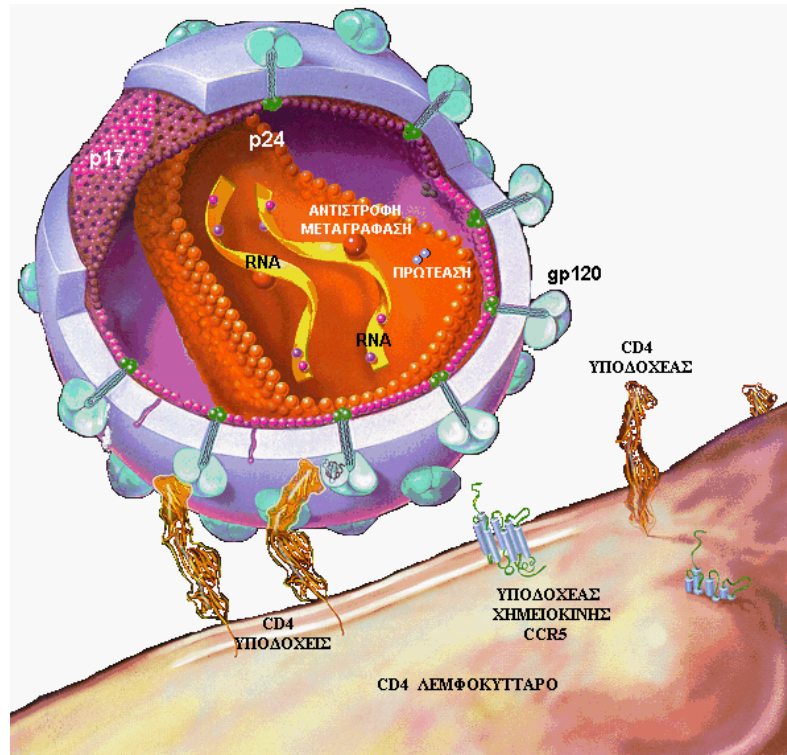


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΗΣ
ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΥΠΟΔΟΧΕΑ CCR5 ΤΟΥ CD4+ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΟΥ
ΜΕ ΤΗ V3 ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ gp120 ΤΟΥ HIV-1

Αφροδίτη Στ. Μπουντουράκη



ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2010

Τα Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ρίζος Απόστολος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κραμποβίτης Ηλίας

Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσιώτης Γεώργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ευχαριστήριο Σημείωμα

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο εργαστήριο σκέδασης ακτινών Laser του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ - FORTH).

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας τόσο επειδή με δέχθηκε ως μεταπτυχιακή του φοιτήτρια όσο και γιατί με στήριξε οικονομικά κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου (Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. Εφηρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας).

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» για την υπομονή του, την καλοσύνη του και τη διαρκή στήριξη και ουσιαστική του βοήθεια θα ήθελα να εκφράσω στον Άνθρωπο και επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Κ. Ρίζο.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση, διόρθωση και κρίση της παρούσας εργασίας.

Πώς θα ήταν δυνατόν να ξεχάσω τους μεταπτυχιακούς μου συναδέλφους και ειδικότερα εκείνους που μοιραστήκαμε τον ίδιο χώρο, το εργαστήριο μας, για τόσο καιρό, τη Χρύσα Λογκάκη, τον Παναγιώτη Σαμόλη και το Γιάννη Τσικαλά. Τους ευχαριστώ πολύ για την πολύτιμη βοήθειά τους και την όμορφη παρέα τους.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου όλους τους καλούς μου φίλους, τη Φωτεινή, τη Χρυσούλα και το Γιάννη που πάντα τόσα χρόνια με στήριζαν και με βοηθούσαν, και φυσικά, το Μανώλη μου για την αγάπη του, τη συμπαράσταση και την υπομονή του.

Κυρίως όμως, θέλω να εκφράσω την αγάπη και την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Στέλιο και Ζουμπουλιά και στην αδελφή μου τη Μαρία, για την απέραντη αγάπη, την κατανόηση και την ενθάρρυνσή τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και για την αμέριστη στήριξη που μου παρείχαν στις δυσκολίες που αντιμετώπισα.

Τέλος, ευχαριστώ το Θεό για όλα, για τα καλά και τα άσχημα, και που μου έδωσε τη δύναμη να φτάσω ως το τέρμα.

Πολλά τα εφόδια που αποκόμισα κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας τόσο σε επίπεδο γνώσης όσο και χαρακτήρα. Μεγάλος και γλυκός ο «πειρασμός» για γνώση και κοινωνική καταξίωση. Είναι όμως δύσκολος πολύ ο δρόμος για την κορυφή και μένουν ακόμα χιλιόμετρα...

...Από μεγάλη απόσταση κορφή σε καμαρώνω

κι ένα χαλίκι επάνω σου ήθελα να 'μαι μόνο...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Περίληψη

Abstract

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Βιολογία του HIV-1	8
1.1.1 Δομή του ιού HIV-1	11
1.1.2 Βιολογικός Κύκλος του Ιού	14
1.1.3 Κυτταρικός Τροπισμός Ιικών Στελεχών- Υποδοχείς Ιικής πρόσδεσης.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	22
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1 Σκέδαση Ακτίνων LASER	24
2.1.1 Σκέδαση Ακτίνων Laser.....	24
2.1.2 Ο Μηχανισμός της Σκέδασης.....	27
2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	31
2.1.4 Στατική Σκέδαση Φωτός.....	34
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
2.2 Πειραματικά Συστήματα	35
2.2.1 Πειραματική Διάταξη.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	39
Ανάλυση Αποτελεσμάτων	40
3.1 Χημειοκίνες και χημειοϋποδοχείς	40
3.1.1 Προσδιορισμός των Υδροδυναμικών Παραμέτρων Πεπτιδίων CCR5.....	40
3.1.2 Αλληλεπίδραση Πεπτιδίων V3 και CCR5.....	48
3.1.3 Συμπεράσματα.....	51
Βιβλιογραφία	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εφαρμογές και η χρήση συνθετικών πεπτιδίων για την αντιμετώπιση ασθενειών του ανθρώπου αυξάνονται ραγδαία, καθώς και η ανάπτυξη της απαιτούμενης αντίστοιχης τεχνολογίας. Παρόλο που γνωρίζουμε καλά τη βιολογία του ιού που προκαλεί το AIDS (HIV-1), οι πληροφορίες μας για το τρόπο που ο ιός προκαλεί τη ασθένεια είναι περιορισμένες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός είναι εξαιρετικά εξαρτημένος στον φυσικό του ξενιστή, τον Άνθρωπο, και δεν υπάρχουν ικανοποιητικά μοντέλα για να μελετηθεί η δράση του ιού σε συνάρτηση με την ασθένεια. Το πρόβλημα που κάνει πολύ πιο σύνθετο το θέμα της παθογένεσης είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού που απαλείφεται εξαιτίας της παρουσίας του ιού στον οργανισμό του ξενιστή δεν έχει μολυνθεί από τον ιό. Η επικρατούσα άποψη σήμερα είναι ότι ο ιός ευαισθητοποιεί τα αποπτωτικά μονοπάτια αυτών των κυττάρων και τα οδηγεί σε «προγραμματισμένο θάνατο». Το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε στο παρελθόν από την ερευνητική μας ομάδα με συνθετικά πεπτίδια της V3 περιοχής του ιού σε συνάρτηση με τον φυσιολογικό μηχανισμό της αντιγονο-παρουσίασης. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκε μία καινοτόμος μέθοδος μελέτης ειδικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου η οποία επιβεβαίωσε ότι το V3 φαινόμενο είναι ένας γενικός μηχανισμός του ιού. Κύριος σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη του υποδοχέα χημειοκινών CCR5 που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων καθώς και της αλληλεπίδρασης της V3 περιοχής με το CCR5 με φυσικοχημικές μεθόδους και ειδικότερα με φασματοσκοπία σκέδασης ακτίνων laser. Αναλύθηκε η συμπεριφορά των συγκεκριμένων υλικών σε φυσιολογικά διαλύματα και η επιρροή ιοντικών δυνάμεων/αλληλοεπιδράσεων σαν συνάρτηση του αριθμού των βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή.

Abstract

The applications and the use of synthetic peptides to treat human diseases are increasing rapidly, as well as the development of relevant technologies. Although we know the basic biology of the virus that causes AIDS (HIV-1), our information on how the virus causes the disease is limited. That is because the virus is highly dependent on its natural host, humans, and there aren't good models to study the effect of the virus in relation to the disease. The problem that makes even more complex the issue of pathogenesis is that the majority of the cell population that is deleted by the presence of the virus in the body of the host is not infected. The prevailing view today is that the virus sensitizes the apoptotic pathways of these cells and leads them to programmed death. This phenomenon has been studied previously by our research team with synthetic peptides of the V3 region of the virus according to the physiological mechanism of antigen presentation. Therefore we developed a novel method to study specific mechanisms of the human immune system which confirmed that the V3 phenomenon is a general mechanism for the virus. The main purpose of this work is the study of chemokine receptor CCR5 who lies on the surface of activated T lymphocytes and the interaction of the V3 region with CCR5 by physicochemical methods, in particular laser light scattering spectroscopy. We have analyzed the behavior of these materials in physiological solutions and the influence of ionic forces/interactions as a function of the number of basic amino acids in the V3 region.

Κεφάλαιο 1

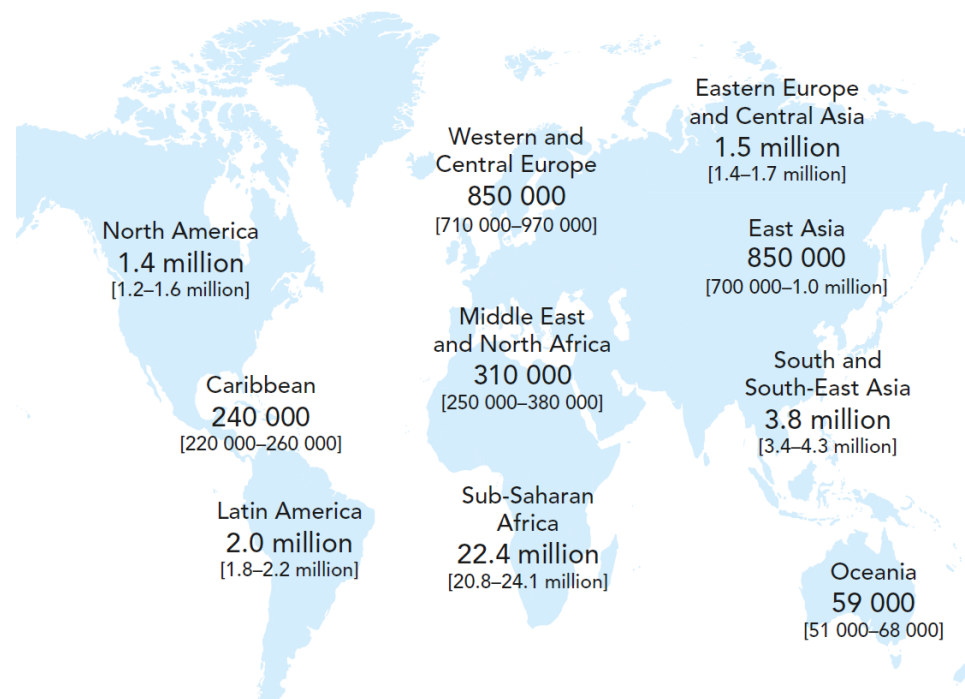
Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία του HIV-1

Πολλές θανατηφόρες και μη ιάσιμες ασθένειες πλήττουν το ανθρώπινο γένος. Το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome – AIDS) όμως, άγγιξε και αγγίζει, περισσότερο ίσως, τις πιο ευαίσθητες χορδές όλων των κοινωνιών και όλων των κρατών παγκοσμίως, για τον εξής απλό λόγο: διότι πλήττει τη ζωή και την σεξουαλική συμπεριφορά των νέων ανθρώπων. Το AIDS είναι μία ασθένεια που έγινε γνωστή μόλις το 1982 και που κατόρθωσε μέσα σε λίγα χρόνια να τρομοκρατήσει ολόκληρη την ανθρωπότητα και να καταστεί πραγματική μάστιγα. Σήμερα η ασθένεια του AIDS τείνει να βρεθεί εκτός «προσκήνιου», όχι γιατί έπαψε να υφίσταται ως επιδημία ή γιατί βρέθηκε η θεραπεία της, αλλά λόγω της αδιαφορίας και της υποτίμησης για τις διαστάσεις και τις συνέπειές της.



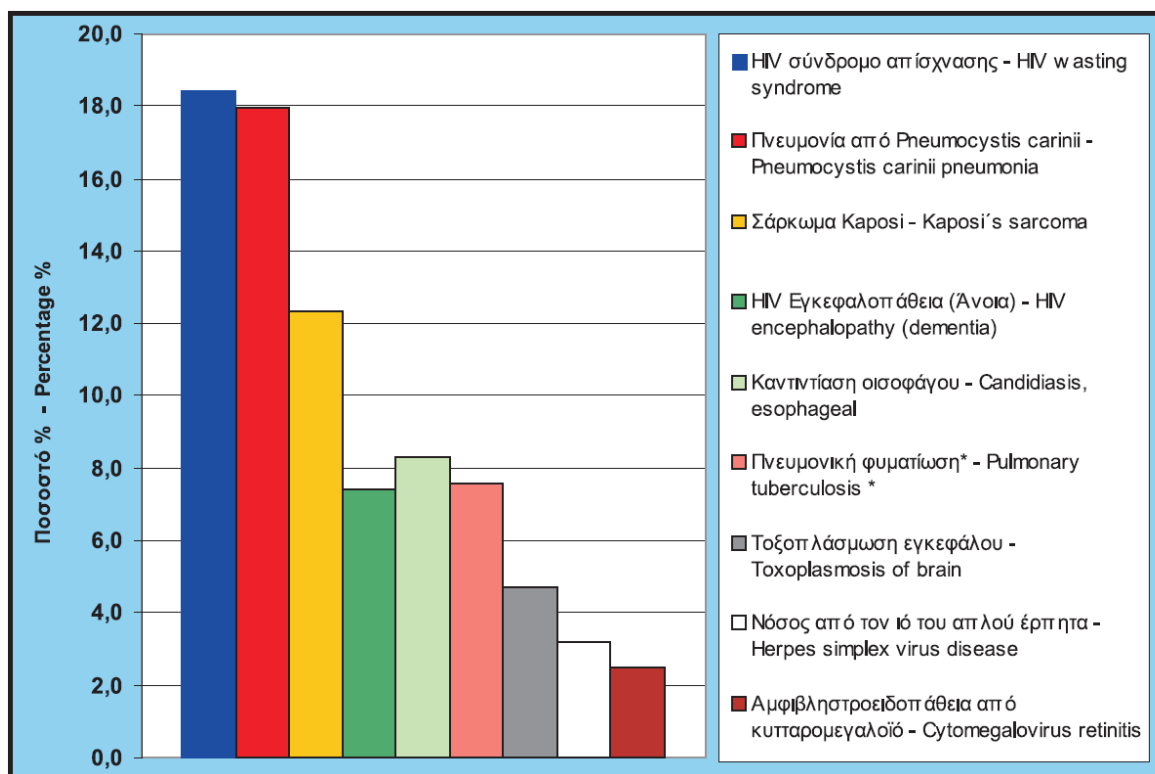
Σχήμα 1.1 Επιδημιολογικός χάρτης του AIDS ανά τον κόσμο (UNAIDS 2009).

Οι ιοί που προκαλούν στον άνθρωπο το AIDS ανήκουν στο γένος των ρετροϊών Lentiviruses και είναι ευρέως γνωστοί ως HIV-1 και HIV-2 (Human Immunodeficiency Virus-1, -2). Η επιστημονική κοινότητα πιστεύει ότι ο ιός HIV μεταδόθηκε στον άνθρωπο από τους πιθήκους γύρω στη δεκαετία του 30. Επιστημονική έρευνα αποδίδει την πιθανή προέλευση των HIV ιών στη συσσώρευση διαδοχικών μεταλλάξεων πάνω σε ένα συγγενικό

ικό στέλεχος, το STLV II, που παρασιτεί στους πράσινους πιθήκους της Αφρικής. Ο πρώτος επιβεβαιωμένος θάνατος από AIDS (όπως διαπιστώθηκε εκ των υστέρων), σημειώθηκε το 1959 σε άνδρα καταγόμενο από το σημερινό Κονγκό. Το 1978 ομοφυλόφιλοι άνδρες στις ΗΠΑ και τη Σουηδία και ετεροφυλόφιλοι στην Τανζανία και την Αιτή εμφανίζουν συμπτώματα μιας παράξενης ασθένειας του ανοσοποιητικού. Το 1981 το CDC παρατηρεί αυξημένη συχνότητα μιας μορφής καρκίνου, του σαρκώματος Karosi σε ομοφυλόφιλους. Τον επόμενο χρόνο, υπό το βάρος αυξανόμενων κρουσμάτων ανοσοανεπάρκειας σε νέους άνδρες, γυναίκες και βρέφη, χρησιμοποιείται για πρώτη φορά ο όρος AIDS. Δηλώνονται κρούσματα από 14 διαφορετικές χώρες. Το 1983 τα κρούσματα μόνο στις ΗΠΑ φθάνουν τα 3.000 και οι θάνατοι τους 1.000. Το 1986 δηλώνονται 40.000 περιπτώσεις AIDS από 85 χώρες. Το 1990 οι φορείς του ιού παγκοσμίως είναι πλέον 8.000.000.

