

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΚΤΙΝΩΝ LASER

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΑΜΟΛΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

**UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF SCIENCES & TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



Ph.D. THESIS

**SPECTROSCOPIC STUDY OF BIOACTIVE PEPTIDES
WITH LASER LIGHT SCATTERING**

PANAGIOTIS SAMOLIS

SUPERVISOR: APOSTOLOS K. RIZOS

HERAKLION 2012

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Απόστολος Κ. Ρίζος (Επιβλέπων Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας)
- Σταύρος Φαράντος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας)
- Ηλίας Κραμποβίτης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Απόστολος Κ. Ρίζος, Επιβλέπων Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης
- Σταύρος Φαράντος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης
- Ηλίας Κραμποβίτης Καθηγητής, Τμήματος Κτηνιατρικής Παν/μίου Θεσσαλίας,
- Θεοφάνης. Κιτσόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης
- Δημήτριος Άγγλος, Αναπ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης
- Γεώργιος Τσιώτης, Αναπ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης
- Απόστολος Σπύρος, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος μιας πολύχρονης προσπάθειας και μετά από πολλούς κόπους το ελάχιστο που μπορώ να κάνω είναι να προσφέρω μια μικρή αναγνώριση σε όλους αυτούς που μπόρεσαν να μου σταθούν και να με υποστηρίξουν με υπομονή.

Πάνω από όλα ευχαριστώ το Θεό που με κράτησε γερό και υγιή όλα αυτά τα χρόνια μέχρι να φέρω σε πέρας αυτήν τη διατριβή. Παρά κάποιες αντιξοότητες, μου έδωσε θέληση και υπομονή να συνεχίσω προσφέροντάς μου στο μεταξύ μερικά απρόσμενα δώρα.

Ευχαριστώ το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για το ότι με δέχτηκε σα Μεταπτυχιακό φοιτητή και αργότερα ως Διδάκτορα καθώς και για την οικονομική ενίσχυση που μου προσέφερε κατά διαστήματα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Υπεύθυνο Καθηγητή μου, Απόστολο Ρίζο για το ότι με δέχτηκε στο Εργαστήριό του για τη Μεταπτυχιακή μου Διατριβή και αργότερα για την υπομονή του να συνεχίσει μαζί μου σε Διδακτορικό επίπεδο παρά τις όποιες αργοπορίες που ανέστειλαν την εξέλιξη του έργου αυτού. Πέραν από τις γνώσεις και την τεχνική υποστήριξη, το ότι με αντιμετώπισε ως άνθρωπο και όχι απλά ως φοιτητή, ήταν καθοριστικό για τη διεκπεραίωση της διατριβής. Η κατανόησή του είναι η κυριότερη συνεισφορά στην πρόοδο των επιστημονικών μου διατριβών.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς μου επιτροπής: τους κυρίους Σταύρο Φαράντο, Ηλία Κραμποβίτη, Θεοφάνη Κιτσόπουλο, Γεώργιο Τσιώτη, Απόστολο Σπύρο και Δημήτριο Άγγλο για το ότι δέχτηκαν να αναλάβουν την εξέταση και την αξιολόγηση αυτής της διατριβής.

Εξυπακούεται ότι η οικογένειά μου έχει την ευγνωμοσύνη μου για την ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση σε αυτά τα ατελείωτα χρόνια κατά τα οποία ασχολούμουν με την έρευνα σε πανεπιστημιακό επίπεδο. Παρά τις δυσκολίες που προέκυπταν μπόρεσαν καρτερικά να περιμένουν μέχρι το τέλος αυτής της πορείας.

Άφησα για το τέλος τους αγαπημένους μου συνεργάτες, όχι ασφαλώς γιατί έχουν την τελευταία θέση, αλλά αντίθετα γιατί πιστεύω ότι η αναφορά στο όνομά τους πρέπει να είναι και η πιο ξεχωριστή. Ευχαριστώ λοιπόν από τα βάθη της καρδιάς μου το συνάδελφό μου Δόκτορα Γιάννη Τσικαλά τον οποίον είχα ξεχωρίσει για την επιστημονική του αφοσίωση και το χαρακτήρα του πολύ προτού έρθει να δουλέψει στο Εργαστήριο μας. Τον ευχαριστώ για την παρέα που μου προσέφερε πριν χρόνια στο Εργαστήριο και την ανταλλαγή γνώσεων και απόψεων που είχαμε στα επιστημονικά θέματα. Η βοήθειά του ήταν πολύτιμη έστω και δια της παρουσίας του στο Εργαστήριο.

Ασφαλώς την πιο ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου δε θα μπορούσαν να μην έχουν οι φίλες και συνάδελφοι μου, Αφροδίτη Μπουντουράκη και

Χρυσούλα Λογκάκη , κάτοχοι μεταπτυχιακού διπλώματος πια. Η παρέα τους εκτός και εντός Εργαστηρίου ήταν μια πολύτιμη αχτίδα φωτός σε δύσκολες περιόδους, όταν το επιστημονικό μου έργο για τον οποιοδήποτε λόγο δεν προχωρούσε. Χωρίς την ηθική τους συμπαράσταση στις δυσκολίες δε θα μπορούσα να τα είχα βγάλει πέρα. Τις ευχαριστώ για την κατανόησή τους και τους εύχομαι ό,τι καλό είδα από τη θέρμη του χαρακτήρα τους, ο Θεός να τους το ανταποδώσει και με το παραπάνω.

Όταν ξεκίνησε αυτή η διατριβή (υπό τις πιο βιαστικές συνθήκες μάλιστα) τα κίνητρά μου ήταν τα κλασικά (και φυσικά λανθασμένα): καταξίωση, περισσότερα διαπιστευτήρια για αύξηση πιθανοτήτων εύρεσης εργασίας, εφάμιλλος τίτλος για συναγωνισμό με όποιον άλλο κάτοχο διδακτορικού. Η μαγεία όμως του ταξιδιού είναι αυτή που σε κάνει να αναθεωρήσεις τις απόψεις σου και να καταλάβεις τι σημαίνει η λέξη «διατριβή» και ποιο το ουσιαστικό της νόημα. Τα πάντα που έγιναν τα τελευταία χρόνια ήταν μια άκρως πολύτιμη εμπειρία που σε εφοδιάζει για τη συνέχεια: από τις επιτηρήσεις και τις αρμοδιότητες έως το διάβασμα, το ψάξιμο για βιβλιογραφικές πηγές, την ανάπτυξη κριτικής και ώριμης σκέψης για την εγκυρότητα ή μη των αποτελεσμάτων και τη σύνθεση των δεδομένων σε μια συμπυκνωμένη κατανοητή μορφή (είτε κείμενο είτε παρουσίαση). Είναι λοιπόν η παιδεία και η καλλιέργεια επιστημονικής σκέψης που συμπληρώνουν το πακέτο των όποιων γνώσεων αποκομίζεις και κάνουν όλη την εμπειρία αξιοσημείωτη και αξιομνημόνευτη.

Ευχαριστώ ολόψυχα όλους όσους πίστεψαν σε μένα και στις δυνατότητές μου , δίνοντάς μου μια πολύτιμη ευκαιρία. Να είστε καλά.

Παναγιώτης

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο : Σαμόλης Παναγιώτης

Εκπαίδευση

Ιούνιος 1997 : Απολυτήριο Β΄βάθμιας Εκπαίδευσης
(5^ο Γενικό Λύκειο Θεσσαλονίκης) *Βαθμός : 19 (Άριστα)*

Οκτώβριος 1997 – Ιούνιος 2001 : Προπτυχιακές Σπουδές Τμήμα Χημείας ,
Πανεπιστήμιο Κρήτης (Ηράκλειο)

Ιούλιος 2001 : Πτυχίο Χημείας *ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ*

Οκτώβριος 2001 : Εισαγωγή στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα , Τμήμα
Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιανουάριος 2005 : Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Master) στη Χημεία

Μάιος 2005 – Μάιος 2006 : Στρατιωτική Θητεία

Ιανουάριος 2005 – Ιανουάριος 2012 : Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο
Πανεπιστήμιο Κρήτης , Τμήμα Χημείας

Μεταπτυχιακά Μαθήματα

Συνθετική Οργανική Χημεία II Βαθμός : 7.1	Φαρμακευτική Χημεία Βαθμός : 8.5
Φασματοσκοπικές Τεχνικές στη Βιοανόργανη Χημεία Βαθμός : 8.2	Φασματοσκοπία Μάζας , NMR και UV/Vis Βαθμός : 7
Φασματοσκοπία, IR , Raman Βαθμός : 8	Φασματοσκοπία Σκέδασης Φωτός Βαθμός : 8.5
Οργανομεταλλική Χημεία Βαθμός : 9	Ειδικά Κεφάλαια Περιβαλλοντικής Χημείας -(Χημεία και Φυσική της Ατμόσφαιρας) Βαθμός : 8.75

Ερευνητική Εμπειρία

Καλοκαίρι 2001 : Διπλωματική Εργασία στο Εργαστήριο Χημικής Κινητικής και Φωτοχημείας «Κινητική Μελέτη Αντίδρασης ατόμων χλωρίου και τετραφθοροαιθυλ-μεθυλ-αιθέρα (TFEME) στην αέριο φάση» .
Επιβλέπων Καθηγητής : Παπαγιαννακόπουλος Παναγιώτης *Βαθμός : 10*

Οκτώβριος 2001 – Ιανουάριος 2005 : Μεταπτυχιακή Διατριβή στο Εργαστήριο Φυτικοχημείας Βιοπολυμερών «Φασματοσκοπική Μελέτη μιας πρωτεΐνης του Chlorobium Terpidum με Σκέδαση Ακτίνων Φωτός»
Επιβλέπων Καθηγητής : Ρίζος Απόστολος

Ιανουάριος 2005 – Ιανουάριος 2012 : Διδακτορική Διατριβή στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας Βιοπολυμερών «Φασματοσκοπική Μελέτη Βιοδραστικών Πεπτιδίων με Σκέδαση Ακτίνων Laser»
Επιβλέπων Καθηγητής : Ρίζος Απόστολος

ΑΡΜΟΔΙΟΤΗΤΕΣ

Εαρινό Εξάμηνο 2001 – 2002 : Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Γενικής Χημείας ΙΙ (Ποιοτική και Ποσοτική Ανάλυση)

Χειμερινό Εξάμηνο 2003 – 2004 : Βοηθός στο προπτυχιακό μάθημα της Γενικής Χημείας Ι

Εαρινό Εξάμηνο 2003 – 2004 : Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Φυσικοχημείας Ι (Θεωρητικές Διαλέξεις και Ασκήσεις)

Χειμερινό Εξάμηνο 2004 – 2005 : Βοηθός στο προπτυχιακό μάθημα της Γενικής Χημείας Ι

Εαρινό Εξάμηνο 2007 – 2008 : Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Φυσικοχημείας Ι (Θεωρητικές Διαλέξεις και Ασκήσεις)

Εαρινό Εξάμηνο 2010 – 2011 : Βοηθός στο προπτυχιακό επιλεγόμενο μάθημα «Χημεία και Σύγχρονα Θέματα Διατροφής»

Ξένες Γλώσσες : Αγγλικά (*Επίπεδο Άριστα*)

Certificate of Elementary (P.A.L.S.O.)

First Certificate in English (Lower) Cambridge University

Certificate in Advanced English Cambridge University

Certificate of Proficiency in English Michigan University (with Honors : Άριστα)

Γνώσεις Η / Υ

Πιστοποιητικό Επάρκειας E.C.D.L. Core (Ιούνιος 2007)

Πιστοποιητικό Επάρκειας E.C.D.L. Expert (Απρίλιος 2009)

Πιστοποιητικό Επάρκειας E.C.D.L. Image Maker (Μάιος 2009)

Πιστοποιητικό Επάρκειας E.C.D.L. Web Starter (Ιούνιος 2009)

Microsoft Windows XP – Microsoft Windows '98

- Microsoft Word
- Microcal Origin
- Microsoft Excel
- Microsoft Power Point
- Microsoft Office Picture Manager
- Adobe Photoshop CS2
- Microsoft Access
- Chem Draw / Isis Draw
- Microsoft Front Page
- Internet Explorer
- Microsoft Outlook / Outlook Express

Λειτουργικό Σύστημα UNIX
Γλώσσες Προγραμματισμού BASIC , FORTRAN 77
Κώδικας Εντολών HTML [για κατασκευή ιστοσελίδων]

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- 1) "*Evidence of HIV-1 gp120/V3 — CCR5 peptide complex organization in vitro*"
A.K. Rizos, A. Mpountouraki, C. Logakh, P. Samolis, G. Hatzidakis, D.C.
Doetschman, E. Krambovitis, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357 (2011) 723-725.

- 2) "*Conformational Properties of HIV-1 gp120/V3 Immunogenic Domains*" Petros
A. Galanakis, Georgios A. Spyroulias, Apostolos K. Rizos, Panagiotis Samolis and
Elias Krambovitis *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2005) 1551-1568.

- 3) "*Molecular size determination of a membrane protein in surfactants by light scattering*"
Michalis Aivaliotis, Panagiotis Samolis, Eleftheria Neofotistou, Herve Remigy, Apostolos
K. Rizos and Georgios Tsiotis
Biochimica et Biophysica Acta 1615 (2003) 69–76.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	vi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xi
ABSTRACT	xiii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	xv

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΑ

1) Ανάπτυξη πεπτιδίων ως φάρμακα.....	2
2) Εφαρμογές πεπτιδίων στη φαρμακευτική	11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

A.I.D.S.

1) Η ασθένεια του AIDS	17
2) Βιολογία του ιού HIV-1	33
2α) Βασική δομή του ιού	33
2β) Παράγωγα από το γονιδίωμα του ιού.....	35
2γ) Τροπισμός του ιού.....	38
2δ) Δράση του ιού και μόλυνση	40
2ε) Πρόσφατες εξελίξεις στη θεραπεία της νόσου	44
3) Κυτταρικός υποδοχέας CCR5	46
4) Εναλλακτική δέσμευση σε CXCR4	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ : ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

- 1) Αλληλεπίδραση Η/Μ ακτινοβολίας και ύλης73
- 2) Συσχέτιση φωτονίων76

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1) Οργανολογία79
- 2) Πεπτίδια.....84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV

ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ : ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- 1) Δυναμική Σκέδαση Φωτός86
- 2) Στατική Σκέδαση Φωτός97

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1) Φασματοσκοπική μελέτη πρότυπων πεπτιδίων.....107
- 2) Προσδιορισμός των υδροδυναμικών παραμέτρων121
- 3) Αλληλεπιδράσεις V3 περιοχής132
- 4) Προσδιορισμός υδροδυναμικών παραμέτρων πεπτιδίων CCR5-Nt.....137
- 5) Προσδιορισμός των υδροδυναμικών παραμέτρων V3 πεπτιδίων.....141
- 6) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πεπτιδικών μορίων V3 και CCR5-Nt146
- 7) Συμπεράσματα.....154

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....157

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. Ο βασικός κυτταρικός πληθυσμός που πλήττεται από την μόλυνση με τον HIV-1 ανήκει στην οικογένεια των CD4+ T λεμφοκυττάρων. Ο κύριος λειτουργικός ρόλος αυτών των κυττάρων είναι να αλληλεπιδρούν με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα και να διαμεσολαβούν με έκκριση κυτοκινών και άλλων παραγόντων στην ρύθμιση του τύπου της ανοσιακής απόκρισης (κυττοτοξική ή χυμική). Συστατικά του ιού (και όχι υποχρεωτικά ολόκληρος ο ιός) προκαλούν ένα ειδικό φαινόμενο κατά την αντιγονοπαρουσίαση το οποίο χαρακτηρίζεται από μια αυξημένη ενεργοποίηση των CD4+ T κυττάρων που ανταποκρίνονται στο αντιγονικό ερέθισμα, και τα οποία μετά πηγαίνουν σε απόπτωση. Το φαινόμενο αυτό παρεμποδίζεται όταν τα μακροφάγα εκτεθούν σε συνθετικά πεπτίδια του ιού. Η επικρατούσα άποψη σήμερα είναι ότι ο ιός ευαισθητοποιεί τα αποπτωτικά μονοπάτια αυτών των κυττάρων και τα οδηγεί σε «προγραμματισμένο θάνατο». 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 παρουσία συστατικών του ιού όπως η γλυκοπρωτεΐνη gp120 στην επιφάνεια μολυσμένων από τον HIV-1 μακροφάγων παρεμποδίζουν τον φυσιολογικό μηχανισμό αντιγονοπαρουσίασης μέσω της αλληλοεπίδρασης της V3 περιοχής της gp120 με την αμινο-τελική περιοχή του συνυποδοχέα CCR5 του

ανταποκρινόμενου CD4+ T λεμφοκυττάρου. Το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε με συνθετικά πεπτίδια της V3 περιοχής του ιού σε συνάρτηση με τον φυσιολογικό μηχανισμό της αντιγόνο-παρουσίασης. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι καθαρά ιοντικής φύσεως και η ένταση της αντίδρασης συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή. Κύριος σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η φασματοσκοπική μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συνθετικών πεπτιδίων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τον συνυποδοχέα χημειοκινών CCR5-Nt που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων με φασματοσκοπία σκέδασης ακτίνων Laser. Αναλύθηκε η συμπεριφορά μιας σειράς πρότυπων βιοδραστικών πεπτιδίων σε φυσιολογικά διαλύματα καθώς και η επιρροή ιοντικών δυνάμεων/αλληλοεπιδράσεων σαν συνάρτηση του αριθμού των βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή.

ABSTRACT

The applications and use of synthetic peptides for the treatment of human diseases are increasing rapidly, as well as the development of the required relevant technology. Although we know the biology of the virus that causes AIDS, our information on how the virus causing 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 main cell population affected by infection with HIV-1 belongs to the CD4+ T lymphocytes. The principal functional role of such cells is to interact with cells "professional antigen-presenters" such as macrophages and mediate the secretion of cytokines and other factors in regulating the type of immune response (humoral or cytotoxic). Components of the virus (and not necessarily the whole virus) cause a specific effect on antigen-presentation characterized by an increased activation of CD4+ T cells that respond to antigenic stimulus, which then go to apoptosis. This phenomenon is prevented when the macrophages were exposed to synthetic peptides of the virus. The prevailing view today is that the virus sensitizes the apoptotic pathways of these cells and leads them to programmed death. The problem that makes the issue of pathogenesis more much complex is that the majority of the cell population that is depleted by the presence of the virus in the body of the host is not infected. The presence of viral components, such as glycoprotein gp120 on the surface of infected macrophages, impede the physiological mechanism of antigen-presentation through the interplay of the V3 region of gp120 with the amino-terminal region of the coreceptor CCR5 of the responsive CD4+ T lymphocytes. This phenomenon has been studied with synthetic peptides of the V3 region of the virus according to the physiological mechanism of antigen presentation. This interaction is purely ionic in nature and the intensity of the reaction is directly related to the number of basic amino acids in the V3

region. The main objective of this work was to study the physicochemical properties of V3 synthetic peptides involved in the interaction with chemokine coreceptor CCR5-Nt present in the surface of activated T-lymphocytes by Laser light scattering spectroscopy. We analyzed the behavior of these peptides in physiological solutions and the influence of ionic forces / interactions as a function of the number of basic amino acids in the V3 region.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια τα πεπτίδια έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τη λειτουργία τους. Το ευρύτατο φάσμα εφαρμογών των συνθετικών πεπτιδίων το οποίο παρατηρείται σήμερα, οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στα επιτεύγματα της Χημείας τόσο στον τομέα της συνθετικής παρασκευής πεπτιδίων όσο και στην ύπαρξη φασματοσκοπικών τεχνικών χαρακτηρισμού σε μοριακό και μακρομοριακό επίπεδο. Η έρευνα στον τομέα των πεπτιδίων καλείται να συμβάλει στην πρόβλεψη της βιολογικά ενεργής διαμόρφωσης ενός βιοδραστικού πεπτιδίου, στην κατανόηση των σχέσεων μεταξύ δομής-διαμόρφωσης, στην εύρεση της πιο απλής και οικονομικά συμφέρουσας σύνθεσης και καθώς στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, η φασματοσκοπία CD και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), καθώς και οι μοριακές προσομοιώσεις με ενεργειακούς υπολογισμούς αποτελούν μερικά από τα «εργαλεία» για τον *de novo* σχεδιασμό και την σύνθεση πεπτιδίων με καθορισμένες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Ειδικότερα, τα συνθετικά πεπτίδια βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στη ρύθμιση της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης, στον έλεγχο του πόνου, στη θεραπευτική αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων, ως διαγνωστικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου, και των αυτοάνοσων νοσημάτων, στον σχεδιασμό και τη σύνθεση πεπτιδικών συνθετικών εμβολίων, στην αντιμετώπιση δυσλειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και του AIDS, κ.α. τα οποία θα απαιτήσουν τη στενή συνεργασία Χημείας, Βιολογίας και Ιατρικής.

Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας διαπιστώθηκε η ιοντική αλληλεπίδραση βιοδραστικών πεπτιδίων που μιμούνται τη δομή της V3 εξωκυττάριας πρωτεϊνικής περιοχής του ιού HIV-1 που θεωρείται κλειδί για τη δέσμευση του ιού σε κύτταρα, με τον κυτταρικό συνυποδοχέα CCR5. Τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα της V3 θεωρείται πως έλκονται από τα αρνητικά

σουλφουρωμένα κατάλοιπα τυροσίνης του CCR5-Nt. Ο στόχος μας ήταν ο σχεδιασμός δομικών μοντέλων για την αλληλεπίδραση V3 – CCR5-Nt έτσι ώστε να βρεθούν οι ιδανικές θέσεις δέσμευσης λαμβάνοντας υπόψη θερμοδυναμικές παραμέτρους όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb, ελεύθερες ενέργειες ιονισμού για κάθε αμινοξύ, ενέργειες επιδιалύτωσης συνυποδοχέα και ιού και τη ΔG για τη συμπλοκοποίηση. Οι γνώσεις αυτές είναι σημαντικές για τη σχεδίαση μοντέλων φαρμακοφόρων ουσιών που δρουν ανταγωνιστικά ως προς την πραγματική V3 περιοχή του ιού για τη θέση δέσμευσης του συνυποδοχέα CCR5 εμποδίζοντας τον ιό να συνδεθεί με το κύτταρο-ξενιστή.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο αποσαφηνισμός του πιθανού μηχανισμού που εμπλέκεται στη γενικότερη δυσλειτουργία του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος μετά τη μόλυνση από στελέχη του HIV-1. Τα βιοδραστικά πεπτίδια μας έχουν αλληλουχία καταλοίπων που μοιάζει με ένα τμήμα της γλυκοπρωτεϊνικής περιοχής gp120 από την εξωτερική περιοχή του ιού HIV-1 που προκαλεί το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS). Η gp120 βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος της επιφάνειας του ιού και θεωρείται ότι διαδραματίζει τον πρωταρχικό ρόλο στη δέσμευση του ιού πάνω στα κύτταρα-ξενιστές. Η gp120 αποτελείται από περιοχές σταθερής αλλά και μεταβλητής σύστασης. Οι μεταβλητές περιοχές είναι πέντε και η τρίτη από αυτές ονομάζεται V3 και είναι η πιο σημαντική. Οι υποδοχείς χημειοκινών πάνω στους οποίους προσκολλάται η gp120, ανάλογα με το είδος του κυττάρου που δέχεται την προσβολή, είναι ο CCR5 και ο CXCR4 οι οποίοι κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το είδος της οικογένειας χημειοκινών που δεσμεύουν υπό φυσιολογικές συνθήκες. Συνθετικά πεπτίδια από τη V3 περιοχή διαφορετικών ή τροποποιημένων ιικών στελεχών και από το αμινοτελικό άκρο του CCR5 συνυποδοχέα παρουσίασαν την ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων μόνο παρουσία σουλφουρωμένων τυροσινών στη σύσταση του CCR5-Nt πεπτιδίου. Η

φύση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων φάνηκε να είναι καθαρά ιοντική χωρίς δομικούς περιορισμούς, ενώ η ένταση της αντίδρασης συσχετίστηκε άμεσα με τον αριθμό των βασικών αμινοξέων του V3 πεπτιδίου. Συγκεκριμένα ο αριθμός των θετικά φορτισμένων αμινοξέων πάνω στη V3 επηρεάζει σημαντικά το μηχανισμό μόλυνσης . Πεπτίδια που μιμούνται την αλληλουχία και επομένως τη δράση της V3 θα αποτελέσουν άριστους ανταγωνιστές για τη δέσμευση πάνω στους κυτταρικούς υποδοχείς και επομένως ένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη νόσο του AIDS. Η διατριβή αυτή εξετάζει τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις αυτών των βιοδραστικών πεπτιδίων καθώς και τη συμπεριφορά τους σε υδατικά διαλύματα τα οποία μελετήθηκαν ως προς τις υδροδυναμικές τους διαστάσεις σε διαφορετικές συνθήκες: θερμοκρασίας, συγκέντρωσης, ιονικής ισχύος κτλ. Για κάθε κατηγορία διαλύματος οι υδροδυναμικές ακτίνες φανερώνουν αλλαγές ως προς τη διαδικασία συσσωμάτωσης αλλά και τις διαστάσεις τους. Τα δεδομένα αυτά θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των πιθανών παθογενετικών μηχανισμών που φαίνεται να εμπλέκονται στην εξέλιξη του AIDS αλλά και στη γενικότερη δυσλειτουργία του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι :

ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΑ

1) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τα σήματα που δέχονται οι κυτταρικές μεμβράνες μπορούν να διαδοθούν σε διάφορα ενεργά κέντρα του κυττάρου προκαλώντας βιολογικές αποκρίσεις. Το εναρκτήριο γεγονός είναι συνήθως αναγνώριση υποδοχέων από συγκεκριμένα ligands, κάτι που ρυθμίζει την κυτταρική ομοιόσταση και προκαλεί κυτταρικές αντιδράσεις και φαινόμενα όπως πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, αγγειογένεση, ανοσοαπόκριση και κυτταρικό θάνατο. Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια προκαλούν εναλλακτικές λύσεις ως φαρμακευτικοί φορείς όταν λαμβάνεται υπόψη η παρεμπόδιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Δηλαδή αν η διεπιφάνεια επαφής μεσολαβεί για τις αλληλεπιδράσεις δυο πρωτεϊνών, τότε μια ένωση που μιμείται τις ιδιότητες μιας από τις δυο επιφάνειες μπορεί να δράσει ανταγωνιστικά και να αποτρέψει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο υπόστρωμα και τον υποδοχέα ¹. Κάποια βιομιμητικά πεπτίδια αποτελούν καλούς ανταγωνιστές. Οι διεπιφάνειες επαφής που χρησιμοποιούν οι πρωτεΐνες απαρτίζονται από προλίνη, τυροσίνη, θρυπτοφάνη, ασπαραγίνη και αργινίνη. Τα πεπτίδια που έχουν αλληλουχίες παρόμοιες με τα τμήματα που δεσμεύονται, μπορούν να καλύψουν το ενεργό κέντρο επαφής και να λειτουργήσουν ως φάρμακα εμποδίζοντας την πρωτεΐνη από την οποία έχει προέλθει να συναρμοστεί στον υποδοχέα. Εμπόδια που πρέπει να υπερβληθούν για την αποτελεσματική φαρμακολογική δράση του πεπτιδίου είναι η σταθερότητα, η διατήρηση της συγγενείας του για τον υποδοχέα, η εκλεκτικότητά του και ο τρόπος πρόσληψης και η μεταφορά του έως το κύτταρο-στόχο.

Αν και ο μηχανισμός δράσης μπορεί να είναι κατάληψη του ενεργού κέντρου και παρεμπόδιση δέσμευσης του ligand, μια εναλλακτική στρατηγική είναι οι στερεοχημικές αλλαγές που προκαλούνται αλλοστερικά από τη δέσμευση του υποδοχέα με το πεπτίδιο. Η συγγένεια ενός πεπτιδίου με το στόχο του όμως μπορεί να

εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Είναι δύσκολο να προβλέψει κανείς τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεϊνική αλληλεπίδραση δυο μορίων *in vitro* μεταφέρεται σε σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους *in vivo*. Η συγκρότηση μιας πρωτεΐνης με πολλές υπομονάδες συνεπάγεται πολλές αλληλεπιδράσεις που δε μπορούν να υπολογιστούν εύκολα. Κινητικές παράμετροι, η ενδοκυτταρική τοποθεσία και η προσβασιμότητα του υποδοχέα-στόχου, η ανοσογενής φύση & σταθερότητα του συμπλόκου στο οποίο ενσωματώνεται το πεπτίδιο είναι όλα καθοριστικοί παράγοντες για πιθανή θεραπευτική χρήση.

Σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διασαφηνιστούν κατά την προετοιμασία πεπτιδίων για μεταφορά μέσα στον οργανισμό είναι η υδροφοβικότητά τους, το μέγεθος και η φυσική/χημική ευελιξία του φαρμακευτικού μορίου². Αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά τη φαρμακευτική δυναμική και την κινητική του μορίου μέσα στον οργανισμό. Αυτές οι παράμετροι είναι που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου πρόσληψης του φαρμάκου, της διαμόρφωσης και της αποθήκευσής του. Πεπτίδια που χρησιμεύουν για τους πνεύμονες είναι σύνηθες να εισάγονται με εισπνοή aerosol, παρά το γεγονός ότι αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε αρχικά για μικρότερα μόρια. Τα περισσότερα φάρμακα που βασίζονται σε πρωτεϊνική αλληλουχία χορηγούνται κατά πλειοψηφία παρεντερικά. Οι μέθοδοι είναι ενδοφλέβιες, υποδόριες και ενδομυϊκές. Πολλά παρέχονται σε διαλυμένη μορφή με την εξαίρεση της ινσουλίνης και κάποιων ανασυνδυασμένων εμβολίων. Για την παρεντερική πρόσληψη μικρών μορίων τα συνηθισμένα έκδοχα είναι επίσης σε πρωτεϊνική μορφή. Ο ρόλος που έχουν αυτά τα έκδοχα είναι είτε να διευκολύνουν τη διάλυση του φαρμακοφόρου, είτε οσμωτικοί φορείς για να προωθήσουν τη διάχυση, είτε ρυθμιστικά διαλύματα για να δράσει το μόριο σε συγκεκριμένο pH, είτε συντηρητικά για να το προστατεύσουν από δράση ενζύμων.

μέσα στον οργανισμό. Κάποιοι φορείς με λειτουργίες αντισυσσωμάτωσης και αντιπροσρόφησης, όπως είναι η αλβουμίνη και κάποια επιφανειοδραστικά, αυξάνουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του μορίου αφού μειώνουν το ρίσκο αλληλεπίδρασης του μορίου με κάποια επιφάνεια που θα επάγει αλλαγές όπως συσσωμάτωση, αποδιάταξη ή ακόμα και καθίζηση .

Τα «βιοσυγκολλητικά» είναι μια πρόσφατη στρατηγική θεραπευτικής δράσης κατά την οποία υπάρχουν βοηθητικά μόρια στο φαρμακοφόρο τα οποία προεκτείνουν την έκθεση του ιστού στη δραστική ουσία. Η βιοσυγκόλληση είναι αλληλεπίδραση που περιλαμβάνει δέσμευση πολλών ligands (συνήθως ετεροπολική) από την επιφάνεια του μορίου πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου. Αυτή η σύναψη επάγει γρήγορη ενσωμάτωση του μορίου-φορέα. Τα πεπτίδια μπορούν να αποτελέσουν βιοσυγκολλητικά για φαρμακευτικούς φορείς. Η αφθονία ανιοντικών φορτίων πάνω στην κυτταρική μεμβράνη σημαίνει ότι κατιοντικά τμήματα μορίων έχουν την τάση να κολλάνε εύκολα πάνω σε αυτήν. Τα κατιοντικά λιπίδια και τα κατιοντικά πολυμερή όμως έχουν μεγάλα μοριακά βάρη και η μεταφορά τους είναι δύσκολη. Αντιθέτως τα μικρά κατιοντικά πεπτίδια είναι μικρά, έχουν μεγάλη πυκνότητα θετικού φορτίου και αυτό τα καθιστά ιδανικούς μεταφορείς κατιοντικού φορτίου σε μια κυτταρική μεμβράνη. Τα πεπτίδια είναι λιγότερο ογκώδη και μεταφέρουν το θετικό τους φορτίο πάνω στη δραστική ουσία με την οποία είναι συνδεδεμένα στο φαρμακοφόρο.

Η κυτταρική στόχευση από μόνη της δεν αρκεί για αποτελεσματική δράση του φαρμάκου. Πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού ενός καθορισμένου κέντρου δέσμευσης και ενδοκυτταρική μεταφορά. Τα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων για παράδειγμα είναι δύσκολο να στοχευθούν γιατί δεν έχουν τους κατάλληλους υποδοχείς. Υπάρχουν όμως κάποια πεπτίδια που ενσωματώνονται

αυθόρμητα από το κύτταρο. Υπάρχουν πρωτεϊνικές περιοχές που εσωκλείονται μέσα στα κύτταρα γρήγορα και αποτελεσματικά. Αυτά τα τμήματα του μορίου που αναγνωρίζει το κύτταρο ονομάζονται «περιοχές μεταγωγής». Αυτά τα πεπτίδια φαίνεται πως αναπαριστούν ένα εκτεταμένο και εξελιγμένο σύστημα μακρομοριακής αναγνώρισης και μεταφοράς. Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι το VP22 του ιού του έρπη και ο μεταγραφικός ενεργοποιητής του ιού HIV-1 που για συντομία αναφέρεται ως TAT. Υπάρχουν επίσης υδρόφοβα πεπτίδια που διαπερνάνε το κύτταρο και που καθοδηγούνται από ειδικές αλληλουχίες. Η στρατηγική μεταφοράς τους είναι είτε σύζευξη του πεπτιδίου με την πρωτεΐνη είτε σχηματισμός μιας χημικής πρωτεΐνης από το συνδυασμό θεραπευτικής πρωτεΐνης και πρωτεΐνης μεταφοράς.

Η μεταφορά των πεπτιδίων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) περιορίζεται από τη φτωχή βιοδιαθεσιμότητά τους δηλαδή τα χαμηλά επίπεδα απορρόφησής τους από τον ανθρώπινο οργανισμό³. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή μεταβολική τους σταθερότητα και την υψηλή τους εκκαθάριση από το συκώτι. Επίσης τα πεπτίδια είναι σε γενικές γραμμές υδατοδιαλυτές ενώσεις που δε θα εισέλθουν εύκολα στο ΚΝΣ, μέσω παθητικής διάχυσης, επειδή υπάρχει το φράγμα εγκεφάλου-αίματος [Blood-Brain Barrier : BBB]. Η ικανότητα ενός πεπτιδίου να διασχίσει το BBB και να εισέλθει στον εγκέφαλο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με τη χημική σύστασή του, όπως το μέγεθος, την ευκαμψία, τη στερεοδομή, τις βιοχημικές ικανότητες των αμινοξέων και την αλληλουχία των αμινοξέων. Η χημική τους σύνθεση επηρεάζει επίσης το βαθμό πρωτεϊνικής δέσμευσης, την ενζυμική σταθερότητα, την κατακράτηση από τα κύτταρα, την απορρόφηση από κύτταρα ιστών που δεν είναι οι στόχοι, το ρυθμό εκκαθάρισης και τη συγγένεια για πρωτεϊνικούς μεταφορείς. Υπάρχουν και άλλες παράμετροι που

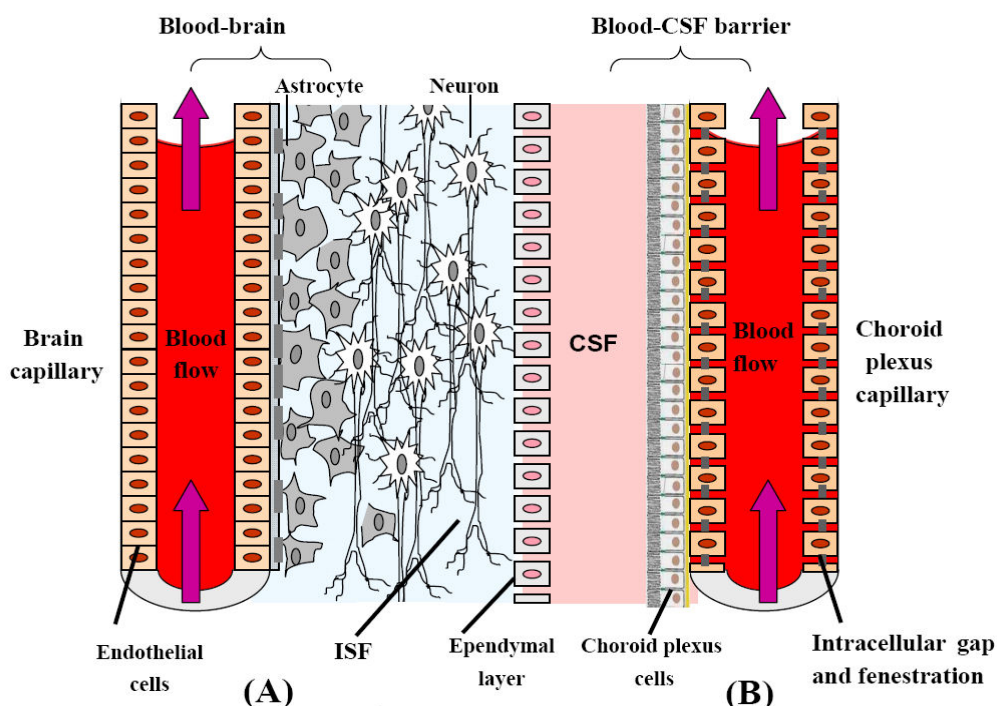
πρέπει να ληφθούν υπόψη, ανεξάρτητες από την αλληλουχία, όπως η ροή του αίματος στο εγκεφαλικό σύστημα, διαίτα και ηλικία του ασθενούς και επιρροή από προηγούμενες παθολογικές καταστάσεις. Η επιφάνεια επαφής του BBB είναι 5000 φορές περισσότερη από το όριο αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού, συνεπώς αυτό είναι και το σημαντικότερο εμπόδιο για την εισροή φαρμάκων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Μια από τις πιο συχνές στρατηγικές για να υπερνικηθεί το όριο BBB είναι η χημική τροποποίηση του φαρμάκου με τέτοιο τρόπο ώστε να αντέξει στις αντίξοες συνθήκες αρκετά ώστε να εισβάλλει στο ΚΝΣ. Οι συνηθισμένες τροποποιήσεις χωρίζονται στις εξής κατηγορίες 1) Λιπιδίωση καθώς η διαλυτότητα των λιπιδίων είναι παράγων-κλειδί για την ταχύτητα διάσχισης του ορίου BBB. Η παρουσία των υδροξυλομάδων στο πεπτίδιο ευνοεί το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το νερό κάτι που επάγει μείωση του συντελεστή διάχυσης και της μεμβρανικής διαπερατότητας. Οι πολικές ομάδες που περιέχουν τα πεπτιδικά φάρμακα επάγουν διπολισμό και γέφυρες υδρογόνου. Η προσθήκη της άπολης λιπιδικής ομάδας καθώς και οι σχετικές θέσεις πολικών και άπολων περιοχών οδηγεί σε επιθυμητή διάσχιση των μεμβρανών . 2) Δομική αλλαγή προς αύξηση σταθερότητας . Η ενζυματική αποικοδόμηση μέσα στον οργανισμό περιορίζει το χρόνο ζωής του μορίου . Πρέπει λοιπόν να ανιχνευθούν τα πιθανά ενεργά κέντρα με τα οποία δεσμεύεται το ένζυμο . Η συχνότερη τεχνική «κάλυψης» από τα ένζυμα περιλαμβάνει τροποποίηση του N-τελικού άκρου. Ωστόσο η απόκρυψη από τα ένζυμα με τροποποίηση πολλές φορές έχει την αρνητική επίπτωση της μειωμένης βιολογικής δραστηριότητας. Για παράδειγμα τα οπιοειδή πεπτίδια απαιτούν την N-τελική ουρά τους ελεύθερη για αποτελεσματική δέσμευση με τον υποδοχέα τους. 3) Γλυκοζυλίωση δηλαδή προσθήκη υπομονάδων σακχάρων τα οποία έχουν μεγάλη μεταβολική σταθερότητα

και μειωμένη εκκαθάριση όταν συνοδεύουν το μόριο. Αυτά τα φάρμακα έχουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα από το ΚΝΣ. Τα γλυκοπεπτίδια είναι αμφίπολα και φαίνεται πως η μεγάλη τους σταθερότητα οφείλεται στη ραγδαία εναλλαγή τους ανάμεσα σε δυο μορφές: την τελείως υδατοδιαλυτή με σχήμα τυχαίου σπειράματος και τη δεσμευμένη σε διεπιφάνειες επαφής νερού και μεμβράνης με δομή μικκυλίου. Το ενεργειακό φράγμα για την ενδομετατροπή των μορφών είναι αρκετά χαμηλό. 4) Σύζευξη / Εγκυτίωση πολυμερούς, καθώς η σύνδεση με κάποιο πολυμερές μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα, να μειώσει την εκκαθάριση και την ανοσοαπόκριση. Η πολύ-αιθυλενο-γλυκόλη (PEG) δείχνει να έχει προοπτικές ως βοηθητικό μόριο. Οι αλυσίδες PEG αν δεσμευτούν σωστά σε πεπτίδιο προάγουν τη δράση του, καθώς περιέχουν ευθεία τμήματα και διακλαδώσεις. Η σύζευξη με PEG καλύπτει την επιφάνεια του πεπτιδίου και αυξάνει το μοριακό βάρος, κάτι που μειώνει την ανοσοαπόκριση. Επίσης αποφεύγονται σε μεγάλο βαθμό η ενζυματική αποικοδόμηση, η τοξικότητα και το ρινικό υπερφιλτράρισμα. Το PEG προσφέρει επίσης μεγάλη θερμική και φυσική σταθερότητα. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι μια πιθανή απώλεια της βιοδραστικότητας αν επιλεγθεί το λάθος είδος PEG (μοριακό βάρος, είδος διακλαδώσεων κτλ.) ή και σύνδεση στο λάθος ενεργό κέντρο. Ειδικά για το ΚΝΣ, η αυξημένη υδροφιλικότητα του PEG και το μοριακό βάρος συντελούν σε μείωση της παθητικής διάχυσης.

Τόσο το BBB όσο και το εγκεφαλονωτιαίο όριο περιέχουν τόσο εμπόδια μεταφοράς (αφού δεν επιτρέπουν την ελεύθερη διάχυση) όσο και ενζυμικά εμπόδια, καθιστώντας ίσως τον εγκέφαλο το λιγότερο προσβάσιμο όργανο για τη μεταφορά των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών⁴. Οι ίδιοι μηχανισμοί που προστατεύουν τον εγκέφαλο από ξένες ουσίες, παρεμποδίζουν και την είσοδο θεραπευτικών φορέων. Το BBB χωρίζει το αίμα από το ενδιάμεσο εγκεφαλικό υγρό και βρίσκεται στο επίπεδο

των τριχοειδών του εγκεφαλικού επιθηλίου, όπου υπάρχει σύγκλιση διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως ενδοεπιθηλιακά κύτταρα και περιαγγειακοί μακροφάγοι. Υπάρχουν στενές συνδέσεις ανάμεσα στα κύτταρα. Το όριο αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Blood-CerebroSpinal Fluid Barrier BCSFB) βρίσκεται στο χοριοειδές πλέγμα. Αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα ενωμένα στις κορυφές τους με στενές συνδέσεις που μειώνουν την παρακυττάρια ροή. Η επιφάνεια των κυττάρων που είναι στραμμένη προς το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αυξάνεται από μικρά ινίδια. Τα τριχοειδή στο χοριοειδές πλέγμα επιτρέπουν ελεύθερη κίνηση των μορίων διαμέσω ενδοκυτταρικών κενών και θυριδωμάτων. Το παρακάτω σχεδιάγραμμα απεικονίζει παραστατικά τη ροή του αίματος στο εγκεφαλονωτιαίο σύστημα.



Σχήμα I.1 : Τα δυο κύρια «φράγματα» στο ΚΝΣ (A) Όριο αίματος-εγκεφάλου [BBB] (B) Όριο αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού [Blood-CSF barrier]
 CSF: CerebroSpinal Fluid (=Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό)
 ISF : Interstitial Fluid (=Ενδιάμεσο Υγρό)

Στο BBB δεν υπάρχουν θυριδώματα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα ενώ στα τριχοειδή του Blood-CSF barrier υπάρχουν θυριδώματα τα οποία επιτρέπουν την μεταφορά μορίων. Το εσωτερικό του εγκεφάλου απεικονίζει κάποια νευρικά κύτταρα. [Source : Pavan , Dalpiaz (2008) Molecules Vol.13]

Οι εφαρμοζόμενες χημικές τροποποιήσεις για την αύξηση της σταθερότητας των πεπτιδίων συχνά δεν έχουν αποτέλεσμα στη βιοδιαθεσιμότητα σε ό,τι αφορά το ΚΝΣ. Για αυτό το λόγο μια εναλλακτική προσέγγιση είναι ο σχεδιασμός ενός αποτελεσματικού «προ-φάρμακου». Τα προφάρμακα είναι αδρανείς θεραπευτικά φορείς οι οποίοι μπορούν ελεγχόμενα να μεταμορφωθούν σε ενεργούς μεταβολίτες. Τα προφάρμακα δρουν λοιπόν ως πρόδρομοι φαρμάκων χωρίς ενδογενή δράση και πρέπει (είτε μέσω ενζυμικής, είτε μέσω χημικής/αυθόρμητης διαδικασίας) να υποστούν με προσχεδιασμένο τρόπο μεταμόρφωση σε ενεργούς φορείς *in vivo*³⁻⁴. Τα απλούστερα προφάρμακα περιέχουν έναν ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα στο φάρμακο και το στρατηγικά επιλεγμένο τμήμα μεταφοράς. Το ανενεργό μόριο επομένως θα απελευθερώσει στις κατάλληλες συνθήκες τον ενεργό φορέα. Αυτή η αποδέσμευση θα γίνει είτε μη ενζυμικά στον υποδοχέα ή με τη βοήθεια καθορισμένων ενζύμων που είναι εκλεκτικά για αυτό το μόριο ή πιο άφθονα μέσα στο σώμα. Το προφάρμακο θα πρέπει να έχει πρόσβαση στον ιστό που στοχεύει.

Η μεταφορά των πεπτιδίων στον εγκέφαλο είναι μεγάλο πρόβλημα γιατί είναι ευάλωτα σε αποικοδόμηση από πεπτιδάσες που βρίσκονται στο τριχοειδές ενδοθήλιο του εγκεφάλου. Οι παρεμποδιστές πεπτιδάσης είναι υποψήφιοι για μόρια συνοδοί στα προφάρμακα. Ακόμα και η χειρομορφία των αμινοξέων του πεπτιδίου παίζει ρόλο στη σταθερότητά του καθώς τα D-αμινοξέα επάγουν μικρότερη ταχύτητα υδρόλυσης από τις μορφές L-αμινοξέων. Μερικές άλλες αποτελεσματικές μέθοδοι παρασκευής προφάρμακου είναι 1) Σύστημα μεταφοράς χημικού οξειδοαναγωγικού μέσου. Ένα λιποφιλικό μόριο χρησιμοποιείται ως μεταφορέας του φαρμάκου και με ενζυμική οξείδωση απελευθερώνει ένα υδατοδιαλυτό άλας πυριδίνης. Η διαλυτή μορφή διαδίδεται σε όλο το σώμα, ακόμα και στο ΚΝΣ. 2) Σύστημα μεταφοράς

άλλων ουσιών όπως βιταμίνες ή ορμόνες. Τα συστήματα αυτά έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα δέσμευσης για τα υποστρώματά τους. Τα νευροφάρμακα δε μπορούν άμεσα να μεταφερθούν με αυτό το σύστημα. Το προφάρμακο πρέπει να έχει βιομιμητική δομή με το θεραπευτικό συστατικό που μεταφέρεται ή να συνδέεται με το συστατικό οπότε η μεταφορά θα είναι συζευγμένη: και στις δυο περιπτώσεις τα φάρμακα θα ξεφύγουν από την ανενεργή τους πρόδρομη μορφή και θα απελευθερωθούν με ενζυμική λύση μετά τη στόχευσή τους στο ΚΝΣ.

Η οσφρητική περιοχή είναι προσβάσιμη για τη λήψη πεπτιδικών φαρμάκων. Το ρινικό επιθήλιο έχει πολλά αγγεία. Η οσφρητική περιοχή είναι τοποθετημένη στην κορυφή της ρινικής κοιλότητας και είναι το μόνο ενεργό κέντρο του σώματος όπου το ΚΝΣ είναι σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Από τη ρινική μεμβράνη της αναπνευστικής περιοχής τα μόρια μπορούν να διαδοθούν κατευθείαν στη ροή του αίματος. Τα λιποφιλικά μόρια μεταφέρονται εύκολα μέσω ενός διακυτταρικού μηχανισμού. Τα πολικά./υδρόφιλα μόρια περνάνε από τη ρινική μεμβράνη μέσω ενός παρακυττάριου μηχανισμού που είναι λιγότερο επιτυχής. Ως εκ τούτου τα πολικά μόρια θα παραμείνουν περισσότερο χρόνο στη ρινική μεμβράνη και έχουν περισσότερες πιθανότητες να εισχωρήσουν στο ΚΝΣ.

Η σύνθεση πεπτιδίων για φαρμακευτικούς σκοπούς απαιτεί 1 – 2 χρόνια κατά μέσο όρο ακόμα και για απλές αλληλουχίες⁵. Παρά τα πλεονεκτήματά τους η χαμηλή τους βιοδιαθεσιμότητα τα περιορίζει στη δράση τους. Ωστόσο ήδη έχουν θεραπευτικές χρήσεις στη νευρολογία, την ενδοκρινολογία και την αιματολογία⁶. Τα περισσότερα πεπτίδια δε μπορούν να ληφθούν από το στόμα γιατί τα ένζυμα στο γαστρεντερικό σύστημα τα αποικοδομούν ραγδαία. Η εισαγωγή γίνεται κυρίως υποδόρια ή ενδοφλέβια. Οι προσπάθειες για καινούριες, εναλλακτικές μεθόδους

δοσοληψίας, επικεντρώνονται πλέον σε εισπνοή, ενδορινική, λήψη από το δέρμα ή τις παρειές.

2) ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Το σημαντικότερο μέλημα στην παρασκευή πεπτιδίων με φαρμακευτική δράση είναι ο μηχανισμός μεταφοράς του και ο τρόπος που διαπερνάει τη μεμβράνη του κυττάρου, όταν υπάρχουν οι κατάλληλες αλληλεπιδράσεις ⁷⁻⁸. Το πεπτίδιο που παράγεται από την πρωτεΐνη Tat του ιού HIV-1 είναι ένα βασικό μόριο με επιτυχημένη λειτουργία μεταφοράς διαφόρων πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων, με μεγάλο εύρος διαφορετικών μεγεθών ⁷. Η περιοχή μεταγωγής έχει αναγνωριστεί και είναι μια αλληλουχία από 9 βασικά αμινοξέα. Είναι εύκολο για αυτό το πρωτεϊνικό θραύσμα να μετατοπιστεί στη μεμβρανική επιφάνεια και να ενσωματωθεί τελικά στον πυρήνα του κυττάρου. Αν και ο ακριβής τρόπος με τον οποίο το πεπτίδιο συνδέεται με το κύτταρο και στη συνέχεια εισβάλλει δεν είναι τελείως σαφής, η λειτουργία του είναι χρήσιμη και με πολλές προοπτικές .

Η κατανόηση των μηχανισμών που σχετίζονται με τη βιολογική πορεία και τη βιοκατανομή πεπτιδίων έχει προχωρήσει στο βαθμό που η χρήση ή η μίμηση αυτών των μηχανισμών εφαρμόζεται όταν αυτοί είναι διαθέσιμοι. Το δυναμικό χρήσης πρωτεϊνικών αντικαρκινικών φορέων είναι όμως περιορισμένο, ακριβώς γιατί υπάρχουν προβλήματα στη μεταφορά των φαρμακοφόρων στους καρκινικούς όγκους και στην εισχώρησή τους στα καρκινικά κύτταρα ⁸. Οι προσεγγίσεις για πιο επιτυχή δράση τέτοιων πεπτιδίων περιλαμβάνουν βελτίωση της σταθερότητάς τους, του χρόνου ζωής και της στόχευσης τους, κάτι που επιτυγχάνεται είτε με τροποποίηση (χρησιμοποιώντας υδατοδιαλυτά πολυμερή), είτε με ενσωμάτωσή τους σε φορείς ή και εξειδικευμένη στόχευση για καρκινικά κύτταρα με τη βοήθεια εκλεκτικών

τμημάτων. Μια πιο πρόσφατη στρατηγική είναι η χρήση μεταγωγικών πεπτιδίων και πρωτεϊνών για ενδοκυτταρική μεταφορά .

Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών όγκων παρέχει πολλαπλά σήματα τα οποία μπορούν να γίνουν αντικείμενο εκμετάλλευσης από τους ερευνητές και να βελτιώσουν την ήδη υπάρχουσα χημειοθεραπευτική ⁹⁻¹¹. Τα πολυπεπίδια έχουν συγκεκριμένα ενεργά κέντρα για να ωφεληθούν από αυτά τα σήματα ⁹. Τα πεπίδια παρέχουν: 1) Ένα πλούσιο ρεπερτόριο βιολογικά εκλεκτικών αλληλεπιδράσεων για σχεδίαση φαρμάκων. 2) Συμπεριφορές με αλλαγές φάσης ως περιβαλλοντική απόκριση σε αλλαγές συνθηκών, ώστε να μπορούν να συντονίζονται με τα σήματα της νόσου. 3) Έλεγχο σε πιθανές πορείες βιοαποικοδόμησης. 4) Την επιλογή να συνδυάζουν τις λειτουργίες τους ανεπαίσθητα σε ένα μόνο πολυμερές με βιοσύνθεση ενός μόνο σταδίου. Οι λειτουργικές μονάδες των πεπτιδίων παρέχουν ποικιλία στόχευσης σε διάφορα καρκινικά κύτταρα.

Πρόσφατα πεπτιδικά συστήματα φορείς χρησιμοποιήθηκαν σε αντικαρκινικά φάρμακα όπως η καμπτοθικίνη (CMT) ένα αλκαλοειδές που αναστέλλει τη λειτουργία της DNA τοποϊσομεράσης. Το πολυμερές PEG ήταν ο φορέας, ενώ συνθετικά πεπίδια που μιμούνται τη δράση ορμόνης (LHRH) ή της αποπτωτικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης BCL-2 (BH3), λειτούργησαν βοηθητικά ως τμήματα στόχευσης και αναστολείς της αποπτωτικής άμυνας αντίστοιχα ¹⁰. Η CMT έχει γνωστή δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών. Με τις χημικές βελτιώσεις παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός PEG-CMT έχει πολύ πιο δραστικά αποτελέσματα σε σχέση με την απομονωμένη CMT. Η φαρμακοκινητική της CMT αυξήθηκε ακόμα περισσότερο με τη χρήση των πεπτιδίων στόχευσης LHRH και BH3 και επαληθεύει τη χρήση τροποποιημένης στόχευσης ως μέθοδο αποτελεσματικής καρκινικής θεραπείας.

Εκτός από την αλληλουχία των αλυσίδων, η στερεοχημεία των αμινοξέων μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας στη συμπεριφορά του πεπτιδίου και να οδηγήσει σε στερεοεκλεκτική συμπεριφορά ¹¹. Τέσσερα εναντιομερή πεπτίδια με 9 κατάλοιπα και κωδικά ονόματα A , B , C , D απομονώθηκαν από μεγαλύτερα πεπτίδια σκαθαριών. Οι διαμορφώσεις των αμινοξέων ήταν d και όχι l. Τα εναντιομερή αυτά διατήρησαν την ικανότητα διατάραξης της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης επιδεικνύουν διαφορετικές δυνατότητες αναστολής ανάπτυξης σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων. Το B έχει την ισχυρότερη κυτοτοξικότητα απέναντι σε καρκινικό κύτταρο μυελώματος ποντικού. Το B ωστόσο δεν επηρεάζει τα υγιή λευκοκύτταρα του μυελού. Η παρουσία υψηλής πυκνότητας αρνητικού φορτίου στην καρκινική κυτταρική επιφάνεια λόγω παρουσίας του μορίου της φωσφατιδυλοσερίνης κάνει τα πεπτίδια πιο ευαίσθητα στην αναγνώριση και την εκλεκτική τους σύνδεση.

Πολλά βιοδραστικά πεπτίδια που παρεμποδίζουν την αγγειοτενσίνη I, το αντίστοιχο ένζυμο που μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I (angiotensin converting enzyme = ACE) και τον υποδοχέα τύπου 1 (AT1) στο καρδιαγγειακό σύστημα, συμβάλλουν στην πρόληψη και τη θεραπεία της υπέρτασης ¹². Αυτά τα πεπτίδια με την παρεμποδιστική λειτουργία απομονώνονται από τροφικές πρωτεΐνες ή και από συνθετικά παράγωγα. Η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των πεπτιδίων θα πρέπει να εξετασθεί αναλυτικότερα, αν και ένα συνθετικό πεπτίδιο που αναστέλλει το ACE είναι σίγουρο ότι μπορεί να μειώσει την πίεση του αίματος χωρίς παρενέργειες.

Η ασθένεια Alzheimer είναι διαταραχή του νευρικού συστήματος για την οποία δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία. Υποτίθεται πως η συσσώρευση της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης στον εγκέφαλο και η εναπόθεσή της είναι κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη Alzheimer. Δυο συνθετικά πεπτίδια τα οποία περιέχουν ένα τμήμα της

κεντρικής αλληλουχίας της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης (για συντομία Αβ) , θεωρείται ότι αποτελούν πιθανούς παρεμποδιστές της συσσωμάτωσης της Αβ στον εγκέφαλο ¹³. Τα μιμητικά πεπτίδια περιέχουν την αλληλουχία θέσεων 16 – 22 αν και υπέστησαν χημική τροποποίηση για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητά τους. Τα πεπτίδια τα οποία περιείχαν την αλληλουχία 16 – 22 αντιστραμμένη βρέθηκε ότι είναι πιο δραστικά σε σχέση με τα αρχικά, καθώς προλαμβάνανε σε μεγαλύτερο βαθμό το σχηματισμό διαλυτών ολιγομερών και ινιδίων από Αβ. Τα ολιγομερή και τα ινίδια των Αβ λοιπόν φαίνεται ότι ακολουθούν την ίδια βιοσυνθετική πορεία.

Οι καρδιοαγγειακές παθήσεις ίσως να μπορούν να αποτραπούν με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου που μιμείται τη γλυκαγόνη, μια γαστρεντερική ορμόνη που παράγεται κυρίως μετά τα γεύματα. Το πεπτίδιο αυτό που αναφέρεται για συντομία ως GLP-1, μειώνει την κυκλοφορία γλυκόζης στο αίμα με την διέγερση έκκρισης ινσουλίνης και την αναστολή κυκλοφορίας γλυκαγόνης ¹⁴. Το GLP-1 παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς μειώνει το ρίσκο μυϊκής ισχαιμικής βλάβης και παράλληλα βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία. Οι αγωνιστές αυτού του πεπτιδίου πρέπει να μελετηθούν εκτεταμένα , αν και οι ενδείξεις υποδηλώνουν ότι η δράση τους συντελεί σε μείωση της πίεσης του αίματος και ευνοϊκά αποτελέσματα στη λιπιδική συμπεριφορά των μεμβρανών. Επίσης επάγουν απώλεια βάρους σε διαβητικούς ασθενείς. Θα πρέπει ασφαλώς να υπάρξουν πολλές μακροχρόνιες κλινικές δοκιμές που θα επαληθεύσουν τα δεδομένα.

