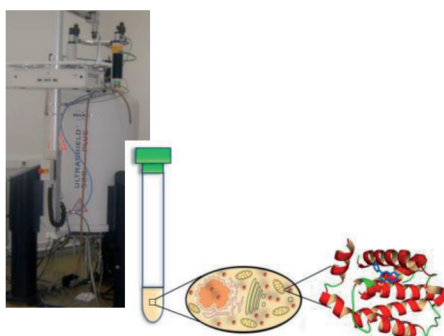




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων με υψηλής
ευαισθησίας φασματοσκοπία NMR κρυογενικής τεχνολογίας και
έλεγχος της αντινεοπλασματικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης**



Πριμηκύρη Αλεξάνδρα

Βιολόγος, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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

Ημερομηνία **αίτησης** της κ. Πριμηκύρη Αλεξάνδρα: 11-12-2013

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 728^A/ 04-02-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γεροθανάσης Ιωάννης

Μέλη:

Φώτης Θεόδωρος

Τρογκάνης Αναστάσιος

Ημερομηνία **ορισμού θέματος**: 06-03-2009

Θέμα: « Μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων με υψηλής ευαισθησίας φασματοσκοπία NMR κρυογενικής τεχνολογίας και έλεγχος της αντινεοπλασματικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης.»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 873^A/18-11-2013

1. Ιωάννης Γεροθανάσης
2. Θεόδωρος Φώτης
3. Αναστάσιος Τρογκάνης
4. Ευάγγελος Μπριασούλης
5. Θεώνη Τράγκα
6. Ανδρέας Τζάκος
7. Ευάγγελος Κωλέττας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**Άριστα**» στις **28-11-2013**

Προς: τη Γραμματεία του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα, 28-11-2013

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΔΙΔΑΚΤΩΡ
κ. ΠΡΙΜΗΚΥΡΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

Σήμερα στις 28 Νοεμβρίου και ώρα 18:30, η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. Καθηγητή **Ιωάννη Γεροθανάση**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, επιβλέπων καθηγητής
2. Καθηγητή **Θεόδωρο Φώτση**, Ιατρική Σχολή και Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων, μέλος της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
3. Αναπλ. Καθηγητή **Αναστάσιο Τρογκάνη**, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
4. Καθηγητή **Ευάγγελο Μπριασούλη**, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
5. Αναπλ. Καθηγήτρια **Θεώνη Τράγκα**, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
6. Επίκουρο **Ανδρέα Τζάκο**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
7. Επίκουρο **Ευάγγελο Κωλέττα**, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής

που ορίστηκε με την απόφαση του Τμήματος Χημείας (Συνεδρίαση 873^Α/18-11-2013), συνήλθε στην αίθουσα συνεδριάσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψήφιας διδάκτωρ κ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη του Ιωάννη με τίτλο:

«Μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων με υψηλής ευαισθησίας φασματοσκοπία NMR κρυογενικής τεχνολογίας και έλεγχος της αντινεοπλασματικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης»

Πριν την έναρξη της συνεδρίας ο επιβλέπων καθηγητής ενημέρωσε τα μέλη και το κοινό για τη διαδικασία σύμφωνα με το άρθρο 13, 12 του Νόμου 2083/92. Η κ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη παρουσίασε επί μία ώρα περίπου τα κυριότερα αποτελέσματα της διατριβής της, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στην συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής.

Στην συνέχεια αποχώρησε η κ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη μαζί με το ακροατήριο. Η επταμελής εξεταστική επιτροπή έπειτα από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση έκρινε ότι η διατριβή είναι υψηλού επιπέδου, πρωτότυπη και συμβάλει ουσιαστικά στην εξέλιξη της επιστήμης. Η επιτροπή κατόπιν ψηφοφορίας αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει την απονομή του τίτλου της διδάκτορος στην κ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη με βαθμό «Άριστα» από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η εξεταστική επιτροπή:

1. Καθηγητής **Ιωάννης Γεροθανάσης**
2. Καθηγητής **Θεόδωρος Φώτσης**
3. Αναπλ. Καθηγητής **Αναστάσιος Ν. Τρογκάνης**
4. Καθηγητής **Ευάγγελος Μπριασούλης**
5. Αναπλ. Καθηγήτρια **Θεώνη Τράγκα**
6. Επίκουρος **Ανδρέας Τζάκος**
7. Επίκουρος **Ευάγγελος Κωλέττας**

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ σημαντικό τμήμα της πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών 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 την 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.

Ευχαριστώ θερμά επίσης τον Επικ. Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα για την άμεση συνεργασία και καθοδήγηση, τις εύστοχες υποδείξεις και το συνεχές ενδιαφέρον που επέδειξε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής και την προθυμία του να βοηθήσει σε κάθε μου απορία και δυσκολία.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής. Καταρχήν, ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Φώτση για την ζεστή φιλοξενία του στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών του οποίου και αισθάνθηκα να αποτελώ μέλος. Τον ευχαριστώ για το ενδιαφέρον και την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις στις επιστημονικές μας συζητήσεις. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Τρογκάνη Αναστάσιο για τα εύστοχα σχόλια και υποδείξεις κατά την διόρθωση της παρούσας διατριβής.

Σημαντική ήταν η συμβουλή του προσωπικού του Κέντρου NMR του Τμήματος Χημείας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά την αγαπημένη φίλη και συνεργάτη Δρ. Βασιλική Εξάρχου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη για την σημαντική συμβολή του και βοήθεια στην λήψη φασμάτων NMR και την παραγωγική μας συνεργασία. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τους κ. Μπριασούλη και κ. Κωλέττα για την σημαντική συνεισφορά τους και τις επιστημονικές τους υποδείξεις σε ένα σημαντικό κομμάτι της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους αγαπημένους φίλους και συναδέλφους Χαρισιάδη Παντελή, Καραλή Ευδοξία, Κωσταρά Ελευθέριο, Κοντογιάννη Βασιλική και Nisar Sayyad για την άψογη συνεργασία, για τις ατελείωτες ώρες επιστημονικών συζητήσεων και για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσης διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Παππά Χαράλαμπο, Κυριακού Ελένη, Χατζηκωνσταντίνου Αλεξάνδρα, Σακκά Μαριάννα, Παπαδάκη Στελίνα, Χατζηαθανασιάδου Μαρία και Μαυρογιαννάκη Έφη για το φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον του εργαστηρίου. Ευχαριστώ θερμά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του

Ινστιτούτου Βιοιατρικών Ερευνών που ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν τη βοήθειά τους αλλά και για το φιλικό περιβάλλον.

Ευχαριστώ πολύ τις καλές μου φίλες μου και συμφοιτήτριες Πουρνάρα Αναστασία και Αναστασοπούλου Ρούλα που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και μου στάθηκαν σε κάθε δυσκολία.

Τέλος, το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Πανδώρα και Ιωάννη, για την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που στάθηκαν δίπλα μου όχι μόνο ηθικά και οικονομικά αλλά και για την παρότρυνση και στήριξή τους να ακολουθήσω τα ενδιαφέροντα και τις σπουδές μου. Σ' αυτούς και στα αγαπημένα μου αδέρφια Δημήτρη και Ιωάννη αφιερώνω τη διατριβή μου με όλη μου την αγάπη.

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής οι παρακάτω εργασίες έχουν ήδη δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ή βρίσκονται υπό κρίση:

1. Unprecedented Ultra-High-Resolution Hydroxy Group ^1H NMR Spectroscopic Analysis of Plant Extracts.

Charisiadis P., Primikyri A., Exarchou V., Tzakos A. and Gerothanassis I.P., *J. of Nat. Prod.*, **2011**, 74, 2462-2466.

2. Unexpected Enzyme-Catalyzed Regioselective Acylation of Flavonoid Aglycones and Rapid Product Screening.

Kyriakou E., Primikyri A., Charisiadis P., Katsoura M., Gerothanassis I. P., Stamatis H. and A. G. Tzakos, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 1739-1742.

3. Fine-Tuning of the Diffusion Dimension of -OH Groups for High Resolution DOSY NMR Applications in Crude Enzymatic Transformations and Mixtures of Organic Compounds.

Primikyri A., Kyriakou E., Charisiadis P., Tsiafoulis C., Stamatis H., Tzakos A. G. and Gerothanassis I. P., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 6887-6891.

4. Hydrogen bonding probes of phenol –OH groups.

Kontogianni V.G., Charisiadis P., Primikyri A., Pappas C.G., Exarchou V., Tzakos A.G. and Gerothanassis I.P., *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 1013-1025.

5. Decoding the Apoptotic Activity of Quercetin: Interaction with Bcl-2 family Proteins.

Primikyri A., Karali E., Kostaras E., Manztaris M.D., Chatziathanasiadou M., Hatzimichael E., Shin J.-S., Chi S.-W., Briasoulis E., Gerothanassis I. P., Tzakos A.G. *submitted*.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Φυσικά Προϊόντα και Σχεδιασμός Φαρμάκων.....	1
1.1 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή φαρμάκων.....	1
1.2 Ο ρόλος φυσικών προϊόντων στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων	5
2. Κατηγορίες Φυσικών προϊόντων και Βιοσύνθεση	9
2.1 Κύριες κατηγορίες πολυφαινολών	9
2.2 Φλαβονοειδή και Βιοσύνθεση	10
2.2.1 Ανθοκυανίνες και Ανθοκυανιδίνες	14
2.2.2 Φλαβανόνες.....	14
2.2.3. Φλαβονόλες.....	14
2.2.4 Φλαβονόλες.....	15
2.2.5 Φλαβόνες	16
2.2.6 Ισοφλαβόνες.....	16
3. Φασματοσκοπία NMR: Μελέτη Φυσικών Προϊόντων και Συμβολή στην Ανάπτυξη Φαρμάκων	19
3.1 Προσδιορισμός δομικών και διαμορφωτικών χαρακτηριστικών ιδιοτήτων φυσικών προϊόντων με φασματοσκοπία NMR 1D και 2D.....	19
3.1.1 Φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης (1D ^1H και ^{13}C NMR).....	20
3.1.2 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης Πρωτονίων μέσω Δεσμών (Correlated Spectroscopy ^1H - ^1H COSY NMR).	22
3.1.3 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Ολικής Συσχέτισης (Total Correlated Spectroscopy ^1H - ^1H TOCSY NMR).....	22
3.1.4 Ετεροπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης Απλού Κβάντου ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Correlation, ^1H - ^{13}C HSQC NMR).	23
3.1.5 Ετεροπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Corellation ^1H - ^{13}C HMBC NMR).	23
3.1.6 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου NOE ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy ^1H - ^1H NOESY NMR).....	24
3.1.7 Φασματοσκοπία Διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy) για την μελέτη μιγμάτων.	26
3.2 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων.	29
3.2.1 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR).....	32
3.2.2 Χρήση του μεταφερόμενου φαινομένου Overhauser (transferred nuclear Overhauser effect, tr-NOE) για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό της πρόσδεσης υποκαταστάτη.	36
3.2.3 Φασματοσκοπία In-cell NMR.	37
4. Βιολογική δραστικότητα φλαβονοειδών	45
4.1 Αντιοξειδωτική δραστικότητα φλαβονοειδών.....	45
4.1.1 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης μέσω συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων.....	47
4.1.2 Πειραματικές και θεωρητικές μελέτες συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων με φλαβονοειδή στη διεθνή βιβλιογραφία.....	48
4.2 Αντικαρκινική δράση φλαβονοειδών.	50
4.2.1 Μελέτες αντικαρκινικής δράσης φλαβονοειδών και συσχέτιση δομής-δράσης.....	52
4.2.2 Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης φλαβονοειδών.	56
4.2.2.1 Αντιαγγειογενετική δράση φλαβονοειδών.	56
4.2.2.2 Αποπτωτική δράση φλαβονοειδών.	59
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	69
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	73

1. Λήψη φασμάτων NMR	73
1.1 Αντιδραστήρια	73
1.2 Οργανολογία	73
1.3 Λήψη φασμάτων DOSY	73
1.4 Λήψη φασμάτων STD	74
1.5 Λήψη φασμάτων tr-NOESY NMR	75
1.6 Λήψη φασμάτων 2D ^1H - ^{15}N HSQC	75
2. Υπολογισμοί πρόσδεσης	76
3. Βιολογικά πειράματα	76
3.1 Κυτταρικές καλλιέργειες	76
3.2 Υπολογισμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού	77
3.3 Έλεγχος αποπτωτικής δράσης	77
3.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της Bcl-xL	78
3.5 Πειράματα pull down	78
3.6 Πείραμα BrdU ανοσοφθορισμού	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΕΛΕΤΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	83
1.1 Δομικές μελέτες φλαβονοειδών με φασματοσκοπία NMR	83
1.1.1 Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία 1D και 2D NMR (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC)	84
1.1.2 Μελέτη της ισχύς του δεσμού υδρογόνου	91
1.1.3 Επιδράσεις του διαλύτη στις χημικές μετατοπίσεις ^1H των φαινολικών OH ομάδων	95
1.1.4 Επιδράσεις της θερμοκρασίας στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των φαινολικών OH ομάδων	96
1.1.5 Δομικές μελέτες NMR 2D ^1H - ^1H NOESY	100
1.2 Μελέτη του συντελεστή διάχυσης και διαχωρισμός μιγμάτων φλαβονοειδών με φασματοσκοπία DOSY NMR	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΙΟΝΤΑ	117
2.1 NMR μελέτη του συμπλόκου κερσετίνης-ψευδαργύρου(II) και λουτεολίνης-ψευδαργύρου(II)	117
2.2 Πειράματα NMR μεταβλητής θερμοκρασίας	121
2.3 Πειράματα NMR DOSY-προσδιορισμός μοριακού βάρους του συμπλόκου κερσετίνης-Zn(II)	123
2.4 Θεωρητική μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων κερσετίνης-Zn(II) και λουτεολίνης-Zn(II) σε επίπεδο DFT υπολογισμών	124
2.5 Μελέτη οξείδωσης της κερσετίνης και ανταγωνισμού των μετάλλων Zn(II) και Fe(II) ως προς τη συμπλοκοποίηση με την κερσετίνη	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	137
3.1 Μελέτη κυτταροτοξικής δραστηριότητας των φλαβονοειδών ενάντια σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές	137
3.2 Συσχέτιση δομής-δραστηριότητας των φλαβονοειδών	139
3.3 Έλεγχος της ανασταλτικής δράσης της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs	142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	145
4.1 Αντιπολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση της κερσετίνης στη λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat	145
4.2 Βιοχημικές μελέτες με χρωματογραφία συγγένειας (pull down assays)	148
4.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL με τη χρήση μεταβολών χημικών μετατοπίσεων αμινοξέων με φασματοσκοπία NMR ^1H - ^{15}N HSQC και θεωρητικούς υπολογισμούς πρόσδεσης	151

4.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης αμινοξικού παραγώγου της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL με χρήση φασματοσκοπίας ^1H - ^{15}N HSQC και in-cell STD NMR.	155
4.5 Μελέτη αλληλεπίδρασης αμινοξικού παραγώγου της κερσετίνης με την πρωτεΐνη Bcl-2 με τη χρήση φασματοσκοπίας TR-NOESY in-cell NMR.	165
4.6 Μελέτη ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων H-8 και H-6 φλαβονοειδών.....	172
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	179
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	183
SUMMARY	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	187

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

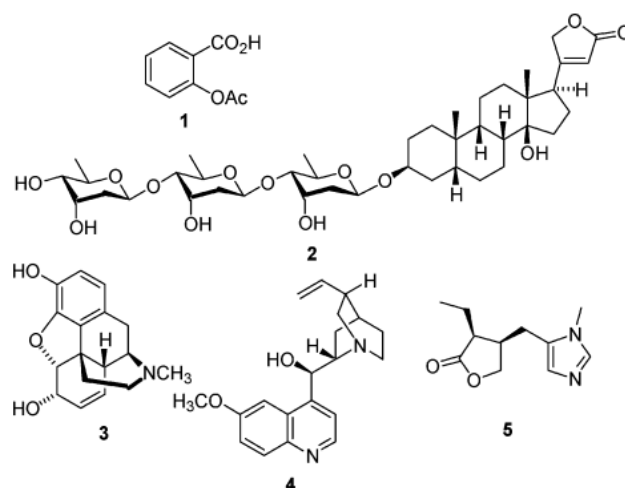
1.Φυσικά Προϊόντα και Σχεδιασμός Φαρμάκων

1.1 Τα φυσικά προϊόντα ως πηγή φαρμάκων.

Από πολύ νωρίς στην ιστορία της Ιατρικής η διατροφή συνδέθηκε άμεσα με την πρόληψη και την θεραπεία ασθενειών, με τον Ιπποκράτη, τον πατέρα της σύγχρονης Ιατρικής, να επισημαίνει το 480 π.Χ. ότι θα πρέπει η τροφή να γίνει το φάρμακό μας και το φάρμακο να είναι η τροφή μας. Στο «Περί Διαιτήσης» έργο του αναφέρει ότι για να συστήσει κάποιος ωφέλιμη διατροφή απαιτείται πρωτίστως καλή γνώση και διάκριση της ανθρώπινης φύσης γενικά, γνώση δηλαδή των στοιχείων από τα οποία ο άνθρωπος συνετέθη εξ αρχής και να είναι δυνατή η διάκριση από ποια μέρη του σώματος ελέγχονται. Θα πρέπει επίσης να γνωρίζει τον ρόλο των διαφόρων τροφών και τις δυνατότητες που έχει η κάθε μία από τη φύση, την ανάγκη και την ανθρώπινη επεξεργασία. Αυτό που ο Ιπποκράτης καλούσε «ανθρώπινη φύση» αποτελεί αυτό που στη σύγχρονη επιστήμη καλείται «γενετική» [Reddy et al., 2003].

Ο Γαληνός (129-200 μ.Χ.), ο δεύτερος μεγαλύτερος ιατρός της αρχαιότητας, ο οποίος και συστηματοποίησε μία εκλογικευμένη ιατρική πρακτική που στηρίχτηκε στην κληρονομιά του Ιπποκράτη, δίδαξε τη σημασία της διατροφής και της χρήσης των φυτικών προϊόντων στην πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών. Κατέγραψε 540 φαρμακευτικά φυτά περιγράφοντας τη μορφολογία και τις ιδιότητές τους και διαπίστωσε ότι τα φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν διάφορα συστατικά τα οποία ασκούν διαφορετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Για το λόγο αυτό παρασκεύαζε σύνθετα φάρμακα που περιείχαν διάφορα συστατικά σε διαφορετικές αναλογίες [Ji et al., 2009].

Η χρήση και η σημασία των φυσικών προϊόντων στο πέρας των αιώνων στην Ιατρική και στην θεραπεία έχει παραμείνει ιδιαίτερα υψηλή και έτσι σήμερα διαθέτουμε ένα πλούσιο ιστορικό αρχείο από τους αρχαίους επιστήμονες (physicians) για το πώς είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα φυσικά φάρμακα μόνα τους ή και σε συνδυασμό, γεγονός που μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Κλινικές, φαρμακολογικές και χημικές μελέτες των παραδοσιακών αυτών φαρμάκων τα οποία προήλθαν κυρίως από φυτά, αποτέλεσαν τη βάση των πρώτων φαρμάκων όπως η ασπιρίνη (1), η διγίτοξίνη (2), η μορφίνη (3), η κινίνη (4) και η πιλοκαρπίνη (5) (Εικόνα 1.1.1) [Butler M., 2004].



Εικόνα 1.1.1 Δομές φαρμάκων από φυσικά προϊόντα.

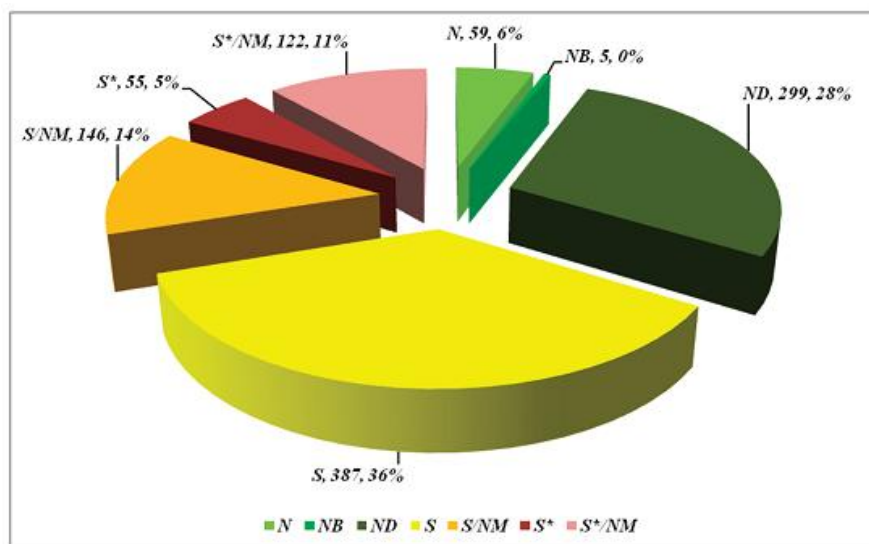
Ιστορικά τα φυσικά προϊόντα έχουν προσφέρει μια αστείρευτη πηγή φαρμάκων και παρόλη τη διαφοροποίηση της τεχνολογίας ανάπτυξης φαρμάκων και τη μειωμένη χρηματοδότηση για το σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τα φυσικά προϊόντα, παραμένουν μια αστείρευτη πηγή φαρμακευτικών. Πράγματι, παρά τη μείωση της βιομηχανικής χρηματοδότησης για την ανάπτυξη φαρμάκων με βάση τα φυσικά προϊόντα από το 1984 έως και το 2003, το ποσοστό των πατεντών που αφορούν μικρά μόρια προερχόμενα από φυσικά προϊόντα παραμένει σταθερό [Schmidt et al., 2007].

Παρόλο που η συνδυαστική χημεία αποτελεί την κύρια πηγή σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων, έως και σήμερα μόνο μια de novo χημική ένωση έχει αναφερθεί ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μεθόδου και έχει εγκριθεί ως φάρμακο. Πρόκειται για το αντικαρκινικό φάρμακο sorafenib (Nexavar, 1) της Bayer που εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2005 για τη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκίνου, ενώ το 2007 εγκρίθηκε και για τη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [Newman et al., 2012].

Ο Macarron στην εργασία του με τίτλο «Critical review of the role of HTS in drug discovery» το 2006 τόνισε τον πέμπτο κανόνα του Lipinski όπου αναφέρει ότι τα φυσικά προϊόντα δεν ακολουθούν τους υπόλοιπους τέσσερις κανόνες ανάπτυξης φαρμάκων που αφορούν το μοριακό βάρος, τον αριθμό δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου και τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού που αφορά την μεμβρανική διαπερατότητα [Macarron, 2006]. Παρόλα τα μειωμένα επίπεδα χρηματοδότησης ερευνών που αφορούν την ανάπτυξη φαρμάκων με βάση τα φυσικά προϊόντα από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες, έπειτα από εκτεταμένη μελέτη του ποσοστού των εγκεκριμένων νέων χημικών ουσιών (NCE-new chemical entities) προκύπτει ότι ακόμη και το 2010 το πεδίο των φυσικών προϊόντων ήταν ιδιαίτερα παραγωγικό συμμετέχοντας με ποσοστό 50% επί του συνόλου των μικρών μορίων της δεκαετίας 2000 έως και 2010

(Εικόνα 1.1.2). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι το 2010 τα μισά από τα 20 εγκεκριμένα μικρά μόρια (NCEs) ανήκουν σε κατηγορίες φυσικών προϊόντων (“N”), συμπεριλαμβάνοντας και την πλειοψηφία των αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα έτη 2000, 2001 και 2002 ένας σημαντικός αριθμός φαρμάκων παραγώγων φυσικών προϊόντων κατατάχθηκαν στα 35 πρώτα φάρμακα στις παγκόσμιες πωλήσεις [Newman et al., 2012].

Τα τελευταία χρόνια άρχισε να επανακάμπτει το ενδιαφέρον για την έρευνα των φυσικών προϊόντων λόγω των αποτυχημένων προσπαθειών μεθόδων ανάπτυξης φαρμάκων θεραπευτικών κλάδων όπως ανοσοκατασταλτικών, αντιμολυσματικών και μεταβολικών ασθενειών. Για να παραμείνει ανταγωνιστικός ο τομέας αυτός απαιτείται η επιτάχυνση των διαδικασιών σάρωσης, απομόνωσης και ταυτοποίησης της δομής, προσαρμόζοντας την καταλληλότητα των μεθόδων σάρωσης σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων και αντιμετωπίζοντας θέματα που προκύπτουν σχετικά με την προώθηση στην αγορά μεγάλων ποσοτήτων των ενώσεων αυτών [Butler M., 2004].



Εικόνα 1.1.2. Πηγές μικρών μορίων ως εγκεκριμένων φαρμάκων.

Κύριες κατηγορίες πηγών NCEs (εγκεκριμένων μικρών μορίων):

“B”: βιολογικά, συνήθως ένα μεγάλο πεπτίδιο (>45 αμινοξέα) ή πρωτεΐνη είτε απομονωμένη από έναν οργανισμό/κυτταρική σειρά είτε παραγόμενη από βιοτεχνολογικά μέσα.

“N”: φυσικό προϊόν

“NB”: φυσικό προϊόν «βοτανικό» (γενικά αυτή η κατηγορία εγκρίθηκε πρόσφατα)

“ND”: Παράγωγο φυσικών προϊόντων και προέρχεται συνήθως από ημι-συνθετική μετατροπή

“NM”: Μιμητές φυσικών προϊόντων

“S”: Απόλυτα συνθετικό φάρμακο, που συχνά ανακαλύπτεται από τυχαία σάρωση/μετατροπή μιας ήδη υπάρχουσας ένωσης.

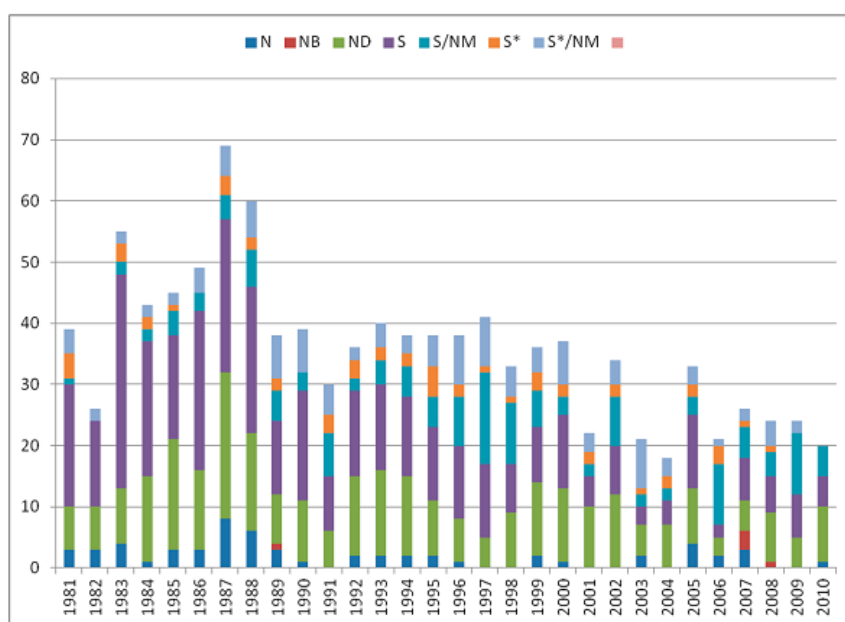
“S*”: Απόλυτα συνθετικό, αλλά το φαρμακοφόρο είναι/ήταν κάποιο φυσικό προϊόν.

“V”: Εμβόλιο

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έτσι, πιο αναλυτικά από 01/01/1981 έως και 31/12/2010 εγκρίθηκαν 104 μικρά μόρια φάρμακα με αντι-βακτηριδιακή δράση εκ των οποίων αυτά που ανήκουν στις κατηγορίες “N” και “ND” αντιστοιχούν σχεδόν στο 75% του συνόλου. Σε αντίθεση με την αντιβακτηριδιακή δράση, στο πεδίο των αντιμυκητιακών φαρμάκων, ο αριθμός των μικρών μορίων αντιστοιχεί στα 28 φάρμακα, αλλά στο ίδιο εύρος των 30 χρόνων μόλις τρία φάρμακα αντιστοιχούν στην “ND” κατηγορία σε ποσοστό 10% των εγκεκριμένων φαρμάκων. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των αντικών μικρών μορίων μόλις 48 φάρμακα έχουν εγκριθεί για το ίδιο χρονικό διάστημα με μόλις 8% να αντιστοιχεί σε παράγωγα φυσικών προϊόντων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη θεραπεία του καρκίνου από το 1940 έως και σήμερα από ένα σύνολο 175 μικρών μορίων, τα μόρια που προέρχονται άμεσα από φυσικά προϊόντα αποτελούν το 48.6%. Από τα εγκεκριμένα αντικαρκινικά φάρμακα, για το χρονικό διάστημα 01/1981 έως και 12/2010, τα μικρά μόρια ανέρχονται σε ποσοστό 77% και από αυτά μόλις το 20.2% ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών φαρμάκων (Εικόνα 1.1.3). Είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό το γεγονός ότι ο αριθμός των μικρών μορίων - αντικαρκινικών φαρμάκων εμπνευσμένων από τη φύση (N, ND, NB, S/NM, S*, S*/NM) φτάνει σε ποσοστό 74.9%.



Εικόνα 1.1.3. Πηγές μικρών μορίων ως νέων χημικών ουσιών ως συνάρτηση του χρόνου.

“N”: φυσικό προϊόν

“NB”: φυσικό προϊόν «βοτανικό» (γενικά αυτή η κατηγορία εγκρίθηκε πρόσφατα)

“ND”: Παράγωγο φυσικών προϊόντων και προέρχεται συνήθως από ημι-συνθετική μετατροπή

“NM”: Μιμητές φυσικών προϊόντων

“S”: Απόλυτα συνθετικό φάρμακο, που συχνά ανακαλύπτεται από τυχαία σάρωση/μετατροπή μιας ήδη υπάρχουσας ένωσης.

“S*”: Απόλυτα συνθετικό, αλλά το φαρμακοφόρο είναι/ήταν κάποιο φυσικό προϊόν.

Από τα επτά αντικαρκινικά φάρμακα που εγκρίθηκαν το 2010, παρόλο το μειωμένο ενδιαφέρον των μεγάλων φαρμακευτικών εταιρειών τα τελευταία 20 χρόνια, το ένα, η ρομιδεψίνη που είναι και αναστολέας της ιστόνης διακετυλάσης (HDAC), είναι ένα φυσικό προϊόν μικροβιακής προέλευσης χωρίς καμία μετατροπή και παρόλο που έχει συντεθεί, παράγεται ακόμα από ζύμωση. Από τα υπόλοιπα έξι, τα τέσσερα προέρχονται από φυσικά προϊόντα με τα τρία από αυτά (vinflunine, cabazitaxel και την eribulin) να επιδρούν το καθένα σε διαφορετικές θέσεις της τουμπουλίνης [VanderMolen et al., 2011].

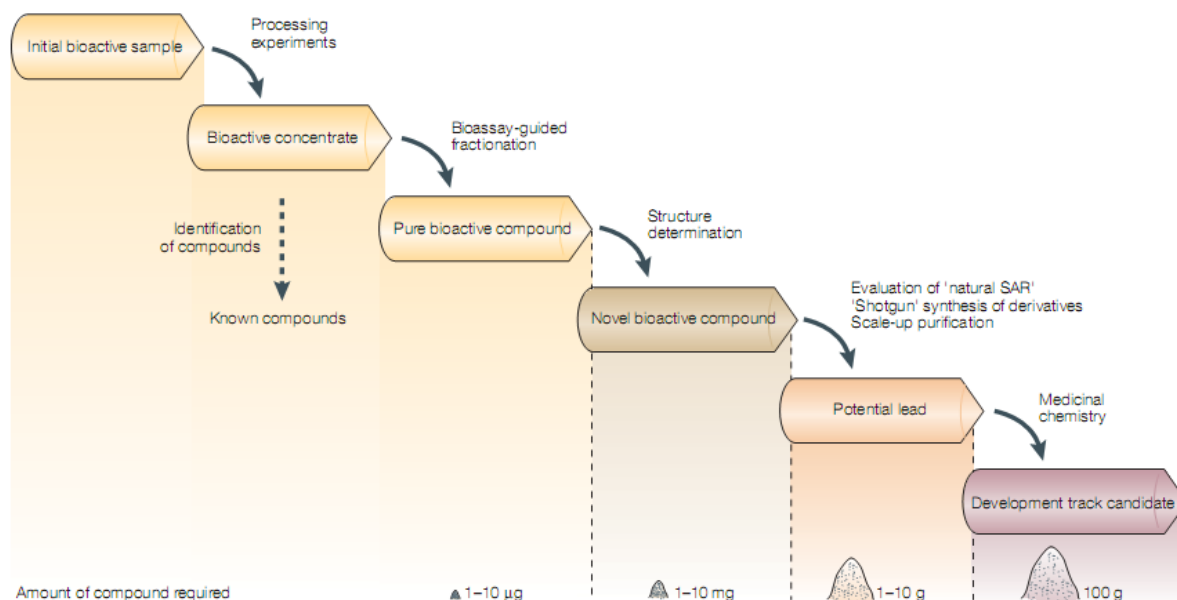
1.2 Ο ρόλος φυσικών προϊόντων στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων αποτελεί μία πολύπλοκη, διεπιστημονική αναζήτηση χημικών, φαρμακευτικών και κλινικών επιστημών που έχει ωφελήσει ιδιαίτερα την ανθρωπότητα τα τελευταία 100 χρόνια (Εικόνα 1.2.1). Παρά το γεγονός ότι η ανάπτυξη φαρμάκων παραδοσιακά αποτελεί μία δύσκολη και υψηλού κόστους διαδικασία, το ποσό των χρημάτων που επενδύεται σε R&D και σε κλινική ανάπτυξη έχει αυξηθεί κατακόρυφα, παρότι η εισαγωγή νέων φαρμάκων στην αγορά έχει ελαττωθεί σημαντικά, κάτι που έχει προκαλέσει ποικίλες συζητήσεις για τα αίτια και τις συνέπειες στη βιομηχανία. Μία πιθανή αιτία της έλλειψης φαρμάκων «οδηγών» από τις συνθετικές βιβλιοθήκες σε ορισμένους θεραπευτικούς ερευνητικούς τομείς όπως λοιμώξεις, νεοπλασίες, ανοσολογικές και μεταβολικές ασθένειες είναι ο διαφορετικός «χημικός χώρος» που καλύπτεται από τα φυσικά προϊόντα και τις συνθετικές ενώσεις [Butler M., 2004].

Αυτή η διαφορά στο «χημικό χώρο» καθιστά τα φυσικά προϊόντα μία ιδιαίτερα ελκυστική εναλλακτική λύση για τις συνθετικές βιβλιοθήκες, ειδικά στους θεραπευτικούς τομείς που παρουσιάζουν έλλειψη «οδηγών» ενώσεων. Έτσι πραγματοποιούνται προσπάθειες να καλυφθεί ο χώρος αυτός όπως για παράδειγμα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται ως πρότυπες ενώσεις (starting templates) στη σύνθεση ενώσεων σε συνδυαστικές βιβλιοθήκες. Τα φυσικά προϊόντα ως φαρμακοφόρα παρουσιάζονται σε λίστες ως ιδιαίτερα «προνομιακές δομές», γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς υποψήφιους ως δομικές μονάδες βιολογικά σχετιζόμενων χημικών βιβλιοθηκών. Οι «προνομιακές» αυτές δομές αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών στόχων για συγκεκριμένους σκοπούς και έχουν γίνει αποτελεσματικά φάρμακα σε ένα μεγάλο εύρος θεραπευτικών ενδείξεων. Τα φυσικά προϊόντα εκτός από την ικανότητα πρόσδεσης των ενζυμικών ενεργών κέντρων και τη λειτουργία τους ως αναστολέων κατάλυσης, χαρακτηρίζονται και από την ικανότητα να προσδένουν ποικιλία

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

πρωτεϊνικών περιοχών και αναδιπλωμένων μοτίβων αναστέλλοντας πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, τα μόρια αυτά είναι αποτελεσματικοί ρυθμιστές των κυτταρικών διαδικασιών όπως η ανοσολογική απόκριση, η μεταγωγή σημάτων, η μίτωση και η απόπτωση [KoeHN et al., 2005].



Εικόνα 1.2.1. Διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκου από φυσικό προϊόν. Το προϊόν αυτό παραλαμβάνεται από φυσική πηγή ως εκχύλισμα το οποίο συμπυκνώνεται, κλασματώνεται και καθαρίζεται με στόχο την απομόνωση ενός βιολογικά ενεργού μορίου. Η ταυτοποίηση πραγματοποιείται με διάφορες αναλυτικές τεχνικές LC-MS, NMR κ.α. Στις περιπτώσεις που το προφίλ της βιολογικής δραστηριότητας πληρεί τα κριτήρια δραστηριότητας και εκλεκτικότητας, πραγματοποιούνται περαιτέρω μελέτες συσχέτισης δομής-δραστηριότητας και η διαδικασία καθαρισμού πραγματοποιείται σε μεγαλύτερες ποσότητες. Στην περίπτωση που είναι ικανή η ρύθμιση της βιολογικής απόκρισης με συνθετικές τροποποιήσεις η ένωση (hit) αποκαλείται ένωση «οδηγός» και προωθείται για επιπλέον βελτιστοποίηση με μεθόδους της ιατρικής χημείας [KoeHN et al., 2005].

Η πολυπλοκότητα και η υψηλή χημική ποικιλομορφία των φυσικών προϊόντων, η διατήρηση υψηλής επιλεκτικότητας και εξειδίκευσης σε βιολογικές δράσεις και άλλες μοριακές τους ιδιότητες τα καθιστούν ευνοϊκούς παράγοντες για χρήση τους ως ενώσεις «οδηγούς» στη σχεδίαση φαρμάκων [Cragg et al., 2013]. Από πλήθος συγκριτικών μελετών έχει προκύψει ότι τα φυσικά προϊόντα τυπικά φέρουν μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηριστικών ομάδων και χηλικών κέντρων και αυξημένη στερική πολυπλοκότητα σε σύγκριση με τα συνθετικά φάρμακα ή συνδυαστικές βιβλιοθήκες. Παρά το γεγονός ότι τα φάρμακα και τα συνδυαστικά μόρια τείνουν να περιέχουν σημαντικά υψηλό αριθμό ομάδων αζώτου, θείου και αλογόνων, τα φυσικά προϊόντα περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηριστικών ομάδων οξυγόνου. Από διάφορες στατιστικές αναλύσεις τα

φυσικά προϊόντα διαφέρουν σημαντικά: (i) ως προς την αναλογία των ατόμων που φέρουν οι αρωματικοί δακτύλιοι με το σύνολο των βαρέων ατόμων να είναι μικρότερο σε σχέση με τα συνθετικά φάρμακα και τις συνδυαστικές βιβλιοθήκες, (ii) ως προς τον αριθμό των δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου που είναι υψηλότερος και (iii) ως προς την υψηλότερη μοριακή ακαμψία [Feher et al., 2003; Lee et al., 2001; Stahura et al., 2000].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Butler M. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 2141-2153.

Cragg G., Newman D. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, *1830*, 3670-3695.

Feher M., Schmidt J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2003**, *43*, 218-227.

Ji H.-F., Li X.-J., Zhang H.-Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep.*, **2009**, *10*, 194-200.

Koehn F., Carter G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, **2005**, *4*, 206-220.

Lee M. L., Schneider G. Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: Application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *J. Comb. Chem.*, **2001**, *3*, 284-289.

Macarron R. Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov. Today*, **2006**, *11*, 277-279.

Newman D., Cragg G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311-335.

Reddy L., Odhav B., Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol. Ther.*, **2003**, *99*, 1-13.

Schmidt B.M., Ribnicky D.M., Lipsky P.E., Raskin I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 360-366.

Stahura F., Godden J. W., Ling X., Bajorath J. Distinguishing between natural products and synthetic molecules by descriptor Shannon entropy analysis and binary QSAR calculations. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2000**, *40*, 1245-1252.

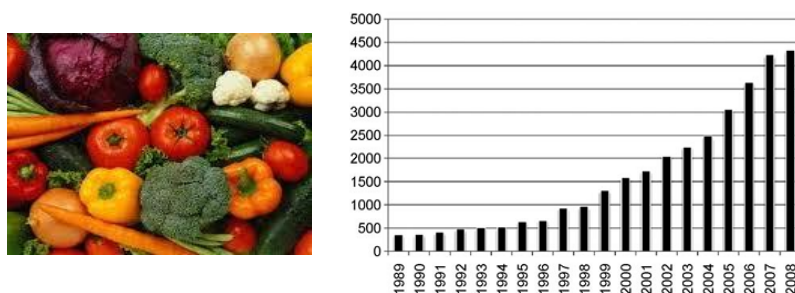
VanderMolen K.M., McCulloch W., Pearce C.J., Oberlies N.H. Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma. *J. Antibiot.*, **2011**, *64*, 525-531.

2. Κατηγορίες Φυσικών προϊόντων και Βιοσύνθεση

2.1 Κύριες κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν συστατικά των φυτικών προϊόντων και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον όχι μόνο της επιστημονικής κοινότητας αλλά και του ευρύτερου κοινού λόγω της παρουσίας και της αφθονίας τους στη διατροφή όπως λαχανικά, φρούτα, καρπούς, σπόρους και αφεψήματα των οποίων η συχνή κατανάλωση έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ωφέλιμη για την ανθρώπινη υγεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες που αφορούν φαρμακευτικές ιδιότητες πολυφαινολών και έχει αποδειχθεί τόσο με *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες ότι αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά με ιδιαίτερα σημαντική συμβολή στην πρόληψη ασθενειών και πιο συγκεκριμένα διαφόρων τύπων καρκίνου, καρδιαγγειακών καθώς και νευροεκφυλιστικών παθήσεων.

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει σημαντική κατακόρυφη αύξηση στον αριθμό των επιστημονικών δημοσιεύσεων που αφορούν τις πολυφαινόλες (Εικόνα 2.1.1). Σ' αυτές περιλαμβάνονται πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες που επιβεβαιώνουν τη σημασία των φυσικών αυτών προϊόντων στην πρόληψη ασθενειών. Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι οι πολυφαινόλες δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και ενεργές μορφές οξυγόνου (π.χ. ROS) οι οποίες παράγονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε συνθήκες οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα οι ενδογενείς κυτταρικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες όπως η γλουταθειόνη (GSH), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, ή ακόμα και οι διατροφικές αντιοξειδωτικές βιταμίνες όπως E και C και τα καροτενοειδή, να αδυνατούν να τις δεσμεύσουν [Quideau et al., 2011].



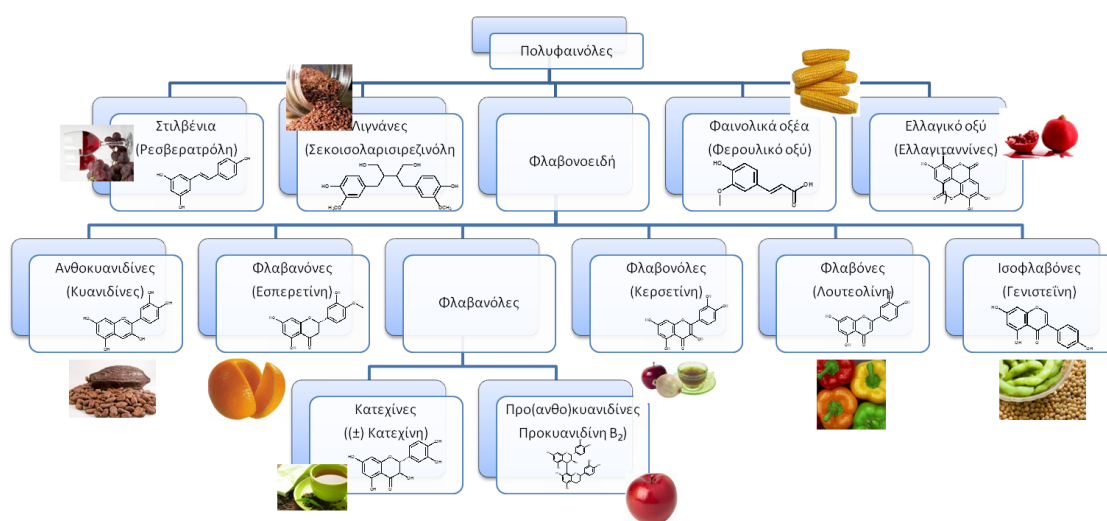
Εικόνα 2.1.1 Εξέλιξη του αριθμού των δημοσιεύσεων που αφορούν πολυφαινόλες από το 1989 έως και το 2008 (πηγή: SciFinder Scholar).

Τα φυσικά προϊόντα παράγονται από τα φυτά με μία εντυπωσιακά μεγάλη βιοποικιλότητα και αποτελούνται από περισσότερα από 40.000 διαφορετικά τερπενοειδή, 20.000 φαινολικές ενώσεις και 5.000 αλκαλοειδή που είναι γνωστά προς το παρόν. Παρά το γεγονός ότι ο πραγματικός ρόλος των φυτοχημικών ενώσεων, τα οποία

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

επίσης αναφέρονται και ως δευτερογενείς μεταβολίτες, παραμένει κυρίως άγνωστος, τα φυτά χρησιμοποιούν έναν περιορισμένο αριθμό από αρκετά περίπλοκα βιοσυνθετικά μονοπάτια για την παραγωγή τους, καταναλώνοντας πολύ ενέργεια για την σύνθεση, συγκέντρωση και διαλογή [Lewinsohn et al., 2009].

Οι πολυφαινόλες διαφέρουν μεταξύ τους τόσο χημικά όσο και ως προς τη φυσιολογία και έτσι κατηγοριοποιούνται σε πέντε κύριες υπο-ομάδες. Η κατηγοριοποίηση γίνεται σύμφωνα με την χημική τους δομή και την παρουσία υδροξυλομάδων στους αρωματικούς δακτυλίους (Εικόνα 2.1.2) Παρακάτω θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στα флаβονοειδή και στις υποκατηγορίες.



Εικόνα 2.1.2 Κύριες κατηγορίες πολυφαινολών και υποκατηγορίες флаβονοειδών.

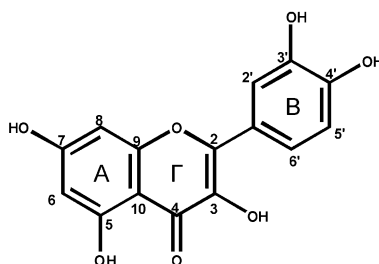
2.2 Φλαβονοειδή και Βιοσύνθεση

Τα флаβονοειδή αποτελούν μία από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών με περισσότερα από 6500 μόρια. Έχουν ως βάση ένα 15μελή-ανθρακικό σκελετό και περιλαμβάνουν 12 υποκατηγορίες. Ως φυσικά διατροφικά φυτοχημικά, τα флаβονοειδή έχουν ελκύσει την προσοχή εξαιτίας των πειραματικών και κλινικών ερευνών που τα προτείνουν ως καρδιοπροστατευτικούς, νευροπροστατευτικούς και χημειοπροστατευτικούς παράγοντες [Rice-Evans C., 2004].

Είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλο το φυτικό βασίλειο και είναι άφθονα σε πολλά φυτά, φρούτα και φύλλα. Ο κύριος ρόλος τους είναι ο σχηματισμός των κόκκινων και μωβ χρωστικών ουσιών ανθοκυάνης, ενώ μη-χρωστικές ενώσεις флаβονοειδών χρησιμεύουν ως σήματα για επικοινωναστές και για άλλους ωφέλιμους οργανισμούς, παίζουν έναν ουσιώδη ρόλο στην αναπαραγωγή συμμετέχοντας στη σηματοδότηση με φυτικές ορμόνες και στη βλάστηση του σωλήνα της γύρης, προστατεύουν τα φυτά από

την UV-B ακτινοβολία, και λειτουργούν ως φυτοαλεξίνες και αλληλοπαθητικές ενώσεις [Tan et al., 2006].

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά τους είναι δύο βενζολικοί δακτύλιοι (δακτύλιος Α και Β) συνδεδεμένοι από μία 3-ανθρακική γέφυρα, για τις χαλκόνες, ή από έναν πυρανικό ή από έναν πυρονικό δακτύλιο (δακτύλιος Γ). Έχουν χαρακτηριστεί περισσότερα από 6000 φλαβονοειδή, και αυτός ο αριθμός αυξάνει συνεχώς λόγω της μεγάλης δομικής ποικιλομορφίας. Ως συνέπεια υποδιαιρούνται σε πολλές οικογένειες, π.χ. φλαβόνες, φλαβονόλες (Σχήμα 2.2.1), φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβαν 3-όλες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες [Hollman et al., 1999].



Σχήμα 2.2.1 Χημική δομή της φλαβονόλης κερσετίνης.

Η αφθονία των βιολογικών και βιοχημικών τους ιδιοτήτων είναι στενά συνδεδεμένη με την ποικιλία των τροποποιήσεων στη δομή τους. Οι διαφορές στον αριθμό και στην κατανομή των υδροξυλικών ομάδων ως προς τους τρεις φαινολικούς δακτυλίους καθώς και οι υποκαταστάσεις τους, όπως μεθυλομάδες, υδροξυλομάδες, γλυκοζίτες, ακυλ- ομάδες, είναι υπεύθυνες για το μεγάλο εύρος των βιολογικών τους δράσεων, όπως επίσης και η ποικιλομορφία του δακτυλίου Γ και η παρουσία ή μη γλυκοζιτών [Quideau et al., 2011]. Η γλυκοζυλίωση καθιστά τα φλαβονοειδή λιγότερο δραστικά και περισσότερο υδατοδιαλυτά με τη γλυκόζη να είναι το πιο συχνό σάκχαρο των φλαβονοειδών ακολουθούμενο από τη γαλακτόζη, τη ραμνόζη κ.α. [Veitch et al., 2008].

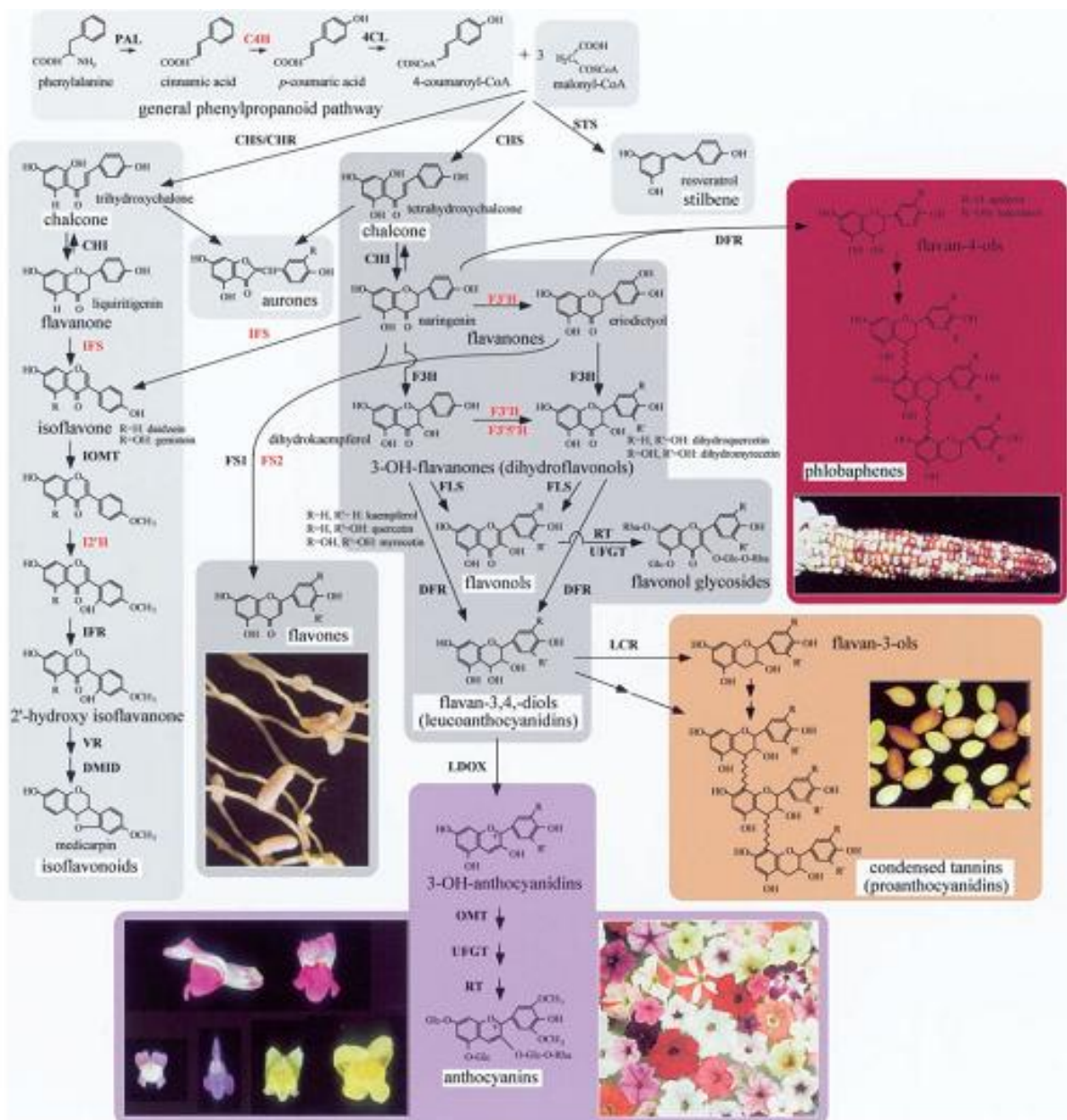
Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι ειδική για τον κάθε ιστό, καθώς τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι ποικίλλουν στη διανομή και στην επιλεκτικότητα του υποστρώματος σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά είδη [Austin et al., 2003]. Ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι η ακτινοβολία UV, η μόλυνση από μύκητες, η αλληλεπίδραση με μικροοργανισμούς, ο τραυματισμός κ.α. [Vvedenskaya et al., 2004]. Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός γενετικών, χημικών, βιοχημικών και μοριακών πληροφοριών πολλών ερευνητικών μελετών οι οποίες έχουν καθιερώσει το δευτερογενές μεταβολικό βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών στα φυτά.

Πολλές ενώσεις συντίθενται με βάση τον φαινυλοπροπανοειδή μεταβολισμό (Εικόνα 2.2.1) στα φυτά και ένα μέρος αυτού του μεταβολικού μονοπατιού οδηγεί στην

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

παραγωγή των φλαβονοειδών με το πρώτο βήμα-κλειδί να καταλύεται από την συνθάση της χαλκόνης (CHS) της PKS οικογένειας τύπου III [Winkel-Shirley B., 2001; Weisshaar et al., 1998]. Οι πολυκετιδικές συνθάσες (PKS) αποτελούνται από μεγάλα ενζυμικά σύμπλοκα τα οποία συνθέτουν τα πολυκετίδια, μία αρκετά ποικίλη οικογένεια φυσικών προϊόντων [Watts et al., 2005]. Υπάρχει μία υπερ-οικογένεια από ομόλογα PKS ένζυμα τύπου III, με την CHS, την συνθάση του στιλβενίου (STS), την VPS, την BUS, την BBS κ.α. ως παραδείγματα που έχουν κατηγοριοποιηθεί [Flores-Sanchez et al., 2008]. Τα περισσότερα από τα περιοριστικά ένζυμα, τα οποία καταλύουν την υδροξυλίωση, Ο-μεθυλίωση, γλυκοσιλίωση, ακυλίωση, φαινυλίωση και σύνδεση σε διάφορες θέσεις, είναι μέλη τριών κοινών ενζυμικών οικογενειών, των NADPH-εξαρτώμενων αναγωγασών, οξογλουταρικών-εξαρτώμενων διοξυγενασών ή των υδροξυλασών του κυτοχρώματος P450 [Austin et al., 2003].

Η CHS, μία σχετικά μικρή ομοδιμερής πρωτεΐνη (υπομονάδα 40-45 kDa), είναι άφθονη στα ανώτερα φυτά και χρησιμοποιεί τον p-κουμαρόυλ-CoA εστέρα, ένα εναρκτήριο μόριο που προέρχεται από την φαινυλανίνη μέσω του φαινυλοπροπανοειδούς μεταβολισμού, ως υπόστρωμα και καταλύει τρεις διαδοχικές δεκαρβοξυλικές προσθήκες τριών οξικών ομάδων από το μαλόνυλ- CoA στην σύνθεση ενός τετρακετιδικού ενδιάμεσου που υφίσταται ενδομοριακή κυκλοποίηση και αρωματοποίηση και αναδιπλώνεται σε ένα νέο αρωματικό σύστημα δακτυλίου, ώστε να σχηματίσει τη χαλκόνη. Η ισομεράση της χαλκόνης (CHI) στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη χαλκόνη, σχηματίζει τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο από την φλαβανόνη ναρινγενίνη και με επακόλουθη οξείδωση από την φλαβανόνη 3-υδροξυλάση (F3H), αναγωγή από την αναγωγάση της διυδροφλαβονόλης (DFR) και αφυδάτωση από την συνθάση της ανθοκυανιδίνης του κεντρικού δακτυλίου, σχηματίζεται η ανθοκυανιδίνη. Επιπλέον η γλυκοζυλίωση αυτής της μορφής παράγει κόκκινες χρωστικές τύπου ανθοκυάνης. Η συνθάση της φλαβόνης (FS or FNS) I και II και η συνθάση της ισοφλαβόνης (IFS) μετατρέπουν τις φλαβανόνες σε φλαβόνες και ισοφλαβόνες αντίστοιχα. Η συνθάση της φλαβονόλης (FLS) σχηματίζει φλαβονόλες από διυδροφλαβονόλες και η αναγωγάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LCR) φλαβαν-3-όλες από φλαβαν-3,4-διόλες [Horinouchi S., 2009; Capell et al., 2004; Funa et al., 1999]. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά οι διάφορες υποκατηγορίες φλαβονοειδών.



Εικόνα 2.2.1 Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, ξεκινώντας από τον γενικό φαινυλοπροπανοειδή μεταβολισμό και καταλήγοντας στις εννέα κύριες υποομάδες: άχρωμες χαλκόνες, αουρόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβαν-διόλες (γκρι πλαίσια), και ανθοκυανίνες, τανίνες και ρηλοβαρφαί χρωστικές (χρωματιστά πλαίσια). Οι υδροξυλάσες P450 που λειτουργούν και ως μεμβρανικές «άγκυρες» για πολυενζυμικά συστήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα. Οι φωτογραφίες παρουσιάζουν τις τρεις κύριες κατηγορίες χρωστικών σε φυτά μοντέλα. Επίσης ως φωτογραφία παρουσιάζονται και τα οζίδια ριζών του *Melilotus alba*, που περιέχουν φλαβόνες, φλαβανόνες και ισοφλαβόνες ως σηματοδοτικά μόρια [Winkel-Shirley B. 2001].

2.2.1 Ανθοκυανίνες και Ανθοκυανιδίνες

Πολλά φρούτα όπως τα μούρα, τα λαχανικά, τα πέταλα των φυτών και διάφορες ποικιλίες σιτηρών όπως το μαύρο ρύζι, διαθέτουν ένα εύρος χρωμάτων όπως μπλε, μωβ, κόκκινο κ.α. τα οποία οφείλονται στην παρουσία ομάδας χρωστικών που ονομάζονται ανθοκυανίνες. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε όλους τους ιστούς των ανωτέρων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των φύλλων, των λουλουδιών και των ριζών. Οι ανθοκυανίνες θεωρούνται ως οι γλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών (πολυυδρόξυ- και πολυμεθόξυ- παραγώγων των 2- phenylbenzopyrylium). Από διάφορες επιστημονικές μελέτες προκύπτει ότι οι ανθοκυανίνες διαθέτουν ένα εύρος φαρμακευτικών ιδιοτήτων ενάντια σε φλεγμονές, νευρολογικές ασθένειες, τον καρκίνο, τον διαβήτη, βακτηριακές μολύνσεις, την ινοκυστική νόσο κ.α. [Wang et al., 2012; Seeram et al., 2008].

2.2.2 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή λόγω της απουσίας διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων C-2 και C-3 και την παρουσία ενός χειρικού κέντρου στη θέση C-2 (Σχήμα 2.2.1). Παρόλο που οι φλαβανόνες ανήκουν στα λιγότερα άφθονα φλαβονοειδή στη φύση πολλές από αυτές παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων. Η βουτίνη για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα ενάντια σε ασθένειες σχετιζόμενες με οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, ασθένειες του ήπατος, και ο διαβήτης. Ο Zhang και η ομάδα του ανέφεραν ότι προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 αντιδρώντας με ομάδες ROS (δραστικά είδη οξυγόνου) και ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα, ότι ελαττώνει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες μέσω ενεργοποίησης της οξογουανίνης γλυκοσυλάσης 1 (OGG1) κ.α.. Η ναρινγενίνη και η εσπερετίνη συναντώνται στα εσπεριδοειδή και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιπολλαπλασιαστική δράση [Zhang et al., 2011; Zarebczan et al., 2011; Scalbert et al., 2000].

2.2.3. Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες γνωστές και ως 3-υδροξυφλαβόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου Γ καθώς και από την παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ των C-2 και C-3 (Σχήμα 2.2.1). Παρουσιάζουν μεγάλη αφθονία στα φύλλα των ανώτερων φυτών και μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί 450 διαφορετικά είδη άγλυκων φλαβονολών στα ανώτερα φυτά, ενώ η κερσετίνη και η κεμφερόλη που είναι και οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις χαρακτηρίζονται από περίπου 279 και 347 διαφορετικούς γλυκοσιδικούς συνδυασμούς, αντίστοιχα [Valant-Vetschera et al., 2006].

Οι φλαβονόλες παρουσιάζουν ποικιλία φαρμακευτικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονώδων κ.α. Η κεμφερόλη, είναι μια φλαβονόλη που απαντάται πολύ συχνά στην διατροφή μας (π.χ. τσάι, μπρόκολο, φασόλια, ντομάτες, σταφύλια) καθώς επίσης και σε φαρμακευτικά φυτά (π.χ. *Ginkgo biloba*, propolis και άλλα). Από επιδημιολογικές μελέτες έχει προκύψει ότι η κατανάλωση τροφών που περιέχουν την φλαβονόλη αυτή συνδέεται με μειωμένες πιθανότητες ανάπτυξης διαφόρων ασθενειών όπως καρκίνων και καρδιαγγειακών νόσων ενώ πολλές προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζει ένα εύρος φαρμακευτικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική, αναλγητική κ.α. [Calderón-Montañón, et al., 2011].

Μία πολύ συχνά απαντώμενη φλαβονόλη είναι η κερσετίνη (κρεμμύδι, μήλα, μούρα, μπρόκολο, σπανάκι, τσάι κ.α.), η οποία υπάρχει στα φυτά σε ποικίλες γλυκοζυλιωμένες μορφές, με την ρουτίνη (κερσετίνη 3-ρουτινοσίδη) να είναι μία από τις πιο διαδεδομένες. Υπάρχει πληθώρα ερευνητικών εργασιών σχετικά με τη δραστηριότητα της κερσετίνης, η οποία παρουσιάζει ποικιλία ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτική δράση, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αγγειοδιασταλτική κ.α., για τις οποίες οι μοριακοί μηχανισμοί είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες οφείλονται στην ικανότητα της κερσετίνης να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες και να προσδένει ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, με αποτέλεσμα να αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων που είναι υπεύθυνη για διάφορες καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες [Boots et al., 2008]. Μία επίσης σημαντική ιδιότητα των φλαβονολών, όπως της φισετίνης, είναι ότι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των CYP (P450) αλλά και των CYP2C9 και CYP3A4 ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των περισσότερων φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό [Si et al., 2009].

2.2.4 Φλαβανόλες

Από τις φλαβαν-3-όλες, όπως αλλιώς ονομάζονται, απουσιάζει ο διπλός δεσμός ανάμεσα στους C-2 και C-3 όπως επίσης και η καρβόνυλο ομάδα CO-4 του δακτυλίου Γ (Σχήμα 2.2.1). Η παρουσία της υδροξυλομάδας στη θέση C-3 και η απουσία του διπλού δεσμού έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο χειλικών κέντρων στις θέσεις C-2 και C-3 δίνοντας έτσι τη δυνατότητα σχηματισμού τεσσάρων διαστερεοϊσομερών. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει δύο υπο-ομάδες τις κατεχίνες/επικατεχίνες και τις προ(ανθο)κυανιδίνες. Οι περισσότερες φλαβονόλες που υπάρχουν στη φύση είναι στερεοϊσομερή με διαμόρφωση *cis* ((-)- επικατεχίνη) ή *trans* ((+)-κατεχίνη) ως προς τους άνθρακες 2 και 3. Σε κάποια φυτά όπως το τσάι (*Camellia sinensis*), οι φλαβανόλες περιέχουν και ομάδες γαλλικού εστέρα όπως π.χ. η (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα (EGCG) και σχηματίζουν πολύπλοκα πολυμερή (ταννίνες) [Fraga et al., 2011].

Οι φλαβονόλες και οι προκυανιδίνες παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με μείωση δεικτών οξειδωτικού στρες σε ζώα και σε ανθρώπους. Επίσης υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι συγκεκριμένες φλαβονόλες και προκυανιδίνες παρέχουν οφέλη σε παθολογικές καταστάσεις που συσχετίζονται με υψηλή παραγωγή οξειδωτικών, για παράδειγμα, της υπέρτασης και καρδιαγγειακών νόσων [Graziani et al., 2005].

2.2.5 Φλαβόνες

Η κατηγορία αυτή των φλαβονοειδών έχει τον κύριο σκελετό χωρίς υποκατάσταση στη θέση 3 του δακτυλίου C. Δύο πολύ κοινές φλαβόνες η λουτεολίνη και η απιγενίνη παρουσιάζουν δραστικότητα αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιαγγειογενετική κ.α. Η λουτεολίνη θεωρείται αποτελεσματική στη βελτίωση της πολλαπλής σκλήρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της εγκεφαλικής ισχαιμίας [Zhao et al., 2010]. Η τανγκερετίνη είναι μία φλαβόνη που απαντάται στα εσπεριδοειδή, γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και έχει παρουσιάσει και νευροπροστατευτικές δράσεις σε ποντικούς με ασθένεια Πάρκινσον έπειτα από επίδραση της 6-υδροξυνοτοπαμίνης (6-OHDA). Από τις μελέτες αυτές προκύπτει για πρώτη φορά ότι η τανγκερετίνη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [Datla et al., 2001].

2.2.6 Ισοφλαβόνες

Στις ισοφλαβόνες ο δακτύλιος B είναι συνδεδεμένος στη θέση 3 του δακτυλίου Γ και παράγονται σχεδόν αποκλειστικά από τα μέλη της οικογένειας *Fabaceae* (π.χ. *Leguminosae*). Υπάρχουν περίπου 900 ισοφλαβόνες στη φύση χωρίς γλυκοζίτη και έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 14 ομάδες και 23 υποομάδες με βάση δομικές διαφορές.

Το φυτο-οιστρογόνο γενιστεΐνη είναι άφθονο στη σόγια και έχει βρεθεί ότι προσδένεται άμεσα σε υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) και παρουσιάζει δράση όμοια με αυτή των οιστρογόνων. Τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της ευεργετικής της δράσης στην πρόληψη και στη θεραπεία πλήθους ασθενειών όπως καρδιαγγειακών ασθενειών, διαβήτη, συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, νεφρικών παθήσεων και διαφόρων τύπων καρκίνου. [Dang Z.C., 2009; Dang et al., 2005]. Η γενιστεΐνη και η νταϊτζεΐνη μπορούν να μιμηθούν τις νευροπροστατευτικές δράσεις και λειτουργίες των οιστρογόνων στον εγκέφαλο, καθώς και οι δύο προσδένονται στον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) και επηρεάζουν διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα οιστρογόνα. Επίσης διαθέτουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες ενάντια σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στο οξειδωτικό στρες κ.α. [Adams et al., 2012].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams S.**, Aksenova M., Aksenov M., Mactutus C., Booze R. Soy isoflavones genistein and daidzein exert antiapoptotic actions via a selective er-mediated mechanism in neurons following HIV-1 Tat1-86 exposure. *PLoS One.*, **2012**, *7*, e37540.
- Austin M.B.**, Noel J.P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, *20*, 79-110.
- Boots A.**, Haenen G., Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, *585*, 325-337.
- Calderón-Montaña J.M.**, Burgos-Moron E., Perez-Guerrero C., Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini. Rev. Med. Chem.*, **2011**, *11*, 298-344.
- Capell T.**, Christou P. Progress in plant metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *15*, 148-154.
- Dang Z.C.** Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obes. Rev.*, **2009**, *10*, 342-349,
- Dang Z.C.**, Löwik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2005**, *16*, 207-213.
- Datla K.P.**, Christidou M., Widmer W.W., Rooprai H.K., Dexter D.T. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport.*, **2001**, *12*, 3871-3875.
- Fraga G.**, Oteiza I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic Biol Med.*, **2011**, *51*, 813-823.
- Flores-Sanchez I.J.**, Verpoorte R. PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in Cannabis sativa L. plants. *Plant Cell Physiol.*, **2008**, *49*, 1767-1782.
- Funa N.**, Ohnishi Y., Fujii I., Shibuya M., Ebizuka Y., Horinouchi S. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, **1999**, *400*, 897-899.
- Graziani G.**, D'Argenio G., Tuccillo C., Loguercio C., Ritieni A., Morisco F., Del Vecchio Blanco C., Fogliano V., Romano M. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa *in vivo*. *Gut.*, **2005**, *54*, 193-200.
- Hollman P.C.**, Katan M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.*, **1999**, *37*, 937-942.
- Horinouchi S.** Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides by microorganisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, *13*, 197-204.
- Lewinsohn E.**, Gijzen M. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science*, **2009**, *176*, 161-169.
- Quideau S.**, Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouysgu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 586-621.
- Rice-Evans C.** Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic. Biol. Med.*, **2004**, *36*, 827-828.
- Scalbert F.R.**, Felgines C.R.C., Texier O., Morand C., Manach C.A. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2000**, *279*, G1148-G1154.

Seeram N.P. Berry Fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 627-629.

Si D., Wang Y., Zhou YH., Guo Y., Wang J., Zhou H., Li S., Fawcett JP. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*, 629-634.

Tan G., Gyllenhaal C., Soejarto D.D. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr. Drug Targets*, **2006**, *7*, 265-277.

Valant-Vetschera K.M., Wallenweber E. Flavones and Flavonols. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M.; Markham, K.R., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, **2006**, 618-748.

Vvedenskaya I., Vorsa N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. *Plant Science*, **2004**, *167*, 1043–1054.

Veitch N., Grayer R. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*, 555-611.

Wang Y., Chen X., Zhang Y., Chen X. Antioxidant activities and major anthocyanins of Myrobalan Plum (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *J. Food Sci.*, **2012**, *77*, C388-C393.

Watts K., Mijts B., Schmidt-Dannert C. Current and emerging approaches for natural product biosynthesis in microbial cells. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 927-940.

Weisshaar B., Jenkins G.I Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1998**, *1*, 251-257.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, **2001**, *126*, 485-493.

Zarebczan B., Pinchot S.N., Kunnimalaiyaan M., Chen H. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. *Am. J. Surg.*, **2011**, *201*, 329-333.

Zhang R., Lee I.K., Piao M.J., Kim K.C., Kim A.D., Kim H.S., Chae S., Kim H.S., Hyun J.W. Butin (7,3',4'-Trihydroxydihydroflavone) Reduces Oxidative Stress-Induced Cell Death via Inhibition of the Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, *12*, 3871-3887.

Zhao G., Qin G.W., Wang J., Chu W.J., Guo L.H. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) *Britt. Neurochem. Int.*, **2010**, *56*, 168-176.

3. Φασματοσκοπία NMR: Μελέτη Φυσικών Προϊόντων και Συμβολή στην Ανάπτυξη Φαρμάκων

3.1 Προσδιορισμός δομικών και διαμορφωτικών χαρακτηριστικών ιδιοτήτων φυσικών προϊόντων με φασματοσκοπία NMR 1D και 2D.

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) υψηλής διακριτικής ικανότητας είναι μία ευρέως αναγνωρισμένη και αξιόπιστη τεχνική για τη μελέτη φυσικών ή συνθετικών δειγμάτων. Επίσης, αρκετές έρευνες αναφέρουν την ολοένα και αυξανόμενη χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε φασματοσκοπικές αναλύσεις. Η διαθεσιμότητα οργάνων υψηλού-πεδίου σε συνδυασμό με συνεχείς βελτιώσεις στον σχεδιασμό των υποδοχέων (probes) και αποτελεσματικής επεξεργασίας των σημάτων, έχουν αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία, την ακρίβεια και τις αναλυτικές δυνατότητες της τεχνικής αυτής.

Η φασματοσκοπία ^1H NMR μιας διάστασης έχει αποδειχτεί πολύτιμη τεχνική για την ποιοτική μελέτη φυσικών προϊόντων αλλά και για την παροχή ποσοτικών δεδομένων φυτικών εκχυλισμάτων καθώς το ολοκλήρωμα ενός σήματος είναι απευθείας ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που δίνουν το σήμα αυτό. Η ακρίβεια των ολοκληρωμάτων καθορίζει και την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης, η οποία εξαρτάται από: (α) το επίπεδο θορύβου του φάσματος, (β) το εύρος του σήματος (line shape), (γ) την ποιότητα ομογενοποίησης του σήματος, (δ) την επιλογή των μαθηματικών συναρτήσεων στην επεξεργασία των σημάτων (window function) και (ε) τις διορθώσεις της φάσης και της βασικής γραμμής του φάσματος. Όμως, όταν η πολυπλοκότητα των δειγμάτων αυξάνει, τα σήματα συντονισμού αλληλεπικαλύπτονται και συνιστούν ένα σοβαρό αναλυτικό πρόβλημα. Ορισμένες φορές, αλλάζοντας το είδος του διαλύτη, το pH του δείγματος ή προσθέτοντας αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης (shift reagents), επιτυγχάνεται διαχωρισμός των σημάτων [Campo et al., 2006].

Η μελέτη της δομής και της διαμόρφωσης ενός φυσικού προϊόντος πραγματοποιείται συνήθως σε διάλυμα, όπου το μόριο διατηρεί την φυσική του πλαστικότητα. Το νερό είναι ο διαλύτης που προτιμάται για την μελέτη φυσικών προϊόντων που στοχεύουν διαλυτές πρωτεΐνες αλλά και οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη υδρόφοβων μορίων ή για την μίμηση του υδρόφοβου περιβάλλοντος των κυτταρικών μεμβρανών. Τέλος, η γνώση του τρόπου της αλληλεπίδρασης του φυσικού προϊόντος με τον υποδοχέα επιτρέπει το σχεδιασμό αναλόγων με υψηλότερη συγγένεια και με βελτιωμένες διαμοριακές επαφές. Για την επίτευξη των στόχων αυτών, τα φυσικά προϊόντα μελετώνται δομικά τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και σε κατάσταση σύμπλεξης με τον υποδοχέα [Carlomagno, 2012].

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια από τις πιο σύγχρονες και σημαντικές φασματοσκοπικές μεθόδους, λόγω των μεγάλων δυνατοτήτων που παρουσιάζει στην

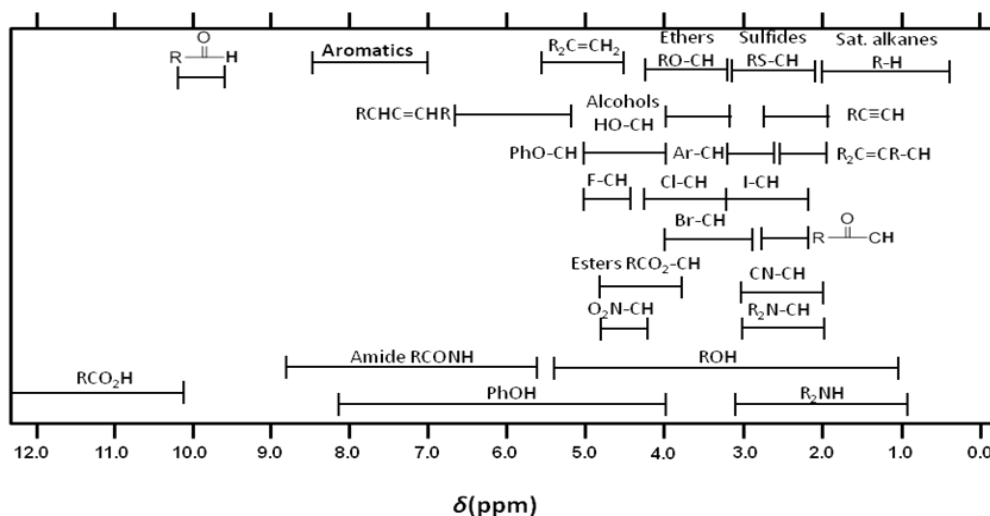
ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

διευκρίνιση της δομής και γενικότερα στην μελέτη της διαμόρφωσης ενός φυσικού προϊόντος τόσο σε κατάσταση διαλύματος όσο και σε σύμπλεξη με εποδοχείς όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

3.1.1 Φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης ($1D$ 1H και ^{13}C NMR).

Κάθε χημικά διακριτός πυρήνας 1H ενός μορίου συντονίζεται σε ελάχιστα διαφορετική αλλά ανιχνεύσιμη συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Η ακριβής θέση κάθε κορυφής καλείται **χημική μετατόπιση**. Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις οφείλονται στα μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια που «προστατεύουν» τους πυρήνες από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου (Σχήμα 3.1.1.1) [Gerothanassis et al., 1996]. Για τη μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων χρησιμοποιείται η κλίμακα δ (ppm) η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$\delta = \frac{\nu_{\delta\epsilon\gamma} - \nu_{\alpha\nu\alpha\phi}}{\nu_{\alpha\nu\alpha\phi}} 10^6 \text{ (ppm)}$$



Σχήμα 3.1.1.1 Εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων [Γεροθανάσης, 1998].

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από ένα φάσμα 1H NMR συνοψίζονται στις παρακάτω [Βαλαβανίδης, 2006; Γεροθανάσης, 1998]:

- **Ο αριθμός των σημάτων** που εμφανίζεται σε ένα φάσμα NMR δίνει τον αριθμό των χημικά μη ισοδύναμων πρωτονίων.

