



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΡΑΚΗΣ

DEMOCRITUS
UNIVERSITY
OF THRACE

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ & ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: Μοντελοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός πεπτιδίου που προσδένεται μη ειδικά στο DNA και ενός κανονικού B-DNA μορίου.

“Modeling the interaction between a non-specific DNA-binding peptide and canonical B-DNA”

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΡΙΟΣ ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ (476)

26/08/2024

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΛΥΚΟΣ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΔΗΜΟΚΡΕΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ

ΜΕΛΟΣ 2° : ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΦΑΔΟΥΛΟΓΛΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΔΗΜΟΚΡΕΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ

ΜΕΛΟΣ 3° : ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΔΗΜΟΚΡΕΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ



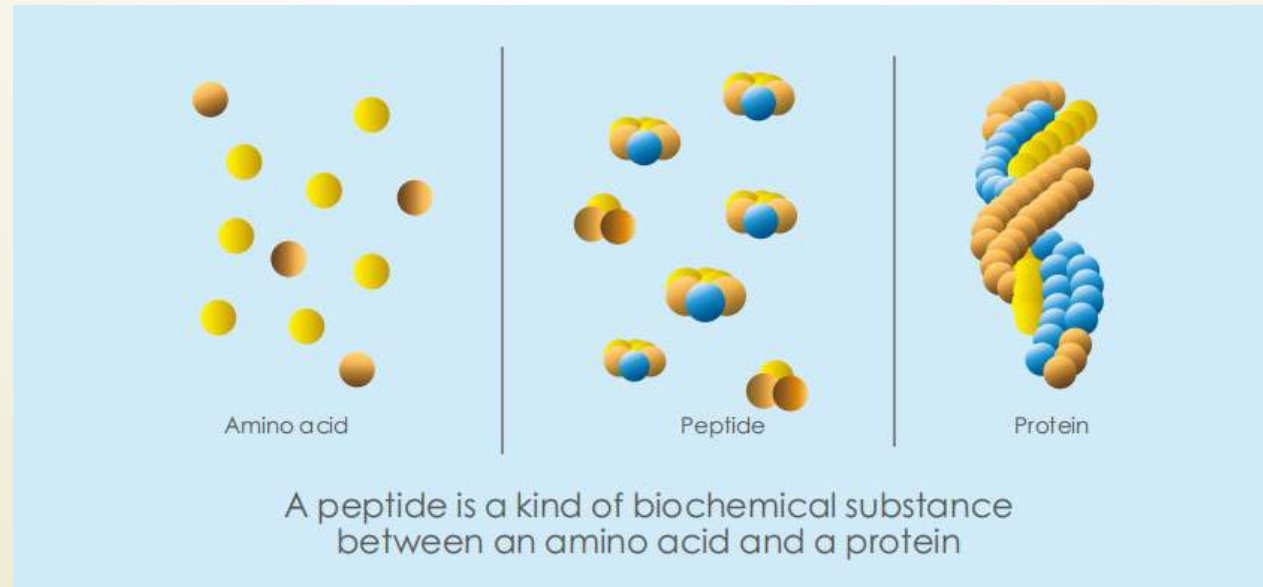
Εισαγωγή

- ▶ Μοντελοποίηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ ενός μικρού 12-μερούς πεπτιδίου (SVSVG MKPSRP) και ενός μορίου κανονικού B-DNA.
- ▶ **Στόχος:** Ανάλυση των βασικών παραγόντων που οδηγούν στη δέσμευση του πεπτιδίου στο μόριο του B-DNA.
- ▶ **Υπόβαθρο:** Το πεπτίδιο είναι γνωστό πως προσδένεται μη-ειδικά στο B-DNA, όπως αποδείχτηκε από τους Wolcke και Weinhold σε παλαιότερη έρευνα (2001).



Η σημασία της μελέτης αλληλεπιδράσεων πεπτιδίων-DNA.

- ▶ **Κατανόηση Βασικών Βιολογικών Μηχανισμών** (γονιδιακή ρύθμιση και επιγενετική, επιδιόρθωση και αντιγραφή DNA)
- ▶ **Ανάπτυξη Θεραπευτικών Προσεγγίσεων** (π.χ. πεπτίδια που μπορούν να δεσμεύσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και να αναστείλουν την έκφραση επιβλαβών γονιδίων – στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία)
- ▶ **Κατανόηση Γενετικών Παθήσεων** (κατανόηση του πως μεταλλάξεις ή αλλαγές στη δομή του DNA επηρεάζουν τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που αλληλοεπιδρούν με αυτό, οδηγώντας σε γενετικές παθήσεις)
- ▶ **Βιοτεχνολογία & Γενετική** (π.χ. βιοαισθητήρες DNA-peptide)



(Source: Do You Know What Is Small Peptide Chelated Minerals (SPM) Product?, Sustarfeed. Available at: <https://www.sustarfeed.com/news/do-you-know-what-is-small-peptide-chelated-minerals-spm-product/>)

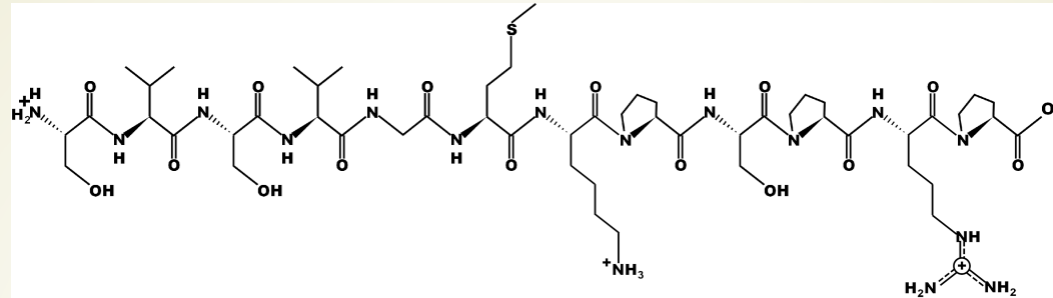


Μικρού μήκους πεπτίδια ως φάρμακα

- ▶ Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων πεπτιδίων με βιολογικά μακρομόρια όπως το DNA θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων.
 - ▶ Αντιβακτηριακά και Αντιικά Πεπτίδια
 - ▶ Αντικαρκινικά
 - ▶ Αντιφλεγμονώδη Πεπτίδια (αρθρίτιδα, φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, και άλλα αυτοάνοσα)
 - ▶ Αναλγητικά
 - ▶ Αντιοξειδωτικά πεπτίδια
 - ▶ Αντιγηραντικά πεπτίδια



Το δωδεκαμερές πεπτίδιο “SVSVGMPSPRP”



