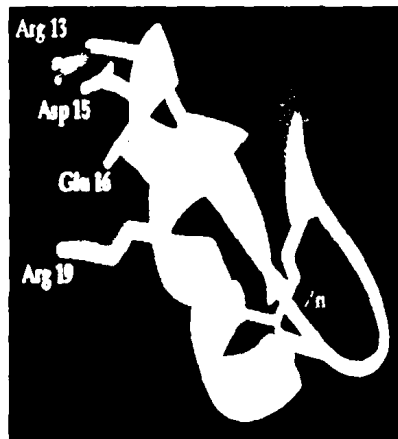


Κοσμοπούλου Αγγελική
ΧΗΜΙΚΟΣ

116

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ
(ZINC-FINGER) ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ Rb60KD.



ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ
ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ 'ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ'

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001.



Κοσμοπούλου Αγγελική
ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ
(ZINC-FINGER) ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ R₀60KD.**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ ΚΑΜΠΑΝΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ
ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ 'ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ'

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001.



*Αφιερωμένο στους γονείς μου, Νίκο και Νικολίτσα,
στις αδερφές μου, Μάγδα και Τόνια και στη μνήμη
της θείας μου Παναγιώτας.*



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα Οκτώβριος 1999- Ιούλιος 2001.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Νικόλαο Χατζηλιάδη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο πρόγραμμα Ε.Π.Ε.Α.Κ. 'Βιοανόργανη Χημεία' καθώς και τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ.Θεμιστοκλή Καμπανό για το συνεχές ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Μαρία Σακαρέλλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας, και τον κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν από τα πρώτα δειλά μου βήματα στο εργαστήριο, για τον τρόπο που αγκάλιασαν τις ερευνητικές μου προσπάθειές καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στην κ. Ευγενία Πάνου- Πομώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας, για την πολύτιμη βοήθεια της και το έκδηλο ενδιαφέρον της όσον αφορά την εξέλιξη της ερευνητικής μου εργασίας. Επίσης ευχαριστώ θερμά την κ. Βασιλική Θεοδώρου- Κασιούμη για τις εύστοχες παρατηρήσεις της σε θέματα πάνω στη Χημεία των Συμπλόκων Ενώσεων.

Ευχαριστώ τον κ. Βασίλειο Τσίκαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, για τη βοήθεια του στην ανάλυση της διαμόρφωσης των πεπτιδίων, που συνέθεσα, καθώς και για τις παρατηρήσεις του στη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Αθανάσιο Σταυρακούδη για τη βοήθεια του σε θέματα διερεύνησης βιβλιογραφικών και ειδικότερα κρυσταλλογραφικών δεδομένων στο ξεκίνημα της εργασίας μου.



Τα βιολογικά πειράματα της εργασίας αυτής έγιναν στο Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Για το λόγο αυτό ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ.Αθανάσιο Τζιούφα, το Δρ. Ιωάννη Ρούτσια και τη συνάδελφο Αθηνά Μακρή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συναδέλφους μου στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων Δήμητρα Κεραμισάνου, Νικόλαο Μπίρη, Αγγελική Κούκη, Δημήτριο Κρικοριάν, Σεβαστή Μακροπούλου, Παναγιώτα Σοφού, Σπύρο Μαμμωνά, Μόρφη Αμπατζή, Ιωάννη-Νεκτάριο Χονδρογιάννη, Παναγιώτη Σταθόπουλο, Κωνσταντίνο Στρογγύλη, Χριστίνα Μπαλαμάτσια, Δημήτριο Ροκά, Σαράντο Κωστίδη, Βούλα Παππά, Κατερίνα Ρίζου και Μάριο Μυλωνά, από το Ερευνητικό Εργαστήριο Γενικής και Ανόργανης Χημείας, για την βοήθεια τους σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω για την βοήθεια τους την κ. Ελένη Ντάφλου, γραμματέα του Προγράμματος Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. 'Βιοανόργανη Χημεία', καθώς και την κ. Ναταλία Παπαστεργίου, γραμματέα του Τομέα Οργανικής Χημείας.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ Η ΤΕΧΝΗ

Ο άνθρωπος είναι ένα ζώο που σκέφτεται. Η σκέψη του είναι η βάση της επιστήμης και της τεχνολογίας. Η επιστήμη είναι η προσπάθεια να κατανοήσουμε τον κόσμο γύρω μας με βάση την παρατήρηση και την λογική. Η τεχνολογία είναι η εφαρμογή της επιστήμης στην πράξη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι αλληλοεξαρτημένες. Η επιστήμη δίνει τη βάση για την τεχνολογία, και η τεχνολογία δίνει τη βάση για την επιστήμη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι αλληλοεξαρτημένες. Η επιστήμη δίνει τη βάση για την τεχνολογία, και η τεχνολογία δίνει τη βάση για την επιστήμη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη.

Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι αλληλοεξαρτημένες. Η επιστήμη δίνει τη βάση για την τεχνολογία, και η τεχνολογία δίνει τη βάση για την επιστήμη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη. Η επιστήμη και η τεχνολογία είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Η επιστήμη είναι η θεωρία, και η τεχνολογία είναι η πράξη.



I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

-Η ιστορία του ψευδαργύρου.

Ο ψευδάργυρος ήταν γνωστός για τη συμμετοχή του σε μίγματα μετάλλων από τα αρχαία χρόνια. Την προϊστορική περίοδο μάλιστα ανακαλύφθηκε στην Τρανσυλβανία ένα τέτοιο μίγμα μετάλλων το οποίο περιείχε 87% ψευδάργυρο. Μπρούτζινα αντικείμενα τα οποία περιείχαν ψευδάργυρο ανακαλύφθηκαν στην Κεντρική Ανατολή και χρονολογούνται 3000 χρόνια πριν, ενώ Βαβυλωνιακά χάλκινα αντικείμενα τα οποία περιείχαν κασσίτερο και ψευδάργυρο ανακαλύφθηκαν τον τρίτο αιώνα π.Χ. Ο ψευδάργυρος χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή καθρεπτών και κοσμημάτων στην Κίνα γύρω στα 600π.Χ. Στον Ελληνικό και εν συνεχεία στο Ρωμαϊκό πολιτισμό χρησιμοποιούσαν κατεξοχήν ψευδάργυρο για να παρασκευάσουν ορείχαλκο. Υπάρχουν αναφορές για το μεταλλικό ψευδάργυρο και τον ορείχαλκο γύρω στον τέταρτο αιώνα. χαρακτηριστικά αναφέρεται :

‘Υπάρχει ένας λίθος κοντά στην Andreida (βορειοδυτική Ανατολή), ο οποίος αποδίδει σίδηρο όταν καίγεται. Αφού κατεργαστεί σε κλίβανο με χώμα (certain earth) αποφέρει σταγόνες από ψεύτικο ασήμι. Αν προστεθεί σε χαλκό και γίνει ένα μίγμα αυτού προκύπτει ορείχαλκος (Strabco, Geography, Book 3, p.56).

Σε μια αναφορά του Αριστοτέλη αναφέρεται:

‘ Λένε στις Ινδίες πως ο μπρούντζος είναι λαμπερός, καθαρός και απαλλαγμένος από διάβρωση τόσο ώστε να μη διακρίνεται από το χρυσό. Ανάμεσα στις κούπες του Δαρείου υπάρχει ένας αξιοσημείωτος αριθμός αυτών που ήταν δύσκολο να διακριθούν αν ήταν χρυσές ή χάλκινες εκτός από το χρώμα’.

Διακρίνουμε δυο περιόδους:

- Ορείχαλκος πριν την ανακάλυψη του ψευδαργύρου
- Ορείχαλκος μετά την ανακάλυψη του ψευδαργύρου.

Κατά τη πρώτη περίοδο, πρώιμα αρχαιολογικά ευρήματα δείχνουν ότι ο ψευδάργυρος υπήρχε σε μεγάλη έκταση στην Ινδία. Στο Lothal βρέθηκαν αρχαία ευρήματα, τα οποία περιείχαν 70.7% χαλκό, 6.04% ψευδάργυρο, 0.9% σίδηρο και 6.04% κάποιου άλλου στοιχείου, πιθανόν άνθρακα (προϊόν ατμοσφαιρικής διάβρωσης). Παρόμοια ευρήματα τα οποία χρονολογούνται στα 1200-600 π.Χ. βρέθηκαν να περιέχουν 20.72% κασσίτερο και 16.2%ψευδάργυρο. Αυτά τα ευρήματα περιείχαν ίχνη θείου δείχνοντας τη πιθανότητα να προέρχονται από μεταλλεύματα του τύπου chalcorynite

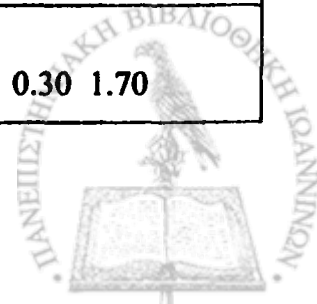


και sphalerite-galena, τα οποία βρέθηκαν στην περιοχή Ahar-Zawar. Τα πρώτα δείγματα ορείχαλκου που περιείχαν πάνω από 28% ψευδάργυρο παρασκευάστηκαν μετά την απομόνωση καθαρού μεταλλικού ψευδαργύρου κατά τη διάρκεια της δεύτερης περιόδου γύρω στα 400 π.Χ. Αποδεικτικό στοιχείο για τη διαθεσιμότητα του μεταλλικού ψευδαργύρου την περίοδο αυτή αποτελεί ένα δείγμα ορείχαλκου, το οποίο περιείχε 34.34% ψευδάργυρο, 4.25% κασσίτερο, 3% μόλυβδο, 1.77% σίδηρο και 0.4% νικέλιο. Πιθανότατα η Ινδία είναι η πρώτη χώρα στην οποία απομονώθηκε καθαρός μεταλλικός ψευδάργυρος, με τη διαδικασία της απόσταξης. Παρόλα αυτά οι Ινδοί έδιναν περισσότερη έμφαση στον ορείχαλκο που έμοιαζε με χρυσό και όχι στον καθαυτό μεταλλικό ψευδάργυρο. Ο μύθος του ψευδαργύρου στην αρχαία Ινδία εγκαθιδρύθηκε από δυο ομάδες φοιτητών στην Ινδία (Hegde, Biswas) και την Αγγλία (Craddock, Willies).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται δείγματα ορείχαλκου στην αρχαία Ινδία.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι.

S.No	Date and site	Object	Analysis % metal (Cu, Zn, Sn, Pb)
1	1500 B.C.Lothal	Copper object	70.7 6.04 - -
2	Harappan, Rosdi	Chinel,bangle	98.5 1.54 1.23 1.20
3	4 th century AD, Gujarat, Taxila	Vase female figure carrying flower container	55.4 34.3 4.25 3.08
4	2 th century AD	Bangle	88.6 7.60 0.13 2.49
5	5 th century AD	Buddha	68.5 20.25 3.86 3.62
6	6 th century AD	Ambika	76.7 16.32 1.61 4.0
7	8 th century AD Mahudi, Kashmir	Shiva	82.0 17.0 1.0 -
8	9 th century AD Nalanda	Buddha	78.95 15.15 0.74 3.0
9	11 th century AD W.Tibet	Manjusri	65.5 30.4 0.30 1.70



Ο ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Γενικά για τον ψευδάργυρο.

Ο ψευδάργυρος έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα πιο σημαντικά μεταλλικά στοιχεία εδώ και 100 περίπου χρόνια, όταν το 1869 ο Raulin ανακάλυψε πως είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του *Aspergillus niger*. Έκτοτε αποδεικνύεται συνεχώς η χρησιμότητα του μετάλλου αυτού στην υγεία ανθρώπων και ζώων (1-9). Ο ψευδάργυρος λειτουργεί σαν οξύ κατά Lewis (δέκτης ηλεκτρονίων) καταλύοντας βιολογικές διαδικασίες. Μέχρι σήμερα πάνω από 200 ένζυμα, τα οποία περιέχουν ψευδάργυρο, έχουν ταυτοποιηθεί ως προς τη δομή και τη λειτουργία τους σε σημαντικές βιοχημικές πορείες. Μερικά από τα ένζυμα στα οποία ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος τόσο στον προσδιορισμό της δομής όσο και της λειτουργίας είναι δεϋδρογονάσες, αλδολάσες, πεπτιδάσες, φωσφατάσες, η τρανσφωσφορυλάση, η ασπαρτική τρανσκαρβαμυλάση (3,10,11) και η παγκρετική καρβοξυπεπτιδάση. Επίσης μεταλλοένζυμα του ψευδαργύρου βρέθηκαν ανάμεσα στις οξειδοοξειδοκτάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λυάσες, ισομεράσες και λιγάσες (3,12). Ο ψευδάργυρος απαιτείται επίσης για τη δράση της καρβονικής ανυδράσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης(3,13). Σημαντική είναι επίσης η παρουσία του ψευδαργύρου σε DNA-πολυμεράσες(3,11,14,15) και RNA-πολυμεράσες(3,11,16,17). Τέλος ο ψευδάργυρος απαντάται σε μια πληθώρα ορμονών όπως ορμόνες ανάπτυξης, ορμόνες καθορισμού του φύλου, την ινσουλίνη (3, 18-21) και άλλες ενώ είναι απαραίτητος για τη λειτουργία του εγκεφάλου και την εκδήλωση αντικής, αντιβακτηριακής, αντιμυκητιακής και αντικαρκινικής δράσης .

• Ψευδάργυρος και ανάπτυξη

Πειραματική μελέτη της ανάπτυξης μικρών ζώων έδειξε εμφανή και πρόωμη καθυστέρηση ανάπτυξης σε ζώα τα οποία παρουσίασαν έλλειψη ψευδαργύρου. Στις αρχές του 1960 αναφέρθηκαν περιπτώσεις έλλειψης ψευδαργύρου και σε ανθρώπους. Αυτή είχε σαν αποτέλεσμα διανοητική καθυστέρηση, σκληρό και ξηρό δέρμα, ηπατική ανεπάρκεια, νανισμός και γαστρίτιδα (22-24). Μια δεκαετία αργότερα αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και από άλλους ερευνητές.



- **Ψευδάργυρος και εγκέφαλος**

Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ψευδάργυρος είναι το επικρατέστερο ιχνοστοιχείο, το οποίο βρέθηκε στον εγκέφαλο, κυρίως στην περιοχή του υποκάμπου. Πράγματι τα επίπεδα ψευδαργύρου στην περιοχή αυτή βρέθηκαν υψηλότερα από των άλλων ιχνοστοιχείων, συμπεριλαμβανομένων του ασβεστίου και του σιδήρου. Αρκετός ψευδάργυρος της περιοχής αυτής σχετίζεται με τις αξονικές υποφυάδες νευρώνων των βρυωδών ινών (mossy fibres), οι οποίες εξέρχουν από κοκκώδη κύτταρα (25-32). Ο υπόκαμπος μπορεί να επηρεάσει πολλές εγκεφαλικές δραστηριότητες, ώστε η έλλειψη ψευδαργύρου από τις βρυώδεις ίνες (mossy fibres) να οδηγεί σε μια ποικιλία εγκεφαλικών φυσιοπαθολογιών(26). Ο υπόκαμπος δεν είναι η μόνη περιοχή στον εγκέφαλο με υψηλό περιεχόμενο σε ψευδάργυρο. Άλλες περιοχές είναι ο νεοφλοιός, η αμυγδαλή εγκεφάλου, ο μυελός και ο θάλαμος εγκεφάλου. Έρευνες σε τρωκτικά επέτρεψαν την σε βάθος εξέταση αυτού του θέματος. Βρέθηκε ότι έγκυα ποντίκια, τα οποία πριν και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης παρουσίαζαν έλλειψη ψευδαργύρου, οδηγήθηκαν είτε σε εμβρυϊκή επαναπορρόφηση, είτε σε άμβλωση είτε στη γέννηση ποντικών με διάφορες δυσμορφίες, ενώ επηρεάστηκε σημαντικά ο εγκέφαλος(28). Από την άλλη πλευρά, αν η έλλειψη μητρικού ψευδαργύρου περιορίζεται στο 1/3 της εγκυμοσύνης, αποβολή ή τερατογένεση δεν είναι πιθανόν να συμβούν. Αυτό που πιθανόν να συμβαίνει είναι η μειωμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους του εγκεφάλου και των εγκεφαλικών κυττάρων(27-29,33). Η έλλειψη ψευδαργύρου μετά τη γέννα έχει επίσης βρεθεί ότι επιβραδύνει την ανάπτυξη του εγκεφάλου και την ωρίμανση αυτού. Για παράδειγμα, όταν η έλλειψη ψευδαργύρου συνεχίστηκε από τη γέννηση έως την απογαλάκτιση, κουταβάκια βρέθηκαν να υποφέρουν λόγω της μειωμένης ενσωμάτωσης της θυμιδίνης στο DNA του εγκεφάλου. Ο ψευδάργυρος είναι επίσης απαραίτητος για αρκετές ομοιοστατικές διαδικασίες στον εγκέφαλο. Για παράδειγμα η δράση της 3,φωσφοϋδρολάσης του 2,3-κυκλικού νουκλεοτιδίου και της δεϋδρογονάσης του L- γλουταμικού οξέος είναι μειωμένες στον υπόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα σε έμβρυα ποντικών που παρουσιάζουν έλλειψη ψευδαργύρου(28). Επιπλέον σε ζώα με μειωμένα επίπεδα ψευδαργύρου παρατηρήθηκε αύξηση των κατεχολαμινών στον εγκέφαλο όπως της νοραδρεναλίνης, ντοπαμίνης και σεροτονίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα (27,34).



- **Ψευδάργυρος και λειτουργία των νεύρων**

Ο ψευδάργυρος έχει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά μηνυμάτων μέσω νευρώνων και στη σύνθεση νευρονικών μικροσωλινίσκων νευροπλασμάτων. Κάνοντας πειράματα σε ζώα, βρέθηκε ότι η μεταφορά μηνυμάτων μέσω νευρώνων συμβαίνει σε υποδοχείς, σε νεύρα σπλάχνων και σπλήνας(27). Τα ιόντα ψευδαργύρου είναι απαραίτητα κατά τη διαδικασία φωσφορυλίωσης του εγκεφάλου καθώς και κατά τη διαδικασία αύξησης του αριθμού νευρονημάτων. Επιπλέον ο ψευδάργυρος αποτελεί το πιο σημαντικό ιχνοστοιχείο σε υποκυττάρια κλάσματα DNA και RNA, κάτι το οποίο εξηγεί τον ζωτικό του ρόλο στην ωρίμανση και εξάπλωση των νευρώνων(27,35).

- **Ο ψευδάργυρος στην αναπαραγωγή**

-Εγκυμοσύνη

Αφού ο ψευδάργυρος συμμετέχει σε πολλές διαδικασίες που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση και την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, η παρουσία του είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την διάρκεια περιόδων ταχείας κυτταρικής ανάπτυξης, όπως κατά τη διάρκεια οργανογένεσης και εμβρυϊκής ανάπτυξης. Πράγματι η περίοδος από τη στιγμή της σύλληψης και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι η πιο ζωτική περίοδος για να εξασφαλιστεί το βέλτιστο επίπεδο ψευδαργύρου. Πειράματα σε ζώα και ανθρώπους έδειξαν ότι η γονική ανεπάρκεια στα επίπεδα ψευδαργύρου επιφέρουν μια ποικιλία βλαβερών επιδράσεων στους απογόνους, κυρίως στην κυτταρική διαίρεση και αντιγραφή. Μελέτες σε έγκυα ποντίκια έδειξαν ότι οι απόγονοι που γεννήθηκαν παρουσίασαν πλήρη γενετική δυσμορφία, η οποία ήταν εμφανής σε κάθε οργανικό σύστημα του σώματος. Επιπλέον η έλλειψη ψευδαργύρου σε αρσενικά και θηλυκά βρέφη ποντίκια είχε σαν αποτέλεσμα την οξεία καθυστέρηση της ανάπτυξης, ανωμαλίες στο τρίχωμα και το δέρμα, καταστολή του επιπέδου των πρωτεϊνών στο πλάσμα, ανώμαλος οιστρικός κύκλος καθώς και ιστολογικές βλάβες στους όρχεις και στον οισοφάγο(36). Στους ανθρώπους η ανεπάρκεια του ψευδαργύρου κατά τη διατροφή σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επιλοκών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, εσωουρηθρικές ανωμαλίες, παρατεταμένη κούραση, ανώμαλο τοκετό, κοιλιακή αιμορραγία και ποικιλία



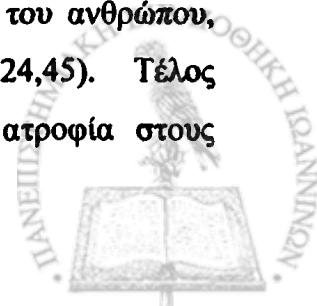
δυσμορφιών(37). Είναι χαρακτηριστικό πως όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα ψευδαργύρου τόσο μεγαλύτερο είναι το βάρος του μωρού(38). Ερευνητές υποστηρίζουν πως αφού το ανοσοποιητικό σύστημα αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της κύησης, η έλλειψη μητρικού ψευδαργύρου οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία υπάρχει στις επόμενες γενιές(39,40).

-Θηλασμός

Έλλειψη ψευδαργύρου κατά την περίοδο θηλασμού σε ποντίκια βρέφη είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερου μεγέθους πρόσθιου εγκεφάλου, μικρότερο υπόκαμπο, μειωμένο αριθμό κυττάρων, λιγότερους εγκεφαλικούς νευρώνες και ελαττωμένο DNA και RNA(41,42). Επιπλέον η έλλειψη ψευδαργύρου κατά την κρίσιμη αυτή περίοδο ανάπτυξης και διαμόρφωσης του εγκεφάλου φαίνεται να προκαλεί μόνιμη ζημιά στην λειτουργία του υπόκαμπου. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν μια αυξημένη επιθετικότητα των ζώων σε διάφορα ερεθίσματα. Η δυσμενής επίδραση της έλλειψης ψευδαργύρου στην κατασκευή του εγκεφάλου σε βρέφη(ανθρώπου) δεν μπορεί να προσδιοριστεί ακριβώς. Παρόλα αυτά, διαφορές στην ανάπτυξη των μωρών που τρέφονται με το γάλα της μητέρας τους και κείνα που τρέφονται με τυποποιημένο γάλα σχετίζονται με τον τρόπο που απορροφάται ο ψευδάργυρος που προέρχεται από αυτές τις δυο πηγές. Φαίνεται πάντως πως η διαθεσιμότητα σε ψευδάργυρο του μητρικού γάλακτος είναι μεγαλύτερη από το αγελαδινό γάλα, της σόγιας και παρόμοιων κονσερβοποιημένων παρασκευασμάτων. Η σημαντική βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου από το μητρικό γάλα έχει αποδοθεί στην παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους υποκαταστατών που δεσμεύουν τον ψευδάργυρο σε αντίθεση με το αγελαδινό γάλα όπου ο ψευδάργυρος προσδένεται ισχυρά στις πρωτεΐνες του γάλακτος(43,44).

-Αναπαραγωγή αρσενικών

Ο ψευδάργυρος αποτελεί ζωτικό χαρακτηριστικό για τη σπερματογένεση και την ανάπτυξη πρωτογενών και δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών(9). Χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου σε διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, επεμβαίνουν στην φυσιολογική σεξουαλική ανάπτυξη(3,2,23,24,45). Τέλος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, ολιγοσπερμία ατροφία στους



όρχεις, δυσμορφία στην ουρά του σπέρματος και μειωμένη κινητικότητα αυτού(46,47).

- **Σύνδρομα απόκρισης ψευδαργύρου**

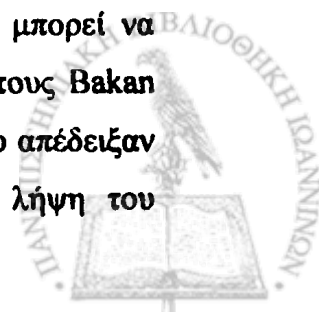
Μερικά από τα σπουδαιότερα σύνδρομα που παρατηρήθηκαν σε ανθρώπους με μειωμένα ποσά ψευδαργύρου ήταν απάθεια, λήθαργος, σχιζοφρένια, νευρική ανορεξία, κατάθλιψη, υπερενεργητικότητα, νευρική ανορεξία και η νόσος Alzheimer.

-Σχιζοφρένια

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η σχιζοφρένια οφείλεται πιθανόν σε αυξημένη δραστηριότητα της ντοπαμίνης του εγκεφάλου(48,49). Έχουν γίνει υποθέσεις πως η έλλειψη ψευδαργύρου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική ανύψωση των επιπέδων των κατεχολαμινών στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης της ντοπαμίνης, και μερικά είδη σχιζοφρένειας προκαλούνται αποκλειστικά από την έλλειψη ψευδαργύρου(27,29). Βέβαια αυτό μπορεί να γίνει και σε συνδυασμό με την αύξηση του χαλκού (27,29). Είναι γνωστό πως ψευδάργυρος και χαλκός είναι ανταγωνιστές στο ανθρώπινο σώμα και η αύξηση του ενός συνεπάγεται μείωση του άλλου και αντίστροφα. Η πιο αποτελεσματική θεραπεία για τη μείωση του χαλκού ήταν ένας συνδυασμός δίαιτας που περιλαμβάνει ψευδάργυρο σε συνδυασμό με μαγγάνιο (27,29). Επιπλέον ένα μεγάλο ποσοστό σχιζοφρενών έχει βρεθεί να εκκρίνει μια χημική ουσία το κρυπτοπυρόλιο στα ούρα του(27,29,50,51). Το κρυπτοπυρόλιο συμπλέκεται ισχυρά με αλδεύδες και ενώνεται με πυριδοξαλική φωσφατάση. Το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται από τον ψευδάργυρο και το προϊόν αυτό αποβάλλεται από τα ούρα. Αυτή η κατάσταση καλείται συχνοουρία, και θεραπεύεται εύκολα με ψευδάργυρο και βιταμίνη B₆.

-Ανορεξία

Το γεγονός ότι τα επίπεδα ψευδαργύρου σχετίζονται άμεσα με την ανορεξία και τη βουλιμία είναι γνωστό από το 1934 περίπου όπου περιγράφηκαν κλινικές διαταραχές σε ζώα λόγω έλλειψης ψευδαργύρου (52). Η ιδέα ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να συνδέεται απευθείας με τη νευρική ανορεξία διατυπώθηκε αρχικά από τους Bakan και Hotobin(53). Όμως, οι Bryce-Smith και Simpson ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν πως η νευρική ανορεξία θεραπεύεται απλά και αποτελεσματικά με λήψη του



ψευδαργύρου από το στόμα(54). Ο λόγος για τον οποίο η έλλειψη ψευδαργύρου πράγματι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νευρικής ανορεξίας στους έφηβους, οφείλεται αρχικά στη μείωση της γεύσης και της οσμής. Ο τρόπος με τον οποίο ο ψευδάργυρος επιδρά στην αίσθηση της γεύσης, αποδίδεται στην ύπαρξη ενός πολυπεπτιδίου που περιέχει ψευδάργυρο και βρίσκεται στο σάλιο. Συνεπώς μείωση στη συγκέντρωση του ψευδαργύρου οδηγεί σε μείωση της γευστικής ικανότητας και σε συνεχώς αυξανόμενη απώλεια της όρεξης(3,44,55). Ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών σε έφηβες είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του ψευδαργύρου(54). Ανορεξικά παιδιά τα οποία υποβλήθηκαν σε εξετάσεις παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου στο αίμα, στον ορό, στο πλάσμα και στα ούρα. Παροχή ψευδαργύρου ήταν απαραίτητη για την αντιμετώπιση της ανορεξίας.

-Νόσος Alzheimer's

Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν πως ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλουμινίου στον εγκέφαλο. Μάλιστα κάποιες μεμβράνες θεωρείται ότι επιτρέπουν τη μεταφορά υπερβολικά μεγάλων ποσών αλουμινίου στον εγκέφαλο(56). Είναι ήδη γνωστό ότι κανονικά επίπεδα ψευδαργύρου είναι απαραίτητα στην σωστή διατήρηση όλων των βιολογικών μεμβρανών. Συνεπώς ένας πιθανός λόγος της εμφάνισης της νόσου αυτής είναι η σχετικά ευνοϊκή διατροφή σε ψευδάργυρο, η οποία έχει σαν συνέπεια την διάρρηξη των μεμβρανών του εγκεφάλου και την αυξημένη εισαγωγή στον εγκέφαλο αλουμινίου και άλλων τοξινών(57). Συνηθισμένες είναι οι διαταραχές στην μνήμη καθώς και η υπερκινητικότητα που εκδηλώνεται σε ορισμένα παιδιά σε συνδυασμό με την αδυναμία μάθησης.

-Άλλες ασθένειες

Η ακροδερματίτιδα είναι μια από τις παθήσεις που σχετίζονται με την ύπαρξη ψευδαργύρου και οφείλεται σε μια κληρονομική γενετική ανωμαλία που αφορά την απορρόφηση του τελευταίου(58). Άλλες ασθένειες γνώστες μέχρι σήμερα είναι το γαστρικό έλκος, η ακμή, η ιδιοπαθητική υπογευσία(3,59,60), η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η δυσλεξία καθώς και άλλου είδους δυσλειτουργίες. Επιπλέον η έλλειψη ψευδαργύρου πιθανόν να σχετίζεται και με την ανάπτυξη του AIDS(3,61,62). Στην πραγματικότητα ο ψευδάργυρος είναι πολύ σημαντικός για τη σωστή λειτουργία του

ανοσοποιητικού συστήματος. Για το λόγο αυτό σε άτομα φορείς του AIDS ή ασθενείς συνήθως ρυθμίζονται τα επίπεδα του ψευδαργύρου με σκοπό τη διέγερση του ανοσοποιητικού τους συστήματος.

- **Ψευδάργυρος και διατροφή**

Σύμφωνα με ειδικούς κανονισμούς διαιτολογίας των Η.Π.Α η μέγιστη ποσότητα ψευδαργύρου για ενήλικες είναι 15mg, για έγκυες γυναίκες 20mg και για γυναίκες που θηλάζουν 25mg. Το 1981 τα ποσοστά αυτά άλλαξαν και η καθημερινή διαίτα απαιτούσε 10,5mg ή ακόμα λιγότερο για τους χορτοφάγους, μέχρι να μειωθεί τελικά στα 9,7mg .

- Απορρόφηση ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος είναι παρών στα περισσότερα τρόφιμα με το κρέας και το ψάρι να αποτελούν τις καλύτερες πηγές. Στα φυτά υπάρχει ψευδάργυρος αλλά η διαθεσιμότητα αυτού είναι μικρότερη από ότι στα δυο προηγούμενα. Στην πραγματικότητα η διαθεσιμότητα σε ψευδάργυρο είναι εξαιρετικά χαμηλή σε δίαιτες που περιέχουν λαχανικά(63). Φύτρες σιταριού είναι πλούσιες σε ψευδάργυρο, κάτι που όμως δεν αποτελεί μέρος της διατροφικής μας συνήθειας. Επιπλέον το ασβέστιο και ο σίδηρος (64,65) έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην απορρόφηση του ψευδαργύρου. Τέλος καθημερινές συνήθειες τροφές όπως παράγωγα του γάλακτος και ο καφές μειώνουν την ικανότητα απορρόφησης του ψευδαργύρου στα διάφορα ζωτικά όργανα.

- **Τοξικά στοιχεία και ψευδάργυρος**

- Κάδμιο

Ο ψευδάργυρος έχει ιδιαίτερη σχέση με τη βιοχημεία και την τοξικότητα του καδμίου, το οποίο απαντάται συνήθως στον καπνό των τσιγάρων(66,67). Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το κάδμιο ανταγωνίζεται τον ψευδάργυρο σε μεταλλοένζυμα που απαιτούν ψευδάργυρο όπως η καρβονική ανυδράση και η αλκαλική φωσφατάση. Μετά από εκτεταμένες μελέτες βρέθηκε πως το κάδμιο και ο



μόλυβδος επηρέαζαν πολύ αρνητικά το βάρος νεογέννητων και το μέγεθος του κεφαλιού. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως ο μόλυβδος ήταν ικανός να μετατοπίσει τον ψευδάργυρο από την περιοχή του υπόκαμπου με αποτέλεσμα την τοξική επίδραση του πρώτου.

-Αλκοόλ

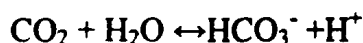
Είναι γενικά γνωστό ότι η κατανάλωση οιοπνευματωδών αυξάνει την έκκριση βιταμινών και μεταλλικών στοιχείων στα ούρα. Μελέτες που έγιναν σε 25 αλκοολικές γυναίκες και σε 25 μη αλκοολικές έγκυες γυναίκες, έδειξαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ψευδαργύρου στο πλάσμα σε κείνες τις γυναίκες που έκαναν κατάχρηση αλκοόλ, παρόλο που το ποσοστό ψευδαργύρου στο πλάσμα δεν αποτελεί την πιο αξιόπιστη πηγή για τη γενική ποσότητα του ψευδαργύρου στο σώμα. Παρόλα αυτά για γυναίκες με χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου αναφέρθηκαν υψηλά ποσοστά γεννήσεων, οι οποίες δεν ήταν φυσιολογικές(68,69). Τα τελευταία χρόνια μελετάται η συσχέτιση εμφάνισης τερατογένεσης με την κατάχρηση αλκοόλ καθώς και η άμεσα σχετιζόμενη με το αλκοόλ εμβρυϊκή δυσμορφογένεση(67,68).



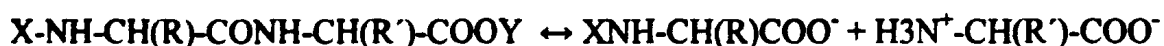
ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ

Γενικά

Ο τρόπος με τον οποίο τα μεταλλοϊόντα δεσμεύονται και ενεργοποιούν υποστρώματα, χωρίς τα ίδια να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου του καταλυτικού μηχανισμού, είναι μοναδικός. Ο Zn(II) είναι μοναδικός μεταξύ των βιολογικών μεταβατικών μεταλλοϊόντων διότι δρα σαν οξύ κατά Lewis χωρίς να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Η πρώτη αναγνώριση του ρόλου του σε βιοχημικό μηχανισμό ήταν το 1939 όταν ανακαλύφθηκε ότι ο ψευδάργυρος είναι αναγκαίο συστατικό της καρβονικής ανυδράσης, μιας λυάσης που καταλύει την αντίδραση :



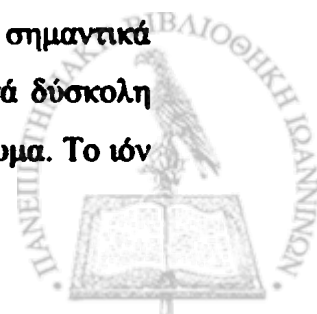
Απουσία ενζύμου, η αντίδραση είναι βραδεία σε φυσιολογικό pH, αλλά αυξάνεται παρουσία του ενζύμου. Το 1955 ανακαλύφθηκε ένα δεύτερο ένζυμο που έχει ανάγκη από ψευδάργυρο, η καρβοξυπεπτιδάση A, η οποία διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σύμφωνα με την αντίδραση :



Μια σχετική πρωτεΐνη που είναι γνωστή ως καρβοξυπεπτιδάση B προτιμά βασικά αμινοξέα. Και τα δυο ένζυμα συντίθεται στο πάγκρεας. Άλλες υδρολάσες στις οποίες ο ψευδάργυρος παίζει καταλυτικό ρόλο περιλαμβάνουν την αλκαλική φωσφατάση, τη φωσφοδιεστεράση του δηλητηρίου των όφειων και διάφορες νουκλεάσες. Επιπλέον ο ψευδάργυρος είναι λειτουργικά σημαντικό συστατικό των τρανσφερασών, όπως οι RNA και DNA πολυμεράσες και η αντιστρεπτή τρανσκριπτάση, και των ισομερασών, λυασών και μερικών αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Προφανώς ο ψευδάργυρος παίζει σπουδαίο ρόλο σε πολλά ένζυμα υδρόλυσης και μεταφοράς ομάδος ατόμων και έτσι έχει γίνει ένα από τα πιο μελετημένα μέταλλα στη Βιοανόργανη χημεία.

-Καρβοξυπεπτιδάση A και Θερμολυσίνη

Η καρβοξυπεπτιδάση A και η θερμολυσίνη είναι δυο από τα πιο σημαντικά υδρολυτικά ένζυμα. Η υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού είναι μια αρκετά δύσκολη αντίδραση, παρά το γεγονός ότι ευνοείται θερμοδυναμικά σε υδατικό διάλυμα. Το ιόν



ψευδαργύρου βρίσκεται μακριά(στο εσωτερικό του μορίου) από την πρωτεϊνική επιφάνεια και είναι συναρμοσμένο με δυο ιστιδίνες His69 και His196, και μια καρβοξυλική ομάδα από το Glu72. Η γεωμετρία συναρμογής συμπληρώνεται με ένα μόριο ύδατος, οδηγώντας έτσι σε ένα κέντρο ψευδαργύρου με αριθμό συναρμογής πέντε. Το ιόν ψευδαργύρου δρα ως εκμαγείο και συγκεντρώνει όλες τις ενεργές ομάδες που συμμετέχουν στη διάσπαση του δεσμού C-N, ειδικά την καρβοξυλική ομάδα του Glu270. Η οξύτητα Lewis του μεταλλοϊόντος και ο λιγότερο όξινος χαρακτήρας της Glu270 καρβοξυλικής ομάδας μειώνει το pK_a του δεσμευμένου ύδατος, το οποίο προσβάλλει τον προς σχάση πεπτιδικό δεσμό. Πρέπει να τονισθεί ότι αν και ο ψευδάργυρος παίζει σπουδαίο ρόλο στην πεπτιδική υδρόλυση, η παρουσία των παρακείμενων αμινοξέων που προέρχονται από την πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι εξίσου σημαντική.

-Αλκαλική φωσφατάση

Η αλκαλική φωσφατάση περιέχει ένα ζεύγος ιόντων ψευδαργύρου που δεσμεύουν την τελική φωσφορική ομάδα ενός υποστρώματος, τυπικά ενός μονοεστέρος, όπως το ρ-νιτροφαινυλο-φωσφορικό. Το -OH της σερίνης στο ενεργό κέντρο προσβάλλει τη φωσφορική ομάδα, διασπώντας τον εστέρα. Κατά τη διαδικασία αυτή η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται στο ένζυμο σχηματίζοντας έτσι φωσφοαμινοξύ. Υδρόλυση του φωσφορικού εστέρα από το συναρμοσμένο υδροξύλιο συμπληρώνει τον κύκλο. Στο προκείμενο ένζυμο, το ζεύγος ιόντων ψευδαργύρου δρα ως γενικό οξύ κατά Lewis, καθιστώντας το υπόστρωμα καλύτερο ηλεκτρονιόφιλο.

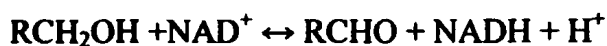
-Καρβονική ανυδράση (λύαση)

Η καρβονική ανυδράση ήταν το πρώτο μεταλλοβιομόριο που ανακαλύφθηκε. Όπως η καρβοξυπεπτιδάση, έτσι και η καρβονική ανυδράση έχει μελετηθεί στο βαθμό που παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο του ψευδαργύρου και το μηχανισμό του ενζύμου. Το ιόν ψευδαργύρου είναι συναρμοσμένο με τρεις ιστιδίνες. Ένα επίσης μόριο ύδατος είναι δεσμευμένο στο μέταλλο και συμπληρώνει τη παραμορφωμένη τετραεδρική σφαίρα συναρμογής. Η κινητική της αντίδρασης της καρβονικής ανυδράσης εξαρτάται από το pH. Είναι δραστικότερη σε υψηλό pH και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο μιας ομάδας που έχει pK_a κοντά στο 7. Η πιο απλή και

αποδεκτή εξήγηση του φαινομένου αυτού περιλαμβάνει το σχηματισμό υδροξυλίων δεσμευμένων στο ιόν ψευδαργύρου.

-Αλκοολική δεϋδρογονάση(οξειδοορεδουκτάση)

Το ένζυμο αυτό καταλύει την (NAD^+ εξαρτώμενη) μετατροπή των πρωτοταγών αλκοολών σε αλδεύδες :



Το ένζυμο περιέχει ψευδάργυρο που χρησιμεύει στη δέσμευση και ενεργοποίηση του υποστρώματος πριν από το στάδιο μεταφοράς υδριδίου. Η αλκοολική δεϋδρογονάση αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, κάθε μια από τις οποίες περιέχει δυο ιόντα ψευδαργύρου σε ξεχωριστές περιοχές. Ένα από τα ιόντα ψευδαργύρου βρίσκεται στην καταλυτική περιοχή, όπου δεσμεύει το αναγκαίο συνένζυμο και είναι συναρμοσμένο με δυο κυστείνες, μια ιστιδίνη και ένα μόριο ύδατος. Το άλλο ιόν ψευδαργύρου είναι συναρμοσμένο με τέσσερις κυστεϊνικούς υποκαταστάτες και είναι απρόσιτο στο διαλύτη. Το ιόν αυτό φαίνεται να παίζει δομικό ρόλο. Ο ρόλος του ψευδαργύρου είναι διπλός. Διευκολύνει την αποπρωτονίωση της αλκοόλης, καθιστώντας την καλύτερο δότη υδριδίου λόγω συσσωρευμένου αρνητικού φορτίου και τοποθετεί το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο κατά τέτοιο τρόπο που μεγιστοποιεί τους παράγοντες που οδηγούν στη μεταφορά υδριδίου στο συνένζυμο. Η απομάκρυνση του ύδατος από το ενεργό κέντρο με τη δέσμευση του υποστρώματος έχει διπλό σκοπό. Διατηρεί τον αριθμό συναρμογής και τη γεωμετρία του ψευδαργύρου και απομακρύνει ένα αρκετά ενεργό μόριο από τη γειτονιά του ενεργοποιημένου υποστρώματος.

-Νουκλεοτιδική ενεργοποίηση

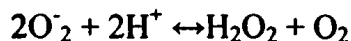
Αρκετά μεταλλοένζυμα ψευδαργύρου συμμετέχουν στο μεταβολισμό νουκλεϊνικών οξέων. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται οι φώσφοδιεστεράσες και οι νουκλεάσες. Στην τάξη επίσης των ενζύμων ψευδαργύρου που ονομάζονται τρανσφεράσες ανήκουν και οι πολυμεράσες που καταλύουν το σχηματισμό πολυμερών από



μονονουκλεοζιτικές τριφωσφορικές οικοδομικές μονάδες. Συνεπώς η καταλυτική χημεία του ψευδαργύρου είναι αρκετά πλούσια σε θέματα μοριακής βιολογίας.

-Σουπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου

Τα μεταλλοένζυμα σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) καταλύουν την αντίδραση-αυτοξειδοαναγωγής του σουπεροξειδικού ιόντος σύμφωνα με την εξίσωση:



Όπως φαίνεται από την αντίδραση αυτή, το υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι επικίνδυνη ουσία αποτελεί ένα από τα προϊόντα. Τα υπεροξείδιο του υδρογόνου δεσμεύεται από ένα άλλο μεταλλοένζυμο, την καταλάση. Έτσι η SOD και η καταλάση δρουν συνεργειακά και προστατεύουν τους οργανισμούς που χρησιμοποιούν οξυγόνο από τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού του οξυγόνου. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από δυο όμοιες υπομονάδες κάθε μια από τις οποίες περιέχει ένα άτομο ψευδαργύρου και ένα άτομο χαλκού. Στο ενεργό κέντρο, το ιόν ψευδαργύρου είναι τετραεδρικά συναρμοσμένο με τρεις ιστιδίνες, His69, His78 και His61 και ένα ασπαραγινικό οξύ Asp81. Η παρουσία του ψευδαργύρου στη SOD οδηγεί στο συμπέρασμα πως το μέταλλο αυτό συμμετέχει στην ενεργότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Στα πλαίσια ενός τέτοιου ρόλου, η ιμιδαζολική γέφυρα διασπάται και επανασχηματίζεται κατά τη διάρκεια κάθε καταλυτικού κύκλου. Η ταχύτητα του γεγονότος αυτού μπορεί να πλησιάσει εκείνη του ρυθμού αναπλήρωσης του ενζύμου. Πιθανόν το ιόν ψευδαργύρου βοηθά στη δημιουργία της βαθμίδωσης του ηλεκτρικού πεδίου που έλκει το ιόν O_2^- στη κοιλότητα-παγίδα του ενζύμου. Τα μόρια του O_2 και H_2O_2 είναι ουδέτερα και μπορούν με διάχυση να εξέλθουν από την κοιλότητα, όχι όμως το ανιόν O_2^- . Επιπλέον, το ιόν ψευδαργύρου μπορεί να επιφέρει θερμική σταθερότητα στην πρωτεΐνη, όπως προέκυψε από θερμοκρασιακές μελέτες σταθερότητας παρουσία και απουσία του μεταλλοιόντος.

-Ασπαραγινική τρανσκαρβαμούλαση

Το ένζυμο αυτό καταλύει τη συμπύκνωση του φωσφορικού καρβαμούλιου με το ασπαραγινικό οξύ που οδηγεί στο σχηματισμό του N-καρβαμούλοασπαραγινικού οξέος και ανόργανων φωσφορικών. Η αντίδραση αυτή είναι το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών. Το ολοένζυμο αποτελείται από 12 πολυπεπίδια και

περιέχει συνολικά έξι ιόντα ψευδαργύρου, ένα σε κάθε ρυθμιστική αλυσίδα. Η αλλοστερική συμπεριφορά του ένζυμου περιγράφεται με τη βοήθεια ενός απλού μοντέλου. Σύμφωνα με αυτό, το ένζυμο μπορεί να υπάρξει σε δύο τεταρτοταγείς μορφές. Η μια ονομάζεται T(τεταμένη) και έχει χαμηλή συγγένεια προς το υπόστρωμα και η άλλη ονομάζεται R(χαλαρή) και έχει υψηλότερη συγγένεια. Συνεπώς στο μοντέλο αυτό η δράση ενός παρεμποδιστή είναι να μετατοπίσει την ισορροπία προς την πλευρά της κατάστασης T, ενώ η δράση ενός ενεργοποιητή έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατάσταση R.



Ο ψευδάργυρος είναι συναρμοσμένος με τέσσερις κυστείνες οργανώνοντας έτσι δομικά μια περιοχή που βρίσκεται στο καρβόξυ τελικό άκρο κάθε ρυθμιστικής αλυσίδας. Η περιοχή ψευδαργύρου συμμετέχει στην απ'ευθείας σύνδεση μεταξύ των ρυθμιστικών και καταλυτικών υπομονάδων. Μελετές χημικών μετατροπών έδειξαν ότι όταν απομακρύνεται ο ψευδάργυρος επέρχεται διάσταση μεταξύ των καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων. Πρόσφατα ο ρόλος της περιοχής ψευδαργύρου έχει ερευνηθεί απ'ευθείας με την παραγωγή υπομονάδων, στα βακτήρια, από τις οποίες έχει απαλειφθεί η αμινο-τελική περιοχή. Προσθήκη καταλυτικών υπομονάδων στα σύμπλοκα αυτά επιφέρει καταλυτική ενεργότητα στο ένζυμο. Συνεπώς ο ψευδάργυρος επιτρέπει το σχηματισμό μιας μικρής πρωτεϊνικής περιοχής που μπορεί να δεσμευτεί στη καταλυτική υπομονάδα κατά τρόπο που παράγει αναστροφή από την T στην R κατάσταση.



ΜΟΤΙΒΟ ΔΑΚΤΥΛΩΝ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ (ZINC-FINGER) ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ)

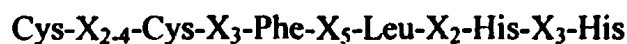
-Μοντέλα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με το DNA

Ο τρόπος με τον οποίο τα γονίδια εκφράζονται σε πολυκύτταρους οργανισμούς είναι ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο βιολογικό φαινόμενο και σημείο αιχμής στην έρευνα. Αν ένα γονίδιο πρόκειται να ενεργοποιηθεί, πρωτεΐνες γνωστές σαν μεταγραφικοί παράγοντες, προσκολλούνται σε ένα τμήμα του γονιδίου, το οποίο καλείται προαγωγός. Αυτό καθιστά ένα ένζυμο ικανό να μεταγράψει ένα δεύτερο τμήμα από DNA σε RNA(70). Στις περισσότερες περιπτώσεις το προκύπτον μόριο χρησιμοποιείται σαν μόριο γενετικού κώδικα για τη σύνθεση μιας ειδικής πρωτεΐνης ή αλληλουχίας αμινοξέων. Μερικές φορές το ίδιο το RNA είναι το τελικό προϊόν(71). Οι επιστήμονες αναρωτιούνται για τον τρόπο που ένας μεταγραφικός παράγοντας επιλέγει την περιοχή αλληλεπίδρασης με το DNA, όταν υπάρχουν πολλά γονίδια στο κύτταρο. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών είναι ιδανικοί στην αναγνώριση και αλληλεπίδραση με το DNA(72). Ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας απομονώθηκε το 1985 από ένα είδος βατράχου. Από τότε ανακαλύφθηκαν περισσότερες από 200 πρωτεΐνες, πολλές από αυτές μεταγραφικοί παράγοντες, που περιέχουν δακτυλίους ψευδαργύρου(73). Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου(zinc-fingers) δεν είναι οι μόνες δομές που χρησιμοποιούν οι μεταγραφικοί παράγοντες για να αλληλεπιδράσουν με το DNA. Ουσιαστικά υπάρχουν δυο τύποι πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με ορισμένες περιοχές του DNA:

- Το κλασικό zinc-finger
- Οι στεροειδείς υποδοχείς

-Κλασικό zinc-finger

Η γενική ακολουθία ενός zinc-finger είναι η εξής :



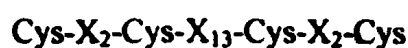
Το μοτίβο αυτό παίρνει το ονομά του από τη θηλιά των αμινοξέων η οποία προεξέχει από την περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου και περιγράφεται ως δακτύλιος



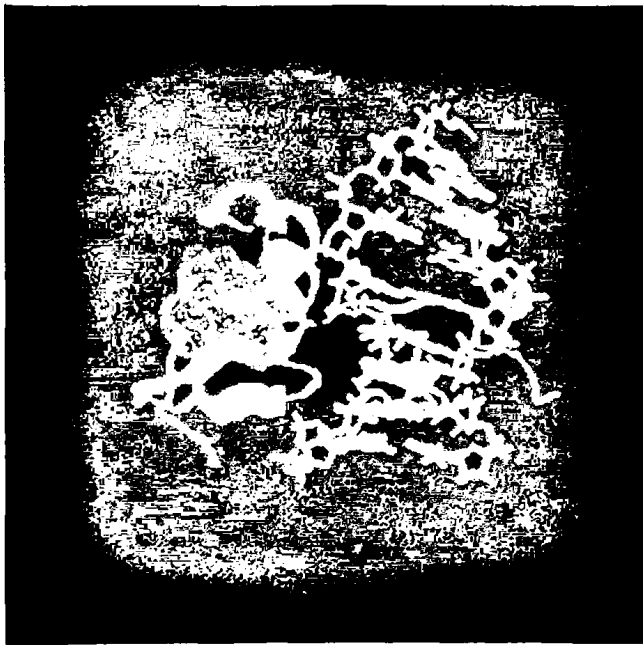
ψευδαργύρου(zinc-finger ή zif). Το ιόν Zn^{+2} ενώνεται με δυο κυστείνες και δυο ιστιδίνες, όπου οι κυστείνες βρίσκονται σε περιοχή πτυχωτού φύλλου και οι ιστιδίνες σε α-έλικα. Σύμφωνα με τη δομή αυτή πρωτείνες που περιέχουν ψευδάργυρο τυλίγονται γύρω από τη διπλή έλικα του DNA με τις ενεργές zif περιοχές και φτιάχνουν πολλαπλά ζευγάρια πρωτεΐνης-DNA επιτρέποντας την αναγνώριση. Συνήθως ένας δακτύλιος ψευδαργύρου περιλαμβάνει συνολικά 22-24 αμινοξέα και η θηλιά 12 αμινοξέα. Το C-τελικό άκρο ενός zif είναι μια α-έλικα που δεσμεύεται στο DNA. Το N-τελικό άκρο είναι ένα β-πτυχωτό φύλλο. Τα αμινοξέα του C-τελικού άκρου από κάθε zif ευθύνονται για την αναγνώριση ειδικών περιοχών 'στόχων'. Όταν μια πρωτεΐνη λειτουργεί πολλαπλά υπάρχει η υποψία ότι η πρωτεΐνη λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα τα zinc-fingers να εμπλέκονται στη δέσμευση του DNA παρά του RNA.

-Στεροειδείς υποδοχείς

Ευκαρυωτικά κύτταρα εκφράζουν πολλές κυτταρικές πρωτείνες ως απόκριση της ορμονικής διέγερσης. Πολλές από αυτές τις ορμόνες είναι στεροειδή παράγωγα χοληστερόλης. Οι στεροειδείς ορμόνες είναι μη πολικά μόρια, τα οποία περνούν διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου(στόχου) στο κυτοσόλιο, όπου δεσμεύονται από τους υποδοχείς τους(74). Τα σύμπλοκα στεροειδείς ορμόνες-υποδοχείς μπαίνουν στον πυρήνα όπου δεσμεύονται σε ειδικές περιοχές του χρωμοσώματος(chromosomal enhancers) γνώστα σαν στοιχεία απόκρισης(response elements) ώστε να μειώσουν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων. Για παράδειγμα οι υποδοχείς για γλυκοκορτικοειδή δεσμεύονται σε ειδικά 15bp-γλυκοκορτικοειδή στοιχεία απόκρισης(GREs) σε συγκεκριμένη περιοχή πολλών γονιδίων. Έτσι οι ευκαρυωτικοί στεροειδείς υποδοχείς αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως στα ευκαρυωτικά συστήματα διαφορετικά είδη κυττάρων μπορεί να έχουν τον ίδιο υποδοχέα για δεδομένη στεροειδή ορμόνη και παρόλα αυτά να συνθέτουν διαφορετικές πρωτείνες προς απόκριση της ορμόνης. Οι στεροειδείς υποδοχείς έχουν έναν άλλο τύπο zinc-finger. Η κατασκευή αυτού του zinc-finger βασίζεται σε μια ακολουθία του τύπου :



Τα zif αυτού του τύπου διαφέρουν από το κλασικό μοντέλο επειδή δεν διαθέτουν ένα ζεύγος ιστιδινών. Οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν Cys₂/Cys₂ δακτυλίους συχνά δεν έχουν επαναλαμβανόμενα zif σε αντίθεση με αυτά του τύπου Cys₂/His₂. Οι περιοχές που αλληλεπιδρούν με το DNA είναι μικρές και παλινδρομικές. Οι οιστρογενείς και γλυκοκορτικοειδείς υποδοχείς έχουν δυο δακτυλίους ψευδαργύρου με το ιόν Zn⁺² να εντάσσεται τετραεδρικά. Οι δυο δακτύλιοι ψευδαργύρου συμμετέχουν σε α-έλικες, οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους δημιουργώντας μια μεγάλη σφαιροειδή περιοχή. Οι αρωματικές περιοχές στις α-έλικες σχηματίζουν ένα υδρόφοβο κέντρο μαζί με το β-πτυχωτό φύλλο, που συνδέει τις α-έλικες (έλικα-φύλλο-έλικα).

