



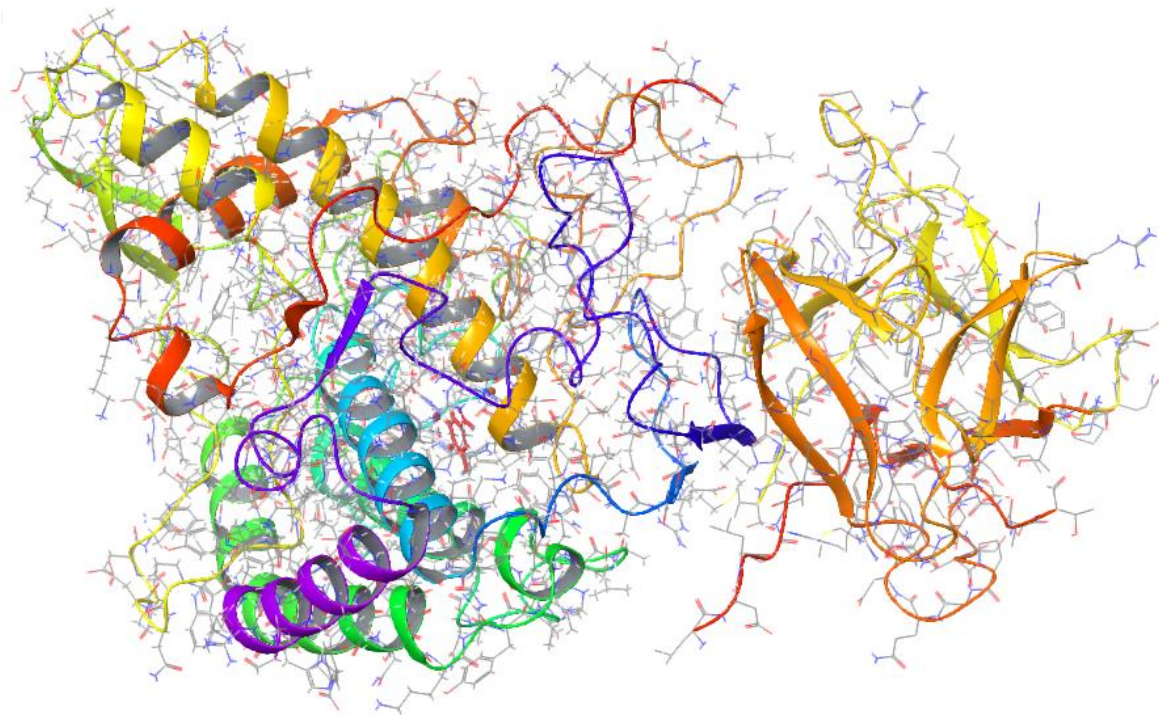
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Υπολογιστικές τεχνικές για την αναζήτηση νέων  
ενώσεων αναστολέων της ενζυμικής αμαύρωσης»**



**Όνοματεπώνυμο: ΓΚΟΡΤΣΑ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ (ΑΜ: 18684004)**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΚΡΙΤΣΗ ΕΥΤΥΧΙΑ**

**ΑΙΓΑΛΕΩ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2023**



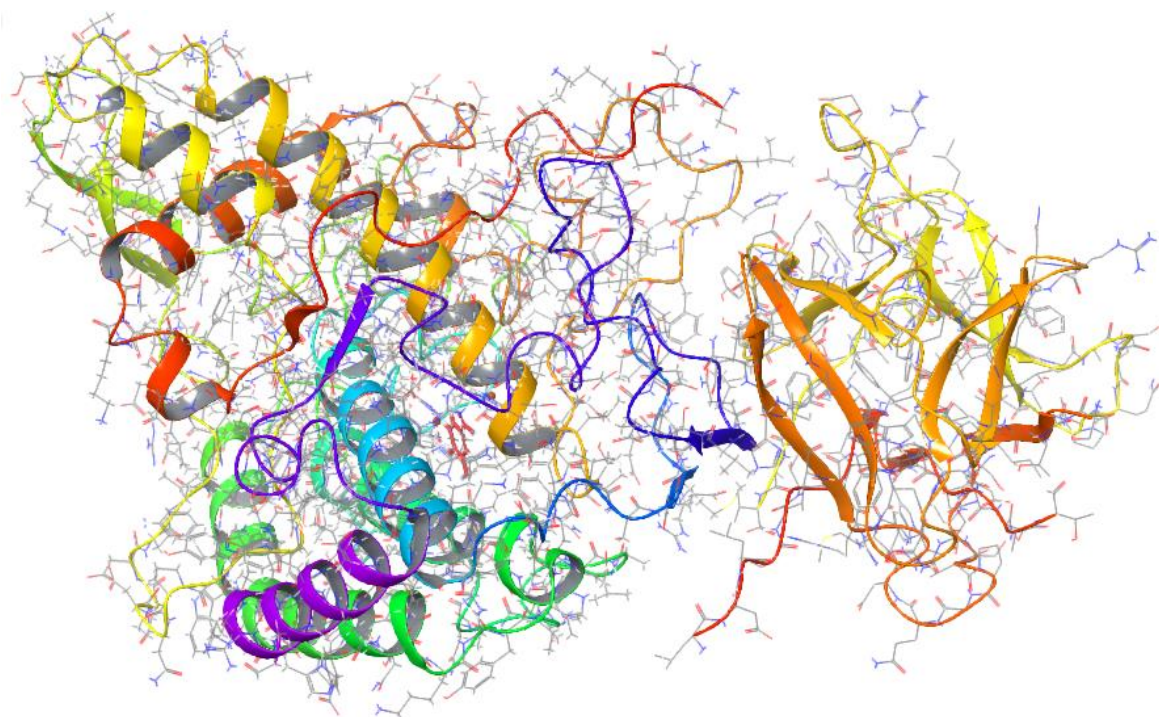
UNIVERSITY OF WEST ATTICA SCHOOL

SCHOOL OF FOOD SCIENCE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

**DIPLOMA THESIS**

**“Computational techniques for the discovery of novel  
compounds inhibitors of enzymatic browning”**



**Name of Student: GKORTSA ELEFThERIA (RN: 18684004)**

**Supervisor: KRITSI EFTICHIA**

**AIGALEO, JULY 2023**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Υπολογιστικές τεχνικές για την αναζήτηση νέων ενώσεων  
αναστολέων της ενζυμικής αμάρωσης»**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή**

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
01	ΕΥΤΥΧΙΑ ΚΡΙΤΣΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	
02	ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
03	ΘΑΛΕΙΑ ΤΣΙΑΚΑ	ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΕΣΠΑ	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γκορτσά Ελευθερία του Αθανασίου, με αριθμό μητρώου 18684004 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».



Η Δηλούσα  
ΓΚΟΡΤΣΑ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Κρίση Ευτυχία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ, για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και τον χρόνο που διέθεσε δίνοντας μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις παρατηρήσεις τους καθώς επίσης και για τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, οφείλω επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την πολύτιμη υποστήριξη σε όλο το διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	13
Abstract.....	14
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ .....</b>	<b>15</b>
1.1 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΜΑΥΡΩΣΗ.....	15
1.2 ΦΑΙΝΟΛΑΣΕΣ .....	17
1.3 ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ.....	18
1.3.1 Καταλυτικός κύκλος μελανίνης.....	20
1.3.2 Δομή και λειτουργία τυροσινάσης.....	22
1.3.3 Στάδια οξείδωσης τυροσινάσης.....	25
1.3.3.1 Η οξείδωση των φαινολών σε ορθοκινόνες: <i>oxy</i> → <i>deoxy</i> -τυροσινάση .....	27
1.3.3.2 Η οξείδωση των κατεχολών σε ορθοκινόνες: <i>oxy</i> → <i>met</i> -τυροσινάση .....	28
1.3.3.3 Η αυτοενεργοποίηση και η περίοδος υστέρισης: <i>met</i> → <i>deoxy</i> -τυροσινάση .....	29
1.3.3.4 Αδρανοποίηση από κατεχόλες και ρεσορκινόλες: <i>oxy</i> → <i>deact</i> -τυροσινάση .....	32
1.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ .....	34
1.4.1 Κατηγορίες αναστολέων (συνθετικές και φυσικές ενώσεις).....	36
1.4.1.1 Συνθετικοί αναστολείς .....	37
1.4.1.2 Φυσικές ενώσεις αναστολέων τυροσινάσης.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗ (VIRTUAL SCREENING) .....</b>	<b>43</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	43
2.2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ .....	43
2.2.1 Zinc Database .....	43
2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ.....	44
2.3.1 Εισαγωγή .....	44
2.3.2 Το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης - Glide .....	44
2.3.3 Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης.....	45
2.3.4 Προετοιμασία Πρωτεΐνης .....	45
2.3.5 Προετοιμασία Προσδετών .....	45
2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	47
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ .....</b>	<b>48</b>
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	48

3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ .....	48
3.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ .....	49
3.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ .....	50
3.4.1 Επικύρωση μεθόδων μοριακής πρόσδεσης .....	50
3.4.2 Εκτέλεση πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης .....	52
3.4.3 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων .....	52
3.4.4 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης .....	52
3.4.5 Εφαρμογή του αλγορίθμου πρόσδεσης μέσω εφαρμογής Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced-Fit Docking) .....	73
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....</b>	<b>77</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>78</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Η πρώτη δομή απεικονίζει το κοτζικό οξύ και η δεύτερη δομή την τροπολόνη 36
- Εικόνα 2:** Χημική δομή ορισμένων ισχυρών φυσικών αναστολέων τυροσινάσης. ....39
- Εικόνα 3:** Χημικές δομές αντιπροσωπευτικών φλαβονοειδών.....40
- Εικόνα 4:** Αντιπροσωπευτικές χαλκόνες με ανασταλτική δράση έναντι της τυροσινάσης 40
- Εικόνα 5:** Γνωστά παράγωγα ρεσβερατρόλης που δρουν ανασταλτικά ως προς το ένζυμο της τυροσινάσης.....41
- Εικόνα 6:** Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου της τυροσινάσης από το μανιτάρι *Agaricus bisporus*, συμπλοκοποιημένο με τον αναστολέα τροπολόνη (Κωδικός PDB: 2Y9X)..... 50
- Εικόνα 7:** Υπέρθηση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης, έπειτα από την εφαρμογή του Glide SP. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση - Glide SP.....51
- Εικόνα 8:** Υπέρθηση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης, έπειτα από την εφαρμογή του Glide SP. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση - Glide XP.....51
- Εικόνα 9:** Υπέρθηση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης έπειτα από την εφαρμογή του IFD. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση – IFD. ....51
- Εικόνα 10:** Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. 58
- Εικόνα 11:** Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 4-Hydroxyisophthalic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....59
- Εικόνα 12:** Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol A στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....60
- Εικόνα 13:** Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Salicylic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP ..... 61
- Εικόνα 14:** Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Vanillic acid στο



ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	62
<b>Εικόνα 15:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης p- Hydroxybenzoic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	63
<b>Εικόνα 16:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Rhein στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	64
<b>Εικόνα 17:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Gallic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	65
<b>Εικόνα 18:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Benzoic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	66
<b>Εικόνα 19:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Protocatechuic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide SP. ....	67
<b>Εικόνα 20:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl)lactic acid sodium salt R στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide XP. ....	68
<b>Εικόνα 21:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol C στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide XP. ....	69
<b>Εικόνα 22:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Salicylic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide XP. ....	70
<b>Εικόνα 23:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Salvianolic acid C στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide XP. ....	70
<b>Εικόνα 24:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (-)-Epigallocatechin 3-gallate στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide XP. ....	71
<b>Εικόνα 25:</b> Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Vanillic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X)	

μετά την εφαρμογή του Glide XP.....	72
<b>Εικόνα 26:</b> (Αριστερά) διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκκομένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.....	74
<b>Εικόνα 27:</b> (Αριστερά) διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Salicylic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκκομένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.....	74
<b>Εικόνα 28:</b> (Αριστερά) διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Secoisolariciresinol B στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκκομένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.....	75
<b>Εικόνα 29:</b> (Αριστερά) διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Vanillic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού <i>Agaricus bisporus</i> (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκκομένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.....	76

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Γενικές ομάδες συνθετικών αναστολέων.....	37
<b>Πίνακας 2:</b> Παραδείγματα ερευνών συνθετικών αναστολέων .....	37
<b>Πίνακας 3:</b> Παραδείγματα ενώσεων με ανασταλτική δράση που ανοίκουν στις κατηγορίες των φλαβονοειδών.....	39
<b>Πίνακας 4:</b> Οι φυσικές ενώσεις με τις καλύτερες αξιολογήσεις στον Glide-SP .....	53
<b>Πίνακας 5:</b> Οι φυσικές ενώσεις με τις καλύτερες αξιολογήσεις στον Glide-XP .....	56
<b>Πίνακας 6:</b> Κοινές ενώσεις που προέκυψαν έπειτα από την εφαρμογή των Glide-SP και Glide-XP .....	73

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Το πρώτο σχήμα απεικονίζει την δραστικότητα της φαινολάσης, ενώ το δεύτερο σχήμα την δραστικότητα της κατεχολάσης.....	18
<b>Σχήμα 2:</b> Οι τέσσερις πιθανές καταστάσεις οξείδωσης της τυροσινάσης.....	19
<b>Σχήμα 3:</b> Η αλληλοσυσχέτιση των τεσσάρων διακριτών καταστάσεων οξείδωσης της τυροσινάσης.....	20
<b>Σχήμα 4:</b> Eoxy/Emet /Edeoxy μορφές κατάστασης οξείδωσης της τυροσινάσης. Καταλυτικός μηχανισμός κύκλου μονοφαινόλης και κύκλου διφαινόλης. Eoxy M: μονοφαινολάση Eoxy σύμπλοκο, Eoxy D: διφαινολάση Eoxy σύμπλοκο, Emet D: σύμπλοκο διφαινολάσης Emet. ....	23
<b>Σχήμα 5:</b> Μονοφαινολική και διφαινολική δράση της τυροσινάσης.....	24
<b>Σχήμα 6:</b> Η τυροσινάση καταλύεται με 2 τρόπους οξείδωσης.....	25
<b>Σχήμα 7:</b> Καταστάσεις οξείδωσης των δύο ατόμων Cu .....	26
<b>Σχήμα 8:</b> Αλληλομετατροπή oxy→deoxy- τυροσινάση.....	27
<b>Σχήμα 9:</b> Μετατροπή oxy→met- τυροσινάση από κατεχόλες .....	29
<b>Σχήμα 10:</b> Η μετατροπή met→deoxy- τυροσινάση από κατεχόλες .....	30
<b>Σχήμα 11:</b> Οξειδοαναγωγική ανταλλαγή που οδηγεί σε μη ενζυμικό σχηματισμό της dopa .....	31
<b>Σχήμα 12:</b> Η αναδιάταξη σε κινομεθάνιο αποτρέπει το σχηματισμό μιας κατεχόλης που ενεργοποιεί τα ένζυμα.....	32
<b>Σχήμα 13:</b> Η μετατροπή oxy→deact-τυροσινάη από κατεχόλες.....	34

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί ραγδαία η αγορά φρούτων και λαχανικών λόγω της αλλαγής των διατροφικών συνηθειών των καταναλωτών, οι οποίοι υιοθετούν πιο υγιή πρότυπα. Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι σημαντικά για την υγεία των καταναλωτών λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ουσίες. Ωστόσο, αλλοιώνονται πολύ γρήγορα μετά την επεξεργασία τους στο σπίτι ή στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις λόγω της ενζυμικής αμαύρωσης. Η αντιμετώπιση της ενζυμικής αμαύρωσης αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τις βιομηχανίες τροφίμων και τους τεχνολόγους τροφίμων. Συγκεκριμένα, δύο είναι τα ένζυμα που ευθύνονται για την αμαύρωση, η πολυφαινόλη (PPO) και η υπεροξειδάση (POD). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάζεται η ενζυμική αμαύρωση που προκαλείται μέσω των πολυφαινολών και συγκεκριμένα από το ένζυμο τυροσινάση (EC1.14.18.1).

Συγκεκριμένα, στόχος της εργασίας είναι η εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών (*in silico* τεχνικές) για την εύρεση φυσικών ενώσεων πιθανών αναστολέων του εξεταζόμενου ενζύμου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική έρευνα για τις λειτουργίες της τυροσινάσης. Μελετήθηκε η ενζυμική αμαύρωση και συγκεκριμένα ο ρόλος του ενζύμου φαινόλαση σε αυτή. Ακολούθησε εκτενής περιγραφή του ενζύμου και των τεσσάρων οξειδωτικών καταστάσεων του καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια, ακολούθησε μέσω εκτενούς ανασκόπησης επιστημονικών πηγών, η διερεύνηση των γνωστών φυσικών και συνθετικών αναστολέων της τυροσινάσης.

Στο δεύτερο τμήμα της εργασίας, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών, για την εύρεση νέων ενώσεων πιθανών αναστολέων του ενζύμου της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus*. Συγκεκριμένα, πειράματα μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) εφαρμόστηκαν σε βιβλιοθήκη φυσικών ενώσεων. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι ενώσεις που ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες α) οργανικά οξέα-εστέρες, β) κουμαρίνες, γ) λιγνάνες, δ) παράγωγα κινναμικού οξέος, ε) ανθρακινόνες και στ) κατεχίνες εμφάνισαν ενδιαφέρουσα ανασταλτική ικανότητα. Η ικανότητα αναστολής των προτεινόμενων ενώσεων θα εξεταστεί μελλοντικά με *in vitro* δοκιμές με απώτερο στόχο την εφαρμογή τους σε συσκευασμένα τρόφιμα.

**Λέξεις - Κλειδιά:** τυροσινάση, ενζυμική αμαύρωση, *in silico* μελέτες, μοριακή πρόσδεση, αναστολείς, φυσικές ενώσεις, φρούτα-λαχανικά

## ABSTRACT

In recent decades, the fruit and vegetable market has grown rapidly due to the changing eating habits of consumers, who are adopting healthier patterns. Fruits and vegetables are important for consumer's health due to their high fibre, vitamin and antioxidant content. However, they deteriorate very quickly after being processed at home or in industrial facilities due to enzymatic browning. Enzymatic browning is an important issue to be addressed from food industries and food technologists. Particularly, two enzymes are responsible for browning, polyphenol (PPO) and peroxidase (POD). In the present thesis, enzyme-induced browning by polyphenols and specifically by the enzyme tyrosinase (EC1.14.18.1) is discussed.

The aim of the present thesis is the application of computational techniques (*in silico* techniques) to discover novel natural compounds that are potential inhibitors of the examined enzyme. For this scope, a literature review was carried out on the functions of tyrosinase. Also, enzymatic browning was studied and the role of the enzyme phenolase. An extensive description of the enzyme and its four oxidation states was followed, as well as the interaction between them. In continuation, through an extensive review of scientific sources, well-known natural and synthetic tyrosinase inhibitors were investigated.

The second part of the study includes the application of computational techniques to reveal natural compounds as potential inhibitors of the tyrosinase enzyme of the mushroom *Agaricus bisporus*. In particular, molecular docking studies were performed to a library of natural compounds. The evaluation of the results indicated that compounds belonging to the following categories (a) organic acid - esters, (b) coumarins, (c) lignans, (d) quinamic acid derivatives, (e) anthraquinones and (f) catechins showed interesting predicted inhibitory capacity. The inhibitory activity of the proposed compounds will be investigated in the future through *in vitro* tests with the ultimate goal of their application in packaged foods.

**Keywords:** tyrosinase, enzymatic browning, *in silico* studies, molecular docking, inhibitors, natural compounds, fruits and vegetables

## Θεωρητικό Μέρος

### Κεφάλαιο 1. Το ένζυμο της τυροσινάσης

#### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΜΑΥΡΩΣΗ

Μια μακροχρόνια πρόκληση για τον τομέα της βιομηχανίας τροφίμων είναι η διαδικασία αντιμετώπισης της αμαύρωσης, ενός φυσικού φαινομένου που παρουσιάζεται στα φρούτα και στα λαχανικά. Συγκεκριμένα, είναι μια διαδικασία σταδιακής αλλαγής χρώματος των οπωροκηπευτικών σε καφέ ή σκούρο καφέ χρώμα με την πάροδο του χρόνου, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των τροφίμων με αρνητικό τρόπο. Η ανεπιθύμητη αυτή κατάσταση έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα των τροφίμων, προκαλώντας υποβάθμιση των θρεπτικών και αισθητηριακών ιδιοτήτων, καθώς επίσης επηρεάζει και την ασφάλεια των τροφίμων. Η εμφάνιση των προϊόντων αποτελεί κύριο μέλημα των καταναλωτών. Επομένως, η χρωματική εμφάνιση του τρόφιμου είναι ένας από τους δείκτες που λαμβάνουν υπόψη οι καταναλωτές στη διαδικασία επιλογής τους. Οι αντιδράσεις αμαύρωσης στα τρόφιμα, συνήθως επηρεάζουν αρνητικά την εμφάνιση του χρώματος των τροφίμων, μειώνοντας σημαντικά την αποδοχή των προϊόντων από τον καταναλωτή. Οι επιστήμονες και οι τεχνολόγοι τροφίμων εξέφρασαν τις ανησυχίες τους σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις που έχει η επίδραση του καφέ χρώματος στα φρούτα και τα λαχανικά, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την οικονομική κατάσταση μιας χώρας. (Kyoung Mi Moon et al., 2020, Norfadilah Hamdan et al., 2022)

Η αντίδραση αμαύρωσης στα φρούτα και τα λαχανικά διακρίνεται σε ενζυμική και μη ενζυμική αμαύρωση, ανάλογα με τον μηχανισμό που λαμβάνει χώρα. Η μη ενζυμική αντίδραση αμαύρωσης δημιουργεί μια ουσία καφέ χρώματος μέσω μιας χημικής αντίδρασης περιλαμβάνει μία μόνο ένωση ή πολλαπλά συστατικά στα τρόφιμα, χωρίς τη συμμετοχή οποιασδήποτε ενζυμικής δραστηριότητας και σχετίζεται με χημικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την αντίδραση Maillard, την καραμελοποίηση και την οξειδωση με ασκορβικό οξύ. Στα τρόφιμα, οι συγκεκριμένες αντιδράσεις πραγματοποιούνται, κυρίως σε συνδυασμό και όχι ως μεμονωμένες αντιδράσεις, επειδή τα τρόφιμα αποτελούνται από πολύπλοκα συστατικά. (Kyoung Mi Moon et al., 2020)

Αντίθετα, η ενζυμική αντίδραση αμαύρωσης είναι το φυσικό μαύρισμα των φρέσκων φρούτων ή λαχανικών και γενικά χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή των φαινολικών συστατικών των τροφίμων προς σκουρόχρωμες πολυμερείς ενώσεις, τις μελανίνες. Η αντίδραση αυτή ανησυχεί τους επιστήμονες, διότι τα ένζυμα που προκαλούν την ενζυμική

αντίδραση υπάρχουν φυσικά στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τη δράση του ενζύμου οξειδάση της πολυφαινόλης (PPO) που απαντάται φυσικά στα τρόφιμα. (Norfadilah Hamdan et al., 2022, Σφλώμος Κωνσταντίνος et al., 2019)

Η ενζυμική αμαύρωση φρούτων και λαχανικών αποτελεί συνέπεια μηχανικών και φυσικών καταπονήσεων που συμβαίνουν κατά τη μετασυλλεκτική επεξεργασία και αποθήκευση. Επίσης, συμβαίνει με έκθεση στον αέρα έπειτα από το κόψιμο και τον τεμαχισμό και σε πολτοποιημένες καταστάσεις ή με μηχανική βλάβη κατά τη μεταφορά και απόψυξη κατεψυγμένων ή ψυχρών τροφίμων. Η ενζυμική αμαύρωση φρούτων και λαχανικών δεν είναι επιθυμητή και προκαλεί μεγάλες οικονομικές απώλειες, τόσο στους παραγωγούς τροφίμων όσο και στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων, καθώς η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε βιομηχανικό επίπεδο κατά τον χειρισμό, τη μεταφορά, την αποθήκευση και την επεξεργασία μετά τη συγκομιδή. Σημειώνεται ότι οι μισές από τις παγκόσμιες καλλιέργειες οπωροκηπευτικών απορρίπτονται λόγω των αλλοιώσεων μετά τη συγκομιδή. (M.Victoria Martinez et al., 2000, Norfadilah Hamdan et al., 2022, Balwinder Singh et al., 2018, Federica Tinello et al., 2018 )

Κατά συνέπεια, το ενζυμικό καφέ χρώμα επηρεάζει όχι μόνο την εναλλαγή των χρωμάτων, αλλά οδηγεί, επίσης σε διατροφικές και οργανοληπτικές απώλειες, οδηγώντας σε μικρότερη εμπορευσιμότητα και χαμηλότερη αποδοχή από τους καταναλωτές. Μηχανικά και φυσικά ερεθίσματα που περιλαμβάνουν το ξεφλούδισμα, το κόψιμο, τον τεμαχισμό, τον τεμαχισμό κατά την επεξεργασία των τροφίμων και σοβαρές αλλαγές θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση μπορεί να προκαλέσουν φυσικές βλάβες στους ιστούς των φρούτων και των λαχανικών. Λόγω της βλάβης των ιστών, οι φαινολικές ενώσεις και τα ένζυμα PPO που απαντώνται στα τρόφιμα εκτίθενται στο οξυγόνο, προκαλώντας την οξείδωση των φαινολών σε κινόνες. Στη συνέχεια, οι παραγόμενες κινόνες και τα παράγωγά τους πολυμερίζονται μέσω πολυάριθμων αντιδράσεων, σχηματίζοντας μια σχετικά αδιάλυτη καφέ χρωστική ουσία γνωστή ως μελανίνη. Ο βαθμός αμαύρωσης σχετίζεται με διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως η ειδικότητα του υποστρώματος, το pH και το προφίλ T που ποικίλλουν ανάλογα με την πηγή του ενζύμου. (Kyoung Mi Moon et al., 2020, Norfadilah Hamdan et al., 2022, Federica Tinello et al., 2018)



## 1.2 ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Μια ενζυμική αντίδραση αμαύρωσης καταλύεται από μια ομάδα ενζύμων με τη συνεργιστική δράση μονοσθενούς ή δισθενούς χαλκού, ο οποίος αποτελεί προσθετική ομάδα στα ένζυμα. Συγκεκριμένα, ποικίλες πολυφαινολικές ουσίες, οι οποίες περιέχονται στο κενοτόπιο των φυτικών κυττάρων, συνήθως οξειδώνονται από την παρουσία του ενζύμου φαινόλαση που ευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Όταν πραγματοποιηθεί ρήξη μεταξύ των φυτικών ιστών, όπως είναι το κόψιμο ή το ξεφλούδισμα των φρούτων-λαχανικών(ΦΛ) και δημιουργηθούν μώλωπες ή ακόμα τα ΦΛ προσβληθούν από μύκητες, τότε το ένζυμο έρχεται σε επαφή με τα υποστρώματα, τις φαινολικές ενώσεις. Τα κυριότερα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στην ενζυμική αμαύρωση είναι το ένζυμο πολυφαινολοξειδάση (PPO) ή άλλα, όπως η υπεροξειδάση (POD) και η τυροσινάση. (Kyoung Mi Moon et al., 2020)