Σύμφωνα με τα τελευταία επίσημα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, περί τα 33 εκατομμύρια άνθρωποι ζούν με τον HIV, εκ των οποίων τα 2,5 εκατομμύρια είναι παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών, ενώ περισσότεροι από 25 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από AIDS μέχρι σήμερα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά φορέων του HIV εμφανίζονται στις χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής και τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης [1].

Ο ιός HIV έκανε την εμφάνισή του στην Ελλάδα στα μέσα της δεκαετίας του 80. Διαχρονικά, η τάση της επιδημίας, από την αρχή της μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του 1990, ήταν αυξητική, και στους άνδρες και στις γυναίκες. Από το 2000 μέχρι και το 2004, ο αριθμός των δηλούμενων νέων μολύνσεων ήταν περίπου σταθερός. Όμως το 2005 και το 2006, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση σε σχέση με τα προηγούμενα έτη με μία μικρή κάμψη το 2007.



* Για εφήβους/ενήλικες

* In adults/adolescents

Σχήμα 1.2 Ενδεικτικές νόσοι AIDS (εκατοστιαία αναλογία) στους εφήβους/ενήλικες στην Ελλάδα μέχρι τις 31/10/2009 (Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα, τεύχος 24, Οκτώβριος 2009)

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Κέντρου Παρακολούθησης του AIDS, ανάμεσα στις Ευρωπαϊκές χώρες όπου, η κυρίαρχη αριθμητικά ομάδα μεταξύ αυτών που μολύνθηκαν από τον ιό, είναι οι ομοφυλόφιλοι. Τέτοιες χώρες είναι η Γερμανία, η Δανία, η Τσεχία κ.ά. Αντίθετα, στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, επικρατούν ανάμεσα στους φορείς οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών.

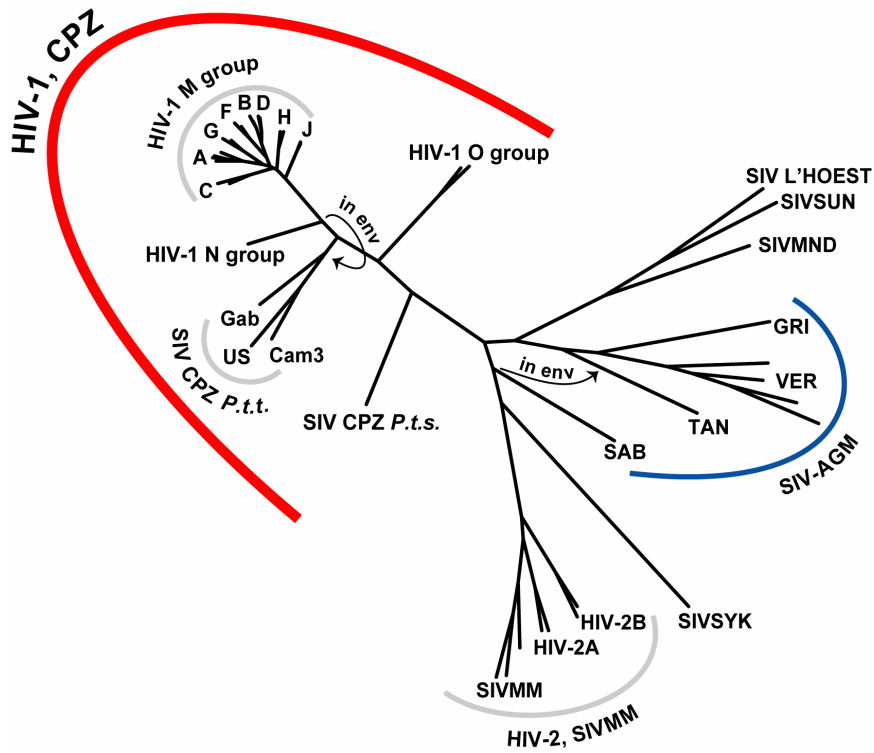
Περιπτώσεις AIDS κατά κατηγορία μετάδοσης και κατά φύλο στην Ελλάδα μέχρι 31/10/2009
Cumulative AIDS cases by transmission group and gender reported in Greece by 31/10/2009

Κατηγορία Μετάδοσης	Άνδρες - Males		Γυναίκες - Females		Σύνολο - Total		Transmission group
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Ομο/αμφιφυλόφιλοι άνδρες	1683	(65,8)	-	-	1683	(55,6)	Men who have sex with men (MSM)
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	95	(3,7)	25	(5,3)	120	(4,0)	Injecting Drug Users (IDUs)
Πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος	116	(4,5)	5	(1,1)	121	(4,0)	Haemophiliacs/ Coagulation disorder
Μεταγγισθέντες/είσες	35	(1,4)	29	(6,2)	64	(2,1)	Transfusion recipients
Ετεροφυλόφιλοι/ες	376	(14,7)	368	(78,3)	744	(24,6)	Heterosexuals
Κάθετη μετάδοση	12	(0,5)	11	(2,3)	23	(0,8)	Mother to child
Ακαθόριστοι/ες	240	(9,4)	32	(6,8)	272	(9,0)	Undetermined
Σύνολο	2557	100%	470	100%	3027	100%	Total

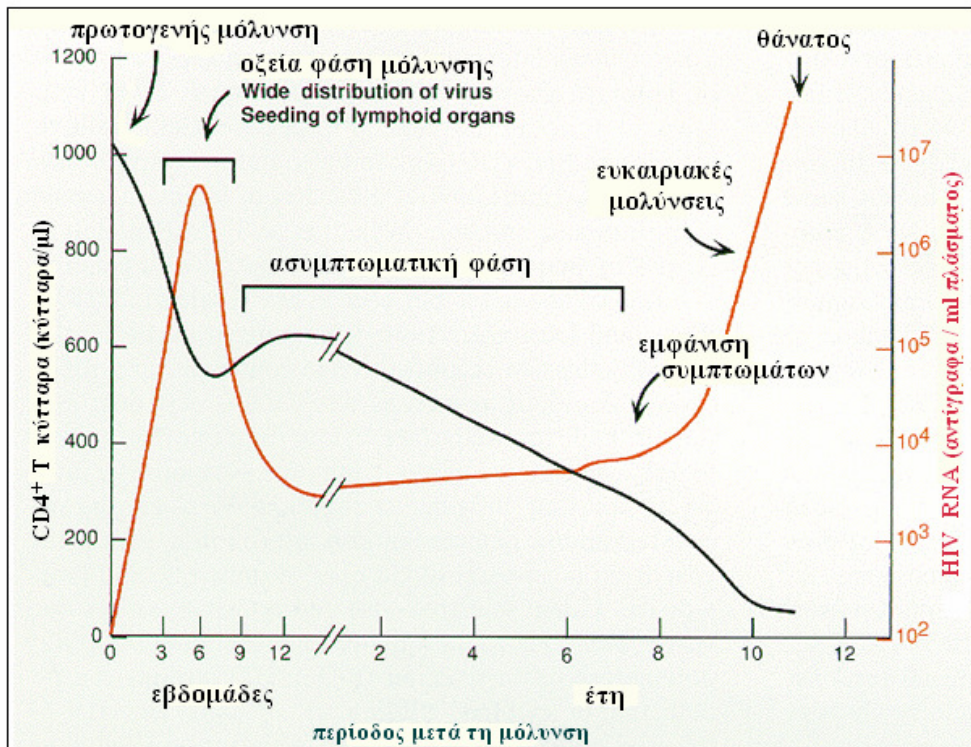
Σχήμα 1.3 Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα (τεύχος 24, Οκτώβριος 2009)

1.1.1 Δομή του Ιού HIV-1

Για τις περισσότερες μολύνσεις στο δυτικό κόσμο ευθύνονται κυρίως οι υπότυποι του HIV-1 (Σχήμα 1.4). Η κλινική κατάσταση του μολυσμένου ατόμου χαρακτηρίζεται από μία μακρά λανθάνουσα περίοδο επώασης του ιού, συνοδευόμενη από ασθενείς χυμικές απαντήσεις του ξενιστή, οι οποίες περιπλέκονται από παρατεταμένη παρουσία ιικού RNA στο πλάσμα. Η πρόοδος της ασθένειας επιφέρει σοβαρές δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα, με τον οργανισμό να γίνεται επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε ανάπτυξη νεοπλασμάτων, ενώ παράλληλα εμφανίζονται αρνητικές επιπτώσεις και στο νευρικό, αιμοποιητικό και αναπνευστικό σύστημα με τελική κατάληξη τουλάχιστον μέχρι σήμερα τον θάνατο (Σχήμα 1.5).



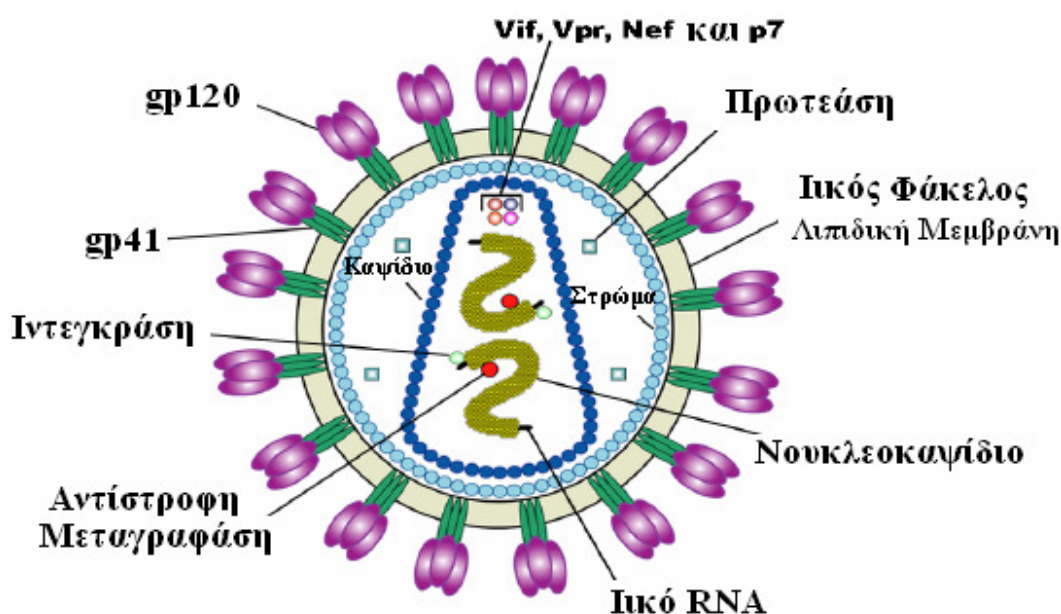
Σχήμα 1.4 Φυλογενετικό δένδρο του HIV.



Σχήμα 1.5 Τυπική πρόοδος της HIV μόλυνσης.

Το ώριμο ιοσωμάτιο του HIV-1 όπως και των περισσότερων ρετροϊών έχει σχεδόν σφαιρική δομή διαμέτρου περίπου 100 nm, αποτελούμενη από τον ικό φάκελο, το στρώμα (Matrix), το καψίδιο (Capsid), το νουκλεοκαψίδιο (Nucleocapsid) και 2 πανομοιότυπα μόρια μονόκλωνου RNA ως γενετικό υλικό[2].

Ο ικός φάκελος, ο οποίος προέρχεται από την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, φέρει τη δομή λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η οποία συμπληρώνεται από έντονα γλυκοζυλιωμένες ικές πρωτεΐνες που προεκβάλλουν στην εξωτερική του επιφάνεια. Κάθε τέτοια προεκβολή σχηματίζεται από την σύνδεση 2 κύριων γλυκοπρωτεϊνών, της εξωκυτταρικής gp120 και της διαμεμβρανικής gp41 γλυκοπρωτεΐνης (Σχήμα 1.6). Όπως σε όλους τους σύνθετους ρετροϊούς, έτσι και το γένωμα του HIV κωδικοποιεί επιπλέον πολλές συνοδευτικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως τις tat, nef, rev, vif, vpr και vru. Το tat ενεργοποιεί την ική μεταγραφή λειτουργώντας ως μεταγραφικός παράγοντας επιμήκυνσης. Η rev μεσολαβεί τη μεταφορά των ατελώς ή καθόλου κατεργασμένων (spliced) ικών RNAs από τον κυτταρικό πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

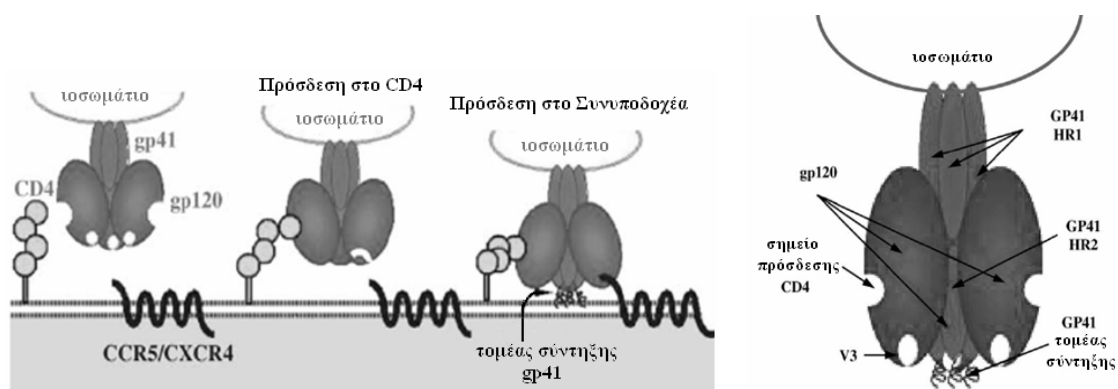


Σχήμα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ιοσωματίου του HIV-1.

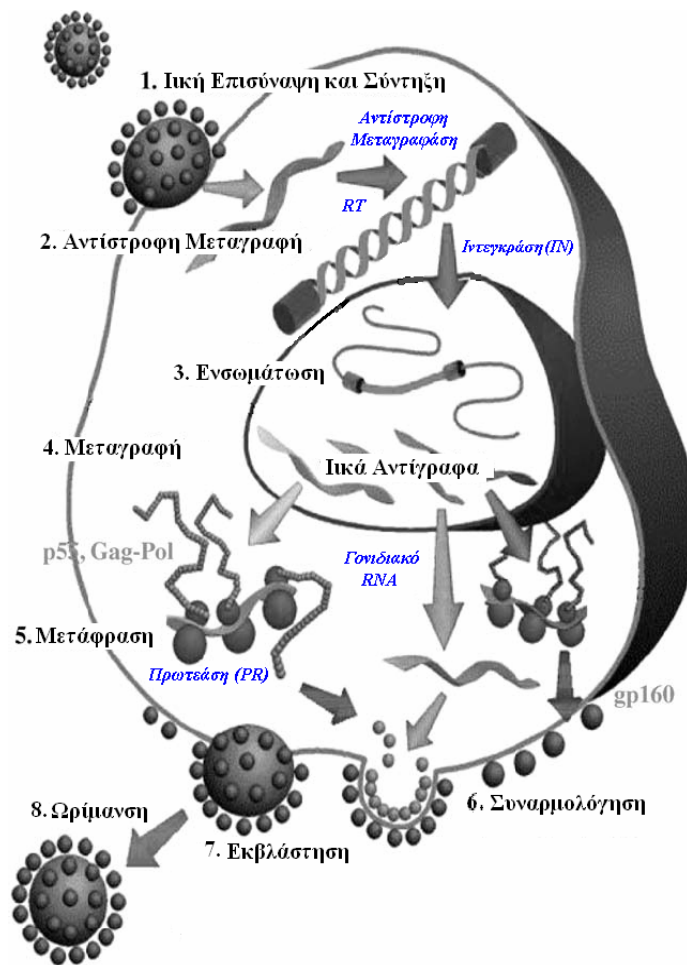
Η Nef και η vif ενισχύουν την μολυσματικότητα του ιοσωματίου, η vpr μεσολαβεί τη γρήγορη εκτόπιση των ιικών νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων μέσα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και η vru προωθεί την αποδόμηση των CD4 μορίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του πρόδρομου προϊόντος του env γονιδίου (gp160) [3]. Από τις συστατικές πρωτεϊνικές υπομονάδες της gp160, η gp120 είναι αυτή που κύρια συμμετέχει στα γεγονότα της μεμβρανικής σύντηξης και της ικής εισόδου στο κύτταρο του ξενιστή με άμεση αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα CD4, αλλά και με τους υπόλοιπους συνυποδοχείς. Κάθε gp120 πρωτεϊνικό μόριο αποτελείται από 5 μεταβλητές (V1-V5) και 4 σταθερές (C1-C4) [4 , 5].

1.1.2 Βιολογικός Κύκλος του Ιού HIV-1

Ο κύκλος ζωής του HIV ξεκινά με την πρόσδεση της gp120 γλυκοπρωτεΐνης στους επιφανειακούς υποδοχείς του κυττάρου στόχου που περιλαμβάνουν το CD4 μόριο και έναν από τους υποδοχείς χημειοκινών (chemokines) [6 , 7]. Η αλληλεπίδραση της gp120 με το σουλφονιωμένο άκρο του CCR5 είναι κρίσιμη. Αμέσως μετά την πρόσδεση η διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp41 υφίσταται μία αλλαγή στην διαμόρφωση της που προάγει τη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα ξεκινά η μετατροπή του ιικού RNA σε δίκλωνο γραμμικό DNA από τη δράση της ικής αντίστροφης μεταγραφάσης, Reverse Transcriptase (RT). Το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μετατοπίζεται ταχύτητα μέσω της Vpr στον κυτταρικό πυρήνα όπου με τη βοήθεια της IN (Integrase) ενσωματώνεται στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή. Τα κύτταρα με ενσωματωμένο ιικό DNA λειτουργούν ως αποθήκες μόλυνσης.