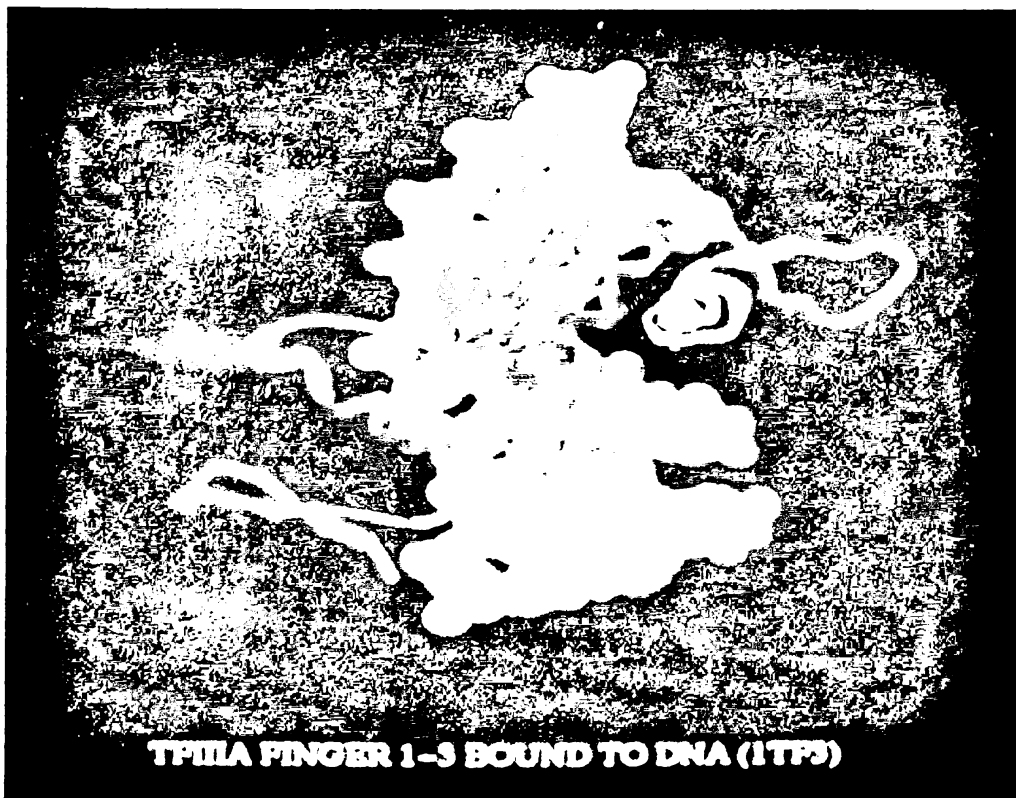
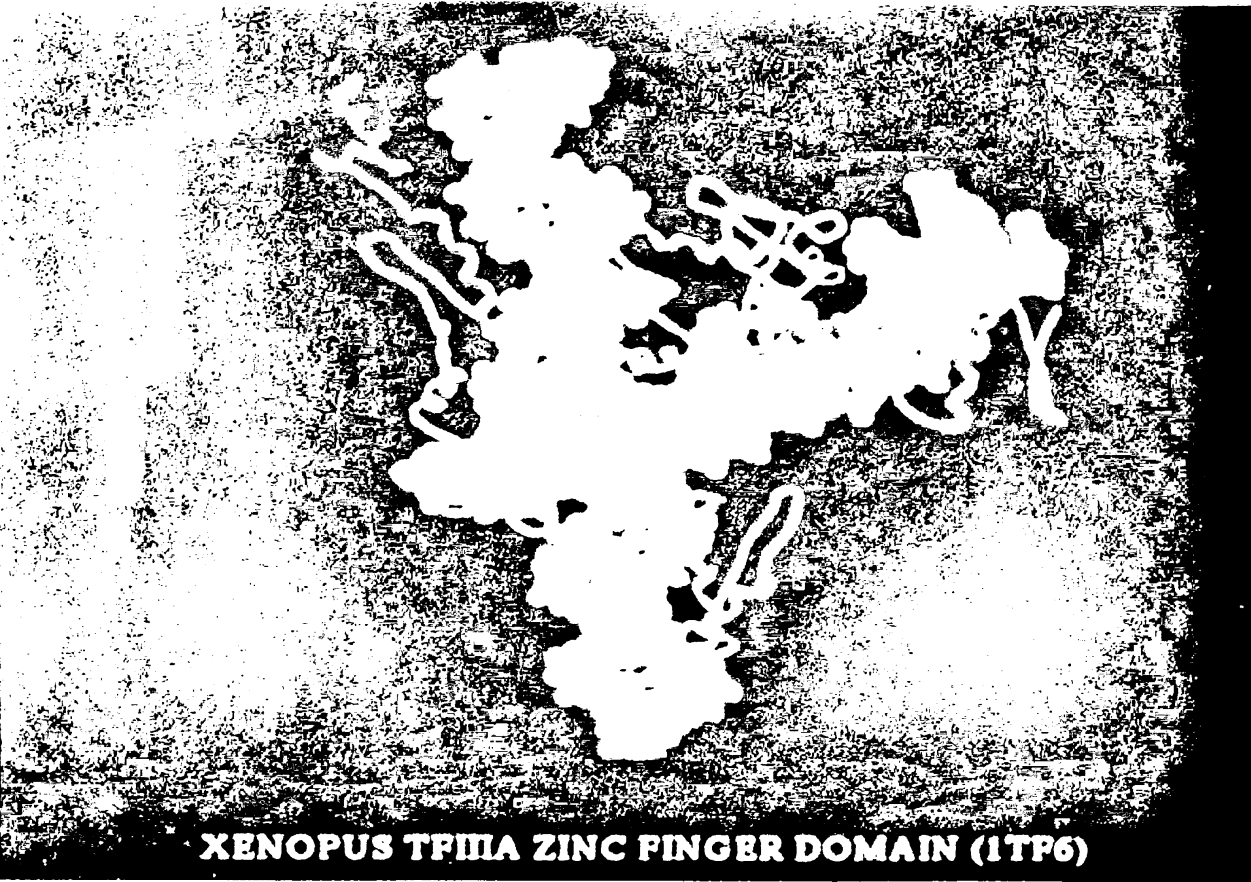


Σχήμα 1: Χαρακτηριστική δομή ενός zinc-finger του στεροειδούς υποδοχέα, ο οποίος αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα του DNA. Το zif του στεροειδούς υποδοχέα ρυθμίζει πιθανώς την ειδική δέσμευση στο DNA.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο πιο γνωστός και καλύτερα μελετημένος μεταγραφικός παράγοντας είναι ο TFIIIA, μια πρωτεΐνη, η οποία απαιτείται για τη μεταγραφή των 5S-RNA γονιδίων με την RNA -πολυμεράση III(75,76). Η ασυνήθιστη ακολουθία του TFIIIA οδήγησε στην πρόταση ενός μοτίβου DNA-πρόσδεσης, το zinc-finger(δάκτυλος ψευδαργύρου). Ο παράγοντας TFIIIA περιέχει συνολικά 7-11 άτομα ψευδαργύρου σε κάθε μόριο και αποτελείται από 9 επαναλαμβανόμενα τμήματα(μονάδες) 30 αμινοξέων περίπου το καθένα. Κάθε μονάδα περιέχει δυο ζευγάρια κυστεΐνης και ιστιδίνης που συμμετέχουν σε ένα τετραεδρικό συνδυασμό στο κέντρο του οποίου βρίσκεται το ιόν ψευδαργύρου. Τα αμινοξέα που είναι ανάμεσα στον τετραεδρικό συνδυασμό (δηλαδή αυτά που σχηματίζουν θηλιά-loop) χαρακτηρίζονται σαν δάκτυλος(finger). Ανάλογα με τη πρωτεΐνη ο αριθμός των πιθανών fingers διαφέρει από δυο έως δέκα. Σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχτεί ότι για αυτές τις πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το DNA(και έχουν δάκτυλους ψευδαργύρου), ο ψευδάργυρος είναι απολύτως απαραίτητος για τη δέσμευση με DNA. Και στα δυο μοντέλα (Cys₂/His₂, Cys₂/Cys₂), η δέσμευση στο DNA γίνεται με συγκεκριμένα αμινοξέα(residues) του δακτυλίου με την α-έλικα του DNA(77). Παρόλα αυτά, ένα συνθετικό πεπτίδιο, το οποίο περιέχει δυο δακτυλίους ψευδαργύρου(ARD1) δε μπορεί να αναγνωρίσει το στόχο του. Αυτό δείχνει ότι ο δακτύλιος ψευδαργύρου παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με το DNA, όμως δεν υπάρχει πάντα άμεση αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-DNA. Είναι δυνατή η αντικατάσταση ενός ζεύγους ιστιδινών στο μοντέλο Cys₂/His₂ από ένα ζεύγος κυστεϊνών, γεγονός που μειώνει σημαντικά τη τάση αλληλεπίδρασης με το DNA. Σημαντικό επίσης παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη Ro52KD, αυτοαντιγόνο στο σύνδρομο Sjogren's(SS) και τον συστηματικό ερμηματώδη λύκο(SLE). Αν και η λειτουργία της δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή, η ομοιότητα που παρουσιάζει με γνωστές πρωτεΐνες δείχνει ότι συνδέεται με το DNA. Μελετήθηκε η υπόθεση ότι η Ro52KD αναγνωρίζει συγκεκριμένα τμήματα νουκλεϊκών οξέων(78). Τα τρία zif που περιέχει είναι λειτουργικά. Επομένως η Ro52KD ανήκει σε μια κατηγορία πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το DNA και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Η Ro52KD λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας(μεταγραφή του DNA σε RNA) με συνέπεια να παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτοάνοσες παθήσεις.



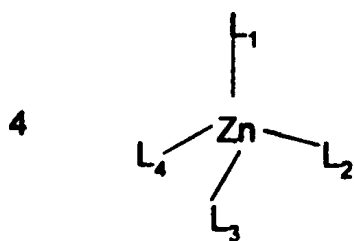


Σχήμα 2: Χαρακτηριστικές δομές zinc-fingers από τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIIA.

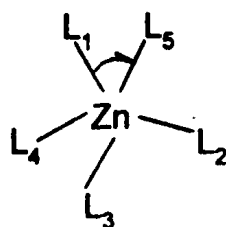


Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ

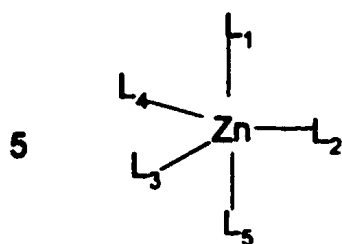
Ο Ζn αποτελεί ένα κρίσιμο στοιχείο για περισσότερες από 300 πρωτεΐνες, όπως οι μεταλλοπρωτεΐνάσες που εμπλέκονται στην έρευνα κατά του καρκίνου, και ένα πλήθος πρωτεϊνών που περιέχουν zinc-finger, οι οποίες μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-νουκλεϊνικών οξέων(79-82). Παρ'όλα αυτά οι γνώσεις μας για την χημεία ένταξης αυτού του ψευδαργύρου είναι σχετικά περιορισμένες(83-85). Ο Ζn ανήκει στην 12^η στήλη του περιοδικού πίνακα και χαρακτηρίζεται ως μέταλλο μετάπτωσης αν και έχει συμπληρωμένα πλήρως τα d τροχιακά του. Ο Ζn έχει ατομικό αριθμό 30, που αντιστοιχεί σε ηλεκτρονιακή κατανομή $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10}$. Το ιόν Zn^{+2} προκύπτει με αποβολή των $2e^-$ από την 4s υποστοιβάδα του μετάλλου οπότε η ηλεκτρονιακή κατανομή για το ιόν Zn^{+2} είναι $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10}$. Το ιόν Zn^{+2} έχει αρκετές ιδιότητες που το διαχωρίζουν από τα ιόντα άλλων μετάλλων μετάπτωσης, όπως ότι δεν είναι παραμαγνητικό, δεν είναι έγχρωμο και σχηματίζει μάλλον ασθενή σύμπλοκα(παρά το μικρό του μέγεθος). Για το ιόν Zn^{+2} έχουν παρατηρηθεί αριθμοί ένταξης 4, 5, 6 και 8(86,87). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η ιδανική γεωμετρία για αριθμούς ένταξης 4, 5 και 6 καθώς και η παρατηρούμενη δομή συμπλόκων που περιέχουν Ζn.



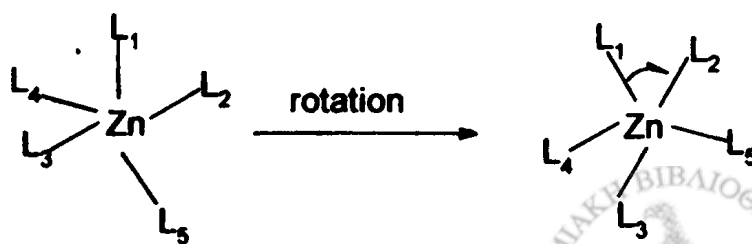
Ιδανική τετραεδρική



Διδοντική τετραεδρική

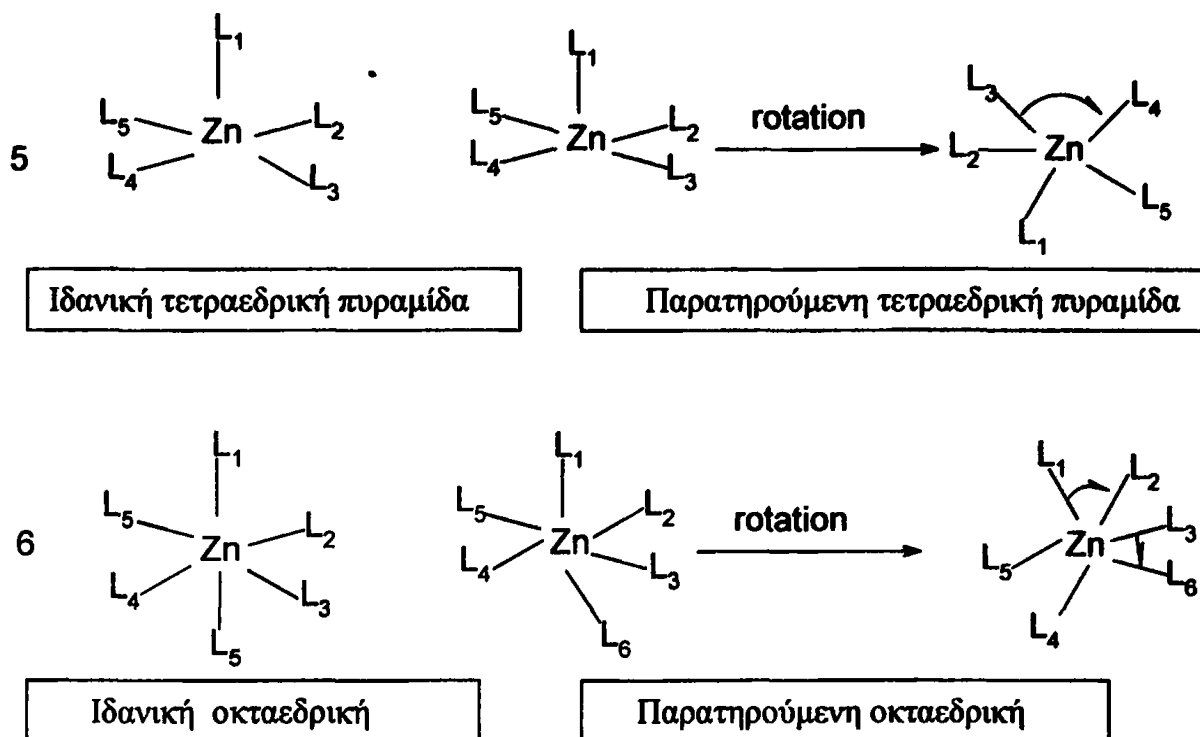


Ιδανική τριγωνική διπυραμίδα



Παρατηρούμενη τριγωνική διπυραμίδα





Σχήμα 3: Προτεινόμενες δομές για το ιόν Zn^{+2} ανάλογα με τον αριθμό ένταξης.

Έχει βρεθεί ότι το ποσοστό των ιόντων Zn^{+2} που συμμετέχουν σε τετραεδρικά τετραεδρικά διδοντικά (bidentate), τετραγωνικής πυραμίδας, τριγωνικής διπυραμίδας και οκταεδρικά σύμπλοκα είναι αντίστοιχα 74%, 16%, 6%, 2% και 2% αντίστοιχα (88). Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνουμε ότι η γεωμετρία των συμπλόκων Zn είναι ως επί το πλείστον τετραεδρική. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη μας την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του ιόντος $Zn^{+2}(3d^{10})$. Το ιόν Zn^{+2} έχει κενά τέσσερα τροχιακά ($4s4p^3$), τα οποία ενεργειακά ευνοούν την τοποθέτηση 4 ζευγών e^- από τους υποκαταστάτες. Όταν συμπληρωθούν τα 4 τροχιακά του ιόντος $Zn^{+2}(4s^24p^6)$ τα προκύπτοντα σύμπλοκα είναι σταθερά σύμφωνα με τις αρχές της Κβαντομηχανικής. Τα τετραεδρικά σύμπλοκα του Zn αποδίδονται λοιπόν σε sp^3 υβριδισμό (89).

ΔΑΚΤΥΛΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ R₀52KD ΚΑΙ R₀60KD ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJOGREN'S(SS)

I.Φυσιολογική Απόκριση του Ανοσοποιητικού Συστήματος

Γενικά

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών είναι ένα απέραντο δίκτυο από μόρια και κύτταρα η πρωταρχική τους λειτουργία είναι η προστασία των οργανισμών από τους μικροοργανισμούς-ιούς, βακτήρια και παράσιτα. Το ανοσοποιητικό σύστημα εξετάζει συνεχώς αναρίθμητα μόρια για να αποφασίσει ποια από αυτά είναι ξένα και να κάνει το πρώτο βήμα για την καταστροφή τους. Μαθαίνει μάλιστα από τις εμπειρίες και θυμάται τι έχει συναντήσει στο παρελθόν. Τα τρία χαρακτηριστικά του γνωρίσματα είναι η εξειδίκευση, η προσαρμογή και η μνήμη. Η προστασία του ανοσοποιητικού συστήματος επιτυγχάνεται μέσω δύο βασικών κατηγοριών μηχανισμών:

- 1. Μη ειδική ανοσία(φυσική), η οποία ρυθμίζεται από κύτταρα που ανταποκρίνονται μη εξειδικευμένα σε ξένους οργανισμούς και δεν βελτιώνεται με τη μη συνεχή έκθεση σε αυτούς τους οργανισμούς.
- 2. Ειδική ανοσία(επίκτητη), η οποία κατευθύνεται σε ειδικά μόρια και επαυξάνεται με την συνεχή έκθεση. Η ειδική ανοσία ρυθμίζεται κυρίως από τα λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στον πρωτογενή λεμφικό ιστό(στον μυελό των οστών και τον θυμό αδέν), αναγνωρίζουν το ξένο σώμα(αντιγόνο) και ανταποκρίνονται αρχικά σε αυτό στον δευτερογενή λεμφικό ιστό(λεμφικοί αδένες, σπλήνας, αμυγδαλές), ενώ η δραστική φάση της απόκρισης (effector phase) εμφανίζεται στο σημείο όπου ανευρίσκεται η πηγή του αντιγόνου.

Τα λεμφοκύτταρα ανάλογα με την λειτουργία τους διακρίνονται στα εξής:

- 1. Τα Β-λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών και τα οποία μπορούν στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν σε πλασμοκύτταρα που παράγουν αντισώματα.
- 2. Τα Τ-λεμφοκύτταρα που ωριμάζουν και διαφοροποιούνται στο θυμό αδέν. Τα Τ-λεμφοκύτταρα βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα, καταστρέφουν μολυσμένα κύτταρα, ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση και ενεργοποιούν την μικροβιοκτόνο δράση άλλων κυττάρων όπως μακροφάγων.



Κάθε λεμφοκύτταρο από τις παραπάνω κατηγορίες διαθέτει έναν υποδοχέα επιφάνειας ικανό να αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο. Τα Β-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν αντισώματα και φέρουν μια τροποποιημένη μορφή του ίδιου αντισώματος στην επιφανειά τους, που λειτουργεί σαν υποδοχέας των αντιγόνων. Τα Τ-λεμφοκύτταρα έχουν το δικό τους υποδοχέα (TCR), ο οποίος αναγνωρίζει ένα τμήμα του αντιγονικού μορίου σε σύνδεση με μόρια του μεγίστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC).

Τα αντισώματα

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες (Ab) είναι πρωτεΐνες που φτιάχνονται από τους οργανισμούς εξαιτίας της παρουσίας μέσα σε αυτό μιας ξένης ουσίας. Εκκρίνονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και κυκλοφορούν μέσω του αίματος και της λέμφου. Αυτές οι διαλυτές πρωτεΐνες είναι τα μόρια αναγνώρισης για τη χημική ανοσολογική απόκριση. Κάθε αντίσωμα έχει μια ειδική συγγένεια για την χημική ουσία που έχει προκαλέσει τη συνθεσή του. Ο σχηματισμός αντισωμάτων προκαλείται από ξένα προς τον οργανισμό μακρομόρια που ονομάζονται αντιγόνα (Ag). Η ειδική συγγένεια ενός αντισώματος δεν αφορά ολόκληρο το μακρομοριακό αντιγόνο, αλλά μια συγκεκριμένη θέση του, που ονομάζεται αντιγονικός προσδιοριστής (antigenic determinant) ή επίτοπος. Τα σύμπλοκα Ab-Ag απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω φαγοκύτωσης από τα μακροφάγα.

Τα αντισώματα είναι μια μεγάλη οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών με κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Κάθε αντίσωμα με το χαρακτηριστικό σχήμα Y περιέχει 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες 2 με μεγάλο μοριακό βάρος που ονομάζονται βαριές αλυσίδες (H) και άλλες δύο με μικρότερο μοριακό βάρος που ονομάζονται ελαφριές (L). Διακρίνονται σε πέντε τάξεις την IgG, IgA, IgE και IgD με κυριότερη την πρώτη. Η Η-αλυσίδα φέρει μια μεταβλητή περιοχή και τρεις σταθερές. Οι μεταβλητές περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας αποτελούν την περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο. Η μεγαλύτερη μεταβλητότητα των μεταβλητών περιοχών (V) των δύο αλυσίδων εντοπίζεται σε τρεις υπερμεταβλητές περιοχές, που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο και ονομάζονται CDRs (complementarity determining regions).



II. Ανοσολογική Απόκριση

Η ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αναγνώριση του αντιγόνου και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυτταρικών κλώνων που ανταποκρίνονται θετικά σε αυτό και σε δεύτερη φάση την παραπέρα διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών και την ενεργοποίηση ανοσοδραστικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την παραγωγή αντισωμάτων, τη δραστηριοποίηση των μακροφάγων και την ανάπτυξη κυτταροτοξικών κυττάρων ώστε να εξαλειφθεί η πηγή του αντιγόνου. Στην αναγνώριση του αντιγόνου εμπλέκονται τρεις κατηγορίες μορίων:

- Ο υποδοχέας αντιγόνου των Β-λεμφοκυττάρων(αντίσωμα Ab)
- Ο υποδοχέας αντιγόνου των Τ- λεμφοκυττάρων(TCR)
- Τα μόρια του μέγιστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας(MHC:major histocompatibility complex).

Είναι σαφές λοιπόν πως το έναυσμα της ανοσολογικής απόκρισης είναι το αντιγόνο. Όταν το αντιγόνο εξαλειφθεί δεν έχουμε πλέον το σήμα της σύνδεσης του TCR με το MHC-πεπτίδιο με αποτέλεσμα η λειτουργία του Τ-λεμφοκυττάρου να καταστέλλεται. Παρόμοια το αντίσωμα που παράγεται από ένα Β-λεμφοκύτταρο δε βρίσκει το αντιγόνο στόχο του με αποτέλεσμα την καταστολή του. Με αυτούς τους μηχανισμούς η ανοσολογική απόκριση(κυτταρική ή χυμική) καταστέλλεται με την καταστροφή της πηγής του αντιγόνου(π.χ. του μολυσματικού παράγοντα) και παραμένουν τα κύτταρα μνήμης, δηλαδή κύτταρα που έχουν υποστεί φαινοτυπικές και γονοτυπικές αλλαγές έτσι ώστε να μπορούν να ενεργοποιηθούν σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο(Ag).



III. Αυτοάνοση Ανοσολογική Απόκριση και Αυτοάνοσες παθήσεις

Το ανοσολογικό σύστημα σε υγιή άτομα είναι ικανό να διακρίνει ένα ξένο συστατικό από τα συστατικά του ίδιου του οργανισμού. Η ικανότητα αυτή αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ανοσολογικού συστήματος. Σε ασθενείς με αυτοάνοσα νόσηματα, το ανοσοποιητικό του σύστημα λανθασμένα επιτίθεται εναντίον του ίδιου του οργανισμού στοχεύοντας τα κύτταρα τους ιστούς και τα όργανά του. Η συσσώρευση κυττάρων και μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα σημείο του σώματος που δέχεται επίθεση, αναφέρεται ευρέως ως φλεγμονή. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα, καθένα από τα οποία μπορεί να προσβάλλει τον οργανισμό με διαφορετικούς τρόπους. Για παράδειγμα στη σκλήρυνση κατά πλάκας η αυτοάνοση αντίδραση στρέφεται εναντίον του εγκεφάλου. Σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, οι ιστοί και τα όργανα που προσβάλλονται μπορεί να διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή, παρόλο που όλοι πάσχουν από την ίδια νόσο. Ένας ασθενής με Λύκο μπορεί να έχει προσβολή του δέρματος και των αρθρώσεων, ενώ κάποιος άλλος(να έχει προσβολή) του δέρματος, των νεφρών και των πνευμόνων. Μερικά από τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι σχετικά σπάνια. Τα αυτοάνοσα νοσήματα προσβάλλουν εκατομμύρια ανθρώπων και πιο συχνά τις γυναίκες από τους άντρες. Πιο συγκεκριμένα προσβάλλουν γυναίκες που βρίσκονται σε παραγωγική ηλικία. Ο Λύκος είναι συχνότερος στις γυναίκες αφρικανικής και ισπανικής καταγωγής από τις γυναίκες της καυκάσιας φυλής που προέρχονται από την Ευρώπη. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σκληρόδερμα προσβάλλουν σε μεγαλύτερο ποσοστό κάποιες κοινότητες ιθαγενών κατοίκων από ότι το γενικό Αμερικανικό πληθυσμό. Δεν έχει αποδειχτεί μέχρι σήμερα ότι κάποιο αυτοάνοσο νόσημα είναι μεταδοτικό. Τα αυτοάνοσα νοσήματα δεν μεταδίδονται σε άλλους ανθρώπους όπως οι λοιμώξεις. Δεν σχετίζονται με το σύνδρομο επίκτητης ανοσοεπάρκειας(AIDS), ούτε αποτελούν κάποια μορφή καρκίνου. Από την άλλη τα γονίδια που κληρονομούν οι άνθρωποι συνεισφέρουν στην προδιάθεση για την εκδήλωση κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος. Επιπλέον ορισμένα μέλη μιας οικογένειας μπορεί να κληρονομούν και να έχουν την ίδια ομάδα μη φυσιολογικών γονιδίων και όμως να εμφανίσουν διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα.



ΣΥΝΔΡΟΜΟ SJOGREN'S

-Γενικά

Το σύνδρομο Sjogren είναι μια βραδέως εξελισσόμενη αυτοάνοση πάθηση των εξωκρινών αδένων που προσβάλλει κυρίως γυναίκες(90,91,92,93,94). Είναι δυνατόν να παρουσιάζεται σαν μια αυτοτελής κλινική οντότητα που ονομάζεται πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren ή σε συνδυασμό με άλλα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα, όπως Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, Σκληρόδερμα και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο(SLE), οπότε ονομάζεται δευτεροπαθές σύνδρομο Sjogren(95,96,97). Η διάγνωση του συνδρόμου Sjogren επιβεβαιώνεται με βιοψία των μικρών σιελογόνων αδένων του χείλους, λόγω ύπαρξης αυξημένων ποσών ανοσοσφαιρινών που ανιχνεύονται στον ορό των ασθενών αυτών.

-Κλινικά συμπτώματα του SS

Τα κύρια κλινικά συμπτώματα που εμφανίστηκαν σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο SS μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

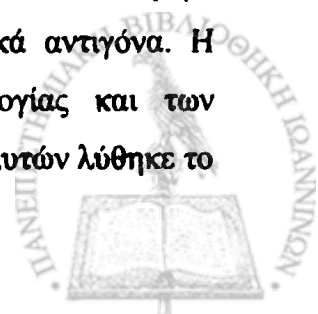
- Ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο SS είχαν υψηλότερα επίπεδα νευρικών διαταραχών (48%) και κατάθλιψης (32%) συγκρινόμενοι με τις ομάδες αναφοράς (υγιή άτομα). Επιπλέον οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν κακή διάθεση, εριστικότητα, πονοκέφαλο και ασθενή μνήμη(98,99).
- Εξασθένηση της ακοής μέχρι και απώλεια αυτής(100-102).
- Αυξημένος κίνδυνος διακοπής εγκυμοσύνης σε γυναίκες με SS(103,-106). Ο κίνδυνος αυτός είναι ορατός και σε γυναίκες που εμφανίζουν Λύκο. Καθυστέρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης η οποία είναι περισσότερο κοινή σε ασθενείς με Λύκο.
- Εμφάνιση Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας, Παρωτίτιδας και Λευκοπενίας σε παιδιά στην Ελλάδα, ηλικίας από 16 ετών και άνω, κυρίως κορίτσια(107-110).
- Ανάπτυξη ψευδοόγκου στο πάγκρεας ασθενούς, η οποία συνοδεύτηκε από ξηροστομία και μεγενθυμένους σιελογόνους αδένες.
- Εμφάνιση νεφρικής σωληνοειδούς οξέωσης (τύπου I), η οποία σχετίστηκε με το πρωτοπαθές SS σε γυναίκες ηλικίας 44 ετών, με μακρά ιστορία νεφρικών προβλημάτων(111).



- Οπτική και στοματική ξηρότητα(112-122).
- Εμφάνιση υψηλών ποσοστών λεμφαδενοπάθειας, αντι-Ro/SSA αντισωμάτων και μονοκλωνικών ανοσογλοβουλινών κατά τα πρώτα στάδια της νόσου.
- Ξηρότητα στα χείλη και τη γλώσσα, στοματίτιδα και ασυνήθιστη μορφή τερηδόνας σε ασθενείς με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές σύνδρομο Sjogren (123-126).
- Σκελετική μυοπάθεια και κακή λειτουργία του περιφερειακού νευρικού συστήματος, τρεις μήνες μετά τη διάγνωση της νόσου(110).

-Αντισώματα κατά Ro/SSA και La/SSB αντιγόνων

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των αντιγόνων Ro και La αποτελεί συχνό εύρημα σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα κυρίως το σύνδρομο Sjogren(SS) και δευτερόντως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος(SLE). Η ανίχνευση αυτών των αυτοαντισωμάτων και η απομόνωση των αντίστοιχων αντιγόνων τους παρουσίασε κάποια ιδιαιτερότητα. Για πρώτη φορά το 1958 ο Jones περιέγραψε την ύπαρξη αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjogren που αντιδρούσαν με κάποια άγνωστα αντιγόνα σε εκχυλίσματα δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων. Εν συνεχεία ο Andersen το 1961 εξετάζοντας, με τη μέθοδο της διπλής ανοσοδιάχυσης, ορούς αρρώστων με σύνδρομο SS περιέγραψε την ύπαρξη δυο συστημάτων αντιγόνου-αντισώματος(127). Τα αντιγόνα αυτά ονομάστηκαν SjT και SjD. Από τις ιδιότητες που παρουσίαζε το αντιγόνο SjD, συμπέρανε πως η φύση του είναι πρωτεϊνική. Μερικά χρόνια αργότερα οι Clark και συν. απομόνωσαν ένα αντιγόνο που χαρακτήρισαν σαν κυτταροπλασματικό όξινο μακρομόριο και που ονόμασαν Ro(128), από τα αρχικά του αρρώστου στον ορό του οποίου ανιχνεύτηκε το αντίσωμα κατά του αντιγόνου αυτού. Αργότερα περιγράφηκε το αντιγόνο Ro, σαν ένα κυτταροπλασματικό σύμπλεγμα RNA και πρωτεΐνης και τα αντισώματα κατά του La, σαν αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται αποκλειστικά σε ορούς ασθενών με Λύκο(129). Το 1975 και 1976 οι Alsbaugh και συν.περιέγραψαν τα αυτοαντιγόνα SSA και SSB, τα οποία αναφέρθηκε ότι ανιχνεύτηκαν μόνο σε ασθενείς με Sjogren(130,131). Τα αντιγόνα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως πυρηνικά αντιγόνα. Η σύγχυση που είχε δημιουργηθεί λόγω της ποικίλης ονοματολογίας και των φερόμενων διαφορετικών βιοχημικών ιδιοτήτων των αυτοαντιγόνων αυτών λύθηκε το



1979 μετά από ανταλλαγή ορών μεταξύ των εργαστηρίων. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα πως τα Ro, SSA και SjD είναι ταυτόσημα μεταξύ τους καθώς και τα La, SSB και SjT(132).

Τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα αυτοαντισωμάτων που στρέφονται κατά οργανοειδικών και μη αυτοαντιγόνων. Μεταξύ των αυτοαντισωμάτων υπάρχει μεγάλη ποικιλία και ετερογένεια. Υπάρχουν δυο μεγάλες κατηγορίες αυτοαντισωμάτων:

- τα φυσικά (μη παθογενετικά)
- τα παθογονικά

Τα παθογονικά εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- είναι συνήθως IgG
- η συγγενειά τους με το αντιγόνο είναι μεγάλη
- είναι ειδικά για ένα αυτοαντιγόνο.

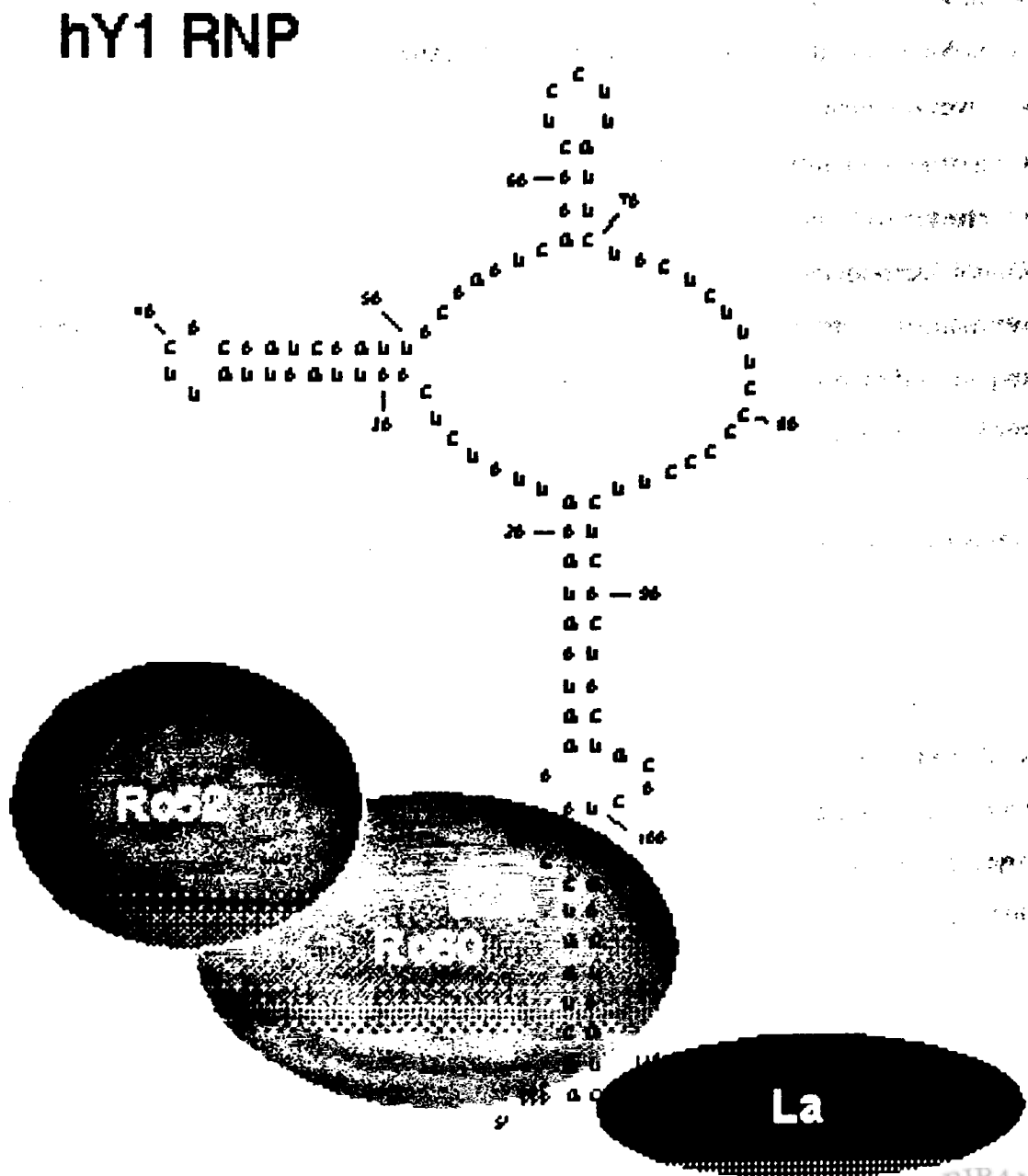
Κύριοι εκπρόσωποι μη οργανοειδικών αυτοαντισωμάτων της κατηγορίας είναι τα αντισώματα κατά των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Αυτοαντισώματα κατά μικρών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων(RNP) απαντώνται σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren(SS) και Λύκο(SLE).

-Δομή του συμπλόκου Ro/La RNP.

Το Ro/La RNP είναι ένα μικρό κυτταροπλασματικό σύμπλοκο RNA και πρωτεϊνών με άγνωστη λειτουργία που απαντάται στα κύτταρα όλων των ειδών. Το RNA συστατικό του συμπλόκου ποικίλει από είδος σε είδος. Στον άνθρωπο υπάρχουν πέντε και χαρακτηρίζονται σαν hY₁ έως hY₅(human cYtoplasmic)(133), ενώ στους ποντικούς είναι δύο και στους αρουραίους τρία. Το μήκος του περιλαμβάνει από 80 έως 110 νουκλεοτίδια και ο αριθμός τους υπολογίστηκε σε 10⁵ αντίγραφα ανά κύτταρο. Το τελευταίο υποδηλώνει χαμηλή ιστική συγκέντρωση και ερμηνεύει τις δυσκολίες ανίχνευσης του Ro αντιγόνου. Και τα πέντε Ro/La RNPs παρουσιάζουν μια ιδιαίτερα διατηρημένη περιοχή, η οποία αποτελεί την περιοχή σύνδεσης με την αντιγονική πρωτεΐνη. Ενδιαφέρον προκάλεσε η ανίχνευση των Ro/La RNPs σε πολλαπλάσια συγκέντρωση σε ορισμένους ιστούς απ' ότι σε άλλους. Στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο δέρμα και στο φλοιό των επινεφριδίων τα Ro/La RNPs βρέθηκαν σε δεκαπλάσιες ποσότητες απ' ότι σε άλλα όργανα όπως π.χ. στο ήπαρ, όργανο που



παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση. Το πρωτεϊνικό τμήμα του συμπλόκου αποτελείται από τις πρωτεΐνες Ro60KD, Ro52KD και La48KD(134,135,136). Η πιθανή δομή του hY₁ Ro/La RNP παρουσιάζεται στο σχήμα 4. Από τη δομή αυτή πιθανόν να απουσιάζουν κάποια μέλη του συμπλόκου, αφού το μοριακό βάρος του συμπλόκου διαφέρει πολύ από το πειραματικά προσδιοριζόμενο, που είναι 300–400 KD.

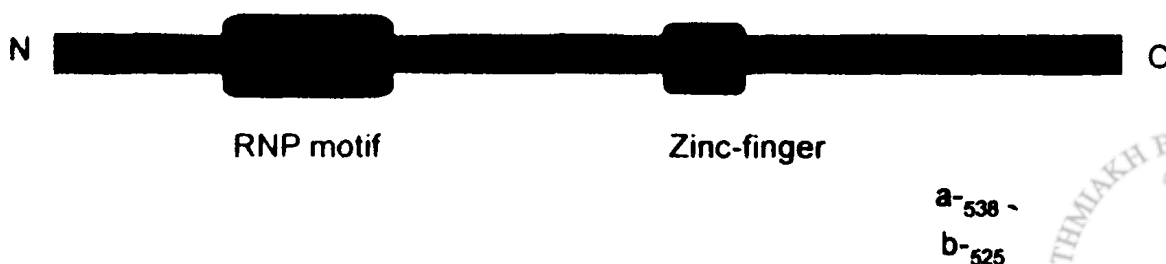


Σχήμα 4: Δομή του συμπλόκου Ro/La RNP.



- Η πρωτεΐνη Ro60KD.

Η Ro60KD είναι μια από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζεται από αντισώματα ασθενών που υποφέρουν από αυτοάνοσες ασθένειες όπως το σύνδρομο Sjogren (SS) και ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (SLE). Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζεται με δύο μορφές, τον α-τύπο με 538 αμινοξέα και 60,6KD μοριακό βάρος(137,138) και τον β-τύπο με 525 αμινοξέα και 59,3KD μοριακό βάρος(139). Ο βήτα τύπος της πρωτεΐνης αυτής προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA, που οδηγεί σε αντικατάσταση 25 αμινοξέων της Ro60α με 11 διαφορετικά για την Ro60β(140). Περιλαμβάνει ένα μοτίβο RNP (περιοχή δέσμησης του RNA)(141) και ένα δάκτυλο ψευδαργύρου(zinc-finger), που συνήθως απαντάται σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA και RNA. Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται στην περιοχή 276-318 της πρωτεΐνης και έχει υποδειχτεί επιπλέον σαν υπεύθυνη για τη δέσμηση της πρωτεΐνης Ro52KD (η πρωτεΐνη Ro52KD δεν συνδέεται άμεσα με τα hYRNA αλλά έμμεσα μέσω της Ro60KD πρωτεΐνης)(142). Πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ομολογία με τη Ro60KD έχουν ανιχνευτεί σε κύτταρα πιθήκου, χοίρου, αγελάδας, σκύλου, γάτας, κουνελιού, ποντικιού, αρουραίου και ινδικού χοιριδίου(143,144). Η Ro60KD από τον *Xenopus laevis* και από τον ποντικό είναι ίδιου μήκους με τη με την οποία παρουσιάζουν ομολογία κατά 78% και 95% αντίστοιχα(145-147). Η πρωτεΐνη Ro60KD θεωρείται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης των 5S rRNA(148,149). Είναι δυνατόν να συντεθούν ελαττωματικά 5S rRNA, τα οποία προκύπτουν λόγω της αποτυχίας της πολυμεράσης III να τερματίσει τη μεταγραφή τους στο πρώτο σήμα τερματισμού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται πρόσθετα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των 5S rRNA. Αυτά τα νουκλεοτίδια αναγνωρίζονται ειδικά από την Ro60KD πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με έτσι με ελαττωματικά 5S rRNA. Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι η μη αποτελεσματική ωρίμανση και αποικοδόμηση των ελαττωματικών 5S rRNA(148,149).



Σχήμα 5: Η πρωτεΐνη Ro60KD.



-Η πρωτεΐνη Ro52KD.

Η πρωτεΐνη Ro52KD είναι και αυτή μια από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζεται από αντισώματα ασθενών που πάσχουν από SS και SLE. Η Ro52KD αποτελείται από 475 αμινοξέα. Το 1988 προσδιορίστηκε η Ro52KD σαν μέλος του RNP συμπλόκου(134-136). Η πρωτεΐνη αυτή δεν συνδέεται με τα hYRNAs αλλά έμμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με τη Ro60KD. Η συμμετοχή της στο σύμπλοκο έχει αμφισβητηθεί από ορισμένους, αλλά νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Ro52KD αποτελεί μέρος του Ro/La RNP συμπλόκου(150). Περιλαμβάνει πολλές περιοχές όπως ένα RING finger-B box(περιοχή τύπου δακτύλου ψευδαργύρου)(151), ένα φερμουάρ λευκίνης(leucine zipper)(152) και μια περιοχή με δομή έλικας. Το φερμουάρ λευκίνης χρησιμεύει για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθώς και για τη δέσμευση του DNA(153). Η πρωτεΐνη Ro52KD αποτελεί μέλος της ευρύτερης οικογένειας των RFP (human transforming protein) πρωτεϊνών λόγω ομολογίας στο καρβοξυτελικό άκρο της. Οι RFP πρωτεΐνες είναι κυρίως πρωτεΐνες δέσμευσης του DNA και ρυθμιστές μεταγραφής. Σε αντίθεση με τις Ro60KD και La48KD πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σε μια πληθώρα ζωικών ειδών, η Ro52KD εμφανίζεται μόνο στον άνθρωπο, στον πίθηκο και στο ινδικό χοιρίδιο(144). Ο πιθανός ρόλος για την πρωτεΐνη Ro52KD εντοπίζεται στην αλληλεπίδραση με το DNA και στη ρύθμιση της μεταγραφής(153,154).

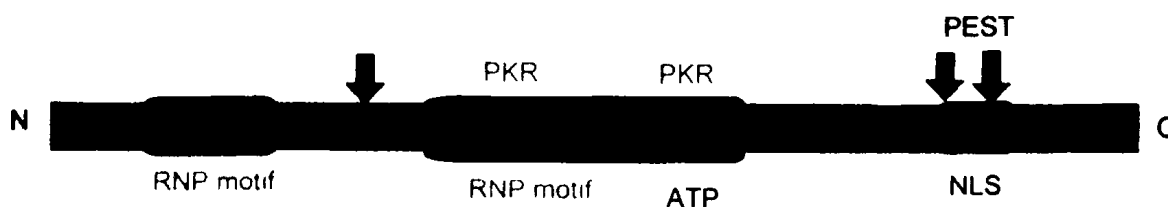


Σχήμα 6: Η πρωτεΐνη Ro52KD.

- Η πρωτεΐνη La48KD.

Ακόμη μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από αντισώματα ασθενών που πάσχουν από SS και SLE είναι η La48KD(138,155,156). Η πρωτεΐνη αυτή έχει 48 χιλιάδες ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει πολλές περιοχές με διαφορετική λειτουργία η κάθε μία. Στην πρωτοταγή της δομή η La περιέχει δυο περιοχές αναγνώρισης

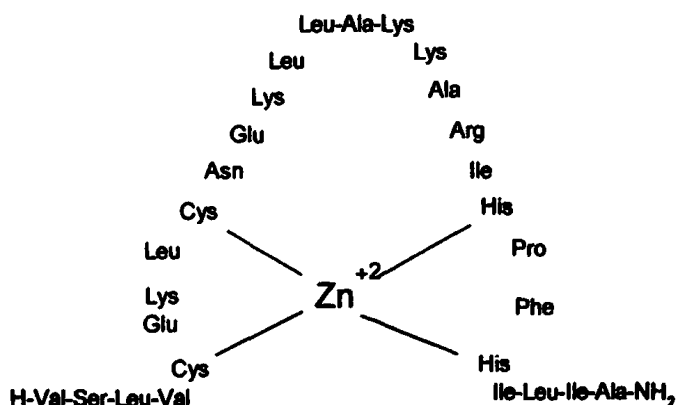
RNA(141), ένα μοτίβο δέσμευσης ATP(157), τρεις περιοχές PEST(περιοχές πλούσιες σε αμινοξέα προλίνη, γλουταμινικό, σερίνη και θρεονίνη, που είναι απαραίτητα στην πρωτεολυτική πέψη)(158), δυο περιοχές ομόλογες με την πρωτεϊνική κινάση PKR(159) και ένα σήμα πυρηνικής εντόπισης(nuclear localisation signal:NLS)(160). Η La πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη σε υψηλό βαθμό κυρίως στο καρβοξυτελικό τμήμα της(151,161). Η πρωτεΐνη έχει ανιχνευτεί σε κύτταρα πιθήκου, χοίρου, σκύλου, κουνελιού, αρουραίου και ποντικιού(144,162-164). Η La πρωτεΐνη θεωρείται απαραίτητη για τη σωστή και αποτελεσματική έναρξη καθώς και για τον τερματισμό της μεταγραφής του RNA από την RNA πολυμεράση III(165-167). Μια άλλη λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής σχετίζεται με την ικανότητα της να διαχωρίζει υβρίδια DNA-RNA καθώς και διπλής έλικας εξαρτώμενα από το ATP(168-170). Παρόλα αυτά η λειτουργία και η συμμετοχή της στο Ro/La RNP σύμπλοκο παραμένει άγνωστη.



Σχήμα 7: Η πρωτεΐνη La .

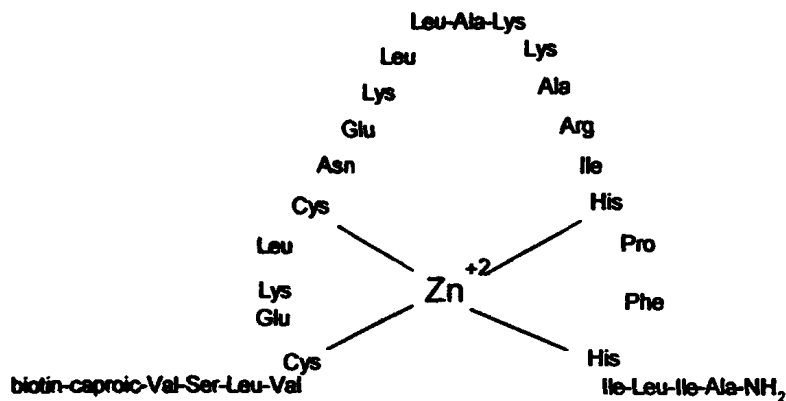
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της εργασίας αυτής αναφέρεται στο σχεδιασμό και τη σύνθεση μοντέλων του δακτύλου ψευδαργύρου του αυτοαντιγόνου Ro60KD καθώς και στη διερεύνηση των συνθηκών σχηματισμού συμπλόκων Zn με αυτά τα μοντέλα. Μελετήθηκαν επίσης οι αντιγονικές ιδιότητες των μοντέλων αυτών σε σχέση με αντι-Ro θετικούς ορούς ασθενών με SLE και SS, καθώς και πως αυτές μεταβάλλονται με την επίδραση ιόντων Zn^{+2} . Επειδή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Ro60KD και της πρωτεΐνης Ro52KD στο σύμπλοκο RNP γίνεται μέσω του δακτύλου ψευδαργύρου της Ro60KD μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα αναγνώρισης των μοντέλων δακτύλου ψευδαργύρου από την ανασυνδυασμένη Ro52KD και η επίδραση των ιόντων Zn^{+2} σ' αυτή την αναγνώριση. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε και μελετήθηκε η αλληλουχία 301-327 της Ro60KD, η οποία εμπεριέχει τον δάκτυλο ψευδαργύρου της Ro60KD, καθώς και το ανάλογο στο οποίο στο άμινο τελικό άκρο του έχει προσδεθεί ομοιοπολικά το μόριο της βιοτίνης και του 6-αμινο-εξανοϊκού οξέος ώστε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης στα πειράματα αναγνώρισης των SLE και ορών SS (ELISA).



Σχήμα 8: Αλληλουχία του δακτύλου ψευδαργύρου 301-327(zif-1) της πρωτεΐνης Ro60KD.



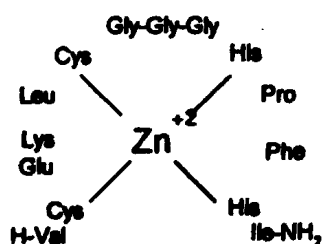


Σχήμα 9: Αλληλουχία του δακτύλου ψευδαργύρου 301-327 με βιοτίνη και 6-αμινοεξανοϊκό οξύ στο άμινο-άκρο του(zif-1b).

Με σκοπό να διερευνήσουμε τη σημασία της αλληλουχίας 310-320 που παρεμβάλλεται μεταξύ της Ro52KD και του δακτύλου ψευδαργύρου της Ro60KD στην αναγνώριση των αντι-θετικών ορών SS παρασκευάστηκε ένα μοντέλο στο οποίο μεταξύ της Cys⁹ και His¹⁹ έχουν εισαχθεί τρία αμινοξέα γλυκίνης. Η επιλογή αυτή έγινε με τη βοήθεια κρυσταλλογραφικών δεδομένων δακτύλων ψευδαργύρου απ'όπου προκύπτει ότι η ελάχιστη απαιτούμενη απόσταση μεταξύ Cys και His σε δακτύλους ψευδαργύρου με γενικό τύπο:

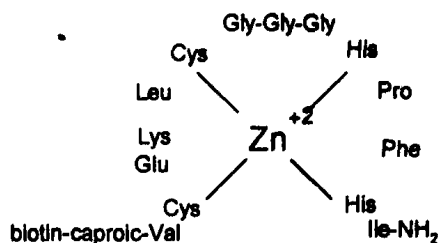


είναι περίπου 7Å, προϋπόθεση που ικανοποιείται με την παρεμβολή των τριών γλυκινών.



Σχήμα 10: Μοντέλο δακτύλου ψευδαργύρου της πρωτεΐνης Ro60KD, όπου η αλληλουχία 310-320 έχει αντικατασταθεί από 3Gly(zif-2).





Σχήμα 11: Μοντέλο δακτύλου ψευδαργύρου της πρωτεΐνης Ro60KD, όπου η αλληλουχία 310-320 έχει αντικατασταθεί από 3Gly και στο αμινο-τελικό άκρο έχει συζευχθεί βιοτίνη και 6-αμινο-εξανοϊκό οξύ(zif-2b).

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει τα εξής:

- Σχεδιασμό, σύνθεση, καθαρισμό και ταυτοποίηση των μοντέλων δακτύλου ψευδαργύρου της Ro60KD.
- Πειράματα $^1\text{H-NMR}$ των μοντέλων δακτύλου ψευδαργύρου.
- Πειράματα παρακολούθησης σχηματισμού των συμπλόκων του δακτύλου ψευδαργύρου, όπου τα ιόντα Zn^{+2} βρίσκονται σε διάφορες αναλογίες, με φασματοσκοπία μάζας (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy:ESI-MS).
- Πειράματα αναγνώρισης των βιοτυνλιωμένων μοντέλων δακτύλου ψευδαργύρου από ορούς ασθενών με σύνδρομο SS παρουσία και απουσία ιόντων Zn^{+2} .
- Πειράματα αναγνώρισης των βιοτυνλιωμένων αναλόγων από την r.Ro52KD, παρουσία ή απουσία Zn^{+2} .

