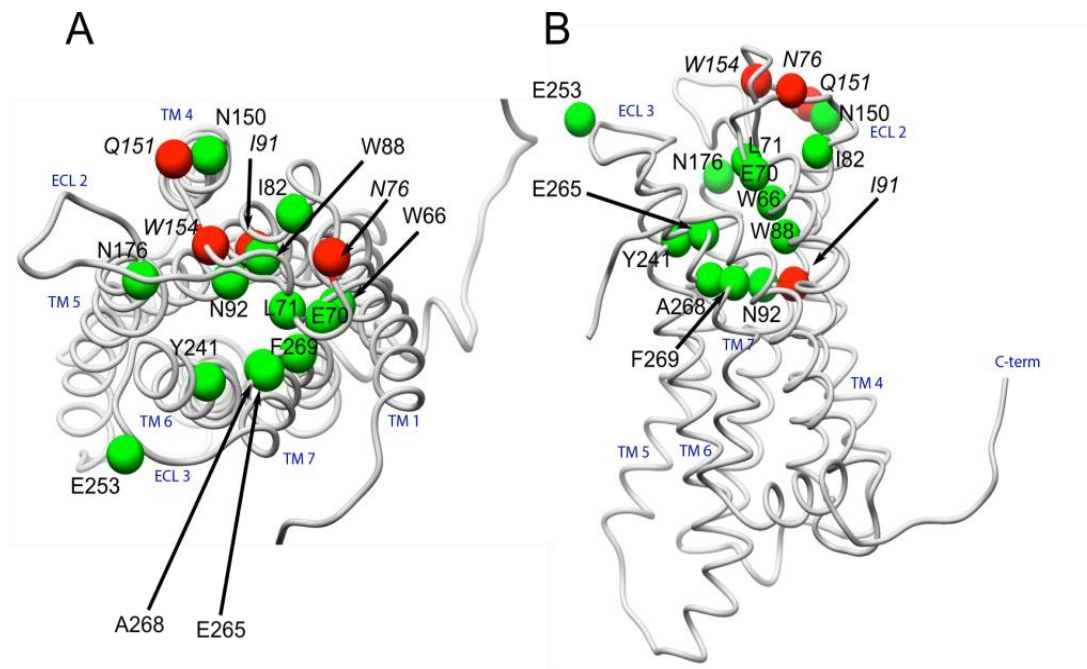


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εφαρμογή *in silico* τεχνικών για τον προσδιορισμό νέων ενώσεων ενεργοποιητών της πικρής γεύσης»



Όνοματεπώνυμο: ΜΑΓΓΕΝΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ (ΑΜ: 20684054)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευτυχία Κρίτση



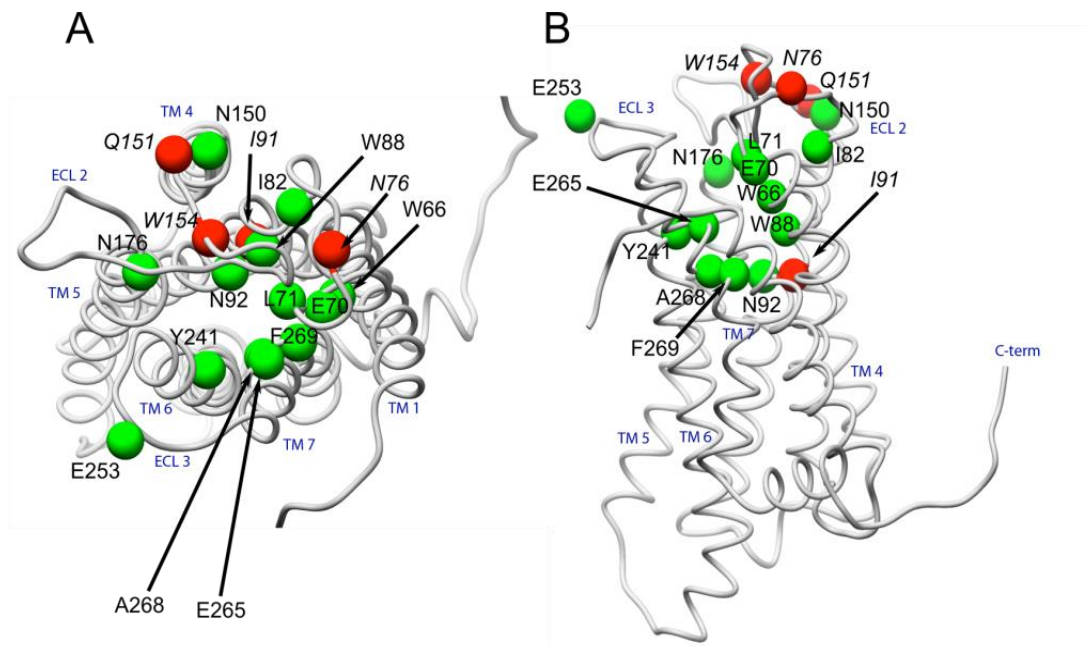
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF FOOD SCIENCES

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECNOLOGY

DIPLOMA THESIS

«*In silico* techniques for the identification of novel bitter taste receptor activators»



Name of Student: ARTEMIS MANGENAKI (RN: 20684054)

Supervisor: Eftichia Kritsi

AIGALEO, JULY 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Εφαρμογή *in silico* τεχνικών για τον προσδιορισμό νέων ενώσεων ενεργοποιητών της πικρής γεύσης»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και της Επιβλέπουσας

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ - ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΚΡΙΤΣΗ ΕΥΤΥΧΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ	
2	ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ /ΜΕΛΟΣ	
3	ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΜΕΛΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

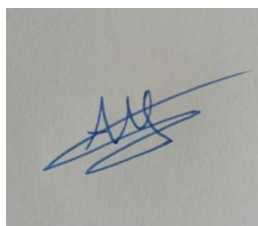
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μαγγελνάκη Άρτεμις του Μιχαήλ, με αριθμό μητρώου 20684054, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«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 εμένα 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

Μαγγελνάκη Άρτεμις



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ευτυχία Κρίτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής εργασίας αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής την κα. Σινάνογλου Βασιλεία, Καθηγήτρια ΠΑΔΑ και την κα. Τσιάκα Θάλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ, για τις παρατηρήσεις τους και τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διατροφικές επιλογές και οι διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη γεύση των τροφίμων. Από τις βασικές γεύσεις, η πικρή γεύση θεωρείται ως η πιο περίπλοκη και συνεπώς πολλοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη και μεταγωγή της πικρής γεύσης. Είναι γνωστό ότι πλήθος δομικά διαφορετικών γευστικών μορίων προκαλούν την αίσθηση του πικρού. Η πικρή γεύση ενεργοποιείται από μια οικογένεια υποδοχέων, η οποία ονομάζεται TAS2R. Στην παρούσα εργασία δόθηκε έμφαση στον υποδοχέα πικρής γεύσης TAS2R46. Η ικανότητα των υποδοχέων πικρής γεύσης να ανιχνεύουν ενώσεις, που δρουν ως αγωνιστές της, παρουσιάζει εξελικτικό χαρακτήρα.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η εύρεση νέων πικρών ενώσεων που θα μπορούσαν δυνητικά να ενισχύσουν την αίσθηση της πικρής γεύσης παρουσιάζει μέγιστο ενδιαφέρον. Επιπλέον, σημαντικός κρίνεται ο πιθανός εμπλουτισμός τους σε άγευστα τρόφιμα, έτσι ώστε να αποκτήσουν μια γεύση αρεστή από τους καταναλωτές. Τέλος, η ανακάλυψη νέων πικρών ενώσεων μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση φυσικών πηγών που μπορούν να αντικαταστήσουν τεχνητά πρόσθετα.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανακάλυψη νέων φυσικών ενώσεων που περιέχονται στα τρόφιμα και εν δυνάμει έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν την πικρή γεύση. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης βιβλιοθηκών μορίων. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε μια σειρά φυσικών ενώσεων, στοχεύοντας στην εύρεση νέων ενώσεων αγωνιστών της πικρής γεύσης. Η αποτίμηση των αποτελεσμάτων και η τελική επιλογή των ενώσεων βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια:

- Τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ενώσεων και των κρίσιμων αμινοξέων για την πρόσδεση
- Την ικανότητα πρόσδεσης των φυσικών ενώσεων που εξετάστηκαν, που αξιολογήθηκε μέσω του Glide-score.

Συμπερασματικά, μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της Μοριακής Πρόσδεσης εντοπίστηκαν 10 ενώσεις, οι οποίες δύναται να αγοραστούν μελλοντικά και να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της βιολογικής τους δραστηρότητας ως αγωνιστές του εξεταζόμενου υποδοχέα TAS2R46.

Λέξεις - Κλειδιά: πικρή γεύση, μηχανισμοί γεύσης, υποδοχέας πικρής γεύσης TAS2R46, αγωνιστές πικρής γεύσης, φυσικές ενώσεις, μοριακή πρόσδεση

ABSTRACT

Food choices and eating habits of consumers are highly influenced by the taste of food. Of the basic tastes, bitter is considered to be the most complex, and therefore many mechanisms are responsible for the perception and transduction of bitter taste. The fact that a number of structurally different taste molecules cause the sensation of bitterness inevitably led to the creation of a whole family of bitter taste receptor genes, which is called (TAS2R). In the present work, emphasis was placed on bitter taste receptor TAS2R46. The ability of bitter taste receptors to detect compounds, which act as its agonists, shows an evolutionary character.

In this direction, finding new bitter compounds that could potentially enhance the sensation of bitter taste is of great interest. In addition, their possible enrichment in tasteless foods is considered important, so that they acquire a taste liked by consumers. Finally, the discovery of new bitter compounds can help identify natural sources that can replace artificial additives.

The purpose of this thesis is to discover new natural compounds that are contained in food and potentially have the ability to activate the bitter taste. In order to achieve this, computational tools were used to virtually scan libraries of molecules. Specifically, molecular binding experiments were implemented to a series of natural components, aiming to find compounds that are potential agonists of the bitter taste. The assessment of the results as well as the ultimate choice of the compounds was grounded on the additional requirements:

- The creation of interactions between the examined compounds and amino acids critical for the binding.
- The binding capacity of the examined natural compounds evaluated through the Glide-score.

In conclusion, after the analysis of the Molecular Docking results, 10 compounds emerged, which can be transferred to the prospective buyer at a later time and conducted *in vitro* biological evaluation as agonists of the examined receptor TAS2R46.

Keywords: bitter taste, taste mechanisms, bitter taste receptor TAS2R46, bitter taste agonists, natural compounds, molecular docking

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	14
1.1 Επισκόπηση της γευστικής αντίληψης από τον άνθρωπο	14
1.2. Αντίληψη της γεύσης.....	14
1.3. Ανατομία και Φυσιολογία της γεύσης.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η ΠΙΚΡΗ ΓΕΥΣΗ.....	18
2.1. Ορισμός της πικρής γεύσης	18
2.2. Οι υποδοχείς της πικρής γεύσης	19
2.2.1. <i>TAS2R46</i> υποδοχέας.....	20
2.3. Παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανακάλυψη αγωνιστών της πικρής γεύσης.....	21
2.4. Ενώσεις με χαρακτηρισμένη πικρή γεύση και βάσεις δεδομένων/ενώσεων	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: <i>IN SILICO</i> ΤΕΧΝΙΚΕΣ	27
3.1. Εισαγωγή	27
3.2. Βιβλιοθήκες Φυσικών ενώσεων	29
3.2.1 Προετοιμασία βιβλιοθηκών	30
3.3. Η τεχνική της Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking).....	31
3.4.1. Εισαγωγή.....	31
3.4.2. Διάγραμμα ροής Μοριακής πρόσδεσης.....	32
3.4.3. Προετοιμασία Πρωτεΐνης	33
3.4.4. Προετοιμασία Προσδετών	34
3.4.5. Εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης και Αποτελέσματα	34

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	36
4.1. Επιλογή βιβλιοθηκών φυσικών ενώσεων	36
4.2. Προετοιμασία βιβλιοθηκών φυσικών ενώσεων	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ.....	37
5.1. Προετοιμασία υποδοχέα για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης	37
5.2. Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.....	38
5.2.1 Επικύρωση μεθόδων Μοριακής Πρόσδεσης	38
5.2.2 Αποτελέσματα εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης	39
5.2.3 Αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης μέσω της πλατφόρμας Virtuous taste	54
5.3 Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58
Ξένη βιβλιογραφία	58
Ελληνική Βιβλιογραφία	60
Ιστοσελίδες.....	61

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Αναγνωρισμένες πικρές ενώσεις	18
Πίνακας 2: Αναγνωρισμένα μόρια που πιθανώς αλληλεπιδρούν με τον ανθρώπινο υποδοχέα TAS2R46 σύμφωνα με το εργαλείο VirtualTaste	25
Πίνακας 3: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αγωνιστή στρυχνίνη και του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46.....	38
Πίνακας 4: Οι χημικές δομές των επιλεγμένων ενώσεων μέσω της χρήσης του αλγόριθμου Glide-SP. Δίνονται οι κωδικοί Indofine/NuBBE/Specs, το Glide-score, η ονομασία τους και η διδιάστατη δομή τους.....	40
Πίνακας 5: Χαρακτηρισμένα φλαβονοειδή με πικρή γεύση: (αριστερά) η ονομασία των φλαβονοειδών, (δεξιά) η 2D διαμόρφωσή τους.....	53
Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης των προκρινόμενων ενώσεων έπειτα από την εφαρμογή του εργαλείου Virtuous taste της εταιρείας Multitaste. Δίνονται οι κωδικοί Indofine/NuBBE/Specs, η ονομασία τους και η πιθανότητά τους(%) να είναι πικρές, γλυκές, άλλη γεύση ή ουμάμι.....	55

Κατάλογος Εικόνων

<i>Εικόνα 1.1</i>	<i>Γλώσσα και γευστικοί κάλυκες.</i>	<i>15</i>
<i>Εικόνα 1.2</i>	<i>Η μετάδοση σήματος γεύσης μεταξύ γλώσσας και εγκεφάλου.</i>	<i>16</i>
<i>Εικόνα 2.1</i>	<i>Γονιδιωματική οργάνωση των υποδοχέων του πικρού (TAS2R).</i>	<i>19</i>
<i>Εικόνα 2.2</i>	<i>Αρχιτεκτονική του TAS2R46 και η θέση πρόσδεσης της στρυχνίνης.</i>	<i>20</i>
<i>Εικόνα 2.3</i>	<i>Φαινολικό Προφίλ δειγμάτων μπανάνας με ανάλυση LC-MS/MS.</i>	<i>22</i>
<i>Εικόνα 2.4</i>	<i>Έλεγχος συστατικών σε πίνακες κυτταρικής σειράς για τον προσδιορισμό πιθανού πληθυσμού ανταποκριτών.</i>	<i>23</i>
<i>Εικόνα 2.5</i>	<i>Μελέτη βάσει δεδομένων στην επιστήμη της γεύσης.</i>	<i>24</i>
<i>Εικόνα 2.6</i>	<i>Η χημική δομή των ενώσεων αναλύεται μέσω μοριακής μοντελοποίησης.</i>	<i>26</i>
<i>Εικόνα 3.1</i>	<i>Σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκου για τον μετριασμό των επιπτώσεων των μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες.</i>	<i>27</i>
<i>Εικόνα 3.2</i>	<i>Διαδικασία από την εξαγωγή, καθαρισμό και ταυτοποίηση βιοδραστικών πεπτιδίων έως την αξιολόγηση της μοριακής τους δράσης σε κυτταρικό μοντέλο.</i>	<i>28</i>
<i>Εικόνα 3.3</i>	<i>Επισκόπηση των βάσεων δεδομένων γεύσεων που κυκλοφόρησαν από το 1998 έως το 2022.</i>	<i>30</i>
<i>Εικόνα 3.4</i>	<i>Σχήματα υπολογιστικών στρατηγικών για την εύρεση νέων μορίων γεύσης.</i>	<i>31</i>
<i>Εικόνα 3.5</i>	<i>Οπτικοποίηση της μοριακής πρόσδεσης μεταξύ δραστικών ενώσεων που βρίσκονται στο σκόρδο και την πρωτεΐνη CCR5.</i>	<i>32</i>
<i>Εικόνα 3.6</i>	<i>Ένα τυπικό διάγραμμα ροής μοριακής πρόσδεσης.</i>	<i>33</i>

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 5.1 Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46 με τον αγωνιστή στρυχνίνη.	37
Σχήμα 5.2 Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Ο αγωνιστής της κρυσταλλικής δομής αναπαριστάται με χρώμα γαλάζιο και με πράσινο χρώμα αναπαριστάται ο αγωνιστής, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP.	39
Σχήμα 5.3 (Δεξιά) Τριδιάστατη (3D) και (Αριστερά) διδιάστατη (2D) απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Quercetin-3-galactoside (Ένωση 1) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.	42
Σχήμα 5.4 (Δεξιά) Τριδιάστατη (3D) και (Αριστερά) διδιάστατη (2D) απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Sorbifolin (Ένωση 2) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με χρώμα κίτρινο και ο pi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο.	43
Σχήμα 5.5 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Taxifolin (Ένωση 3) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με χρώμα κίτρινο και ο pi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο.	44
Σχήμα 5.6 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin (Ένωση 4) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου	45
Σχήμα 5.7 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rel-(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamene (Ένωση 5) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο pi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο.	46
Σχήμα 5.8 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamene (Ένωση 6) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο pi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο.	47
Σχήμα 5.9 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside (Ένωση 7) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο pi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο.	48

Σχήμα 5.10 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Colletoriperazine (Ένωση 8) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με γαλάζιο χρώμα ο πi-cation δεσμός 49

Σχήμα 5.11 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Epicatechin (Ένωση 9) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο πi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο. 50

Σχήμα 5.12 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Nebularine (Ένωση 10) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο πi-cation δεσμός με χρώμα γαλάζιο. 51

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγικά στοιχεία

1.1 Επισκόπηση της γευστικής αντίληψης από τον άνθρωπο

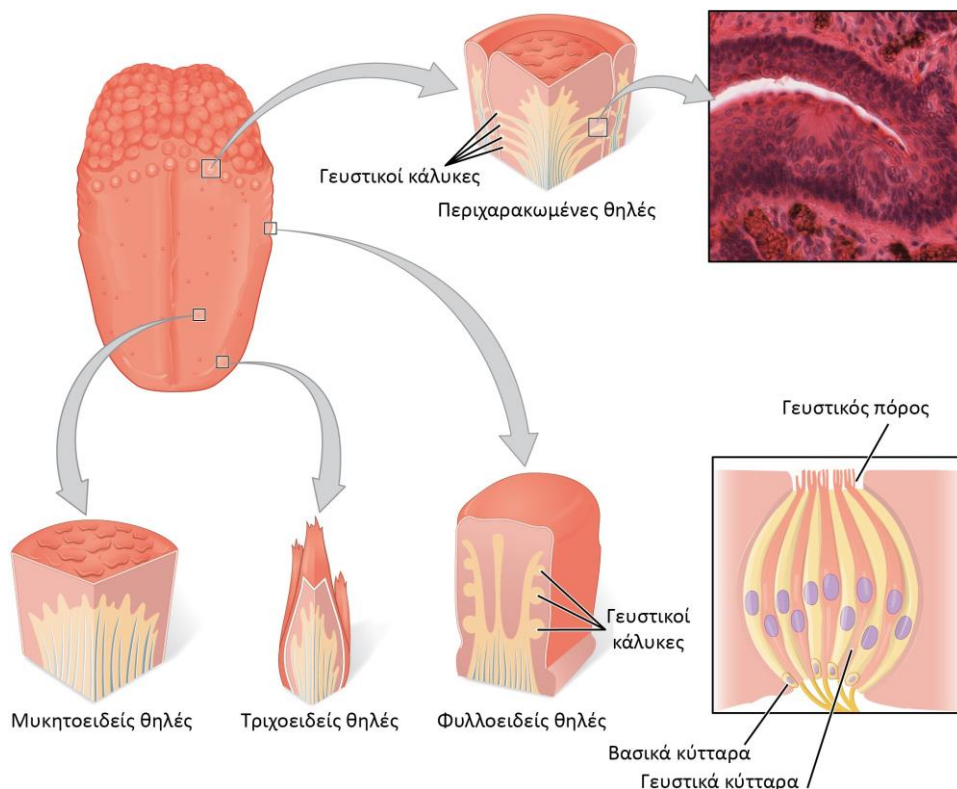
Η αίσθηση των τροφών αποτελεί ένα σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό, που συχνά καθορίζει την επιλογή των καταναλωτών. Είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού της γεύσης, του αρώματος και στοματικών αισθήσεων. Η γεύση οφείλεται στις μη πτητικές ενώσεις που περιέχονται στα τρόφιμα, οι οποίες χαρακτηρίζουν τις πέντε βασικές γεύσεις: γλυκιά (sweet), αλμυρή (salty), πικρή (bitter), όξινη (sour) και ουμάμι (umami). Το άρωμα σχετίζεται με τις πτητικές ενώσεις, οι οποίες συμβάλλουν στη χαρακτηριστική γεύση του φαγητού. Τέλος, οι γεύσεις συνήθως γίνονται αντιληπτές μέσω της διέγερσης των απολήξεων του ανθρώπινου νεύρου μέσα στο στόμα, τη μύτη ή τα μάτια. (Menis-Henrique, 2020)