Σχήμα 1.7 Η gp120 που περιέχει το σημείο πρόσδεσης του υποδοχέα CD4 και του συνυποδοχέα που μπορεί να είναι είτε ο CCR5, είτε ο CXCR4, και περιλαμβάνει 5 μεταβλητές (V1-V5) και 5 σταθερές (C1-C5) περιοχές. Το σημείο πρόσδεσης του συνυποδοχέα αποτελείται από το **βρόχο V3** και το έλασμα γέφυρας (bridging sheet)[8].

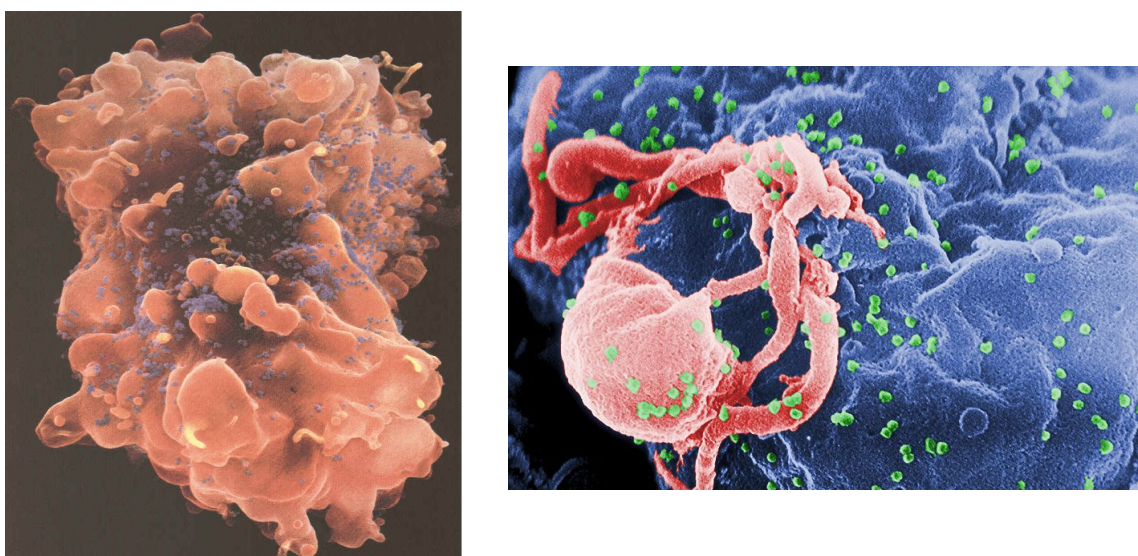


Σχήμα 1.8 Βιολογικός κύκλος του ιού HIV-1.

Η ιική μεταγραφή επιτυγχάνεται μέσω της κυτταρικής RNA πολυμεράσης II και προϋποθέτει συνήθως την ενεργοποίηση του μολυσμένου κυττάρου, που παραδείγματος χάριν, για τα T λεμφοκύτταρα μπορεί να προέλθει είτε από αντιγονικό ερεθισμό του TCR υποδοχέα είτε από τη δράση μιτογόνων ή άλλων διεγερτικών μορίων [9]. Μέσω της ρυθμιστικής δράσης της Rev όλα τα ιικά μετάγραφα κατεργασμένα ή μη (spliced ή genomic-length RNAs) μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και μεταφράζονται στα ριβοσώματα. Εξάιρεση αποτελεί το mRNA του ενν γονιδίου το οποίο μεταφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε μετέπειτα στάδιο το ενν προϊόν (gp160) πρωτεολύεται στο σύστημα Golgi από κυτταρικές πρωτεάσες στις συστατικές gp120 και gp41 πρωτεΐνες, οι οποίες εξάγονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και συμπλέκονται με τις πρόδρομες γλυκοπρωτεΐνες Gag και Pol, τις Vif, Vpr, Nef και με το

RNA. Η εκβλάστηση (budding) των ‘ανώριμων’ ιικών τμημάτων στην κυτταρική μεμβράνη ακολουθείται από μία μορφολογική αλλαγή του ιοσωματίου, γνωστή ως ‘ωρίμανση’, η οποία εμπλέκει πρωτεολυτική κατεργασία των Gag-Pol γλυκοπρωτεϊνών από την ιική PR στα MA, CA, NC, p6, PR, RT, και IN. Το ώριμο πλέον ιοσωμάτιο είναι έτοιμο να μολύνει άλλο κύτταρο.

Ο HIV-1 μπορεί να μολύνει *in vitro* ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων, όπως περιφερικά ή θηλακοειδή δενδριτικά κύτταρα (FDCs), κύτταρα μικρογλοίας, NK και B κύτταρα, CD8+ και CD4+ T λεμφοκύτταρα, ηοσινόφιλα, πρόδρομα CD4+ κύτταρα του μυελού των οστών και πολλά άλλα [10, 11].



Σχήμα 1.9 α. Ο HIV-1 (μικρά μπλε σωματίδια) επιτίθεται σε ένα κύτταρο ανθρώπινου ιστού (μεγάλο ροζ σώμα). **β.** Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης της εκβλάστησης του HIV-1 από καλλιεργημένα λεμφοκύτταρα.

Η μόλυνση των μακροφάγων θεωρείται σημαντική για τον *in vivo* πολλαπλασιασμό και τη μολυσματικότητα του ιού, αφού τα πρώτα κύτταρα που μολύνονται κατά την πρωτογενή μετάδοση της ασθένειας είναι της σειράς των μακροφάγων [12] από τα παρακείμενα βλενώδη επιθήλια, τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενές ιών που συντηρούν και προάγουν συνεχώς την εξάπλωση του ιού. Στο γεγονός αυτό οφείλεται και η αντίσταση πολλών φορέων στη μείωση του ιικού δυναμικού ακόμη και μετά από μακράς διάρκειας αντιρετροϊκή θεραπεία.

Για τη βέλτιστη αντιγραφή και μεταγραφή του ιού εντός των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων απαιτείται προγενέστερη ενεργοποίησή τους, γεγονός που δεν παρατηρείται στα μακροφάγα. Ωστόσο, η *in vitro* μόλυνση των μακροφάγων από τον HIV παρουσιάζει περιορισμένη κυτταροπαθογένεια με τα ιικά τμήματα να απελευθερώνονται μέσα σε ενδοκυτταροπλασματικά κυστίδια [13], ενώ των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων προκαλεί μαζικό κυτταρικό θάνατο με απελευθέρωση των ιοσωματίων σχεδόν αποκλειστικά στην πλασματική μεμβράνη.

Καθώς τα κύτταρα με τον πρωταγωνιστικό ρόλο, τα μακροφάγα και τα T CD4⁺ κύτταρα μνήμης που εκκρίνουν το CCR5, μολύνονται στην ασυμπτωματική φάση της μόλυνσης από τον HIV-1, δημιουργήθηκε ένα πειραματικό *in vitro* μοντέλο για την εξερεύνηση του ρόλου της V3 περιοχής στην αντιγονοπαρουσίαση [14]. Ουσιαστικά λοιπόν, η αλληλεπίδραση της V3 περιοχής με το CCR5 είναι αυτή που διεγείρει την κινητοποίηση των T κυττάρων οδηγώντας τα τελικά σε μαζικό κυτταρικό θάνατο, και όχι επειδή έχουν μολυνθεί από τον ιό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση μολυσμένων μακροφάγων είναι σχετικά μικρότερη στο περιφερικό αίμα των φορέων από εκείνη που παρατηρείται στους ιστούς λεμφικών και μη λεμφικών οργάνων, όπως η σπλήνα, ο πνεύμονας, ο εγκέφαλος και τα νεφρά, όργανα των οποίων η λειτουργία διαταράσσεται σημαντικά κατά την εξέλιξη της ασθένειας του AIDS.

ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ	1. ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ	i. ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ	
		ii. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ
	2. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	i. Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	α. ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ
			β. ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΝΗΜΗΣ
		ii. Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	α. ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ (CD4)
			β. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ (CD8)
			γ. ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ (CD8)
			δ. ΜΝΗΜΗΣ

Σχήμα 1.10 Τα Είδη των Λευκών Αιμοσφαιρίων

1.1.3 Κυτταρικός Τροπισμός Ιικών Στελεχών - Υποδοχείς Ιικής Πρόσδεσης

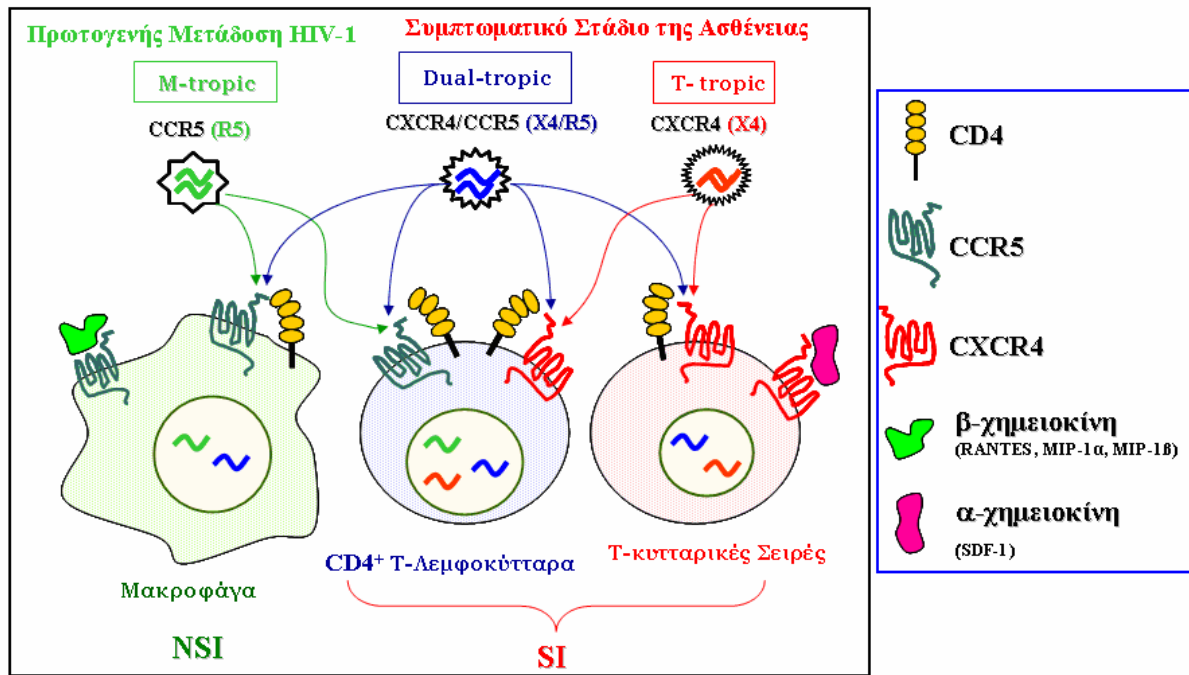
Η ικανότητα του HIV να μολύνει διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους εξαρτάται κάθε φορά από το είδος του ιικού στελέχους, όμως και η επιδεκτικότητα μόλυνσης των κυττάρων στόχων διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια τόσο της εισόδου όσο και της αντιγραφής των διαφόρων ιικών στελεχών. Ως εκ τούτου, τα γνωστά HIV-1 στελέχη διαχωρίζονται πειραματικά σε κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που μπορούν να μολύνουν και να αντιγραφούν *in vitro* [15] (Σχήμα 1.10).

Ιικά στελέχη που μολύνουν κυρίως πρωτογενή μακροφάγα αλλά μπορούν να αναπτύσσονται και σε καλλιέργειες πρωτογενών CD4⁺ T-κυττάρων είναι γνωστά ως M-tropic (*Macrophage-tropic*) και χρησιμοποιούν τον CCR5 συνυποδοχέα (R5 στελέχη), ενώ στελέχη που συνήθως αντιγράφονται ελάχιστα στα μακροφάγα αλλά

ικανοποιητικά μέσα σε CD4⁺ T-κυτταρικές σειρές αναφέρονται ως T-tropic (*T-cell line tropic*) και δείχνουν προτίμηση στον συνυποδοχέα CXCR4 (X4 στελέχη) [16].

Τα M-tropic στελέχη είναι υπεύθυνα για την πρωτογενή μετάδοση του ιού και την ασυμπτωματική φάση της μόλυνσης, και συνήθως δε δημιουργούν συγκυτία, έχουν δηλαδή NSI (*Non-Syncytium Inducing*) φαινότυπο. Για αυτό, η προτίμηση που επιδεικνύουν τα περισσότερα M-tropic στελέχη για τον CCR5 ως συνυποδοχέα εισόδου, υποδηλώνει την κρίσιμη συμμετοχή του κατά τη διάρκεια της μετάδοσης και της ασυμπτωματικής φάσης της μόλυνσης. Αντιθέτως, τα T-tropic στελέχη τα οποία προάγουν τη δημιουργία συγκυτίων ανάμεσα σε μολυσμένα και μη μολυσμένα T λεμφοκύτταρα με σύντηξη των μεμβρανών τους, έχουν SI (*Syncytium Inducing*) φαινότυπο, σπανίως μεταδίδονται και εμφανίζονται κατά την πρόοδο της ασθένειας. Έτσι, ο CXCR4 φαίνεται να χρησιμοποιείται από τον ιό κυρίως στο μετέπειτα συμπτωματικό στάδιο της ασθένειας.

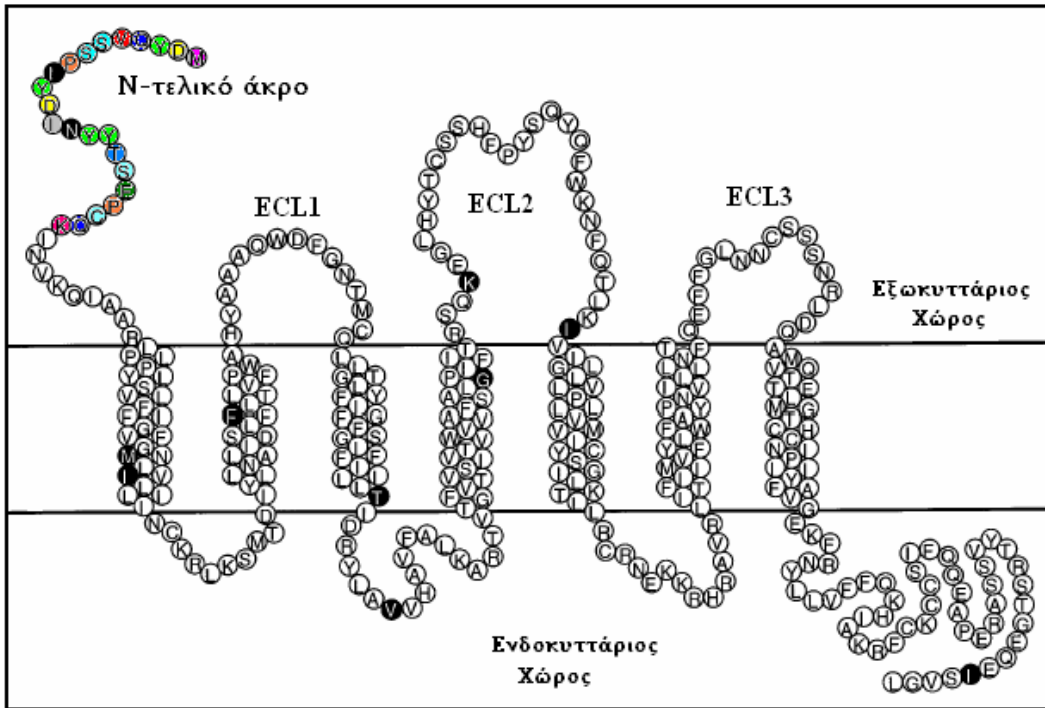
Κατά την εξέλιξη της νόσου, η μετάπτωση του τροπισμού είναι πιθανόν να προκαλέσει απώλεια της ικανότητας μόλυνσης μακροφάγων. Για αυτό, πολύ συχνά, πρωτογενή ιικά στελέχη προκειμένου να διατηρήσουν αυτήν την ιδιότητα αποκτούν δυνατότητα εξίσου αποτελεσματικής πρόσδεσης και στους δύο συνυποδοχείς, μολύνοντας έτσι ικανοποιητικά και μακροφάγα και μετασηματισμένες T-κυτταρικές σειρές, και είναι γνωστά ως στελέχη με διπλό τροπισμό (*Dual tropic*) και SI φαινότυπο.