Μελλοντικός στόχος αυτής της έρευνας είναι να δοκιμαστεί η δυνατότητα ανοσοκαταστολής σε ζώα που έχουν προηγουμένως ανοσοποιηθεί με r.Ro52KD και τα μοντέλα zif της Ro60KD. Η προσέγγιση αυτή θα προσφέρει μια εναλλακτική αντιμετώπιση στην ανοσορύθμιση και θα μπορούσε να οδηγήσει στο μέλλον σε νέες θεραπευτικές εφαρμογές.



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



II. ΑΡΧΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

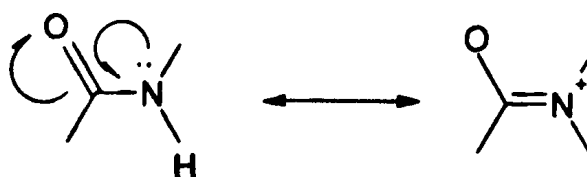
-Γενικά

Τα πεπτίδια είναι μόρια με μοριακό βάρος μεταξύ του μοριακού βάρους ενός αμινοξέος και μιας πρωτεΐνης. Στη φύση τα πεπτίδια είναι ευρύτατα διαδεδομένα κυρίως με τη μορφή πρωτεϊνών καλύπτοντας πλήθος δομικών και λειτουργικών αναγκών των έμβιων όντων. Τα πεπτίδια μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά και λαμβάνουν διάφορες διαμορφώσεις λόγω του γεγονότος ότι είναι ιδιαίτερα ευκίνητα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ταυτόχρονα μειονέκτημα και πλεονέκτημα.

-Μειονέκτημα γιατί η πληθώρα των διαμορφώσεων που μπορεί να λάβει ένα πεπτίδιο καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη συσχέτιση 'Βιολογικής Δράσης και Διαμόρφωσης' με αποτέλεσμα ο σχεδιασμός και η σύνθεση δραστικών αναλόγων να αποτελεί μια ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία.

-Πλεονέκτημα διότι η μετάπτωση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη επιτρέπει στο μόριο να προσλάβει και την ενεργά βιολογική διαμόρφωση προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα.

Ο ρόλος των πεπτιδίων στη λειτουργία της ζωτικής διαδικασίας κάθε οργανισμού αποτέλεσε την αιτία για την ανάπτυξη της πεπτιδικής σύνθεσης. Στους ζωικούς οργανισμούς η σύνθεση των πεπτιδίων ακολουθεί μια βήμα προς βήμα διαδικασία κατά την οποία η αμινομάδα ενός αμινοξέος συνδέεται με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου, σχηματίζοντας έτσι ένα διπεπτίδιο. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την απομάκρυνση ενός μορίου νερού και συνεχίζεται μέχρι να σχηματιστεί το συγκεκριμένο κάθε φορά πεπτίδιο. Η σύνδεση των αμινοξέων μεταξύ τους για το σχηματισμό πεπτιδίων ή πρωτεϊνών γίνεται μέσω αμιδικού ή πεπτιδικού δεσμού. Ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας και του αμιδικού αζώτου έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού που αποδίδεται στο συντονισμό:



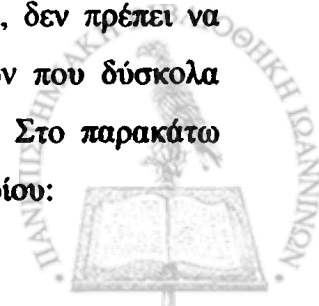
1. Ο πεπτιδικός δεσμός C-N είναι αισθητά μικρότερος ($1,32^{\circ}\text{A}$) απ'ότι ένας αντίστοιχος δεσμός ($1,47^{\circ}\text{A}$). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει τις ιδιότητες του διπλού δεσμού και στον ίδιο περίπου βαθμό ιδιότητες απλού δεσμού.

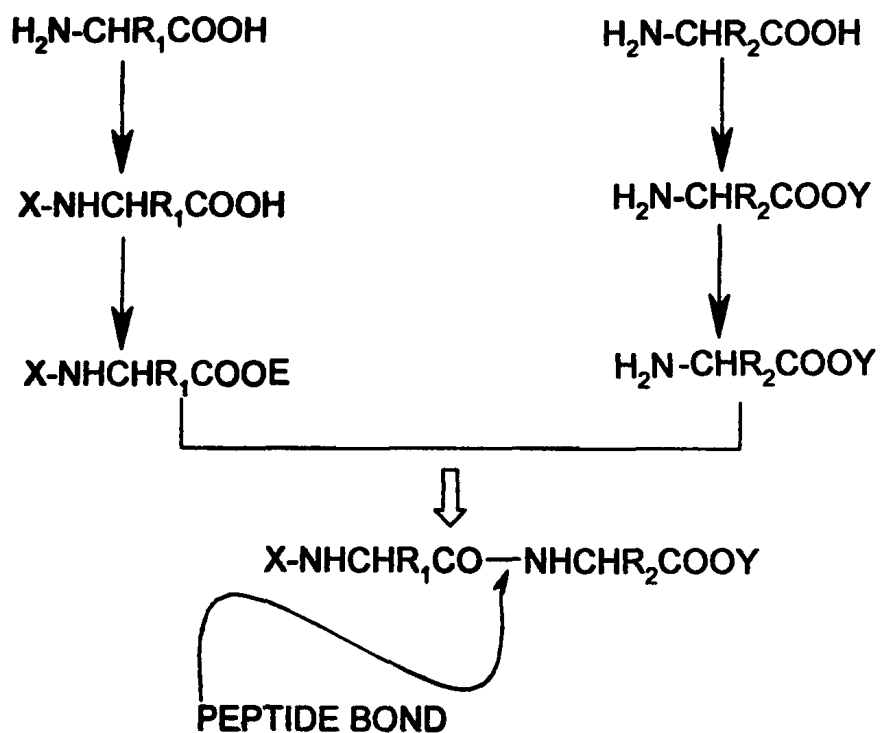
2. Στο υβρίδιο της μεσομέρειας τα άτομα του άνθρακα, του αζώτου, του υδρογόνου και του οξυγόνου βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και η στερεοχημική διάταξη του δεσμού μπορεί να είναι cis ή trans.

3. Η trans-διάταξη ευνοείται θερμοδυναμικά κατά 2kcal/mol . Η μικρότερη σταθεροποίηση της cis-διάταξης οφείλεται κυρίως σε απώσεις μεταξύ των παράπλευρων ομάδων (R) των 2C^{α} ανθρακοατόμων.

4. Cis-διατάξεις συναντάμε σε δεσμούς Xaa-Pro, στις δικετοπιπεραζίνες και στα N-αλκυλιωμένα μη φυσικά αμινοξέα.

Η σύνθεση ακόμη και ενός διπεπτιδίου αποδεικνύεται πως είναι μια επίπονη διαδικασία αφού πρέπει να ληφθούν υπόψιν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού απαιτεί την προστασία της α-αμινομάδας του ενός αμινοξέος και της α-καρβοξυλομάδας του άλλου ώστε να μη συμμετέχουν στην αντίδραση σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού. Ένα άλλο πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπισθεί κατά τη διαδικασία σύνθεσης πεπτιδίων είναι η κατάλληλη προστασία των πλευρικών δραστικών ομάδων ώστε να μην λάβουν μέρος σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό παραπροϊόντων. Επίσης η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων σε ενδιάμεσα στάδια ή στο τέλος της συνθετικής διαδικασίας θα πρέπει να είναι εκλεκτική και χωρίς δευτερογενείς επιδράσεις στον πεπτιδικό δεσμό. Γι'αυτό απαιτούνται αμινοπροστατευτικές και καρβοξυπροστατευτικές ομάδες σταθερές κατά τη διάρκεια της ανοικοδόμησης της πεπτιδικής αλυσίδας. Τις προστατευτικές ομάδες που παραμένουν μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση τις χαρακτηρίζουμε σαν μόνιμες ενώ εκείνες που απομακρύνονται στα ενδιάμεσα στάδια της σύνθεσης σαν παροδικές. Η επιλογή των προστατευτικών ομάδων και ο συνδυασμός τους εξαρτάται από τη σύνθεση που θα ακολουθήσουμε. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η επιλογή των μεθόδων που θα εφαρμοστούν για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Δεδομένου ότι τα αμινοξέα περιέχουν συνήθως ένα ασύμμετρο α-άτομο άνθρακα, δεν πρέπει να προκαλείται ρακεμίωση η οποία οδηγεί στη δημιουργία προϊόντων που δύσκολα μπορούν να διαχωριστούν με τις συνήθεις μεθόδους καθαρισμού. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία σύνθεσης ενός διπεπτιδίου:

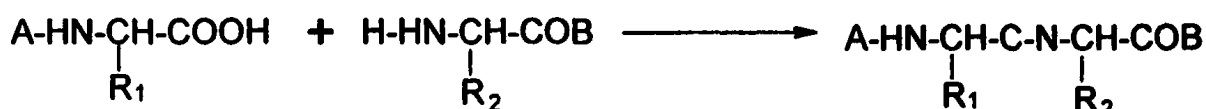




Σχήμα 12: Γενική πορεία σχηματισμού ενός διπεπτιδίου, όπου X:η προστατευτική ομάδα της α-NH₂, Y:η προστατευτική ομάδα του α-COOH και E:η ομάδα ενεργοποίησης του υπό σύζευξη καρβοξυλίου.

- Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.

Όταν η α-αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά με την α-καρβοξυλομάδα του γειτονικού αμινοξέος έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δεσμού, που ονομάζεται πεπτιδικός (ή αμιδικός). Η αντίδραση αυτή συνοδεύεται με απώλεια ενός μορίου νερού και οδηγεί στον σχηματισμό διπεπτιδίου.



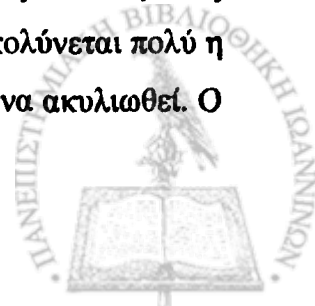
Η ισορροπία της αντίδρασης αυτής βρίσκεται στην πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης. Συνεπώς η σύνθεση των πεπτιδικών δεσμών απαιτεί κατανάλωση ελεύθερης ενέργειας, ενώ η υδρόλυση απελευθερώνει ενέργεια.

-Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού.

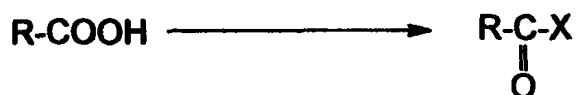
Οι κυριότερες μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού μπορούν να συνοψιστούν στις παρακάτω:

- Μέθοδος των χλωριδίων
- Μέθοδος των αζιδίων
- Μέθοδος των ανυδριτών
- Μέθοδος των ενεργών εστέρων
- Σχηματισμός δεσμού που καταλύεται από ένζυμα
- Μη συμβατικές μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού
- Αντιδραστήρια σύζευξης

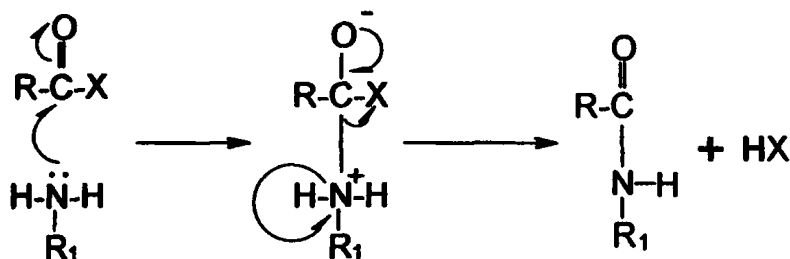
Με όμοιο τρόπο είναι δυνατόν να δημιουργηθούν πεπτίδια με μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων. Για να μετατραπούν τα καρβοξυλικά οξέα σε ακυλιωτικά μέσα πρέπει οι καρβοξυλικές ομάδες τους να αντικατασταθούν από έναν υποκαταστάτη (X) δέκτη ηλεκτρονίων ώστε να αυξηθεί η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας και επομένως ο ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας του ατόμου του άνθρακα. Έτσι διευκολύνεται πολύ η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να ακυλιωθεί. Ο σχηματισμός ενός διπεπτιδίου ακολουθεί τη γενική πορεία.



Ενεργοποίηση :



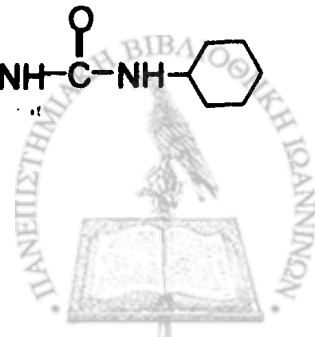
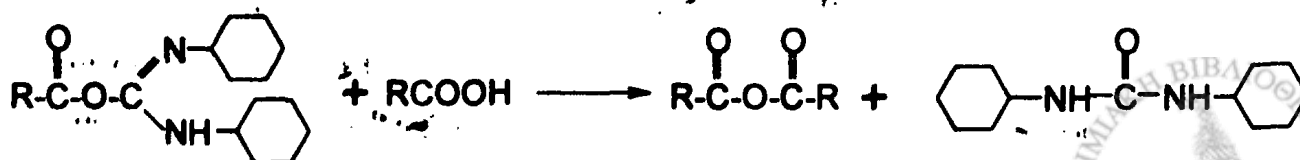
Σύζευξη :

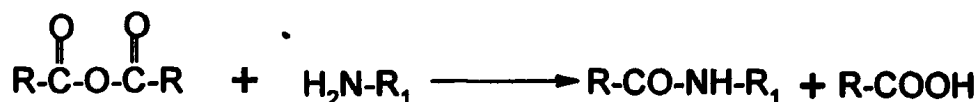


Σχήμα 13: Διαδικασία σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού.

-Αντιδραστήρια σύζευξης.

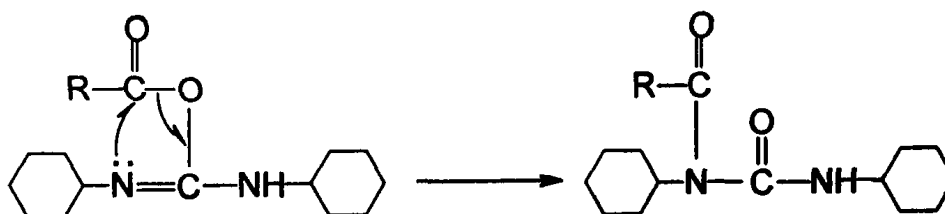
Ιδιαίτερη σημασία για την πεπτιδική σύνθεση αποτέλεσε η εισαγωγή των αντιδραστηρίων σύζευξης, ιδιαίτερα του δικυκλοεξυλο-καρβοδιϊμιδίου(DCC) (171,172). Το κύριο χαρακτηριστικό των αντιδραστηρίων σύζευξης είναι ότι μπορούν να προστεθούν στο μίγμα του καρβοξυλο-συστατικού και του αμινο-συστατικού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ενεργοποίηση και η σύζευξη να προχωρούν ταυτόχρονα. Με την προσθήκη DCC αντιδρούν τόσο οι αμίνες όσο και τα καρβοξυλικά οξέα, με τη διαφορά ότι αμίνες αντιδρούν πολύ αργά σε σχέση με τα οξέα τα οποία που αντιδρούν πολύ γρήγορα. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός που οδηγεί σε σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού προχωρεί μέσω συμμετρικών ανυδριτών που παράγονται κατά την προσβολή ενός μη αντιδράσαντος ακόμη μορίου του καρβοξυλο-συστατικού επί του ενδιάμεσου παραγώγου της Ο-ακυλο-ισοουρίας.





Σχήμα14: Διαδικασία σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού μέσω συμμετρικών ανυδριτών

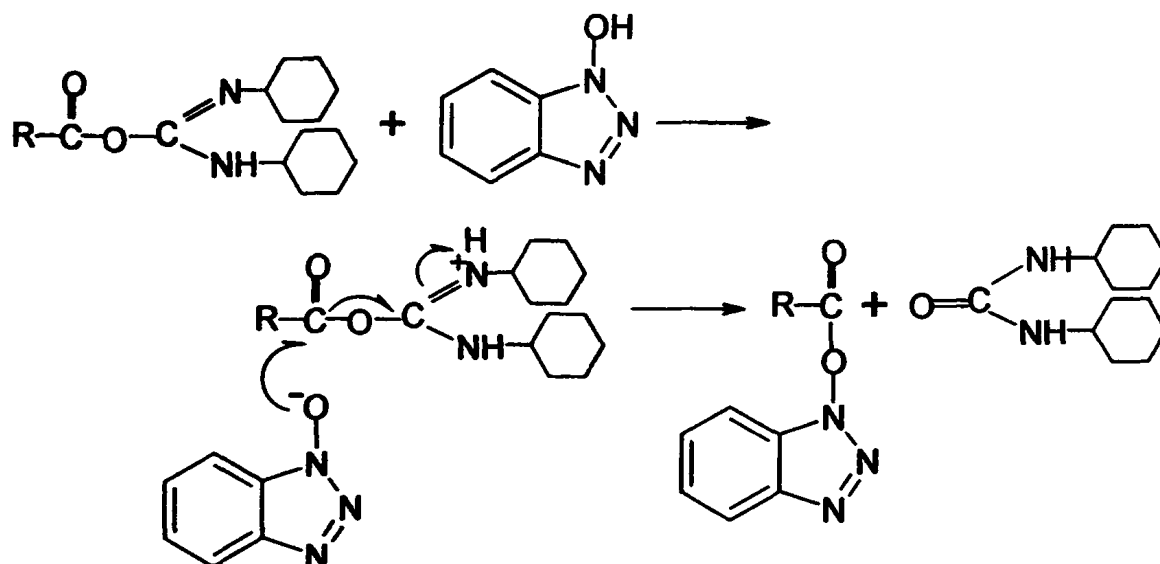
Η εξαιρετικά γρήγορη δημιουργία των συμμετρικών ανυδριτών μπορεί να εξηγηθεί με την υπόθεση μιας σχεδόν ενδομοριακής προσβολής του καρβοξυλικού ανιόντος επί του ενεργού καρβonyλίου εντός του ζεύγους των ιόντων των δύο συστατικών. Το παραπροϊόν N,N'-δικυκλοεξυλουρία(DCU) απομακρύνεται εύκολα με διήθηση(173). Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι το πυρηνόφιλο κέντρο στο παράγωγο της O-ακυλο-ισοουρίας ανταγωνίζεται με το άμινο-συστατικό για το ακυλο-αμινοξύ και ο ανταγωνισμός αυτός οδηγεί στο σχηματισμό μη δραστικών παραπροϊόντων, παραγώγων της N-ακυλοουρίας.



Σχήμα15: Σχηματισμός μη δραστικών παραπροϊόντων, παραγώγων της N-ακυλοουρίας.

Η ρακεμίωση και ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας ελαττώθηκαν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυ-βενζοτριαζόλιο(HOBT) (174,175). Η ουσία αυτή προσβάλλει το ενεργό ενδιάμεσο με αποτέλεσμα το σχηματισμό O-ακυλο-1-υδροξυ-βενζοτριαζόλιου(176), που είναι ισχυρό ακυλιωτικό μέσο:

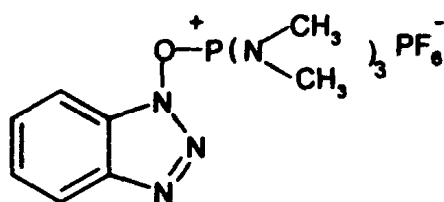




Σχήμα 16: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού παρουσία του ακυλιωτικού μέσου HOBt.

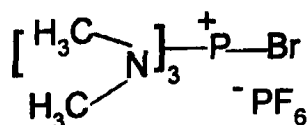
Το HOBt ως ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα και έτσι συμβάλλει στην διατήρηση της οπτικής καθαρότητας. Επυλέον η χρησιμοποίησή του ως βοηθητικού πυρηνόφιλου ελαττώνει το χρόνο ζωής του πολύ ενεργοποιημένου ενδιάμεσου παραγώγου της O-ακυλοισουρίας και επομένως την ένταση της O→N ακυλομετατόπισης που οδηγεί σε σχηματισμό των παραγώγων της N-ακυλοισουρίας. Το HOBt αναγεννάται κατά την διάρκεια της ακυλίωσης με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως στη σύζευξη το αντιδραστήριο BOP(177-179), το οποίο ονομάζεται εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλ-τρικ[διμεθυλοαμινο]φωσφονίου :

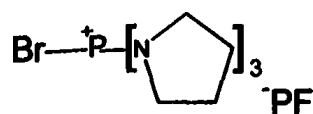


Άλλα αντιδραστήρια σύζευξης τα οποία χρησιμοποιούνται κατά την σύζευξη μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

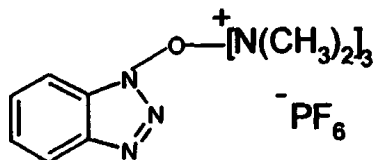
RyBOP : [βενζοτριαζολ-οξυ-τρις(πυρολιδινο)-φωσφονιο-εξαφθοροφωσφορικό] (180-182).



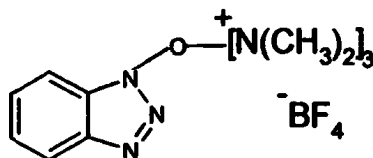
Brp : [βρωμο-τρις(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό].



RyBrp : [βρωμο-τρις(πυρολιδινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό] (183,184).



HBTU : [βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό] (185-188).



TBTU : [βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό] (185-188).

Κατά την επιλογή ενός αντιδραστηρίου σύζευξης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- Να είναι αδρανές ως προς το αμινο-συστατικό.
- Να μην δημιουργεί δραστικό ενδιάμεσο παράγωγο, που να περιέχει ένα πυρηνόφιλο κέντρο.



- Να μην προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση, η οποία θα οδηγούσε σε παράπλευρες αντιδράσεις και επομένως σε παραπροϊόντα.

-Σύνθεση σε στερεή φάση

Σύμφωνα με αυτήν, όλες οι αντιδράσεις της πεπτιδικής σύνθεσης λαμβάνουν χώρα πάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, το οποίο βρίσκεται συνήθως συνδεδεμένο στο καρβόξυ-τελικό αμινοξύ του πεπτιδίου. Η αρχική ιδέα αφορούσε ένα σύστημα δύο φάσεων, όπου ένα διαλυτό παράγωγο αμινοξέος αντιδρούσε με την επεκτεινόμενη πεπτιδική αλυσίδα, η οποία ήταν συνδεδεμένη σε ένα αδιάλυτο φορέα(στερεή φάση) και αποχωρίζονταν στο τέλος με διήθηση. Έτσι προέκυψε ο χαρακτηρισμός πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης (SPPS:Solid Phase Peptide Synthesis). Οι προϋποθέσεις για την καταλληλότητα του στερεού υποστρώματος είναι η δυνατότητα του να παραμένει αδιάλυτο κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, η φυσική και χημική του σταθερότητα και τέλος το σημαντικότερο όλων να δημιουργεί τις απαιτούμενες συνθήκες ώστε η εξέλιξη των αντιδράσεων να είναι ταχεία και ποσοτική. Όλες οι ρητίνες που αποτελούνται από πολυστυρόλιο πληρούν τις προϋποθέσεις αυτές.

-Το αδιάλυτο πολυμερές

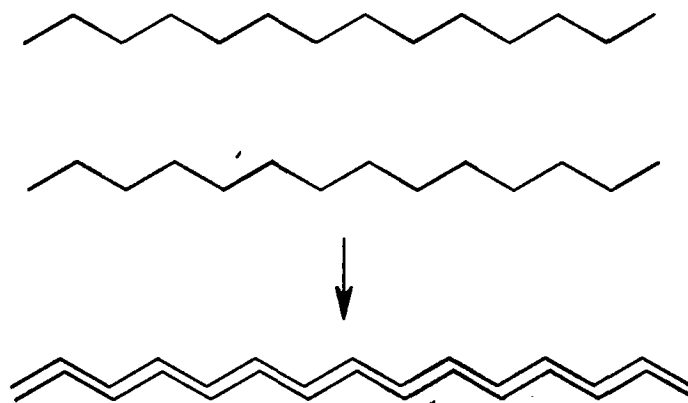
Η πρώτη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση ήταν η ρητίνη του Merrifield, η οποία είναι ένα χλωρομεθυλο-παράγωγο ενός συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου. Η ρητίνη αυτή, όπως και όλες χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση, είναι αδιάλυτες, χημικά σταθερές και σταθερές στις φυσικές διεργασίες ανάδευσης και διήθησης. Επιπλέον μπορούν με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών να διογκωθούν έτσι ώστε να δημιουργηθεί μεγάλη επιφάνεια η οποία διευκολύνει την πραγματοποίηση αντιδράσεων σαν να γίνονται αυτές σε διάλυμα.

-Διαλύτες

Σημαντική είναι επίσης η σωστή επιλογή του διαλύτη ή μίγματος διαλυτών για μια επιτυχή σύνθεση σε στερεή φάση. Η σωστή επιλογή του διαλύτη επηρεάζει σε



μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της σύζευξης. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στη πεπτιδική σύνθεση είναι το 1,1-δίχλωρο-αιθάνιο, το διμέθυλοφορμαμίδιο(DMF), το δίχλωρο-μεθάνιο(DCM), το διμεθυλοσουλφίδιο(DMS) και άλλοι. Μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες του διαλύτη είναι, εκτός από το να διαλύει τα αντιδρώντα, να διογκώνει τη ρητίνη έτσι ώστε να βοηθάει στην έκθεση της N-τελικής αμινομάδας στο ακυλιωτικό αντιδραστήριο, να αυξάνει την ταχύτητα των αντιδράσεων ενεργοποίησης και ακυλίωσης και να μην διευκολύνει τη ρακεμίωση.

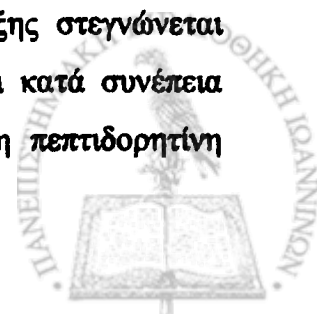


Σχήμα 17: Παράσταση διόγκωσης και συρρίκνωσης ρητίνης με εφαρμογή κατάλληλου διαλύτη.

Πολικοί διαλύτες ευνοούν μεν τη ρακεμίωση, λόγω σταθεροποίησης των φορτισμένων ενδιάμεσων σωματιδίων που σχηματίζονται, επιταχύνουν δε τις αντιδράσεις. Ο διαλύτης που αποτέλεσε ένα συνδυασμό όλων αυτών των παραγόντων ήταν το διμέθυλοφορμαμίδιο(DMF).

-Προετοιμασία της πεπτιδορητίνης

Η πεπτιδορητίνη πριν την προσθήκη των αντιδραστηρίων σύζευξης στεγνώνεται καλά ώστε να μην προκαλείται αραίωση των αντιδραστηρίων και κατά συνέπεια καθυστέρηση στο χρόνο σύζευξης. Μετά από κάθε αντίδραση η πεπτιδορητίνη



εκκλίνεται και διηθείται για να απομακρυνθούν τα παραπροϊόντα, η περίσσεια αντιδρώντων και τα ανεπιθύμητα προϊόντα.

-Σύζευξη αμινοξέος πολυμερούς

Η σύνδεση του αμινοξέος πάνω στο πολυμερές υπόστρωμα γίνεται με αντίδραση της καρβοξυλομάδας του είτε απ'ευθείας με τη χαρακτηριστική ομάδα του πολυμερούς είτε με μια ενδιάμεση ομάδα που έχει το ρόλο συνδέσμου(linker), μεταξύ του αμινοξέος και του πολυμερούς. Η ομάδα αυτή μπορεί να βρεθεί απ'ευθείας συνδεδεμένη με το πολυμερές ή να αντιδράσει πρώτα με το αμινοξύ και στη συνέχεια με την χαρακτηριστική ομάδα του πολυμερούς. Άρα συμπεραίνει κανείς πως το είδος αυτής της ομάδας επηρεάζει το είδος της σύζευξης μεταξύ αμινοξέος και πολυμερούς. Η κλειοψηφία των πολυμερών που χρησιμοποιούνται στην SPPS είναι είτε πολυμερείς αλκοόλες είτε πολυμερή αλογονίδια. Στη σύνθεση σε στερεή φάση, όπως άλλωστε συμβαίνει και στην υγρή φάση, η δέσμευση του πεπτιδίου πάνω στο πολυμερές γίνεται από το καρβοξυ-τελικό αμινοξύ και η επεκτασή του από το αμινο-τελικό άκρο του. Η πορεία αυτή επιτρέπει τη χρήση πληθώρας αντιδράσεων πάνω στο δεσμευμένο πεπτίδιο, με ελάχιστη πιθανότητα ρακεμίσωσης ή παράπλευρων αντιδράσεων.

-Απόσπαση του πεπτιδίου από το πολυμερές υπόστρωμα.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη πολυμερές(ρητίνη) είτε ως ελεύθερο είτε ως προστατευμένο ανάλογα με τις συνθήκες αποκοπής και το είδος της ρητίνης. Για πολλές ρητίνες, όπως και για την MBHA(4-μεθυλο-βενζυδρυλαμίνη), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με άνυδρο, υγρό HF(189). Το HF(σ.ζ.=19°C) είναι εξαιρετικά τοξικό, οξειδωτικό και καταστρέφει το γυαλί. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή από teflon, η οποία τοποθετείται σε απαγωγό. Παράλληλα με την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη απομακρύνονται και οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη προσθέτουμε ουσίες, που καλούνται παγίδες (scavengers), διότι λειτουργούν ως παγιδευτές κατιόντων, δεσμεύοντας τις προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων μετά την αποκοπή τους.

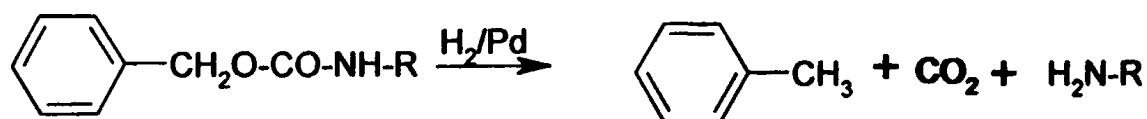


Συνήθως χρησιμοποιείται η φαινόλη και η ανισόλη. Λόγω των αμινοξέων Cys, Met, Trp, τα οποία ενδέχεται να οξειδωθούν, προσθέτουμε διμέθυλο-σουλφίδιο(DMS) και p-κρεσόλη που είναι αναγωγικά(190). Στους -7 έως -10 °C κόβονται οι προστατευτικές ομάδες σχετικά αργά(περίπου μισή ώρα) και δεσμεύονται από τα scavengers. Εν συνεχεία στους 0°C αποκόπτεται το πεπτίδιο από τη ρητίνη καθώς και όσες προστατευτικές ομάδες δεν έχουν αποκοπεί. Μόλις αποκοπεί το πεπτίδιο από τη ρητίνη το HF απομακρύνεται με απόσταξη υπό κενό. Η πεπτιδορητίνη εκπλένεται με αιθέρα αρκετά καλά ώστε να απομακρυνθούν τα scavengers. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με CH_3COOH 2N. Το διάλυμα CH_3COOH 2N λυοφιλοποιείται και πιστοποιείται η υπαρχή του πεπτιδίου με TLC χρωματογραφία.

-Κύρια στάδια κατά την πεπτιδική σύνθεση

1. Προστασία της α-αμινομάδας

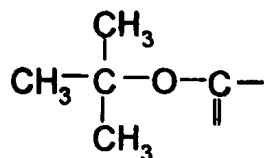
Η α-αμινομάδα των αμινοξέων παρουσιάζει τη γενική συμπεριφορά των αμινών. Η προστασία της απαιτείται ώστε να μειωθεί ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της και να αποκλείεται η συμμετοχή της σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης. Η αμινοπροστατευτική ομάδα πρέπει να απομακρύνεται σε συνθήκες οι οποίες αφήνουν άθικτες τις προστασίες της καρβοξυλομάδας και των παράπλευρων δραστικών ομάδων καθώς και τον πεπτιδικό δεσμό. Επομένως η προστασία της α-αμινομάδας είναι γενικά παροδική. Το 1932 εισήχθη στη βιβλιογραφία η βενζυλοξυ-καρβονυλομάδα(Z) για την προστασία της α- NH_2 , που συνέβαλε καθοριστικά στην ανάπτυξη της συνθετικής πεπτιδοχημείας. Η ομάδα αυτή υφίσταται ήπια ομολυτική διάσπαση με καταλυτική υδρογόνωση και η αντίδραση συμπληρώνεται με αυθόρμητη αποκαρβοξυλίωση:



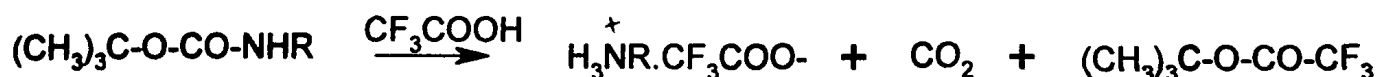
Σχήμα 18: Ομολυτική διάσπαση της Z-ομάδας με καταλυτική υδρογόνωση.



Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα για την προστασία της αμινομάδας, είναι η

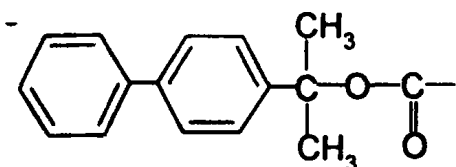


tert.-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc), η οποία απομακρύνεται εύκολα με τριφθοροξικό οξύ (TFA)

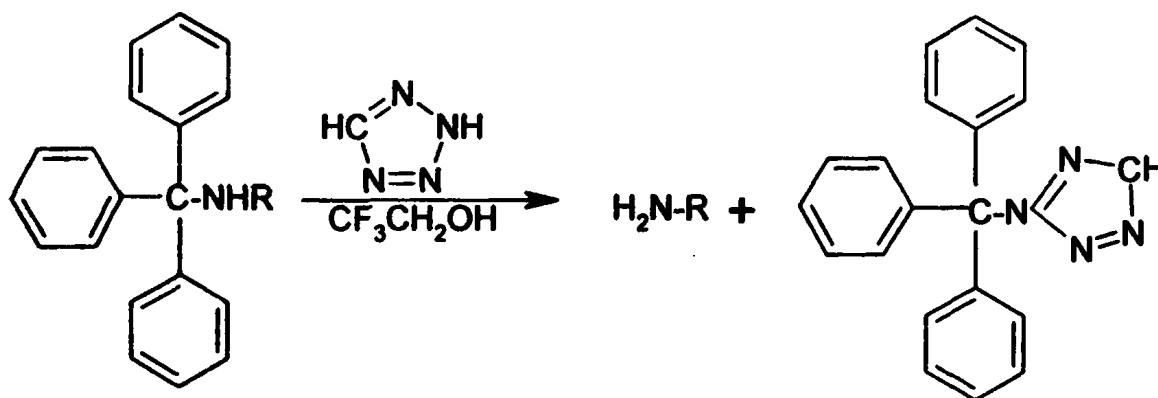


Σχήμα 19: Απομάκρυνση της Boc-ομάδας με 40% TFA

Άλλες ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της α-αμινομάδας είναι η διφαινυλο-ισοπροπυλοκαρβονυλομάδα (Bpsc)

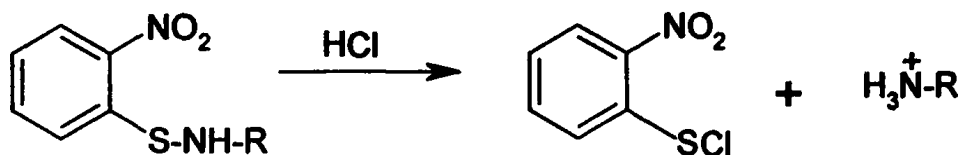


Η τριφαινυλο-μεθυλο (trityl, Trt) ομάδα, η οποία διασπάται με οξικό οξύ και επίσης με τετραζόλιο σε τριφθοροαιθανόλη



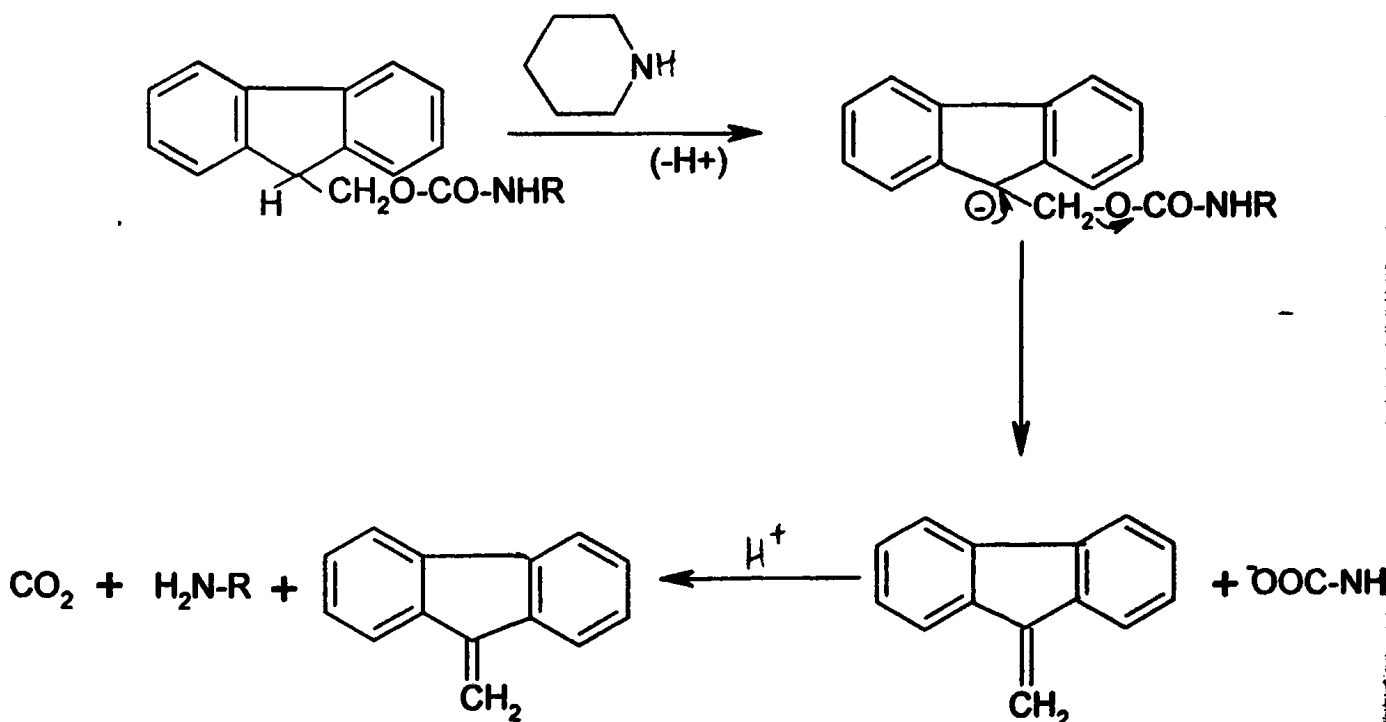
Σχήμα 20: Διάσπαση της Trt-ομάδας παρουσία τετραζόλιου σε τριφθοροαιθανόλη.

Η ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλομάδα(Nps) απομακρύνεται με αραιά διαλύματα υδροχλωρίου σε οργανικούς διαλύτες



Σχήμα 21: Απομάκρυνση της Nps-ομάδας με αραιό δ/μα HCl.

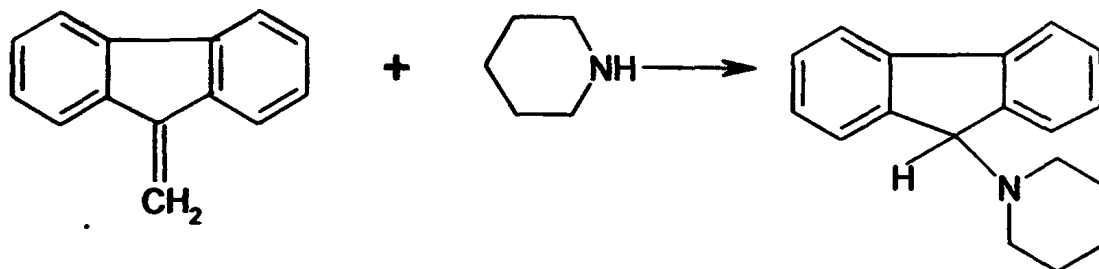
Τέλος ιδιαίτερα επιτυχής για την προστασία της αμινομάδας ήταν η χρησιμοποίηση της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα(Fmoc) που απομακρύνεται από την αμινομάδα με αφαίρεση πρωτονίου με δευτεροταγείς αμίνες. Δημιουργείται ένα καρβαμίδικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια χάνει CO_2 και παρέχει την ελεύθερη αμίνη.



Σχήμα 22: Απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας.



Η πιπεριδίνη είναι η συνιστώμενη βάση αν και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να ληφθούν καλύτερα αποτελέσματα με διαιθυλαμίνη. Το παραπροϊόν, διφαινυλοφουλβένιο, συνδυάζεται με τη δευτεροταγή αμίνη και δίνει μια σταθερή βάση:



(διφαινυλοφουλβένιο)

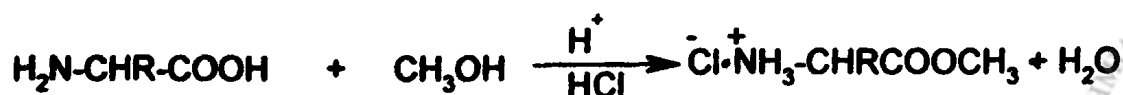
(πιπεριδίνη)

Σχήμα 23: Αντίδραση σχηματισμού σταθερής βάσης.

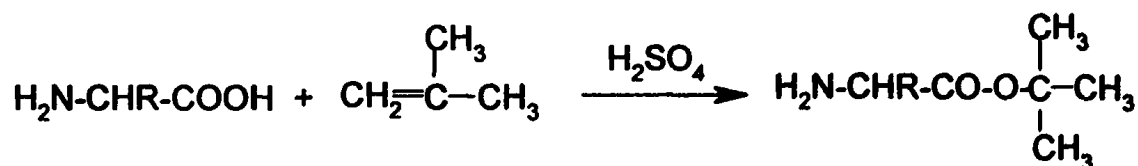
η οποία όμως συνήθως δεν παρεμβαίνει στην αντίδραση ή στην απομόνωση του προϊόντος.

2. Προστασία της καρβοξυλικής ομάδας

Η ανάγκη να προστατευτούν οι ελεύθερες καρβοξυλομάδες προκύπτει για δυο λόγους. Η παροδική προστασία του καρβοξυλίου του αμινο-συστατικού είναι αναγκαία στα στάδια της σύζευξης στα οποία το προϊόν θα χρησιμοποιηθεί σαν καρβοξυλο-συστατικό στην σύζευξη κλασμάτων που ακολουθεί. Ημιμόνιμη προστασία θα χρησιμοποιηθεί αν το καρβοξύλιο ανήκει στο C-τελικό άκρο του προς σύνθεση μορίου διότι η προστατευτική ομάδα απομακρύνεται μόνο στο στάδιο της τελικής αποπροστασίας. Ο συνήθης τρόπος προστασίας του καρβοξυλίου είναι η εστεροποίηση. Η χρήση μέθυλο- ή αιθυλο-ομάδας, είναι κατάλληλη για ημιμόνιμη προστασία, αν και η συνήθως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αποπροστασίας, η αλκαλική υδρόλυση παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα (ρακεμίσωση).

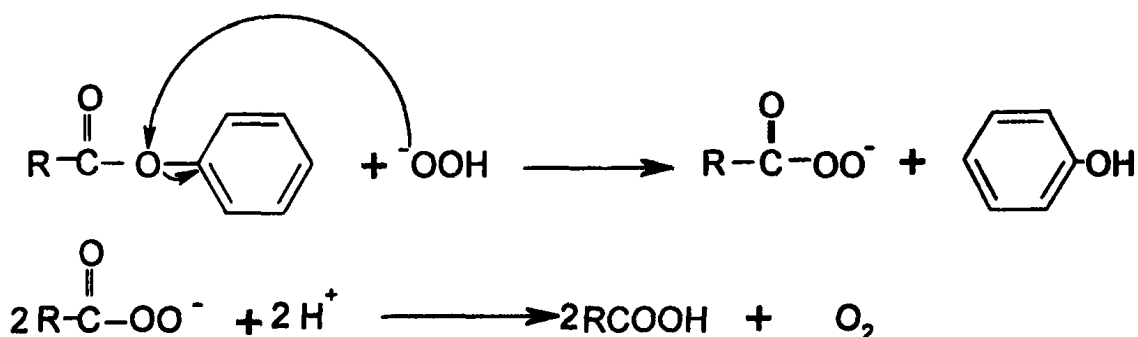


Η προσθήκη της καρβοξυλομάδας σε ισοβουτένιο, παρουσία ισχυρών οξέων, χρησιμοποιείται για την προστασία του καρβοξυλίου λόγω σχηματισμού tert.βουτυλεστέρων :



Σχήμα 24: Σχηματισμός tert.βουτυλεστέρων.

Λίγες ομάδες είναι γνωστές που απομακρύνονται από το προστατευμένο καρβοξύλιο σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες, όπως οι φαινυλεστέρες που διασπώνται με αλκαλικό υπεροξειδίο του υδρογόνου:



Σχήμα 25: Διάσπαση φαινυλεστέρων με αλκαλικό υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Οι φλουορενυλομεθυλο-εστέρες (Fm-εστέρες) διασπώνται με δευτεροταγείς αμίνες όπως η πιπεριδίνη.

3. Προστασία των παράπλευρων αμινομάδων.

Προκειμένου να εμποδιστεί η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας από παράπλευρες αμινομάδες είναι απαραίτητο να προστατευθούν οι ομάδες αυτές (λυσίνης και ορνιθίνης). Η προστατευτική ομάδα που θα χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, πρέπει να παραμένει στη θέση της κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και να

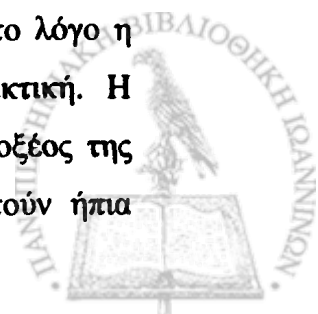
απομακρύνεται μόνο στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης. Προφανώς χρειάζεται μια αμινοπροστατευτική ομάδα διαφορετική από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική προστασία των α-αμινομάδων. Ένας κλασικός συνδυασμός που χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στη σύνθεση πεπτιδίων είναι η προστασία των αμινομάδων της παράπλευρης αλυσίδας με την βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) και των α-αμινομάδων με την βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z) και το αντίστροφο. Οι δυο προστατευτικές ομάδες διασπώνται με οξέα, το ένα με ήπιες και το άλλο με πιο δραστικές συνθήκες. Είναι δυνατόν να υπάρχει μικρή απώλεια της Z ομάδας από την παράπλευρη αλυσίδα, κατά την απομάκρυνση της Boc-ομάδας από την α-αμινομάδα, σε μικρό όμως ποσοστό. Μια λύση στο πρόβλημα αυτό είναι η αντικατάσταση της Z ομάδας από ομάδες λιγότερο ευαίσθητες στα οξέα αποσταθεροποιώντας το βενζυλικό κατιόν με υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια. Οι τροποποιημένες Z ομάδες απαιτούν πολύ ισχυρά οξέα όπως υδροφθόριο (HF) για την απομάκρυνση τους κατά την τελική αποπροστασία.

4. Προστασία άλλων δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων.

Τα αμινοξέα που δεν έχουν δραστική πλευρική ομάδα δεν χρειάζονται περαιτέρω προστασία προκειμένου να ενσωματωθούν στην πεπτιδική αλυσίδα. Εάν είναι C-τελικά αμινοξέα και έχουν $-COOH$ στην πλευρική τους ομάδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν διεστέρες, ενώ εάν είναι N-τελικά ή ενδιάμεσα απαιτείται διαφορετική προστασία του πλευρικού $-COOH$, ώστε να αποκλειστεί η συμμετοχή τους σε μη επιθυμητές αντιδράσεις.

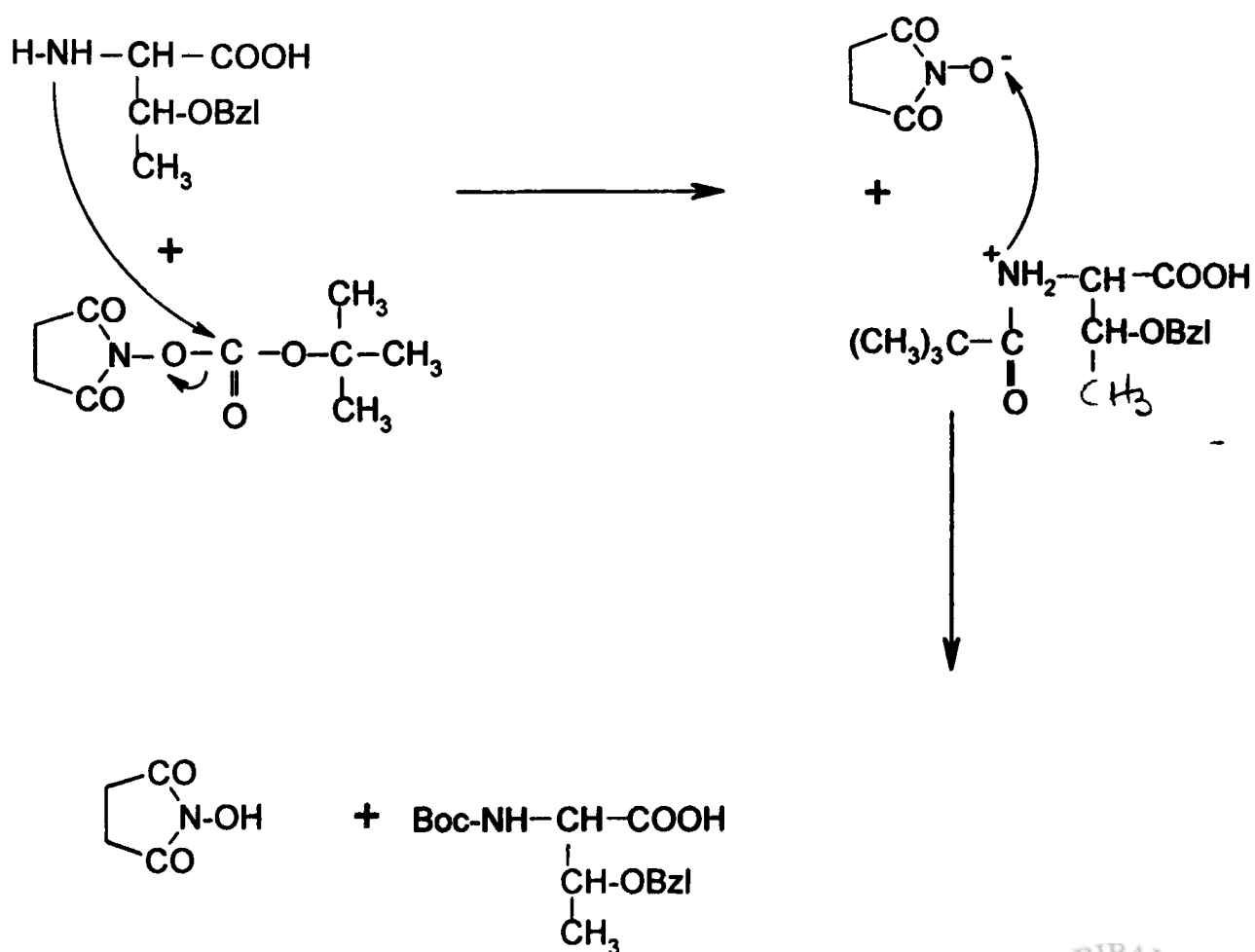
-Προστασία των υδρόξυ-αμινοξέων Ser, Thr και Tyr.

Τα υδρόξυ-αμινοξέα Ser, Thr, Tyr, απαιτούν προστασία του $-OH$. Το δευτεροταγές υδροξύλιο της θρεονίνης παραμένει ως επί το πλείστον ανεπηρέαστο κατά τη σύζευξη γιατί ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της υδροξυλομάδας είναι λιγότερο εμφανής από εκείνον της αμινομάδας και η δραστικότητα του ελαττώνεται περαιτέρω λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από την γειτονική μεθυλομάδα. Για αυτό το λόγο η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της θρεονίνης δεν είναι επιτακτική. Η κατάσταση είναι διαφορετική με την πρωτοταγή υδροξυλομάδα του αμινοξέος της σερίνης. Εδώ η προστασία πραγματικά ενδείκνυται εκτός αν εφαρμοστούν ήπια



ακυλιωτικά μέσα. Ακόμη και με μέτρια δραστικά αντιδραστήρια περίσσεια του ενεργοποιημένου καρβόξυλο-παραγώγου προκαλεί κατάλληλη Ο-ακυλίωση, η οποία αυξάνεται περαιτέρω από το ιμιδαζόλιο και τα παραγωγά του και από το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBT) που συχνά προστίθεται στο μίγμα σύζευξης.

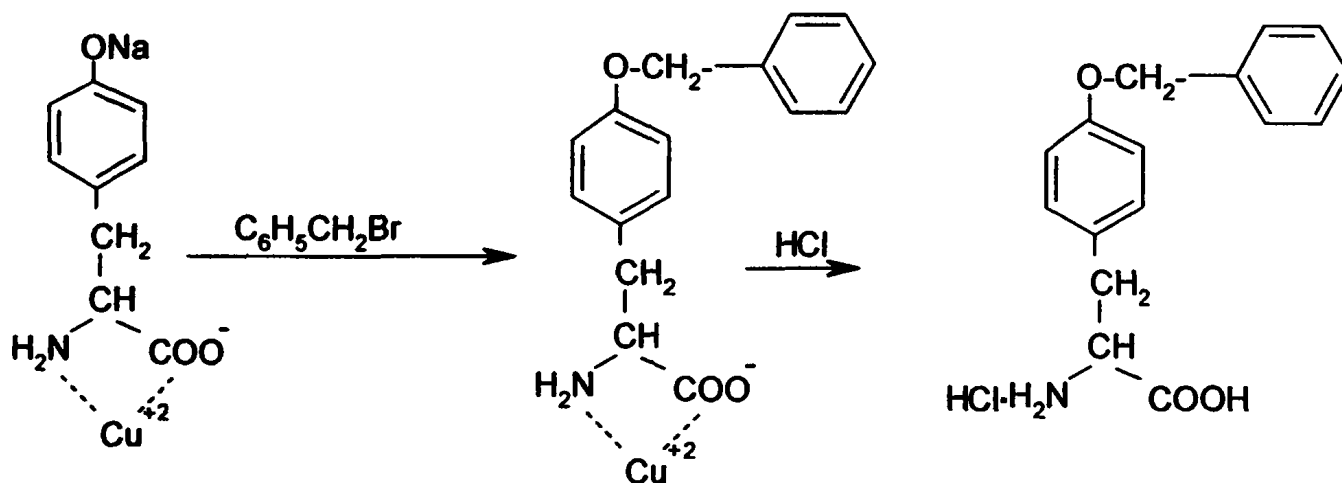
Η φαινολική υδροξυλομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης είναι σχετικά αδρανής και αφήνεται χωρίς προστασία ακόμη και σε μεγαλύτερες συνθέσεις. Το φαινολικό ιόν που δημιουργείται παρουσία βάσης είναι ένα καλό πυρηνόφιλο που μπορεί να συναγωνιστεί με την αμινομάδα για το ακυλιωτικό μέσο. Αν το τελευταίο χρησιμοποιείται σε περίσσεια τότε η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης είναι πραγματικά επιθυμητή. Για όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η Bzl χρησιμοποιείται για την προστασία του -OH.



