



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μελέτη αλληλεπιδράσεων ακόρεστων λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη ορού και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με έμφαση στη χρήση μεθοδολογιών NMR κυτταρικού επιπέδου (in-cell NMR)

Ελένη Αλεξανδρή

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2022

Ιωάννινα

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 973^A/30-3-18

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γεροθανάσης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-3-18

Θέμα: «Μελέτη αλληλεπιδράσεων ακόρεστων λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη ορού και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με έμφαση στη χρήση μεθοδολογιών NMR κυτταρικού επιπέδου (in-cell NMR)»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1041/19-7-21

1. Δούλιας Πασχάλης-Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Σίσκος Μιχάλης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Σταμάτης Χαράλαμπος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Τζάκος Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 24 -8-22

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουτζόγλου

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ιωάννη Π. Γεροθανάση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου κ. Γεροθανάση Ιωάννη για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και τη συνεχή καθοδήγησή του αλλά και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Τον ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις, την ανεκτίμητη γνώση που μου προσέφερε αλλά και τον συνδυασμό της επιστημονικής κατάρτισης και του επιστημονικού ήθους που με δίδαξε. Ιδιαίτερα τον ευχαριστώ για τη στήριξη και την κατανόηση που έδειξε στο σοβαρό τραυματισμό μου κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με αποτέλεσμα να υποβληθώ σε χειρουργική επέμβαση.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, την Καθηγήτρια κα. Μπαϊρακτάρη Ελένη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα, για την καθοδήγησή τους και τις πολύτιμες συμβουλές.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σίσκο Μιχάλη για τις συμβουλές του και την προθυμία του να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε, επιστημονικό ή μη.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Κούκκου Ειρήνη και τον Καθηγητή κ. Τσελέπη Αλέξανδρο καθώς και τις ερευνητικές τους ομάδες για την άψογη συνεργασία και τη ζεστή φιλοξενία στα ερευνητικά τους εργαστήρια, όπου πραγματοποιήθηκαν σημαντικά πειράματα της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Σταμάτη Χαράλαμπο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δούλια Πασχάλη που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθώς επίσης και για τις σημαντικές παρατηρήσεις τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική μου ομάδα, την Δρ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη και τον υποψήφιο διδάκτορα Βενιανάκη Θέμη, για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη, την πλέον αγαπημένη μου φίλη Άντα, για την πολύτιμη συμβολή της στην εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής, την προθυμία της να με βοηθήσει σε κάθε μου απορία και δυσκολία, καθώς και για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσφέρει από την αρχή του τραυματισμού μου μέχρι τώρα.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ Παπαμώκο Γιώργο για τη συνεργασία και την πολύτιμη συνεισφορά του στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Σημαντική ήταν η συμβουλή του προσωπικού του Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την εκπόνηση της διπλωματικής διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαλανδρίνο Γεράσιμο για τη συμβολή και τη βοήθειά του σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε κατά τη λήψη των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ πολύ τις αγαπημένες μου φίλες Χατζημπέη Έλενα, Παπαεμμανουήλ Χριστίνα, Τσανασίδου Χαρούλα και Κυριάκου Δήμητρα που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν.

Τέλος, το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Τερέζα και Κωνσταντίνο και τη μικρή μου αδερφή Αγγελική για την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που στάθηκαν δίπλα μου και με παρότρυναν να ακολουθήσω τα ενδιαφέροντα και τις σπουδές μου.

From the research results of the present PhD thesis, the following papers have been published in the international literature:

1. Serum Albumin as a Primary Non-covalent Binding Protein for Nitro-oleic Acid. L Hernychová¹, E Alexandri¹, AG. Tzakos, M. Zatloukalová, A Primikyri, IP. Gerothanassis, L. Uhrík, M. Šebela, D Kopečný, L Jedinak, J Vacek. *Int. J. Biomol. Micromol.*, **2022**, 203, 116-129 (I.F. 6.953).

¹Contributed equally.

2. NMR and computational studies reveal novel aspects in molecular recognition of unsaturated fatty acids with non-labeled serum albumin. E Alexandri, A Primikyri, G Papamokos, T Venianakis, VK. Gkalpinos, AG. Tzakos, A Karydis-Messinis, D Moschovas, A Avgeropoulos, IP. Gerothanassis, *FEBS Journal*, **2022**, doi:10.1111/febs.16453 (2022) (I.F. 5.622).

The following papers, which are mainly based in the content of the present PhD thesis, are under preparation:

1. NMR and computational studies reveal the molecular basis for recognition of EPA and DHA with non-labeled serum albumin. E Alexandri, A Primikyri, G Papamokos, VK. Gkalpinos, AG. Tzakos, IP. Gerothanassis, *In preparation* (2022).

2. NMR and computational studies reveal the molecular basis of recognition of unsaturated fatty acids with the non-labeled Bcl-2 protein. E Alexandri, A Primikyri, G Papamokos, VK. Gkalpinos, AG. Tzakos, IP. Gerothanassis, *In preparation* (2022).

The following papers have been published during the period of my PhD thesis:

1. Functional stability of goats' milk yoghurt supplemented with Pistacia atlantica resin extracts and Saccharomyces boulardii. E Hadjimbei, G Botsaris, V Goulas, E Alexandri, V Gekas and IP. Gerothanassis. *International Journal of Dairy Technology*, **2019**, 0, 1-10.

2. DFT Calculations of ¹H- and ¹³C-NMR Chemical Shifts of Geometric Isomers of Conjugated Linoleic Acid (18:2 ω -7) and Model Compounds in Solution. T Venianakis, C Oikonomaki, MG. Siskos, PC. Varras, A Primikyri, E Alexandri, IP. Gerothanassis. *Molecules*, **2020**, 25, 3660.

3. Molecular models of three ω -3 fatty acids based on NMR and DFT calculations of ¹H NMR chemical shifts. T Venianakis, A Primikyri, E Alexandri, G Papamokos, IP. Gerothanassis, *J. Mol. Liq.*, **2021**, 342, 117460.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA	arachidonic acid, αραχιδονικό οξύ
ABT-199	Venetoclax
ABT-263	Navitoclax
ALA	α -linolenic acid, α -λινολενικό οξύ
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 gene, πρωτο-ογκογονίδιο λεμφώματος B
BSA	bovine serum albumin, αλβουμίνη βόειου ορού
CA	caproic acid, καπρολεϊκό οξύ
CLA	conjugated linoleic acid, συζευγμένο λινελαϊκό οξύ
DAG	diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη
DHA	docosahexaenoic acid, εικοσιδιεξαενικό οξύ
DPA	docosapentaenoic acid, εικοσιδιπενταενικό οξύ
EET	epoxyeicosatrienoic acid, εποξυεικοσατριενικό οξύ
EPA	eicosapentaenoic acid, εικοσαπενταενικό οξύ
FA	fatty acid, λιπαρό οξύ
FFA	free fatty acid, ελεύθερο λιπαρό οξύ
HEPE	hydroxy eicosapentaenoic acid, υδροξυ-εικοσαπενταενικό οξύ
HETE	hydroxy eicosatetraenoic acid, υδροξυ-εικοσατετραενικό οξύ
HODE	hydroxyoctadecadienoic acid, υδροξυ-οκταδεκαδιενικό οξύ
HSA	human serum albumin, αλβουμίνη ανθρώπινου ορού
IB	ibuprofen, ιβουπροφαίνη
in-cell NMR	NMR κυτταρικού επιπέδου
INPHARMA NMR	Interligand NOEs for PHARmacophore Mapping, NMR διαμοριακών σημάτων NOE για φαρμακοφόρο χαρτογράφηση
KODE	oxooctadecadienoic acid, οξοοκταδεκαδιενικό οξύ

LA	linoleic acid, λινελαϊκό οξύ
LT	leukotrienes, λευκοτριένια
MAG	monoacylglycerol, μονοακυλογλυκερόλη
MUFA	monounsaturated fatty acid, μονοακόρεστο λιπαρό οξύ
NO ₂ -FA	nitro-fatty acids, νιτρο-λιπαρά οξέα
NO ₂ -OA	nitro-oleic acid, νιτρο-ελαϊκό οξύ
9-NO ₂ -OA	9-nitro-oleic acid, 9-νιτρο-ελαϊκό οξύ
10-NO ₂ -OA	10-nitro-oleic acid, 10-νιτρο-ελαϊκό οξύ
OA	oleic acid, ελαϊκό οξύ
PFL	propofol, προποφόλη
PG	prostaglandins, προσταγλανδίνες
PTM	post-translational modification, μετα-μεταφραστική τροποποίηση
PUFA	polyunsaturated fatty acid, πολυακόρεστο λιπαρό οξύ
RNS	reactive nitrogen species, δραστικά είδη αζώτου
SFA	saturated fatty acids, κορεσμένο λιπαρό οξύ
STD-NMR	saturation transfer difference NMR, NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού
TAG	triacylglycerol, τριακυλογλυκερόλη
Tr-NOESY NMR	transferred nuclear Overhauser effect, NMR μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser
TX	thromboxanes, θρομβοξάνια
W	warfarin, βαρφαρίνη

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Λιπίδια.....	1
1.2 Νιτρωμένα Λιπίδια.....	13
1.3 Αλληλεπίδραση Λιπιδίων με Πρωτεΐνες.....	20
1.3.1 Αλληλεπίδραση Λιπαρών Οξέων με την Αλβουμίνη.....	20
1.3.2 Αλληλεπίδραση Φαρμάκων με την Αλβουμίνη	26
1.4 Αντικαρκινική Δράση Λιπαρών Οξέων	29
1.4.1 Κυτταρική Απόπτωση	31
1.4.2 Οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2.....	33
1.4.3 Θεραπευτική αναστολή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2.....	39
1.5 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	45
2.1 Τεχνικές NMR για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης λιπαρών οξέων με πρωτεΐνες	45
2.1.1 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR)	47
2.1.2 Φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect).....	50
2.1.3 Χρήση του μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transferred nuclear Overhauser effect, tr-NOE) για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό της πρόσδεσης υποκαταστάτη (tr-Noesy)	53
2.1.4 Χαρτογράφηση του προσανατολισμού των υποκαταστατών στη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα μέσω δύο ανταγωνιστικά προσδεδεμένων υποκαταστατών με τη χρήση της τεχνικής INPHARMA NMR (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping).....	55
2.2 Φασματοσκοπία in-cell NMR	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	65
3.1 Αντιδραστήρια.....	65
3.2 Οργανολογία.....	65
3.3 Λήψη φασμάτων STD NMR	66
3.4 Λήψη φασμάτων tr-NOESY NMR	68
3.5 Λήψη φασμάτων INPHARMA NMR	69
3.6 Υπολογιστικές Μέθοδοι	70
3.7 Βιολογικά πειράματα.....	71
3.7.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.....	71
3.7.2 Κυτταρικές καλλιέργειες Jurkat	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73

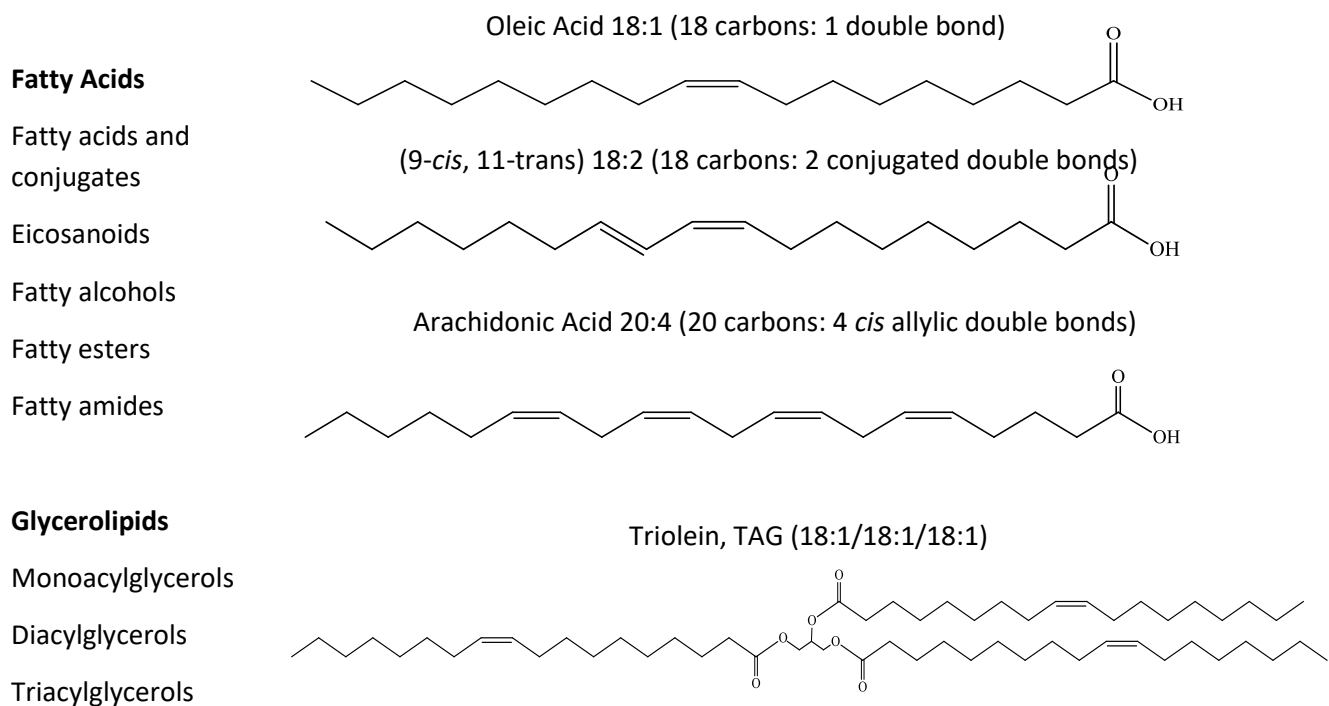
4.1 Ταυτοποίηση του επίτοπου πρόσδεσης ελεύθερων λιπαρών οξέων και χαρτογράφηση των θέσεων πρόσδεσής τους στην αλβουμίνη ορού (BSA / HSA) με τη χρήση της τεχνικής STD-NMR.....	73
4.2 Μελέτη διαμορφωτικών αλλαγών λιπαρών οξέων κατά την αλληλεπίδρασή τους με την αλβουμίνη ορού (BSA / HSA) με τη χρήση μεταφερόμενου φαινομένου NOE (tr-NOESY NMR).....	88
4.3 Χαρτογράφηση του προσανατολισμού των λιπαρών οξέων στη θέση πρόσδεσης στην αλβουμίνη ορού (BSA/HSA) με τη χρήση της τεχνικής INPHARMA NMR.....	97
4.4 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων στην HSA με υπολογισμούς docking.....	112
4.5 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO ₂ -OA) με την αλβουμίνη ορού (HSA) με τη χρήση τεχνικών NMR (¹ H NMR, STD-NMR, tr-NOESY NMR, INPHARMA NMR).....	126
4.6 Μελέτη της αλληλεπίδρασης ελεύθερων λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με τη χρήση των τεχνικών STD-NMR και tr-NOESY NMR	134
4.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος DHA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο (in-cell NMR).....	152
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	157
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	160
SUMMARY	162
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	164

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι μία ευρεία κατηγορία βιομορίων με πολυάριθμες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες και ποικίλους και σημαντικούς ρόλους στη διατροφή και την υγεία [Gustone, 1996; Vance et al, 2008; Watkins et al, 2002]. Έχουν πληθώρα λειτουργικών ρόλων ως κύρια συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, ως μόρια σηματοδότησης και ως πηγή ενέργειας για διάφορες μεταβολικές διεργασίες.

Τα λιπίδια λόγω της υδρόφοβης χημικής δομής δεν είναι συμβατά με υδατικά μέσα και επομένως η μεταφορά τους στη συστηματική κυκλοφορία και η κατανομή τους στους ιστούς επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού μακρομοριακών συμπλόκων με λιποπρωτεΐνες. Τα λιπαρά οξέα (fatty acids, FAs) είναι οι κύριες δομικές μονάδες των σύνθετων λιπιδίων όπως τα γλυκερολιπίδια, δηλαδή οι μονοακυλογλυκερόλες (monoacylglycerols, MAGs), οι διακυλογλυκερόλες (diacylglycerols DAGs), και οι τριακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια (triacylglycerols, TAGs) (Εικόνα 1.1). Αυτά τα ουδέτερα λιπίδια αποτελούνται από ένα γλυκερινικό σκελετό στον οποίο συνδέονται λιπαρά οξέα με εστερικό δεσμό και, σε σπάνιες περιπτώσεις, με αιθερικό.



Glycerophospholipids

Glycerophosphocholines

Glycerophosphoethanolamines

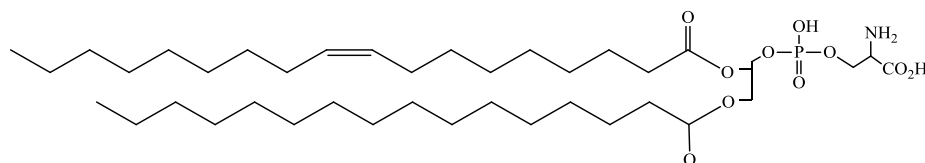
Phosphatidylserine, PS (16:0/18:1)

Glycerophosphoserines

Glycerophosphoglycerols

Glycerophosphoinositols

Glycerophosphates



Shingolipids

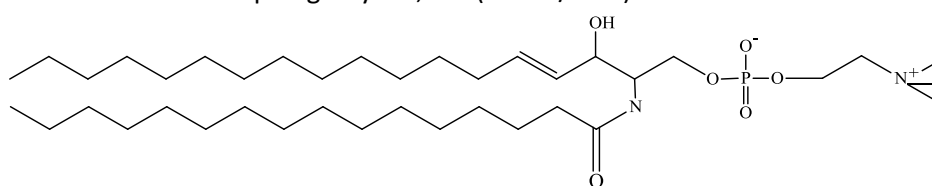
Sphingoid bases

Sphingomyelin, SM (18:1 d/16:0)

Ceramides

Phosphosphingolipids

Glycosphingolipids

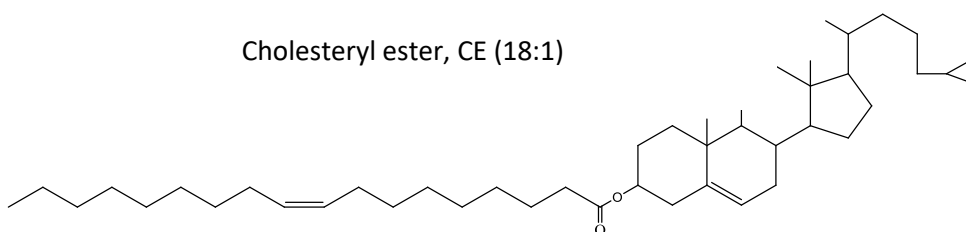


Sterols

Cholesterol
and derivatives

Cholesteryl ester, CE (18:1)

Cholesteryl
esters



Εικόνα 1.1. Αντιπροσωπευτικές δομές διαφόρων ομάδων λιπιδίων [Mitchell et al, 2012].

Τα λιπαρά οξέα είναι τα απλούστερα λιπίδια και ορίζονται χημικά ως μια γραμμική, μη διακλαδισμένη, μη πολική αλυσίδα υδρογονανθράκων που μπορεί να είναι κορεσμένη ή ακόρεστη, με μία μόνο καρβοξυλική ομάδα στο ένα άκρο. Σύμφωνα με αυτό τον ορισμό, ο όρος «γραμμικό» υποδηλώνει ότι τα λιπαρά οξέα είναι μια αλυσίδα με καθορισμένη αρχή και τέλος, δηλαδή δεν περιλαμβάνει δακτυλίους. Μη διακλαδισμένο σημαίνει ότι υπάρχουν μόνο δύο άκρα στο μόριο. Ο όρος «μη πολικά» υποδηλώνει ότι δεν διαλύονται στο νερό, σε αντίθεση με τα πολικά μόρια. Ο όρος «μια αλυσίδα υδρογονανθράκων» υποδηλώνει ότι περιλαμβάνονται μόνο άτομα υδρογόνου και άνθρακα, με τυπικό μήκος 16-22 ανθράκων, αλλά μπορεί επίσης να υπάρχουν μικρότερα και μεγαλύτερα μόρια. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFAs) δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς, ενώ τα ακόρεστα περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα διπλό δεσμό. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν ως

μονοακόρεστα (monounsaturated fatty acids, MUFAs) εάν περιλαμβάνουν ένα μόνο διπλό δεσμό ή ως πολυακόρεστα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) εάν περιέχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς [Abraham et al, 2019].

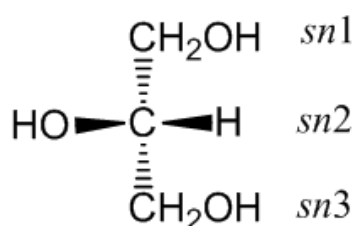
Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχονται στις ελιές, τις πινιάτες, την κάνολα και σε ποικιλία άλλων φυτικών ελαίων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν βρεθεί σε διάφορα έλαια σπόρων και στα θαλασσινά. Ο βαθμός ακορεστότητας των διαφόρων λιπαρών οξέων έχει προκαλέσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς τα διαιτητικά έλαια που περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη συνολική και την LDL χοληστερόλη και, ως εκ τούτου, τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Αντίθετα, τα έλαια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα [Kuller 2006; Layden et al, 2013; Schwager et al, 2015]. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι η υπερβολική κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων προκαλεί ουσιαστικές μεταβολικές αλλαγές που οδηγούν σε τροποποίηση της σύνθεσης της LDL και ενισχύει την ευαισθησία της στο σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η σημαντική κατανάλωση ακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνει την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος στις αορτικές πρωτεογλυκάνες [Ruuth et al, 2021].

Επιπλέον, έχουν αυξηθεί οι ανησυχίες για την υγεία σχετικά με τα *trans* λιπαρά οξέα που μπορεί να υπάρχουν σε επεξεργασμένα έλαια ως αποτέλεσμα του ισομερισμού των *cis* διπλών δεσμών κατά τις διεργασίες εξευγενισμού και απόσπησης [Kummerow, 2009; Nishida et al, 2009]. Ως εκ τούτου, οι διεθνείς οργανισμοί υγείας έχουν συστήσει περιορισμένη πρόσληψη *trans* λιπαρών οξέων [US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture, 2005; Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, 2003]. Οι επίσημες οργανώσεις, επίσης, απαιτούν διατροφική επισήμανση για τα τρόφιμα που περιέχουν λίπη, η οποία περιλαμβάνει συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα σε *trans*, κορεσμένα, μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα [European Communities, 2006].

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα απαντώνται στα φωσφολιπιδία ως εστέρες. Η μεταφορά των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις φωσφολιπιδικές ομάδες καταλύεται από πρωτεΐνες-μεταφορείς των λιπαρών οξέων [Watkins et al, 2002]. Τα ένζυμα αυτά διαμεσολαβούν στην ακυλο-σύνθεση των μεμβρανών και των ειδικών ομάδων φωσφολιπιδίων. Δύο συνήθεις λειτουργίες των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι οι

αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-λιπιδίου για ενζυμική στόχευση και ως αγγελιοφόροι σηματοδότησης [Lemmon, 2008]. Μια πρωτεϊνική περιοχή μπορεί να αναγνωρίσει ένα μεμβρανικό λιπίδιο και να στοχεύσει σε συγκεκριμένη θέση στο κύτταρο για καθορισμένη πρωτεϊνική λειτουργία. Τα λιπίδια μπορούν επίσης να δράσουν ως μόρια σηματοδότησης. Για παράδειγμα, η διακυλογλυκερόλη (DAG) είναι ένας δευτερος λιπιδικός αγγελιοφόρος που μπορεί να ρυθμίσει τη λειτουργία της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) [Newton, 2004] ενώ το λυσοφωσφατιδικό οξύ (PLA) συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τη μετανάστευση και την επιβίωσή τους [Moolenaar et al, 2004].

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι το ακόρεστο λιπιδικό περιεχόμενο των μεμβρανών μπορεί να τροποποιήσει τη δομή και τη λειτουργικότητα των μεμβρανικών ενζύμων [Watkins et al, 2002]. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στις μεμβράνες περιορίζονται, με λίγες εξαιρέσεις, στη θέση *sn*-2 των φωσφολιπιδίων (Εικόνα 1.2). Η παρουσία ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων στο ίδιο μόριο φωσφολιπιδίου μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία της μεμβράνης. Πρώτον, οι δύο τύποι ακυλο-αλυσίδων δεν μπορούν να αναμιχθούν στη μεμβράνη. Δεύτερον, ο υψηλός βαθμός *cis* ακορεστότητας συνεπάγεται λιγότερη ικανότητα περιστροφής γύρω από τους αλληλικούς διπλούς δεσμούς και, κατά συνέπεια, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ακυλο-πλήρωση της μεμβράνης. Τρίτον, η θέση των *cis* διπλών δεσμών μπορεί να έχει ουσιαστικό ρόλο στην τροποποίηση των μεμβρανικών δομών. Αντίθετα, οι δομές των *trans* λιπαρών οξέων είναι σχετικά ανεπηρέαστες από τη θέση του διπλού δεσμού [O'Keefe, 2002].



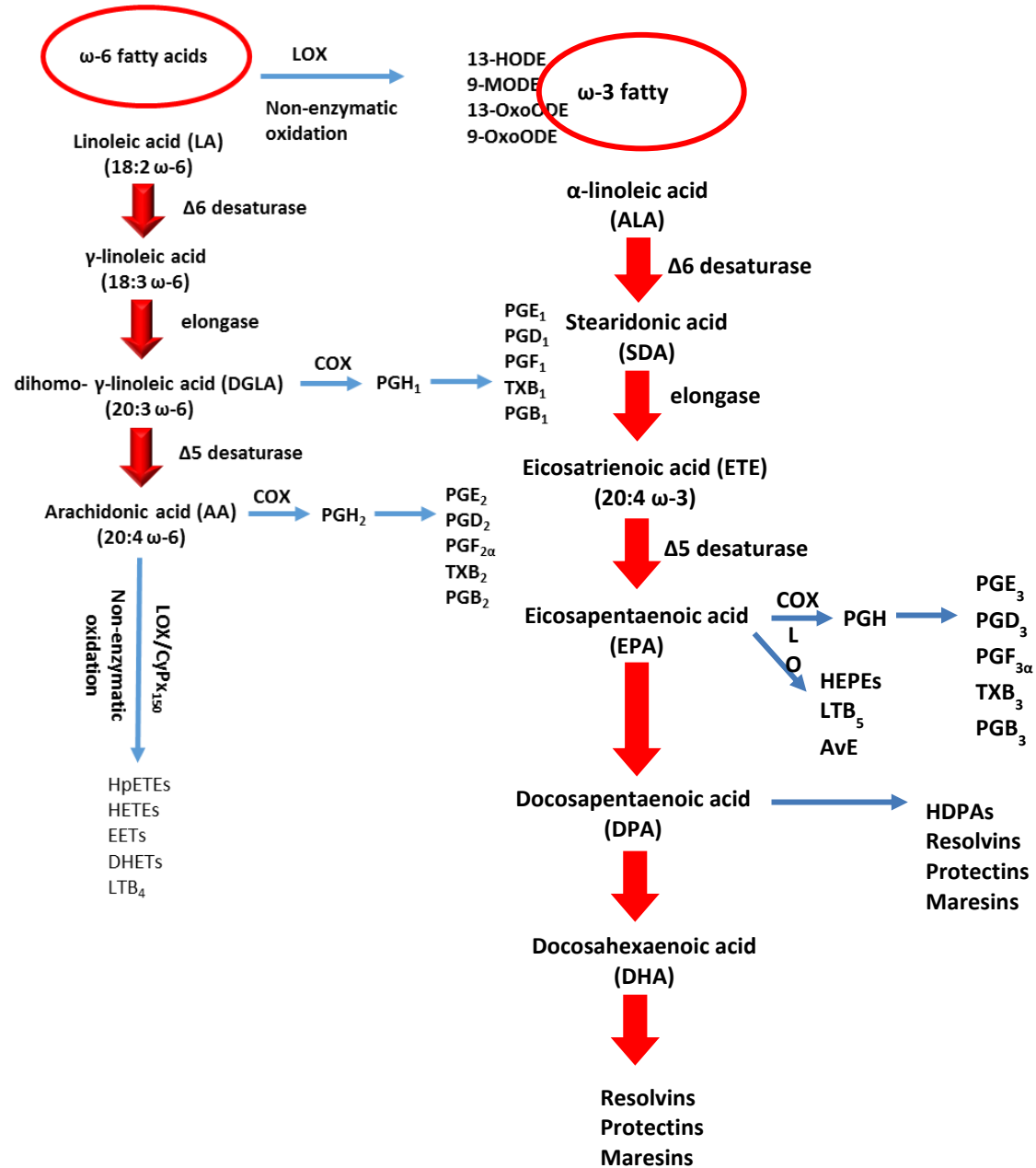
Εικόνα 1.2. Στερεοειδική αρίθμηση *sn* των τριακυλογλυκερολών [O'Keefe, 2002].

Πολλά λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν ενδογενώς στο σώμα. Υπάρχουν όμως και λιπαρά οξέα τα οποία είναι απαραίτητα και ο οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα λαμβάνονται από τη διατροφή. Τα ω-6 και ω-3

λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα και πρόδρομοι βιολογικά δραστικών λιπιδικών ενώσεων, όπως τα εικοσανοειδή και τα εικοσιδινοειδή (Εικόνα 1.3). Τα εικοσανοειδή, που περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες (prostaglandins, PG), τα λευκοτριένια (leukotrienes, LT), το υδροξυ-εικοσατετραενοϊκό οξύ (hydroxy eicosatetraenoic acid, HETE), το υδροξυ-εικοσαπενταενοϊκό οξύ (hydroxy eicosapentaenoic acid, HEPE), το εποξυεικοσατριενοϊκό οξύ (epoxyeicosatrienoic acid, EET) και τα θρομβοξάνια (thromboxanes, TX), είναι βιοδραστικά παράγωγα του αραχιδονικού οξέος (AA,20:4 ω -6) και του εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA,20:5 ω -3) που σχηματίζονται μέσω της κυκλοξυγενάσης (COX), της λιποξυγενάσης (LOX) και του κυτοχρώματος P450 (CYP450) καθώς και μέσω μη ενζυμικών μονοπατιών. Τα παράγωγα του λινελαϊκού οξέος, όπως το υδροξυ-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ (hydroxyoctadecadienoic acid, HODE) και το οξοοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (oxooctadecadienoic acid, KODE), παράγονται επίσης μέσω της 15-LOX ή μέσω μη ενζυμικού μονοπατιού. Άλλα ισχυρά αντιφλεγμονώδη παράγωγα όπως οι ρεσολβίνες, οι προτεκτίνες και οι μαρεσίνες παράγονται εντός του ίδιου μονοπατιού από το EPA, το εικοσιδιπενταενοϊκό οξύ (DPA,22:5 ω -3) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA,22:6 ω -3). Αυτά τα παράγωγα εμφανίζουν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών δράσεων [Masoodi et al, 2014].

Τα ω -3 λιπαρά οξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή, ρυθμίζοντας έτσι τη ρευστότητα της μεμβράνης και τις λιπιδικές σχέδιες. Μια μελέτη που διεξήχθη από τον Gutierrez και τους συνεργάτες έδειξε ότι τα ω -3 λιπαρά οξέα ενσωματώνονται σε ολόκληρο το διφωσfolιπιδικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης των ουδετερόφιλων και παράγουν διαφορετικούς μεσολαβητές όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και μαρεσίνες [Gutierrez et al, 2019]. Για το λόγο αυτό, εάν συμβεί τραυματισμός, τα υποπροϊόντα αυτών των κυτταρικών μεμβρανών μπορεί να παράγουν λιγότερους μεσολαβητές που προκαλούν φλεγμονή σε σύγκριση με τα ω -6 [Saifullah et al, 2007]. Τα ω -3 βελτιώνουν τη λειτουργία των μακροφάγων εκκρίνοντας κυτοκίνες και χημειοκίνες, προάγοντας την ικανότητα φαγοκυττάρωσης και ενεργοποιώντας τα μακροφάγα με πόλωση [Albert et al, 1998]. Επίσης, τα ω -3 λιπαρά οξέα μπορούν να ενισχύσουν τις αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς, όπως είναι γνωστό, ρυθμίζουν αρνητικά τον πυρηνικό παράγοντα-kappa B (NF- κ B). Ο NF- κ B θεωρείται ότι είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη σηματοδότηση των κυττάρων για την έναρξη μιας φλεγμονώδους απόκρισης από το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα. Η μελέτη έδειξε ότι το ιχθυέλαιο ενισχύει την αντιϊκή

απόκριση επάγοντας ιντερφερόνη (IFN) η οποία αναστέλλει την αναπαραγωγή του ιού [Albert et al, 1998]. Τα ω-3 λιπαρά οξέα εξασθενούν την αντιική απόκριση των CD₈ T κυττάρων και, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για τη ρύθμιση των αποκρίσεων κυτοκινών στους ιογενείς εισβολείς [Yang et al, 2020].



Εικόνα 1.3. Σχηματική επισκόπηση των παραγώγων των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων [Masoodi et al, 2014].

Η έλλειψη ω-3 λιπαρών οξέων από τη διατροφή μπορεί να αλλάξει τη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης. Κάθε κύτταρο χρειάζεται μια υγιή, λειτουργική λιπιδική διπλοστιβάδα για τη διευκόλυνση των φυσιολογικών αποκρίσεων και τη διατήρηση της

ρευστότητας. Μία από τις κύριες αιτίες θανάτου σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κορονοϊού-2 (SARS-CoV-2) είναι η πολυοργανική ανεπάρκεια, η οποία είναι αποτέλεσμα υπερδιέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλεί καταιγίδες κυτοκινών. Τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι γνωστό ότι παράγουν λιγότερες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, επομένως η αύξηση της πρόσληψής τους στη διατροφή ή μέσω συμπληρωμάτων διατροφής θα μπορούσε να μειώσει την είσοδο του ιού, να προωθήσει την καλύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού και να μειώσει τη σοβαρότητα της ασθένειας με COVID-19. Καθώς πραγματοποιούνται διαρκώς έρευνες για τη θεραπεία του COVID-19, τα ω-3 λιπαρά οξέα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια σχετικά φθηνή προφυλακτική και θεραπευτική προσέγγιση για όσους βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο νόσησης ή ήδη νοσούν [Hathaway et al, 2020; Akram et al, 2021; Mazidimoradi et al, 2022]. Μάλιστα, ο Doaei και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι συμπληρώματα ω-3 λιπαρών οξέων έχουν σημαντική επίδραση στην οξέωση και τη νεφρική λειτουργία και πιθανόν μπορούν να βελτιώσουν τα κλινικά αποτελέσματα ασθενών που έχουν μολυνθεί με COVID-19 [Doaei et al, 2021].

Είναι σημαντικό ότι το λινελαϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ και το EPA έχουν δείξει πρόσφατα σημαντική αποτελεσματικότητα κατά του COVID-19. Πιο συγκεκριμένα, η Goc και οι συνεργάτες της διερεύνησαν τη δυνατότητα επιλεγμένων FA και λιποδιαλυτών βιταμινών να αναστέλλουν την πρόσδεση του SARS-CoV-2 στον ανθρώπινο υποδοχέα του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), και την κυτταρική του είσοδο. Μεταξύ των 17 λιπιδίων που ερευνήθηκαν, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν την υψηλότερη ανασταλτική δυνατότητα δέσμευσης της ιικής RBD της πρωτεΐνης ακίδας στον υποδοχέα hACE2. Μάλιστα, το λινολενικό οξύ, το EPA και το λινελαϊκό οξύ είχαν την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με την πρωτεΐνη ακίδα. Επιπλέον, ταυτόχρονη έρευνα με σωματίδια ψευδοϊού SARS-CoV-2 αποκάλυψε ότι το λινολενικό οξύ και το EPA θα μπορούσαν επίσης να αναστείλουν την ιϊκή δέσμευση, τη μεμβρανική σύντηξη και την είσοδο, με το λινολενικό οξύ, ωστόσο, να είναι πιο κυτταροτοξικό από το EPA. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το EPA και σε μικρότερο βαθμό το λινολενικό οξύ, αναστέλλουν τη δραστηριότητα της πρωτεάσης TMPRSS2 και της καθεψίνης L, που διευκολύνουν την προσκόλληση και την είσοδο του SARS-CoV-2, αλλά δεν επηρεάζουν την έκφρασή τους σε επίπεδο πρωτεΐνης. Τέλος, κανένα από τα FA δεν επηρέασε τη δραστηριότητα του hACE2. Ωστόσο, αν και η μελέτη αυτή τεκμηριώνει για πρώτη φορά τις ιδιότητες των FA κατά του SARS CoV-2, βρίσκεται επί

του παρόντος υπό περαιτέρω διερεύνηση για την αποκάλυψη των μηχανισμών της ανασταλτικής δράσης των FA έναντι της μολυσματικότητας του COVID-19 [Goc et al, 2021].

Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά κλινικά περιλαμβάνουν το α-λινολενικό οξύ (ALA), το EPA και το DHA. Τα οφέλη τους για την υγεία περιλαμβάνουν και καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών οργάνων και στόχων, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, νόσο Alzheimer, άνοια, κατάθλιψη, οπτική και νευρολογική ανάπτυξη για την υγεία μητέρας - παιδιού [Hathaway et al, 2020]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί [Liu et al, 2015; Hopkins et al, 2016] ότι μερικές δράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων οφείλονται σε δύο συζευγμένους υποδοχείς της πρωτεΐνης G (GPCRs) με την οικογένεια υποδοχέων των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAR), FFA1 (GPR40) και FFA4 (GPR120). Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη ότι η κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων δρα προληπτικά έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου [Hardman, 2002] συμπεριλαμβανομένου και του μαστού [Zheng et al, 2013].

Δεν είναι γνωστό ακριβώς ποια είναι η βέλτιστη αναλογία μεταξύ ω-6/ω-3, αλλά πολλές πηγές υποδηλώνουν ότι οι πρόγονοί μας επιβίωναν με μια διατροφή που περιείχε 1-4:1, σε αντίθεση με τη μέση διατροφή του σημερινού δυτικού πληθυσμού, όπου αυτή η αναλογία είναι περισσότερο από 15:1 [Molendi-Coste et al, 2010; Patterson et al, 2012; Simopoulos, 2002]. Επιπλέον, η αυξημένη πρόσληψη των ω-6 σε βάρος των ω-3 λιπαρών οξέων φαίνεται να προωθεί την παθογένεση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, του καρκίνου, της παχυσαρκίας, των φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νόσων. Αυξημένα επίπεδα των ω-3 σε σχέση με τα ω-6 επιφέρουν τα αντίθετα αποτελέσματα [Simopoulos, 2002; Simopoulos, 2008; Gupta et al, 2013; Blasbalg et al, 2011; Torres-Castillo et al, 2018]. Υψηλότερα επίπεδα ω-6 και χαμηλότερα σε ω-3 (λόγω μακροχρόνιων μεταβολών στη διαιτητική πρόσληψη), έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο διαταραχών της διάθεσης σε νεαρά άτομα με φαινότυπο εξαιρετικά υψηλού κινδύνου [Berger et al, 2017]. Η αναλογία ω-3 προς ω-6 έχει διαταραχθεί από τα τρόφιμα που καταναλώνονται πλέον και συγκεκριμένα από τη μειωμένη κατανάλωση θαλασσινών, την αυξημένη χρήση άλλων ελαίων σε βάρος του ελαιόλαδου αλλά και από την αυξημένη πρόσληψη κορεσμένου λίπους.

Πίνακας 1.1. Μερικά αντιπροσωπευτικά ακόρεστα και πολυακόρεστα ω-6 λιπαρά οξέα [Alexandri et al, 2017].

Λιπαρό οξύ	Συμβολισμός	Δ ⁿ Συμβολισμός	Μοριακός τύπος
Oleic acid	18:1(ω-9)	Δ ⁹	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH
Linoleic acid	18:2 (ω-6)	Δ ^{9,12}	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
Arachidonic acid (AA)	20:4 (ω-6)	Δ ^{5,8,11,14}	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ COOH
γ - Linolenic acid	18:3 (ω-6)	Δ ^{6,9,12}	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂)COOH
Dihomo - γ - linolenic acid	20:3 (ω-6)	Δ ^{8,11,14}	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ COOH
Adrenic acid	22:4 (ω-6)	Δ ^{7,10,13,16}	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₅ COOH

Πίνακας 1.2. Τα ω-3 λιπαρά οξέα που απαντώνται στη φύση [Alexandri et al, 2017].

Λιπαρό οξύ	Συμβολισμός	Χημική ονομασία
n/a	16:3 (ω-3)	all- <i>cis</i> -7,10,13-hexadecatrienoic acid
α-Linolenic acid (ALA)	18:3 (ω-3)	all- <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoic acid
Stearidonic acid (SDA)	18:4 (ω-3)	all- <i>cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenoic acid
Eicosatrienoic acid (ETE)	20:3 (ω-3)	all- <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoic acid
Eicosatetraenoic acid (ETA)	20:4 (ω-3)	all- <i>cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoic acid
Eicosapentaenoic acid (EPA)	20:5 (ω-3)	all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid
Docosapentaenoic acid (DPA)	22:5 (ω-3)	all- <i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid
Docosahexaenoic acid (DHA)	22:6 (ω-3)	all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid
Tetracosapentaenoic acid	24:5 (ω-3)	all- <i>cis</i> -9,12,15,18,21-tetracosapentaenoic acid
Tetracosahexaenoic acid (Nisinic acid)	24:6 (ω-3)	all- <i>cis</i> -6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid

Το καπρολεϊκό οξύ (CA) είναι ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (MUFA) με 10 άτομα άνθρακα και τερματικό διπλό δεσμό αντί τελικής μεθυλομάδας (Εικόνα 1.4). Είναι συστατικό του γάλακτος αλλά περιέχεται επίσης σε αλκοολούχα ποτά, μύδια, τυρί και σαλιγκάρια [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9-Decenoic_acid#section=Top].

Το ελαϊκό οξύ (OA) (18:1 *cis*-9) (Εικόνα 1.4) είναι ένα ω-9 μονοακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και ένα διπλό δεσμό, 9 άνθρακες από το μεθυλικό

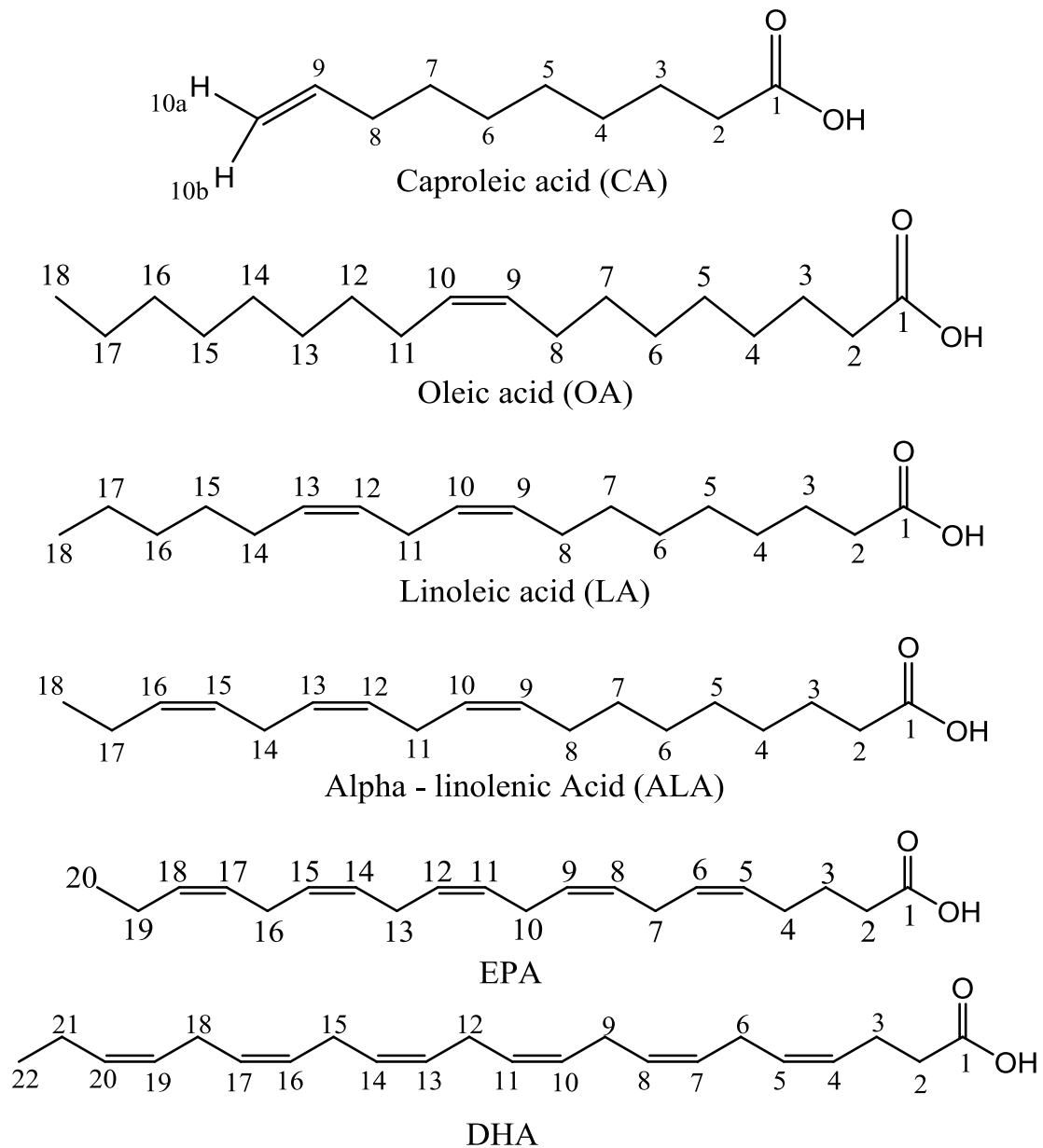
άκρο. Η παρουσία ενός μόνο διπλού δεσμού προσδίδει μεγάλη διάρκεια ζωής, υψηλή σταθερότητα και αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα PUFAs [Asif, 2015]. Το ελαιϊκό οξύ περιέχεται σε ζωικά και φυτικά λίπη και έλαια και αποτελεί το κύριο συστατικό του ελαιόλαδου [Alfred, 2000]. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου [Asif, 2015], μειώνει την αρτηριακή πίεση [Teres et al, 2008] και μπορεί να βελτιώσει την ενδοθηλιακή λειτουργία μειώνοντας τα επίπεδα των ROS [Wang et al, 2006; Willett 2007]. Τέλος, έχει προταθεί ότι συμβάλλει στη χημειοπροστασία του παχέος εντέρου [Asif, 2015] και στη μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων καθώς ενσωματώνεται στη μεμβράνη των φωσφολιπιδίων των μαστικών κυττάρων [Caughey et al, 1996; Caygill et al, 1995; Chin et al, 1992; Deckere, 1999].

Το λινελαϊκό οξύ (LA) (18:2 *cis*-9,12) (Εικόνα 1.4) είναι ένα ω-6 ακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και δύο διπλούς δεσμούς, εκ των οποίων ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται μεταξύ του έκτου και του έβδομου ατόμου άνθρακα από το μεθυλικό του άκρο. Είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ που δεν συντίθεται από το ανθρώπινο σώμα και συμμετέχει στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (μέσω του αραχιδονικού οξέος) και των κυτταρικών μεμβρανών. Διαθέτει αντικαρκινικές και αντιαθηρογενείς ιδιότητες και ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα στη διατροφή μπορεί να προστατεύσει από διάφορες μορφές καρκίνου [Asif, 2015]. Επιπλέον, το λινελαϊκό οξύ έχει δείξει πρόσφατα σημαντική αποτελεσματικότητα κατά του COVID-19, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [Goc et al, 2021]. Απαντάται συνήθως στους ξηρούς καρπούς, τους λιπαρούς σπόρους καθώς και στα παραγόμενα από αυτούς φυτικά έλαια [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic_acid#section=Top].

Το α-λινολενικό οξύ (ALA) (18:3 *cis*-9,12,15) (Εικόνα 1.4) είναι ένα ω-3 ακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα και τρεις *cis* διπλούς δεσμούς. Είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ, που δε συντίθεται από το ανθρώπινο σώμα και λαμβάνεται μέσω της διατροφής [Burdge, 2006]. Το ALA είναι το πρόδρομο μόριο δύο σημαντικών ω-3 λιπαρών οξέων μεγαλύτερης αλυσίδας, του EPA και του DHA, που απαιτούνται για τη λειτουργία των ιστών. Έχει αναφερθεί ότι έχει καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές, αντι-οστεοπορωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις [Kyu-Bong et al, 2014, Li et al, 2020]. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι το α-λινολενικό οξύ προκαλεί απόπτωση, αναστέλλει την εισβολή και τη μετάσταση και σταματά τον κυτταρικό κύκλο στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού

αναστέλλοντας τη συνθάση των λιπαρών οξέων [Huang et al, 2022]. Επιπλέον, έχει δείξει σημαντική αποτελεσματικότητα κατά του COVID-19 [Goc et al, 2021]. Απαντάται στα σπορέλαια, φασόλια, καρύδια, λιναρόσπορους και στα φυλλώδη λαχανικά [Ayerza, 1995; Raper et al, 1992; Rajaram S, 2014].

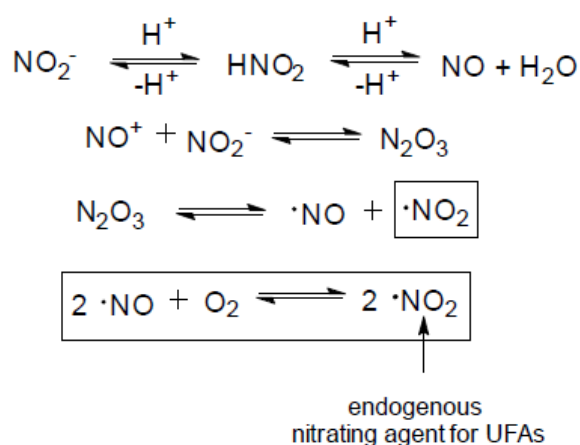
Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας αποτελούνται κυρίως από το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA). Το EPA (20:5n-3) (Εικόνα 1.4) έχει 20 άτομα άνθρακα και 5 διπλούς δεσμούς. Το DHA (22:6n-3) (Εικόνα 2.4) αποτελείται από μια αλυσίδα 22 ανθράκων και 6 διπλών δεσμών, που το καθιστά ως το σημαντικότερο μακράς αλυσίδας ακόρεστο λιπαρό οξύ που απαντάται στα βιολογικά συστήματα. Στο ανθρώπινο σώμα, το EPA προέρχεται από τη β-οξείδωση του DHA, το οποίο λαμβάνεται από τη διατροφή. Τα λιπαρά ψάρια κρύου νερού (σολομός, μπαρμπούνι, σκουμπρί) και τα ιχθυέλαια είναι η κύρια διατροφική πηγή EPA και DHA [Gil et al, 2015]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το EPA και το DHA είναι σημαντικά για τη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργίας των νευρώνων, του αμφιβληστροειδούς και του ανοσοποιητικού [Ramakrishnan et al, 2010; Helland et al, 2008]. Το EPA και το DHA μπορεί να επηρεάσουν πολλές πτυχές της καρδιαγγειακής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της περιφερικής αρτηριακής νόσου, των μεγάλων στεφανιαίων συμβάντων και της αντιπηκτικής αγωγής [Khan et al, 2021; Mason et al, 2020; Lev et al, 2010]. Επιπλέον, έχουν συσχετιστεί με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ορισμένους τύπου καρκίνου [Wei et al, 2022; Serini et al, 2011] καθώς και στην πρόληψη, τη διαχείριση βάρους και τη γνωστική λειτουργία σε άτομα με πολύ ήπια νόσο Αλτσχάιμερ [Shinto et al, 2014; Quinn et al, 2010]. Ακόμα και στα πλαίσια της πρόσφατης πανδημίας COVID-19, το EPA και το DHA προτείνονται σε θεραπευτικές στρατηγικές για την πρόληψη της αποκαλούμενης «καταιγίδας κυτοκινών» και έχουν σημαντικό ρόλο ως πιθανή συμπληρωματική θεραπεία σε καρδιαγγειακές επιπλοκές που σχετίζονται με τον COVID-19 [Mazidimoradi et al, 2022; Doaei et al, 2021; Darwesh et al, 2021].



Εικόνα 1.4. Χημικές δομές λιπαρών οξέων: καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαιϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA), EPA και DHA.

1.2 Νιτρωμένα Λιπίδια

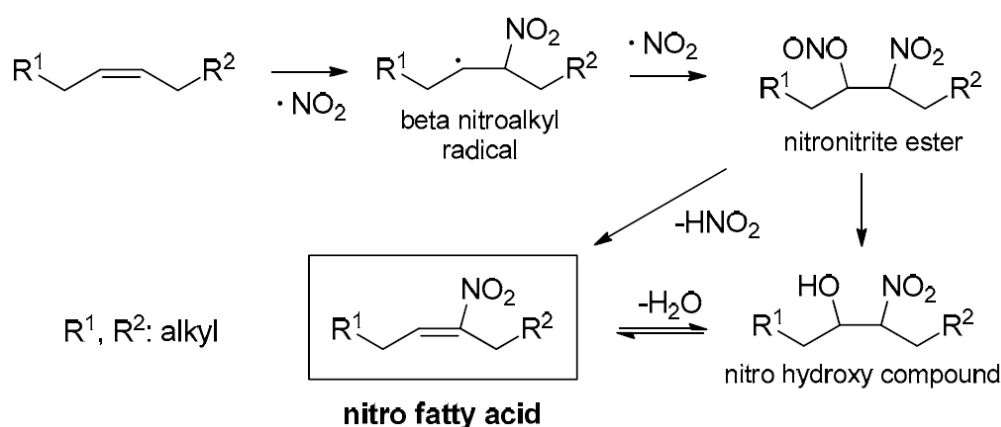
Κατά την τελευταία δεκαετία, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στα νιτρωμένα λιπίδια, ως νέων ενδογενών μορίων σηματοδότησης με σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην υγεία και τις ασθένειες. Η έρευνα στοχεύει στην κατανόηση αλληλεπίδρασης δραστικών ειδών αζώτου (RNS) με τα λιπίδια *in vivo* καθώς και στους βιολογικούς τους ρόλους. Μεταξύ των νιτρωμένων και νιτρο-οξειδωμένων λιπιδίων που έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής, τα νιτρο-λιπαρά οξέα (NO₂-FA) είναι τα πιο γνωστά προϊόντα των RNS [Melo et al, 2019]. Πιο πρόσφατα, άλλα νιτρωμένα και νιτρο-οξειδωμένα λιπίδια καθώς και νιτρο-παράγωγα φωσφολιπιδίων (PL) [Melo et al, 2016; Melo et al, 2017] και τριγλυκεριδίων (TAG) [Fazzari et al, 2015] έχουν ανιχνευθεί σε βιολογικά δείγματα και συσχετίστηκαν με προστατευτικά και ευεργετικά αποτελέσματα, παρότι ελλιπώς μελετημένα. Επίσης, έχουν βρεθεί εστεροποιημένες μορφές NO₂-FA καθώς μπορούν να προκύψουν είτε με άμεση νίτρωση του εστεροποιημένου λιπαρού ακυλο τμήματος ή με την ενσωμάτωση του NO₂-FA [Fazzari et al, 2015].



Εικόνα 1.5. Ενδογενής σχηματισμός διοξειδίου του αζώτου, του δραστικού παράγοντα νιτροποίησης των UFA [Koutoulougenis et al, 2021].

Τα NO₂-FA είναι μια κατηγορία ενώσεων που σχηματίζονται ενδογενώς από την αντίδραση ακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ κτλ) με δευτερογενή προϊόντα μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) και νιτρώδη ανιόντα (NO₂⁻) (Εικόνα 1.5), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δραστικού τμήματος νιτρο-αλκενίου [Delmastro et al, 2015; Vitturi et al, 2015; Freeman et al, 2008]. Τα νιτρωμένα λιπίδια έχουν ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί σε αρκετούς ιστούς και βιολογικά υγρά, με τη χρήση

φασματομετρίας μαζών [Lima et al, 2002; Baker et al, 2005; Tsikas et al, 2009; Schoeman et al, 2018].

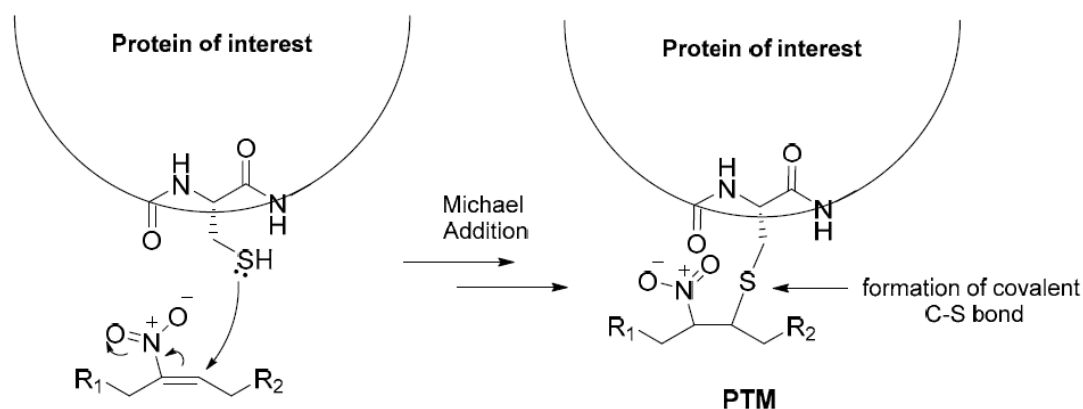


Εικόνα 1.6. Ενδογενής νίτρωση των UFA [Freeman et al, 2008].

Ο ενδογενής σχηματισμός των $\text{NO}_2\text{-FA}$ ξεκινά με το σχηματισμό μιας νιτρο-αλκυλο ρίζας και τη μετατροπή της σε ένα νιτρο-νιτρώδες ή ένα νιτρο-υδρόξυ ενδιάμεσο (Εικόνα 1.6). Ο σχηματισμός των $\text{NO}_2\text{-FA}$ επιτυγχάνεται είτε με την απόσπαση νιτρικού οξέος από τον νιτρο-νιτρικό εστέρα ή με απομάκρυνση ενός μορίου νερού του νιτρο-υδρόξυ-ενδιάμεσου [Freeman et al, 2008]. Τα $\text{NO}_2\text{-FA}$ έχουν τουλάχιστον έναν νιτρωμένο διπλό δεσμό στον οποίο οφείλεται η ηλεκτρόφιλη φύση του μορίου. Για το λόγο αυτό τα $\text{NO}_2\text{-FA}$ μπορούν να αντιδράσουν ταχύτατα με ομάδες θειόλης δημιουργώντας αναστρέψιμα προϊόντα προσθήκης Michael [Baker et al, 2007; Batthyany et al, 2006; Turell et al, 2017]. Μάλιστα, ο Vacek με τους συνεργάτες του [Grippe et al, 2021] μελέτησαν τις βιοφυσικές ιδιότητες και τη συμπεριφορά των νιτρο-λιπαρών οξέων στο νερό, προκειμένου να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα σηματοδοτούν με $\text{NO}_2\text{-FA}$.

Τα $\text{NO}_2\text{-FA}$ έχει αναφερθεί ότι σχηματίζουν ομοιοπολικά προϊόντα προσθήκης με κυστεΐνη της πρωτεΐνης Keap-1 (Kelchlike ECH-associated protein), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Αυτή η ενεργοποίηση του Nrf2 επάγει την έκφραση γονιδίων, υπεύθυνων για την αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική λειτουργία [Tsuji et al, 2011; Kansanen et al, 2009; Cole et al, 2009]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των $\text{NO}_2\text{-FA}$ και των Cys επάγουν αντιφλεγμονώδη κυτταρική σηματοδότηση. Ο σχηματισμός ομοιοπολικών προϊόντων προσθήκης μεταξύ των $\text{NO}_2\text{-FA}$

FA και πρωτεϊνών, μέσω του σχηματισμού ενός νέου δεσμού C-S, προκαλεί αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών και επομένως στη λειτουργία της. Αυτή η δομική αλλαγή πρωτεϊνών ονομάζεται Μετα-Μεταφραστική Τροποποίηση (PTM) (Εικόνα 1.7). Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα NO₂-FA αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα αμινοξέα της καταλυτικής θέσης πολλών πρωτεϊνών, αλλά και πέραν του καταλυτικού θύλακα ή ακόμη και μη ενζυμικές πρωτεΐνες (όπως δομικές πρωτεΐνες ή μεταγραφικούς παράγοντες), είναι υψίστης σημασίας για τη σχέση δομής-δραστικότητας (SAR). Στόχος των μελετών είναι να μεγιστοποιηθούν τα θεραπευτικά οφέλη των NO₂-FA και να ελαχιστοποιηθούν οι επιβλαβείς συνέπειες των ασθενειών [Freeman et al, 2008]. Επιπλέον, τα NO₂-FA αναφέρονται και στην αλκυλίωση σημαντικών Cys των υπομονάδων p65 και p50 του NF-κB, αποτρέποντας έτσι τον ενδογενή σχηματισμό προφλεγμονωδών μεσολαβητών, υπεύθυνων για ασθένειες, όπως η αγγειακή φλεγμονή και οι προϊνώτικες αποκρίσεις [Cui et al, 2006; Villacorta et al, 2013; Ambrozova et al, 2016].



Εικόνα 1.7. Μετα-Μεταφραστική Τροποποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με προσθήκη Michael [Freeman et al, 2008].

Οι κυστεΐνες αρκετών πρωτεϊνών μπορούν να αντιδράσουν με πολυάριθμες ηλεκτρόφιλες ενώσεις, λόγω της υψηλής πυρηνόφιλης δραστηριότητας της ομάδας -SH, προκειμένου να σχηματιστούν ομοιοπολικά προϊόντα προσθήκης Michael. Το περιβάλλον όπου βρίσκεται η Cys έχει κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό της τιμής pK_a της ομάδας -SH, η οποία σε υδατικό διάλυμα είναι 8.33. Η οξύτητα του πρωτονίου -SH αυξάνεται σημαντικά όταν πλησίον της Cys υπάρχουν βασικά αμινοξέα όπως His, Lys και Arg, κέντρα μετάλλων διαφόρων ενζύμων (π.χ. του σιδήρου της αιμοσφαιρίνης) και αρωματικά αμινοξέα, όπως Tyr και Trp (π αλληλεπίδραση με την ομάδα της θειόλης)

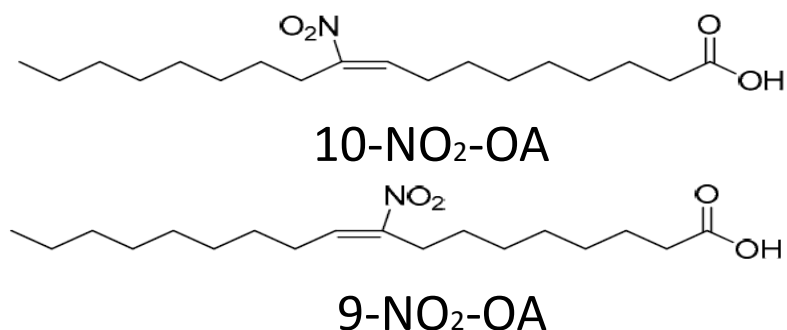
[Rudolph et al, 2009]. Οι παραπάνω παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του εξαιρετικά δραστικού θειολικού ανιόντος (RS^-), το οποίο είναι καλύτερο πυρηνόφιλο σε σύγκριση με την ελεύθερη ομάδα θειόλης της Cys σε οξειδωτικές αντιδράσεις ή αντιδράσεις Michael [Netto et al, 2007; Derakshan et al, 2007].

Ο ομοιοπολικός σχηματισμός προϊόντων προσθήκης μεταξύ Cys και NO_2 -FA παίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια με ευεργετική έκβαση για τον οργανισμό. Τα NO_2 -FA εμφανίζουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση σε ζωικά μοντέλα [Cole et al, 2009; Cui et al, 2006; Villacorta et al, 2013]. Αυτά τα ηλεκτρόφιλα μόρια αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα αμινοξέα Cys πολλών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως Keap-1, Nrf2, NF- κ B, PPAR γ , HSP (Heat Shock Proteins), 5-λιποξυγενάσης (5-LO).

Ένα από τα πιο μελετημένα NO_2 -FA είναι το 10-νιτρο-ελαϊκό οξύ (10- NO_2 -OA, CXA-10), το οποίο βρίσκεται σε κλινική δοκιμή φάσης 2 κατά της Πνευμονικής Αρτηριακής Υπέρτασης (PAH), της Εστιακής Τμηματικής Σπειραματοσκλήρυνσης (FSGS) και το άσθμα, από την Complexa Inc, παρά το γεγονός ότι αρχικά μελετήθηκε κατά της οξείας νεφρικής βλάβης [Complexa, 2021; Chieffo et al, 2016; Clinical Trial of CXA-10 against Asthma, 2021]. Το 10- NO_2 -OA είναι το τοπο-ισομερές στο οποίο η νίτρο ομάδα βρίσκεται στο C10 του OA (Εικόνα 1.8) και παρουσιάζει σημαντική βιολογική δράση. Ο Garner και οι συνεργάτες του [Garner et al, 2019] περιέγραψαν ορισμένες από τις φαρμακοκινητικές (PK) και τις φαρμακοδυναμικές (PD) επιδράσεις του 10- NO_2 -OA που λαμβάνεται από το στόμα σε υγιή και παχύσαρκα άτομα. Επιπλέον, ο Alparslan και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι το 10- NO_2 -OA αυξάνει σημαντικά τις αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις ορισμένων γνωστών παραγόντων που καταστρέφουν το αντινεοπλασματικό DNA, όπως η ολαπαρίμπη, η cis-πλατίνη και η δοξορουβικίνη που δρουν ενάντια στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) [Alparslan et al, 2018].

Το 2018, ο Kühn με τους συνεργάτες του ανέφεραν ότι το 9-νιτρο-ελαϊκό οξύ (9- NO_2 -OA) (Εικόνα 1.8), δρα ως κυτταροτοξικός παράγοντας έναντι των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του παχέος εντέρου, HCT-116 και HT-29. Η κυτταρική βιωσιμότητα αυτών των καρκινικών κυτταρικών σειρών καταστέλλεται σημαντικά από το 9- NO_2 -OA μέσω μιας εξαρτώμενης από κασπάση απόπτωσης. Η δράση κατά των καρκινικών κυτταρικών σειρών βασίζεται στην αντιοξειδωτική δράση των NO_2 -FA και στην ικανότητα του 9- NO_2 -OA να στοχεύει τα μιτοχόνδρια και να ρυθμίζει αρνητικά τη

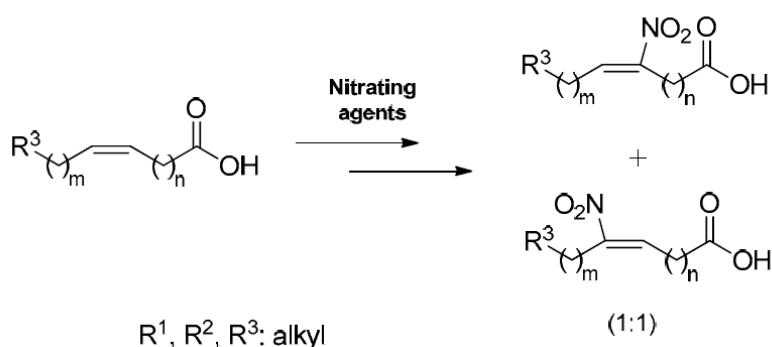
μεμβράνη και την αναπνοή τους, με αποτέλεσμα την τελική απόπτωση των κυττάρων [Kühn et al, 2018].



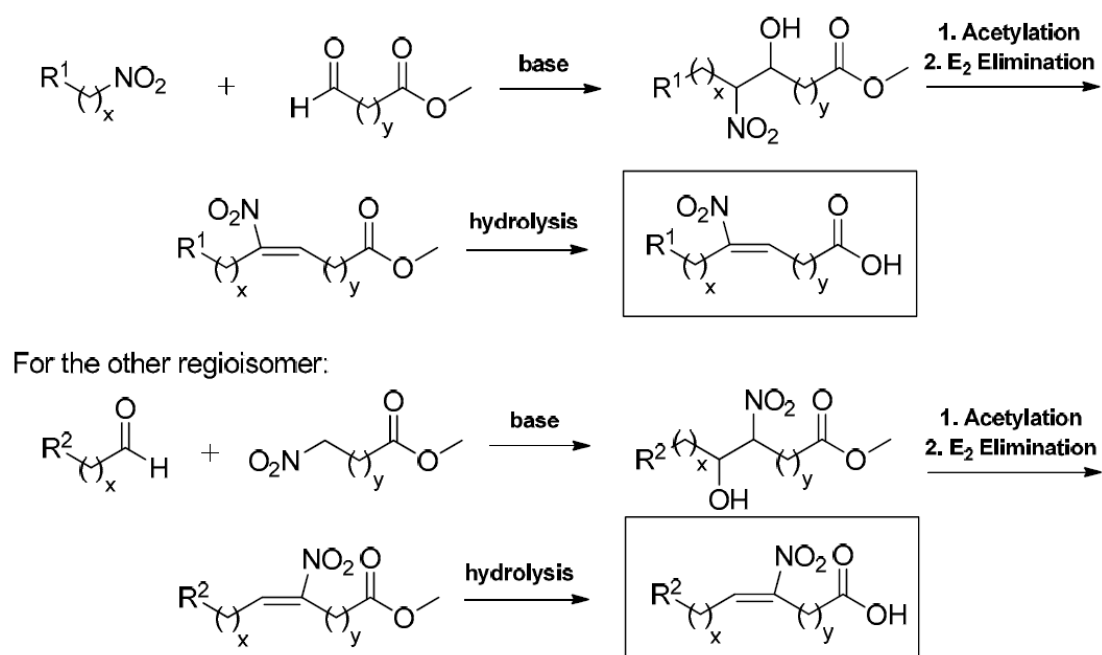
Εικόνα 1.8. Χημικές δομές των 10-NO₂-OA και 9-NO₂-OA.

Η σημασία των NO₂-FA και οι πιθανές εφαρμογές τους για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών ή καρκίνου έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων συνθετικών στρατηγικών. Οι ενώσεις που φέρουν νιτρο-αλκένιο μπορούν να συντεθούν είτε με απευθείας νίτρωση του διπλού δεσμού του αντίστοιχου UFA, που οδηγεί στο σχηματισμό περίπου 1:1 νιτρο τοπο-ισομερών [D’Ischia et al, 1996; Napotalino et al, 2000; Manini et al, 2008; Woodcock et al, 2013; Hassan et al, 2021], ή με σύνθεση βήμα προς βήμα [Gorczynski et al, 2006; Woodcock et al, 2006; Fioravanti et al, 2008; Hock et al, 2016; Hassan et al, 2021; Woodcock et al, 2021; Fang et al, 2021] (Εικόνα 1.9). Η σύνθεση βήμα προς βήμα περιλαμβάνει μια αντίδραση Henry μεταξύ της κατάλληλης αλδεΐδης και του νιτρο συστατικού, ανάλογα με την επιθυμητή θέση νίτρωσης. Το τελικό στάδιο αυτής της συνθετικής πορείας είναι μια απόσπαση E2 προς σχηματισμό του επιθυμητού τμήματος νιτρο-αλκενίου, που ακολουθείται από ένα στάδιο αποπροστασίας εστέρα.

• **Direct Nitration: Non-regioselective synthesis**



• **Step-by-step Nitration: Regioselective synthesis**



Εικόνα 1.9. Διαφορετικοί τρόποι σύνθεσης των NO₂-FA [Koutoulogenis et al, 2021].

Το δυναμικό μη ομοιοπολικής έναντι ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης των NO₂-FA με άλλα κυτταρικά συστατικά είναι σημαντικό για την ερμηνεία της βιολογικής τους δραστηριότητας. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη μεταφορά τους, την περαιτέρω αξιοποίηση, την (ανα)κατανομή, τον βιομετασχηματισμό και την αποικοδόμησή τους. Τα NO₂-FA μπορούν να μετασχηματιστούν σε εστέρες ή να ενσωματωθούν σε λιπιδικά συστατικά κυττάρων και ιστών [Fazzari et al, 2019]. Η σταθερότητα των NO₂-FA κυμαίνεται από λεπτά έως ώρες και η αποικοδόμησή τους λαμβάνει χώρα κυρίως σε υδατικό περιβάλλον [Grippio et al, 2021; Manini et al, 2008] συνοδευόμενη από την απελευθέρωση της ρίζας NO. Παρουσία λιπιδίων και μεμβρανών, η αποικοδόμηση των NO₂-FA συμβαίνει μόνο σε περιορισμένο βαθμό ή καθόλου [Zatloukalova et al, 2021]. Οι μη ομοιοπολικές (αναστρέψιμες)

αλληλεπιδράσεις συμβάλουν στη μεταφορά τους μεταξύ της λιπιδικής φάσεως και του υδατικού περιβάλλοντος [Fazzari et al, 2019; Fazzari et al, 2017].