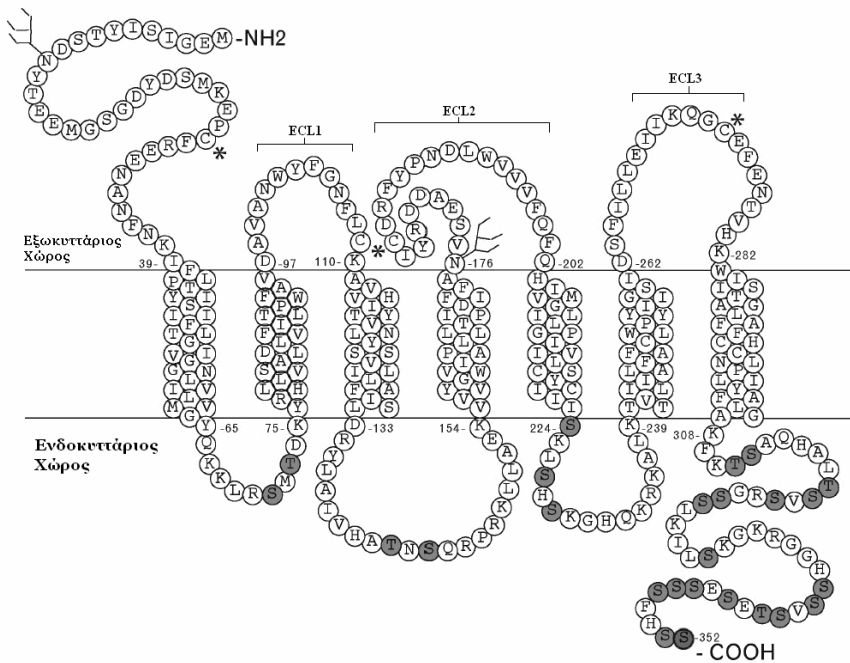
Σχήμα 1.11 Τροπισμός Ιικών Στελεχών και Υποδοχείς Ιικής Πρόσδεσης

Πιθανολογείται ότι η παρουσία των διαφορετικών ικών στελεχών οφείλεται στην εξελικτική πίεση που υφίσταται το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, ενώ η ποικιλομορφία τους ανταποκρίνεται στους διαφορετικούς ρυθμούς ικής αντιγραφής που απαιτούνται στα επιμέρους στάδια της νόσου.

Η επιλεκτικότητα πρόσδεσης, δηλαδή ο τροπισμός κάθε στελέχους για συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, καθορίζεται από το είδος του συνυποδοχέα που χρησιμοποιεί ο ιός προκειμένου να επιτύχει ικανή πρόσδεση στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Εκτός από το βασικό κυτταρικό υποδοχέα CD4, 2 μέλη της οικογένειας των υποδοχέων χημειοκινών, οι CCR5 (Σχήμα 1.11) και CXCR4 (Σχήμα 1.12) χρησιμοποιούνται από τον HIV-1 ως συνυποδοχείς πρόσδεσης. Τα M-tropic στελέχη δείχνουν προτίμηση στον CCR5 συνυποδοχέα (R5 στελέχη), ενώ τα T-cell-line-tropic στον CXCR4 (X4 στελέχη).



Σχήμα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση του συνυποδοχέα CCR5



Σχήμα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση του συνυποδοχέα CXCR4 [17].

Οι υποδοχείς χημειοκινών ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων που διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές επικράτειες. Οι χημειοκίνες είναι μικρομοριακές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που χωρίζονται κυρίως σε 2 μεγάλες υπο-οικογένειες ανάλογα με τη θέση των 2 από τα 4 υπολείμματα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στο μόριο. Η CC ή α- υπο-οικογένεια χημειοκινών περιλαμβάνει κυρίως τα μέλη: MIP-1α , MIP-1β (macrophage inflammatory protein-1α/β), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and activated) και MCP-1, -2, -3, -4 (Monocyte Chemotactic Protein-1, -2, -3, -4). Οι χημειοκίνες αυτές αποτελούν τους φυσιολογικούς δεσμευτές των αντίστοιχων CCR υποδοχέων [18]. Χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας των CXC ή β-χημειοκινών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, είναι η χημειοκίνη SDF-1α (Stromal Derived Factor-1α) και ο υποδοχέας της CXCR4 (fusin ή LESTR) αντίστοιχα. Τόσο οι φυσιολογικοί δεσμευτές του CCR5 υποδοχέα, RANTES, MIP-1α και MIP-1β, όσο και ο φυσιολογικός δεσμευτής του CXCR4, SDF-1α μπορούν να καταστείλουν in vitro την είσοδο διαφόρων ιικών στελεχών σε διαφορετικούς CD4+ κυτταρικούς τύπους. Η επιλεκτικότητα χρήσης του CCR5 από τα περισσότερα M-tropic στελέχη ως συνυποδοχέα εισόδου, υποδηλώνει τη κρίσιμη συμμετοχή του κατά τη διάρκεια της μετάδοσης και της ασυμπτωματικής φάσης της μόλυνσης. Αντίθετα, ο CXCR4 φαίνεται να χρησιμοποιείται από τον ιό κυρίως στο μετέπειτα συμπτωματικό στάδιο της ασθένειας όταν αρχίζουν να εμφανίζονται τα T-cell-line-tropic στελέχη.

Κεφάλαιο 2

Θεωρία και Πείραμα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκέδαση Ακτίνων Laser

Η πρώτη αναφορά στην ιστορία για τη σκέδαση του φωτός έρχεται από τον Leonardo da Vinci ο οποίος κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το μπλε του ουρανού οφείλεται στη σκέδαση φωτός από «μικροσκοπικά και ανεπαίσθητα άτομα πάνω στα οποία προσπίπτουν οι ηλιακές ακτίνες» καθώς επίσης και στο σκοτάδι που επικρατεί στην ατμόσφαιρα. Περίπου 350 χρόνια αργότερα, ο Leroy Tyndall δημοσίευσε πειράματα σκέδασης φωτός από εναιωρήματα σε διαυγή ρευστά, και ο Lord Rayleigh χρησιμοποιώντας την κυματική θεωρία του φωτός του Maxwell ανέλυσε θεωρητικά την σκέδαση φωτός από αιωρούμενα σωματίδια.

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ν , αλληλεπιδράσει με κάποιο σωματίδιο, το ηλεκτρικό πεδίο της δέσμης διεγείρει τα ηλεκτρικά φορτία των μορίων σε ταλάντωση (κατά μήκος της ευθείας επί της οποίας κείται το διάνυσμα E).

Το προσπίπτον ηλεκτρικό πεδίο είναι ένα επίπεδο κύμα της μορφής:

$$\vec{E}_i(\vec{r}, t) = \vec{n}_i E_0 \exp[j(\vec{k}_i \vec{r} - \omega_i t)]$$

όπου n_i : το μοναδιαίο διάνυσμα με κατεύθυνση ίση με την κατεύθυνση του προσπίπτοντος ηλεκτρικού πεδίου

E_0 : το πλάτος του πεδίου

k_i : το κυματόνυσμα (διάνυσμα διάδοσης) $k_i = 2\pi/\lambda_i$

λ_i : το μήκος κύματος

ω_i : η κυκλική συχνότητα

$k_i \cdot r$: η φάση του κύματος στη θέση r , υποθέτοντας ότι η πηγή της ακτινοβολίας έχει φάση 0.

Οποιαδήποτε κατανομή φορτίου που εκτελεί ημιτονοειδή ταλάντωση στο χρόνο (εδώ με συχνότητα ν) παράγει ένα αντίστοιχο ημιτονοειδές ηλεκτρομαγνητικό κύμα, λόγω της επιτάχυνσης των φορτίων. Έτσι, τα φορτία αυτά εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιας συχνότητας με αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η οποία ονομάζεται σκεδαζόμενη ακτινοβολία (*elastic light scattering*, ελαστική σκέδαση φωτός).

Όταν τα μόρια κινούνται στο διάλυμα, λόγω του φαινομένου Doppler, παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση στη συχνότητα ακτινοβολίας και η σκέδαση ονομάζεται *quasi elastic light scattering* (ημιελαστική σκέδαση φωτός). Έτσι, αντί για μια Rayleigh γραμμή εμφανίζεται μια Rayleigh κορυφή.

Αν τα σωματίδια βρίσκονται σε τέλειο κρύσταλλο (ομογενές μέσο) δε λαμβάνεται σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε διεύθυνση διαφορετική από αυτή του προσπίπτοντος φωτός, αφού το αποτέλεσμα της προσθήκης πολλών διανυσμάτων με διαφορετική φάση είναι μηδέν.

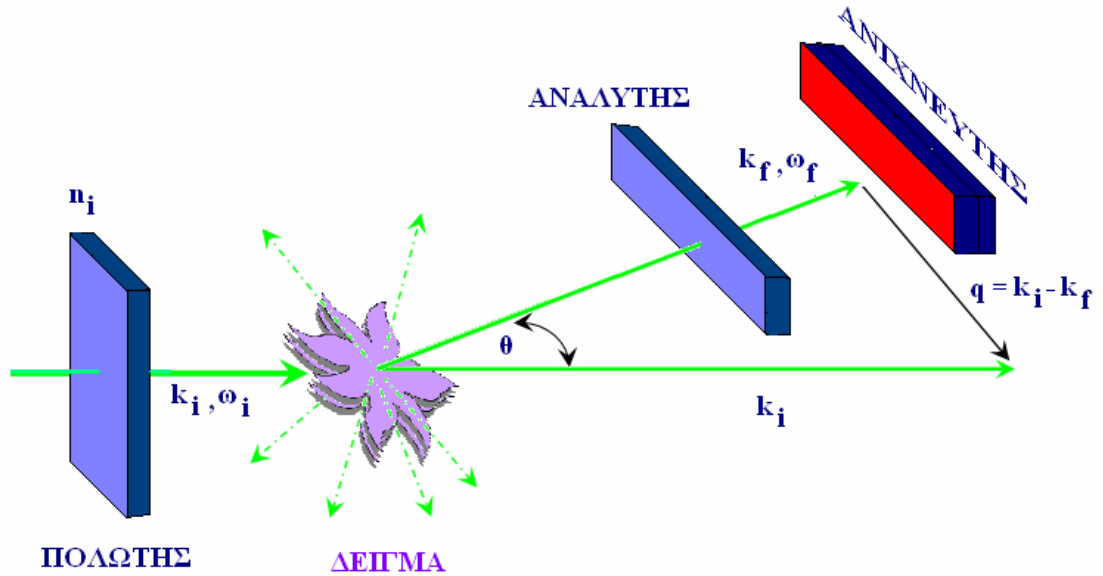
Αν τα σωματίδια είναι τοποθετημένα τυχαία τότε η ολική ένταση σε κάθε διεύθυνση είναι το άθροισμα των εντάσεων των ακτινοβολιών που σκέδασε κάθε άτομο. Συνεπώς, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανομοιογένεια του υγρού για αποστάσεις της τάξης του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Αν η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική και πολωθεί κάθετα με το επίπεδο σκέδασης (Vertically), τότε τα δίπολα θα κινούνται κατά τον άξονα z. Αν πολωθεί οριζόντια (H), η ταλάντωση των διπόλων θα γίνεται κατά τον άξονα y.

Για ισοτροπικά μόρια το κάθετα (V) πολωμένο φως θα δίνει κάθετα σκεδαζόμενο φως και το H πολωμένο φως θα δίνει H σκεδαζόμενο φως. Ωστόσο, για ανισοτροπικά μόρια το V πολωμένο φως δίνει και H και V πολωμένο φως. Αυτό το φαινόμενο καλείται *Depolarization of the scattered light*.

Για τα μικρά μόρια η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι ίδια σε όλες τις γωνίες (σφαιρικά συμμετρική). Για μεγάλα μόρια η ένταση διαφέρει καθώς η γωνία μεταβάλλεται. Οι σκεδαζόμενες ακτινοβολίες από δυο διαφορετικά μέρη ενός μακρομορίου δεν αλληλεπιδρούν σε μηδενική γωνία παρά μόνο σε μεγαλύτερες γωνίες. Αυτό σημαίνει ότι σε μεγάλες γωνίες είναι δυνατόν να δούμε όλο το μόριο, ενώ στις μικρές βλέπουμε μέσα στο μόριο.

Ο παράγοντας σκέδασης ορίζεται ως ο λόγος της μετρούμενης έντασης στη γωνία θ ως προς την ένταση extrapolated στη $\theta=0^\circ$, σχετίζεται με τη μέση γυροσκοπική ακτίνα R_g και εξαρτάται από το σχήμα των σωματιδίων που μπορεί να είναι σφαίρα, ράβδος, άκαμπτο σπείραμα ή/και τυχαίο σπείραμα (spheres, rods, stiff coils and random coils).



Σχήμα 2.1 Προσπίπτον φως με n_i πόλωση και k_i κυματοδιάνυσμα υφίσταται σκέδαση από το δείγμα προς κάθε κατεύθυνση. Μονάχα το σκεδαζόμενο φως με n_f και k_f μετρείται από τον ανιχνευτή σε γωνία θ . Το σκεδαζόμενο κυματοδιάνυσμα, καθώς φαίνεται και στο σχήμα μας, καθορίζεται από τη γεωμετρία.

Κατά την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης είναι δυνατόν να αλλάξουν τρεις από τις φυσικές ποσότητες που χαρακτηρίζουν το προσπίπτον κύμα: η έντασή του (I), η ενέργειά του (E) και το κυματοδιάνυσμά του (k). Τα αντίστοιχα φαινόμενα που συμβαίνουν στο δείγμα περιλαμβάνουν απορρόφηση, απώλεια ενέργειας και σκέδαση της ακτινοβολίας.

Κατά τη σκέδαση, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλλάζει τη διεύθυνση του κυματοδιανύσμά της ($k \neq k_0$). Η σκέδαση χαρακτηρίζεται *ελαστική* όταν δεν αλλάζει το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας $\lambda = \lambda_0$ και *ανελαστική* όταν $\lambda \neq \lambda_0$.

Όταν φωτόνια προσπίπτουν πάνω σε ένα μόριο, αυτό δύναται να απορροφήσει ή να αποδώσει ενέργεια από τους μεταφορικούς, ηλεκτρονικούς, δονητικούς και περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας του.

Αν η σκέδαση φωτός θεωρηθεί από τους μεταφορικούς και περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας, εμφανίζεται μια μικρή μετατόπιση των συχνοτήτων του προσπίπτοντος φωτός (φαινόμενο Doppler), η σκέδαση θεωρείται ελαστική και ονομάζεται **Rayleigh** σκέδαση.

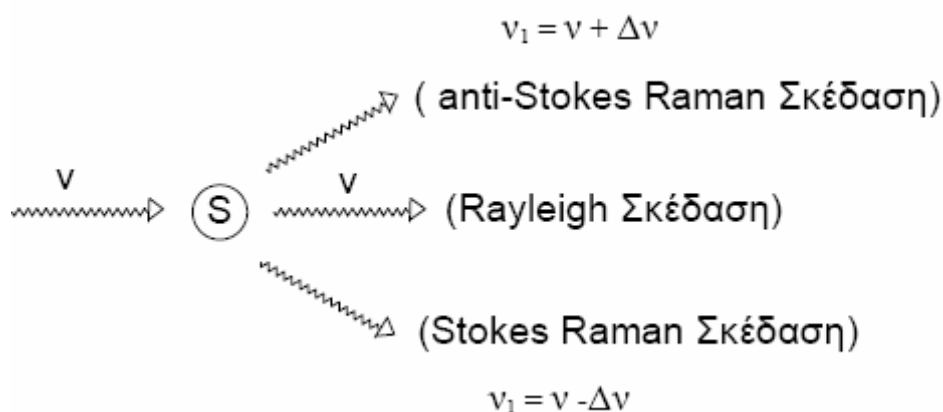
Αντίθετα, η σκέδαση από τους δονητικούς βαθμούς ελευθερίας ονομάζεται **Raman** σκέδαση και παρέχει πληροφορίες για το ενεργειακό φάσμα των μορίων παρουσιάζοντας τις δονήσεις που αντιστοιχούν στις αλλαγές συχνοτήτων της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας κατά την αλληλεπίδραση του προσπίπτοντος κύματος με το μόριο.

Στην Ελαστική σκέδαση φωτός (Rayleigh) η συχνότητα των φωτονίων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι ίση με αυτή των φωτονίων της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Στην ημιελαστική σκέδαση φωτός τα προσπίπτοντα φωτόνια έχουν συχνότητα περίπου ίση με τα σκεδαζόμενα φωτόνια. Η ημιελαστική σκέδαση φωτός που εφαρμόστηκε στα πειράματά μας διακρίνεται σε δυναμική και στατική.

Για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης είναι απαραίτητη η χρήση της κβαντικής ηλεκτροδυναμικής θεωρίας, όμως για την περιγραφή της σκέδασης του φωτός αρκεί η κλασική θεωρία του ηλεκτρομαγνητισμού.

2.1.2 Ο Μηχανισμός της Σκέδασης

Όταν μία δέσμη φωτός διέρχεται από ένα μόριο, ένα μέρος της απορροφάται από το μέσο, ένα άλλο εκπέμπεται κι ένα άλλο σκεδαάζεται όπως φαίνεται στο Σχήμα.