- ▶ **Ταυτοποίηση** μέσω τυχαιοποιημένης βιβλιοθήκης φάγου 12-μερών πεπτιδίων: ανταγωνιστική εκχύλιση με την DNA Μεθυλοτρανσφεράση M.TaqI και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μέσω δοκιμής ELISA.
- ▶ **Πιθανές εφαρμογές στην ιατρική:**
 - ▶ Ικανότητα Στόχευσης Όγκων: Αν αγνωρίζει τη νεοαγγειογένεση σε όγκους σε ποντίκια (ανθρώπινους όγκους). Δεν επηρεάζει τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία.
 - ▶ Σε συνδυασμό με λιποσωμικά μεταφερόμενη Δοξορουβικίνη βρέθηκε ότι αυξάνει το προσδόκιμο επιβίωσης σε ποντίκια με ανθρώπινες νεοπλασίες πνεύμονα και στοματικής κοιλότητας.
 - ▶ Συνδέεται με αντισώματα που εξουδετερώνουν τον ιό HIV-1.
 - ▶ Πιθανή αλληλεπίδραση με αντισώματα του ιού της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας.
- ▶ **Νανοτεχνολογία και Υλικά:** σύνθεση νανοσωματιδίων κοβαλτίου-πλατίνας, συνδέεται με νανοσωλήνες άνθρακα και χρωστικές, καθώς και σε μια πληθώρα ημιαγώγιμων ενώσεων.



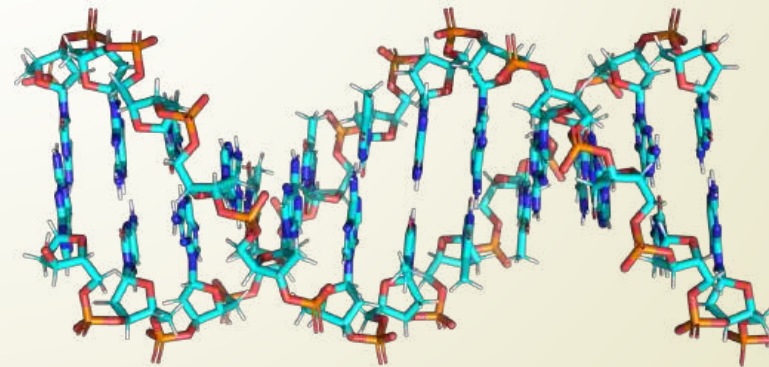
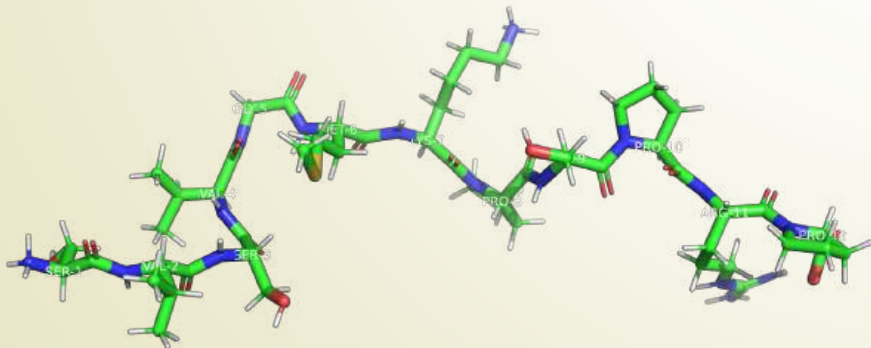
Μέθοδοι

- ▶ **100** διαφορετικές **πιθανές διαμορφώσεις** του 12-μερους πεπτιδίου ήταν διαθέσιμες σε PDB μορφή μέσω προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (MD).
- ▶ Αυτοματοποιημένο Docking με χρήση του εργαλείου **HDOCKlite** που οδήγησε στους «εκπροσώπους» του πεπτιδίου που εμφάνιζαν τη ευνοϊκότερη ενεργειακά πρόσδεση.
- ▶ Τα αποτελέσματα αυτά εξετάστηκαν περαιτέρω με τη χρήση δύο ακόμη εργαλείων docking: **HADDOCK** και **PyDockDNA** που οδήγησαν στα **τρία επικρατέστερα μοντέλα** πρόσδεσης του πεπτιδίου στο B-DNA.
- ▶ Τα μοντέλα αυτά απεικονίστηκαν με τη βοήθεια του εργαλείου **Pymol** και ακολούθησε **δομική ανάλυση** των αλληλεπιδράσεων που χαρακτηρίζουν τη μη-ειδική πρόσδεση του πεπτιδίου.



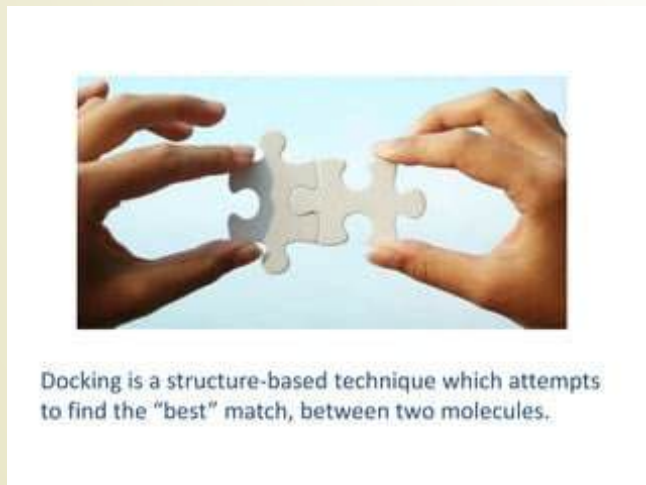
Προέλευση PDB αρχείων για πεπτίδιο και B-DNA

- ▶ Οι δομές **100 διαφορετικοί «εκπρόσωπων»** του 12-μερους πεπτιδίου
 - ▶ Οι διαμορφώσεις εξασφαλίστηκαν στη PDB μορφή τους από προηγούμενη έρευνα προσομοίωσης **αναδίπλωσης** μοριακής δυναμικής (**MD**) (Αλεξιάδου Δ., 2022).
 - ▶ Οι δομές αυτές αντιστοιχούν στους πιο αντιπροσωπευτικούς εκπροσώπους 100 συστάδων που προέκυψαν μέσω ανάλυσης κύριων συνιστωσών (**dPCA**) διεδρων γωνιών.
 - ▶ Στη συνέχεια για την ερμηνεία και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική **CARMA** και **GRCARMA** (Graphical CARMA). Τα εργαλεία αυτά βοηθούν στην επεξεργασία και ερμηνεία των δεδομένων προσομοίωσης.
- ▶ Δομή «κανονικού» **B-DNA**
 - ▶ Η δομή του B-DNA που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα έρευνα δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού **NAMOT** , το οποίο αξιοποιείται στη δημιουργία DNA νανο-δομών.



