



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

**Αξιολόγηση της σταθερότητας συμπλόκων του
ογκογονιδίου c-Myc και πιθανών αναστολέων μέσω
προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πυλαρινού Κλεονίκη

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Δέτση Αναστασία

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

Περίληψη

Η πρωτεΐνη c-Myc είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την διαίρεση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Η απορρύθμιση της έκφρασης της c-Myc έχει συσχετιστεί με περισσότερο από το 30% όλων των μορφών ανθρώπινου καρκίνου και η αναστολή της αποτελεί υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η c-Myc αποτελεί μέλος της οικογένειας των εγγενώς αδιάτακτων πρωτεϊνών, καθώς χαρακτηρίζεται από έλλειψη σταθερής δευτεροταγής και τριτοταγής δομής στην αδέσμευτή της μορφή και καθίσταται λειτουργική εφόσον σχηματίζει ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη Max. Επομένως, ένας πιθανός τρόπος παρεμποδισμού της λειτουργίας της είναι η αναστολή του πρωτεϊνικού συμπλόκου c-Myc και Max. Η αναστολή αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την σύνδεση μικρών μορίων στην ελεύθερη μορφή της c-Myc.

Καθώς η αδέσμευτη μορφή της c-Myc δεν εμφανίζει δευτεροταγή δομικά στοιχεία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλασσικές τεχνικές σχεδιασμού αναστολέων με βάση τη δομή της πρωτεΐνης. Σε αυτήν την εργασία, προτείνουμε να αξιολογηθούν σύμπλοκα μίας λειτουργικής περιοχής του ογκογονιδίου c-Myc (Myc402-412) με γνωστούς αναστολείς της πρωτεΐνης μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, ώστε να εξεταστεί η σταθερότητά τους στο χρόνο και στο χώρο. Η υπόθεση εργασίας είναι ότι εάν ένα μικρό μόριο προσδένεται σταθερά στον χρόνο στη c-Myc, τότε θα αναστέλλει τον ετεροδιμερισμό της c-Myc με την Max και συνεπώς θα αναστέλλεται η μεταγραφική δράση της c-Myc. Στη συγκεκριμένη εργασία θα μελετήσουμε τον αριθμό των μικρά μόρια που θα παραμείνουν σταθερά προσδεμένα στη c-Myc, ώστε να κατανοήσουμε εάν η συγκεκριμένη μέθοδος έχει προβλεπτική ικανότητα να διαχωρίζει δραστικούς από μη δραστικούς αναστολείς. Τα υπό μελέτη μόρια αξιολογήθηκαν επίσης ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με την αλληλουχία c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, ώστε να αξιολογηθεί ο πιθανός μηχανισμός πρόσδεσής τους στη c-Myc.

Μέσω της παρούσας μελέτης, έγινε πρόβλεψη της πρόσδεσης δύο εκ των τριών αληθώς θετικών προσδετών. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η αδυναμία πρόσδεσης των δύο αληθώς αρνητικών δειγμάτων. Τέλος, διερευνήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης αναστολέων της πρωτεΐνης, για τους όποιους δεν έχουμε γνώση της περιοχής πρόσδεσης τους.

Abstract

c-Myc is a transcriptional factor, that regulates the transcription of genes involved in cellular metabolism, growth, proliferation, differentiation, and death. The deregulation of the expression of c-Myc is linked to more than 30% of all forms of human cancer, therefore, its inhibition is a promising prospect for the development of anticancer therapies. c-Myc is part of a family of intrinsically disordered proteins, as it lacks secondary and tertiary structure elements in its apo form, and is activated only when it heterodimerises with the protein Max. Therefore, a possible strategy for the inhibition of c-Myc's function, is the inhibition of the heterodimerization of c-Myc and Max. This inhibition can be achieved through the binding of small molecules to c-Myc.

Due to the fact that c-Myc in its apo form has no secondary structural elements, classical targeting drug design approaches based on the structure of the protein cannot be used. In this thesis, it is proposed to evaluate the stability of the complex of a functional site of the c-Myc oncoprotein (c-Myc 402-412) with potential inhibitors, using Molecular Dynamics. The hypothesis of the thesis, is that if a small molecule is bound to c-Myc throughout the simulation time, then it will inhibit the heterodimerization between c-Myc and Max, and therefore, will inhibit the transcriptional activity of c-Myc. In this thesis, we examine which small molecules bind with stability to c-Myc, in order to understand if this method is able to distinguish the active and non-active inhibitors. These small molecules were also evaluated based on their physicochemical properties and the interactions formed between them and the c-Myc 402-412 region, in order to assess their binding mechanism.

In this study, we predicted the binding of the two out of three known inhibitors of this region. Additionally, we confirmed that the two negative controls do not bind on c-Myc 402-412. Finally, we investigated the binding of six unknown inhibitors.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών σε συνεργασία με την Ερευνήτρια Β' Δρ. Ζωή Κούρνια, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Αναστασία Δέτση, η οποία μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την παρούσα διπλωματική και που με στήριξε και με συμβούλευσε όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ την Δρ. Ζωή Κούρνια για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, καθώς μου παρείχε την δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριο της και να γνωρίσω τον τομέα της υπολογιστικής χημείας, μέσω της εκπαίδευσης και της καθοδήγησής της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της Σχολής Χημικών Μηχανικών Τόπακα Ευάγγελο και Ζαννίκο Φανούριο, οι οποίοι ήταν μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την συνεισφορά τους μέσω των εύστοχων ερωτήσεων και παρατηρήσεων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μιχάλη Παπαδουράκη, ο οποίος με συμβούλευσε και με καθοδήγησε καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, τόσο με τεχνικά ζητήματα, όσο και με το θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Δανάη Κοτζαμπάση, η οποία με στήριξε και με συμβούλευσε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Ομοίως θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τον Δρ. Αλέξη Χατζηγούλα, Δρ. Πάνο Κούκο και Γιάννη Παπάζογλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και τις φίλες μου, που τόσα χρόνια και ειδικά φέτος, ήταν δίπλα μου και με στήριζαν σε κάθε βήμα, που έκαναν πιο όμορφες τις μέρες μου, γεμάτες με όνειρα για το μέλλον και λιακάδα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για όλη την στήριξη και την αγάπη.

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	7
1.1 Οικογένεια πρωτεϊνών MYC	7
1.2 Φυσιολογική λειτουργία της c-Myc στο κύτταρο.....	7
1.3 Δομή της πρωτεΐνης c-Myc.....	7
1.4 Ετεροδιμερισμός c-Myc και ρόλος του ετεροδιμερούς στο κύτταρο	9
1.5 Ρόλος της c-Myc στον καρκίνο και σημασία της ως θεραπευτικός στόχος.....	10
1.6 c-Myc ως φαρμακολογικός στόχος.....	11
1.6.1 Γνωστοί αναστολείς του ετεροδιμερισμού c-Myc-Max.....	11
1.7 Αποτελέσματα προηγούμενων υπολογιστικών μελετών	13
1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	15
Κεφάλαιο 2. Θεωρητικό Υπόβαθρο	17
2.1 Εισαγωγή στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων.....	17
2.2 Μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων, βασιζόμενες στην δομή της πρωτεΐνης.....	18
2.2.1 Κοιλότητες πρόσδεσης στο σχεδιασμό φαρμάκων και η πρόσδεση μικρών μορίων στη c-MYC.....	19
2.2.2 Προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής	19
2.3 Υπολογισμοί μοριακής αγκυροβόλησης (Docking).....	20
2.4 Συνάρτηση δυναμικής ενέργειας - Πεδίο δυνάμεων (Force Field).....	22
2.5 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ).....	26
2.5.1 Βασικές αρχές των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ).....	26
2.5.2 Προετοιμασία συστήματος.....	28
2.5.3 Ελαχιστοποίηση ενέργειας	28
2.5.4 Θέρμανση συστήματος.....	30
2.5.5 Εξισορρόπηση συστήματος	30
2.5.6 Παραγωγή τροχιάς.....	30
2.6 Ανάλυση ιδιοτήτων συστήματος.....	31
2.6.1 Ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD)	31
2.6.2 Ομαδοποίηση πρωτεϊνικών δομών (Clustering).....	32
2.6.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες	32
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα.....	34
3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων	34
3.2 Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής στην ελεύθερη μορφή της c-Myc	34
3.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συστήματα της c-Myc με επιλεγμένους προσδέτες.....	36
3.3.1 Επιλογή και δημιουργία συστημάτων προς προσομοίωση	37

3.3.2 Παράμετροι προσομοίωσης.....	39
3.3.3 Αναλύσεις προσομοιώσεων.....	40
Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα	70
Κεφάλαιο 5. Μελλοντικά Σχέδια	72
Βιβλιογραφία	73

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Οικογένεια πρωτεϊνών MYC

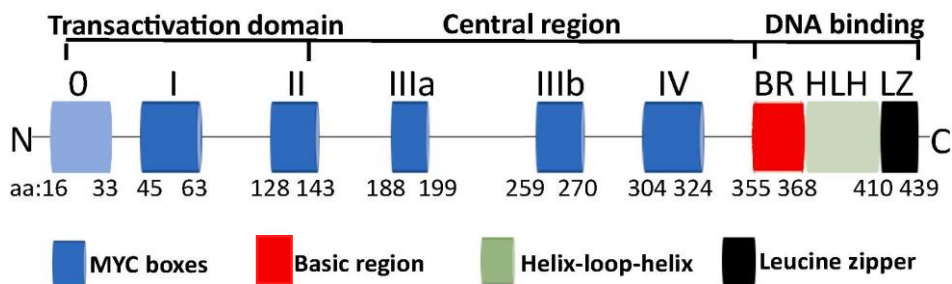
Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια MYC είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι στοχεύοντας σε μια καθορισμένη αλληλουχία DNA, σηματοδοτούν κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, τον μεταβολισμό και την απόπτωση των κυττάρων. Η οικογένεια πρωτεϊνών Myc αποτελείται από τρία μέλη, την c-Myc, την l-Myc και τέλος, την n-Myc. Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται εντός του πυρήνα του κυττάρου και εμφανίζουν παρόμοιες κυτταρικές λειτουργίες, με κύρια διαφορά, την περιορισμένη έκφραση των l-Myc και n-Myc σε συγκεκριμένους ιστούς [1]. Η παρούσα εργασία θα εστιάσει στην πρωτεΐνη c-Myc, η οποία συχνά αναφέρεται απλώς και ως Myc.

1.2 Φυσιολογική λειτουργία της c-Myc στο κύτταρο

Η c-Myc είναι μέλος μιας ομάδας μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται Εγγύς Δίκτυο της MYC (PMN, Proximal MYC Network). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη c-Myc είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της μεταγραφής μέχρι και του 15% των γονιδίων του ανθρώπινου οργανισμού, γεγονός που καταδεικνύει την σημασία της. Η c-Myc μεσολαβεί κατ' αυτό τον τρόπο σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες όπως στην κυτταρική ανάπτυξη, στον κυτταρικό κύκλο, στην κυτταρική διαφοροποίηση (differentiation), στην απόπτωση, στο μεταβολισμό, στην επιδιόρθωση του DNA, στην μετάφραση πρωτεϊνών, στην ανοσολογική απόκριση και τέλος, στον σχηματισμό βλαστοκυττάρων (stem cells) [2]. Για την ορθή λειτουργία της c-Myc είναι απαραίτητος ο έλεγχος της έκφρασης της, ο οποίος πραγματοποιείται από πληθώρα κυτταρικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, την αρνητική αυτορρύθμιση και την πρωτεόλυση [1]. Επιπλέον, η c-Myc ως μονομερές, δεν έχει την δυνατότητα να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Συνεπώς, για να πραγματοποιηθεί η φυσιολογική λειτουργία της c-Myc στο κύτταρο, είναι απαραίτητος ο διμερισμός της με μία πρωτεΐνη συμπαράγοντα, την Max, η οποία ανήκει και αυτή στην ομάδα Εγγύς δίκτυο της MYC. Η πραγματοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής από τα ετεροδιμερή της c-Myc με την Max γίνεται μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA, στο επονομαζόμενο πλαίσιο ενίσχυσης (E-Box, Enhancer Box), το οποίο έχει σταθερή αλληλουχία και συχνά βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου [1].

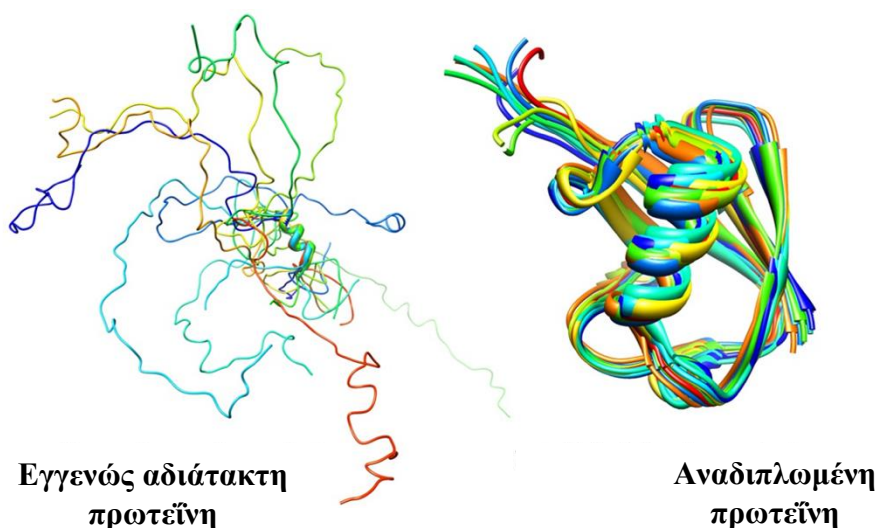
1.3 Δομή της πρωτεΐνης c-Myc

Η πρωτεΐνη c-Myc απαρτίζεται από 439 αμινοξέα και περιλαμβάνει υψηλά διατηρημένες περιοχές (highly conserved regions), οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1, η c-Myc περιλαμβάνει ένα υψηλά αδιάτακτο N-τελικό άκρο ενεργοποίησης (N-terminal transactivation domain TAD), τα πλαίσια Myc (MYC Boxes), καθώς και το C-τελικό άκρο (C-terminal domain), το οποίο περιέχει τη δομή έλικας-στροφής-έλικας-φερμουάρ λευκίνης (basic helix-loop-helix leucine zipper, bHLHLZ) και το τμήμα πρόσδεσης με το DNA (DNA-binding domain, DBD) [1].



Σχήμα 1.1 Περιοχές που περιέχονται στην πρωτεΐνη c-Myc.
 Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [3].

Βασικό χαρακτηριστικό της c-Myc αποτελεί και η αδιάτακτη δομή της. Πιο συγκεκριμένα, η c-Myc ανήκει στην ομάδα των εγγενώς αδιάτακτων πρωτεϊνών (Intrinsically disordered proteins, IDPs), οι οποίες χαρακτηρίζονται από απουσία σταθερού δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής σε όλη την αμινοξική αλληλουχία ή σε μεγάλο μέρος αυτής. Οι αδιάτακτες πρωτεΐνες, σε φυσιολογικές συνθήκες, δεν αναδιπλώνονται στον χώρο, αλλά υπάρχουν ως ένα σύνολο διακριτών διαμορφώσεων (Σχήμα 1.2). Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μεγάλη διαμορφωτική ελευθερία με αποτέλεσμα να έχουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με πληθώρα πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που σχηματίζονται σε αυτές τις περιπτώσεις, δρουν σταθεροποιητικά ως προς την δομή της πρωτεΐνης και συμβάλλουν στην δράση της, όπως και στην περίπτωση της c-Myc που θα μελετηθεί στην Υποενότητα 1.4 [2].

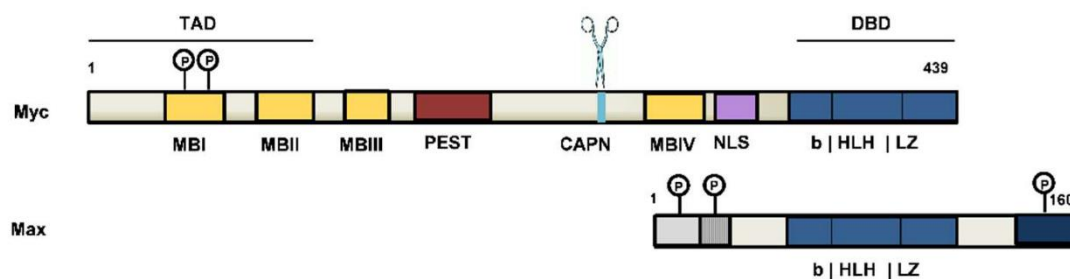


Σχήμα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση των δομών μιας εγγενώς αδιάτακτης πρωτεΐνης (αριστερά) και μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (δεξιά).
 Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [4].

1.4 Ετεροδιμερισμός c-Myc και ρόλος του ετεροδιμερούς στο κύτταρο

Όπως αναφέρθηκε στις Υποενότητες 1.2 και 1.3, για την λειτουργία της πρωτεΐνης c-Myc είναι αναγκαίος ο ετεροδιμερισμός της με μια άλλη πρωτεΐνη, που έχει ως συνέπεια την σταθεροποίηση της δομής της. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη με την οποία ετεροδιμερίζεται η c-Myc είναι η πρωτεΐνη Max. Και οι δύο πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων που φέρουν τη δομή έλικας-στροφής-έλικας-φερμουάρ λευκίνης. Σε αντίθεση με την c-Myc, η Max έχει την δυνατότητα σχηματισμού ετεροδιμερούς με την c-Myc, αλλά και ασταθών ομοδιμερών. Σε φυσιολογικά επίπεδα, τα ομοδιμερή της Max αποτυγχάνουν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Όμως η υπερέκφραση της Max μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της μεταγραφής και έχει αποδειχτεί πως μπορεί να μειώσει την καρκινογένεση που προκύπτει από τη δράση της c-Myc [1].

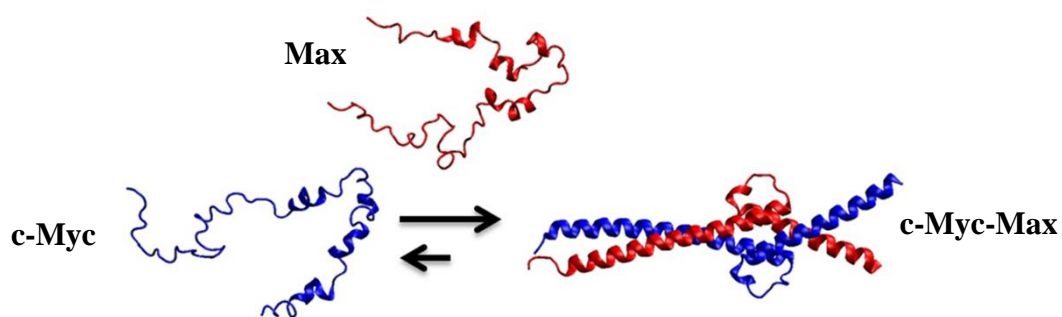
Δομικά η Max φέρει πολλές ομοιότητες με την c-Myc, όμως σε αντίθεση με την c-Myc δεν έχει τμήμα ενεργοποίησης (TAD), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3 Αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης c-Myc και της Max.

Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [1].

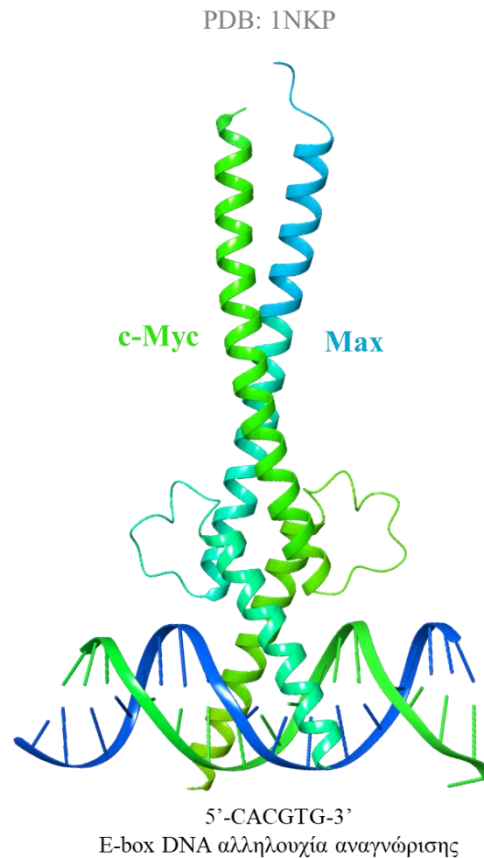
Ο διμερισμός μεταξύ των c-Myc και Max γίνεται μέσω συζευγμένης αναδίπλωσης και πρόσδεσης (coupled folding and binding) και έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός συμπλόκου με σταθερή ελικοειδή δομή (Σχήμα 1.4). Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στον σχηματισμό συμπλόκων υψηλής εκλεκτικότητας και χαμηλής συγγένειας, λόγω του υψηλού εντροπικού κόστους σχηματισμού των συμπλόκων [2].



Σχήμα 1.4 Σχηματισμός ετεροδιμερούς από τις πρωτεΐνες c-Myc (μπλε) και Max (κόκκινη), μέσω συζευγμένης αναδίπλωσης και πρόσδεσης.

Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [2].

Το ετεροδιμερές c-Myc-Max αναγνωρίζει και προσδένεται σε μια αλληλουχία 6 νουκλεοτιδίων στο DNA (5'-CACGTG-3'), η οποία ονομάζεται πλαίσιο ενίσχυσης (E-Box) και εντοπίζεται στην περιοχή των υποκινητών (promoter) των γονιδίων στόχων. Επομένως, μέσω της πρόσδεσης ενεργοποιείται η μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων [1]. Η πρόσδεση του διμερούς στο DNA προσελκύει πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό της χρωματίνης [5].



Σχήμα 1.5 Πρόσδεση ετεροδιμερούς c-Myc-Max στην αλληλουχία αναγνώρισης πλαισίου ενίσχυσης (E-box) του DNA.

1.5 Ρόλος της c-Myc στον καρκίνο και σημασία της ως θεραπευτικός στόχος

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η κατανόηση του καρκίνου σε μοριακό επίπεδο έχει διευρυνθεί σημαντικά. Ο ρόλος της πρωτεΐνης c-Myc στον καρκίνο είναι πολύ σημαντικός, καθώς αποτελεί μία από τις πιο συχνά απορρυθμισμένες ογκοπρωτεΐνες. Στην απορρύθμιση της c-Myc μπορούν να αποδοθούν μέχρι και 70.000 θάνατοι από καρκίνο στην Αμερική. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο της c-Myc συχνά υπερεκφράζεται, είτε μέσω χρωμοσωμικής μετατόπισης, όπως παρατηρείται στις περιπτώσεις του λεμφώματος, είτε μέσω ενίσχυσης, όπως παρατηρείται στο 20 – 30 % των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και του προστάτη είτε τέλος, λόγω απώλειας του φυσιολογικού ελέγχου μεταγραφής, όπως παρατηρείται στο 60 – 80 % των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου [6].

Η αναστολή της c-Myc συνεπώς, μπορεί να αποτελέσει μία πιθανή λύση για το πρόβλημα αυτό. Οι πιθανές στρατηγικές για την αναστολή της λειτουργίας της c-Myc αναφέρονται στην Υποενότητα 1.6.

1.6 c-Myc ως φαρμακολογικός στόχος

Όπως αναφέρθηκε στην Υποενότητα 1.5, η αναστολή της c-Myc μπορεί να συμβάλει στην αντιμετώπιση του καρκίνου, που οφείλεται στην απορρύθμιση της. Πιο συγκεκριμένα οι κυριότερες στρατηγικές αναστολής της c-Myc είναι οι: α) αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου της c-Myc, β) αναστολή των γονιδίων που στοχεύονται από την c-Myc, γ) αναστολή του ετεροδιμερισμού c-Myc και Max και δ) αναστολή της πρόσδεσης του ετεροδιμερούς c-Myc-Max στο DNA [6]. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η μέθοδος της αναστολής του ετεροδιμερισμού της c-Myc με την Max. Για την μέθοδο αυτή, παρατίθενται μερικοί γνωστοί αναστολείς, από την βιβλιογραφία, στην Υποενότητα 1.6.1.

1.6.1 Γνωστοί αναστολείς του ετεροδιμερισμού c-Myc-Max

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 1.5, η αναστολή της c-Myc μπορεί να αποτελέσει σημαντική θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών ανθρώπινου καρκίνου. Για τον λόγο αυτό έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα ερευνών, με στόχο την εύρεση μικρών μορίων που προσδένονται στην c-Myc και αναστέλλουν τον ετεροδιμερισμό της με την πρωτεΐνη Max. Μερικοί από τους αναστολείς του ετεροδιμερισμού c-Myc-Max που έχουν μελετηθεί θα αναφερθούν στην παρούσα υποενότητα.

Αρχικά ανακαλύφθηκαν τα μικρά μόρια 10058-F4 και 10075-G5, μέσω υψηλής απόδοσης σάρωσης μίας βιβλιοθήκης με 10.000 μόρια. Τα μόρια αυτά υποβλήθηκαν σε πολωσιμετρία φθορισμού, όπου επιβεβαιώθηκε η ικανότητα τους να προσδένονται στην c-Myc. Το ακριβές σημείο πρόσδεσής τους εντοπίστηκε μέσω σημειακών μεταλλάξεων του bHLHZ τμήματος της c-Myc. Κατά συνέπεια, προτάθηκε ότι και τα δύο μόρια αυτά προσδένονται στην c-Myc μέσω των αμινοξέων 402-412. Η συγγένεια πρόσδεσης για το μόριο 10058-F4 προσδιορίστηκε μέσω συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) ($K_D = 5.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$), ενώ για το 10075-G5 προσδιορίστηκε μέσω βιολογικής αξιολόγησης ανταγωνισμού (competition assay) έναντι του προσδέτη 10058-F4, ($K_D = 24 \pm 4 \mu\text{M}$). Εκτός του σημείου πρόσδεσης 402-412, μέσω σημειακών μεταλλάξεων εντοπίστηκαν άλλα δύο ανεξάρτητα σημεία πρόσδεσης της c-Myc, στα αμινοξέα 366-375 και 370-409 [7].



Σχήμα 1.6 Τα τρία σημεία πρόσδεσης της c-Myc.
Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [7].