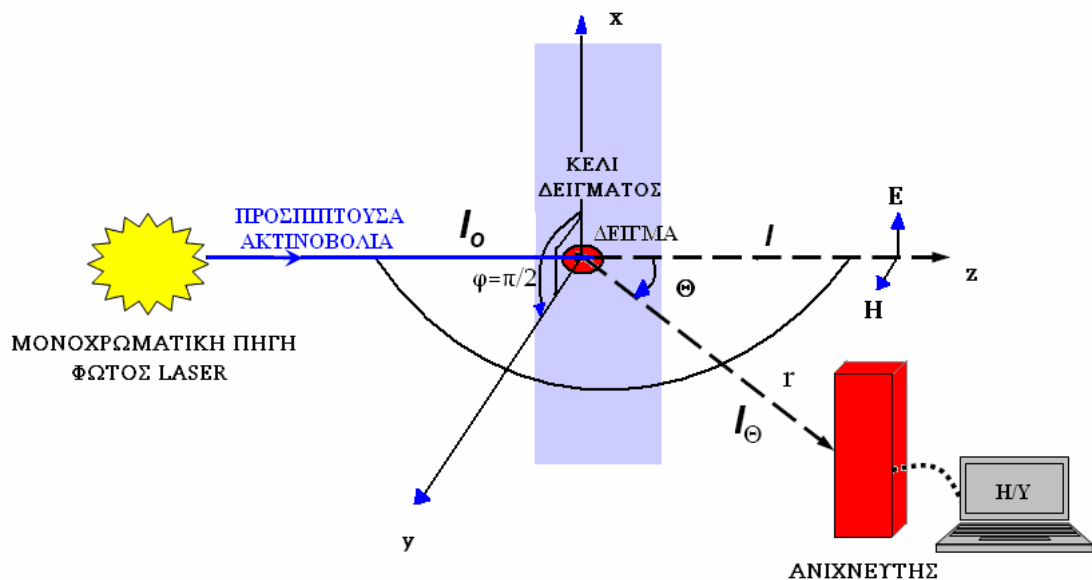
Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση για τα είδη της σκέδασης φωτός.

Το κλάσμα της ακτινοβολίας που σκεδάζεται ελαστικά χωρίς αλλαγή στη συχνότητα αναφέρεται σαν Rayleigh σκέδαση. Το κλάσμα του φωτός που σκεδάζεται ανελαστικά διαφέρει στη συχνότητα από το εισερχόμενο φως και είναι γνωστό σαν σκέδαση Raman.

Όταν φως προσπίπτει πάνω στην ύλη το ηλεκτρικό του πεδίο προκαλεί τη δημιουργία παλλόμενων διπόλων που συμπεριφέρονται σαν δευτερογενείς πηγές φωτός επανεκπέμποντας την ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις (σκέδαση). Οι μεταπτώσεις των συχνοτήτων, η γωνιακή κατανομή, η πολωσιμότητα και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός μπορούν να καθοριστούν από το μέγεθος, το σχήμα και τις αλληλεπιδράσεις του υλικού που προκαλεί τη σκέδαση. Από τα χαρακτηριστικά, λοιπόν, της σκέδασης από ένα υλικό εξάγονται πληροφορίες τόσο για τη δομή, όσο και τη μοριακή δυναμική του.

Ο λόγος που κάποιο μέσο σκεδάζει είναι ότι οι θερμικές διακυμάνσεις δημιουργούν τοπικές ανομοιογένειες οι οποίες προκαλούν διακυμάνσεις στην πυκνότητα και τη διηλεκτρική σταθερά. Το μέσο τετράγωνο αυτών των διακυμάνσεων είναι ανάλογο της σκεδαζόμενης έντασης. Απουσία τοπικών ανομοιογενειών στο διάλυμα, αλληλεπίδραση ακτινοβολίας-ύλης δεν υφίσταται.

Όταν, λοιπόν, δέσμη φωτός προσπίπτει σε διάλυμα, μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται από το διάλυμα, ενώ η υπόλοιπη σκεδάζεται.



Σχήμα 2.3 Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι συνάρτηση του μεγέθους των σκεδαστών, του μοριακού βάρους, του σχήματος και της συγκέντρωσής τους.

Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μέγεθος των σκεδαστών, το μοριακό βάρος, το σχήμα και τη συγκέντρωσή τους.

Σε ένα πείραμα σκέδασης (*Rayleigh σκέδαση*) δέσμη φωτός προσπίπτει σε έναν όγκο υγρού δείγματος και σκεδάζεται προς τον ανιχνευτή. Πολωτές και αναλυτές χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της πόλωσης της προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Συνήθως, η σκεδαζόμενη ένταση καταγράφεται σε δύο γεωμετρίες, την *πολωμένη* (VV), όπου προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη δέσμη πολώνονται κάθετα σε σχέση με το επίπεδο σκέδασης (το οποίο καθορίζεται από τους κυματαριθμούς προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας) και την *αποπολωμένη* (VH), όπου η προσπίπτουσα πολώνεται κάθετα, ενώ η σκεδαζόμενη παράλληλα προς το επίπεδο σκέδασης.

Η δυναμική σκέδαση φωτός παρέχει πληροφορίες στον αντίστροφο χώρο, εξετάζοντας τη χαλάρωση των διακυμάνσεων σε μια χωρική συνιστώσα Fourier μήκους $2\pi/q$, όπου q το διάνυσμα σκέδασης. Η τιμή που προκύπτει εφαρμόζοντας το νόμο των συνημιτόνων στο τρίγωνο που προκύπτει για τα κυματοανύσματα σκέδασης k_f και k_i , τα οποία περιγράφουν τη διεύθυνση και το μέγεθος της ακτινοβολίας που σκεδάζεται και αυτής που εισέρχεται στο δείγμα, αντίστοιχα.

Για *σκέδαση Rayleigh*, όπως και στην περίπτωση μας των πειραμάτων μας, η κρούση φωτός και ύλης μπορεί να θεωρηθεί ελαστική και τα k_f και k_i μεταξύ τους ίσα ($|k_f| \approx |k_i| = 2\pi n/\lambda$). Έτσι, προκύπτει:

$$q = 2k_i \sin(\theta/2) = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin(\theta/2) \quad \begin{array}{l} \text{Συνθήκη του Bragg για} \\ \text{τη σκέδαση} \end{array}$$

όπου n : ο δείκτης διάθλασης του νερού ($n_{H_2O} = 1.333$)

λ : το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ($\lambda = 532 \text{ nm}$)

θ : η γωνία που σχηματίζουν τα k_f και k_i

Για τον προσδιορισμό βασικών χαρακτηριστικών των πολυμερών (μοριακό βάρος, μέγεθος) παρασκευάζονται αραιά διαλύματα. Η συμπεριφορά των πολυμερικών διαλυμάτων επηρεάζεται τόσο από τη συγκέντρωση, όσο και από το είδος του διαλύτη και τη θερμοκρασία.

Η **επίδραση του διαλύτη** αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και ανάλογα με την ικανότητά του να διαλύει πολυμερή σε μεγάλο ή μικρό εύρος θερμοκρασιών και την τάση του να δημιουργεί απωστικό ή ελκτικό δυναμικό για τα μόρια του διαλυμένου πολυμερούς, χαρακτηρίζεται καλός ή φτωχός διαλύτης, αντίστοιχα.

Τα πολυμερικά διαλύματα σε καλό διαλύτη διαχωρίζονται περαιτέρω σε τρεις περιοχές: την **αραιή**, την **ημιαραιή** και την **πυκνή** περιοχή, ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος.

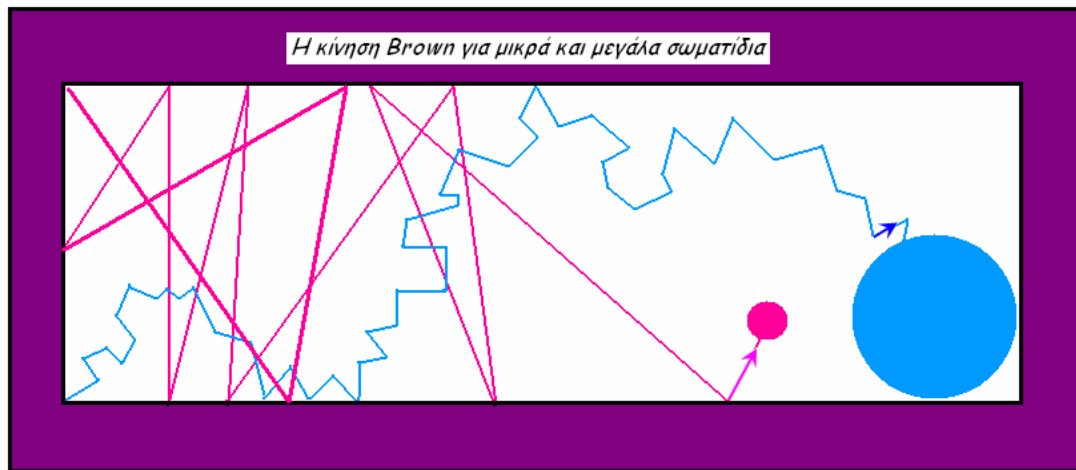
Αραιά διαλύματα χαρακτηρίζονται εκείνα στα οποία οι πολυμερικές αλυσίδες βρίσκονται απομακρυσμένες η μια από την άλλη και οι αλληλεπιδράσεις τους θεωρούνται αμελητέες.

Κατά μέσο όρο, κάθε πολυμερές έχει σφαιρικό σχήμα ακτίνας R_g και οι φυσικές ιδιότητες του διαλύματος δύνανται να αναπτυχθούν σε δυναμοσειρές ως προς τη συγκέντρωση. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος, κάθε αλυσίδα διεισδύει στο χώρο της άλλης με αποτέλεσμα να μη μπορούν οι αλληλεπιδράσεις να χαρακτηριστούν αμελητέες (μετάβαση στην *ημιαραιή περιοχή*).

Στην ημιαραιή περιοχή, η συσχέτιση των διακυμάνσεων στην πυκνότητα των στοιχειωδών μονάδων είναι ισχυρή, ενώ για πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις οι διακυμάνσεις γίνονται πολύ μικρές και η κατάσταση του συστήματος είναι δυνατόν να περιγραφεί από μια, απλή στη διατύπωσή της, θεωρία μέσου πεδίου (*πυκνά διαλύματα*).

Πέρα από τις ιδιότητες των πολυμερικών διαλυμάτων, σε κατάσταση στατικής ισορροπίας, τα πολυμερή λόγω του μεγάλου μεγέθους τους εμφανίζουν αξιοσημείωτη δυναμική συμπεριφορά. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι: η διαρκής και τυχαία **κίνηση Brown** εξαιτίας συγκρούσεων των αλυσίδων με μόρια του διαλύτη, οι υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις, και φαινόμενα που δημιουργούνται από τυχαίες αλληλεπιδράσεις των αλυσίδων (εναγκαλισμοί, κίνηση δικτύου). Αν τα σωματίδια είναι μικρά κινούνται μέσω διάχυσης πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα και οι διακυμάνσεις της έντασης να είναι πολύ γρήγορες. Αντίθετα, μεγάλα σωματίδια διαχέονται αργά, κι έτσι η ένταση του φωτός που σκεδάζεται από αυτά μεταβάλλεται σε μικρότερη χρονική κλίμακα (Σχήμα 2.4).

Τα φαινόμενα αυτά είναι δυνατόν να μελετηθούν παρατηρώντας τη χαλάρωση των διακυμάνσεων σύστασης. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η **δυναμική σκέδαση φωτός** (Dynamic Light Scattering, DLS).



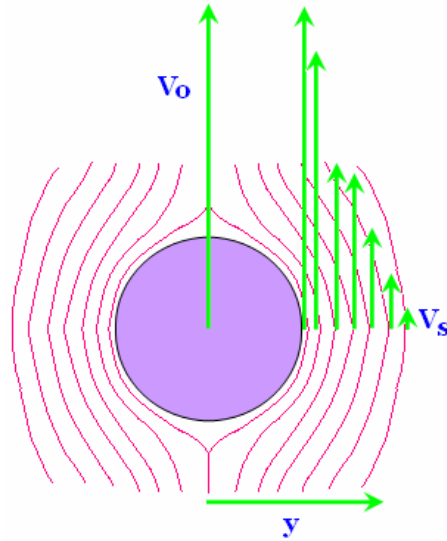
Σχήμα 2.4 Η διαρκής και τυχαία κίνηση Brown.

2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια τεχνική διάχυσης που στηρίζεται στην επίδραση του συντελεστή τριβής στη διάχυση του σωματιδίου του υπό εξέταση δείγματος. Ο συντελεστής τριβής δηλώνει την αντίσταση που συναντά η επιφάνεια του σωματιδίου κατά τη μετακίνησή του σε ένα υγρό. Η ακτίνα που προκύπτει από την τεχνική αυτή ονομάζεται υδροδυναμική R_H και υπολογίζεται από τη σχέση *Stokes-Einstein*. Κάθε μόριο της διαλυμένης ουσίας περιστοιχίζεται από πολλά μόρια διαλύτη σχηματίζοντας μία φυσαλίδα (blob) με σφαιρικό πάντα σχήμα και ακτίνα R_h . Είναι η ακτίνα του blob που σχηματίζει ένα μόριο σε ένα διάλυμα και μπορεί να μεταβληθεί αλλάζοντας το διαλύτη.

Η δυναμική σκέδαση φωτός μετράει τις διακυμάνσεις τις οποίες υφίσταται η σκεδαζόμενη ένταση του φωτός κατά τη διάρκεια του πειράματος και καταγράφει τις χρονικές στιγμές που συμβαίνουν οι μέγιστες διακυμάνσεις. Η κάθε μέγιστη μεταβολή αντιστοιχεί στη διαδικασία της χαλάρωσης σκέδασης εξαιτίας της μοριακής κίνησης στο διάλυμα. Κανονικά, ο χαρακτήρας της κίνησης είναι μεταφορικός ή περιστροφικός αλλά επειδή η περιστροφική διάχυση είναι πολύ αργή, θεωρείται αμελητέα και υπολογίζεται μόνο η διάχυση λόγω μεταφορικής κίνησης.

Το μοντέλο Stokes αναφέρεται στην κίνηση σκληρών σφαιρών μέσα σε υγρό (Σχήμα 2.5). Η αντίσταση στην κίνησή τους σχετίζεται με τη δύναμη ανάμεσα στο υγρό και την επιφάνεια της επιταχυνόμενης σφαίρας.



Σχήμα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση της κίνησης σκληρής σφαίρας μέσα σε υγρό.

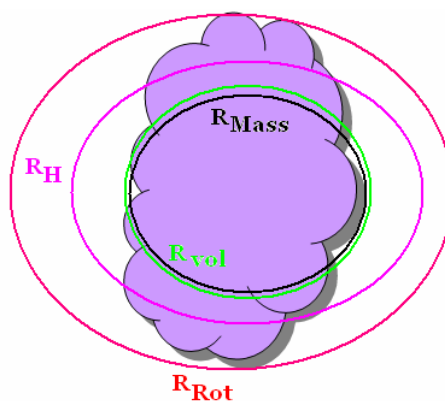
Η συνολική δύναμη που ασκείται από το υγρό δίνεται από τη σχέση:

$$F = 6\pi\eta R$$

Ο παράγοντας F ονομάζεται *συντελεστής τριβής* και χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ακτίνα του σωματιδίου μέσω του συντελεστή διάχυσης D . Σύμφωνα με την εξίσωση του Stokes-Einstein ισχύει:

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Η ακτίνα που προκύπτει από τη μέθοδο διάχυσης σκληρών σφαιρών μπορεί να υποθεθεί ότι είναι η ακτίνα του εξεταζόμενου σωματιδίου που κινείται με την ίδια ταχύτητα. Η υπόθεση όμως δεν είναι απόλυτα σωστή γιατί στην πραγματικότητα τα μακρομόρια που μας ενδιαφέρουν δεν είναι σφαιρικά. Συνεπώς, η υδροδυναμική ακτίνα που υπολογίζουμε είναι ενδεικτική του πραγματικού μεγέθους του σωματιδίου.



Σχήμα 2.6 Ενδεικτικές ακτίνες σε ένα μη σφαιρικό πολυμερικό μόριο ή πολυμοριακό σύμπλοκο.

ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ ΜΕ LASER

(*laser light scattering*)

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ακριβής μέτρηση πολλών παραμέτρων (μοριακό βάρος, γυροσκοπική ακτίνα, συντελεστής διάχυσης, $2^{\text{ος}}$ συντελεστής virial)	Απαιτείται διαλύτης με διαφορετικό δείκτη διάθλασης από τη διαλυμένη ουσία, προσεκτική απομάκρυνση εξωτερικών ανεπιθύμητων σκευαστών (σκόνη)

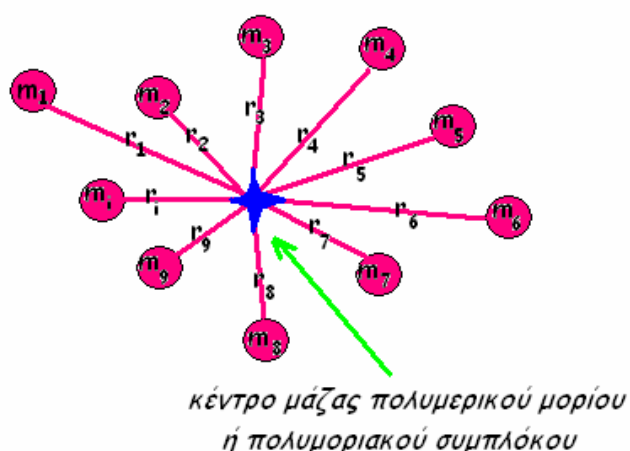
ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αμελητέα παρενόχληση της θερμοδυναμικής κατάστασης του δείγματος από τις ακτίνες laser	Εφαρμόζεται μόνο σε δείγματα με αμελητέα απορρόφηση στην ορατή περιοχή
Ευρεία κάλυψη δυναμικής περιοχής	Απαιτείται η διαλυμένη ουσία να έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης από το διαλύτη ώστε να μπορεί να μελετηθεί

2.1.4 Στατική Σκέδαση Φωτός

Η στατική σκέδαση φωτός αποτελεί μια τεχνική με την οποία μπορούν να μετρηθούν μεταβολές στη σκέδαση Rayleigh συμπλόκων πρωτεϊνών σε διάλυμα χωρίς να καταστρέφεται η δομή τους και να γίνει χαρακτηρισμός των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων χωρίς να απαιτείται τεμαχισμός ή ακινητοποίηση της πρωτεΐνης. Μετράει τη μέση τιμή της σκεδαζόμενης από το δείγμα έντασης του φωτός κατά τη διάρκεια του πειράματος και παρέχει συμπεράσματα για το μοριακό βάρος, τη γυροσκοπική ακτίνα R_g και το δεύτερο συντελεστή virial, ενώ είναι δυνατόν να υπολογίσουμε και τη μοριακή μάζα των πολυμοριακών συμπλόκων.