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια μπορούν να παραχθούν από γονιδιακές αλληλουχίες φάγων ¹⁵. Δυο συνθετικά πεπτίδια από φάγους με φαινομενική αντιμικροβιακή δράση συντέθηκαν και μελετήθηκαν με βάση τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Τα πεπτίδια X και Y και τα ανάλογά τους έχουν φαρμακευτική δράση, είτε βακτηριοστατική είτε βακτηριοκτόνο. Η λειτουργία τους μπορεί να

ασκηθεί είτε με κάθε πεπτίδιο μεμονωμένα είτε με συνδυασμό τους. Τα πεπτίδια έχουν ελικοειδή δομή που συντελεί σε συνηθισμένο μηχανισμό φαρμακευτικής δράσης. Συγκεκριμένα δεσμεύονται πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και στη συνέχεια διαπερνούν τα λιποσώματα. Η βακτηριοκτόνος κινητική τους είναι ραγδαία και η αντιμικροβιακή τους λειτουργία ενισχύεται με σχηματισμό αμιδικών δεσμών. Αυτά τα πεπτίδια μπορούν να αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης έτσι ώστε να συντεθούν μελλοντικά καινούρια φάρμακα που να αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της αυξανόμενης μικροβιακής αντίστασης.

Η ινσουλίνη είναι ευαίσθητη σε βιοαποικοδόμηση από πρωτεάσες και ελαστάσες. Η προστασία της ινσουλίνης *in vitro* μπορεί να επιτευχθεί αν είναι ενσωματωμένη σε κατάλληλο φορέα. Πολυμερή που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς συνδέονται ομοιοπολικά με άλλους αναστολείς αυξάνοντας συνεργειακά την προστασία τους. Ο μεταβολισμός της ινσουλίνης *in vitro* μπορεί πλέον να μελετηθεί χρονικά και να ελεγχθεί ¹⁶. Η αποικοδόμησή της παρουσία μονάχα του πολυμερούς είναι ραγδαία, αλλά η συνδυασμένη προστασία από πολυμερές και αναστολέα μειώνει την ποσότητα της ινσουλίνης που λύεται ενζυμικά στο 20 % περίπου σε σχέση με τις αρχικές συνθήκες (όπου η ινσουλίνη αποικοδομείται σχεδόν ποσοτικά). Ακόμα και μετά από 4 ώρες κατεργασίας με τα πρωτεολυτικά ένζυμα θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, η διαδικασία λύσης της ινσουλίνης παρέμεινε στάσιμη σε αυτά τα επίπεδα. Η σύζευξη πολυμερούς-αναστολέα είναι επομένως ένα χρήσιμο εργαλείο για να υπερνικηθεί το σημαντικό εμπόδιο της λήψης ινσουλίνης από το στόμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II :
AIDS

1) Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ A.I.D.S

Το A.I.D.S. είναι μια από τις μεγαλύτερες μάστιγες στη σύγχρονη κοινωνία . Κατέχει μια υψηλή θέση στη λίστα με τις μεγαλύτερες ασθένειες / αίτια θνησιμότητας για τους ανθρώπους μαζί με τις καρδιοπάθειες και τον καρκίνο. Τα αρχικά A.I.D.S. σημαίνουν Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας. Αν και η επίσημη ταυτοποίηση του ιού έγινε μόλις το 1981, στην πραγματικότητα ο ιός υπήρχε, προκαλώντας κρούσματα, ήδη από τη δεκαετία του '50. Το 2001 τα θύματα της ασθένειας είχαν ήδη ξεπεράσει σε όλο τον πλανήτη τις απώλειες από το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο ¹⁷. Οι ρυθμοί διάδοσης της νόσου είναι ραγδαίοι ήδη από τη δεκαετία του '90. Μόνο στη Σοβιετική Ένωση το 2000 προέκυψαν 250.000 καινούρια κρούσματα. Κάθε καινούριος ασθενής είναι ταυτόχρονα και μια πιθανότητα διασποράς της αρρώστιας. Σε αντίθεση με την κοινή αντίληψη η μετάδοση είναι πολύ πιο γρήγορη ανάμεσα σε χρήστες τοξικών ουσιών, παρά ανάμεσα σε ερωτικούς συντρόφους. Σε μερικές χώρες η συνεισφορά από μετανάστες από τις πιο μολυσμένες περιοχές της Κεντρικής Αφρικής είναι πολύ αισθητή. Από τις εγκύους ασθενείς στη Σουηδία για παράδειγμα, οι μισές κατάγονται από την Αφρική. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο οι πιο προφανείς εστίες μόλυνσης έχουν μπλοκαριστεί στην Ευρώπη. Οι τράπεζες αίματος (που τη δεκαετία του '80 προκάλεσαν γρήγορη εξάπλωση της νόσου σε αιμοφιλικούς και άλλους ασθενείς που χρειάζονταν τακτικά αίμα) είναι πλέον απόλυτα ασφαλείς, αφού το αίμα που χαρίζουν οι εθελοντές αιμοδότες πάντοτε ελέγχεται. Η αποτελεσματική θεραπεία έχει μειώσει σημαντικά τη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί. Η εξάπλωση ανάμεσα σε ετεροφυλόφιλους συντρόφους έχει επίσης ελαττωθεί αισθητά. Η ενημέρωση και τα τεστ για τον ιό έχουν συνεισφέρει σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο ερωτικών επαφών χωρίς προφύλαξη.

Για τους ανθρώπους που ζουν στις πιο ευημερείς περιοχές του κόσμου, τα καινούρια φάρμακα έχουν μετατρέψει την ασθένεια από μια ανίατη νόσο σε μια χρόνια ιική μόλυνση. Την τελευταία 15ετία, αποτελεσματική θεραπεία έχει επιτευχθεί χάρη σε «κοκτέιλ» που συνδυάζουν πολλά φάρμακα. Παρά το ότι η φαρμακευτική αγωγή μειώνει πάρα πολύ την ιική αναπαραγωγή, ποτέ δεν εξουδετερώνει τελείως τον ιό. Μετά από κάποια χρόνια υπάρχουν παρενέργειες από τα φάρμακα. Η ανάπτυξη εμβολίου είναι πολύ δύσκολη και χρονοβόρος διαδικασία, όχι μόνο εξαιτίας της πολυπλοκότητας του ιού αλλά και του διαφορετικού τρόπου με τον οποίο επηρεάζει τους πληθυσμούς (Ευρωπαϊκό , Ασιατικό κτλ.). Οι δοκιμές εμβολίων επίσης απαιτούν πολύ χρόνο και έξοδα. Οι πειραματισμοί σε ζώα είναι δύσκολοι και λίγα εργαστήρια είναι διατεθειμένα ή/και εξοπλισμένα να τους διεξάγουν.

Οι διαφορές μετάδοσης ανάμεσα στα δυο φύλα είναι επίσης αξιοσημείωτες. Στο τέλος του 2007 ο αριθμός των ανθρώπων που εκτιμήθηκε να ζουν με την ασθένεια ήταν ανάμεσα στα 33 και τα 36 εκατομμύρια, με το ρυθμό μόλυνσης στις γυναίκες να είναι διαρκώς αυξανόμενος¹⁸. Οι γυναίκες είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στη μόλυνση εξαιτίας βιολογικών, κοινωνικών, πολιτισμικών και οικονομικών παραγόντων. Το AIDS δεν οφείλεται μόνο στην ανισότητα των δυο φύλων, αλλά και ενισχύει αυτήν την ανισότητα, αφήνοντας τις γυναίκες ακόμα πιο επιρρεπείς στη μόλυνση. Στην υπο-σαχάρια Αφρική για παράδειγμα πάνω από το 60 % των ασθενών είναι γυναίκες.

Στη Βραζιλία το AIDS αν και θεωρήθηκε αποκλειστικά αρρώστια των ομοφυλοφίλων, η επιδημία γρήγορα έφτασε σε επίπεδα εξίσωσης των δυο φύλων αφού οι γυναίκες μολύνθηκαν πολύ γρήγορα. Το A.I.D.S. αυτήν τη στιγμή είναι η σοβαρότερη αιτία θανάτου για τις γυναίκες 15 έως 49 χρονών που ζούνε στις 3 μεγαλύτερες πόλεις της Βραζιλίας (Σαλβαδόρ, Σάο Πάολο, Ρίο ντε Τζανέιρο). Στη Βραζιλία η διάγνωση του A.I.D.S. γίνεται κυρίως σε γυναίκες που βρίσκονται σε

λιγότερο προνομιούχες οικονομικο-κοινωνικές καταστάσεις, αν και οι περισσότερες από αυτές έχουν μια μονογαμική ετεροφυλοφιλική σχέση. Αυτή η παρατήρηση εξηγείται με την έλλειψη πρόσβασης στη μόρφωση και ενημέρωση, όπως και πολιτισμικά έθιμα τα οποία συντηρούν διακρίσεις, στιγματισμό και ανισότητα των φύλων. Η ετεροφυλόφιλη μετάδοση μάλιστα είναι πιο συχνή στις γυναίκες και το μεγαλύτερο ρίσκο για αυτές είναι ο σύντροφός τους, ενώ αυτές συχνά αγνοούν τους κινδύνους από την έλλειψη προφύλαξης. Οι πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι σε μια περιοχή χαμηλού εισοδήματος, υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες για μια γυναίκα να κολλήσει τον ιό από το σύζυγο ή ένα σταθερό σύντροφο παρά από μια βραχυπρόθεσμη σχέση. Ερευνώντας ανάμεσα στους ασθενείς μπορεί κάποιος να διαπιστώσει διαφορές ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες σε ότι αφορά την ηλικία, τον τρόπο μόλυνσης, τις παράπλευρες ευκαιριακές λοιμώξεις (που επιφέρει η αρρώστια) και την έκβαση της μόλυνσης (θνησιμότητα, νοσηρότητα κτλ.). Συνήθως οι γυναίκες δεν είναι τοξικομανείς και έχουν υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο σε σχέση με τους άνδρες. Η ελαστική τήρηση της αγωγής επίσης αποδεδειγμένα σχετίζεται με το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο. Οι μη έγκυες γυναίκες ανακαλύπτουν την αρρώστια αργότερα σε σχέση με τις εγκύους οι οποίες κάνουν συχνότερα εξετάσεις.

Σε γενικές γραμμές οι ασθενείς οι οποίοι δε συμμορφώνονται με την αγωγή είναι αυτοί με χαμηλό μορφωτικό επίπεδο, κάνουν χρήση αλκοόλ ή παράνομων ουσιών, έχουν (έστω και περιστασιακές) ομοφυλοφιλικές σχέσεις, είναι άνεργοι ή ανύπαντροι και βρίσκονται σε αβέβαια οικονομική/κοινωνική κατάσταση. Το ότι οι έγκυοι ακολουθούν πιο πιστά τη θεραπεία σε σχέση με τις μη εγκύους, είναι τέλος ένα αίτιο για τη χαμηλότερη θνησιμότητα.

Το A.I.D.S. έχει τελείως διαφορετική αντιμετώπιση ανά τον κόσμο, ανάλογα με τις συνήθειες του κάθε λαού και τις αποφάσεις που παίρνει η κάθε κυβέρνηση για να εξυπηρετήσει τα συμφέροντά της. Οι στατιστικές δεν είναι πάντα εύκολο να διεξαχθούν. Οι βασικές κατηγορίες ασθενών κωδικοποιούνται ως MSM (**M**en **W**ho **H**ave **S**ex with **M**en), δηλαδή ομοφυλόφιλοι, IDU (**I**ntravenous **D**rug **U**sers) δηλαδή ενδοφλέβιοι χρήστες ναρκωτικών ουσιών [τοξικομανείς] καθώς και η μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο η οποία ονομάζεται «κάθετη» (vertical transmission).

Στην Ασία η άρνηση για τη σοβαρότητα ή ακόμα και για την ύπαρξη της νόσου είναι ένα μεγάλο εμπόδιο για την αποτελεσματικότητα της πρόληψης της επιδημίας¹⁹. Ο ιός έχει ανιχνευτεί στην πλειοψηφία των τοξικομανών σε Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Βιετνάμ, Ταϊλάνδη, Μιανμάρ και Νεπάλ, όπως και στο ένα δέκατο των ατόμων που εκδίδονται επαγγελματικά σε αυτές τις χώρες. Οι περισσότερες από αυτές τις χώρες δεν έχουν κάνει τίποτα για να αντιμετωπίσουν την αυξανόμενη κρίση καθώς μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό από τις ομάδες «υψηλού κινδύνου» έχουν πρόσβαση σε βασικές υπηρεσίες πρόληψης. Το κοινωνικό στίγμα και οι διακρίσεις ανάμεσα σε ανθρώπους που έχουν A.I.D.S. προκύπτουν κυρίως από την έντονα αρνητική στάση εναντίον των ασθενών. Η αρνητική αυτή δημόσια εικόνα για τους φορείς δεν οφείλεται μόνο στη φύση της αρρώστιας αλλά και στην κοινωνική έννοια των ρισκοκίνδυνων παραγόντων που οδήγησαν σε αυτή. Ο τρόπος μετάδοσης και ο τρόπος ζωής των ασθενών θεωρείται ως υπεύθυνος για την ύπαρξη της νόσου. Στα μέρη όπου οι κοινωνικοί θεσμοί χωρίζουν τον πληθυσμό σε ομάδες, οι ελίτ και οι «κοινοί» άνθρωποι νομίζουν πως το A.I.D.S. είναι μια αρρώστια ατόμων που ζουν έξω από την κοινότητά τους και είναι αδύνατον να επηρεάσει τους ίδιους. Όταν οι Αρχές εφαρμόζουν την προσέγγιση «αυτοί» και «εμείς», συνδέοντας προκατειλημμένα τη νόσο με συγκεκριμένα τμήματα του πληθυσμού, οι εκστρατείες κατά του A.I.D.S. παραμένουν αποσπασματικές και άστοχες. Για παράδειγμα, ενώ

στη Βραζιλία το A.I.D.S. αντιμετωπίστηκε επιτυχώς ως μια γενική απειλή, στη Νότια Αφρική το A.I.D.S. συνδέθηκε με ρατσιστικά θέματα οπότε η πολιτική ενάντια στην ασθένεια αμαυρώθηκε από τις φυλετικές διακρίσεις.

Η άρνηση για τις διαστάσεις της επιδημίας έχει πολλές πτυχές και παραμέτρους. Υπάρχει μια μικρή ομάδα επιστημόνων που αμφιβάλλει ή και αρνείται ότι ο ιός HIV έχει ταυτοποιηθεί ή και ότι προκαλεί A.I.D.S. [Source : Binod Nepal (2007) *Health Policy Vol.84*]. Συνεπώς ο ιός θεωρείται αβλαβής και η ασθένεια προκαλείται από χρήση ναρκωτικών , φάρμακα κατά του A.I.D.S. ή και κακή διατροφή ή υποσιτισμό. Μια πολύ συνηθισμένη αντίληψη είναι πως η νόσος θεωρείται μια «ξένη» αρρώστια. Οι Ασιάτες έως και σήμερα θεωρούν πως το A.I.D.S. είναι μια ασθένεια των Δυτικών χωρών. Τα πρώτα κρούσματα σε Ασιατικές χώρες ήταν τουρίστες ή αιμοφιλικοί ασθενείς που δέχτηκαν αίμα από Δυτικούς δωρητές και η προκατάληψη αυτή επικρατεί έως τώρα, αφού τα περιστατικά αυτά δημιούργησαν μια ψευδαίσθηση για την πηγή και τις προοπτικές της νόσου. Τρίτον, πολλοί Ασιάτες ηγέτες είχαν υπερβολικά αισιόδοξη πεποίθηση για τη διατήρηση της ηθικής τάξης στις χώρες τους. Πίστεψαν πως αυτού του είδους οι αποκλίνουσες συμπεριφορές ήταν ανύπαρκτες ή σπάνιες και απίθανο να εξαπλωθούν στις μάζες. Η αντίληψη είναι ότι η αρρώστια μεταδίδεται μόνο σε αποκλίνουσες ή απομονωμένες ομάδες. Στην Ινδία το πρώτο κρούσμα ήταν μια ιερόδουλη. Στο Μιανμάρ οι πρώτες διαγνώσεις έγιναν σε τοξικομανείς και στην Ινδονησία οι πρώτοι ασθενείς βρέθηκαν σε παραλιακές περιοχές στις οποίες συχνάζαν και Ταϊλανδοί ψαράδες. Η πρώτη εξάπλωση στην Κίνα έγινε σε τοξικομανείς από την περιοχή Yunnan που ανήκαν σε εθνικές μειονότητες. Αυτά τα περιστατικά δημιούργησαν την ψευδαίσθηση ότι η επικρατούσα κοινωνική πλειοψηφία θα απομονωνόταν από την επιδημία.

Η άρνηση παροχής φροντίδας στους ασθενείς ήταν λογικό επακόλουθο αφού επικρατούσε η αντίληψη ότι τα άτομα που κολλούσαν την αρρώστια ήταν

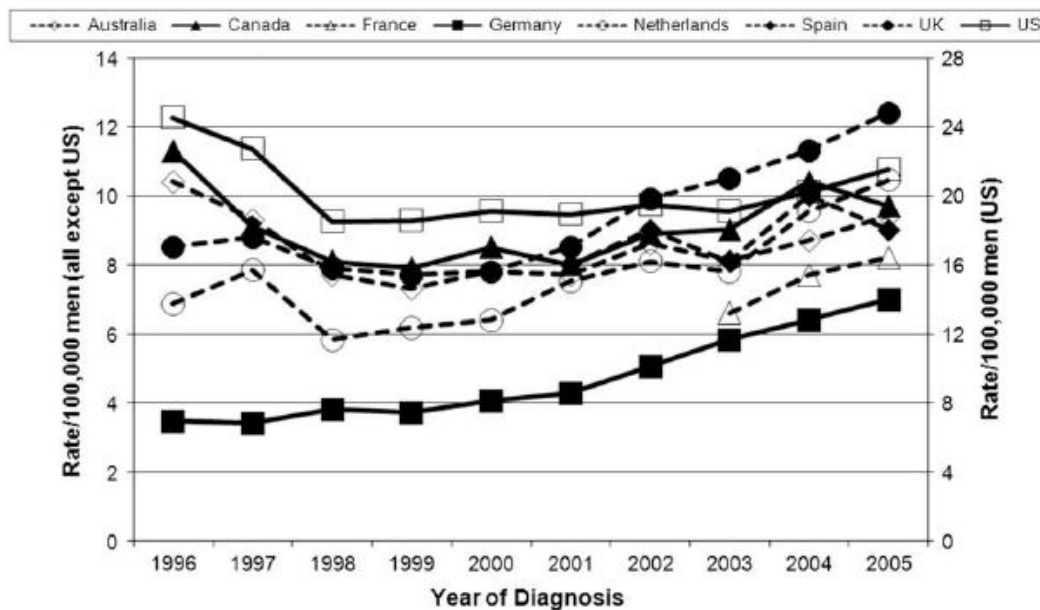
αποκλειστικά υπεύθυνα λόγω της ανήθικης, αποκλίνουσας και αμαρτωλής ζωής τους. Πολλές ομάδες υψηλού κινδύνου όπως MSM, IDU, μετανάστες και φυλακισμένοι στερούνται υπηρεσιών βασικής πρόληψης και αγωγής. Φυσικά η δημοσίευση στατιστικών για αυτές τις ομάδες θεωρείται ως ευαίσθητο δεδομένο το οποίο είναι καλύτερα να παραμείνει μυστικό. Η Ταϊλάνδη αν και τώρα έχει εφαρμόσει εκστρατεία πρόληψης με προφύλαξη, στην αρχή απέκρυψε τα αποτελέσματα των ανιχνευτικών τεστ ανάμεσα στις ιερόδουλες, γιατί ανησύχησε ότι η είδηση για μια τέτοια επιδημία θα έβλαπτε τον τουρισμό της χώρας. Πολλές τοπικές αυτοδιοικήσεις σε μια χώρα δε θέλουν να ξέρουν, ούτε και οι άλλες περιοχές να μάθουν για το A.I.D.S. στην περιοχή τους, από φόβο ότι θα δημιουργήσει αρνητική εικόνα στην περιοχή και τις Αρχές της. Οι τοπικές κυβερνήσεις μερικές φορές αποκρύπτουν τις πληροφορίες ή και αντιστέκονται ενεργά στην έρευνα για το AIDS. Η ευαισθησία πολλές φορές μεταφράζεται και σε διαφωνία για το βαθμό της εξάπλωσης. Η Κίνα και η Ινδία για πολύ καιρό αμφισβητούσαν την εγκυρότητα των στατιστικών. Οι Ινδοί κυβερνήτες το 1996 αρνήθηκαν να παραδεχτούν ότι 3 εκατομμύρια στη χώρα τους ήταν φορείς · υποπτεύονταν ότι τα νούμερα ήταν υπερβολικά και « η Δύση τα μεγαλοποιεί για να πιέσει την Ινδία ώστε να δεχτεί δοκιμαστικούς εμβολιασμούς και άλλες έρευνες στους φορείς ».

Περίπου 2 εκατομμύρια άνθρωποι εκτιμάται ότι ζουν με AIDS στη Λατινική Αμερική και την Καραϊβική – παραπάνω από ότι στις Η.Π.Α., τον Καναδά τη Δυτική Ευρώπη και την Ιαπωνία μαζί ²⁰. Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό μετάδοσης είναι μέσω ερωτικής επαφής χωρίς προφύλαξη, εξίσου ανησυχητική είναι η αύξηση ρυθμού εξάπλωσης από ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών. Παρά το ότι ο ρυθμός αύξησης της μόλυνσης στη Λατινική Αμερική είναι μικρός (0.5 %) σε σχέση με την Αφρική (5%), τα νούμερα εξακολουθούν να παραμένουν υψηλά. Συγκεκριμένα οι περισσότερες μεταδόσεις της νόσου είναι από MSM, στη συνέχεια

είναι τα άτομα που εκδίδονται επαγγελματικά και τους πελάτες τους, οι IDU και οι μετανάστες. Το ανησυχητικό πρόβλημα στην περιοχή είναι πως πολλοί άνδρες διατηρούν ερωτικές επαφές και με γυναίκες και με άνδρες κάτι το οποίο οδηγεί στη ραγδαία εξάπλωση του ιού ανάμεσα στις γυναίκες. Η Καραϊβική, με ένα ρυθμό εξάπλωσης 1% ανάμεσα στους ενήλικες, είναι η δεύτερη περιοχή στον κόσμο με τα περισσότερα πλήγματα μετά την υπο-σαχάρια Αφρική. Οι ετεροφυλόφιλες σχέσεις είναι η κυριότερη αιτία μόλυνσης, ενώ οι γυναίκες και οι νεαροί άντρες είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι. Αν και κάποιες Καραϊβικές χώρες όπως η Δομινικανή Δημοκρατία και η Αϊτή (κυρίως σε αστικές περιοχές σε σχέση με αγροτικές) έχουν σταθεροποιήσει το ρυθμό αύξησης κρουσμάτων, σε καμία δεν έχει παρατηρηθεί πτώση του ποσοστού και μάλιστα προβλέπεται αύξηση των νέων μολύνσεων στα επόμενα χρόνια. Το αμάλγαμα από διάφορους πολιτισμούς σε αυτές τις χώρες, οι κοινωνικές και οικονομικές ανομοιογένειες, οι γλώσσες και οι συμβατικοί κανόνες στην ερωτική συμπεριφορά σημαίνει ότι το AIDS είναι ετερογενές φαινόμενο και δε μπορεί κάποιος να γενικεύσει τη μια χώρα με τη γειτονική της. Σε αυτή την περιοχή λοιπόν το θέμα αυτό είναι ένα ταμπού το οποίο πρέπει να «καταχωνιαστεί κάτω από το χαλί». Μερικοί από τους συνηθισμένους παράγοντες που χαρακτηρίζουν αυτήν την περιοχή και εμποδίζουν μια αποτελεσματική ανταπόκριση συμπεριλαμβάνουν: γενική φτώχεια, ανισότητα των 2 φύλων, έλλειψη πρόσβασης σε ιατρική περίθαλψη και ενημερωτικές υπηρεσίες, εσωτερική και εξωτερική μετανάστευση, η απουσία ηγεσίας σε κάποιες χώρες, η έλλειψη έρευνας για το μοτίβο της μετάδοσης, πίεση από την Καθολική Εκκλησία που εμποδίζει τα μέτρα προφύλαξης και νόμους που είναι ανεπαρκείς στα πλαίσια της επιδημίας. Επιπλέον, η πενιχρή επένδυση στους τομείς της υγείας και της έρευνας είναι μια τεράστια πρόκληση γιατί οι περισσότεροι διεθνείς χορηγοί και δότες απευθύνονται συνήθως σε χώρες της Αφρικής και της Νότιας Ασίας. Προς τιμήν της Λατινικής Αμερικής ωστόσο, πάνω από το 90 % των

πόρων για την έρευνα κατά της νόσου προέρχονται από εσωτερικούς δημόσιους παράγοντες. Η Βραζιλία μάλιστα έχει εφαρμόσει μια φιλολαϊκή πολιτική σε φαρμακευτικά θέματα και έχει κάνει την παγκόσμια πρόσβαση σε αντι-ρετροϊκά φάρμακα μια πραγματικότητα. Το Μεξικό ήταν από τα πρώτα κράτη τα οποία επιβάλλανε έλεγχο στα δείγματα αίματος που προσέφεραν οι αιμοδότες και έτσι έχει ελέγξει τις νόσους που μεταδίδονται μέσω αίματος.

Οι MSM εξακολουθούν να είναι το κυρίαρχο group με αυξημένη επικινδυνότητα μετάδοσης σε πολλές χώρες με συγκεντρωτική επιδημία της νόσου. Για παράδειγμα στον Καναδά, στις Η.Π.Α., στην Αυστραλία, οι MSM έχουν συχνότερες διαγνώσεις της ασθένειας ²¹. Στις Η.Π.Α. εκτιμάται ότι αυτή η ομάδα είναι η πλειοψηφία των φορέων (53 %) για τα νέα κρούσματα. Σε έρευνα που διεξήχθη στο διάστημα 1996 – 2005 σε MSM ηλικίας 15 – 65 έλαβαν στοιχεία από 8 χώρες: Αυστραλία, Καναδά, Γαλλία, Γερμανία, Ολλανδία, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Η.Π.Α. . Η ανάλυση των δεδομένων χωρίζεται σε 2 περιόδους : 1996 – 2000 και 2000 – 2005. Όπως φαίνεται υπήρξε επιβράδυνση στους ρυθμούς διάγνωσης κατά το 1996 – 2000 και αντιθέτως κατά το 2000 – 2005 οι ρυθμοί διάγνωσης αυξήθηκαν. Όλα αυτά φαίνονται ξεκάθαρα στο παρακάτω διάγραμμα που ακολουθεί



Σχήμα II.1 : Το έτος διάγνωσης είναι ο άξονας X . Τα δεδομένα για 25 πολιτείες των Η.Π.Α. είναι ο δεξιός άξονας Y . Οι υπόλοιπες 7 χώρες είναι ο αριστερός άξονας Y . Ο ρυθμός διάγνωσης είναι ανά 100.000 άνδρες . Οι ΗΠΑ έχουν αισθητά περισσότερες καινούριες διαγνώσεις . [SOURCE : Sullivan , Hamonda et al. Annals of Epidemiology (2009) Vol.19]

Τα στοιχεία πρέπει ωστόσο να αναλυθούν με ιδιαίτερη προσοχή. Καινούριες διαγνώσεις δε σημαίνουν απαραίτητα και πρόσφατες μολύνσεις. Το ότι στις περισσότερες χώρες παρατηρείται ύφεση μέχρι το 2000, και αύξηση μετά το 2000, εξηγείται με 2 πιθανά σενάρια. Πρώτον αλλαγές στις διαδικασίες παρακολούθησης και δεύτερον αύξηση των συστηματικών τεστ διάγνωσης ανάμεσα στους MSM μετά το 2000. Τα δεδομένα συνδυάστηκαν με έρευνες σχετικές με τη νόσο της σύφιλης σε 4 από αυτές τις χώρες. Παρατηρήθηκαν ανάλογα αποτελέσματα αύξησης της μετάδοσης της σύφιλης σε σχέση με το AIDS. Αυτό αντανακλά αφενός ερωτική συμπεριφορά υψηλού ρίσκου σε MSM που ήδη έχουν A.I.D.S. και αφετέρου το ότι οι άνδρες με συμπτώματα σύφιλης επιζητούν άμεσα εξετάσεις για σύφιλη και τα διαγνωστικά τεστ καλύπτουν και το AIDS. Οι διάφορες τάσεις στις ιδεολογίες, τις ρισκοκίνδυνες συμπεριφορές, τις χρήσεις ουσιών και προληπτικές εκστρατείες από τη μια χώρα μπορούν να μεταδοθούν στην άλλη, οπότε είναι σημαντικό αυτές οι

βιομηχανικές χώρες να συνεργάζονται σε θέματα παροχής περίθαλψης και προληπτικής έρευνας.

Η Ευρώπη τα τελευταία χρόνια έχει ραγδαίους ρυθμούς εξάπλωσης της επιδημίας²². Η ανατολική Ευρώπη έχει τη μεγαλύτερη αύξηση και η δυτική Ευρώπη παρά τα μέχρι πρότινος χαμηλά επίπεδα έχει παρουσιάσει και αυτή αύξηση. Η μετάδοση είναι εξαιρετικά πιο πολύπλοκη στην ανατολική από την κεντρική και δυτική Ευρώπη, καθώς έχει υποστεί περισσότερες σημαντικές οικονομικές, πολιτικές, κοινωνικές, πολιτισμικές αλλαγές. Αντιθέτως οι κεντρικές χώρες που έχουν προσχωρήσει στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν πετύχει πιο ομαλή μετάβαση. Στην ανατολική Ευρώπη η επιδημία του AIDS δεν έχει αντιμετωπιστεί με επιτυχία γιατί οι επιρροές από τις επιδημίες των άλλων Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων (STD), της φυματίωσης και της ενδοφλέβιας χρήσης τοξικών ουσιών δυσχεραίνουν μια αποτελεσματική πολιτική ενάντια στη νόσο. Παράγοντες όπως τα πολιτισμικά πιστεύω, τα συστήματα αξιών, τις δημοσιονομικές πολιτικές στον τομέα της υγείας, προτεραιότητες, οργάνωση του συστήματος υγείας, χρηματοδότηση, περίθαλψη και οι προσδοκίες των πολιτών διαμορφώνουν τελικά την ανταπόκριση μιας χώρας στην εκστρατεία πρόληψης και θεραπείας. Για παράδειγμα στα μέσα της δεκαετίας του 1990 η νόσος εξαπλώθηκε γρήγορα ανάμεσα στους IDU της Ρωσίας και τις πρώην χώρες της Ε.Σ.Σ.Δ. που μόλις είχε διασπαστεί²³. Μια προτεινόμενη λύση ήταν συστηματική αλλαγή σύριγγας προς αποφυγή περαιτέρω κρουσμάτων και χορήγηση αγωγής σε ανθρώπους που έκαναν κατάχρηση ουσιών. Οι χρήστες σε χώρες της ανατολικής Ευρώπης ανταποκρίθηκαν θετικά στη μείωση ανταλλαγής βελόνας και σύριγγας ως προληπτικό μέτρο.

Η Ολλανδία ήταν από τις πρώτες δυτικο-Ευρωπαϊκές χώρες που εφάρμοσε προγράμματα ανταλλαγής σύριγγας, δημόσια επιμορφωτικά προγράμματα και (όπως έγινε και στο Ηνωμένο Βασίλειο) η πολιτική στήριξη προκάλεσε υπεύθυνη

συμπεριφορά των πολιτών. Αντιθέτως στην Ιρλανδία κοινωνικές και θρησκευτικές αντιδράσεις εμπόδισαν μια γρήγορη και αποτελεσματική ανταπόκριση. Στην κεντρική Ευρώπη η δράση του συστήματος υγείας είχε ποικίλες εκφάνσεις. Στην Ουγγαρία η ανταπόκριση από την πολιτική ηγεσία ήταν αποφασιστική περιλαμβάνοντας μαζικές επιμορφωτικές εκστρατείες, αλληλοδιδασκτικά προγράμματα σε ιερόδουλες, υποχρεωτικά τεστ σε ομάδες υψηλού κινδύνου, και εθελοντικά τεστ για όλο τον πληθυσμό. Στην Πολωνία υπήρξαν κοινωνικά και θρησκευτικά εμπόδια, συνδυασμένα με συχνές εκλογές και αλλαγές στην υπουργική διοίκηση, που απέτρεψαν μια αποτελεσματική δράση. Κατά τη δικτατορική περίοδο στη Ρουμανία μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '80 το A.I.D.S. θεωρήθηκε ως μια «καπιταλιστική ασθένεια» που δεν υπήρχε επίσημα εντός των Ρουμανικών συνόρων. Αντίθετα η πολιτική προωθούσε την αύξηση του πληθυσμού, επομένως η απαγόρευση της αντισύλληψης, των εκτρώσεων και της σεξουαλικής αγωγής έκανε το έδαφος γόνιμο για την εξάπλωση της επιδημίας. Πολύ αργότερα, μετά το 2002, ένας ειδικός νόμος υποσχόμενος δωρεάν περίθαλψη και διαιτολογικά συμπληρώματα για αυτούς που τα χρειάζονταν, ξεκίνησε τη διαδικασία πρόληψης και αγωγής.

Αντιθέτως η Τσεχική Δημοκρατία είχε μια από τις πιο γρήγορες δράσεις μετά το τέλος της δεκαετίας του '80 με μαζικά επιμορφωτικά προγράμματα και εθελοντικά τεστ, καθώς και καινούριους νόμους που απενοχοποιούσαν τις ομόφυλες σχέσεις και την έκδοση κατ' επάγγελμα. Η ανταπόκριση σε κάποιες χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης παραμένει ανεπαρκής. Στη Ρωσία η χρηματοδότηση εξακολουθεί να είναι ελλιπής και άστοχη, αφού διαφορετικές ερμηνείες της υγείας και ποινικοί νόμοι παρεμποδίζουν την πρόληψη της νόσου. Στην Ουκρανία, απ' όπου ξεκίνησε η επιδημία της Ανατολικής Ευρώπης η κυβερνητική δράση παραμένει αργή. Η χαμηλή χρηματοδότηση για τα προγράμματα κατά του AIDS στις ανατολικές χώρες γενικά οδηγεί σε λιγότερο από 1% από τον κυβερνητικό προϋπολογισμό στον τομέα της

υγείας να επιδοθεί για αυτό το ζήτημα. Ακόμα και η κατανομή των πόρων που τελικά χορηγούνται είναι δυσανάλογη σε ότι αφορά τη διάγνωση και την περίθαλψη (όπως στη Ρωσία), αφού συνήθως η χρηματοδότηση για την αγωγή υγείας είναι χαμηλή. Αυτό το φαινόμενο της δυσανάλογης κατανομής χρημάτων παρατηρείται ακόμα και σε πλουσιότερες ανατολικής χώρας της Ευρώπης.

Στη Δυτική Ευρώπη η πρόληψη ξεκίνησε αρκετά νωρίς αφού η κοινωνία κέντρισε την ενεργό δράση με την ενσωμάτωση επιμορφωτικών προγραμμάτων και διαγνωστικών τεστ στο επίσημο σύστημα υγείας. Η αρχική άρνηση ορισμένων ομάδων φορέων να αποκαλύψουν στον τακτικό τους γιατρό ότι πάσχουν από τη νόσο λόγω φόβου κοινωνικής απόρριψης, όπως και η πρωταρχική απροθυμία γιατρών και νοσηλευτικού προσωπικού να περιθάλψουν τους φορείς, σύντομα ξεπεράστηκαν. Έτσι οι γιατροί αναμείχθηκαν ενεργά στην υπηρεσία πρόληψης και φροντίδας. Η αυξημένη εμπιστοσύνη, η άμεση πρόσβαση στις ιατρικές υπηρεσίες και η ικανοποίηση των ασθενών δημιούργησε θετικό κλίμα και αύξησε ακόμα περισσότερο το επίπεδο παροχής υπηρεσιών.

Οι περιθωριοποιημένες ομάδες Ευρωπαίων εξακολουθούν να είναι σημαντική εστία εξάπλωσης της νόσου. Η πλειοψηφία των ετερόφυλων νέων μολύνσεων είναι μετανάστες από χώρες υψηλού αριθμού φορέων και, συνήθως συμβαίνει με τις εθνικές μειονότητες, παρουσιάζονται πολύ αργά στις ιατρικές υπηρεσίες. Για παράδειγμα στο Ηνωμένο Βασίλειο οι Αφρο-αμερικάνοι φορείς, παρουσιάζονται στα εξωτερικά ιατρεία όταν η νόσος είναι πια στα τελευταία στάδια. Ωστόσο αφού έγινε η διάγνωση η παροχή υπηρεσιών είναι ακριβώς η ίδια με τους λευκούς πολίτες. Οι Ιταλοί τοξικομανείς που ζουν στο Ηνωμένο Βασίλειο επίσης αντιμετωπίζουν πρόβλημα στην πρόσβαση στις υπηρεσίες. Οι μαύροι που ζουν στην Ολλανδία έχουν λιγότερες πιθανότητες να ζητήσουν διαγνωστικό τεστ. Στην Ιταλία και την Αγγλία οι φορείς από χαμηλότερα κοινωνικο-οικονομικά στρώματα δεν είχαν πρόσβαση στις

κοινωνικές υπηρεσίες. Στην Ολλανδία οι ανασφάλιστοι είναι ασυνήθιστο να επιζητήσουν διάγνωση, ενώ οι ιδιωτικά ασφαλισμένοι πολίτες είναι πιο πιθανόν να χρησιμοποιήσουν κλινικές υπηρεσίες από τους ασφαλισμένους στο δημόσιο. Στις περισσότερες δυτικο-Ευρωπαϊκές χώρες η επιμόρφωση, η πρόληψη και τα προγράμματα αγωγής έχουν εφαρμοστεί και στις φυλακές. Ωστόσο η πολιτικοποίηση των προγραμμάτων παρέμβασης, το αυταρχικό καθεστώς που επικρατεί στα σωφρονιστικά ιδρύματα, τα εμπόδια στην επικοινωνία και ανεπαρκείς πόροι μειώνουν την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων αυτών. Στην Ισπανία, τη Γαλλία και την Ιταλία οι ομάδες υψηλού κινδύνου δεν τηρούν το πρόγραμμα θεραπείας λόγω ασυνεννοησίας με το κλινικό προσωπικό και έλλειψης κατανόησης των όρων της αγωγής ή ακόμα και χαμηλή κοινωνική υποστήριξη.

Η καταγραφή δεδομένων και η παρακολούθηση της πορείας εξάπλωσης της επιδημίας είναι καλή σε χώρες όπως η Δανία, η Ελβετία, η Γερμανία, η Σκωτία και η Αγγλία, αλλά σε κεντρικές και ανατολικές χώρες δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα. Η καταγραφή της εξέλιξης ανάμεσα σε μετανάστες, εθνικές μειονότητες και ιερόδουλες είναι ακόμα και τώρα μη ικανοποιητική.

Στην Ελλάδα οι μεταλλάξεις του ιού και η αντίσταση της ασθένειας στα φάρμακα μελετήθηκε το 2003 σε ασθενείς που διαγνώστηκαν οροθετικοί για πρώτη φορά (καινούριες διαγνώσεις) και μάλιστα δεν είχαν λάβει καμία αντι-ρετροϊκή αγωγή στο παρελθόν⁸. Η κατανομή των μεταλλάξεων είναι τελείως διαφορετική στον τύπο του ιού-B και τους τύπους του ιού μη-B. Οι υποτύποι είδους B είναι οι πιο συνηθισμένοι (σχεδόν το 50 %), ενώ ο υποτύπος A είναι δεύτερος στη συχνότητα. Οι μεταλλάξεις που παρουσιάζουν αντίσταση στα φάρμακα βρέθηκε ότι είναι 9 %. Ο αριθμός αυτός πλησιάζει πολύ το μέσο όρο για τις άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (λίγο παραπάνω από 10 %). Η κυκλοφορία μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας τύπων ιού στον Ελληνικό πληθυσμό είναι μάλλον αποτέλεσμα της γειτονικής εγγύτητας της χώρας με

την Αφρική, όπου οι υπο-τύποι μη Β είναι κυρίαρχοι. Αν και το 81 % των νέων διαγνώσεων ξεκίνησε από την Ελλάδα, η παρουσία τόσων πολλών μεταλλάξεων μη-Β (σχεδόν τα μισά κρούσματα) αποδεικνύει ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν περιορίζονται μόνο στους μετανάστες. Επίσης καμία από τις μεταλλάξεις μη-Β δεν παρατηρήθηκε σε κάποιο άτομο που να ανήκει σε ομάδα υψηλού κινδύνου. Η γενετική ετερογένεια του ιού στην Ευρώπη είναι ανησυχητική και πρέπει να αποτελέσει αφετηρία για την αντιμετώπιση μεταλλάξεων πέραν του τύπου Β.

Η λεγόμενη «κάθετη μετάδοση»²⁵ από την έγκυο μητέρα φορέα στο έμβryo παιδί της ονομάζεται και MTCT (Mother to Child Transmission)²⁶. Οι τρόποι μόλυνσης ποικίλλουν και μπορεί να είναι είτε μέσα στη μήτρα, κατά τον τοκετό, ή και αργότερα κατά την περίοδο του θηλασμού. Σχεδόν όλα τα παιδιά που νοσούν σήμερα κόλλησαν τον ιό από τη μητέρα τους. Οι ρυθμοί αύξησης της παιδιατρικής αυτής επιδημίας ποικίλλουν επίσης από χώρα σε χώρα: τα χαμηλότερα ποσοστά είναι στην Ευρώπη, ακολουθούν οι Η.Π.Α., μετά η Αφρική ενώ οι πιο ραγδαίοι ρυθμοί εξάπλωσης μπορούν να βρεθούν σε κάποιες χώρες της Νότιας και Νοτιοανατολικής Ασίας.

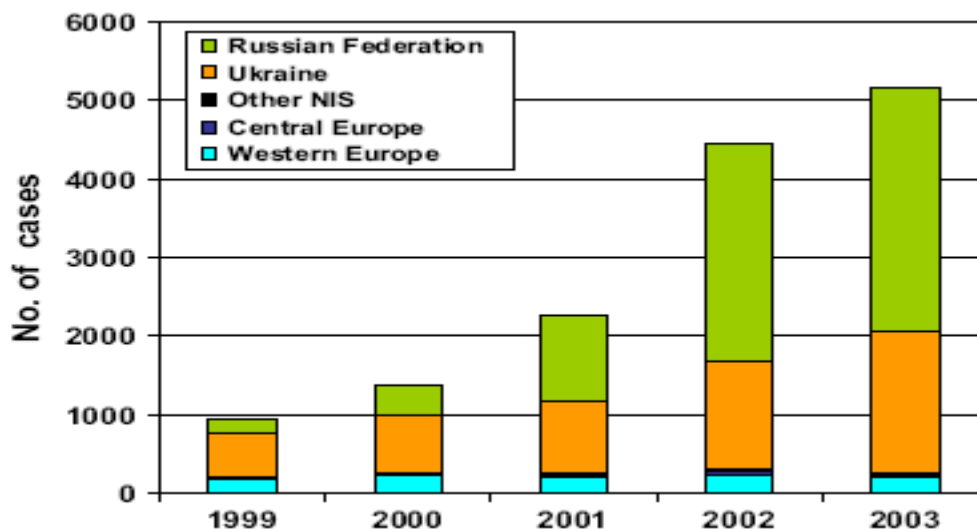
Το έμβryo / νεογνό μπορεί να γίνει φορέας είτε αν εκτεθεί σε μολυσματικά σωματικά υγρά της μητέρας κατά τη γέννα, σε μεμβρανικά ρήγματα της μήτρας κατά τις ωδίνες ή απορρόφηση του ιού από τον ομφάλιο λώρο κατά την τροφοδοσία. Η μόλυνση από το μητρικό γάλα έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε περιπτώσεις που η μητέρα κόλλησε τον ιό μετά τη γέννα. Οι επικίνδυνες συμπεριφορές της μητέρας που αποτελούν παράγοντες αύξησης της μετάδοσης είναι ερωτικές επαφές χωρίς προφύλαξη κατά την εγκυμοσύνη, παράνομη χρήση τοξικών ουσιών κατά την εγκυμοσύνη και ανεπάρκεια σε βιταμίνη Α. Γυναικολογικοί παράγοντες με υψηλό ρίσκο συμπεριλαμβάνουν κανονικό τοκετό από τον κόλπο, παρατεταμένη ρήξη των

μεμβρανών, γυναικολογικές εισαγωγικές επεμβάσεις και παράλληλη μόλυνση με άλλο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα. Ο πρόωρος τοκετός επίσης συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης. Επιλόχειοι παράγοντες που πρέπει να εξετασθούν είναι η υγεία των μαστών και το πρόγραμμα θηλασμού. Έχει παρατηρηθεί ότι ο μεικτός θηλασμός (φυσικό γάλα και γάλα του εμπορίου) είναι πιο επικίνδυνος απ' ό,τι ο αποκλειστικός θηλασμός για 3 μήνες.

Ο πρόωρος τοκετός και τα ελλιποβαρή νεογνά διπλασιάζουν την πιθανότητα μετάδοσης του ιού. Ωστόσο δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα δεδομένα που να δηλώνουν ότι η ύπαρξη της νόσου σε ένα νεογέννητο συνδέεται με άλλες γενετικές ανωμαλίες. Η οροθετικότητα ενός παιδιού μπορεί να διατηρηθεί ακόμα και 18 μήνες μετά τον τοκετό εξαιτίας μεταφοράς αντισωμάτων από τον πλακούντα της μητέρας. Για να γίνει έγκυρη διάγνωση πρέπει ο ιός να ανιχνευτεί σε τουλάχιστον δυο δείγματα αίματος του παιδιού μετά τη γέννα (το αίμα δε λαμβάνεται ποτέ βεβαίως από τον ομφάλιο λώρο). Το παιδί θεωρείται υγιές αν δυο δείγματα αίματος (που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους) δεν έχουν καθόλου αντισώματα και είναι αρνητικά σε ιό ή αντιγόνο. Το 20-25 % από τα μολυσμένα νεογνά υφίστανται σύντομα αναστολή του ανοσοποιητικού τους συστήματος, έχουν πρώιμα συμπτώματα της νόσου και γίνονται φορείς του AIDS μέσα στον πρώτο χρόνο της ζωής τους. Η μέση ηλικία εκδήλωσης της «επίθεσης» του ιού στα κύτταρα είναι από 5 έως 11 μήνες.

Μέχρι στιγμής η πιο αποτελεσματική πρόληψη μετάδοσης από τη μητέρα φορέα στο παιδί φαίνεται πως είναι η καισαρική τομή. Ασχέτως της αντι-ρετροϊκής θεραπείας που ασκείται, η πιθανότητα μετάδοσης με καισαρική τομή είναι μόλις το ένα τρίτο από τις περιπτώσεις φυσιολογικού τοκετού. Για να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο, η παρέμβαση δεν πρέπει να περιοριστεί στην κλινική φροντίδα, αλλά και να ενσωματώσει θέματα προστασίας. Υπάρχει μεγάλη ανομοιογένεια στις διάφορες

χώρες. Η μόλυνση στα έμβρυα από τις εγκύους γυναίκες το 2004 ήταν αισθητά μεγαλύτερη στις Αφρικανικές χώρες σε σχέση με τις Ευρωπαϊκές ²⁶.



Σχήμα II.2 : Αύξηση ρυθμού εξάπλωσης της νόσου σε εγκύους σε επιλεγμένες χώρες από την Ασία , την Αφρική , την Καραϊβική και την ανατολική Ευρώπη [SOURCE : EuroHIV December 2004 , Reference : Ostergren , Maljuta Seminars in Fetal & Neonatal Medicine (2006) Vol.11]

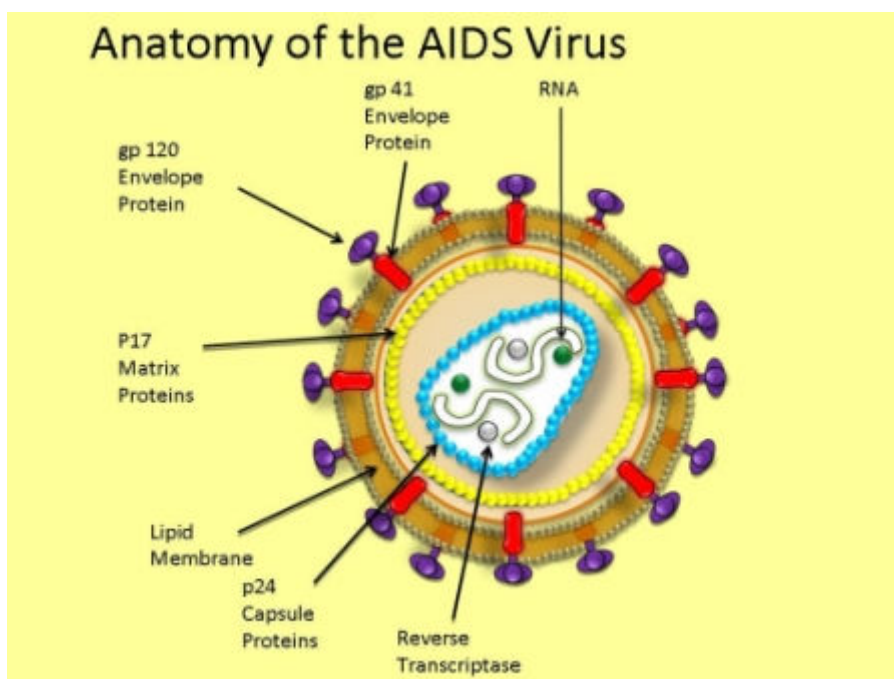
Το Στρατηγικό Πλαίσιο για την αντιμετώπιση περιλαμβάνει τα εξής στάδια 1) πρόληψη μόλυνσης 2) πρόληψη ανεπιθύμητης εγκυμοσύνης σε γυναίκες που είναι ήδη φορείς 3) πρόληψη μετάδοσης της νόσου από τη μητέρα φορέα στο παιδί και 4) πρόνοια και υποστήριξη σε φορείς μητέρες, παιδιά και τις οικογένειές τους. Ένα συχνό λάθος είναι η υπερβολική έμφαση της αγωγής στα φάρμακα, την ιατρική περίθαλψη σε συνδυασμό με άλλους αρνητικούς παράγοντες όπως παρωχημένα προγράμματα θεραπείας, έλλειψη βασικών πόρων, ανεπαρκείς νόμοι και ανισότητες σε ότι αφορά πρόσβαση σε ποιοτική περίθαλψη. Το κύριο μέλημα για την ανατολική Ευρώπη είναι οι τοξικομανείς, οι γυναίκες που διακινούνται και οι ιερόδουλες. Αυτές οι ομάδες έχουν χαμηλή πρόσβαση σε ιατρικές υπηρεσίες . Εθελοντικά τεστ κατά την εγκυμοσύνη παρέχουν μια έξοχη ευκαιρία για έγκαιρη διάγνωση. Τα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι το 10 % από τα μολυσμένα νεογνά

εγκαταλείπεται από τις μητέρες μετά τη γέννα. Μια επιτυχημένη εκστρατεία θα περιλαμβάνει φαρμακευτική αγωγή με αντι-ρετροικά, πιο ασφαλείς μεθόδους τοκετού και υποστήριξη τροφοδοσίας στα παιδιά.

2) ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ HIV-1

2A) Βασική Δομή του Ιού

Ο ιός HIV – 1 (Human Immunodeficiency Virus) ανήκει στην κατηγορία των ρετροϊών στους οποίους η μεταγραφή δεν παράγει RNA από DNA αλλά αντιθέτως ακολουθεί μια ασυνήθιστη αντίστροφη διαδικασία και παράγεται DNA από RNA. Ο ιός ανήκει στην υποκατηγορία των Lentiviruses (Lenti = αργός στα Λατινικά) καθώς αποθηκεύουν το γενετικό τους υλικό σε κύτταρα-ξενιστές και έχουν εξαιρετικά μεγάλους χρόνους επώασης. Σε αυτήν την υποκατηγορία το tRNA^{Lys3} είναι το κυριότερο μεταφορικό RNA για την αντίστροφη μεταγραφή²⁷. Στην περίπτωση του HIV υπάρχουν δυο εναλλακτικά μεταφορικά RNA τα tRNA^{Lys1} & tRNA^{Lys2}. Η βασική δομή του ιού φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα II.3 : Δομή του ιού HIV - 1 . Τα βασικά μέρη είναι το πρωτεϊνικό περίβλημα που θωρακίζει την εξωτερική λιπιδική μεμβράνη και το κεντρικό καψίδιο το οποίο προστατεύει το ιικό RNA που θα χρησιμεύσει για την αναπαραγωγή των νέων ιών .
[SOURCE : http://www.itg.be/internet/e-learning/virology/1_hiv_structure.html]

Το RNA είναι δίκλωνο όπως φαίνεται στην εικόνα. Οι διάσπαρτες γλυκοπρωτεΐνες στην επιφάνεια αποτελούνται από το τμήμα της gp120 που χρησιμεύει για δέσμευση του ιού στους υποδοχείς των κυττάρων και το τμήμα της gp41 που είναι το διαμεμβρανικό και συνδέει το εσωτερικό με το εξωτερικό του. Τα δυο τμήματα μαζί συνιστούν τη γλυκοπρωτεΐνη gp160. Μέσα στον πυρήνα εκτός από το γενετικό υλικό βρίσκονται και τα απαραίτητα ένζυμα για την αναπαραγωγή όπως η Reverse Transcriptase [RT] (=Αντίστροφη Μεταγραφή) και η Integrase (=Ενσωμάτωση) που φροντίζει να ενσωματωθεί το γενετικό υλικό του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Το γονιδίωμα του ιού είναι πλούσιο και περιλαμβάνει 3 γονίδια που είναι συνηθισμένα στους ρετρο-ιούς, τα gag, pol & env ²⁸. Το gag κωδικοποιεί τα παράγωγα που θα αποτελέσουν τα δομικά συστατικά για τους πυρήνες των νέων ιών. Το env κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που θα αποτελέσουν τα προεξέχοντα μέρη πάνω από τη λιπιδική μεμβράνη και τέλος το pol κωδικοποιεί τις ενζυμικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του ιού και ΔΕΝ παρέχονται από τα κύτταρα ξενιστές. Αυτές οι λειτουργίες είναι σημαντικές για τον κύκλο αναπαραγωγής. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της Gag και της Pol με το tRNA^{Lys3} είναι καθοριστικής σημασίας . Το σύμπλοκο Gag-Pol όχι μόνο σταθεροποιεί το μεταφορικό RNA, αλλά η gag επιλέγει και ποιο θα δεσμεύσει (Lys 1 , 2 , 3). Αυτό γίνεται με την εκλεκτική δέσμευση του ενζύμου της Συνθετάσης α-α-Lys-tRNA.

Φυσικά το κεντρικό καψίδιο έχει και άλλα απαραίτητα ένζυμα όπως ριβονουκλεάσες και πρωτεάσες. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι τριμερή και στο εξωτερικό τμήμα gp120 και στο διαμεμβρανικό τμήμα gp41.

2B) Παράγωγα από το Γονιδίωμα του Ιού

Εκτός από τα 3 βασικά γονίδια των ρετρο-ιών, το γενετικό υλικό περιλαμβάνει 6 ακόμα βασικές περιοχές-κωδικούς, αυξάνοντας το σύνολο σε 9 γονίδια. Οι 6 επιπλέον περιοχές είναι οι tat, rev, nef, vif, vpr, vpu. Η gag είναι μια πρωτεΐνη με πολλαπλές περιοχές οι οποίες είναι διακριτές ξεχωριστά χάρη σε ορατούς εύκαμπτους συνδέσμους²⁹. Αν η gag απομονωθεί σε διάλυμα τότε είναι σε κατάσταση ισορροπίας μονομερούς-διμερούς και αν αναμειχθεί με γενετικό υλικό είναι ικανή να παράγει από μόνη της ιικά σωματίδια που μοιάζουν πολύ με τέλειους ιούς. Στην πρώιμη φάση αναπαραγωγής η δομή της είναι ραβδωτή. Προκειμένου να συμμετάσχει στη διαδικασία, η gag διπλώνεται και τα άκρα της έρχονται κοντά το ένα με το άλλο. Μια αζωτο-τελική περιοχή (αποτελούμενη από μια σφαιρική κεφαλή και ένα διαμορφωμένο μίσχο σε σχήμα α-έλικας) είναι υπεύθυνη για την κατευθυνόμενη πορεία της Gag στις κυτταρικές μεμβράνες³⁰. Η κεντρική περιοχή είναι υπεύθυνη για το πακετάρισμα του RNA με πολλές gag ξεχωριστά και συντελεί στον πολυμερισμό της gag. Τέλος μια καρβοξυλική περιοχή, αν και δεν έχει συγκεκριμένη δομή, είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση και το διαχωρισμό των πρώιμων ιικών σωματιδίων.

Παρά το ότι η env είναι δευτερευούσης σημασίας για τη σύσταση ιικών σωματίων, πειράματα με χιμαιρικά γονιδιώματα Gag-Env, απέδειξαν ότι τα νέα ιοσωμάτια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από αυτά στα οποία δεν έγινε σύντηξη με env³¹. Η ανάπτυξη μάλιστα δε γίνεται μόνο στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου αλλά και σε μεμβράνες ενδοκυτταρικών κενών.

Η πρωτεΐνη Tat είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής, ενώ η Rev είναι ένας παράγοντας εξαγωγής πυρηνικού RNA με εκλεκτική αλληλουχία³².

Δηλαδή η Rev αναλαμβάνει να βγάλει το κατάλληλο RNA από τον πυρήνα αλλά και να βοηθήσει στην έκφραση των τελείως ανόμοιων ικόν μεταγραφμάτων. Η αλληλουχία – στόχος ονομάζεται Rev Response Element [RRE] (= Στοιχείο απόκρισης Rev) και μάλιστα βρίσκεται εντός της περιοχής ενν. Η περιοχή Rev περιέχει περίπου 116 αμινοξέα και μια πλούσια περιοχή σε αργινίνες κοντά στο αζωτο-τελικό άκρο που χρησιμεύει και ως σημείο δέσμευσης αλλά και ως σήμα πυρηνικής στόχευσης. Αρχικά η Rev συνδέεται με ένα τμήμα RNA ως μονομερές και δρα ως εστία «πυρήνωσης» για να επιστρατεύσει και άλλα μονομερή Rev στο RRE έτσι ώστε να ξεκινήσει μια διαδικασία πολυμερισμού που απαιτεί και τα δυο είδη αλληλεπιδράσεων (πρωτεΐνη – πρωτεΐνη και RNA - πρωτεΐνη). Η δεύτερη λειτουργική περιοχή της Rev είναι ανάμεσα στα αμινοξέα 75–84 και είναι 10 αμινοξέα από τα οποία τα περισσότερα είναι λευκίνες. Η πλούσια λευκινική περιοχή δρα ως πυρηνικό σήμα εξόδου και στη Rev και όταν είναι συνδεδεμένη σε άλλες πρωτεΐνες – υποστρώματα. Αφού λοιπόν η Rev είναι ταυτόχρονα σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού και αλληλουχία εξαγωγής από τον πυρήνα, έχει την ικανότητα να εισέρχεται και να εξέρχεται ελεύθερα και γρήγορα τόσο από τον πυρήνα όσο και από τα κύτταρα-ξενιστές.