1.3 Αλληλεπίδραση Λιπιδίων με Πρωτεΐνες

Μεγάλες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) κυκλοφορούν στο πλάσμα των θηλαστικών και έχουν σημαντικό ρόλο σε μια ποικιλία φυσιολογικών δραστηριοτήτων. Λειτουργούν ως υποστρώματα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-λιπιδίου και αποτελούν μόρια σηματοδότησης [Quehenberger et al, 2011; Yli-Jama et al, 2002]. Περίπου 40 διαφορετικά FFA απαντώνται στο αίμα και σε συγκέντρωση από 100 μM έως περίπου 0.1 mM. Το προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων αντικατοπτρίζει τη φυσιολογική κατάσταση και τυχόν αλλαγές του σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών [Huber et al, 2017].

Πολλά ελεύθερα λιπαρά οξέα αλληλεπιδρούν με την αλβουμίνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες 0.1-2 mole λιπαρών οξέων δεσμεύονται στην αλβουμίνη. Η μοριακή αναλογία λιπαρού οξέος / αλβουμίνης αυξάνεται έως και 6 φορές κατά τη διάρκεια νηστείας ή έντονης άσκησης, ή υπό παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης και η καρδιαγγειακή νόσος. Τα λιπαρά οξέα-υποκαταστάτες βρίσκονται σε ταχεία ανταλλαγή μεταξύ του διαλύματος και των θέσεων πρόσδεσης στην πρωτεΐνη.

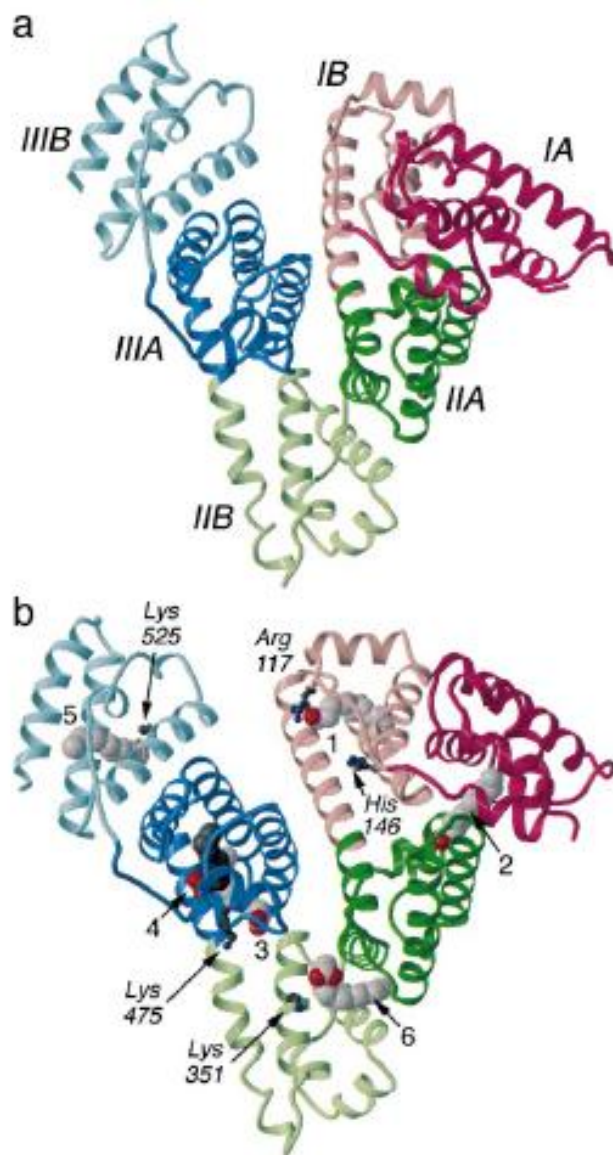
1.3.1 Αλληλεπίδραση Λιπαρών Οξέων με την Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού (HSA) είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 585 αμινοξέων με μοριακό βάρος 66.4 kDa. Αντιπροσωπεύει το 60% των συνολικών πρωτεϊνών του πλάσματος με φυσιολογική συγκέντρωση 35 έως 50 g/L [Yu et al, 2021]. Συνδέεται με διάφορους υποκαταστάτες και έχει ενζυμικές ιδιότητες. Είναι μεταφορέας και αποθήκη για πολλές ενδογενείς ενώσεις, όπως τα λιπαρά οξέα, εξωγενείς ενώσεις και μεγάλου αριθμού φαρμάκων ευρείας κατανάλωσης. Ως εκ τούτου, είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή των φαρμάκων. Από την πρώτη δημοσίευση της τρισδιάστατης δομής της αλβουμίνης το 1992 [He et al, 1992], περισσότερες από 70 δομές έχουν κατατεθεί στην Τράπεζα Πρωτεϊνικών Δεδομένων (PDB). Ο προσδιορισμός των δομών με ακτίνες X έδειξε ότι η αλβουμίνη είναι α-ελικοειδής σε ποσοστό 67%, χωρίς β -πτυχωτά φύλλα, με τρεις ομόλογες περιοχές (επισημασμένες I-III) και 17 δισουλφιδικές γέφυρες που συμβάλλουν στην υψηλή θερμοσταθερότητα της πρωτεΐνης [Xe et al, 1992; Sugio et al, 1999].

Πιο συγκεκριμένα, η αλβουμίνη είναι μια ελικοειδής πρωτεΐνη με στροφές και εκτεταμένες θηλιές και έχει σχήμα "καρδιάς" με διαστάσεις περίπου $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.10a. Αποτελείται από τρεις περιοχές, I (αμινοξέα 1-195), II (196-383) και III (384-585), οι οποίες έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή. Κάθε περιοχή μπορεί να διαιρεθεί σε υποπεριοχές A και B. Παρά το γεγονός ότι και οι τρεις περιοχές του μορίου της αλβουμίνης έχουν παρόμοιες τρισδιάστατες δομές, η συγκρότησή τους είναι εξαιρετικά ασύμμετρη. Οι περιοχές I και II είναι σχεδόν κάθετες μεταξύ τους και σχηματίζουν μια διάταξη σχήματος T, στην οποία η ουρά της υποπεριοχής IIA συνδέεται στη διεπιφάνεια των υποπεριοχών IA και IB με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Αντίθετα, η περιοχή III προεξέχει από την υποπεριοχή IIB με αποτέλεσμα οι περιοχές II και III να σχηματίζουν μια Y-διάταξη. Η περιοχή III αλληλεπιδρά μόνο με την υποπεριοχή IIB. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθορίζουν το σχήμα "καρδιάς" της αλβουμίνης. Οι περιοχές I και III συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός μεγάλου διαύλου που σχηματίζεται από τις υποπεριοχές IB, IIIA και IIIB [Sugio et al, 1999].

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της αλβουμίνης και των λιπαρών οξέων έχει μελετηθεί διεξοδικά. Από την ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X της δομής του συμπλόκου αλβουμίνης-μυριστικού οξέος αποκαλύφθηκε η παρουσία 6 θέσεων πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην πρωτεΐνη [Curry et al, 1998]. Πέντε από τις θέσεις (αριθμοί 1-5 στην Εικόνα 1.10b) χαρακτηρίζονται από ισχυρή ηλεκτρονιακή πυκνότητα του υποκαταστάτη. Η έκτη θέση πρόσδεσης βρίσκεται στη διεπιφάνεια των υποπεριοχών IIΑ και IIΒ. Οι θέσεις δέσμευσης 1, 4 και 5 βρίσκονται εντός των υποπεριοχών IB, IIIA και IIIB αντίστοιχα. Οι θέσεις πρόσδεσης 2 και 3 βρίσκονται σε αμινοξέα διαφορετικών περιοχών [Curry et al, 1999].

Ένας σημαντικός αριθμός πειραμάτων βιοχημικής σήμανσης και NMR [Hamilton et al, 1991; Reed, 1986; Sklar et al, 1977] εμπλέκουν τις περιοχές I και III με τη δέσμευση λιπαρών οξέων. Ειδικότερα μελέτες NMR με τη χρήση λιπαρών οξέων εμπλουτισμένων με ^{13}C έδειξαν ότι η καρβοξυλική ομάδα του λιπαρού οξέος συνδέεται πιο ισχυρά στη θέση πρόσδεσης λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε σχέση με την εύκαμπτη και υδρόφοβη μεθυλενική αλυσίδα

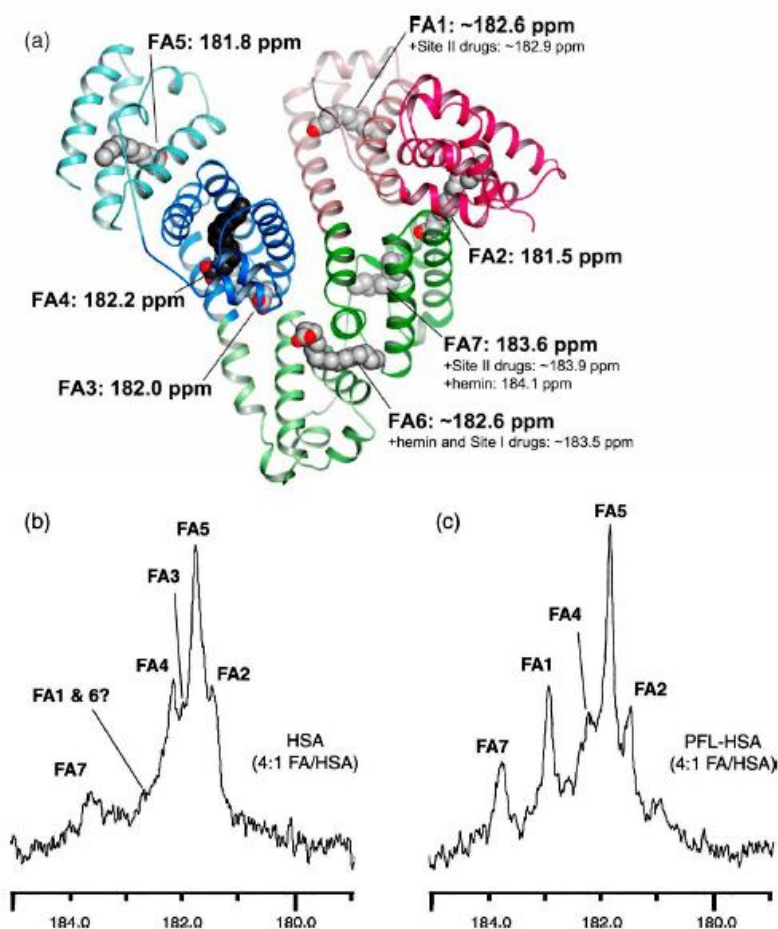


Εικόνα 1.10. Η πρόσδεση του λιπαρού οξέος στην αλβουμίνη (HSA) προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. (a) Κρυσταλλική δομή της μη υποκατεστημένης αλβουμίνης [48] (PDB ID, 1a06). Κάθε υποπεριοχή σημειώνεται με διαφορετικό χρώμα ως εξής: IA φούξια, IB ροζ, IIA πράσινο, IIB ανοιχτό πράσινο, IIIA μπλε, IIIB γαλάζιο. (b) Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου αλβουμίνης-μυριστικού οξέος (PDB ID, 1bj5). Και οι δύο κρυσταλλικές δομές έχουν πλήρως βελτιστοποιηθεί σε διακριτική ανάλυση 2,5 Å. Τα έξι μόρια μυριστικού οξέος αριθμούνται 1-6 και παρουσιάζονται σε αναπαράσταση πλήρωσης χώρου [Curry et al, 1999].

[Cistola et al, 1984; Parks et al, 1983]. Μεταγενέστερες μελέτες NMR που έγιναν με επισημασμένα σε ^{13}C λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα στο λαυρικό οξύ, μυριστικό οξύ, παλμιτικό οξύ, στεατικό οξύ και το ελαϊκό οξύ, έδειξαν την ύπαρξη τουλάχιστον 5 διαφορετικών χημικών μετατοπίσεων του καρβοξυλικού άνθρακα λόγω των 5 διακριτών θέσεων σύνδεσης με την αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) [Cistola et al, 1987; Cistola et

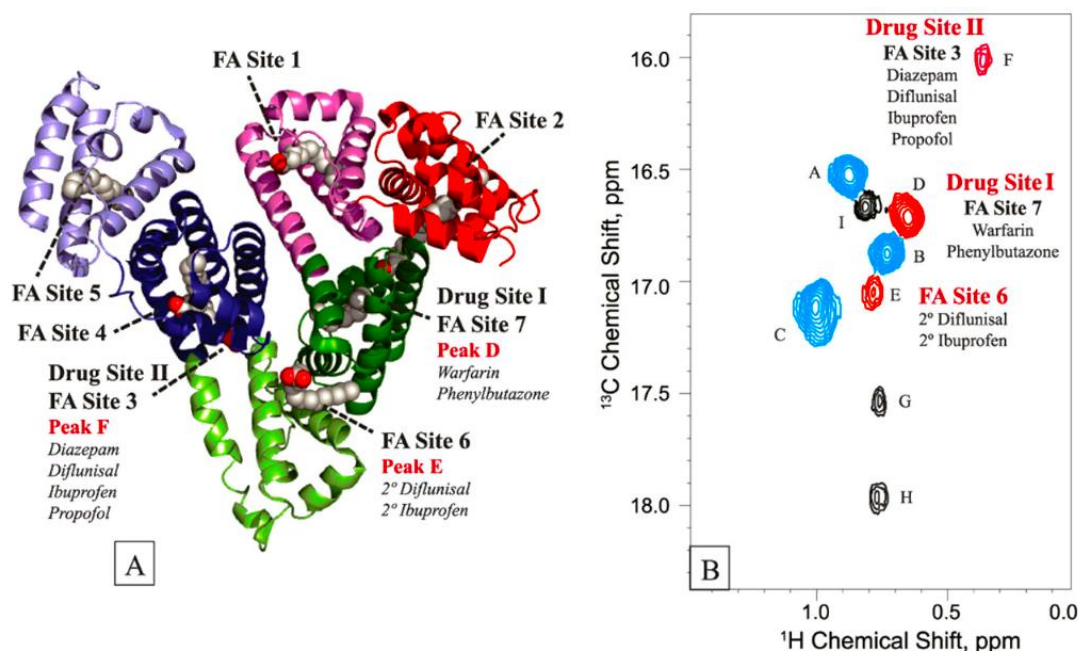
al, 1987; Kenyon et al, 1994]. Οι 4 από τις 5 θέσεις πρόσδεσης εμπλέκονται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην περιοχή pH 4-8 λόγω των ιοντικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του λιπαρού οξέος και των βασικών αμινοξέων πλευρικής αλυσίδας, όπως η αργινίνη ή η λυσίνη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάλυση της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X δεικνύει αλληλεπιδράσεις ιοντικών δεσμών υδρογόνου και για τις 6 θέσεις δέσμευσης. Συγκριτικές μελέτες NMR που έγιναν σε άθικτα και πρωτεολυτικά θραύσματα της BSA έδειξαν την ύπαρξη 3 θέσεων υψηλής συγγένειας του ελαϊκού οξέος [Hamilton et al, 1991], μία στην περιοχή I και δύο στην περιοχή II.

Λεπτομερείς μελέτες NMR συμπλόκου παλμιτικού οξέος, επισημασμένου με ^{13}C στην καρβοξυλική ομάδα, και HSA παρουσία ανταγωνιστών υποκαταστατών και φαρμάκων για ειδικές θέσεις πρόσδεσης, επέτρεψαν τον χαρακτηρισμό θέσεων χαμηλής και υψηλής συγγένειας του λιπαρού οξέος. Επιπλέον, επιτεύχθηκε η συσχέτιση των ειδικών θέσεων πρόσδεσης, όπως προέκυψαν από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, με συγκεκριμένα σήματα NMR ^{13}C . Η Εικόνα 1.11 απεικονίζει μία στρατηγική για την ταυτοποίηση των κορυφών παρουσία φαρμάκου-ανταγωνιστή. Η θέση 1 πρόσδεσης του λιπαρού οξέος εμφανίζεται ως μια καλά διαχωρισμένη κορυφή και η θέση 2 με βελτιωμένη ανάλυση. Το φάρμακο προποφόλη (PFL), που συνδέεται στη θέση II, εκτοπίζει τα μόρια του λιπαρού οξέος από τις θέσεις 3 και 4, και επομένως οι κορυφές στο φάσμα NMR που αντιστοιχούν σε αυτές τις θέσεις εξαφανίζονται. Η απομάκρυνση του λιπαρού οξέος από αυτές τις θέσεις οδηγεί σε ενίσχυση του σήματος στη θέση πρόσδεσης 1 [Simard et al, 2006]. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι θέσεις πρόσδεσης 2, 4 και 5 είναι υψηλής συγγένειας, ενώ οι θέσεις 1, 3, 6 και 7 είναι χαμηλής συγγένειας για το λιπαρό οξύ.



Εικόνα 1.11. Συσχέτιση των δεδομένων NMR ^{13}C με την κρυσταλλική δομή της αλβουμίνης (HSA). (a) Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου HSA-παλμιτικού οξέος. Οι επισημάνσεις υποδεικνύουν τις θέσεις πρόσδεσης του λιπαρού οξέος (FA), τις χημικές τους μετατοπίσεις και τις επιδράσεις των διαφόρων φαρμάκων στις χημικές μετατοπίσεις. (b) Φάσμα NMR ^{13}C του παλμιτικού οξέος σε σύμπλεξη με την HSA (γραμμομοριακή αναλογία FA/HSA 4:1). Παρότι στα 182.6 ppm υπάρχει ένα ευρύ σήμα, οι κορυφές των θέσεων 1 και 6 του FA δεν παρατηρούνται στα φάσματα της HSA στις αναλογίες FA/HSA που μελετήθηκαν. (c) Φάσμα NMR ^{13}C του παλμιτικού οξέος συνδεδεμένου με την HSA παρουσία του ανταγωνιστή PFL σε γραμμομοριακή αναλογία FA/HSA 4:1 [Hamilton, 2013].

Πιο πρόσφατα, από την ανάλυση πειραμάτων ^1H - ^{13}C HSQC, με χρήση ελαϊκού οξέος 18:1 με επισημασμένη τη μεθυλομάδα, προέκυψε ότι υπάρχουν 9 διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης στην HSA (Εικόνα 1.12) [Krenzel et al, 2013]. Στα φάσματα NMR ανιχνεύτηκαν μεμονωμένες θέσεις πρόσδεσης, καθώς είναι διακριτές δομικά και η ταχύτητα ανταλλαγής τους είναι αργή στη χρονική κλίμακα NMR. Από τη λεπτομερή ανάλυση των πειραμάτων παρουσία ανταγωνιστών-φαρμάκων προέκυψαν στοιχεία για την εκλεκτικότητα της δέσμευσης των λιπαρών οξέων στην HSA [Krenzel et al, 2013; Hamilton et al, 2013].

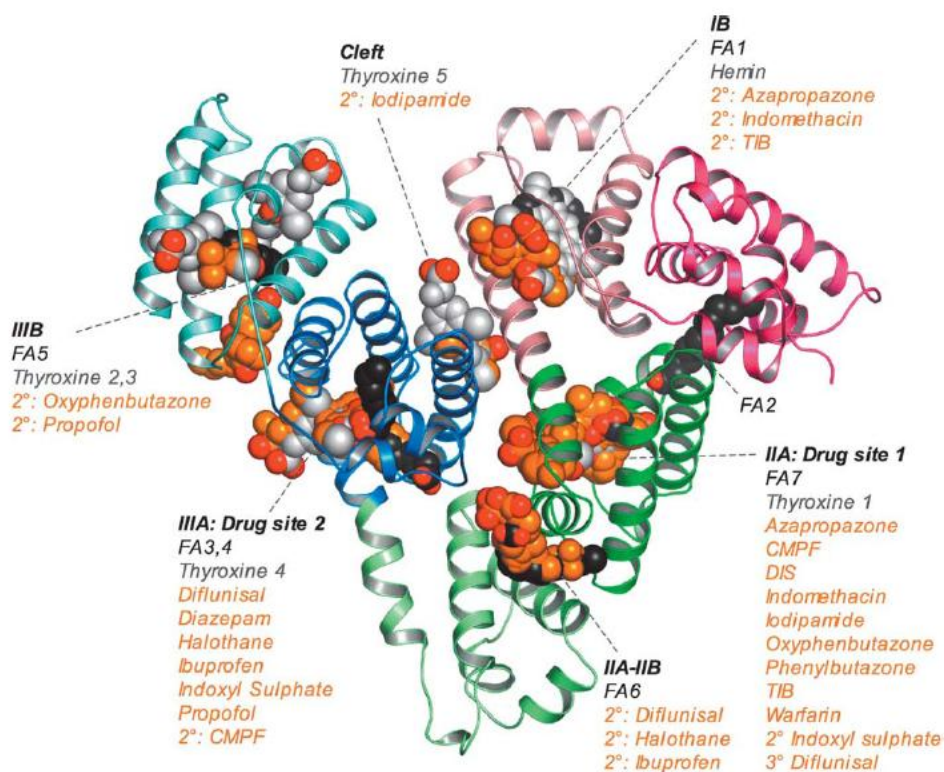


Εικόνα 1.12. Σύνοψη των πειραμάτων του ελαϊκού οξέος με την HSA. (A) Κρυσταλλική δομή της HSA συνδεδεμένης με 7 μόρια λιπαρού οξέος. Επιπλέον, παρατίθενται τα φάρμακα και οι ενδογενείς ενώσεις που συνδέονται στις θέσεις I και II (PDB 1E7G). (B) Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC του συμπλόκου ελαϊκού οξέος-HSA με αναλογία 4:1. Οι θέσεις 2, 4 και 5 (μπλε χρώμα) είναι οι κύριες θέσεις πρόσδεσης λιπαρών οξέων και γενικά δεν επηρεάζονται από τη σύνδεση του ανταγωνιστή. Οι χαμηλής συγγένειας θέσεις 3, 6 και 7 (κόκκινο χρώμα), ταυτοποιήθηκαν μέσω πειραμάτων που έγιναν παρουσία φαρμάκων-ανταγωνιστών. Παρατίθενται τα φάρμακα και οι ενδογενείς ενώσεις που συνδέονται στις θέσεις I και II. Το φάσμα 500 MHz καταγράφηκε στους 25 °C και σε pH 7.4 ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM φωσφορικού και 50 mM NaCl [Krenzel et al, 2013].

Από διεξοδική διερεύνηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, προκύπτει ότι δεν έχουν δημοσιευθεί μελέτες NMR με ισοτοπική επισήμανση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αμινοξέων με ^{13}C και ^{15}N , ώστε να διερευνηθεί η επίδραση του pH στην πρόσδεση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, δεν έχουν εφαρμοστεί πειράματα NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (saturation transfer difference, STD-NMR) [Claasen et al, 2005; Viegas et al, 2011; Tanoli et al, 2015] καθώς και πειράματα NMR με τη χρήση του μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transferred nuclear Overhauser effect, Tr-NOESY NMR) [Mari et al, 2010; Primikyri et al, 2018]. Αυτά τα πειράματα θα επέτρεπαν τον γρήγορο χαρακτηρισμό του "επίτοπου" πρόσδεσης του υποκαταστάτη (ligand) στην πρωτεΐνη και παράλληλα θα παρείχαν πληροφορίες για τις αλλαγές στη διαμόρφωση του υποκαταστάτη κατά την πρόσδεση αυτή, χωρίς να απαιτείται η χρήση λιπαρών οξέων εμπλουτισμένων με ^{13}C . Τα πειράματα αυτά αποτελούν κύριο αντικείμενο της παρούσας διατριβής (Ενότητες 4.1, 4.2, 4.3).

1.3.2 Αλληλεπίδραση Φαρμάκων με την Αλβουμίνη

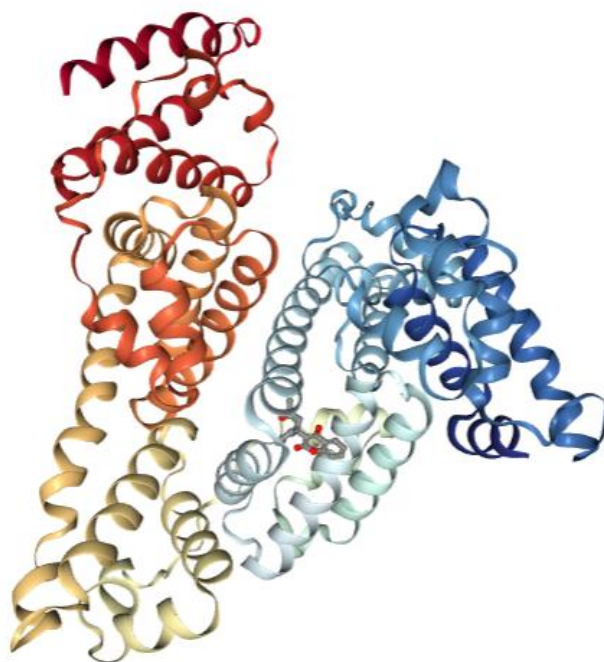
Η αλβουμίνη (HSA) συνδέεται, εκτός από τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, και με άλλες ενδογενείς ενώσεις, όπως η χολερυθρίνη, η αιμίνη και η θυροξίνη, σε διαφορετικές θέσεις. Επιπλέον, συνδέεται και με φάρμακα, όπως η βαρφαρίνη και η ιβουπροφαίνη, τα οποία προσδένονται στις θέσεις I και II που βρίσκονται στις υποπεριοχές IIA και IIIA αντίστοιχα (Εικόνα 1.13) [Ghuman et al, 2005].



Εικόνα 1.13. Συνοπτική παρουσίαση θέσεων πρόσδεσης στην αλβουμίνη (HSA) διαφόρων υποκαταστατών, όπως προκύπτουν από δημοσιευμένες κρυσταλλικές μελέτες. Τα άτομα οξυγόνου είναι χρωματισμένα κόκκινα, όλα τα άτομα του μυριστικού οξέος, των ενδογενών υποκαταστατών (αιμίνη, θυροξίνη) και των φαρμάκων είναι χρωματισμένα σκούρο γκρι, ανοιχτό γκρι και πορτοκαλί, αντίστοιχα [Ghuman et al, 2005].

Η βαρφαρίνη είναι ένα κοινό αντιπηκτικό φάρμακο που χορηγείται από το στόμα και χρησιμοποιείται στη θεραπεία της φλεβικής θρόμβωσης, της πνευμονικής εμβολής, καθώς και στην πρόληψη της θρομβοεμβολής σε ασθενείς με προσθετική καρδιακή βαλβίδα. Το φάρμακο αυτό αναστέλλει την παραγωγή των εξαρτώμενων από τη βιταμίνη Κ παραγόντων πήξης II, VII, IX και X. Στην κυκλοφορία δεσμεύεται σε μεγάλο βαθμό από την αλβουμίνη (HSA). Αυτή η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα σε μια καλά καθορισμένη περιοχή της HSA γνωστής ως Sudlow I ή warfarin-azapropazone

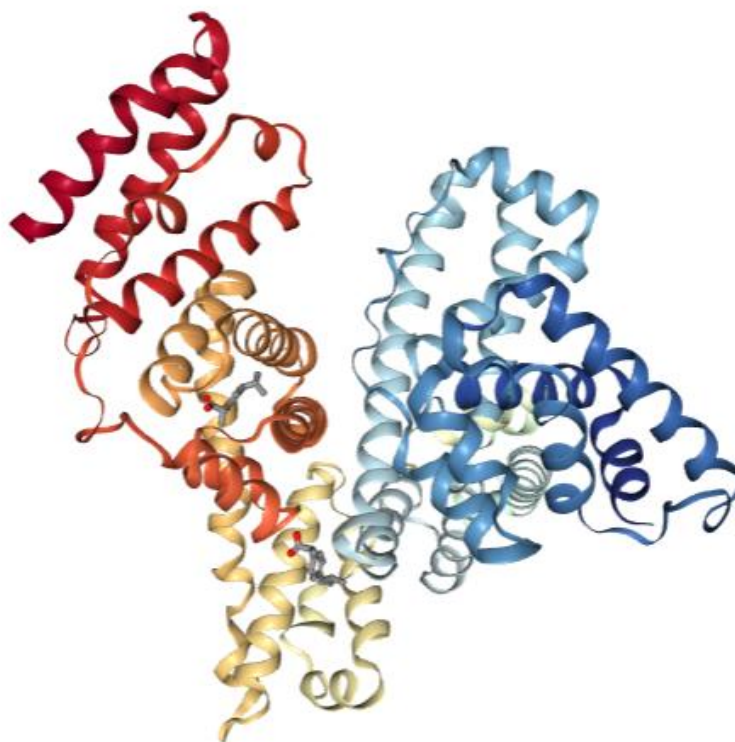
(Εικόνα 1.14). Η θέση αυτή βρίσκεται στην υποπεριοχή ΙΙΑ της HSA και δεσμεύει μια μεγάλη ποικιλία φαρμάκων και άλλων ενώσεων. Τα R και S εναντιομερή της βαρφαρίνης έχουν σταθερές ισορροπίας στη θέση 1 2.1 και $26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ αντίστοιχα, σε pH 7.4 και στους 37 °C. Λόγω του επακριβούς χαρακτηρισμού της θέσης δέσμευσης Sudlow I της βαρφαρίνης στην HSA, η βαρφαρίνη χρησιμοποιείται συχνά ως ανταγωνιστής για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων άλλων φαρμάκων και ενδογενών ουσιών, όπως τα λιπαρά οξέα [Moser et al, 2006; Petitpas et al, 2001; Ghuman et al, 2005].



Εικόνα 1.14. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της αλβουμίνης (HSA) με τη βαρφαρίνη (PDB-2BXD).

Η ιβουπροφαίνη είναι ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (NSAID) που χρησιμοποιείται ως δραστική ένωση σε αναλγητικά, αντιπυρετικά και αντιρευματικά φάρμακα με $pK_a = 4.91$. Η φυσιολογική θεραπευτική της συγκέντρωση στο αίμα είναι περίπου 50 mg/L, ενώ σε συγκέντρωση 250 mg/L ή υψηλότερη είναι τοξική. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της ιβουπροφαίνης δεν είναι εντελώς γνωστός. Όμως, είναι πολύ πιθανόν να περιορίζει τη σύνθεση των προσταγλανδινών λόγω της αναστολής της κυκλοοξυγενάσης COX που συμμετέχει στη σύνθεση αυτή. Επιπλέον η ιβουπροφαίνη θεωρείται πιθανό φάρμακο για τη θεραπεία του καρκίνου καθώς, όπως και τα υπόλοιπα NSAID, μπλοκάρει την τυροσίνη στις τοποϊσομεράσες, που είναι απαραίτητα ένζυμα για την αντιγραφή, τη μεταγραφή, τον ανασυνδυασμό και την

επιδιόρθωση του DNA [Jasinska et al, 2009]. Στην κυκλοφορία δεσμεύεται σε μεγάλο βαθμό από την αλβουμίνη (HSA). Πιο συγκεκριμένα, συνδέεται στη θέση II, που βρίσκεται στην υποπεριοχή IIIA της HSA



Εικόνα 1.15. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της αλβουμίνης (HSA) με την ιβουπροφαίνη (PDB-2BXG).

η οποία δεσμεύει, επίσης, μια μεγάλη ποικιλία φαρμάκων και άλλων ενώσεων. Επιπλέον, συνδέεται και στη θέση 6, που είναι θέση πρόσδεσης λιπαρών οξέων και βρίσκεται στη διεπιφάνεια των υποπεριοχών IIA και IIB (Εικόνα 1.15). Η ιβουπροφαίνη, όπως και η βαρφαρίνη, χρησιμοποιείται συχνά ως ανταγωνιστής στη μελέτη αλληλεπιδράσεων της HSA με άλλα φάρμακα και ενδογενείς ενώσεις, όπως τα λιπαρά οξέα [Jasinska et al, 2009].

1.4 Αντικαρκινική Δράση Λιπαρών Οξέων

Ο καρκίνος είναι μια σημαντική παγκόσμια νόσος και, σε ορισμένες χώρες, κατατάσσεται ως η δεύτερη κοινή αιτία θανάτου μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις [Ma et al, 2006]. Επιπλέον, καθώς οι ηλικιωμένοι είναι πιο ευπαθείς στον καρκίνο και η γήρανση του πληθυσμού συνεχίζεται, ο καρκίνος προβλέπεται να γίνει η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως σε πολλές χώρες. Παρά την πρόοδο που σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια στη θεραπεία του καρκίνου, οι συμβατικές κυτταροτοξικές θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία έχουν πολλαπλούς περιορισμούς, οδηγώντας σε αποτυχία της θεραπείας, υποτροπή του καρκίνου και μη ικανοποιητικά μακροχρόνια κλινικά αποτελέσματα [Basile et al, 2012]. Αυτοί οι περιορισμοί σχετίζονται κυρίως με δύο σημαντικά προβλήματα. Πρώτον, οι συμβατικές θεραπείες οδηγούν στην ανάπτυξη της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στα φάρμακα, ή/και αποτυγχάνουν να καταστρέψουν καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs) ή ογκοκύτταρα (TICs) [Reya et al, 2001; Maugeri-Sacca et al, 2011]. Δεύτερον, οι συμβατικές θεραπείες μπορούν να προκαλέσουν το θάνατο τεράστιου αριθμού φυσιολογικών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε τοπική και συστημική τοξικότητα. Δεδομένου ότι η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων καθοδηγείται από πολύπλοκες μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ σημάτων ανάπτυξης και θανάτου [Hanahan et al, 2011], οι πλειοψηφία των ογκολόγων θεωρεί ότι η στόχευση ενός μόνο μοριακού συστατικού μπορεί να μην επαρκεί για να διακόψει αυτή τη διαδικασία και χρειάζονται συνδυαστικές θεραπείες, στόχευση πολλαπλών μορίων, μονοπατιών ή δικτύων για την εξάλειψη του καρκίνου και την αύξηση της επιβίωσης των ασθενών [Pritchard et al, 2013].

Τα λιπαρά οξέα, εκτός από το ρόλο τους στις φυσιολογικές λειτουργίες, μπορούν να επηρεάσουν ορισμένες χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος [Riediger et al, 2009; Calder, 2015; Laviano et al, 2013; Bhagat et al, 2015; Murray et al, 2015]. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να ασκήσουν αντι-νεοπλασματική δράση, έχοντας ρόλο στην πρόληψη ή στη θεραπεία του καρκίνου. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στον προστατευτικό ρόλο των ω-3 λιπαρών οξέων, όπως το EPA και το DHA, από διάφορα κακοήθη νεοπλάσματα [Hardman, 2002] συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [Zheng et al, 2013], πιθανώς μέσω αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G (GPCRs) [Ye et al, 2013; Hopkins et al, 2016]. Ομοίως, αντικαρκινική δράση έχει αποδοθεί σε *in vivo* μελέτες [Dilzer et al, 2012] στο συζευγμένο λινελαϊκό οξύ, CLA, και ειδικότερα

στο ισομερές *cis*-9, *trans*-11, 18:2 CLA. Άλλα FA όπως το βουτυρικό οξύ, το βακενικό, το ελαϊκό και το λινολενικό οξύ έχουν επίσης διερευνηθεί για την αντικαρκινική τους δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου [Gomez-Cortes et al, 2009; Rodriguez-Alcala et al, 2017].

Η αντικαρκινική δράση των FFA έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το ω-6 πολυακόρεστο γ-λινολενικό οξύ (GLA) αναφέρθηκε ότι επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος ανθρώπου και αρουραίου *in vitro*, ενώ η κυτταρική απόπτωση *in vivo* προωθήθηκε όταν σε ένα μοντέλο γλοιώματος αρουραίου έγινε έγχυση με GLA [Leaver et al, 2002]. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες πρότειναν ότι οι αντικαρκινικές ιδιότητες των λιπιδίων πρέπει να αποδοθούν στη δομική τους ομοιότητα με ανταγωνιστές της αντι-αποπτωτικής οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές [Esposti 2010; Kim et al, 2017]. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα λιπίδια μπορούν να επάγουν την κυτταρική απόπτωση σε πλήθος καρκινικών μοντέλων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* όπως σε καρκίνο του παγκρέατος, του οισοφάγου, του στήθους, το μελάνωμα κ.α., αλλά και σε μυελογενείς και λεμφικές λευχαιμίες και λεμφώματα [D'Eliseo et al, 2016]. Μελέτες *in vitro* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, παχέος εντέρου και ήπατος έδειξαν μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL και Bim) ως μηχανισμό της προ-αποπτωτικής δραστηριότητας των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων [Sun et al, 2013; Danbara et al, 2004; Corsetto et al, 2011; Zhang et al, 2015]. Το 13-μεθυλοτετραδεκανοϊκό οξύ (13-MTD), ένα κορεσμένο FA που απομονώθηκε από τη ζύμωση σόγιας, ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, προάγοντας την απόπτωση. Το 13-MTD βρέθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 και αυξάνει τη Bax [Lin et al, 2012]. Είναι σημαντικό ότι τα CLA έχουν δείξει σημαντική αντικαρκινική δράση κατά των ανθρώπινων καρκινικών σειρών όπως του καρκίνου του προστάτη και του παχέος εντέρου μέσω της επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης. Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 ήταν ενδεικτικά για την προ-αποπτωτική τους δράση [Xu et al, 2014]. Παρόλο το πλήθος των μελετών αυτών ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης των λιπαρών οξέων με τις Bcl-2 πρωτεΐνες καθώς και ο μηχανισμός της προ-αποπτωτικής τους δράσης παραμένει άγνωστος.

1.4.1 Κυτταρική Απόπτωση

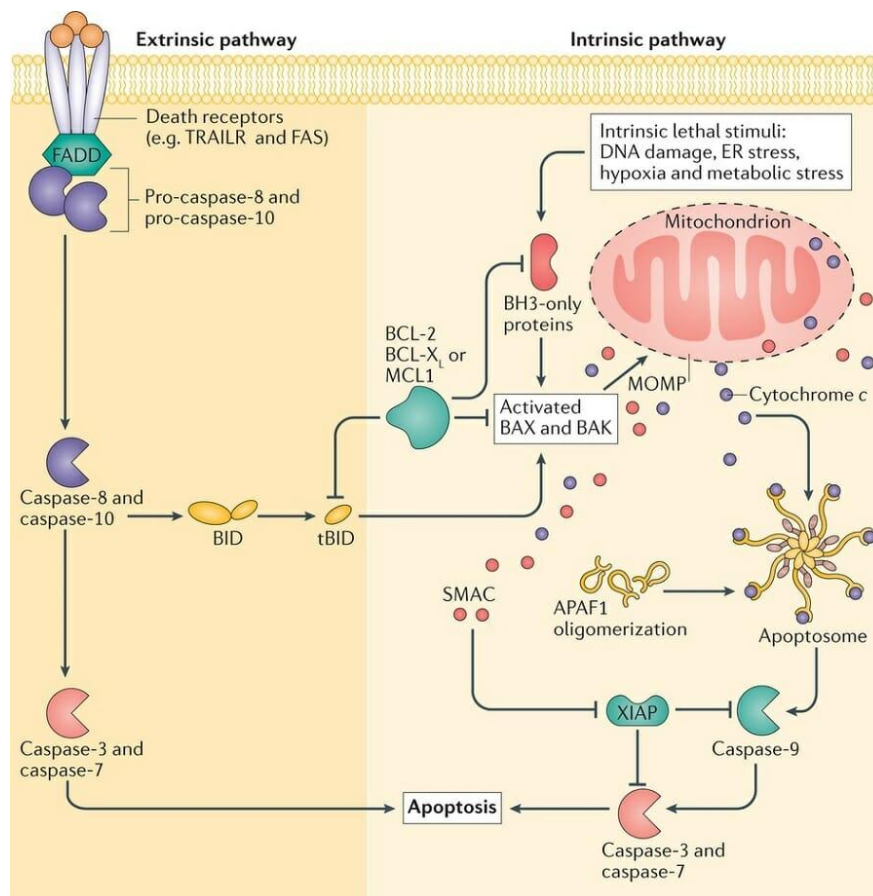
Η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι ένα πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας, διαφορετικό από τη νέκρωση, που ενεργοποιείται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως ανάπτυξη των ιστών και διαφοροποίηση καθώς και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση στην οποία ένα κύτταρο ακολουθεί ενεργά μια πορεία προς το θάνατο όταν λαμβάνει ορισμένα ερεθίσματα. Οι μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης που βρέθηκαν στους περισσότερους τύπους κυττάρων περιλαμβάνουν πυρηνική πύκνωση, κατακερματισμό DNA και συμπύκνωση της χρωματίνης, καταστροφή του κυτταροσκελετού, εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών στην πλασματική μεμβράνη, και τελικά το σχηματισμό μεμβρανωδών "αποπτωσωμάτων", τα οποία φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα και άλλα κύτταρα χωρίς την προώθηση φλεγμονώδους αντίδρασης [Yuan et al, 2003].

Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι εξελικτικά συντηρητικός και εκτελείται από μια οικογένεια πρωτεασών Cys, που ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες, είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν όχι μόνον την απόπτωση, αλλά και άλλες μη αποπτωτικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της μετανάστευσης. Προς το παρόν, έχουν περιγραφεί 14 κασπάσες θηλαστικών, και έχουν ταξινομηθεί σε εναρκτήριες κασπάσες (κασπάσες-2, -8, -9 και -10), εκτελεστικές κασπάσες (κασπάσες-3, -6 και -7) και τις φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάσες-1, -4, -5, -11, -12 και -13). Οι πρωτεάσες αυτές χρησιμοποιούν ένα αμινοξύ Cys στο ενεργό τους κέντρο και κόβουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα μετά από το αμινοξύ Asp. Συντίθενται ως πρόδρομες μορφές που ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση, κυρίως από την ρύθμιση μιας άλλης οικογένειας πρωτεϊνών, της οικογένειας Bcl-2 [Zimmermann et al, 2001; & Li et al, 2008; Pop et al, 2009].

Υπάρχουν δύο βασικά και διακριτά μεταξύ τους μονοπάτια που οδηγούν σε απόπτωση: το εξωγενές μονοπάτι (μονοπάτι υποδοχέα θανάτου) που δρα ανεξάρτητα από τα μιτοχόνδρια και το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό. Το πρώτο ενεργοποιείται από τους υποδοχείς θανάτου CD95 (Apo-1 ή Fas) / TRAIL / Υποδοχέας Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (TNF), που αποτελούν πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης και ενεργοποιούν άμεσα τον καταρράκτη κασπασών μέσω της

στρατολόγησης του "εκκινήτη" κασπάση-8 σε ένα σύμπλεγμα σηματοδότησης που προκαλεί θάνατο (DISC) [Tzifi et al, 2012; Kashyap et al, 2021].

Το ενδογενές μιτοχondριακό μονοπάτι, ενεργοποιείται από εξωκυτταρικά σήματα όπως έλλειψη παραγόντων επιβίωσης, ακτινοβολία και χημικό στρες, αλλά και από ενδοκυτταρικά σήματα όπως το οξειδωτικό στρες, βλάβη του DNA και ελαττωματικές πρωτεΐνες. Κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, που οδηγούν στην απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα μετά από διαταραχή της μιτοχondριακής μεμβράνης. Το κυτόχρωμα c που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζει ένα σύμπλοκο που ονομάζεται αποπτώσωμα με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) και την προκασπάση-9. Αυτό το σύμπλοκο διασπά την προκασπάση-9 σε κασπάση-9, η οποία στη συνέχεια διασπά και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες, όπως οι κασπάσες -3, -6 και 7, προκαλώντας τελικά απόπτωση [Dejean et al, 2006; Wang et al, 2009; Kashyap et al, 2021] (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16. Το εξωγενές μονοπάτι ή μονοπάτι υποδοχέα θανάτου και το ενδογενές ή μιτοχondριακό μονοπάτι της απόπτωσης [<https://biologydictionary.net/apoptosis/>].

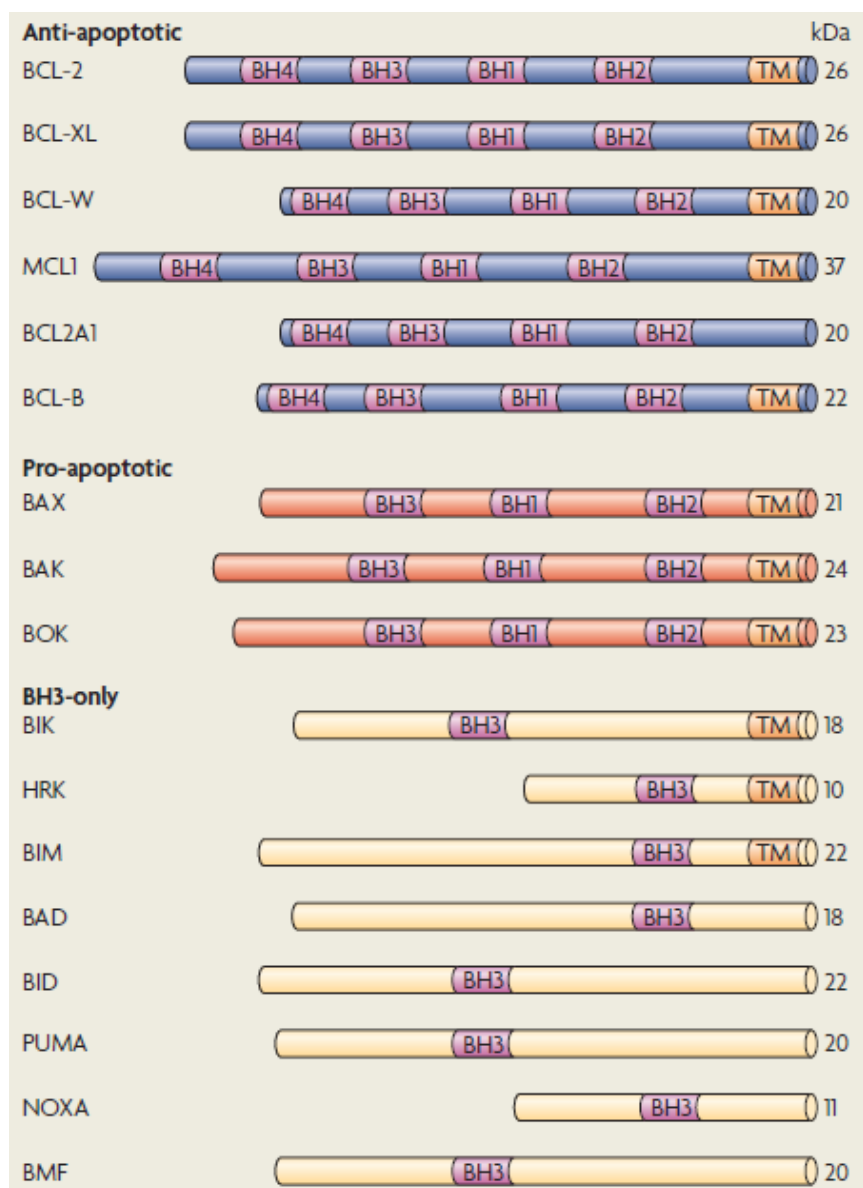
1.4.2 Οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 έλαβε το όνομά της από το πρωτο-ογκογονίδιο λεμφώματος B κυττάρων Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 gene). Το γονίδιο αυτό ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο οξώδες λέμφωμα B-κυττάρων ως ένα γονίδιο που συνδέεται στη γενετική θέση της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης στα σημεία διακοπής της μετατόπισης t(14;18). Το αποτέλεσμα της μετατόπισης αυτής είναι η ενίσχυση της μεταγραφής της πρωτεΐνης Bcl-2. Σε φυσιολογικά κύτταρα το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο χρωμοσωμικό τμήμα 18q21.3. Η Bcl-2 πρωτεΐνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο. Η ανακάλυψη αυτή ήταν μια επανάσταση στον τρόπο προσέγγισης της παθολογίας του καρκίνου, αφού γέννησε την ιδέα ότι η ογκογένεση θα μπορούσε να οφείλεται όχι μόνο στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά και σε διαταραχή της απόπτωσης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 έχει βρεθεί όχι μόνο στο οξώδες μη-Hodgkin λέμφωμα, αλλά και σε άλλες αιμοποιητικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους, ανεξάρτητα της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(14;18) [Tzifi et al, 2012].

Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 των θηλαστικών αποτελείται από 30 σχετικές πρωτεΐνες, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τεσσάρων συντηρημένων περιοχών σχετικά μικρής αλληλουχίας (μήκους λιγότερο από 20 αμινοξέα) που ονομάζονται τομείς ομολογίας (BH) (Bcl-2 - Homology domains). Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 1.17, οι τομείς ομολογίας των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 είναι οι BH1, BH2, BH3 και BH4. Εκτός από τους τομείς ομολογίας, τα περισσότερα μέλη της οικογένειας φέρουν και μια καρβοξυ-τελική υδρόφοβη περιοχή, τη διαμεμβρανική περιοχή (TM) που συμμετέχει στη σύνδεση του πρωτεϊνικού μορίου με μεμβράνες, όπως η εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου [Taylor et al, 2008].

Με βάση την κύρια λειτουργία τους, η οικογένεια Bcl-2 χωρίζεται σε τρεις ομάδες: (1) αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2A1, Bcl-B), (2) προ-αποπτωτικές (Bax, Bak και Bok) και (3) προ-αποπτωτικές BH3-μόνο (Bad, Bid, Bik, Bim, BMF, HRK, Noxa και PUMA). Τα αποπτωτικά προωθητικά αποτελέσματα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αντισταθμίζονται από την άμεση αλληλεπίδρασή τους με τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2. Αυτή η λεπτή και δυναμική ισορροπία μεταξύ των προ- και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 καθορίζει εάν ένα

Β κύτταρο υφίσταται απόπτωση ή επιβιώνει [Shamas-Din et al, 2013; Adams et al, 2019].



Εικόνα 1.17. Ταξινόμηση των μελών της οικογένειας Bcl-2 ανάλογα με τη δομή και λειτουργία τους [Taylor et al, 2008].

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2

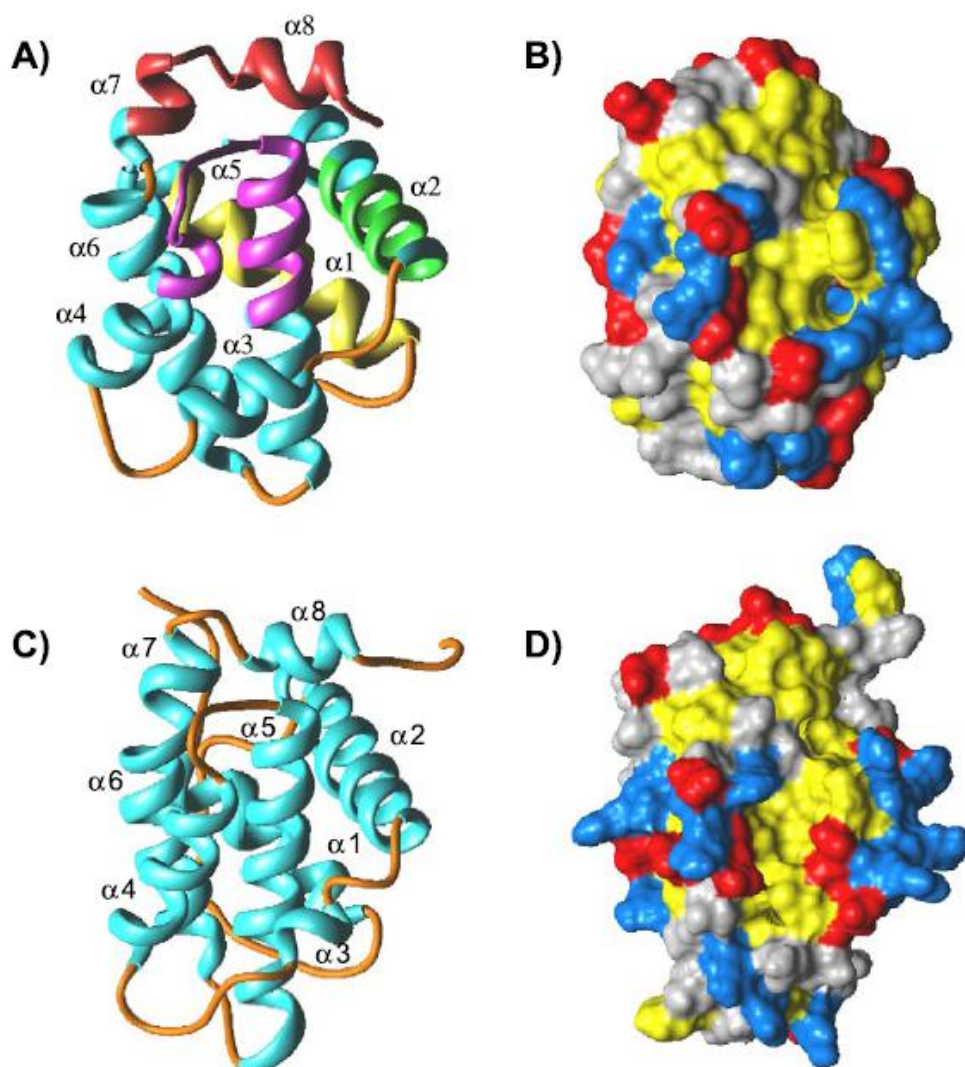
Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, κυρίως η Bcl-2 και η Bcl-x1, λειτουργούν εναντίον του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και τον αναστέλλουν μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης [Tsujimoto, 1998]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των

μιτοχονδρίων και καταστέλλουν τη διαδικασία απόπτωσης αναστέλλοντας την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τη μεμβρανική διαπερατότητα [Kale et al, 2018]. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί έξι διαφορετικά αντι-αποπτωτικά μέλη: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, αλληλουχία 1 λευχαιμίας μυελοειδών κυττάρων (Mcl-1), Bcl2A1 και Bcl-B. Όλα αυτά τα μέλη διαθέτουν και τους τέσσερις τομείς ομολογίας BH (BH1 – BH4) και μια καρβοξυ-τελική υδρόφοβη περιοχή την TM [Taylor et al, 2008]. Οι ομόλογες περιοχές BH1 - BH3 σχηματίζουν ένα υδρόφοβο αυλάκι και η αμινοτελική περιοχή BH4 σταθεροποιεί αυτή τη δομή. Η περιοχή BH4 είναι συνήθως απύσασ από τα αποπτωτικά μέλη και, ως εκ τούτου, αποτελεί βασικό παράγοντα για την αντιαποπτωτική δράση. Η συγκεκριμένη περιοχή αποτελείται από 26 αμινοξέα και η δομή της δείχνει έναν αμφιπαθητικό χαρακτήρα κατά την αλληλεπίδρασή της με τις μεμβράνες. Η δευτεροταγής δομή της περιοχής BH4 στο νερό συνίσταται από μια α-ελικοειδή δομή, κατάλληλη ώστε να αλληλεπιδρά ευνοϊκά με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες [Khemtémourian et al, 2006].

Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς του σώματος: η Bcl-2 σε νεφρικά επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης των προγόνων μελανοκυττάρων και των ώριμων B και T λεμφοκυττάρων [Bouillet et al, 2001; Veis et al, 1993], η Bcl-xL σε προγονικά ερυθροειδή και νευρωνικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [Motoyama et al, 1995], η Bcl-w σε σπερματογένεση [Print et al, 1998] και η Mcl-1 είναι απαραίτητη για την εμφύτευση κατά την πρόιμη ανάπτυξη [Rinkenberger et al, 2000]. Τέλος, η απορρύθμιση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών έχει βρεθεί σε ανθρώπινους καρκίνους και υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι είναι κρίσιμη στην ανάπτυξη και τη συντήρηση του καρκίνου [Fernald et al, 2013].

Η Bcl-2 εντοπίζεται μόνιμα στη μεμβράνη, ενώ η Bcl-xl και η Bcl-w συνδέονται στη μεμβράνη μετά από κάποιο κυτταροτοξικό σήμα [Tzifi et al, 2012]. Η Bcl-2 δεν έχει εντοπιστεί μόνο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αλλά και στον πυρηνικό φάκελο και τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Στη μεμβράνη του ER ρυθμίζει την αποθήκευση του ασβεστίου, του οποίου τα ενδοκυτταρικά επίπεδα έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την απόπτωση. Η σχετιζόμενη με το ER Bcl-2 είναι σε θέση να προστατεύει από την απόπτωση που επάγεται από διάφορους παράγοντες. Επιπλέον, εκτός από την Bcl-2 και η Bcl-xl αλληλεπιδρά με προ-αποπτωτικά μέλη όπως η Bax και

η Bak [Khemtémourian et al, 2006]. Είναι πιθανό ότι η αντι-αποπτωτική δράση των Bcl-2 και Bcl-xL μετατρέπεται σε προ-αποπτωτική όταν αυτές οι πρωτεΐνες διασπώνται από τις κασπάσες μετά την έναρξη της απόπτωσης [Simonen et al, 1997].



Εικόνα 1.18. Δομές των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (A) & (B) Bcl-xL και (C) & (D) Bcl-2. Στη Bcl-xL, ο τομέας ομολογίας BH1 είναι χρωματισμένος με φούξια, ο BH2 με κόκκινο, ο BH3 με πράσινο και ο BH4 με κίτρινο. Στις δομές (B) και (D) τα αμινοξέα χρωματίζονται ως εξής: λευκίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη, μεθειονίνη και αλανίνη με κίτρινο χρώμα, αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη με μπλε, ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό οξύ με κόκκινο, ενώ όλα τα άλλα αμινοξέα έχουν γκρι χρώμα. Η υδρόφοβη αύλακα φαίνεται ξεκάθαρα (κίτρινο χρώμα) στις επιφανειακές αναπαραστάσεις της Bcl-xL και Bcl-2 [Petros et al, 2004].

Η Bcl-2 αποτελείται από 239 αμινοξέα και έχει 8 α-έλικες, εκ των οποίων οι έλικες 5 και 6 είναι κεντρικές υδρόφοβες και τέσσερις από τις υπόλοιπες είναι αμφιπαθητικές (amphipathic) [Kelekar et al, 1998]. Υπάρχει επίσης μια εύκαμπτη

περιοχή-θηλιά, μεταξύ της έλικας 1 (αμινοξέα 14-27) και της έλικας 2 (αμινοξέα 95-108). Η FLD περιέχει αμινοξέα όπως Asp34, Thr59, Thr72, Ser73 και Ser90, καθώς και τη θέση ρύθμισης της κασπάσης. Η διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών Bcl-2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 212-233 [Raghav et al, 2012]. Οι υδρόφοβες θέσεις που υπάρχουν στην πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνες για τον διμερισμό ορίζονται στους τομείς ομολογίας BH1 (αμινοξέα 139–157), BH2 (αμινοξέα 190–206) και BH3 (αμινοξέα 100–109) [Kelekar et al, 1998]. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Conus και τους συνεργάτες του αποκάλυψε ότι δεν υπήρχαν στοιχεία για τον ομοδιμερισμό της Bcl-2, ακόμη και σε συνθήκες υπό τις οποίες η Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση [Conus et al, 2000]. Ορισμένες πρόσφατες μελέτες προσπάθησαν να προβλέψουν τη σύνδεση αναστολέων στην FLD περιοχή στις φωσφορυλιωμένες και μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Bcl-2, προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος τους στον ομοδιμερισμό και τη φωσφορυλίωση [Zacarias-Lara et al, 2016].

Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 ελέγχουν την επιβίωση των κυττάρων ρυθμίζοντας ή διατηρώντας τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών [Carrington et al, 2017]. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax, Bak και Bok χαρακτηρίζονται συνήθως από ομολογία στην αλληλουχία των περιοχών BH1, BH2, BH3 αλλά στερούνται της περιοχής BH4 [Taylor et al, 2008]. Η Bax είναι μια κυτταροπλασματική μονομερής πρωτεΐνη, η οποία ενσωματώνεται στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και στη συνέχεια ολιγομερίζεται, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των αποπτωγονικών παραγόντων όπως του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Από την άλλη πλευρά, η Bak είναι μια αναπόσπαστη εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία υφίσταται επίσης διαμορφωτικές αλλαγές προκειμένου να σχηματίσει μεγαλύτερα συσσωματώματα κατά την διάρκεια της απόπτωσης. Και τα δύο προ-αποπτωτικά μέλη, Bax και Bak, είναι επίσης παρόντα στο ER, όπου ελέγχουν την απόπτωση μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του ασβεστίου ανταγωνιστικά ως προς τη Bcl-2. Ο εντοπισμός της Bcl-2 στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου υποστηρίζει την άποψη ότι ρυθμίζει τη δραστηριότητα των Bax και Bak. Επιπλέον, η p53 μπορεί να ενεργοποιήσει την Bax, ενώ

κατά τη διάρκεια φαρμακο-επαγόμενης απόπτωσης η Bax διασπάται από κασπάσες και ενεργοποιημένες καλπαΐνες [Vaseva et al, 2009; Tzifi et al, 2012].

Τα προ-αποπτωτικά BH3-μόνο μέλη της οικογένειας Bcl-2

Τα προ-αποπτωτικά BH3-μόνο μέλη της οικογένειας Bcl-2 περιλαμβάνουν έναν αριθμό προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bad, Bid, Bik, Bim, BMF, HRK, Noxa και PUMA. Αυτά τα μέλη διαθέτουν μόνο έναν τομέα ομολογίας των BH3 και ορισμένα διαθέτουν και μια διαμεμβρανική περιοχή TM. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, έχουν προταθεί δύο μοντέλα επαγωγής της απόπτωσης. Στο μοντέλο άμεσης ενεργοποίησης, οι προ-αποπτωτικές BH3-μόνο πρωτεΐνες δρουν είτε ως άμεσοι ενεργοποιητές της απόπτωσης (Bim, Bid και ίσως PUMA), έχοντας την ικανότητα να ενεργοποιούν τις εκτελεστικές πρωτεΐνες Bax και Bak, ή ως "ευαισθητοποιητές" πρωτεΐνες (Noxa, Bad, Hrk). Επειδή οι "ευαισθητοποιητές" δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τις Bax και Bak, η προ-αποπτωτική τους δράση προκαλείται μέσω σύνδεσης με αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες και μετέπειτα απελευθέρωσης ενεργοποιητών BH3-μόνο πρωτεϊνών [Ke et al, 2013; Certo et al, 2006].

Στο δεύτερο, έμμεσο μοντέλο απόπτωσης, μόνιμα δραστικές μορφές των Bax και Bak συνδέονται με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2. Η αυξημένη έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών οδηγεί στον εκτοπισμό αυτών των δραστικών μορφών προ-αποπτωτικών εκτελεστικών πρωτεϊνών προκαλώντας έτσι τη μιτοχονδριακή απόπτωση. Έχει αποδειχθεί επιλεκτική πρόσδεση και διαφορετικές συγγένειες μεταξύ των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και των BH3-μόνο πρωτεϊνών. Ενώ οι ενεργοποιητές BH3-μόνο πρωτεΐνες δεσμεύονται σε όλες τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, οι "ευαισθητοποιητές" BH3-μόνο εμφανίζουν επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Noxa – Mcl-1, Hrk – Bcl-xl) που προκαλούνται από διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων του τομέα BH3 [Certo et al, 2006]. Έχει επανειλημμένα αποδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα, των οποίων οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 καταλαμβάνονται από ενεργοποιητές BH3-μόνο πρωτεΐνες, είναι τα αποκαλούμενα "προετοιμασμένα για θάνατο" [Certo et al, 2006]. Τέτοια κύτταρα μπορούν να υποστούν ταχεία απόπτωση, όταν εκτίθενται σε ευαισθητοποιητές BH3-μόνο πρωτεΐνες ή μιμητικά BH3 πεπτιδία, μια κατηγορία αντικαρκινικών μορίων που

εκτοπίζουν ενεργοποιητές BH3-μόνο για να ενεργοποιήσουν τις Bax / Bak και να προκαλέσουν απόπτωση [Merino et al, 2018].

1.4.3 Θεραπευτική αναστολή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2

Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εγγενής απόπτωση. Μάλιστα, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 στην οξεία μυελογενή λευχαιμία μπορεί να παρακάμψει την αντίσταση στην απόπτωση και τη χημειοθεραπεία. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το αποτέλεσμα, η εξερεύνηση των αναστολέων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 θεωρείται ότι έχει τεράστιες δυνατότητες για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων στη θεραπεία του καρκίνου [Wei et al, 2020].

Δεδομένου ότι οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 έχουν καθοριστικό ρόλο σε αρκετούς τύπους καρκίνου, η μελέτη της εξέλιξής τους και η αντίσταση στα φάρμακα, είναι σε εξέλιξη για αρκετές δεκαετίες. Η πρωτεΐνη Bcl-2 είναι στο προσκήνιο εκτεταμένων προσπαθειών για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών. Έχουν διερευνηθεί αρκετές προσεγγίσεις για τη στόχευση αυτής της πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένων των αντιπληροφοριακών ολιγονουκλεοτιδίων που αναστέλλουν την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2, των πεπτιδίων – αναστολέων και των μικρομοριακών αναστολέων [Klanova et al, 2020].

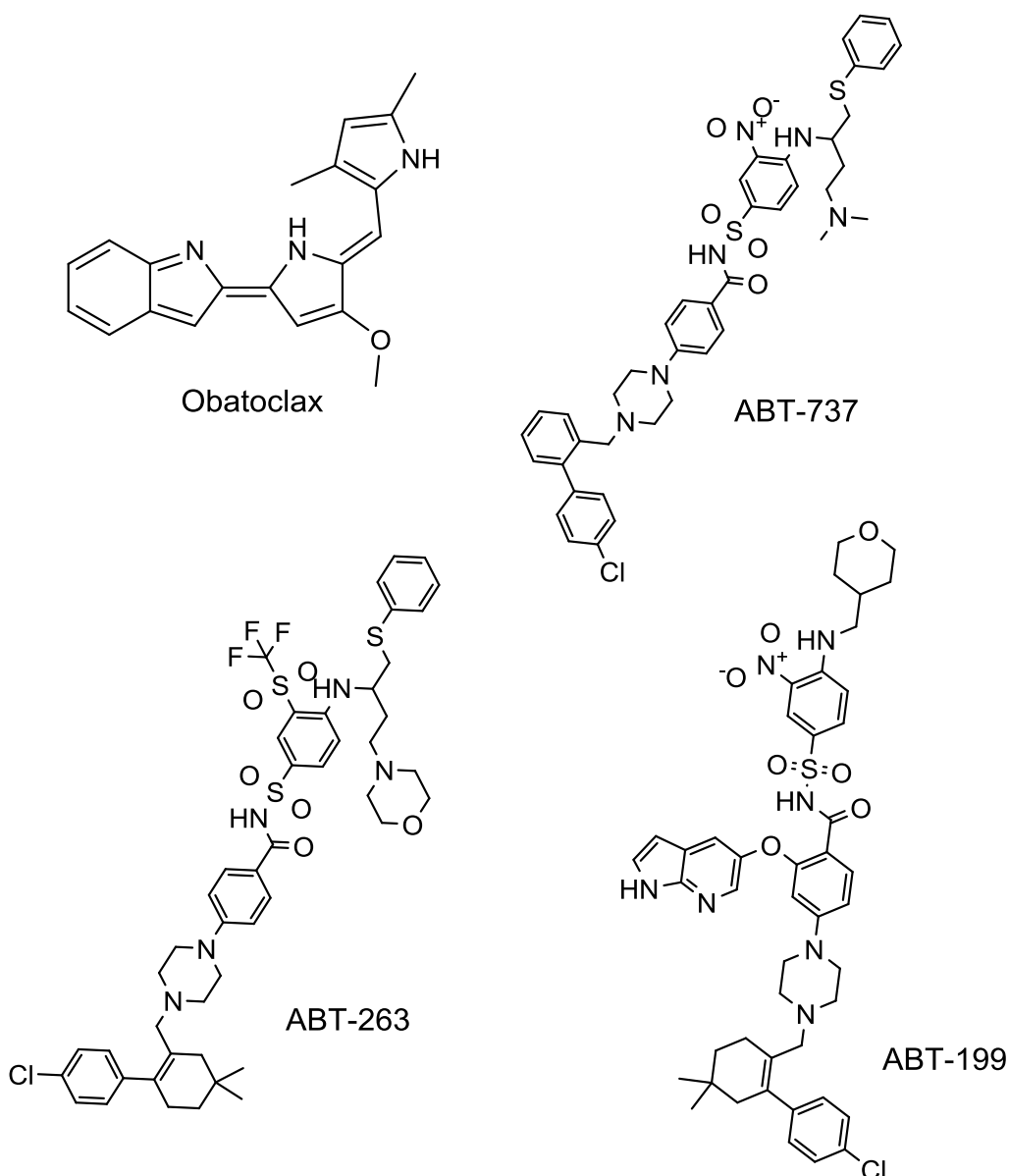
Αρκετά από τα αντιπληροφοριακά μόρια RNA έχουν ενθαρρυντικά προκλινικά αποτελεσματικότητα και χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των Oblimersen (G3139/Genasense), PNT2258 (NCT02226965) και SPC2996 (NCT00285103. Από τα τρία αντι-Bcl-2 αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια, τις βέλτιστες ιδιότητες είχε το νάτριο Oblimersen [Adams et al, 2019, G3139, Genasense, Genta Inc, Berkeley Heights, NJ, USA]. Ήταν ο πρώτος αναστολέας της Bcl-2 που χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές και είναι ένα φωσφοροθειικό μόριο DNA 18 βάσεων, το οποίο σχεδιάστηκε για συμπληρωματική σύνδεση στα πρώτα έξι κωδικόνια του BCL2 mRNA οδηγώντας στην αποικοδόμησή του και μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 [Klasa et al, 2002]. Παρά τις ενδείξεις αποτελεσματικότητας σε πρώιμες κλινικές δοκιμές αιματολογικών κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας λεμφογενούς λευχαιμίας (CLL), στη φάση 3 που χρησιμοποιήθηκε συνδυαστικά με ανοσο-χημειοθεραπεία σε ασθενείς με

υποτροπιάζουσα απέτυχε να δείξει σαφές κλινικό όφελος. Ως αποτέλεσμα, δεν εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) [O'Brien et al, 2009].

Μία άλλη προσπάθεια άμεσης στόχευσης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 έγινε με τον μικρομοριακό αναστολέα, obatoclaix (GX-15-070) (Εικόνα 1.19) ο οποίος συνδέεται με όλες τις βασικές αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, Bcl-2, Bcl-xl και Mcl-1 με αποτέλεσμα τη μετατόπιση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak ή Bim και την επαγωγή απόπτωσης [Nguyen et al, 2007]. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης του φαρμάκου, συμπεριλαμβανομένης της διακοπής του κυτταρικού κύκλου S/G2 με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι εκτός από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, το obatoclaix έχει και άλλους στόχους [Konopleva et al, 2008]. Το obatoclaix έχει δοκιμαστεί σε διάφορες κλινικές δοκιμές φάσης 1-2 σε διάφορους τύπους μη Hodgkin λεμφωμάτων (B-NHL) και CLL. Αυτές οι δοκιμές έδειξαν μέτρια κλινική δράση του φαρμάκου ως μονοθεραπεία και δεν επιβεβαίωσαν τη συνεργατική δράση του obatoclaix με διάφορες θεραπείες κατά του λεμφώματος που προτάθηκαν σε προκλινικές μελέτες. Επιπλέον, σε όλες αυτές τις δοκιμές παρατηρήθηκε νευρολογική τοξικότητα [Goy et al, 2014; Goy et al, 2014; O'Brien et al, 2009; Brown et al, 2015]. Τα δύο αυτά αποτελέσματα, η μέτρια κλινική δράση καθώς και η τοξικότητα περιόρισαν την ανάπτυξη του φαρμάκου ως θεραπευτικού παράγοντα σε B/NHL και CLL.