Η γυροσκοπική ακτίνα ενός πολυμερούς που αποτελείται από N μονομερή είναι ένας τρόπος μέτρησης του μεγέθους του πολυμερικού μορίου και ορίζεται από την απόσταση μεταξύ των μονομερών i και j . Συνήθως, η απόσταση r_{ij} αντικαθίσταται από την απόσταση r_{i0} του κάθε μονομερούς από το κέντρο μάζας του πολυμερούς ή του πολυμοριακού συμπλόκου (Σχήμα 2.7).



Σχήμα 2.7 Το κέντρο μάζας σε ένα μη σφαιρικό πολυμοριακό σύμπλοκο.

$$R_G = \frac{1}{2N} \left(\sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij} \rangle^2 \right)^{1/2} \cong \left(\sum_i^N r_i^2 \right)^{1/2}$$

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.2 Πειραματικά Συστήματα

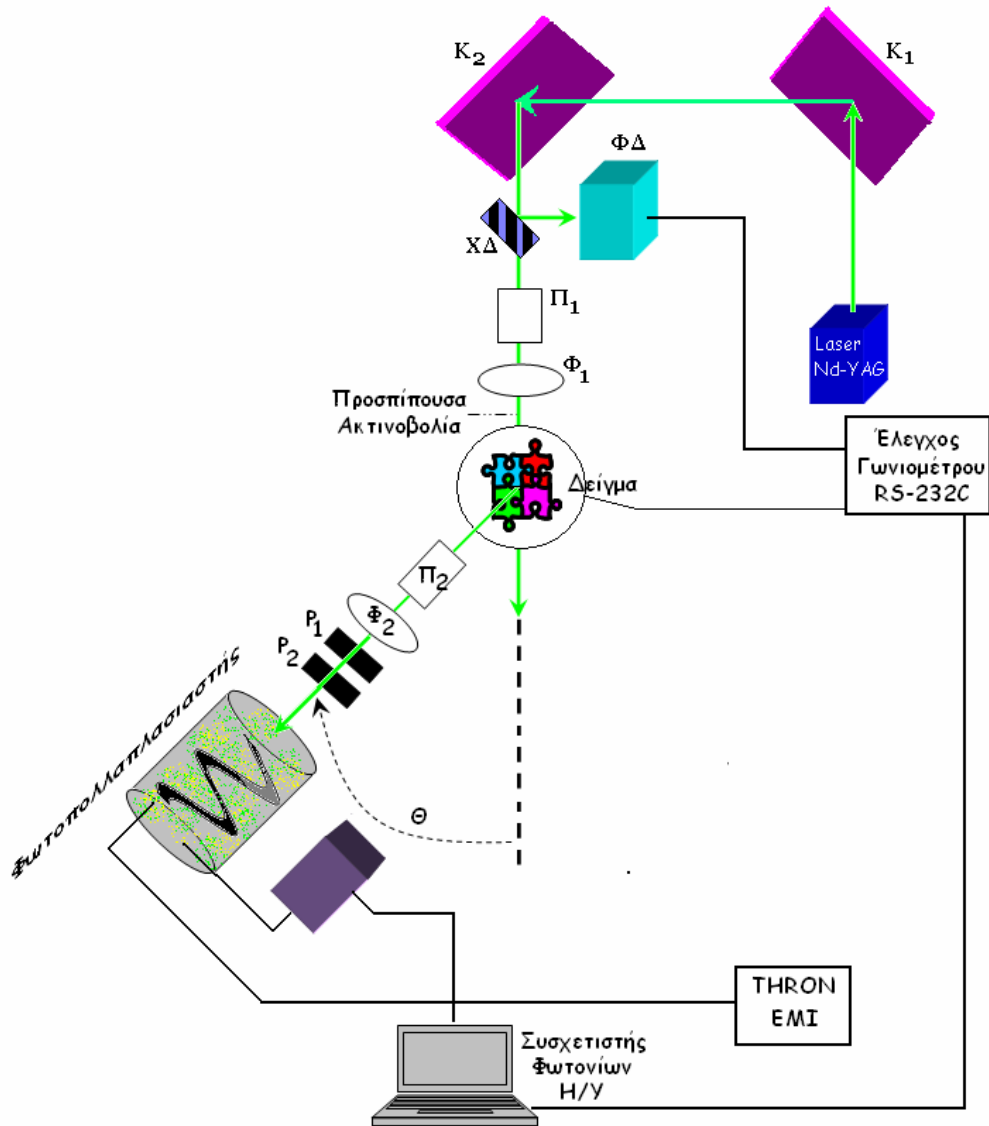
2.2.1 Πειραματική Διάταξη

Οι μετρήσεις δυναμικής και στατικής σκέδασης γίνονται χρησιμοποιώντας τη διάταξη του παρακάτω σχήματος.

Η πηγή φωτός είναι ένα Nd:YAG laser με μήκος κύματος $\lambda=532\text{nm}$ (πράσινη ακτινοβολία), η διάμετρος της δέσμης είναι 0.32mm , ενώ η μέγιστη ισχύς του είναι 100mW . Το φως, μέσω των καθρεφτών K_1 και K_2 , κατευθύνεται σε ένα διαχωριστή δέσμης (beam splitter) για τον έλεγχο της έντασης και της θέσης της προσπίπτουσας δέσμης με μια διάταξη τεσσάρων φωτοдиодων (ΦΔ) και για τον προσανατολισμό της στο δείγμα. Για να φτάσει στο δείγμα, καταρχήν πολώνεται μέσω του πολωτή Π_1 κάθετα (V) στο επίπεδο σκέδασης, και εστιάζεται στο δείγμα μέσω ενός αχρωματικού φακού (Φ_1) με μήκος εστίασης $F=200\text{mm}$ [19].

Το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα, κατασκευασμένη από οπτικό γυαλί, με διάμετρο στο σημείο πρόσπτωσης της δέσμης ίση με 10mm . Η κυψελίδα είναι τοποθετημένη σε λουτρό που περιέχει τολουόλιο (υγρό ίδιου δείκτη διάθλασης με το γυαλί) για την αποφυγή φαινομένων ανάκλασης σε όλο το φάσμα των μετρούμενων γωνιών.

Η θερμοκρασία του λουτρού και του δείγματος καθορίζεται και σταθεροποιείται με τη χρήση θερμοστάτη. Γύρω από το δείγμα υπάρχει ένα αυτόματο γωνιόμετρο το οποίο μπορεί να καθορίσει γωνίες σκέδασης από 11° έως 150° . Το γωνιόμετρο ελέγχεται από τον υπολογιστή.



Σχήμα 2.8 Η πειραματική διάταξη των πειραμάτων μας.

Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία περνάει από έναν πολωτή (Π_2) ώστε να είναι δυνατή η επιλογή της μέτρησης της κάθετης (VV) ή της οριζόντιας (VH) συνιστώσας πόλωσης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Μέσω ενός φακού (Φ_2) και δύο οπών (pinholes, P_1 και P_2) εισέρχεται στο φωτοπολλαπλασιαστή. Οι οπές χρησιμεύουν ώστε να καθοριστεί ο όγκος της σκέδασης.

Η συσχέτιση φωτονίων γίνεται με τη χρήση ενός ALV-5000/E πολλαπλών χρόνων χαλάρωσης ψηφιακό συσχετιστή φωτονίων ο οποίος:

α) αρχικά, μετράει τους φωτοηλεκτρικούς παλμούς $n(t)$ (ένταση) ανά τακτά χρονικά διαστήματα,

β) καθυστερεί τα αποτελέσματα για ακέραια πολλαπλάσια των διαστημάτων αυτών $\tau=kt$,

γ) έπειτα, πολλαπλασιάζει τις άμεσες και τις καθυστερημένες εντάσεις και

δ) τέλος, προσθέτει τα γινόμενα που προκύπτουν.

Έτσι, υπολογίζει την ποσότητα: $n(q, t + \tau) n(q, t)$ στη διάρκεια του συνολικού χρόνου μέτρησης, για διάφορες τιμές του τ και υπολογίζει τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης των φωτονίων, δηλαδή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας:

$$G(\tau) = \langle n(t + \tau)n(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T}^T n(t + \tau)n(t) dt$$

την οποία προσεγγίζει με τη διακριτή συνάρτηση:

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{N-1} n_i n_{i+k} = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau) dt = 1 - e^{-f\tau}$$

κανονικοποιώντας την οποία, προκύπτει:

$$G_{norm}(q, t) = \frac{\langle n(q, t)n(q, 0) \rangle}{\langle n(q, 0) \rangle^2}$$

Οι τιμές του τ για τις οποίες γίνονται οι μετρήσεις, είναι χαρακτηριστικές του κάθε φωτοπολλαπλασιαστή.

Ο συσχετιστής φωτονίων χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια των δυναμικών μετρήσεων καταγράφοντας τη συνάρτηση συσχέτισης, ενώ για τις στατικές μετρήσεις το σήμα λαμβάνεται απευθείας από τον ανιχνευτή.

Σχεδόν όλα τα δείγματα που υφίστανται δυναμική σκέδαση φωτός εμφανίζουν δύο κορυφές. Η πρώτη αντιστοιχεί σε μεμονωμένα μικκύλια διαστάσεων μερικών nm και η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί σε ογκώδη συσσωματώματα (aggregates) μεταξύ των μικκυλίων, διαστάσεων μερικών δεκάδων nm. Ακόμη και σε πολύ αραιές συγκεντρώσεις παρατηρείται συσσωμάτωση ανάμεσα στα μικκύλια. Το Μοριακό Βάρος των συσσωματωμάτων είναι πολύ μεγάλο αλλά το συνολικό ποσοστό τους κατά μάζα είναι πολύ μικρό. Ωστόσο, επειδή οι διαστάσεις των μακρομορίων είναι καθοριστικές για το φαινόμενο της σκέδασης, η συνεισφορά τους στην ένταση της σκέδασης είναι υπολογίσιμη.

Σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως μοριακού βάρους υπάρχει μια αργή περιοχή μικρού πλάτους. Η εξάρτηση στα διαγράμματα Γ προς q^2 εμφανίζεται πάντα γραμμική, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο τρόπος χαλάρωσης είναι η διάχυση.

Κεφάλαιο 3

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

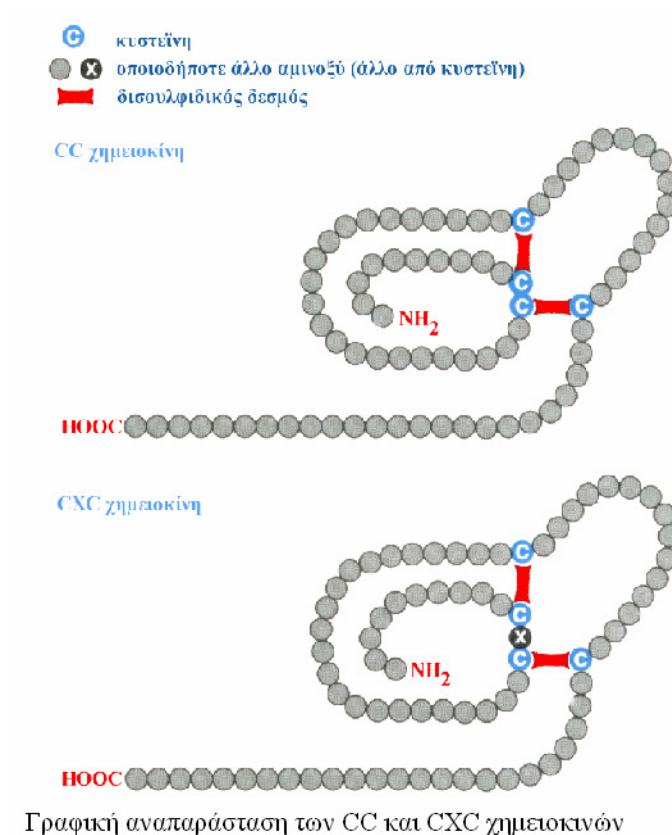
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

3.1 Χημειοκίνες και χημειοϋποδοχείς

Η ταυτοποίηση της πρώτης χημειοκίνης έγινε το 1987 και μέχρι σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 40 χημειοκίνες. Οι χημειοκίνες αποτελούν μία ομάδα μικρών πεπτιδίων (μεγέθους 8-15 kDa) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Οι χημειοκίνες επιδρούν σε κύτταρα μέσω χημειοτακτικών υποδοχέων που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, έχουν επταμερή διαμεμβρανική δομή και μεταβιβάζουν ενδοκυτταρικές πληροφορίες μέσω πρωτεϊνών του τύπου G. Ως ομοιοστατικοί χημειοϋποδοχείς θεωρούνται οι CXCR4, CXCR5, CCR4, CCR7, και CCR9 ενώ ως φλεγμονώδεις χημειοϋποδοχείς θεωρούνται οι CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, και CCR6. Συνολικά, οι χημειοϋποδοχείς αποτελούν ένα μεγάλο τμήμα των κυτταρικών υποδοχέων της ομάδας της ροδοψίνης που έχουν χαρακτηριστική επταμεμβρανική δομή. Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των χημειοϋποδοχέων αποτελούν η κοινή δομή τους (25-80% ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων) (Σχήμα 3.A), η έκφραση τους κυρίως σε λευκοκύτταρα, και η μεταβίβαση ενδοκυτταρικών πληροφοριών μέσω πρωτεϊνών τύπου G όταν επιδρούν με τις αντίστοιχες χημειοκίνες [20].

Οι βιολογικές διεργασίες που χαρακτηρίζουν τους χημειοϋποδοχείς είναι η χημειοταξία των λευκοκυττάρων και κατά συνέπεια συμβάλλουν στις ανοσολογικές αντιδράσεις τόσο της πρωτογενούς όσο και της επίκτητης ανοσίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των χημειοϋποδοχέων σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος συμβάλλουν σημαντικά στην ανορχήστρωση μίας ανοσολογικής αντίδρασης [21]. Τα T λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα υπόκεινται σε δραματικές αλλαγές στην έκφραση των χημειοϋποδοχέων τους ανάλογα με τον τύπο του T λεμφοκυττάρου για παράδειγμα εάν είναι ανενεργά ή μνημονικού τύπου και εάν τα δενδριτικά κύτταρα είναι ανώριμα ή ώριμα. Για παράδειγμα, μετά την ενεργοποίηση τους πρώιμα (naïve) T λεμφοκύτταρα ελατώνουν την έκφραση των χημειοϋποδοχέων για τις ομοιοστατικές χημειοκίνες όπως CXCR4, CCR7 και εκφράζουν υποδοχείς για τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες όπως CCR3, CCR5 και CXCR3 [22]. Σε αντίθεση, τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς για τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες και συνεπώς προσελκύονται σε φλεγμονώδεις ιστούς για να αποκτήσουν συγκεκριμένα αντιγόνα και συνεπώς να μπορέσουν να ενεργοποιήσουν T λεμφοκύτταρα. Επιπρόσθετα T λεμφοκύτταρα του τύπου 1 και τύπου 2 έχουν βρεθεί ότι εκφράζουν διαφορετικούς χημειοϋποδοχείς. Για παράδειγμα οι χημειοϋποδοχείς CXCR3 και CCR5 εκφράζονται κυρίως σε T λεμφοκύτταρα τύπου 1.



Σχήμα 3.Α Οι σχετικές θέσεις των αμινοξέων κυστεΐνης σε δύο από τις τέσσερις ομάδες χημειοκινών.