Στην συνέχεια ανακαλύφθηκαν μόρια που έχουν εμφανίσει *in vivo* δραστικότητα έναντι της c-Myc. Αρχικά τα μόρια Mycro1 και Mycro2 ανιχνεύθηκαν μέσω υψηλής απόδοσης σάρωσης μίας βιβλιοθήκης pyrazolo [1,5-a] pyrimidine. Η βελτίωση των μορίων αυτών, ως προς τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους, οδήγησε στον σχεδιασμό του μορίου Mycro3. Για το μόριο αυτό βρέθηκε ότι και είναι γνωστή η τιμή του δείκτη IC_{50} , όπως προσδιορίστηκε από βιολογική αξιολόγηση ανταγωνισμού ($IC_{50} = 40 \pm 13 \mu M$) [8, 9]. Επιπλέον, σε συνεργασία του εργαστηρίου της Α. Πολίτου (Παν. Ιωαννίνων) με το εργαστήριο Κούρνια μέσω πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού διαπιστώθηκε ότι ο διμερισμός c-Myc/Max αναστέλλεται παρουσία Mycro3 και αναλόγων μορίων. Επιπλέον βάσει αυτών των πειραμάτων, ερευνητικές ομάδες του ΙΒΕΑΑ σε συνεργασία με το εργαστήριο Κούρνια προχώρησαν σε προκλινικές μελέτες του Mycro3 και αναλόγων για να προσδιοριστεί η *in vivo* δραστικότητα του. Συγκεκριμένα σε ξενομοσχεύματα όγκων ανθρώπινου παγκρεατικού καρκίνου που υπερ-εκφράζουν τη c-Myc έγινε χορήγηση 100 mg/kg Mycro3 σε διάστημα 2 εβδομάδων, η οποία έδειξε δραστική μείωση των όγκων (Σχήμα 1.7). Επίσης σε διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα παγκρεατικού καρκίνου που υπερ-εκφράζουν τη c-Myc, χορηγήθηκε Mycro3 δια στόματος για 2 μήνες και με παρακολούθηση του όγκου με PET-CT μετρήθηκε δραστική μείωση των όγκων (Σχήμα 1.8). Τα αποτελέσματα κατοχυρώθηκαν σε πατέντα [48].

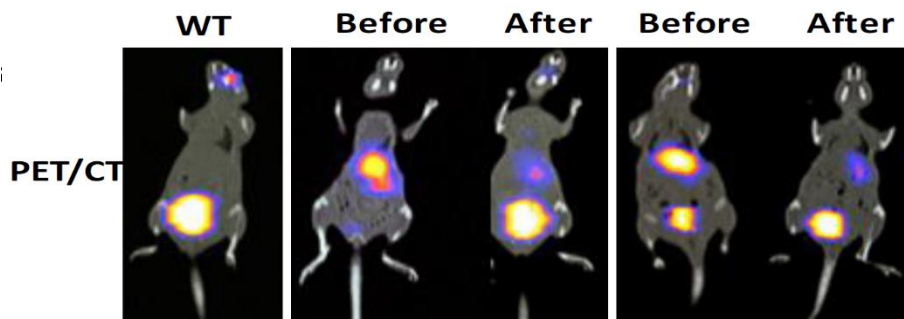
Heterotopic MiaPaCa2: Untreated



Heterotopic MiaPaCa2: Mycro3-treated



Σχήμα 1.7 Αποτελέσματα χορήγησης Mycro3 σε ξενομοσχεύματα όγκων ανθρώπινου παγκρεατικού καρκίνου. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [48].



Σχήμα 1.8 Αποτελέσματα χορήγησης Mycro3 σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα παγκρεατικού καρκίνου. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [48].

Από σάρωση με πολωσιμετρία φθορισμού σε βιβλιοθήκη που περιέχει μόρια πυριδινών που συντίθεται με αντίδραση Kröhnke, ανακαλύφθηκε ότι το μόριο KJ-Pyr-9 προσδέεται στην c-Myc. Επιπλέον, μέσω συμβολομετρίας οπισθοσκέδασης υπολογίστηκε και η συγγένεια πρόσδεσης του μορίου στην c-Myc (K_D 6.5 ± 1.0 nM) [8, 10].

Η βιολογική αξιολόγηση συμπλήρωσης διμοριακού φθορισμού μίας βιβλιοθήκης με 1990 ενώσεις, οδήγησε στην εύρεση των μορίων MYCMI-6 και MYCMI-7. Μέσω πειραμάτων αλληλεπίδρασης κυττάρων, επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των μορίων αυτών να διασπούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ c-Myc και Max. Για τα μόρια αυτά προσδιορίστηκε η συγγένεια πρόσδεσης μέσω πειραμάτων συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, $K_D = 1.6 \pm 0.5$ μ M για το μόριο MYCMI-6 και $K_D = 4$ μ M για το μόριο MYCMI-7 [8, 11, 12].

Ένα ακόμα μόριο, το sAJM589, με άγνωστη περιοχή πρόσδεσης στην c-Myc, ανακαλύφθηκε μέσω υψηλής απόδοσης σάρωσης βασισμένη σε βιολογική αξιολόγηση συμπλήρωσης θραύσματος πρωτεϊνών, στην οποία χρησιμοποιήθηκε όλο το bHLHLZ τμήμα της c-Myc. Επιπλέον, μέσω συμβολομετρίας διπλής στιβάδας, προέκυψε ότι η ένωση στοχεύει επιλεκτικά τα αμινοξέα 403–437 της c-Myc [8, 13].

Δύο επιπλέον μόρια (MYCi361 και MYCi975) εντοπίστηκαν να διασπούν τον ετεροδιμερισμό μεταξύ c-Myc και Max, μέσω *in vivo* αναλύσεων. Η διάσπαση του ετεροδιμερούς από αυτά επιβεβαιώθηκε μέσω βιολογικής αξιολόγησης κυτταρικής θερμικής μετατόπισης, ενώ η πρόσδεση τους στην c-Myc επιβεβαιώθηκε μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Από αναλύσεις πολωσιμετρίας φθορισμού έναντι του μορίου 10074–G5 (επιβεβαιωμένη πρόσδεση στο τμήμα αυτό, Σχήμα 1.6) προσδιορίστηκε η πρόσδεση των μορίων στα αμινοξέα 363–381 της c-Myc καθώς και η συγγένεια πρόσδεσης τους ($K_D = 3.2$ μ M για το μόριο MYCi361 και $K_D = 2.5$ μ M για το μόριο MYCi975) [8, 14, 15].

1.7 Αποτελέσματα προηγούμενων υπολογιστικών μελετών

Όπως προαναφέρθηκε, η σημαντικότητα στόχευσης της c-Myc για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών ανθρώπινου καρκίνου έχει οδηγήσει στην μελέτη της αναστολής της, τόσο με βιοφυσικές μεθόδους όσο και υπολογιστικά. Η μελέτη της c-Myc, όπως και οποιασδήποτε εγγενώς αδιάτακτης πρωτεΐνης, μέσω Μοριακών Δυναμικών προσομοιώσεων μπορεί να ξεπεράσει την δυσκολία επίτευξης δομής υψηλής ακρίβειας που συναντάται στις βιοφυσικές μεθόδους [2]. Στην υποενότητα αυτή, θα παρουσιαστούν προηγούμενες υπολογιστικές μελέτες που είχαν ως στόχο την μελέτη της c-Myc σε σύμπλοκο με αναστολείς της.

Αρχικά θα αναλυθεί η μελέτη της c-Myc με τον αναστολέα 10058–F4 μέσω μοριακών προσομοιώσεων μεταδυναμικής. Από τις προσομοιώσεις του συμπλόκου της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με το μόριο 10058–F4 συμπεραίνεται ότι η δομή της c-Myc παραμένει αδιάτακτη και δεν σταθεροποιείται από την πρόσδεση του μορίου. Επιπλέον, από την ανάλυση των προσομοιώσεων, προκύπτει ότι το μόριο 10058–F4 έρχεται σε επαφή κατά κύριο λόγο με τα αμινοξέα τυροσίνη 402 και λυσίνη 412. Τέλος, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του μορίου 10058–F4 στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό μεταξύ c-Myc και Max [2].

Για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού πρόσδεσης μικρών μορίων στην αδιάτακτη πρωτεΐνη c-Myc, πραγματοποιήθηκε μελέτη στην οποία συνδυάστηκαν θερμοδυναμικά αποτελέσματα με προσομοιώσεις μεταδυναμικής επαγωγής σε συνδυασμό με δεδομένα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR-restrained metadynamic metainference simulations), για το σύμπλοκο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/10058-F4. Από τις προσομοιώσεις συμπεραίνεται ότι, η πρόσδεση του 10058-F4 είναι διάχυτη (diffuse), καθώς η c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ παραμένει αδιάτακτη, ενώ επιπλέον παρατηρείται εκλεκτικότητα ως προς την αλληλουχία πρόσδεσης του μορίου 10058-F4. Πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα που φέρουν μεγαλύτερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με το μόριο, είναι η τυροσίνη 402, η λευκίνη 404 και η γλουταμίνη 407 [16].

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί η μελέτη εικονικής σάρωσης (virtual screening) που πραγματοποιήθηκε σε βιβλιοθήκη φαρμάκων (βάση δεδομένων ZINC15). Τα μόρια της βιβλιοθήκης αυτής αξιολογήθηκαν ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους και στην συνέχεια αγκυροβολήθηκαν στην περιοχή 402 – 412 της c-Myc. Τέλος για κάθε σύμπλοκο μορίου με την c-Myc πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής για την πρόβλεψη της συγγένειας και του μηχανισμού πρόσδεσης. Τελικά, από την βιβλιοθήκη αυτή, τρεις ενώσεις ανακαλύφθηκαν ως ιδανικές υποψήφιες ενώσεις για την αναστολή της c-Myc [17].

Στον Πίνακα 1.1 περιέχονται προσδέτες που έχουν καταγραφεί στην βιβλιογραφία, με τις αλληλουχίες της c-Myc στις οποίες προσδένονται, καθώς και οι βιοφυσικοί δείκτες που έχουν υπολογιστεί για κάθε έναν από αυτούς.

Πίνακας 1.1 Μόρια βιβλιογραφίας που διασπάνε το c-Myc-Max ετεροδιμερές, η περιοχή πρόσδεσης τους στην c-Myc και οι βιοφυσικοί δείκτες τους.

Προσδέτες	Σημείο πρόσδεσης στην c-Myc	Βιοφυσικός δείκτης
10058-F4	402-412	$K_D = 5.3 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
10075-G5	402-413	$K_D = 24 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
Mycro3	402-414	$IC_{50} = 40 \mu\text{M}$ (βιολογική αξιολόγηση ανταγωνισμού)
MYCi361	366-375	$K_D = 3.2 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
MYCi975	366-376	$K_D = 2.5 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
KJ-Pyr-9	Άγνωστο	$K_D = 6.5 \mu\text{M}$ (συμβολομετρία διπλής στιβάδας)
MYCMI-6	Άγνωστο	$K_D = 1.6 \mu\text{M}$ (συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων)
MYCMI-7	Άγνωστο	$K_D = 4 \mu\text{M}$ (συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων)
Mycro1	Άγνωστο	$IC_{50} = 30 \pm 5 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
Mycro2	Άγνωστο	$IC_{50} = 23 \pm 4 \mu\text{M}$ (πολωσιμετρία φθορισμού)
sAJM589	Άγνωστο	-

1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Στην υποενότητα 1.5 τονίστηκε η σημαντικότητα στόχευσης της c-Myc για την αντιμετώπιση διαφόρων ειδών καρκίνου στον άνθρωπο. Για τον σκοπό αυτό, έχει αναπτυχθεί πληθώρα στρατηγικών, οι οποίες συνοψίστηκαν στην Υποενότητα 1.6.1. Στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί η στρατηγική αναστολής του ετεροδιμερισμού της c-Myc με την Max. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της εργασίας αποτελεί η δημιουργία ενός προβλεπτικού μοντέλου για την αξιολόγηση της ικανότητας μικρών μορίων να προσδεθούν στην ογκοπρωτεΐνη c-Myc (περιοχή 402–412). Η υπόθεση εργασίας είναι ότι εάν ένα μικρό μόριο προσδέεται σταθερά

στη c-Myc σε συνάρτηση με το χρόνο, τότε θα αναστέλλει τον ετεροδιμερισμό της c-Myc με την Max και συνεπώς θα αναστέλλει και τη μεταγραφική δράση της c-Myc.

Κεφάλαιο 2. Θεωρητικό Υπόβαθρο

2.1 Εισαγωγή στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων

Για τον σχεδιασμό ενός φαρμακευτικού μορίου, αρχικά απαιτείται ο προσδιορισμός ενός βιολογικού μορίου-στόχου, συνήθως μίας πρωτεΐνης, το οποίο έχει κάποιο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Στο μόριο-στόχο πραγματοποιείται δοκιμή χιλιάδων χημικών ενώσεων με σκοπό την εύρεση ενός μορίου που έχει βιολογική δράση έναντι του στόχου, είτε με χρήση *in vitro* βιολογικές αξιολογήσεων, είτε με χρήση βιολογικών αξιολογήσεων ελευθέρων κυττάρων. Για την εύρεση του μορίου αυτού, μπορεί να χρησιμοποιηθούν υπολογιστικές μέθοδοι, οι οποίες έχουν ως στόχο τον προσδιορισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης μεταξύ των ενώσεων-οδηγών και του βιολογικού στόχου, τον χρόνο πρόσδεσης των ενώσεων στον βιολογικό στόχο, καθώς και διάφορες φυσικοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του υποψήφιου φαρμακευτικού μορίου [18]. Η χρήση υπολογιστικών μεθόδων για τον σχεδιασμό ενός φαρμακευτικού μορίου πλεονεκτεί έναντι *in vitro* τεχνικών, τόσο ως προς τον απαιτούμενο χρόνο, όσο και ως προς το κόστος.

Οι υπολογιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανακάλυψη ενός φαρμακευτικού μορίου, κατηγοριοποιούνται με βάση την γνώση ή μη της δομής της πρωτεΐνης-υποδοχέα, σε μεθόδους που βασίζονται στην δομή της πρωτεΐνης, ή σε μεθόδους που βασίζονται στην δομή του προσδέτη, αντίστοιχα. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην δομή του προσδέτη εφαρμόζονται στις περιπτώσεις που η δομή της πρωτεΐνης δεν είναι γνωστή, αλλά υπάρχουν πληροφορίες για την δομή δραστικών προσδετών που αλληλεπιδρούν με το μακρομόριο. Αντιθέτως, οι μέθοδοι που βασίζονται στην δομή της πρωτεΐνης-υποδοχέα εφαρμόζονται όταν η δομή και το σημείο πρόσδεσης μικρών μορίων στην πρωτεΐνη είναι γνωστά. Συνεπώς, μέσω αυτών των δεδομένων, γίνεται η αναζήτηση ενός μορίου που μπορεί να προσδεθεί στην περιοχή και να σταθεροποιήσει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-προσδέτη σε μια χαμηλής ενέργειας διαμόρφωση [19].

Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιηθούν οι μέθοδοι που βασίζονται στη δομή του υποδοχέα (πρωτεΐνης) και θα αναλυθούν οι βασικές αρχές τους στην υποενότητα 2.2.

2.2 Μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων, βασιζόμενες στην δομή της πρωτεΐνης

Στις μεθόδους υπολογιστικού σχεδιασμού μίας φαρμακευτικής ένωσης βάσει της πρωτεϊνικής δομής, πρώτο βήμα αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης στόχου. Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής δομής μπορεί να πραγματοποιηθεί πειραματικά μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, ή με την χρήση κρυσταλλογραφίας μικροσκοπίας (CryoEM). Εάν ο πειραματικός προσδιορισμός της δομής δεν είναι εφικτός μπορεί να χρησιμοποιηθούν υπολογιστικές μέθοδοι μοντελοποίησης, για εύρεση μίας κατά προσέγγιση δομής με βάση στοιχεία συγγενών πρωτεϊνών. Στην συνέχεια, εφόσον προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, εντοπίζονται οι κοιλότητες πρόσδεσης της πρωτεΐνης, που της προσδίδουν λειτουργικότητα. Σε μερικές περιπτώσεις, η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, φέρει προσδέτη, με αποτέλεσμα, ο εντοπισμός των κοιλοτήτων να πραγματοποιείται άμεσα [19, 20].

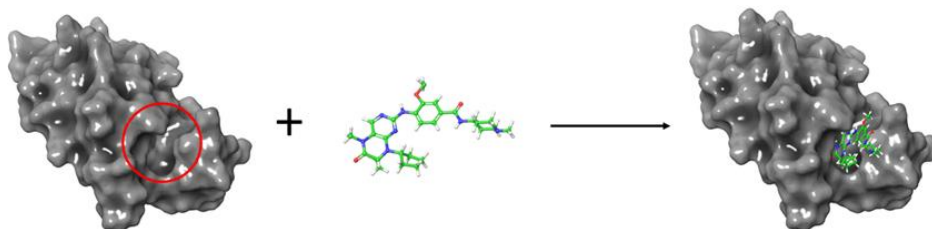
Επόμενο βήμα στην διαδικασία αποτελεί η εύρεση ενός βιοενεργού προσδέτη (hit). Αρχικά πραγματοποιείται εικονική σάρωση (virtual screening) σε βιβλιοθήκες μικρών μορίων, τα οποία φέρουν κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Τα μόρια αυτά, κατατάσσονται βάσει της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης στην πρωτεΐνη-στόχο, με ικανοποιητικότερη πρόσδεση να αποδίδεται σε μόρια με χαμηλές τιμές ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης [21]. Στην συνέχεια, τα πιο υποσχόμενα μόρια εξετάζονται περαιτέρω μέσω βιοχημικών ή βιοφυσικών μεθόδων. Τέλος, για την βελτιστοποίηση της ένωσης, η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόζεται επανειλημμένα με στόχο την τροποποίηση των βιοενεργών προσδετών για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων [19].

Οι πιο βασικές υπολογιστικές τεχνικές που εφαρμόζονται στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων είναι η μοριακή αγκυροβόληση (Docking), η εικονική σάρωση (Virtual Screening – VS), η χρήση προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics – MD) κ.ο.κ. Ειδικότερα, μέσω των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, εξάγονται δυναμικά δεδομένα σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και της πρωτεΐνης σε πραγματικό χρόνο. Μέσω αυτών των δεδομένων, γίνεται πρόβλεψη των δομικών αλλαγών του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, καθώς και η πιθανή απομάκρυνση ενός μορίου που δεν συνδέεται ισχυρά με τον υποδοχέα [19]. Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής θα αναλυθούν εκτενώς στην ενότητα 2.5.

Στην περίπτωση της c-Myc, ο σχεδιασμός αναστολέα βάσει της δομής της πρωτεΐνης αποτελεί δύσκολο εγχείρημα. Αυτό οφείλεται στην εγγενώς αδιάτακτη φύση της c-Myc, εξαιτίας της οποίας, δεν υπάρχουν σταθερές κοιλότητες πρόσδεσης. Παρόλα αυτά, η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς της c-Myc μπορεί να πραγματοποιηθεί με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.

2.2.1 Κοιλότητες πρόσδεσης στο σχεδιασμό φαρμάκων και η πρόσδεση μικρών μορίων στη c-MYC

Όπως προαναφέρθηκε, το πρώτο στάδιο του σχεδιασμού βιοενεργών μορίων που βασίζεται στην δομή της πρωτεΐνης, απαιτεί τον προσδιορισμό μίας κοιλότητας πρόσδεσης στην πρωτεΐνη στόχο.



Σχήμα 2.1 Σύνδεση του αναστολέα κινάσης BI 2536 στην κοιλότητας πρόσδεσης του υποδοχέα επικράτειας bromo (bromodomain) (PDB ID: 4O74).

Η c-Myc ανήκει στην οικογένεια των εγγενώς αδιάτακτων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να στερείται σταθερής δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής. Συνεπώς, οι κανόνες που εφαρμόζονται στις κοιλότητες πρόσδεσης πρωτεϊνών, δεν μπορούν να εφαρμοστούν στα σημεία πρόσδεσης της c-Myc, καθώς η δομή τους μεταβάλλεται συνεχώς.

Παρά τις δυσκολίες που προκύπτουν από την εγγενώς αδιάτακτη φύση της c-Myc, οι καρτεσιανές συντεταγμένες, όπως αυτές προσδιορίστηκαν από πειράματα μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση της μοριακής αγκυροβόλησης και ακολούθως των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής. Όμως για την χρήση των καρτεσιανών συντεταγμένων, είναι απαραίτητη η κατάλληλη προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής.

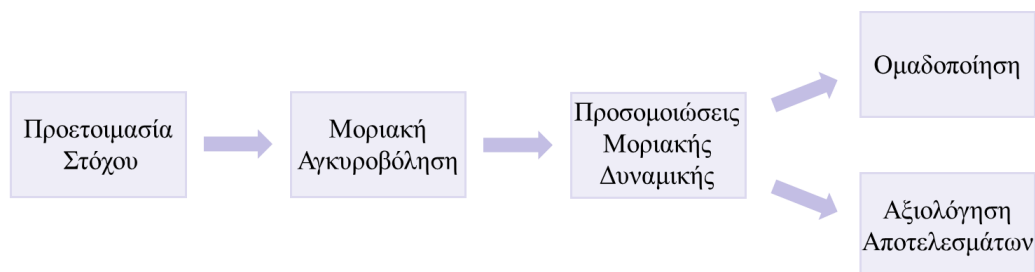
2.2.2 Προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής

Οι τρισδιάστατες δομές πρωτεϊνών που προέρχονται από μεθόδους δομικής βιολογίας χρειάζονται επεξεργασία πριν τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών όπως η αγκυροβόληση, η οποία αφορά την προσθήκη ατόμων υδρογόνου, βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου, την ελαχιστοποίηση της ενέργειας της πρωτεΐνης κ.ά. [22].

Αυτό συμβαίνει διότι ένα τυπικό αρχείο δομής προερχόμενο από κρυσταλλογραφία ακτίνων X, λόγω χάρη σε μορφή protein data bank «.pdb», περιέχει μόνο βαρέα άτομα και επίσης μπορεί να περιέχει ένα συγκρυσταλλωμένο προσδέτη, μόρια νερού, μεταλλικά ιόντα και άλλους συμπαράγοντες. Επίσης, λόγω της μειωμένης διακριτικής ικανότητας των πειραμάτων κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, καθίσταται δύσκολη η διάκριση μεταξύ ατόμων αζώτου και οξυγόνου καθώς έχουν μόλις ένα ηλεκτρόνιο διαφορά. Επομένως χρειάζεται προσεκτικός έλεγχος των ομάδων αυτών καθώς μπορεί να μην έχουν τοποθετηθεί σωστά κατά τη μοντελοποίηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

Το Protein Preparation Wizard είναι ένα εργαλείο του λογισμικού Schrödinger που αποσκοπεί στην επιβεβαίωση της ορθότητας της υπό εξέταση δομής, αλλά και την παροχή μιας ποιοτικής δομής, η οποία θα είναι ιδανική για την πραγματοποίηση μοριακής μοντελοποίησης [23].

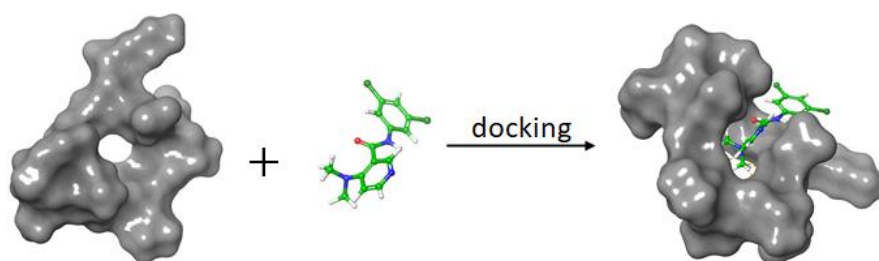
Συνεπώς, μετά την προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής, θα εφαρμοστεί η ροή εργασίας, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2.



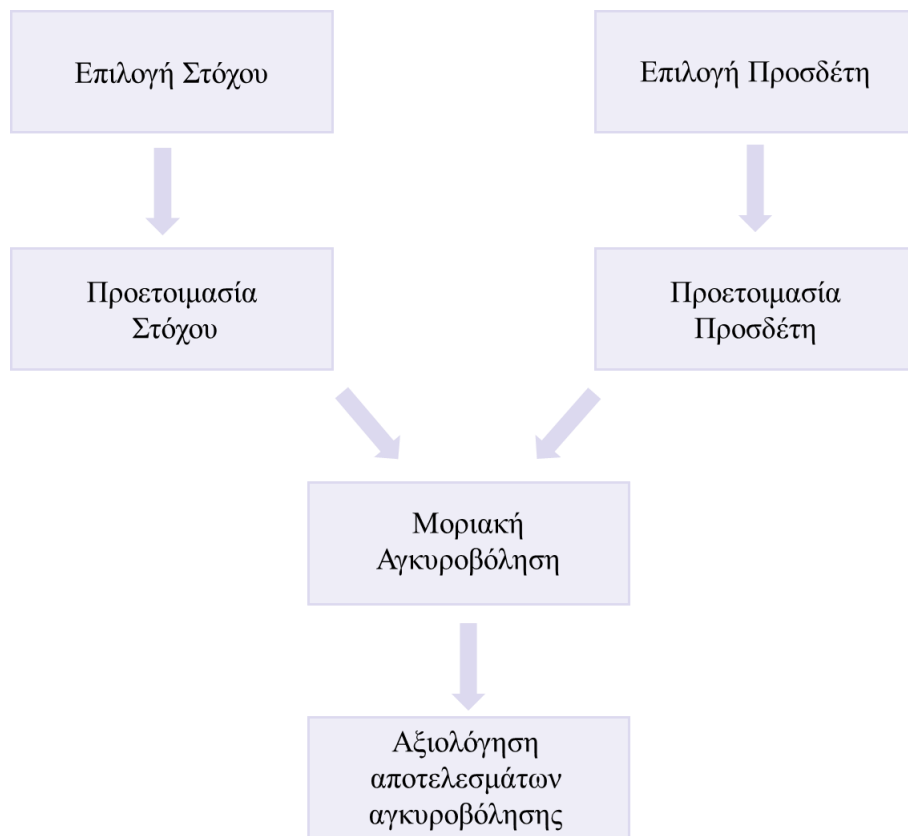
Σχήμα 2.2 Διαγραμματική αναπαράσταση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία.

2.3 Υπολογισμοί μοριακής αγκυροβόλησης (Docking)

Ο στόχος της μοριακής αγκυροβόλησης είναι η πρόβλεψη πιθανών δομών πρόσδεσης και η συγγένειας πρόσδεσης τους. Συνήθως, η μοριακή αγκυροβόληση εφαρμόζεται μεταξύ ενός μικρού μορίου (Ligand) και ενός μακρομορίου στόχου (Protein). Η μέθοδος της μοριακής αγκυροβόλησης διερευνά υπολογιστικά έναν χώρο που ορίζεται μέσω της μοριακής αναπαράστασης και κατατάσσει πιθανές διαμορφώσεις πρόσδεσης για την εύρεση της βέλτιστης. Συνεπώς, απαιτείται τόσο μία μέθοδος αναζήτησης, όσο και μία συνάρτηση βαθμολόγησης [24]. Τα βήματα για την πραγματοποίηση μοριακής αγκυροβόλησης συνοψίζονται στο Σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση του στόχου της μοριακής αγκυροβόλησης.