Όλες οι εξελίξεις στη μελέτη των γεύσεων οφείλονται στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που διευκολύνουν και επιτρέπουν την ανάλυση πτητικών και μη πτητικών ενώσεων στα τρόφιμα ή την αναγνώριση προτύπων, όπως παρατηρείται από τον εξοπλισμό ηλεκτρονικής γλώσσας και ηλεκτρονικής μύτης. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της γεύσης των τροφίμων, που υποστηρίζονται από τη συνεχή ανάπτυξη νέων τεχνολογιών. (Menis-Henrique, 2020)

1.2. Αντίληψη της γεύσης

Η αντίληψη της γεύσης συνδέεται με τις επιλογές τροφών και την αντίληψη του καταναλωτή κατά την πρόσληψη τροφής. Αυτό επηρεάζει άμεσα τις διατροφικές συνήθειες και τις επιλογές τροφών που γίνονται. Παρ' όλα αυτά, η αντίληψη της γεύσης αποτελεί ένα υποκειμενικό φαινόμενο. Η αίσθηση της γεύσης και η επιλογή των τροφών επηρεάζονται από την πυκνότητα των θηλών της γεύσης στη γλώσσα, τις γενετικές διαφορές στους υποδοχείς της γεύσης, την ευαισθησία αυτών των υποδοχέων, τα συστατικά του σιέλου και άλλους παράγοντες. Επιπλέον, οι γενετικά προσδιορισμένες διαφορές στην πυκνότητα των θηλών της γεύσης επηρεάζουν την ευαισθησία στη γεύση. Ωστόσο, το γονίδιο ή τα γονίδια που ευθύνονται για αυτό το χαρακτηριστικό δεν έχουν γίνει ακόμη σαφή. Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζεται η ανθρώπινη γλώσσα και οι γευστικοί κάλυκες. (Καζάκου, 2023)

Η γεύση γίνεται αντιληπτή από ειδικά κύτταρα (Taste Receptor Cells-TRCs), που δρουν ως υποδοχείς, τους γευστικούς κάλυκες. Είναι τροποποιημένα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στη γλώσσα και στη μαλακή υπερώα του στόματος, τα οποία έχουν μέση διάρκεια ζωής μία εβδομάδα. (Παπανικολάου, 2015)



Εικόνα 1.1 Γλώσσα και γευστικοί κάλυκες. Οι μυκητοειδείς θηλές βρίσκονται στα πρόσθια 2/3 της γλώσσας και έχουν σχήμα μανιταριού και μικρό αριθμό γευστικών καλύκων. Είναι σημαντικές για τις γευστικές αισθήσεις του γλυκού, του πικρού και του umami. Οι περιχαρακωμένες θηλές είναι μεγαλύτερες, βρίσκονται στις πλευρικές και κεντρικές περιοχές του οπίσθιου 1/3 της γλώσσας και ξεχωρίζουν από το περιβάλλον τους με μια αύλακα στην οποία εκβάλλουν οι ορώδεις αδένες του Ebner. Είναι σημαντικές για την αίσθηση του όξινου και του πικρού. Οι φυλλοειδείς θηλές βρίσκονται στις πλευρικές επιφάνειες της γλώσσας, περιέχουν πολλούς γευστικούς κάλυκες και είναι σημαντικές για την αντίληψη της όξινης γεύσης (Παπανικολάου, 2015)

Η αντίληψη της γεύσης αποτελεί την κατάληξη μιας αλληλουχίας διεργασιών. Το γευστικό ερέθισμα (taste stimuli), μεταφέρεται μέσω ενός προσδέτη (ligand) και αλληλεπιδρά με κατάλληλο γευστικό υποδοχέα (taste receptor), προκαλώντας τη μετάδοση μιας νευρικής ώσης. Μεταφέρεται στον εγκέφαλο και δημιουργεί την αίσθηση της αντίστοιχης γεύσης. Η παρουσία ειδικών υποδοχέων είναι αναγκαία καθώς οι προσδέτες δεν διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες εύκολα. (ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ, 2017)

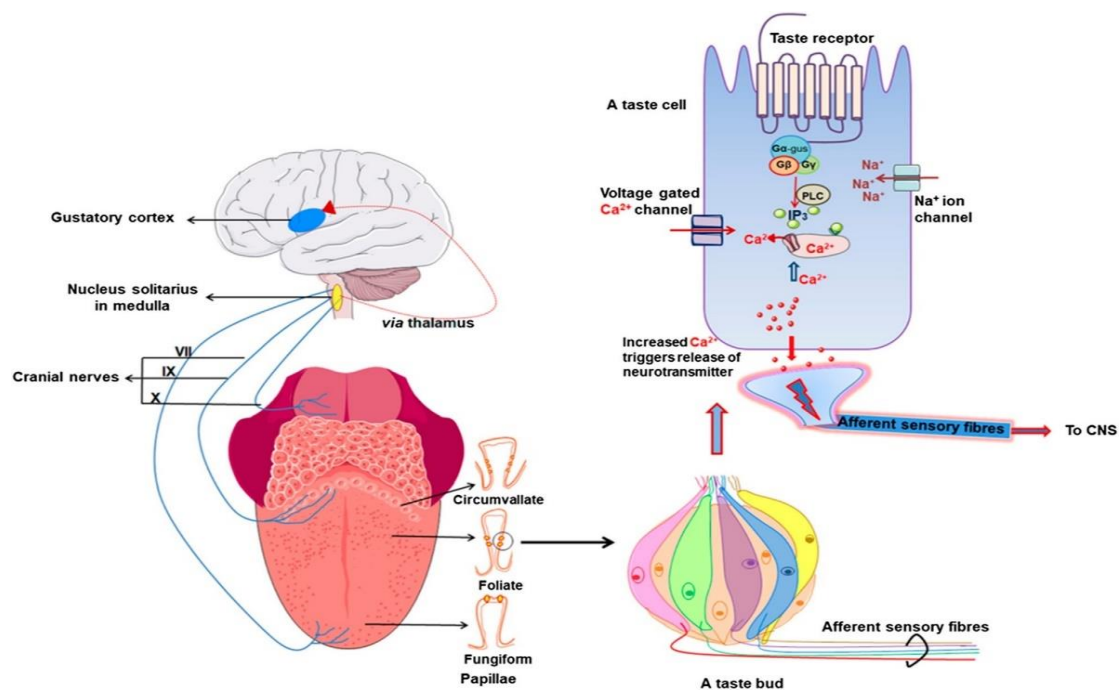
Για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ως υποδοχέας γεύσης πρέπει να πληρούνται ορισμένα κριτήρια όπως:

- Η μοριακή του ταυτότητα να είναι διευκρινισμένη.
- Η έκφρασή του σε κύτταρα γευστικών υποδοχέων (TRCs) να έχει επιβεβαιωθεί.
- Να υπάρχουν εκλεκτικοί προσδέτες για αυτό.
- Να αποδεικνύονται μεταβολές στη λειτουργία της γεύσης ως αποτέλεσμα αλλαγών στους υποδοχείς. (ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ, 2017)

1.3. Ανατομία και Φυσιολογία της γεύσης

Οι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs) αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων στα θηλαστικά και είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση των περισσότερων φυσιολογικών λειτουργιών. Αρχικά, οι GPCRs μεταφέρουν σήματα για τις τρεις βασικές γεύσεις: του γλυκού, του umami και του πικρού. Οι GPCRs γεύσης βρίσκονται σε εξειδικευμένα κύτταρα γευστικών υποδοχέων (TRC) εντός των γευστικών κάλυκων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2. Επιπλέον, βοηθούν στις αισθήσεις της όσφρησης και της όρασης. (Ahmad & Dalziel, 2020)

Οι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs) ενεργοποιούνται από πολυάριθμα μόρια με τη μορφή λιπιδίων, σακχάρων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών που μεταφέρουν πληροφορίες από το εξωτερικό περιβάλλον στο κύτταρο για να μεσολαβήσουν στις αντίστοιχες λειτουργικές τους αντιδράσεις. (Billington, 2003)



Εικόνα 1.2 Η μετάδοση σήματος γεύσης μεταξύ γλώσσας και εγκεφάλου. Οι γευστικοί κάλυκες που υπάρχουν σε διαφορετικές θηλές στη γλώσσα και στον ουρανίσκο περιέχουν κύτταρα γευστικών υποδοχέων (TRC) που περιέχουν υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G (GPCRs). Αριστερά: Τρόπος με τον οποίο τα προσαγωγά νεύρα μεταδίδουν ένα σήμα στον γευστικό φλοιό στον εγκέφαλο μέσω κρανιακών / γλωσσοφαρυγγικών νεύρων. Δεξιά: Γευστικός κάλυκας με TRCs γεύσης και απλοποιημένη οδό μεταγωγής σήματος του υποδοχέα γεύσης, που οι GPCR γεύσης ενεργοποιούνται από μια γεύση που με τη σειρά της στρατολογεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη G που επάγει περαιτέρω την ενδοκυτταρική απελευθέρωση ασβεστίου. (Ahmad, 2020)

Πρόσφατες ανακαλύψεις σχετικά με τους υποδοχείς βασικών γεύσεων, καθώς και η παρατήρηση της έκφρασής τους σε ιστούς και ανατομικές θέσεις εκτός από τη γλώσσα και

το στόμα, αναζωογόνησαν το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον τρόπο αντίληψης της γεύσης. (Ahmad, 2020)

Κεφάλαιο 2: Η πικρή γεύση

2.1. Ορισμός της πικρής γεύσης

Οι διατροφικές επιλογές καθώς και οι διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη γεύση των τροφίμων. Χωρίς να αποτελεί την κυρίαρχη γευστική αίσθηση, η πικρή γεύση συμβάλλει στην πολυπλοκότητα και την απόλαυση των ποτών και των φαγητών. (Drewnowski, 2001)

Από τις βασικές γεύσεις, η πικρή γεύση θεωρείται ως η πιο περίπλοκη και ίσως η λιγότερο κατανοητή. Οι ενώσεις που γίνονται αντιληπτές ως πικρές δεν έχουν παρόμοια χημική δομή. Εκτός από τα πεπτίδια και τα άλατα, οι πικρές ενώσεις στα τρόφιμα μπορεί να περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις και πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης, φλαβονοειδή, κατεχίνες καθώς και την καφεΐνη. Μεταξύ των πικρών ενώσεων στα τρόφιμα περιλαμβάνονται επίσης αμινοξέα, εστέρες και λακτόνες, τερπένια, μεθυλοξανθίνες (καφεΐνη) και σουλφιμίδια (σακχαρίνη). (Drewnowski, 2001)

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 1) με μερικές αναγνωρισμένες πικρές ενώσεις, τις πηγές τους και τις χρήσεις τους:

Πίνακας 1: Αναγνωρισμένες πικρές ενώσεις (Ηλεκτρονική πηγή: BitterDB: <https://bitterdb.agri.huji.ac.il/>)

ΠΙΚΡΗ ΕΝΩΣΗ	ΠΗΓΗ	ΧΡΗΣΗ
Κινίνη	Ξύλο της κινχόνης	Γευστικός παράγοντας
Καφεΐνη	Καφές, Τσάι	Διεργετικό
Ναριγκίνη	Γκρέιπφρουτ	Γευστικός παράγοντας
Εσπεριδίνη	Κίτρινα φρούτα	Γευστικός παράγοντας
Κατεχίνη	Πράσινο τσάι	Αντιοξειδωτικός παράγοντας
Γέντιαν	Ρίζα γέντιαν	Βοήθημα πέψης
Δενατόνιο	Bitrex	Αποτροπή μη αποστειρωμένων προϊόντων
Χιουμουλόνη	Ανθοί σταφυλιού	Παρασκευή μύρας
Βερβερίνη	Goldenseal	Ιατρική

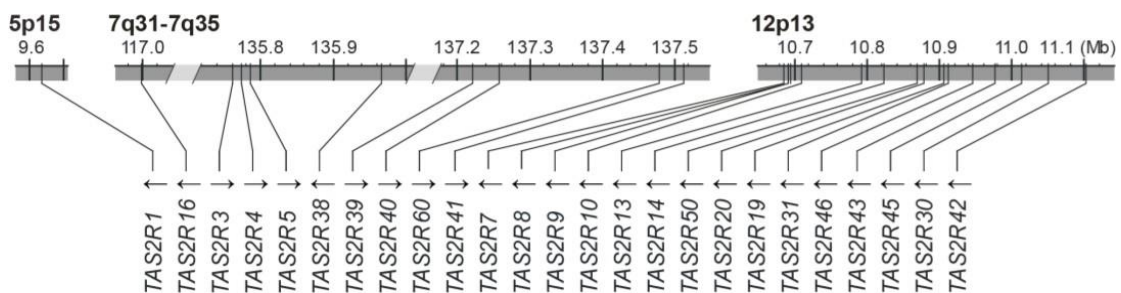
Το γεγονός ότι τέτοιες δομικά διαφορετικές ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν μια μοναδική πικρή γεύση υποδηλώνει ότι πολλοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη και μεταγωγή της πικρής γεύσης. Κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς μπορεί να είναι κοινοί στην αντίληψη τόσο του πικρού όσο και του γλυκού. Μικρές αλλαγές στη χημική δομή

μπορούν να μετατρέψουν τις πικρές ενώσεις σε έντονα γλυκές ή αντίστροφα. (Schiffman, 2000).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνθρωποι διαθέτουν πλήθος υποδοχέων πικρής γεύσης και ότι η μεταγωγή της πικρής γεύσης μπορεί να διαφέρει μεταξύ μιας ένωσης και της άλλης. (Drewnowski, 2001)

2.2. Οι υποδοχείς της πικρής γεύσης

Υπάρχει μια ολόκληρη οικογένεια γονιδίων υποδοχέων της πικρής γεύσης (Εικόνα 2.1), η οποία ονομάζεται (TAS2R). Η ανακάλυψη της θεωρείται αναμενόμενη, καθώς πλήθος δομικά διαφορετικών γευστικών μορίων προκαλούν την αίσθηση του πικρού. (Παπανικολάου, 2015)



Εικόνα 2.1 Γονιδιωματική οργάνωση των υποδοχέων του πικρού (TAS2R). (Παπανικολάου, 2015)

Η οικογένεια των TAS2 υποδοχέων στον άνθρωπο περιλαμβάνει είκοσι πέντε λειτουργικά γονίδια και τουλάχιστον έντεκα ψευδογονίδια. Δεκατέσσερα TAS2R γονίδια βρίσκονται σε σύμπλεγμα του χρωμοσώματος 12, εννιά σε σύμπλεγμα του χρωμοσώματος 7 και ένας μικρότερος αριθμός στο χρωμόσωμα 5. Η γονιδιωματική οργάνωση των TAS γονιδίων υποδεικνύει ότι πολλά από αυτά προέκυψαν από διπλασιασμούς και στη συνέχεια εξελίχθηκαν, επιτελώντας νέες λειτουργίες. (W. Meyerhof, 2005)

Τα γονίδια της οικογένειας TAS2R κωδικοποιούν πρωτεΐνες 290-330 αμινοξέων με επτά διαμεμβρανικές έλικες και βραχεία αμινοτελικά άκρα. Παρουσιάζουν μεταξύ τους ομολογία της τάξεως του 25-89%. Κάθε γευστικό κύτταρο εκφράζει διαφορετικά μέλη της οικογένειας TAS2R. Έτσι, διαφορετικά μεταξύ τους γευστικά μόρια μπορούν να οδηγούν στη διέγερση των ίδιων νευρικών απολήξεων. (W. Meyerhof, 2005)

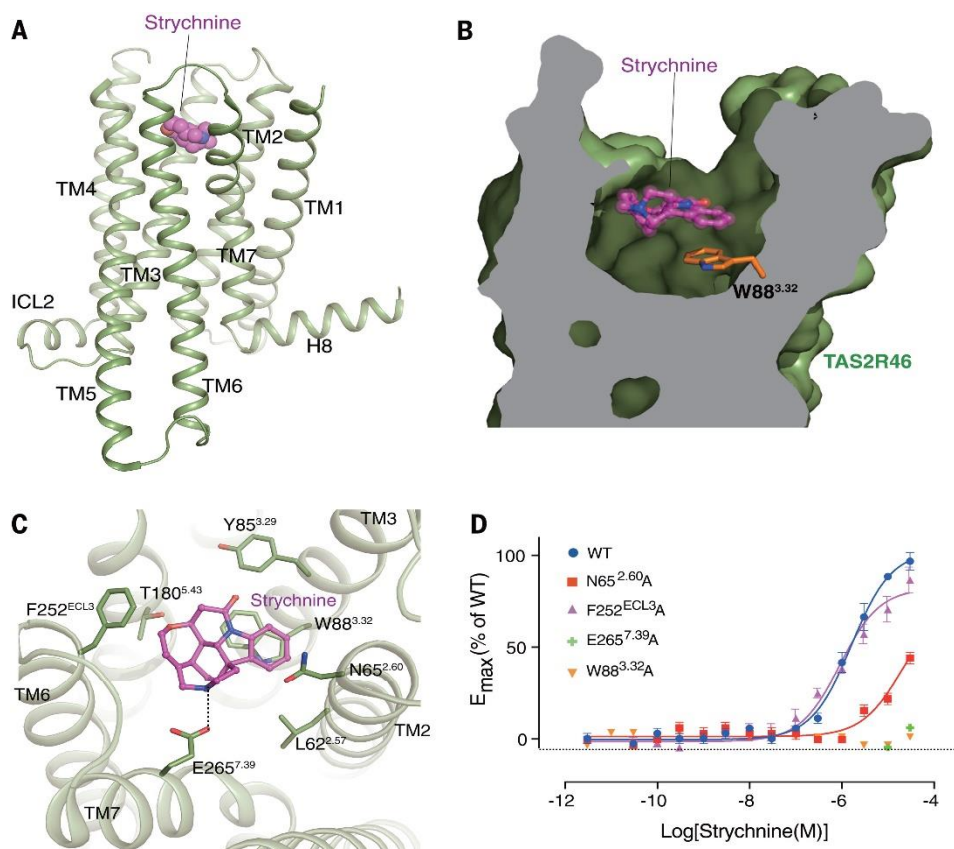
Το γεγονός αυτό ερμηνεύει γιατί πολύ διαφορετικές μεταξύ τους δομικά ενώσεις γίνονται αντιληπτές γενικά ως πικρές, χωρίς να είναι δυνατόν να αναγνωριστούν. Οι μέχρι τώρα λειτουργικές μελέτες δείχνουν ότι ορισμένοι υποδοχείς της πικρής γεύσης είναι σε θέση να αναγνωρίζουν μεγάλο φάσμα πικρών ουσιών. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς TAS2R10, TAS2R46 και TAS2R14 φαίνεται να μπορούν να ανιχνεύσουν περίπου τις μισές από

τις πικρές ουσίες που αντιλαμβάνεται ο άνθρωπος. Άλλοι πικροί υποδοχείς φαίνεται να έχουν πολύ περιορισμένο εύρος προσδετών. (Παπανικολάου, 2015)

2.2.1. TAS2R46 υποδοχέας

Ο TAS2R46 είναι ένας από τους πολλούς υποδοχείς πικρής γεύσης που βρίσκονται στη γλώσσα και στο πεπτικό σύστημα και που ανιχνεύουν πικρές ενώσεις, με τη στρυχνίνη να έχει αναγνωριστεί ως ο πιο ισχυρός αγωνιστής μέχρι στιγμής (Εικόνα 2.2). Η στρυχνίνη είναι μια πικρή και εξαιρετικά τοξική ένωση που χρησιμοποιείται συχνά ως δηλητήριο για τα τρωκτικά. (Xu et al., 2022)