Το ένζυμο PPO ταξινομείται ως ένζυμο οξειδοαναγωγής με τέσσερα άτομα χαλκού ως προσθετική ομάδα και ταξινομείται σε EC1.14.18.1 (μονοφαινολική μονοοξυγενάση, κρεζολάση ή τυροσινάση) και EC1.10.3.1 (οξειδάση διφαινόλης, οξειδάση κατεχόλης ή οξειδοαναγωγής οξυγόνου *ο*-διφαινόλης) από την Επιτροπή Ενζύμων (EC) σύμφωνα με την εξειδίκευση του υποστρώματος. Καταλύει δυο διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων, αρχικά την οξείδωση της λειτουργικής ομάδας OH που συνδέεται με το άτομο άνθρακα του δακτυλίου βενζολίου των μονοϋδροξυ φαινολών (φαινόλη, τυροσίνη, *ρ*-κρεσόλη) σε *ο*-διυδροξυ φαινόλες (κατεχόλη, ντοπαμίνη, αδρεναλίνη) και δεύτερον την αφυδρογόνωση *ο*-διυδροξυ φαινολών σε *ο*-κινόνες. Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε κινόνες και η παραγωγή μελανίνης δημιουργούν ένα σκούρο χρώμα στα τρόφιμα. Γενικά, το PPO αναφέρεται σε ένα ένζυμο που ανήκει στο EC1.10.3.1 και υπάρχει στους ιστούς των φυτών, ιδιαίτερα στα φρούτα (μήλο, ροδάκινο, αχλάδι, μπανάνα, βερίκοκο, μούρα, μάνγκο, αβοκάντο και σταφύλι) και στα λαχανικά (πατάτα, μαρούλια, κολλιτσίδα, γκουάβα, πεπόνι, μελιτζάνα και μανιτάρια). Η δραστηριότητα του ενζύμου PPO είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της ενζυμικής αμαύρωσης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της PPO συμπεριλαμβανομένου του τύπου και της ποσότητας των ενδογενών ενώσεων φαινόλης, της παρουσίας οξυγόνου και του pH, στοχεύουν στην πρόληψη της ενζυμικής αμαύρωσης. (Kyoung Mi Moon et al., 2020)

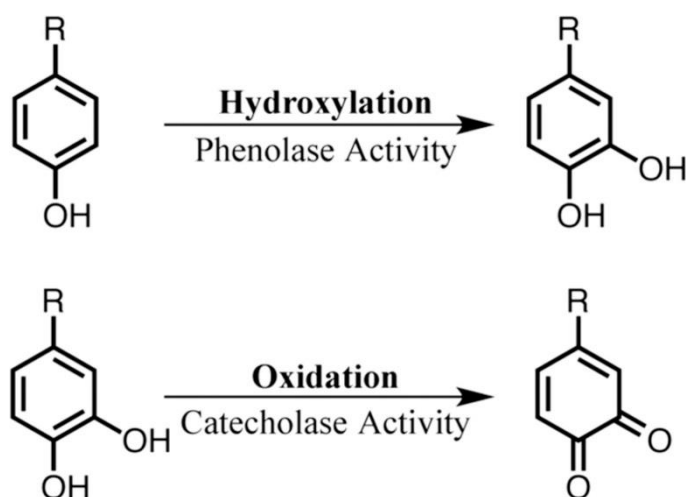
Το ένζυμο POD είναι ένα θερμοσταθερό ένζυμο που ανήκει σε μια ομάδα οξειδασών που χρησιμοποιούν H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ως καταλύτη για την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Το POD σχετίζεται με ανεπιθύμητες αλλαγές στη γεύση, στην υφή, στο χρώμα και στη διατροφική ποιότητα των τροφίμων. Το επίπεδο PPO και POD ποικίλλει στα φρούτα και τα λαχανικά

και η περιεκτικότητά τους αλλάζει με την ωριμότητα και τη γήρανση ανάλογα με την αναλογία των δεσμευμένων και διαλυτών ενζύμων. (Balwinder Singh et al., 2018)

### 1.3 ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ

Η τυροσινάση (EC 1.14.18.1) (κατεχολοοξειδάση, οξειδάση πολυφαινόλης ή διφαινόλαση) είναι ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα στη βιοσύνθεση της μελανίνης και απαντάται ευρέως στη βίοςφαιρα. Συγκεκριμένα, απαντάται στα θηλαστικά, στους μύκητες, στα βακτήρια, στα φρούτα και στα λαχανικά και η μη φυσιολογική έκφραση ή ενεργοποίηση της τυροσινάσης δημιουργεί ανωμαλίες μελάγχρωσης του δέρματος, όπως κηλίδες και συνδέεται με διάφορες ασθένειες, όπως η νόσος του Πάρκινσον και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως ο αλμπινισμός, η λεύκη και το μελάνωμα. Στα φρούτα-λαχανικά και στα μανιτάρια η αμαύρωση εμφανίζεται κατά τη δημιουργία μολώπων ή κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση. (Yasuyuki Matoba et al., 2006, Yunwei Qu et al., 2020)

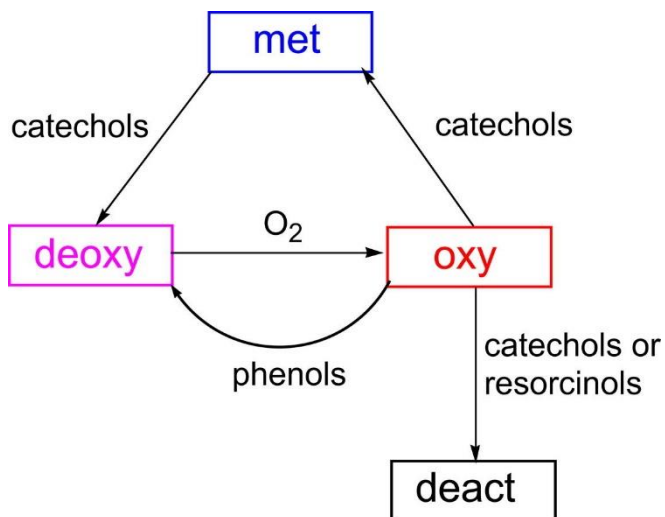
Αναλυτικότερα, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και το καταλυτικό της κέντρο σχηματίζεται από διπυρηνικό χαλκό ικανό να δεσμεύει μοριακό οξυγόνο. Το διπυρηνικό κέντρο χαλκού εμπλέκεται στις καταλυτικές αντιδράσεις της τυροσινάσης, στην υδροξυλίωση των φαινολικών υποστρωμάτων (δραστικότητα φαινόλασης) (Σχήμα 1) και στην επακόλουθη οξείδωση των κατεχολών σε ο-κινόνες (δραστικότητα κατεχολάσης) (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1:** Το πρώτο σχήμα απεικονίζει τη δραστηριότητα της φαινόλασης, ενώ το δεύτερο σχήμα τη δραστηριότητα της κατεχολάσης.

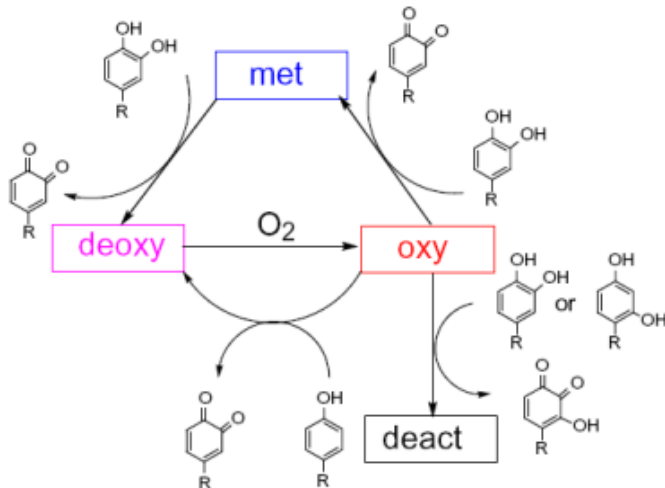
Οι δύο αυτές ενέργειες αντικατοπτρίζουν τις καταστάσεις οξείδωσης του ενεργού κέντρου. Η τυροσινάση έχει τέσσερις πιθανές καταστάσεις οξείδωσης και η αλληλεπίδρασή τους φαίνεται ότι προκαλεί την ασυνήθιστη κινητική συμπεριφορά του ενζύμου (Σχήμα 2).

Το ενεργό κέντρο αποτελείται από δυο ιόντα χαλκού. Το κάθε ιόν Cu συνδέεται με τρία μόρια ιστιδίνης (His), τα οποία μεταβαίνουν κατά τη διάρκεια των καταλυτικών κύκλων στις εξής οξειδωτικές καταστάσεις, με αριθμό οξείδωσης +2, +1 (και 0 όταν απενεργοποιείται το ένζυμο) με τις αντίστοιχες ονομασίες *met*, *oxy*, *deoxy*, *deact* – *tyrosinase*. (Evangelia Deligianni et al., 2021, Nobutaka Fujieda et al., 2013).



**Σχήμα 2:** Οι τέσσερις πιθανές καταστάσεις οξείδωσης της τυροσινάσης.

Η κατάσταση ηρεμίας του ενζύμου είναι η *met*- τυροσινάση [Cu(II)<sub>2</sub>] και η ενεργοποίηση, που σχετίζεται με μια «περίοδο υστέρησης», περιλαμβάνει αναγωγή σε *deoxy*- *tyrosinase* [Cu(I)<sub>2</sub>], η οποία είναι ικανή να δεσμεύει O<sub>2</sub> για να σχηματίσει *oxy*- *tyrosinase* [Cu(II)<sub>2</sub>·O<sub>2</sub>]. Αρχικά, η μετατροπή της *met* - σε *deoxy*- τυροσινάση προκαλείται από μια κατεχόλη που σχηματίζεται έμμεσα από ένα προϊόν *ortho*- κινόνης της δράσης της τυροσινάσης. Η κύρια λειτουργία του ενζύμου είναι η μονοοξυγόνωση των φαινολών σε *ortho*- κινόνες από την *oxy*- *tyrosinase*. Η αδρανοποίηση του ενζύμου προκύπτει από την οξείδωση των κατεχολών, η οποία οδηγεί σε αναγωγή ενός από τα ιόντα χαλκού και μετατροπή της *oxy*- τυροσινάση στην *deact*- τυροσινάση [Cu(II)Cu(0)] (Σχήμα 3). Το ένζυμο δεν αλληλεπιδρά όταν βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή στη *met* μορφή [Cu(II)<sub>2</sub>], ενώ ενεργοποιείται όταν βρίσκεται στη μορφή *deoxy*, καθώς δίνεται η δυνατότητα δέσμευσης οξυγόνου για να σχηματιστεί η *oxy* μορφή [Cu(II)<sub>2</sub>·O<sub>2</sub>]. (Christopher A. Ramsden et al., 2014, Evangelia Deligianni et al., 2021)



**Σχήμα 3:** Η αλληλοσυσχέτιση των τεσσάρων διακριτών καταστάσεων οξείδωσης της τυροσινάσης.

### 1.3.1 Καταλυτικός κύκλος μελανίνης

Η μελανίνη σχηματίζεται από έναν συνδυασμό ενζυμικών και χημικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Παράγεται από εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται μελανοκύτταρα μέσω μιας χημικής διαδικασίας πολλαπλών σταδίων. Τα μελανοκύτταρα παράγουν δύο πολυσήμαντους τύπους μελανίνης: την ευμελανίνη (χρώματος καφέ - μαύρο) και την φαιομελανίνη (χρώματος ερυθρό-κίτρινο) που σχηματίζονται από την σύζευξη κυστεΐνης ή γλουταθειόνης. Η σύνθεση μελανίνης στα μελανοκυτταρικά κύτταρα ρυθμίζεται από την τυροσινάση (EC 1.14.18.1), που όπως έχει αναφερθεί αποτελεί ένα πολυλειτουργικό μεταλλοένζυμο και συγκεκριμένα μια πρωτεΐνη χαλκού τύπου 3 με διπυρηνικά ιόντα Cu που καταλύει τη μετατροπή μιας μονοφαινόλης (τυροσίνης) ή/και *o*-διφαινόλης (L-DOPA) στο αντίστοιχο παράγωγο *o*-κινόνης (L-DOPA κινόνη), το οποίο μετατρέπεται περαιτέρω σε μελανίνη. Δεδομένου ότι η τυροσινάση είναι το βασικό ένζυμο στο πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης μελανίνης, το ένζυμο συνδέεται συχνά με τη μελάγχρωση. (Rami J. Obaid et al., 2021, Wangsa T. Ismaya et al., 2011, Evangelia Deligianni et al., 2021)

Η μελανογένεση ορίζεται ως η διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων μακρομοριακών χρωστικών, δηλαδή μελανίνης. Η διαδικασία αρχίζει με την καταλύομη από τυροσινάση (TYR) οξείδωση του αμινοξέος L- τυροσίνη μέσω της ενδιάμεσης L-3,4-διυδροξυφαινοϋλαανίνης (L-DOPA) σε dopa-κινόνη (DQ) από τη δράση της μονοοξυγενάσης της ίδιας της TYR. Το στάδιο αυτό οξείδωσης, αποτελεί το στάδιο για τη μείωση του ρυθμού σύνθεσης της μελανίνης, καθώς διατηρεί σε φυσιολογικές τιμές το pH, με αποτέλεσμα η αλληλουχία της αντίδρασης να προχωρήσει αυθόρμητα. Στη συνέχεια, με τον σχηματισμό της DQ εκτελείται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση για την παραγωγή

ινδολίνης λεύκο-*dopa*-χρώσης ή κυκλοντόπα. Μεταξύ της κυκλοντόπα και της DQ πραγματοποιείται οξειδοαναγωγή που οδηγεί στην παραγωγή *dopa*-χρώμα και L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνης (L-DOPA), το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την TYR και οξειδώνεται από αυτό εκ νέου σε DQ. Ένα δεύτερο ένζυμο, η πρωτεΐνη TYRP-2, *dopachrome tautomerase* (DCT) επιταχύνει τη μετατροπή της DQ σε *dopa*-χρώμιο και στη συνέχεια, σε 5,6-διυδροξυινδόλη (DHI) και ινδόλη-5,6-κινόνη-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA). Μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξείδωσης από διυδροξυινδόλη (DHI) και διυδροξυινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA), τα οποία είναι τα προϊόντα αντίδρασης από το *dopa*-χρώμιο, σχηματίζεται η ευμελανίνη. Το TYRP-1 (οξειδάση DHICA) συγκεκριμένα καταλύει την οξείδωση του DHICA για την παραγωγή ευμελανίνης.

Η αναδιάταξη του *dopa*-χρωμίου σχηματίζει στη συνέχεια 5,6-διυδροξυινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA) που μπορεί μερικώς να αποκαρβοξυλιωθεί σε 5,6-διυδροξυινδόλη (DHI) οδηγώντας σε ινδολο-5,6-κινόνη. Αυτά τα ενδιάμεσα μπορεί να σχηματίσουν ολιγομερή ή να αντιδράσουν με άλλες ενώσεις, ιδιαίτερα με πυρηνόφιλα όπως οι θειόλες. Παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης, η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε κυστεΐνυλντόπα ή γλουταθειονυλντόπα και τελικά μπορεί να παράγει φαιομελανίνη. Αυτές οι δευτερεύουσες αντιδράσεις προκαλούν τις χρωστικές που ταξινομούνται ως ευμελανίνες (μαύρες/καφέ) και φαιομελανίνες (κοκκινωπό/κίτρινο). Αν και τρία ένζυμα (TYR, TRP-1 και TRP-2) εμπλέκονται στη μελανογένεση, μόνο το ένζυμο TYR είναι αποκλειστικά απαραίτητο ως περιοριστικός καταλύτης για τη μελανογένεση. (Evangelia Deligianni et al., 2021, Mohammad N. Masum et al., 2019, Te-Sheng Chang et al., 2009, Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Εκτός από την ευμελανίνη και τη φαιομελανίνη, άλλες «μελανίνες» που βασίζονται σε φαινολικά μονομερή διαφορετικά από την τυροσίνη ονομάζονται αλλομελανίνη. Το φαινόμενο της αμαύρωσης σε φρούτα και μύκητες σχετίζεται, επίσης, συνήθως με τον οξειδωτικό πολυμερισμό, εννοιολογικά παρόμοιο με τη μελανογένεση. Η κύρια διαφορά έγκειται στο γεγονός, ότι η αλλομελανίνη ουσιαστικά δεν περιέχει μοτίβα που προέρχονται από ντοπακινόνη ως κύρια μονομερή στη δομή της και αντίθετα, βασίζεται σε άλλα δομικά στοιχεία κινουειδών. (Te-Sheng Chang et al., 2009)

Έχει παρατηρηθεί ότι η L-τυροσίνη και η L-διυδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA) αναγνωρίζονται ως υποστρώματα και ενδιάμεσα στη μελανογένεση. Ωστόσο, έχει επίσης βρεθεί ότι σε πολλαπλές σειρές μελανώματος/μελανοκυττάρων, η L-τυροσίνη οδηγεί σε αύξηση της μελάγχρωσης της μελανίνης, χωρίς εμφανείς αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών/γονιδίων της σύνθεσης μελανίνης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η L-τυροσίνη

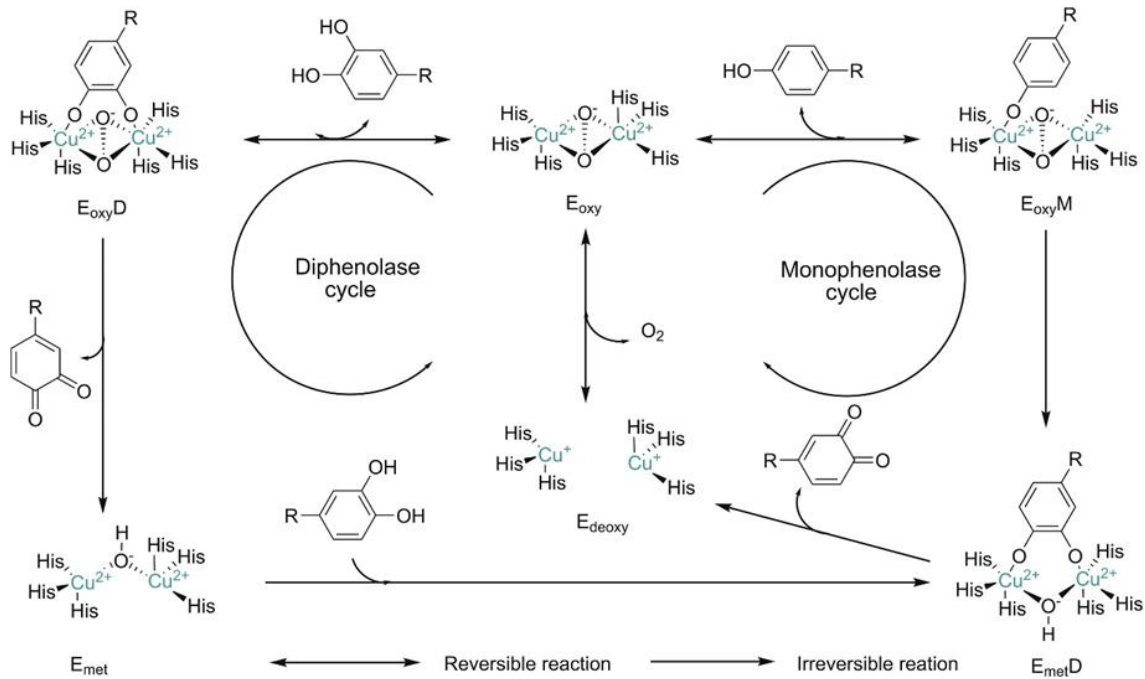
και η L-DOPA, εκτός από υποστρώματα και ενδιάμεσα της μελανογένεσης, διαδραματίζουν βιορυθμιστικούς ρόλους ως επαγωγείς και θετικοί ρυθμιστές της μελανογένεσης και άλλων κυτταρικών διεργασιών. (Mubashir Hassan et al., 2023)

Δεδομένου ότι και οι δυο λειτουργίες της τυροσινάσης διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα είναι το αμινοξύ τυροσίνη. Με βάση τη ρυθμιστική οδό της μελανογένεσης γίνεται αντιληπτό ότι το ένζυμο έχει υψηλότερη συγγένεια με τα L-ισομερή των υποστρωμάτων συγκριτικά με τα D-ισομερή. (Καλεμκερή Όλγα et al., 2014)

### 1.3.2 Δομή και λειτουργία τυροσινάσης

Η τυροσινάση ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών χαλκού τύπου 3 και υπάρχει στην πρώιμη διαδικασία σχηματισμού μελανίνης. Συμμετέχει, κυρίως στις ακόλουθες δύο διαδικασίες: (1) υδροξυλίωση της L -τυροσίνης σε L -DOPA, (2) οξείδωση L -DOPA για το σχηματισμό ντοπακινόνης. Η ντοπακινόνη, τελικά θα σχηματίσει μελανίνη μέσω μιας σειράς αντιδράσεων. Τα άλλα δύο μέλη της οικογένειας χαλκού τύπου 3 είναι η κατεχολοξειδάση και η αιμοκυανίνη. Η κατεχολική οξειδάση παρουσιάζει αποκλειστικά δράση διφαινολάσης και η αιμοκυανίνη βρίσκεται στη λέμφο πολλών μαλακίων και στα αρθρώποδα ως φορέας οξυγόνου. Όλες οι πρωτεΐνες χαλκού τύπου 3 έχουν κοινά τη δομή στα ενεργά κέντρα και την ικανότητα σύνδεσης με μόρια οξυγόνου. Αντίθετα, η ενζυμική δράση τους διακρίνεται από το υπόστρωμα που προσδένεται στο ενεργό κέντρο τους (Yunwei Qu et al., 2020)

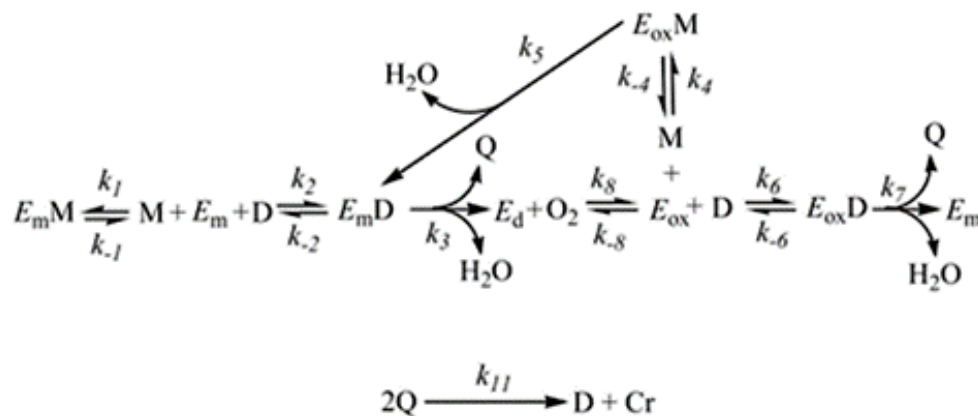
Κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X της οξειδάσης της κατεχόλης, της αιμοκυανίνης, της αρθρώποδης φαινολοοξειδάσης και τυροσινάσης, ενώ δεν έχουν εκθέσει πλήρως τη μοριακή οργάνωση αυτών των μορίων έχουν αποκαλύψει τις δομικές ιδιότητες αυτών των μορίων. Τα ενεργά κέντρα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών παρουσιάζουν δομή στο κέντρο του χαλκού (διπλός πυρήνας), που αποτελείται από δύο ιόντα χαλκού (Σχήμα 4), τα οποία συνδέονται με τρία υπολείμματα ιστιδίνης στην πρωτεΐνη, στα οποία είναι συνδεδεμένο το διοξυγόνο σε μια διάταξη *υπέροξυ*. Αυτές οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη (δηλ. ζεύγος spin) μεταξύ των δύο  $s = \frac{1}{2}$  ιόντων μετάλλων λόγω της ομοιοπολικής τους επικάλυψης μ' έναν υποκαταστάτη γέφυρα. Τα δύο κέντρα ιόντων χαλκού συνδέονται με την ενδογενή γέφυρα συντονισμού. (Christopher A. Ramsden et al., 2014, Yunwei Qu et al., 2020)



Σχήμα 4: Eoxy/Emet /Edeoxy μορφές κατάστασης οξειδωσης της τυροσινάσης. Καταλυτικός μηχανισμός κύκλου μονοφαινόλης και κύκλου διφαινόλης. Eoxy M: μονοφαινόλαση Eoxy σύμπλοκο, Eoxy D: διφαινόλαση Eoxy σύμπλοκο, Emet D: σύμπλοκο διφαινόλασης Emet.

Οι δύο δράσεις στον καταλυτικό κύκλο της τυροσινάσης (Σχήμα 5), δηλαδή η δράση μονοφαινόλασης, που υδροξυλιώνει τις μονοφαινόλες (π.χ. L-τυροσίνη) σε *ο*-διφαινόλες (π.χ. L-dopa) και η δράση διφαινόλασης, που η τυροσινάση οξειδώνει τις *ο*-διφαινόλες σε *ο*-κινόνες (*ο*-ντοπακινόνη), οφείλονται στην πρόσδεση μοριακού οξυγόνου στα δύο ιόντα χαλκού (που συνήθως προσδιορίζονται ως CuA και CuB) και τοποθετούνται στο ενεργό κέντρο. Σημαντική παραμένει η τεκμηρίωση επιστημονικά των δύο διακριτών μηχανισμών σχηματισμού *ο*-κινονών. Βιβλιογραφικά επικροτείται η άποψη ότι η οξείδωση της φαινόλης περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο βήμα υδροξυλίωσης που ακολουθείται από οξείδωση κατεχόλης. Ωστόσο, στην πραγματικότητα ο μηχανισμός μονοοξυγενάσης λειτουργεί διαφορετικά, η όρθο-κινόνη παράγεται απευθείας από τη φαινόλη χωρίς να πραγματοποιείται ενδιάμεσο βήμα σχηματισμού κατεχόλης. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Christopher A. Ramsden et al., 2014)





Σχήμα 5: Μονοφαινολική και διφαινολική δράση της τυροσινάσης.