Αυτοματοποιημένο Docking με HDockLite

- ▶ Οι παράμετροι του Docking ρυθμίστηκαν και τα αρχεία σε μορφή PDB εισήχθησαν στο HDockLite.
- ▶ Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας για κάθε αρχείο PDB προέκυψε ένα αντίστοιχο αρχείο .dat για κάθε μοντέλο docking που δημιουργήθηκε.
- ▶ Στα αρχεία εξόδου περιέχεται το **ενεργειακό σκορ** που χαρακτηρίζει την πρόσδεση κάθε πόζας του πεπτιδίου που προσδέθηκε στο B-DNA.
- ▶ Η πληροφορία αυτή αξιοποιήθηκε για τη δημιουργία **διαγραμμάτων ενεργειακής βαθμολογίας** (energy score) σε σχέση με τις πόζες πρόσδεσης του κάθε εκπροσώπου του πεπτιδίου.
- ▶ Η μελέτη αυτών των διαγραμμάτων οδήγησε στους εκπροσώπους του πεπτιδίου που εμφάνιζαν την πιο αποδοτική πρόσδεση



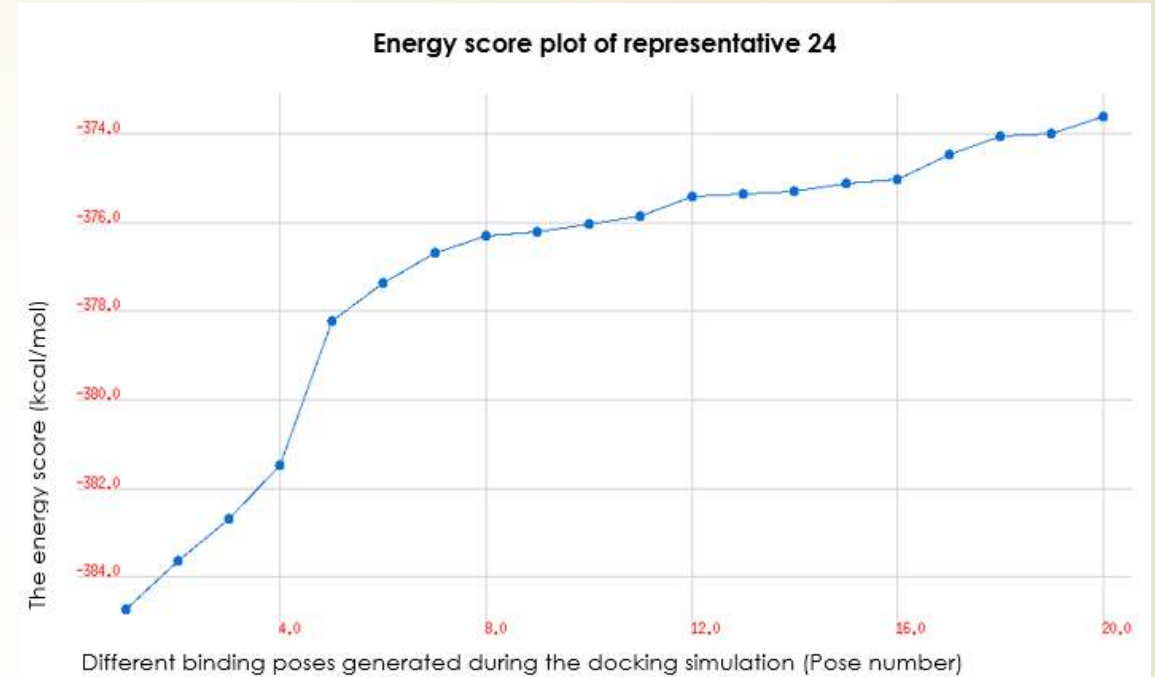
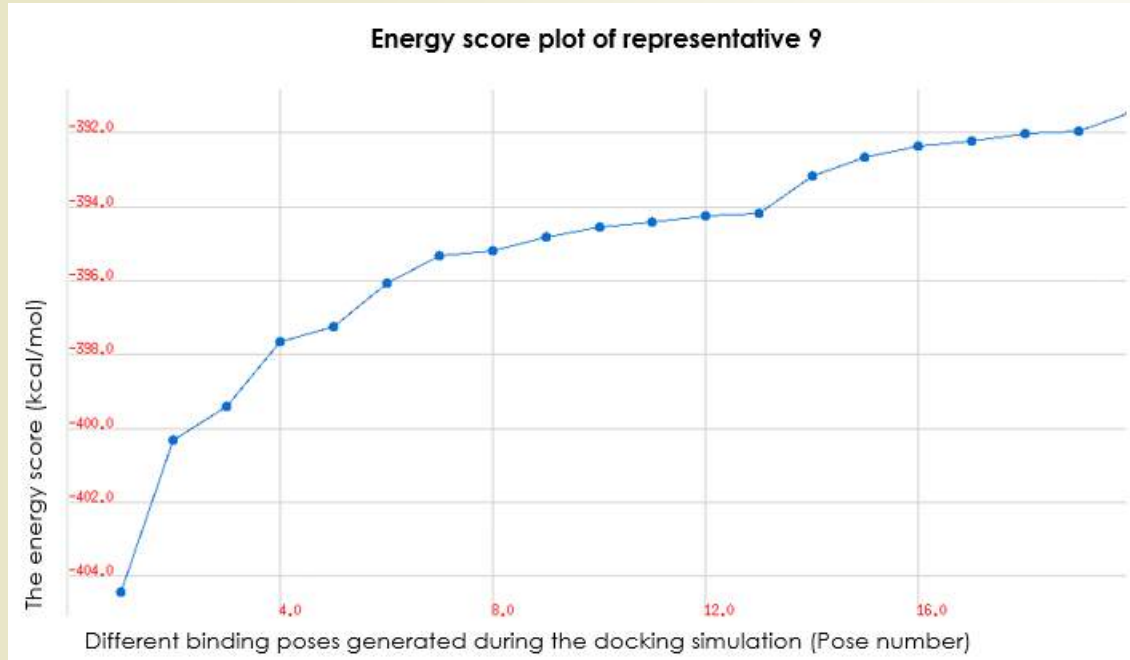
(Source: Pillai, Aswathy. Docking. 2024. SlideShare. Available at: <https://www.slideshare.net/pillaiaswathy/docking-75321729>)



(Source: Molecular Docking, Drug Design Org. available at: <https://www.drugdesign.org/chapters/molecular-docking/>)