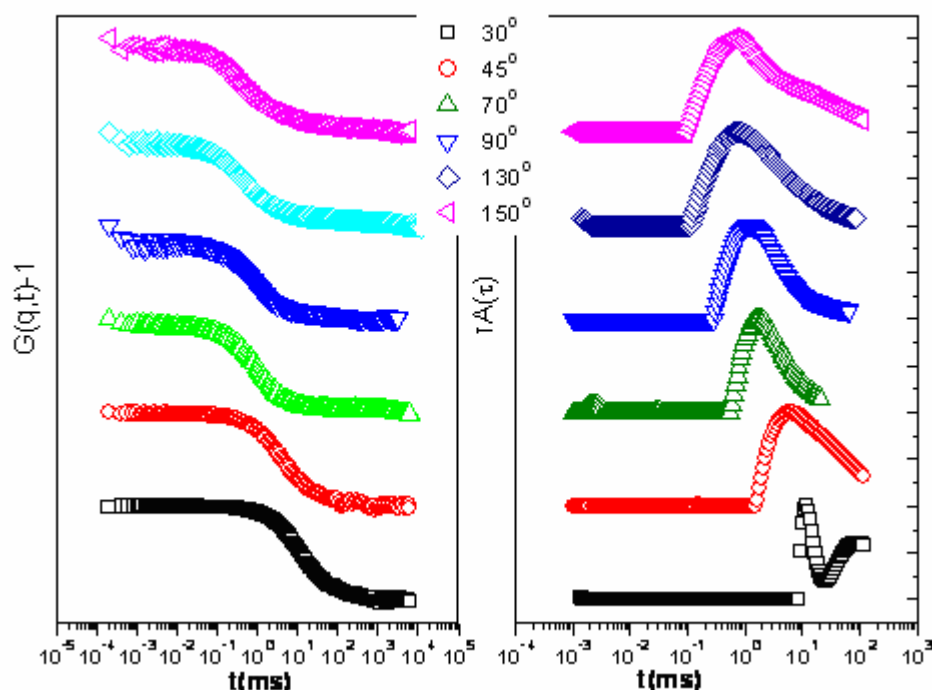
Ο υποδοχέας CCR5 αποτελεί έναν από τους κύριους συνυποδοχείς της λοίμωξης από τον ιό HIV [23, 24]. Η ανακάλυψή του ανήκει τόσο στον Edward Berger που πρώτος εντόπισε την ιδιότητα του ιού να χρησιμοποιεί συνυποδοχείς όσο και στον Ghalib Alkhatib που ήταν εκείνος που το 1996 ανακάλυψε ότι ο CCR5 είναι ο συνυποδοχέας που χρησιμοποιούν τα μακροφαγοτροπικά (M-tropic) στελέχη του ιού [25]. Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο CD34, και σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου που έχουν χαρακτηριστικά βοηθητικών T λεμφοκυττάρων τύπου 1 [26, 27]. Σε T λεμφοκύτταρα η έκφραση του υποδοχέα αυξάνεται με παρατεταμένη ενεργοποίηση τους με IL-2 και άλλα μιτογόνα ερεθίσματα. Ο CCR5 επίσης εκφράζεται τόσο σε CD4+ όσο και σε CD8+ θυμοκύτταρα και σε διάφορους άλλου τύπου κυττάρων όπως νευρώνες, αστροκύτταρα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, λυϊκά μυοκύτταρα των αγγείων, και ινοβλάστες [28, 29]. Η λειτουργικότητα του υποδοχέα CCR5 αναστέλλεται σε άτομα που

φέρουν την μετάλλαξη CCR5Δ32, που δεν περιέχει 32 ζεύγη βάσεων στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου και κωδικοποιεί μία κολοβή μή λειτουργική πρωτεΐνη [30]. Η συχνότητα της ομοζυγωτίας για το γονίδιο CCR5Δ32 είναι περίπου το 1% των καυκάσιων της Βορείου Αμερικής που είναι κατά τα άλλα υγιείς και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε λοίμωξη από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό (HIV) [31].

Ο CXCR4 είναι ο πρώτος υποδοχέας που βρέθηκε να αποτελεί συνυποδοχέα της λοίμωξης από τον ιό HIV [32]. Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, μονοκυττάρων, T λεμφοκυττάρων, B λεμφοκυττάρων, προγονικών κυττάρων του περιφερικού αίματος και μυελού των οστών, δενδριτικών κυττάρων, κυττάρων του Langerhans, και θυμοκυττάρων [26 , 28]. Ο υποδοχέας CXCR4 επίσης εκφράζεται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, μικρογλία και αστροκύτταρα [33]. Σε T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ο υποδοχέας CXCR4 εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα τύπου CD45RA+, και η έκφραση του αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με φυτοαιμαγλουτινίνη και IL-2 [34]. Ο υποδοχέας CXCR4 συνδέει την χημειοκίνη SDF-1 η οποία προκαλεί την κινητοποίηση ασβεστίου και την χημειοταξία κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό.

3.1.1 Προσδιορισμός υδροδυναμικών παραμέτρων πεπτιδίων CCR5

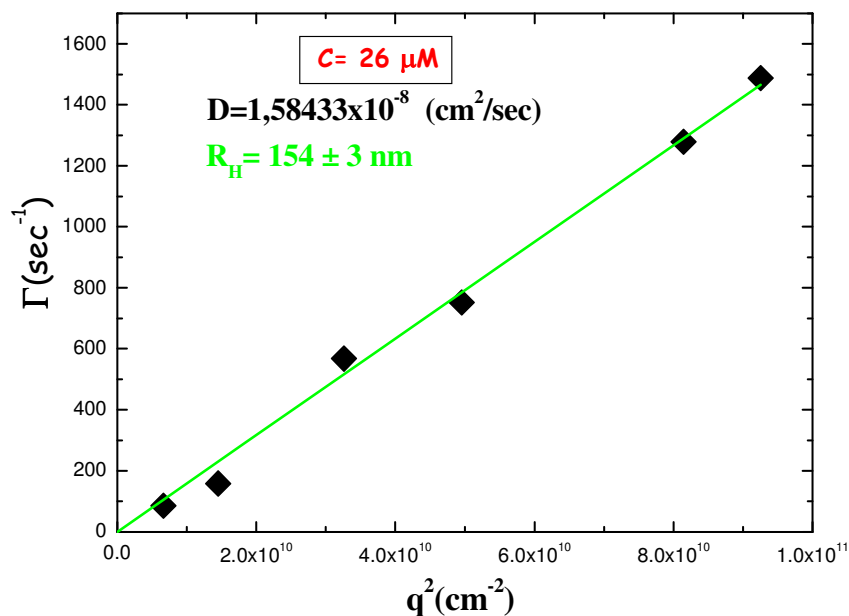
Στο Σχήμα 3.1 δίνονται οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης για το συγκεκριμένο διάλυμα του πεπτιδίου CCR5 ($C=26 \mu\text{M}$) με γεωμετρία σκέδασης VV, σε επτά διαφορετικές γωνίες σκέδασης σε θερμοκρασία 23°C . Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης υπολογίστηκαν από τον συσχετιστή φωτονίων που έχει περιγραφεί στο πειραματικό μέρος και μετρήθηκε στην πειραματική διάταξη του Σχήματος 2.8.



Σχήμα 3.1 Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του πεπτιδίου CCR5 ($C=26 \mu\text{M}$) για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

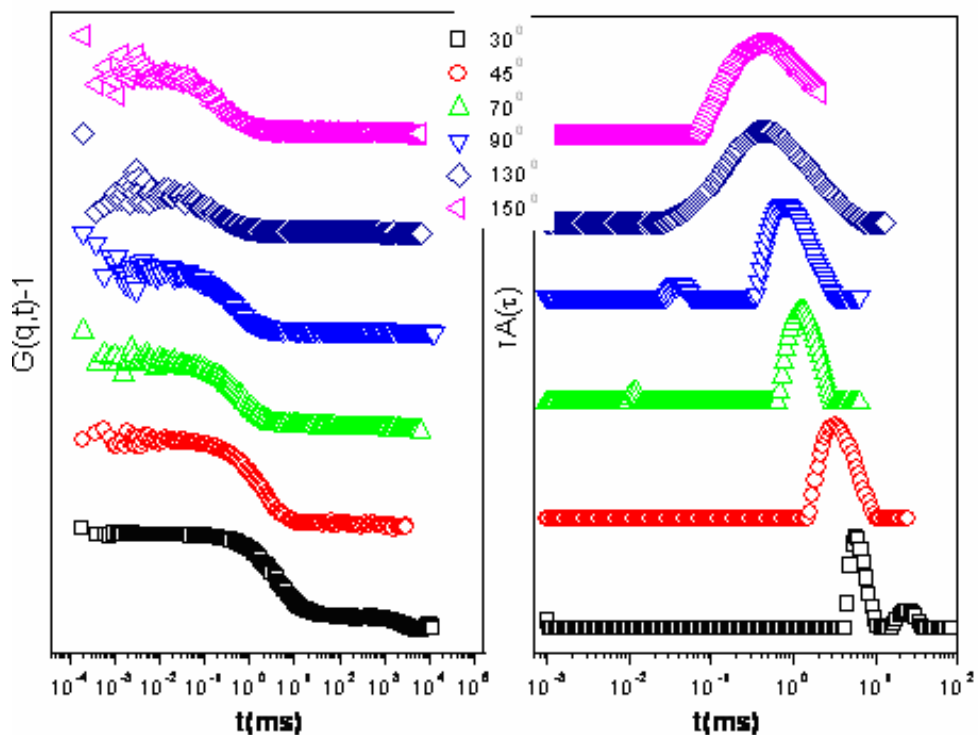
Στη συγκεκριμένη περίπτωση η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μπορεί να περιγραφεί σαν μια απλή εκθετική χαλάρωση και προσαρμογή με μια συνάρτηση της μορφής $ae^{-t/\tau}$ μπορεί να δώσει την ένταση και τον χαρακτηριστικό χρόνο χαλάρωσης της κίνησης. Η ανάλυση αυτή απαιτεί την εκτέλεση ενός μετασχηματισμού Laplace, ο οποίος επιτυγχάνεται με την χρήση του προγράμματος REPES. Το REPES υποθέτει ότι η $G^{(1)}(q,t)$ αποτελείται από μια υπέρθεση εκθετικών η οποία περιγράφει την κατανομή των χρόνων χαλάρωσης $\tau A(\tau)$. Η προσαρμογή που δίνει την κατανομή χρόνων φαίνεται στο δεξί μέρος του σχήματος. Η ένταση της διαδικασίας υπολογίζεται από το εμβαδόν κάτω από την αντίστοιχη κορυφή

πολλαπλασιασμένο με την ολική σκεδαζόμενη ένταση, ενώ ο χαρακτηριστικός χρόνος χαλάρωσης τ υπολογίζεται από τον χρόνο στο μέγιστο της κορυφής.



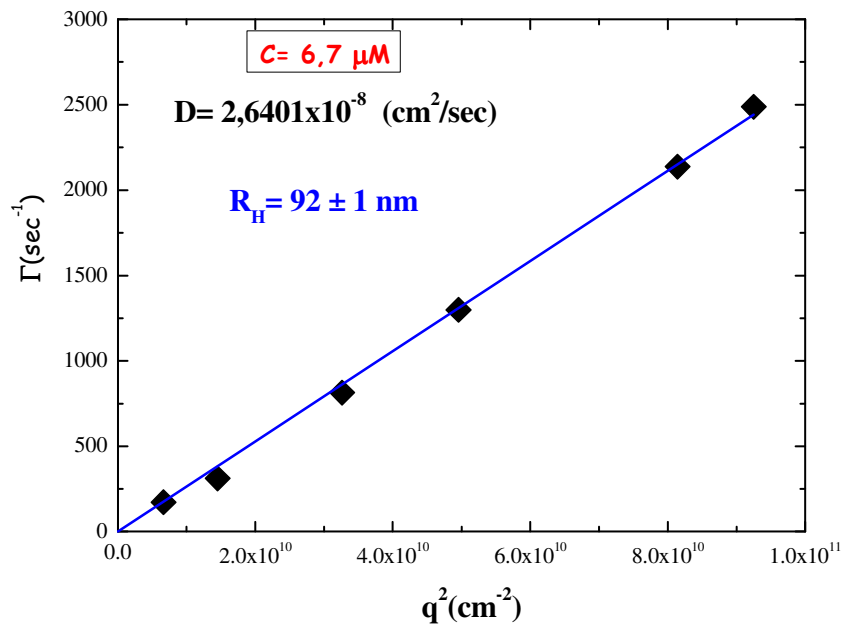
Σχήμα 3.2 Ο ρυθμός χαλάρωσης του πεπτιδίου CCR5 ($C=26 \mu M$) σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης. Η κλίση δίνει τον συντελεστή διάχυσης.

Αν σχεδιάσουμε την γραφική παράσταση του ρυθμού χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ συναρτήσει του q (Σχήμα 3.2) παρατηρούμε ότι $\Gamma \sim q^2$ το οποίο είναι ένα τυπικό αποτέλεσμα για αραιά διαλύματα μακρομορίων τα οποία ακολουθούν κίνηση Brown. Ο συντελεστής μεταφορικής διάχυσης D δίνεται από την σχετική κλίση και ισούται με $(\Gamma/q^2)_{q \rightarrow 0}$. Η υδροδυναμική ακτίνα μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης Stokes-Einstein θεωρώντας ότι έχουμε κίνηση Brown σφαιρικών σωματιδίων διασπαρμένα μέσα σε διαλύτη. Η σχέση αυτή περιέχει τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D και δίνεται από την έκφραση $R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D}$ όπου K_B είναι η σταθερά Boltzmann και η είναι το ιξώδες του διαλύτη. Αν αντικαταστήσουμε την τιμή που βρήκαμε προηγουμένως για τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D (σχήμα 3.2) στην σχέση αυτή εξάγουμε την αντίστοιχη υδροδυναμική ακτίνα στα 154 ± 3 nm.



Σχήμα 3.3 Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του πεπτιδίου $CCR5$ ($C=6.7 \mu M$) για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

Στο παραπάνω Σχήμα 3.3 παρουσιάζονται παρόμοιες πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης και για μία ακόμη συγκέντρωση του πεπτιδίου $CCR5$ ($C=6.7 \mu M$) μαζί με τον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης και της υδροδυναμικής ακτίνας (Σχήμα 3.4).

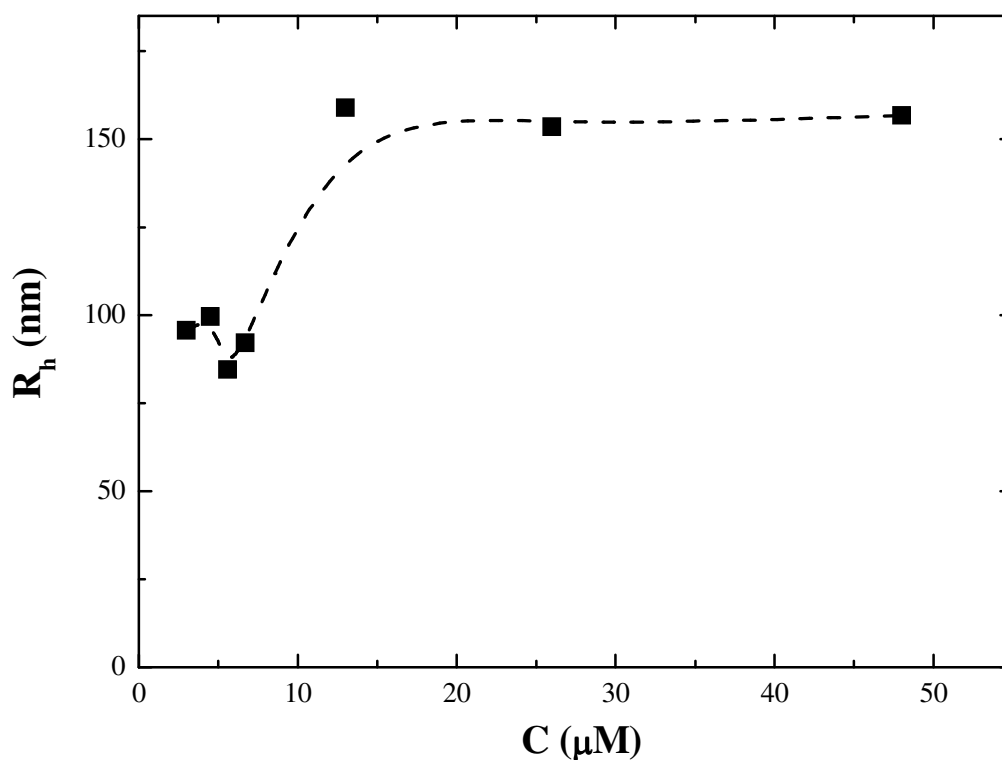


Σχήμα 3.4 Ο ρυθμός χαλάρωσης του πεπτιδίου CCR5 ($C=6.7 \mu\text{M}$) σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης. Η κλίση δίνει τον συντελεστή διάχυσης.

Συνολικά έγιναν μετρήσεις σε επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται και στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα.