Αν και η πρωτεΐνη Nef είναι σημαντική, ο ακριβής ρόλος της στην αναπαραγωγική διαδικασία του ιού δεν έχει διασαφηνιστεί μέχρι σήμερα ³³. Η Nef πιθανόν να εμπλέκεται σε οποιοδήποτε από τα στάδια της αναπαραγωγή του ιού (αυτο-αντιγραφή, μολυσματικότητα, ενσωμάτωση του ιικού DNA, αποφυγή της ανοσολογικής αντίχενυσης) αλλά δεν υπάρχει επιβεβαίωση. Η Nef δεν έχει ενδογενή ενζυμική δραστικότητα. Έχει μοριακό βάρος 23 kDa , αποτελείται από μια συμπαγή πυρηνική περιοχή, ένα εύκαμπτο N-τελικό βραχίονα και μια μεγάλη θηλιά απροσδιόριστης δομής. Η Nef είναι αποδεδειγμένο ότι αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες και μάλιστα με πολλούς τρόπους και αυτό αποδίδεται στην εύκαμπτη

περιοχή της. Κάθε φορά που ο εύκαμπτος βραχίονας συνδέεται με διαφορετικό υπόστρωμα, αλλοστερικά φαινόμενα από την αλληλεπίδραση βραχίονα και πυρήνα παράγουν διαφορετικές διαμορφώσεις. Αυτό αποδεικνύεται πειραματικά με ενεργειακές μετρήσεις σταθεροποίησης της Nef. Η παρουσία των εύκαμπτων περιοχών λοιπόν διευκολύνει τις δομικές ανακατατάξεις που είναι απαραίτητες για την έκθεση διαφορετικών επιτόπων δέσμευσης και αλλοστερική τροποποίηση των υποστρωμάτων.

Η Αντίστροφη Μεταγραφάση (RT) , η Ενσωματάση (IN) και η Vpr είναι σε εγγύτητα στα πρώιμα αλλά και στα κατοπινά σύμπλοκα πρωτεΐνης και RNA. Η διαφορά είναι ότι ενώ στο πρώιμο σύμπλοκο υπάρχει RNA, το καθορισμένα προενσωματώσιμο σύμπλοκο που σχηματίζεται αργότερα (και που προορίζεται για εισβολή στον ξενιστή) περιέχει DNA³⁴. Οι 3 πρωτεΐνες είναι σε κοντινές θέσεις για να μπορούν να αλληλεπιδρούν. Έχει αποδειχθεί με βιομιμητικά πεπτίδια που καλύπτουν την αλληλουχία 96 αμινοξέων της Vpr, ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να αναστείλει την ενζυμική δράση και της RT και της IN. Η αλληλεπίδραση Vpr – IN περιορίζεται αποκλειστικά σε φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις, καθώς η Vpr δε δεσμεύεται καθόλου με το DNA. Τα απαραίτητα ένζυμα-βοηθοί της RT είναι η DNA πολυμεράση και η Ριβονουκλεάση Η. Αν και τα ενεργά κέντρα της RT που δεσμεύονται με τα δυο βοηθητικά ένζυμα είναι σε μακρινή απόσταση το ένα από το άλλο, οι δυο καταλυτικές δραστηριότητες είναι αμοιβαία εξαρτώμενες. Μετάλλαξη της περιοχής δέσμευσης της πολυμεράσης επηρεάζει και τη δραστηριότητα της ριβονουκλεάσης σε σχέση με την RT. Απαιτείται πολλή ώρα από το τέλος της αντίστροφης μεταγραφής μέχρι την ενσωμάτωση του συμπλόκου στο μολυσμένο κύτταρο, αφήνοντας περιθώρια στην Ενσωματάση να διαπράξει κάποιου είδους «αυτοκτονία», κατά την οποία το ιικό DNA ενσωματώνεται στον εαυτό του.

2γ) Τροπισμός του Ιού

Η παθογένεση του ιού θεωρείται ότι οφείλεται στο λεγόμενο «προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο» (απόπτωση) των CD4 T-κυττάρων. Η απόπτωση είναι μια αρκετά επιτυχημένη στρατηγική άμυνας του οργανισμού γιατί τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να εξουδετερωθούν γρήγορα και αποτελεσματικά και ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να πυροδοτηθεί από μια πλειάδα αντιγόνων³⁵. Υπάρχουν ιοί που χρησιμοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες για να αναστείλουν την απόπτωση που θα περικόψει την αναπαραγωγή του ιού. Οι περισσότεροι ιοί συνθέτουν δίκλωνο DNA κατά τη μόλυνση του ξενιστή. Η παρουσία του ενδοκυττάριου ιικού DNA ενεργοποιεί κυτταρική απόκριση με τη δράση κάποιων ενζύμων που εξαρτώνται από το ιικό DNA (κινάσες και συνθετάσες). Αν αυτά τα λυτικά και ανασταλτικά ένζυμα ενεργοποιηθούν τότε επάγεται η απόπτωση. Τα μολυσμένα κύτταρα πεθαίνουν και εμποδίζεται έτσι περαιτέρω εξάπλωση. Στην περίπτωση του HIV υπάρχει μια περιοχή του RNA η οποία δρα ως θραύσμα DNA το οποίο είναι σήμα για απόπτωση. Ο πραγματικός στόχος όμως του HIV είναι οι μακροφάγοι, άσχετα αν τα T-λεμφοκύτταρα είναι αυτά που καταστρέφονται. Ενώ λοιπόν η μόλυνση των μακροφάγων συνεχίζεται, το σύστημα άμυνας του οργανισμού χασομερά ενώ το ανοσολογικό σύστημα αυτο-καταστρέφεται και «καίγεται».

Όσο η ασθένεια προχωράει τα T-λεμφοκύτταρα καταστρέφονται. Μια σύγχρονη προσέγγιση για την εύρεση θεραπείας είναι ότι οι Μακροφάγοι του ιστού δε δρουν μόνο ως αποθήκες φύλαξης ιικού γονιδιώματος & εργοστάσια παραγωγής νέων ιών, αλλά συμμετέχουν στην απόπτωση των T-κυττάρων³⁶. Ο ρόλος τους φαίνεται πως είναι καθοριστικός. Οι Μακροφάγοι εκκρίνουν πρωτεΐνες ύστερα από την επαφή τους με τη Nef οι οποίες προωθούν χημειοτακτισμό σε γειτονικά αδρανή T-λεμφοκύτταρα. Αυτό αυξάνει τις πιθανότητές τους να συναντήσουν πρώιμα ιικά σωματίδια και να μολυνθούν. Επίσης οι πρωτεΐνες που εκκρίνουν οι Μακροφάγοι

μπορούν να ενεργοποιήσουν τα T-κύτταρα ώστε να υποστηρίξουν την αντιγραφή του ιού, κάνοντάς τα ακόμα πιο ευάλωτα στη μόλυνση. Αυτός ο χημειοτακτισμός δεν περιορίζεται μόνο στα CD4+ T-κύτταρα, αλλά φαίνεται πως επεκτείνεται και στα CD8+ T-κύτταρα.

Αν και παλιότερα πίστευαν πως ο ιός μόλυνε αποκλειστικά CD4+ T-κύτταρα, τώρα έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνος για μόλυνση σε μονοκύτταρα, κύτταρα Langerhans (επιδερμίδα), κύτταρα στον αμφιβληστροειδή καθώς και κάποιους επιθηλιακούς κυτταρικούς πληθυσμούς που υπάρχουν στο συκώτι. Όλα αυτά τα είδη των κυττάρων εκφράζουν το αντιγόνο CD 4 στην επιφάνειά τους, αν και σε χαμηλότερο βαθμό από τα T – λεμφοκύτταρα. Το αντιγόνο CD 4 εξακολουθεί να είναι το κυριότερο γνωστό αντιγόνο που οδηγεί στην έκφραση του ιού αν και υπάρχουν και κάποιες σπάνιες περιπτώσεις μόλυνσης χωρίς τη μεσολάβηση του μορίου αυτού.

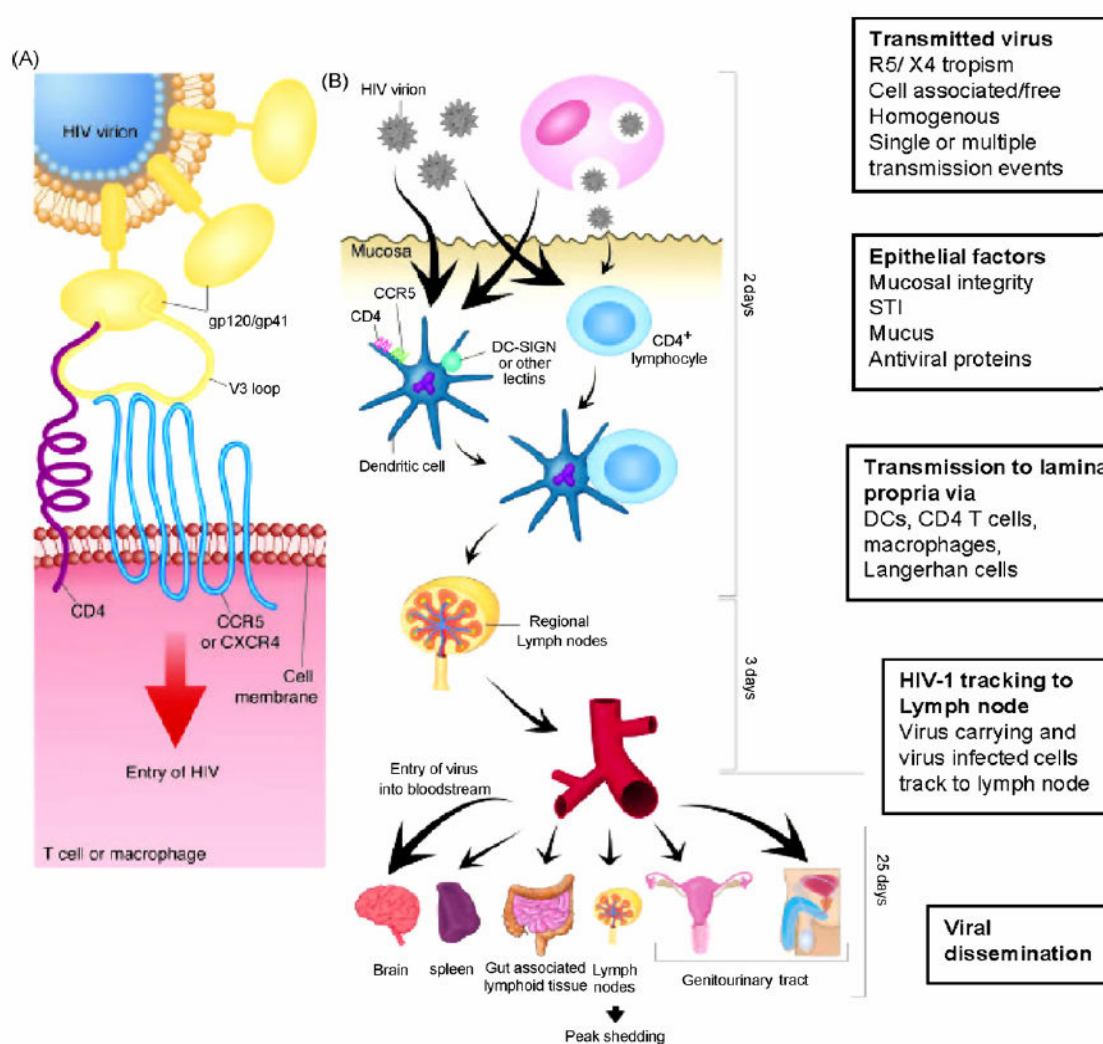
Παρά το ότι ο ιός έχει ποικίλες μορφές εξαιτίας των πολλών γονιδίων και των αντίστοιχων πρωτεϊνών που παράγονται (κάθε ιικό σωματίδιο είναι μοναδικό και για αυτό είναι δύσκολο να βρεθεί εμβόλιο), πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X αποδεικνύουν ότι παρά τις μεγάλες διαφορές, η τρισδιάστατη δομή του ιού έχει κάποιο γενικό σχέδιο ²¹. Η λιπιδική διπλοστιβάδα έχει 100-200 nm διάμετρο. Το σχήμα και το μέγεθος του κωνικού καψιδίου είναι παρόμοιο σε κάθε σωματίο : έχει μια πλατειά «βάση», η θέση της βάσης και των άλλων περιοχών του καψιδίου είναι 11 nm μακριά από τον πρωτεϊνικό φάκελο της εξωτερικής μεμβράνης, η κωνική γωνία είναι 18 έως 24 μοίρες γύρω από το μεγάλο άξονα του κώνου και μια εσωτερική πυκνότητα συγκεντρωμένη κυρίως στη βάση του κώνου.

2δ) Δράση του Ιού και Μόλυνση

Η ασθένεια προχωράει συνήθως αργά σε ενήλικες και πολλά χρόνια περνάνε από τη μόλυνση και την εμφάνιση αισθητών συμπτωμάτων³⁷. Υπάρχουν 3 διακριτά στάδια με το συνηθισμένο χρονοδιάγραμμα. Πρώτον μια σύντομη οξεία φάση αμέσως μετά την μόλυνση και διαρκεί μόνο για λίγες εβδομάδες. Η αντιγραφή των ιοσωματίων είναι έντονη σε αυτό το διάστημα. Τα σωματίδια αυτά μπορούν να απομονωθούν εύκολα από την περιφερειακή κυκλοφορία και μερικές φορές από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τα συμπτώματα σε αυτό το στάδιο θυμίζουν γρίπη ή μονοπυρήνωση. Στο τέλος αυτού του σταδίου τα συμπτώματα υποχωρούν και οι ιοί πέφτουν σε πολύ χαμηλά, αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα. Η «ήσυχη» αυτή φάση συμπίπτει με χυμική αλλά και κυτταρική ανοσοαπόκριση. Τα μολυσμένα άτομα μπορούν να παραμείνουν σε αυτό το στάδιο για εκτεταμένο χρονικό διάστημα, μερικές φορές και 10 χρόνια, κατά το οποίο δεν παρουσιάζουν έκδηλη αρρώστια, εκτός ίσως κάποια μορφή πάθησης στους λεμφαδένες. Το τέλος αυτής της φάσης σηματοδοτείται με βαθμιαία άνοδο, συνήθως σε 1 έως 2 χρόνια, του επιπέδου των αυτό-αντιγραφόμενων ιών. Η αναλογία των λεμφοκυττάρων T4 / T8 μειώνεται με ρυθμούς διαρκώς επιβραδυνόμενους. Η συγκέντρωση τη ιικής πρωτεΐνης και η ευκολία στην απομόνωση των μη δεσμευμένων σε κύτταρα ιών αυξάνεται. Στο 3^ο και τελευταίο στάδιο συμβαίνουν οι παράπλευρες ευκαιριακές λοιμώξεις που συνοδεύουν την πλήρη εκδήλωση του AIDS.

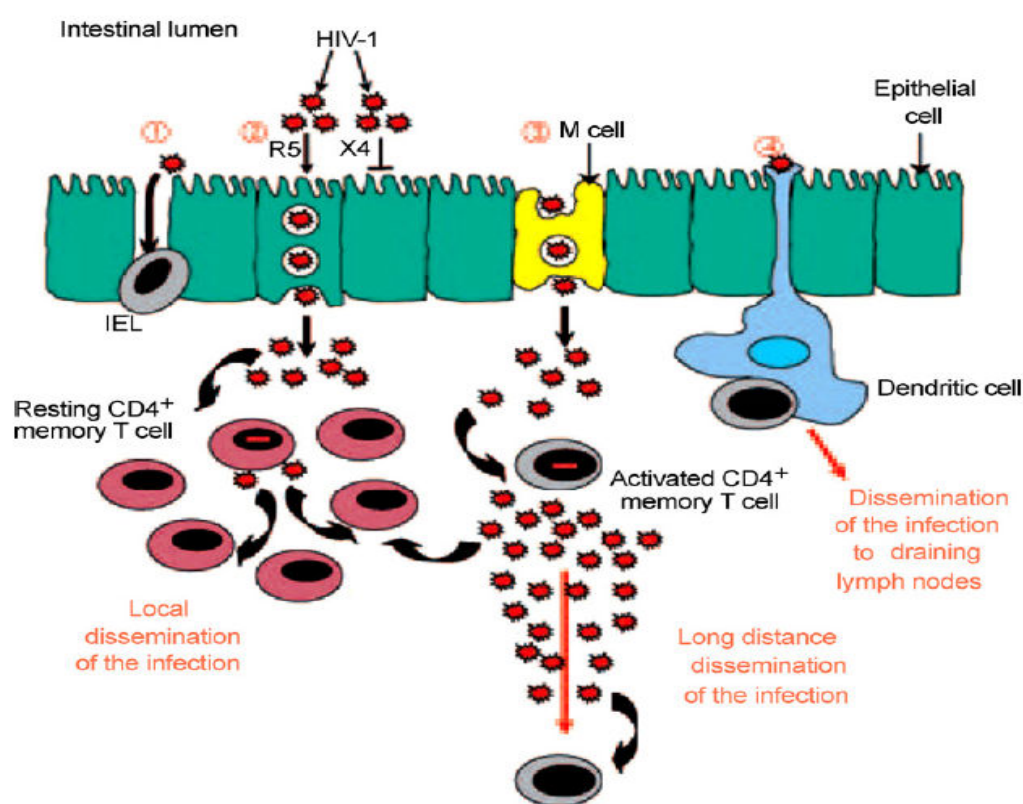
Σημαντικοί παράγοντες-κλειδιά που πρέπει να ληφθούν υπόψη στο μηχανισμό εισβολής του ιού είναι ποιοι ακριβώς είναι οι κυτταρικοί στόχοι, η ακεραιότητα της επιθηλιακής επιφάνειας, η ποσότητα του ιικού φορτίου στο πλάσμα του ασθενούς, η απόκριση του ανοσολογικού συστήματος του φορέα (T / B κύτταρα) ακόμα και οι συνθήκες που έγινε η μόλυνση³⁸. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει τους

πιθανούς τρόπους με τους οποίους μπορεί να γίνει η πορεία του ιού στο αίμα και η διασπορά του. Η δέσμευση του ιού και η εισβολή απαιτεί ένα μόριο CD4 σε ένα λεμφοκύτταρο, ένα μακροφάγο ή ένα δενδριτικό κύτταρο καθώς και έναν υποδοχέα που μπορεί να είναι είτε CCR5 ή CXCR4. Τα καινούρια ισωμάτια μπορούν να προσβάλλουν τον εγκέφαλο, τη σπλήνα, το λεμφικό ιστό του ήπατος, τους λεμφαδένες και τα γεννητικά εσωτερικά όργανα



Σχήμα II.4 : Είσοδος ιού και διασπορά κατά τη μετάδοση μέσω ερωτικής επαφής (A) Αλληλεπιδράσεις με τις γλυκοπρωτεΐνες και τους υποδοχείς , σύντηξη και είσοδος του ιού (B) Χρονοδιάγραμμα γεγονότων που ακολουθούν μετά τη διασπορά του ιού στον οργανισμό [SOURCE : Fox , Fidler (2010) Antiviral Research Vol.85]

Οι 6 πρώτοι μήνες μετά την εισβολή του ιού συγκεντρώνουν πολύ υικό φορτίο (viral load = VL). Το υψηλό VL κρύβει μεγάλο ρίσκο επακόλουθης μετάδοσης της νόσου στους ερωτικούς συντρόφους που θα εκτεθούν το επόμενο βμηνο. Μελέτη σε ετεροφυλόφιλους απέδειξε ότι είναι 8 – 10 φορές πιο επικίνδυνο (ανά ερωτική πράξη) να κολλήσουν τη νόσο κατά τους 5 πρώτους μήνες παρά στην ασυμπτωματική φάση που ακολουθεί. Το παρακάτω σχήμα δείχνει τους τρόπους με τους οποίους ο ιός μπορεί να διεισδύσει στο επιθήλιο



Σχήμα II.5 : Διαφορετικοί Μηχανισμοί που επιτρέπουν στον ιό να περάσει το επιθηλιακό «φράγμα» : από τα αριστερά προς τα δεξιά (1) Ρήγμα με άμεση μόλυνση των ενδο-επιθηλιακών λεμφοκυττάρων (2) Τρανσκύτωση μέσω επιθηλιακών κυττάρων

(3) Τρανσκύτωση μέσω M κυττάρων (4) Μεταφορά μέσω δενδριτικών κυττάρων. Αφού ο ιός περάσει από το βλεννώδες επιθήλιο, τα ανενεργά T – κύτταρα μνήμης ενεργοποιούνται και παράγουν νέους ιούς σε υψηλά επίπεδα και η διασπορά της μόλυνσης συνεχίζεται σε μακρινότερες αποστάσεις. [SOURCE : Fox , Fidler (2010) Antiviral Research Vol.85]

Η συμπεριφορά του ασθενούς παίζει ζωτικό ρόλο στον καθορισμό των παραγόντων που αυξάνουν την πιθανότητα μετάδοσης. Η αυξημένη διάρκεια μιας σχέσης, η συχνή εναλλαγή ερωτικών συντρόφων και οι τακτές ερωτικές επαφές έχουν συνδεθεί με τη μετάδοση της νόσου. Όλες οι έρευνες αποδεικνύουν ότι (ελλείψει προφύλαξης) η πρωκτική συνουσία είναι πιο επικίνδυνη από την κολπική, ενώ το ρίσκο είναι πάντοτε μεγαλύτερο για το δέκτη της συνεύρεσης από το δότη. Υπάρχουν πολλοί βιοχημικοί μηχανισμοί που μπορούν να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο αυξημένης μετάδοσης από άνδρα σε γυναίκα σε σχέση με τη μετάδοση από γυναίκα σε άνδρα: η μεγαλύτερη ανατομική επιφάνεια και ο αριθμός των ευάλωτων κυτταρικών τύπων στον κόλπο σε σχέση με το ανδρικό γεννητικό όργανο, ο μεγαλύτερος βαθμός επιθηλιακής διάρρηξης, ορμονικές επιρροές και ο συχνότερος ρυθμός ερωτικά μεταδιδόμενων μολύνσεων στις γυναίκες (που υποβοηθούν τη μόλυνση με HIV-1). Η επιθηλιακή βλέννα στον κόλπο και στον τράχηλο της μήτρας συγκριτικά είναι λιγότερο ευαίσθητη, σε σχέση με το πρωκτικό επιθήλιο, σε τραυματικές αμυχές.

Φυσικά το υπόβαθρο της σχέσης είναι εξίσου σημαντικό. Η δυναμική μεταξύ των συντρόφων, η έλλειψη επικοινωνίας, η οικογενειακή βία και τα προβλήματα στη σχέση πρέπει να ληφθούν υπόψη. Για άτομα σε μακροχρόνια σχέση η χρήση προφύλαξης είναι ασυνήθιστη. Αν και η εκστρατεία για την προφύλαξη ως μέσο πρόληψης είναι διαδεδομένη και με πολύ επιτυχή αποτελέσματα (στην Ταϊλάνδη το 90 % των εργαζόμενων στα χαμαιτυπεία χρησιμοποιούν προφύλαξη, ενώ οι ρυθμοί μετάδοσης στο στρατιωτικό σώμα μειώθηκε στο μισό) υπάρχει ακόμα έλλειψη προθυμίας και αποδοχής. Η μόνη εναλλακτική μέθοδος πρόληψης για τους άντρες είναι η περιτομή που προσφέρει πάνω από 50 % προστασία. Ωστόσο η παγκόσμια εφαρμογή της θα είναι σίγουρα δύσκολο να γίνει και για αυτό οι έρευνες γύρω από την εύρεση ενός κατάλληλου εμβολίου συνεχίζονται.

2ε) Πρόσφατες Εξελίξεις στη Θεραπεία της Νόσου

Η εξαρτώμενη από τα αντισώματα ενίσχυση του ιού του A.I.D.S. ονομάζεται για λόγους συντομίας A.D.E (Antibody Dependent Enhancement) και είναι συνηθισμένο φαινόμενο στην οικογένεια των Lentiviruses³⁹. Η ποικιλομορφία του ιού δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την παρασκευή ενός αποτελεσματικού εμβολίου. Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν γίνει κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, με απογοητευτικά αποτελέσματα. Τα περισσότερα δείγματα δεν ξεπερνάνε τη φάση I ή II. Πιο πρόσφατα πειράματα που έγιναν σε υγιείς ανθρώπους (φάση III) με υψηλό ρίσκο μετάδοσης του ιού ήταν δείγματα μονομερούς gp120. Το αποτέλεσμα ήταν χαμηλή παραγωγή αντισωμάτων και σχεδόν καθόλου προστασία. Πιο πρόσφατα ένας ανασυνδυασμένος εξασθενημένος αδενο-ιός ο Ad5 (ο οποίος εκφράζει τα γονίδια gag, pol, env & nef) δοκιμάστηκε σε φάση II. Δεν παρατηρήθηκε καμία προστασία. Αντιθέτως η μόλυνση από HIV-1 ευνοήθηκε και ιδιαίτερα σε ασθενείς οι οποίοι είχαν ήδη αντισώματα για τον τέλειο Ad5. Μια υπόθεση για το πώς τα αντισώματα του Ad5 ευνοούν τη μόλυνση από άλλο ιό, είναι ότι τα αντισώματα που ανιχνεύονται για προστασία από τον Ad5 αντανακλούν τη συνολική ανοσία ενάντια στον ιό. Αυτό υπονοεί την αυξημένη παρουσία CD T-κυττάρων μνήμης εξειδικευμένων στον Ad5. Αυτά τα κύτταρα μνήμης ενεργοποιούνται ξανά με την προσθήκη καινούριων ιών Ad5 και γίνονται πιο ευάλωτα σε μόλυνση από HIV-1. Αυτό δρα απαγορευτικά για τη χρήση ιικών τμημάτων ως φορείς για lenti-ικά αντιγόνα σε εμβόλια αφού προκαλούν A.D.E., συνεπώς οι συνδυασμένες ανοσολογικές αποκρίσεις θα είναι συχνές και το ανοσολογικό σύστημα που ενεργοποιείται θα προκαλεί αυξημένη αναπαραγωγή του HIV αντί για προστασία. Η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της A.D.E. είναι επιτακτική ανάγκη για να συσχετιστεί η παθογένεση με την ανοσολογική απόκριση. Το πιθανότερο σενάριο είναι ότι υπάρχει μια ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στην ανοσολογική προστασία και την ενίσχυση της ιικής αντιγραφής και το τελικό

αποτέλεσμα του εμβολιασμού καθορίζεται από το συνδυασμό των δυο παραγόντων. Άλλα θεμελιώδη καθοριστικά στοιχεία είναι ο τύπος του εμβολίου, η βιολογία του ιού αλλά και η αλληλεπίδραση με τον ξενιστή, παράπλευρες μολύνσεις και χρόνος μετά τον εμβολιασμό.

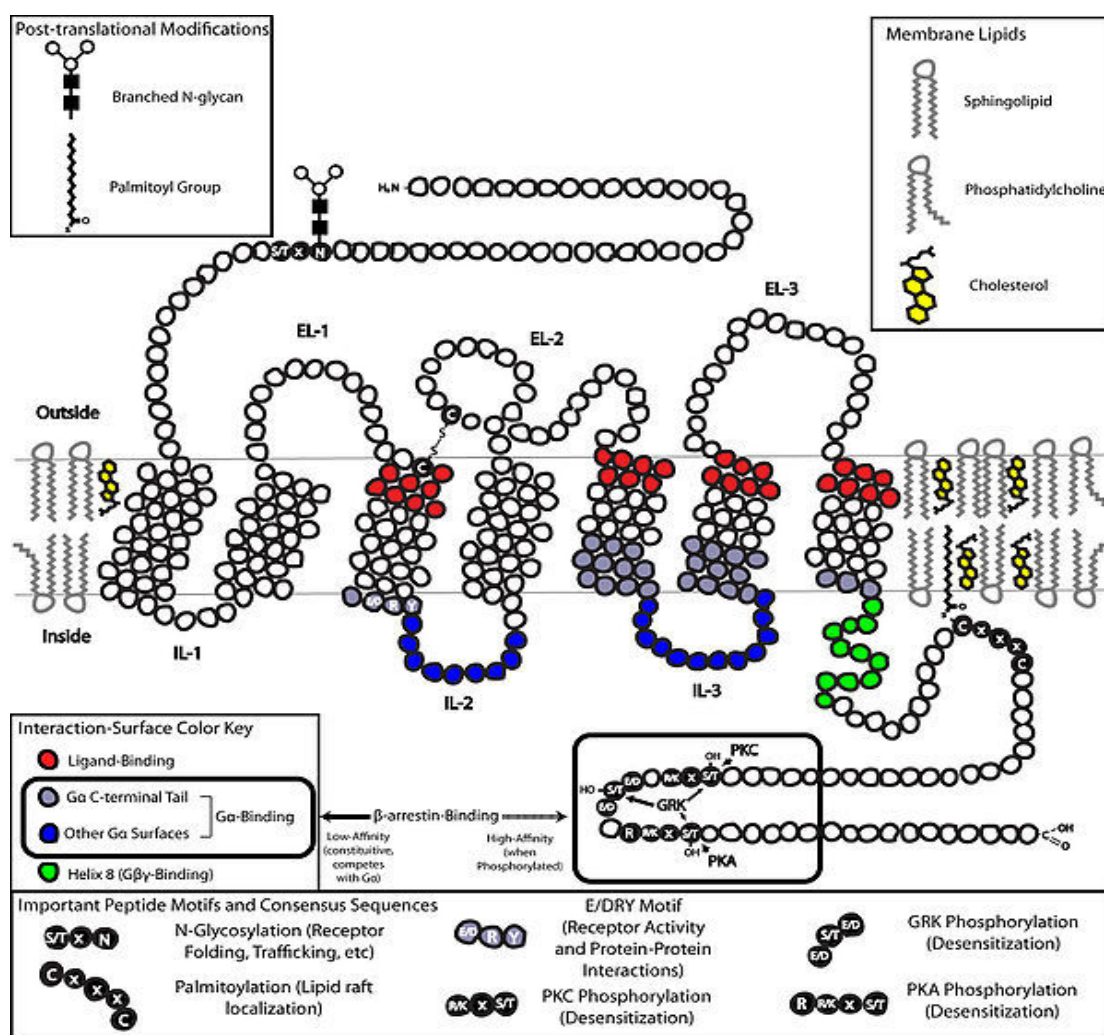
Λόγω απουσίας ενός αποτελεσματικού εμβολίου, τα μικροβιοκτόνα είναι η μόνη αποτελεσματική θεραπεία και ιδιαίτερα για τις γυναίκες. Ένα απλό μικροβιοκτόνο με 60 % επιτυχία μπορεί να αποτρέψει εκατομμύρια καινούριες μολύνσεις με AIDS κάθε χρόνο παγκοσμίως⁴⁰. Μερικά σημαντικά κριτήρια για την αποτελεσματικότητα ενός μικροβιοκτόνου είναι: 1) Το προϊόν να είναι δραστικό στην παρουσία κολπικού υγρού, τραχηλικής βλέννας, σπέρματος και κολπικού pH 2) Προστασία του κολπικού μικρο-περιβάλλοντος από τραυματισμό 3) Η ικανότητα να χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες δόσεις του προϊόντος για να μη χρειάζεται συνεχής λήψη 4) ο βαθμός απορρόφησης του μικροβιοκτόνου από τα πρωκτικά ή τα κολπικά κύτταρα στο κυκλοφορικό σύστημα. Φυσικά για την εμπορική ευρεία κατανάλωση ενός καινούριου προϊόντος και στον αναπτυσσόμενο και στον υπανάπτυκτο κόσμο , το μικροβιοκτόνο πρέπει να είναι φτηνό και εύκολο στη χρήση. Η χρήση τους πρέπει να είναι προληπτική και όχι φαρμακευτική, δηλαδή να περιέχουν και ιο-κτόνες ουσίες που θα απενεργοποιούν τους ιούς που εισέρχονται ή έστω θα τους εμποδίζουν να ενσωματωθούν στα κύτταρα στόχους. Οι μορφές τους είναι ημι-στερεές (κρέμες και gel) ή στερεές. Τα στερεά δείγματα έχουν το σχήμα δαχτυλιδιού ή τη μορφή ταινίας. Παρά το ότι η βαρύτητα έχει δοθεί στην παραγωγή κολπικών μικροβιοκτόνων, θα πρέπει μελλοντικά να δοθεί προσοχή και στη δημιουργία καινούριων σκευασμάτων για πρωκτική χρήση. Παρά τις όποιες αποτυχίες, η έρευνα συνεχίζεται και στο άμεσο μέλλον καινούρια προϊόντα θα μπουν στη φάση III.

3) ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CCR5

Οι κυτταροκίνες γενικά είναι διαλυτές πρωτεΐνες που δρουν ως ανοσοδιαβιβαστές. Σε αντίθεση με τις ορμόνες που έχουν πολύ εξειδικευμένη λειτουργία, οι κυτταροκίνες καλύπτουν ένα αρκετά ευρύ φάσμα κυτταρικών στόχων. Οι χημειοκίνες (ετυμολογικά προέρχονται από τις λέξεις χημεία + κίνηση) επάγουν χημειοτακτισμό στα κοντινά κύτταρα που αποκρίνονται στο σήμα τους. Οι ομοιότητες στην οικογένεια των χημειοκινών δεν περιορίζονται στη λειτουργία τους, αλλά έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά στη δομή τους.

Για να εισέλθει ο ιός HIV σε ένα κύτταρο όπως φάνηκε και από το σχήμα 4, το μόριο CD4 δεν είναι αρκετό. Η σύντηξη υποβοηθείται και από έναν υποδοχέα από την οικογένεια των χημειοκινών. Ανάλογα με τη διάταξή του, ο υποδοχέας αυτός μπορεί να είναι είτε ο CCR5 είτε ο CXCR4. Ο CCR5 ανήκει στην υποκατηγορία β και έχει το μοτίβο C-C, ενώ ο CXCR4 ανήκει στην υποκατηγορία α και έχει το μοτίβο C-X-C⁴⁰. Το γράμμα R σημαίνει Υποδοχέας (Receptor). Σε γενικές γραμμές ο CCR5 είναι ο κύριος υποδοχέας για Μ-τροπικές ιικές αλυσίδες HIV-1 (δηλαδή ιούς που προσβάλλουν εκλεκτικά Μακροφάγους), ενώ ο CXCR4 είναι ο κύριος υποδοχέας για Τ-τροπικές ιικές αλυσίδες HIV-1 (δηλαδή ιούς που προσβάλλουν εκλεκτικά Τ-κύτταρα)⁴¹⁻⁴⁵.

Η ομάδα χημειοκινικών υποδοχέων στην οποία ανήκουν και οι δυο υποδοχείς είναι η λεγόμενη υπερ-οικογένεια των επταπλά διαμεμβρανικών G-πρωτεϊνών⁴². Τα αρχικά της ομάδας είναι GPCR [G protein coupled receptors] δείχνοντας ότι ο υποδοχέας είναι συζευγμένος με τις διαμεμβρανικές περιοχές. Τα GPCR ενεργοποιούνται όταν δεσμευτεί στον υποδοχέα ένα μικρό υπόστρωμα που μπορεί να είναι είτε ετερόκλητο είτε εξειδικευμένο για αυτόν τον υποδοχέα. Μια γενική σχηματική απεικόνιση της οικογένειας GPCR ακολουθεί στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα II.6 : Διάγραμμα της GPCR . Το πάνω τμήμα είναι η εξωκυττάρια περιοχή , το κάτω τμήμα είναι η ενδοκυττάρια περιοχή και το τμήμα που περικλείεται ανάμεσα στις δυο γραμμές είναι το εσωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης . Τα αμφιπολικά μόρια των σφιγγολιπιδίων , της φωσφατιδυλοχολίνης και της χοληστερόλης με τους κατάλληλους προσανατολισμούς στη μεμβράνη φαίνονται στη διαμεμβρανική περιοχή . Υπάρχουν 3 εξωκυτταρικές θηλιές [Extracellular Loops] EL-1 , EL-2 & EL-3 , 3 ενδοκυτταρικές θηλιές [Intracellular Loops] IL-1 , IL-2 & IL-3, μια N-τελική εξωκυττάρια ουρά , ένα C-τελικό ενδοκυττάρια άκρο που περιλαμβάνει μια ελικοειδή περιοχή (πράσινο χρώμα) για τη δέσμευση της σηματοδοτικής πρωτεΐνης GEF. Το κόκκινο χρώμα είναι οι συνηθισμένες περιοχές δέσμευσης του υποστρώματος . Οι διαμεμβρανικές περιοχές είναι 7 και ονομάζονται TM-1 , TM-2 ... , TM-7 . Έχουν όλες δομή α-έλικας και είναι αρκετά εύκαμπτες ώστε να ευνοούν αλλαγές στη στερεοχημεία μετά τη δέσμευση κάποιου υποστρώματος . Η GEF εναλλάσσεται μεταξύ των δυο μορφών δέσμευσης μορίων GTP/GDP και επάγει τα σήματα ενεργοποίησης και αδρανοποίησης αντίστοιχα . [SOURCE : en.wikipedia.org/wiki/GPCR]

Η ενδοκυτταρική πρωτεΐνη G στο C-τελικό άκρο είναι ένα ενδοκυτταρικό σήμα και ενεργοποιεί ή παρεμποδίζει ενδοκυτταρικά ένζυμα. Η υπερ-οικογένεια αυτού του

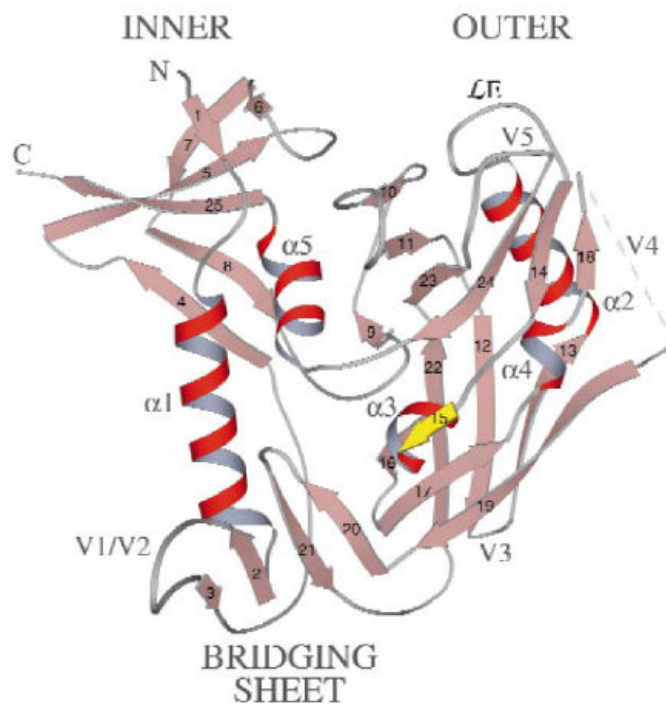
σηματοδοτικού μοντέλου είναι τόσο διαδεδομένη που οι GPCR χρησιμοποιούνται για να διαδώσουν αισθητήρια σήματα σχετικά με γεύση, οσμή, όραση και έλεγχο πολλών ενδοκυττάρων σημάτων. Πολλές ασθένειες όπως μορφές τύφλωσης, παχυσαρκίας, φλεγμονής, κατάθλιψης και υπέρτασης συνδέονται με ανωμαλίες στη λειτουργία των GPCR. Δεν είναι καθόλου τυχαίο το ότι οι μισοί στόχοι των φαρμάκων που παρασκευάζονται στη βιομηχανία είναι GPCR.

Όταν δεσμευτεί κάποιος αγωνιστής, τα GPCR ενεργοποιούνται και φωσφορυλιώνονται γρήγορα σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο και την τρίτη ενδοκυτταρική περιοχή. Ο CCR5 έχει μόνο επτά ενεργά κέντρα φωσφορυλίωσης ενώ ο CXCR4 έχει 21 τέτοια ενεργά κέντρα. Το κατά πόσο θα χρησιμοποιηθεί ένας υποδοχέας εκλεκτικά ή πόσο θα δεσμευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθορίζεται από πολλές μεταβλητές. Η πιο σημαντική μεταβλητή είναι το επίπεδο της έκφρασης του υποδοχέα ⁴⁵. Για παράδειγμα υψηλά επίπεδα έκφρασης ενός υποδοχέα προάγουν σε μεγάλο βαθμό τη σύντηξη (με τη βοήθεια της ενν) ικών τμημάτων HIV, ενώ χαμηλότερα επίπεδα υποδοχέα επιτρέπουν σε ελάχιστες αλυσίδες HIV να εισέλθουν. Η παρουσία του CD4 είναι επίσης πολύ σημαντική. Υψηλά επίπεδα CD4 στην κυτταρική επιφάνεια απαιτούν πολύ μικρές ποσότητες CCR5 ή CXCR4 για να υποβοηθήσουν την ιική είσοδο.

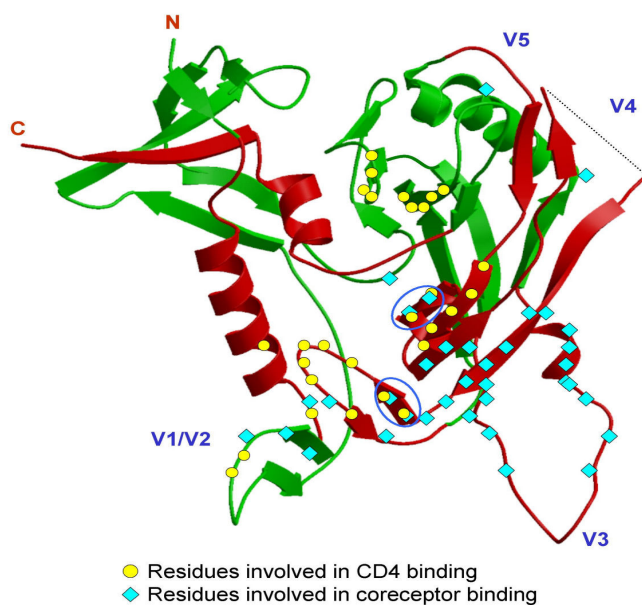
Εκτός από αυτά τα δυο είδη, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον άλλοι 9 τύποι υποδοχέων που ευνοούν την είσοδο άλλων ικών τμημάτων. Μερικοί είναι οι CCR2b, CCR3, CCR8, GPR1, GPR15, STRL33, US28, V28 & ChemR23. Αν και η σημασία των συνυποδοχέων αυτών *in vivo* δεν είναι ξεκάθαρη, είναι πιθανώς καθοριστική η επιρροή τους σε άλλους τομείς της ικής παθογένεσης.

Ο υποδοχέας παίρνει το όνομά του από τα υποστρώματα που δεσμεύει, συνεπώς τα γράμματα CC δηλώνουν την οικογένεια χημειοκινών β, η οποία σημαίνει

Cysteine – Cysteine, αφού περιέχονται δυο συζυγή κατάλοιπα κυστεΐνης στο N-τελικό τους άκρο. Το μόριο «κουλουριάζεται» και τα κυστεϊνικά κατάλοιπα συνδέονται με δισουλφιδικές γέφυρες με άλλα κατάλοιπα κυστεΐνης το καθένα σε άλλα τμήματα του πεπτιδίου. Η δομή του CCR5 είναι η τυπική επταπλά διαμεμβρανική που έχουν οι GPCR. Από τις γλυκο-πρωτεΐνες που έχει ο ικός φάκελος, το εξωτερικό τμήμα gp120 είναι αυτό που δεσμεύεται άμεσα στον υποδοχέα CD4 και κατ' επέκταση και στο διαθέσιμο συνυποδοχέα. Η gp120 περιέχει κάποιες περιοχές καθορισμένης (σταθερής) αλληλουχίας και 5 μεταβλητές περιοχές που ονομάζονται V1, V2, V3, V4 & V5 (V:Variable = Μεταβλητός) οι οποίες έχουν ακαθόριστη σύσταση. Η V3 είναι και αυτή που παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα ⁴³. Ωστόσο και οι Σταθερές και οι Μεταβλητές περιοχές συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία. Τα κατάλοιπα που συνεισφέρουν στη δέσμευση με το συν-υποδοχέα βρίσκονται κυρίως στις μεταβλητές περιοχές V1/V2 και στη V3. Υπάρχουν κατάλοιπα στις υπόλοιπες περιοχές που συνεισφέρουν στη δέσμευση με τον κύριο υποδοχέα CD 4. Η gp120 περιλαμβάνει τόσο στερεοδιάταξη α-έλικας όσο και β-πτυχωτής επιφάνειας. Στα κάτωθι σχήματα απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή της gp120. Το σχήμα II.7 δείχνει τη γενική διαμόρφωση στο χώρο καθώς και πιο είναι τα ενδότερα και εξωτερικά τμήματα, ενώ το σχήμα II.8 περιέχει περισσότερες λεπτομέρειες για την εξειδίκευση των πεπτιδικών περιοχών. Αμφότερα τα σχήματα δείχνουν τα N-τελικά και C-τελικά άκρα καθώς και τις μεταβλητές περιοχές V1 έως V5. Τα βέλη και στα δυο σχήματα υποδεικνύουν τη φορά από την αρχή ως το τέλος της πεπτιδικής αλυσίδας.

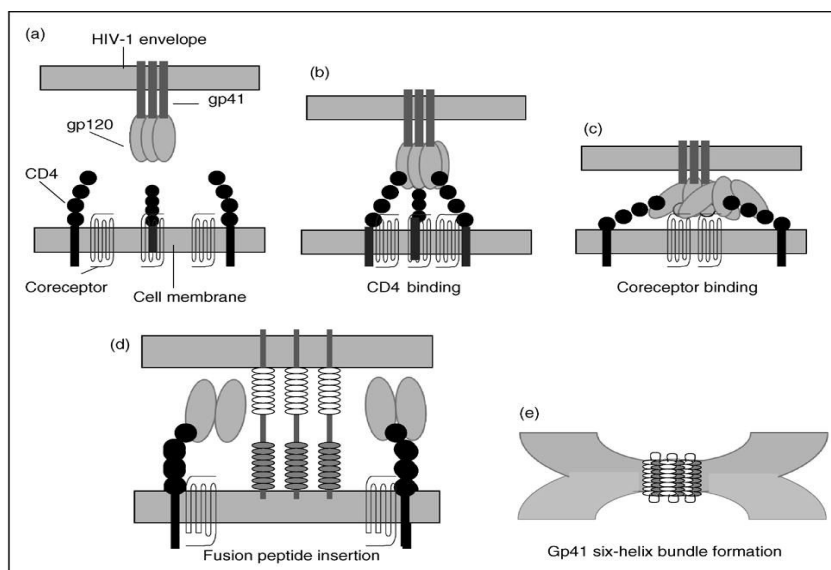


Σχήμα II.7 : Αναπαράσταση της gp120 με 5 περιοχές α-έλικας και 25 τμήματα με β-πτυχωτή επιφάνεια. Η περιοχή γεφύρωσης είναι κάπου ανάμεσα στα τμήματα β-20 και β-21 . [SOURCE : www.biodavidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/Spring2005/Greendyke]



Σχήμα II.8 : Αναπαράσταση της gp120 . Οι κύκλοι είναι οι περιοχές των αμινοξέων που δεσμεύονται στο CD4 και οι ρόμβοι οι αντίστοιχες περιοχές που θα δεσμευτούν πάνω στον συνοποδοχέα (π.χ. CCR5) [SOURCE : www.biomedcentral.com/1471-2334/4/41/figure/F4?highres=Y]

Τα «καρφιά» τα οποία προεξέχουν από την επιφάνεια του HIV αποτελούνται από τη γλυκο-πρωτεΐνη ενν που αποτελείται από τα δυο τμήματα της gp120 και της gp41. Οι μελέτες υποδεικνύουν τη δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά του CCR5 (την EL2) ως την κυρίως υπεύθυνη για τη δέσμευση. Η V3 και η περιοχή γεφύρωσης της gp120 είναι τα ενεργά μέλη του υποστρώματος για αυτήν την αλληλεπίδραση. Η διαδικασία σύντηξης ξεκινάει από τη δέσμευση πρώτα στο CD4 και μετά στο συνυποδοχέα. Στη συνέχεια η gp120 υφίσταται μια δραστική στερική αναδιάταξη που είτε δημιουργεί , είτε αποκαλύπτει το κρυμμένο ενεργό κέντρο για δέσμευση με το συνυποδοχέα. Αφού η gp120 δεσμευτεί και με το CCR5, η gp41 ενεργοποιείται και προάγει την αντίδραση σύντηξης του ιικού φακέλου με άλλη μια σειρά από πολύπλοκες στερεοχημικές αναδιατάξεις. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις με το συνυποδοχέα, προκαλούν την προέκταση της gp41 και την εισβολή του N-τελικού «πεπτιδίου σύντηξης» στο κύτταρο-στόχος. Στη συνέχεια η gp41 επάγει μια νέα εξαμερή μορφή «δεσμίδας», η οποία είναι πιο ευνοϊκή ενεργειακά και αναδιπλώνεται έτσι ώστε οι δυο μεμβράνες (ική και κυτταρική) πακετάρονται πιο στενά, ώστε τελικά να γίνει η «ένωση» του γενετικού υλικού του ιού στο κύτταρο-στόχο. Αξιοσημείωτα, ο μηχανισμός εισβολής του ξένου γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα δεν έχει γίνει ακόμα και σήμερα πλήρως κατανοητός. Η έλλειψη σαφούς κρυσταλλογραφικής δομής για το σύμπλοκο gp120-συνυποδοχέα είναι ένα μεγάλο εμπόδιο για τους ερευνητές. Η δομή του συνυποδοχέα και η ανάμειξή του στη δέσμευση και τη δημιουργία του συμπλόκου, εξακολουθεί να είναι αφανής σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα που πάρθηκαν με ακτίνες X τόσο για τη gp120 δεσμευμένη με CD4, όσο και για τον πυρήνα της gp41 μετά τη σύντηξη. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για τη δημιουργία του συμπλόκου και τη μεμβρανική σύντηξη όπως περιγράφηκε, απεικονίζεται στο σχήμα που ακολουθεί



Σχήμα II.9 : Διάγραμμα για τους παράγοντες κλειδιά στο μηχανισμό εισβολής του HIV-1 α) Δέσμευση στο CD4 β) Αναδιάταξη της gp120 και έκθεση του ενεργού κέντρου δέσμευσης συνυποδοχέα γ) Δέσμευση συνυποδοχέα και gp120, εγγύτητα ικού φακέλου και κυτταρικής επιφάνειας, δεύτερη αναδιάταξη της gp120 δ) Διείσδυση της gp41 στην κυτταρική επιφάνεια ε) Σχηματισμός εξαμερούς δεσμίδας gp41 και πακετάρισμα μεμβρανών που τελικά θα οδηγήσει στην είσοδο του γενετικού υλικού. [Source : Alkhatib (2009) *Current Opinion in HIV and AIDS* Vol.4]

Πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια που έχουν ανεπάρκεια σε CCR5, δείχνουν ότι η ανάπτυξή τους είναι κανονική αλλά είναι ανίσχυρα στην άμυνα του οργανισμού απέναντι στη μόλυνση *Listeria* και ασκούν προστατευτική αντίδραση στην ενδοτοξαιμία που προκαλείται από λιπο-πολυσακχαρίτες, κάτι που αντανακλά ελαττωματική λειτουργία των μακροφάγων. Άλλες παρενέργειες στα πειραματόζωα περιλαμβάνουν αργές αντιδράσεις υπερευαισθησίας και αυξημένη χυμική απόκριση σε αντιγόνα που επηρεάζουν T-κύτταρα, κάτι που υποδεικνύει πως ο CCR5 δρα ως υπο-ρυθμιστής στη λειτουργία των T-κυττάρων. Άνθρωποι με ανεπάρκεια σε CCR5 προστατεύονται αλλά όχι τελείως αφού η μόλυνση από τον HIV μπορεί να προχωρήσει εναλλακτικά με τη βοήθεια του συνυποδοχέα CXCR4.

Ο ικός φάκελος gp120 / gp41 που σχηματίζει αυτό το τριμερές σύμπλοκο έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία σε σχέση με τις

υπόλοιπες πρωτεΐνες που προέρχονται από τον HIV-1. Υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στις παραλλαγές της αλληλουχίας gp120 και τη λειτουργία του ιού. Οι μεταλλάξεις στις θηλιές V1, V2 & V3 της gp120, οι οποίες συντελούν σε αλλαγές του μήκους της αλυσίδας και διαφορετικά φορτία, συνδέονται με παραλλαγμένο κυτταρικό τροπισμό⁴⁶. Οι αλληλουχίες gp160 από ασθενείς που βρίσκονται στα τελευταία στάδια της νόσου έχουν υψηλότερο συνολικό θετικό φορτίο σε σχέση με ασθενείς που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της νόσου πριν τη μαζική αναπαραγωγή των ιών.

Η ακριβής θέση των θετικά φορτισμένων κατάλοιπων στην αλυσίδα διαφέρει από ασθενή σε ασθενή. Είναι αξιοσημείωτο όμως ότι τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα που συνεισφέρουν στο συνολικό φορτίο είναι κυρίως συγκεντρωμένα στις μεταβλητές περιοχές εκτός της V3, η οποία ήταν σταθερά διατηρημένη σε σχέση με χρόνιους ασθενείς ή ασθενείς στα τελευταία στάδια. Από τις μεταβλητές περιοχές της gp120 με αυξημένο θετικό φορτίο, οι πιο φορτισμένες ήταν η V2 και η V4. Εκτός από την υψηλή βασικότητα της V2, μετά την προσβολή από AIDS, τα καινούρια θετικά κατάλοιπα συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της gp120 (μαζί με τη V4) φτιάχνοντας μια νέα βασική περιοχή. Καθώς η ασθένεια προχωράει, η αλληλεπίδραση με το CCR5 οδηγεί σε μοριακές αλλαγές όπως αύξηση του θετικού φορτίου. Το ότι τα φορτία της V3 δε μεταβάλλονται στα στάδια της ασθένειας ίσως είναι ένδειξη για το ότι, αν και το θετικό της φορτίο συμμετέχει ενεργά στην αλληλεπίδραση, δεν αποτελεί παράγοντα εκλεκτικότητας για τον υποδοχέα CCR5. Αφού η επιφάνεια του κυττάρου-στόχου όπως και η συνολική ιική επιφάνεια είναι αρνητικά φορτισμένα, τότε η ηλεκτροστατική άπωση πρέπει να νικηθεί για να προκύψει σύνδεση. Συνεπώς χρειάζεται ένα ισχυρό θετικό φορτίο για να συμβεί η επιτυχής σύνδεση. Αν και η έλξη δε θα είναι στερεο-εκλεκτική ως προς τον υποδοχέα, τουλάχιστον η άπωση μεταξύ των αρνητικών φορτίων θα μειωθεί δραστικά.

Ο συσχετισμός ανάμεσα στο συνολικό θετικό φορτίο και την ικανότητα προσκόλλησης του ιού πάνω στον υποδοχέα βρέθηκε ότι είναι υψηλότερος στη gp160 απ' ό,τι σε σχέση με τη μεμονωμένη gp120. Είναι πιθανόν λοιπόν να υπάρχουν και θετικά φορτισμένα κατάλοιπα στην περιοχή gp41 που συνεισφέρουν και αυτά στις ιδιότητες του ιού. Οι αλληλουχίες των gp120 μελετήθηκαν ακόμα και για τα πιθανά ενεργά κέντρα N-σύνδετης γλυκοζυλίωσης (πολύ συνηθισμένη χημική τροποποίηση). Οι γλυκάνες είναι ογκώδεις αλλά και αρνητικά φορτισμένες, συνεπώς η απώλειά τους ίσως να συνεισφέρει ακόμα περισσότερο στην ανύψωση του συνολικού ιικού φορτίου. Παρά το ότι η καινούρια βασική περιοχή δε συνδέεται άμεσα με το CD4, η αλλαγή στο ηλεκτροστατικό δυναμικό και η απώλεια των γλυκανών διευρύνει την επιφάνεια της gp120, σε σημείο που ο ιός έχει μεγαλύτερη ροπή προς τη σύντηξη. Η βασική επιφάνεια δεν αποτελεί τμήμα του κέντρου δέσμησης με το CD4, ούτε και η V3, αλλά διατηρημένα κομμάτια του ενεργού κέντρου δέσμησης για το συνυποδοχέα μέσα στη gp120 έχουν ταυτοποιηθεί και δείχνουν υψηλή ευαισθησία και τροπισμό για τα πολυανιόντα.

Υπάρχει αντίστροφη εξάρτηση ανάμεσα στο θετικό φορτίο της gp120 και την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς, όπως αποδεικνύεται από τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων κατά την απομόνωση του ιού. Στο τελικό στάδιο, η χαμηλή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού φαίνεται πως οδηγεί σε αύξηση του θετικού φορτίου. Παρόμοιος συσχετισμός μπορεί να γίνει και στα τελείως αρχικά στάδια, όταν υπάρχει έλλειψη απόκρισης του ανοσολογικού συστήματος. Δηλαδή η μειωμένη διαθεσιμότητα κυττάρων-στόχων συνεισφέρει στον τροπισμό.

Οι πρώτες απόπειρες να παρασκευαστούν εκλεκτικοί παρεμποδιστές της εισόδου του HIV-1 επικεντρώθηκαν στο να σχεδιαστούν διαλυτά μόρια CD4. Αν και αυτά τα μόρια είχαν καλή ιδιότητα στο να δεσμεύουν *in vitro* ιικές αλυσίδες, λόγω της διατηρημένης τους συγγένειας με τη gp120, οι κλινικές δοκιμές που ακολούθησαν

ήταν απογοητευτικές⁴⁷. Διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις έχουν οδηγήσει σε ποικιλία μορίων που μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και του CCR5. Τα μόρια αυτά είναι είτε ανταγωνιστές μικρού μοριακού βάρους (που έχουν την κατάληξη -νίρος, συντομία για Viral Receptor Occupancy = κατοχή ιικού υποδοχέα), είτε ομοιοπολικά τροποποιημένοι CCR5 υποκαταστάτες. Τα 3 μόρια -νίρος που έχουν εγκριθεί για μελέτες Φάσης II, ονομάζονται aplavivίρος, maravivίρος, vicivivίρος και επίσης το υποκατάστατο CCR5 με κωδικό INCB009471. Δυστυχώς οι πολλές τους παρενέργειες και τα μετρίως ικανοποιητικά κλινικά τεστ δηλώνουν ότι πρέπει να γίνουν πολύ περισσότερες μελέτες. Λίγα από αυτά θα εγκριθούν για κλινική χρήση όπως το maravivίρος.