Διαγράμματα Ενεργειακού Σκορ Πρόσδεσης

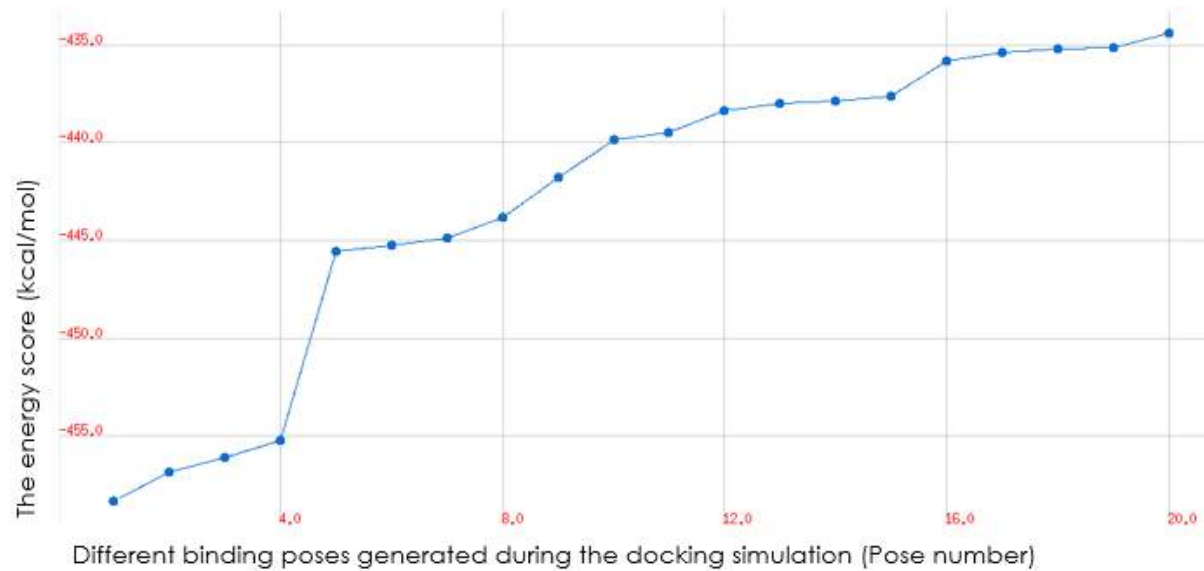


Παρατηρώντας τα διαγράμματα για τις 20 «πόζες» με τη χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης για κάθε εκπρόσωπο, μία απότομη πτώση της ενέργειας είναι το χαρακτηριστικό που καθιστά έναν εκπρόσωπο πιθανό αποτελεσματικό προσδέτη στο μόριο του B-DNA.

