wood, J. *Statistical Mechanics of chain molecules.* John Wiley & Sons, INC., 1969.
54. Laage, D.; Elsaesser, T.; Hynes J.T. Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules. *Chem. Rev.* 2017, 117, 16, 10694–10725
55. Kolokathis, P. D.; Pantatosaki, E.; Papadopoulos, G. K. Atomistic Modeling of Water Thermodynamics and Kinetics Within MIL-100(Fe). *J. Phys. Chem. C* 2015, 119, 20074–20084.
56. Fröhlich, D.; Pantatosaki, E.; Kolokathis, P. D.; Markey, K.; Reinsch, H.; Baumgartner, M.; van der Veen, M. A.; De Vos, D. E.; Stock, N.; Papadopoulos, G. K.; Henninger, S. K.; Janiak, C. Water adsorption behaviour of CAU-10-H: A thorough investigation of its structure-property relationships. *J. Mater. Chem. A* 2016, 4, 11859–11869.
57. Splith, T.; Pantatosaki, E.; Kolokathis, P. D.; Fröhlich, D.; Zhang, K.; Földner, G.; Chmelik, C.; Jiang, J.; Henninger, S. K.; Stallmach, F.; Papadopoulos, G. K. Molecular Dynamics Phenomena of Water in the Metalorganic Framework MIL-100(Al), as Revealed by Pulsed Field Gradient NMR and Atomistic Simulation. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121, 18065–18074.
58. Chen, D.; Oezguen, N.; Urvil, P.; Ferguson, C.; Dann, S. M.; Savidge, T. C. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci. Adv.* 2016, 2, e1501240.
59. Schiebel, J.; Gaspari, R.; Wulsdorf, T.; Ngo, K.; Sohn, K.; Schrader, T. E.; Cavalli, A.; Ostermann, A.; Heine, A.; Klebe, G. Intriguing role of water in protein-ligand binding studied by neutron crystallography on trypsin complexes. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3559.