Σχήμα 26: Προστασία της α-NH₂ της Thr-BzI με την Boc-ομάδα.

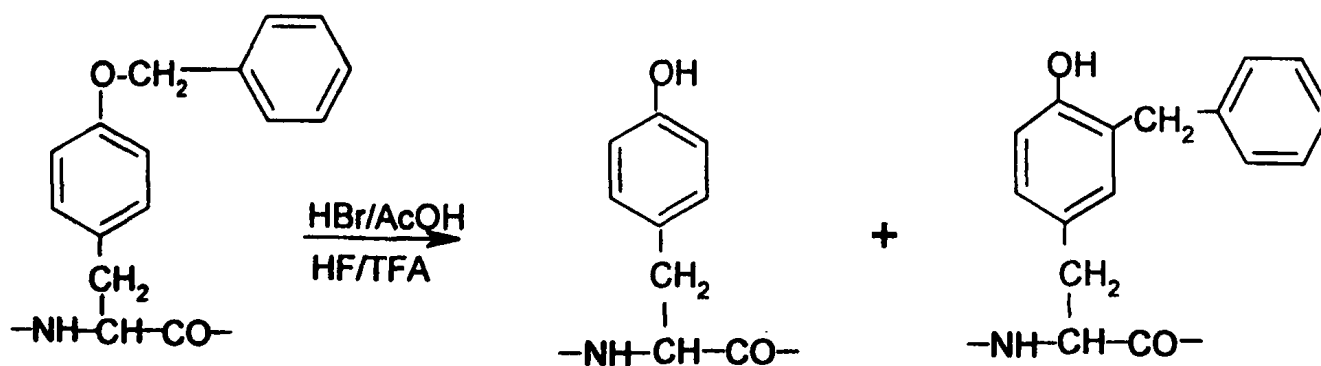


Το $-OH$ της τυροσίνης μπορεί ακόμη να προστατευτεί και μέσω σχηματισμού συμπλόκων χαλκού με την $\alpha-NH_2$ και το $\alpha-COOH$:



Σχήμα 27: Προστασία του $-OH$ της τυροσίνης μέσω συμπλόκων χαλκού.

Η απομάκρυνση της Bu^t -ομάδας γίνεται με όξινα διαλύματα ενώ της Bzl -ομάδας με καταλυτική υδρογόνωση ή $HBr/AcOH$. Απομάκρυνση της Bzl -ομάδας από την τυροσίνη με υδροφθόριο (HF) δίνει σαν παραπροϊόν την 3-βενζυλοτυροσίνη. Μείωση του παραπροϊόντος επιτυγχάνεται με προσθήκη φαινόλης, ανισόλης κ.λ.π.

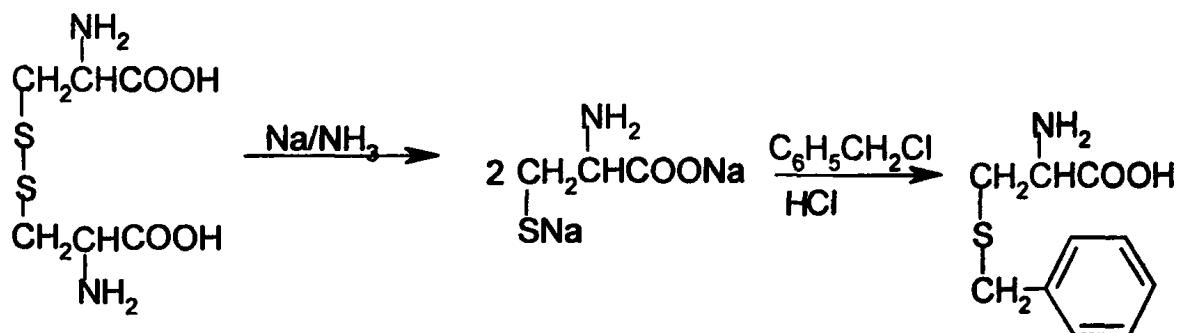


Σχήμα 28: Απομάκρυνση της Bzl -ομάδας με $HBr/AcOH$ ή HF/TFA .

Η αλκύλιωση του αρωματικού πυρήνα οφείλεται εν μέρει σε ενδομοριακή μετάθεση της βενζυλομάδας ή προκαλείται από τον τριφθοροξικό βενζυλεστέρα που δημιουργείται κατά την αντίδραση διάσπασης. Η σουλφυδρυλομάδα για τα αμινοξέα



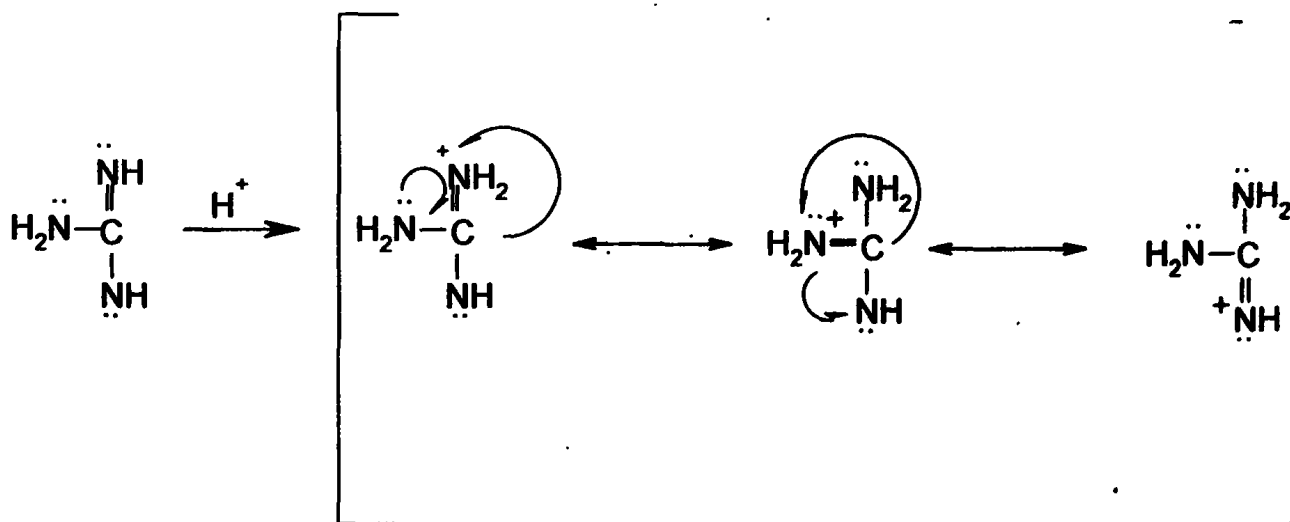
κυστεΐνη και μεθειονΐνη εΐναι απαραίτητο να προστατευτεί λόγω της εύκολης οξειδωσης της που οφείλεται στον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της. Το 1930 ο Du Vigneaud χρησιμοποίησε την H-Cys(Bzl)-OH στην σύνθεση των πεπτιδίων με αποτέλεσμα να αποφεύγονται αντιδράσεις ακυλίωσης ή οξειδωσης της σουλφυδρυλομάδας(SH), και τη δημιουργία δεσμού S-S ακόμη και στον αέρα. Η εισαγωγή της Bzl- ομάδας γίνεται με κατεργασία της κυστΐνης με Na σε υγρή NH₃ και στη συνέχεια αντίδραση με Bzl-Cl:



Σχήμα 29: Εισαγωγή της Bzl-ομάδας στην κυστΐνη.

-Προστασία της γουανιδομάδας της παράπλευρης αλυσίδας της Αργινΐνης (Arg).

Η πλευρική γουανιδομάδα της αργινΐνης εΐναι ισχυρή βάση λόγω της σταθεροποίησης της πρωτονιωμένης μορφής της μέσω συντονισμού:



Σχήμα 30: Δομές συντονισμού της γουανιδομάδας της παράπλευρης αλυσίδας της Arg.

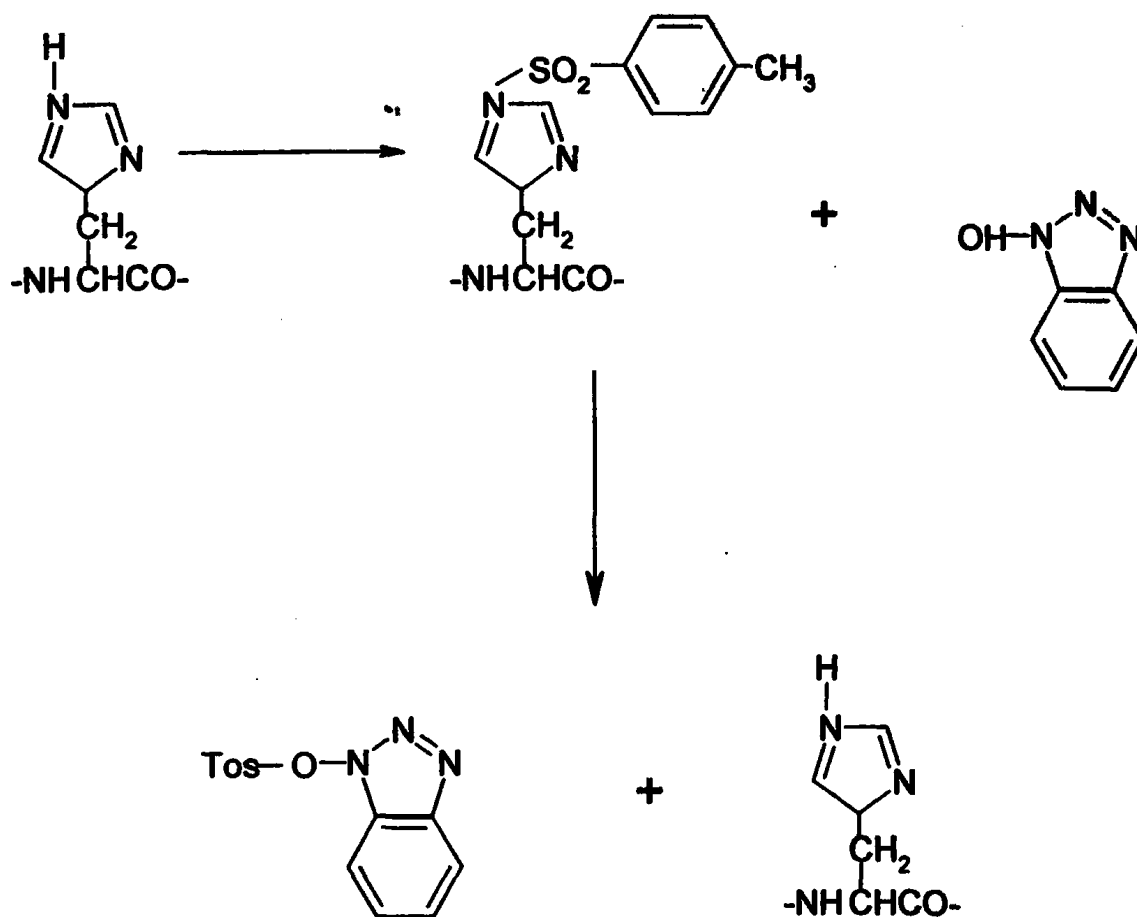


Η ελεύθερη γουανιδομάδα ακυλιώνεται εύκολα ενώ η πρωτονιωμένη λιγότερο
το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθέσεις. Η Tos-ομάδα χρησιμοποιείται
αρχικά για την προστασία της γουανιδομάδας. Η απομάκρυνσή της γίνεται με υγρό
υδροφθόριο HF. Στην περίπτωση που το υπό σύνθεση πεπτίδιο περιέχει τυροσίνη
(Tyr) υπάρχει η πιθανότητα μεταφοράς της Tos-ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο
της τυροσίνης γεγονός που περιορίσει σημαντικά τη χρήση της Tos-ομάδας.

-Προστασία της πλευρικής ομάδας της ιστοιδίνης (His).

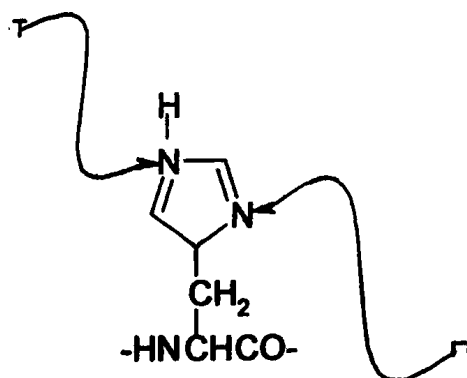
Η βασικότητα και ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας του ιμιδαζολίου της ιστοιδίνης
δημιουργούν προβλήματα στη σύνθεση αν ο ιμιδαζολικός δακτύλιος δε φέρει
προστασία. Έτσι το ιμιδαζόλιο ακυλιώνεται εύκολα, δρα σαν καταλύτης για
ακυλίωση των πλευρικών ομάδων της σερίνης και της τυροσίνης και παρουσία νερού
προκαλεί υδρόλυση ενεργών εστέρων. Επίσης πεπτίδια της ιστοιδίνης συχνά
απομονώνονται με δυο μορφές, είτε σαν ελεύθερα είτε σαν υδροχλωρικά ή
τριφθοροξικά άλατα. Για τους λόγους αυτούς απαιτείται προστασία του δακτυλίου
της ιστοιδίνης. Η προστασία συνήθως γίνεται με την προσθήκη της Tos-ομάδας. Η
Tos-ομάδα προτιμάται για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της ιστοιδίνης
διότι την καθιστά ιδιαίτερα ευδιάλυτη. Επιπλέον η Tos-ομάδα απομακρύνεται κατά
την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με υγρό υδροφθόριο HF ή
TFMSA(τριφθορομεθανο-σουλφονικό οξύ). Παρόλα αυτά παρουσιάζει αρκετά
μειονεκτήματα. Η Tos-ομάδα απομακρύνεται με το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο(HOBt)
γεγονός το οποίο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα αν χρησιμοποιούνται
αντιδραστήρια σύζευξης όπως το DCC και το PyBOP. Αυτό οφείλεται στον
τερματισμό, σε ένα μικρό ποσοστό, της επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας λόγω
τοξυλίωσης του αμινο-τελικού άκρου. Προς αντιμετώπιση τούτου, η Tos-ομάδα
απομακρύνεται μετά την σύζευξη με 1M HOBt σε DCM. Η Boc-His(Tos)-OH είναι
σταθερή στους 20 °C για μικρές χρονικές περιόδους. Συνήθως χρησιμοποιείται το
άλας Boc-His(Tos)-OH.DCHA που είναι πιο σταθερό.





Σχήμα 31: Απομάκρυνση της Tos-ομάδας με HOBt.

Στον μιδαζολικό δακτύλιο της ιστοιδίνης, τα άτομα του αζώτου N χαρακτηρίζονται ως 'τ' και 'π' όπως φαίνεται στο σχήμα:



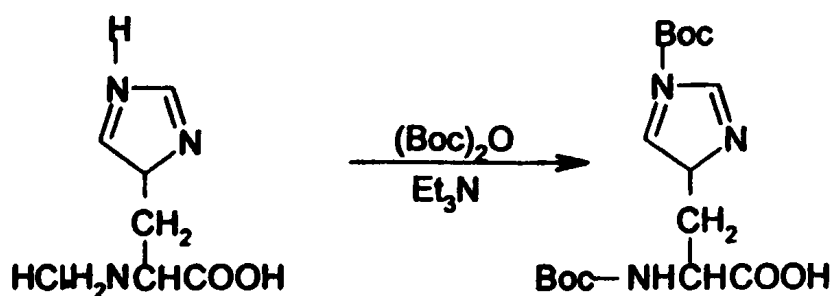
Σχήμα 32: Χαρακτηρισμός των ατόμων N του μιδαζολικού δακτυλίου της His.



Η δραστηριότητα των ατόμων N του ιμιδαζολίου δε διαφέρει σημαντικά και συχνά αντιδραστήρια αλκυλίωσης δίνουν μόνο- και δι-υποκατεστημένα παράγωγα. Η αναλογία των τ/π παραγώγων είναι συνήθως 3/1, εκτός αν λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης σχηματιστεί μόνο το τ -παράγωγο. Κατά την αλκυλίωση και τοξυλίωση του ιμιδαζολίου εισάγονται ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων που μειώνουν τη βασικότητα του άλλου αζώτου του ιμιδαζολίου και έτσι λαμβάνονται μονοπαράγωγα, κυρίως με υποκατάσταση στο N $^{\tau}$. Ο οξικός ανυδρίτης π.χ. δίνει μια τέτοια τοποειδική αντίδραση (regiospecific) στο N $^{\tau}$, ενώ άλλες ομάδες μειώνουν τη βασικότητα του αζώτου, όπως χλωρομυρμηκικοί εστέρες και Boc₂O που δίνουν σημαντικά ποσά από τα N $^{\pi}$ παράγωγα.



Η Boc-His(N-Boc)-OH παρασκευάζεται σε ένα στάδιο με Boc₂O:



Σχήμα 33: Παρασκευή Boc-His(N-Boc)-OH σε ένα στάδιο.



III.ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

ΓΕΝΙΚΑ

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού(NMR: Nuclear Magnetic Resonance) οφείλονται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων, που βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο. Όπως η αυτοπεριστροφή του ηλεκτρονίου δημιουργεί το spin του, έτσι και ορισμένοι πυρήνες εμφανίζουν πυρηνικό spin I, που παίρνει τιμές 0, 1/2, 1, 3/2 ... , σε μονάδες h/2π, ανάλογα με τη φύση του κάθε πυρήνα(191). Κάποιοι πυρήνες συμπεριφέρονται σαν μικροσκοπικοί μαγνήτες δηλαδή έχουν μαγνητική ροπή. Αν π.χ πυρήνες υδρογόνου τεθούν σε μαγνητικό πεδίο, τότε διευθετούνται σε δύο στάθμες ενέργειας, ανάλογα αν έχουν παράλληλο ή αντιπαράλληλο προσανατολισμό του spin, σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Ο παράλληλος προσανατολισμός με I=1/2 (α) αποτελεί τη βασική στάθμη ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος με I= -1/2 (β) τη διεγερμένη. Γενικά το σύνολο των προσανατολισμών ενός πυρήνα με I μέσα σε μαγνητικό πεδίο είναι 2I+1. Η διαφορά ενέργειας ΔE είναι πολύ μικρή (της τάξης των 10⁻³cal/mol) και αντιστοιχεί σε συχνότητα ν της περιοχής των βραχέων ραδιοκυμάτων, δίνεται δε από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu = \mu B_0 I = \gamma h B_0 / 2\pi$$

όπου, μ : μαγνητική ροπή του πυρήνα

B₀ :η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

γ : ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα.

Ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα γ είναι μια σταθερά χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα και δίνεται από τη σχέση $\gamma = \mu 2\pi / h$.

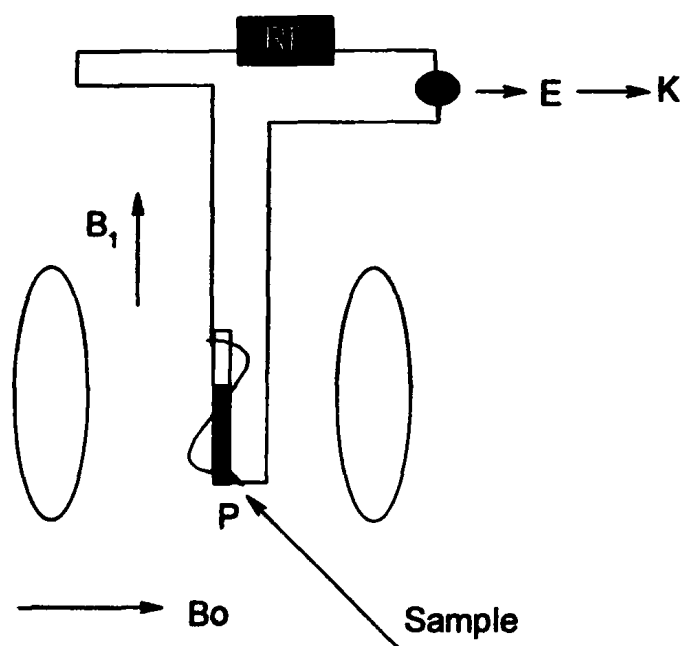
Η φασματοσκοπία NMR άρχισε να παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη Χημεία όταν διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων στις διάφορες ενώσεις δεν είναι σταθερή αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με το χημικό περιβάλλον. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως χημική μετατόπιση και οφείλεται στο γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια προκαλούν προστασία του πυρήνα με τη δημιουργία επαγόμενου μαγνητικού πεδίου που αντιτίθεται στο εφαρμοζόμενο πεδίο, με συνέπεια τη μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου.

Η χημική μετατόπιση δ εκφράζεται σε ppm και απεικονίζει τη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα σε σχέση με τη συχνότητα συντονισμού μιας ουσίας αναφοράς.



-Τεχνική των φασμάτων NMR.

Η λήψη του φάσματος NMR μιας ένωσης επιτυγχάνεται γενικά με την εφαρμογή στρεφόμενου μαγνητικού πεδίου B_1 , κάθετο στο εξωτερικό στατικό πεδίο B_0 (191). Ένα φασματοόμετρο αποτελείται από το μαγνήτη που δημιουργεί το πεδίο B_0 , ομογενές και σταθερό, από τον ραδιοπομπό RF, που δημιουργεί το στρεφόμενο μαγνητικό πεδίο B_1 κάθετο στο B_0 , από το σύστημα ανίχνευσης A, ενίσχυσης E και καταγραφής K του σήματος απορρόφησης κατά το συντονισμό. Το σύστημα μέσα στο οποίο τίθεται η ουσία για τη λήψη του φάσματος της λέγεται δοκιμαστής P (Probe).



Σχήμα 34: Στοιχειώδης διάταξη με ένα πηνίο.

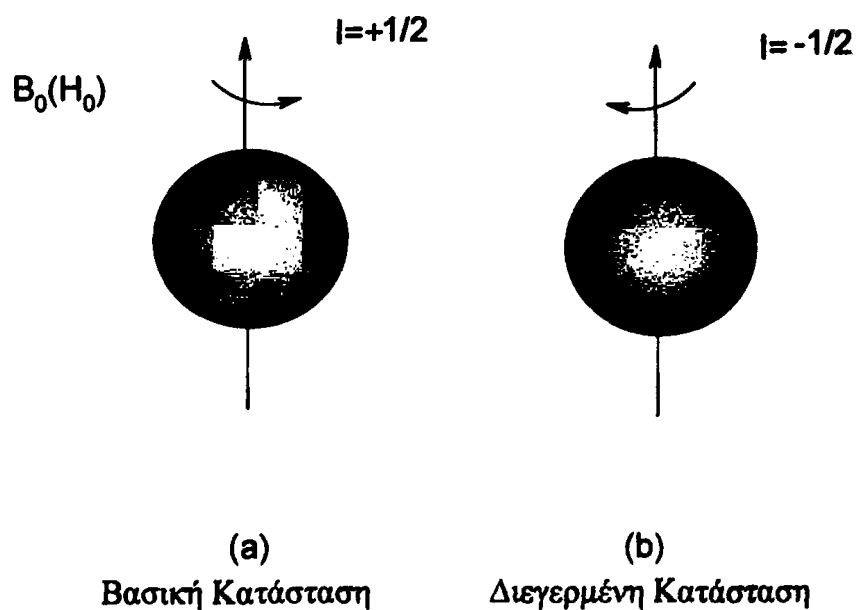
Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι συνήθως 5-20% (w/v) και ο απαιτούμενος όγκος για τη λήψη φάσματος είναι ~ 0.5ml. Οι διαλύτες πρέπει να είναι χημικά αδρανείς, μαγνητικά ισότροποι και να στερούνται υδρογόνων. Συνήθως χρησιμοποιούνται CCl_4 , CS_2 και άλλοι δευτεριωμένοι όπως $CDCl_3$, d_6 -DMSO και CD_3COCD_3 , ώστε να μην υπάρξει κάλυψη των σημάτων συντονισμού από τα σήματα των πρωτονίων του διαλύτη. Όταν το διάλυμα είναι πολύ αραιό (<1%) τότε δεν έχουμε ικανοποιητικό φάσμα, γιατί το ύψος του σήματος είναι περίπου το ίδιο με το ύψος των τυχαίων ηλεκτρονικών θορύβων. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιείται το



TMS(τετραμέθυλοσιλάνιο:(CH₃)₄Si), το οποίο είναι χημικά αδρανές, μαγνητικά ισότροπο, δίνει ένα σήμα συντονισμού(διότι τα δώδεκα πρωτόνια του είναι ισοδύναμα άρα συντονίζονται στην ίδια συχνότητα), είναι πτητικό, αναμιγνύεται εύκολα με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις και συντονίζεται σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου από όλες τις συνηθισμένες οργανικές ενώσεις, εκτός από ορισμένες οργανομεταλλικές, τα καρβανιόντα και ενώσεις με έντονη διαμαγνητική προστασία. Συνήθως χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο με την προσθήκη μιας σταγόνας αυτού στο προς μέτρηση διάλυμα.

- Αρχές φασμάτων πρωτονιακού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR ή PMR (Proton Magnetic Resonance).

Αναφέρθηκε προηγουμένως πως τα πρωτόνια, μέσα σε μαγνητικό πεδίο έχουν δυο προσανατολισμούς του spin, τον παράλληλο προσανατολισμό σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου, που είναι χαμηλότερης στάθμης ενέργειας και τον αντιπαράλληλο υψηλής ενέργειας, που αποτελεί και τη διεγερμένη κατάσταση(191,192).

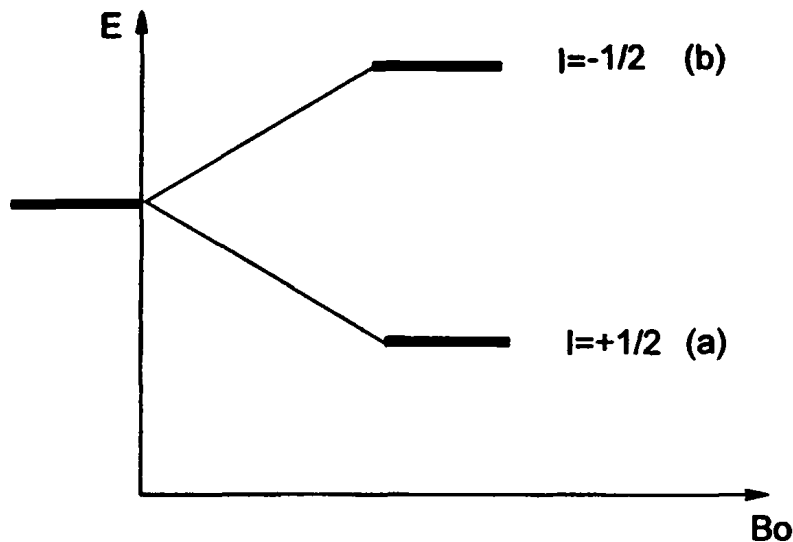


Σχήμα 35: Απεικόνιση της Βασικής και Διεγερμένης Κατάστασης πρωτονίου μέσα σε μαγνητικό πεδίο B_0 .



Για την διαφορά ενέργειας ΔE μεταξύ των δυο προσανατολισμών και γενικότερα μεταξύ δυο γειτονικών σταθμών ενέργειας ισχύουν οι σχέσεις:

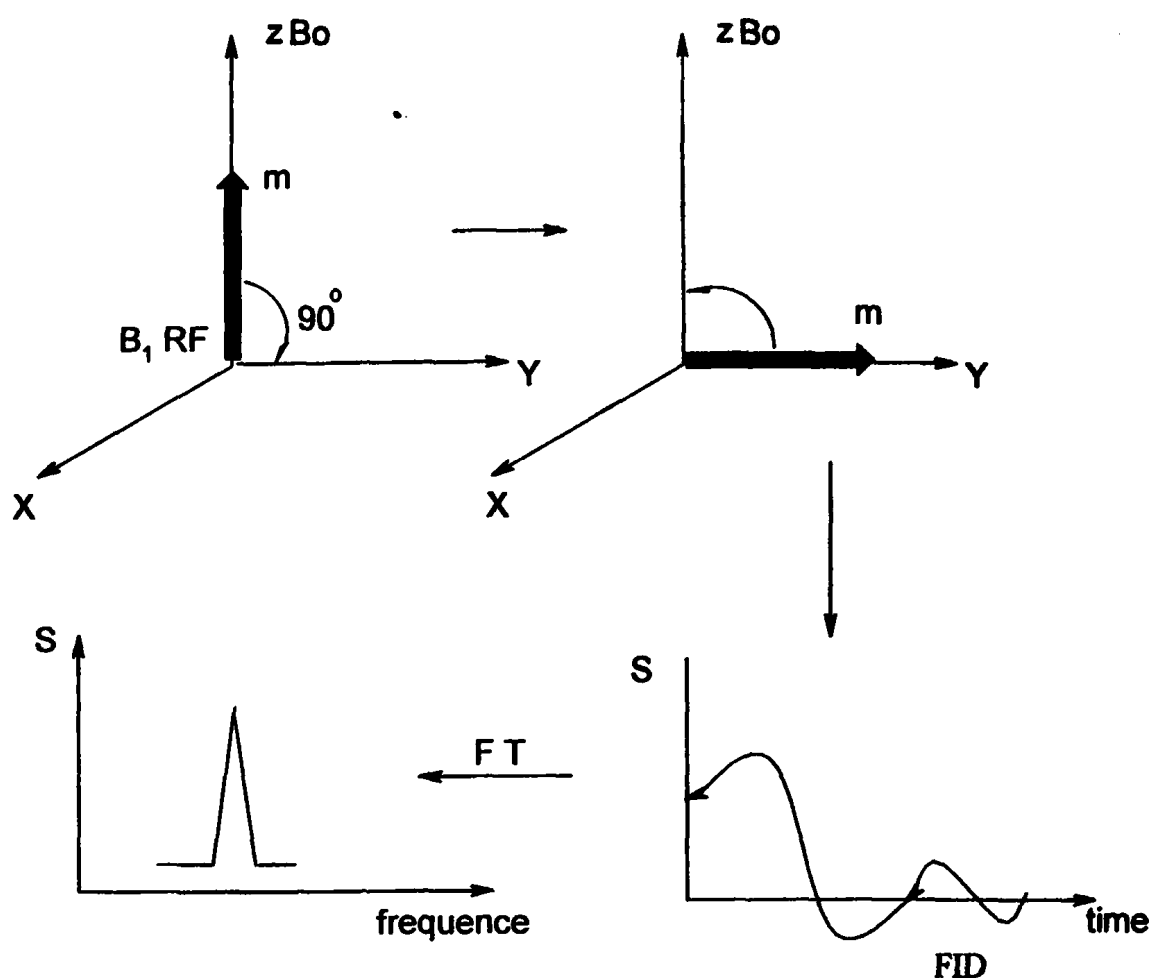
$$\Delta E = h\nu = \mu B_0 / I = 2\mu B_0 = \gamma B_0 \hbar / 2\pi$$



Σχήμα 36: Στάθμες ενέργειας πυρήνα ($I=1/2$) μέσα σε μαγνητικό πεδίο.

Αν στο σύστημα που βρίσκεται μέσα στο μαγνητικό πεδίο επιδράσουμε με μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κάθετη προς το εξωτερικό πεδίο και συχνότητας ν , τότε γίνεται συντονισμός που συνοδεύεται με απορρόφηση ενέργειας με αποτέλεσμα οι πυρήνες να μεταβαίνουν από τη βασική ($+1/2$) στη διεγερμένη ($-1/2$) κατάσταση. Τα φασματόμετρα διακρίνονται γενικά σε φασματόμετρα συνεχούς κύματος (CW: Continuous-Wave) και στα φασματόμετρα παλμών (Pulsed-NMR). Στα φασματόμετρα παλμών το πεδίο B_1 εφαρμόζεται με τη μορφή παλμών και το φάσμα παίρνεται μετά από ανάλυση μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR). Το σήμα FID (ελεύθερη επαγωγική φθορά) ονομάζεται και φάσμα χρόνου και ύστερα από μετασχηματισμό Fourier (FT), με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι ενσωματωμένος στο κυρίως όργανο NMR, παίρνουμε το φάσμα συχνοτήτων, που αποτελεί το κανονικό φάσμα NMR (193).





Σχήμα 37: Στάδια λήψης του NMR φάσματος συχνοτήτων (Pulsed-FT-NMR) για παλμό 90° .

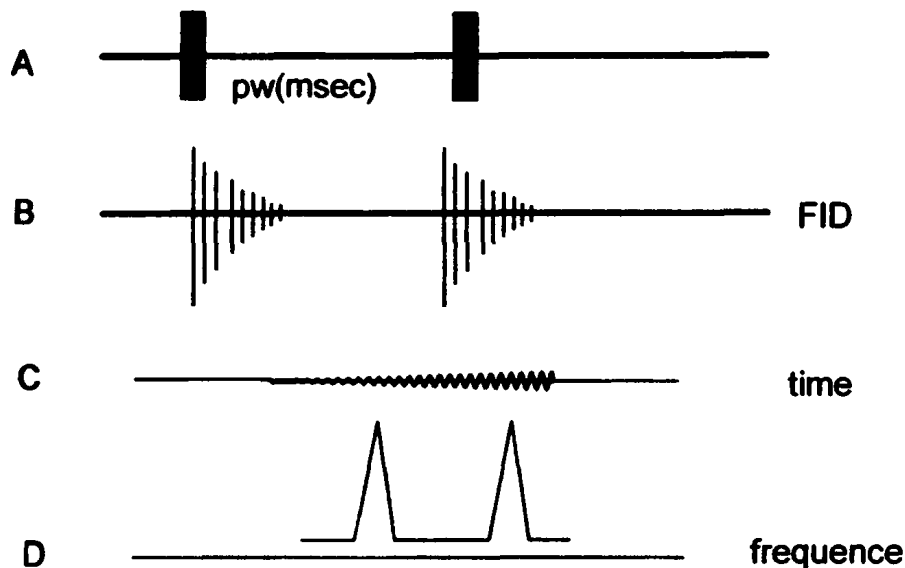
- Φάσματα ^{13}C NMR.

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της φασματοσκοπίας FT-NMR τεράστιο ενδιαφέρον απέκτησαν τα φάσματα ^{13}C και σήμερα αποτελούν απαραίτητο συμπλήρωμα των φασμάτων για τη μελέτη των οργανικών ενώσεων (191,193). Η μικρή περιεκτικότητα του ^{13}C στο φυσικό άνθρακα (1.1%) και η μικρότερη ευαισθησία του πυρήνα σε σχέση με το ^1H καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη λήψη του φάσματος με τις συνήθεις τεχνικές. Ο ^{13}C έχει $I=1/2$ και λόγω της μικρότερης μαγνητικής του ροπής συντονίζεται σε μικρότερες συχνότητες σε σχέση με το ^1H .



Για τη λήψη ενός φάσματος απαιτούνται οι εξής διεργασίες:

- Εφαρμογή παλμών για τη διέγερση του ^{13}C .
- Φάσμα εκπομπής σε συνάρτηση με το χρόνο.
- Συλλογή CAT(Computer of Average Transients) και διόρθωση σημάτων.
- Μετασχηματισμός Fourier, λήψη φάσματος συχνοτήτων.



Σχήμα 38: Απεικόνιση των σταδίων λήψης ενός φάσματος ^{13}C .

Στα φάσματα ^{13}C χρησιμοποιείται η κλίμακα $\delta(\text{ppm})$ ($\text{TMS}=0$) και οι χημικές μετατοπίσεις βρίσκονται μεταξύ 0-200ppm.

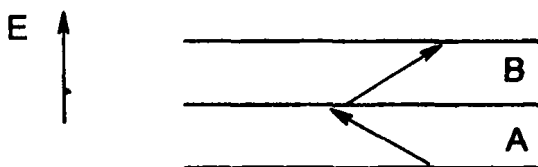
- **Φαινόμενο Overhauser (NOE: Nuclear Overhauser Effect).**

Η αύξηση της έντασης I του σήματος ενός πυρήνα όταν ακτινοβοληθεί (διεγερθεί) ένας γειτονικός καλείται φαινόμενο Overhauser (NOE: Nuclear Overhauser Effect) και δίνεται από τη σχέση:

$$I = (1/2 \times \gamma_1/\gamma_2)$$

Όπου γ_1 και γ_2 οι γυρομαγνητικοί λόγοι των πυρήνων που αλληλεπιδρούν και βρίσκονται σε κατάσταση σύζευξης. Αν $\gamma_1=\gamma_2$ (π.χ. ^1H) τότε έχουμε αύξηση της έντασης κατά το 1/2 της αρχικής. Το φαινόμενο NOE(193) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα φάσματα ^{13}C και εμφανίζεται γενικά όταν το σύστημα περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια διέγερσης των πυρήνων.





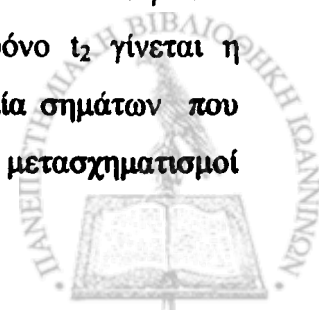
Σχήμα 39: Απεικόνιση της αρχής του φαινομένου NOE.

Έτσι στο σύστημα AB η διεγερμένη κατάσταση του πυρήνα A αποτελεί τη βασική του B. Αν λοιπόν διεγερθεί ο πυρήνας A και επέλθει κορεσμός, επιδρώντας με τη ραδιοσυχνότητα του RF, τότε θα αυξηθεί το πλήθος των πυρήνων στη διεγερμένη κατάσταση του A, που αποτελεί τη βασική κατάσταση για το B, με συνέπεια την αύξηση της έντασης του σήματος, όταν ακολουθήσει η διέγερση του B. Στα σύγχρονα φασματοόμετρα NMR το φαινόμενο NOE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διερεύνηση θεμάτων στερεοχημικής δομής και στηρίζεται στην ενίσχυση του σήματος ενός πυρήνα όταν ένας γειτονικός πυρήνας διεγερθεί με την επίδραση ραδιοσυχνότητας RF.

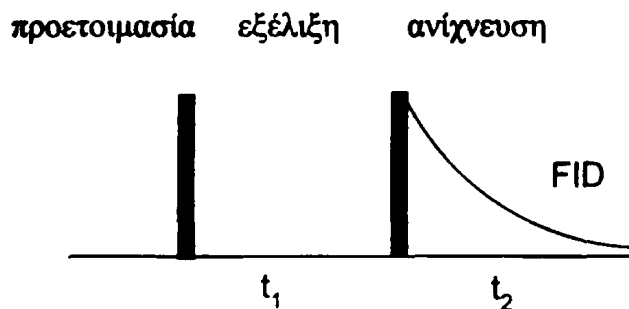
- Διδιάστατη φασματοσκοπία (2D-NMR).

Τα τελευταία χρόνια με την εισαγωγή της τεχνικής των διδιάστατων φασμάτων, η φασματοσκοπία NMR απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα φάσματα αυτά προέρχονται από φασματοόμετρα παλμών (PFT-NMR) και περιλαμβάνουν δυο συχνότητες ν_1, ν_2 που προκύπτουν από δυο μετασχηματισμούς Fourier δεδομένους σε χρόνους t_1, t_2 μετά την εφαρμογή των ηλεκτρομαγνητικών παλμών. Για τη λήψη ενός κανονικού φάσματος NMR εφαρμόζεται κατάλληλος ηλεκτρομαγνητικός παλμός 90° και μετά ακολουθεί η συλλογή δεδομένων (FID) σε χρόνο t , οπότε το φάσμα του χρόνου (συμβολογράφημα) μετατρέπεται με μετασχηματισμό στο φάσμα συχνοτήτων ενός μονάχα είδους πυρήνων π.χ φάσμα ^1H ή ^{13}C .

Στο φάσμα δυο διαστάσεων (2D-NMR) εφαρμόζονται δυο ή περισσότεροι παλμοί (π.χ $90^\circ-90^\circ$ ή $90^\circ-180^\circ$ ανάλογα με το πείραμα) μεταξύ των οποίων μεσολαβεί μεταβαλλόμενος t_1 (χρόνος εξέλιξης, Evolution time) στη διάρκεια του οποίου γίνεται αλληλεπίδραση των μαγνητικών πυρήνων. Στη συνέχεια σε χρόνο t_2 γίνεται η καταγραφή του σήματος εκπομπής (FID), οπότε συλλέγεται ποικιλία σημάτων που αντιστοιχούν στους μεταβαλλόμενους χρόνους. Ακολουθούν δυο μετασχηματισμοί



Fourier συναρτήσει των χρόνων t_1 και t_2 οπότε λαμβάνεται το φάσμα 2D-NMR. Η τεχνική για τη λήψη φάσματος 2D-NMR με δυο παλμούς 90° μπορεί να παρασταθεί ως εξής:

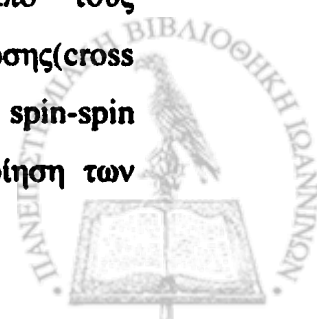


Σχήμα 40: Παλμική ακολουθία του πειράματος 2D-NMR.

Τα διάφορα σήματα εκπομπής(FID) που συλλέγονται στο χρόνο t_2 περιλαμβάνουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ανάλογα με το χρόνο εξέλιξης t_1 , οπότε με δυο μετασχηματισμούς Fourier προκύπτει το διδιάστατο φάσμα NMR. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της διδιάστατης φασματοσκοπίας είναι η εύρεση του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφόρων μαγνητικών πυρήνων. Αυτό καθιστά το NMR ιδανική μέθοδο για τη μελέτη της δομής διαφόρων ενώσεων και ιδιαίτερα πολύπλοκων μορίων όπως πεπτίδια και νουκλεοτίδια. Τελευταία έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών που στηρίζονται στα φάσματα 2D-NMR. Οι κυριότερες από αυτές είναι η φασματοσκοπία συσχετισμού COSY(CORrelated SpectroscopY), που υποδιαιρείται στην ομοπυρηνική(Homonuclear, H,H-COSY) και την ετεροπυρηνική(Heteronuclear, H,X-COSY), η φασματοσκοπία NOESY και η φασματοσκοπία ολικού συσχετισμού TOCSY(Total CORrelated SpectroscopY).

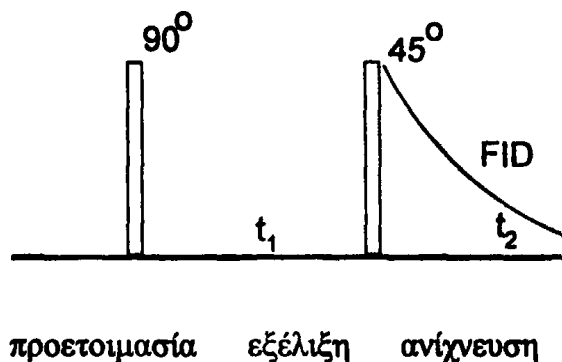
- Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης H,H-COSY.

Το πείραμα COSY(CORrelated SpectroscopY), γνωστό και ως πείραμα του Jeener(193) από τον Βέλγο φυσικό Jeener, είναι ίσως η πιο σημαντική τεχνική της φασματοσκοπίας 2 διαστάσεων(2D-NMR). Στο φάσμα ύστερα από τους μετασχηματισμούς Fourier λαμβάνονται τα λεγόμενα σημεία διασταύρωσης(cross peaks), τα οποία δείχνουν ποιοι πυρήνες συζεύγγονται μεταξύ τους με spin-spin αλληλεπίδραση. Το COSY πείραμα έχει σαν κύριο στόχο την ταυτοποίηση των



πυρήνων των υπό εξέταση μορίων μεταξύ των οποίων υφίσταται σύζευξη. Τα σημεία διασταύρωσης εμφανίζονται εκτός της διαγωνίου του φάσματος.

Η παλμική ακολουθία του COSY πειράματος φαίνεται στο σχήμα:

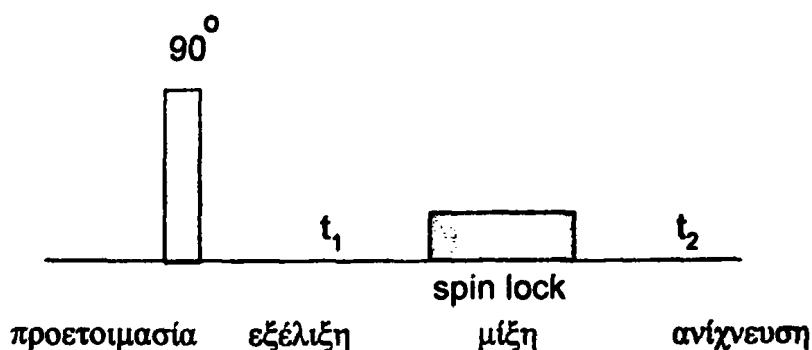


Σχήμα 41: Παλμική ακολουθία του πειράματος COSY με παλμούς 90° και 45° .

- **Φασματοσκοπία NOESY περιστρεφόμενου πλαισίου (ή ROESY).**

Στην φασματοσκοπία NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) η μεταφορά της μαγνήτισης γίνεται μέσω του μηχανισμού της διπολικής αλληλεπίδρασης (193). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου ανάμεσα σε δυο πρωτόνια, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους $\leq 5\text{\AA}$.

Η παλμική ακολουθία του NOESY φαίνεται στο σχήμα:



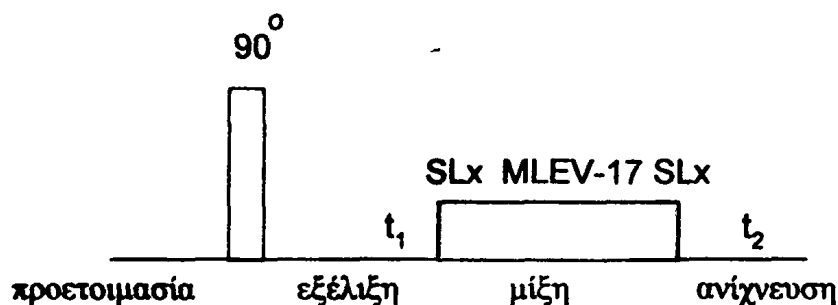
Σχήμα 42: Παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY.



- Φασματοσκοπία TOCSY ολικής συσχέτισης (ή HOHAHA:HOmonuclear HArtmann-HAn:ομοκυρηνικό πείραμα Hartmann-Han).

Η TOCSY (Total Correlated Spectroscopy: φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης) φασματοσκοπία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συσχέτισης ανάμεσα σε δυο πρωτόνια είτε όταν αυτά συζεύγνυται άμεσα μεταξύ τους (193), είτε όταν υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς μαγνήτισης μεταξύ τους (μέσω άλλων πρωτονίων).

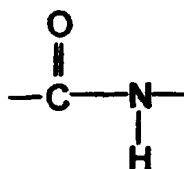
Η παλμική ακολουθία για το TOCSY πείραμα φαίνεται στο σχήμα:



Σχήμα 43: Παλμική ακολουθία του πειράματος TOCSY.

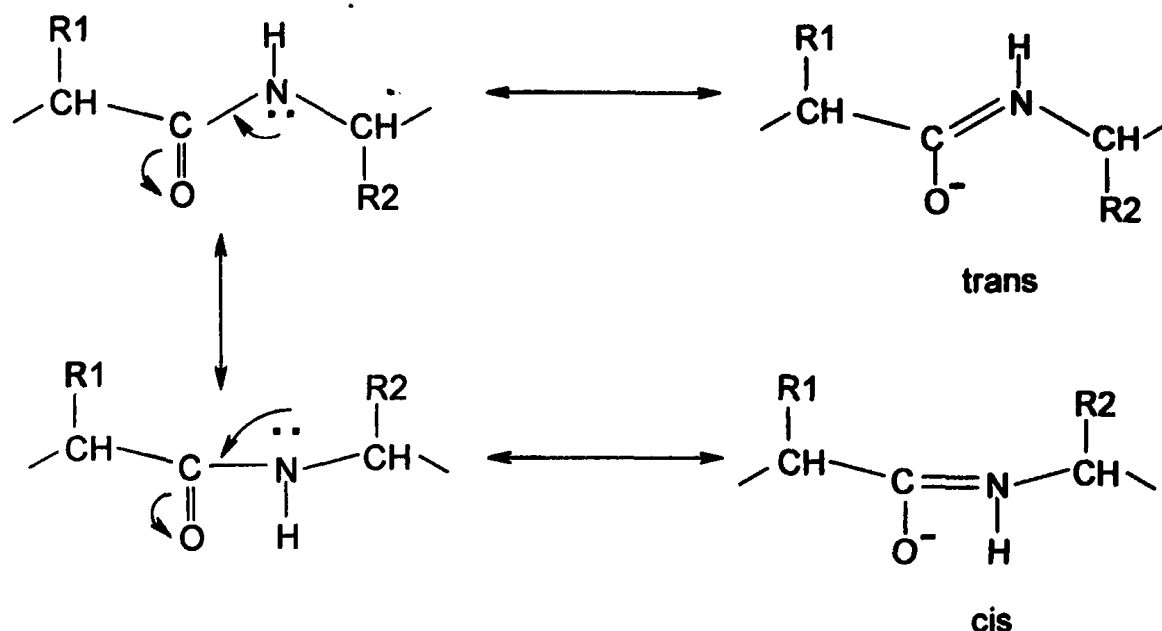
- Μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων σε διάλυμα με $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία μιας και δυο διαστάσεων.

Τα πεπτίδια, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούνται από αμινοξέα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς του τύπου:



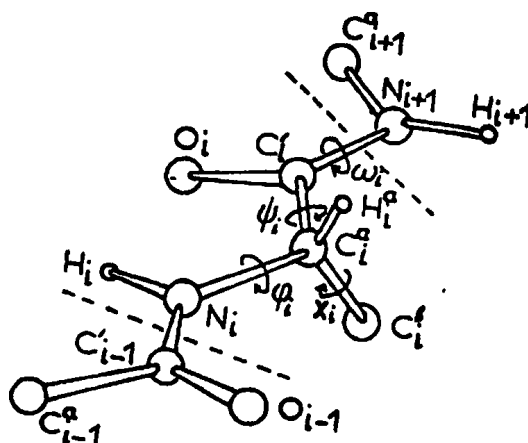
Η μη ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμό C-N οδηγεί στην ύπαρξη δυο σταθερών ισομερών μορφών cis και trans όπως φαίνεται στο σχήμα:





Σχήμα 44: Cis και trans μορφές του πεπτιδικού δεσμού σταθεροποιούμενες με μεσομέρεια.

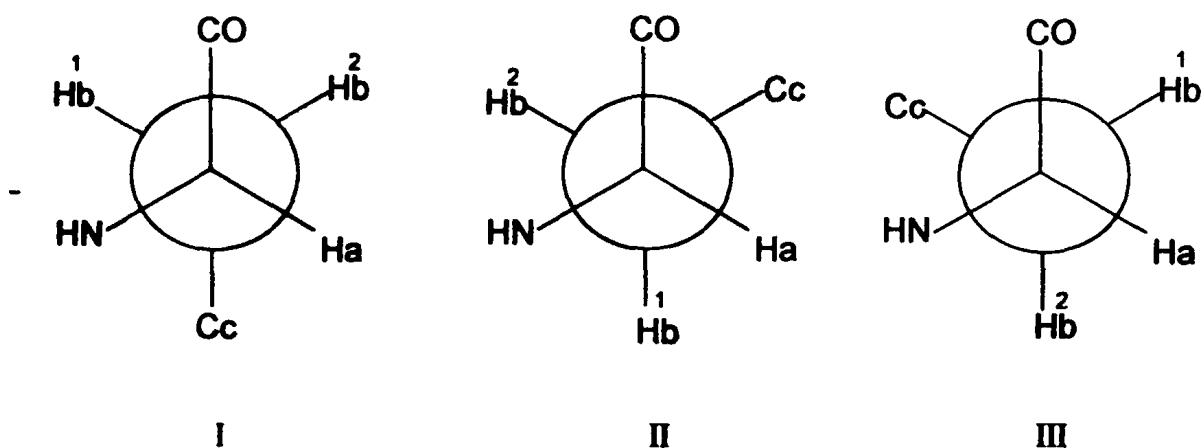
Η διαμόρφωση των πεπτιδίων καθορίζεται από την πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή σύνταξη. Στην πραγματικότητα η πεπτιδική αλυσίδα σπάνια καταλαμβάνει μέσα στο χώρο μια ευθύγραμμη διαμόρφωση, ενώ συνήθως οργανώνεται και σχηματίζει τη δευτεροταγή δομή (δευτεροταγής σύνταξη). Η δομή αυτή σταθεροποιείται κυρίως με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, ιοντικούς δεσμούς, δεσμούς Van der Waals και άλλους(192). Για την περιγραφή της σύνταξης αυτής αρκεί να προσδιοριστούν οι διεδρες γωνίες ϕ_i, ψ_i, ω_i και χ_i (σχήμα 44).



Σχήμα 45: Τμήμα πεπτιδικής αλυσίδας με δυο πεπτιδικούς δεσμούς. Τα όρια του καθενός αμινοξέος απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές. Παρουσιάζονται επίσης οι γωνίες ϕ_i, ψ_i, ω_i και χ_i



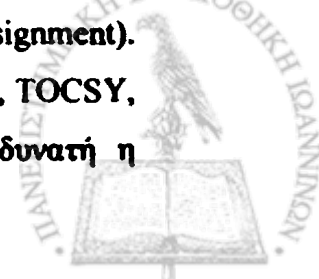
Προκειμένου να προσδιοριστεί πλήρως η δευτεροταγής σύνταξη ενός πεπτιδίου δεν αρκεί η περιγραφή της διαμόρφωσης του πεπτιδικού σκελετού, αλλά απαιτείται επίσης και ο προσδιορισμός της διαμόρφωσης των παράπλευρων αλυσίδων. Η diedρη γωνία χ (περιστροφή γύρω από το δεσμό $C_\alpha-C_\beta$) καθορίζει το σχετικό προσανατολισμό της παράπλευρης αλυσίδας σε σχέση με τον πεπτιδικό σκελετό. Οι τιμές της γωνίας χ εξαρτώνται από τις γωνίες φ και ψ . Οι πιθανότερες θέσεις της παράπλευρης αλυσίδας ενός αμινοξέος γύρω από το δεσμό ονομάζονται στροφομερή (rotamers) και αντιστοιχούν σε τρεις ενεργειακά ευνοϊκές καταστάσεις με $\chi_i = -60^\circ$, $+180^\circ$ και $+60^\circ$ για τα στροφομερή I, II και III αντίστοιχα.