Στη δεκαετία του 1980 μια φαρμακευτική αγωγή με ανταγωνιστή εισόδου στο CCR5 θεωρούνταν επιτυχημένη αν έδινε τρεις μήνες παράταση ζωής. Στη δεκαετία του 1990, συνδυασμός νέων αντι-ικών φαρμάκων αύξησε το προσδόκιμο της ζωής κατά ένα χρόνο. Προς το τέλος της δεκαετίας του '90 πιο αποτελεσματικοί συνδυασμοί φαρμάκων, έδωσαν μεγάλες ελπίδες στους ασθενείς καθώς η νόσος δεν ήταν πια μια άμεση θανατική καταδίκη. Η θεραπεία με χρήση συνδυασμού φαρμάκων ονομάζεται HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), δηλαδή Υψηλά Δραστική Αντι-ική Θεραπεία. Σήμερα ένας 20χρονος ασθενής που ξεκινάει την αγωγή HAART μπορεί να ζήσει σχεδόν άλλα 50 χρόνια όπως δείχνουν έρευνες σε 43000 ανθρώπους που ζουν σε πλούσιες χώρες⁴⁸. Το HAART συνδυάζει φάρμακα που παρεμποδίζουν πολλά στάδια-κλειδιά του κύκλου ζωής του ιού. Με τακτική και σωστή χρήση το HAART μπορεί να μειώσει το ιικό φορτίο στο αίμα του ασθενούς κάτω από ανιχνεύσιμα επίπεδα, ένα επίτευγμα που δε βελτιώνει μονάχα την υγεία του ασθενούς, αλλά μειώνει και τον κίνδυνο μετάδοσης. Ωστόσο η λήψη πρέπει να είναι καθημερινή και αδιάκοπη γιατί οι δόσεις που παραλείπονται οδηγούν σε αντίσταση του ιού. Πάνω από 20 αντιρετροϊκά φάρμακα είναι στην αγορά για χρήση με

συνιστώμενους συνδυασμούς. Κανένα από αυτά δεν είναι τέλειο και διαφέρουν ως προς την ικανότητα, την ευκολία χρήσης, την αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα και τις παρενέργειες.

Για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων οι ερευνητές προσπαθούν να κάνουν πιο ευχερή τη χρήση τους. Για να μην παίρνουν οι ασθενείς πολλά διαφορετικά χάπια σε διάφορες ώρες της ημέρας και υπό διαφορετικές συνθήκες, η προσέγγιση είναι ένα χάπι ανά ημέρα. Το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι ότι όσο δραστικό και αν είναι ένα καινούριο φάρμακο, πάντοτε υπάρχει αντίσταση. Αρκεί μια μονάχα μετάλλαξη για να γίνει το φάρμακο ανενεργό. Επιπλέον οι παρενέργειες πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότερες για να μπορούν οι ασθενείς να το χρησιμοποιούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αξιοσημείωτα, οι φτωχές χώρες εξακολουθούν να χρησιμοποιούν παλιά και ξεπερασμένα φάρμακα που είναι πια εκτός ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Η μεγάλη δυσκολία στο να βρεθεί ένας ανταγωνιστής για τη σύνδεση με το CCR5 έχει κάνει ακόμα πιο επιτακτική την ανάγκη να στραφούν οι έρευνες στην πρόληψη και όχι τη θεραπεία με την εύρεση ενός κατάλληλου εμβολίου. Η χρήση αντιρετροϊκών φαρμάκων μέχρι στιγμής είναι αρκετά αποτελεσματική για το ένα τρίτο των ανθρώπων που χρειάζονται αγωγή και έχουν πρόσβαση σε αυτή. Ο ρυθμός θανατηφόρων κρουσμάτων έχει μειωθεί περίπου στα 2 εκατομμύρια ανά χρόνο ⁴⁹. Ωστόσο η αγωγή δεν είναι θεραπεία και για κάθε δυο ανθρώπους που έχουν διαθέσιμη θεραπεία, πέντε άνθρωποι μολύνονται. Η επ' αόριστον φαρμακευτική αγωγή για όλους αυτούς που τη χρειάζονται δεν είναι πρακτική και (με δεκάδες δισεκατομμύρια δολάρια που χρειάζονται ανά χρόνο) υπερβολικά δαπανηρή. Η μεγάλη δυσκολία στο να βρεθεί αποτελεσματικό φάρμακο είναι ότι ο HIV μεταλλάσσεται γρήγορα, διαφεύγει από το ανοσοποιητικό και στη συνέχεια στοχεύει τα ίδια τα κύτταρα που χρειάζονται για την καταπολέμηση της μόλυνσης. Υπάρχει

μόνο ένα πολύ μικρό περιθώριο που μπορεί να αντιμετωπιστεί ο HIV επιτυχώς πριν δημιουργήσει μια χρόνια αρρώστια. Η ανοσολογική απόκριση ενός εμβολίου λοιπόν θα πρέπει να είναι καλύτερη και από την ανοσολογική άμυνα του ίδιου του οργανισμού. Σε απόλυτα ιδανικές συνθήκες το εμβόλιο θα πρέπει να μπορεί να αντιμετωπίσει και τις μεταλλάξεις τις οποίες αποκτούν οι ιικές αλυσίδες. Είναι όμως τελείως άγνωστο το μέγεθος, το εύρος, ο τύπος αντισώματος και η Τ-κυτταρική απόκριση που απαιτούνται, πόσο μάλλον να βρεθεί το εμβόλιο που θα τα προκαλέσει.

Το ήδη δύσκολο έργο των ερευνητών δυσχεραίνεται ακόμα πιο πολύ από αντιδράσεις και πίεση από επικριτές οι οποίοι υποστηρίζουν ότι τα χρήματα για την έρευνα είναι άνισα μοιρασμένα σε πρόληψη, αγωγή και κλινικές δοκιμές. Είναι επίσης άγνωστο αν η βαρύτητα θα πρέπει να δοθεί σε ένα φάρμακο που να επάγει την πρόληψη ή σε μια ουσία που να διεγείρει απόκριση από τα Τ-κύτταρα. Είναι γνωστό ότι πίθηκοι μπορούν να αναπτύξουν αντισώματα, αλλά τα ανθρώπινα αντισώματα μέχρι στιγμής δεν έχουν τον κατάλληλο αντίκτυπο. Λαμβάνοντας υπόψη τα εμπόδια των επιστημόνων και το περιορισμένο κίνητρο για τους επενδυτές, η φαρμακευτική έρευνα για το AIDS ποτέ δεν ήταν ιδιαίτερα δημοφιλής στο βιομηχανικό χώρο.

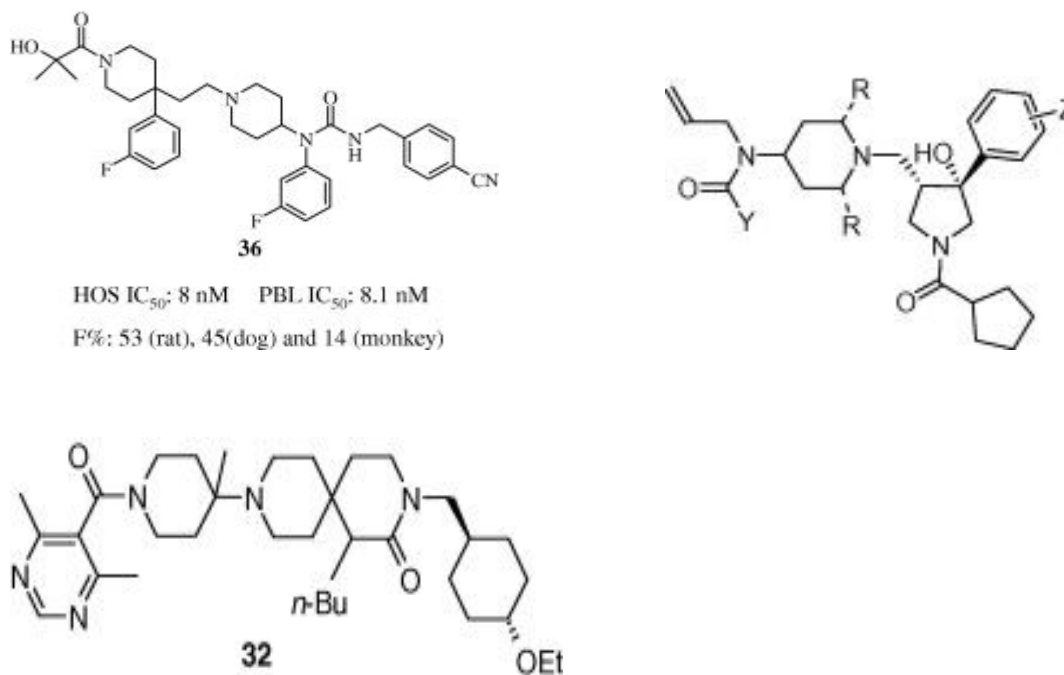
Ο μηχανισμός δέσμευσης ανάμεσα στο CCR5 και τον ιό είναι μείζονος σημασίας για την εύρεση μιας κατάλληλης θεραπείας. Υπάρχουν ακόμα πολλά σκοτεινά σημεία τα οποία πρέπει να αποσαφηνιστούν για να υπάρξει μια ξεκάθαρη εικόνα για την εισβολή του ιού στο κύτταρο-στόχο. Οι ανταγωνιστές στον CCR5 μπορούν να εκμεταλλευτούν μια ποικιλία μηχανισμών για τη δράση τους όπως δεσμούς υδρογόνου και αλλοστερική τροποποίηση της δεύτερης εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα εμποδίζοντας τη δέσμευση του ιού⁵⁰, πλήρη στερεοχημική παρεμπόδιση μπλοκάροντας το ενεργό κέντρο και κλείνοντας την «είσοδο» στις χημειοκίνες⁵¹, χημικά πεπτιδια-μιμητές που μοιάζουν με ένα Ν-τελικό τμήμα του CCR5 και τα οποία προκαλούν ανοσοαπόκριση, με τα παραγόμενα αντισώματα να

μπλοκάρουν τη μόλυνση⁵² και άρση της ικανότητας αντίστασης του ιού σε πιθανούς ανταγωνιστές με παρεμπόδιση της δέσμευσης του ιού στον ήδη κατειλημμένο με ανταγωνιστή υποδοχέα βάσει της σταθεράς διάστασης του συμπλόκου⁵³.

Αξιοσημείωτα η ίδια η ύπαρξη του υποδοχέα CCR5 σε πληθυσμούς Ινδιάνων φαίνεται πως είναι η μοναδική εστία παθογένεσης⁵⁴ σε αντίθεση με τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς οι οποίοι μπορούν εναλλακτικά να χρησιμοποιήσουν και τον CXCR4. Οι Ινδιάνοι ωστόσο έχουν μόνο αποπτωτικά CD4-CCR5 κύτταρα ενώ τα CD4-CXCR4 παραμένουν ενεργά. Οι γενετικοί τους φαινότυποι είναι διαφορετικοί σε σχέση με των Ευρωπαίων και αυτή η έλλειψη εναλλακτικού τροπισμού των συνυποδοχέων είναι ένας σημαντικός παράγοντας που αξίζει να μελετηθεί στο μέλλον.

Άλλες χημικές ουσίες με γνωστά ανταγωνιστικά αποτελέσματα είναι η Ν-βενζυλο-Ν'-(4-πιπεριδινούλο)-ουρία⁵⁵, η [2-(4-Φαινυλο-4-πιπεριδινυλο)-αιθυλ]-Αμίνη⁵⁶, η 1,3,3,4-τετρα-υποκατεστημένη πυρρολιδίνη⁵⁷, το 3,9-διαζωσπιρο[5.5]ανδεκανιο⁵⁸. Ο CCR5 έχει δυο σουλφουρωμένες τυροσίνες στο Ν-τελικό του άκρο που χρειάζονται για τη δέσμευση και την εισβολή του ιού. Ένα ολιγοπεπτιδικό θραύσμα του CCR5 με 14 κατάλοιπα και δυο σουλφουρωμένες τυροσίνες έχει καλή μιμητική δράση⁵⁹. Επειδή όμως είναι δύσκολο να συντεθεί λόγω της χημικής αστάθειάς του, η διαδικασία μπορεί να παρακαμφθεί. Οι ισοεστέρες με σουλφουρωμένες τυροσίνες έχουν εξίσου καλή δεσμευτική δράση με τα πεπτίδια αυτά, δεσμεύοντας αποτελεσματικά τη gp120.

Τα παρακάτω σχήματα απεικονίζουν αυτές τις ενώσεις :

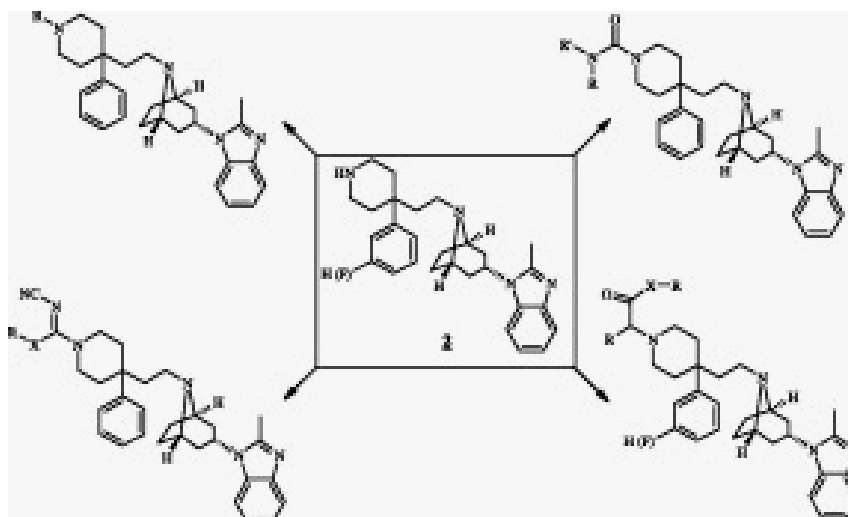


Σχήμα Π.10 : Ανταγωνιστές της δέσμευσης CCR5 – gp120 .

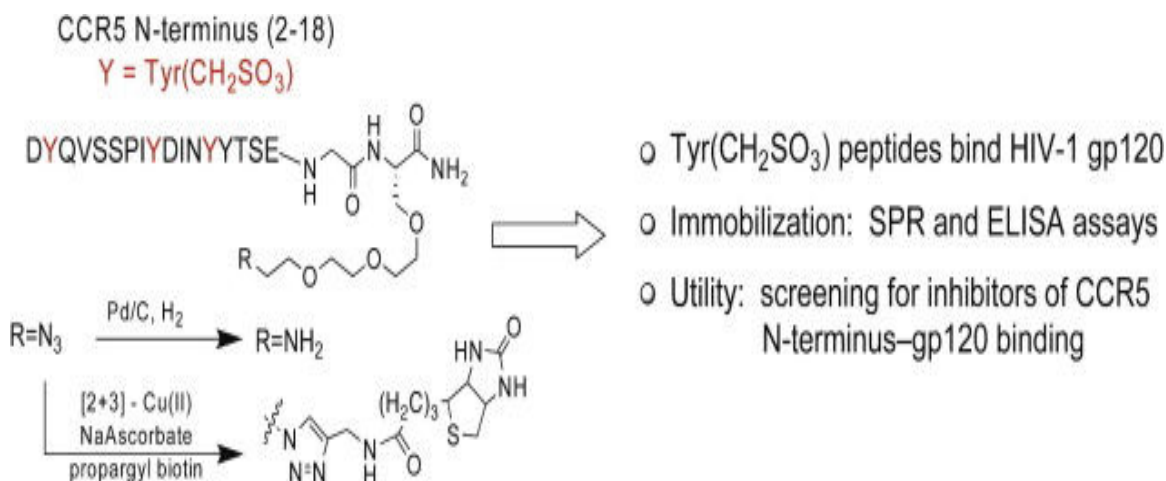
ΠΑΝΩ ΑΡΙΣΤΕΡΑ : το βενζυλο-παράγωγο της ουρίας με πιπερινικό δακτύλιο [55]

ΠΑΝΩ ΔΕΞΙΑ : το τετρα-υποκατεστημένο παράγωγο της πυρρολιδίνης [57]

ΚΑΤΩ ΑΡΙΣΤΕΡΑ : το διαζωσπιρο-παράγωγο 582]



Σχήμα II.11 : Ανταγωνιστής της δέσμευσης CCR5 – gp120 . Τα φαινυλοπαράγωγα στις γωνίες προκύπτουν από την κεντρική ένωση που απεικονίζεται στο κέντρο . Οι χημικές συνθέσεις που γίνονται είναι τροποποιήσεις στο N-τελικό άκρο του πιπεριδινικού δακτυλίου [56].



Σχήμα II.12 : Αναπαράσταση τυροσινο-σουλφονικού εστέρα με βιοδραστικές ιδιότητες στη δέσμευση gp120 στο CCR5 . Το αριστερό μέρος είναι η χημική σύνθεσή τους από το αντίστοιχο πεπτίδιο και το δεξιό μέρος είναι τα αποτελέσματα των ερευνών . Από πάνω προς τα κάτω 1) Δέσμευση στη gp120 2) Ακίνητοποίηση 3) Παρεμπόδιση δέσμευσης στον υποδοχέα CCR5 .

4) ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΕ CXCR4

Ο συνυποδοχέας CXCR4 δεσμεύει και αυτός χημειοκίνες με δυο N-τελικές κυστεΐνες όπως δηλώνουν τα γράμματα CC μόνο που το γράμμα X ανάμεσά τους δείχνει πως υπάρχει ένα αμινοξύ που τα διαχωρίζει. Αξιοσημείωτα οι δισουλφιδικές γέφυρες είναι δυο και όχι μια. Τα δυο κατάλοιπα είναι περίπου στο άκρο της αλληλουχίας και κάνουν δισουλφιδικούς εκατέρωθεν της συσπειρωμένης αλυσίδας. Το ένα από αυτά (το πιο εσωτερικό) συνδέεται με μια κυστεΐνη στο C-τελικό άκρο και το άλλο από τα δυο (το πιο εξωτερικό) συνδέεται με μια κυστεΐνη που βρίσκεται στο μέσο της αλληλουχίας. Ο υποδοχέας θεωρείται ότι έχει T-τροπισμό, δηλαδή σε

αντίθεση με το CCR5, είναι το συνηθισμένο σημείο δέσμευσης για τον ιό όταν βρίσκεται πάνω στην κυτταρική επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων και όχι των Μακροφάγων^{41, 44, 45, 47}. Καθώς η ασθένεια προχωράει από τα πρώιμα στάδια στα ενδιάμεσα (4-5 χρόνια μετά τη μετάδοση), αναπτύσσονται ικές αλυσίδες που μπορούν να προσβάλλουν T-λεμφοκύτταρα τόσο αναπτυγμένα, όσο και ανώριμα⁴⁵. Οι ιοί που χρησιμοποιούσαν αρχικά το CCR5 για κυτταρική είσοδο σε μακροφάγο μεταλλάσσονται στη γλυκοπρωτεΐνη ενν για να εξελιχθούν σε T-τροπικούς αλλά η αλλαγή δε γίνεται απαραίτητα στη θηλιά V3.

Η πρώτη και η δεύτερη εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα (ECL 1 & 2) φαίνεται ότι είναι οι πιο καθοριστικές για τη διαδικασία δέσμευσης του ιού. Οι περιοχές αυτές είναι πολύ πιο ανιοντικές σε σχέση με τις αντίστοιχες του CCR5. Ο CXCR4 δεν υποστηρίζει την ική είσοδο σε μακροφάγους καθώς υπάρχουν τέτοιοι υποδοχείς σε μακροφάγους οι οποίοι όμως αντιστέκονται στην εισβολή του HIV-1. Υπάρχουν διάφορες ερμηνείες ως προς το γιατί συμβαίνει αυτό, διαφορετικό μάτισμα μετά τη μετάφραση και την πρωτεΐνο-σύνθεση και διαφορετικός τρόπος με τον οποίο ο CXCR4 παρουσιάζεται σε συνεργασία με το μόριο CD4 σε κάθε είδος κυττάρου (M ή T).

Έχει διαπιστωθεί μετάλλαξη σε ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ στη θέση 25 της μεταβλητής θηλιάς V3 σε θετικά φορτισμένο μπορεί να αλλάξει τον τροπισμό του ιού από R5 (που δεσμεύεται εκλεκτικά σε CCR5) σε X4 (που δεσμεύεται εκλεκτικά σε CXCR4). Αντίστοιχα, ένα αρνητικό φορτίο στη θέση 25 μπορεί να υποβοηθηθεί σε έναν X4 ιό αν υπάρχει ένα θετικά φορτισμένο κατάλοιπο στη θέση 11. Αυτές οι έρευνες θεμελιώνουν το λεγόμενο κανόνα 11 / 25 που δηλώνει ότι αν υπάρχει ένα θετικό φορτίο στη θέση 11 ή στη θέση 25 του V3 ο ιός θα είναι X4 τροπικός⁴³. Οι ιοί X4 έχουν μεγάλο θετικό φορτίο σε αντίθεση με τους R5. Επειδή όμως δεν υπάρχουν διαφορές στα αποτελέσματα όταν το συνολικό φορτίο είναι +4 ή

+5 ή +6, η εξήγηση είναι πως ο καθοριστικός παράγοντας δεν είναι απλά το μέγεθος του θετικού φορτίου, αλλά η συγκέντρωσή του σε καθορισμένη περιοχή που επιβάλλει τελικά τη δέσμευση σε συγκεκριμένο συνυποδοχέα. Η ύπαρξη θετικού φορτίου στο κατάλοιπο 24 συντελεί ακόμα περισσότερο στη δέσμευση και επεκτείνει τον κανόνα σε 11 / 24 / 25. Αν δεν υπάρχει κανένα θετικό φορτίο σε αυτές τις 3 θέσεις, τότε ο ιός θα είναι R5.

Οι μελέτες για το ποιες υποκατηγορίες ιού HIV (για παράδειγμα A ,B, C) ευνοούν τη χρήση CXCR4 ή CCR5 οδηγούν σε αντιφατικά αποτελέσματα²⁸. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών τύπου B δεσμεύουν το CXCR4 και συνήθως σε πολύ πιο προχωρημένα στάδια της νόσου. Τα δείγματα τύπου A ή D δεν καταφέρνουν συνήθως να μολύνουν τα κύτταρα που εκφράζουν το CXCR4 υποδεικνύοντας ότι είναι ιοί τροπισμού R5. Ωστόσο σε αναλογική κλίμακα οι υποτύποι D είναι πιο πιθανό να έχουν X4 τροπισμό από τους υποτύπους A. Αν και το ιικό φορτίο από R5 είναι συνήθως ανεξάρτητο , το X4 είναι πάντα αναμειγμένο με R5 στο πλάσμα⁴⁷.

Παρά το ότι η αλλαγή στον τροπισμό του ιού είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο όσο προχωρά η νόσος, δεν είναι απαραίτητο ότι θα χαθεί η ικανότητα για μόλυνση των μακροφάγων. Ο ιός μπορεί να διατηρήσει και τις δυο ιδιότητες πρόσδεσης σε T ή M κύτταρα και αναφέρεται ως διπλά τροπικός. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα της V3 είναι υπεύθυνα για τη διττή φύση του ιού²⁸. Υποτίθεται πως οι διπλά τροπικές αλυσίδες πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να υιοθετούν δυο διαφορετικές στερεοχημείες για να κάνουν τη μετάβαση από τον ένα τύπο της επιφανειακής περιοχής της V3 στον άλλο.

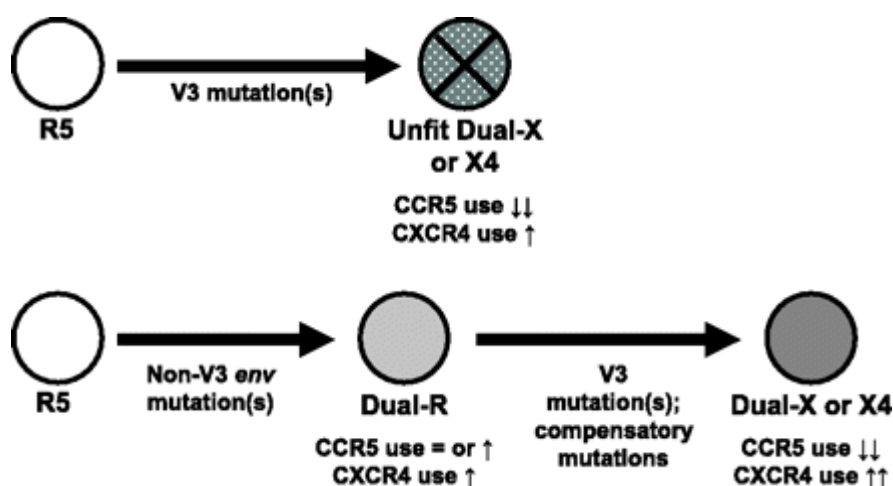
Είναι δύσκολο να βρεθεί πειραματικά μια αλληλουχία διπλού τροπισμού. Η σπανιότητα αυτών των αλυσίδων έγκειται στο ότι είναι δύσκολο να εξελιχθεί ο ιικός φάκελος από R5 σε X4, γιατί περιορίζεται από τη δομή και την ευκαμψία του

ιού. Το ότι οι διπλά τροπικοί ιοί κυριαρχούν σε ασθενείς *in vivo* είναι λοιπόν δύσκολο να εξηγηθεί. Οι λόγοι για αυτό το φαινόμενο είναι οι πολλές και ποικίλες αλυσίδες που είναι δύσκολο να διαχωριστούν και να ταξινομηθούν. Επίσης οι πειραματικές τεχνικές ίσως να υπερτιμούν το βαθμό παρουσίας των διπλά τροπικών ιών (κάποια ανιχνευτικά κύτταρα μπορούν να διεγείρουν ή να καταστείλουν την έκφραση ενός υποδοχέα οδηγώντας σε λανθασμένα νούμερα). Αν και η φύση του διπλού τροπισμού παραμένει μυστήριο, το πιθανό είναι ότι οι σπάνιες αυτές δομές είναι εξαιρετικά εύκαμπτες και μπορούν, είτε διαδοχικά με εναλλαγές, είτε ταυτόχρονα να χρησιμοποιήσουν και τις δυο χαρακτηριστικές επιφάνειες-κλειδιά. Είναι λοιπόν πιθανόν ότι κατάλοιπα σε περιοχές εκτός της V3 όπως η V1/V2 και η σταθερή περιοχή C4 (που αν και γενικά έχουν περιορισμένη συνεισφορά στην επιλογή του συνυποδοχέα) μπορούν να τροποποιήσουν το επιφανειακό πλέγμα με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να επιλέξει σε ποιο από τα 2 είδη συνυποδοχέα θα δεσμευτεί διαμορφώνοντας δυο δομές ή μια δομή που μπορεί να δεσμευτεί και στα 2 είδη.

Οι διπλά τροπικές αλυσίδες μπορούν να ταξινομηθούν με τη σειρά τους σε κατηγορίες. Η μια είναι αυτή που δείχνει προτίμηση σε CCR5 και η αλληλουχία της είναι σχεδόν ίδια με των R5 ιών και αυτή που τις περισσότερες φορές δεσμεύεται σε CXCR4 και η αλληλουχία της μοιάζει πολύ με τους ιούς X4. Οι ομάδες αυτές μπορούν να ονομαστούν διπλή-R και διπλή-X αντίστοιχα⁴⁴. Σε κύτταρα με υποδοχείς CCR5 η μολυσματικότητα των διπλών R είναι ίδια με αυτή των απλών R5 και μεγαλύτερη από τους διπλούς X. Αντίστοιχα, σε κύτταρα που εκφράζουν τους CXCR4 η μολυσματικότητα των διπλών R είναι χαμηλότερη όπως ήταν το αναμενόμενο και από τους διπλούς X και από τους συνηθισμένους X4. Όλα αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν ακόμα περισσότερο τη θεωρία ότι πρέπει να υπάρχουν κατάλοιπα εκτός της V3 που προσδίδουν την ικανότητα τροπισμού X4 χωρίς όμως να

υποβιβάζουν την ικανότητα χρήσης του συνυποδοχέα CCR5. Ωστόσο η απόκτηση της νέας λειτουργίας με δέσμευση στο CXCR4 μειώνει κάπως τη χρήση του CCR5.

Η μετάβαση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη υποδεικνύει ότι οι διπλοί R ιοί ίσως να αναπαριστούν πρόδρομες αλυσίδες των X4 τροπικών ιών που προκύπτουν αργότερα και μπορούν να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά το CXCR4 επιτυχώς. Οι απαραίτητες μεταλλάξεις στη V3 για να γίνει η αλλαγή της λειτουργίας είναι πολύ επιζήμιες στην ευκαμψία των αλυσίδων που χρησιμοποιούν το CCR5. Η αντίστροφη διαδικασία είναι αδύνατο να συμβεί (για να επιστρέψει η εκλεκτικότητα στην αρχική της R5 τροπική κατάσταση) επομένως το ενεργειακό φράγμα για αυτήν τη μετάλλαξη είναι υψηλό και το φαινόμενο συμβαίνει μόνο κάτω από πολύ αρνητική πίεση. Αντιθέτως οι μεταλλάξεις έξω από την περιοχή V3 είναι εύκολο να γίνουν, επιφέρουν κάποιο περιορισμένο X4 τροπισμό χωρίς να υποβιβάζουν τη χρήση του CCR5, δίνουν μερικές πιθανότητες στον ιό να μολύνει και κύτταρα που εκφράζουν το συνυποδοχέα CXCR4. Το παρακάτω σχήμα δείχνει όλους τους πιθανούς τροπισμούς και τις μεταλλάξεις που ξεκινάνε από τους R5 ιούς με την πορεία εξέλιξής τους .



Σχήμα II.13 : Μοντέλο εξέλιξης τροπισμού . Οι R5 τροπικοί ιοί αναπαριστώνται με λευκό χρώμα . Οι διπλοί-R αναπαριστώνται με ανοιχτό γκριζο και οι διπλοί-X και οι X4 ιοί αναπαριστώνται με σκούρο γκριζο .

ΠΑΝΩ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ : Μετάλλαξη της V3 ενός R5 για χρήση CXCR4 . Το προκύπτον προϊόν είναι X4 ή διπλό X αλλά με μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση και έλλειψη ευκαμψίας σε σχέση με τη μητρική αλυσίδα (υποδεικνυόμενο με το X) .

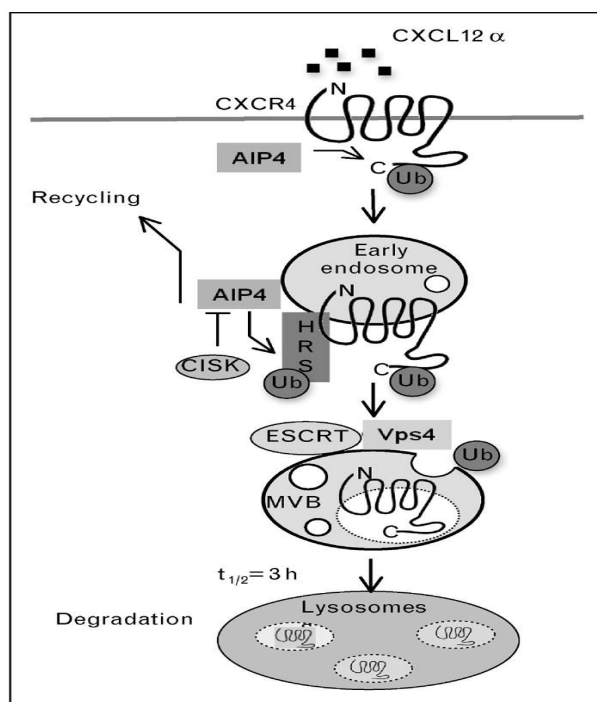
ΚΑΤΩ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ : Μετάλλαξη σε περιοχές της env έξω από τη V3. Η χρήση του CCR5 στο αρχικό στάδιο του διπλού-R είναι ίδια ή και μεγαλύτερη και σίγουρα δε μειώνεται , ενώ το προϊόν αποκτά και μια μειωμένη ικανότητα χρήσης του CXCR4 . Στο τελικό στάδιο , οι συμπληρωματικές μεταλλάξεις οδηγούν τελικά σε έναν ιό με στερική ευκαμψία ο οποίος αν και περιορίζει τον τροπισμό R5 , αυξάνει τον τροπισμό X4 και είναι το διπλό-X ή ο X4: ο διπλός R είναι λοιπόν ο πρόγονος του διπλού-X / X4. [Source : Huang , Eshleman et al. (2007)Journal of Virology Vol.81]

Οι ιοί που έχουν και τους δυο τροπισμούς αναφέρονται συντομευμένα ως R5X4. Όταν ένας ιός χρησιμοποιεί το CCR5 ως πιο αποτελεσματικό υποδοχέα καταχωρείται ως R5X4 αν χρησιμοποιεί το CXCR4 σε ποσοστό τουλάχιστον 10 % παραπάνω από το CCR5 ⁴⁵. Αυτό το όριο κατωφλίου είναι όμως αυθαίρετο και μπορεί να αλλάξει ανάλογα με τα εκάστοτε κριτήρια.

Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους οι χημειοκίνες μπλοκάρουν τους συνυποδοχείς δεν είναι ακόμα και σήμερα πλήρως κατανοητοί, το πιθανότερο μοντέλο προτείνει ότι δεσμεύονται σε κάποια περιοχή του υποδοχέα την οποία δεσμεύει εκλεκτικά η gp120. Πρόκειται λοιπόν για μια στερεοχημική παρεμπόδιση ⁴¹. Ωστόσο υπάρχει και άλλη μια ερμηνεία σύμφωνα με την οποία η χημειοκίνη δίνει στον υποδοχέα ένα σήμα ενσωμάτωσης στην κυτταρική μεμβράνη. Τα ενεργά κέντρα εξαφανίζονται από την κυτταρική επιφάνεια καθιστώντας τα κύτταρα αόρατα για αλληλεπίδραση με τον ιικό φάκελο.

Για να αποφευχθεί παρατεταμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων, τα σύμπλοκα των GPCR υφίστανται ενδοκύττωση και μετά είτε ανακυκλώνονται και επιστρέφουν στην πλασματική μεμβράνη ή ταξινομούνται σε αποικοδομητικά «μονοπάτια». Ένα σύστημα με χρήση ουβικουιτίνης είναι σημαντικό στο να ρυθμίζει αυτές τις διαδικασίες και περιλαμβάνει σύζευξη της ουβικουιτίνης σε πρωτεΐνες στόχους που προορίζονται για αποικοδόμηση, η οποία έχει ως μεσολαβητές μια

οικογένεια πρωτεϊνών που αποκαλούνται λιγκάσες ουβικουιτίνης E3. Ένα αρκετά χαρακτηριστικό παράδειγμα αγωνιστικά εξαρτώμενης αποικοδόμησης του CXCR4 είναι η AIP4 που ανήκει σε αυτήν την οικογένεια των λιγκασών E3. Η AIP4 συμμετέχει σε πολλά στάδια της διαδικασίας ταξινόμησης. Ο ουβικουινωμένος CXCR4 συγκεντρώνεται σε περιοχές με μόρια AIP4. Η AIP4 βοηθάει στη δημιουργία μεγάλων φυσαλίδων [MVB]. Η CISK που είναι η λεγόμενη κινάση «επιβίωσης» φωσφορυλιώνει και παρεμποδίζει τη δραστηριότητα της AIP4, συνεπώς και την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα. Αυτό ευνοεί τη διαδικασία ανακύκλωσης. Μια ρυθμιστική πρωτεΐνη η Vps4 καθορίζει τα επίπεδα ουβικουιτίνωσης των CXCR4 και MVB. Η ουβικουιτίνωση είναι απλά ένα ενδοκυτταρικό σήμα ενδομετατροπής των δυο μορφών και δεν είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση του CXCR4 μέσα στο κύτταρο. Το ακόλουθο διάγραμμα απεικονίζει την «κυκλοφορία» του CXCR4 μέσα στο ενδοσωμικό-λυσosomalικό σύστημα.



Σχήμα II.14 : Η χημειοκίνη CXCL12 ενεργοποιεί τον υποδοχέα CXCR4 μόλις δεσμευτεί. Στο εσωτερικό του κυττάρου η AIP4 (μέλος των λιγκασών E3)

ουβικουιτώνει το CXCR4 . Η CISK (Cytokine Independent Survival Kinase) παρεμποδίζει την περαιτέρω ενσωμάτωση του CXCR4 / Ub στο λυσοσωμικό εσωτερικό σύστημα και το προωθεί στην ανακύκλωση (πίσω στην επιφάνεια) . Το ESCRT [Endosomal Sorting Complex Requiring for Transport] είναι το σύμπλοκο που ευνοεί την εναλλακτική διαδικασία καταστροφής μεταφέροντας το αρχικό σύμπλοκο σε MVB [Multi-Vesicular Bodies] . Η μεγάλη φυσαλίδα με τη βοήθεια των λυσοσωμάτων αποικοδομεί τελείως το CXCR4 . Η ρυθμιστική πρωτεΐνη Vps4 είναι απολύτως απαραίτητη για την επιλογή της μιας από τις δυο πορείες . [Source : Alkhatib (2009) Current Opinion in HIV and AIDS Vol.4]

Η ανάπτυξη φαρμάκων για παρεμπόδιση των CXCR4 είναι πιο αργή σε σχέση με των CCR5⁴⁷. Μικρού μοριακού βάρους ουσίες που εγκρίθηκαν για δοκιμές σε ανθρώπους είναι το AMD3100 και το AMD11070. Μια σοβαρή παρενέργεια του AMD3100 ήταν μια υποτυπώδης λευκοκυττάρωση. Η έρευνα αποκάλυψε ότι η παρεμπόδιση του CXCR4 απελευθερώνει μυελώδη κύτταρα από το μυελό των οστών στο αίμα. Η μακροπρόθεσμη χρήση του AMD11070 σε ζώα αποκάλυψε σοβαρές βλάβες στην ηπατική λειτουργία και η ευρεία χρήση αυτών των ουσιών έχει ανασταλεί επ' αόριστον.

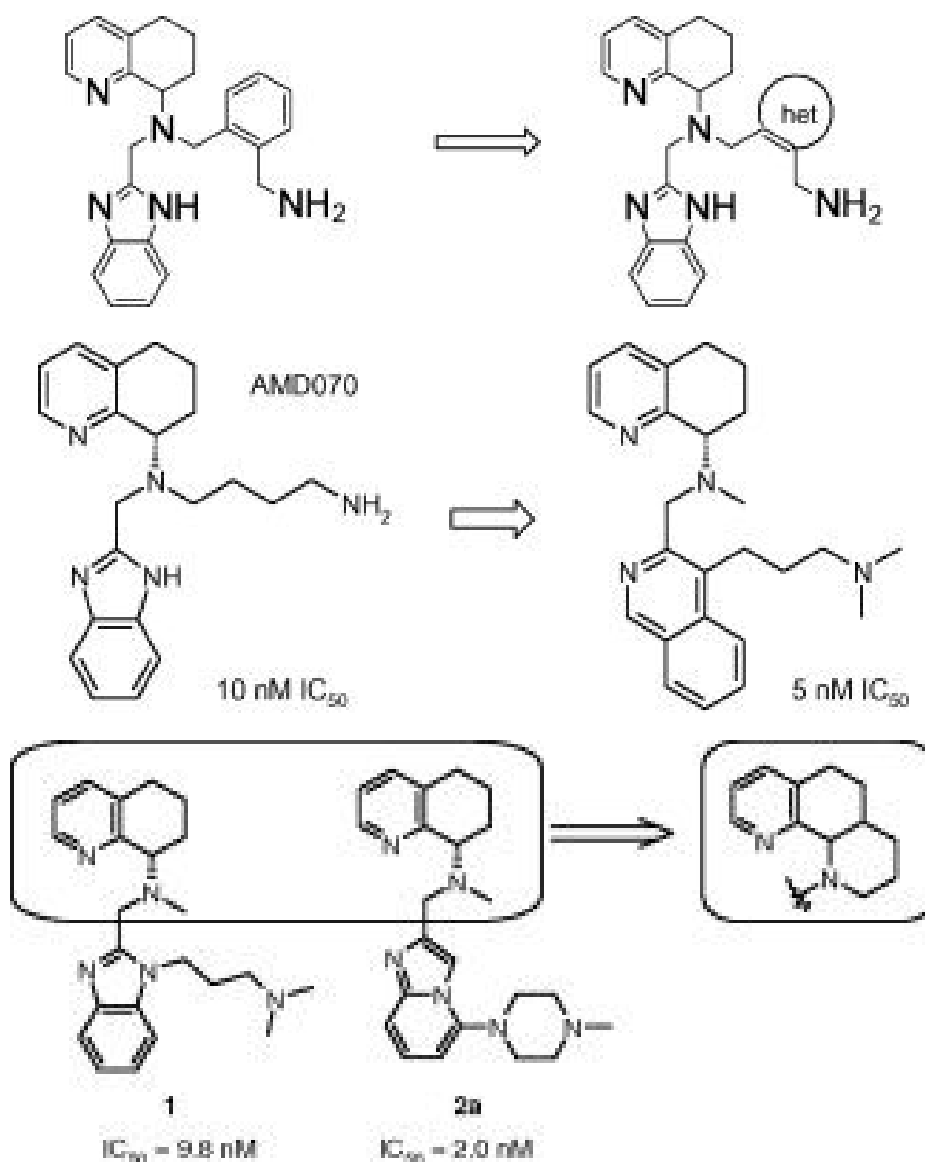
Η έκφραση του ενζύμου της 15-λιποξυγενάσης-1 επιδρά στην απόκριση των μονοκυττάρων⁴¹. Ο μηχανισμός επίδρασης του ενζύμου της 15-LOX-1 σε κύτταρα τα οποία μεταβάλλουν την έκφρασή τους για τους σημαντικούς υποδοχείς είναι υπό μελέτη. Τα επίπεδα έκφρασης των CD4 και CXCR4 μειώνονται. Αφού οι LOX είναι ένζυμα λιπιδικής υπεροξειδάσης, η ενζυμική τους δραστηριότητα αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση υπεροξειδίων. Αυτό ίσως να επάγει την έκφραση γονιδίων ευαίσθητων σε οξειδο-αναγωγές (redox). Ο κύκλος ενδοκυττάρωσης μπορεί εναλλακτικά να ευνοήσει την καταστροφή των υποδοχέων ή την ανακύκλωσή τους. Για παράδειγμα αν η LOX στο ενδοκυτταρικό σύστημα κατεργαστεί με οξειδωτικό αντιδραστήριο όπως H₂O₂ , τότε η έκφραση των CD4 / CXCR4 υποδοχέων μειώνεται αισθητά. Αντιθέτως αν η LOX κατεργαστεί με αναγωγικό αντιδραστήριο τότε η έκφραση του CXCR4 είναι η διπλάσια σε σχέση με τα αρχικά κύτταρα. Η ευκολία

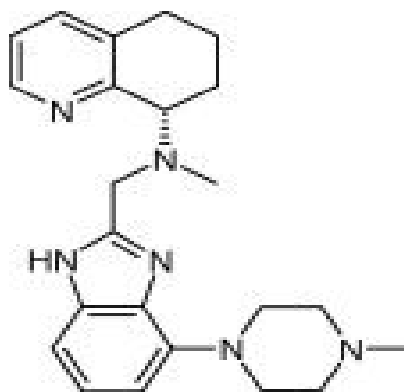
μόλυνσης των κυττάρων από HIV-1 μπορεί λοιπόν να ρυθμιστεί από το ένζυμο LOX το οποίο μπορεί να μειώσει την παρουσία του ενεργού κέντρου δέσμευσης CXCR4.

Πολλά από τα μόρια με ρόλους-κλειδιά στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι γλυκοπρωτεΐνες. Στην κυτταρική ανοσοαπόκριση πολλά είναι αυτά τα μόρια που συμμετέχουν στο πακετάρισμα, τον ποιοτικό έλεγχο και τη συγκέντρωση των αντιγόνων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (που αναφέρεται για συντομία ΜΣΙ) και το σύμπλοκο των T-κυττάρων. Αν και μερικά από τα γλυκοπεπτιδικά αντιγόνα παρουσιάζονται αυτούσια από το ΜΣΙ, πολλά πεπτιδικά αντιγόνα χρειάζονται ενζυματική αφαίρεση των σακχάρων πριν η πρωτεΐνη διασπαστεί. Οι γλυκάνες χρησιμεύουν κυρίως για προστασία των πεπτιδίων λόγω του ογκώδους μεγέθους τους. Οι ιοί με γλυκο-πρωτεϊνικό φάκελο όπως ο HIV μπορούν εύκολα να αποφύγουν την ανοσοαπόκριση γιατί εκμεταλλεύονται το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και τις αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης προστατεύοντας πιθανούς πρωτεϊνικούς αντιγονικούς επιτόπους ⁶⁰. Επιπλέον τέτοιοι ιοί μπορούν να χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς γλυκοζυλίωσης του ξενιστή για να συσπειρώσουν ή να συγκεντρώσουν τις δικές τους ογκώδεις γλυκο-πρωτεΐνες που απαρτίζουν το περίβλημά τους. Μια πιθανή αντι-ρετροϊκή προσέγγιση είναι η χρήση παρεμποδιστών γλυκοζυλίωσης για να σταματήσουν το σχηματισμό γλυκοπρωτεϊνών για τους ιούς. Τα CD4+ T-κύτταρα αναγνωρίζουν το ΜΣΙ τύπου II. Τα CD4+ διατηρούν την ικανότητα τους για αναγνώριση γλυκο-πεπτιδίων ακόμα και αν υπάρχει ένας ή και δυο σακχαρικοί υποκαταστάτες. Σε περίπτωση ύπαρξης πιο πολύπλοκων γλυκανών υπάρχει μια μικρή πιθανότητα αναγνώρισης σε ΜΣΙ τύπου II από τα T-κύτταρα.

Οι μεταλλάξεις της V3 με απώτερο φαρμακευτικό σκοπό δεν είναι απαραίτητο να περιοριστούν στις θέσεις 11, 24, 25. Υποκαταστάσεις στις θέσεις 6 έως 8 σε αυτήν την περιοχή οδηγούν σε απώλεια μιας πιθανής θέσης για N-σύνδετη

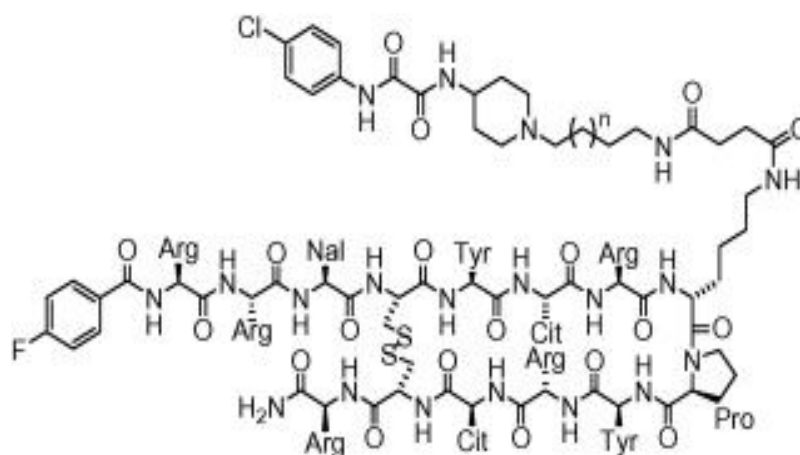
γλυκοζυλίωση και μειώνουν τη χρήση του CXCR4 από ιικές αλυσίδες⁶¹. Μεγάλες ετεροκυκλικές ενώσεις έχουν δοκιμαστεί κλινικά σε ζώα ως ανταγωνιστές CXCR4 και δείχνουν σημαντικές φαρμακοκινητικές ικανότητες⁶²⁻⁶⁵. Μερικές από αυτές τις ετεροκυκλικές ενώσεις παριστάνονται στο σχήμα που ακολουθεί. Οι τεχνικές σύνθεσης μπορούν να είναι μετατροπή αρωματικού δακτυλίου σε ετεροκυκλικό⁶², ισομερείωση με μετατόπιση ανθρακικής αλυσίδας⁶³, προσθήκη τρίτου δακτυλίου σε δικυκλικά εναντιομερή⁶⁴ και αμινο-υποκατάσταση σε κινολαμίνες⁶⁵. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει αυτές τις διαδικασίες και τα προϊόντα τους.





Σχήμα II.15 : Σύνθεση ετεροκυκλικών ανταγωνιστών για τον υποδοχέα CXCR4 . Από πάνω προς τα κάτω οι διαδικασίες είναι μετατροπή , ισομερείωση , ανοικοδόμηση με προσθήκη 3^ο δακτυλίου και υποκατάσταση .

Τα μικρά μόρια-μιμητές του μορίου CD4 μπλοκάρουν τη δέσμευση gp120-CD4 και αλλάζουν τη διάταξη της gp120 . Οι ανταγωνιστές των CXCR4 είναι ακόμα πιο αποτελεσματικοί όταν αξιοποιούνται συνδεδεμένοι με βιομιμητικά τμήματα CD4 φτιάχνοντας υβριδικά μόρια ⁶⁶. Το ακόλουθο σχήμα δείχνει ένα τέτοιο υβρίδιο



Σχήμα II.16 : Υβριδικό μόριο ανταγωνιστή CXCR4 και βιομιμητικού μορίου CD4 .

Ο υποδοχέας CXCR4 δεν είναι καθοριστικός παράγοντας μόνο για τη μόλυνση από HIV αλλά και από άλλες σοβαρές ασθένειες. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του

συνυποδοχέα αυτού συνδέονται με μετάσταση του καρκίνου στους λεμφαδένες ⁶⁷, ενώ πειράματα με ανταγωνιστές του CXCR4 σε ποντίκια είναι απόδειξη πως μια τέτοια αγωγή μπορεί να μειώσει τόσο τη μετάσταση όσο και την ανάπτυξη του πρωταρχικού όγκου του καρκίνου του μαστού ⁶⁸. Η έκφραση του CXCR4 είναι επίσης συνηθισμένη σε κρούσματα καρκίνου του θυρεοειδούς και ίσως συμμετέχει στη μετατροπή του όγκου από καλοήγη σε κακοήγη ⁶⁹. Ο CXCR4 εκφράζεται αισθητά σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα ⁷⁰. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεγάλα επίπεδα παρουσίας του μορίου σε αντίθεση με τα υγιή, επομένως πρόκειται για ένα ανεξάρτητο κριτήριο πρόγνωσης για την αρρώστια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ :
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ : ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

1) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ Η/Μ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΥΛΗΣ

Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που συνιστά το φως μπορεί να αλληλεπιδρά με τα χημικά και βιολογικά μόρια με πολλούς τρόπους. Το φως μπορεί να διεγείρει τα μόρια σε ανώτερες ενεργειακές καταστάσεις και κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης να παραχθούν φωτόνια χαμηλότερης ωστόσο ενέργειας. Εκτός από απορρόφηση, η ακτινοβολία μπορεί απλά να διασκορπιστεί αφού προσπέσει στα υλικά μόρια, δημιουργώντας φαινόμενα σκέδασης. Για να συμβεί σκέδαση όμως πρέπει να υπάρχουν τοπικές ανομοιογένειες ως προς τις οπτικές ιδιότητες μιας υγρής ουσίας ή ενός διαλύματος. Τα ηλεκτρόνια που έχουν τα μόρια συντονίζονται με το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός και οι αλλαγές στην ενεργειακή τους κατάσταση έχουν ως αποτέλεσμα την απορρόφηση ή τη σκέδαση.

Η σκέδαση δίνει πληροφορίες για τη δομή των μορίων, ενώ η απορρόφηση φανερώνει τις πιθανές ενεργειακές τους καταστάσεις (δονητικές, περιστροφικές κτλ.). Το μεγαλύτερο μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με αρχική κυκλική συχνότητα ω_i σκεδάζεται και εξέρχεται ανέπαφο, συνεπώς η τελική κυκλική συχνότητα του εξερχόμενου φωτός ω_f είναι ακριβώς ίση με την αρχική, δηλαδή $\omega_i = \omega_f$. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σκέδαση Rayleigh κατά την οποία η εξερχόμενη ακτινοβολία έχει την ίδια ενέργεια με την εισερχόμενη⁷¹. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι ανάλογη προς το τετράγωνο της πολωσιμότητας των μορίων. Είναι φανερό πως οι ιδιότητες του διαλύματος όπως θερμοκρασία, δείκτης διάθλασης διαλύτη και διαφορές στην πολωσιμότητα διαλύτη και διαλυμένης ουσίας επηρεάζουν σημαντικά το φαινόμενο. Οι διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς σχετίζονται με το δείκτη διάθλασης. Οι διαταραχές αυτές του ϵ προκαλούνται από

διακυμάνσεις στην πίεση και τη συγκέντρωση. Ουσιαστικά η πυκνότητα του διαλύματος και οι αλληλεπιδράσεις των μορίων της διαλυμένης ουσίας (ακόμα και σε πολύ αραιά διαλύματα) καθορίζουν την έκταση της σκέδασης .

Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που θα επάγει τις αλλαγές στα ηλεκτρικά δίπολα των μορίων πρέπει οπωσδήποτε να είναι μονοχρωματικό, επίπεδα πολωμένο και ομοιόμορφο (δηλαδή σταθερής έντασης). Τα μήκη κύματος για εισερχόμενη και σκεδαζόμενη ακτινοβολία αντιπροσωπεύονται από τα κυματάνυσματα k_i και k_s αντίστοιχα. Το κυματάνυσμα σκέδασης q είναι η διαφορά ανάμεσα στα k_i και k_s . Επειδή όμως το μήκος κύματος αλλάζει ελάχιστα ενώ το μόνο που αλλάζει ουσιαστικά είναι η διεύθυνση , η διανυσματική διαφορά δίνει τελικά την εξίσωση :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$

Το q λοιπόν εξαρτάται από το μήκος κύματος λ αντιστρόφως ανάλογα, ενώ είναι ανάλογο με το δείκτη διάθλασης n του μέσου διάδοσης και το ημίτονο της γωνίας σκέδασης θ . Επειδή η ένταση της σκεδαζόμενης μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου με μικρές διακυμάνσεις από δευτερόλεπτο σε δευτερόλεπτο, αυτό που υπολογίζεται ως ένταση είναι ένας μέσος όρος στο φάσμα του χρόνου για τα μόρια της διαλυμένης ουσίας. Η I_s υπολογίζεται από την εξής σχέση

$$I_s = \frac{\pi^2 V^2 I_o}{\lambda^4 R^2 N} \langle (\delta\varepsilon)^2 \rangle \quad (2)$$

Το πηλίκο $\frac{V}{N}$ (όπου V ο συνολικός όγκος και N όλα τα μόρια διαλυμένης ουσίας) είναι ο στοιχειώδης όγκος κάθε μορίου, I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας R η απόσταση από το κέντρο του όγκου σκέδασης και το $\langle(\delta\varepsilon)^2\rangle$ είναι η μέση τιμή του τετραγώνου των μεταβολών της ηλεκτρικής πολωσιμότητας. Οι στιγμιαίες διακυμάνσεις της σκεδαζόμενης έντασης φωτός είναι υπολογισμός της ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS = Dynamic Light Scattering). Όταν όμως υπολογιστεί η μέση τιμή της σκεδαζόμενης έντασης τότε η τεχνική που απαιτείται είναι η ΣΤΑΤΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (SLS = Static Light Scattering). Η DLS είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό των διαστάσεων του μορίου ενώ οι χρήσιμες πληροφορίες που εξάγει η SLS είναι τα μοριακά βάρη, οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις κτλ. Η απόλυτη ένταση του φωτός είναι δύσκολο να μετρηθεί και για αυτό υπολογίζεται ο λόγος Rayleigh που συμβολίζεται ως R_θ και δίνεται από την εξίσωση

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_o V} R^2 \quad (3)$$

R είναι η απόσταση παρατηρητή και σκεδαστή σε γωνία θ και V ο όγκος σκέδασης. Για τη φασματοσκοπική μελέτη ενός μακρομορίου (όπως ένα πολυμερές ή μια πρωτεΐνη) υπάρχουν κάποιες συμβάσεις απαραίτητες για την απλοποίηση των υπολογισμών⁷² I) Έλλειψη ισχυρών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων δηλαδή πολύ αραιά διαλύματα II) Μακρινές αποστάσεις ανάμεσα στα μόρια ώστε η σκέδαση του κάθε μορίου μπορεί να μελετηθεί ανεξάρτητα από το γειτονικό του. III) Μικρή σκέδαση από κάθε μόριο εν συγκρίσει με την αρχική IV) Η συνεισφορά της απορρόφησης και της μη ελαστικής σκέδασης (όπως π.χ. φαινόμενα Raman στα

οποία διεγείρονται ή αποδιεγείρονται δονητικο-περιστροφικές καταστάσεις) πρέπει να είναι πολύ μικρή για να θεωρείται αμελητέα. Τα 2 αυτά ανεπιθύμητα φαινόμενα αντιμετωπίζονται με την απόρριψη των αντίστοιχων ακτινοβολιών με φίλτρο.

2) ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΩΤΟΝΙΩΝ

Η ανάλυση των εισερχόμενων φωτονίων από τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία του laser είναι πολύπλοκη διαδικασία. Ωστόσο με τη χρήση της κατάλληλης τεχνολογίας οι διακυμάνσεις στην ένταση μπορούν να υπολογιστούν εύκολα και αξιόπιστα σε ελάχιστο χρόνο. Η ανιχνευτική διάταξη περιλαμβάνει δυο τμήματα, τον αναλυτή και το συσχετιστή⁷³. Τα μονοφωτονικά σήματα είναι αρκετά ασθενή και για αυτόν το λόγο ενισχύονται με μια σειρά «φωτοπολλαπλασιασμών» στην οποία κάθε φωτόνιο προκαλεί την παραγωγή πάρα πολλών φωτοηλεκτρονίων (από 10^5 έως 10^7). Το ανάλογο αυτό σήμα για κάθε φωτόνιο είναι και αυτό που τελικά φτάνει στον αναλυτή. Το μηχάνημα μετατρέπει το ανάλογο σήμα με τη βοήθεια του μαθηματικού μετασχηματισμού Fourier. Ο correlator συσχετίζει συνεχώς τα αποθηκευμένα σήματα της προηγούμενης του μέτρησης με τα καινούρια εισερχόμενα σήματα φωτονίων που προέρχονται από το δείγμα κάθε χρονική στιγμή. Η συνάρτηση συσχέτισης είναι

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)J(\tau + t)dt \quad (4)$$

$I(t)$ και $J(\tau+t)$ δυο διαφορετικά σήματα που έχουν ως μεταβλητή το χρόνο t . Η σταθερά τ είναι το χρονικό διάστημα καθυστέρησης μέχρι τη λήψη του δεύτερου σήματος J . Αν το σήμα J είναι διαφορετικό από το αρχικό I τότε η συνάρτηση ονομάζεται cross-correlation δηλαδή σταυρωτή συσχέτιση. Όταν όμως το J είναι το ίδιο σήμα με το I , όπως συμβαίνει και στην αποκωδικοποίηση των πειραμάτων

σκέδασης, η συνάρτηση G είναι μια self-correlation (αυτοσυσχέτιση) . Ο καινούριος παλμός που εισέρχεται στη συσκευή αναγκάζει τον τελευταίο εισερχόμενο από την προηγούμενη περίοδο δειγματοληψίας να μετατοπιστεί. Την επόμενη χρονική στιγμή ο άρτια εισερχόμενος παλμός θα μετατοπιστεί και αυτός για να δώσει τη θέση του στο νέο παλμό που συλλέχθηκε. Οι πληροφορίες όμως των παλιών παλμών δε χάνονται ποτέ, αντιθέτως συσχετίζονται και γίνονται αντικείμενο επεξεργασίας. Ο καταγραφέας που λαμβάνει τις πληροφορίες έχει πολλά κανάλια «μνήμης» τα οποία συσχετίζουν τους παλμούς, πολλαπλασιάζοντάς τους ανάλογα με το πόσο αργά εισήχθη ο ένας σε σχέση με τον άλλον. Το Κανάλι 1 βρίσκει γινόμενα παλμών τα οποία έχουν διαφορά μιας σταθεράς τ , το Κανάλι 2 υπολογίζει γινόμενα παλμών που απέχουν χρονικά δυο περιόδους τ , το Κανάλι 3 συσχετίζει παλμούς που έχουν επιβράδυνση τρία διαστήματα τ κ.ο.κ. Οι παρακάτω εξισώσεις υποδεικνύουν τις συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης G για το κανάλι 1 , το κανάλι 2 και οποιοδήποτε κανάλι k του συσχετιστή : n_i είναι ο νεοεισερχόμενος παλμός και \tilde{n}_i ο παλιός παλμός που έχει ήδη αποθηκευτεί .

$$G(\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_1 + n_1\tilde{n}_2 + n_2\tilde{n}_3 + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+1} \quad (5)$$

$$G(2\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_2 + n_1\tilde{n}_3 + n_2\tilde{n}_4 + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+2} \quad (6)$$

$$G(k\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_k + n_1\tilde{n}_{k+1} + n_2\tilde{n}_{k+2} + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+k} \quad (7)$$

Όσο πιο πολλά είναι τα κανάλια μνήμης, σε τόσο πιο συχνά διαστήματα γίνονται οι δειγματοληψίες και όσο περισσότερους παλμούς μπορεί να αποθηκεύει η διάταξη, τόσο πιο ευνοϊκές θεωρούνται οι συνθήκες του πειράματος. Αν υπάρχει ένας μεγάλος χρόνος δειγματοληψίας τα κανάλια μπορούν να είναι πολλά και δε χάνεται κανένα

από τα σήματα καθώς όλοι οι παλμοί αναλύονται και συσχετίζονται. Μικρότερος χρόνος δειγματοληψίας οδηγεί σε απώλεια δεδομένων καθώς το μηχάνημα δεν προλαβαίνει να χάσει την παλιά του μνήμη πριν κάνει το συσχετισμό αφού εισέρχονται διαρκώς νέα δεδομένα, πριν ολοκληρωθεί ο κύκλος των υπολογισμών και των καταγραφών μνήμης. Ωστόσο ο μεγάλος χρόνος δειγματοληψίας δεν αποτελεί πάντοτε άριστη συνθήκη αφού μέχρι να ολοκληρωθεί ο κύκλος πρόσθεσης δεδομένων, πολλαπλασιασμού παλμών και καταγραφής μνήμης το πείραμα μπορεί να παραταθεί έως και μια ώρα. Σε τόσο μεγάλο διάστημα το δείγμα μπορεί να έχει αλλοιωθεί σημαντικά. Είναι φανερό πως πρέπει να επιτευχθεί μια «χρυσή τομή» ανάμεσα στην εγκυρότητα των αποτελεσμάτων και τη χρονική διάρκεια.

Οι ανεπιθύμητες συνεισφορές από φαινόμενα όπως η ανελαστική σκέδαση αντιμετωπίζονται με ένα προκαθορισμένο όριο φωτονίων. Ο ανιχνευτής είναι ρυθμισμένος με ένα ελάχιστο όριο «αποκοπής» κάτω από το οποίο δε λαμβάνει τα λίγα αυτά φωτόνια υπόψη και τα καταχωρεί ως 0. Οι χρόνοι δειγματοληψίας είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ποιότητα του μηχανήματος. Ωστόσο οι αρνητικές παράμετροι ενός πειράματος είναι εξίσου σημαντικοί και δεν πρέπει ποτέ να αγνοούνται. Η καθαρότητα ενός δείγματος και η απαλλαγή του από προσμείξεις ή σκόνη ρυθμίζεται με συνηθισμένες αναλυτικές μεθόδους (απόσταξη, διήθηση, υπερφυγοκέντρηση).

Ο θόρυβος που αλλοιώνει το σήμα προέρχεται από πολλούς παράγοντες. Η ένταση του laser παρουσιάζει διακυμάνσεις και επίσης η ακτινοβολία εξαιτίας τοπικών ταλαντώσεων δημιουργεί εκλάμψεις ή και ανακλάσεις. Η συνεισφορά από μόρια του διαλύτη ή και από ουσίες που λειτουργούν σαν συνδιαλύτες είναι πολλές φορές σημαντική. Φυσικά υπάρχουν και άλλα συστηματικά σφάλματα από πειραματικούς παράγοντες όπως φυσαλλίδες αέρα μέσα στο υγρό, βρόμικες

κυψελίδες ή και με φθορές & ρωγμές, κομματάκια γυαλί μέσα στο δείγμα κτλ. Κάποια από αυτά τα σφάλματα εξαλείφονται με τους κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς, για παράδειγμα τη δημιουργία ενός κατάλληλου baseline.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

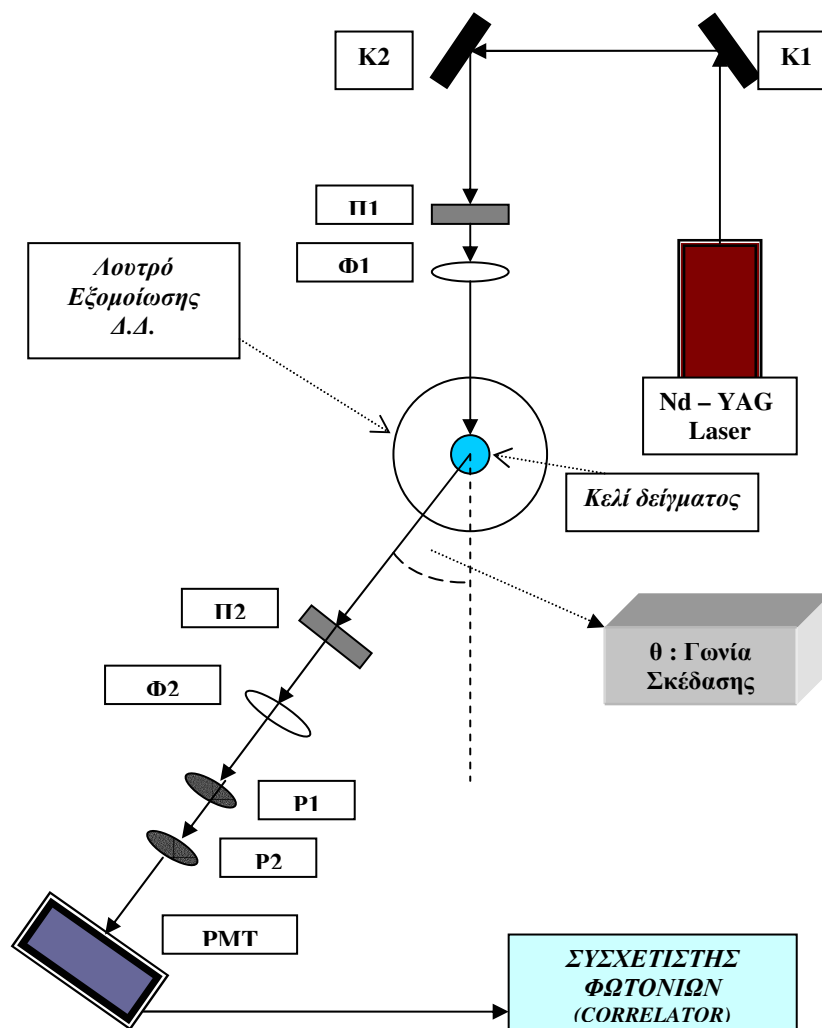
1) ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Οι πειραματικές διατάξεις μπορούν να διεξάγουν μετρήσεις τόσο ελαστικής όσο και ανελαστικής σκέδασης. Τα βασικά τμήματα της τεχνικής είναι το laser (δηλαδή η πηγή του φωτός), η οπτική είσοδος, το δοχείο εξομάλυνσης του δείκτη διάθλασης, το κελί στο οποίο είναι αποθηκευμένο το δείγμα, η οπτική διέξοδος και ο ανιχνευτής. Η οπτική διέξοδος και ο ανιχνευτής σχηματίζουν τη γωνία σκέδασης θ σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η γωνία θ ρυθμίζεται με το γωνιόμετρο. Τα laser (πηγές φωτός) μπορούν να είναι είτε Ar, είτε He/Ne, είτε Kr.

Η οπτική είσοδος έχει το ρόλο του ρυθμιστή αφού εμποδίζει οποιαδήποτε μη ευθύγραμμη συνιστώσα να εισέλθει στο δείγμα. Η εστίαση είναι απαραίτητη γιατί πρέπει η μέγιστη ποσότητα έντασης να συγκεντρωθεί σε μια μικρή είσοδο. Το λουτρό εξομείωσης δείκτη διάθλασης πρέπει να βρίσκεται αρκετά κοντά στο φακό εστίασης έτσι ώστε να μη χαθεί ποσοστό της ακτινοβολίας. Δεν πρέπει όμως να έχουμε υπερβολικά μικρό εστιακό μήκος γιατί τότε το δείγμα δε θα μπορεί να περιστραφεί και να έχουμε αξιόπιστες μετρήσεις σε μεγάλες γωνίες σκέδασης θ .

Μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους του πειράματος είναι το λουτρό εξίσωσης δ.δ. (index matching bath). Ο δείκτης διάθλασης του διαλύματος δεν πρέπει να έχει μεγάλη διαφορά από το δ.δ. του γυαλιού που περικλείει το δείγμα για να μην υπάρξουν αποκλίσεις της δέσμης φωτός. Η οπτική διέξοδος αμέσως μετά το κελί του δείγματος είναι μια σειρά από φακούς και οπές οι οποίες ρυθμίζονται

ανάλογα με τις συνθήκες και διαφοροποιούν τον όγκο σκέδασης. Μικρές γωνίες σκέδασης έχουν ως αποτέλεσμα ισχυρά φωτονικά σήματα αφού οι διακυμάνσεις της πολωσιμότητας ϵ είναι μεγάλες για κοντινές αποστάσεις. Μεγάλες γωνίες σκέδασης όμως έχουν το πλεονέκτημα ισχυρής σκεδαζόμενης έντασης. Είναι φανερό ότι σε μέτριες γωνίες σκέδασης (40-90) υπάρχουν όλες οι ζητούμενες πληροφορίες με ικανοποιητική εγκυρότητα. Ο ανιχνευτής περιέχει το φωτοπολλαπλασιαστή ο οποίος με τη λεγόμενη αλυσίδα δυνόδου ενισχύει το ασθενές μονοφωτονικό σήμα με την παραγωγή πολλών φωτοηλεκτρονίων, μετατρέποντάς το σε μια καταγράψιμη και αξιοποιήσιμη πληροφορία. Τα καταμετρημένα ηλεκτρόνια γίνονται παλμοί χρονικής διάρκειας ανάλογης με τις προδιαγραφές του πειράματος. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει την πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτής της διατριβής και η πηγή του φωτός είναι ένα laser Nd – YAG ^{74 – 79}.



Σχήμα III.1

Διαγραμματική αναπαράσταση του laser που χρησιμοποιείται για τα πειράματα . PMT είναι ο Φωτοπολλαπλασιαστής (Photomultiplier) . Π1 και Π2 οι πολωτές εισόδου και εξόδου αντίστοιχα , Φ1 και Φ2 οι φακοί εστίασης εισερχόμενης και εξερχόμενης ακτινοβολίας αντίστοιχα , K1 και K2 δυο κάτοπτρα , ενώ τα P1 & P2 είναι οι οπές (pinholes) 1 και 2 .

Οι οπές (Pinholes) 1 και 2 αμέσως πριν το φωτοπολλαπλασιαστή είναι σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του όγκου σκέδασης αφού το μέγεθός τους είναι αυξομειούμενο και μπορεί να ρυθμιστεί. Οι πολωτές Π1 και Π2 πριν και μετά το κελί του δείγματος χρησιμεύουν για να διαφοροποιηθεί η διεύθυνση πόλωσης της ακτινοβολίας. Τα πειράματα σκέδασης μπορούν να

χωριστούν σε δυο κατηγορίες : πόλωση VV και πόλωση VH. Στις συνθήκες VV τόσο η προσπίπτουσα όσο και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι κάθετα πολωμένες στο επίπεδο σκέδασης (Vertical – Vertical) , ενώ σε συνθήκες VH η προσπίπτουσα είναι κάθετα πολωμένη αλλά η εξερχόμενη είναι επίπεδα πολωμένη προς το επίπεδο σκέδασης (Vertical – Horizontal).

Η κανονικοποιημένη μορφή της συνάρτησης G συμβολίζεται με $g(q,t)$ δηλαδή εξαρτάται τόσο από το χρόνο , όσο και από τις πειραματικές συνθήκες (γωνία σκέδασης, δείκτη διάθλασης, μήκος κύματος). Η g δίνεται από την παρακάτω σχέση

$$g^{(2)}(q,t) = 1 + f^* \left| \alpha g^{(1)}(q,t) \right|^2 \quad (8)$$

Η $g^{(1)}$ που υπολογίζεται στη μέση τιμή εξαρτάται από τη συνάρτηση $g(q,0)$ δηλαδή την τιμή της συνάρτησης σε χρονική στιγμή $t = 0$. Η σταθερά α λαμβάνει τιμές από 10^{-3} έως 10^{-4} συνήθως και είναι το ποσοστό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με την αρχική ένταση δηλαδή 1 τοις χιλίοις ή και λιγότερο. Η σταθερά f^* είναι η πειραματική σταθερά του οργάνου και εξαρτάται ανάλογα από τον όγκο σκέδασης . Αν ο όγκος σκέδασης είναι μεγάλος, τότε κάποια φωτόνια θα διανύσουν μεγαλύτερες διαδρομές και θα φτάσουν στο PMT με αρκετή χρονική καθυστέρηση. Για να είναι όμως έγκυρα τα δεδομένα, ορίζεται μια επιφάνεια συνοχής, εκτός ορίων της οποίας αν ένα φωτόνιο προσπέσει θα έχει σημαντική διαφορά φάσης και επομένως θα απορριφθεί. Αν συμβολίσουμε με R την απόσταση από τον ανιχνευτή και με α την ακτίνα του λεγόμενου όγκου σκέδασης, τότε η εξίσωση από την οποία εξάγεται η επιφάνεια συνοχής $A_{\text{coherence}}$ είναι

$$A_{\text{coh}} = \frac{\lambda^2 R^2}{\pi \alpha^2} \quad (9)$$

Η σχέση αυτή δηλώνει ότι η περιοχή συνοχής εξαρτάται και από το μήκος κύματος.

Η μαθηματική επεξεργασία που είναι απαραίτητη για την ανάλυση αυτών των πειραματικών δεδομένων είναι το μοντέλο του Αντίστροφου Μετασχηματισμού Laplace (**I**nverse **L**aplace **T**ransform). Η κάθε διαδικασία χαλάρωσης ενός μεγάλου μορίου στο διάλυμα εξαιτίας της κίνησής του παριστάνεται με μια φθίνουσα εκθετική συνάρτηση. Παρά το γεγονός ότι οι υπολογισμοί περιλαμβάνουν μόνο διαδικασίες μεταφορικής διάχυσης και όχι περιστροφικής (η περιστροφή ενός μακρομορίου θεωρείται υπερβολικά αργή αφού ο συντελεστής περιστροφικής διάχυσης D_{rot} είναι τουλάχιστον 6 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D_{trans} , συνεπώς η περιστροφή θεωρείται αμελητέα συνεισφορά), η μεταφορική διάχυση μπορεί να αποτελείται από δυο ή και περισσότερες ετεροχρονισμένες διαδικασίες. Για αυτό το λόγο, το μαθηματικό μοντέλο ILT χρησιμοποιείται για να εξάγει πληροφορίες για κάθε εκθετική συνάρτηση που συμμετέχει. Η εξίσωση που περιγράφει το μετασχηματισμό είναι

$$ag^{(1)}(q,t) = \int_{-\infty}^{+\infty} L(\ln \tau) * \exp[-t/\tau(q)] * d(\ln \tau) \quad (10)$$

Το φάσμα δεν περιλαμβάνει απλώς τους χρόνους τ , αλλά ορίζει μια λογαριθμική κλίμακα έτσι οι χρόνοι που υπολογίζονται ανήκουν σε πολλές τάξεις μεγέθους (από ελάχιστα μs έως αρκετά ms) επιτρέποντας και τον πιο ευρύ συσχετισμό διακυμάνσεων της έντασης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

2. ΠΕΠΤΙΔΙΑ

ΠΕΠΤΙΔΙΑ V3, CCR5 ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΙΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Τα πεπτίδια

Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂ και

Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂

αγοράστηκαν από την GenScript Corporation, USA.

Τα πεπτίδια

Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ και

Ac-EALAK-EAQAK-EALAK-NH₂

αγοράστηκαν από την EZBiolab, Inc. USA.

Τα πεπτίδια V3 και CCR5 ήταν ευγενική προσφορά του καθηγ. Η. Κραμποβίτη από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Οι λεπτομέρειες της αμινοξικής ακολουθίας φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Αμινοξικές αλληλουχίες συνθετικών V3 πεπτιδίων από διαφορετικά ιικά στελέχη

Ιικό στέλεχος	Αμινοξική αλληλουχία														
LAI	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	Q	R	A	F	Y
MN	•	•	R	•	H	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF2	•	•	S	•	N	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF128	•	•	S	•	Y	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF162	•	•	S	•	T	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•

Μεταβολές στον αριθμό και στη θέση των βασικών αμινοξέων στην αμινοξική αλληλουχία του V3_{LAI} πεπτιδίου

Ιικό στέλεχος	Αμινοξική αλληλουχία														
LAI +5	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	Q	R	A	F	Y
LAI +1	V	G	•	•	L	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•
LAI +9	•	•	•	•	•	R	•	•	R	•	K	R	•	K	•

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV :
**ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΚΗ
ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ : ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

1) ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Η τεχνική της DLS είναι εξαιρετικά χρήσιμη στον καθορισμό του μεγέθους και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h ενός μακρομορίου⁸⁰⁻⁸². Η R_h θεωρεί ότι το μόριο είναι παγιδευμένο σε μια σφαιρική φυσαλίδα από μόρια νερού (ή του εκάστοτε διαλύτη) τα οποία περιβάλλουν τη διαλυμένη ουσία και σχηματίζουν το λεγόμενο blob. Η φυσαλίδα αυτή κινείται μέσα στο διάλυμα και (λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη μεταφορική διάχυση) εξάγεται ο συντελεστής διάχυσης D που είναι ένα μέτρο της ταχύτητας του μορίου μέσα στο διάλυμα και είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την υδροδυναμική ακτίνα, αφού όσο πιο ογκώδες το μόριο τόσο πιο αργό είναι μέσα στο διάλυμα.

Ο υπολογισμός της R_h είναι ιδιαίτερα χρήσιμος σε βιολογικά συστήματα, όπως το σχηματισμό συμπλόκων του D.N.A. με κατιονικές μακρομοριακές ενώσεις όπως η χιτοσάνη⁸⁰. Για να υπάρξει αποτελεσματική συμπλοκοποίηση ανάμεσα στις δυο ουσίες υπάρχουν σημαντικές παράμετροι που πρέπει να μελετηθούν, όπως η επίδραση του pH και του ιζώδους. Οι μετρήσεις στις R_h θέτουν ένα ιδανικό όριο για τα σύμπλοκα της τάξεως 190 – 250 nm. Όσο μεγαλύτερο το pH, τόσο περισσότερη η ποσότητα της χιτοσάνης που απαιτείται για την αποδοτική αλληλεπίδραση με το D.N.A., ενώ το ιζώδες πρέπει να έχει μέσες έως υψηλές τιμές. Επίσης, όσο αυξανόταν το μοριακό βάρος, οι διαστάσεις των συμπλόκων όπως διαφαίνονται από τις R_h αύξαναν.

Η μυκητιακή φυτάση A (phyA) έχει δυο μορφές, τη διπλωμένη και την ανοιχτή. Η μελέτη για την εναλλαγή των δυο μορφών μπορεί να γίνει με DLS για να καθοριστούν οι συνθήκες που την επηρεάζουν⁸¹. Η ενεργή συσπειρωμένη μορφή έχει R_h 4 nm ενώ η ανενεργή ξεδιπλωμένη μορφή έχει R_h 14 nm. Η ξεδιπλωμένη μορφή μπορεί να επανέλθει αυτόνομα στην αρχική της κατάσταση σε θερμοκρασίες από 25

έως 37 °C αλλά πάνω από αυτό το όριο η αποδιάταξη είναι μη αναστρέψιμη. Οι δισουλφιδικές γέφυρες που αναπτύσσονται ανάλογα με το χημικό περιβάλλον είναι επίσης κρίσιμες για το ποια μορφή θα επικρατήσει. Η DLS αποδεικνύει ότι για να γίνει αναδίπλωση και επαναφορά στην ενεργή μορφή οι δισουλφιδικές γέφυρες πρέπει να ευνοούνται.

Οι διαστάσεις που μπορεί να μετρήσει η τεχνική εξάγουν και μια χρήσιμη αναλογία, το λόγο «μήκος προς διάμετρο» όπου λαμβάνεται υπόψη και το συνολικό μήκος της αλυσίδας⁸². Οι νανοσωλήνες με πολλά τοιχώματα (Multi-Walled Nano-Tubes) παράγονται με καταλυτικές αντιδράσεις. Οι διαστάσεις των τοιχωμάτων των MWNT καθώς και η συμπεριφορά των αιωρημάτων τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις μελετώνται με DLS.

Οι αλλαγές στις διαστάσεις των διαλυμένων ουσιών με την πάροδο του χρόνου είναι πληροφορίες που μπορούν να αξιοποιηθούν για την καταγραφή της κινητικής μιας αντίδρασης ή ενός φαινομένου^{83, 84}. Ένα οδοντικό συστατικό για παράδειγμα έχει σωματίδια σε σχήμα δίσκου τα οποία πολυμερίζονται⁸³. Τα μόρια κατά τη διάρκεια της αντίδρασης κινούνται και η διάχυσή τους παρακολουθείται χρονικά από την τεχνική DLS. Η κινητική της αντίδρασης πολυμερισμού είναι έντονη το πρώτο χρονικό διάστημα μετά την ακτινοβόληση, ενώ η κίνηση των μορίων μειώνεται εκθετικά μετά από αυτό όσο περνάει ο χρόνος. Η τεχνική είναι χρήσιμη γιατί επιτρέπει τη μελέτη χωρίς άμεση επαφή με το δείγμα. Η επιτάχυνση, η επιβράδυνση και ο ορισμός της μέγιστης ταχύτητας πολυμερισμού αποδεικνύεται ότι εξαρτάται από την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η αλληλεπίδραση του D.N.A. με κατιονικά λιπίδια είναι συνάρτηση και του χρόνου αλληλεπίδρασης⁸⁴. Οι διαφορετικοί χρόνοι επώασης των δυο ουσιών μαζί οδηγούν και σε διαφορετικά αποτελέσματα. Η διαδικασία συμπλοκοποίησης

παρουσιάζεται σε μια συνάρτηση του χρόνου όπως αποδεικνύεται από τις αυξήσεις και τις μειώσεις των διαστάσεων των σωματιδίων του συμπλόκου. Η μέθοδος επίσης βοηθάει και στον προσδιορισμό της ιδανικής αναλογίας D.N.A. προς λιπίδιο για γρήγορη και αποτελεσματική αντίδραση.

Ο υπολογισμός των διαστάσεων βοηθάει έμμεσα και στην εκτίμηση άλλων μεγεθών όπως η ποσότητα σε ένα διάλυμα⁸⁵ ή το μοριακό βάρος⁸⁶. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων χρυσού στο αίμα τα οποία έχουν μια κελυφοειδή δομή μετρήθηκε με DLS, ύστερα από συνδυασμό παραμέτρων όπως μέγεθος, επιφανειακό φορτίο, βαθμός συσσωμάτωσης⁸⁵. Σε μικρά δείγματα αίματος της τάξεως των 15 μL τα νανοσωματίδια χρυσού είναι παρόμοια σε μέγεθος και σχήμα με άλλα νανοσωματίδια τα οποία χορηγούνται ενδοφλέβια σε βιο-φαρμακευτικές εφαρμογές. Η ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου συστατικού είναι όμως εύκολη με τη βοήθεια μιας καμπύλης βαθμονόμησης αφού η συγκέντρωση του χρυσού είναι ευθέως ανάλογη προς την ένταση του φωτός που σκεδάζεται. Η ένταση αυτή δεν είναι απόλυτη αλλά σχετική ως προς τα επιφανειοδραστικά αντιδραστήρια που σχηματίζουν μικκύλια στο διάλυμα ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης.

Η κατάλληλη καμπύλη βαθμονόμησης συντελεί και στην αποτίμηση ενός μοριακού βάρους για διάφορες μορφές αιμοσφαιρίνης⁸⁵. Η υπεροικογένεια των πρωτεϊνών σφαιρίνης έχει μεγάλες ομοιότητες ως προς την τρισδιάστατη δομή τους, δηλαδή τη σφαιρική συσπείρωσή τους παρά το ότι οι αλληλουχίες των αμινοξέων συχνά διαφοροποιούνται. Ο ολιγομερισμός τους διαφέρει πολύ από είδος σε είδος. Η μυσσφαιρίνη σχηματίζει μονομερή, η αιμοσφαιρίνη σε φυτά διμερή, ενώ η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη A (HbA) είναι τετραμερής. Η τεταρτοταγής δομή τους είναι υψίστης σημασίας για τη βιολογική τους λειτουργία, καθώς επηρεάζει τη συνεργειακότητα

τους και την αποτελεσματική τους μεταφορά οξυγόνου. Δείγματα πολυμερισμένης αιμοσφαιρίνης καθώς και αιμοσφαιρίνης συζευγμένης με PEG, μελετήθηκαν ως προς το μέγεθός τους και την κατάσταση πολυμερισμού. Το συμπολυμερές αιμοσφαιρίνης βρέθηκε ότι είναι τριμερές. Το πεγκυλιωμένο δείγμα αιμοσφαιρίνης αποδεικνύεται ότι έχει αυξημένο μοριακό βάρος. Η προσθήκη PEG παράγει σωματίδια με μοριακό βάρος 1.7 έως και 2.8 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το αρχικό τετραμερές.

Η διαδικασία διάχυσης ενός μορίου είναι συνάρτηση όχι μόνο των διαστάσεών του αλλά και της συνολικής ευκαμπτότητας της αλυσίδας, η οποία εξαρτάται από τη χημική του δομή. Η φωσφατιδυλο-χολίνη σχηματίζει φυσαλλίδες που αποτελούνται μόνο από ένα στρώμα (λεπτό φύλλο). Η μεμβράνη περιέχει μια ποσότητα χοληστερόλης που επηρεάζει τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του μορίου. Η DLS μπορεί να καθορίσει το πώς ακριβώς η παρουσία της χοληστερόλης αλλοιώνει την κίνηση και τη συμπεριφορά της φωσφατιδυλοχολίνης⁸⁷. Για διαφορετικές αναλογίες χοληστερόλης προς φωσφατιδυλοχολίνη οι διαφορετικοί συντελεστές διάχυσης εξάγουν τελικά την ελαστική σταθερά κάμψης κ . Η αύξηση της κ με αυξανόμενη μοριακή αναλογία χοληστερόλης δείχνει ότι η παρουσία της στο μόριο το κάνει πιο άκαμπτο.

Πέραν από την κινητική μιας αντίδρασης η DLS είναι κριτήριο και για το αποτέλεσμα που μπορεί να ακολουθήσει μετά από μια σειρά από πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις⁸⁸. Η εξωκυτάρια αιμοσφαιρίνη από ένα σκόληκα αποτελείται από διάφορες υπομονάδες με αίμη, άλλοτε μονομερείς, άλλοτε τριμερείς, καθώς και κάποιες μη αιμικές μονάδες που λειτουργούν ως σύνδεσμοι. Σε $\text{pH} = 6 - 8$ η R_h της αιμοσφαιρίνης έχει μέσο όρο 27 nm. Σε πιο αλκαλικό pH το μόριο υφίσταται μια μη αναστρέψιμη διάσπαση όπως φαίνεται από τη μείωση της R_h που είναι πλέον περίπου 10 nm. Σε $\text{pH} = 9$ η ταχύτητα διάστασης είναι χαμηλή, ωστόσο αυξάνεται

δραστικά με αύξηση του pH σε 10.5. Η θερμοκρασία φυσικά έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διάστασης. Η αποδιάταξη δεν εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία αλλά και από το pH. Όσο πιο υψηλό το pH, τόσο πιο χαμηλή η θερμοκρασία που απαιτείται για τη διάσταση του ολιγομερούς. Η αιμοσφαιρίνη μπορεί επίσης να αυτο-οξειδωθεί. Η διπλή συνεισφορά από τις διαδικασίες αυτο-οξείδωσης και διάστασης έχει ως αποτέλεσμα μια συμπεριφορά που περιγράφεται με μια διπλά εκθετική συνάρτηση, ενώ όταν επικρατεί μόνο η διάσταση η περιγραφή γίνεται με μια μονο-εκθετική συνάρτηση. Φυσικά το αποτέλεσμα εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες. Σε θερμοκρασία 25 °C και σε χαμηλά αλκαλικό pH χρειάζεται μόνο μια εκθετική καμπύλη ενώ όσο αυξάνεται το pH η συνάρτηση είναι διπλά εκθετική. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (π.χ. 38 °C) η κινητική αυξάνεται ραγδαία ανεξαρτήτως pH και είναι πάντα διπλά εκθετική. Οι δυο διαδικασίες (διάσταση και αυτο-οξείδωση) είναι στην πραγματικότητα συνεργειακές και αύξηση στην ταχύτητα της μιας επάγει αύξηση στην ταχύτητα της άλλης. Πιο συγκεκριμένα η διάσταση αλλάζει το χαρακτήρα της αυτο-οξείδωσης μετατρέποντας τη συνάρτηση από απλά σε διπλά εκθετική, αν και το αντίστροφο δε φαίνεται να ισχύει όπως δείχνουν τα πειραματικά δεδομένα.

Η συσσωμάτωση ανάμεσα στα μόρια που υπάρχουν σε βιολογικά και χημικά συστήματα αυξάνει τις διαδικασίες διάχυσης αφού τα ογκωδέστερα aggregates (= συσσωματώματα) που προκύπτουν έχουν αυξημένες R_h και πολύ πιο αργή κίνηση μέσα στο διάλυμα^{89, 90}. Η επιρροή της θέρμανσης στην αλλαγή του μεγέθους των μικυλλίων καζείνης από ορό του γάλακτος μελετήθηκε με DLS για να εκτιμηθεί η κατανομή των ειδών συσσωμάτωσης μέσα στο δείγμα⁸⁹. Οι μετρήσεις αποδεικνύουν ότι το ζέσταμα προκαλεί μια αλλαγή στα φάσματα αφού η περιγραφή τους γίνεται με διπλά εκθετική συνάρτηση. Αυτό είναι απόδειξη συσσωμάτωσης

ανάμεσα στα απλά μονομερή μικκύλια. Παρά το ότι η μικρή R_h του μικκυλίου δεν επηρεάστηκε καθόλου από τη θέρμανση, το ότι προέκυψε μια δεύτερη μεγάλη R_h δηλώνει ότι το μέσο μέγεθος των σωματιδίων έχει αυξηθεί, μια άμεση συνέπεια από τη συσσωμάτωση και την αλλαγή στη διασπορά των μικκυλίων καζεΐνης.

Οι β-γλυκάνες από δημητριακά συσσωματώνονται ακόμα και σε πολύ αραιά υδατικά διαλύματα. Η συσσωμάτωσή τους όπως αποδεικνύεται με DLS είναι μια γρήγορη διαδικασία και πρόκειται για μια ισορροπία μεταξύ διάστασης και σύναψης στην οποία το σύστημα φτάνει άμεσα⁹⁰. Οι μέσες R_h των γλυκανών που μετρήθηκαν έχουν άμεση εξάρτηση από τη συνολική συγκέντρωση. Αυτό υποδεικνύει πως η συσσωμάτωση είναι η κυρίαρχη διαδικασία, αφού όσο πιο κοντά έρχονται τα μόρια σε ένα πυκνό διάλυμα τόσο πιο εύκολα συνδέονται. Τα δομικά χαρακτηριστικά των γλυκανών είναι επίσης σημαντικά για τη συμπεριφορά του συστήματος. Όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος, οι ταχύτητες διάχυσης των μορίων μειώνονται κάτι που οδηγεί σε πτώση του βαθμού συσσωμάτωσης. Οι πιο συμπαγείς και άκαμπτες διαμορφώσεις των γλυκανών (αλλάζοντας τη στερεοχημεία τους) είναι επίσης πιο βραδείες από τις ελαστικές δομές και συνεπώς το φαινόμενο της συσσωμάτωσης δεν ευνοείται. Συνεπώς η διαδικασία σχηματισμού των aggregates είναι διαδικασία που εξαρτάται από τη διάχυση.

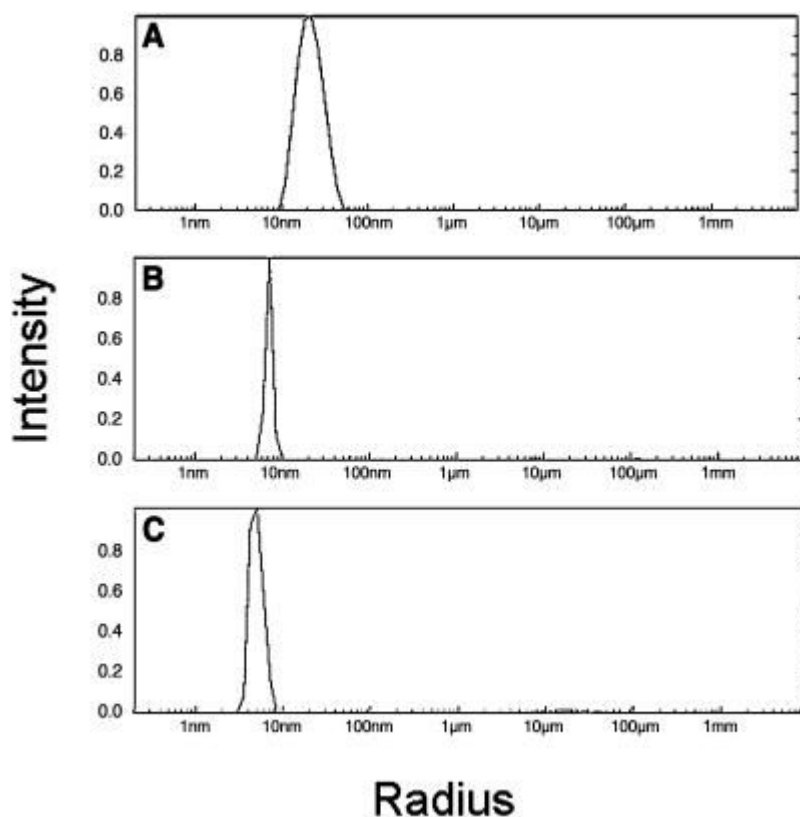
Οι αλλαγές στη διαμόρφωση δεν περιορίζονται σε μια απλή συσσωμάτωση. Μπορεί να υπάρξει μεταβολή στη στερεοδιάταξη⁹¹, τη δομή ανάλογα με το βαθμό συσπείρωσης⁹² ή τη σχετική σύνδεση των υπομονάδων ενός μορίου⁹³. Ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης D_{trans} για φορτισμένα πολυπεπτίδια λυσίνης μεταβάλλεται ανάλογα με τη στερεοχημεία τους. Η DLS μπορεί να εκτιμήσει τη μετάβαση από τη διαμόρφωση από τυχαίο σπείραμα (random coil) σε α-έλικα ή β-πτυχωτή επιφάνεια⁹¹. Η μεταβολή σε πειραματικές συνθήκες όπως pH ή

θερμοκρασία είναι που καθορίζει ποια θα είναι και η τελική δομή. Με βάση τις R_h που υπολογίζονται φαίνεται πως αυξημένη θερμοκρασία ευνοεί τη μορφή της β-πτυχωτής επιφάνειας, ενώ αυξημένο pH οδηγεί σε μια α-ελικοειδή διάταξη.

Η α-χυμοθρυψίνη από βοδινό πάγκρεας περνά από δομικές μεταπτώσεις ως αποτέλεσμα διάλυσης σε οργανικές ουσίες, προκαλώντας αποδιάταξη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι περιοχές της συγκέντρωσης που αλλοιώνουν τη δομή ορίζονται με τη βοήθεια της DLS ως πολύ αραιή, αραιή και ημι-αραιή⁹². Πιο συγκεκριμένα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.1 έως 50 mg/mL, η DLS μπορεί να υπολογίσει την κρίσιμη συγκέντρωση c^{**} που χωρίζει την πολύ αραιή από την αραιή περιοχή καθώς και τη συγκέντρωση επικάλυψης c^* που χωρίζει την αραιή περιοχή από την ημι-αραιή περιοχή. Η αποδιάταξη και το «ξεδίπλωμα» της α-χυμοθρυψίνης καταγράφεται με την προσθήκη οργανικού συνδιαλύτη σε διάφορες ποσότητες. Η συσπειρωμένη μορφή όπως φαίνεται από τις υδροδυναμικές ακτίνες χρειάζεται μετάβαση από μια περιοχή συγκεντρώσεων στην άλλη, αλλά δεν απαιτεί κινητικά ενδιάμεσα. Η αποδιάταξη της μισής ποσότητας πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με προσθήκη ουρίας ή γουανυλικού χλωριδίου. Το ακετονιτρίλιο έχει και αυτό κάποιες ιδιότητες αποδιάταξης και μπορεί να επηρεάσει από το 10 % έως το 50 % της χυμοθρυψίνης.

Οι αιμοκυανίνες είναι πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου διαλυμένες στο λεμφαγγείο αρθρώπων και μαλακίων. Η οξυγονωμένη και η αποξυγονωμένη μορφή για μια αιμοκυανίνη περιλαμβάνουν δομικές υπομονάδες. Όπως φαίνεται από τα πειραματικά δεδομένα της DLS, οι υπομονάδες 1 και 2 στην οξυ-μορφή και στην απο-μορφή έχουν διαφορετικές δομές⁹³. Οι αλλαγές στη στερεοδιάταξη των δυο δομών είναι αισθητές ακόμα και παρουσία και ενός διαφορετικού (από το οξυγόνο) αλλοστερικού τροποποιητή. Το παρακάτω σχήμα δείχνει τις διαφορές στις

υδροδυναμικές ακτίνες της πρωτεΐνης και των δυο υπομονάδων. Οι κορυφές είναι ευρείες γιατί στην πραγματικότητα είναι μέσοι όροι, αφού δεν είναι δυνατόν ακόμα και στα όρια του πειραματικού σφάλματος όλες οι ακτίνες να είναι ακριβώς ίδιες.



Σχήμα IV.1 : Μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός και υπολογισμός R_h για μια αιμοκυανίνη (A) Φυσική Πρωτεΐνη στην οξυ-μορφή με $R_h = 23.6 \text{ nm}$. Αν και δε φαίνεται στο σχήμα η ακτίνα για την απο-μορφή είναι $R_h = 22.2 \text{ nm}$. (B) Υπομονάδα H1 στην οξυ-μορφή με $R_h = 7.8 \text{ nm}$ (η απο-μορφή έχει $R_h = 6.4 \text{ nm}$) (C) Υπομονάδα H2 στην οξυ-μορφή με $R_h = 7.5 \text{ nm}$ (η απο-μορφή έχει $R_h = 7.4 \text{ nm}$) [Source : Georgieva, Schwank et al. (2005) Biophysical Journal Vol.88]

Οι διαφορές ανάμεσα στην οξυγονωμένη και την ελεύθερη μορφή, τόσο σε γενικό επίπεδο όσο και στις ξεχωριστές υπομονάδες, είναι σε συμφωνία με ένα συνεργειακό μηχανισμό δέσμευσης οξυγόνου. Αυτό σημαίνει ότι η δέσμευση του οξυγόνου στη μια λειτουργική υπομονάδα επάγει αλλοστερικά μεταβολές στη διαμόρφωση της άλλης.

Η θερμοδυναμική σταθερότητα των aggregates και οι ευνοϊκές συνθήκες υπό τις οποίες σχηματίζονται μπορούν να προβλεφθούν εύκολα από τη DLS αφού η ένταση του φωτός σε μέτριες συγκεντρώσεις είναι συνάρτηση των θερμοδυναμικών αλληλεπιδράσεων⁹⁴⁻⁹⁶. Οι βιοφυσικές ιδιότητες ενός διαλύματος ανοσοσφαιρίνης G που περιέχει σάκχαρα, πολυσθενείς αλκοόλες, αμινοξέα ή άλατα διαφέρουν ως προς τη σταθερότητά τους ανάλογα με το ακριβές περιεχόμενο. Η DLS αποκαλύπτει ότι με προσθήκη μαλτόζης ή γλυκίνης οι ευνοϊκές συνθήκες συσσωμάτωσης διαφέρουν αφού η γλυκίνη προσδίδει περισσότερη σταθερότητα από τη μαλτόζη⁹⁴. Όταν η συσσωμάτωση παρεμποδίζεται, τότε το διάλυμα δεν είναι σταθερό. Το φαινόμενο αυτό πάντοτε αποτρέπει με αύξηση της ιονικής ισχύος παρουσία αλάτων, όποια και αν είναι η σύσταση.

Ο πολυσακχαρίτης pullulan αποτελείται από μονάδες μαλτόζης. Όταν φέρει μονάδες χοληστερόλης αυτοσυσσωματώνεται και σχηματίζει νανοσωμάτια υδρο-gel. Αυτά τα gels ονομάζονται για συντομία CHP. Η σταθερότητα και η δομή των CHP διαφέρει αν κατεργαστούν με μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη ή πρωτεΐνη από το λεύκωμα του αυγού της κότας. Τα nanogels είναι σφαιρικά με $R_h = 6.7$ nm. Τα CHP διασπώνται με προσθήκη κυκλοδεξτρίνης και σχηματίζουν κλειστά σύμπλοκα με τη χοληστερόλη⁹⁵. Αυτά τα σύμπλοκα καταστέλλουν τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια χοληστερόλης. Όταν το nanogel αναμειγνύεται με την πρωτεΐνη του λευκώματος και θερμαίνεται σχηματίζει σύμπλοκα. Ως γνωστόν η αποδιάταξη του λευκώματος με θέρμανση το μετατρέπει από διαφανές σε άσπρο και αδιαφανές στερεό. Με την επίδραση των CHP η θερμοδυναμική σταθερότητα της αρχικής δομής ευνοείται, έτσι ακόμα και αν θερμανθεί, το λεύκωμα παραμένει ρευστό αδιαφανές.

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι συμπλοκοποίησης για δυο αμφιφιλικές πενικιλίνες με την αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού μπορούν επίσης να εξαχθούν

με τη χρήση της DLS. Οι θερμοδυναμικές συναρτήσεις για τη διαδικασία δέσμευσης όπως ενθαλπία, εντροπία, ελεύθερη ενέργεια Gibbs ΔG , η σταθερά ισορροπίας καθώς και τα ενεργά κέντρα δέσμευσης εξετάστηκαν και συσχετίστηκαν με τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνων. Η εξάρτηση των συντελεστών διάχυσης από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων φανερώνει με τα πειράματα DLS ότι η ιδανική συνθήκη για συμπλοκοποίηση είναι $\text{pH} = 7.4$ αφού το δυναμικό της αλληλεπίδρασης και η σταθερότητα είναι μέγιστα⁹⁶. Όσο η συγκέντρωση των αντιδρώντων αυξάνεται, τόσο η κolloειδής διασπορά αποκτά μειωμένη σταθερότητα στα σύμπλοκα αλβουμίνης-πενικιλλίνης.

Χρήσιμα δεδομένα από την τεχνική της σκέδασης μπορούν να εξαχθούν και για τη μετάβαση από μια φάση σε μια άλλη. Οι ιδανικές συγκεντρώσεις για τη στερεοποίηση (παραγωγή gel) και οι θερμοκρασίες μετάβασης μπορούν να υπολογισθούν από τις κατάλληλες παραμέτρους που σχετίζονται έμμεσα με τις θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις^{97 - 99}. Η παρεμποδιστική δράση της τρεχαλόζης (ένας γλυκοζιτικός δισακχαρίτης) στην παραγωγή κρυστάλλων πάγου μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα. Η μη γραμμική εξάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός από τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση ερμηνεύεται από τη DLS με την παρουσία δυο διαφορετικών δικτύων σχηματισμού δεσμών υδρογόνου⁹⁷. Τα αραιά διαλύματα με συγκέντρωση μικρότερη από 10% σε σάκχαρο έχουν συμπεριφορά πολύ παρόμοια με του νερού. Πυκνότερα διαλύματα με υψηλό ιξώδες έχουν ισχυρή εξάρτηση από τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση. Αυτό συμβαίνει γιατί το νερό είναι λιγότερο και οι δισακχαρίτες σχηματίζουν clusters με μόρια νερού αναπτύσσοντας καινούρια δίκτυα δεσμών υδρογόνου. Διαλύματα ζάχαρης ή μαλτόζης είχαν παρόμοιες δράσεις αναστολής κρυσταλλοποίησης συνεπώς οι καινούριοι δεσμοί υδρογόνου είναι το αίτιο για την παρεμπόδιση.

Η διαδικασία στερεοποίησης της β-λακτοσφαιρίνης (bIG) σε υδατικό διάλυμα μελετήθηκε με σκέδαση φωτός. Οι θερμοκρασίες και οι πιέσεις υπέστησαν μεγάλες μεταβολές (από 20 έως 75 °C και από 0.1 έως 315 MPa αντίστοιχα) και η χρονική καταγραφή της αλλαγής φάσης παρακολούθηθηκε με σκέδαση φωτός⁹⁸. Το «κατώφλι» σχηματισμού gel όταν άλλαξε η θερμοκρασία ορίζεται ως το σημείο που η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός αυξάνεται ραγδαία ενώ η συνάρτηση συσχέτισης χρόνου στενεύει πολύ στο εύρος. Η μεταβολή στην πίεση φανερώνει σταδιακή μείωση της έντασης και βαθμιαία ελάττωση του εύρους της συνάρτησης συσχέτισης. Η bIG υφίσταται θερμική αποδιάταξη και σχηματισμό gels που αποτελούνται από πυκνά και διπλωμένα ολιγομερή aggregates. Τα gels που σχηματίζονται από αυξημένη πίεση όμως αποτελούνται από μονομερή aggregates.

Αν και υπάρχουν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού της κρίσιμης θερμοκρασίας T_c για μετάβαση φάσης, οι οπτικές ιδιότητες του διαλύματος είναι ένας ακόμα εύκολος τρόπος για τον υπολογισμό της. Για παράδειγμα, όταν τα λιπιδικά συστήματα αλλάζουν στερεοδιάταξη, επάγονται αλλαγές στους συντελεστές απορρόφησης και διάθλασης. Οι αλλαγές στην ένταση του σκεδαζόμενου φωτός αντανακλούν αλλαγές στις οπτικές ιδιότητες του συστήματος⁹⁹. Καθώς λοιπόν οι αλλαγές στη σκεδαζόμενη ένταση συνδέονται άμεσα με τις μεταβολές της θερμοκρασίας, η θερμοκρασία αλλαγής φάσης μπορεί να εκτιμηθεί για πολλά φυσικά ή τεχνητά επιφανειοδραστικά, ανεξάρτητα από το πολικό ή το υδροφοβικό τους τμήμα. Δηλαδή το μήκος της αλυσίδας δεν παίζει κανένα ρόλο στη μέτρηση της T_c , κάτι που αυξάνει την ευχέρεια της τεχνικής.

2) ΣΤΑΤΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Η Στατική Σκέδαση Φωτός SLS είναι εξίσου σημαντική για τη μέτρηση των ιδιοτήτων ενός διαλύματος. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός στο φάσμα του χρόνου (που πάντα υπολογίζεται ως μέσος όρος) εξαρτάται από τις διαστάσεις του μακρομορίου. Μια περιγραφική εξίσωση είναι η εξής

$$I_{scattered} = \frac{4\pi^2 N \alpha^6}{\lambda^4 R^2} * \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} * I_i \quad (11)$$

I_i είναι η προσπίπτουσα (αρχική) ένταση, N ο αριθμός των μορίων (αντανακλώντας τη συγκέντρωση), R η απόσταση δείγματος-παρατηρητή (που προσδιορίζει τον όγκο σκέδασης), λ το μήκος κύματος, α το μήκος της αλυσίδας του μακρομορίου (που είναι υψωμένος στην έκτη δύναμη και που φανερώνει ότι όσο πιο μεγάλο είναι το μόριο τόσο πιο πολύ συνεισφέρει στη σκεδαζόμενη ένταση) και το m είναι ένα μέγεθος που εξαρτάται από τους δείκτες διάθλασης. Σε σχετικά αραιά διαλύματα το

m απλοποιείται και ονομάζεται σχετικός δείκτης διάθλασης $m = \frac{n_{\text{διαλ. ουσ.}}}{n_{\text{διαλ. ύτη}}}$. Η

προσέγγιση Zimm δηλώνει ότι η αντίστροφη σκεδαζόμενη ένταση εξαρτάται τόσο από το μοριακό βάρος και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, όσο και από το θερμοδυναμικό δεύτερο συντελεστή virial A_2 που δηλώνει τις ελκτικές διαμοριακές δυνάμεις. Επίσης όπως φαίνεται και από την (11) η αντίστροφη I_{scat} θα εξαρτάται και από την αντίστροφη $I_{incident}$. Για να κατασκευαστεί ένα διάγραμμα Zimm χρειάζεται ο λόγος Rayleigh $R(\theta, c)$ που υπολογίζεται από την (3) και είναι συνάρτηση των σχετικών εντάσεων και η σταθερά K που δίνεται από την επόμενη εξίσωση

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{(N_A \lambda)^4} * \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (12)$$

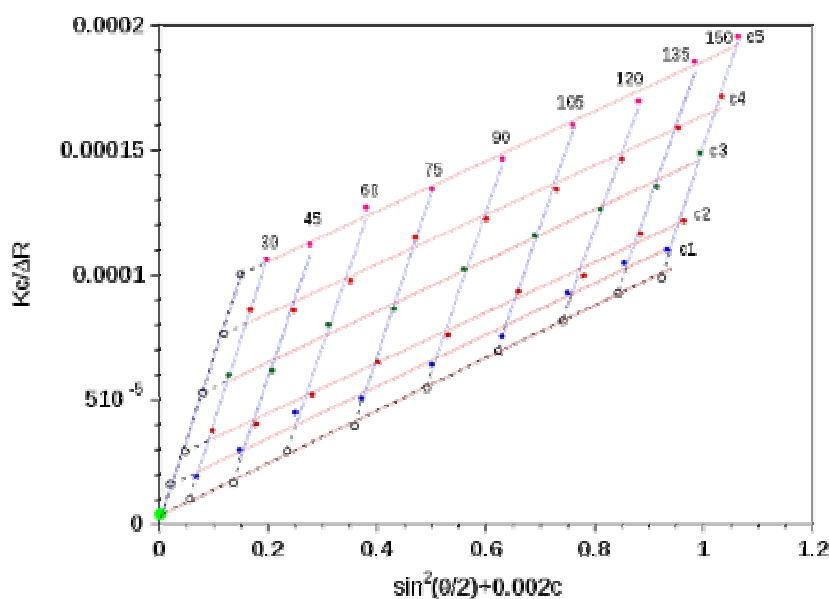
N_A ο αριθμός του Avogadro, n_0 ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη και το πηλίκο $\frac{dn}{dc}$ είναι η αναλογία αύξησης του δείκτη διάθλασης με τη συγκέντρωση. Η εξίσωση Zimm βάσει της οποίας κατασκευάζονται τα ομώνυμα διαγράμματα είναι η

$$\frac{Kc}{R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w} \left[1 + \frac{R_G^2 * q^2}{3} \right] + 2A_2 c \quad (13)$$

Το πρώτο μέλος της εξίσωσης είναι ο άξονας Y ενώ οι μεταβλητές X είναι η συγκέντρωση c και το τετράγωνο του κυματανύσματος q . Για πυκνά διαλύματα, το διπλάσιο του συντελεστή virial A_2 είναι η κλίση της ευθείας και υπολογίζεται εύκολα ενώ για αραιά διαλύματα η συγκέντρωση c στο δεύτερο σκέλος απαλείφεται και απομένει μόνο η εξάρτηση από το q^2 . Με κατάλληλη παρεκβολή στο 0 (δηλαδή στην υποθετική γωνία σκέδασης $\theta = 0$), η τεταγμένη επί την αρχή είναι το αντίστροφο του μοριακού βάρους M_w . Τέλος η R_G στο δεύτερο μέλος της εξίσωσης είναι η λεγόμενη γυροσκοπική ακτίνα η οποία διαφέρει από την υδροδυναμική στο ότι δε θεωρεί το μόριο απαραίτητα σφαιρικό. Ουσιαστικά η γυροσκοπική ακτίνα είναι η απόσταση από το κέντρο μάζας του μακρομορίου στην εξώτατή του άκρη. Το πηλίκο $\frac{R_G^2}{3}$ είναι ίσο με το ξ^2 που είναι το λεγόμενο μήκος συσχέτισης, το οποίο λαμβάνει υπόψη όχι μόνο το συνολικό μήκος της αλυσίδας αλλά και την απόσταση ανάμεσα στις άκρες του (στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι η ίδια αφού τα μόρια συσπειρώνονται σε κλειστές δομές). Ένα τυπικό διάγραμμα Zimm με εξάρτηση από τη γωνία

σκέδασης θ αλλά και από τη συγκέντρωση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Κάθε οριζόντια γραμμή είναι και μια συγκέντρωση σε διάφορες γωνίες, ενώ κάθε κατακόρυφη γραμμή είναι και μια γωνία σκέδασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Το αποτέλεσμα είναι πάντοτε ένα διάγραμμα πλέγματος σαν το ακόλουθο.



Σχήμα IV.2 : Χαρακτηριστικό Διάγραμμα Zimm ως συνάρτηση του τετραγώνου του ημιτόνου της $\theta/2$ και της συγκέντρωσης . Το εύρος των θ είναι από 30° έως 150° και μετρήθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις . Ο A_2 virial έχει ήδη αποτυπωθεί στο διάγραμμα ως $0,002/2 = 0,001$. Η πρώτη κατακόρυφη γραμμή έχει σχεδιαστεί με παρεκβολή και αναπαριστά την υποθετική γωνία σκέδασης θ για την οποία δε μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα πειραματικά δεδομένα . Η τεταγμένη επί την αρχή που φαίνεται κάτω αριστερά ως το έντονο σημείο προέρχεται από τη διασταύρωση των δυο ευθειών παρεκβολής , της οριζόντιας που αναπαριστά τη μηδενική συγκέντρωση και της κατακόρυφης που αναπαριστά τη μηδενική θ . Η τεταγμένη επί την αρχή αναπαριστά το αντίστροφο Μοριακό Βάρος .

Σε αραιά διαλύματα όπου η συγκέντρωση δε λαμβάνεται υπόψη , η γραμμική εξάρτηση της αντίστροφης έντασης σκέδασης από το q^2 εξάγει τη γυροσκοπική ακτίνα. Σε μια ευθεία της μορφής $Y = A + B \cdot X$, όπου X το q^2 και Y είναι το $1 / I_{sc}$, το A είναι το $1 / I_0$ και ο συντελεστής B (δηλαδή η κλίση της ευθείας) εμπεριέχει τόσο το τετράγωνο του μήκους συσχέτισης ξ^2 όσο και το A . Συγκεκριμένα

για αραιά διαλύματα το ξ^2 είναι B / A . Συνεπώς με τον υπολογισμό των δυο αυτών παραμέτρων, η γυροσκοπική ακτίνα δίνεται κατευθείαν από την εξίσωση

$$R_G = \sqrt{\frac{3B}{A}} \quad (14)$$

Ο συνδυασμός των δυο ακτίνων από τη SLS και τη DLS (γυροσκοπικής και υδροδυναμικής αντίστοιχα) εξάγει το λεγόμενο γεωμετρικό παράγοντα ρ που δίνει το

σχήμα. Ο $\rho = \frac{R_G}{R_h}$ και καθορίζει τη σφαιρικότητα του μορίου. Για τιμές ρ κοντά στο

0.78 το μακρομόριο είναι τέλεια σφαιρικό. Όσο όμως το ρ αυξάνεται τόσο πιο ελλειψοειδές σχήμα αποκτά το μόριο. Όπως ακριβώς η αναλογία των ημιαξόνων a και b σε μια έλλειψη φανερώνει πόσο συμπιεσμένη είναι στους πόλους και πόσο πεπλατυσμένη είναι στα άκρα, έτσι και σε ένα μόριο ο λόγος ρ δηλώνει πόσο γραμμικό είναι. Όσο πιο πάνω από την ιδανική τιμή 0.78 είναι το ρ τόσο πιο ελλειψοειδές γίνεται. Αν ξεπεράσει την τιμή 1 αρχίζει να μοιάζει με ακαθόριστο κουβάρι το οποίο ονομάζεται Gaussian Coil (Γκαουσιανό Σπείραμα). Αν το ρ συνεχίσει να αυξάνεται, τότε έχει τη γραμμική μορφή ενός rod (μπαστούνι).

Ο καθορισμός του μοριακού βάρους είναι πολύτιμος σε περιπτώσεις που η κατάσταση συσσωμάτωσης δεν είναι δυνατόν να μελετηθεί αλλιώς και να εκτιμηθεί ο αριθμός των μονομερών που απαρτίζουν ένα ολιγομερές ή ένα αυτο-συγκροτημένο σύμπλοκο $^{100} - ^{10^3}$. Οι ενσωματωμένες πρωτεΐνες που είναι διάσπαρτες στη λιπιδική μεμβράνη είναι εξαιρετικά δύσκολο να εξετασθούν από πλευράς στοιχειομετρίας αφού αποτελούνται από υπομονάδες και γιατί ο ακριβής αριθμός του επιφανειοδραστικού και των λιπιδίων που συνδέονται με αυτά είναι άγνωστος. Η SLS όμως είναι μια από τις ελάχιστες τεχνικές που μπορεί να μετρήσει άμεσα τη μοριακή

μάζα μιας πρωτεΐνης παρούσας σε ένα μικκύλιο χωρίς καμία σύμβαση για το πόσο επιφανειοδραστικό έχει δεσμευτεί ή το σχήμα της πρωτεΐνης¹⁰⁰.

Η απογαλακτοζυλίωση της ξυλο-γλυκάνης από τους σπόρους ενός εξωτικού δέντρου με τη βοήθεια του ένζυμου της β-γαλακτοσιδάσης καταγράφηκε με SLS. Το ένζυμο αφαιρεί κάποια παράπλευρα μόρια γαλακτόζης από την αλυσίδα. Η σκέδαση πραγματοποιήθηκε στις 90° υποδεικνύοντας μια μικρή μείωση του μοριακού βάρους¹⁰¹. Στα τελευταία στάδια της αντίδρασης παρατηρήθηκε φαινόμενο συσσωμάτωσης και το αποτέλεσμα ήταν ένα microgel σε αραιές συγκεντρώσεις. Η συσσωμάτωση είναι το κύριο αίτιο για τη στερεοποίηση της ξυλογλυκάνης κατά την ενζυμική αντίδραση.