Η ικανότητα των υποδοχέων πικρής γεύσης να ανιχνεύουν ενώσεις, όπως η στρυχνίνη έχει εξελικτικό νόημα. Στη φύση, πολλές πικρές ουσίες είναι τοξικές ή επιβλαβείς, και η αντίληψη της πικρής γεύσης μπορεί να λειτουργεί ως προειδοποίηση για την αποφυγή πιθανών κινδύνων. Η στρυχνίνη, με την έντονα πικρή γεύση της, είναι ένα παράδειγμα ουσίας που θα προκαλούσε μια γρήγορη αντίδραση αποστροφής. (Xu et al., 2022)



Εικόνα 2.2 Αρχιτεκτονική του TAS2R46 και η θέση πρόσδεσης της στρυχνίνης. (Α) Πλάγια όψη της δέσμης 7TM του συμπλόκου στρυχνίνη-TAS2R46. Η, έλικα. (Β) Κατακόρυφη διατομή της θέσης πρόσδεσης της στρυχνίνης στον TAS2R46 υποδοχέα. Η πλευρική αλυσίδα του W88^{3.32} εμφανίζεται με πορτοκαλί χρώμα. (Γ) Θήκη πρόσδεσης στρυχνίνης από την εξωκυτταρική όψη. Τα αμινοξέα του

TAS2R46 που αλληλεπιδρούν με τη στρυχνίνη εμφανίζονται ως ραβδιά. Οι δεσμοί υδρογόνου εμφανίζονται ως μαύρες διακεκομμένες γραμμές. (Xu et al., 2022)

Όταν κάποιος υποδοχέας της πικρής γεύσης, όπως ο TAS2R46, έρχεται σε επαφή με τη στρυχνίνη ή μια παρόμοια, στέλνονται σήματα στον εγκέφαλο που προκαλούν την αίσθηση της πικρής γεύσης και μπορεί να οδηγήσουν σε αντανακλαστικές αντιδράσεις, όπως είναι ο βήχας ή η ναυτία. (Xu et al., 2022)

Αν και η σχέση μεταξύ του TAS2R46 και της στρυχνίνης είναι κυρίως στη βάση της γεύσης, αυτή η γνώση έχει ενδιαφέρον για την τοξικολογία και την ασφάλεια τροφίμων. Κατανοώντας τον τρόπο με τον οποίο οι υποδοχείς πικρής γεύσης αντιδρούν σε τοξικές ουσίες, μπορούμε να αναπτύξουμε καλύτερες προσεγγίσεις για την ανίχνευση και την αποφυγή επικίνδυνων χημικών ουσιών. (Xu et al., 2022)

2.3. Παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανακάλυψη αγωνιστών της πικρής γεύσης

Η ανακάλυψη αγωνιστών της πικρής γεύσης, δηλαδή ενώσεων που ενεργοποιούν υποδοχείς πικρής γεύσης, είναι ένα σημαντικό πεδίο έρευνας που αφορά τη γευστική αντίληψη. Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανακάλυψη αυτών των αγωνιστών συνδυάζουν τις επιστήμες της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας. (Bayer et al., 2021)

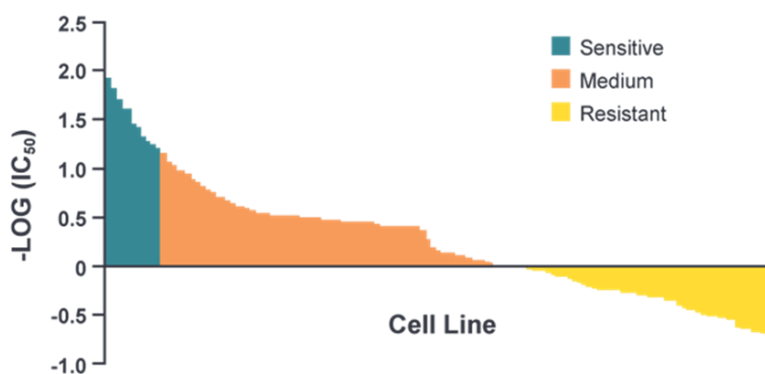
Μία παραδοσιακή προσέγγιση περιλαμβάνει την απομόνωση φυσικών ενώσεων από φυτά, βότανα, ή άλλα βιολογικά υλικά. Οι ερευνητές εξετάζουν τις ενώσεις αυτές για να προσδιορίσουν εάν έχουν πικρή γεύση ή εάν ενεργοποιούν υποδοχείς πικρής γεύσης. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις απομονώνονται με διάφορες τεχνικές όπως η εκχύλιση (με νερό, αλκοόλη, ή άλλους διαλύτες), η κλασματική απόσταξη, και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Μετά την απομόνωση, οι ενώσεις καθαρίζονται και αναλύονται με φασματοσκοπία, αέρια χρωματογραφία- φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζεται το φαινολικό προφίλ δειγμάτων μπανάνας με ανάλυση LC-MS/MS. (Daniel C.Harris, 2021)

Storage Period (Days)	Apigenin	Caffeic Acid	Chlorogenic Acid	Kaempferol	Naringenin	Quercetin	Rosmarinic Acid	Syringic Acid
2	✓			✓	✓		✓	
4	✓			✓	✓			✓
7				✓	✓			✓
9	✓			✓	✓		✓	✓
11	✓			✓	✓	✓	✓	✓
14			✓	✓	✓	✓		✓
17		✓	✓	✓	✓			✓
21		✓		✓	✓	✓		

Εικόνα 2.3 Φαινολικό Προφίλ δειγμάτων μπανάνας με ανάλυση LC-MS/MS (E. Kritsi, 2023)

Επόμενη προσέγγιση αποτελούν οι βιοχημικές δοκιμές με κυτταρικές σειρές (cell line testing): Σε αυτήν την προσέγγιση, οι ερευνητές χρησιμοποιούν κυτταρικές σειρές που εκφράζουν συγκεκριμένους υποδοχείς πικρής γεύσης, όπως ο TAS2R46. Οι ενώσεις δοκιμάζονται σε αυτές τις κυτταρικές σειρές για να ελεγχθεί αν ενεργοποιούν τους υποδοχείς. Τα δεδομένα κυτταρικής σειράς *in vitro* μπορούν να βοηθήσουν επίσης, σε διαφορετική περίπτωση, στην επιλογή συγκεκριμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών για την αξιολόγηση των αντικαρκινικών βιοενεργών CNT ως ένα νέο εργαλείο χορήγησης φαρμάκων στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτή η προσέγγιση είναι πιο αποτελεσματική από τις ανθρώπινες δοκιμές, καθώς επιτρέπει τη δοκιμή πολλών ενώσεων σε λιγότερο χρόνο και με μεγαλύτερη ακρίβεια. (Kesharwani et al., 2015)

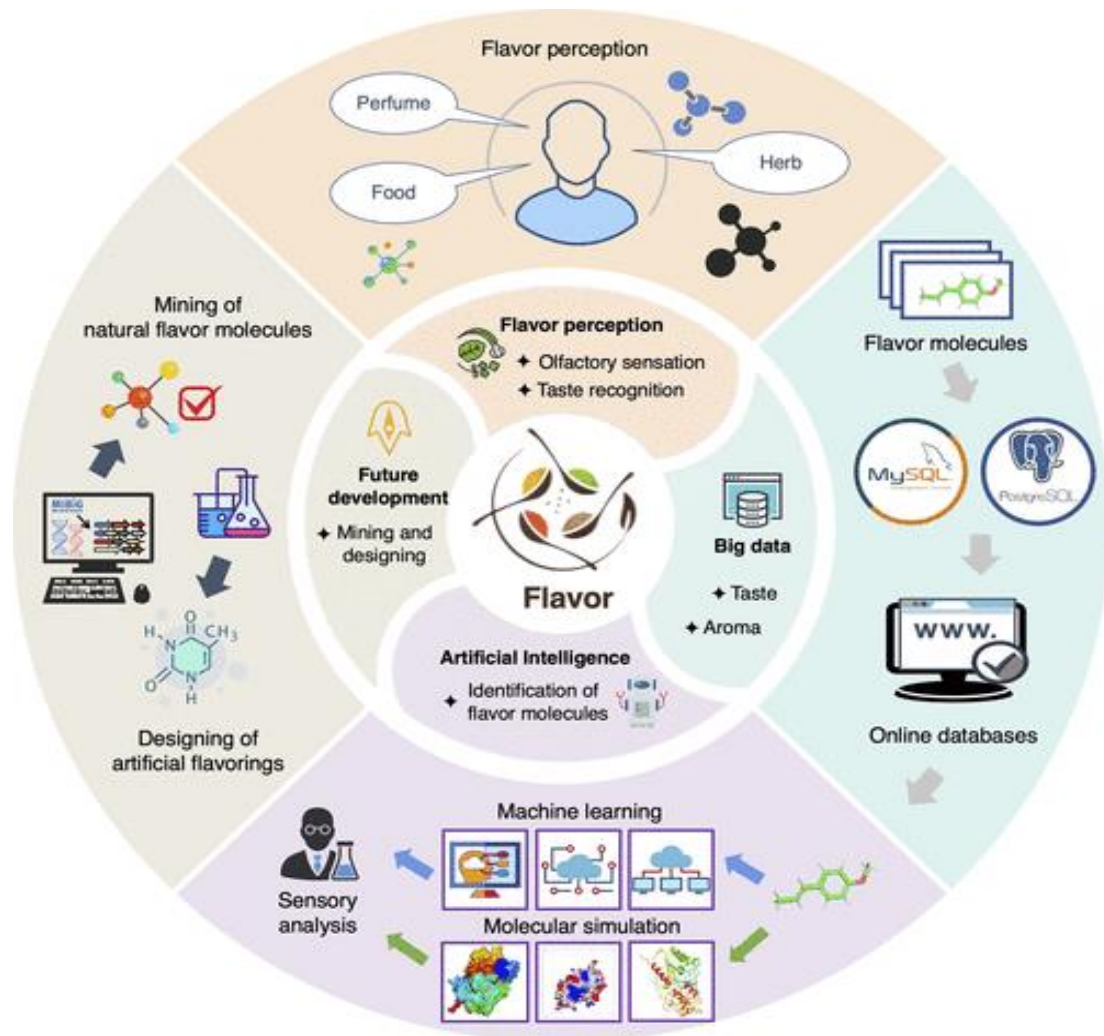
Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα κατανομής που απεικονίζει την ευαισθησία διαφόρων κυτταρικών σειρών σε μια ουσία, βασισμένη στην τιμή του $-\text{LOG}(\text{IC}_{50})$. Το IC_{50} αναπαριστά τη συγκέντρωση μιας ουσίας που είναι ικανή να οδηγήσει στην αναστολή της βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας της κυτταρικής σειράς κατά 50%. Η τιμή του $-\text{LOG}(\text{IC}_{50})$ χρησιμοποιείται για να δείξει την ευαισθησία των κυτταρικών σειρών. (Swinney, 2011)



Εικόνα 2.4 Έλεγχος συστατικών σε πίνακες κυτταρικής σειράς για τον προσδιορισμό πιθανού πληθυσμού ανταποκριτών. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://www.crownbio.com/hs-fs/hubs/assets/cell-line-panel-graph.png?width=900&name=cell-line-panel-graph.png>)

Η πικρή γεύση μεταδίδεται μέσω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού στον οργανισμό. Η διαδικασία ξεκινά με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης Cβ2, η οποία απελευθερώνει δύο μόρια, την τριφωσφορική ινοσοτόλη (IP3) και τη διακυλογλυκερόλη (DAG). Αυτά τα μόρια προκαλούν την αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου εντός του κυττάρου, η οποία εν τέλει οδηγεί στην εκπόλωση του. Επιπλέον, η πικρή γεύση αναγνωρίζεται από άλλους μηχανισμούς, όπως η αναστολή των καναλιών καλίου, η αναστολή των φωσφοδιεστερασών και διαφόρων τύπων πρωτεϊνικών κινασών (Ιορδανίδου, 2012).

Υπολογιστικές Προσεγγίσεις (*In Silico*): Με βάση τη δομή των υποδοχέων πικρής γεύσης, οι ερευνητές χρησιμοποιούν προγράμματα υπολογιστικής χημείας για να προβλέψουν ενώσεις ως εν δυνάμει αγωνιστών της πικρής γεύσης. Αυτό επιτρέπει στους ερευνητές να μειώσουν τον αριθμό των ενώσεων που χρειάζεται να δοκιμάσουν στο εργαστήριο. Η μεθοδολογία που ακολουθείται απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.5. (Von Itzstein et al., 1993, Varney et al., 1992)



Εικόνα 2.5 Μελέτη βάσει δεδομένων στην επιστήμη της γεύσης. Τα μόρια γεύσης στα αρώματα, τα βότανα και τα τρόφιμα είναι υπεύθυνα για τη διέγερση των ανθρώπινων αισθητηριακών αντιλήψεων. Λόγω του αυξανόμενου αριθμού γνωστών μορίων γεύσης, δημιουργήθηκαν εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων μορίων τροφίμων με βάση λογισμικό διαχείρισης δεδομένων, όπως MySQL και PostgreSQL. Αυτές οι βάσεις δεδομένων επέτρεψαν την εφαρμογή υπολογιστικών στρατηγικών (π.χ. μηχανική μάθηση και μοριακή προσομοίωση) στην επιστήμη της γεύσης και, σε συνδυασμό με την αισθητηριακή ανάλυση, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον εντοπισμό νέων μορίων γεύσης. Με την ταχεία ανάπτυξη της multi-omics και της τεχνητής νοημοσύνης, οι προηγμένες υπολογιστικές προσεγγίσεις έχουν εκφράσει μεγάλες δυνατότητες στην καθοδήγηση του σχεδιασμού τεχνητών αρωμάτων και της εξόρυξης φυσικών μορίων γεύσης. (Κου, 2023)

2.4. Ενώσεις με χαρακτηρισμένη πικρή γεύση και βάσεις δεδομένων/ενώσεων

Η αίσθηση του πικρού προκαλεί αποστροφή, λειτουργώντας αποτρεπτικά στην κατανάλωση τροφίμων που μπορεί να αποδειχθούν επικίνδυνα για τον οργανισμό. Πολλές θανατηφόρες τοξίνες φυτικής προέλευσης είναι αλκαλοειδή και οι περισσότερες έχουν πικρή γεύση. (Παπανικολάου, 2015)

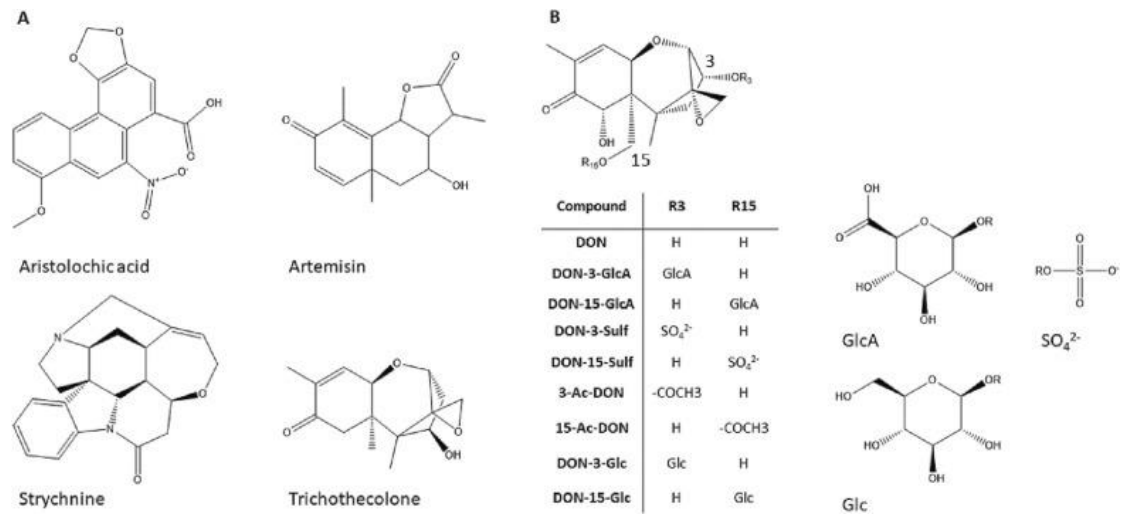
Οι πικροί παράγοντες είναι χημικά ανομοιογενείς. Ανάμεσά τους συγκαταλέγονται αζωτούχες οργανικές ενώσεις μακράς αλυσίδας, αλκαλοειδή, τερπενοειδή και φλαβονοειδή

(Πίνακας 2), ουσίες που προσλαμβάνονται με την τροφή είτε από τα φυτικά συστατικά της είτε ως αποτέλεσμα της διαδικασίας παραγωγής και μαγειρέματος. (Παπανικολάου, 2015)

Πίνακας 2: Αναγνωρισμένα μόρια που πιθανώς αλληλεπιδρούν με τον ανθρώπινο υποδοχέα TAS2R46 σύμφωνα με το εργαλείο VirtualTaste (Pedroni L, 2023)

Name	Pubchem CID	VirtualTaste Confidence Score ¹	T3DB ID
4-Hydroxydecenal	6439956	0.776	T3D4193
4-Hydroxynonenal	5283344	0.73	T3D4180
Acetyl tributyl citrate	6505	0.913	T3D4871
Allethrin ²	11442	0.796	T3D1024
Androstenedione	6128	0.769	T3D4240
Brompheniramine ³	6834	0.988	T3D4554
Cinerin I ²	5281547	0.789	T3D1853
Cinerin II ²	5281548	0.765	T3D1854
Coriamyrtin ⁴	433737	0.92	T3D4074
Fexofenadine ⁵	3348	0.908	T3D2938
Gelsemine	5390854	0.926	T3D4071
Hypoxanthine ⁴	135398638	0.886	T3D4150
Jasmolin I ²	12304687	0.794	T3D1855
Jasmolin II ²	12304690	0.773	T3D1856
Pyrethrin I ²	5281045	0.796	T3D1857
Pyrethrin II ²	5281555	0.774	T3D1858
Pyrethrum ²	71310221	0.794	T3D0233
Quinine ^{4,6,*}	3034034	0.996	T3D2800
S-Bioallethrin ²	62829	0.796	T3D3920
Trichothecolone	107974	0.713	T3D3719
Tutin ⁷	75729	0.831	T3D3089
Xanthine ³	1188	0.867	T3D4409

Χαρακτηριστικές πικρές ουσίες είναι η ουρία, αμινοξέα L- διαμόρφωσης (βαλίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη), πεπτίδια (όπως το διπεπτίδιο Ala-Leu), αμίνες (π.χ. προπυλαμίνη), λακτόνες και εστέρες (π.χ. βουτυρολακτόνη) και γλυκοσίδες, με κυριότερο εκπρόσωπο την αμαρογεντίνη, μια από τις πιο πικρές φυτικές ουσίες. Η πιο πικρή γνωστή ουσία είναι το βενζοϊκό δενατόνιο, που προστίθεται σε διάφορα διαλύματα και προϊόντα με σκοπό να προληφθεί η κατάποσή τους. Στην Εικόνα 2.6 απεικονίζονται ορισμένες από τις δομές των χημικών ενώσεων του Πίνακα 2. (Παπανικολάου, 2015)