Σχήμα 46: Απεικονίσεις κατά Newman των τριών στροφομερών των αμινοξέων.

Η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ειδικότερα η $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία μιας και δύο διαστάσεων, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση της σύνταξης και της δυναμικής των πεπτιδίων και άλλων βιολογικών μορίων σε κατάσταση διαλύματος. Ένα φάσμα ενός πεπτιδίου σε κατάσταση διαλύματος αποτελείται γενικά από ένα σύνολο σημάτων, των οποίων η μορφή, η θέση και η ένταση εξαρτώνται από τις παραμέτρους: σταθερές σύζευξης (coupling constants), χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts) και το χρόνο επαναφοράς του μορίου σε ισορροπία (relaxation time) μετά από κάποια διαταραχή.

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό της δομής των πεπτιδίων με την $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία είναι η αναγνώριση και ο προσδιορισμός των κορυφών (assignment). Με τον κατάλληλο συνδυασμό και μελέτη των 2D-NMR φασμάτων (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY) και την αξιολόγηση των NOE φαινομένων είναι δυνατή η



ταυτοποίηση των πρωτονίων και της αλληλουχίας των αμινοξέων σε ένα πεπτιδίο η μια πρωτεΐνη. Από τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν προηγουμένως ιδιαίτερα σημαντική είναι η σταθερά σύζευξης J (γειτονική σταθερά σύζευξης) διότι παρέχει σημαντικές πληροφορίες, λόγω της εξάρτησής της από τη δίεδρη γωνία θ , για την διαμόρφωση των πεπτιδίων σε κατάσταση διαλύματος (192,194). Πρώτος ο Karplus πρότεινε μια σχέση η οποία συσχετίζει την τιμή της σταθεράς σύζευξης 3J με τη δίεδρη γωνία θ

$$^3J = A \cos 2\theta + B \sin \theta + C.$$

Για τη μελέτη της περιστροφής της παράπλευρης αλυσίδας γύρω από το δεσμό $\text{HC}_\alpha\text{-C}_\beta\text{H}$ χρησιμοποιούνται κυρίως οι σταθερές σύζευξης και $^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta 1}$ και $^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta 2}$. Ο Pachler έδειξε πως αυτές οι σταθερές σύζευξης μπορούν να αποδώσουν την αναλογία των στροφομερών γύρω από το δεσμό $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ όλων των αμινοξέων. Κατά τη μετάβαση από το ένα στροφομερές στο άλλο, το ενεργειακό φράγμα είναι της τάξης των 3Kcal/mol, και η περιστροφή γύρω από τους δεσμούς C-C είναι συνήθως πολύ γρήγορη με αποτέλεσμα οι πειραματικές σταθερές σύζευξης να αποτελούν το μέσο όρο των πραγματικών σταθερών σύζευξης που αντιστοιχούν στην % ποσοστιαία αναλογία κάθε στροφομερούς (P).

$$^3J_{\alpha\beta}^1 = P_1J + P_2J_g + P_3J_t, \quad (J_t = J_{\text{trans}}, J_g = J_{\text{gauche}})$$

$$^3J_{\alpha\beta}^2 = P_1J_g + P_2J + P_3J_t$$

$$P_1 + P_2 + P_3 = 1$$

$$J_t = J_{(180^\circ)} \quad \text{και} \quad J_g = J_{(60^\circ)}$$

Ένας τελευταίος σημαντικός παράγοντας για την επίλυση της διαμόρφωσης πεπτιδίου σε διάλυμα είναι ο εντοπισμός ένδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ κάποιου αμιδικού πρωτονίου (δότης) και του οξυγόνου (δέκτης) ενός καρβonyλίου του πεπτιδικού σκελετού. Η ύπαρξη ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου διαπιστώνεται με τη μεταβολή της χημικής μετατόπισης των αμιδικών πρωτονίων συναρτήσει της θερμοκρασίας ($\Delta\delta/\Delta T$). Όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO τότε ισχύουν τα εξής:



- Αν η σχέση $\Delta\delta/\Delta T$ είναι γραμμική και η τιμή της κυμαίνεται από 0 έως -3×10^{-3} ppm, τότε το αμιδικό πρωτόνιο(-NH) συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου ή είναι προστατευμένο από το διαλύτη.
- Αν η σχέση $\Delta\delta/\Delta T$ είναι γραμμική και η τιμή της κυμαίνεται από -6 έως -10×10^{-3} , τότε το αμιδικό πρωτόνιο(-NH) συμμετέχει σε διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου(επιδιαλυτωμένο).
- Αν η σχέση $\Delta\delta/\Delta T$ έχει τιμή μεταξύ -3 και -6×10^{-3} , τότε είναι δύσκολο να προκύψουν συμπεράσματα για τη συμμετοχή του αμιδικού πρωτονίου(-NH) σε ένδο- ή διαμοριακό δεσμό υδρογόνου.



IV.ELECTROSPRAY IONIZATION ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ

Γενικά

Ένα φάσμα μάζας λαμβάνεται αφού μετατραπεί το δείγμα σε μίγμα ιόντων στην αέρια φάση και στη συνέχεια διαχωριστεί με βάση το λόγο μάζας προς το φορτίο. Η φασματοσκοπία μάζας παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση οργανικών και ανόργανων δειγμάτων, τη δομή πολύπλοκων μορίων, την ισοτοπική σχέση των ατόμων σε ένα μόριο, τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών κ.λ.π. Ορισμένοι βασικοί όροι(195) που χρησιμοποιούνται στην φασματοσκοπία μάζας(199) συνοψίζονται στα εξής:

- *Atomic mass unit(amu)*: η ατομική μονάδα μάζας είναι μια σχετική μονάδα που βασίζεται στο γεγονός ότι θεωρούμε ότι ο ^{12}C έχει μάζα ακριβώς 12amu. Έτσι το 1amu είναι το 1/12 της μάζας του ουδέτερου ατόμου ^{12}C :

$$1\text{amu} = \frac{12\text{gr}^{12}\text{C}/\text{mol}^{12}\text{C}}{6.023 \times 10^{23} \text{atoms}^{12}\text{C}/\text{mol}^{12}\text{C}}$$

- *Exact mass*: είναι η ακριβής μάζα των διαφόρων ισοτόπων ενός στοιχείου που βρίσκεται σε μια χημική ένωση. Έτσι για παράδειγμα το CH_4 στη φυσική του μορφή βρίσκεται κυρίως στις πιο κάτω μάζες:

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4: \quad m=12.0000 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 16.031 \text{ amu}$$

$$^{13}\text{C}^1\text{H}_4: \quad m=13.0035 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 17.035 \text{ amu}$$

$$^{12}\text{C}^2\text{H}^1\text{H}_3: \quad m=12.0000 \times 1 + 1.007825 \times 3 + 2.0014 \times 1 = 17.037 \text{ amu}$$

- *Nominal mass*: η ακέραια μάζα που χρησιμοποιείται συνήθως στις περισσότερες μετρήσεις. Για το προηγούμενο παράδειγμα οι αντίστοιχες μάζες είναι 16,17 και 17amu αντίστοιχα.
- *Mass to charge ratio(m/z)*: ο λόγος αυτός μάζας προς φορτίο είναι ο καθοριστικός για τον διαχωρισμό των ιόντων μεταξύ τους. Έτσι για ένα ιόν CH_4 είναι:

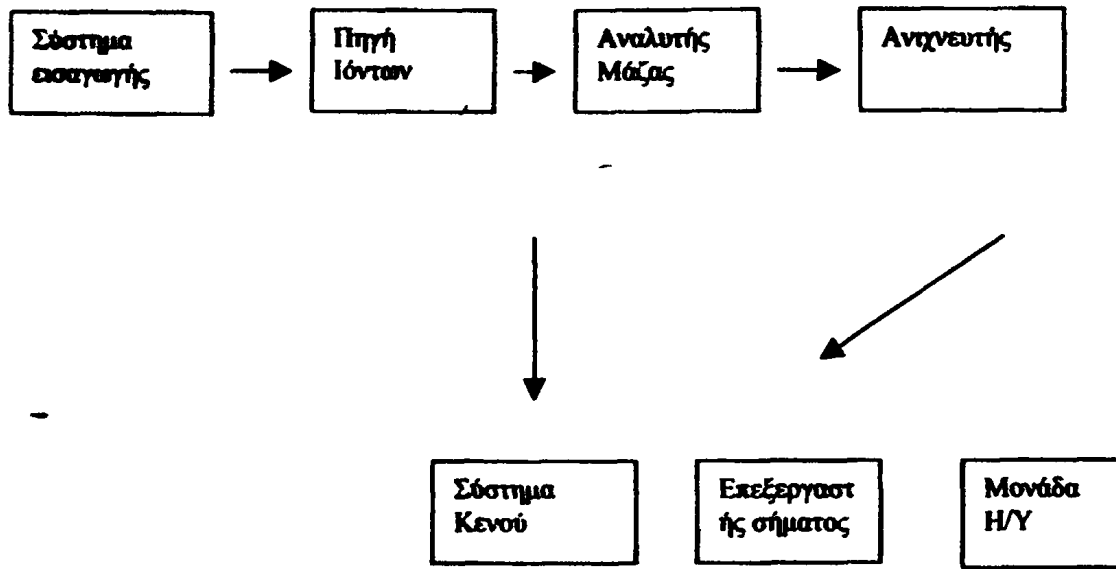
$$(m/z) = 16.035/1, \quad [^{12}\text{C}^1\text{H}_4]^+$$

$$(m/z) = 17.035/2, \quad [^{13}\text{C}^1\text{H}_4]^{+2}$$



Φασματοόμετρο μάζας

Ένα φασματοόμετρο μάζας μπορεί να περιγραφεί από το γενικό σχήμα:



Σχήμα 47: Τυπική διάταξη φασματομέτρου μάζας, όπου το σύστημα βρίσκεται υπό πίεση 10^5 - 10^8 Torr.

Η εισαγωγή του δείγματος επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους(195) όπως:

- Ασυνεχές σύστημα εισαγωγής(υγρά ή αέρια).
- Σύστημα απ' ευθείας εισαγωγής(στερεά και μη πτητικά υγρά)
- Σύστημα εισαγωγής με χρωματογράφο.

Οι ανιχνευτές αποτελούνται από πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων για την ανίχνευση των ιόντων, οι οποίοι είναι ανάλογοι εκείνων που χρησιμοποιούνται ως φωτοπολλαπλασιαστές για την ανίχνευση της υπεριώδους ή της ορατής ακτινοβολίας, αποτελούμενοι δηλαδή από δινόδους υψηλού δυναμικού. Οι αναλυτές μάζας(195,196) διακρίνονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες:



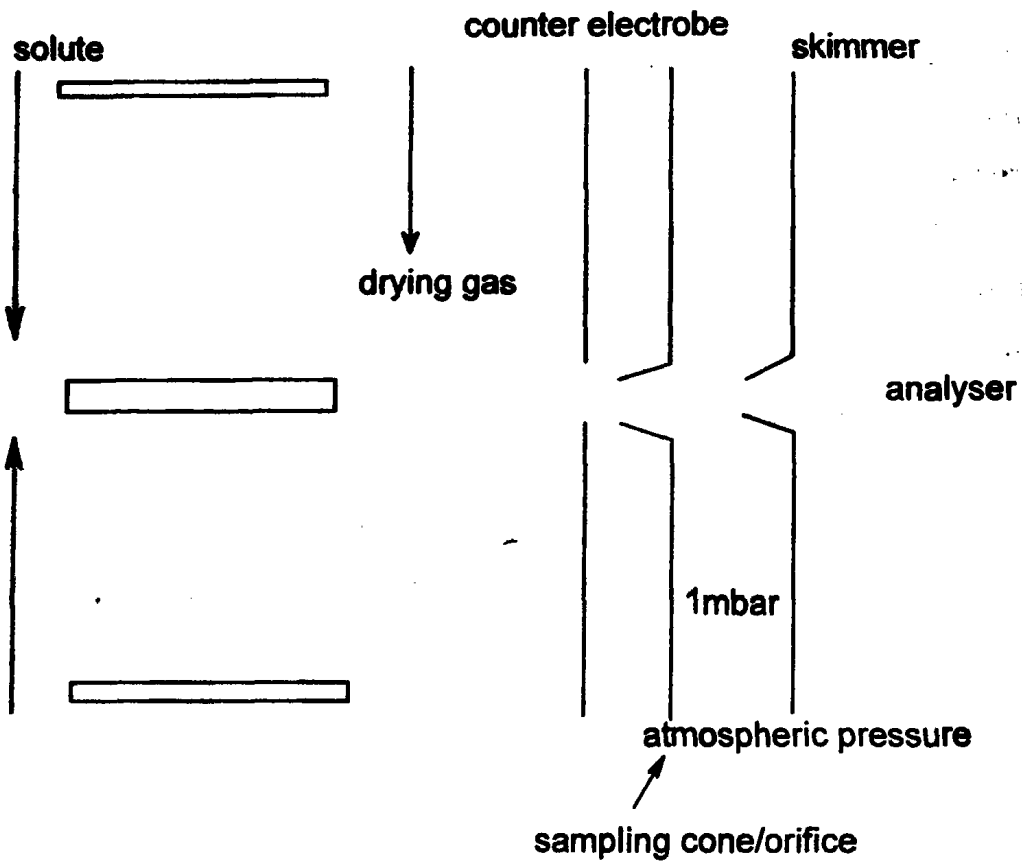
1. Αναλυτές Μαγνητικής περιοχής
2. Διπλής εστίασης φασματοόμετρα
3. Αναλυτές παγίδευσης ιόντων
4. Τετραπολικοί αναλυτές.

Το δείγμα μετά την εισαγωγή του και πριν φτάσει στον αναλυτή μάζας και εν συνεχεία στον ανιχνευτή υφίσταται διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα τον ιονισμό του. Οι κυριότερες μέθοδοι ιονισμού(195) είναι οι εξής:

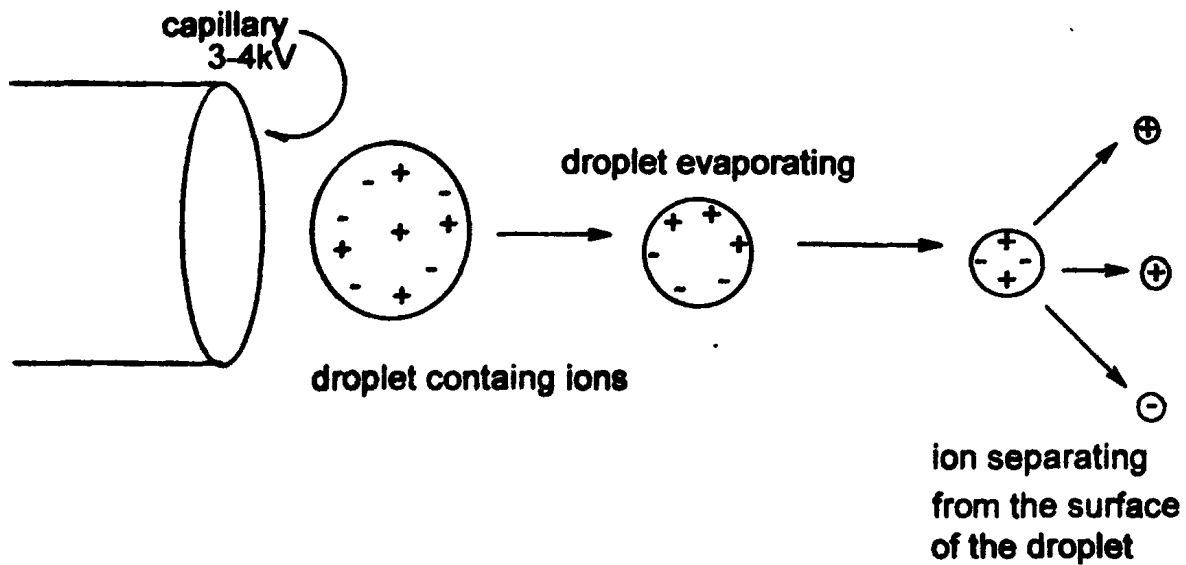
- Ιονισμός με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact:EI)(195-198).
- Χημικός ιονισμός (Chemical Ionization:CI)(195-198).
- Ιονισμός πεδίου.
- Ιονισμός με δέσμη ταχέως κινούμενων ατόμων (Fast Atom Bombardment:FAB)(195).
- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-MS)(199,200).
- Electrospray Ionization (ESI-MS)(195,200).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία η ταυτοποίηση των πεπτιδίων I και II καθώς και των πεπτιδικών αναλόγων III και IV έγινε με τη χρήση του Electrospray Ionization (ESI-MS). Το ESI-MS χαρακτηρίζεται ως η πιο ήπια μέθοδος ιονισμού για βιομόρια και μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις. Οι έρευνες άρχισαν πριν από 21 χρόνια περίπου από τον Dole και τους συνεργάτες του και ετέθει σε εφαρμογή το 1988, σε φασματοόμετρα με τετραπολικό αναλυτή μάζας(196). Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών διότι δεν παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα αλλά εξάγει τα υπάρχοντα στο διάλυμα ιόντα. Στο σχήμα 48 δίνεται η λειτουργία του ESI-MS καθώς και η σχηματική παράσταση κατά τη διαδικασία εξαγωγής ιόντων από το προς ανάλυση δείγμα.





Σχήμα 48: Σχηματικό διάγραμμα της λειτουργίας του ESI-MS.



Σχήμα 49: Διαδικασία εξαγωγής ιόντων στο ESI-MS.



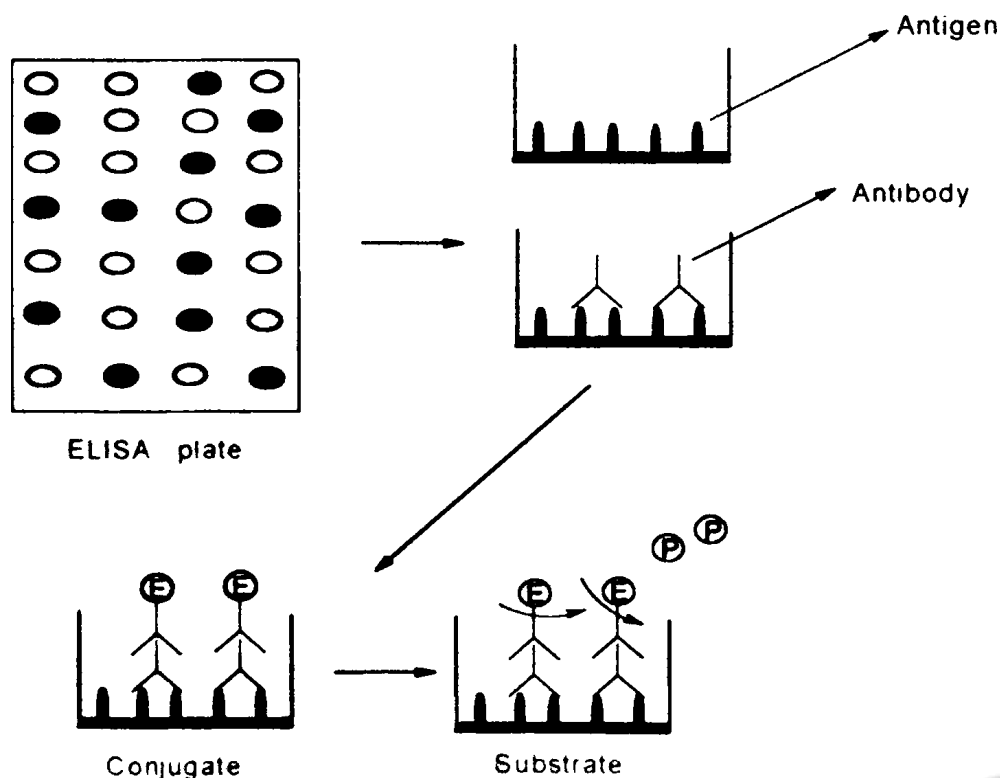
Το δείγμα εισάγεται μέσα από ένα τριχοειδή σωλήνα που καταλήγει σε ένα ακροφύσιο με ταχύτητα ροής από 0.5 έως 10μl/min(196,200). Το δείγμα αραιώνεται είτε χρησιμοποιώντας 100% οργανικό διαλύτη, είτε 100% νερό ανάλογα με τη διαλυτοτητά του, συνήθως όμως η προετοιμασία γίνεται με αραιώση του δείγματος σε H₂O/CH₃CN σε αναλογία 1/1 και συνολικό όγκο 1ml. Η συγκέντρωση του δείγματος που χρειάζεται προκειμένου να παραχθεί ένα πλήρες φάσμα μάζας ποικίλει ανάλογα με την ποιότητα του δείγματος και τον τύπο του οργάνου που θα χρησιμοποιηθεί. Για μόρια με σχετικά υψηλή μοριακή μάζα όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια τυπικές συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 1-20pmol/μL . Το δείγμα ψεκάζεται και οι σταγόνες που δημιουργούνται φορτίζονται από ένα ηλεκτρόδιο. Το αέριο που συνήθως χρησιμοποιείται είναι το άζωτο, ενώ συχνή είναι και η χρήση του ηλίου. Καθώς οι σταγόνες κινούνται με τη βοήθεια ενός ηλεκτροστατικού πεδίου(3-4kV), ένα μέρος του διαλύτη εξατμίζεται και το φορτίο της σταγόνας κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια(σχήμα 49). Τελικά η σταγόνα διασπάται λόγω απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται στην επιφάνεια της εξαιτίας της ελάττωσης της ακτίνας, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των φορτισμένων ιόντων. Μερικά από τα ιόντα αυτά περνάνε διαμέσου του συστήματος εισαγωγής(sampling cone) ή του ειδικού ανοίγματος(orifice) μέσα σε ένα ενδιάμεσο χώρο που υπάρχει κενό(pumped intermediate vacuum) και εν συνεχεία περνούν από ένα μικρό χώρο, το skimmer, στον αναλυτή μάζας είτε με περαιτέρω διάσπαση είτε με εξάτμιση του διαλύτη. Το skimmer λειτουργεί σαν διαχωριστής ταχύτητας (momentum separator), ενώ ο αναλυτής μάζας μετρά τα διάφορα m/z υπό υψηλό κενό(196,200). Μια σημαντική παράμετρος για την απομάκρυνση του διαλύτη από τα ιόντα είναι η μικρή διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του skimmer και του δειγματοληπτικού δίσκου.



V.ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ

Στους ανοσολογικούς προσδιορισμούς παρόλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι απομόνωσης που εφαρμόζονται κυρίως για τις πρωτεΐνες(π.χ. χρωματογραφία συγγένειας) έχουν σήμερα αναπτυχθεί εξειδικευμένες τεχνικές που στηρίζονται στη σύμπλεξη αντιγόνου-αντισώματος. Οι τεχνικές αυτές έχουν αυξηθεί σημαντικά σε αριθμό και έχουν βελτιωθεί σε ευαισθησία και ειδικότητα. Οι γνωστότερες ανοσολογικές τεχνικές είναι η ιζηματινοαντίδραση, η ανοσοδιάχυση, η ανοσοηλεκτροφόρηση, ο ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός, η ανοσοαποτύπωση και οι ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί(ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) που λόγω της ευκολίας στη χρήση τους είναι σήμερα ευρύτατα διαδεδομένοι. Οι μέθοδοι ELISA έχουν πολλές παραλλαγές αλλά σαν κοινό σημείο την ακινητοποίηση ενός ειδικού αντιγόνου ή αντισώματος σε μια στερεά επιφάνεια(π.χ. κυτταρίνη, αгарόζη, πολυακρυλαμίδιο κ.λ.π), την αντίδραση αντισώματος ή αντιγόνου και τη μέτρηση της ενζυμικής δράσης του συζεύγματος ενζύμου-αντισώματος ή ενζύμου-αντιγόνου με τη χρήση ειδικών υποστρωμάτων που δίνουν έγχρωμα προϊόντα(P) αντίδρασης(201).



Σχήμα 50: Απεικόνιση της τεχνικής ELISA για τον προσδιορισμό του έγχρωμου προϊόντος. Οι διάφοροι τύποι ELISA απεικονίζονται στις παραγράφους Α και Β.



A. Μη ανταγωνιστική έμμεση ELISA για τον προσδιορισμό αντισώματος.

1. Προσρόφηση του αντιγόνου σε στερεά φάση.



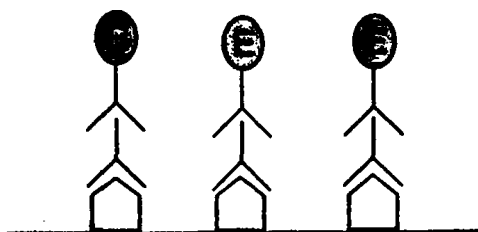
2. Έκπλυση.

3. Επώαση με διάλυμα αντισώματος.



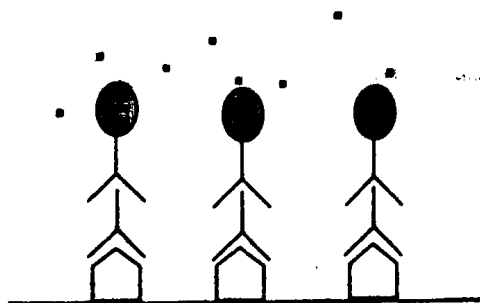
4. Έκπλυση.

5. Επώαση με σύζευγμα ενζύμου-αντιανοσοσφαιρίνης.



6. Εκκλύση.

7. Επώαση με έγχρωμο ενζυμικό υπόστρωμα (°) και μέτρηση του προϊόντος (•)



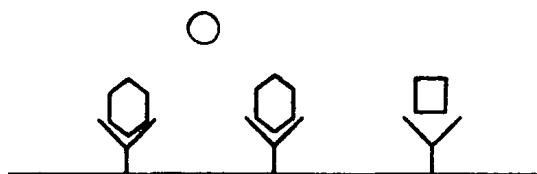
B. Μη ανταγωνιστική ELISA τύπου πάντουιτς για τον προσδιορισμό αντιγόνου.

1. Προσρόφηση του αντισώματος στην στερεά φάση.



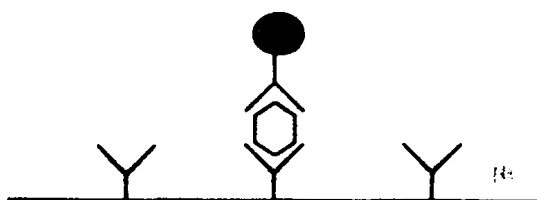
2. Έκλυση.

3. Επώαση με διάλυμα αντιγόνου.



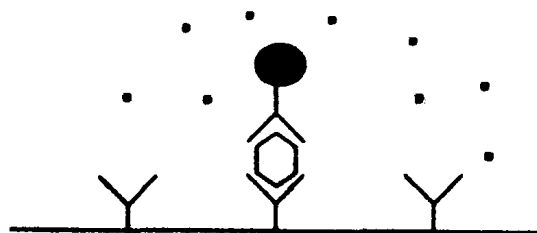
4. Έκλυση.

5. Επώαση με σύζευγμα ενζύμου-ανοσοσφαιρίνης.



6. Έκλυση.

7. Επώαση με έγχρωμο ενζυμικό υπόστρωμα (*) και μέτρηση του προϊόντος (*).



-Κάλυψη του πλακιδίου.

Η κάλυψη του πλακιδίου με μια πρωτεΐνη είναι μια ευαίσθητη διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς είναι οι εξής:

- το μέγεθος της πρωτεΐνης
- η ιοντική ισχύς του διαλύματος
- ο χρόνος
- η θερμοκρασία.

Η θερμοκρασία και ο χρόνος αποτελούν ίσως τους πιο σημαντικούς από όσους προαναφέρθηκαν. Αύξηση του χρόνου σε συνδυασμό με την αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την γρήγορη κάλυψη του πλακιδίου αλλά συνεπάγεται μετουσίωση των πρωτεϊνών, η οποία εν συνεχεία οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των μορίων που βρίσκονται στο πλακίδιο προσροφημένα με τη δραστική τους μορφή και μειώνεται σημαντικά η δραστικότητα του τεστ ELISA. Ένας παράγοντας που επηρεάζει επίσης την κάλυψη του πλακιδίου είναι το pH. Υπάρχουν πεπτιδία συνήθως μικρού μοριακού βάρους, τα οποία απαιτούν αυστηρή ρύθμιση του pH για την αποτελεσματική κάλυψη. Συνήθως το pH που επιλέγεται είναι δυο μονάδες πάνω από το ισηλεκτρικό σημείο του πεπτιδίου και δίνεται από τη γενική σχέση:

$$pH_{(κάλυψης)} = \text{Ισηλεκτρικό σημείο του πεπτιδίου} + 1-2 \text{ μονάδες.}$$

-Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

Η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως:

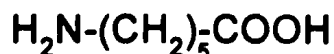
- ο χρόνος: αύξηση του γενικά συνεπάγεται αύξηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.
- η θερμοκρασία: αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται αύξηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Προτιμούνται θερμοκρασίες της τάξης των 37 °C. Με υψηλότερες θερμοκρασίες είναι δυνατόν να μετουσιωθούν τα προσροφημένα μόρια.
- τα ρυθμιστικά διαλύματα: η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος εξαρτάται πολύ από τα ρυθμιστικά διάλυμα, την ιοντική ισχύ του διαλύματος και τα απορρυπαντικά (Tween 20).



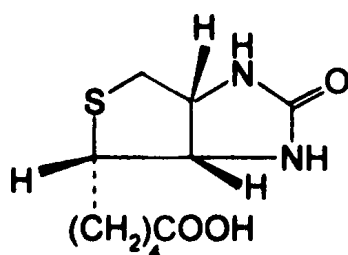
- γεωμετρία διάχυσης: η ελάττωση της απόστασης διάχυσης μπορεί να επιταχύνει την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ELISA είναι δυνατόν να παρουσιαστούν διάφορα προβλήματα, τα οποία μπορεί να οφείλονται στα απορρυπαντικά που χρησιμοποιούνται στις διάφορες διαμορφώσεις, τις οποίες μπορούν να πάρουν τα πεπτίδια που προσροφούνται, στην ευαισθησία του υποστρώματος, στην απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας, στον χρόνο που απαιτείται κάθε φορά για την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, στον αριθμό των δραστικών ομάδων στο μόριο του πεπτιδίου και τέλος σε λάθη που οφείλονται στον ανθρώπινο παράγοντα και ενδεχομένως να επηρεάζουν την ευαισθησία της μεθόδου. Προς αποφυγή των σφαλμάτων αυτών αναπτύχθηκαν διάφορες τροποποιημένες μέθοδοι ELISA.

Η πρώτη εξ'αυτών περιλαμβάνει ομοιοπολική σύνδεση του πεπτιδίου με τη στερεή επιφάνεια. Λόγω της ομοιοπολικής σύνδεσης το πεπτίδιο είναι μόνιμα συνδεδεμένο σε υψηλή πυκνότητα στην επιφάνεια, δεν μπορεί να αντικατασταθεί και έχει διαμορφωτική ελευθερία. Μια δεύτερη τροποποίηση περιλαμβάνει την κάλυψη του πλακιδίου με μια πρωτεΐνη, η οποία καλείται στρεπταβιδίνη, και εν συνεχεία την προσθήκη των βιοτυνλιωμένων πεπτιδίων. Τα πεπτίδια αυτά στο αμινο-τελικό άκρο τους έχουν μια αλληλουχία επιμήκυνσης (spacer) και ένα μόριο βιοτίνης, το οποίο επηρεάζει την ισχυρή δέσμευση των πεπτιδίων με την στρεπταβιδίνη. Κάθε μόριο στρεπταβιδίνης μπορεί να δεσμεύσει ισχυρά τρία μόρια βιοτυνλιωμένων πεπτιδίων.



Σχήμα 50: Το 6-αμινο-εξανοϊκό οξύ (spacer).



Σχήμα 51: Το μόριο της βιοτίνης.



-Εφαρμογές ELISA.

Η τεχνική αυτή βρίσκει ένα μεγάλο πλήθος εφαρμογών που συνίσταται στα εξής:

- προσδιορισμού ορμονών
- έλεγχος φαρμάκων
- μέτρηση ενζύμων
- μέτρηση καρκινικών δεικτών
- μέτρηση λιποπρωτεϊνών
- προσδιορισμός βιταμινών
- ανίχνευση αυτοαντισωμάτων
- ανίχνευση αντιγόνων ιών και βακτηρίων.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία, η ευκολία κατά τη χρήση και ο ποσοτικός προσδιορισμός αντιγόνων ή αντισωμάτων και τέλος η μεγάλη ειδικότητα. Τα βιοτινυλιωμένα πεπτίδια προτιμώνται πολλές φορές επειδή η βιοτίνη συμβάλλει στην καλύτερη προσρόφηση του πεπτιδίου στα πλακίδια και έτσι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



ΕΠΙΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το παρόν βιβλίο περιλαμβάνει πειράματα που έχουν επιλεγεί για να βοηθήσουν τον μαθητή να κατανοήσει καλύτερα τις έννοιες της φυσικής.

Τα πειράματα αυτά είναι απλά και εύκολα να γίνουν στο σπίτι ή στο σχολείο. Η επιλογή τους έγινε με βάση την εμπειρία των εκπαιδευτικών και την ανάγκη του μαθητή να εφαρμόσει τις θεωρητικές γνώσεις του στην πράξη.

Η ΕΠΙΡΑΦΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Πριν από την έναρξη του πειράματος, ο μαθητής πρέπει να διαβάσει προσεκτικά τις οδηγίες και να κατανοήσει το σκοπό του πειράματος. Είναι σημαντικό να ακολουθείται πιστά η διαδικασία που περιγράφεται, ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, ο μαθητής πρέπει να παρατηρεί προσεκτικά τα φαινόμενα που συμβαίνουν και να καταγράφει τα αποτελέσματα του πειράματος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η επιρραφή των πειραμάτων είναι η διαδικασία κατά την οποία ο μαθητής καταγράφει τα αποτελέσματα του πειράματος και τα συγκρίνει με τις θεωρητικές προβλέψεις.

Το πείραμα αυτό έχει σκοπό να ελέγξει την υπόθεση ότι η δύναμη είναι ανάλογη του τετραγώνου της ταχύτητας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά και εξαρτήματα: χρονόμετρο, κλίμακα, βάρη, νήμα, κλπ.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Μετράμε το μήκος του νήματος που χρησιμοποιούμε. 2. Βάζουμε το βάρη στο τέλος του νήματος. 3. Μετράμε τον χρόνο που χρειάζεται να διανύσει το βάρη το μήκος που μετρήσαμε.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα του πειράματος προκύπτει ότι η δύναμη είναι ανάλογη του τετραγώνου της ταχύτητας.



VI. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

VIA. ΣΥΝΘΕΣΗ

Τα πεπτίδια που συντέθηκαν στη παρούσα εργασία είναι τα εξής :

1. Δάκτυλος ψευδαργύρου (zinc-finger), τμήμα της πρωτεΐνης Ro60KD (27 αμινοξέα) με αλληλουχία αμινοξέων:

H-VSLVCEKLCNEKLLKKARIHPFHIAIA-NH₂ (zif-1)

2. Βιοτινυλιωμένος δάκτυλος ψευδαργύρου (zinc-finger) με αλληλουχία αμινοξέων:

Biotin-caproic-VSLVCGKLCNGKLLKKARIHPFHIAIA-NH₂ (zif-1b)

3. Ανάλογο του δάκτυλου ψευδαργύρου (14 αμινοξέα) με αλληλουχία αμινοξέων:

H-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂ (zif-2)

4. Βιοτινυλιωμένο ανάλογο του δάκτυλου ψευδαργύρου, όμοιο με το (3) με αλληλουχία αμινοξέων:

Biotin-caproic-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂ (zif-2b)

Το πεπτίδιο (1) αποτελεί τμήμα της πρωτεΐνης Ro60KD, με χαρακτηριστική περιοχή εκείνη που περιλαμβάνει τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη, τα οποία συμμετέχουν στη δομή:

Cys-X₃-Cys-X₁₀-His-X₂-His

Η δομή αυτή απαντάται σε πεπτίδια ή πρωτεΐνες και είναι γνωστή σαν δάκτυλος ψευδαργύρου (zinc-finger) με μια ιδιαίτερη διαφοροποίηση από το κλασικό μοτίβο των δακτύλων ψευδαργύρου που έχει τη δομή:

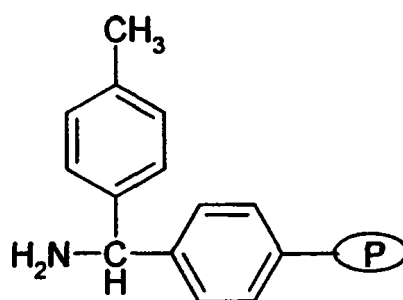
Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃-His

Η διαφοροποίηση ανάμεσα στα δυο μοτίβα μπορεί να συνοψιστεί στα παρακάτω:



- Ο αριθμός των αμινοξέων που παρεμβάλλεται μεταξύ των δυο κυστεινών και των δύο ιστιδινών είναι διαφορετικός.
- Ο αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων, που σχηματίζουν το δακτύλιο (loop) και συνδέουν την κυστεΐνη(9) με την ιστιδίνη(20) είναι κατά δυο αμινοξέα μικρότερος από εκείνων στο κλασικό μοτίβο.

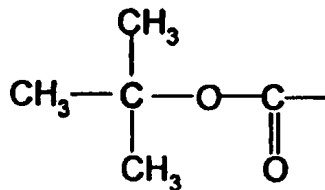
Η σύνθεση των πεπτιδίων (1) και (2) καθώς και των πεπτιδικών αναλόγων (3) και (4) έγινε σε στερεή φάση χρησιμοποιώντας την Boc-στρατηγική. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε κατά τη σύνθεση των τεσσάρων πεπτιδίων ήταν η 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη (MBHA) με γενικό τύπο:



Η MBHA ρητίνη(202) χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη σύνθεση πεπτιδίων στην αμιδική τους μορφή, σε στερεή φάση. Αποτελείται από πολυστυρένιο ακυλωμένο με μεθυλοβενζυλο-χλωρίδιο ώστε να γίνει η εισαγωγή ενός επιπλέον φαινολικού δακτυλίου δίνοντας έτσι μια κετονική ρητίνη. Ο επιπλέον φαινολικός δακτύλιος προσδίδει στην πεπτιδορητίνη περισσότερη σταθερότητα έναντι του τριφθοροξικού οξέος (TFA), σε αντίθεση με τη βενζυδρυλαμίνη, η οποία δεν είναι σταθερή έναντι του τριφθοροξικού οξέος. Τα αμινοξέα συνδέονται απευθείας με την αμινομάδα της ρητίνης χρησιμοποιώντας τις συνηθισμένες μεθόδους σύζευξης. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι εφικτή με τη χρήση άνυδρου υδροφθορίου.

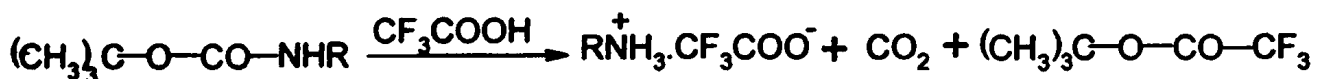
-Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Για τη σύνθεση των πεπτιδίων (1) και (2) καθώς και τα πεπτιδικών αναλόγων (3) και (4) χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη MBHA και η σύνθεση έγινε σε στερεή φάση. Για την προστασία της α-αμινομάδας(NH₂-) των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε η



tert -βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc).

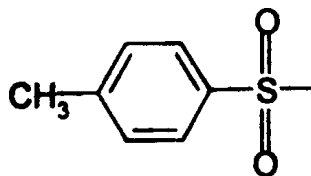
Η Boc-ομάδα είναι σήμερα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα στη σύνθεση σε στερεή φάση και απομακρύνεται πολύ εύκολα σύμφωνα με την αντίδραση:



και επίσης με άλλα όξινα αντιδραστήρια για παράδειγμα τριμεθυλοχλωροσιλάνιο παρουσία φαινόλης.

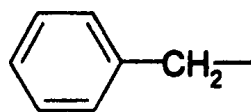
Προς αποφυγή των παράπλευρων αντιδράσεων που ενδεχομένως θα οδηγούσαν στο σχηματισμό πληθώρας παραπροϊόντων είναι ανάγκη να προστατευτούν οι ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων ορισμένων αμινοξέων.

- Για την προστασία της γουανιδινομάδας της παράπλευρης αλυσίδας της αργινίνης (Arg) χρησιμοποιήθηκε η π-τολουολοσουλφόνυλο ομάδα (Tos) :

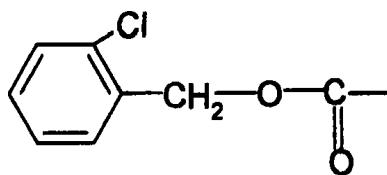


- Για την προστασία του ιμιδαζολίου της ιστοιδίνης(His) χρησιμοποιήθηκε η tert -βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc).

- Για την προστασία της σουλφυδρυλομάδας (SH) της κυστεΐνης (Cys) χρησιμοποιήθηκε η βενζυλομάδα (Bzl):



- Για την προστασία της υδροξυλομάδας (OH) της σερίνης (Ser) χρησιμοποιήθηκε επίσης η βενζυλομάδα (Bzl).
- Τέλος για την προστασία της ε-αμινομάδας της λυσίνης (Lys) χρησιμοποιήθηκε η 2-χλωρο-βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (2Cl-Z):



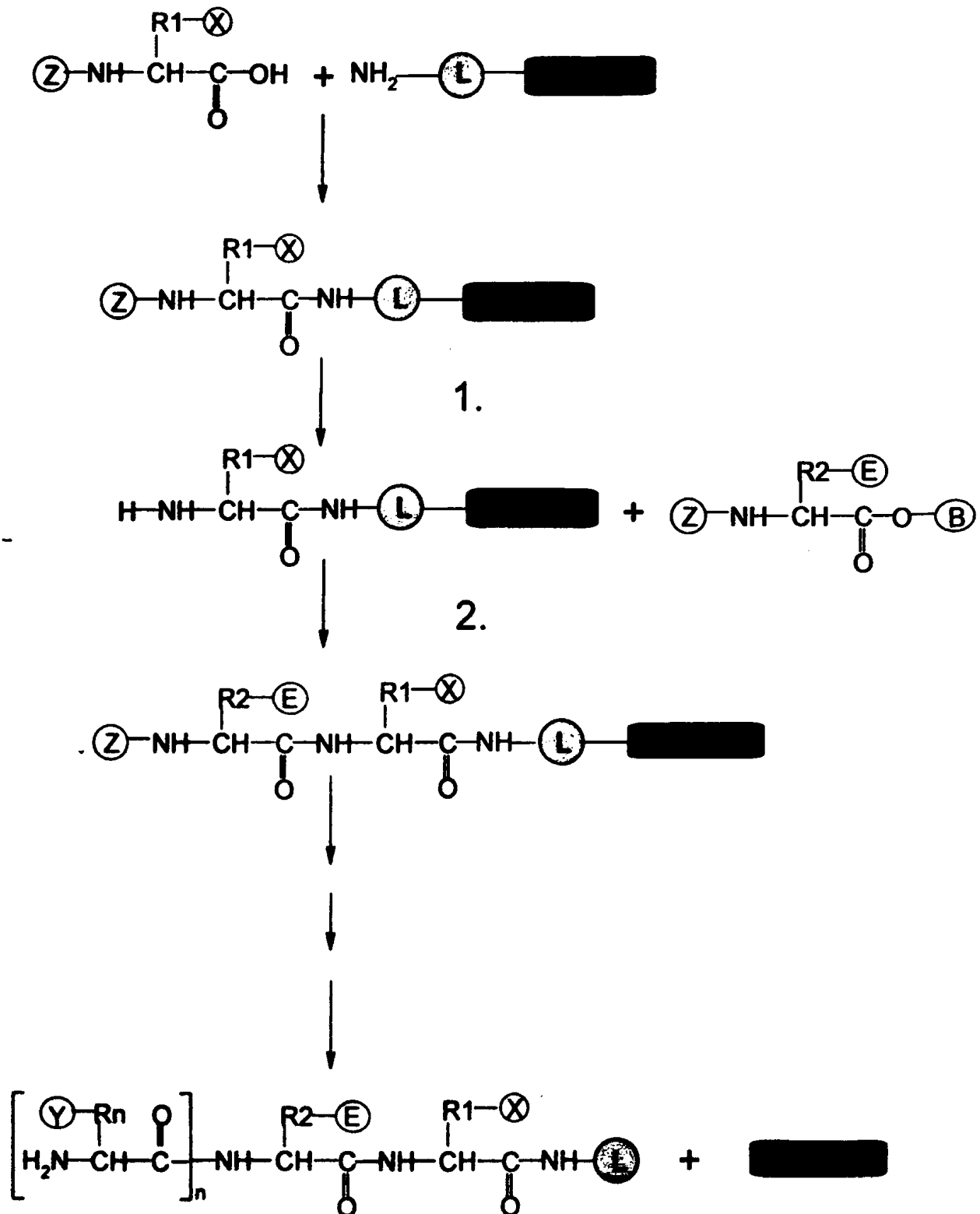
Για την ανίχνευση των ελεύθερων αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε το test Kaiser (203) που περιγράφεται στη συνέχεια. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται μερικοί κόκκοι πεπτιδορητίνης και 2-3 σταγόνες των παρακάτω διαλυμάτων:

1. 2ml KCN 0.001M σε 98ml πυριδίνης.
2. 5gr νυιδρίνη σε 100ml αιθανόλης.
3. 400mgρ φαινόλη σε 100ml αιθανόλης.

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο και θερμαίνεται στους 100°C για 2 λεπτά. Γίνεται έλεγχος των κόκκων της ρητίνης και ανάλογα με το χρώμα τους και το χρώμα του υπερκείμενου διαλύματος εξάγονται συμπεράσματα για την επιτυχία ή μη της σύζευξης. Αν οι κόκκοι της ρητίνης έχουν λευκό χρώμα τότε η σύζευξη χαρακτηρίζεται επιτυχής. Αν οι κόκκοι της ρητίνης έχουν μπλε χρώμα η σύζευξη πρέπει να επαναληφθεί (μπλε κόκκοι εμφανίζονται και κατά το στάδιο της αποπροστασίας).



Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των πεπτιδίων με την Boc-στρατηγική φαίνεται στο σχήμα:



Σχήμα 53: Μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων με την Boc-στρατηγική (όπου Z: η προστατευτική ομάδα της α-NH₂, X, E, Y: οι προστατευτικές ομάδες της παράπλευρης αλυσίδας των αμινοξέων που προστίθενται, B: ομάδα ενεργοποίησης του καρβοξυλίου ενός αμινοξέος).



1. Στάδιο Αποπροστασίας- Εξουδετέρωσης.

- 1x2min. 40% TFA/DCM
 - 1x15min. 40% TFA/DCM
 - 3x1 min. DCM
 - 2x2 min 8% DIEA/DCM
 - 3x1 min. DCM
 - 3x1 min. MeOH
 - 3x1 min. DCM
 - Test Kaiser (+).
- } Αποπροστασία
- } Εξουδετέρωση
- } Εκπλύσεις

2. Στάδιο Σύζευξης.

- 3 eq. αμινοξέος
 - 3eq. BOP/DCM
 - 3eq. HOBt/DMF
 - 3x1 min. DCM
 - 3x1 min. MeOH
 - 3x1 min. DCM
 - Test Kaiser (-).
- } Σύζευξη 4-5 ώρες.
- } Εκπλύσεις

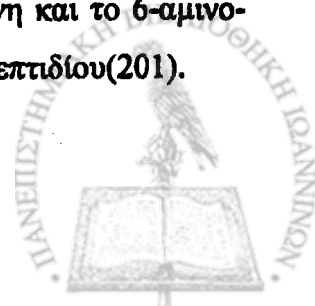
Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την σύζευξη ήταν:

- TBTU DCM
- BOP DMF
- HOBt MeOH
- DIEA

Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση του zif-1 της πρωτεΐνης Ro60KD ήταν τα εξής:

Ala, Ile, Leu, Ile, His, Phe, Pro, His, Ile, Arg, Ala, Lys, Lys, Leu, Leu, Lys, Glu, Asn, Cys, Leu, Lys, Glu, Cys, Val, Leu, Ser, Val.

Για τη σύνθεση του βιοτινυλωμένου zif-1b προστέθηκαν η βιοτίνη και το 6-αμινοεξανοϊκό οξύ (καπροϊκό) ως βραχίων(spacer) μεταξύ βιοτίνης και πεπτιδίου(201).



Τα αμινοξέα που προστέθηκαν για τη σύνθεση του αναλόγου zif-2 της πρωτεΐνης Ro60KD ήταν τα εξής:

Pe, His, Phe, Pro, His, Gly, Gly, Gly, Cys, Leu, Lys, Glu, Cys, Val.

Για τη σύνθεση του βιοτινυλιωμένου zif-2b προστέθηκαν η βιοτίνη και το 6-αμινοεξανοϊκό οξύ (καπροϊκό) ως βραχίων(spacer) μεταξύ βιοτίνης και πεπτιδίου(201).

-Εισαγωγή του πρώτου αμινοξέος.

Για τη σύνθεση των πεπτιδίων I-IV χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη MBHA (4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) με αρχική υποκατάσταση 0.95meq NH₂/g (NEOSYSTEM). Επειδή η υποκατάσταση ήταν αρκετά μεγάλη έγινε μείωση της υποκατάστασης. Συνήθως για τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων προτιμάται μικρή υποκατάσταση ρητίνης για να αποφεύγονται στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Η διαδικασία μείωσης της υποκατάστασης περιλαμβάνει την εισαγωγή του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Ala-OH).

- Ζύγιση της ρητίνης MBHA
- Ποσοτική μεταφορά της ρητίνης στο δοχείο σύζευξης(Vessel)
- Έκλυση με DMF 3x1 min.
- Έκλυση με DCM 3x1 min.
- Εξουδετέρωση με 8% DIEA/DCM
- Έκλυση με MeOH 3x1 min.
- Έκλυση με DMF 3x1 min.
- Έκλυση με MeOH 3x1 min.
- Έκλυση με DCM 3x1 min.
- Προσθήκη του πρώτου αμινοξέος(0.3meq/g ρητίνης)
- Προσθήκη των αντιδραστηρίων σύζευξης (TBTU ή BOP, HOBt, DIEA)
- Σύζευξη για 24 ώρες
- Ακετυλίωση μη υποκατεστημένων NH₂ με (CH₃CO)₂O
- Έκλυση με DCM 3x1 min.
- Έκλυση με MeOH 3x1 min.
- Έκλυση με DCM 3x1 min.
- Ζύγιση μικρής ποσότητας πεπτιδορητίνης σε κρυσταλλωτήριο
- Αποκοπή Fmoc-ομάδας και τιτροδότηση της πεπτιδορητίνης (Fmoc-Ala-R)



- Υπολογισμός της υποκατάστασης με φασματοσκοπία UV-VIS σύμφωνα με τη σχέση: $Y=2A \times V / 7800 \times g$

όπου A: η απορρόφηση στα 301nm του δείγματος, V: ο όγκος του δείγματος και g: τα γραμμάρια της μετρούμενης ουσίας.

Μετά την σύνθεση των πεπτιδίων έγινε αποκοπή αυτών από τη ρητίνη με άνυδρο, υγρό HF. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20ml υγρού HF. Τα αντιδραστήρια ανισόλη, DMS και p-κρεσόλη χρησιμοποιήθηκαν ως παγίδες(190) (scavengers) των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων των αμινοξέων που απεκόπησαν με υγρό υδροφθόριο(HF). Τα πεπτίδια παρελήφθησαν με CH_3COOH 2N και το διάλυμα λυοφιλοποιήθηκε. Η ανίχνευση των πεπτιδίων έγινε αρχικά με TLC χρωματογραφία. Χρησιμοποιήθηκαν δυο συστήματα ανάπτυξης:

<u>1.</u> n-βουτανόλη: 4	<u>2.</u> n-βουτανόλη :5
πυριδίνη : 1	πυριδίνη :5
οξικό οξύ : 1	οξικό οξύ :1
νερό : 2	νερό : 4

Η εμφάνιση των πλακιδίων έγινε με διάλυμα νινυδρίνης και γλωρο-τολουιδίνης.



VIB. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

zif-1, zif-1b, zif-2, zif-2b.

VIB1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1 με αλληλουχία

αμινοξέων: H-VSLVCEKLCNEKLLKKARIHPFHIAI-NH₂

Για τη σύνθεση του χρησιμοποιήθηκαν 2.74g ρητίνης MBHA(4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) με αρχική υποκατάσταση 0.95mmol NH₂/g. Προστέθηκε το πρώτο αμινοξύ (Fmoc-Ala-OH) και έγινε μείωση της υποκατάστασης σε 0.309mmol NH₂/g. Μετά την αποκοπή της προστατευτικής ομάδας (40% πυπεριδίνη/DMF)ακολούθησε διαδοχικά η προσθήκη των αμινοξέων:



Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Boc-παράγωγα ενώ ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν το TBTU, το BOP και το DCC, κατά περίπτωση, παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBt (1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο). Οι προστατευτικές ομάδες για τα διάφορα αμινοξέα φαίνονται στον πίνακα II:

ΠΙΝΑΚΑΣ II: Προστατευτικές ομάδες αμινοξέων.

AMINOΞΥ	ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ
His	Boc
Arg	Tos
Lys	2Cl-Z
Glu	O-Bzl
Cys	Bzl

Αφού ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο με τη βοήθεια μεθανόλης και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅(πεντοξειδίου του φωσφόρου). Ελήφθησαν τελικά 3.60g πεπτιδορητίνης με απόδοση σύνθεσης πριν από την αποκοπή του πεπτιδίου A₁%=86.5%. Ακολούθησε η αποκοπή του πεπτιδίου zif-1 από τη ρητίνη με κατεργασία με άνυδρο υγρό HF και παραλαβή του ακαθάρτου πεπτιδίου zif-1 με CH₃COOH 2N. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 2.47g ακαθάρτου πεπτιδίου με απόδοση A₂%= 93.8%. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική HPLC και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα III:



ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ: Συνθήκες ημιπαρασκευαστικής HPLC.

Σύστημα Έκλουσης	Μίγμα A/B	Μίγμα A/B	Χρόνος Έκλουσης	Ταχύτητα Ροής
H ₂ O/0.1%TFA(A)	80	20	30min.	4.7ml/min
CH ₃ CN/0.1%TFA(B)	40	60		

Μετά τον καθαρισμό του πεπτιδίου zif-1 ελήφθησαν 103.8mg καθαρού πεπτιδίου, με απόδοση A₃%=4.2%. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με τις εξής τεχνικές:

- Φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (σχήμα 54).
- Αναλυτική RP-HPLC (σχήμα 55).

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1 έγινε με τη χρήση της Electrospray Ionization Φασματοσκοπίας Μάζας(ESI-MS). Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει διάλυση 0.1mg στερεής ουσίας σε 1ml διαλύματος H₂O/CH₃CN/CH₃COOH σε αναλογία 0.45/0.45/0.1. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε για την εξάτμιση του διαλύτη είναι το άζωτο(N₂) και η ταχύτητα ροής του δείγματος ήταν 50μl/min.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H⁺ : η μάζα του πρωτονίου.