Η τυροσίνη και άλλες ουσίες συμπλέκονται με το ένζυμο, μέσω του δεσμού μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και της ομάδας υδροξυλίου. Κατά τη διαδικασία της καταλυτικής αντίδρασης της μελανίνης, η καταλυτική θέση κατηγοριοποιείται σε τρεις μορφές: κατάσταση οξειδωσης (Eoxy), κατάσταση αναγωγής (Emet) και κατάσταση αποοξυγόνωσης (Edeoxy). Η διαφορά έγκειται στη δομή του διπυρηνικού ενεργού κέντρου των ιόντων χαλκού. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Christopher A. Ramsden et al., 2014)

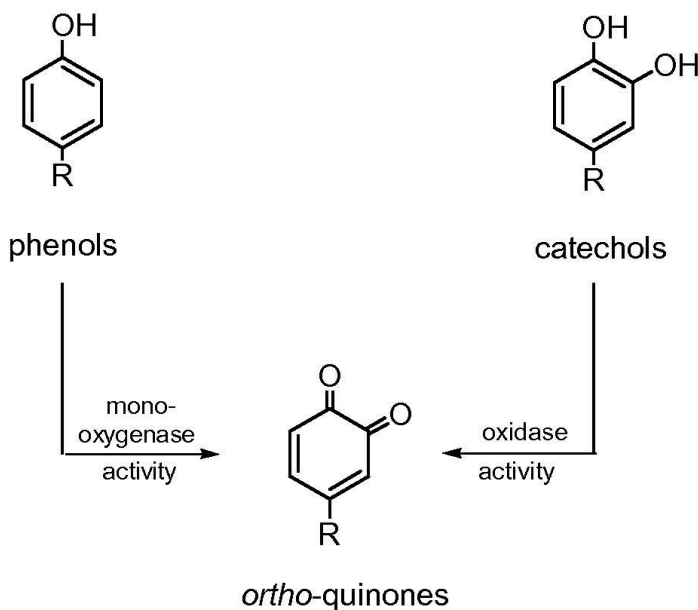
Το Eoxy αποτελείται από δύο άτομα χαλκού (II). Το εξωγενές μόριο οξυγόνου δεσμεύει και γεφυρώνει τα δύο κέντρα χαλκού με τη μορφή υπεροξειδίων. Το μήκος του δεσμού Cu–Cu είναι περίπου 0,35 nm. Ο συνδυασμός μορίων οξυγόνου οδηγεί στο σχηματισμό της δομής  $(\mu-\eta^2:\eta^2-\text{περοξο})$ , επομένως το ενεργό κέντρο οξυγόνου μπορεί να γραφεί ως  $[\text{Cu(II)}-\text{O}_2-\text{Cu(II)}]$ . Η ηλεκτρονιακή δομή των υπεροξειδίων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες του Eoxy. Λόγω της ισχυρής δράσης δέκτη  $\sigma^*$ , το υπεροξείδιο φέρει μικρότερο αρνητικό φορτίο, ενώ ο δέκτης ηλεκτρονίων  $\pi$  αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια στο τροχιακό  $\sigma^*$  του υπεροξειδίου, γεγονός που εξασθενεί σημαντικά την ισχύ του δεσμού οξυγόνου-οξυγόνου, καθιστώντας τον πυρήνα του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης εύκολα διασπώμενο. Η *met*-τυροσινάση (Emet) είναι παρόμοια με την Eoxy, και περιέχει επίσης, δύο άτομα χαλκού (II) συζευγμένα μέσω μιας ενδογενούς γέφυρας. Η διαφορά είναι ότι ο υποκαταστάτης γεφύρωσης μεταξύ ιόντων χαλκού είναι υδροξείδιο αντί για υπεροξείδιο. Όσον αφορά τις οξειδωτικές ιδιότητες, το Emet και το Eoxy παρουσιάζουν μικρές διαφορές. Το Emet δεν είναι σε θέση να οξειδώσει μονοφαινολικές ενώσεις. Σε απουσία υποστρωμάτων, το Emet υπάρχει ως η κύρια μορφή στους οργανισμούς. Η δεοξυτυροσινάση (Edeoxy), παρόμοια με τη δεοξυαιμοκυανίνη, διαθέτει συμμετρική δομή



[(Cu(I)-Cu(I)]. Δεν υπάρχει υποκαταστάτης γεφύρωσης, όπως το υπεροξείδιο ή το υδροξείδιο μεταξύ του διπυρηνικού χαλκού και επομένως το υδροξείδιο στο νερό είναι ένας απαραίτητος υποκαταστάτης γεφύρωσης. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Christopher A. Ramsden et al., 2014)

### 1.3.3 Στάδια οξείδωσης τυροσινάσης

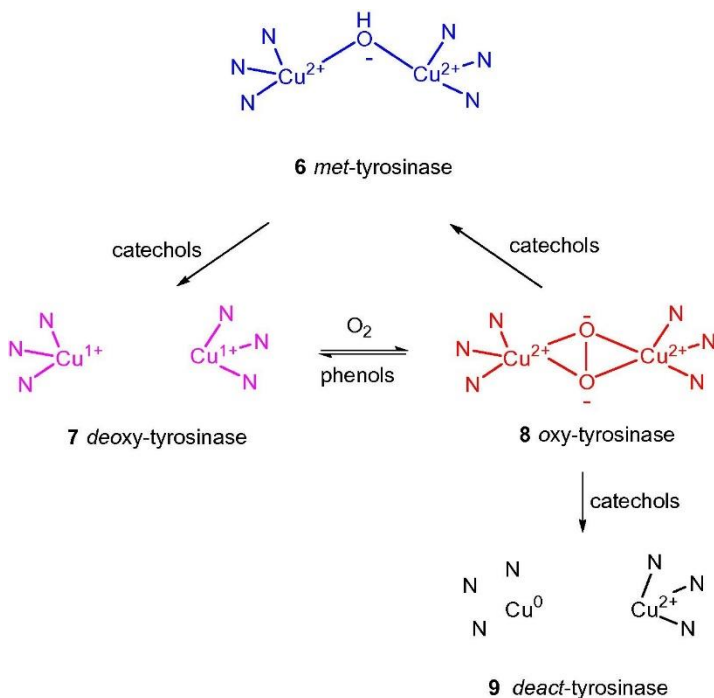
Στη διάρκεια των βημάτων οξείδωσης που απεικονίζονται στο Σχήμα 6, οι καταστάσεις οξείδωσης των ατόμων χαλκού αλλάζουν, ώστε να προσδώσουν διαφορετικές μορφές στο ένζυμο. Οι απαιτήσεις για την αλληλομετατροπή αυτών των καταστάσεων οξείδωσης είναι ειδικές και οδηγούν σε ασυνήθιστα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, τα οποία μέχρι πρόσφατα ήταν δύσκολο να εξηγηθούν. Αυτές οι ασυνήθιστες ιδιότητες περιλαμβάνουν τη λεγόμενη «περίοδο υστέρησης» σε δοκιμές *in vitro* και την αυτόματη απενεργοποίηση του ίδιου του ενζύμου που σχετίζεται με την οξείδωση της κατεχόλης. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Σχήμα 6: Η τυροσινάση καταλύεται με 2 τρόπους οξείδωσης.

Η έναρξη της μελάγχρωσης επηρεάζεται από τρεις παράγοντες. Οι δύο βασικοί περιλαμβάνουν τη χορήγηση της τυροσινάσης στα προμελανοσώματα και την πρόσβαση του υποστρώματος στο εσωτερικό του οργανιδίου και ο τελευταίος αποτελείται από τους παράγοντες που καθορίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του Cu. Η κατάσταση του Cu μεταβάλλεται από τη χορήγηση εξωτερικού αναγωγικού μέσου ή/και από το μηχανισμό της περιόδου υστέρησης που είναι ευαίσθητος στο pH. (Yunwei Qu et al., 2020, Christopher A. Ramsden et al., 2014)

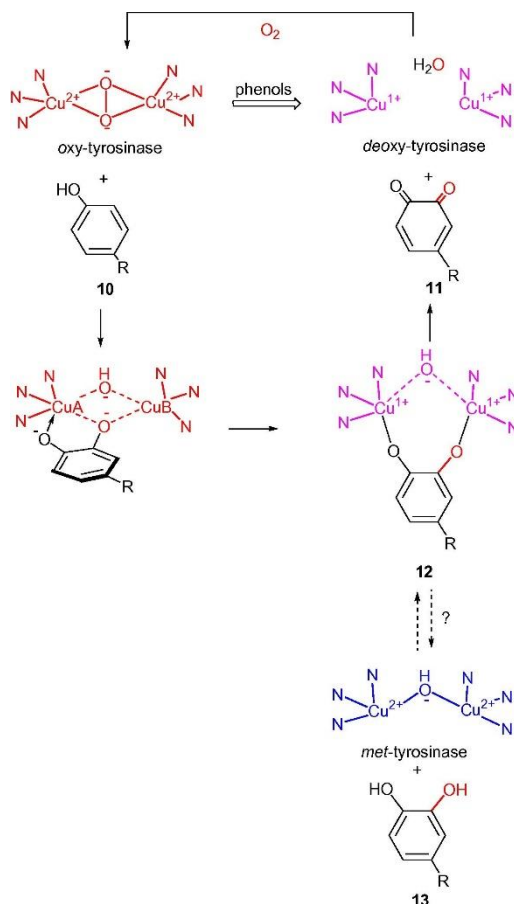
Η απεικόνιση του Σχήματος 7 επαξηγεί, τον τρόπο με τον οποίο οι καταστάσεις οξειδωσης των δύο ατόμων χαλκού στο ενεργό κέντρο διαμορφώνουν τις ιδιότητες της τυροσινάσης. Η κύρια κατάσταση της τυροσινάσης είναι η *met*-τυροσινάση (Σχήμα 7 - (6)), στην οποία ένα ιόν υδροξυλίου  $\text{HO}^-$  είναι συνδεδεμένο με τα δύο ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ . Η *met*-τυροσινάση συνδέεται με τις φαινόλες, αλλά η μορφή αυτή του ενζύμου δεν τις οξειδώνει. Αντίθετα, η συγκεκριμένη μορφή του ενζύμου οξειδώνει τις κατεχόλες και ανάγεται σε *deoxy*-τυροσινάση (Σχήμα 7 - (7)) και ο χαλκός οξειδώνεται σε  $\text{Cu}^{1+}$ . Στη συνέχεια το  $\text{O}_2$  δεσμεύεται τάχιστα από τη *deoxy*-τυροσινάση, στην οποία τα δύο άτομα  $\text{O}^-$  οξυγόνου συγκρατούνται μεταξύ των ιόντων  $\text{Cu}$  στο ενεργό κέντρο, δίνοντας έτσι την κύρια οξειδωτική μορφή του ενζύμου, την *oxy*-τυροσινάση (Σχήμα 7 - (8)). Κατά τον κατεχολικό κύκλο, μια κατεχόλη περιστασιακά αντιμετωπίζεται ως φαινόλη και οξειδώνεται από την *oxy*-τυροσινάση μέσω ενός μηχανισμού μονοοξυγενάσης, που οδηγεί στον μη αντιστρεπτό σχηματισμό *deact*-τυροσινάσης (Σχήμα 7 - (9)), στην οποία το ένα από τα άτομα χαλκού έχει αναχθεί στην κατάσταση  $\text{Cu}$  και μπορεί να διαχέεται έξω από το ενεργό κέντρο. Αυτή η δευτερεύουσα οδός οδηγεί τελικά σε ολική αδρανοποίηση του ενζύμου από τις κατεχόλες. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Σχήμα 7: Καταστάσεις οξειδωσης των δύο ατόμων  $\text{Cu}$ .

### 1.3.3.1 Η οξείδωση των φαινολών σε ορθοκινόνες: *oxy* → *deoxy* - τυροσινάση

Η πρώτη οξειδωτική κατάσταση είναι η σημαντικότερη λειτουργία του ενζύμου και περιλαμβάνει την οξείδωση των φαινολών σε ορθοκινόνες από τη *oxy*-τυροσινάση (Σχήμα 8). Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει ότι η L-τυροσίνη μετατρέπεται σε ντοπακινόνη για τη βιοσύνθεση μελανινών. Από χημικομηχανικής άποψης, το οξυγόνο της φαινόλης συνδέεται με το CuA και ακολουθεί ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη O<sub>2</sub> στο δακτύλιο που οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκου, στο οποίο το υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο με τα δύο ιόντα χαλκού. Το σύμπλοκο αυτό υφίσταται ομολυτική διάσπαση, ώστε να δώσει όρθο-κινόνη και *deoxy*-τυροσινάση. Στο τελευταίο βήμα του κύκλου οξείδωσης της φαινόλης, η *deoxy*-τυροσινάση δεσμεύει το οξυγόνο, ώστε να αναβαθμιστεί σε *oxy*-τυροσινάση. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι να εξαντληθούν τα υποστρώματα φαινόλης και οξυγόνου. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Σχήμα 8: Αλληλομετατροπή *oxy*→*deoxy* - τυροσινάση.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το δεύτερο διακριτό βήμα είναι η οξείδωση των φαινολών σε κατεχόλες από το ένζυμο της τυροσινάσης, οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνονται σε όρθο-κινόνες. Η θεωρία αυτή απορρίπτεται, διότι η οξείδωση της L-τυροσίνης από την τυροσινάση οδηγεί στον σχηματισμό της κατεχολικής ντόπα (*dopa*).

Πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η ντόπα σχηματίζεται έμμεσα από έναν μη- ενζυμικό μηχανισμό. Επιπλέον υπάρχει πιθανότητα, για ορισμένα υποστρώματα, το σύμπλοκο να έχει τη δυνατότητα να υποστεί σε μικρό ποσοστό ετερολυτική διάσπαση, σχηματίζοντας έτσι μια κατεχόλη. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Εντούτοις, και αυτή η διαδικασία δίνει *met*-τυροσινάση, η οποία δεν οξειδώνει τις φαινόλες και έτσι ο κύκλος της οξειδωσης της φαινόλης θα συνεχίσει εφόσον το στάδιο σχηματισμού της κατεχόλης αντιστραφεί. Δεδομένου ότι κάποια από τις κατεχόλες, εφόσον σχηματιστεί, θα μπορούσε να διαχυθεί μακριά από το ενεργό κέντρο, αυτό θα οδηγούσε σε αργή εξάντληση της διαθέσιμης *oxy*-τυροσινάσης. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

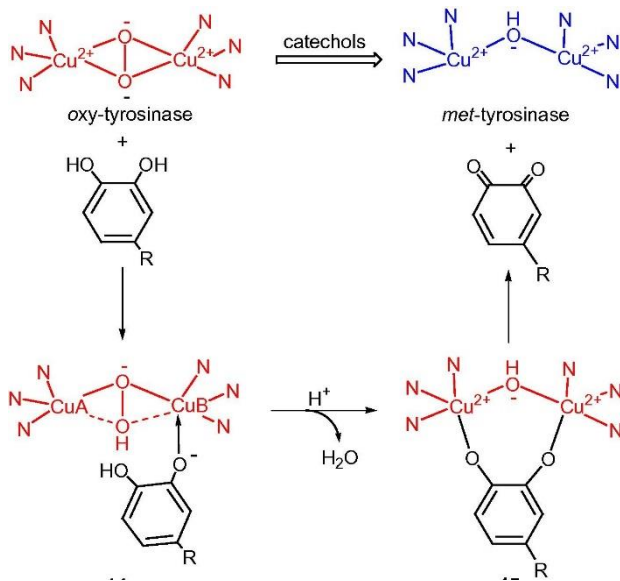
### 1.3.3.2 Η οξείδωση κατεχολών σε ορθοκινόνες: *oxy* → *met* - τυροσινάση

Η *oxy*-τυροσινάση έχει τη δυνατότητα να οξειδώνει κατεχόλες και φαινόλες, αλλά εμφανίζει υψηλότερη ειδική δραστηριότητα κατεχολικής οξειδάσης σε σύγκριση με την αντίστοιχη αντίδραση οξειδωσης της φαινόλης. Το γεγονός αυτό προκαλεί διαφορές στην ευκολία προσανατολισμού του υποστρώματος κατά την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο. Ενώ, οι φαινόλες συνδέονται με τον CuA, οι κατεχόλες προσδέονται στο ενεργό κέντρο μέσω του CuB. Έτσι στη συν-παρουσία ενός φαινολικού υποστρώματος θα υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ της δραστηριότητας μονοοξυγενάσης και οξειδάσης. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Το κατεχολικό υπόστρωμα συνδέεται μέσω μιας διαδικασίας αποπρωτονίωσης των γειτονικών υδροξυλίων με αποτέλεσμα, τα οξυγόνα να συντονίζονται με τα δυο ιόντα Cu του ενεργού κέντρου. Συνέπεια είναι ο προσανατολισμός να διαφέρει από αυτόν της δέσμευσης μονοϋδρικής φαινόλης, καθώς ευνοείται στερεοχημικά από την ύπαρξη υδρόφοβης περιοχής που βρίσκεται το υπόστρωμα. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Στον κύκλο των κατεχολών συναντώνται δύο στάδια οξείδωσης (Σχήμα 9). Αρχικά, η *oxy*-τυροσινάση μετατρέπεται σε *met*-τυροσινάση και το σύμπλοκο κατεχόλης/ενζύμου διασπάται με την απελευθέρωση ενός από τα άτομα οξυγόνου του υπεροξειδίου του δεσμευμένου διοξυγόνου δίνοντας την αντίστοιχη ορθο-κινόνη και νερό. Η μορφή του ενζύμου *met* που προέκυψε διατηρεί την κατάσταση οξείδωσης των δραστικών ιόντων Cu(II) του ενεργού κέντρου σε πρωτονιωμένη μορφή, με την οποία συντονίζεται το εναπομείναν άτομο οξυγόνου. Η κατεχόλη αναγάγει τη «γέφυρα» υπεροξειδίου με το σχηματισμό νερού και οξειδώνεται σε ορθο-κινόνη. Στο τελευταίο στάδιο του κύκλου της κατεχόλης, ένα δεύτερο μόριο κατεχόλης ανάγει τα ενεργά ιόντα χαλκού σε Cu(I) δίνοντας *deoxy*-τυροσινάση και ένα δεύτερο μόριο ορθο-κινόνης. Οι καταστάσεις οξείδωσης των

ιόντων χαλκού του ενεργού κέντρου Cu(II) αποκαθίστανται στη συνέχεια με δέσμευση διοξυγόνου. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Σχήμα 9: Μετατροπή oxy→met- τυροσινάση από κατεχόλες.

### 1.3.3.3 Η αυτοενεργοποίηση και η περίοδος υστέρησης: met → deoxy –τυροσινάση.

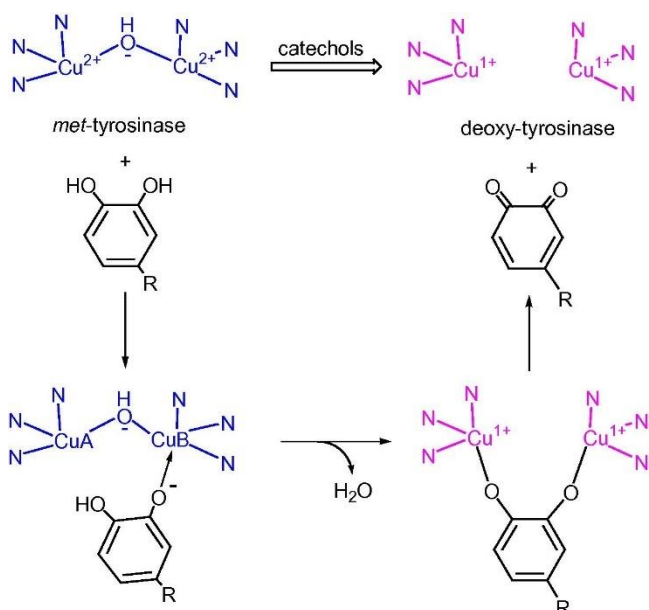
Χαρακτηριστικό γνώρισμα της τυροσινάσης είναι η λεγόμενη «περίοδος υστέρησης», κατά την οποία η *in vitro* μονοοξείδωση των φαινολικών υποστρωμάτων είναι εξαιρετικά αργή και η οξείδωση επιταχύνεται αργά στη μέγιστη ταχύτητά της κατά τη διάρκεια μιας αρχικής περιόδου υστέρησης. Τα άτομα χαλκού πρέπει να βρίσκονται στην κατάσταση Cu(I) για να επιτρέψουν στο μοριακό οξυγόνο να δεσμευτεί κατά την προετοιμασία της διαδικασίας της μονοοξυγενάσης. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του χαλκού ευνοεί μια «κατάσταση ηρεμίας» των ατόμων του ενεργού κέντρου στην οξειδωμένη μορφή Cu(II)<sub>2</sub>. Για το λόγο αυτό, η φυσική τυροσινάση εμφανίζεται κυρίως ως *met*-τυροσινάση, που βρίσκεται στη σταθερή οξειδωτική κατάσταση Cu(II)<sub>2</sub> και σε αυτή την κατάσταση το ένζυμο αδυνατεί να δεσμεύσει το μοριακό οξυγόνο. Ως αποτέλεσμα, η δραστηριότητα μονοοξυγενάσης δεν μπορεί να εκφραστεί, αν και τα υποστρώματα μονοοξυγενάσης (φαινόλες) είναι σε θέση να δεσμεύονται αντιστρεπτά στη δραστική θέση. Η ενεργοποίηση της μονοοξυγενάσης απαιτεί αναγωγή των ατόμων χαλκού της ενεργού θέσης σε Cu(I)<sub>2</sub>. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τέσσερις τρόπους:

1. Άμεση αναγωγή με υπεροξείδιο του υδρογόνου
2. Αναγωγή με αναγωγικό παράγοντα, όπως το ασκορβικό οξύ
3. Ανταλλαγή οξειδοαναγωγής με άλλα μέταλλα

#### 4. Αναγωγή με κατεχολικό υπόστρωμα

Ο τελευταίος μηχανισμός αποδείχθηκε ο πιο σημαντικός βάση *in vitro* πειραμάτων.

Παρουσία μόνο φαινολικών υποστρωμάτων η πηγή των κατεχολών που ενεργοποιούν δεν είναι σαφής. Στην πραγματικότητα σχηματίζονται μέσω όρθο-κινονών. Η φυσική τυροσινάση περιέχει μικρές ποσότητες οξυ-τυροσινάσης που μπορεί να δημιουργήσει αντίστοιχα μικρές ποσότητες ορθο-κινόνης. Η προσθήκη ενός πυρηνόφιλου υποκαταστάτη σε αυτές τις ορθο-κινόνες παράγει σε αυτή την περίπτωση, μια κατεχόλη η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει *met*-τυροσινάση (Σχήμα 10) και η αλληλουχία συνεχίζεται έως ότου το σύνολο του ενζύμου να βρίσκεται σε *oxy* μορφή. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

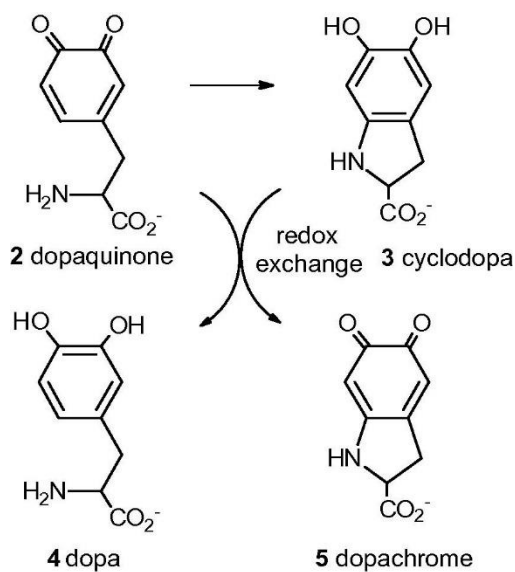


Σχήμα 10: Η μετατροπή *met*→*deoxy*- τυροσινάση από κατεχόλες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός που ακολουθείται για τη μετατροπή της L-τυροσινάσης. Η μονοοξυγενάση της L-τυροσίνης δίνει ντοπακινόνη (2), η οποία υφίσταται ταχεία ενδομοριακή κυκλοποίηση δίνοντας κυκλοντόπα (3) (Σχήμα 11). Η αυθόρμητη ανταλλαγή οξειδοαναγωγής με ντοπακινόνη (2) δίνει στη συνέχεια 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (ντόπα) (4) και ντοπαχρώμιο (5). Αυτή η διαδικασία, επομένως, εξηγεί την *in vitro* κινητική που παρατηρείται, όταν η τυροσινάση δρα σε μονοϋδρικά υποστρώματα φαινόλης, ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της οποίας, είναι η περίοδος υστέρησης. Αυτός ο μηχανισμός (Σχήμα 11) δείχνει, επίσης ότι η 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (dopa) (4) συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της καταλυόμενης από τυροσινάση οξείδωσης του φυσικού μονοφαινολικού υποστρώματος L-τυροσίνη και σχηματίζεται από ένα έμμεσο μηχανισμό και όχι με άμεση ενζυμική οξείδωση. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι φαινόλες που δεν διαθέτουν κάποια κατάλληλη πυρηνόφιλη πλευρική ομάδα, υπόκεινται σε δραστικότητα μονοοξειδάσης μετά από μια περίοδο υστέρησης λόγω χάρη η 4-υδροξυανισόλη. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αρχική ορθο-κινόνη μπορεί να υποβληθεί σε ενδομοριακή προσθήκη ενός πυρηνόφιλου υποκαταστάτη για να προσδώσει μια κατεχόλη. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

Οι θειόλες και οι αμινομάδες συνδέονται με τις όρθο-κινόνες των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των αμινοξέων. σε πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα. Την παραγωγή ενεργοποιημένης κατεχόλης αντιπροσωπεύει αυτή η οδός στην περίπτωση άλλων υποστρωμάτων, όπως είναι η N, N, N-τριμεθυλοτυραμίνη. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

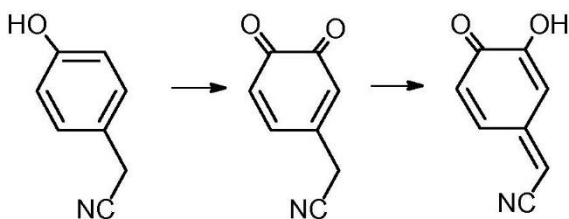


Σχήμα 11: Οξειδοαναγωγική ανταλλαγή που οδηγεί σε μη ενζυμικό σχηματισμό της dopa.

Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η πυρηνόφιλη προσθήκη στην κινόνη εξαρτάται από ένα εξωτερικό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο. Από *in vitro* πειράματα αποδείχθηκε ότι το ίδιο το ένζυμο δρα ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο και ότι το επισημασμένο υπόστρωμα συνδέεται με την τυροσινάση. Το δεσμευμένο προϊόν μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε οξειδοαναγωγή με το μη δεσμευμένο πρόδρομο μόριο της ορθο-κινόνης για να δημιουργήσει την ενεργοποιημένη κατεχόλη. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Η απεικονιζόμενη αναδιάταξη (Σχήμα 12) παρουσιάζει τις ιδιότητες της 4-κυανομεθυλοφαινόλης, που αποτυγχάνει να συμπεριφερθεί ως υπόστρωμα ενεργοποίησης.



Σχήμα 12: Η αναδιάταξη σε κινομεθάνιο αποτρέπει το σχηματισμό μιας κατεχόλης που ενεργοποιεί τα ένζυμα.