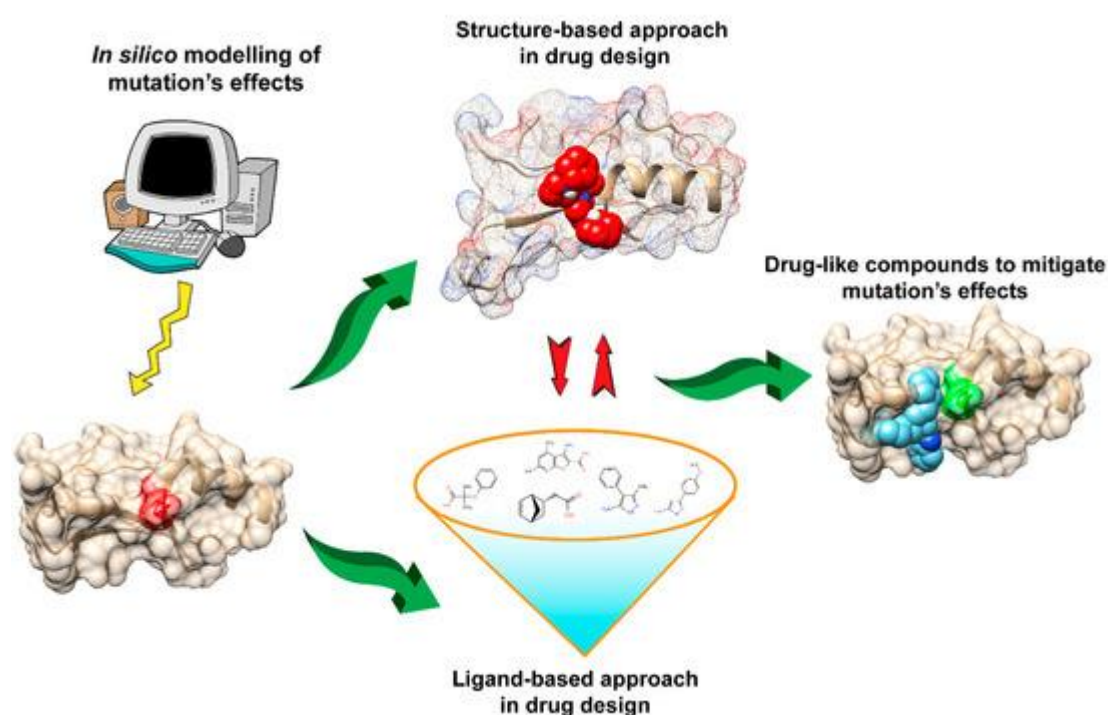
Εικόνα 2.6 Η χημική δομή των ενώσεων αναλύεται μέσω μοριακής μοντελοποίησης. Α. Αριστολοχικό οξύ (CID 2236), αφινθίνη (CID 442138), στρυχνίνη (CID 441071) και τριχοθεκόλη (CID 107974). Β. Ικρίωμα DON με τον χημικό υποκαταστάτη του στη θέση 3 (R3) και 15 (R15). (Pedroni L, 2023)

Κεφάλαιο 3: *In silico* τεχνικές

3.1. Εισαγωγή

Τα μόρια γεύσης (Flavor molecules) χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για να ενισχύσουν την ποιότητα των προϊόντων και να βελτιώσουν την εμπειρία των καταναλωτών, αλλά συνδέονται με πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις. Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα υγείας και να προωθηθεί η ορθολογική χρήση των μορίων γεύσης, έχουν αναπτυχθεί πολλές βάσεις δεδομένων που περιέχουν μόρια γεύσης. Ορισμένες από αυτές είναι η FOODB (<https://foodb.ca/>), CNATURAL (<http://cnatural.gr/home/>) και η ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). (Κου, 2023)

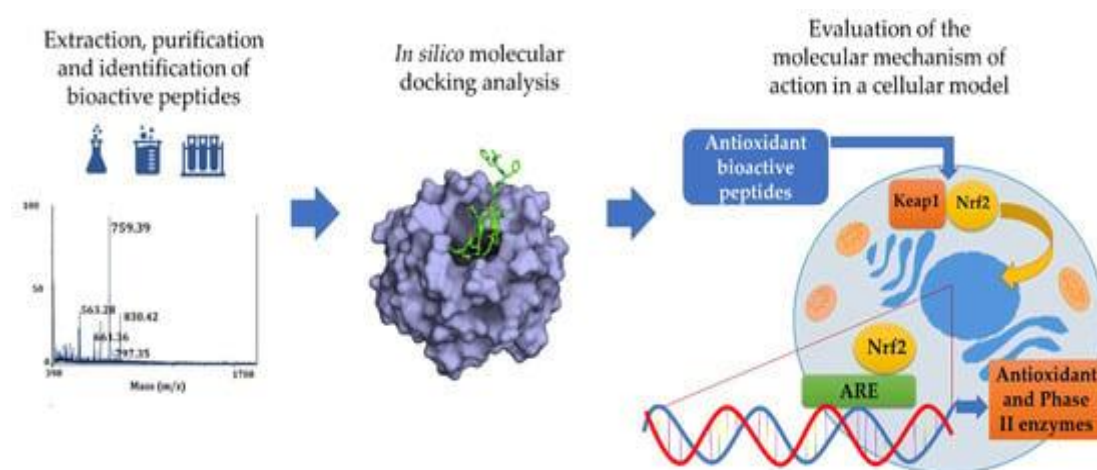
In silico είναι μία φράση που αναφέρεται σε ό,τι πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης σε υπολογιστή (Εικόνα 3.1). Σύμφωνα με τον EFSA (European Food Safety Authority), *in silico* τεχνική αποτελεί τη θεωρητική ερευνητική μέθοδο, η οποία ειδικότερα περιλαμβάνει τη χρήση υπολογιστικών μοντέλων για την πρόβλεψη πιθανών τοξικολογικών, ή άλλων, επιδράσεων των ουσιών. (Ηλεκτρονική πηγή: <https://www.efsa.europa.eu/el/>)



Εικόνα 3.1 Σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκου για τον μετριασμό των επιπτώσεων των μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες. (Waszkowycz, 2002)

Η ταχεία ανάπτυξη υπολογιστικών στρατηγικών, όπως η μηχανική μάθηση (ML) και η μοριακή προσομοίωση (MS), παρέχει νέες ευκαιρίες για την ανακάλυψη βιολογικών μηχανισμών αντίληψης της γεύσης. Χρησιμοποιώντας υπολογιστικές στρατηγικές, αναλύονται τα δομικά χαρακτηριστικά των γνωστών μορίων γεύσης και διερευνούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων αντίληψης και των υποψηφίων μορίων (Μοντέλα πρόβλεψης). (Shen, 2003) (Shoichet, 2004).

Επιπλέον, μελετάται η ικανότητα πρόσδεσης φυσικών ή χημικών ενώσεων στην πρωτεΐνη-στόχο που εξετάζεται (Εικόνα 3.2). Αφού εντοπιστεί η ένωση που εμφανίζει την υψηλότερη ικανότητα πρόσδεσης στον ενδιαφερόμενο στόχο, μπορεί να αγοραστεί και να υποβληθεί σε πειραματική μελέτη. (Shen, 2003) (Shoichet, 2004).



Εικόνα 3.2 Διαδικασία από την εξαγωγή, καθαρισμό και ταυτοποίηση βιοδραστικών πεπτιδίων έως την αξιολόγηση της μοριακής τους δράσης σε κυτταρικό μοντέλο. Αρχικά, τα πεπτίδια εξάγονται, καθαρίζονται και ταυτοποιούνται μέσω φασματομετρίας μάζας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ανάλυση μοριακής πρόσδεσης *in silico* για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασής τους με πρωτεΐνες-στόχους. (Tonolo et al., 2023)

Το κύριο πλεονέκτημα των υπολογιστικών τεχνικών είναι η παράλληλη μελέτη βιβλιοθηκών μορίων, που περιέχουν μεγάλο αριθμό ενώσεων, στο βιολογικό στόχο που εξετάζεται, γεγονός που συντελεί στην μείωση των δαπανών. (Eringis, 2002)

Εν κατακλείδι, τα υπολογιστικά εργαλεία διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ανακάλυψη νέων ενώσεων για την ενεργοποίηση υποδοχέων όλων των γεύσεων. Προσφέρουν τη δυνατότητα να προβλεφθεί η συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ του εξεταζόμενου βιολογικού στόχου και των ενώσεων που έχουν επιλεγεί μέσα από τις βιβλιοθήκες. Η πρόβλεψη αυτή οδηγεί στην εύρεση της ένωσης που προσδέεται αποδοτικότερα με τον στόχο, η οποία στην συνέχεια πρόκειται να αγοραστεί και να πραγματοποιηθούν *in vitro* δοκιμές, για να διασφαλιστεί η δράση της ως ενεργοποιητή της πρωτεΐνης-στόχου. Η μέθοδος αυτή συμβάλλει στο έργο των ερευνητών εφόσον μειώνεται το κόστος της έρευνας, αλλά και ο απαιτούμενος χρόνος (Shoichet, 2004).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναζητούνται νέες φυσικές ενώσεις που δρούν ως ενεργοποιητές της πικρής γεύσης.

3.2. Βιβλιοθήκες Φυσικών ενώσεων

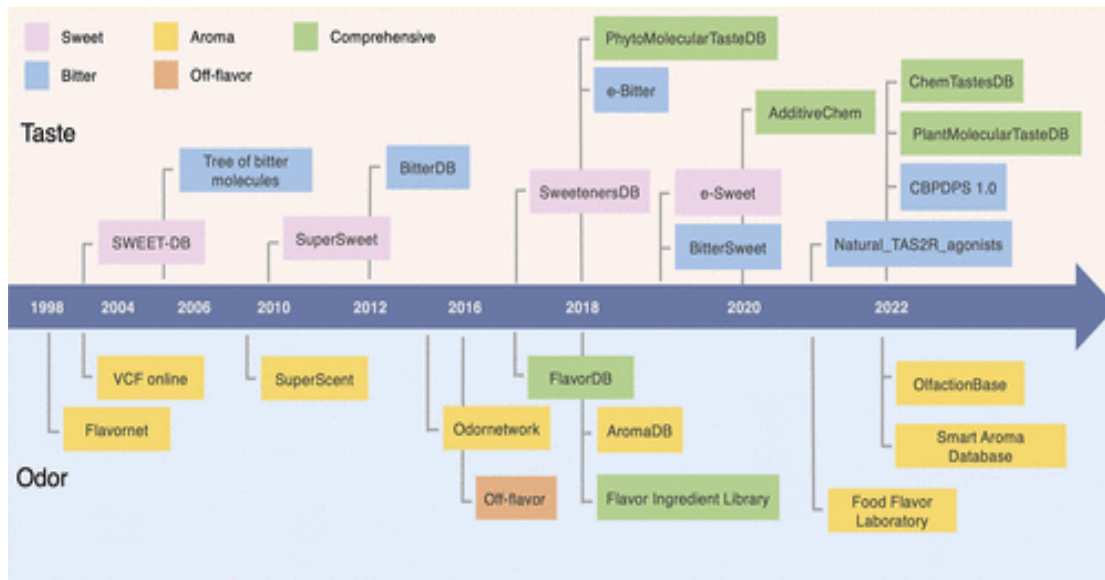
Οι βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων παρέχουν πολύτιμη βοήθεια στους ερευνητές, οι οποίοι αναζητούν νέες ενώσεις που περιέχονται σε τρόφιμα και εν δυνάμει μπορούν να δράσουν ως αγωνιστές των υποδοχέων των βασικών γεύσεων.

Πρόσφατα, οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί σε φυσικές ενώσεις που κυρίως παρουσιάζουν πικρή και γλυκιά γεύση. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε περιορισμένο ενδιαφέρον για τις άλλες γευστικές αισθήσεις. (Κου, 2023)

Υπάρχει πλήθος διαθέσιμων βιβλιοθηκών τόσο φυσικών όσο και συνθετικών χημικών ενώσεων με ελεύθερη πρόσβαση. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των βιβλιοθηκών είναι η διαθεσιμότητα χιλιάδων εμπορικών ενώσεων, οι οποίες δύνανται να αξιοποιηθούν για την εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, η χημειοθήκη ZINC (<https://zinc.docking.org/>) πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις υπόλοιπες χημειοθήκες, δεδομένου ότι περιλαμβάνει συγκεκρωτικούς καταλόγους εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χημειοθήκη COCONUT (<https://coconut.naturalproducts.net/>), η οποία περιέχει τον μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων. (Κρίτση, 2017)

Ορισμένα παραδείγματα βιβλιοθηκών είναι:

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), LINC5 (<https://lincs.hms.harvard.edu/db/>),
ChemDB (<https://cdb.ics.uci.edu/>), ZINC (<https://zinc.docking.org/>), COCONUT
(<https://coconut.naturalproducts.net/>), Binding DataBase
(<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)
και η βιβλιοθήκη Specs (<https://www.specs.net/>). (Κρίτση, 2017)



Εικόνα 3.3 Επισκόπηση των βάσεων δεδομένων γεύσεων που κυκλοφόρησαν από το 1998 έως το 2022. Οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν μόρια γεύσης παρουσιάζονται στο επάνω μέρος της γραμμής χρόνου και οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν μόρια αρώματος βρίσκονται στο κάτω μέρος. Τα χρώματα αντιπροσωπεύουν τους τύπους βάσεων δεδομένων. (Κου, 2023)

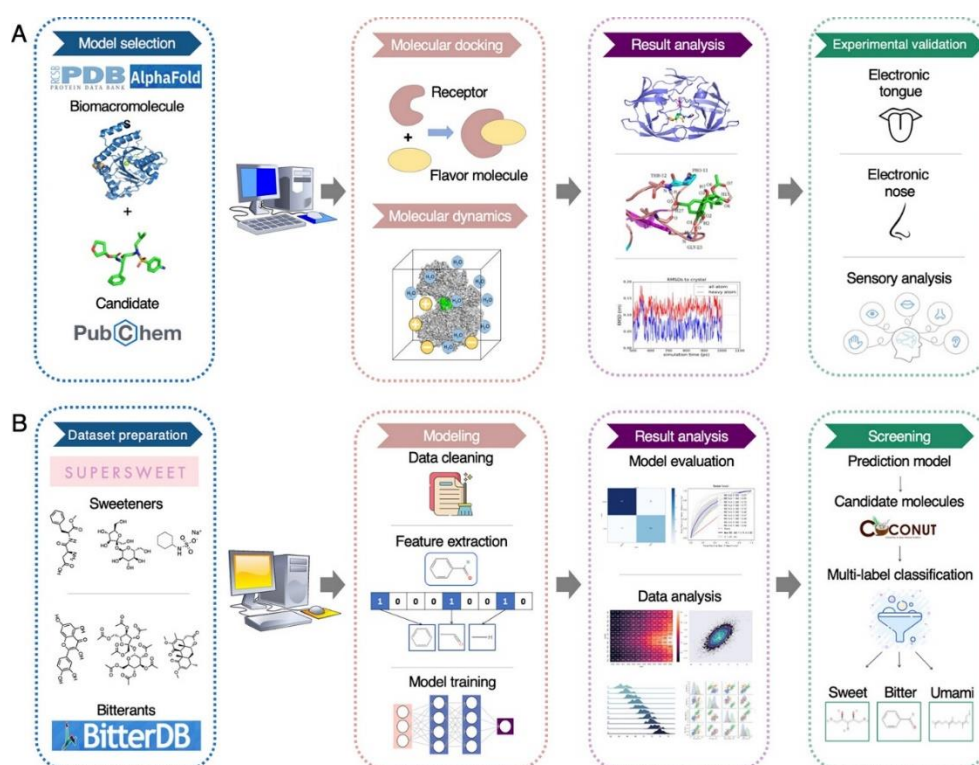
3.2.1 Προετοιμασία βιβλιοθηκών

Πρωταρχικό βήμα στην προετοιμασία μιας βιβλιοθήκης αποτελεί η επιλογή της μορφής των αρχείων, ώστε να επιτευχθεί ο σωστός χειρισμός και η αποθήκευσή τους. Η πιο διαδεδομένη μορφή που συναντάται είναι αυτή των αρχείων SMILES (Simplified Molecular Input Entry Structure), τα οποία αποτελούν αρχεία κειμένου που έχουν τη δυνατότητα να κωδικοποιούν όλες τις δομικές πληροφορίες σε διδιάστατη μορφή. (Κρίτση, 2017)

Η Εικόνα 3.4 παρουσιάζει δύο διαφορετικές μεθοδολογίες για την πρόβλεψη της πικρής γεύσης από τη χημική δομή των ενώσεων. Στο Μέρος Α περιγράφεται η προσέγγιση της μοριακής προσομοίωσης. Αρχικά, γίνεται επιλογή ενός μοντέλου χρησιμοποιώντας δεδομένα από βάσεις, όπως η PDB ProteinDataBank (<https://www.rcsb.org>), AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) και PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), για την επιλογή μακρομορίων και υποψηφίων μορίων γεύσης. Ακολουθεί η προσομοίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ υποδοχέα και μορίου γεύσης μέσω μοριακής πρόσδεσης και η κατανόηση των κινήσεων και σταθεροποιήσεων των συμπλεγμάτων μέσω μοριακής δυναμικής. Τα αποτελέσματα αυτών των προσομοιώσεων, όπως οι δομικές αλλαγές και τα ενεργειακά προφίλ, αναλύονται λεπτομερώς. Τέλος, γίνεται πειραματική επικύρωση των προβλέψεων με τη χρήση ηλεκτρονικής γλώσσας και μύτης. (Κου, 2023)

Στο Μέρος Β περιγράφεται η προσέγγιση μηχανικής μάθησης. Ξεκινά με την προετοιμασία δεδομένων, όπου συγκεντρώνονται δεδομένα γλυκαντικών και πικρών ουσιών

από βάσεις, όπως η SuperSweet (<https://bio.tools/supersweet>) και η BitterDB (<https://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>). Ακολουθεί, η μοντελοποίηση με καθαρισμό δεδομένων, εξαγωγή χαρακτηριστικών και εκπαίδευση μοντέλων μηχανικής μάθησης. Τα αποτελέσματα αξιολογούνται και πραγματοποιείται ανάλυση δεδομένων για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων. Στο τελευταίο βήμα, το μοντέλο πρόβλεψης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση νέων υποψηφίων μορίων και πραγματοποιείται πολυεπίπεδη ταξινόμηση για την κατηγοριοποίηση των μορίων σε κατηγορίες γεύσης όπως γλυκιά, πικρή και ουμάμι.



Εικόνα 3.4 Σχήματα υπολογιστικών στρατηγικών για την εύρεση νέων μορίων γεύσης. (Α) Μοριακή προσομοίωση, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δεδομένων, της προσομοίωσης, της ανάλυσης αποτελεσμάτων και της πειραματικής επικύρωσης. (Β) Σχηματική απεικόνιση της μοριακής μηχανικής μάθησης, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας συνόλων δεδομένων, της μοντελοποίησης, της ανάλυσης αποτελεσμάτων και της επιλογής. (Κου, 2023)

3.3. Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

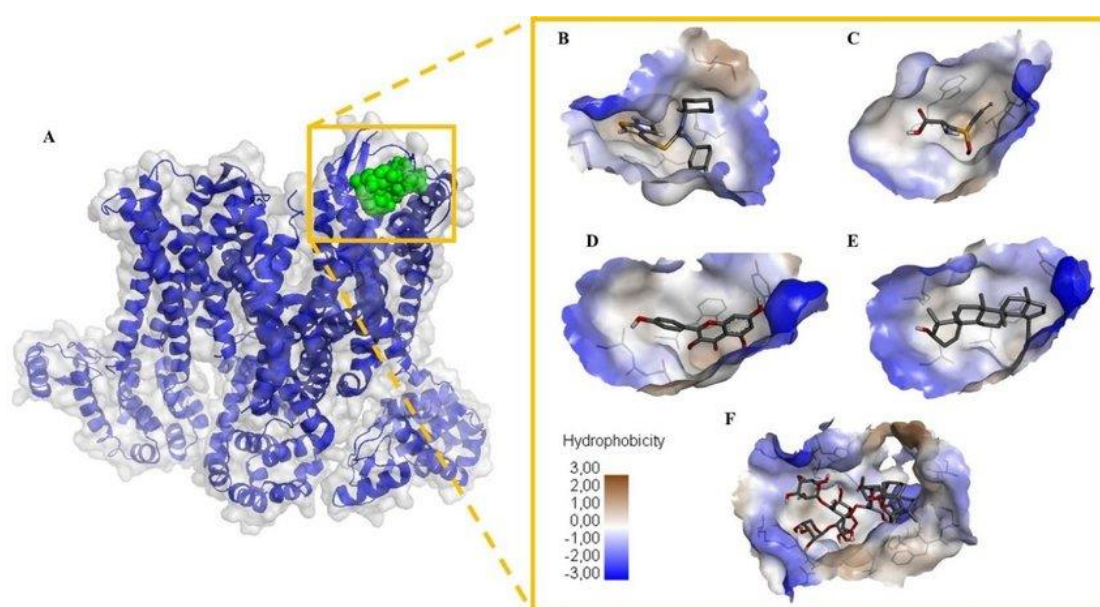
3.4.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί μια υπολογιστική τεχνική, η οποία συμβάλλει στην πρόβλεψη του προτιμώμενου προσανατολισμού πρόσδεσης ενός μορίου-προσδέτη (ligand) σε ένα άλλο μόριο (π.χ. υποδοχέα), με τα δύο αυτά να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να σχηματίσουν ένα σταθερό σύμπλοκο. (Morris, 2008)

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τον προτιμώμενο προσανατολισμό των δεσμευμένων μορίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του ενεργειακού

προφίλ και τη σταθερότητα (όπως συγγένεια και σταθερά δέσμευσης) των συμπλεγμάτων. Αυτό μπορεί να γίνει εφικτό χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση βαθμολόγησης της μοριακής πρόσδεσης (scoring). (Agarwal S, 2016)