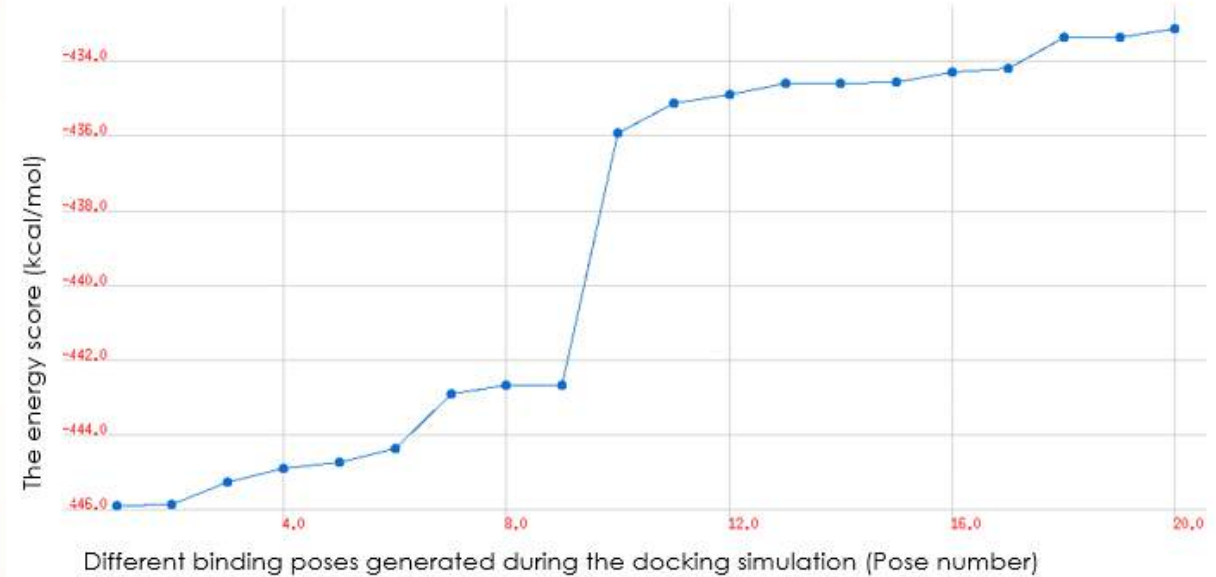


Διαγράμματα Ενεργειακού Σκορ Πρόσδεσης

Energy score plot of representative 42

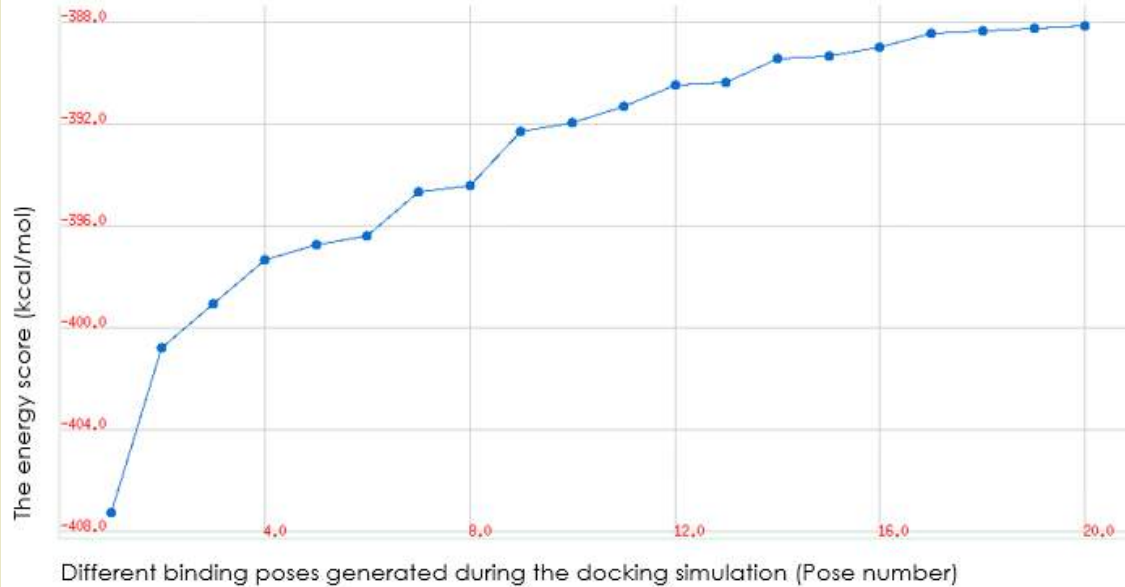


Energy score plot of representative 59

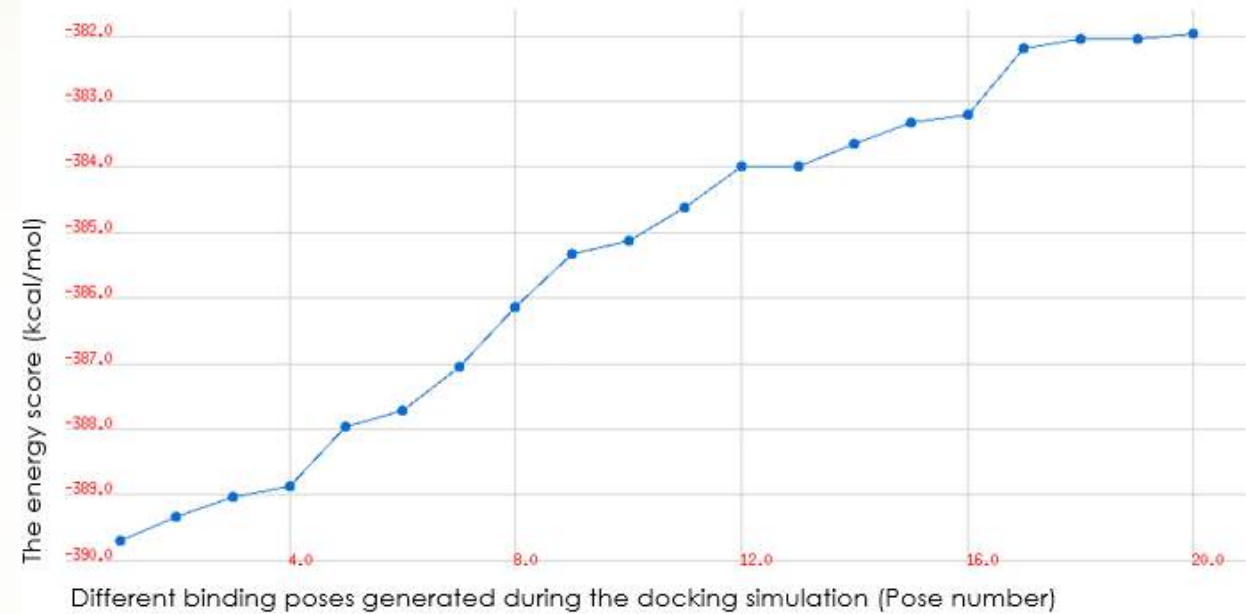


Διαγράμματα Ενεργειακού Σκορ

Energy score plot of representative 73



Energy score plot of representative 22

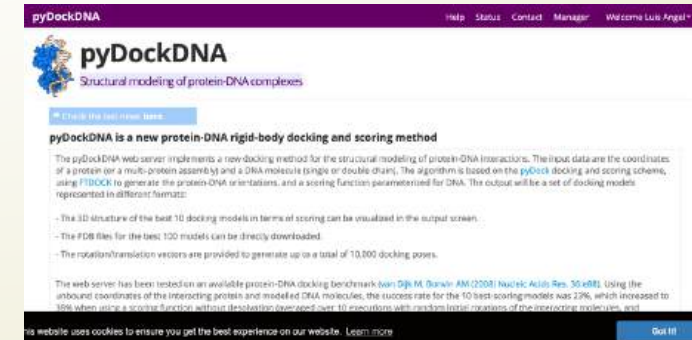


Το διάγραμμα του εκπροσώπου 22 είναι ένα παράδειγμα διαγράμματος που δεν εμφανίζει αυτή την απότομη πτώση ενέργειας, άρα δεν είναι πιθανή λύση.