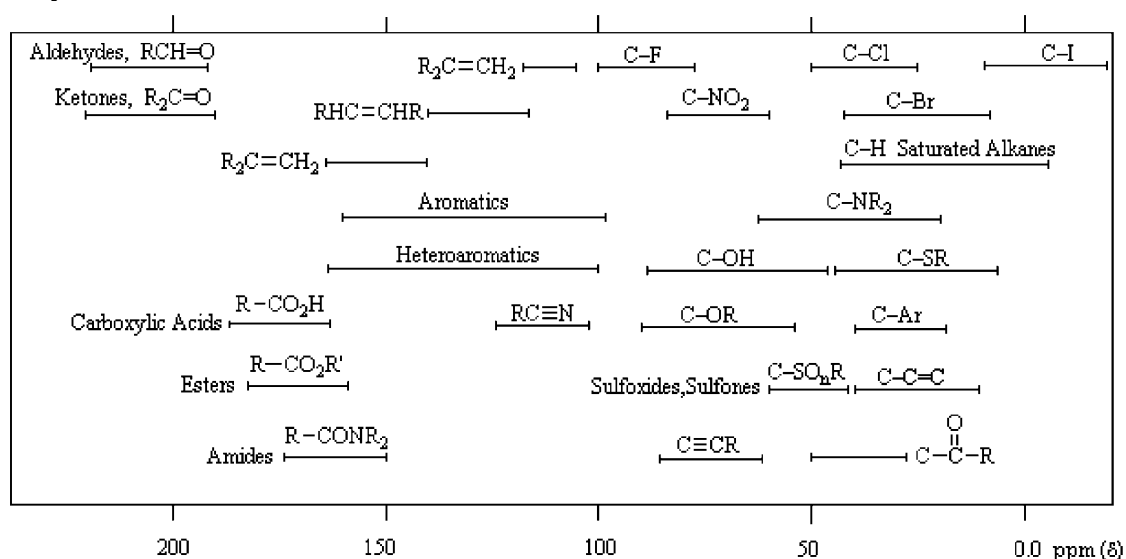
- **Η σχέση spin-spin** ενός πρωτονίου, η οποία προκαλείται από την σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών ατόμων, δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των

γειτονικών πρωτονίων. Τις περισσότερες φορές ισχύει ο γενικός κανόνας $n + 1$, όπου πρωτόνια με n ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια εμφανίζουν $n + 1$ κορυφές στο φάσμα NMR.

- Το **εμβαδόν** που περικλείει κάθε κορυφή (**ολοκλήρωμα** της κορυφής) είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή.

- Οι **χημικές μετατοπίσεις** δίνουν πληροφορίες για το ηλεκτρονικό περιβάλλον των υδρογόνων κάποιου μορίου. Πιο συγκεκριμένα οι πυρήνες που προστατεύονται περισσότερο από τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε μικρότερες τιμές δ σε ένα φάσμα NMR, ενώ πυρήνες που προστατεύονται λιγότερο αποτελεσματικά συντονίζονται σε μεγαλύτερες τιμές δ του γραφήματος NMR (Σχήμα 3.1.1.1).

Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή με άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με την μορφή πολλαπλών κορυφών, οι οποίες έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin – spin και οφείλεται στη μέσω δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους κατά μια σταθερά J που καλείται **σταθερά σύζευξης** και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου B_0 . Η σταθερά σύζευξης (J coupling) εξαρτάται από τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων που βρίσκονται σε σύζευξη, τη δομή και τη γεωμετρία του μορίου. Για το λόγο αυτό η τιμή της σταθεράς σύζευξης ποικίλει. Η σταθερά σύζευξης έχει τόσο μεγαλύτερη τιμή όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι πυρήνες που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών. Η σταθερά J διακρίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών που χωρίζουν τους πυρήνες που συζευγνύονται (nJ , όπου n ο αριθμός των δεσμών) [Βαλαβανίδης, 2006; Αλεξάνδρου, 1992].



Σχήμα 3.1.1.2 Εύρος των χημικών μετατοπίσεων άνθρακα διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων [Γεροθανάσης, 1998].

Το μειονέκτημα της φασματοσκοπίας μιας διάστασης ^{13}C είναι η πολύ μικρή περιεκτικότητα του άνθρακα-13 στο φυσικό στοιχείο ($\approx 1.11\%$) και η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου, που έχουν ως συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία του (σχετική ευαισθησία ως προς το $^1\text{H} \approx 1/400$) [Breitmaier, 1990]. Ωστόσο, το σημαντικό πλεονέκτημα της μεθοδολογίας είναι η μεγάλη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (Σχήμα 3.1.1.2) και ως εκ τούτου η μεγάλη διαγνωστική σημασία. Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^{13}C είναι περίπου 200 ppm για τις συμβατικές οργανικές ενώσεις. Είναι, συνεπώς, σε σχέση με την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^1H περίπου 20 φορές μεγαλύτερη [Γεροθανάσης, 1998].

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H μιας διάστασης λόγω της πολυπλοκότητας τους (αλληλοεπικάλυψη παρατηρούμενων σημάτων) οδήγησαν στην εφαρμογή της τεχνικής των πολυδιάστατων φασμάτων NMR που συνέβαλε σημαντικά στη μελέτη πολύπλοκων μορίων. Αναμφισβήτητα η πρόοδος στην τεχνολογία των οργάνων και η εξέλιξη της μεθοδολογίας της πολυδιάστατης NMR φασματοσκοπίας είναι τεράστια τα τελευταία χρόνια [Ernst, 1989; Wuthrich, 1986].

3.1.2 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης Πρωτονίων μέσω Δεσμών (Correlated Spectroscopy ^1H - ^1H COSY NMR).

Η ομοπυρηνική φασματοσκοπία COSY NMR είναι από τις πιο απλές και πιο χρήσιμες τεχνικές. Τα δισδιάστατα φάσματα λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και παρέχουν πληροφορίες spin-spin σύζευξης πρωτονίων μέσω δύο έως τριών δεσμών. Οι κορυφές διασταύρωσης προκύπτουν από το φαινόμενο που καλείται μεταφορά μαγνήτισης και η παρουσία τους υποδεικνύει ότι δύο πυρήνες με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις συζεύγνυται και δίνουν τις συντεταγμένες των κορυφών διασταύρωσης. Κάθε σύζευξη δίνει δύο συμμετρικές κορυφές διασταύρωσης επάνω και κάτω από τη διαγώνιο του φάσματος και έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της σύνδεσης μεταξύ δύο πρωτονίων.

3.1.3 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Ολικής Συσχέτισης (Total Correlated Spectroscopy ^1H - ^1H TOCSY NMR).

Η ομοπυρηνική φασματοσκοπία TOCSY NMR είναι παρόμοια με την COSY καθώς παρατηρούνται κορυφές διασταύρωσης πρωτονίων που συζεύγνυνται. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι τα σήματα που παρατηρούνται προέρχονται από πρωτόνια που συνδέονται άμεσα ή έμμεσα μέσω συζεύξης spin-spin παρέχοντας τη δυνατότητα προσδιορισμού μεγαλύτερων διασυνδεδεμένων δικτύων συζεύξεων spin-spin. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή μιας επαναλαμβανόμενης σειράς παλμών που προκαλούν μαγνητική ανάμιξη κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης. Μεγαλύτεροι

ισοτοπικοί χρόνοι ανάμιξης προκαλούν μαγνητική πόλωση που μπορεί να εξαπλωθεί μέσω ενός αυξανόμενου αριθμού δεσμών.

3.1.4 Ετεροπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης Απλού Κβάντου ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Correlation, ^1H - ^{13}C HSQC NMR).

Με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων. Το μειονέκτημα της δισδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας ^{13}C - ^1H (με άμεσα παρατηρούμενο πυρήνα τον ^{13}C) είναι όπως τονίστηκε η πολύ μικρή ευαισθησία. Αύξηση της ευαισθησίας του πυρήνα ^{13}C επιτυγχάνεται, όταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς του γίνεται διαμέσου της επίδρασης που ασκεί στον, μεγαλύτερης ευαισθησίας, πυρήνα του πρωτονίου. Με τον τρόπο αυτό ο πυρήνας του πρωτονίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταγραφή του σήματος. Η φασματοσκοπία HSQC ^1H - ^{13}C συσχετίζει πυρήνες πρωτονίου με πυρήνες άνθρακα-13 που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες ^1H - ^{13}C που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης 1J .

Η παλμική ακολουθία του πειράματος HSQC ^1H - ^{13}C μπορεί, περιγραφικά, να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (A) επιτυγχάνεται η μεταφορά μαγνήτισης από τον πυρήνα του πρωτονίου στον πυρήνα του άνθρακα-13. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των πυρήνων πρωτονίου που δε συζεύγνυνται με πυρήνες άνθρακα-13. Στο δεύτερο στάδιο (B) η μαγνήτιση μεταφέρεται από τον ^{13}C στον πυρήνα ^1H και ανιχνεύεται. Η παλμική ακολουθία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες ^1H - ^{13}C που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης $^1J_{\text{HC}}$ [Parella et al., 2001]. Κατά τρόπο ανάλογο γίνεται και η εφαρμογή της φασματοσκοπίας 2D HSQC ^1H - ^{15}N που συσχετίζει ζεύγη πυρήνων ^1H και ^{15}N του αμινοξικού σκελετού πρωτεϊνών.

Οι σταθερές σύζευξης ^{13}C - ^1H μέσω ενός δεσμού ποικίλουν από 120 μέχρι 320 Hz. Οι σταθερές σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ αυξάνουν κατά τη μεταβολή του υβριδισμού από sp^3 σε sp , σύμφωνα με την αύξηση του ποσοστού συμμετοχής του s τροχιακού στον υβριδισμό. Τυπικές τιμές είναι: CH_4 (sp^3) $^1J_{\text{CH}} = 125$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ (sp^2) $^1J_{\text{CH}} = 157$ Hz και $\text{HC}\equiv\text{CH}$ (sp) $^1J_{\text{CH}} = 250$ Hz [Γεροθανάσης, 1998; Breitmaier et al., 1990].

3.1.5 Ετεροπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Corellation ^1H - ^{13}C HMBC NMR).

Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία HSQC ^1H - ^{13}C , η τεχνική HMBC ^1H - ^{13}C παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων άνθρακα-13 που συζεύγνυνται με

πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν πλέον του ενός δεσμού, συνήθως δύο έως τέσσερις δεσμούς ($^{2-4}J_{CH}$). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC 1H - ^{13}C περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό 90° με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις $^1J_{CH}$, έτσι ώστε οι διασταυρούμενες κορυφές, που τελικά θα προκύπτουν, να αντιστοιχούν σε συζεύξεις $^nJ_{CH}$ (όπου $n > 1$). Ο δεύτερος παλμός 90° ^{13}C δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται υπό την επίδραση του παλμού 1H 180° που ακολουθεί. Τέλος με την εφαρμογή του παλμού 90° και την καταγραφή του φάσματος, προκύπτει ο δισδιάστατος χάρτης της τεχνικής HMBC 1H - ^{13}C [Rahman, 1996].

Οι σταθερές σύζευξης $^2J_{CH}$ και $^3J_{CH}$ είναι μικρότερες και έχουν τιμές μεταξύ 1 - 10 Hz. Ως σύζευξη μακράς εμβέλειας, θεωρούμε τη σύζευξη μεταξύ πυρήνων οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων ή περισσότερων δεσμών (nJ ($n \geq 4$)). Επειδή η αλληλεπίδραση των πυρήνων εξασθενεί με την αύξηση του αριθμού των δεσμών, η σταθερά σύζευξης μακράς εμβέλειας αναμένεται να είναι πολύ μικρή (συνήθως 0.1 - 3 Hz).

3.1.6 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου NOE 1H - 1H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy 1H - 1H NOESY NMR).

Σε διάλυμα είναι δυνατή η μελέτη της διαμόρφωσης φυσικών προϊόντων με την χρήση φασματοσκοπίας NOESY και ROESY NMR (υπολογισμός αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων) και τον υπολογισμό των δίδρων γωνιών μέσω μετρήσεων των σταθερών σύζευξης [Carlmagno, 2012]. Η φασματοσκοπία 1H - 1H NOESY έχει σημαντικές εφαρμογές στη μελέτη δομικών χαρακτηριστικών βιολογικών μακρομορίων όπως πεπτιδίων, πρωτεϊνών [Johnson et al., 2010], DNA και RNA [Tzakos et al., 2004]. Με τη χρήση της μελετώνται πυρήνες που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 5 Å και είναι δυνατός ο υπολογισμός των αποστάσεων των πυρήνων στο χώρο με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων [Wüthrich, 1989].

Στο δισδιάστατο πείραμα 1H - 1H NOESY οι διασταυρούμενες κορυφές οφείλονται στην ανταλλαγή μαγνήτισης λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μέσω του χώρου. Η ένταση των σημάτων εξαρτάται από το ποσοστό ανταλλαγής μαγνήτισης των πυρήνων A και B και τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης των spin (τ). Όταν ο χρόνος ανάμιξης είναι περίπου ίσος με το μικρότερο χρόνο αποδιέγερσης (T_1) των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων, τότε παρατηρείται η μέγιστη ένταση των διασταυρούμενων κορυφών [Bovey, 1998].

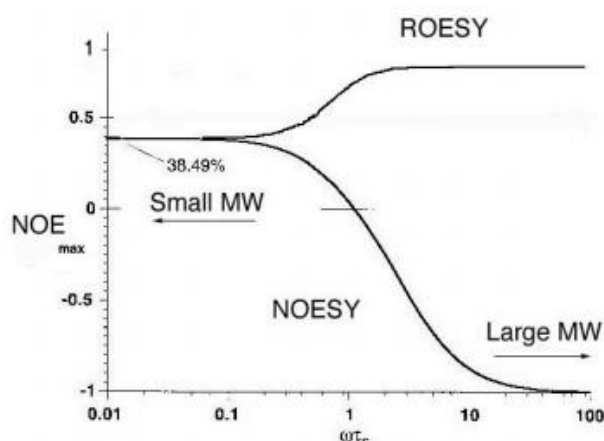
Το φαινόμενο NOE ως ολοκλήρωμα της περιοχής ενός πρωτονίου έχει μία εξάρτηση από την απόσταση r μεταξύ δύο πρωτονίων που συζεύγνυται μέσω χώρου της μορφής r^{-6} . Έτσι παρέχει μία σημαντική μεθοδολογία για την ανίχνευση ζεύγους πρωτονίων τα οποία στο χώρο είναι κοντά το ένα στο άλλο ακόμα και αν διαχωρίζονται

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, είναι η μέτρηση των εντάσεων NOE για μία σειρά διαφορετικών χρόνων ανάμιξης και στην συνέχεια η συσχέτιση των εντάσεων με το χρόνο [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 ουσίας 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. πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες ($MB > 1200$). Σε περιπτώσεις μορίων ενδιάμεσου MB εφαρμόζεται η τεχνική ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) όπου όλες οι κορυφές είναι θετικές για όλα τα μόρια ανεξαρτήτως μοριακού βάρους [Rosemary et al., 2013].

Το φαινόμενο NOE αναπτύσσεται δυναμικά ως συνάρτηση του χρόνου και στη συνέχεια φθίνει λόγω αποδιέγερσης κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάμιξης. Έτσι, η τιμή NOE για δεδομένο B_0 ως συνάρτηση του χρόνου ανάμιξης παρουσιάζει μέγιστη τιμή η οποία εξαρτάται από το χρόνο συσχέτισης, το μοριακό βάρος και την απόσταση μεταξύ των πρωτονίων. Γενικά, τα μεγάλα μόρια αναπτύσσουν NOE γρήγορα ενώ τα μικρά μόρια πιο αργά. Για το λόγο αυτό οι μέγιστες τιμές NOE για μεγάλα 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 μικρά μόρια, επιλέγεται ένας μέσος χρόνος ανάμιξης που μεγιστοποιεί το NOE, εκτός αν σκοπός είναι η μέτρηση της απόστασης με ακρίβεια. Για μεγάλα 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).



Σχήμα 3.1.6.1 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 και μεγάλου μοριακού βάρους έχουν αντίθετα σήματα.

Στο Σχήμα 3.1.6.1 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 περιστροφής ($\omega_0\tau_c \ll 1$), $\text{NOE (max)} = 0.5$
2. Πολύ αργή ταχύτητα περιστροφής ($\omega_0\tau_c > 1$), $\text{NOE} = -1$
3. Ενδιάμεση ταχύτητα περιστροφής ($\omega_0\tau_c \sim 1$), όπου το φαινόμενο NOE αλλάζει πρόσημο, ενώ σε κάποια περιοχή $\omega_0\tau_c$ γίνεται ίσο με μηδέν.

Η ενδιάμεση περιοχή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το μέγεθος του μορίου, το ιξώδες του διαλύματος, τη θερμοκρασία, την ένταση του πεδίου B_0 (τη συχνότητα ω_0) και, μερικές φορές, από το pH του διαλύματος.

3.1.7 Φασματοσκοπία Διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy) για την μελέτη μιγμάτων.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην εισαγωγή πρόσθετων διαστάσεων στη φασματοσκοπία NMR οι οποίες εξαρτώνται από τις μακροσκοπικές και φυσικοχημικές ιδιότητες ενός μορίου όπως το μέγεθος, το σχήμα, το μοριακό βάρος, και το φορτίο. Βασική παρατήρηση προς αυτή τη κατεύθυνση αποτέλεσε η επισημάνση πως οι χρόνοι χαλάρωσης των πυρήνων, οι οποίοι και εξαρτώνται από τους χρόνους συσχέτισης της κίνησης των μορίων, επηρεάζονται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου. Έτσι αναπτύχθηκε η τεχνική DOSY NMR (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy).

Την τελευταία δεκαετία, η τεχνική NMR παλμικής κλίσεως πεδίου (pulsed field-gradient, PFG) έχει ευρεία εφαρμογή στη μελέτη μοριακής δυναμικής και μεταφορικής (translational) κίνησης των μορίων, με τη φασματοσκοπία DOSY NMR να αποτελεί ένα

ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση του συντελεστή διάχυσης σε διάλυμα. Η τεχνική αυτή έχει επίσης πολλαπλές εφαρμογές στην ανάλυση μιγμάτων φυσικών προϊόντων, στη συνδυαστική χημεία, στη φαρμακευτική και κλινική χημεία και στη χημεία τροφίμων [Morris et al., 199; Cohen et al., 2005; Trefi 2008; Liu et al., 1996; Gil 2004; Rodrigues et al., 2009].

Η φασματοσκοπία διάχυσης (DOSY) μέσω του προσδιορισμό των συντελεστών αυτο-διάχυσης ενός μορίου παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις φυσικές μοριακές ιδιότητες όπως το σχήμα και το κατά προσέγγιση μοριακό βάρος. Επιτρέπει επίσης τον προσδιορισμό της ταχύτητας ανταλλαγής των πρωτονίων, τον εντοπισμό διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, συσσωμάτωσης καθώς και αλλαγών στη διαμόρφωση. Για την επίτευξη υψηλής ανάλυσης στο πείραμα DOSY NMR απαιτείται τα συστατικά του μίγματος να έχουν διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης και τα σήματά τους να μην αλληλεπικαλύπτονται.

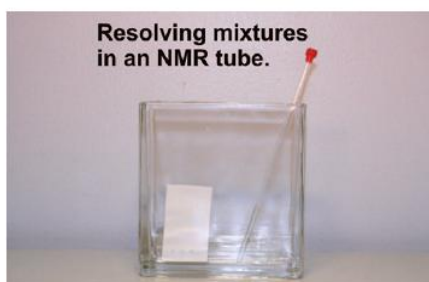
Διασπορά των τιμών των συντελεστών διάχυσης έχει επιτευχθεί με την χρήση χρωματογραφίας στατικής φάσης, μικυλλίων (surfactants), πολυμερών και παραγόντων συμπλοκοποίησης. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί τεχνική DOSY όπου επιτυγχάνεται ταυτόχρονη ενίσχυση της διασποράς χημικών μετατοπίσεων και της διάχυσης στην ανάλυση μιγμάτων [Rogerson et al., 2011].

Ο συντελεστής αυτοδιάχυσης D ενός μορίου περιγράφεται από τη σχέση Stokes-Einstein [Johnson C.S. 1999] :

$$D = k_b T / 6\pi\eta r_s, \quad [\text{Εξίσωση 1}]$$

όπου k_b η σταθερά του Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του μέσου και r_s η υδροδυναμική ακτίνα του μορίου. Ο συντελεστής διάχυσης δεν παρουσιάζει γραμμική εξάρτηση από τη θερμοκρασία T διότι το ιξώδες επηρεάζεται μη γραμμικά από αυτήν. Αυτό οδηγεί σε μια εκθετική εξάρτηση του συντελεστή διάχυσης από την θερμοκρασία.

Η δυνατότητα της ταυτοποίησης των συστατικών φυτικών εκχυλισμάτων χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό έχει ιδιαίτερη σημασία στη χημεία των φυσικών προϊόντων. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση που ορισμένα από τα συστατικά είναι ευαίσθητα στις μεθόδους καθαρισμού ή έχουν την τάση να παράγουν παραπροϊόντα. Καθώς ο κύριος σκοπός της τεχνικής DOSY NMR είναι ο εικονικός διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος πολλοί ερευνητές την αναφέρουν ως NMR χρωματογραφία ή χρωματογραφία των spin (Εικόνα 3.1.7.1) [Rodrigues et al., 2009; Kavakka 2009].



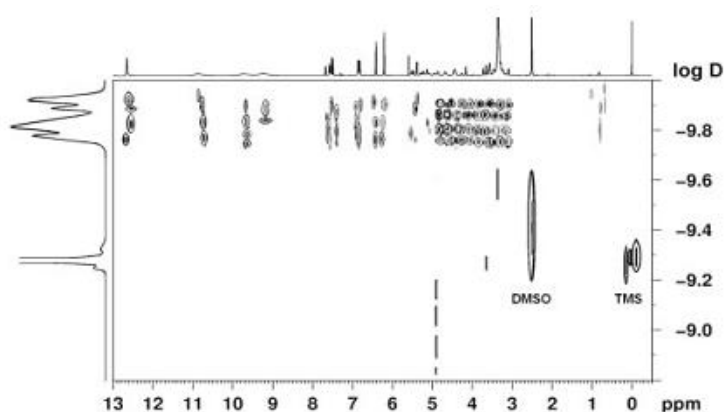
Εικόνα 3.1.7.1 Διαχωρισμός μιγμάτων με φασματοσκοπία DOSY NMR. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος προσομοιάζει με τη μέθοδο της χρωματογραφίας, π.χ. την TLC. Η μεθοδολογία αυτή παρέχει μια γρήγορη, φθηνή και απλή τεχνική για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων με φασματοσκοπία NMR [Kavakka et al., 2009].

Στοιχείο που καθιστά τη συγκεκριμένη τεχνική ιδιαίτερη αποτελεί η ύπαρξη στον ένα από τους δύο άξονες του φάσματος της τιμής του συντελεστή διάχυσης (Σχήμα 3.1.7.1) και όχι η κλασσική κλίμακα χημικών μετατοπίσεων που συνήθως χρησιμοποιείται στα φάσματα 2D [Primikyri et al., 2012; Karur et al., 2000], γεγονός που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο πείραμα ως «ψευδοδισδιάστατο». Ο διαχωρισμός των διαφορετικών συστατικών πραγματοποιείται φασματοσκοπικά στη δεύτερη διάσταση ενώ δεν απαιτείται προηγούμενος διαχωρισμός του μίγματος. Η μοριακή διάχυση είναι αποτέλεσμα της τυχαίας κίνησης των σωματιδίων ενός αερίου ή υγρού λόγω της θερμικής ενέργειας του συστήματος. Ο συντελεστής διάχυσης εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, από το ουσιαστικό μοριακό βάρος του αλλά και από τις χημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται το μίγμα όπως π.χ. το ιξώδες και η θερμοκρασία.

Η τεχνική DOSY NMR μπορεί να θεωρηθεί ως μια ειδική χρωματογραφική μέθοδος φυσικού διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος, δεν απαιτεί προετοιμασία του δείγματος ή βελτιστοποίηση των συνθηκών της χρωματογραφικής τεχνικής, ενώ διατηρεί αμετάβλητες τις αρχικές συνθήκες του δείγματος. Η δυνατότητα αυτή ελαχιστοποιεί το κίνδυνο της υποβάθμισης του δείγματος και επιταχύνει τη διαδικασία της ταυτοποίησης των συστατικών του [Nicolay et al., 2001].

Επίσης, στα πλαίσια της μεθοδολογίας αυτής έχει καταστεί δυνατή η μελέτη των σταθερών πρόσδεσης και καθώς και η ταυτοποίηση αλληλεπιδράσεων υποκαταστάτη-υποδοχέα. Έτσι, καθώς ο συντελεστής διάχυσης του συμπλόκου θα ελαττωθεί σε σχέση με το συντελεστή διάχυσης της ελεύθερης κατάστασης, ο παρατηρούμενος συντελεστής (D_{obs}) θα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των συντελεστών της ελεύθερης ($D_{unbound}$) και της προσδεδωμένης (D_{bound}) κατάστασης. Συνεπώς, η παράμετρος D_{obs} μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή πληροφοριών ως προς το μοριακό κλάσμα X του προσδεδωμένου τμήματος όπως προκύπτει από την ακόλουθη εξίσωση: $D_{obs} = X D_{bound} + (1-X) D_{unbound}$ [Cohen et al., 2005; Shapiro et al., 1999; Gounarides et al., 1999].

Με τη μελέτη επίσης των αλλαγών των συντελεστών διάχυσης διαφόρων συστατικών λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μπορούν να εξαχθούν ποιοτικά συμπεράσματα για την ισχύ τους [Gurpreet et al., 2000; Eurico et al., 2001]. Επίσης η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην μελέτη του υδρόφοβου χαρακτήρα διαφόρων μορίων σε μίγματα [Morris et al., 1994; Caldarelli S., 2007]. Η φασματοσκοπία DOSY NMR επιτρέπει επίσης και την κινητική μελέτη ανταλλαγών πρωτονίων χωρίς τη μεταβολή των φυσιολογικών συνθηκών ενός δείγματος. Πρόσφατα, η ανταλλαγή του OH5 υδροξυλικού πρωτονίου της κερσετίνης μελετήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση της ταχύτητας ανταλλαγής με τα πρωτόνια του διαλύτη (H_2O) [Thureau et al., 2006; Hong et al., 2008].



Σχήμα 3.1.7.1 2D DOSY NMR φάσμα ενός φυτικού εκχυλίσματος [Rodrigues et al., 2009].

3.2 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων.

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκαν τεχνικές προσδιορισμού της δομής και της διαμόρφωσης φυσικών προϊόντων σε κατάσταση διαλύματος αλλά και για την ταυτοποίησή τους σε μίγματα. Όμως εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της διαμόρφωσης φυσικών προϊόντων όταν είναι προσδεσμένα σε υποδοχείς αλλά και ο τρόπος πρόσδεσης στον υποδοχέα-στόχο.

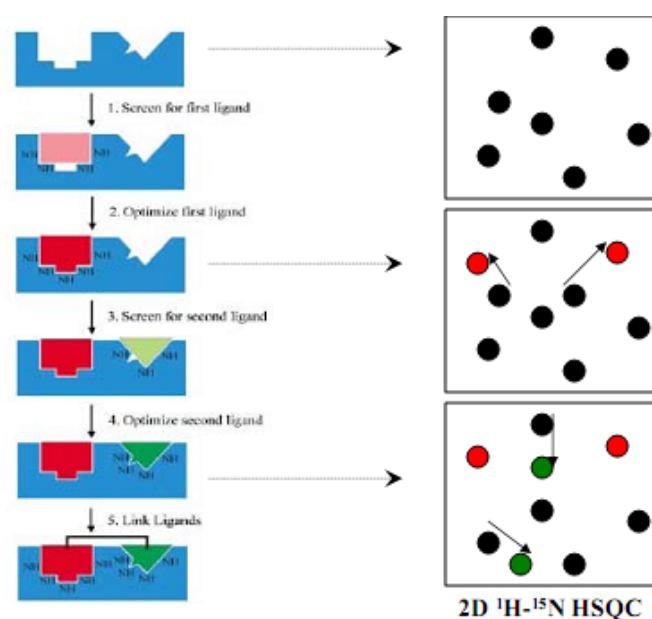
Η διαδικασία βελτιστοποίησης υποψήφιων φαρμάκων είναι συνήθως εξαιρετικά χρονοβόρα και αποτελείται από αρκετά στάδια: (1) επιλογή της ασθένειας, (2) επιλογή στόχου, (3) ανάπτυξη μεθοδολογίας, (4) δημιουργία μιας ένωσης «οδηγού» (lead), (5) βελτιστοποίηση της ένωσης «οδηγού», (6) προσδιορισμός υποψήφιου φαρμάκου και, (7) πραγματοποίηση κλινικών μελετών. Για τον χαρακτηρισμό μιας νέας ένωσης ως «οδηγού» απαιτείται η σάρωση ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων και ο προσδιορισμός της ικανότητας πρόσδεσης στον στόχο. Οι ενώσεις «οδηγοί» χρησιμοποιούνται ως εναρκτήρια διαδικασία βελτιστοποίησης με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της δραστικότητας, της επιλεκτικότητας και των φαρμακοκινητικών παραμέτρων. Στις αρχές

και στα μέσα της δεκαετίας του '90 η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως εργαλείο για τη σάρωση και την αξιολόγηση ενώσεων «οδηγών» με άμεσο προσδιορισμό των θέσεων αλληλεπίδρασης [Shuker et al., 1996]. Τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία όσο και στην ακαδημαϊκή έρευνα, η σάρωση βασισμένη σε τεχνικές NMR έχει γίνει ένας βασικός τρόπος διερεύνησης δομικών ιδιοτήτων, όπως αλληλεπιδράσεων υποκαταστατών με πρωτεϊνικούς υποδοχείς σε ατομικό επίπεδο, και ανακάλυψης βελτιστοποιημένων δραστικών φαρμάκων.

Η φασματοσκοπία NMR, ως ένα σημαντικό εργαλείο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την μοριακή δομή, τη δυναμική και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων και των στόχων τους. Μια κοινή στρατηγική για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασίζεται στην έρευνα βασικών δομικών μονάδων και στον σχεδιασμό εν συνεχεία υποκαταστατών με υψηλή ικανότητα πρόσδεσης. Έτσι, με ένα μεθοδικό τρόπο, ξεκινώντας από βασικές δομικές μονάδες ή τμήματα τα οποία συνδέονται ή συγχωνεύονται, οι επιστήμονες οδηγούνται στην ανάπτυξη ενώσεων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα [Erlanson D.A., 2006]. Οι μέθοδοι NMR που χρησιμοποιούνται για την σάρωση ενώσεων μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: μεθόδους που βασίζονται στην παρατήρηση των αλλαγών στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτεϊνικών υποδοχέων-στόχων και σε αυτές που βασίζονται στις αλλαγές των χημικών μετατοπίσεων των υποκαταστατών.

Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιείται μελέτη και σύγκριση των αλλαγών των χημικών μετατοπίσεων του στόχου παρουσία και απουσία υποκαταστάτη. Η προσέγγιση αυτή συσχέτισης δομής-δραστικότητας με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR καλείται SAR (structure-activity relationship). Μία πειραματική τεχνική για την ανίχνευση πρόσδεσης υποκαταστατών σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς και την ταυτοποίηση ταυτόχρονα των αμινοξέων στην θέση πρόσδεσης αποτελεί η μέθοδος της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ^1H - ^{15}N HSQC, η οποία απαιτεί την επισήμανση της πρωτεΐνης με ^{15}N . Η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται αρχικά με την λήψη ενός φάσματος αναφοράς ^1H - ^{15}N HSQC μόνον της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια στο ίδιο δείγμα προστίθεται ποσότητα υποκαταστάτη και ταυτοποιούνται οι κορυφές διασταύρωσης που μετατοπίζονται σημαντικά σε σύγκριση με το φάσμα αναφοράς. Από τις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων ^1H και ^{15}N της πρωτεΐνης παρουσία του υποκαταστάτη μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το είδος των αμινοξέων που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση [Morgan et al., 1999; Polshakov et al., 1999]. Αρχικά η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της πρόσδεσης υποκαταστατών σε πρωτεΐνες και ειδικότερα στη σάρωση υποκαταστατών για την μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης του FK506 στην πρωτεΐνη FKBP [Shuker et al., 1996]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η αλλαγή στην τιμή των χημικών μετατοπίσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενικότερα για τη σάρωση ελέγχου βιβλιοθηκών ενώσεων [Meyer et al., 2003].

Η τεχνική αυτή (SAR-NMR) μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πέντε κύρια βήματα όπως απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.1: (1) Χρήση της φασματοσκοπίας ^1H - ^{15}N HSQC για την ταυτοποίηση ενώσεων με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης. (2) Συνθετικές χημικές τροποποιήσεις του υποκαταστάτη για βελτιστοποίηση της αλληλεπίδρασης. (3) Χρήση πειραμάτων ^1H - ^{15}N HSQC για την ταυτοποίηση πρόσδεσης υποκαταστατών παρουσία του βελτιστοποιημένου υποκαταστάτη σε συγκεντρώσεις κορεσμού. (4) Βελτιστοποίηση των υποκαταστατών για τη δεύτερη θέση πρόσδεσης. (5) Δέσμευση των δύο υποκαταστατών σε διάφορες θέσεις και επανέλεγχος δυνατότητας πρόσδεσης [Meyer et al., 2003].



Σχήμα 3.2.1 Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής SAR-NMR για την ταυτοποίηση υποκαταστατών με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στη βάση δύο μοριακών θραυσμάτων που προσδένουν δύο γειτονικές θέσεις [Meyer et al., 2003].

Οι μέθοδοι μελέτης των υποκαταστατών βασίζονται στο γεγονός ότι κατά την πρόσδεση σε έναν πρωτεϊνικό στόχο, οι χρόνοι μοριακών κινήσεων (molecular tumbling, τ_c) των υποκαταστατών σε διάλυμα αλλάζουν. Γενικά, οι περισσότερες βιβλιοθήκες σάρωσης με NMR αποτελούνται από μικρά μόρια που πάντα επιδεικνύουν αργή αποδιέγερση (T_1 , T_2) και γρήγορη διάχυση. Κατά την πρόσδεση σε έναν υποδοχέα μεγάλου μοριακού βάρους, ο χρόνος αποδιέγερσης των spin και ο συντελεστής της μοριακής αυτο-διάχυσης του υποκαταστάτη θα μειωθούν σημαντικά. Αυτές οι αλλαγές που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση αυτή διευκολύνουν την άμεση παρατήρηση των σημάτων του υποκαταστάτη με τη χρήση NMR [Zhang et al., 2006]. Τα πειράματα αυτά δεν απαιτούν την χρήση ισοτοπικά επισημασμένων πρωτεϊνών, και τα πειράματα

1D που χρησιμοποιούνται απαιτούν μικρότερο χρόνο από ότι τα πειράματα 2D που απαιτούνται για την παρατήρηση του πρωτεϊνικού στόχου. Οι καλύτεροι υποκαταστάτες ταυτοποιούνται χωρίς την ανάγκη του διαχωρισμού τους από μίγματα ενώσεων και επίσης δεν υπάρχει ανώτατο όριο του μεγέθους του στόχου που μπορεί να μελετηθεί. Ένα γενικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η έλλειψη της ικανότητάς τους να ανιχνεύσουν υποκαταστάτες με υψηλή συγγένεια. Σε υποκαταστάτες που προσδένονται ισχυρά, οι αργοί ρυθμοί αποσύνδεσής τους εμποδίζουν την μεταφορά των ιδιοτήτων του μικρού τμήματος των προσδεδεμένων μορίων στον μεγάλο όγκο των μη προσδεδεμένων μορίων που είναι στην πραγματικότητα αυτά που παρατηρούνται από τη χρήση NMR [Fernández et al., 2004]. Δύο τεχνικές NMR που βασίζονται στην μέθοδο παρατήρησης των αλληλεπιδράσεων μέσω των υποκαταστατών περιγράφονται παρακάτω.

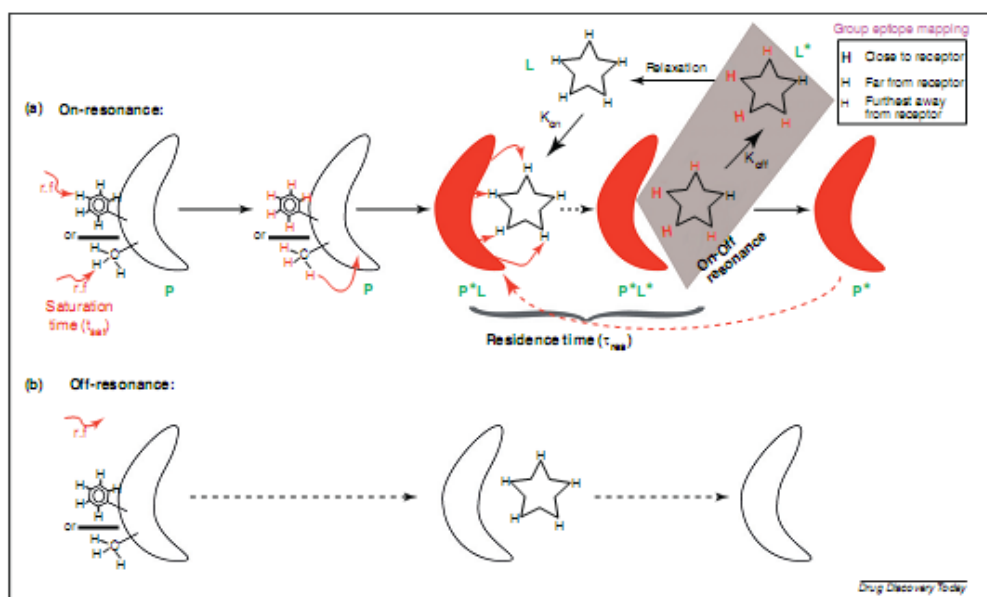
3.2.1 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR).

Η φασματοσκοπία STD NMR έχει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια στον χαρακτηρισμό των συμπλόκων υποκαταστάτη-πρωτεΐνης και στηρίζεται στην παρατήρηση του πυρηνικού φαινομένου Overhauser των σημάτων συντονισμού του υποκαταστάτη. Μπορεί 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 [Mayer et al., 2001].

Με την τεχνική αυτή μπορούν να προκύψουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που αφορούν την ταυτοποίηση των τμημάτων του υποκαταστάτη που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον υποδοχέα λόγω μεταφοράς κορεσμού, ενώ είναι δυνατή και η ομαδική χαρτογράφηση του επίτοπου.

Το πείραμα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι σε έναν προσδεδεμένο υποκαταστάτη, με σταθερά αποσύνδεσης, K_D , να κυμαίνεται 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 τα -1 ppm) με ένταση κορυφών I_{SAT} (εντός συντονισμού φάσμα), 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 προσδένονται στον υποδοχέα

δεν 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 και να αποτελέσει ένδειξη της ισχύος πρόσδεσης. Για ένα μόριο που προσδένεται σε έναν υποδοχέα, μόνο τα σήματα των υδρογόνων 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].



Σχήμα 3.2.1.1 Ο μηχανισμός του πειράματος STD NMR (α) Στο εντός συντονισμού φάσμα τα πρωτόνια της πρωτεΐνης ακτινοβολούνται (t_{sat}) σε μια συχνότητα όπου δεν υπάρχουν σήματα συντονισμού του υποκαταστάτη (π.χ. μεθυλικά ή αρωματικά πρωτόνια της πρωτεΐνης). Η επιλεγμένη συχνότητα ακτινοβολήσης προκαλεί κορεσμό στη μαγνήτιση της πρωτεΐνης και στη συνέχεια μεταφέρεται σε όλη την πρωτεΐνη λόγω διάχυσης των spin (P^*). Εάν ο υποκαταστάτης προσδένεται στον υποδοχέα, ο κορεσμός μεταφέρεται και στην προσδεσμένη ένωση (L^*) κατά τη διάρκεια παραμονής (τ_{res}) στη θέση πρόσδεσης, επιφέροντας ελαττωμένο σήμα στο φάσμα STD. (β) Σε εκτός συντονισμού συνθήκες, η επιλεγμένη συχνότητα ακτινοβολήσης πραγματοποιείται σε μια τιμή όπου δεν συντονίζεται ούτε η πρωτεΐνη ούτε ο υποκαταστάτης, καταλήγοντας σε ένα τυπικό φάσμα NMR του υποκαταστάτη. Αφαίρεση του (α) από το φάσμα (β) καταλήγει σε ένα φάσμα διαφοράς όπου παρατηρείται μόνο η κλασματική ενίσχυση (fractional enhancement) του προσδεσμένου υποκαταστάτη. Η χαρτογράφηση του επίτοπου πρόσδεσης στηρίζεται στην εγγύτητα των πρωτονίων του υποκαταστάτη σε αυτά του υποδοχέα [Bhunia et al., 2012].

Πιο αναλυτικά, σε ένα πείραμα NMR ^1H επιλέγεται η περιοχή όπου θα πραγματοποιηθεί η ακτινοβολήση της πρωτεΐνης και πρέπει η συχνότητα αυτή να είναι

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

μετατοπισμένη τουλάχιστον κατά 1.2 ppm σε σχέση με την πιο κοντινή συχνότητα συντονισμού του υποκαταστάτη (φάσμα εντός συντονισμού) (Σχήμα 3.2.1.1). Ο υποκαταστάτης που είναι προσδεδεδμένος 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 την 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 trNOE παρατηρείται μείωση της έντασης [Meyer et al., 2003].

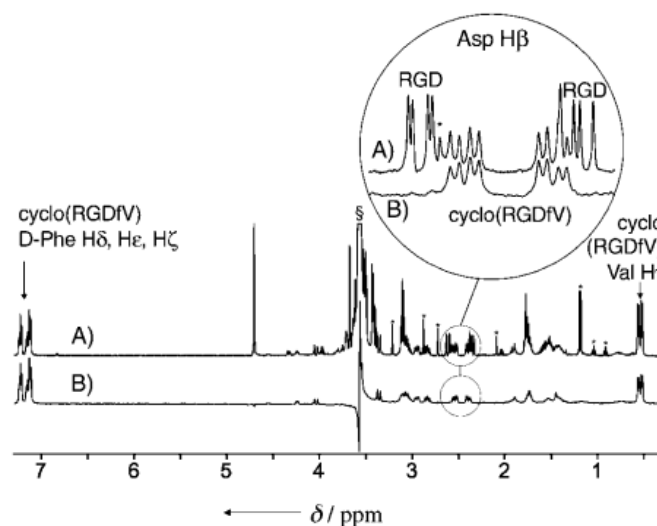
Σε ένα δεύτερο πείραμα η συχνότητα ακτινοβολήσης επιλέγεται σε μια τιμή που να βρίσκεται μακριά από οποιοδήποτε σήμα είτε υποκαταστάτη είτε πρωτεΐνης, για παράδειγμα στα 40 ppm (φάσμα εκτός συντονισμού). Το φάσμα καταγράφεται και παράγει ένα τυπικό φάσμα NMR του μίγματος. Αφαίρεση των δύο φασμάτων οδηγεί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

Στην περίπτωση πρόσδεσης η οποία είναι πολύ ισχυρή και συνεπώς οι ρυθμοί αποσύνδεσης κυμαίνονται μεταξύ $0.1-0.01\text{ s}^{-1}$, 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 προσδεδεδμένου υποκαταστάτη οδηγεί σε πολύ αποτελεσματική μεταφορά κορεσμού στα μόρια στο διάλυμα. Η παρατηρούμενη ένταση των σημάτων του υποκαταστάτη στο φάσμα STD NMR δεν εξαρτάται, συνεπώς, μόνο από την ισχύ πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα του STD NMR εξαρτώνται σημαντικά και από τον ρυθμό αποσύνδεσης, μεγάλη τιμή της οποίας επιφέρει μεγαλύτερη ένταση STD 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 και αλληλεπιδράσεων με K_D έως περίπου 10 mM [Bhunia et al., 2012]. Μία 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 μετρήθηκε με σχετική ευκολία η σταθερά αποσύνδεσης K_D [Bleichner et al., 1998].

Η φασματοσκοπία STD έχει χρησιμοποιηθεί επίσης και στην κλινική χημεία. Αρχικά αναπτύχθηκε για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και χρησιμοποιήθηκε για τη σάρωση βιβλιοθήκης τέτοιων μορίων με ποικιλία συγγένειας πρόσδεσης. Έχει επίσης ευρεία εφαρμογή στη σάρωση νέων βιβλιοθηκών διαφόρων τύπων μορίων όπως μεταβολιτών, φαρμάκων σε υποδοχείς πρόσδεσης (όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων). Έχει εφαρμοστεί επίσης με

επιτυχία σε ποικιλία συστημάτων υψηλού μοριακού βάρους, όπως ολόκληρων ιών, αιμοπεταλίων, ζωντανών κυττάρων, μικυλλίων λιποπολυσακχαριτών, μεμβρανικών πρωτεϊνών και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών [Siebert et al., 2010; Herfurth et al., 2005; Bhunia et al., 2011; Benie et al., 2003]. Για παράδειγμα, ο Pons και η ομάδα του χρησιμοποίησαν την τεχνική αυτή για να παρακολουθήσουν την ανταγωνιστική πρόσδεση στην πρωτεϊνική λιγάση ουβικιτίνη, β -TrCP ανάμεσα σε φωσφορυλιωμένες μορφές του μεταγραφικού παράγοντα-4 (ATF-4) και της β -κατενίνης και πέτυχαν να χαρακτηρίσουν τον επίτοπο πρόσδεσης του ATF-4 [Pons et al., 2008].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρωτεϊνικοί στόχοι σχεδιασμού φαρμάκων οι οποίοι είναι προσδεδεμένοι στην κυτταρική μεμβράνη και για το λόγο αυτό είναι αρκετά δύσκολο να μελετηθούν, διότι αν αποκοπούν από το φυσικό μεμβρανικό τους περιβάλλον χάνουν την δομή και λειτουργικότητά τους. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές STD NMR που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την μελέτη τους όπως π.χ. η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών σε στερεά φάση [Meyer et al., 2003]. Επίσης, για τη μελέτη των μεμβρανικών πρωτεϊνών στο φυσικό τους περιβάλλον μελετήθηκαν οι ιδιότητες πρόσδεσης ιντεγκρινών ενσωματωμένες σε λιποσώματα. Πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες σταθεροποιούνται σε διάλυμα απορρυπαντικών, όπως για παράδειγμα η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ που ενσωματώθηκε σε λιποσωμικές μεμβράνες που σχηματίστηκαν από την διμυρυστυλ-φωσφατίδυλο χολίνη (DMPC) και την διμυρυστυλ-φωσφατίδυλο γλυκερόλη (DMPG) και μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης πεπτιδίων που περιλαμβάνουν το μοτίβο RGD (Arg-Gly-Asp) (Σχήμα 3.2.1.2) [Meinecke et al., 2001].



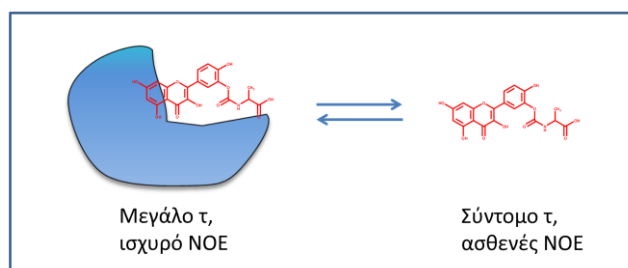
Σχήμα 3.2.1.2 Φάσματα NMR ^1H μίγματος RGD και κυκλο-RGDfV με την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ ενσωματωμένη σε λιποσώματα. Α) Φάσμα NMR ^1H με σήματα και από τους δύο υποκαταστάτες. Το ένθετο δείχνει σε μεγέθυνση την περιοχή που περιέχει σήματα συντονισμού δύο ασπαρτικών διαστερεοτοπικών β πρωτονίων. Τα άλλα σήματα προέρχονται από το ρυθμιστικό διάλυμα TRIS και από κάποια βρωμιά (impurity) *) Β) Το φάσμα STD NMR δείχνει μόνον τις κορυφές του

κυκλοπεπτιδίου που προσδένεται ισχυρά στην ιντεγκρίνη. Το ένθετο δείχνει μόνο τα σήματα από το ισχυρό προσδεδεμένο κυκλο-RGDfV [Meinecke et al., 2001].

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

Το πείραμα αυτό βασίζεται στην μεγάλη διαφορά των ρυθμών διασταυρούμενης αποδιέγερσης T_1 μεταξύ των μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, MB, μορίων. Οι μικρού μοριακού βάρους υποκαταστάτες χαρακτηρίζονται από μικρές θετικές τιμές NOE ενώ οι μεγάλου μοριακού βάρους υποδοχείς παρουσιάζουν αρνητικές τιμές (Σχήμα 3.1.6.1). Για έναν υποκαταστάτη με γρήγορη ανταλλαγή μεταξύ της ελεύθερης και προσδεδεμένης μορφής η παρατηρούμενη τιμή του ρυθμού διασταυρούμενης αποδιέγερσης θα είναι ο μέσος όρος. Η φασματοσκοπία αυτή έχει πλήθος εφαρμογών τα τελευταία χρόνια όπως στη μελέτη πρωτεϊνικών συμπλόκων, στην ανακάλυψη ενώσεων «οδηγών» για τον σχεδιασμό φαρμάκων, στη μελέτη πεπτιδίων που προσδένονται σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς κ.α [Gizachew et al., 2011; Beth et al., 2003].

Όταν τα μόρια του υποκαταστάτη προσδένονται σε πρωτεΐνες-υποδοχείς τα NOE υπόκεινται σε 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 trNOE βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους μοριακής περιστροφής (molecular correlation time) τ_c των ελεύθερων και προσδεδεμένων μορίων. Μόρια χαμηλού ή μεσαίου μοριακού βάρους ($MB < 1000-2000$) 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 (Σχήμα 3.1.6.1). Όταν ένα μόριο μικρού MB (υποκαταστάτης) είναι προσδεδεμένο σε μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνη-υποδοχέα συμπεριφέρεται ως μέρος αυτού του μακρομορίου και έτσι υιοθετεί την αντίστοιχη συμπεριφορά NOE δείχνοντας αρνητικά tr-NOE που αντανakλούν την διαμόρφωσή του σε κατάσταση πρόσδεσης (Σχήμα 3.2.2.1). 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].



Σχήμα 3.2.2.1 Ένα μόριο-υποκαταστάτης μικρού MB σε περίσσεια παρουσία ενός μακρομοριακού υποδοχέα. Στο σύμπλοκο αναπτύσσεται ισχυρό φαινόμενο NOE το οποίο μεταφέρεται στην ελεύθερη μορφή του μορίου-υποκαταστάτη όπου και υπολογίζεται από τα σήματα συντονισμού του.

Γενικά, είναι δυνατή η παρατήρηση δια- και ενδομοριακών trNOE. Τα ενδομοριακά trNOE είναι το κλειδί για τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης των προσδεσμένων υποκαταστατών. Τα διαμοριακά trNOE πραγματοποιούνται ανάμεσα σε υποκαταστάτη και υποδοχέα-πρωτεΐνη, και για το λόγο αυτό επιτρέπουν τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του προσδεσμένου υποκαταστάτη στις πρωτεϊνικές θέσεις πρόσδεσης.

3.2.3 Φασματοσκοπία In-cell NMR.

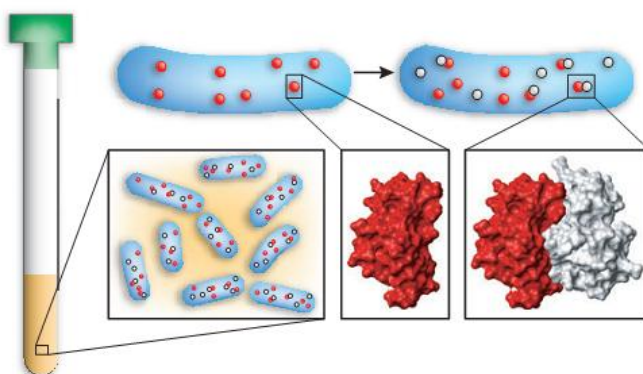
Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια μοναδική τεχνική, ανάμεσα σε πλήθος βιοφυσικών τεχνικών, μελέτης βιολογικών μακρομορίων συνδυάζοντας δύο σημαντικά πλεονεκτήματα. Το πρώτο είναι η ικανότητα να παρέχει πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο σε σχεδόν φυσιολογικές συνθήκες. Ιδιαίτερα μάλιστα τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες και εξελιγμένες τεχνικές όπως *in vivo* NMR η οποία εστιάζει στη μελέτη μεταβολιτών σε συστήματα όπως εναιώρημα βακτηρίων ή άλλων κυττάρων και σε ολόκληρα perfused όργανα. Το δεύτερο σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ευαισθησία της χημικής μετατόπισης των πυρήνων σε αλλαγές του χημικού περιβάλλοντος και έτσι αποτελεί ένα ιδανικό εργαλείο για την μελέτη αλληλεπιδράσεων βιολογικών μακρομορίων με άλλα μακρομόρια, ή υποκαταστατών και φαρμάκων. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω πλεονεκτημάτων έδωσε τη δυνατότητα μελέτης τα τελευταία χρόνια της διαμόρφωσης και της δυναμικής βιολογικών μακρομορίων σε ζωντανά κύτταρα [Serber et al., 2001; Serber et al., 2001].

Από την ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική HSQC NMR μελέτης και χαρακτηρισμού αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και φαρμάκων *in vitro*, προκύπτει το ερώτημα αν η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο και *in vivo*. Η συμπεριφορά ενός φαρμάκου *in vivo* μπορεί να εξαρτάται για παράδειγμα από τη μη δυνατότητά του να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, τον γρήγορο μεταβολισμό, στην πρόσδεση σε άλλα κυτταρικά συστατικά με υψηλότερη συγγένεια ή σε διαφορές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης-στόχου ανάμεσα σε *in vitro* και *in vivo*

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

συνθήκες. Αυτό το σημαντικό μειονέκτημα μπορεί εν μέρει να ξεπεραστεί με τη χρήση της φασματοσκοπίας *in-cell* NMR [Reckel et al., 2005].

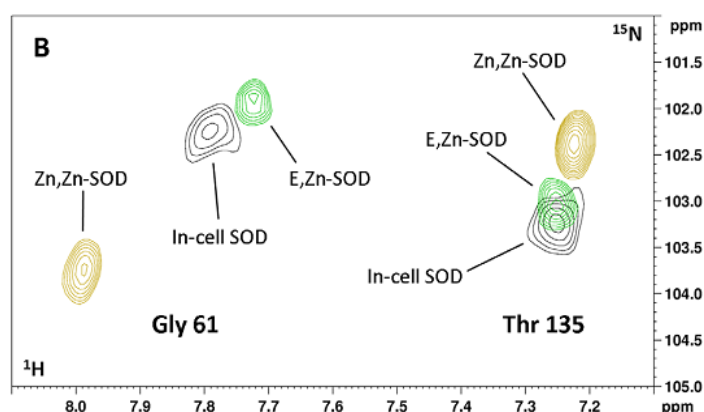
Με τη χρήση φασματοσκοπίας *in-cell* NMR είναι δυνατή η μελέτη αλλαγών στο περιβάλλον ενός μακρομορίου που οφείλονται είτε σε μετα-μεταφραστικές μετατροπές, σε αλλαγές στη διαμόρφωση ή σε αλλαγές που οφείλονται σε πρόσδεση άλλων μορίων και έχουν ως συνέπεια αλλαγές στις συχνότητες συντονισμού των πυρήνων των ατόμων που επηρεάζονται. Για παράδειγμα η αιτία των διαφορών μεταξύ του *in-cell* φάσματος και του αντίστοιχου *in vitro* μπορούν περαιτέρω να διερευνηθούν προσομοιώνοντας τις *in vivo* συνθήκες με *in vitro* πείραμα. Ο Delmon και η ομάδα του με τον τρόπο αυτό απέδειξαν ότι η βακτηριακή πρωτεΐνη FlgM η οποία είναι εντελώς αποδιαταγμένη *in vitro*, στο κυτταρόπλασμα των *E.coli* είναι εν μέρει αναδιπλωμένη [Dedmon et al., 2002]. Μία άλλη σημαντική εφαρμογή της φασματοσκοπίας *in-cell* NMR είναι ο έλεγχος της ταυτομερείωσης και της πρωτονιωμένης κατάστασης των ιστιδινών στο κυτταρικό περιβάλλον. Καθώς οι ιστιδίνες συχνά εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και καθορίζουν τη δραστηριότητά τους, η τεχνική αυτή έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί για τέτοιου είδους μελέτες [Sudmeier et al., 2003].



Εικόνα 3.2.3.1 *In-cell* NMR φασματοσκοπία πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Για την ανάλυση των δομικών λεπτομερειών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και οι δύο εκφράζονται σε *E.coli* και το εναιώρημα των ζωντανών βακτηρίων χρησιμοποιείται για τη λήψη φάσματος NMR [Selenko et al., 2006].

Πλήθος δομικών και λειτουργικών μελετών έχει πραγματοποιηθεί σε βακτηριακά κύτταρα για την ανάλυση της δυναμικής πρωτεϊνών, πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, για *de novo* ταυτοποίηση κ.α. (Εικόνα 3.2.3.1). Ο Luchinat και η ομάδα του μελέτησαν με *in-cell* NMR την άγριου τύπου ανθρώπινη Cu,Zn hSOD1 υπεροξειδική δισμουτάση καθώς και τα αρχικά στάδια κατά την ωρίμανσή της. Με την ανάλυση βακτηριακών κυττάρων *E.coli* που υπερεκφράζουν την hSOD1 στα αρχικά στάδια καθώς και στα αρχικά στάδια ωρίμανσης με πρόσληψη ψευδαργύρου και τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών επιτεύχθηκε η μελέτη της επίδρασης στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της

πρωτεΐνης. Ειδικότερα προέκυψαν σημαντικά στοιχεία για την αναδίπλωση της μη-ώριμης πρωτεΐνης κατά τη διαδικασία πρόσληψης ψευδαργύρου και την αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο κυτταρικό περιβάλλον. Ένα αποτέλεσμα μεγάλης σημασίας που προέκυψε αφορά την επιλεκτικότητα πρόσδεσης του ψευδαργύρου εντός των κυττάρων όπου όταν το μέταλλο προστεθεί σε περίσσεια στην καλλιέργεια, η πρωτεΐνη hSOD1 προσδένει μόνο ένα ισοδύναμο ψευδαργύρου, ενώ *in vitro* και οι δύο θέσεις πρόσδεσης μετάλλου συμπλοκοποιούν τον ψευδάργυρο με συγκρίσιμη συγγένεια (Εικόνα 3.2.3.2) [Banci et al., 2011].



Εικόνα 3.2.3.2 Φάσμα in-cell NMR της hSOD1 με την προσθήκη Zn(II). Αλληλεπικάλυψη του φάσματος ^1H - ^{15}N HSQC σε *E.coli* που εκφράζουν την hSOD1 παρουσία Zn(II) (μαύρο) και του αντίστοιχου φάσματος του *in vitro* δείγματος E,Zn-hSOD1 (πράσινο) όπου ένα ιόν μετάλλου προσδένεται στη θέση πρόσδεσης και Zn,Zn-hSOD1 (κίτρινο) όπου δύο ιόντα μετάλλου προσδένονται στις δύο θέσεις πρόσδεσης. Σε μεγέθυνση η περιοχή όπου παρουσιάζονται οι κορυφές διασταύρωσης των αμινοξέων Gly 61 και Thr 135 [Banci et al., 2011].

Ορισμένα σημαντικά τεχνικά χαρακτηριστικά που προκύπτουν από τη χρήση της μεθοδολογίας αυτής είναι τα ακόλουθα: (i) για τον διαχωρισμό των συντονισμών του μακρομορίου που μελετάται από όλους τους υπόλοιπους του κυττάρου είναι απαραίτητη η υπερέκφραση και η επισήμανσή του με ισότοπα όπως ^{15}N και ^{13}C . (ii) Ένας σημαντικός περιορισμός είναι ότι τα μακρομόρια θα πρέπει να περιστρέφονται στο διάλυμα με ικανοποιητικά σύντομο χρόνο συσχέτισης και για το λόγο αυτό το ιξώδες στο εσωτερικό των κυττάρων είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει το χρόνο συσχέτισης περιστροφής. (iii) Ο βάθος επιβίωσης των κυττάρων στο σωληνάριο NMR είναι σημαντικός περιοριστικός παράγοντας διότι μπορεί να επηρεάζεται από έλλειψη οξυγόνου ή θρεπτικών ουσιών [Reckel 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

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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 το καθαρισμό, μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων με μικροέγχυση ή με άλλες τεχνικές μεταγωγής φορέων. Η μεθοδολογία αυτή περιλαμβάνει ορισμένους περιορισμούς όπως π.χ. μπορεί να εφαρμοστεί σε περιορισμένο τύπο ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική με σημαντικές μελλοντικές εφαρμογές. Από διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα ζύμης, εντόμων και θηλαστικών για την υπερέκφραση επισημασμένων πρωτεϊνών ενώ πρόσφατα ο Selenko και συνεργάτες του και ορισμένες ακόμα ομάδες αναφέρουν την χρήση ωοκυττάρων του *Xenopus laevis* για μετρήσεις in-cell NMR [Selenko et al., 2007].

Μια 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 και 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 υποδοχέων, όπως οι ιντεγκρίνες. Σε ένα ολοένα αυξανόμενο αριθμό μελετών γίνεται χρήση φασματοσκοπίας in-cell tr-NOESY και STD NMR για την 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 την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων [Guzzetti et al., 2013; Mari et al., 2010].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλεξάνδρου, Ν.Ε. Γενική Οργανική Χημεία: Δομή–Φάσματα –Μηχανισμοί, Τεύχος Β΄, Εκδόσεις Ζήτη, **1992**, Θεσσαλονίκη.

Βαλαβανίδης Α.Π., Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Αθηνών, **2006**, Αθήνα.

Γεροθανάσης Ι.Π., Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, , Εκδόσεις Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, **1998**, Πάτρα.

Banci L., Barbieri L., Bertini I., Cantini F., Luchinat E. In-cell NMR in *E. coli* to monitor maturation steps of hSOD1. *PLoS ONE*, **2011**, 6, e23561.

Benie A., Moser R., Buml E., Blaas D., Peters T. Virus-ligand interactions: identification and characterization of ligand binding by NMR spectroscopy. *J.Am.Chem.Soc.*, **2003**, 125, 14-15.

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

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

Bovey F.A., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **1998**, 2nd ed., Academic Press, California.

Breitmaier E., Voelter W., Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution, Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry, **1990**, VCH, New York.

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

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

Bhunia A., Saravanan R., Mohanram H., Mangoni ML., Bhattachatjua S. NMR structures and interactions of Temporin-1TI and Temporin-1Tb with lipopolysaccharide micelles: mechanistic insights into outer membrane permeabilization and synergistic activity. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 24394-24406.

Campo G., Berregi I., Caracena R., Santos I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 556, 462-468.

Caldarelli S. Chromatographic NMR: a tool for the analysis of mixtures of small molecules. *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, 45, S48-S55.

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

Cohen Y., Avram L., Frish L. Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter—new insights. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 520-554.

Dedmon M. M., Patel C. N., Young G. B., Pielak G. J., FlgM gains structure in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 12681-12684.

Erlanson, D. A. Fragment-based lead discovery: a chemical update. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2006**, 17, 643-652.

Ernst, R.R., Bodenhausen, G. and Wokaun, A. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions, Clarendon Press, Oxford, **1989**, UK.

Eurico J. Cabrita and Stefan Berger DOSY studies of hydrogen bond association: tetramethylsilane as a reference compound for diffusion studies. *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, *39*, S142-S148.

Fernández C., Jahnke W. New approaches for NMR screening in drug discovery. *Drug Discov. Today Tech.*, **2004**, *1*, 277-283.

Gerothanassis I.P., Kalodimos C.G., NMR shielding and the periodic table. *J. Chem. Educ.*, **1996**, *73*, 801-804.

Gil A., Duartea I., Cabritab E., Goodfellowa B.J., Spraulc M., R Kerssebaumc Exploratory applications of diffusion ordered spectroscopy to liquid foods: an aid towards spectral assignment. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, *506*, 215-223.

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.

Gounarides J., Chen A., Shapiro M. Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1999**, *725*, 79-90.

Gurpreet S. Kapur, Eurico J. Cabrita and Stefan Berger The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 7181-7185.

Guzzetti I. et al., Determination of the binding epitope of RGDpeptidomimetics to $\alpha v \beta 3$ and $\alpha I b \beta 3$ integrin-rich intact cells by NMR and computational studies. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 3886-3893.

Herfurth, L. et al. Comparative epitope mapping with saturation transfer difference NMR of sialyl Lewis a compounds and derivatives bound to a monoclonal antibody. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6879-688.

Hong Y.-S, Hong K.S., Cho J.-H., Volkov V.I., Lee C.-H. Chemical exchange of hydroxyl protons in quercetin measured by pulsed field gradient NMR. *Appl. Magn. Reson.*, **2008**, *35*, 261-270.

Inomata K., et al., High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, **2009**, *458*, 106-110.

Johnson C.S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1999**, *34*, 203-256.

Johnson M.A., Jaudzems K., Wuthrich K., NMR Structure of the SARS-CoV Nonstructural Protein 7 in Solution at pH 6.5. *J. Mol. Biol.*, **2010**, *402*, 619-628.

Kapur G.S., Cabrita E.J., Berger S. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 7181-7185.

Kavakka J., Kilpeläinen I., Heikkinen S. General chromatographic NMR method in liquid state for synthetic chemistry: polyvinylpyrrolidone assisted DOSY experiments. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1349-1352.

Liu M., Nicholson J., Lindon J. High-Resolution diffusion and relaxation edited one- and two-dimensional ^1H NMR spectroscopy of biological fluids. *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 3370-3376.

Mari S. et al. 2D TR-NOESY Experiments interrogate and rank ligand–receptor interactions in living human cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1071-1074.

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.

Meinecke R., Meyer B. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin α IIb β 3. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3059-3065.

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

Morgan W.D., Birdsall B., Nieto P. M., Gargaro A. R., Feeney J. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC NMR studies of ligand carboxylate group interactions with arginine residues in complexes of brodimoprim analogues and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 2127-2134.

Morris K. F., Stilbs P., Johnson C. S. Analysis of mixtures based on molecular size and hydrophobicity by means of diffusion-ordered 2D NMR. *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 211-215.

Nicolay K., Braun K.P., Graaf R.A., Dijkhuizen R.M., Kruiskamp M.J. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR in Biomed.*, **2001**, *14*, 94-111.

Parella T., Bello J. Gradient-enhanced 1D HMQC- and HSQC-relayed experiments with maximum sensitivity. *Magn. Res. Chem.*, **2001**, *39*, 311-315.

Polshakov V. I., Morgan W. D., Birdsall B., Feeney J. Validation of a new restraint docking method for solution structure determinations of protein-ligand complexes. *J. Biomol. NMR*, **1999**, *14*, 115-122.

Pons J., Evrard-Todeschi N., Bertho G., Gharbi-Benarous J., Tanchou V., Benarous R., Girault J.-P. Transfer-NMR and docking studies identify the binding of the peptide derived from activating transcription factor 4 to protein ubiquitin ligase bTrCP. Competition STD NMR with b-catenin. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 14-29.

Primikyri A., Kyriakou E., Charisiadis P., Tsiafoulis K., Stamatis C., Tzakos A., Gerothanassis I.P. Fine-tuning of the diffusion dimension of –OH groups for high resolution DOSY NMR applications in crude enzymatic transformations and mixtures of organic compounds. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 6887–6891.

Rahman A., Choudhary M.I., Solving problems with NMR spectroscopy, **1996**, Academic Press, San Diego, California, USA.

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

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

Rodrigues E.D., da Silva D.B., de Oliveira D.C.R., da Silva G.V. DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*. *J. Magn. Reson. Chem.*, **2009**, *47*, 1095-1100.

Rogerson A.K., Aguilar J. A., Nilso M., Morris G.A. Simultaneous enhancement of chemical shift dispersion and diffusion resolution in mixture analysis by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 7063-7064.

Selenko P., Wagner G. NMR mapping of protein interactions in living cells. *Nat. Methods*, **2006**, *3*, 80-81.

Selenko P., Wagner G. Looking into live cells with in-cell NMR spectroscopy *J. Struct. Biol.*, **2007**, *158*, 244-253.

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

Serber Z., Keatinge-Clay A.T., Ledwidge R., Kelly A.E., Miller S.M., Dötsch V. High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2446-2447.

Shapiro M.J.; Gounarides J.S. NMR methods utilized in combinatorial chemistry research. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1999**, *35*, 153-200.

Shuker S.B., Hajduk P.J., Meadows R.P., Fesik S.W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **1996**, *274*, 1531-2534.

Siebert H.C. et al. Interaction of the $\alpha 2A$ domain of integrin with small collagen fragments. *Protein Cell*, **2010**, *1*, 393-405.

Sudmeier J.L., Bradshaw E.M., Haddad K.E., Day R.M., Thalhauser C.J., Bullock P.A., Bachovchin W.W., Identification of histidine tautomers in proteins by 2D $^1H/^{13}C(\delta 2)$ one-bond correlated NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8430-8431.

Thureau P., Ancian B., Viel S., Thévand A. Determining chemical exchange rates of the uracil labile protons by NMR diffusion experiments. *Chem. Commun.*, **2006**, *2*, 200-202.

Tzakos A.G., Fuchs P., van Nuland N.A.J., Troganis A., Tselios T., Deraos S., Matsoukas J., Gerothanassis I.P., Bonvin A.M.J.J., NMR and molecular dynamics studies of an autoimmune myelin basic protein peptide and its antagonist. structural implications for the MHC II (I-Au)-peptide complex from docking calculations. *Eur. J. Biochem.*, **2004**, *271*, 3399-3413.

Trefi S., Gilard V., Balayssac S., Malet-Martino M., Martino R. Quality assessment of fluoxetine and fluvoxamine pharmaceutical formulations purchased in different countries or via the Internet by ^{19}F and 2D DOSY 1H NMR. *Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, *46*, 707-722.

Viegas A., Manso J., Nobrega F., Cabrita E. 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.

Wuthrich K., Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*, **1989**, *243*, 45-50.

Wuthrich, K. NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley and Sons, New York, **1986**, USA.

Zhang X., Tang H., Ye C., Liu M. Structure-based drug design: NMR-based approach for ligand-protein interactions. *Drug Discov. Today Tech.*, **2006**, *3*, 241-245.

4. Βιολογική δραστικότητα φλαβονοειδών

4.1 Αντιοξειδωτική δραστικότητα φλαβονοειδών.

Ένας σημαντικός αριθμός φαρμακευτικών ιδιοτήτων έχουν αποδοθεί στα φλαβονοειδή περιλαμβάνοντας αντιμικροβιακή δραστικότητα, ανθελονοσιακή, αντι-ιική, αντιαλλεργική, αντιφλεγμονώδη, αγγειοδιασταλτική, αντι-αρθριτική, προστασία στην καρδιοαγγειακή θνησιμότητα, αντικαρκινικές ιδιότητες κ.α. Από τις πιο καλά μελετημένες βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών είναι η αντιοξειδωτική και η προστασία από το οξειδωτικό στρες.

Πλήθος επιδημιολογικών μελετών υποστηρίζουν ότι η αυξημένη κατανάλωση διατροφής που περιέχει υψηλά επίπεδα φλαβονοειδών συνδέεται με διατήρηση καλής υγείας και την πρόληψη χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση φλαβονοειδών έχει προστατευτική επίδραση σε πλήθος ασθενειών όπως καρδιοαγγειακές, καρκίνο, Parkinson και Alzheimer κ.α.. Υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών με τη διατροφή έχει συνδεθεί με χαμηλή θνησιμότητα λόγω στεφανιαίας νόσου σε γυναίκες και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου σε άντρες. Στο μεγαλύτερο μέρος τους οι δράσεις αυτές έχουν αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών [Heim et al., 2002].

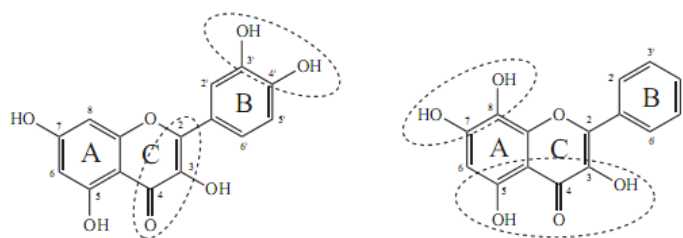
Κατά τον μεταβολισμό τους τα περισσότερα φλαβονοειδή απορροφώνται στα εντερικά κύτταρα με παθητικούς μηχανισμούς και μετά την κυκλοφορία τους στο αίμα μετατρέπονται σε μεταβολίτες με υψηλότερη αντιοξειδωτική και οιστρογονική δραστικότητα σε σύγκριση με τα αρχικά μη-μεταβολισμένα μόρια. Τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, λειτουργώντας ως δότες υδρογόνων αλλά και μέσω συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων. Οι ιδιότητες αυτές έχουν αποδοθεί κυρίως στην ύπαρξη φαινολικών υδροξυλικών ομάδων στους αρωματικούς δακτυλίους με τα φλαβονοειδή κερσετίνη και λουτεολίνη να αποτελούν από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά [Leopoldini et al., 2011].

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στο ανθρώπινο σώμα για συγκεκριμένους μεταβολικούς σκοπούς όπως π.χ. ρίζες οξυγόνου που περιλαμβάνουν μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$), υπεροξείδιο ($\text{O}_2^{\cdot-}$), υδροξύλιο ($\text{HO}^{\cdot}$) κ.α. Όταν απορυθμιστεί η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και των αμυντικών μηχανισμών τότε επιτίθενται στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, στις πρωτεΐνες των ιστών, στα ένζυμα και στο DNA και προκαλούν καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, πρωτεϊνικές τροποποιήσεις και βλάβες στο DNA. Οι βλάβες αυτές είναι υπεύθυνες για πλήθος ασθενειών όπως καρκίνος, καρδιακές ασθένειες κ.α [Ami et al., 2007]. Οι ομάδες $\text{HO}^{\cdot}$ γενικά είναι από τις πιο δραστικές ρίζες και έχουν πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής (περίπου 10^{-9}s). Σε σύγκριση με τα υπεροξείδια του υδρογόνου που μεταβολίζονται από την υπεροξειδική δισμουτάση, οι ρίζες υδροξυλίου δεν απομακρύνονται κατά την

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ενζυμική δράση και αντιδρούν με οποιοδήποτε είδος υποστρώματος [Leopoldini et al., 2011].

Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές επιδράσεις των φλαβονοειδών στο οξειδωτικό στρες έχουν αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στον αριθμό και τη θέση των φαινολικών υδροξυλικών ομάδων. Εκτεταμένες μελέτες σχέσης δομής-δραστικότητας έχουν αποδείξει ότι τα ουσιώδη δομικά χαρακτηριστικά υπεύθυνα για την πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι τα ακόλουθα (Σχήμα 4.1.1): (1) Η παρουσία ο-διϋδρόξυ δομής (3',4' κατεχόλης) στον Β δακτύλιο που προσφέρει υψηλότερη σταθερότητα στις φαινοξυλικές ρίζες των φλαβονοειδών μέσω δεσμών υδρογόνου ή εκτεταμένου ηλεκτρονιακού απεντοπισμού. (2) Η παρουσία διπλού δεσμού C2-C3 σε συνδυασμό με την καρβόνυλο ομάδα στη θέση C4, που προσδίδει ομοεπιπεδότητα των δακτυλίων και συμμετέχει σε σταθεροποίηση της ρίζας (radical stabilization) μέσω ηλεκτρονιακού απεντοπισμού στο σύστημα των τριών δακτυλίων. (3) Η παρουσία των ομάδων OH-3 και OH-5 για μέγιστη ικανότητα δέσμευσης των ριζών. Η απουσία της ομάδας 3-OH ή η υποκατάστασή της από άλλη ομάδα έχει αποδειχτεί ότι μειώνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δραστηριότητα [Pannala et al., 2001].



Σχήμα 4.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών με υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Προς το παρόν δεν υπάρχει ολοκληρωμένη εικόνα του μηχανισμού της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Οι τρεις κύριοι επικρατέστεροι μηχανισμοί που έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία είναι η ικανότητα να λειτουργούν ως δότες υδρογόνων, να μεταφέρουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο και η συμπλοκοποίηση μεταλλικών ιόντων. Πιο συγκεκριμένα οι δύο πρώτοι μηχανισμοί αναφέρονται στην ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, για παράδειγμα ελαττώνοντας την παραγωγή αντιδρώντων μορφών οξυγόνου (ROS), αναστέλλοντας ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η λιπιδική υπεροξειδάση, η πρωτεϊνική κινάση C και αναστέλλοντας την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL). Επίσης μπορούν να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων κυκλοοξυγενάση, λιποξυγενάση, γλουταθειόνη S-τρανσφεράση και NADH οξειδάση, οι οποίες εμπλέκονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο τρίτος προτεινόμενος μηχανισμός αναλύεται παρακάτω [Soobrattee et al., 2005; Pietta et al., 2000].

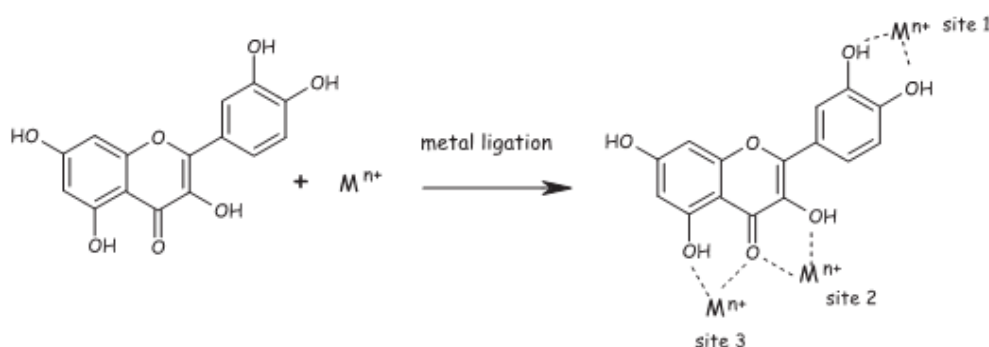
4.1.1 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης μέσω συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων.

Ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών είναι γνωστό ότι συμπλοκοποιούν αποτελεσματικά ιόντα μεταλλικών στοιχείων, όπως σίδηρο(II) και χαλκό(I), τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του οξυγόνου και στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Σχήμα 4.1.1.1).

Η ενδοκυττάρια πρόσδεση του σιδήρου είναι υπεύθυνη για την προστασία που προσδίδουν τα φλαβονοειδή ενάντια στις βλάβες του DNA που οφείλονται στην παρουσία H_2O_2 . Η παρουσία ομάδων $-OH$ είναι σημαντική για την χηλική συμπλοκοποίηση του ελεύθερου σιδήρου(II) που βρίσκεται ενδοκυττάρια και συνεπώς αναστέλλεται η κατάλυση της αντίδρασης Fenton την οποία καταλύει σύμφωνα με την αντίδραση:



Η αντίδραση αυτή είναι υπεύθυνη για την παραγωγή υδροξυλικών ριζών που είναι ιδιαίτερα βλαβερές για το κύτταρο [Melidou et al., 2005]. Η αντίδραση του ελεύθερου σιδήρου (είτε ως Fe^{3+} είτε ως Fe^{2+}) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υδροξυλικών ριζών υπεύθυνων για την παραγωγή των ROS και την οξείδωση βιομορίων. Κυτταρικοί αναγωγείς όπως το ασκορβικό και το NADH ανακυκλώνουν το Fe^{3+} σε Fe^{2+} καθιστώντας την αντίδραση Fenton καταλυτική όταν υπάρχει περίσσεια H_2O_2 [Guo et al., 2007]. Το γεγονός ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φλαβονοειδών οφείλεται στην συμπλοκοποίηση σιδήρου(II) έχει περαιτέρω αποδειχτεί από το γεγονός ότι επέδειξαν ισχυρότερη δραστηριότητα στην περίπτωση που η οξείδωση προκλήθηκε παρουσία μετάλλου από ότι απουσία τους [Arora et al., 1998].



Σχήμα 4.1.1.1 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης φλαβονοειδών μέσω συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων.

Η αντίδραση Fenton πραγματοποιείται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του νευρικού ιστού όπου φυσιολογικά ο ντοπαμινικός καταβολισμός παράγει κάποια επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η συγκέντρωση ελευθέρων ριζών στους

νευρώνες μπορεί να αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης της ασθένειας του Parkinson ενώ άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer παρουσιάζουν ως χαρακτηριστικό εύρημα μια σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του σιδήρου σε καθορισμένες περιοχές του εγκεφάλου [Leopoldini et al., 2011].

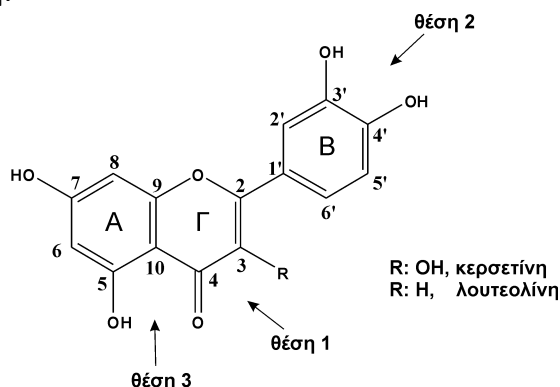
Σε ορισμένες ενδιαφέρουσες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η ικανότητα των φλαβονοειδών να απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες αυξάνεται όταν αυτά βρίσκονται σε συμπλοκοποιημένη μορφή με το ιόν του $Zn(II)$ αλλά και άλλα μέταλλα. Ο $Zn(II)$ δεν είναι μεταπτωτικό μέταλλο και δεν μπορεί να εμπλακεί σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όμως όταν σχηματίζει σύμπλοκα με τα φλαβονοειδή έχει αποδειχτεί ότι ενισχύει τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Εκτός από την αύξηση της ικανότητάς τους να προστατεύσουν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επιφέρουν και αυξημένη προστασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε βλάβες [de Souza et al., 2004; Kostyuk et al., 2001].

Ο $Zn(II)$ ανήκει στα ιχνοστοιχεία και έχει πολύ σημαντικό ρόλο σε πλήθος μεταβολικών σηματοδοτικών μονοπατιών, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, στην άμυνα ενάντια σε ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, την επιδιόρθωση βλαβών του DNA ενώ παρουσιάζει ανταγωνιστικό ρόλο με οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα μετάπτωσης. Είναι σημαντικό μέταλλο για πλήθος πρωτεϊνών για παράδειγμα την $CuZn$ υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), ένα σημαντικό ένζυμο άμυνας πρώτης-γραμμής ενάντια σε ρίζες οξυγόνου αλλά και την p53 ένα σημαντικό παράγοντα που έχει ουσιώδη ρόλο στην απόκριση σε βλάβες του DNA [Ho et al., 2002; Oteiza et al., 2001]. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι έλλειψη $Zn(II)$ προκαλεί βλάβες στο DNA, ενώ *in vivo* αυξήθηκε το οξειδωτικό στρες και οι βλάβες στο DNA σε κύτταρα περιφερικού αίματος. Πιθανός προτεινόμενος μηχανισμός για τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του $Zn(II)$ είναι ότι ανταγωνίζεται τη δραστικότητα δισθενών μετάλλων μετάπτωσης όπως το σίδηρο(II) και το χαλκό(II) και προλαμβάνει την αντίδραση Fenton [Song et al., 2009].

4.1.2 Πειραματικές και θεωρητικές μελέτες συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων με φλαβονοειδή στη διεθνή βιβλιογραφία.

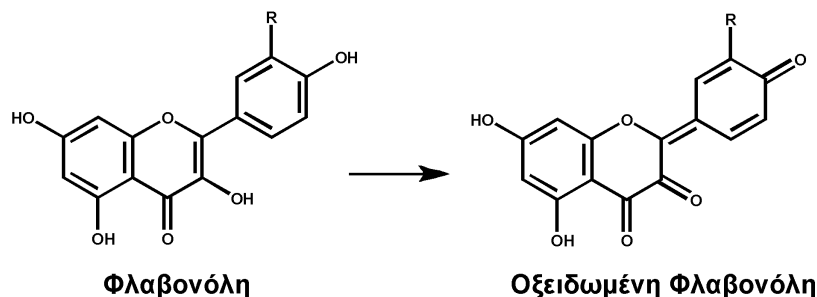
Πλήθος μελετών έχουν δημοσιευθεί με στόχο τον χαρακτηρισμό της συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων με φλαβονοειδή. Οι δομικές και κινητικές ιδιότητες σχηματισμού συμπλόκων των φλαβονοειδών με τον σίδηρο ερευνήθηκαν σε υδατικό διάλυμα pH 7.2 με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές (UV/vis, NMR και EPR) καθώς και με φασματομετρία μαζών και προτάθηκε ότι η κερσετίνη συμπλοκοποιείται με τον Fe^{2+} πιο ισχυρά και από την γνωστή φερροζίνη. Οι ομάδες OH-3 και CO-4 χαρακτηρίστηκαν ως οι πλέον πιθανές θέσεις χηλικής πρόσδεσης [Guo et al., 2007]. Άλλες μελέτες σε μίγμα μεθανόλης-νερού αναφέρουν ότι η κερσετίνη μπορεί να ανάγει

τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} και να προσδέσει και τα δύο ιόντα σε pH 5 και ακόμα πιο γρήγορα σε pH 7.4 [Fernandez et al., 2002].



Σχήμα 4.1.2.1 Πιθανές θέσεις χηλικής συμπλοκοποίησης μετάλλων: η θέση 1 χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγγένεια και οι θέσεις 2 και 3 ακολουθούν.

Άλλες φασματοσκοπικές μελέτες προτείνουν ότι η κερσετίνη (Σχήμα 4.1.2.1) και η κεπφερόλη σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με ιόντα Cu^{2+} αλλά η παρουσία της ομάδας OH-3 ενισχύει την οξείδωσή τους (Σχήμα 4.1.2.2). Η λουτεολίνη (Σχήμα 4.1.2.1) και η ρουτίνη που δεν διαθέτουν ομάδα OH-3 δεν οξειδώνονται τόσο άμεσα από τα ιόντα Cu^{2+} [Brown et al., 1998].



Σχήμα 4.1.2.2 Δομή των φλαβονολών και των οξειδωμένων μορφών τους. R=OH, κερσετίνη; R=H κεπφερόλη [Brown et al., 1998].

Πλήθος μεταλλικών συμπλόκων με την κερσετίνη έχουν χαρακτηριστεί από τον Zhou και την ομάδα του με τη χρήση διάφορων πειραματικών τεχνικών που υποδεικνύουν ότι η ομάδα OH-3 αποπρωτονιώνεται και οι θέσεις συμπλοκοποίησης είναι οι ομάδες OH-3 και CO-4. Οι προτεινόμενες δομές έχουν το γενικό τύπο $[\text{ML}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$ με δύο μόρια νερού να συμμετέχουν στη θέση συμπλοκοποίησης [Zhou et al., 2001]. Επίσης, σύμπλοκα των φλαβονοειδών με Zn(II) , που δεν είναι οξειδωτικός παράγοντας φαινολικών ομάδων αλλά δρα ως οξύ κατά Lewis, μελετήθηκαν σε μίγματα υδατο-οργανικών διαλυτών σε pH 7 και ως θέσεις πρόσδεσης με υψηλή συγγένεια χαρακτηρίστηκαν οι ομάδες OH-3 και CO-4, καθώς το OH-3 πρωτόνιο είναι πιο όξινο, ενώ η θέση OH-3' του B δακτυλίου έχει μικρότερη συγγένεια [Nest et al., 2004; de Souza et al., 2005]. Ο Larouge αναφέρει ότι τα σύμπλοκα των φλαβονοειδών 3-υδροξυφλαβόνης,

5-υδροξυφλαβόνης και 3',4'-διυδροξυφλαβόνης με Zn(II) έχουν στοιχειομετρία 1:1 [Larouge et al., 2006].

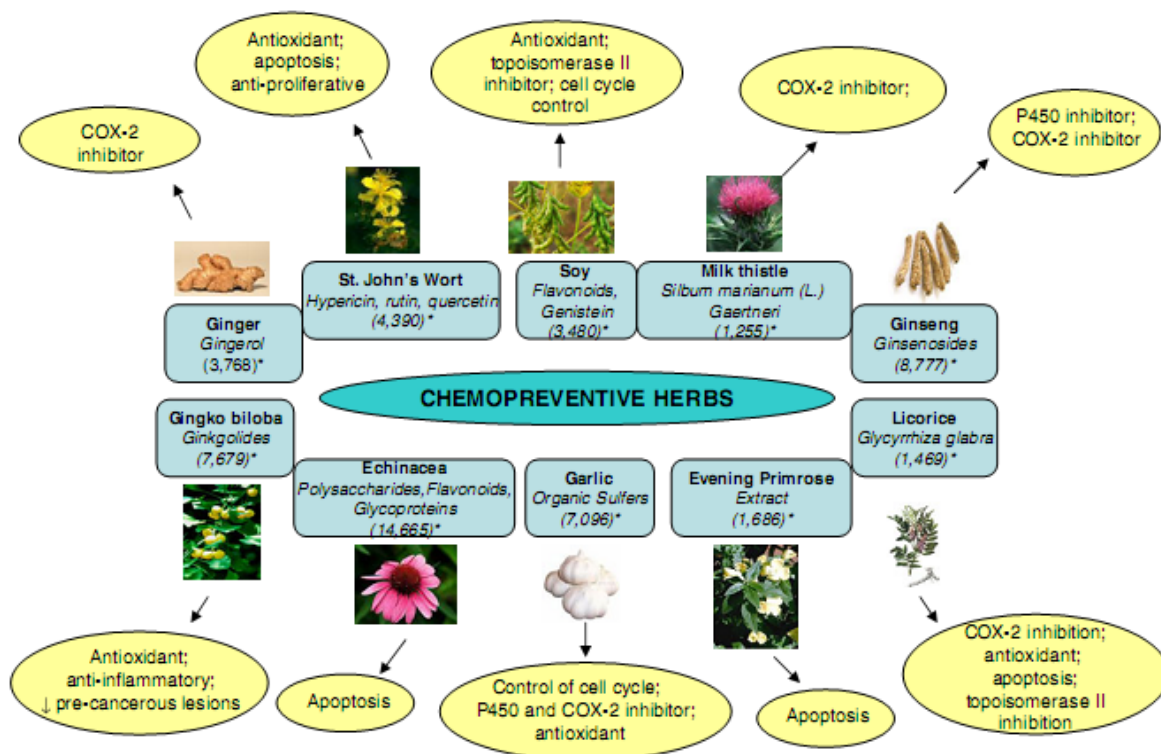
Πλήθος θεωρητικών μελετών σε επίπεδο DFT υπολογισμών προτείνουν τις θέσεις OH-3 και CO-4 των φλαβονοειδών ως τις βέλτιστες για συμπλοκοποίηση με τον σίδηρο(II). Οι υψηλότερες ενέργειες πρόσδεσης υποδεικνύουν ως λιγότερο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης τις υδρόξυ ομάδες 3'-4'. Κατά την συμπλοκοποίηση με τον Fe(II) ο διπλός δεσμός της καρβονυλικής ομάδας καθίσταται πιο πολικός και η ομάδα OH-3 αποπρωτονιώνεται με συνέπεια τη δημιουργία αρνητικώς φορτισμένων μορίων. Έτσι τα φλαβονοειδή μπορούν να μεταφέρουν φορτίο μέσω της αποπρωτονιωμένης ομάδας για τον σχηματισμό φαινοξυλικών ριζών [Ren et al., 2008]. Άλλοι υπολογισμοί σε επίπεδο DFT και μοριακής δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν για τα ιόντα Fe^+ και Cu^+ υπέδειξαν την τάση για συμπλοκοποίηση κυρίως του δακτυλίου Γ και συγκεκριμένα στη θέση CO-4 όταν δεν υπάρχει υποκατάσταση στη θέση 3 [Kazazica et al., 2006].

Θεωρητικές μελέτες DFT-B3LYP συμπλοκοποίησης του Fe(II) με την κερσετίνη υποδεικνύουν ότι η ουδέτερη και η αποπρωτονιωμένη μορφή της κερσετίνης μπορούν να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με άνυδρο και με ενυδατωμένο Fe(II) στοιχειομετρίας 1:2. Οι θέσεις 3-4 και 4-5 χαρακτηρίστηκαν ως οι πιο ευνοϊκές για τη συμπλοκοποίηση [Leopoldini et al., 2006].

4.2 Αντικαρκινική δράση φλαβονοειδών.

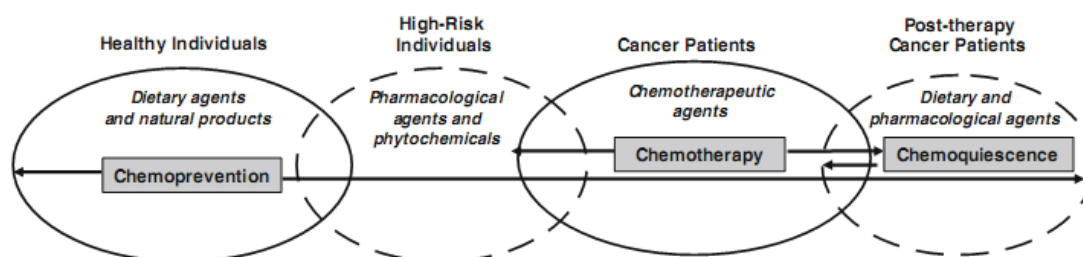
Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μια αστείρευτη πηγή βιοενεργών ενώσεων. Γενικά, τα φυσικά προϊόντα και οι πολυφαινόλες έχουν επιδείξει σημαντικές χημειοπροληπτικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες και συγχρόνως χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα. Πληθώρα μελετών έχει πραγματοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της πιθανής χρήσης των φαινολικών ενώσεων ως αντικαρκινικών παραγόντων. Φρούτα και λαχανικά περιέχουν συστατικά όπως φλαβονοειδή, καροτενοειδή κ.α. τα οποία από πειραματικές μελέτες έχουν επιδείξει αντικαρκινικές ιδιότητες (Εικόνα 4.2.1).

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή από πολλές ερευνητικές μελέτες στη συνεργατική συνεισφορά των συστατικών των φυτικών προϊόντων τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία του καρκίνου. Είναι αρκετά ξεκάθαρο πλέον ότι έκθεση στις ενώσεις αυτές, είτε μέσω της διατροφής είναι μέσω φαρμακολογικών δόσεων, επιφέρει αλλαγές σε βασικές γονιδιακές αποκρίσεις με αποτέλεσμα την πιθανή αναστολή ή καθυστέρηση της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.2.1 η διαδικασία της χημειοπροφύλαξης μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο στην έναρξη όσο και στην πρόοδο της καρκινογένεσης. Κλινικά η χημειοπροφύλαξη εφαρμόζεται σε υγιή άτομα στα οποία διατροφή πλούσια σε φυτοχημικά μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση. Οι φαρμακολογικοί παράγοντες που κατηγοριοποιούνται ως χημειοπροληπτικοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για άτομα με υψηλό ρίσκο ανάπτυξης καρκίνου [Mehta et al., 2010].



Εικόνα 4.2.1 Ορισμένα από τα φυτικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί για τις χημειοπροφυλακτικές τους ιδιότητες και οι δραστικές τους ενώσεις. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των ΗΠΑ που καταναλώνουν αυτά τα χημειοπροστατευτικά βότανα [Mehta et al., 2010].

Πολλές φαινολικές ενώσεις και συγκεκριμένα της ομάδας των φλαβονοειδών έχουν εξεταστεί για πιθανή χρήση ως χημειοπροληπτικών παραγόντων [Fresco et al., 2006]. Διατροφικές συστάσεις που περιέχουν ποικιλία φρούτων, λαχανικών κ.α. μπορούν να προσφέρουν πρόσθετη προστασία και μπορεί να αποτελούν απαραίτητη διατροφή για την περίοδο μετά την θεραπεία των ασθενών. Επίσης, φαρμακολογικές δόσεις των χημειοπροληπτικών αυτών παραγόντων μπορούν να αποδειχτούν ωφέλιμοι για την πρόληψη της επανεμφάνισης, μετάστασης και της επιθετικής εξέλιξης της ασθένειας [Mehta et al., 2010].



Σχήμα 4.2.1 Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης της επιλεκτικής απόκρισης υγιεινούς πληθυσμού καθώς και καρκινοπαθών σε χημειοπροληπτικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι χρήσιμοι για όλους τους πληθυσμούς [Mehta et al., 2010].

4.2.1 Μελέτες αντικαρκινικής δράσης φλαβονοειδών και συσχέτιση δομής-δράσης.

Πλήθος πειραματικών, επιδημιολογικών και κλινικών μελετών υποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή έχουν σημαντικές επιδράσεις στην χημειοπροφύλαξη του καρκίνου. Πολλοί μηχανισμοί έχουν διερευνηθεί και συμπεριλαμβάνουν απενεργοποίηση του καρκινογόνου, αντιπολλαπλασιαστική δράση, διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επαγωγή απόπτωσης και διαφοροποίησης, αναστολή αγγειογένεσης, αντιοξειδωτική δράση και αντιστροφή της ανθεκτικότητας σε φάρμακα ή και συνδυασμός των μηχανισμών αυτών [Mehta et al., 2010].

Ένας ολόένα αυξανόμενος αριθμός επιδημιολογικών μελετών συσχετίζουν την υψηλή κατανάλωση φλαβονοειδών με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου. Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε υγιή άτομα, η διατροφική κατανάλωση φλαβονοειδών συνδέθηκε αντίστροφα με την συχνότητα εμφάνισης καρκίνου και η συσχέτιση προέκυψε κυρίως λόγω μειωμένης εμφάνισης καρκίνων του πνεύμονα. Επίσης βρέθηκε ότι οι άντρες που κατανάλωναν υψηλά ποσοστά κερσετίνης παρουσίασαν μειωμένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα και άντρες με υψηλότερη κατανάλωση μυρισετίνης παρουσίασαν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Άλλες μελέτες προτείνουν ότι η υψηλή κατανάλωση κερσετίνης και κεμπφερόλης μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη [Teillet et al., 2008].

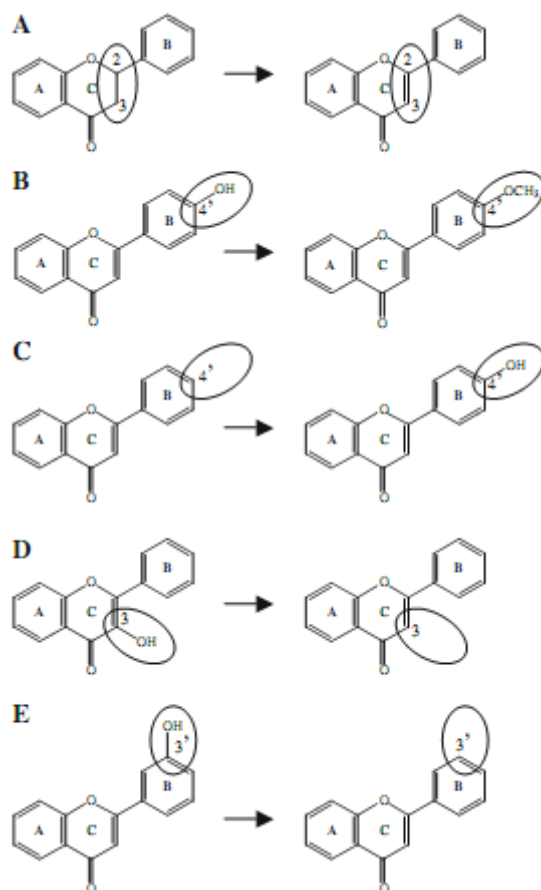
Πλήθος *in vitro* μελετών σε ποικίλα κυτταρικά συστήματα υποδεικνύουν τα φλαβονοειδή ως πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Ο Hirano και οι συνεργάτες του [Hirano et al., 1994] μελέτησαν την αντικαρκινική δραστηριότητα 28 φλαβονοειδών στην λευχαιμική κυτταρική σειρά HL-60 και σύγκριναν την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση και την κυτταροτοξικότητα με αυτές τεσσάρων κλινικών αντικαρκινικών παραγόντων. Οχτώ από τα 28 φλαβονοειδή επέδειξαν σημαντική δραστηριότητα με την γενιστεΐνη να έχει την ισχυρότερη και σχεδόν ισοδύναμη με αυτή των αντικαρκινικών παραγόντων ενώ έχει ελάχιστη τοξικότητα σε αντίθεση με

τους αντικαρκινικούς παράγοντες. Επίσης, διερευνήθηκαν 27 φλαβονοειδή που απαντούν σε εσπεριδοειδή και παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ είναι λιγότερο δραστικά σε φυσιολογικά κύτταρα [Kawai et al., 1999]. Τα φλαβονοειδή όμως δρουν και *in vivo* επιδρώντας σε μοριακούς μηχανισμούς διαφόρων σταδίων έναρξης, προώθησης και προόδου της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, ερευνήθηκε η αναστολή της ογκογένεσης του πνεύμονα από τις κατεχίνες που βρίσκονται στο τσάι σε A/J ποντικούς. Από τα αποτελέσματα προτάθηκε ότι το τσάι παρουσιάζει ευρεία ανασταλτική ικανότητα καρκινογένεσης του πνεύμονα και δρα αποτελεσματικά όταν χορηγείται κατά την έναρξη, την εξέλιξη ή την σταδιακή πρόοδο της ασθένειας. Επίσης, υπάρχουν και πολλά δεδομένα φλαβονοειδών για καταστολή των μεταστατικών όγκων [Yang et al., 2000].

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των προκλινικών μελετών παρακίνησαν και τις κλινικές μελέτες των φλαβονοειδών σε ανθρώπους. Έτσι, για παράδειγμα η κερσετίνη πέρασε επιτυχώς τις κλινικές μελέτες φάσης I σε ασθενείς π.χ. με καρκίνο των ωοθηκών που δεν αποκρίνονταν σε χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδιο/cis-πλατίνα και επέδειξε πτώση καρκινικού δείκτη. Το φλαβονοειδές αυτό δε ήταν επιτυχές στη φάση II των κλινικών μελετών γιατί ο οργανικός διαλύτης, DMSO, στον οποίο διαλύεται δεν ήταν κατάλληλος για τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Επόμενο βήμα αποτέλεσε η σύνθεση ενός υδατοδιαλυτού αναλόγου της κερσετίνης που θα προχωρήσει σε αντίστοιχες μελέτες.

Πλήθος συγκριτικών μελετών έχουν πραγματοποιήσει πειράματα συσχέτισης δομής-δραστικότητας σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Υπάρχει μια γενική τάση για αυξημένη αντικαρκινική δράση παρουσία των ακόλουθων δομικών χαρακτηριστικών: διπλός δεσμός C2-C3, ύπαρξη της καρβονυλικής ομάδας στη θέση 4, των OH ομάδων στις θέσεις 5 και 7 του Α δακτυλίου ενώ η ύπαρξη μεθοξυλικής ομάδας στον Β δακτύλιο στη θέση 4' έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενίσχυση της δραστικότητας [Nagao et al., 2002; Katayama et al., 2007]. Επιπλέον η αντικαρκινική δράση αυξάνεται παρουσία 4-οξο ομάδας και διπλού δεσμού C2-C3 στο δακτύλιο Γ ενώ η παρουσία ομάδας 3-OH, όπως στις φλαβονόλες, φαίνεται να τροποποιεί την αντιμικροβιακή δράση με απρόβλεπτο τρόπο [Fotsis et al., 1997]. Σύμφωνα με πολλές συστηματικές μελέτες με σκοπό τη συσχέτιση δομής-δραστικότητας υπάρχουν ομάδες φλαβονοειδών που αναστέλλουν την πρωτεΐνη BCRP, υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα στη χορήγηση φαρμάκων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Μεταξύ των ενώσεων αυτών, το φλαβονοειδές 3',4',7-τριμεθοξυ-φλαβόνη επιφέρει την ισχυρότερη ανασταλτική δράση [Katayama et al., 2007]. Τα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία φαίνεται ότι αυξάνουν την ανασταλτική ικανότητα των φλαβονοειδών, είναι ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων C2 και C3 στον Γ δακτύλιο, η 4'-Ο-μεθοξυλίωση στον Β δακτύλιο ή η 4'-υδροξυλίωση καθώς και η απουσία της 3-OH στον C δακτύλιο ή της 3'-OH του Β δακτυλίου (Σχήμα 4.2.1.1).

Από την πλειοψηφία τέτοιων μελετών προκύπτει ότι η ύπαρξη του διπλού δεσμού 2,3 είναι απαραίτητο χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών που επιδεικνύουν ισχυρή δραστικότητα η οποία μπορεί να αποδοθεί στην επίπεδη δομή του φλαβονοειδούς λόγω εκτεταμένης συζυγίας των π ηλεκτρονίων των δακτυλίων Β και Γ και της καρβόνυλο ομάδας στη θέση 4. Επιπλέον, η παρουσία των ομάδων OH-5 και OH-7 είναι απαραίτητη λόγω του σχηματισμού ισχυρού ενδομοριακού δεσμού 5-OH...OC-4 και πιθανού σχηματισμού δεσμού υδρογόνου της ομάδας OH-7 με πρωτεϊνική θέση πρόσδεσης [Zhang et al., 2005].



Σχήμα 4.2.1.1 Συσχέτιση δομής-δραστικότητας της BCRP αναστολής φλαβονοειδών. Τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αύξηση της ανασταλτικής ικανότητας υποδεικνύονται με τη φορά του βέλους [Zhang et al., 2005].

Τα μεθοξυλιωμένα φλαβονοειδή παρουσιάζουν σε πολλές μελέτες ισχυρή αντικαρκινική δράση ενάντια σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών αλλά και αντιμεταστατική δραστικότητα. Τα φλαβονοειδή αυτά, όπως η τανγκερετίνη, είναι λιγότερα πολικά και έχουν επίπεδη δομή. Οι μεθοξυλιωμένες υποκαταστάσεις επηρεάζουν γενικά τις βιολογικές τους ιδιότητες όπως την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών, τη μεταβολική τους πορεία και την ικανότητα πρόσδεσης [Mantheyand et al., 2002]. Επίσης, τα μεθοξυλιωμένα φλαβονοειδή παρουσίασαν

υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και ανθεκτικότητα στον ηπατικό μεταβολισμό. Η υψηλότερη εντερική τους απορρόφηση και η ηπατική μεταβολική σταθερότητα τα καθιστά αποτελεσματικότερους χημειοπροληπτικούς παράγοντες *in vivo* [Wen et al., 2006]. Η γλυκουρονίδωση και η θείωση είναι τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια των πολυφαινόλων με ελεύθερες υδροξυλομάδες και ελαττώνουν σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητά τους.

Στην παρούσα διατριβή εστιάσαμε την προσοχή μας σε δύο καρκινικούς κυτταρικούς τύπους, στο αδеноκαρκίνωμα μαστού και στο καρκίνωμα ουδορόχου κύστης. Το αδеноκαρκίνωμα του μαστού αποτελεί τη συντριπτική πλειοψηφία των κακοήθων όγκου του μαστού και προέρχεται από τα επιθηλιακά στοιχεία του μαζικού αδένου, δηλαδή τα αδενικά λοβία και τους πόρους. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση σε περιπτώσεις 'κληρονομικού' καρκίνου του μαστού που σχετίζονται με την ύπαρξη μεταλλάξεων στα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA1 και BRCA2, αν και δεν ξεπερνούν το 5% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού [Coene et al., 2011]. Η ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά MCF7 προέρχεται από ανθρώπινο αδеноκαρκίνωμα μαστού και τα κύτταρα αυτά είναι θετικά σε πυρηνικούς υποδοχείς οιστρογόνων. Έχουν αποδειχτεί ιδιαίτερα σημαντικά για *in vitro* μελέτες καθώς αυτή η κυτταρική σειρά έχει διατηρήσει πολλά σημαντικά χαρακτηριστικά ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού [Levenson et al., 1997].

Ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER) αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό στόχο για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού και σύμφωνα με μελέτες τα φλαβονοειδή που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με τα οιστρογόνα μπορούν να δράσουν είτε ως μιμήτες είτε ως ανταγωνιστές τους. Φυτο-οιστρογόνα όπως η γενιστεΐνη αλληλεπιδρούν άμεσα με τους υποδοχείς των οιστρογόνων και ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στον υποδοχέα της 17β- οιστραδιόλης [Marik et al., 2011].

Περίπου το 80% των όγκων της κύστης προέρχονται από το επιθήλιο (ουρηθήλιο) ενώ οι υπόλοιποι, όπως μυοσαρκώματα, λειομυοσαρκώματα ή ραβδομυοσαρκώματα είναι πολύ σπάνιοι. Οι όγκοι της κύστης διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: (1) Στους επιφανειακούς που περιορίζονται στο επιθήλιο και αποτελούν την πιο ήπια μορφή. (2) Στους διηθητικούς που διηθούν το μυϊκό τοίχωμα και (3) στους μεταστατικούς, που έχουν διηθήσει τους επιχώριους λεμφαδένες, το περικυστικό λίπος ή έχουν προκαλέσει μεταστάσεις σε άλλα όργανα. Η κυτταρική σειρά T24 προήλθε από ανθρώπινο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης. Παρατηρήθηκε ότι αυτή η κυτταρική σειρά παράγει μια ποικιλία κυτοκινών και διαθέτει μετάλλαξη του p53 γονιδίου. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν το ras (H-ras) ογκογονίδιο και είναι επιθηλοειδή προσκολλώμενα κύτταρα που μεγαλώνουν σε μονόστιβα [Peng et al., 2006].

4.2.2 Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης φλαβονοειδών.

Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί από πλήθος *in vitro* και *in vivo* μελετών αφορούν την πρόληψη της μεταβολικής ενεργοποίησης του καρκινογόνου, την αντιπολλαπλασιαστική δράση, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της απόπτωσης, την προώθηση της διαφοροποίησης, την αναστολή της αγγειογένεσης και τη ρύθμιση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα [Ren et al., 2003]. Η αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών εμφανίζεται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κακοήθων όγκων προστατεύοντας το DNA από οξειδωτική βλάβη, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση καρκινογόνων, την έκφραση μεταλλαξιονογόνων γονιδίων και ενζύμων υπεύθυνων για την ενεργοποίηση προκαρκινογόνων, και ενεργοποιώντας αποτοξινωτικά καρκινογόνα [Bravo, 1998; Benavente-Garcia et al., 2008; Galati et al., 2004].

Πλήθος πρωτεϊνικών στόχων έχουν αναφερθεί αναδεικνύοντας την οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών ως την πιο σημαντική. Η ισχυρή αναστολή ενζύμων-κλειδιά, όπως πολλών κινασών (π.χ. PKC, τυροσινικών κινασών, λιπιδικών κινασών, MAPK κινασών κ.α.), αναφέρεται ως πιθανός μηχανισμός για την αντιπολλαπλασιαστική δράση των φλαβονοειδών [Koh et al., 2004]. Πολλά φλαβονοειδή αναφέρεται ότι αναστέλλουν κινάσες, π.χ. η μυρισετίνη, η λουτεολίνη και η απιγενίνη που επιδεικνύουν ισχυρή ανασταλτική δράση ($IC_{50} = 1.8 \mu M$) στην PI 3-κινάση [Bagli et al., 2004]. Η φλαβονόλη κερσετίνη αναστέλλει τη δράση της τυροσινικής κινάσης *pp60v-src*, καθώς και τις δράσεις της CAMP-ανεξάρτητης πρωτεϊνικής κινάσης, της Ca^{2+} /φωσφολιπιδικής-εξαρτώμενης ενζυμικής πρωτεϊνικής κινάσης C και της φωσφορυλάσης κινάσης [Akiyama et al., 1987].

Ως προτεινόμενο κοινό χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών το οποίο πιθανόν να εξηγεί το σύνολο των πρωτεϊνικών τους αλληλεπιδράσεων έχει προταθεί η ιδιότητά τους να δρουν ανταγωνιστικά για τις πρωτεϊνικές θέσεις πρόσδεσης του ATP. Το αρωματικό τμήμα των φλαβονοειδών πιθανόν να λειτουργεί ως μιμητής του ATP και καταλαμβάνει το τμήμα της αδενίνης στη θέση πρόσδεσης με τις κινάσες. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τη συγκρουστικότητα της κερσετίνης με την ανθρώπινη κυκλινό-εξαρτώμενη κινάση 2 (CDK2) και πιο πρόσφατα, της φισετίνης (3,7,3',4'-τετραϋδροξυφλαβόνης) με την ανθρώπινη κυκλινό-εξαρτώμενη κινάση 6 (CDK6) [Teillet et al., 2008; De Azevedo et al., 1996].

Παρακάτω θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην περίπτωση της αντιαγγειογενετικής και αποπτωτικής δράσης των φλαβονοειδών.

4.2.2.1 Αντιαγγειογενετική δράση φλαβονοειδών.

Η διαδικασία της αγγειογένεσης διακρίνεται στα εξής τέσσερα βασικά βήματα: (1) στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων. (2) Στην μετανάστευση αυτών των ενδοθηλιακών κυττάρων προς το αγγειογενετικό

ερέθισμα. (3) Στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και σχηματισμό στερεών βλαστών ενδοθηλιακών κυττάρων στο στρωματικό χώρο και (4) στην οργάνωση των κυττάρων σε τριχοειδείς σωλήνες και αγγειακούς βρόχους με τον σχηματισμό σφιχτών κόμβων και την εναπόθεση της νέας βασικής μεμβράνης [Mojzis et al., 2008].

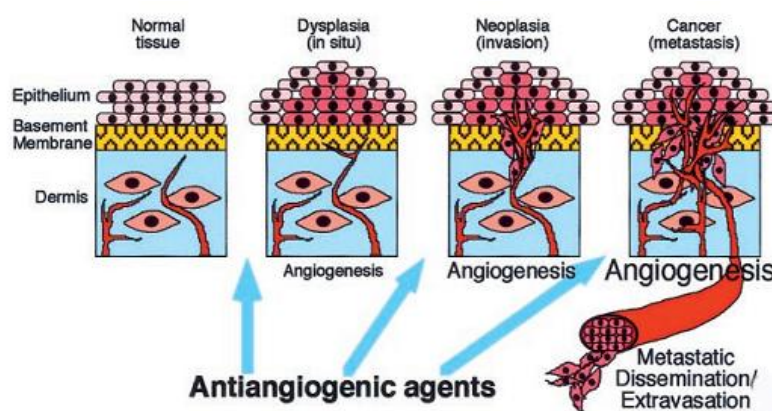
Η αγγειογένεση είναι μία αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία σε ένα υγιές άτομο και ρυθμίζεται από διάφορους ενδογενείς αγγειογενικούς και αγγειοστατικούς παράγοντες. Κατά την αγγειογένεση νέα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από το ήδη υπάρχον μικροαγγειακό δίκτυο. Όμως, η παθολογική αγγειογένεση αποτελεί ένα βήμα κλειδί στην ανάπτυξη του καρκινικού όγκου, στη διήθηση και στη μετάσταση. Οι όγκοι μπορούν να παραμείνουν χωρίς αγγεία και λανθάνουν για χρόνια, όμως η εκκίνηση της ανάπτυξης του όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την νέο-αγγείωση. Ένας αριθμός ορμονών, αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών ρυθμίζουν την αγγειογένεση που σχετίζεται με τον όγκο μετατοπίζοντας την ομοιοστατική ισορροπία προς το σχηματισμό αγγείων. Το νέο μικροαγγειακό δίκτυο που αναπτύσσεται τροφοδοτεί τον όγκο με οξυγόνο και άλλα θρεπτικά συστατικά και επίσης απομακρύνει τα τοξικά απόβλητα που προέρχονται από τον κυτταρικό μεταβολισμό. Επιπρόσθετα, τα αγγεία αυτά λειτουργούν ως πύλες των καρκινικών κυττάρων για την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος και την εξάπλωσή τους σε άλλα όργανα. Συνεπώς, η αγγειογένεση δεν είναι υπεύθυνη για την έναρξη της κακοήθειας αλλά προωθεί την εξέλιξη του όγκου καθώς και τη μετάστασή του [Dietmar et al., 2004].

Καθώς έχει αποσαφηνιστεί μια στενή συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης του όγκου και της αγγειογένεσης και λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο μηχανισμός της έχει διελευκανθεί σε σημαντικό βαθμό, η αναστολή της αγγειογένεσης θεωρείται ως μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για τον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου, της εξέλιξης, της διήθησης και της μετάστασης [Gourley et al., 2000]. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση είναι ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), ο οποίος παίζει ρόλο κλειδί στις αγγειογενικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs), όπως για παράδειγμα στον πολλαπλασιασμό, στη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση καθώς και στην προστασία από την απόπτωση. Στον καρκίνο ο VEGF υπερεκφράζεται μετά από υποξία ή/και ως συνέπεια γενετικών αλλαγών του καρκίνου, όπως μεταλλάξεις ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έτσι σε ένα μεγάλο εύρος τύπων καρκίνων τα επίπεδα του VEGF στο πλάσμα ή σε δείγματα βιοψίας είναι κρίσιμης προγνωστικής σημασίας για το αποτέλεσμα της ανάπτυξης του όγκου. Είναι φανερό λοιπόν ότι ο VEGF αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους για την ανάπτυξη αντιαγγειογενετικών αντικαρκινικών φαρμάκων [Bagli et al., 2004; Mojzis et al., 2008].

Πολλές μελέτες προτείνουν ότι τα φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της αγγειογένεσης (Εικόνα 4.2.2.1.1). Οι ενώσεις αυτές παρεμβαίνουν σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης, όπως η καταστροφή της βασικής μεμβράνης των αιμοφόρων

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αγγείων, ο πολλαπλασιασμός και μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων ή ο σχηματισμός του αυλού [Fotsis et al., 1998]. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί η συσχέτιση της μείωσης που προκαλούν στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη με την μειωμένη αγγειακή πυκνότητα και την χαμηλότερη έκφραση του VEGF στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η γενιστεΐνη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό αγγείων, ελαττώνει την έκφραση του VEGF που προκλήθηκε από υποξία σε καρκίνο του προστάτη και σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ελαττώνει την έκφραση του VEGF υποδοχέα σε ενδοθηλιακά κύτταρα και την έκφραση του HIF-1α, από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές του VEGF γονιδίου, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη ως απόκριση σε υποξία [Guo et al., 2007].



Εικόνα 4.2.2.1.1 Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να παρέμβουν στη διαδικασία αγγειογένεσης σε διαφορετικά στάδια της ογκογένεσης. Η «αγγειογενετική εκκίνηση» που εμφανίζεται νωρίς κατά τη διάρκεια των προνεοπλασματικών σταδίων θα μπορούσε να ανασταλλεί από τους «αγγειοπροληπτικούς» παράγοντες πριν οι φαινοτυπικές και μοριακές αλλαγές καταλήξουν στην εξέλιξη από δυσπλασία σε διηθητικό καρκίνο [Tosetti et al., 2002].

Οι φλαβονόλες αναστέλλουν την αγγειογένεση και τον πολ/σμό του όγκου και των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*. Παράγοντες εκτός της πολικότητας των φλαβονοειδών συνεισφέρουν στον έλεγχο της έκκρισης του VEGF διότι η δραστηρότητα τους δεν σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των ομάδων -OH. Π.χ. η μορίνη (5-OH) που είναι πιο υδρόφιλη από την γενιστεΐνη (3-OH) είναι ανενεργή [Benavente-Garcia et al., 2008]. Η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής, του εγκεφάλου, του φλοιού των επινεφριδίων και του ομφάλιου λώρου παρομοίως δείχνει μη εξειδίκευση για τους διάφορους τύπους ενδοθηλιακών κυττάρων [Fotsis et al., 1997].

Η λουτεολίνη αναστέλλει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη του όγκου σε πειραματόζωα ενώ επίσης αναστέλλει την επαγόμενη από τον VEGF αγγειογένεση σε κερατινοειδή πειραματόζωου. Επιπλέον βρέθηκε να αναστέλλει την επιβίωση και τον

πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας HUVECs με χαμηλή τιμή $IC_{50} \approx 5 \mu\text{mol/L}$. Η αναστολή της επαγόμενης από VEGF δραστηριότητα της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3'-κινάσης (PI3K) κινάσης στα HUVECs είναι κρίσιμης σημασίας για την δραστηριότητά της [Bagli et al., 2004]. Η EGCG καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη *in vitro* και το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης σε συγκέντρωση των 20μM και το αφέψημα του τσαγιού προλαμβάνει το σχηματισμό νέων αγγείων από τον VEGF [Cao et al., 1999]. Άλλο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της αντιαγγειογενετικής δράσης των φλαβονοειδών αποτελεί η περίπτωση της κερσετίνης που βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και το σχηματισμό αγγείων από επιδερμικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Ως πιθανή αιτία της δράσης αυτής προτείνεται η μείωση στην έκφραση και στη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας [Tan et al., 2003].

Ο Oak και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι οι πολυφαινόλες από το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι αναστέλλουν σημαντικά στάδια της αγγειογένεσης όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και την έκφραση δύο κύριων προαγγειογενικών παραγόντων, του VEGF και των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Παρόμοιες ιδιότητες παρατηρήθηκαν και στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη από έμβρυο πτηνού όπου η τοπική εφαρμογή των πολυφαινολών αυτών ανέστειλε ισχυρά το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων [Oak et al., 2003].

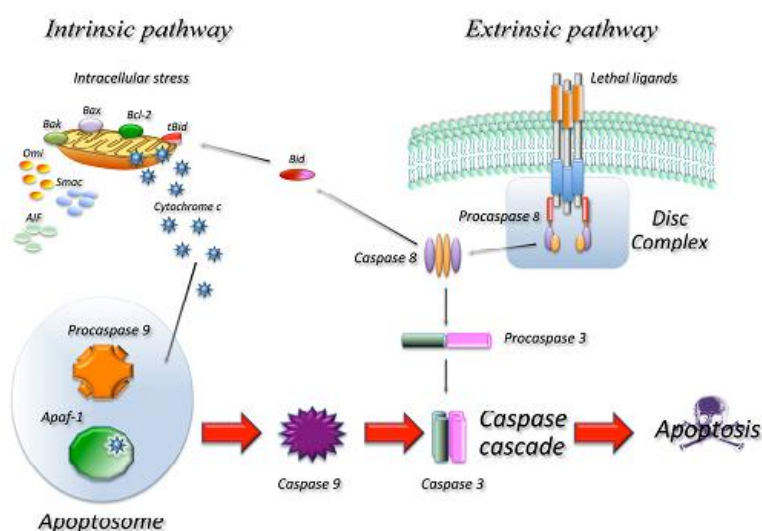
4.2.2.2 Αποπτωτική δράση φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή γενικά έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα ενώ διαφυλάσσουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι μοριακοί μηχανισμοί που μπορεί να εμπλέκονται, περιλαμβάνουν αναστολή της δραστηριότητας DNA τοποϊσομερασών I και II, ρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ, τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, μειорύθμιση της έκφρασης των Bcl-2 και Bcl-xL πρωτεϊνών, ενεργοποίηση ενδονουκλεασών, καταστολή της Mcl-1 πρωτεΐνης, κ.α. [Ren et al., 2003].

Η απόπτωση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια σημαντική φυσιολογική διαδικασία που ρυθμίζει τον αριθμό των κυττάρων και την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών (Εικόνα 4.2.2.2.1). Συνεπώς, απορύθμιση της απόπτωσης συμμετέχει στην παθογένεια διαφόρων ασθενειών όπως και στον καρκίνο. Παρεκκλίνουσα δυσλειτουργία ή απόσβεση της αποπτωτικής μοριακής μηχανής επιτρέπει την επέκταση των καρκινικών κυττάρων που τελικά αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στον επαγόμενο από φάρμακα κυτταρικό θάνατο. Αυτό θεωρείται ως ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου [Hanahan et al., 2011].

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απόπτωση ρυθμίζεται από μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 ρυθμιστικών πρωτεϊνών [Adams et al., 2007]. Η αρχέτυπη Bcl-2 και οι υπόλοιπες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) προσδένονται και αναστέλλουν δύο προ-αποπτωτικές (Bax και Bak) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ο σχηματισμός πόρων διευκολύνεται με την παύση της αναστολής των Bax και Bak, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP), και την ακόλουθη ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών μεταφέροντας (conveying downstream) αποπτωτικά σήματα μέσω πρωτεολυτικής δράσης [Brunelle et al., 2009].



Εικόνα 4.2.2.2.1 Κύρια μοριακά μονοπάτια που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση [Brunelle et al., 2009].

Πρόσδεση των μελών της αντιαποπτωτικής Bcl-2 οικογένειας στην υποοικογένεια πρωτεϊνών BH3-μόνο είναι κοινός παρανομαστής όλων των μοντέλων («άμεσης ενεργοποίησης», «αποκαταστολής» και «από κοινού ενσωμάτωσης») με την οποία οι πρωτεΐνες Bcl-2 απαιτείται να διασυνδεθούν στη ρύθμιση του MOMP [Weyhenmeyer et al., 2012]. Έτσι η απόπτωση αρχίζει όταν η συγκέντρωση των BH3-μόνων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών ξεπερνά την χωρητικότητα πρόσδεσης της υδρόφοβης θέσης που σχηματίζεται από την αναδίπλωση των BH1, BH2 και BH3 τομέων της αντιαποπτωτικής Bcl-2 οικογένειας.

Η χρόνια λεμφική λευχαιμία (ΧΛΛ) αποτελεί από τους πιο συχνούς τύπους λευχαιμίας σε ενήλικους στο δυτικό κόσμο. Η υπερέκφραση της οικογένειας των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 είναι κοινό φαινόμενο για την ΧΛΛ λόγω της υπομεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του Bcl-2 γονιδίου [Pepper et al., 2008; , Hanada et al., 1993] ή λόγω της έλλειψης έκφρασης των miR-15a και miR-16-1, τα οποία

ρυθμίζουν την Bcl-2 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο [Cimmino et al., 2005]. Αυξημένη αναλογία Bcl-2/Bax έχει συσχετιστεί με προοδευτική εξέλιξη της ασθένειας. Πρόσφατα αναφέρθηκε για την Mcl-1 (μυελοειδής κυτταρική λευχαιμία-1), ένα άλλο μέλος της Bcl-2 οικογένειας που σχετίζεται με ανθεκτικότητα στην απόπτωση στην ΧΛΛ [Longo et al., 2008], ότι μειорύθμισή της (downregulation) προκαλεί απόπτωση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από λευχαιμία καθώς επίσης και ενίσχυση της απόπτωσης που προκαλείται από το φάρμακο rituximab [Hussain et al., 2007]. Η Mcl-1 προσδένει και απομονώνει τις προαποπτωτικές Bax και Bak μπλοκάροντας την ικανότητά τους να σχηματίζουν πόρους στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και να απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα. Η μειорύθμιση της Mcl-1 απελευθερώνει τις Bax και Bak επιτρέποντας τον πολυμερισμό τους και ενεργοποιώντας την απόπτωση [Thomas et al., 2010].

Ανατροπή της εγγενούς αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο αποτελεί μια ελκυστική προσέγγιση για την ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας. Έτσι, ο σχεδιασμός μικρών μορίων που μιμούνται τον BH3 τομέα της Bcl-2 προαποπτωτικής οικογένειας αποτελεί ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον θέμα που αποσκοπεί στην ανάπτυξη παραγόντων που αναστέλλουν αντιαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση [Dalafove et al., 2010]. Για παράδειγμα, το ABT-263, ένα μικρό μόριο που αναστέλλει τις Bcl-2 και Bcl-xL πρωτεΐνες, έχει επιδείξει κλινική δράση σε Bcl-2-εξαρτώμενους αιματολογικούς καρκίνους, ενώ το διάδοχο μόριο ABT-199, ένα φάρμακο νέας γενιάς και πιο ισχυρός αναστολέας της Bcl-2 βιοδιαθέσιμος από το στόμα, βρίσκεται στα πρώτα στάδια κλινικής ανάπτυξης για την θεραπεία των Bcl-2-εξαρτώμενων αιματολογικών καρκίνων [Souers et al., 2013]. Οι ενώσεις ABT-199 και ABT-737 λειτουργούν ως BH3 μιμητές και επιδεικνύουν σημαντική επίδραση σε ER-θετικό καρκίνο του μαστού με σημαντική ενίσχυση της απόκρισης του όγκου στο αντι-οιστρογόνο ταμοξιφέν (tamoxifen), παρέχοντας έτσι ενδείξεις για την αναγκαιότητα περαιτέρω κλινικής μελέτης [Vaillant et al., 2013].

Τα φυσικά προϊόντα είναι πηγή ενώσεων με BH3 μιμητική δραστηριότητα. Η 7,8-υδροξυφλαβόνη βρέθηκε να προκαλεί απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα λευχαιμίας U937 μέσω τροποποίησης της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν σημαντικά τα κύτταρα από την απόπτωση όταν υπερεκφράζονται [Park et al., 2013]. Σε άλλες μελέτες οι κατεχίνες που υπάρχουν στο πράσινο τσάι βρέθηκε ότι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL. Οι πολυφαινόλες μπορεί να αναστείλλουν την εξέλιξη του καρκίνου και να επάγουν απόπτωση προσδένοντας και καταστέλλοντας τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Έχει αναφερθεί ότι επειδή οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 δεν εκφράζονται στα φυτά είναι πιθανό να έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες πολυφαινόλες στα φυτά που δρουν ως φυσικά εντομοκτόνα στοχεύοντας την Bcl-2 οικογένεια των εντόμων και των νηματοιειδών επιφέροντας έτσι κυτταρικό θάνατο [Leone et al., 2003].

ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γκοσυπόλη AT-101, το ενεργό εναντιομερές της γκοσυπόλης (μια φυσική πολυφαινόλη προερχόμενη από το βαμβάκι) είναι ένας BH3 μιμητής που αλληλεπιδρά άμεσα με την Bcl-xL και προς το παρόν βρίσκεται σε κλινικές μελέτες σε χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς για την θεραπεία μεταστατικών καρκίνων [Liu et al., 2009; Sonpavde et al., 2012]. Επίσης, η γκοσυπόλη ρυθμίζει τα επίπεδα της Mcl-1 επιδρώντας άμεσα ή έμμεσα στη σταθερότητα του mRNA και την πρωτεϊνική αποδόμηση ενώ με τον τρόπο αυτό μιμείται και τη δραστηριότητα της κερσετίνης. Ιδιαίτερη προσοχή έχει λάβει η κερσετίνη για τις αντικαρκινικές της ιδιότητες και έχει αναφερθεί ότι παρεμβαίνει με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας [Spagnuolo et al., 2011; Cheng et al., 2010].

Η κερσετίνη έχει ήδη αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ότι προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε λευχαιμικά κύτταρα ενώ ποικίλοι μηχανισμοί και πιθανόν στόχοι έχουν προταθεί όσον αφορά τον υποδοχέα θανάτου-5 (death receptor-5), τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, τις κασπάσες, την Akt/PKB κινάση, την Cu-Zn υπεροξειδική δισμουτάση και τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ [Philchenkov et al., 2010]. Η κερσετίνη είναι ένα μόριο το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποκαταστήσει την ευαισθησία στην επαγωγή της απόπτωσης σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές όταν συνδυάζεται με ανασυνδυασμένο παράγοντα νέκρωσης όγκων-σχετιζόμενο με επαγωγή απόπτωσης υποκαταστάτη (TRAIL) ή anti-CD95 [Russo et al., 2003; Russo et al., 2007].

Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι η κερσετίνη έχει αντιπολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση ενάντια σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Η κερσετίνη μπορεί να μειώσει τα επίπεδα έκφρασης της Mcl-1 επιδρώντας σε διάφορα ρυθμιστικά μονοπάτια [Spagnuolo et al., 2011]. Στην έρευνα αυτή προτείνεται ως πιθανός μηχανισμός της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης η ικανότητά της να ελαττώνει τα επίπεδα της Mcl-1, επιδρώντας άμεσα ή έμμεσα στην σταθερότητα του mRNA της και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης, βοηθώντας έτσι λευχαιμικά κύτταρα, απομονωμένα από ΧΛΛ ασθενείς, να ξεπεράσουν την ανθεκτικότητα στην απόπτωση και ευαισθητοποιώντας Β κύτταρα, επίσης από ΧΛΛ ασθενείς, στην απόπτωση που προκαλείται από φάρμακα και υποδοχείς παρακίνητες θανάτου. Η ιδιότητα αυτή της κερσετίνης μπορεί να συσχετιστεί και με την ικανότητά της να ευαισθητοποιεί τα U-937 κύτταρα λευχαιμίας στην απόπτωση που προκαλείται από την ένωση fluradabine και υποδοχείς παρακίνητες θανάτου.

Από άλλη μελέτη προέκυψε ότι η χορήγηση κερσετίνης οδήγησε σε σημαντική απόπτωση τόσο σε μετασχηματισμένα όσο και σε πρωταρχικά λευχαιμικά κύτταρα αλλά όχι σε φυσιολογικά περιφερειακά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος. Επαγωγή απόπτωσης από την κερσετίνη συνοδεύεται από μείωση της ρύθμισης της Mcl-1 και μορφολογικές αλλαγές της Bax καθώς και μιτοχονδριακή μετατόπιση που πυροδότησε την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Επίσης, *in vivo* χορήγηση κερσετίνης εξασθένησε

την ανάπτυξη όγκων σε U937 πειραματόζωα όπου επίσης παρατηρήθηκε μείωση της ρύθμισης της Mcl-1 και ενεργοποίηση της Bax [Cheng et al., 2010].

Σε άλλους καρκινικούς τύπους όπως για παράδειγμα σε κυτταρική σειρά μελανώματος ποντικού B16-BL6, η οποία παρουσιάζει υψηλή μεταστατική ικανότητα, η κερσετίνη ανέστειλε *in vitro* την εισβολή (invasiveness) και μετάσταση των κυττάρων με επαγωγή απόπτωσης ελαττώνοντας σημαντικά την έκφραση της Bcl-2, που σχετίζεται με μεταστάσεις όγκων, ενώ επηρέασε ελάχιστα τα επίπεδα της Bcl-xL [Zhang et al., 2001]. Σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος HepG2, παρουσία κερσετίνης βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα της Bcl-xs, που είναι το προϊόν πρωτεολυτικής διάσπασης της Bcl-xL από κασπάσες, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή επαγωγή απόπτωσης μέσω άμεσης ενεργοποίησης των κασπασών [Granado-Serrano A. et al., 2006]. Η κερσετίνη επίσης επέφερε απόπτωση και σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC-3 σχετιζόμενη με αύξηση του λόγου Bax/Bcl-2 και ανεξάρτητα από ρύθμιση της p53 καθώς η κυτταρική αυτή σειρά είναι p53-αρνητική [Vijayababu et al., 2006].

Τα T-λευχαιμικά κύτταρα Jurkat βρέθηκε ότι μπορούν να προσλαμβάνουν κερσετίνη εξαιρετικά γρήγορα, ενώ από μελέτη της κατανομής της κερσετίνης στα κυτταρικά διαμερίσματα παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση στα μιτοχόνδρια [Fiorani et al., 2009]. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση της αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με τις μεμβρανικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Ωστόσο, παρά τις εκτενείς μελέτες που αφορούν την ικανότητα της κερσετίνης να επιφέρει απόπτωση σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της δράσης αυτής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams**, J.M., Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **2007**, 26, 1324-1337.
- Akiyama** T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 5592-5595.
- Ami** D., Davidović-Amić D., Bešlo D., Rastija V., Lučić B., Trinajsti N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 827-845.
- Arora** A., Nair M. G., Gale M. Strasburg Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 24, 1355-1363.
- Bagli** E., Stefaniotou M., Morbidelli L., Ziche M., Psillas K., Murphy C., Fotsis T., Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7936-7946.
- Benavente-Garcia** O., Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 6185-6205.
- Bravo** L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **1998**, 56, 317-333.
- Brown** J. E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C. A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, **1998**, 330, 1173-1178.
- Brunelle** J.K., Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 437-441.
- Cao** Y., Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, **1999**, 398, 381.
- Cimmino** A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M., Ferracin M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS*, **2005**, 102, 13944–13949.
- Cheng**, S., Gao, N., Zhang, Z., Chen, G., Budhreja, A., Ke, Z., Son, Y., Wng, X., Luo, J., Shi, X. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax. *Clin. Cancer Res.*, **2010**, 16, 5679-5691.
- Coene** E., Gadelha C., White N., Malhas A., Thomas B., Shaw M., Vaux D. A novel role for BRCA1 in regulating breast cancer cell spreading and motility. *J. Cell Biol.*, **2011**, 192, 497-512.
- Dalafave** D.S., Prisco G. Inhibition of antiapoptotic Bcl-xL, Bcl-2, and Mcl-1 proteins by small molecule mimetics. *Cancer Inform.*, **2010**, 9, 169-177.
- De Azevedo** WF, Jr., Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim SH. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 2735-2740.
- Dietmar** W., Siemann D., Chaplin J., Horsman M. R. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. *Cancer*. **2004**, 100, 2491-2499.

Fernandez M. T., Mira M. L., Florencio M. H., Jennings K. R., Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 92, 105-111.

Fiorani M., Guidarelli A., Blasa M., Azzolini C., Candiracci M., Piatti E., Cantoni O. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *J. Nutr. Biochem.*, **2010**, 21, 397-404.

Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., Breit S., Rasku S., Adlercreutz H., Wähälä K., Montesano R., Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.*, **1997**, 57, 2916-2921.

Fotsis T., Pepper M.S., Montesano R., Aktas E., Breit S., Schweigerer L., Rasku S., Wahala K., Adlercreutz H. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, 12, 649–666.

Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M.P.M. new insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.*, **2006**, 26, 747-766.

Galati G., O'Brien P. J., Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.*, **2004**, 37, 287-303.

Gourley M., Williamson J.S. Angiogenesis: Newtargets for the development of anticancer chemotherapies. *Curr. Pharm. Des.*, **2000**, 6, 417-439.

Granado-Serrano A., Martin M., Bravo L., Goya L., Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Nutr.*, **2006**, 136, 2715-2721.

Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., Chasteen N.D. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans.*, **2007**, 43, 4951-4961

Guo Y., Wang S., Hoot D. R., Clinton S. Suppression of VEGF-mediated autocrine and paracrine interactions between prostate cancer cells and vascular endothelial cells by soy isoflavones *J. Nutr. Biochem.*, **2007**, 18, 408- 417.

Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmayer E., Reed J.C. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **1993**, 82, 1820-1828.

Hanahan, D., Weinberg, A.R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **2011**, 144, 646-674.

Heim K.E., Tagliaferro A.R, Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, 13, 572-584.

Hirano T., Gotoh M., Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.*, **1994**, 55, 1061-1069.

Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, 99, 16770-16775.

Hussain S.-R., Cheney C., Johnson A et al. Cytotoxicity rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent lymphoid malignancies: down-regulation enhances Mcl-1 Is a relevant therapeutic target in acute and chronic. *Clin Cancer Res.*, **2007**, 13, 2144 –2150.

Katayama K., Masuyama K., Yoshioka S., Hasegawa H., Mitsuhashi J., Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure–activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *60*, 789-797.

Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1999**, *63*, 896-899.

Kazazica, S. P., Butkovic, V., Srzica, D., & Klasinc, L. Gas-phase ligation of Fe⁺ and Cu⁺ ions with some flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 8391-8396.

Koh E.Y., Chen T., Daley G.Q. Genetic complementation of cytokine signaling identifies central role of kinases in hematopoietic cell proliferation. *Oncogene*, **2004**, *23*, 1214-1220.

Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Afanas'ev I.B.A. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *385*, 129-137.

Lapouge, C., Dangleterre, L., & Cornard, J. P. Spectroscopic and theoretical studies of the Zn(II) chelation with hydroxyflavones. *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 12494-12500.

Leone M., Zhai D., Sareth S., Kitada S., Reed JC., Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 8118-8121.

Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 6343-6351

Leopoldini M., Russo N., Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, **2011**, *125*, 288-306.

Levenson A., Jordan C. MCF-7: The First Hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 3071-3078.

Liu, G., Kelly, W.K., Wilding, G., Leopold, L., Brill, K., Somer, B. An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2009**, *15*, 3172-3176.

Longo P., Laurenti L., Gobessi S., Sica S., Leone G., Efremov D. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **2008**, *111*, 846-855.

Mantheyand J., Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5837-5843.

Marik R., Allu M., Anchoori R., Streams V., Umbricht C., Khan S. Potent genistein derivatives as inhibitors of estrogen receptor alpha-positive breast cancer. *Cancer Biol. Ther.*, **2011**, *11*, 883-892.

Mehta R., Murillo G., Naithani R., Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm. Res.*, **2010**, *27*, 950-961.

Melidou M., Riganakos K., Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**, *39*, 1591-1600.

Mojzis J., Varinska L., Mojzisova G., Kostova I., Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol. Res.*, **2008**, *57*, 259-265.

Nagao T., Abe F., Kinjo J., Okabe H. Antiproliferative constituents in plants 10. flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure–activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, 25, 875-879.

Nest G. L., Caille O., Woudstra M., Roche S., Guerlesquin F., Lexa D. Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, 357, 775-784.

Oak MH, Chataigneau M, Keravis T, Chataigneau T, Beretz A, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Chang SJ, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23, 1001-1007.

Oteiza P.I., Clegg M.S., Keen C.L. Short-term zinc deficiency affects nuclear factor-kappaB nuclear binding activity in rat testes. *J Nutr.*, **2001**, 131, 21-26.

Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J., Rice-Evans C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 282, 1161-1168.

Park H.Y., Kim G.Y., Kwon T.K., Hwang H.J., Kim N.D., Yoo Y.H., Choi Y.H. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by 7,8-dihydroxyflavone hydrate through modulation of the Bcl-2 family of proteins and the MAPKs signaling pathway. *Mutat. Res.*, **2013**, 751, 101-108.

Peng C.-C., Chen K.-C., Peng R., Su C.-H., Hsieh-Li H. Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the *Antrodia camphorata* extracts. *Cancer Lett.*, **2006**, 243, 109-119.

Pepper C., Lin T.T., Pratt G., Hewamana S., Brennan P., Hiller L. et al. 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.

Philchenkov A., Zavelevich M., Savinska L., Blokhin D. Jurkat/A4 cells with multidrug resistance exhibit reduced sensitivity to quercetin. *Exp Oncol* **2010** 32, 76–80.

Pietta P.-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1035-1042.

Ren J., Meng S., Lekka C. E., Kaxiras E. Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 1845-1850.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23, 519-534.

Russo M., Nigro P., Rosiello R., D'Arienzo R., Russo G.L. Quercetin enhances CD95- and TRAIL-induced apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia* **2007**, 21, 1130–1133.

Russo M., Palumbo R., Mupo A., Tosto M. et al. Flavonoid quercetin sensitizes a CD95-resistant cell line to apoptosis by activating protein kinase Ca. *Oncogene* **2003**, 22, 3330–3342.

Song Y., Leonard S., Traber M., Ho E. Zinc deficiency affects dna damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J. Nutr.*, **2009**, 139, 1626-1631.

Sonpavde, G., Matveev, V., Burke, J.M., Caton, J.R., Fleming, M.T., Hutson, T.E., Galsky, M.D., Berry, W.R., Karlov, P., Holmlund, J.T., et al. Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol.*, **2012**, 23, 1803-1808.

Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T., "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res.*, **2005**, 579, 200-213.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. ABT-199, a potent and selective Bcl-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.*, **2013**, 19, 202-208.

de Souza R. F., De Giovani W. F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.*, **2004**, 9, 97-104.

de Souza R.F.V., De Giovani W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochim. Acta A*, **2005**, 61, 1985-1990.

Spagnuolo C., Cerella C., Russo M., Chateauvieux S., Diederich M., Russo G.L. Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. *Br. J. Cancer*, **2011**, 105, 221-230.

Tan W.F., Lin L.P., Li M.H., Zhang Y.X., Tong Y.G., Xiao D., Ding J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, 459, 255-262.

Teillet F., Boumendjel A., Boutonnat J., Ronot X. Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28, 715-745.

Thomas L., Lam C., Edwards S. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* **2010**, 584, 2981–2989.

Tosetti F., Ferrari N., De Flora S., Albini A. 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J.*, **2002**, 16, 2-14.

Vaillant F., Merino D., Lee L., et al. Targeting Bcl-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell*, **2013**, 8, 120-129.

Vijayababu R., Kanagaraj P., Arunkumar A., Ilangoan R., Dharmarajan A., Arunakaran J. Quercetin induces p53-independent apoptosis in human prostate cancer cells by modulating Bcl-2-related proteins: a possible mediation by IGFBP-3. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, **2006**, 16, 67-74.

Wen X., Walle T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, 34, 1786-1792.

Weyhenmeyer, B., Murphy, A.C., Prehn, J.H.M., Murphy, B.M. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp. Oncol.*, **2012**, 34, 192-199.

Yang CS, Chung JY, Yang GY, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J. Nutr.*, **2000**, 130, 472S-478S.

Zhang X., Xu Q., Saiki I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. *Clin. Exper. Metastasis* **2001**, 18, 415–421.

Zhang S., Yang X., Coburn R. A., Morris M. E. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, 70, 627-639.

Zhou J., Wang L., Wang J., Tang N. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes. *Trans. Metal Chem.*, **2001**, 26, 57-63.

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγά τους αποτελούν μια αστείρευτη και ανεκτίμητη πηγή θεραπευτικών παραγόντων. Αποτελούν παραδοσιακά πολύ σημαντικούς θεραπευτικούς παράγοντες από την αρχή της ανάπτυξης των ιατρικών επιστημών και έχουν αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη πλήθους φαρμάκων. Τα φυτά έχουν εξελιχθεί και προσαρμοστεί μέσα από το πέρασμα χιλιάδων ετών ώστε να αντιμετωπίζουν τα βακτήρια, τα έντομα και τους μύκητες και έχουν παράγει μοναδικούς και δομικά ποικίλλους δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι εθνοφαρμακολογικές τους ιδιότητες έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρωτογενής πηγή φαρμάκων στις πρώτες μελέτες για την ανάπτυξη φαρμάκων [Dias et al., 2012].

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), 80% των ανθρώπων χρησιμοποιούν ακόμα φάρμακα βασισμένα σε φυτικά προϊόντα για πρωτογενή ιατρική περίθαλψη και το 80% των 122 φυτικά προερχόμενων φαρμάκων έχουν συσχετιστεί με την αρχική τους εθνοφαρμακολογική χρήση. Η γνώση που έχει αποκομιστεί από την παραδοσιακή ιατρική έδωσε το έναυσμα για την προώθηση περαιτέρω ερευνών των φαρμακευτικών φυτών ως πιθανών φαρμάκων και οδήγησε στην απομόνωση πολλών φυσικών προϊόντων που έχουν γίνει ευρέως γνωστά φαρμακευτικά. Ένα τέτοιο είδος φαρμάκου αποτελεί το paclitaxel (Taxol®), για τον καρκίνο του μαστού, που απομονώθηκε από το φλοιό του φυτού *Taxus brevifolia* [Dias et al., 2012].

Παρά τις πιέσεις που εφαρμόστηκαν στη βιομηχανία ανάπτυξης φαρμάκων έναντι των φυσικών προϊόντων λόγω εναλλακτικών μεθόδων ανάπτυξης φαρμάκων όπως η εκλογικευμένη σχεδίαση συνθετικών φαρμάκων και η συνδυαστική χημεία, πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις έχουν επαναφέρει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην ανάπτυξη φαρμάκων από φυσικά προϊόντα. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται κυρίως, στο ότι οι χημικές δομές των φυσικών προϊόντων διαθέτουν μεγάλη χημική ποικιλότητα και βιοχημική επιλεκτικότητα αλλά και άλλες μοριακές ιδιότητες που τα καθιστούν ευνοϊκά για την μελέτη δομών «οδηγών» στην ανάπτυξη φαρμάκων και από τις βιβλιοθήκες των συνθετικών και συνδυαστικών ενώσεων [Koehn et al., 2005].

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πιο άφθονα συστατικά στην ανθρώπινη διατροφή και ο μέσος όρος κατανάλωσης υπολογίζεται στο 1g/ημέρα. Παρουσιάζουν ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία διότι αντιδρούν με πλήθος κυτταρικών στόχων. Χαρακτηριστικές ιδιότητες είναι οι αντιοξειδωτικές λόγω απομάκρυνσης ελευθέρων ριζών, αντιφλεγμονώδεις, αντιακές και κυρίως αντικαρκινικές ιδιότητες. Η χημειοπροφύλαξη του καρκίνου είναι ιδιαίτερης σημασίας και τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν με διάφορους μηχανισμούς όπως η καταστολή του σχηματισμού νέων καρκίνων από προκαρκινογόνα ενώ μπορούν να δεσμεύσουν καρκινογόνες ενώσεις από το να φτάσουν σε κρίσιμα στάδια έναρξης της ασθένειας. Τέλος, διευκολύνουν τον

μεταβολισμό καρκινογόνων συστατικών σε λιγότερο τοξικές ενώσεις ή την πρόληψη των βιολογικών τους δράσεων [Chahar et al., 2011].

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η μελέτη πρότυπων φυτικών προϊόντων της ομάδας των φλαβονοειδών που φέρουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά και υποκαταστάσεις ώστε να διαθέτουν βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες. Αρχικά, μελετήθηκαν τα δομικά τους χαρακτηριστικά και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες με την χρήση φασματοσκοπίας NMR 1D και 2D (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) αλλά και χαρακτηριστικές ιδιότητές τους όπως η ισχύς των δεσμών υδρογόνου. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας με την χρήση της φασματοσκοπίας DOSY NMR με σκοπό τον διαχωρισμό μίγματος των βιοδραστικών αυτών ενώσεων και την ταυτοποίηση των δομών τους στο μίγμα με τη χρήση μόνο του συντελεστή αυτοδιάχυσης των μορίων και χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό και απομόνωση των επιμέρους συστατικών.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των φλαβονοειδών είναι η αντιοξειδωτική τους δράση και ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν τα ελεύθερα κατιόντα Fe^{2+} το οποία καταλύουν την αντίδραση Fenton που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων και εξαιρετικά δραστικών ριζών. Επίσης, από κάποιες άλλες μελέτες προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα φλαβονοειδών με Zn^{2+} έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση *in vitro* χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός της δραστικότητας αυτής. Στόχος του τμήματος αυτού της διατριβής υπήρξε η μελέτη του μηχανισμού της χηλικής συμπλοκοποίησης των δύο μετάλλων με την κερσετίνη, μία από τις πιο σημαντικές και ευρέως μελετημένες πολυφαινόλες, και τη λουτεολίνη. Η μελέτη της δομής της συμπλοκοποιημένης μορφής της κερσετίνης με τον Zn^{2+} διευκολύνεται από το γεγονός ότι πρόκειται για διαμαγνητικό μέταλλο κατάλληλο για φασματοσκοπικές μελέτες NMR. Περαιτέρω μελέτη των συμπλόκων περιλαμβάνει τη θεωρητική δομική και ενεργειακή διερεύνηση σε επίπεδο υπολογισμών DFT. Επίσης, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος DOSY για τον προσδιορισμό του αποτελεσματικού MB συμπλόκων μετάλλων-φλαβονοειδών. Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας του Fe^{2+} στο σύμπλοκο αυτό αλλά και στην ελεύθερη κερσετίνη.

Επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής στα πλαίσια μιας ολιστικής μελέτης πιθανών ενώσεων «οδηγών» προερχόμενων από τα βιοδραστικά φλαβονοειδή αποτέλεσε η μελέτη *in vitro* της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης επιλεγμένης ομάδας φλαβονοειδών σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, την MCF7 προερχόμενη από καρκίνο του μαστού και την T24 από καρκίνο ουροδόχου κύστης. Από τη συσχέτιση των δομών με την δραστικότητα θα εξαχθούν συμπεράσματα που αφορούν τον κατάλληλο συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών που να προσδίδουν τη μέγιστη δυνατή αντικαρκινική δραστικότητα.

Η περαιτέρω μελέτη της αντιαγγειογενετικής δραστικότητας ως πιθανού μηχανισμού της αντικαρκινικής δράσης κρίθηκε απαραίτητη για την περίπτωση της

πλέον δραστηκής ένωσης. Στόχος της μελέτης αυτής αποτέλεσε η έρευνα της ικανότητας της αντιαγγειογενετικής δραστηκότητας μέσω αναστολής του αυξητικού παράγοντα VEGF, υπεύθυνου για την επαγωγή της αγγειογένεσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρέχοντας στον καρκινικό όγκο οξυγόνο και απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.

Επόμενος μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης που ελέγχθηκε αποτέλεσε η ικανότητα επαγωγής απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 προερχόμενα από T λευχαιμικά κύτταρα. Το φλαβονοειδές που επιλέχθηκε ήταν η κερσετίνη, γνωστή για την ισχυρή αντικαρκινική της δραστηκότητα *in vitro* και *in vivo*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πλήθος τεχνικών όπως: (i) *in vitro* μελετών (έλεγχος αντιπολλαπλασιαστικής και αντιαποπτωτικής δράσης), (ii) βιοχημικών pull down πειραμάτων (iii) φυσικοχημικών τεχνικών (^1H - ^{15}N HSQC NMR) και (iv) θεωρητικών υπολογισμών πρόσδεσης. Τέλος, για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη σε ζωντανά κύτταρα που υπερεκφράζουν την Bcl-2 (Jurkat Bcl-2) για πρώτη φορά με την χρήση νέων σύγχρονων τεχνικών NMR (STD και TR-NOESY).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Chahar** M.K., Sharma N., Dobhal M.P., Joshi Y.C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.*, **2011**, 5, 1-12.
- Dias** D.A., Urban S., Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2012**, 2, 303-336.
- Koehn** F.E., Carter G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature*, **2005**, 4, 206-220.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Λήψη φασμάτων NMR

1.1 Αντιδραστήρια

Η πρότυπη ένωση κερσετίνη αγοράστηκε από την Sigma (Steinheim, Germany) και οι ενώσεις λουτεολίνη, 3',4',5,7-4OH-3-μεθοξυφλαβόνη, ταμαριξετίνη, 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη και 3,5,7-3OH-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνη από την Extrasynthese (Genay, France). Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε με δευτεριωμένους διαλύτες ακετόνη- d_6 , DMSO- d_6 και D₂O, η προμήθεια των οποίων έγινε από τη Deutero (Kastellaun, Germany).

1.2 Οργανολογία

Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στους φασματογράφους NMR Bruker AV-400 και Bruker AV-500 του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο φασματογράφος Bruker AV-500 είναι συζευγμένος με υποδοχέα ΤΧΙ κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 2.1.



Εικόνα 1.2.1 Φασματογράφος NMR Bruker AV-500.

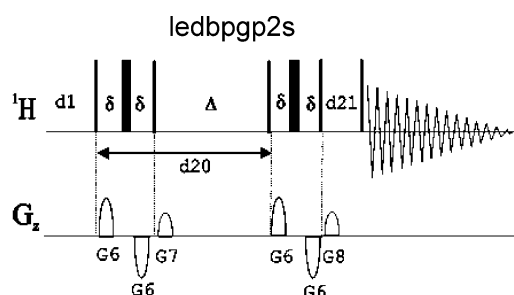
1.3 Λήψη φασμάτων DOSY

Η λήψη των φασμάτων DOSY πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 και όλες οι χημικές μετατοπίσεις μετρήθηκαν με αναφορά στο εσωτερικό πρότυπο TSP- d_4 ($\delta=0.00$ ppm). Τα φάσματα καταγράφηκαν με χρόνο λήψεως (acquisition time) 1.09 s και χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) $4T_1$. Οι τιμές T_1 προσδιορίστηκαν από την παλμική ακολουθία αντίστροφης-επαναφοράς (inversion-recovery) και

ΕΝΟΤΗΤΑ 2-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

υπολογίστηκαν 2 με 3.5 s. Τα πειράματα DOSY πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας bipolar pulse longitudinal eddy current delay (BPPLIED). Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκαν 16 φάσματα BPPLIED με 16 K σημεία και το eddy current delay (T_e) ορίστηκε στα 5 ms (Εικόνα 1.3.1). Η διάρκεια της pulse field gradient, δ_g , βελτιστοποιήθηκε προκειμένου να ληφθεί 5% υπολειπόμενο σήμα με τη μέγιστη βαθμιδωτή κλίση πεδίου. Η μεταβολή της βαθμίδωσης παλμού (pulse gradient) από 2 σε 95% της μέγιστης βαθμιδωτής δύναμης επιτεύχθηκε μέσω μιας γραμμικής ράμπας. Έπειτα από μετασχηματισμό Fourier και διόρθωση της γραμμής βάσης, η επεξεργασία του φάσματος διάχυσης επιτεύχθηκε με το λογισμικό Topspin 2.1.