Ένα ουδέτερο υδατοδιαλυτό πολυμερές όπως το PNIPA (N-ισοπροπυλο ακρυλαμίδιο) μπορεί να αλληλεπιδράσει με μια ποικιλία από πρωτεΐνες, όπως την αλβουμίνη από ανθρώπινο ορρό (HSA), την αλβουμίνη (OVA) από αυγό και τη λυσοζύμη (LYZ). Η κατεργασία οδηγεί σε σχηματισμό συμπλόκων. Τα μείγματα πολυμερούς και των πρωτεϊνών μελετήθηκαν με SLS σε διαφορετικές αναλογίες μοριακής μάζας¹⁰². Σε όλες τις περιπτώσεις το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς είναι μικρότερο από ενός συμπλόκου που έχει δυο πολυμερικές αλυσίδες και μια πρωτεΐνη. Αυτό υποδεικνύει το σχηματισμό ενός ενδοπολυμερικού συμπλόκου σε κάθε σύστημα. Η σχετική μοριακή μάζα που αντανάκλα τον αριθμό των πρωτεϊνών ανά πολυμερές μετρήθηκε με SLS και βρέθηκε ότι είναι OVA > HSA > LYZ. Η υδροφοβικότητα του κάθε μορίου λοιπόν είναι καθοριστική για την τελική διαμόρφωση του πολυμερούς όπως φαίνεται από τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμερούς και πρωτεΐνης.

Η SLS μπορεί να μετρήσει την αυθόρμητη αυτο-συμπλοκοποίηση που υφίσταται η ινσουλίνη σε διαφορετικές τιμές pH από 1.85 έως 10. Σε pH = 1.95 η

ινσουλίνη είναι μονομερές αν το μέσο οξίνισης είναι το αιθανικό οξύ ενώ αν είναι το υδροχλωρίο, τότε είναι διμερές. Σε κλίμακα pH = 3 έως 8 η εξάρτηση της έντασης που σκεδάζεται από τη συγκέντρωση (για μικρές συγκεντρώσεις έως 1.5 ppm) εξηγείται ως ένα σύστημα ισορροπίας όπου υπάρχει μόνο μια σταθερά ισορροπίας για τη σύναψη μονομερούς-μονομερούς ή μονομερούς-ολιγομερούς¹⁰³. Σε pH = 10 όμως η σταθερά ισορροπίας για τη σύνδεση μονομερούς-μονομερούς βρέθηκε μικρότερη από την αντίστοιχη σταθερά για τη σύναψη μονομερούς στο ολιγομερές κατά 5 τάξεις μεγέθους. Η σταθερά ισορροπίας υπολογίστηκε με την εξάρτηση του μοριακού βάρους από τη συγκέντρωση και οι άριστες συνθήκες ήταν σε pH = 7.2.

Η κινητική μελέτη μιας αντίδρασης ή ενός φυσικού φαινομένου γενικότερα μπορεί να υποβοηθηθεί από την SLS με την παρατήρηση μεταβολών στο μοριακό βάρος και την παραγωγή των προϊόντων^{104 - 107}. Για παράδειγμα στην επανυδάτωση του γάλακτος-σκόνη που περιέχει συμπυκνωμένες πρωτεΐνες, η κινητική διάλυσης της σκόνης αξιοποιεί πληροφορίες από Στατική Σκέδαση Φωτός¹⁰⁴. Συγκεκριμένα η κατανομή μεγέθους και η συγκέντρωση ανά όγκο των αιωρούμενων σωματιδίων σκόνης ποσοτικοποιούν τη διαδικασία διάλυσης. Σε θερμοκρασία δωματίου η σκόνη με περιεχόμενο 85 % σε πρωτεΐνη έχει χαμηλή διαλυτότητα. Αυτό στην πραγματικότητα οφείλεται σε μια αργή διαδικασία διάλυσης παρά στην ύπαρξη θερμοδυναμικώς αδιάλυτου συστατικού στη σκόνη. Η διαδικασία επανυδάτωσης περιλαμβάνει δυο στάδια τα οποία αλληλοεπικαλύπτονται. Το πρώτο είναι η διάρρηξη των συσσωματωμένων πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μορφή αδρομερών στη σκόνη και η παραγωγή μονομερών πρωτεϊνών. Το δεύτερο είναι η διάλυση των μονομερών αυτών από τη στερεά κατάσταση στο υδάτινο περιβάλλον στο οποίο απελευθερώνονται. Η τελευταία διαδικασία φαίνεται πως είναι και το

καθορίζον στάδιο για τη διαδικασία της ενυδάτωσης και επιταχύνεται με θέρμανση του διαλύτη.

Οι β-αμυλοειδείς ίνες σχηματίζουν πλάκες κάτι που θεωρείται ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της νόσου Alzheimer. Το ενδιάμεσο στάδιο πριν το σχηματισμό πλάκας είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων κάτι που μελετήθηκε με SLS για να εκτιμηθεί η κατανομή μεγεθών και δομών των ινών αυτών¹⁰⁵. Η παρουσία NaCl επιταχύνει τη συσσωμάτωση αισθητά. Οι ίνες αποδεικνύεται ότι είναι λεπτές και επιμήκεις. Η ακαμψότητα των αλυσίδων επίσης μετρήθηκε με τη βοήθεια του μήκους συσχέτισης που βρέθηκε ότι είναι 50 nm. Η πυκνότητα της μοριακής μάζας ανά ίνα δηλώνει ότι υπάρχουν περίπου δυο μονομερείς μονάδες ανά nm. Τα πολυμερή ινίδια φτάνουν σε συνολικό μήκος αρκετές χιλιάδες nm. Ωστόσο οι οριακές τιμές στις οποίες οι καμπύλες φτάνουν σε οριζόντια γραμμή δε συμφωνούν με το μοντέλο μιας μακριάς αλυσίδας. Οι ασυμφωνίες στα μοριακά βάρη και τα συνολικά μήκη μάλλον υποδηλώνουν την παρουσία προσμείξεων στις αρχικές φάσεις της συσσωμάτωσης εκτός από τα μονομερή. Αυτό ίσως είναι ένδειξη για παρεμπόδιση της διαδικασίας στα αρχικά της στάδια αν βρεθεί το κατάλληλο φάρμακο που θα προστεθεί και θα επιδράσει στα αμυλοειδή με τον κατάλληλο τρόπο.

Η ινσουλίνη επίσης σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Η κινητική συσσωμάτωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης σε κατάλληλο χαμηλό pH και διάφορες θερμοκρασίες μελετήθηκε με SLS έτσι ώστε η κατανομή της σκεδαζόμενης έντασης να αποτιμήσει τη δομή των συμπλόκων¹⁰⁵. Η δημιουργία των συσσωματωμάτων σε ευρεία κλίμακα μεγεθών δηλώνει ότι παράγονται μονομερείς πρωτεΐνες, επιμήκη ινίδια και μεγάλα δίκτυα από συσσωματώματα. Τα ινίδια αυτά συσπειρώνονται και συνδέονται χάρη σε ένα μηχανισμό θρόμβωσης που ενεργοποιείται θερμικά. Η προσέγγιση γίνεται και πλευρικά ανάμεσα στις αλυσίδες

και με επαφή άκρης με άκρη. Το ενδιάμεσο στάδιο το οποίο επιβραδύνει την όλη διαδικασία είναι συγκέντρωση των ινιδίων σε δεσμίδες και μεγάλα clusters.

Η θερμομηχανική έκθλιψη σε άμυλο από αραβόσιτο και λιπίδια (4 % κατά βάρος) σχηματίζει λωρίδες. Τα λιπαρά περιεχόμενα είναι είτε ελεύθερα οξέα είτε οξέα σε ηλιέλαιο. Μεταβάλλοντας το περιεχόμενο νερού στην ίδια θερμοκρασία, οι λωρίδες μπορούσαν να αποθηκευτούν είτε σε υαλώδη είτε σε ελαστική μορφή. Σε όλα τα προϊόντα το περιεχόμενο της αμυλοπηκτικής όπως καθορίζεται από το μοριακό βάρος μετρήθηκε με SLS όπως επίσης και ο βαθμός οξειδωσης των λιπαρών οξέων ¹⁰⁷. Η ταχύτητα οξειδωσης των λιπών ήταν υψηλότερη σε δείγματα που βρίσκονταν σε υαλώδη κατάσταση σε σχέση με την ελαστική. Η μέτρηση του μοριακού βάρους έγινε μετά από 6 εβδομάδες αποθήκευσης και εκτιμήθηκε η αμυλοπηκτική. Σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα από το λιπαρό οξύ, το μοριακό βάρος παρουσίασε πτώση κατά 40 %.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό σύνδεσης μονομερών ανάμεσα σε μείγματα πρωτεϊνών και σύναψης ανάμεσα σε όμοια μόρια πρωτεΐνης ¹⁰⁸. Για συγκεντρώσεις έως 125 g / L, οι λόγοι Rayleigh για τις εντάσεις σκέδασης μετρήθηκαν για διαλύματα αλβουμίνης βοδινού ορού, αλβουμίνης από λεύκωμα αυγού κότας, αυγο-βλεννοειδές στο λεύκωμα και δυαδικά μείγματα αυτών των συστατικών. Οι εντάσεις συσχετίστηκαν με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις η δομή φαίνεται πως υπακούει στο μοντέλο μιας συμπαγούς σφαίρας. Κάθε πρωτεΐνη αναπαριστάται με μια σφαίρα διαφορετικού μεγέθους, το οποίο καθορίζεται από τις απωστικές αλληλεπιδράσεις. Παρόμοιες μετρήσεις για τη χυμοθρυψίνη A όπου συσχετίστηκε η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός με τη συγκέντρωση υποδεικνύει και πάλι ένα μοντέλο συμπαγούς σφαίρας. Ωστόσο σε αυτήν την περίπτωση το pH διαφοροποιεί το αποτέλεσμα. Η εξάρτηση της έντασης

σκέδασης από το pH είναι ένδειξη ότι κάθε μονομερές πρωτεΐνης συνδέεται με ένα όμοιο μόριο προς σχηματισμό διμερούς. Το διμερές και το μονομερές βρίσκονται σε ισορροπία και με μεταβολή του pH η σύναψη των μονομερών μπορεί να συνεχιστεί, σχηματίζοντας πενταμερές ή και εξαμερές.

Εκτός από τις συνηθισμένες διαδικασίες συσσωμάτωσης και σύνδεσης μονομερών όπως αποδεικνύονται από αύξηση της μοριακής μάζας, η μείωση στο μοριακό βάρος μπορεί να δηλώσει την αντίστροφη διαδικασία: τη διάσπαση και την αποικοδόμηση ενός μακρομορίου¹⁰⁹. Η αποικοδόμηση πολλών αιθέρων της κυτταρίνης μπορεί να επιτευχθεί εύκολα με έκθεση ενός αραιού υδατικού διαλύματος του δείγματος σε υπέρηχους για 24 ώρες. Οι αιθέρες που μελετήθηκαν ήταν υδροξυ-προπυλ-μεθυλ-αιθέρας (HPMC), υδροξυ-προπυλ-αιθέρας (HPC) και αιθυλ-υδροξυ-αιθυλ-αιθέρας (EHEC). Το γράμμα C σε όλες τις συντομογραφίες δηλώνει ότι οι αιθέρες είναι ενσωματωμένοι σε κυτταρίνη (Cellulose). Το μοριακό τους βάρος και η κατανομή του μοριακού βάρους ανά πολυμερές υπολογίστηκαν με χρήση SLS. Ανάλογα με το χρόνο έκθεσης στους υπέρηχους, τα προϊόντα ήταν μια ευρεία κλίμακα από πολυμερικά διαλύματα διαφόρων μοριακών βαρών. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως το μοριακό βάρος του πολυμερούς έφτασε ένα ανώτατο όριο μετά από το χρόνο των 24 ωρών. Το κατώφλι μοριακού βάρους ήταν ανεξάρτητο της συγκέντρωσης του δείγματος, αλλά ήταν διαφορετικό για κάθε είδος αιθέρα. Άρα ο καθοριστικός παράγοντας είναι η φύση του αιθέρα και όχι η ποσότητά του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V
ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 13 παραλλαγές συνθετικών πεπτιδίων, 8 από τις οποίες προήλθαν από την ημισυντηρημένη επικράτεια της V3 περιοχής (α.α. 304-318) της γλυκοπρωτεΐνης gp120 από HIV στελέχη του υποτύπου B. 5 από τις 8 παραλλαγές προήλθαν από τα στελέχη SF2, SF128, SF162, MN και LAI. Οι υπόλοιπες 3 προέκυψαν μετά από κατάλληλες αμινοξικές τροποποιήσεις (αντικαταστάσεις ή υποκαταστάσεις) πάνω στην αλληλουχία του LAI πεπτιδίου, ώστε τελικά να δημιουργηθούν πεπτίδια με 1 ($V3_{LAI+1}$) ή 9 ($V3_{LAI+9}$) βασικά αμινοξέα ή με την ίδια αμινοξική σύσταση με το πρωτογενές $V3_{LAI}$ πεπτίδιο αλλά με τα βασικά αμινοξέα σε διαφορετικές θέσεις ($V3_{LAIrandom}$). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το αμινοτελικό πεπτίδιο Ac-MDYQVSSPIYDINYYTSEPSQK-NH₂ της πρωτεΐνης του συνυποδοχέα CCR5 (CCR5-Nt) σε σουλφουρωμένη ή μη κατάσταση.

1) Φασματοσκοπική Μελέτη Πρότυπων Πεπτιδίων

Στη πρώτη φάση αυτής της διατριβής διερευνήθηκε η φυσικοχημική συμπεριφορά σε φυσιολογικά διαλύματα μιας σειράς πρότυπων πεπτιδίων σαν συνάρτηση της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας EAAAK με ιδιαίτερη έμφαση στην επιρροή των ιοντικών δυνάμεων/αλληλοεπιδράσεων.

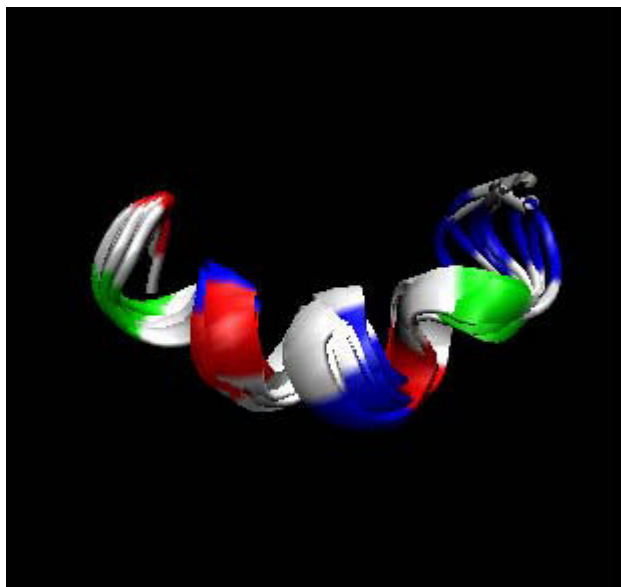
Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂ (P3)

Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂ (P4)

Ac-EALAK-EAQAK-EALAK-NH₂ (DIM)

Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ (DMI)

Η υψηλή περιεκτικότητα των πεπτιδίων σε αλανίνη (A) προωθεί τη δομή ελικοειδούς διαμόρφωσης όπως επίσης και η παρουσία γλουταμινικού οξέος (E), γλουταμίνης (Q), αργινίνης (R) και λυσίνης (K).

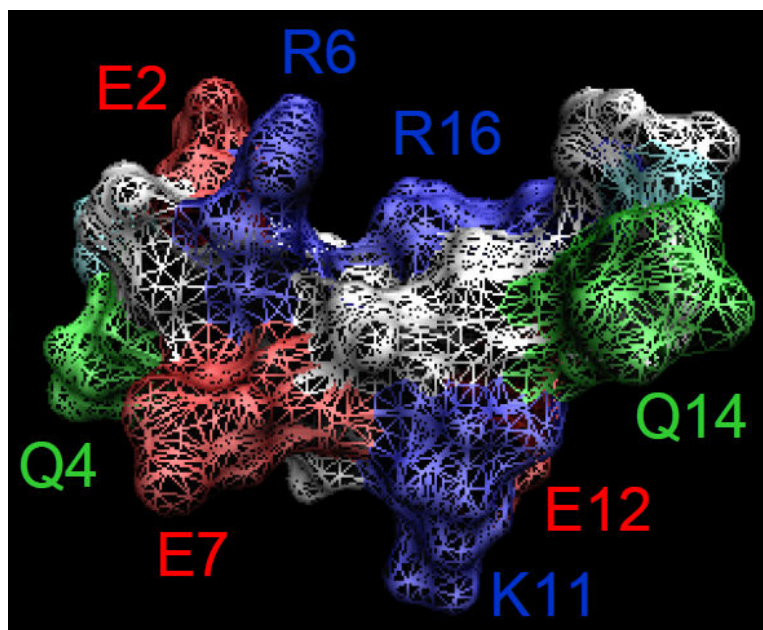


Σχήμα V.1.1

*Αναπαράσταση της δομής του πεπτιδίου Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ μέσω NMR. (Ο χρωματικός κώδικας έχει ως εξής: το κόκκινο αντιστοιχεί σε αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, το μπλε σε θετικά φορτισμένα, το πράσινο σε ουδέτερα αλλά πολικά αμινοξέα και το άσπρο σε μη πολικά αμινοξέα) (Li Zhang and Dimitrios Morikis, *Biochemistry* **2007**, 46, 12959-12967)*

Οι μετρήσεις με φασματοσκοπία NMR του πεπτιδίου Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ έδωσαν την δομή του παραπάνω σχήματος V.1.1 στο οποίο η διάταξη των αμινοξέων επιλέχθηκε να περιλαμβάνει κατάλοιπα που να έχουν τάση προς σχηματισμό α-έλικας. Η δομή της α-έλικας σταθεροποιεί τη διαμόρφωσή του στο διάλυμα σε μεγάλο βαθμό. Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο της δομής NMR είναι η κάμψη του πεπτιδίου. Συνήθως τέτοιες δομές προάγονται από clustering υδροφοβικών πλευρικών αλυσίδων σε μια εσωτερική επιφάνεια και την παρουσία πολικών πλευρικών αλυσίδων στην επιφάνεια που εκτίθεται στο διαλύτη. Στο πεπτίδιο μας η κάμψη επάγεται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις του τύπου (i, i+8) μεταξύ της W1 και της L9). Τα υπόλοιπα κατάλοιπα προωθούν την ελικοειδή δομή. Η στρατηγική ενσωμάτωσης αλληλεπιδράσεων θετικού-αρνητικού φορτίου της μορφής (i, i ± 4) και (i, i ± 1) παίζει σημαντικό ρόλο στη

σταθεροποίηση της δομής. Το παρακάτω σχήμα δείχνει τις κατανομές των φορτισμένων (E, R, K), ουδέτερων-πολικών (Q), και μη πολικών (W, A, L) αμινοξέων στην επιφάνεια του πεπτιδίου και καταδεικνύει την παρουσία των πολικών καταλοίπων τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική στροφή της α -έλικας.



Σχήμα V.1.2

*Αναπαράσταση της επιφάνειας του μέσου όρου της ελαχιστοποιημένης δομής του πεπτιδίου Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ χρωματισμένα ανάλογα με το είδος του αμινοξέος. (Li Zhang and Dimitrios Morikis, *Biochemistry* **2007**, 46, 12959-12967)*

Τα φάσματα NMR αποδεικνύουν ότι η σταθεροποίηση της δομής δεν οφείλεται μόνο σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Η παρουσία αλληλεπιδράσεων τύπου (i, i+4) ανάμεσα στο αρνητικά φορτισμένο γλουταμινικό οξύ (E) και τις θετικά φορτισμένες αργινίνες (R) και λυσίνες (K) που βρίσκονται 4 θέσεις πιο πέρα στην αλυσίδα ενισχύουν τη σταθερότητα της δομής σε υδατικά διαλύματα ¹²². Αυτού του είδους οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα αντίθετα φορτία όμως δεν είναι και οι μοναδικές που οφείλονται σε σχηματισμό «ζεύγους ιόντων». Υπάρχουν και άλλες παρόμοιες οι οποίες βρίσκονται σε συναγωνισμό με τις (i, i+4). Συγκεκριμένα υπάρχουν ζεύγη ιόντων τα οποία είναι της μορφής (i, i-1) (E-

R/K) και μάλιστα η συνεισφορά τους όπως δηλώνεται από τα φάσματα NMR είναι σημαντική. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου είναι επίσης πολύ καθοριστικός για τη διαμόρφωση. Τα μεσαία κατάλοιπα συμμετέχουν σε γέφυρες υδρογόνου, τόσο με τα κατάλοιπα που βρίσκονται στις προηγούμενες θέσεις, όσο και με τα κατάλοιπα που βρίσκονται στις επόμενες θέσεις.

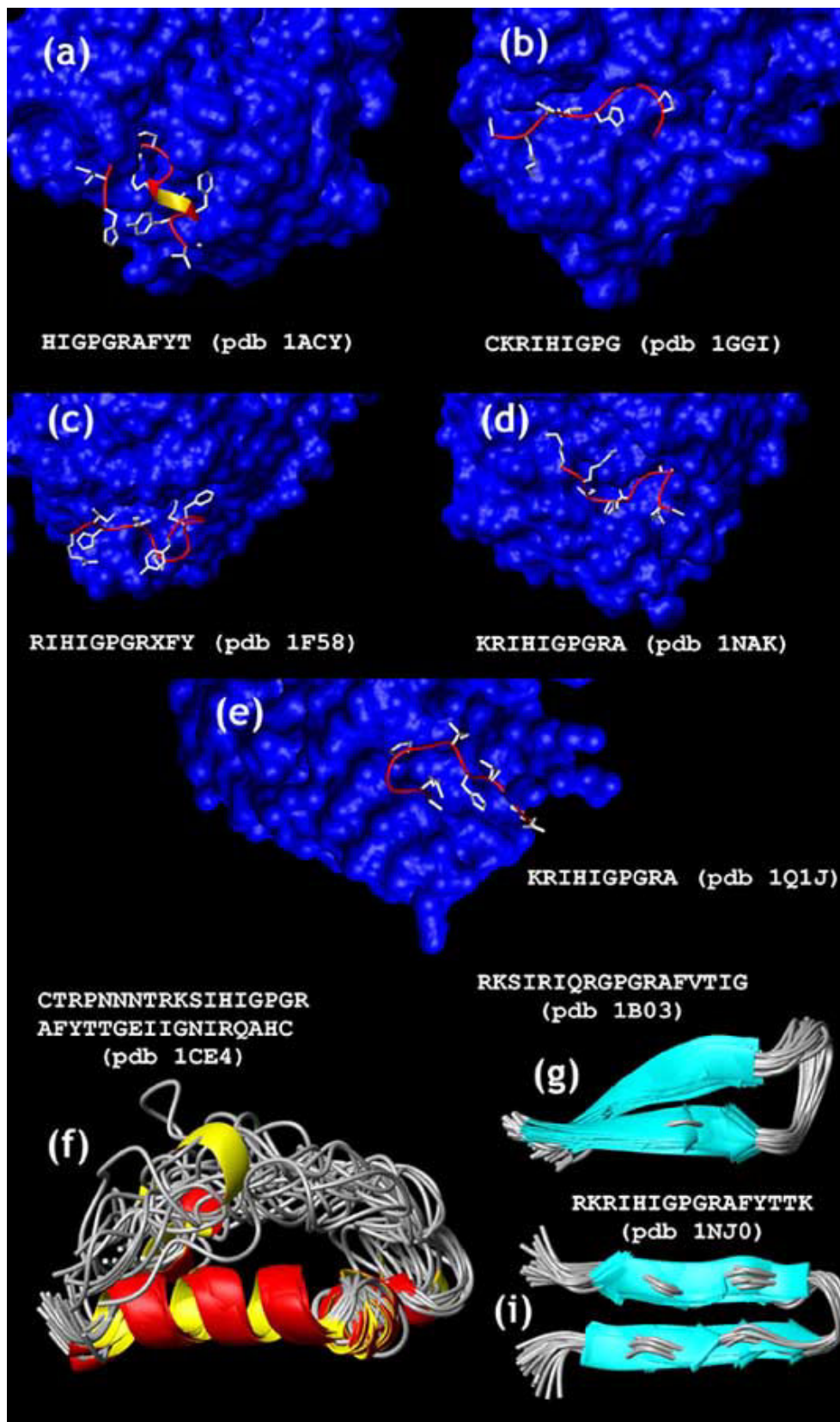
Στη δεύτερη φάση αυτής της μελέτης διερευνήθηκε η φυσικοχημική συμπεριφορά σε φυσιολογικά διαλύματα της σειράς πεπτιδίων V3 και CCR5-Nt καθώς και η επιρροή ιοντικών δυνάμεων/αλληλοεπιδράσεων σαν συνάρτηση της διαφορετικής αμινοξικής ακολουθίας.

Ιικό στέλεχος	Αμινοξική αλληλουχία														
LAI	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	Q	R	A	F	Y
MN	•	•	R	•	H	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF2	•	•	S	•	N	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF128	•	•	S	•	Y	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•
SF162	•	•	S	•	T	•	–	–	•	•	•	•	•	•	•

Μεταβολές στον αριθμό και στη θέση των βασικών αμινοξέων στην αμινοξική αλληλουχία του V3_{LAI} πεπτιδίου

Ιικό στέλεχος	Αμινοξική αλληλουχία														
LAI +5	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	Q	R	A	F	Y
LAI +1	V	G	•	•	L	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•
LAI +9	•	•	•	•	•	R	•	•	R	•	K	R	•	K	•

Η θηλιά V3 έχει δομή μιας β-φουρκέτας με μια μικρή έλικα στο C-τελικό άκρο της. Η δευτεροταγής αυτή δομή είναι σε καλή συμφωνία με παρατηρήσεις από πειράματα φασματοσκοπίας NMR και κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. Παρά το ότι υπάρχει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία στις περιοχές V3 της gp120, υπάρχει μια ομοφωνία σε κάποια δομικά χαρακτηριστικά. 1) Στο «στέμμα» της V3 υπάρχει μια στροφή GPC 2) Η β-πτυχωτή επιφάνεια τεντώνεται στα άκρα που είναι συζυγή προς τη στροφή αυτή με το



Σχήμα V.1.3

Κρυσταλλογραφικές (a-e) και NMR δομές (f-i) πεπτιδίων V3 της gp120. (Petros A. Galanakis, Georgios A. Spyroulias, Apostolos K. Rizos, **Panagiotis Samolis** and Elias Krambovitis *Conformational Properties of HIV-1 gp120/V3 Immunogenic Domains*, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2005) 1551-1568)

A

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment of CCR5 sequences

CKR5_HUMAN	MDYQVSSP--IYDINYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_PYGBI	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKVNKQIAA	30
CKR5_PYGNE	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKVNKQIAA	30
CKR5_TRAFR	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKVNKQIAA	30
CKR5_TRAPH	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKVNKQIAA	30
CKR5_GORGO	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKTNKQIAA	30
CKR5_PANTR	MDYQVSSP--IYDIDYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_PONPY	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_PAPHA	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_MACMU	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_CERTO	MDYQVSSP--TYDIDYYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_CERAE	MDYQVSSP--TYDIDNYTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_HYLLE	MDYQVSSP--TYDIDYDTSEPCQKINVKQIAA	30
CKR5_MOUSE	MDFQGSVPTYIYDIDYGMSAPCQKINVKQIAA	32
CKR5_RAT	MDFQGSIPTYIYDIDYSMSAPCQKINVKQIAA	32
	:* * * * **:* * ** *****	

B

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment of CXCR4 sequences

CCR4_HUMAN	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSMKEPCFREANANFNKI-	39
CCR4_PANTR	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIF	40
CCR4_MACMU	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSIKEPCFRENAHFNRI-	39
CCR4_CERTO	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSIKEPCFREKNAHFNRI-	39
CCR4_MACFA	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSIKEPCFRENAHFNRI-	39
CCR4_PAPAN	MEGIS--IYTSDNYTEE-MGSGDYDSIKEPCFRENAHFNRI	40
CCR4_BOVIN	MEGIR--IFTSDNYTEDDLGSGDYDSMKEPCFRENAHFNRI-	40
CCR4_FELCA	MDGFR--IYPSDNYTEDDLGSGDYDSMKEPCFRENAHFNRI-	40
CCR4_MOUSE	MEPISVSIYTSDNYSSEE-VGSGDYDSNKEPCFRDENVHFNR--	40
CCR4_RAT	ME-----IYTSDNYSSEE-VGSGDYDSNKEPCFRDENENFNRI	37
CCR4_SHEEP	-----YTEDDLGSGDYDSMKEPCFRENAHFNRI	30
	: :***** *****:* :* :*:	

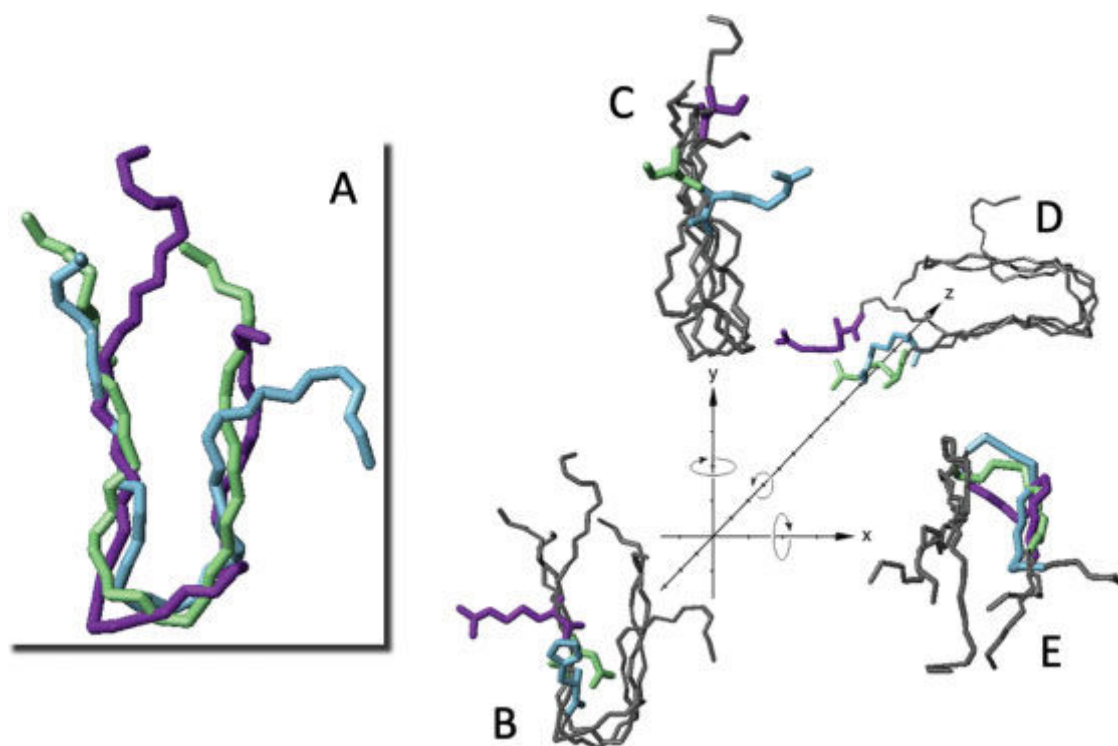
Σχήμα V.1.4

Στοιχισή της αμινοξικής ακολουθίας του N-τελικού τμήματος των συνυποδοχέων (A) CCR5 και (B) CXCR4. (Petros A. Galanakis, Georgios A. Spyroulias, Apostolos K. Rizos, Panagiotis Samolis and Elias Krambovitis *Conformational Properties of HIV-1 gp120/V3 Immunogenic Domains*, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2005) 1551-1568)

μοτίβο GPC 3) Στο C-τελικό άκρο υπάρχει ισχυρή τάση για ελικοειδή δομή 4) Μεγάλη δομική ευκαμψία της V3 παρά τους παραπάνω περιορισμούς. Εκτός από τις κλασικές δομές α-έλικας, β-πτυχωτής επιφάνειας και φουρκέτας υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις όταν το δείγμα δεν εντάσσεται σε καμία από αυτές τις κατηγορίες. Για παράδειγμα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως «τυχαίο σπείραμα». Η «στροφή» σε ένα πεπτίδιο μπορεί να συνίσταται από 3 αμινοξέα (ονομάζεται γ-στροφή), 4 αμινοξέα (β-στροφή) και 5 αμινοξέα (α-στροφή). Η γ-στροφή επάγει το σχηματισμό 7 δακτυλίων από δεσμούς υδρογόνου, η β-στροφή σχηματίζει 10 και η α-στροφή 13. Όταν υπάρχουν πολλές διαδοχικές β-στροφές, τότε ονομάζονται 3_{10} -έλικες.

Οι διαμορφώσεις της V3 μπορούν να εξαχθούν με φασματοσκοπία NMR μέσω του φαινομένου NOE ¹¹⁷. Τα δεδομένα NMR για τα βιοδραστικά πεπτίδια της V3 περιοχής αποκαλύπτουν τα παρακάτω στοιχεία για τη δομή τους: α) Δεν υπάρχουν ισχυρά σήματα NOE μεγάλης εμβέλειας ή εσωτερικά για τα κατάλοιπα που είναι παράπλευρα στη στροφή. Ένα πολύ μικρό πεπτίδιο μάλιστα δεν έχει NOE. Αυτό σημαίνει πως το μοτίβο αυτής της αντίστροφης θηλιάς των καταλοίπων GPCR δεν είναι συχνό σε μικρά πεπτίδια. β) Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο στο σχηματισμό της στροφής GPCR, αφού τα σήματα NOE δε διαφοροποιήθηκαν ιδιαίτερα απουσία τους. γ) Αλληλεπιδράσεις της μορφής $d_{NN}(i,i+1)$ τόσο κοντά στο N-τελικό όσο και στο C-τελικό άκρο είναι ενδείξεις για παρουσία σε μεγάλο ποσοστό της β-πτυχωτής επιφάνειας ή πιο απλά εκτεταμένων αλυσίδων. δ) Προσθήκη στο νερό ενός συνδιαλύτη TFE αλλάζει τη δομή. Από μια επιμήκη αλυσίδα που είναι στο νερό, η V3 μετατρέπεται σε μια «νεότευκτη» έλικα. Αυτό υποδηλώνει την παρουσία υψηλού ελικοειδούς ποσοστού στο C-τελικό άκρο στην αρχική μορφή του πεπτιδίου. Η C-τελική αυτή έλικα ωστόσο, φαίνεται πως δεν είναι σταθερή. Το πιθανότερο είναι πως υπάρχει δυνατότητα ενδομετατροπής έλικας σε τυχαία διαμόρφωση. Το τελικό συμπέρασμα είναι πως η δομή ακολουθεί το εξής σχέδιο : N-τελικό άκρο / β-πτυχωτή επιφάνεια / β-αντίστροφη φουρκέτα / β-πτυχωτή

επιφάνεια / α -έλικα / C-τελικό άκρο. Το μοτίβο GPCR κυριαρχεί στην αντίστροφη φουρκέτα.



Σχήμα V.1.5

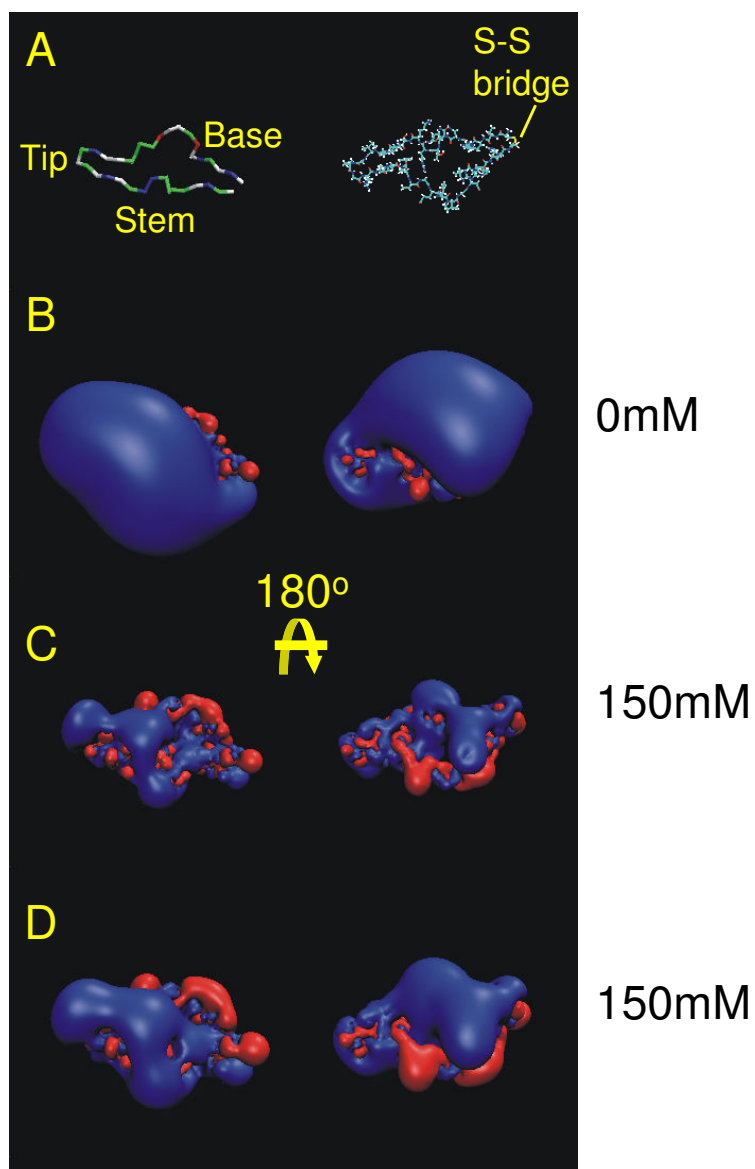
Υπέρθεση της μέσης τιμής της ελάχιστης ενέργειας των δομών PND V3 SF2, PND V3 MN, και PND V3 αντίστοιχα. ("NMR evidence of charge-dependent interaction between various PND V3 and CCR5 N-terminal peptides" Galanakis PA, Kandias NG, Rizos AK, Morikis D, Krambovitis E, Spyroulias GA. *Biopolymers*. **92(2)** (2009) 94-109)

Πρόσθετα στοιχεία φανερώνουν τα εξής (i) Το πεπτίδιο μπορεί να εναλλάσσεται σε διαφορετικές δομές ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες (και κάτω των 10 °C) (ii) Αμέσως μετά τη στροφή GPCR, ακολουθούν μικρά τμήματα β -αλυσίδων μέχρι την τελική α -έλικα που κυριαρχεί στο C-τελικό άκρο. (iii) Ο σκελετός της GPCR χαρακτηρίζεται ως γ -στροφή αφού το τελευταίο κατάλοιπο R (Αργινίνη) δε φαίνεται να είναι τόσο καταλυτικό στη διαμόρφωση όπως δηλώνεται από τα αποτελέσματα υποκατάστασής του. Η γ -στροφή σταθεροποιείται κυρίως από δεσμό υδρογόνου της

μορφής (i, i+2) ανάμεσα στο καρβονυλικό οξυγόνο της πρώτης γλυκίνης και το αμιδικό υδρογόνο της δεύτερης γλυκίνης. Η προλίνη (το 3^ο κατάλοιπο) είναι σε trans διάταξη σε σχέση με τις γλυκίνες.

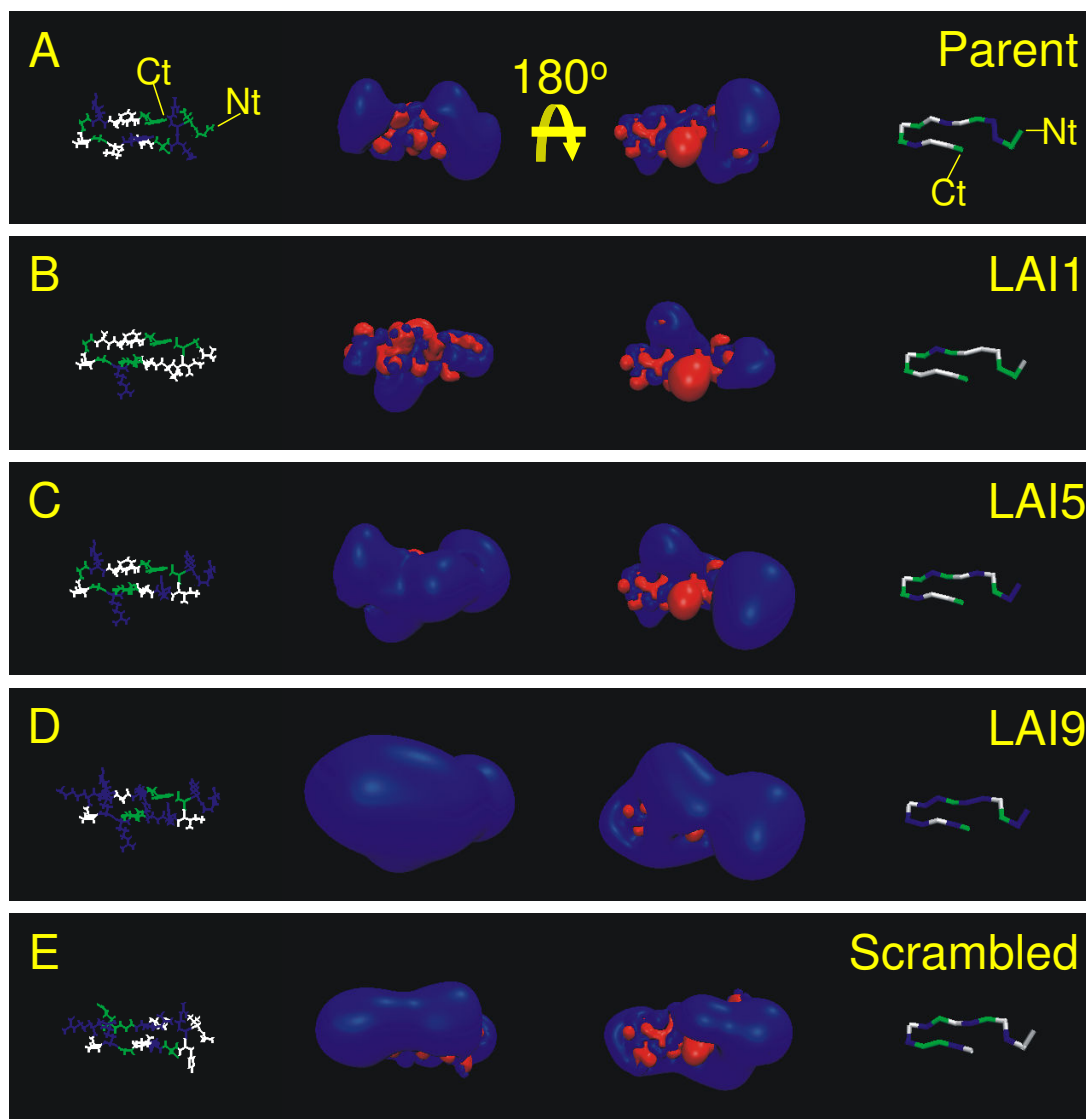
Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας εφαρμόστηκαν υπολογιστικές μέθοδοι προσομοίωσης σε ατομική ανάλυση σε συνδυασμό με ηλεκτροστατικούς υπολογισμούς για να συμπληρώσουμε τα πειραματικά μας ευρήματα σχετικά με τις επιδράσεις συνθετικών γραμμικών PND V3-πεπτιδίων σε πρωτογενή κύτταρα. Ένα φυσικοχημικό μοντέλο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-ligand συνήθως περιλαμβάνει μια διαδικασία δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αναγνώριση μεταξύ των δύο μορίων και τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου συμπλόκου. Το δεύτερο βήμα είναι η συγκεκριμένη δεσμική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την αναδιοργάνωση της μακρομοριακής αλυσίδας αλλά και των πλευρικών αλυσίδων με τον αποκλεισμό των μορίων των διαλυτών.

Η διαδικασία αναγνώρισης κατευθύνεται από μεγάλες αποστάσεις μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μακροδιπόλων, όπως αυτά απεικονίζονται στα παρακάτω σχήματα. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι επίσης παρούσες και κατά τη δεύτερη φάση της δεσμευτικής διαδικασίας. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή συνήθως κυριαρχείται από αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας, όπως δεσμούς υδρογόνου και γέφυρες άλατος (επίσης ηλεκτροστατικής φύσεως) αλλά και van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (μη ηλεκτροστατικές). Η εντροπία είναι επίσης άλλος ένας σημαντικός παράγοντας.



Σχήμα V.1.6

Δομή και ηλεκτροστατικά δυναμικά του μεμονωμένου βρόχου V3. Μπλε και κόκκινο υποδηλώνουν θετικά και αρνητικά ηλεκτροστατικά δυναμικά, αντίστοιχα. Η επιλογή 0 mM ιοντικής ισχύος απεικονίζει τις μέγιστες ενδομοριακές Coulombic αλληλεπιδράσεις. (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.)



Σχήμα V.1.7

Δομή και ηλεκτροστατικά δυναμικά του μεμονωμένου βρόχου V3 σαν συνάρτηση του συνολικού φορτίου +1 (LAI1), +5 (LAI5) και +9 (LAI9) (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.)

Οι πρόσφατες μελέτες με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της ερευνητικής μας ομάδας επικεντρώθηκαν στο αρχικό στάδιο της αναγνώρισης. Αυτό έγινε εφικτό δεδομένου ότι έχουμε τις δομές μόνο για τα πιθανολογούμενα μεμονωμένα σύμπλοκα πεπτιδίου-πεπτιδίου ή της πρωτεΐνης-πεπτιδίου, αλλά δεν έχουμε τη δομή του πραγματικού συμπλόκου V3-CCR5 έτσι ώστε να δώσουμε μια λεπτομερή εικόνα των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των θέσεων δέσμωσης.

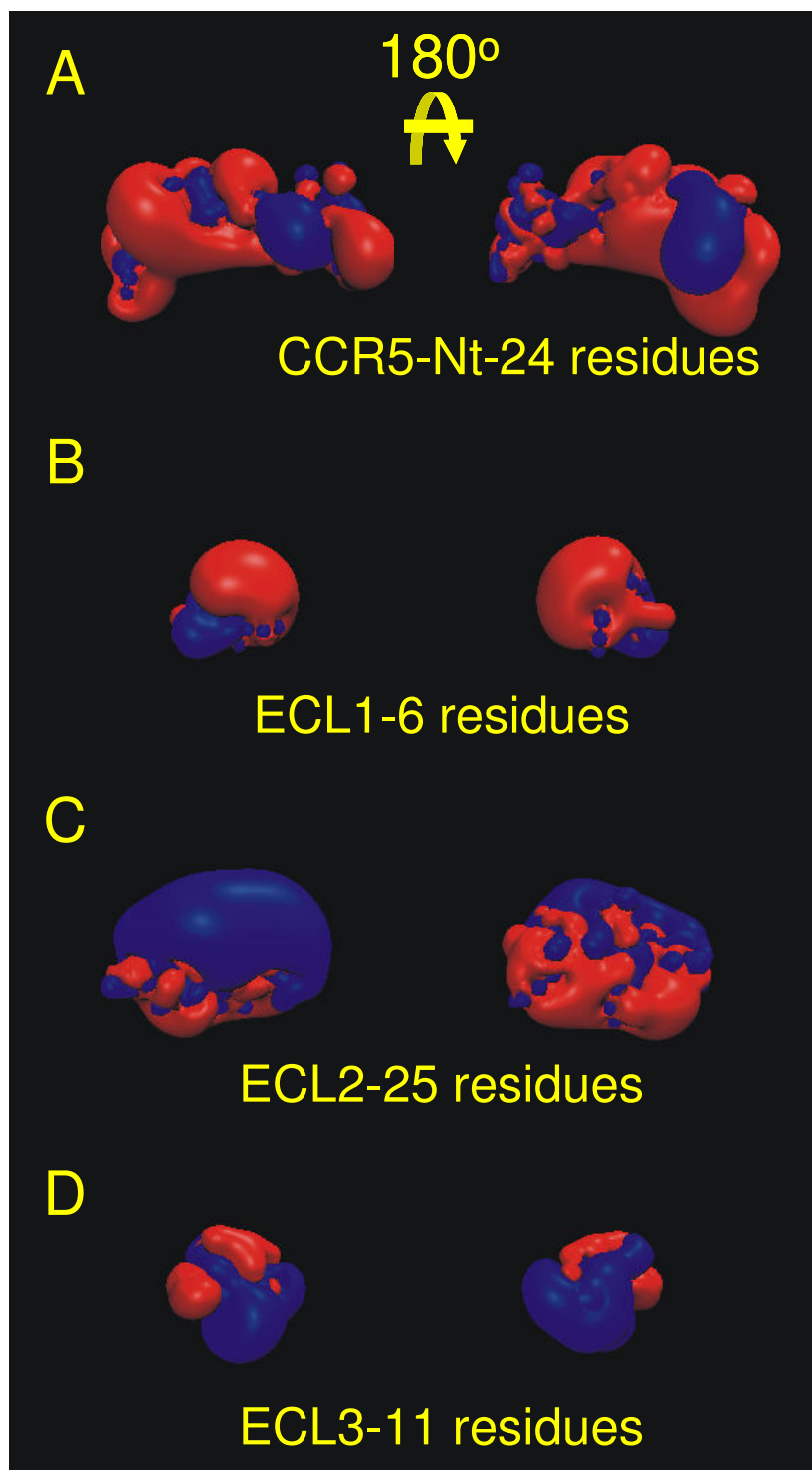
Διερευνήθηκαν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων πεπτιδίων που προέρχονται από το V3 βρόχο της γλυκοπρωτεΐνης gp120 και το N-τελικό άκρο του CCR5. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αναγνώρισης είναι δυνατές λόγω του συμπληρωματικού χαρακτήρα της χωρικής κατανομής των κατά κύριο λόγο θετικών ηλεκτροστατικών δυναμικών των V3-πεπτιδίων και των κατά κύριο λόγο αρνητικών ηλεκτροστατικών δυναμικών των πεπτιδίων CCR5-Nt. Φυσικά, η ισχύς της αλληλεπίδρασης εξαρτάται από το μήκος και την αμινοξική ακολουθία των πεπτιδίων. Τα PND V3-πεπτιδία καλύπτουν ένα μικρό μέρος του μίσχου και ολόκληρη την περιοχή της άκρης του βρόχου V3. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η δομή και ο ηλεκτροστατικός χαρακτήρας αυτής της περιοχής δικαιολογεί την ενεργό συμμετοχή της στην αλληλεπίδραση με τα πεπτιδία CCR5-Nt (Σχήμα V.1.6). Η έλλειψη περιοριστικών διαμορφώσεων στο V3 βρόχο που θα μπορούσε να ρυθμίζει την αλληλεπίδρασή του με το CCR5-Nt και η χαρακτηριστική ηλεκτροστατική φύση του PND V3 φαίνεται να είναι το κύριο χαρακτηριστικό που μπορεί να επηρεάσει την παρατηρούμενη διαδικασία ενεργοποίησης που προκαλείται από το θάνατο των κυττάρων (AICD).

Τόσο το CCR5-Nt όσο και η ECL2 περιοχή του συνυποδοχέα CCR5 είναι κρίσιμης σημασίας για την δέσμωση και σύντηξη του ιού με τη μεσολάβηση του βρόχου V3. Επίσης είναι πιθανό ότι η ECL2 και οι γειτονικές διαμεμβρανικές υδρόφοβες περιοχές, συμμετέχουν και αυτές ενεργά στα βήματα δέσμωσης της gp120 και της επακόλουθης σύντηξης. Ωστόσο, δεν είναι καθόλου σαφές ποιο τμήμα του βρόχου V3 αλληλεπιδρά με

τα εξωκυτταρικά τμήματα του CCR5, επειδή τα επιστημονικά δεδομένα μέχρι σήμερα είναι αντικρουόμενα¹²³⁻¹²⁵.

Διερευνήθηκαν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων πεπτιδίων που προέρχονται από το βρόχο V3 της gp120 και του συνυποδοχέα CCR5. Ειδικότερα, επικεντρωθήκαμε στο CCR5-Nt και στην ECL2 εξωκυτταρική περιοχή του CCR5. Σε μια προκαταρκτική σύγκριση, φαίνεται ότι η αμινο-τελική περιοχή CCR5-Nt είναι πιο δεκτική για δέσμευση με το πεπτίδιο V3, από ότι η ECL2 περιοχή λόγω της κυριαρχίας των αρνητικών ηλεκτροστατικών δυναμικών. Ωστόσο, υπάρχουν θετικές περιοχές ηλεκτροστατικών δυναμικών στο CCR5-Nt και αρνητικές περιοχές στην ECL2 (Σχήμα V.1.6), οι οποίες μετά τη σύνδεση του V3 και τις συναφείς με αυτήν δομικές ανακατατάξεις μπορεί να είναι παράγοντες που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση του συστήματος. Μια διαδοχική σε δύο στάδια δέσμευση μετά την αναγνώριση, μπορεί επίσης να είναι δυνατή, με τη συμμετοχή διαφόρων εξωκυτταρικών περιοχών. Οι ιδιαιτερότητες των ηλεκτροστατικών δυναμικών μπορεί να διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στους τρόπους αλληλεπίδρασης που έχουν προταθεί στο παρελθόν (π.χ. αναλογία 2:3 σε CCR5-Nt : V3-πεπτίδιο). Ωστόσο, δεν μπορούμε να προτείνουμε ένα πιο συγκεκριμένο μοντέλο επειδή απουσιάζει η τρισδιάστατη δομή ενός τέτοιου συμπλόκου.

Η ενεργοποίηση των T κυττάρων-στόχων και η δέσμευση της gp120 είναι κατά πάσα πιθανότητα δύο ξεχωριστές λειτουργίες του βρόχου V3. Με βάση τους ηλεκτροστατικούς υπολογισμούς της ερευνητικής μας ομάδας και της υπολογιστικής μοντελοποίησης με βάση το βρόχο V3 προτείνουμε ένα μοντέλο στο οποίο η V3 περιοχή αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με το CCR5-Nt.

**Σχήμα V.1.8**

Ηλεκτροστατικά δυναμικά των εξωκυτταρικών περιοχών του CCR5.

(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.)

2) Προσδιορισμός των υδροδυναμικών παραμέτρων

Η δυναμική σκέδαση ακτίνων Laser εκτιμά τις διαστάσεις των μορίων θεωρώντας ότι σχηματίζουν πάντοτε μια σφαιρική φυσαλλίδα στην οποία το μακρομόριο περιστοιχίζεται από μόρια διαλύτη (συνήθως νερό). Κάθε μέγιστη διακύμανση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αντιστοιχεί σε μια κορυφή η οποία παρέχει το μεταφορικό συντελεστή διάχυσης (D_{trans}) του μακρομορίου μέσα στο διάλυμα. Ο D_{trans} σε αραιά διαλύματα χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της λεγόμενης υδροδυναμικής ακτίνας R_h που είναι η ακτίνα της φυσαλλίδας. Η σκέδαση φωτός σε αντίθεση με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές μπορεί να προβλέψει εύκολα και με ακρίβεια την παρουσία και τις ακριβείς διαστάσεις των συσσωματωμάτων που πολλές φορές σχηματίζουν τα μονομερή μόρια, αφού η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από το μοριακό βάρος και τις διαστάσεις του μορίου.

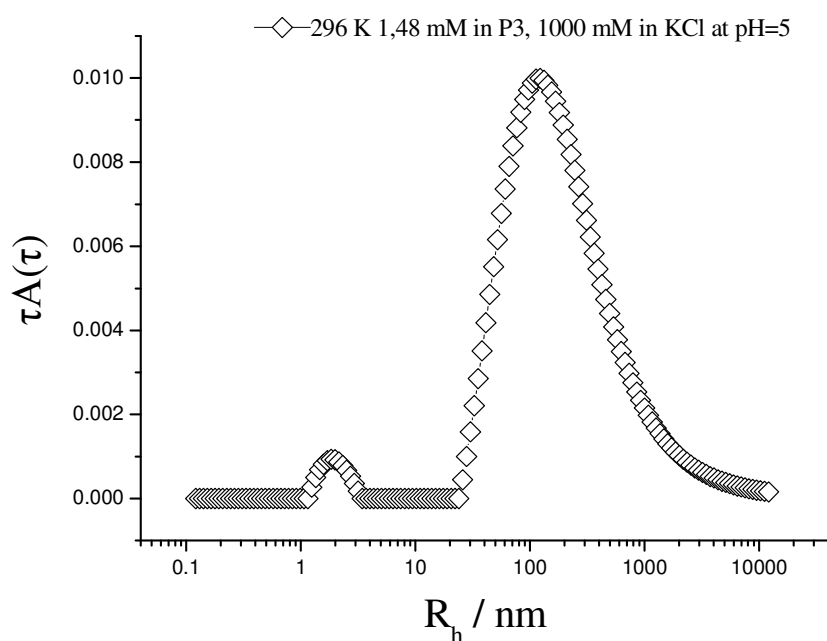
Στην συγκεκριμένη περίπτωση η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μπορεί να περιγραφεί σαν μια απλή εκθετική συνάρτηση και η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων με μια συνάρτηση της μορφής $ae^{-t/\tau}$ μπορεί να δώσει την ένταση και τον χαρακτηριστικό χρόνο χαλάρωσης της κίνησης. Η ανάλυση αυτή απαιτεί την εκτέλεση ενός αντίστροφου 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 $\tau A(\tau)$ (Σχήμα V.2.1). 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.

Τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς τις διαστάσεις τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης, ιονικής ισχύος κτλ. Για κάθε κατηγορία διαλύματος οι υδροδυναμικές ακτίνες φανερώνουν αλλαγές ως προς τη διαδικασία συσσωμάτωσης αλλά και τις διαστάσεις τους.

Τα πεπτίδια Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂ (P3) και

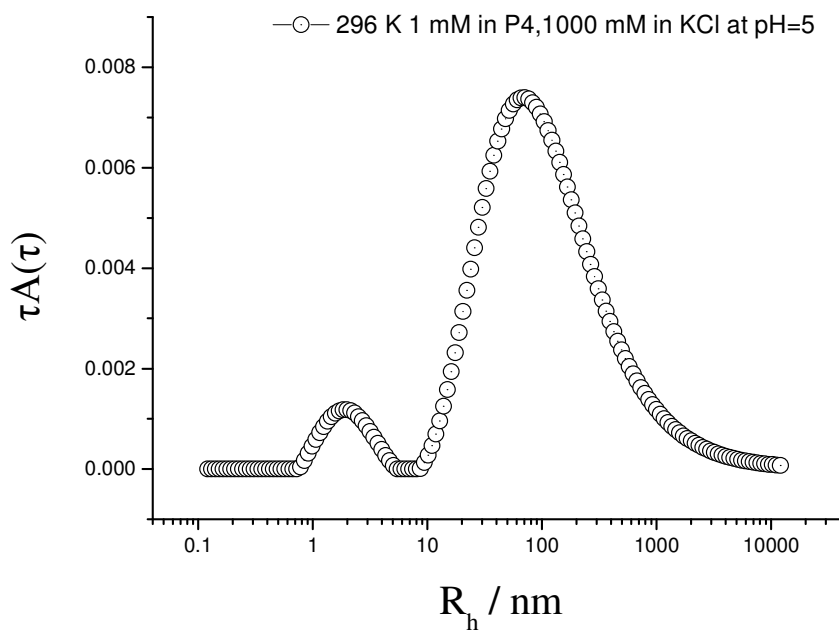
Ac-W-EAAAK-EAAAK-EAAAK-EAAAK-NH₂ (P4)

διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ύπαρξη μιας επί πλέον επαναλαμβανόμενης ακολουθία EAAAK στο πεπτίδιο P4. Παρατηρούμε ότι το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace των πειραματικών συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης δίνει δύο χαρακτηριστικές κορυφές. Οι υδροδυναμικές ακτίνες των αντίστοιχων πεπτιδίων P3 και P4 εμφανίζονται με τιμές της ίδιας τάξης μεγέθους περίπου των 2 nm.