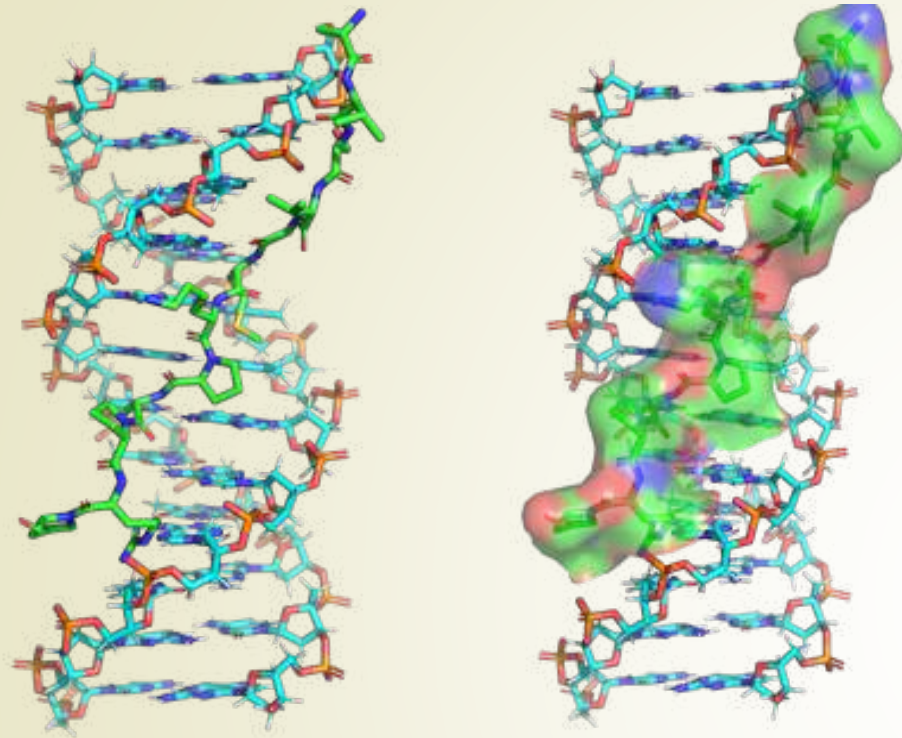


Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων με HADDOCK & PyDockDNA

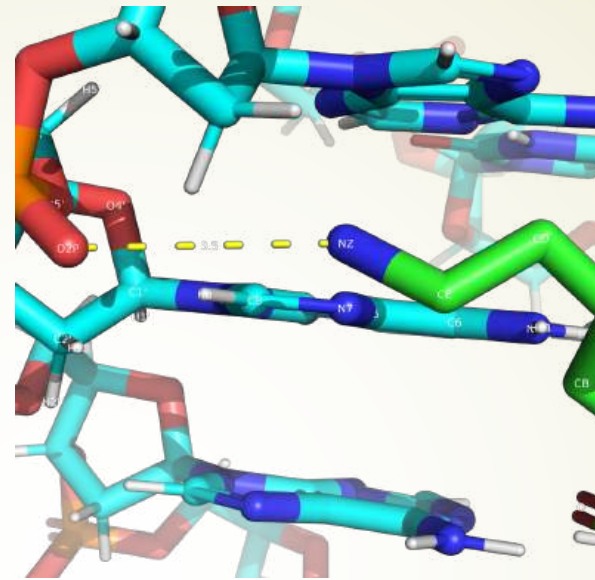
- **Οι 5 εκπρόσωποι** (9, 24, 42, 59, 73) με τα **πιο αποδοτικά διαγράμματα** ενεργειακής βαθμολογίας, υποβλήθηκαν σε δύο ακόμη γύρους docking με τα εργαλεία HADDOCK & PyDockDNA αντίστοιχα.
 - Κατά την καταχώρηση του B-DNA.pdb αρχείου στο πλατφόρμα του HADDOCK διαπιστώθηκε ότι κάποια άτομα υδρογόνου (H2'1, H2'2, H5'1, H5'2) δεν αναγνωρίζονταν σωστά και έπρεπε να αντικατασταθούν:
 - **H2'1 → H2A, H2'2 → H2B, H5'1 → H5A, H5'2 → H5B**
 - Επιπλέον άτομα όπως **"HTER"** και **"HCAP"** που δεν είναι κρίσιμα για τη δομή του DNA έπρεπε να αφαιρεθούν, αλλά παράλληλα να διατηρηθεί η σωστή αρίθμηση του αρχείου PDB
 - Όσο αφορά τα pdb αρχεία των πεπτιδίων παρατηρήθηκε ότι πολλαπλά άτομα χαρακτηρίζονταν από **τον ίδιο αριθμό καταλοίπου** ένα πρόβλημα που έπρεπε επίσης να αντιμετωπιστεί για να είναι τα αρχεία συμβατά με τα προγράμματα docking.
- Η ολοκλήρωση αυτού του σταδίου της έρευνας οδήγησε στους εκπροσώπους **9, 24 και 73** ως τα πιο αποτελεσματικά μοντέλα που περιγράφουν τη πρόσδεση του πεπτιδίου στο B-DNA.
- Τα μοντέλα αυτά απεικονίστηκαν με το εργαλείο **Pymol** και μελετήθηκαν περαιτέρω.



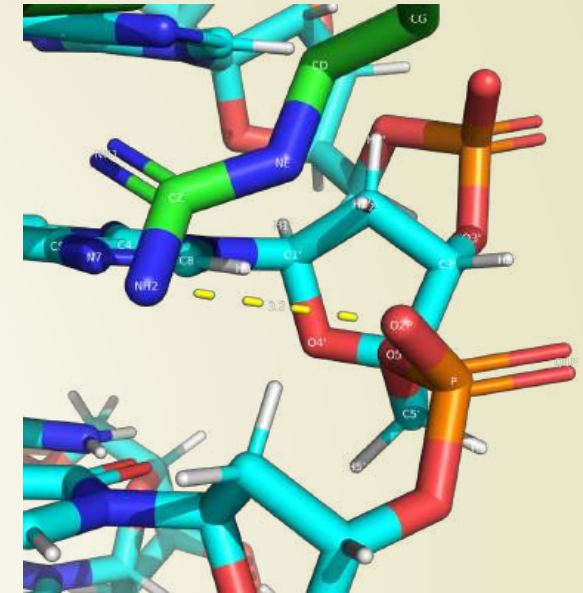
(I) Μοντέλο πρόσδεσης εκπροσώπου 9



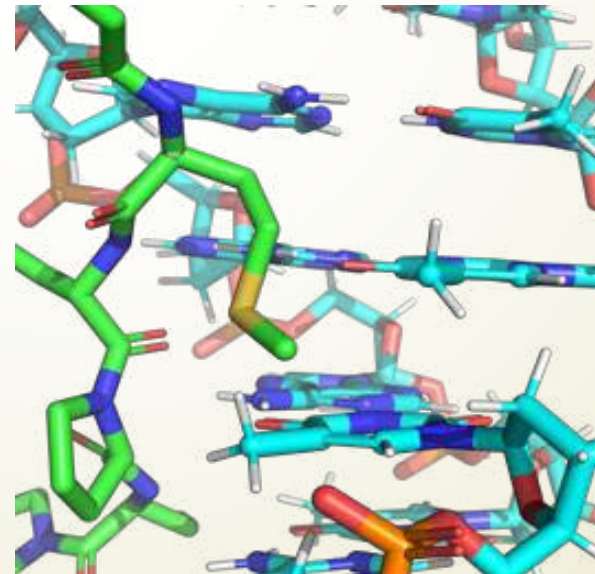
Στο συγκεκριμένο μοντέλο η πρόσδεση του πεπτιδίου διαμεσολαβείται από **ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις** (**Lys7** και **Arg11** με το backbone του DNA) ενώ επιπλέον οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες της **Met7** και της **Pro8** σχηματίζουν **Van der Waals** με τις αζωτούχες βάσεις του μορίου του B-DNA



