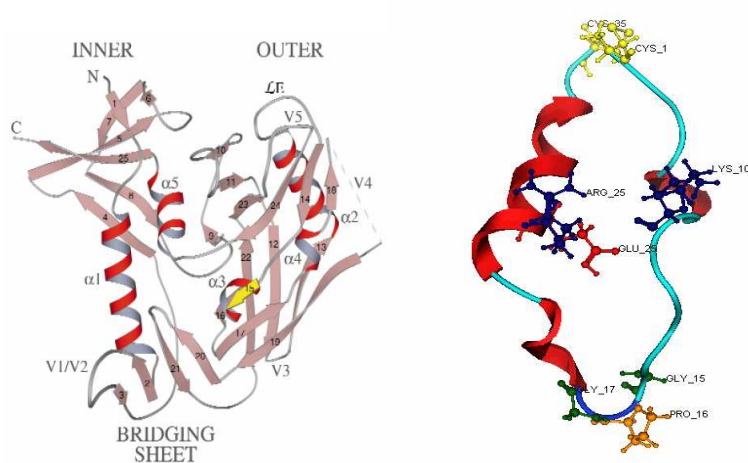


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ V3 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ
ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ gp120 ΤΟΥ ΙΟΥ HIV-1

ΧΡΥΣΗ Μ. ΛΟΓΚΑΚΗ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Βιολογία του HIV-1	7
1.1.1 Μοριακή οργάνωση του ιού HIV-1.....	13
1.1.2 Βιολογικός Κύκλος του Ιού.....	18
1.1.3 Υποδοχείς Ιικής Πρόσδεσης – Τροπισμός.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1 Φασματοσκοπία Σκέδασης ακτίνων Laser.....	26
2.1.1 Ο Μηχανισμός της Σκέδασης.....	26
2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	29
2.1.4 Στατική Σκέδαση Φωτός.....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.2 Πειραματικά συστήματα.....	33
2.2.1 Πειραματική Διάταξη.....	33
2.2.2 V3 πεπτίδια.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
Ανάλυση Αποτελεσμάτων	
3.1 - Αλληλεπιδράσεις V3 περιοχής.....	38
3.1.1 Προσδιορισμός των υδροδυναμικών παραμέτρων.....	44
3.1.2 Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με τον υποδοχέα της χημειοκίνης CCR5.....	53
3.1.4 Συμπεράσματα.....	57
Βιβλιογραφία.....	58

Τα Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ρίζος Απόστολος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κραμποβίτης Ηλίας

Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσιώτης Γεώργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS) θεωρείται ως η μεγάλη επιδημία της εποχής μας, με 65 εκ. ανθρώπους να έχουν μολυνθεί, 35 εκ. εκ των οποίων να έχουν ήδη πεθάνει, και 15.000 άτομα να μολύνονται κάθε μέρα. Η πλέον ορθολογική στρατηγική αντιμετώπισης της ασθένειας είναι η ανάπτυξη προληπτικού εμβολίου, αλλά η ανάπτυξη τέτοιου εμβολίου προϋποθέτει ικανοποιητική γνώση της παθογένεσης της ασθένειας. 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. Το πρόβλημα είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού που απαλείφεται εξαιτίας της παρουσίας του ιού στον οργανισμό του ξενιστή δεν έχει μολυνθεί από τον ιό. Η επικρατούσα άποψη είναι ότι ο ιός ευαισθητοποιεί τα αποπτωτικά μονοπάτια αυτών των κυττάρων και τα οδηγεί σε «προγραμματισμένο θάνατο». 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). Η ερευνητική μας ομάδα έδειξε πρόσφατα ότι 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 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. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι καθαρά ιοντικής φύσεως και η ένταση της αντίδρασης συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή. Ο κύριος στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη των φυσικοχημικών

ιδιοτήτων των συνθετικών πεπτιδίων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τον συνυποδοχέα CCR5 με φασματοσκοπία σκέδασης ακτίνων Laser. Αναλύθηκε η συμπεριφορά των συγκεκριμένων πεπτιδίων σε φυσιολογικά διαλύματα και η επιρροή ιοντικών δυνάμεων/αλληλοεπιδράσεων σαν συνάρτηση του αριθμού των βασικών αμινοξέων στην V3 περιοχή.

Abstract

The acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is the great epidemic of our times, with 65 million people infected, 35 million already died and 15,000 people infected every day. The most rational strategy for coping with the disease is to develop a preventive vaccine, however developing such a vaccine requires sufficient knowledge of the pathogenesis of the disease. Although we know the biology of the virus that causes AIDS, our information on how the virus causing the disease is limited. 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 prevailing view today is that the virus sensitizes the apoptotic pathways of these cells and leads them to programmed death. 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). Our research group has recently shown that 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 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 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 CCR5 of the responsive CD4+ T lymphocyte. This interaction is purely ionic in nature and 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 CCR5 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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία του HIV-1

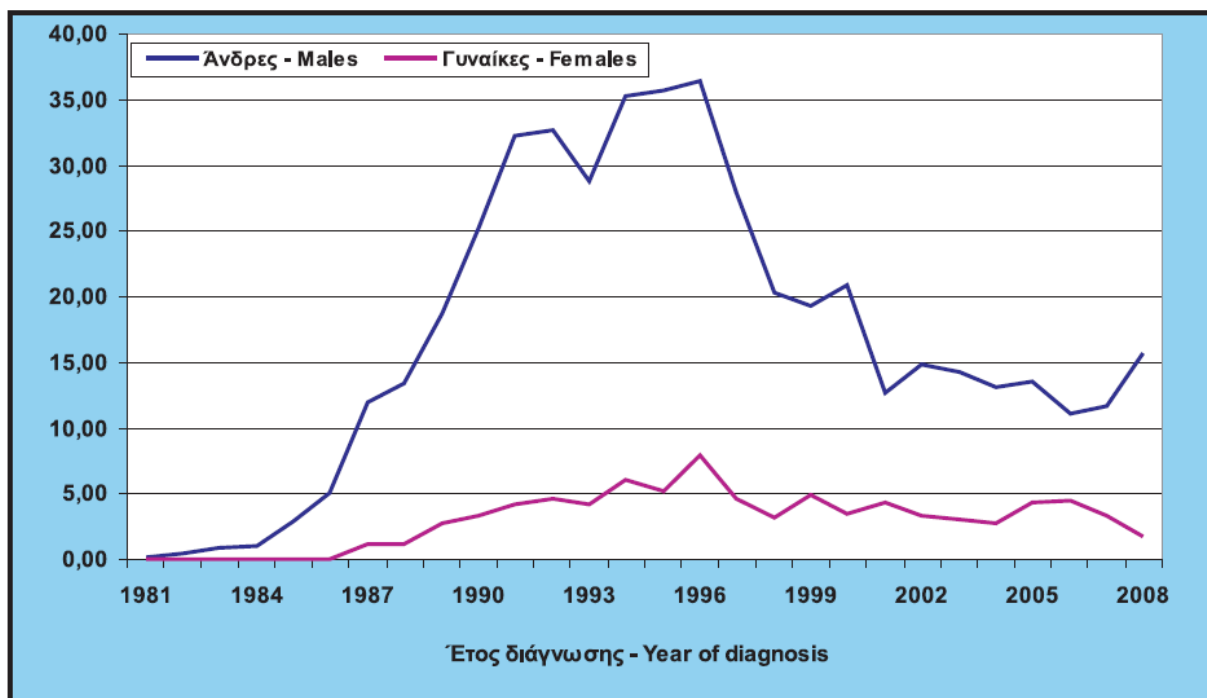
Το AIDS είναι μία ασθένεια που έγινε γνωστή μόλις το 1981 και που κατόρθωσε μέσα σε λίγα χρόνια να τρομοκρατήσει ολόκληρη την ανθρωπότητα και να καταστεί πραγματική μάστιγα. Σήμερα η ασθένεια του AIDS τείνει να βρεθεί εκτός «προσκήνιου», όχι γιατί έπαψε να υφίσταται ως επιδημία ή γιατί βρέθηκε η θεραπεία της, αλλά λόγω της αδιαφορίας και της υποτίμησης για τις διαστάσεις και τις συνέπειές της.

Οι ιοί που προκαλούν στον άνθρωπο το AIDS ανήκουν στο γένος των ρετροϊών Lentiviruses και είναι ευρέως γνωστοί ως HIV-1 και HIV-2 (Human Immunodeficiency Virus-1, -2). Η πορεία της λοίμωξης με αυτούς τους ιούς χαρακτηρίζεται από μεγάλο χρονικό διάστημα μεταξύ της αρχικής λοίμωξης και την εμφάνιση σοβαρών συμπτωμάτων. Η επιστημονική κοινότητα πιστεύει ότι ο ιός HIV μεταδόθηκε στον άνθρωπο από τους πιθήκους γύρω στη δεκαετία του 30. Φυλογενετικές αναλύσεις εικάζουν τη πιθανή προέλευση των HIV ιών στη συσσώρευση διαδοχικών μεταλλάξεων πάνω σε ένα συγγενικό ιικό στέλεχος, το STLV II, που παρασιτεί στους πράσινους πιθήκους της Αφρικής. Ο πρώτος επιβεβαιωμένος θάνατος από AIDS (όπως διαπιστώθηκε εκ των υστέρων), σημειώθηκε το 1959 σε άνδρα καταγόμενο από το σημερινό Κονγκό. Το 1978 ομοφυλόφιλοι άνδρες στις ΗΠΑ και τη Σουηδία και ετεροφυλόφιλοι στην Τανζανία και την Αϊτή εμφανίζουν συμπτώματα μιας παράξενης ασθένειας του ανοσοποιητικού. Το 1981 το CDC παρατηρεί αυξημένη συχνότητα μιας μορφής καρκίνου, του σαρκώματος Kaposi σε ομοφυλόφιλους. Τον επόμενο χρόνο, υπό το βάρος αυξανόμενων κρουσμάτων ανοσοανεπάρκειας σε νέους άνδρες, γυναίκες και βρέφη, χρησιμοποιείται για πρώτη φορά ο όρος AIDS. Δηλώνονται κρούσματα από 14 διαφορετικές χώρες. Το 1983 τα κρούσματα μόνο στις ΗΠΑ φθάνουν τα 3.000 και οι θάνατοι τους 1.000. Το 1986 δηλώνονται 40.000 περιπτώσεις AIDS από 85 χώρες. Το 1990 οι φορείς του ιού παγκοσμίως είναι πλέον 8.000.000.

Σύμφωνα με τα τελευταία επίσημα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, περί τα 33 εκατομμύρια άνθρωποι ζούν με τον HIV , εκ των οποίων τα 2,5 εκατομμύρια είναι παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών, ενώ περισσότεροι από 35 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από AIDS μέχρι σήμερα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά φορέων του HIV εμφανίζονται στις χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής και τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης.

Οι περιπτώσεις AIDS που παρουσιάζονται στη διατριβή αυτή αξιολογούνται βάσει του Ευρωπαϊκού ορισμού του AIDS. Ο ορισμός αυτός αρχικά δημοσιεύθηκε το Σεπτέμβριο του 1982 [1] και αναθεωρήθηκε τον Ιούνιο του 1985 [2,3] και τον Αύγουστο του 1987 [4,5]. Για τους εφήβους και ενήλικες (ηλικίας 13 ετών και άνω), ο ορισμός αναθεωρήθηκε τον Ιανουάριο του 1993 [6,7]. Η διαφορά σε σχέση με τον αντίστοιχο ορισμό που ισχύει στις ΗΠΑ είναι ότι δεν χρησιμοποιείται ως κριτήριο ο αριθμός των CD4 κυττάρων. Για τα παιδιά, ο ορισμός που χρησιμοποιείται στην Ευρώπη είναι ουσιαστικά ο ίδιος με αυτόν στις ΗΠΑ [8].

Ο ιός HIV έκανε την εμφάνισή του στην Ελλάδα στα μέσα της δεκαετίας του 80. Ο συνολικός αριθμός των περιπτώσεων AIDS που δηλώθηκαν στην Ελλάδα μέχρι την 31η Οκτωβρίου 2009, ανέρχεται σε 3027, εκ των οποίων, 2557 (84,5%) ήταν άνδρες και 470 (15,5%) ήταν γυναίκες.

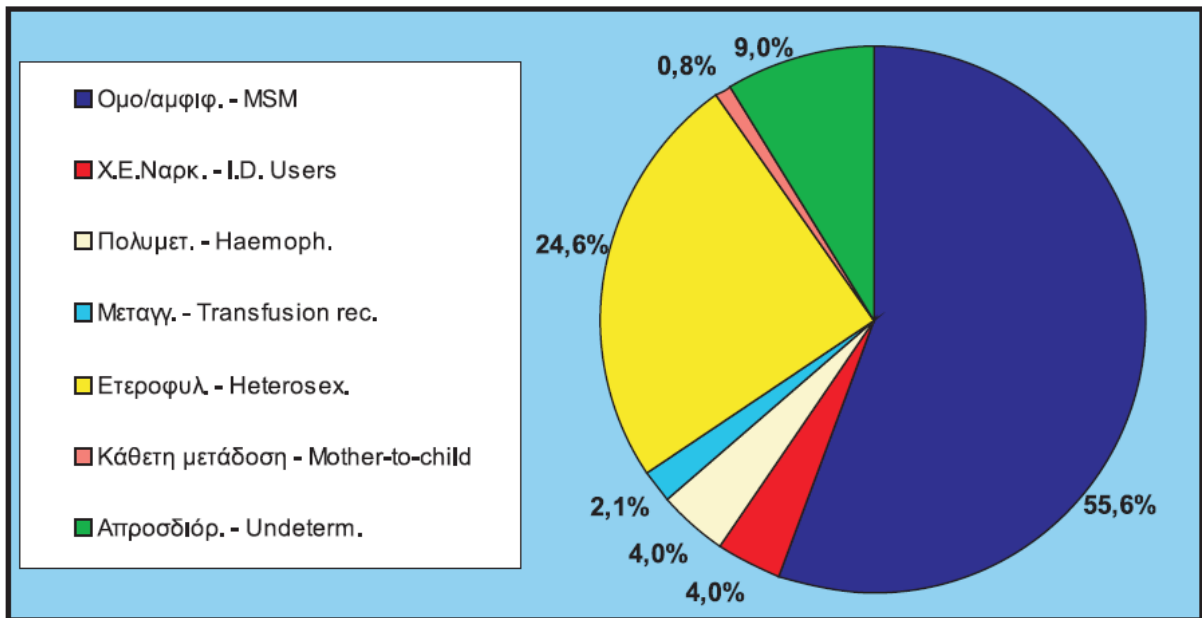


Σχήμα 1. 1

Περιπτώσεις AIDS ανά εκατομμύριο πληθυσμού κατά έτος διάγνωσης και κατά φύλο στην Ελλάδα

Πρέπει να τονιστεί ότι η ερμηνεία των διαχρονικών τάσεων του AIDS πρέπει να γίνει υπό το πρίσμα δύο πολύ σημαντικών αλλαγών στην ιστορία της νόσου, δηλαδή την επέκταση των διαγνωστικών κριτηρίων το 1993 και την εισαγωγή των νέων συνδυασμένων θεραπειών (HAART) το 1996. Η απότομη αύξηση που παρατηρείται τα έτη 1993-96 οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στον αυξημένο αριθμό κρουσμάτων λόγω της επέκτασης των κριτηρίων για τη διάγνωση της νόσου. Αντίθετα, η μεγάλη μείωση στην επίπτωση του AIDS που παρατηρείται από το 1997 μέχρι το 2001 μπορεί να αποδοθεί στις νέες αντιρετροϊκές αγωγές. Ο αριθμός των νέων περιπτώσεων AIDS τα τελευταία έτη παραμένει χαμηλός. Το 2008, η επίπτωση του AIDS παρουσίασε μία μικρή αύξηση συγκριτικά με τα δύο προηγούμενα έτη.