C(μM)	D (cm/s ²)	R _h (nm)
48	$0,55 \times 10^{-8}$	157 ± 6
26	$1,58 \times 10^{-8}$	154 ± 3
13	$1,53 \times 10^{-8}$	159 ± 5
6.7	$2,64 \times 10^{-8}$	92 ± 1
5.6	$2,88 \times 10^{-8}$	85 ± 2
4.5	$2,44 \times 10^{-8}$	100 ± 1
3	$2,54 \times 10^{-8}$	96 ± 2

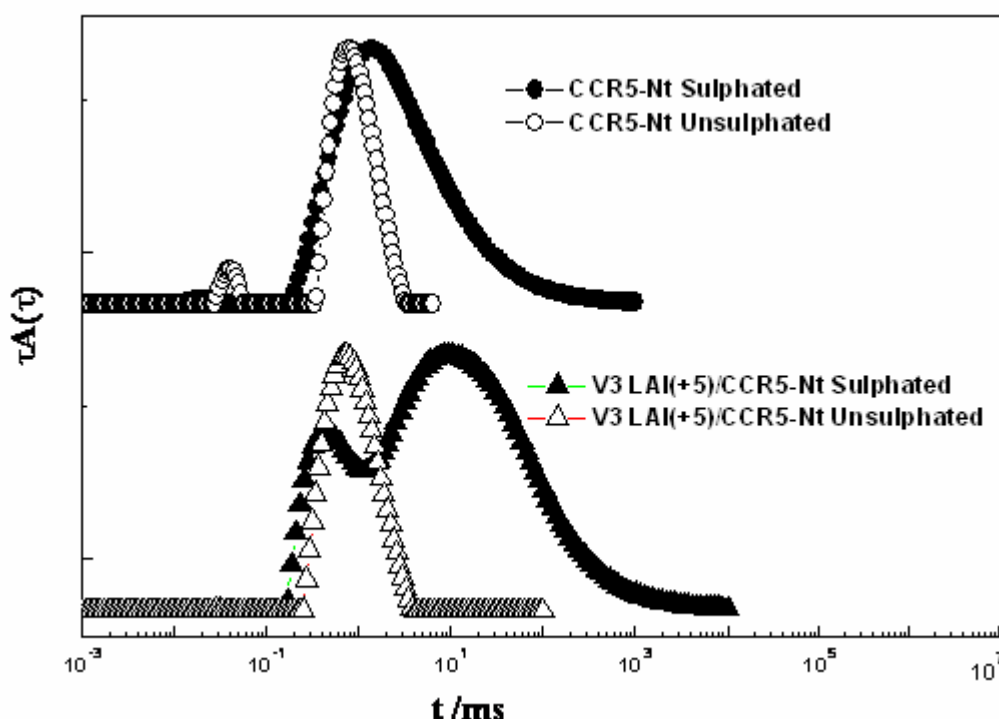
Με τη μείωση της συγκέντρωσης παρατηρείται μια προοδευτική μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας των υπερμοριακών συμπλόκων CCR5-Nt που σχηματίζονται. Η τάση αυτή του CCR5-Nt να σχηματίζει υπερμοριακά σύμπλοκα έχει παρατηρηθεί και με άλλες πειραματικές τεχνικές και βοηθά στη βιολογική του δράση. Επίσης, οι αντίστοιχες στατικές μετρήσεις σκέδασης έδωσαν επί πλέον πληροφορίες σχετικά με τη μορφή αυτών των συμπλόκων. Τιμές του λόγου $R_g/R_h \sim 1,7$ αντιστοιχούν σε ελλειψοειδή όπου ο λόγος των αντίστοιχων ημιαξόνων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30.



Σχήμα 3.5 Η υδροδυναμική ακτίνα R_h των υπερμοριακών συμπλόκων του αμινοτελικού άκρου του CCR5 σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης.

3.1.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ πεπτιδίων V3 και CCR5

Για τη μελέτη του σχηματισμού διαλυτών V3_{LAI}/CCR5-Nt συμπλόκων με σκέδαση ακτίνων Laser προετοιμάστηκαν διαλύσεις των παραπάνω πεπτιδίων με συγκέντρωση του V3_{LAI} πεπτιδίου (50nM) και συγκέντρωση του CCR5-Nt (16,7 nM) (V3_{LAI}/CCR5-Nt: 3:1). Η μοριακή συγκέντρωση των V3/CCR5-Nt πεπτιδίων επιλέχτηκε στο 3:1, ως η αναλογία με τα καλύτερα πρότυπα πρόσδεσης, με βάση τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων με την τεχνική SPR (Surface Plasmon Resonance).



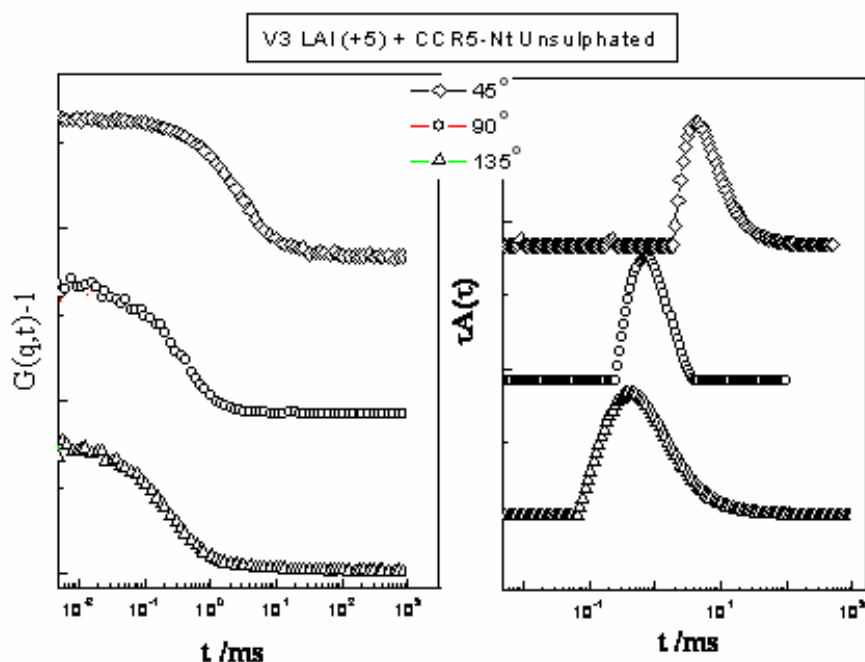
Σχήμα 3.6 Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου V3 LAI(+5) παρουσία σουλφονιωμένου και μη σουλφονιωμένου CCR5-Nt

Ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ των V3 πεπτιδίων και του σουλφονιωμένου αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα CCR5 φάνηκε επίσης να σχετίζεται άμεσα με την πολυκατιονική φύση του V3.

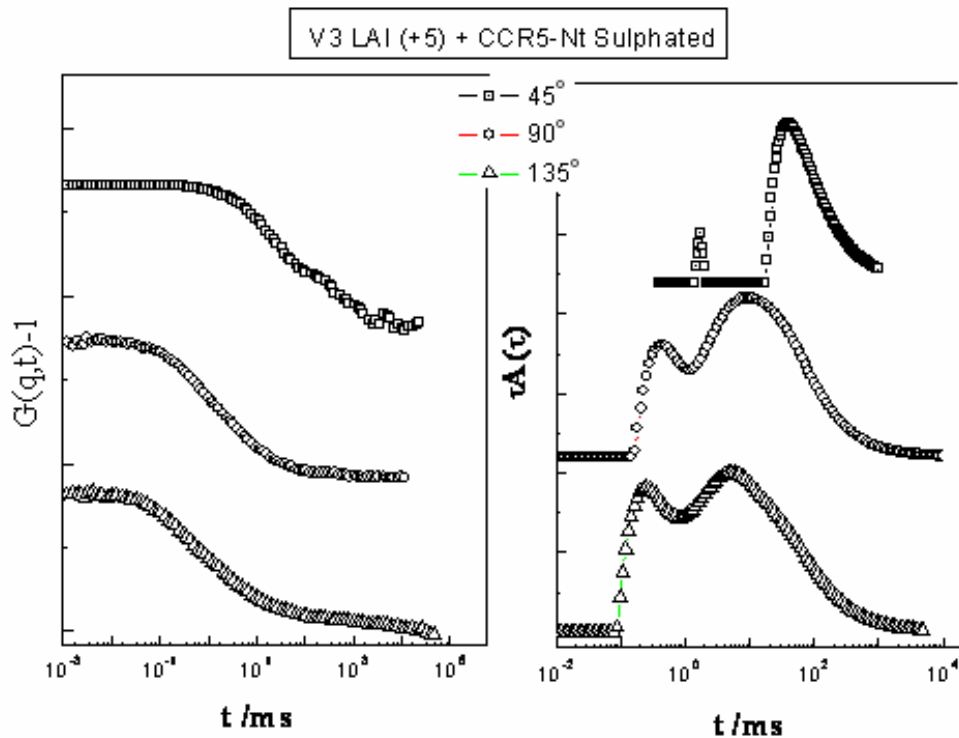
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.6, η ύπαρξη σουλφομάδων στα πεπτίδια CCR5 προκαλεί μια μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής του υπερμοριακού συμπλόκου σε

μεγαλύτερους χρόνους. Αντίθετα, η γρήγορη κορυφή μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Στο κάτω μέρος του Σχήματος 3.6, γίνεται σύγκριση μεταξύ των $V3_{LAI}/CCR5-Nt$ συμπλόκων με παρουσία σουλφονιωμένων τυροσινών στο $CCR5-Nt$ άκρο, αλλά και απλών μορίων $CCR5-Nt$. Και σε αυτή την περίπτωση η ύπαρξη σουλφομάδων στα πεπτίδια $CCR5$ σχετίζεται με την εμφάνιση δύο χαρακτηριστικών κορυφών. Προκαλείται λοιπόν αφ' ενός μια μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής του υπερμοριακού συμπλόκου σε μεγαλύτερους χρόνους ενώ αφ' ετέρου η γρήγορη κορυφή μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση σε σύγκριση με την κορυφή του μη σουλφονιωμένου $CCR5-Nt$. Η πιθανή εξήγηση αυτής της μετατόπισης σχετίζεται με την εμφάνιση πιο συμπαγών δομών $V3_{LAI}/CCR5-Nt$ συμπλόκων εξ' αιτίας των ευνοϊκών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του θετικά φορτισμένου $V3_{LAI}$ και του αρνητικά φορτισμένου $CCR5-Nt$ παρουσία σουλφονιωμένων τυροσινών.



Σχήμα 3.7 Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του συμπλόκου $V3_{LAI}(+5)/CCR5-Nt$ για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.



Σχήμα 3.8 Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του σουλφονιωμένου συμπλόκου $V3_{LAI(+5)}/CCR5-Nt$ για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

Ο σχηματισμός των υπερμοριακών συμπλόκων $V3_{LAI}/CCR5-Nt$ συνοδεύεται επίσης και από μεγάλη αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η αύξηση αυτή είναι συμβατή με την εμφάνιση της αργής κορυφής στην περίπτωση του σουλφονιωμένου $CCR5-Nt$ όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο παραπάνω Σχήμα.

Η αλληλεπίδραση του $V3$ μόνο με το σουλφονιωμένο $CCR5-Nt$ πεπτίδιο συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις των Cormier et al., 2000, Farzan et al., 1999 και Huang et al., 2005 και 2007 οι οποίοι υποστηρίζουν την εμπλοκή της $V3$ περιοχής στην αλληλεπίδραση της $gp120$ με το αμινοτελικό άκρο του $CCR5$ υπό την προϋπόθεση παρουσίας σουλφονιωμένων τυροσινών στο $CCR5-Nt$ άκρο. Η σπουδαιότητα της παρουσίας των σουλφουομάδων επιβεβαιώθηκε στην πρόσφατη μελέτη των Huang et al [36] με χρήση τεχνικών κρυσταλλογραφίας και NMR. Πρόσφατη NMR μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας απέδειξε ότι τα πεπτίδια $V3$ και $CCR5Nt$ έχουν τάση για αλληλεπίδραση, ακόμη και απουσία σουλφουομάδων στις τυροσίνες, ενώ ηλεκτροστατικές υπολογιστικές μελέτες

επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των θετικών και αρνητικών ηλεκτροστατικών δυναμικών του V3 και CCR5 αντίστοιχα [37, 38]. Η δυναμική της αλληλεπίδρασης μολυσμένων κυττάρων με φυσιολογικά κύτταρα έχει μελετηθεί με μικροσκοπία δύναμης απλού μορίου (single molecule force microscopy) και με 3D Video Μικροσκοπία όπου επιβεβαιώθηκε η δημιουργία ιολογικών συνάψεων (virological synapses) οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της παθογένεσης [39, 40].

3.1.3 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι ο συνυποδοχέας CCR5-Nt αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την V3 περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του HIV-1 οδηγώντας σε δημιουργία ανοσοβιολογικών φαινομένων. Τα CCR5-Nt πεπτίδια παρουσιάζουν αυτοοργάνωση σε φυσιολογικά διαλύματα σχηματίζοντας υπερμοριακά σύμπλοκα, η δε αλληλεπίδραση με το V3 πεπτίδιο χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας όταν συνδυάζεται με παρουσία σουλφοομάδων στις τυροσίνες του CCR5-Nt. Όλα αυτά τα ευρήματα συνηγορούν στη παρουσία μιας ισχυρής αλληλεπίδρασης του V3 με τον συνυποδοχέα CCR5-Nt του κυτταρικού στόχου, που πιθανόν σχετίζεται με τις διαδικασίες της ιικής πρόσδεσης κατά τη μόλυνση με τον ιό HIV και τη μεσολάβηση των υποδοχέων χημειοκινών.

Βιβλιογραφία

- 1 Levine, A. M., Scadden, D. T., Zaia, J. A., and Krishnan, A. Hematologic Aspects of HIV/AIDS. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2001; 463-78.
- 2 Μπαριτάκη Α. Σταυρούλα. Μελέτη των μηχανισμών απορρύθμισης της λειτουργίας των ανοσοδραστικών CD4+ T κυττάρων από τη V3 περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 ιού HIV-1, 2002, Διδακτορική Διατριβή
- 3 Fackler, O. T., and Baur, A. S. Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* 2002; 16(4): 493-7.
- 4 Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., and et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986, 45; (5): 637-48.
- 5 Willey, R. L., Rutledge, R. A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C. E., and Martin, M. A. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(14): 5038-42.
- 6 Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272(5263): 872-7.
- 7 E. T Brower, A. Schon, J. C. Klein, E. Freire. Binding Thermodynamics of the N-terminal peptide of the CCR5 Coreceptor to HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120. *Biochemistry* 2009; 48: 779-785
- 8 S. Sierra et al., *Journal of Clinical Virology* 2005 ; 34: 233–244
- 9 Weiss, R. A. How does HIV cause AIDS? *Science* 1993; 260: 1273-9.

- 10 Rosenberg, Z. F., and Fauci, A. S. Induction of expression of HIV in latently or chronically infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989; 5(1); 1-4.
- 11 Dittmar, M. T., McKnight, A., Simmons, G., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Simmonds, P. HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature* 1997; 385(6616); 495-6.
- 12 Dittmar, M. T., Simmons, G., Donaldson, Y., Simmonds, P., Clapham, P. R., Schulz, T. F., and Weiss, R. A. Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derived from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. *J Virol* 1997; 71(7): 5140-7.
- 13 Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Baca, L. M., Weiser, B., Burger, H., Kalter, D. C., and Meltzer, M. S. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *Aids* 1989; 3(8): 475-95.
- 14 F. Porichis, Z. Vlata, G. Hatzidakis, D. A. Spandidos, E. Krambovitis. HIV-1 gp120/V3-derived epitopes promote activation-induced cell death to superantigen-stimulated CD4⁺ / C45RO⁺ T cells. *Immunology Letters* 2007; 108: 97-102
- 15 Lalani, A. S., Barrett, J. W., and McFadden, G. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol Today* 2000; 21(2): 100-6.
- 16 Schuitemaker, H., Kootstra, N. A., de Goede, R. E., de Wolf, F., Miedema, F., and Tersmette, M. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* 1991; 65(1): 356-63.
- 17 Ghalib Alkhatib. The biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion in HIV and AIDS* 2009; 4:96-103.
- 18 A History of Chemokines, *Bulletin of Experimental Treatments for AIDS* March 1997

- 19 Αλιφραγκής Ιωάννης. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός βιοδραστικών πολυμερών της Πολυβινυλοπυρρολιδόνης με σκέδαση ακτίνων Laser. Διατριβή Διπλώματος Ειδίκευσης 2002.
- 20 Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 1997; 139:1349-60.
- 21 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-7.
- 22 Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European Journal of Immunology* 1999; 29:2037-45.
- 23 Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85:1135-48.
- 24 Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1955-8.
- 25 Edward A. Berger, Ghalib Alkhatib. HIV gp120 interactions with coreceptors: insights from studies with CCR5-based peptides. *European Journal of Medical Research* 2007; 12:403-407.
- 26 Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.[see comment]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94:1925-30.
- 27 Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.

- 28 Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature Medicine* 1997; 3:1369-75.
- 29 Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, et al. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *Journal of Immunology* 1998; 161:3103-13.
- 30 Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:30603-6.
- 31 McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998; 352:866-70.
- 32 Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.[see comment]. *Science* 1996; 272:872-7.
- 33 Hesselgesser J, Halks-Miller M, DeVecchio V, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Current Biology* 1997; 7:112-21.
- 34 Amara A, Gall SL, Schwartz O, et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186:139-46.
- 35 AIDS Medical Glossary and Drug Chart
- 36 Huang CC, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang SH, Hussan SS, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Bewley CA, Kwong PD. Structures of

- the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*. 2007 (317) 1930-4.
- 37 Morikis D, Rizos AK, Spandidos DA, Krambovitis E. Electrostatic modeling of peptides derived from the V3-loop of HIV-1 gp120: implications of the interaction with chemokine receptor CCR5. *Int J Mol Med*. 2007 (19) 343-51.
- 38 Galanakis PA, Kandias NG, Rizos AK, Morikis D, Krambovitis E, Spyroulias GA. NMR evidence of charge-dependent interaction between various PND V3 and CCR5 N-terminal peptides. *Biopolymers*. 2009 (92) 94-109.
- 39 Hübner W, McNerney GP, Chen P, Dale BM, Gordon RE, Chuang FY, Li XD, Asmuth DM, Huser T, Chen BK. Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science*. 2009 (323) 1743-7.
- 40 Dobrowsky TM, Zhou Y, Sun SX, Siliciano RF, Wirtz D. Monitoring early fusion dynamics of human immunodeficiency virus type 1 at single-molecule resolution. *J Virol*. 2008 (82) 7022-33.