Σήμερα, η μοριακή πρόσδεση συχνά χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του προσανατολισμού πρόσδεσης μικρών μορίων στον βιομοριακό τους στόχο (όπως πρωτεΐνη, υδατάνθρακα και νουκλεϊκό οξύ) με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό των παραμέτρων πρόσδεσης (Εικόνα 3.5). Αυτή η διαδικασία παράγει πλήθος νέων δεδομένων που δύνανται να χρησιμοποιηθούν για τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων φαρμάκων και τροφών με καλύτερη αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερη ειδικότητα. (Νάσιου, 2023)

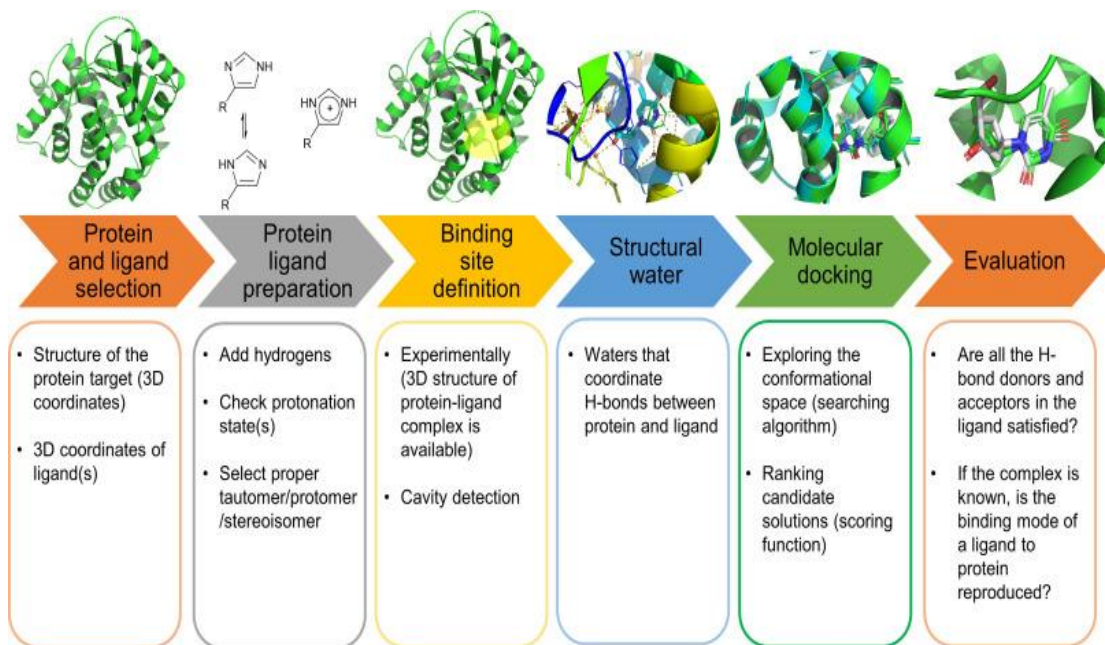


Εικόνα 3.5 Οπτικοποίηση της μοριακής πρόσδεσης μεταξύ δραστικών ενώσεων που βρίσκονται στο σκόρδο και την πρωτεΐνη CCR5 . (A) Θέση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο προσδέτης και με μπλε η πρωτεΐνη. Πρόσδεση: (B) του αναστολέα CCR5 γνωστού ως TAK – 9, (C) της S – αλλυλοκυστεΐνης, της (D) ισοκερκιτρίνης, της (E) λουπεόλης και της (F) τιγογενίνης . Στο κίτρινο πλαίσιο απεικονίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενώσεων και του CCR5 με βάση την υδροφοβικότητα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και τα υπολείμματα αμινοξέων για κάθε ένωση.. (Balqis Balqis, 2022)

3.4.2. Διάγραμμα ροής Μοριακής πρόσδεσης

Η μοριακή πρόσδεση αποτελείται από τα εξής βήματα: Προετοιμασία προσδετών, προετοιμασία πρωτεΐνης, διαδικασία πρόσδεσης και τέλος επεξεργασία αποτελεσμάτων (Madhavi Sastry, 2013).

Παρακάτω παρουσιάζεται η διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης μέσω ενός διαγράμματος ροής. (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Ένα τυπικό διάγραμμα ροής μοριακής πρόσδεσης. Αυτό το διάγραμμα ροής δείχνει τα βασικά βήματα που είναι κοινά σε όλα τα πρωτόκολλα πρόσδεσης. Οι τριδιάστατες δομές του στόχου, το μακρομόριο και το μικρό μόριο πρέπει πρώτα να επιλεγούν και, στη συνέχεια, κάθε δομή πρέπει να προετοιμαστεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις της μεθόδου πρόσδεσης που χρησιμοποιείται. Η θέση πρόσδεσης ορίζεται χρησιμοποιώντας υπολογιστικά εργαλεία ή χρησιμοποιώντας πειραματικές πληροφορίες. Ενεργό ή δομικό νερό θα πρέπει επίσης να συμπεριληφθεί. Μετά την πρόσδεση, τα αποτελέσματα πρέπει να αναλυθούν, επιλέγοντας τους καλύτερους τρόπους σύνδεσης, οι οποίοι βαθμολογούνται και αξιολογούνται. (Francesca Stanzione, 2021)

3.4.3. Προετοιμασία Πρωτεΐνης

Έπειτα από την επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου, πραγματοποιείται λήψη της κρυσταλλικής της δομής από τη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη υφίσταται κατάλληλη τροποποίηση ώστε να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η ορθότητα της δομής της.

Η τροποποίηση γίνεται με βάση τα παρακάτω βήματα:

1. Τη συμπλήρωση των υδρογόνων και των δεσμών.
2. Την αναγνώριση κάθε ομάδας ετεροατόμων και την επεξεργασία των φορτίων τους.
3. Την αφαίρεση μορίων νερού (H₂O) που δεν συμμετέχουν σε γέφυρες μεταξύ του προσδέτη και των αμινοξέων στόχου.

Τέλος, η μέγιστη μείωση της ενέργειας της πρωτεΐνης είναι σημαντική για να επιτευχθεί μια σταθερή δομή. (Madhavi Sastry, 2013) (Κρίση, 2017).

3.4.4. Προετοιμασία Προσδετών

Απαραίτητη κρίνεται και η προετοιμασία των προσδετών πριν από τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης. Αρχικά, προστίθενται υδρογόνα για να εξασφαλιστεί η ορθή χημική δομή. Στη συνέχεια, αφαιρούνται μόρια που δεν υποστηρίζουν την επιθυμητή αλληλεπίδραση, ενώ ρυθμίζεται το pH και εντοπίζονται τυχόν ταυτομερείς δομές. Τελικά, επιλέγεται η πιο κατάλληλη γεωμετρία του προσδέτη μέσω ενέργειας που ελαχιστοποιείται. (Madhavi Sastry, 2013).

3.4.5. Εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης και Αποτελέσματα

Μετά την προετοιμασία της πρωτεΐνης και των προσδετών, ακολουθεί η διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης, σύμφωνα με το διάγραμμα ροής που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.6. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο οι ενώσεις προσδέονται στην πρωτεΐνη-στόχο και να υπολογιστεί η συγγένεια της πρόσδεσης. Κατόπιν, αξιολογούνται τα αποτελέσματα και επιλέγονται οι προσδέτες που εμφανίζουν την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με τον στόχο της μελέτης. (Κρίτση, 2017).

Σκοπός Εργασίας

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση νέων φυσικών ενώσεων που περιέχονται στα τρόφιμα και εν δυνάμει έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν την πικρή γεύση. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης βιβλιοθηκών μορίων. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε σειρά φυσικών ενώσεων, στοχεύοντας στην εύρεση ενώσεων εν δυνάμει αγωνιστών της πικρής γεύσης. Η ανακάλυψη νέων ενώσεων με πικρή γεύση θα συμβάλει στη βιομηχανία τροφίμων παρέχοντας νέες πληροφορίες για τη γεύση των τροφίμων.

Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 4: Επιλογή και Προετοιμασία βιβλιοθηκών φυσικών ενώσεων

4.1. Επιλογή βιβλιοθηκών

Προκειμένου να ληφθεί ο δειγματοχώρος φυσικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Zinc (<https://zinc15.docking.org>). Η βάση δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ελεύθερα μέσω της χρήσης του διαδικτύου. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι παρακάτω τρεις βάσεις δεδομένων: Indofine, Nubbe και Specs. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη φυσικών ενώσεων της εταιρείας Indofine (<https://indofinechemical.com/>), η οποία περιλάμβανε 112 φυσικές ενώσεις, της εταιρείας Nubbe (<https://nubbe.iq.unesp.br/>), η οποία περιλάμβανε 1858 φυσικές ενώσεις και της εταιρείας Specs (<https://www.specs.net/>), η οποία περιλάμβανε 2138 και πραγματοποιήθηκε λήψη των αρχείων σε μορφή .SMILES.

4.2. Προετοιμασία βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων

Μετά την επιλογή των βιβλιοθηκών φυσικών ενώσεων για την παρούσα εργασία, οι ενώσεις προετοιμάστηκαν κατάλληλα μέσω της πλατφόρμας Maestro. Αρχικά, έγινε η εισαγωγή των βιβλιοθηκών στην πλατφόρμα και στη πορεία οι ενώσεις υποβλήθηκαν σε προετοιμασία μέσω της εφαρμογής του προγράμματος LigPrep. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι ενώσεις μετατράπηκαν σε τριδιάστατη μορφή και προστέθηκαν τα απαραίτητα υδρογόνα. Επιπλέον, για να εξασφαλιστούν όλες οι πιθανές ιοντικές μορφές, καθορίστηκε επιθυμητό $pH = 7,0 \pm 0,5$ και χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005.

Έπειτα από την προετοιμασία που περιγράφηκε ο αριθμός των φυσικών ενώσεων των εταιρειών αυξήθηκε σημαντικά, εξαιτίας της δημιουργίας όλων των πιθανών ιοντικών μορφών. Συγκεκριμένα, η βιβλιοθήκη φυσικών ενώσεων της εταιρείας Indofine (<https://indofinechemical.com/>), περιλαμβάνει πλέον 135 φυσικές ενώσεις, παρουσιάζοντας προσθήκη 23 μορφών, της εταιρείας Nubbe (<https://nubbe.iq.unesp.br/>), η οποία περιελάμβανε 1950 φυσικές ενώσεις, έχοντας προστεθεί 92 μορφές και τέλος της εταιρείας Specs (<https://www.specs.net/>), η οποία περιελάμβανε 2600 φυσικές ενώσεις, με την προσθήκη 462 μορφών.

Κεφάλαιο 5: Διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής πρόσδεσης

5.1. Προετοιμασία υποδοχέα για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Ο εξεταζόμενος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο υποδοχέας πικρής γεύσης TAS2R46.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η επιλογή της κατάλληλης δομής του υποδοχέα, χρησιμοποιώντας τη πρωτεϊνική βάση δεδομένων Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Πιο αναλυτικά, στην παρούσα εργασία αξιοποιήθηκε η κρυο-ηλεκτρονική δομή (Cryo-EM-cryo-electron microscopy) του υποδοχέα πικρής γεύσης TAS2R46, συμπλοκοποιημένη με την στρυχνίνη (Κωδικός PDB: 7XP6, ανάλυση 3,01Å) η οποία είναι γνωστό ότι δρα ως αγωνιστής της πικρής γεύσης (Σχήμα 5.1). (Bellon et al., 2004).



Σχήμα 5.1 Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46 με τον αγωνιστή στρυχνίνη.

Στην συνέχεια, έγινε χρήση και πάλι της πλατφόρμας Maestro και πιο συγκεκριμένα με το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard. Κατά την διαδικασία αυτή το pH ρυθμίστηκε σε τιμές 7,0 +/- 0,5.

Ο στόχος της προετοιμασίας ήταν να αφαιρεθούν τα μόρια νερού που δεν συμμετείχαν σε γέφυρες μεταξύ του προσδέτη ή των αμινοξέων του στόχου, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε η ενεργειακή ελαχιστοποίηση του υποδοχέα. Χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005 για να επιτευχθεί μια σταθερή χαμηλής ενέργειας διαμόρφωση του υποδοχέα.

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα μέσω της καταγραφής των αλληλεπιδράσεων της στρυχνίνης με τον υποδοχέα TAS2R46 (Πίνακας 4).

Πίνακας 3: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αγωνιστή στρυχνίνη και του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46

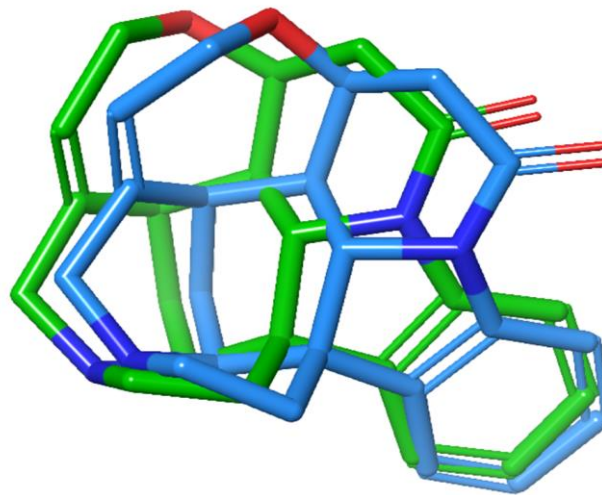
Κρίσιμα Αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Θρεονίνη (Thr) 180	Δεσμός υδρογόνου
Θρυπτοφάνη (Trp) 88	πi - cation
Θρυπτοφάνη (Trp) 88	πi - πi
Γλουταμινικό οξύ (Glu) 265	Δεσμός υδρογόνου

5.2. Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

5.2.1 Επικύρωση μεθόδων Μοριακής Πρόσδεσης

Συνεχίζοντας, έλαβαν χώρα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης στον συμπλοκοποιημένο αγωνιστή στρυχνίνη με χρήση του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (Standard Precision - SP) του προγράμματος Glide, στοχεύοντας στην επικύρωση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου. Για τον σκοπό αυτό απαραίτητη ήταν η δημιουργία πλέγματος (Grid Box), η οποία βασίστηκε στις συντεταγμένες του αγωνιστή στρυχνίνη ($X, Y, Z = 10 \text{ \AA}$).

Μετά τη σύγκριση της υπέρθεσης της κρυο-ηλεκτρονικής δομής της στρυχνίνης με τη δομή που προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) (Σχήμα 5.2), διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος είναι επικυρωμένη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια για πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης σε φυσικές ενώσεις που περιλαμβάνονται στις βιβλιοθήκες Indofine (<https://indofinechemical.com/>), Specs (<https://www.specs.net/>) και Nubbe (<https://nubbe.ig.unesp.br/>). Επίσης, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP, η τιμή της ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) της στρυχνίνης υπολογίστηκε ίση με $-5,441 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.2 Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Ο αγωνιστής της κρυσταλλικής δομής αναπαριστάται με χρώμα γαλάζιο και με πράσινο χρώμα αναπαριστάται ο αγωνιστής, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP.

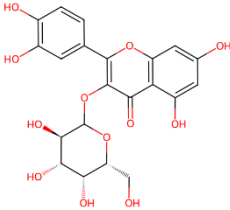
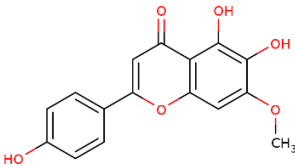
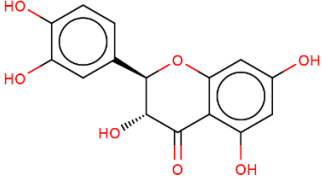
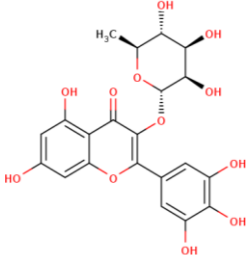
5.2.2 Αποτελέσματα εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Επόμενο στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-SP στις φυσικές ενώσεις των βιβλιοθηκών και η αποτίμηση των αποτελεσμάτων της τεχνικής της μοριακής πρόσδεσης. Μέσα από τα αποτελέσματα αναδείχθηκαν 4685 φυσικές ενώσεις, οι οποίες αξιολογήθηκαν βάσει των ακόλουθων κριτηρίων:

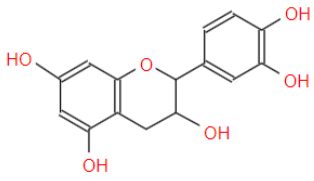
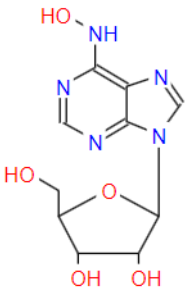
1. Την ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων, βάσει των τιμών Glide-score καθώς επίσης και
2. Από την ικανότητα αλληλεπίδρασης ή όχι των εξεταζόμενων ενώσεων με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα (Πίνακας 4).
3. Από τις αλληλεπιδράσεις των εξεταζόμενων ενώσεων με πλήθος αμινοξέων.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω κριτήρια, διαπιστώθηκε ότι μόνο οι 10 (Πίνακας 5) από τις 4685 φυσικές ενώσεις συμμορφώνονται με τα προαναφερθέντα κριτήρια.

Πίνακας 4: Οι χημικές δομές των επιλεγμένων ενώσεων μέσω της χρήσης του αλγόριθμου Glide-SP. Δίνονται οι κωδικοί Indofine/NuBBE/Specs, το Glide-score, η ονομασία τους και η διδιάστατη δομή τους

A/A	Κωδικός Indofine	Glide-score(kcal · mol ⁻¹)	Ονομασία κατά IUPAC	Ονομασία	Δομή
1	Indofine 06-047	-6,208	Quercetin-3-galactoside		
A/A	Κωδικός NuBBE	Glide-score(kcal · mol ⁻¹)	Ονομασία κατά IUPAC	Ονομασία	Δομή
2	NuBBE_126	-5,784	5,6-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4H-chromen-4-one	Sorbifolin	
3	NuBBE_139	-6,313	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one	Taxifolin	
4	NuBBE_162	-5,037	5,7-dihydroxy-3-(((2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methoxyoxan-2-yl)oxy)-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one	Myricetrin, 3-O-α-rhamnosyl myricetin	

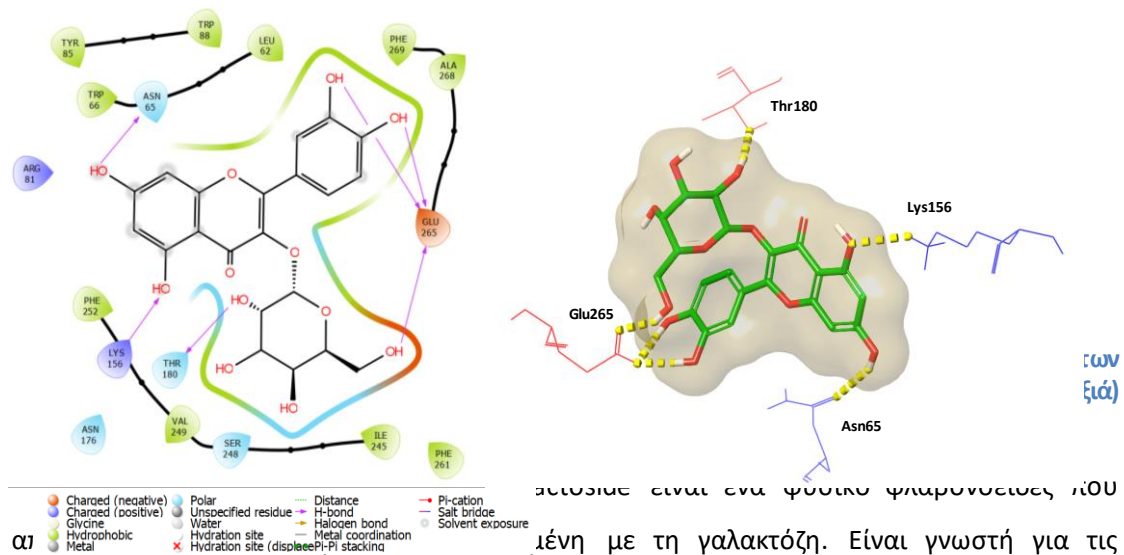
5	NuBBE_217	-5,782	(1R,3aS,4S,8aR)-7-(2-hydroxypropan-2-yl)-1,4-dimethyl-2,3,3a,5,6,8a-hexahydroazulene-1,4-diol	Rel(-)- (7S,9S,10S)- 3,9,12-trihydroxycalamenene	
6	NuBBE_218	-5,321	(1R,2R,4S)-4-[(2S)-1-hydroxypropan-2-yl]-1,6-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2,7-diol	Rel(+)- (7S,9R,10S)- 3,9,12-trihydroxycalamenene	
7	NuBBE_281	-6,155	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy)methyl)oxan-2-yl)oxy)-4H-chromen-4-one	Kaempferol- 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranoside	
8	NuBBE_906	-5,271	6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methyl-3-(methylsulfanyl)-1H,2H,3H,4H,10H,10aH-piperazino[1,2-a]indole-1,4-dione	Colletopiperazine	
A/A	Κωδικός Specs	Glide-score(kcal·mol ⁻¹)	Όνομασία κατά IUPAC	Όνομασία	Δομή

9	AE-765/20006021	-5,940		Epicatechin	
10	AG-670/20238004	-5,693		Nebularine	

Ο τρόπος πρόσδεσης των προκρινόμενων ενώσεων με τον εξεταζόμενο υποδοχέα πικρής γεύσης απεικονίζονται στα Σχήματα 5.3-5.12 και περιγράφονται επεξηγηματικά παρακάτω:

- Ένωση 1: *Quercetin-3-galactoside*

Η ένωση 1 (Σχήμα 5.3) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το κρίσιμο αμινοξύ Glu265 και με την υδροξυλομάδα του γλυκοζιτικού δακτυλίου. Επιπλέον, το κρίσιμο αμινοξύ Thr180 αλληλεπιδρά με την υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου Α, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Τέλος, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με τα αμινοξέα Lys156 και Asn65, με τις υδροξυλομάδες στις θέσεις 4' και 3' του δακτυλίου Β αντίστοιχα, οι οποίοι σταθεροποιούν περαιτέρω την πρόσδεση. Ο δακτύλιος Β αποτελεί το φαινολικό μέρος της χημικής ένωσης.