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Κέντρου Παρακολούθησης του AIDS, ανάμεσα στις Ευρωπαϊκές χώρες όπου, η κυρίαρχη αριθμητικά ομάδα μεταξύ αυτών που μολύνθηκαν από τον ιό, είναι οι ομοφυλόφιλοι. Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης του HIV σε άτομα που έχουν εμφανίσει AIDS παραμένει η σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (55,6%) και ακολουθεί η ετεροφυλοφιλική (για άνδρες και γυναίκες) σεξουαλική επαφή (24,6%). Οι περιπτώσεις, οι οποίες μολύνθηκαν ενδεχομένως μέσω άλλων τρόπων μετάδοσης, εμφανίζουν μικρά ποσοστά.



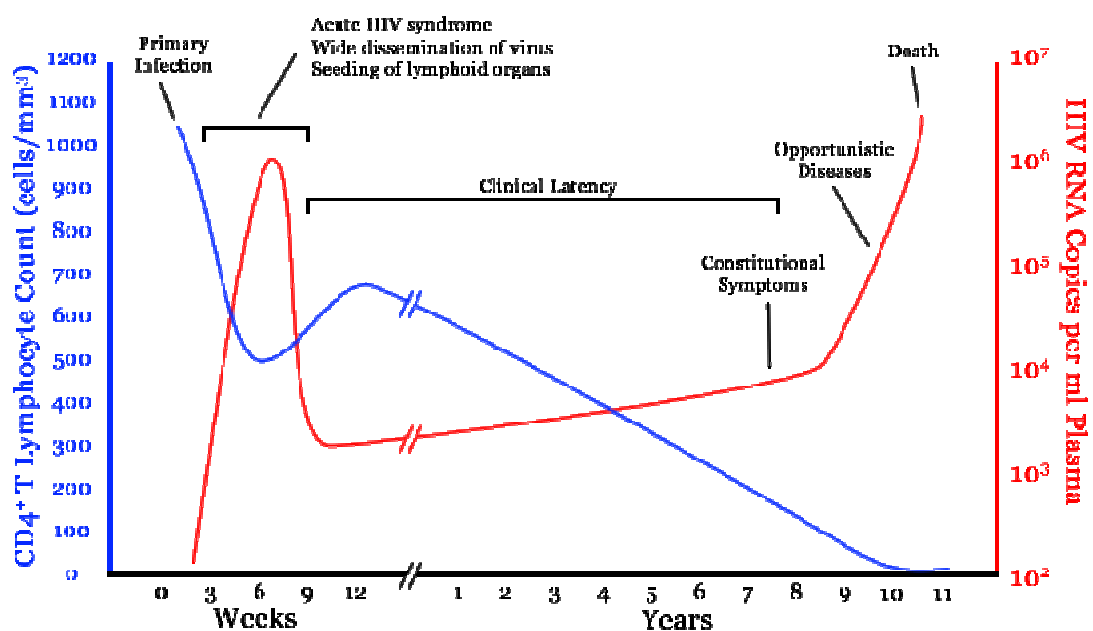
Σχήμα 1. 2

Περιπτώσεις AIDS κατά κατηγορία μετάδοσης στην Ελλάδα μέχρι 31/10/2009

Αντίθετα στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, επικρατούν ανάμεσα στους φορείς οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Για τις περισσότερες μολύνσεις στο δυτικό κόσμο ευθύνονται κυρίως οι υπότυποι του HIV-1. Η κλινική κατάσταση του μολυσμένου ατόμου χαρακτηρίζεται από μία μακρά λανθάνουσα περίοδο επώασης του ιού, συνοδευόμενη από ασθενείς χυμικές απαντήσεις του ξενιστή, οι οποίες περιπλέκονται από παρατεταμένη παρουσία ιικού RNA στο πλάσμα. Η πρόοδος της ασθένειας επιφέρει σοβαρές δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα, με τον οργανισμό να γίνεται

επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε ανάπτυξη νεοπλασμάτων, ενώ παράλληλα εμφανίζονται αρνητικές επιπτώσεις και στο νευρικό, αιμοποιητικό και αναπνευστικό σύστημα. Η κατάληξη του ξενιστή είναι πάντα, τουλάχιστον μέχρι σήμερα, ο θάνατος.

Φυλογενετικές αναλύσεις εικάζουν τη πιθανή προέλευση των HIV ιών σε ένα συγγενικό ιικό στέλεχος που παρουσιάζεται στους πιθήκους (Pan troglodytes troglodytes) της Αφρικής. Για τις περισσότερες μολύνσεις στο δυτικό κόσμο ευθύνονται κυρίως οι υπότυποι του HIV-1.

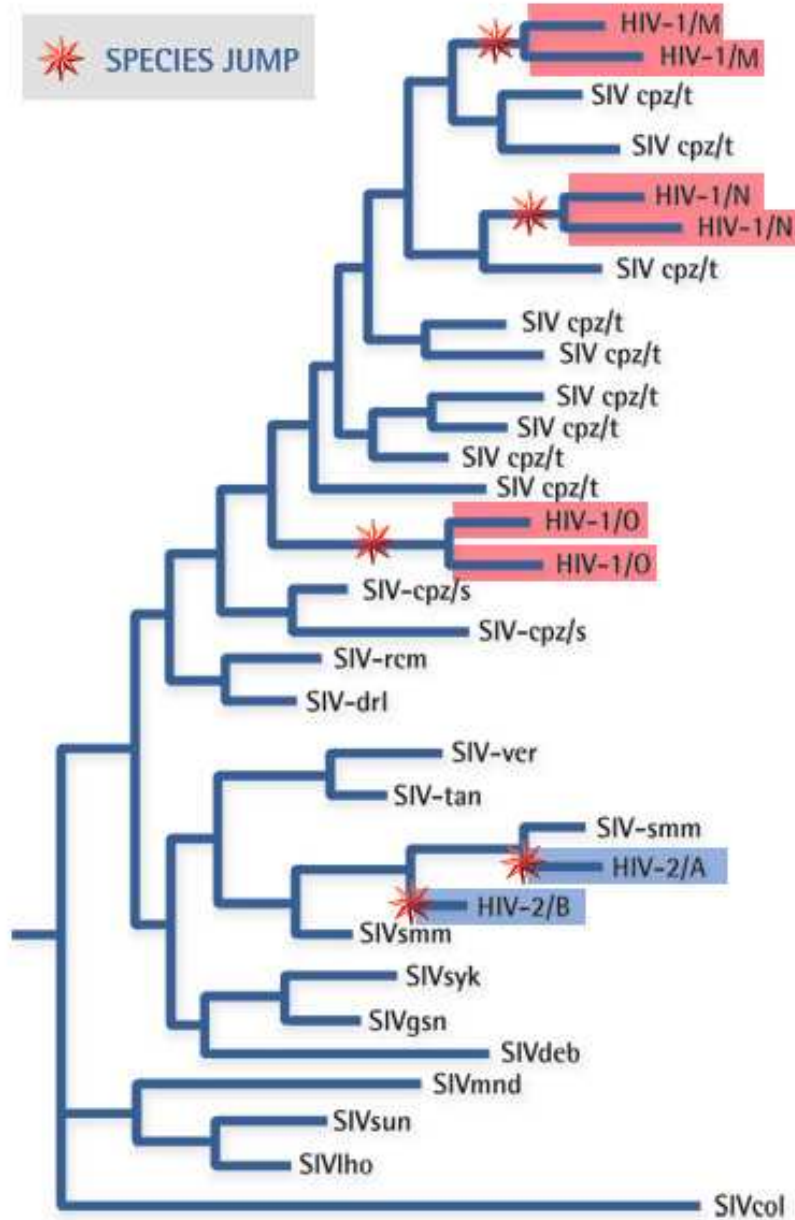


Σχήμα 1. 3

Τυπική πρόοδος της HIV μόλυνσης

Η κλινική κατάσταση του μολυσμένου ατόμου χαρακτηρίζεται από μία μακρά λανθάνουσα περίοδο επώασης του ιού, συνοδευόμενη από μια παρατεταμένη παρουσία ιικού RNA στο πλάσμα. Η πρόοδος της ασθένειας επιφέρει σοβαρές δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα, με τον οργανισμό

να γίνεται επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε ανάπτυξη νεοπλασμάτων, ενώ παράλληλα εμφανίζονται αρνητικές επιπτώσεις και στο νευρικό, αιμοποιητικό και αναπνευστικό σύστημα με τελική κατάληξη τουλάχιστον μέχρι σήμερα τον θάνατο.



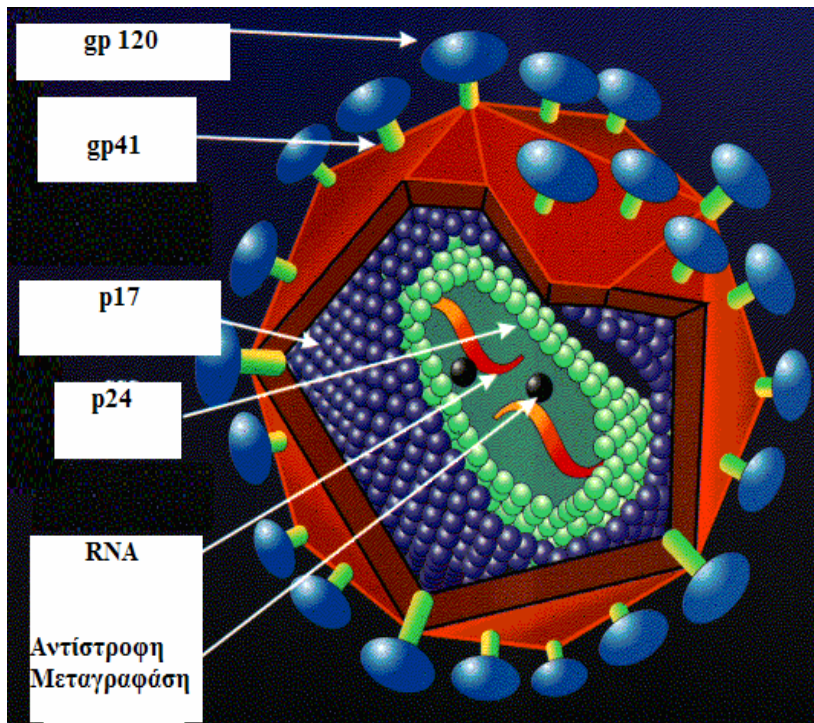
Σχήμα 1. 4

Φυλογενετικό δένδρο του HIV

1.1.1 Μοριακή οργάνωση του ιού HIV-1

Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του HIV-1 είναι το ασυνήθιστα πολύπλοκο γένωμα του. Το ώριμο ισωμάτιο του HIV-1 όπως και των περισσότερων ρετροϊών έχει σχεδόν σφαιρική δομή διαμέτρου περίπου 100 nm, αποτελούμενη από τον ικό φάκελο, το στρώμα (Matrix), το καψίδιο (Capsid), το νουκλεοκαψίδιο (Nucleocapsid) και 2 πανομοιότυπα μόρια μονόκλωνου RNA ως γενετικό υλικό. Το RNA περιέχει τρία γονίδια: gag, pol και env, τα οποία κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του εξωτερικού κελύφους του ιού, τα ένζυμα και τις γλυκοπρωτεΐνες του ιικού φακέλου αντίστοιχα.

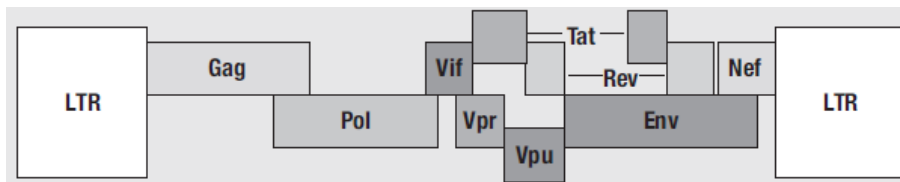
Ο ικός φάκελος, ο οποίος προέρχεται από την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, φέρει τη δομή λιπιδικής διπλοστοιβάδας, η οποία συμπληρώνεται από έντονα γλυκοζυλιωμένες ικές πρωτεΐνες που προεκβάλλουν στην εξωτερική του επιφάνεια. Κάθε τέτοια προεκβολή σχηματίζεται από την σύνδεση 2 κύριων γλυκοπρωτεϊνών,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



Σχήμα 1. 5

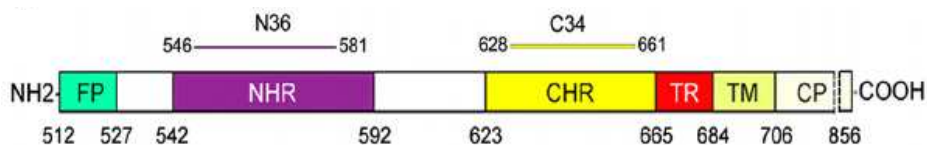
Σχηματική αναπαράσταση της δομής του HIV-1 ιοσωματίου

Η Nef και η vif ενισχύουν την μολυσματικότητα του ιοσωματίου, η vpr μεσολαβεί τη γρήγορη εκτόπιση των ιικών νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων μέσα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή και η vpru προωθεί την αποδόμηση των CD4 μορίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του πρόδρομου προϊόντος του ενν γονιδίου (gp160). Επίσης το γονιδίωμα των ρετροϊών περιέχει δύο λειτουργικές αλληλουχίες: α) μία αλληλουχία πακεταρίσματος (packaging sequence, ps), η οποία επιτρέπει στο ιϊκό RNA να διαφοροποιείται από τα RNAs του κυττάρου ξενιστή και β) δύο αλληλουχίες LTR (long terminal repeats). Τα LTRs περιέχουν αλληλουχίες ενισχυτή και υποκινητή οι οποίες είναι απαραίτητες για την μεταγραφή των γονιδίων του ιού και καθορίζουν την αρχή και το τέλος του ιικού γονιδιώματος).