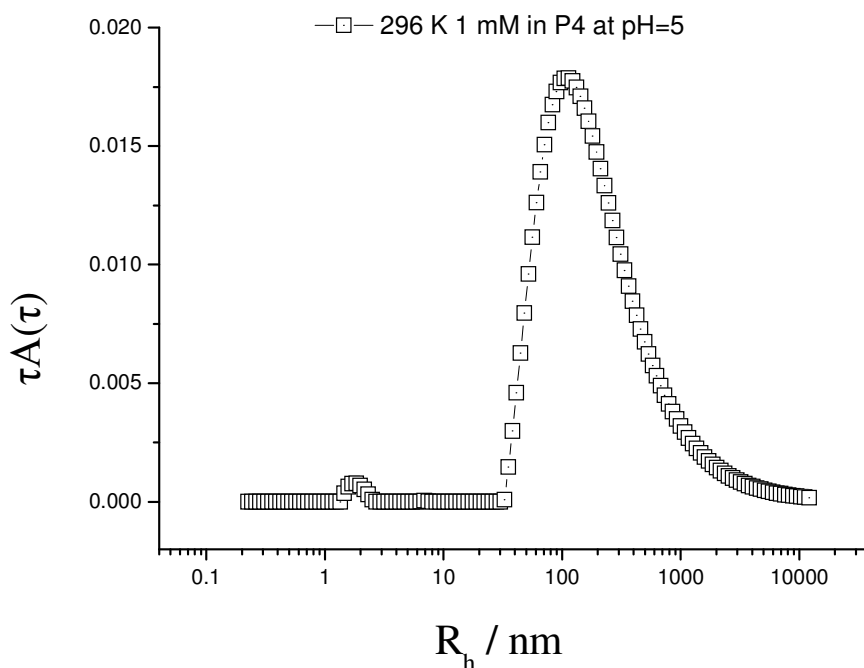
Σχήμα V.2.1

Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου P3



Σχήμα V.2.2

Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου P4 παρουσία άλατος

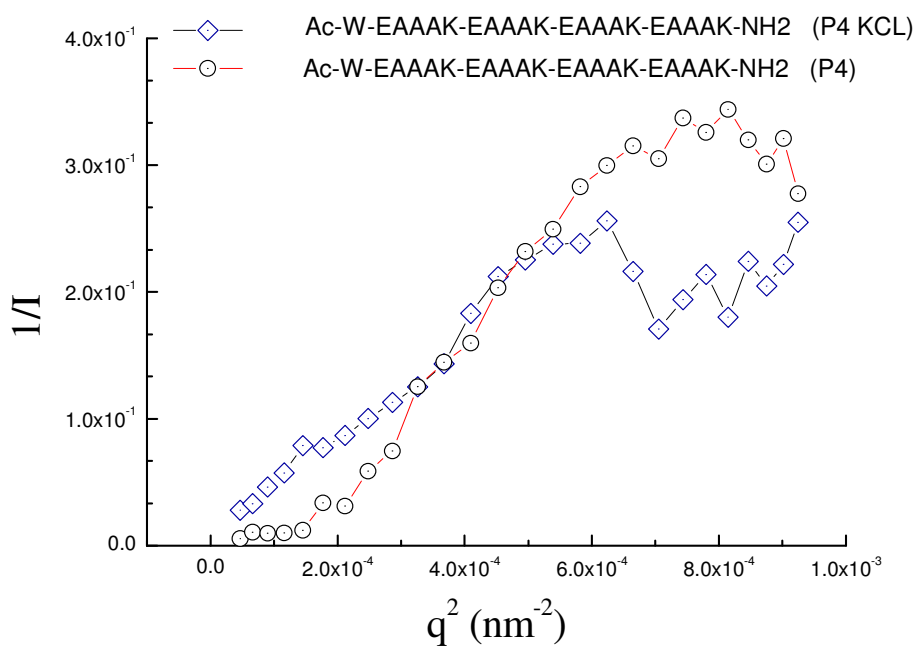


Σχήμα V.2.3

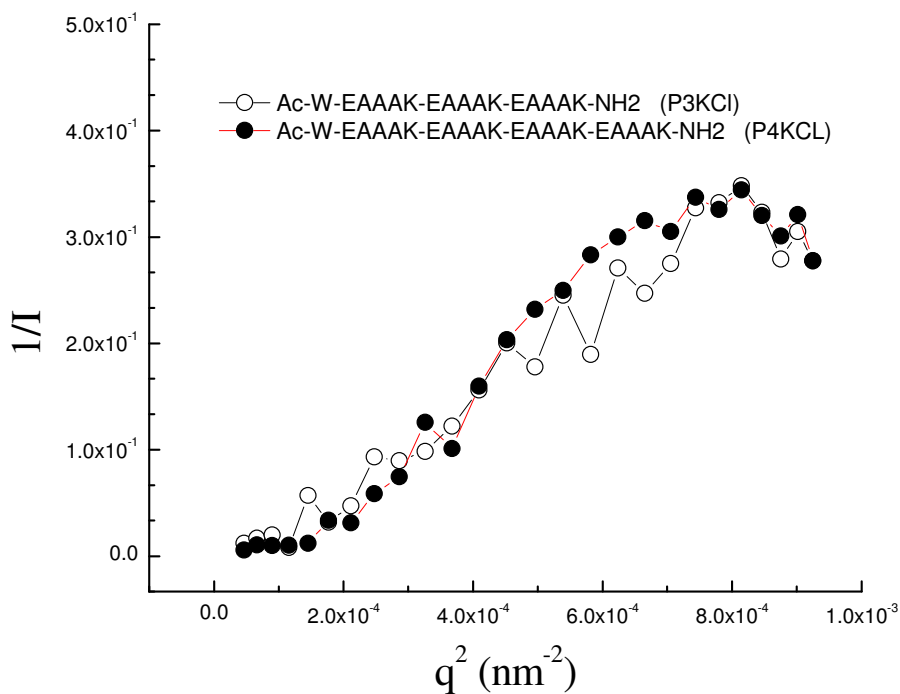
Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου P4 απουσία άλατος

Η παρουσία του άλατος φαίνεται ότι κάνει πιο ευδιάκριτη την γρήγορη κορυφή στα φάσματα των πεπτιδίων P3 και P4, (Σχήμα V.2.1 και Σχήμα V.2.2 σε σύγκριση με το Σχήμα V.2.3) πολύ πιθανότατα μέσω της τροποποίησης-ελαχιστοποίησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες συνεισφέρουν στην σταθερότητα της δομής των πεπτιδίων. Τα πειραματικά μας δεδομένα από τις μετρήσεις NMR συνηγορούν υπέρ της παρουσία μεσαίου και μεγάλου βεληνεκούς ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν όλα τα φορτισμένα αμινοξέα π.χ. E2 με R6, E7 με K11, E12 με R16 δηλ. του τύπου E-K/R(I, i+4) καθώς και E7 με R6, E12 με K11 δηλ. δηλ. του τύπου E-K/R(i, i-1).

Η αργή κορυφή αντιστοιχεί σε συσσωματώματα τα οποία αντιπροσωπεύουν υπερμοριακά σύμπλοκα με ακτίνες οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 70 και 120 nm. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η αργή κορυφή κατέχει δεσπόζουσα θέση στα μεγάλα μεγέθη, αυτό δεν σημαίνει ότι τα μεγάλα υπερμοριακά συγκροτήματα πεπτιδίων υπερτερούν πληθυσμιακά σε σχέση με τα μικρά μονομερή πεπτίδια. Υπενθυμίζουμε εδώ επειδή η σκεδαζόμενη ένταση είναι ανάλογη τη έκτης δύναμης του μεγέθους των σωματιδίων, η τεχνική της σκέδασης ακτίνων Laser είναι πολύ ευαίσθητη στην παρουσία μεγάλων σωματιδίων. Τα φάσματα στατικής σκέδασης δείχνουν επίσης τις μεταβολές στά μεγέθη των υπερμοριακών συμπλόκων στο παράδειγμα σύγκρισης που παρουσιάζεται στο Σχήμα V.2.4 σαν συνάρτηση της παρουσίας ή μη άλατος.

**Σχήμα V.2.4**

Το αντίστροφο της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ($1/I$) σαν συνάρτηση του q^2 .

**Σχήμα V.2.5**

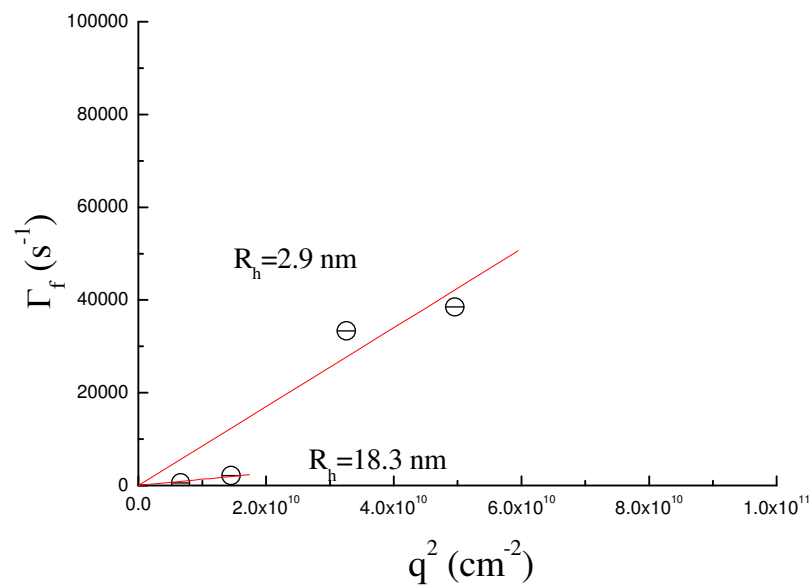
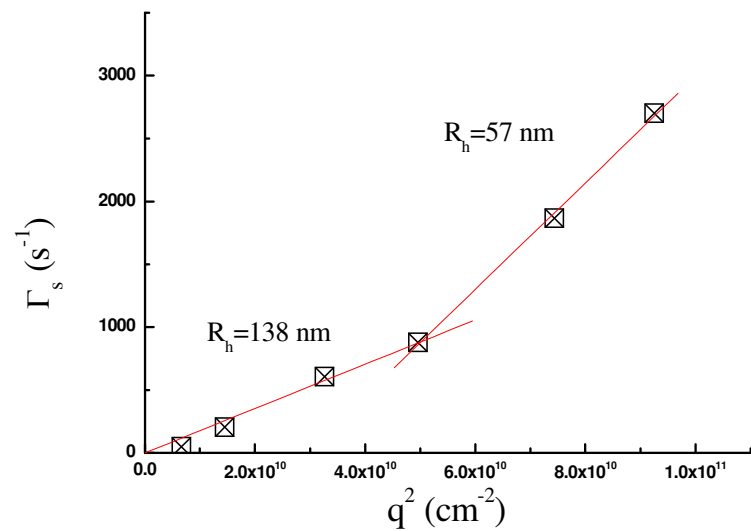
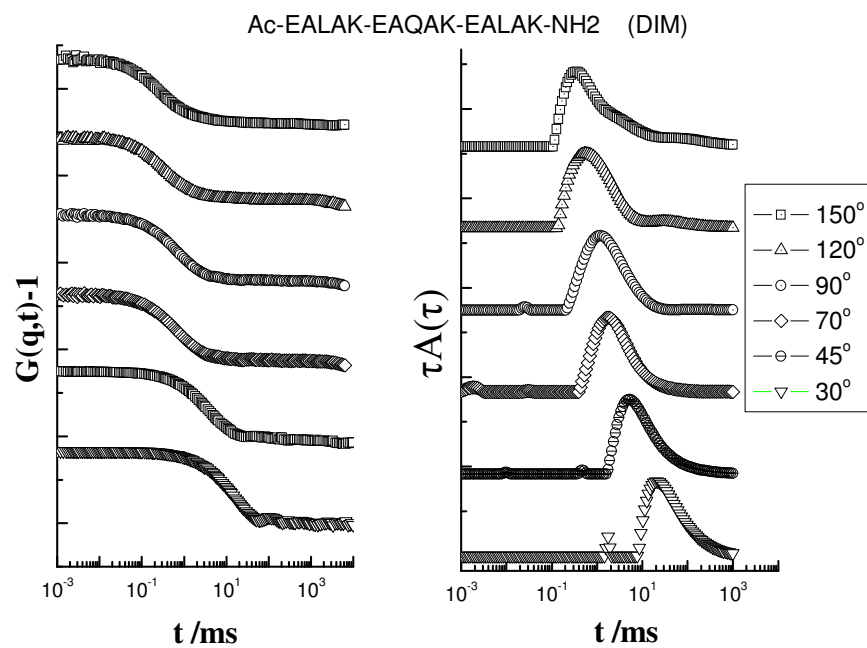
Το αντίστροφο της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ($1/I$) σαν συνάρτηση του q^2 .

Όπως παρατηρούμε στο Σχήμα V.2.5 η διαφορά στο φάσμα στατικής σκέδασης των πεπτιδίων P3 και P4 είναι ανεπαίσθητη παρά την προσθήκη μιας επί πλέον επαναλαμβανόμενης ακολουθίας ΕΑΑΑΚ. Πρέπει να τονιστεί ότι και η φασματοσκοπία NMR στην περίπτωση μικρών πεπτιδίων δίνει μία δυναμική εικόνα πολλών δομών (διαμορφωμένων) που εναλλάσσονται μεταξύ τους σε πραγματικό χρόνο ακριβώς γιατί υπάρχουν διαταραχές στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

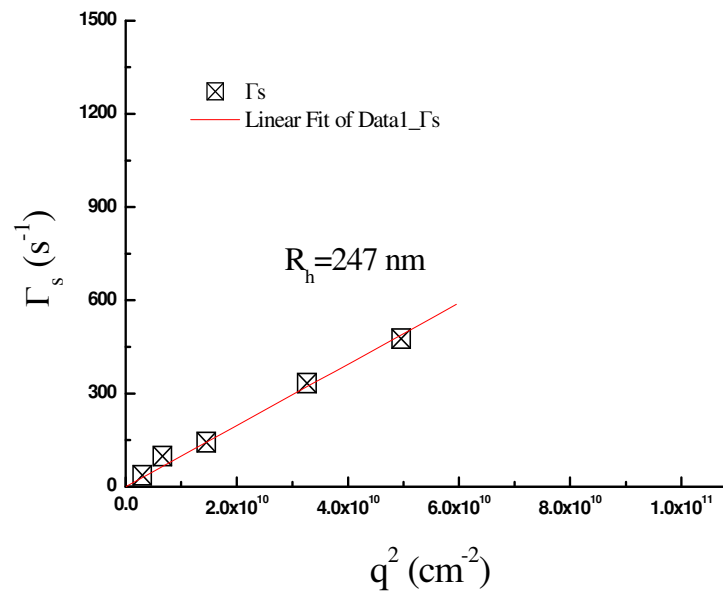
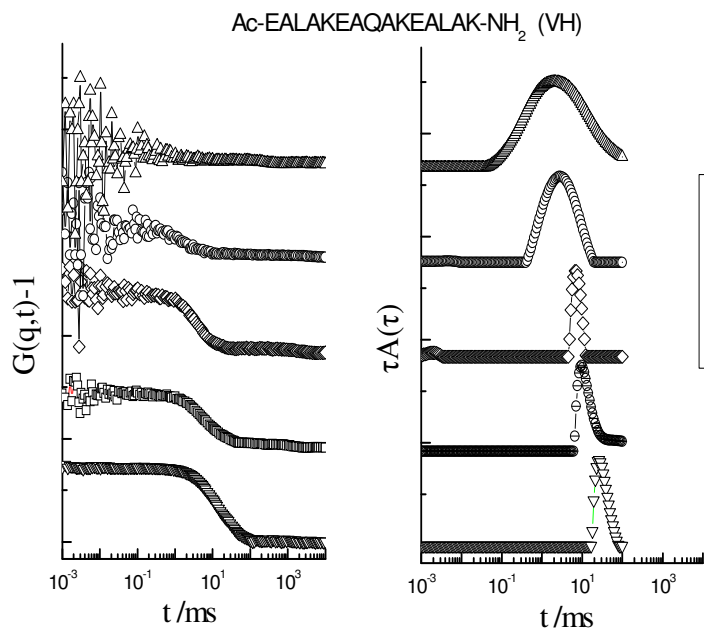
Με δεδομένη την ευαισθησία της σκέδασης ακτίνων Laser σε μια ευρεία δυναμική περιοχή η οποία καλύπτει και την περιοχή των διαστάσεων που αντιστοιχούν στις ηλεκτροστατικές αλλά και στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν μέσω NMR, τα πειραματικά μας δεδομένα δίνουν επί πλέον σημαντικές πληροφορίες για τις υδροδυναμικές παραμέτρους και διαστάσεις των υπερμοριακών συμπλόκων που δεν ανιχνεύονται από το NMR.

Η δεύτερη σειρά πεπτιδίων Ac-EALAK-EAQAK-EALAK-NH₂ (DIM) και Ac-W-EAQAR-EALAK-EAQAR-A-NH₂ (DMI) μελετήθηκαν επίσης ως προς τις υδροδυναμικές τους παραμέτρους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης, ιονικής ισχύος κτλ. Ένα αντιπροσωπευτικό σετ μετρήσεων των πεπτιδίων DIM δίνεται παρακάτω. Παρατηρούμε ότι οι υδροδυναμικές παράμετροι παραμένουν στην ίδια τάξη μεγέθους με τα πεπτιδία P3 και P4. Εν τούτοις σχηματίζονται δύο οικογένειες υπερμοριακών συμπλόκων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και βρίσκονται σε μια κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Οι μετρήσεις αποπολωμένης σκέδασης που παρατίθενται παρακάτω επιβεβαιώνουν την ραβδόμορφη διαμόρφωση αυτών των μικρών πεπτιδίων.

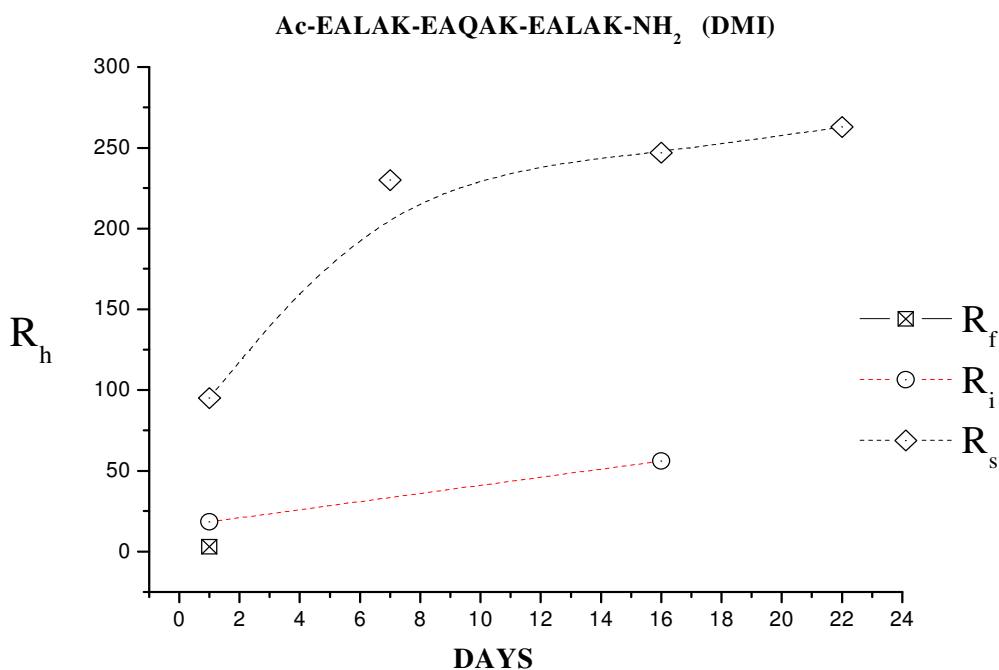
Ac-EALAKEAQAKEALAK-NH ₂		
VV (c= 18,4 mM, 296 K)	Γωνία σκέδασης	Ένταση (kHz)
DMI30.dat	30	2055
DMI45.dat	45	433
DMI70.dat	70	110
DMI90.dat	90	76
DMI130.dat	120	50
DMI150.dat	150	78



Ac-EALAKEAQAKEALAK-NH ₂ (VH)		
VH [depolarized] (T = 296 K)	Γωνία σκέδασης	Ένταση (kHz)
DEP20.dat	20	52.7
DEP30.dat	30	4.5
DEP45.dat	45	2.3
DEP70.dat	70	0.6
DEP90.dat	90	0.6



Η χρονική εξέλιξη των υδροδυναμικών ακτίνων χαρακτηρίζεται από μία σταδιακή αύξηση του μεγέθους των υπερμοριακών συμπλόκων. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα η υδροδυναμική ακτίνα προσεγγίζει μια οριακή τιμή μετά από την πάροδο περίπου μιας εβδομάδας.

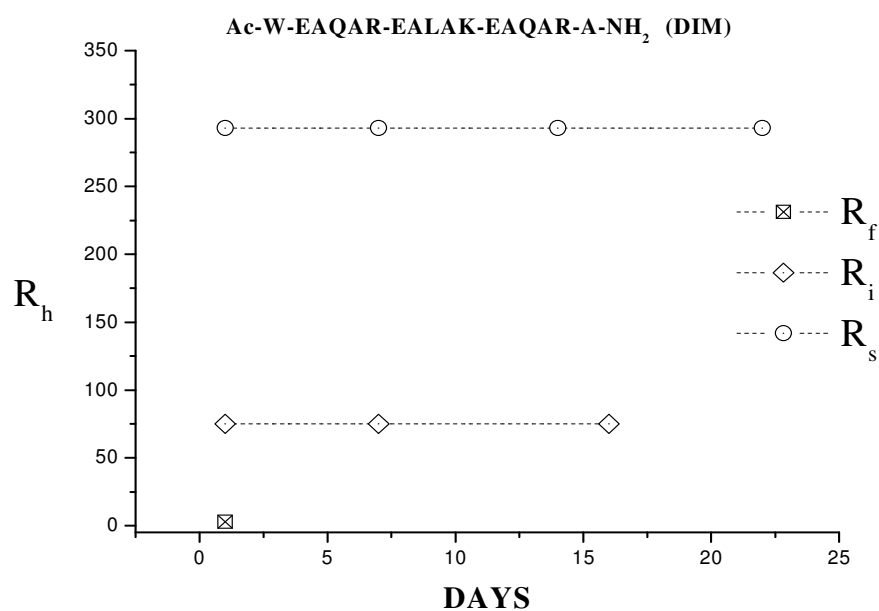


Σχήμα V.2.6

Χρονική εξέλιξη υδροδυναμικών ακτίνων (T = 296 K c = 18,4 mM)

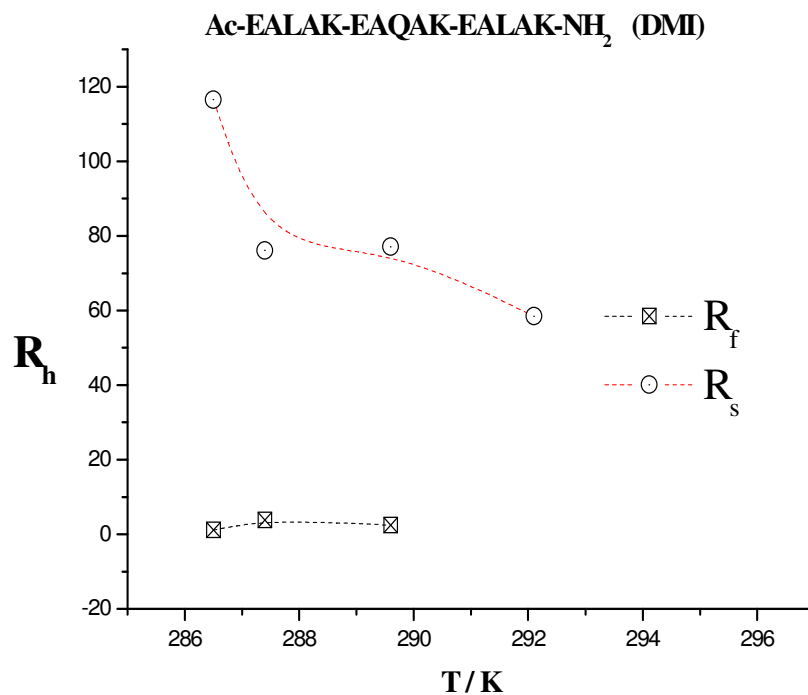
Τα αντίστοιχα δεδομένα του πεπτιδίου DIM δείχνουν σχετικά σταθερές τιμές υδροδυναμικής ακτίνας τόσο των υπερμοριακών συμπλόκων όσο και της ενδιάμεσης χαλαρωτικής διαδικασίας (Σχήμα V.2.7).

Η εξάρτηση των υδροδυναμικών παραμέτρων του πεπτιδίου DMI από την θερμοκρασία δείχνει μια πολύ μικρή επίδραση στις διαστάσεις των μονομερών πεπτιδίων, όμως τα πολύ μεγαλύτερα ασταθή υπερμοριακά σύμπλοκα δείχνουν να επηρεάζονται σημαντικά. Όπως είναι αναμενόμενο η υδροδυναμική ακτίνα των υπερμοριακών συμπλόκων μειώνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία (Σχήμα V.2.8).



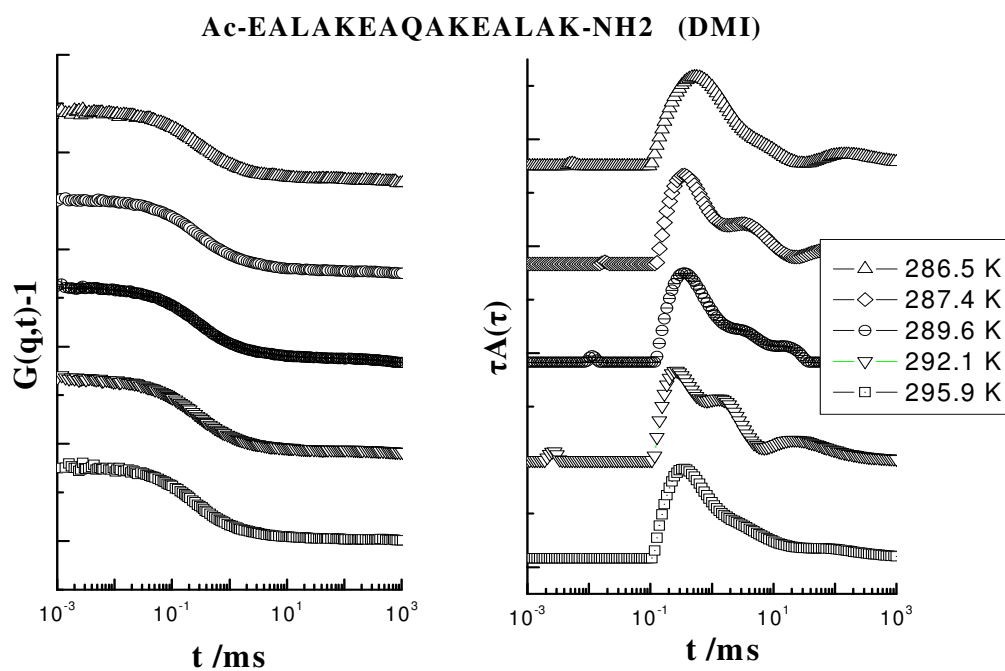
Σχήμα V.2.7

Χρονική εξέλιξη υδροδυναμικών ακτίνων ($T = 296\text{ K}$ $c = 0,21\text{ mM}$).



Σχήμα V.2.8

Θερμοκρασιακή εξέλιξη για το δείγμα DMI.

**Σχήμα V.2.9**

ΑΡΙΣΤΕΡΑ : Συγκεντρωτικό διάγραμμα με συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης.

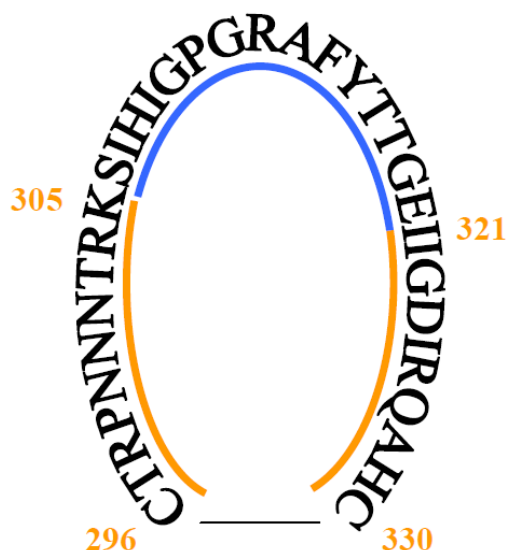
ΔΕΞΙΑ : Συγκεντρωτικό διάγραμμα με *ILT* σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας.

3) Αλληλεπιδράσεις V3 περιοχής

Μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης του HIV-1 με τους υποδοχείς χημειοκινών. Σχετικά πρόσφατες μελέτες αναγνωρίζουν τη V3 ως το βασικό επίτοπο της gp120 που μπορεί να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 ή CXCR4 των κυττάρων στόχων επιτυγχάνοντας πέρα από την ιική είσοδο σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και αύξηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{+2} και της τριφωσφορικής ινοσιτόλης στα T λεμφοκύτταρα, γεγονότα άμεσα σχετιζόμενα με καταστάσεις ενεργοποίησης^{114, 120}. Πρόσφατες μελέτες στα κριτήρια αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CCR5 με την gp120 έχουν δείξει ότι απαιτείται επιπλέον η προσθήκη τουλάχιστον δύο θεικών ομάδων στα κατάλοιπα τυροσίνης του CCR5-Nt προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική πρόσδεση^{121, 122}. Παράλληλα, η συμμετοχή της V3 περιοχής έχει έμμεσα δειχθεί σε πειράματα εφαρμογής της τεχνικής SPR (Surface Plasmon Resonance), όπου διαλυτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα gp120 /sCD4 με έλλειψη της V3 περιοχής (gp120ΔV3/sCD4) αδυνατούν να αλληλεπιδράσουν με CCR5-Nt πεπτίδια, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα 'wild type' (gp120/sCD4)¹²⁶. Ήδη γνωρίζουμε από τους *Zafiroopoulos et al*¹¹⁴ ότι η επίδραση του αριθμού των βασικών αμινοξέων της V3 αλληλουχίας στο βαθμό ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων από το V3 λιπόσωμα αποτελεί άμεση ένδειξη ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης του V3 με αρνητικά φορτισμένα στοιχεία της επιφάνειας των CD4+ T κυττάρων. Η κατασκευή της συγκεκριμένης λιποσωμικής δομής με επιφανειακά ακινητοποιημένο V3 λιποπεπτίδιο είχε ως σκοπό τη χωροταξική μίμηση της gp120 πάνω στο ιοσωμάτιο του HIV. Η δομή αυτή εξυπηρετούσε την έκθεση του V3 πεπτιδίου στην επιφάνεια των μακροφάγων μέσω μιας διαδικασίας μεμβρανικής σύντηξης.

Έχει προταθεί λοιπόν ότι πιθανόν η V3 υποπεριοχή της gp120 να συμμετέχει στη διαδικασία αλληλεπίδρασης. Στα X4 και R5/X4 ιικά στελέχη η V3 περιοχή είναι ισχυρά θετικά φορτισμένη, κάτι που της επιτρέπει να ασκεί ισχυρές ηλεκτροστατικές

αλληλεπιδράσεις με πολυανιοντικά μόρια, όπως η όξινη αμινοτελική εξωκυτταρική επιφάνεια του CXCR4 ¹¹⁰.



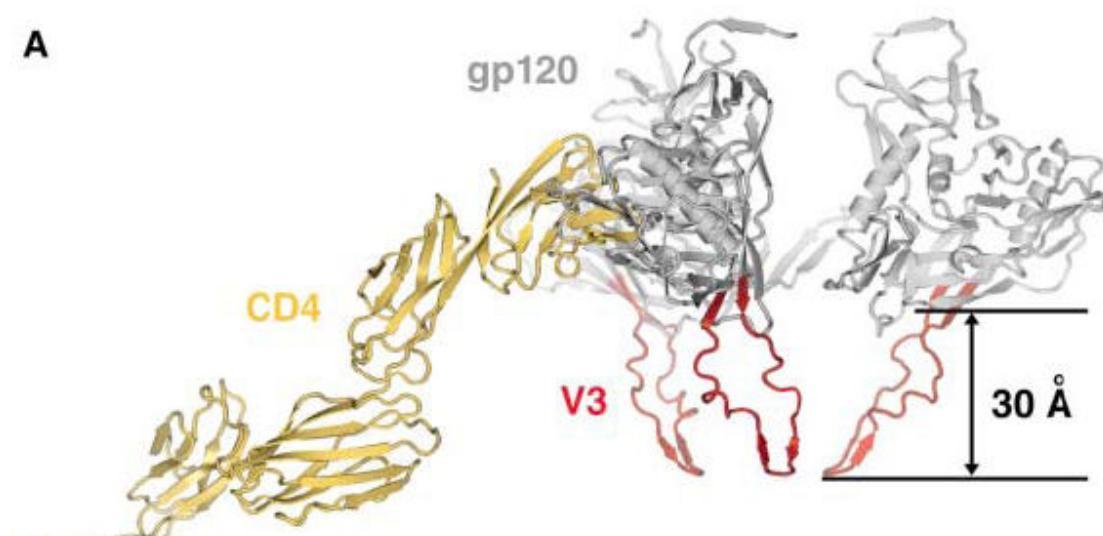
Σχήμα V.3.1

Δομή της V3 MN περιοχής. Η δομή β-φουρκέτας του V3 στέμματος μιμείται τη δομή που βρέθηκε σε χημειοκίνες οι οποίες είναι τα φυσικά ligand των συνυποδοχέων του HIV.

Μικρού εύρους αμινοξικές αλλαγές μέσα σ' αυτή την περιοχή, που όπως έχει δειχθεί δε συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το CD4 μόριο, μεταβάλλει την ικανότητα του ιού να μολύνει μακροφάγα ή μετασχηματισμένα T κύτταρα ¹¹¹.

Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι ισοωμάτια με ελλειμματικές παραλλαγές της V3 περιοχής αδυνατούν να προσδεθούν στον CCR5 υποδοχέα, ακόμα και κάτω από συνθήκες ισχυρής αλληλεπίδρασης με τον CD4 υποδοχέα ¹¹². Αν και οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι η άμεση αλληλεπίδραση των υποδοχέων CCR5 ή CXCR4 με την gp120 μπορεί να είναι ισχυρή και αποτελεσματική μόνο παρουσία του CD4, πρόσφατα ευρήματα από το πεδίο συσχέτισης της μολυσματικότητας του HIV-1 με τα επίπεδα έκφρασης των CD4 μορίων και των συνυποδοχέων, ειδικά του CCR5, καταλήγουν ότι ναι μεν και οι δύο υποδοχείς μπορεί να απαιτούνται για αποτελεσματική πρόσδεση του ιού, όμως η έκφραση

του CCR5 μπορεί να είναι ιδιαίτερα κρίσιμη όταν τα επίπεδα έκφρασης του CD4 είναι χαμηλά. Αυτό βρίσκει εφαρμογή στην περίπτωση μόλυνσης μακροφάγων, δενδριτικών και μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν μικρή έκφραση CD4, άρα για να μολυνθούν ικανοποιητικά πιθανόν να απαιτούνται συμπληρωματικές αλληλεπιδράσεις.

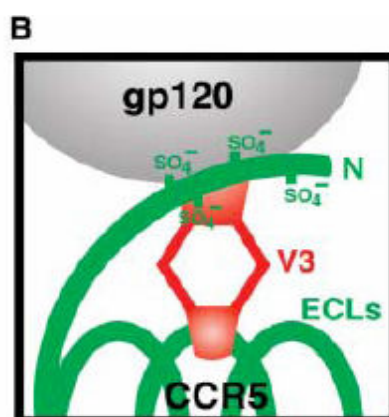


Σχήμα V.3.2

*Κρυσταλλογραφική δομή του μορίου CD4 μαζί με την γλυκοπρωτεΐνη gp120*¹¹³

Έτσι, το CD4 μόριο πιστεύεται ότι είναι ο πρωταρχικός υποδοχέας πρόσδεσης για τα T-cell-line adapted (TCLA) HIV-1 στελέχη πάνω στα T κύτταρα, αλλά πιθανόν να έχει μικρότερο ρόλο στην πρόσδεση του ιού στα μακροφάγα, στη μικρογλοία και στα δενδριτικά κύτταρα, όπου η παρουσία του συνυποδοχέα και πιθανόν άλλων μορίων παίζει περισσότερο καθοριστικό ρόλο¹¹⁰.

Παρατηρήσεις των *Zafirooulos et al*¹¹⁴ έδειξαν ότι ένα συνθετικό πεπτίδιο 15 αμινοξέων από τον κύριο ημισυντηρημένο εξουδετεροποιητικό (neutralizing) επίτοπο της PND V3 περιοχής της gp120 του HIV-1 LAI στελέχους, φορέας ενός GPGRAF αμινοξικού μοτίβου, μπορούσε, όταν βρισκόταν εκτεθειμένο στην επιφάνεια λιποσωμάτων, να μεταφέρει ένα ειδικό σήμα ενισχυμένης ενεργοποίησης σε φυσιολογικά ανοσοδραστικά CD4+ T κύτταρα μνήμης παρουσία μακροφάγων και του αναμνηστικού αντιγόνου. Μετά την πάροδο μικρού χρονικού διαστήματος η αυξημένη διέγερση του συγκεκριμένου πληθυσμού ακολουθούσε πάντα μία ισχυρή και απότομη πτώση. Τα παρατηρούμενα πρότυπα ενεργοποίησης παρουσίαζαν διακριτή ποιοτική και ποσοτική διαφοροποίηση από τα αντίστοιχα που επάγονται από την κλασσική αντιγόνο-παρουσιαστική διαδικασία. Οι παραπάνω επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις μπορούν να συσχετιστούν με ανοσολογικά γεγονότα της HIV μόλυνσης υποδηλώνοντας ότι ο ρόλος του V3 πιθανόν δεν περιορίζεται αποκλειστικά πάνω στα γεγονότα της ιικής εισόδου, αλλά μπορεί παράλληλα να προκαλεί μεταβολές της βιολογικής συμπεριφοράς των αποδεκτικών κυττάρων.



Σχήμα V.3.3

Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του συνυποδοχέα. Φαίνεται ο CCR5 (πράσινο) με το θειωμένο στην τυροσίνη N τελικό άκρο του (στα κατάλοιπα 3, 10, 14 και 15) και τρεις

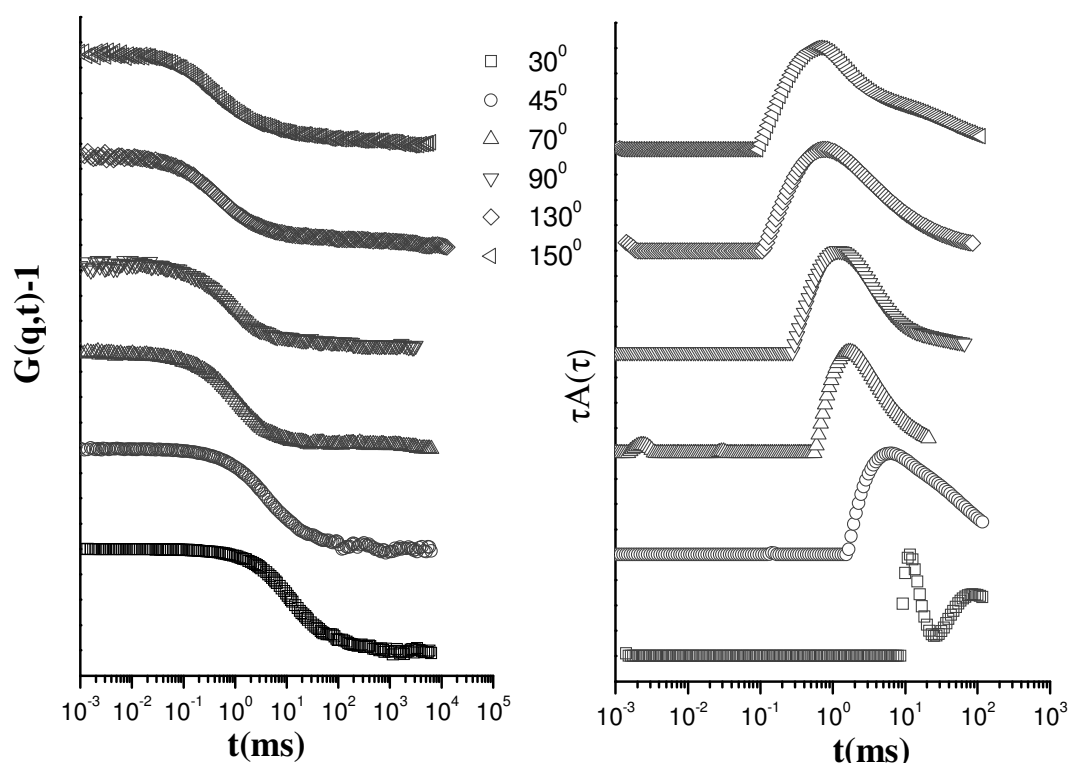
εξωκυττάριοι βρόχοι (ECLs). Φαίνεται η βάση της V3 να αλληλεπιδρά με το N- τελικό άκρο του CCR5 και η άκρη της V3 να αλληλεπιδρά με την ECL2 του CCR5¹¹³.

Η παρούσα μελέτη θέλησε να διερευνήσει τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις αφ' ενός μεταξύ συνθετικών V3 ή CCR5-Nt πεπτιδίων και αφ' ετέρου μεταξύ V3 πεπτιδίων και του συνυποδοχέα CCR5-Nt. Τα βασικά ερωτήματα που τέθηκαν συνοψίζονται ως εξής:

- Ποια είναι η 'τύχη' των σύμπλοκων δομών των πεπτιδίων V3 και CCR5-Nt κάτω από φυσιολογικές συνθήκες;
- Πώς μεταβάλλονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των V3 πεπτιδίων και του συνυποδοχέα CCR5-Nt με βάση τα συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του V3 επιτόπου όπως του φορτίου και της δομής του;
- Ποιος πιθανός μηχανισμός μπορεί να κρύβεται πίσω από το όλο φαινόμενο με βάση την ανίχνευση των ειδικών αλληλεπιδράσεων του V3 με τον συνυποδοχέα CCR5-Nt;

4) Προσδιορισμός υδροδυναμικών παραμέτρων των πεπτιδίων CCR5

Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πεπτιδίων CCR5-Nt πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο με εφαρμογή της τεχνικής σκέδασης ακτίνων Laser. Το αμινοτελικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης του συνυποδοχέα CCR5 περιελάμβανε 4 τυροσίνες στις θέσεις 3, 10, 14 και 15.



Σχήμα V.4.1

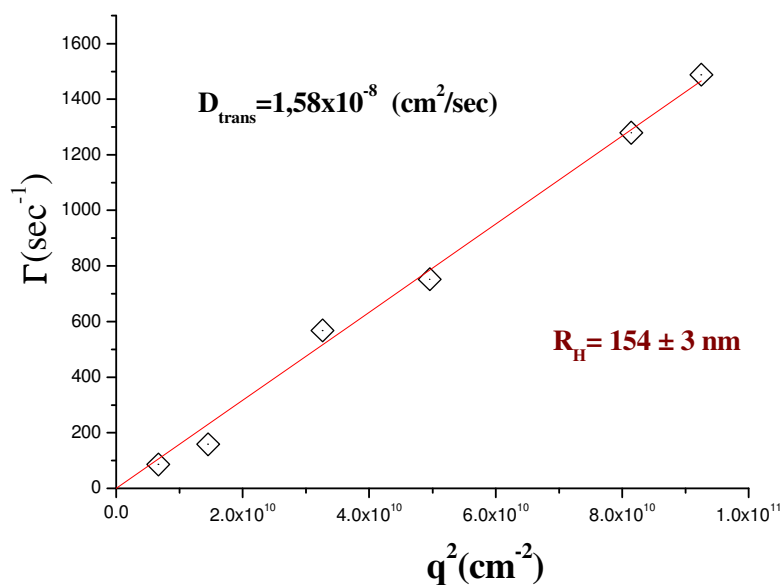
Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του πεπτιδίου CCR5 ($c=0.0696 \text{ mg/ml}$) για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

Στο σχήμα V.4.1 δίνονται οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης για το συγκεκριμένο διάλυμα του πεπτιδίου CCR5 με γεωμετρία σκέδασης VV, σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης

και θερμοκρασία 296 Κ. Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης υπολογίστηκαν από τον συσχετιστή φωτονίων που έχει περιγραφεί στο πειραματικό μέρος και μετρήθηκε στην πειραματική διάταξη του σχήματος III.1.

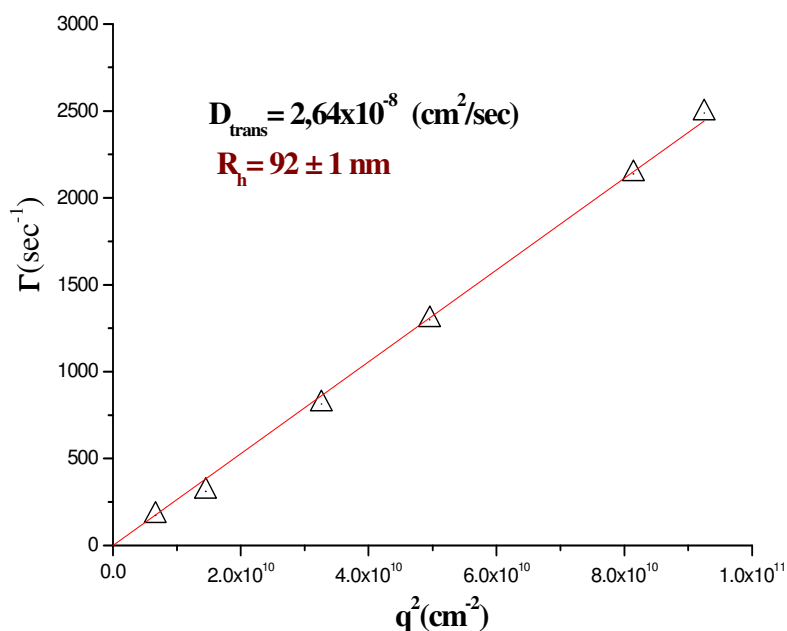
Αν σχεδιάσουμε την γραφική παράσταση του ρυθμού χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ συναρτήσει του q (Σχήμα V.4.2 και V.4.3) παρατηρούμε ότι $\Gamma \sim q^2$ το οποίο είναι ένα τυπικό αποτέλεσμα για αραιά διαλύματα μακρομορίων τα οποία ακολουθούν κίνηση Brown. Ο συντελεστής μεταφορικής διάχυσης D_{trans} δίνεται 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_{trans} και δίνεται από την έκφραση $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_{trans}}$ 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_{trans} στην σχέση αυτή εξάγουμε τις αντίστοιχες υδροδυναμικές ακτίνες.



Σχήμα V.4.2

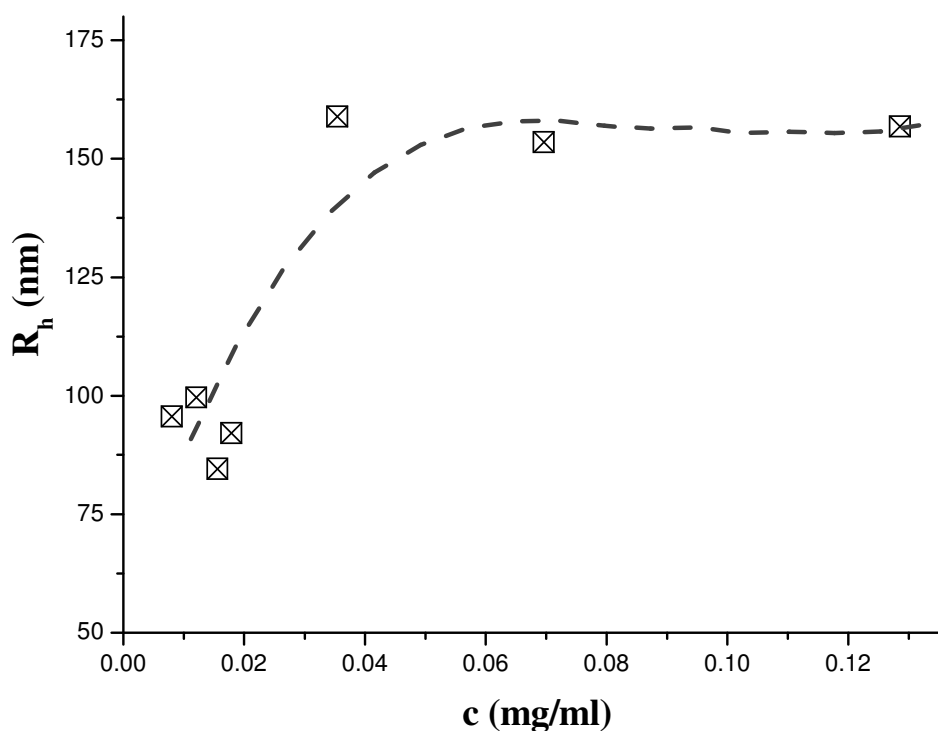
Ο ρυθμός χαλάρωσης του πεπτιδίου CCR5 ($c=0.0696$ mg/ml) σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης. Η κλίση δίνει τον συντελεστή διάχυσης.



Σχήμα V.4.3

Ο ρυθμός χαλάρωσης του πεπτιδίου CCR5 ($c=0.0179$ mg/ml) σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης. Η κλίση δίνει τον συντελεστή διάχυσης.

Παρατηρούμε μια προοδευτική μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας των υπερμοριακών συμπλόκων CCR5-Nt που σχηματίζονται καθώς ελαττώνεται η συγκέντρωση. 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.

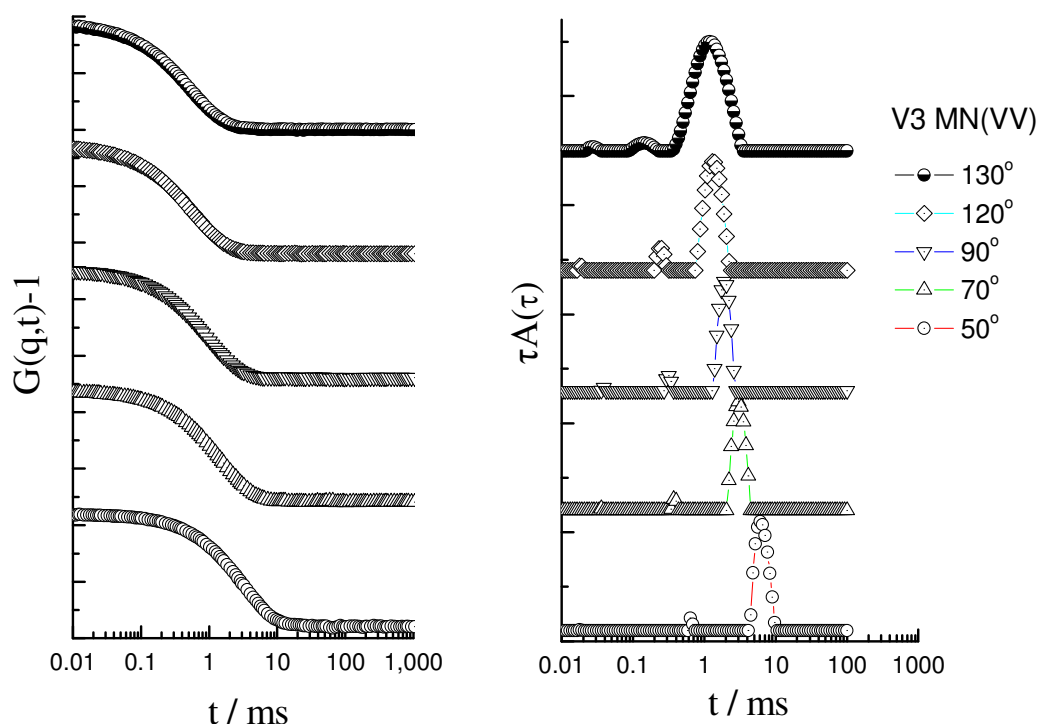


Σχήμα V.4.4

Η υδροδυναμική ακτίνα R_h των υπερμοριακών συμπλόκων του CCR5-Nt σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης

5) Προσδιορισμός υδροδυναμικών παραμέτρων των V3 πεπτιδίων

Στην εργασία αυτή έγιναν δυναμικές μετρήσεις σκέδασης φωτός σε πραγματικό χρόνο. Στο σχήμα V.5.1 δίνεται η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για το συγκεκριμένο διάλυμα V3MN, σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης σε θερμοκρασία 296 K. Και σε αυτή τη περίπτωση η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μπορεί να περιγραφεί σαν μια απλή εκθετική συνάρτηση και η προσαρμογή της μέσω της εκτέλεσης ενός αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace με την χρήση του προγράμματος REPES δίνει την κατανομή των χρόνων χαλάρωσης $\tau A(\tau)$ στο δεξί μέρος του σχήματος του σχήματος V.5.1.



Σχήμα V.5.1

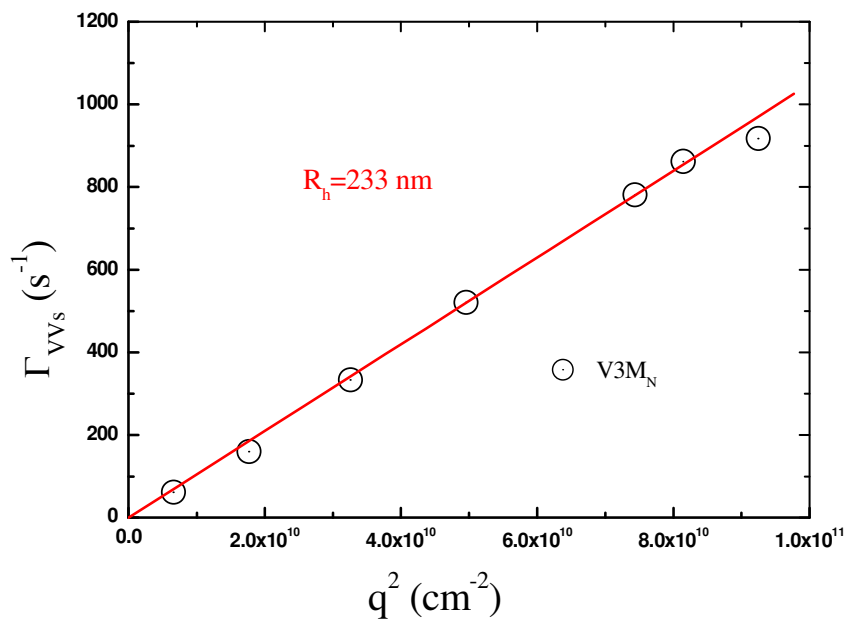
Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του πεπτιδίου V3 MN(+4) διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

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 της κορυφής.

Επειδή το διάλυμα μας είναι αραιό τα πεπτίδια αλληλεπιδρούν χαλαρά μεταξύ τους και ακολουθούν κίνηση Brown. Έτσι είναι αναμενόμενο η κίνηση τους να χαρακτηρίζεται από μια κύρια διαδικασία χαλάρωσης, η οποία σχετίζεται με την μεταφορική κίνηση των υπερμοριακών συμπλόκων που σχηματίζονται στο διάλυμα. Όντως αν σχεδιάσουμε την γραφική παράσταση του ρυθμού χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ συναρτήσει του q (σχήμα V.5.2) παρατηρούμε ότι $\Gamma \sim q^2$ το οποίο είναι ένα τυπικό αποτέλεσμα για αραιά διαλύματα.

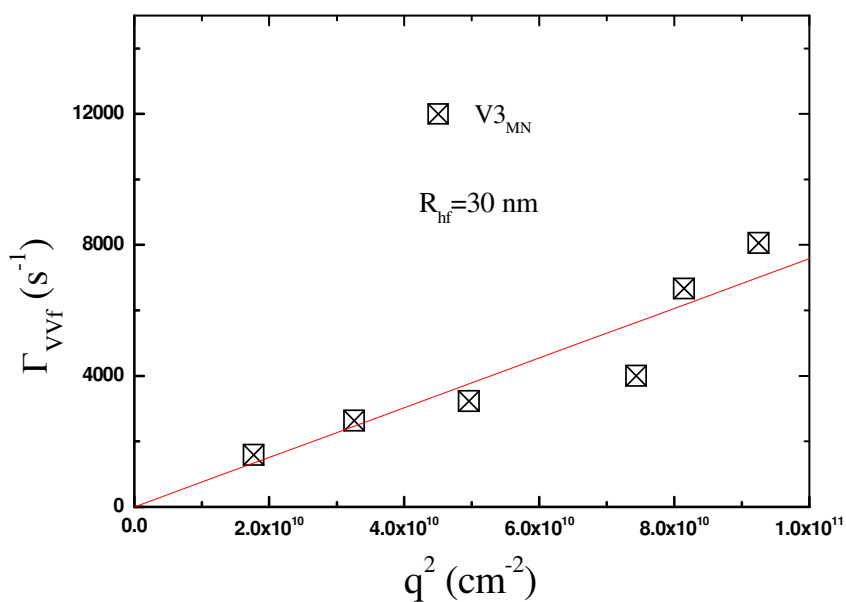
Ο συντελεστής μεταφορικής διάχυσης D ισούται με $(\Gamma/q^2)_{q \rightarrow 0}$. Ομοίως η γραφική παράσταση του ρυθμού χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ συναρτήσει του q (σχήμα) για την γρήγορη διαδικασία δίνει επίσης σαν αποτέλεσμα ότι το $\Gamma \sim q^2$ δηλαδή κίνηση διάχυσης Brown.

Οι υδροδυναμικές ακτίνες στην θερμοκρασία αυτή μπορεί να υπολογιστούν και εδώ μέσω της σχέσης Stokes-Einstein θεωρώντας ότι έχουμε κίνηση Brown σφαιρικών σωματιδίων διασπαρμένων μέσα σε διαλύτη. Αν αντικαταστήσουμε την τιμή που βρήκαμε προηγουμένως για τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D (Σχήματα V.5.2 και V.5.3) στην σχέση αυτή εξάγουμε τις αντίστοιχες υδροδυναμικές ακτίνες στα 30 και 233 nm.



Σχήμα V.5.2

Ο ρυθμός χαλάρωσης σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης.