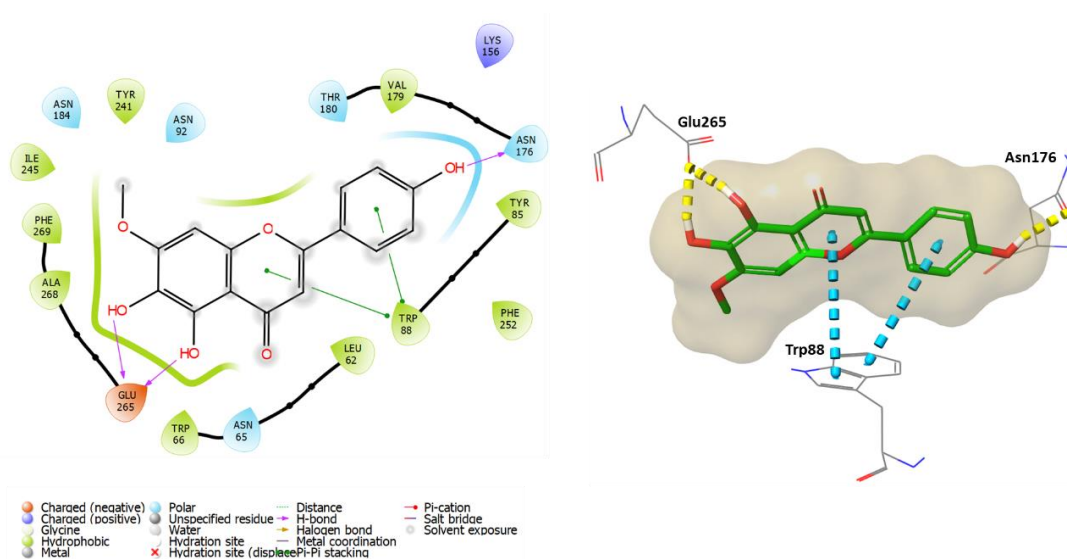


αντιοξειδωτικές της ικανότητες, προσφέροντας προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Η γεύση της κερκετίνης, και των παραγώγων της, περιγράφεται συχνά ως πικρή. Τα αλκοολούχα διαλύματα της κερσετίνης έχουν πολύ πικρή γεύση και η ένωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συμπληρώματα διατροφής ή και σε τρόφιμα. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- Ένωση 2: *Sorbifolin*

Η ένωση 2 (Σχήμα 5.4) αλληλεπιδρά μέσω δεσμού υδρογόνου με το κρίσιμο αμινοξύ Glu265 στις θέσεις 11 και 13 των υδροξυλομάδων του δακτυλίου. Επιπλέον, σχηματίζεται ένας πi- πi δεσμός με το αμινοξύ Trp88. Επίσης, σχηματίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ της υδροξυλομάδας στη θέση 1 του δακτυλίου και του αμινοξέος Asn176.



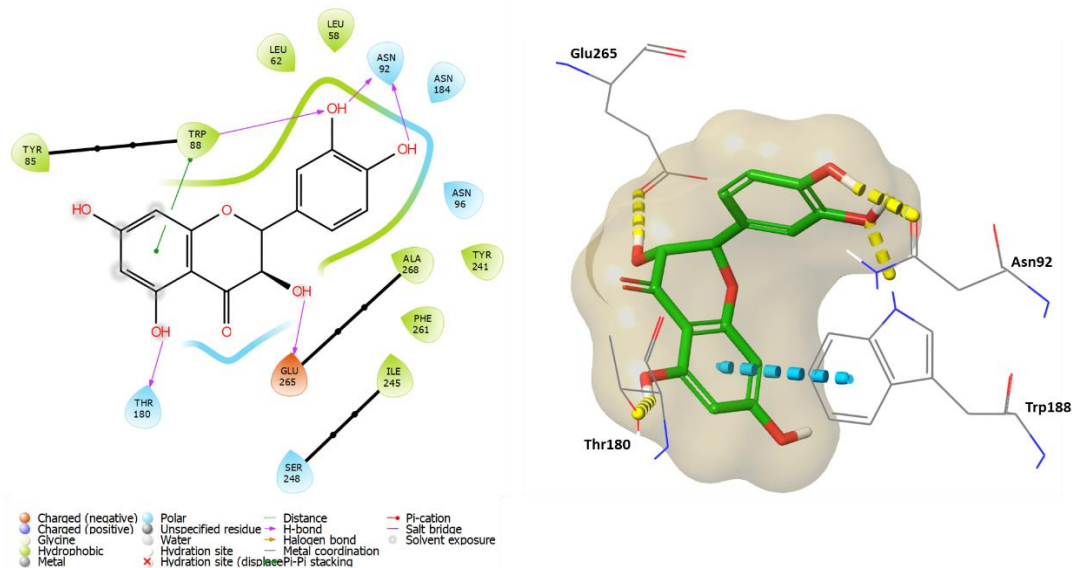
Σχήμα 5.4 (Δεξιά) Τριδιάστατη (3D) και (Αριστερά) διδιάστατη (2D) απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *Sorbifolin* (Ένωση 2) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με χρώμα κίτρινο και ο πi- πi δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Η χημική ένωση *Sorbifolin* ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αποτελείται από μια μονομεθοξυφλαβόνη και μια τριυδροξυφλαβόνη. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Όσον αφορά τις βιολογικές της ιδιότητες, πρόκειται για αντιοξειδωτικό, με ικανότητα να αναστέλλει την μυελοϋπεροξειδάση και την γλυκοσιδάση. Με αυτό τον τρόπο, επιβραδύνεται η πέψη των υδατανθράκων και μειώνεται η απορρόφηση της γλυκόζης. (E. Xourgia, 2019)

- Ένωση 3: Taxifolin

Η ένωση 3 (Σχήμα 5.5) παρουσιάζει παρόμοιο μοτίβο αλληλεπιδράσεων με την στρυχνίνη, καθώς οι υδροξυλομάδες των δακτυλίων αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με όλα τα κρίσιμα αμινοξέα Glu265, Thr180 και Trp88. Επιπλέον, αναπτύσσει π-π δεσμό με το αμινοξύ Trp88. Τέλος, αναπτύσσονται δύο δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις υδροξυλομάδες της ένωσης 3 και του αμινοξέος Asn92, οι οποίοι ενισχύουν την σταθεροποίηση της πρόσδεσης.



Σχήμα 5.5 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Taxifolin (Ένωση 3) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με χρώμα κίτρινο και ο π-π δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Είναι ένα συζυγές οξύ μιας (+)-ταξιφολίνης (1-) και ένα εναντιομερές μιας (-)-ταξιφολίνης. Ανήκει επίσης στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:17948>)

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA), η ταξιφολίνη προορίζεται για χρήση ως συστατικό σε μη αλκοολούχα ποτά σε επίπεδο που δεν υπερβαίνει τα 0,02 g/L, σε αρωματισμένο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα σε επίπεδο που δεν υπερβαίνει τα 0,02 g/kg και σε προϊόντα σοκολάτας σε επίπεδο που δεν υπερβαίνει τα 0,07 g /κιλό. Θεωρείται επίσης γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές. (Generally Recognised as Safe-GRAS). Ηλεκτρονική πηγή: (<https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=916>)

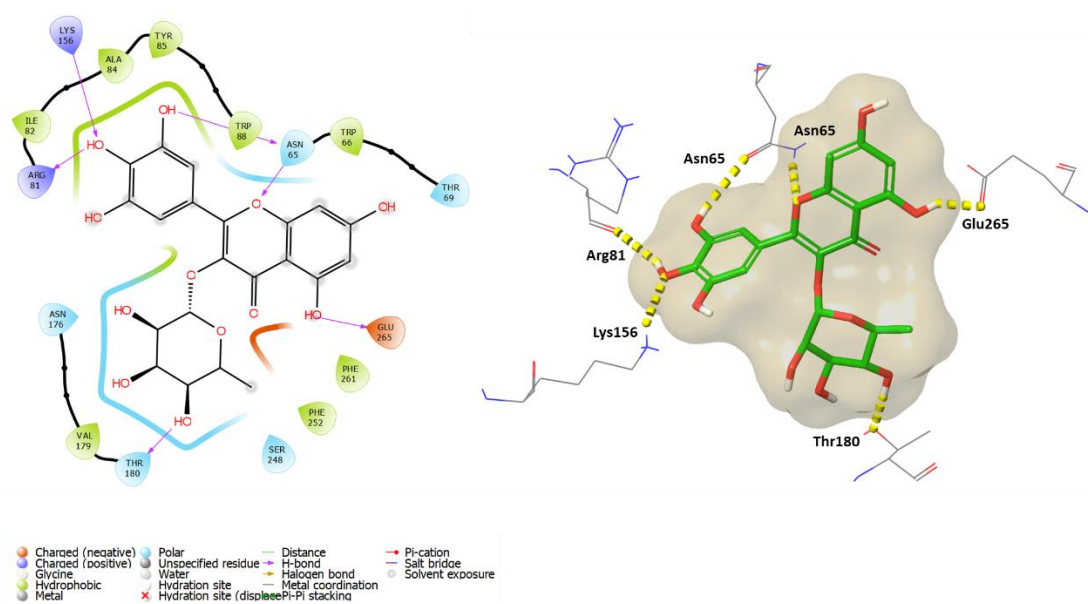
Σε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, η ένωση 3 μετά από αναζήτησή της στην βάση δεδομένων BitterDB, βρέθηκε μέσα στις πικρές ενώσεις της βάσης αυτής. Αξίζει να ανφερθεί ότι, η συγκεκριμένη ένωση φαίνεται να είναι αγωνιστής των υποδοχέων πικρής

γεύσης TAS2R14 και TAS2R39. Ηλεκτρονική πηγή:

(<https://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>)

• Ένωση 4: *Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin*

Η ένωση 4 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τον υποκαταστάτη στην θέση 1 του δακτυλίου με το αμινοξύ Glu265 (Σχήμα 5.6). Επιπλέον, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μεταξύ του υποκαταστάτη της θέσης 4 του δακτυλίου με την Thr180. Επιπλέον αναπτύσσονται δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων και του αμινοξέος Asn65, οι οποίοι σταθεροποιούν περαιτέρω την πρόσδεση. Τέλος, αναπτύσσεται δεσμός υδρογόνου με το αμινοξύ Arg81 και Lys156 και τις υδροξυλομάδες των δακτυλίων στις θέσεις 6 και 2 αντίστοιχα, προσφέροντας περαιτέρω σταθερότητα στην πρόσδεση.



Σχήμα 5.6 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin* (Ένωση 4) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου

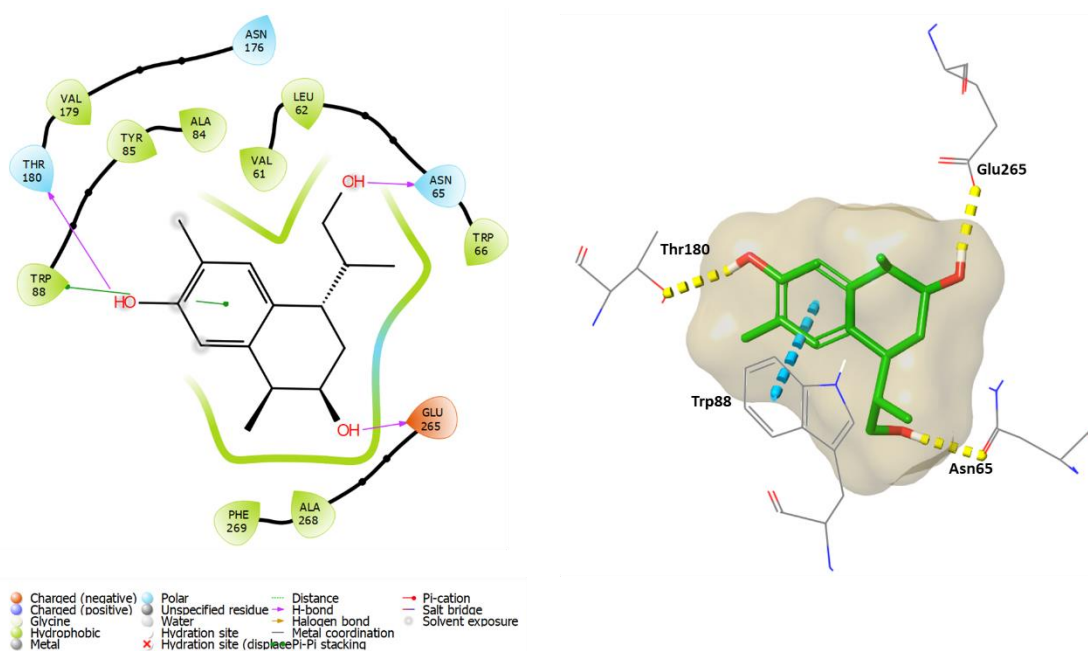
Η *Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin* ή μυρικιτρίνη (1-) είναι ένα φλαβονοειδές οξοανιόν που είναι η συζευγμένη βάση της μυρικιτρίνης που προκύπτει από την εκλεκτική αποπρωτονίωση της 7-υδροξυ ομάδας. Τα κύρια είδη βρίσκονται σε pH 7,3. Ηλεκτρονική πηγή:(<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:144432>)

Διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προστατεύοντας τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. (Agnihotri VK, 2008)

• Ένωση 5: *Rel-(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene*

Στην ένωση 5 (Σχήμα 5.7), παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα που είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται και στον αγωνιστή στρυχνίνη. Αρχικά, σχηματίζεται πi-πi δεσμός με το αμινοξύ Trp88. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στην θέση 14 και του κρίσιμου αμινοξέος Glu265. Επόμενη αλληλεπίδραση παρατηρείται στη θέση 1 μεταξύ της υδροξυλομάδας της ένωσης και του αμινοξέος Thr180. Επίσης, δημιουργείται δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στη θέση 18 του δακτυλίου και του αμινοξέος Asn65.

Ηλεκτρονική πηγή: (NuBBE- <https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>)



Σχήμα 5.7 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rel(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene (Ένωση 5) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο πi-πi δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

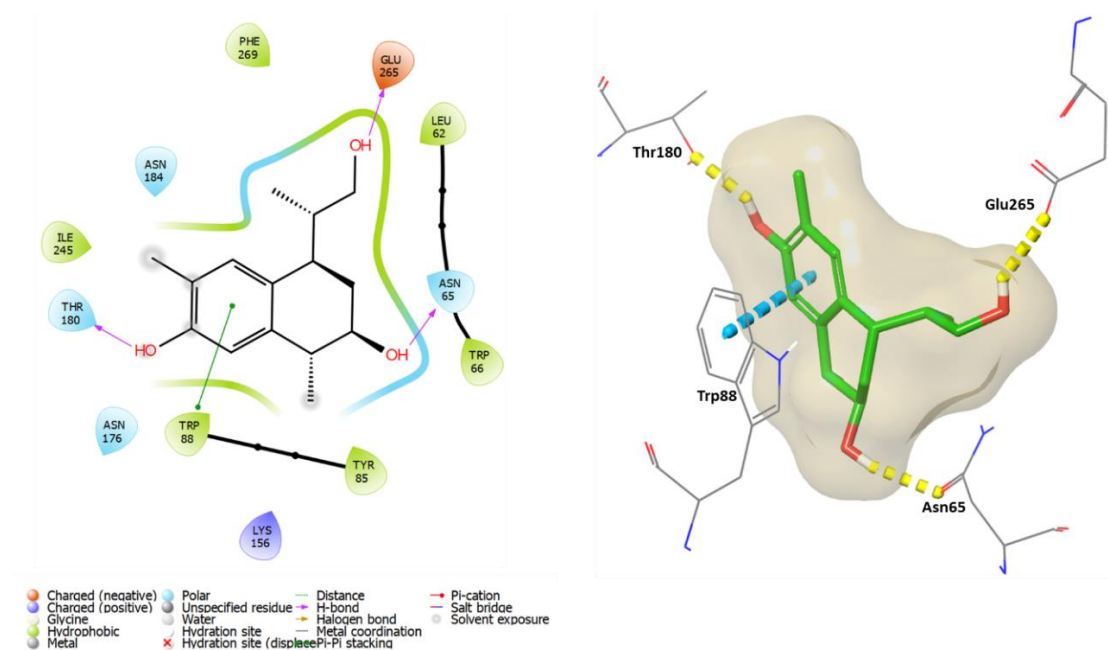
Η ένωση 5 δεν ανήκει, όπως οι προηγούμενες χημικές ενώσεις, στην κατηγορία των φλαβονοειδών, αλλά στην κατηγορία των τερπενίων. Η συγκεκριμένη ένωση έχει απομονωθεί από τον μικροοργανισμό *Valsaceae Phomopsis cassia* και δεν παρουσιάζει καμία αναγνωρισμένη βιολογική ιδιότητα.