Σχήμα 1. 6

Δομή και οργάνωση γονιδιώματος του HIV-1. Τα ιικά γονιδιώματα περιλαμβάνονται από περιοχές που ονομάζονται μακρές τελικές επαναλήψεις (Long Terminal Repeats, LTR)



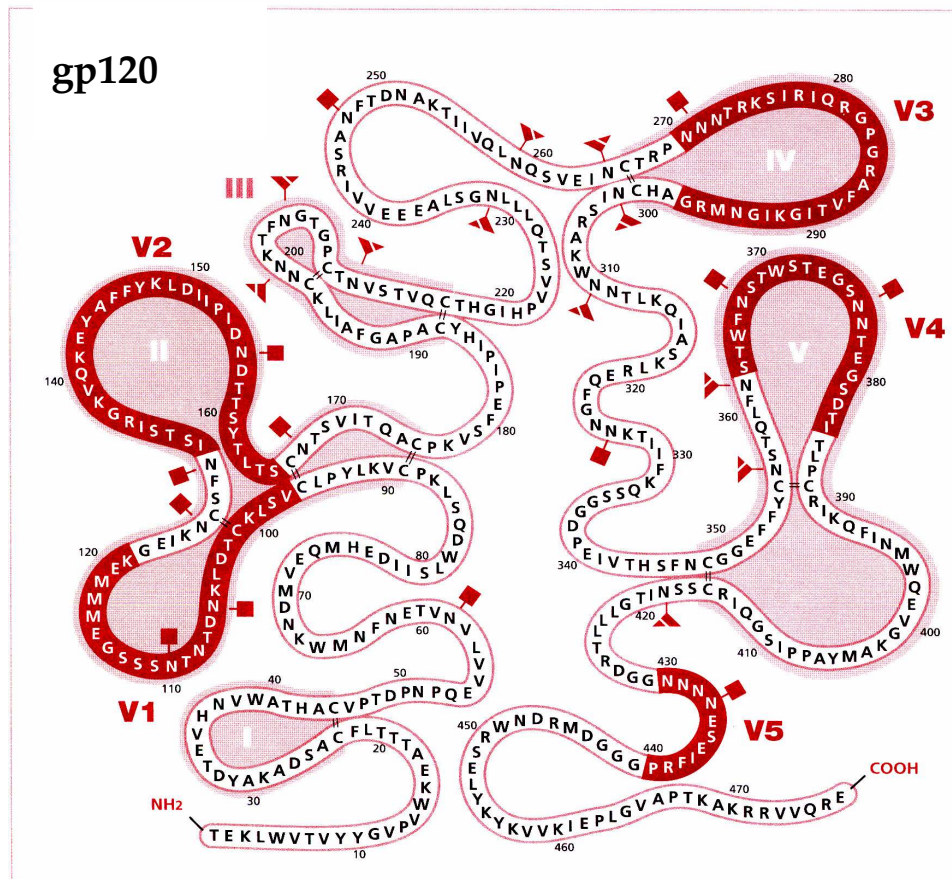
Σχήμα 1. 7

Δομή και οργάνωση γονιδιώματος της γλυκοπρωτεΐνης gp41 του HIV-1

- Πεπτίδιο σύντηξης FP (fusion peptide),
- Αλληλουχία NHR (N-terminal heptad repeat),
- Αλληλουχία CHR (C-terminal heptad repeat),
- Τρυπτοφάνη TR (tryptophan-rich),
- Διαμεμβρανικές TM (transmembrane), και
- Κυτταροπλασματικές περιοχές CP (cytoplasmic domains).
- Αριθμοί αμινοξέων της γλυκοπρωτεΐνης gp160 του ιού HIV-1.

Από τις συστατικές πρωτεϊνικές υπομονάδες της gp160, η gp120 είναι αυτή που κύρια συμμετέχει στα γεγονότα της μεμβρανικής σύντηξης και της ικτής εισόδου στο κύτταρο του ξενιστή με άμεση αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα CD4, αλλά και με τους υπόλοιπους συνυποδοχείς. Κάθε gp120

πρωτεϊνικό μόριο αποτελείται από 5 μεταβλητές (V1-V5) και 4 σταθερές (C1-C4).



Σχήμα 1. 8

Σχηματική αναπαράσταση των σταθερών και μεταβλητών περιοχών της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του HIV-1.

Η τρίτη υπερ-μεταβλητή περιοχή της gp120 του HIV-1 (V3), έχει δειχθεί να συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό γεγονότων που σχετίζονται με τη σύντηξη του ιού στη μεμβράνη του ξενιστή, τη δημιουργία συγκυτίων και τον καθορισμό του κυτταρικού τροπισμού κάθε ιικού στελέχους [9, 10, 11, 12]. Παρόλο που υπάρχουν πολλές αναφορές για την εμπλοκή της και σε δυσλειτουργίες των

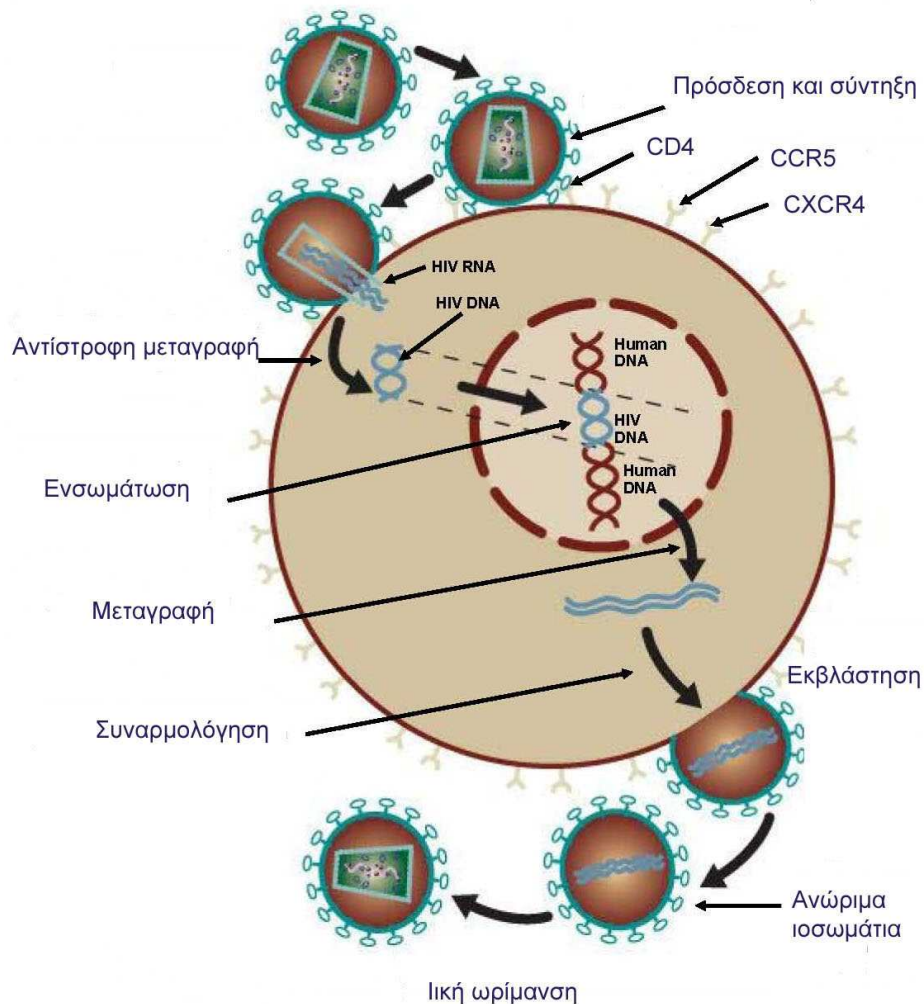
CD4+ T κυττάρων, ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκεί το παθογεννητικό της ρόλο δεν έχει κατανοηθεί επαρκώς [13].

1.1.2 Βιολογικός Κύκλος του Ιού

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

Η ιική μεταγραφή επιτυγχάνεται από την κυτταρική RNA πολυμεράση II. Η ενεργοποίηση της ιικής μεταγραφής προϋποθέτει συνήθως την ενεργοποίηση του μολυσμένου κυττάρου, η οποία, αν μιλάμε για T κύτταρα, μπορεί να προέλθει είτε από αντιγονικό ερεθισμό του TCR υποδοχέα ή από τη δράση μιτογόνων ή άλλων διεγερτικών μορίων. Μέσω της ρυθμιστικής δράσης της Rev όλα τα ιικά μετάγραφα κατεργασμένα ή μη (spliced ή genomic-length RNAs) μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και μεταφράζονται στα ριβοσώματα. Εξάιρεση αποτελεί το mRNA του ενν γονιδίου το οποίο μεταφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε μετέπειτα στάδιο το ενν προϊόν (gp160) πρωτεολύεται στο σύστημα Golgi από κυτταρικές πρωτεάσες στις συστατικές gp120 και gp41 πρωτεΐνες, οι οποίες εξάγονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και συμπλέκονται με τις πρόδρομες γλυκοπρωτεΐνες Gag και Pol, τις Vif, Vpr, Nef και με το RNA. Η εκβλάστηση (budding) των 'ανώριμων' ιικών τμημάτων στην κυτταρική μεμβράνη ακολουθείται από μία μορφολογική αλλαγή του ιοσωματίου, γνωστή ως 'ωρίμανση', η οποία εμπλέκει πρωτεολυτική κατεργασία των Gag-Pol γλυκοπρωτεϊνών από την ιική PR στα MA, CA, NC, p6, PR, RT, και IN. Το ώριμο πλέον ιοσωμάτιο είναι έτοιμο να μολύνει άλλο κύτταρο.

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

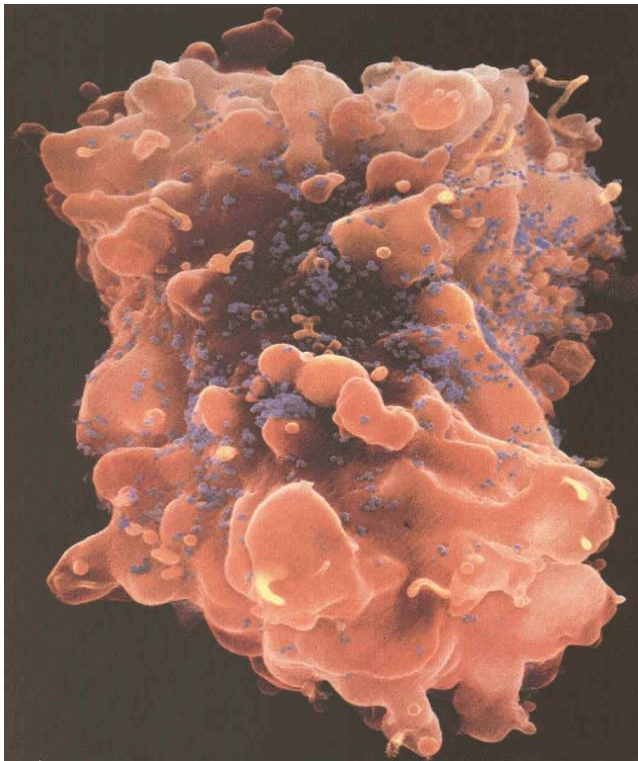


Σχήμα 1. 9

Βιολογικός κύκλος του ιού

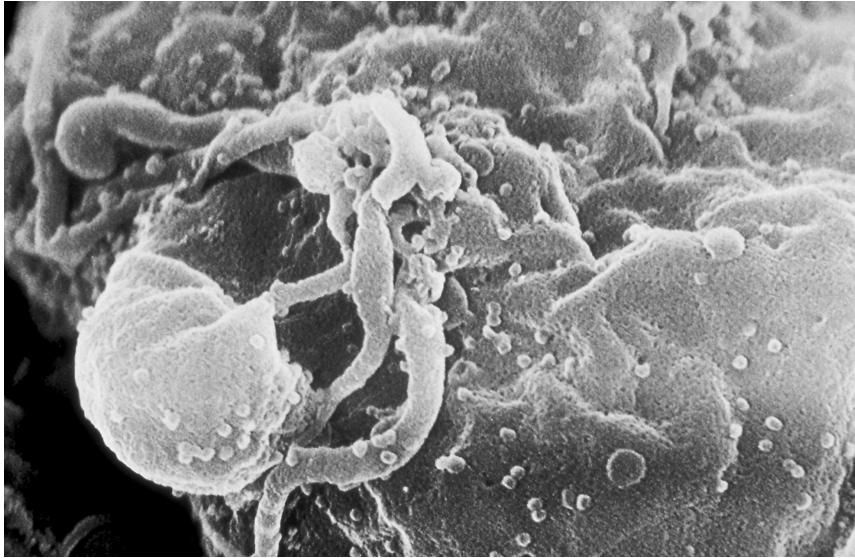
Σε *in vivo* μελέτες, τα μόνα κύτταρα φορείς του HIV που ανιχνεύονται στους ασθενείς είναι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα μονοκυτταρικής προέλευσης. Σε αντίθεση με τα μακροφάγα, ο HIV για να επιτύχει βέλτιστη αντιγραφή και μεταγραφή μέσα στα CD4+ T λεμφοκύτταρα

απαιτεί τη προγενέστερη ενεργοποίησή τους. Ενώ μόνο ένας σχετικά μικρός αριθμός μολυσμένων μακροφάγων μπορεί να ανιχνευθεί στο περιφερικό αίμα φορέων, υψηλή συγκέντρωση μολυσμένων μακροφάγων έχει παρατηρηθεί στους ιστούς ενός πλήθους λεμφικών και μη λεμφικών οργάνων όπως στο σπλήνα, στον πνεύμονα, στον εγκέφαλο και στα νεφρά. Για το λόγο αυτό τα εν λόγω όργανα εμφανίζουν αρκετές λειτουργικές ανωμαλίες κατά την εξέλιξη της ασθένειας του AIDS. Τα πρώτα κύτταρα που μολύνονται κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής μετάδοσης του ιού είναι μάλλον της σειράς των μακροφάγων από τα παρακείμενα βλεννώδη επιθήλια. Τα κύτταρα αυτά λειτουργούν ως δεξαμενές ιών που συντηρούν και προάγουν συνεχώς την εξάπλωση του ιού.