Σχήμα 2.4 Διαγραμματική αναπαράσταση των απαιτούμενων βημάτων για την πραγματοποίηση μοριακής αγκυροβόλησης [24].

Όπως προαναφέρθηκε, κάθε μέθοδος μοριακής αγκυροβόλησης χρειάζεται μία συνάρτηση βαθμολόγησης (Scoring Function), για την κατάταξη των πιθανών δομών πρόσδεσης των μικρών μορίων στον υποδοχέα. Οι συναρτήσεις αυτές μπορεί να είναι είτε εμπειρικές, βασιζόμενες στο πεδίο δυνάμεων (Υποκεφάλαιο 2.4), ή να βασίζονται στην γνώση των αλληλεπιδράσεων (Knowledge-based).

Επιπλέον, απαιτείται και μία μέθοδος αναζήτησης. Οι μέθοδοι αναζήτησης κατηγοριοποιούνται είτε ως στοχαστικές, είτε ως συστηματικές. Οι συστηματικές μέθοδοι μοριακής αγκυροβόλησης είναι ντετερμινιστικές και εξερευνούν τον χώρο σε προκαθορισμένα διαστήματα. Αντιθέτως, οι στοχαστικές μέθοδοι πραγματοποιούν τυχαίες επαναλαμβανόμενες αλλαγές σε καταστατικές μεταβλητές (state variables), μέχρις ότου ένα κριτήριο, καθορισμένο από τον χρήστη, καλυφθεί [24].

Ένα εργαλείο για την πραγματοποίηση μοριακής αγκυροβόλησης, το οποίο θα εφαρμοστεί στην παρούσα εργασία είναι το Glide [25, 26, 27]. Το εργαλείο Glide έχει στόχο την πραγματοποίηση εκτενής αναζήτησης της θέσης, κατεύθυνσής και διαμόρφωσης που μπορεί να έχει ένας προσδέτης, σε σύντομο υπολογιστικό χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση μία σειράς ιεραρχικών φίλτρων (Hierarchical filters).

Η συνάρτηση βαθμονόμησης που χρησιμοποιεί το Glide ονομάζεται Glide Score και δίνεται από την Εξίσωση 2.1.

$$\begin{aligned} \Delta G_{bind} = & C_{lipo-lipo} \sum f(r_{1r}) + C_{hbond} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{max-metal-ion} \sum f(r_{1m}) \\ & + C_{rotb} H_{rotb} + C_{polar-phob} V_{polar-phob} + C_{coul} E_{coul} + C_{vdW} E_{vdW} \\ & + solvation terms \quad (2.1) \end{aligned}$$

Ο πρώτος όρος της συνάρτησης αυτής αναφέρεται σε λιποφιλικές αλληλεπιδράσεις και ο όρος r_{1r} είναι η ακτίνα van der Waals του πρώτου ατόμου.

Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Ο όρος Δr αντιστοιχεί στην απόκλιση του δεσμού υδρογόνου ($H \cdots O/N$) από το μήκος 1.85 Å και ο όρος $\Delta \alpha$ είναι η απόκλιση της γωνίας του δεσμού υδρογόνου ($N/O-H \cdots O/N$) από την ιδανική τιμή 180°.

Ο τρίτος όρος αντιστοιχεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλου και του προσδέτη. Η συνάρτηση $f(r_{1m})$ είναι ένας όρος επαφής και αντίστοιχα ο όρος r_{1m} αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ του προσδέτη και των ατόμων της πρωτεΐνης.

Ο τέταρτος όρος λαμβάνει υπόψιν την ύπαρξη και το πάγωμα δεσμών που έχουν την δυνατότητα περιστροφής.

Ο πέμπτος όρος αντιστοιχεί στις πολικές αλληλεπιδράσεις εντός του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Ο έκτος και έβδομος όρος αντιστοιχούν στην ενέργεια λόγω ηλεκτροστατικών Coulomb αλληλεπιδράσεων και van der Waals αλληλεπιδράσεων αντίστοιχα.

Τέλος ο όγδοος όρος αντιστοιχεί στον όρο επιδιалύτωσης [28].

2.4 Συνάρτηση δυναμικής ενέργειας - Πεδίο δυνάμεων (Force Field)

Κάθε σύστημα περιγράφεται από άτομα ή ομάδες ατόμων, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους είτε δεσμικά, είτε μη δεσμικά. Επιπλέον, η συνολική ενέργεια του συστήματος περιγράφεται από την Χαμιλτονιανή ενέργεια (Εξίσωση 2.2), η οποία είναι το άθροισμα της κινητική και δυναμικής ενέργειας του συστήματος.

$$H = T + V = \frac{1}{2} m v^2 + V(r) \quad (2.2)$$

Όπου, T : η κινητική ενέργεια και V : η δυναμική ενέργεια

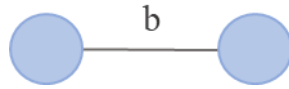
Η δυναμική ενέργεια του συστήματος $V(r)$ μπορεί να περιγραφεί ως το άθροισμα των ομοιοπολικών (bonded) και των μη ομοιοπολικών (non-bonded) αλληλεπιδράσεων του (Εξίσωση 2.3).

$$V(r) = V_{bonded} + V_{non-bonded} \quad (2.3)$$

Στις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβάνονται οι όροι της τάσης των δεσμών (bond stretching), της κάμψης των γωνιών (angle bending), των δίεδρων γωνιών (dihedrals) και των μη επιτρεπών δίεδρων γωνιών (improper dihedral) (Εξίσωση 2.4).

$$V_{bonded} = V_{bonds} + V_{angles} + V_{dihedrals} + V_{improper\ dihedrals} \quad (2.4)$$

Ο πρώτος ομοιοπολικός όρος αντιστοιχεί στη τάση των δεσμών και περιγράφει τις δυνάμεις που δρουν μεταξύ δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων. Ο όρος μπορεί να περιγραφεί από ένα αρμονικό δυναμικό βασιζόμενο στο νόμο του Hooke (Εξίσωση 2.5).



$$V_{bonds} = k_b (b - b_0)^2 \quad (2.5)$$

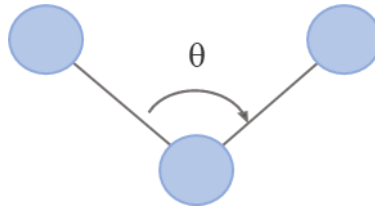
Όπου:

b : είναι η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων,

b_0 : η μέση απόσταση μεταξύ των ατόμων στη θέση της ισορροπίας, και

k_b : η σταθερά της δύναμης που χαρακτηρίζει την αλληλεπίδραση.

Ο δεύτερος ομοιοπολικός όρος αντιστοιχεί στη κάμψη των δεσμών και περιγράφει τη δόνηση μεταξύ τριών ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων. Ο όρος αυτός περιγράφεται με ένα αρμονικό δυναμικό βασιζόμενο στο νόμο του Hooke (Εξίσωση 2.6).



$$V_{angles} = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.6)$$

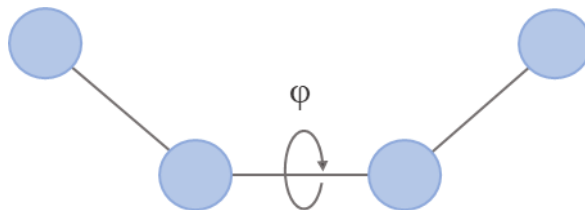
Όπου:

θ : η γωνία μεταξύ των τριών ατόμων,

θ_0 : η γωνία μεταξύ των τριών ατόμων στη θέση της ισορροπίας, και

k_θ : η σταθερά της δύναμης που χαρακτηρίζει τη δόνηση της γωνίας.

Ο τρίτος ομοιοπολικός όρος αντιστοιχεί στις διεδρες γωνίες και περιγράφει το φράγμα περιστροφής μεταξύ τεσσάρων ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων. Οι διεδρες γωνίες (dihedrals) χαρακτηρίζονται από τη συνημιτονοειδή συνάρτηση δυναμικού (Εξίσωση 2.7).



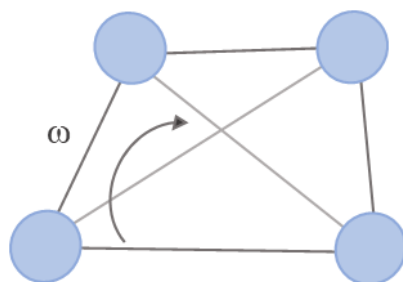
$$V_{dihedrals} = k_\phi (1 + \cos[n\phi - \delta]), \quad n = 1, 2, 3, 4, 6 \quad (2.7)$$

Όπου:

ϕ : η γωνία μεταξύ των επιπέδων που σχηματίζονται από το πρώτο και τα τρία τελευταία από τα τέσσερα άτομα,

δ : καθορίζει τη γωνία με την ελάχιστη ενέργεια,
 k_ϕ : η σταθερά δυνάμεως, και
 n : η περιοδικότητα.

Ο τελευταίος ομοιοπολικός όρος αντιστοιχεί στις μη επιτρεπτές δίεδρες γωνίες και διατηρεί τόσο την τετραεδρική γεωμετρία γύρω από ένα χειρόμορφο άτομο, όσο και την επίπεδη διαμόρφωση γύρω από συγκεκριμένες ομάδες ατόμων, όπως ο βενζολικός δακτύλιος. Ο όρος περιγράφεται από ένα αρμονικό δυναμικό (Εξίσωση 2.8).



$$V_{\text{improper dihedral}} = k_\omega (\omega - \omega_0)^2 \quad (2.8)$$

Όπου:

ω : η γωνία μεταξύ του επιπέδου που σχηματίζεται από το κεντρικό άτομο, τα δύο, περιφερειακά άτομα και το επίπεδο που σχηματίζεται από τα περιφερειακά άτομα,
 ω_0 : η γωνία μεταξύ των ατόμων στη θέση ισορροπίας, και
 k_ω : η σταθερά της δύναμης που χαρακτηρίζει τη δόνηση της γωνίας.

Οι όροι των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, που περιέχονται στον όρο $V_{\text{non-bonded}}$, περιγράφουν τις δυνάμεις van der Waals και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb μεταξύ των ατόμων (Εξίσωση 2.9)

$$V_{\text{non-bonded}} = V_{\text{vdW}} + V_{\text{electrostatic}} \quad (2.9)$$

Ο πρώτος μη ομοιοπολικός όρος περιγράφει τις δυνάμεις van der Waals, οι οποίες δρουν σε δύο άτομα, i και j που είναι γειτονικά μεταξύ τους. Είναι απωστικές σε μικρή απόσταση μεταξύ των ατόμων, στη συνέχεια εμφανίζουν ένα βάθος δυναμικού στη βέλτιστη απόσταση αλληλεπίδρασης μεταξύ των ατόμων, είναι ελκτικές σε μεγαλύτερες αποστάσεις και τείνουν στο μηδέν όταν απομακρυνθούν πολύ τα μόρια. Η αλληλεπίδραση προσεγγίζεται από το δυναμικό Lennard-Jones, το οποίο απεικονίζεται στο Σχήμα 2.5 (Εξίσωση 2.10).

$$V_{\text{vdW}} = 4 \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.10)$$

Όπου:

r_{ij} : η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων,
 σ_{ij} : η ακτίνα van der Waals, η απόσταση για την οποία η δυναμική ενέργεια είναι μηδέν,
 και

ϵ_{ij} : το βάθος του πηγαδιού, υποδηλώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης.

Ο δεύτερος μη ομοιοπολικός όρος αφορά τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ατόμων i και j και περιγράφονται από τον νόμο του Coulomb (Εξίσωση 2.11).

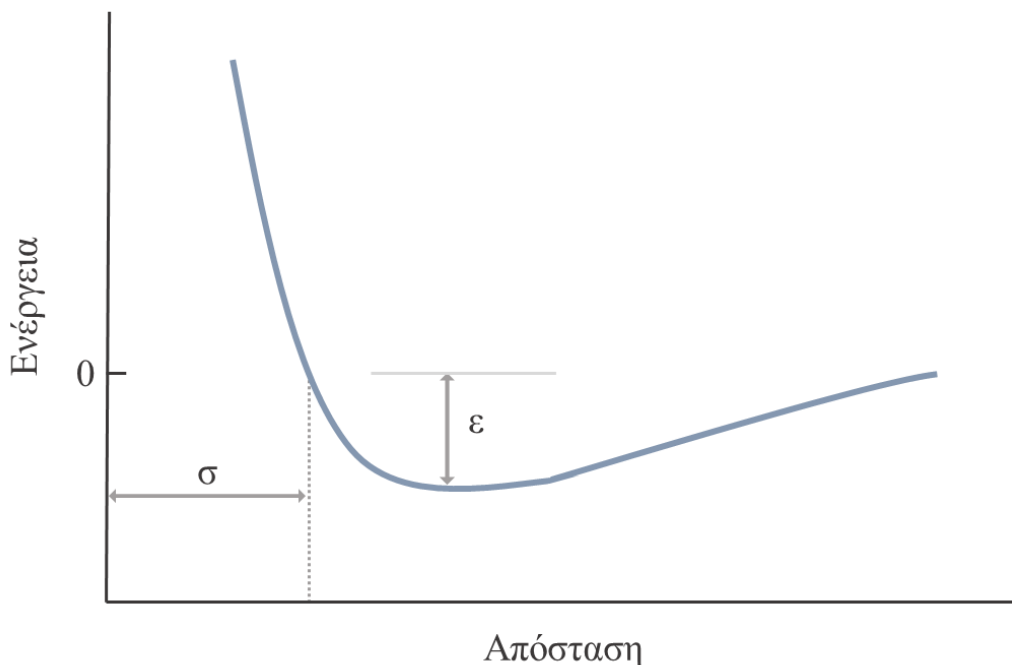
$$V_{electrostatic} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.11)$$

Όπου:

q_i και q_j : τα φορτία των δύο ατόμων,
 r_{ij} : η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων, και
 ϵ_0 : η διηλεκτρική σταθερά του κενού.

Συνεπώς το συνολικό πεδίο δυνάμεων περιγράφεται από την Εξίσωση 2.12 [29].

$$\begin{aligned} V(r) = & \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\varphi (1 + \cos[n\varphi - \delta]) \\ & + \sum_{impropers} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i,j} 4 \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\ & + \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.12) \end{aligned}$$



Σχήμα 2.5 Το δυναμικό Lennard-Jones. Η δυναμική ενέργεια (V) απεικονίζεται συναρτήσει της απόστασης των ατόμων (r). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται επίσης η ακτίνα van der Waals (σ) και το βάθος του πηγαδιού (ϵ) [30].

2.5 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ)

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσπάθεια κατανόησης των ιδιοτήτων, της δομής και της λειτουργίας ενός μοριακού συστήματος. Για τον λόγο αυτό, αποτελούν βασικό εργαλείο για τον προβλεπτικό μοριακό σχεδιασμό. Βασικός στόχος των προσομοιώσεων ΜΔ είναι η σύνδεση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων του συστήματος με τη μακροσκοπική του συμπεριφορά, μέσω εξισώσεων στατιστικής μηχανικής.

Στις προσομοιώσεις ΜΔ, τα μόρια αναπαρίστανται από σωματίδια που αντιπροσωπεύουν άτομα ή ομάδες ατόμων. Η περιγραφή των δεσμικών και μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων (bonded and non-bonded interactions) γίνεται με χρήση εμπειρικών παραμέτρων [31].

2.5.1 Βασικές αρχές των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ)

Στις προσομοιώσεις ΜΔ είναι απαραίτητη η περιγραφή των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων που υπάρχουν σε κάθε σύστημα. Για τον υπολογισμό της συνολικής ενέργειας του συστήματος χρησιμοποιείται η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας, όπως υπολογίζεται από την Εξίσωση 2.12. Για την ενσωμάτωση της δυναμικής ενέργειας στην περιγραφή του συστήματος, χρησιμοποιείται ο 2^{ος} νόμος του Νεύτωνα (2.13). Συνεπώς, οι εξισώσεις 2.13 και 2.14 συνδυάζονται ώστε να προκύψει η εξίσωση 2.15. Αρχικά στο σύστημα αναθέτονται αρχικές ταχύτητες μέσω τυχαίας κατανομής Boltzmann και κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, η εξίσωση 2.15 ολοκληρώνεται αριθμητικά, σε μικρά βήματα χρόνου, αποδίδοντας κατά αυτό τον τρόπο τις συντεταγμένες του συστήματος κάθε χρονική στιγμή. Οι συντεταγμένες αυτές αποτελούν την επονομαζόμενη τροχιά του συστήματος.

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.13)$$

$$F_i = -\nabla V(r_i) \quad (2.14)$$

$$-\nabla V(r_i) = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.15)$$

Όπου:

F_i : η δύναμη που ασκείται στο σύστημα,

m_i : μάζα συστήματος,

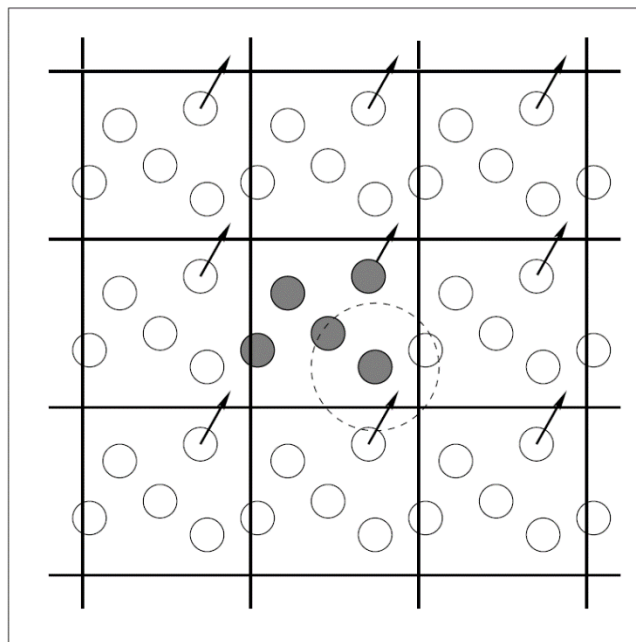
a_i : επιτάχυνση συστήματος, και

$\nabla V(r_i)$: ανάδελτα της δυναμικής ενέργειας του συστήματος.

Από την τροχιά του συστήματος σε κατάσταση ισορροπίας, μπορούν να υπολογιστούν, σε μικροσκοπικό επίπεδο, πληθώρα μακροσκοπικών ιδιοτήτων, όπως πίεση, όγκος, θερμοκρασία, καθώς και η ελεύθερη ενέργεια και η δομή του συστήματος, μέσω εξισώσεων στατιστικής μηχανικής [31]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το στατιστικό σύνολο NPT για την παραγωγή της τροχιάς. Στο στατιστικό σύνολο NPT διατηρούνται σταθερά ο αριθμός των

σωματιδίων (N), η πίεση (P) και η θερμοκρασία (T) του συστήματος. Στο σύστημα γίνεται σύζευξη ενός βαροστάτη και ενός θερμοστάτη, οι οποίοι διατηρούν σταθερές την πίεση και την θερμοκρασία του συστήματος αντίστοιχα, με στόχο η κατανομή να προσομοιάζει τις κανονικές πειραματικές συνθήκες.

Για την αριθμητική επίλυση της διαφορικής εξίσωσης 2.15, είναι απαραίτητη η χρήση περιοδικών συνοριακών συνθηκών (periodic boundary conditions). Οι περιοδικές συνθήκες εφαρμόζονται για την ελαχιστοποίηση των τεχνητών οριακών φαινομένων (edge effects) στις προσομοιώσεις. Συνεπώς, το σύστημα προσομοιώνεται εντός ενός κουτιού που συνορεύει με πανομοιότυπα αντίτυπα. Όταν ένα μόριο εγκαταλείπει το κεντρικό κουτί προσομοίωσης, μία περιοδική του εικόνα εισέρχεται από ένα συνορεύον κουτί, με αποτέλεσμα η πυκνότητα του κουτιού να παραμένει σταθερή (Σχήμα 2.6). Με την χρήση περιοδικών συνοριακών συνθηκών, οι μακροσκοπικές ιδιότητες του συστήματος προσεγγίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς τα πειραματικά δεδομένα. Παρόλα αυτά, δεν είναι επιθυμητό ένα σωματίδιο να αλληλεπιδρά με σωματίδια από τα γειτονικά κουτιά. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η χρήση ενός ορίου αποκοπής (cut-off) για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις, το οποίο θα είναι μικρότερο των διαστάσεων του κουτιού προσομοίωσης [31].



Σχήμα 2.6 Περιοδικές συνοριακές συνθήκες. Με την μετακίνηση ενός σωματιδίου εκτός του κεντρικού κουτιού προσομοίωσης, το σωματίδιο αντικαθίσταται από ένα πανομοιότυπο σωματίδιο από κάποιο συνορεύον αντίτυπο. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [32].

Για την πραγματοποίηση προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής απαραίτητη είναι η ολοκλήρωση ορισμένων βημάτων, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στις επόμενες υποπαραγράφους. Αρχικά είναι απαραίτητη η προετοιμασία του συστήματος (2.5.2), η ελαχιστοποίηση της ενέργειας (2.5.3) η θέρμανση (2.5.4) και τέλος η εξισορρόπηση αυτού (2.5.5).

2.5.2 Προετοιμασία συστήματος

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.2.2 η επιλογή της αρχικής δομής της πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για την μοριακή αγκυροβόληση και τις ΜΔ προσομοιώσεις είναι μείζονος σημασίας για την ορθότητα των αποτελεσμάτων. Για την προετοιμασία της δομής, η οποία προέρχεται από πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, χρησιμοποιείται το εργαλείο Protein Preparation Wizard που παρέχεται από την Schrödinger. Επιπλέον, η αρχική δομή του συστήματος θα πρέπει να βρίσκεται πλησίον ενός ενεργειακού ελαχίστου [30].

Για την προσομοίωση ενός βιολογικού συστήματος πραγματοποιείται η επιδιαιτύωσή του σε νερό, καθώς και η προσθήκη κατάλληλων αντισταθμιστικών ιόντων για την εξισορρόπηση του. Συνεπώς, τα βήματα της προσομοίωσης που απεικονίζονται στο Σχήμα 2.7 αναφέρονται σε επιδιαιλυμένο σύστημα, του οποίου το συνολικό φορτίο ισούται με μηδέν.



Σχήμα 2.7 Τα στάδια των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.

2.5.3 Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας ενός βιομοριακού συστήματος, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 2.3.2, περιγράφει τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ατόμων του συστήματος. Όταν αναπαρασταθεί γραφικά η δυναμική ενέργεια ως συνάρτηση κάποιας μεταβλητής του συστήματος, (Σχήμα 2.8) το βαθύτερο σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί στο ολικό ελάχιστο, ενώ η γραφική παράσταση

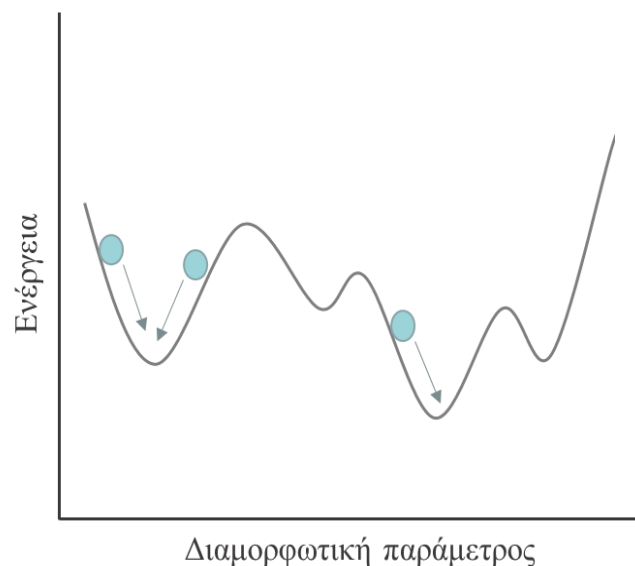
περιλαμβάνει και ένα μεγάλο αριθμό τοπικών ελάχιστων. Ο στόχος της ελαχιστοποίησης της ενέργειας του συστήματος είναι να βρεθεί ένα τοπικό ελάχιστο για τη εκκίνηση των ΜΔ. Από φυσικής σκοπιάς, η ελαχιστοποίηση της ενέργειας αντιστοιχεί σε στιγμιαία «ψύξη» του συστήματος στους 0 K. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων van der Waals αλληλεπιδράσεων που σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανό να οδηγήσουν σε τοπική στρέβλωση της δομής και συνεπώς σε ασταθή προσομοίωση.

Για την αναγνώριση διαμορφώσεων που αντιστοιχούν στην χαμηλότερη ενέργεια του συστήματος, χρησιμοποιούνται οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης. Δοσμένης μιας συνάρτησης f η οποία εξαρτάται από τις μεταβλητές x_1, x_2, \dots, x_n , ως ελάχιστο της συνάρτησης, ορίζεται το σημείο στο οποίο η πρώτη παράγωγος της f ως προς κάθε μεταβλητή x_i ισούται με μηδέν (Εξίσωση 2.16) και οι δεύτερες παράγωγοι έχουν όλες θετικές τιμές (Εξίσωση 2.17).

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0 \quad (2.16)$$

$$\frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (2.17)$$

Τα ελάχιστα των βιομοριακών συστημάτων υπολογίζονται με αριθμητικές μεθόδους, οι οποίες αλλάζουν σταδιακά τις συντεταγμένες του συστήματος ώστε να δημιουργήσουν χαμηλότερες ενεργειακά διαμορφώσεις, μέχρις ότου βρεθεί η διαμόρφωση του συστήματος με την ελάχιστη ενέργεια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μέσω αυτών των αλγορίθμων δεν είναι πάντα εφικτό να βρεθεί το ολικό ελάχιστο της ενέργειας του συστήματος χωρίς την παροχή κάποιας εξωτερικής δύναμης στο σύστημα.



Σχήμα 2.8 Παράδειγμα διαγράμματος ενέργειας συναρτήσει μιας διαμορφωτικής παραμέτρου, βάσει της οποίας χαρτογραφείται το υπό μελέτη σύστημα.