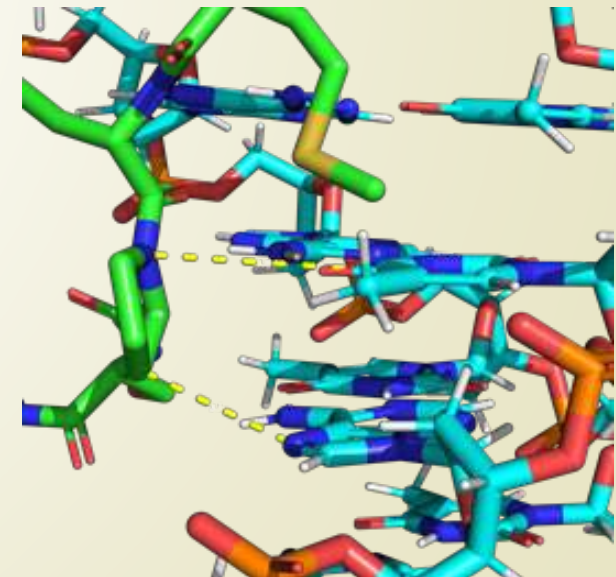
A



B

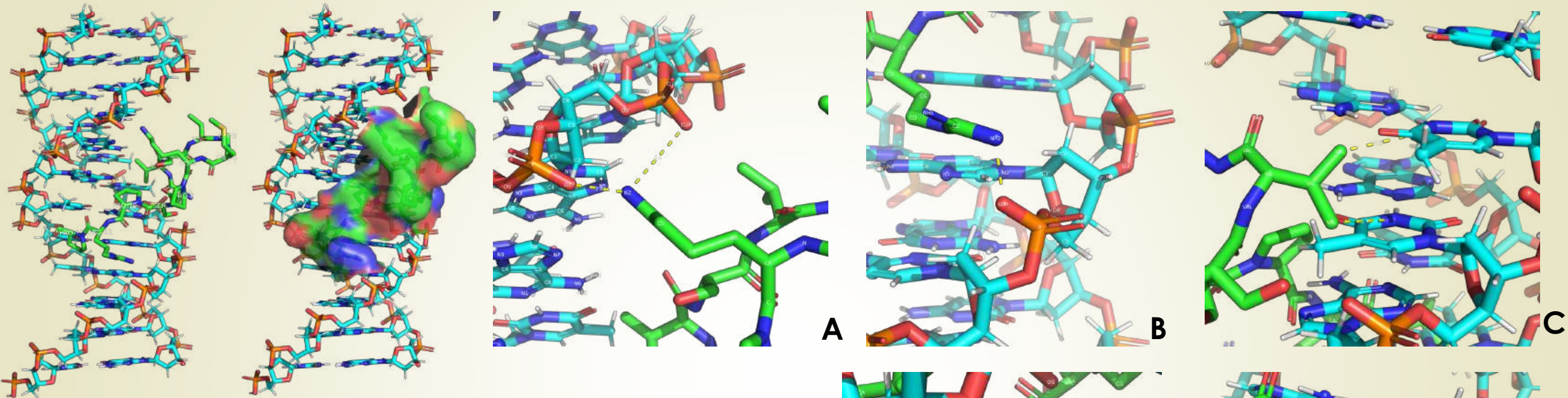


Γ



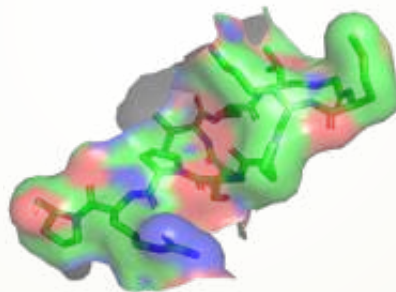
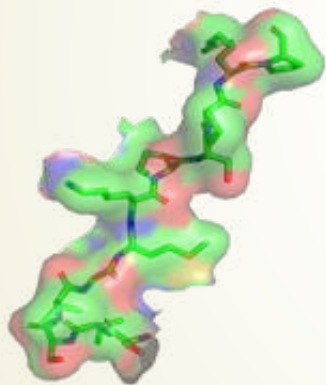
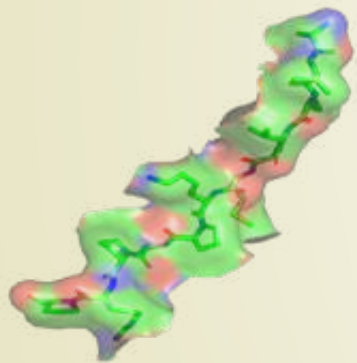
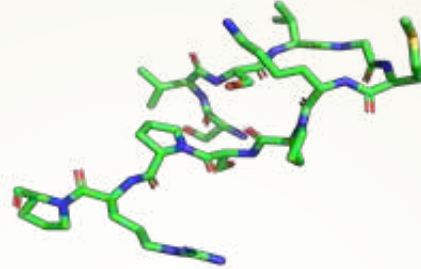
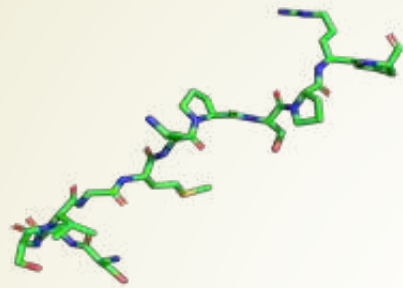
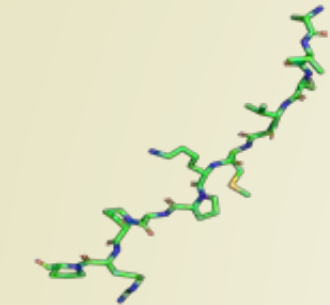
Δ

(III) Μοντέλο πρόσδεσης εκπροσώπου 73



Στο συγκεκριμένο μοντέλο η πρόσδεση του πεπτιδίου πραγματοποιείται μέσω **ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Lys7, Arg11)**, **υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις** μεταξύ της μη πολικής πλευρικής αλυσίδας της **Val4** και της **Pro8** και αρρωματικούς δακτυλίους των αζωτούχων βάσεων του DNA. Τέλος η δομή σταθεροποιείται περαιτέρω από το σχηματισμό **δεσμού υδρογόνου** μεταξύ του υδροξυλίου της πλευρικής ομάδας της **Ser1** και του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας του σκελετού του DNA.