Σχήμα 1. 10

Ο HIV-1 φαίνεται με μικρά μπλε σωματίδια, το κύτταρο του ανθρώπινου ιστού είναι το μεγάλο κόκκινο σώμα

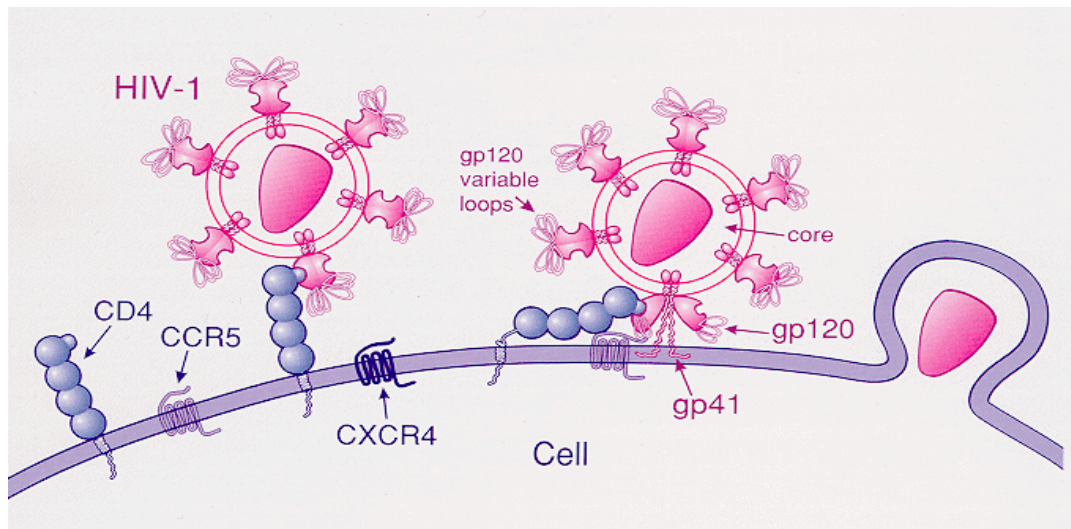


Σχήμα 1. 11

Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης της εκβλάστησης του HIV-1 από καλλιεργημένα λεμφοκύτταρα

1.1.3 Υποδοχείς Ιικής Πρόσδεσης - Τροπισμός

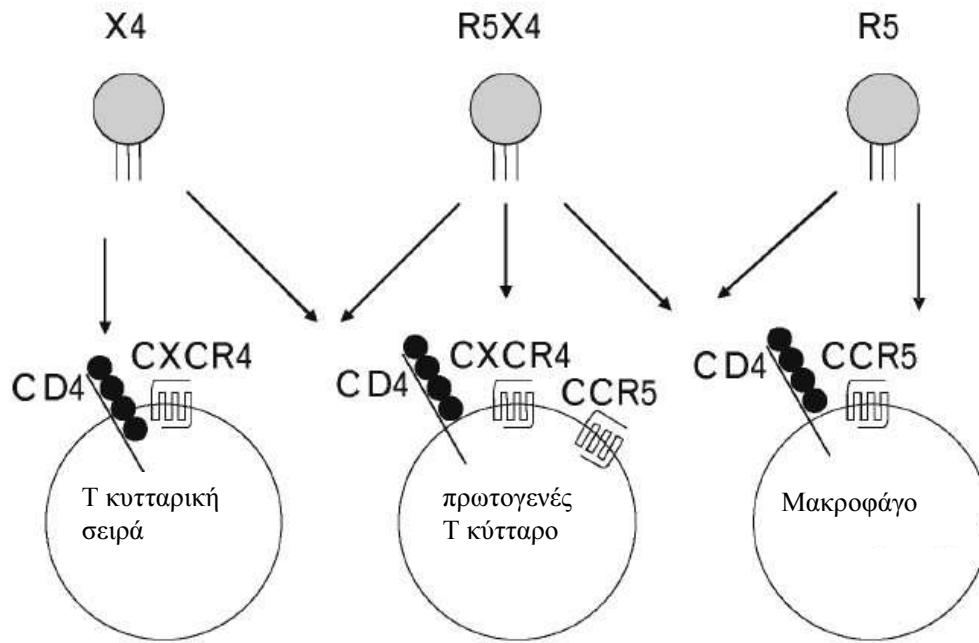
Τα γνωστά HIV-1 στελέχη έχουν πειραματικά διαχωριστεί σε 2 μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων τα οποία μπορούν να μολύνουν και να υποστηρίξουν την αντιγραφή τους *in vitro*. Ιικά στελέχη που αντιγράφονται ικανοποιητικά μέσα σε CD4+ T-κυτταρικές σειρές αλλά όχι μέσα σε μακροφάγα ή μονοκύτταρα είναι γνωστά ως T-cell-line-tropic, ενώ στελέχη που επιλέγουν να μολύνουν κυρίως πρωτογενή μακροφάγα και καλλιέργειες πρωτογενών T-κυττάρων αλλά όχι μετασχηματισμένες T κυτταρικές σειρές, αναφέρονται ως Macrophage-tropic ή M-tropic.



Σχήμα 1.12

Σχηματική αναπαράσταση της σύντηξης του ιού HIV-1

Η επιλεκτικότητα πρόσδεσης, δηλαδή ο τροπισμός κάθε στελέχους για συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, καθορίζεται από το είδος του συνυποδοχέα που χρησιμοποιεί ο ιός προκειμένου να επιτύχει ικανή πρόσδεση στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή.



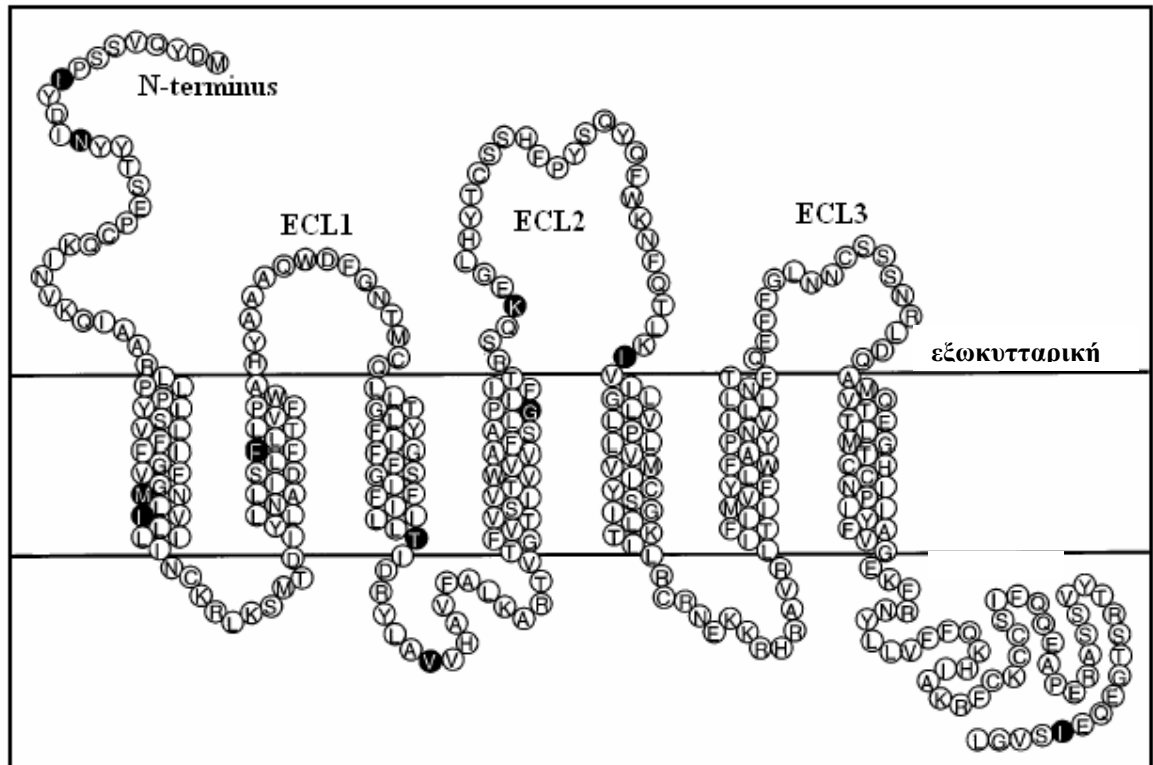
Σχήμα 1. 13

Τροπισμός Ιικών Στελεχών και Υποδοχείς Ιικής Πρόσδεσης

Εκτός από το βασικό κυτταρικό υποδοχέα CD4, 2 μέλη της οικογένειας των υποδοχέων χημειοκινών, οι CCR5 και CXCR4 χρησιμοποιούνται από τον HIV-1 ως συνυποδοχείς πρόσδεσης. Τα M-tropic στελέχη δείχνουν προτίμηση στον CCR5 συνυποδοχέα (R5 στελέχη), ενώ τα T-cell-line-tropic στον CXCR4 (X4 στελέχη). Οι υποδοχείς χημειοκινών ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων που διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές επικράτειες.

Οι χημειοκίνες είναι μικρομοριακές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που χωρίζονται κυρίως σε 2 μεγάλες υπο-οικογένειες ανάλογα με τη θέση των 2 από τα 4 υπολείμματα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στο

μόριο. Η CC ή α - υπο-οικογένεια χημειοκινών περιλαμβάνει κυρίως τα μέλη: MIP-1 α , MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 α/β), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and activated) και MCP-1, -2, -3, -4 (Monocyte Chemotactic Protein-1, -2, -3, -4).



Σχήμα 1. 14

Σχηματική αναπαράσταση του συνυποδοχέα CCR5

Οι χημειοκίνες αυτές αποτελούν τους φυσιολογικούς δεσμευτές των αντίστοιχων CCR υποδοχέων. Χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας των CXC ή β -χημειοκινών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, είναι η χημειοκίνη SDF-1 α (Stromal Derived Factor-1 α) και ο υποδοχέας της CXCR4 (fusin ή LESTR) αντίστοιχα. Τόσο οι φυσιολογικοί δεσμευτές του CCR5 υποδοχέα, RANTES, MIP-1 α και MIP-1 β , όσο και ο φυσιολογικός δεσμευτής του CXCR4, SDF-1 α μπορούν να καταστείλουν *in vitro* την είσοδο διαφόρων ιικών στελεχών σε

διαφορετικούς CD4+ κυτταρικούς τύπους. Η επιλεκτικότητα χρήσης του CCR5 από τα περισσότερα M-tropic στελέχη ως συνυποδοχέα εισόδου, υποδηλώνει τη κρίσιμη συμμετοχή του κατά τη διάρκεια της μετάδοσης και της ασυμπτωματικής φάσης της μόλυνσης. Αντίθετα ο CXCR4 φαίνεται να χρησιμοποιείται από τον ιό κυρίως στο μετέπειτα συμπτωματικό στάδιο της ασθένειας όταν αρχίζουν να εμφανίζονται τα T-cell-line-tropic στελέχη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Φασματοσκοπία Σκέδασης ακτίνων Laser

2.1.1 Ο Μηχανισμός της Σκέδασης

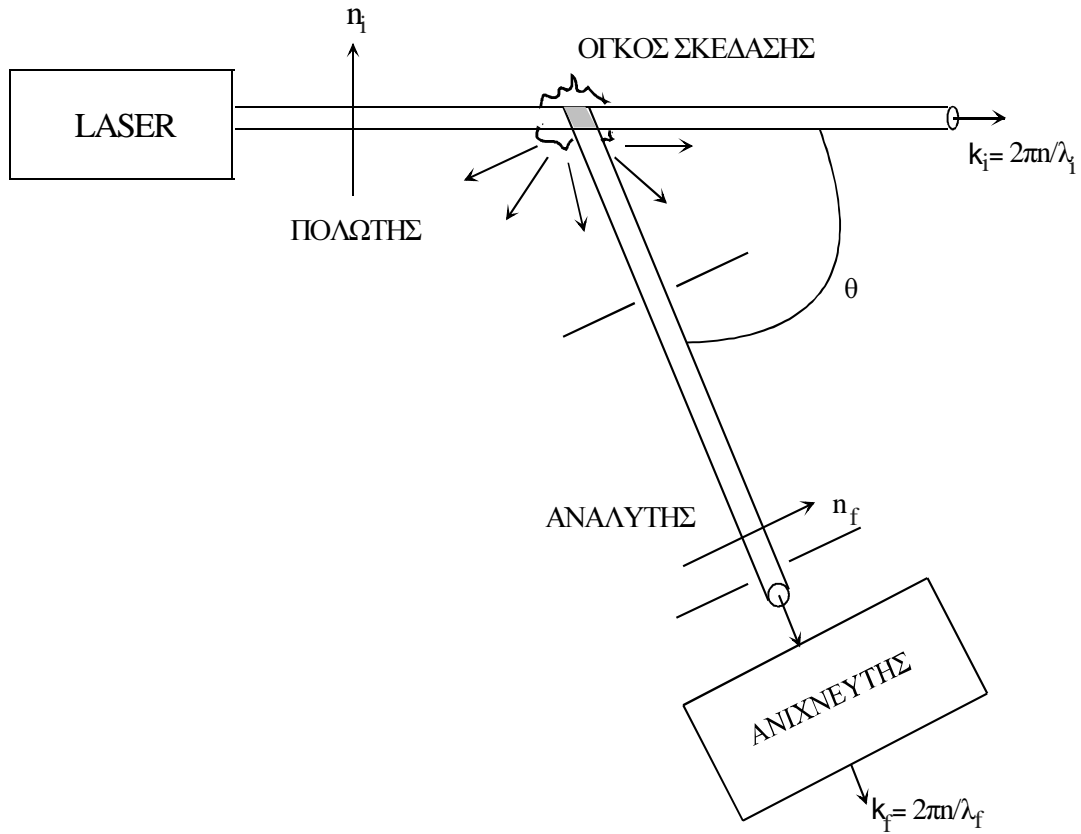
Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη είναι ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία για την μελέτη της δομής και της δυναμικής της ύλης. Όταν φωτόνια προσπίπτουν πάνω στο μόριο αυτά μπορούν είτε να κερδίσουν είτε να χάσουν ενέργεια από τους μεταφορικούς, περιστροφικούς, ταλαντωτικούς ή δονητικούς βαθμούς ελευθερίας. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να προκαλέσουν απορρόφηση ή σκέδαση του φωτός με την πρώτη να συνοδεύεται από μετατοπίσεις στη συχνότητα.