Αποδείχθηκε ότι αυτό οφείλεται στον γρήγορο ταυτομερισμό της ορθο-κινόνης προς παρα-κινομεθάνιο, το οποίο εμποδίζει τη δημιουργία της ενεργοποιημένης κατεχόλης. Στην περίπτωση της 2,5,6-τριφθορο-4-υδροξυανισόλης, η αντίστοιχη ορθο-κινόνη που σχηματίζεται δεν μπορεί να υποστεί πυρηνόφιλη προσθήκη και δεν λαμβάνει χώρα καμία ενεργοποίηση. Με βάση αυτούς τους ισχυρισμούς φαίνεται ότι οι ενεργοποιημένες κατεχόλες σχηματίζονται έμμεσα. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

#### 1.3.3.4 Αδρανοποίηση από κατεχόλες και ρεσορκινόλες: *oxy* → *deact* - τυροσινάση

Πάνω από 60 χρόνια έχει αναγνωριστεί ότι η τυροσινάση αδρανοποιείται βραδέως κατά την οξείδωση των κατεχολών. Είναι γνωστό ότι τα ώριμα μελανοσώματα, κοκκία μελανίνης, στερούνται δραστηριότητας τυροσινάσης και υπάρχει μια αμοιβαία σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της τυροσινάσης και του βαθμού μελανοποίησης.

Αρχικά, υποτέθηκε ότι η *in vivo* απώλεια δραστηριότητας προέκυψε από το γεγονός ότι τα μελανογόνα ένζυμα επικαλύφθηκαν από το προϊόν τους και αδρανοποιήθηκαν από το περίβλημα. Ωστόσο, η *in vitro* αδρανοποίηση της τυροσινάσης αποδείχθηκε σε απομονωμένα μελανοσώματα, όταν χρησιμοποιήθηκε ντόπα ως υπόστρωμα. Η αδρανοποίηση παρατηρήθηκε ανεξάρτητα από το εάν το ένζυμο ήταν συνδεδεμένο με σωματίδια ή σε διαλυτή μορφή. Μελέτες κινητικής απέδειξαν ότι η ταχύτητα αδρανοποίησης δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση του προϊόντος, αλλά εξαρτάται από την αρχική ποσότητα τυροσινάσης. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)

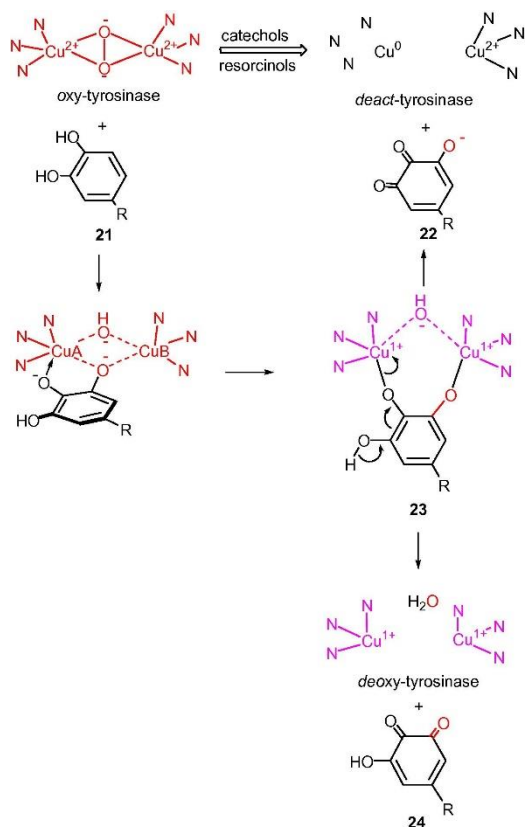
Ο Land και οι συνεργάτες του (Edward J. Land et al., 2007) πρότειναν ότι τα κατεχολικά υποστρώματα μπορούν μερικές φορές να υποβάλλονται σε επεξεργασία ως φαινόλες και να οξειδώνονται από την μονοοξυγενάση (Σχήμα 13). Η μονοοξυγόνωση μιας κατεχόλης (21) οδηγεί στο υποθετικό ενδιάμεσο (23), το οποίο στην κανονική οδό δίνει την 3-υδροξυκινόνη (24) και τη *deoxy*-τυροσινάση. Όμως η παρουσία του επιπρόσθετου υποκαταστάτη υδροξυλίου παρέχει μια εναλλακτική μέθοδο κατακερματισμού του ενδιάμεσου (23). Η



αποπρωτονίωση μπορεί να οδηγήσει σε αναγωγική αποβολή ενός από τα άτομα χαλκού του ενεργού κέντρου που δίνει την κινώνη (22). Επιπλέον στοιχεία που ενισχύουν την ουσία αυτού του μηχανισμού είναι:

- Ο μηχανισμός εξαρτάται από μια αναλογία ενός κατεχολικού υποστρώματος που υποβάλλεται σε επεξεργασία από την οδό μονοοξυγενάσης και η πυρογαλλόλη (1,2,3-τριυδροξυβενζόλιο), η οποία μπορεί να εμφανίζεται μόνο ως κατεχόλη, δεν παρουσιάζει κινητική απενεργοποίησης.
- Η αναστολή της δράσης της μονοοξυγενάσης αναστέλλοντας τους άνθρακες του παρακείμενου δακτυλίου μιας κατεχόλης, αποτρέπει την αδρανοποίηση από αυτόν τον μηχανισμό, όπως αποδεικνύεται στην περίπτωση της 3,6-διφθοροκατεχόλης.
- Μια οξειδάση κατεχόλης που στερείται δραστηριότητας μονοοξυγενάσης, όπως το ένζυμο που εξάγεται από τις μπανάνες (*Musa cavendishii*), αποτυγχάνει να επιδείξει αδρανοποίηση.
- Εφόσον η αδρανοποίηση είναι συνέπεια της οδού μονοοξυγενάσης, ο ρυθμός αδρανοποίησης αναμένεται να μειωθεί με την εισαγωγή ενός ανταγωνιστικού υποστρώματος μονοϋδρικής φαινόλης.
- Επειδή, ο μηχανισμός απαιτεί αποπρωτονίωση, η αδρανοποίηση θα πρέπει να καταστέλλεται με αυξημένη συγκέντρωση πρωτονίων.
- Αναμένεται ότι ο προσανατολισμός δέσμωσης υποστρώματος που εμπλέκεται στις οδούς οξειδάσης και ανασταλτικής μονοοξυγενάσης διαφέρει και αυτό αντικατοπτρίζεται από διακριτά χαρακτηριστικά συγγένειας, όταν συγκρίνεται η επίδραση των υποκαταστατών δακτυλίου.

Τελευταία στοιχεία δηλώνουν ότι αυτός ο μηχανισμός αδρανοποίησης ευθύνεται επίσης, και για την μη αναστρέψιμη αναστολή της τυροσινάσης από τις ρεσορκινόλες, αλλά και ότι η υδροκινώνη δεν αποτελεί υπόστρωμα τυροσινάσης. (Christopher A. Ramsden et al., 2014)



Σχήμα 13: Η μετατροπή oxy→ deact-τυροσινάση από κατεχόλες.

#### 1.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Οι αναστολείς γενικά, διακρίνονται σε αντιστρεπτούς αναστολείς και σε μη αντιστρεπτούς αναστολείς. Η παραπάνω διάκριση πραγματοποιείται σύμφωνα με το αν οι αναστολείς που αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα προκαλούν μόνιμη αδρανοποίηση του ενζύμου. Στην περίπτωση του ενζύμου της τυροσινάσης πραγματοποιείται αντιστρεπτή αναστολή κατά την οποία ο συνδυασμός αναστολέα και ενζύμου είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία δυναμικής ισορροπίας. Η αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα προκαλεί μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, αλλά δεν απενεργοποιεί μόνιμα το ένζυμο. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση του αναστολέα μειωθεί, η δραστηριότητα της τυροσινάσης αυξάνεται. Σ' αυτόν το τύπο αναστολέων ανήκουν οι εξής κατηγορίες ενώσεων: μη ειδικοί απενεργοποιητές ενζύμων, εναλλακτικά υποστρώματα ενζύμων, δεσμευτές ντοπακινόνης και παράγοντες που προκαλούν χημική αναγωγή της ντοπακινόνης. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Yunwei Qu et al., 2020)

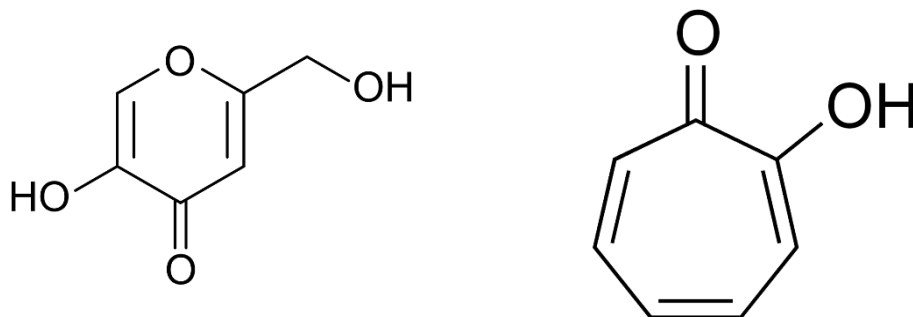
Αντίθετα, η μη αντιστρεπτή αναστολή προκαλεί μόνιμη αδρανοποίηση της τυροσινάσης. Στο τύπο αυτό ανήκουν οι παρακάτω τύποι ενώσεων: οι ειδικοί αναστολείς τυροσινάσης, δηλαδή ενώσεις που προσδένονται αντιστρεπτά με την τυροσινάση και μειώνουν την καταλυτική της ικανότητα και οι ειδικοί απενεργοποιητές τυροσινάσης. Οι συγκεκριμένοι

αναστολείς σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο, αδρανοποιώντας έτσι, μη αντιστρεπτά το ένζυμο κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αντίδρασης. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Te-Sheng Chang et al., 2009)

Οι αναστολείς της τυροσινάσης διακρίνονται σε τέσσερις μορφές: ανταγωνιστικός, συναγωνιστικός, μικτού τύπου (ανταγωνιστικός/μη ανταγωνιστικός) και μη ανταγωνιστικός αναστολέας. Ο ανταγωνιστικός αναστολέας είναι συνήθως μια ουσία που προσδένεται σε κάποιο ελεύθερο ένζυμο, αποτρέποντας έτσι, την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Δηλαδή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα ανταγωνίζονται την ίδια «θέση» στο ενεργό κέντρο. Ο αναστολέας μπορεί να είναι ένα χηλικό σύμπλοκο χαλκού ή παράγωγα του υποστρώματος. Δεδομένου ότι η τυροσινάση είναι μεταλλοένζυμο, οι χηλικές ενώσεις χαλκού πχ. αρωματικά οξέα, φαινόλες, πολυφαινολικές ενώσεις και ορισμένες μη αρωματικές ενώσεις αναστέλλουν συνήθως την τυροσινάση μιμούμενοι το υπόστρωμα της τυροσινάσης. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η D-τυροσίνη ρυθμίζει αρνητικά τη σύνθεση της μελανίνης αναστέλλοντας ανταγωνιστικά τη δραστηριότητα της τυροσινάσης, αντίθετα, η L-τυροσίνη αποδείχθηκε αναστολέας. Στον αντίποδα, ο συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται μόνο με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Ο αναστολέας μικτού τύπου μπορεί να συνδεθεί και με το ελεύθερο ένζυμο αλλά και με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Ωστόσο, οι σταθερές ισορροπίας για τις δύο μορφές είναι διαφορετικές. Αντίθετα, ο μη ανταγωνιστικός αναστολέας μπορεί να συνδεθεί με την ίδια σταθερά ισορροπίας, με κάποιο ελεύθερο ένζυμο και μ' ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Οι δύο τελευταίοι τύποι αναστολέων έχουν παρατηρηθεί ως οι πιο συχνοί τρόποι για τις μελέτες κινητικής σχετικά με τη δραστηριότητα τυροσινάσης μανιταριών. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Te-Sheng Chang et al., 2009)

Παραδείγματα αναστολέων μικτού τύπου είναι τα παράγωγα υδροξυπυριδινόνης, φθαλικού οξέος και κινναμωμικού οξέος για την αναστολή μονο-φαινολάσης, ενώ για την αναστολή δι-φαινολάσης είναι το φθαλικό οξύ, ανάλογα θυμόλης και άλλα. Ακόμα, παραδείγματα μη ανταγωνιστικών αναστολέων είναι δύο παράγωγα θειαδιαζολίου, χλωροκινναμικά οξέα, προπανικό οξύ και μερικά παράγωγα θειαζολών. (Samaneh Zolghadri et al., 2019)

Το κοτζικό οξύ είναι ο γνωστότερος και επομένως ευρύτερα μελετημένος αναστολέας της τυροσινάσης και είναι μυκητιακός μεταβολίτης προερχόμενος κυρίως από το μανιτάρι *Aspergillus oryzae*. Χρησιμοποιείται στην κοσμητολογία ως παράγοντας λεύκανσης του δέρματος αλλά και ως πρόσθετο στα τρόφιμα για την πρόληψη της ενζυμικής αμαύρωσης. Ο αναστολέας αυτός παρουσιάζει δύο τύπων αναστολή: α) Ανταγωνιστική αναστολή κατά τη δραστηριότητα της μονοφαινολάσης, η οποία εξηγείται από την ικανότητα του κοτζικού οξέος να συνδέεται χηλικά με τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου του ενζύμου. β) Μικτή αναστολή κατά τη δραστηριότητα της διφαινολάσης και συγκεκριμένα αργής πρόσδεσης αναστολέας, το οποίο σημαίνει ότι πριν την πρόσδεση του αναστολέα στο ένζυμο απαιτείται η δραστική μορφή της τυροσινάσης, που δημιουργείται στον καταλυτικό κύκλο με την παρουσία του υποστρώματος. Επίσης, πολύ ισχυρός αναστολέας βραδείας δέσμευσης της τυροσινάσης είναι η τροπολόνη και το ανάλογο υπόστρωμα L-μιμοσύνη. (Te-Sheng Chang et al., 2009)



Εικόνα 1: Η πρώτη δομή απεικονίζει το κοτζικό οξύ και η δεύτερη δομή τη τροπολόνη.

Η τιμή  $IC_{50}$  είναι η συγκέντρωση ενός αναστολέα που απαιτείται για την αναστολή του μισού της ενζυμικής δράσης στην υπό δοκιμή κατάσταση. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ασύγκριτες τιμές  $IC_{50}$  για τους αναστολείς της τυροσινάσης, εξαιτίας των ποικίλων συνθηκών ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος και του ποικίλου χρόνου επώασης. Οι μελέτες που διεξάγονται στην ανακάλυψη νέων αναστολών τυροσινάσης, χρησιμοποιούν την τιμή  $IC_{50}$  του κοτζικού οξέος ( $IC_{50}=59,3$ ) (kojic acid) ως πρότυπο σύγκρισης για την ικανότητα αναστολής. (Samaneh Zolghadri et al., 2019, Te-Sheng Chang et al., 2009)

#### 1.4.1 Κατηγορίες αναστολέων (συνθετικές – φυσικές ενώσεις)

Πληθώρα αναστολέων τυροσινάσης έχει ταυτοποιηθεί τόσο από φυσικές όσο και από συνθετικές πηγές. Ο αναστολέας κοτζικό οξύ μαζί με την αρβουτίνη, την υδροκινόνη ή την τροπολόνη χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την εύρεση αναστολέων.

#### 1.4.1.1 Συνθετικοί αναστολείς τυροσινάσης

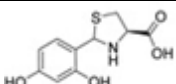
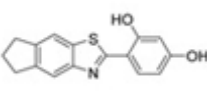
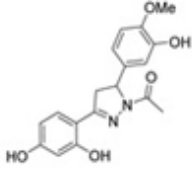
Η εξέλιξη της τεχνολογίας βοήθησε στον ορθολογικό σχεδιασμό αποτελεσματικών συνθετικών αναστολέων της τυροσινάσης. Οι πιο γνωστοί συνθετικοί αναστολείς παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1). (Mohammad N. Masum et al., 2019)

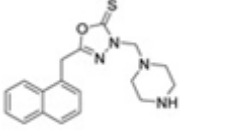
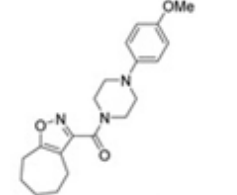
Πίνακας 1: Γενικές ομάδες συνθετικών αναστολέων.

N-υδροξυ-N'-φαινυλθειουρία	Τετρακετόνες
N-κυκλοπεντυλ-N νιτροσοϋδροξυλαμίνη	Τριαζολοθιαδουαζόλες
S -φαινυλ N -αρυλ S αλκυλθειοκαρβαμικά	Οξαζολόνες
μεθυλαιθέρας σιλденаφίλης	θειοημικαρβαζόνες βενζαλδεϋδης
2,5-διυποκατεστημένες-οξαδιαζόλες	Θειοημικαρβαζόνες
2-αρυλθειαζολιδινο-4-καρβοξυλικά οξέα	διαρυλπεντανοειδή κουρκουμίνης
4,4'-διυδροξυδιφαινύλιο	δισ-βενζυλο γλυκοσίδες
παράγωγα πολυφαινολικής κουρκουμίνης	βενζυλιδενο υδαντοΐνες
υβριδικές ενώσεις κουμαρίνης-ρεσβερατρόλης	5-βενζυλιδενο βαρβιτουρικά
παράγωγα 4-υδροξυβενζαλδεϋδης	παράγωγα ροδανίνης
3,4-διυδροξυβενζοϊκά	φαινυλουρενυλ χαλκόνες
δισ-σαλικυλαλδεϋδες	

Πολλοί ερευνητές εξακολουθούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη νέων συνθετικών αναστολέων της τυροσινάσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα συνθετικών αναστολέων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Παραδείγματα ερευνών συνθετικών αναστολέων.

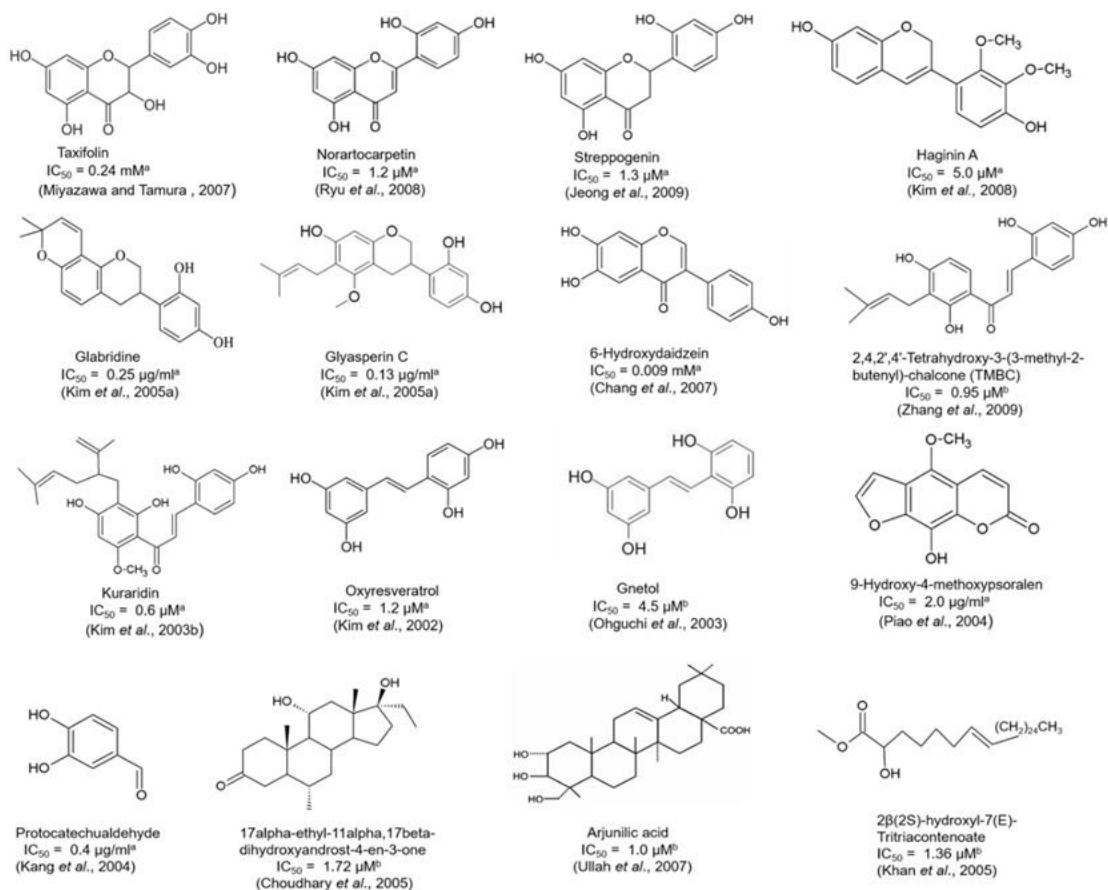
Παράγωγα ενώσεων	Χημική Δομή	Τιμή IC <sub>50</sub>	Βιβλιογραφία
(4R)-2-(2,4-διυδροξυφαινυλ)θειαζολιδινο-4-καρβοξυλικό οξύ		1,81 μM	Han et al., 2012
4-(6,7-διυδρο-5H-ινδανο [5,6-d]θειαζολ-2-υλ)βενζο-1,3-διόλη		0,50 μM	Park et al., 2013
1-(5-(3,4-διυδροξυφαινυλ)-3-(4-υδροξυφαινυλ)-4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-1-υλ)αιθανόνη		0,301 μM	Zhou et al., 2013

5-(ναφθαλεν-1-υλμεθυλ)-3-(πιπεραζιν-1-υλμεθυλ)-1,3,4-οξαδιαζολο-2(3H)-θειόνη		0,87 $\mu$ M	Lam et al., 2010
5,6,7,8-τετραϋδρο-4H-κυκλοεπτα [d]ισοξαζολίου		2,10 $\mu$ M	Song et al., 2012

#### 1.4.1.2 Φυσικές ενώσεις αναστολείς τυροσινάσης

Υπάρχει μια συνεχής προσπάθεια αναζήτησης αναστολέων τυροσινάσης από φυσικές πηγές, ιδιαίτερα από φυτά, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή βιοδραστικών ουσιών και είναι ως επί το πλείστον απαλλαγμένα από επιβλαβείς παρενέργειες. Ένας αριθμός ερευνών έχει επικεντρωθεί στον εντοπισμό αναστολέων τυροσινάσης, εκτός από φυτά, σε μεταβολίτες μυκήτων και θαλάσσια φύκια. Ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων έχει διερευνηθεί ως προς την ανασταλτική δράση της τυροσινάσης των μανιταριών. Αυτές οι ενώσεις διαφέρουν μεταξύ τους, ως προς την ισχύ και τον τύπο της αναστολής του ενζύμου. Στους φυσικούς αναστολείς της τυροσινάσης συγκαταλέγονται οι πολυφαινόλες, τα στυλβένια, τα παράγωγα κουμαρίνης, τα μακράς αλυσίδας λιπίδια, τα στεροειδή, η βενζαλδεΐδη και τα βενζοϊκά παράγωγα. (Mohammad N. Masum et al. 2019)

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση και αποτελούν μια από τις κυριότερες ομάδες αναστολέων τυροσινάσης. Από την κατηγορία των πολυφαινολών τα флаβονοειδή έχουν διερευνηθεί εκτενώς για την ανασταλτική τους δράση. Τα флаβονοειδή υποδιαιρούνται σε επτά ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των флаβονών, των флаβονολών, των флаβανονών, των флаβανολών, των ισοφλαβονοειδών, των χαλκόνων και των κατεχινών. Στην Εικόνα 2 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικοί αναστολείς της τυροσινάσης που προσδιορίστηκαν από φυσικές πηγές και η ικανότητα αναστολής τους προσδιορίστηκε ή μεγαλύτερη συγκριτικά με το κοτζικό οξύ. (Mohammad N. Masum et al. 2019)



a, Inhibition of monophenolase activity; b, Inhibition of diphenolase activity;  $IC_{50}$ , Inhibitory Concentration 50%

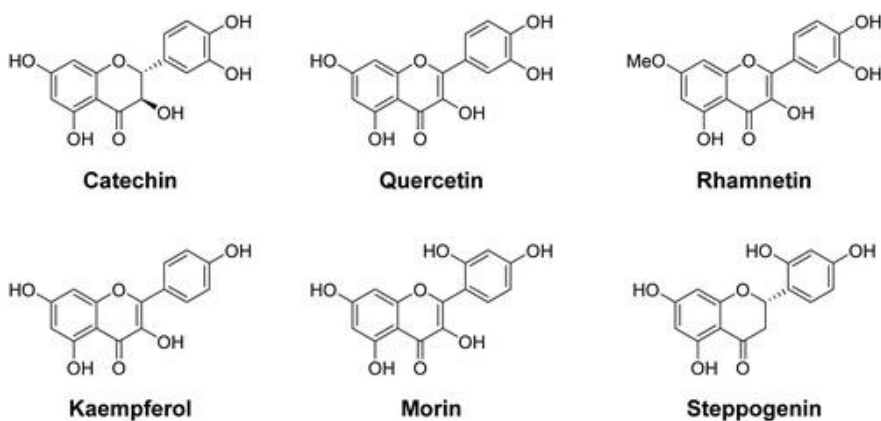
Εικόνα 2: Χημική δομή ορισμένων ισχυρών φυσικών αναστολέων τυροσινάσης. (Mohammad N. Masum et al. 2019)

Στο Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι κατηγορίες των φλαβονοειδών και οι ενώσεις αυτών που έχουν ταυτοποιηθεί ως αναστολείς της δράσης της τυροσινάσης με βάση τις έρευνες των τελευταίων ετών. Στην Εικόνα 3 αναπαρίστανται η μοριακή δομή το πιο αντιπροσωπευτικών φλαβονοειδών.

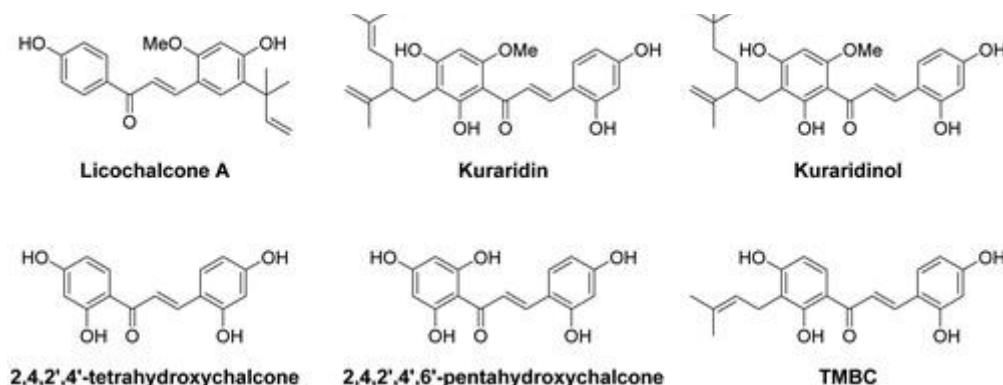
Πίνακας 3: Παραδείγματα ενώσεων με ανασταλτική δράση που ανήκουν στις κατηγορίες των φλαβονοειδών.