Μία σημαντική ανακάλυψη στην ανάπτυξη των Bcl-2 αναστολέων επιτεύχθηκε με το πρώτο συνθετικό μιμητικό BH-3, τον ABT-737 (Εικόνα 1.19), έναν μικρομοριακό αναστολέα των Bcl-2, Bcl-xl και Bcl-w. Ο ABT-737 εμφανίζει πολύ υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες σε σχέση με το obatoclaix, με επακόλουθη απελευθέρωση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και επαγωγή απόπτωσης μέσω των Bax και Bak [Oltersdorf et al, 2005]. Ο ABT-263 (Navitoclax, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) (Εικόνα 1.19) είναι ένας παρόμοιος από χημικής άποψης αναστολέας, ο οποίος λαμβάνεται από το στόμα, με παρεμφερή συγγένεια πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες Bcl-2. [Tse et al, 2008; Ashkenazi et al, 2017]. Η πολλά υποσχόμενη προκλινική δράση οδήγησε στην κλινική δοκιμή του navitoclax σε B-NHL και CLL. Στη φάση 1 το navitoclax, σε ασθενείς με υποτροπιάζουσες ή ανθεκτικές λεμφοειδείς κακοήθειες, έδειξε κλινική δράση σε όλους τους ιστολογικούς υπότυπους

με την καλύτερη δραστηριότητα στην περίπτωση CLL [Wilson et al, 2010]. Η μελέτη αυξημένης δόσης φάσης 1 του navitoclax ως μονοθεραπείας σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική CLL επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα του navitoclax με ανθεκτικές αποκρίσεις και μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου 25 μήνες σε ασθενείς με CLL που υπέστησαν βαριά θεραπεία (Roberts et al, 2012; Adams et al, 2019).



Εικόνα 1.19. Δομές των αναστολέων της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.

Η τοξικότητα του navitoclax που παρατηρήθηκε σε αυτές τις δοκιμές ήταν η θρομβοπενία. Ταχεία μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων (βαθμός 3-5) παρατηρήθηκε στο 28% των ασθενών και εμπόδισε την διερεύνηση υψηλότερων

δόσεων του navitoclax [Roberts et al, 2012]. Η θρομβοπενία προκλήθηκε από την αναστολή της Bcl-xl στα αιμοπετάλια, που αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από τη Bcl-xl για επιβίωση [Vogler et al, 2011; Zhang et al, 2007]. Περαιτέρω δοκιμή φάσης 2 του navitoclax σε συνδυασμό με το rituximab αντί για rituximab μόνο σε ασθενείς με προηγουμένως μη θεραπευμένη CLL έδειξε βελτιωμένο ποσοστό αντικειμενικής απόκρισης (ORR) της συνδυαστικής χρήσης rituximab με το navitoclax έναντι του rituximab (50% έναντι 35%, αντίστοιχα), με περαιτέρω αύξηση του ORR (70%) όταν το navitoclax με το rituximab χορηγήθηκε μέχρι την εξέλιξη της νόσου. Έχει αποδειχθεί ότι ασθενείς με CLL με del(17p) ή υψηλά επίπεδα Bcl-2 είχαν σημαντικά καλύτερες κλινικές αποκρίσεις όταν έλαβαν θεραπεία με το navitoclax [Kipps et al, 2015]. Αυτή η παρατήρηση μαζί με την προκαλούμενη από το navitoclax θρομβοπενία που προκλήθηκε από την αναστολή της Bcl-xl οδήγησε σε προσπάθειες ανάπτυξης ενός ειδικού Bcl-2 αναστολέα.

Το venetoclax (ABT-199/GDC-0199) (Εικόνα 1.19) ήταν ο πρώτος εξαιρετικά επιλεκτικός διαθέσιμος στοματικά Bcl-2 αναστολέας που αναπτύχθηκε με βάση το navitoclax. Ο venetoclax εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τη Bcl-2 ($K_i < 0.010$ nM), ωστόσο η συγγένεια πρόσδεσης με τις άλλες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Bcl-xl ($K_i = 48$ nM), Mcl-1 ($K_i > 444$ nM) και Bcl-w ($K_i = 245$ nM), είναι πολύ ασθενέστερη. Προκλινικές *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε διάφορες ανθρώπινες αιματολογικές κυτταρικές σειρές και μοντέλα ξενομοσχεύματος κατέδειξαν σημαντική αντικαρκινική αποτελεσματικότητα που οδήγησε σε πρώιμες κλινικές δοκιμές [Ashkenazi et al, 2017; Souers et al, 2013].

1.5 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Όπως αναλύθηκε λεπτομερώς στην εισαγωγική ενότητα, η μεταφορά στη συστηματική λειτουργία και η κατανομή στους ιστούς των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της αλβουμίνης (BSA/HSA) [Gustone, 1996; Vance et al, 2008; Watkins et al, 2002]. Από την κρυσταλλογραφία ακτίνων X και τη φασματοσκοπία NMR έχει βρεθεί ότι υπάρχουν επτά θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην αλβουμίνη. Μάλιστα, η FA7 συμπίπτει με τη θέση I των φαρμάκων (βαρφαρίνη), ενώ η FA3 με τη θέση II των φαρμάκων (ιβουπροφαίνη). Όμως, παρά τις πολυάριθμες διαθέσιμες δομικές μελέτες ακτίνων X, οι διαμορφωτικές καταστάσεις των λιπαρών οξέων στη θέση I των φαρμάκων δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν με ακρίβεια [Curry et al, 1998; Bhattacharya et al, 2000; Petitpas et al, 2001].

Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε διεργασίες κυτταρικής σηματοδότησης, μεταβολισμού ενέργειας και σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Όπως αναλύθηκε λεπτομερώς στην εισαγωγική ενότητα, πρόσφατες μελέτες αντικαρκινικής δράσης των απαραίτητων ω -3 και ω -6 FFA, απέδειξαν τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με τη δομική ομοιότητα των ακόρεστων FFA με αναστολείς της Bcl-2 υποδεικνύει την προ-αποπτωτική δράση των FFA ως πιθανό μηχανισμό [Sun et al, 2013; Danbara et al, 2004; Corsetto et al, 2011; Zhang et al, 2015]. Όμως, τα δομικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης των FFA με την Bcl-2 καθώς και ο μηχανισμός της αντικαρκινικής τους δράσης παραμένει άγνωστος.

Σκοπός, συνεπώς, της διδακτορικής διατριβής είναι:

- (i) Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης και διαμορφωτικών αλλαγών ακόρεστων FFA (καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, α -λινολενικού οξέος, EPA και DHA) στην αλβουμίνη ορού με τη χρήση των τεχνικών διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (saturation transfer difference, STD-NMR) και μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transferred nuclear Overhauser effect, Tr-NOESY NMR).
- (ii) Προσδιορισμός σε ατομικό επίπεδο αλληλεπιδράσεων ακόρεστων λιπαρών οξέων στην αλβουμίνη με τη συνδυαστική χρήση υπολογισμών docking και των διαμοριακών σημάτων NOE για φαρμακοφόρο χαρτογράφηση (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping, INPHARMA NMR).

(iii) Μελέτη αλληλεπιδράσεων του νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) με την αλβουμίνη με τη χρήση τεχνικών STD-NMR, tr-NOESY και INPHARMA NMR και διερεύνηση ομοιοπολικής ή μη ομοιοπολικής πρόσδεσης στην πρωτεΐνη.

(iv) Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων ακόρεστων FFA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με τη συνδυαστική χρήση των τεχνικών STD-NMR και tr-NOESY NMR.

(v) Μελέτη, με τη χρήση της μεθοδολογίας in-cell NMR, δομικών και διαμορφωτικών ιδιοτήτων αλληλεπιδράσεων του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος DHA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

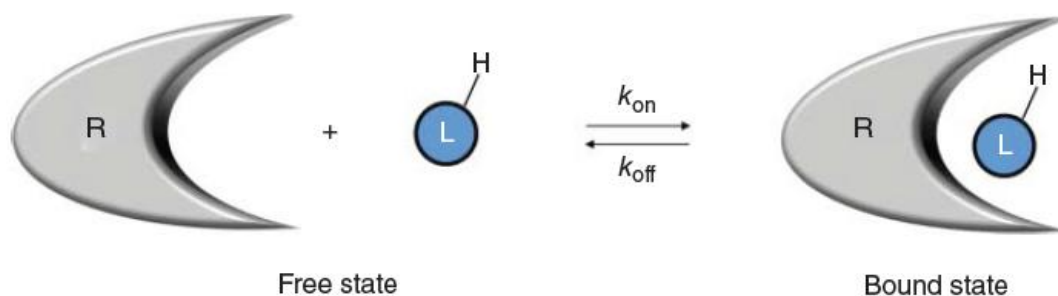
2.1 Τεχνικές NMR για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης λιπαρών οξέων με πρωτεΐνες

Οι τεχνικές NMR μπορούν να παρέχουν πληροφορίες όχι μόνο για τη διαμόρφωση και τη δυναμική οργανικών μορίων μικρού μοριακού βάρους σε διάλυμα αλλά και σε κατάσταση δέσμευσης με υποδοχείς μεγάλου MB. Η διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων σε διάλυμα μέσω μη ομοιοπολικών δυνάμεων αντιπροσωπεύουν τη θεμελιώδη βάση διαδικασιών μοριακής αναγνώρισης. Σε όλες τις περιπτώσεις, βασικό κριτήριο είναι η δομική συμπληρωματικότητα μεταξύ των χαρακτηριστικών ομάδων των αλληλεπιδρώντων μορίων. Η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τις τελευταίες δεκαετίες για την παροχή δομικών πληροφοριών σε ατομικό επίπεδο και, ως εκ τούτου, διευκρίνιση της βιολογικής σημασίας αλληλεπιδράσεων υποκαταστάτη-υποδοχέα [Pellecchia et al, 2008; Calle et al, 2011; Roldos et al, 2011; Pellecchia et al, 2002] .

Γενικά, για τη μελέτη με NMR αλληλεπιδράσεων ισορροπίας υποκαταστάτη-υποδοχέα, δύο προσεγγίσεις μπορούν να διακριθούν: (i) ανάλυση των σημάτων του υποδοχέα για την περίπτωση ισχυρής πρόσδεσης με $k_{\text{off}} < 1\text{s}^{-1}$ ή (ii) παρακολούθηση των σημάτων μικρών υποκαταστατών για την περίπτωση $k_{\text{off}} > 1\text{s}^{-1}$, που αντιστοιχεί σε σταθερά διάστασης της ισορροπίας, K_D , σε ένα εύρος mM έως μM [Meyer et al, 2003; Lepre et al, 2004]. Όσον αφορά τη δεύτερη προσέγγιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο τεχνικές NMR: STD (Saturation Transfer Difference) και Tr-Noesy (transferred nuclear Overhauser effect, tr-NOE) NMR, που βασίζονται στο φαινόμενο NOE. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται με ιδιαίτερη επιτυχία στην περίπτωση ενός υποκαταστάτη μικρού MB (όπως λιπαρού οξέος), ο οποίος ανταλλάσσεται γρήγορα με ένα μεγάλου MB υποδοχέα (πρωτεΐνη) (Εικόνα 2.1) [Cid et al, 2015].

Οι τεχνικές STD NMR, Tr-Noesy και διάχυσης (DOSY) προσφέρουν αρκετές δυνατότητες για τη μελέτη μορίων σε κατάσταση σύμπλεξης με υποδοχείς μεσαίας έως ασθενούς συγγένειας. Οι τεχνικές διάχυσης NMR παρέχουν πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων συμπλόκων όπως το μέγεθος και το σχήμα. Η χρήση τους είναι ιδιαίτερα σημαντική στη μελέτη συσσωματωμάτων που σχηματίζονται κατά την ισορροπία αυτο-σύνδεσης μονομερών προς σχηματισμό μακρομορίων. Τα

πλεονεκτήματα των τεχνικών STD NMR και Tr-NOesy, σε σχέση με την τεχνική DOSY, είναι ότι παρέχουν τη δυνατότητα εξαγωγής λεπτομερών δομικών χαρακτηριστικών όπως των δομικών χαρακτηριστικών του υποκαταστάτη σε κατάσταση πρόσδεσης [Meyer et al, 2003; Lepre et al, 2004; Cid et al, 2015].



Εικόνα 2.1. Διαμοριακή ισορροπία μεταξύ ενός υποκαταστάτη και ενός μακρομοριακού υποδοχέα για το σχηματισμό συμπλόκου με στοιχειομετρία 1:1. Η συνολική ταχύτητα ανταλλαγής της ισορροπίας είναι το άθροισμα των επιμέρους αντιδράσεων k_{on} και k_{off} [Cid et al, 2015].

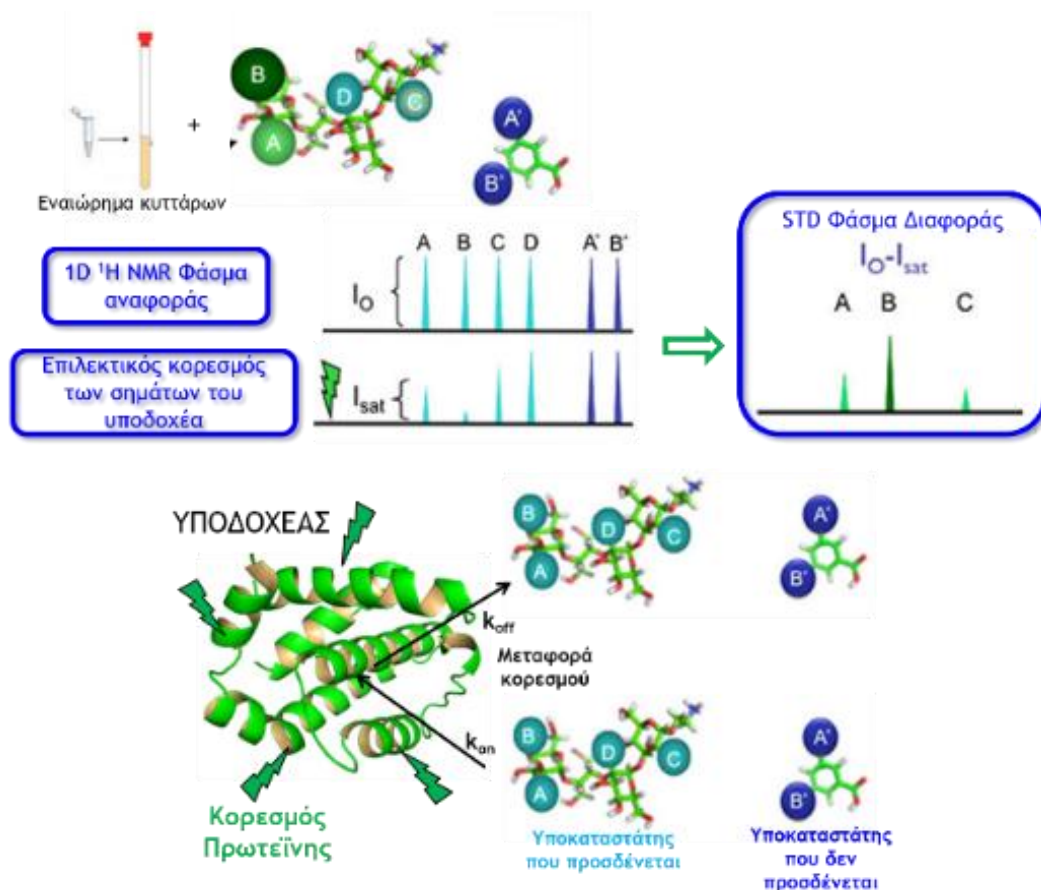
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η θέση του υποκαταστάτη στον υποδοχέα (επίτοπος πρόσδεσης) μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της τεχνικής STD NMR. Ωστόσο, επειδή οι συντονισμοί του υποδοχέα, δεν παρατηρούνται, καθώς η συγκέντρωση του υποκαταστάτη είναι 50-100 φορές μεγαλύτερη αυτής του υποδοχέα, άμεσες δομικές πληροφορίες για τη γεωμετρία των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στο σύμπλοκο παραμένουν ανέφικτες. Αυτό αποτελεί ένα εγγενές πρόβλημα διερεύνησης των δομικών χαρακτηριστικών του υποκαταστάτη, καθώς και των αποστάσεων μεταξύ του υποδοχέα και του υποκαταστάτη. Τη λύση στο πρόβλημα αυτό δίνει η τεχνική INPHARMA NMR (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping) που βασίζεται στην παρατήρηση των διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ δύο υποκαταστατών μικρού MB που συνδέονται ανταγωνιστικά σε έναν κοινό υποδοχέα. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο ένας εκ των υποκαταστατών σε κατάσταση ανταγωνισμού να είναι γνωστής διαμόρφωσης και θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα [Carlomango, 2012; Sanchez-Pedregal et al, 2005; Orts et al, 2008].

2.1.1 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR)

Η φασματοσκοπία STD NMR έχει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια στις βιβλιοθήκες σάρωσης διαφόρων κατηγοριών μορίων, όπως μεταβολιτών και φαρμάκων, στις θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων [Siebert et al, 2010; Mari et al, 2010]. Στηρίζεται στην παρατήρηση του πυρηνικού φαινομένου Overhauser των σημάτων συντονισμού του υποκαταστάτη. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική σάρωσης, για τον προσδιορισμό ενώσεων «οδηγών» ή ως εργαλείο για την ταυτοποίηση τμημάτων του υποκαταστάτη που μετέχουν στην πρόσδεση. Ο όρος «επίτοπος πρόσδεσης» χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπία NMR για τον χαρακτηρισμό των υδρογόνων του υποκαταστάτη που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη κατά την πρόσδεση. Με την τεχνική αυτή μπορούν να προκύψουν σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των τμημάτων του υποκαταστάτη που βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα λόγω μεταφοράς κορεσμού, ενώ είναι δυνατή και η χαρτογράφηση επιτόπων μειγμάτων ενώσεων βιολογικού ενδιαφέροντος [Mayer et al, 2001].

Το πείραμα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι σε έναν προσδεδεμένο υποκαταστάτη, με σταθερά αποσύνδεσης, K_D , μεταξύ 10^{-7} και 10^{-3} mol L⁻¹, υπάρχει ανταλλαγή μεταξύ της προσδεδεμένης και της ελεύθερης κατάστασης του μορίου. Βασικά, με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η αφαίρεση ενός φάσματος στο οποίο η πρωτεΐνη ακτινοβολείται επιλεκτικά σε μια περιοχή που περιέχει μόνο κορυφές συντονισμού της πρωτεΐνης (π.χ. από τα 0 έως -1 ppm) με ένταση κορυφών I_{SAT} (φάσμα NMR εντός συντονισμού), από ένα φάσμα που καταγράφεται χωρίς κορεσμό της πρωτεΐνης (εκτός συντονισμού), με ένταση κορυφών I_0 . Στο φάσμα διαφοράς ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) παραμένουν μόνο τα σήματα του υποκαταστάτη που έχουν λάβει μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη μέσω διάχυσης spin λόγω πυρηνικού φαινομένου Overhauser. Σε ενώσεις που μπορεί να βρίσκονται στο διάλυμα αλλά δεν προσδέονται στον υποδοχέα (πρωτεΐνη) δε λαμβάνει χώρα μεταφορά κορεσμού και τα σήματά τους θα έχουν την ίδια ένταση και στους δύο τύπους φασμάτων και, συνεπώς, δεν θα εμφανιστούν σήματα στο φάσμα διαφοράς. Η διαφορά στην ένταση των κορυφών λόγω μεταφοράς κορεσμού μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ανά ομάδα πρωτονίων και να

αποτελέσει ένδειξη του βαθμού πρόσδεσης σε μοριακό επίπεδο. Για ένα μόριο που προσδένεται σε έναν υποδοχέα, μόνο τα σήματα των πρωτονίων που βρίσκονται κοντά στην πρωτεΐνη ($\leq 5 \text{ \AA}$) και λαμβάνουν μεταφορά κορεσμού θα εμφανιστούν στο φάσμα διαφοράς και από αυτά, εκείνα που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη θα έχουν πιο έντονα σήματα λόγω πιο αποτελεσματικής μεταφοράς μαγνήτισης [Viegas et al, 2011].



Εικόνα 2.2. Ο μηχανισμός του πειράματος STD NMR.

Πιο αναλυτικά, σε ένα πείραμα NMR ^1H επιλέγεται η περιοχή όπου θα πραγματοποιηθεί η ακτινοβολή της πρωτεΐνης και πρέπει η συχνότητα αυτή να είναι μετατοπισμένη τουλάχιστον κατά 1,2 ppm σε σχέση με την πιο κοντινή συχνότητα συντονισμού του υποκαταστάτη (φάσμα εντός συντονισμού). Ο υποκαταστάτης που είναι προσδεδεμένος στην πρωτεΐνη θα κορεστεί επίσης και ο βαθμός κορεσμού εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής του στη θέση πρόσδεσης. Η αποσύνδεση του υποκαταστάτη θα έχει ως συνέπεια τη μεταφορά του κορεσμού στο διάλυμα όπου ο ελεύθερος υποκαταστάτης δίνει σήματα συντονισμού. Στα πρωτόνια του υποκαταστάτη που αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια της πρωτεΐνης μέσω ενός διαμοριακού tr NOE παρατηρείται μείωση της έντασης [Meyer et al, 2003].

Σε ένα δεύτερο πείραμα η συχνότητα ακτινοβολήσης επιλέγεται σε μια τιμή που να βρίσκεται μακριά από οποιοδήποτε σήμα είτε υποκαταστάτη είτε πρωτεΐνης, για παράδειγμα στα -40 ppm (φάσμα εκτός συντονισμού). Το φάσμα καταγράφεται και παράγει ένα τυπικό φάσμα NMR του μίγματος. Αφαίρεση των δύο φασμάτων οδηγεί σε ένα φάσμα διαφοράς στο οποίο είναι ορατά μόνο σήματα των πρωτονίων που ελαττώθηκαν λόγω μεταφοράς κορεσμού. Τα σήματα NMR των υπόλοιπων μορίων χωρίς ικανότητα πρόσδεσης απουσιάζουν [Meyer et al, 2003].

Στην περίπτωση πρόσδεσης η οποία είναι πολύ ισχυρή και συνεπώς οι ρυθμοί αποσύνδεσης, k_{off} , κυμαίνονται μεταξύ 0.1-0.01 s⁻¹, η μεταφορά κορεσμού στα ελεύθερα μόρια του υποκαταστάτη δεν είναι πολύ αποτελεσματική. Αυτό συμβαίνει συνήθως σε περιπτώσεις που οι τιμές K_D είναι μικρότερες του 1 nM ενώ αν είναι από 100 nM και πάνω η γρήγορη ανταλλαγή του ελεύθερου και του προσδεμένου υποκαταστάτη οδηγεί σε πολύ αποτελεσματική μεταφορά κορεσμού στα μόρια του διαλύματος. Η παρατηρούμενη ένταση των σημάτων του υποκαταστάτη στο φάσμα STD NMR δεν εξαρτάται, συνεπώς, μόνο από την ισχύ πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα STD NMR εξαρτώνται σημαντικά και από την ταχύτητα αποσύνδεσης διότι μεγάλη τιμή k_{off} επιφέρει μεγαλύτερη ένταση σημάτων. Όταν η πρόσδεση είναι πολύ ασθενής, η πιθανότητα του υποκαταστάτη να βρίσκεται στην θέση πρόσδεσης είναι πολύ μικρή και καταλήγει σε ιδιαίτερα ασθενή σήματα STD. Συνεπώς, η φασματοσκοπία STD NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη περιπτώσεων από ισχυρή πρόσδεση έως αλληλεπιδράσεων με $K_D \sim 10$ mM [Bhunia et al, 2012]. Μια άλλη σημαντική πληροφορία που μπορεί να προκύψει από την τεχνική αυτή είναι ο υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης. Από πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ υποκαταστατών για την ίδια θέση πρόσδεσης είναι δυνατόν να μετρηθεί με σχετική ευκολία η σταθερά αποσύνδεσης K_D , υπό την προϋπόθεση ότι η K_D του υποκαταστάτη-πρότυπο είναι γνωστή [Bleichner et al, 1998].

2.1.2 Φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect)

Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser έχει πολύ μεγάλη σημασία για τη μελέτη της στερεοχημείας και διαμόρφωσης των οργανικών μορίων. Βασίζεται στη μεταβολή της έντασης απορρόφησης ενός πρωτονίου όταν γειτονικό, μέσω χώρου, πρωτόνιο ακτινοβολείται. Ειδικότερα σε ένα σύστημα πυρήνων A και X, οι οποίοι δεν συζεύγγονται μέσω σταθεράς σύζευξης J, αλλαγή στην ένταση απορρόφησης του πυρήνα A επέρχεται όταν διαταράσσονται οι πληθυσμοί των ενεργειακών καταστάσεων spin του πυρήνα X. Η διατάραξη των πληθυσμών των ενεργειακών καταστάσεων του πυρήνα X είναι δυνατόν να γίνει με το λεγόμενο κορεσμό (saturation) της αντίστοιχης απορρόφησης, δηλαδή την ακτινοβολήσή της, έτσι ώστε να μην υπάρχει περίσσεια πυρήνων στη βασική κατάσταση. Ως συνέπεια, υπάρχουν οι ίδιοι πληθυσμοί στη βασική και διεγερμένη κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση, το όλο σύστημα των πυρήνων A και X επιχειρεί να επανέλθει σε μία κατάσταση θερμικής ισορροπίας και αυτό ακριβώς είναι το φαινόμενο NOE [Rosemary et al, 2013].

Εναλλακτικά, το φαινόμενο NOE θα μπορούσε να εκφραστεί ως η τάση του συστήματος των πυρήνων A και X να αντισταθμίσει μία τεχνητή μεταβολή που προκλήθηκε κατά την ακτινοβολήση ενός μέρους του συστήματος. Ως συνέπεια, επέρχεται μία μεταβολή πληθυσμού ενός άλλου μέρους του συστήματος έτσι ώστε τελικά να επικρατήσει και πάλι θερμική ισορροπία στο σύστημα.

Μία έκφραση του φαινομένου NOE δίνεται από τη παρακάτω εξίσωση:

$$\text{NOE}(n_{A(X)}) = \frac{I - I_0}{I_0}$$

όπου:

$\text{NOE}(n_{A(X)})$ είναι το NOE της απορρόφησης των πυρήνων A όταν οι πυρήνες X ακτινοβολούνται.

I_0 είναι η ένταση του σήματος των πυρήνων A σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας, δηλαδή πριν την ακτινοβολήση των πυρήνων X.

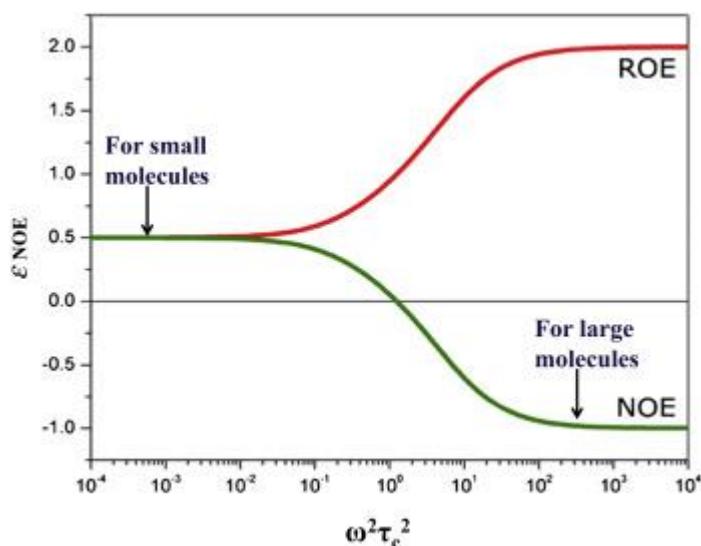
I είναι η ένταση του σήματος των πυρήνων A σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας του συστήματος μετά την ακτινοβολήση των πυρήνων X.

Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι το αποτέλεσμα NOE θα έχει θετική τιμή αν η νέα ένταση I των πυρήνων A είναι μεγαλύτερη της έντασης I_0 και θα έχει αρνητική τιμή αν η ένταση I είναι μικρότερη της έντασης I_0 [Rosemary et al, 2013]. Το φαινόμενο NOE, ως ολοκλήρωμα της απορρόφησης ενός πρωτονίου, έχει εξάρτηση r^{-6} από την απόσταση r μεταξύ δύο πρωτονίων που αλληλεπιδρούν μέσω χώρου. Έτσι παρέχει μία σημαντική μεθοδολογία μελέτης αποστάσεων ζεύγους πρωτονίων τα οποία στο χώρο είναι κοντά το ένα στο άλλο παρότι διαχωρίζονται από ένα μεγάλο αριθμό δεσμών. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική μελέτη των αποστάσεων, αλλά υπό κατάλληλες προϋποθέσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποσοτικές μετρήσεις αποστάσεων όπως, για παράδειγμα, η μέτρηση των εντάσεων NOE για σειρά διαφορετικών χρόνων ανάμιξης και στη συνέχεια συσχέτιση των εντάσεων ως προς την ένταση NOE δύο πρωτονίων γνωστής απόστασης [Rosemary et al, 2013].

Η μέγιστη τιμή του φαινομένου NOE εξαρτάται από τον μοριακό χρόνο συσχέτισης (ή από το αντίστροφο του ρυθμού της μοριακής περιστροφής), που κατά ένα μεγάλο μέρος καθορίζεται από το μοριακό βάρος της ένωσης και το ιξώδες του διαλύτη. Μεγαλύτερα μοριακά βάρη και υψηλό ιξώδες οδηγούν σε μεγαλύτερους χρόνους συσχέτισης. Έτσι, η τιμή NOE είναι θετική για μικρά μόρια ($MB < 600$), κοντά στο μηδέν για ενδιάμεσου μεγέθους μόρια ($MB 700-1200$) και αρνητική για μεγάλα μόρια π.χ. πολυπεπίδια και πρωτεΐνες ($MB >> 1200$). Σε περιπτώσεις μορίων ενδιάμεσου MB εφαρμόζεται η τεχνική ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) όπου όλες οι κορυφές είναι θετικές ανεξαρτήτως μοριακού βάρους [Rosemary et al, 2013].

Το φαινόμενο NOE αναπτύσσεται δυναμικά ως συνάρτηση του χρόνου και στη συνέχεια φθίνει λόγω διαδικασιών spin αποδιέγερσης κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάμιξης. Συνεπώς η τιμή NOE ως συνάρτηση του χρόνου ανάμιξης, για δεδομένο B_0 , παρουσιάζει μέγιστη τιμή η οποία εξαρτάται από το μοριακό βάρος και την απόσταση μεταξύ των πρωτονίων. Γενικά, στα βιομόρια μεγάλου M.B. το φαινόμενο NOE αναπτύσσεται γρήγορα ενώ στα μόρια μικρού M.B. πιο αργά. Για το λόγο αυτό οι μέγιστες τιμές NOE στα μεγάλου M.B. μόρια μετατοπίζονται σε μικρότερους χρόνους ανάμιξης. Μικρότερη απόσταση μεταξύ των πρωτονίων οδηγεί σε πιο γρήγορη εξέλιξη των NOE και μετατόπιση του μέγιστου NOE σε μικρότερους χρόνους ανάμιξης.

Σε κάθε πείραμα NOE ο καθορισμός του πειραματικού χρόνου ανάμιξης είναι η πιο σημαντική παράμετρος. Για μικρού M.B. μόρια, επιλέγεται ένας μέσος χρόνος ανάμιξης που μεγιστοποιεί το NOE, εκτός αν σκοπός είναι η μέτρηση της απόστασης με ακρίβεια. Για μεγάλου M.B. μόρια, οι χρόνοι ανάμιξης πρέπει να είναι μικροί έτσι ώστε η ανάπτυξη του φαινομένου NOE να βρίσκεται στην περιοχή της γραμμικής συσχέτισης και να αποφευχθεί το φαινόμενο της διάχυσης των spin (spin diffusion).



Εικόνα 2.3. Εξάρτηση του φαινομένου NOE από το γινόμενο $\omega_0\tau_c$, όπου, ω_0 είναι η συχνότητα περιστροφής Larmor του πυρήνα και τ_c ο χρόνος συσχέτισης των πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου. Τα NOE μορίων μικρού M.B. και μεγάλου M.B. έχουν σήματα αντίθετης φάσης.

Στην Εικόνα 2.3 απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης του φαινομένου NOE ενός συστήματος δύο πυρήνων ως συνάρτηση του γινομένου $\omega_0\tau_c$. Διακρίνονται τρεις περιοχές:

1. Γρήγορη ταχύτητα μοριακής περιστροφής ($\omega_0\tau_c \ll 1$), $\text{NOE (max)} = 0.5$
2. Πολύ αργή ταχύτητα μοριακής περιστροφής ($\omega_0\tau_c > 1$), $\text{NOE} = -1$
3. Ενδιάμεση ταχύτητα μοριακής περιστροφής ($\omega_0\tau_c \sim 1$), όπου το φαινόμενο NOE αλλάζει πρόσημο και καθίσταται ίσο με μηδέν. Η ενδιάμεση περιοχή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το μοριακό βάρος του μορίου, το ιξώδες του διαλύματος, τη θερμοκρασία, την ένταση του πεδίου B_0 (συχνότητα ω_0) και, μερικές φορές, από το pH του διαλύματος.

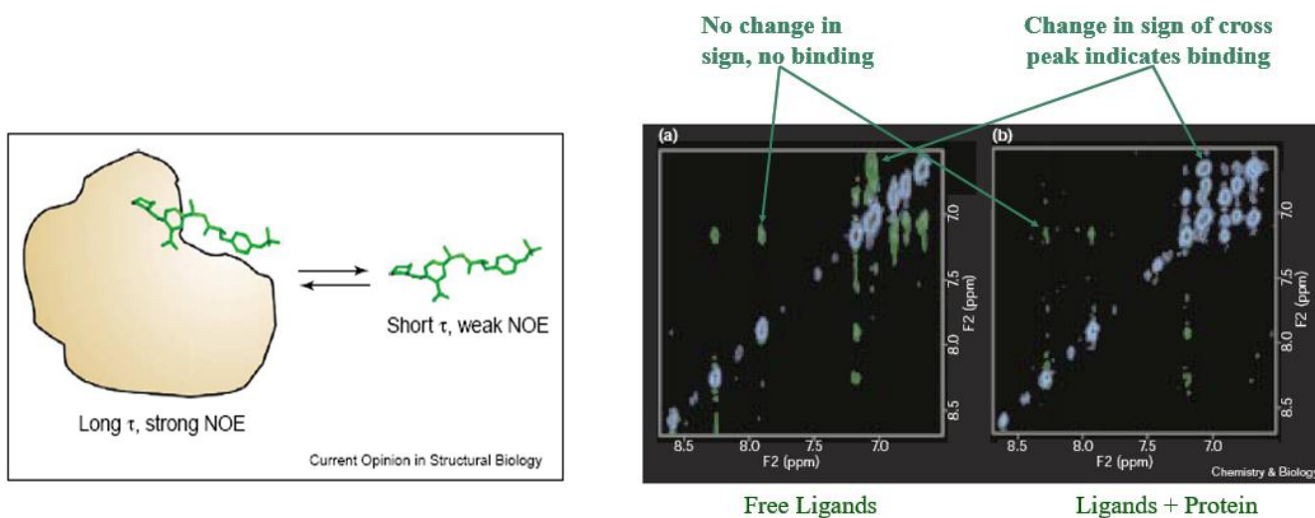
2.1.3 Χρήση του μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transferred nuclear Overhauser effect, tr-NOE) για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό της πρόσδεσης υποκαταστάτη (tr-Noesy)

Το φαινόμενο Tr-NOE, το οποίο ανακαλύφθηκε από τον BothnerBy [Bothnerby et al, 1979] χρησιμοποιήθηκε ευρέως από τον Feeney [Albrand et al, 1979] και τους συνεργάτες του και άλλους επιστήμονες [Arepalli et al, 1995] διότι επιτρέπει τη μελέτη της βιοδραστικής διαμόρφωσης ενός υποκαταστάτη μικρού M.B. κατά την αλληλεπίδρασή του με ένα μακρομοριακό υποδοχέα (πρωτεΐνη). Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης ο υποκαταστάτης, συνήθως, υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωσή του κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα. Η γνώση της βιοδραστικής διαμόρφωσης ενός υποκαταστάτη στο βιολογικό του στόχο είναι προφανές ότι έχει καθοριστικό ρόλο στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων.

Το πείραμα αυτό βασίζεται στη μεγάλη διαφορά των ρυθμών διαμήκους (longitudinal) αποδιέγερσης T_1 μεταξύ των μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, M.B., μορίων. Όπως τονίστηκε παραπάνω, οι μικρού M.B. υποκαταστάτες χαρακτηρίζονται από μικρές θετικές τιμές NOE ενώ οι μεγάλου M.B. υποδοχείς παρουσιάζουν αρνητικές τιμές (Εικόνα 2.3). Για έναν υποκαταστάτη με γρήγορη ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης και της προσδεδεμένης μορφής η παρατηρούμενη τιμή του ρυθμού διαμήκους αποδιέγερσης θα είναι ο μέσος όρος. Η φασματοσκοπική αυτή τεχνική έχει πλήθος εφαρμογών τα τελευταία χρόνια όπως στη μελέτη πρωτεϊνικών συμπλόκων, στην ανακάλυψη ενώσεων «οδηγών» για τον σχεδιασμό φαρμάκων, στη μελέτη πεπτιδίων που προσδέονται σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς κ.α. [Gizachew et al, 2011].

Όταν τα μόρια του υποκαταστάτη προσδέονται σε πρωτεΐνες-υποδοχείς τα NOE υφίστανται δραστικές αλλαγές που παρέχουν τη δυνατότητα παρατήρησης των μεταφερόμενων NOE (tr-NOE). Οι αλλαγές αυτές είναι η βάση για μια ποικιλία πειραματικών διαδικασιών ανίχνευσης και χαρακτηρισμού της ικανότητας πρόσδεσης. Η παρατήρηση των tr-NOE βασίζεται, όπως προαναφέρθηκε, στους διαφορετικούς χρόνους μοριακής περιστροφής (molecular correlation time) τ_c των ελεύθερων και προσδεδεμένων μορίων. Μόρια μικρού ή μεσαίου μοριακού βάρους (M.B. < 1000-2000) έχουν μικρό χρόνο συσχέτισης τ_c και ως συνέπεια έχουν θετικά NOE, μηδενικά NOE, ή πολύ μικρά αρνητικά NOE που εξαρτώνται από το μοριακό τους βάρος, το σχήμα και την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Μόρια μεγάλου μοριακού

βάρους όμως έχουν αρνητικά σήματα NOE (Εικόνα 2.3). Όταν ένα μόριο μικρού MB (υποκαταστάτης) είναι προσδεμένο σε μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνη-υποδοχέα συμπεριφέρεται ως μέρος αυτού του μακρομορίου και έτσι υιοθετεί την αντίστοιχη συμπεριφορά NOE η οποία έχει ως συνέπεια την ύπαρξη αρνητικών t_1 -NOE που αντανakλούν τη διαμόρφωσή του σε κατάσταση πρόσδεσης (Εικόνα 2.4) [Post et al, 2003; Fejzo et al, 1999]. Έτσι η πρόσδεση του υποκαταστάτη σε πρωτεΐνη-υποδοχέα μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί από το πλήθος, το μέγεθος και το πρόσημο των παρατηρούμενων NOE [Meyer et al, 2003].



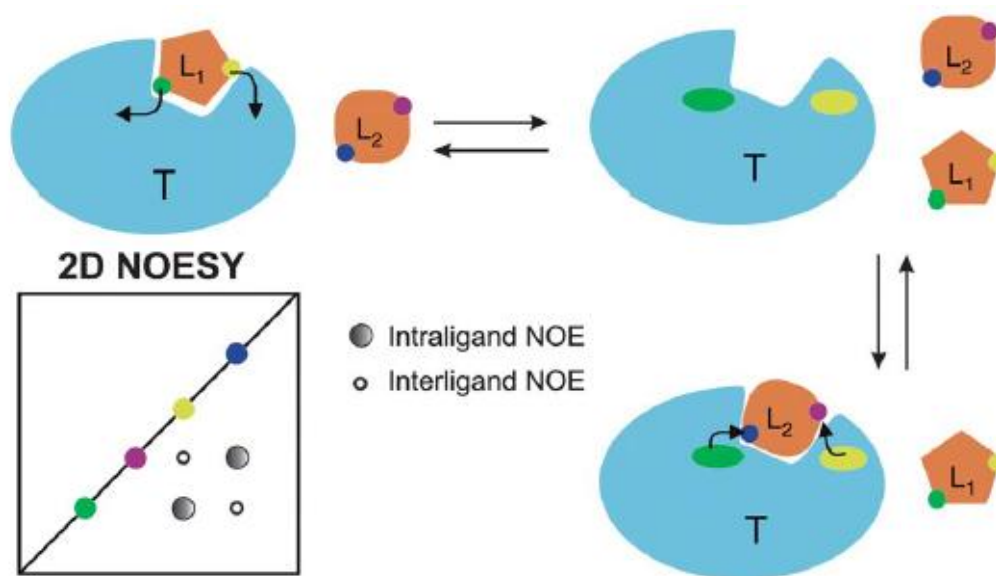
Εικόνα 2.4. Αλληλεπίδραση αναστολέα μικρού μοριακού βάρους (MW) με πρωτεϊνικό στόχο μεγάλου μοριακού βάρους επιφέρει σημαντική μεταβολή στη φάση των NOE κορυφών διασταύρωσης [Post et al, 2003; Fejzo et al, 1999].

2.1.4 Χαρτογράφηση του προσανατολισμού των υποκαταστατών στη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα μέσω δύο ανταγωνιστικά προσδεδεμένων υποκαταστατών με τη χρήση της τεχνικής INPHARMA NMR (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping)

Στο σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή, ο σχετικός προσανατολισμός δύο ανταγωνιστών υποκαταστατών στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο σχεδιασμό υψηλής συγγένειας υποψήφιων φαρμάκων. Σε πολλές περιπτώσεις, ο προσανατολισμός ενός υποκαταστάτη στη θέση πρόσδεσης είναι γνωστός, για παράδειγμα, από την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ή από τα δεδομένα μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (FRET). Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι επιθυμητό να αναπτυχθεί μια τεχνική που να επιτρέπει τον προσδιορισμό του τρόπου πρόσδεσης και, συνεπώς, του φαρμακοφόρου μοντέλου για έναν δεύτερο ανταγωνιστή υποκαταστάτη. Έτσι, τα διαμοριακά σήματα NOE θα μπορούσαν να παρέχουν την πειραματική βάση για μια τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για οποιονδήποτε συνδυασμό υποκαταστατών που προσδένονται σε έναν κοινό υποδοχέα. Η τεχνική αυτή είναι η INPHARMA NMR (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping) [Sanchez-Pedregal et al, 2005; Carlomango, 2012; Orts et al, 2008].

Η τεχνική INPHARMA NMR βασίζεται στην παρατήρηση διαμοριακών NOE μεταξύ δύο υποκαταστατών L_1 και L_2 που προσδένονται ανταγωνιστικά σε ένα μακρομοριακό υποδοχέα T (Εικόνα 2.5). Το διάλυμα που μελετάται περιέχει δύο υποκαταστάτες L_1 και L_2 σε περίσσεια 30-100 φορές ως προς τον υποδοχέα-στόχο T . Καθώς οι υποκαταστάτες στο διάλυμα βρίσκονται σε συγκέντρωση της τάξεως των mM, τέτοια NOE δεν προέρχονται από μια άμεση μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των δύο υποκαταστατών, αλλά μάλλον από μια διαδικασία διάχυσης spin που διαμεσολαβείται από τα πρωτόνια της θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα. Συνεπώς, εξαρτώνται από τις ειδικές αλληλεπιδράσεις καθενός από τους δύο υποκαταστάτες με την πρωτεΐνη. Κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάμιξης του πειράματος NOESY, ο L_1 προσδένεται στον υποδοχέα και τα πρωτόνια του (H_{L1}) μεταφέρουν μαγνήτιση στα πρωτόνια του υποδοχέα (H_T). Αν το k_{off} του συμπλόκου TL_1 είναι γρήγορο ($> 100-1000s^{-1}$), ο L_1 αποσυνδέεται από τον υποδοχέα κατά τη διάρκεια του ίδιου χρόνου ανάμιξης και η θέση δέσμευσης παραμένει ελεύθερη για την πρόσδεση του L_2 . Η μαγνήτιση που μεταφέρθηκε από το H_{L1} στο H_T μπορεί τώρα να μεταφερθεί από το H_T

στο H_{L2} . Αυτό οδηγεί σε μία διαμοριακή NOE κορυφή συσχέτισης μεταξύ των H_{L1} και H_{L2} αν και οι L_1 και L_2 δεν μπορούν να βρεθούν κοντά μέσω χώρου κατά τη διάρκεια του πειράματος NMR. Η διαμοριακή κορυφή NOE, συνεπώς, μεταξύ των πρωτονίων H_{L1} και H_{L2} , είναι το αποτέλεσμα της διαμεσολαβούμενης διάχυσης spin μέσω του πρωτονίου H_T του υποδοχέα. Είναι σαφές ότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκύψει μόνον εάν τα πρωτόνια H_{L1} και H_{L2} είναι και τα δύο κοντά στο πρωτόνιο H_T στα δύο σύμπλοκα TL_1 και TL_2 αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, ο αριθμός τέτοιων διαμοριακών σημάτων NOE περιγράφει το σχετικό προσανατολισμό των δύο υποκαταστατών στη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα. Τέτοια σήματα NOE μπορούν να παρατηρηθούν για σύμπλοκα με K_d της τάξεως των μM έως mM ($k_{\text{off}} > 100\text{--}1000\text{s}^{-1}$) [Carlomango, 2012].



Εικόνα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου της τεχνικής INPHARMA NMR. Στην αρχή του χρόνου ανάμιξης, ο υποκαταστάτης L_1 προσδένεται στον υποδοχέα T και το πρωτόνιό του H_{L1} (κίτρινο / πράσινο) μεταφέρει μαγνήτιση στο πρωτόνιο H_T (κίτρινο / πράσινο) του υποδοχέα. Καθώς ο L_1 είναι ένας υποκαταστάτης με χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης, αποσυνδέεται από τον υποδοχέα κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάμιξης και η θέση του καταλαμβάνεται από τον L_2 . Σε αυτό το σημείο η μαγνήτιση που είχε μεταφερθεί στο H_T από το H_{L1} (κίτρινο / πράσινο) μπορεί να μεταφερθεί στο H_{L2} του L_2 (μωβ / μπλε). Η διαδικασία αυτή διάχυσης spin μέσω του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός σήματος NOE μεταξύ του H_{L1} (κίτρινο / πράσινο) και του H_{L2} (μωβ / μπλε) στο φάσμα 2D NOESY.

Τα INPHARMA NOE δεν πρέπει να συγχέονται με τα NOE (ILOE) που εμφανίζονται μεταξύ δύο υποκαταστατών που προσδένονται ταυτόχρονα σε γειτονικές ή μερικώς επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης. Στην τεχνική INPHARMA NMR, οι δύο υποκαταστάτες L_1 και L_2 ούτε βρίσκονται κοντά μέσω χώρου ούτε προσδένονται ταυτόχρονα στην πρωτεΐνη. Αντιθέτως, οι δύο υποκαταστάτες προσδένονται στην

πρωτεΐνη ανταγωνιστικά και διαδοχικά και τα παρατηρούμενα NOE είναι συνέπεια της διάχυσης spin που διαμεσολαβείται από τα πρωτόνια της πρωτεΐνης [Carlomango, 2012; Sanchez-Pedregal et al, 2005].

Αρχικά, η μέθοδος αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό του τρόπου πρόσδεσης του L_2 όταν είναι γνωστός ο τρόπος πρόσδεσης του L_1 (σχετικός τρόπος πρόσδεσης). Ωστόσο, η τεχνική INPHARMA NMR, σε ευνοϊκές περιπτώσεις, μπορεί να επιτρέψει τη *de novo* περιγραφή του τρόπου πρόσδεσης τόσο του L_1 όσο και του L_2 (απόλυτος τρόπος πρόσδεσης). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την ανακάλυψη φαρμάκων με βάση τη δομή, οι πειραματικές πληροφορίες που προέρχονται από τα INPHARMA NOE χρησιμοποιούνται για την επιλογή του σωστού τρόπου πρόσδεσης μεταξύ πολλών πιθανών προσανατολισμών που λαμβάνονται με διαδικασίες υπολογισμών docking [Carlomango, 2012].

Η Carlomango με τους συνεργάτες της [Sanchez-Pedregal et al, 2005; Carlomango, 2012; Orts et al, 2008] έχουν παρατηρήσει INPHARMA NOE συμπλόκων διαφόρων μεγεθών που κυμαίνονται από μικρές πρωτεΐνες (~30 kDa) έως μεγάλα σύμπλοκα (π.χ. ριβόσωμα). Οι πειραματικές παράμετροι της τεχνικής INPHARMA-NOESY πρέπει να είναι βελτιστοποιημένες για το κάθε σύμπλοκο που μελετάται. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος ανάμιξης (τ_m) που μεγιστοποιεί την ένταση των INPHARMA NOE εξαρτάται από το χρόνο μοριακής συσχέτισης και, ως εκ τούτου, από το μέγεθος του συμπλόκου. Ως γενικός κανόνας, για έναν υποδοχέα 400 kDa, το μέγιστο INPHARMA NOE λαμβάνεται για $\tau_m < 100$ ms, ενώ για έναν υποδοχέα 20 kDa, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν χρόνοι ανάμιξης της τάξης των 500 ms ή μεγαλύτεροι. Κρίσιμης σημασίας είναι το σχετικό μέγεθος των ρυθμών διάστασης για L_1 και L_2 , k_{1off} και k_{2off} . Σαφώς, η βέλτιστη κατάσταση για τη μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των δύο υποκαταστατών είναι όταν $k_{1off} = k_{2off}$ και οι δύο υποκαταστάτες παραμένουν στη θέση πρόσδεσης για ίσο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό μεταφοράς μαγνήτισης μέσω INPHARMA NOE παρατηρείται για τιμές k_{1off} / k_{2off} έως 8, ενώ για $k_{1off} / k_{2off} > 10$ τα INPHARMA NOE γίνονται ολοένα και μικρότερα [Carlomango, 2012].

2.2 Φασματοσκοπία in-cell NMR

Οι περισσότερες βιολογικές οδοί ελέγχονται από μακρομόρια. Προκειμένου να μελετηθεί η δομή και η λειτουργία των βιομορίων, συνήθως εφαρμόζονται μελέτες σε επίπεδο *in vitro*. Στη συνέχεια, τα δεδομένα που προκύπτουν προεκβάλλονται στο φυσικό κυτταρικό περιβάλλον. Αν και τέτοιες προσεγγίσεις παρέχουν πληθώρα χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με τη σχέση δομής – λειτουργίας βιομορίων, παραμένει το βασικό ερώτημα εάν *in vivo* η βιολογική δράση παραμένει η ίδια λόγω παρουσίας πληθώρας αλληλεπιδράσεων εντός των κυττάρων [Luchinat et al, 2016; Luchinat et al, 2017].

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η φασματοσκοπία NMR έχει εξελιχθεί σε ένα πολύ σημαντικό αναλυτικό εργαλείο στις χημικές και βιολογικές επιστήμες διότι παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού δομών βιολογικών μακρομορίων υπό σχεδόν φυσιολογικές συνθήκες. Η δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων in-cell NMR επιτρέπει μελέτες βιολογικών μακρομορίων στο φυσικό τους περιβάλλον και έχει δημιουργήσει νέες μεθόδους άμεσης διερεύνησης αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιολογικών μακρομορίων και άλλων βιοργανικών ενώσεων ή φαρμάκων σε ζωντανά κύτταρα [Dotsch, 2019].

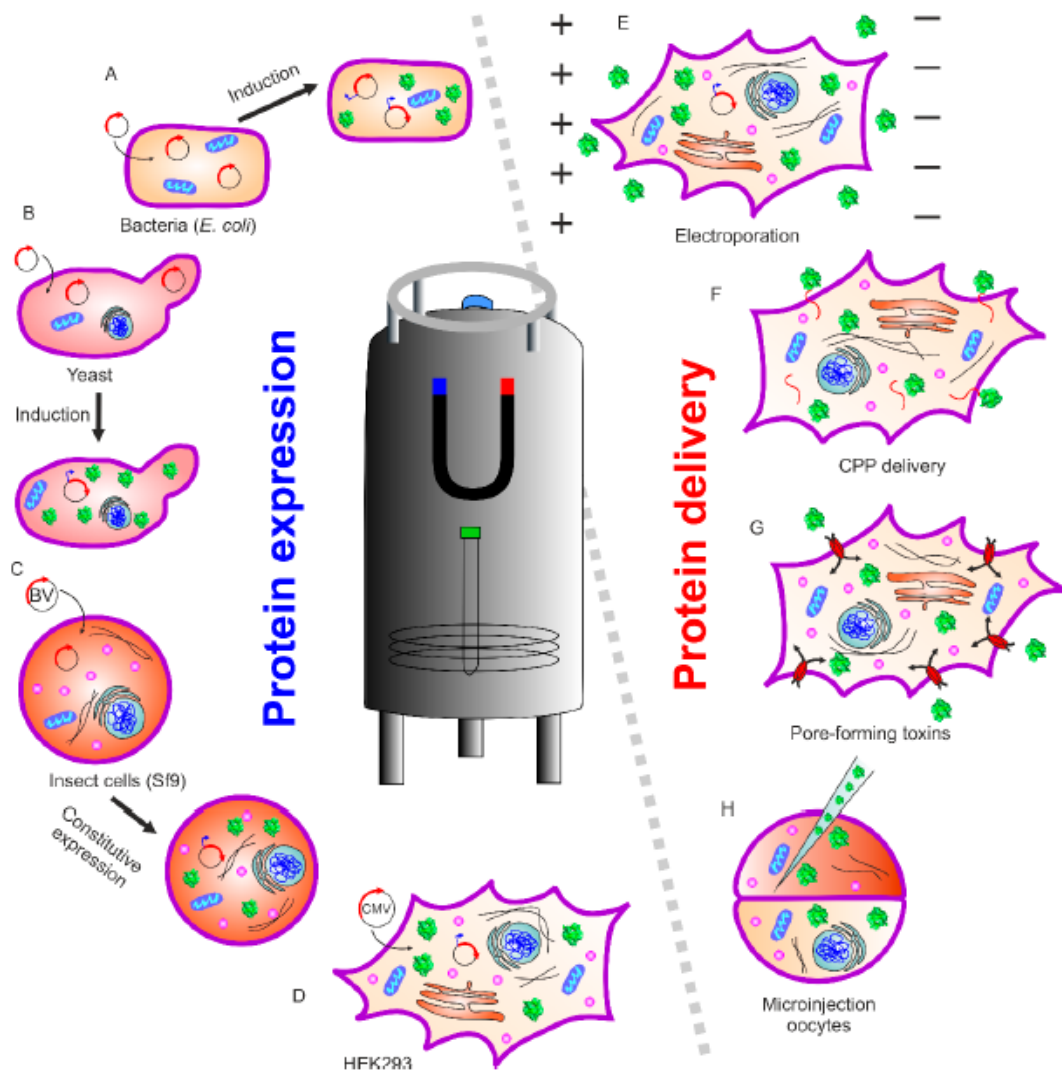
Η φασματοσκοπία in-cell NMR παρέχει τη δυνατότητα άμεσου προσδιορισμού αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και υποκαταστάτη-πρωτεΐνης στο κυτταρικό περιβάλλον. Επομένως, η μεθοδολογία αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με τις *in vitro* τεχνικές όπως η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία χαμηλής θερμοκρασίας, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X και η φασματομετρία μάζας ανταλλαγής υδρογόνου-δευτερίου. Παρέχει, συνεπώς, πληθώρα πληροφοριών όπως αλλαγές στη δομή ή/και τη δυναμική μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης μορφής. Η φασματοσκοπία in-cell NMR είναι μια ιδανική τεχνική για τη μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών των βιομορίων, της λειτουργίας τους, και των αλληλεπιδράσεων τους ενώ παραμένουν στο φυσικό τους κυτταρικό περιβάλλον, όπως αναλύθηκε πρόσφατα [Luchinat et al, 2016; Luchinat et al, 2017; Luchinat et al, 2018].

Η τεχνική αυτή είναι μη επεμβατική και παρέχει δομικές και βιοχημικές λεπτομέρειες των μακρομορίων σε ζωντανά κύτταρα σε ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας και του pH. Οι μέθοδοι NMR είναι μέθοδοι

συνόλου, που σημαίνει ότι το αποτέλεσμα υπολογίζεται κατά μέσο όρο από τις πληροφορίες των δειγμάτων που προέρχονται από διάφορα μόρια σε μεγάλο αριθμό κυττάρων. Έτσι, οι πληροφορίες που λαμβάνονται αντανακλούν τις ιδιότητες των μορίων χωρίς υποκυτταρική ανάλυση [Kumar et al, 2019]. Ιστορικά, η τεχνική *in vivo* NMR ξεκίνησε με μελέτες μικρών μορίων εντός ζωντανών οργανισμών/κυττάρων. Μια από τις πρώτες *in-cell* NMR προσεγγίσεις για τη λήψη πληροφοριών υψηλής ανάλυσης μακρομορίων (π.χ. πρωτεϊνών) μέσα σε ζωντανά κύτταρα περιγράφηκε από τον Serber και τους συνεργάτες του [Serber et al, 2001; Serber et al, 2001] (Εικόνα 2.6). Στη μελέτη, οι συγγραφείς επέλεξαν δύο σφαιρικές διαλυτές πρωτεΐνες, την N-τερματική περιοχή της βακτηριακής αναγωγάσης ιόντων υδραργύρου (Nmer) A και την ανθρώπινη καλμοδουλίνη, ώστε να διερευνηθούν με τη χρήση *in-cell* NMR. Στην προσέγγισή τους, χρησιμοποίησαν συμβατική έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και ιστοτοπική σήμανση σε βακτηριακά κύτταρα, ενώ λήφθηκαν υπόψιν διάφορες παράμετροι όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο χρόνος επαγωγής, η βιωσιμότητα των κυττάρων, ο τύπος ιστοτοπικής σήμανσης και η διεύρυνση των σημάτων NMR. Η έκφραση της πρωτεΐνης βελτιστοποιήθηκε ώστε να ληφθούν σήματα επαρκούς έντασης και πολύ εντονότερα αυτών των άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών [Serber et al, 2001; Serber et al, 2001].

Ορισμένα σημαντικά τεχνικά χαρακτηριστικά που προκύπτουν από τη χρήση της φασματοσκοπίας *in-cell* NMR είναι τα ακόλουθα:

- (i) Για τη διάκριση των συντονισμών του μακρομορίου που μελετάται, σε σχέση με υπόλοιπα μακρομόρια του κυττάρου, είναι απαραίτητη η υπερέκφραση και η επισήμανσή του με ισότοπα όπως ^{15}N και ^{13}C .
- (ii) Ένας σημαντικός περιορισμός είναι ότι θα πρέπει να λαμβάνονται φάσματα NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας. Συνεπώς, τα μακρομόρια θα πρέπει να έχουν μικρό χρόνο μοριακής περιστροφής και για το λόγο αυτό το ιξώδες στο εσωτερικό των κυττάρων είναι μια σημαντική παράμετρος.
- (iii) Ο βαθμός επιβίωσης των κυττάρων στο σωληνάριο NMR είναι σημαντικός περιοριστικός παράγοντας διότι επηρεάζεται από έλλειψη οξυγόνου ή θρεπτικών ουσιών [Reckel et al, 2005].



Εικόνα 2.6. Σχηματική επισκόπηση διαφορετικών βιβλιογραφικών προσεγγίσεων στη φασματοσκοπία in-cell NMR. (Αριστερά) Ενδογενώς εκφρασμένη και ισοτοπικά επισημασμένη πρωτεΐνη μπορεί να επιτευχθεί με μεταφορά του φορέα έκφρασης που περιέχει το γονίδιο ενδιαφέροντος σε (A) βακτήρια, (B) ζυμομύκητες, (C) κυτταρικές σειρές εντόμων και (D) θηλαστικά κύτταρα. (Δεξιά) Ένας εναλλακτικός τρόπος in-cell NMR, όπου η ισοτοπικά επισημασμένη πρωτεΐνη παρασκευάζεται εξωγενώς ακολουθούμενη από μεταφορά σε ευκαρυωτικά κύτταρα με διαφορετικές μεθόδους όπως (E) ηλεκτροπόρωση, (F) σύνδεση πρωτεΐνης με πεπτιδία που διεισδύουν στα κύτταρα (CPP), (G) μεταφορά πρωτεΐνης μέσω σχηματισμού πόρων τοξινών, και (H) μεταφορά μέσω μικροέγχυσης σε ωκύτταρα *Xenopus laevis* [Kumar et al, 2019].

Η μελέτη βιολογικών μακρομορίων σε κυτταρικά συστήματα απαιτεί επισήμανση ώστε να είναι δυνατή η επιλεκτική ταυτοποίηση των υπό διερεύνηση μακρομορίων σε ένα περιβάλλον με πληθώρα άλλων μακρομορίων αλλά και μικρού M.B. μεταβολιτών [Serber et al, 2001; Serber et al, 2001]. Τα μακρομόρια, συνεπώς, πρέπει να επισημανθούν είτε με ενεργά ισότοπα NMR ή με παραμαγνητικούς ανιχνευτές για μελέτες in-cell EPR [Igarashi et al, 2010; Azarkh et al, 2013; Qi et al,

2014]. Δύο διαφορετικοί τρόποι είναι δυνατοί για να επιτευχθεί επισήμανση στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Η πρώτη μέθοδος είναι η υπερέκφραση του υπό μελέτη μακρομορίου εντός των κυττάρων. Στα αρχικά πειράματα in-cell NMR χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος υπερέκφρασης με βακτηριακά κύτταρα [Serber et al, 2001; Serber et al, 2001]. Ωστόσο, επιτεύχθηκε υπερέκφραση και με άλλους τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών ευκαρυωτικών κυττάρων (ζυμομύκητων [Bertrand et al, 2012], κυττάρων εντόμων [Hamatsu et al, 2013] και κυττάρων θηλαστικών [Banci et al, 2013]). Η υπερέκφραση, ιδιαίτερα στα βακτήρια, είναι εύχρηστη διότι γίνεται χρήση πολύ καλά καθιερωμένων πρωτοκόλλων. Δημιουργεί, όμως, μη φυσιολογικές συνθήκες λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων εμπλουτισμένων ενώσεων που απαιτούνται για τη λήψη επιτυχών πειραμάτων NMR, και παράγει μεγάλο αριθμό σημάτων υποβάθρου όχι μόνο του υπό μελέτη μακρομορίου αλλά και πληθώρας άλλων κυτταρικών συστατικών [Dotsch, 2019].

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ισοτοπικής επισήμανσης πρωτεϊνικών δειγμάτων για την πραγματοποίηση in-cell NMR. Η επισήμανση με ^{15}N είναι η πιο χρήσιμη και αποτελεί την πρώτη επιλογή για τις περισσότερες μελέτες (Εικόνα 2.6A,B). Η μεγαλύτερη φυσική αφθονία του ^{13}C στα βιομόρια σε σύγκριση με το ^{15}N , καθιστά αυτό το ισότοπο ως μη κατάλληλη τροποποίηση για μελέτες in-cell NMR. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μεγάλος αριθμός βιομορίων έχει ως αποτέλεσμα στο φάσμα να μην μπορούν να διακριθούν οι κορυφές του υπό μελέτη βιομορίου εξαιτίας του κυτταρικού υποβάθρου. Μία εναλλακτική προσέγγιση στον εμπλουτισμό με ^{13}C είναι η ειδική επισήμανση αμινοξέων [Serber et al, 2001]. Η επισήμανση της μεθυλο- ^{13}C μεθειονίνης ήταν μια επιτυχημένη στρατηγική για την ανίχνευση ανθράκων πλευρικής αλυσίδας πολύ πάνω από το κυτταρικό υπόβαθρο [Serber et al, 2004]. Μία περαιτέρω προσέγγιση είναι η ενσωμάτωση μη φυσικών αμινοξέων που περιέχουν ^{19}F η οποία αποτελεί μία χρήσιμη μεθοδολογία για τη διερεύνηση της δυναμικής των πρωτεϊνών στο κυτταρικό περιβάλλον. Το πλεονέκτημα της επισήμανσης πρωτεϊνών με ^{19}F είναι ότι το φάσμα in-cell NMR είναι ουσιαστικά απαλλαγμένο από το υπόβαθρο [Li et al, 2010; Ye et al, 2013].

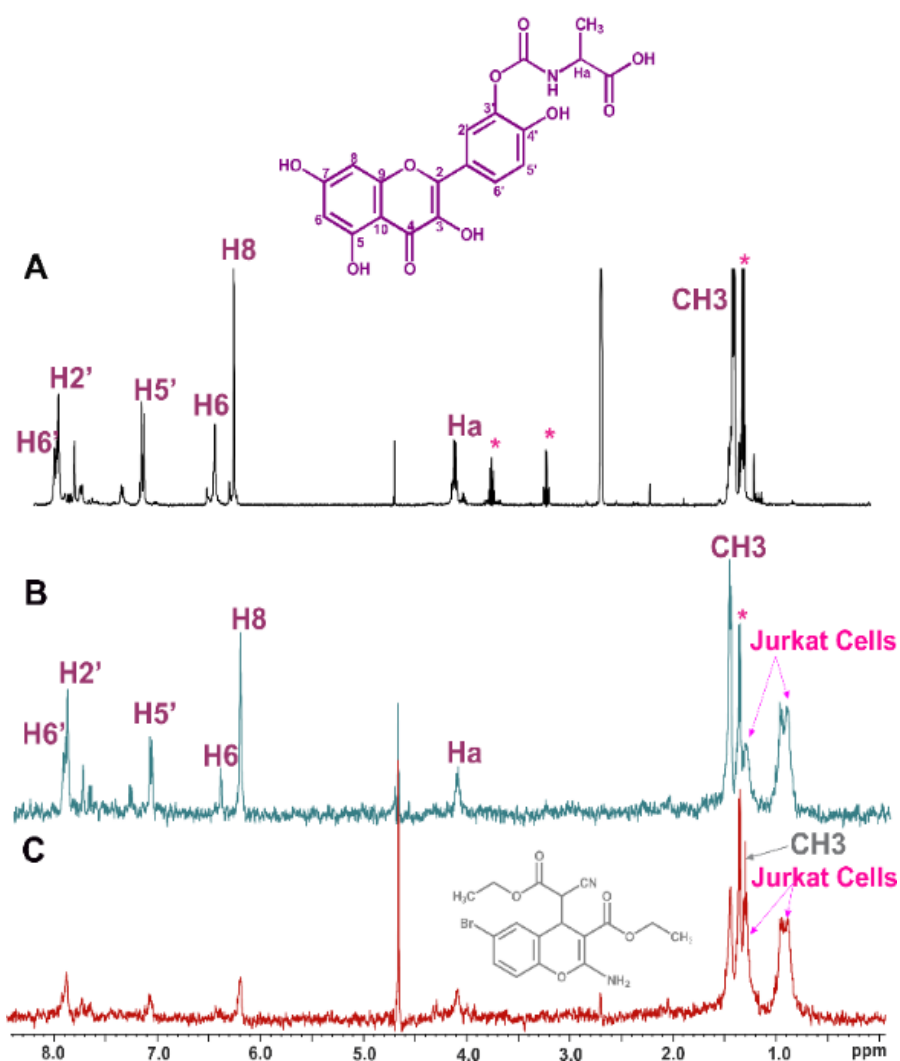
Μια διαφορετική στρατηγική που προτάθηκε είναι η καταστολή του υψηλού υποβάθρου με επιλεκτική έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με την ταυτόχρονη καταστολή της έκφρασης όλων των άλλων πρωτεϊνών του ξενιστή. Αυτή η καταστολή

της έκφρασης του γονιδίου ξενιστή μπορεί να επιτευχθεί με δύο διαφορετικές τεχνικές. Η πρώτη βασίζεται στη χρήση του φαρμάκου ριφαμπικίνη, το οποίο αναστέλλει τη βακτηριακή RNA πολυμεράση [Campbell et al, 2001]. Η δεύτερη προσέγγιση είναι η αποικοδόμηση όλων των μορίων mRNA που περιέχουν αλληλουχίες ACA από μια mRNA ιντερφεράση [Suzuki et al, 2005].

Μία από τις τελευταίες εφαρμογές της φασματοσκοπίας in-cell NMR που έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς και της φαρμακευτικής έρευνας είναι η χρήση της σε μελέτες ευκαρυωτικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς τα προκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένο εύρος βιολογικών δράσεων και πολλές κυτταρικές διαδικασίες που καθορίζουν σημαντικά ζητήματα στη μοντέρνα βιολογική έρευνα απουσιάζουν από τα βακτήρια. Μία τεχνική για την εφαρμογή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα είναι η υπερέκφραση επισημασμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα και μετά τον καθαρισμό, μεταφορά στο εσωτερικό των κυττάρων με μικροέγχυση ή με άλλες τεχνικές μεταγωγής φορέων. Η μεθοδολογία αυτή περιλαμβάνει ορισμένους περιορισμούς όπως π.χ. η εφαρμογή της σε περιορισμένο τύπο ευκαρυωτικών κυττάρων, η τοπολογία της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, η δομή της ή οι πιθανές τροποποιήσεις που φέρει, αλλά αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική με σημαντικές μελλοντικές εφαρμογές [Kumar et al, 2019].

Η φασματοσκοπία in-cell NMR εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε ευκαρυωτικά κύτταρα στο σύστημα ωοκυττάρων *Xenopus laevis* (Εικόνα 2.6H) [Sakai et al, 2006; Selenko et al, 2006; Serber et al, 2006]. Αυτό επιτεύχθηκε με την παρασκευή πρωτεΐνης, με έγχυση στα ωοκύτταρα, με αποτέλεσμα υψηλή επιλεκτικότητα επισήμανσης και σχεδόν καθόλου κυτταρικό υπόβαθρο. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε ένα εξαιρετικό εργαλείο για τη μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών. Επιπλέον, μία επιτυχημένη μελέτη πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή πρωτεϊνών στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa με εισαγωγή επισημασμένων πρωτεϊνών συνδεδεμένων σε κυτταρικά διαπερατά πεπτίδια. Τα πεπτίδια απελευθέρωσαν τις πρωτεΐνες είτε με ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα ή με αυτόνομη αναγωγική διάσπαση. Στη συνέχεια λήφθηκαν πειράματα 2D ^1H - ^{15}N HSQC με στόχο τη μελέτη σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ της FKBP12 και χορηγούμενων ανοσοκατασταλτικών [Inomata et al, 2009].

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που προκύπτει από την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα μελέτης και χαρακτηρισμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποκαταστατών και διαμεμβρανικών υποδοχών, όπως οι ιντεγκρίνες και οι υποδοχείς τους. Σε ένα ολοένα αυξανόμενο αριθμό μελετών γίνεται χρήση φασματοσκοπίας in-cell STD και tr-NOESY NMR για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων και ανταγωνισμού υποκαταστατών με ιντεγκρίνες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση του όγκου αλλά και σε ανθρώπινα αιμοπετάλια όπου επίσης είναι σημαντικές για τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων [Guzzetti et al, 2013; Mari et al, 2010].



Εικόνα 2.7. Μελέτες in-cell NMR αλληλεπίδρασης της κερσετίνης-αλανίνης με τη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα. (A) Φάσμα ¹H NMR του φλαβονοειδούς με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2. (B) Φάσμα STD-NMR του φλαβονοειδούς με τα κύτταρα. (C) Φάσμα STD-NMR του φλαβονοειδούς με τα κύτταρα παρουσία του επιλεκτικού αναστολέα HA14-1 [Primikyri et al, 2018].