2.5.4 Θέρμανση συστήματος

Μετά το πέρας της ελαχιστοποίησης της ενέργειας του συστήματος, ακολουθεί η ανάθεση των αρχικών ταχυτήτων σε κάθε άτομο του συστήματος. Αυτό πραγματοποιείται με τυχαίας ανάθεσης χρησιμοποιώντας την κατανομή Maxwell–Boltzmann (Εξίσωση 2.18) σε μια χαμηλή θερμοκρασία [30]. Η προσομοίωση ξεκινά με τον σταδιακό προσδιορισμό νέων ταχυτήτων σε ελαφρώς υψηλότερη θερμοκρασία, σε κανονικό (NVT) στατιστικό σύνολο, στο οποίο ο αριθμός των σωματιδίων (N), ο όγκος (V) και η θερμοκρασία του συστήματος (T) παραμένουν σταθερά κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου το σύστημα φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία. Στο σύνολο NVT, η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή μέσω της χρήσης θερμοστάτη.

$$p(V_i) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} e^{-\frac{\frac{1}{2}(m_i V_i^2)}{k_B T}} \quad (2.18)$$

Όπου:

$p(V_i)$: η πιθανότητα ενός ατόμου i να έχει ταχύτητα $V_i = (V_{ix}, V_{iy}, V_{iz})$,

k_B : η σταθερά Boltzmann,

m_i : η μάζα του ατόμου i , και

T: η απόλυτη θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται το σύστημα.

2.5.5 Εξισορρόπηση συστήματος

Μετά το τέλος της θέρμανσης και αφού το σύστημα έχει αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία, ακολουθεί το στάδιο της εξισορρόπησης του συστήματος. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η σταθεροποίηση του συστήματος σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις πειραματικές βιοφυσικές συνθήκες. Επομένως η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιείται σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο, στο οποίο ο αριθμός των σωματιδίων (N), η πίεση (P), με την χρήση βαροστάτη, και η θερμοκρασία του συστήματος (T), με την χρήση θερμοστάτη, είναι σταθερά. Το στάδιο αυτό συνεχίζεται έως ώτου η πίεση και άρα η πυκνότητα του συστήματος να σταθεροποιηθεί στις απαραίτητες τιμές στο χρόνο της εξισορρόπησης.

2.5.6 Παραγωγή τροχιάς

Το τελευταίο βήμα μιας προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής είναι η φάση της παραγωγής της τροχιάς, όπου το σύστημα προσομοιώνεται για χρονικό διάστημα από μερικά ns έως ms. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι συντεταγμένες του συστήματος σε διαφορετικούς χρόνους αποθηκεύονται με τη μορφή τροχιών. Οι τροχιές αυτές χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό ιδιοτήτων όπως η ενέργεια του συστήματος, οι ρίζες των μέσων τετραγωνικών διακυμάνσεων πρωτεΐνης-προσδέτη κ.λπ. Από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, μπορούν επίσης να υπολογιστούν ιδιότητες συναρτήσεων του χρόνου, όπως οι συναρτήσεις συσχέτισης, οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να διασταυρωθούν με φασματοσκοπικές μετρήσεις.

Οι ιδιότητες που προσδιορίστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζονται στην ενότητα 2.6.

2.6 Ανάλυση ιδιοτήτων συστήματος

Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 2.5.6, από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής είναι εφικτό να υπολογιστούν πολλές ιδιότητες του συστήματος συναρτήσει του χρόνου. Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε αρχικά η ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD), τόσο της ίδιας της πρωτεΐνης, όσο και του προσδέτη (Υποκεφάλαιο 2.6.1). Επιπλέον προσδιορίστηκαν οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με την πρωτεΐνη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Για την απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων αυτών, γίνεται ομαδοποίηση της παραγόμενης τροχιάς με στόχο την απεικόνιση της πιο αντιπροσωπευτικής διαμόρφωσης του συστήματος (Υποκεφάλαιο 2.6.2). Τέλος για τη ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού μορίου, είναι ύψιστης σημασίας η αξιολόγηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του (ADMET) (Υποκεφάλαιο 2.6.3)

2.6.1 Ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD)

Η ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης των ατομικών θέσεων του συστήματος (Root Mean Square Deviation, RMSD) ορίζεται ως η μετατόπιση των ατόμων του συστήματος σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή της τροχιάς σε σχέση με μία αρχική δομή της τροχιάς στην χρονική στιγμή αναφοράς. Συνήθως η πρώτη χρονική στιγμή χρησιμοποιείται ως χρονική στιγμή αναφοράς ($t=0$) και ο τύπος υπολογισμού του RMSD δίνεται από την Εξίσωση 2.20.

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2} \quad (2.20)$$

Όπου:

- n : ο αριθμός των επιλεγμένων ατόμων,
- t_{ref} : ο χρόνος (frame) αναφοράς, και
- r' : η θέση των επιλεγμένων ατόμων σε χρόνο t_x .

Στην παρούσα εργασία υπολογίζεται τόσο το RMSD της πρωτεΐνης, όσο και του προσδέτη. Πιο συγκεκριμένα:

1. RMSD της πρωτεΐνης

Σε κάθε στιγμιότυπο της τροχιάς γίνεται υπέρθεση των ατόμων του σκελετού (backbone) της πρωτεΐνης, ως προς το στιγμιότυπο αναφοράς, $t=0$. Συνεπώς, για κάθε ένα στιγμιότυπο υπολογίζεται η μετατόπιση των ατόμων της πρωτεΐνης (υπολογισμός ως προς τα βαρέα άτομα). Το RMSD της πρωτεΐνης αποτελεί ένα μέτρο για την σταθερότητα της δομής κατά την διάρκεια της προσομοίωσης.

2. RMSD του προσδέτη

Σε κάθε στιγμιότυπο της τροχιάς γίνεται υπέρθεση των ατόμων του σκελετού (backbone) της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον προσδέτη, ως προς το στιγμιότυπο αναφοράς, $t=0$. Συνεπώς, για κάθε ένα στιγμιότυπο υπολογίζεται η

μετατόπιση των βαρέων ατόμων του προσδέτη. Το RMSD του προσδέτη αποτελεί ένα μέτρο για την σταθερότητα της πρόσδεσης του μορίου στην πρωτεΐνη [34].

2.6.2 Ομαδοποίηση πρωτεϊνικών δομών (Clustering)

Μετά το πέρας της προσομοίωσης, μπορούν να υπολογιστούν οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, σημαντική είναι η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών μέσω της τρισδιάστατης απεικόνισης των πιο συχνών στιγμιότυπων κάθε προσομοίωσης. Για τον σκοπό αυτό, είναι απαραίτητη η ομαδοποίηση των δομών του συμπλόκου που προκύπτουν από την τροχιά του συστήματος.

Η γεωμετρική ομαδοποίηση πραγματοποιείται για τον εντοπισμό παρόμοιων διαμορφώσεων που αποτελούν στιγμιότυπα μιας τροχιάς Μοριακής Δυναμικής. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ομαδοποίησης. Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αλγορίθμους ομαδοποίησης που εφαρμόζονται σε τροχιές Μοριακής Δυναμικής είναι το gromos, το οποίο παρέχεται από το λογισμικό GROMACS [35].

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με τον ακόλουθο τρόπο: αρχικά επιλέγεται μια ακτίνα αποκοπής RMSD, με βάση την οποία θα γίνει η ομαδοποίηση των διαμορφώσεων μια τροχιάς Μοριακής Δυναμικής σε συστάδες. Στη συνέχεια υπολογίζεται η τιμή του RMSD για κάθε ζεύγος διαμορφώσεων, σε όλη την έκταση της τροχιάς. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το βήμα, γίνεται προσδιορισμός του αριθμού των γειτόνων της κάθε διαμόρφωσης που βρίσκονται εντός της ορισμένης ακτίνας αποκοπής και με αυτό τον τρόπο προσδιορίζεται η διαμόρφωση με τον μεγαλύτερο αριθμό γειτόνων ως το κέντρο της συστάδας. Η διαμόρφωση αυτή μαζί με τις γειτονικές διαμορφώσεις που αποτελούν μια συστάδα, αποκλείονται από την αρχική συλλογή στιγμιότυπων. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες διαμορφώσεις της αρχικής συλλογής μέχρι να γίνει αντιστοίχιση όλων των στιγμιότυπων σε μία συστάδα.

Όλες οι συστάδες είναι αμοιβαία αποκλειστικές, επομένως μια διαμόρφωση μπορεί να είναι μέλος μόνο μίας συστάδας. Η διαμόρφωση με τον μεγαλύτερο αριθμό γειτόνων σε κάθε συστάδα χαρακτηρίζεται ως η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση της συστάδας (κέντρο της συστάδας). Οποιαδήποτε διαμόρφωση χωρίς γείτονες αντιπροσωπεύει τη δική της μονομελή συστάδα [36][37].

2.6.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Τέλος, βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού μορίου αποτελούν οι τιμές των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων, όπως αυτές ορίζονται από τον κανόνα των 5 ή αλλιώς τον κανόνα του Lipinski. Σύμφωνα με τον κανόνα του Lipinski, ένα φαρμακευτικό μόριο πρέπει να τηρεί τουλάχιστον 4 από τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Να έχει μοριακό βάρος (M.B) μικρότερο από 500 g/mol.
2. Η τιμή του συντελεστή κατανομής οκτανόλης και νερού (logP) να έχει τιμή μικρότερη του 5. Ο συντελεστής αυτός αποτελεί το μέτρο της λιποφιλικότητας του μορίου.
3. Να μην έχει περισσότερους από 5 δότες δεσμού υδρογόνου και 10 δέκτες δεσμού υδρογόνου. Ο αριθμός των δοτών δεσμού υδρογόνου υπολογίζεται από τον συνολικό αριθμό των δεσμών αζώτου-υδρογόνου (N-H) και οξυγόνου-υδρογόνου (O-H), ενώ

για τον υπολογισμό των δεκτών μετρώνται όλα τα άτομα οξυγόνου και αζώτου του εκάστοτε μορίου.

4. Η πολική επιφάνεια του μορίου (polar surface area PSA) πρέπει να έχει ανώτερη ή ίση τιμή με 140 \AA^2 . Η τιμή αυτή εκφράζει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη του συστήματος και υπολογίζεται με βάση την επιφάνεια των ατόμων N και O του μορίου.
5. Να έχει λιγότερους από 10 περιστρεφόμενους δεσμούς (rotatable bonds) [38].

Επιπρόσθετα με τους κανόνες του Lipinski, ορίζονται επιπλέον επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες που εξετάζονται υπολογιστικά, με την χρήση του εργαλείου Qikprop που παρέχεται από το λογισμικό Schrödinger [39]. Ο σκοπός αυτού του υπολογισμού είναι να διαπιστωθεί στο αρχικό στάδιο σχεδιασμού φαρμάκων, εάν η εξεταζόμενη ένωση μπορεί να αποτελέσει εν δυνάμει φαρμακευτικό μόριο. Οι ιδιότητες αυτές αφορούν:

1. Τη διαλυτότητα στο νερό, η οποία επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα και εκφράζεται με τον όρο $\log S$ ο οποίος πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη από -6 mol/dm^3 .
2. Την κυτταρική διαπερατότητα, υπολογίζοντας την προβλεπόμενη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2. Τα κύτταρα Caco-2 αποτελούν ένα μοντέλο προσομοίωσης του αιματο-εντερικού φραγμού. Η μονάδα μέτρησης είναι nm/sec και το κατώτερο όριο είναι 25 nm/sec . Η επιθυμητή τιμή είναι πάνω από 500 nm/sec .
3. Τους μεταβολίτες που αναμένεται να προκύψουν από την πορεία μεταβολισμού του φαρμάκου, οι οποίοι δεν πρέπει να υπερβαίνουν τους 7.
4. Τα χειρόμορφα κέντρα του μορίου τα οποία δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 1.

Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

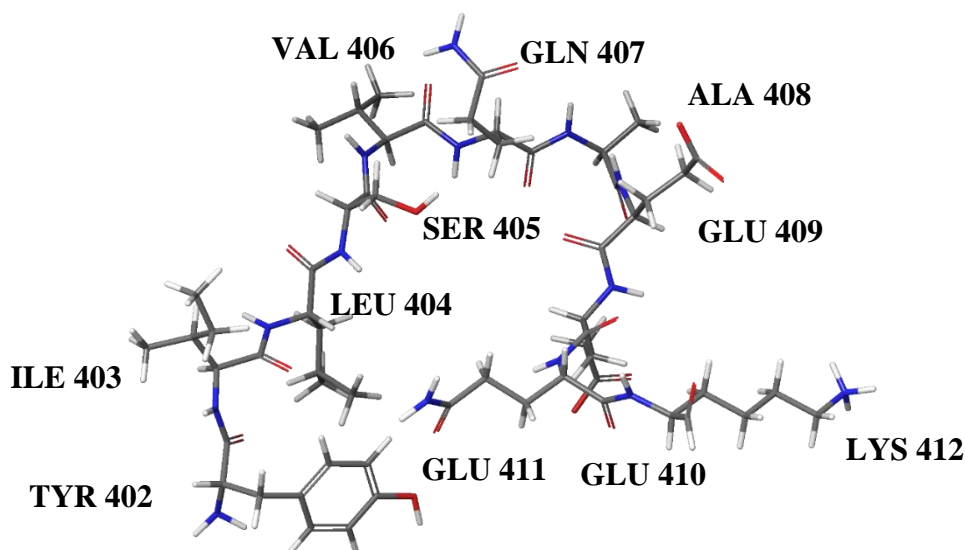
3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά την ολοκλήρωση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων για κάθε σύστημα. Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Maestro που παρέχεται από το Schrödinger 2020-3 και πιο συγκεκριμένα τα εργαλεία Interactions Diagram και Qikprop. Για την ανάλυση του κάθε συστήματος παρατίθενται τα εξής στοιχεία:

- Η δομή του προσδέτη.
- Το διάγραμμα της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD) του προσδέτη.
- Το διάγραμμα της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον προσδέτη.
- Το διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη και των αμινοξέων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.
- Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του, οι οποίες υπολογίζονται μέσω του εργαλείου Qikprop του Maestro.

3.2 Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής στην ελεύθερη μορφή της c-Myc

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής της ελεύθερης μορφής του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ (Σχήμα 3.1). Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 1.6.1, η c-Myc περιέχει τρία γνωστά σημεία πρόσδεσης μικρών μορίων (Σχήμα 1.6), στα οποία συμπεριλαμβάνεται και το τμήμα 402–412. Το τμήμα αυτό επιλέχθηκε, έτσι ώστε να εξεταστεί η ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων μικρών μορίων στην c-Myc. (Ενότητες 3.3 και 3.4).



Σχήμα 3.1 Ελεύθερη μορφή του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Για την πραγματοποίηση της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής της ελεύθερης μορφής του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, το σύστημα κατασκευάστηκε βάσει των παραμέτρων που παρατίθενται στον Πίνακα 3.1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε προετοιμασία της πρωτεΐνης μέσω του Protein Preparation Wizard, στην συνέχεια το σύστημα επιδιαλυτώθηκε σε ορθορομβικό κουτί νερού,

έπειτα εξισορροπήθηκε το φορτίο του συστήματος, μέσω προσθήκης κατάλληλου αριθμού αντισταθμιστικών ιόντων νατρίου (Na^+) και χλωρίου (Cl^-) και τέλος έγινε επιπλέον προσθήκη ιόντων νατρίου και χλωρίου για επίτευξη φυσιολογικής συγκέντρωσης άλατος (0.15 M).

Πίνακας 3.1 Παράμετροι για την δημιουργία του συστήματος της ελεύθερης μορφής του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

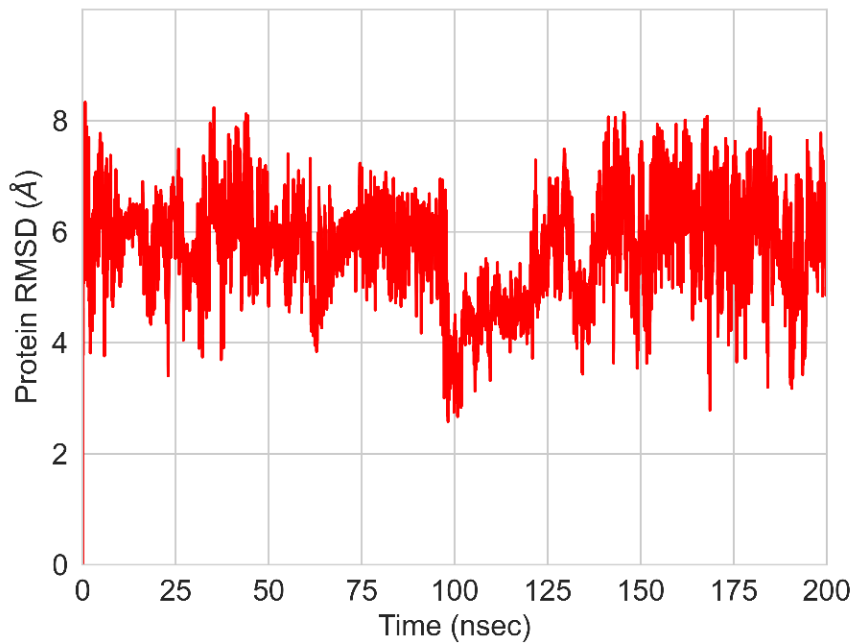
Μοντέλο διαλύτη	TIP3P
Περιοδικές συνθήκες	Ορθορομβικό κουτί
Αποστάσεις κουτιού	20.0 Å
Πεδίο δυνάμεων	OPLS3e
Συγκέντρωση άλατος	0.15 M

Για την προσομοίωση του συστήματος χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι που αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Παράμετροι που εφαρμόστηκαν για την προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής της ελεύθερης μορφής του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Χρόνος προσομοίωσης	200 ns
Θερμοκρασία συστήματος	310 K
Πίεση συστήματος	1 atm
Στατιστικό σύνολο	NPT
Ακτίνα αποκοπής ηλεκτροστατικών και vdW αλληλεπιδράσεων	12 Å

Μετά την ολοκλήρωση της προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής της ελεύθερης μορφής του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, εξήχθη το διάγραμμα της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (200 ns) που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3.1.



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα RMSD για την ελεύθερη μορφή του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (200 ns).

Για την ελεύθερη μορφή της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ υπολογίζεται η μέση τιμή του RMSD κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, η οποία είναι ίση με $5.7 \pm 0.9 \text{ \AA}$. Η τιμή αυτή υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη δεν αποκτά σταθερή διαμόρφωση κατά την διάρκεια των 200 ns της προσομοίωσης.

3.3 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συστήματα της c-Myc με επιλεγμένους προσδέτες

Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 1.6.1 έχει διεξαχθεί πληθώρα ερευνών με στόχο την εύρεση κατάλληλων αναστολέων της c-Myc. Μέσω αυτών, έχουν ανακαλυφθεί ενώσεις, οι οποίες δρουν ως αναστολείς της ογκοπρωτεΐνης c-Myc. Η ανασταλτική δράση ορισμένων εξ' αυτών οφείλεται στην πρόσδεση τους στο τμήμα 402–412 της c-Myc, και κατά συνέπεια στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού της c-Myc με την πρωτεΐνη Max. Οι ενώσεις αυτές έχουν επιλεγεί για να μελετηθούν στην παρούσα εργασία.

Για την επικύρωση της καταλληλότητας της Μοριακής Δυναμικής ως μεθόδου για την πρόβλεψη της ικανότητας μικρών μορίων να παραμένουν προσδεδεμένα σταθερά στην αλληλουχία c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω: αρχικά πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις σε γνωστούς από την βιβλιογραφία προσδέτες σε σύμπλοκο με την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ (θετικά δείγματα). Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν μόρια που προσδένονται σε διαφορετικά τμήματα πρόσδεσης από την περιοχή 402-412 (αρνητικά δείγματα). Τέλος, εξετάστηκε και η πρόσδεση αναστολέων της c-Myc για τους οποίους όμως δεν έχει προσδιοριστεί η περιοχή πρόσδεσης (άγνωστα δείγματα). Στην ενότητα 3.3.1 παρατίθενται αναλυτικά τα συστήματα που επιλέχθηκαν προς εξέταση, καθώς και η πορεία κατασκευής τους.

3.3.1 Επιλογή και δημιουργία συστημάτων προς προσομοίωση

Τα συστήματα που επιλέχθηκαν χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με βάση την ικανότητα πρόσδεσης των μορίων στο πεπτιδίο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, όπως αυτή προκύπτει από την τρέχουσα βιβλιογραφία [7-15]. Τα τρία συστήματα κατηγοριοποιούνται ως εξής: ως αληθώς θετικά δείγματα (positive control), εφόσον είναι επιβεβαιωμένη πειραματικά η πρόσδεση τους στο τμήμα c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Σε αυτήν την κατηγορία εντάσσονται τα μόρια 10058-F4, Mycro3 και 10075-G5. Ως αληθώς αρνητικά δείγματα (negative control), εφόσον είναι επιβεβαιωμένη πειραματικά η πρόσδεση τους σε διαφορετικές περιοχές της c-Myc. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τα μόρια MYCi361 και MYCi975, που προσδένονται στην περιοχή 336-375 της c-Myc. Τέλος, ως άγνωστα δείγματα (unknown), εφόσον δεν είναι επιβεβαιωμένη πειραματικά η πρόσδεση τους σε συγκεκριμένο τμήμα της c-Myc. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα μόρια KJ-Pyr-9, sAJM589, Mycro1, Mycro2, MYCMI-6 και MYCMI-7. Στον Πίνακα 3.3 περιέχονται τα συστήματα εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία με βάση την κατηγοριοποίηση του εκάστοτε μορίου.

Πίνακας 3.3. Κατηγοριοποίηση μορίων που επιλέχθηκαν να προσομοιωθούν.

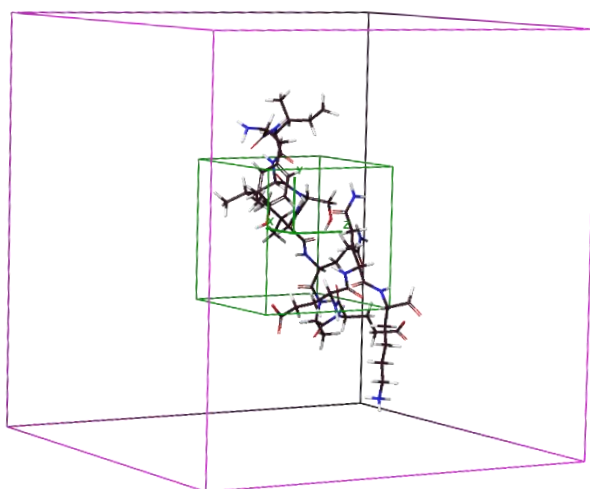
Προσδέτης	Κατηγορία συστήματος
10058-F4	Θετικό
10075-G5	Θετικό
Mycro3	Θετικό
MYCi361	Αρνητικό
MYCi975	Αρνητικό
KJ-Pyr-9	Άγνωστο
sAJM589	Άγνωστο
Mycro1	Άγνωστο
Mycro2	Άγνωστο
MYCMI-6	Άγνωστο
MYCMI-7	Άγνωστο

Αρχικό στάδιο για τη δημιουργία των συστημάτων, ήταν η προετοιμασία του εκάστοτε προσδέτη (Πίνακας 3.3) και του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Η προετοιμασία των προσδετών έγινε με την χρήση του εργαλείου LigPrep [40] του λογισμικού Schrödinger 2020-3, ενώ για την πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Protein Preparation Wizard [34, 41] του ίδιου λογισμικού.

Για τις προσομοιώσεις αξιοποιήθηκε η δομή του συμπλόκου του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ που φέρει προσδεσμένη την ένωση οδηγό 10058-F4. Η δημιουργία του μοντέλου βασίστηκε στις συντεταγμένες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία [7], προερχόμενες από φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Η επεξεργασία του αρχείου pdb από την οποία απομονώθηκε η αλληλουχία c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ έγινε από την πτυχιούχο φαρμακευτικής Μαρία Ελένη Λιόση.

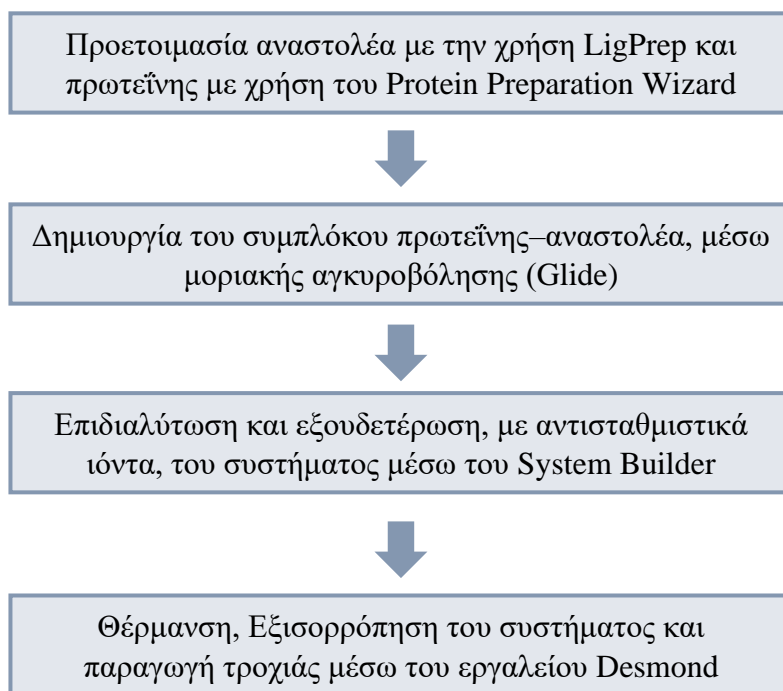
Μετά την προετοιμασία των συστημάτων, πραγματοποιήθηκε η μοριακή αγκυροβόληση κάθε προσδέτη στην περιοχή c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Για την διεξαγωγή της αγκυροβόλησης χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Glide του λογισμικού Maestro Schrödinger 2020-3. Συνεπώς δημιουργήθηκε για κάθε προσδέτη, το αντίστοιχο σύμπλοκο με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Για την πραγματοποίηση της μοριακής αγκυροβόλησης, αρχικά δημιουργήθηκε ένα πλαίσιο (grid) με κέντρο τον προσδέτη 10058-F4 (Σχήμα 3.2). Στην συνέχεια βάση του πλαισίου αυτού αγκυροβολήθηκαν τα προς εξέταση μόρια και μέσω του αλγορίθμου Glide SP επιλέχθηκε για κάθε ένα η ενεργειακά χαμηλότερη διαμόρφωση.



Σχήμα 3.2 Τρισδιάστατη αναπαράσταση του πλαισίου που δημιουργήθηκε για το c-Myc, βάσει του μορίου 10058-F4.