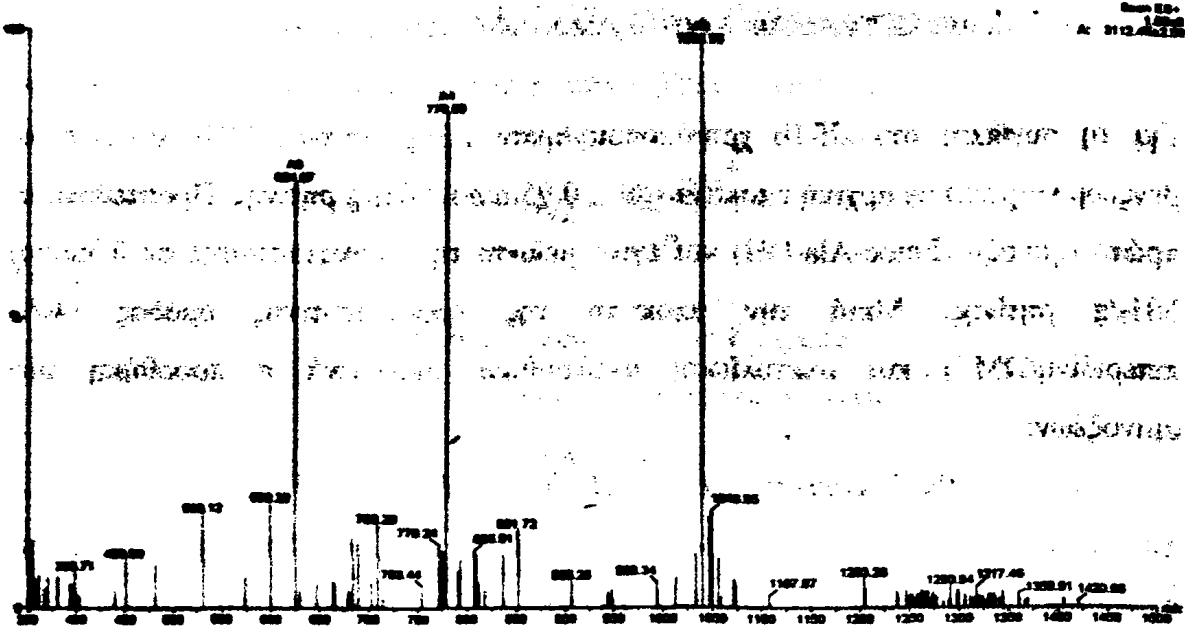
Στο σχήμα 54 φαίνεται το φάσμα μάζας για το zif-1 πεπτίδιο. Η κύρια κορυφή αντιστοιχεί στο κλάσμα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 3H^+}{3}$$

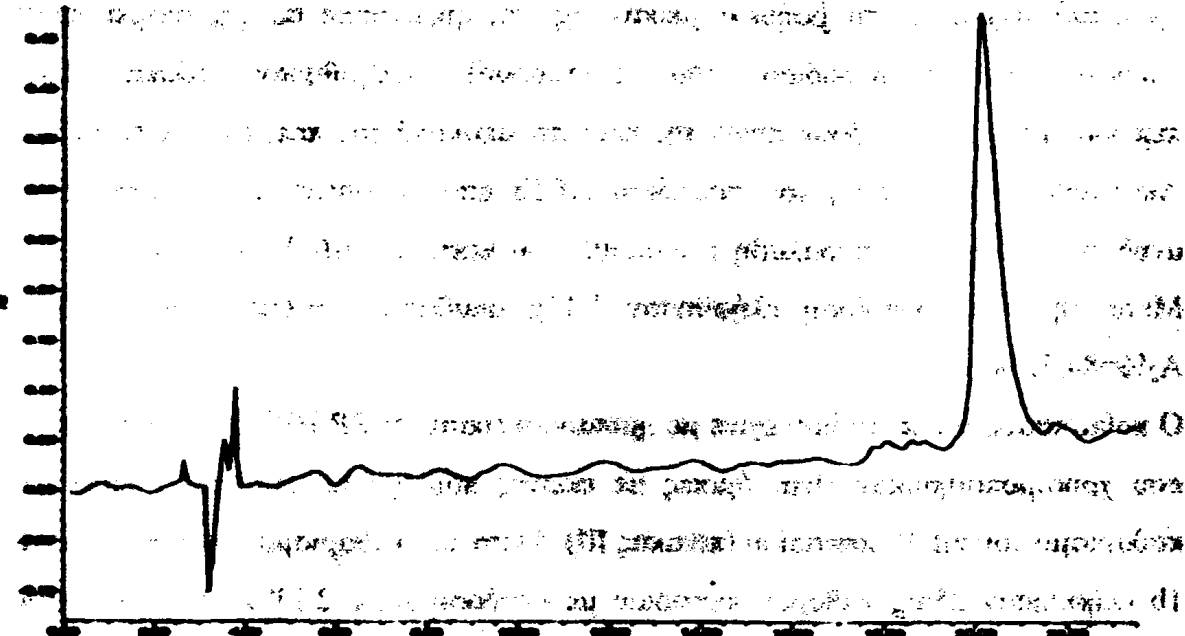
με τρεις θέσεις βασικότητας.



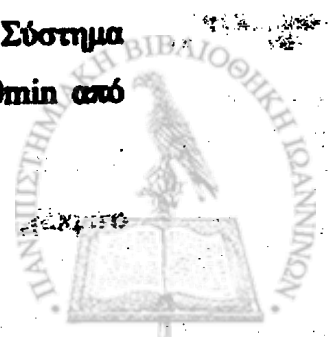
με τρεις θέσεις βασικότητας.



Σχήμα 54: Φάσμα μάζας ESI(Electrospray Ionization) του zif-1. Υπολογισθέν μοριακό ιόν [M+H⁺]=3112, ευρεθέν μοριακό ιόν [M+H⁺]=3112.45



Σχήμα 55: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το πεπτικό zif-1. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0.1%TFA, (B)CH₃CN/0.1%TFA, Χρόνος έκλουσης 30min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, Ταχύτητα ροής 1ml/min, Ανίχνευση στα 214nm.



VIB 2. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1b με αλληλουχία αμινοξέων: *Biotin-caproic-VSLVCGKLCNGKLLKKARIHPFHIAIA-NH₂*

Για τη σύνθεση του zif-1b χρησιμοποιήθηκαν 1.34g ρητίνης MBHA(4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) με αρχική υποκατάσταση 0.95mmol NH₂/g ρητίνης. Προστέθηκε το πρώτο αμινοξύ (Fmoc-Ala-OH) και έγινε μείωση της υποκατάστασης σε 0.3mmol NH₂/g ρητίνης. Μετά την αποκοπή της προστατευτικής ομάδας (40% πιπεριδίνη/DMF) και ακετυλίωση ακολούθησε διαδοχικά η προσθήκη των αμινοξέων:

Biotin-caproic-VSLVCGKLCNGKLLKKARIHPFHIAI

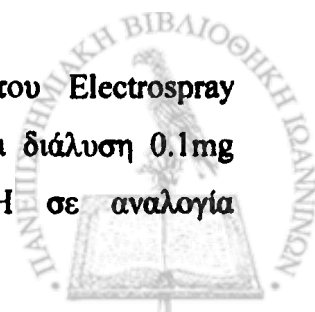
Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Boc-παράγωγα ενώ ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν το TBTU, το BOP και το DCC, κατά περίπτωση, παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBt (1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο). Οι προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για το πεπτίδιο zif-1(πίνακας II).

Αφού ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο με τη βοήθεια μεθανόλης και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅(πεντοξειδίου του φωσφόρου). Ελήφθησαν τελικά 2.30g πεπτιδορητίνης με απόδοση σύνθεσης πριν την αποκοπή του πεπτιδίου A₁%=68.9%. Ακολούθησε η αποκοπή του πεπτιδίου zif-1b από τη ρητίνη με κατεργασία με άνυδρο, υγρό HF και παραλαβή του ακαθάρτου πεπτιδίου zif-1b με CH₃COOH 2N. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 1.17g ακαθάρτου πεπτιδίου με απόδοση A₂%=84.52% .

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό του zif-1b πεπτιδίου (πίνακας III). Μετά τον καθαρισμό του πεπτιδίου zif-1b ελήφθησαν 25mg καθαρού πεπτιδίου με απόδοση A₃%=2.13% . Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με τις εξής τεχνικές:

- Φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (σχήμα 56).
- Αναλυτική RP-HPLC (σχήμα 57).

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1b έγινε με τη χρήση του Electrospray Ionization(ESI-MS). Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει διάλυση 0.1mg στερεής ουσίας σε 1ml διαλύματος H₂O/CH₃CN/CH₃COOH σε αναλογία



0.45/0.45/0.1. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε για την εξάτμιση του διαλύτη είναι το άζωτο (N_2) και η ταχύτητα ροής του δείγματος ήταν 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

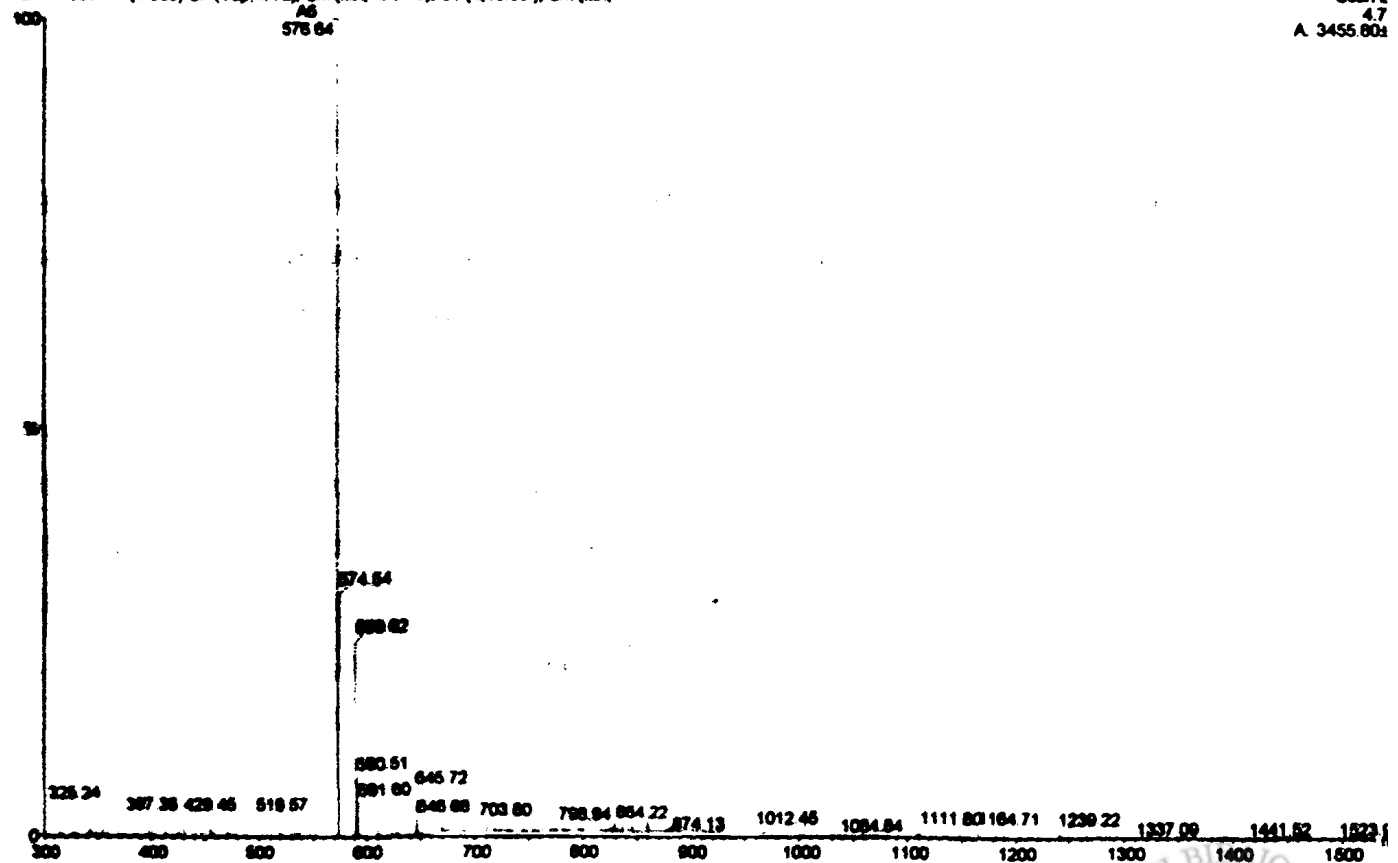
H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Στο σχήμα 2 φαίνεται το φάσμα μάζας για το zif-1b πεπτίδιο. Η κύρια κορυφή αντιστοιχεί στο κλάσμα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 6H^+}{6}$$

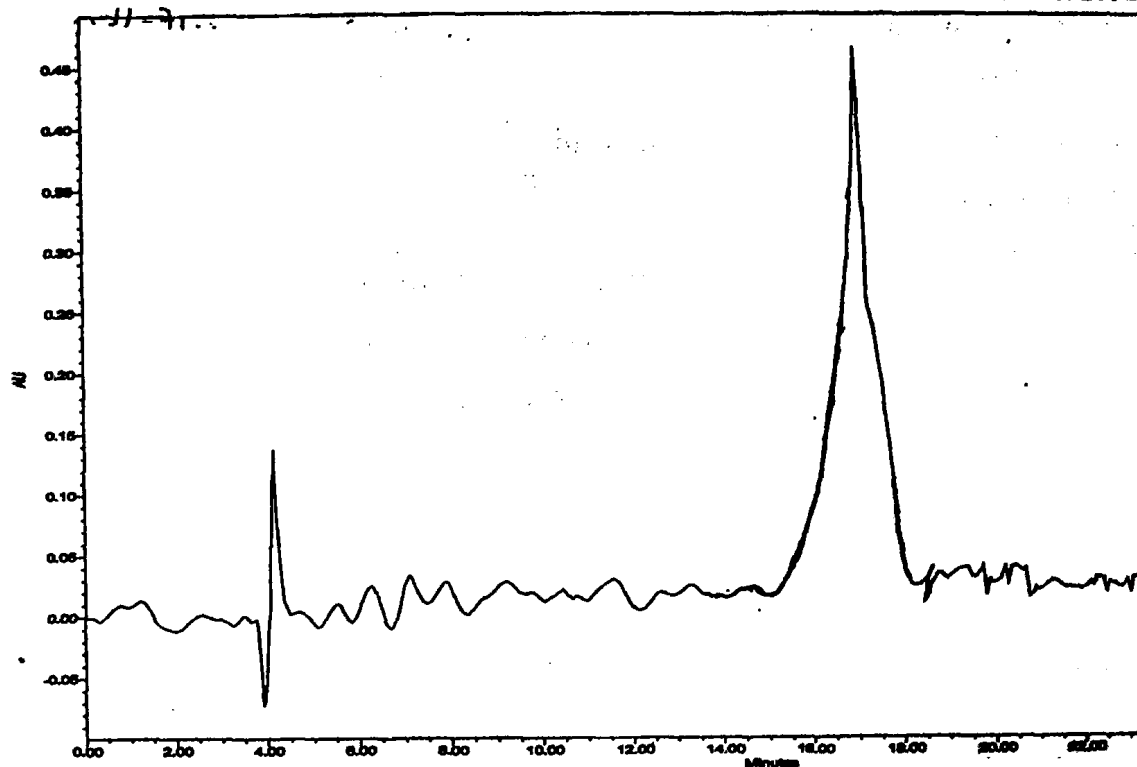
με έξι θέσεις βασικότητας.

KOR1-16301 1 (1.000) C1 (Top. 4. M): 8m (Min. 4x0.75), 8b (4.10.00), 8m (Min.



Σχήμα 56: Φάσμα μάζας ESI(Electrospray Ionization) του zif-1b. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=3455.37$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=3455.80$.





Σχήμα 57: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το πεπτίδιο zif-1b. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0.1%TFA, (B)CH₃CN/0.1%TFA, Χρόνος έκλουσης 30min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, Ταχύτητα ροής 1ml/min, Ανίχνευση στα 214nm.

VIB 3. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2 με αλληλουχία αμινοξέων: H-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂

Για τη σύνθεση του χρησιμοποιήθηκαν 1.4g ρητίνης MBHA(4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) με αρχική υποκατάσταση 0.95mmol NH₂/g. Προστέθηκε το πρώτο αμινοξύ (Fmoc-Ala-OH) και έγινε μείωση της υποκατάστασης σε 0.42mmol NH₂/g. Μετά την αποκοπή της προστατευτικής ομάδας (40% πιπεριδίνη/DMF)ακολούθησε διαδοχικά η προσθήκη των αμινοξέων:

VCEKLCGGGHPFH

Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Boc-παράγωγα ενώ ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν το TBTU, το BOP και το DCC, κατά περίπτωση, παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBt (1-υδροξυ-βενζοτριαζόλιο). Οι προστατευτικές ομάδες για τα διάφορα αμινοξέα είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για το πεπτίδιο zif-1(πίνακας II).

Αφού ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο με τη βοήθεια μεθανόλης και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅(πεντοξειδίου του φωσφόρου). Ελήφθησαν τελικά 1.89g πεπτιδορητίνης με απόδοση σύνθεσης πριν από την αποκοπή του πεπτιδίου A₁%=82%. Ακολούθησε η αποκοπή του πεπτιδίου zif-2 από τη ρητίνη με κατεργασία με άνυδρο, υγρό HF και παραλαβή του ακαθάρτου πεπτιδίου zif-1b με CH₃COOH 2N. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 612.42mg ακαθάρτου πεπτιδίου με απόδοση A₂%= 97.6%.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό του zif-1 πεπτιδίου (πίνακας III). Μετά τον καθαρισμό του πεπτιδίου zif-2 ελήφθησαν 122.5mg καθαρού πεπτιδίου με απόδοση A₃%=20% . Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με τις εξής τεχνικές:

- Φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (σχήμα 58).
- Αναλυτική RP-HPLC (σχήμα 59).

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2 έγινε με τη χρήση της Electrospray Ionization(ESI-MS) Φασματοσκοπίας Μάζας. Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει διάλυση 0.1mg στερεής ουσίας σε 1ml διαλύματος H₂O/CH₃CN/CH₃COOH σε αναλογία 0.45/0.45/0.1. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε



για την εξάτμιση του διαλύτη είναι το άζωτο(N₂) και η ταχύτητα ροής του δείγματος ήταν 50μl/min.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H⁺ : η μάζα του πρωτονίου.

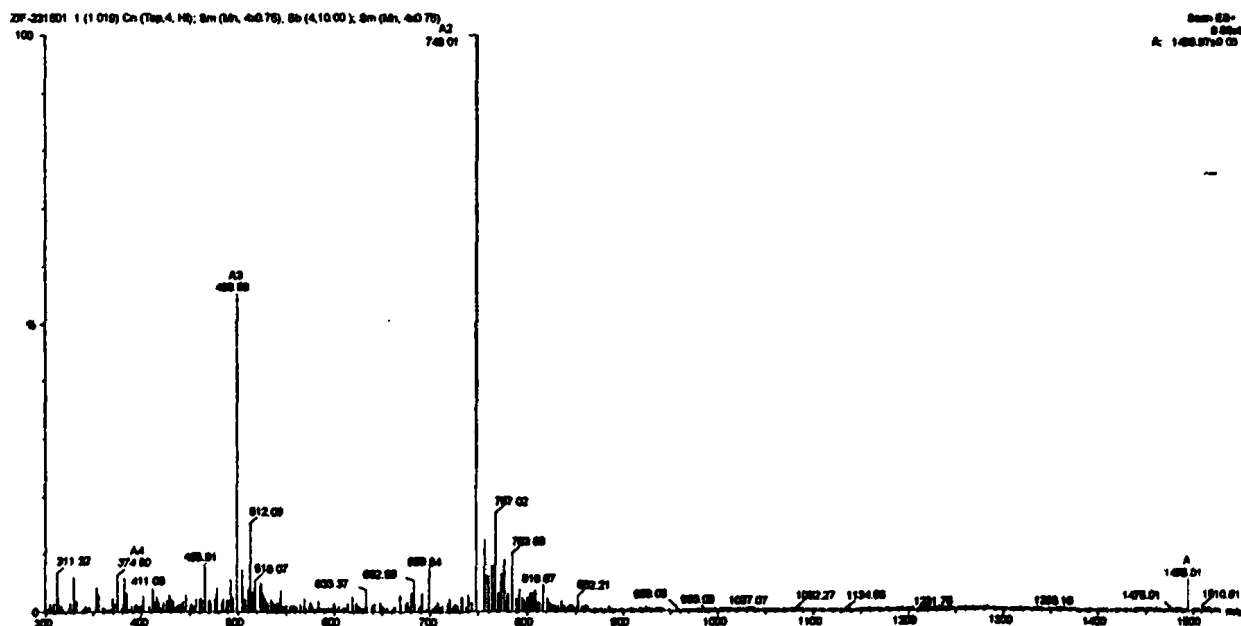
Στο σχήμα 58 φαίνεται το φάσμα για το ανάλογο zif-2. Ανιχνεύθηκαν 2 κύριες κορυφές. Η πρώτη αντιστοιχεί στο κλάσμα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 2H^+}{2}$$

και η δεύτερη στο κλάσμα μάζας,

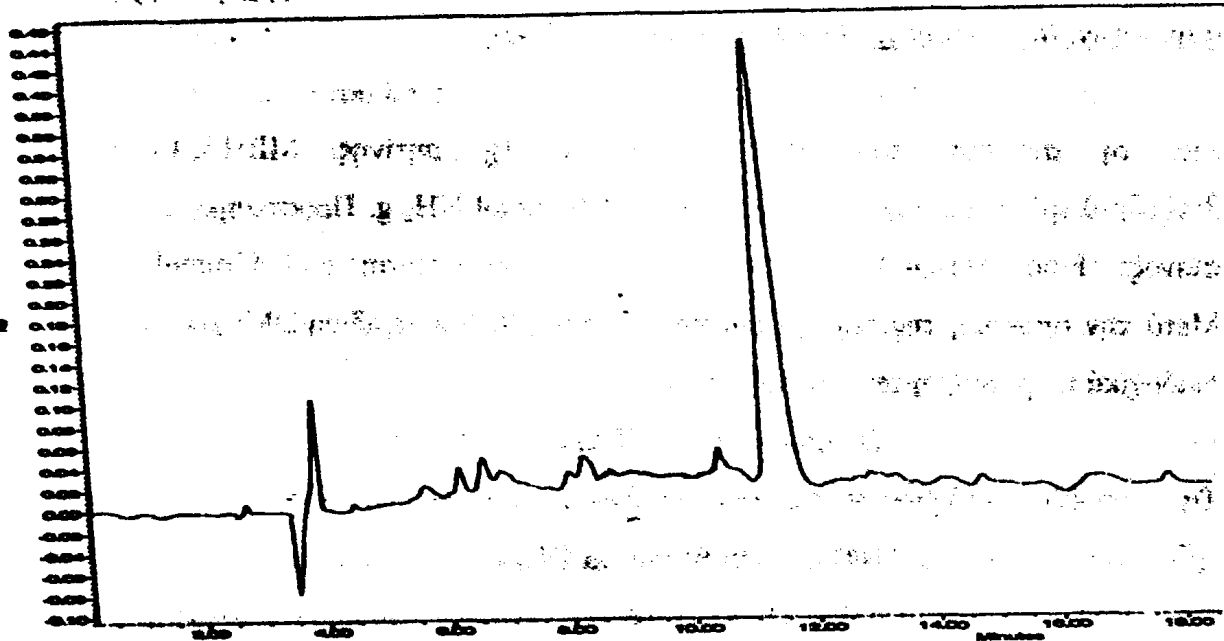
$$m/z = \frac{M + 3H^+}{3}$$

με δύο και τρεις θέσεις βασικότητας αντίστοιχα.



Σχήμα 58: Φάσμα μάζας ESI(Electrospray Ionization) του zif-2. Υπολογισθέν μοριακό ιόν [M+H⁺]=1494, ευρεθέν μοριακό ιόν [M+H⁺]=1493.97 .





Σχήμα 59: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το πεπτίδιο zif-2. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0.1%TFA, (B)CH₃CN/0.1%TFA, Χρόνος έκλουσης 30min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, Ταχύτητα ροής 1ml/min, Ανίχνευση στα 214nm.

αποδοτικότητα των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων είναι άριστη (RSD < 1%) και οι διαφορές των αποτελεσμάτων είναι ελάχιστες. Η μέση τιμή της απόδοσης είναι 100%. Η μέση τιμή της απόδοσης είναι 100%. Η μέση τιμή της απόδοσης είναι 100%.



VIB 4. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2b με αλληλουχία αμινοξέων: *Biotin-caproic-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂*

Για τη σύνθεση του χρησιμοποιήθηκαν 1g ρητίνης MBHA(4-μεθυλοβενζυδρολαμίνη) με αρχική υποκατάσταση 0.95mmol NH₂/g. Προστέθηκε το πρώτο αμινοξύ (Fmoc-Ala-OH) και έγινε μείωση της υποκατάστασης σε 0.43mmol NH₂/g. Μετά την αποκοπή της προστατευτικής ομάδας (40% πιπεριδίνη/DMF)ακολούθησε διαδοχικά η προσθήκη των αμινοξέων:

Biotin-caproic-VCEKLCGGGHPFH

Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Boc-παράγωγα ενώ ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν το TBTU, το BOP και το DCC, κατά περίπτωση, παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBt (1-υδροξυ-βενζοτριαζόλιο). Οι προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για το πεπτίδιο zif-1(πίνακας II).

Αφού ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο με τη βοήθεια μεθανόλης και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅(πεντοξειδίου του φωσφόρου). Ελήφθησαν τελικά 1.64g πεπτιδορητίνης με απόδοση σύνθεσης πριν από την αποκοπή του πεπτιδίου A₁%=82.4%. Ακολούθησε η αποκοπή του πεπτιδίου zif-2b από τη ρητίνη με κατεργασία με άνυδρο υγρό HF και παραλαβή του ακαθάρτου πεπτιδίου zif-2b με CH₃COOH 2N. Μετά τη λυοφιλοποίηση ελήφθησαν 729mg ακαθάρτου πεπτιδίου με απόδοση A₂%=92.4% .

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό του zif-1 πεπτιδίου (πίνακας III). Μετά τον καθαρισμό του πεπτιδίου zif-2b ελήφθησαν 58.32mg καθαρού πεπτιδίου με απόδοση A₃%=8%. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με τις εξής τεχνικές:

- Φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (σχήμα 60).
- Αναλυτική RP-HPLC (σχήμα 61).

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2b έγινε με τη χρήση της Electrospray Ionization(ESI-MS) Φασματοσκοπίας Μάζας. Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει διάλυση 0.1mg στερεάς ουσίας σε 1ml διαλύματος H₂O/CH₃CN/CH₃COOH σε αναλογία 0.45/0.45/0.1. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε

για την εξάτμιση του διαλύτη είναι το άζωτο (N_2) και η ταχύτητα ροής του δείγματος ήταν 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

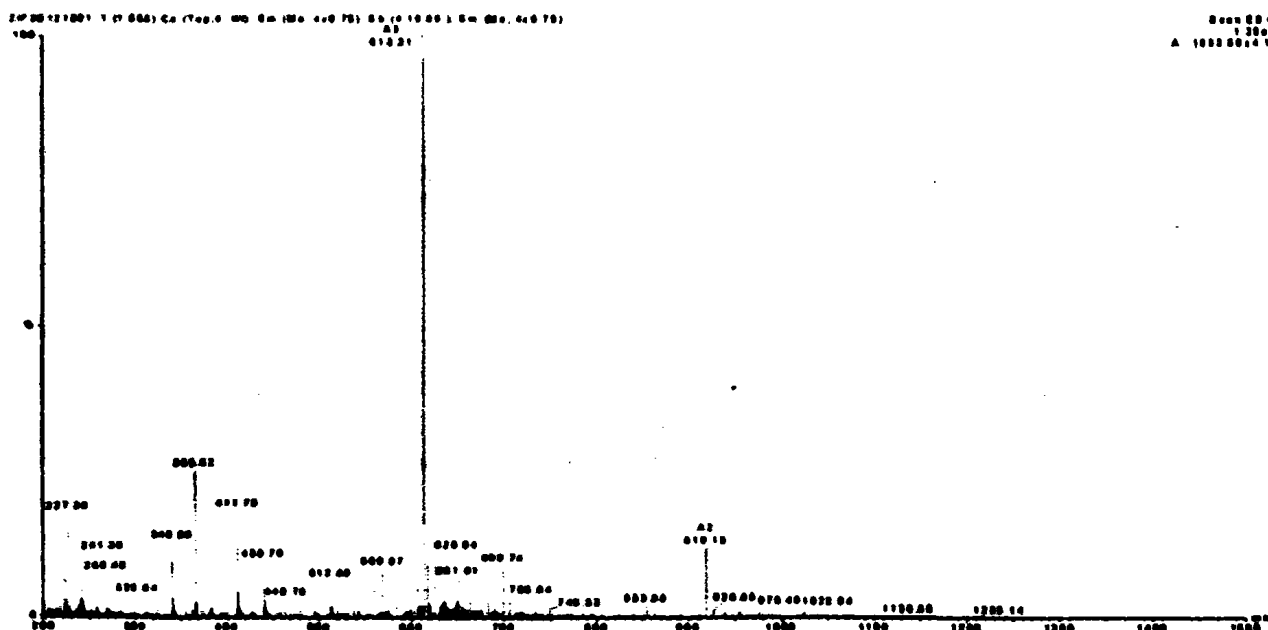
Στο σχήμα 60 φαίνεται το φάσμα για το ανάλογο zif-2b. Ανιχνεύτηκε 2 κύριες κορυφές, που αντιστοιχούν στο κλάσματα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 2H^+}{2}$$

και

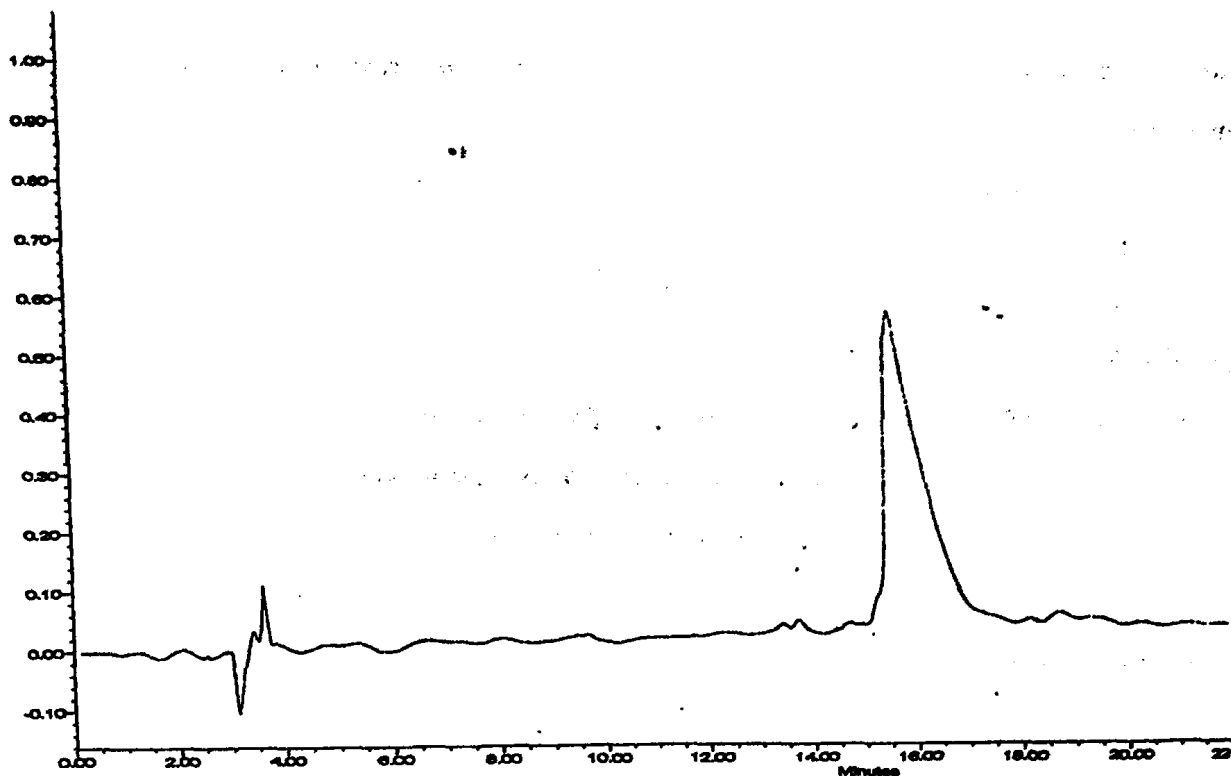
$$m/z = \frac{M + 3H^+}{3}$$

με δύο και τρεις θέσεις βασικότητας αντίστοιχα.



Σχήμα 60: Φάσμα μάζας ESI(Electrospray Ionization) του zif-2b. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=1835$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=1833.5$.



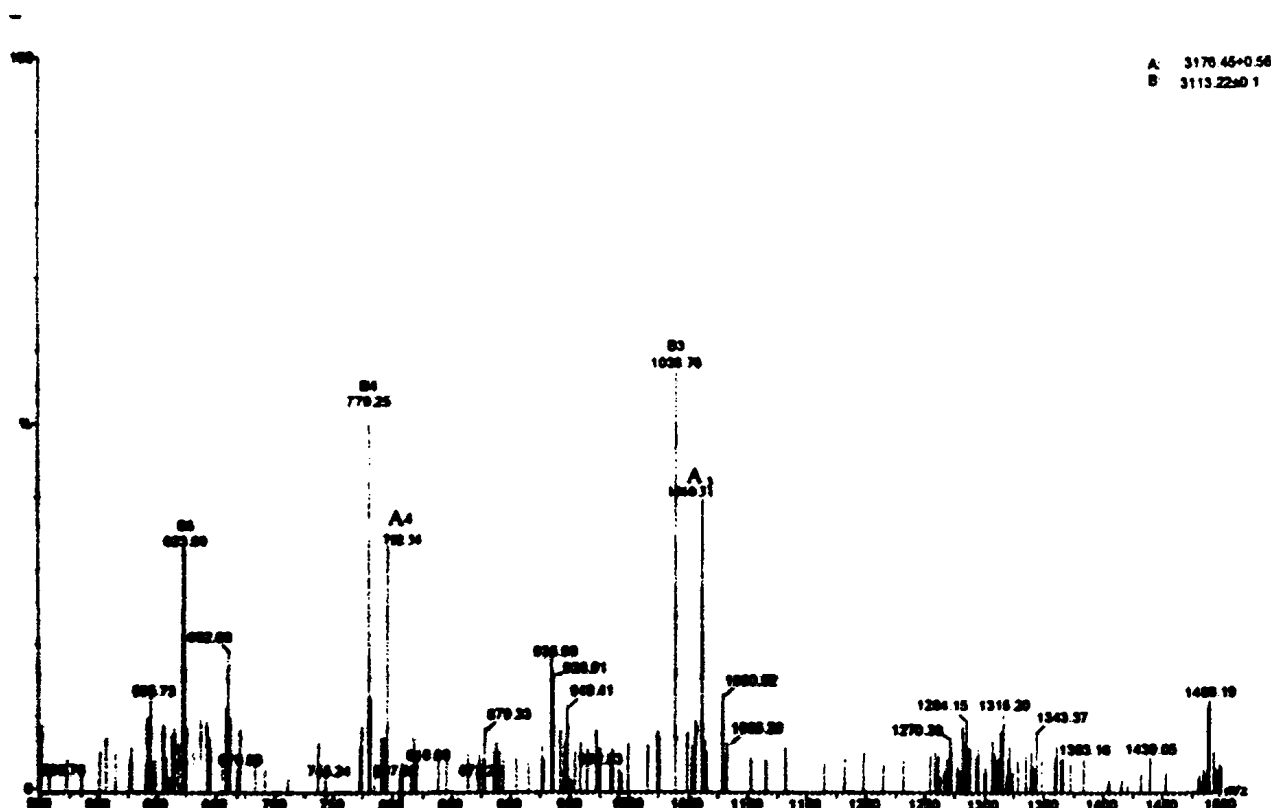


Σχήμα 61: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το πεπτίδιο zif-2b. Σύστημα έκλουσης (A) $H_2O/0.1\%TFA$, (B) $CH_3CN/0.1\%TFA$, Χρόνος έκλουσης 30min από A/B:80/20 σε A/B:40/60, Ταχύτητα ροής 1ml/min, Ανίχνευση στα 214nm.

VIΓ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ $zif-1/Zn^{+2}$, $zif-2/Zn^{+2}$ ΜΕ ESI-MS.

VIΓ 1. Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου $zif-1/Zn^{+2}$ σε αναλογία 1:1 με ESI-MS.

Για την παρασκευή του συμπλόκου $zif-1/Zn^{+2}$ 15.56mg(0.005mmol) πεπτιδίου $zif-1$ διαλύθηκαν σε 2ml απεσταγμένου H_2O . Ισομοριακή ποσότητα 50μL 0.1 M $Zn(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ προστίθενται αργά υπό συνεχή ανάδευση. Γίνεται ρύθμιση και διατήρηση του pH σε 6-7 με προσθήκη διαλύματος $NaOH$ 0.02N. Μετά από τρεις ώρες δείγμα του διαλύματος του συμπλόκου λυοφιλοποιείται και ο σχηματισμός του συμπλόκου πιστοποιείται με ESI-MS Φασματοσκοπία Μάζας(σχήμα 62).



Σχήμα 62: Φάσμα μάζας ESI-MS(ElectroSpray Ionization) του συμπλόκου $zif-1/Zn^{+2}$ σε αναλογία 1:1 μετά από τρεις ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{υπολ}}=3176$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{ευρ}}=3176.45$.



Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος ($zif-1+Zn$)

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Ανιχνεύθηκαν δυο κύριες κορυφές, που αντιστοιχούν στο κλάσματα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 3H^+}{3}$$

και

$$m/z = \frac{M + 4H^+}{4}$$

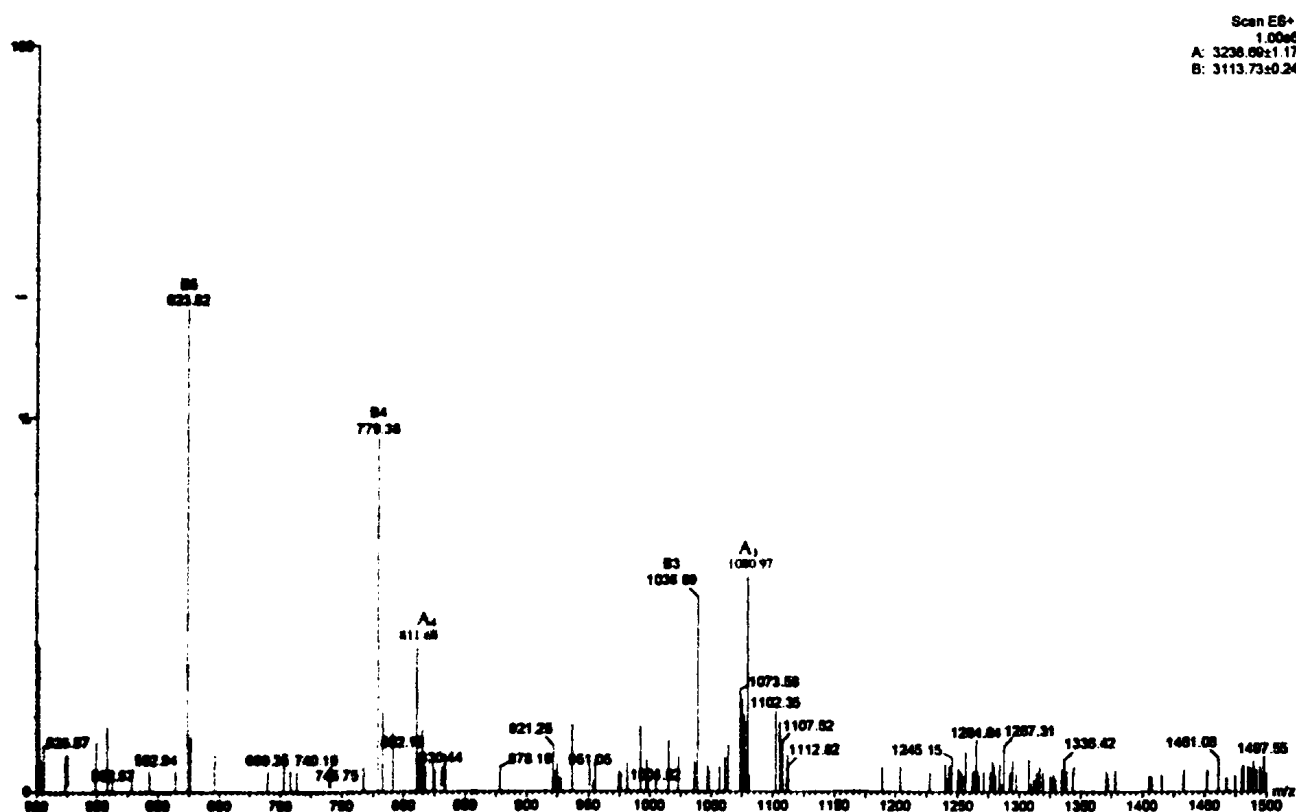
και αντιστοιχούν σε τρεις και τέσσερις θέσεις βασικότητας.

- Τα μοριακά ιόντα 1060.31(A_3) και 792.54(A_4) αντιστοιχούν στο σύμπλοκο $zif-1/Zn^{+2}$ σε αναλογία 1:1 με $(M+H^+)_{υπολ.}=3177$ και $(M+H^+)_{ευρ.}=3176.45$
- Τα μοριακά ιόντα 1038.75(B_3), 779.25 (B_4) και 623.69(B_5) αντιστοιχούν στο πεπτίδιο $zif-1$ με $(M+H^+)_{υπολ.}=3112$ και $(M+H^+)_{ευρ.}=3113.22$.
- Ως πιθανότεροι υποκαταστάτες του συμπλόκου $zif-1/Zn^{+2}$ σε αναλογία 1:1 αναμένεται να είναι οι παράπλευρες ομάδες των δύο Cys($-S^-$) και οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι των δυο His($-N$) που μπορούν να σχηματίσουν τετραεδρικό σύμπλοκο.



VIΓ 2. Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου $\text{zif-1}/(\text{Zn}^{+2})_2$ σε αναλογία 1:2 με ESI-MS.

Για την παρασκευή του συμπλόκου $\text{zif-1}/(\text{Zn}^{+2})_2$ 15.56mg(0.005mmol) πεπτιδίου zif-1 διαλύθηκαν σε 2ml απεσταγμένου H_2O . Διπλάσια ποσότητα 100 μL 0.1 M $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01mmol) προστίθεται αργά υπό συνεχή ανάδευση. Γίνεται ρύθμιση και διατήρηση του pH σε 6-7 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0.02N. Μετά από τρεις ώρες δείγμα του διαλύματος του συμπλόκου λυοφιλοποιείται και ο σχηματισμός του συμπλόκου πιστοποιείται με ESI-MS Φασματοσκοπία Μάζας (σχήμα 63).



Σχήμα 63: Φάσμα μάζας ESI-MS(ElectroSpray Ionization) του συμπλόκου $\text{zif-1}/(\text{Zn}^{+2})_2$ σε αναλογία 1:2 μετά από τρεις ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}^+]=3239$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}^+]=3238.69$.



Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος ($zif-1+2Zn$)

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Ανιχνεύτηκαν δυο κύριες κορυφές, που αντιστοιχούν στο κλάσματα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 3H^+}{3}$$

και

$$m/z = \frac{M + 4H^+}{4}$$

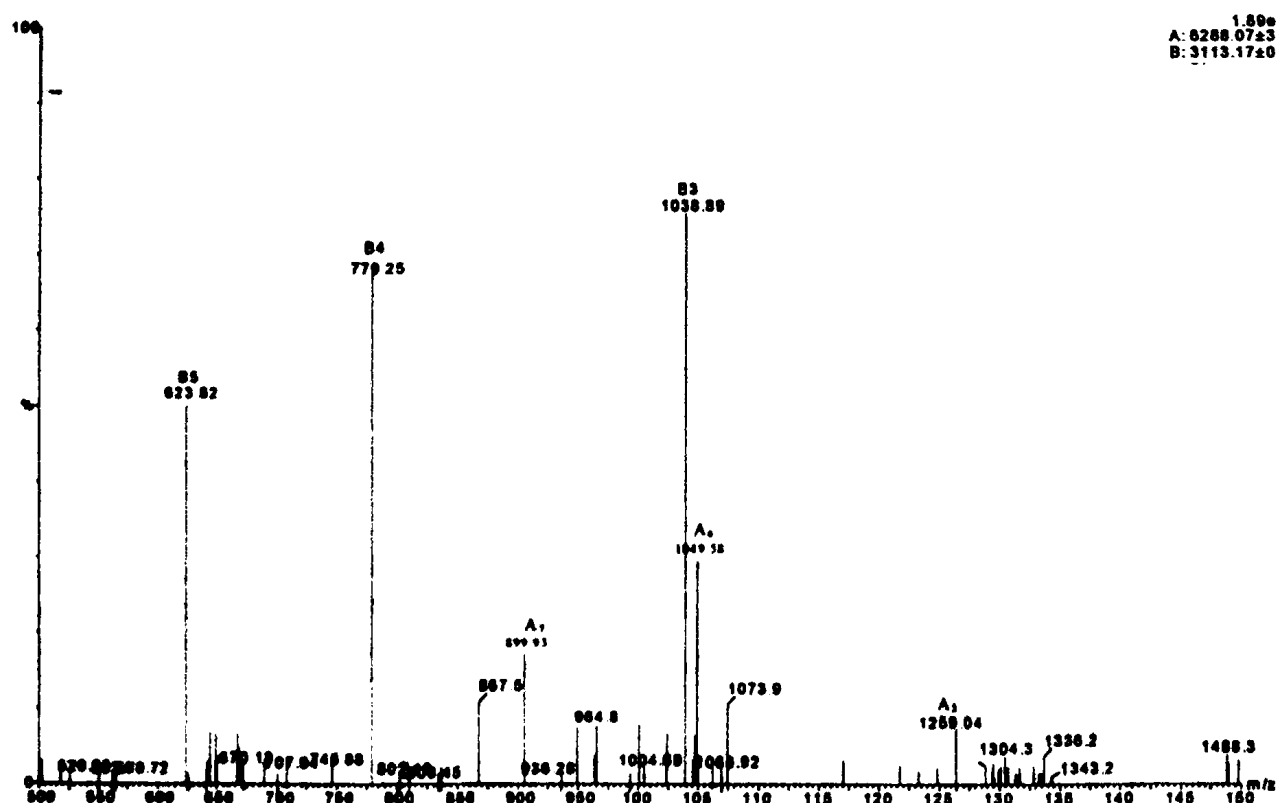
και αντιστοιχούν σε τρεις και τέσσερις θέσεις βασικότητας.

- Τα μοριακά ιόντα 1080.97(A_3) και 811.68(A_4) αντιστοιχούν στο σύμπλοκο $zif-1/(Zn^{+2})_2$ σε αναλογία 1:2 με $(M+H^+)_{\text{υπολ.}}=3239$ και $(M+H^+)_{\text{ευρ.}}=3238.69$.
- Τα μοριακά ιόντα 1038.8(B_3), 779.38 (B_4) και 623.82(B_5) αντιστοιχούν στο πεπτίδιο $zif-1$ με $(M+H^+)_{\text{υπολ.}}=3112$ και $(M+H^+)_{\text{ευρ.}}=3113.73$.
- Ως πιθανότεροι υποκαταστάτες του δεύτερου ιόντος ψευδαργύρου στο σύμπλοκο $zif-1/(Zn^{+2})_2$ σε αναλογία 1:2 αναμένεται να είναι οι παράπλευρες ομάδες των δυο $Glu(COO^-)$.



VIΓ 3. Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου $(zif-1)_2/Zn^{+2}$ σε αναλογία 2:1 με ESI-MS.

Για την παρασκευή του συμπλόκου $(zif-1)_2/Zn^{+2}$ 31.12mg(0.01mmol) πεπτιδίου zif-1 διαλύθηκαν σε 2ml απεσταγμένου H_2O . Υποδιπλάσια ποσότητα 50μL 0.1 M $Zn(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ (0.005mmol) προστίθεται αργά υπό συνεχή ανάδευση. Γίνεται ρύθμιση και διατήρηση του pH σε 6-7 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0.02N. Μετά από τρεις ώρες δείγμα του διαλύματος του συμπλόκου λυοφιλοποιείται και ο σχηματισμός του συμπλόκου πιστοποιείται με ESI-MS Φασματοσκοπία Μάζας(σχήμα 64).



Σχήμα 64: Φάσμα μάζας ESI-MS(ElectroSpray Ionization) του συμπλόκου $(zif-1)_2/Zn^{+2}$ σε αναλογία 2:1 μετά από τρεις ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{υπολ} = 6286.0$ ή 6288, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{ευρ} = 6288.07$.



Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος ($2zif-1 + Zn$)

n : ο αριθμός των θετικών φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Ανιχνεύτηκαν δυο κύριες κορυφές, που αντιστοιχούν στο κλάσματα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 5H^+}{5}$$

$$m/z = \frac{M + 6H^+}{6}$$

και

$$m/z = \frac{M + 7H^+}{7}$$

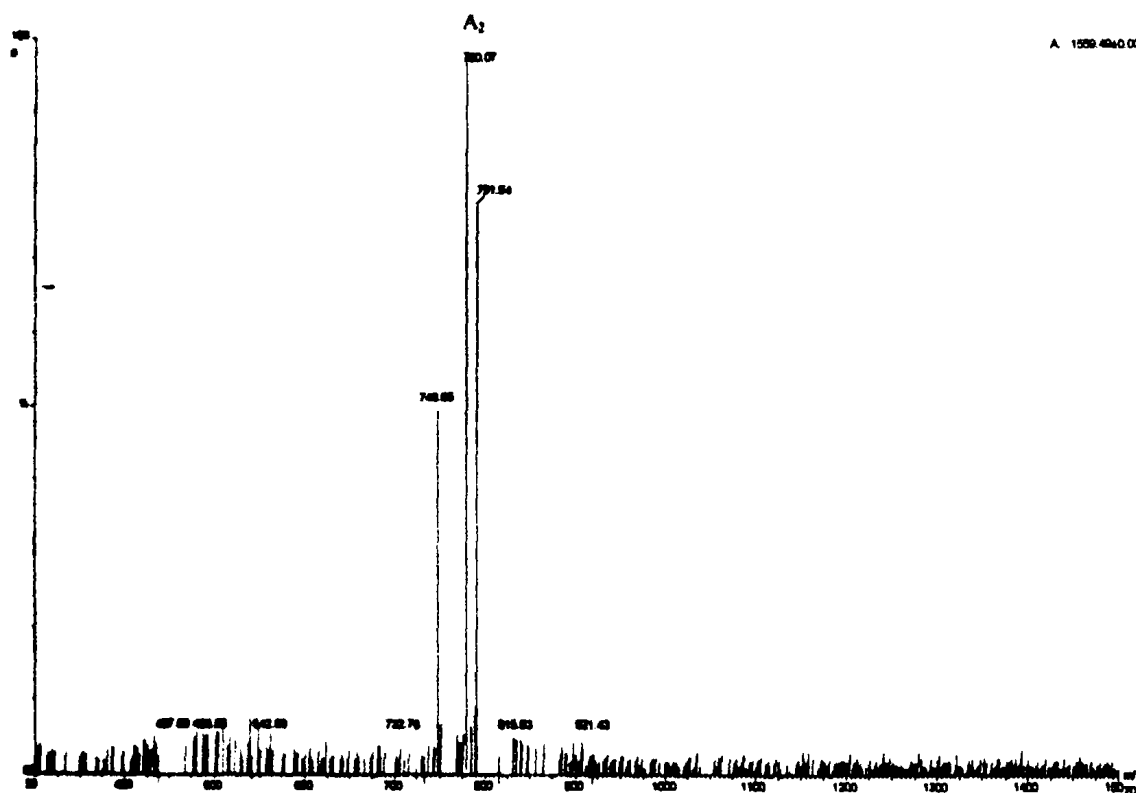
και αντιστοιχούν σε πέντε, έξι και επτά θέσεις βασικότητας.

- Τα μοριακά ιόντα 1259.04(A_5), 1049.58(A_6) και 899.93(A_7) αντιστοιχούν στο σύμπλοκο $(zif-1)_2/Zn^{+2}$ σε αναλογία 2:1 με $(M+H^+)_{υπολ.}=6286$ ή 6288 και $(M+H^+)_{ευρ.}=6288.07$.
- Τα μοριακά ιόντα 1038.62(B_3), 779.25 (B_4) και 623.82(B_5) αντιστοιχούν στο πεπτίδιο $zif-1$ με $(M+H^+)_{υπολ.}=3112$ και $(M+H^+)_{ευρ.}=3113.17$.
- Ως πιθανότεροι υποκαταστάτες του συμπλόκου $(zif-1)_2/Zn^{+2}$ σε αναλογία 2:1 είναι δυνατόν να εντάσσονται είτε δύο Cys($-S^-$) από κάθε πεπτίδιο [$(M+H^+)_{υπολ.}=6286$] είτε δυο Cys($-S^-$) από τον ένα πεπτιδικό υποκαταστάτη και δυο His($-N$) από τον άλλο [$(M+H^+)_{υπολ.}=6288$].



VI 4. Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-2/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1.

Για την παρασκευή του συμπλόκου zif-2/ Zn^{+2} 31.2mg(0.02mmol) πεπτιδίου zif-2 διαλύθηκαν σε 2ml απεσταγμένου H_2O . Ισομοριακή ποσότητα 200 μ L 0.1 M $Zn(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ προστίθεται αργά υπό συνεχή ανάδευση. Γίνεται ρύθμιση και διατήρηση του pH σε 6-7 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0.02N.. Μετά από 15 ώρες δείγμα του διαλύματος του συμπλόκου λυοφιλοποιείται και ο σχηματισμός του συμπλόκου πιστοποιείται με ESI-MS Φασματοσκοπία Μάζας(σχήμα 65).



Σχήμα 65: Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο zif-2/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 μετά από 15 ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{υπολ}} = 1558.0$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{εμφ}} = 1559.49$.

Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος (zif-2/Zn)

n : ο αριθμός των φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Στο σχήμα φαίνεται το φάσμα για το σύμπλοκο zif-2/ Zn^{+2} . Ανιχνεύτηκε 1 κύρια κορυφή, που αντιστοιχεί στο κλάσμα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 2H^+}{2}$$

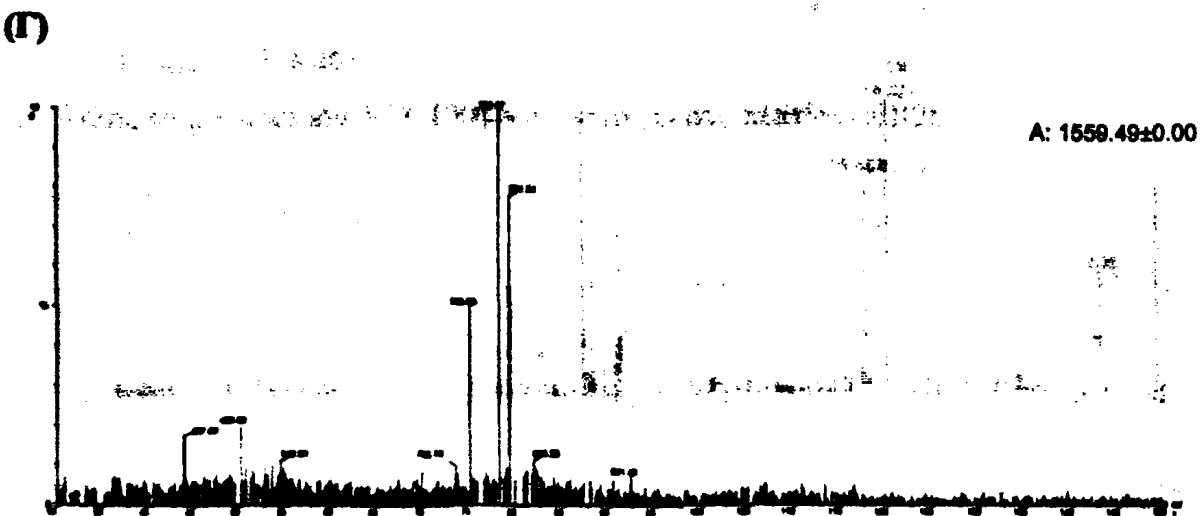
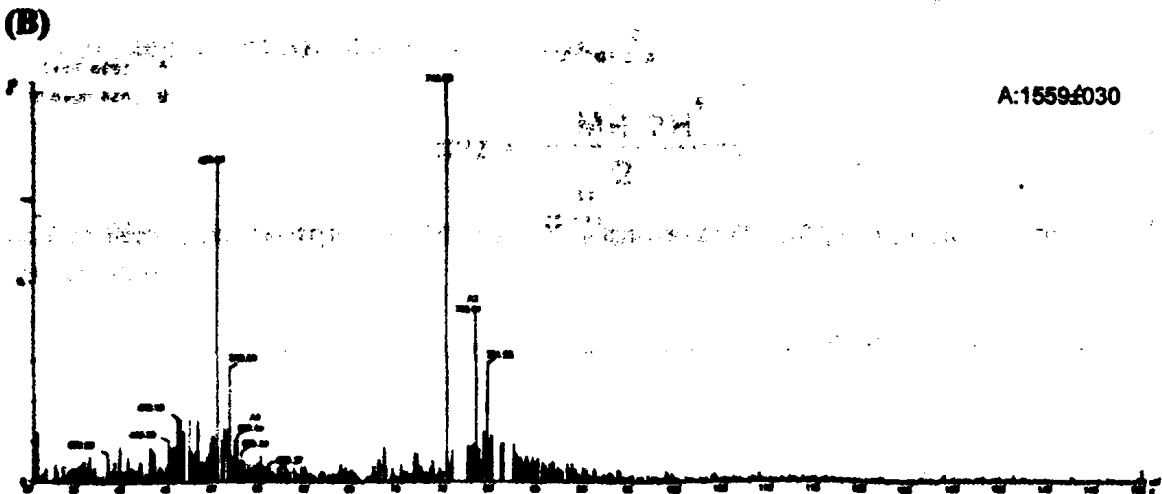
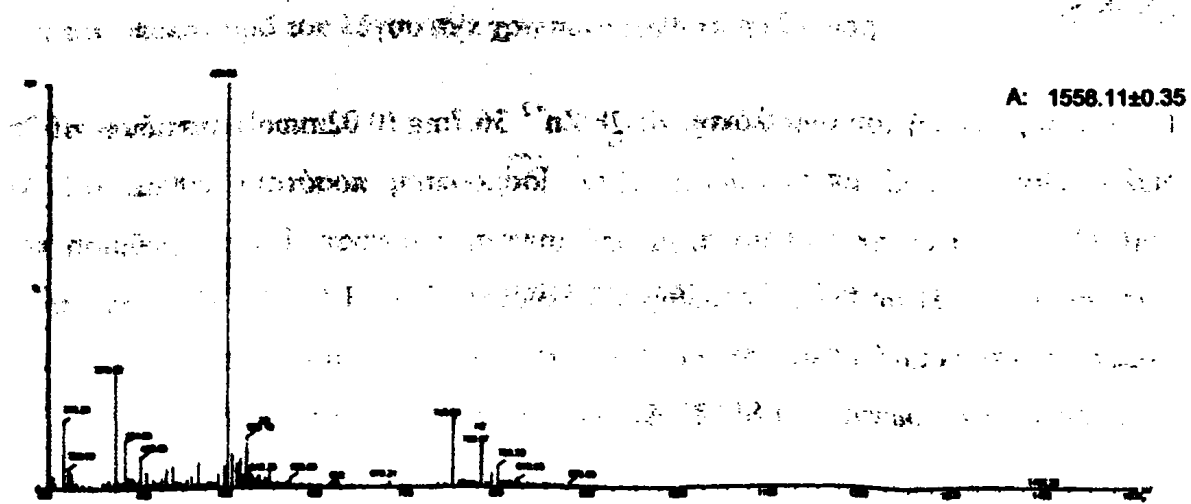
με δύο θέσεις βασικότητας αντίστοιχα, που αποτελεί ένδειξη σχηματισμού του συμπλόκου.

- Το μοριακό ιόν 780.75(A2) αντιστοιχεί στο σύμπλοκο zif-2/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 με $(M+H^+)_{\text{υπολ.}} = 1558$ και $(M+H^+)_{\text{ευρεθ.}} = 1559.49$.
- Το μοριακό ιόν 791.79 αντιστοιχεί στο σύμπλοκο του ψευδαργύρου με πιθανή ένταξη, εκτός των υποκαταστατών της Cys και His, επιπλέον ενός μορίου H_2O [$(M+H^+)_{\text{υπολ.}} = M_{\text{συμπλ.}} + M_{H_2O \text{ υπολ.}} = 1578$, $(M+H^+)_{\text{ευρεθ.}} = 1581.6$].
- Τέλος το μοριακό ιόν 748.4 αντιστοιχεί στο πεπτίδιο zif-2.

Μελετήθηκε η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου zif-2/ Zn^{+2} μετά από 1, 3 και 15 ώρες. Τα φάσματα μάζας που ελήφθησαν φαίνονται στο σχήμα(66). Παρατηρούμε αύξηση του σήματος που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν του συμπλόκου καθώς και σε αυτό που αντιστοιχεί στην ένταξη ενός μορίου νερού.



(A) **ESI-MS mass spectrum of the complex $zif-2/Zn^{+2}$ after 1 hour.**

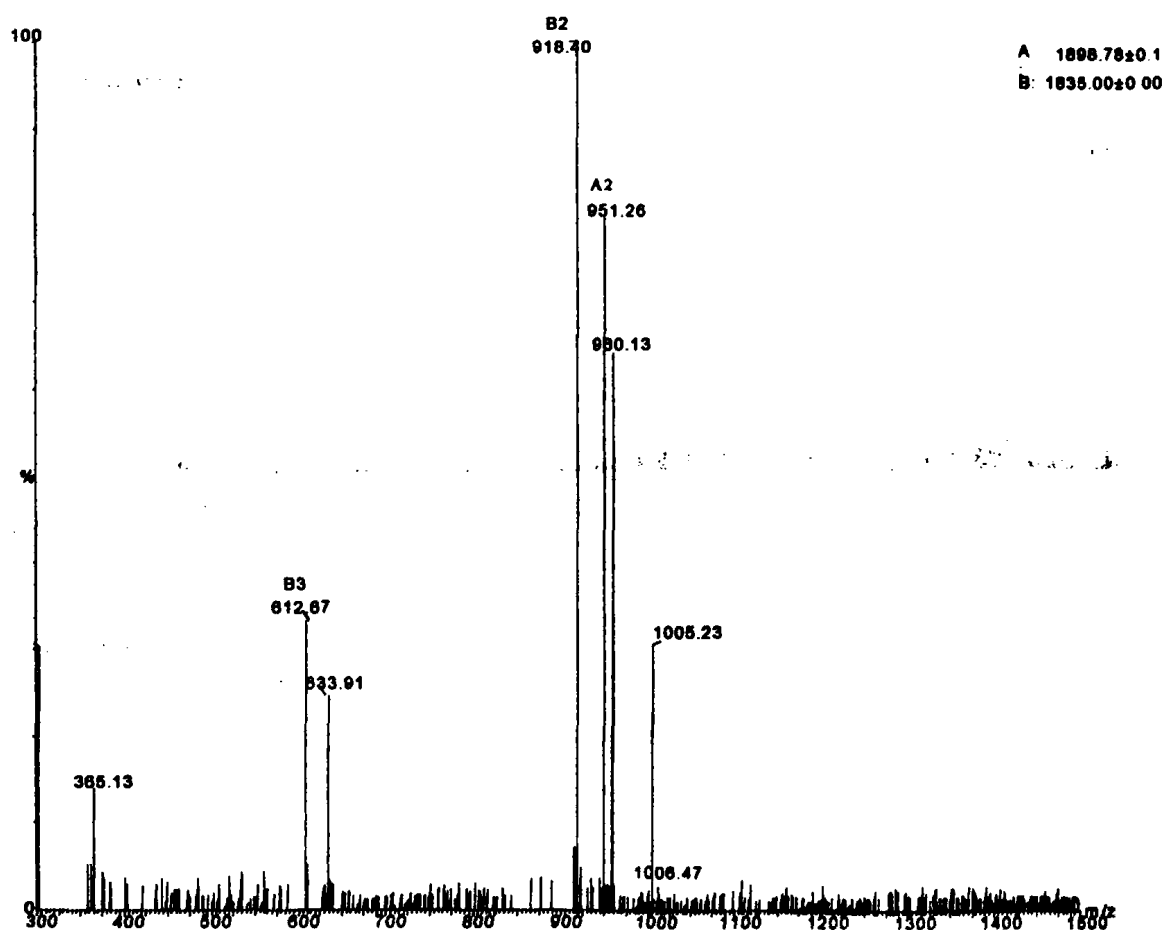


Σχήμα 66: Φάσμα ESI-MS μάζας του συμπλόκου $zif-2/Zn^{+2}$ (A) μετά από 1 ώρα, (B) μετά από 3 ώρες και (Γ) μετά από 15 ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{καλ}}=1558$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]_{\text{απ}}=1559.49$.



VIΓ 5. Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-2b/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 με ESI-MS.

Για την παρασκευή του συμπλόκου zif-2b/ Zn^{+2} 36.7mg (0.02mmol) πεπτιδίου zif-2b διαλύθηκαν σε 2ml απεσταγμένου H_2O . Ισομοριακή ποσότητα 200μL 0.1 M $Zn(ClO_4)_2 \times 6H_2O$ προστίθεται αργά υπό συνεχή ανάδευση. Γίνεται ρύθμιση και διατήρηση του pH σε 6-7 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0.02N. Μετά από τρεις ώρες δείγμα του διαλύματος του συμπλόκου λυοφιλοποιείται και ο σχηματισμός του συμπλόκου πιστοποιείται με ESI-MS Φασματοσκοπία Μάζας(σχήμα 67)



Σχήμα 67: Φάσμα ESI-MS για το σύμπλοκο zif-2b/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 μετά από 3 ώρες. Υπολογισθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=1898.4$, ευρεθέν μοριακό ιόν $[M+H^+]=1898.78$.



Για τον υπολογισμό του λόγου m/z χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$m/z = \frac{M + nH^+}{n}$$

Όπου,

M : η μοριακή μάζα του δείγματος ($zif-2b+Zn$)

n : ο αριθμός των φορτίων

H^+ : η μάζα του πρωτονίου.

Στο σχήμα φαίνεται το φάσμα για το σύμπλοκο $zif-2b/Zn^{+2}$. Ανιχνεύτηκε 1 κύρια κορυφή, που αντιστοιχεί στο κλάσμα μάζας,

$$m/z = \frac{M + 2H^+}{2}$$

με δύο θέσεις βασικότητας αντίστοιχα, που αποτελεί ένδειξη σχηματισμού του συμπλόκου.

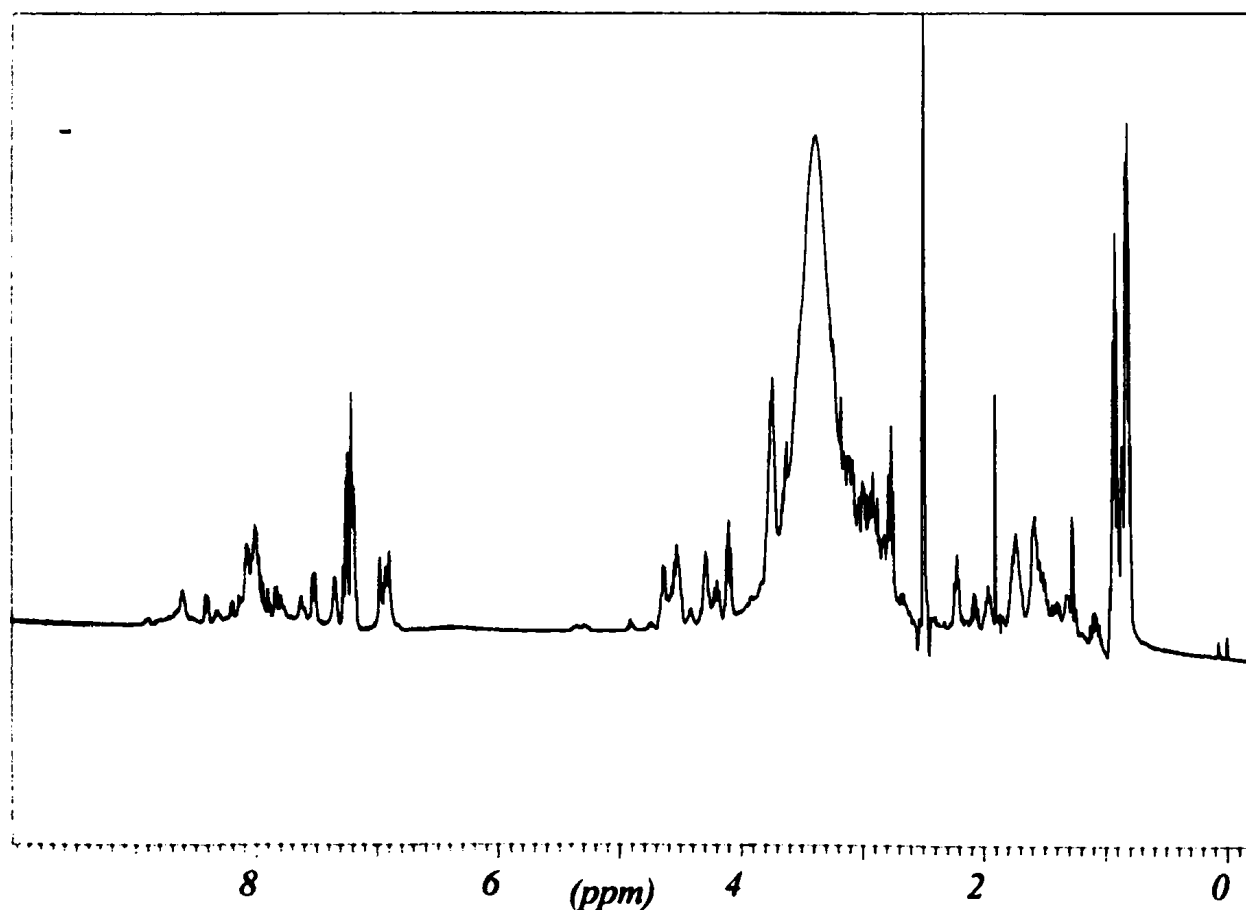
- Το μοριακό ιόν 951.26(A_2) αντιστοιχεί στο σύμπλοκο $zif-2b/Zn^{+2}$ σε αναλογία 1:1 με $(M+H^+)_{\text{υπολ}} = 1898.4$ και $(M+H^+)_{\text{επιρρ}} = 1898.78$
- Το μοριακό ιόν 960.13 αντιστοιχεί στο σύμπλοκο του ψευδαργύρου με πιθανή ένταξη επικλέον ενός μορίου $H_2O[(M+H^+)_{\text{υπολ}} = M_{\text{συμπλ.}} + M_{H_2O \text{ υπολ.}} = 1918,$ $(M+H^+)_{\text{επιρρ}} = 1918.26)$.
- Τέλος το μοριακό ιόν 918.40(B_2) αντιστοιχεί στο πεπτίδιο $zif-2b$.



ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ zif-2 ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ zif-2/Zn⁺²
ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H-NMR ΜΙΑΣ ΚΑΙ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ.

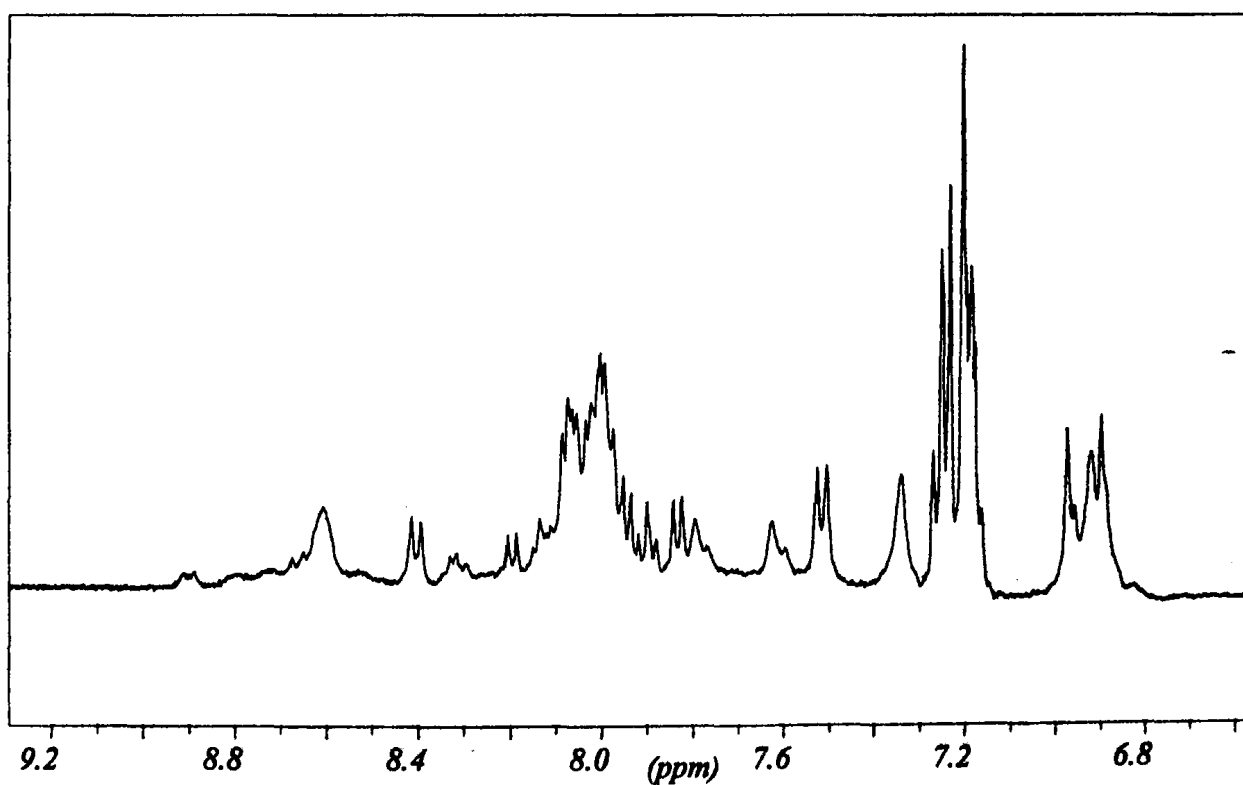
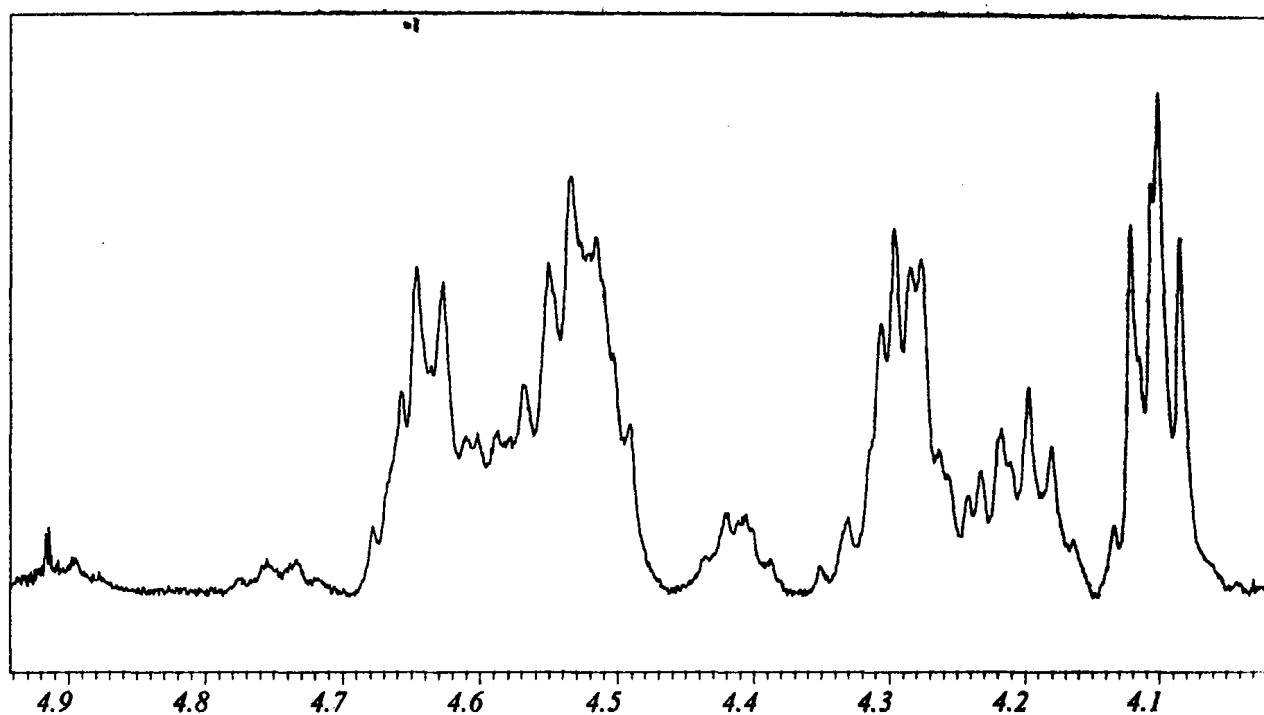
Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ¹H-NMR ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο zif-2 με αλληλουχία αμινοξέων: H-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂

Τα φάσματα μιας και δυο διαστάσεων ελήφθησαν σε DMSO-d₆ στα 400MHz. Για τη λήψη των φασμάτων το δείγμα διαλύθηκε αρχικά σε απεσταγμένο νερό, το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 2 με την προσθήκη HCl και στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκε. Μετά τη λυοφιλοποίηση το δείγμα διαλύθηκε σε 0.5ml (συγκέντρωση 5mM) DMSO-d₆.

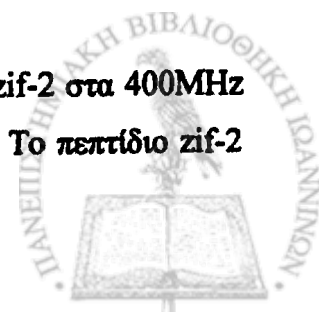


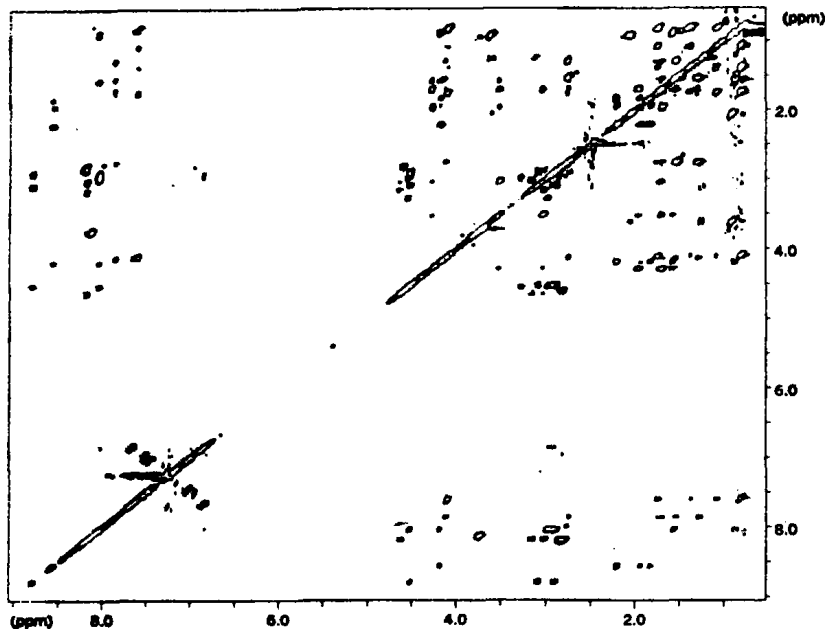
Σχήμα 68: Φάσμα ¹H-NMR μιας διάστασης του πεπτιδίου zif-2 στα 400MHz σε DMSO-d₆, σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία T= 300 K. Το πεπτίδιο zif-2 λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.



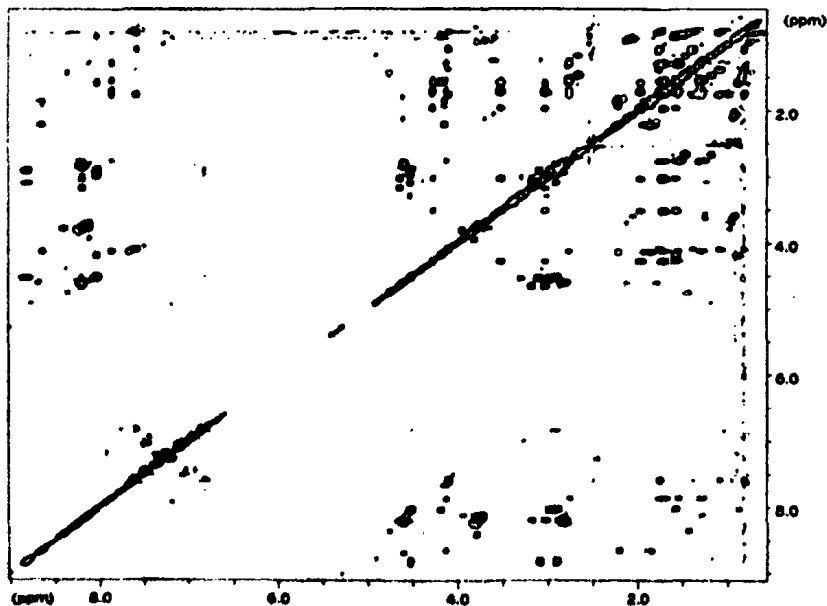


Σχήμα 69: Τμήματα του ¹H-NMR μιας διάστασης του πεπτιδίου zif-2 στα 400MHz σε DMSO-d₆, σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία T= 300 K. Το πεπτίδιο zif-2 λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.

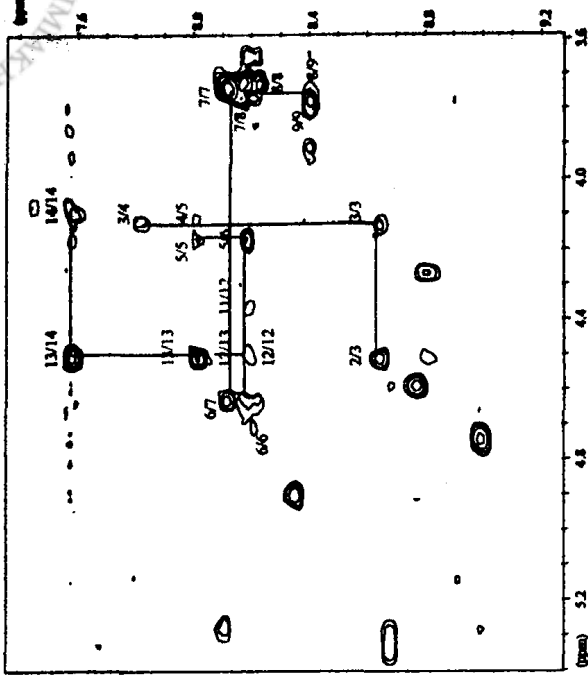
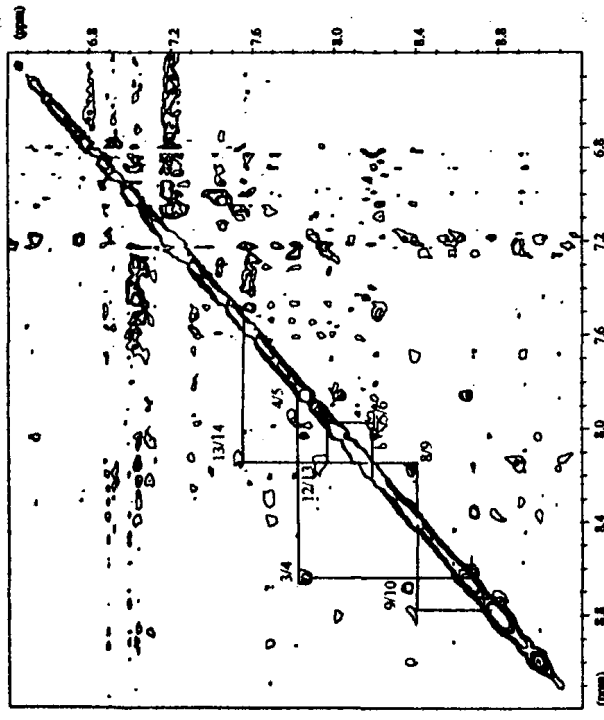




Σχήμα 70: Τμήμα TOCSY του πεπτιδίου zif-2 στα 400MHz σε DMSO-d₆ , σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία T= 300 K. Το πεπτίδιο zif-2 λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.



Σχήμα 71: Τμήμα NOESY του πεπτιδίου zif-2 στα 400MHz σε DMSO-d₆ , σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία T= 300 K. Το πεπτίδιο zif-2 λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.

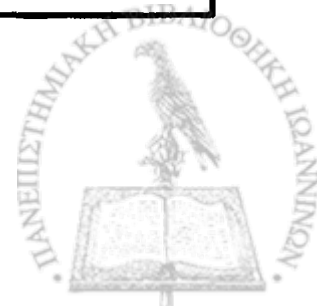


Σχήμα 72: Τμήματα του φάσματος NOESY του πεπτιδίου zif-2 στα 400MHz, σε DMSO-d₆ σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία 300°K. Το πεπτίδιο λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.

Η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων του πεπτιδίου και ο προσδιορισμός των χημικών τους μετατοπίσεων έγινε με συνδυαστική χρήση των NOESY και TOCSY φασμάτων. Στον πίνακα δίνονται συγκεντρωτικά οι χημικές μετατοπίσεις δ (σε ppm) των πρωτονίων του zif-2, ως προς TMS, σε DMSO- d_6 , στους 300 K. Το δείγμα έχει λυοφιλοποιηθεί σε pH=2.

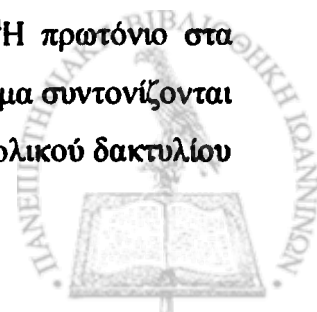
ΠΙΝΑΚΑΣ IV: Χημικές μετατοπίσεις δ (ppm) των πρωτονίων του πεπτιδίου zif-2, στα 400MHz σε DMSO- d_6 , σε συγκέντρωση 5mM και θερμοκρασία T= 300°K. Το πεπτίδιο zif-2 λυοφιλοποιήθηκε από υδατικό διάλυμα σε pH=2.

AMINOΞΥ	NH δ (ppm)	C ^{α} H δ (ppm)	C ^{β} H δ (ppm)	C ^{γ} H δ (ppm)	C ^{δ} H δ (ppm)	ΑΛΛΑ ΠΡΩΤΟΝΙΑ δ (ppm)
Val ¹	-	3.58	2.04	0.94 0.90	-	-
Cys ²	8.18	4.59	2.80	-	-	-
Glu ³	8.64	4.12	1.92	2.19	-	-
Lys ⁴	7.86	4.11	1.76 1.68	1.29	1.54	N ^{ϵ} H: 2.73
Leu ⁵	8.02	4.18	1.56	-	0.89 0.86	-
Cys ⁶	8.18	4.59	2.80	-	-	-
Gly ⁷	8.12	3.74	-	-	-	-
Gly ⁸	8.17	3.74	-	-	-	-
Gly ⁹	8.40	3.79	-	-	-	-
His ¹⁰	8.18	4.64	3.14 3.02	-	-	-
Pro ¹¹	-	4.27	1.95 1.71	1.57	3.50 3.01	-
Phe ¹²	8.02	4.52	2.96 2.90	-	-	-
His ¹³	8.81	4.52	3.11 3.08	-	-	NHμδ: 8.03 8.01
Ile ¹⁴	7.58	4.07	1.74	1.39 1.08	0.80	-



Από τις τιμές αυτές παρατηρούμε τα εξής:

- Το C^αH της Val¹ συντονίζεται στα 3.58ppm, τα C^βH στα 2.04ppm ενώ τα C^γH είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 0.94 και 0.90ppm αντίστοιχα.
- Το -NH της Cys² συντονίζεται στα 8.18ppm, το C^αH στα 4.59ppm ενώ τα C^βH₂ στα 2.80ppm.
- Το -NH πρωτόνιο του Glu³ συντονίζονται στα 8.64ppm, το C^αH στα 4.12ppm, τα C^βH₂ στα 1.19ppm και τα C^γH₂ στα 2.19ppm.
- Το -NH της Lys⁴ της συντονίζεται στα 7.86 ppm, το C^αH στα 4.11ppm, ενώ τα C^βH₂ είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 1.76 και 1.68ppm, τα C^γH₂ στα 1.29ppm, τα C^δH₂ στα 1.54ppm και τα C^εH₂ στα 1.54 ppm.
- Το -NH της Leu⁵ συντονίζονται στα 8.02ppm, το C^αH πρωτόνιο στα 4.18ppm, τα C^βH₂ είναι μαγνητικά ισοδύναμα και απορροφούν στα 1.56ppm ενώ τα C^δH₂ είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 0.89 και 0.86ppm αντίστοιχα.
- Το -NH της Cys⁶ συντονίζεται στα 8.18ppm, το C^αH στα 4.59ppm ενώ τα C^βH₂ στα 2.80ppm.
- Το -NH της Gly⁷ συντονίζεται στα 8.12ppm και το C^αH πρωτόνιο στα 3.74ppm
- Το -NH της Gly⁸ συντονίζεται στα 8.17ppm και το C^αH πρωτόνιο στα 3.74ppm.
- Το -NH της Gly⁹ συντονίζεται στα 8.40ppm και τα C^αH πρωτόνια στα 3.79ppm.
- Το αμιδικό -NH πρωτόνια της His¹⁰ απορροφούν στην περιοχή των 8.18ppm, το C^αH στα 4.64ppm, τα C^βH₂ είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και απορροφούν στα 3.14 και 3.02ppm αντίστοιχα.
- Τα C^αH και C^γH₂ της Pro¹¹ συντονίζονται στα 4.27 και 1.57ppm αντίστοιχα. Τα C^βH₂ της Pro είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 1.95 και 1.71ppm αντίστοιχα. Τέλος τα C^δH₂ είναι επίσης μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 3.50 και 3.01ppm αντίστοιχα.
- Το -NH της Phe¹² συντονίζεται στα 8.02ppm, το C^αH πρωτόνιο στα 4.52ppm και τα C^βH₂, τα οποία είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα συντονίζονται στα 2.96 και 2.90ppm αντίστοιχα.
- Το αμιδικό -NH της His¹³ συντονίζεται στα 8.81ppm, το C^αH πρωτόνιο στα 4.52ppm ενώ τα C^βH₂ πρωτόνια που είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα συντονίζονται στα 3.11 και 3.08ppm αντίστοιχα. Σε pH=2 τα άζωτα του μιδαζολικού δακτυλίου



είναι πρωτονιωμένα με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σήματα στα 8.03 και 8.01ppm αντίστοιχα.

- Το $-NH$ της Pe^{14} συντονίζεται στα 7.58ppm, το $C^{\alpha}H$ πρωτόνιο στα 4.07ppm και τα $C^{\beta}H_2$, τα οποία είναι μαγνητικά ισοδύναμα συντονίζονται στα 1.74ppm, τα $C^{\gamma}H_2$ είναι επίσης μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 1.39 και 1.08ppm αντίστοιχα και τα $C^{\delta}H_2$ στα 0.80ppm.



ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ELISA.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 87 οροί ασθενών με αντι-Ro ή με αντι-Ro/αντι-La αντισώματα και 35 οροί φυσιολογικοί. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Zif-1b: *biotin-caproic-VSLVCEKLCNEKLLKKARIHPFHILIA-NH₂*

Zif-2b: *biotin-caproic-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂*

▪ 1^ο πείραμα παρουσία φαινανθρολίνης

Η διεξαγωγή του πειράματος παρουσία φαινανθρολίνης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

⊙ Κάλυψη των θέσεων του πλακιδίου ELISA με 100μL διαλύματος (5mg/ml) πεπτιδίου σε pH=9.6 (zif-1b ή zif-2b) και επώαση για 24h(+4 °C).

⊙ Απόρριψη του περιεχομένου του πλακιδίου και προσθήκη 18μL ρυθμιστικού διαλύματος(blocking buffer) σε κάθε θέση για 1 ώρα, ώστε να καλυφθούν οι κενές θέσεις του πλακιδίου που δεν περιέχουν πεπτίδιο.

- blocking buffer : 1g ορού αλβουμίνης βοός(BSA) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και NaCl(PBS), pH=7.4 σε 750ml H₂O.

+ 2ml φαινανθρολίνης (15mg φαινανθρολίνης σε 750μL δ/τος)

⊙ Απόρριψη του blocking buffer και προσθήκη 100μL δ/των ορών σε κάθε θέση του πλακιδίου. Επώαση για 24h (+4 °C).

- Δ/μα ορού: αραιώση 1/120 του ορού σε blocking buffer.

⊙ Απόρριψη περιεχομένου.

⊙ Έκπλυση 3 φορές κάθε θέσης του πλακιδίου με 180 μL δ/τος PBS.

⊙ Προσθήκη 100μL δ/τος conjugate σε κάθε θέση του πλακιδίου και παραμονή για 1 ώρα.

- Conjugate: αντι-αντίσωμα + αλκαλική φωσφατάση

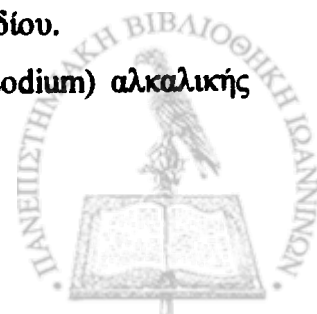
- Conjugate: αραιώση 1/1400 του conjugate σε blocking buffer.

⊙ Απόρριψη περιεχομένου, έκπλυση 3 φορές κάθε θέσης του πλακιδίου με 180 μL δ/τος PBS.

⊙ Προσθήκη 100μL δ/τος υποστρώματος σε κάθε θέση του πλακιδίου.

- Δ/μα υποστρώματος: υπόστρωμα(p-nitrophenyl phosphate disodium) αλκαλικής φωσφατάσης + 20ml buffer διαιθανολαμίνης.

⊙ Ανάπτυξη χρώματος και λήψη απορρόφησης στα 410nm.



• 2^ο πείραμα απουσία φατινθρολίνης

Θ Κάλυψη των θέσεων του πλακιδίου με 100 δ/τος κεπτιδίου (zif-1b ή zif-2b) και επώαση για 24h (+4°C). Το πλακίδιο κλείνεται αεροσταγώς.

- Δ/μα κεπτιδίου: 10μL δ/τος κεπτιδίου (5mg/ml) + 10 NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ σε pH=6.33 + 200μL δ/τος διθειοθρεϊτόλης (DTT) σε 1 EtOH_(abs) ως αναγωγικό μέσο

Θ Απόρριψη του περιεχομένου του πλακιδίου και προσθήκη 180μL blocking buffer και διαλύματος Zn⁺² σε κάθε θέση για 1 ώρα.

- blocking buffer: 2g BSA σε PBS1x μέχρι τελικό όγκο 100ml + 880μL δ/τος Zn⁺².

Θ Απόρριψη του blocking buffer.

Θ Προσθήκη 100μL δ/τος ορού σε κάθε θέση του πλακιδίου και επώαση για 24h (+4°C). Το πλακίδιο κλείνεται αεροστεγώς.

-Δ/μα ορού: αραιώση 1/110 του ορού σε blocking buffer.

Θ Απόρριψη περιεχομένου.

Θ Έκλυση 3 φορές κάθε θέσης του πλακιδίου με 180 μL δ/τος PBS κάθε φορά.

Θ Προσθήκη 100μL δ/τος conjugate σε κάθε θέση του πλακιδίου και παραμονή για 1 ώρα.

- Conjugate: αντι-αντίσωμα + αλκαλική φωσφατάση.

- Conjugate: αραιώση 1/1400 του conjugate σε blocking buffer.

Θ Απόρριψη του περιεχομένου.

Θ Έκλυση 3 φορές κάθε θέσης του πλακιδίου με 180μL δ/τος PBS κάθε φορά.

Θ Προσθήκη 100μL δ/τος υποστρώματος σε κάθε θέση του πλακιδίου.

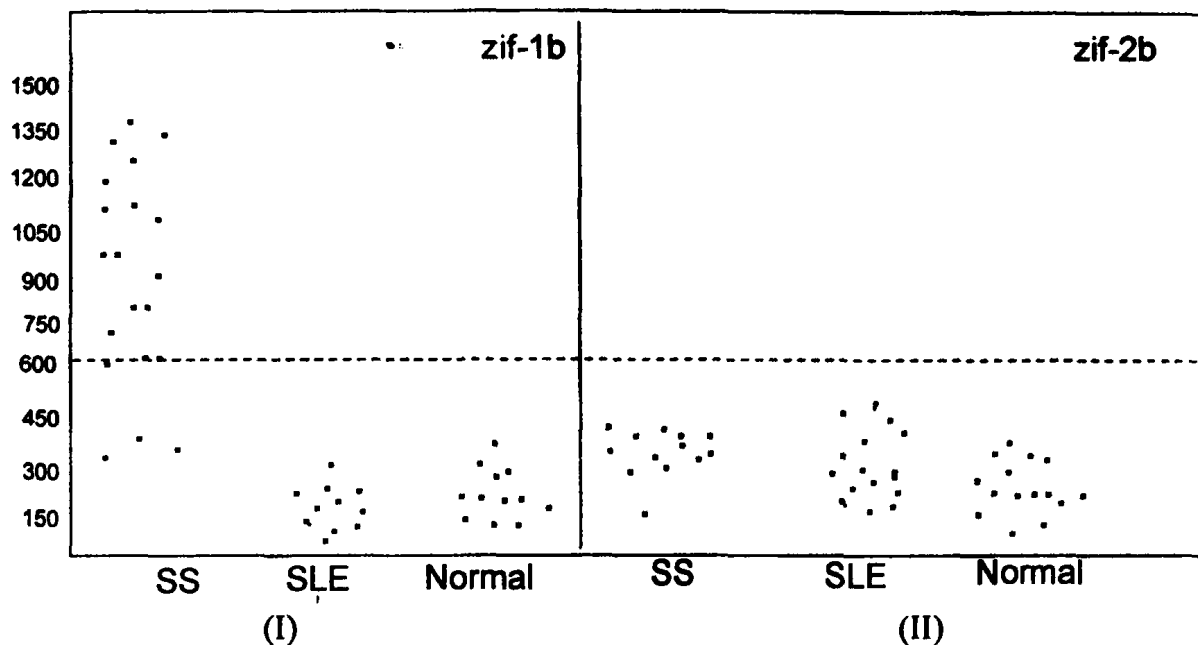
- Δ/μα υποστρώματος: υπόστρωμα φωσφατάσης + 20ml διαιθανολαμίνης

Θ Ανάπτυξη χρώματος και λήψη απορροφήσεων στα 410nm.

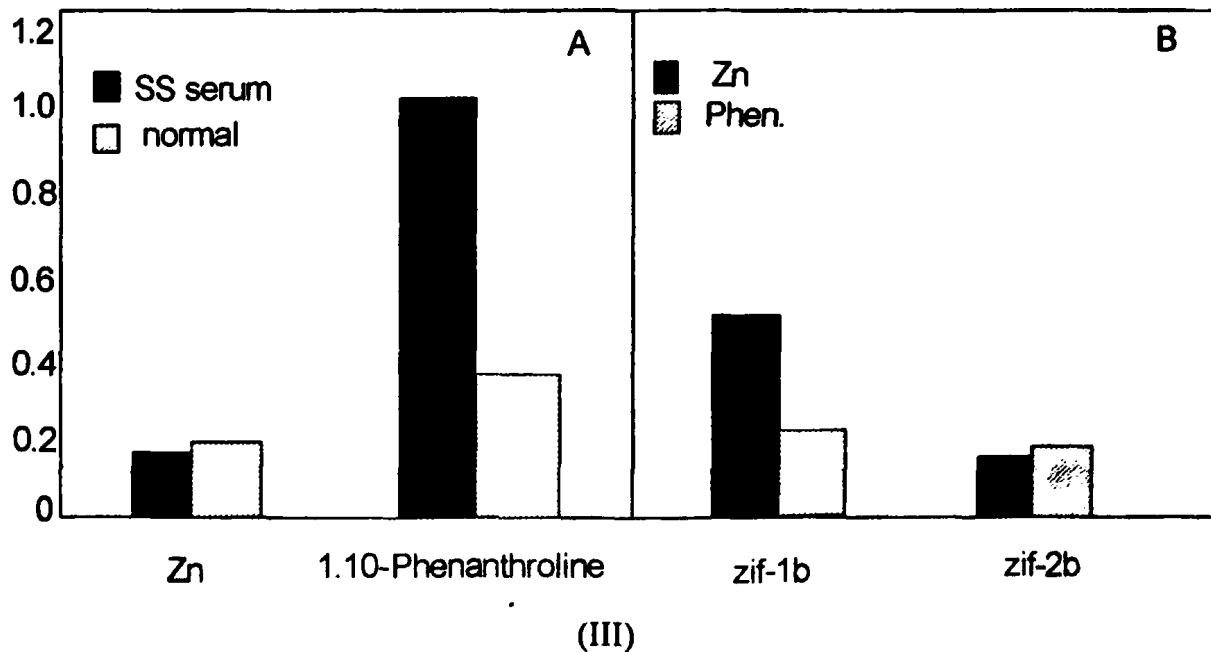
• 3^ο πείραμα αναγνώρισης της r.Ro52KD

Ανάλογο πείραμα έγινε με επίστρωση της r.Ro52KD στα πλακίδια για να μελετηθεί η αναγνώρισή της από τα zif-1b και zif-2b παρουσία και απουσία ιόντων Zn⁺².





Σχήμα 73: Πειράματα ELISA αναγνώρισης των πεπτιδίων zif-1b(I) και zif-2b(II) από ορούς ασθενών με SS(anti-Ro/SSA θετικοί), SLE(anti-Ro/SSA αρνητικοί) και φυσιολογικούς(normal) ορούς παρουσία φαινανθρολίνης.



Σχήμα 74: Πειράματα ELISA αναγνώρισης του συμπλόκου zif-1b/ Zn^{+2} από ορούς ασθενών με SS(anti-Ro/SSA θετικοί), SLE(anti-Ro/SSA αρνητικοί) και φυσιολογικούς(normal) ορούς παρουσία 1.10 φαινανθρολίνης(III-A). Πειράματα ELISA αναγνώρισης των πεπτιδίων zif-1b και zif-2b από την r.Ro52KD παρουσία και απουσία ιόντων Zn^{+2} (III-B).

Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από τα πειράματα ELISA αναγνώρισης ορών ασθενών με SS και SLE από τα πεπτίδια zif-1b και zif-2b φαίνονται στο σχήμα 73.

- Οι οροί ασθενών με σύνδρομο Sjogren(SS) αναγνωρίζουν το βιοτινυλιωμένο zif-1b(σχήμα 73-I), ενώ δεν αναγνωρίζουν το βιοτινυλιωμένο zif-2b(σχήμα 73-II). Στο πείραμα τα ίχνη ιόντων Zn^{+2} όλων των διαλυμάτων έχουν απομακρυνθεί με 1.10 φαινανθρολίνη.
- Τα πειράματα ELISA έδειξαν, επίσης, ότι οι οροί ασθενών με σύνδρομο Sjogren αναγνωρίζουν το βιοτινυλιωμένο zif-1b, απουσία ιόντων Zn^{+2} (σχήμα 74III-A).
- Πειράματα ELISA έδειξαν πως η r.Ro52KD αναγνωρίζει πιο ισχυρά το βιοτινυλιωμένο zif-1b σε σχέση με το βιοτινυλιωμένο zif-2b(σχήμα 74III-B) παρουσία ιόντων Zn^{+2} (σχήμα 74III-B).



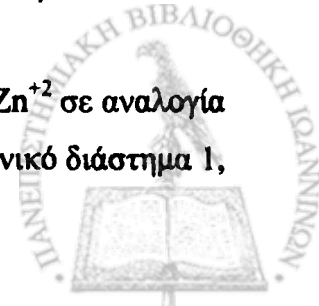
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Στην εργασία αυτή έγινε η σύνθεση με τη μέθοδο της στερεής φάσης κατά Merrifield, ο καθαρισμός με χρωματογραφία υψηλής διακριτικής ικανότητας (HPLC) και η ταυτοποίηση με Electrospray Ionization φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS) καθώς και με $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία των παρακάτω μοντέλων του δακτύλου ψευδαργύρου του αυτοαντιγόνου Ro60KD:

- a) zif-1: *H-VSLVCEKLCNEKLLKKARIHPFHIAIA-NH₂*
- b) zif-1b: *biotin-caproic-VSLVCEKLCNEKLLKKARIHPFHIAIA-NH₂*
- c) zif-2: *H-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂*
- d) zif-2b: *Biotin-caproic-VCEKLCGGGHPFHI-NH₂*

II. Παρασκευάστηκαν επίσης τα σύμπλοκα του zif-1 μοντέλου του δακτύλου ψευδαργύρου με ιόντα Zn^{+2} στις αναλογίες πεπτιδίου:μετάλλου, 1:1, 1:2 και 2:1 καθώς και του zif-2 και zif-2b σε αναλογία πεπτιδίου:μετάλλου 1:1 και ο σχηματισμός τους πιστοποιήθηκε με ESI-MS.

- Στην περίπτωση του συμπλόκου zif-1/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 από τα αποτελέσματα του ESI-MS προκύπτει ότι το ιόν ψευδαργύρου εντάσσεται με δυο Cys και δυο His του πεπτιδικού υποκαταστάτη.
- Στο σύμπλοκο zif-1/ $(\text{Zn}^{+2})_2$ σε αναλογία 1:2 από τα αποτελέσματα του ESI-MS προκύπτει ότι το ένα ιόν ψευδαργύρου εντάσσεται με δυο Cys και δυο His, ενώ το δεύτερο ιόν Zn^{+2} πολύ πιθανόν να εντάσσεται με δυο Glu(COO⁻) και δυο καρβονυλικές ομάδες του πεπτιδικού σκελετού.
- Στο σύμπλοκο $(\text{zif-1})_2/\text{Zn}^{+2}$ σε αναλογία 2:1 από τα αποτελέσματα του ESI-MS τα ιόντα Zn^{+2} είναι δυνατόν να εντάσσονται (α) με δυο Cys από κάθε πεπτιδικό υποκαταστάτη, το οποίο συμφωνεί με $(\text{M}+\text{H}^+)=6286$, ή (β) με δυο Cys από τον ένα πεπτιδικό υποκαταστάτη και δυο His από τον άλλο, το οποίο συμφωνεί με $(\text{M}+\text{H}^+)=6288$. Η περίπτωση (β) συμπίπτει πλήρως με το $(\text{M}+\text{H}^+)_{\text{exp}}$ που είναι 6288.07.
- Τα σύμπλοκα zif-2/ Zn^{+2} και zif-2b/ Zn^{+2} σε αναλογία πεπτιδίου:μετάλλου 1:1 εντάσσεται με δυο Cys και δυο His.
- Παρατηρήθηκε αύξηση του σχηματισμού του συμπλόκου zif-2/ Zn^{+2} σε αναλογία 1:1 συναρτήσει του χρόνου με τη βοήθεια του ESI-MS για το χρονικό διάστημα 1,



3 και 15 ωρών. Επίσης βρέθηκε ότι ένα μόριο H_2O εντάσσεται ως πέμπτος υποκαταστάτης του ψευδαργύρου.

III. Τα πειράματα ELISA για την αναγνώριση αντι-Ro/SSA θετικών ορών από τα μοντέλα του δακτύλου ψευδαργύρου(zinc-finger) έδειξαν τα εξής:

- Το πεπτιδίο zif-1b αναγνωρίζεται από αντι-Ro/SSA(+) ορούς απουσία ακόμη και ιχνών Zn^{+2} που μπορεί να υπάρχουν στο πείραμα, λόγω προσθήκης της 1.10 φαινανθρολίνης που συμπλέκεται με τα ιόντα . Αντίθετα το zif-2b στις ίδιες συνθήκες δεν αναγνωρίζεται από τους αντι- Ro/SSA(+) ορούς. Το πείραμα αυτό δείχνει ότι η αναγνώριση των αντι- Ro/SSA(+) ορών γίνεται μέσω της περιοχής 310-319(loop) που απουσιάζει από το zif-2b.
- Το σύμπλοκο του zif-1b/ Zn^{+2} δεν αναγνωρίζεται από τους αντι-Ro/SSA(+) ορούς, ενώ φαίνεται να αναγνωρίζεται πολύ καλά από τα αντι-Ro/SSA αντισώματα παρουσία της 1.10 φαινανθρολίνης, η οποία συμπλέκεται με τα ιόντα ψευδαργύρου. Αντίθετα το σύμπλοκο zif-2b/ Zn^{+2} δεν αναγνωρίζεται σε καμία περίπτωση όπως ήταν αναμενόμενο. Από το πείραμα αυτό προκύπτει ότι η δίπλωση που συνήθως επιφέρει το ιόν ψευδαργύρου στην πεπτιδική αλυσίδα δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αναγνώριση του δακτύλου ψευδαργύρου από τα αντι-Ro/SSA αντισώματα. Επομένως είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι τα αντι-Ro/SSA αντισώματα δεν αναγνωρίζουν απαραίτητως διαμορφωτικούς επιτόπους.
- Η μελέτη της r.Ro52KD με το zif-1b έδειξε ότι στην περίπτωση αυτή απαιτείται η παρουσία ιόντων Zn^{+2} . Από αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει ότι η αναγνώριση r.Ro52KD/zif-1b ευνοείται όταν το zif-1b προσλαμβάνει συγκεκριμένη διαμόρφωση, λόγω δίπλωσης του πεπτιδικού σκελετού που την επιβάλλει η παρουσία ιόντων Zn^{+2} . Επίσης ο δακτύλιος του ψευδαργύρου(310-319:loop) είναι απαραίτητος για την αναγνώριση του zif-1 από την r.Ro52KD, επειδή στο προαναφερθέν πείραμα το zif-2b δεν αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη r.Ro52KD ακόμη και παρουσία ιόντων Zn^{+2} .
- Από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η αναγνώριση της Ro52KD και της Ro60KD γίνεται μέσω του δακτύλου ψευδαργύρου και ότι κατάλληλα σχεδιασμένα μοντέλα του δακτύλου ψευδαργύρου μπορούν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν για την παρεμπόδιση



αυτής της αναγνώρισης και να οδηγηθούμε έτσι στην ανάπτυξη, μέσω ανοσοπαρέμβασης, εναλλακτικών θεραπευτικών εφαρμογών.