Τέλος, πιο πρόσφατα, επιτεύχθηκε η μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μη επισημασμένων πρωτεϊνών και μικρών μορίων υπό συνθήκες in-cell NMR, παρακάμπτοντας τα προβλήματα μεγέθους των πρωτεϊνών, ισοτοπικής επισήμανσης και υπερέκφρασης. Έτσι, για πρώτη φορά, στο εργαστήριό μας μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της μη επισημασμένης αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 με κερσετίνη-αλανίνη σε ζωντανά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία in-cell NMR και, ειδικότερα, το συνδυασμό πειραμάτων STD και Tr-NOESY. Διαπιστώθηκε πως όλα τα αρωματικά πρωτόνια του υποκαταστάτη αλληλεπιδρούν με ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, ενώ από τα ανταγωνιστικά πειράματα με τον επιλεκτικό αναστολέα της Bcl-2, HA14-1, ταυτοποιήθηκε η άμεση πρόσδεση της κερσετίνης-αλανίνης στον τομέα BH3 της πρωτεΐνης (Εικόνα 2.7). Από το πείραμα tr-NOESY in-cell NMR προέκυψε ότι η διαμόρφωση της κερσετίνης-αλανίνης αλλάζει κατά την πρόσδεση στη Bcl-2, αφού στο φάσμα 2D tr-NOESY NMR εμφανίστηκαν δύο νέα σήματα NOE [Primikyri et al, 2018].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Αντιδραστήρια

- Καπρολεϊκό οξύ, καθαρότητας $\geq 96\%$, Sigma Aldrich
- Ελαϊκό οξύ, καθαρότητας $\geq 99\%$ (GC), Sigma Aldrich
- Λινελαϊκό οξύ, καθαρότητας $\geq 99\%$, Sigma Aldrich
- Μεθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος, καθαρότητας $\geq 99\%$ (GC), Sigma Aldrich
- α -Λινολενικό οξύ, καθαρότητας $\geq 99\%$, Sigma Aldrich
- EPA, καθαρότητας $\geq 99\%$, Larodan (Stockholm, Sweden)
- DHA, καθαρότητας $\geq 99\%$, Larodan (Stockholm, Sweden)
- Αλβουμίνη Βόειου Ορού (BSA), λυοφιλοποιημένη σκόνη, καθαρότητας $\geq 96\%$ (ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτής αγαρόζης), Sigma Aldrich
- Αλβουμίνη Ανθρώπινου Ορού (HSA), λυοφιλοποιημένη σκόνη, χωρίς λιπαρά οξέα, καθαρότητας $\geq 96\%$ (ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτής αγαρόζης), Sigma Aldrich
- Warfarin, καθαρότητας $\geq 98\%$ (GC), Sigma Aldrich
- Ibuprofen, καθαρότητας $\geq 98\%$ (GC), Sigma Aldrich
- Navitoclax (ABT-263), καθαρότητας $\geq 99\%$ (HPLC), Selleckchem
- Χλωροφόρμιο CHCl_3 , analytical grade, Fisher Scientific (U. K.)
- Μεθανόλη CH_3OH , analytical grade, Fisher Scientific (U. K.)
- CDCl_3 , 99.8%, Deutero (Kastellaum, Germany)
- $\text{DMSO-}d_6$, 99.5%, Deutero (Kastellaum, Germany)
- D_2O , 99.9%, Deutero (Kastellaum, Germany)

3.2 Οργανολογία

Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στον φασματογράφο NMR Bruker AV-500 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο φασματογράφος παρότι είναι συζευγμένος με υποδοχέα ΤΧΙ κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας δεν λειτουργεί για οικονομικούς λόγους. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού TopSpin 3.5.

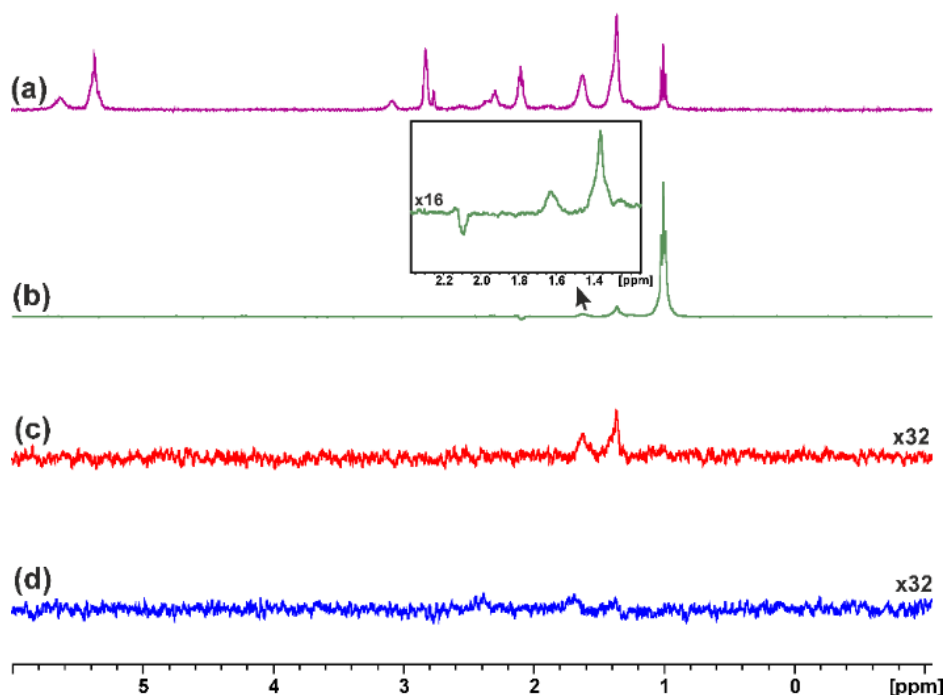


Εικόνα 3.1. Φασματογράφος NMR Bruker AV-500.

3.3 Λήψη φασμάτων STD NMR

Τα πειράματα STD NMR πραγματοποιήθηκαν στους 37°C στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500, με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας *stddiffesgp.3*, παρουσία BSA/HSA (25 μM), 10 mM PBS (pD 7.4) σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ για διευκόλυνση της διάλυσης λιπαρών οξέων (2.5 mM). Τα λιπαρά οξέα αρχικά διαλύθηκαν σε DMSO-*d*₆ και στη συνέχεια αραιώθηκαν σε PBS. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωληνάριο NMR και θερμάνθηκε στους 50°C για 5min πριν την προσθήκη BSA/HSA. Για τα ανταγωνιστικά πειράματα, τα φάρμακα, βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη, προστέθηκαν στο διάλυμα σε ισομοριακές συγκεντρώσεις για διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέων/FFAs. Επιλεκτικός κορεσμός των απορροφήσεων του δείγματος επιτεύχθηκε με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped), ο καθένας με διάρκεια 50 ms, που διαχωρίζονται με χρονική καθυστέρηση 1ms. Ο χρόνος κορεσμού ρυθμίστηκε στα 2sec και ο συνολικός πειραματικός χρόνος ήταν 50min (80 σαρώσεις). Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο πείραμα εντός συντονισμού στα 4.0 ppm, όπου δεν εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών, και στο φάσμα εκτός συντονισμού στα -40.0 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR. Ο κορεσμός του ισχυρού σήματος του νερού επιτεύχθηκε με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας *excitation sculpting* [Viegas et al, 2011]. Η επιλεκτικότητα των παλμών τύπου Gaussian (~ 0.9 ppm) αξιολογήθηκε πολύ προσεκτικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2. Από τα πειράματα εντός συντονισμού που πραγματοποιήθηκαν για όλα τα FFA στα 0.0 ppm, 4.0 ppm και 7.5 ppm (Εικόνα 3.3), είναι προφανές ότι οι πλησιέστεροι συντονισμοί ελεύθερων λιπαρών οξέων ήταν στα -1.0 ppm, -1.2 ppm και +1.5 ppm, αντίστοιχα. Μπορεί, επομένως, να

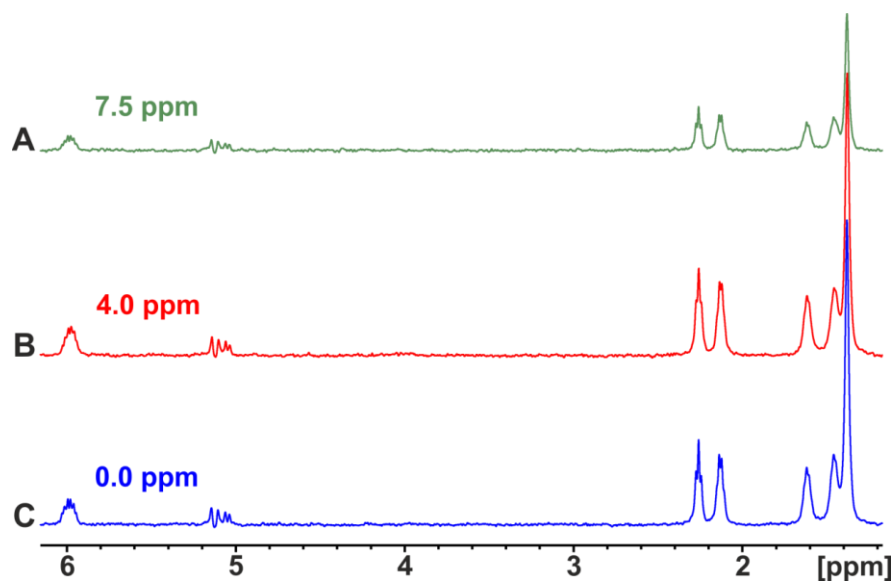
εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η επιλεκτικότητα του παλμού κορεσμού ήταν επαρκής για την πρόληψη της τυχόν διέγερσης των υποκαταστατών.



Εικόνα 3.2. Επιλεκτικότητα του παλμού κορεσμού στο πείραμα STD-NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM), σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $DMSO-d_6$ χωρίς HSA. (a) Φάσμα NMR 1H . (b) Επιλεκτικός κορεσμός της ομάδας CH_3- του ALA στα $\delta=0.98$ ppm. Επιλεκτικός κορεσμός στα $\delta=0.68$ ppm (c) και $\delta=0.08$ ppm (d).

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, τα πειράματα STD NMR πραγματοποιήθηκαν στους $37^\circ C$ στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας stddiffesgr.3, παρουσία Bcl-2 (50 μM), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% $DMSO-d_6$ για διευκόλυνση της διάλυσης λιπαρών οξέων (2 mM). Για τα ανταγωνιστικά πειράματα, ο αναστολέας ABT-263 (50 μM) προστέθηκε στο διάλυμα σε μοριακή αναλογία FFA/ABT-263 = 40/1. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω με τη διαφορά ότι τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν στο πείραμα εντός συντονισμού στα 4.25 ppm.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του DHA (2 mM) με τις κυτταρικές σειρές Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pD 7.4) 10 mM σε D_2O με 4% $DMSO-d_6$. Για τη λήψη των φασμάτων



Εικόνα 3.3. Φάσματα STD-NMR του καπροϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ με ακτινοβολία του δείγματος στα φάσματα εντός συντονισμού στα 7.5 ppm, 4.0 ppm και 0.0 ppm.

χρησιμοποιήθηκαν πέντε εκατομμύρια κύτταρα από κάθε κυτταρική σειρά. Ο αριθμός αυτός είναι ικανοποιητικός για το χρόνο λήψης των φασμάτων STD πριν τα κύτταρα αρχίσουν να δημιουργούν συσσωματώματα με συνέπεια την καθίζηση, αλλά και για την αποφυγή των έντονων και προβληματικών κορυφών που οφείλονται στους διάφορους μεταβολίτες [Mari et al, 2010]. Για το ανταγωνιστικό πείραμα, ο αναστολέας ABT-263 (50 μM) προστέθηκε στο διάλυμα της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 σε μοριακή αναλογία DHA/ABT-263 = 40/1. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω με τη διαφορά ότι το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο πείραμα εντός συντονισμού στα 4.55 ppm.

3.4 Λήψη φασμάτων tr-NOESY NMR

Τα πειράματα tr-NOESY NMR πραγματοποιήθηκαν στους 37°C παρουσία BSA/HSA (25 μM) σε 10 mM PBS (pD 7.4) σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ προσθέτοντας περίσσεια λιπαρού οξέος (2.5 mM). Τα χρονικά σήματα ελεύθερης επαγωγής (FIDs, free induction decays) λήφθηκαν με 110 αυξητικές τιμές του χρόνου εξέλιξης (States-TPPI) και 56 σαρώσεις των 2k. Οι χρόνοι ανάμιξης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 100, 200 και 300ms προκειμένου να ληφθεί η μέγιστη ένταση tr-NOE εντός της περιοχής γραμμικότητας. Η

καταστολή του διαλύτη επιτεύχθηκε με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας excitation sculpting.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, τα πειράματα tr-NOESY NMR πραγματοποιήθηκαν στους 37°C, παρουσία Bcl-2 (50 μM), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆ για διευκόλυνση της διάλυσης λιπαρών οξέων (2 mM). Για τα ανταγωνιστικά πειράματα, ο αναστολέας ABT-263 (50 μM) προστέθηκε στο διάλυμα σε μοριακή αναλογία FFA/ABT-263 = 40/1. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του DHA (2 mM) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 το δείγμα παρασκευάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pD 7.4) 10 mM σε D₂O με 4% DMSO-d₆. Για το ανταγωνιστικό πείραμα χρησιμοποιήθηκε και πάλι ο αναστολέας ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία DHA/ABT-263 = 40/1. Η λήψη των φασμάτων tr-NOESY πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV 500 στους 37°C με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας noesyegpph (States-TPPI) [Mari et al, 2010]. Οι παράμετροι των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 προσαρμόστηκαν έτσι ώστε ο συνολικός πειραματικός χρόνος να είναι ο ελάχιστος δυνατός (2 ώρες και 15 λεπτά) πριν τα κύτταρα αρχίσουν να καθιζάνουν και πριν επηρεαστεί σημαντικά η θνησιμότητά τους. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν παρουσία 5×10^6 κυττάρων που αποτελεί ικανοποιητική κυτταρική πυκνότητα για το πείραμα αυτό. Στη συνέχεια προστέθηκε περίσσεια DHA (2 mM) και η συγκέντρωση αυτή επέτρεψε τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων με κυτταρικές πρωτεΐνες. Ο χρόνος ανάμιξης που χρησιμοποιήθηκε για το φάσμα του λιπαρού οξέος παρουσία και απουσία των κυττάρων καθώς και παρουσία του αναστολέα ήταν 100 ms [Mari et al, 2010].

3.5 Λήψη φασμάτων INPHARMA NMR

Τα ανταγωνιστικά πειράματα INPHARMA NMR πραγματοποιήθηκαν όπως στην περίπτωση των πειραμάτων tr-NOESY με χρόνους ανάμιξης 100, 200 και 300ms παρουσία των εκλεκτικών αναστολέων, βαρφαρίνης και ιβουπροφαίνης.

3.6 Υπολογιστικές Μέθοδοι

Οι υπολογισμοί docking πραγματοποιήθηκαν από τον Δρ. Παπαμώκο Γιώργο. Οι δομές της πρωτεΐνης HSA που χρησιμοποιήθηκαν, λήφθηκαν από την Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών (PDB). Οι κωδικές ονομασίες εισόδου είναι 1GNI (HSA με ελαϊκό οξύ) [Petitas et al, 2001], 2BXG (HSA με ιβουπροφαίνη) [Ghuman et al, 2005] και 2BXD (HSA με βαρφαρίνη) [Ghuman et al, 2005]. Οι δομές των καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA), ιβουπροφαίνης και βαρφαρίνης κατασκευάστηκαν με το Gauss View 6.0.16 [Dennington et al, 2019]. Για κάθε υποκαταστάτη υιοθετήθηκε η αποπρωτονιωμένη φορτισμένη κατάσταση.

Για τους υπολογισμούς docking των παραπάνω μορίων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AutoDock Vina1.1.2 [Trott et al, 2010]. Αρχικά, το AutoDock Tools 1.5.6 [Morris et al, 2009] ως λογισμικό προεπεξεργασίας για την προσθήκη ατόμων υδρογόνου στην πρωτεΐνη και τον καθορισμό των διεδρων γωνιών των υποκαταστατών που επιτρέπονται να ποικίλουν. Με το ίδιο λογισμικό, επιλέχθηκε ο χώρος αναζήτησης για κάθε σύμπλοκο πρωτεΐνης – λιπαρού οξέος/αναστολέα που μελετήθηκε (τα αρχεία διαμόρφωσης και οι δομές που προκύπτουν δίνονται στο Παράρτημα (Supplementary Material, SI)).

Για τις θέσεις πρόσδεσης 3, 4, και 6, όλα τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δοκιμάστηκαν μαζί με ιβουπροφαίνη. Η δομή 1GNI.pdb χρησιμοποιήθηκε για καπρολεϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ και α-λινολενικό οξύ, ιβουπροφαίνη και βαρφαρίνη σε σχέση με τις θέσεις πρόσδεσης 3, 4, 6 και 7, ενώ η δομή 2BXG.pdb χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα για προσομοίωση docking της ιβουπροφαίνης και των θέσεων 3, 4 και 6. Για τη βαρφαρίνη και τη θέση πρόσδεσης 7 χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα η δομή 2BXD.PDB. Τα αμινοξέα που καθορίζουν τις συντεταγμένες της ειδικής θέσης πρόσδεσης ήταν: για τη θέση 3 (υποπεριοχές IIIA και IIB) Ser-342, Arg-348 και Arg-485, για τη θέση 4 (υποπεριοχή IIIA) Arg-410, Tyr-411, Ser-489, Ser-419 και Thr-422, για τη θέση 6 (υποπεριοχές IIA και IIB) Arg-209, Lys-351 και Ser-480 και για τη θέση 7 (υποπεριοχή IIA) Lys-199, Arg-218, Arg-222, His-242 και Arg-257. Η διαδικασία ακολούθησε το πρωτόκολλο self-docking.

Τα docking αποτελούνταν από 10 ανεξάρτητες εκτελέσεις για κάθε σύμπλοκο. Οι διαμορφώσεις docking επιλέχθηκαν με βάση τη συγγένεια πρόσδεσης (kcal mol^{-1}) για κάθε εκτέλεση, αν και συζητούνται επίσης πρόσθετες προκύπτουσες πόζες.

3.7 Βιολογικά πειράματα

3.7.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 έλαβε χώρα στο ερευνητικό εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Χημείας, Κούκκου Ειρήνης, με τη βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα Τσαγκογιάννη Επαμεινώνδα και της διδάκτορος Πριμηκώρη Αλεξάνδρας. Το πλασμίδιο της πρωτεΐνης αγοράστηκε από την εταιρία GenScript. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε στο στέλεχος BL21 των *E.coli* βακτηριακών κυττάρων και καθарίστηκε σε στήλη Ni^{2+} με χρωματογραφία συγγένειας σε Äkta Prime FPLC (GE Healthcare). Τέλος, διατηρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA στους -20°C .

3.7.2 Κυτταρικές καλλιέργειες Jurkat

Κατά την εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν: (i) η Jurkat Puro προερχόμενη από T λευχαιμικά κύτταρα τα οποία μετασηματίστηκαν σταθερά με έναν άδειο φορέα ρετροϊού προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην πιουρομυκίνη και (ii) με τον ίδιο φορέα που έφερε ανθρώπινο Bcl-2 cDNA, Jurkat Bcl-2. Οι κυτταρικές σειρές, Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2, χορηγήθηκαν ευγενικώς από τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής, Κωλέττα Ευάγγελο. Οι καλλιέργειες των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, Τσελέπη Αλέξανδρου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της διδάκτορος Πριμηκώρη Αλεξάνδρας.

Η επώαση των κυττάρων έγινε στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 . Οι κυτταρικές σειρές Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 καλλιεργήθηκαν σε RPMI (Gibco Invitrogen) εμπλουτισμένο με 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 10% ορό (Fetal Bovine Serum) και 0.1 $\mu\text{g/ml}$ αντιβιοτικό puromycin. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε με τη

συσκευή TC Automated Cell Counter BIO-RAD. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

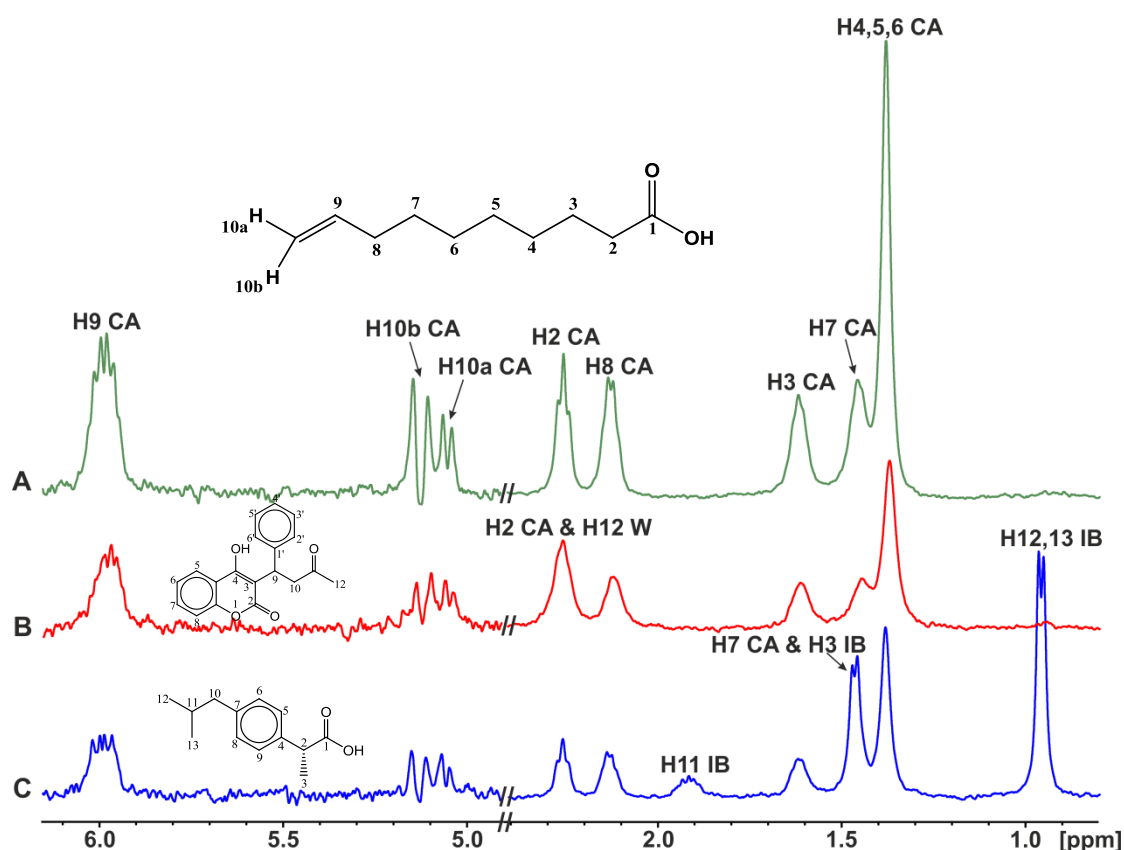
Όπως αναφέρθηκε η φασματοσκοπία NMR αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα πολύ ισχυρό και ευέλικτο εργαλείο μελετών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με διάφορους υποκαταστάτες λόγω του σημαντικού αριθμού νέων τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί. Τρεις από τις τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής εργασίας με στόχο τη διερεύνηση του επίτοπου πρόσδεσης και των διαμορφώσεων των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) σε κατάσταση πρόσδεσης με την αλβουμίνη ορού (BSA / HSA) είναι οι ακόλουθες: NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (saturation transfer difference, STD), μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transfer NOESY, tr-NOESY) και διαμοριακών σημάτων NOE για φαρμακοφόρο χαρτογράφηση (Interligand NOEs for PHARmacophore MApping, INPHARMA).

4.1 Ταυτοποίηση του επίτοπου πρόσδεσης ελεύθερων λιπαρών οξέων και χαρτογράφηση των θέσεων πρόσδεσής τους στην αλβουμίνη ορού (BSA / HSA) με τη χρήση της τεχνικής STD-NMR

Η τεχνική STD NMR έχει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια στη σάρωση νέων βιβλιοθηκών διαφόρων τύπων μορίων, όπως φαρμάκων, σε υποδοχείς πρόσδεσης, όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων [Siebert et al, 2010]. Μια πολύ σημαντική εφαρμογή του STD NMR είναι η χαρτογράφηση του επίτοπου πρόσδεσης ενός υποκαταστάτη αποκαλύπτοντας τα πλησιέστερα συνδεδεμένα τμήματα στον υποδοχέα. Βασίζεται στη διαμοριακή μεταφορά μαγνήτισης από τον ακτινοβολούμενο υποδοχέα στον προσδεδεμένο υποκαταστάτη με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των πρωτονίων που βρίσκονται σε απόσταση $\leq 5 \text{ \AA}$ από την πρωτεΐνη [Claasen et al, 2005; Mayer et al, 2001; Tanoli et al, 2015; Viegas et al, 2011].

Στην Εικόνα 4.1A παρουσιάζεται το φάσμα STD NMR του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του καπρολεϊκού οξέος αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανταγωνιστικά πειράματα χρησιμοποιώντας τα φάρμακα βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη, τα οποία προσδένονται σε γνωστές θέσεις της BSA/HSA. Η Εικόνα 4.1B αντιπροσωπεύει το φάσμα STD NMR του καπρολεϊκού οξέος μετά την προσθήκη

βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) σε μοριακή αναλογία καπρολεϊκού οξέος/βαρφαρίνης $\approx 1/1$. Η προσθήκη βαρφαρίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του καπρολεϊκού οξέος (Πίνακας 4.1). Παρόμοιο πείραμα διεξήχθη με την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.7 mM) σε μοριακή αναλογία καπρολεϊκού οξέος/ιβουπροφαίνης $\approx 1/1.1$. Και πάλι, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του καπρολεϊκού οξέος (Εικόνα 4.1, Πίνακας 4.1). Παρόμοια αποτελέσματα STD λήφθηκαν και με την πρωτεΐνη HSA.



Εικόνα 4.1. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2.5 mM): (A) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.7 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

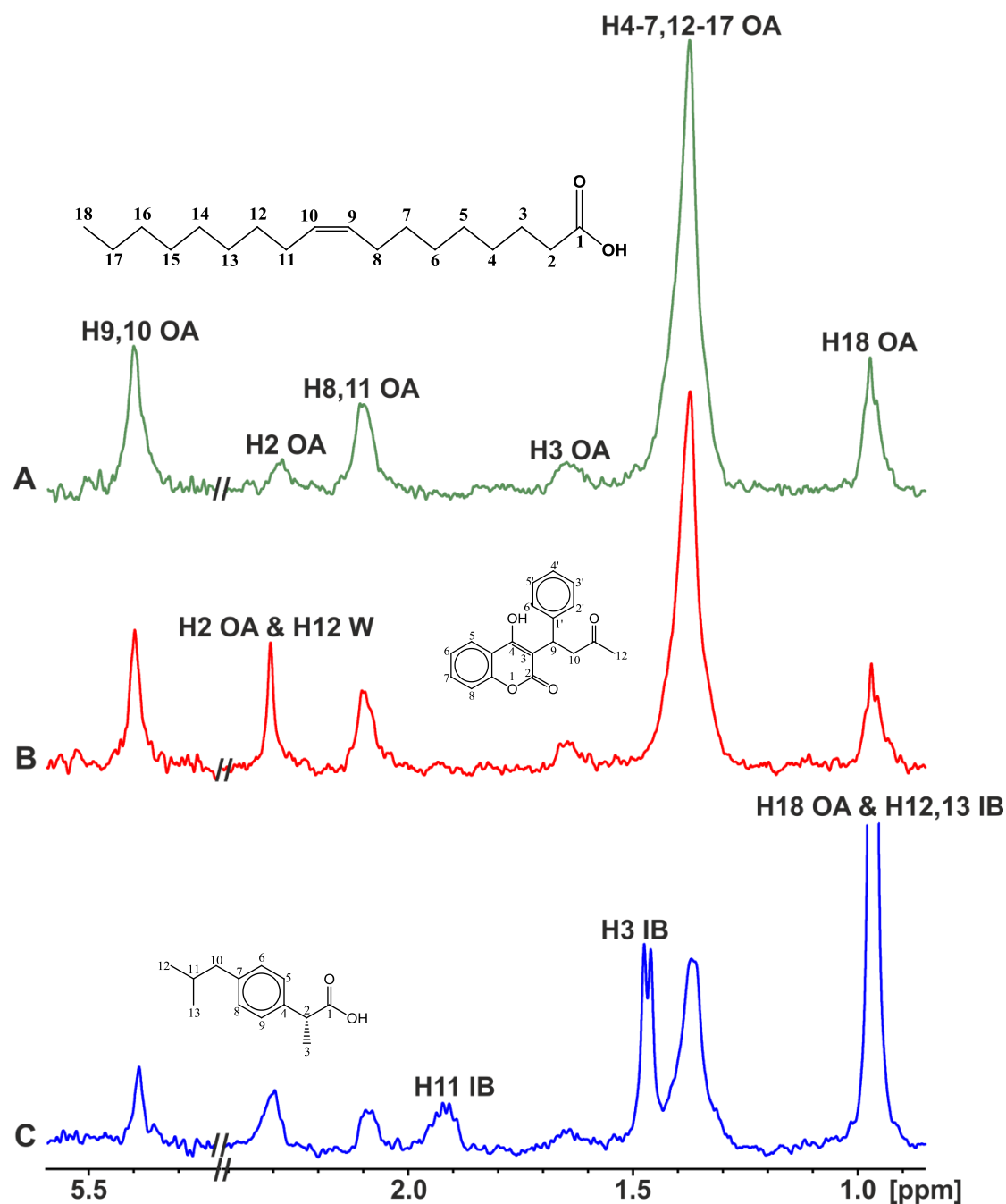
Προφανώς, η πρόσδεση του καπρολεϊκού οξέος με τα εξωγενή φάρμακα, βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη, αντανακλά τον ανταγωνισμό για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης, αν και η περίπτωση αλλοστερικής αλληλεπίδρασης δεν μπορεί να αποκλειστεί (βλέπετε παρακάτω την εφαρμογή της μεθοδολογίας INPHARMA). Η βαρφαρίνη και η ιβουπροφαίνη θεωρούνται ως στερεοτυπικοί υποκαταστάτες για τις θέσεις των φαρμάκων I (Sudlow I) και II (Sudlow II), αντίστοιχα. Η βαρφαρίνη

συνδέεται στο κέντρο της θέσης I (εντός του πυρήνα της υποπεριοχής ΙΑ) σχηματίζοντας τρεις δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα, κυρίως Tyr-150 που έχει κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φαρμάκων [Ghuman et al, 2005]. Η θέση I των φαρμάκων συμπίπτει με τη θέση FA7 που έχει χαρακτηριστεί ως χαμηλής συγγένειας [Fasano et al, 2005]. Αυτό είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τα πειράματα STD, καθώς η βαρφαρίνη υποκαθιστά σε σημαντικό βαθμό το καπρολεϊκό οξύ.

Ο προσδιορισμός της δομής με ακτίνες X των συμπλεγμάτων HSA-μυριστικού οξέος-φαρμάκου έδειξε ότι, κατά τη δέσμευση των λιπαρών οξέων, η θέση I εκτείνεται σημαντικά πέρα από την υποπεριοχή ΙΑ [Ghuman et al, 2005]. Η Tyr-150 της υποπεριοχής ΙΒ αλληλεπιδρά με την καρβοξυλική ομάδα του λιπαρού οξέος που είναι δεσμευμένο στη θέση υψηλής συγγένειας FA2. Η ιβουπροφαίνη προσδένεται στο κέντρο της θέσης πρόσδεσης της υποπεριοχής ΙΙΑ. Αν και αυτή η θέση Ι των φαρμάκων είναι μικρότερων διαστάσεων από τη θέση I, παρουσιάζει σημαντική προσαρμοστικότητα και μπορεί να δεσμεύει δύο μόρια λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (θέσεις FA3 και FA4). Οι μεθυλενικές ομάδες των λιπαρών οξέων που συνδέονται στη FA3 καταλαμβάνουν τη μη πολική περιοχή της θέσης Ι των φαρμάκων και η καρβοξυλική ομάδα σχηματίζει γέφυρες άλατος με τα αμινοξέα Arg-348, Arg-485 και δεσμό υδρογόνου με Ser-342. Η καρβοξυλική ομάδα των λιπαρών οξέων που είναι συνδεδεμένη στη θέση FA4 αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Tyr-411, Lys-414 και Ser-489 [Alexandri et al, 2022].

Στην Εικόνα 4.2Α παρουσιάζεται το φάσμα STD NMR του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του ελαϊκού οξέος αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Τα άλλα δύο φάσματα (4.2B, 4.2C) είναι αποτελέσματα των ανταγωνιστικών πειραμάτων με τα φάρμακα βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη. Πιο συγκεκριμένα, το 4.2B είναι το φάσμα STD NMR του ελαϊκού οξέος μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.7 mM) σε μοριακή αναλογία ελαϊκού οξέος/βαρφαρίνης $\approx 1/1.1$. Η προσθήκη βαρφαρίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του ελαϊκού οξέος, και μάλιστα τα πρωτόνια του διπλού δεσμού H_{9,10} σημείωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης STD 80.1% (Πίνακας 4.1). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον ανταγωνισμό του ελαϊκού οξέος με τη βαρφαρίνη για την ίδια θέση πρόσδεσης FA7, αν και θα πρέπει πάλι να επισημανθεί ότι

η περίπτωση αλλοστερικής αλληλεπίδρασης δεν μπορεί να αποκλειστεί. Παρόμοιο πείραμα διεξήχθη με την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM) σε μοριακή αναλογία ελαϊκού



Εικόνα 4.2. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM): (A) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.7 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

οξέος/ιβουπροφαίνης $\approx 1/1$. Και πάλι, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του ελαϊκού οξέος, με τη μεγαλύτερη μείωση να εμφανίζουν τα ολεφινικά πρωτόνια H9,10 84.4% (Εικόνα 4.2 C, Πίνακας 4.1). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον ανταγωνισμό του ελαϊκού οξέος με την ιβουπροφαίνη για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης, FA3 και FA6. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν με

Πίνακας 4.1. Μείωση Διαφοράς Μεταφοράς Κορεσμού (STD) (%) καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαϊκού οξέος (OA), λιγνολαϊκού οξέος (LA), α -λιγνολεϊκού οξέος (ALA), DHA και EPA με την προσθήκη ισομοριακών ποσοτήτων βαρφαρίνης (W) και ιβουπροφαίνης (I) σε αλβουμίνη (SA).

Complex	Notation	% STD Reduction Rate	Complex	Notation	% STD Reduction Rate
CA/W/SA	H9	68.0	CA/I/SA	H9	75.8
	H10b	59.9		H10b	76.0
	H10a	44.4		H10a	63.6
	H2	- ^a		H2	78.6
	H8	69.8		H8	79.7
	H3	73.8		H3	77.8
	H7	76.9		H7	- ^a
	H4,5,6	70.7		H4,5,6	76.8
OA/W/SA	H9,10	80.1	OA/I/SA	H9,10	84.4
	H2	- ^a		H2	82.9
	H8,11	75.9		H8,11	79.8
	H3	79.3		H3	77.1
	H4-7,12-17	73.6		H4-7,12-17	- ^a
	H18	68.9		H18	- ^a
LA/W/SA	H9,10,12,13	71.9	LA/I/SA	H9,10,12,13	77.2
	H11	79.2		H11	68.8
	H2	- ^a		H2	59.3
	H8,14	64.8		H8,14	61.5
	H3	73.5		H3	47.8
	H4-7,15-17	61.5		H4-7,15-17	- ^a
	H18	52.6		H18	- ^a
ALA/W/SA	H9,10,12,13,15,16	30.7	ALA/I/SA	H9,10,12,13,15,16	59.3
	H11,14	31.1		H11,14	53.9
	H2	- ^a		H2	28.1
	H8,17	22.1		H8,17	45.4
	H3	24.1		H3	20.0
	H4-7	22.0		H4-7	- ^a
	H18	20.8		H18	- ^a

EPA/W/SA	H5,6,8,9,11,12,14,15,17,18	79.4	EPA/I/SA	H5,6,8,9,11,12,14,15,17,18	73.6
	H7,10,13,16	84.8		H7,10,13,16	76.9
	H2	- ^a		H2	66.4
	H4,19	82.0		H4,19	75.9
	H3	73.4		H3	69.3
	H20	69.8		H20	- ^a
DHA/W/SA	H4,5,7,8,10,11,13,14,16,17,19,20	13.9	DHA/I/SA	H4,5,7,8,10,11,13,14,16,17,19,20	16.0
	H6,9,12,15,18	14.6		H6,9,12,15,18	20.5
	H2,3	- ^a		H2,3	15.6
	H21	-10.2		H21	15.9
	H22	3.0		H22	- ^a

^aΗ ισχυρή αλληλοεπικάλυψη των σημάτων των FFAs και των φαρμάκων δεν επιτρέπει την ακριβή εκτίμηση της % μείωσης STD.

Πίνακας 4.2. Μείωση Διαφοράς Μεταφοράς Κορεσμού (STD) (%) της βαρφαρίνης (W) με την προσθήκη ισομοριακών ποσοτήτων α-λινολενικού οξέος (ALA) και EPA σε αλβουμίνη (SA).

Complex	Notation	% STD Reduction Rate	Complex	Notation	% STD Reduction Rate
W/ALA/SA	H12	- ^a	W/EPA/SA	H12	- ^a
	H10	47.5		H10	81.7
	H9	-		H9	93.7
	H4'	37.1		H4'	62.7
	H3',5',6,8	38.3		H3',5',6,8	59.9
	H2',6'	31.7		H2',6'	60.1
	H7	26.6		H7	60.4
	H5	38.3		H5	63.5

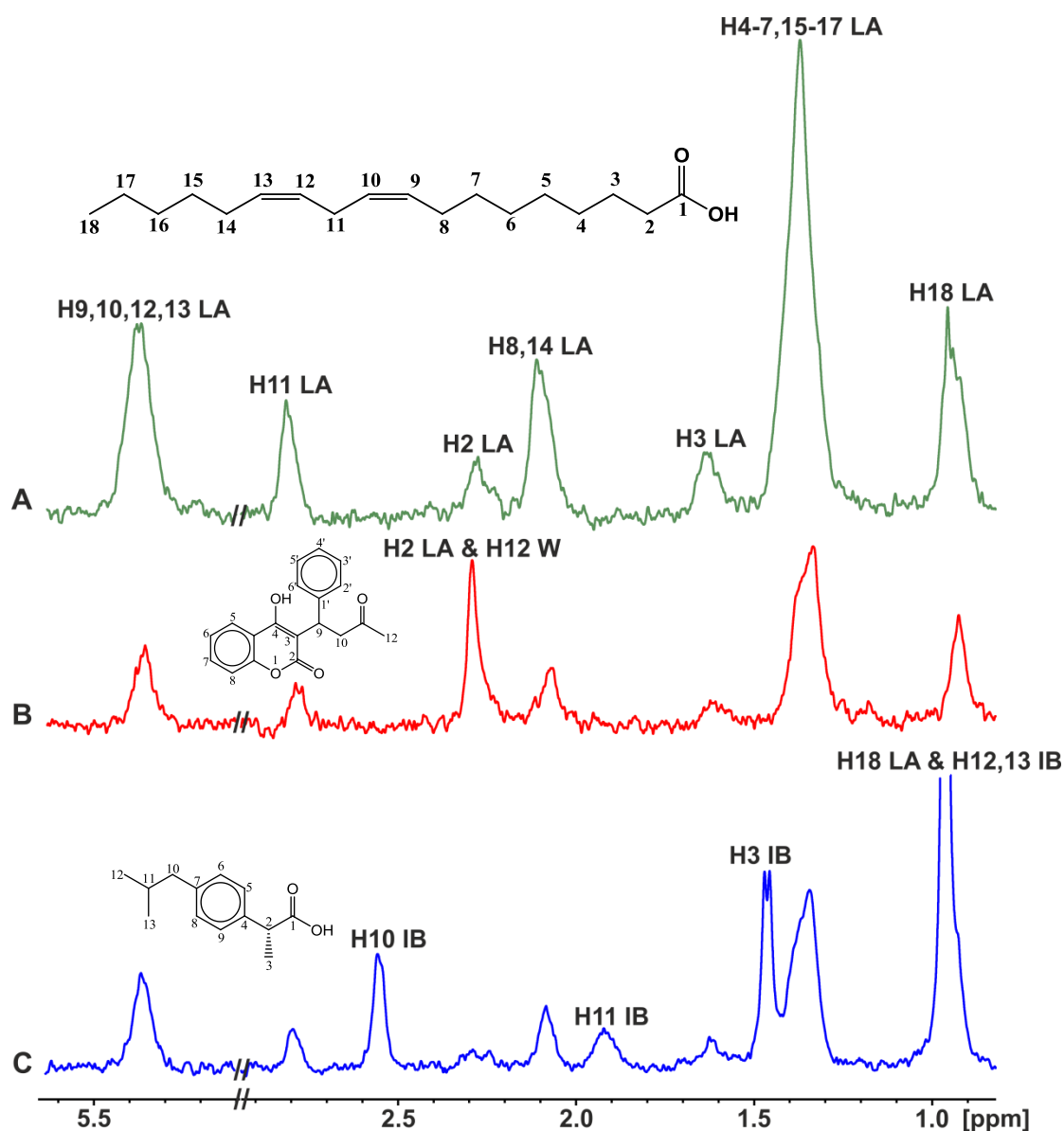
^aΗ ισχυρή αλληλοεπικάλυψη των σημάτων της βαρφαρίνης και των α-λινολενικού οξέος (ALA) και EPA δεν επιτρέπει την ακριβή εκτίμηση της % μείωσης STD.

την προσθήκη ισομοριακής αναλογίας βαρφαρίνης και ιβουπροφαίνης με ελαϊκό οξύ παρουσία της πρωτεΐνης HSA.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του λινελαϊκού οξέος με την πρωτεΐνη BSA. Στην Εικόνα 4.3A παρουσιάζεται το φάσμα STD NMR του λινελαϊκού οξέος (LA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Για την πραγματοποίηση των ανταγωνιστικών πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε και πάλι τα φάρμακα βαρφαρίνη και

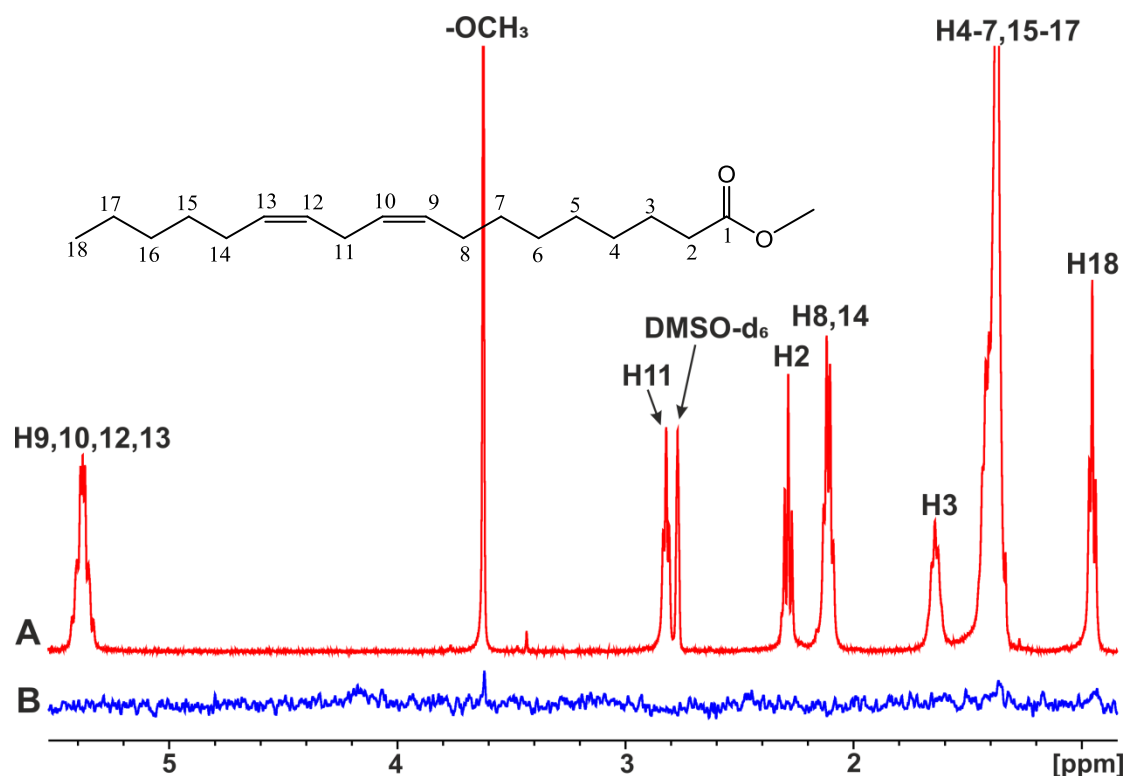
ιβουπροφαίνη. Το φάσμα 4.3B στην Εικόνα 4.3 αντιπροσωπεύει το φάσμα STD NMR του λινελαϊκού οξέος μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3 mM) σε μοριακή αναλογία λινελαϊκού οξέος/βαρφαρίνης $\approx 1/1.2$. Η προσθήκη βαρφαρίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του λινελαϊκού οξέος. Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.1, τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης % STD εμφανίζουν τα ολεφινικά πρωτόνια H9,10,12,13 (71.9%), τα δις-αλλυλικά H11 (79.2%) καθώς και τα β-πρωτόνια H3 (73.5%). Μετά την προσθήκη της ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM) στο διάλυμα του λινελαϊκού οξέος με BSA, σε μοριακή αναλογία λινελαϊκού οξέος/ιβουπροφαίνης $\approx 1/0.9$, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του λινελαϊκού οξέος, με το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης να εμφανίζουν τα ολεφινικά πρωτόνια (77.2%) (Εικόνα 4.3C, Πίνακας 4.1). Προφανώς, η πρόσδεση του λινελαϊκού οξέος με τα εξωγενή φάρμακα, βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη, αντανακλά τον ανταγωνισμό για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης (FA7, FA3, FA6). Παρόμοια αποτελέσματα STD λήφθηκαν και με HSA.

Στην Εικόνα 4.4 απεικονίζονται τα φάσματα NMR- ^1H και STD, του μεθυλεστέρα του λινελαϊκού οξέος (LAME) (2.5 mM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Πιο συγκεκριμένα, στο 4.4A απεικονίζονται οι χημικές μετατοπίσεις NMR- ^1H του μεθυλεστέρα του λινολεϊκού οξέος με την αντίστοιχη ταυτοποίησή τους. Το 4.4B είναι το φάσμα STD NMR του μεθυλεστέρα του λινολεϊκού οξέος με BSA. Όπως φαίνεται, ο μεθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος δεν αλληλεπιδρά με τη BSA, αφού τα σήματα των πρωτονίων του είναι μηδενικά. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τις κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X που έδειξαν



Εικόνα 4.3. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του λινελαϊκού οξέος (LA) (2.5 mM): (A) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

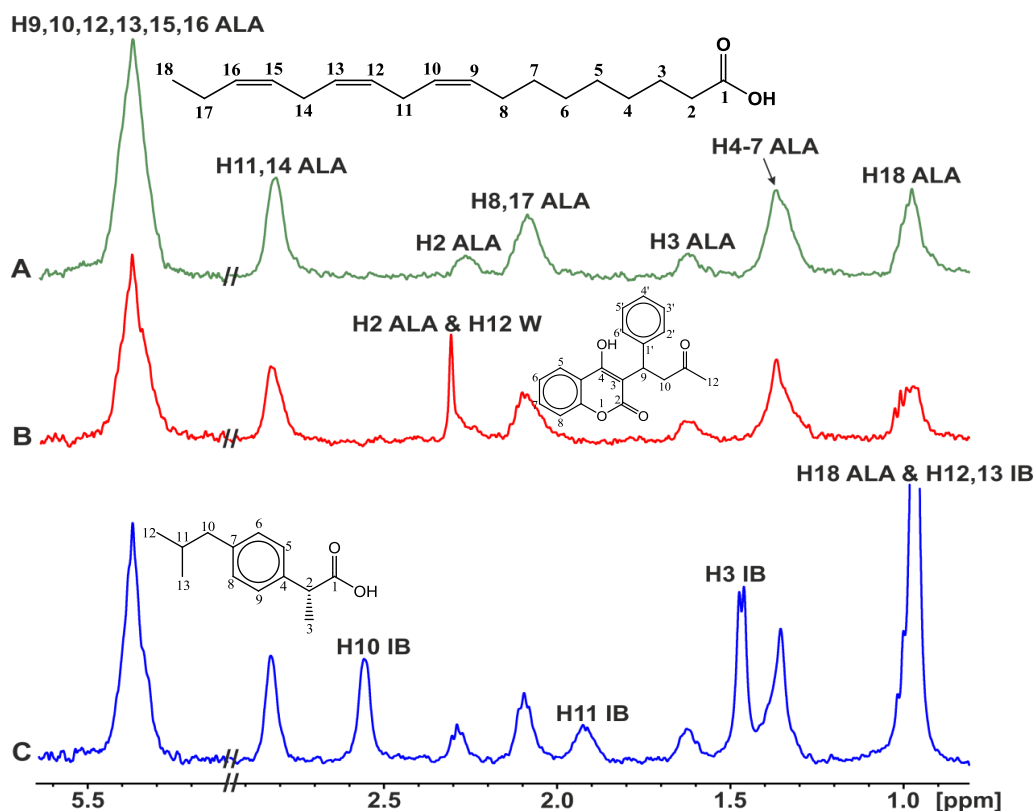
αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου ιοντικού τύπου για όλες τις θέσεις πρόσδεσης στην αλβουμίνη [Curry et al, 1998; Curry et al, 1999; Bhattacharya et al, 2000; Petitpas, Grüne et al, 2001; Petitpas, Bhattacharya et al, 2001; Ghuman et al, 2005;]. Επιπλέον, λεπτομερείς μελέτες NMR μεταβλητού pH αποκάλυψαν ότι τέσσερις από τις πέντε θέσεις δέσμευσης εμπλέκονται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην περιοχή pH 4-8 λόγω ιοντικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων και των πλευρικών αλυσίδων βασικών αμινοξέων, όπως αργινίνης ή λυσίνης [Cistola et al, 1987; Kenyon et al, 1994].



Εικόνα 4.4. (A) Φάσμα ¹H NMR (500 MHz) του μεθυλεστέρα του λινελαϊκού οξέος (LAME) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =32, πειραματικός χρόνος =4min 11sec). (B) Φάσμα STD-NMR του διαλύματος (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

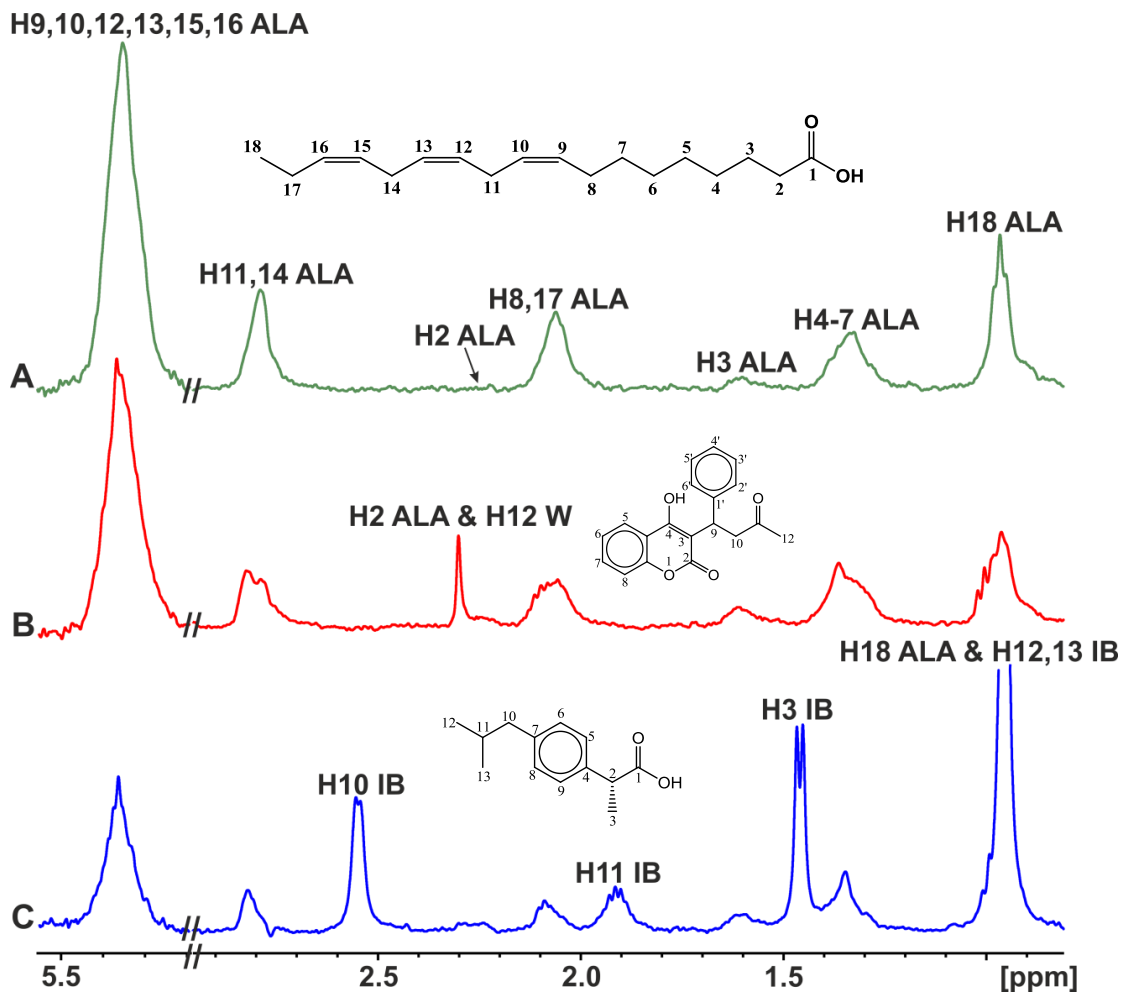
Στις Εικόνες 4.5A και 4.6A παρουσιάζονται τα φάσματα STD NMR του α-λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) παρουσία BSA (25 μM) και HSA (25 μM) που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του α-λινολενικού οξέος αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες. Τα 4.5B, 4.6B και 4.5C, 4.6C αντιπροσωπεύουν τα φάσματα STD NMR του α-λινολενικού οξέος μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.2 mM) και ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM) αντίστοιχα, σε μοριακή αναλογία α-λινολενικού οξέος/βαρφαρίνης, ιβουπροφαίνης ≈1/0.9. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1, τα ανταγωνιστικά πειράματα με βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη έδειξαν μικρή μείωση στο STD του α-λινολενικού οξέος σε σύγκριση με τη σημαντική επίδραση στην περίπτωση του καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος και λινελαϊκού οξέος. Αυτή η μικρότερη επίδραση, η οποία συμβαίνει ιδιαίτερα στα ανταγωνιστικά πειράματα με βαρφαρίνη, θα μπορούσε να ερμηνευθεί με όρους ασθενούς συγγένειας πρόσδεσης του α-λινολενικού οξέος στη θέση FA7, καθώς έχει χαρακτηριστεί ως χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης [Fasano et al, 2005]. Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι η έλλειψη μιας σαφώς καθορισμένης διαμόρφωσης των

καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων στη θέση πρόσδεσης 7 στις δομές ακτίνων X των C14:0 [Curry et al, 1998], C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 [Bhattacharya et al, 2000], C18:0, C18:1 και C20:4 [Petitpas, Grúne et al, 2001] οφείλεται στη χαμηλή συγγένεια ως προς την FA7. Υποκατάσταση, συνεπώς, του μορίου βαρφαρίνης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης λιπαρών οξέων.



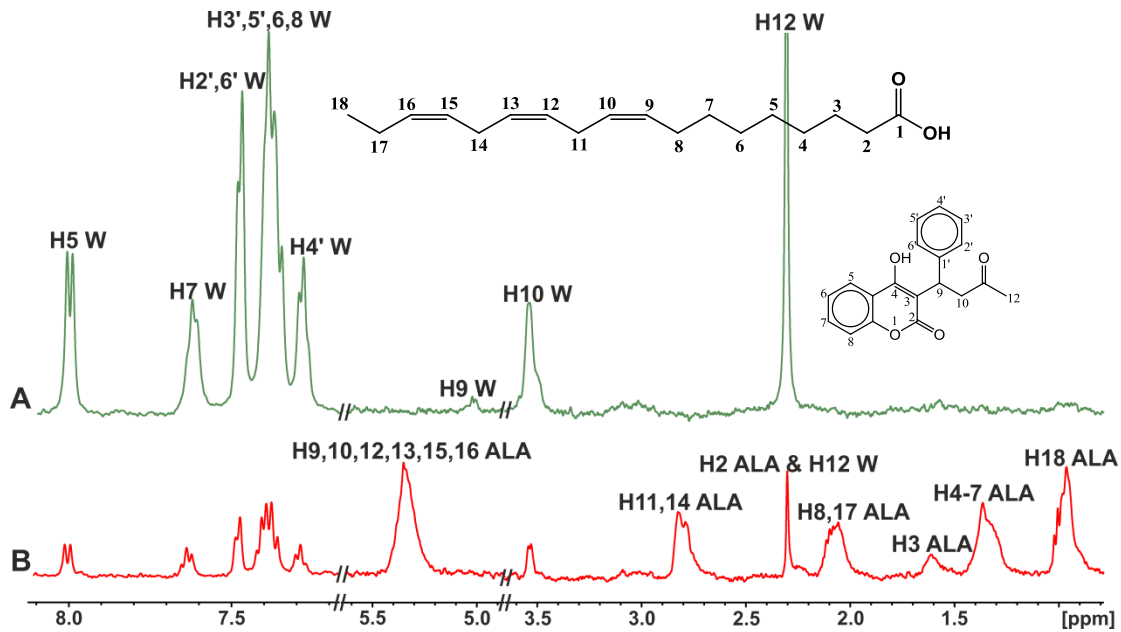
Εικόνα 4.5. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM): (A) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.2 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

Ωστόσο, μια εναλλακτική ερμηνεία των πειραμάτων STD (Εικόνα 4.5 και Εικόνα 4.6) θα μπορούσε να είναι ότι το α -λινολενικό οξύ έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης από τη βαρφαρίνη. Επομένως, η προσθήκη βαρφαρίνης σε ισομοριακή αναλογία στο σύμπλεγμα α -λινολενικού οξέος-HSA/BSA έχει μικρή επίδραση στην ένταση του σήματος STD του α -λινολενικού οξέος. Αυτό συμφωνεί με το ισχυρό σήμα STD NMR της βαρφαρίνης στο σύμπλεγμα με HSA, το οποίο μειώθηκε σημαντικά κατά 79% με την προσθήκη της βαρφαρίνης στο σύμπλεγμα α -λινολενικού οξέος/HSA, όπως

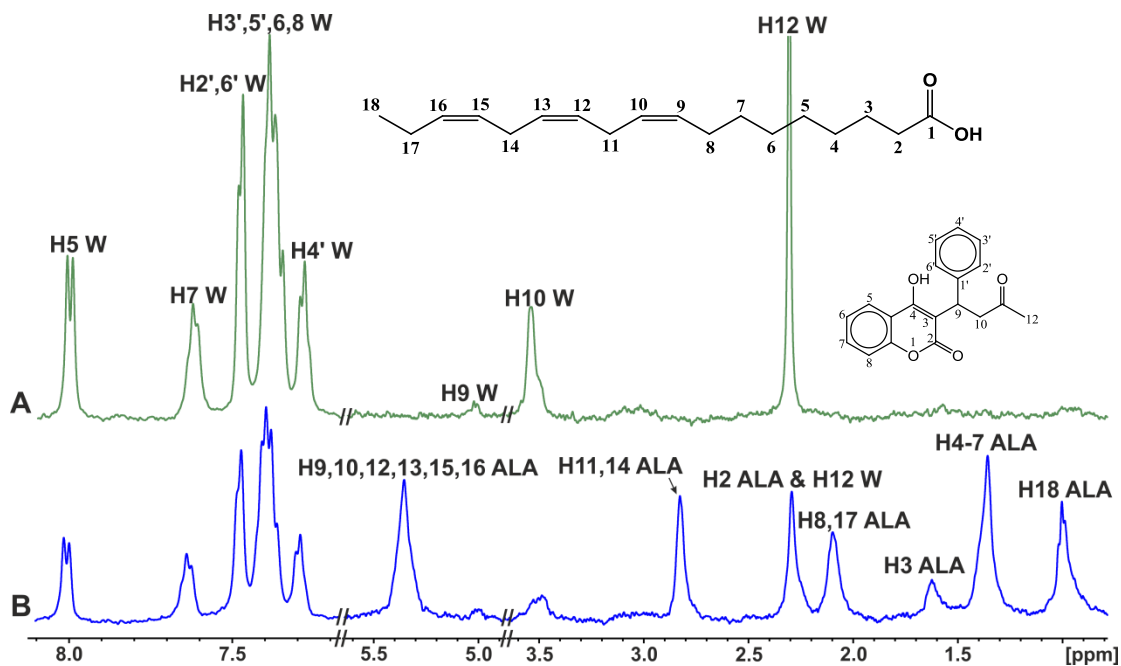


Εικόνα 4.6. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM): (A) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $DMSO-d_6$, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.2 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

προκύπτει από την Εικόνα 4.7. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε επίσης με πειράματα STD στα οποία προστέθηκε α -λινολενικό οξύ στο σύμπλεγμα βαρφαρίνης-HSA/BSA (Εικόνα 4.8), αντί για το αντίστροφο πείραμα στο οποίο προστέθηκε βαρφαρίνη στα συμπλέγματα HSA/BSA-FFA (Εικόνες 4.1, 4.2, 4.3, 4.5, 4.6). Η Εικόνα 4.8 δείχνει σαφώς μια πολύ σημαντική μείωση κατά 38% του STD της βαρφαρίνης στο σύμπλεγμα HSA/BSA-βαρφαρίνης με την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας α -λινολενικού οξέος. Το συμπέρασμα της υψηλότερης συγγένειας πρόσδεσης του α -λινολενικού οξέος στη θέση FA7, σε σχέση με εκείνη της βαρφαρίνης, επιβεβαιώθηκε επίσης με πειράματα INPHARMA NMR, όπως αναλύεται παρακάτω.



Εικόνα 4.7. Φάσματα STD NMR: (A) βαρφαρίνης (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) βαρφαρίνης (2.5 mM) μετά την προσθήκη της στο σύμπλεγμα α -λινολενικού οξέος (3.2 mM)/HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

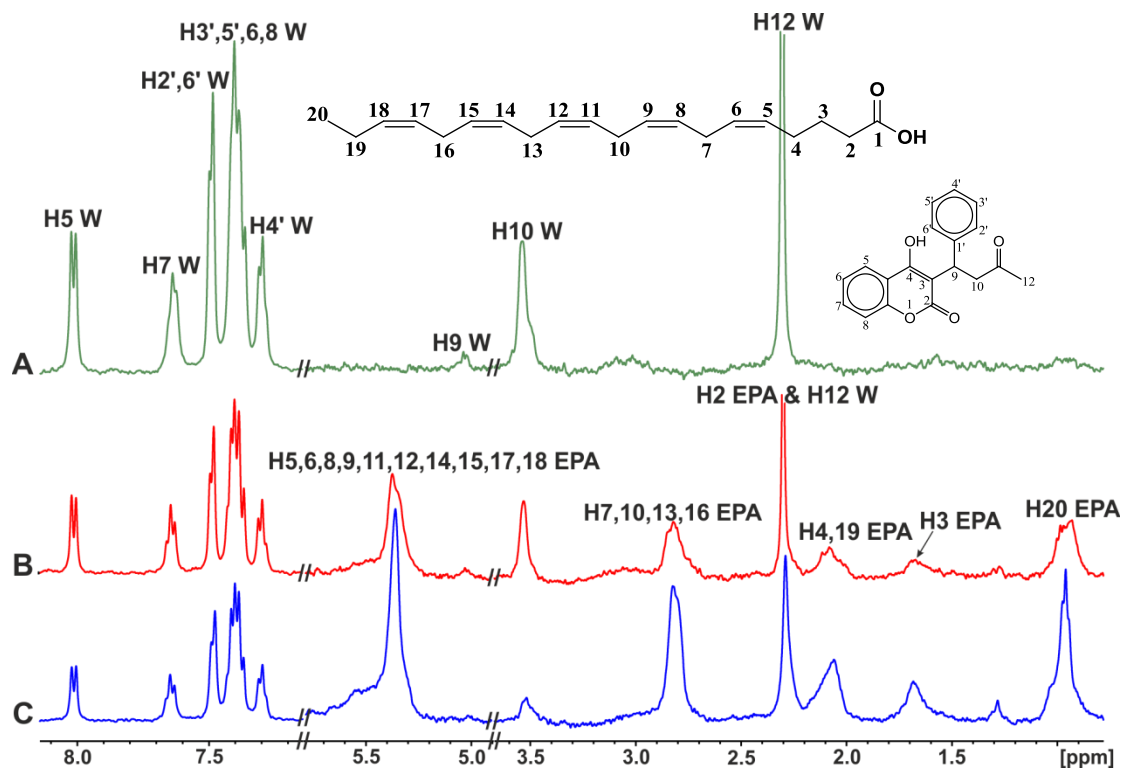


Εικόνα 4.8. Φάσματα STD-NMR της βαρφαρίνης (W) (2.5 mM): (A) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

Περαιτέρω μελέτη περιελάμβανε την αλληλεπίδραση του EPA με την πρωτεΐνη HSA. Στο φάσμα STD NMR του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του EPA αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.3 mM), σε μοριακή αναλογία EPA/βαρφαρίνης \approx 1/1.3, διαπιστώνουμε πολύ σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του EPA, με τα δις-αλλυλικά πρωτόνια H7,10,13,16 να εμφανίζουν το μεγαλύτερο % ποσοστό μείωσης STD 84.8% (Πίνακας 4.1). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον ανταγωνισμό μεταξύ του λιπαρού οξέος και του φαρμάκου για την ίδια θέση πρόσδεσης, FA7.

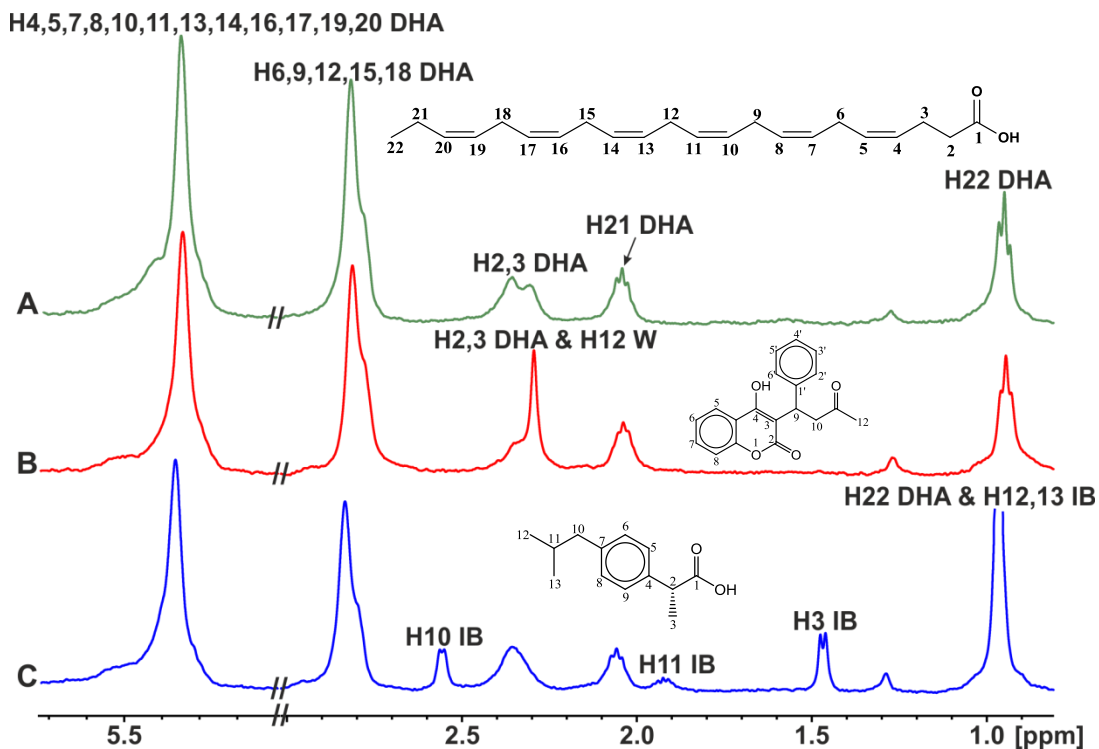
Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε και το αντίστροφο πείραμα με τη βαρφαρίνη, όπως και στην περίπτωση του α-λινολενικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, στην Εικόνα 4.9A απεικονίζεται το φάσμα STD NMR της βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με HSA (25 μ M) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Μετά την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας του EPA (3.0 mM) στο σύμπλεγμα βαρφαρίνης/HSA παρατηρούμε σημαντική μείωση του STD της βαρφαρίνης (Εικόνα 4.9C, Πίνακας 4.2). Μάλιστα, όπως φαίνεται και στους Πίνακες 4.1 και 4.2 τα % ποσοστά μείωσης STD του EPA και της βαρφαρίνης είναι περίπου ίδια. Αυτό πιθανόν υποδηλώνει ότι το EPA και η βαρφαρίνη προσδένονται ανταγωνιστικά στη FA7 και μάλιστα με παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και το ανταγωνιστικό πείραμα του EPA με την ιβουπροφαίνη. Με την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.9 mM) στο διάλυμα του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) με HSA, σε μοριακή αναλογία EPA/ιβουπροφαίνης \approx 1/1.1, παρατηρούμε σημαντική μείωση των σημάτων STD όλων των πρωτονίων του EPA. Προφανώς, η πρόσδεση του EPA με την ιβουπροφαίνη, αντανakλά τον ανταγωνισμό για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης, FA3 και FA6.



Εικόνα 4.9. Φάσματα STD-NMR της βαρφαρίνης (W) (2.5 mM): (A) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη της στο σύμπλεγμα EPA (3.0 mM)/HSA (25 μ M), (C) μετά την προσθήκη EPA (2.5 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

Τέλος, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του λιπαρού οξέος DHA με την πρωτεΐνη HSA. Στην Εικόνα 4.10A απεικονίζεται το φάσμα STD NMR του DHA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια του DHA αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Στην Εικόνα 4.10B απεικονίζεται το φάσμα STD NMR του DHA μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.2 mM) σε μοριακή αναλογία DHA/βαρφαρίνης \approx 1/1.3. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1, η προσθήκη βαρφαρίνης οδήγησε σε πολύ μικρή μείωση των σημάτων STD του DHA. Προφανώς, το DHA προσδένεται ανταγωνιστικά με τη βαρφαρίνη στη θέση FA7 και μάλιστα με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και



Εικόνα 4.10. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων STD-NMR του DHA (2.5 mM): (A) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆, (B) μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.2 mM) στο διάλυμα (A), (C) μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (1.9 mM) στο διάλυμα (A) (T=310 K, αριθμός σαρώσεων =80, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος =50min).