Στην συνέχεια για κάθε σύμπλοκο, το σύστημα επιδιαλυτώθηκε σε νερό βάσει των παραμέτρων που αναγράφονται στον Πίνακα 3.1 μέσω της χρήση του εργαλείου System Builder του λογισμικού Maestro. Στην συνέχεια, εξισορροπήθηκε το φορτίο του συστήματος, μέσω προσθήκης κατάλληλου αριθμού αντισταθμιστικών ιόντων νατρίου (Na⁺) και χλωρίου (Cl⁻) και τέλος, έγινε επιπλέον προσθήκη ιόντων νατρίου και χλωρίου για επίτευξη φυσιολογικής συγκέντρωσης άλατος (0.15 M). Τέλος, έγινε επιλογή των παραμέτρων προσομοίωσης μέσω του εργαλείου Molecular Dynamics του λογισμικού Desmond [42, 43] για την έναρξη της προσομοίωσης. Τα παραπάνω βήματα παρουσιάζονται συνοπτικά και στο Σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3 Βήματα για την κατασκευή των συστημάτων πριν την προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής.

3.3.2 Παράμετροι προσομοίωσης

Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις προσομοιώσεις, αναγράφονται στον Πίνακα 3.4. Πρέπει να σημειωθεί πως στον συγκεκριμένο πίνακα συμπεριλαμβάνονται τόσο οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δημιουργία του συστήματος, όσο και κατά την προσομοίωση αυτών.

Πίνακας 3.4 Παράμετροι κατασκευής του συστήματος και παράμετροι προσομοίωσης.

Παράμετρος	Τιμή
Μοντέλο διαλύτη	TIP3P
Περιοδικές συνθήκες	Ορθορομβικό κουτί
Πεδίο δυνάμεων	OPLS3e
Χρόνος προσομοίωσης	200 ns
Στατιστικό σύνολο	NPT (ισόθερμο - ισοβαρές)
Θερμοστάτης - Βαροστάτης	Nosé - Hoover
Θερμοκρασία	310 K
Πίεση	1,01325 bar
Ακτίνα αποκοπής ηλεκροστατικών και vdW αλληλεπιδράσεων	12 Å

3.3.3 Αναλύσεις προσομοιώσεων

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης κάθε συστήματος. Για κάθε σύστημα αναγράφεται η δομή του προσδέτη, το διάγραμμα της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη, το διάγραμμα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, καθώς και το διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με την πρωτεΐνη c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Για την ικανοποιητική πρόσδεση ενός μικρού μορίου στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, πρέπει το ποσοστό των στιγμιότυπων με RMSD προσδέτη μικρότερο από 13 Å, να υπερβαίνει το 55–60%. Επιπλέον, για την απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων στο σύστημα μετά το πέρας της προσομοίωσης παρουσιάζονται οι πιο αντιπροσωπευτικές δομές των συμπλοκών μετά από ομαδοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, για τα μόρια με ικανοποιητική πρόσδεση στο πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, η ομαδοποίηση έγινε με χρήση τιμή αποκοπής RMSD, τα 6 Å, ενώ για τα υπόλοιπα μόρια επιλέχθηκε μεγαλύτερη τιμή RMSD, τα 8 Å. Σε κάθε ένωση παρουσιάζεται η κεντρική δομή (centroid) από τις τρεις πρώτες ομάδες (clusters) που παράχθηκαν κατά την ομαδοποίηση.

Τα αποτελέσματα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την ικανότητα των προσδετών να αλληλεπιδρούν με την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Αρχικά, για κάθε ένα από υπό εξέταση μόρια παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως αυτές υπολογίστηκαν από το εργαλείο Qikprop του Maestro (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες πιθανών αναστολέων, όπως υπολογίστηκαν από το εργαλείο Qikprop.

Μόρια	logP	logS	Caco-2 (nm/s)	Μεταβολίτες	Χειρόμορφα κέντρα
10058-F4	3.143	-3.872	1978.581	1	0
10075-G5	2.122	-2.006	497.2	3	1
Mycro3	5.743	-8.192	1125.592	1	0
MYCi361	9.302	-11.644	3658.263	3	0
MYCi975	8.703	-10.825	3654.008	3	0
KJ-Pyr-9	3.346	-5.865	94.148	3	0
MYCMI-6	1.872	-4.512	90.85	5	0
MYCMI-7 *	5.13	-5.12	-	-	0
Mycro1	5.275	-7.146	2311.773	3	0
Mycro2	5.104	-6.835	2634.63	3	0
sAJM589	3.052	-3.755	2113.836	1	0

Οι ιδιότητες του μορίου MYCMI-7 δεν υπολογίστηκαν με το εργαλείο Qikprop. Ο υπολογισμός για το συγκεκριμένο μόριο δεν ήταν εφικτός, καθώς το Qikprop δεν μπορεί να πραγματοποιήσει υπολογισμούς φυσικοχημικών ιδιοτήτων σε τεταρτοταγείς αμίνες. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FAF-Drugs4 για τις τιμές logP και logS [44], καθώς και το λογισμικό PerMM για τον υπολογισμό του λογαρίθμου της διαπερατότητας κυττάρων Caco-2, η οποία υπολογίστηκε ίση με -2.64. Η τιμή αυτή είναι εντός των ορίων τιμών, που κυμαίνονται από -7 έως -2 για Caco-2/MDCK assays [45, 46]. Μόρια με τιμή πλησίον του -2 έχουν επιθυμητή τιμή διαπερατότητας, επομένως και στην περίπτωση μας, το MYCMI-7 έχει επιθυμητή τιμή διαπερατότητας.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.3, τα όρια για τις ιδιότητες αυτές είναι:

- **logP < 5**

Εκτός του ορίου αυτού, είναι τα μόρια Mycro3, MYCi362, MYCi975, Mycro1 και Mycro2.

- **logS > -6**

Εκτός του ορίου αυτού είναι τα μόρια Mycro3, MYCi362, MYCi975, Mycro1 και Mycro2.

- **Caco-2 > 500 nm/sec**

Για τα μόρια KJ-Pyr-9, MYCMI-6 και οριακά για το 10075-G5 η τιμή διαπερατότητας (Caco-2) είναι μικρότερη των 500 nm/sec (ιδανικά Caco-2 > 500 nm/s), όμως είναι ανώτερες οι τιμές από το κατώτατο όριο (25 nm/s).

- **Μεταβολίτες < 7**

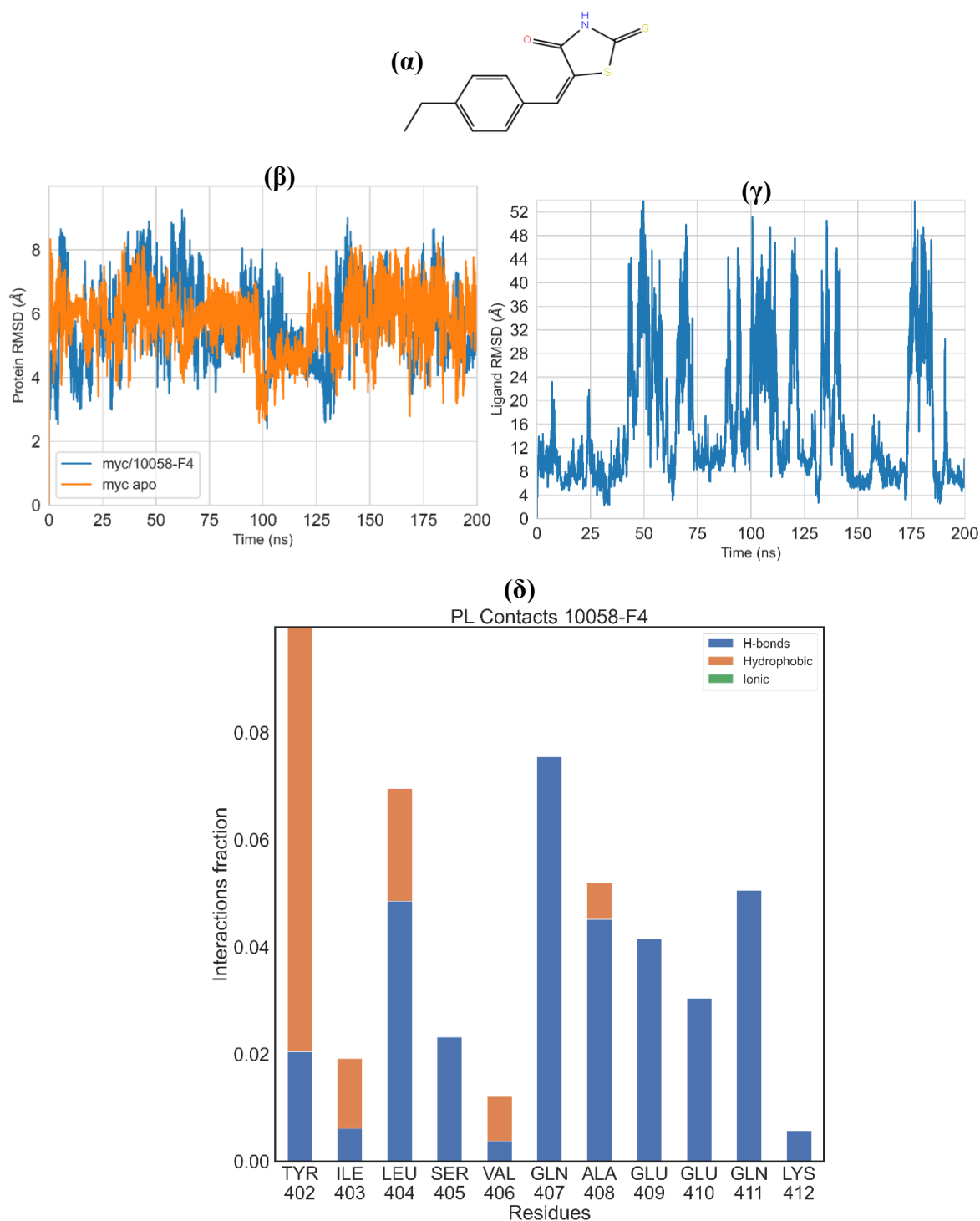
Κανένα μόριο δεν έχει παραπάνω από 7 μεταβολίτες.

- **Χειρόμορφα κέντρα < 1**

Το μόριο 10075-G5 έχει ένα χειρόμορφο κέντρο.

A. Αποτελέσματα για αληθώς θετικά δείγματα

1. Ανάλυση συστήματος 10058-F4 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂

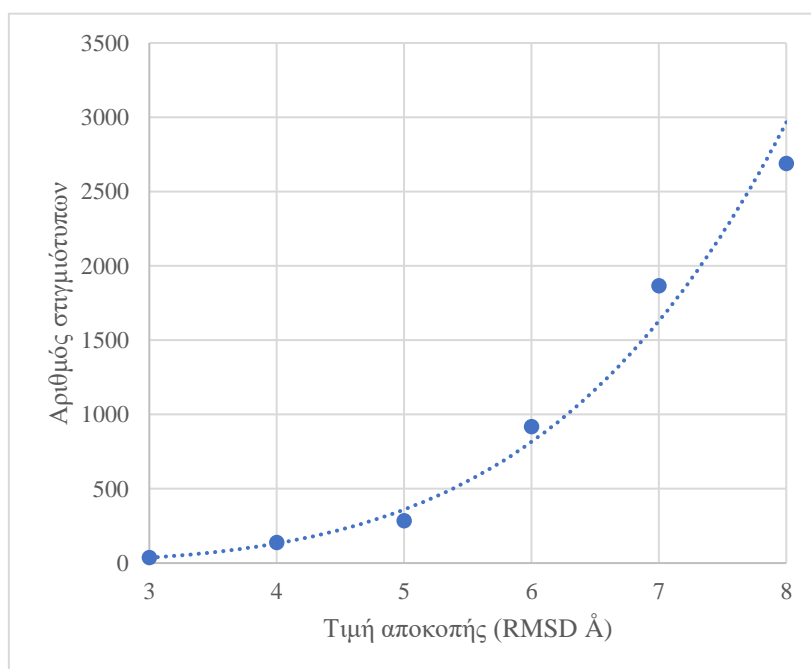


Σχήμα 3.4 (α) Δομή αναστολέα 10058-F4, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων για το μόριο 10058-F4 απεικονίζονται στο Σχήμα 3.4. Για το σύμπλοκο του προσδέτη 10058-F4 με την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ έγινε ομαδοποίηση των δομών μετά το πέρας της προσομοίωσης, με στόχο την απεικόνιση των πιο αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων του συστήματος. Για την πραγματοποίηση της ομαδοποίησης επιλέχθηκαν τα στιγμιότυπα στα οποία το μόριο βρίσκεται προσδεδεμένο στο πεπτίδιο και κατά συνέπεια επιλέχθηκε μία τιμή αποκοπής των δομών βάση του RMSD του προσδέτη. Για την κατάλληλη επιλογή ορίου αποκοπής, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τιμές RMSD που κυμαίνονται από 3 έως 8 Å. Για κάθε τιμή καταγράφεται ο αριθμός των στιγμιότυπων στα οποία το μόριο θεωρείται προσδεδεμένο στην c-Myc. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 3.6 και απεικονίζονται στο Σχήμα 3.5.

Πίνακας 3.6 Αριθμός στιγμιότυπων στα οποία το μόριο 10058-F4 θεωρείται προσδεδεμένο στο πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ για δεδομένη τιμή αποκοπής RMSD.

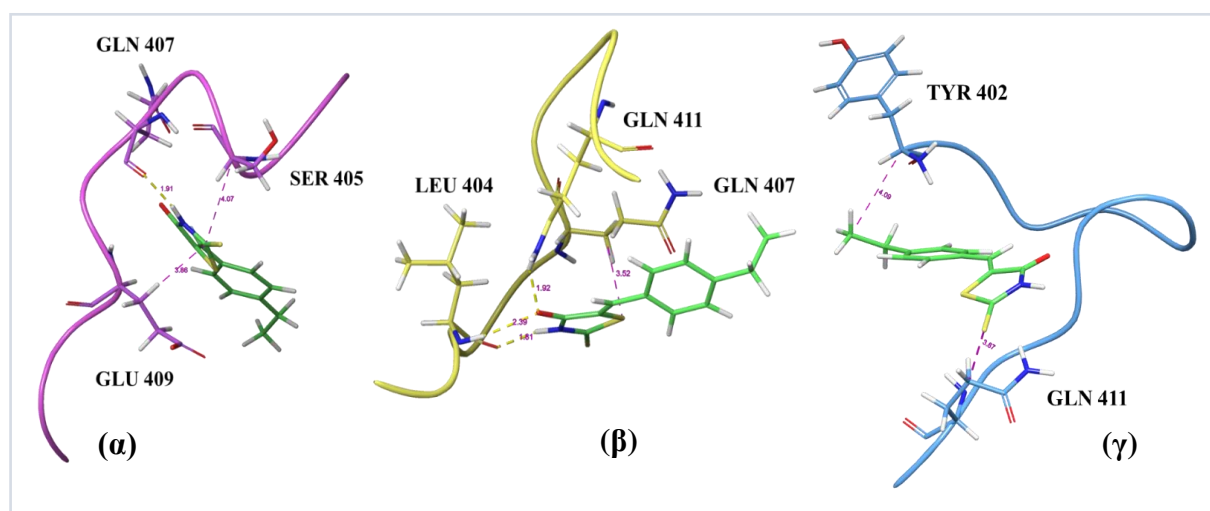
RMSD αποκοπής (Å)	Αριθμός στιγμιότυπων
8	2690
7	1866
6	920
5	285
4	140
3	37



Σχήμα 3.5 Αριθμός στιγμιότυπων στα οποία το μόριο 10058-F4 θεωρείται προσδεδεμένο στο πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ για δεδομένη τιμή αποκοπής RMSD.

Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, παρατηρείται ότι ο αριθμός των στιγμιότυπων είναι υψηλός (920) για τιμές RMSD μεγαλύτερες από 6 Å. Επιπλέον, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή αποκοπής, τόσο πιο απομακρυσμένος θα βρίσκεται ο προσδέτης από την πρωτεΐνη, και άρα δεν θα απεικονίζουν της οι διαμορφώσεις την πρόσδεση του μορίου στο πεπτίδιο. Συνεπώς, επιλέγεται ως όριο αποκοπής η τιμή 6 Å, έτσι ώστε ο προσδέτης να μην είναι απομακρυσμένος από την πρωτεΐνη, αλλά και ο αριθμός των στιγμιότυπων να είναι επαρκής για την πραγματοποίηση της ομαδοποίησης.

Επιπλέον με στόχο την απεικόνιση αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων πρόσδεσης του μορίου με την πρωτεΐνη, επιλέχθηκαν οι κεντρικές δομές (centroids) των πρώτων τριών ομάδων. Για τον προσδέτη 10058-F4 οι δομές αυτές απεικονίζονται στο **Σχήμα 3.6**.



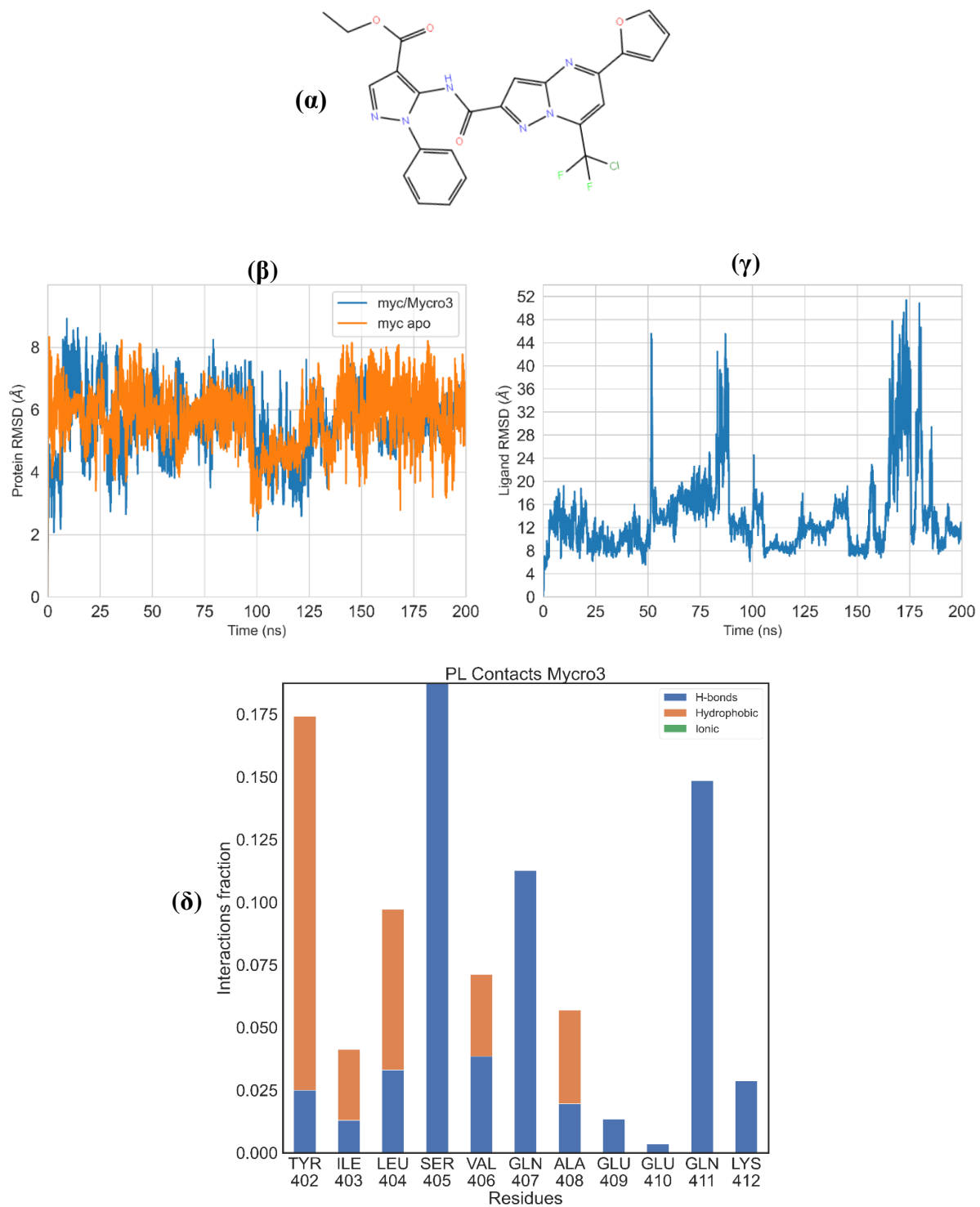
Σχήμα 3.6 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των τριών ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/10058-F4 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η απόσταση του προσδέτη από τα αμινοξέα με τα οποία αλληλεπιδρά. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 600 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 289 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 31 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.4γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD του προσδέτη είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **60%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς επιβεβαιώνεται από την προσομοίωση ότι το μόριο 10058-F4 προσδέεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για τον γνωστό αναστολέα 10058-F4 (Σχήμα 3.4δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με τα αμινοξέα **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.10) (TYR402) με το οποίο το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά, σχηματίζοντας π – π αλληλεπίδραση μεταξύ του δακτυλίου του προσδέτη και του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης, με την **γλουταμίνη 407** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.08) (GLN407), όπου το οξυγόνο που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό της

γλουταμίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του δακτυλίου του προσδέτη, καθώς και με την **λευκίνη 404** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.07) (LEU404), με την οποία σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου. Ο πρώτος δεσμός σχηματίζεται μεταξύ του οξυγόνου που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό της λευκίνης και της ομάδας NH του δακτυλίου του προσδέτη. Ο δεύτερος δεσμός σχηματίζεται μεταξύ της ομάδας NH της κύριας αλυσίδας της λευκίνης, με το πλευρικό οξυγόνο του δακτυλίου του προσδέτη.

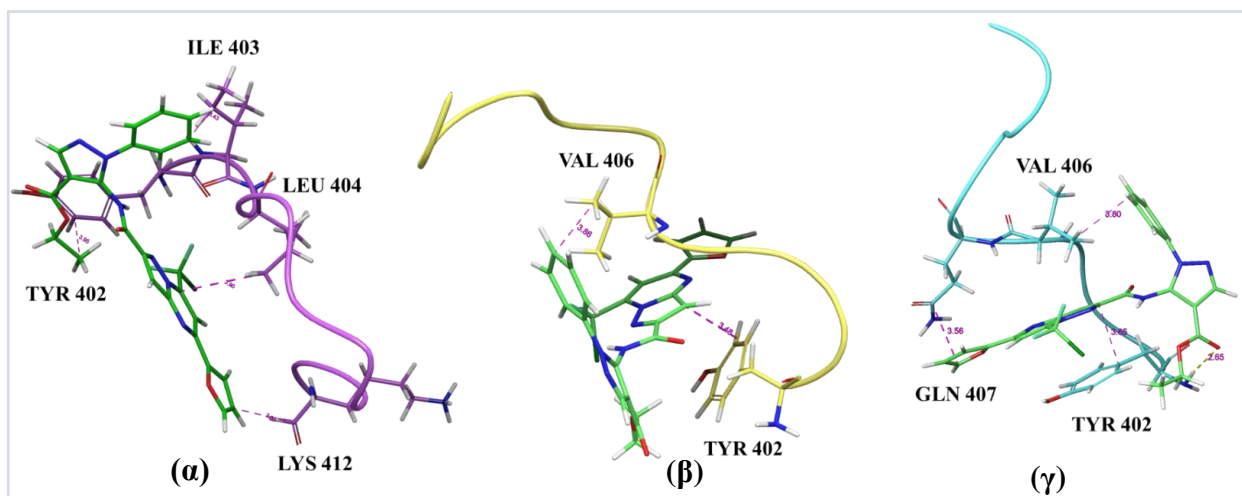
Στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας δεν εντοπίζονται οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με την πρωτεΐνη. Στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας εντοπίζονται οι αλληλεπιδράσεις με την γλουταμίνη 407, με την λευκίνη 404, καθώς και με την γλουταμίνη 411, η οποία αποτελεί την τέταρτη πιο συχνή αλληλεπίδραση (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.05). Τέλος, στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις του μορίου με την τυροσίνη 402 και την γλουταμίνη 411 (Σχήμα 3.6).

2. Ανάλυση συστήματος Mycro3 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.7 (α) Δομή αναστολέα Mycro3, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη Mycro3 κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.8 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.

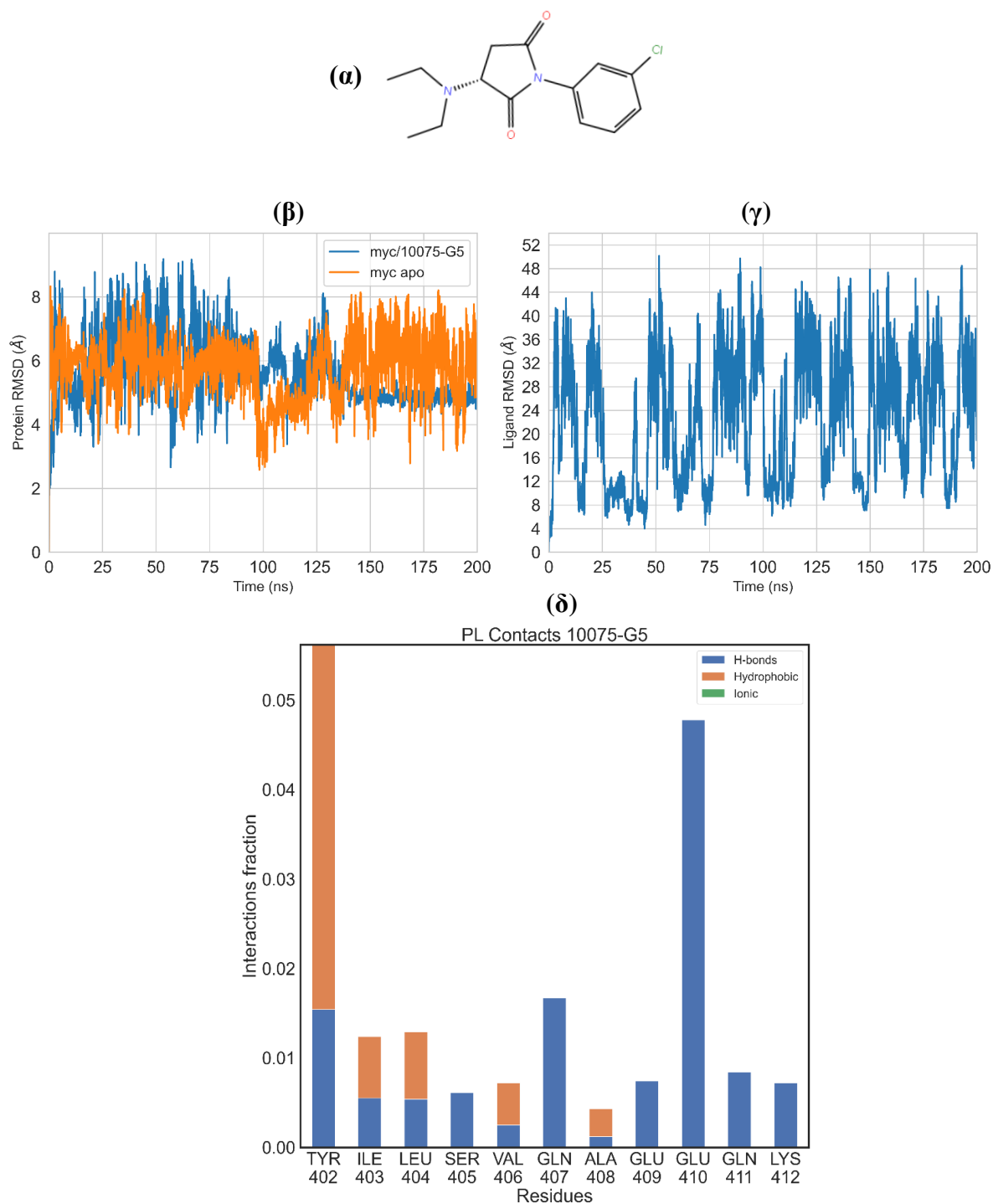


Σχήμα 3.8 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των τριών ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/Mycr3 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η απόσταση του προσδέτη από τα αμινοξέα με τα οποία αλληλεπιδρά. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 69 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 7 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 1 μέλος.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.6γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **58%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς επιβεβαιώνεται από την προσομοίωση ότι ο αναστολέας Mycr3 προσδέεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για τον γνωστό αναστολέα Mycr3 (Σχήμα 3.6δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με τα αμινοξέα **σερίνη 405** (SER405) (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.18), με την οποία το μόριο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου, με την **τυροσίνη 402** (TYR402) (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.18) με την οποία το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά, καθώς και με την **γλουταμίνη 411** (GLN411) (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.15) με την οποία το μόριο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (H-bond).