Σημαντικές παράμετροι που πρέπει να υπολογιστούν στις ακολουθίες αυτές είναι ο χρόνος διάχυσης (Δ) και η χρονική διάρκεια του παλμού κλίσεως πεδίου-PFGs (δ , p30). Στο χρόνο Δ τα συστατικά του μίγματος διαχέονται μέσα στο μίγμα που αναλύεται. Το δ , είναι το μήκος του χρόνου κατά τον οποίο εφαρμόζεται η βαθμίδωση του πεδίου. Το p30 ισούται με το μισό του δ ($\delta/2$). Τυπικές τιμές για τον χρόνο Δ είναι 50-100 msec ενώ για το p30 είναι 1-5 msec [Hong et al., 2008].



Εικόνα 1.3.1 Διάγραμμα παλμικής ακολουθίας ledbpgrp2s DOSY.

1.4 Λήψη φασμάτων STD

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7 σε D_2O παρουσία 4% DMSO- d_6 . Για τη λήψη των φασμάτων μετρήθηκαν πέντε εκατομμύρια κύτταρα από την κυτταρική σειρά λευχαιμίας Jurkat Bcl-2. Ο αριθμός αυτός είναι ικανοποιητικός για το χρόνο λήψη των φασμάτων STD και NOESY (βλέπετε Ενότητα 1.5) πριν τα κύτταρα αρχίσουν να δημιουργούν συσσωματώματα και να καθιζάνουν, αλλά και για την αποφυγή του έντονων και προβληματικών κορυφών που οφείλονται στους διάφορους μεταβολίτες [Mari et al., 2010].

Η λήψη των φασμάτων STD πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 37°C με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας stddiffesgp.3. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός κορεσμός του δείγματος με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped) με 1% περικοπή ο καθένας με διάρκεια 50 ms που διαχωρίζονται με χρονική καθυστέρηση 1 ms. Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 2s. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εντός συντονισμού πείραμα στα 0.98 ppm, όπου δεν

εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών, και στο εκτός συντονισμού φάσμα στα 400 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR [Viegas et al., 2011].

1.5 Λήψη φασμάτων tr-NOESY NMR

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7 σε D₂O παρουσία 4% DMSO-*d*₆. Η λήψη των φασμάτων tr-NOESY πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 37°C με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας noesyegprh (States-TPPI). Οι παράμετροι των πειραμάτων αυτών που πραγματοποιήθηκαν με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 προσαρμόστηκαν έτσι ώστε ο συνολικός πειραματικός χρόνος να είναι ο ελάχιστος δυνατός (2ώρες και 15 λεπτά) πριν τα κύτταρα αρχίσουν να καθιζάνουν και πριν επηρεαστεί σημαντικά η θνησιμότητά τους. Ο κορεσμός του ισχυρού σήματος του νερού επιτεύχθηκε με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας excitation sculpting. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν παρουσία 5x10⁶ κυττάρων που αποτελεί ικανοποιητική κυτταρική πυκνότητα για το πείραμα αυτό. Στη συνέχεια προστέθηκε περίσσεια υποκαταστάτη (1mM) και η συγκέντρωση αυτή επέτρεψε την μελέτη των αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς και την αποφυγή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων στο πείραμα trNOESY.

Όπως έχει αναφερθεί όταν ένας υποκαταστάτης βρίσκεται σε ταχεία ανταλλαγή με τον υποδοχέα υιοθετεί τον χρόνο περιστροφής του μακρομορίου (correlation time, τ_c) κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης με αυτό. Έτσι τα χαρακτηριστικά της μοριακής κίνησης στην κατάσταση σύμπλεξης μεταφέρονται στο διάλυμα και ανιχνεύονται στα σήματα της ελεύθερης μορφής. Επειδή ο χρόνος μοριακής περιστροφής (correlation time, τ_c) των πρωτεϊνών-υποδοχέων των κυττάρων είναι μεγάλος, τα αρνητικά NOE σήματα που αναπτύσσονται από τον υποκαταστάτη στην προσδεσμένη κατάσταση υπερτερούν των μικρών θετικών NOE στην ελεύθερη κατάσταση ακόμα και όταν υποκαταστάτης βρίσκεται σε σημαντική περίσσεια (αναλογία υποκαταστάτη προς υποδοχέα <10⁵). Ο χρόνος ανάμιξης (t_{mix}) που χρησιμοποιήθηκε για το φάσμα του υποκαταστάτη παρουσία και απουσία των κυττάρων ήταν 100ms, όπου και εμφανίστηκε η κορυφή διασταύρωσης NOE με τη μέγιστη ένταση [Mari et al., 2010].

1.6 Λήψη φασμάτων 2D ¹H-¹⁵N HSQC

Τα φάσματα NMR λήφθηκαν σε φασματογράφο Bruker Avance II 800MHz στο Ερευνητικό Κέντρο Ιατρικής Πρωτοομικής της Κορέας από το Δρ. Seung-Wook Chi. Τα φάσματα των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL ελήφθησαν στους 25°C πριν και μετά την προσθήκη 0.1mM κερσετίνης η οποία διαλύθηκε σε 0.1% DMSO-*d*₆/H₂O. Τα δείγματα NMR ετοιμάστηκαν σε 90% H₂O/10% D₂O σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), με 5mM DTT για την Bcl-2 και 20 mM sodium phosphate (pH 6.5), 150 mM NaCl και 1 mM DTT για την Bcl-xL. Η επεξεργασία και η ανάλυση όλων των δεδομένων

ΕΝΟΤΗΤΑ 2-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

πραγματοποιήθηκε με τα λογισμικά nmrPipe/nmrDraw and SPARKY. Οι (Weighted) μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων υπολογίστηκαν με τη χρήση της εξίσωσης $\Delta CS = [(\Delta^1H)^2 + 0.2(\Delta^{15}N)^2]^{0.5}$, όπου Δ^1H και $\Delta^{15}N$ αντιπροσωπεύουν τις αλλαγές των χημικών μετατοπίσεων στις διαστάσεις των 1H και ^{15}N [Ha et al., 2013].

2. Υπολογισμοί πρόσδεσης

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης έγιναν με βάση τις κρυσταλλικές δομές των ακόλουθων πρωτεϊνών από τη Βάση Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων Πρωτεϊνών (Protein Data Bank, PDB). Για την Bcl-2 χρησιμοποιήθηκε η διαμόρφωση της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με το πεπτίδιο Bax BH3 (pdbid: 2XA0) ενώ για την Bcl-xL σε σύμπλοκο με το ABT-737 (pdbid: 2YXJ). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Autodock-vina [Tzakos et al., 2005]. Για την 3D απεικόνιση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PYMOL.

3. Βιολογικά πειράματα

3.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Κατά την εκπόνηση της παρούσης διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η MCF7, προερχόμενη από καρκίνο του μαστού, η T24 από καρκίνο ουροδόχου κύστης, η Jurkat Puro από T λευχαιμικά κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν σταθερά με έναν άδειο φορέα ρετροϊού προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην πιουρομυκίνη ή με τον ίδιο φορέα που έφερε ανθρώπινο Bcl-2 cDNA, Jurkat Bcl-2. Οι κυτταρικές σειρές MCF7 και T24 ευγενικώς χορηγήθηκαν από τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής και Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιοιατρικών Ερευνών Φώτη Θεόδωρο, ενώ τα Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 από τον Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Κωλέττα Ευάγγελο.

Η επώαση των κυττάρων έγινε στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Οι καρκινικές σειρές καλλιεργήθηκαν στα παρακάτω θρεπτικά υλικά: 1) Τα T24 και τα MCF7 σε D-MEM (Gibco Invitrogen) εμπλουτισμένο με 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% ορό (Fetal Bovine Serum). Για την περίπτωση των MCF7 ο ορός εμπλουτίστηκε με 1% μη απαραίτητα αμινοξέα (non essential aminoacids). 3) Τα Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 καλλιεργήθηκαν σε RPMI (Gibco Invitrogen) εμπλουτισμένο με 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 10% ορό (Fetal Bovine Serum) και 0.1μg/ml αντιβιοτικό puromycin. 4) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλυμμένα με κολλαγόνο τύπου I (Becton Dickinson Biosciences) M199 θρεπτικό υλικό (Gibco Invitrogen) εμπλουτισμένο με 20% ορό (Fetal Bovine Serum), 50mg/ml συμπλήρωμα ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (ECGS, Sigma), ηπαρίνη 10u/μl (Sigma) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη [].

3.2 Υπολογισμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τα κύτταρα MCF7 και T24 τρυψινοποιήθηκαν, μετρήθηκαν 10.000 κύτταρα/πηγαδάκι, και επώαστηκαν στο θρεπτικό τους υλικό σε 12άρι πιάτο. Την επόμενη ημέρα στα κύτταρα προστέθηκαν 5μl σε κάθε πηγαδάκι από δέκα διαδοχικές συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων διαλυμένες σε 1:1 DMSO/αιθανόλη (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2 και 0.098 μM). Χρησιμοποιήθηκαν δύο κοντρόλ, ένα πηγάδι στο οποίο προστέθηκε μόνο ο διαλύτης DMSO/ αιθανόλη και ένα πηγάδι με κύτταρα στο οποίο δεν έγινε προσθήκη. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από δύο ημέρες, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, και τα κύτταρα μετρήθηκαν με Coulter Counter μετά από άλλες δύο ημέρες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις.

Για τις κυτταρικές σειρές Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 μετρήθηκαν $1,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml και επώαστηκαν σε 24άρι πιάτο. Στα κύτταρα προστέθηκαν 2.5μl σε κάθε πηγαδάκι από πέντε διαδοχικές συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων διαλυμένες σε 1:1 DMSO/αιθανόλη (100, 75, 50, 25 και 12.5 μM). Χρησιμοποιήθηκαν δύο κοντρόλ, ένα πηγάδι στο οποίο προστέθηκε μόνο ο διαλύτης DMSO/ αιθανόλη και ένα πηγάδι με κύτταρα στο οποίο δεν έγινε προσθήκη. Μετά από 24 ώρες ο αριθμός των κυττάρων για κάθε πηγαδάκι μετρήθηκε με Neubauer. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις [Goulas et al., 2009].

3.3 Έλεγχος αποπτωτικής δράσης

Οι κυτταρικές σειρές Puro και Jurkat Bcl-2 μετρήθηκαν ($1,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml) και επώαστηκαν σε 6άρι πιάτο. Στα κύτταρα προστέθηκαν 5μl σε κάθε πηγαδάκι από τέσσερις διαδοχικές συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων διαλυμένες σε 1:1 DMSO/αιθανόλη (100, 75, 50 και 25 μM). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν, εκπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε αννεξίνη Annexin V ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (BD Pharmingen™ 556454) σε τελική συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/100μl. Τα κύτταρα χρωματίστηκαν με 5μl Annexin V και 5μl ιωδιούχου προπίδιου PI (Invitrogen P3566, τελική συγκέντρωση 50 μg/mL) για 30' σε σκοτάδι.

Η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε από τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Μιχάλη Μάντζαρη στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής σε κυτταρόμετρο Partec ML flow cytometer (CyFlow®ML, Partec, Munster, Germany), εξοπλισμένο με λέιζερ αργού και χρησιμοποιήθηκαν δύο κανάλια ανίχνευσης, FL1 και FL3 αντίστοιχα. Τα κύτταρα που βρέθηκαν αρνητικά σε Annexin V και PI αντιπροσωπεύουν τα ζωντανά κύτταρα. Τα κύτταρα θετικά σε Annexin V και αρνητικά σε PI αντιπροσωπεύουν τα πρώιμα αποπτωτικά ενώ διατηρείται ακόμα η ακεραιότητα της μεμβράνης. Τέλος, τα θετικά κύτταρα σε Annexin V και PI είναι ενδεικτικά των

ΕΝΟΤΗΤΑ 2-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

τελευταίων σταδίων της απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις.

3.4 Υπερέκφραση και καθαρισμός της Bcl-xL

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη 6xHis-tagged Bcl-xL στην οποία απαλείφθηκαν στο C τελικό άκρο τα Δ197-233 και στον εσωτερικό βρόχο ανάμεσα στις έλικες R1 και R1 τα Δ45-84, υπερεκφράστηκε στο στέλεχος BL21 των *E. coli* βακτηριακών κυττάρων. Η πρωτεΐνη καθαρίστηκε σε στήλη Ni^{2+} με χρωματογραφία συγγένειας σε Äkta Prime FPLC (GE Healthcare). Τέλος, διατηρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM φωσφορικού νατρίου pH 7, 5mM EDTA pH 8, 150mM NaCl και 3mM β-Me. Το πλασμίδιο της πρωτεΐνης χορηγήθηκε ευγενικώς από την Δρ. Isabelle Krimm (Laboratoire des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Γαλλία).

3.5 Πειράματα pull down

Πραγματοποιήθηκαν οι ζυγίσεις 3mg κερσετίνης και 3mg ταξιφολίνης (αρνητικό κοντρόλ) τα οποία στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος σύζευξης (coupling buffer) (0.1M NaHCO_3 , 0.5M NaCl και 35% DMSO, pH 8.3). 300mg από την ρητίνη CNBr-activated 4B sepharose (GE Healthcare) (Σχήμα 3.5.1) μεταφέρθηκαν σε γυάλινο χωνί με φίλτρο G3 όπου και ενεργοποιήθηκαν με 1mM HCl για 20'. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε τρεις στήλες όπου και πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης (Σχήμα 3.5.2). Στην πρώτη στήλη προστέθηκε η κερσετίνη, στη δεύτερη η ταξιφολίνη και η τρίτη περιείχε μόνο τα σφαιρίδια και χρησιμοποιήθηκε ως κοντρόλ. Οι τρεις στήλες αφέθηκαν υπό ανάδευση για μια νύχτα στους 4°C.

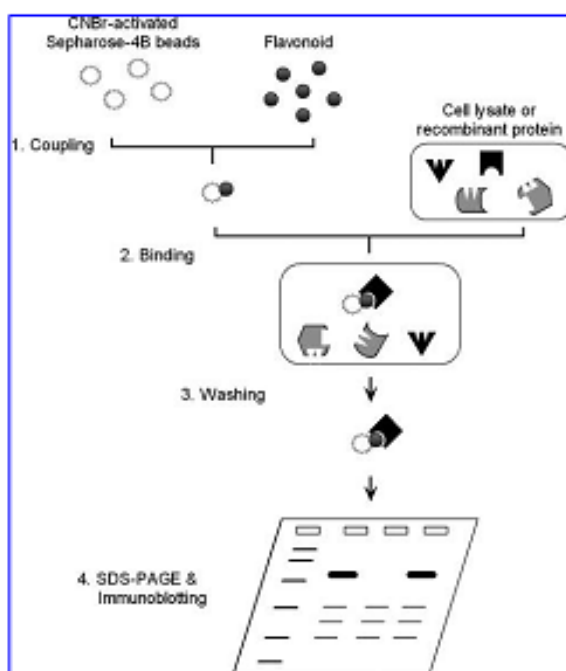
Την επόμενη μέρα οι στήλες πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια υποκαταστάτη. Στη συνέχεια πλύθηκαν με Tris-HCl pH=8 και έπειτα αφέθηκαν με αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 2h ώστε να μπλοκάρουμε τις ομάδες στις οποίες δεν προσδέθηκε υποκαταστάτης. Έπειτα πλύθηκαν εναλλάξ με τα ρυθμιστικά διαλύματα 0.1 M Tris-HCl pH 8 (0.5M NaCl) και 0.1 M οξικό οξύ/ οξικό νάτριο pH 4 (0.5M NaCl) για 3-4 κύκλους.

Από κάθε στήλη σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε ependorf και πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M EDTA pH 8, NP-40 0.5%, 1mM DTT, BSA 0.1%) και έπειτα μεταφέρθηκαν στους 4°C για 1h.

Τα κύτταρα Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 φυγοκεντρήθηκαν και πλύθηκαν και στην συνέχεια λύθηκαν με 2ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M EDTA pH 8, NP-40 0.5%, 1mM DTT, BSA 0.1% και Tablet Roche EDTA free 1x). Τα κυτταρικά λύματα Jurkat Puro (500μg), Jurkat Bcl-2 (500μg) και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Bcl-xL (20μg) επώαστηκαν στους 4°C μαζί με τα σφαιρίδια CNBr 4B sepharose και με τα σύμπλοκα κερσετίνη-CNBr 4B sepharose και ταξιφολίνη-

CNBr 4B sepharose σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M EDTA pH 8, NP-40 0.5%, 1mM DTT, BSA 0.1% και Tablet Roche EDTA free 1x) [Lee et al., 2008; Hou et al., 2010].

Την επόμενη μέρα τα σφαιρίδια πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 5 φορές και στη συνέχεια έγινε έκλουση των προσδεσμένων πρωτεϊνών με SDS-PAGE και την προσθήκη laemmli buffer. Η ανίχνευση της Bcl-2 πραγματοποιήθηκε με πείραμα ανοσοσύτωσης με το αντίσωμα της Bcl-2 (mouse monoclonal α-Bcl-2 Santa Cruz) ενώ για την Bcl-xL με χρώση coomassie.



Σχήμα 3.5.1 Πείραμα χρωματογραφίας συγγένειας pull-down για τον έλεγχο της πρόσδεσης φλαβονοειδών σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς π.χ. κινάσες. Η διαδικασία περιλαμβάνει: (1) Τη σύζευξη του φλαβονοειδούς με τα CNBr-activated Sepharose 4B σφαιρίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης για μια νύχτα στους 4°C. (2) την πρόσδεση στο συζευγμένο φλαβονοειδές με τα Sepharose 4B σφαιρίδια με κυτταρολύματα ή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης. (3) Πλύσιμο του προσδεσμένου συμπλόκου και (4) απομάκρυνση των προσδεσμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών από το σύμπλοκο με SDS-PAGE και στη συνέχεια ανίχνευση με ανοσοσύτωση με τη χρήση ειδικού αντισώματος [Hou et al., 2010].

ΕΝΟΤΗΤΑ 2-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Σχήμα 3.5.2 Στήλες μετά από ανάδευση για μια νύχτα στους 4°C που περιέχουν συζευγμένο φλαβονοειδές με CNBr-activated Sepharose 4B σφαιρίδια (κίτρινες στήλες) και μόνο τα σφαιρίδια ως αρνητικό κοντρόλ (διαφανής στήλη).

3.6 Πείραμα BrdU ανοσοφθορισμού

Τα HUVECs διαχωρίστηκαν σε 12άρι πιάτο με 20,000 κύτταρα/πηγάδι και την επόμενη μέρα υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού με θρεπτικό υλικό που περιείχε 5% ορό, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και ηπαρίνη για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του αυξητικού παράγοντα VEGF (50ng/ml) παρουσία και απουσία υποκαταστάτη σε διάφορες συγκεντρώσεις ενώ στα κύτταρα κοντρόλ δεν προστέθηκε ο VEGF. Στις 16 ώρες προστέθηκε η βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU; Sigma, St. Louis, MO) και μετά από 8 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3.7% παραφορμαλδεΐδη.

Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 50 mM χλωριούχου αμμωνίου για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε 1.5M υδροχλωρίου HCl για τη μετουσίωση του DNA στις μονές έλικες καθώς η BrdU ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων, στη θέση της θυμιδίνης, που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα γίνονται διαπερατά στο αντίσωμα με προσθήκη 0.1% Triton X-100 για 4 λεπτά και στη συνέχεια οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε θάλαμο όπου οι μη ειδικά προσδεδεμένες θέσεις μπλοκάρονται με 10% ορό για 20 λεπτά. Έπειτα προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, anti-BrdU, και μετά από μία ώρα ακολουθούν εκπλύσεις με PBS για την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος, FITC, το οποίο επίσης παραμένει για μία ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα συνδέεται με το anti-BrdU αντίσωμα. Αφού ακολουθήσουν και πάλι εκπλύσεις προστίθεται RNase 1mg/ml και επωάζονται για 30 λεπτά. Αυτό γίνεται με σκοπό την ενζυμική απομάκρυνση του RNA με την ριβονουκλεάση ώστε στη συνέχεια η PI χρωστική να χρωματίσει επιλεκτικά μόνο το DNA. Έπειτα πραγματοποιείται χρώση με PI που είναι μια φθορίζουσα χρωστική που υποδεικνύει την περιεκτικότητα του συνολικού DNA στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα στις φάσεις G2 και M περιέχουν διπλάσιο DNA σε σύγκριση με αυτά που βρίσκονται στις φάσεις G0 και G1, ενώ το DNA που περιέχεται στα κύτταρα στην S φάση βρίσκεται ανάμεσα στις παραπάνω δύο κατηγορίες. Η τοποθέτηση των καλυπτρίδων επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Prolong Gold Antifade της Invitrogen. Η μέτρηση των PI και BrdU θετικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου Leica DM IBRE και πραγματοποιήθηκε σύγκριση του αριθμού των κυττάρων τα οποία επώαστηκαν ή όχι με VEGF παρουσία και απουσία υποκαταστάτη [Bellou et al., 2012].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bellou S., Karali E., Bagli E., Al-Maharik N., Morbidelli L., Ziche M., Adlercreutz H., Murphy C., Fotsis T. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol. Cancer*, **2012**, *11*, 35.

Goulas V., Exarchou V., Troganis A.N., Psomiadou E., Fotsis T., Briasoulis E., Gerothanassis I.P. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *53*, 600-608.

Ha J.-H., Shin J.-S., Yoon M.-K., Lee M.-S., He F., Bae K.-H., Yoon H.S., Lee C.-K., Park S.G., Muto Y., Chi S.-W. Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 7387-7398.

Hong Y.-S., Hong K.S., Cho J.-H., Volkov V.I., Lee C.-H. Chemical exchange of hydroxyl protons in quercetin measured by pulsed field gradient NMR. *Appl. Magn. Reson.*, **2008**, *35*, 261-270.

Hou D.-X., Kumamoto T. Flavonoids as Protein Kinase Inhibitors for Cancer Chemoprevention: Direct Binding and Molecular Modeling. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2010**, *13*, 691-719.

Lee K.W., Kang N.J., Heo Y.-S., et al. Flavonol in red wine for the chemopreventive effect of quercetin, a major raf and mek protein kinases are direct molecular targets. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 946-955.

Mari S., Invernizzi C., Spitaleri A., Alberici L., Ghitti M., Bordinon C., Traversari C., Rizzardi, G.-P., 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.

Viegas A., Manso J., Nobrega F., Cabrita E. 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.

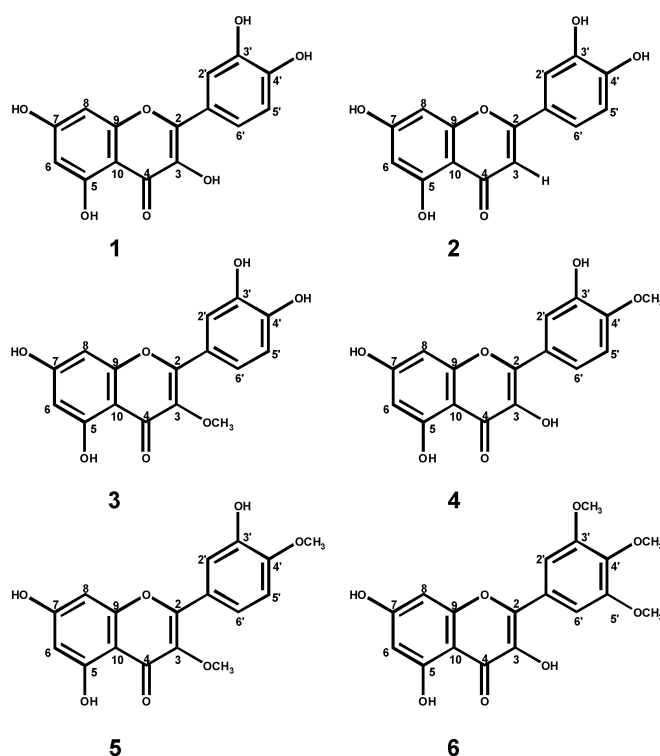
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΕΛΕΤΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

1.1 Δομικές μελέτες φλαβονοειδών με φασματοσκοπία NMR.

Μετά από μια εκτενή βιβλιογραφική αναζήτηση διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός άρθρων όπου το κύριο αντικείμενο μελέτης αποτελεί η προσπάθεια συσχέτισης των δομικών χαρακτηριστικών των φλαβονοειδών με ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική δραστικότητα, αντικαρκινική δράση κ.α. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται κυρίως από την χημική τους δομή. Η παρουσία υδροξυλικών πρωτονίων ή μεθόξυ- υποκαταστάσεων, καθώς ο αριθμός και η θέση τους μπορούν να αυξήσουν ή να ελαττώσουν την δραστικότητά τους. Η παρουσία ή όχι του διπλού δεσμού C2-C3 και η παρουσία της καρβονυλικής ομάδας στη θέση CO-4 στο δακτύλιο Γ αυξάνουν την δραστικότητα παρέχοντας μια πιο σταθερή ρίζα του φλαβονοειδούς μέσω σύζευξης και ηλεκτρονιακού απεντοπισμού [Heim *et al.*, 2002].

Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων μίας ομάδας επιλεγμένων φλαβονοειδών έτσι ώστε στη συνέχεια να είναι δυνατή η πραγματοποίηση συσχέτισης της δομής και της δραστικότητάς τους και η πιθανή εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους. Με βάση την συστηματική βιβλιογραφική μελέτη που πραγματοποιήθηκε επιλέχθηκε μία ομάδα φλαβονοειδών (Σχήμα 1.1.1) για σύγκριση δομής-δραστικότητας. Τα κριτήρια επιλογής ήταν η απουσία ή ο περιορισμένος αριθμός μελετών συσχέτισης δομικών χαρακτηριστικών και βιολογικής δραστικότητας, η ύπαρξη μεθόξυ- υποκαταστατών που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προσδίδουν βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες όπως αυξημένη αντικαρκινική δραστικότητα [Ta *et al.*, 2007, 2007 Manthey *et al.*, 2002] και βιοδιαθεσιμότητα [Wen *et al.*, 2006, Wen *et al.*, 2006] και η επιλογή των κατάλληλων θέσεων που να φέρουν τις ανάλογες υποκαταστάσεις [Katayama *et al.*,]. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και τα γνωστά από τη βιβλιογραφία φλαβονοειδή κερσετίνη και λουτεολίνη με σκοπό την σύγκριση της παρουσίας των υποκαταστατών στις κατάλληλες θέσεις.



Σχήμα 1.1.1 Δομές των έξι φλαβονοειδών που επιλέχθηκαν για μελέτη συσχέτισης δομής-δραστικότητας **(1)** Κερσετίνη, **(2)** Λουτεολίνη, **(3)** 5,7,3',4'-Τετραυδρόξυ-3-μεθοξυ-φλαβόνη, **(4)** Ταμαριξετίνη, **(5)** 5,7,3'-Τριυδρόξυ-3,4'-διμεθοξυ-φλαβόνη και **(6)** 3,5,7-Τριυδρόξυ-3',4',5'-τριμεθοξυ-φλαβόνη.

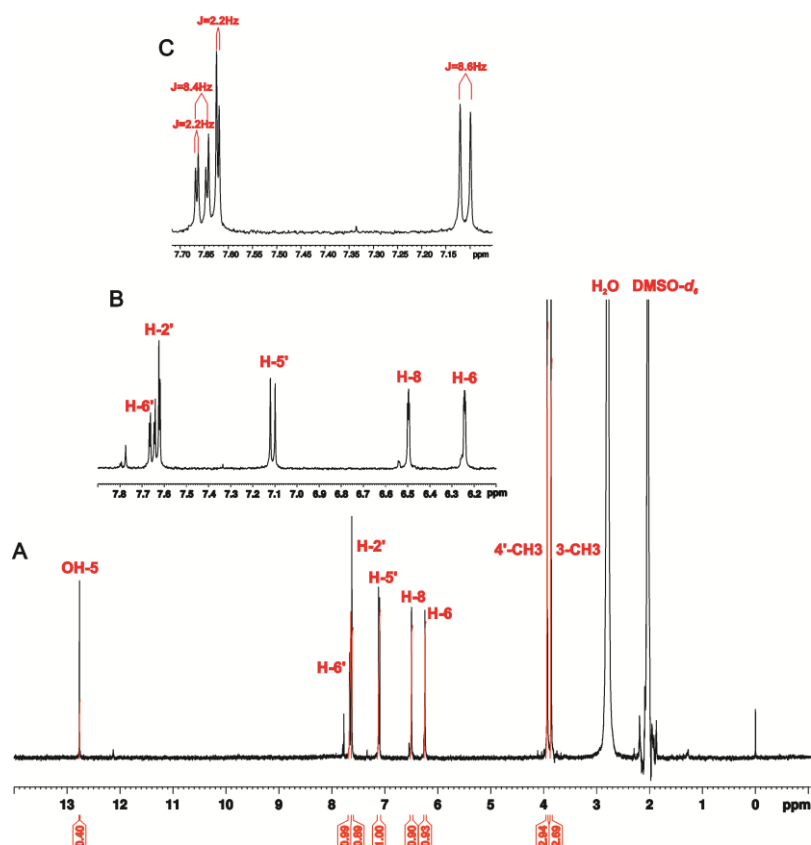
1.1.1 Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία 1D και 2D NMR (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC).

Έπειτα από την εκτενή βιβλιογραφική αναζήτηση και την επιλογή της ομάδας των φλαβονοειδών, για τα οποία θα μελετηθούν τόσο οι φυσικοχημικές όσο και οι βιολογικές τους ιδιότητες, ακολούθησε δομική μελέτη με φασματοσκοπία NMR.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο δομικός χαρακτηρισμός όλων των φλαβονοειδών τόσο με 1D φασματοσκοπία πρωτονίου όσο και με 2D NMR, COSY, HSQC και HMBC, με διαλύτη δευτεριωμένη ακετόνη- d_6 . Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα φάσματα της 5,7,3'-τριυδρόξυ-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης, ενώ η πλήρης ταυτοποίηση για όλα τα φλαβονοειδή παρουσιάζεται στους Πίνακες 1-6 του παραρτήματος.

Το πρωτονιακό φάσμα της διμεθοξυφλαβόνης **(5)** (Σχήμα 1.1.1.1) επιδεικνύει στην αρωματική περιοχή την κορυφή του πρωτονίου στη θέση 6' του δακτυλίου Β στα 7.65 ppm ως διπλή-διπλής κορυφής λόγω της παρουσίας σε όρθο θέση του πρωτονίου 5' με σταθερά σύζευξης $^3J=8.5$ Hz και στη μέτα θέση του πρωτονίου 2' με σταθερά σύζευξης $^4J=2.2$ Hz. Η κορυφή του πρωτονίου 2' στα 7.63 ppm εμφανίζεται ως διπλή λόγω της παρουσίας σε μέτα θέση του Η-6' με σταθερά σύζευξης $^4J=2.2$ Hz. Το Η-5' εμφανίζεται στα 7.1 ppm ως διπλή λόγω της παρουσίας του Η-6' με σταθερά σύζευξης

$J=8.5$ Hz, ενώ τα πρωτόνια H-8 και H-6 εμφανίζονται στα 6.5 και 6.2 ppm αντίστοιχα. Επίσης, στο Σχήμα απεικονίζονται και τα ολοκληρώματα των αντίστοιχων απορροφήσεων όπου παρατηρούμε ότι τα ολοκληρώματα των μεθυλικών πρωτονίων αντιστοιχούν σε τρία πρωτόνια για τη κάθε μία μεθυλομάδα.

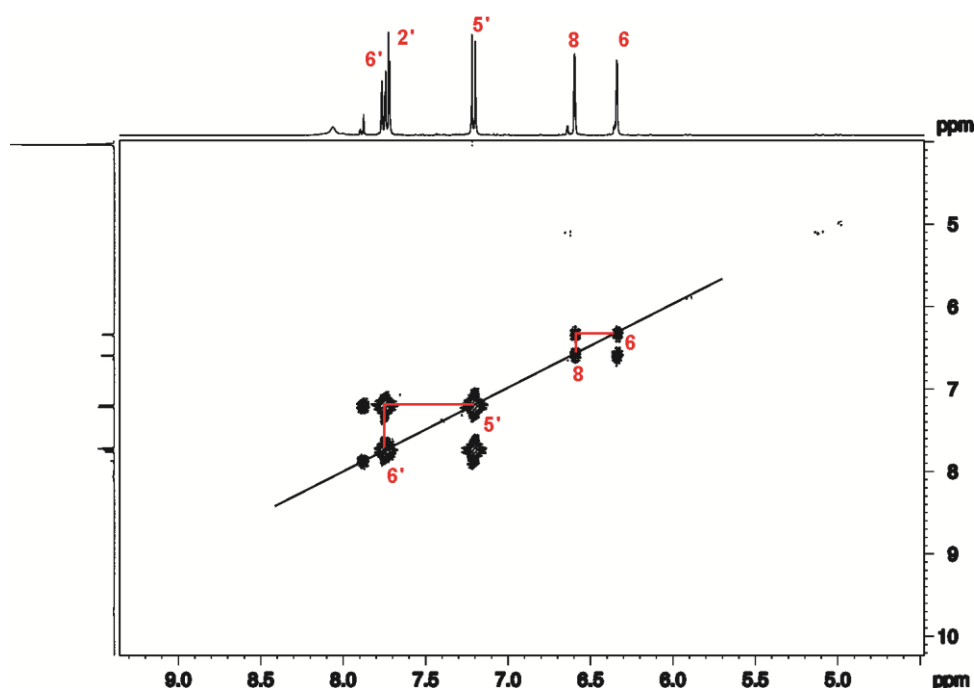


Σχήμα 1.1.1.1 Α. Φάσμα NMR ^1H 400MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 Β. Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος πρωτονίου όπου παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή 6-8 ppm και C. σταθερές σύζευξης J των αρωματικών πρωτονίων H-2', H-6' και H-5' ($T=298\text{K}$, αριθμός παλμών=32, $t_{\text{acq}}=2.56$, πειραματικός χρόνος=3m44s).

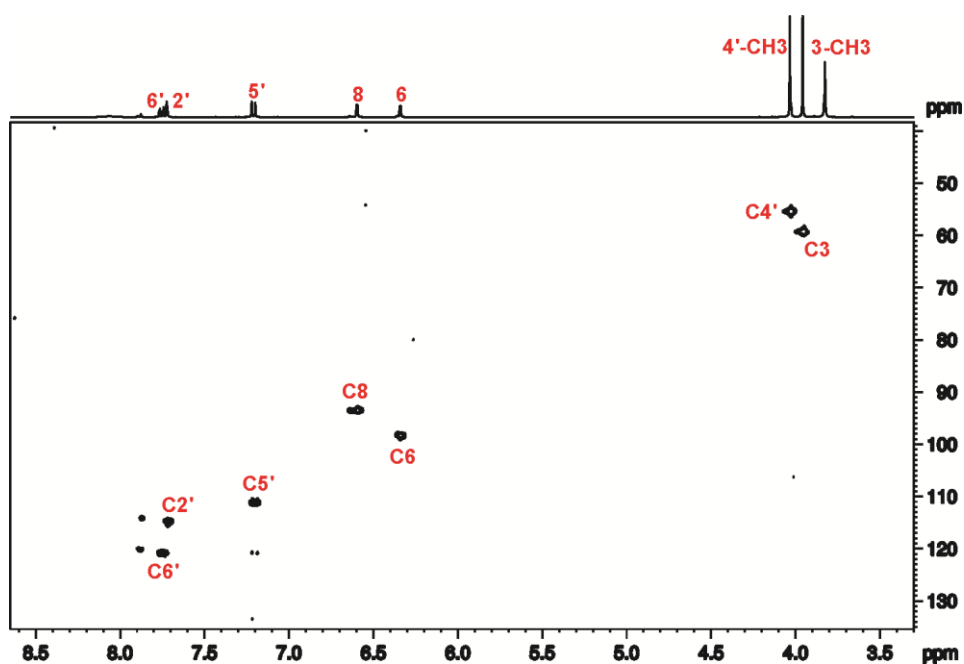
Η εξαιρετικά λεπτή κορυφή απορρόφησης που εμφανίζεται στα $\delta=12.8$ ppm αποδίδεται στο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση 5 του δακτυλίου A, το οποίο συμμετέχει σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του CO(4). Ο ενδομοριακός αυτός δεσμός υδρογόνου ελαττώνει σε σημαντικό βαθμό την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του C-5 OH με αποτέλεσμα την ισχυρή αποπροστασία. Παράλληλα όμως περιορίζει σε σημαντικό βαθμό την ανταλλαγή του πρωτονίου OH(5) με τα μόρια H_2O που υπάρχουν στον οργανικό διαλύτη με αποτέλεσμα να λαμβάνονται εξαιρετικά λεπτές απορροφήσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες $-\text{OH}$ [Exarchou et al., 2002].

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

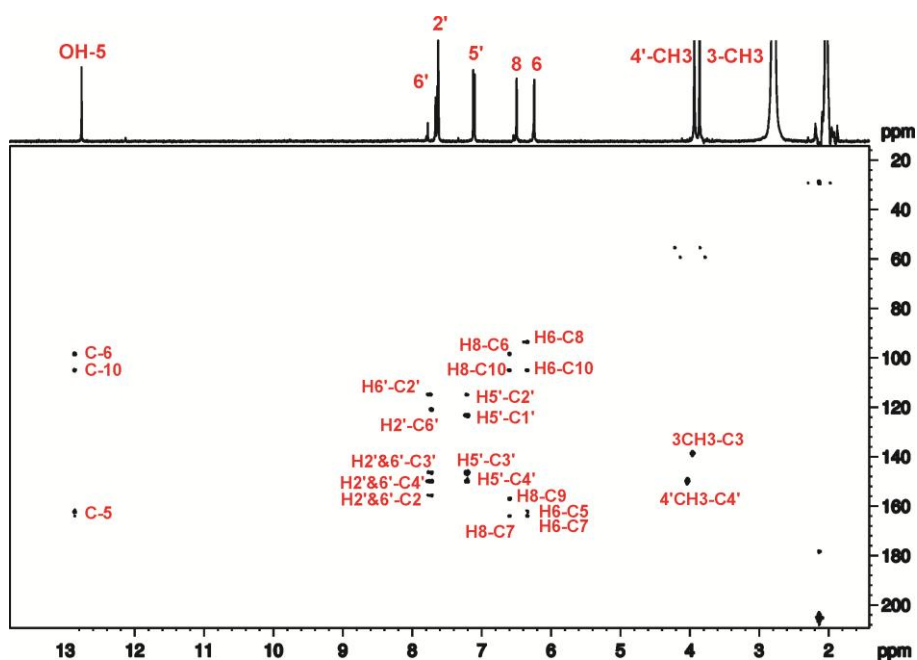
Στον δισδιάστατο χάρτη του φάσματος COSY (Σχήμα 1.1.1.2) παρατηρούμε τις κορυφές διασταύρωσης των γειτονικών πρωτονίων H-5' με H-6' καθώς και των H-8 με H-6 των αρωματικών δακτυλίων B και A, αντίστοιχα. Στη συνέχεια από το φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC (Σχήμα 1.1.1.3) πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των ανθράκων που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με τα αρωματικά πρωτόνια H-8, H-6, H5', H6' όπως και τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων στις θέσεις C-3 και C-4'. Στο δισδιάστατο χάρτη ^1H - ^{13}C HMBC (Σχήμα 1.1.1.4) παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις που προέκυψαν από συζεύξεις πρωτονίων και ανθράκων σε απόσταση δύο έως τέσσερις δεσμούς $^{2-4}J(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ που μας παρέχει τη δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης των ^1H και ^{13}C της διμεθοξυφλαβόνης (**5**).



Σχήμα 1.1.1.2 Φάσμα NMR 2D ^1H - ^1H COSY 400MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (5mM)σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=298K, αριθμός παλμών=24, td=2k, πειραματικός χρόνος=3h44m).



Σχήμα 1.1.1.3 Φάσμα NMR 2D ^1H - ^{13}C HSQC 400MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=298K, αριθμός παλμών=40, td=2k, πειραματικός χρόνος=4h46m).



Σχήμα 1.1.1.4 Φάσμα NMR 2D ^1H - ^{13}C HMBC 400MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=298K, αριθμός παλμών=56, td=4k, πειραματικός χρόνος=15h10m).

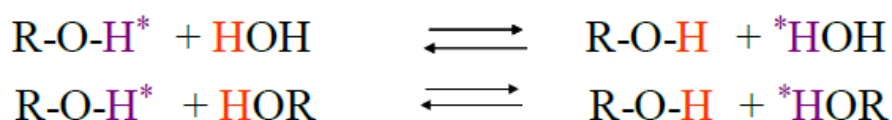
Παρατηρούμε όμως ότι με εξαίρεση την ύπαρξη σαφών κορυφών διασταύρωσης (cross-peaks) του πρωτονίου C-5 OH, η δεύρυνση των φαινολικών υδροξυλομάδων καθιστά αδύνατη την λεπτομερή ανάλυση και ταυτοποίηση των αντίστοιχων κορυφών

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διασταύρωσης. Ο λόγος που οι απορροφήσεις εμφανίζονται διευρυμένες είναι η διαμοριακή ανταλλαγή πρωτονίων [Pavia et al., 2001]. Εξαιτίας της χημικής ανταλλαγής των πρωτονίων των υδροξυλομάδων με τα μόρια H_2O (Σχήμα 1.1.1.5) που υπάρχουν στο διάλυμα, οι κορυφές εμφανίζονται εξαιρετικά διευρυμένες και υπολείπονται σημαντικά σε ένταση σε σχέση με το πρωτόνιο C-5 OH.

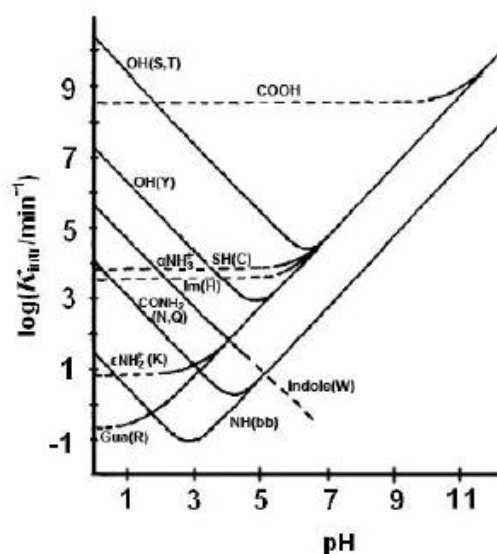
Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε και η λήψη των 1D και 2D φασμάτων των αντίστοιχων φλαβονοειδών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη δευτεριωμένο $DMSO-d_6$ ώστε να επιτύχουμε να μελετήσουμε και τις υδροξυλομάδες των ενώσεων αυτών και να πραγματοποιηθεί η πλήρης ταυτοποίηση του δομικού τους σκελετού.

Προκειμένου, να βελτιωθεί η ποιότητα του φάσματος χρησιμοποιήθηκε μια καινοτόμος μεθοδολογία που στηρίζεται στη μείωση της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίων των ευκίνητων ομάδων OH, μέσω ρύθμισης της οξύτητας του διαλύματος (Σχήμα 1.1.1.6) [Charisiadis et al., 2011]. Αυτό επιτεύχθηκε με τιτλοδότηση των δειγμάτων με διάλυμα πικρικού οξέος, συγκέντρωσης 10.18 mM σε $DMSO-d_6$.



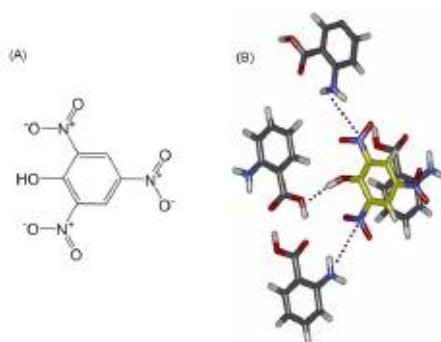
Σχήμα 1.1.1.5 Σχηματική απεικόνιση ανταλλαγής υδρογόνων.

Στη γραφική απεικόνιση του διαγράμματος του Σχήματος 1.1.1.6 [Wüthrich, 1986], παρατηρείται ότι η ταχύτητα ανταλλαγής ευκίνητων πρωτονίων ομάδων $-NH$ (πεπτιδικών αλυσίδων), $CO-NH_2$, και $-OH$ σε υδατικά διαλύματα, ως συνάρτηση του pH του διαλύματος, παρουσιάζει καμπύλη τύπου U. Ειδικότερα για την περίπτωση ομάδων $-OH$ φαινολικού τύπου παρουσιάζεται ελάχιστο στην περιοχή $pH \approx 4 - 5$. Συνεπώς, η προσεκτική εμπειρική ρύθμιση του pH δειγμάτων σε μη υδατικούς διαλύτες για την ελαχιστοποίηση της ταχύτητας ανταλλαγής των ομάδων $-OH$ με το H_2O , καταλήγει στην εκτέλεση των απορροφήσεων αυτών των ομάδων [Sanders et al., 1987].



Σχήμα 1.1.1.6 Γραφική λογαριθμική απεικόνιση της ταχύτητας ανταλλαγής ενεργών πρωτονίων ως συνάρτηση του pH σε υδατικά διαλύματα στους 25°C [Wüthrich, 1986].

Το πικρικό οξύ (Σχήμα 1.1.1.7) είναι μια φαινόλη που φέρει τρεις νιτροομάδες στις θέσεις 2, 4 και 6 του δακτυλίου και χαρακτηρίζεται από χαμηλή τιμή pK_a (0.42) [Lide, 2006-2007]. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές ότι το πικρικό οξύ αλληλεπιδρά με αρωματικά συστήματα με τη δημιουργία δομών συσσωματωμάτων μέσω αλληλεπιδράσεων των π-ηλεκτρονιακών νεφών των αρωματικών δακτυλίων (stacking modes) [Refat et al., 2010; Bindya et al., 2007], αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου [Singh et al., 2010; Zeslawska et al., 2007; Ilczyszyn et al., 1995], καθώς και σχηματισμού συμπλόκων μεταφοράς φορτίου [Teled et al., 2005] (Σχήμα 1.1.1.8). Η δυνατότητα, συνεπώς, του πικρικού οξέος να δρα όχι μόνο ως οξύ αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων το καθιστά ιδανικό οξύ για αυτό το σκοπό.

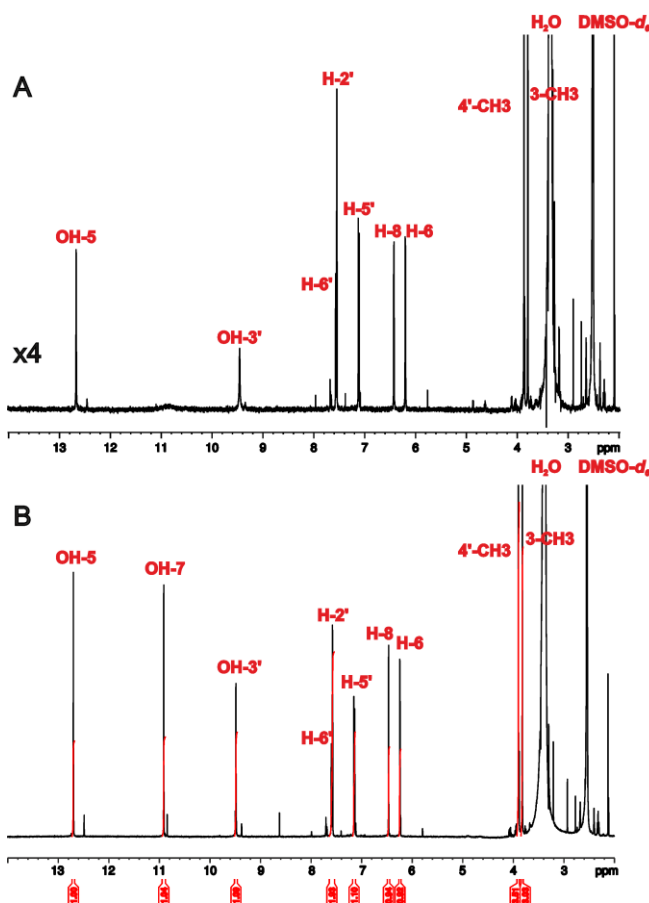


Σχήμα 1.1.1.7 Α. Το πικρικό οξύ μπορεί να συμμετέχει σε ποικιλία αλληλεπιδράσεων όπως ηλεκτροστατικών, δεσμών υδρογόνου και συσσωμάτωσης (stacking) τύπου π-π. Β. Ένα παράδειγμα αυτών των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός μορίου πικρικού οξέος (ο ανθρακικός σκελετός αναπαριστάται με κίτρινο χρώμα) και τεσσάρων μορίων ανθρακικού οξέος (ο

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

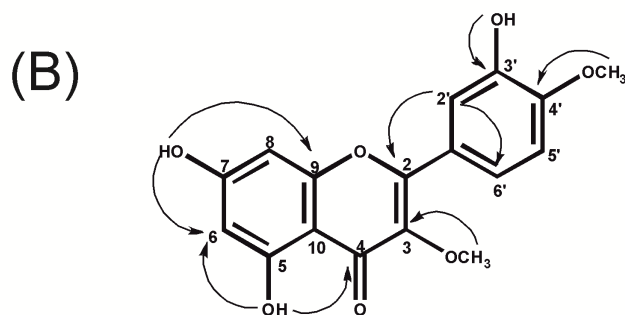
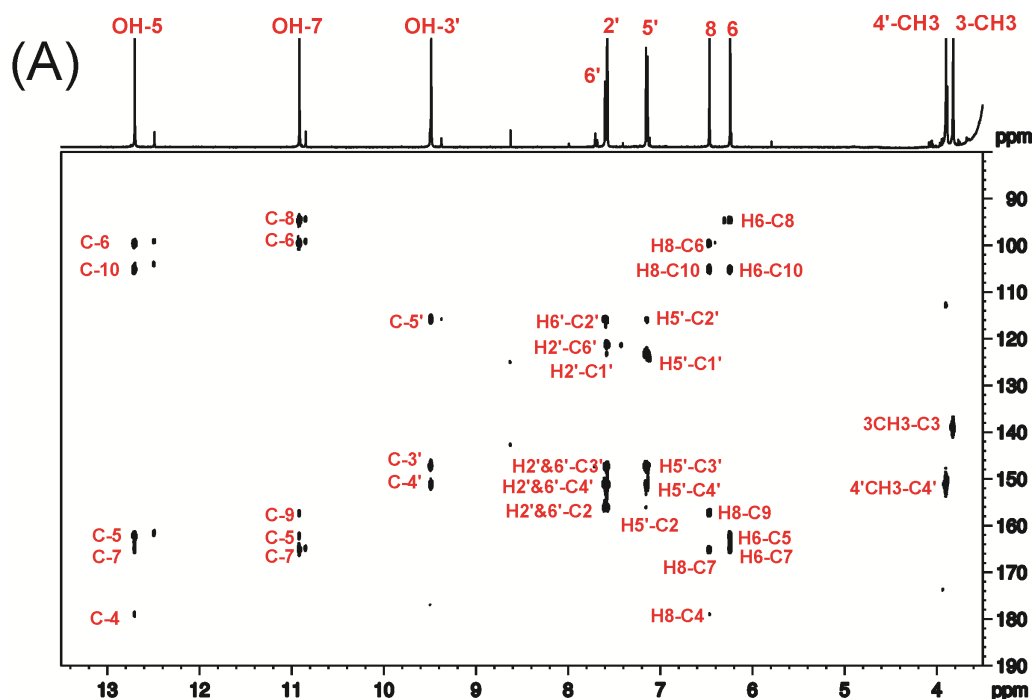
ανθρακικός σκελετός αναπαριστάται με γκρι χρώμα). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ανθρανιλικού οξέος και των πολικών νιτροομάδων του πικρικού οξέος [Singh et al., 2010].

Πράγματι, έπειτα από τιτλοδότηση των προς ανάλυση δειγμάτων με πικρικό οξύ παρατηρήθηκε εξαιρετική μείωση του εύρους των απορροφήσεων στην περιοχή των φαινολικών υδροξυλομάδων (Σχήμα 1.1.1.8). Για παράδειγμα στην περίπτωση της 3',5,7-τριυδροξυ-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (1 mM) με προσθήκη πολύ μικρής συγκέντρωσης πικρικού οξέος (0.02 mM) με αναλογία συγκεντρώσεων [PA]/[διμέθοξυφλαβόνη] $\approx$ 1:50 επιτεύχθηκε ελάχιστο στο εύρος των απορροφήσεων των ομάδων –OH, με αποτέλεσμα να γίνονται πλέον διακριτές όλες οι απορροφήσεις των πρωτονίων. Οι εξαιρετικά λεπτές απορροφήσεις ($\Delta\nu \approx 1.3$ Hz) επέτρεψαν την εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ^1H - ^{13}C HMBC (Σχήμα 1.1.1.9), λαμβάνοντας σημαντικό αριθμό κορυφών διασταύρωσης των ομάδων –OH.



Σχήμα 1.1.1.8 Φάσμα NMR ^1H 500MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (1mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος (T=298K, αριθμός παλμών=16, t_{acq} =2.18s, πειραματικός χρόνος=1min), (B) με την προσθήκη 0.02 mM πικρικού οξέος σε αναλογία

[PA]/[διμεθοξυφλαβόνη]≈1:50 (T=298K, αριθμός παλμών=16, t_{acq} =2.18, πειραματικός χρόνος=1min).



Σχήμα 1.1.1.9 (A) Φάσμα NMR 2D ^1H - ^{13}C HMBC 500MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (1mM) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ με την προσθήκη 0.02 mM πικρικού οξέος σε αναλογία [PA]/[διμεθοξυφλαβόνη] $\approx$ 1:50 T=298K, αριθμός παλμών=100, t_d =4k, πειραματικός χρόνος=13h4m). (B) Ενδεικτικές συσχετίσεις $^nJ_{\text{HC}}$ της διμεθοξυφλαβόνης.

1.1.2 Μελέτη της ισχύς του δεσμού υδρογόνου.

Ο δεσμός υδρογόνου είναι μία θεμελιώδης ιδιότητα των δομών και της δραστηριότητας βιολογικών μακρομορίων και η φασματοσκοπία NMR είναι από τις πρωταρχικές μεθοδολογίες για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου τόσο σε διάλυμα όσο και σε στερεό. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων παρέχουν σημαντικές πληροφορίες δεδομένου ότι και το μέγεθός τους εξαρτάται από την ισχύ του δεσμού υδρογόνου. Επίσης, τα πρωτόνια που σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς

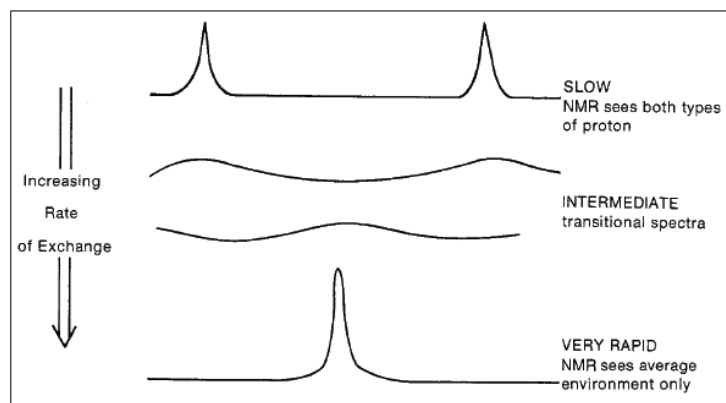
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υδρογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερα έντονη εξάρτηση της χημικής μετατόπισης από τη θερμοκρασία του δείγματος [Kontogianni et al., 2013].

Πρωτόνια τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (π.χ. πρωτόνια καρβοξυλικών ομάδων, φαινολικών υδροξυλίων, υδροξυλίων αλκοολών ή αμινοομάδων) εμφανίζουν ευρεία κλίμακα χημικών μετατοπίσεων. Όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός υδρογόνου τόσο πιο αποπροστατευμένο είναι το πρωτόνιο που συμμετέχει στο δεσμό.

Η πιθανότητα σχηματισμού διαμοριακών δεσμών υδρογόνου είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας. Όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση του διαλύματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, ενώ όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο ελαττώνεται αυτή η πιθανότητα. Ο σχηματισμός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου εξαρτάται σε πολύ μικρότερο βαθμό τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη συγκέντρωση. Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία για τη διάκριση ενδο- και δια-μοριακών δεσμών υδρογόνου [Jeffrey et al., 1991].

Η χρήση υδροξυλικών πρωτονίων σε διάλυμα για τη μελέτη δεσμών υδρογόνου και διαμόρφωσης παρουσιάζει διάφορες πειραματικές δυσκολίες λόγω ταχείας χημικής ανταλλαγής μεταξύ των υδροξυλικών ομάδων και των πρωτικών διαλυτών [Kontogianni et al., 2013]. Διαμοριακή ανταλλαγή πρωτονίων συχνά οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών. Οι κορυφές αντί να εμφανιστούν ως οξείες ως προς το εύρος, πολλές φορές διευρύνονται και υπολείπονται σε ένταση. Μία κορυφή που οφείλεται, για παράδειγμα, σε απορρόφηση –Ο-Η μπορεί να διακριθεί από τις υπόλοιπες απλές κορυφές, σε αρκετές περιπτώσεις, και μόνο από τη μορφή της. Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, σημειώνουμε μόνο την εξάρτηση από τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία. Στο Σχήμα 1.1.2.1 αποτυπώνεται διαγραμματικά η επίδραση στο φάσμα NMR της ταχύτητας ανταλλαγής, από πολύ αργή έως πολύ γρήγορη, ως προς την κλίμακα χρόνου του NMR.



Σχήμα 1.1.2.1 Η επίδραση της ταχύτητας ανταλλαγής στη διεύρυνση κορυφών σε ένα φάσμα NMR [Pavia et al., 2001].

Η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων μπορεί να επιβραδυνθεί με τη χρήση DMSO- d_6 ή ακετόνης- d_6 , με την ψύξη υδατικών διαλυμάτων ή με την χρήση οργανικών συνδιαλυτών. Έτσι, συντελεστές θερμοκρασίας υδροξυλικών πρωτονίων υδατανθράκων έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε δομικές αναλύσεις [Bekiroglu et al., 2004]. Σε αντίθεση, οι φαινολικές υδροξυλικές ομάδες έχουν μελετηθεί ελάχιστα παρά το γεγονός ότι είναι ανάμεσα στις πιο σημαντικές και συχνά συναντώμενες λειτουργικές ομάδες σε οργανικές και βιομοριακές ενώσεις. Σύμφωνα με την τράπεζα φαρμάκων (DrugBank, <http://www.drugbank.ca>) το 7% των φαρμάκων περιέχουν φαινολικές -OH ομάδες [Kontogianni et al., 2013].

Από τα πρώτα χρόνια χρήσης του NMR είναι γνωστό ότι η χημικές μετατοπίσεις των πεπτιδικών πρωτονίων παρουσιάζουν αρνητικό συντελεστή θερμοκρασίας. Η αιτιολόγηση της επίδρασης αυτής είναι ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας ο δεσμός υδρογόνου του πεπτιδικού πρωτονίου εξασθενεί και η απορρόφηση του πρωτονίου μετατοπίζεται προς χαμηλές συχνότητες (αύξηση προστασίας). Έτσι, η τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας του πεπτιδικού πρωτονίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην πρόβλεψη δεσμών υδρογόνου σε πεπτίδια και πρωτεΐνες. Επομένως, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η κατανόηση των μεταβολών της χημικής μετατόπισης των ομάδων -OH τόσο για την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου όσο και για την εξάρτηση από τη δομή μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος.

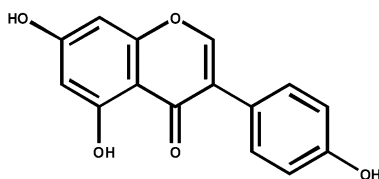
Στην περίπτωση των φλαβονοειδών τόσο ο αριθμός όσο και η κατανομή των υδροξυλικών πρωτονίων μπορούν να επηρεάσουν το είδος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών φλαβονοειδών και των λιπιδικών διπλοστιβάδων καθώς η αλληλεπίδραση των υδρόφιλων φλαβονοειδών και των ολιγομερών με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων στην λιπιδική-υδατική διεπιφάνεια, σχετίζεται κυρίως με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [Oteiza et al., 2005]. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των φλαβονοειδών και των πολικών κεφαλών των μεμβρανικών λιπιδίων στην διεπιφάνεια είναι καθοριστικός για την ικανότητα των ενώσεων αυτών να αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της μεμβράνης και να την προστατεύουν από εξωτερικές βλάβες.

Η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των φλαβονοειδών είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις διάφορες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη BSA (αλβουμίνη ορού βοοειδούς). Η αύξηση του αριθμού των δοτών δεσμών υδρογόνου στα φλαβονοειδή είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συγγένειας ως προς την πρωτεΐνη επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως υπεύθυνες για την πρόσδεση των φλαβονοειδών στη BSA [Shi et al., 2011].

Στην περίπτωση των φλαβονοειδών το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας OH-5 στα 12.0-13.0 ppm είναι και το περισσότερο αποπροστατευμένο λόγω του ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει με το οξυγόνου του καρβονυλίου

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

CO(4) σχηματίζοντας έτσι ένα είδος ψευδοδακτυλίου. Από διάφορες μελέτες προκύπτει η μεγάλη σημασία του σχηματισμού του ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου καθώς η παρουσία του φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες και η αντικατάσταση αρωματικών δακτυλίων από τέτοιους ψευδοδακτυλίους αποτελεί μία νέα και μη συμβατική στρατηγική σε μια προσπάθεια μίμησης καθιερωμένων ενώσεων «οδηγών». Για παράδειγμα, στην περίπτωση της γενιστεΐνης (Σχήμα 1.1.2.2) η οποία έχει βρεθεί ότι μπορεί να δράσει ως αναστολέας της EGFR PTK κινάσης, ο Liechti και η ομάδα του [Liechti et al., 2003] επιχείρησαν να μιμηθούν τον σχηματισμό του εξαμελούς ψευδοδακτυλίου της. Έτσι, αντικατέστησαν την παρουσία πυριμιδινικού δακτυλίου μίας ομάδας συνθετικών ενώσεων με εξαμελή ψευδοδακτύλιο επιτυγχάνοντας την αναστολή της EGFR PTK κινάσης με τιμές IC_{50} 23-71 nM, ενώ η απουσία του ισχυρού δεσμού υδρογόνου είχε ως αποτέλεσμα την απουσία αναστολής των υπό μελέτη κινασών, EGFR, VEGFR και c-Abl. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και άλλες μελέτες κατά τις οποίες έπειτα από αντικατάσταση αρωματικών δακτυλίων με εξαμελείς ψευδοδακτυλίους επιτεύχθηκε αναστολή διαφόρων τυροσινικών κινασών όπως η c-Src, EGF-R, c-Abl και Tie-2 της τάξεως των nM [Furet et al., 2008, Furet et al., 2003, Honma et al., 2001, Jansma et al., 2007].



Σχήμα 1.1.2.2 Δομή του ισοφλαβονοειδούς γενιστεΐνης.

Στο ερώτημα που προκύπτει αν τέτοιου είδους ισχυροί δεσμοί μπορούν να διατηρηθούν και σε υδατικά συστήματα έχει ήδη απαντήσει η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας [Exarchou et al., 2002] σύμφωνα με την οποία ο ισχυρός δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του OH-5 και της CO-4 ομάδας των φλαβονοειδών δεν επηρεάζεται σε πρωτικούς διαλύτες. Επίσης και άλλες μελέτες έχουν αποδείξει τη διατήρηση του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου σε υδατικά διαλύματα, ο οποίος και σχεδιάστηκε έτσι ώστε να σχηματίζει το ψευδοδακτύλιο ενός μιμητή scaffold αναστολέα κινασών [Jansma et al., 2007].

Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου έχει σημαντικό ρόλο όχι μόνον στις ενδομοριακές αλλά και στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως αποδεικνύεται από πληθώρα κρυσταλλογραφικών δομών συμπλόκων αναστολέων με κινάσες όπου και εντοπίζονται αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ του αναστολέα και του πρωτεϊνικού σκελετού στην περιοχή άρθρωσης (hinge). Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στην ύπαρξη τάσης (stretch) των αμινοξέων που συνδέουν τις N- και C- τερματικές περιοχές

των κινασών των οποίων η διεπιφάνεια σχηματίζει την θέση πρόσδεσης του ATP [Furet et al., 2003; Xiao et al., 2011].

Για όλους τους ανωτέρω λόγους καθώς και ότι τα φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των κινασών, παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της ισχύος των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου του πρωτονίου OH-5 αλλά και των υπολοίπων υδροξυλικών πρωτονίων και η περαιτέρω σύγκριση των διαφορετικών αναλόγων. Πραγματοποιήθηκαν ως εκ τούτου πειράματα μελέτης επίδρασης του διαλύτη στις μετατοπίσεις των φαινολικών –OH ομάδων καθώς και πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας έτσι ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τη φύση των αλληλεπιδράσεων των ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου των φλαβονοειδών.

1.1.3 Επίδρασεις του διαλύτη στις χημικές μετατοπίσεις NMR ^1H των φαινολικών OH ομάδων

Για να διευκρινιστεί εάν η αποπροστασία των φαινολικών –OH πρωτονίων προκαλείται λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δικτύων διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα υδροξυλικά πρωτόνια και τα μόρια του διαλύτη, πραγματοποιήθηκε μελέτη φασματοσκοπίας NMR ^1H της ομάδας των έξι φλαβονοειδών του Σχήματος 1.1.1 σε δύο διαλύτες, ακετόνη- d_6 και DMSO- d_6 που παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ισχύ δεσμών υδρογόνου και την ικανότητα διαλυτοποίησης.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 298K και στον Πίνακα 1.1.3.1 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των φαινολικών υδροξυλομάδων στους δύο διαλύτες. Σε όλες τις περιπτώσεις η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των OH-5 στους δύο διαλύτες είναι αρκετά μικρή ($|\Delta\delta| \leq 0.6\text{ppm}$). Απεναντίας οι υδροξυλομάδες OH-3 και OH-7 παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαλυτών DMSO- d_6 και ακετόνης- d_6 γεγονός που υποδηλώνει ότι το μέγεθος των μετατοπίσεων σχετίζεται με την ισχύ του δεσμών υδρογόνου του διαλύτη (Πίνακας 1.1.3.1).

Όσον αφορά τα OH-5 πρωτόνια, παρατηρήθηκε αμελητέα μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των φαινολικών OH-5 στους δύο διαλύτες γεγονός που οφείλεται στην μεγαλύτερη ισχύ των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου σε σχέση με τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με το διαλύτη για τα φλαβονοειδή αυτά. Η επίδραση δηλαδή του διαλύτη φαίνεται ότι μειώνεται με την αύξηση της ισχύς του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ των ομάδων OH-5 και CO-4. Στην περίπτωση αυτή τα περιβάλλοντα μόρια του διαλύτη γύρω από το OH-5 αποκλείονται, οδηγώντας σε σημαντικά μειωμένη διαλυτοποίηση και συνεπώς σε μικρότερη εξάρτηση της μετατόπισης των –OH από το διαλύτη. Η παρουσία, επομένως, ενδομοριακών δεσμών

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υδρογόνου όπως επίσης και η ισχύς τους μπορεί να συναχθεί από την επίδραση του διαλύτη στις χημικές μετατοπίσεις των υδροξυλικών πρωτονίων.

Πίνακας 1.1.3.1 Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των υδροξυλικών πρωτονίων φλαβονοειδών σε ακετόνη- d_6 και DMSO- d_6 στους 298K.

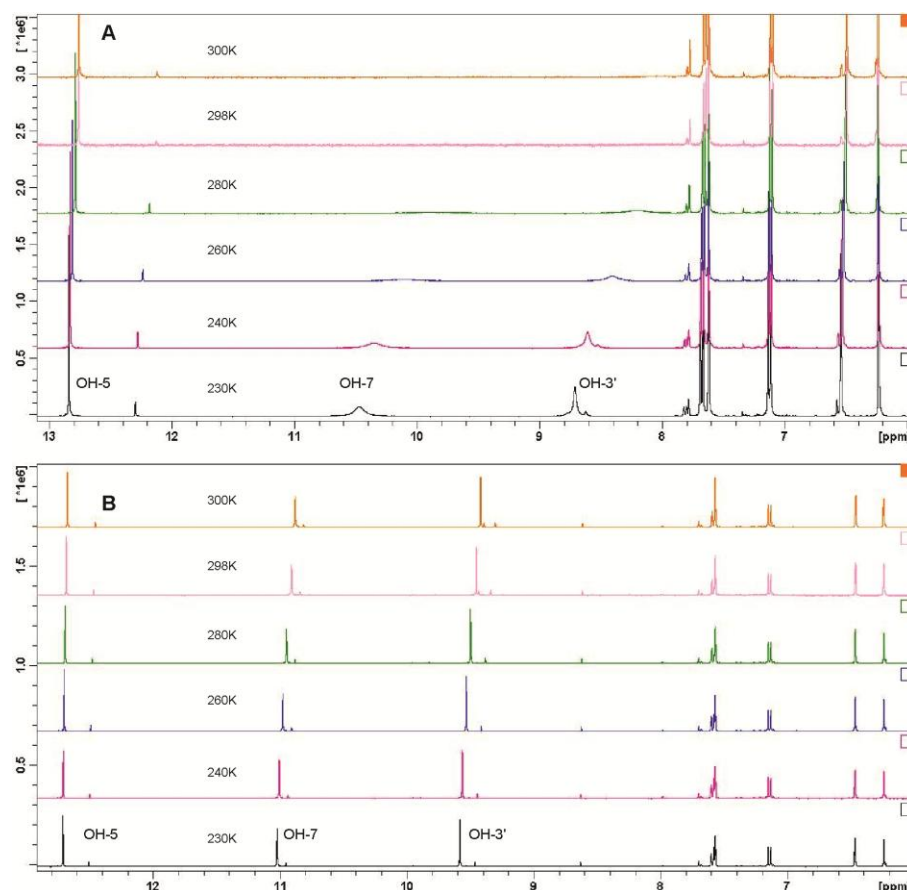
Compound	Proton	$\delta_{\text{DMSO-d}_6}$	$\delta_{\text{acetone-d}_6}$	$\Delta\delta (\delta_{\text{DMSO-d}_6} - \delta_{\text{acetone-d}_6})$
Quercetin	OH-5	12,52	12,16	0,36
Luteolin	OH-5	13,01	13,01	-
3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone	OH-5	12,74	12,75	-0,1
Tamarixetin	OH-5	12,48	12,14	0,34
3',5,7-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone	OH-5	12,7	12,76	-0,6
3,5,7-Trihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone	OH-5	12,39	12,08	0,31
	OH-3	9,69	8,29	1,4
	OH-7	10,93	9,75	1,18

1.1.4 Επιδράσεις της θερμοκρασίας στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των φαινολικών OH ομάδων

Στο Σχήμα 1.1.4.1 απεικονίζεται η εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων των υδροξυλικών πρωτονίων από τη θερμοκρασία, $\Delta\delta/\Delta T$, της διμεθοξυφλαβόνης στους δύο διαλύτες, ακετόνη- d_6 και DMSO- d_6 . Γενικά, οι χημικές μετατοπίσεις των OH εμφανίζουν προστασία (χαμηλότερες συχνότητες) καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται και αυτό συμβατικά περιγράφεται ως αρνητικός συντελεστής θερμοκρασίας. Στον Πίνακα 1.1.4.1 παρουσιάζονται οι τιμές $\Delta\delta/\Delta T$ των –OH πρωτονίων των φλαβονοειδών.

Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση με τις μεταβολές της θερμοκρασίας και οι συντελεστές $\Delta\delta/\Delta T$, με εξαιρετικά ικανοποιητικό συντελεστή προσδιορισμού $R^2 > 0.995$, καλύπτουν ένα εύρος από -1.4 έως -11.14 ppm K^{-1} (ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το TMS- d_4). Όπως έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία [Jameson et al., 1991] η παρατηρούμενη συσχέτιση της θερμοκρασίας θα έπρεπε να καθορίζεται από τη συμβολή μεταβολών του μήκους των δεσμών. Συνεπώς θα πρέπει να παρατηρείται αύξηση της αποπροστασίας με αύξηση της θερμοκρασίας διότι, καθώς το μόριο περιστρέφεται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες, προκαλείται αύξηση του μήκους των δεσμών λόγω κεντρομόλου τάσης (centrifugal stretching), γεγονός το οποίο δε συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η συσχέτιση με τη θερμοκρασία είναι πιο πολύπλοκη λόγω αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το διαλύτη και επιπρόσθετων περιστροφικών κινήσεων

γύρω από τους δεσμούς. Πράγματι αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει σχάση δεσμών υδρογόνου της ένωσης με το διαλύτη με συνέπεια την αύξηση της προστασίας (χαμηλές τιμές δ , ppm) σε άριστη συμφωνία με τα πειραματικά μας δεδομένα.



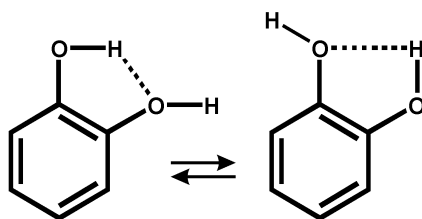
Σχήμα 1.1.4.1 Φάσματα NMR ^1H 400MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) σε διάφορες θερμοκρασίες: (A) σε ακετόνη- d_6 και (B) σε DMSO- d_6 .

Επιπλέον παρατηρείται ότι οι τιμές $\Delta\delta/\Delta T$ σε DMSO- d_6 , με εξαίρεση το OH-5, βρίσκονται σε ένα εύρος μεταξύ -5.2 έως -8 ppb K^{-1} . Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι όλες οι φαινολικές ομάδες OH είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη συμπεριλαμβανομένων και αυτών που βρίσκονται σε όρθο- θέση, όπως οι OH-3' και OH-4' της κερσετίνης που δεν εμπλέκονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου τύπου flip-flip (Σχήμα 1.1.4.2). Στην ακετόνη- d_6 οι τιμές $\Delta\delta/\Delta T$ της τριμεθοξυφλαβόνης, με εξαίρεση και πάλι το OH-5, βρίσκονται σε ένα εύρος μεταξύ -9.43 έως -11.14 ppb K^{-1} , μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή από τις αντίστοιχες σε DMSO- d_6 . Συνεπώς, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου ένωσης-διαλύτη στην ακετόνη- d_6 σχάζουν πιο εύκολα από ότι σε DMSO- d_6 με την αύξηση της θερμοκρασίας.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 1.1.4.1 Συντελεστές θερμοκρασίας χημικών μετατοπίσεων ($\Delta\delta/\Delta T$) των πρωτονίων OH φλαβονοειδών σε ακετόνη- d_6 και σε DMSO- d_6 .

Compound	$\Delta\delta/\Delta T$		
	Πρωτόνιο	Ακετόνη- d_6	DMSO- d_6
Quercetin	OH-5	-3,04	-2,0
	OH-7		-5,4
	OH-3		-8,0
	OH-3'		-6,3
	OH-4'		-6,5
Luteolin	OH-5	-2,09	-1,8
	OH-7		-5,2
	OH-3'		-5,7
	OH-4'		-6,7
3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone	OH-5	-1,68	-1,4
	OH-7		-5,8
	OH-3'		-6,6
	OH-4'		-6,9
Tamarixetin	OH-5	-3,05	-2,1
	OH-7		-5,9
	OH-3		-8,2
	OH-3'		-6,6
3',5,7-Trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone	OH-5	-1,68	-1,4
	OH-7		-5,7
	OH-3'		-6,6
3,5,7-Trihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone	OH-5	-2,39	-1,8
	OH-7	-9,43	-5,9
	OH-3	-11,14	-8,3



Σχήμα 1.1.4.2 Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου τύπου flip-flop.

Η μεταβολή της μέσης απόστασης των δεσμών υδρογόνου ως συνάρτηση της θερμοκρασίας είναι πολύ μεγαλύτερη σε διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου (όπως δεσμών υδρογόνου με τον διαλύτη) από ότι σε ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Συνεπώς, οι χημικές μετατοπίσεις των OH πρωτονίων που σχηματίζουν δεσμούς

υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη θα αποπροστατευτούν σε μεγαλύτερο βαθμό με την αύξηση της θερμοκρασίας.

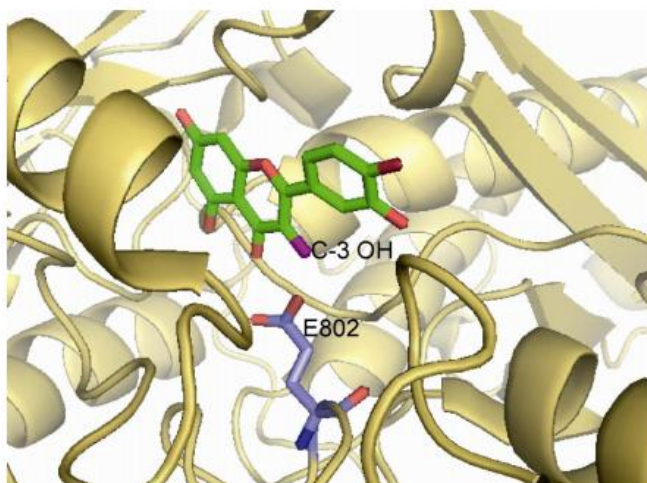
Συμπερασματικά, οι συντελεστές θερμοκρασίας $\Delta\delta/\Delta T$ και οι μεταβολές στη προστασία των πυρήνων λόγω εξάρτησης από το διαλύτη των φαινολικών ομάδων OH είναι συμπληρωματικές μέθοδοι μελέτης της συμμετοχής των σχετικών ομάδων σε δεσμούς υδρογόνου. Συνολικά παρατηρούμε ότι οι φαινολικές OH ομάδες OH-3 και OH-7 που σχηματίζουν τους πιο ισχυρούς διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου ενώ ακολουθούν οι OH-3' και OH-4'. Τέλος, παρατηρούμε ότι τα φλαβονοειδή 3',4',5,7-τετραυδροξύ-3-μεθοξυφλαβόνη και 5,7,3'-τριυδροξύ-3,4'-διμεθοξεφλαβόνη χαρακτηρίζονται από τον πιο ισχυρό δεσμό υδρογόνου στη θέση OH-5 γεγονός που αναμένουμε να επηρεάζει τις βιολογικές ιδιότητές τους. Η μικρότερη ισχύς των δεσμών υδρογόνου των φλαβονοειδών κερσετίνη, ταμαριξετίνη και 3,5,7-τριυδροξύ-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνη οφείλεται στην παρουσία της ομάδας OH-3 η οποία στις φλαβονόλες προκαλεί μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο άτομο του οξυγόνου της ομάδας του CO-4 με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ισχυρός ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου C5-OH---OC-4.