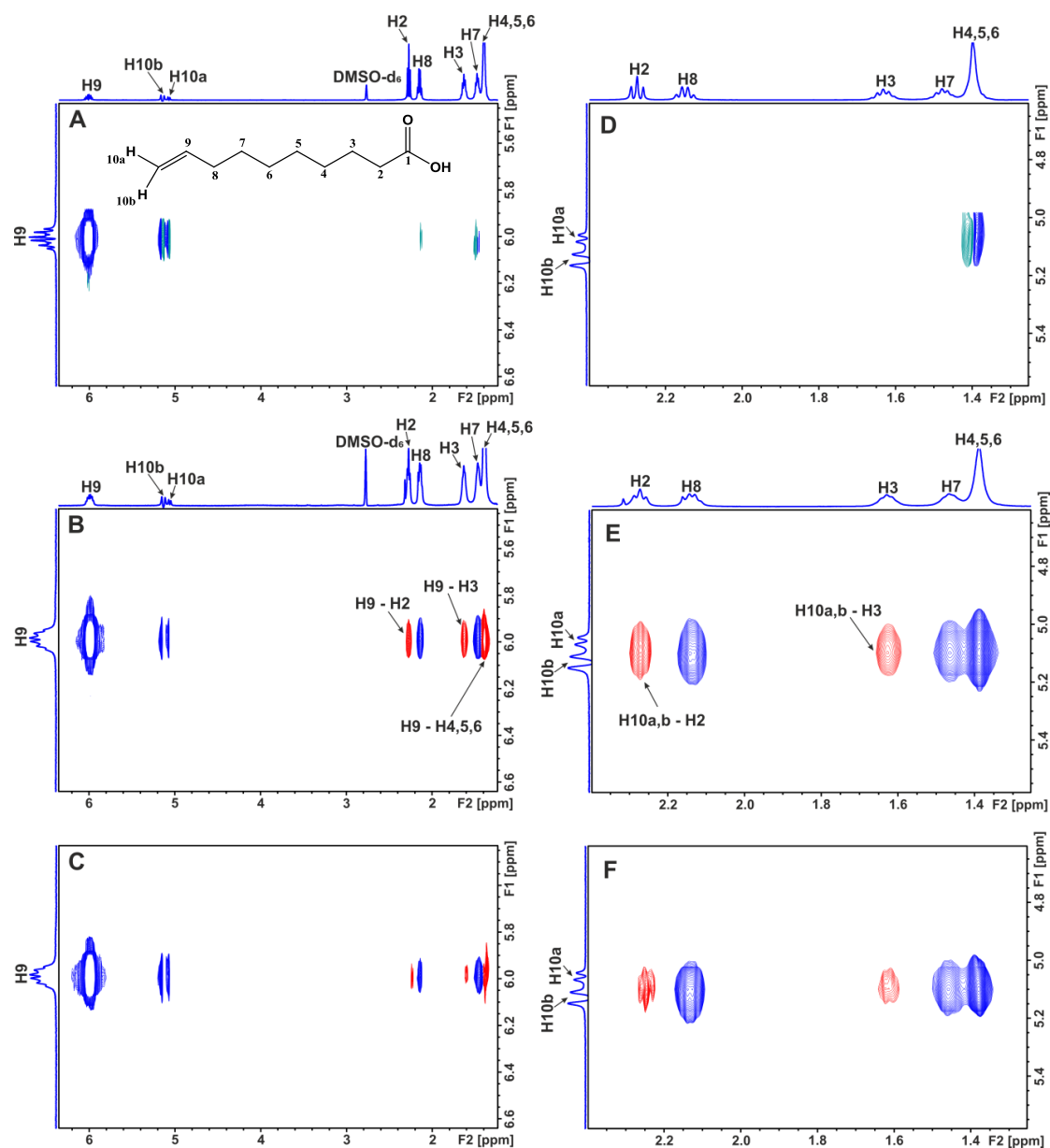
κατά την πραγματοποίηση του ανταγωνιστικού πειράματος με ιβουπροφαίνη. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα 4.10C αντιπροσωπεύει το φάσμα STD NMR του DHA μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (1.9 mM) σε μοριακή αναλογία DHA/ιβουπροφαίνης $\approx 1/0.8$. Η προσθήκη της ιβουπροφαίνης, όπως και στην περίπτωση της βαρφαρίνης προκάλεσε πολύ μικρή μείωση των % ολοκληρωμάτων STD του DHA (Πίνακας 4.1), που υποδηλώνει ότι το DHA προσδένεται ανταγωνιστικά με την ιβουπροφαίνη στις θέσεις FA3 και FA6 και μάλιστα με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης. Επομένως, η πρόσδεση του DHA παρουσία των εξωγενών φαρμάκων, βαρφαρίνης και ιβουπροφαίνης, αντανακλά ανταγωνισμό για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης (FA7, FA3, FA6) καθώς και την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης του λιπαρού οξέος. Όμως, όπως και στην περίπτωση του ALA, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η αλλοστερική αλληλεπίδραση. Η περίπτωση αυτή μελετήθηκε διεξοδικά με τη χρήση τη μεθοδολογίας INPHARMA NMR (βλέπετε την Ενότητα 4.3).

4.2 Μελέτη διαμορφωτικών αλλαγών λιπαρών οξέων κατά την αλληλεπίδρασή τους με την αλβουμίνη ορού (BSA / HSA) με τη χρήση μεταφερόμενου φαινομένου NOE (tr-NOESY NMR)

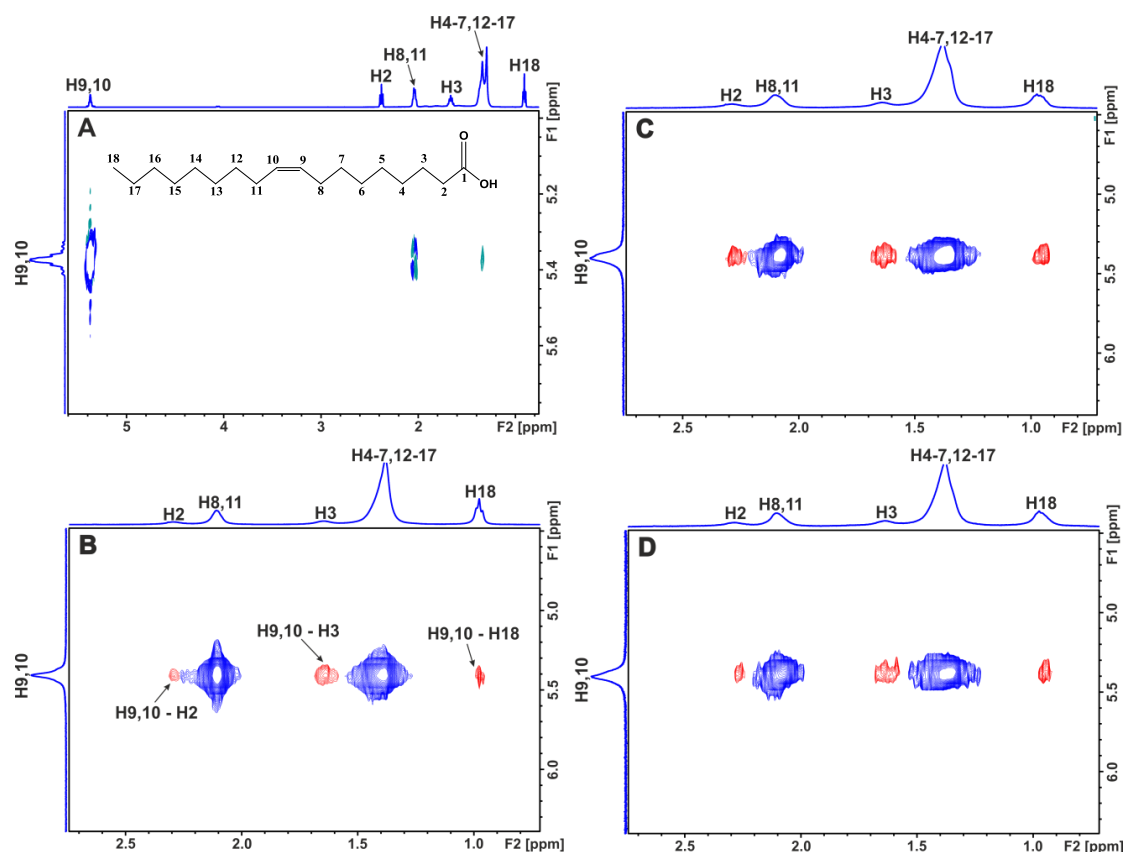
Το επόμενο ερώτημα που προκύπτει για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη ορού (BSA /HSA) είναι εάν αλλάζει η διαμόρφωσή τους κατά τη πρόσδεση στην πρωτεΐνη. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό μπορεί να δοθεί με τη χρήση της τεχνικής tr-NOESY NMR. Η σημασία του πειράματος αυτού έγκειται στη δυνατότητα μελέτης διαμορφωτικών αλλαγών μεταξύ της ελεύθερης και της προσδεμένης δομής βιοδραστικών ενώσεων. Η μέθοδος βασίζεται στη μεγάλη διαφορά των χρόνων διαμήκους αποδιέγερσης T_1 μεταξύ των μικρού και μεγάλου M.B. μορίων. Οι μικρού M.B. υποκαταστάτες χαρακτηρίζονται από θετικές τιμές NOE ενώ οι μεγάλου M.B. υποδοχείς παρουσιάζουν αρνητικές τιμές. Όταν ένα μόριο μικρού M.B. αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη-υποδοχέα συμπεριφέρεται ως μέρος αυτού του μακρομορίου και υιοθετεί την αντίστοιχη συμπεριφορά NOE. Αυτό έχει ως συνέπεια την εμφάνιση αρνητικών τιμών tr-NOE που αντανακλούν τη διαμόρφωσή του σε κατάσταση πρόσδεσης [Post, 2003; Potenza et al, 2011; Mari et al, 2010; Primikyri et al, 2018] (βλέπετε υποενότητα 2.1.2).

Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR (A&D) του ελεύθερου καπρολεϊκού οξέος (2.5 mM) και 2D tr-NOESY NMR (B,C,E,F) του καπρολεϊκού οξέος με BSA/HSA (25 μ M), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% DMSO- d_6 στους 310K. Το φάσμα του καπρολεϊκού οξέος παρουσίασε αρνητικά σήματα NOE, της ίδιας φάσης ως προς τη διαγώνιο, σε υδατικό διάλυμα (A&D) ακόμη και απουσία BSA/HSA. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο σχηματισμό μικκυλίων στο υδατικό διάλυμα. Στην περίπτωση, για παράδειγμα, συμμετοχής τουλάχιστον 20 μονομερών, το συνολικό M.B. του μικκυλίου αντιστοιχεί στα $280 \times 20 = 5.6$ kDa. Άρα συμπεριφέρονται ως μια μικρή πρωτεΐνη 56-60 αμινοξέων με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σήματα NOE με την ίδια φάση ως προς τη διαγώνιο. Στα φάσματα tr-NOESY NMR του καπρολεϊκού οξέος παρουσία BSA/HSA παρατηρούμε αρκετά νέα ενδομοριακά σήματα NOE του καπρολεϊκού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, το καπρολεϊκό οξύ εμφανίζει σημαντικά, μακράς εμβέλειας, ενδομοριακά NOE μεταξύ των H10a,b – H2, H3 καθώς και H9 – H2, H3, που παρουσιάζονται στα φάσματα με κόκκινο χρώμα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει

την παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του καπρολεϊκού οξέος στη δεσμευμένη κατάσταση.



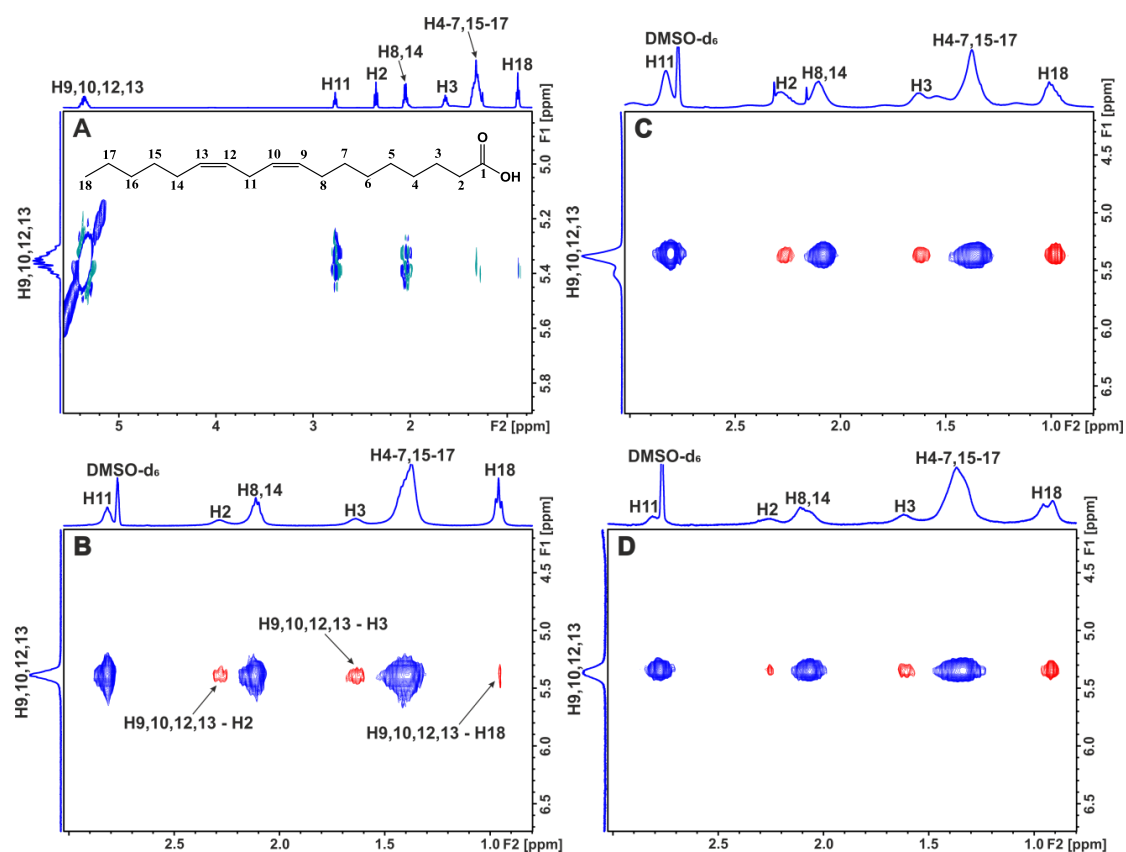
Εικόνα 4.11. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων: 2D NOESY NMR (A, D) ελεύθερου καπρολεϊκού οξέος (2.5 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. 2D tr-NOESY NMR (B, E) καπρολεϊκού οξέος (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. 2D tr-NOESY NMR (C, F) καπρολεϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (χρόνος ανάμιξης = 300ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 4.12. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων: (A) 2D NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (2.5 mM) σε CDCl_3 με χρόνο ανάμειξης 100ms. (B) 2D NOESY NMR του ελεύθερου ελαϊκού οξέος (2.5 mM) σε 10 mM ρυθμιστικό PBS σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$. (C) 2D tr-NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$. (D) 2D tr-NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$. Στα (B), (C) και (D) χρησιμοποιήθηκε χρόνος ανάμειξης 300ms. ($T = 310\text{K}$, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Στην Εικόνα 4.12A απεικονίζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (2.5 mM) σε CDCl_3 , όπου παρατηρούμε ότι τα σήματα NOE είναι αντίθετης φάσης ως προς τη διαγώνιο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο αφού το ελαϊκό οξύ είναι ένα μόριο μικρού M.B. και λόγω της γρήγορης μοριακής περιστροφής και του μικρού χρόνου συσχέτισης παρουσιάζει θετικά σήματα NOE αρνητικής φάσης ως προς τη διαγώνιο του φάσματος. Στην Εικόνα 4.12B απεικονίζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D NOESY NMR του ελεύθερου ελαϊκού οξέος (2.5 mM) και στις Εικόνες 4.12C και 4.12D επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR του ελαϊκού οξέος με BSA (C) (25 μM) και HSA (D) (25 μM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Το ελαϊκό οξύ έδειξε την παρουσία αρνητικών NOE σε υδατικό διάλυμα ακόμη και απουσία BSA/HSA, όπως και το καπρολεϊκό οξύ. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός

ότι το FFA υπάρχει σε μικκυλιακή μορφή σε υδατικό διάλυμα, με μεγάλο M.B. που έχει ως αποτέλεσμα αρνητικές τιμές NOE. Επιπλέον, στο φάσμα 2D NOESY NMR του ελεύθερου ελαϊκού οξέος παρατηρούμε την παρουσία νέων σημάτων NOE μακράς εμβέλειας, μεταξύ των πρωτονίων του διπλού δεσμού H9,10 με τα α -πρωτόνια, H2 και τα β -πρωτόνια, H3, που παρουσιάζονται στο φάσμα 4.12B με κόκκινο χρώμα. Τα νέα αυτά

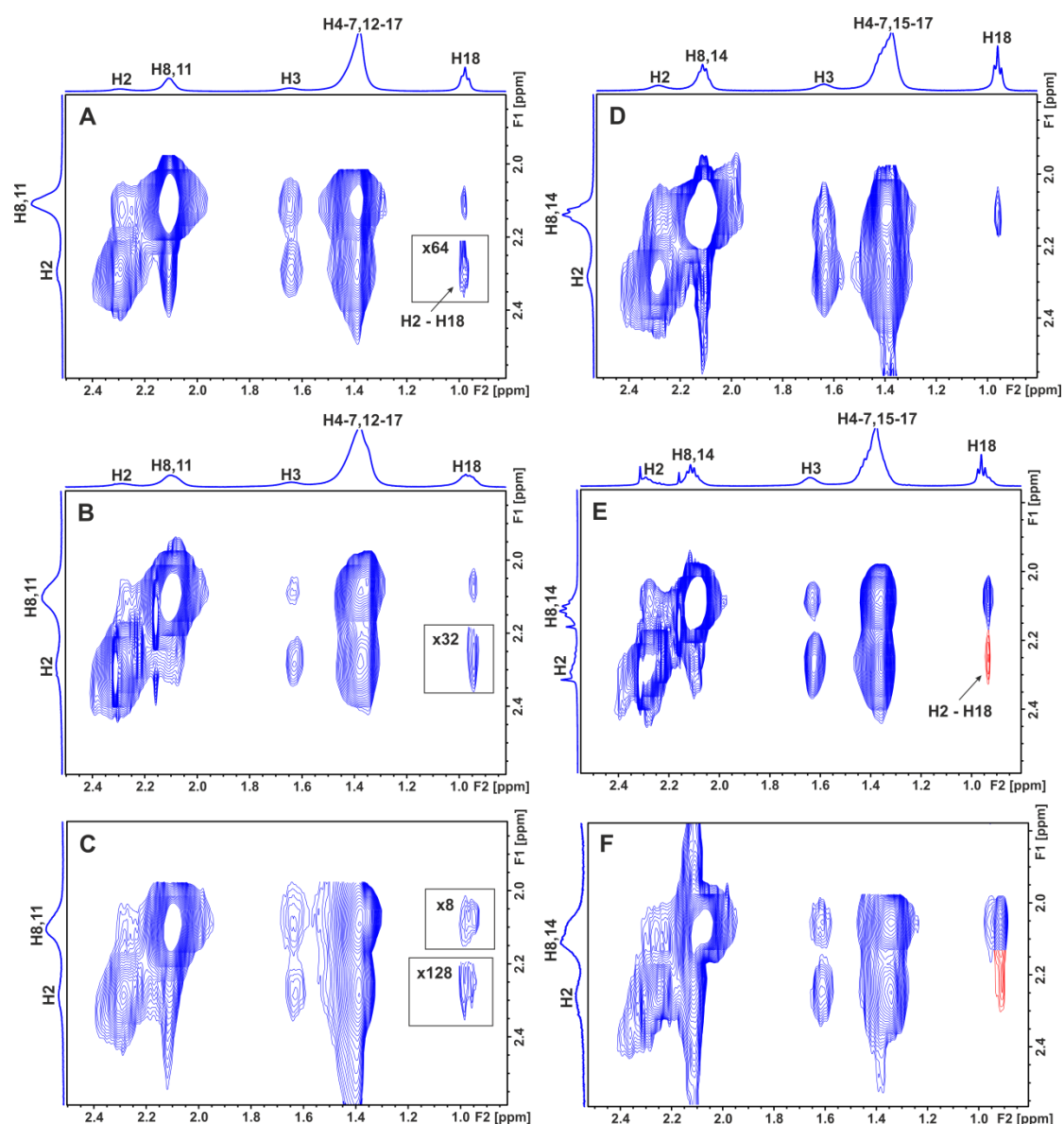


Εικόνα 4.13. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR: (A) λιγνελαιϊκού οξέος (2.5 mM) σε CDCl_3 με χρόνο μίξης 100 ms, (B) ελεύθερου λιγνελαιϊκού οξέος (2.5 mM) σε 10 mM ρυθμιστικό PBS σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$, (C) λιγνελαιϊκού οξέος (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ και (D) λιγνελαιϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$. Τα (B), (C) και (D) λήφθηκαν με χρόνο μίξης 300 ms ($T = 310\text{K}$, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

ενδομοριακά σήματα NOE παρατηρούνται και παρουσία BSA/HSA και μάλιστα εμφανίζονται πιο έντονα. Συνεπώς, αποδεικνύεται η παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του ελαϊκού οξέος, τόσο στη μικκυλιακή όσο και στη δεσμευμένη κατάσταση.

Στην Εικόνα 4.13A απεικονίζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D NOESY NMR του λινελαϊκού οξέος (2.5 mM) σε CDCl_3 στους 298K. Παρατηρούμε ότι τα σήματα NOE, όπως και στην περίπτωση του ελαϊκού οξέος, είναι σε αντίθετη φάση ως προς τη διαγώνιο. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο αφού το λινελαϊκό οξύ είναι ένα μόριο μικρού M.B. Στην Εικόνα 4.13B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D NOESY NMR του ελεύθερου λινελαϊκού οξέος (2.5 mM) και στις Εικόνες 4.13C και 4.13D επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D *tr*-NOESY NMR του λινελαϊκού οξέος με BSA (C) (25 μM) και HSA (D) (25 μM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Το λινελαϊκό οξύ έδειξε την παρουσία αρνητικών σημάτων NOE σε υδατικό διάλυμα ακόμη και απουσία BSA/HSA. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το FFA υπάρχει σε μικκυλιακή μορφή σε υδατικό διάλυμα, με μεγάλο M.B. που έχει ως αποτέλεσμα αρνητικές τιμές NOE. Επιπλέον, στο φάσμα 2D NOESY NMR του ελεύθερου λινελαϊκού οξέος παρατηρούμε την παρουσία νέων σημάτων NOE μακράς εμβέλειας, μεταξύ των πρωτονίων του διπλού δεσμού H9,10,12,13 με τα H2 και H3, που παρουσιάζονται στο φάσμα 4.13B με κόκκινο χρώμα. Τα νέα αυτά ενδομοριακά σήματα NOE παρατηρούνται και παρουσία BSA/HSA και μάλιστα εμφανίζονται πιο έντονα. Αυτό υποδηλώνει την παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του λινελαϊκού οξέος, τόσο στη μικκυλιακή όσο και τη δεσμευμένη κατάσταση.

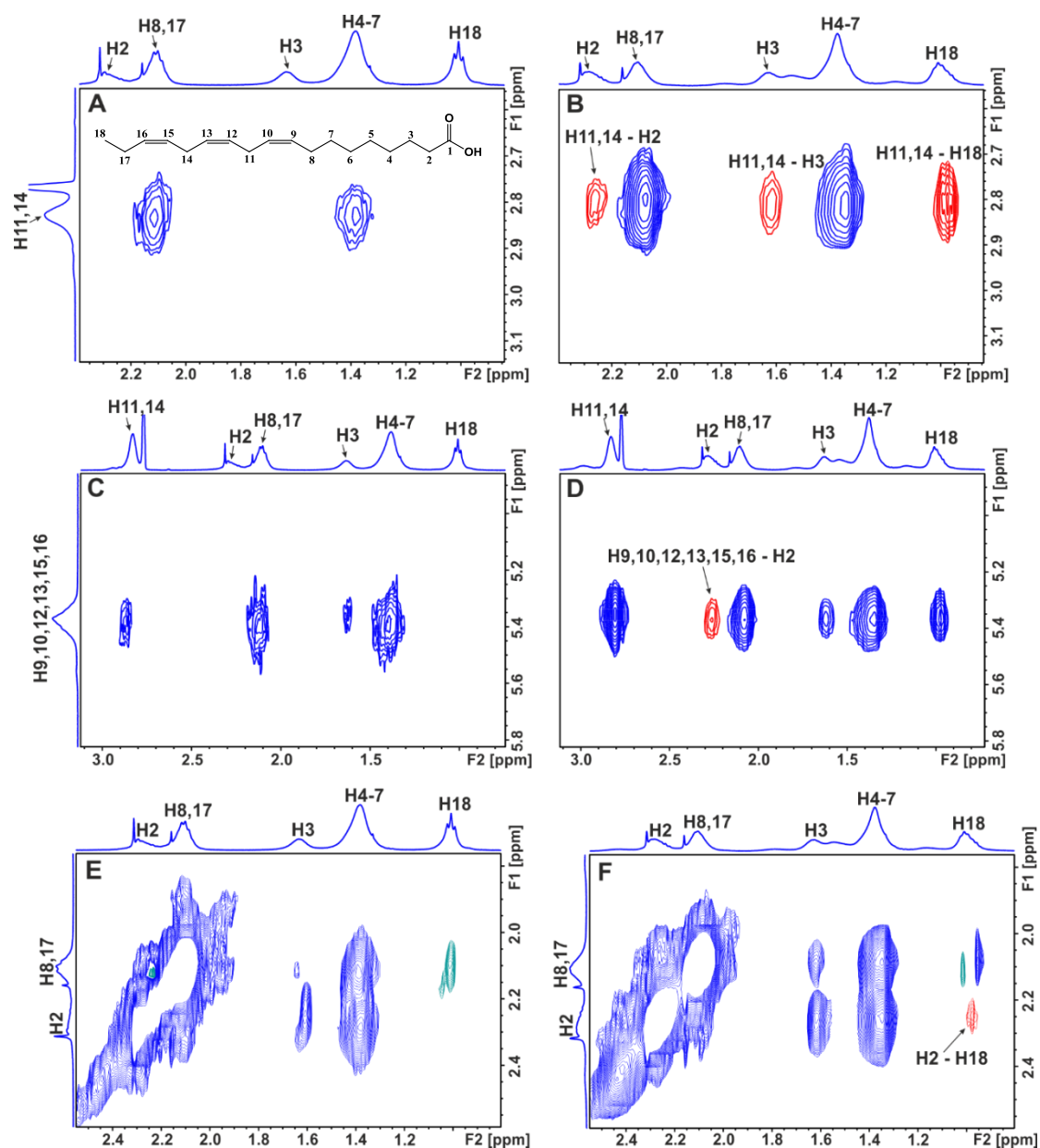
Στην Εικόνα 4.14 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR του ελεύθερου ελαϊκού οξέος (A) και του ελεύθερου λινελαϊκού οξέος (D) σε μικκυλιακή κατάσταση. Επιπλέον, παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες περιοχές των φασμάτων 2D *tr*-NOESY NMR των λιπαρών οξέων παρουσία BSA (B&E) και HSA (C&F). Στην περίπτωση του ελαϊκού οξέος παρατηρούμε ακόμα και σε μικκυλιακή κατάσταση την παρουσία σήματος NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων της μεθυλομάδας H18 με τα α -πρωτόνια H2. Αντίθετα, στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος δεν παρατηρούμε τη παρουσία σήματος μεταξύ H18-H2 σε μικκυλιακή κατάσταση, παρά μόνο κατά την αλληλεπίδραση με BSA/HSA. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη ενός επιπλέον διπλού δεσμού στο λινελαϊκό οξύ.



Εικόνα 4.14. Επιλεγμένες περιοχές φασμάτων 2D NOESY NMR σε ρυθμιστικό PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆: (A) ελαϊκού οξέος (2.5 mM), (B) ελαϊκού οξέος (2.5 mM) με BSA (25 μM), (C) ελαϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM). Επιλεγμένες περιοχές φασμάτων 2D NOESY NMR σε ρυθμιστικό PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆: (D) λινελαϊκού οξέος (2.5 mM), (E) λινελαϊκού οξέος (2.5 mM) με BSA (25 μM), (F) λινελαϊκού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM) (χρόνος μίξης 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE μεταξύ των H2 και H18 σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

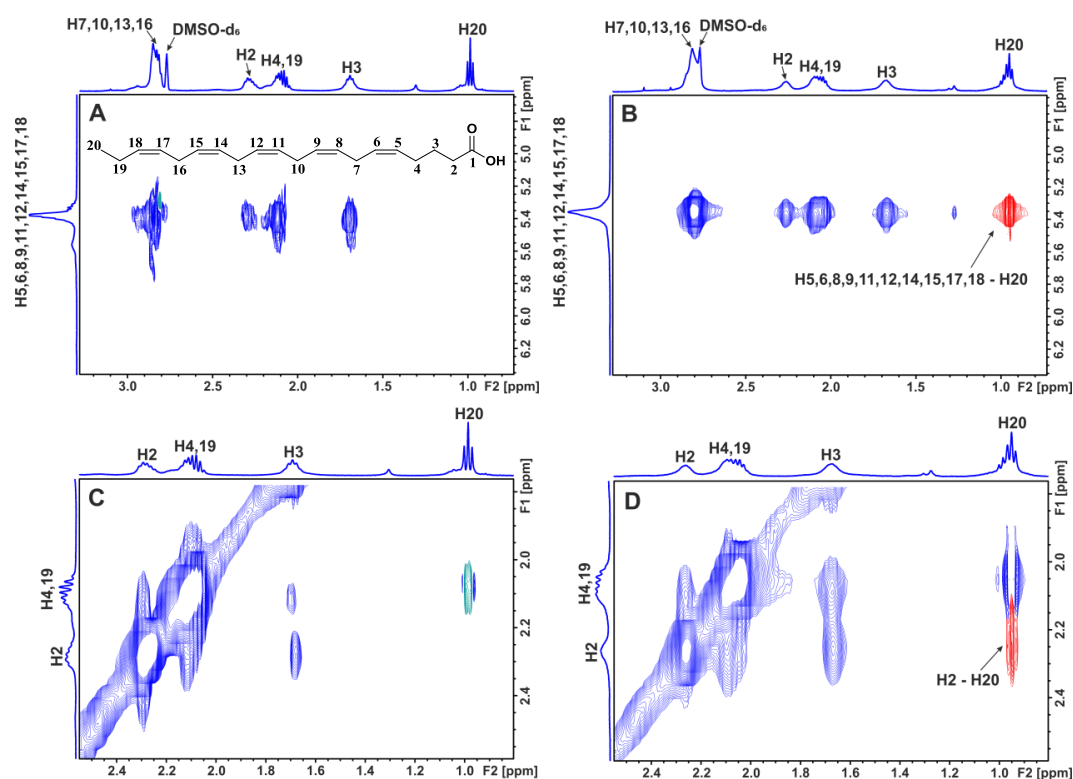
Στην Εικόνα 4.15 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR (A,C,E) του ελεύθερου α-λινολενικού οξέος (2.5 mM), καθώς και οι αντίστοιχες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (B,D,F) παρουσία HSA (25μM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το α-λινολενικό οξύ έδειξε την παρουσία σημάτων NOE της ίδιας φάσης με τη διαγώνιο σε υδατικό διάλυμα ακόμη και απουσία HSA. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο

γεγονός ότι το FFA υπάρχει σε μικκυλιακή μορφή στο υδατικό διάλυμα, με μεγάλο M.B. που έχει ως αποτέλεσμα αρνητικές τιμές NOE. Τα φάσματα 2D tr-NOESY NMR του α-λινολενικού οξέος παρουσία HSA παρέχουν αρκετά νέα ενδομοριακά σήματα NOE του λιπαρού οξέος κατά την πρόσδεσή του. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία HSA, παρατηρήθηκαν NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των δις-αλλυλικών



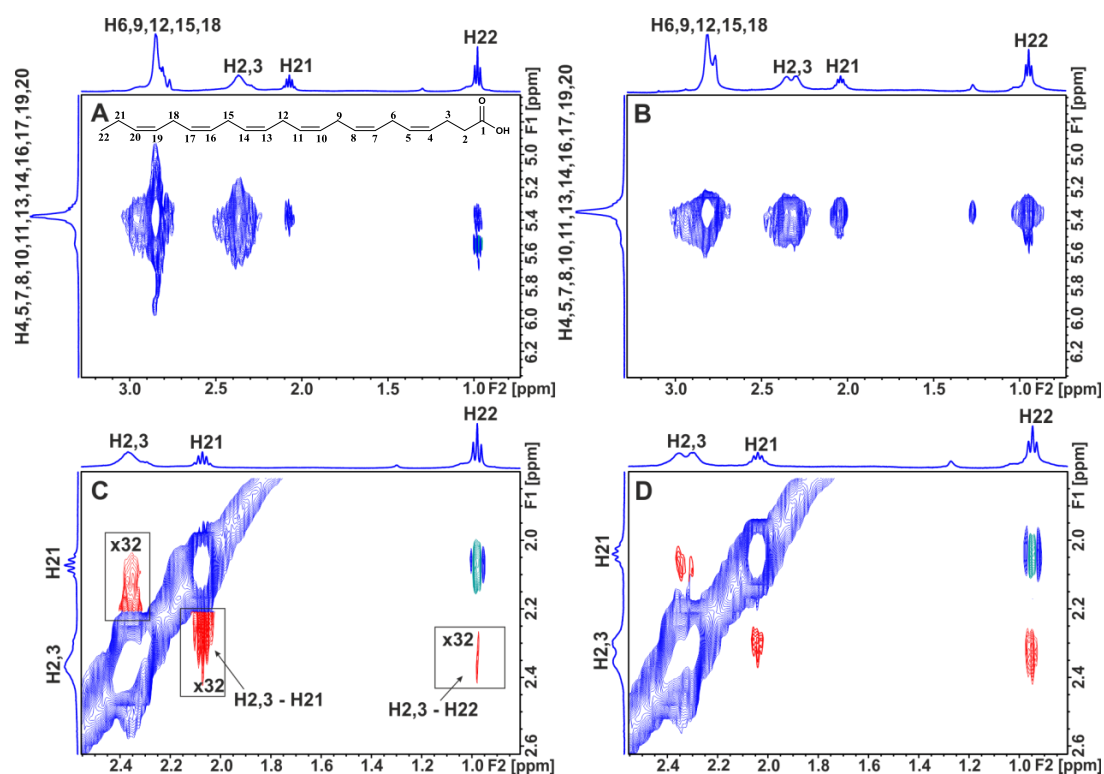
Εικόνα 4.15. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων: (A,C,E) 2D NOESY NMR του ελεύθερου α-λινολενικού οξέος (2.5 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (B,D,F) 2D tr-NOESY NMR του α-λινολενικού οξέος (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (χρόνος μίξης 300ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

πρωτονίων H11,14 με H2, H3 καθώς και των τερματικών πρωτονίων H18 με H2, που αποδεικνύουν την παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του α-λινολενικού οξέος στη δεσμευμένη κατάσταση.



Εικόνα 4.16. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων: (A,C) 2D NOESY NMR του ελεύθερου EPA (2.5 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (B,D) 2D tr-NOESY NMR του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (χρόνος μίξης 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Στην Εικόνα 4.16 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR (A,C) του ελεύθερου EPA (2.5 mM), καθώς και οι αντίστοιχες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (B,D) παρουσία HSA (25μM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το EPA έδειξε την παρουσία αρνητικών σημάτων NOE στο υδατικό διάλυμα ακόμη και απουσία HSA, λόγω της ύπαρξης μικκυλιακής μορφής στο υδατικό διάλυμα. Στις επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR του EPA παρουσία HSA παρατηρούνται ενδομοριακά σήματα NOE μακράς εμβέλειας, που σημειώνονται με κόκκινο χρώμα, με πιο χαρακτηριστικό το NOE μεταξύ των α- πρωτονίων H2 με τα πρωτόνια της μεθυλομάδας H20. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του EPA στη δεσμευμένη κατάσταση.



Εικόνα 4.17. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων: (A,C) 2D NOESY NMR του ελεύθερου DHA (2.5 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (B,D) 2D tr-NOESY NMR του DHA (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (χρόνος μίξης 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min). Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

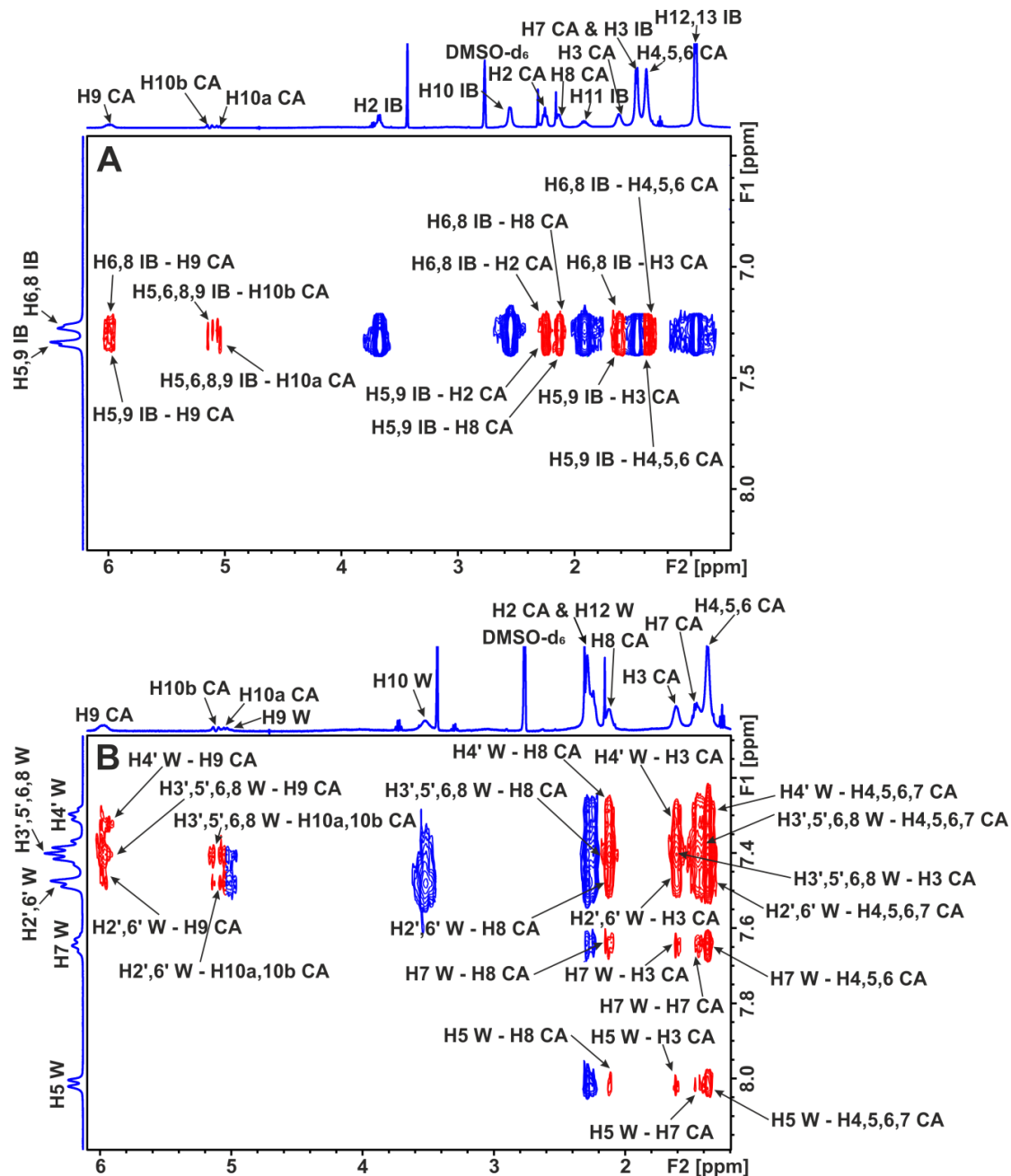
Στην Εικόνα 4.17 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR (A,C) του ελεύθερου DHA (2.5 mM), καθώς και οι αντίστοιχες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (B,D) παρουσία HSA (25μM), που λήφθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το DHA έδειξε την παρουσία σημάτων NOE της ίδιας φάσης με τη διαγώνιο στο υδατικό διάλυμα ακόμη και απουσία HSA, που μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη μικκυλιακής μορφής στο υδατικό διάλυμα. Επιπλέον, στο φάσμα 4.17C του ελεύθερου DHA παρατηρούμε την παρουσία νέων σημάτων NOE μακράς εμβέλειας, μεταξύ των H2,3 – H21 καθώς και H2,3 – H22, που παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα. Τα νέα αυτά ενδομοριακά σήματα NOE παρατηρούνται και παρουσία HSA και μάλιστα εμφανίζονται πιο έντονα. Συνεπώς, αποδεικνύεται η παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων του DHA, τόσο στη μικκυλιακή όσο και τη δεσμευμένη κατάσταση.

4.3 Χαρτογράφηση του προσανατολισμού των λιπαρών οξέων στη θέση πρόσδεσης στην αλβουμίνη ορού (BSA/HSA) με τη χρήση της τεχνικής INPHARMA NMR

Σε πρωτεΐνες με πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης, όπως στην περίπτωση αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης (BSA/HSA) με ελεύθερα λιπαρά οξέα, η χρήση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων NOE μεταξύ δύο υποκαταστατών, εκ των οποίων ο ένας γνωστής π.χ. κρυσταλλικής δομής, είναι πολύ πιο κατατοπιστική. Η τεχνική INPHARMA NMR βασίζεται στην παρατήρηση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων NOE μεταξύ δύο υποκαταστατών που αλληλεπιδρούν ανταγωνιστικά ως προς έναν κοινό μακρομοριακό υποδοχέα [Sanchez-Pedregal et al, 2005; Orts et al, 2008; Carlomango, 2012] με την προϋπόθεση ότι οι τιμές K_d είναι στο εύρος μM έως mM ($k_{\text{off}} < 100\text{-}1000 \text{ s}^{-1}$). Ο αριθμός τέτοιων διαμοριακών σημάτων NOE μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να εξαχθεί ο σχετικός προσανατολισμός των δύο υποκαταστατών στη θέση πρόσδεσης του μακρομοριακού υποδοχέα.

Στην Εικόνα 4.18Α παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM). Παρατηρούμε την παρουσία σημαντικών αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του καπρολεϊκού οξέος και της ιβουπροφαίνης, που υποδηλώνεται με τις κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE παρατηρούνται μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια του διπλού δεσμού H9, H10_{a,b}, τα πρωτόνια H8, H4,5,6,7, H3 και H2 του καπρολεϊκού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της BSA. Παρόμοια αρνητικά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών λήφθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης HSA.

Τα διαμοριακά αυτά σήματα NOE εξαρτώνται από την απόσταση (r^{-6}) [Li et al, 2001], επομένως, δεν προέρχονται από μια άμεση μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των δύο υποκαταστατών, αλλά μάλλον από μια διαδικασία διάχυσης σπιν που διαμεσολαβείται από τα πρωτόνια του υποδοχέα (BSA/HSA) στη θέση πρόσδεσης. Επομένως, ο αριθμός και η ένταση κάθε διαμοριακού NOE εξαρτώνται από τις



Εικόνα 4.18. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: (A) ιβουπροφαίνης (IB) (2.2 mM), (B) βαρφαρίνης (W) (2.2 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

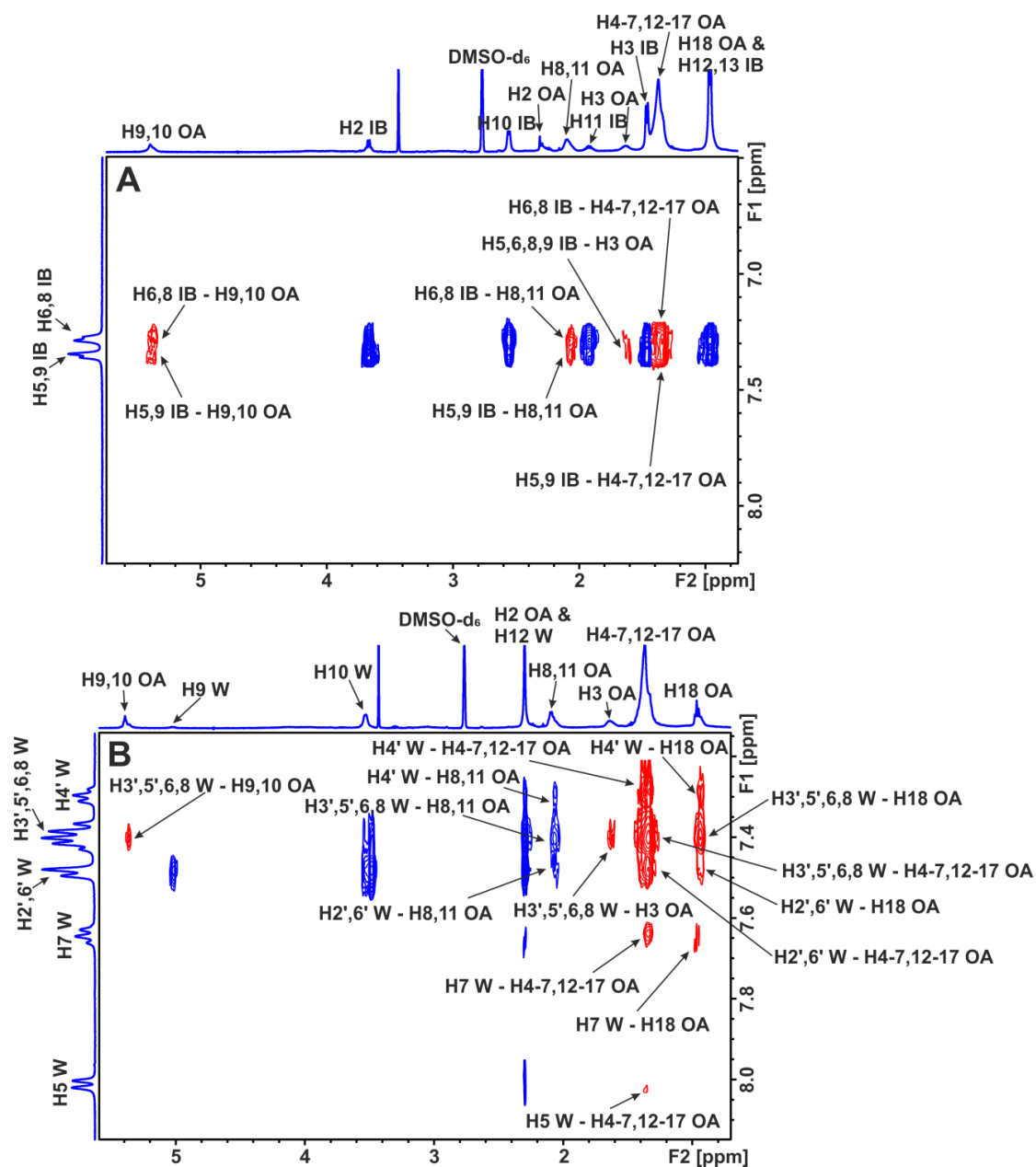
ειδικές αλληλεπιδράσεις καθενός από τους δύο υποκαταστάτες με την πρωτεΐνη, αν και οι δύο υποκαταστάτες δεν βρίσκονται κοντά στο χώρο κατά τη διάρκεια του χρόνου μίξης (300 ms) του πειράματος NMR [Sanchez-Pedregal et al, 2005; Orts et al, 2008; Carlomango, 2012]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2 και H3 του καπρολεϊκού

οξέος. Αυτό αποδεικνύει τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών, σε εξαιρετική συμφωνία με τα αποτελέσματα docking (Ενότητα 4.4). Παραδόξως, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των H_{12,13} της ιβουπροφαίνης με τα H₂ του καπρολεϊκού οξέος, αν και οι αποστάσεις των πρωτονίων είναι πέραν των ορίων ανίχνευσης των σημάτων NOE. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην παρουσία μιας δεύτερης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του καπρολεϊκού οξέος εντός της FA4, η οποία προτάθηκε από τον δομικό προσδιορισμό με ακτίνες X [Petitpas, Grüne et al, 2001] και επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking της παρούσας διατριβής (Ενότητα 4.4).

Στην Εικόνα 4.18B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.2 mM). Παρατηρούμε σημαντικό αριθμό αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του καπρολεϊκού οξέος και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), τα οποία επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H₃ του καπρολεϊκού οξέος με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου (H_{2',6'}, H_{3',5'} και H_{4'}) όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης (H₅, H₇ και H_{6,8}) της βαρφαρίνης, παρότι η κρυσταλλογραφική απόσταση των κέντρων των δύο αρωματικών δακτυλίων είναι ~ 6.9 Å. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως, δύο διαμορφωτικών καταστάσεων του καπρολεϊκού οξέος στη θέση FA7. Αυτή η διαμορφωτική ευελιξία, η οποία επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking, ερμηνεύει γιατί η θέση και οι διαμορφωτικές καταστάσεις των FFA στη θέση πρόσδεσης FA7 δεν προσδιορίστηκαν με ακρίβεια, παρά τις πολυάριθμες δομικές μελέτες με ακτίνες X [Curry et al, 1998; Bhattacharya et al, 2000; Petitpas, Grüne et al, 2001]. Παρόμοια αρνητικά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ του καπρολεϊκού οξέος και της βαρφαρίνης λήφθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης HSA.

Στην Εικόνα 4.19A παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (3.2 mM). Παρατηρούμε την παρουσία σημαντικών αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE

μεταξύ του ελαϊκού οξέος και της ιβουπροφαίνης, που υποδηλώνεται με τις κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα ολεφινικά πρωτόνια H9,10, τα αλλυλικά πρωτόνια H8,11 και τα



Εικόνα 4.19. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: (A) ιβουπροφαίνης (IB) (3.2 mM), (B) βαρφαρίνης (W) (3.2 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

β -πρωτόνια H3 του ελαϊκού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της

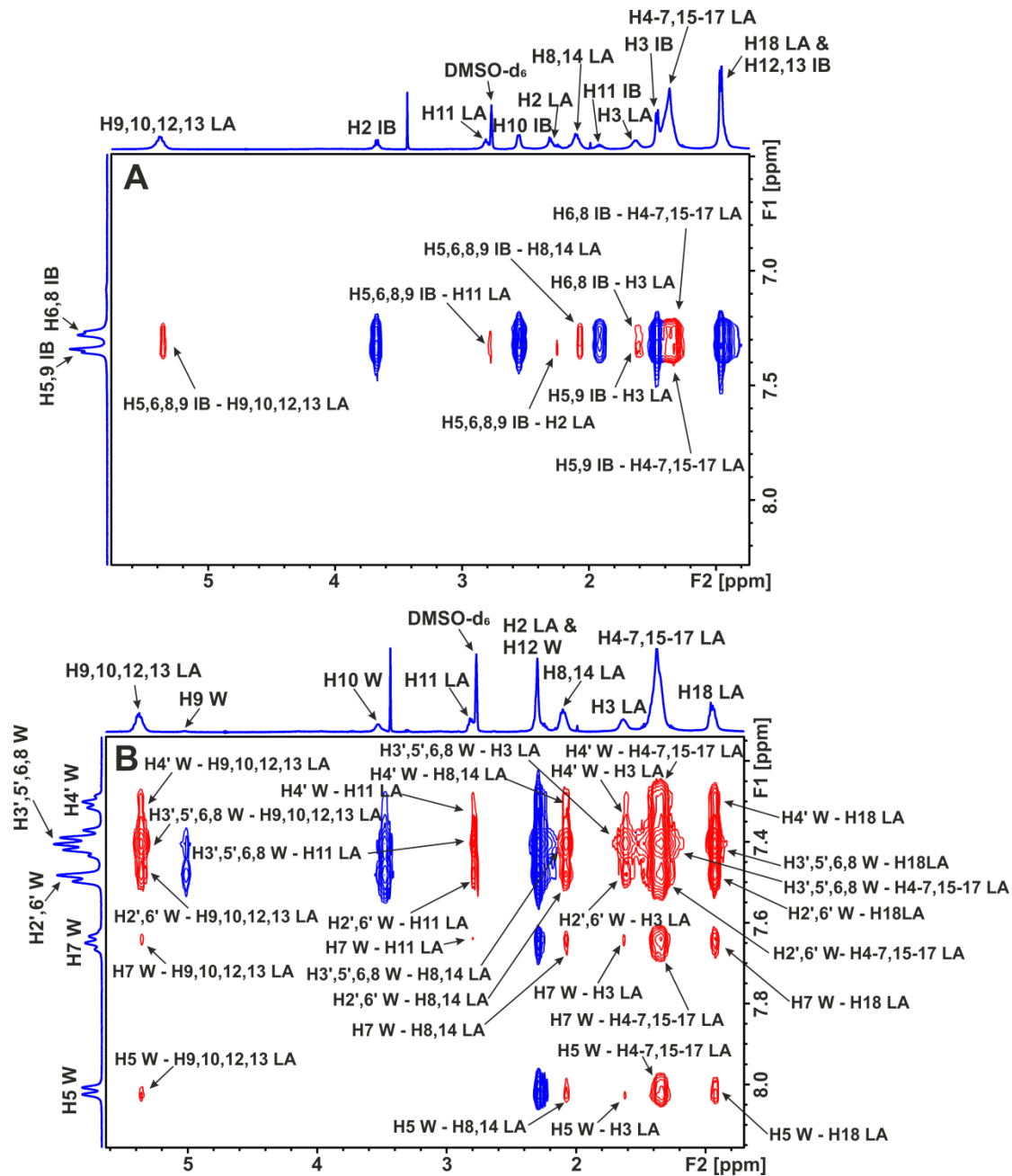
BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2 και H3 του ελαϊκού οξέος. Αυτό αποδεικνύει τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών που είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τα αποτελέσματα docking. Παραδόξως, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ του H11 της ιβουπροφαίνης με τα H2 και H3 του ελαϊκού οξέος, αν και οι αποστάσεις των πρωτονίων είναι πέραν των ορίων ανίχνευσης σημάτων NOE. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην παρουσία μιας δεύτερης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του ελαϊκού οξέος εντός της θέσης πρόσδεσης FA4, η οποία προτάθηκε από τον δομικό προσδιορισμό με ακτίνες X [Petitpas, Grüne et al, 2001] και επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking (βλέπετε Ενότητα 4.4).

Στην Εικόνα 4.19B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.2 mM). Παρατηρούμε σημαντικό αριθμό αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του ελαϊκού οξέος και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), οι οποίες επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H3 του ελαϊκού οξέος με τα αρωματικά πρωτόνια H3',5',6,8 της βαρφαρίνης, καθώς και των τερματικών πρωτονίων H18 του ελαϊκού οξέος με τα πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου (H2',6', H3',5' και H4') όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης (H7 και H6,8) της βαρφαρίνης. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως, δύο διαμορφωτικών καταστάσεων του ελαϊκού οξέος στη θέση πρόσδεσης FA7. Αυτή η διαμορφωτική ευελιξία επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking. Παρόμοια αρνητικά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ του ελαϊκού οξέος και της βαρφαρίνης λήφθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης HSA.

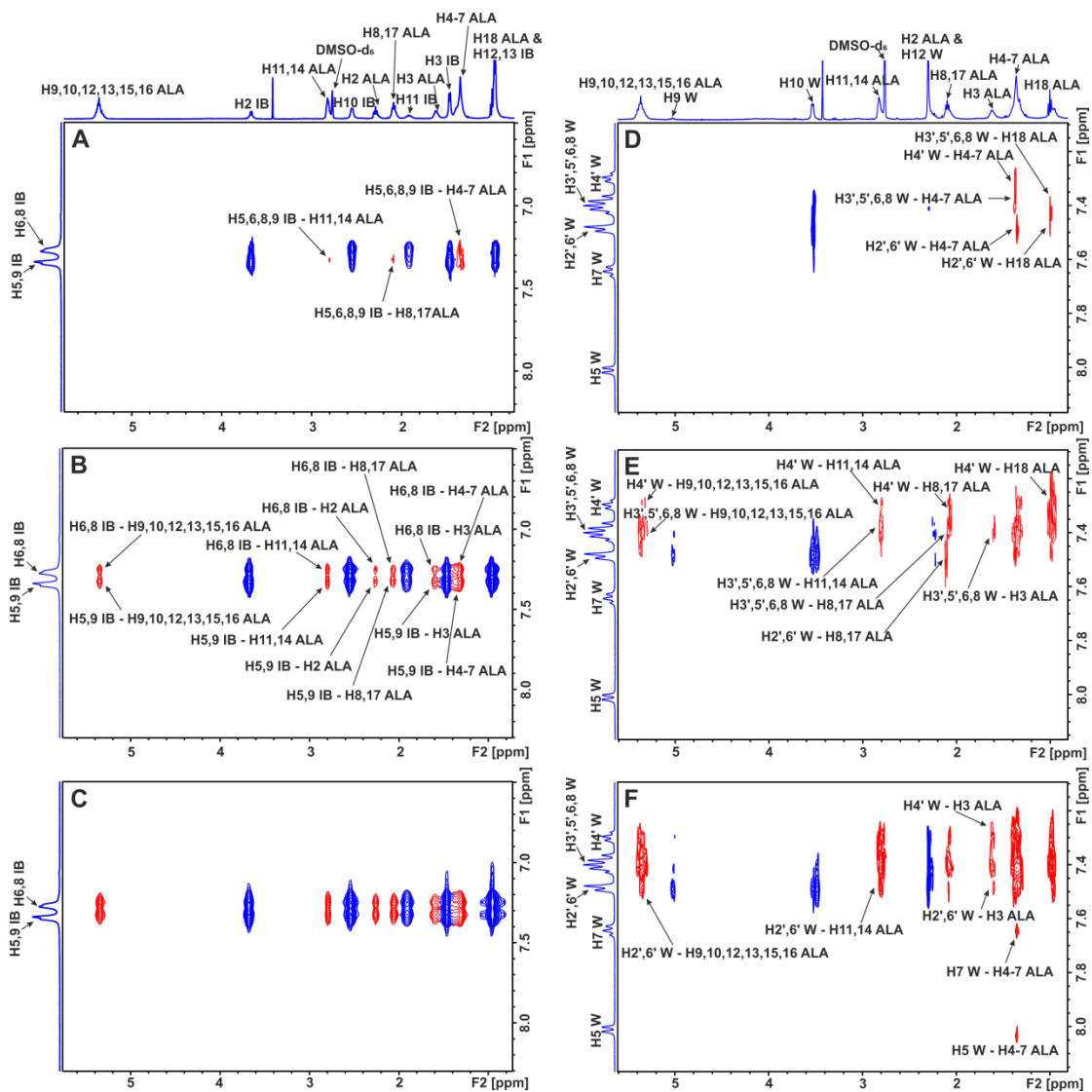
Στην Εικόνα 4.20A παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του λινελαϊκού οξέος (LA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (3 mM). Παρατηρούμε την παρουσία σημαντικών αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του λινελαϊκού οξέος και της ιβουπροφαίνης (κόκκινες διασταυρούμενες

κορυφές). Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE παρατηρούνται μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα ολεφινικά πρωτόνια H9,10,12,13, τα δις-αλλυλικά πρωτόνια H11, τα αλλυλικά πρωτόνια H8,14 και τα πρωτόνια H2 και H3 του λινελαϊκού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2 και H3 του λινελαϊκού οξέος. Αυτό αποδεικνύει τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών που είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τα αποτελέσματα docking. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ του H11 της ιβουπροφαίνης με τα H2 και H3 του λινελαϊκού οξέος, που οφείλονται στην παρουσία μιας δεύτερης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του λινελαϊκού οξέος εντός της θέσης πρόσδεσης FA4, όπως προκύπτει άλλωστε και από τους υπολογισμούς docking.

Στην Εικόνα 4.20B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του λινελαϊκού οξέος (LA) (2.5 mM) με BSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3 mM). Παρατηρείται σημαντικός αριθμός αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του λινελαϊκού οξέος και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), που επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H3 και H18 του λινελαϊκού οξέος με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου (H2',6', H3',5' και H4') όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης (H5, H7 και H6,8) της βαρφαρίνης. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως, δύο διαμορφωτικών καταστάσεων του λινελαϊκού οξέος στη θέση πρόσδεσης FA7. Αυτή η διαμορφωτική ευελιξία επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking. Παρόμοια αρνητικά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ του λινελαϊκού οξέος και της βαρφαρίνης λήφθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης HSA.



Εικόνα 4.20. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του λινελαϊκού οξέος (LA) (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: (A) ιβουπροφαίνης (IB) (3 mM), (B) βαρφαρίνης (W) (3 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 4.21. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 50 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: ιβουπροφαίνης (IB) (3.2 mM) με χρόνους ανάμιξης 100ms (A), 200ms (B) και 300ms (C), βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με χρόνους μίξης 100 ms (D), 200 ms (E) και 300 ms (F) (T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικοί χρόνοι = 15h 57min (A, D), 16h 38min (B, E), 17h 19min (C, F)). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

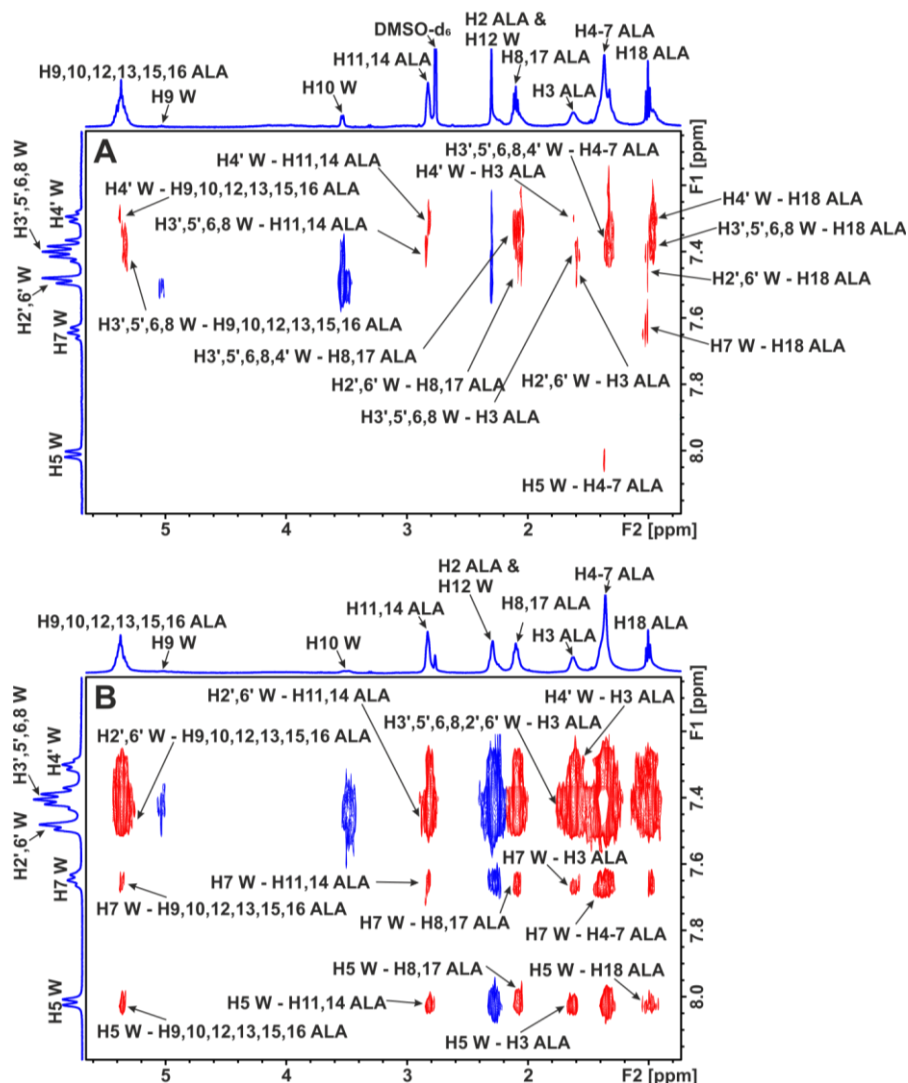
Στην Εικόνα 4.21Α παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (3.2 mM) με χρόνο μίξης 100 ms. Στις Εικόνες 4.21B και 4.21C παρουσιάζεται το ίδιο ανταγωνιστικό πείραμα αλλά με χρόνους μίξης 200 ms και 300 ms, αντίστοιχα. Παρατηρούμε την παρουσία σημαντικών αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του α -λινολενικού οξέος και της ιβουπροφαίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές). Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE παρατηρούνται μεταξύ των

H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα ολεφινικά πρωτόνια H9,10,12,13,15,16, τα δις-αλλυλικά πρωτόνια H11,14, τα αλλυλικά πρωτόνια H8,17 και τα πρωτόνια H3 και H2 του α -λινολενικού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της BSA. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως με την αύξηση του χρόνου ανάμιξης από $\tau = 100$ σε 200 και 300 ms οι εντάσεις των διαμοριακών σημάτων NOE αυξάνονται περίπου γραμμικά. Παρόμοια αρνητικά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών λήφθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης HSA.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2 και H3 του α -λινολενικού οξέος. Αυτό αποδεικνύει τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών που είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τα αποτελέσματα docking. Παραδόξως, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H10 και H11 της ιβουπροφαίνης με τα H2 και H3 του α -λινολενικού οξέος, αν και οι αποστάσεις των πρωτονίων είναι εκτός των ορίων ανίχνευσης των σημάτων NOE. Αυτό οφείλεται στην παρουσία μιας δεύτερης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του α -λινολενικού οξέος εντός της θέσης πρόσδεσης FA4, που επαληθεύτηκε με τους υπολογισμούς docking.

Στην Εικόνα 4.21D παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με χρόνο μίξης 100 ms. Στις Εικόνες 4.21E και 4.21F παρουσιάζεται το ίδιο ανταγωνιστικό πείραμα αλλά με χρόνους μίξης 200 ms και 300 ms, αντίστοιχα. Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του α -λινολενικού οξέος και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), που επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Αξιοσημείωτο είναι βέβαια πως ακόμα και με χρόνο μίξης 300 ms, τα ενδομοριακά σήματα NOE της βαρφαρίνης είναι πιο ασθενή σε σχέση με τα διαμοριακά NOE μεταξύ της βαρφαρίνης και του α -λινολενικού οξέος. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε περαιτέρω πείραμα 2D tr-NOESY NMR στο οποίο προστέθηκε α -λινολενικό οξύ στο σύμπλοκο βαρφαρίνης-HSA/BSA (Εικόνα 4.22B), αντί για το αντίστροφο πείραμα στο οποίο προστέθηκε βαρφαρίνη στο σύμπλοκο

HSA/BSA-FFA (Εικόνα 4.21D,E,F & Εικόνα 4.22A). Παρατηρούμε μια πολύ σημαντική αύξηση των διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του α -λινολενικού οξέος και της βαρφαρίνης. Αυτό συμφωνεί με τα πειράματα STD ότι δηλαδή το α -λινολενικό οξύ έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στη θέση FA7 σε σχέση με αυτή της βαρφαρίνης.

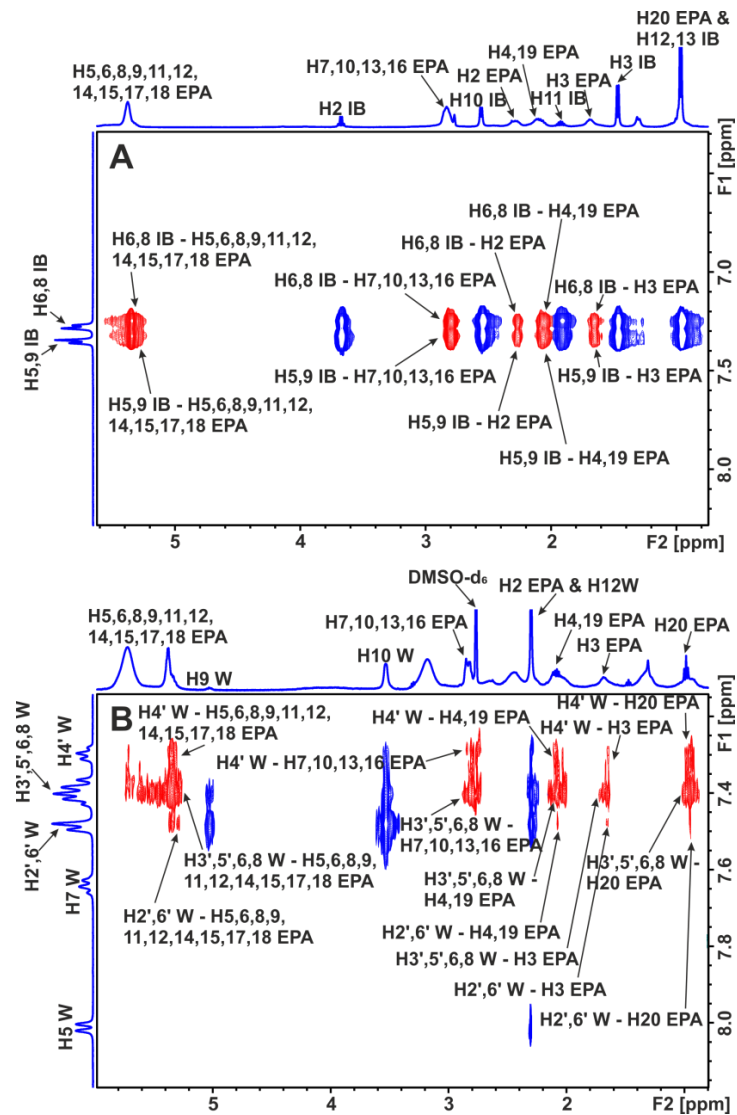


Εικόνα 4.22. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A) του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.5 mM). (B) της βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη α -λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη ένδειξη σημαντικής δέσμευσης στη θέση FA7 ενός ω -3 πολυακόρεστου λιπαρού οξέος σε σχέση με τα ακόρεστα λιπαρά

οξέα με τον ίδιο αριθμό ανθράκων (C18) αλλά με διαφορετικό αριθμό αλληλικών διπλών δεσμών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H3 και της τερματικής ομάδας CH₃ του α-λινολενικού οξέος με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης της βαρφαρίνης (Εικόνα 4.22B) παρά τη μεγάλη κρυσταλλογραφική απόσταση των κέντρων των δύο αρωματικών δακτυλίων. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως δύο διαμορφωτικών καταστάσεων, και την ισχυρή αναδίπλωση του α-λινολενικού οξέος εντός της θέσης πρόσδεσης FA7 [Alexandri et al, 2022].

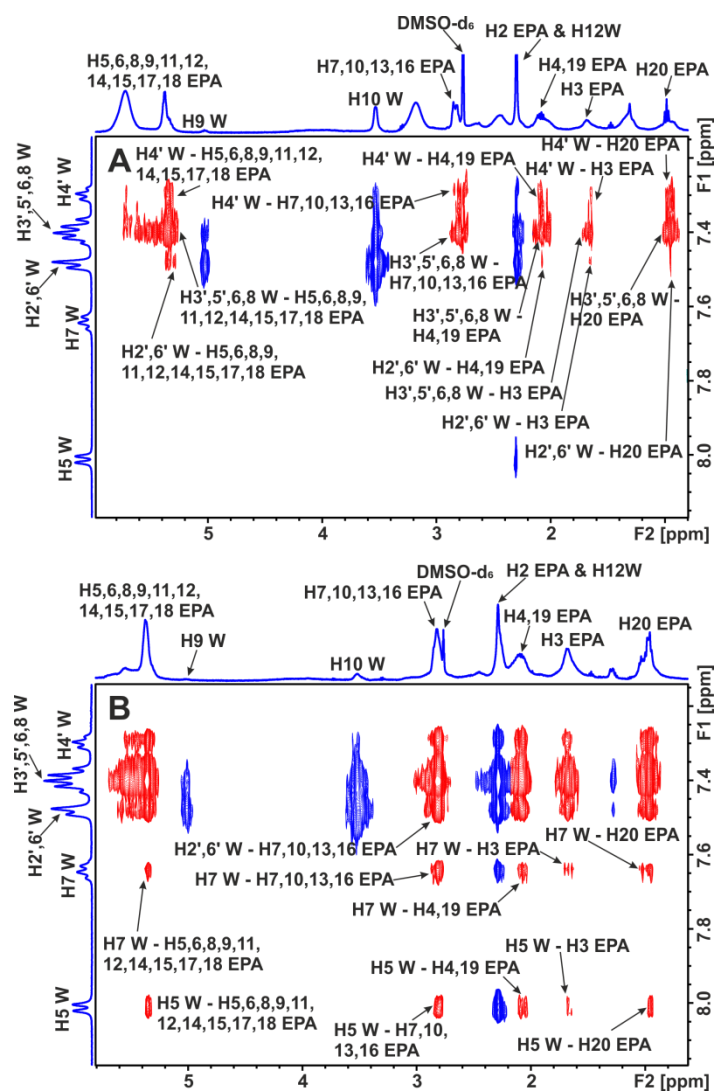
Στην Εικόνα 4.23A παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.9 mM). Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του EPA και της ιβουπροφαίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές). Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα ολεφινικά πρωτόνια H5,6,8,9,11,12,14,15,17,18, τα δις-αλληλικά πρωτόνια H7,10,13,16, τα αλληλικά πρωτόνια H4,19 και τα πρωτόνια H3 και H2 του EPA. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της HSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2 και H3 του EPA, αποδεικνύοντας τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H10 και H11 της ιβουπροφαίνης με τα H2 και H3 του EPA παρότι οι αποστάσεις των πρωτονίων είναι εκτός των ορίων ανίχνευσης σημάτων NOE. Όπως και στην περίπτωση των άλλων ακόρεστων λιπαρών οξέων, αυτό οφείλεται στην παρουσία μιας δευτέρης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του EPA.