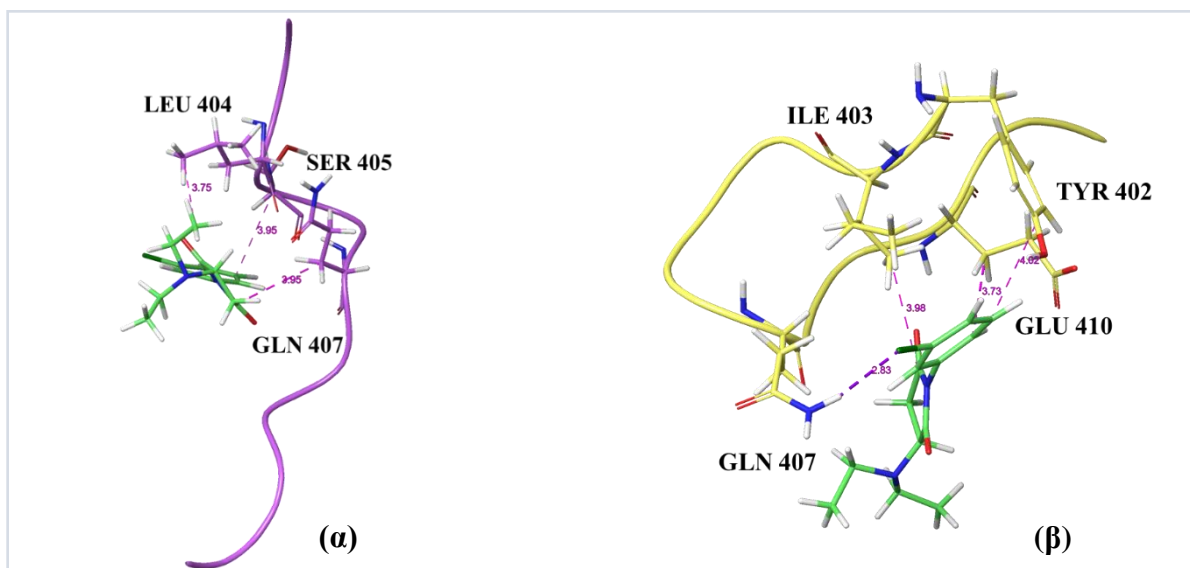
Στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας και της δεύτερης ομάδας, από τις συχνότερες αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με την πρωτεΐνη, εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την τυροσίνη 402, όπου ο φαινολικός δακτύλιος της πλευρικής ομάδας της σχηματίζει π-π αλληλεπίδραση με τον δακτύλιο του Mycr3. Τέλος, στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας, εντοπίζονται οι αλληλεπιδράσεις με την τυροσίνη 402, καθώς και με την **γλουταμίνη 407**, η οποία είναι η τέταρτη πιο συχνή αλληλεπίδραση (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.12). Με την γλουταμίνη 407, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του πενταμελή δακτυλίου του προσδέτη και του αζώτου της πλευρικής ομάδας της γλουταμίνης (Σχήμα 3.6).

3. Ανάλυση συστήματος 10075-G5 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.9 (α) Δομή αναστολέα 10075-G5, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον, στο Σχήμα 3.10 αναπαρίστανται οι κεντρικές δομές των δύο ομάδων, μετά από ομαδοποίηση. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση του 10075-G5 η ομαδοποίηση έγινε με RMSD 8 Å. Το RMSD αυτό επιλέχθηκε έτσι ώστε να επαρκούν τα στιγμιότυπα για την πραγματοποίηση της ομαδοποίησης (644 στιγμιότυπα για 8 Å). Από την ομαδοποίηση αυτή προέκυψαν 2 ομάδες.



Σχήμα 3.10 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc402-412/10075-G5 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 8 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η απόσταση του προσδέτη από τα αμινοξέα με τα οποία αλληλεπιδρά. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 536 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 107 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.9γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **28%**. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς η πρόσδεση του αναστολέα 10075-G5 στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ δεν επιβεβαιώνεται από την προσομοίωση. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για τον γνωστό αναστολέα 10075-G5 (Σχήμα 3.9δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.06) (TYR402) με την οποία το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά σχηματίζοντας π – π αλληλεπίδραση μεταξύ του δακτυλίου του προσδέτη και του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης, καθώς και με την **γλουταμίνη 410** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.05) (GLN410) με την οποία το μόριο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου (H-bond) ανάμεσα στο άζωτο του αμινοξέος που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό και του οξυγόνου του δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας του προσδέτη.

Στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας δεν εντοπίζεται κάποια από τις συχνότερες αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με την πρωτεΐνη. Στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας, εντοπίζονται οι αλληλεπιδράσεις με την τυροσίνη 402, με το γλουταμικό οξύ 410, καθώς και

με την γλουταμίνη 407 (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.01), με το οποίο το πεπτίδιο σχηματίζει δεσμό αλογόνου μεταξύ του χλωρίου του προσδέτη και της ομάδας NH₂ της πλευρικής ομάδας της γλουταμίνης (Σχήμα 3.8).

Με βάση το διάγραμμα του RMSD της πρωτεΐνης, για κάθε μόριο πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης του RMSD της πρωτεΐνης κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Τα αποτελέσματα για τα αληθώς θετικά δείγματα, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7 Ανάλυση αποτελεσμάτων για αληθώς θετικά δείγματα.

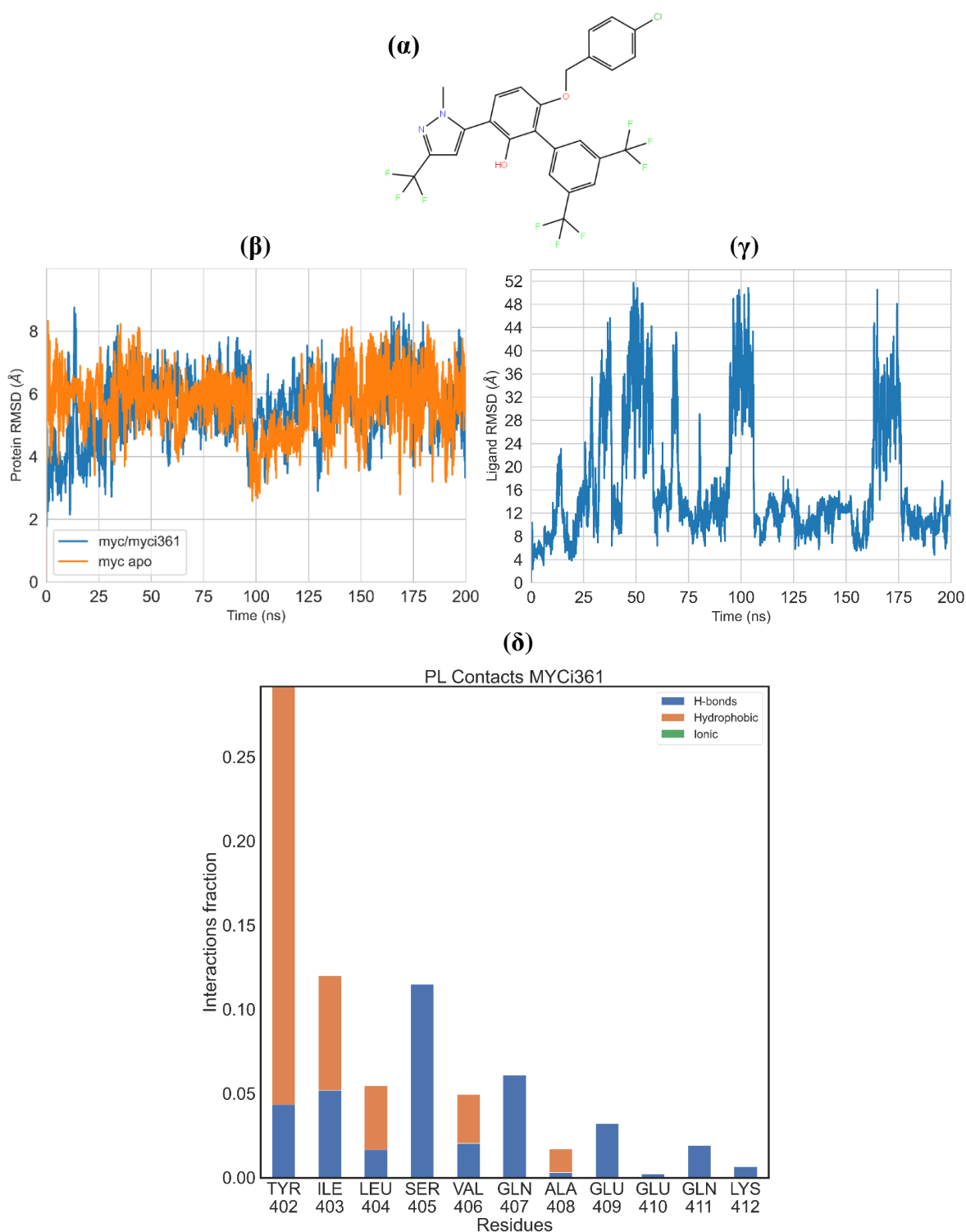
Ένωση	Ποσοστό RMSD > 13 (Å)	Μέσος όρος RMSD πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση με τον προσδέτη
10058-F4	60%	5.7 ± 1.1
Mycro3	58%	5.6 ± 1.0
10075-G5	28%	5.6 ± 1.0

Σημειώνεται να θεωρηθεί ένα μόριο ως ικανό να προσδεθεί στο πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, το ποσοστό RMSD του προσδέτη που είναι μικρότερο των 13 Å, πρέπει να υπερβαίνει το 55–60 %. Για τα αληθώς θετικά δείγματα συμπεραίνεται ότι τα μόρια 10058-F4 και Mycro3 προσδέονται ικανοποιητικά στο πεπτίδιο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ικανοποιητικά, καθώς μέσω της μεθόδου επαληθεύεται η πρόσδεση των μορίων, όπως έχει παρατηρηθεί και βιβλιογραφικά [7, 8, 9]. Αντίθετα, το μόριο 10075-G5 δεν προσδέεται στο πεπτίδιο, ενώ βιβλιογραφικά έχει παρατηρηθεί πρόσδεση. Με βάση την βιβλιογραφία το αποτέλεσμα αυτό είναι αιτιολογημένο, καθώς η πρόσδεση του αναστολέα 10075-G5 που έχει παρατηρηθεί είναι κατά 3–7 φορές ασθενέστερη της πρόσδεσης του αναστολέα 10058-F4 στο πεπτίδιο [7].

Για τα θετικά δείγματα, έγινε σύγκριση του μέσου όρου ο μέσος όρος του RMSD της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της με τον προσδέτη (Πίνακας 3.7), με τον μέσο όρο του RMSD στην apo μορφή (5.7 ± 0.9 Å). Παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος της τιμής του RMSD της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται με την πρόσδεση των μορίων. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η δομή της c-Myc δεν σταθεροποιείται με την πρόσδεση των μικρών μορίων.

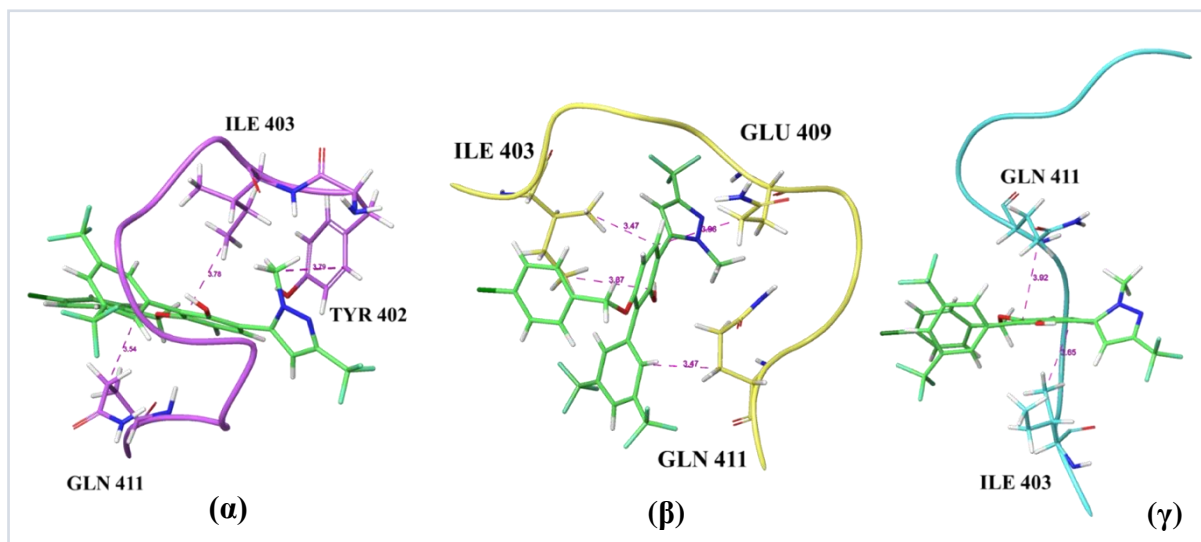
Β. Αποτελέσματα για αληθώς αρνητικά δείγματα

1. Ανάλυση συστήματος MYCi361 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.11 (α) Δομή της ένωσης MYCi361, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του μορίου κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον μόριο.

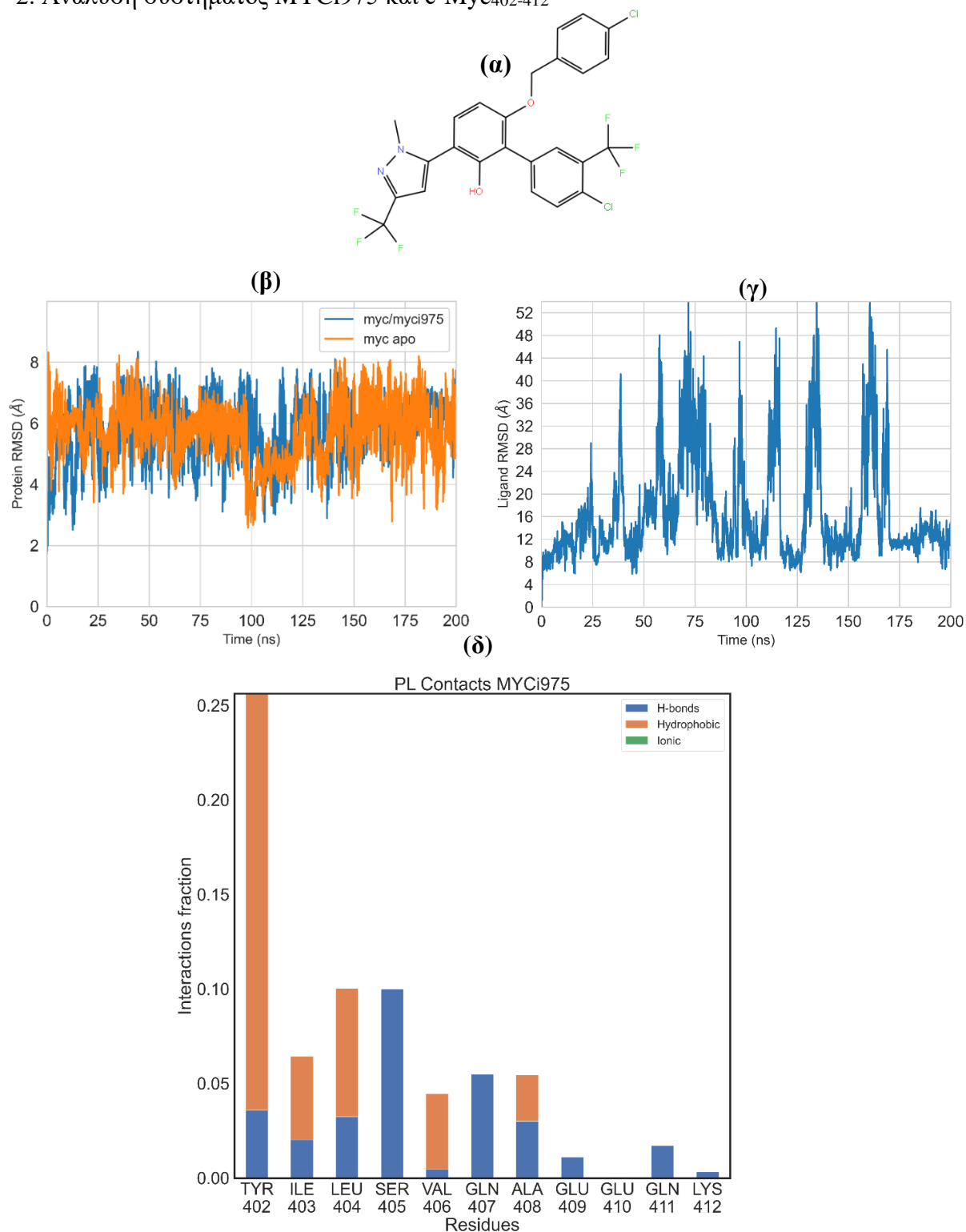
Επιπλέον στο Σχήμα 3.12 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.



Σχήμα 3.12 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/MYCi361 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 240 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 130 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 22 μέλη.

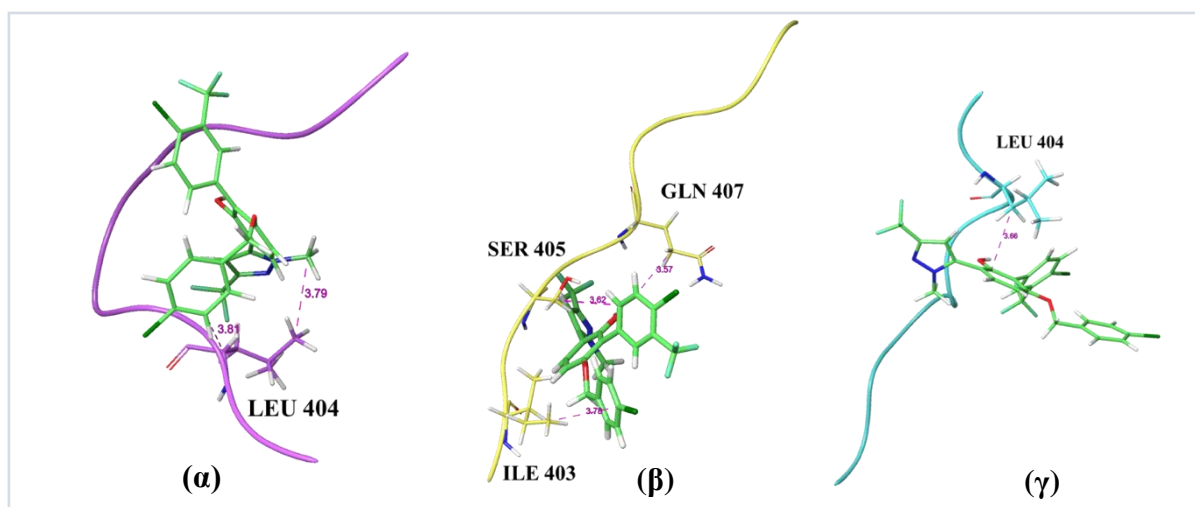
Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.11γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **52%**. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς επιβεβαιώνεται από την προσομοίωση ότι ο αναστολέας MYCi361 δεν προσδένεται στο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο MYCi361 (Σχήμα 3.11δ), συμπεραίνεται ότι η συχνότερη αλληλεπίδραση του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.30) (TYR402) με την οποία το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά. Η αλληλεπίδραση αυτή, εντοπίζεται στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας (Σχήμα 3.12).

2. Ανάλυση συστήματος MYCi975 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.13 (α) Δομή της ένωσης MYCi975, (β) Διάγραμμα ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με το μόριο, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον προσδέτη.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.14 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.



Σχήμα 3.14 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/MYC_{i975} μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 23 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 4 μέλη, (γ) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 1 μέλος.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.13γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **49%**. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς επιβεβαιώνεται από την προσομοίωση ότι ο αναστολέας MYC_{i975} δεν προσδένεται στο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο MYC_{i975} (Σχήμα 3.13δ), συμπεραίνεται ότι η συχνότερη αλληλεπίδραση του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.25) (TYR402) με την οποία το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν απεικονίζεται σε καμία από τις κεντρικές δομές του συμπλόκου (Σχήμα 3.14).

Παρομοίως με τα αληθώς θετικά δείγματα, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, καθώς και το ποσοστό των στιγμιότυπων με RMSD < 13 Å, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8 Ανάλυση αποτελεσμάτων για αληθώς αρνητικά δείγματα.

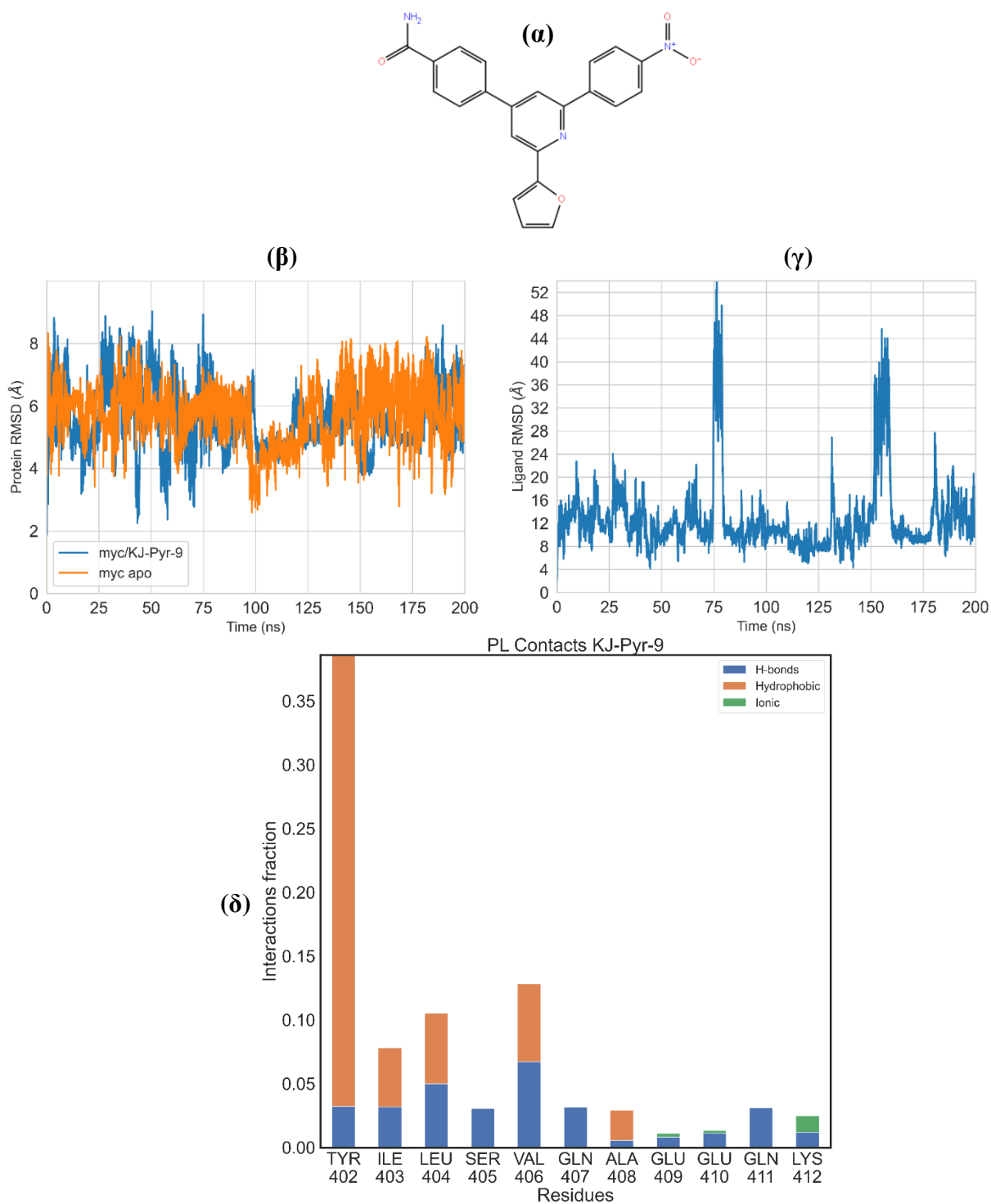
Ένωση	Ποσοστό RMSD > 13 (Å)	Μέσος όρος RMSD πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση με τον προσδέτη
MYCi361	52%	5.5 ± 1.0
MYCi975	49%	5.7 ± 1.0 Å

Όπως αναφέρθηκε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των αληθώς θετικών δειγμάτων, το ποσοστό RMSD του προσδέτη που είναι μικρότερο των 13 Å πρέπει να ξεπερνάει το 55–60 %, έτσι ώστε να θεωρείται το μόριο προσδεδεμένο. Για τα αληθώς αρνητικά δείγματα, το ποσοστό αυτό υπολογίζεται 52% και 49% στην περίπτωση των MYCi361 και MYCi975 αντίστοιχα. Συνεπώς, κανένα από τα δύο μόρια δεν θεωρείται ότι προσδένεται στην περιοχή c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Για τα αρνητικά δείγματα, έγινε σύγκριση του μέσου όρου του RMSD της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της με τα προς εξέταση μόρια (Πίνακας 3.8), με τον μέσο όρο του RMSD στην αρο μορφή (5.7 ± 0.9 Å). Παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος της τιμής του RMSD της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται με την πρόσδεση των μορίων. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι η δομή της c-Myc δεν σταθεροποιείται με την πρόσδεση των μικρών μορίων.