Η παρατήρηση αυτή είναι αρκετά σημαντική όσον αφορά την στερεοχημεία της ομάδας OH-3. Η υδροξυλομάδα αυτή βρέθηκε (σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφική μελέτη [Kontogianni et al., 2013]) να είναι εκτός επιπέδου σε σχέση με τους αρωματικούς δακτυλίους με τις δίεδρες γωνίες H3-O3-C3-C4 να είναι -14.62° , -14.45° και -11.26° . Οι αντίστοιχες δίεδρες γωνίες για το OH-5 υδρογόνο (H3-O3-C3-C4) είναι -0.53° , 2.1° και 4.71° . Στην ίδια μελέτη, μέρος της οποίας αποτέλεσαν και αποτελέσματα της διατριβής, η ομάδα OH-3 παρουσίασε πολύ σημαντικούς αρνητικούς συντελεστές θερμοκρασίας $\Delta\delta/\Delta T$ (-8.0 έως -8.3 ppb K^{-1} σε DMSO- d_6) (Πίνακας 1.1.4.1). Συνεπώς, η υδροξυλομάδα αυτή είναι εκτεθειμένη στα μόρια του διαλύτη και δεν σχηματίζει σταθερό και ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με την ομάδα CO-4 [Kontogianni et al., 2013].

Η εκτός επιπέδου διεύθυνση της ομάδας C-3 OH μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα σε βιολογικά συστήματα, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η παρουσία της, σε συνδυασμό με άλλα δομικά χαρακτηριστικά, ρυθμίζει πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων όπως π.χ ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών και την απομάκρυνση ελευθέρων ριζών από αυτά [Rice-Evans et al., 1996]. Η απουσία της έχει βρεθεί ότι μειώνει την ανασταλτική ικανότητα της BCRP (breast cancer resistance protein) από τα φλαβονοειδή [Zhang et al., 2005]. Σε πλήθος κρυσταλλογραφικών δεδομένων συμπλόκων φλαβονολών, που φέρουν ομάδα OH-3, με πρωτεΐνες παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις της ομάδας αυτής με ομάδες των πρωτεϊνικών αμινοξέων. Για παράδειγμα, στην κρυσταλλική δομή της κερσετίνης με την ξανθίνη οξειδάση (pdbid:

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2NVY) η OH-3 ομάδα αλληλεπιδρά με το γλουταμικό 802 (E802) της πρωτεΐνης (Εικόνα 1.1.4.1).



Εικόνα 1.1.4.1 Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου κερσετίνη-ξανθίνη οξειδάση (pdbid: 2NVY). Η ομάδα OH-3 αλληλεπιδρά με το γλουταμικό 802 (E802) της πρωτεΐνης (η απόσταση μεταξύ του E802 και της ομάδας OH-3 είναι περίπου 2.07Å) [Wang et al., 2006].

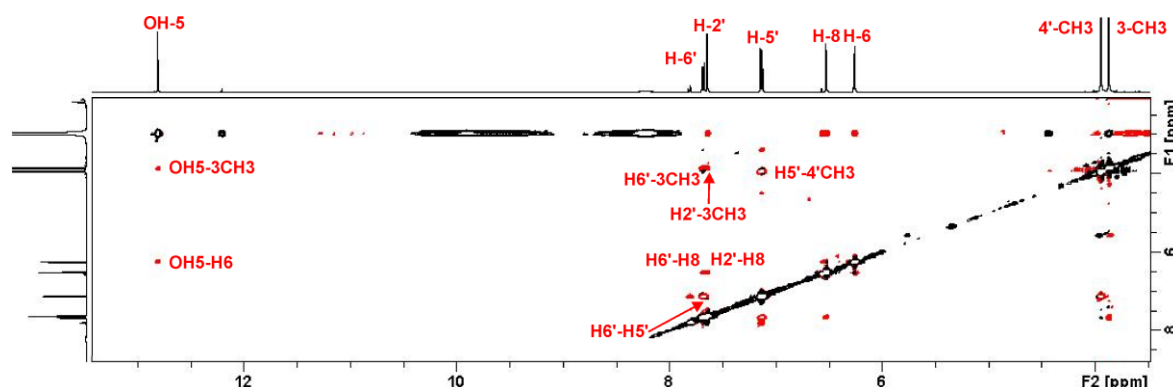
1.1.5 Δομικές μελέτες NMR 2D ^1H - ^1H NOESY.

Η φασματοσκοπία NMR NOESY έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία στη μελέτη τρισδιάστατων δομών βιολογικών μακρομορίων και δομών συμπλόκων πρωτεΐνης-υποκαταστάτη και DNA-υποκαταστάτη. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από ένα πείραμα NOESY δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διαμόρφωση του μορίου στο χώρο καθώς δύο πρωτόνια που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 5Å θα δώσουν μία κορυφή διασταύρωσης στον δισδιάστατο χάρτη. Παρουσιάζει συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της διαμόρφωσης των φλαβονοειδών στο χώρο καθώς η απουσία κρυσταλλικών δομών για τα περισσότερα από αυτά αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την πλήρη κατανόηση μελετών συσχέτισης δομικών χαρακτηριστικών με δραστικότητα.

Για παράδειγμα η φασματοσκοπία NMR NOESY μας δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η επιπεδότητα του φαινολικού δακτυλίου B σε σύγκριση με τους βενζοπυρονικούς δακτυλίους A και Γ. Η επιπεδότητα ή μη των δακτυλίων έχει βρεθεί ότι αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική δομική ιδιότητα και μπορεί να επηρεάσει τη δραστικότητα των φλαβονοειδών.

Για παράδειγμα, στην επιπεδότητα των δακτυλίων της κερσετίνης έχει αποδοθεί η ισχυρή αναστολή που προκαλεί στη λειτουργία των αιμοπεταλίων όταν αυτή διεγείρεται από το κολλαγόνο σε αντίθεση με την απουσία επιπεδότητας του δακτυλίου Γ της κατεχίνης που οδηγεί σε απώλεια ικανότητας ισχυρής αναστολής [Wright et al., 2010]. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή που διαθέτουν επίπεδη δομή λόγω της

παρουσίας του διπλού δεσμού μεταξύ των C2 και C3 παρουσιάζουν πολύ καλή ανασταλτική δράση της λειτουργίας της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, έναν μεμβρανικό μεταφορέα της οποίας η υπερέκφραση σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στα καρκινικά κύτταρα [Kitagawa et al., 2005].



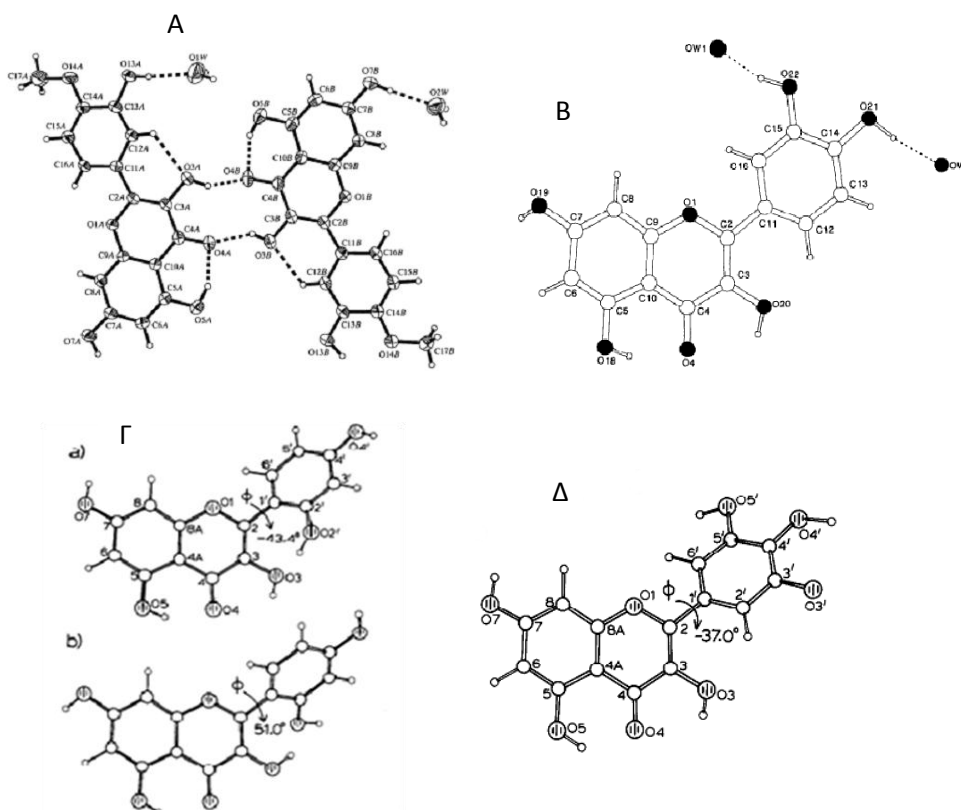
Σχήμα 1.1.5.1 Φάσμα NMR 2D ^1H - ^1H NOESY 500MHz της διμεθοξυφλαβόνης (**5**) (5.7mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=283K, αριθμός παλμών=8, d8=1s, πειραματικός χρόνος=3h31m). Οι τιμές T_1 των αρωματικών πρωτονίων κυμαίνονται μεταξύ 1.6 έως 2.8 s.

Στο Σχήμα 1.1.5.1 παρουσιάζεται το φάσμα NMR NOESY της διμεθοξυφλαβόνης όπου και παρατηρείται καταρχήν ότι οι κορυφές διασταύρωσης NOE έχουν αντίθετη φάση ως προς τη διαγώνιο όπως και αναμένεται λόγω του μικρού χρόνου συσχέτισης τ_c . Η πιο ισχυρή κορυφή διασταύρωσης στο δισδιάστατο χάρτη αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5' και H6' τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους. Από την κρυσταλλική δομή της κερσετίνης [Rossi et al., 1986] προκύπτει ότι η μεταξύ τους απόσταση αντιστοιχεί σε 2.5 Å περίπου. Επίσης παρατηρούνται σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων OH5 και H6, OH5 και την μεθυλομάδα της θέσης 3 όπως επίσης μεταξύ των H6' με την 3CH₃ και του H5' με την 4CH₃. Η απόσταση μεταξύ των πρωτονίων αυτών, σύμφωνα με διάφορες κρυσταλλικές δομές φλαβονοειδών όπως της κερσετίνης και της ταμαριξετίνης, είναι μικρότερη των 5 Å οπότε είναι αναμενόμενη η παρατήρησή τους [Rossi et al., 1986, Shuib et al., 1999]. Το φάσμα λήφθηκε στους 283K και με χρόνο ανάμιξης 1s σύμφωνα με τον Kim και την ομάδα του [Kim et al., 2006]. Αντίστοιχες είναι οι παρατηρήσεις για τα φάσματα NMR NOESY των φλαβονοειδών 3, 4 και 6 τα οποία παρουσιάζονται στα Σχήματα 1 έως 3 του παραρτήματος.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρούνται NOE σήματα που αντιστοιχούν σε συσχετίσεις μεταξύ της μεθυλομάδας 3CH₃ και του H2' αλλά και του πρωτονίου H8 με το H2' και το H6'. Αυτές οι κορυφές διασταύρωσης είναι πιθανόν να οφείλονται στην προσέγγιση του H8 τόσο με το H2' όσο και με το H6' λόγω της ικανότητας περιστροφής του δακτυλίου Β γύρω από το δεσμό C2-C1' [Cody et al., 1994]. Ελαφρώς ισχυρότερη εξέλιξη του φαινομένου NOE (τιμές χρόνου ανάμιξης 400-1000ms)

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ως προς το H8 επιδεικνύει το πρωτόνιο H2' γεγονός που αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερης πληθυσμιακής κατανομής του διαμορφωμερούς όπου τα πρωτόνια H8 και H2' βρίσκονται στην ίδια πλευρά του μορίου. Από κρυσταλλικές δομές φλαβονοειδών όπως π.χ. της ταμαριξετίνης, της μορίνης, της μυρισετίνης, έχει παρατηρηθεί ότι είναι δυνατόν να υπάρξουν διάφορες διαμορφώσεις του ίδιου μορίου όπου ο βενζολικός δακτύλιος B είτε να παρουσιάζει επιπεδότητα σε σχέση με τους δακτυλίους A και Γ αλλά μπορεί να παρουσιάζει και στρέψη γύρω από το δεσμό C2-C1'. Έτσι για παράδειγμα στην κρυσταλλική δομή της κερσετίνης ο δακτύλιος B παρουσιάζει πολύ μικρή στρέψη περίπου 7° με το H6' να βρίσκεται κοντά στο OH3 (Σχήμα 1.1.5.2) ενώ στην ταμαριξετίνη και στην μυρισετίνη το H2' να βρίσκεται κοντά στην υδροξυλομάδα OH3, παρουσιάζοντας και για τις δύο περιπτώσεις στρέψη του B δακτυλίου.



Σχήμα 1.1.5.2 Κρυσταλλικές δομές: (Α) δύο μορίων της ταμαριξετίνης (Β) της κερσετίνης και (Γ) δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της μορίνης και (Δ) της μυρισετίνης [Rossi et al., 1986; Shuib et al., 1999].

1.2 Μελέτη του συντελεστή διάχυσης και διαχωρισμός μιγμάτων φλαβονοειδών με φασματοσκοπία DOSY NMR.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η φασματοσκοπία NMR διάχυσης αποτελεί μια μη επεμβατική τεχνική και είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη μελέτη μοριακής δυναμικής και

μεταφορικής διάχυσης και συνεπώς και δομικών λεπτομερειών σε βιολογικά συστήματα, όπως το μέγεθος, το σχήμα, η ακτίνα του μορίου κ.α.. Επίσης η χρήση φασματοσκοπίας διάχυσης παρέχει σημαντικό πλεονέκτημα μελέτης διαφόρων μιγμάτων είτε προέρχονται από φυσικά εκχυλίσματα είτε από συνθετικά παράγωγά τους χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό του μίγματος. Η συνδυαστική χημεία για παράδειγμα έχει γίνει ένα ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στην οργανική και φαρμακευτική έρευνα τα τελευταία χρόνια. Μία από τις κυριότερες συνέπειες της συνδυαστικής χημείας είναι η παραγωγή μιγμάτων με ένα μεγάλο αριθμό προϊόντων σε μικρές συγκεντρώσεις και για το λόγο αυτό απαιτούνται τεχνικές με τις οποίες να είναι δυνατή η ταυτοποίηση του μίγματος χωρίς χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επίσης, η κινητική αντιδράσεων στερεής φάσης μπορεί να εξαρτάται από την ικανότητα των ενώσεων να διαχυθούν στην διεπιφάνεια του στερεού [Cohen et al., 2005]. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί, ο συντελεστής διάχυσης του κάθε συστατικού ενός μίγματος μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ικανότητα του ανάλογου να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα.

Η φασματοσκοπία NMR διάχυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον «εικονικό διαχωρισμό» μιγμάτων ή βιβλιοθηκών ενώσεων μέτριου μεγέθους και παρέχει έναν αποτελεσματικό και γενικό τρόπο, ο οποίος δεν προϋποθέτει τον έλεγχο της κάθε ένωσης ξεχωριστά. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της φασματοσκοπίας NMR διάχυσης είναι ότι η υπό μελέτη παράμετρος, ο συντελεστής διάχυσης, συνδέεται με πολλά φαινόμενα που μελετώνται με πιο άμεσο τρόπο από τις άλλες πιο συμβατικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες παραμέτρους NMR, όπως οι χημικές μετατοπίσεις και οι χρόνοι αποκατάστασης [Cohen et al., 2005].

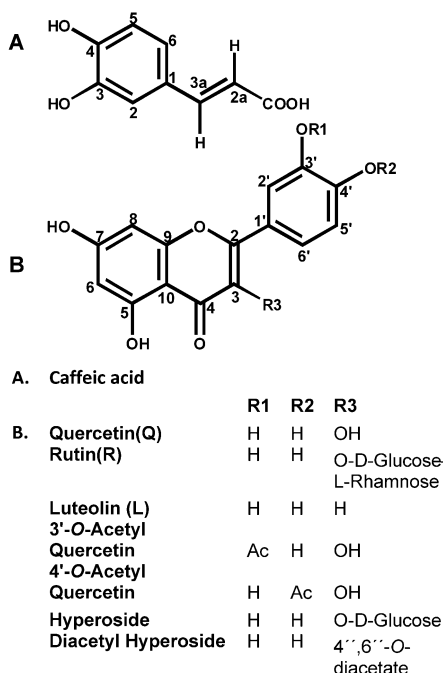
Έτσι για τους λόγους αυτούς αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την φασματοσκοπία NMR DOSY ώστε να μελετήσουμε τη συμπεριφορά επιλεγμένων φυσικών προϊόντων σε κατάσταση διαλύματος ξεχωριστά αλλά και σε μίγμα και να επιτύχουμε τον διαχωρισμό τους με τη χρήση της κατάλληλης μεθοδολογίας. Στη συνέχεια προχωρήσαμε και στη μελέτη ημισυνθετικών ακετυλιωμένων αναλόγων τους καθώς και στον διαχωρισμό των μιγμάτων τους [Primikyri et al., 2012].

Τα πρωτόνια των φαινολικών υδροξυλομάδων, πέραν του ότι είναι αρκετά ευαίσθητα σε μεγάλης απόστασης ηλεκτρονιακές επιδράσεις, εμφανίζονται σε μια φασματική περιοχή η οποία είναι διακριτή σε σχέση με την αρωματική και την αλειφατική περιοχή. Επομένως, η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων. Ωστόσο, σε ένα φάσμα ^1H -NMR σε θερμοκρασία δωματίου, οι υδροξυλομάδες εμφανίζονται ως διευρυμένα σήματα, λόγω φαινομένων ανταλλαγής των πρωτονίων των υδροξυλομάδων με τα πρωτόνια του νερού που περιέχεται στο δευτεριωμένο διαλύτη. Το φαινόμενο αυτό αναλύθηκε διεξοδικά στην ενότητα 1.1.1. Σε ένα φάσμα NMR διάχυσης οι υδροξυλομάδες εμφανίζουν συντελεστή διάχυσης παρόμοιο με αυτό του νερού. Επομένως, είναι απαραίτητο να

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ρυθμιστεί το pH, ούτως ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο το ποσοστό ανταλλαγής των πρωτονίων. Αυτό έχει επιτευχθεί, με τη χρήση πικρικού οξέος (Ενότητα 1.1.1).

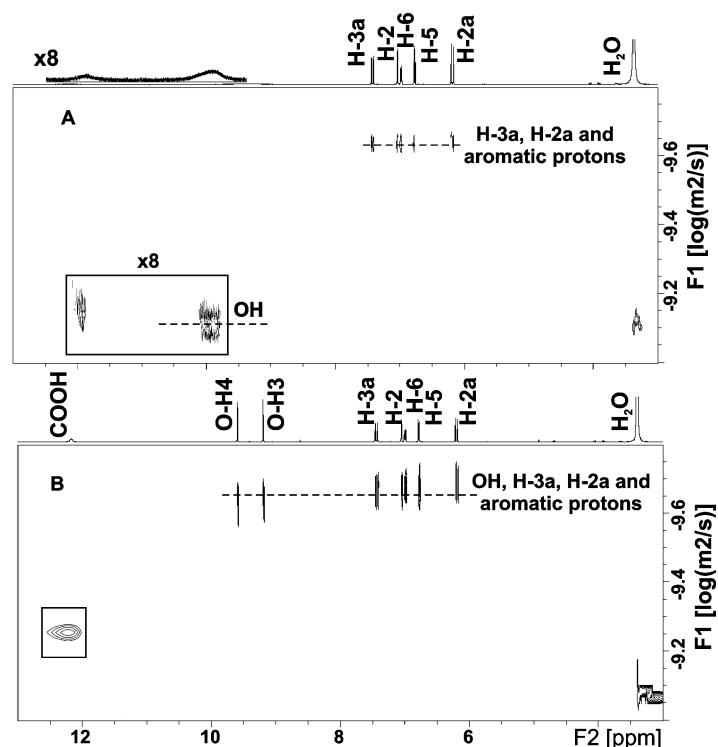
Αρχικά για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ (Σχήμα 1.2.1), το οποίο είναι ένα φυσικό προϊόν, και το φάσμα NMR ^1H παρουσίασε ιδιαίτερα διευρυμένα σήματα των πρωτονίων των υδροξυλομάδων αλλά και του καρβοξυλικού οξέος σε διαλύτη DMSO- d_6 , λόγω της ανταλλαγής με τα πρωτόνια του εναπομείναντος H_2O και/ή λόγω της διαμοριακής μεταφοράς πρωτονίων μεταξύ των ομάδων $-\text{OH}$ και $-\text{COOH}$ (Σχήμα 1.2.2). Στο φάσμα DOSY του καφεϊκού οξέος σε DMSO- d_6 παρατηρούμε ότι τα αρωματικά πρωτόνια παρουσιάζουν τον ίδιο συντελεστή διάχυσης ($\approx 2.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), ενώ τα υδροξυλικά και καρβοξυλικά πρωτόνια, τα οποία παρουσιάζουν διευρυμένα σήματα, έχουν συντελεστή διάχυσης που διαφέρει πολύ από τους αντίστοιχους συντελεστές των αρωματικών, παρόλο που ανήκουν στο ίδιο μόριο (Σχήμα 1.2.2). Τα πρωτόνια αυτά έχουν συντελεστή διάχυσης ($6.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) παρόμοιο με αυτό του H_2O στον οργανικό διαλύτη ($D_{\text{H}_2\text{O}} = 7.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), υποδηλώνοντας ότι βρίσκονται σε κατάσταση ταχείας ανταλλαγής με το νερό.



Σχήμα 1.2.1 Δομές φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν.

Η υψηλή ανάλυση που επιτεύχθηκε με προσθήκη πικρικού οξέος (Σχήμα 1.2.2) για τα σήματα συντονισμού των ανταλλάξιμων $-\text{OH}$ πρωτονίων, είχε ως αποτέλεσμα την ταύτιση των συντελεστών διάχυσης των πρωτονίων αυτών με τις αντίστοιχες τιμές των αρωματικών πρωτονίων. Η ελάχιστη τιμή των συντελεστών διάχυσης των πρωτονίων των υδροξυλομάδων OH-3 και OH-4 ($D \approx 2.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) προέκυψε για γραμμομοριακή

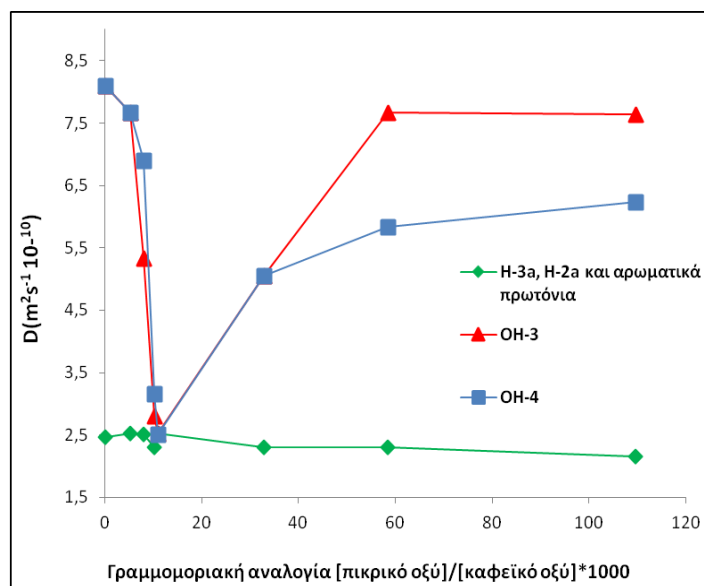
αναλογία [πικρικό οξύ]/[καφεϊκό οξύ] ≈ 0.011 , στην οποία παρατηρήθηκε και το ελάχιστο εύρος των κορυφών των πρωτονίων αυτών. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.2.2 η προσθήκη πικρικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα την πολύ καλή διάκριση και βελτιστοποίηση των συντελεστών διάχυσης των ανταλλάξιμων –OH πρωτονίων.



Σχήμα 1.2.2 Φάσματα NMR ^1H DOSY 500MHz του καφεϊκού οξέος (5.66 mM) σε $\text{DMSO-}d_6$ (292K, $\Delta=100\text{ms}$, $\delta_g=4.8\text{ms}$, αριθμός παλμών=24, πειραματικός χρόνος=40min). Οι συντελεστές διάχυσης των ομάδων –OH ταυτίζονται με τις τιμές των συντελεστών διάχυσης των αρωματικών με την προσθήκη πικρικού οξέος. Στο ένθετο παρουσιάζονται τα πρωτόνια –OH και –COOH σε χαμηλότερο επίπεδο (x8). (A) Χωρίς και (B) με την προσθήκη 0.062 mM πικρικού οξέος (γραμμομοριακή αναλογία [πικρικό οξύ]/[καφεϊκό οξύ] ≈ 0.011) [Primikyri et al., 2012].

Προσθήκη επιπλέον ποσότητας πικρικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των συντελεστών διάχυσης των πρωτονίων –OH (Σχήμα 1.2.3), σε αντίθεση με τους συντελεστές διάχυσης του $\text{DMSO-}d_6$ και του $\text{TSP-}d_4$, που παρέμειναν σχεδόν σταθεροί.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

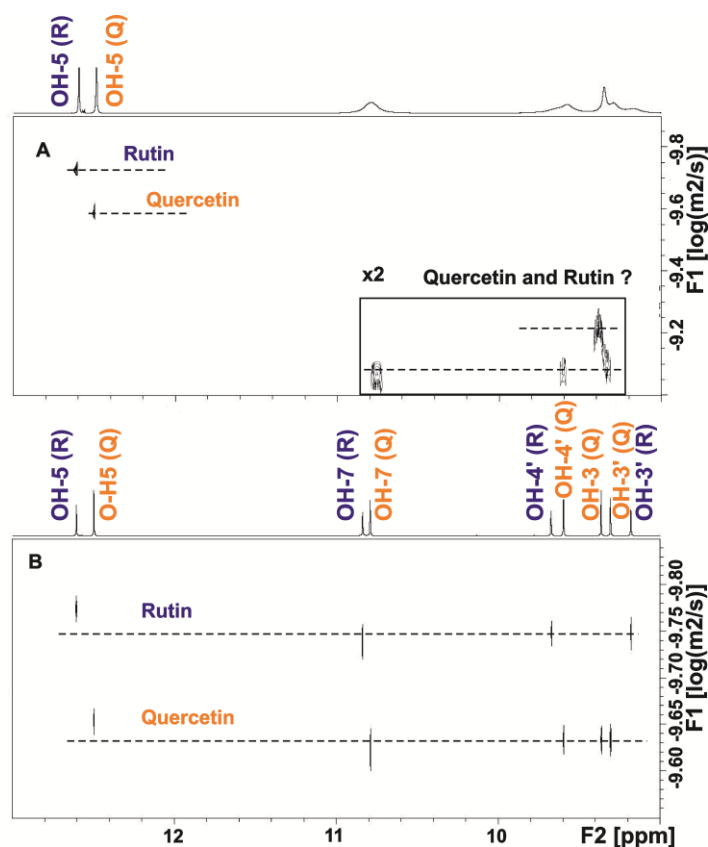


Σχήμα 1.2.3 Βελτιστοποίηση των τιμών των συντελεστών διάχυσης των ανταλλάξιμων πρωτονίων –OH ως προς το μοριακό συντελεστή διάχυσης των αρωματικών πρωτονίων. Οι συντελεστές διάχυσης των (▲) OH-3, (■) OH-4 και (◆) H-3a, H-2a και των αρωματικών πρωτονίων του καφεϊκού οξέος (5.66 mM) σε DMSO- d_6 στους 292K, $\Delta=100$ ms, $\delta_g=4.8$ ms, ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας [πικρικό οξύ]/[καφεϊκό οξύ]. Οι ελάχιστες τιμές των συντελεστών διάχυσης επιτεύχθηκαν σε αναλογία [πικρικό οξύ]/[καφεϊκό οξύ] ≈ 0.011 .

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μίγμα βιοφαινολών, των φλαβονοειδών της κερσετίνης (Q) και της ρουτίνης (R) που είναι ο 3-O-ρουτινοζίτης της κερσετίνης (Σχήμα 1.2.1). Στο φάσμα NMR ^1H παρουσιάζονται δύο ιδιαίτερα οξείες κορυφές στα 12.60 και στα 12.49 ppm (Σχήμα 1.2.4 A), οι οποίες αποδίδονται στα πρωτόνια OH-5 της ρουτίνης και της κερσετίνης, αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό με την καρβόνυλο ομάδα στη θέση 4 (CO-4). Οι απορροφήσεις των υπόλοιπων –OH εμφανίζονται ως ιδιαίτερα αλληλοεπικαλυπτόμενα σήματα με ποικιλία εύρους κορυφών. Το φάσμα DOSY του μίγματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2.4 όπου παρατηρείται ότι οι συντελεστές διάχυσης των πρωτονίων OH-3', OH-4', OH-7 και OH-3 της κερσετίνης και της ρουτίνης είναι παρόμοιοι με τους συντελεστές διάχυσης του νερού, λόγω ταχείας ανταλλαγής πρωτονίων, ενώ ο συντελεστής διάχυσης του OH-5 μειώθηκε λόγω του ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου με την καρβονυλική ομάδα, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική μείωση της ταχύτητας ανταλλαγής των πρωτονίων.

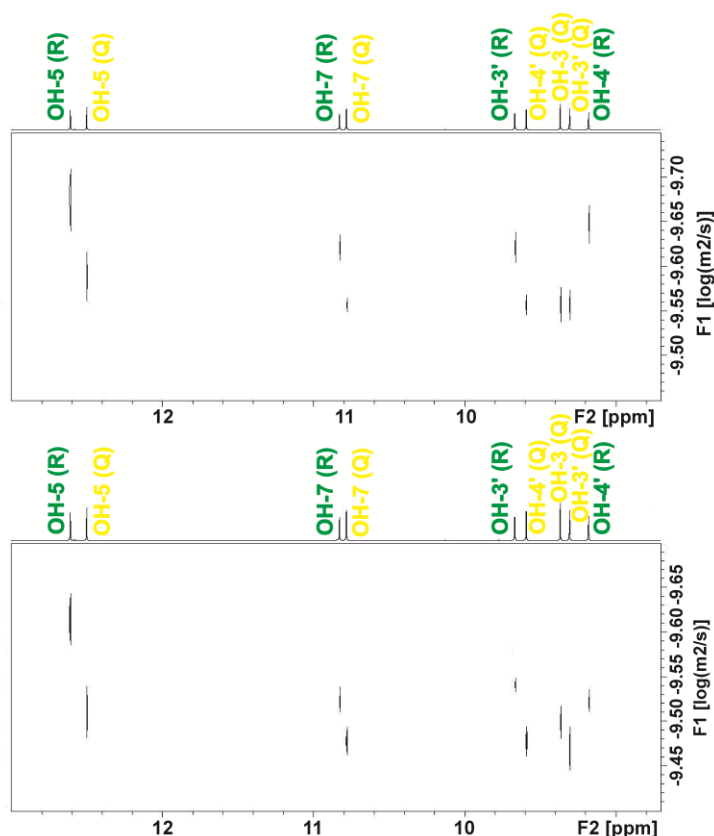
Από το φάσμα διάχυσης (Σχήμα 1.2.4 B) προκύπτει ότι όλες οι απορροφήσεις των πρωτονίων –OH του κάθε φλαβονοειδούς βρίσκονται στην ίδια ευθεία με τα αρωματικά του ίδιου μορίου στην διάσταση της διάχυσης επιτυγχάνοντας έτσι υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των ομάδων –OH των δύο ενώσεων ($D_{\text{OH(κερσετίνη)}}=2.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ και $D_{\text{OH(ρουτίνη)}}=1.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). Εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR HSQC και HMBC στο

ίδιο διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη ταυτοποίηση των απορροφήσεων –OH (Σχήμα 4, Πίνακας 7 παραρτήματος).



Σχήμα 1.2.4 Βελτιστοποίηση των τιμών διάχυσης της ρουτίνης (R) και της κερσετίνης (Q). Φάσματα NMR DOSY 500 MHz μίγματος ρουτίνης (5mM) και κερσετίνης (5.20mM) σε DMSO-*d*₆ (290K, Δ=100 ms, δ_g=4.8ms, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=27min). Στο ένθετο παρουσιάζονται τα υδροξυλικά πρωτόνια σε μεγαλύτερη μεγένθυση (x2). (A) Χωρίς και (B) με την προσθήκη 0.07mM πικρικού οξέος (γραμμομοριακή αναλογία [πικρικό οξύ]/[ρουτίνη]≈0.014 και [πικρικό οξύ]/[κερσετίνη]≈0.013) [Primikyri et al., 2012].

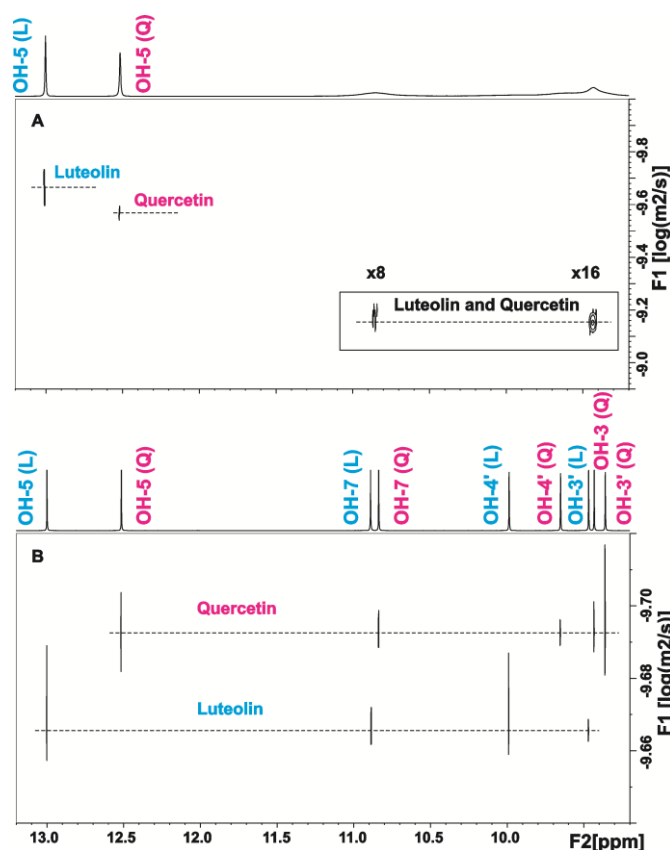
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 1.2.5 Φάσμα NMR DOSY 500MHz του μίγματος ρουτίνης (R) (5.27mM) και κερσετίνης (Q) (5.62mM) σε DMSO-*d*₆ μετά την προσθήκη πικρικού οξέος (0.07mM) στους 290K, A. Δ=300ms, δ_g=3.4ms, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=28min και B. Δ=500 ms, δ_g=2ms, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=30min [Primikyri et al., 2012].

Στη συνέχεια ελέγχθηκε περαιτέρω η επίδραση του χρόνου διάχυσης (Δ) στους φαινομενικούς συντελεστές διάχυσης των ομάδων –OH. Για εύρη απορροφήσεων –OH πρωτονίων $\Delta\nu_{1/2} \leq 1.5$ Hz, η επιλογή χρόνου διάχυσης Δ=100 ms επέφερε το βέλτιστο διαχωρισμό με ελαχιστοποίηση του φαινομένου της ανταλλαγής πρωτονίων. Στο Σχήμα 1.2.5 φαίνεται ότι για Δ= 300 και 500 ms, οι απορροφήσεις στο φάσμα DOSY των πρωτονίων –OH τόσο της κερσετίνης όσο και της ρουτίνης δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν λόγω διαφορετικών συντελεστών διάχυσης ως προς τα αρωματικά πρωτόνια.

Πειράματα DOSY πραγματοποιήθηκαν και στο μίγμα δύο φλαβονοειδών, της κερσετίνης (Q) και της λουτεολίνης (L), τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους μόνο κατά μια ομάδα –OH στη θέση 3 (Σχήμα 1.2.1). Ο πολύ καλός διαχωρισμός των αντίστοιχων φαινολικών OH-7, OH-4' και OH-3' ομάδων (Σχήμα 1.2.6) επέτρεψε τη διάκριση των δύο μορίων στη διάσταση της διάχυσης (D_{OH} (λουτεολίνη) = $1.89 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ και D_{OH} (κερσετίνη) = $1.74 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

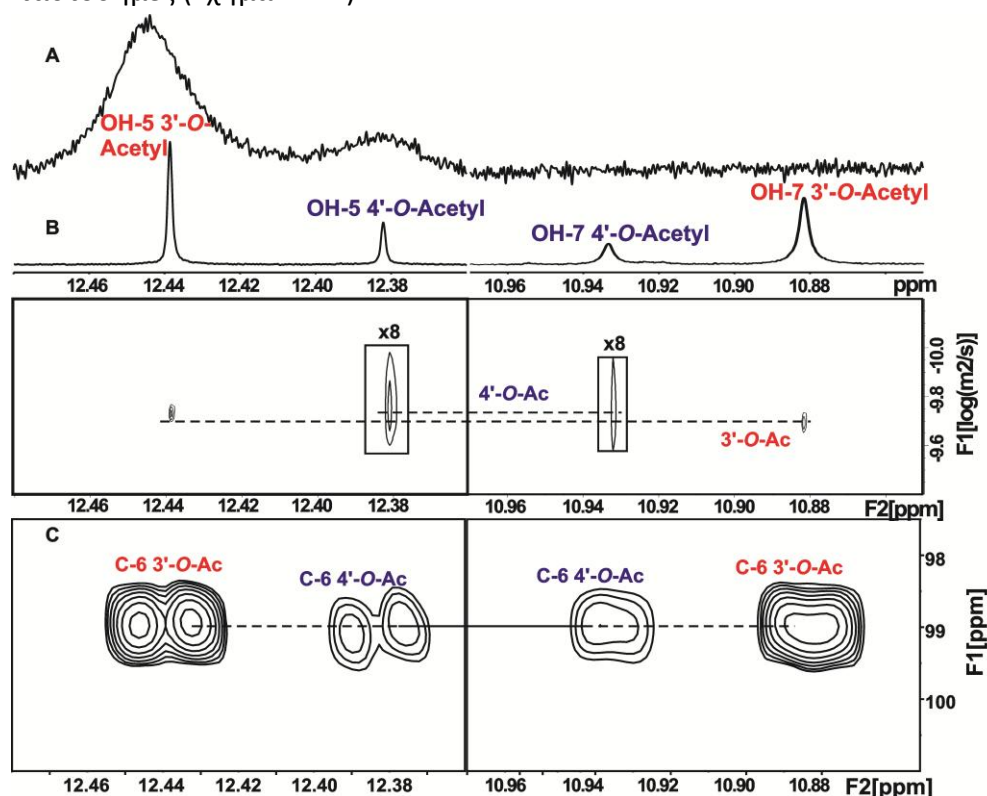


Σχήμα 1.2.6 Βελτιστοποίηση των τιμών διάχυσης της κερσετίνης (Q) και της λουτεολίνης (L). Φάσμα NMR ^1H DOSY 500MHz του μίγματος λουτεολίνης (3.7mM) και κερσετίνης (3.5mM) σε $\text{DMSO}-d_6$ (289K, $\Delta=100\text{ms}$, $\delta_g=4.8\text{ms}$, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=27min). Στο ένθετο παρουσιάζονται τα υδροξυλικά πρωτόνια σε χαμηλότερο επίπεδο (x8 και x16). (A) Χωρίς και (B) με την προσθήκη 0.07mM πικρικού οξέος (γραμμομοριακή αναλογία [πικρικό οξύ]/[λουτεολίνη] ≈ 0.014 και [πικρικό οξύ]/[κερσετίνη] ≈ 0.015 [Primikyri et al., 2012]).

Η ίδια μεθοδολογία με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR DOSY εφαρμόστηκε και σε μίγμα προϊόντων ενζυμικής αντίδρασης, χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Στην περίπτωση της ενζυμικής ακυλίωσης της κερσετίνης από την *Candida Antarctica* λιπάση B (Novozym 435), CALB, προέκυψαν δύο μονο-ακυλιωμένα προϊόντα. Μετά την προσθήκη 0.002 mM πικρικού οξέος το φάσμα NMR ^1H ήταν σημαντικά βελτιωμένο στην περιοχή των ομάδων $-\text{OH}$ (Σχήμα 1.2.7). Για την ταυτοποίηση των διαφόρων χημικών μετατοπίσεων στα προϊόντα της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων DOSY, στα οποία φαίνεται η παρουσία δύο προϊόντων. Τα δύο προϊόντα που προέκυψαν ενζυμικά είναι η 3'-O-ακέτυλ-κερσετίνη και η 4'-O-ακέτυλ-κερσετίνη (Σχήμα 1.2.1), διαχωρίστηκαν αρκετά ικανοποιητικά στη διάσταση της διάχυσης, παρότι έχουν το ίδιο μοριακό βάρος, πιθανόν λόγω διαφορών στο σχήμα του μορίου (Σχήμα 1.2.7). Το παράγωγο 4'-O-ακέτυλ-κερσετίνη παρουσίασε λίγο αυξημένο συντελεστή διάχυσης σε σύγκριση με το 3'-O-ακέτυλ παράγωγο (D_{OH} (4'-O-ακέτυλ) $\approx$

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

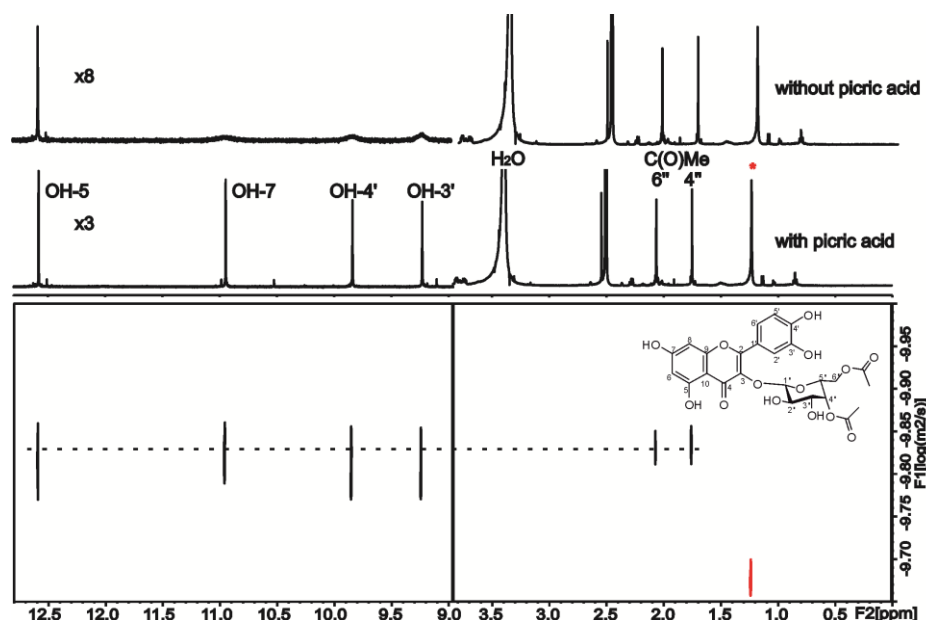
$2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ και $D_{\text{OH}} (3'\text{-O-ακέτυλ}) \approx 1.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι στο φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC παρόλο που τα δύο ακέτυλο- παράγωγα έχουν σημαντικά διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων $-\text{OH}$, οι μετατοπίσεις των ^{13}C είναι σχεδόν ταυτόσημες (Σχήμα 1.2.7).



Σχήμα 1.2.7 Επιλεγμένες περιοχές φασμάτων (A) 500 MHz 1D ^1H NMR του αρχικού μίγματος της αντίδρασης της ενζυμικής ακετυλίωσης της κερσετίνης από την CALB που κατέληξε σε δύο ακέτυλο παράγωγα, την 3'-O-ακέτυλο-κερσετίνη (2.53mM) και 4'-O-ακέτυλο-κερσετίνη (0.84mM) σε $\text{DMSO-}d_6$ (298K, αριθμός παλμών=64, πειραματικός χρόνος=8min) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος. (B) 500 MHz 1D ^1H NMR και DOSY του ίδιου δείγματος (289K, $\Delta=100\text{ms}$, $\delta_g=4.8\text{ms}$, αριθμός παλμών=24, πειραματικός χρόνος=54min), με την προσθήκη 0.002mM πικρικού οξέος (γραμμομοριακή αναλογία [πικρικό οξύ]/[3'-O-ακέτυλο-κερσετίνη] $\approx 0.71 \times 10^{-3}$ και [πικρικό οξύ]/[4'-O-ακέτυλο-κερσετίνη] $\approx 2 \times 10^{-3}$). (C) 500 MHz HMBC του ίδιου διαλύματος (289K, αριθμός παλμών=76, πειραματικός χρόνος=10h) [Primikyri et al., 2012].

Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε επίσης και στην ταυτοποίηση του μίγματος της αρχικής αντίδρασης του ενζυμικού μετασχηματισμού του γλυκοζυλιωμένου φλαβονοειδούς υπεροσίδης (κερσετίνη 3-O-γαλακτοσίδη) με τη χρήση οξικού βινυλίου ως τον άκυλο δότη και την CALB ως τον ενζυμικό καταλύτη. Για την επίτευξη της ταυτοποίησης καταγράφηκε το φάσμα DOSY (Σχήμα 1.2.8), στο οποίο διαφαίνεται η παρουσία των φαινολικών ομάδων OH-5, OH-7, OH-3' και OH-4' και δύο ακέτυλο-ομάδων και τα οποία ανήκουν στο ίδιο μόριο καθώς έχουν τον ίδιο συντελεστή διάχυσης ($D \approx 1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Η ακέτυλο ομάδα που επισημαίνεται με τον αστερίσκο δεν ανήκει

στο ίδιο μόριο διότι παρουσιάζει σημαντικά διαφορετικό συντελεστή διάχυσης ($D=2.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Εφαρμογή της φασματοσκοπίας HMBC στο ίδιο διάλυμα κατέληξε σε μία ολοκληρωμένη ταυτοποίηση των απορροφήσεων ^1H και ^{13}C (Πίνακας 8 του παραρτήματος).

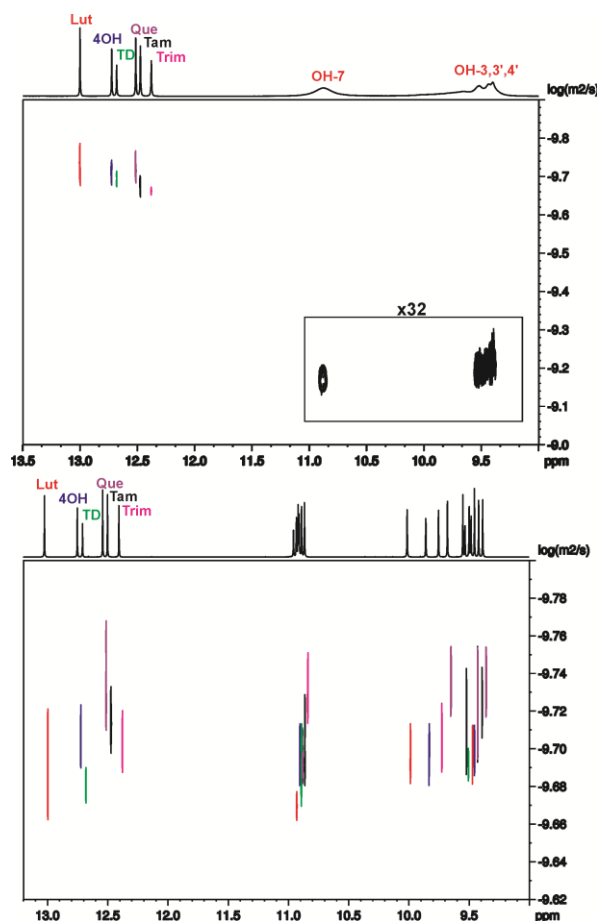


Σχήμα 1.2.8 Επιλεγμένες περιοχές φασμάτων 500 MHz 1D ^1H και DOSY NMR του αρχικού μίγματος της αντίδρασης που προήλθε από τον μετασχηματισμό του 3-Ο-γαλακτοζίτη της κερσετίνης από την CALB σε $\text{DMSO}-d_6$ (A) χωρίς την προσθήκη και (B) με την προσθήκη 0.11mM πικρικού οξέος, (298K, $\Delta=100\text{ms}$, $\delta_g=5.4\text{ms}$, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=27min). Επισημαίνονται οι ταυτοποιήσεις των OH-5, OH-7, OH-3', OH-4' και των ακέτυλο ομάδων της ακέτυλο υπεροσίδης. *Ακέτυλο ομάδα παραπροϊόντος της αντίδρασης [Primikyri et al., 2012].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η φασματοσκοπία NMR διάχυσης (DOSY) είναι μια ευαίσθητη τεχνική η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό των συντελεστών αυτοδιάχυσης φαινολικού τύπου ενώσεων. Έτσι, προχωρήσαμε στη μελέτη των φαινολικών OH ομάδων με τη χρήση DOSY NMR μίγματος έξι φλαβονοειδών (κερσετίνης, λουτεολίνης, ταμαριξετίνης, 3',4',5,7-τετραϋδρόξυ-3-μεθοξυφλαβόνης, 3',5,7-τριϋδρόξυ-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης και 3,5,7-τριϋδρόξυ-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνης) (Σχήμα 1.1.1) με στόχο το διαχωρισμό των ομάδων που σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου [Kontogianni et al., 2013]. Στο δισδιάστατο φάσμα τα OH πρωτόνια των ανθράκων C-7, C-3, C-3' και C-4', τα οποία εμφανίζονται ως διευρυμένες απορροφήσεις, έχουν συντελεστές διάχυσης πολύ διαφορετικούς αυτών των OH του C-5 παρόλο που ανήκουν στο ίδιο μόριο (Σχήμα 1.2.9). Οι συντελεστές διάχυσης που κυμαίνονται μεταξύ $6.79 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ για τα OH-7 και $6.33 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ για τα υπόλοιπα πρωτόνια, τα οποία εμφανίζονται ως ένα σύνθετο και ευρύ σήμα, είναι παρόμοιοι με το συντελεστή διάχυσης του H_2O στον οργανικό διαλύτη ($D_{\text{H}_2\text{O}} = 6.81 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), υποδεικνύοντας ότι

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

βρίσκονται σε ταχεία ανταλλαγή με το νερό. Σε αντίθεση, οι συντελεστές διάχυσης των OH-5 πρωτονίων με συντελεστές διάχυσης μεταξύ $1.89 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ και $2.17 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ είναι σαφώς διαφορετικοί και σημαντικά μικρότεροι των υπόλοιπων πρωτονίων OH. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα OH-5 πρωτόνια συμμετέχουν όπως έχει αναφερθεί στο σχηματισμό ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου με το CO-4 με συνέπεια να προστατεύονται από την ανταλλαγή με τα πρωτόνια του H₂O στον οργανικό διαλύτη.



Σχήμα 1.2.9 Βελτιστοποίηση των τιμών διάχυσης του ισομοριακού μίγματος (3 mM) των έξι φλαβονοειδών του Σχήματος 1.1.1. Φάσμα NMR ¹H DOSY 500MHz του μίγματος σε DMSO-*d*₆ (290K, Δ=100ms, δ_g=3 ms, αριθμός παλμών=16, πειραματικός χρόνος=27min). Στο ένθετο παρουσιάζονται τα υδροξυλικά πρωτόνια σε μεγαλύτερη μεγένθυση (x32). (A) Χωρίς και (B) με την προσθήκη 0.06mM πικρικού οξέος.

Ο διαχωρισμός των υδροξυλομάδων στη διάσταση της διάχυσης ήταν αρκετά ικανοποιητικός παρότι ορισμένα εκ των φλαβονοειδών έχουν ταυτόσημα μοριακά βάρη (ταμαριξετίνη και 5,7,3',4'-τετραυδροξυ-3-μεθοξυφλαβόνη) ή έχουν πολύ μικρές διαφορές μοριακών βαρών. Με τη βοήθεια της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ¹H-¹³C HMBC πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των πρωτονίων -OH αλλά όχι των αρωματικών λόγω των πολλαπλών αλληλεπικαλύψεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bekiroglu S., Sandstrom A., Kenne L., Sandstrom C., Ab initio and NMR studies on the effect of hydration on the chemical shift of hydroxy protons in carbohydrates using disaccharides and water/methanol/ethers as model systems. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 200-205.

Bindya S., Wong W.T., Ashok M.A., Yathirajana H.S., Rathorec R.S., Amitriptylinium picrate: conformational disorder. *Acta Cryst.*, **2007**, *C63*, o546-o548.

Cohen Y., Avram L., Frish L. Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter-new insights. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 520-554.

Charisiadis P., Primikyri A., Exarchou V., Tzakos A., Gerothanassis I. P. Unprecedented ultra high resolution hydroxy group ^1H NMR spectroscopic analysis of plant extracts. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 2462-2466.

Cody V., Luft J. Conformational analysis of flavonoids: crystal and molecular structures of morin hydrate and myricetin (1:2) triphenylphosphine oxide complex. *J. Mol. Struct.*, **1994**, *317*, 89-97.

Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I.P., Tsimidou M., Boskou D., Do strong intramolecular hydrogen bonds persist in aqueous solution? Variable temperature gradient 1h,1h-13c ge-hsqc and ge-hmbc nmr studies of flavonols and flavones in organic and aqueous mixtures. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7423-7429.

Furet P., Bold G., Hofmann F., Manley P., Meyer T., Altmann K.-H. Identification of a new chemical class of potent angiogenesis inhibitors based on conformational considerations and database searching. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2967-2971.

Furet P., Caravatti G., Guagnano V., Lang M., Meyer T., Schoepfer J. Entry into a new class of protein kinase inhibitors by pseudo ring design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 897-900.

Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.

Honma T., Hayashi K., Aoyama T., Hashimoto N., et al., Structure-based generation of a new class of potent cdk4 inhibitors: new de novo design strategy and library design. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 4615-4627.

Ilczyszyn M., Ratajczak H., Proton-exchange mechanisms in phenol-tertiary amine-aprotic solvent systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1995, *91*, 3859-3867.

Jameson C. J., De Dios A. C., Jameson A. K. Nuclear magnetic shielding of nitrogen in ammonia. *J. Chem. Phys.*, **1991**, *95*, 1069-1079.

Jansma A., Zhang Q., Li B., Ding Q., et al., Verification of a designed intramolecular hydrogen bond in a drug scaffold by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5875-5877.

Jeffrey G.A., Saenger W., Hydrogen bonding in biological structures, **1991**, SpringerVerlag, Pittsburgh, USA.

Katayama K., Masuyama K., Yoshioka S., Hasegaw H., Mitsuhashi J., Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *60*, 789-797.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Kim H., Moon B.-H., Ahn J.-H., Lim Y. Complete NMR signal assignments of flavonol derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 188-190.

Kitawaga S., Nabekura T., Takahashi T., Nakamura Y. et al. Structure–activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, *28*, 2274-2278.

Kontogianni V., Pappas C., Charisiadis P., Exarchou V., Primikyri A., Tzakos A., Gerotheranassis I.P. Hydrogen bonding probes of phenol –OH groups. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 1013-1025.

Lide D.R., Handbook of Chemistry and Physics, 2006–2007, 87th edition, CRC.

Liechti C., Séquin U., Bold G., Furet P., Meyer T., Traxler P. Salicylanilides as inhibitors of the protein tyrosine kinase epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, *39*, 11-26.

Manthey J., Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5837-5843.

Oteiza P., Erlejman A., Verstraeten S., Keen C., Fraga C. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.*, **2005**, *12*, 19-25.

Pavia D., Lampman G.M., Kriz G.S., Introduction to Spectroscopy, **2001**, Thomson Learning Inc., Washington, USA.

Primikyri A., Kyriakou E., Charisiadis P., Tsiakoulis C., Stamatis C., Tzakos A., Gerotheranassis I.P. Fine-tuning of the diffusion dimension of eOH groups for high resolution DOSY NMR applications in crude enzymatic transformations and mixtures of organic compounds. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 6887-6891.

Rice-Evans C.A., Miller N., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 933-956.

Refat M.S., El-Zayat L.A., Yesilel O.Z., Spectroscopic characterization of charge-transfer complexes of morpholine with chloranilic and picric acids in organic media: crystal structure of bis(morpholinium 2,4,6-trinitrocyclohexanolate). *Spectrochim. Acta Part A*, **2010**, *75*, 745-752.

Rossi M., Rickles L., Halpin W. The Crystal and molecular structure of quercetin: a biologically active and naturally occurring flavonoid. *Bioorg. Chem.*, **1986**, *14*, 55-69.

Sanders J.M.K., Hunter B.K., Modern NMR Spectroscopy - A Guide for Chemists, **1993**, Oxford University Press, Oxford.

Shi J., Cao H. Molecular structure-affinity relationship of dietary flavonoids for bovine serum albumin. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.*, **2011**, *21*, 594-600.

Huib N.S., Sam T.W., Wong K.C., Chinnakali K., Fun H.-K. Tamarixetin monohydrate. *Acta Cryst.*, **1999**, *C55*, 576-578.

Singh N., Ahmad A., Spectrophotometric and spectroscopic studies of charge transfer complex of 1-naphthylamine as an electron donor with picric acid as an electron acceptor in different polar solvents. *J. Mol. Struct.*, **2010**, *977*, 197-202.

Ta N., Walle T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **2007**, *107*, 127-129.

Teleb S.M., Gaballa A.S., Preparation and spectroscopic studies on charge-transfer complexes of 2,2-bipyridine with picric and chloranilic acids. *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, *62*, 140-145.

Wang D., Bushnell D.A., Westover K.D., Kaplan C.D., Kornberg R.D. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, **2006**, *127*, 941-954.

Wen X., Walle T. Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica*, **2006**, *36*, 387-397.

Wen X., Walle T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, *34*, 1786-1792.

Wright B., Moraes L., Kemp C., Mullen W., Crozier A., Lovegrove J., Gibbins J. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet functions by quercetin and structurally related flavonoids. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *159*, 1312-1325.

Wuthrich, K. NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley and Sons, New York, **1986**, USA.

Xiao J., Zhao Y., Wang H., Yuan Y., Yang F., Zhang C., Kai G. Non-covalent interaction of dietary polyphenols with total plasma proteins of type II diabetes: molecular structure/property-affinity relationships. *Integr. Biol.*, **2011**, *3*, 1087-1094.

Zhang S., Yang X., Coburn R.A., Morris M.E. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, *70*, 627-639.

Zeslawska E., Sturzebecher J., Oleksyn B.J., Geometry of GPPE binding to picrate and to the urokinase type plasminogen activator. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6212-6215.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΙΟΝΤΑ

2.1 NMR μελέτη του συμπλόκου κερσετίνης-ψευδαργύρου(II) και λουτεολίνης-ψευδαργύρου(II).

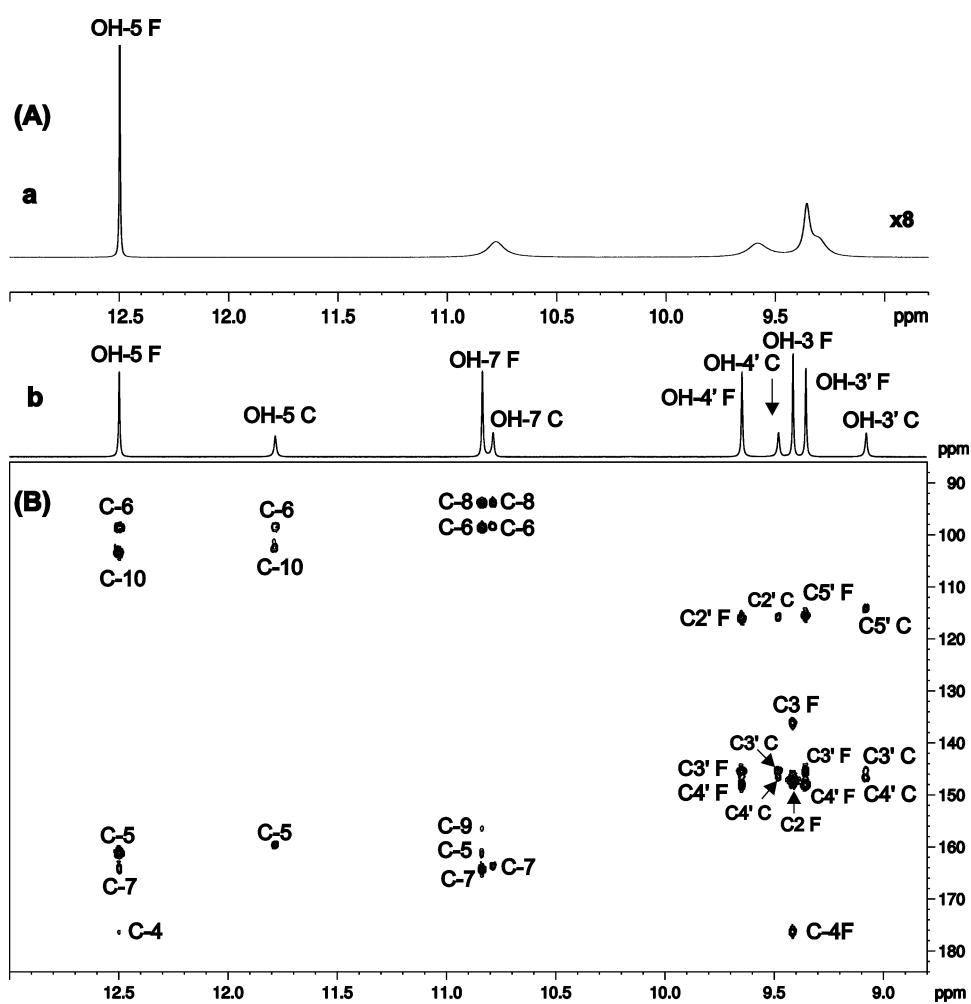
Το φάσμα 1D της κερσετίνης (7mM) σε DMSO- d_6 παρουσιάζει χαρακτηριστική οξεία και αποπροστατευμένη κορυφή στα 12.50 ppm (Σχήμα 2.1.1) που αντιστοιχεί στο OH-5 πρωτόνιο λόγω σχηματισμού του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου με την ομάδα CO-4. Σε αντίθεση, οι υπόλοιπες υδροξυλομάδες OH-3, OH-3' και OH-4' εμφανίζονται ως αρκετά διευρυμένες στην περιοχή των 9.2 έως 9.7 ppm ενώ η ομάδα OH-7 δεν μπορεί να διακριθεί από τη φασματική γραμμή βάσης, λόγω διαμοριακής ανταλλαγής των πρωτονίων με το H₂O του οργανικού διαλύτη ο οποίος είναι ιδιαίτερα υγροσκοπικός.

Στη συνέχεια στο δείγμα αυτό πραγματοποιήθηκε προσθήκη ZnCl₂ σε αναλογία 1:30 περίπου. Στο φάσμα ¹H της κερσετίνης παρουσία Zn(II) (200mM) σε DMSO- d_6 παρατηρούνται, για πρώτη φορά, ιδιαίτερα οξείες και διακριτές κορυφές συντονισμού και για τις δύο μορφές της κερσετίνης, την ελεύθερη και την συμπλοκοποιημένη. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι με την προσθήκη του ZnCl₂ μεταβάλλεται η τιμή pH του διαλύματος, όπως και με την περίπτωση προσθήκης του πικρικού οξέος. Έτσι, η εφαρμογή της πειραματικής ακολουθίας ¹H-¹³C HMBC έδωσε ένα σημαντικό αριθμό κορυφών διασταύρωσης ^ηJ(¹H, ¹³C) των υδροξυλικών πρωτονίων που σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία 2D ¹H-¹³C HSQC επέτρεψε την πλήρη ταυτοποίηση τόσο της ελεύθερης όσο και της συμπλοκοποιημένης μορφής (Σχήμα 2.1.1).

Ως θέσεις πρόσδεσης του Zn(II) χαρακτηρίστηκε η ομάδα OH της θέσης 3 η οποία απουσιάζει στην συμπλοκοποιημένη μορφή λόγω αποπρωτονίωσης και η καρβόνυλο ομάδα της θέσης CO-4. Η αποπρωτονίωση της ομάδας OH-3 και η σημαντική αποπροστασία κατά την συμποκοποίηση του άνθρακα C-3 (~9ppm) και του άνθρακα C-4 (~2ppm) αποδεικνύουν κατά τρόπο αδιαμφισβήτητο ότι οι λειτουργικές ομάδες OH-3 και CO-4 είναι οι θέσεις συμπλοκοποίησης (Πίνακας 2.1.1) (Σχήμα 2.1.1).

Η ίδια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε και για τη λουτεολίνη, τα οποία υπέδειξαν ως θέσεις συμπλοκοποίησης με τον Zn(II) τις θέσεις OH-5 και CO-4 (Σχήμα 2.1.2). Παρομοίως και στην περίπτωση της λουτεολίνης με την προσθήκη ZnCl₂ εμφανίζονται οξείες και διακριτές κορυφές που καθιστούν δυνατή την ταυτοποίηση και των δύο μορφών της. Η συμπλοκοποιημένη μορφή χαρακτηρίζεται από αποπρωτονίωση της ομάδας OH-5 όπως αποδεικνύεται από την ελάττωση του ολοκληρώματος ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του Zn(II) αλλά και από την απουσία διακριτής απορρόφησης της ομάδας OH-5 της συμπλοκοποιημένης μορφής σε αντίθεση με τις ομάδες C-7 OH, C-4' OH και C3' OH (Πίνακας 2.1.2).

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 2.1.1 Επιλεγμένες περιοχές: (A) Φάσματος ^1H NMR 500MHz της κερσετίνης, 7mM σε $\text{DMSO}-d_6$ (a); παρομοίως με το (a) παρουσία 200mM Zn^{2+} (b) ($T = 298\text{K}$, αριθμός παλμών = 8, πειραματικός χρόνος = 1min). (B) Φάσμα NMR 2D ^1H - ^{13}C HMBC 500MHz του ίδιου διαλύματος όπως στο (A) (b) ($T = 298\text{K}$, αριθμός παλμών = 88, $\text{td} = 4\text{K}$, πειραματικός χρόνος = 11h30min).

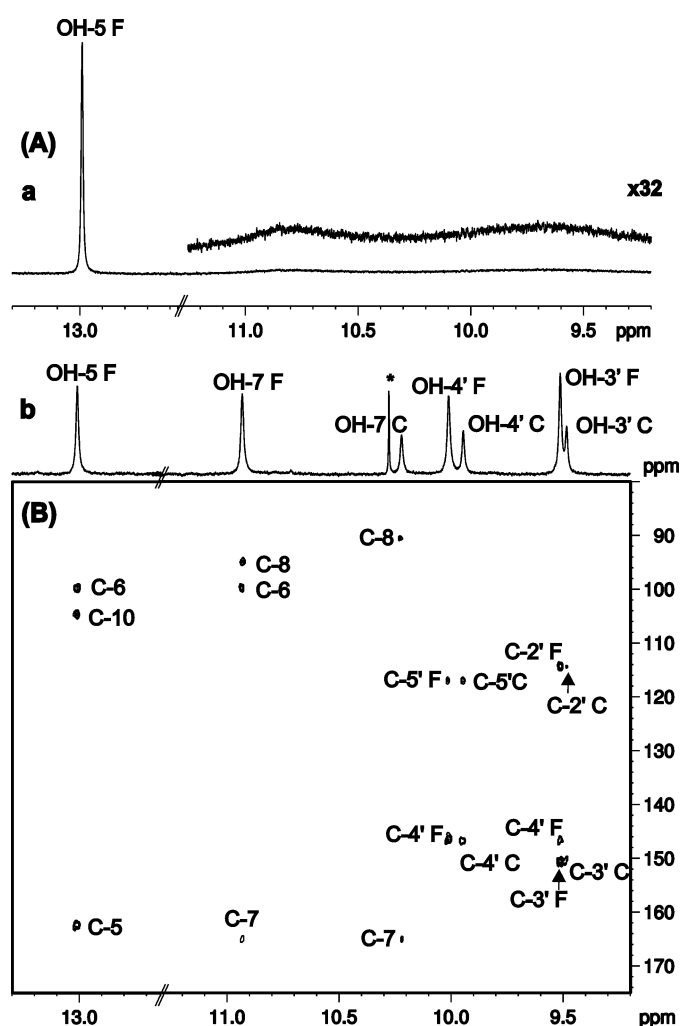
Πίνακας 2.1.1. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής της κερσετίνης με τον Zn(II) .

^1H	Ελεύθερη κερσετίνη	Σύμπλοκο	^{13}C	Ελεύθερη κερσετίνη	Σύμπλοκο
OH5	12,51	11,8	C1	122,3	125,07
OH7	10,85	10,78	C2	147,2	
OH4'	9,65	9,49	C3	136	145,1
OH3	9,42	-	C4	176,5	178
OH3'	9,36	9,08	C5	161,4	160,1
H2'	7,68	7,93	C6	98,8	98,6
H6'	7,55	7,97	C7	164,2	163,7
H5'	6,88	6,84	C8	93,9	93,7
H8	6,41	6,43	C9	156,4	159,8
H6	6,19	6,19	C10	103,7	102,9
			C2'	115,3	114,21
			C3'	145,5	145,7
			C4'	148	146,8
			C5'	115,4	114,2
			C6'	120,2	119,5

Πίνακας 2.1.2 Χημικές μετατοπίσεις ^1H και ^{13}C της ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής της λουτεολίνης με τον Zn(II) .

^1H	Ελεύθερη λουτεολίνη	Σύμπλοκο	^{13}C	Ελεύθερη λουτεολίνη	Σύμπλοκο
OH5	13,03	-	C1	122,3	122,3
OH7	10,95	10,22	C2	164,8	163
OH3'	10,01	9,95	C3	104,5	107,3
OH4'	9,51	9,48	C5	162,6	
H2'	7,40	7,37	C6	99,8	
H6'	7,43	7,37	C7	164,9	164,6
H5'	6,89	6,89	C8	94,4	90,2
H3	6,69	6,59	C9	158,2	160,2
H8	6,45	6,07	C10	104,1	103,6
H6	6,21	5,87	C2'	116,9	116,9
			C3'	150,5	150,1
			C4'	146,6	146,7
			C5'	114,3	114,3
			C6'	119,9	119,4

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 2.1.2 Επιλεγμένες περιοχές 500MHz (A) Φάσματος ^1H NMR 500MHz της κερσετίνης, 7mM σε $\text{DMSO}-d_6$ (a); παρομοίως με το (a) παρουσία 200mM Zn^{2+} (b) ($T=298\text{K}$, αριθμός παλμών=8, πειραματικός χρόνος=1min). (B) Φάσμα NMR 2D ^1H - ^{13}C HMBC 500MHz του ίδιου διαλύματος όπως στο (A) (b) ($T=298\text{K}$, αριθμός παλμών=272, $td=4\text{K}$, πειραματικός χρόνος=1d11h33min).

Η ισορροπία σχηματισμού του συμπλόκου κερσετίνη- Zn(II) μπορεί να περιγραφεί από την σταθερά ισορροπίας K_{eq}

$$K_{\text{eq}} = [\text{Zn}^{2+}\text{-κερσετίνη}]/[\text{κερσετίνη}] \quad (3)$$

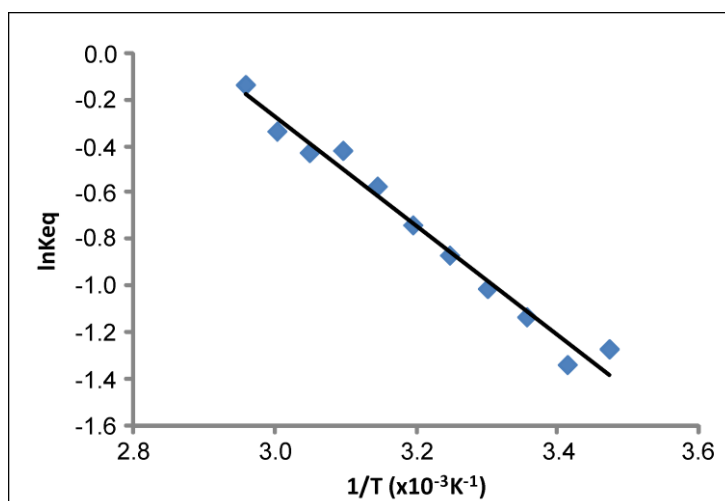
που σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια ΔG° μέσω της εξίσωσης (4) ως εξής:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}} \quad (4)$$

Προσδιορισμός των τιμών σταθεράς ισορροπίας σε διάφορες θερμοκρασίες παρέχει σύμφωνα με την εξίσωση Van't Hoff

$$\ln K_{eq} = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad (5)$$

την ενθαλπία σχηματισμού (ΔH°) και την αντίστοιχη μεταβολή της εντροπίας (ΔS°). Η παρουσία διακριτών κορυφών συντονισμού των ομάδων OH-5 της ελεύθερης και OH-5 της συμπλοκοποιημένης κερσετίνης για ένα μεγάλο εύρος αναλογίας συγκεντρώσεων $[Zn^{2+}]/[\text{κερσετίνης}]$ και ένα ικανοποιητικό εύρος θερμοκρασιών (από 288 έως 338K) επέτρεψε τον ακριβή προσδιορισμό του $\ln K_{eq}$ (Σχήμα 2.1.3) και των τιμών ΔH° και ΔS° . Έτσι, για αναλογία συγκεντρώσεων $[Zn^{2+}]/[\text{κερσετίνη}] = 30$ προέκυψαν οι τιμές $\Delta H^\circ = 19.5 \text{ KJmol}^{-1}$ και $\Delta S^\circ = 56.31 \text{ KJmol}^{-1}$. Συνεπώς στους 298K $-T\Delta S^\circ = -17 \text{ KJmol}^{-1}$ που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της εντροπίας. Η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου δεν ευνοείται ενθαλπικά, πολύ πιθανό λόγω του ασθενούς δεσμού συναρμογής $Zn(II)-O^-C(3)$, ευνοείται όμως εντροπικά λόγω έκλυσης αερίου HCl και ως εκ τούτου αύξησης της αταξίας του συστήματος.



Σχήμα 2.1.3 Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα Van't Hoff με βάση τα ολοκληρώματα NMR του πρωτονίου –OH(5) της ελεύθερης κερσετίνης και του συμπλόκου Zn^{2+} -κερσετίνης του δείγματος του Σχήματος 1 (Α)(β). Η γραμμή αντιπροσωπεύει τη βέλτιστη προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων στη γραμμική εξίσωση (3).

2.2 Πειράματα NMR μεταβλητής θερμοκρασίας.

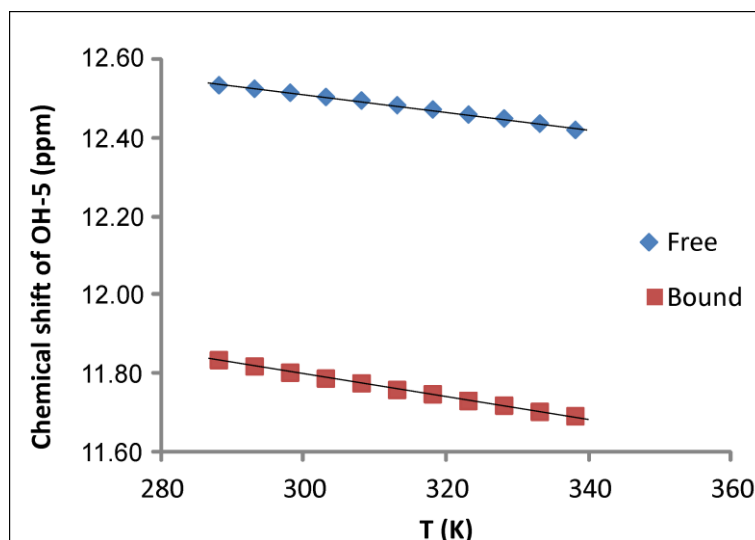
Έχει αποδειχθεί ότι η εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων NMR 1H των φαινολικών OH ομάδων από την θερμοκρασία είναι γραμμική και οι συντελεστές $\Delta\delta/\Delta T$ που προκύπτουν, καλύπτουν εύρος τιμών από -0.5 έως -12.3 ppb K^{-1} σε σε διάλυμα DMSO- d_6 , acetone- d_6 και CD_3CN [Kontogianni et al., 2013; Siskos et al., 2013].

Οι τιμές $\Delta\delta/\Delta T$ σε DMSO- d_6 , με εξαίρεση την ομάδα OH-5 των φλαβονοειδών, είναι μεταξύ -5.4 και -8.0 ppb K^{-1} όταν ως αναφορά χρησιμοποιείται η κορυφή του διαλύτη (-5.8 έως -8.4 ppb K^{-1} όταν ως αναφορά χρησιμοποιείται το εσωτερικό πρότυπο

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

TMSP- d_4). Αυτό το εύρος των τιμών $\Delta\delta/\Delta T$ υποδεικνύει ότι όλες οι φαινολικές ομάδες OH είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη και σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου (DMSO). Οι ομάδες OH σε όρθο θέση, όπως οι OH-3' και OH-4' της κερσετίνης, επίσης εκτίθενται στο διαλύτη και δεν εμπλέκονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου τύπου flip-flop [Jeffrey et al., 1991]. Οι τιμές $\Delta\delta/\Delta T$ του πρωτονίου OH-5 είναι σημαντικά μικρότερες σε απόλυτη τιμή από αυτές των υπόλοιπων υδροξυλικών πρωτονίων, ανεξάρτητα από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Αυτό υποδεικνύει ότι το OH-5 εμπλέκεται σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το CO-4 άτομο οξυγόνου που έχει ως συνέπεια την αδυναμία σχηματισμού διαμοριακών δεσμών υδρογόνου με τα περιβάλλοντα μόρια διαλύτη. Το πρωτόνιο OH-5, συνεπώς, παρουσιάζει ιδιαίτερα μικρή εξάρτηση από το διαλύτη και τη θερμοκρασία σε σχέση με πρωτόνια OH που είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη [Siskos et al., 2013].