Η σκέδαση από μεταφορικούς και περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας η οποία προκαλεί μόνο μια μικρή μετατόπιση Doppler στην προσπίπτουσα συχνότητα του φωτός θεωρείται σαν ελαστική σκέδαση και ονομάζεται *σκέδαση Rayleigh*. Οι δονητικοί βαθμοί ελευθερίας προκαλούν την *σκέδαση Raman* της οποίας το φάσμα αποτελείται από συντονισμούς στις συγκεκριμένες συχνότητες των μεταβάσεων. Η αλληλεπίδραση με τα θερμικά κύματα στο μέσο έχει σαν αποτέλεσμα μια επιπρόσθετη σκέδαση και συγκεκριμένα την εμφάνιση μιας διπλέτας (doublet) στο φάσμα συχνοτήτων η οποία ονομάζεται διπλέτα *Brillouin*.

Τα φαινόμενα αλληλεπίδρασης της ύλης με την ακτινοβολία περιγράφονται ακριβώς, χρησιμοποιώντας κβαντική θεωρία πεδίου (κβαντική ηλεκτροδυναμική). Παρόλο αυτά αρκετά από τα φαινόμενα αυτά, όπως η σκέδαση φωτός μπορούν επίσης να κατανοηθούν αρκετά καλά μέσα στο εννοιολογικό πλαίσιο της κλασσικής ηλεκτρομαγνητικής θεωρίας. Σύμφωνα με αυτή όταν φως προσπίπτει στην ύλη το ηλεκτρικό του πεδίο πολώνει τα μόρια.

Αυτά δρούν σαν ταλαντούμενα δίπολα τα οποία ακτινοβολούν (σκεδαίνουν) φως. Οι μετατοπίσεις στην συχνότητα, η γωνιακή κατανομή, η πόλωση και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός καθορίζονται από το μέγεθος, το σχήμα και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις στο σκεδαζόμενο υλικό.

Η βασική θεωρία της σκέδασης Rayleigh αναπτύχθηκε στις αρχές του αιώνα από τους Rayleigh, Mie, Smoluchowski, Einstein και Debye. Οι Einstein και Smoluchowski ανέπτυξαν την θεωρία σκέδασης από υγρά τα οποία τα θεώρησαν σαν ένα συνεχές μέσο στο οποίο οι θερμικές διακυμάνσεις δημιουργούν τοπικές ανομοιογένειες και κατά συνέπεια διακυμάνσεις στην πυκνότητα και στην διηλεκτρική σταθερά [Θεωρία διακυμάνσεων της σκέδασης φωτός- *fluctuation (or thermodynamic) theory of light scattering*]. Το μέσο τετράγωνο αυτών των διακυμάνσεων είναι ανάλογο της σκεδαζόμενης έντασης. Αν δεν υπάρχουν διακυμάνσεις στο υλικό, δεν υπάρχει σκεδαζόμενη ένταση (εκτός από την μπροστά κατεύθυνση), λόγω της αλληλοαναίρεσης των σκεδαζόμενων κυματοπακέτων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του υλικού που έχουν το ίδιο πλάτος αλλά κατά ζεύγη αντίθετες φάσεις. Εκτός βέβαια την παραπάνω φαινομενολογική προσέγγιση υπάρχει και η μοριακή προσέγγιση της σκέδασης φωτός η οποία αποδίδει την σκέδαση σε διακυμάνσεις του τανυστή της πολωσιμότητας των μορίων.



Σχήμα 2. 1

Τυπική διάταξη για πειράματα σκέδασης φωτός

2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Γενικά σε ένα πείραμα σκέδασης Rayleigh ακτινοβολία από ένα laser πέφτει στο υλικό αφού περάσει από ένα πολωτή για να καθοριστεί η πόλωση της εισερχόμενης δέσμης. Το σκεδαζόμενο φως αφού περάσει από ένα αναλυτή ώστε να επιλεγεί η πόλωση του προσπίπτει στον ανιχνευτή η θέση του οποίου ορίζει την γωνία σκέδασης θ . Η τομή της εισερχόμενης δέσμης καθορίζει τον όγκο σκέδασης V . Μια τυπική διάταξη για αυτό το πείραμα φαίνεται στο σχήμα 1. Το q ονομάζεται διάνυσμα σκέδασης και ορίζεται από τις διευθύνσεις διάδοσης του εισερχόμενου και του σκεδαζόμενου μήκους κύματος (δηλ. $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$) και ουσιαστικά ορίζει την γωνία σκέδασης θ .

Σε ένα πείραμα σκέδασης φωτός Rayleigh η μετρούμενη ποσότητα είναι η ολική σκεδαζόμενη ένταση $I(q,t)$ ή το φάσμα $I(q,\omega)$. Στην περίπτωση που μετράμε τη $I(q,t)$ μπορούμε είτε να τη χρησιμοποιήσουμε απευθείας με σκοπό να εξάγουμε πληροφορίες για το υπό εξέταση σύστημα (Στατική σκέδαση φωτός), είτε να τη χρησιμοποιήσουμε με την μορφή της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης

$$G^{(2)}(q, t) = \langle I_s(q,0)I_s(q, t) \rangle$$

(Δυναμική σκέδαση φωτός). Η τελευταία εξετάζει τη χαλάρωση των διακυμάνσεων σε μια χωρική συνιστώσα Fourier, μήκους $2\pi/q$, όπου q είναι το διάνυσμα σκέδασης. Το μήκος αυτό συνδέεται και με έναν χαρακτηριστικό χρόνο, που είναι ο χρόνος που χρειάζεται το σωματίο για να διανύσει την απόσταση $2\pi/q$. Γενικά όταν δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις, στην περιοχή των χαμηλών διανυσμάτων σκέδασης ανιχνεύονται μεγάλης κλίμακας, αργές κινήσεις, ενώ στην περιοχή των υψηλών q , μικρής κλίμακας γρήγορες κινήσεις.

Η σκεδαζόμενη ένταση συνήθως μετράται σε δύο γεωμετρίες, την πολωμένη (VV) όπου αμφότερες η προσπίπτουσα στο δείγμα και η μετρούμενη από τον ανιχνευτή ακτινοβολία είναι πολωμένες κάθετα στο επίπεδο σκέδασης και την αποπολωμένη γεωμετρία (VH) όπου η προσπίπτουσα δέσμη είναι πολωμένη κάθετα και η σκεδαζόμενη δέσμη οριζόντια (στο επίπεδο σκέδασης). Η πολωμένη

γεωμετρία δίνει πληροφορίες για τις διακυμάνσεις στη συγκέντρωση ή στην πυκνότητα που υπάρχουν στο υλικό, ενώ η αποπλωμένη γεωμετρία για τις διακυμάνσεις στον προσανατολισμό.

2.1.4 Στατική Σκέδαση Φωτός

Η στατική σκέδαση φωτός περιλαμβάνει μετρήσεις της γωνιακής κατανομής της μέσης σκεδαζόμενης έντασης και αποτελεί μια τεχνική με την οποία μπορούμε να προσδιορίσουμε την γυροσκοπική ακτίνα R_g και τη μοριακή μάζα των μακρομορίων που σκεδάζουν. Η γυροσκοπική ακτίνα ενός μακρομορίου που αποτελείται από N μονομερή, είναι ένας τρόπος μέτρησης του μεγέθους του μορίου και ορίζεται από την απόσταση μεταξύ των μονομερών i και j . Συνήθως η απόσταση r_{ij} αντικαθίσταται από την απόσταση, r_{i0} , του κάθε μονομερούς από το κέντρο μάζας του πολυμερούς.

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

Το μέγεθος το οποίο μετράται σ' αυτή την τεχνική είναι η συνολική ένταση I_s της σκεδαζόμενης, σ' όλες τις γωνίες, ακτινοβολίας, καθώς και η ένταση I_o της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος Rayleigh:

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_o} \left(\frac{r^2}{1 + \cos^2 \theta} \right)$$

όπου

r^2 είναι η απόσταση ανάμεσα στο σκεδαζόμενο δείγμα και το φωτοπολλαπλασιαστή και

θ είναι η γωνία σκέδασης.

Η μοριακή μάζα προσδιορίζεται από την εξίσωση Rayleigh:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C \right) P(\theta)$$

όπου R είναι ο λόγος Rayleigh

C = συγκέντρωση

M = Μοριακή μάζα

$A_2 = 2^{\text{ος}}$ συντελεστής Virial

K = οπτική σταθερά

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_O^4 N_A} \left(n_O \frac{dn}{dc} \right)^2$$

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

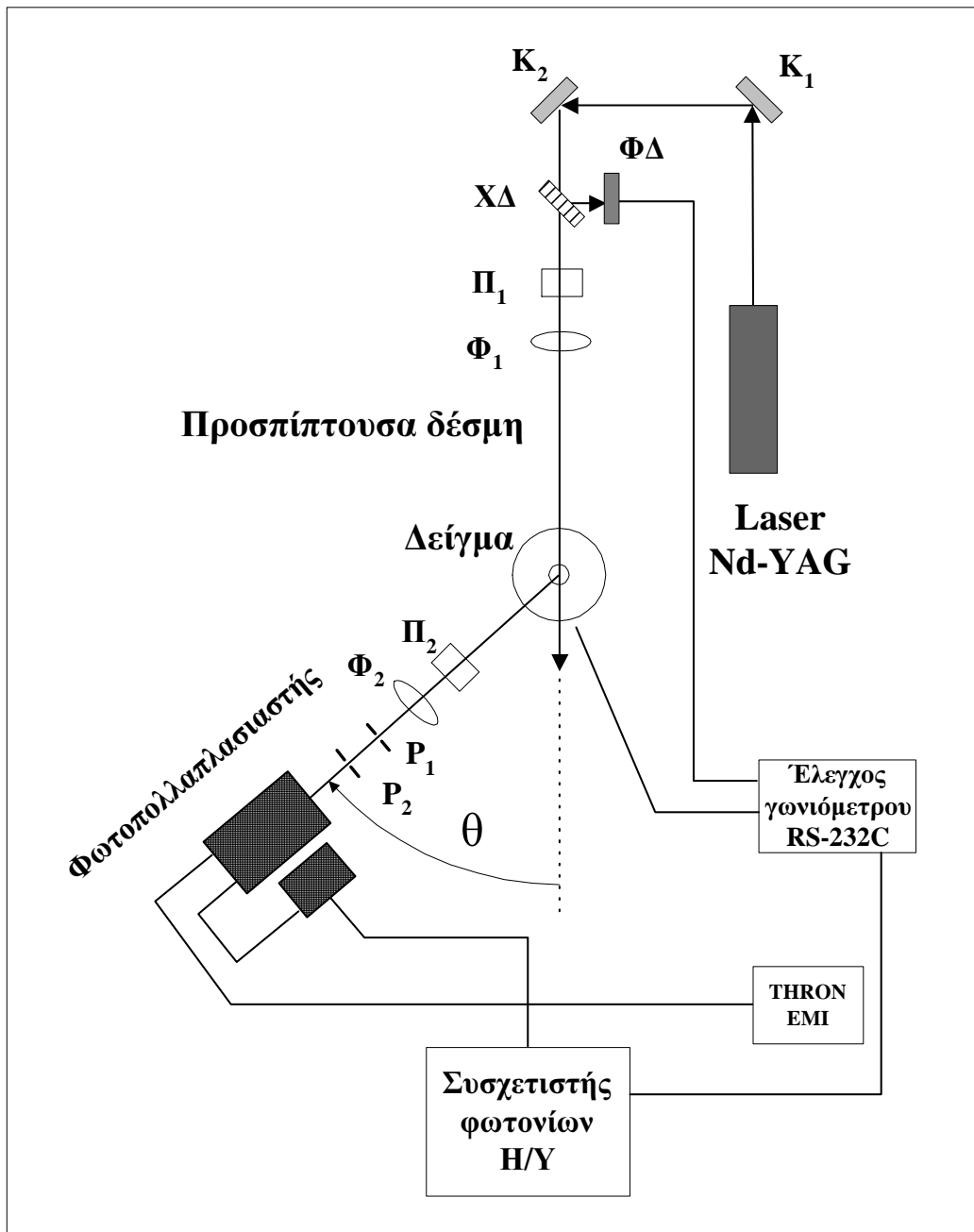
2.2 Πειραματικά συστήματα

2.2.1 Πειραματική Διάταξη

Οι μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης έγιναν χρησιμοποιώντας την πειραματική συσκευή της οποίας η σχηματική αναπαράσταση φαίνεται στο σχήμα . Με την χρήση γωνιομέτρου, στο κέντρο βρίσκεται το δείγμα, είναι εφικτή η μέτρηση σε γωνίες σκέδασης από 150° έως 11° ($q=3.42 \times 10^{-2}$ - $3.39 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$). Η πόλωση της προσπίπτουσας δέσμης καθορίζεται με την χρήση δύο πολωτών (Π_1 και Π_2). Στο πείραμα που έγινε η πόλωση ήταν πάντα κάθετη στο επίπεδο σκέδασης και στην προσπίπτουσα αλλά και στην σκεδαζόμενη δέσμη, δηλαδή πάντα VV μετρήσεις, και αντίστοιχα υπόλογισμός της $I_{VV}(q)$ σκεδαζόμενης έντασης.

Η πηγή φωτός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα Nd:YAG αερόψυκτο laser (Adlas DPY 315 II) με μήκος κύματος $\lambda=532 \text{ nm}$. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία εστιάζεται στο δείγμα με την χρήση φακού (Φ_1). Η ένταση και η θέση της προσπίπτουσας δέσμης ελέγχεται με την χρήση τεσσάρων φωτοδιόδων ($\Phi\Delta$). Το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα, κατασκευασμένη από οπτικό γυαλί. Με την σειρά της η κυψελίδα τοποθετείται σε λουτρό το οποίο εμπεριέχει τολουόλιο (γενικά υγρό ίδιου, κατά προτίμηση, δείκτη διάθλασης) ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα ανάκλασης, σε όλο το φάσμα των μετρούμενων γωνιών.