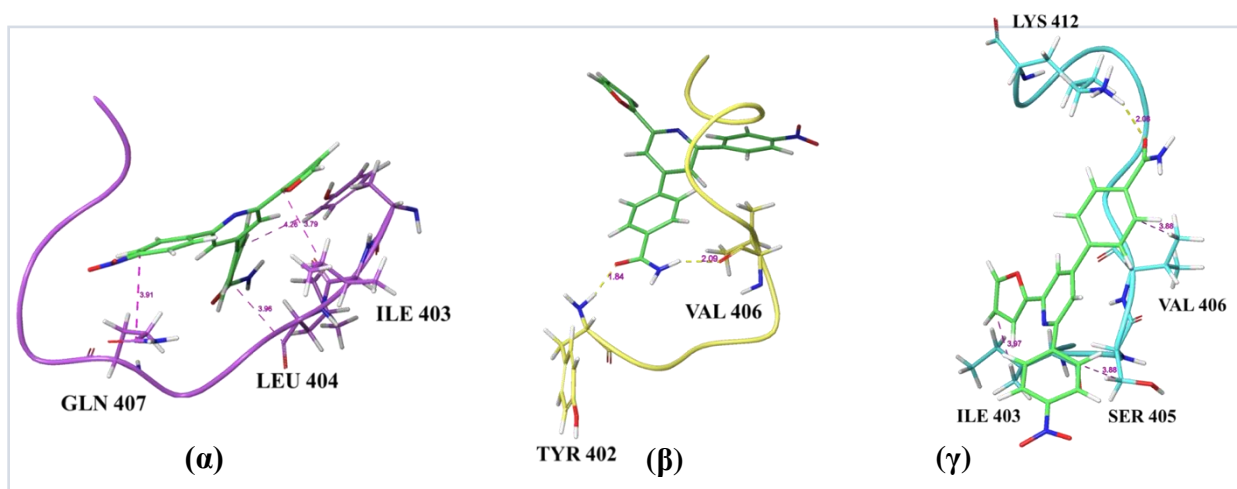
Γ. Αποτελέσματα για άγνωστα δείγματα

1. Ανάλυση συστήματος KJ-Pyr-9 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.15 (α) Δομή της ένωσης KJ-Pyr-9, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.16 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.

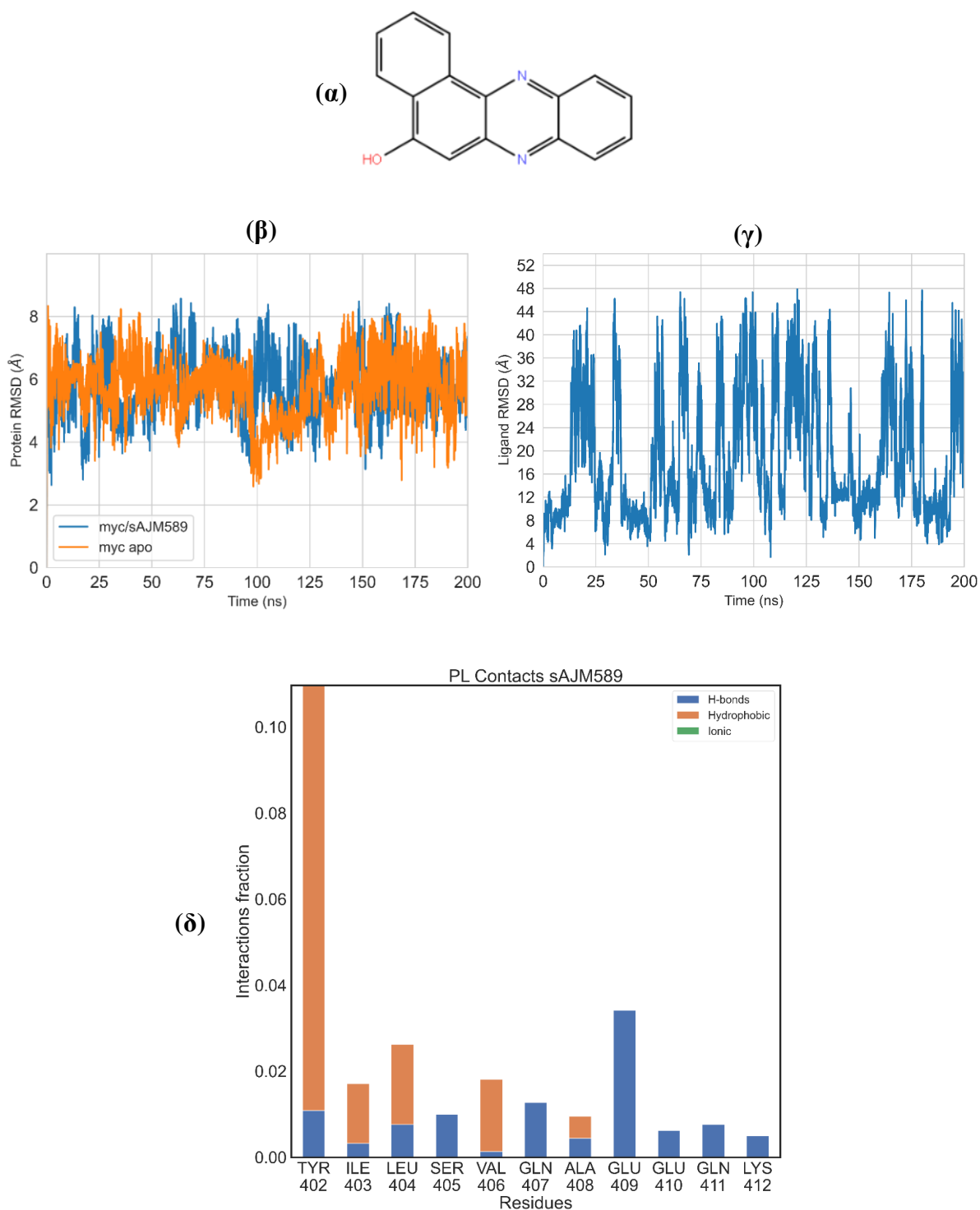


Σχήμα 3.16 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/KJ-Pyr-9 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 66 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 51 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 1 μέλος.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.13γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων, στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **70%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς από την προσομοίωση προβλέπεται ότι το μόριο KJ-Pyr-9 προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο KJ-Pyr-9 (Σχήμα 3.13δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.40) (TYR402), **λευκίνη 404** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.10) (LEU 404) και με την **βαλίνη 406** (κλάσμα αλληλεπίδρασης 0.15) (VAL 406). Με τα τρία αμινοξέα, το μόριο αλληλεπιδρά υδροφοβικά.

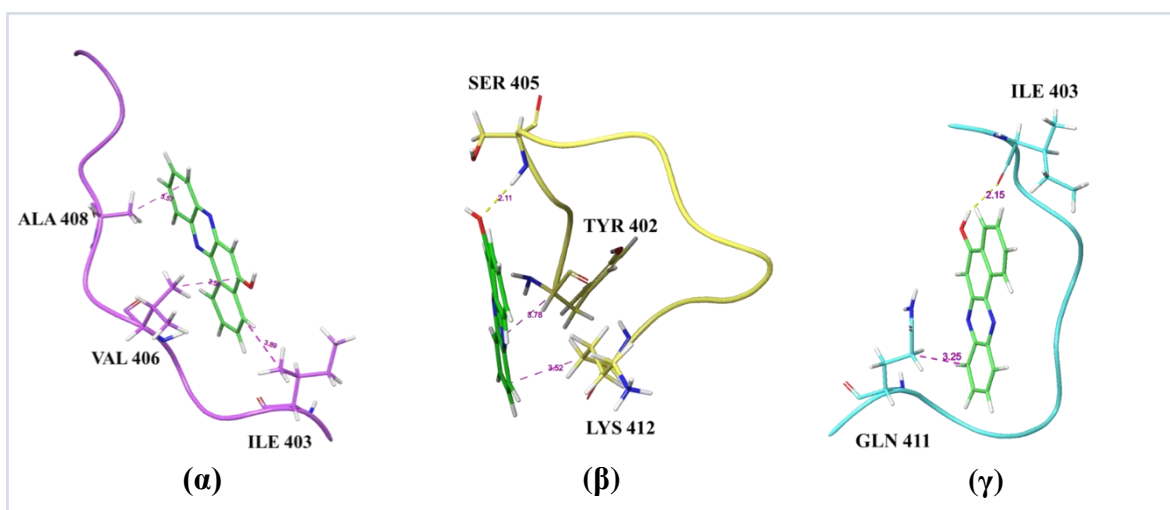
Στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας, από τις συχνότερες αλληλεπιδράσεις, εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την λευκίνη 404. Στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας, από τις πιο συχνές αλληλεπιδράσεις, εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την τυροσίνη 402, όπου σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ της ομάδας NH₂ της κύριας αλυσίδας της τυροσίνης και του οξυγόνου του προσδέτη και με την βαλίνη 406, με την οποία σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του πεπτιδικού δεσμού και της ομάδας NH₂ του προσδέτη. Τέλος στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την βαλίνη 406 (Σχήμα 3.16).

2. Ανάλυση συστήματος sAJM589 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.17 (α) Δομή της ένωσης sAJM589, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον προσδέτη.

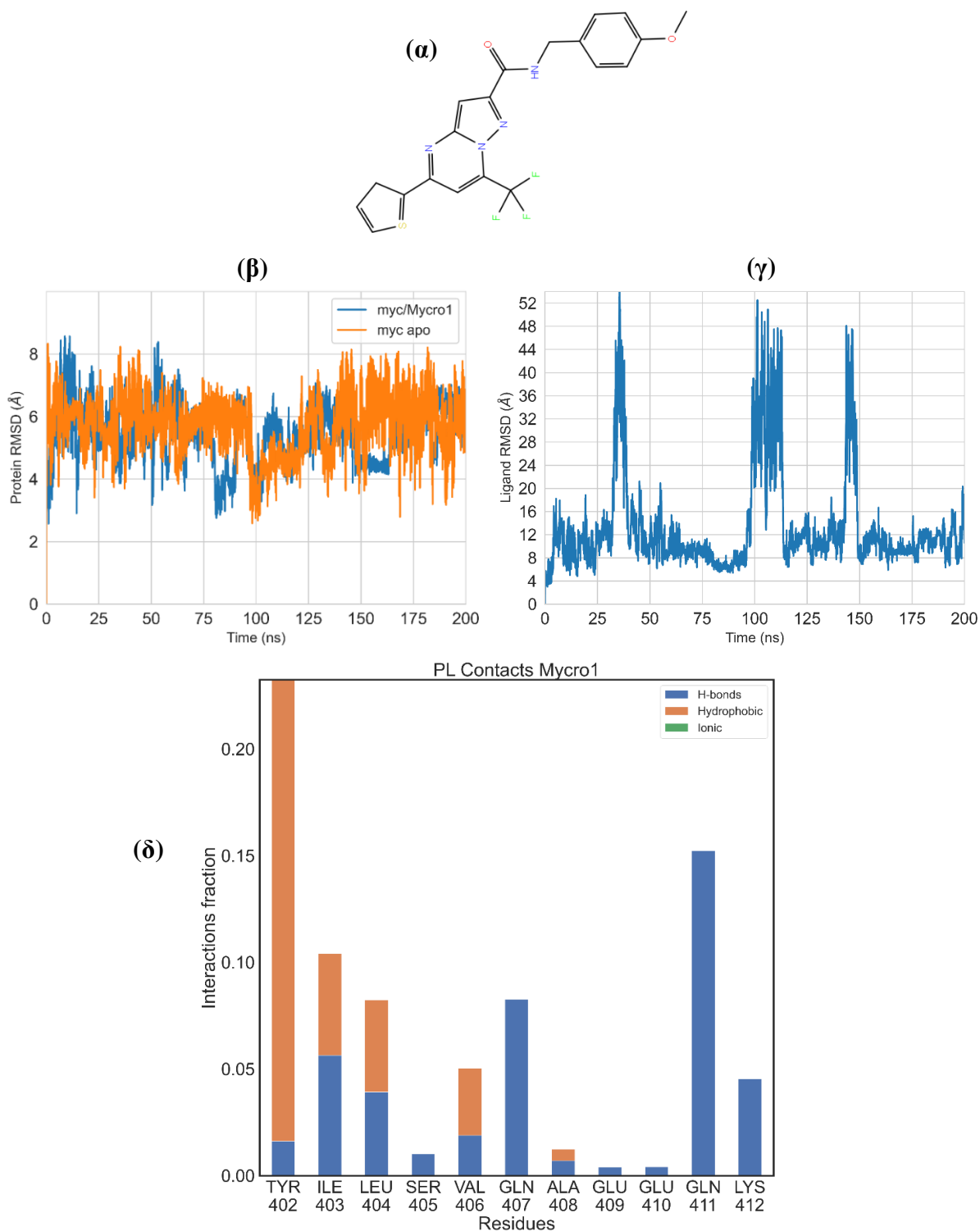
Επιπλέον στο Σχήμα 3.18 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.



Σχήμα 3.18 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/sAJM589 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 167 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 74 μέλη, (γ) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 26 μέλη.

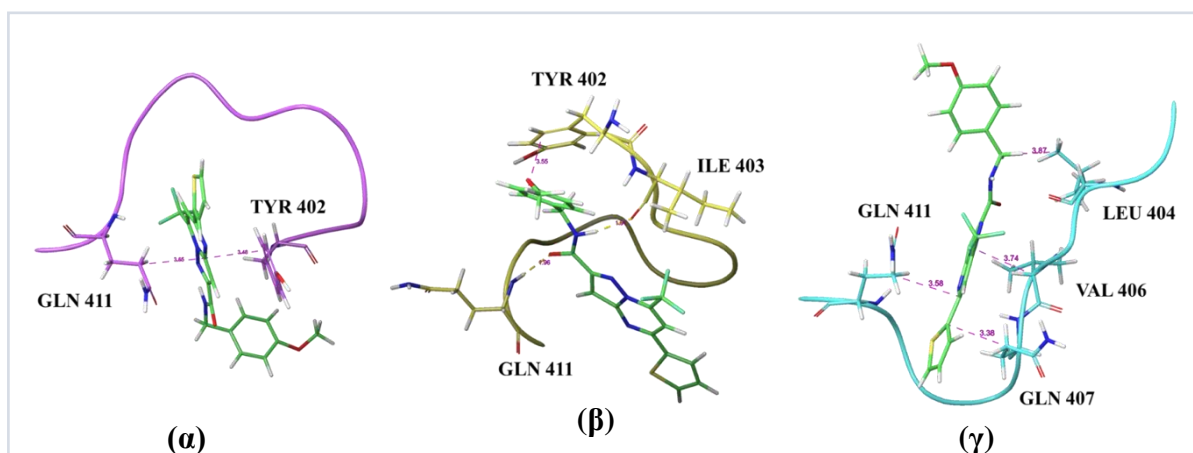
Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.17γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων, στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **44%**. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς από την προσομοίωση προβέπεται ότι το μόριο sAJM589 δεν προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο sAJM589 (Σχήμα 3.17δ), συμπεραίνεται ότι η συχνότερη αλληλεπίδραση του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.12) (TYR402), η οποία εντοπίζεται στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζεται π-π αλληλεπίδραση μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης και του δακτυλίου του προσδέτη (Σχήμα 3.18).

3. Ανάλυση συστήματος Mycro1 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.19 (α) Δομή της ένωσης Mycro1, (β) Διάγραμμα ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.20 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.

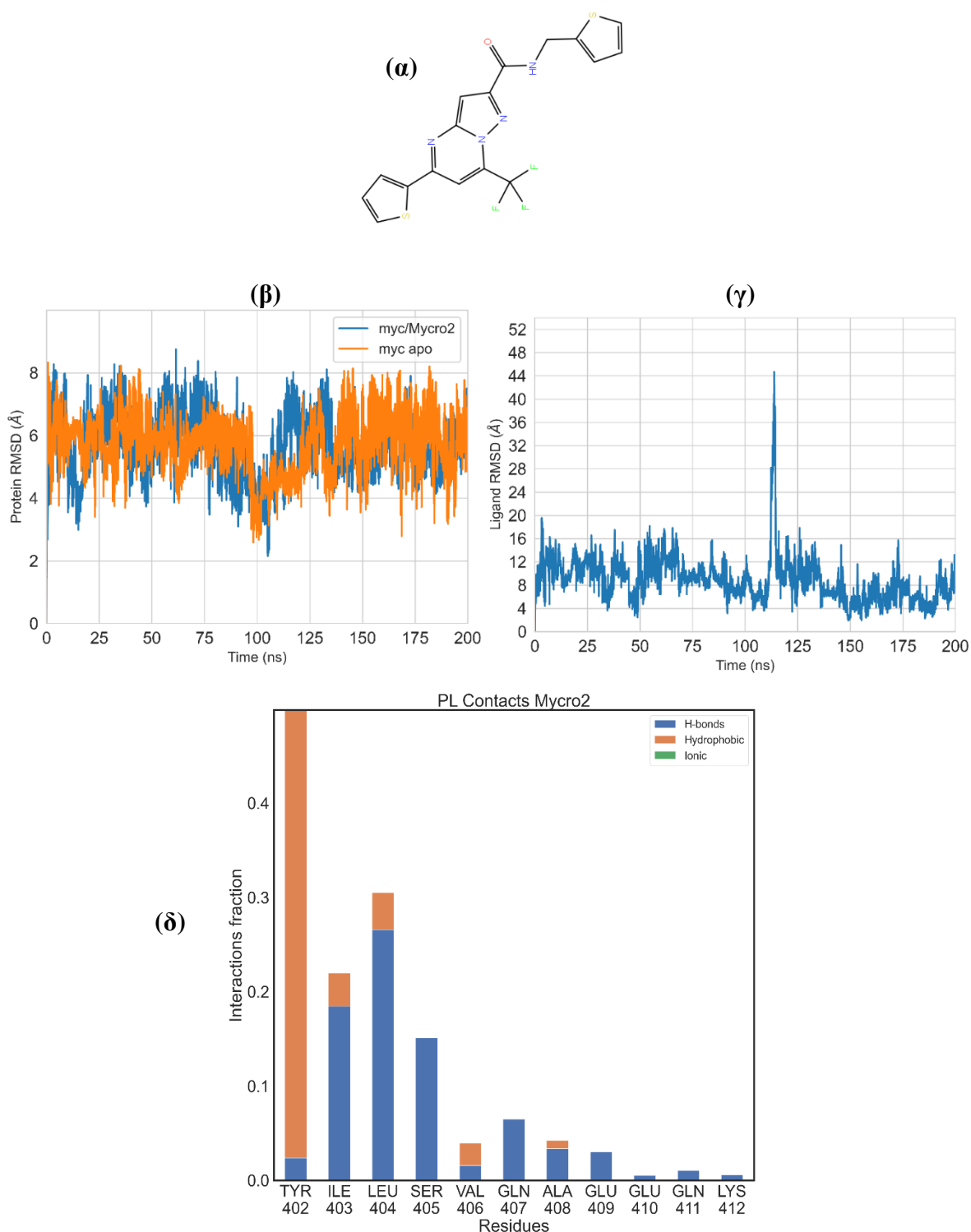


Σχήμα 3.20 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/Mycr1 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 152 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 104 μέλη, (γ) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 38 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.19γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **75%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς από την προσομοίωση προβλέπεται ότι το μόριο Mycr1 προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο Mycr1 (Σχήμα 3.19δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.25) (TYR402), όπου σχηματίζεται π – π αλληλεπίδραση μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της και του δακτυλίου του προσδέτη και με την **γλουταμίνη 411** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.15) (GLN 411), με την οποία σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ της ομάδας NH του πεπτιδικού δεσμού της και του οξυγόνου της κύριας αλυσίδας του προσδέτη.

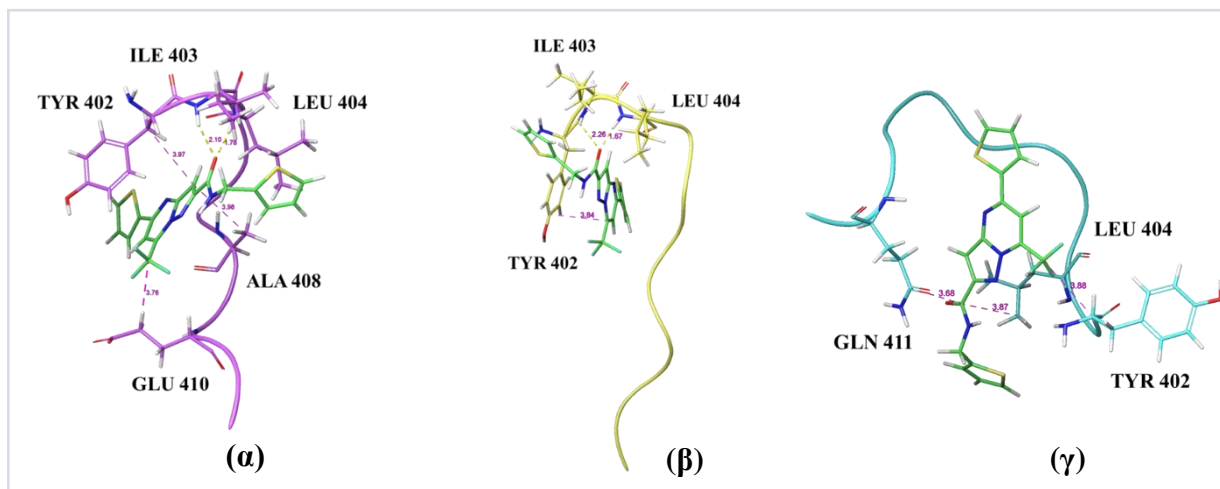
Στην κεντρική δομή της πρώτης και δεύτερης ομάδας εντοπίζονται οι αλληλεπιδράσεις με την τυροσίνη 402 και με την γλουταμίνη 411. Στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την γλουταμίνη 411 (Σχήμα 3.20).

4. Ανάλυση συστήματος Mycro2 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.21 (α) Δομή της ένωσης Mycro2, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.22 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.

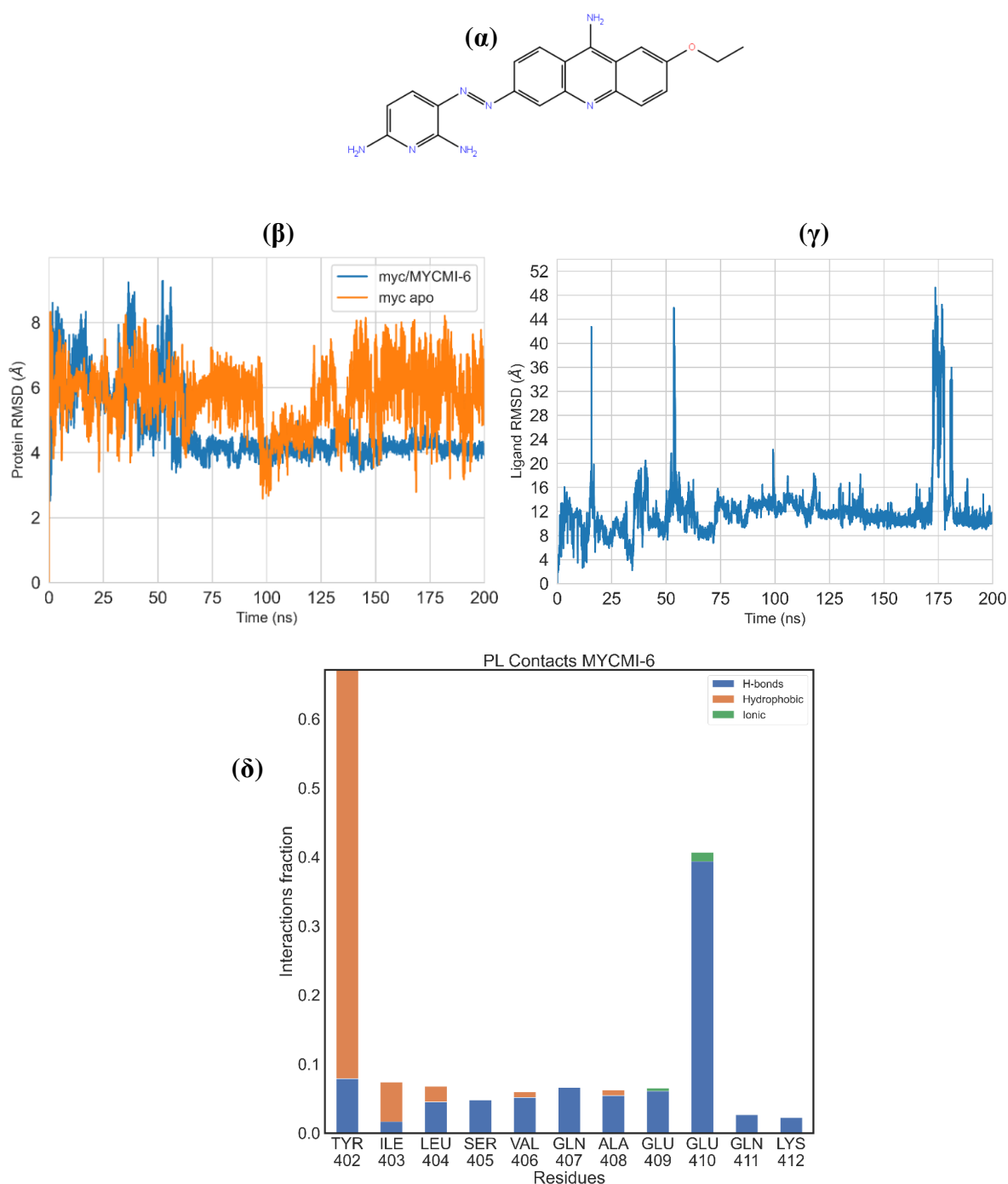


Σχήμα 3.22 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/Mycr₂ μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 1457 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 363 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 273 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.21γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων, στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **91%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς από την προσομοίωση προβλέπεται ότι το μόριο Mycr₂ προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο Mycr₂ (Σχήμα 3.21δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.50) (TYR402), όπου σχηματίζεται π – π αλληλεπίδραση μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής ομάδας της και του δακτυλίου του προσδέτη, με την **ισολευκίνη 403** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.20) (ILE 403) και τη **λευκίνη 404** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.3) (LEU 404), όπου και για τα δύο αμινοξέα οι ομάδες NH που συμμετέχουν στον πεπτιδικό δεσμό τους σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του μορίου.