Έτσι πραγματοποιήθηκε μελέτη μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων του OH-5 πρωτονίου τόσο της ελεύθερης όσο και της συμπλοκοποιημένης μορφής της κερσετίνης με Zn(II) ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Από το Σχήμα 2.2.1 προκύπτει ότι ο συντελεστής θερμοκρασίας του συμπλόκου κερσετίνης-Zn²⁺ ($\Delta\delta/\Delta T = -2.9$ ppb K⁻¹) είναι παρόμοιος με αυτόν της ελεύθερης μορφής ($\Delta\delta/\Delta T = -2.2$ ppb K⁻¹) με συντελεστές συσχέτισης $R^2 = 0.9989$ και 0.9961 , αντίστοιχα. Αυτό υποδεικνύει ότι ο ισχυρός ενδομοριακός δεσμός C5-OH---OC(4) παραμένει και στο σύμπλοκο κερσετίνης-Zn²⁺.



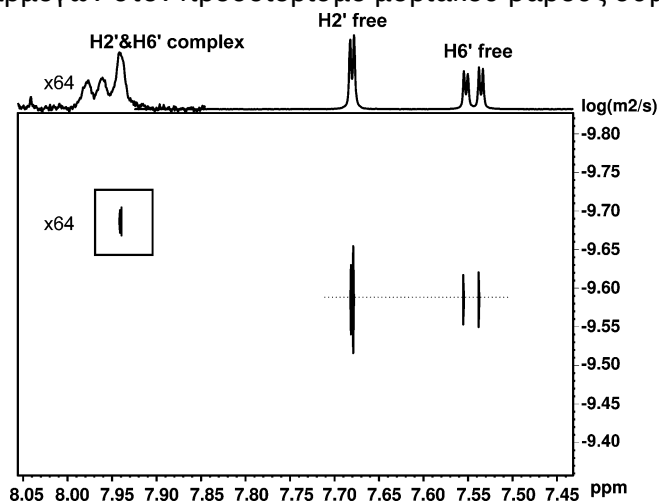
Σχήμα 2.2.1 Εξάρτηση της θερμοκρασίας των OH-5 πρωτονίων της ελεύθερης κερσετίνης (♦) και του συμπλόκου Zn-κερσετίνης (■).

2.3 Πειράματα NMR DOSY-προσδιορισμός μοριακού βάρους του συμπλόκου κερσετίνης-Zn(II).

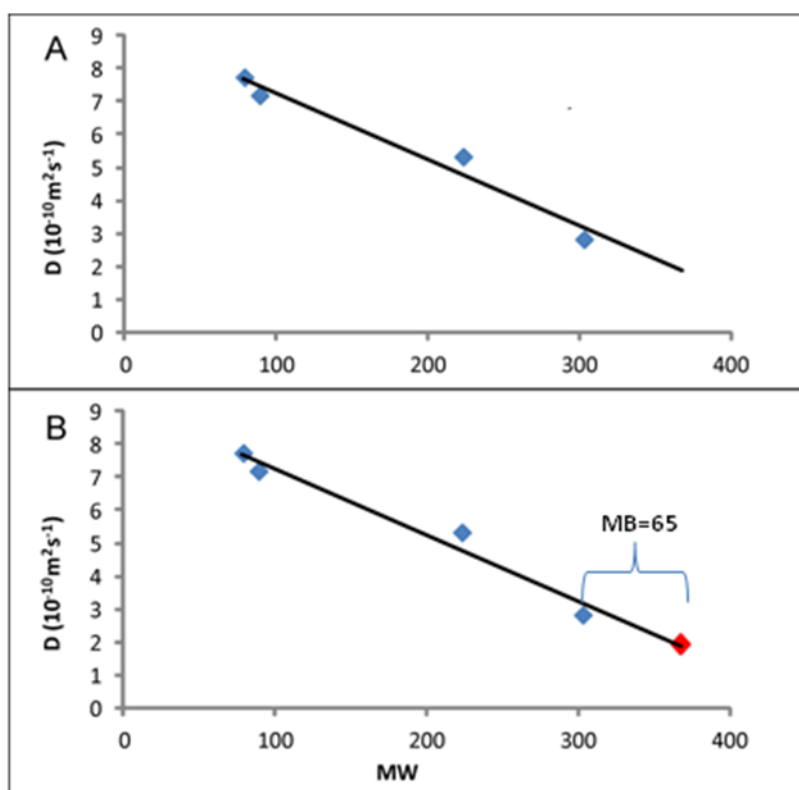
Όπως έχει ήδη αναφερθεί με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας DOSY NMR μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το μέγεθος, το σχήμα και το μοριακό βάρος (MB) ενώσεων μέσω προσδιορισμού του συντελεστή αυτοδιάχυσης (D). Στη διεθνή βιβλιογραφία η στοιχειομετρία του συμπλόκου κερσετίνης-Zn(II) αποτελεί ένα αρκετά αμφιλεγόμενο θέμα λόγω της αδυναμίας κρυστάλλωσης των συμπλόκων. Ωστόσο, η χρήση της φασματοσκοπίας DOSY (Σχήμα 2.3.1) μας παρέχει μια πολύ σημαντική πληροφορία που αφορά το κατά προσέγγιση MB του συμπλόκου κερσετίνης με Zn(II) και συνεπώς της στοιχειομετρίας του.

Στο Σχήμα 2.3.1 παρατηρείται, όπως ήταν αναμενόμενο, μείωση των συντελεστών διάχυσης των πρωτονίων 2' και 6' ($D=1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) του συμπλόκου σε σύγκριση με το συντελεστή των ίδιων πρωτονίων της ελεύθερης κερσετίνης ($2.15 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ και $2.12 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ των πρωτονίων H2' και H6', αντίστοιχα). Αυτό οφείλεται στην αύξηση του μοριακού βάρους της κερσετίνης λόγω συμπλοκοποίησης με το μέταλλο. Το Σχήμα 2.3.2 Α απεικονίζει την ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης των συντελεστών διάχυσης των ενώσεων αναφοράς TMS και HMCT (Hexamethylcyclotrisiloxane), του διαλύτη DMSO και της ελεύθερης κερσετίνης ως συνάρτηση του MB. Με την υπόθεση ισχύος της ως άνω γραφικής παράστασης ο συντελεστής διάχυσης του συμπλόκου της κερσετίνης με τον Zn(II) αντιστοιχεί σε αύξηση του τυπικού MB της κερσετίνης κατά το ατομικό βάρος του Zn^{2+} (~65) προκύπτει συντελεστής συσχέτισης (Σχήμα 2.3.2B).

Η γραμμική αυτή εξάρτηση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι υποδεικνύει ως επικρατέστερη στοιχειομετρία την αναλογία 1:1 και πιθανόν να είναι ευρύτερης σημασίας και εφαρμογών στον προσδιορισμό μοριακού βάρους συμπλόκων.



Σχήμα 2.3.1 Φάσμα NMR DOSY 500MHz της κερσετίνης (3mM) παρουσία 16mM Zn^{2+} σε $\text{DMSO}-d_6$ (T=298K, αριθμός παλμών=8, πειραματικός χρόνος=13min).



Σχήμα 2.3.2 Γραμμική συσχέτιση των συντελεστών διάχυσης ως συνάρτηση του MB των: A. DMSO (1), TMS (2), HMCT (Hexamethylcyclotrisiloxane) (3) και ελεύθερης κερσετίνης (4). B. Όπως στο A με την εισαγωγή του συντελεστή διάχυσης του συμπλόκου Zn-κερσετίνης (5) με την υπόθεση της τυπικής αύξησης του MB της κερσετίνης κατά το ατομικό βάρος του Zn(II).

2.4 Θεωρητική μελέτη σχηματισμού των συμπλόκων κερσετίνης-Zn(II) και λουτεολίνης-Zn(II) σε επίπεδο DFT υπολογισμών.

Οι ενεργειακά ευνοϊκές θέσεις συμπλοκοποίησης του Zn(II) με την κερσετίνη, μελετήθηκαν σε επίπεδο DFT υπολογισμών σε συνεργασία με την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χριστίνα Λέκκα. Κατά την συμπλοκοποίηση λαμβάνει χώρα αποπρωτονίωση της ομάδας OH-3 (Πίνακας 2.4.1) σε συμφωνία με τα σύμπλοκα κερσετίνης-Fe και κερσετίνης-Cu όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως [Ren et al., 2008; Lekka et al., 2009]. Η παρουσία του H στην 3-OH ομάδα καταλήγει σε σημαντική αύξηση της απόστασης του δεσμού Zn-O (πάνω από $0.92 \text{ \AA}$), με συνέπεια οι ενέργειες δέσμευσης στις θέσεις 3_H-4 (όπου 3_H υποδηλώνει πρωτονιωμένη ομάδα 3-OH) να παραμένουν υψηλότερες από τα άλλα σύμπλοκα, ενώ επακολουθεί η θέση $3'-4_H'$ (Εικόνα 2.4.1). Η λιγότερη ευνοϊκή θέση συμπλοκοποίησης είναι η διυδροξύ ομάδα $3'-4'$ του δακτυλίου B. Η παρουσία χλωρίου αυξάνει τον αριθμό των θέσεων συμπλοκοποίησης (coordination) του Zn(II) και συνεπώς την ενέργεια σύζευξης, ενώ η παρουσία του H_2O ως υποκαταστάτη καταλήγει σε πιο σταθερό σύμπλοκο.

Πίνακας 2.4.1 Παράμετροι ενέργειας και δομής των συμπλόκων Zn-κερσετίνη και Zn-λουτεολίνη^α.

Σύμπλοκο	Θέση	E _b (eV)	E _b ' (eV)	N	d _{Zn-O} (Å)
Zn-Κερσετίνη					
	3-4	1.499	1.337	2	2.00
	3 _H -4	1.420	1.258		2.92 (O ₃), 2.69(O ₄)
	4-5	0.764	0.602	2	1.98
	3'-4'	0.219	0.057	2	1.93
	3 _H '-4'	0.888	0.721	1	2.20(O ₃ '), 1.91(O ₄ ')
	3'-4 _H '	1.014	0.852	1	1.91(O ₃ '), 2.20(O ₄ ')
	<i>Reservoir</i>	<i>Cl⁻</i>	<i>Cl⁻-H₂O</i>		
	3-4	2.563	3.203	3, 4*	1.98
	3 _H -4	1.174	1.877	3, 4*	2.08 (O ₃), 1.90 (O ₄)
Zn-Λουτεολίνη					
	4-5	0.726	0.564	2	1.92
	4-5 _H	0.802	0.640		2.55 (O ₄), 2.74(O ₅)
	3'-4'	0.051	-0.110	2	1.93
	3 _H '-4'	0.694	0.532	1	2.22(O ₃ '), 1.90(O ₄ ')
	3'-4 _H '	0.642	0.480	1	1.90(O ₃ '), 2.23(O ₄ ')
	<i>Reservoir</i>	<i>Cl⁻</i>	<i>Cl⁻-H₂O</i>		
	4-5	1.606	2.281	3, 4*	1.92
	4-5 _H	0.543	1.164	3, 4*	1.83 (O ₄), 2.11 (O ₅)

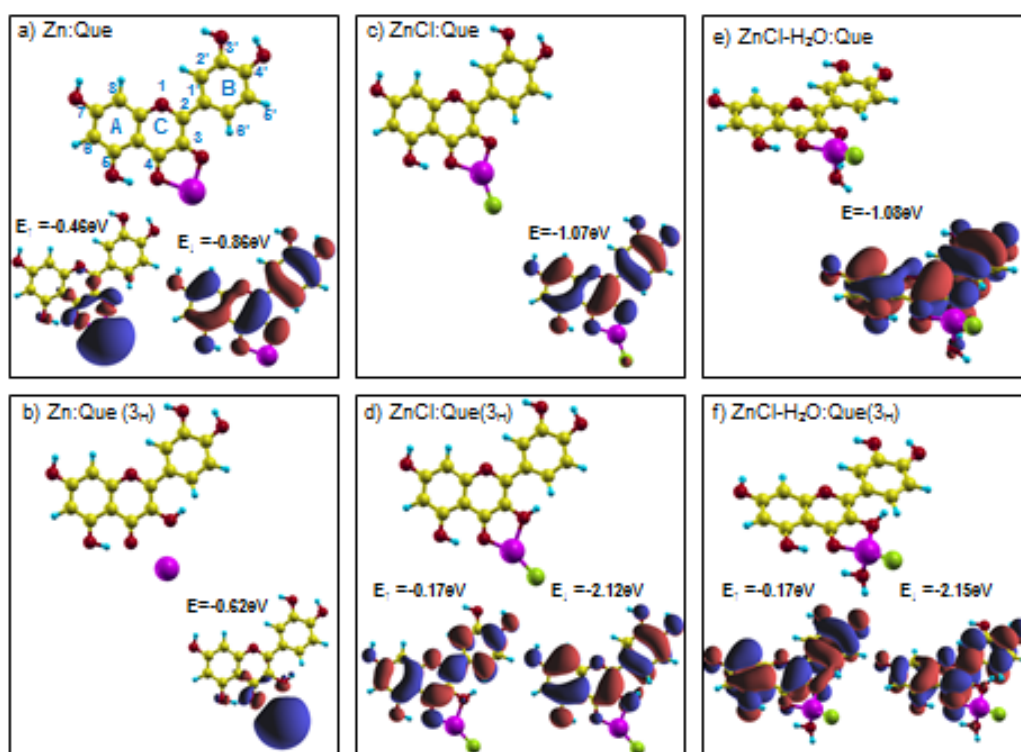
^α Ενέργειες πρόσδεσης του Zn (E_b και E_b' με βάση την παρουσία ή απουσία ατόμων H). Τα άτομα H απομακρύνονται από τις θέσεις πρόσδεσης του OH εκτός από τις περιπτώσεις που υποδηλώνεται ως δείκτης. Οι μέσες αποστάσεις Zn-O, αλλιώς δίνεται το αντίστοιχο άτομο O. Το N αντιστοιχεί στον αριθμό θέσεων συμπλοκοποίησης και ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την περίπτωση παρουσίας H₂O.

Από την μελέτη των συμπλόκων λουτεολίνης-Zn(II) [Ren et al., 2008] προέκυψε ότι η θέση 4-5 είναι αυτή που προτιμάται ενεργειακά (Πίνακας 2.4.1), σε συμφωνία με

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

τις περιπτώσεις συμπλόκων Fe-λουτεολίνης και Cu-λουτεολίνης [Lekka et al., 2009]. Η παρουσία του H στην ομάδα OH-5 καταλήγει σε μικρή αύξηση (0.08eV) των ενεργειών σύζευξης και αυξάνει και πάλι τις αποστάσεις Zn-O. Η θέση 3'-4' παραμένει μη ευνοϊκή ενεργειακά σε συμφωνία με τα σύμπλοκα της κερσετίνης. Κατά την προσθήκη του χλωρίου, η ενέργεια σύζευξης του συμπλόκου αυξάνει σημαντικά και η διαφορά σε σχέση με την αντίστοιχη περίπτωση αποπρωτονίωσης φτάνει το 1eV, σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα.

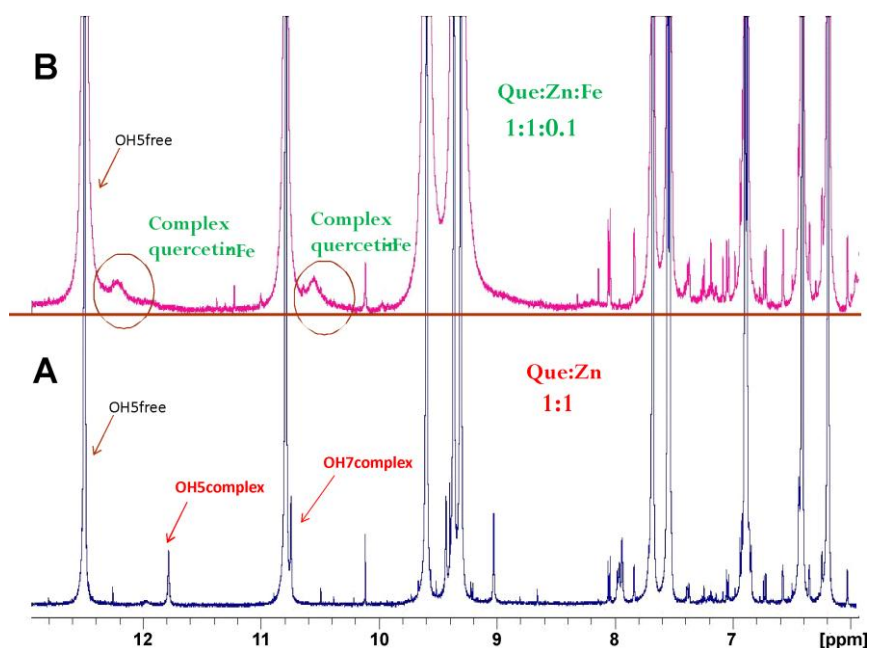
Σε όλες τις περιπτώσεις, τα αποπρωτονιωμένα σύμπλοκα παρουσίασαν ισοδύναμες αποστάσεις Zn-O, ενώ η παρουσία του H στις υδροξυλομάδες των θέσεων συμπλοκοποίησης διαφοροποιεί τις τιμές των αποστάσεων αυτών όπως παρουσιάζεται ξεχωριστά στον Πίνακα 2.4.1. Παρουσία χλωρίου, οι δεσμοί Zn-O ήταν συγκρίσιμοι με τις αποπρωτονιωμένες τιμές, οι δεσμοί Zn-O με το άτομο οξυγόνου του μορίου H_2O είναι $2.12\text{\AA}$, ενώ η μέση απόσταση Zn-Cl είναι $2.10\text{\AA}$. Γενικά, στα δύο αυτά φλαβονοειδή η αποπρωτονίωση της ομάδας C3-OH κοντά στην καρβονυλική ομάδα CO-4 ευνοείται, ενώ η παρουσία του H στη θέση 3'-4' στις αντίστοιχες ομάδες OH προτιμάται παρόλο που ο αριθμός των θέσεων συμπλοκοποίησης ελαττώνεται.



Εικόνα 2.4.1 Ενέργειες και δομές των συμπλόκων Zn-κερσετίνης με την χρήση θεωρητικών υπολογισμών σε επίπεδο DFT.

2.5 Μελέτη οξείδωσης της κερσετίνης και ανταγωνισμού των μετάλλων Zn(II) και Fe(II) ως προς τη συμπλοκοποίηση με την κερσετίνη.

Επόμενος στόχος αποτέλεσε η μελέτη της ικανότητας συμπλοκοποίησης του Fe(II) με την κερσετίνη. Ο Fe(II) όμως είναι ένα παραμαγνητικό μεταλλικό ιόν και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για τη λήψη φασμάτων NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας. Έτσι επιχειρήθηκε η μελέτη συμπλοκοποίησης του Fe(II) με την κερσετίνη κατά έμμεσο τρόπο. Μελετήθηκε δηλαδή η επίδραση που ασκεί η παρουσία του σιδήρου μετά την προσθήκη του σε μίγμα ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης με ψευδάργυρο κερσετίνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων όπου μελετήθηκε ο ανταγωνισμός των δύο μετάλλων Zn(II) και Fe(II) ως προς την συγγένεια συμπλοκοποίησης της κερσετίνης. Επίσης όπως προαναφέρθηκε σε πλήθος μελετών επισημαίνεται ότι η κερσετίνη παρουσία Fe(II) οξειδώνεται και έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα προϊόντα οξείδωσης. Έτσι, στη συνέχεια επιχειρήθηκε και η μελέτη της ιδιότητας αυτής του σιδήρου καθώς και το ποσοστό οξείδωσης του φλαβονοειδούς.



Σχήμα 2.5.1 Φάσματα NMR 1D ^1H 500MHz της κερσετίνης (2.5mM) (A) παρουσία Zn(II) (2.5mM) και (B) μετά την προσθήκη Fe(II) (0.25mM) (αριθμός παλμών=128, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K).

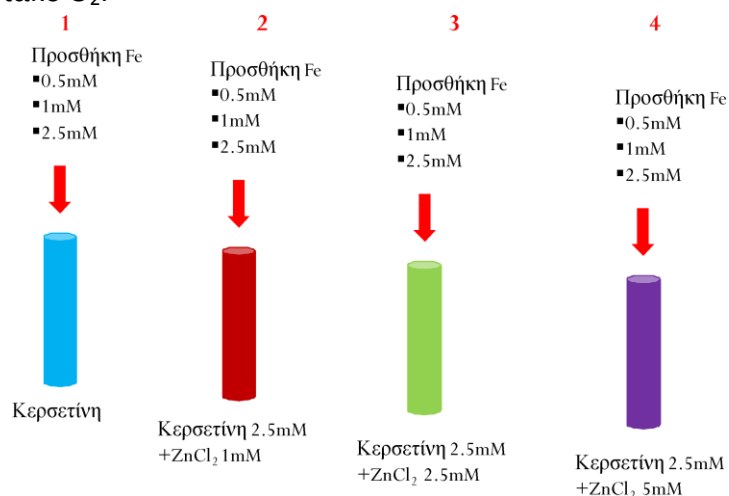
Στο Σχήμα 2.5.1 απεικονίζεται το πρωτονιακό φάσμα της κερσετίνης παρουσία ψευδαργύρου. Η κορυφή στα 12.45 ppm αποδίδεται στο C-5 OH της ελεύθερης κερσετίνης και στα 10.82 ppm στο C-7 OH. Με κόκκινο επισημαίνονται τα αντίστοιχα πρωτόνια της συμπλοκοποιημένης κερσετίνης με Zn(II) σε ισομοριακή αναλογία. Στη συνέχεια προστέθηκε Fe(II) (Σχήμα 2.5.1 B) σε συγκέντρωση δέκα φορές μικρότερη από

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αυτή της κερσετίνης και του Zn(II) . Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο φάσμα ήταν ιδιαίτερα σημαντικές καθώς πλέον δεν διακρίνονται τα πρωτόνια της συμπλοκοποιημένης με Zn(II) κερσετίνης γεγονός που οφείλεται στην υποκατάσταση του Zn(II) από τον Fe(II) λόγω μεγαλύτερης συγγένειας, αν και σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Επίσης, δύο νέες διευρυμένες κορυφές προέκυψαν στην περιοχή 10-12.5 ppm του φάσματος που είναι πιθανό να αποδίδονται σε νέα συμπλοκοποιημένη μορφή της κερσετίνης με τον Fe(II) .

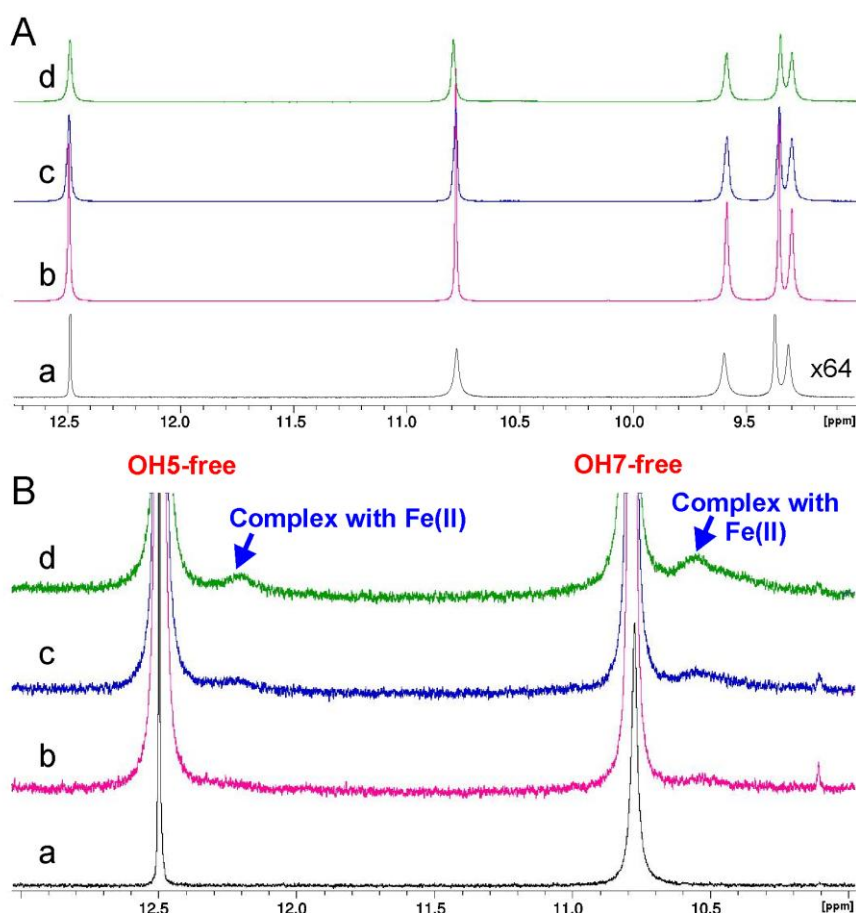
Ένα σημαντικό στοιχείο των πειραμάτων αυτών είναι ότι ο Fe(II) προστίθεται σε μικρές συγκεντρώσεις χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την ανάλυση του φάσματος και η ελάχιστη διεύρυνση των κορυφών επιτρέπει τον υπολογισμό των ολοκληρωμάτων των περιοχών αυτών και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις μεταβολές της συγκέντρωσης της κερσετίνης.

Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε μία σειρά πειραμάτων που περιελάμβανε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (Σχήμα 2.5.2). Το πρώτο σετ περιλαμβάνει μόνο ελεύθερη κερσετίνη σε συγκέντρωση 2.5mM, το δεύτερο κερσετίνη (2.5mM) με προσθήκη 1mM ZnCl_2 , το τρίτο κερσετίνη (2.5mM) με προσθήκη 2.5mM ZnCl_2 και το τέταρτο κερσετίνη (2.5mM) με προσθήκη 5mM ZnCl_2 . Στο πρώτο σωληνάριο δηλαδή υπάρχει μόνο ελεύθερη κερσετίνη και στα άλλα τρία μίγμα ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης κερσετίνης με Zn(II) . Στα τέσσερα σωληνάκια προστέθηκαν διαδοχικές συγκεντρώσεις $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 1 και 2.5 mM και κάθε φορά καταγράφεται το πρωτονιακό φάσμα του μίγματος. Η επιλογή των παραπάνω συγκεντρώσεων έγινε με βάση τη δυνατότητα παρατήρησης της συμπλοκοποιημένης μορφής της κερσετίνης στο φάσμα $\text{NMR } ^1\text{H}$ και όπως τονίστηκε παραπάνω χρήσης της ελάχιστης δυνατής συγκέντρωσης Fe(II) έτσι ώστε να μην δημιουργούνται σοβαρά προβλήματα ανομοιογένειας στο μαγνητικό πεδίο. Η λήψη όλων των φασμάτων έγινε σε ατμόσφαιρα N_2 ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του Fe(II) από το μοριακό O_2 .



Σχήμα 2.5.2 Ακολουθία πειραμάτων προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων Fe^{2+} σε τέσσερα διαφορετικά μίγματα κερσετίνης με Zn^{2+} .

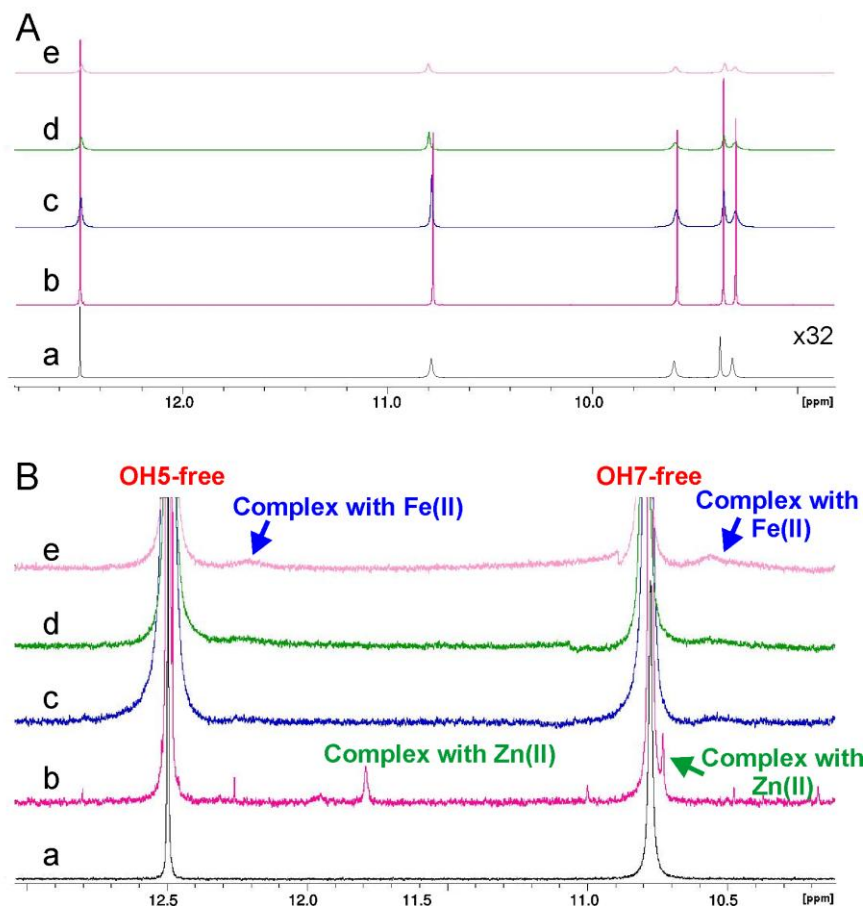
Για την μελέτη των ολοκληρωμάτων και κατά συνέπεια των αντίστοιχων συγκεντρώσεων των διαφορετικών μορφών της κερσετίνης επιλέχθηκε το πρωτόνιο OH-5 καθώς υπάρχει σαφής διάκριση μεταξύ ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης μορφής για όλες τις περιπτώσεις. Για την αποφυγή αντίδρασης οξείδωσης της ένωσης αναφοράς (TMSP- d_4), που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των ολοκληρωμάτων, από τον Fe(II), ακολουθήθηκε η ακόλουθη πειραματική διαδικασία. Διάλυμα TMSP- d_4 γνωστής συγκεντρώσεως σε DMSO- d_6 (4.6mM) τοποθετήθηκε σε σωληνάριο 2 mm ομόκεντρου ως προς το εξωτερικό σωληνάριο 5mm που περιείχε τα μίγματα του Σχήματος 2.5.2. Στη λήψη των ολοκληρωμάτων έχει ληφθεί υπόψιν διορθωτικός παράγοντας λόγω του διαφορετικού αποτελεσματικού όγκου των δύο σωληναρίων. Στο Σχήμα 2.5.3A παρουσιάζονται τα πρωτονιακά φάσματα της περιοχής των OH της κερσετίνης μετά από προσθήκες διαδοχικών συγκεντρώσεων Fe(II). Στο Σχήμα 2.5.3B παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή των C-5 OH και C-7 OH. Στα υπόλοιπα Σχήματα 2.5.4-2.5.6 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα πρωτονιακά φάσματα διαφορετικών αναλογιών κερσετίνης προς Zn(II) μετά από προσθήκες διαδοχικών συγκεντρώσεων Fe(II).



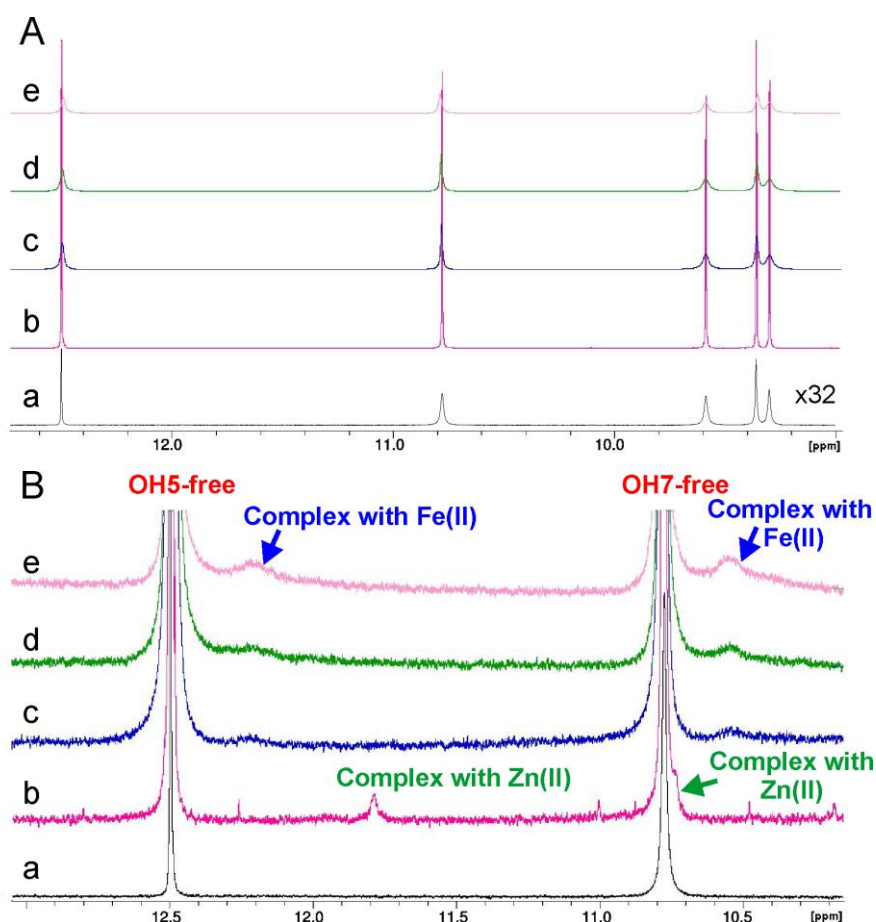
Σχήμα 2.5.3 Φάσματα NMR 1D ^1H 500MHz ελεύθερης κερσετίνης και με προσθήκη Fe^{2+} . (A) Η περιοχή των πρωτονίων OH της ελεύθερης κερσετίνης (a) και παρουσία Fe(II) σε

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διαφορετικές συγκεντρώσεις (b-d). (B) Σε μεγέθυνση η περιοχή των C-5 OH και C-7 OH πρωτονίων όπου παρουσιάζεται το φάσμα της ελεύθερης κερσετίνης (a) (2.5mM) (αριθμός παλμών=8, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K), της κερσετίνης μετά την προσθήκη 0.5mM Fe^{2+} (b), μετά την προσθήκη 1mM Fe^{2+} (c) και μετά την προσθήκη 2.5mM Fe^{2+} (d) (αριθμός παλμών=112, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K).

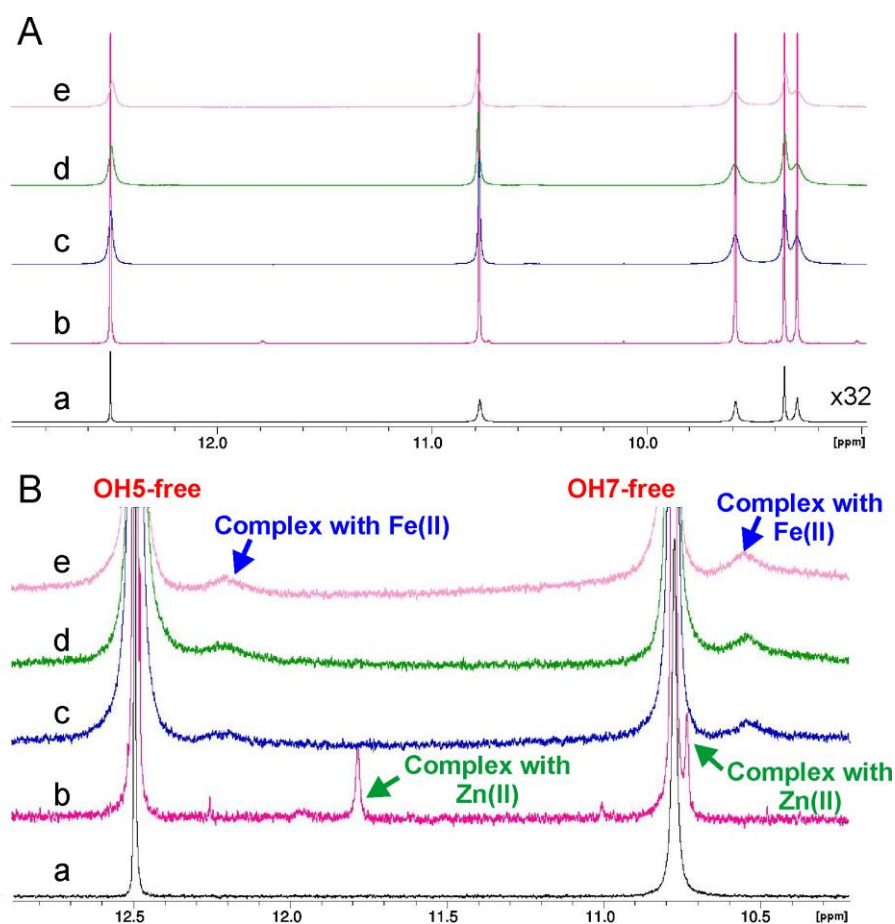


Σχήμα 2.5.4 Φάσματα NMR 1D ^1H 500MHz ελεύθερης κερσετίνης, με προσθήκη Zn(II) και με προσθήκη Fe(II) . (A) Η περιοχή των πρωτονίων OH της ελεύθερης κερσετίνης (a), με προσθήκη Zn(II) (b) και προσθήκη στο ίδιο δείγμα Fe(II) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (c-e). (B) Σε μεγέθυνση η περιοχή των C-5 OH και C-7 OH πρωτονίων όπου παρουσιάζεται το φάσμα της ελεύθερης κερσετίνης (a) (2.5mM) (αριθμός παλμών=8, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K), της κερσετίνης μετά την προσθήκη 1mM Zn^{2+} (b), μετά την προσθήκη στο ίδιο δείγμα 0.5mM Fe^{2+} (c), μετά την προσθήκη 1mM Fe^{2+} (d) και μετά την προσθήκη 2.5mM Fe^{2+} (e) (αριθμός παλμών=112, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K).



Σχήμα 2.5.5 Φάσματα NMR 1D ^1H 500MHz ελεύθερης κερσετίνης, με προσθήκη Zn(II) και με προσθήκη Fe(II). (A) Η περιοχή των πρωτονίων OH της ελεύθερης κερσετίνης (a), με προσθήκη Zn(II) (b) και προσθήκη στο ίδιο δείγμα Fe(II) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (c-e). (B) Σε μεγέθυνση η περιοχή των C-5 OH και C-7 OH πρωτονίων όπου παρουσιάζεται το φάσμα της ελεύθερης κερσετίνης (a) (2.5mM) (αριθμός παλμών=8, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K), της κερσετίνης μετά την προσθήκη 2.5mM Zn^{2+} (b), μετά την προσθήκη στο ίδιο δείγμα 0.5mM Fe^{2+} (c), μετά την προσθήκη 1mM Fe^{2+} (d) και μετά την προσθήκη 2.5mM Fe^{2+} (e) (αριθμός παλμών=112, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K).

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

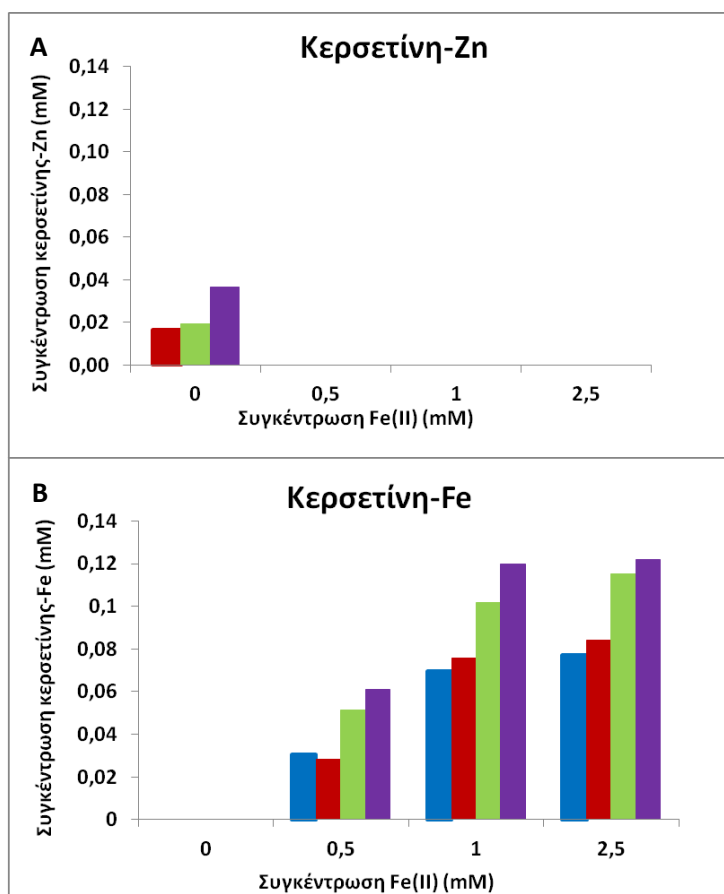


Σχήμα 2.5.6 Φάσματα NMR 1D ^1H 500MHz ελεύθερης κερσετίνης, με προσθήκη Zn(II) και με προσθήκη Fe(II) . (A) Η περιοχή των πρωτονίων OH της ελεύθερης κερσετίνης (a), με προσθήκη Zn(II) (b) και προσθήκη στο ίδιο δείγμα Fe(II) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (c-e). (B) Σε μεγέθυνση η περιοχή των C-5 OH και C-7 OH πρωτονίων όπου παρουσιάζεται το φάσμα της ελεύθερης κερσετίνης (a) (2.5mM) (αριθμός παλμών=8, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K), της κερσετίνης μετά την προσθήκη 5mM Zn^{2+} (b), μετά την προσθήκη στο ίδιο δείγμα 0.5mM Fe^{2+} (c), μετά την προσθήκη 1mM Fe^{2+} (d) και μετά την προσθήκη 2.5mM Fe^{2+} (e) (αριθμός παλμών=112, td=64k, aq=4.4s, d1=9s, T=298K).

Στο διάγραμμα του Σχήματος 2.5.7A απεικονίζεται η συγκέντρωση της συμπλοκοποιημένης κερκετίνης με Zn^{2+} για τις τρεις περιπτώσεις όπου προστέθηκε ZnCl_2 . Όπως είναι αναμενόμενο καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Zn^{2+} αυξάνεται και η συγκέντρωση του συμπλόκου με την κερκετίνη. Στο διάγραμμα 2.5.7 B παρουσιάζεται η συγκέντρωση της συμπλοκοποιημένης κερκετίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του Fe^{2+} όπου παρομοίως παρατηρείται αύξηση του βαθμού συμπλοκοποίησης με την κερσετίνη καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Fe^{2+} . Η μεγαλύτερη συγγένεια του Fe^{2+} σε σύγκριση με το Zn(II) προς σχηματισμό χηλικού συμπλόκου με την κερσετίνη προκύπτει καταρχήν από το γεγονός ότι με την προσθήκη Fe^{2+} το σύμπλοκο κερσετίνης-

Zn εξαφανίζεται για όλες τις συγκεντρώσεις ενώ οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου κερσετίνης-Fe αυξάνουν διαδοχικά. Συνεπώς ο Fe(II) σχηματίζει “σταθερότερα” σύμπλοκα.

Μία ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση αποτελεί η αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου κερσετίνης-Fe(II) στις περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης Zn(II) στο διάλυμα (από το δεύτερο προς το τέταρτο σετ πειραμάτων). Για παράδειγμα από την τέταρτη σειρά πειραμάτων (μωβ χρώμα) με την υψηλότερη συγκέντρωση Zn(II) (5 mM) προκύπτουν και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του συμπλόκου κερσετίνης-Fe(II). Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι, ως συνέπεια της αποπρωτονίωσης της κερσετίνης στη θέση C-3 OH λόγω συμπλοκοποίησης με τον Zn(II), το φλαβονοειδές αλληλεπιδρά άμεσα με το Fe(II).



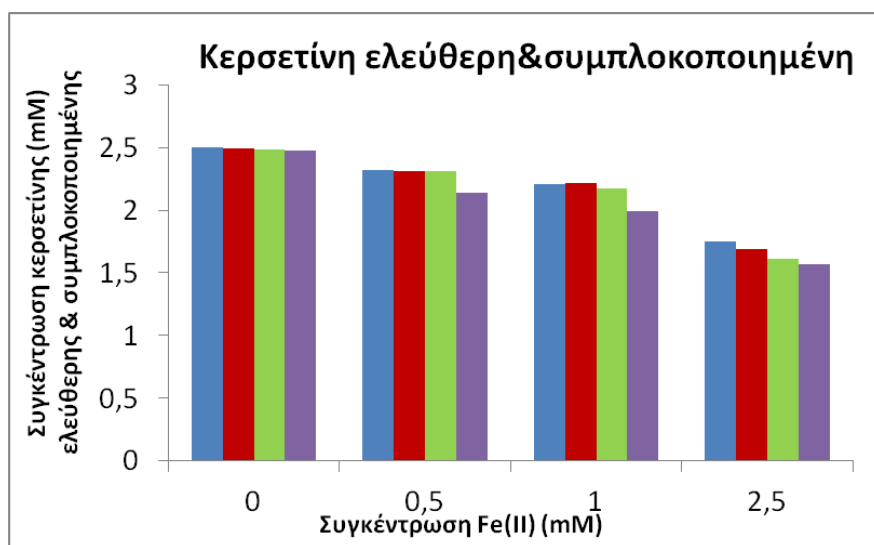
Σχήμα 2.5.7 (Α) Διάγραμμα συγκέντρωσης συμπλόκου κερσετίνης-Zn ως συνάρτηση της προσθήκης διαδοχικών συγκεντρώσεων 1, 2.5 και 5mM Zn(II) πριν την προσθήκη Fe(II). (Β) Διάγραμμα συγκέντρωσης συμπλόκου κερσετίνης-Fe ως συνάρτηση της προσθήκης διαδοχικών συγκεντρώσεων 0.5, 1 και 2.5mM Fe(II) και για τα τρία σετ πειραμάτων.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας του Fe^{2+} στην οξείδωση της κερσετίνης. Σε κάθε φάσμα αθροίζονται τα ολοκληρώματα της ελεύθερης και της

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συμπλοκοποιημένης κερσετίνης. Συγκεκριμένα, πριν την προσθήκη του Fe(II) αθροίζονται τα ολοκληρώματα της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης με Zn(II) κερσετίνης και στα υπόλοιπα πρωτονιακά φάσματα, όπου προστίθενται διαδοχικές συγκεντρώσεις Fe(II) , αθροίζονται τα ολοκληρώματα της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης με Fe(II) κερσετίνης. Σκοπός είναι η παρακολούθηση των μεταβολών στη συνολική συγκέντρωση της κερσετίνης παρουσία Fe(II) διότι, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, συνέπεια της συμπλοκοποίησης αυτής είναι η οξείδωση του φλαβονοειδούς.

Στο διάγραμμα του Σχήματος 2.5.8 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της κερσετίνης (συμπλοκοποιημένης και ελεύθερης) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του Fe^{2+} που προστίθεται κάθε φορά στο κάθε ένα από τα τρία διαφορετικά σωληνάκια. Πριν την προσθήκη του Fe^{2+} απεικονίζεται η συγκέντρωση της κερσετίνης (ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης με Zn^{2+}) ενώ για τις συγκεντρώσεις 0,5 έως και 2,5 mM Fe^{2+} απεικονίζεται η συγκέντρωση της κερσετίνης (ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης με Fe^{2+}) καθώς το σύμπλοκο κερκετίνης- Zn^{2+} παρουσία Fe^{2+} λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης δεν είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί.



Σχήμα 2.5.8 Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης της κερσετίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του Fe(II) . Τα χρώματα αντιστοιχούν στο σετ των πειραμάτων όπως απεικονίζονται στο Σχήμα 2.6.2.

Από το Σχήμα 2.5.8 παρατηρείται σταδιακή μείωση στη συνολική συγκέντρωση της κερσετίνης (ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης) με την αύξηση της συγκέντρωσης του Fe^{2+} . Συνεπώς ένα ποσοστό της κερσετίνης μετατρέπεται σε προϊόντα οξείδωσης, όπως άλλωστε αναφέρεται και στην βιβλιογραφία (η συνολική της συγκέντρωση στο διάλυμα ελαττώνεται περίπου κατά 1mM).

Επίσης, μία άλλη σημαντική παρατήρηση που προκύπτει είναι ότι στις περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης του συμπλόκου της κερσετίνης με Zn^{2+} , λόγω αυξημένης συγκέντρωσης Zn^{2+} , όπως π.χ. στην τέταρτη περίπτωση (μωβ χρώμα), μετά την προσθήκη του Fe^{2+} η συγκέντρωση της συνολικής κερσετίνης μειώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Η μείωση αυτή στη συγκέντρωση της κερσετίνης (ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης) πολύ πιθανόν οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό οξειδώσης από το Fe^{2+} παρουσία Zn^{2+} .

Συμπερασματικά, παρουσία Fe^{2+} η συγκέντρωση της συμπλοκοποιημένης κερσετίνης με τον Zn^{2+} μειώνεται σημαντικά λόγω μεγαλύτερης χημικής συγγένειας του πρώτου. Επίσης η αύξηση της συγκέντρωσης του Zn^{2+} διευκολύνει τη σύμπλεξη της κερσετίνης με Fe^{2+} . Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η αποπρωτονίωση της ομάδας C-3 OH κατά τη συμπλοκοποίηση με Zn^{2+} υποβοηθά σε σημαντικό βαθμό την αλληλεπίδραση με Fe^{2+} . Συνεπώς, ο Fe^{2+} παρουσιάζει επίσης μεγαλύτερη συγγένεια ως προς την αποπρωτονιωμένη μορφή της κερσετίνης σε σύγκριση με Zn^{2+} . Τέλος, από την ελάττωση της συνολικής συγκέντρωσης της κερσετίνης με την αύξηση της παρουσίας του Fe^{2+} συμπεραίνουμε ότι ένα ποσοστό της κερσετίνης οξειδώνεται από το μεταλλικό αυτό ιόν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Jeffrey, G.A.; Saenger, W. Hydrogen Bonding in Biological Structures, Springer Verlag: Berlin, **1991**.

Kontogianni V., Charisiadis P., Primikyri A., Pappas C.G., Exarchou V., Tzakos A., Gerothanassis I.P. Hydrogen bonding probes of phenol -OH groups. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 1013-1025.

Lekka C.E., Ren J., Meng S., Kaxiras E., Structural, electronic, and optical properties of representative Cu-flavonoid complexes. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6478-6483.

Ren J., Meng S., Lekka C. E., Kaxiras E. Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 1845-1850.

Siskos, M.G.; Kontogianni, V.; Tsiafoulis, C.G.; Tzakos, A; Gerothanassis, I.P. Investigation of solute-solvent interactions in phenol compounds: accurate ab initio calculations of solvent effects on (1)H NMR chemical shifts. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 7400-7411.

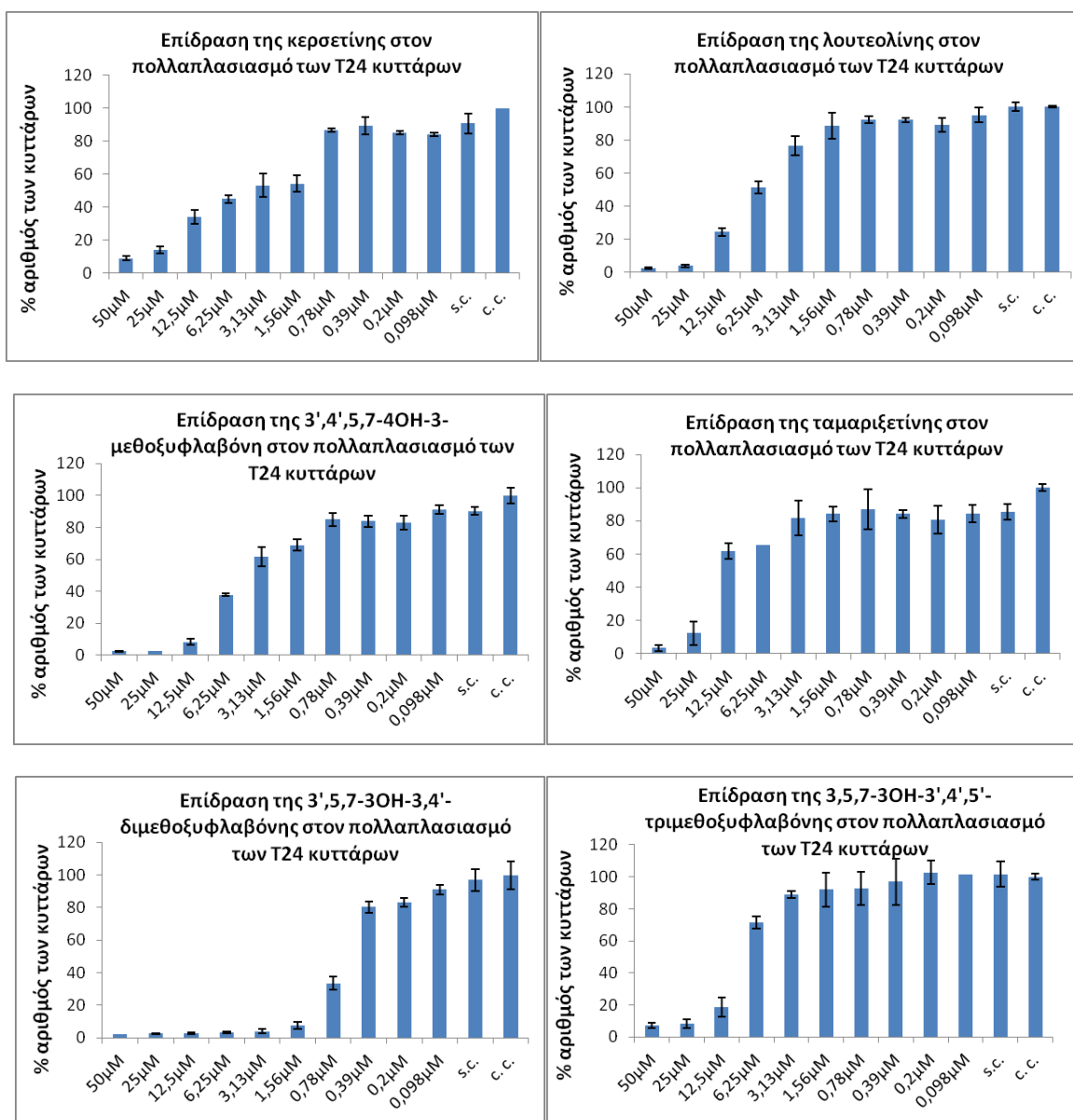
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

3.1 Μελέτη κυτταροτοξικής δραστηριότητας των φλαβονοειδών ενάντια σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές.

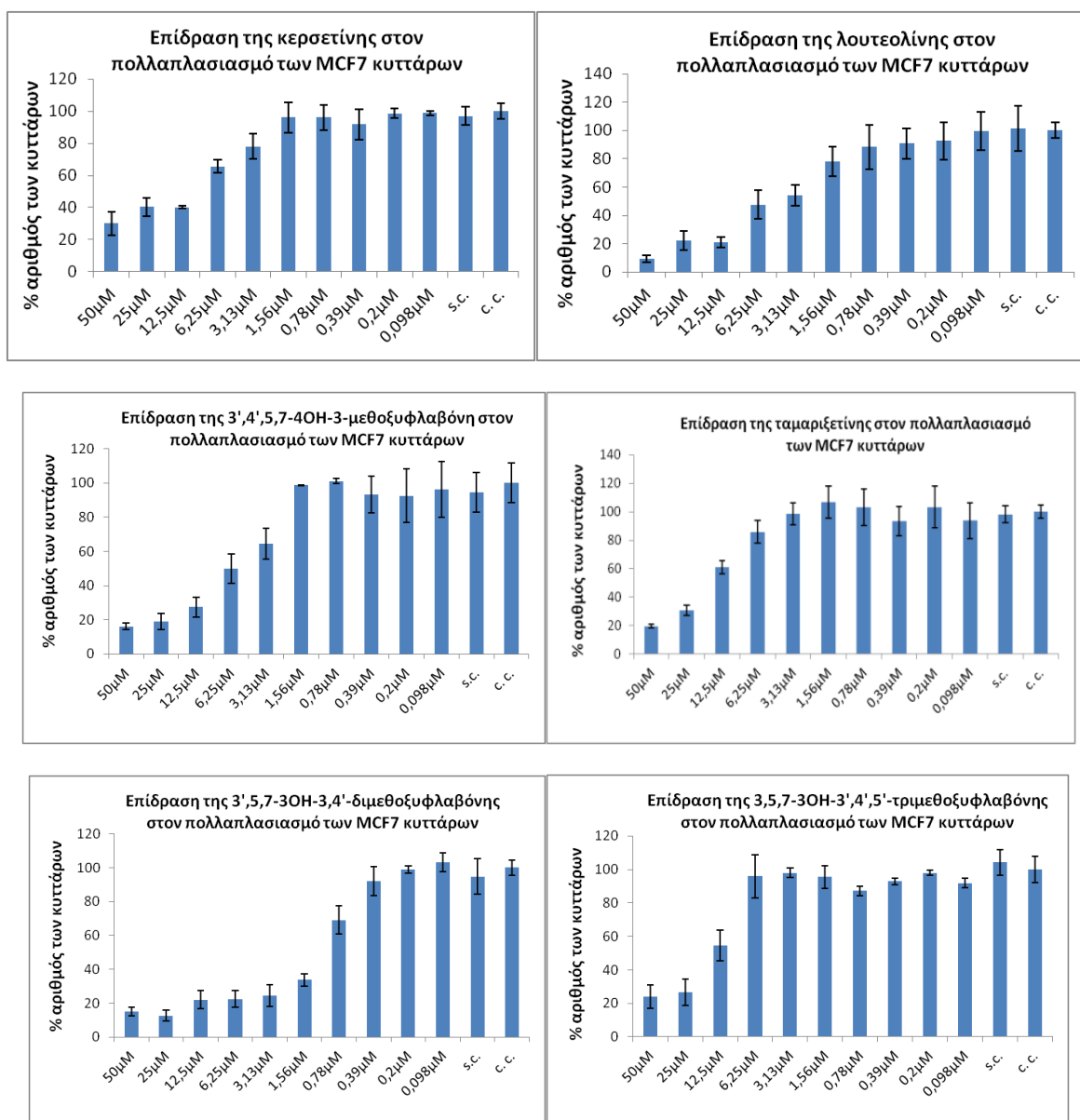
Ως συνέχεια της ολιστικής μελέτης δομικών ιδιοτήτων των φλαβονοειδών, της αντιοξειδωτικής τους δράσης και του πιθανού μηχανισμού δράσης μέσω συμπλοκοποίησης μετάλλων, ακολούθησε η μελέτη της κυτταροτοξικότητάς τους σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, την T24 και την MCF7. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η σύγκριση και η συσχέτιση της δομής και των επιμέρους υποκαταστάσεων με τη δραστηριότητά τους.

Με βάση πλήθος συστηματικών μελετών που συσχετίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών με την επίδραση στη κυτταροτοξική τους δραστηριότητα επιλέξαμε την ομάδα των έξι φλαβονοειδών του Σχήματος 1.1.1 ώστε να ελέγξουμε την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση. Τα βασικά κοινά χαρακτηριστικά που επιλέχθηκαν ήταν η ύπαρξη του διπλού δεσμού 2,3 και των ομάδων OH-5 και OH-7, ως υπεύθυνων για την αύξηση της δραστηριότητας. Οι υποκαταστάσεις που φέρουν τα φλαβονοειδή αυτά, είναι είτε υδροξυλικές είτε μεθόξυ ομάδες και βρίσκονται σε διάφορες θέσεις των δακτυλίων Β και Γ. Αρχικά παρουσιάζεται ο έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης των φλαβονοειδών ενάντια στην T24 (Σχήμα 3.1.1) και στη συνέχεια ενάντια στην MCF7 (Σχήμα 3.1.2).

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 3.1.1 Κυτταροτοξική δράση έξι φλαβονοειδών στην καρκινική σειρά T24 ως επί τις εκατό ποσοστό του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης της ένωσης (s.c. αντιστοιχεί στο κοντρόλ του διαλύτη και c.c. αντιστοιχεί στο κοντρόλ αριθμό κυττάρων στο οποίο δεν χορηγήθηκε δόση φλαβονοειδών).



Σχήμα 3.1.2 Κυτταροτοξική δράση έξι φλαβονοειδών ενάντια στην καρκινική σειρά MCF7 ως επί τις εκατό ποσοστό του αριθμού των κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης της ένωσης (s.c. αντιστοιχεί στο κοντρόλ του διαλύτη και c.c. αντιστοιχεί στο κοντρόλ αριθμό κυττάρων στο οποίο δεν χορηγήθηκε δόση φλαβονοειδών).

3.2 Συσχέτιση δομής-δραστικότητας των φλαβονοειδών.

Στον Πίνακα 3.2.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές IC₅₀ των φλαβονοειδών που αντιστοιχούν στη συγκέντρωση της ένωσης που προκαλεί πενήντα τοις εκατό αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Η λουτεολίνη, για παράδειγμα, έχει καλύτερη ανασταλτική δράση από την κερσετίνη, την ταμαριξετίνη και την τριμεθοξυφλαβόνη που φέρουν την ομάδα 3-OH. Συνεπώς, η απουσία της υδροξυλομάδας αυτής έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

κυτταροτοξικότητας. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από τις τιμές IC_{50} των άλλων δύο флаβονοειδών, της 3',4',5,7-4OH-3-μεθοξυφλαβόνης και της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης που στη θέση 3 φέρουν ως υποκαταστάτη μεθόξυ ομάδα και παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση. Όσον αφορά το δακτύλιο B δεν είναι δυνατόν να καταλήξουμε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα γιατί παρατηρούμε ότι όταν υπάρχουν μόνο μεθόξυ υποκαταστάτες η δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά ενώ η παρουσία μόνο υδροξυλομάδων έχει ισχυρό αποτέλεσμα μόνο στην περίπτωση της λουτεολίνης. Η συνδυαστική παρουσία μιας υδροξυλομάδας και μιας μεθόξυ ομάδας έχει πολύ ισχυρή επίδραση στην περίπτωση της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης σε αντίθεση με την ταμαριξετίνη, λόγω της ύπαρξης της υδροξυλομάδας στη θέση 3 που ελαττώνει σημαντικά τη δράση της.

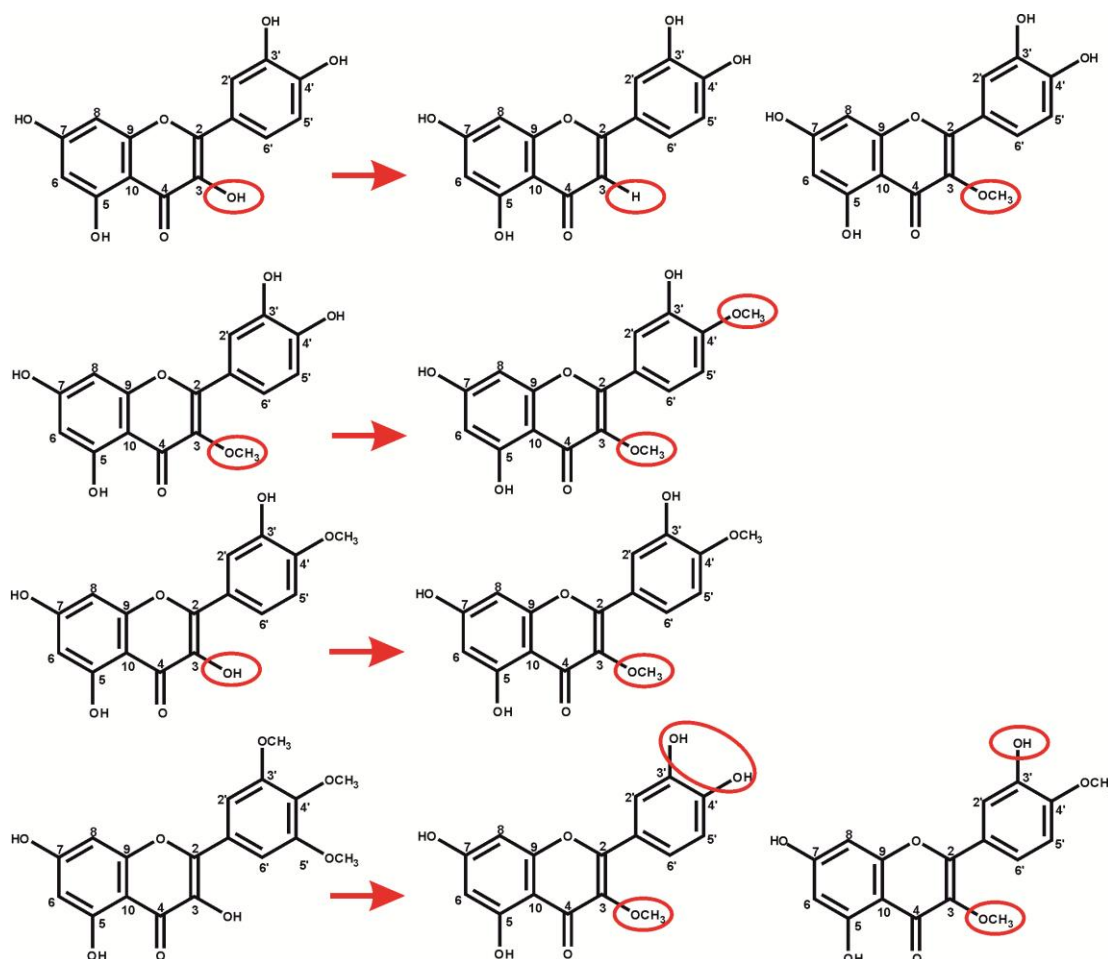
Πίνακας 3.2.1 Τιμές IC_{50} (μM) των флаβονοειδών του Σχήματος 3.1.2 στις δύο κυτταρικές σειρές T24 και MCF7.

Φλαβονοειδές/ Κυτταρική σειρά	T24	MCF7
1. Κερσετίνη	7	9.6
2. Λουτεολίνη	6.3	4.8
3. 3',4',5,7-4OH-3- μεθοξυφλαβόνη	4.4	6
4. Ταμαριξετίνη	15	16
5. 3',5,7-3OH-3,4'- διμεθοξυφλαβόνη	0.57	1.11
6. 3,5,7-3OH-3',4',5'- τριμεθοξυφλαβόνη	8.2	14

Συνοψίζοντας, το флаβονοειδές 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη που επέδειξε ιδιαίτερα ισχυρή κυτταροτοξική δράση έχει τον ακόλουθο συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών: (1) διπλό δεσμό στη θέση C2 και C3, (2) μεθόξυ ομάδα στη θέση 3 στον δακτύλιο Γ και (3) στον δακτύλιο Β μία υδροξυλομάδα στη θέση 3' και μία μεθόξυ ομάδα στη θέση (4). Όπως έχει αναφερθεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού 2,3 είναι υπεύθυνη για την επίπεδη δομή του μορίου, ενώ η ύπαρξη των μεθόξυ ομάδων στις θέσεις 3 και 4' υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μέσω αυτών των ομάδων με τους

διάφορους υποδοχείς είναι υδρόφοβες. Επίσης απαραίτητη είναι και η ύπαρξη μιας υδροξυλομάδας στο δακτύλιο Β στη θέση 3', η οποία πιθανότατα απαιτείται για το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με θέση πρόσδεσης του υποδοχέα.

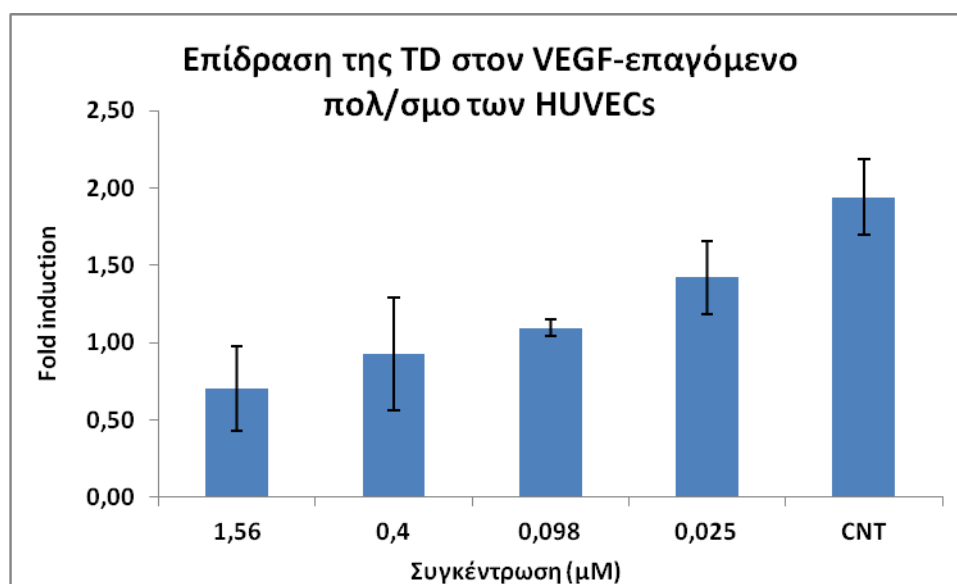
Συμπερασματικά, η ιδιαίτερα ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση που επέδειξε το φλαβονοειδές αυτό και το γεγονός ότι ο αριθμός των ενώσεων αυτών που στη βιβλιογραφία παρουσιάζουν τόσο ισχυρή κυτταροτοξικότητα είναι εξαιρετικά περιορισμένος, υποδεικνύει ότι είναι απαραίτητος ο συνδυασμός κάποιων βασικών δομικών χαρακτηριστικών. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η ύπαρξη του διπλού δεσμού 2,3 και κατάλληλων υδροξυλικών ομάδων στις θέσεις 5,7 και 3' και μεθόξυ υποκαταστάσεων στις θέσεις 3 και 4' για τη δημιουργία είτε δεσμών υδρογόνου είτε υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 3.2.1).



Σχήμα 3.2.1 Συσχέτιση δομικών χαρακτηριστικών με την αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα φλαβονοειδών. Τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής ικανότητας υποδεικνύονται με τη φορά του βέλους.

3.3 Έλεγχος της ανασταλτικής δράσης της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs.

Μία πιθανή αιτία της πολύ καλής δράσης της 3',5,7-3OH-3,4'-διμεθοξυφλαβόνης (TD) αποτελεί η ικανότητα αναστολής της αγγειογένεσης στον όγκο. Με γνώμονα όλα τα παραπάνω, ελέγχθηκε η ανασταλτική δράση του φλαβονοειδούς ενάντια στην επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs. Η δραστηριότητά της εκτιμήθηκε μετά από ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης (BrdU) στο DNA των κυττάρων και πραγματοποίηση ανοσοφθορισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή προσμετράται το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA τους σε σύγκριση με το ολικό αριθμό κυττάρων. Η χρωστική ιωδιούχο προπίδιο PI (Propidium Iodide) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε DNA των κυττάρων και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της BrdU χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της BrdU που έχει ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο DNA. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα στα οποία τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες έλλειψης ορού (σε 5% ορό FCS) για 18 ώρες που όπως είναι γνωστό επάγουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Σχήμα 3.3.1). Η επαγόμενη από τη στέρηση ορού απόπτωση αναστέλλεται με την προσθήκη του VEGF [Bellou et al., 2012]. Από τις μετρήσεις αυτές προέκυψε ότι το φλαβονοειδές ανέστειλλε ισχυρά τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs με τιμή IC_{50} 0.6 μ M.



Σχήμα 3.3.1 Επίδραση της διμεθοξυφλαβόνης στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των HUVECs ενδοθηλιακών κυττάρων ως επί τις εκατό ποσοστό του αριθμού των κυττάρων που έχουν ενσωματώσει την BrdU συναρτήσει της συγκέντρωσης της ένωσης από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bellou S., Karali E., Bagli E., Al-Maharik N., Morbidelli L., Ziche M., Adlercreutz H., Murphy C., Fotsis T. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol. Cancer*, **2012**, 11, 35.

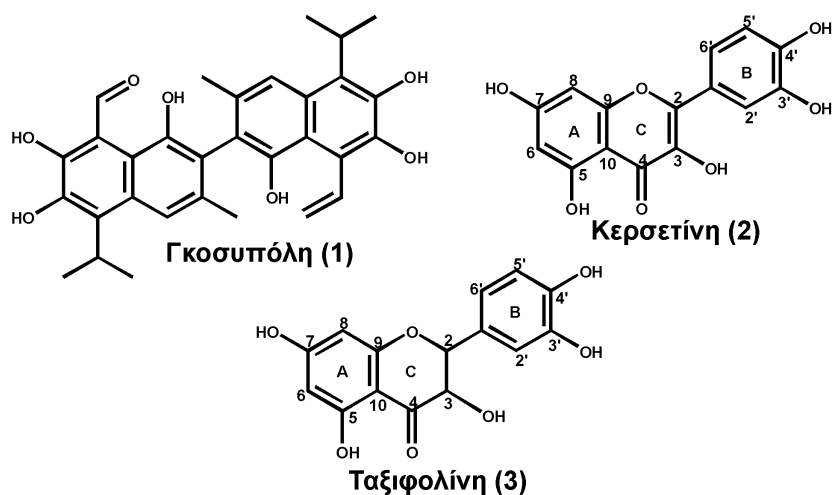
Dai Q., Franke A.A., Jin F., Shu X.O., Hebert J.R., Custer L.J., Cheng J., Gao Y.T., Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2002**, 11, 815-821.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23, 519-534.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ

4.1 Αντιπολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση της κερσετίνης στη λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat.

Με βάση τη δομική ομολογία της κερσετίνης με την γκοσσυπόλη (Σχήμα 4.1.1), η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί αλληλεπιδρά άμεσα με την Bcl-xL, αποφασίσαμε να μελετήσουμε εάν η κερσετίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και τις πιθανές συνέπειες από τέτοιου είδους αλληλεπίδραση, αλλά και να χαρτογραφήσουμε τη θέση πρόσδεσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε διάφορες βιοχημικές, βιοφυσικές και υπολογιστικές προσεγγίσεις που παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.



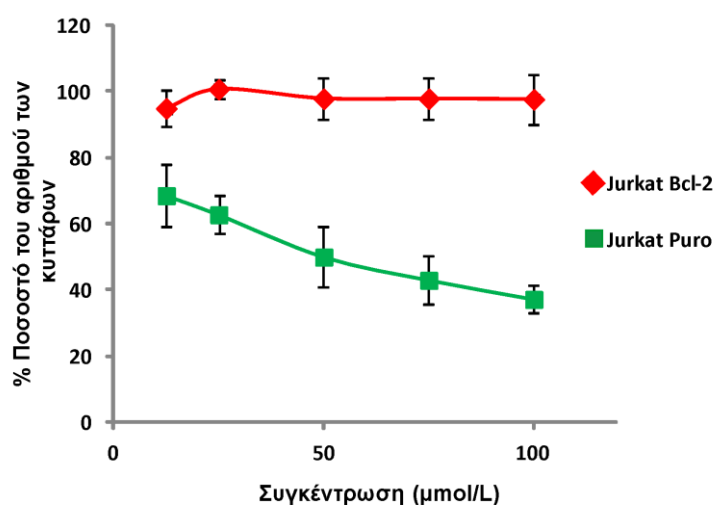
Σχήμα 4.1.1 Χημικές δομές της γκοσσυπόλης, κερσετίνης και ταξιφολίνης.