Κατηγορίες φλαβονοειδών	Αναστολείς τυροσινάσης
1. Φλαβόνες	λουτεολίνη, απιγενίνη, βαϊκελαΐνη, χρυσίνη, οι γλυκοσίδες, νομπιλετίνη, 7,8,4'-τριυδροξυφλαβόνη ( $IC_{50} = 10,31 \text{ }\mu\text{M}$ )
2. Φλαβονόλες	μυρικετίνη, καμφερόλη, κερκετίνη, γαλανθίνη και οι γλυκοσίδες τους

3. Ισοφλαβόνες	γενιστεΐνη, γλυκιτεΐνη, φορμονονετίνη, γλαβριδίνη (IC <sub>50</sub> = 0,43 μM)
4. Φλαβανόλη	ναρινγενίνη, εσπεριτίνη, εριοδικτυόλη, γλυκοσίδες και οι φλαβανονόλες του
5. Χαλκόνες (Εικόνα 4)	βουτεΐνη, φλορετίνη, καρθαμίνη, 1,3-διφαινυλ-2-προπεν-1-όνες, κουραριδίνη, κουραριδινόλη, 2,4,2',4'-τετραϋδροξυ-3-(3-μεθυλ-2-βουτενυλ) χαλκόνη (TMBC), 2,4,2',4'-τετραϋδροξυχαλκόνη (IC <sub>50</sub> = 0,02 μM).



Εικόνα 3: Χημικές δομές αντιπροσωπευτικών φλαβονοειδών.

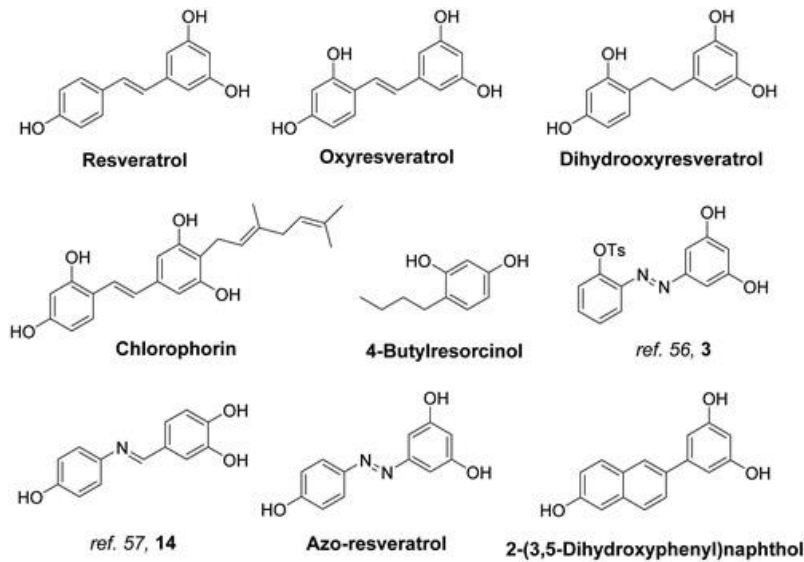


Εικόνα 4: Αντιπροσωπευτικές χαλκόνες με ανασταλτική δράση έναντι της τυροσινάσης.

Οι κουμαρίνες που βρίσκονται σε πολλά φυτά, ειδικά στην καννέλα κασσίας και στα φασόλια τόνκα, είναι επίσης γνωστές ως αναστολείς της τυροσινάσης. Η ανασταλτική ικανότητα πολλών παραγώγων κουμαρίνης, συμπεριλαμβανομένων των 3-αρυλοκουμαρινών και 3-ετεροαρυλοκουμαρινών, των φαινυλοκουμαρινών, των υδροξυκουμαρινών, των διαμιδίων θειοφωσφορικού οξέος και υβρίδια κουμαρίνης-



ρεσβερατρόλης, έχουν επισημανθεί ως αναστολείς της τυροσινάσης. Το γνωστότερο στιλβένιο που αναστέλλει τη δράση της τυροσινάσης είναι η ρεσβερατρόλη (Εικόνα 5), που βρίσκεται στα σταφύλια και στο κόκκινο κρασί. Υπάρχουν πολλά παράγωγα στιλβενίου από φυσικές και συνθετικές πηγές που έχουν διερευνηθεί για την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης. (Mubashir Hassan et al., 2022)



Εικόνα 5: Γνωστά παράγωγα ρεσβερατρόλης που δρουν ανασταλτικά ως προς το ένζυμο της τυροσινάσης.

Αρκετά λιπίδια προερχόμενα από φυσικές πηγές παρουσιάζουν ανασταλτική ικανότητα του ενζύμου της τυροσινάσης. Έχει αποδειχθεί ότι η τριλινολεΐνη (τριακυλογλυκερόλη) που απομονώθηκε από υποπροϊόντα της παραγωγής του sake, παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση ίση με την ικανότητα αναστολής του κοτζικού οξέος στην αναστολή της δράσης της διφαινολάσης. Επίσης η σογιακερεβροσίδη (γλυκοσφιγγολιπίδιο) αναστέλλει τη δραστηριότητα της μονοφαινολάσης και της διφαινολάσης, ενώ το trans-γερανικό οξύ από λεμονόχορτο αναγνωρίστηκε ως αναστολέας (με το 1/10 της δράσης του κοτζικού οξέος). Ορισμένα στεροειδή αναφέρθηκαν επίσης ως αναστολείς. Η στιγμαστ-5-εν-3β,26-διόλη (7 φορές), ο εστέρας μακράς αλυσίδας, 2β(2S) -υδροξυλ-7( E )-τριακοντενοϊκός εστέρας (12,3 φορές) εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της δράσης της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού σε σύγκριση με την ισχύ του κοτζικού οξέος. Υψηλότερη ανασταλτική δράση παρουσίασε το τριτερπενοειδή, 3β,21,22,23-τετραϋδροξυκυκλοαρτ-24(31),25(26)-διένιο (1,6 φορές) έναντι της δραστηριότητας της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού σε σύγκριση με το κοτζικό οξύ. (Te-Sheng Chang et al., 2009)

Η ανασταλτική δράση της βενζαλδεΐδης και των βενζοϊκών παραγώγων που έχουν ανακαλυφθεί παρουσίασαν χαμηλότερη δράση από αυτή του κοτζικού οξέος. Τα πιο ευρέως γνωστά βενζοϊκά παράγωγα είναι το βενζοϊκό οξύ, το ανισικό οξύ, η ανισαλδεΐδη, το

κινναμωμικό οξύ, το μεθοξυκινναμωμικό οξύ και το βανιλικό οξύ. (Sang Yeul Lee et al., 2014)

## Κεφάλαιο 2. Εικονική σάρωση (Virtual Screening)

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας νέος κλάδος που συνεχώς αναπτύσσεται στον τομέα των φαρμάκων αλλά και στον τομέα των τροφίμων είναι οι υπολογιστικές τεχνικές. Συγκεκριμένα, σαρώνονται εικονικά μέσω προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων με ορθολογικό τρόπο, μειώνοντας έτσι το κόστος και το χρόνο. Οι τεχνικές αυτές, ονομάζονται *in silico* και η πιο γνωστή τεχνική είναι η μοριακή πρόσδεση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ένζυμο της τυροσινάσης ευθύνεται για τη μελάγχρωση του δέρματος και την αμαύρωση των φρούτων-λαχανικών. Η μοριακή πρόσδεση έχει συνεισφέρει σημαντικά στην ανακάλυψη αναστολέων της ανθρώπινης τυροσινάσης. Η ίδια τεχνική εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία χρησιμοποιώντας την τυροσινάση μανιταριών για την ανακάλυψη φυσικών ενώσεων, οι οποίες εν δυνάμει θα αναστέλουν τη λειτουργία του ενζύμου της τυροσινάσης. Στη συνέχεια, οι φυσικές αυτές ενώσεις θα αγοραστούν και θα δοκιμαστούν με πειράματα *in vitro*, ως αναστολείς της τυροσινάσης, με μελλοντική εφαρμογή σε συσκευασμένα τρόφιμα. (Brian K. Shoichet et al., 2004, Alexander Amberg et al., 2013)

### 2.2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων αποτελούν εργαλείο για ερευνητές που αναζητούν νέες ενώσεις με εν δυνάμει ανασταλτική δράση έναντι βιολογικών στόχων.

Υπάρχουν διαθέσιμες πολλές βιβλιοθήκες φυσικών αλλά και συνθετικών χημικών ενώσεων με ελεύθερη πρόσβαση. Βασικό πλεονέκτημα των βιβλιοθηκών αυτών είναι ότι περιλαμβάνουν χιλιάδες εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή εικονικής σάρωσης. Ορισμένα παραδείγματα βιβλιοθηκών είναι: ScrubChem (<https://www.scrubchem.org/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), LINCSt (<https://lincs.hms.harvard.edu/db/>), ChemDB(<https://cdb.ics.uci.edu/>), Chematica (<https://www.inpharmatica.co.uk/chematica.html>), [Binding](https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp) DB (<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>), ChEMBL(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) και άλλες.

#### 2.2.1 Zinc Database

Στην παρούσα εργασία ελήφθησαν δεδομένα από τη βιβλιοθήκη Zinc (<https://zinc.docking.org/>), μια βιβλιοθήκη εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων ελεύθερης

πρόσβασης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εικονική σάρωση. Περιέχει περισσότερες από 230 εκατομμύρια ενώσεις.

Από τη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη Zinc έγινε λήψη 552 χημικών ενώσεων σε 2D μορφή, που περιλαμβάνουν ενώσεις των ακόλουθων κατηγοριών: C-γλυκοζίτες, O-γλυκοζίτες, ισοφλαβόνες, χρωμόνες-ξανθόνες, κινναμικό οξύ-παράγωγα, κουμαρίνες, λιγνάνες, στυλμπένες, ανθρακινόνες, βένζοκινόνες, υδροκινόνες, ναφθοκινόνες, κατεχίνες, γαλλοτανίνες, αλκοόλες-φαινόλες, αλδεΐδες-κετόνες, χαλκόνες- διυδροχάλη, φλαβανόλες, φλαβανόνες, 3-υδροξυφλαβόνες, διφλαβόνες, οργανικά οξέα-εστέρες και αλκαλοειδή.

## 2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ

### 2.3.1 Εισαγωγή

Η μεθοδολογία της μοριακής πρόσδεσης προβλέπει και αναζητά τη φυσική θέση, τον προσανατολισμό και τη διαμόρφωση ενός προσδέτη εντός της θέσης πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης στόχου. Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί έτσι, ένα βασικό εργαλείο στη δομική μοριακή βιολογία και στον σχεδιασμό φαρμάκων με τη βοήθεια υπολογιστή. Οι επιτυχημένες μέθοδοι αναζητούν χώρους υψηλών διαστάσεων και χρησιμοποιούν μια συνάρτηση βαθμολόγησης ενέργειας που κατατάσσει σωστά τις υποψήφιες βάσεις σύνδεσης. Κάθε τρόπος πρόσδεσης του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ονομάζεται «πόζα». Επομένως, με το βήμα της αναζήτησης, δημιουργούνται πολυάριθμες «πόζες» και χρειάζεται ένα σύστημα βαθμολόγησης (scoring) για να τις κατατάξει σύμφωνα με την πιθανότητα το μόριο να είναι υποψήφιος προσδέτης. Η βαθμολόγηση μπορεί να είναι είτε με βάση την ενέργεια, το σχήμα, τις φυσικοχημικές ιδιότητες είτε με κάποια άλλη μέτρηση. (Kaushik Raha et al., 2005, Akansha Saxena et al., 2009, Vincent Zoete et al., 2009)

### 2.3.2 Το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης - Glide

Το πρόγραμμα Glide χρησιμοποιεί μια σειρά από φίλτρα για την αναζήτηση πιθανών θέσεων πρόσδεσης και το σωστό προσανατολισμό του προσδέτη στην περιοχή του ενεργού κέντρου του υποδοχέα/πρωτεΐνης/ενζύμου. Οι ακατάλληλες διαμορφώσεις (πόζες) που προκύπτουν από τους διάφορους τρόπους πρόσδεσης του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βαθμολογούνται από το πρόγραμμα Glide μέσω μιας συνάρτησης βαθμολόγησης, το Glide Score. Η συνάρτηση βαθμολόγησης, GlideScore, ταξινομεί τις ενώσεις που συνδέονται ισχυρά συγκριτικά με αυτές που παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης. (Richard A. Friesner et al., 2004)

### 2.3.3 Διάγραμμα ροής μοριακής πρόσδεσης

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης είναι απαραίτητη η προετοιμασία της πρωτεΐνης και των πιθανών προσδετών με ορθολογικό τρόπο.

### 2.3.4 Προετοιμασία πρωτεΐνης

Γενικά, οι πρωτεϊνικές κρυσταλλικές δομές ακτίνων X υψηλής ανάλυσης λαμβάνονται από την Πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank (PDB)). Προετοιμάζονται πριν από τη μοριακή πρόσδεση, αφού αποτελούνται από βαρέα άτομα, μεταλλικά ιόντα, προκειμένου να προστεθούν άτομα υδρογόνου, να βελτιστοποιηθούν οι δεσμοί υδρογόνου, να αφαιρεθούν οι ατομικές συγκρούσεις και να εκτελεστούν άλλες λειτουργίες που δεν αποτελούν μέρος της διαδικασίας επαναπροσδιορισμού της κρυσταλλικής δομής ακτίνων X. (G. Madhavi Sastry et al. 2012)

Η διαδικασία συγκεντρώνει, αυτοματοποιεί και ενσωματώνει τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εργαλεία και τεχνικές στην προετοιμασία της δομής της πρωτεΐνης, καθώς διορθώνει κοινά προβλήματα, όπως άτομα υδρογόνου που λείπουν, ελλείψεις πλευρικές αλυσίδες και, διαφορούμενες καταστάσεις πρωτονίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει τις ακόλουθες εργασίες:

- διόρθωση των καταστάσεων ιονισμού μετάλλων,
- αφαίρεση των συμπλοκοποιημένων μορίων νερού,
- προσδιορισμός της πιο πιθανής κατάστασης πρωτονίωσης του προσδέτη
- προσδιορισμός των βέλτιστων καταστάσεων πρωτονίωσης για την ιστιδίνη
- και ελαχιστοποίηση ενέργειας (minimize) που επιτρέπει στα άτομα υδρογόνου (H) να ελαχιστοποιούνται ελεύθερα, επιτρέποντας παράλληλα επαρκή κίνηση βαρέων ατόμων για χαλάρωση των δεσμών. (Schrödinger Release 2021-4)

### 2.3.5 Προετοιμασία προσδετών

Πριν από την εικονική σάρωση οι εν δυνάμει προσδέτες προετοιμάζονται κατάλληλα για να δημιουργηθούν τριδιάστατες γεωμετρίες, ώστε να αποδοθούν οι κατάλληλες τάξεις δεσμών και να δημιουργηθούν καταστάσεις ταυτομέρειας και ιοντισμού. Τα προγράμματα προετοιμασίας προσδετών παράγουν μια ενιαία, χαμηλής ενέργειας, τριδιάστατη δομή με σωστές χειρομορφίες για κάθε εξετάζομενη δομή. Επίσης παράγει διάφορες καταστάσεις ιοντισμού, ταυτομέρειας και στερεοχημείας για κάθε δομή ξεχωριστά. Η προετοιμασία αποτελείται από τις ακόλουθες εργασίες:

- προσθήκη ατόμων υδρογόνου,

- αφαίρεση ανεπιθύμητων μορίων, εάν οι δομές έχουν συμπεριλάβει πρόσθετα μόρια, όπως ιόντα αλάτων και μόρια νερού,
- εξουδετέρωση των φορτισμένων ομάδων. Οι φορτισμένες ομάδες πρέπει να εξουδετερωθούν προτού δημιουργηθούν καταστάσεις ιοντισμού. Η εξουδετέρωση πραγματοποιείται προσθέτοντας ή αφαιρώντας ιόντα υδρογόνου,
- δημιουργία καταστάσεων ιοντισμού. Σε αυτό το βήμα, παράγονται διάφορες καταστάσεις ιοντισμού για κάθε δομή,
- δημιουργία ταυτομερών,
- φιλτράρισμα μορίων,
- δημιουργία διαμορφώσεων δακτυλίου χαμηλής ενέργειας,
- βελτιστοποίηση των γεωμετριών,
- δημιουργία στερεοϊσομερών.

(G. Madhavi Sastry et al. 2012)

## 2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση πιθανών μορίων-προσδετών ικανών για την αναστολή του ενζύμου τυροσινάση με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Maestro Schrödinger 13.5. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εικονική σάρωση βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων μέσω εφαρμογής μοριακής πρόσδεσης. Ακολούθησε φιλτράρισμα όλων των εξεταζόμενων ενώσεων σύμφωνα με το σχηματισμό αλληλεπιδράσεων και την ενέργεια πρόσδεσης (docking score). Τέλος, η επιλογή των ικανών μορίων-αναστολέων βασίστηκε στη βιβλιογραφία και στους γνωστούς αναστολείς των προηγούμενων πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης.

## Πειραματικό Μέρος

### Κεφάλαιο 3. Εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν *in silico* πειράματα για την εύρεση ενώσεων με αυξημένη πιθανότητα πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της τυροσινάσης. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα. Αρχικά, την προετοιμασία των ενώσεων της βιβλιοθήκης που απαρτίζουν το δειγματοχώρο, την προετοιμασία του εξεταζόμενου ενζύμου της τυροσινάσης, τη δημιουργία πλέγματος οριοθετώντας το εύρος της θέσης πρόσδεσης και τέλος την πρόσδεση των ενώσεων.

#### 3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε λήψη 552 φυσικών ενώσεων από τη βιβλιοθήκη Zinc (<https://zinc.docking.org/>) με τη μορφή αρχείου κειμένου SMILE (.smi). Στη συνέχεια, οι ενώσεις μετατράπηκαν από 2 διαστάσεις (2D) που ελήφθησαν σε 3 διαστάσεις (3D) στο βέλτιστο pH  $6,5 \pm 0,5$  του ενζύμου. Η προετοιμασία των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του προγράμματος LigPrep (Schrödinger Release 2021-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) της υπολογιστικής πλατφόρμας Maestro (Schrödinger Release 2021-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021).

Η προετοιμασία των ενώσεων αποσκοπεί (α) στην προσθήκη υδρογόνων ή/και στον επαναπροσανατολισμό των υδροξυλίων, (β) στον έλεγχο των καταστάσεων ιοντισμού και ταυτομέρειας, καθώς και (γ) στη διεύρυνση της στεreoχημείας των ενώσεων. Η δημιουργία των καταστάσεων ιοντισμού και ταυτομερών μπορεί να πραγματοποιηθεί με εργαλεία, που αποτελούν μέρος του LigPrep, όπως είναι το Epik (Schrödinger Release 2021-2: Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021), το οποίο βασίζεται στις ακριβέστερες μεθοδολογίες Hammett και Taft πραγματοποιώντας πρόβλεψη των τιμών pK<sub>a</sub> των ιοντισμένων προσδετών για την παραγωγή των πιθανών ταυτομερών δομών σε ένα συγκεκριμένο εύρος pH. (Shelley et al., 2007)

Τέλος, από τη διαδικασία της προετοιμασίας των προσδετών παρήχθησαν 1022 πιθανές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων και των ισομερών δομών. Στη συνέχεια, οι δομές αυτές δοκιμάστηκαν ώστε να προβλεφθεί η ικανότητα πρόσδεσής τους στο ένζυμο της τυροσινάσης μέσω εφαρμογής του προγράμματος Glide (Schrödinger Release 20231-2: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021).

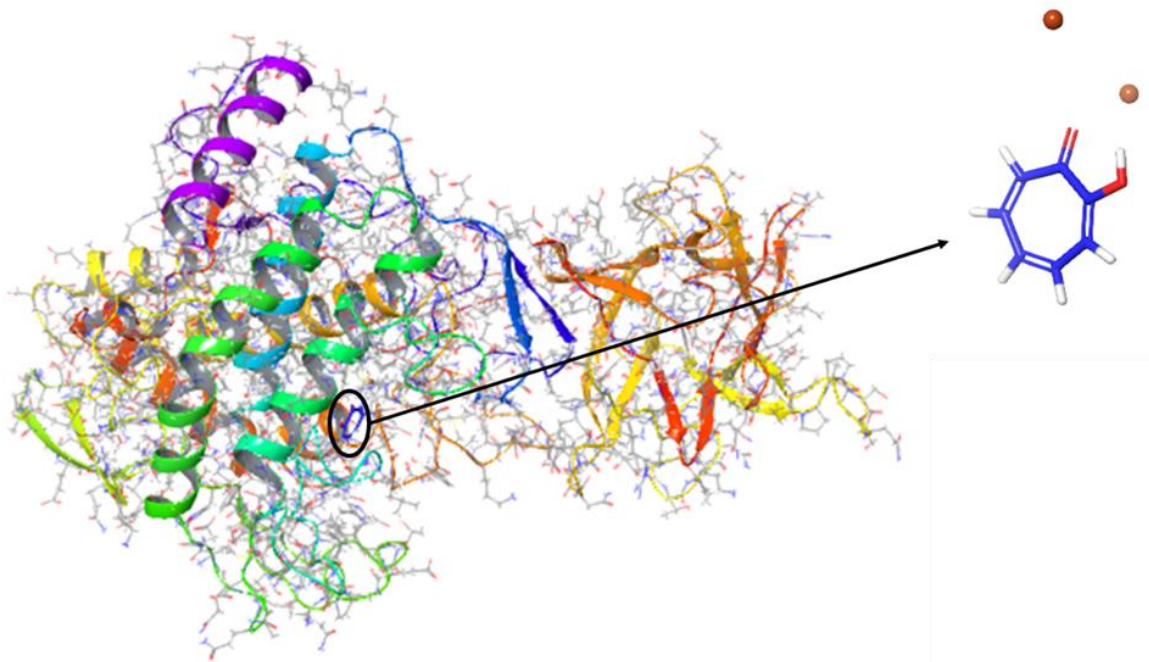


### 3.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Μετά την προετοιμασία των ενώσεων, ακολούθησε η επιλογή και η προετοιμασία του ενζύμου της τυροσινάσης. Για το σκοπό αυτό, από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων (<https://www.rcsb.org>) επιλέχθηκε η κρυσταλλική δομή της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X και ανάλυση: 2,78Å) συμπλοκοποιημένη με τον αναστολέα τροπολόνη. Δηλαδή, μια τετραμερής δομή H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> με μοριακή μάζα 120 kDa που αποτελείται από δυο υπομονάδες των 43 kDa (υπομονάδα H) που παρουσιάζουν ενζυμική δράση και δυο υπομονάδες των 14 kDa (υπομονάδα L) των οποίων η δράση δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. (Wangsa T. Ismaya et al. 2011)

Για την προετοιμασία του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2021-2: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) της πλατφόρμας Maestro (Schrödinger Release 2021-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021). Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του ενός μονομερούς, των δύο υπομονάδων L καθώς και της μίας υπομονάδας H από το εναπομείναν μονομερές. Στη συνέχεια, ακολούθησε ρύθμιση του pH  $6,5 \pm 0,5$  του ενζύμου, ώστε να προσομοιώνει τις συνθήκες των *in vitro* πειραμάτων για την κατάλληλη λειτουργία του ενζύμου. Η εύρεση της τιμής του βέλτιστου pH πραγματοποιήθηκε με χρήση της βάσης δεδομένων BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

Ακολούθησε, η αφαίρεση όλων των μορίων H<sub>2</sub>O, δότι δεν σχημάτιζαν γέφυρα με την τροπολόνη ή με τα αμινοξέα του στόχου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του ενζύμου χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS3, ώστε να εξασφαλιστεί μια σταθερή, χαμύλης ενέργειας διαμόρφωση για το ένζυμο. Στην Εικόνα 6 απεικονίζεται το εξεταζόμενο ένζυμο συμπλοκοποιημένο με τον αναστολέα τροπολόνη έπειτα από την προετοιμασία του.



Εικόνα 6: Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου της τυροσινάσης από το μανιτάρι *Agaricus bisporus*, συμπλοκοποιημένο με τον αναστολέα τροπολόνη (Κωδικός PDB: 2Y9X).

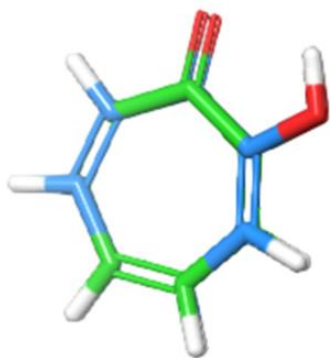
### 3.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

#### 3.4.1 Επικύρωση μεθόδων μοριακής πρόσδεσης

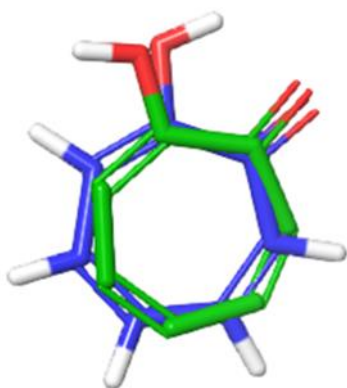
Το επόμενο βήμα της μελέτης περιελάμβανε την επικύρωση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων μοριακής πρόσδεσης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης στον συμπλοκοποιημένο αναστολέα, τροπολόνη, με χρήση των αλγορίθμων Πρότυπης Ακρίβειας (Standard Precision - SP), Επιπρόσθετης Ακρίβειας (Extra Precision - XP) του προγράμματος Glide καθώς επίσης και του αλγορίθμου πρόσδεσης μέσω εφαρμογής Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced-Fit Docking). Δηλαδή, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση της κρυσταλλικής διαμόρφωσης της τροπολόνης (διαμόρφωση από κρυσταλλική δομή 2Y9X) με τη διαμόρφωση που προέκυπτε έπειτα από την εφαρμογή των Glide-SP και XP καθώς και IFD, με σκοπό να βρεθεί η διαμόρφωση που ταυτίζεται με την κρυσταλλική δομή της τροπολόνης.

Για την επικύρωση, δημιουργήθηκε πλέγμα (Grid box) μέσω του προγράμματος Glide Grid Generation, τα όρια του οποίου διαμορφώθηκαν σύμφωνα με τις συντεταγμένες του αναστολέα τροπολόνη.

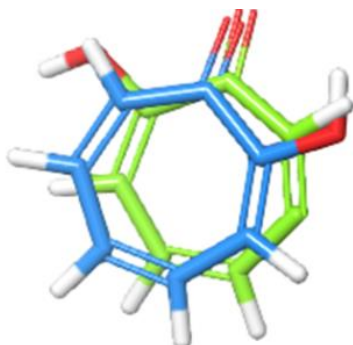
Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της υπέρθεσης προέκυψε ότι έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) (Εικόνα 7), του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Εικόνα 8) και αλγορίθμου πρόσδεσης μέσω Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced-Fit Docking) (Εικόνα 9) προέκυψε ότι οι μέθοδοι είναι επικυρωμένες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για τη διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στις εξεταζόμενες φυσικές ενώσεις. Επίσης, οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης (docking score) της τροπολόνης μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-SP, XP και IFD είναι  $-4,793$ ,  $-3,857$  και  $-5,329$  kcal·mol<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Υπέρθεση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης, έπειτα από την εφαρμογή του Glide-SP. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση – Glide-SP.



Εικόνα 8: Υπέρθεση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης, έπειτα από την εφαρμογή του Glide-XP. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση – Glide-XP.



Εικόνα 9: Υπέρθεση των 3D διαμορφώσεων της τροπολόνης, έπειτα από την εφαρμογή του IFD. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προέρχεται από την κρυσταλλική δομή, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η τροπολόνη που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση – IFD.