Εικόνα 4.23. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: (A) ιβουπροφαίνης (IB) (2.9 mM), (B) βαρφαρίνης (W) (3.3 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

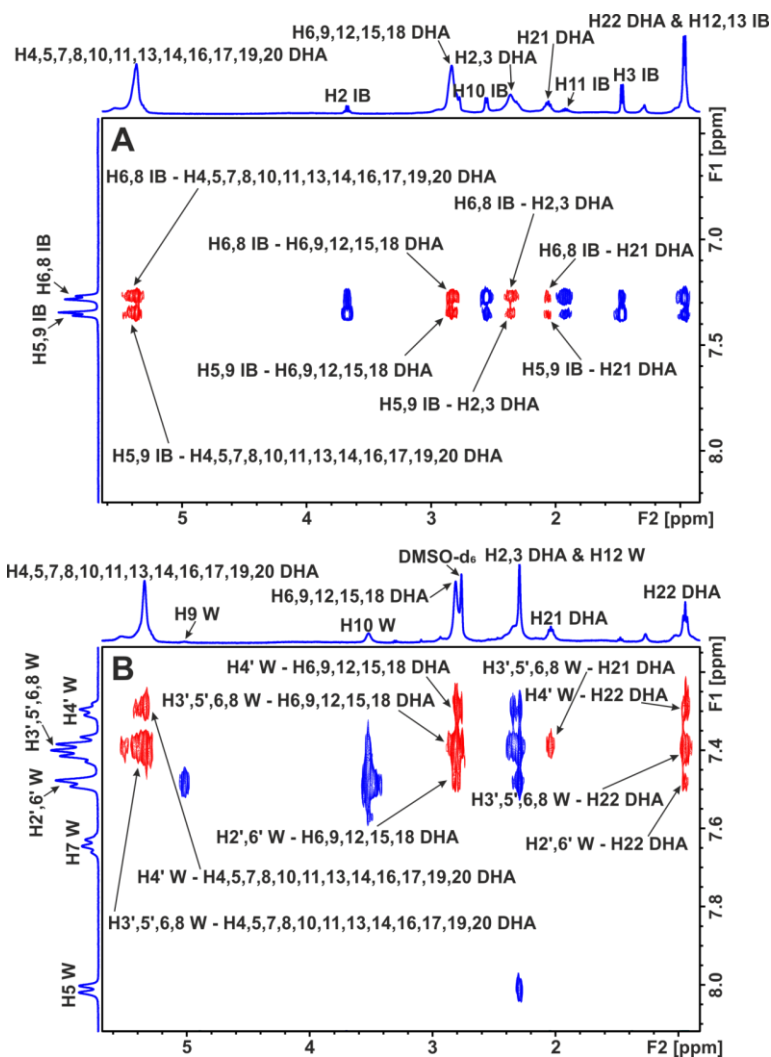
Στην Εικόνα 4.23B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του EPA (2.5 mM) με BSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.3 mM). Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του EPA και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), που επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Αξιοσημείωτο είναι βέβαια πως τα ενδομοριακά σήματα NOE της βαρφαρίνης είναι εξίσου ασθενή με τα διαμοριακά NOE μεταξύ βαρφαρίνης και EPA. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε περαιτέρω πείραμα 2D tr-NOESY NMR στο οποίο προστέθηκε EPA

στο σύμπλοκο βαρφαρίνης-HSA (Εικόνα 4.24B), αντί για το αντίστροφο πείραμα στο οποίο προστέθηκε βαρφαρίνη στο σύμπλοκο EPA-HSA (Εικόνα 4.24A). Παρατηρούμε μια πολύ σημαντική αύξηση των διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του EPA και της βαρφαρίνης καθώς και μία λιγότερο σημαντική αύξηση των ενδομοριακών NOE της βαρφαρίνης. Αυτό υποδεικνύει ότι το EPA έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στη θέση FA7 με αυτή της βαρφαρίνης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H3 και H20



Εικόνα 4.24. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A) του EPA (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (3.3 mM). (B) της βαρφαρίνης (W) (2 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη α-λινολενικού οξέος (ALA) (2.5 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

του EPA με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης της βαρφαρίνης. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως, δύο διαμορφωτικών καταστάσεων του EPA στη θέση FA7 σε συμφωνία με τη διαμορφωτική συμπεριφορά και των άλλων ακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων.



Εικόνα 4.25. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D Tr-NOESY NMR του DHA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη: (A) ιβουπροφαίνης (IB) (2.9 mM), (B) βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Στην Εικόνα 4.25A παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του DHA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.9 mM). Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του DHA και της

ιβουπροφαίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές). Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια του διπλού δεσμού H4,5,7,8,10,11,13,14,16,17,19,20, τα δις-αλλυλικά πρωτόνια H6,9,12,15,18, και τα πρωτόνια H21 και H2,3 του DHA. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της HSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2,3 του DHA, αποδεικνύοντας τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H10 και H11 της ιβουπροφαίνης με τα H2,3 του DHA, αν και οι αποστάσεις των πρωτονίων είναι εκτός των ορίων ανίχνευσης των σημάτων NOE, που πιθανόν οφείλονται στην παρουσία μιας δεύτερης ανεστραμμένης διαμόρφωσης του DHA.

Στην Εικόνα 4.25B παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος tr-NOESY NMR του DHA (2.5 mM) με HSA (25 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη βαρφαρίνης (W) (2.5 mM). Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του DHA και της βαρφαρίνης (κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές), που επιβεβαιώνουν τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ των δύο υποκαταστατών στην κοινή θέση πρόσδεσης FA7 της BSA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά διαμοριακά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H22 του DHA με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης της βαρφαρίνης. Πιθανότατα, αυτό οφείλεται στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης και, επομένως, δύο διαμορφωτικών καταστάσεων του DHA στη θέση FA7.

4.4 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων στην HSA με υπολογισμούς docking

Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγική ενότητα, με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και φασματοσκοπίας NMR έχουν βρεθεί επτά θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην αλβουμίνη. Η FA7 συμπίπτει με τη θέση 1 των φαρμάκων, ενώ η FA3 με τη θέση 2 των φαρμάκων. Όμως, παρά τις πολυάριθμες διαθέσιμες δομικές μελέτες ακτίνων Χ, οι διαμορφωτικές καταστάσεις των λιπαρών οξέων στη θέση 1 των φαρμάκων δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν με ακρίβεια [Curry et al, 1998; Bhattacharya et al, 2000; Petitpas et al, 2001]. Στο εργαστήριό μας εφαρμόστηκε μια προσέγγιση που βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση των τεχνικών STD, Tr-NOESY και INPHARMA NMR και υπολογισμών docking για τη χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων και των ειδικών θέσεων πρόσδεσης των καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος και α-λινολενικού οξέος με μη επισημασμένη αλβουμίνη ορού (BSA/HSA). Τα διαμοριακά NOE μεταξύ των λιπαρών οξέων και των φαρμάκων, ιβουπροφαίνη (θέση 2) και βαρφαρίνη (θέση 1) και οι υπολογισμοί docking οδήγησαν στον προσδιορισμό των διαμορφώσεων των λιπαρών οξέων και μάλιστα έδωσαν τεκμηριωμένη απάντηση για τη διαμορφωτική κατάσταση στη θέση πρόσδεσης FA7 [Alexandri et al, 2022]. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών docking για τις θέσεις FA7, FA6, FA3 και FA4. Οι υπολογισμοί docking πραγματοποιήθηκαν από τον Δρ. Παπαμώκο Γεώργιο.

Θέση πρόσδεσης 7 (FA7)

Η θέση αυτή βρίσκεται εντός του πυρήνα της υποπεριοχής ΙΑ. Το εσωτερικό της είναι κυρίως υδρόφοβο, ωστόσο, περιέχει δύο ομάδες πολικών αμινοξέων: μια εσωτερική που απαρτίζεται από τα αμινοξέα Tyr-150, His-242 και Arg-257, και μία εξωτερική στην είσοδο της κοιλότητας που αποτελείται από τα αμινοξέα Lys-195, Lys-199, Arg-218 και Arg-222 [Ghuman et al, 2005]. Μεγάλος αριθμός δομών κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, σημαντικού αριθμού ελεύθερων λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των C14:0 [Curry et al, 1998], C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 [Bhattacharya et al, 2000], C18:0, C18:1 και C20:4 [Petitpas et al, 2001] έδειξε μειωμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα χωρίς την χαρακτηριστική διεύρυνση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό της καρβοξυλικής ομάδας των υποκαταστατών. Κατά συνέπεια, τα προσδεδεμένα λιπαρά οξέα μοντελοποιήθηκαν μόνο ως προς τη μεθυλενική ακολουθία σε καμπυλωτές

διαμορφώσεις, οι οποίες βρέθηκαν να είναι ομοεπίπεδες με το αρωματικό τμήμα φαρμάκων στη θέση αυτή. Η έλλειψη ενός σαφώς καθορισμένου προσανατολισμού των καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η θέση FA7 έχει χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης και, επομένως, ο εκτοπισμός του μορίου της βαρφαρίνης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων.

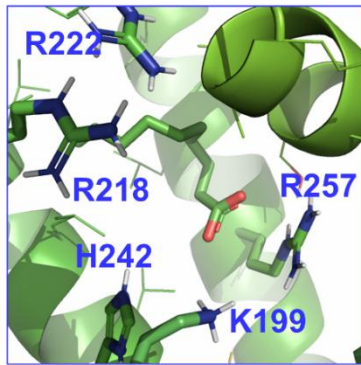
Τα αποτελέσματα των υπολογισμών docking και οι πόζες με το υψηλότερο σκορ για κάθε FFA και τη βαρφαρίνη απεικονίζονται στον Πίνακα 4.3 και στην Εικόνα 4.26. Επιπλέον, οι πόζες με την καλύτερη βαθμολογία καθώς και οι υπόλοιπες πόζες για κάθε FFA υποδεικνύουν ότι μπορούν να έχουν ποικίλες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Arg-218, Arg-222, Arg-257 και His-242 (Πίνακας 4.3). Το καπρολεϊκό οξύ βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με Arg-257 (Εικόνα 4.26a) και Arg-222 (Πίνακας 4.3) και το ελαϊκό οξύ με Arg-222 (Εικόνα 4.26b), Arg-218, Arg-257 και His-242 (Πίνακας 4.3). Το λινελαϊκό οξύ αλληλεπιδρά με Arg-222 (Εικόνα 4.26c), Arg-218, Arg-257 και His-242 (Πίνακας 4.3). Το α -λινολενικό οξύ έχει ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με Arg-218 (2.3 Å, Εικόνα 4.26d) και αλληλεπιδρά με His-242 και Arg-257 (Πίνακας 4.3). Η βαρφαρίνη δημιουργεί ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με Lys-199 και Arg-222 (Εικόνα 4.26e). Ο προσδιορισμός της δομής της βαρφαρίνης σε κατάσταση πρόσδεσης στην HSA με ακτίνες X [Petitpas et al, 2001] δείχνει ότι το άτομο O4 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα N_{ε2} της His-242 (2.9 Å) και με ένα δεσμευμένο μόριο νερού (2.8 Å). Το άτομο O2 βρίσκεται σε απόσταση 3.6 Å από το N_ε της Arg-222 και το οξυγόνο της ακετονυλο ομάδας βρίσκεται 3.3 Å από την NH₂ της Arg-222. Το βενζοϋλο τμήμα της βαρφαρίνης σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την Arg-218 (4.4 Å) και την πλευρική αλυσίδα της Trp-214. Υποκατάσταση των αμινοξέων Arg-218 και Trp-214 οδήγησαν σε μείωση της συγγένειας πρόσδεσης της βαρφαρίνης [Fehske et al, 1979; Petersen et al, 2000], γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα [Petitpas et al, 2001].

Πίνακας 4.3. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων του καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA), και των αμινοξέων της θέσης 7 της HSA. Παρουσιάζονται επίσης οι πόζες αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα, οι συγγένειες σε kcal/mol, και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου της βαρφαρίνης (W).

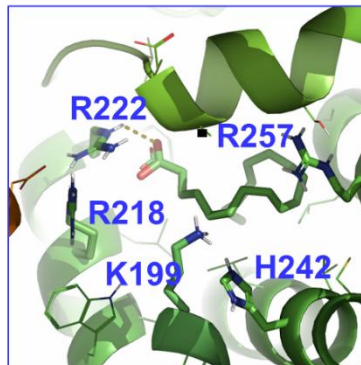
Ligand	K199			R218			R222			H242			R257		
	Anchor site 1						Anchor site 2								
	Group	Dist. (Å)	Pose / affinity (kcal/mol)	Group	Dist. (Å)	Pose / affinity (kcal/mol)	Group	Dist. (Å)	Pose / affinity (kcal/mol)	Group	Dist. (Å)	Pose / affinity (kcal/mol)	Group	Dist. (Å)	Pose / affinity (kcal/mol)
CA							NHe-	2.5	2/-5.2				NHe-	3.0	1/-5.3
OA				NH ₂ η ¹	3.2	9/-5.6	NHe	2.5	1/-6.0	NHτ	2.6	3/-5.8	NH ₂ η ¹	2.8	7/-5.7
LA				NH ₂ η ¹	3.0	7/-5.9	NHe	2.4	2/-6.2	NHτ	2.4	6/-6.0	NHe	2.8	1/-6.2
ALA				NH ₂ η ²	2.3	1/-7.1				NHτ	3.3	4/-7.0	NH ₂ η ¹	3.5	4/-7.0
W	O(4) ⁻ NH ₃ ⁺	2.6	7/-7.5	NH ₂ η ^{1,2} - C(11)= O	2.2	7/-7.5	NH ₂ η ¹ - C(11)= O	2.5	4/-7.7	C=O ring- He ²	2.3	4/-7.7			

Η υπέρθεση των τεσσάρων FFA δείχνει ξεκάθαρα την παρουσία δύο προσανατολισμών των καρβοξυλικών ομάδων λόγω της ύπαρξης δύο ομάδων πολικών αμινοξέων που χρησιμεύουν ως μοριακή άγκυρα: μία εσωτερική με τα αμινοξέα His-242 και Arg-257 και μία στην είσοδο της θέσης πρόσδεσης με τα αμινοξέα Arg-218 και Arg-222 (Εικόνα 4.26f). Αυτή η διαμορφωτική ευελιξία συμφωνεί με την ύπαρξη διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του H3 και της τελικής CH₃ ομάδας για παράδειγμα του α-λινολενικού οξέος με τα αρωματικά πρωτόνια τόσο του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης της βαρφαρίνης (Εικόνα 4.22 και Εικόνα 4.27). Επιπλέον, η διαμορφωτική αυτή ευελιξία των FFA στη θέση πρόσδεσης FA7 ερμηνεύει την αδυναμία πολυάριθμων δομικών μελετών με ακτίνες X να προσδιοριστεί η ακριβής θέση δέσμευσης των FFA [Curry et al, 1998; Bhattacharya et al, 2000; Petitpas et al, 2001]. Τα αποτελέσματα με τις κρυσταλλικές δομές 1GNI και 2BXD ήταν παρόμοια. Το καπρολεϊκό οξύ εμφανίζει τη χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του μήκους της αλυσίδας και του αριθμού των αλληλικών διπλών δεσμών. Το α-λινολενικό οξύ παρουσιάζει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ των FFA, και πιθανώς αυτό είναι το μόνο που μπορεί να ανταγωνιστεί ευνοϊκά τη βαρφαρίνη τη θέση FA7. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των ω-3 λιπαρών οξέων να υιοθετούν διπλωμένες διαμορφώσεις του πολυακόρεστου τμήματος, ακόμη και σε υγρή κατάσταση [Venianakis et al, 2021].

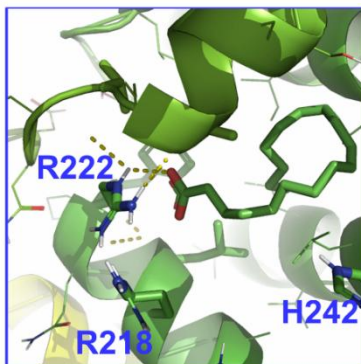
Human Serum Albumin 1GNI
Binding site no 7



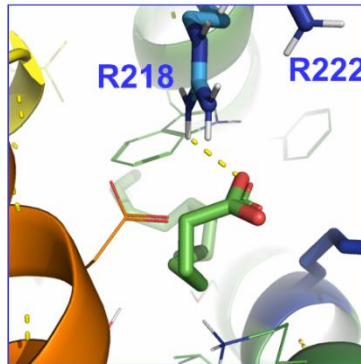
a. Caproic



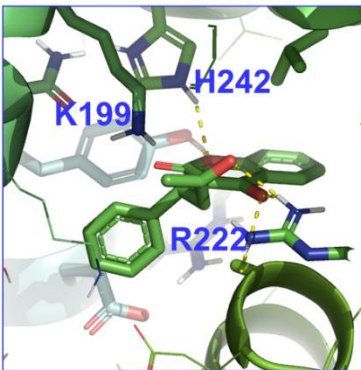
b. Oleic



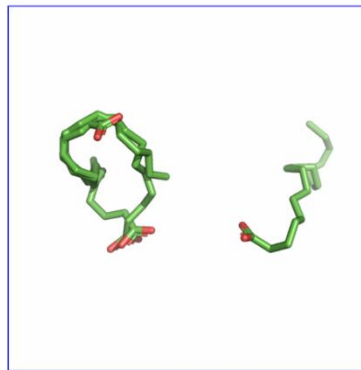
c. Linoleic



d. α -Linolenic

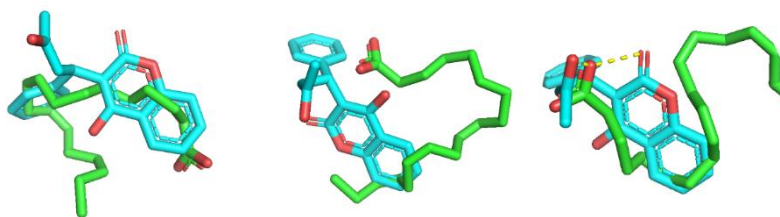


e. Warfarin



f. Superposition

Εικόνα 4.26. Πόζες με τα καλύτερα σκορ για τη θέση FA7 της HSA με: **a.** καπρολεϊκό οξύ, **b.** ελαϊκό οξύ, **c.** λινελαϊκό οξύ, **d.** α -λινολενικό οξύ, **e.** βαρφαρίνη. **f.** Υπέρθωση των τεσσάρων FFAs για το α -λινολενικό οξύ παρατηρείται χωρική απόκλιση σε σχέση με τα υπόλοιπα FFA.



Εικόνα 4.27. Επιλεγμένες διαμορφώσεις του α -λινολενικού οξέος και της βαρφαρίνης που απεικονίζουν τη γειννίαση του ελεύθερου λιπαρού οξέος και των αρωματικών πρωτονίων τόσο του φαυνολο βουτυλο δακτυλίου όσο και του δακτυλίου βενζοπυράνης της βαρφαρίνης.

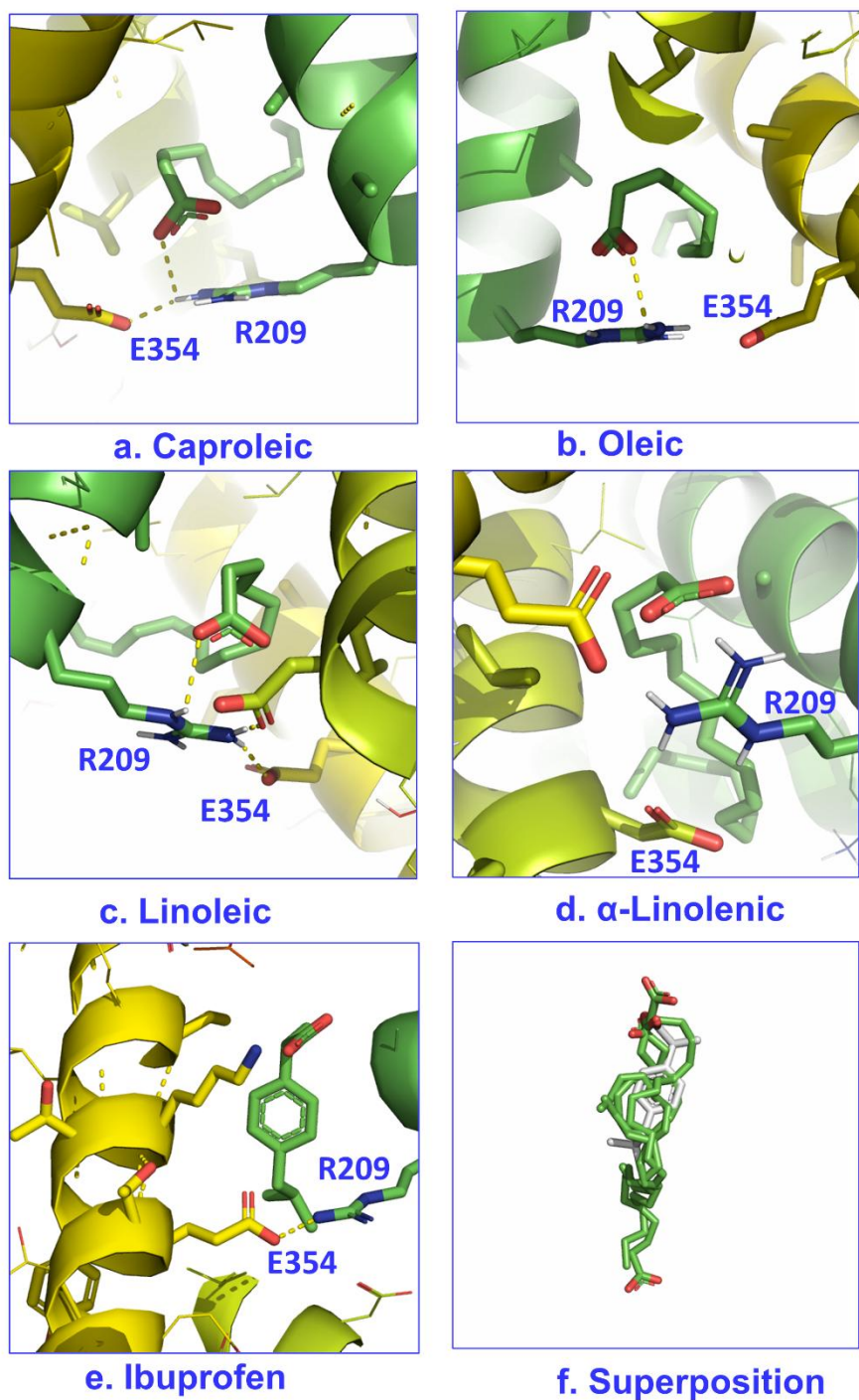
Θέση πρόσδεσης 6 (FA6)

Αυτή η θέση πρόσδεσης είναι σχετικά ανοιχτή, αποτελούμενη από μια ρηχή κοιλότητα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης μεταξύ των υποπεριοχών ΠΑ και ΠΒ [Bhattacharya et al, 2000]. Προσδιορισμός της δομής με ακτίνες X έδειξε ότι οι καρβοξυλικές ομάδες διαφόρων ελεύθερων λιπαρών οξέων υιοθετούν μια ποικιλία διαμορφώσεων χωρίς την υιοθέτηση κοινών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg-209, Lys-351 και Ser-480 εμπλέκονται παροδικά σε αλληλεπιδράσεις με FFA [Bhattacharya et al, 2000]. Η σταθεροποίηση, για παράδειγμα, του μεσαίου τμήματος της μεθυλενο αλληλουχίας αποδόθηκε στα αμινοξέα Arg-209, Asp-324 και Glu-354. Η απουσία σαφώς καθορισμένων αμινοξικών αλληλεπιδράσεων με τις καρβοξυλικές ομάδες των λιπαρών οξέων υποδηλώνει ότι η συγγένεια πρόσδεσης μπορεί να είναι σχετικά χαμηλή. Τα αποτελέσματα docking συμφωνούν με τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από την κρυσταλλογραφία ακτίνων X [Bhattacharya et al, 2000]. Η συντριπτική πλειονότητα στις πόζες που εντοπίστηκαν, δεν εμφανίζουν συγκεκριμένες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η μόνη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση που εντοπίστηκε είναι μεταξύ της Arg-209 και των καρβοξυλικών ομάδων του καπρολεϊκού οξέος, του ελαϊκού οξέος (τρίτη καλύτερη πόζα), του λινελαϊκού οξέος και της ιβουπροφαίνης (τρίτη καλύτερη πόζα) (Εικόνα 4.28a,b,c,e και Πίνακας 4.4). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η θέση πρόσδεσης εμφανίζει τα χαμηλότερα σκορ σε kcal/mol (Πίνακας 4.4) σε σύγκριση με τις θέσεις 3 και 4, όπως αναλύεται παρακάτω. Παρόμοια αποτελέσματα για τη θέση πρόσδεσης FA6 ελήφθησαν και με τις δομές 1GNI και 2BXG PDB.

Πίνακας 4.4. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων, καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαιϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA) και της ιβουπροφαίνης (IB) με τα αμινοξέα της θέσης FA6 της HSA. Οι πόζες που προκύπτουν από τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις και οι συγγένειες σε kcal/mol επίσης απεικονίζονται.

Ligands		R209	
	Group	Distance (Å)	Pose/affinity (kcal/mol)
CA	NH ₂ η ¹	2.8	1/-5.0
OA	NH ₂ η ¹	2.6	5/-6.4
LA	NHε	2.5	1/-6.7
ALA	NH ₂ η ²	2.7	7/-6.7
IB	NH ₂ η ²	2.7	2/-6.8

Human Serum Albumin 1GNI
Binding site no 6



Εικόνα 4.28. Πόζες με τα καλύτερα σκορ για τη θέση πρόσδεσης FA6 της HSA με: **a.** καπρολεϊκό οξύ, **b.** ελαϊκό οξύ, **c.** λινελαϊκό οξύ, **d.** α -λινολενικό οξύ, **e.** ιβουπροφαίνη. **f.** Υπέρθωση των τεσσάρων FFA και της ιβουπροφαίνης.

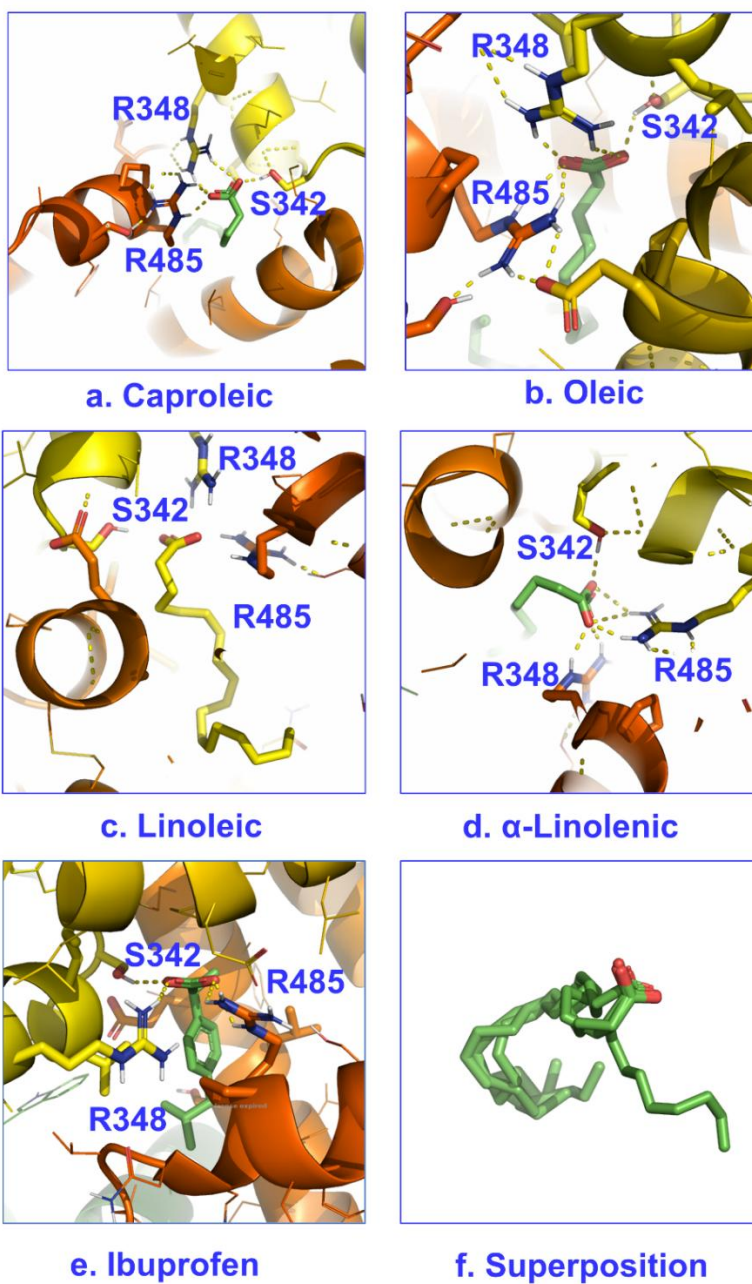
Θέση πρόσδεσης 3 (FA3)

Ο προσδιορισμός με ακτίνες X των δομών πέντε λιπαρών οξέων προσδεδεμένων στην πρωτεΐνη HSA (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 και C18:0) έδειξε ότι στη θέση 3, οι καρβοξυλικές ομάδες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη Ser-342 και Arg-348 στην υποπεριοχή IIB και με την Arg-485 στην υποπεριοχή IIIA [Bhattacharya et al, 2000]. Καθώς αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος, υιοθετείται μία καμπυλωτή διαμόρφωση τύπου U, διότι η μεγαλύτερη διάσταση της κοιλότητας FA3 μπορεί να υποδεχθεί μόνο 12-14 μεθυλενο ομάδες σε γραμμική διαμόρφωση. Οι προκύπτουσες συγγένειες πρόσδεσης των υπολογισμών docking παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Όλα τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που μελετήθηκαν έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με το ελαιϊκό οξύ στην κρυσταλλική δομή [Petitpas et al, 2001], με ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg-485, Arg-348 και Ser-342 (Εικόνα 4.29a-d). Διαφοροποίηση παρατηρείται στο καπρολεϊκό οξύ, καθώς έχει τη μικρότερη ανθρακική αλυσίδα και δεν ακολουθεί τη διαμόρφωση των μακρύτερων FFA, όπως φαίνεται στην υπέρθεση της Εικόνας 4.29f. Η διαμόρφωση της ιβουπροφαίνης στη θέση πρόσδεσης FA3 (Εικόνα 4.29e) δεν συμφωνεί με τη διαμόρφωση που προκύπτει από τον προσδιορισμό της δομής με ακτίνες X. Σε αυτήν τη θέση πρόσδεσης οι συντεταγμένες docking ορίστηκαν από τα αμινοξέα Ser-342, Arg-348 και Arg-485. Ωστόσο, οι δύο πρώτες πόζες της ιβουπροφαίνης με τα υψηλότερα σκορς αναφέρονται στη θέση πρόσδεσης FA4, με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg-410 και Tyr-411. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων X δείχνουν επίσης ότι η ιβουπροφαίνη αλληλεπιδρά με την Arg-410 στη θέση πρόσδεσης FA4 [Petitpas et al, 2001; Ghuman et al, 2005], όπως αναφέρεται παρακάτω. Οι συγγένειες πρόσδεσης για τις τρεις πρώτες πόζες είναι -7.5, -7.3 και -7.2 kcal/mol χωρίς να παρουσιάζουν διακριτή προτίμηση. Στην Εικόνα 4.29f, η υπέρθεση των τεσσάρων FFA (πόζες με τα βέλτιστα σκορ) δείχνει ότι οι υποκαταστάτες υιοθετούν παρόμοιες διαμορφώσεις.

Πίνακας 4.5. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων, καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαιϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA) και της ιβουπροφαίνης (IB) με τα αμινοξέα της θέσης FA3 της HSA. Οι πόζες που προκύπτουν από τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις και οι συγγένειες σε kcal/mol επίσης απεικονίζονται.

Ligands	S342		R348		R485		
	Group	Distance (Å)	Group	Distance (Å)	Group	Distance (Å)	Pose/affinity (kcal/mol)
CA	OH	1.9	NH ₂ η ²	1.8	NH ₂ η ²	2.1	1/-6.3
OA	OH	2.1	NH ₂ η ²	2.0	NH ₂ η ²	2.1	1/-7.0
LA	OH	2.1	NH ₂ η ²	1.8	NHε	2.1	1/-7.3
ALA	OH	2.1	NH ₂ η ²	1.9	NH ₂ η ²	2.1	1/-7.6
IB	OH	2.11	NH ₂ η ¹	3.0	NHε	2.4	3/-7.2

Human Serum Albumin 1GNI
Binding site no 3



Εικόνα 4.29. Πόζες με τα καλύτερα σκορ για τη θέση FA3 της HSA με: **a.** καπρολεϊκό οξύ, **b.** ελαϊκό οξύ, **c.** λινελαϊκό οξύ, **d.** α -λινολενικό οξύ, **e.** ιβουπροφαίνη. **f.** Υπέρθωση των τεσσάρων FFA· η αλυσίδα του καπρολεϊκού οξέος δεν ακολουθεί τη χωρική διάταξη των άλλων FFA.

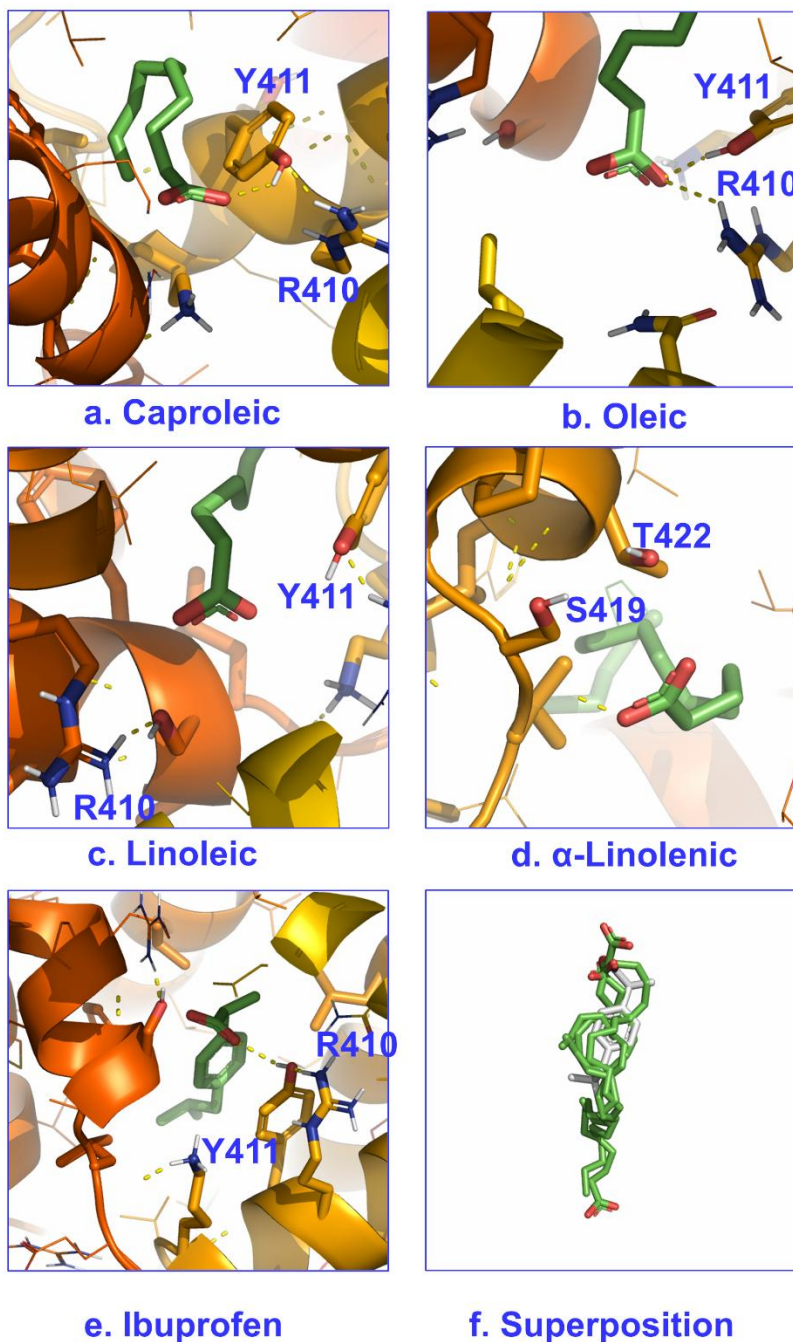
Θέση πρόσδεσης 4 (FA4)

Προσδιορισμός με ακτίνες X των δομών πέντε λιπαρών οξέων προσδεδεμένων στην πρωτεΐνη HSA (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 και C18:0) έδειξε ότι στη θέση FA4, η οποία είναι μεγαλύτερη αλλά στενότερη από την FA3, οι διαμορφώσεις των λιπαρών οξέων είναι παρόμοιες. Οι καρβοξυλικές τους ομάδες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg-410, Tyr-411 και Ser-489 που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της υποπεριοχής IIIA [Bhattacharya et al, 2000]. Τα λιπαρά οξέα με τη μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα υιοθετούν εκτεταμένη διαμόρφωση που ακολουθεί το σχήμα της σήραγγας της FA4. Η αυξημένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τελικής μεθυλομάδας του λιπαρού οξέος C18:0 ερμηνεύτηκε με όρους ανεστραμμένης διαμόρφωσης που τοποθετεί την καρβοξυλική ομάδα σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με το πεπτιδικό άζωτο της Ser-419 και την –OH ομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Thr-422. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των ακόρεστων λιπαρών οξέων C18:1 και C20:4 [Petitras et al, 2001] έδειξε τα ίδια χαρακτηριστικά που ερμηνεύτηκαν επίσης με όρους δύο προσανατολισμών στη θέση πρόσδεσης FA4. Ωστόσο, στην περίπτωση του C20:4 η κυρίαρχη διαμόρφωση προτάθηκε να είναι αυτή που υιοθετήθηκε από τα μικρότερα από C18 κορεσμένα λιπαρά οξέα με την καρβοξυλική ομάδα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg-410, Tyr-411 και Ser-489. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών docking για τη θέση FA4 παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.6 και την Εικόνα 4.30.

Πίνακας 4.6. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων των λιπαρών οξέων, καπρολεϊκού οξέος (CA), ελαϊκού οξέος (OA), λινελαϊκού οξέος (LA), α-λινολενικού οξέος (ALA) και της ιβουπροφαίνης (IB) με τα αμινοξέα της θέσης FA4 της HSA. Οι πόζες που προκύπτουν από τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις και οι συγγένειες σε kcal/mol επίσης απεικονίζονται.

Ligand	R410		Y411			S419		T422		
	Group	Distance (Å)	Group	Distance (Å)	Pose/affinity (kcal/mol)	Group	Distance (Å)	Group	Distance (Å)	Pose/affinity (kcal/mol)
	Anchor site 1					Anchor site 2				
CA	NH ₂ η ²	3.4	OH	2.2	1/-5.5	OH	5.2	OH	3.6	6/-5.3
OA	NH ₂ η ²	2.4	OH	2.1	1/-6.8	OH	4.4	OH	3.2	5/-6.6
LA	NH ₂ η ²	2.4	OH	1.8	2/-7.2	OH	4.3	OH	3.1	7/-7.1
ALA	NH ₂ η ²	2.4	OH	2.0	8/-7.2	OH	3.8	OH	3.0	6/-7.3
IB	NH ₂ η ²	2.9	OH	2.0	2/-7.3		-		-	

Human Serum Albumin – 1GNI
Binding site no 4

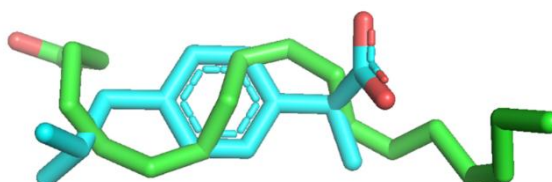


Εικόνα 4.30. Πόζες με τα καλύτερα σκορ για τη θέση πρόσδεσης FA4 της HSA με: **a.** καπρολεϊκό οξύ, **b.** ελαιϊκό οξύ, **c.** λινολεϊκό οξύ, **d.** α -λινολενικό οξύ, **e.** ιβουπροφαίνη. **f.** Υπέρθωση των τεσσάρων FFA και της ιβουπροφαίνης.

Παρατηρούνται δύο ομάδες αμινοξέων που αποτελούν τις αντιποδικές μοριακές άγκυρες των καρβοξυλικών ομάδων των FFA. Ως συνέπεια, οι αλληλεπιδράσεις των καρβοξυλικών ομάδων με τα αμινοξέα Arg-410 και Tyr-411 (Εικόνα 4.30a-c)

εναλλάσσονται με τα αμινοξέα Ser-419 και Thr-422 (Εικόνα 4.30d). Τα καλύτερα σκορ παρατηρούνται με τα αμινοξέα Arg-410 και Tyr-411 για όλους τους υποκαταστάτες, καθώς οι αλληλεπιδράσεις γέφυρας άλατος είναι πολύ ισχυρές. Παρόλα αυτά, και οι εννέα προτεινόμενες πόζες δείχνουν συγγένεια πρόσδεσης μεγαλύτερης των 7.0 kcal/mol για το ελαϊκό οξύ, το λινελαϊκό οξύ και το α -λινολενικό οξύ. Η ιβουπροφαίνη δείχνει μόνο μια θέση πρόσδεσης στα αμινοξέα Arg-410 και Tyr-411, χωρίς αλληλεπίδραση με Ser-419 και Thr-422. Από την υπέρθεση όλων των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της ιβουπροφαίνης (Εικόνα 4.30f) είναι σαφές ότι οι διαμορφώσεις προσαρμόζονται στις στερεοχημικές απαιτήσεις της θέσης FA4.

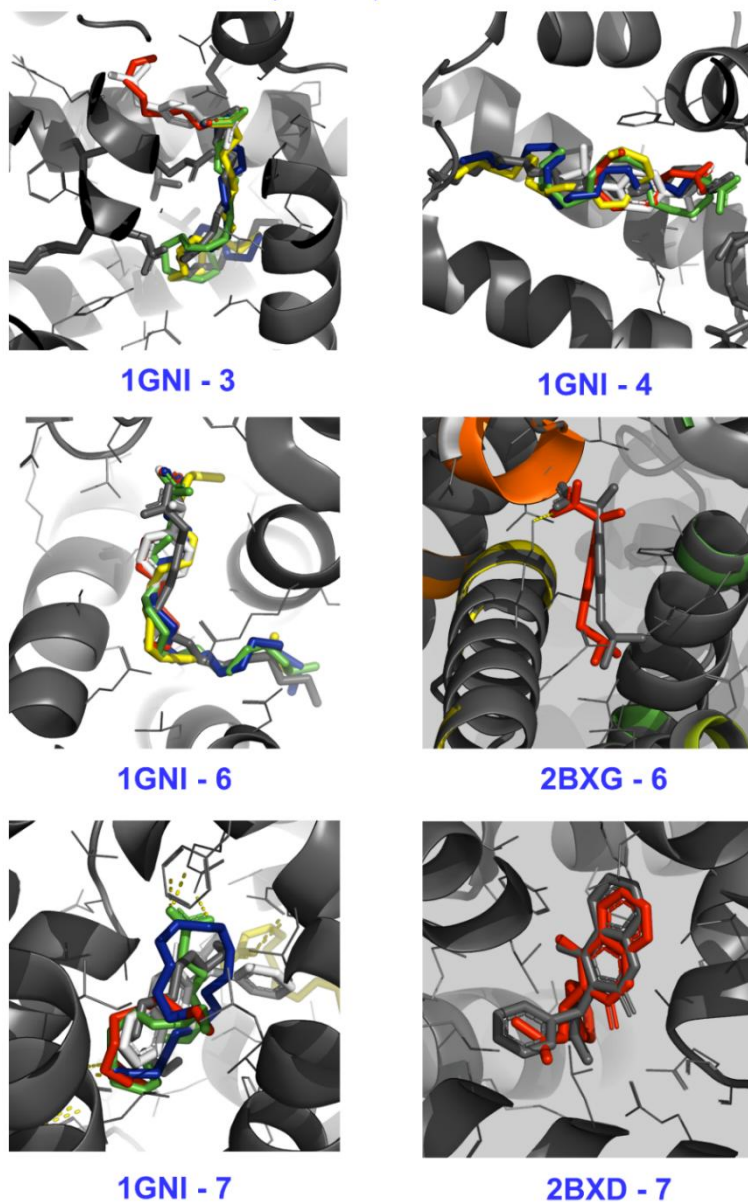
Ο κοινός τρόπος πρόσδεσης των καρβοξυλικών ομάδων της ιβουπροφαίνης και των FFA με τα αμινοξέα Arg-410 και Tyr-411 είναι σε εξαιρετική συμφωνία με τα κοινά διαμοριακά NOE μεταξύ των H_{2,3} της ιβουπροφαίνης και των H_{2,3} του καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος και α -λινολενικού οξέος. Επιπλέον, η παρουσία μιας δεύτερης αντιποδικής διαμόρφωσης των FFA στην FA4, παρέχει μια λογική ερμηνεία των διαμοριακών NOE σημάτων και, επομένως, της εγγύτητας των H_{2,3} των FFA με τα τερματικά ισοβουτυλικά πρωτόνια της ιβουπροφαίνης (Εικόνα 4.31).



Εικόνα 4.31. Επιλεγμένη διαμόρφωση του α -λινολενικού οξέος και της ιβουπροφαίνης που απεικονίζει την εγγύτητα του H₃ του α -λινολενικού οξέος με τα πρωτόνια της τελικής ισοβουτυλικής ομάδας της ιβουπροφαίνης.

Μία υπέρθεση επιλεγμένων διαμορφώσεων των FFA, της ιβουπροφαίνης και της βαρφαρίνης στις κρυσταλλικές δομές 1GNI (HSA με ελαϊκό οξύ) [Curry et al, 1998], 2BXG (HSA με ιβουπροφαίνη) [Ghuman et al, 2005] και 2BXD (HSA με βαρφαρίνη) [Ghuman et al, 2005], παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.32. Τα υπολογιστικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα δομικά δεδομένα των ακτίνων X με εξαίρεση τις δομές των FFA στη θέση FA7 λόγω της παρουσίας δύο διαμορφώσεων των FFA και, επομένως, δύο ομάδων πολικών αμινοξέων που δρουν ως μοριακές άγκυρες. Η χρήση του ίδιου πρωτοκόλλου για τη βαρφαρίνη (self-docking με τη PDB δομή 2BXD) αποδεικνύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων docking για τη θέση FA7.

Superposition of selected poses of FFAs and
Ibuprofen/warfarin on the crystal structures
1GNI, 2BXG, 2BXD of HSA



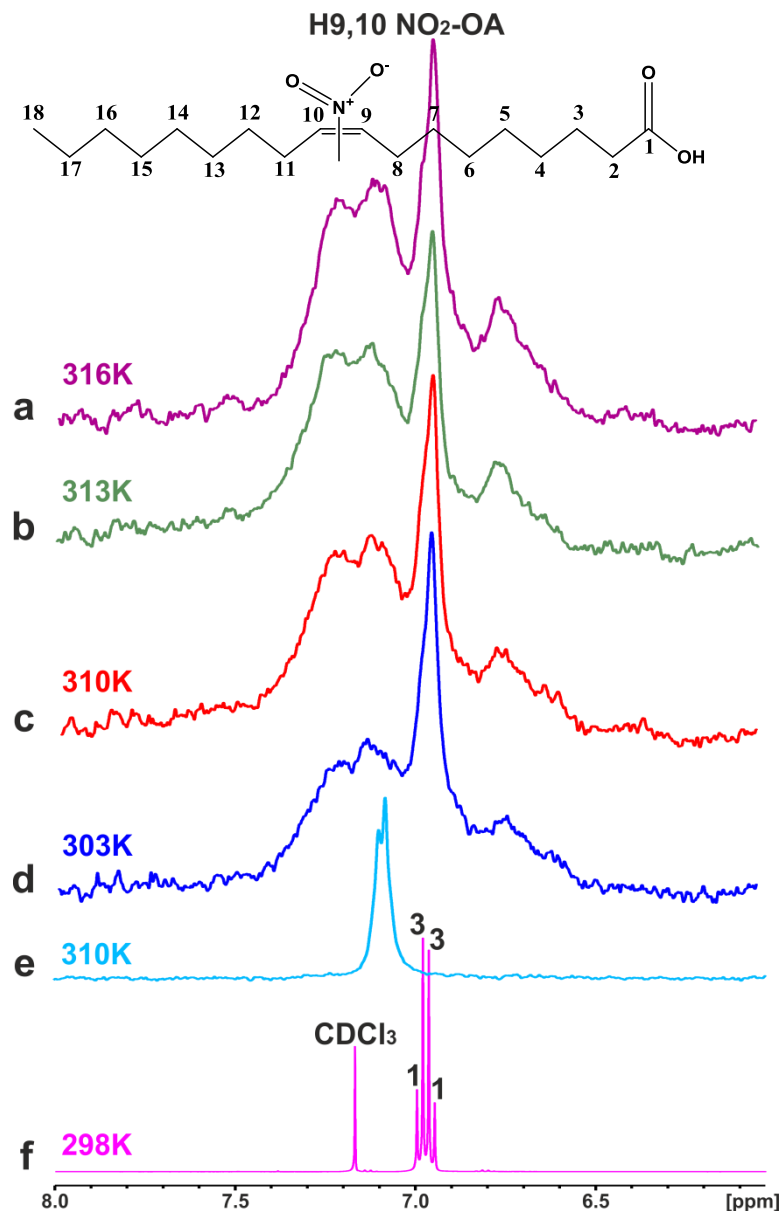
Εικόνα 4.32. Υπέρθυση επιλεγμένων διαμορφώσεων των FFA και της ιβουπροφαίνης: **1GNI-3:** για τη θέση πρόσδεσης FA3 στη δομή 1GNI.pdb. **1GNI-4:** για τη θέση πρόσδεσης FA4 στη δομή 1GNI.pdb. **1GNI-6:** για τη θέση πρόσδεσης FA6 στη δομή 1GNI.pdb. **2BXG-6:** Η υπέρθεση της ιβουπροφαίνης θέτει στο 2BXG.pdb για τη θέση πρόσδεσης FA6. Υπέρθυση επιλεγμένων διαμορφώσεων των FFA και της βαρφαρίνης: **1GNI-7:** για τη θέση πρόσδεσης FA7 στη δομή 1GNI.pdb. **2BXG-7:** για τη θέση πρόσδεσης FA7 στη δομή 2BXD.pdb. Κωδικός χρωμάτων: CA=κόκκινο, OA=πράσινο, LA=μπλε, ALA=κίτρινο, 1GNI.pdb, 2BXG.pdb, 2BXD.pdb και τα αντίστοιχα συνδεδεμένα OA, ιβουπροφαίνη και βαρφαρίνη: γκρι. Για την αναπαράσταση 2BXG-6 και 2BXD-7, το φόντο ορίστηκε σε ανοιχτό γκρι.

4.5 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) με την αλβουμίνη ορού (HSA) με τη χρήση τεχνικών NMR (¹H NMR, STD-NMR, tr-NOESY NMR, INPHARMA NMR)

Όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 1.2 τα νίτρο παράγωγα ακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντι-υπερτασικές, αντικαρκινικές και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες [Melo et al, 2017; Chieffo et al, 2016; Kuhn et al, 2018]. Αντιδρούν με κυστεΐνη δημιουργώντας αναστρέψιμα προϊόντα προσθήκης Michael, με αποτέλεσμα τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση (PTM) των πρωτεϊνών [Freeman et al, 2008]. Ως εκ τούτου, η μελέτη τους με τη χρήση μεθοδολογιών NMR που αναλύθηκαν λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2 κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Στην Εικόνα 4.33 παρουσιάζεται μια επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR ¹H (500 MHz) ισομοριακού μίγματος των δύο ισομερών θέσεως του (Z)-9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) με HSA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 303, 310, 313 και 316K. Παραδόξως, τα φάσματα δείχνουν την παρουσία: (i) τριών εξαιρετικά διευρυμένων κορυφών, λόγω τριών υψηλής συγγένειας θέσεων πρόσδεσης, πιθανώς FA2, FA4 και FA5. (ii) Μιας οξείας κορυφής στα ~6.96 ppm, η οποία μετά τον μετασχηματισμό Gauss - Lorentz υποδεικνύει την παρουσία τριών έντονα αλληλεπικαλυπτόμενων οξέων απορροφήσεων που μπορούν να αποδοθούν σε θέσεις δέσμευσης χαμηλής συγγένειας, πιθανώς FA3, FA6 και FA7.

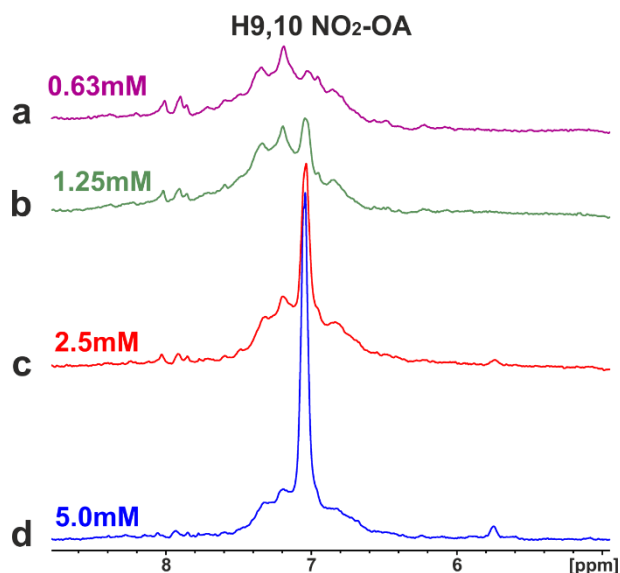
Αυξάνοντας σταδιακά τη θερμοκρασία στην περιοχή 303–316K, οι απορροφήσεις καθίστανται λιγότερο διευρυμένες. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ταχύτερη μοριακή περιστροφή του συμπλόκου NO₂-OA/HSA και στο μειωμένο ιξώδες του διαλύματος σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η μεταβολή στα εύρη των κορυφών βρέθηκε να είναι αναστρέψιμη. Τα πειράματα μεταβλητής συγκέντρωσης του NO₂-OA στην περιοχή από 0.63 έως 5.0 mM, εμφανίζουν σαφώς σημαντική αύξηση της έντασης της οξείας κορυφής στα ~6.96 ppm, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.34. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του μη δεσμευμένου NO₂-OA που βρίσκεται σε ταχεία ανταλλαγή, στη χρονική κλίμακα NMR, με τις θέσεις χαμηλής συγγένειας της HSA.



Εικόνα 4.33. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR ¹H (500 MHz) του 9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) (2.5 mM): (a) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 316 K, (b) 313 K, (c) 310 K και (d) 303 K (αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 15min 23sec); (e) χωρίς HSA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 50 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310 K (αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec); (f) σε CDCl₃ (T = 298 K, αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 8min). Οι δύο μη ισοδύναμες τριπλές κορυφές των πρωτονίων CH= του ισομοριακού μίγματος των δύο ισομερών του (*Z*)-9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος εμφανίζονται ως ψευδοτετραπλή (1:3:3:1).

Αντίθετα, η επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR ¹H (500 MHz) του NO₂-OA, στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα όπως παραπάνω χωρίς HSA, δείχνει δύο ισχυρά επικαλυπτόμενα σήματα λόγω δύο μη ισοδύναμων CH= πρωτονίων με χημικές μετατοπίσεις 7.09 ppm και 7.07 ppm. Επομένως, η πολύ μικρή διαφορά χημικής μετατόπισης 0.02 ppm του ισομοριακού μίγματος μπορεί να αποδοθεί στα δύο ισομερή

του (Z)-9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος. Το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του $\text{NO}_2\text{-OA}$ σε CDCl_3 περιέχει εξαιρετικά οξείες τριπλές κορυφές των δύο μη ισοδύναμων CH= πρωτονίων, με διαφορά χημικής μετατόπισης ~ 0.015 ppm, που εμφανίζονται ως μία ψευδοτετραπλή απορρόφηση.

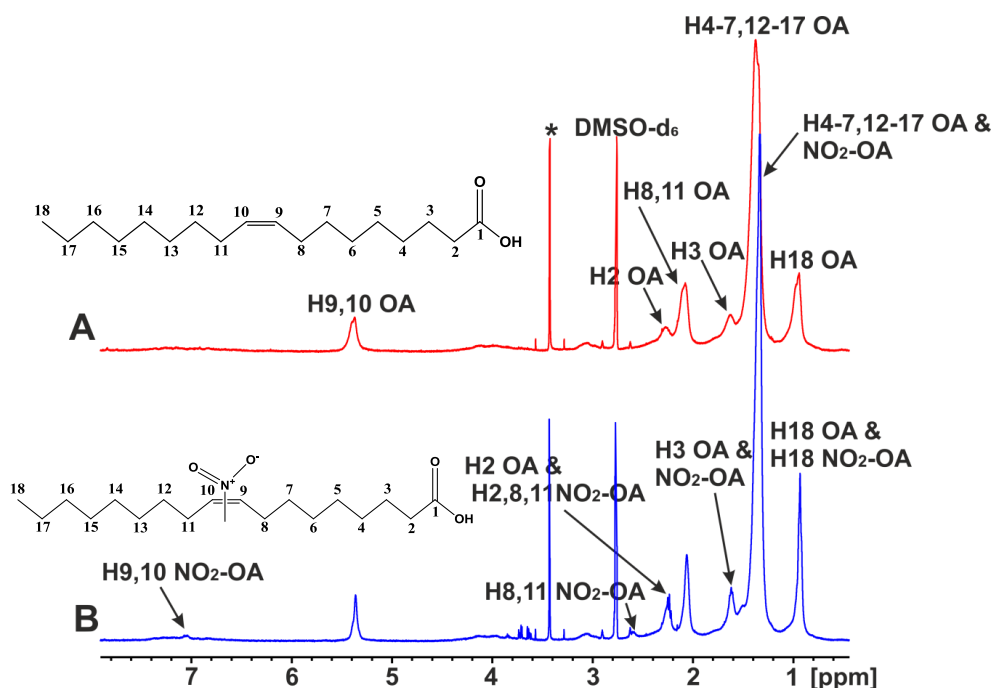


Εικόνα 4.34. Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων NMR ^1H (500 MHz) διαφόρων συγκεντρώσεων του 9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος ($\text{NO}_2\text{-OA}$) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ ($T = 310$ K, αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 15min 23sec).

Στην Εικόνα 4.35 απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310 K. Η προσθήκη $\text{NO}_2\text{-OA}$ σε μοριακή αναλογία 1:2.3 $\text{NO}_2\text{-OA:OA}$ οδηγεί σε σημαντική μείωση των ευρών των κορυφών του OA. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το $\text{NO}_2\text{-OA}$ έχει υψηλότερη συγγένεια με την HSA από αυτή του OA. Αυτό έχει ως συνέπεια τη σημαντική μείωση του ρυθμού ανταλλαγής και, συνεπώς, του εύρους των κορυφών του OA με HSA.

Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, μελέτες NMR ^1H για τη χαρτογράφηση μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και ειδικών θέσεων δέσμησης του $\text{NO}_2\text{-OA}$ με την HSA, μέσω ανταγωνιστικών πειραμάτων με τα φάρμακα βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη. Το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) της βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ εμφανίζεται στην Εικόνα 4.36A-a. Στην Εικόνα 4.36A-b παρουσιάζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του $\text{NO}_2\text{-OA}$ (1.25 mM) και της βαρφαρίνης (W) (3.3 mM) σε μοριακή αναλογία 1:2.7.

Παρατηρούμε πως η προσθήκη NO₂-OA έχει ως αποτέλεσμα σημαντική εκλέπτυνση των απορροφήσεων της βαρφαρίνης. Ως εκ τούτου, το NO₂-OA πολύ πιθανόν προσδένεται στην ίδια θέση FA7 με τη βαρφαρίνη, και μάλιστα με υψηλότερη συγγένεια.

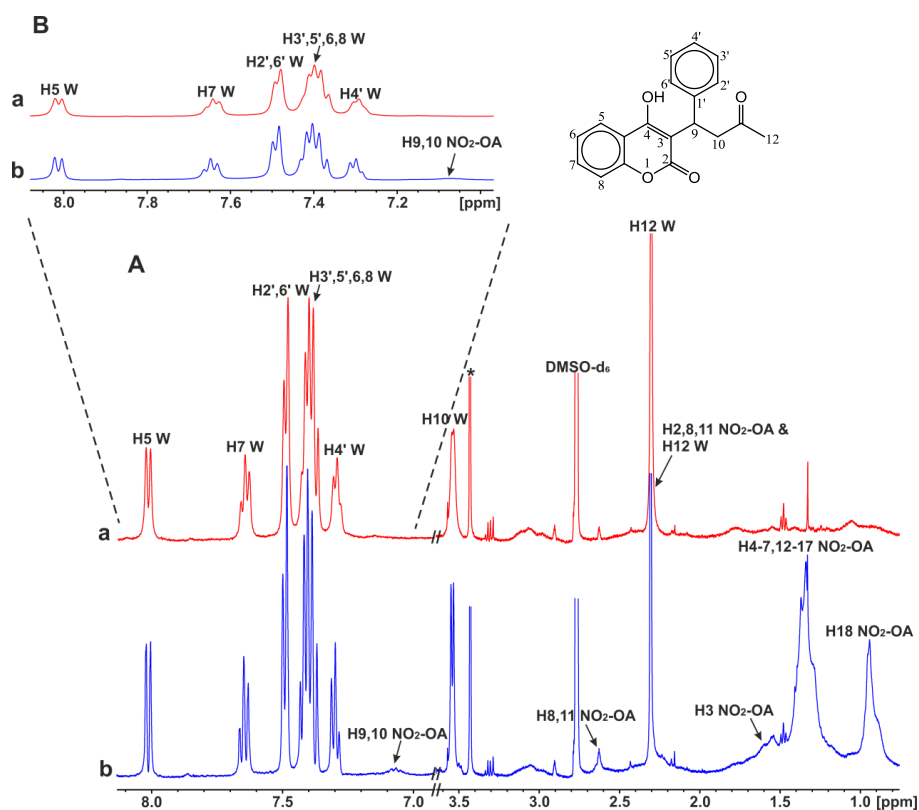


Εικόνα 4.35. Φάσματα NMR ¹H (500 MHz): (A) ελαϊκού οξέος (OA) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (B) νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) (1.25 mM) και ελαϊκού οξέος (OA) (2.8 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ (T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 15min 23 sec). *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης με την ιβουπροφαίνη. Το φάσμα NMR ¹H (500 MHz) της ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ εμφανίζεται στην Εικόνα 4.37A-a. Στην Εικόνα 4.37A-b παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H (500 MHz) του NO₂-OA (1.25 mM) και της ιβουπροφαίνης (IB) (3.25 mM) σε μοριακή αναλογία 1:2.6. Και πάλι, η προσθήκη NO₂-OA έχει ως αποτέλεσμα την εκλέπτυνση των κορυφών της ιβουπροφαίνης (Εικόνα 4.37A-b). Επομένως, το NO₂-OA πολύ πιθανόν προσδένεται στις ίδιες θέσεις με την ιβουπροφαίνη, δηλαδή στις FA6 και/ή FA3.

Στην Εικόνα 4.38A-a παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H των ολεφινικών πρωτονίων του ελαϊκού οξέος (OA) (1.25 mM) με HSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το φάσμα

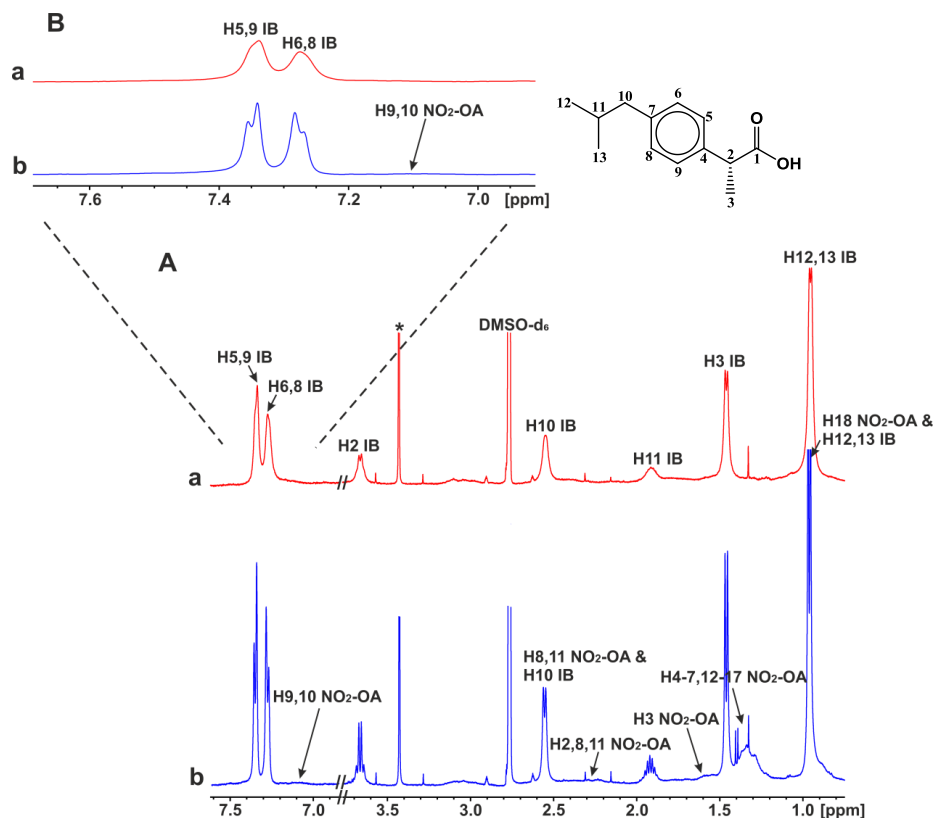
STD NMR του ΟΑ παρουσία HSA δείχνει ισχυρό σήμα των ολεφινικών πρωτονίων H9,10 (Εικόνα 4.38A-b). Στην Εικόνα 4.38A-c απεικονίζεται το φάσμα STD NMR του ΟΑ (1.25 mM) μετά την προσθήκη στο σύμπλοκο NO₂-ΟΑ (1.25 mM)/HSA (25 μM). Παρατηρούμε μια πολύ σημαντική μείωση του σήματος STD του ΟΑ, το οποίο γίνεται δυσδιάκριτο ως προς το θόρυβο της γραμμής βάσης. Αυτό αποδεικνύει ότι το NO₂-ΟΑ έχει σημαντικά μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στην HSA απ' ό,τι το ΟΑ (Εικόνα 4.35).



Εικόνα 4.36. Φάσματα NMR ¹H (500 MHz): A (a) βαρφαρίνης (W) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (b) νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-ΟΑ) (1.25 mM) και βαρφαρίνης (W) (3.3 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. Στα (A) και (B), T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 15min 23sec. Τα B(a) και B(b) είναι εκτεταμένες περιοχές των A(a) και A(b), αντίστοιχα. *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στην Εικόνα 4.38B-a παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H των αρωματικών πρωτονίων του φαινυλο βουτυλο δακτυλίου (H2',6', H3',5' και H4') και του δακτυλίου βενζοπυράνης (H5, H7 και H6,8) της βαρφαρίνης (W) (1.25 mM) με HSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το φάσμα STD της βαρφαρίνης παρουσία HSA δείχνει ισχυρά σήματα των αρωματικών πρωτονίων (Εικόνα 4.38B-b). Το σήμα STD της βαρφαρίνης, που είναι δεσμευμένη

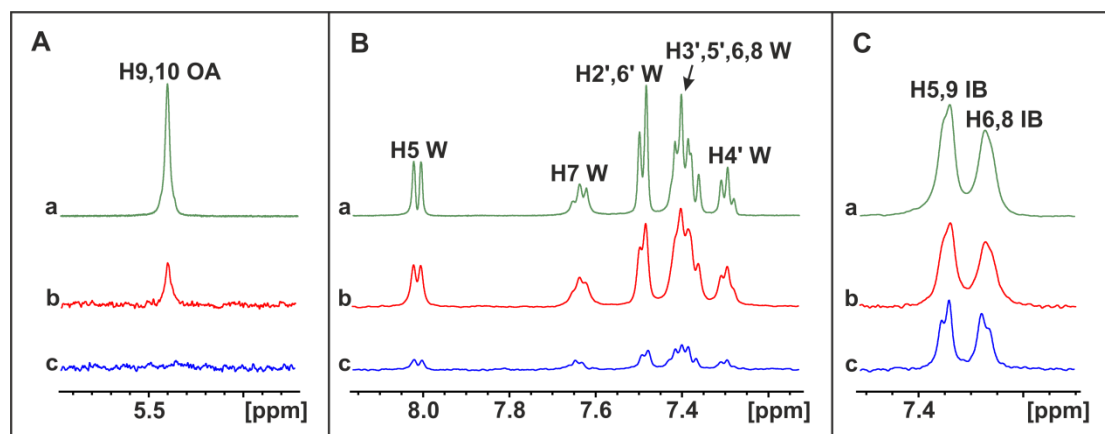
στην HSA, μειώνεται σημαντικά (>80%) κατά την προσθήκη στο σύμπλοκο NO₂-OA/HSA (Εικόνα 4.38B-c). Αυτά τα πειράματα παρέχουν σαφείς αποδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι ανταγωνιστικές παρά αλλοστερικές [Mayer et al, 2001; Claasen et al, 2005; Tanoli et al, 2015], αν και η πλήρης απόδειξη απαιτεί τη χρήση μεθοδολογιών INPHARMA NMR (βλέπετε παρακάτω).



Εικόνα 4.37. Φάσματα NMR ¹H (500 MHz): A (a) ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. (b) νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) (1.25 mM) και ιβουπροφαίνης (IB) (3.25 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆. Στα (A) και (B), T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 128, πειραματικός χρόνος = 15min 23sec. Τα B(a) και B(b) είναι εκτεταμένες περιοχές των A(a) και A(b), αντίστοιχα. *Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στην Εικόνα 4.38C-a παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H των αρωματικών πρωτονίων της ιβουπροφαίνης (IB) (1.25 mM) με HSA (25 μM) που λήφθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το φάσμα STD της ιβουπροφαίνης παρουσία HSA δείχνει και πάλι ισχυρά σήματα των αρωματικών πρωτονίων (Εικόνα 4.38C-b) τα οποία εμφανίζουν μικρή μείωση με την προσθήκη στο σύμπλοκο NO₂-OA/HSA (Εικόνα 4.38C-c). Αυτό αποδεικνύει ότι το NO₂-OA δεν έχει σημαντικά υψηλότερη συγγένεια ως προς την HSA σε σχέση με τη συγγένεια της ιβουπροφαίνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα

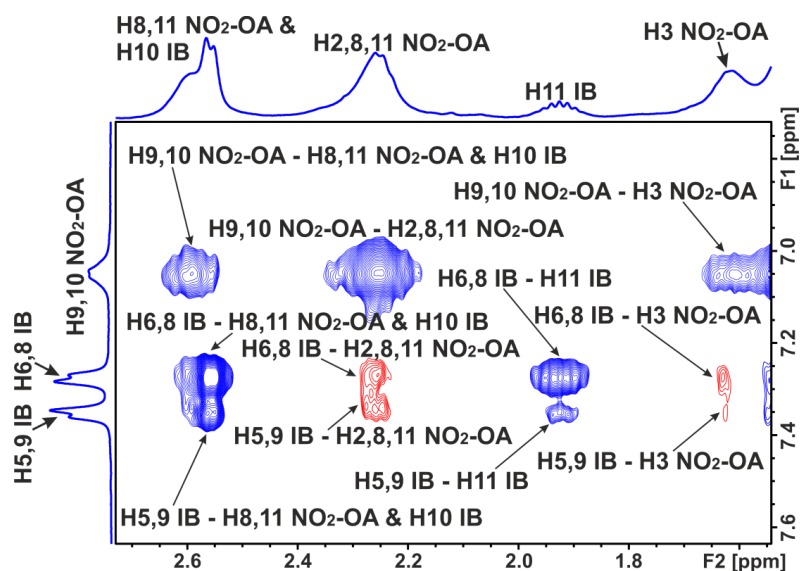
βιβλιογραφικά δεδομένα, ότι δηλαδή η ιβουπροφαίνη εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς την αλβουμίνη, με πειραματικές σταθερές δέσμευσης περίπου $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [Itoh et al, 1997; Rahman et al, 1993], σε αντίθεση με τη βαρφαρίνη με συγγένεια $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ [Kragh-Hansen, 1985].



Εικόνα 4.38. Επιλεγμένες περιοχές: A (a) του φάσματος NMR ^1H (500 MHz) του ελαϊκού οξέος (OA) (1.25 mM) με HSA (25 μM). (b) Φάσμα STD NMR του (a). (c) Φάσμα STD NMR του ελαϊκού οξέος (1.25 mM) μετά την προσθήκη στο σύμπλοκο $\text{NO}_2\text{-OA}$ (1.25 mM)/HSA (25 μM). B (a) του φάσματος ^1H NMR (500 MHz) της βαρφαρίνης (W) (1.25 mM) με HSA (25 μM). (b) Φάσμα STD NMR του (a). (c) Φάσμα STD NMR της βαρφαρίνης (1.25 mM) μετά την προσθήκη στο σύμπλοκο $\text{NO}_2\text{-OA}$ (1.25 mM)/HSA (25 μM). C (a) του φάσματος ^1H NMR (500 MHz) της ιβουπροφαίνης (IB) (1.25 mM) με HSA (25 μM). (b) Φάσμα STD NMR του (a). (c) Φάσμα STD NMR της ιβουπροφαίνης (1.25 mM) μετά την προσθήκη στο σύμπλεγμα $\text{NO}_2\text{-OA}$ (1.25 mM)/HSA (25 μM). Στα (A), (B) και (C), τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$), $T = 310 \text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για το (a) και αριθμός σαρώσεων = 80, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 50 min για τα (b) και (c).