Αρχικά, ερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της κερσετίνης στην επιβίωση της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς Jurkat που προέρχεται από T λευχαιμικά κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν σταθερά με έναν άδειο φορέα ρετροϊού προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην πιουρομυκίνη (Jurkat Puro) ή με τον ίδιο φορέα που έφερε ανθρώπινο Bcl-2 cDNA (Jurkat Bcl-2). Για τη μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της κερσετίνης πραγματοποιήθηκε η καταγραφή καμπύλης ανάπτυξης απόκρισης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Έτσι 24 ώρες μετά το διαχωρισμό των κυττάρων προστέθηκαν πέντε διαφορετικές δόσεις της κερσετίνης (12.5, 25, 50, 75 και 100 μM) και αφέθηκαν για επώαση. Στη συνέχεια, 24 ώρες μετά την έκθεση στην κερσετίνη πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Στην περίπτωση των Jurkat Puro τα κύτταρα παρουσίασαν σημαντική μείωση του αριθμού τους φτάνοντας για τη συγκέντρωση των 50 $\mu\text{mol/L}$ στο 50% του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με το κοντρόλ, τα οποία δεν εκτέθηκαν στην παρουσία της κερσετίνης (Σχήμα 4.1.2). Η σειρά Jurkat Bcl-2 αντιθέτως παρουσίασε αρκετά διαφορετικό προφίλ ανάπτυξης. Ο αριθμός των κυττάρων αυτών παρέμεινε

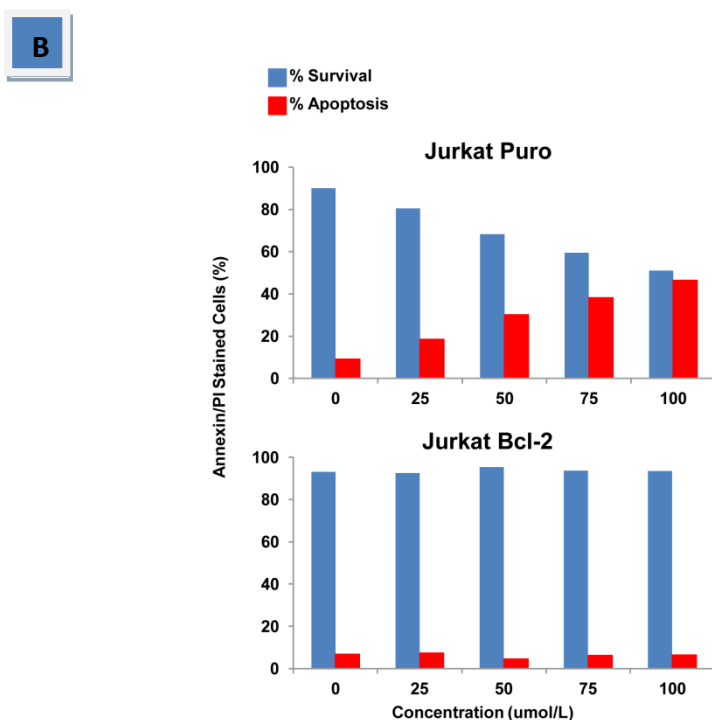
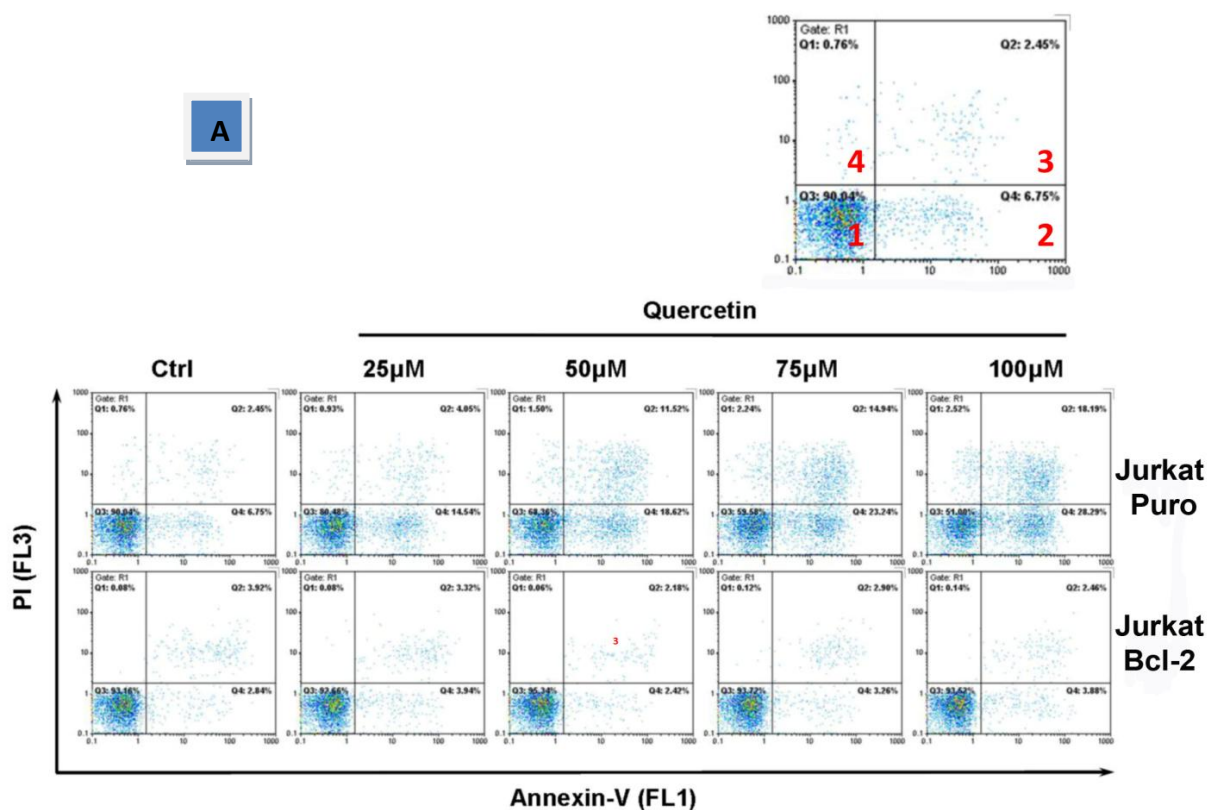
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

σταθερός στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της κερσετίνης 24 ώρες μετά την έκθεσή τους σε αυτήν ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{mol/L}$. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χρειάζεται αυξημένη συγκέντρωση της κερσετίνης ώστε να επιτύχουμε αντιπολλαπλασιαστική δράση όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα της Bcl-2 πρωτεΐνης είναι αυξημένα λόγω υπερέκφρασης. Επομένως, είναι πιθανό η κερσετίνη να στοχεύει και να αλληλεπιδρά άμεσα με την Bcl-2. Το πειραματικό αυτό αποτέλεσμα είναι αντίστοιχο με αυτό της αλληλεπίδρασης της γκοσουπόλης με την Bcl-xL [Kitada et al., 2003].



Σχήμα 4.1.2 Η επαγόμενη υπερέκφραση της Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την αποπτωτική δράση της κερσετίνης. Οι κυτταρικές σειρές Jurkat Bcl-2 και Jurkat Puro εκτέθηκαν για 24 ώρες σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις της κερσετίνης (12.5, 25, 50, 75 και 100 μM). Η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει το % ποσοστό του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν 24 ώρες μετά την έκθεση σε σύγκριση με το κοντρόλ το οποίο δεν εκτέθηκε σε προσθήκη κερσετίνης. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο δύο όμοιων πειραματικών μετρήσεων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης με κυτταρομετρία ροής με πρόσδεση Annexin-V και χρώση PI. Από την ανάλυση απόκρισης σε διάφορες δόσεις κερσετίνης (12.5, 25, 50, 75 και 100 μM) που πραγματοποιήθηκε επίσης 24 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων σε αυτή προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα. Για τα Jurkat Puro κύτταρα προέκυψε μια μέτρια αύξηση της απόπτωσης για τη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{mol/L}$ και εκτεταμένη απόπτωση για συγκεντρώσεις 50 $\mu\text{mol/L}$ ή και μεγαλύτερες (Σχήμα 4.1.3). Αντιθέτως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναστολή της απόπτωσης σε όλες τις συγκεντρώσεις της κερσετίνης για τα Jurkat Bcl-2 κύτταρα, προτείνοντας ότι η επαγόμενη υπερέκφραση της Bcl-2 επέφερε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και προστασία των κυττάρων από την επαγόμενη απόπτωση παρουσία της κερσετίνης.



Σχήμα 4.1.3 Η επαγόμενη υπερέκφραση της Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την αποπρωτική δράση της κερσετίνης. Οι κυτταρικές σειρές Jurkat Bcl-2 και Jurkat Puro εκτέθηκαν για 24 ώρες σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κερσετίνης (25, 50, 75 και 100 μM). Η εκτίμηση της αποπρωτικής δράσης της κερσετίνης πραγματοποιήθηκε με αννεξίνη-V/PI χρωστική

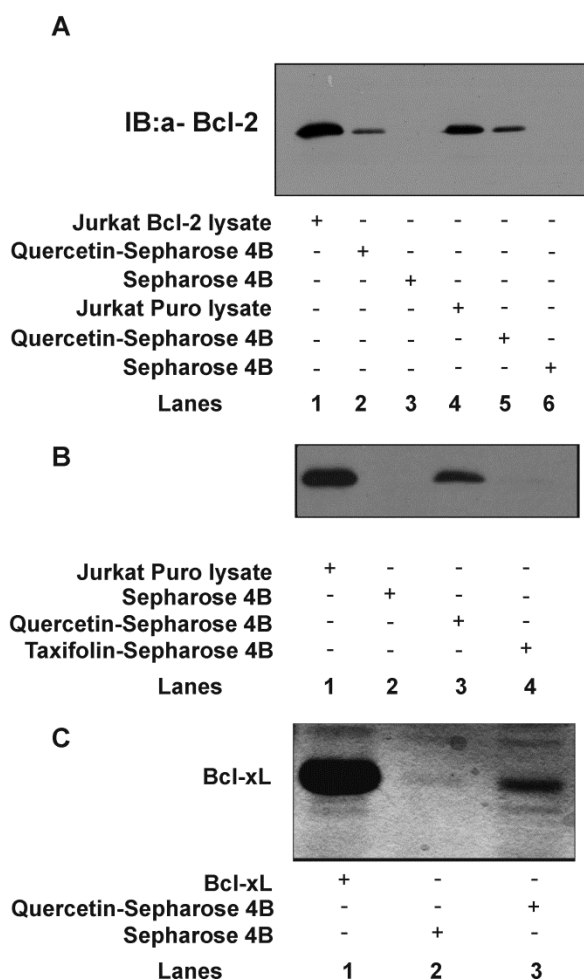
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

και για τις δύο κυτταρικές σειρές. **A.** Τα γραφήματα παρουσιάζουν το ποσοστό των ζωντανών (1), των πρώιμα αποπτωτικών (2), των αποπτωτικών (3) και των νεκρωτικών (4) κυττάρων για όλες τις συγκεντρώσεις της κερσετίνης για τις δύο κυτταρικές σειρές. **B.** Στα ραβδογράμματα παρουσιάζεται το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων (μπλε μπάρες) και του συνόλου των αποπτωτικών κυττάρων (κόκκινες μπάρες) σε σύγκριση με το κοντρόλ.

Από τα μέχρι στιγμής δεδομένα το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι πιθανώς η αποπτωτική δράση της κερσετίνης να πραγματοποιείται με επίδραση στο μιτοχονδριακό μονοπάτι απόπτωσης και στα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2. Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η κερσετίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2.

4.2 Βιοχημικές μελέτες με χρωματογραφία συγγένειας (pull down assays).

Με στόχο τον έλεγχο της ισχύος της υπόθεσης ότι η κερσετίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, ερευνήθηκε η ικανότητα άμεσης πρόσδεσής της στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων πρόσδεσης pull down. Η μέθοδος ανίχνευσης άμεσης πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε με ακινητοποίηση της κερσετίνης σε Cyanogen Bromide (CNBr)-ενεργοποιημένη σεφαρόζη 4B παρουσία βιοεκλεκτικών προσροφητών χρωματογραφίας συγγένειας [Hou et al., 2010]. Η χρήση της σε μελέτες με πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και πολυσακχαρίτες έχει αναφερθεί αρκετά ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες η CNBr-ενεργοποιημένη σεφαρόζη 4B παρουσιάζει την ικανότητα να προσδένει φλαβονοειδή [Choi et al., 2005; Lee et al., 2007]. Οι πρωταρχικές διαδικασίες περιλαμβάνουν: α) τη σύζευξη του φλαβονοειδούς με τα σφαιρίδια της CNBr-ενεργοποιημένης σεφαρόζης 4B σε ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης, β) την πρόσδεση των σφαιρίδιων συζευγμένου φλαβονοειδούς-σεφαρόζης 4B με τα κυτταρικά λύματα ή με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, γ) το πλύσιμο του προσδεδεμένου συμπλόκου με ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών και δ) την ανίχνευση των πρωτεϊνών που προσδέθηκαν στο σύμπλοκο σεφαρόζη 4B-σφαιρίδια-φλαβονοειδές με ανοσοαποτύπωση και τη χρήση ειδικού αντισώματος. Με τη διαδικασία αυτή διευκολύνεται ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα με τα φλαβονοειδή χωρίς την παροχή πληροφοριών που αφορούν τη συγγένεια πρόσδεσης ή τη λειτουργική κατηγορία των θέσεων πρόσδεσης. Για τους λόγους αυτούς, αποτελεί έναν ιδιαίτερα εύχρηστο εργαλείο για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της άμεσης πρόσδεσης των φλαβονοειδών στις πρωτεΐνες.

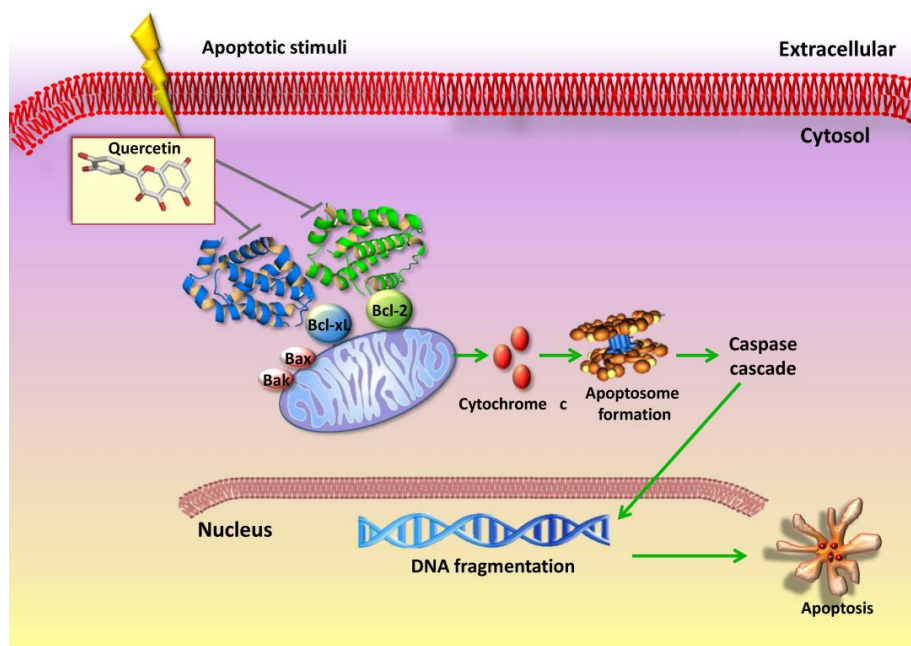


Σχήμα 4.2.1 Πείραμα *in vitro* pull down μελέτης άμεσης αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. **A.** Η κερσετίνη προσδένεται άμεσα με την Bcl-2 από τα κυτταρολύματα όπως φαίνεται από την ανοσοσύτρωση με τη χρήση αντισώματος ποντικού για την Bcl-2. *Στήλη 1:* το κοντρόλ εισόδου, το οποίο περιέχει το κυτταρόλυμα από τα κύτταρα Jurkat Bcl-2. *Στήλη 2:* η Bcl-2 προσδέθηκε στη συζευγμένη κερσετίνη στα σφαιρίδια σεφαρόζης 4B και *στήλη 3:* το αρνητικό κοντρόλ, όπου η Bcl-2 δεν προσδέθηκε στη σεφαρόζη 4B. *Στήλη 4:* το κοντρόλ εισόδου, το οποίο περιέχει το κυτταρόλυμα από τα κύτταρα Jurkat Puro. *Στήλη 5:* η Bcl-2 προσδέθηκε στη συζευγμένη κερσετίνη στα σφαιρίδια σεφαρόζης 4B και *στήλη 6:* το αρνητικό κοντρόλ, όπου η Bcl-2 δεν προσδέθηκε στη σεφαρόζη 4B. **B.** Η κερσετίνη προσδένεται άμεσα στην Bcl-2 από το κυτταρόλυμα των Jurkat Puro σε αντίθεση με την ταξιφολίνη η οποία δεν προσδένεται στην Bcl-2 και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό κοντρόλ. *Στήλη 1:* το κοντρόλ εισόδου για την Bcl-2 από το κυτταρόλυμα των Jurkat Puro. *Στήλη 2:* η σεφαρόζη 4B ως αρνητικό κοντρόλ. Η *στήλη 3* παρουσιάζει την Bcl-2 που έχει προσδεθεί στην κερσετίνη ενώ στην *στήλη 4* η ταξιφολίνη δεν έχει προσδεθεί στην Bcl-2. **Γ.** Η κερσετίνη έχει προσδεθεί στη Bcl-xL *in vitro*. Η πρόσδεση της Bcl-xL *in vitro* επιβεβαιώθηκε με τη χρωστική coomassie. *Στήλη 1:* το κοντρόλ εισόδου για την ανασυνδυασμένη Bcl-xL. *Στήλη 2:* η σεφαρόζη B χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό κοντρόλ. *Στήλη 3:* η Bcl-xL προσδέθηκε στη συζευγμένη κερσετίνη στα σφαιρίδια σεφαρόζης 4B.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έτσι, ελέγχθηκε η ικανότητα άμεσης πρόσδεσης της κερσετίνης, συζευγμένης με σφαιρίδια σεφαρόζης 4B στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν και δύο αρνητικά κοντρόλ ελέγχου της αξιοπιστίας του αποτελέσματος χρήσης των σφαιριδίων σεφαρόζης 4B. Το ένα εξ' αυτών πραγματοποιήθηκε χωρίς προσδεσμένη κερσετίνη και το δεύτερο με το φλαβονοειδές ταξιφολίνη το οποίο είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Η πρόσδεση της Bcl-2 από τα κυτταρολύματα των Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 στη συζευγμένη κερσετίνη επάνω σε σφαιρίδια σεφαρόζης 4B, αλλά όχι στα κοντρόλ σφαιρίδια σεφαρόζης 4B, διαφαίνεται αρκετά ξεκάθαρα από την ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος για την πρωτεΐνη (Σχήμα 4.2.1). Στη συνέχεια για επιπλέον επιβεβαίωση του αποτελέσματος αυτού χρησιμοποιήθηκε ένα φλαβονοειδές με παρόμοια δομή με αυτήν της κερσετίνης, ως αρνητικό κοντρόλ. Η ταξιφολίνη είναι μία φυσική πολυφαινόλη η οποία διαφέρει από την κερσετίνη ως προς την παρουσία του διπλού δεσμού C2-C3 στο δακτύλιο Γ (Σχήμα 4.1.1) και στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η αποπτωτική της δράση είναι ανεξάρτητη από την έκφραση του mRNA της Bcl-2. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός έλεγχος στην παρούσα μελέτη. Πράγματι, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.2.1 δεν παρατηρήθηκε άμεση πρόσδεση της ταξιφολίνης στη Bcl-2. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το αντίστοιχο πείραμα pull down *in vitro* με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Bcl-xL. Έτσι και στην περίπτωση αυτή προέκυψε ότι η ανασυνδυασμένη Bcl-xL προσδέθηκε ειδικά στη συζευγμένη κερσετίνη στα σφαιρίδια σεφαρόζης 4B και όχι στα κοντρόλ σφαιρίδια σεφαρόζης 4B (Σχήμα 4.2.1) όπως διαφαίνεται από την χρώση που πραγματοποιήθηκε με χρωστική coomassie.

Συμπερασματικά, από το σύνολο των πειραμάτων αυτών προκύπτει ότι η κερσετίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Η αναστολή της αντι-αποπτωτικής τους δράσης στη συνέχεια είναι πιθανό να διευκολύνει το σχηματισμό πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak με επαγόμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c το οποίο ενεργοποιεί έναν καταρράκτη κασπασών μεταφέροντας αποπτωτικά σήματα μέσω της πρωτεολυτικής τους δραστηριότητας (Σχήμα 4.2.2).



Σχήμα 4.2.2 Η κερσετίνη προσδένεται άμεσα τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τελικά τα Jurkat λευχαιμικά κύτταρα στην απόπτωση.

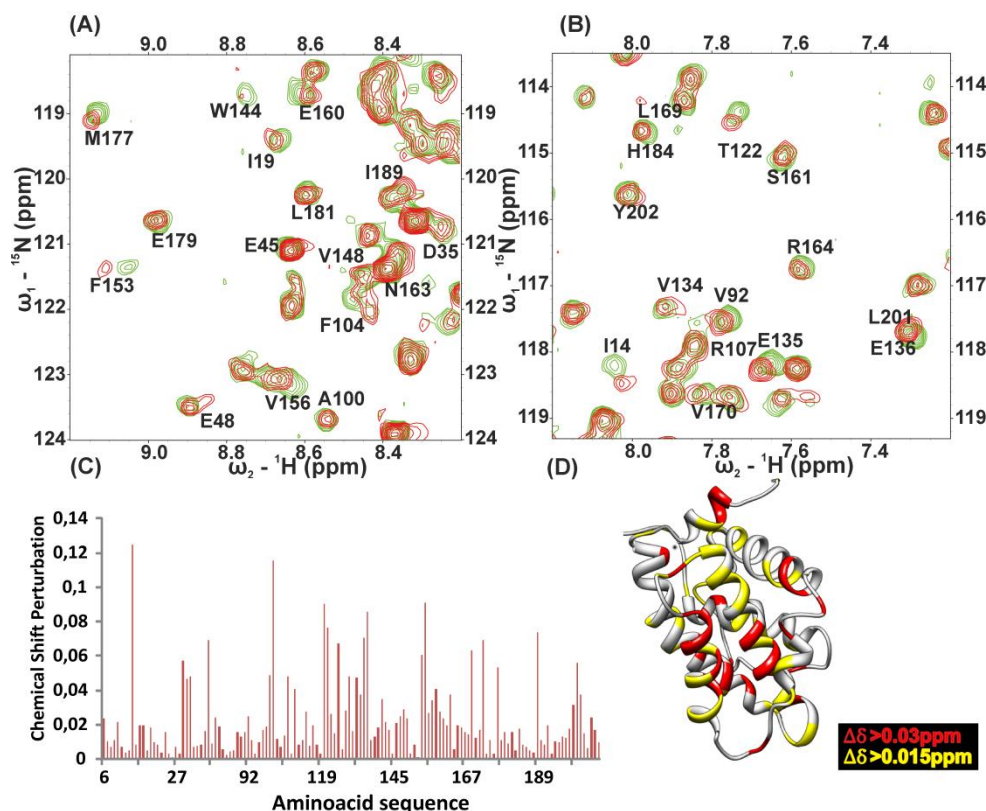
4.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL με τη χρήση μεταβολών χημικών μετατοπίσεων αμινοξέων με φασματοσκοπία NMR ^1H - ^{15}N HSQC και θεωρητικούς υπολογισμούς πρόσδεσης.

Περαιτέρω μελέτη της άμεσης αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, πραγματοποιήθηκε με λήψη φασμάτων 2D NMR ^1H - ^{15}N HSQC με σκοπό την χαρτογράφηση των διεπιφανειών υποκαταστάτη-πρωτεΐνης που εμπλέκονται στην πρόσδεση. Τα πειράματα NMR μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων επιβεβαίωσαν περαιτέρω την άμεση αλληλεπίδραση της κερσετίνης με μια ειδική διεπιφάνεια τόσο της Bcl-2 όσο και της Bcl-xL. Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων επιλεγμένων αμινοξέων παρουσιάζονται στην Εικόνες 4.3.1Γ και 4.3.2Γ για τις Bcl-2 και Bcl-xL, αντίστοιχα.

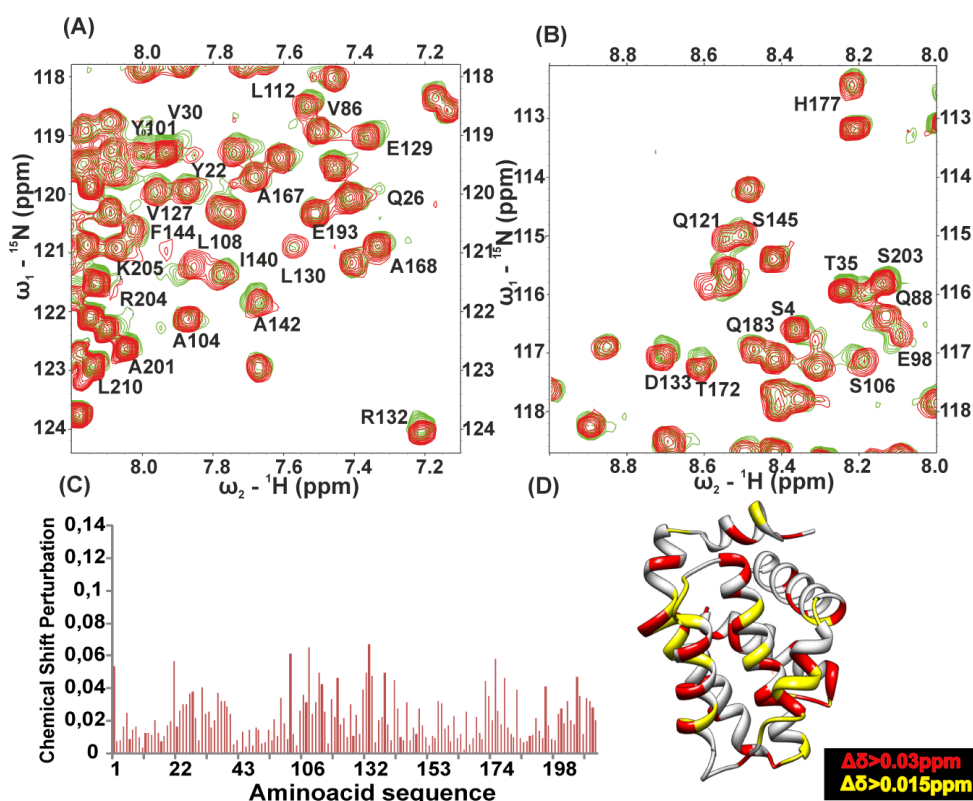
Τα αμινοξέα που παρουσίασαν τιμές $0.015 < \Delta\text{CS} < 0.03$ ppm χαρτογραφήθηκαν επί της δομής της πρωτεΐνης (Εικόνες 4.3.1Δ & 4.3.2Δ) σε κίτρινο και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα (όπου $\Delta\text{CS} = [(\Delta^1\text{H})^2 + 0.2(\Delta^{15}\text{N})^2]^{0.5}$, όπου $\Delta^1\text{H}$ και $\Delta^{15}\text{N}$ αντιπροσωπεύουν τις αλλαγές των χημικών μετατοπίσεων στις διαστάσεις των ^1H και ^{15}N , όπως αναφέρεται και στην ενότητα 2.6 του Πειραματικού Μέρους). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα αμινοξέα τα οποία παρουσιάζουν μεταβολή της χημικής μετατόπισης μπορεί και να μην συμμετέχουν άμεσα στη διαδικασία πρόσδεσης διότι οι μεταβολές αυτές των χημικών μετατοπίσεων πιθανόν να οφείλονται σε αλλοστερικές δομικές αλλαγές [Krishnamoorthy et al., 2010]. Από τα αμινοξέα που παρουσιάζουν τιμές ΔCS πάνω από 0.02 ppm για την

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πρωτεΐνη Bcl-2, τέσσερα εντοπίζονται στον τομέα BH1, τρία στον BH2 και 13 βρέθηκαν να καλύπτουν την BH3 αύλακα δέσμευσης. Για την περίπτωση της Bcl-xL, 14 αμινοξέα εντοπίζονται επίσης στην BH3 αύλακα δέσμευσης, ενώ οχτώ και δέκα αμινοξέα αναγνωρίστηκαν για τους τομείς BH1 και BH4, αντίστοιχα. Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των αμινοξέων της Bcl-2 και της Bcl-xL με προσδεσμένη την κερσετίνη απεικονίζονται σε σύγκριση με τις ακολουθίες των αμινοξέων και οι θέσεις πρόσδεσης χαρτογραφούνται επάνω στις τρισδιάστατες δομές (Εικόνες 4.3.1Δ & 4.3.2Δ).



Εικόνα 4.3.1 Χαρτογράφηση της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης της Bcl-2 με την κερσετίνη. Α&Β. Φάσματα NMR ^1H - ^{15}N HSQC με επισημασμένη σε ^{15}N πρωτεΐνη χωρίς την προσθήκη κερσετίνης (κόκκινες κορυφές διασταύρωσης) και με την προσθήκη κερσετίνης (πράσινες κορυφές διασταύρωσης) σε αναλογία 1:1. **Γ.** Μεταβολές χημικών μετατοπίσεων των απορροφήσεων του πολυπεπτιδικού σκελετού της Bcl-2 λόγω πρόσδεσης της κερσετίνης. **Δ.** Χαρτογράφηση της θέσης πρόσδεσης της κερσετίνης στη δομή της Bcl-2. Τα αμινοξέα που δείχνουν μεταβολές χημικών μετατοπίσεων με $\Delta\text{CS} > 0.03 \text{ ppm}$ και $0.015 < \Delta\text{CS} < 0.03 \text{ ppm}$ παρουσιάζονται με κόκκινο και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα.

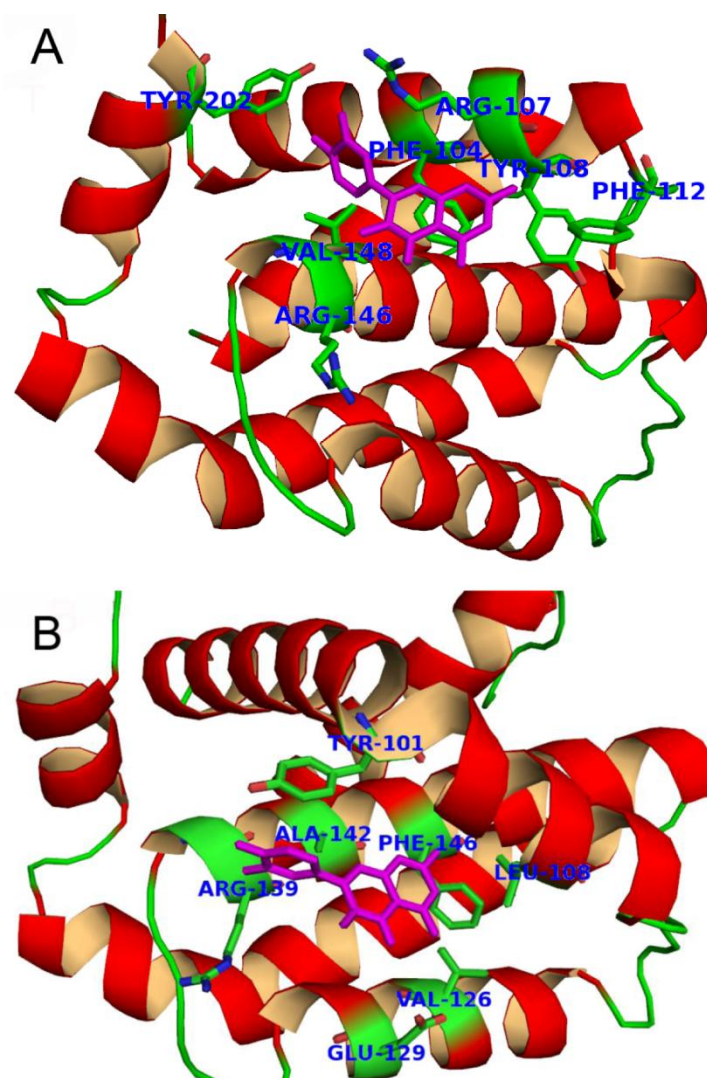


Εικόνα 4.3.2 Χαρτογράφηση της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης της Bcl-xL με την κερσετίνη. Α&Β. Φάσματα NMR ^1H - ^{15}N HSQC με επισημασμένη σε ^{15}N πρωτεΐνη χωρίς την προσθήκη κερσετίνης (κόκκινες κορυφές διασταύρωσης) και με την προσθήκη κερσετίνης (πράσινες κορυφές διασταύρωσης) σε αναλογία 1:1. **Γ.** Μεταβολές χημικών μετατοπίσεων των απορροφήσεων του πολυπεπτιδικού σκελετού της Bcl-2 λόγω πρόσδεσης της κερσετίνης. **Δ.** Χαρτογράφηση της θέσης πρόσδεσης της κερσετίνης στη δομή της Bcl-2. Τα αμινοξέα που δείχνουν μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων με $\Delta\text{CS} > 0.03$ ppm και $0.015 < \Delta\text{CS} < 0.03$ ppm παρουσιάζονται με κόκκινο και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα.

Για την περαιτέρω διευκρίνιση των δομών των πρωτεϊνικών συμπλόκων κερσετίνης-Bcl-xL και κερσετίνης-Bcl-2, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης με το υπολογιστικό πρόγραμμα Autodock-vina [Tzakos et al., 2005] χρησιμοποιώντας τη διαμόρφωση της Bcl-2 στο σύμπλοκο με το πεπτίδιο Bax BH3 (PDBid: 2XA0) και για την Bcl-xL τη διαμόρφωση του συμπλόκου με τον υποκαταστάτη ABT-737 (PDBid: 2YXJ). Στην Εικόνα 4.3.3Α&Β απεικονίζεται η βέλτιστη λύση από ένα σύνολο μοντέλων για τα δύο σύμπλοκα. Η κερσετίνη εντοπίζεται στην βαθιά υδρόφοβη κοιλότητα των δύο πρωτεϊνών δημιουργώντας ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Στην περίπτωση της Bcl-2 οι δακτύλιοι Α και Γ σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα F104, R107, Y108, F112, ενώ ο δακτύλιος Β αναπτύσσει ευνοϊκή υδρόφοβη συσσωμάτωση με τα αμινοξέα F104, V148 και βρίσκεται σε μικρή απόσταση από το Y202. Η ομάδα $-\text{OH}_3'$ του Β δακτυλίου βρίσκεται σε απόσταση δεσμού

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υδρογόνου με την παράπλευρη αλυσίδα του R107. Τα σχετικά αμινοξέα εντοπίζονται στον BH3 τομέα πρόσδεσης του συμπλόκου των προαποπτωτικών Bak/Bad πρωτεϊνών [Ku et al., 2010; Sattler et al., 1997].



Εικόνα 4.3.3 Τρισδιάστατη μοντελοποίηση (3D) του συμπλόκου της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 (A) και Bcl-xL (B). Επισημαίνεται ότι η κερσετίνη εντοπίζεται στην βαθιά υδρόφοβη κοιλότητα και στις δύο πρωτεΐνες δημιουργώντας ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Τα σχετικά αμινοξέα ανήκουν στον BH3 τομέα πρόσδεσης του συμπλόκου των προαποπτωτικών Bak/Bad πρωτεϊνών.

Στο μοντέλο πρόσδεσης της κερσετίνης στην Bcl-xL, οι δακτύλιοι B και Γ της κερσετίνης σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα F146, V126, L108, A142, ενώ η καρβόνυλο ομάδα CO(4) είναι σε γειτνίαση με την καρβοξυλική ομάδα του E129. Ο δακτύλιος B σχηματίζει αλληλεπιδράσεις συσσωμάτωσης (stacking) με το Y101 και η -OH3' ομάδα είναι επίσης σε γειτνίαση με το R139.

Παρόλο που οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα ακολουθίας στην δεσμευτική αύλακα BH3, η κερσετίνη δεσμεύεται σε ελαφρώς διακριτές περιοχές στις δύο πρωτεΐνες. Η διαφοροποίηση αυτή δικαιολογήθηκε λόγω αλλαγής του αμινοξέος L108 στην Bcl-xL στο M115 στην Bcl-2. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται έμμεσα με τα πειράματα NMR μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων λόγω πρόσδεσης, όπου βρέθηκε ΔCS 0.07 και 0.02 ppm για τις περιπτώσεις των αμινοξέων L108 και M115, αντίστοιχα.

Από τη δομική σύγκριση των συμπλόκων Bcl-xL/κερσετίνη και Bcl-xL/ABT-737 [Oltersdorf et al., 2005] προκύπτει ότι η κερσετίνη προσδένεται στην Bcl-xL με παρόμοιο τρόπο με αυτό ενός ανταγωνιστή του BH3 τομέα. Έξι από τα επτά αμινοξέα που παρουσιάζονται στη θέση πρόσδεσης της κερσετίνης με την Bcl-xL υπάρχουν επίσης και στον τομέα πρόσδεσης της κρυσταλλικής δομής της Bcl-xL με τον ABT-737. Έστι ένας πιθανός προτεινόμενος μηχανισμός βιολογικής δράσης της κερσετίνης είναι αναστολή της λειτουργίας των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2.

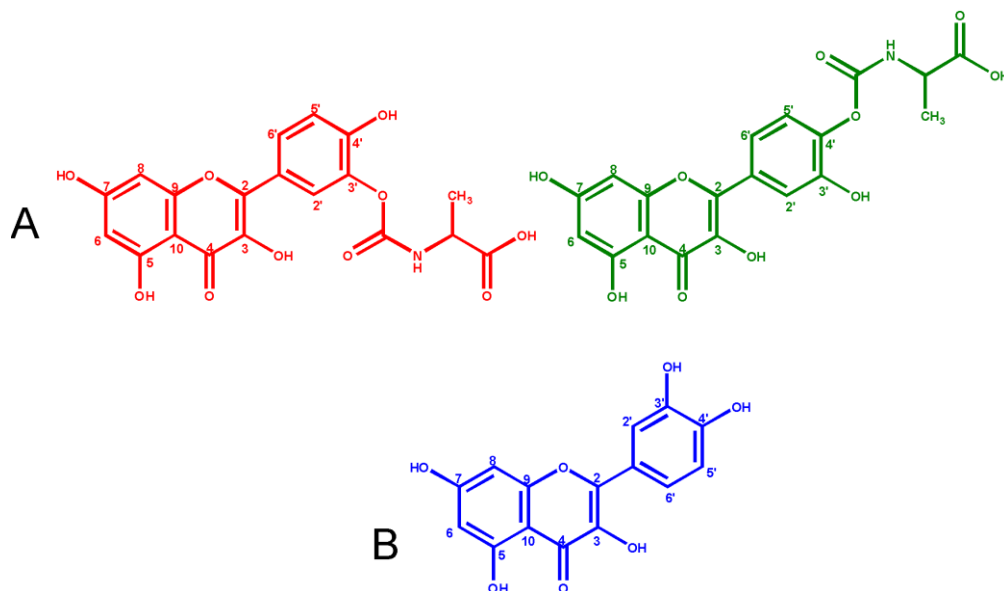
Συμπερασματικά, από ένα σύνολο πειραμάτων που περιλαμβάνουν: (α) μεθόδους ελέγχου κυτταροτοξικότητας της κερσετίνης στις T λευχαιμικές κυτταρικές σειρές Jurkat Bcl-2 και Jurkat Puro, (β) βιοχημικές μεθόδους ελέγχου της άμεσης πρόσδεσης της κερσετίνης στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, (γ) NMR πειράματα μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων λόγω πρόσδεσης καθώς και (δ) θεωρητικούς υπολογισμούς, προκύπτει το σημαντικό συμπέρασμα ότι η κερσετίνη προσδένεται άμεσα στις πρωτεΐνες αυτές στον τομέα πρόσδεσης BH3. Η ιδιότητα αυτή κατηγοριοποιεί την κερσετίνη ως ένα φυσικό φλαβονοειδές με δραστικότητα BH3 μιμητή ικανού να οδηγήσει τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση. Αυτά τα αποτελέσματα όχι μόνο εξηγούν την κυτταροτοξική δράση της κερσετίνης στα Jurkat λευχαιμικά κύτταρα αλλά πιθανόν και σε άλλες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Επίσης παρέχει και μια αρχική δομή για τη σύνθεση πιο δραστικών προαποπτωτικών αναλόγων για την θεραπεία του καρκίνου.

4.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης αμινοξικού παραγώγου της κερσετίνης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL με χρήση φασματοσκοπίας ^1H - ^{15}N HSQC και in-cell STD NMR.

Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης φαρμάκων-υποκαταστατών με υποδοχείς π.χ. πρωτεΐνες αποτελεί γνώση κλειδί για τη φαρμακευτική έρευνα. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η φασματοσκοπία NMR τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ένα πολύ ισχυρό και ευέλικτο εργαλείο στις μελέτες αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με διάφορους υποκαταστάτες λόγω σημαντικού αριθμού νέων τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Δύο από τις τεχνικές αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής με στόχο τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη με την πρωτεΐνη Bcl-2 ήταν οι τεχνικές STD και tr-NOESY (transfer NOESY).

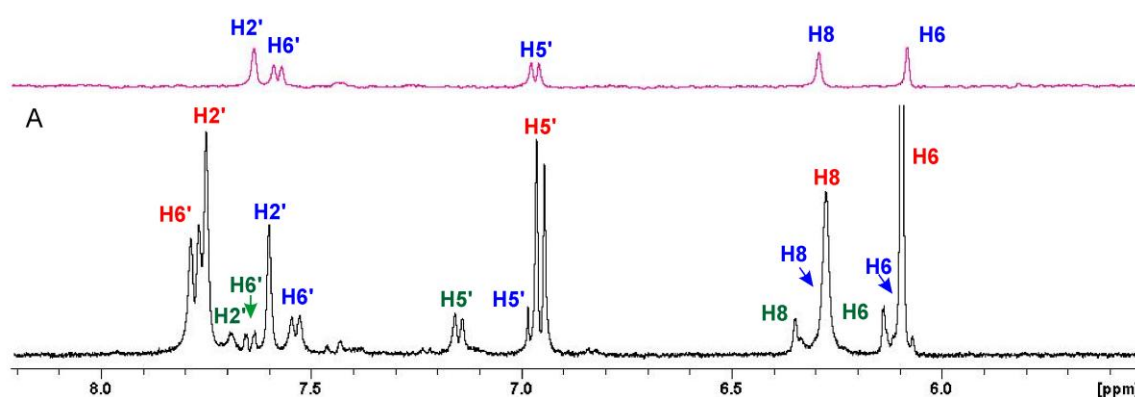
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά επιχειρήθηκε η μελέτη του μορίου της κερσετίνης, αλλά η μικρή διαλυτότητα που παρουσιάζει στο νερό έχει ως αποτέλεσμα να καθιζάνει ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις (~200μM). Συνεπώς, είναι εξαιρετικά δύσκολη η μελέτη της αλληλεπίδρασης του μορίου αυτού με την πρωτεΐνη Bcl-2 με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός αμινοξικού παραγώγου της κερσετίνης σε συνεργασία με τον Nisar Sayyad (υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων), με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας του μορίου. Το αμινοξικό παράγωγο που επιλέχτηκε ήταν το ανάλογο κερσετίνη-αλανίνη (Σχήμα 4.4.1) το οποίο σύμφωνα με την βιβλιογραφία παρουσιάζει αυξημένη υδατοδιαλυτότητα (26 περίπου φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της κερσετίνης) [Kim et al., 2009]. Από τη σύνθεση προέκυψε ένα μίγμα δύο αναλόγων της κερσετίνης και κερσετίνης ως προϊόν υδρόλυσης. Το κύριο παράγωγο φέρει την αλανίνη στη θέση 3' (Σχήμα 4.4.1 A) σε ποσοστό 71.2% και παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα στο πρωτονιακό φάσμα (Σχήμα 4.4.2 A). Ακολουθεί η κερσετίνη ως προϊόν υδρόλυσης σε ποσοστό 20.5%, ενώ το δεύτερο παράγωγο είναι αυτό που φέρει την υποκατάσταση στη θέση 4' (Σχήμα 4.4.1 B) σε ποσοστό 8.3% (πράσινο χρώμα). Στο Σχήμα 4.4.2 A παρουσιάζεται το φάσμα NMR ¹H του συνθετικού υποκαταστάτη όπου διακρίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δύο αναλόγων (κερσετίνη-αλανίνη 3' και κερσετίνη-αλανίνη 4') και της κερσετίνης, σε αντιπαράθεση με το φάσμα NMR ¹H της ελεύθερης κερσετίνης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (Σχήμα 4.4.2 B).



Σχήμα 4.4.1 Χημικές δομές των ενώσεων που προέκυψαν ως μίγμα κατά την σύνθεση του αμινοξικού παραγώγου: (A) κερσετίνη-αλανίνη 3' (κόκκινο) και κερσετίνη-αλανίνη 4' (πράσινο) και (B) της κερσετίνης (μπλε) ως προϊόν υδρόλυσης.

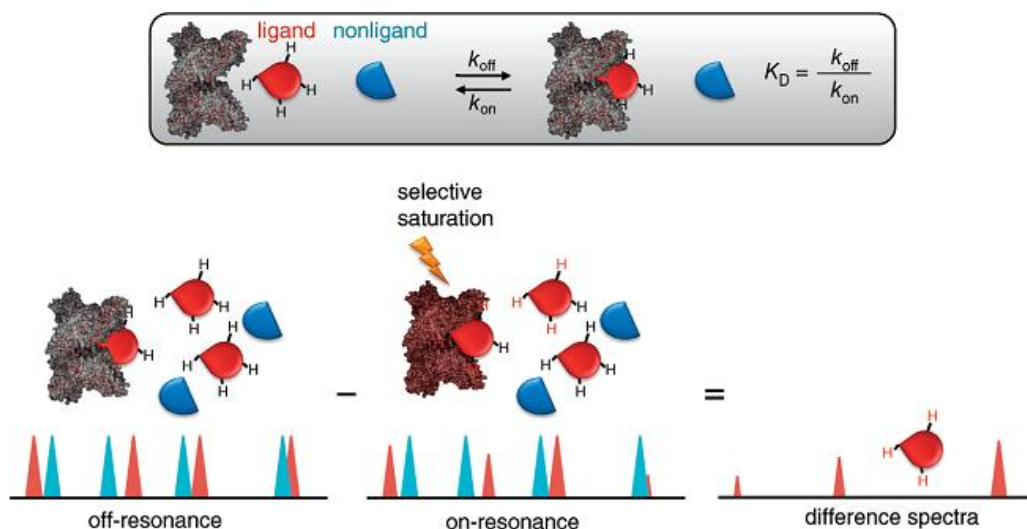
B



Σχήμα 4.4.2 Φάσματα NMR ^1H 500MHz (A) του μίγματος που προέκυψε κατά την σύνθεση κερσετίνη-αλανίνη 3' (κόκκινο), κερσετίνη-αλανίνη 4' (πράσινο) (2mM) και οι χημικές μετατοπίσεις της κερσετίνης (προϊόν υδρόλυσης του συνθετικού παραγώγου) (μπλε) (100μM) και (T=310K, pH=7, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, t_{aq} =6.55s) (B) της ελεύθερης κερσετίνης σε ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (T=310K, pH=7, αριθμός παλμών=64, πειραματικός χρόνος=10min, t_{aq} =6.55s).

Η φασματοσκοπία STD NMR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων τύπων μορίων, όπως μεταβολιτών, φαρμάκων με υποδοχείς πρόσδεσης όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Μία πολύ σημαντική εφαρμογή του STD NMR είναι η χαρτογράφηση του επίτοπου πρόσδεσης του μορίου-υποκαταστάτη, της περιοχής δηλαδή του μορίου που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση. Η τεχνική αυτή, συνεπώς, διευκολύνει το χαρακτηρισμό σε ατομικό επίπεδο των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης υποκαταστατών-υποδοχέων. Επίσης, με την μέθοδο αυτή είναι δυνατό να προσδιοριστεί και η σταθερά διάστασης. Η μεθοδολογία αυτή όπως έχουμε αναφέρει στηρίζεται στη μεταφορά κορεσμού (saturation) μαγνήτισης από την πρωτεΐνη στον προσδεδεμένο υποκαταστάτη ο οποίος, λόγω ανταλλαγής, απελευθερώνεται στο διάλυμα όπου και εντοπίζεται. Ο βαθμός κορεσμού των μεμονωμένων πρωτονίων του υποκαταστάτη (που εκφράζεται ως απόλυτο-STD ποσοστό) και κατά συνέπεια η ένταση των αντίστοιχων σημάτων αντανάκλα την εγγύτητά τους στην πρωτεϊνική επιφάνεια και μπορεί έτσι να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων υποκαταστάτη-στόχου (Εικόνα 4.4.1).

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

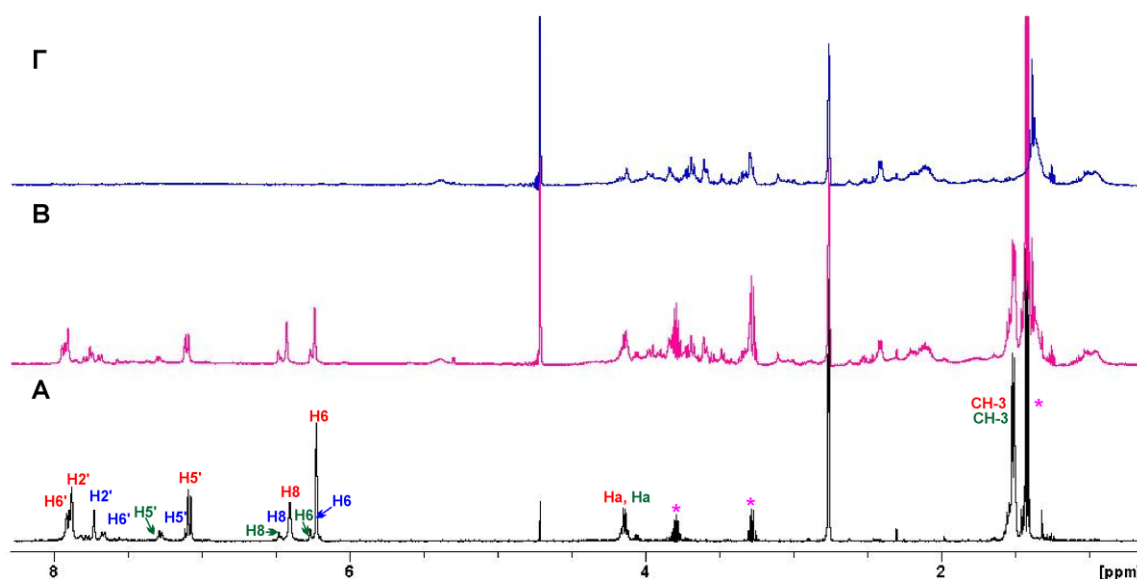


Εικόνα 4.4.1 Σχηματική παράσταση του πειράματος STD NMR. Η ανταλλαγή ανάμεσα σε ελεύθερο και δεσμευμένο υποκαταστάτη επιτρέπει την διαμοριακή μεταφορά μαγνήτισης κορεσμού από τον υποδοχέα σε προσδεδεδεμένα μικρά μόρια. Το μέγεθος της κορυφής στο φάσμα διαφοράς αντανakλά το βαθμό κορεσμού του αντίστοιχου πρωτονίου του υποκαταστάτη και συνεπώς το βαθμό αλληλεπίδρασής του με τον υποδοχέα [Viegas et al., 2011].

Η πρώτη σειρά των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Δρ. G. Musco (San Raffaele Ινστιτούτο, Εργαστήριο Biomolecular NMR, Μιλάνο) όπου και πραγματοποιήθηκε η αρχική εκπαίδευση στη μελέτη αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με την πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα Jurkat Bcl-2. Η κυτταρική αυτή σειρά όπως έχει αναφερθεί υπερεκφράζει την πρωτεΐνη Bcl-2 η οποία είναι μια μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη και η αλληλεπίδραση μελετήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας in-cell STD και trNOESY NMR. Το γεγονός ότι η Bcl-2 είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης με φασματοσκοπία NMR καθώς, όπως έχει αναφερθεί, μέχρι στιγμής η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία μόνο σε πρωτεΐνες-υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης.

Όλα τα φάσματα ελήφθησαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7, σε δευτεριωμένο διαλύτη D_2O παρουσία 4% $DMSO-d_6$ για την καλύτερη διαλυτότητα του υποκαταστάτη. Στο Σχήμα 4.5.3 παρουσιάζονται τα πρωτονιακά φάσματα του ελεύθερου υποκαταστάτη (Α), των κυττάρων (Β) και των κυττάρων παρουσία του υποκαταστάτη (Γ). Στο φάσμα των κυττάρων (Σχήμα 4.4.3 Β) παρατηρούμε αρκετές διευρυμένες κορυφές που οφείλονται στην παρουσία των ευκίνητων λιπιδίων [Mari et al., 2010]. Στο φάσμα 1D 1H NMR των κυττάρων παρουσία του αναλόγου τα σήματα είναι ιδιαίτερα διευρυμένα ενώ στην περιοχή από 0.5 έως 4.5 ppm περίπου ο συνωστισμός των σημάτων είναι ιδιαίτερα έντονος καθιστώντας αδύνατο το διαχωρισμό και την περαιτέρω μελέτη της περιοχής με πρωτονιακή φασματοσκοπία (Σχήμα 4.4.3 Γ). Έτσι στη συνέχεια εφαρμόστηκε η

φασματοσκοπία STD NMR για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της κερσετίνης-αλανίνης 3' με την πρωτεΐνη-στόχο (Bcl-2).



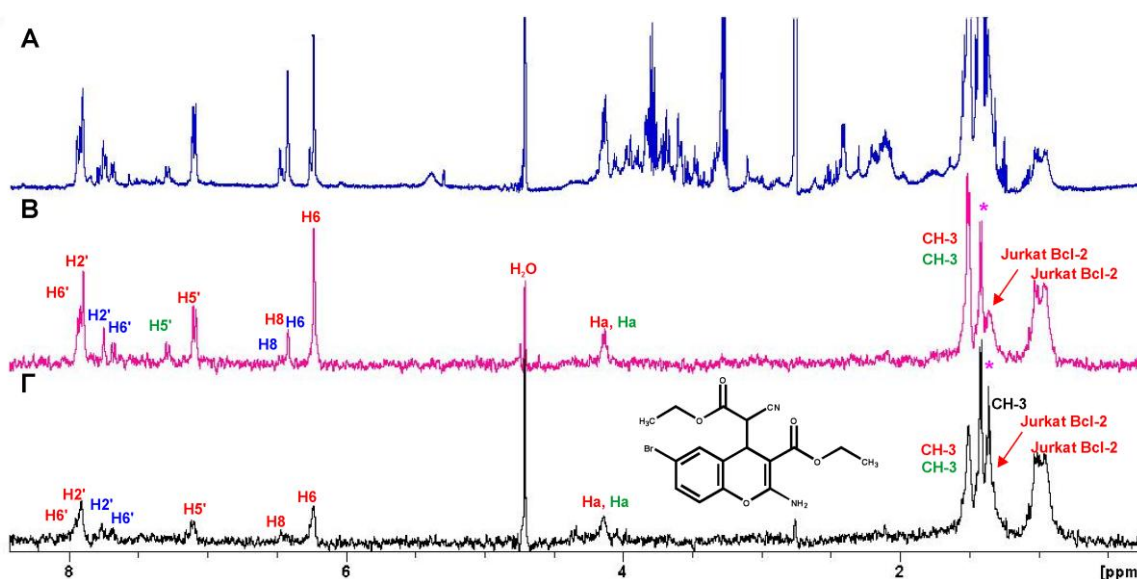
Σχήμα 4.4.3 Φάσματα NMR ^1H 500MHz (T=310K, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, t_{aq} =6.55s,) (A) του μίγματος (2mM) που προέκυψε από την σύνθεση του αμινοξικού αναλόγου, κερσετίνη-αλανίνη 3' (κόκκινο), κερσετίνη-αλανίνη 4' (πράσινο) και η κερσετίνη ως προϊόν υδρόλυσης (μπλε), (B) των κυττάρων Jurkat Bcl-2 παρουσία του συνθετικού μίγματος και Γ. των κυττάρων Jurkat Bcl-2. Με αστερίσκο (*) υποδηλώνονται τα παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την συνθετική πορεία.

Με τη φασματοσκοπία STD NMR μπορούμε καταρχήν να διακρίνουμε αν το συνθετικό ανάλογο κερσετίνη-αλανίνη και η κερσετίνη ως προϊόν υδρόλυσης αλληλεπιδρούν με υποδοχείς και ποια είναι τα πρωτόνια που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις αυτές. Στο φάσμα STD (Σχήματα 4.4.4B και 4.4.5B) που αποτελεί το φάσμα διαφοράς μεταξύ των εντός και εκτός συντονισμού φασμάτων παρατηρούμε ότι όλα τα πρωτόνια της κερσετίνης-αλανίνης 3' αλληλεπιδρούν με διάφορους υποδοχείς στο εσωτερικό των κυττάρων, ενώ για την κερσετίνη-αλανίνη 4' και την κερσετίνη που επίσης αλληλεπιδρούν με υποδοχείς παρατηρούμε ορισμένα μόνο πρωτόνια να δίνουν STD σήμα πιθανόν λόγω της ελαττωμένης τους συγκέντρωσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην περιοχή των 3 έως 4 ppm απουσιάζουν τα πρωτόνια των παραπροϊόντων που προέκυψαν κατά την σύνθεση, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία αλληλεπίδρασης των πρωτονίων τους αυτών με υποδοχείς. Στο Σχήμα 4.4.6 Γ παρουσιάζεται η περιοχή των μεθυλικών πρωτονίων από όπου και προκύπτει ότι και τα μεθυλικά πρωτόνια των δύο αναλόγων συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με διάφορους υποδοχείς. Επιπρόσθετα, τα μεθυλικά πρωτόνια των παραπροϊόντων της σύνθεσης φαίνεται να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό από των

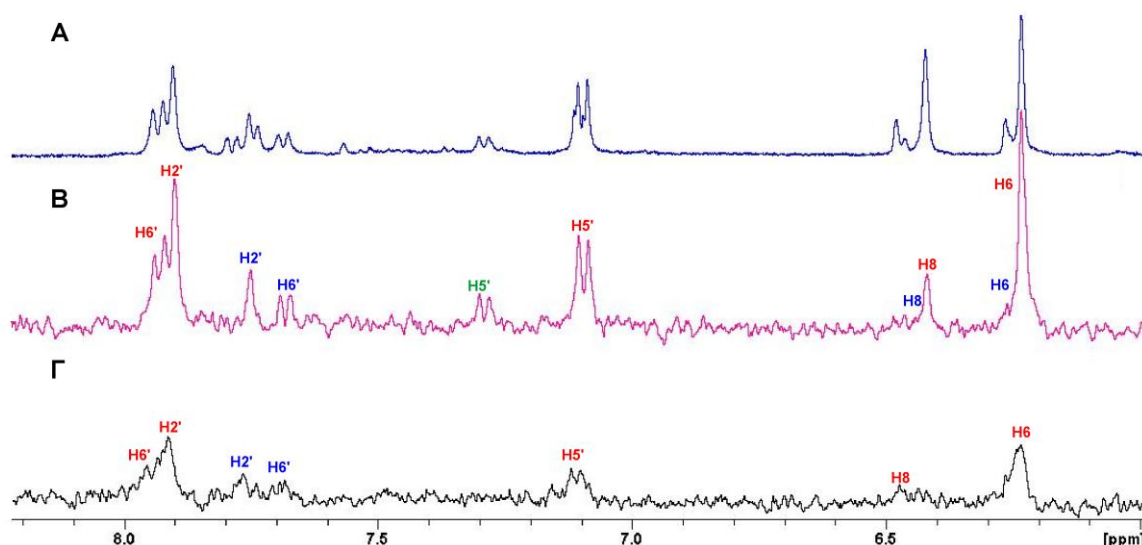
ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συνθετικών αναλόγων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η ένταση του STD σήματος των παραπροϊόντων στην περιοχή αυτή είναι σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με τα μεθυλικά πρωτόνια των αναλόγων.

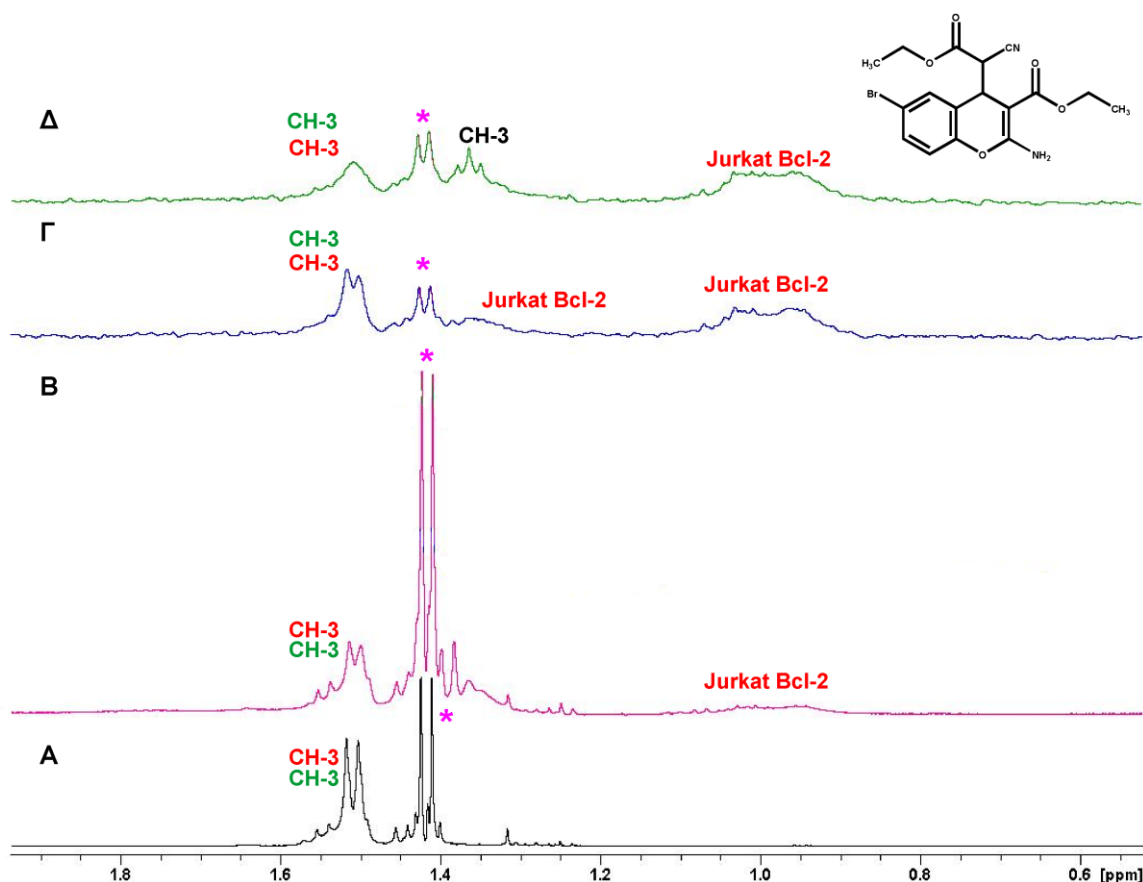
Παρά το γεγονός ότι ο υποκαταστάτης κερσετίνη-αλανίνη και η κερσετίνη εισέρχονται στα κύτταρα και αλληλεπιδρούν με υποδοχείς είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν με οποιοδήποτε υποδοχέα-πρωτεΐνη που μπορεί να βρίσκεται σε οποιοδήποτε κυτταρικό διαμέρισμα. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη με βάση το προηγούμενο πείραμα την εκτίμηση της πιθανής αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη στόχο Bcl-2 που μας ενδιαφέρει.



Σχήμα 4.4.4 Πειράματα NMR 500MHz μελέτης αλληλεπίδρασης του μίγματος (2mM) που προέκυψε από την σύνθεση του αμινοξικού αναλόγου κερσετίνης-αλανίνης με τη κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2. (Α) Φάσμα NMR ^1H του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 ($T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, $t_{\text{aq}}=6.55\text{s}$), (Β) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 (εντός συντονισμού=0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$ αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). (Γ) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 παρουσία του επιλεκτικού αναστολέα HA14-1 (μαύρο) (2mM). Στα 0.97 και 1.35 ppm εμφανίζεται υπολειπόμενο σήμα από το φάσμα των κυττάρων (εντός συντονισμού=0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). Με αστερίσκο (*) υποδηλώνονται τα παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την συνθετική πορεία.



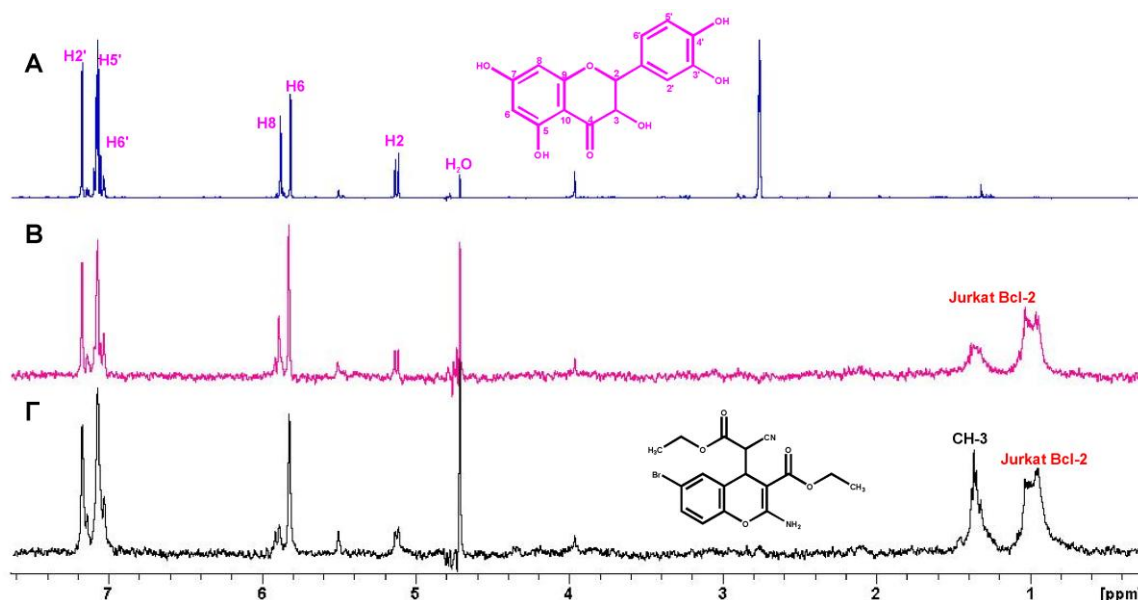
Σχήμα 4.4.5 Πειράματα NMR 500MHz μελέτης αλληλεπίδρασης του μίγματος (2mM) που προέκυψε από την σύνθεση του αμινοξικού αναλόγου κερσετίνης-αλανίνης με τη κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 όπου παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. (Α) Φάσμα NMR ^1H του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 ($T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, $t_{aq}=6.55\text{s}$), (Β) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 (εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$ αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). (Γ) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος και της κυτταρικής σειράς Jurkat Bcl-2 παρουσία του επιλεκτικού αναστολέα HA14-1 (μαύρο) (2mM). Στα 0.97 και 1.35 ppm εμφανίζεται υπολειπόμενο σήμα από το φάσμα των κυττάρων (εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). Με αστερίσκο (*) υποδηλώνονται τα παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την συνθετική πορεία.



Σχήμα 4.4.6 Πειράματα NMR 500MHz αλληλεπίδρασης του μίγματος που προέκυψε από την σύνθεση του αμινοξικού αναλόγου κερσετίνης-αλανίνης (2mM) με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 όπου παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή των μεθυλικών πρωτονίων. (Α) Φάσμα NMR ^1H του συνθετικού μίγματος ($T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, $t_{\text{aq}}=6.55\text{s}$). (Β) Φάσμα NMR ^1H του συνθετικού μίγματος με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 ($T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, $t_{\text{aq}}=6.55\text{s}$). (Γ) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος με την κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2 (εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). (Δ) Φάσμα STD διαφοράς του συνθετικού μίγματος με την κυτταρική σειρά παρουσία του επιλεκτικού αναστολέα HA14-1 (μαύρο) (2mM). Στα 0.97 και 1.35 ppm εμφανίζονται υπολειπόμενα σήματα από το φάσμα των κυττάρων εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, $T=310\text{K}$, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). Με αστερίσκο (*) υποδηλώνονται τα παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την συνθετική πορεία.

Για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της άμεσης αλληλεπίδρασης του αναλόγου και της κερσετίνης με την πρωτεΐνη στόχο Bcl-2 κρίθηκε απαραίτητη η χρήση θετικού και αρνητικού κοντρόλ. Έτσι, αρχικά λήφθηκε φάσμα STD του μίγματος και της ένωσης HA14-1 (Σχήματα 4.4.4Γ και 4.4.5Γ), γνωστή από τη βιβλιογραφία ως επιλεκτικός αναστολέας της Bcl-2 με τιμή $\text{IC}_{50}=9 \mu\text{M}$ [Wang et al., 2000]. Ο αναστολέας HA14-1

χρησιμοποιήθηκε ως θετικό κοντρόλ, παρουσία των Jurkat Bcl-2. Στο Σχήμα 4.4.4 Γ παρατηρούμε ότι παρουσία του επιλεκτικού αναστολέα τα σήματα στο φάσμα STD διαφοράς του αναλόγου και της κερσετίνης ελαττώθηκαν σημαντικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο επιλεκτικός αναστολέας απομακρύνει τα ήδη προσδεσμένα μόρια από το σύμπλοκο κερσετίνη-αλανίνη-Bcl-2 και κερσετίνη-Bcl-2 λόγω μεγαλύτερης συγγένειας πρόσδεσης και η μαγνήτιση που μεταφέρεται πλέον από τον υποδοχέα στο ανάλογο είναι πολύ μικρότερη. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μια έμμεση αλλά ισχυρή ένδειξη της άμεσης αλληλεπίδρασης του αμινοξικού αναλόγου με την Bcl-2 όπως επίσης και της κερσετίνης. Επίσης, ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι τα παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την σύνθεση δεν αλληλεπιδρούν με την Bcl-2 καθώς δεν παρατηρείται ελάττωση των STD σημάτων των μεθυλικών τους πρωτονίων (4.4.6 Δ) κατά την προσθήκη του HA14-1. Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικό κοντρόλ για την αλληλεπίδραση με την Bcl-2.

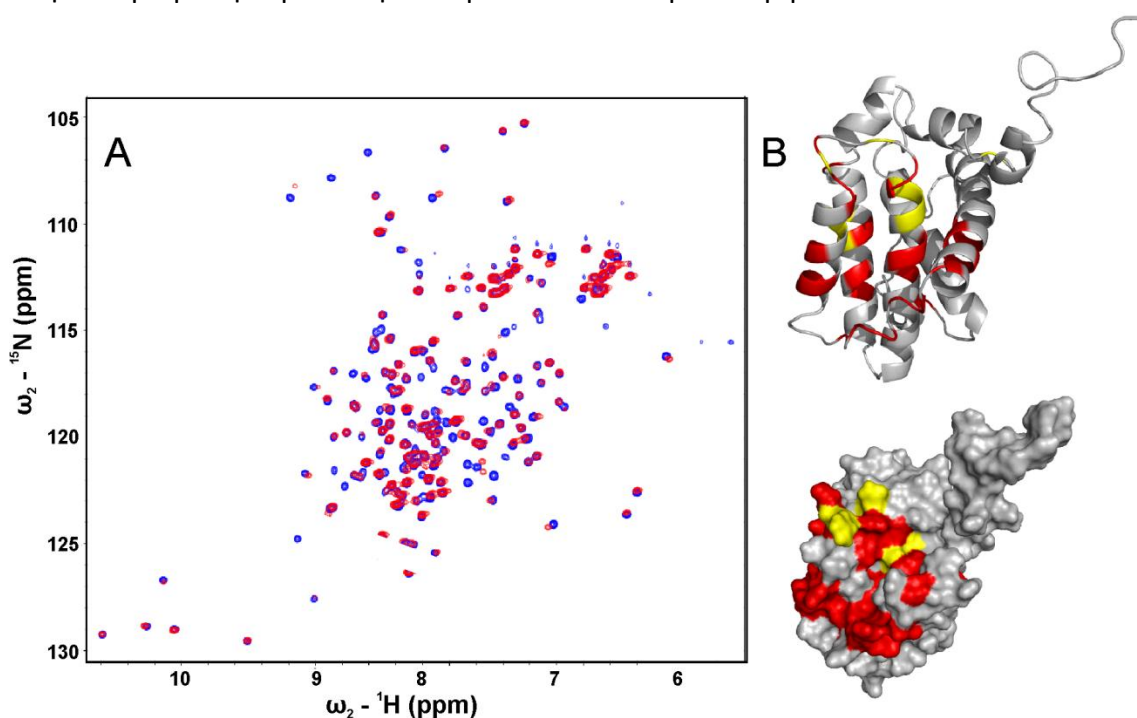


Σχήμα 4.4.7 Πειράματα NMR 500MHz αλληλεπίδρασης της ταξιφολίνης (2mM) με τη κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2. (Α) Φάσμα NMR ^1H της ταξιφολίνης, (T=310K, αριθμός παλμών=32, πειραματικός χρόνος=5min, t_{aq} =6.55s) (Β) Φάσμα STD διαφοράς του διαλύματος ταξιφολίνη και Jurkat Bcl-2 (εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, T=310K, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min). (Γ) Φάσμα STD διαφοράς του μίγματος ταξιφολίνης, επιλεκτικού αναστολέα HA14-1 (2mM) και Jurkat Bcl-2. Στα 0.97 και 1.35 ppm εμφανίζεται υπολειπόμενο σήμα από το φάσμα των κυττάρων (εντός συντονισμού =0.98 ppm και εκτός συντονισμού=400 ppm, χρόνος κορεσμού (saturation time)=2s, T=310K, αριθμός παλμών=128, πειραματικός χρόνος=1h20min).

Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος αυτού πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα STD με χρήση ενός αρνητικού κοντρόλ, της ταξιφολίνης (Σχήμα 4.4.7). Όπως

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

έχει ήδη αναφερθεί είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ταξιφολίνη δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, υπόθεση η οποία επιβεβαιώθηκε και από τα πειράματα pull down όπως παρουσιάζονται στην Ενότητα 4.3. Στο φάσμα STD διαφοράς (Σχήμα 4.4.7 Β) παρατηρούμε ότι τα πρωτόνια της ταξιφολίνης αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες καθώς εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Όλα τα πρωτόνια της ταξιφολίνης συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με εξαίρεση τα πρωτόνια της θέσης 3 για τα οποία δε μπορούμε να καταλήξουμε σε συμπέρασμα καθώς αλληλεπικαλύπτονται με την κορυφή του H₂O στα 4.7 ppm. Στη συνέχεια με την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας του επιλεκτικού αναστολέα της Bcl-2 στο μίγμα (Σχήμα 4.4.7 Γ) παρατηρείται ότι δεν επήλθε ελάττωση της έντασης των σημάτων της ταξιφολίνης. Η ταξιφολίνη δεν αλληλεπιδρά με την Bcl-2 και συνεπώς η προσθήκη του αναστολέα HA14-1 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της ταξιφολίνης με τους υπόλοιπους υποδοχείς. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση ότι το συνθετικό ανάλογο κερσετίνης-αλανίνης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bcl-2 μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον.



Εικόνα 4.4.2 Χαρτογράφηση της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης της Bcl-xL με την κερσετίνη-αλανίνη 3' με τη χρήση NMR. (Α) Φάσμα 800MHz NMR ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC με επισημασμένη σε ${}^{15}\text{N}$ πρωτεΐνη χωρίς την προσθήκη κερσετίνης-αλανίνης 3' (κόκκινες κορυφές διασταύρωσης) και με την προσθήκη κερσετίνης-αλανίνης 3' (μπλε κορυφές διασταύρωσης) σε αναλογία 1:1. Β. Χαρτογράφηση της θέσης πρόσδεσης της κερσετίνης-αλανίνης στη δομή της Bcl-xL. Οι τιμές ΔCS υπολογίστηκαν με την χρήση της εξίσωσης $\Delta\text{CS} = [(\Delta{}^1\text{H})^2 + 0.2(\Delta{}^{15}\text{N})^2]^{0.5}$. Τα αμινοξέα που δείχνουν μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων με $\Delta\text{CS} > 0.03$ ppm και $0.015 < \Delta\text{CS} < 0.03$ ppm παρουσιάζονται με κόκκινο και κίτρινο χρώμα, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η άμεση αλληλεπίδραση του συνθετικού αναλόγου με την Bcl-xL πρωτεΐνη με τη χρήση φασματοσκοπίας ^1H - ^{15}N HSQC με σκοπό την χαρτογράφηση των διεπιφανειών υποκαταστάτη-πρωτεΐνης που εμπλέκονται στην πρόσδεση. Τα πειράματα NMR μεταβολής χημικών μετατοπίσεων (Εικόνα 4.4.2) επιβεβαίωσαν περαιτέρω την άμεση αλληλεπίδραση του αναλόγου και μιας ειδικής διεπιφάνειας της Bcl-xL. Τα αμινοξέα που παρουσίασαν μεταβολές χημικών μετατοπίσεων ΔCS τιμές πάνω από 0.015 και 0.03 ppm χαρτογραφήθηκαν στη δομή της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.4.2 Β) σε κίτρινο και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. Το ανάλογο συμπλέκεται στην ίδια θέση με το σύμπλοκο κερσετίνη-πρωτεΐνη λειτουργώντας, συνεπώς, ως ένας μιμητής BH3.

4.5 Μελέτη αλληλεπίδρασης αμινοξικού παραγώγου της κερσετίνης με την πρωτεΐνη Bcl-2 με τη χρήση φασματοσκοπίας TR-NOESY in-cell NMR.

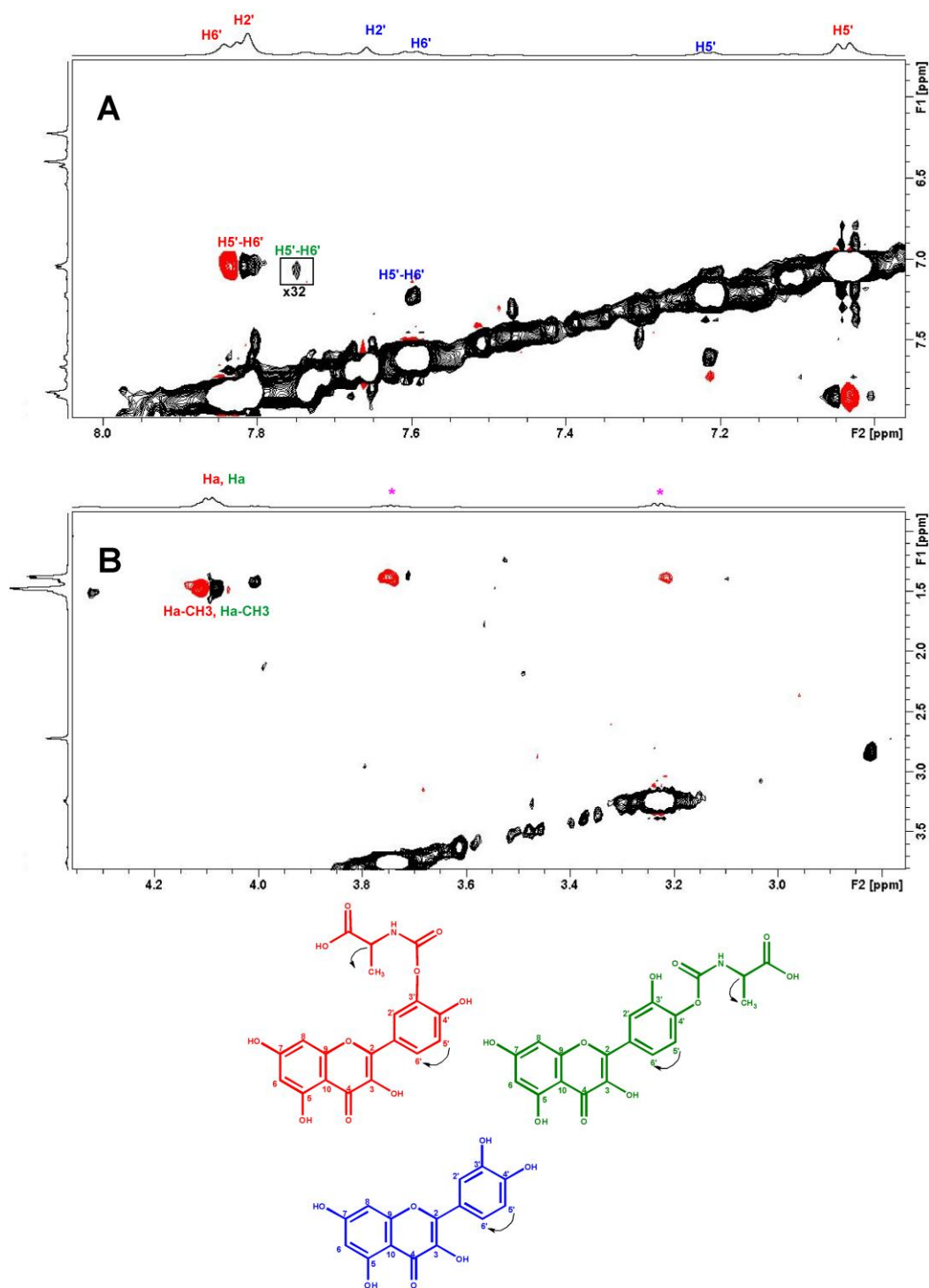
Το επόμενο ερώτημα που προκύπτει μετά την επιβεβαίωση της υπόθεσης της άμεσης αλληλεπίδρασης του συνθετικού αναλόγου κερσετίνης-αλανίνης με την πρωτεΐνη Bcl-2 εντός των κυττάρων είναι εάν η διαμόρφωση του υποκαταστάτη αλλάζει κατά την πρόσδεση στην Bcl-2 και ποια είναι η πιθανή νέα διαμόρφωση. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό μπορεί να δοθεί με τη χρήση φασματοσκοπίας in-cell trNOESY NMR.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί όταν τα μόρια του υποκαταστάτη συμπλέκονται σε πρωτεΐνες υποδοχείς οι αλληλεπιδράσεις NOE (NOE effects) υπόκεινται σε δραστικές αλλαγές που οδηγούν στην δυνατότητα παρατήρησης των NOE μεταφοράς (transfer NOEs). Η παρατήρηση των trNOE έγκειται στη διαφορετική συμπεριφορά ενός μορίου μικρού μοριακού βάρους (MB) και ελεύθερου στο διάλυμα σε σχέση με το ίδιο μόριο όταν είναι προσδεδεμένο σε μία πρωτεΐνη-υποδοχέα. Ένας υποκαταστάτης μικρού MB ελεύθερου στο διάλυμα παρουσιάζει συνήθως θετικά σήματα NOE τα οποία βρίσκονται στην αντίθετη φάση ως προς τη διαγώνιο του φάσματος λόγω της γρήγορης περιστροφής του μορίου και του μικρού χρόνου συσχέτισης. Ο προσδεδεμένος υποκαταστάτης σε μια πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους συμπεριφέρεται ως ένα μέρος του μεγάλου αυτού μορίου και υιοθετεί την αντίστοιχη συμπεριφορά NOE. Προκύπτουν συνεπώς ισχυρά αρνητικά NOEs τα οποία βρίσκονται στην ίδια φάση με την διαγώνιο του φάσματος, τα αποκαλούμενα trNOE (Σχήμα 3.1.6.1). Αυτά τα trNOE αντανakλούν τη διαμόρφωση του προσδεδεμένου υποκαταστάτη. Έτσι, η πρόσδεση ενός υποκαταστάτη σε μία πρωτεΐνη υποδοχέα μπορεί εύκολα να γίνει διακριτή από το σήμα και του μέγεθος των παρατηρούμενων NOE [Guzzetti et al., 2013].