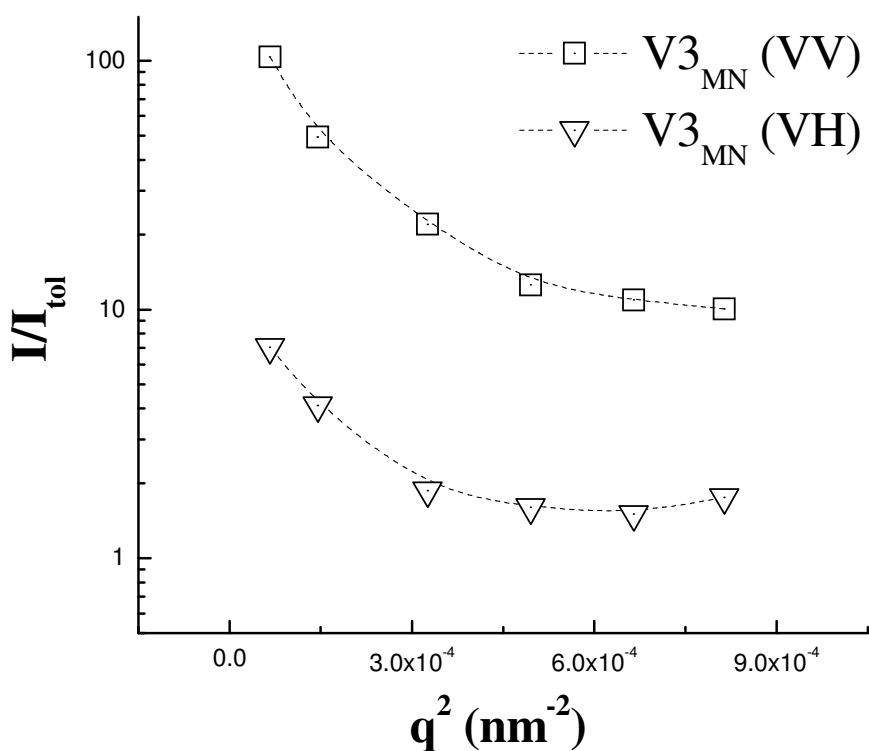


Σχήμα V.5.3

Ο ρυθμός χαλάρωσης σαν συνάρτηση του q^2 , ένδειξη ότι η διαδικασία είναι κίνηση διάχυσης.

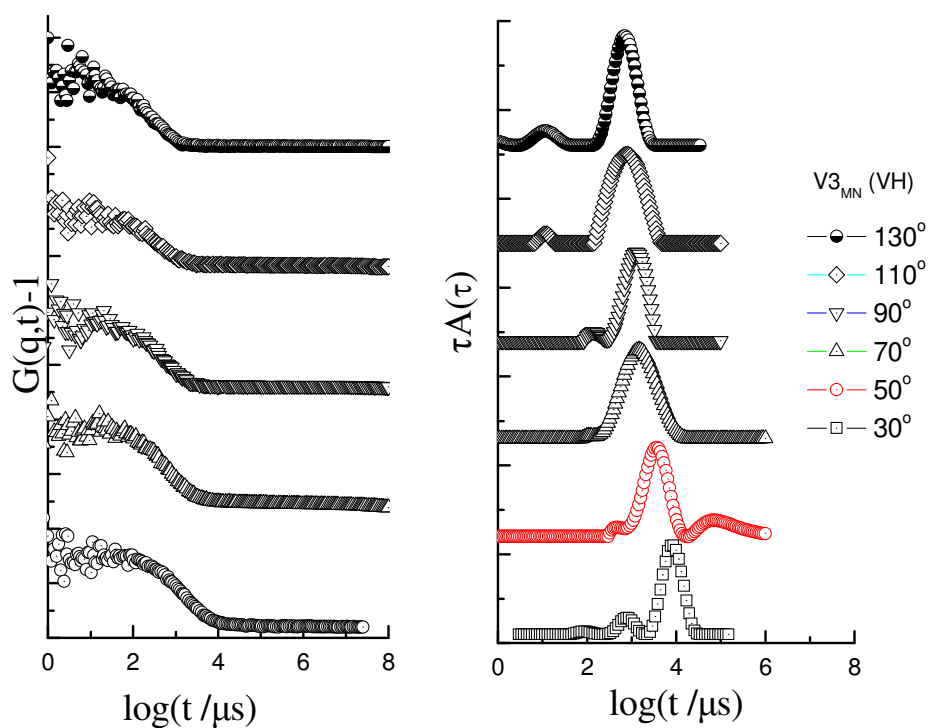
Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης έδειξαν ότι τα υπερμοριακά σύμπλοκα των V3 πεπτιδίων εμφανίζουν μη σφαιρικές διαμορφώσεις σε φυσιολογικά υδατικά διαλύματα.

Η εμφάνιση αποπλωμένης σκέδασης στη πειραματική γεωμετρία VH επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα V.5.4. Η σύζευξη πολλών μορίων V3 μικρού μεγέθους σε δύο μεγαλύτερα υπερμοριακά σύμπλοκα διαστάσεων 14 και 128 nm αντίστοιχα επιβεβαιώνεται και με τις συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης στη VH γεωμετρία (σχήμα V.4.5).



Σχήμα V.5.4

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με γεωμετρίες σκέδασης VV και VH του πεπτιδίου V3_{MN} (+4)



Σχήμα V.5.5

Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VH του πεπτιδίου $V3_{MN}$ (+4) για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

6) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πεπτιδικών μορίων V3 και CCR5-Nt

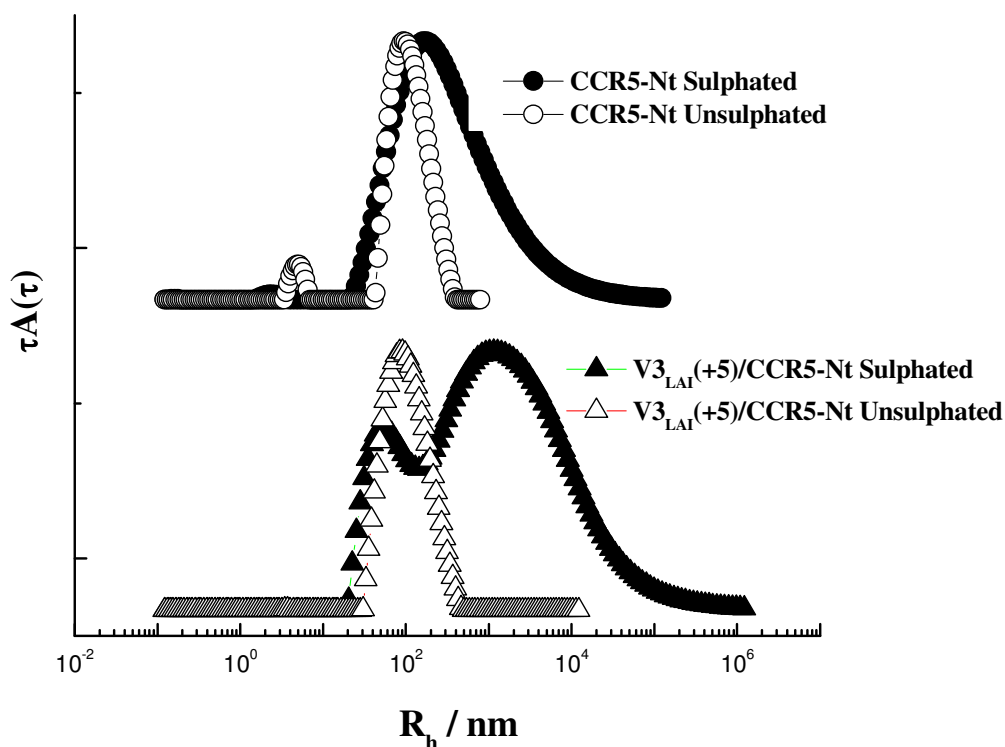
Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πεπτιδίων V3 και CCR5-Nt πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο με εφαρμογή της τεχνικής σκέδασης ακτίνων Laser. Με βάση τα παραπάνω διερευνήθηκε η υπόθεση της ύπαρξης άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συνθετικών V3 πεπτιδίων και του ίδιου 22-μερούς CCR5 συνθετικού πεπτιδίου από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (CCR5-Nt), το οποίο μπορούσε να φέρει επιλεκτικά προσθήκες θεικών ομάδων στα 4 κατάλοιπα τυροσίνης της αλληλουχίας του. Σε μία πρώτη πειραματική προσέγγιση μετρήθηκαν μεμονωμένα V3 και CCR5-Nt πεπτίδια, όσο και μείγματα τους (V3/CCR5-Nt). Σε μια τυπική μέτρηση, πολλαπλές συγκεντρώσεις του σουλφουρωμένου ή μη CCR5-Nt πεπτιδίου (6, 15, 30, 60, 90, 150 nmoles) αναμίχθηκαν σε σε φυσιολογικό pH 7,4 με σταθερή συγκέντρωση V3LAI πεπτιδίου (50 nM). Ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων των διαφορετικών V3 πεπτιδίων (V3_{SF2}, V3_{SF128}, V3_{SF162}, V3_{MN}, V3_{LAI (+1)}, V3_{LAI (+9)} και V3_{LAI-random}) με το CCR5-Nt πεπτίδιο πραγματοποιήθηκε σε μείγματα των παραπάνω πεπτιδίων με μοριακή αναλογία περίπου 3 moles V3 προς 1 mole CCR5-Nt.

Η επίδραση του αριθμού των βασικών αμινοξέων της V3 αλληλουχίας στο βαθμό αλληλεπίδρασης των V3 πεπτιδίων με το σουλφονυλιωμένο CCR5-Nt πεπτίδιο μελετήθηκε από τους *Zafiropoulos et al*¹¹⁴ σε SPR αναλύσεις και από τους *Rizos et al*¹²⁷ όπου η μοριακή συγκέντρωση των V3/CCR5-Nt πεπτιδίων επιλέχτηκε στο 3:2, ως η αναλογία με τα καλύτερα πρότυπα πρόσδεσης. Μεταξύ των διαφορετικών μιγμάτων παρατηρήθηκε μία κλιμακούμενη αύξηση στη γωνία πρόσπτωσης όσο τα νεο-σχηματιζόμενα σύμπλοκα V3/CCR5 περιείχαν σταδιακά αυξανόμενο αριθμό βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή. Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης έδειξε σχηματισμούς λιποσωματίων τα οποία σχηματίζουν υπερμοριακές δομές με υδροδυναμική ακτίνα της τάξης των 900 nm για απλά και 1300 nm για V3- λιποσώματα. Η κατασκευή της συγκεκριμένης λιποσωμικής δομής με επιφανειακά

ακίνητοποιημένο V3 λιποπεπτίδιο είχε ως σκοπό τη χωροταξική μίμηση της gp120 πάνω στο ιοσωμάτιο του HIV. Η δομή αυτή εξυπηρετούσε την έκθεση του V3 πεπτιδίου στην επιφάνεια των μακροφάγων μέσω μιας διαδικασίας μεμβρανικής σύντηξης.

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν την καθοριστικής σημασίας επίδραση του αριθμού των βασικών αμινοξέων της V3 περιοχής στη δημιουργία συμπλόκων και ως εκ τούτου στην ένταση της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του V3 και του σουλφονυλιομένου αμινοτελικού άκρου του CCR5. Όλες οι πειραματικές συνθήκες (θερμοκρασία, ρυθμιστικό διάλυμα) παρέμειναν σταθερές για όλα τα πεπτίδια ή τους συνδυασμούς πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την προσέγγιση. Ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ των V3 πεπτιδίων και του σουλφονιωμένου αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα CCR5-Nt φάνηκε επίσης να σχετίζεται άμεσα με την πολυκατιονική φύση του V3. Όπως φαίνεται στο Σχήμα V.6.1, η ύπαρξη σουλφομάδων στα πεπτίδια CCR5-Nt προκαλεί μια μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής του υπερμοριακού συμπλόκου σε μεγαλύτερους χρόνους. Αντίθετα, η γρήγορη κορυφή μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση.

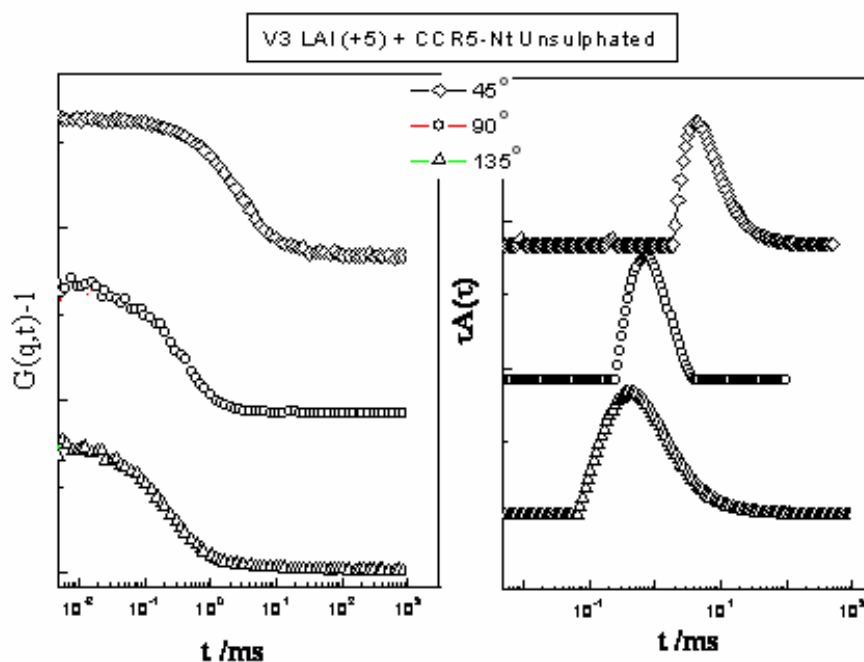
Στο κάτω μέρος του Σχήματος V.6.1, γίνεται σύγκριση μεταξύ των V3_{LAI}(+5)/CCR5-Nt συμπλόκων παρουσία σουλφονιωμένων τυροσινών στο CCR5-Nt άκρο, αλλά και απλών μορίων CCR5-Nt. Και σε αυτή την περίπτωση η ύπαρξη σουλφομάδων στα πεπτίδια CCR5 σχετίζεται με την εμφάνιση δύο χαρακτηριστικών κορυφών. Προκαλείται 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.



Σχήμα V.6.1

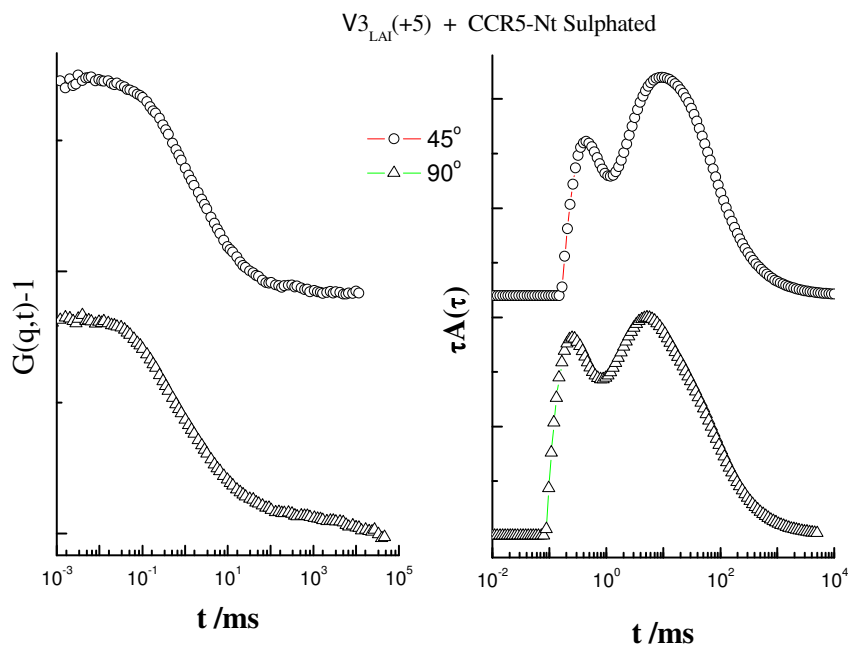
Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου $V3_{LAI}(+5)$ παρουσία σουλφονιωμένου και μη σουλφονιωμένου CCR5-Nt (A.K. Rizos, A. Mpountouraki, C. Logakh, P. Samolis, G. Hatzidakis, D.C. Doetschman, E. Krambovitis, Journal of Non-Crystalline Solids, 2011, 357, 723-725)

Η πιθανή εξήγηση αυτής της μετατόπισης σχετίζεται πιθανότατα 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 V.6.2

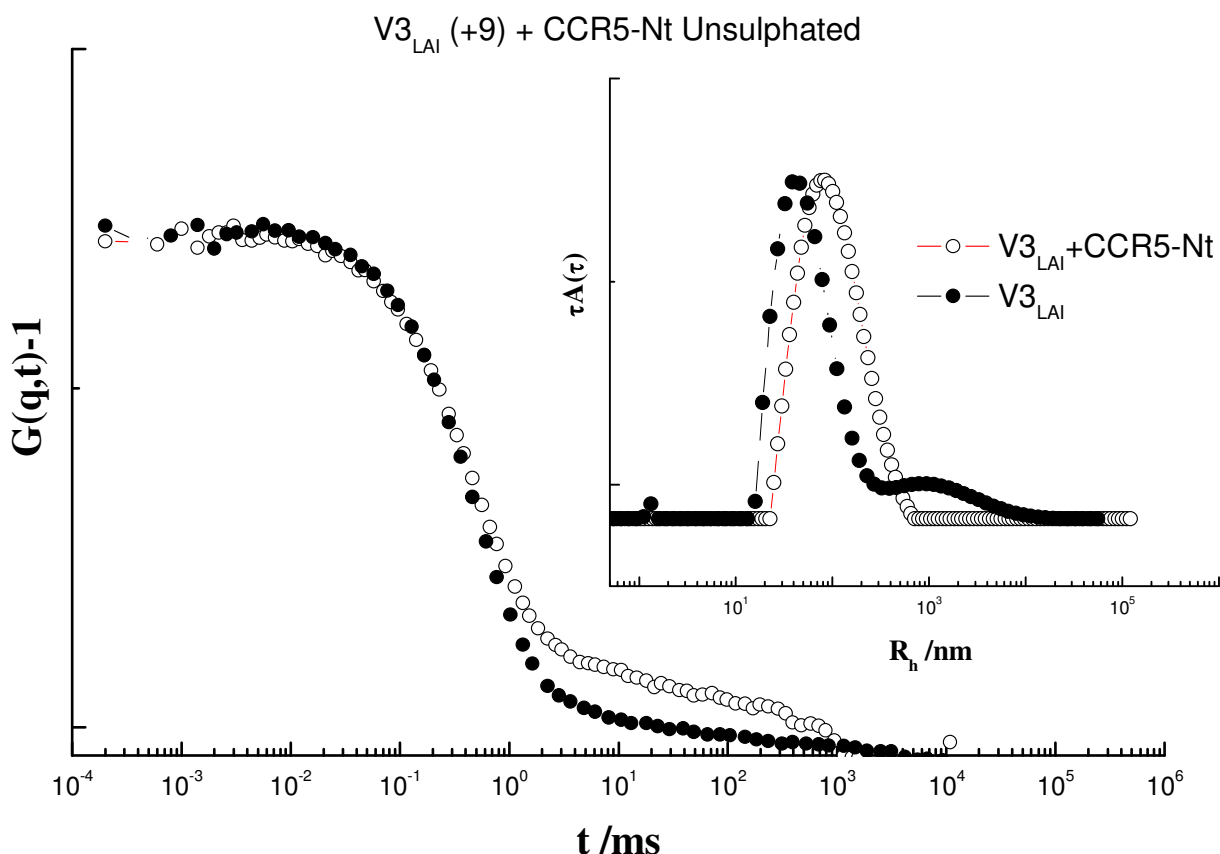
Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VV του συμπλόκου $V3_{LAI}(+5)/CCR5-Nt$ για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.



Σχήμα V.6.3

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 V.6.3.

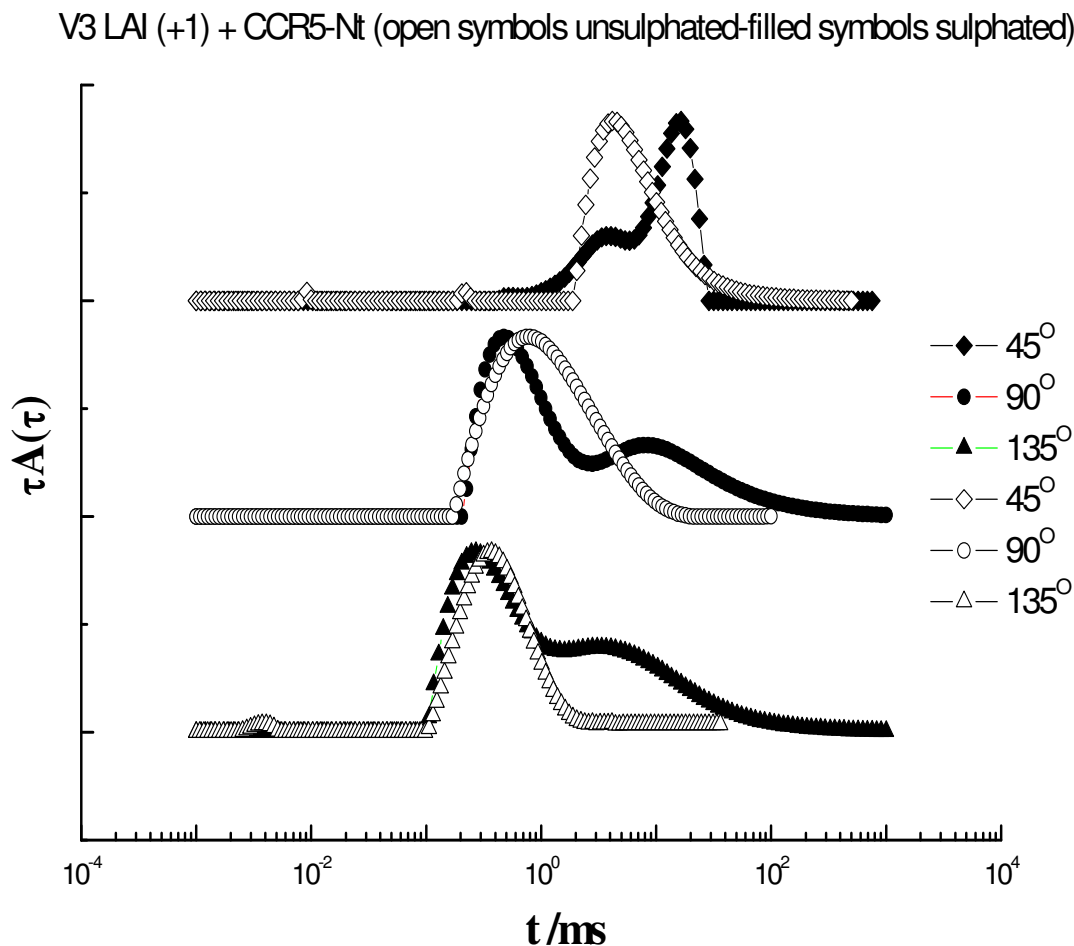


Σχήμα V.6.4

Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ της πειραματικής συνάρτησης αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου $V3_{LAI} (+9)$ παρουσία του μη σουλφονιωμένου CCR5-Nt.

Η αλληλεπίδραση του V3 μόνο με το σουλφονιωμένο CCR5-Nt πεπτίδιο συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις των Cormier *et al.*¹²⁶, Farzan *et al.*¹²¹, και Huang *et al.*^{113, 115} 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 σουλφοομάδων επιβεβαιώθηκε στην πρόσφατη μελέτη των Huang et al ¹¹⁵ με χρήση τεχνικών κρυσταλλογραφίας και NMR.



Σχήμα V.6.5

Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ των πειραματικών συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου $V3_{LAI}(+1)$ παρουσία σουλφονυλιωμένου και μη σουλφονυλιωμένου CCR5-Nt για διαφορετικές γωνίες σκέδασης. (A.K. Rizos, A. Mpountouraki, C. Logakh, P. Samolis, G. Hatzidakis, D.C. Doetschman, E. Krambovitis, Journal of Non-Crystalline Solids, **2011**, 357, 723-725)

Όμως πειράματα με SPR, στα οποία χρησιμοποιήθηκε το $V3_{LAI}$ πεπτίδιο με μη σουλφονιομένο CCR5-Nt στις ίδιες μοριακές αναλογίες, δεν έδειξαν ισχυρά σήματα αλληλεπίδρασης μεταξύ του V3 και του CCR5-Nt. Αντίθετα, πρόσφατη μελέτη NMR¹¹⁶ της

ερευνητικής μας ομάδας απέδειξε ότι τα πεπτιδία V3 και CCR5-Nt έχουν τάση για ασθενή αλληλεπίδραση, ακόμη και απουσία σουλφοομάδων στις τυροσίνες, ενώ ηλεκτροστατικές υπολογιστικές μελέτες¹¹⁷ επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των θετικών και αρνητικών ηλεκτροστατικών δυναμικών του V3 και CCR5-Nt αντίστοιχα. Η επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων έρχεται από τα Σχήματα V.6.4 και V.6.5 όπου διακρίνεται ξεκάθαρα η μεταβολή των υδροδυναμικών παραμέτρων του πεπτιδίου V3_{LAI} (+9) παρουσία του μη σουλφονυλιωμένου CCR5-Nt. Ακόμη και η ύπαρξη φορτίου (+1) (Σχήμα V.6.5) είναι ικανή να προκαλέσει σημαντικές διαφοροποιήσεις των μεγεθών των υπερμοριακών συμπλόκων.

Η δυναμική της αλληλεπίδρασης μολυσμένων κυττάρων με φυσιολογικά κύτταρα έχει μελετηθεί με μικροσκοπία δύναμης απλού μορίου (single molecule force microscopy)¹²⁸ και με 3D Video μικροσκοπία¹²⁹ όπου επιβεβαιώθηκε η δημιουργία ιολογικών συνάψεων (virological synapses) οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της παθογένεσης.

Τέλος στη πιο πρόσφατη υπό δημοσίευση εργασία¹³² μας εκτελέσαμε ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (hierarchical clustering analysis) της χωρικής κατανομής των ηλεκτροστατικών δυναμικών και φορτίων των δομών του βρόχου V3 που περιέχουν τις consensus ακολουθίες α.α. των υποτύπων HIV-1. Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των consensus ακολουθιών έχει ένα καθαρό φορτίο +3, η χωρική κατανομή των ηλεκτροστατικών τους δυναμικών και φορτίων ενδέχεται να αποτελέσει παράγοντα διάκρισης για τη δέσμευση και τη μολυσματικότητα του ιού. Το γεγονός αυτό αποδείχτηκε από τη δημιουργία πολλών μικρών subclusters, μέσα στις μεγάλες ομάδες από clusters, το οποίο υποδηλώνει κοινή προέλευση, αλλά διακριτές χωρικές λεπτομέρειες των ηλεκτροστατικών ιδιοτήτων. Συμπερασματικά προτείνουμε ότι το μακροσκοπικό ηλεκτροστατικό δυναμικό είναι υπεύθυνο για τη μακράς εμβέλειας αναγνώριση του V3 βρόχου με τους συνυποδοχείς CCR5/CXCR4, ενώ η χωρική

κατανομή των φορτίων συμβάλλει μέσω των συγκεκριμένων μικρής εμβέλειας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο σχηματισμό του συμπλόκου V3/CCR5 ή V3/CXCR4 αντίστοιχα.

7) Συμπεράσματα

Σχεδόν επί 30 χρόνια μετά την ανακάλυψη του ιού HIV, μια τεράστια ερευνητική προσπάθεια διεξάγεται σε παγκόσμιο επίπεδο με στόχο την εξουδετέρωση αυτού του μολυσματικού παράγοντα. Παρά το γεγονός ότι ένα αποτελεσματικό εμβόλιο κατά του HIV δεν φαίνεται στον ορίζοντα, η επιστημονική έρευνα έχει επιτύχει εν μέρει το στόχο αυτό, καθώς έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικά αντι-HIV φάρμακα. Οι εφαρμογές και η χρήση συνθετικών πεπτιδίων για την αντιμετώπιση ασθενειών του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένου και του AIDS αυξάνονται ραγδαία, καθώς και η ανάπτυξη της απαιτούμενης αντίστοιχης τεχνολογίας.

Ακόμη και σήμερα η παραγωγή νέας γνώσης στο «βιολογικό ερώτημα» γιατί και πως ο ιός του AIDS (HIV-1) προκαλεί χρόνια ανοσοανεπάρκεια, ιδιαίτερα κατά την ασυμπτωματική φάση όπου τα περισσότερα κύτταρα που πεθαίνουν εξ αιτίας του ιού δεν είναι μολυσμένα από τον ιό είναι περιορισμένη.

Με δεδομένη την ευαισθησία της σκέδασης ακτίνων Laser σε μια ευρεία δυναμική περιοχή η οποία καλύπτει και την περιοχή των διαστάσεων που αντιστοιχούν στις ηλεκτροστατικές αλλά και στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν μέσω NMR, η παρούσα διατριβή περιστράφηκε γύρω από έναν βασικό άξονα: την ανάλυση των δομών των πεπτιδικών αντιστοιχιών που εμπλέκονται στο V3 φαινόμενο για να δώσει στοιχεία ως προς την συμπεριφορά των συγκεκριμένων μακρομορίων σε φυσιολογικά διαλύματα, την επιρροή ιοντικών δυνάμεων και την σταθεροποίηση των πεπτιδικών αλληλοεπιδράσεων. Τα πειραματικά μας δεδομένα δίνουν επί πλέον σημαντικές

πληροφορίες για τις δυναμικές παραμέτρους και διαστάσεις των υπερμοριακών συμπλόκων που δεν ανιχνεύθηκαν από το NMR.

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 πεπτίδια χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σύγκριση με την μη σουλφονυλιωμένη μορφή του CCR5-Nt. Η απαίτηση της ύπαρξης αρνητικά φορτισμένων ομάδων στο αμινοτελικό άκρο του CCR5, προκειμένου να επιτευχθεί μία ικανή αλληλεπίδραση με την gp120 κατά τη διαδικασία της ιικής εισόδου, φαίνεται να παίζει εξίσου κρίσιμο ρόλο και στην επιπρόσθετη προτεινόμενη λειτουργία της V3.

Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι ένας απομονωμένος επίτοπος από την ημισυντηρημένη V3 περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του HIV-1 LAI στελέχους (α.α 304-318) μπορεί να δρα με έναν ιδιαίτερο τρόπο, οδηγώντας σε δημιουργία ανοσοβιολογικών φαινομένων. Τα V3 πεπτίδια παρουσιάζουν και αυτά αυτοοργάνωση σε φυσιολογικά διαλύματα, η δε αλληλεπίδραση με το CCR5-Nt πεπίδιο χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. 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. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και η αργή κορυφή κατέχει δεσπόζουσα θέση στα μεγάλα υπερμοριακά σύμπλοκα που σχηματίζονται, αυτό δεν σημαίνει ότι τα μεγάλα υπερμοριακά μεγέθη υπερτερούν πληθυσμιακά σε σχέση με τα μικρά μονομερή πεπτίδια, και στην

πραγματικότητα αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό. Πολύ πιθανόν αυτή είναι και η αιτία που αδυνατούν να ανιχνευθούν μέσω της φασματοσκοπίας NMR.

Σε σχετικά άρθρα των *Nature* και *Science*^{130, 131} τονίζεται ότι παρά το γεγονός ότι τα τελευταία 30 χρόνια έχουν δαπανηθεί τεράστια ποσά για την ενίσχυση της έρευνας για το AIDS δεν έχει υπάρξει πραγματική πρόοδος σχετικά με την παθογένεση του ιού HIV. Είναι ανάγκη να εφαρμόσουμε την πλήρη δύναμη της σύγχρονης επιστήμης χωρίς φραγμούς μεταξύ Χημείας Ιατρικής και Βιολογίας στο AIDS που ήδη έχει προκαλέσει πάνω από 30 εκατομμύρια θανάτους.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- 1) Ken A. Witt , Thomas P. Davis “*CNS Drug Delivery : Opioid Peptides and Blood-Brain Barrier*” AAPS Journal (2006) Vol.8 (1) Article 9 pages E76-E88
- 2) Barbara Pavan , Alessandro Dalpiaz et al. “*Progress in Drug Delivery to the Central Nervous System by the Prodrug Approach*” Molecules Vol.13 (2008) 1035-1065
- 3) Albert Loffet “*Peptides as Drugs : Is there a market ?*” Journal of Peptide Science Vol.8 (2002) 1-7
- 4) C.M.B. Edwards , M.A. Cohen , S.R. Bloon “*Peptides as Drugs*” – Editorial Quarterly Journal of Medicine (QJM) Vol.92 (1999) 1-4
- 5) Hilary Brooks , Bernard Lebleu and Eric Vives “*Tat peptide-mediated cell delivery : back to basics*” Advanced Drug Delivery Reviews Vol.57 Issue 4 (2005) 559-577
- 6) Vladimir P. Torchilin and Anatoly N. Lukyanov “*Peptide and protein drug delivery to and into tumors : challenges and solutions*” Drug Discovery Today Vol.8 Issue 6 (2003) 259-266
- 7) Suhaas Aluri, Siti M. Janib, J. Andrew Mackay “*Environmentally responsive peptides as anticancer drug carriers*” Advanced Drug Delivery Reviews Vol.61 Issue 11 (2009) 940-952
- 8) S. S. Dharap , B. Qiu et al. “*Molecular delivery of drug delivery systems to ovarian cancer by BH3 and LHRH peptides*” Journal of Controlled Release Vol. 91 Issues 1-2 (2003) 61-73
- 9) Takashi Iwashaki , Jun Ishibashi et al. “*Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface*” Peptides Vol. 30 Issue 4 (2009) 660-668
- 10) Fang Hong , Luo Ming et al. “*The anti-hypertensive effect of peptides : a novel alternative to drugs ?*” Peptides Vol.29 Issue 6 (2008) 1062-1071

- 11) Balpreet Matharu, Omar El-Agnaf, Amna Razvi, Brian M. Austen “*Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs in β -amyloid in Alzheimer ‘s disease*” *Peptides* Vol.31 Issue 10 (2010) 1866-1872
- 12) E. Mannucci , C.M. Rotella “*Future perspectives of glucagons-like peptide-1 , diabetes and cardiovascular risk*” *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* Vol. 18 Issue 9 (2008) 639-645
- 13) Shahar Rotem, Inna Radzishovsky, Roger T. Inouye, Matthew Samore and Amram Mor “*Identification of antimicrobial peptide regions derived from genomic sequences of phage lysins*” *Peptides* Vol.27 Issue1(2006)18-26
- 14) Michaela K. Marschutz and Andreas Bernkop-Schnurch “*Oral peptide drug delivery : polymer-inhibitor conjugates protecting insulines from enzymatic degradation in vitro*” *Biomaterials* Vol.21 Issue 14 (2000) 1499-1507
- 15) B. Warhen “*Letter to the Editor*” *Journal of Clinical Virology* 21 (2001) 171-173
- 16) Altacilio Aparecido Nunes , Igor Mariano de Melo et al. “*Hospitalizations for HIV/AIDS : Differences Between Sexes*” *Gender Medicine* Vol.7 No.1 (2010) p.28-38
- 17) Binod Nepar “*AIDS denial in Asia : Dimensions and Roots*” *Health Policy* 84 (2007) 133-141
- 18) Editorial “*HIV in Latin America and the Caribbean*” *Lancet* vol.372 July 2008
- 19) Patrick S. Sullivan , Osamah Hamonda et al. “*Reemergence of the HIV Epidemic Among Men who have sex with Men in North America , Western Europe , and Australia 1996-2005*” *Annals of Epidemiology* (2009) Vol19 : 423-431
- 20) Rifat A. Atun , Martin Mc Kee , Richard Coker , Ipek Gurol-Urganci “*Health Systems’ responses to 25 years of HIV in Europe : Inequities persist anf challenges remain*” *Health Policy* 86 (2008) 181-194

- 21) Don C. De Jarlais , Jean-Paul Grund et al. “*HIV risk behavior among participants of syringe exchange programmes in central/eastern Europe and Russia*”
International Journal of Drug Policy 13 (2002) 165-174

- 22) D. Paraskevis , E. Magiorkinis et al. “*Prevalence of resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Greece*” Virus Research 112 (2005) 115-122

- 23) Claire Thorne , Marie-Louise Newell “*Epidemiology of HIV infection in the newborn*” Early Human Development 58 (2000) 1-16

- 24) Mikael Ostergren , Ruslan Malyuta “*Elimination of HIV infection in infants in Europe – challenges and demand for response*” Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 11 (2006) 54-57

- 25) Jenan Saadatmand , Fei Guo , Shan Cen , Meijuan Niu and Lawrence Kleiman

- 26) “*Interactions of reverse transcriptase sequences in Pol with Gag and LysRS in the HIV-1 tRNA^{Lys3} packaging / annealing complex*” Virology 380 (2008) 109-117

- 27) Ernest F. Terwilliger , Joseph G. Sodroski , William A. Haseltine “*Mechanisms for Infectivity and Replication of HIV-1 and Implications for Therapy*” Annals of Emergency Medicine 19 (March 1990)

- 28) Siddharta A.K. Datta , Zhuojun Zhao et al. “*Interaction between HIV-1 Gag Molecules in Solution : An Inositol phosphate-mediated Switch*” Journal of Molecular Biology (2007) Vol.365 799-811

- 29) Paul D. Bieniasz “*The Cell Biology of HIV-1 : Virion Genesis*” Cell Host & Microbe 5 (18 June 2009)

- 30) Lizhong Luo , Yan Li , Ci Yong Kang “*Budding and secretion of HIV Gag-Env virus-like particles from recombinant human adenovirus infected cells*” Virus Research 92 (2003) 75-82

- 31) Seongwoo Hwang , Natarajan Tamilarasu , Tariq M. Rana “*Selection of HIV Replication Inhibitors : Chemistry and Biology*” Advances in Pharmacology Volume 49 (2000) 167
- 32) Teresa D. Groesch , Ernest Freire “*Characterization of intramolecular interactions of HIV-1 accessory protein Nef by differential scanning calorimetry*” Biophysical Chemistry 126 (2007) 36-42
- 33) Iris Oz Greenberg , Alon Herschhorn and Amnon Hizi “*Inhibition of the Activities of Reverse Transcriptase and Integrase*” of Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Peptides Derived from the Homologous Viral Protein (Vpr)” Journal of Molecular Biology (2007) Vol.369 1230-1243
- 34) Billi Goldberg , Raphael B. Stricker “*Apoptosis and HIV Infection : T-cells fiddle while the immune system burns*” Immunology Letters 70 (1999) 5-8
- 35) Ulrich Mahlknecht and Georges Herbein “*Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection : a leading role for accessory cells*” Trends in Immunology Vol.22 No.5 May 2001
- 36) Jordan Benjamin , Barbie K. Ganser-Pornillos , William F. Tivol , Wesley I. Sundquist and Grant J. Jensen “*Three-dimensional Structure of Hiv-1 Virus-like Particles by Electron Cryotomography*” Journal of Molecular Biology (2005) Vol.346 557-588
- 37) Julie Fox , Sarah Fidler “*Sexual Transmission of HIV-1*” Antiviral Research Vol.85 (2010) 276-285
- 38) W. Huisman , B.E.E. Martina , G.F. Rimmelzwaan , R.A. Gruters and A.D.M.E. Osterhaus “*Vaccine-induced enhancement of viral infections*” Vaccine Vol.27 Issue 4 22/1/2009 505-512
- 39) Robert W. Buckheit Jr , Karen M. Watson , Kathleen M. Morrow and Anthony S. Ham “*Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV*” Antiviral Research 85 (2010) 142-158

- 40) Pavlos Chaitidis , Hartmut Kuhn “*Induction of 15-lipoxygenase-1 impairs expression of HIV-1 receptors CD4 and CXCR4 in monocytic cells*” FEBS Letters 579 (2005) 3691-3694
- 41) Ghalib Alkhatib “*The Biology of CCR5 and CXCR4*” Current Opinion in HIV and AIDS (2009) 4 : 96-103
- 42) Timothy Gardozo , Tetsuya Kimura et al. “*Structural Basis for Coreceptor Selectivity by the HIV Type-1 V3 Loop*” AIDS Research and Human Retroviruses Vol.23 Number 3 (2007) pp.415-426
- 43) Wei Huang , Susan H. Eshleman et al. “*Coreceptor Tropism in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype D : High Prevalence of CXCR4 Tropism and Heterogeneous Composition of Viral Populations*” Journal of Virology (2007) August p.7885-7893
- 44) Robert W. Doms and John P. Moore “*HIV-1 Coreceptor Use : A Molecular Window into Viral Tropism*” HIV Molecular Immunology Database : HIV Database Review Articles (1997) Issue 3 December 25-36
- 45) Johanna Repits , Jasminka Sterjovski et al. “*Primary HIV-1 R5 isolates from end-stage display enhanced viral fitness parallel with increased gp120 net charge*” Virology Vol.379 (2008) 125-134
- 46) Daniel R. Kuritzkes “*HIV-1 entry inhibitors : an overview*” Current Opinion in HIV and AIDS (2009) 4: 82-87
- 47) Ann Thayer “*New Antiretrovirals : In recent years , new drugs have brought better options for controlling HIV*” Chemical & Engineering News Cover Story (2008) September 22 Vol.86 No.33 pp.29-36
- 48) Ann Thayer “*Resetting Priorities : The already challenging path to an HIV vaccine takes a hard turn after recent clinical trials*” Chemical & Engineering News Cover Story (2008) September 22 Vol.86 No.33 pp.17-28

- 49) Kenji Maeda , Debananda Das et al. *‘‘Involvement of the Second Extracellular Loop and Transmembrane Residues of CCR5 in Inhibitor Binding and HIV-1 Fusion : Insights into the Mechanism in Allosteric Inhibition’’* Journal of Molecular Biology Volume 381 , Issue 4 (2008) pages 956-974
- 50) Ting Wang , Yong Duan *‘‘Binding modes of CCR5-targeting HIV entry inhibitors : Partial and full antagonists’’* Journal of Molecular Graphics and Modelling , Volume 26 Issue 8 (2008) 1287-1295
- 51) Benjamin M. Chain , Mahdad Noursadeghi , Michelle Gardener , Jhen Tsang , Edward Wright *‘‘HIV blocking antibodies following immunisation with chimaeric peptides coding a short N-terminal sequence of the CCR5 receptor’’* Vaccine Vol.26 Issue 45 (2008) 5752-5759
- 52) Peter J. Buontempo , Lisa Wojcik et al. *‘‘Quantifying the relationship between HIV-1 susceptibility to CCR5 antagonists and virus affinity for antagonist-occupied co-receptor’’* Virology Vol.395 Issue 2 (2009) 268-279
- 53) Shweta Dubey , Mohammad Khalid et al. *‘‘Downregulation of CCR5 on activated CD4 T cells in HIV-infected Indians’’* Journal of Clinical Virology Volume 43 Issue 1 (2008) 25-31
- 54) Maosheng Duan , Jennifer Peckham et al. *‘‘Discovery of N-benzyl-N’-(4-piperidinyl)urea CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents (II) : Modification of the acyl portion’’* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.20 Issue 24 (2010) 7401-7404
- 55) Maosheng Duan , Christopher Aquino et al. *‘‘[-2(4-Phenyl-4-piperidinyl)ethyl]amine based CCR5 antagonists : derivitizations at the N-terminal of the piperidine ring’’* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.19 Issue 6 (2009) 1610-1613
- 56) Ben Li , Eric Dale Jones et al. *‘‘Studies on the structure-activity relationship of 1,3,3,4-tetra-substituted pyrrolidine embodied CCR5 receptor antagonists . Part 2 : Discovery of highly potent anti-HIV agents’’* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.20 Issue 17 (2010) 5334-5336

- 57) Hanbiao Yang , Xiao-Fa Lin et al. *“Discovery of a potent , selective and orally bioavailable 3,9-diazaspiro[5.5]undeca-2-one CCR5 antagonist”* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.19 Issue 1 (2009) 209-213
- 58) Son N. Lam , Priyamvada Acharya , Richard Wyatt , Peter D Kwong , Carole A. Bewley *“Tyrosine-sulfate isoesters of CCR5 N-terminus as tools for studying HIV-1 entry”* Bioorganic & Medicinal Chemistry Vol.16 Issue 23 (2008) 10113-10120
- 59) Pauline M. Rudd , Tim Elliot , Peter Creswell , Ian A. Wilson and Raymond A. Dwek *“Glycosylation and the Immune System”* Science Vol.291 (2001) 23 March
- 60) Wei Huang , Arne Frantzell et al. *“Mutational pathways and genetic barriers to CXCR4-mediated entry by human immunodeficiency virus type 1”* Virology *In Press available on line 10 November (2010)*
- 61) Renato Skerji , Gary Bridger et al. *“Synthesis and SAR of novel CXCR4 antagonists that are potent inhibitors of T-tropic (X4) HIV-1 replication”* Bioorganic & Medicinal Chemistry *In Press available on line 6 November (2010)*
- 62) John F. Miller , Kristjan S. Gudmundsson et al. *“Synthesis and SAR of novel isoquinoline*
- 63) *CXCR4 antagonists with potent anti-HIV activity”* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.20 Issue 10 (2010) 3026-3030
- 64) John G. Catalano , Kristjan S. Gudmundsson et al. *“Synthesis of a novel tricyclic 1,2,3,4,4a,5,6,10b-octahydro-1,10-phenanthroline ring system and CXCR4 antagonists with potent activity against HIV-1”* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.20 Issue 7 (2010) 2186-2190
- 65) Kristjan S. Gudmundsson , Paul R. Sebahar et al. *“Amine substituted N-(1H-benzimidazol-2-methyl)-5,6,7,8-tetrahydro-8-quinolamines as CXCR4 antagonists with potent activity against HIV-1”* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.19 Issue 17 (2009) 5048-5052

- 66) Tetsuo Narumi , Chichiro Ochiai et al. “*CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist*” Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vol.20 Issue 19 (2010) 5853-5858
- 67) Daisuke Uchida , Tomitaro Onoue et al. “*Blockade of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma inhibits lymph node metastases*” European Journal of Cancer *In Press* available on line 19 October (2010)
- 68) Eugene H. Huang , Balraj Singh et al. “*A CXCR4 Antagonist CTCE-9908 Inhibits Primary Tumor Growth and Metastasis of Breast Cancer*” Journal of Surgical Research Vol.155 Issue 2 (2009) 231-236
- 69) Xin Ne , Qing Wei et al. “*Immunohistochemical expression of CXCR4 in thyroid carcinomas and thyroid benign lesions*” Pathology-Research and Practice Vol.206 Issue 10 (2010) 712-715
- 70) Yoshihiro Minamiya , Hajime Saito et al. “*Expression of the chemokine receptor CXCR4 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung*” Lung Cancer Vol.68 Issue 3 (2010) 466-471
- 71) Karin Shillen “*Solution Properties of Block Copolymers using Light Scattering*” Doctoral Dissertation (comprehensive summary) Uppsala University (1994)
- 72) “*Neutron , X-Ray and Light Scattering : Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems . PART VI : Using Light*” Edited by P. Lindner , Th. Zemb , North-Holland-Delta Series © ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. 1991 written by Michael Hofer
- 73) “*Dynamic Light Scattering : Applications in Photon Correlation Spectroscopy*” Edited by Robert Pecora © 1985 Plenum Press New York
- 74) Ιωάννης Αλιφραγκής “*Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός βιοδραστικών πολυμερών της πολυβινυλοπυρρολιδόνης με σκέδαση ακτίνων laser*” Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης-Ηράκλειο (2002)

- 75) Εμμανουήλ Στειακάκης “*Κινητικά Διαγράμματα φάσεων σε αστεροειδή πολυμερή*”
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης-Ηράκλειο
(2001)
- 76) Γεώργιος Βλάχος “*Δυναμική πολυμερικών πολυκλαδικών αστεριών*”
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης-Ηράκλειο
(1999)
- 77) Ιωάννης Τσικαλάς “*Διερεύνηση της σταθερότητας λιπιδικών μικροσφαιριδίων ως
ανοσολογικών παραγόντων*” Διδακτορικό Δίπλωμα Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο
Κρήτης-Ηράκλειο (2007)
- 78) Χρυσή Λογκάκη “*Φασματοσκοπική μελέτη της V3 περιοχής της γλυκοπρωτεΐνης
gp120 του ιού του HIV-1*” Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης-Ηράκλειο (2010)
- 79) Αφροδίτη Μπουντουράκη “*Μελέτη των ιοντικών αλληλεπιδράσεων της
αμινοτελικής περιοχής του συνυποδοχέα CCR5 του CD4+ T λεμφοκυττάρου με τη V3
περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του HIV-1*” Μεταπτυχιακό Δίπλωμα
Ειδίκευσης Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης-Ηράκλειο (2010)
- 80) Manuel Alatorre-Meda , Pablo Taboada , Juan Sabin , Barbara Krajewska , Luis M.
Varela and Julio R. Rodriguez “*DNA-chitosan complexation : A dynamic light
scattering study*” Colloids and Surfaces : A Physicochemical and Engineering
Aspects Vol.339 Issues 1-3 (2009) 145-152
- 81) Abul H.J. Ulah , Kandan Sethumadhavan and Edward J. Mullaney “*Monitoring of
unfolding and refolding in fungal phytase (phyA) by dynamic light scattering*”
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.327 Issue 4 (2005) 993-
998
- 82) C. Branca , V. Magazu and A. Mangione “*Determination of MWNTs length-to-
diameter ratio by static and dynamic light scattering*” Diamond and Related
Materials Vol.14 Issues 3-7 (2005) 846-849

- 83) Elaine M. Wells-Gray , Sean J. Kirkpatrick and Ronald L. Sakaguchi “*A dynamic light scattering approach for monitoring dental composite curing kinetics*” *Dental Materials* Vol.26 Issue 7 (2010) 634-642
- 84) A. Pelin Yargan , T. Eldem and O. Eser “*Dynamic light scattering as a screening tool to monitor the maturation time of cationic liposome-DNA complexes*” *Journal of Controlled Release* Vol.116 Issue 2 (2006) e71-e73
- 85) Huan Xie , Kelly L. Gill-Sharp and D. Patrick O’ Neal “*Quantitative estimation of gold nanoshell concentrations in whole blood using dynamic light scattering*” *Nanomedicine : Nanotechnology , Biology and Medicine* Vol.3 Issue 1 (2007) 89-94
- 86) Serena Faggiano , Luca Ronda , Stefano Bruno , Hanna Jankevics and Andrea Mozzarelli “*Polymerized and polyethylene glycol-conjugated hemoglobins : A globin-based calibration curve for dynamic light scattering analysis*” *Analytical Biochemistry* Vol.401 Issue 2 (2010) 266-270
- 87) Laura R. Arriaga , Ivan Lopez-Montero et al. “*Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases : A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles*” *Biophysical Journal* Vol.96 Issue 9 (2009) 3629-3637
- 88) Patricia S. Santiago , Franciane Moura et al. “*Dynamic Light Scattering and Optical Absorption Spectroscopy Study of pH and Temperature Stabilities of the Extracellular Hemoglobin of Glossoscolex Paulistus*” *Biophysical Journal* Vol.94 Issue 6 (2008) 2228-2240
- 89) Thu Tran Le, Pieter Saveyn, Hoang Dinh Hoa and Paul Van der Meeren “*Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis*” *International Dairy Journal* Vol.18 Issue 18 (2008) 1090-1096
- 90) Wei Li , Steve W. Cui , Qi Wang , Rickey Y. Yada “*Studies of aggregation behaviours of cereal β -glucans in dilute aqueous solutions by light scattering : Part I. Structure effects*” *Food Hydrocolloids* Vol.25 Issue 2 (2011) 3 March pages 189-195

- 91) L. Rodriguez-Maldonado , A. Fernandez-Nieves and A. Fernandez-Barbero
“*Dynamic light scattering from high molecular weight poly-L-lysine molecules*”
Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Volumes 270-271 (2005) 335-339
- 92) N. Ghaouar , S. Elmissaoui , A. Aschi and A. Gharbi “*Concentration regimes and denaturation effects on the conformational changes of α -chymotrypsin by viscosity and dynamic light scattering*” International Journal of Biological Macromolecules Vol.47 Issue 4 (2010) 425-430
- 93) Dessislava Georgieva , Daniel Schwark et al. “*Conformational States of the *Rapana thomasiana* Hemocyanin and Its Substructures Studied by Dynamic Light Scattering and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy*” Biophysical Journal Vol.88 Issue 2 (2005) 1276-1282
- 94) Karin Ahrer , Andrea Buchacher , Gunter Iberer and Alois Jungbauer
“*Thermodynamic stability and formation of aggregates of human immunoglobulin G characterized by differential scanning calorimetry and dynamic light scattering*”
Journal of Biochemical and Biophysical Methods Vol.66 Issues 1-3 (2006) 73-86
- 95) Norihiro Inomoto , Noboru Osaka et al. “*Interaction of nanogel with cyclodextrin or protein : Study by dynamic light scattering and small-angle neutron scattering*”
Polymer Vol.50 Issue 2 (2009) 541-546
- 96) Silvia Barbosa , Pablo Taboada , Victor Mosquera “*Analysis of the interactions between human serum albumin / amphiphilic penicillin in different aqueous media : an isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering*” Chemical Physics Vol.310 Issues 1-3 (2005) pages 51-58
- 97) Tsutomu Ulchida , Masafumi Nagayama and Kazutoshi Gohara “*Trehalose solution viscosity at low temperatures measured by dynamic light scattering method : Trehalose depresses molecular transportation for ice crystal growth*” Journal of Crystal Growth Vol.311 Issues 3-4 (2009) 4747-4752

- 98) Noboru Osaka , Shin-ichi Takata , Takuya Suzuki , Hitoshi Endo and Mitsuhiro Shibayama “*Comparison of heat- and pressure-induced gelation of β -lactoglobulin aqueous solutions studied by small-angle neutron and dynamic light scattering*”
Polymer Vol.49 Issue 12 (2008) 2957-2963
- 99) Nicolas Michel , Anne-Sylvie Fabiano , Ange Polidori , Robert Jack and Bernard Pucci “*Determination of phase transition temperatures of lipids by light scattering*”
Chemistry and Physics of Lipids Vol.139 Issue 1 (2006) 11-19
- 100) Dirk Jan Slotboom , Ria H. Duurkens , Kees Olieman , Guus B. Erkens “*Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution*” Methods
Vol.46 Issue 2 (2008) 73-82
- 101) Rilton A. de Freitas , Ana P. Busato , David A. Mitchell , Joana L.M. Silveira “*Degalatosylation of xuloglycan : Effect on aggregation and conformation as studied by time dependent static light scattering , HPSEC-MALLS and viscosimetry*”
Carbohydrate Polymers In Press available on line 15 October (2010)
- 102) Hiroshi Matsunami , Chiho Fujita , Kazuyoshi Ogawa , Etsuo Kokufuta “*Static light scattering study of complex formation between protein and neutral water-soluble polymer*” Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Vol.56 Issues 1-2 (2007) 149-154
- 103) Arun K. Attri , Cristina Fernandez , Allen P. Milton “*pH-dependent self-association of zinc-free insulin characterized by concentration-gradient static light scattering*”
Biophysical Chemistry Vol.148 Issues 1-3 (2010) 28-33
- 104) Arnaud Mimouni , Hilton C. Deeth et al. “*Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering*” Food Hydrocolloids
Vol.23 Issue 7 (2009) 1958-1965
- 105) Thomas Witte , Lars A. Haller et al. “*Time resolved structure analysis of growing β -amyloid fibers*” Journal of Structural Biology Vol.159 Issue 1 (2007) 71-81
- 106) Mauro Manno , Emanuela Fabiola Craparo et al. “*Kinetics of Different Processes in Human Insulin Formation*” Journal of Molecular Biology Vol.366 Issue 1 (2007) 258-274

- 107) Sarah E. Bowen , David A. Gray et al. “*Lipid oxidation and amylopectin molecular weight changes occurring during storage of extruded starch samples*” *Journal of Cereal Science* Vol.43 Issue 3 (2006) 275-283
- 108) Cristina Fernandez and Allen P. Minton “*Static Light Scattering From Concentrated Solutions II : Experimental Test of Theory for Protein Mixtures and Weakly Self-Associating Proteins*” *Biophysical Journal* Vol.96 Issue 5 (2009) 1992-1998
- 109) D.J. Goodwin , D.R. Picout et al. “*Ultrasonic degradation for molecular weight reduction of pharmaceutical cellulose ethers*” *Carbohydrate Polymers* Vol.83 Issue 2 (2011) 10 January pages 843-851
- 110) 16. Ugolini, S., Mondor, I., and Sattentau, Q. J. (1999). *HIV-1 attachment: another look*. *Trends Microbiol* 7(4), 144-9
- 111) 17. Forster, R., Kremmer, E., Schubel, A., Breitfeld, D., Kleinschmidt, A., Nerl, C., Bernhardt, G., and Lipp, M. (1998). *Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation*. *J Immunol* 160(3), 1522-31.
- 112) 18. Labrosse, B., Treboute, C., Brelot, A., and Alizon, M. (2001). *Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor*. *J Virol* 75(12), 5457-64
- 113) 19. Huang CC, Tang M, Zhang MY, et al: *Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core*. *Science* 310: 1025-1028, 2005.
- 114) Zafiroopoulos, A., Baritaki, S., Sioumpara, M., Spandidos, D. A., and Krambovitis, E. (2001). *V3 induces in human normal cell populations an accelerated macrophage-mediated proliferation--apoptosis phenomenon of effector T cells when they respond to their cognate antigen*. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1), 63-70.
- 115) 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.
- 116) 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.
- 117) 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.
- 118) 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.
- 119) 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.
- 120) Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1995). *New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection.* Annu Rev Immunol 13, 487-512
- 121) Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. (1999). *Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry.* Cell 96(5), 667-76
- 122) Farzan, M., Vasilieva, N., Schnitzler, C. E., Chung, S., Robinson, J., Gerard, N. P., Gerard, C., Choe, H., and Sodroski, J. (2000). *A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry.* J Biol Chem 275(43), 33516-21.
- 123) Liu S, Fan S and Sun Z: *Structural and functional characterization of the human CCR5 receptor in complex with HIV gp120 envelope glycoprotein and CD4 receptor by molecular modeling studies.* J Mol Model (Online) 9: 329-336, 2003.

- 124) Safarian D, Carnec X, Tsamis F, Kajumo F and Dragic T: *An anti-CCR5 monoclonal antibody and small molecule CCR5 antagonists synergize by inhibiting different stages of human immunodeficiency virus type 1 entry*. *Virology* 352: 477-484, 2006.
- 125) Suphaphiphat P, Essex M and Lee TH: *Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor*. *Virology* 2006.
- 126) Cormier, E. G., Persuh, M., Thompson, D. A., Lin, S. W., Sakmar, T. P., Olson, W. C., and Dragic, T. (2000). *Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5762-7.
- 127) Rizos AK, Baritaki S, Tsikalas I, Doetschman DC, Spandidos DA, Krambovitis E. *Biophysical characterization of V3-lipopeptide liposomes influencing HIV-1 infectivity*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 (355) 963-9.
- 128) 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.
- 129) 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.
- 130) Virgin HW, Walker BD. *Immunology and the elusive AIDS vaccine*. *Nature*. 2010 (464) 224-31.
- 131) Walker BD, Burton DR. *Toward an AIDS vaccine*. *Science* 2008 (320) 760-4
- 132) Aliana López de Victoria, Chris A. Kieslich, Apostolos K. Rizos, Elias Krambovitis, Dimitrios Morikis *Clustering of HIV-1 Subtypes Based on gp120 V3 Loop Electrostatic Properties*