Για να εκτιμηθεί εάν η επίδραση στα εύρη των κορυφών οφείλεται σε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις ως προς τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης και όχι σε αλλοστερικά φαινόμενα, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική INPHARMA NMR. Στην Εικόνα 4.39 παρουσιάζεται το ανταγωνιστικό πείραμα 2D INPHARMA NMR του νιτρο-ελαϊκού οξέος ($\text{NO}_2\text{-OA}$) (5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 10% $\text{DMSO-}d_6$ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM). Παρατηρούμε την παρουσία αρνητικών διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του νιτρο-ελαϊκού οξέος και της ιβουπροφαίνης, που υποδηλώνεται με τις κόκκινες διασταυρούμενες κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, διαμοριακά σήματα NOE έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των H5,9 και H6,8 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2,8,11 και H3 του νιτρο-ελαϊκού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει τη μεταφορά μαγνήτισης NOE μεταξύ

των δύο υποκαταστατών στις κοινές θέσεις πρόσδεσης FA3, FA4 και FA6 της HSA. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κοινά σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2 της ιβουπροφαίνης με τα πρωτόνια H2,8,11 και H3 του νιτρο-ελαϊκού οξέος. Αυτό αποδεικνύει τον κοινό τρόπο δέσμευσης των καρβοξυλικών ομάδων των υποκαταστατών.



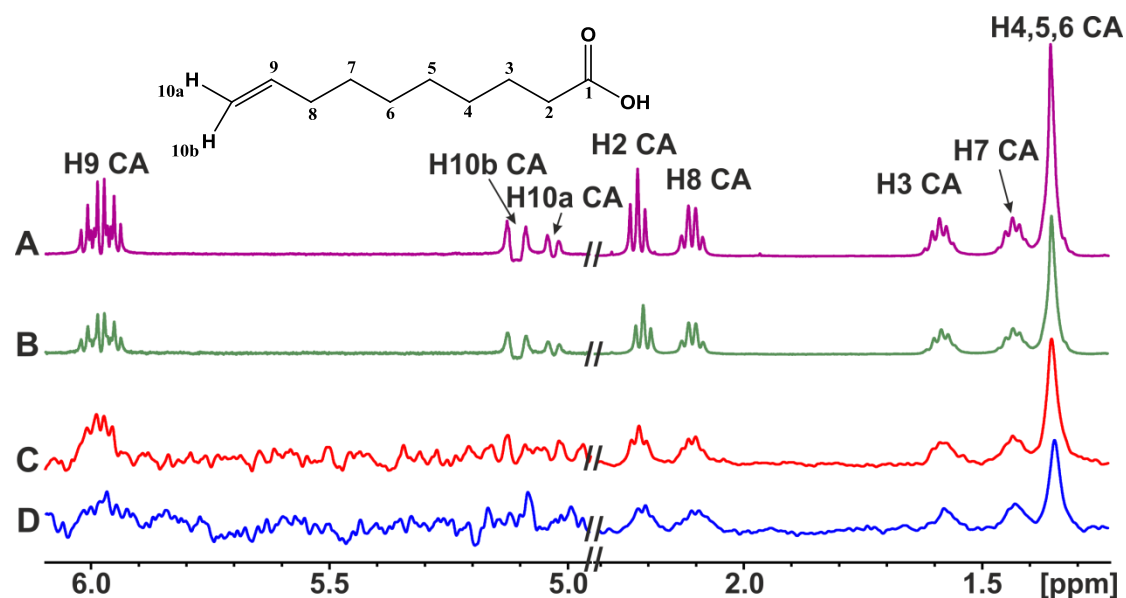
Εικόνα 4.39. Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D tr-NOESY NMR του νιτρο-ελαϊκού οξέος (NO₂-OA) (5 mM) με HSA (25 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 10% DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη ιβουπροφαίνης (IB) (2.5 mM) (χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310 K, αριθμός σαρώσεων = 112, πειραματικός χρόνος = 17h 19min). Τα διαμοριακά σήματα NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

4.6 Μελέτη της αλληλεπίδρασης ελεύθερων λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με τη χρήση των τεχνικών STD-NMR και tr-NOESY NMR

Στις ενότητες 4.1, 4.2, 4.3 και 4.4 ολοκληρώσαμε τη μελέτη αλληλεπίδρασης ελεύθερων λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη ορού (BSA/HSA) και αντλήσαμε σημαντικές πληροφορίες σε ατομικό επίπεδο για τον ανταγωνιστικό τρόπο δέσμευσης, την αναδίπλωση της δις-αλλυλικής περιοχής και την παρουσία δύο προσανατολισμών των FFA στις θέσεις πρόσδεσης των φαρμάκων βαρφαρίνης και ιβουπροφαίνης στην αλβουμίνη. Στην ενότητα αυτή αναλύονται τα αποτελέσματα της μελέτης αλληλεπίδρασης ελεύθερων λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, με τη χρήση των τεχνικών STD-NMR και tr-NOESY NMR. Η πρωτεΐνη αυτή έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και κυρίως στη λευχαιμία [Pepper et al, 2008], ενώ κλινικά έχει μεγάλη προγνωστική σημασία ως θεραπευτικός στόχος [Adams et al, 2007] (βλέπετε εισαγωγική ενότητα της διδακτορικής διατριβής). Το MB της Bcl-2, 26 kDa, 239 αμινοξέα, την καθιστά ιδανική για μελέτες NMR. Για την πραγματοποίηση των ανταγωνιστικών πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα ABT-263, ο οποίος προσδένεται ισχυρά σε επίπεδο υπο-nano-mole συγκέντρωσης στη Bcl-2 οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση [Ashkenazi et al, 2017].

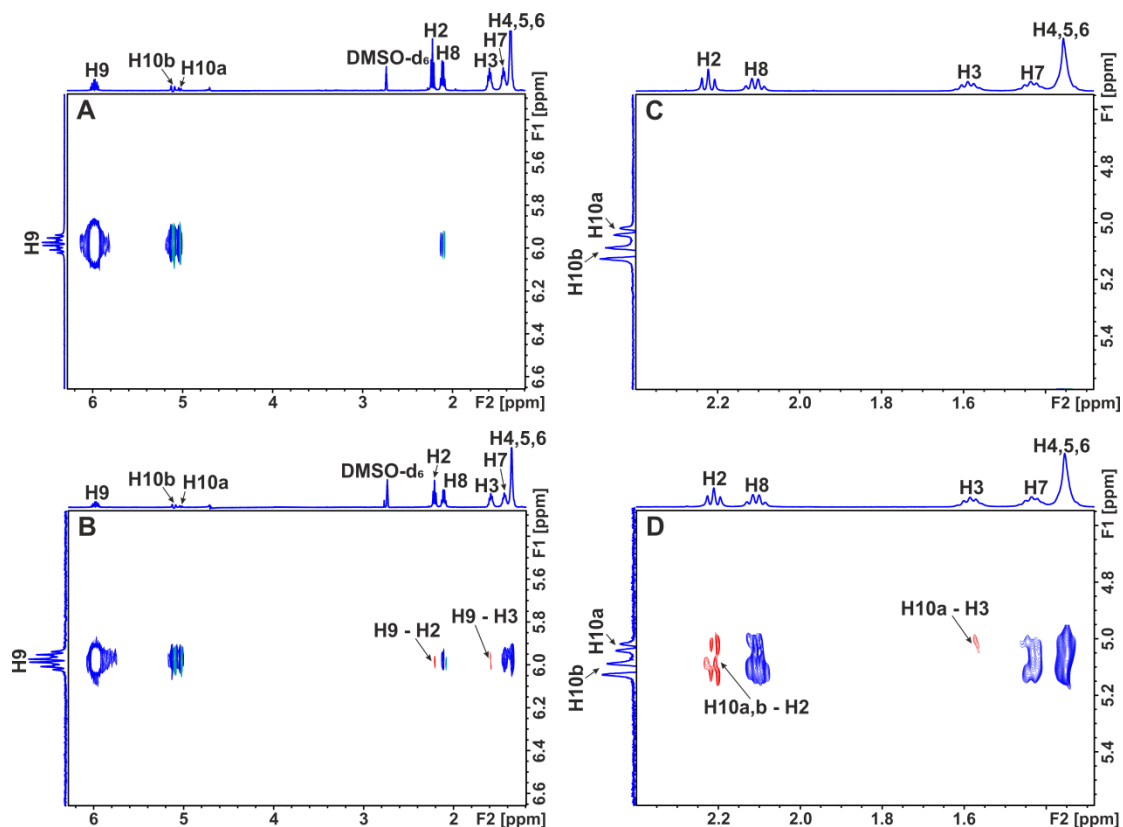
Στην Εικόνα 4.40A απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% $\text{DMSO-}d_6$, στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του καπρολεϊκού οξέος (Εικόνα 4.40C) παρατηρούμε την παρουσία όλων των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική αλληλεπίδραση όλων των χαρακτηριστικών ομάδων του οξέος με την πρωτεΐνη. Το φάσμα 4.40B αντιπροσωπεύει το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του καπρολεϊκού οξέος μετά την προσθήκη του ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία CA/ABT-263 = 40/1 η οποία οδηγεί σε σημαντική διεύρυνση των κορυφών NMR ^1H του καπρολεϊκού οξέος. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει συνεργατική και όχι ανταγωνιστική δράση μεταξύ του λιπαρού οξέος και του αναστολέα. Ωστόσο, από τη σύγκριση των φασμάτων STD NMR του καπρολεϊκού οξέος με τη Bcl-2 (Εικόνα 4.40C) και μετά την προσθήκη του ABT-263 (Εικόνα 4.40D) δε μπορούμε να εξάγουμε κάποιο

ασφαλές συμπέρασμα, αφού τα σήματα STD των πρωτονίων H9, H8, H4,5,6 και H2 μειώνονται, ενώ των πρωτονίων H7 και H3 δεν επηρεάζονται.



Εικόνα 4.40. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του καπρολεϊκού οξέος (CA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT- 263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. (ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 , $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων =264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D)).

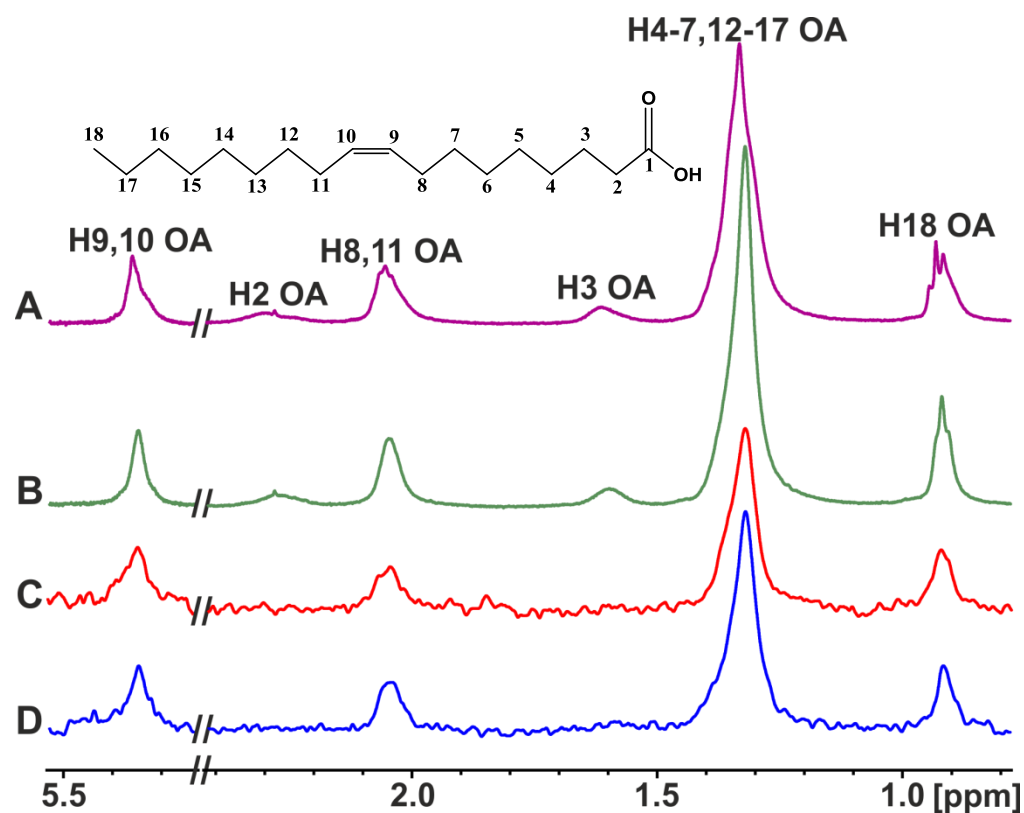
Για την πληρέστερη μελέτη της επίδρασης του αναστολέα ABT-263 πραγματοποιήσαμε πειράματα 2D tr-NOESY NMR. Στην Εικόνα 4.41 απεικονίζονται περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του καπρολεϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) καθώς και (B&D) του καπρολεϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 στους 310K. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 παρατηρούμε ότι τα σήματα NOE γίνονται εντονότερα, αλλά ταυτόχρονα εμφανίζονται και καινούριες κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, το καπρολεϊκό οξύ εμφανίζει σημαντικά ενδομοριακά NOE, μακράς εμβέλειας, μεταξύ των πρωτονίων H10a,b – H2, H3 καθώς και H9 – H2, H3, που παρουσιάζονται στα φάσματα με κόκκινο χρώμα. Συνεπώς, υπάρχει συνεργατική δράση μεταξύ του λιπαρού οξέος και του αναστολέα.



Εικόνα 4.41. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) καπρολείκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM). (B, D) καπρολείκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆), χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min. Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Στην Εικόνα 4.42A απεικονίζεται το φάσμα NMR ¹H (500 MHz) του ελαϊκού οξέος (OA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆, στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του ελαϊκού οξέος (Εικόνα 4.42C) παρατηρούμε την παρουσία των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ελαϊκό οξύ προσδένεται στην πρωτεΐνη. Να σημειωθεί ότι τα σήματα των πρωτονίων H2 και H3 είναι σχεδόν μηδενικής έντασης στο φάσμα STD-NMR, επειδή οι κορυφές είναι εξαιρετικά διευρυμένες. Επιπλέον, το φάσμα NMR ¹H του ελαϊκού οξέος με τη Bcl-2 δείχνει ασυμμετρία στις κορυφές, που πιθανόν οφείλεται στην παρουσία δύο μορφών του λιπαρού οξέος που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Μετά την προσθήκη του ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία OA/ABT-263 = 40/1 παρατηρούμε στο φάσμα NMR ¹H του ελαϊκού οξέος (Εικόνα 4.42B) διαμορφωτική ομοιογένεια. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία του αναστολέα οι δύο μορφές του λιπαρού οξέος συμπίπτουν σε μία, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει συνεργατικό φαινόμενο. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται

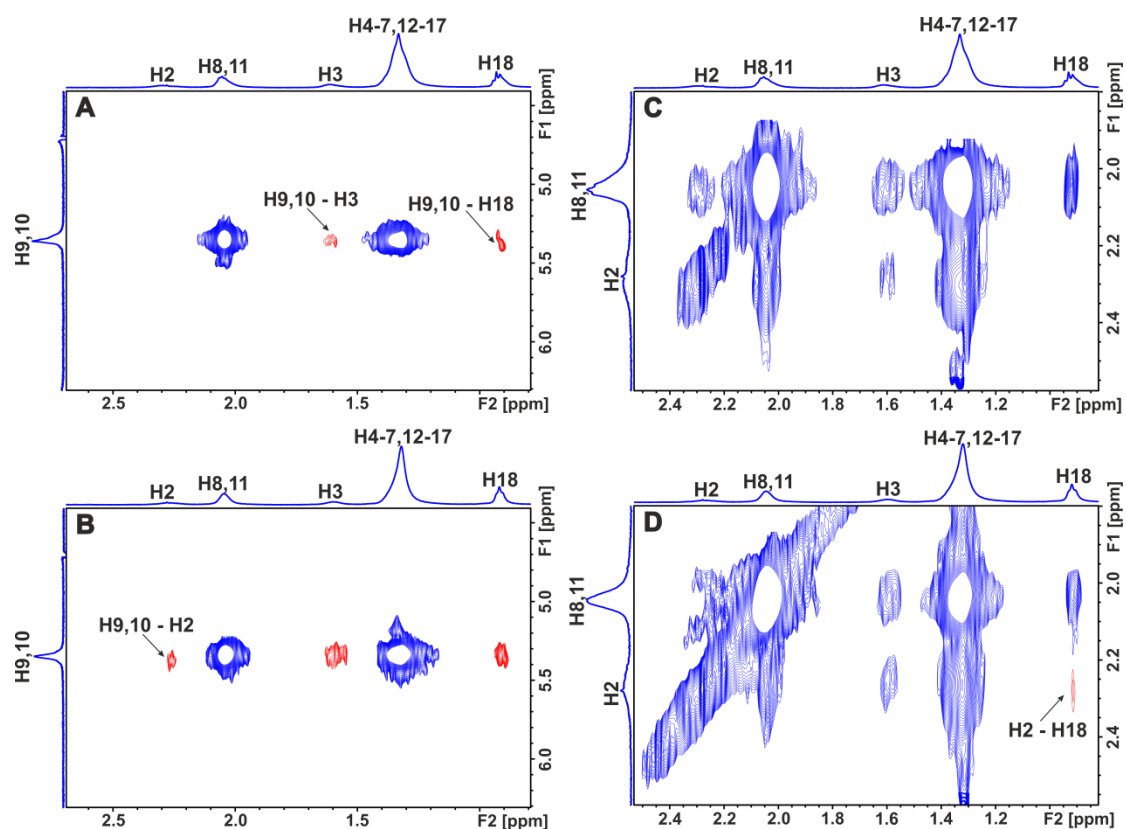
και από το φάσμα STD NMR του ελαϊκού οξέος μετά την προσθήκη του ABT-263 (Εικόνα 4.42D), όπου διαπιστώνουμε την αύξηση της έντασης των σημάτων STD NMR του λιπαρού οξέος.



Εικόνα 4.42. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του ελαϊκού οξέος (OA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του ελαϊκού οξέος (OA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων = 264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D).

Στην Εικόνα 4.43 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του ελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) καθώς και (B&D) του ελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 στους 310K. Στο φάσμα 2D tr-NOESY NMR 4.43A παρατηρούμε την ύπαρξη ενδομοριακών NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων του διπλού δεσμού με τα β -πρωτόνια και τα πρωτόνια της μεθυλομάδας (απεικονίζονται στο φάσμα με κόκκινο χρώμα). Αυτό υποδηλώνει ότι το ελαϊκό οξύ αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 και μάλιστα με μερικώς αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 στο διάλυμα του ελαϊκού οξέος με την πρωτεΐνη

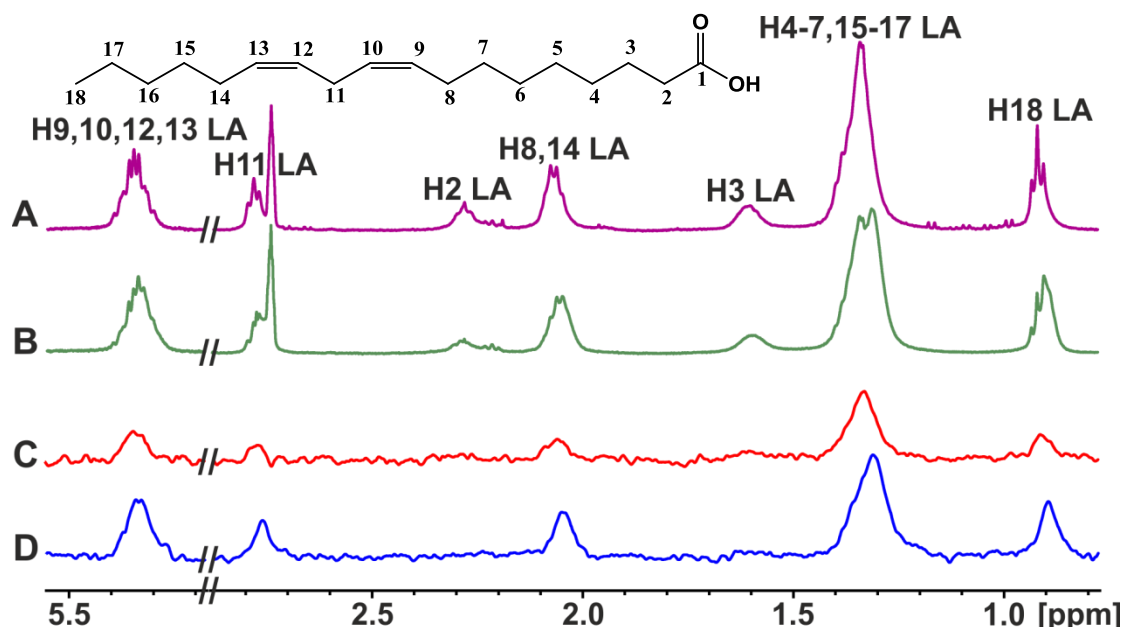
παρατηρούμε ότι τα σήματα NOE γίνονται εντονότερα, αλλά ταυτόχρονα εμφανίζονται και σημαντικά, ενδομοριακά NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων H9,10 – H2 και H2 - H18. Επομένως, υπάρχει συνεργατικό φαινόμενο μεταξύ του λιπαρού οξέος και του αναστολέα που συνεπάγεται μεγαλύτερη αναδίπλωση του λιπαρού οξέος.



Εικόνα 4.43. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) ελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M). (B, D) ελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆), χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min. Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

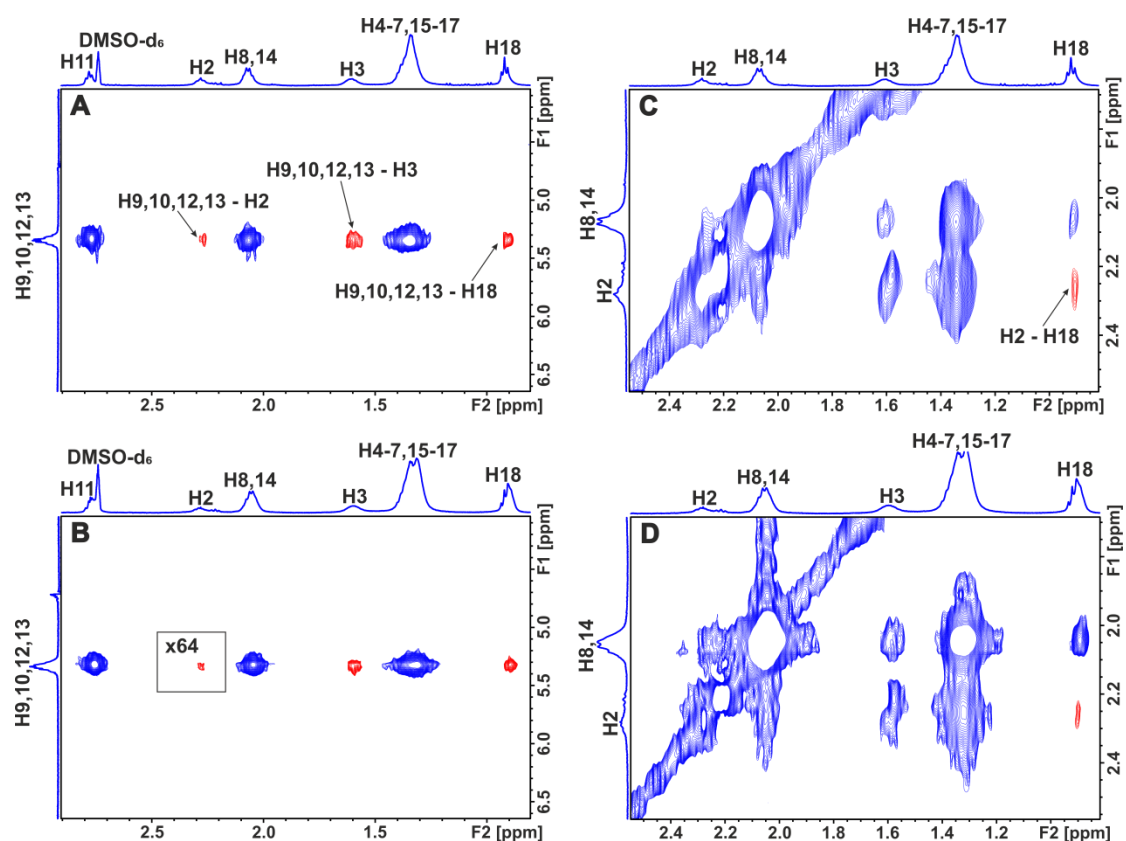
Στην Εικόνα 4.44A παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H (500 MHz) του λινελαϊκού οξέος (LA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆, στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του λινελαϊκού οξέος (Εικόνα 4.44C) παρατηρούμε την παρουσία όλων των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει ότι το λινελαϊκό οξύ αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Να σημειωθεί ότι τα σήματα των πρωτονίων H2 και H3 είναι μηδενικά στο φάσμα STD-NMR, λόγω ευρύτητας των απορροφήσεων. Μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M) σε μοριακή αναλογία LA/ABT-263 = 40/1, παρατηρείται σημαντική διεύρυνση των κορυφών NMR ¹H του λινελαϊκού οξέος, που

πιθανόν υποδηλώνει συνεργατική δράση μεταξύ λιπαρού οξέος και ABT-263 (Εικόνα 4.44B). Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα STD NMR του λινελαϊκού οξέος μετά την προσθήκη του αναστολέα (Εικόνα 4.44D), διότι παρατηρείται σημαντική αύξηση της έντασης των σημάτων STD NMR του λιπαρού οξέος.



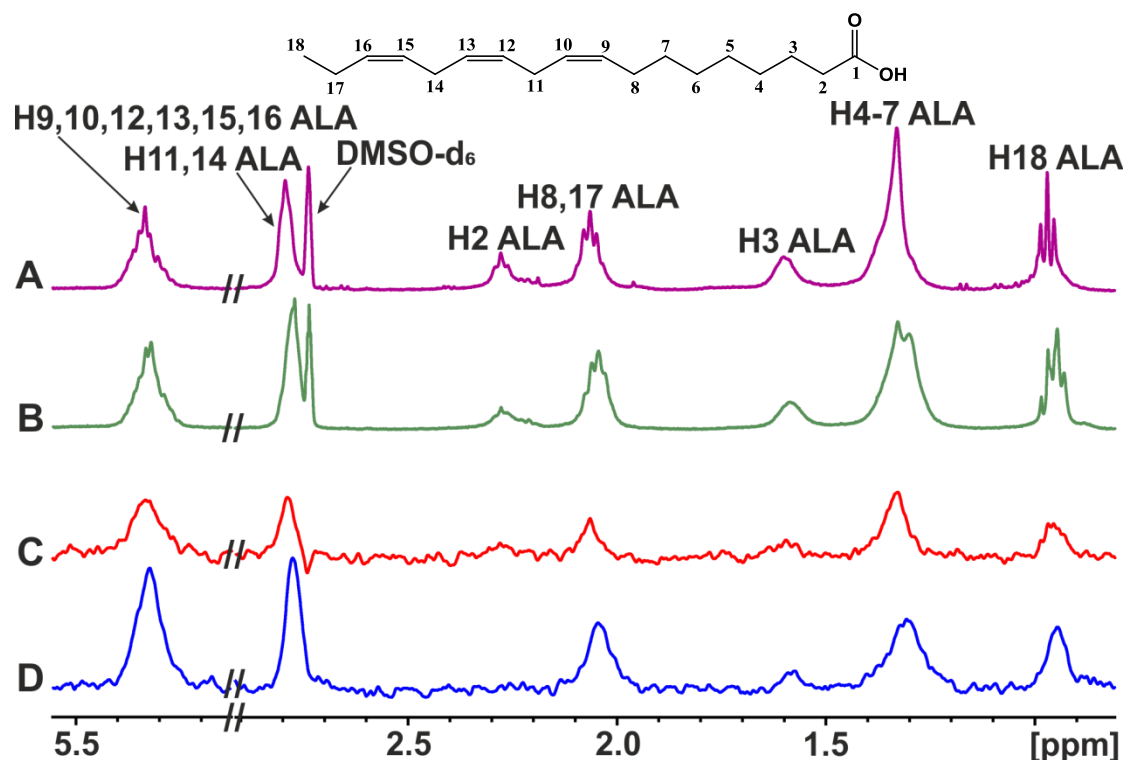
Εικόνα 4.44. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του λινελαϊκού οξέος (LA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του λινελαϊκού οξέος (LA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων = 264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D).

Στην Εικόνα 4.45 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του λινελαϊκού οξέος (2 mM) παρουσία Bcl-2 (50 μM) καθώς και (B&D) του λινελαϊκού οξέος (2 mM) παρουσία Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl,



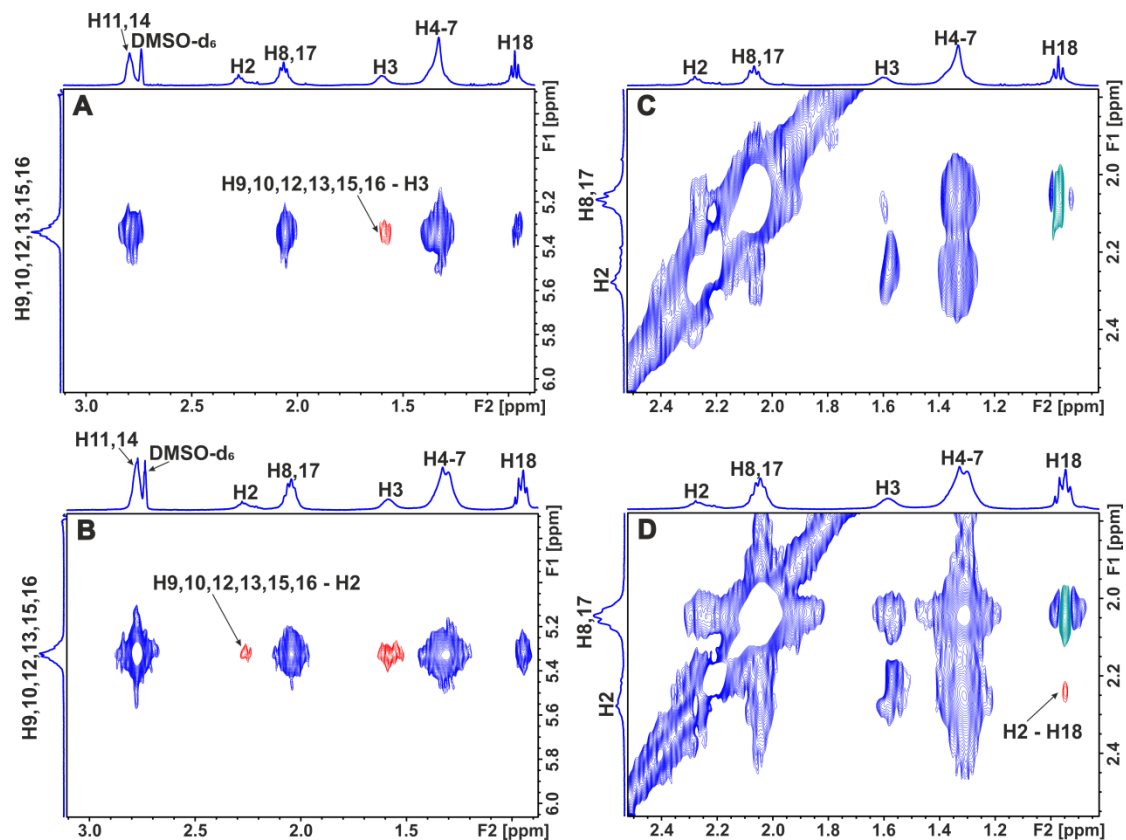
Εικόνα 4.45. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) λινελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM). (B, D) λινελαϊκού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆, χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min. Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆ στους 310K. Στα φάσμα 2D tr-NOESY NMR 4.45A και 4.45C παρατηρούμε την ύπαρξη σημαντικών ενδομοριακών NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων H_{9,10,12,13} – H₂, H_{9,10,12,13} – H₃, H_{9,10,12,13} – H₁₈ και H₂ – H₁₈ (κόκκινο χρώμα). Αυτό υποδηλώνει ότι το λινελαϊκό οξύ αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 και μάλιστα με αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 στο διάλυμα του λινελαϊκού οξέος παρατηρούμε αύξηση των σημάτων NOE. Εξαιρέση, βέβαια, αποτελούν τα ενδομοριακά σήματα NOE μεταξύ των ολεφινικών πρωτονίων με τα α- και β-πρωτόνια καθώς και μεταξύ των α-πρωτονίων με τα πρωτόνια της μεθυλομάδας που εμφανίζονται ασθενέστερα. Συνεπώς, υπάρχει συνεργατική δράση μεταξύ λιπαρού οξέος και αναστολέα, η οποία όμως δεν ενισχύει την προσέγγιση της καρβοξυλικής ομάδας ως προς τα ολεφινικά πρωτόνια και τα πρωτόνια της μεθυλομάδας.



Εικόνα 4.46. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT- 263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων = 264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D).

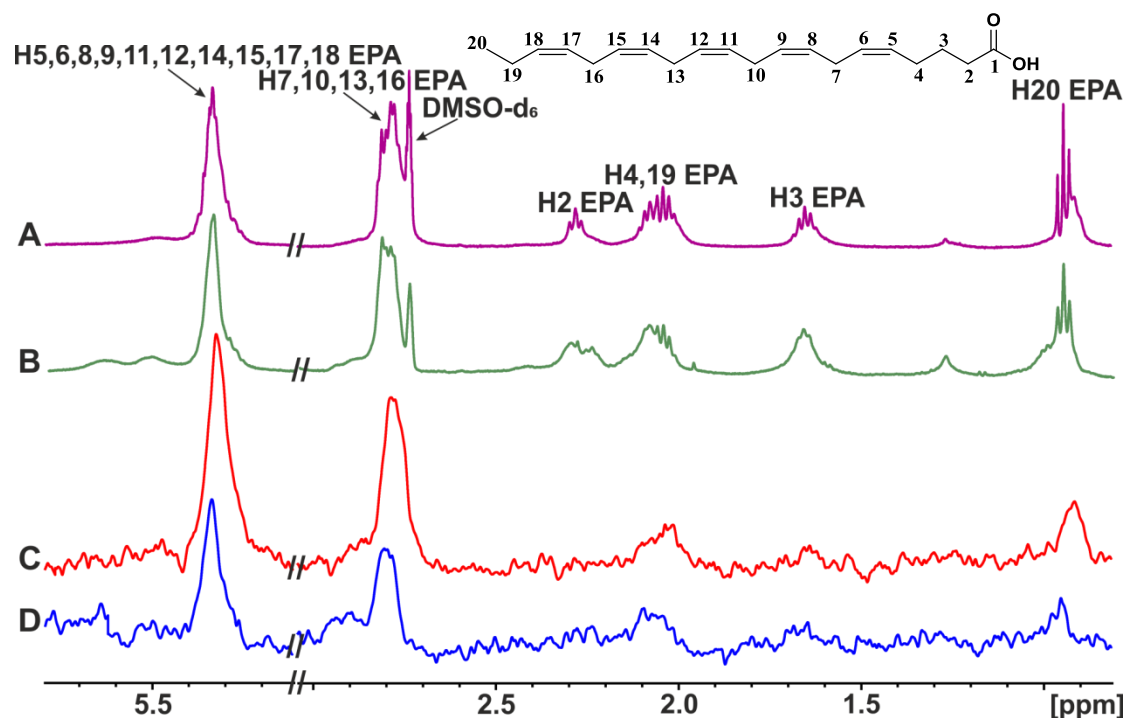
Στην Εικόνα 4.46Α παρουσιάζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του α -λινολενικού οξέος (ALA) (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 , στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του α -λινολενικού οξέος (Εικόνα 4.46C) παρατηρούμε πως όλα τα πρωτόνια αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, όπως και στην περίπτωση του καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος και λιγνολαϊκού οξέος. Η προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία ALA/ABT-263 = 40/1 οδηγεί σε σημαντική διεύρυνση των κορυφών NMR ^1H του α -λινολενικού οξέος (Εικόνα 4.46B), που πιθανόν υποδηλώνει συνεργατική δράση μεταξύ του λιπαρού οξέος και του ABT-263. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα STD NMR του α -λινολενικού οξέος μετά την προσθήκη του αναστολέα (Εικόνα 4.46D), η οποία επιφέρει σημαντική αύξηση της έντασης των σημάτων STD NMR του λιπαρού οξέος.



Εικόνα 4.47. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) α -λινολενικού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M). (B, D) α -λινολενικού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆), χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min. Τα μακράς εμβέλειας ενδομοριακά NOE σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

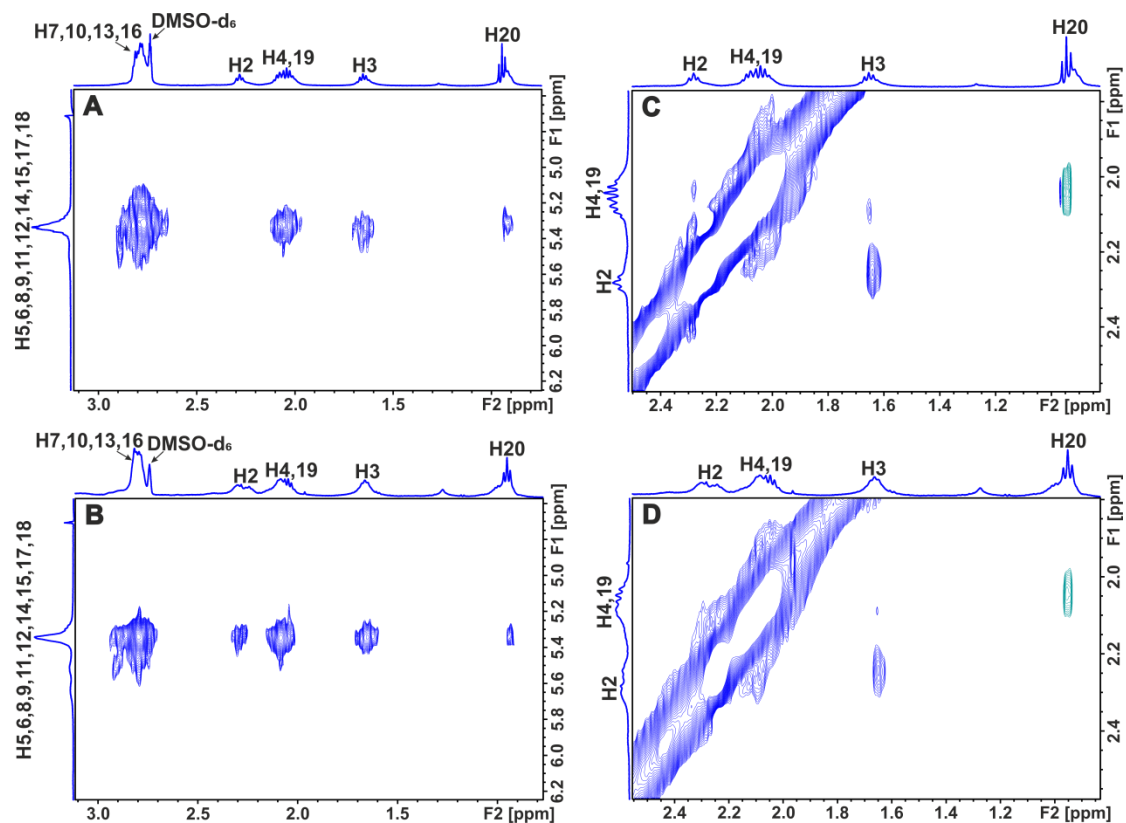
Στην Εικόνα 4.47 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του α -λινολενικού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) καθώς και (B&D) του α -λινολενικού οξέος (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆ στους 310K. Στο φάσμα 2D tr-NOESY NMR (Εικόνα 4.47A) παρατηρούμε την ύπαρξη ενός ενδομοριακού NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων του διπλού δεσμού και των β -πρωτονίων (κόκκινο χρώμα). Αυτό υποδηλώνει ότι το α -λινολενικό οξύ αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 και μάλιστα με μερικώς αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 τα σήματα NOE γίνονται εντονότερα και ταυτόχρονα εμφανίζονται σημαντικά, ενδομοριακά NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων H_{9,10,12,13,15,16} – H₂ και H₂ – H₁₈. Επομένως, υπάρχει συνεργατικό φαινόμενο

μεταξύ του λιπαρού οξέος και του αναστολέα, η οποία ευνοεί την προσέγγιση της καρβοξυλικής ομάδας προς τα ολεφινικά πρωτόνια και τα πρωτόνια της μεθυλομάδας.



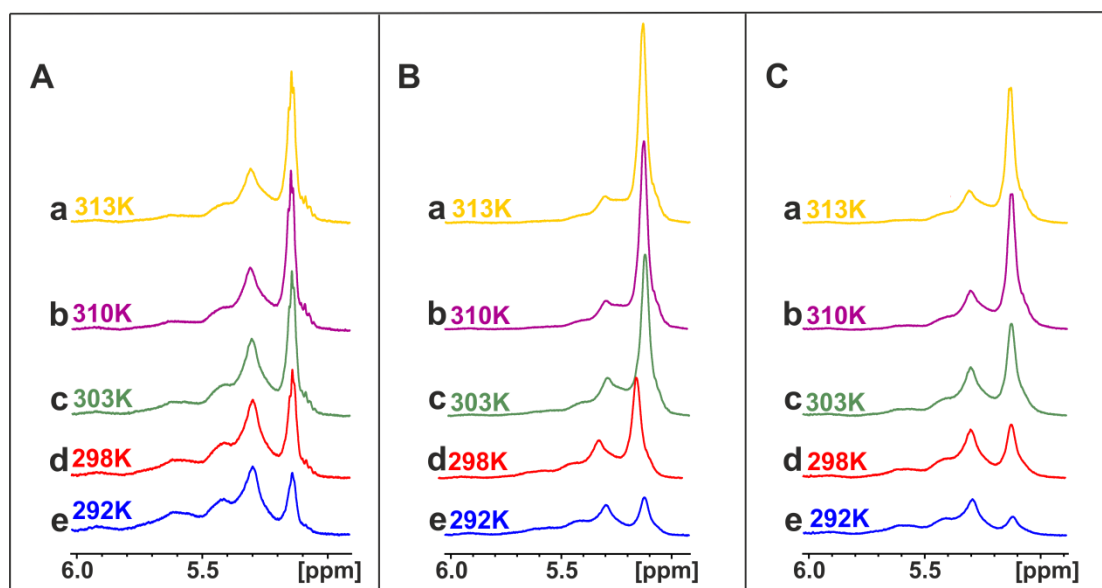
Εικόνα 4.48. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του EPA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του EPA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων = 264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D).

Στην Εικόνα 4.48A παρουσιάζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του EPA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 , στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του EPA (Εικόνα 4.46C) παρατηρούμε την παρουσία όλων των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει ότι το EPA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία LA/ABT-263 = 40/1 οδηγεί σε σημαντική μείωση των ευρών των κορυφών NMR ^1H του λιπαρού οξέος (Εικόνα 4.48B) σε αντίθεση με την περίπτωση των καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος και α -λινολενικού οξέος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ανταγωνιστική δράση μεταξύ EPA και ABT-263. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα STD NMR του EPA μετά την προσθήκη του αναστολέα (Εικόνα 4.48D), όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης των απορροφήσεων του λιπαρού οξέος.



Εικόνα 4.49. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) EPA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M). (B, D) EPA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆), χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min.

Στην Εικόνα 4.49 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του EPA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) καθώς και (B&D) του EPA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆ στους 310K. Απουσία του αναστολέα δεν παρατηρούμε την ύπαρξη ενδομοριακού NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων H2 - H20, παρότι υπάρχει ενδομοριακό σήμα NOE μεταξύ H3 – H20. Αυτό υποδηλώνει ότι το EPA αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 και μάλιστα με μερικώς αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 διαπιστώνουμε ότι τα σήματα NOE γίνονται ασθενέστερα και, ειδικότερα, εξαφανίζεται το σήμα NOE μεταξύ των β -πρωτονίων με τα πρωτόνια της μεθυλομάδας. Συνεπώς, υπάρχει ανταγωνιστική δράση μεταξύ του EPA και του αναστολέα.



Εικόνα 4.50. Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR ^1H (500 MHz) των ολεφινικών πρωτονίων: (A) του DHA (2 mM) στους 313 K (a), 310 K (b), 303 K (c), 298 K (d) και 292 K (e). (B) του DHA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) στους 313 K (a), 310 K (b), 303 K (c), 298 K (d) και 292 K (e). (C) του DHA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) στους 313 K (a), 310 K (b), 303 K (c), 298 K (d) και 292 K (e). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), αριθμός σαρώσεων = 256, πειραματικός χρόνος = 19min 40sec).

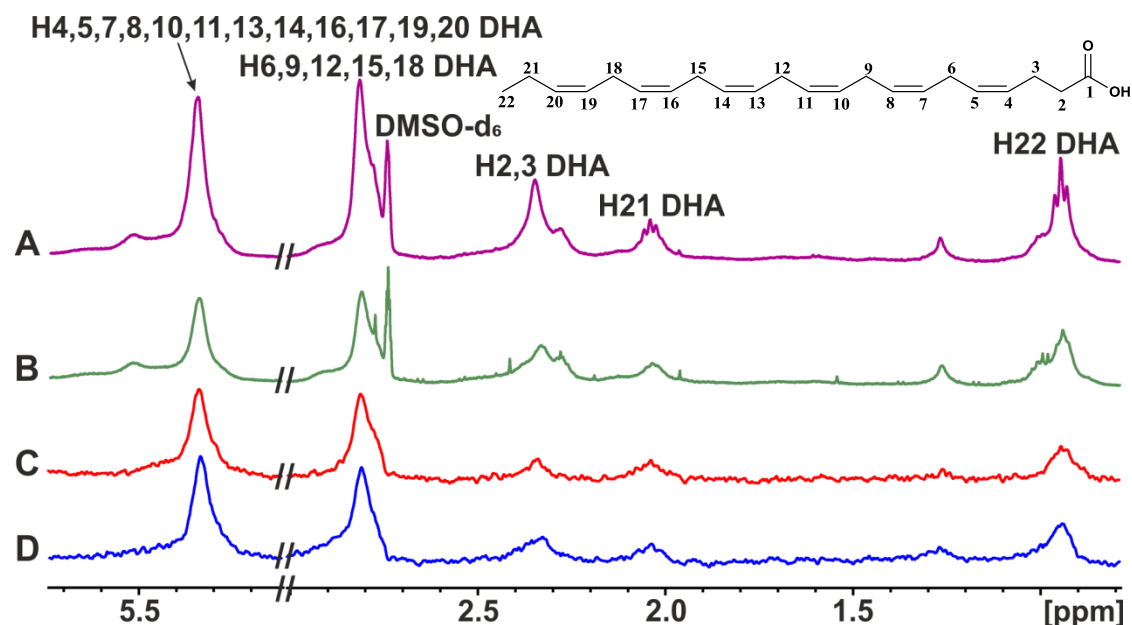
Στην Εικόνα 4.50A απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) των ολεφινικών πρωτονίων του ελεύθερου DHA (2 mM) σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 στους 292, 298, 303, 310, 313 και 313K. Στους 310K παρατηρούμε την παρουσία ευρέων κορυφών με πιο χαρακτηριστικές δύο σχετικά οξείες κορυφές στα $\delta = 5.2$ και $\delta = 5.14$ ppm. Με τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 292K στους 313K διαπιστώνουμε την ελάττωση των ολοκληρωμάτων των ευρέων κορυφών αλλά, κυρίως, την ταυτόχρονη ενίσχυση του σήματος της, σχετικά οξείας, κορυφής στα $\delta = 5.14$ ppm. Πιθανόν, πρόκειται για διάφορες διαμορφωτικές καταστάσεις του DHA οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική θερμική εξάρτηση. Με την αύξηση της θερμοκρασίας ευνοείται η διαμορφωτική κατάσταση που αντιστοιχεί στη δεξιά οξεία κορυφή με $\delta = 5.14$ ppm. Να σημειωθεί ότι η μεταβολή στα εύρη και, κυρίως, ολοκληρώματα των κορυφών βρέθηκε να είναι αντιστρεπτή. Η παρουσία διαφορετικών χημικών μετατοπίσεων των ολεφινικών πρωτονίων, πολύ πιθανόν, υποδηλώνει την παρουσία διαφόρων μορφών μικκυλίων με διακριτά διαμορφωτικά χαρακτηριστικά στην περιοχή των ολεφινικών πρωτονίων των μορίων DHA. Παρότι υπάρχει πληθώρα δημοσιεύσεων στη διεθνή βιβλιογραφία

[Bagheri Novir et al, 2021; Law et al, 2006; Balendiran et al, 2000; Kaneko et al, 1998] σχετικά με προτεινόμενες διαμορφώσεις του DHA στην υγρή κατάσταση, κατάσταση διαλύματος, συστήματα μικκυλίων και μεμβρανών, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη ένδειξη διακριτών διαμορφώσεων του DHA σε διάφορες μικκυλιακές μορφές απουσία πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη του DHA σε υγρή κατάσταση όπου διαπιστώθηκε πληθώρα διαμορφωτικών καταστάσεων χαμηλής ενέργειας, με έμφαση στη δομή έλικας [Venianakis et al, 2021].

Με την προσθήκη της πρωτεΐνης Bcl-2 στο διάλυμα του DHA πραγματοποιήσαμε, επίσης, πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας (Εικόνα 4.50B). Η παρουσία της πρωτεΐνης επιφέρει σημαντική αύξηση του ολοκληρώματος της δεξιάς οξείας κορυφής στα $\delta = 5.14$ ppm με παράλληλη ελαφρά διεύρυνση της κορυφής στους 313 K. Διαδοχική ελάττωση της θερμοκρασίας επιφέρει σημαντική μεταβολή στα ολοκληρώματα και ιδιαίτερα στην οξεία απορρόφηση στα $\delta = 5.14$ ppm. Είναι προφανές ότι η κύρια μορφή του DHA η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη είναι αυτή της κορυφής στα $\delta = 5.14$ ppm, όπως θα δειχτεί παρακάτω με τα φάσματα STD NMR. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 στο σύμπλοκο DHA/Bcl-2 (Εικόνα 4.50C). Στους 313 K παρατηρούμε ότι η οξεία κορυφή στα $\delta = 5.14$ ppm ελαττώνεται και ταυτόχρονα διευρύνεται. Μάλιστα, με τη σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας διαπιστώνουμε ότι η ένταση της κορυφής στα $\delta = 5.14$ ppm μειώνεται με ταυτόχρονη αύξηση της έντασης της κορυφής στα $\delta = 5.2$ ppm. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι αυτή είναι η μικκυλιακή μορφή του λιπαρού οξέος που προσδένεται στην πρωτεΐνη.

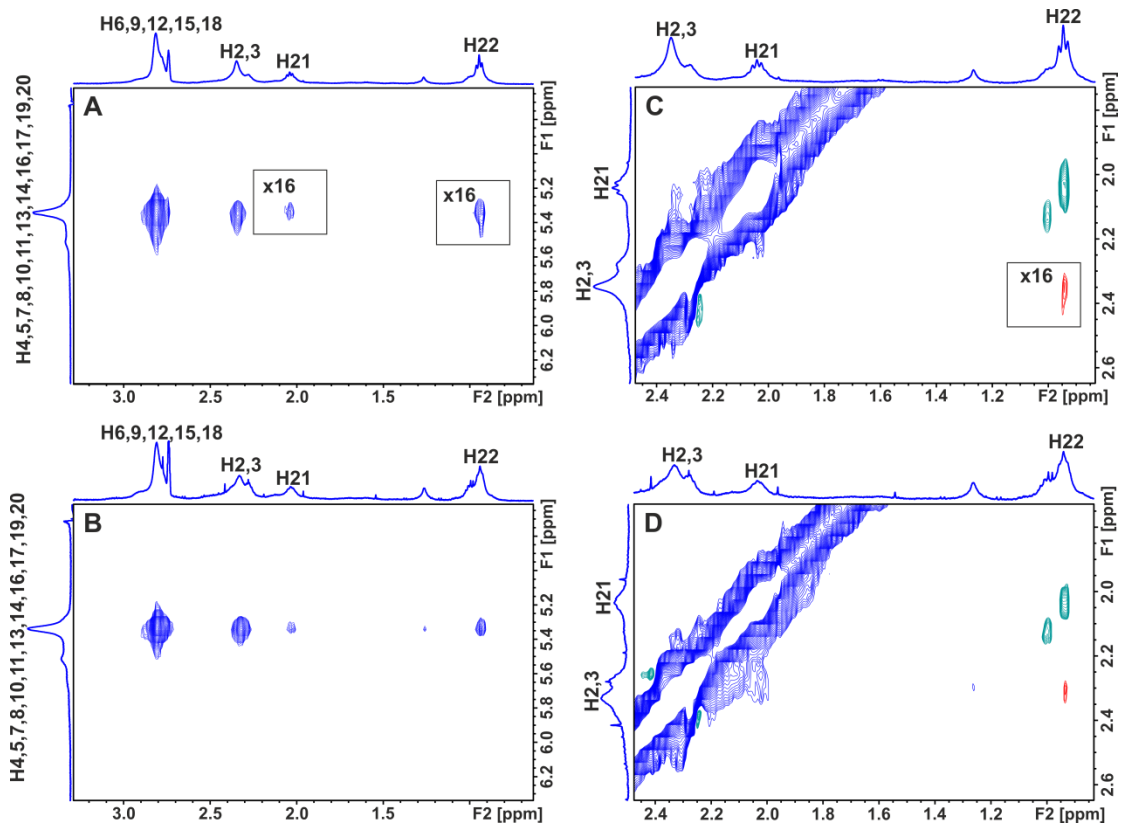
Στην Εικόνα 4.51A παρουσιάζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του DHA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 , στους 310K. Στο φάσμα STD NMR του DHA (Εικόνα 4.51C) παρατηρούμε την παρουσία όλων των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει ότι το DHA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) σε μοριακή αναλογία DHA/ABT-263 = 40/1 οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών NMR ^1H του DHA, που πιθανόν υποδηλώνει συνεργατική δράση μεταξύ λιπαρού οξέος και ABT-263 (Εικόνα 4.51B). Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα STD NMR του DHA μετά την προσθήκη του

αναστολέα (Εικόνα 4.51D), όπου παρατηρούμε αύξηση της έντασης των σημάτων STD NMR του DHA και, ιδιαίτερα, των α - και β -πρωτονίων H2,3.



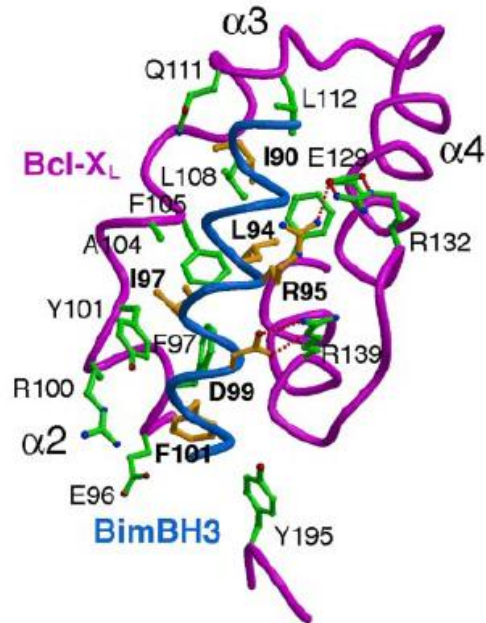
Εικόνα 4.51. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz): (A) του DHA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM). (B) του DHA (2 mM) με τη Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (C) του διαλύματος A. (D) του διαλύματος B. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6), $T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B) και αριθμός σαρώσεων = 264, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 3h 10min για τα (C), (D).

Στην Εικόνα 4.52 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (A&C) του DHA (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) καθώς και (B&D) του DHA (2 mM) με Bcl-2 (50 μM) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM) που λήφθηκαν σε 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μM DTT, 500 μM EDTA με 10% D_2O και 4% DMSO-d_6 στους 310K. Παρατηρούμε την ύπαρξη ενδομοριακού NOE μακράς εμβέλειας μεταξύ των πρωτονίων H2,3 – H22 (κόκκινο χρώμα). Αυτό υποδηλώνει ότι το DHA αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 με αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 παρατηρούμε ότι τα σήματα NOE γίνονται εντονότερα, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει συνεργατικό φαινόμενο μεταξύ του DHA και του αναστολέα.



Εικόνα 4.52. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR: (A, C) DHA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M). (B, D) DHA (2 mM) με Bcl-2 (50 μ M) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 250 μ M DTT, 500 μ M EDTA με 10% D₂O και 4% DMSO-d₆), χρόνος μίξης = 300 ms, T = 310K, αριθμός σαρώσεων = 56, πειραματικός χρόνος = 4h 20min.

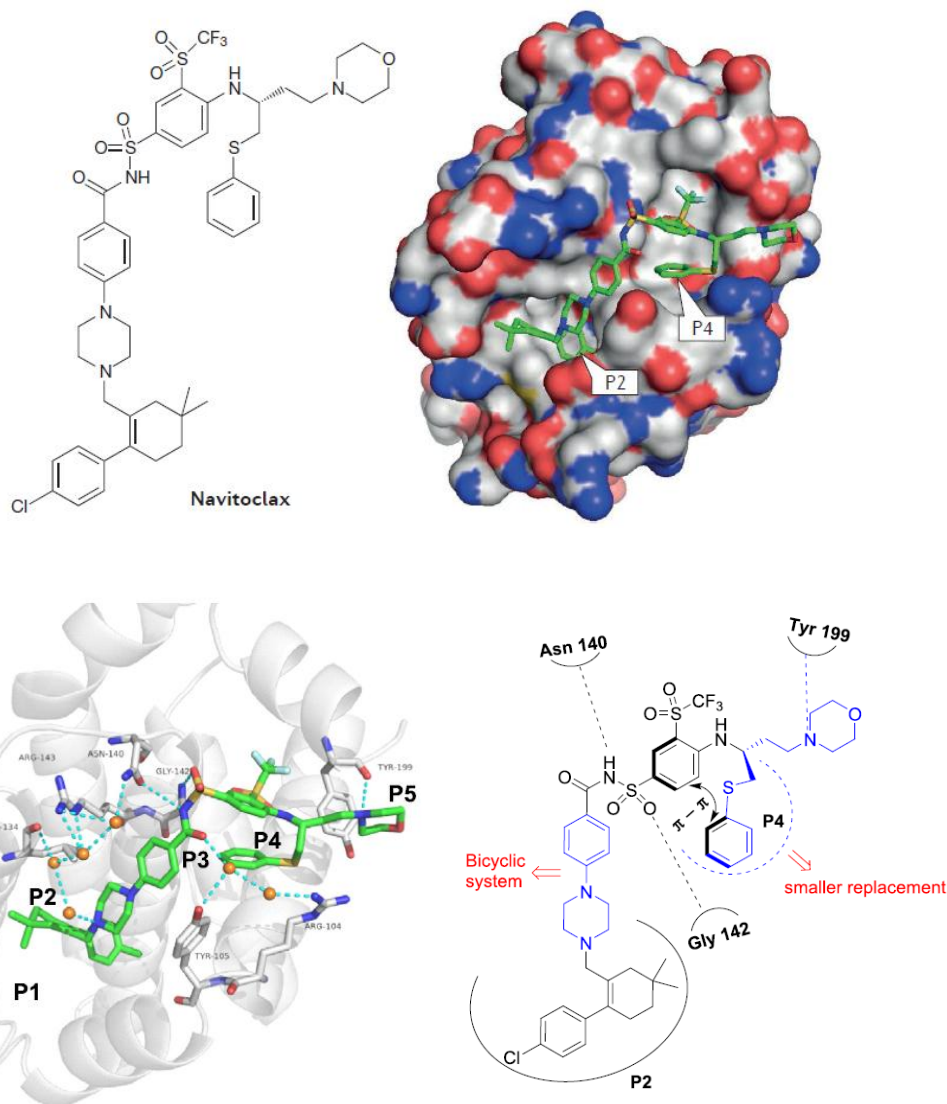
Όπως αναλύθηκε λεπτομερώς στην Ενότητα 1.4, οι τρισδιάστατες δομές των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 χαρακτηρίζονται από ένα κοινό μοτίβο που περιλαμβάνει δύο υδρόφοβες α -έλικες που περιβάλλονται από έξι ή επτά αμφιπαθητικές α -έλικες. Τέσσερις από τις τελευταίες σχηματίζουν μια ευρεία υδρόφοβη αύλακα που αποτελεί τη θέση πρόσδεσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Μεταλλαξιγένεση σάρωσης αλανίνης (alanine scanning mutagenesis) έχει δείξει ότι η υψηλής συγγένειας πρόσδεση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στις Bcl-2 και Bcl-x1 περιλαμβάνει σε μεγάλο βαθμό αλληλεπιδράσεις των δύο υδρόφοβων τμημάτων, P2 και P4, καθώς και ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ ασπαρτικού οξέος και αργινίνης στις προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, αντίστοιχα [Sattler et al, 1997]. Για παράδειγμα στην Εικόνα 4.53 παρατηρούμε στο σύμπλοκο της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-x1 με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BimBH3 την αλληλεπίδραση μεταξύ Arg139 και Asp99 [Oberstein et al, 2007]. Τα



Εικόνα 4.53. Σύμπλοκο της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xl με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BimBH3 [Oberstein et al, 2007].

τιμήματα P2 και P4 περιλαμβάνουν υδρόφοβα αμινοξέα των μοτίβων BH3 των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών [Sattler et al, 1997; Bharatham et al, 2011], τα οποία στις Bcl-2 και Bcl-xl πρωτεΐνες παρέχουν το απαραίτητο δομικό πλαίσιο για τον ορθολογικό σχεδιασμό επιλεκτικών μιμητικών BH3 αναστολέων, όπως το navitoclax (ABT-263) [Ashkenazi et al, 2017].

Στην Εικόνα 4.54 απεικονίζεται η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ABT-263/Bcl-2. Το ακυλοσουλφοναμιδικό τμήμα του ABT-263, παρότι δεν σχηματίζει άμεσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την αργινίνη, προσδένεται στα δύο υδρόφοβα τμήματα P2 και P4 της Bcl-2. Όπως προκύπτει από την κρυσταλλική δομή, το θειοφαινυλο τμήμα του ABT-263 προσδένεται στη θέση P4 της Bcl-2 και εμπλέκεται σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση π-τύπου με το αρυλοσουλφοναμιδικό τμήμα. Η χλωροφαινυλο ομάδα εισχωρεί βαθιά εντός του τμήματος P2 [Souers et al, 2013].



Εικόνα 4.54. Κρυσταλλική δομή ακτίνων-X του συμπλόκου navitoclax με τη Bcl-2. Η φαρμακοφόρος δέσμευση υποδεικνύεται στις θέσεις P2 και P4 [Ashkenazi et al, 2017; Liu et al, 2018].

Από τη μελέτη NMR αλληλεπιδράσεων του καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, α -λινολενικού οξέος, EPA και DHA, με την απομονωμένη αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε διάλυμα, προκύπτει συνεργατική δράση μεταξύ FFA και ABT-263, εκτός από την περίπτωση του EPA που είναι ανταγωνιστική. Όπως προκύπτει από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ABT-263/Bcl-2 (Εικόνα 4.54), η αλληλεπίδραση του αναστολέα με τη Bcl-2 είναι σχεδόν αμιγώς επιφανειακή. Ως εκ τούτου, η μεγάλη υδρόφοβη αύλακα της Bcl-2 επιτρέπει την ταυτόχρονη δέσμευση ABT-263 και FFA συνεργατικού χαρακτήρα, με μόνη εξαίρεση την περίπτωση του EPA. Η δομική αυτή πολυμορφία είναι σε αντίθεση με τις δομικές μελέτες αλληλεπίδρασης λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη BSA/HSA όπου διαπιστώθηκε

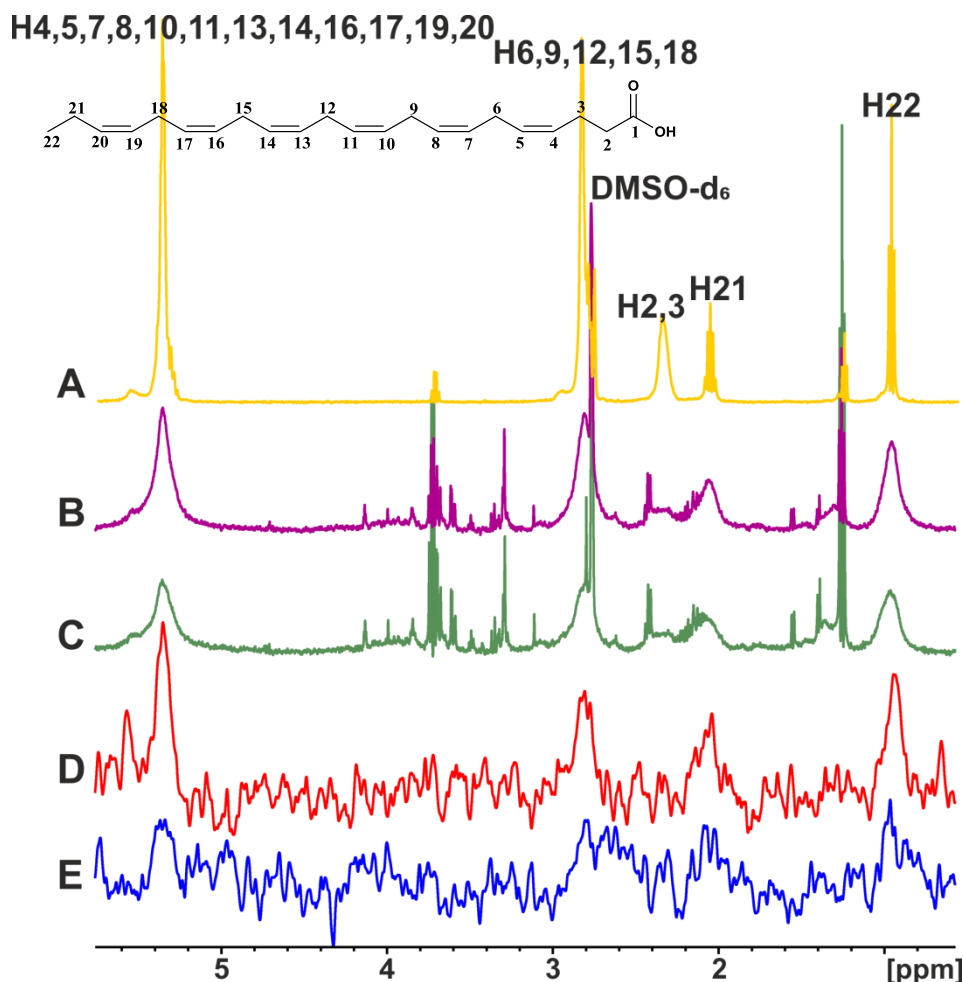
ανταγωνιστική δράση σε όλες τις περιπτώσεις με τη βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη, ως προς τις θέσεις πρόσδεσης FA7 και FA4,3, αντίστοιχα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη δομική στενότητα των θέσεων FA7 και FA4,3 της HSA, σε αντίθεση με την ευρεία και υδρόφοβη αύλακα στη Bcl-2. Περαιτέρω μελέτες docking των συμπλόκων FFA και Bcl-2 παρουσία του αναστολέα ABT-263 είναι σε εξέλιξη σε συνεργασία με τον Δρ. Παπαμώκο Γεώργιο.

4.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος DHA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο (in-cell NMR)

Στην ενότητα 4.6 μελετήσαμε λεπτομερώς τον επίτοπο πρόσδεσης καθώς και τις διαμορφωτικές αλλαγές του καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, α-λινολενικού οξέος, EPA και DHA κατά την αλληλεπίδραση με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε διάλυμα buffer. Κατά την πραγματοποίηση των ανταγωνιστικών πειραμάτων με τον αναστολέα ABT-263 προέκυψε ότι υπάρχει συνεργατική δράση μεταξύ λιπαρών οξέων και αναστολέα, με εξαίρεση το EPA που έδειξε ανταγωνιστική δράση. Το θεμελιώδες ερώτημα που εγείρεται είναι κατά πόσον οι ίδιες δομικές και διαμορφωτικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα και σε κυτταρικό επίπεδο. Μελετήσαμε, συνεπώς, τον επίτοπο πρόσδεσης καθώς και τις διαμορφωτικές ιδιότητες του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος DHA στην πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά κύτταρα. Η επιλογή του DHA έγινε με βάση δύο κριτήρια, τη σημαντική του επίδραση στην αλλαγή της σύνθεσης των μεμβρανών [Burns et al, 1979] και την ιδιότητά του ως το κύριο ω-3 λιπαρό οξύ με αντικαρκινική δράση που εμπλέκεται στην απόπτωση των κυττάρων [D'Eliseo et al, 2016].

Η μελέτη αυτή επιτεύχθηκε με τη χρήση ζωντανών καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2) που υπερεκφράζουν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη-στόχο με τη χρήση της φασματοσκοπίας in-cell NMR. Ειδικότερα, έγινε χρήση συνδυασμού των τεχνικών STD και tr-NOESY NMR. Είναι προφανές, όμως, ότι σε ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα, όπως το κυτταρικό, βιοδραστικά μόρια αλληλεπιδρούν με ποικιλία διαφορετικών υποδοχέων. Συνεπώς, θα πρέπει να απαντηθεί το βασικό ερευνητικό ερώτημα, πώς είναι δυνατόν σε ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα να μελετηθεί η επιλεκτική αλληλεπίδραση λιπαρών οξέων με τον υποδοχέα-στόχο Bcl-2. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε μία μεθοδολογία, η οποία έχει αναπτυχθεί με επιτυχία στο εργαστήριό μας [PrimiKyri et al, 2018], και η οποία περιλαμβάνει τη χρήση επιλεκτικών αναστολέων της πρωτεΐνης-στόχου (π.χ. HA14-1) και τη μελέτη μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού. Εάν η περιοχή πρόσδεσης του επιλεκτικού αναστολέα συμπίπτει με την περιοχή πρόσδεσης του βιοδραστικού μορίου, ο επιλεκτικός αναστολέας θα υποκαταστήσει το μόριο αυτό λόγω μεγαλύτερης συγγένειας πρόσδεσης. Συνεπώς, τα σήματα του επιτόπου πρόσδεσης του μορίου θα ελαττωθούν κατά την προσθήκη του επιλεκτικού αναστολέα. Περαιτέρω πειράματα in-

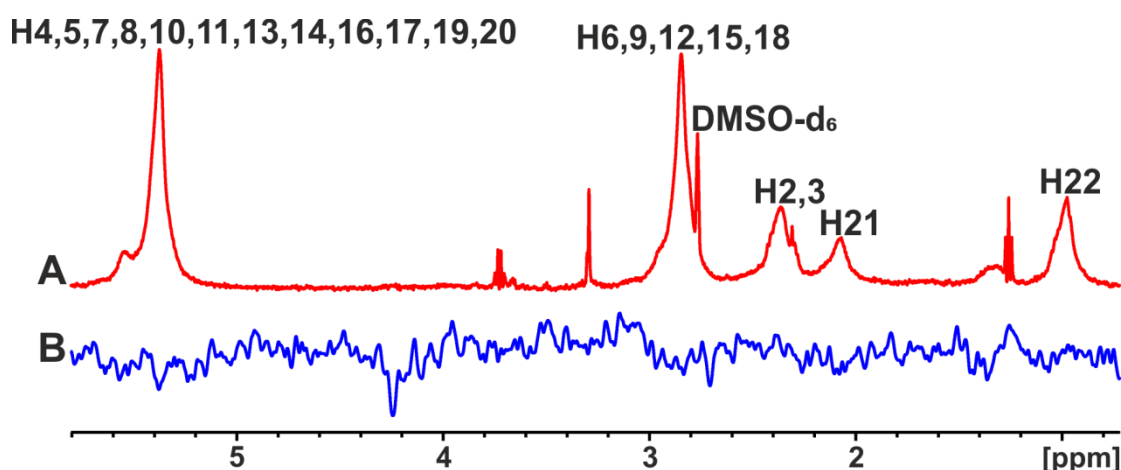
cell *tr*-NOESY NMR υπέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με την Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα επιφέρει αλλαγή στη φάση των κορυφών NOE και, ως εκ τούτου, στη διαμόρφωση του φλαβονοειδούς που μελετήθηκε [Primikyri et al, 2018].