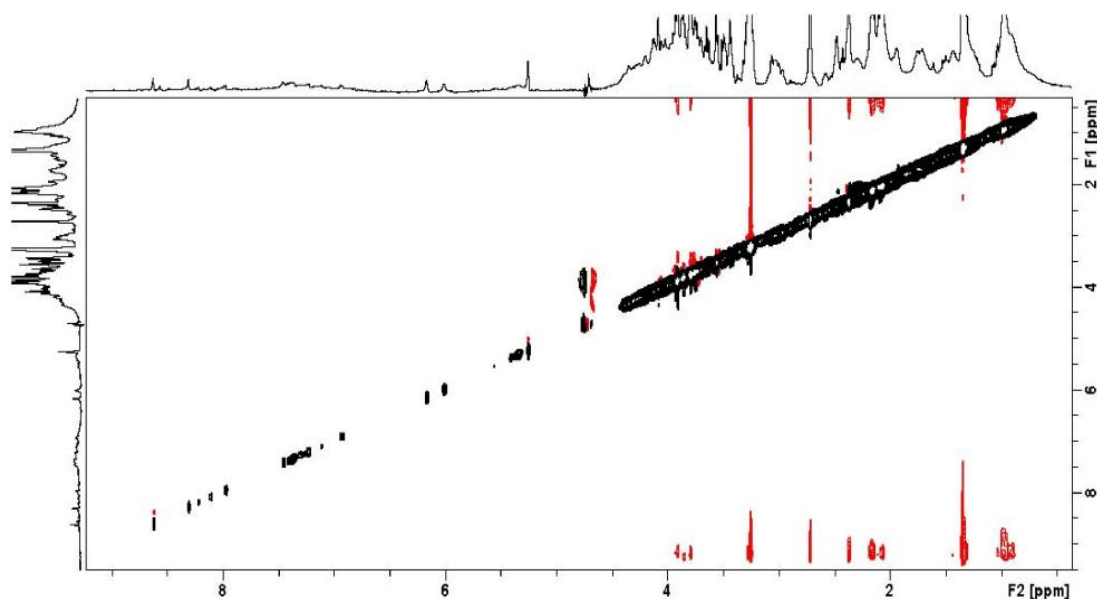
Στο φάσμα NOESY του ελεύθερου υποκαταστάτη παρατηρούμε ότι οι κορυφές διασταύρωσης NOEs βρίσκονται κυρίως στην αντίθετη φάση ως προς τη διαγώνιο. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, αυτό είναι αναμενόμενο σε περιπτώσεις μορίων μικρού MB και ελεύθερων στο διάλυμα στα οποία ο χρόνος συσχέτισης είναι μικρός (Σχήμα 4.5.1). Θα

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι παρατηρούμε και κορυφές διασταύρωσης να παρουσιάζουν θετική και αρνητική φάση γεγονός που οφείλεται στο ότι τα NOEs είναι μηδενικής έντασης τόσο για χρόνο ανάμιξης 600ms όσο και για 100ms. Ο χρόνος ανάμιξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν $d_8=100\text{ms}$ και ο λόγος είναι ότι το φάσμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με το αντίστοιχο του υποκαταστάτη που θα ληφθεί παρουσία των κυττάρων που στην περίπτωση αυτή είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι χρησιμοποιούνται μικρότεροι χρόνοι ανάμιξης NOE ($\sim 100\text{ms}$) σε σχέση με τα μόρια μικρού MB.

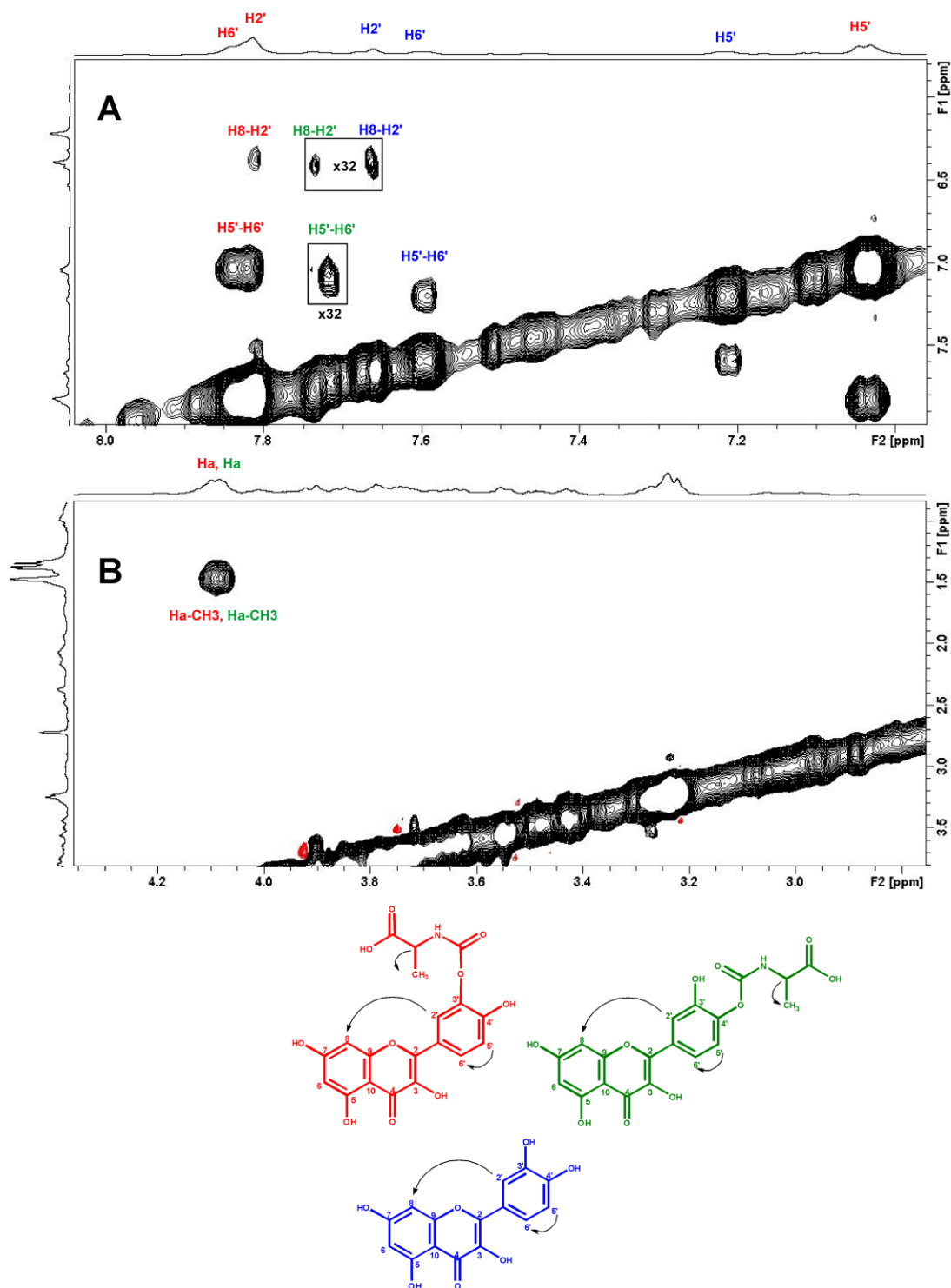


Σχήμα 4.5.1 Επιλεγμένες περιοχές φάσματος NOESY NMR 600 MHz του συνθετικού μίγματος κερσετίνης-αλανίνης 3', κερσετίνης-αλανίνης 4' και της κερσετίνης (προϊόν υδρόλυσης) (T=310K, αριθμός παλμών=32, πειραματικό χρόνος=2h14min, d8=100ms). Διακρίνεται (A) η αρωματική περιοχή και (B) η περιοχή όπου παρατηρούμε κορυφές διασταύρωσης μεταξύ των Ha και των μεθυλικών πρωτονίων. Σε μεγέθυνση (x32) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες κορυφές διασταύρωσης του αναλόγου κερσετίνη-αλανίνη 4'.



Σχήμα 4.5.2 Επιλεγμένες περιοχές φάσματος NOESY NMR 600 MHz των καρκινικών κυττάρων Jurkat Bcl-2 (T=310K, αριθμός παλμών=32, πειραματικό χρόνος=2h14min, d8=100ms).

Στη συνέχεια λήφθηκαν τα αντίστοιχα φάσματα υπό τις ίδιες συνθήκες μόνο των καρκινικών κυττάρων Jurkat Bcl-2 (Σχήμα 4.5.2) και το tr-NOESY φάσμα των κυττάρων Jurkat Bcl-2 παρουσία του υποκαταστάτη στο οποίο παρατηρούμε την αλλαγή φάσης των κορυφών διασταύρωσης του υποκαταστάτη (Σχήμα 4.5.3) σε σχέση με το Σχήμα 4.5.1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο προσδεδμενός υποκαταστάτης συμπεριφέρεται πλέον ως ένα μέρος του μεγάλου αυτού μορίου και υιοθετεί την αντίστοιχη NOE συμπεριφορά με μεγάλο χρόνο συσχέτισης. Συνεπώς παρατηρούνται ισχυρά αρνητικά NOEs της ίδιας φάσης με τη διαγώνιο του φάσματος. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο φάσμα tr-NOESY παρατηρείται και μία νέα κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων H8 και H2' του αναλόγου, η οποία δεν υπάρχει στο φάσμα του ελεύθερου υποκαταστάτη. Συνεπώς, η διαμόρφωση του μορίου αλλάζει όταν προσδένεται στον υποδοχέα και ο προσανατολισμός του δακτυλίου Γ είναι όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.5.3. Προφανώς το πρωτόνιο H-8 και H-2' βρίσκονται στην ίδια πλευρά με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μια νέα tr-NOE κορυφή διασταύρωσης.

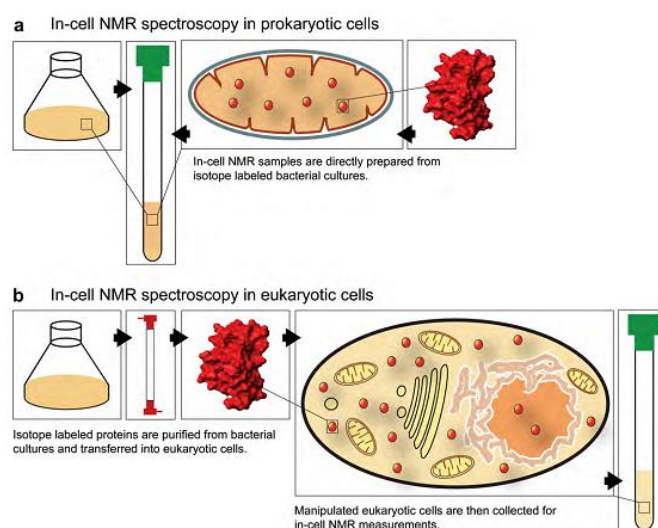


Σχήμα 4.5.3 Επιλεγμένες περιοχές φάσματος NOESY NMR 600 MHz των καρκινικών κυττάρων Jurkat Bcl-2 παρουσία του συνθετικού μίγματος (T=310K, αριθμός παλμών=32, πειραματικό χρόνος=2h14min, d8=100ms). Διακρίνεται (A) η αρωματική περιοχή των αναλόγων και (B) η περιοχή όπου παρατηρούμε κορυφές διασταύρωσης μεταξύ των Ha και των μεθυλικών πρωτονίων. Σε μεγέθυνση (x32) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες κορυφές διασταύρωσης του αναλόγου κερσετίνη-αλανίνη 4' και της κερσετίνης (προϊόν υδρόλυσης).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε διάφορες κρυσταλλικές δομές της κερσετίνης σε σύμπλεξη με πρωτεϊνικούς υποδοχείς που μελετήθηκαν, ο δακτύλιος B μπορεί να παρουσιάζει προσανατολισμό με τέτοιο τρόπο ώστε είτε τα πρωτόνια H-8 και H-6' να βρίσκονται σε γειτνίαση είτε τα H-8 και H-2'.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι στη διεθνή βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές πρωτοποριακές έρευνες που αφορούν τη μελέτη αλληλεπιδράσεων υποκαταστατών με πρωτεϊνικούς υποδοχείς τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Για την πρώτη περίπτωση πραγματοποιείται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης-στόχου σε βακτήρια *E.coli* η οποία επισημαίνεται με ^{15}N (Εικόνα 4.5.1). Έτσι στη συνέχεια η λήψη του φάσματος in-cell NMR πραγματοποιείται απευθείας στο δείγμα των κυττάρων που φέρουν την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη και με φασματοσκοπία ^1H - ^{15}N HSQC είναι δυνατή η μελέτη της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα, η ανάλυση της δυναμικής της πρωτεΐνης, αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, de-novo ταυτοποίηση σημάτων συντονισμού και αυτοματοποιημένης ταυτοποίησης δομών σε κυτταρικά εκχυλίσματα [Selenko et al., 2007].

Σε ευκαρυωτικά εκχυλίσματα όμως στα οποία δεν είναι δυνατή η υπερέκφραση επισημασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται άλλες μεθοδολογίες όπως η υπερέκφραση και επισήμανση της πρωτεΐνης σε κύτταρα *E.coli* αρχικά, ο καθαρισμός και η εισαγωγή της στη συνέχεια σε ευκαρυωτικά κύτταρα με μικροέγχυση. Έτσι τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων σε κύτταρα ζυμομύκητα, εντόμων και θηλαστικών. Για την απευθείας μελέτη όμως πρωτεϊνών μη επισημασμένων σε άθικτα κύτταρα, υπάρχουν μελέτες που αφορούν μόνο μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτό συμβαίνει γιατί τα πειράματα NMR in-cell trNOESY στηρίζονται στο γεγονός ότι ο υποκαταστάτης είναι επιλεκτικός ως προς την υπό μελέτη μεμβρανική πρωτεΐνη και επομένως αν προσδεθεί στον υποδοχέα τα σήματα NOE θα αλλάξουν φάση ενώ αν παραμείνει ελεύθερος στο διάλυμα τα NOE θα βρίσκονται στην αντίθετη φάση ως προς τη διαγώνιο. Έτσι για παράδειγμα υπάρχουν πρόσφατες μελέτες που αφορούν την αλληλεπίδραση υποκαταστατών με τις ιντεγκρίνες, που είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, σε καρκινικά κύτταρα όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο εισαγωγικό τμήμα [Mari et al., 2010; Araldi et al., 2011].



Εικόνα 4.5.1 (α) Η εφαρμογή in-cell NMR σε προκαρυωτικά κύτταρα τυπικά πραγματοποιείται με την χρήση ανασυνδυασμένης υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, ισοτοπικά επισημασμένης και η ανάλυση in-cell NMR πραγματοποιείται στα ίδια κύτταρα. Το δείγμα των βακτηριακών κυττάρων αναλύεται απευθείας χωρίς προηγούμενο καθαρισμό της πρωτεΐνης. (β) Η εφαρμογή της in-cell NMR σε ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνει ισοτοπική επισημάνση της πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα, καθαρισμό και μεταφορά μέσα στα κύτταρα με μικροέγχυση, ή άλλες τεχνικές με μεταγωγή φορέα, και στη συνέχεια πραγματοποιείται η λήψη NMR [Selenko et al., 2007].

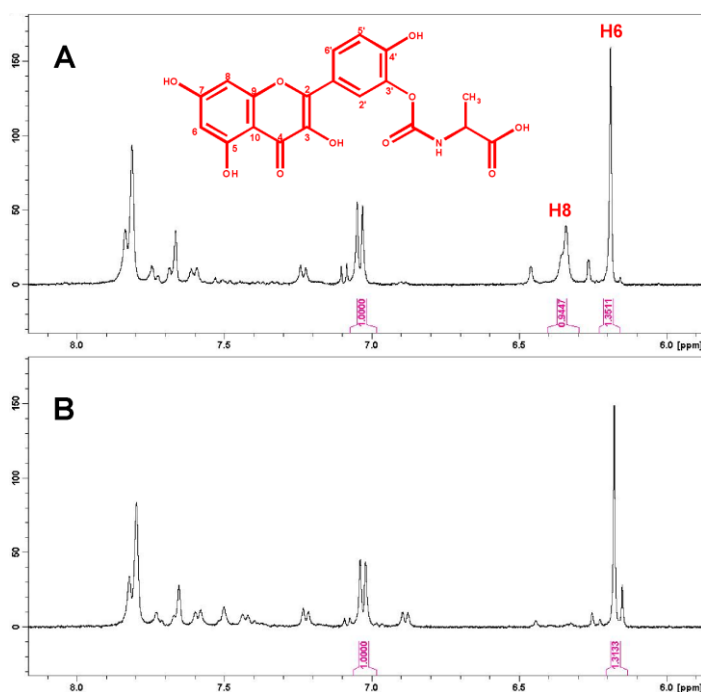
Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη στόχος της παρούσας διατριβής είναι μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και όχι στην κυτταροπλασματική όπως οι ιντεγκρίνες, καθιστά ιδιαίτερα σημαντική την επιτυχή χρήση της φασματοσκοπίας trNOESY και STD NMR και την απόδειξη της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποκαταστάτη και της μη-επισημασμένης Bcl-2 με πολύ σημαντικές εφαρμογές σε παρόμοια βιολογικά συστήματα.

Συμπερασματικά, από τα πειράματα in-cell NMR που πραγματοποιήθηκαν στα ζωντανά καρκινικά κύτταρα Jurkat, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη στόχο επιτεύχθηκε: (α) με STD NMR ο προσδιορισμός των τμημάτων του υποκαταστάτη που βρίσκονται σε άμεση πρόσδεση με την πρωτεΐνη και (β) με tr-NOESY NMR να καθοριστούν οι προτιμώμενες διαμορφώσεις του προσδεδεμένου υποκαταστάτη. Τα δύο αμινοξικά ανάλογα κερσετίνη-αλανίνη 3' και κερσετίνη-αλανίνη 4' καθώς και η κερσετίνη (ως προϊόν υδρόλυσης) προσδέονται άμεσα στην Bcl-2 και η διαμόρφωση του αναλόγου είναι τέτοια ώστε το πρωτόνιο H-2' του δακτυλίου B να βρίσκεται στην ίδια πλευρά με αυτή του H-8 του δακτυλίου A. Τέλος, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR ^1H - ^{15}N HSQC ταυτοποιήθηκε ο τομέας BH3 της πρωτεΐνης Bcl-xL ως θέση πρόσδεσης του αναλόγου το οποίο δρα, συνεπώς, ως ένας μιμητής τύπου BH3.

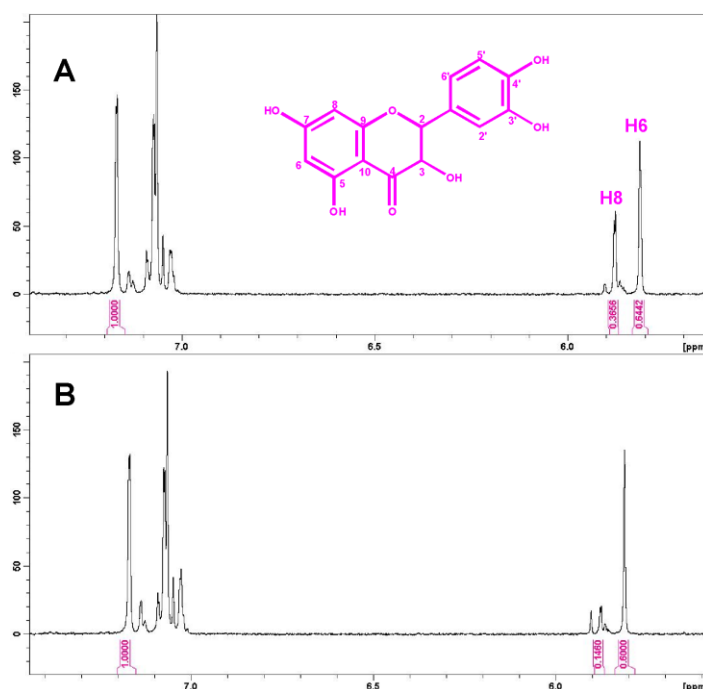
4.6 Μελέτη ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων H-8 και H-6 φλαβονοειδών.

Κατά τη λήψη των πειραμάτων STD παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μια σημαντική ελάττωση του ολοκληρώματος του πρωτονίου H-8 τόσο του αμινοξικού αναλόγου της κερσετίνης όσο και της ταξιφολίνης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι μη αναμενόμενο διότι τα αρωματικά πρωτόνια είναι ιδιαίτερα σταθερά και δεν ανταλλάσσονται. Συνεπώς πολλές ποσοτικές μελέτες στηρίζονται στην ανάλυση της περιοχής των αρωματικών πρωτονίων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη της συμπεριφοράς των αναλόγων αυτών στις ίδιες συνθήκες, D₂O σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7, απουσία των κυττάρων ώστε να διερευνηθεί αρχικά αν το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όχι μόνο σε κυτταρικό επίπεδο αλλά και σε κατάσταση υδατικού διαλύματος.

Πράγματι, τόσο για την περίπτωση του αναλόγου κερσετίνη-αλανίνη όσο και στην ταξιφολίνη το πρωτόνιο H-8 ελαττώνεται σημαντικά ως συνάρτηση του χρόνου μέχρι την πλήρη ανταλλαγή με ²D μετά από 3 περίπου ώρες (Σχήματα 4.6.1&4.6.2). Αντίθετα στην περίπτωση του πρωτονίου H-6 δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ελάττωση της έντασης της κορυφής όπως και για όλα τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια.



Σχήμα 4.6.1 Φάσματα NMR ¹H 500MHz μελέτης ελάττωσης του ολοκληρώματος του πρωτονίου H-8 της κερσετίνης-αλανίνης (2mM) ως συνάρτηση με το χρόνο (αριθμός παλμών=16, T=310K, τ_{acq}=6.55, πειραματικός χρόνος=2m42s). (A) Λήψη του φάσματος αμέσως μετά τη διάλυση της ένωσης, και (B) μετά από 3 ώρες.



Σχήμα 4.6.2 Φάσματα NMR ^1H 500MHz μελέτης ελάττωσης του ολοκληρώματος του πρωτονίου H-8 της ταξιφολίνης (2mM) ως συνάρτηση με το χρόνο (αριθμός παλμών=16, T=310K, τ_{acq} =6.55, πειραματικός χρόνος=2m42s). (A) Λήψη του φάσματος αμέσως μετά τη διάλυση της ένωσης, και (B) μετά από 3 ώρες.

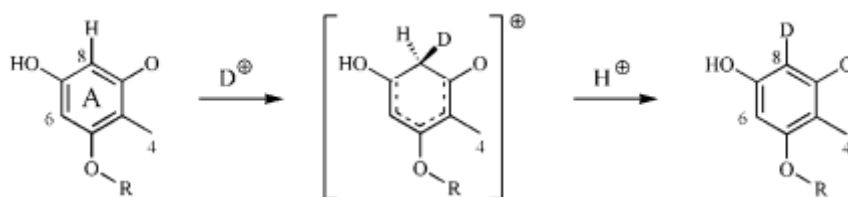
Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει εξαιρετικά περιορισμένος αριθμός άρθρων σχετικά με τη μελέτη της συμπεριφοράς των αρωματικών πρωτονίων H-6 και H-8. Το 1993 ο Pedersen και η ομάδα του μελέτησαν τη συμπεριφορά των ανθοκυανινών και την συμπεριφορά των αρωματικών τους πρωτονίων σε οξινομένη δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD) και τα πρωτόνια αυτά ταυτοποιήθηκαν εύκολα ως δύο διακριτές διπλές κορυφές. Όταν το δείγμα όμως αποθηκεύτηκε για τρεις μήνες και στη συνέχεια επαναλήφθηκε το πείραμα διαπιστώθηκε ότι οι εντάσεις των κορυφών των H-6 και H-8 είχαν ελαττωθεί σημαντικά ενώ για τα υπόλοιπα πρωτόνια δεν προέκυψε αλλαγή. Η εξήγηση που δόθηκε ήταν ότι τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν παρόμοιο ρυθμό ανταλλαγής με το δευτέριο λόγω της μετα- υποκατάστασης με άτομα οξυγόνου στον ίδιο δακτύλιο [Pedersen et al., 1993].

Ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό των ανθοκυανινών είναι η παρουσία θετικού φορτίου στο άτομο οξυγόνου του δακτυλίου Γ που τα καθιστά ιδιαίτερα ισχυρούς αντιοξειδωτικούς δότες υδρογόνου. Τα φλαβονοειδή αυτά υπό συγκεκριμένες συνθήκες υπόκεινται σε σημαντική αποδόμηση και είναι ιδιαίτερα ασταθή και για το λόγο αυτό έχει παρατηρηθεί χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα [Woodward et al., 2009].

Το 2007 ο Andersen μελέτησε το ίδιο φαινόμενο για διαφορετικές συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών και επιπλέον σε καθαρή CD_3OD και διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα ανταλλαγής H (πρωτόνιο) $\rightarrow$ D (δευτέριο) των H-6 και H-8 ήταν ανεξάρτητη της

ΕΝΟΤΗΤΑ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συγκέντρωσης αλλά και της παρουσίας του οξέος. Ως εκ τούτου προτάθηκε ότι οι αντιδράσεις αυτές ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια μελέτη και για τον γλυκοζίτη της κερσετίνης, ρουτίνη, σε οξινοσμένη CD_3OD όπου και πάλι σε 24 ώρες διαπιστώθηκε ανταλλαγή $\text{H} \rightarrow \text{D}$ με την σημαντική παρατήρηση ότι η ελάττωση του ολοκληρώματος στην περίπτωση του H-8 δεν ήταν αρκετά σημαντική (12%) ενώ του H-6 σχεδόν αμελητέα (2%). Μετά από 8 ημέρες το ολοκλήρωμα του H-8 ελαττώθηκε κατά 30% ενώ του H-6 κατά 4%. Η επιλεκτική αντίδραση ανταλλαγής στη θέση C-8 ερμηνεύτηκε με την υπόθεση ότι η θέση αυτή ίσως είναι πιο θετικά φορτισμένη από την C-6 στο ενδιάμεσο, σ -σύμπλοκο, οδηγώντας σε υψηλότερη σταθερότητα του σ -συμπλόκου που εμπλέκεται στην ανταλλαγή του H-8 (Σχήμα 4.6.3) [Andersen et al., 2007]. Τέλος, μια ακόμα μελέτη του φαινομένου που πραγματοποιήθηκε αφορά την ανταλλαγή των πρωτονίων H-6 και H-8 της ναρινγενίνης κατά την ανταλλαγή $\text{H} \rightarrow \text{D}$ έπειτα από αποθήκευση του δείγματος σε μίγμα $\text{DMSO}-d_6$ και D_2O για πέντε ημέρες στους 90°C [Verpoorte et al., 2008].



Σχήμα 4.6.3 Προτεινόμενος μηχανισμός για την ανταλλαγή με το δευτέριο του H-8 του A δακτυλίου [Andersen et al., 2007].

Η παρατήρηση της ανταλλαγής $\text{H} \rightarrow \text{D}$ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης για δύο σημαντικούς λόγους. Καταρχήν, το φαινόμενο αυτό δημιουργεί προβλήματα στη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στη μεταβολομική όπου ένα από τα σημαντικά του πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης άλλων αναλυτικών τεχνικών είναι ότι τα σήματα ενός ^1H φάσματος δίνουν άμεση πληροφορία για τη χημική δομή των μορίων [Verpoorte et al., 2008]. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα πειραμάτων STD διότι το φάσμα διαφοράς θα παρουσιάσει αλλαγές των εντάσεων ορισμένων κορυφών και λόγω φαινομένων ανταλλαγής και όχι μόνο λόγω μαγνητικής μεταφοράς κορεσμού.

Η αξιοσημείωτη ταχύτητα της ανταλλαγής αυτής εγείρει ποικίλα ερωτήματα καθώς οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την δευτερίωση διαφόρων ενώσεων, όπως για παράδειγμα των ισοτοπικά δευτεριωμένων οιστογόνων που χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα σε διάφορες αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους σε βιολογικά δείγματα (π.χ. πλάσμα) για ιατρικούς σκοπούς, είναι

ιδιαίτερα χρονοβόρες και επίπονες. Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις ανταλλαγής $H \rightarrow D$ παρουσία D_2O και ως καταλύτη κάποιο οξύ ή βάση διαπιστώθηκε ότι η δευτερίωση αρωματικών πρωτονίων είναι μια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τη δευτερίωση είναι γενικά χρονοβόρες, όπως π.χ. η κατάλυση δευτερίωσης με κάποιο ανόργανο οξύ ή με $NaOD$ που απαιτεί δύο με τρεις μέρες. Για την επίτευξη δευτερίωσης με D_2O σε υψηλές θερμοκρασίες, $190^\circ C$, απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ανθεκτικός σε υψηλές πιέσεις, ενώ η κατάλυση της δευτερίωσης από μέταλλα όπως π.χ. η πλατίνα παρουσιάζει χαμηλή ισοτοπική καθαρότητα [Ingold C.K. et al., 1936; Vining R.F et al., 1981].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Choi Y.S., Ryu B.K., Min H.K., Lee S.W., Pak Y.K. Analysis of proteome bound to D-loop region of mitochondrial DNA by DNA-linked affinity chromatography and reverse-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci*, **2005**, *1042*, 88–100.

Guzzetti I., Belvisi L., Civera M., Gennari C., Vasile F., Araldi E., Potenza D., Fanelli R., Piarulli 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.

Hou D.-X., Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, *13*, 691–719.

Ingold. C. K., Raisin, C. G., and Wilson, C. L. Structure of benzene. Part II. Direct introduction of deuterium into benzene and the physical properties of hexadeuterobenzene. *J. Chem. Soc.* **1936**, 915-925.

Jordheim M., Fossen T., Songstad J., Andersen Ø. Reactivity of anthocyanins and pyranoanthocyanins. studies on aromatic hydrogen–deuterium exchange reactions in methanol. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8261–8268.

Kim M., Park K., Yeo W., Choo H., Chong Y. In vitro solubility, stability and permeability of novel quercetin–amino acid conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1164–1171.

Kitada S., Leone M., Sareth S., Zhai D., Reed J. C., Pellicchia M. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4259-4264.

Krishnamoorthy J., Yu C. K. V., Mok Y.-K. Auto-FACE: An NMR based binding site mapping program for fast chemical exchange protein-ligand systems. *PLoS ONE* **2010**, *5*, 1-13.

Ku B., Liang C., Jung U. J., Oh B.-H. Evidence that inhibition of BAX activation by Bcl-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res.* **2010**, *21*, 627-641.

Lee K.W., Kang N.J., Rogozin E.A., Kim H.G., Cho Y.Y., Bode A.M., Lee H.J., Surh Y.J., Bowden G.T., Dong Z. Myricetin is a novel natural inhibitor of neoplastic cell transformation and MEK1. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1918–1927.

Mari S., Invernizzi C., Spitaleri A., Alberici L., Ghitti M., Bordinon C., Traversari C., Rizzardì, G.-P., 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.

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

Oltsersdorf T., Elmore S., et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, *435*, 677-681.

Pedersen A., Andersen Ø., Aksnes D., Nerdal W. NMR of anthocyanins: assignments and effects of exchanging aromatic protons. *Magn. Reson. Chem.*, **1993**, *31*, 972-976.

Potenza D., Vasile F., Belvisi L., Civera M., Araldi E. STD and trNOESY NMR study of receptor–ligand interactions in living cancer cells. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 695 – 699.

Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows R.P., Harlan J.E., Eberstadt M., Yoon, H.S., Shuker S.B., Chang B.S., Minn A.J., Thompson C.B., Fesik S.W. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **1997**, *14*, 983-986.

Selenko P., Wagner G. Looking into live cells with in-cell NMR spectroscopy. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 244–253.

Tzakos G.A., Gerothanassis P.I. Domain-selective ligand-binding modes and atomic level pharmacophore refinement in angiotensinI converting enzyme (ACE) inhibitors. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1089-1103.

Verpoorte R., Choi Y., Mustafa N., Kim H. Metabolomics: back to basics. *Phytochem Rev* **2008**, *7*, 525–537.

Viegas A., Manso J., Nobrega F., Cabrita E. 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.

Vining, R. F., Smythe, G. A., and Long, M. A. Deuterium exchange labelling of biologically important phenols, indoles and steroids. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1981**, *18*, 1683-1692.

Wang J.-L., Liu D., Zhang Z.-J., Shan S., Han X., Srinivasula S., Croce C., Alnemri E., Huang Z. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *PNAS* **2000**, *97*, 7124-7129.

Woodward G., Kroon P., Cassidy A., Kay C. Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5271–5278.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τις δομικές μελέτες της ομάδας των επιλεγμένων φλαβονοειδών με φασματοσκοπία NMR 1D και 2D προέκυψε ότι η απουσία της ομάδας OH στη θέση 3 του σκελετού και η παρουσία είτε υδρογόνου είτε μεθόξυ ομάδας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ισχύος του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του OH5 και της CO4 καρβονυλικής ομάδας. Αυτό είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό καταρχήν γιατί η υποκατάσταση της θέσης 3 είναι ουσιώδης για τις βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών. Σε πλήθος μελετών έχει αναφερθεί ότι η παρουσία ομάδας OH στη θέση αυτή βελτιώνει την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα ενώ η απουσία της βελτιώνει την αντικαρκινική τους δραστηριότητα. Επίσης, η αύξηση της ισχύος του δεσμού υδρογόνου μεταξύ OH5 και CO4 έχει σημαντική επίδραση και βελτιώνει τις βιολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών. Συμπερασματικά λοιπόν τα φλαβονοειδή λουτεολίνη, 5,7,3',4'-τετραυδρόξυ-3-μεθόξυ-φλαβόνη και 5,7,3'-τριυδρόξυ-3,4'-διμεθόξυ-φλαβόνη λόγω απουσίας υδροξυλομάδας στη θέση 3 διαθέτουν δεσμό υδρογόνου μεγαλύτερης ισχύος και αναμένεται να διαθέτουν και βελτιωμένη αντικαρκινική δραστηριότητα όπως θα αναφερθεί και παρακάτω.

Στη συνέχεια επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας με την χρήση της φασματοσκοπίας DOSY NMR σε συνδυασμό με την προσαρμογή του pH του διαλύματος με πικρικό οξύ για τον ποιοτικό διαχωρισμό μίγματος των βιοδραστικών αυτών ενώσεων και την ταυτοποίηση των δομών τους σε μίγματα. Η μεθοδολογία αυτή χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό και απομόνωση των επιμέρους συστατικών με τη χρήση μόνο του συντελεστή αυτοδιάχυσης των μορίων συμβάλλει στην γρήγορη ταυτοποίηση των συστατικών μιγμάτων. Η περιοχή των φαινολικών υδροξυλομάδων έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση των αναλόγων και μπορεί να συμβάλλει στην ποιοτική ανάλυση πολύπλοκων φυτικών εκχυλισμάτων.

Η φασματοσκοπία NMR αποτέλεσε ένα πολύ καλό εργαλείο για την μελέτη και τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας μέσω χηλικής συμπλοκοποίησης μετάλλων. Επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η διάκριση στην κλίμακα χρόνου της φασματοσκοπίας NMR ταυτόχρονα η ελεύθερη και η συμπλοκοποιημένη μορφή με Zn^{2+} ενός φλαβονοειδούς όσον αφορά τις απορροφήσεις των πρωτονίων OH. Επισημαίνεται ότι συνήθως στη φασματοσκοπία NMR παρατηρείται ο μέσος όρος των δύο μορφών. Ένα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από την ταυτοποίηση της συμπλοκοποιημένης μορφής είναι ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται με αποπρωτονίωση της θέσης C3-OH στην περίπτωση της κερσετίνης και του C5-OH στην λουτεολίνη. Οι θέσεις πρόσδεσης συνεπώς του Zn^{2+} είναι οι ομάδες C3-O⁻ και OC-4 για την κερσετίνη και οι ομάδες C5-O⁻ και OC-4 για την λουτεολίνη. Τα πειραματικά δεδομένα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με θεωρητικούς υπολογισμούς σε επίπεδο DFT οι οποίοι υπέδειξαν την αποπρωτονίωση των ομάδων OH-3 και OH-5 ως τις πιο ευνοϊκές

ΕΝΟΤΗΤΑ 4-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ενεργειακά καταστάσεις κατά τη συμπλοκοποίηση της κερσετίνης και της λουτεολίνης με τα μεταλλικά ιόντα, αντίστοιχα. Διερευνήθηκε επίσης η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του συντελεστή διάχυσης D (μέσω πειραμάτων NMR DOSY) και του μοριακού βάρους, MB, που οδήγησε για πρώτη φορά στην εισαγωγή μεθοδολογίας προσδιορισμού μοριακών βαρών συμπλόκων φλαβονοειδών με μέταλλα.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της προσθήκης Fe^{2+} στην ήδη συμπλοκοποιημένη κερσετίνη με τον Zn^{2+} . Ένα σημαντικό συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι ο Fe^{2+} παρουσίασε μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης με το σύμπλοκο Zn^{2+} -κερσετίνη σε σχέση με την ελεύθερη κερσετίνη. Αυτό υποδηλώνει ότι η αποπρωτονίωση της κερσετίνης κατά την συμπλοκοποίηση με Zn^{2+} υποβοηθά την δέσμευση του Fe^{2+} . Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει τα *in vitro* αποτελέσματα της βιβλιογραφίας όπου παρατηρείται αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα όταν τα φλαβονοειδή είναι ήδη συμπλοκοποιημένα με τον Zn^{2+} . Επίσης, η οξείδωση της κερσετίνης από τον Fe^{2+} λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερο ποσοστό στην συμπλοκοποιημένη σε σύγκριση με την ελεύθερη για τον ίδιο λόγο.

Στη συνέχεια αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε η *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα των φλαβονοειδών σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, την MCF7 και T24 και η συσχέτιση των δομικών τους χαρακτηριστικών με την δραστηριότητα. Η παρουσία μεθόξυ ομάδας στη θέση 3 των φλαβονοειδών επέφερε σημαντική αύξηση στη δραστηριότητά τους, πιθανώς λόγω αυξημένης ισχύος του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Επίσης η παρουσία μεθόξυ ομάδας στη θέση 4' του Β δακτυλίου, και όχι OH, σε συνδυασμό με τη μεθόξυ OCH_3 ομάδα στη θέση 3 είχαν ως αποτέλεσμα ιδιαίτερα αυξημένη αντικαρκινική δραστηριότητα. Το φλαβονοειδές 5,7,3'-τριυδρόξυ-3,4'-διμεθόξυ-φλαβόνη που έχει το συνδυασμό των ανωτέρω δομικών υποκαταστάσεων επιλέχθηκε για να μελετηθεί περαιτέρω η αντιαγγειογενετική του δραστηριότητα ως πιθανού μηχανισμού της αντικαρκινικής δράσης. Διαπιστώθηκε ότι η ένωση αυτή επέδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs που επάγεται από τον αυξητικό παράγοντα VEGF, ένα πολύ σημαντικό στόχο της αντιαγγειογενετικής θεραπείας του καρκινικού όγκου.

Συνεπώς, τα παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά του φλαβονοειδούς 5,7,3'-τριυδρόξυ-3,4'-διμεθόξυ-φλαβόνης πολύ πιθανό να το καθιστούν ως έναν ισχυρό μιμητή τύπου ATP με αποτέλεσμα να μπορεί να ανταγωνίζεται στην πρωτεϊνική δέσμευση αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την επαγωγή αγγειογένεσης.

Ο επόμενος πιθανός μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης που ελέγχθηκε αποτέλεσε η ικανότητα επαγωγής απόπτωσης από την κερσετίνη στα καρκινικά κύτταρα Jurkat Puro και Jurkat Bcl-2 προερχόμενα από T λευχαιμικά κύτταρα. Ένα σύνολο διαφορετικών προσεγγίσεων που περιλαμβάνουν: (1) πειράματα ελέγχου της αντιπολλαπλασιαστικής και αποπτωτικής δράσης της κερσετίνης στις T λευχαιμικές

κυτταρικές σειρές Jurkat Bcl-2 και Jurkat Puro, (2) βιοχημικές μεθόδους χρωματογραφίας συγγένειας ελέγχου της άμεσης πρόσδεσης της κερσετίνης στην ενδογενή Bcl-2 πρωτεΐνη και στην ανασυνδυασμένη Bcl-xL, (3) NMR πειράματα μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων των επισημασμένων με ^{15}N πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL πρωτεϊνών λόγω πρόσδεσης της κερσετίνης καθώς και (4) θεωρητικοί υπολογισμοί πρόσδεσης, επιβεβαιώνουν το σημαντικό συμπέρασμα ότι η κερσετίνη προσδένεται άμεσα στις πρωτεΐνες αυτές στον τομέα πρόσδεσης BH3.

Στην κυτταρική σειρά Jurkat Bcl-2, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής είχε ως αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων από την αντιπολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση της κερσετίνης ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Από το πείραμα pull down χρωματογραφίας συγγένειας προκύπτει η άμεση πρόσδεση της κερσετίνης στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, ενώ από τα πειράματα NMR και τους θεωρητικούς υπολογισμούς προέκυψε ως θέση πρόσδεσης ο BH3 τομέας. Η ιδιότητα αυτή κατηγοριοποιεί την κερσετίνη ως ένα φυσικό φλαβονοειδές με δραστικότητα BH3 μιμητή ικανού να οδηγήσει τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση. Αυτά τα αποτελέσματα όχι μόνο εξηγούν την κυτταροτοξική δράση της κερσετίνης στα Jurkat λευχαιμικά κύτταρα αλλά πιθανόν και σε άλλες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Επίσης παρέχει και μια σημαντική αρχική δομή για τη σύνθεση πιο δραστικών αναλόγων για την θεραπεία του καρκίνου.

Η φασματοσκοπία NMR αποτέλεσε ένα σύγχρονο και ικανό εργαλείο για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με την πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά κύτταρα. Με την χρήση ενός επιλεκτικού αναστολέα της Bcl-2 προέκυψε ότι το υδατοδιαλυτό ανάλογο της κερσετίνης, κερσετίνη-αλανίνη, που συντέθηκε αλληλεπιδρά άμεσα με την Bcl-2 πρωτεΐνη μέσα στα ζωντανά και άθικτα κύτταρα Jurkat Bcl-2 (in-cell NMR). Με τη χρήση της φασματοσκοπίας STD NMR επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των τμημάτων των δύο αμινοξικών αναλόγων κερσετίνη-αλανίνη 3' και κερσετίνη-αλανίνη 4' καθώς και της κερσετίνης (ως προϊόν υδρόλυσης) που προσδένονται άμεσα στην Bcl-2. Με την χρήση της μεθοδολογίας tr-NOESY NMR καθορίστηκαν οι προτιμώμενες διαμορφώσεις του προσδεδεμένου υποκαταστάτη. Προέκυψε ότι η διαμόρφωση του αναλόγου είναι τέτοια ώστε το πρωτόνιο H-2' του δακτυλίου B να βρίσκεται στην ίδια πλευρά με αυτή του H-8 του δακτυλίου A. Τέλος, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR ^1H - ^{15}N HSQC ταυτοποιήθηκε ο τομέας BH3 της πρωτεΐνης Bcl-xL ως θέση πρόσδεσης του αναλόγου το οποίο δρα, συνεπώς, ως ένας μιμητής τύπου BH3 ισχυρότερο από τη κερσετίνη. Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών in-cell NMR για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η μελέτη αλληλεπιδράσεων ενώσεων σε ενδοκυττάριο επίπεδο με την μη επισημασμένη πρωτεΐνη Bcl-2 που εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τέτοιου είδους πειράματα αναμένεται να χρησιμοποιηθούν εκτενώς για τη μελέτη παρόμοιων βιολογικών συστημάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγά τους έχουν αποδειχτεί μέσα από το πέρασμα των αιώνων και τη χρήση τους στην παραδοσιακή Ιατρική αλλά και τις εφαρμογές τους στην σύγχρονη Ιατρική επιστήμη μια αστείρευτη και ανεκτίμητη πηγή θεραπευτικών παραγόντων. Η ομάδα των φλαβονοειδών αποτελεί τα πιο άφθονα συστατικά στην ανθρώπινη διατροφή και χαρακτηρίζονται από πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιϊκών και κυρίως αντικαρκινικών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η μελέτη πρότυπων φλαβονοειδών που φέρουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά και υποκαταστάσεις ώστε να διαθέτουν βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά και οι φυσικοχημικές ιδιότητες επιλεγμένων φλαβονοειδών με χρήση φασματοσκοπίας NMR 1D και 2D όπου διαπιστώθηκε ότι η απουσία της OH ομάδας στη θέση 3 επιφέρει αύξηση της ισχύος του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του OH-5 πρωτονίου και της καρβονυλικής ομάδας CO-4. Στη συνέχεια με χρήση φασματοσκοπίας διάχυσης DOSY NMR αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση φλαβονοειδών σε μίγματα χωρίς προηγούμενες χρονοβόρες διαδικασίες. Μελλοντική εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής μπορεί να αποτελέσει η άμεση μελέτη των συστατικών φυτικών εκχυλισμάτων χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό και η πρόβλεψη των πιθανών βιολογικών τους ιδιοτήτων.

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός της ιδιαίτερα σημαντικής και εκτενώς μελετημένης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των φλαβονοειδών είναι η ικανότητα της κερσετίνης και της λουτεολίνης να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα. Έτσι, μελετήθηκε η ικανότητά τους να συμπλοκοποιούνται με δύο σημαντικά μεταλλικά ιόντα, τον Zn^{2+} και τον Fe^{2+} . Μελέτες φασματοσκοπίας 1D NMR και θεωρητικοί υπολογισμοί σε επίπεδο DFT υπέδειξαν ως θέσεις συμπλοκοποίησης του Zn^{2+} τις 3-4 και 4-5 για την κερσετίνη και την λουτεολίνη, αντίστοιχα, με αποπρωτονίωση των OH-3 για την πρώτη περίπτωση και του OH-5 για την δεύτερη. Διερευνήθηκε επίσης η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης μεταξύ του συντελεστή διάχυσης D (με τη χρήση φασματοσκοπίας DOSY) και του MB ως νέας μεθοδολογίας προσδιορισμού MB συμπλόκων φλαβονοειδών. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η συμπλοκοποίηση της κερσετίνης με Zn^{2+} υποβοηθά τη σύμπλεξη με τον Fe^{2+} λόγω αποπρωτονίωσης. Η διαπίστωση αυτή μπορεί να αποτελέσει μια ικανή εξήγηση του φαινομένου της βελτιωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών όταν είναι ήδη σε συμπλοκοποιημένη μορφή που έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες *in vitro* μελέτες.

Μια πολύ σημαντική ιδιότητα των φλαβονοειδών, που έχει διερευνηθεί και σε επίπεδο κλινικών μελετών, αποτελεί η αντικαρκινική τους δραστηριότητα κυρίως σε

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

επίπεδο χημειοπροφύλαξης. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής τους δράσης σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και η συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών με τη δραστικότητα. Διαπιστώθηκε ότι τα φλαβονοειδή με τον ισχυρότερο ενδομοριακό δεσμό έχουν βελτιωμένη δραστικότητα, ενώ η παρουσία μεθόξυ υποκαταστατών στις θέσεις 3 και 4' και υδροξυλομάδων στις 5,7 και 3' είναι απαραίτητη για ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση.

Τέλος, επιλέχθηκαν προς μελέτη δύο πιθανοί μηχανισμοί ως υπεύθυνοι για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες: η αντιαγγειογενετική και η αποπτωτική. Για την αντιαγγειογενετική δραστικότητα επιλέχθηκε να μελετηθεί το φλαβονοειδές 5,7,3'-τριυδροξυ-3,4'-διμεθοξυφλαβόνη, το οποίο παρουσίασε και τη σημαντικότερη αντικαρκινική δράση *in vitro*. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι το φλαβονοειδές αυτό αναστέλλει την επαγόμενη από τον VEGF πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs. Η διμεθοξυφλαβόνη, συνεπώς, μπορεί να αποτελέσει ένωση «οδηγό» και να προωθηθεί για περαιτέρω μελέτη αντικαρκινικών και αντιαγγειογενετικών ιδιοτήτων και πιθανή αναστολή τόσο της ίδιας όσο και πιο δραστικών αναλόγων της.

Το φλαβονοειδές κερσετίνη επιλέχθηκε για την μελέτη της ικανότητάς του να επιφέρει απόπτωση σε T λευχαιμικά κύτταρα. Με τη χρήση *in vitro* πειραμάτων αλλά και βιοχημικών και φυσιολογικών μελετών και υπολογισμών πρόσδεσης, διαπιστώθηκε ότι η κερσετίνη αλληλεπιδρά άμεσα με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL στον τομέα BH3 επάγοντας απόπτωση.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας *in-cell* NMR επιτεύχθηκε η μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός συνθετικού υδατοδιαλυτού αναλόγου της κερσετίνης με την Bcl-2 πρωτεΐνη μέσα σε ζωντανά κύτταρα Jurkat που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή. Η μελέτη αλληλεπίδρασης της Bcl-2 με μικρά μόρια αποτελεί την πρώτη σε διεθνές επίπεδο μελέτη μιτοχονδριακής μεμβρανικής πρωτεΐνης σε κυτταρικό επίπεδο. Συνεπώς, η φασματοσκοπία *in-cell* NMR αποτελεί ένα δυναμικό εργαλείο σάρωσης αλληλεπιδράσεων φαρμάκων και πρωτεϊνικών στόχων με δυνατότητα εξέλιξης και ιδιαίτερα υποσχόμενες μελλοντικές εφαρμογές.

SUMMARY

Natural products and their derivatives have proven to be, through centuries and their applications in traditional medicine as well as in modern medicine, an endless and priceless source of therapeutic agents. Flavonoids are the most abundant components in human diet and a wide range of biological properties are attributed to them, such as antioxidant, antiinflammatory, antiviral and mainly anticancer activities.

The main objective of the current PhD thesis was the study of flavonoids with specific structural characteristics and substitutions which confer to their biological properties under investigation.

Firstly, the structural characteristics of a group of selected flavonoids were studied by the use of 1D and 2D NMR spectroscopy. It was concluded that the absence of OH-3 group results in the increase of the intermolecular hydrogen bond strength between OH-5 and CO-4 groups. Furthermore, by the use of diffusion spectroscopy DOSY NMR a new methodology was developed for the separation and the identification of flavonoids in mixtures without the need of previous time-consuming isolation techniques. A future application of this new methodology can be the direct investigation of plant extracts without prior isolation and the prediction of their potential biological properties.

A widely accepted mechanism of the significant and extensively studied antioxidant activity of flavonoids is their ability to chelate with metal complexes. Two essential metal ions, Zn^{2+} and Fe^{2+} , were investigated for their coordination properties with quercetin and luteolin. NMR spectroscopic studies and DFT theoretical calculations indicate sites 3-4 and 4-5 as coordination sites of Zn^{2+} through the deprotonation of OH-3 and OH-5 for quercetin and luteolin, respectively. Also, it was observed that the complexation of quercetin with Zn^{2+} facilitates chelation with Fe^{2+} due to OH-3 deprotonation. This conclusion can effectively justify the improved antioxidant activities of flavonoids in in vitro studies when they are already complexed to metal ions. A linear correlation between diffusion coefficient and molecular weight, MW, was investigated and a new method for the determination of the effective MW of flavonoid-metal complexes was suggested.

Another significant activity of flavonoids, which has been promoted in clinical studies, is their chemoprevention and chemoprotection properties. We studied their antiproliferative activity against two human cancer cell lines and their structure-activity relationship. The presence of a strong intermolecular hydrogen bond in combination with two methoxy groups in positions 3 and 4' as well as hydroxyl groups in positions 5, 7 and 3' were found to be essential structural parameters for a potent antiproliferative activity.

Finally, two suggested molecular mechanisms of their anticancer activity, antiangiogenic and apoptotic, were selected for further studies. 5,7,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone, which demonstrated the strongest anticancer activity, was selected in

SUMMARY

order to study its antiangiogenic activity. This flavonoid was able to inhibit VEGF-induced proliferation of HUVECs endothelial cells with a very low IC₅₀ value. Thus, dimethoxyflavone should be promoted for further anticancer and antiangiogenic evaluation studies and can be a lead compound for the synthesis of more potent compounds.

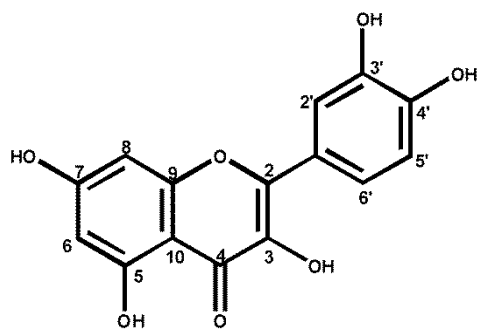
The flavonoid quercetin was selected in order to study its ability to induce apoptosis in T-leukemic cells. By the use of a multidisciplinary approach, in vitro experiments, biochemical and biophysical studies as well as docking calculations, it was suggested that quercetin induces apoptosis by directly binding the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL in BH3 domain.

A state-of-the-art technique was used in order to study the interaction of water-soluble quercetin derivatives with Bcl-2 protein. In-cell NMR spectroscopy indicated that this analogue interacts directly with Bcl-2 in intact Jurkat leukemic cancer cells that overexpress Bcl-2. This is the first report of the interaction of a mitochondrial membrane protein with a small molecule at a cellular level. Thus, in-cell NMR spectroscopy is a highthroughput and robust technique for the screening of drug-protein receptors interactions with promising future applications.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της κερσετίνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και $\text{DMSO}-d_6$ (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

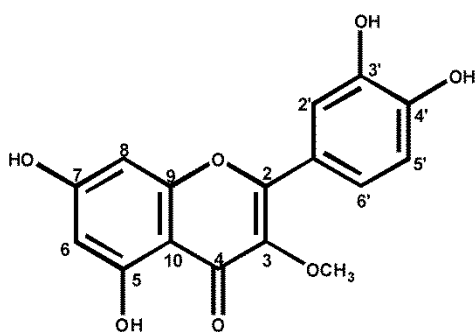
^1H	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$	^{13}C	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$
OH5	12,17	12,51	C2	146,18	147,21
OH7	-	10,85	C3	135,50	136,01
OH4'	-	9,65	C4	-	176,52
OH3	-	9,42	C5	162,1	161,41
OH3'		9,36	C6	98,21	98,86
H2'	7,82	7,68	C7	163,5	164,23
H6'	7,69	7,55	C8	93,03	93,92
H5'	6,98	6,88	C9	156,12	156,47
H8	6,52	6,41	C10	103,54	103,74
H6	6,25	6,19	C1'	122,81	122,32
			C2'	114,83	115,35
			C3'	144,64	145,51
			C4'	147,23	148,04
			C5'	114,28	115,42
			C6'	120,12	120,26



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

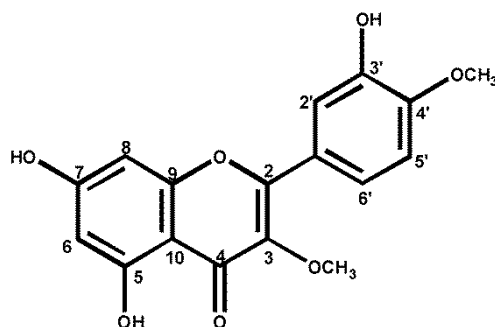
Πίνακας 2. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της 5,7,3',4'-τετραυδροξυ-3-μεθοξυ-φλαβόνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και $\text{DMSO}-d_6$ (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

^1H	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$	^{13}C	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$
OH5	12,79	12,74	C2	155,48	156,47
OH7	-	10,89	C3	138,21	138,59
OH4'	-	9,81	C4	-	178,53
OH3'	-	9,43	C5	162,56	161,64
H2'	7,68	7,58	C6	98,27	99,09
H6'	7,56	7,49	C7	164,01	165,18
H5'	6,98	6,94	C8	93,32	94,26
H8	6,47	6,44	C9	156,34	156,96
H6	6,24	6,23	C10	104,92	105,05
3-CH3	3,85	3,82	C1'	121,97	121,69
			C2'	115,28	116,14
			C3'	148,03	149,17
			C4'	144,56	145,63
			C5'	115,20	116,49
			C6'	121,15	121,33
			3-CH3	59,17	60,31



Πίνακας 3. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της 5,7,3'-τριυδροξυ-3,4'-διμεθοξυ-φλαβόνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και DMSO- d_6 (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

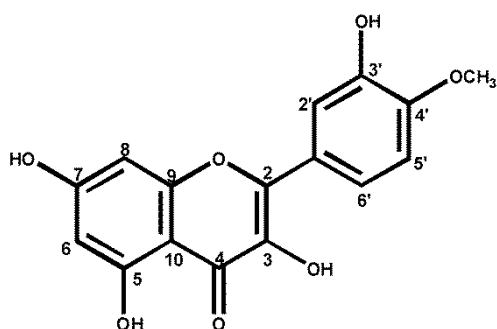
^1H	ακετόνη- d_6	DMSO- d_6	^{13}C	ακετόνη- d_6	DMSO- d_6
OH5	12,76	12,70	C2	155,44	155,46
OH7	-	10,92	C3	138,32	138,92
OH3'	-	9,49	C4	-	178,84
H2'	7,62	7,57	C5	161,54	162,05
H6'	7,65	7,59	C6	98,34	98,94
H5'	7,11	7,14	C7	163,55	164,81
H8	6,50	6,47	C8	93,42	94,33
H6	6,24	6,24	C9	156,32	157,24
4'-CH3	3,93	3,90	C10	104,93	105,15
3-CH3	3,86	3,82	C1'	123,22	122,85
			C2'	114,74	115,63
			C3'	145,61	147,15
			C4'	149,24	151,12
			C5'	111,23	112,55
			C6'	120,75	121,08
			4'-CH3	55,27	56,38
			3-CH3	59,28	60,34



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

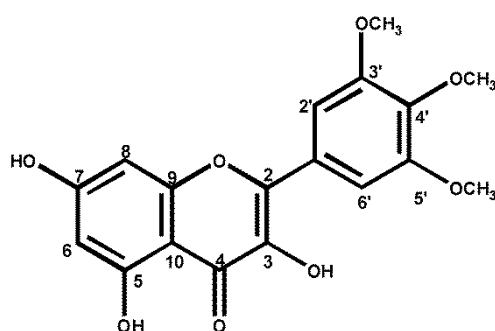
Πίνακας 4. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της ταμαριξετίνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και $\text{DMSO}-d_6$ (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

^1H	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$	^{13}C	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$
OH5	12,13	12,49	C2	-	-
OH7	-	10,89	C3	-	136,87
OH3	-	9,52	C4	-	177,05
OH3'	-	9,40	C5	-	161,67
H2'	7,77	7,70	C6	98,38	99,04
H6'	7,79	7,68	C7	163,82	164,67
H5'	7,12	7,12	C8	93,46	93,94
H8	6,54	6,47	C9	156,94	157,23
H6	6,26	6,23	C10	103,21	104,05
4'-CH3	3,93	3,88	C1'	123,84	124,49
			C2'	114,25	115,38
			C3'	146,26	147,12
			C4'	149,13	150,27
			C5'	111,35	112,77
			C6'	120,17	120,52
			4'-CH3	55,27	56,46



Πίνακας 5. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της 5,7,3-τριυδροξυ-3',4',5'-τριμεθοξυ-φλαβόνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και $\text{DMSO-}d_6$ (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

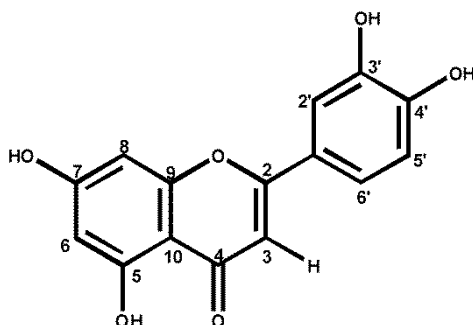
^1H	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO-}d_6$	^{13}C	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO-}d_6$
OH5	12,07	12,39	C2	145,14	146,74
OH7	-	10,87	C3	-	137,48
OH3	-	9,70	C4	-	177,49
H2'	7,59	7,53	C5	161,34	161,69
H6'	7,59	7,53	C6	98,21	99,09
H8	6,56	6,57	C7	164,14	164,96
H6	6,28	6,26	C8	93,85	94,54
3'-CH3	3,90	3,89	C9	156,77	157,08
4'-CH3	3,81	3,79	C10	102,88	104,04
5'-CH3	3,90	3,89	C1'	-	126,94
			C2'	105,68	106,28
			C3'	153,31	153,63
			C4'	140,24	140,05
			C5'	153,35	153,6
			C6'	105,68	106,28
			3'-CH3	59,78	56,73
			4'-CH3	55,66	60,85
			5'-CH3	55,66	56,73

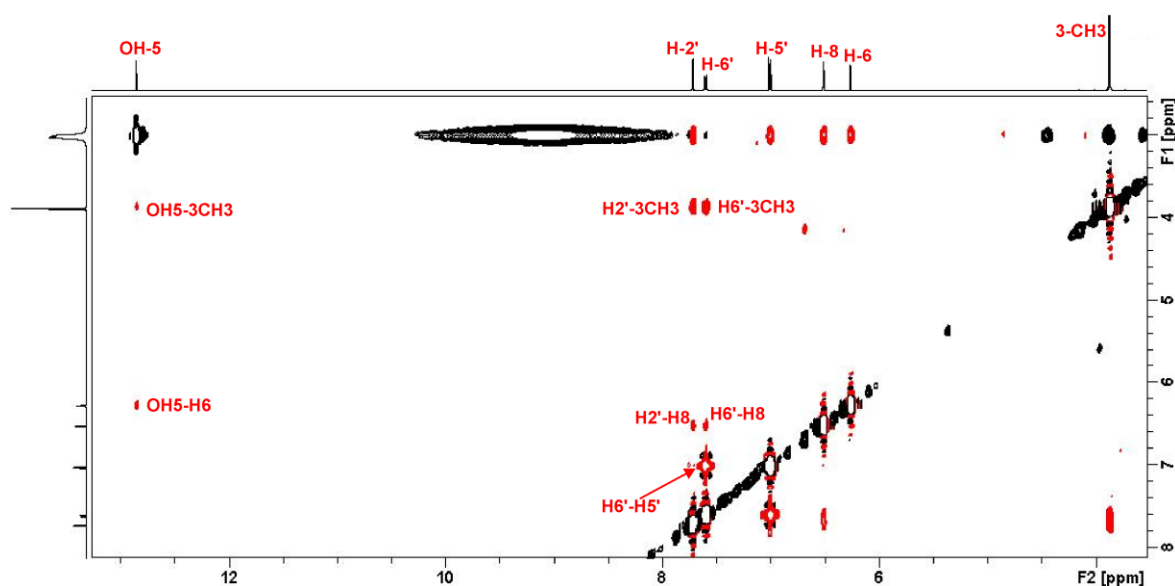


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

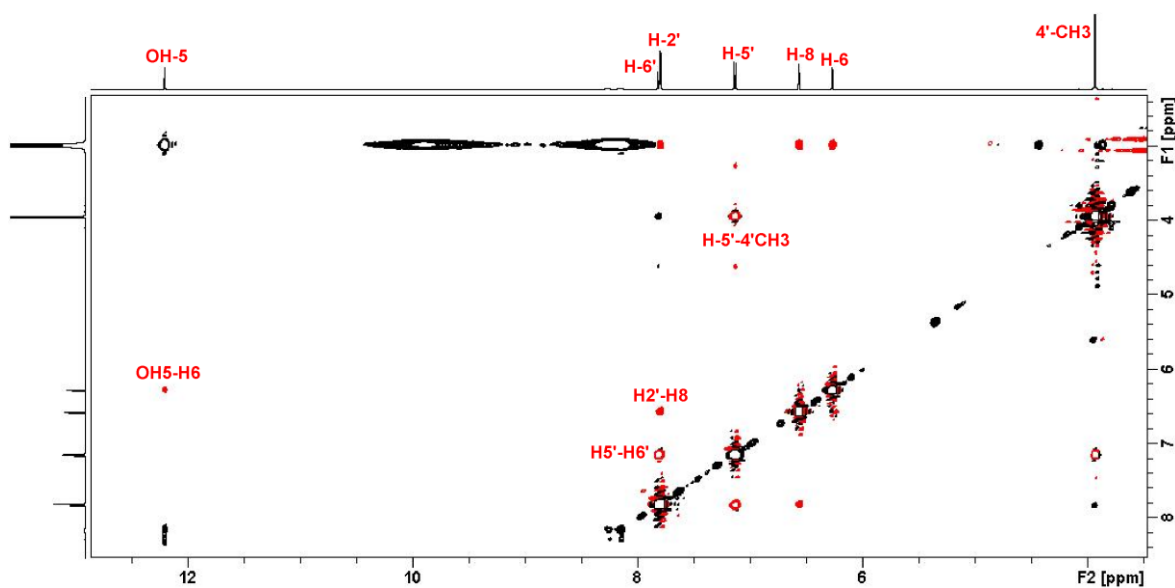
Πίνακας 6. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C της λουτεολίνης στους διαλύτες ακετόνη- d_6 (5mM) και $\text{DMSO}-d_6$ (1mM) με προσθήκη πικρικού οξέος (1:50).

^1H	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$	^{13}C	ακετόνη- d_6	$\text{DMSO}-d_6$
OH5	13,02	13,03	C2	147,52	147,1
OH7	9,60	10,95	C3	135,74	136,1
OH3'	-	10,01	C4	-	182,0
OH4'	-	9,51	C5	161,24	161,9
H2'	7,49	7,40	C6	98,75	99,2
H6'	7,47	7,43	C7	163,85	164,5
H5'	6,99	6,89	C8	93,92	94,0
H3	6,57	6,69	C9	157,92	157,7
H8	6,51	6,45	C10	103,94	104,1
H6	6,23	6,21	C1'	-	-
			C2'	112,45	113,7
			C3'	145,01	145,9
			C4'	149,74	150,1
			C5'	115,67	116,4
			C6'	121,01	120,15



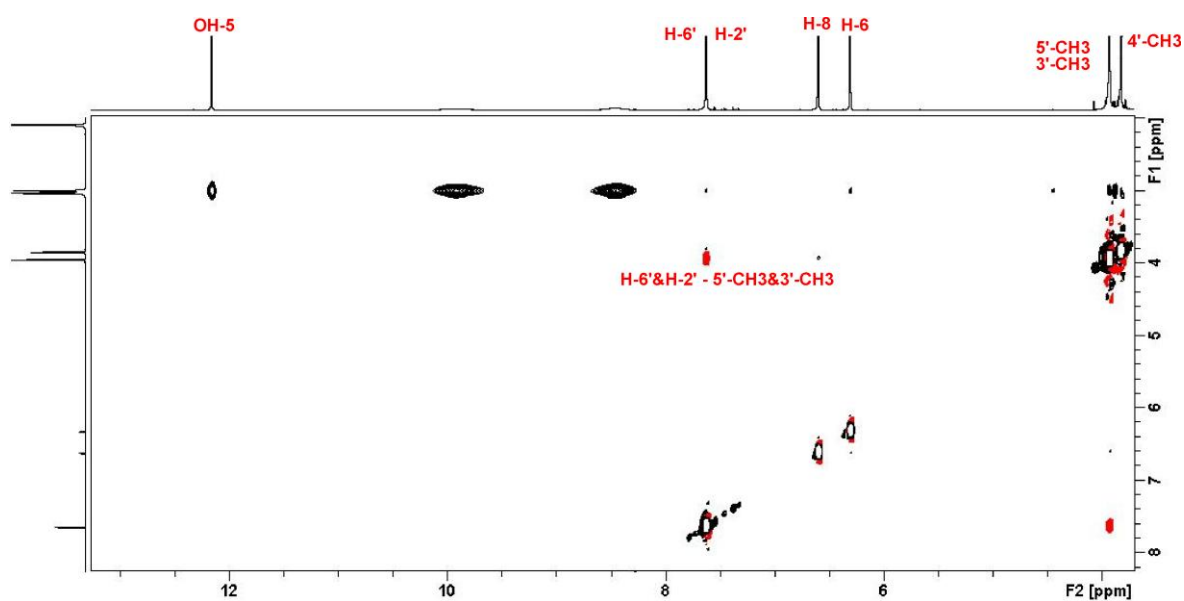


Σχήμα 1. Φάσμα NMR 2D ^1H - ^1H NOESY 500MHz της 5,7,3',4'-τετραυδροξύ-3-μεθοξυφλαβόνης (**3**) (6mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=283K, αριθμός παλμών=8, d8=1s, πειραματικός χρόνος=3h31m).



Σχήμα 2. Φάσμα NMR 2D ^1H - ^1H NOESY 500MHz της ταμαριξετίνης (**4**) (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 (T=283K, αριθμός παλμών=8, d8=1s, πειραματικός χρόνος=3h31m).

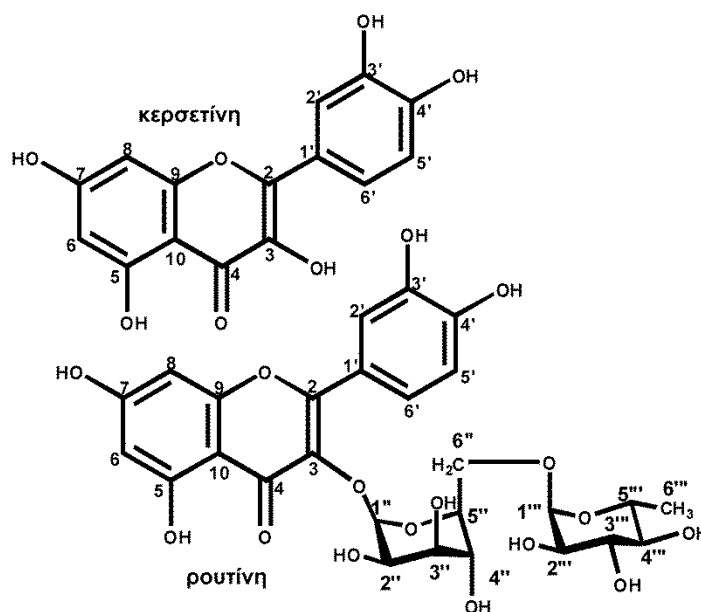
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

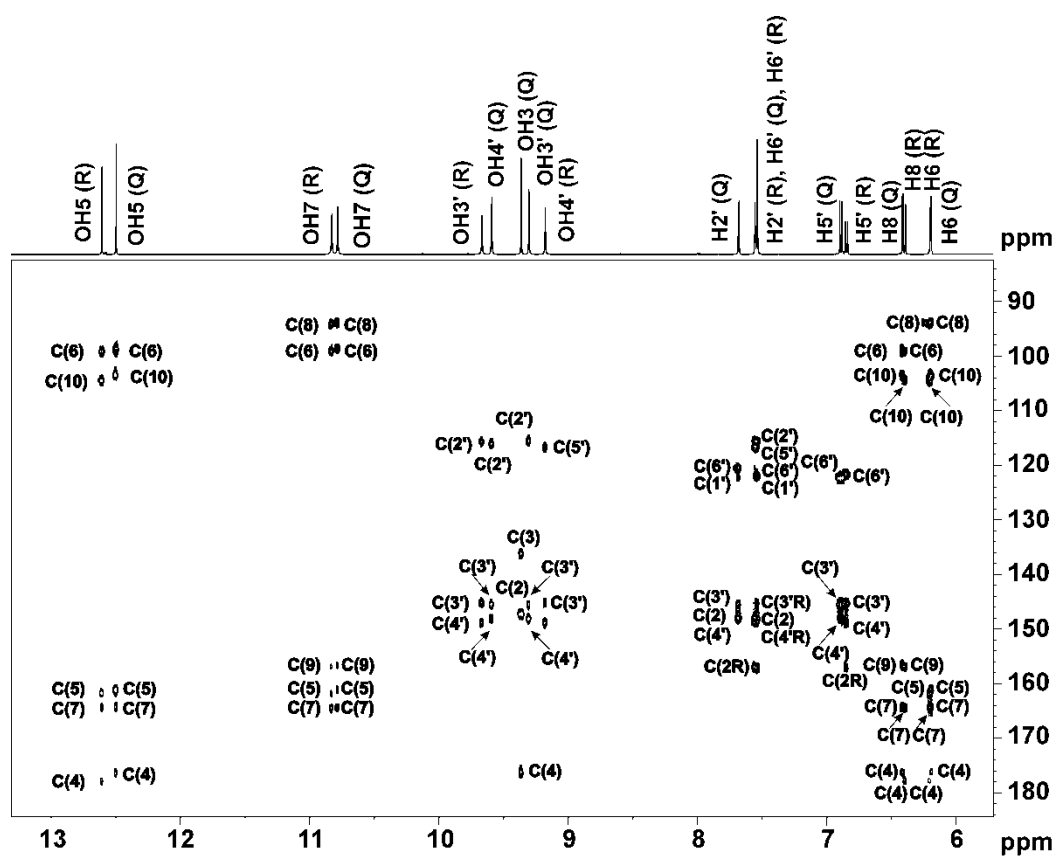


Σχήμα 3. Φάσμα NMR 2D ^1H - ^1H NOESY 500MHz της 3,5,7-τριυδροξυ-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνη (**6**) (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ($T=283\text{K}$, αριθμός παλμών=8, $d8=1\text{s}$, πειραματικός χρόνος=3h31m).

Πίνακας 7. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C του μίγματος κερσετίνης (5.6mM) και ρουτίνης (5.3mM) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ με προσθήκη πικρικού οξέος ($\approx 1:130$).

^1H	κερσετίνη	ρουτίνη	^{13}C	κερσετίνη	ρουτίνη
OH5	12,50	12,61	C2	147,24	-
OH7	10,79	10,83	C3	135,7	-
OH3'	9,31	9,67	C4	177,8	176,1
OH4'	9,37	9,18	C5	161,6	161
OH3	9,59	-	C6	98,6	99,04
H2'	7,68	7,55	C7	164,3	164,3
H6'	7,55	7,55	C8	93,8	94,05
H5'	6,89	6,85	C9	156,1	156,1
H8	6,41	6,39	C10	104,4	103,4
H6	6,19	6,20	C1'	122,3	121,6
			C2'	115,5	116,7
			C3'	145,5	145,1
			C4'	148,18	148,2
			C5'	116,0	115,7
			C6'	120,4	122,0





Σχήμα 4. Φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC NMR 500MHz του μίγματος της κερσετίνης (5.6mM) και ρουτίνης (5.3mM) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ με προσθήκη πικρικού οξέος ($\approx 1:130$) ($T=292\text{K}$, αριθμός παλμών=20, πειραματικός χρόνος=2h38min).

Πίνακας 8. Χημικές μετατοπίσεις των ^1H και ^{13}C του 6'',4''-ακέτυλο (H1) παραγώγου της υπεροσίδης σε DMSO-d₆.

	6'',4''-acetyl- derivative (H1)	
	^1H	^{13}C
2	-	157.1
3	-	134.1
4	-	178.5
5	12.59	161.3
6	6.23	99.5
7	10.9	165.2
8	6.44	93.2
9	-	156.9
10	-	104.4
1'	-	
2'	7.5	116.3
3'	9.17	145.3
4'	9.78	149.7
5'	6.86	115.5
6'	7.62	122.2
1''	5.43	101.6
2''	3.78	68.7
3''	3.73	72.9
4''	3.83	65.8
5''	4.64	75.7
6'' a	4.03	63.3
6'' b	3.91	63.3
OH(2'')	5.19	71.8
OH(3'')	5.51	74.5
<u>COMe</u> (4'')	-	170.5
<u>COMe</u> (4'')	1.75	20.77
<u>COMe</u> (6'')	-	170.5
<u>COMe</u> (6'')	2.08	21.72