### 3.4.2 Εκτέλεση πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης

Την επικύρωση της μοριακής πρόσδεσης, ακολούθησε η εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης με χρήση Glide-SP στους 1022 πιθανούς προσδέτες, που προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος LigPrep. Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε στις ενώσεις που παρουσίασαν τα πιο αξιόλογα αποτελέσματα Glide-XP και IFD.

### 3.4.3 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Η αξιολόγηση μίας ένωσης, για να χαρακτηριστεί ως πιθανός προσδέτης με αξιόλογη ικανότητα πρόσδεσης, περιλαμβάνει: 1) την ύπαρξη κάποιας ομάδας σε τέτοια απόσταση από τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου, ώστε να δημιουργεί αλληλεπίδραση (σύμπλοκο) με το μεταλλοκατιόν (metal coordination), καθώς έτσι παρεμποδίζεται η πρόσδεση του βιολογικού υποστρώματος στο ένζυμο, 2) τη δημιουργία υδρόφοβων ή/και ιοντικών (δεσμοί υδρογόνου) αλληλεπιδράσεων (αμινοξέα : Phe, His, Asn, Gly, Glu, Ser, Met, Val, Ala, Hie) ανάμεσα στα μόρια του προσδέτη και των αμινοξέων του ενζύμου, 3) τη σύγκριση των τιμών του docking score (ds) των προσδετών με το ds της « επικυρωμένης» τροπολόνης της κάθε μεθόδου.

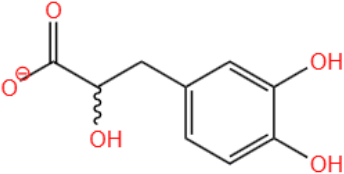
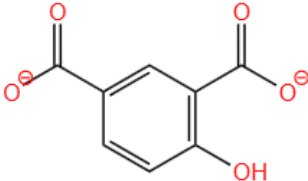
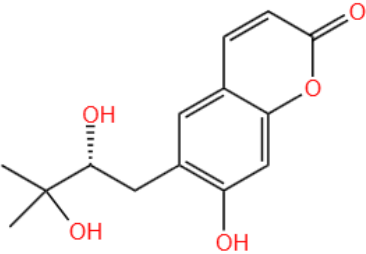
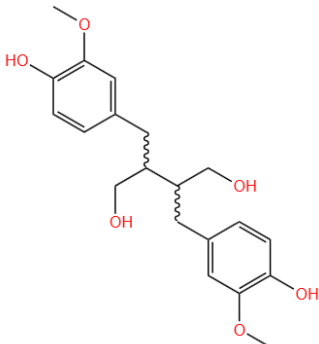
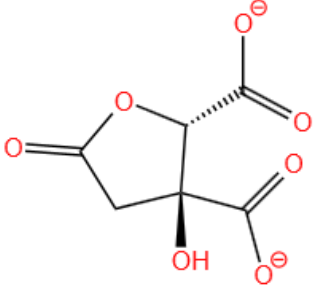
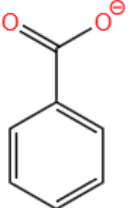
### 3.4.4 Αποτελέσματα Μοριακής Πρόσδεσης

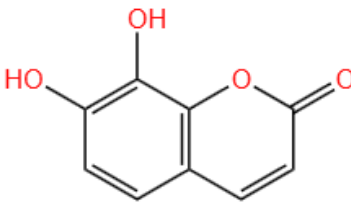
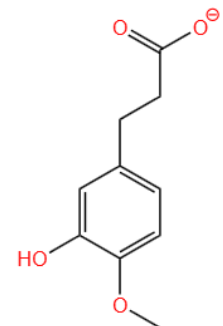
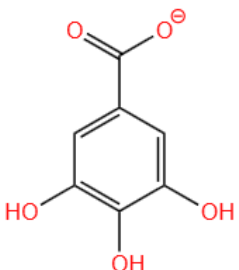
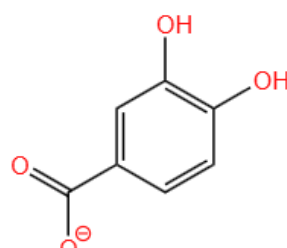
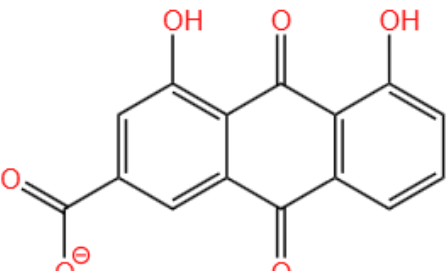
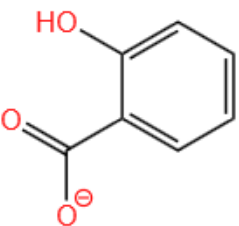
Οι ενώσεις που υποβλήθηκαν στους αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης και αξιολογήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ανήκουν στις παρακάτω κατηγορίες:

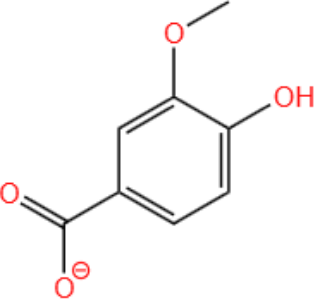
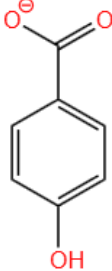
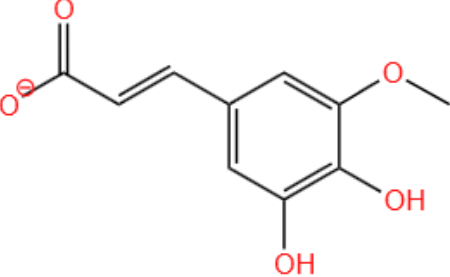
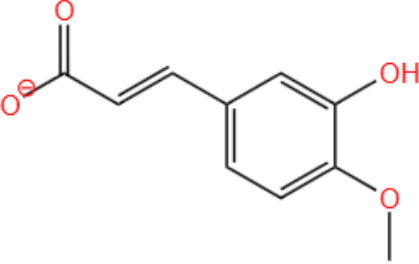
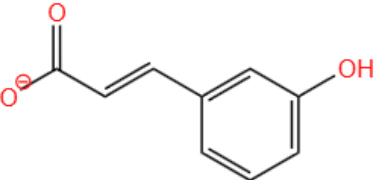
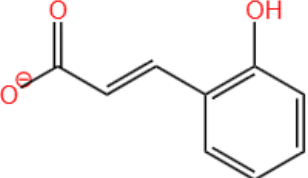
- Οργανικά οξέα και εστέρες
- Κουμαρίνες
- Λιγνάνες
- Παράγωγα κινναμικού οξέος
- Ανθρακινόνες
- Κατεχίνες

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι χημικές δομές καθώς και οι αντίστοιχες τιμές docking score των ενώσεων που παρουσίασαν τα πλέον αξιόλογα αποτελέσματα μετά την εφαρμογή του Glide-SP στο εξεταζόμενο ένζυμο.

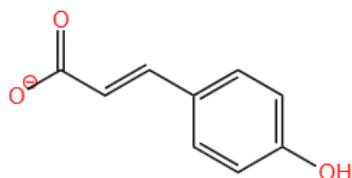
Πίνακας 4: Οι φυσικές ενώσεις με τις καλύτερες αξιολογήσεις στον Glide-SP.

Όνομα	Χημική Δομή	Docking score
3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R,S)		R: -7,945 S: -6,856
4-Hydroxyisophthalic acid		-7,571
(+)-Peucedanol		-4,766
(+)-Secoisolariciresinol (A, B)		A: -4,650 B: -4,632
(-)-Hydroxycitric acid lactone		-7,567
Benzoic acid		-7,714

Daphnetin		-6,192
Dihydroisoferulic acid		-7,121
Gallic acid		-7,377
Protocatechuic acid		-7,360
Rhein		-7,055
Salicylic acid		-7,760

Vanillic acid		-7,754
p-Hydroxybenzoic acid		-7,281
trans-5-hydroxyferulic acid		-6,564
trans-isoferulic acid		-6,608
trans- <i>m</i> -Coumaric acid		-6,355
trans- <i>o</i> -Coumaric acid		-6,202

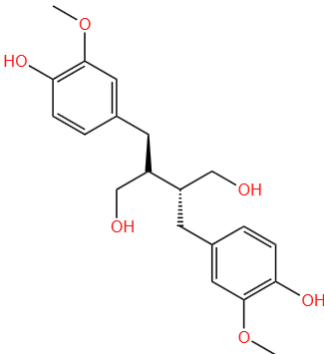
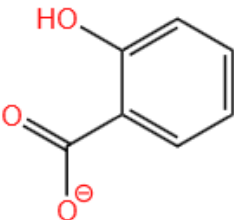
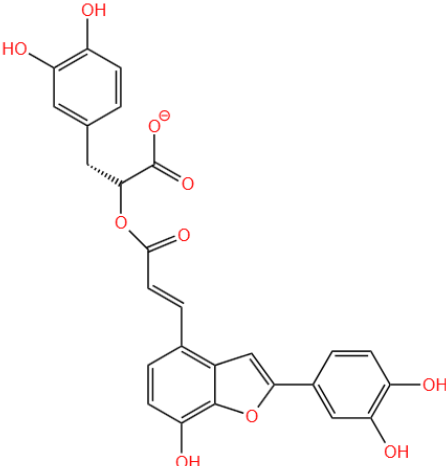
trans-*p*-Coumaric acid



-6,130

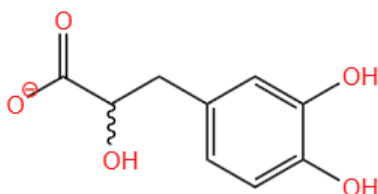
Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν τις καλύτερες αξιολογήσεις μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Πίνακας 5: Οι φυσικές ενώσεις με τις καλύτερες αξιολογήσεις στον Glide-XP.

Όνομα	Χημική δομή	Docking score
(+)-Secoisolariciresinol C	 <p>The structure is a complex polyphenolic compound consisting of two 3,4-dihydroxybenzyl units linked to a central 1,2-dihydroxyethyl chain. One of the benzene rings also has a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>).</p>	-6,887
Salicylic acid	 <p>The structure shows a benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the ortho position relative to a propenoic acid side chain (-CH=CH-COO<sup>-</sup>).</p>	-6,027
Salvianolic acid C	 <p>The structure is a complex polyphenolic compound featuring a central naphthalene-like core with multiple hydroxyl groups and a propenoic acid side chain. It is linked to a 3,4-dihydroxybenzyl unit.</p>	-9,942

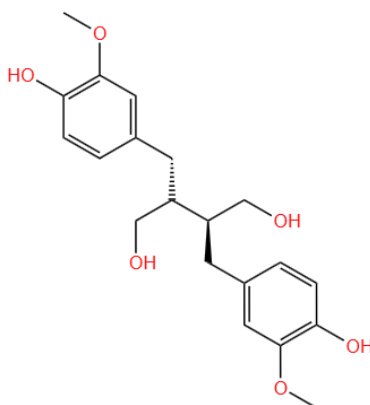


3-(3',4'-Dihydroxyphenyl)  
lactic acid sodium salt R



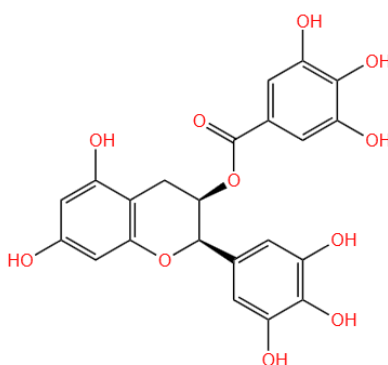
-8,074

(+)-Secoisolariciresinol B



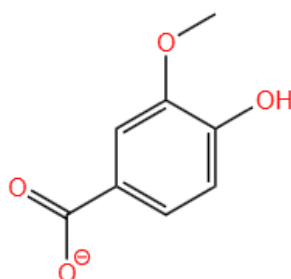
-6,386

(-)-Epigallocatechin 3-  
gallate



-7,119

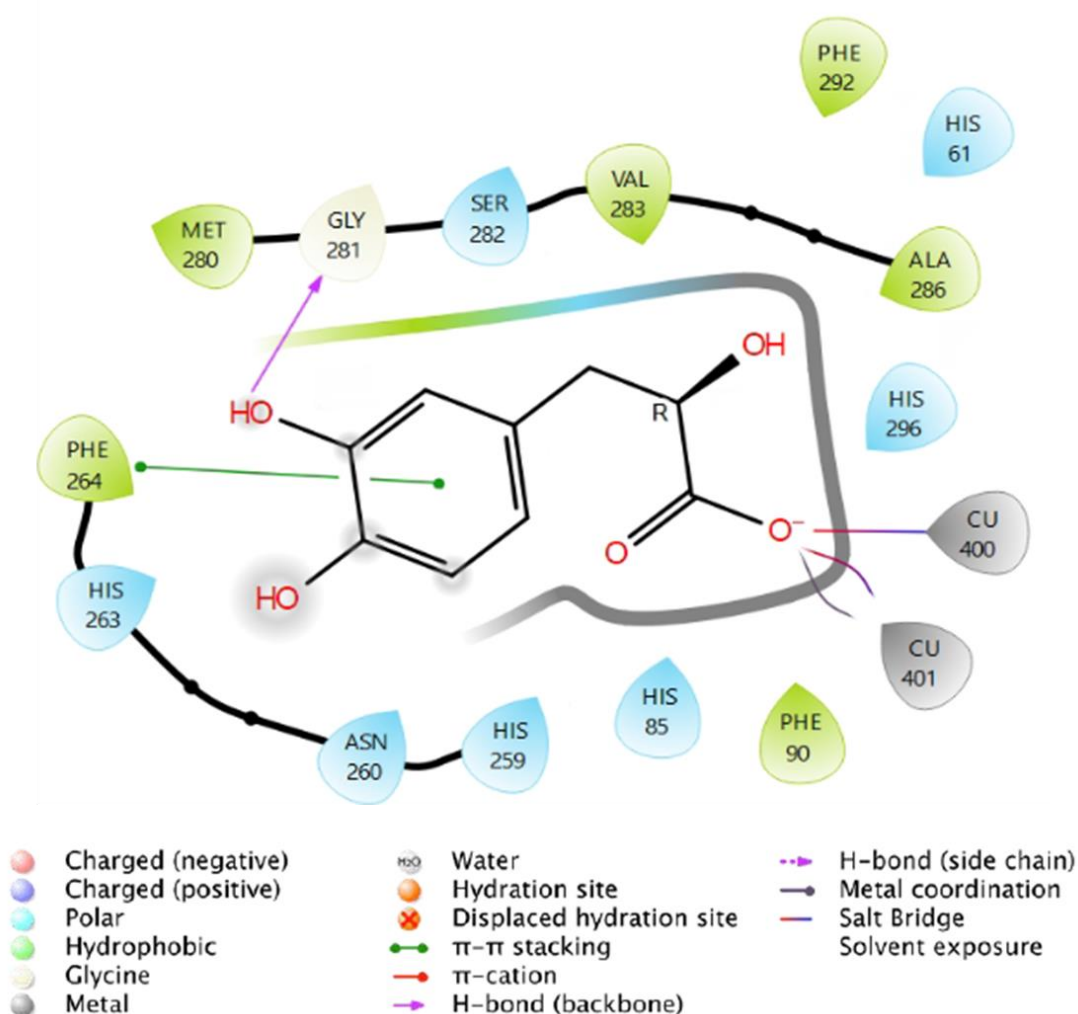
Vanillic acid



-6,470

Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης από την εφαρμογή των Glide-SP και Glide-XP παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την εύρεση νέων ενώσεων αναστολέων του ενζύμου της τυροσινάσης από το μανιτάρι *Agaricus bisporus*. Στις εικόνες (Εικόνα 10-25) που ακολουθούν απεικονίζεται αναλυτικά ο τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να αναστέλουν τη δράση του ενζύμου της τυροσινάσης. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα του Glide-SP παρουσιάζονται στις Εικόνες 10-19 και στις Εικόνες 20-25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Glide-XP.

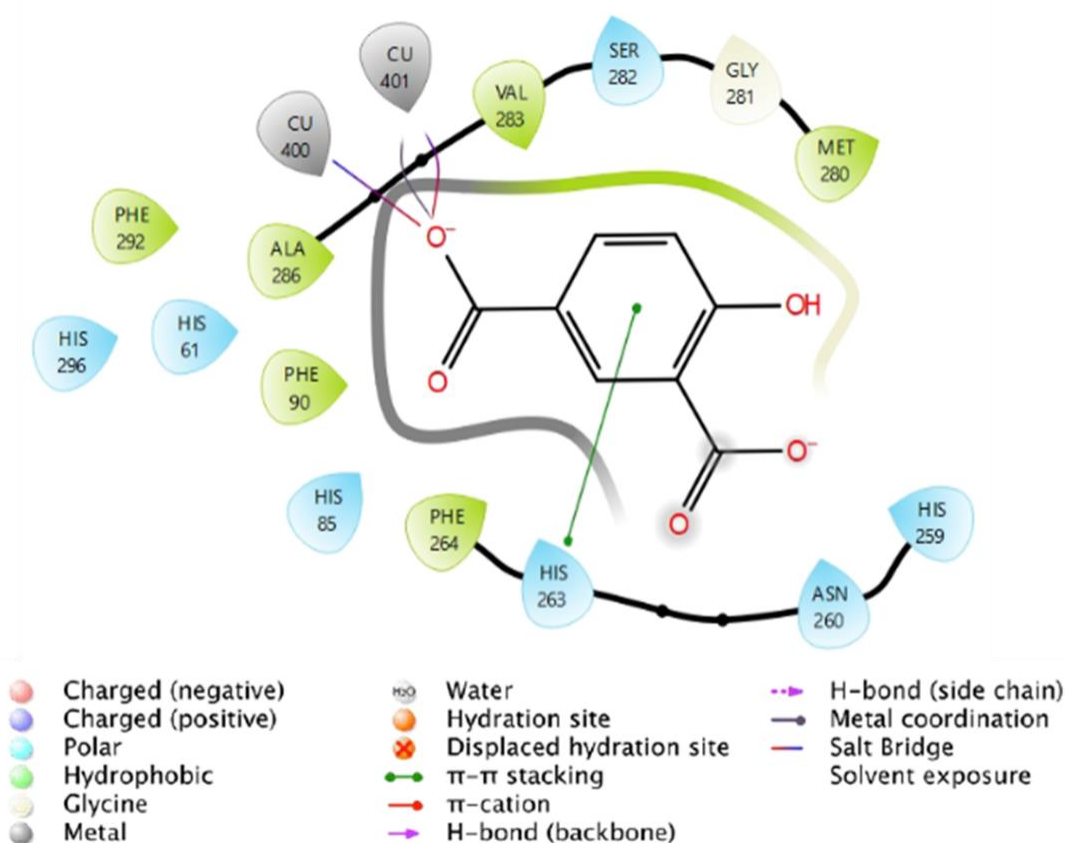
➤ Ένωση 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R)



Εικόνα 10: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Η ένωση 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) (Πίνακας 4, Εικόνα 10) σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Gly281 και αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Phe264 μέσω σχηματισμού π-π αλληλεπίδρασης. Ακόμα, σχηματίζεται γέφυρα άλατος μεταξύ των δύο ιόντων χαλκού και του ανιόντος O<sup>-</sup> της καρβοξυλικής ομάδας. Τέλος, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του Cu<sup>2+</sup> και του ανιόντος O<sup>-</sup> της καρβοξυλικής ομάδας της ένωσης.

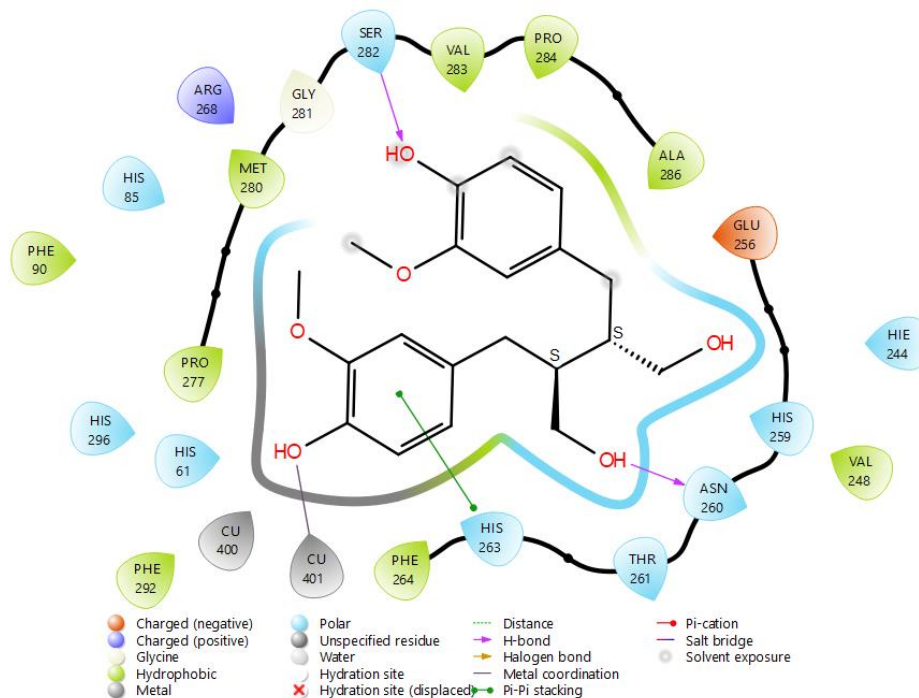
➤ Ένωση 4-Hydroxyisophthalic acid



Εικόνα 11: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 4-Hydroxyisophthalic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Ο φαινολικός δακτύλιος της ένωσης 4-Hydroxyisophthalic acid (Πίνακας 4, Εικόνα 11) αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 μέσω π-π δεσμού και επιπλέον σχηματίζεται γέφυρα άλατος μεταξύ της ένωσης και των δύο ατόμων χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Τέλος, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του  $\text{Cu}^{2+}$  και του ανιόντος  $\text{O}^-$  της καρβοξυλικής ομάδας της ένωσης.

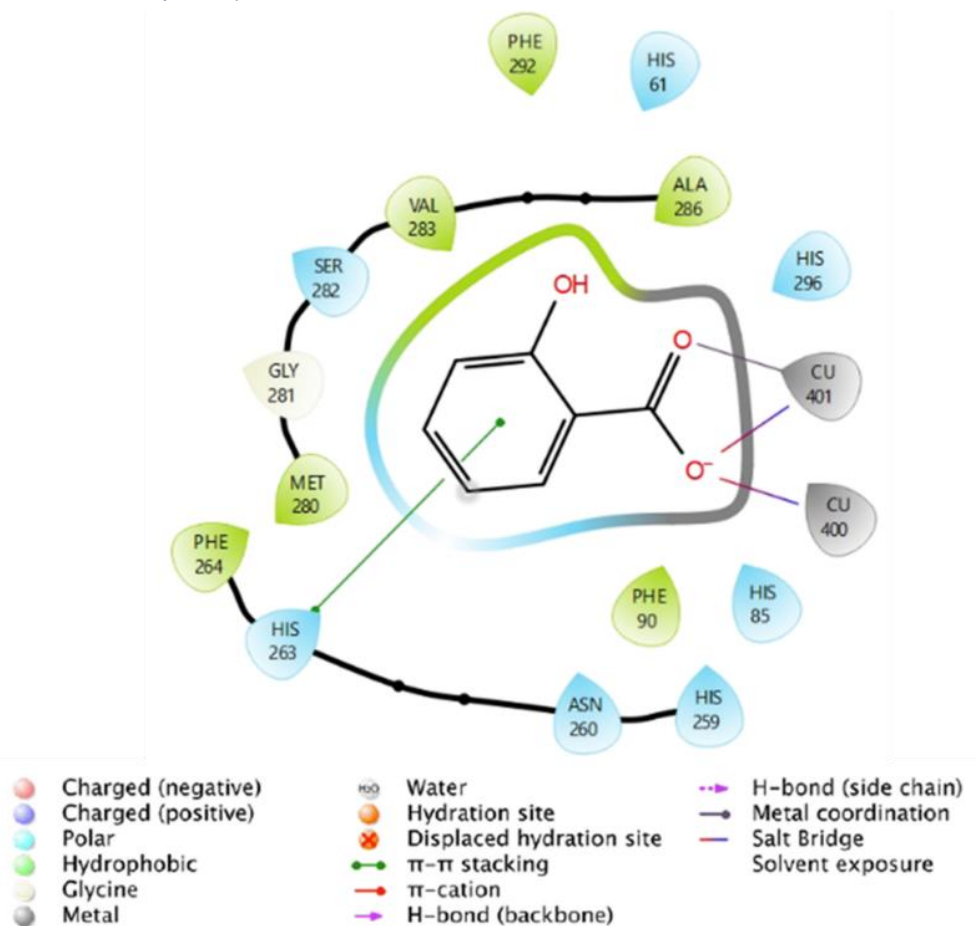
➤ Ένωση (+)-Secoisolariciresinol A



Εικόνα 12: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol A στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Η ένωση (+)-Secoisolariciresinol A (Πίνακας 4, Εικόνα 12) σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Asn260, έναν δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Ser282 και αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 μέσω σχηματισμού π-π δεσμού. Ακόμα, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του  $\text{Cu}^{2+}$  και της υδροξυλομάδας (-OH) της ένωσης.

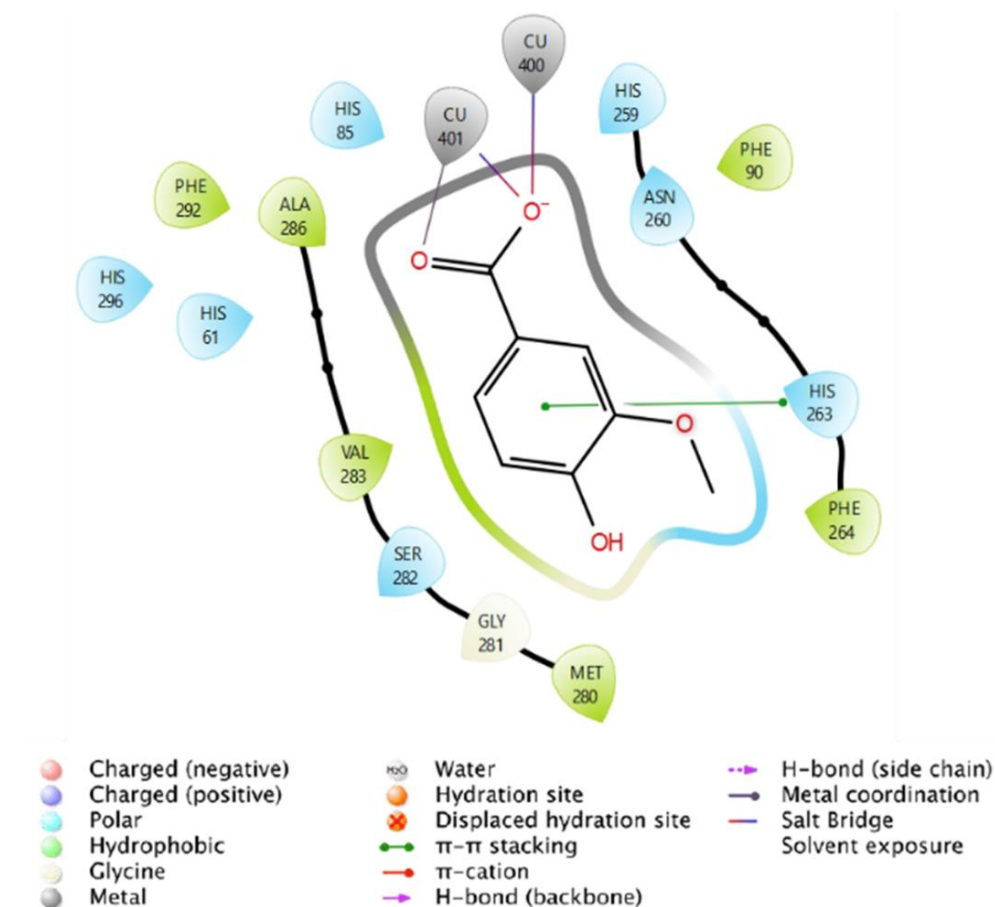
➤ Ένωση Salicylic acid



Εικόνα 13: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Salicylic acid* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Ο φαινολικός δακτύλιος της ένωσης *Salicylic acid* (Πίνακα 4, Εικόνα 13) αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 μέσω π-π δεσμού και σχηματίζει γέφυρα άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Επιπλέον, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του  $\text{Cu}^{2+}$  και του οξυγόνου της ομάδας του καρβονυλίου.