Εικόνα 4.55. Φάσματα NMR ^1H (500 MHz) του DHA (2 mM): (A) χωρίς κυτταρική σειρά, (B) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 (5×10^6 κύτταρα) και (C) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 (5×10^6 κύτταρα) μετά την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μM). Φάσματα STD NMR: (D) του διαλύματος (B), (E) του διαλύματος C. Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 4% $\text{DMSO-}d_6$. ($T = 310\text{ K}$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 4min 11sec για τα (A), (B), (C) και αριθμός σαρώσεων = 176, χρόνος κορεσμού = 2sec, πειραματικός χρόνος = 1h 50min για τα (D), (E)).

Στην Εικόνα 4.55A απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του DHA (2 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 4% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Το 4.55B αντιπροσωπεύει το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2, όπου παρατηρούμε σημαντική διεύρυνση των κορυφών NMR ^1H του DHA που πιθανόν οφείλεται στο ότι το DHA εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από

το φάσμα STD NMR του DHA (Εικόνα 4.55D), όπου διαπιστώνουμε την παρουσία όλων των σημάτων του, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική αλληλεπίδραση όλων των χαρακτηριστικών ομάδων του DHA με πρωτεΐνες σε κυτταρικό επίπεδο. Η προσθήκη του αναστολέα ABT-263 (50 μ M) σε μοριακή αναλογία DHA/ABT-263 = 40/1 οδηγεί σε σημαντική μείωση των ευρών των κορυφών NMR ^1H του DHA, που υποδηλώνει ανταγωνιστική δράση μεταξύ του λιπαρού οξέος και του ABT-263 (Εικόνα 4.55C). Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από το φάσμα STD NMR (Εικόνα 4.55E), όπου παρατηρείται σημαντική μείωση των σημάτων STD του DHA, που σημαίνει ότι ο επιλεκτικός αναστολέας υποκαθιστά το λιπαρό οξύ από τη θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη Bcl-2. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι το αποτέλεσμα αυτό είναι σε αντίθεση με τη μελέτη αλληλεπίδρασης του DHA με την απομονωμένη πρωτεΐνη Bcl-2 σε διάλυμα buffer, όπου διαπιστώθηκε συνεργατική δράση (βλέπετε Ενότητα 4.6). Γίνεται, επομένως, σαφές, η μεγάλη σημασία χρήσης της φασματοσκοπίας NMR σε κυτταρικό επίπεδο.

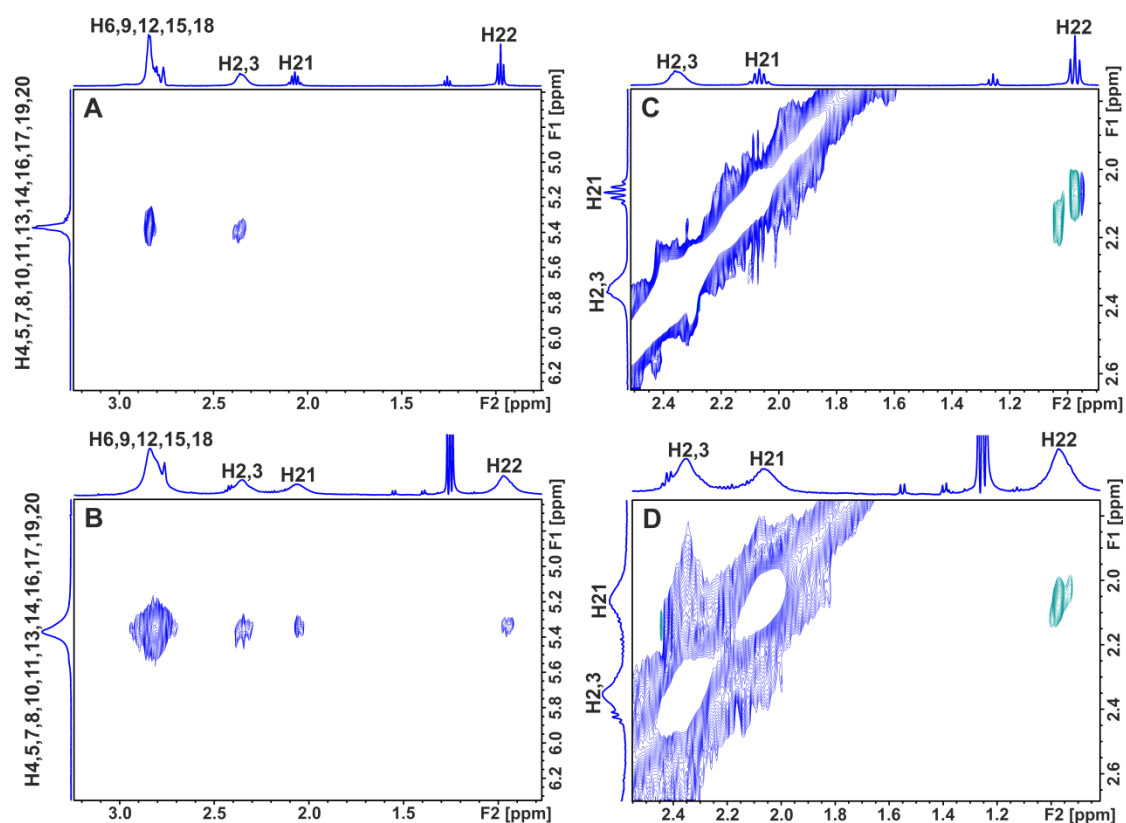


Εικόνα 4.56. (A) Φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του DHA (2 mM) με την κυτταρική σειρά Jurkat Puro (5×10^6 κύτταρα) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 4% $\text{DMSO-}d_6$ ($T=310$ K, αριθμός σαρώσεων =32, πειραματικός χρόνος =4min 11sec). (B) Φάσμα STD-NMR του διαλύματος (A) ($T=310$ K, αριθμός σαρώσεων =176, χρόνος κορεσμού= 2sec, πειραματικός χρόνος = 1h 50min).

Για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του DHA με τη Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του λιπαρού οξέος με την κυτταρική σειρά Jurkat Puro, η οποία δεν φέρει ανθρώπινο Bcl-2 cDNA. Στην Εικόνα 4.56A απεικονίζεται το φάσμα NMR ^1H (500 MHz) του DHA (2 mM) με την κυτταρική σειρά Jurkat Puro σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 4% $\text{DMSO-}d_6$ στους 310K. Το 4.56B είναι το φάσμα STD-NMR του λιπαρού οξέος με τα κύτταρα Jurkat Puro. Η

συγκέντρωση της Bcl-2 στα κύτταρα Jurkat Puro είναι τόσο χαμηλή που οδηγεί σε μη ανιχνεύσιμο σήμα STD του DHA. Από τη σύγκριση των φασμάτων STD-NMR του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Puro (Εικόνα 4.56B) και του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 (Εικόνα 4.55C) συμπεραίνουμε ότι η κύρια πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης του DHA είναι η Bcl-2 παρά την παρουσία πληθώρας πρωτεϊνών σε κυτταρικό επίπεδο. Το συμπέρασμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό αναφορικά με τη χρήση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ή συνθετικών αναλόγων τους ως αναστολέων της Bcl-2.

Εφόσον υπάρχει αλληλεπίδραση του DHA με τη Bcl-2 στα ζωντανά καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήσαμε περαιτέρω πειράματα in-cell tr-NOESY NMR ώστε να μελετήσουμε τη διαμόρφωση του λιπαρού οξέος στην προσδεσμένη κατάσταση. Στην Εικόνα 4.57 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR (A&C) του DHA (2 mM) καθώς και οι αντίστοιχες περιοχές των φασμάτων 2D tr-NOESY NMR (B&D) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D₂O με 4% DMSO-*d*₆ στους 310K. Το ελεύθερο DHA (A&C) έδειξε την παρουσία αρνητικών σημάτων NOE στο υδατικό διάλυμα (ίδια φάση με τη διαγώνιο), που αποδίδεται στην ύπαρξη μικκυλίων. Στα φάσματα 2D tr-NOESY NMR (B&D) του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 παρατηρούμε τα σήματα NOE να γίνονται εντονότερα και ταυτόχρονα να εμφανίζονται και καινούρια σήματα μεταξύ των ολεφινικών πρωτονίων με τα πρωτόνια H21 και H22. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το DHA αλληλεπιδρά με τη Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο και μάλιστα χωρίς να λαμβάνει κάποια αναδιπλούμενη διαμόρφωση, αφού δεν παρατηρείται σήμα NOE μεταξύ των πρωτονίων H2,3 – H22. Με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263, οι κορυφές του DHA στο φάσμα NMR ¹H εμφανίζονται εξαιρετικά διευρυμένες, λόγω υποκατάστασης της Bcl-2 από τον αναστολέα και της συνεπακόλουθης διάχυσης του DHA στο μεμβρανικό σύστημα. Αυτή η εκτεταμένη διεύρυνση των κορυφών οδήγησε στη μη επιτυχή λήψη του φάσματος 2D tr-NOESY NMR. Πρέπει να τονιστεί η ύπαρξη αναδιπλούμενης διαμόρφωσης του DHA κατά την αλληλεπίδραση με την Bcl-2 σε κατάσταση διαλύματος (βλέπετε Ενότητα 4.6). Μάλιστα, με την προσθήκη του αναστολέα, τα σήματα NOE του DHA έγιναν εντονότερα λόγω της ύπαρξης συνεργατικού φαινομένου.



Εικόνα 4.57. Επιλεγμένες περιοχές των φασμάτων 2D NOESY NMR του DHA (2 mM): (A, C) σε ρυθμιστικό διάλυμα, (B, D) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 (5×10^6 κύτταρα). Τα φάσματα καταγράφηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM σε D_2O με 4% $DMSO-d_6$. (χρόνος μίξης = 100 ms, $T = 310K$, αριθμός σαρώσεων = 32, πειραματικός χρόνος = 2h 17min).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μεθοδολογία in-cell NMR είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τον έλεγχο, σε πραγματικό χρόνο, του προφίλ αλληλεπίδρασης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με τους θεραπευτικούς στόχους στο φυσικό τους κυτταρικό περιβάλλον σε ζωντανά ευκαρυωτικά κύτταρα, ανοίγοντας το δρόμο προς το νέο πεδίο του ενδοκυτταρικού ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων. Περαιτέρω μελέτες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε κυτταρικό επίπεδο είναι σε εξέλιξη στο Εργαστήριό μας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση του συνόλου των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Με τη συνδυαστική χρήση της τεχνικής STD NMR και ανταγωνιστικών πειραμάτων με φάρμακα γνωστής θέσης πρόσδεσης, όπως η βαρφαρίνη (FA7) και η ιβουπροφαίνη (FA3, FA6), στην αλβουμίνη (HSA/BSA), μπορεί να διερευνηθεί αν ένα λιπαρό οξύ συνδέεται στις προαναφερθείσες θέσεις πρόσδεσης της BSA. Ειδικότερα, από τα πειράματα μελέτης αλληλεπιδράσεων λιπαρών οξέων με την πρωτεΐνη HSA/BSA προκύπτουν τα εξής: Το καπρολεϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ, α-λινολενικό οξύ, EPA και DHA αλληλεπιδρούν με την αλβουμίνη και προσδένονται ανταγωνιστικά με τα φάρμακα στις θέσεις 7, 3 και 4. Μάλιστα, το α-λινολενικό οξύ και το DHA έχουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στη FA7 σε σχέση με εκείνη της βαρφαρίνης, ενώ το EPA παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης με τη βαρφαρίνη. Αντίθετα, ο μεθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος δεν αλληλεπιδρά με τη BSA.

2. Με τη συμπληρωματική τεχνική tr-NOESY NMR μπορεί να μελετηθεί η αλλαγή της διαμόρφωσης των λιπαρών οξέων κατά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη HSA/BSA. Από τα πειράματα αυτά συμπεραίνεται ότι η εκτεταμένη διαμόρφωση του καπρολεϊκού οξέος σε μικκυλιακή κατάσταση αλλάζει όταν προσδένεται στη HSA/BSA με αποτέλεσμα να λαμβάνει αναδιπλούμενες διαμορφώσεις. Απεναντίας, στην περίπτωση των ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, α-λινολενικού οξέος, EPA και DHA αποδεικνύεται η παρουσία αναδιπλούμενων διαμορφώσεων των λιπαρών οξέων τόσο στη μικκυλιακή όσο και στη δεσμευμένη κατάσταση.

3. Με τη συνδυαστική χρήση της τεχνικής INPHARMA NMR και των υπολογισμών docking λαμβάνουμε πληροφορίες σε ατομικό επίπεδο για τις θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων σε σχέση με τα φάρμακα βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ιβουπροφαίνης προκύπτει ότι όλα τα λιπαρά οξέα εμφανίζουν μια δευτέρα ανεστραμμένη διαμόρφωση στη θέση FA4. Στη θέση της βαρφαρίνης, FA7, προκύπτει ότι υπάρχουν δύο θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων και επομένως δύο διαμορφωτικές καταστάσεις, ερμηνεύοντας γιατί οι διαμορφωτικές καταστάσεις των FFA στη θέση πρόσδεσης FA7 δεν προσδιορίστηκαν με ακρίβεια, παρά τις πολυάριθμες δομικές μελέτες με ακτίνες-X.

4. Από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του 9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος (9/10-NO₂-OA) με την αλβουμίνη (HSA) με τη χρήση τεχνικών NMR (¹H NMR, STD-NMR, tr-NOESY NMR, INPHARMA NMR) αποδείχτηκε η μη ομοιοπολική πρόσδεση του 9/10-NO₂-OA στην HSA, όπως συμβαίνει και με τα μη νιτρωμένα λιπαρά οξέα. Από μελέτες ¹H NMR και ανταγωνιστικά πειράματα με το ελαϊκό οξύ (OA) και τα φάρμακα ιβουπροφαίνη και βαρφαρίνη διαπιστώθηκε ότι το 9/10-NO₂-OA έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης για την HSA. Ακόμα, επιβεβαιώθηκε ότι ανταγωνίζεται τη βαρφαρίνη για τη θέση FA7 με σημαντικά υψηλότερη συγγένεια, ενώ την ιβουπροφαίνη για τις θέσεις FA3 και FA4 με παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης. Τέλος, αποδείχτηκε ότι το 9/10-NO₂-OA έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης για την HSA από εκείνη του OA.

5. Με τη συνδυαστική χρήση των τεχνικών STD και tr-NOESY NMR μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των λιπαρών οξέων με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε διάλυμα buffer. Προέκυψε πως όλα τα λιπαρά οξέα, καπρολεϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ, α-λινολενικό οξύ, EPA και DHA, αλληλεπιδρούν με τη Bcl-2. Κατά την πραγματοποίηση των ανταγωνιστικών πειραμάτων με τον αναστολέα ABT-263 διαπιστώθηκε συνεργατική δράση μεταξύ λιπαρού οξέος και αναστολέα, με τον αναστολέα να ενισχύει την αναδιπλούμενη διαμόρφωση των λιπαρών οξέων. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση του EPA όπου παρατηρήθηκε ανταγωνιστική δράση με τον αναστολέα, με το λιπαρό οξύ να λαμβάνει μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση παρουσία αναστολέα.

6. Με τη χρήση της μεθοδολογίας in-cell NMR μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του DHA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα Jurkat Bcl-2 που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη. Από τα πειράματα STD-NMR και tr-NOesy NMR του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 προέκυψε ότι το DHA εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και αλληλεπιδρά με τη Bcl-2, χωρίς να λαμβάνει κάποια αναδιπλούμενη διαμόρφωση. Μάλιστα, με την προσθήκη του αναστολέα ABT-263 διαπιστώθηκε ανταγωνιστική δράση μεταξύ λιπαρού οξέος και αναστολέα. Επιπλέον, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του DHA με την κυτταρική σειρά Jurkat Puro, κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα Bcl-2, με την τεχνική STD-NMR. Επειδή η συγκέντρωση της Bcl-2 στα κύτταρα αυτά είναι πάρα πολύ χαμηλή, οδήγησε σε μη ανιχνεύσιμο σήμα STD του DHA. Συνεπώς, το DHA εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και αλληλεπιδρά αποκλειστικά και μόνο με τη Bcl-2 και όχι με άλλους πρωτεϊνικούς υποδοχείς.

7. Η μεθοδολογία in-cell NMR μπορεί να συμβάλει στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων λιπιδικής φύσεως μέσω μελέτης αλληλεπιδράσεων με ενδοκυτταρικούς στόχους σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

8. Το σημαντικό πλεονέκτημα όλων των παραπάνω τεχνικών NMR είναι ότι πραγματοποιούνται χωρίς την αναγκαιότητα χρήσης εμπλουτισμένων λιπαρών οξέων ή πρωτεϊνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λιπαρά οξέα (FFA) αποτελούν τις κύριες δομικές μονάδες των σύνθετων λιπιδίων. Η μεταφορά τους στη συστηματική λειτουργία και η κατανομή τους στους ιστούς επιτυγχάνεται με τη μεταφέρουσα πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA/HSA). Με τη χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και φασματοσκοπίας NMR έχει βρεθεί ότι υπάρχουν επτά θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην αλβουμίνη. Η θέση πρόσδεσης 7 (FA7) συμπίπτει με τη θέση I των φαρμάκων (βαρφαρίνη), ενώ η θέση πρόσδεσης 3 (FA3) με τη θέση II των φαρμάκων (ιβουπροφαίνη).

Πρόσφατες μελέτες αντικαρκινικής δράσης των απαραίτητων ω -3 και ω -6 FFA, απέδειξαν τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με τη δομική ομοιότητα των ακόρεστων FFA με αναστολείς της Bcl-2 υποδεικνύει την προ-αποπτωτική δράση των FFA ως πιθανό μηχανισμό. Όμως, τα δομικά χαρακτηριστικά αλληλεπίδρασης των FFA με την Bcl-2 καθώς και ο μηχανισμός της αντικαρκινικής τους δράσης παραμένει άγνωστος.

Βασικοί στόχοι της διδακτορικής διατριβής, με τη χρήση σύγχρονων μεθοδολογιών NMR, είναι η διερεύνηση:

- (α) της μοριακής βάσης αλληλεπίδρασης ακόρεστων FFA με μη επισημασμένη αλβουμίνη ορού,
- (β) της μη ομοιοπολικής έναντι της ομοιοπολικής πρόσδεσης νιτρο-παραγώγων του ελαϊκού οξέος με HSA,
- (γ) της μοριακής βάσης αλληλεπίδρασης πολυακόρεστων FFA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και
- (δ) δομικών και διαμορφωτικών χαρακτηριστικών αλληλεπιδράσεων πολυακόρεστου λιπαρού οξέος DHA με τη Bcl-2, σε κυτταρικό επίπεδο σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα.

Εφαρμόστηκε, για πρώτη φορά, η συνδυαστική χρήση τεχνικών NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (STD), μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (Tr-NOESY), διαμοριακών σημάτων NOE για φαρμακοφόρο χαρτογράφηση (INPHARMA) και υπολογισμών docking με στόχο τη μελέτη αλληλεπιδράσεων των λιπαρών οξέων καπρολεϊκού οξέος, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, α -λινολενικού οξέος, EPA και DHA με μη επισημασμένη αλβουμίνη ορού. Με τη χρήση ανταγωνιστικών πειραμάτων

με τα φάρμακα βαρφαρίνη και ιβουπροφαίνη παρατηρήθηκαν σημαντικά διαμοριακά NOE μεταξύ των FFA και των φαρμάκων, που αντανάκλουν τις διαμορφωτικές καταστάσεις των λιπαρών οξέων στις θέσεις πρόσδεσης των φαρμάκων HSA. Τα διαμοριακά σήματα NOE και οι υπολογισμοί docking ερμηνεύτηκαν σε όρους σημαντικής αναδίπλωσης της δις-αλλυλικής περιοχής και παρουσίας δύο προσανατολισμών των FFA στη θέση πρόσδεσης της βαρφαρίνης, λόγω ύπαρξης δύο ομάδων πολικών αμινοξέων που έχουν το ρόλο μοριακής άγκυρας. Αυτή η διαμορφωτική ευελιξία των FFA στη θέση πρόσδεσης της βαρφαρίνης είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο δεν κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός με ακτίνες-X, παρά τις πολυάριθμες βιβλιογραφικές δομικές μελέτες.

NMR μελέτες της αλληλεπίδρασης του 9/10-νιτρο-ελαϊκού οξέος (9/10-NO₂-OA) με την αλβουμίνη ερμηνεύτηκαν σε όρους μη ομοιοπολικής πρόσδεσης του 9/10-NO₂-OA στην HSA. Με τη χρήση ανταγωνιστικών πειραμάτων του ελαϊκού οξέος και των φαρμάκων ιβουπροφαίνης και βαρφαρίνης διαπιστώθηκε ότι το 9/10-NO₂-OA έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στην HSA σε σχέση με το ελαϊκό οξύ και τη βαρφαρίνη, ενώ με την ιβουπροφαίνη έχει παρόμοια συγγένεια πρόσδεσης.

Με τη συνδυαστική χρήση των τεχνικών STD και tr-NOESY NMR διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των FFA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε διάλυμα buffer. Ανταγωνιστικά πειράματα των FFA με τον αναστολέα ABT-263 (<nM) ερμηνεύτηκαν σε όρους συνεργατικής αλληλεπίδρασης, με εξαίρεση το EPA που έδειξε ανταγωνιστική δράση.

Η μεθοδολογία in-cell NMR χρησιμοποιήθηκε, για πρώτη φορά, στη μελέτη αλληλεπίδρασης του DHA με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα Jurkat Bcl-2 που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Αποδείχθηκε ότι το DHA εισέρχεται στα κύτταρα και αλληλεπιδρά σχεδόν αποκλειστικά με τη Bcl-2 και όχι με άλλους πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Ανταγωνιστικό πείραμα του DHA με τον αναστολέα ABT-263 έδειξε ανταγωνιστική αλληλεπίδραση, σε αντίθεση με τη συνεργατική αλληλεπίδραση με Bcl-2 σε διάλυμα buffer.

SUMMARY

Fatty acids (FAs) are the main building blocks of complex lipids. Their transport into the systemic circulation and their distribution to tissues is achieved with the carrier protein serum albumin (BSA/HSA). X-ray crystallography and NMR studies with human serum albumin suggested the presence of seven fatty acid binding sites. Binding site 7 (FA7) coincides with site I of drugs (warfarin), while binding site 3 (FA3) with site II of drugs (ibuprofen).

Recent studies of antitumor activity of the essential ω -3 and ω -6 FFAs demonstrated the reduction of expression levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2. This result combined with the structural similarity of unsaturated FFAs to Bcl-2 inhibitors indicates the pro-apoptotic action of FFAs as a possible mechanism. However, the structural features of the interaction of FFAs with Bcl-2 as well as the mechanism of their antitumor activity remain unknown.

The objectives of the PhD thesis were to investigate using modern NMR methodologies:

- (a) the molecular basis of the interaction of unsaturated FFAs with non-labelled serum albumin,
- (b) the non-covalent vs. covalent binding of nitro-derivatives of oleic acid with HSA,
- (c) the molecular basis of the interaction of polyunsaturated fatty acids with Bcl-2 and
- (d) the structural and conformational features of the interactions of the polyunsaturated fatty acid DHA with Bcl-2, at the cellular level in living cancer cells overexpressing the receptor.

Saturation transfer difference (STD), transferred nuclear Overhauser effect (Tr-NOESY) and Interligand NOEs for PHarmacophore Mapping (INPHARMA) NMR techniques and docking calculations were applied, for the first time, for mapping interactions and specific binding sites of caproleic acid, oleic acid, linoleic acid, α -linolenic acid, EPA and DHA with non-labelled serum albumin. Competition experiments with the drugs warfarin and ibuprofen showed significant inter-ligand NOEs between the FFAs and the drugs, reflecting the conformational states of the fatty acids in the drug binding sites on HSA, regardless of the carbon chain length and the number of the cis double bonds of FFAs. The inter-ligand NOEs and docking

calculations were interpreted in terms of significant folding of the bis-allylic region and the presence of two orientations of the FFAs in the warfarin binding site, due to two anchoring groups of polar amino acids. This motional flexibility is the reason that the conformational states of the FFAs in the binding site of warfarin could not be determined precisely, despite numerous literature X-ray structural studies.

The NMR study of the interaction of 9/10-nitro-oleic acid (9/10-NO₂-OA) with serum albumin demonstrated the non-covalent binding of 9/10-NO₂-OA to HSA. Competition experiments with oleic acid and the drugs ibuprofen and warfarin revealed that 9/10-NO₂-OA has higher binding affinity for HSA than oleic acid and warfarin, while with ibuprofen it has a similar binding affinity.

The combination of STD and tr-NOESY NMR techniques was used to investigate the interaction of FFAs with the anti-apoptotic protein Bcl-2 in buffer solution. Competition experiments of FFAs with the sub-nanomolar inhibitor ABT-263 showed a cooperative interaction, with the exception of EPA which showed antagonistic interaction.

In-cell NMR methodology was used, for the first time, to investigate the interaction of DHA with the anti-apoptotic protein Bcl-2 in living Jurkat Bcl-2 tumor cells overexpressing the receptor. It turned out that DHA enters the cells and interacts nearly exclusively with Bcl-2 and not with other protein receptors. Competition experiment of DHA with the inhibitor ABT-263 showed an antagonistic interaction, contrary to the cooperative interaction with Bcl-2 in buffer solution.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham J Domínguez-Avila & Gustavo A González-Aguilar. Brief description of lipid classification and metabolism. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, **2019**, 13, 273-292.

Adams CM, Clark-Garvey S, Porcu P & Eischen CM. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Front Oncol.* **2019**, 8, 636.

Adams JM & Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **2007**, 26, 1324-1337.

Akram Z, Allenki A, Kishore S, Ogwu D, Adefalu OT, Valle Villatoro AL, Omole JA, Uddin G, Gopal S, Khan AM, Lodi MN, Shahbaz T, Huda Nabeel N, Vega L, Tariq U & Nkongho MB. Role of omega-3 fatty acid supplementation in COVID-19 patients: a narrative review. *Arch Intern Med Res.* **2021**, 4, 177-183.

Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN & Manson JE. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, **1998**, 279, 23-8.

Albrand JP, Birdsall B, Feeney J, Roberts GCK & Burgen ASV. The use of transferred nuclear Overhauser effects in the study of the conformations of small molecules bound to proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1979**, 1, 37-41.

Alexandri E, Ahmed R, Siddiqui H, Choudhary MI, Tsiafoulis CG & Gerothanassis IP. 2017. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*, **2017**, 22, 1663.

Alexandri E, Primikyri A, Papamokos G, Venianakis T, Gkalpinos V, Tzakos A, Karydis-Messinis A, Moschovas D, Avgeropoulos A & Gerothanassis I. NMR and computational studies reveal novel aspects in molecular recognition of unsaturated fatty acids with non-labeled serum albumin. *The FEBS Journal*, **2022**, 1-20.

Alfred T. Fats and Fatty Oils. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. **2000**, doi:10.1002/14356007.a10_173.

Alparslan A, Skoko JJ, Woodcock C-SC, Wingert BM, Woodcock SR, Normolle D.; Huang, Y, Stark JM, Camacho CJ, Freeman BA et al. Electrophilic fatty acids impair RAD51 function and potentiate the effects of DNA-damaging agents on growth of triple-negative breast cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, 294, 397-404.

Ambrozova G, Martiskova H, Koudelka A, Ravekes T, Rudolph TK, Klinke A, Rudolph V, Freeman BA, Woodcock SR, Kubala L et al. Nitro-oleic acid modulates classical and regulatory activation of macrophages and their involvement in profibrotic responses. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, 90, 252-260.

Arepalli SR, Glaudemans CPJ, Daves GD, Kovac P, and Bax, A. Identification of protein-mediated indirect Noe effects in a disaccharide-Fab? Complex by transferred ROESY. *J. Magn. Reson. Ser. B.*, **1995**, 106, 195–198.

Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD & Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, 16, 273-284.

Asif M. Chemical characteristics and nutritional potentials of unsaturated fatty acids. *Chemistry International.*, **2015**, 1, 118-133.

Ayerza R. Oil Content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, 72, 1079-1081.

Azarkh M, Singh V, Okle O, Seemann IT, Dietrich DR, Hartig JS & Drescher M. Site-directed spin-labeling of nucleotides and the use of in-cell EPR to determine long-range distances in a biologically relevant environment. *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 131-147.

Bagheri Novir S, Tirandaz A & Lotfipour H. Quantum study of DHA, DPA and EPA anticancer fatty acids for microscopic explanation of their biological functions. *J. Mol. Liq.*, **2021**, 325, 114646.

Baker LMS, Baker PRS, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R & Freeman BA. Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 31085–31093.

Baker PR, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LMS et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 42464–42475.

Balendiran G.K, Schnütgen F, Scapin G, Borchers T, Xhong N, Lim K, Godbout R, Spener F & Sacchettini J.C. Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 27045–27054.

Banci L, Barbieri I, Bertini, Luchinat E, Secci E, Zhao & Aricescu AR. Atomic-resolution monitoring of protein maturation in live human cells by NMR. *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, 9, 297-299.

Basile KJ & Aplin AE. Resistance to chemotherapy: Short-term drug tolerance and stem cell-like subpopulations. *Adv. Pharmacol.* **2012**, 65, 315–334.

Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PR, Duran R, Baker LM, Huang Y, Cervenansky, C, Branchaud BP & Freeman BA. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 20450–20463.

Beck M & Baumeister W. Cryo-Electron Tomography: Can it Reveal the Molecular Sociology of Cells in Atomic Detail? *Trends Cell Biol.*, **2016**, 26, 825–837.

Berger ME, Smesny S, Kim SW, Davey CG, Rice S, Sarnyai Z, Schlögelhofer M, Schäfer MR, Berk M, McGorry PD & Amminger GP. Omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and subsequent mood disorders in young people with at-risk mental states: a 7-year longitudinal study. *Translational Psychiatry*, **2017**, 7, 1220.

Bertrand K, Reverdatto S, Burz DS, Zitomer R & Shekhtman A. Structure of Proteins in Eukaryotic Compartments. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 12798 -12806.

Bhagat U & Das UN. Potential role of dietary lipids in the prophylaxis of some clinical conditions. *Arch. Med. Sci.* **2015**, 11, 807–818.

Bharatham, N, Chi SW & Yoon HS. Molecular basis of Bcl-XL–p53 interaction: insights from molecular dynamics simulations. *PLoS ONE* 6, **2011**, 26014.

Bhattacharya AA, Grüne T & Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol*, **2000**, 303, 721–732.

Bhunia A, Bhattacharjya S, Chatterjee S. Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems. *Drug Discov. Today*, **2012**, 17, 505-513.

Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF & Rawlings RR. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, 93, 950-962.

Bleicher K, Lin M, Shapiro MJ, Wareing JR. Diffusion Edited NMR: screening compound mixtures by affinity nmr to detect binding ligands to vancomycin. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8486-8490.

Bothnerby AA & Noggle JH. Time development of nuclear Overhauser effects in multispin systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 5152–5155.

Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A & Adams JM. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell*, **2001**, 1, 645-653.

Brink T & Exner TE. Influence of protonation, tautomeric, and stereoisomeric states on protein ligand docking results. *J Chem Inf Model.*, **2009**, 49, 1535–1546.

Brown JR, Tesar B, Yu L, Werner L, Takebe N, Mikler E, Reynolds HM, Thompson C, Fisher DC, Neuberg D et al. Obatoclax in combination with fludarabine and rituximab is well-tolerated and shows promising clinical activity in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **2015**, 56, 3336–3342.

Burdge G. Metabolism of [alpha]-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **2006**, 75, 161-168.

Burns CP, Luttenegger DG, Dudley DT, Buettner GR & Spector AA. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and methotrexate transport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.*, **1979**, 39, 1726–1732.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A & Darst SA. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, **2001**, 104, 901-912.

Calder PC. Marine ω -3 Fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, 1851, 469–484.

Calle L, Canada FJ & Jimenez-Barbero J. Application of NMR methods to the study of the interaction of natural products with biomolecular receptors. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 1118–1125.

Carlomango T. NMR in natural products: understanding conformation, configuration and receptor interactions. *Nat Prod Rep*, **2012**, 29, 536-554.

Carrington EM, Zhan Y, Brady JL, Zhang JG, Sutherland RM, Anstee NS, Schenk RL, Vikstrom IB, Delconte RB et al. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.*, **2017**, 24, 878-888.

Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG & James MJ. The effect on human tumor necrosis factor and interleukin-1b production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1996**, 63, 116-122.

Caygill CP & Hill MJ. Fish, n–3 fatty acids and human colorectal and breast cancer mortality. *European Journal of Cancer Prevention*, **1995**, 4, 329–332.

Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA & Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, **2006**, 9, 351–365.

Chieffo C, Botbyl J, Perry K, Blok TM & Jorkasky DK. Use of an obese population in phase 1 to evaluate the pharmacology of oral CXA-10, an endogenous, nitrofatty acid signaling agent. In *Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Clinical Pharmacology*, Bethesda, MD, USA, 24–27 September **2016**.

Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL & Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Complement Analysis*, **1992**, 5, 185-197.

Cid MM & Bravo J. Structure Elucidation in Organic Chemistry: The Search for the Right Tools ,1st Ed. **2015**.

Cistola DP, Morrisett JD, Sparrow JT & Small D.M. Interactions of myristic acid with bovine serum albumin: a ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**, 81, 3718-3722.

Cistola DP, Small DM & Hamilton JA. Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites. *J Biol Chem*, **1987**, 262, 10971-10979.

Cistola DP, Small DM & Hamilton JA. Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. II. Electrostatic interactions in individual fatty acid binding sites. *J Biol Chem*, **1987**, 262, 10980-10985.

Claasen B, Axmann M, Meinecke R & Meyer B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha (IIb) beta3 in native platelets than in liposomes. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 916–919.

Clinical Trial of CXA-10 against Asthma, Lead Sponsor: University of Colorado, Denver; Anti Inflammatory Lipid Mediators in Asthma: A Double Blind Placebo Control Cross Over, Proof of Concept Study of CXA-10 to Reduce Bronchial Hyperresponsiveness in Obese Asthmatics, **2021**, Available online: [Ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT03762395](https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT03762395).

Cole MP, Rudolph TK, Khoo NKH, Motanya UN, Golin-Bisello F, Wertz JW, Schopfer FJ, Rudolph V, Woodcock SR, Bolisetty S et al. Nitro-fatty acid inhibition of Neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ. Res.*, **2009**, 105, 965–972.

Complexa. Complexa Announces Successful Completion of Four Phase 1 Studies of CXA-10 and Planned Phase 2 Initiation in Multiple Orphan Indications, **2021**.

Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T & Borner C. Bcl-2 is a monomeric protein: Prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO Journal*, **2000**, 19, 1534–1544.

Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B & Rizzo AM. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis.*, **2011**, 10, 73.

Coupez B & Lewis RA. Docking and scoring--theoretically easy, practically impossible? *Curr Med Chem.*, **2006**, 13, 2995–3003.

Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP et al. Nitrated-fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 35686–35698.

Curry S, Brick P & Franks, NP. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1441, 131-140.

Curry S, Mandelkow H, Brick P & Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites, *Nat Struct Biol*, **1998**, 5, 827-835.

Danbara N, Yuri T, Tsujita-Kyutoku M, Sato M, Senzaki H, Takada H, Hada T, Miyazawa T, Okazaki K & Tsubura A. Conjugated Docosahexaenoic Acid Is a Potent Inducer of Cell Cycle Arrest and Apoptosis and Inhibits Growth of Colo 201 Human Colon Cancer Cells. *Nutr. Cancer*, **2004**, 50, 71–79.

Darwesh AM, Bassiouni W, Sosnowski DK & Seubert JM. Can N-3 polyunsaturated fatty acids be considered a potential adjuvant therapy for COVID-19-associated cardiovascular complications? *Pharmacol. Ther.* **2021**, 219, 107703.

Deckere EA. Possible beneficial effect of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, **1999**, 8, 213–221.

Dejean LM, Martinez-Caballero S & Kinnally KW. Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death and Differentiation*, **2006**, 13, 1387–1385.

D' Eliseo D & Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J. Clin. Med.*, **2016**, 15, 1-29.

Delmastro-Greenwood M, Hughan KS, Vitturi DA, Salvatore SR, Grimes G, Potti G, Shiva S, Schopfer FJ, Gladwin MT & Freeman BA. Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 89, 333–341.

Dennington R, Keith T & Millam J. GaussView Version 6.0.16 Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, **2019**.

Derakhshan B, Hao G & Gross SS. Balancing reactivity against selectivity: The evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* **2007**, 75, 210–219.

Dilzer A & Park Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, 52, 488-513.

D'Ischia M. Oxygen-dependent nitration of ethyl linoleate with nitric oxide. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5773–5774.

Doaei S, Gholami S, Rastgoo S, Gholamalizadeh M, Bourbour F, Bagheri SE, Samipoor F, Akbari ME, Shadnough M, Ghorat F, Mosavi Jarrahi SA, Mirsadeghi NA, Hajipour A, Joola P, Moslem A & Goodarzi MO. The effect of omega-3 fatty acid supplementation on clinical and biochemical parameters of critically ill patients with COVID-19: a randomized clinical trial. *J Transl Med*, **2021**, 19, 128.

Dötsch V. In-cell NMR Spectroscopy: From 2001 to Now. *In-cell NMR Spectroscopy: From Molecular Sciences to Cell Biology*. **2019**, Chapter 1, 1-9.

Espotsi MD. Bcl-2 antagonists and cancer: from the clinic, back to the bench. *Cell Death & Disease*, **2010**, 1, 37.

European Communities, Directive 90/496/EEC on Nutrition Labeling of Foodstuffs, **2006**.

Fang MY, Huang K-H, Tu W-J, Chen Y-T, Pan P-Y, Hsiao W-C, Ke YY, Tsou LK & Zhang MM. Chemoproteomic profiling reveals cellular targets of nitro-fatty acids. *Redox Biol.* **2021**, 46, 102126.

Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S & Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, **2005**, *57*, 787-796.

Fazzari M, Khoo N, Woodcock SR, Jorkasky DK, Li L, Schopfer FJ & Freeman BA. Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment, *J. Lipid Res.*, **2017**, *58*, 375–385.

Fazzari M, Khoo N, Woodcock SR, Li L, Freeman BA & Schopfer FJ. Generation and esterification of electrophilic fatty acid nitroalkenes in triacylglycerides. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *87*, 113–124.

Fazzari M, Vitturi DA, Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA & Schopfer FJ. Electrophilic fatty acid nitroalkenes are systemically transported and distributed upon esterification to complex lipids. *J. Lipid Res.*, **2019**, *60*, 388–399.

Fehske KJ, Muller WE, Wollert U & Velden LM. The lone tryptophan residue of human serum albumin as part of the specific warfarin binding site. Binding of dicoumarol to the warfarin, indole and benzodiazepine binding sites. *Mol Pharmacol*, **1979**, *16*, 778-789.

Fejzo J, Lepre CA, Peng JW, Bemis GW, Murcko MA & Moore JM. The SHAPES strategy: an NMR-based approach for lead generation in drug discovery. *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 755-769.

Fernald K & Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.*, **2013**, *23*, 620-633.

Fioravanti S, Pellacani L, Tardella PA & Vergari MC. Facile and highly stereoselective one-pot synthesis of either (E)- or (Z)-nitro alkenes. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1449–1451.

Freeman BA, Baker PRS, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A & D’Ischia M. Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15515–15519.

Garner RM, Mould DR, Chieffo C & Jorkasky D.K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of oral CXA-10, a nitro fatty acid, after single and multiple ascending doses in healthy and obese subjects. *Clin. Transl. Sci.* **2019**, *12*, 667–676.

Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M & Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol*, **2005**, *353*, 38-52.

Gil A & Gil F. Fish, a Mediterranean source of n-3 PUFA: Benefits do not justify limiting consumption. *Br. J. Nutr.*, **2015**, *113*, 58–67.

Gizachew D & Dratz E. Transferred NOESY NMR studies of biotin mimetic peptide (FSHPQNT) bound to streptavidin: A structural model for studies of peptide-protein interactions. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **2011**, *78*, 14-24.

Goc A, Niedzwiecki A & Rath M. Polyunsaturated ω -3 fatty acids inhibit ACE2-controlled SARS-CoV-2 binding and cellular entry. *Sci Rep*, **2021**, *11*, 5207.

Gomez-Cortes P, Tyburczy C, Brenna JT, Juarez M & de la Fuente MA. Characterization of cis-9 trans-11 trans-15 C18:3 in milk fat by GC and covalent adduct chemical ionization tandem MS. *J. Lipid Res.*, **2009**, 50, 2412-2420.

Gorczyński MJ, Huang J & King B. Regio- and Stereospecific syntheses and nitric oxide donor properties of (E)-9 and (E)-10-nitrooctadec-9-enoic acids. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2305–2308.

Goy A, Berger M, Ford P, Feldman T, Mato A, Bejot C & Fung HC. Sequential single-agent obatoclox mesylate (GX15-070MS) followed by combination with rituximab in patients with previously untreated follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **2014**, 55, 2932–2934.

Goy A, Hernandez-Ilzaliturri FJ, Kahl B, Ford P, Protomastro E & Berger M. A phase I/II study of the pan Bcl-2 inhibitor obatoclox mesylate plus bortezomib for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **2014**, 55, 2761–2768.

Grippo V, Mojovic M, Pavicevic A, Kabelac M, Hubatka F, Turanek J, Zatloukalova M, Freeman BA & Vacek J. Electrophilic characteristics and aqueous behavior of fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* **2021**, 38, 101756.

Gunstone FD. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*, 1st ed, Springer US, **1996**.

Gupta R, Lakshmy R, Abraham RA, Reddy KS, Jeemon P & Prabhakaran. Serum omega-6/omega-3 ratio and risk markers for cardiovascular disease in an industrial population of Delhi. *Food Nutr. Sci.* **2013**, 4, 94-97.

Gutierrez S, Svahn SL & Johansson ME. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells. *Int J Mol Sci.* **2019**, 20, 5028.

Guzzetti I, Civera M, Vasile F, Araldi EM, Belvisi L, Gennari C, Potenza D, Fanelli R & Piarullic U. Determination of the binding epitope of RGD-peptidomimetics to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin-rich intact cells by NMR and computational studies. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 3886-3893.

Halperin I, Ma B, Wolfson H & Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, **2002**, 47, 409–443.

Hamatsu J, O'Donovan D, Tanaka T, Shirai T, Hourai Y, Mikawa T, Ikeya T, Mishima M, Boucher W, Smith BO, Laue ED, Shirakawa M & Ito Y. High-Resolution Heteronuclear Multidimensional NMR of Proteins in Living Insect Cells Using a Baculovirus Protein Expression System. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 1688 -1691.

Hamilton JA. NMR reveals molecular interactions and dynamics of fatty acid binding to albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1830, 5418-5426.

Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP & Reed RG. Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, 88, 2051-2054.

Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **2011**, 144, 646–674.

Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J. Nutr.*, **2002**, 132, 3508-3512.

Hassan M, Krieg S-C, Nde C-N, Roos J, Maier TJ, El Rady EA, Raslan MA, Sadek KU & Manolikakes G. Streamlined One-pot synthesis of nitro fatty acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 15, 2239–2252.

Hassan M, Nde CN & Manolikakes G. Synthesis of nitroolefins via the direct nitration of alkenes. *SynOpen* **2021**, 5, 229–231.

Hathaway D, Pandav K, Patel M, Riva-Moscato A, Mohan Singh B, Patel A, Chi Min Z, Singh-Makkar S, Khawar Sana M, Sanchez-Dopazo R, Desir R, Michael Fahem MM, Manella S, Rodriguez I, Alvarez A & Abreu R. Omega 3 Fatty Acids and COVID-19: A Comprehensive Review. *Infect Chemother.*, **2020**, 52, 478-495.

He XM & Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **1992**, 358, 209-215.

Helland IB, Smith L, Blomen B, Saarem K, Saugstad OD & Drevon CA. Effect of supplementing pregnant and lactating mothers with n-3 verylong-chain fatty acids on children's IQ and body mass index at 7 years of age. *Pediatrics*, **2008**, 122, 472–9.

Hernychova L, Alexandri E, Tzakos AG, Zatloukalova M, Primikyri A, Gerothanassis IP, Uhrík L, Sebela M, Kopečný D, Jedinak L & Vacek J. Serum albumin as a primary non-covalent binding protein for nitro-oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2022**, 203, 116-129.

Hock KJ, Grimmer J, Göbel D, Gasaya GGT, Roos J, Maucher IV, Kühn B, Fettel J, Maier TJ & Manolikakes G. Modular regiospecific synthesis of nitrated fatty acids. *Synthesis* **2016**, 49, 615–636.

Hopkins MM, Zhang Z, Liu Z & Meier KE. Eicosapentanoic acid and other free fatty acid receptor agonists inhibit lysophosphatidic acid- and epidermal growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *J. Clin. Med.*, **2016**, 16, 1-14.

Huang W, Guo X, Wang C, Alzhan A, Liu Z, Ma X & Shu Q. α -Linolenic acid induces apoptosis, inhibits the invasion and metastasis, and arrests cell cycle in human breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase. *Journal of Functional Foods*, **2022**, 92, 105041.

Huber AH & Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid profiles in human plasma and the unexpected absence of unbound palmitoleate. *J. Lipid Res.* **2017**, 58, 578-585.

Igarashi R, Sakai T, Hara H, Tenno T, Tanaka T, Tochio H & Shirakawa M. Distance Determination in Proteins inside *Xenopus laevis* Oocytes by Double Electron–Electron Resonance Experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 8228 —8229.

Inomata K, Ohno A, Tochio H, Isogai S, Tenno T, Nakase I, Takeuchi T, Futaki S, Ito Y, Hiroaki H & Shirakawa M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, **2009**, 458, 106-110.

Itoh T, Saura Y, Tsuda Y & Yamada H. Stereoselectivity and enantiomer-enantiomer interactions in the binding of ibuprofen to human serum albumin. *Chirality*, **1997**, 9, 643–649.

Jasinska A, Ferguson A, Mohamed WS & Szreder T. The study of interactions between ibuprofen and bovine serum albumin. *Food Chemistry and Biotechnology*, **2009**, 73, 16-24.

Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Geneva 7 WHO/FAO, **2003**, 87–89.

Kale J, Osterlund EJ & Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.*, **2018**, 25, 65-80.

Kaneko F, Yano J & Sato K. Diversity in the fatty-acid conformation and chain packing of cis-unsaturated lipids. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 417–425.

Kansanen E, Jyrkkänen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen S-K, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Ylä-Herttuala S et al. Nrf2-dependent and – independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 33233–33241.

Kashyap D, Garg VK & Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **2021**, 125, 73-120.

Ke F, Bouillet P, Kaufmann T, Strasser A, Kerr J & Voss AK. Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis.* **2013**, 4, 650.

Kelekar A & Thompson CB. Bcl-2-family proteins: The role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, **1998**, 8, 324–330.

Kenyon MA & Hamilton JA. ¹³C NMR studies of the binding of medium-chain fatty acids to human serum albumin. *J Lipid Res*, **1994**, 35, 458-467.

Khan SU, Lone AN, Khan MS, Virani SS, Blumenthal RS, Nasir K, Miller M, Michos ED, Ballantyne CM, Boden WE & Bhatt DL. Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, **2021**, 38, 100997.

Khemtémourian L, Sani MA, Bathany K, Gröbner G & Dufourc EJ. Synthesis and secondary structure in membranes of the BCL-2 anti-apoptotic domain BH4. *J Pept Sci.*, **2006**, 12, 58-64.

Kim EY, Jung JY, Kim A, Chang YS & Kim SK. ABT-737 Synergizes with Cisplatin Bypassing Aberration of Apoptotic Pathway in Non-small Cell Lung Cancer. *Neoplasia*, **2017**, 19, 354-363.

Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S, Catalano J, Cosolo W, Dyagil IS, Yalamanchili S, Chai A, Sahasranaman S, Punnoose E et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **2015**, 56, 2826–2833.

Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE & Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: Facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, 12, 193–213.

Klanova M & Klener P. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers*, **2020**, 12, 938.

Konopleva M, Watt J, Contractor R, Tsao T, Harris D, Estrov Z, Bornmann W, Kantarjian H, Viallet J, Samudio, I et al. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* **2008**, 68, 3413–3420.

Koutoulogenis GS & Kokotos G. Nitro Fatty Acids (NO₂-FAs): An Emerging Class of Bioactive Fatty Acids. *Molecules*, **2021**, 26, 7536.

Kragh-Hansen U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochem. J.*, **1985**, 225, 629–638.

Krenzel ES, Chen Z & Hamilton JA. Correspondence of fatty acid and drug binding sites on human serum albumin: A two-dimensional nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, **2013**, 52, 1559-1567.

Kühn B, Brat C, Fettel J, Hellmuth N, Maucher IV, Bulut U, Hock KJ, Grimmer J, Manolikakes G, Rühl M et al. Anti-inflammatory nitro-fatty acids suppress tumor growth by triggering mitochondrial dysfunction and activation of the intrinsic apoptotic pathway in colorectal cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, 155, 48–60.

Kuller LH MD, DrPH. Nutrition, lipids, and cardiovascular disease. *Nutr. Rev.*, **2006**, 64, 15-26.

Kumar A, Kuhn LT & Balbach J. In-Cell NMR: Analysis of Protein–Small Molecule Interactions, Metabolic Processes, and Protein Phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*, **2019**, 20, 378.

Kummerow FA. The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atherosclerosis*, **2009**, 205, 458-465.

Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R & Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol.*, **1982**, 161, 269–288.

Kyu-Bong K, Yoon NA, Hyung Sik K, Wallace Hayes A & Byung-Mu L. α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, **2014**, 70, 163-178.

Laviano A, Rianda S, Molfino A & Rossi Fanelli F. ω -3 Fatty acids in cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2013**, 16, 156–161.

Law JMS, Szori M, Izsak R, Penke B, Csizmadia IG & Viskolcz B. Folded and unfolded conformations of the ω -3 polyunsaturated fatty acid family: $\text{CH}_3\text{CH}_2[\text{CH}=\text{CHCH}_2]_B[\text{CH}_2]_M\text{COOH}$. First principles study. *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110, 6100–6111.

Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, Durai V & Lowe Jr WL. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl. Res.*, **2013**, 161, 131-140.

Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB & Whittle IR. Antitumor and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **2002**, 66, 19-29.

Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2008**, 9, 99-111.

Lepre CA, Moore JM & Peng JW. Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 3641–3675.

Lev EI, Solodky A, Harel N, Mager A, Brosh D, Assali A, Roller M, Battler A, Kleiman NS & Kornowski R. Treatment of aspirin-resistant patients with omega-3 fatty acids versus aspirin dose escalation. *J Am Coll Cardiol*. **2010**, 55, 114–21.

Li C, Wang GF, Wang Y, Creager-Allen R, Lutz EA, Scronce H, Slade KM, Ruf RA, Mehl RA & Pielak GJ. Protein (19)F NMR in Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 321–327.

Li D, Levy LA, Gabel SA, Lebetkin MS, DeRose EF, Wall MJ, Howell EE & London RE. Interligand Overhauser effects in type II dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, **2001**, 40, 4242-4252.

Li G, Wang X, Yang H, Zhang P, Wu F, Li Y, Zhou Y, Zhang X, Ma H, Zhang W & Li J. α -Linolenic acid but not linolenic acid protects against hypertension: critical role of SIRT3 and autophagic flux. *Cell Death & Disease*, **2020**, 11, 83.

Li J & Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **2008**, 27, 6194–6206.

Li X, Li Y, Cheng T, Liu Z, Wang R. Evaluation of the performance of four molecular docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes. *J Comput Chem.*, **2010**, 31, 2109–2125.

Lima ES, Di Mascio P, Rubbo H & Abdalla DSP. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **2002**, 41, 10717–10722.

Lin T, Yin X, Cai Q, Fan X, Xu K, Huang L, Luo J, Zheng J & Huang J. 13-Methyltetradecanoic acid induces mitochondrial-mediated apoptosis in human bladder cancer cells. *Urol. Oncol.*, **2012**, 30, 339-345.

Liu X, Zhang Y, Huang W, Tan W & Zhang A. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new acyl sulfonamides as potent and selective Bcl-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2018**, 26, 443-454.

Liu Z, Hopkins MM, Zhang Z, Quisenberry CB, Fix LC, Galvan BM & Meier KE. ω -3 Fatty acids and other FFA4 agonists inhibit growth factor signaling in human prostate cancer cells. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **2015**, 352, 1-15.

Luchinat E, Banci L. A Unique Tool for Cellular Structural Biology: In-cell NMR. *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291, 3776–3784.

Luchinat E, Banci L. In-cell NMR: A topical review. *IUCrJ*, **2017**, 4, 108–118.

Luchinat E & Banci L. In-Cell NMR in Human Cells: Direct Protein Expression Allows Structural Studies of Protein Folding and Maturation. *Acc. Chem. Res.*, **2018**, 51, 1550–1557.

Ma X & Yu H. Global burden of cancer. *J. Biol. Med.* **2006**, 79, 85–94.

Manini P, Capelli L, Reale S, Arzillo M, Crescenzi O, Napolitano A, Barone V & D'Ischia M. Chemistry of nitrated lipids: Remarkable instability of 9-nitrolinoleic acid in neutral aqueous medium and a novel nitronitrate ester product by concurrent autoxidation/nitric oxide-release pathways. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7517–7525.

Mari S, Invernizzi C, Spitaleri A, Alberici L, Ghitti M, Bordignon C, Traversari C, Rizzardì GP & Musco G. 2D Tr-NOESY experiments interrogate and rank ligand-receptor interactions in living human cancer cells. *Angew Chem Int Ed*, **2010**, 49, 1071–1074.

Mason RP, Libby P & Bhatt DL. Emerging mechanisms of cardiovascular protection for the omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2020**, 40, 1135–47.

Masoodi M & Volmer DA. Comprehensive quantitative determination of PUFA-related bioactive lipids for functional lipidomics using high-resolution mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.*, **2014**, 1198, 221-232.

Maugeri-Saccà M, Vigneri P & de Maria R. Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 4942–4947.

Mayer M & Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc*, **2001**, 123, 6108-6117.

Mazidimoradi A, Alemzadeh E, Alemzadeh E & Salehiniya H. The effect of polyunsaturated fatty acids on the severity and mortality of COVID patients: A systematic review. *Life Sciences*, **2022**, 299, 120489.

Melo T, Domingues P, Ferreira R, Milic I, Fedorova M, Santos SM, Segundo MA & Domingues MRM. Recent advances on mass spectrometry analysis of nitrated phospholipids. *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 2622–2629.

Melo T, Domingues P, Ribeiro-Rodrigues TM, Girao H, Segundo MA & Domingues MRM. Characterization of phospholipid nitroxidation by LC-MS in biomimetic models and in H9c2 Myoblast using a lipidomic approach, *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, 106, 219–227.

Melo T, Montero-Ullon JF, Domingues P & Domingues MR. Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biology*, **2019**, 23, 101106.

Meng XY, Zhang HX, Mezei M & Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*, **2011**, 7, 146-157.

Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW & Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell*, **2018**, 34, 879–891.

Meyer B & Peters T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 864–890.

Mitchell TW, Brown SHO & Blanksby SJ. Structural Lipidomics. In *Lipidomics: Technologies and Applications*, Ekroos K (Ed), Wiley VCH, **2012**, 99-128.

Molendi-Coste O, Legry V & Leclercq IA. Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? *Gastroenterol. Res. Pr.*, **2010**, 2011, 1–11.

Moolenaar WH, Meeteren LA & Giepmans BNG. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioassays*, **2004**, 26, 870-881.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS & Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, **2009**, 30, 2785-2791.

Moser AC, Kingsbury C & Hage DS. Stability of warfarin solutions for drug–protein binding measurements: Spectroscopic and chromatographic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2006**, 1101-1109.

Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S & Loh DY. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, **1995**, 267, 1506-1510.

Murray M, Hraiki A, Bebawy M, Pazderka C & Rawling T. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacol. Ther.* **2015**, 150, 109–128.

Napotalino A, Camera E, Picardo M & D’Ischia M. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-Nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4583–4860.

Netto LES, Antonio de Oliveira M, Monteiro G, Demasi APD, Cussiol JRR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG et al. Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defence, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 146, 180–193.

Newton AC. Diacylglycerol’s affair with protein kinase C turns 25. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 175-177.

Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Belec L, Billot X et al. Small molecule obatoclox (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 19512–19517.

Nishida C & Uauy R. WHO scientific update on health consequences of trans fatty acids: introduction. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2009**, 63, 1-4.

Oberstein A, Jeffrey PD & Shi Y. Crystal Structure of the Bcl-X_L-Beclin Peptide Complex. *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 13123-13132.

O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Gribben J, Itri LM et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 5208–5212.

O'Keefe SF. Nomenclature and Classification of Lipids. In *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biochemistry*, 1st ed., Akoh CC, Min DB (Eds), Marcel Dekker Inc, New York, **2002**.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, **2005**, 435, 677–681.

Orts J, Tuma J, Reese M, Grim SK, Monecke P, Bartoschek S, Schiffer A, Wendt KU, Griesinger C & Carlomango T. Crystallography-independent determination of ligand binding modes. *Angew Chem Int Ed*, **2008**, 47, 7736-7740.

Parks JS, Cistola DP, Small DM & Hamilton JA. Interactions of the carboxyl group of oleic acid with bovine serum albumin: A ¹³C NMR study. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 9262-9269.

Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP & Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Metab.*, **2012**, 2012, 1–16.

Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralt E, Jahnke W, James TL, Homans SW, Kessler H, Luchinat C, Meyer B, Oschkinat H, Peng J, Schwalbe H & Siegal G. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2008**, 7, 738–745.

Pellecchia M, Sem DS & Wuthrich K. NMR in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 211–219.

Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, Hills R, Ward R, Starczynski J, Austen B, Hooper L, Stankovic T & Fegan C. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*, **2008**, 112, 3807–3817.

Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Park DS & Bhagavan NV. Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia may result in altered warfarin pharmacokinetics. *Chem Biol Interact*, **2000**, 124, 161-172.

Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M & Curry S. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin anatomy of drug site I. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 22804-22809.

Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA & Curry S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol*, **2001**, 314, 955–960.

Petros AM, Olejniczak ET & Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1644, 83-94.

Pop C & Salvesen GS. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 21777–21781.

Post CB. Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination. *Curr Opin Struct Biol*, **2003**, 13, 581-588.

Potenza D, Vasile F, Belvisi L, Civera M & Araldi EM. STD and tr-NOESY NMR study of receptor-ligand interactions in living cancer cells. *Chem Bio Chem*, **2011**, 12, 695–699.

Primikyri A, Sayyad N, Quilici G, Vrettos EI, Lim K, Chi S-W, Musco G, Tzakos A & Gerotheranassis IP. Probing the interaction of a quercetin bioconjugate with Bcl-2 in living human cancer cells with in-cell NMR spectroscopy. *FEBS Letters*, **2018**, 592, 3367-3379.

Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM & Cory S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95, 12424-12431.

Pritchard JR, Bruno PM, Gilbert LA, Capron KL, Lauffenburger DA & Hemann MT. Defining principles of combination drug mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110, 170–179.

Qi M, Gross A, Jeschke G, Godt A & Drescher M. Gd(III)-PyMTA Label Is Suitable for In-Cell EPR. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 15366-15378.

Quehenberger O & Dennis EA. The Human plasma lipidome. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 1812-1823.

Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Van Dyck C, Galvin JE, Emond J, Jack CR, Jr, Weiner M, Shinto L & Aisen PS. Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA*. **2010**, 304, 1903–11.

Raghav PK, Verma YK & Gangenahalli GU. Molecular dynamics simulations of the Bcl-2 protein to predict the structure of its unordered flexible loop domain. *Journal of Molecular Modeling*, **2012**, 18, 1885–1906.

Rahman M.H, Maruyama T, Okada T, Yamasaki K & Otagiri M. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin–I. Mechanism of binding studied by dialysis and spectroscopic methods. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 46, 1721–1731.

Ramakrishnan U, Stein AD, Parra-Cabrera S, Wang M, Imhoff-Kunsch B, Juarez-Marquez S, Rivera J & Martorell R. Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Mexico. *Food Nutr Bull.*, **2010**, 31, 108–16.

Raper NR, Cronin F & Exler J. Omega-3 fatty acid content of the US food supply. *J. Am. Coll. Nutr.*, **1992**, 11, 304-308.

Rajaram S. Health benefits of plant-derived α -linolenic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2014**, 100, 443-448.

Reckel S, Lehr F, Dötsch V. In-cell NMR spectroscopy. *Chem. Bio. Chem.*, **2005**, 6, 1601-1606.

Reed RG. Location of long chain fatty acid-binding sites of bovine serum albumin by affinity labeling. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 15619-15624.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF & Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **2001**, 414, 105–111.

Riediger ND, Othman RA, Suh M & Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.* **2009**, 109, 668–679.

Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K & Korsmeyer SJ. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.*, **2000**, 14, 23-27.

Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: Results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30, 488–496.

Rodriguez-Alcala L, Castro-Gomez P, Pimentel L & Fontecha J. Milk fat components with potential anticancer activity-a review. *Biosci. Rep.*, **2017**, 37, BSR20170705.

Roldos V, Canada FJ & Jimenez-Barbero J. Carbohydrate–protein interactions: a 3D view by NMR. *ChemBioChem*, **2011**, 12, 990–1005.

Rosemary B & Reynolds W. Using NMR to identify and characterize natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30, 501-524.

Rudolph TK & Freeman BA. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci. Signal*, **2009**, 2, 1–13.

Ruuth M, Lahelma M, Luukkonen PK, Lorey MB, Qadri S, Sädevirta S, Hyötyläinen T, Kovanen PT, Hodson L, Yki-Järvinen H & Öörni K. Overfeeding Saturated Fat Increases LDL (Low-Density Lipoprotein) Aggregation Susceptibility While Overfeeding Unsaturated Fat

Decreases Proteoglycan-Binding of Lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2021**, 41, 2823-2836.

Saifullah A, Watkins BA, Saha C, Li Y, Moe SM & Friedman AN. Oral fish oil supplementation raises blood omega-3 levels and lowers C-reactive protein in haemodialysis patients--a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*. **2007**, 22, 3561-7.

Sakai T, Tochio H, Tenno T, Ito Y, Kokubo T, Hiroaki H & Shirakawa M. In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biomol. NMR*, **2006**, 36, 179–188.

Sanchez-Pedregal VM, Reese M, Meiler J, Bloomers MJJ, Griesinger C & Carlomango T. The INPHARMA method: Protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angew Chem Int Ed*, **2005**, 44, 4172-4175.

Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB & Fesik SW. Structure of Bcl-xL–Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science*, **1997**, 275, 983–986.

Schoeman JC, Harms AC, van Weeghel M, Berger R, Vreeken RJ & Hankemeier T. Development and application of a UHPLC–MS/MS metabolomics based comprehensive systemic and tissue-specific screening method for inflammatory, oxidative and nitrosative stress. *Anal. Bioanal. Chem*. **2018**, 410, 2551–2568.

Schwager J, Richard N, Riegger C & Salem N. ω -3 PUFAs and resveratrol differently modulate acute and chronic inflammatory processes. *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 535189.

Selenko P, Serber Z, Gade B, Ruderman J & Wagner G. Quantitative NMR analysis of the protein G B1 domain in *Xenopus laevis* egg extracts and intact oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 11904–11909.

Serber Z & Dötsch V. In-cell NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **2001**, 40, 14317-14323.

Serber Z, Keatinge-Clay AT, Ledwidge R, Kelly AE, Miller SM & Dötsch V. High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2446-2447.

Serber Z, Straub W, Corsini L, Nomura AM, Shimba N, Craik CS, Ortiz de Montellano P & Dötsch V. Methyl groups as probes for proteins and complexes in in cell NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 7119–7125.

Serber Z, Selenko P, Hansel R, Reckel S, Lohr F, Ferrell JE, Wagner G & Dötsch V. Investigating macromolecules inside cultured and injected cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nat. Protoc*. **2006**, 1, 2701–2709.

Serini S, Fasano E, Piccioni E, Cittadini ARM & Calviello G. Differential Anti-Cancer Effects of Purified EPA and DHA and Possible Mechanisms Involved. *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18, 4065-4075.

Shamas-Din A, Kale J, Leber B & Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2013**, 5, 008714.

Shinto L, Quinn J, Montine T, Dodge HH, Woodward W, Baldauf-Wagner S, Waichunas D, Bumgarner L, Bourdette D, Silbert L & Kaye J. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **2014**, 38, 111–20.

Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA & Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J. Mol. Biol.* **2006**, 361, 336-351.

Simonen M, Keller H & Heim J. The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, **1997**, 249, 85–91.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 365-379.

Simopoulos AP. The Importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* **2008**, 233, 674-688.

Siebert Hans-Christian, Burg-Roderfeld Monika, Eckert Thomas, Stötzel Sabine, Kirch Ulrike, Diercks Tammo, Humphries Martin J, Frank Martin, Wechselberger Rainer, Tajkhorshid Emad & Oesser Steffen. Interaction of the $\alpha 2A$ domain of integrin with small collagen fragments. *Protein Cell.*, **2010**, 1, 393.

Sklar LA, Hudson BS & Simoni RD. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: binding to bovine serum albumin. *Biochemistry*, **1977**, 16, 5100-5108.

Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **2013**, 19, 202–208.

Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M & Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439-446.

Sun SN, Jia WD, Chen H, Ma JL, Ge YS, Yu JH & Li JS. Docosahexanoic acid (DHA) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. of Clin. Exp. Pathol.*, **2013**, 6, 281–289.

Suzuki M, Zhang J, Liu M, Woychik N & Inouye M. Single Protein Production in Living Cells Facilitated by an mRNA Interferase. *Mol. Cell*, **2005**, 18, 253-261.

Tanoli AKS, Tanoli UN, Bondancia MT, Usmani S, Ul-Haq Z, Fernandes BJ, Thomasi SS & Ferreira GA. Human serum albumin-specific recognition of the natural herbal extract of *Stryphnodendron polyphyllum* through STD NMR, hyphenations and docking simulation studies. *RSC Adv*, **2015**, 5, 23431–23442.

Taylor RC, Cullen SP & Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2008**, 9, 231-241.

Terés S, Barceló-Coblijn G, Benet M, Álvarez R, Bressani R, Halver JE & Escribá PV. Oleic Acid Content Is Responsible for the Reduction in Blood Pressure Induced by Olive Oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 13811-13816.

Torres-Castillo N, Silva-Gómez JA, Campos-Perez W, Barron-Cabrera E, Hernandez-Cañaveral I, Garcia-Cazarin M, Marquez-Sandoval Y, Gonzalez-Becerra K, Barron-Gallardo C & Martinez-Lopez E. High Dietary ω -6: ω -3 PUFA Ratio Is Positively Associated with Excessive Adiposity and Waist Circumference. *Obes Facts*, **2018**, 11, 344-353.

Trott O & Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, **2010**, 31, 455-461.

Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. **2008**, 68, 3421-3428.

Tsikakos D, Zoerner AA, Mitschke A & Gutzki FM. Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: A targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids*, **2009**, 44, 855-865.

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **1998**, 3, 697-707.

Tsujita T, Li L, Nakajima H, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Ohashi K, Kawakami K, Kumagai Y, Freeman BA, Yamamoto M et al. Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: A study using green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Genes Cells*, **2011**, 16, 46-57.

Turell L, Vitturi DA, Coitiño EL, Lebrato L, Möller MN, Sagasti C, Salvatore SR, Woodcock SR, Alvarez B & Schopfer FJ. The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *J. Biol. Chem*. **2017**, 292, 1145-1159.

Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol.*, **2012**, 524308.

Vance DE & Vance JE (Eds). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2008**.

Vaseva AV & Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, **2009**, 1787, 414-420.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR & Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **1993**, 75, 229-240.

Venianakis T, Primikyri A, Alexandri E, Papamokos G & Gerothanassis IP. Molecular models of three ω -3 fatty acids based on NMR and DFT calculations of ^1H NMR chemical shifts. *J. Mol. Liq.*, **2021**, 342, 117460.

Viegas A, Manso J, Nobrega FL & Cabrita EJ. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *J Chem Educ*, **2011**, 88, 990–994.

Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, Ichikawa T, Zhang J, Petrovic-Djergovic D, Jia L, Carlsen H, Schopfer FJ, Freeman BA et al. Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **2013**, 98, 116–124.

Vitturi DA, Minarrieta L, Salvatore SR, Postlethwait EM, Fazzari M, Ferrer-Sueta G, Lancaster JR, Freeman BA & Schopfer FJ. Convergence of biological nitration and nitrosation via symmetrical nitrous anhydride. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 504–510.

Vogler M, Hamali HA, Sun XM, Bampton ET, Dinsdale D, Snowden RT, Dyer MJ, Goodall AH & Cohen GM. BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood*, **2011**, 117, 7145–7154.

US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture, Dietary Guidelines for Americans, 6th Edn, US Government Printing Office, Washington, D.C. **2005**.

Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, Jordan HS & Lau J. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 84, 5–17.

Wang C & Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.*, **2009**, 43, 95-118.

Watkins SM & German JB. Unsaturated Fatty Acids. *In Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biochemistry*, 1st ed, Akoh CC, Min DB (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, **2002**.

Wei L, Wu Z & Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids-an update. *Cancer Letters*, **2022**, 526, 193-204.

Wei Y, Cao Y, Sun R, Cheng L, Xiong X, Jin X, He X, Lu W & Zhao M. Targeting Bcl-2 proteins in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*, **2020**, 10, 1-11.

Willett WC. The role of dietary n-6 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Medicine*, **2007**, 8, 42-45.

Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, Tulpule A, Dunleavy K, Xiong H, Chiu YL et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: A phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* **2010**, 11, 1149–1159.

Woodcock SR, Bonacci G, Gelhaus SL & Schopfer FJ. Nitrated fatty acids: Synthesis and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 59, 14–26.

Woodcock SR, Marwitz AJV, Bruno P & Branchaud BP. Synthesis of nitrolipids. All four possible diastereomers of nitrooleic acids: (E)- and (Z)-, 9- and 10-nitro-octadec-9-enoic acids. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3931–3934.

Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA & Schopfer FJ. Synthesis of 9- and 12-nitro conjugated linoleic acid: Regiospecific isomers of naturally occurring conjugated nitrodienes. *Tetrahedron Lett.* **2021**, 81, 153371.

Xu Y & Qian S. Anti-cancer Activities of ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomed. J.*, **2014**, 37, 112-119.

Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S & Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* **2020**, 8, 475-81.

Ye Y, Liu X, Zhang Z, Wu Q, Jiang B, Jiang L, Zhang X, Liu M, Pielak GJ & Li C. (19) F NMR spectroscopy as a probe of cytoplasmic viscosity and weak protein interactions in living cells. *Chemistry*, **2013**, 19, 12705–12710.

Yu YT, Liu JHB, Wang RL, Yang XH, Shang XL, Wang G, Wang CS, Li BL, Gong, Y, Zhang S, Li X, Wang L, Shao M et al. Expert consensus on the use of human serum albumin in critically ill patients. *Chinese Medical Journal*, **2021**, 134, 1639-1654.

Yli-Jama P, Meyer HE, Ringstad J & Pedersen JI. Serum free fatty acid pattern and risk of myocardial infarction: a case-control study. *J. Intern. Med.* **2002**, 251, 19-28.

Yuan J, Lipinski M & Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, **2003**, 40, 401–413.

Zacarias-Lara OJ, Correa-Basurto J & Bello M. Exploring the conformational and binding properties of unphosphorylated/phosphorylated monomeric and trimeric Bcl-2 through docking and molecular dynamics simulations. *Biopolymers*, **2016**, 105, 393–413.

Zatloukalova M, Jedinak L, Riman D, Frankova J, Novak D, Cytryniak A, Nazaruk E, Bilewicz R, Vrba J, Papouskova B, Kabelac M & Vacek J. Cubosomal lipid formulation of nitroalkene fatty acids: preparation, stability and biological effects. *Redox Biol.*, **2021**, 46, 102097.

Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, Chen J, Fryer RM, Hahn KR, Iciek LA, Morgan SJ, Nasarre MC, Nelson R et al. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ.* **2007**, 14, 943–951.

Zhang C, Yu H, Shen Y, Ni X, Shen S & Das UN. Polyunsaturated fatty acids trigger apoptosis of colon cancer cells through a mitochondrial pathway. *Arch. Med. Sci.*, **2015**, 11, 1081-1094.

Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J & Duo L. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *Brit. Med. J.*, **2013**, 346, 3706.

Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2001**, 108, 99–103.

<https://biologydictionary.net/apoptosis/>

https://en.wikipedia.org/wiki/Computational_chemistry

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9-Decenoic_acid#section=Top

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic_acid#section=Top