Η θερμοκρασία του λουτρού, άρα και του δείγματος, καθορίζεται και σταθεροποιείται με την χρήση θερμοστάτη. Όλες οι λειτουργίες του γωνιομέτρου ελέγχονται από υπολογιστή μέσω ενός bus controller RS-232C. Η σκεδαζόμενη ένταση συλλέγεται από τον οπτικό ανιχνευτή ο οποίος χρησιμοποιεί ένα 2F/2F σύστημα, δηλαδή φακό (Φ_2) ο οποίος τοποθετείται σε απόσταση 2F από τον όγκο σκέδασης και από την τελευταία οπή (pinhole, P_2) πριν από τον φωτοπολλαπλασιαστή.



Σχήμα 2. 2

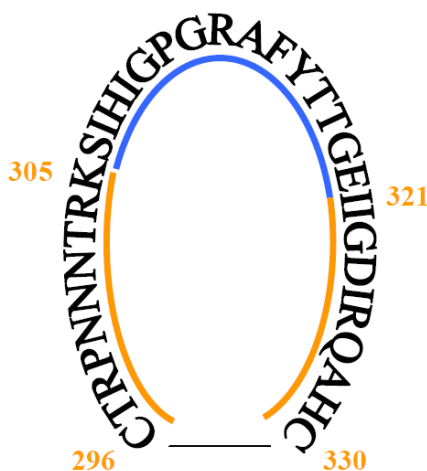
Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής συσκευής.

Χρησιμοποιούνται δύο σπές (P_1 και P_2) με διάμετρο συνήθως είτε 0.2 είτε 0.4 mm πριν τον φωτοπολλαπλασιαστή (Thorn EMI) για τον καθορισμό του

όγκου σκέδασης. Η σκεδαζόμενη ένταση η οποία συλλέγεται από το φωτοπολλαπλασιαστή καταγράφεται και μετατρέπεται σε φωτόνια (photon counts) που μεταφέρονται στον υπολογιστή. Ανάλογα το πως τα χρησιμοποιούμε καθορίζει εάν έχουμε να κάνουμε με στατικές ή δυναμικές μετρήσεις.

2.2.2 V3 πεπτίδια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 8 παραλλαγές V3 πεπτιδίων από την ημισυντηρημένη επικράτεια της V3 περιοχής (α.α. 304-318) της γλυκοπρωτεΐνης gp120 από HIV-1 στελέχη B υποτύπου, ειδικά επιλεγμένα ώστε να φέρουν παρόμοια αμινοξικά μοτίβα. 5 παραλλαγές προήλθαν από τα στελέχη SF2, SF128, SF162, MN και LAI.



Σχήμα 2. 3

Δομή της V3 περιοχής.

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 (V3LAI+1) ή 9 (V3LAI+9) βασικά αμινοξέα ή με την ίδια αμινοξική σύσταση με το πρωτογενές V3LAI πεπτίδιο αλλά με τα βασικά αμινοξέα σε αλλαγμένες θέσεις (V3LAIrandom) (Πίνακες 5.1 & 5.2). Η χημική σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο 430A Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) σύμφωνα με την στρατηγική της επαναληπτικής συμπύκνωσης προστατευμένων πεπτιδίων, (Fmoc/tBu chemistry) [14].

Αμινοξικές αλληλουχίες συνθετικών V3 πεπτιδίων από διαφορετικά ιικά στελέχη

Ιικό στελέχος	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

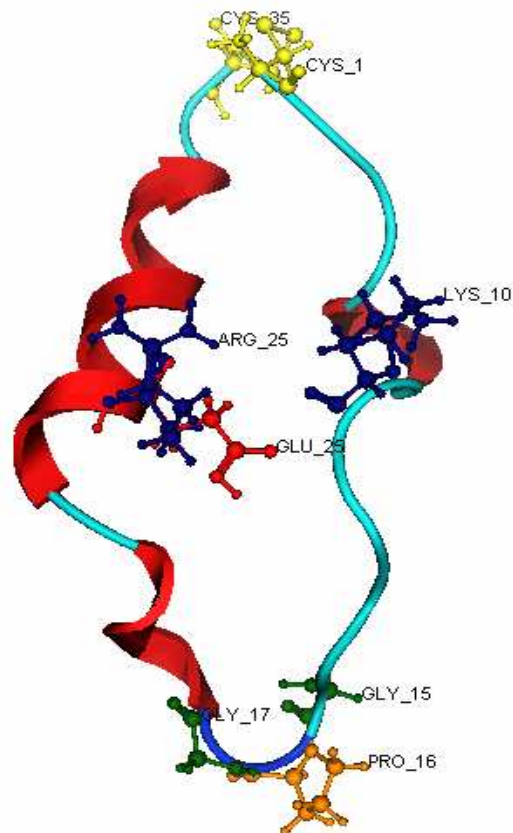
Ιικό στελέχος	Αμινοξική αλληλουχία															
LAI	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	Q	R	A	F	Y	
LAI +1	V	G	•	•	L	•	•	•	•	•	•	A	•	•	•	
LAI +9	•	•	•	•	•	R	•	•	R	•	K	R	•	K	•	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

3.1 Αλληλεπιδράσεις V3 περιοχής

Μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης του HIV-1 με τους υποδοχείς χημειοκινών. Έχει προταθεί ότι πιθανόν η V3 υποπεριοχή της gp120 να συμμετέχει στη διαδικασία αλληλεπίδρασης [15]. Στα X4 και R5/X4 στελέχη η V3 περιοχή είναι ισχυρά θετικά φορτισμένη, κάτι που της επιτρέπει να ασκεί ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με πολυανιονικά μόρια, όπως η όξινη αμινοτελική εξωκυτταρική επιφάνεια του CXCR4 [16].

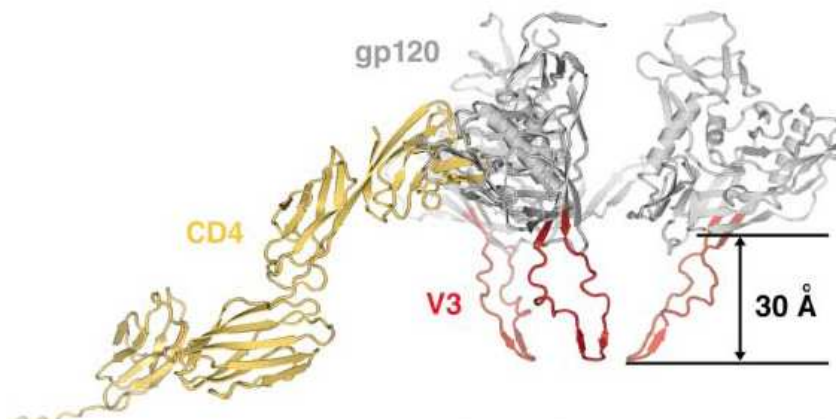


Σχήμα 3. 1

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 [17].

Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι ισοβάτια με ελλειμματικές παραλλαγές της V3 περιοχής αδυνατούν να προσδεθούν στον CCR5 υποδοχέα, ακόμα και κάτω από συνθήκες ισχυρής αλληλεπίδρασης με τον CD4 υποδοχέα [18].



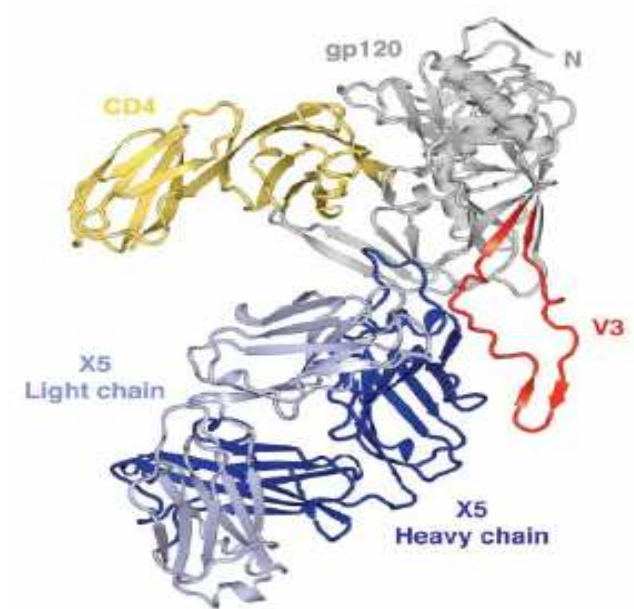
Σχήμα 3. 2

Κρυσταλλογραφική δομή του μορίου CD4 μαζί με την γλυκοπρωτεΐνη gp120 [19]

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,

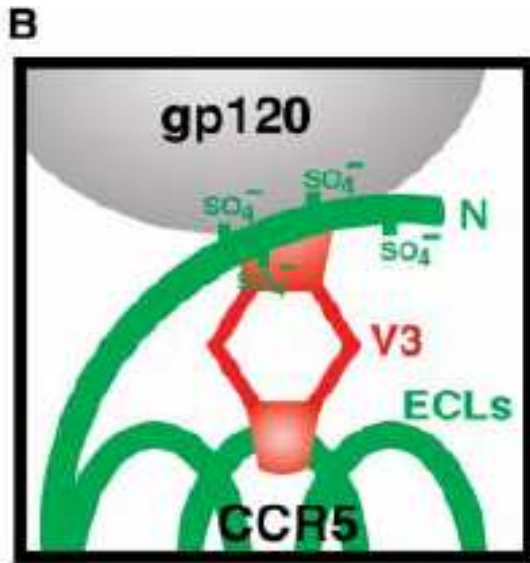
όμως η έκφραση του CCR5 μπορεί να είναι ιδιαίτερα κρίσιμη όταν τα επίπεδα έκφρασης του CD4 είναι χαμηλά. Αυτό βρίσκει εφαρμογή στην περίπτωση μόλυνσης μακροφάγων, δενδριτικών και μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν μικρή έκφραση CD4, άρα για να μολυνθούν ικανοποιητικά πιθανόν να απαιτούνται συμπληρωματικές αλληλεπιδράσεις. 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 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 ρόλο [16].

Παρατηρήσεις των Zafirooulos [20] έδειξαν ότι ένα συνθετικό πεπτίδιο 15 αμινοξέων από τον κύριο ημι-συντηρημένο εξουδετερωποιητικό (neutralizing) επίτοπο της V3 περιοχής της gp120 του HIV-1 LAI στελέχους, φορέας ενός GPGRFV αμινοξικού μοτίβου, μπορούσε, όταν βρισκόταν εκτεθειμένο στην επιφάνεια λιπιδωμάτων, 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 κλασική 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 3. 3

Δομή ενός κορμού HIV-1 gp120 με V3. Η κρυσταλλική δομή του κορμού της gp120 (γκρι) με μια ακέραιη V3 (κόκκινο) φαίνεται δεσμευμένη στους δύο απομακρυσμένους από την μεμβράνη τομείς του CD4 υποδοχέα (κίτρινο) και το Fab κομμάτι του αντισώματος X5 (σκούρο και ανοικτό μπλε). Σε αυτή την οριοθέτηση η υική μεμβράνη θα βρίσκονταν τοποθετημένη προς την κορυφή της σελίδας και το κίτταρο στόχος προς την βάση της [19].



Σχήμα 3. 4

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 V3 (κόκκινο) με την διατηρημένη βάση της να αλληλεπιδρά με το θειωμένο N τελικό άκρο του CCR5 και τα εύκαμπτα «πόδια» του να επιτρέπουν την διατηρημένη άκρη της V3 να φτάσει το δεύτερο ECL του CCR5 [19].

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

- ποια είναι η 'τύχη' των σύμπλοκων δομών των πεπτιδίων V3 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;

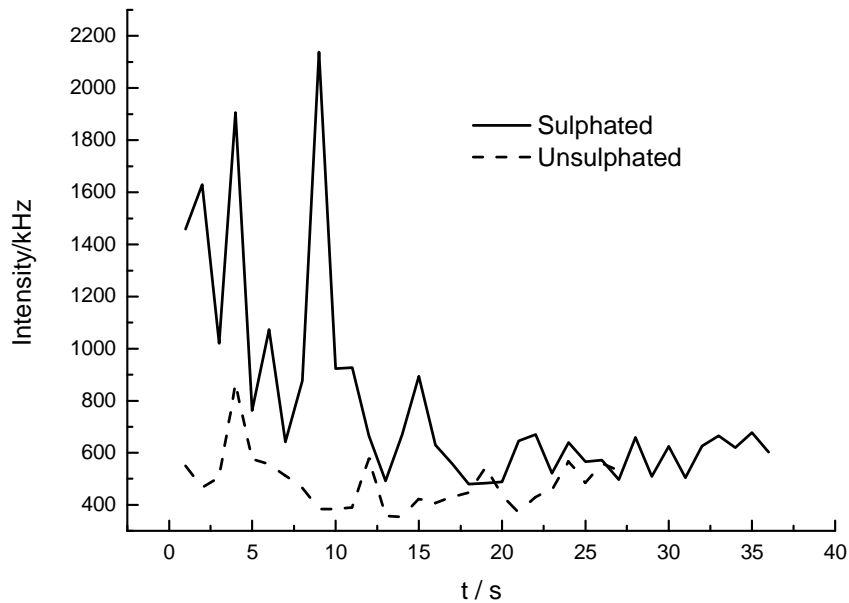
- ποιος πιθανός μηχανισμός μπορεί να κρύβεται πίσω από το όλο φαινόμενο με βάση την ανίχνευση των ειδικών αλληλεπιδράσεων του V3 με τον συνυποδοχέα;

3.1.1 Προσδιορισμός των υδροδυναμικών παραμέτρων

Στην εργασία αυτή έγιναν δυναμικές μετρήσεις σκέδασης φωτός. Τα φωτόνια που φτάνουν στον ανιχνευτή συσχετίζονται. Με κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα η χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης $G^{(2)}(t)$ υπολογίζεται : $G^{(2)}(t) = \langle I(0)I(n \cdot \tau) \rangle$ όπου το σύμβολο $\langle \dots \rangle$ σημαίνει μέση χρονική τιμή. Ο χρόνος t δίνεται από την σχέση $t = n \cdot \tau$, όπου n είναι ο αριθμός των καναλιών καθυστέρησης του συσχετιστή τα οποία διαχωρίζονται από τους χρόνους αποθήκευσης (sample time) τ . Η συνάρτηση που μας ενδιαφέρει θεωρητικά είναι η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης $G^{(1)}(t)$ του ηλεκτρικού πεδίου. Πειραματικά αυτή η ποσότητα εξάγεται από την μετρούμενη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης $G^{(2)}(t)$ μέσω της συνθήκης Siegert: $G^{(2)}(q, t) = 1 + f^* (\alpha G^{(1)}(q, t))^2$ όπου f^* είναι ένας παράγοντας που εξαρτάται από την πειραματική διάταξη και συνδέεται με τον όγκο σκέδασης και τις περιοχές συμφωνίας που περιέχει. Το α εκφράζει το ποσοστό της σκεδαζόμενης έντασης με δυναμική που είναι μετρήσιμη με την φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων. Το διάνυσμα σκέδασης συμβολίζεται με q και ισούται με $q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \sin(\frac{\theta}{2})$ όπου θ είναι η γωνία σκέδασης, λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και η ο συντελεστής διάθλασης του μέσου που προκαλεί τη σκέδαση.