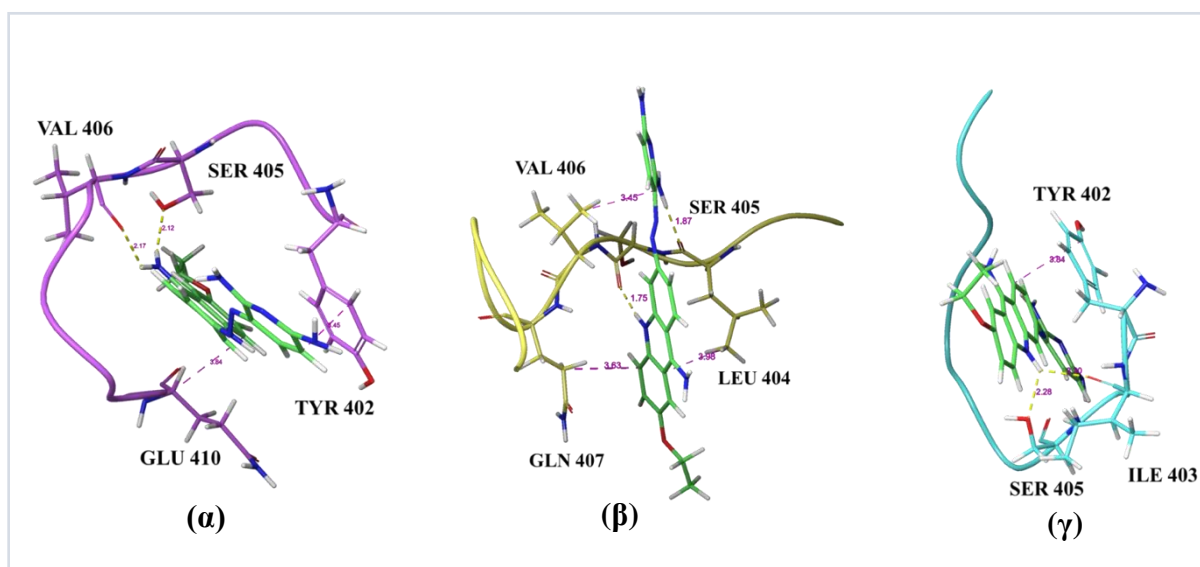
Στην κεντρική δομή της πρώτης και δεύτερης ομάδας εντοπίζονται οι τρεις πιο συχνές αλληλεπιδράσεις του μορίου με την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Επιπλέον, στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας εντοπίζονται οι δύο πρώτες πιο συχνές αλληλεπιδράσεις, η αλληλεπίδραση με την τυροσίνη 402 και με την λευκίνη 404.

5. Ανάλυση συστήματος MYCMI-6 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.23 (α) Δομή της ένωσης MYCMI-6, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.24 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.

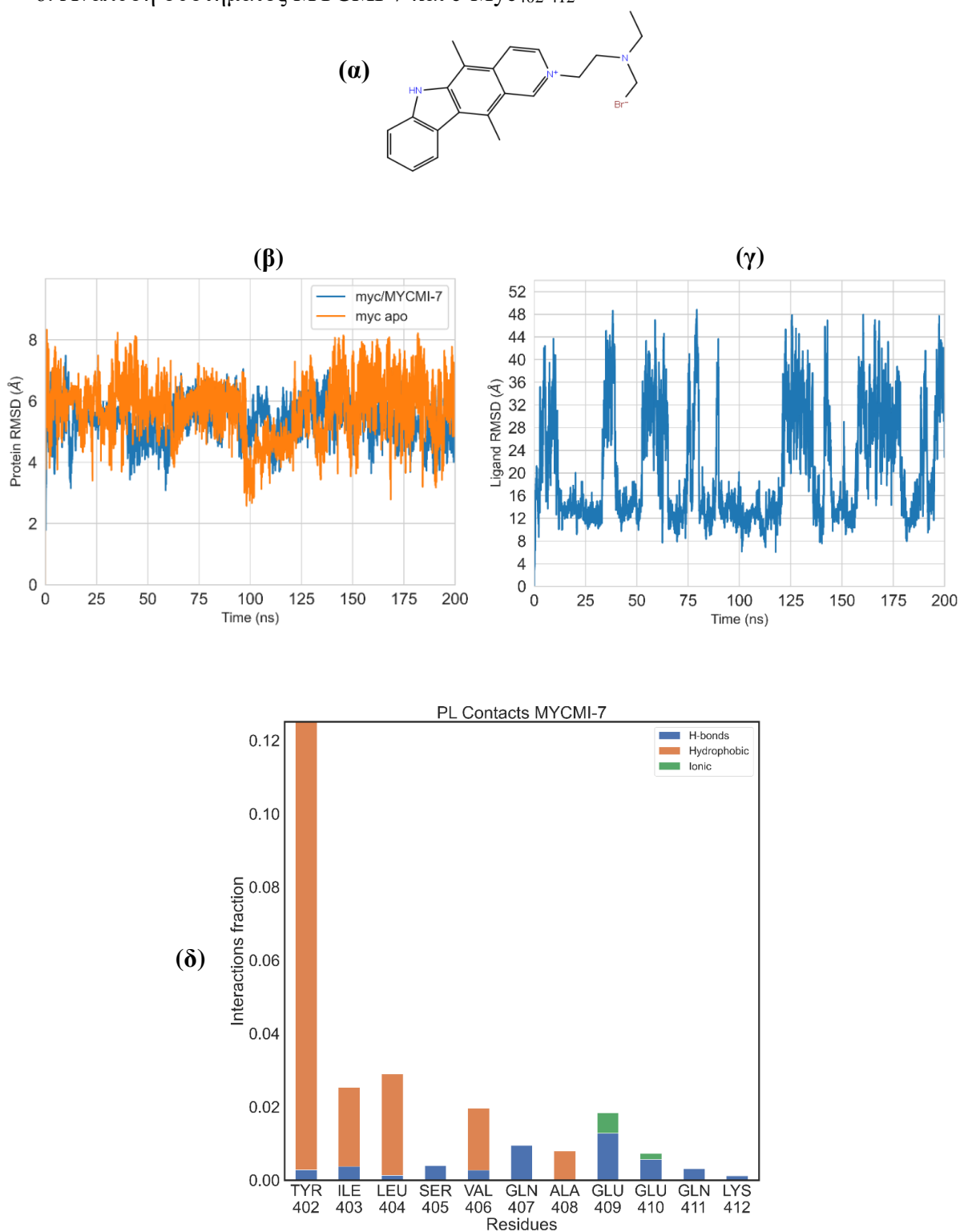


Σχήμα 3.24 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/MYCM1-6 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 97 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 87 μέλη, (γ) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 67 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.23γ), έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **76%**. Το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς προβλέπεται από την προσομοίωση ότι το μόριο MYCM1-6 προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο MYCM1-6 (Σχήμα 3.23δ), συμπεραίνεται ότι οι συχνότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.70) (TYR402), καθώς σχηματίζεται π – π αλληλεπίδραση μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης και του δακτυλίου του προσδέτη και με το **γλουταμικό οξύ 410** (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.40) (GLU 410), όπου το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας του αμινοξέος σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμιδικού δακτυλίου του προσδέτη.

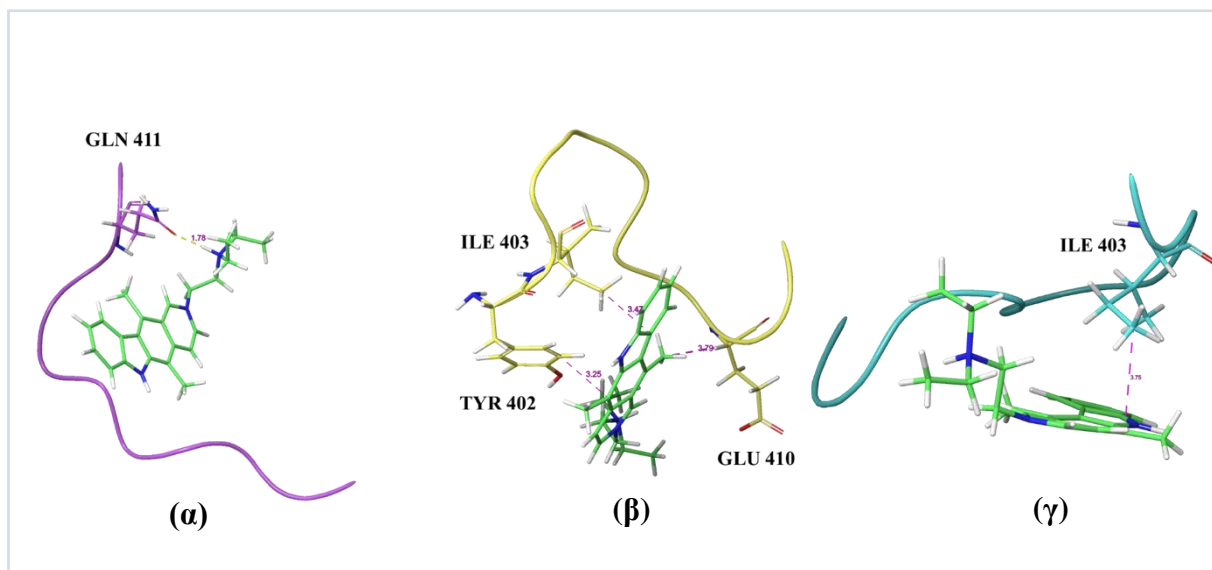
Στην κεντρική δομή της πρώτης ομάδας εντοπίζονται οι δύο πιο συχνές αλληλεπιδράσεις του μορίου με την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, με την τυροσίνη 402 και με το γλουταμικό οξύ 410. Στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας δεν εντοπίζεται κάποια από τις πιο συχνές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, στην κεντρική δομή της τρίτης ομάδας εντοπίζεται η αλληλεπίδραση με την τυροσίνη 402 (Σχήμα 3.24).

6. Ανάλυση συστήματος MYCMI-7 και c-Myc₄₀₂₋₄₁₂



Σχήμα 3.25 (α) Δομή της ένωσης MYCMI-7, (β) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και όταν είναι σε σύμπλοκο με τον αναστολέα, (γ) Διάγραμμα ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης και (δ) Διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ με τον αναστολέα.

Επιπλέον στο Σχήμα 3.26 αναπαρίστανται και οι κεντρικές δομές των τριών ομάδων, μετά από ομαδοποίηση.



Σχήμα 3.26 Τρισδιάστατη αναπαράσταση των κεντρικών δομών των δύο ομάδων του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ /MYCMI-7 μετά από ομαδοποίηση με όριο αποκοπής 6 Å. Στα παραπάνω σχήματα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τα αμινοξέα της c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. (α) Κεντρική δομή πρώτης ομάδας με 25 μέλη, (β) Κεντρική δομή δεύτερης ομάδας με 20 μέλη, (γ) Κεντρική δομή τρίτης ομάδας με 9 μέλη.

Από το διάγραμμα RMSD του προσδέτη κατά την διάρκεια της προσομοίωσης (Σχήμα 3.25γ) έχει εξαχθεί το ποσοστό των στιγμιότυπων στα οποία το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å, το οποίο είναι **26%**. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται ικανοποιητικό για την πρόσδεση ενός αναστολέα στην πρωτεΐνη, συνεπώς από την προσομοίωση προβλέπεται ότι το μόριο MYCMI-7 δεν προσδένεται στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Από το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για το μόριο MYCMI-7 (Σχήμα 3.25δ) συμπεραίνεται ότι η συχνότερη αλληλεπίδραση του μορίου με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ είναι με την **τυροσίνη 402** (TYR402) (κλάσμα αλληλεπίδρασης: 0.13), η οποία εντοπίζεται στην κεντρική δομή της δεύτερης ομάδας (Σχήμα 3.26).

Όμοια με τα αληθώς θετικά δείγματα, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης της πρωτεΐνης, καθώς και το ποσοστό των στιγμιότυπων με RMSD < 13 Å συνοψίζονται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9 Ανάλυση αποτελεσμάτων για άγνωστα δείγματα.

Αναστολείς	Ποσοστό RMSD > 13 Å	Μέσος όρος RMSD πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση με τον προσδέτη
KJ-Pyr-9	70%	5.6 ± 1.0
sAJM589	44%	5.5 ± 0.9
Mycro1	75%	5.5 ± 0.9
Mycro2	91%	5.7 ± 1.0
MYCMI-6	76%	4.7 ± 1.1
MYCMI-7	26%	5.4 ± 0.6

Για τα άγνωστα δείγματα, έγινε σύγκριση του μέσου όρου ο μέσος όρος του RMSD της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της με τον προσδέτη (Πίνακας 3.9), με τον μέσο όρο του RMSD στην apo μορφή (5.7 ± 0.9 Å). Παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος της τιμής του RMSD της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται με την πρόσδεση των μορίων. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η δομή της c-Myc δεν σταθεροποιείται με την πρόσδεση των μικρών μορίων.

Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπως αυτά παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα τόσο για την ικανότητα πρόσδεσης των μορίων που μελετώνται όσο και για την ικανότητα της μεθόδου Μοριακής Δυναμικής να προβλέψει την πρόσδεση νέων μικρών μορίων στο πεπτιδίο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂. Αρχικά, για την αξιολόγησή της πρόσδεσης ενός μικρού μορίου στην c-Myc υπολογίζεται το ποσοστό στιγματίωτων, στα οποία το RMSD του προσδέτη δεν ξεπερνάει τα 13 Å. Για να θεωρείται ικανοποιητική η πρόσδεση, πρέπει το ποσοστό αυτό να υπερβαίνει το 55–60%.

Από τα αληθώς θετικά δείγματα έγινε πρόβλεψη πρόσδεσης δύο εκ των τριών μορίων, 10058–F4 και Mycro3, μέσω του υπολογισμού του ποσοστού στιγματίωτων κάθε προσομοίωσης, όπου το RMSD είναι μικρότερο από 13 Å. Αντίθετα, η μέθοδος δεν μπόρεσε να προβλέψει την πρόσδεση του μορίου 10075–G5, καθώς το ποσοστό στιγματίωτων με RMSD < 13Å υπολογίστηκε στο 29%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην 4 – 5 φορές μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης του μορίου στο πεπτιδίο, σε σύγκριση με το μόριο 10058–F4.

Επιπλέον, η προσομοίωση του συμπλόκου c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/10058–F4 εντόπισε τις αλληλεπιδράσεις του μορίου με τα αμινοξέα τυροσίνη 402, λευκίνη 404 και γλουταμίνη 407 ως τις πιο συχνές. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων υπολογιστικών μελετών, όπως αυτές παρουσιάστηκαν στην ενότητα 1.7. Συγκεκριμένα, από την μελέτη της c-Myc με τον αναστολέα 10058–F4 μέσω μοριακών προσομοιώσεων μεταδυναμικής προκύπτει ότι το μόριο 10058-F4 έρχεται σε επαφή κατά κύριο λόγο με τα αμινοξέα τυροσίνη 402 και λυσίνη 412 [2]. Επιπρόσθετα, από μελέτη στην οποία συνδυάστηκαν θερμοδυναμικά αποτελέσματα με ατομικές προσομοιώσεις μεταδυναμικής επαγωγής σε συνδυασμό με δεδομένα NMR για το σύμπλοκο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/10058-F4 προβλέφθηκε ότι τα αμινοξέα που φέρουν μεγαλύτερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με το μόριο είναι η τυροσίνη 402, η λευκίνη 404 και η γλουταμίνη 407 [16].

Επιπλέον, η μέθοδος Μοριακής Δυναμικής προέβλεψε ικανοποιητικά την αδυναμία πρόσδεσης των αληθώς αρνητικών δειγμάτων στο τμήμα 402–412 της c-Myc. Συγκεκριμένα δεν παρατηρείται πρόσδεση των MYCi361 και MYCi975 μέσω του υπολογισμού του ποσοστού στιγματίωτων με RMSD < 13Å, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς τα μόρια αυτά προσδένονται στην περιοχή 366–375 της c-Myc.

Τέλος, για τα άγνωστα δείγματα, η μέθοδος προέβλεψε την πρόσδεση στο τμήμα 402–412 της c-Myc για τα μόρια KJ-Pyr-9, Mycro1, Mycro2 και MYCMI-7, όπου το ποσοστό στιγματίωτων με RMSD < 13Å υπερέβαινε το 55%. Αντίθετα, τα μόρια sAJM589 και MYCMI-7 δεν έχουν αυτή την ικανότητα, εφόσον το ποσοστό στιγματίωτων με RMSD < 13Å υπολογίστηκε στο 44% και 26% αντίστοιχα.

Για όλα τα μόρια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, έγινε σύγκριση του μέσου όρου του RMSD της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της με τον προσδέτη (Πίνακας 3.7–3.9) με τον μέσο όρο του RMSD στην απομορφία (5.7 ± 0.9 Å). Παρατηρούμε ότι ο μέσος όρος της τιμής του RMSD της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται με την πρόσδεση των μορίων. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η δομή της c-Myc δεν σταθεροποιείται με την πρόσδεση των μικρών μορίων.

Συμπληρωματικά, επιτεύχθηκε ο εντοπισμός των πιο συχνών αλληλεπιδράσεων που προβλέπονται από το Διάγραμμα Αλληλεπιδράσεων μέσω της απεικόνισης των τρισδιάστατων δομών μετά από ομαδοποίηση των στιγμιότυπων για τα περισσότερα προς μελέτη σύμπλοκα. Η μόνη εξαίρεση αποτελεί το μόριο MYCi975, στις κεντρικές δομές του οποίου δεν εντοπίζεται καμία από τις συχνότερες αλληλεπιδράσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον χαμηλό αριθμό στιγμιότυπων στα οποία το μόριο θεωρείται προσδεδεμένο (το ποσοστό στιγμιότυπων με RMSD < 13Å είναι 49%)

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα προκύπτει ότι η μέθοδος Μοριακής Δυναμικής έχει ικανοποιητική δυνατότητα πρόβλεψης της πρόσδεσης μικρών μορίων στην c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, αλλά χρήζει περαιτέρω βελτιστοποίησης.

Κεφάλαιο 5. Μελλοντικά Σχέδια

Για την συνέχεια της έρευνας που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία, προτείνονται οι ακόλουθες μελλοντικές δράσεις. Αρχικά, θα ήταν σημαντική η πραγματοποίηση προσομοιώσεων με πολλαπλά αντίτυπα (replicas) για κάθε σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, είναι εφικτή η πρόβλεψη της πραγματικής συμπεριφοράς του συστήματος με μεγαλύτερη ακρίβεια. Επιπλέον, οι προσομοιώσεις θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν για περισσότερο χρόνο με στόχο την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του συστήματος.

Επιπροσθέτως, για την σωστή αξιολόγηση της μεθόδου είναι θεμιτή η πραγματοποίηση προσομοιώσεων με περισσότερα αληθώς θετικά και αρνητικά δείγματα. Τέλος, προτείνεται να διευρυνθεί η ποικιλία των άγνωστων μορίων που μελετώνται. Για τον λόγο αυτό θα ήταν χρήσιμη η προσομοίωση μορίων από βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων που περιλαμβάνουν χιλιάδες μόρια. Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα μελέτης της συμπεριφοράς του πεπτιδίου με πολλαπλές ενώσεις και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων τους.

Για ένα φαρμακευτικό μόριο, η συγγένεια πρόσδεσης αλλά και ο μέσος χρόνος ζωής του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για την ικανότητα πρόσδεσης του στην πρωτεΐνη-στόχο. Για τον λόγο αυτό, είναι σημαντική η κατανόηση του ρυθμού σχηματισμού του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη όσο και του ρυθμού αποσύνδεσης του προσδέτη από την πρωτεΐνη. Συνεπώς, σημαντική μελλοντική μελέτη θα αποτελούσε η πραγματοποίηση προσομοιώσεων για την μέτρηση της κινητικής της πρόσδεσης και αποσύνδεσης των μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία από την c-Myc₄₀₂₋₄₁₂.

Βιβλιογραφία

1. Carabet, L. A., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2018). Therapeutic inhibition of Myc in cancer. Structural bases and computer-aided drug discovery approaches. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 120.
2. Michel, J., & Cuchillo, R. (2012). The impact of small molecule binding on the energy landscape of the intrinsically disordered protein C-myc. *PloS one*, 7(7), e41070.
3. Duffy, M. J., O'Grady, S., Tang, M., & Crown, J. (2021). MYC as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 94, 102154.
4. Cino, E. A., Wong-Ekkabut, J., Karttunen, M., & Choy, W. Y. (2011). Microsecond molecular dynamics simulations of intrinsically disordered proteins involved in the oxidative stress response. *PloS one*, 6(11), e27371.
5. Beaulieu, M. E., Castillo, F., & Soucek, L. (2020). Structural and biophysical insights into the function of the intrinsically disordered Myc oncoprotein. *Cells*, 9(4), 1038.
6. Prochownik, E. V. (2004). c-Myc as a therapeutic target in cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 4(2), 289-302.
7. Hammoudeh, D. I., Follis, A. V., Prochownik, E. V., & Metallo, S. J. (2009). Multiple independent binding sites for small-molecule inhibitors on the oncoprotein c-Myc. *Journal of the American Chemical Society*, 131(21), 7390-7401.
8. Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., Fairlie, D. P., & Mason, J. M. (2021). Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Molecular Cancer*, 20(1), 1-18.
9. Kiessling, A., Wiesinger, R., Sperl, B., & Berg, T. (2007). Selective Inhibition of c-Myc/Max Dimerization by a Pyrazolo [1, 5-a] pyrimidine. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2(5), 627-630.
10. Hart, J. R., Garner, A. L., Yu, J., Ito, Y., Sun, M., Ueno, L., ... & Janda, K. D. (2014). Inhibitor of MYC identified in a Kröhnke pyridine library. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12556-12561.
11. Castell, A., Yan, Q., Fawkner, K., Hydbring, P., Zhang, F., Verschut, V., ... & Larsson, L. G. (2018). A selective high affinity MYC-binding compound inhibits MYC: MAX interaction and MYC-dependent tumor cell proliferation. *Scientific reports*, 8(1), 1-17.
12. Castell, A., Yan, Q., Fawkner, K., Bazzar, W., Zhang, F., Wickström, M., ... & Larsson, L. G. (2022). MYCMI-7: A Small MYC-Binding Compound that Inhibits MYC: MAX Interaction and Tumor Growth in a MYC-Dependent Manner. *Cancer Research Communications*, 2(3), 182-201.
13. Choi, S. H., Mahankali, M., Lee, S. J., Hull, M., Petrassi, H. M., Chatterjee, A. K., ... & Shen, W. (2017). Targeted disruption of Myc–Max oncoprotein complex by a small molecule. *ACS Chemical Biology*, 12(11), 2715-2719.
14. Truica, M. I., Burns, M. C., Han, H., & Abdulkadir, S. A. (2021). Turning up the heat on MYC: progress in small-molecule inhibitors. *Cancer research*, 81(2), 248-253.
15. Han, H., Jain, A. D., Truica, M. I., Izquierdo-Ferrer, J., Anker, J. F., Lysy, B., ... & Abdulkadir, S. A. (2019). Small-molecule MYC inhibitors suppress tumor growth and enhance immunotherapy. *Cancer cell*, 36(5), 483-497.

16. Heller, G. T., Aprile, F. A., Bonomi, M., Camilloni, C., De Simone, A., & Vendruscolo, M. (2017). Sequence specificity in the entropy-driven binding of a small molecule and a disordered peptide. *Journal of molecular biology*, 429(18), 2772-2779.
17. Ren, J., Huangfu, Y., Ge, J., Wu, B., Li, W., Wang, X., & Zhao, L. (2020). Computational study on natural compounds inhibitor of c-Myc. *Medicine*, 99(50).
18. Shaikh, S. A., Jain, T., Sandhu, G., Latha, N., & Jayaram, B. (2007). From drug target to leads--sketching a physicochemical pathway for lead molecule design in silico. *Current pharmaceutical design*, 13(34), 3454-3470.
19. Huang, H. J., Yu, H. W., Chen, C. Y., Hsu, C. H., Chen, H. Y., Lee, K. J., ... & Chen, C. Y. C. (2010). Current developments of computer-aided drug design. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 41(6), 623-635.
20. Batool, M., Ahmad, B., & Choi, S. (2019). A structure-based drug discovery paradigm. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2783.
21. Shaikh, S. A., Jain, T., Sandhu, G., Latha, N., & Jayaram, B. (2007). From drug target to leads-sketching a physicochemical pathway for lead molecule design in silico. *Current pharmaceutical design*, 13(34), 3454-3470.
22. Sastry, G.M., et al., *Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments*. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2013. 27(3): p. 221-234.
23. Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
24. Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 443, 365-382.
25. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening," *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 1750-1759
26. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T., "Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes," *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 6177-6196
27. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S., "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy," *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 1739-1749
28. Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of computer-aided molecular design*, 11(5), 425-445.
29. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035-4061.
30. P. Atkins και J. De Paula, *Φυσικοχημεία, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2015.
31. Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. (2019). Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. *Living journal of computational molecular science*, 1(1), 5957.

32. Allen, M. P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, 23(1), 1-28.
33. Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. (2019). Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. *LiveCoMS*, 1(1), 5957.
34. Schrödinger Release 2022-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
35. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
36. E. Lindahl, M. J. Abraham, B. Hess και van der Spoel, «GROMACS 2020.6 Manual (2020.6),» 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4576060>. [Πρόσβαση 22 9 2021].
37. X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren & A. E. Mark, (1999), Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, 1-2, pp. 236-240.
38. Lipinski, P.J., et. al., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 23, 3–25
39. Schrödinger Release 2021-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
40. Schrödinger Release 2022-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
41. Sastry, G.M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W., "Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 2013, 27(3), 221-234
42. Schrödinger Release 2022-3: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2021. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2021.
43. Kevin J. Bowers, Edmond Chow, Huafeng Xu, Ron O. Dror, Michael P. Eastwood, Brent A. Gregersen, John L. Klepeis, Istvan Kolossvary, Mark A. Moraes, Federico D. Sacerdoti, John K. Salmon, Yibing Shan, and David E. Shaw, "Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters," *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, 2006, November 11-17
44. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/33/22/3658/4056067>
45. Lomize AL, Pogozheva ID. Physics-based method for modeling passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules. *J Chem Inf Model*. 51:3198-3213. PubMed
46. Lomize AL, Hage JM, Schnitzer K, Golobokov K, LaFaive MB, Forsyth AC, Pogozheva ID. PerMM: A web tool and database for analysis of passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules. *J Chem Inf Model*. 59:3094-3099. PubMed
47. Lomize, A. L., & Pogozheva, I. D. (2019). Physics-based method for modeling passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules. *Journal of chemical information and modeling*, 59(7), 3198-3213. - Supporting Information.
48. Stellas et al, *J Clin Invest*, 2015; D. Stellas, Z. Cournia, C. Tamvakopoulos, A. Klinakis & A. Efstratiadis. US Patent 10,287,294. Application number EP 15 175 918.0.