Ηλεκτρονική πηγή: (NuBBE- <https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>)

- **Ένωση 6:** Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene

Η ένωση 6 (Σχήμα 5.8) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στην θέση 17 και του κρίσιμου αμινοξέος Glu265. Επόμενη αλληλεπίδραση παρατηρείται στη θέση 1 μεταξύ της υδροξυλομάδας της ένωσης και του αμινοξέος Thr180. Σχηματίζεται πi-πi δεσμός με την Trp88, καθώς επίσης ένας ακόμη δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στην

θέση 14 του δακτυλίου και του αμινοξέος Asn65. Ηλεκτρονική πηγή: (NuBBE-
<https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>)



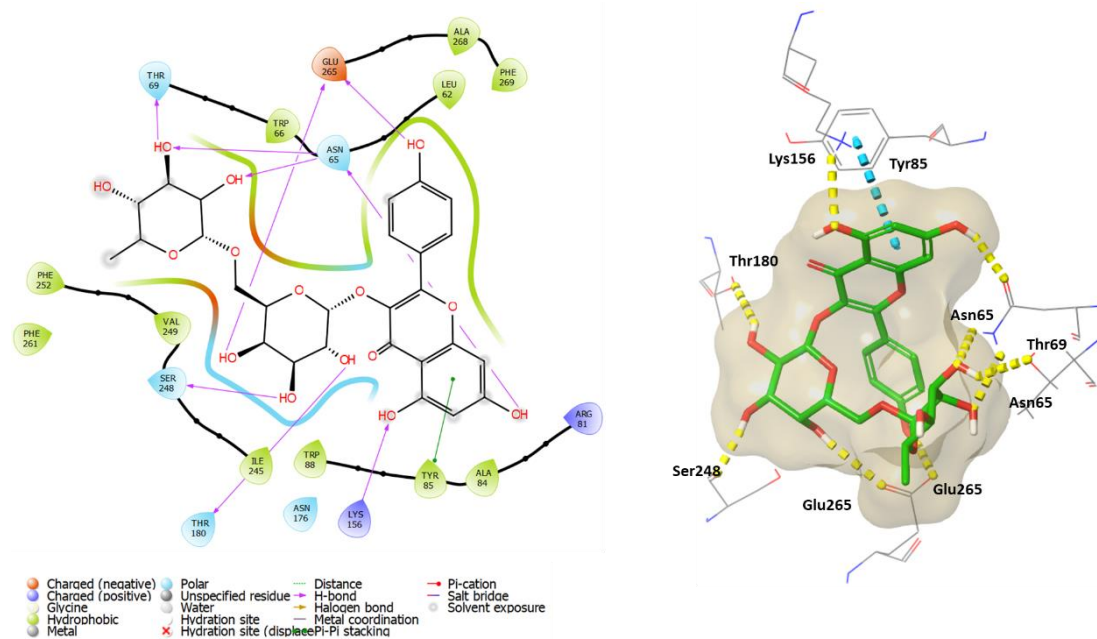
Σχήμα 5.8 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene (Ένωση 6) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο ρι-ρι δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Η ένωση (1R,3aS,4S,8aR)-7-(2-hydroxypropan-2-yl)-1,4-dimethyl-2,3,3a,5,6,8a-hexahydroazulene-1,4-diol είναι ένα οργανικό μόριο που ανήκει όπως και το στερεοϊσομερές του (Ένωση 5) στην κατηγορία των τερπενίων. Η συγκεκριμένη ένωση έχει απομονωθεί από τον μικροοργανισμό *Valsaceae Phomopsis cassia*. Η βάση της δομής είναι ένα αζουλένιο, που είναι ένας δακτύλιος με δέκα άτομα άνθρακα και χαρακτηριστική μπλε απόχρωση. Τέλος, στη θέση 7 υπάρχει ένας υδροξυλιωμένος προπυλο υποκαταστάτης, δηλαδή ένα προπύλιο ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) με υδροξυλομάδα (OH) στη δεύτερη θέση. (Riyadi SA, 2023)

- **Ένωση 7:** *Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside*

Η ένωση 7 αναπτύσσει έναν δεσμό ρι-ρι με το αμινοξύ Tyr85, στην θέση 7 του δεύτερου δακτυλίου (Σχήμα 5.9). Επιπλέον, αναπτύσσονται δύο δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις υδροξυλομάδες της θέσης 5 του πρώτου δακτυλίου και της θέσης 4 του δεύτερου δακτυλίου και του αμινοξέος Glu265. Επίσης, τρεις δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων και του αμινοξέος Asn65 βρίσκονται στις θέσεις 1,3 του πρώτου δακτυλίου και 6 του δεύτερου, γεγονός που συμβάλλει στη σταθεροποίηση της πρόσδεσης. Αντίστοιχα, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με την Thr180 και την υδροξυλομάδα στη θέση 4 του πρώτου δακτυλίου.

Επιπλέον, δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται με τις υδροξυλομάδες και τα αμινοξέα Thr69 στην θέση 6 του πρώτου δακτυλίου, Lys156 στην θέση 4 του πρώτου δακτυλίου και Ser248 στην θέση 4 του δεύτερου δακτυλίου.

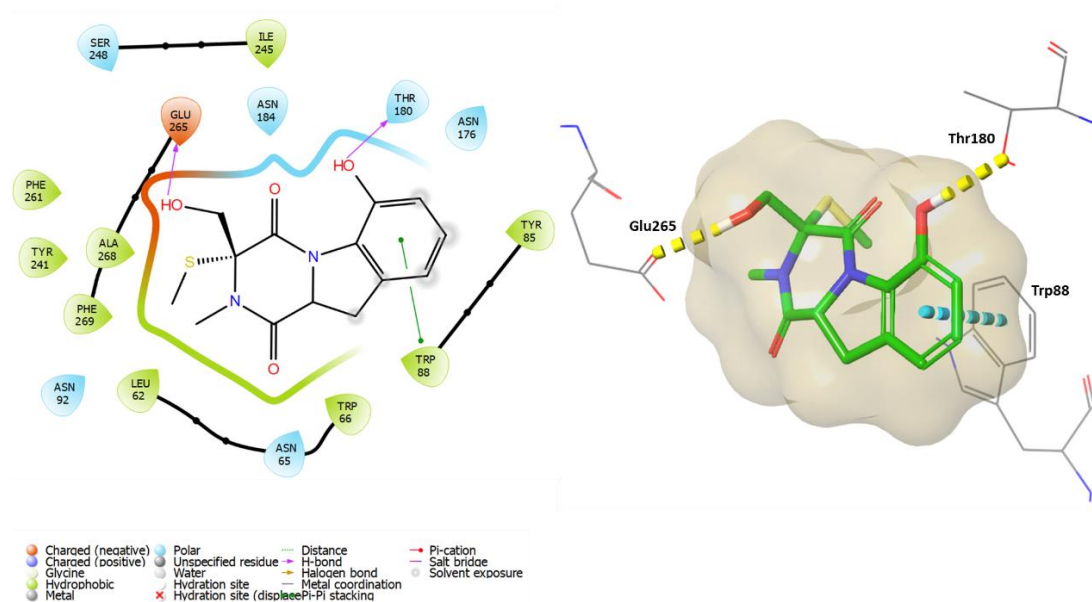


Σχήμα 5.9 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside (Ένωση 7) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο π - π δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Η ένωση 7 ανήκει επίσης στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Είναι ένα φλαβονοειδές, το οποίο αποτελείται από τη φλαβονοειδή ένωση καμφερόλη συνδεδεμένη με δύο σάκχαρα, τη ραμνόζη και τη γαλακτόζη. Η συγκεκριμένη χημική ένωση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς για να υπάρχει πληθώρα πληροφοριών για τη δράση της. (CARDOSO, SILVA, CASTRO-GAMBOA, & BOLZANI, 2005)

- Ένωση 8: *Colletopiperazine*

Η ένωση 8 (Σχήμα 5.10) παρουσιάζει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με εκείνες του αγωνιστή στρυχνίνη. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζεται ένας π - π δεσμός με την Trp88. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα της πιπεραζίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Glu265 και επιπλέον η υδροξυλομάδα του δακτυλίου αλληλεπιδρά με την Thr180.

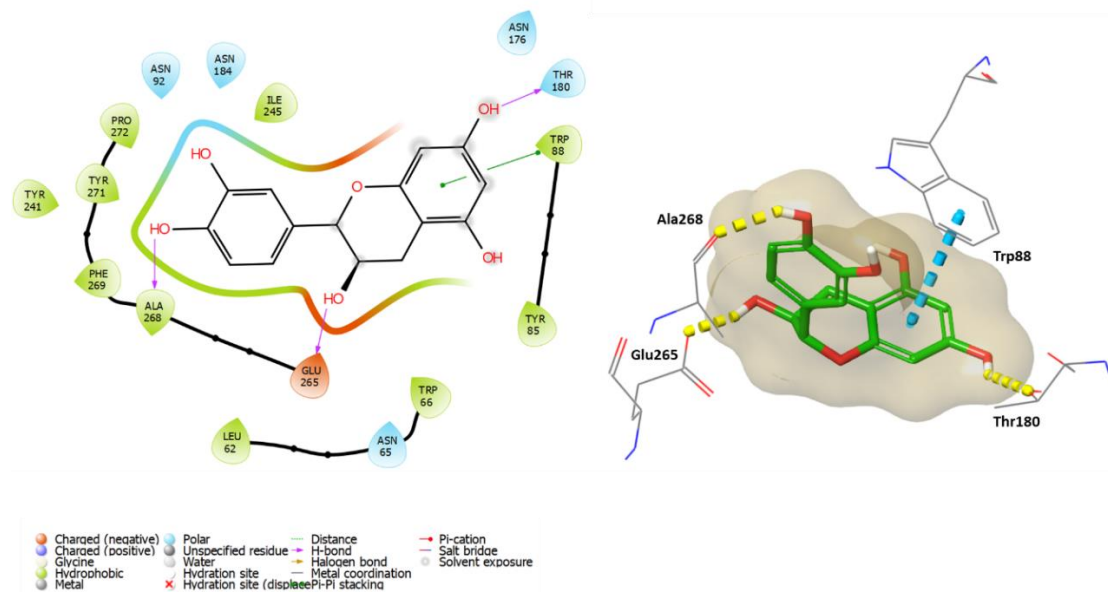


Σχήμα 5.10 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Colletoriperazine (Ένωση 8) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με γαλάζιο χρώμα ο ri-ri δεσμός

Η Colletoriperazine είναι ένα βιοενεργό φυσικό προϊόν που έχει ανακαλυφθεί στους είδος των μυκήτων *Colletotrichum gloeosporioides*. Η κολλετοπιπεραζίνη ανήκει στην κατηγορία των καρβοξυλικών οξέων και συγκεκριμένα είναι ένα ινδολυλοκαρβοξυλικό οξύ. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:210337>)

- Ένωση 9: *Epicatechin*

Στην ένωση 9 (Σχήμα 5.11) γίνεται εμφανής η δημιουργία ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στη θέση 14 και της Ala268. Επιπλέον, η υδροξυλομάδα στη θέση 19 αλληλεπιδρά με το κρίσιμο αμινοξύ Glu265 και η υδροξυλομάδα στη θέση 1 με το αμινοξύ Thr180. Επίσης, δημιουργείται ένας ri-ri δεσμός με το κρίσιμο αμινοξύ Trp88.



Σχήμα 5.11 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Epicatechin (Ένωση 9) με τον υποδοχέα TAS2R46 . (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο πi-πi δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Η επικατεχίνη είναι μία από τις κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, συγκεκριμένα ένα είδος κατεχίνης, που απαντάται σε πολλά φυτικά τρόφιμα και ποτά, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να βρίσκεται στο κακάο και τα παράγωγά του. (Baba, 2000)

Η γεύση της επικατεχίνης είναι γενικά στυφή και πικρή, γι' αυτό και τα τρόφιμα που την περιέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως η μαύρη σοκολάτα και το κακάο, έχουν συνήθως πικρή γεύση. Η επικατεχίνη συμβάλλει στην πικράδα και τη στυφή γεύση του τσαγιού και του κόκκινου κρασιού. (Thorngate III, 1995)

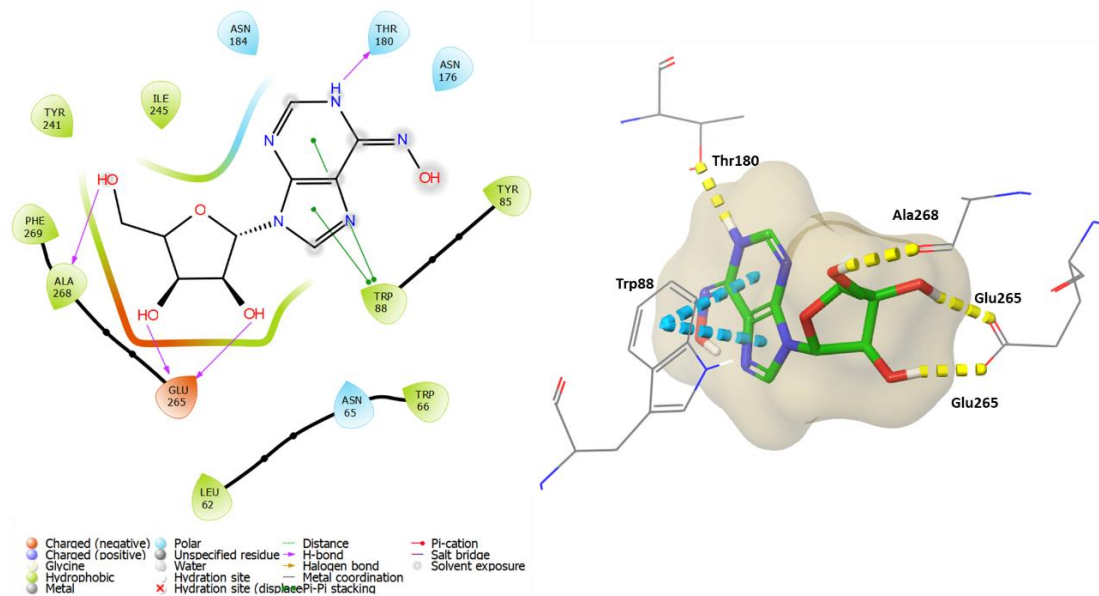
Η επικατεχίνη έχει μελετηθεί εκτενώς για τις πιθανές της ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία. Αρχικά, είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, η επικατεχίνη συνδέεται με τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η επικατεχίνη μπορεί να έχει προστατευτική δράση στο νευρικό σύστημα και να συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου νευροεκφυλιστικών παθήσεων. (Abdulkhaleq, 2017)

Σε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, η ένωση 9 μετά από αναζήτησή της στην βάση δεδομένων BitterDB, βρέθηκε ότι ανήκει στις πικρές ενώσεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι, η συγκεκριμένη ένωση φαίνεται να είναι αγωνιστής και των υποδοχέων πικρής γεύσης TAS2R4, TAS2R5 και TAS2R39.

Ηλεκτρονική πηγή: (<https://bitterdb.agri.huji.ac.il/compound.php?id=813>)

- Ένωση 10: *Nebularine*

Στην ένωση 10, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.12, αναπτύσσεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας στη θέση 6 και της Ala268, που προσδίδει σταθερότητα στην μοριακή πρόσδεση. Επιπλέον, παρατηρείται αλληλεπίδραση με το κρίσιμο αμινοξύ Glu265 και των υδροξυλομάδων στις θέσεις 2'(R) και 3'(S). Επίσης, το αμινοξύ Thr180 αλληλεπιδρά μέσω δεσμού υδρογόνου με το υδρογόνο που συνδέεται με το άζωτο στη θέση 1. Τέλος, δημιουργείται ένας ρι-ρι δεσμός με το κρίσιμο αμινοξύ Trp88 στον δακτύλιο της πουρίνης.



Σχήμα 5.12 (Δεξιά) 3D και (Αριστερά) 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *Nebularine* (Ένωση 10) με τον υποδοχέα TAS2R46. (Δεξιά) Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με χρώμα κίτρινο και ο ρι-ρι δεσμός με χρώμα γαλάζιο.

Η νεμπουλαρίνη είναι ένας ριβονουκλεοζίτης πουρίνης, όπου η 9H-πουρίνη είναι συνδεδεμένη με ένα υπόλειμμα βήτα-D-ριβοφουρανοζυλίου στη θέση 9 μέσω ενός γλυκοσιδικού (N-γλυκοζυλ) δεσμού. Ο νουκλεοσίδης πουρίνης είναι ένας μεταβολίτης που βρίσκεται ή παράγεται από την *Escherichia coli* (στέλεχος K12, MG1655). Ηλεκτρονική πηγή: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/ChEBI>), (<https://ecmdb.ca/compounds/M2MDBO03628>)

Αξίζει να επισημανθεί ότι εκτός από την αντικαρκινική της δράση, η νεμπουλαρίνη μπορεί να αναστείλει την ενζυμική δραστηριότητα της αδενυλοκυκλάσης, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων κυκλικής AMP (cAMP) στο κύτταρο. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nebularine>)

Έχοντας ολοκληρωθεί η εφαρμογή της μοριακής πρόσδεσης παρουσιάζονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

Αρχικά, εξετάζοντας την ικανότητα πρόσδεσης των φυσικών ενώσεων με βάση τα αποτελέσματα του Glide-score παρατηρείται ότι η ένωση 6 (Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene) με Glide-score= -5,321, η ένωση 7 (Rel-(-)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene) με Glide-score= -5,782 και η ένωση 10 (Nebularine) με Glide-score= -5,693, παρουσιάζουν τιμές ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) πολύ κοντινές με τις τιμές ενέργειας πρόσδεσης της στρυχνίνης μετά την χρήση του αλγορίθμου SP (-5,441 kcal·mol⁻¹). Το γεγονός αυτό δρα θετικά στην πρόβλεψη ότι οι ενώσεις αυτές θα χαρακτηριστούν ως πικρές, καθώς η στρυχνίνη αποτελεί ήδη αναγνωρισμένο αγωνιστή του εξεταζόμενου υποδοχέα TAS2R46. Οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις βρίσκονται σε εύρος τιμών -6,313 έως -5,037, τιμές Glide-score οι οποίες κρίνονται ικανοποιητικές.

Στην συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη την αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα παρατηρείται ότι σε ποσοστό 70% (*Taxifolin*, (Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene), (Rel-(-)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene), (*Colletopiperazine*), (*Epicatechin*), (*Nebularine*)), οι χημικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με όλα τα κρίσιμα αμινοξέα. Εξαιρείται η ένωση 1 (*Quercetin-3-galactoside*) η οποία δεν αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Trp88, η ένωση 2 (*Sorbifolin*) η οποία δεν σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Thr180 και η ένωση 4 (μυρικιτρίνη (1-)) και η ένωση 7 (*Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopy-ranosyl-(1→6)-β-D-galactopy-ranoside*), οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με το αμινοξύ Trp88. Το αποτέλεσμα αυτό εκφράζει το ενδεχόμενο οι ενώσεις αυτές να μην προτεραιοποιηθούν για βιολογική δοκιμή.

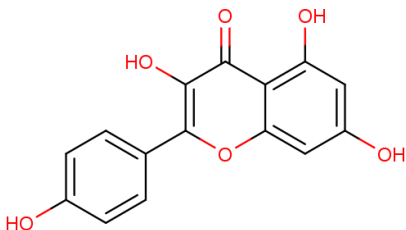
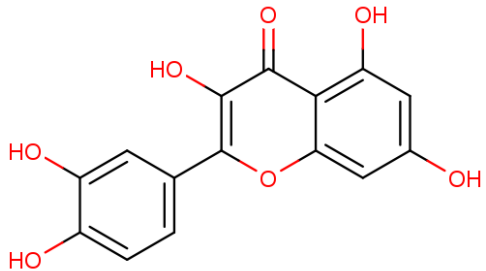
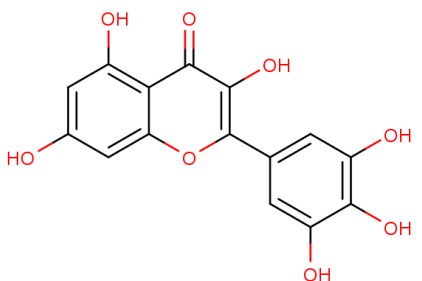
Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις των εξεταζόμενων ενώσεων με την ύπαρξη αμινοξέων που προσφέρουν σταθερότητα στη μοριακή πρόσδεση, παρατηρείται ότι η ένωση 7 (*Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopy-ranosyl-(1→6)-β-D-galactopy-ranoside*) παρουσιάζει τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις (με τα αμινοξέα Thr69, Lys156, Ser248, Asn65), ακολουθεί η ένωση 4 (μυρικιτρίνη (1-)) η οποία αλληλεπιδρά επίσης με ακόμη 3 αμινοξέα (Lys156, Arg81, Asn65), εκτός των κρίσιμων, που προσδίδουν σταθερότητα στην πρόσδεση. Όλες οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις σταθεροποιούνται με την αλληλεπίδραση ενός παραπάνω αμινοξέος. Σε ποσοστό 50% των χημικών ενώσεων ((*Quercetin-3-galactoside*), (μυρικιτρίνη(1-)), (Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene), (Rel-(-)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene), (*Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopy-ranosyl-(1→6)-β-D-galactopy-ranoside*)), περαιτέρω αλληλεπίδραση παρατηρείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων και του αμινοξέος Asn65. Το αυξημένο πλήθος αλληλεπιδράσεων με

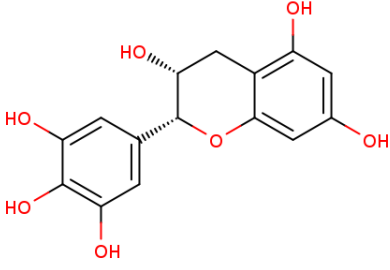
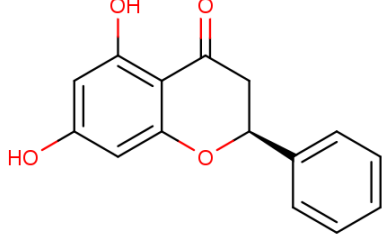
αμινοξέα γενικά δρα συνεργετικά στη σταθεροποίηση της πρόσδεσης, ωστόσο μεγάλη προσόχη απαιτείται να δωθεί στις ενώσεις 1 (*Quercetin-3-galactoside*), 4 (μυρικιτρίνη(1-), 7 (*Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopy-ranosyl-(1→6)-β-D-galactopy-ranoside*).