Η σχέση μεταξύ της $G^{(1)}(t)$ και της προαναφερθείσας διαπλάτυνσης Doppler $S(\omega)$ δίνεται από το θεώρημα των Wiener-Khintchine σαν ο μετασχηματισμός Fourier : $G^{(1)}(t) \sim \int_0^\infty S(\omega) \exp(-i\omega t) d\omega$. Αφού τα πολυμερικά μόρια κινούνται μάλλον αργά στο διάλυμα, η διαπλάτυνση του φάσματος είναι πολύ μικρή και επομένως δεν μπορεί να γίνει φασματική ανάλυση με την τεχνική του φιλτραρίσματος (spectrum analyzers). Γιαυτό η χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης $G^{(2)}(t)$ μετριέται. Αυτό είναι δυνατόν αφού υπάρχουν υπολογιστές με γρήγορους επεξεργαστές και υψηλά μονοχρωματικές πηγές φωτός (Λείζερ). Η διαδικασία συσχέτισης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα όπου οι διακυμάνσεις της σκεδαζόμενης έντασης $I(q)$ παρίσταται γραφικά σαν συνάρτηση του χρόνου. Διεξάγοντας την συσχέτιση

$I(0)I(t=\tau), I(0)I(t=2\tau), \dots, I(0)I(n\tau)$ και επαναλαμβάνοντας αυτή την διαδικασία για μια μεγάλη περίοδο του χρόνου (από λεπτά σε ώρες) οδηγούμαστε στην αυτοσυνάρτηση συσχέτισης $G^{(2)}(t)$ η οποία αποσβήνει. Για μονοδιάσπαρτα μικρά σωμάτια η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης φθίνει σαν απλή εκθετική συνάρτηση $G^{(1)}(t) = B \cdot \exp(-q^2Dt)$ όπου η σταθερά απόσβεσης οδηγεί στο μεταφορικό συντελεστή διάχυσης D .



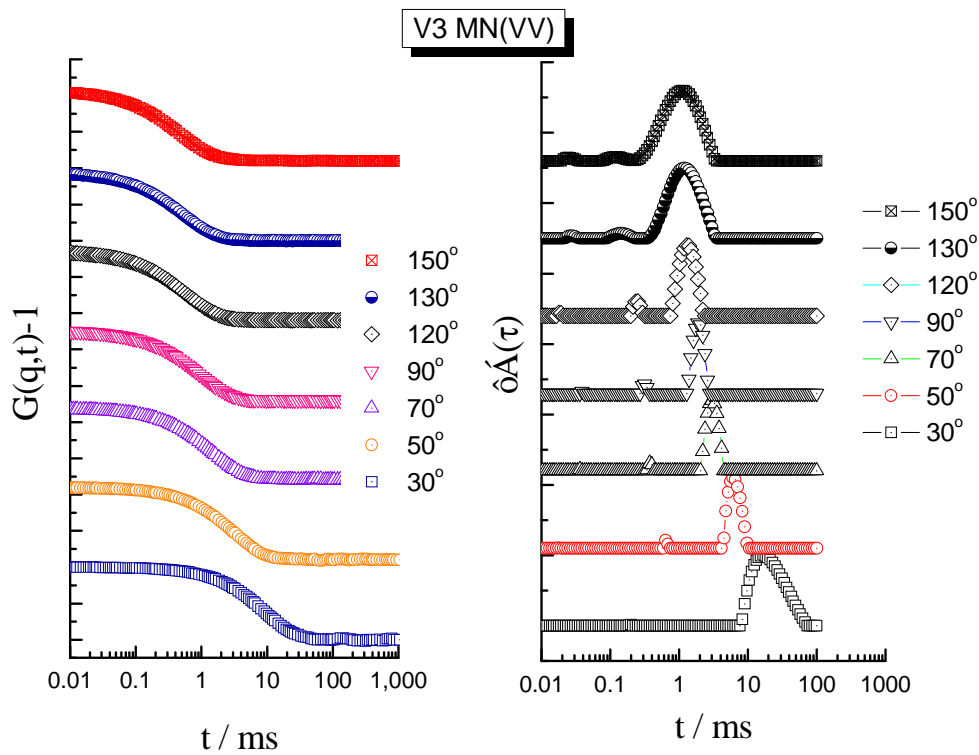
Σχήμα 3. 5

Διακυμάνσεις της σκεδαζόμενης έντασης $I(q)$

Για να είναι εφικτή η μέτρηση των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης πάνω από αρκετές δεκάδες, οι συσχετιστές φωτονίων χρησιμοποιούν λογαριθμική απόσταση μεταξύ των χρόνων καθυστέρησης, έτσι απαιτείται ο χρόνος t_s , να αυξάνει ανάλογα με το χρονικό διάστημα καθυστέρησης. Στην πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε, ο συσχετιστής φωτονίων ήταν ένας ALV-5000/E πολλαπλών χρόνων χαλάρωσης ψηφιακός συσχετιστής, ο οποίος κανονικά διαθέτει 288 κανάλια, και μπορεί να καταγράψει την συνάρτηση

συσχέτισης στο χρονικό εύρος 10^{-6} έως 1000 δευτερόλεπτα. Με την προσθήκη μιας γρήγορης κάρτας, γίνεται εφικτό να μετρηθούν πιο γρήγορες διαδικασίες χαλάρωσης, αυξάνοντας τον αριθμό των καναλιών στα 320, και το χρονικό εύρος μέτρησης από 10^{-7} έως τα 1000 δευτερόλεπτα.

Στο σχήμα δίνεται η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για το συγκεκριμένο διάλυμα V3MN, σε επτά διαφορετικές γωνίες σκέδασης σε θερμοκρασία 23°C . Αυτή υπολογίστηκε από τον συσχετιστή φωτονίων που έχει περιγραφεί παραπάνω και μετρήθηκε στην πειραματική διάταξη του σχήματος. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μπορεί να περιγραφεί σαν μια απλή εκθετική χαλάρωση και προσαρμογή με μια συνάρτηση της μορφής $ae^{-t/\tau}$ μπορεί να δώσει την ένταση και τον χρόνο χαλάρωσης της κίνησης. Η ανάλυση αυτή απαιτεί την εκτέλεση ενός μετασχηματισμού Laplace. Αυτή επιτυγχάνεται με την χρήση ενός προγράμματος που ονομάζεται REPES. Το REPES υποθέτει ότι η $G^{(1)}(q,t)$ αποτελείται από μια υπέρθεση εκθετικών η οποία περιγράφει την κατανομή των χρόνων χαλάρωσης $\tau A(\tau)$.



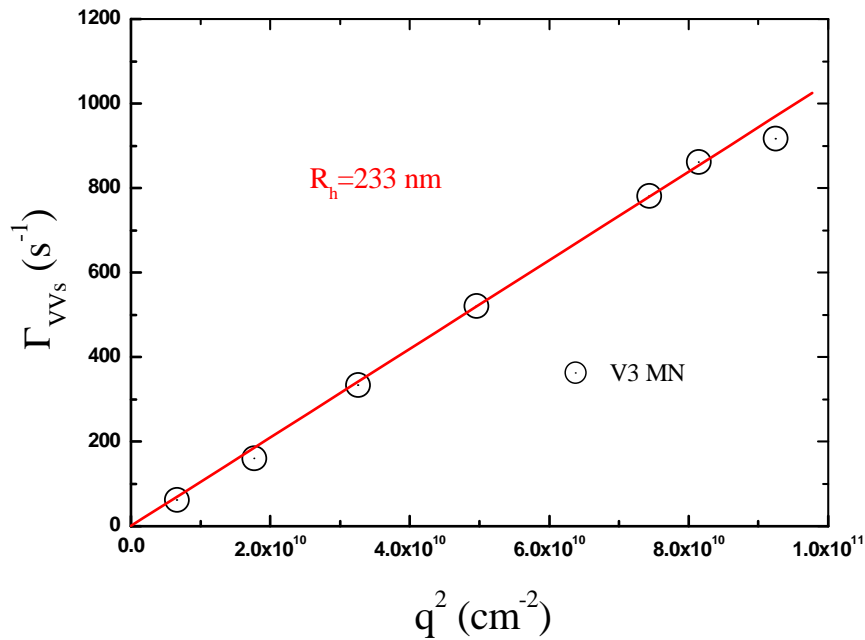
Σχήμα 3. 6

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

Η προσαρμογή που δίνει την κατανομή χρόνων φαίνεται στο δεξί μέρος του σχήματος. Η ένταση της διαδικασίας υπολογίζεται από το εμβαδόν κάτω από την αντίστοιχη κορυφή πολλαπλασιασμένο με την ολική σκεδαζόμενη ένταση, ενώ ο χαρακτηριστικός χρόνος χαλάρωσης τ υπολογίζεται από τον χρόνο 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

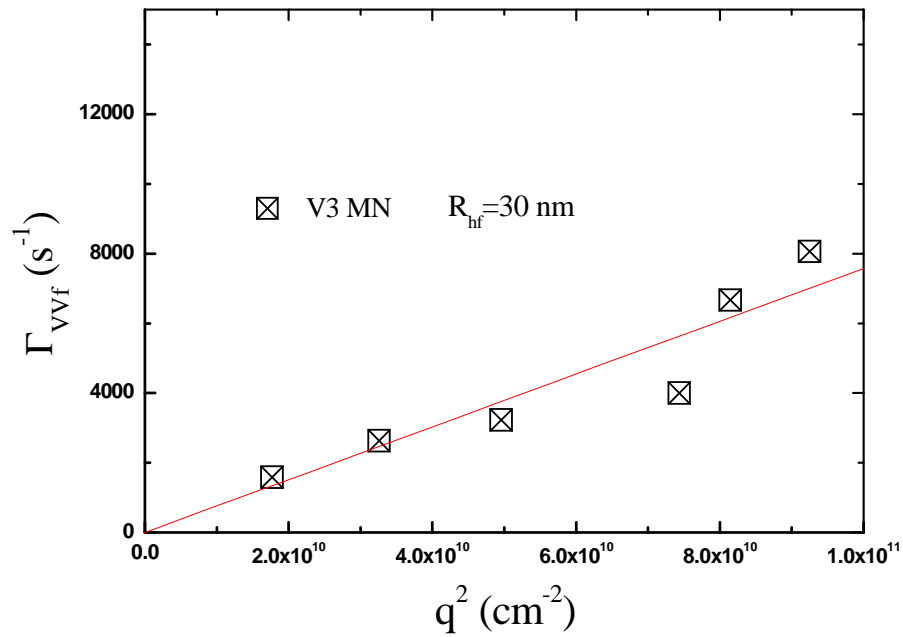
σχετίζεται με την μεταφορική κίνηση των υπερμοριακών συμπλόκων που σχηματίζονται στο διάλυμα. Όντως αν σχεδιάσουμε την γραφική παράσταση του ρυθμού χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ συναρτήσει του q (σχήμα) παρατηρούμε ότι $\Gamma \sim q^2$ το οποίο είναι ένα τυπικό αποτέλεσμα για αραιά διαλύματα.



Σχήμα 3. 7

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

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.



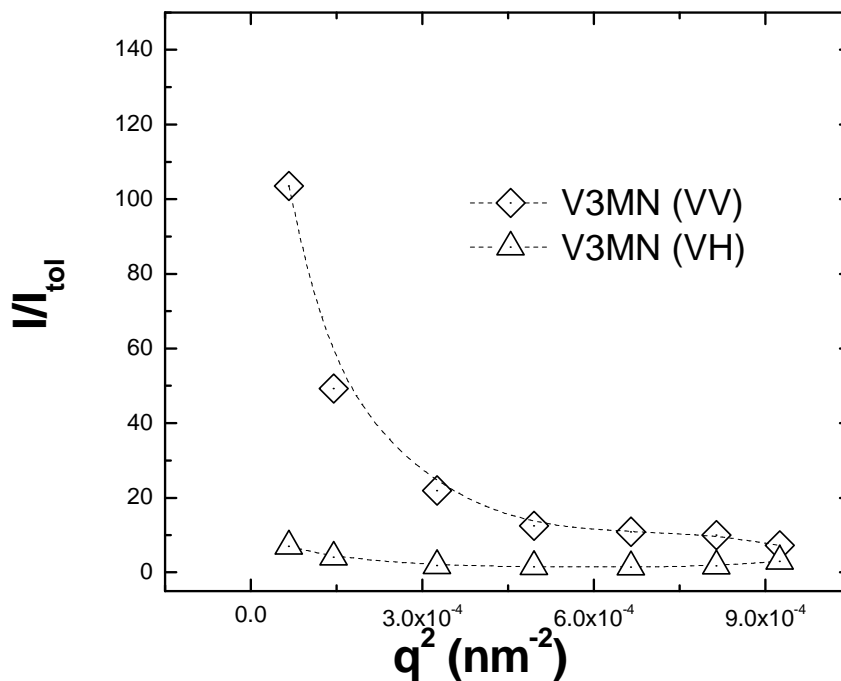
Σχήμα 3. 8

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

Η υδροδυναμική ακτίνα στην θερμοκρασία αυτή μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης Stokes-Einstein θεωρώντας ότι έχουμε κίνηση Brown σφαιρικών σωματιδίων διασπαρμένα μέσα σε διαλύτη. Η σχέση αυτή περιέχει τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D και δίνεται από την έκφραση

$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D}$ όπου K_B είναι η σταθερά Boltzmann και η είναι το ιξώδες του διαλύτη. Αν αντικαταστήσουμε την τιμή που βρήκαμε προηγουμένως για τον συντελεστή μεταφορικής διάχυσης D (σχήμα) στην σχέση αυτή εξάγουμε τις αντίστοιχες υδροδυναμικές ακτίνες στα 30 και 233 nm.