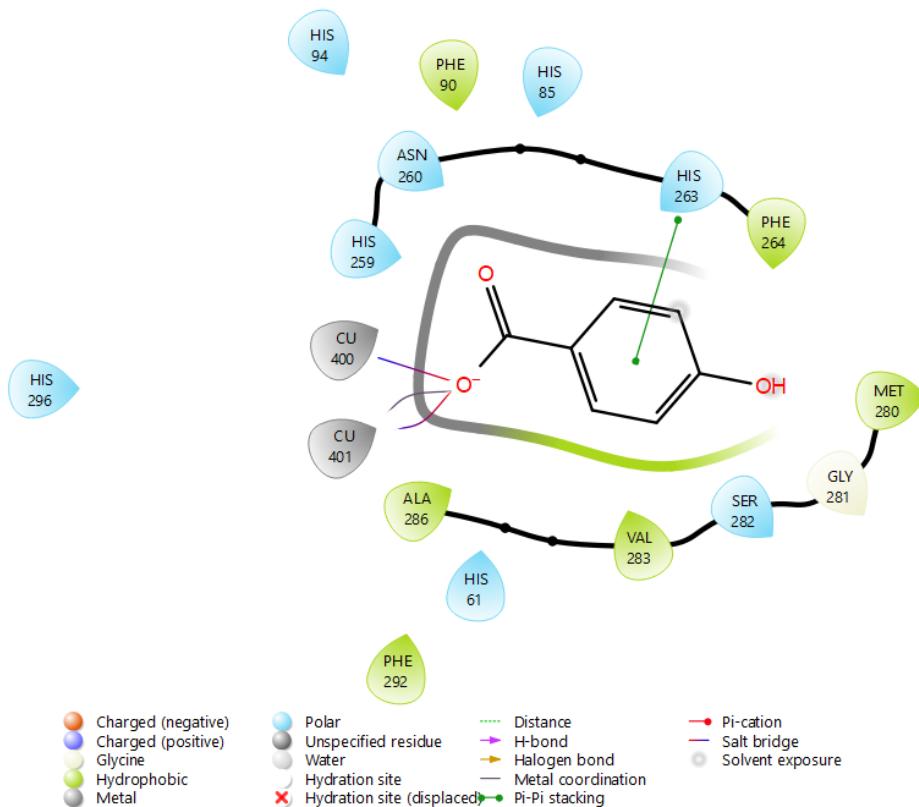
➤ Ένωση Vanillic acid



Εικόνα 14: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Vanillic acid* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Ο φαινολικός δακτύλιος της ένωσης *Vanillic acid* (Πίνακας 4, Εικόνα 14) αλληλεπιδρά επίσης και αυτός, με το αμινοξύ His263 μέσω π-π δεσμού και σχηματίζεται γέφυρα άλατος μεταξύ των ιόντων χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και των ομάδων οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας του μορίου. Επιπρόσθετα, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του  $\text{Cu}^{2+}$  και του οξυγόνου της ομάδας του καρβονυλίου.

➤ Ένωση *p* - Hydroxybenzoic acid

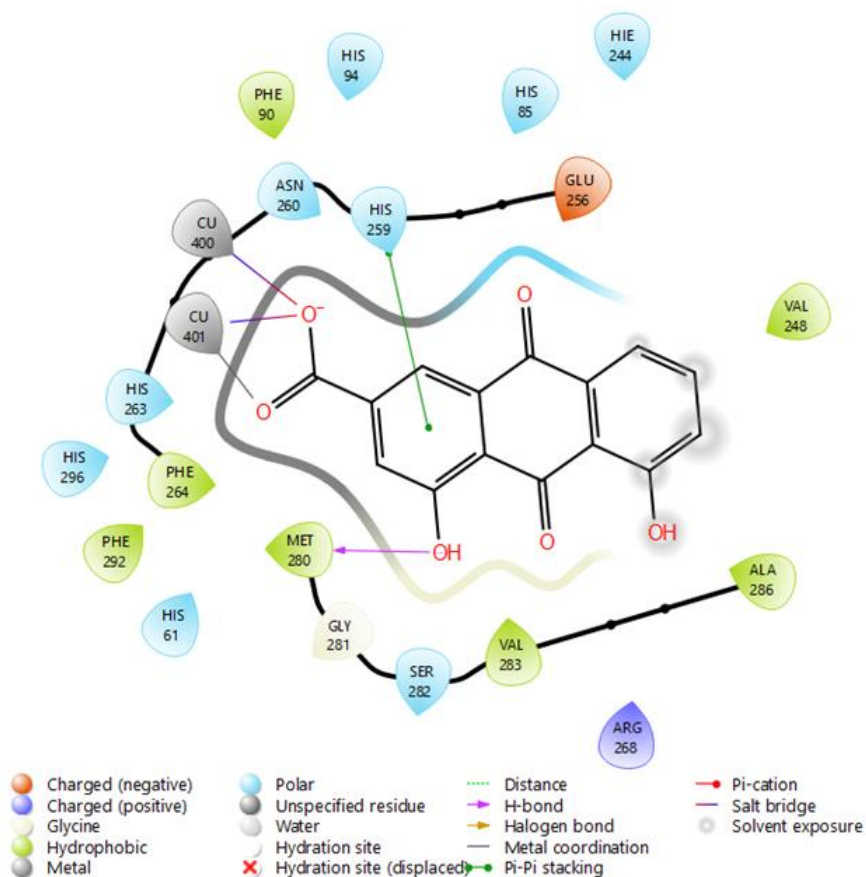


Εικόνα 15: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *p*-Hydroxybenzoic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Η ένωση *p*-Hydroxybenzoic acid (Πίνακας 4, Εικόνα 15) αλληλεπιδρά μέσω του φαινολικού του δακτυλίου με το αμινοξύ His263 με  $\pi$ - $\pi$  δεσμό και σχηματίζει γέφυρα άλατος μεταξύ των ιόντων χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και του ιόντος οξυγόνου  $\text{O}^-$  του μορίου. Επιπλέον, η πρόσδεση σταθεροποιείται μέσω σχηματισμού συμπλόκου με τον χαλκό ( $\text{Cu}^{2+}$ ).



➤ Ένωση Rhein

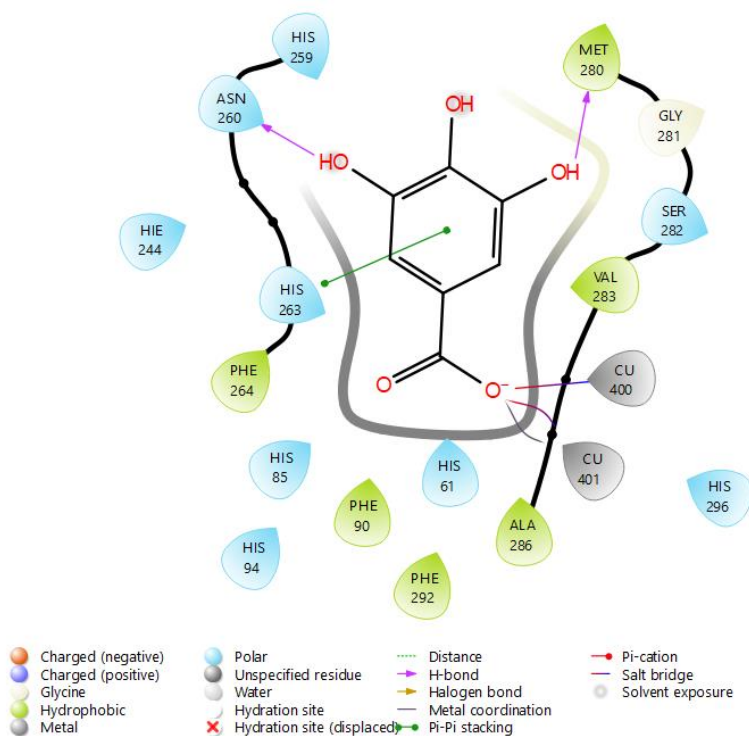


Εικόνα 16: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Rhein στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Η ένωση Rhein (Πίνακας 4, Εικόνα 16) αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His259 μέσω π-π δεσμού και σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Met280, ενώ παράλληλα δημιουργεί και γέφυρα άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Τέλος, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του  $\text{Cu}^{2+}$  και του οξυγόνου της ομάδας του καρβονυλίου.



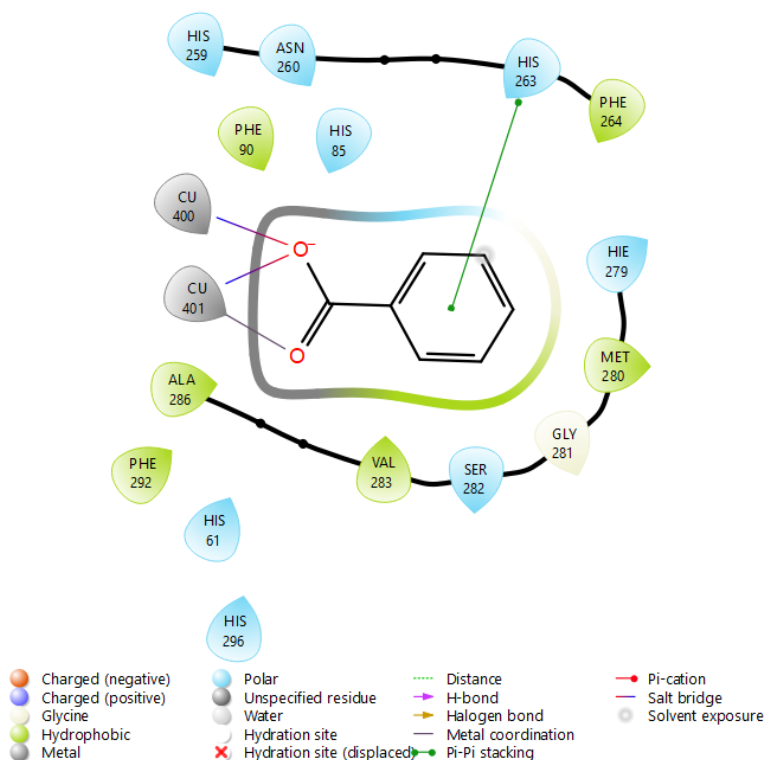
➤ Ένωση Gallic acid



Εικόνα 17: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Gallic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Ο φαινολικός δακτύλιος της ένωσης Gallic acid (Πίνακας 4, Εικόνα 17) αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 μέσω δεσμών π-π. Επιπλέον, δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται μεταξύ των υδροξυλομάδων (-OH) του φαινολικού δακτυλίου και των αμινοξέων Met280 καθώς και Asn260. Τέλος, δημιουργείται γέφυρα άλατος και σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

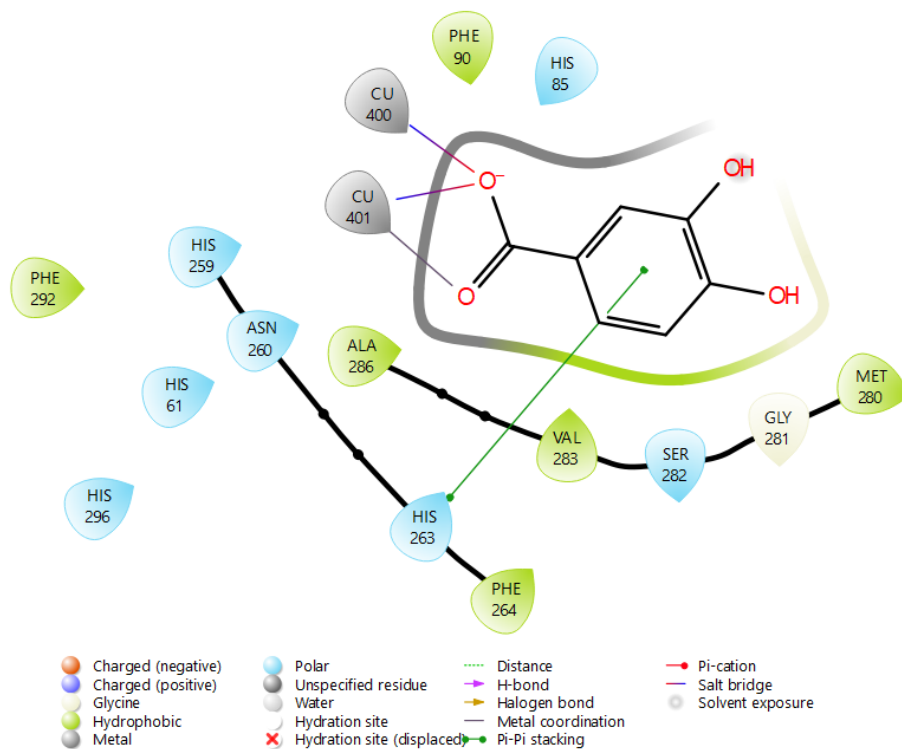
➤ Ένωση Benzoic acid



Εικόνα 18: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Benzoic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Στην ένωση Benzoic acid (Πίνακας 4, Εικόνα 18) αλληλεπιδρά μόνο ο φαινολικός του δακτύλιος με το αμινοξύ His263 μέσω π-π δεσμού και δημιουργείται γέφυρα άλατος και σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

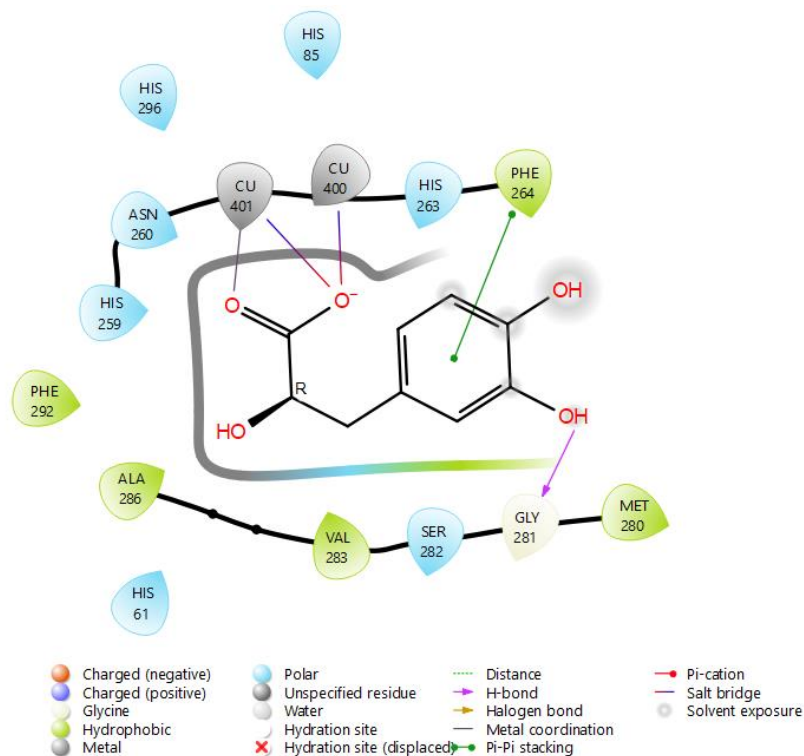
➤ Ένωση Protocatechuic acid



Εικόνα 19: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Protocatechuic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-SP.

Η ένωση Protocatechuic acid (Πίνακας 4, Εικόνα 19) δημιουργεί με το φαινολικό δακτύλιο και το αμινοξύ His263 π-π αλληλεπίδραση. Επιπρόσθετα, το ανιόν O<sup>-</sup> αλληλεπιδρά με τα ιόντα χαλκού (Cu<sup>2+</sup>) μέσω δημιουργίας γέφυρας άλατος και συντονισμού με το μέταλλο.

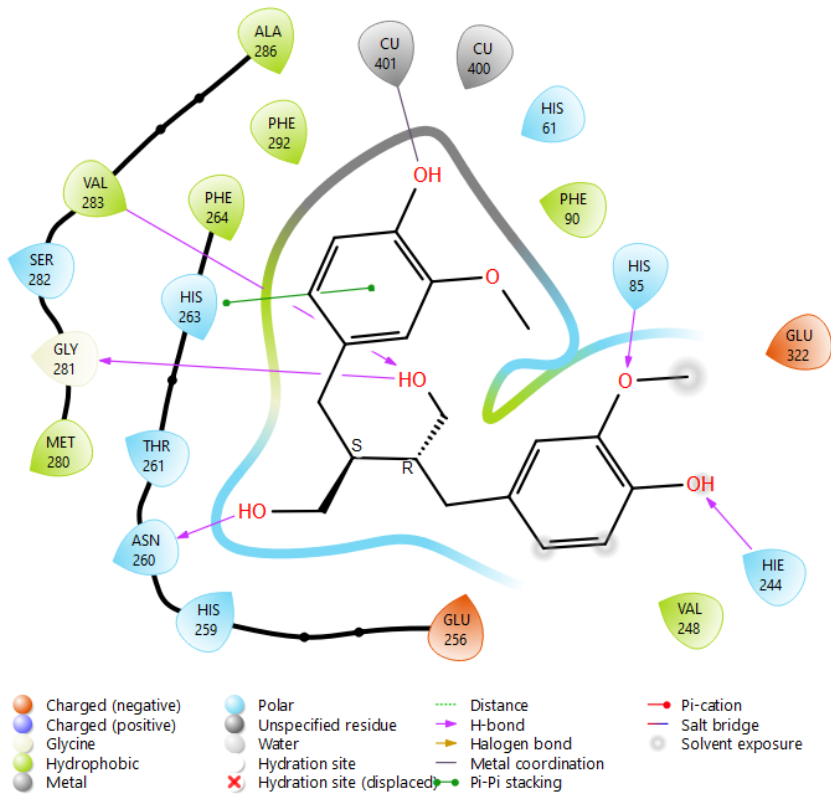
➤ Ένωση 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl)lactic acid sodium salt R



Εικόνα 20: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl)lactic acid sodium salt R στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Η ένωση 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt R (Πίνακας 5, Εικόνα 20) αλληλεπιδρά μέσω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Gly281 και ο φαινολικός της δακτύλιος αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Phe264 μέσω π-π αλληλεπίδρασης. Ακόμα σχηματίζεται γέφυρα άλατος μεταξύ των δύο ιόντων χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και του ανιόντος  $\text{O}^-$  καθώς επίσης δημιουργείται δεσμός μεταξύ του μετάλλου και του οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας, διατηρεί δηλαδή τους ίδιους δεσμούς που παρουσίαζε και κατά την εφαρμογή του Glide-SP.

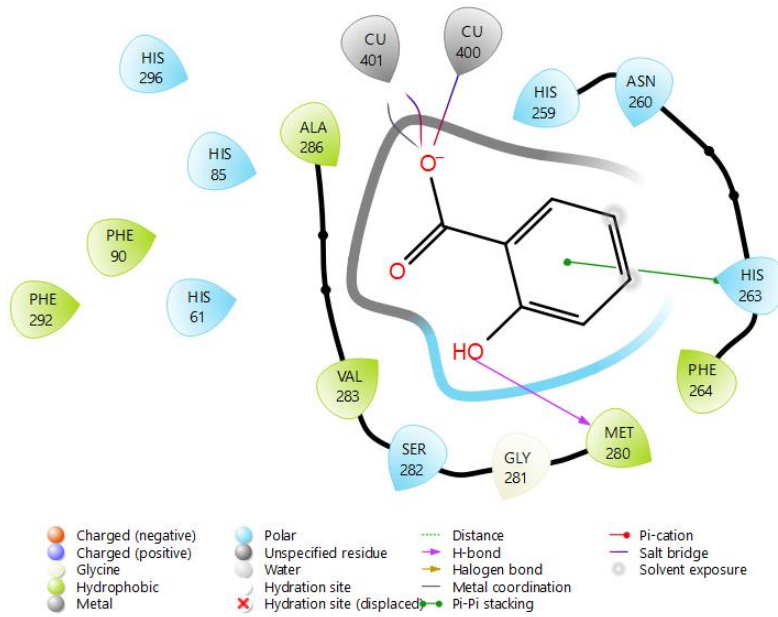
➤ Ένωση (+)-Secoisolariciresinol C



Εικόνα 21: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol C στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Η ένωση (+)-Secoisolariciresinol C (Πίνακας 5, Εικόνα 21) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly281, Val283, Asn260, His85, His244 και αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 δημιουργώντας π-π δεσμό. Ακόμα σχηματίζει σύμπλοκο με το ένα από τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

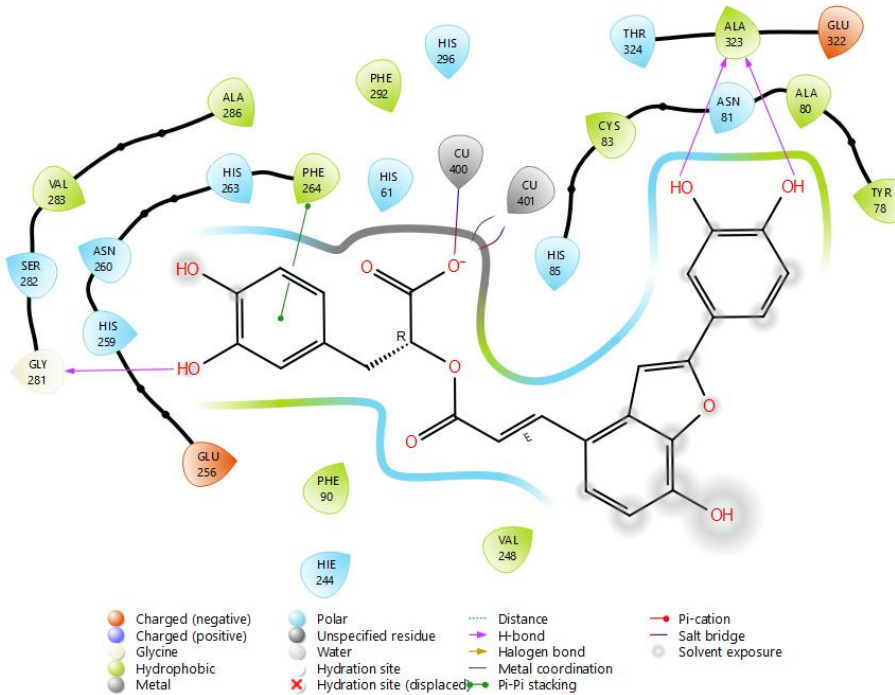
➤ Ένωση Salicylic acid



Εικόνα 22: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Salicylic acid* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Η ένωση *Salicylic acid* (Πίνακας 5, Εικόνα 22) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Met280 και ο φαινολικός της δακτύλιος αλληλεπιδρά με το αμινοξύ His263 δημιουργώντας π-π δεσμό, τέλος το ανιόν O<sup>-</sup> στο άκρο της σχηματίζει γέφυρα άλατος με τα ιόντα χαλκού (Cu<sup>2+</sup>).

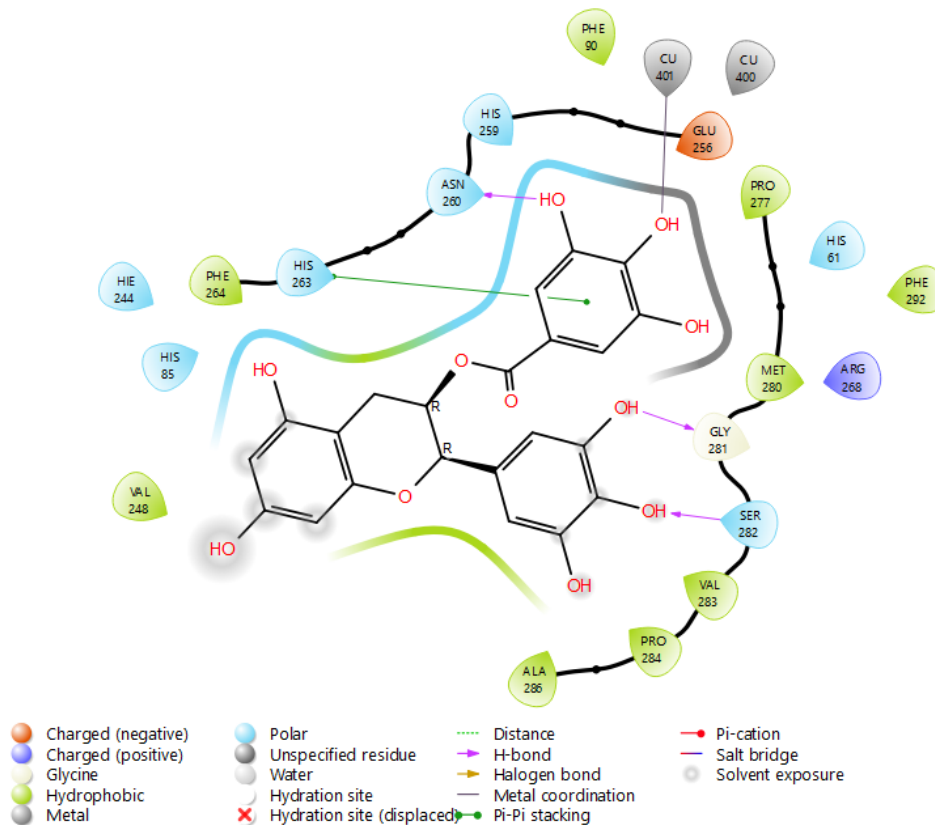
➤ Ένωση Salvianolic acid C



Εικόνα 23: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Salvianolic acid C* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Η ένωση Salvianolic acid C (Πίνακας 5, Εικόνα 23) σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ Ala323 και έναν με τη Gly281 και αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Phe264 μέσω σχηματισμού π-π αλληλεπιδράσης. Επιπλέον, σχηματίζει γέφυρα άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

➤ Ένωση (-)-Epigallocatechin 3-gallate

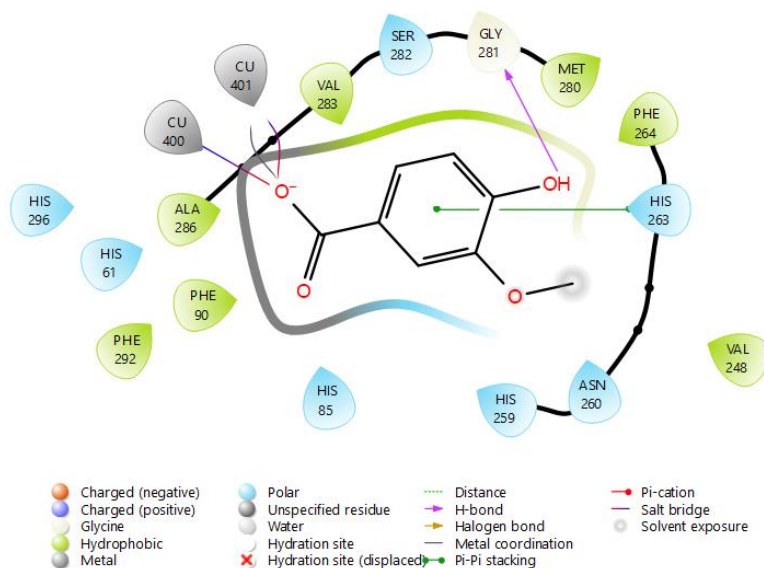


Εικόνα 24: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (-)-Epigallocatechin 3-gallate στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Η ένωση (-)-Epigallocatechin 3-gallate (Πίνακας 5, Εικόνα 24) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser282, Gly281 και Asn260 και ο φαινολικός της δακτύλιος αλληλεπιδρά μέσω δεσμών π-π με το αμινοξύ His263 και τέλος σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και της υδροξυλομάδας (-OH).