Από τις 10 χημικές ενώσεις που προέκυψαν από την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης οι 7 περιλαμβάνονται σε κατηγορίες φυσικών ενώσεων ήδη επιβεβαιωμένων για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, όπως είναι τα φλαβονοειδή και τα πεπτιδία. Σε ποσοστό 70% οι ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών, που στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν πικρή γεύση. Αυτό αποτελεί θετικό συμπέρασμα των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, καθώς ενισχύεται η θεωρητική εκτίμηση για την αγορά των προτεινόμενων φυσικών ενώσεων και τη βιολογική δοκιμή τους.

Ακολουθεί πίνακας με φλαβονοειδή τα οποία έχουν αποδεικτεί ότι προσδίδουν πικρή γεύση. Ηλεκτρονική πηγή: (<https://nubbe.ig.unesp.br/portal/nubbe-search.html>, <https://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>)

Πίνακας 5: Χαρακτηρισμένα φλαβονοειδή με πικρή γεύση: (αριστερά) η ονομασία των φλαβονοειδών, (δεξιά) η 2D διαμόρφωσή τους

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	2D ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ
Kaempferol	
Quercetin	
Myricetin	

<p>(-)-Epigallocatechin</p>	
<p>Pinoцемbrin</p>	

Ως τελικό στάδιο εξετάστηκε η παρουσία των 10 χημικών ενώσεων που προέκυψαν από την μοριακή πρόσδεση στη βάση δεδομένων BitterDB. Η βάση δεδομένων BitterDB (<https://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>) έχει ως στόχο να συγκεντρώνει πληροφορίες σχετικά με φυσικές και συνθετικές ενώσεις με πικρή γεύση, και τους συγγενείς υποδοχείς πικρής γεύσης τους. Το αποτέλεσμα ήταν ότι, από τις 10 αυτές χημικές ενώσεις, μόνο οι δύο βρέθηκαν να είναι χαρακτηρισμένες ως πικρές, σύμφωνα με την βάση δεδομένων BitterDB. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί δείκτη επικύρωσης της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε. Συγκεκριμένα, η ένωση Επικατεχίνη (Epicatechin) και η ένωση Ταξιφολίνη (Taxifolin) που επιλέχθηκαν ως πιθανοί αγωνιστές του υποδοχέα TAS2R46 βρίσκονται στη βάση δεδομένων BitterDB, γεγονός που επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα του πειραματικού μέρους. Επιπλέον, η χημική ένωση Επικατεχίνη φαίνεται να είναι αγωνιστής και των υποδοχέων πικρής γεύσης TAS2R4, TAS2R5 και TAS2R39, ενώ η Taxifolin φαίνεται να είναι αγωνιστής των υποδοχέων TAS2R14 και TAS2R39.

5.2.3 Αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης μέσω της πλατφόρμας Virtuous taste

Στη συνέχεια, οι φυσικές ενώσεις, έπειτα από την χρήση του αλγορίθμου Glide-SP, αξιοποιήθηκαν μέσω της πλατφόρμας Virtuous Taste της εταιρείας Multitaste, ώστε να γίνει πρόβλεψη της πιθανής τους γεύσης.

Συγκεκριμένα, έγινε εξαγωγή των αρχείων SMILES από την πλατφόρμα Maestro και έπειτα εισαγωγή στην πλατφόρμα Virtuous Taste (<https://virtuous.isi.gr/#/multitaste>), που πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη της γεύσης της κάθε ένωσης.

Βασικός σκοπός της χρήσης της πλατφόρμας ήταν η μελέτη, μέσω ενός ακόμα κριτηρίου, της γεύσης των ενώσεων που προέκυψαν από τη μοριακή πρόσδεση. Με αυτό τον

τρόπο θα δωθεί μία επιπλέον ένδειξη της αίσθησης πικρής γεύσης που ενδέχεται να έχουν οι 10 χημικές ενώσεις που προέκυψαν.

Στον Πίνακα 6 καταγράφονται τα αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης των 10 χημικών ενώσεων έπειτα από την εφαρμογή της πλατφόρμας Virtuous Taste.

Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης των προκρινόμενων ενώσεων έπειτα από την εφαρμογή του εργαλείου Virtuous taste της εταιρείας Multitaste. Δίνονται οι κωδικοί Indofine/NuBBE/Specs, η ονομασία τους και η πιθανότητά τους(%) να είναι πικρές, γλυκές, άλλη γεύση ή ουμάμι.

A/A	Κωδικός Specs / ZINC	Ονομασία	ΠΙΚΡΟ(%)	ΓΛΥΚΟ(%)	ΟΥΜΑΜΙ(%)	ΑΛΛΟ(ΟΞΙΝΟ)(%)
1	Indofine 06-047	Quercetin-3-galactoside	47	21	4	27
2	NuBBE_126	Sorbifolin	84	2	0	14
3	NuBBE_139	Taxifolin	85	11	1	3
4	NuBBE_162	Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin	43	22	3	32
5	NuBBE_217	Rel-(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene	68	14	1	17
6	NuBBE_218	Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene	68	14	1	17
7	NuBBE_281	Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside	45	14	0	41
8	NuBBE_906	Colleto Piperazine	54	11	1	35
9	AE-765/20006021	Epicatechin	82	14	1	3
10	AG-670/20238004	Nebularine	23	36	8	33

Από τις 10 ενώσεις που εξετάστηκαν, οι 9 παρουσιάζουν υψηλή πιθανότητα να διαθέτουν πικρή γεύση, εξαιρώντας την ένωση 10, η οποία βαθμολογήθηκε με 23% πιθανότητα. Αρχικά, η ένωση Taxifolin παρουσιάζει 85% ποσοστό να έχει πικρή γεύση, ενώ με υψηλό ποσοστό 84% ακολουθεί η Sorbifolin και τρίτη παρατηρείται η Epicatechin με ποσοστό πικρής γεύσης 82%. Οι υπόλοιπες ενώσεις, εκτός της Nebularine, παρουσιάζουν ποσοστό πικρής αίσθησης σε εύρος 43 με 68%. Το ποσοστό αυτό απαιτείται να συνδυαστεί με τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης που εξετάστηκαν παραπάνω.

Εύλογα δημιουργείται η απορία γιατί η ένωση 10 (Nebularine) κατέχει τόσο μικρό ποσοστό πιθανότητας να έχει πικρή γεύση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Η ένωση

αυτή ανήκει στην κατηγορία των νουκλεοσιδίων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Οι χημικές ιδιότητες των νουκλεοσιδίων είναι πιο ήπιες σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες (π.χ. φλαβονοειδών) λόγω της παρουσίας του σακχάρου και της σχετικά απλής δομής τους. Τα νουκλεοσίδια δεν έχουν στο μόριο τους πολυφαινολικές ομάδες και οι χημικές τους ομάδες είναι πιο ήπιες στη γεύση. Το σάκχαρο στα νουκλεοσίδια μπορεί να μετριάσει τη γεύση, δίνοντας μια πιο γλυκιά ή ουδέτερη γεύση. (Ni et al., 2019)

Μία αρχική κατηγοριοποίηση θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με βάση τα ποσοστά έπειτα από την εφαρμογή της πλατφόρμας Virtuous Taste. Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικές ενώσεις με σειρά προτεραιότητας με βάση τα ποσοστά πικρής γεύσης:

1. NuBBE_139 Taxifolin
2. NuBBE_126 Sorbifolin
3. AE-765/20006021 Epicatechin
4. NuBBE_217 Rel-(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene
5. NuBBE_218 Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene
6. NuBBE_906 Colletopiperazine
7. Indofine 06-04 Quercetin-3-galactoside
8. NuBBE_281 Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside
9. NuBBE_162 Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin

Συνοψίζοντας, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μοριακή πρόσδεση και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το φίλτρο του Virtuous Taste, οι χημικές ενώσεις που θεωρητικά διαθέτουν πικρή γεύση είναι η Taxifolin και η Epicatechin. Από την μία, λόγω του υψηλού ποσοστού τους να έχουν πικρή γεύση 85 % και 82% αντίστοιχα και από την άλλη λόγω των αλληλεπιδράσεων τους με όλα τα κρίσιμα αμινοξέα, το ικανοποιητικό Glide-score, την επιπλέον αλληλεπίδραση με αμινοξέα που σταθεροποιούν την πρόσδεση και τέλος την ύπαρξή τους στην βάση δεδομένων BitterDB.

5.3 Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία, συμπεραίνεται ότι οι φυσικές ενώσεις: Quercetin-3-galactoside, Sorbifolin, Taxifolin, Myricetrin, 3-O- α -rhamnosylmyricetin, Rel-(-)-(7S,9S,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene, Rel-(+)-(7S,9R,10S)-3,9,12-trihydroxycalamenene, Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside, Colletopiperazine, Epicatechin και Nebularine (ριβονουκλεοζίτης πουρίνης),

παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να δρουν ως ενεργοποιητές της πικρής γεύσης. Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μοριακής πρόσδεσης, διαπιστώθηκε ότι οι 10 ενώσεις αλληλεπιδρούν με την πλειονότητα των κρίσιμων αμινοξέων, όπως αυτά εντοπίστηκαν μέσω της τεχνικής της μοριακής πρόσδεσης στον υποδοχέα TAS2R46 και του αγωνιστή στρυχνίνη. Επιπλέον, οι ενώσεις παρουσιάζουν ανάλογη ικανότητα πρόσδεσης με τον αγωνιστή, με ανάλογες τιμές Glide-score.

Επιπλέον, η ένωση Επικατεχίνη (Epicatechin) και η ένωση Ταξιφολίνη (Taxifolin) που επιλέχθηκαν ως πιθανοί αγωνιστές του υποδοχέα TAS2R46 βρίσκονται ήδη στην βάση δεδομένων BitterDB, γεγονός που επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα του πειραματικού μέρους. Επιπλέον, η χημική ένωση Επικατεχίνη φαίνεται να είναι αγωνιστής και των υποδοχέων πικρής γεύσης TAS2R4, TAS2R5 και TAS2R39, ενώ η Taxifolin φαίνεται να είναι αγωνιστής των υποδοχέων TAS2R14 και TAS2R39.

Συμπερασματικά με βάση όσα έχουν ειπωθεί, λαμβάνοντας υπόψιν τα κριτήρια που τέθηκαν, γίνεται κατανοητό ότι η πλειονότητα των τελικών φυσικών ενώσεων ανήκουν σε κατηγορίες φυσικών ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν αναγνωρισμένες αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις (π.χ. флаβονοειδή, πεπτιδία). Σε ποσοστό 70%, οι ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των флаβονοειδών, που στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν πικρή γεύση. Η παρατήρηση αυτή, αποτελεί θετική ένδειξη πώς οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι αποτελεσματικές, αποβλέποντας έτσι στον μελλοντικό στόχο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ο οποίος είναι η προμήθεια γ \ και η πειραματική τους αξιολόγηση. Απώτερος σκοπός είναι η εφαρμογή τους σε γλυκά αρτοσκευάσματα, ώστε να μετριαστεί το αίσθημα της γλυκύτητας στο στόμα, αλλά και ο εμπλουτισμός τους σε άγευστα τρόφιμα, έτσι ώστε να αποκτήσουν μια γεύση αρεστή από τους καταναλωτές. Τέλος, η ανακάλυψη νέων πικρών ενώσεων μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση φυσικών πηγών που μπορούν να αντικαταστήσουν τεχνητά πρόσθετα, προσφέροντας πιο υγιεινές και φυσικές επιλογές για τους καταναλωτές.

Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

Άρθρα

Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Noor, M. H. M., Abdullah, R., Saad, M. Z., & Taufiq-Yap, Y. H. (2017). Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer. *Veterinary world*, 10(8), 869.

Adam Drewnowski, The Science and Complexity of Bitter Taste, *Nutrition Reviews*, Volume 59, Issue 6, June 2001, Pages 163–169, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07007.x>

Agarwal S, And R. Mehrotra. Mini Review_ An Overview Of Molecular Docking. *Jsm Chemistry*, 2016;2:1024.

Agnihotri VK, Elsohly HN, Khan SI, Smillie TJ, Khan IA, Walker LA. Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers. *Phytochemistry*. 2008 Jul;69(10):2061-6. doi: [10.1016/j.phytochem.2008.04.009](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.009). Epub 2008 Jun 3. PMID: 18534639.

Ahmad, R., & Dalziel, J. E. (2020). G Protein-Coupled receptors in taste physiology and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.587664>

Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., & Terao, J. (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free radical research*, 33(5), 635-641.

Balqis, B., Lukiati, B., Amin, M., Arifah, S. N., Atho'illah, M. F., & Widodo, N. (2022). Computational study of garlic compounds as Potential Anti-Cancer agents for the inhibition of CCR5 and CXCR4. *Chiang Mai University Journal*, 21(1). <https://doi.org/10.12982/cmujns.2022.012>

Bayer, S., Mayer, A. I., Borgonovo, G., Morini, G., Di Pizio, A., & Bassoli, A. (2021). Chemoinformatics view on bitter taste receptor agonists in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(46), 13916–13924. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05057>

Bellon, J.R., et al. (2004) A Prospective Study of Concurrent Cyclophosphamide/ Methotrexate/5-Fluorouracil and Reduced-Dose Radiotherapy in Patients with Early-Stage Breast Carcinoma. *Cancer*, 100, 1358-1364. <https://doi.org/10.1002/cncr.20136>

Billington, C. K., and Penn, R. B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* 4, 2. doi:10.1186/1465-9921-4-2

Brieskorn C H. Physiological and therapeutical aspects of bitter compounds. In: Bitterness in foods and beverages, Rouseff R L (ed), Elsevier, NY USA, 1990, pp 15-24.

CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.. New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, p. 1353–1359. 2005. DOI: [10.1590/S0103-50532005000800008](https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800008);

Dagan-Wiener, A., Nissim, I., Abu, N. B., Borgonovo, G., Bassoli, A., & Niv, M. Y. (2017). Bitter or not? BitterPredict, a tool for predicting taste from chemical structure. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12359-7>

Erings, Dawn, and Bruce Goldman. 'Locus Discovery: From Structure to Hit in Weeks'. *Drug Discovery Today* 7, no. 5 (2002): S16–18.

E. Xourgia, A.Papazafiropoulou, S. Papantoniou, A. Melidonis. Antidiabetic treatment and gut microbiome. *Scientific Chronicles* 2019; 24(2): 171-182 eoi: <http://eoi.citefactor.org/10.11212/exronika/2019.2.4>

Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2004). ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 177–182. <https://doi.org/10.1021/ci049714>

Kesharwani, P., Mishra, V., & Jain, N. K. (2015). Validating the anticancer potential of carbon nanotube-based therapeutics through cell line testing. *Drug Discovery Today*, 20(9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.004>

Kou, X., Shi, P., Gao, C., Ma, P., Xing, H., Ke, Q., & Zhang, D. (2023). Data-Driven elucidation of flavor chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(18), 6789–6802. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00909>

Menis-Henrique, M. E. C. (2020). Methodologies to advance the understanding of flavor chemistry. *Current Opinion in Food Science*, 33, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.005>

Morris, Garrett M, and Marguerita Lim-Wilby. 'Molecular Docking'. In *Molecular Modeling of Proteins*, 365–82. Springer, 2008.

Ni, G., Du, Y., Tang, F., Liu, J., Zhao, H., & Chen, Q. (2019). Review of α -nucleosides: from discovery, synthesis to properties and potential applications. *RSC Advances*, 9(25), 14302–14320. <https://doi.org/10.1039/c9ra01399g>

Pedroni, L., Perugino, F., Kurtaga, A., Galaverna, G., Dall'Asta, C., & Dellafiora, L. (2023). The bitter side of toxicity: A big data analysis spotted the interaction between trichothecenes and bitter receptors. *Food Research International*, 173, 113284. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113284>

Riyadi, S. A., Naini, A. A., & Supratman, U. (2023). Sesquiterpenoids from meliaceae family and their biological activities. *Molecules*, 28(12), 4874.

Roy G, Bitterness: Reduction and inhibition, *Trends in Food Science & Technology*, 1992, 3, 85-91

Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>

Schiffman SS. Taste quality and neural coding: implications from psychophysics and neurophysiology. *Physiol Behav* 2000;69:147-59

Shen, Jianhua, Xiaoying Xu, Feng Cheng, Hong Liu, Xiaomin Luo, Jingkang Shen, Kaixian Chen, Weimin Zhao, Xu Shen, and Hualiang Jiang. 'Virtual Screening on Natural Products for Discovering Active Compounds and Target Information'. *Current Medicinal Chemistry* 10, no. 21 (2003): 2327–42.

Shoichet, Brian K. 'Virtual Screening of Chemical Libraries'. *Nature* 432, no. 7019 (2004): 862–65.

Stanzione F, Giangreco I, Cole JC. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Prog Med Chem.* 2021;60:273-343. doi: 10.1016/bs.pmch.2021.01.004. Epub 2021 May 27. PMID: 34147204.

Swinney, D. C. (2011). Molecular mechanism of action (MMOA) in drug discovery. In *Annual reports in medicinal chemistry* (pp. 301–317). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386009-5.00009-6>

Thorngate III, J. H., & Noble, A. C. (1995). Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R (-)-epicatechin and 3S (+)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(4), 531-535.

Tonolo, F., Grinzato, A., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2023). From in silico to a cellular model: molecular docking approach to evaluate antioxidant bioactive peptides. *Antioxidants*, 12(3), 665. <https://doi.org/10.3390/antiox12030665>

Varney, Michael D, Gifford P Marzoni, Cindy L Palmer, Judith G Deal, Stephanie Webber, Katherine M Welsh, Russell J Bacquet, Charlotte A Bartlett, and Catharine A Morse. 'Crystal-Structure-Based Design and Synthesis of Benz [Cd] Indole-Containing Inhibitors of Thymidylate Synthase'. *Journal of Medicinal Chemistry* 35, no. 4 (1992): 663–76.

Von Itzstein, Mark. 'The War against Influenza: Discovery and Development of Sialidase Inhibitors'. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, no. 12 (2007): 967–74.

W. Meyerhof, "Elucidation of mammalian bitter taste," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 154, pp. 37–72, 2005. doi: 10.1007/s10254-005-0041-0.

Waszkowycz, B. (2002). Structure-based approaches to drug design and virtual screening. *PubMed*, 5(3), 407–413. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12058616>

Xu, W., Wu, L., Liu, S., Liu, X., Cao, X., Zhou, C., Zhang, J., Fu, Y., Guo, Y., Wu, Y., Tan, Q., Wang, L., Liu, J., Jiang, L., Fan, Z., Pei, Y., Yu, J., Cheng, J., Zhao, S., . . . Hua, T. (2022). Structural basis for strychnine activation of human bitter taste receptor TAS2R46. *Science*, 377(6612), 1298–1304. <https://doi.org/10.1126/science.abo1633>

Ελληνική Βιβλιογραφία

Άρθρα

Ανδρουλάκη, Α. Γ. (2007). *Αντικειμενική εκτίμηση της πικρής γεύσης του παρθένου ελαιόλαδου με φασματομετρικές μεθόδους* (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).

Ιορδανίδου, Ε. Φ. (2012). *Διαταραχές γεύσης* (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).

Ιωαννίδου, Μαρία Σ., Υποδοχείς πικρής γεύσης, 2017

Καζάκου, Ε. (2023). *Οι ψυχολογικοί παράγοντες που επιδρούν στην επιλογή τροφής (φαγητού)*.

Κρίτση, Ευτυχία. *Ύπολογιστικά Εργαλεία Για Την Αναζήτηση Νέων Βιοδραστικών Ενώσεων Σε Επιλεγμένους Πρωτεϊνικούς Στόχους*, 2017.

Νάσιου, Ε. (2023). Μελέτη Μοριακής Πρόσδεσης Πιθανών Αναστολέων της Πρωτεάσης Mpro του SARSCoV-2.

Παπανικολάου, Γ. (2016). Η αντίληψη της γεύσης του πικρού.

Ιστοσελίδες

Brendadatabase (<https://www.brenda-enzymes.org/>)

ProteinDataBank (<https://www.rcsb.org>)

Specs library (<https://www.specs.net/>)

Zincdatabase (<https://zinc15.docking.org>)

Indofine (<https://indofinechemical.com/>)

Nubbe (<https://nubbe.iq.unesp.br/>),

Virtuous Taste (<https://virtuoussh2020.com/platform/>)

BitterDB (<https://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>)

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)

SuperSweet (<https://bio.tools/supersweet>)