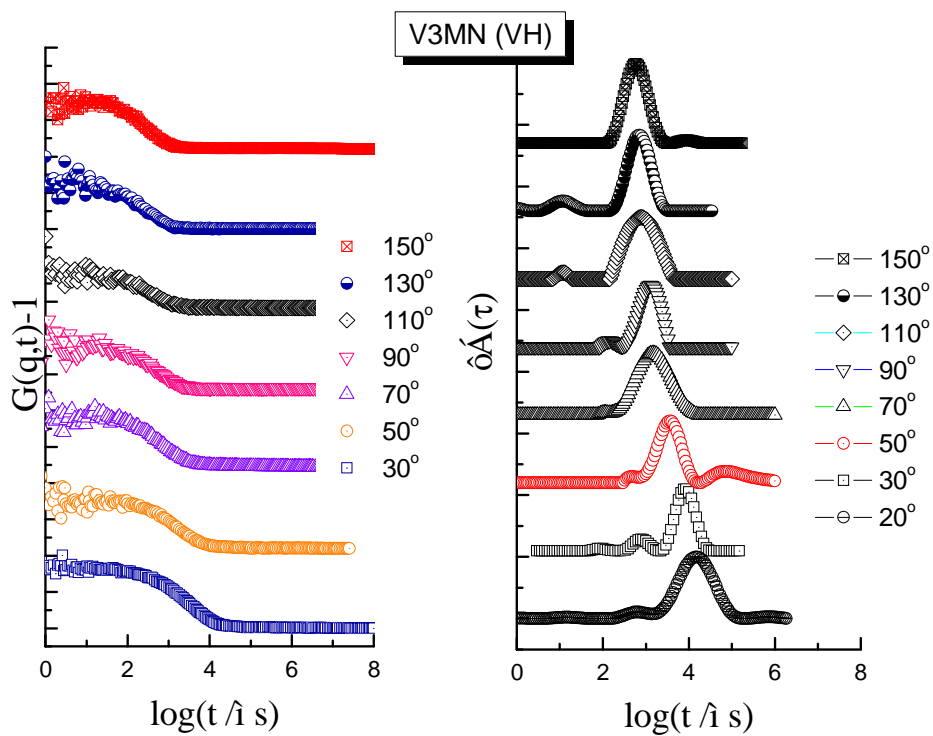
Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης έδειξαν ότι τα υπερμοριακά σύμπλοκα των V3 πεπτιδίων εμφανίζουν μη σφαιρικές διαμορφώσεις σε φυσιολογικά υδατικά διαλύματα.



Σχήμα 3. 9

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με γεωμετρίες σκέδασης VV και VH του πεπτιδίου V3 MN(+4)

Η εμφάνιση αποπολωμένης σκέδασης στη πειραματική γεωμετρία VH επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα. 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 3. 10).



Σχήμα 3. 10

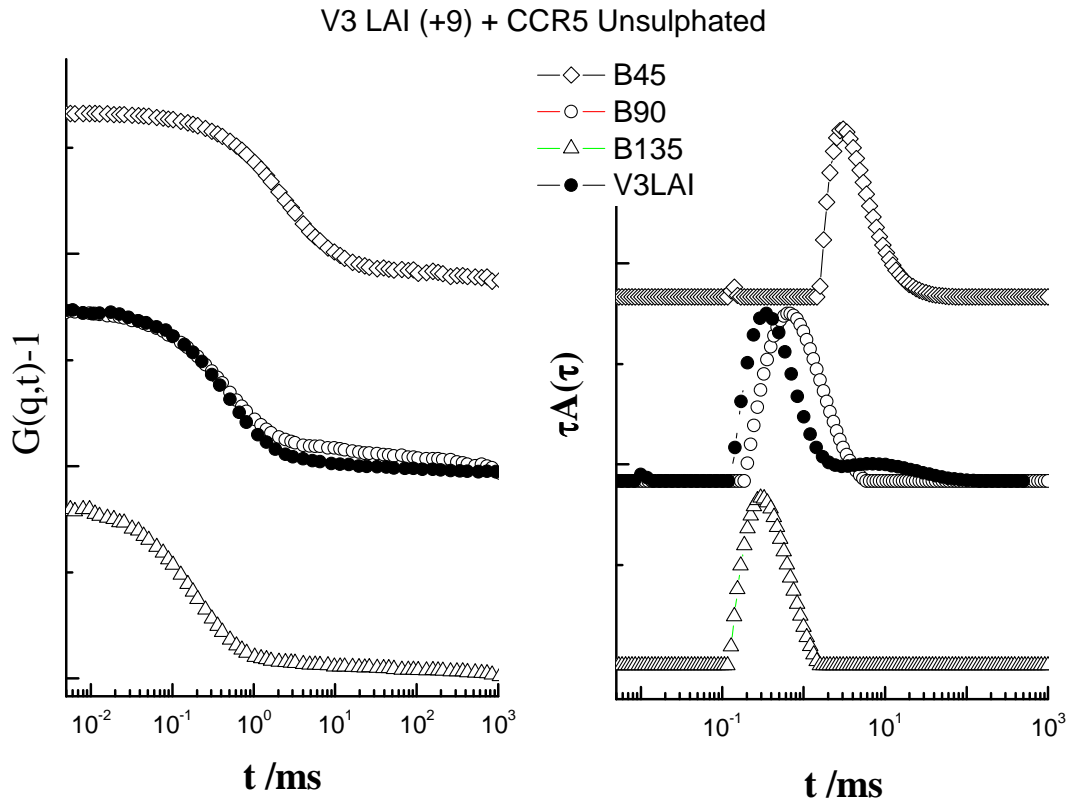
Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης με γεωμετρία σκέδασης VH του πεπτιδίου V3 MN(+4) για διαφορετικές γωνίες σκέδασης μαζί με το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$.

3.1.2 Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με τον υποδοχέα της χημειοκίνης CCR5

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 [20,21]. Πρόσφατες μελέτες στα κριτήρια αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CCR5 με την gp120 έχουν δείξει ότι απαιτείται επιπλέον η σούλφωση 2 τουλάχιστον υπολειμμάτων τυροσίνης του CCR5-Nt προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική πρόσδεση [22, 23]. Παράλληλα, η συμμετοχή της V3 περιοχής έχει έμμεσα δειχθεί σε πειράματα εφαρμογής της τεχνικής SPR, 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 ‘αγρίου τύπου’ (gp120/sCD4) [24]. Ήδη γνωρίζουμε από τους Zafirooulos *et al* 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 μελέτη και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πεπτιδίων V3 και CCR5 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 μεμονωμένα V3 και CCR5-Nt πεπτίδια, όσο και μείγματα αυτών (V3/CCR5-Nt). Σε μια τυπική μέτρηση, πολλαπλές συγκεντρώσεις του σουλφονυλιωμένου ή μη CCR5 αναμίχθηκαν με διάλυμα των αντίστοιχων V3 πεπτιδίων σε φυσιολογικό pH 7.4. 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 πεπτίδιο πραγματοποιήθηκε σε μείγματα των παραπάνω πεπτιδίων με μοριακή αναλογία περίπου 3 moles V3 προς 1 mole CCR5.



Σχήμα 3. 11

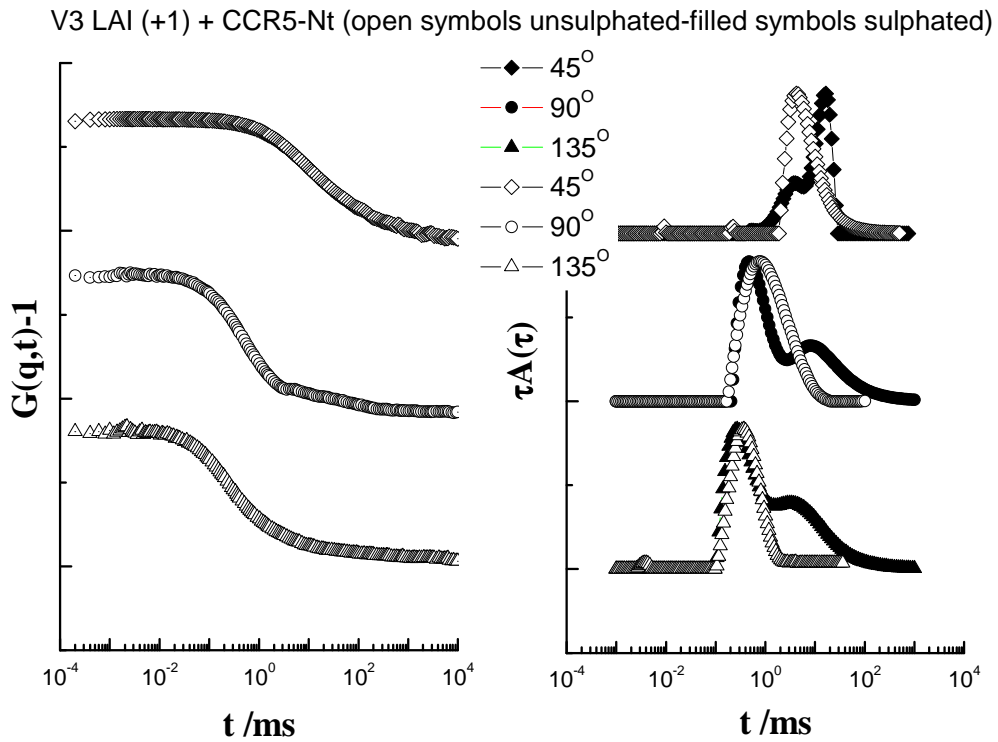
Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου V3 LAI(+9) παρουσία σου μη σουλφονυλιωμένου CCR5-Nt για διαφορετικές γωνίες σκέδασης. Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ παρουσιάζεται στο δεξί μέρος του σχήματος.

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 Zafropoulos et al σε SPR αναλύσεις και από τους Rizos et al [25] 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 λιποσώματα τα οποία σχηματίζουν υπερμοριακές δομές με υδροδυναμική ακτίνα της τάξης των 900 nm για απλά και 1300 nm για V3-λιποσώματα. 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.

Η σπουδαιότητα της σουλφονυλίωσης επιβεβαιώθηκε στην πρόσφατη μελέτη των Huang et al [26] χρήση τεχνικών κρυσταλλογραφίας και NMR. Επίσης ηλεκτροστατικές υπολογιστικές μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των θετικών και αρνητικών ηλεκτροστατικών δυναμικών του V3 και CCR5 αντίστοιχα [27]. Πρόσφατη NMR μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας απέδειξε ότι τα πεπτίδια V3 και CCR5 έχουν τάση για αλληλεπίδραση, ακόμη και απουσία σουλφοομάδων στις τυροσίνες [28].

Η δυναμική της αλληλεπίδρασης μολυσμένων κυττάρων με φυσιολογικά κύτταρα έχει μελετηθεί με μικροσκοπία δύναμης απλού μορίου (single molecule force microscopy) και με 3D Video Μικροσκοπία όπου επιβεβαιώθηκε η δημιουργία ιολογικών συνάψεων (virological synapses) [29,30].



Σχήμα 3. 12

Πειραματικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης του πεπτιδίου V3 LAI(+1) παρουσία σουλφονυλιωμένου και μη σουλφονυλιωμένου CCR5-Nt για διαφορετικές γωνίες σκέδασης. Το αποτέλεσμα του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace $\tau A(\tau)$ παρουσιάζεται στο δεξί μέρος του σχήματος.

3.1.4 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι ένας απομονωμένος επίτοπος από την ημισυντηρημένη επικράτεια της V3 περιοχής της 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 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. Σε σχετικά άρθρα των *Nature* και *science* [31, 32] 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.

Βιβλιογραφία

1. Centers for Disease Control. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1982; 31: 507-14.
2. Centers for Disease Control. Revision of the case definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting - United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1985;34: 373-5.
3. World Health Organization. WHO/CDC case definition for AIDS. *Weekly Epidemiological Record*, 1986; 61: 69-72.
4. Centers for Disease Control. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1987; 36: no1S.
5. World Health Organization. 1987 revision of CDC/WHO case definition for AIDS. *Weekly Epidemiological Record*, 1988; 63: 1-7.
6. Ancelle-Park R. Expanded European AIDS case definition. *Lancet*, 1993; 341: 441.
7. European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS. 1993 revision of the European AIDS surveillance case definition. *AIDS Surveillance in Europe, Quarterly Report*, 1993; no 37: 23-28.
8. European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS. European case definition for AIDS surveillance in children - revision 1995. *HIV/AIDS Surveillance in Europe, Quarterly Report*, 1995; no 48: 46-53.

9. de Jong, J. J., Goudsmit, J., Keulen, W., Klaver, B., Krone, W., Tersmette, M., and de Ronde, A. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 66(2), 757-65.
10. Grimaila, R. J., Fuller, B. A., Rennert, P. D., Nelson, M. B., Hammarskjold, M. L., Potts, B., Murray, M., Putney, S. D., and Gray, G. (1992). Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics, and neutralization. *J Virol* 66(4), 1875-83.
11. Stamatatos, L., and Cheng-Mayer, C. (1993). Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range, and syncytium-forming ability. *J Virol* 67(9), 5635-9.
12. Shioda, T., Levy, J. A., and Cheng-Mayer, C. (1992). Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20), 9434-8.
13. Ullrich, C. K., Groopman, J. E., and Ganju, R. K. (2000). HIV-1 gp120- and gp160-induced apoptosis in cultured endothelial cells is mediated by caspases. *Blood* 96(4), 1438-42.
14. Krambovitis, E., Hatzidakis, G., and Barlos, K. (1998). Preparation of MUC-1 oligomers using an improved convergent solid-phase peptide synthesis. *J Biol Chem* 273(18), 10874-9.
15. Emmanuel G.Cormier and Tatjana Dragic (2002) The Crown and Stem of the V3 Loop Play Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1

Envelope Glycoprotein Interactions with the CCR5 Coreceptor. *Journal of Virology* p. 8953-8957

16. Ugolini, S., Mondor, I., and Sattentau, Q. J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 7(4), 144-9

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.

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

19. Huang CC, Tang M, Zhang MY, et al: Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310: 1025-1028, 2005.

20. 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.

21. Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1995). New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 13, 487-512

22. 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

23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. Virgin HW, Walker BD. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature*. 2010 (464) 224-31.
32. Walker BD, Burton DR. Toward an AIDS vaccine. *Science* 2008(320) 760-4