➤ Ένωση Vanillic acid



Εικόνα 25: Διδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Vanillic acid* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του Glide-XP.

Ο φαινολικός δακτύλιος της ένωσης *Vanillic acid* (Πίνακας 5, Εικόνα 25) αλληλεπιδρά μέσω π-π αλληλεπιδράσεων με το αμινοξύ His263 και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Gly281. Τέλος, σχηματίζει γέφυρα άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και του ανιόντος  $\text{O}^-$  της καρβοξυλικής ομάδας.

Μελετώντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης παρατηρήθηκε ότι δεδομένου ότι το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης που προέρχεται από μανιτάρι (Κωδικός PDB:2Y9X) είναι ανοιχτό, τα μόρια που διαθέτουν ευθύγραμμα τμήματα αλυσίδων βρίσκονται εκτεθειμένα και παρουσιάζουν μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης, λόγω του μήκους τους, σε σύγκριση με τα μόρια που φέρουν αρωματικό δακτύλιο και είναι σταθερότερα. Επίσης, διακρίνεται ότι οι ιστοιδίνες (His) συνήθως δημιουργούν π-π αλληλεπιδράσεις με τους αρωματικούς δακτυλίους ενώ συνδέονται και με τα ιόντα χαλκού του μορίου προσθέτοντας με αυτό το τρόπο μια μεγαλύτερη σταθερότητα στον εν δυνάμει προσδέτη. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι στα μόρια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να διαθέτουν ανασταλτικές ιδιότητες εμφανίζεται επαναλαμβανόμενα η δημιουργία συμπλόκου με τα ιόντα χαλκού που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο, συνήθως σε απόσταση μικρότερη των 2,6 Å. Η δημιουργία συμπλόκου με τον χαλκό σταθεροποιεί το μόριο στο ενεργό κέντρο, εφόσον απενεργοποιείται η δράση των μεταλλοκατιόντων. Συγκεκριμένα, τα φαινολικά οξέα δεσμεύονται από τα ιόντα χαλκού στην αποπρωτονιωμένη μορφή τους, καθώς η υδροξυλομάδα (-OH) των οξέων τοποθετείται σε χωρική εγγύτητα με το ενεργό κέντρο δημιουργώντας σύμπλοκο με τους χαλκούς ( $\text{Cu}^{2+}$ ).



### 3.4.5 Εφαρμογή του αλγορίθμου πρόσδεσης μέσω εφαρμογής Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced-Fit Docking)

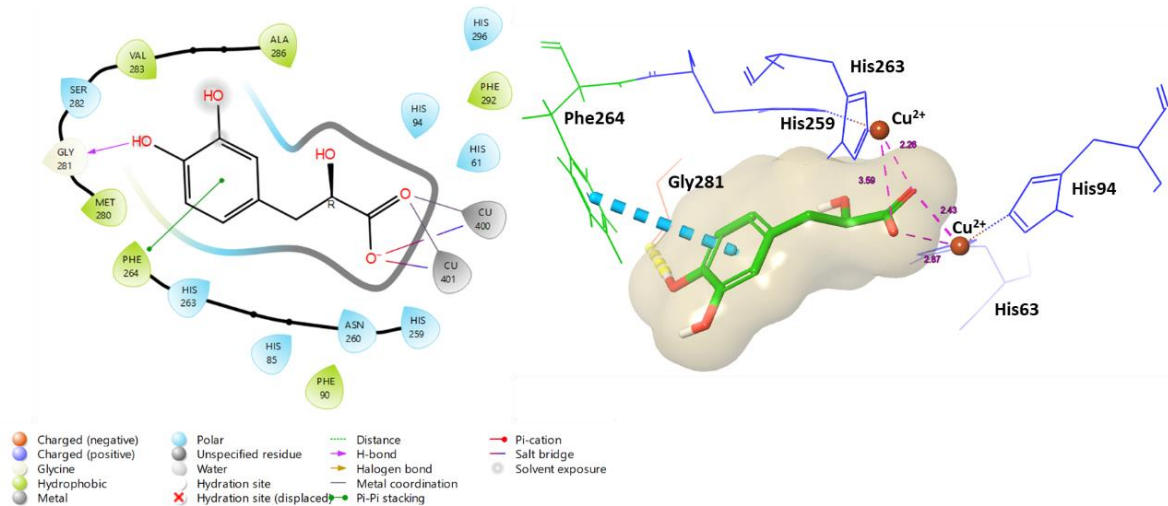
Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των Glide-SP και Glide-XP συγκρίθηκαν με σκοπό την εύρεση κοινών ενώσεων οι οποίες δοκιμάστηκαν περαιτέρω με την τεχνική IFD. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τέσσερις κοινές ενώσεις των δύο τεχνικών και ορισμένες χρήσιμες πληροφορίες, όπως το docking score, το glide score και η απόσταση της εκάστοτε ένωσης από τον χαλκό ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

Πίνακας 6: Κοινές ενώσεις που προέκυψαν έπειτα από την εφαρμογή των Glide-SP και Glide-XP.

Όνομα	SP			XP		
	Απόσταση $\text{Cu}^{2+}$	Docking score	glide gscore	Απόσταση $\text{Cu}^{2+}$	Docking score	glide gscore
3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt R	2,13	-7,945	-7,945	2,13	-8,033	-8,033
(+)-Secoisolariciresinol B	2,34	-4,632	-4,632	2,45	-6,386	-6,386
Salicylic acid	2,20	-7,593	-7,593	2,26	-6,027	-6,027
Vanillic acid	2,60	-6,125	-6,129	2,19	-6,470	-6,474

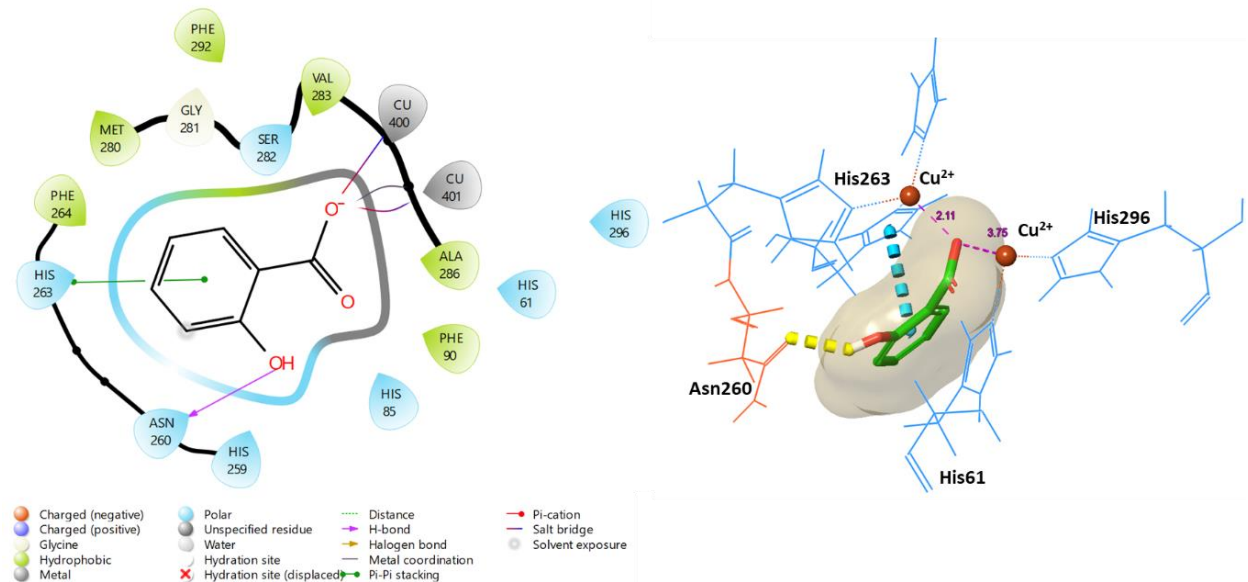
Οι τέσσερις προτεινόμενες ενώσεις υποβλήθηκαν σε πειράματα μοριακής πρόσδεσης με την τεχνική του IFD, η οποία εισάγει διαμορφωτική ευκαμψία στις πλευρικές αλυσίδες ή/και στον ενζυμικό σκελετό, παρουσιάζοντας έτσι, πιο αξιόπιστα αποτελέσματα με μεγαλύτερη ακρίβεια από τις άλλες δύο τεχνικές. Ο τρόπος πρόσδεσης των εξεταζόμενων ενώσεων παρουσιάζεται στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 26-29). Η αξιολόγηση και η τελική επιλογή των υποψήφιων ενώσεων, οι οποίες εν δυνάμει παρουσιάζουν σημαντική αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης σε πειράματα *in vitro* θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα (α) με τον τρόπο πρόσδεσης της ένωσης στο ενεργό κέντρο, (β) με τις δημιουργούμενες αλληλεπιδράσεις, (γ) με τη δημιουργία συμπλόκου με τον χαλκό και (δ) με το docking score.

Στην Εικόνα 26 απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) με docking score = -8,110, η οποία σχηματίζει γέφυρες άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) καθώς επίσης και σύμπλοκο με τον χαλκό ( $\text{Cu}^{2+}$ ), παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη δράση του μετάλλου. Επίσης, δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Gly281 και αλληλεπιδρά με π-π δεσμό με το αμινοξύ Phe264, ενισχύοντας περαιτέρω τη σταθερότητα του συμπλόκου ενζύμου-προσδέτη.



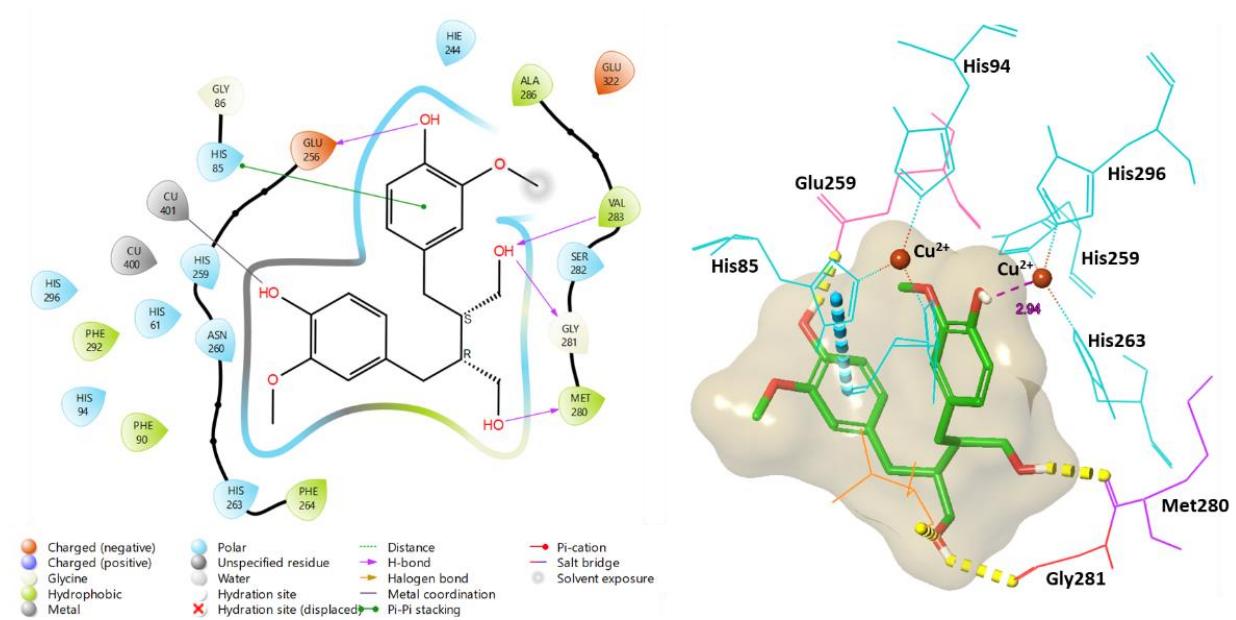
Εικόνα 26: (Αριστερά) Διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.

Στην Εικόνα 27 παρατηρούμε ότι το Salicylic acid, με docking score = -8,265, σχηματίζει γέφυρες άλατος με τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ) καθώς επίσης σχηματίζει σύμπλοκο με τον χαλκό ( $\text{Cu}^{2+}$ ), σταθεροποιώντας την ένωση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επιπλέον, δημιουργείται δεσμός υδρογόνου με το αμινοξύ Asn260 ενώ αλληλεπιδρά με π-π δεσμό και με το αμινοξύ His263.



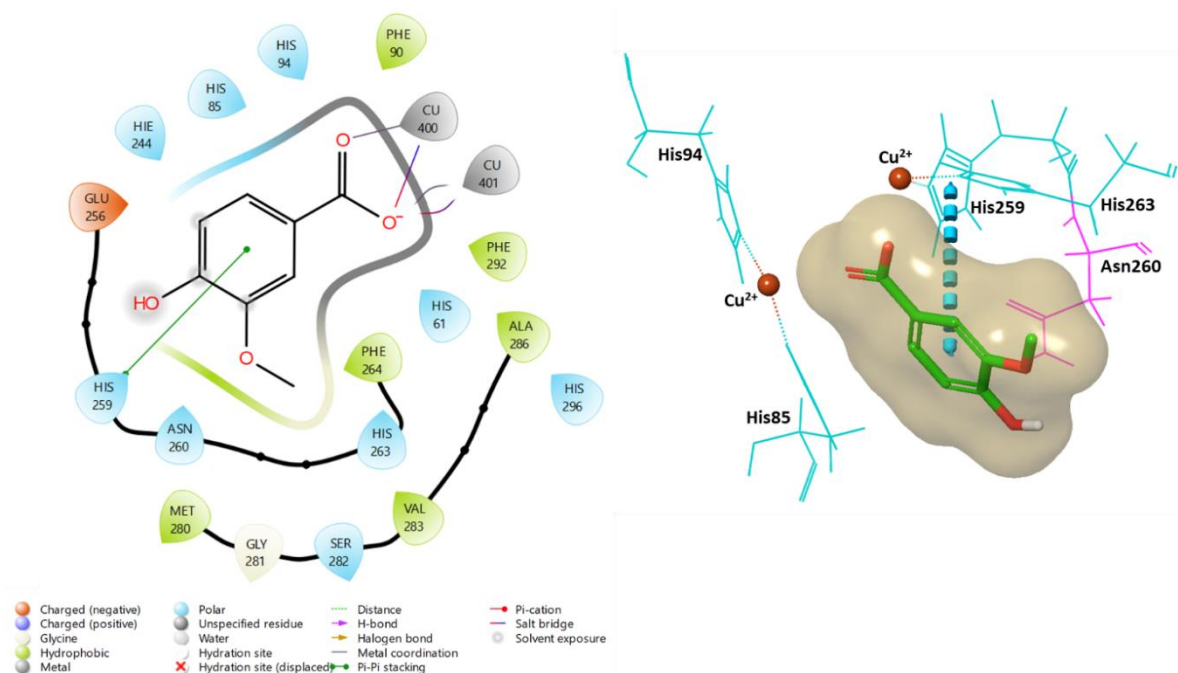
Εικόνα 27: (Αριστερά) Διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης Salicylic acid στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.

Στην Εικόνα 28 απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol B, με docking score = -5,928. Η πρόσδεση σταθεροποιείται μέσω σχηματισμού συμπλόκου με τον χαλκό, μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu256, Val283, Met280 και Gly281 και επιπλέον αλληλεπιδρά με π-π δεσμό με το αμινοξύ His85.



Εικόνα 28: (Αριστερά) Διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης (+)-Secoisolariciresinol B, στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.

Ο τρόπος πρόσδεσης του Vanillic acid παρουσιάζεται στην Εικόνα 29. Παρατηρούμε ότι το Vanillic acid, με docking score= -7,810, αλληλεπιδρά με το ένζυμο μέσω σχηματισμού γέφυρας άλατος και συμπλόκου με τα ιόντα χαλκού (Cu<sup>2+</sup>) και επιπλέον μέσω π-π αλληλεπίδρασης με το αμινοξύ His259.



Εικόνα 29: (Αριστερά) Διδιάστατη και (Δεξιά) τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης *Vanillic acid* στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) μετά την εφαρμογή του IFD. Οι κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι μπλε π-π δεσμούς. Οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις από τους χαλκούς.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω είναι πολύ ενθαρρυντικά για την πιθανότητα εύρεσης ενός υποψήφιου αναστολέα για το ένζυμο τυροσινάση, καθότι οι φαινολικοί δακτύλιοι αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα και κυρίως με τις ιστιδίνες μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, οι καρβοξυλομάδες των ενώσεων δημιουργούν σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού (Cu<sup>2+</sup>), ενώ οι πολικές ομάδες των μορίων (-OH) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Γενικά, οι υδρόφοβες αυτές αλληλεπιδράσεις περικλείουν συνήθως το μόριο, «δυσκολεύοντάς το» να απομακρυνθεί από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενισχύοντας τη σταθερότητα.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι *in silico* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μόρια της βιβλιοθήκης Zinc (<https://zinc.docking.org/>), συνέβαλαν στη διεξαγωγή συμπερασμάτων για την πιθανότητα των ενώσεων να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης του μανιταριού *Agaricus bisporus* (Κωδικός PDB: 2Y9X) με βάση τα χαρακτηριστικά της δομής του.

Αξιολογώντας και παρατηρώντας τα αποτελέσματα έπειτα από την εφαρμογή των Glide-SP, -XP και -IFD προκύπτει το συμπέρασμα ότι η παρουσία του φαινολικού δακτυλίου στην κατάλληλη θέση είναι πολύ σημαντική, καθώς συμμετέχει σε π-π αλληλεπιδράσεις συνήθως με το αμινοξύ His. Οι π-π αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν το μόριο στη θέση πρόσδεσης και ενισχύουν με αυτό τον τρόπο την αναστολή της τυροσινάσης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι πολικές ομάδες των μορίων, όπως οι υδρόξυ-ομάδες, είναι αυτές που συμμετέχουν στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με αμινοξέα και θεωρούνται σημαντικά, καθώς συμβάλλουν και αυτές στη σταθεροποίηση του μορίου βελτιώνοντας την ικανότητα πρόσδεσης. Ακόμα παρατηρείται, ότι η ύπαρξη των καρβοξυλομάδων συντονίζει δυνητικά το μόριο προς τα ιόντα χαλκού του ενεργού κέντρου με την αποπρωτονιωμένη τους μορφή, δημιουργώντας σύμπλοκο, όταν το μόριο πλησιάζει σε απόσταση μικρότερη από 2,6 Å από τα ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}^{2+}$ ), απενεργοποιώντας έτσι τη δράση των μεταλλοκατιόντων και καθιστώντας πολύ ισχυρή την πρόσδεση. Συμπερασματικά, η ύπαρξη δότη ή δέκτη ηλεκτρονίων στο εν δυνάμει μόριο-προσδέτη είναι απαραίτητη για να δημιουργηθούν οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενζύμου. Επιπλέον, η κατηγορία των οργανικών οξέων και εστέρων έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Επομένως, από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του IFD προτείνονται για περαιτέρω ανάλυση οι ενώσεις 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R), Salicylic acid, (+)-Secoisolariciresinol B και Vanillic acid. Από αυτές, οι ενώσεις 3-(3',4'-Dihydroxyphenyl) lactic acid sodium salt (R) και Secoisolariciresinol B παρουσιάζουν την υψηλότερη πιθανότητα να αναστέλουν τη δράση του ενζύμου της τυροσινάσης. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι βάση βιβλιογραφικής έρευνας η ένωση Salicylic acid έχει δοκιμαστεί για την ανασταλτική της ικανότητας και προτείνεται ως ένας ισχυρός αναστολέας της τυροσινάσης μανιταριού. (Ji Ping Zhang et al., 2006)

Απώτερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αγορά των προτεινόμενων ενώσεων και η *in vitro* ενζυμική δοκιμή της ανασταλτικής τους ικανότητας.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akansha Saxena, Diana Wong, Karthikeyan Diraviyam, David Sept (2009). Chapter 12- The Basic Concepts of Molecular Modeling. *Methods in Enzymology*, 28, 467. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)67012-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)67012-9)
- Alexander Amberg. In Silico Methods. In: Vogel, H.G., Maas, J., Hock, F.J., Mayer, D. (eds) Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013 pp. 1273-1296. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2\\_55](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2_55)
- Christopher A. Ramsden, Patrick A. Riley. Volume 22, Issue 8. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014; pp.2388-2395. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.02.048>
- Chang T-S (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), pp. 2440-2475. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Federica Tinello, Anna Lante. Volume 50. Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018; pp. 73-83. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.008>
- G. Madhavi Sastry, Matvey Adzhigirey, Tyler Day, Ramakrishna Annabhimoju & Woody Sherman. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27, 221-234. doi: <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Hamdan N, Lee CH, Wong SL, Fauzi CENCA, Zamri NMA, Lee TH (2022). Prevention of Enzymatic Browning by Natural Extracts and Genome-Editing: A Review on Recent Progress. *Molecules*, 27(3), 1101. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27031101>
- Hassan M, Shahzadi S, Kloczkowski A (2023). Tyrosinase Inhibitors Naturally Present in Plants and Synthetic Modifications of These Natural Products as Anti-Melanogenic Agents: A Review. *Molecules*, 28(1), 378. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28010378>
- Ji-Ping Zhang, Qing-Xi Chen, Kang-Kang Song, Jin-Jin Xie. Volume 95, Issue 4. *Food Chemistry*, 2006; pp.579-584. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.042>
- Kaushik Raha, Kenneth M. Merz Jr. Volume 1. Chapter 9 Calculating Binding Free Energy in Protein–Ligand Interaction. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 2005; pp. 113-130. doi: [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(05\)01009-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(05)01009-1)

- M. Victoria Martinez, John R. Whitaker Volume 6, Issue 6. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 1995; , pp.195-200. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8)
- Matoba Yasuyuki ,Takanori Kumagai, Aiko Yamamoto, Hironari Yoshitsu, Masanori Sugiyama (2006). Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *Protein structure and folding*, 281,13, pp. 8981-8990. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M509785200>
- Moon, K.M., Kwon, E.-B., Lee, B., Kim, C.Y (2020). Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. *Molecules*, 25,2754. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25122754>
- Mohammad N. Masum, Kosei Yamauchi & Tohru Mitsunaga. Volume 7. Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin-lightening Agents. 2019; pp. 41-58. doi: <https://doi.org/10.7831/ras.7.41>
- Nobutaka Fujieda, Shintaro Yabuta, Takuya Ikeda, Norifumi Muraki, Genji Kurisu, Shinobu Itoh. Volume 288, Issue 30. Crystal Structures of Copper-depleted and Copper-bound Fungal Pro-tyrosinase. *Protein structure and folding*, 2013; pp.22128-22140. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477612>
- Richard A. Friesner, Jay L. Banks, Robert B. Murphy, Thomas A. Halgren, Jasna J. Klicic, Daniel T. Mainz, Matthew P. Repasky, Eric H. Knoll, Mee Shelley, Jason K. Perry, David E. Shaw, Perry Francis, and Peter S. Shenkin. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.*, 47(7), 1739-1749. doi: <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Rami J. Obaida, Ehsan Ullah Mughal, Nafeesa Naeemb, Amina Sadiqc, Reem I. Alsantalid, Rabab S. Jassase, Ziad Moussa & Saleh A. Ahmed. (2021). Natural and synthetic flavonoid derivatives as new potential tyrosinase inhibitors: a systematic review. (Review Article). doi: [10.1039/D1RA03196A](https://doi.org/10.1039/D1RA03196A)
- Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, A., Kaur, A., Singh, N. (2018). Enzymatic Browning of Fruit and Vegetables: A Review. In: Kuddus, M. (eds) *Enzymes in Food Technology*. Springer, Singapore. pp. 63-78. doi: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_4)
- Shoichet, B (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 432, 862–865. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03197>
- Samaneh Zolghadri, Asieh Bahrami, Mahmud Tareq Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas & Ali Akbar Saboury. Volume 34, Issue 1. A

- comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019; pp. 279-309. doi: <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>
- Sang Yeul Lee, Namhuk Baek & Tae-gyu Nam. Volume 31, Issue 1. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016; pp.1-13 doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058>
- Shelley, J.C.; Cholleti, A.; Frye, L; Greenwood, J.R.; Timlin, M.R.; Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 21, pp. 681-691.
- Vincent Zoete, Aurélien Grosdidier, Olivier Michielin. Volume 13, Issue 2. Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2009; pp. 238-248. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00665.x>
- Wangsa T. Ismaya, Henriëtte J. Rozeboom, Amrah Weijn, Jurriaan J. Mes, Fabrizia Fusetti, Harry J. Wichers & Bauke W. Dijkstra. (2011). Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry*, 50(24), 5477-5486. doi: <https://doi.org/10.1021/bi200395t>
- Yunwei Qu, Qing Zhan, Shubo Du, Yang Ding, Bin Fang, Wei Du, Qiong Wu, Haidong Yu, Lin Li, Wei Huang. Volume 10, Issue 5. Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020; pp. 414-425. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.07.004>
- Δεληγιάννη Ευαγγελία. (2021). Μείωση της υπέρχρωσης του δέρματος με τη βοήθεια ενζύμων. 107, pp. 43-74.
- Καλεμκερή Όλγα. (2014). Μοριακή πρόσδεση ενώσεων με δράση στο ένζυμο της τροσινάσης με χρήση *in silico* τεχνικών υπολογιστικής χημείας. 107, pp.15-21.
- Σφλώμος Κωνσταντίνος. (2019). Εργαστηριακές Ασκήσεις Χημείας Τροφίμων. Εκδόσεις Τσότρας. 179, pp.134-140.