Συγκρίνοντας τις 3 διαμορφώσεις πρόσδεσης



Representative 9

Representative 24

Representative 73

-64.096 kcal/mol

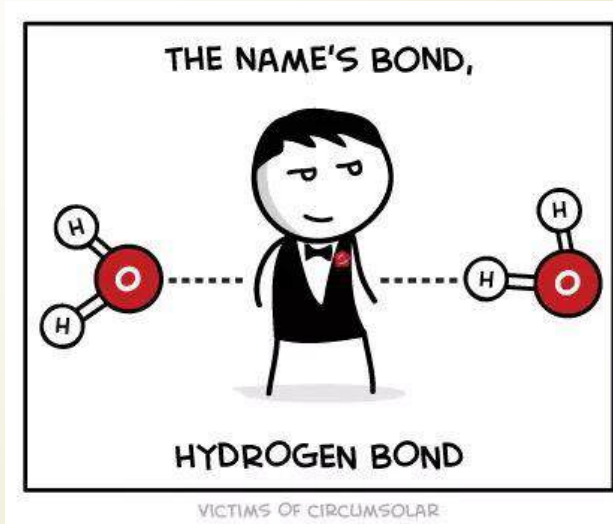
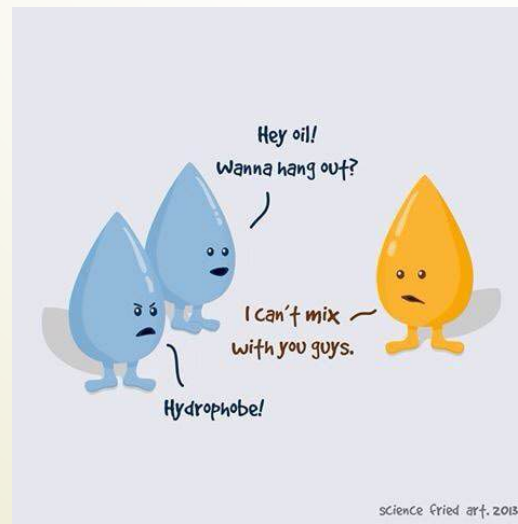
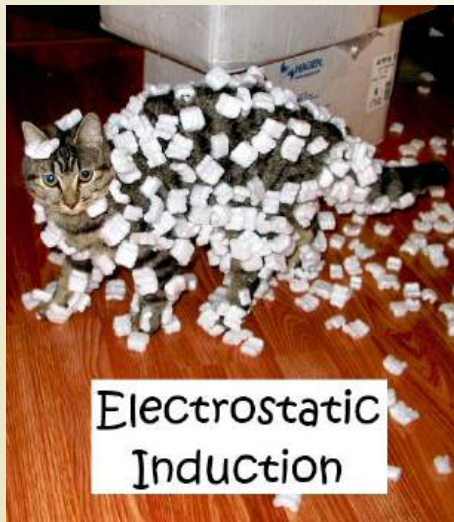
-68.985 kcal/mol

-73.811 kcal/mol

- Η διαμόρφωση του εκπροσώπου 9 παρουσιάζει την πιο εκτεταμένη διάταξη, καθώς και μία κυρτότητα στη διαμόρφωσή του που του επιτρέπει να αντικρίξει την μεγάλη αύλακα του DNA και να αλληλοεπιδρά μαζί της.
- Η διαμόρφωση του εκπροσώπου 24 είναι συγκριτικά λιγότερο εκτεταμένη.
- Η διαμόρφωση του εκπροσώπου 73 παρουσιάζει με διαφορά τη πιο συμπαγή διάταξη (ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις).
- Συγκρίνοντας παράλληλα και τις αντίστοιχες ενέργειες πρόσδεσης, όπως παρουσιάζονται κάτω, η έρευνα καταλήγει στο συμπέρασμα ότι **η πιο συμπαγής διαμόρφωση (εκπρόσωπος 73), συνδέεται πιο αποτελεσματικά στο B-DNA** καθώς χαρακτηρίζεται από την πιο χαμηλή ολική ενέργεια πρόσδεσης με βάση τα ευρήματα (-73,811)

Σύνοψη-Συμπεράσματα

- Σκοπός της έρευνας ήταν να σκιαγραφήσει τα βασικά χαρακτηριστικά που διέπουν την δέσμευση του 12-μερούς πεπτιδίου στο μόριο του B-DNA, με τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων.
- **Η θέση** στην οποία δεσμεύεται το πεπτίδιο **δεν είναι συγκεκριμένη** καθώς δεσμεύεται μη-ειδικά, χωρίς να αναγνωρίζει κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο της ακολουθίας των βάσεων του DNA.
- Παρ' ολ' αυτά τα **τρία μοντέλα** (9, 24, 73) στα οποία κατέληξε η έρευνα φαίνεται να **συγκλείνουν ως προς το είδος των αλληλεπιδράσεων** που αναπτύσσονται ανάμεσα στο 12-μερές πεπτίδιο και το μόριο B-DNA.
- **Ηλεκτροστατικές** (Lys7, Arg11), **υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις** και **van der waals** (Val4, Met7, Pro8), χαρακτηρίζουν αυτή την αλληλεπίδραση, ενώ σε μικρότερο βαθμό ο σχηματισμός **Δεσμών Υδρογόνου** (Ser1).



Κύριοι Περιορισμοί Έρευνας

- ▶ Το πεπτίδιο προσομοιώθηκε σε **ελεύθερη μορφή** (απουσία DNA), γεγονός που μπορεί να μειώσει την ακρίβεια των προβλέψεων.
- ▶ Η αλληλεπίδραση μοντελοποιήθηκε ως **στατική**, παραβλέποντας τις συνεχιζόμενες αλλαγές που πραγματοποιούνται τόσο στη διαμόρφωση του πεπτιδίου όσο και του B-DNA κατά τη διαδικασία της πρόσδεσης. Στη πραγματικότητα κατά την πρόσδεση επιτυγχάνεται μια **δυναμική ισορροπία** μεταξύ των δύο μορίων, το μοντέλο δεν θα έπρεπε να είναι στατικό.
- ▶ Η αλληλουχία του B-DNA επιλέχθηκε **τυχαία**. Διαφορετικές αλληλουχίες DNA θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα δέσμευσης (διαφορετικά ηλεκτροστατικά δυναμικά, ικανότητα σχηματισμού ΔΗ, μήκος μικρής και μεγάλης αύλακας).
- ▶ Αυτοί οι περιορισμοί μπορεί να μειώσουν την ικανότητα εφαρμογής των ευρημάτων σε **πραγματικά βιολογικά συστήματα**, απαιτώντας **προσεκτική ερμηνεία** και **περαιτέρω μελέτη** με πιο ρεαλιστικά μοντέλα.



Μελλοντικοί Στόχοι

- ▶ Μελλοντική έρευνα μπορεί να περιλαμβάνει μελέτη **προσομοίωση μοριακής δυναμικής** του **πεπτιδίου**, παρουσία ενός **ολιγομερούς DNA**. Μια τέτοια προσομοίωση θα επέτρεπε στο πεπτίδιο να εξερευνήσει πιθανές βιολογικά σημαντικές διαμορφώσεις, που θα ήταν απρόσιτες ή ασταθείς στην απουσία του DNA. Για την επίτευξη πιο ρεαλιστικών μοντέλων αλληλεπίδρασης.
- ▶ Θα μπορούσε επιπλέον να πραγματοποιηθεί και πειραματική μελέτη του πεπτιδίου μέσω π.χ. **alanine scan** (12 μεταλλαγμένες εκδοχές του πεπτιδίου εξετάζονται για την ικανότητά τους να δεσμεύονται στο μόριο του DNA)
- ▶ Απώτερος σκοπός αυτών των πειραμάτων θα μπορούσε να είναι ο σχεδιασμός ενός πεπτιδίου το οποίο δεσμεύεται **πιο ισχυρά** ή/και **με ειδικότητα**.



Σας Ευχαριστώ Πολύ για την Προσοχή σας!