Η ανοσοπαρέμβαση αποτελεί μια νέα θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση των αυτοάνοσων ασθενειών. Η βασική της φιλοσοφία είναι η επανόρθωση της ανοσοαπόκρισης, η οποία έχει διαταραχθεί στην αυτοάνοση κατάσταση. Η ανοσοπαρέμβαση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, όπως με τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, με τη χορήγηση ανοσοεπιβιβατικών φαρμάκων ή με τη χορήγηση αντικυτταροκινητικών φαρμάκων. Η ανοσοπαρέμβαση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων, με τη χορήγηση αντιμυκητιασικών φαρμάκων ή με τη χορήγηση αντιιικών φαρμάκων. Η ανοσοπαρέμβαση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χορήγηση αντιεπιγοναδίων φαρμάκων, με τη χορήγηση αντιεπιδερμικών φαρμάκων ή με τη χορήγηση αντιεπιγοναδίων φαρμάκων. Η ανοσοπαρέμβαση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χορήγηση αντιεπιγοναδίων φαρμάκων, με τη χορήγηση αντιεπιδερμικών φαρμάκων ή με τη χορήγηση αντιεπιγοναδίων φαρμάκων.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Katochis H.J., Histology, physiology and pathology of the eye, 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 2. Gifford E., The eye and its diseases, 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 3. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 4. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 5. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 6. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 7. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 8. 1980, Rev. 34, 43, 1980.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 2. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 3. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 4. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 5. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 6. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 7. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 8. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 9. 1980, Rev. 34, 43, 1980.
- 10. 1980, Rev. 34, 43, 1980.

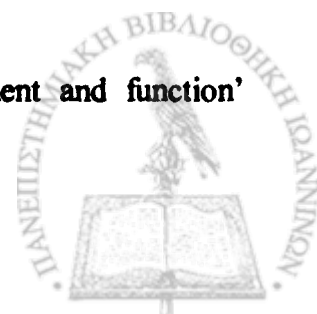


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vallee B.L., 'Biochemistry, physiology and pathology of zinc', *Physiol. Rev.*, **39**, 443, 1959.
2. Underwood E., 'Trace elements in human and animal', *Nutritional 4th Edition*, N.Y., Academy Press, 1997.
3. Bryce-Smith D. 'Zinc deficiency the neglected factor', *Chemistry in Britain*, 783-786, 1989.
4. Aggett P. And Harries J., 'Current status of zinc in health and disease states' *Arch.Dis.Child.*, **54**, 43-68, 1985.
5. Tasman-Jones C., 'Zinc deficiency states', *Adv. Int. Med.*, **26**, 97-114, 1980.
6. Walravens P., 'Nutritional importance of copper and zinc neonates and infants', *Clin. Chem.*, **6**, 185-189, 1980.
7. Editorial, 'Another look at zinc', *Brit. Med. J.*, **282**, 1098-1099, 1981.
8. Miller W., 'Zinc in animal and human health. Trace elements in health.' *Review of Current Issues Ed. J. Rose*, 182-192, London, Butterworth, 1983.
9. Davies S., 'Zinc, nutrition and health', 1984-85, *Yearbook of Nutritional Medicine Ed. J. Bland.*, 113-152, Keats Publishing, New Canaan. Coun., 1985.
10. Vallee B.L. and Wacker W.E.C., 'Metalloproteins. The proteins composition, structure and function', *Ed.H., Neurol. Academy press. N.Y.*, 1970.
11. Riordan J.F., 'Biochemistry of zinc', *Med. Clin.North Am.*, **60**, 661-674, 1976.
12. Cunningham-Rundless and Cunnigham-Rundless W.F., 'Zinc modulation of immune response', *Nutrition and Immunology*, 197-214, Alan.R.Liss.Inc., 1988.
13. Coldez A and Vallee B.L., 'Metal ions and biological systems', **Vol.15**, John Wiley, Inc., N.Y., 1983.
14. Sandstead H.H. and Rinaldi R.A., 'Impairment of DNA synthesis by dietary zinc deficiency in the rat', *J. Cell Physiol.*, **73**, 81, 1969.



15. Slater J.P., Mildwan A.S., Loch L.A., 'Zinc in DNA polymerase', *Bioch.Biophys.Res.Comm.*, **44**, 37, 1971.
16. Wacker W.E.C. and Vallee B.L., 'Nucleic acids and metals', *J.Biol.Chem.*, **234**, 3257, 1959.
17. Prask J.A and Plocke D.J., 'A role for zinc in the structural integrity of the cytoplasmic ribosomes of *Lugiena Gracilis*', *Plant Physiol.*, **48**, 150, 1971.
18. Kirshgessner M. and Weigant E., 'Zinc absorptions and excretion in nutrition. Metal ions in biological systems', Vol. **15**, Ed.H.Siegel, N.Y., Marcel Dekker, Inc. 1983.
19. Quarterman J., Mills C.F., Hmphries W.R., 'The reduced secretions and sensitivity to insulin in zinc-deficient rats', *Bioch.Biophys.Res.Comm.*, **25**,354,1966.
20. Prasad A.S. Oberleas D., Wolf P., Horwitz J.P., 'Effect of growth hormone on nohypophysectomized zinc-deficient rats and zinc on hypophysectomized rats', *J.Lab.Clin.Med.*, **73**,486, 1969.
21. Prasad A., Miale A., Farid Z., Sandstead, 'Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia', *Arch.Intern.Med.*, **111**, 407-428, 1963.
22. Prasad A., Miale A., Farid Z., 'Zinc metabolism in patients with syndrome of iron deficiency anaemia, hypogonadism and dwarfism', *J.Lab.Clin.Med.*, **61**,537-549, 1963.
23. Prasad A.S., Sandstead H., Schulert A., 'Urinary excretion of zinc in patients with the syndrome of anaemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism', *J.Lab.Clin.Med.*, **62**, 591-599, 1963.
24. Crawford I.L. and Conor J.D., 'Zinc and hippocampal function', *J.Orthomol.Psychiatry*, **4**, 39, 1975.
25. Crawford I.L. and Conor J.D., 'Zinc in maturing brain, hippocampal concentration and localization', *J.Neurochem.*, **19**, 1451, 1972.
26. Pfeiffer C.C and Braveman E.R., 'Zinc, brain and behavior', *Biol.Psyc.*, **17**, 513-532, 1982.
27. Sandstead H.H., 'Zinc essentially for brain development and function' *Nutr.Rev.*, **43**, 130-137, 1985.



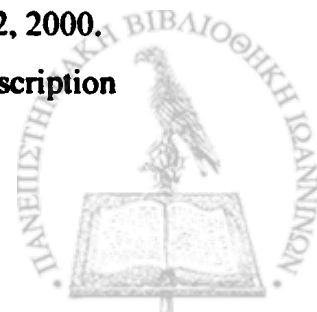
28. Pfeiffer C.C. and La Mola S., 'Zinc and manganese in the schizophrenia', *J.Orthol.Mol.Psyc.*, **12**, 215-234, 1983.
29. Iyata Y. and Otsuka N., 'Electron microscopic demonstration of zinc in hippocampus formation using Timm's sulfide-silver technique', *J.Compl.Neurol.*, **142**, 23, 1971.
30. Fjerdingstad E., Danscher G., Fjerdingstad E.D., 'Zinc-content in hippocampus and whole brain in normal rats', *Brain Res.*, **79**, 338, 1974.
31. Hesse G.W., 'Chronic zinc deficiency alters neuronal function of hippocampal mossy fibres', *Science*, **205**, 1005, 1979.
32. Larsson A., Edstrom A., Wallin M., 'Protein phosphorylation in vitro in brain tubulin preparation: effects of Zn^{+2} and cyclic nucleotides', *J.Neurochem.*, **29**, 115, 1977.
33. Hurley L.S. and Schrader R.E., 'Congenital malformations of the nervous system in the zinc deficient rats', *Academic Press N.Y.*, 1972.
34. Hurley L.S., 'Zinc deficiency in the developing rat', *Am.J.Clin.Nutr.*, **22**, 1332-1339, 1969.
35. Jameson S., 'Effects of zinc deficiency on human reproduction', *Acta Media Scandinavia*, **197A**, 539, 3-82, 1976.
36. Ward N.I., Watson R., Bryce-Smith D., 'Placental elements levels inrelation to fetal development for obstetrically normal births: a study of 37 elements', *Int.J.Biol.Res.*, **9**, 63-81, 1987.
37. Beach R.S., Gershwin M.E., Hurley L.S., 'Persistent immunological consequences of gestational zinc deprivation', *Am.J.Clin.Nutr.*, **38**, 579-590, 1983.
38. Beach R.S, Gershwin M.E., Hurley L.S., 'Gestational zinc deprivation in mice', *Science*, **218**, 469, 1982.
39. Buell S.J., Fosmire G.J., Ollerich D.A., 'Effects of postnatal zinc deficiency on cerebellar and hippocampal development in the rat', *Exptl.Neurol.*, **55**, 199, 1977.
40. Fosmire G.J., Al-Ubaidi Y., Sandstead H.H., 'Some effects of postnatal zinc deficiency on developing rat brain', *Pediatr.Res.*, **9**, 89, 1975.
41. Harzer G. and Kaver B., 'Binding of zinc to casein', *Am.J.Clin.Nutr.*, **35**, 981-987, 1982.



42. Solomous N.W., 'Current knowledge of zinc absorption. Current concepts in Gastroenterology', *4*, 18-22, 1979.
43. Apgar J., 'Zinc and reproduction', *Ann.Rev.Nutr.*, **5**, 43-68, 1985.
44. Abbasi A.A., Prasad A.S., Rabbani P., 'Experimental zinc deficiency in man, effect on testicular function', *J.Lab.Clin.Med.*, **96**, 544-550, 1980.
45. Piessse J., 'Zinc and human male in fertility', *Int.Clin.Nutr.Rev.*, **3**, 4-6, 1983.
46. Horrobin D.F., 'Schizophrenia: reconciliation of the dopamine, prostaglandin and opiod concepts and the of pineal', *Lancet*, 529-531, March 10, 1979.
47. Snyder S.H., 'Schizophrenia Neurotransmitters and CNS disease', *A Lancet Review*, 6-10, 1982.
48. Iwine D.G., Bayne W., Miyashita H., 'Identification of kryptopyrrole in human urine and its relationship to psychosis', *Nature*, **224**, 811, 1969.
49. Shauss A.G. and Bryce-Smith D., 'Evidence of zinc deficiency in anorexia nervosa and bulimia nervosa. Nutrition and brain function', *Ed.W.B.Essum*, Karger, Basel, 151-162, 1987.
50. Todd W.R., Elvehjem C.A, Hart E.B., 'Zinc in the nutrition of the rat', *Am.J.Physiol.*, **107**, 146, 1934.
51. Horrobin D.F. and Cunnase S.C., 'Interactions between zinc, essential fatty acids and prostaglandins', *Med.Hypothesis*, **6**, 277-296, 1980.
52. Bryce-Smith D. and Simpson R.I.D., 'Anorexia, depression and zinc deficiency', *Lancet*, 2162, 1989.
53. Pfeiffer C.C., Sohler A., Jerney E.M., 'Treatment of pyroluric Schizophrenia (malvaria) with large doses of pyridoxine and diatery supplement of zinc', *J.Appl.Nutr.* **20**, 21-28, 1974.
54. Birchall J.L. and Chappel J.S., 'Aluminium, chemical, physiology and Alzheimer's disease', *Lancet*, 1008-1010, 1988.
55. Bryce-Smith D. and Ward W.I., 'Aluminium and the blood -brain barrier', *J.Alt. and Compl.Med.*, June, 1989.
56. Moynahan E.M., 'Acrodermatitis enteropathica, a lethal inherited human zinc deficiency disorder', *Lancet*, 399-400, 1974.



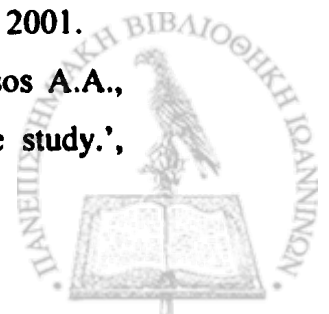
57. Hambridge K.M., Hambridge C., Jacobs M., 'Low level on zinc in hair, anorexia, poor growth and hypogeusia in children', *Pediatr.Res.*, **6**, 868-874, 1972.
58. Schechter P.J., Friedewald W.T., Bronzert P.A., 'Idiopathic hypogeusia', *Int.Rev.Neurolog.Suppl.*, **1**, 125, 1972.
59. Bryce-Smith D., 'Zinc deficiency the neglected factor', *Chemistry in Britain*, 783-786, 1989.
60. Fabris N., 'Acids, zinc deficiency and thymic hormone failure', *JAMA*, **259**, 839-840, 1988.
61. Bodzy P.W., Freeland J.P., Eppright M.A., 'Zinc status in the vegetarian', *Fed.Proc.*, **36**, 1139, 1977.
62. Simmer K., James C., Thompson R.P.H., 'Are iron-folate supplements harmful', *Am.J.Clin.Nutr.*, **45**, 122-125, 1987.
63. Hoenkstra W.R., 'Recent observations on mineral interrelationships', *Fed.Proc.*, **23**, 1068, 1964.
64. Lewis G.P., Coughlin L.L., Jusko J.W., Hartz S., 'Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man', *Lancet*, **1**, 291, 1972.
65. Tuormaa T.E., 'The adverse effects of tobacco smoking on reproduction and health. a review from the literature', *Nutrition and Health*, **10**, 105-120, 1995.
66. Flynn A., Miller S.I., Martier S.S., 'Zinc status of pregnant alcoholic, a determinant of fetal out come', *Lancet*, 572-575, 1981.
67. Tuormaa T.E., 'The adverse effects of alcohol on reproduction, a review from the literature', In press, accepted.
70. Makoto N. and Yukio S., 'Artificial zinc-finger peptides: creation, DNA recognition, gene regulation', *Journal of Inorganic Biochem.*, **82**, 57-63, 2000.
71. Searles M.A., Lu D., Klug A., 'The role of the central zinc-finger of TFIIIA in binding to 5S RNA', *J. Mol. Biol.*, **301**, 47-60, 2000.
72. Wolfe S.A., Nekludora L., Pado C.O., 'DNA recognition by Cys2/His2 zinc-finger proteins', *Ann.Rev.Biophys.Biomol.Struc.*, **29**, 183-212, 2000.
73. Jong Seak K., Kim J.S., 'Zinc-finger proteins as designer transcription factors', *J.Biol.Chem.*, **75**, 8742-8748, 2000.



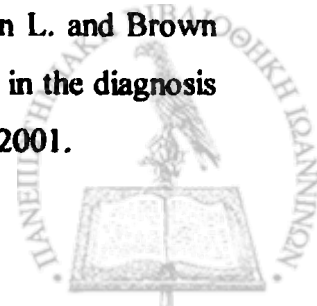
74. Whitfield G.K, Jurutka P.W., Haussler G.A., Haussler M.R., 'Steroid hormone receptors. Evolution, ligands, molecular basis of biologic function', *J.Cell.Biochem.*, **76**, 110-122, 1999.
75. Takashi M., Atsushi O., Maki K., Ysuke U. And Hideo T., 'The third zinc-finger of TFIIIA stabilizes a hairpin structure of the non-coding strand in the internal control region of 5S RNA gene', *J.Inorg.Biochem.*, **82**, 207-213, 2000.
76. Theunissen O., Rudt F. and Pieler T., 'Structural determinants in 5S RNA and TFIIIA for 7S RNP formation', *Eur.J.Biochem.*, **258**, 758-767, 1998.
77. Pizzi S., Dieci G., Frigeri P., Piccoli G., Stocchi V. and Ottonello S., 'Domain organization and functional properties of the yeast transcription factor TFIIIA species with different zinc stoichiometries', *J.Biol.Chem.*, **274**, 2539-2548, 1999.
78. Frank M.B., 'Characterization of DNA properties and sequence specificity of the human 52KDa Ro/SS-A (Ro52) zinc-finger protein', *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **259**, 665-670, 1999.
79. Tainer J.A., Roberts V.A. and Getzoff E.D., *Curr.Opin.Biotech.*, **2**, 582, 1991.
80. Christianson D.W., *Adv.Protein Chem.*, **42**, 281, 1991.
81. Berg J.M. and Shi Y., *Science*, **271**, 1081, 1996.
82. Boehm T., Oreilly M.S., Keough K., Shiloach J., Shapiro R., and Folkman J., 'Zinc binding of Endostatin is essential for its Antiangiogenic Activity', *Bioch.Biophys.Res.Comm.*, **252**, 190-194, 1998.
83. Hanahan D. and Folkman J., 'Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis', *Cell*, **86**, 353-364, 1996.
84. Santos O., Mc Dermott C.D., Daniels R.G. and Applet K., *Clin.Exp.Metast.*, **15**, 499, 1997.
85. Mackay J.P. and Crossley M., *Trends Biochem.Sci.*, **23**, 1, 1998.
86. Pursell K.F. and Kotz J.C., *Inorg.Chem.*, W.B.Saunders:Philadelphia, 1977.
87. Lu D.S. and Voth G.A., *Proteins*, **33**, 119, 1998.
88. Alders I.L., Nadassy K. and Wodak S.J., *Protein. Sci.*, **7**, 1700, 1998.



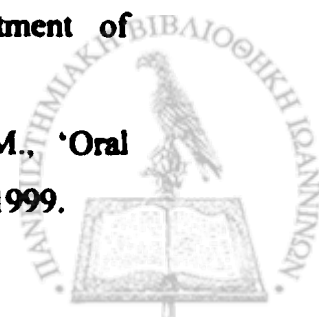
89. Rachel R. Roe and Yuan-Ping Pang, 'Zinc's exclusive tetrahedral coordination governed by its electronic structure', *J.Mol.Model.*, **5**, 134-140, 1999.
90. Manousakis M.N. and Moutsopoulos H.M., 'Sjogren's syndrome', *Otolaryn.Clin.Notr Am.*, **32**, 843-860, 1999.
91. Kassan S.S., 'Immunogenetics of Sjogren's syndrome', *Annals de Medicine Interne*, **149**, 45-48, 1998.
92. Connoly M.K., *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, **20**, 46-52, 2001.
93. Valtysdottir S.T., Gudbjornsson B., Lindqvist U., Hallgren R. And Hetta J., 'Anxiety and depression in patients primary Sjogren's syndrome', *J. Rheumat.*, **27**, 165-169, 2000.
94. Ramos-Casals M., Garcia-Carrasco M., Cerrera R., Rosas J., Trejo O., De La Red G. and Sanchez-Tapias J.M., 'Hepatitis C_{virus} infection mimicking primary Sjogren's syndrome: A clinical and immunologic description of 35 cases', *Medicine*, **80**, 1-8, 2000.
95. Vidal E., Liozon E. and Soria P., 'Dry mouth', *Revue du Praticien*, **51**, 148-154, 2001.
96. Hatron P-Y and Fauchais A.Y., 'Primary Sjogren's syndrome', *Revue du Praticien*, **51**, 159-164, 2001.
97. Nichole Fleming C., Eugene C. Toy and Benton Baker III, 'Sjogren's syndrome', *Primary Care Update for OB/GY NS*, **8**, 48-51, 2001.
98. Lafitte C., 'Neurological manifestations in Sjogren's syndrome', *Archives of Neurology*, **57**, 411-413, 2000.
99. Valtysdottir S.T., Gudbjornsson B., Lindqvist U., Hallgren R. And Hetta J., 'Anxiety and depression in patients with primary Sjogren's syndrome', *J.Rheum.*, **27**, 165-169, 2001.
100. Boki K.A., Ioannidis J.P.A., Segas J.V., Maragkoudakis P.V., Petrou D., Adamopoulos G.K. and Moutsopoulos H.M., 'How significant is sensorineural hearing loss in primary Sjogren's syndrome. An individually matched case-control study', *J.Rheum.*, **28**, 798-801, 2001.
101. Zivra N., Politi E.N., Kastanioudakis I., Skevas A. and Drosos A.A., 'Hearing loss in Sjogren's syndrome patients. A comparative study.', *Clin.Exper.Rheum.*, **18**, 725-728, 2000.



102. Garcia Berrocal J.R., Arellano B., Vargas J.A., Trinidad A., Ramirez Camacho R. and Vergara J., 'Immune-mediated inner ear disease: Report of clinical cases', *Acta Otorrinol. Espanola*, **48**, 565-570, 1997.
103. Theander E., Brucato A., Gudmundsson S., Salomonsson S., Wahren-Herlenius M. and Manthorpe R., 'Primary Sjogren's syndrome-Treatment of fetal incomplete atrioventricular block with dexamethasone', *J.Rheumat.*, **28**, 373-376, 2001.
104. Parke A.L., 'Sjogren's syndrome : A women's health problem', *J.Rheumat.*, **27**, 4-5, 2000.
105. Benveniste O. and Herson S., 'Influence of female sex on respiratory manifestations of connective tissue diseases', *Revue de Pneum.Clin.*, **55**, 301-306, 1999.
106. Ishihara O., Saito M., Hayash N., Kinoshita K. and Takeuchi T., 'Successful treatment of embryo implantation failure in patients with Sjogren's syndrome with low-dose prednisolone', *Fertility and Sterility*, **75**, 640-641, 2001.
107. Bolstad A.I, Haga H., Wassmuth R. and Jonsson R., 'Monozygotic twins with primary Sjogren's syndrome', *J.Rheumat.*, **27**, 2264-2266, 2000
108. Tishler M., Yaron I., Shirazi I. And Yaron M., 'Clinical and immunological characteristics of elderly onset Sjogren's syndrome: A comparison with younger onset disease', *J.Rheumat.*, **28**, 795-797, 2001.
109. Bartunkova J., Sediva A., Vencovsky J. and Tesaur V., 'Primary Sjogren's syndrome in children and adolescents: Proposal for diagnostic criteria', *Clinical and Experimental Rheumatology*, **17**, 381-386, 1999.
110. Sorajjia P., Poirier M.K., Bundvick J.B. and Matteson E.L., 'Autonomic failure and proximal skeletal myopathy in a patient with primary Sjogren's syndrome', *Mayo Clinic Proceeding*, **74**, 695-697, 1999.
111. Asim M. and Turney J.H., 'The female patient with faints and fatigue: Don't forget Sjogren's syndrome', *Nephrology Dialysis Transplantation*, **12**, 1516-1517, 1997.
112. Kaye S.B., Sims G., Willoughby C., Field A.E., Longman L. and Brown M.C., 'Modification of the tear function index and its use in the diagnosis of Sjogren's syndrome', *British J.Ophthalm.*, **85**, 193-199, 2001.



113. Dawson L.J., Holt D.J., Higham S.M, Lougman L.P. and Field E.A., 'A comparison of salivary gland hypofunction in primary and secondary Sjogren's syndrome', *Oral Diseases*, 7, 28-30, 2001.
114. Schiodt M., Christensen L.B., Petersen P.E. and Thorn J.J., 'Periodontal disease in primary Sjogren's syndrome', *Oral Diseases*, 7, 106-108, 2001.
115. Gannot G., Lancaster H.E. and Fox P.C., 'Clinical course of primary Sjogren's syndrome: Salivary, oral and serologic aspects', *J.Rheum.*, 27, 1905-1909, 2000.
116. Dunic M., Mrava K.-Stipetic M., Kaic Z., Ille J., Plavsic V., Batinica S. and Cvitanovic M., 'Xerostomia in patients with triple A syndrome-A newly recognized finding', *Eur.J.Pediat.*, 159, 885-888, 2000.
117. Daniels T.E., 'Evaluation differential diagnosis and treatment of xerostomia', *J.Rheum.*, 27, 6-10, 2000.
118. Astor F.C., Hanft K.L and Ciocon J.O., 'Xerostomia: A prevalent condition in the elderly', *Ear, Nose and Throat Journal*, 78, 476-479, 1999.
119. Pedersen A.M., Reibel J. and Nauntoffe B., 'Primary Sjogren's syndrome (pSS): Subjective symptoms and salivary finding', *J.Oral Pathol.and Medic.*, 28, 303-311, 1999.
120. Rice D.H. and Eisele D.W., 'Salivary Gland Diseases: Preface', *Otor.Clin.N.Am.*, 32, 9-10, 1999.
121. Pedersen A.M. Reidel J., Nordgarden H., Bergem H.O., Jensen J.L. and Nauntofle B., 'Primary Sjogren's syndrome: Salivary gland, function and clinical oral finding', *Oral Diseases*, 5, 128-138, 1999.
122. Ernesto Soto- Rojas A., Villa A.R., Sifuentes-Osornio J., Alarcon-Segonia D. and Krauss A., 'Oral manifestation in patient with Sjogren's syndrome', *J.Rheum.*, 25, 906-910, 1998.
123. Fox R.I., 'Sjogren's syndrome: Current therapies remain inadequate for a common disease', *Expert Opinion of Investigation Drugs*, 9, 2007-2016, 2000.
124. Daniels T.E., 'Evaluation, differential diagnosis and treatment of xerostomia', *J.Rheum.*, 27, 6-10, 2000.
125. Almstahl A., Kroneld U., Tarkowski A. and Wikstrom M., 'Oral microbial flora in Sjogren's syndrome', *J.Rheum.*, 26, 110-114, 1999.



126. Fox R.I., Tornwall J., Mauyama T. and Stern E., 'Evolving concepts of diagnosis, pathogenesis and therapy of Sjogren's syndrome', *Current Opinion in Rheumatology*, **10**, 446-456, 1998.
127. Andersen J.R., *Lancet*, **456**, 1961.
128. Clark G., *J.Immun.*, **102**, 117, 1969.
129. Mattioli M. and Reichlin M., *Arthr.Rheum.*, **17**, 421, 1974.
130. Alspaugh M.A and Tan E.M., *J.Clin.Invest.*, **55**, 1067, 1975.
131. Alspaugh M.A, *Arthr.Rheum.*, **19**, 216, 1976.
132. Alspaugh M., Maddison P.J., *Arthr.Rheum.*, **22**, 796, 1979.
133. Hendrick J.P., Wolin S.L. and Rinke J., 'Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells', *Mol.Cell.Biol.*, **1**, 1138-1149, 1981.
134. Cheng S.T., Ngyen T.Q. and Yang Y.S., 'Calreticulin binds hyRNA and the -52KDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen', *J.Immunol.*, **156**, 4484-4491, 1996.
135. Lieu T.S. and Sontheimer R.D, ' A subpopulation of WIL-2 cell calreticulin molecular is associated with Ro/SS-A ribonucleoprotein particles', *Lupus*, **6**, 40-47, 1997.
136. Eggleton P., Reid K.B. and Kishore U., 'Clinical relevance of calreticulin in Systemic Lupus Erythematosus', *Lupus*, **6**, 564-571, 1997.
137. Deutcher S.L., Harley J.B. and Keene J.D., 'Molecular analysis of the 60-KDa human Ro ribonucleoprotein', *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **85**, 9479-9483, 1988.
138. Pruijn G.J., Slobbe R.L. and van V.W., 'Analysis of protein-RNA interactions with in Ro ribonucleoprotein complexes', *Nucleic.Acids.Res.*, **19**, 5173-5180, 1991.
139. Ben C.E., Gandy B.J. and Tan E.M., 'Isolation and characterization of cDNA clone encoding the 60KD component of the human 5S-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen', *J.Clin.Invest.*, **83**, 1284-1292, 1989.
140. Chan E.K.L. and Buyon J.P., 'The SS-A/Ro antigen', in Van Venrooij W.J., Maini R.N., *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1-18, 1994.
141. Mattaj I.W., 'RNA-recognition. A family matter', *Cell*, **73**, 837, 1993.

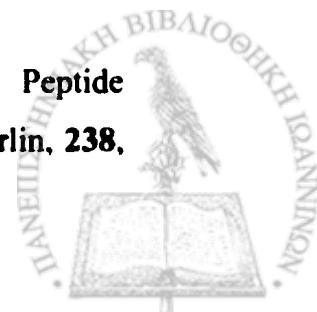
142. Slobbe R.L., Pluk W. and van V.W., 'Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of the RNA-protein and protein-protein interactions', *J.Mol.Biol.*, **227**, 361-366, 1992.
143. Itoh Y., Kriet J.D. and Reichlin M., 'Organ distribution of the Ro(SS-A) antigen in the guinea pig', *Arthr.Rheum.*, **33**, 1815-1821, 1990.
144. Slobbe R.L., Pruijn G.J. and Damen W.G., 'Detection and occurrence of the 60- and 52 KD Ro/SS-A antigens and of autoantibodies against these proteins', [published erratum appears in *Clin.Exp.Immunol.*, 1992, Feb., 87, 336], *Clin.Exp.Immunol.*, **86**, 99-105, 1991.
145. Van H.D., Einsenberg D. and O'Brien C.A., 'Caenorhabditis elegans embryos contain only one major species of the Ro RNP', *RNA*, **1**, 293-303, 1995.
146. O'Brien C.A., Margelot K. and Wolin S.L., 'Xenopus Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionarily conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins', *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 7250-7254, 1993.
147. Wang D., Buyon J.P. and Chan E.K., 'Cloning and expression of mouse 60-KDa ribonucleoproteins 5S-A/Ro', *Mol.Biol.Rep.*, **23**, 205-210, 1996.
148. O'Brien C.A. and Wolin S.L., 'A possible role for the 60-KD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors', *Genes Dev.*, **8**, 2891-2903, 1994.
149. Shi H., O'Brien C.A. and Van H.D., 'A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens', *RNA*, **2**, 769-784, 1996.
150. Ben C.E., Chan E.K. and Sullivan K.F., 'A 52-KD protein is a novel component of the 5S-A/Ro antigenic particle', *J.Exp.Med.*, **167**, 1560-1571, 1988.
151. Reddy B.A., Etkin L.D. and Freemont P.S., 'A novel zinc-finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins', *Trends Biochem.Sci.*, **17**, 344-345, 1992.
152. Albert T., 'Structure of the leucine zipper', *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **2**, 205-210, 1992.
153. Bellini M., Lacroix J.C. and Gall J.G., 'A putative zinc-binding protein on lampbrush chromosome loops', *EMBO J.*, **12**, 107-114, 1993.



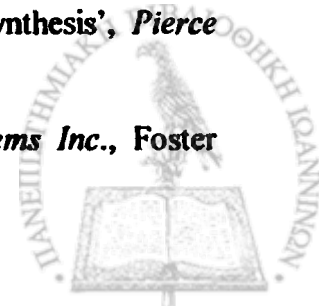
154. Frank M.B., Mc Cubbin V.R. and Heldermon C., 'Expression and DNA binding of the human 52KDa Ro/SSA autoantigen', *Biochem.J.*, **305**, 359-362, 1995.
155. Chambers J.C., Kenan D., Martin B.J., 'Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen', *J.Biol.Chem.*, **263**, 18403-18051, 1988.
156. Chan E.K., Sullivan K.F., Fox R.I., 'Sjogren's syndrome nuclear antigen B(La):cDNA cloning, structural domains and autoepitopes', *J.Autoimmun.*, **2**, 321-327, 1989.
157. Topfer F., Gordon T., Mc Cluskey J., 'Characterization of the mouse autoantigen La(SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies', *J.Immunol.*, **150**, 3091-3100, 1993.
158. Chan E.K., Sullivan K.F. and Tan E.M., 'Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding', *Nucleic.Acids.Res.*, **17**, 2233-2244, 1989.
159. Clemens M.J., 'The small RNAs of Epstein-Barr virus', *Mol.Biol.Rep.*, **17**, 81-92, 1993.
160. Reed B.R., Lee L.A. and Harmon C., 'Autoantibodies to SS-A/Ro in infants with congenital heart block', *Br.J.Dermatol.*, **130**, 342-348, 1994.
161. Alspaugh M.A., *Arthr.Rheum.*, **19**, 216, 1976.
162. Hoch S.O., Francoeur A.M. and Tan E.M., 'Epitopes, structural domains and assymetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein', *J.Immunol.*, **136**, 3744-3749, 1986.
163. Francoeur A.M., Gritzmacher C.A and Peebles C.L., 'Synthesis of small nuclear ribonucleoproteins particles by the malarian parasite plasmodium falciparum', *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **82**, 3635-3639, 1985.
164. Chan E.K. and Tan E.M., 'Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies', *J.Exp.Med.*, **166**, 1627-1640, 1987.
165. Gottlieb E. and Steitz J.A., 'The RNA binding protein La influences both accurancy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro', *EMBO J.*, **8**, 841-850, 1989.



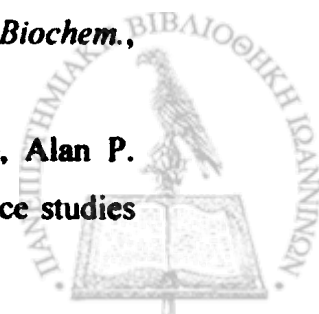
166. Maraia R.J., 'Transcription termination factor La is also initiation factor for RNA polymerase III', *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **93**, 3383-3387, 1996.
167. Maraia R.J., Kenan D.J. and Keene J.D., 'Eukaryotic transcription La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III', *Mol.Cell.Biol.*, **14**, 2147-2158, 1994.
168. Bachmann M., Pfeiffer K. and Schroder H.C., 'Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties', *Cell*, **60**, 85-93, 1990.
169. Huhn P., Pruijn G.J.M. and Van Venrooij W.J., 'Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme', *Nucleic.Acids.Res.*, **25**, 410-416, 1997.
170. Xia Q., Sharp T.V and Jeffrey I.W., 'The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA', *Nucleic.Acids.Res.*, **22**, 2512-2518, 1994.
171. W. Konig et.al, *Chem.Ber.*, **103**, 788, 1970.
172. M. Fujino et.al, *Chem.Pharm.Bull.*, **22**, 1857.
173. Anatol Arends and Aleksander M. Kotodziejczyk, 'O- and N-acylureas in peptide synthesis by DCC method. New observations.', *Tetrahedron Letters*, **19**, 40, 3867-3868, 1978.
174. Peng Li and Jie-Cheng Xu, 'HOBt and HOAt derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis', *Tetrahedron Letters*, **41**, 5, 721-724, 2000.
175. Jian-guo Ji, De-yi Zhang, Yun-hua Ye and Qi-yi Xing, 'Studies on the reactions of HOBt, HOOBt and HOSu with dichloroalkane solvents', *Tetrahedron Letters*, **39**, 36, 6515-6516, 1998.
176. K.U. Prasad, et.al, *J.Org.Chem.*, **50**, 408, 1985.
177. Fournier A., Wang C.T. and Felix A.M., 'Applications of BOP reagent in solid phase synthesis. Advantages of BOP reagent for difficult couplings exemplified by a synthesis of [Ala-15]-GRF(1-29)-NH₂', *Inter.J.Pept.Prot.Res.*, **31**, 1, 86-97, 1988.
178. W.K. Rule et.al in 'Peptides 1988, Proc.20st European Peptide Symposium', G. Jung and E.Bayer(Eds), Walter de Gruyter, Berlin, **238**, 1989.



179. H. Gausepohl, et al in 'Innovation and Perspectives in solid phase synthesis, 2nd International Symposium', R.Epton(Eds), *Intercept UK Ltd*, Andover, 387, 1993.
180. J.Coste, D.Le-Nguyen and B.Castro, 'PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product', *Tetrahedron Letters*, 31, 2, 205-208, 1990.
181. Thomas Hoeg-Jensen, Mogens Havsteen Jakobsen, Carl Eric Olsen and Arne Holm, 'Formation of peptide thioamides by the use of Fmoc amino monoacids and PyBOP', *Tetrahedron Letters*, 32, 51, 7617-7620, 1991.
182. G.B.Fields et.al in 'Innovation and Perspectives in solid phase synthesis, 1st International Symposium', R.Epton(Eds), *SPCC*, Birmingham, 241, 1990.
183. J.Coste et.al in 'Peptides chemistry, structure and biology, Proc. 1st International Symposium', J.E.Rivier and G.R.Marshall(Eds), *ESCOM*, Leiden, 900, 1990.
184. Jacques Coste, Eric Frerot and Patric Jouin Bertrand Casrto, 'Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-methylated amino acids', *Tetrahedron Letters*, 32, 17, 1967-1970, 1991.
185. Reinhard Knorr, Arnold Trzeciak, Willi Bannwarth and Dieter Gillessen, 'New coupling reagents in peptide chemistry', *Tetrahedron Letters*, 30, 15, 1927-1930, 1989.
186. Michael S.Bernatowicz, Scott B.Daniels and Hubert Koster, 'A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides', *Tetrahedron Letters*, 30, 35, 4645-4648, 1989.
187. P.A.Baybayan, et.al in 'Peptides chemistry and biology, Proc., 12th American Peptide Symposium', J.A.Smith and J.E.Rivier(Eds), *ESCOM*, Leiden, 566, 1992.
188. G.B.Fields, et.al in 'Innovation and perspectives in solid phase synthesis, 1st International Symposium', R.Epton(Eds), *SPCC*, Birmingham, 241, 1990.
189. J.M.Stewart and J.D.Young in 'Solid phase peptide synthesis', *Pierce Chemical Co.*, Rockford, Illinois, 1984.
190. Introduction to Cleavage Techniques, *Applied Biosystems Inc.*, Foster City, CA, 1990.



191. 'Φασματοσκοπία Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού', *Βιοανόργανη Χημεία*, 2000.
192. Kurt Wuthrich, 'NMR in Biological research: Peptides and Proteins', *American Elsevier*, North Holland.
193. Harald Gunther. 'NMR spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry', *John Willey and Sons*, NY.
194. Manfred Hesse, Herbert Meier and Bernd Zeeh, 'Spectroscopic Methods in Organic Chemistry', Foundations of Organic Chemistry Series, *Thieme*, 1997, NY.
195. 'Φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS)', *Βιοανόργανη Χημεία*, 2000.
196. Alison E. Ashcroft, 'Ionization Methods in Organic Mass Spectroscopy', *RSC Analytical Spectroscopy Monographs*, Series Editor: Neil W. Barnett, 2000.
197. M.E. Rose and R.A. Johnstone, 'Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists', *Cambridge University Press*, Cambridge, UK, 1982.
198. J.R. Chapman, 'Practical Organic Mass Spectroscopy', *John Willey and Sons*, Chichester, UK, 2nd, 1994.
199. J.A. Carrol and R.C. Beavis, 'Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization', *Laser Desorption and Ablation*, eds, J.C. Miller, R.F. Hagulund, 7, 1996.
200. J.V. Iribane and B.A. Thomas, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287, 1976.
201. Jae-Chul Pyun, Min-Young Cheng, Sung-Hwak, Ho-Youn Kim and Jung-Sang Park, 'Modification of short peptides using ε-aminocaproic acid for improved coating efficiency indirect enzyme-linked ImmunoSorbent Assays (ELISA)', *J. Immun. Meth.*, **208**, 2, 141-149, 1997.
202. Pei Yazhong, Richard A. Houghten and John S. Kiely, 'Synthesis of 4-amino-3,4-dihydro-2(1H)-Quinolinones via β -Lactam Intermediates on the solid phase', *Tetrahedron Letters*, **38**, 19, 3349-3352, 1997.
203. Kaiser E., Collescott L.R., Bossinger D.P. and Look E.P., *Anal. Biochem.*, **34**, 595, 1970.
204. Dallas L. Rabenstein, Susan A. Daignault, Anvarhusein A. Isab, Alan P. Arnold and Mohamed M. Shoukry, 'Nuclear magnetic resonance studies



- of the solution chemistry of metal complexes. The complexation of Zinc by Glycylhistidine and Alanylhistidine peptides', *J.Am.Che.Soc.*, **107**, 23, 6433-6440, 1985.
205. Susan A.Daignault, Allan P.Arnold, Anvarhusein A.Isab and Dallas L.Rabenstein, 'Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. Complexation of zinc by growth-modulating tripeptide Glycylhistidyllysine', *Inorg.Chem.*, **24**, 3984-3988, 1985.
206. Martin Forster and Heinrich Vahrenkamp, 'Zinc complexes of Histidine-containing Di- and Tripeptides', *Chem.Ber.*, **128**, 541-550, 1985.
207. Martin Forster, Iugo Brasack, Anne-Kathrin Duhme, Hans-Friedrich Nolting and Heinrich Vahrenkamp, 'Zinc complexes of oligopeptides containing Histidine at both termini', *Chem.Ber.*, **129**, 347-353, 1996.
208. Peter Gockel and Heinrich Vahrenkamp, 'Difunctional dipeptides containing Cysteine or Histidine: Solution behavior and zinc complexation', *Chem.Ber.*, **129**, 1243-1249, 1996/
209. Katalin Varngy, Imre Sovago, Karoly Agoston Zsuzsanna Liko, Helga Suli-Vargha, Daniele Sann and Giovanni Micera, 'Potentiometric and Spectroscopic studies on Copper(II) and Zinc(II) complexes of peptides containing Bis(imidazolyl) ligands', *J.Chem.Soc.Dalton Trans*, 2939-2945, 1994.
210. Tomas Gajda, Bernard Henry and Jean-Jacques Delpuech, 'Multinuclear NMR and Potentiometric study on tautomerism during protonation and Zinc(II) complex formation: imidazole-containing peptide derivatives', *J.Chem.Soc.Perkins Trans*, 157-164, 1994.
211. Takeshi Yamamura, Hidechika Makamura, Shum-ichi Makajima, Tetsuya Sasaki, Massato Ushiyama, Masa-aki Ueki and Hiroshi Hirota, 'Boc-Glu-Thr-Ile-His-OMe/Zn⁺² in terms of the zinc-binding sites of proteases', *Inorg.Chim.Acta*, **283**, 243-250, 1998.
212. Takashi Miura, Tamami Saton and Hideo Takeuchi, 'Role of metal-ligand coordination in the folding pathway of zinc-finger peptides', *Biochim.et Biophys. Acta*, **1384**, 171-179, 1998.
213. Ulrike Herr, Warner Spahl, Gunter Trojandt, Wolfgang Steglich, Florian Thaler and Rudi van Edlik, 'Zinc(II) complexes of tripodal peptides

mimicking the zinc coordination structure of Carbonic Anhydrase',
Bioorg. Med. Chem., 7, 699-707, 1999.

214. 'Μέθοδοι Μαγνητικού Συντονισμού', *Βιοανόργανη Χημεία*.

ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΕΙΣ - ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- 2-Cl-Z : 2-χλωρο-βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
- A ή Ala : αλανίνη
- BIOTIN:βιοτίνη
- Boc- : tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα
- BOP : εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζυλο-N-οξυτρι[διμεθυλοαμινο] φωσφονικού οξέος
- Bzl : βενζυλομάδα
- C ή Cys : κυστεΐνη
- Caproic : 6-αμινο-εξανικό οξύ
- CAT : (Computer of Average Transients), συλλογή και διόρθωση σημάτων
- CCl₄ : τετραχλωράνθρακας
- CD₃COCD₃ : δευτερωμένη ακετόνη
- CDCl₃ : δευτερωμένο τριχλωρομεθάνιο
- CH₃CN : ακετονιτρίλιο
- CH₃COOH : οξικό οξύ
- CI : (Chemical Ionization), χημικός ιονισμός
- COSY : (Correlated Spectroscopy), φασματοσκοπία συσχέτισης
- CS₂ : διθειανθρακός
- CW : (Continuous Wave), συνεχούς κύματος
- DCC : δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμίδιο
- DCM : διχλωρομεθάνιο
- DIEA : διισοπροπυλοαιθυλαμίνη
- DMF : διμεθυλοφορμαμίδιο
- DMS : διμεθυλοσουλφίδιο
- DMSO : διμεθυλοσουλφοξείδιο
- DTT : διθειοθρεϊτόλη
- E ή Glu : γλουταμινικό οξύ
- EI : (Electron Impact), ιονισμός με δέσμη ηλεκτρονίων
- ESI-MS : (Electrospray Ionization-Mass Spectroscopy),
- ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy) : Electrospray Ionization φασματοσκοπία μάζας
- EtOH : αιθανόλη
- F ή Phe: φαινυλαλανίνη
- FAB : (Fast Atom Bombardment), ιονισμός με δέσμη ταχέως κινούμενων ατόμων
- Fmoc- : 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα
- FT : (Fourier Transform), μετασχηματισμός Fourier
- H ή His : ιστιδίνη
- H₂O : νερό
- HCl : υδροχλωρικό οξύ
- HF : υδροφθορικό οξύ
- HOBT : 1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο
- HOHAHA : (Homonuclear Hartmann-Han), ομοπυρηνικό πείραμα Hartmann-Han
- I ή Ile : ισολευκίνη
- K ή Lys : λυσίνη
- L ή Leu : λευκίνη
- MALDI-MS : (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)



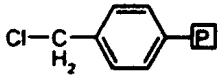
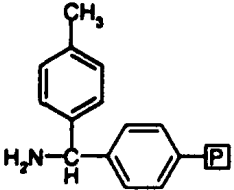
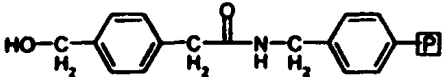
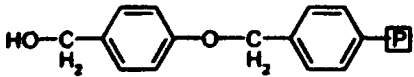
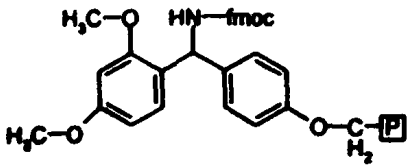
- MBHA : 4-μεθυλο-βενζυδρυλαμίνη
- N ή Asn : ασπαραγίνη
- NaOH : υδροξείδιο του νατρίου
- NMR :(Nuclear Magnetic Resonance), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
- NOE :(Nuclear Overhauser Effect), φαινόμενο Overhauser
- NOESY :(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), φασματοσκοπία περιστρεφόμενου πλαισίου
- Na₂HPO₄ : όξινο θειικό νάτριο
- Na₂HPO₄ : δισόξινο θειικό νάτριο
- P ή Pro : προλίνη
- P₂O₅ : πεντοξείδιο του φωσφόρου
- PMR :(Proton Magnetic Resonance), πρωτονιακός μαγνητικός συντονισμός
- R ή Arg : αργίνη
- ROESY :(Overhauser Effect Spectroscopy), φασματοσκοπία περιστρεφόμενου πλαισίου
- RP-HPLC :υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
- S ή Ser : σερίνη
- TBTU :[βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό]
- TFA : τριφθοροοξικό οξύ
- TLC : χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος
- TMS : τετραμεθυλοσιλάνιο
- TMS : τετραμεθυλοσιλάνιο
- TOCSY :(Total Correlated Spectroscopy), φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης
- Tosyl : π-τολουολοσουλφονυλομάδα
- V ή Val : βαλίνη
- Zn(ClO₄)₂·6H₂O : εξαενδρο-υπερχλωρικός ψευδάργυρος
- ZnCl₂ : χλωριούχος ψευδάργυρος

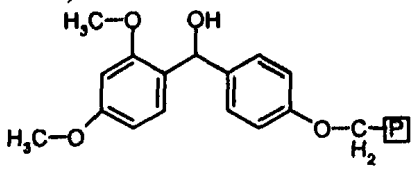
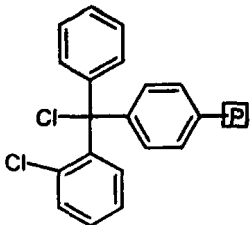
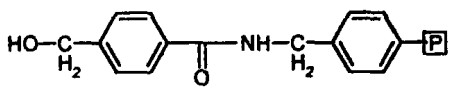


ΠΑΡΑΤΗΜΑ Ι

Οι κυριότερες ρητίνες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση παρουσιάζονται στον πίνακα Ι. Οι ρητίνες από ένα έως τρία χρησιμοποιούνται στην Boc στρατηγική ενώ οι ρητίνες τέσσερα έως οκτώ χρησιμοποιούνται στην Fmoc στρατηγική.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι.

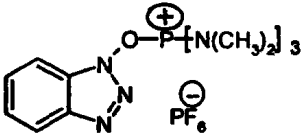
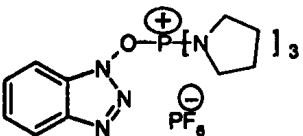
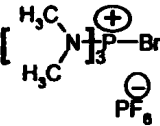
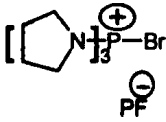
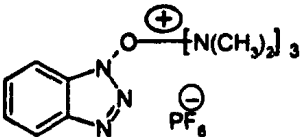
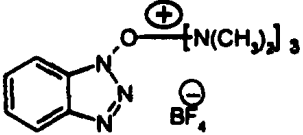
A/A	Στερεό πολυμερές	Απελευθέρωση του πεπτιδίου με	Μορφή-τελικού καρβονυλίου
1	Χλωρομεθυλιωμένο πολυστυρόλιο ρητίνη Merrifield 	Άνυδρο HF	RCOOH
2	4-μεθυλο-βενζυδριλαμίνη(MBHA) 	HF, TFMSA	RCONH ₂
3	Φαινυλο-ακεταμιδο-μέθυλο ρητίνη (PAM) 	Άνυδρο HF	RCOOH
4	ρ-ακλοξυβενζυλοξυβένζυλο ρητίνη (Wang) 	TFA	RCOOH
5	4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλ- Fmoc-αμινομεθυλ)-φαινόξυ ρητίνη) (Rink amide) 	TFA	RCONH ₂

6	<p>4-(2',4',διμεθοξυφαινυλ-υδροξυ-μεθυλ)-φαινόξυ ρητίνη (Rink acid)</p> 	AcOH	RCOOH
7	<p>2-χλωροτρίτυλο ρητίνη (2Cl-Trt)</p> 	AcOH/TFE/DCM TFA	RCOOH
8	<p>4-υδροξυμεθυλοβενζοξυ-AM-ρητίνη (HMBA)</p> 	NH ₃ /MeOH NaOH MeOH/Et ₃ N NaBH ₄ /EtOH	RCONH ₂ RCOOH RCOOCH ₃ RCH ₂ OH

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.

Τα κυριότερα αντιδραστήρια σύζευξης παρουσιάζονται στον πίνακα Ι.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι.

Αντιδραστήριο Σύζευξης	Χημικός Τύπος
BOP	
PyBOP	
Brop	
PyBrop	
HTBU	
TBTU	

Αναλυτικά τα αντιδραστήρια σύζευξης έχουν τις κάτωθι ονομασίες

BOP : [βενζοτριαζολ-οξυ-τρις(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό]

PyBOP: [βενζοτριαζολ-οξυ-τρις πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό]

HBTU: [βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό]

TBTU: [βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβωρικό]

PyBrop: [βρωμο-τρις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό]



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1-36
Γενικά.....	1-2
Ο Ψευδάργυρος σε βιολογικά συστήματα.....	3-10
Γενικά για τον ψευδάργυρο.....	3
Ψευδάργυρος και ανάπτυξη.....	3
Ψευδάργυρος και εγκέφαλος.....	4
Ψευδάργυρος και λειτουργία νευρών.....	5
Ο ψευδάργυρος στην αναπαραγωγή.....	5-7
Σύνδρομο απόκρισης ψευδαργύρου.....	7-9
Ψευδάργυρος και διατροφή.....	9
Τοξικά στοιχεία και ψευδάργυρος.....	10
Ψευδάργυρος και μεταλλοένζυμα.....	11-15
Γενικά.....	11
Καρβοξυπεπτιδάση Α και θερμολυσίνη.....	11
Αλκαλική Φωσφατάση.....	12
Καρβονική Ανυδράση(λυάση).....	12
Αλκοολική Δεϋδρογονάση(οξειδορεδοουκτάση).....	13
Νουκλεοτιδική ενεργοποίηση.....	13
Σουπεροξειδική Δισμουτάση Χαλκού-Ψευδαργύρου.....	14
Ασπαραγινική Τρανσκαρβαμοϋλάση.....	14-15
Μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου(ZINC-FINGER) σε πρωτείνες(σε σχέση με μεταγραφικούς παράγοντες).....	16-18
Μοντέλα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με το DNA.....	16
Κλασσικό zinc-finger.....	16-17
Στεροειδής υποδοχείς.....	17-18
Χαρακτηριστικοί μεταγραφικοί παράγοντες.....	19-20
Η χημεία του ψευδαργύρου(Zn).....	21-22
Δάκτυλος ψευδαργύρου στα αντιγόνα Ro52KDκαι Ro60KD και συσχέτιση με το σύνδρομο Sjogren 's(SS).....	23-26



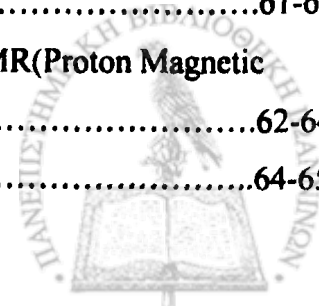
Φυσιολογική Απόκριση-Γενικά.....	23-24
Τα αντισώματα.....	24
Ανοσολογική Απόκριση.....	25
Αυτοάνοση Ανοσολογική Απόκριση-Αυτοάνοσες Παθήσεις.....	26
Σύνδρομο Sjogren's.....	27-33
Γενικά.....	27
Κλινικά συμπτώματα του SS.....	27-28
Αντισώματα κατά των Ro/SSA και La/SSB αντιγόνων.....	28-29
Δομή του Ro/La RNP συμπλόκου.....	29-30
Η πρωτεΐνη Ro60KD.....	31
Η πρωτεΐνη Ro52KD.....	32
Η πρωτεΐνη Ro48KD.....	32-33
Σκοπός της εργασίας.....	34-36

II. ΑΡΧΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....37-59

Γενικά.....	37-39
Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.....	40-41
Αντιδραστήρια σύζευξης.....	41-45
Σύνθεση σε στερεά φάση.....	45
Το αδιάλυτο πολυμερές.....	45
Διαλύτες.....	46
Προετοιμασία της πεπτιδορητίνης.....	46-47
Σύζευξη αμινοξέος πολυμερούς.....	47
Απόσπαση του πεπτιδίου από το πολυμερές υπόστρωμα.....	47-48
Κύρια στάδια κατά την πεπτιδική σύνθεση.....	48-59

III. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ.....60-73

Γενικά.....	60
Η τεχνική των φασμάτων NMR.....	61-62
Αρχές φασμάτων πρωτονιακού μαγνητικού συντονισμού ¹ H-NMR PMR(Proton Magnetic Resonance).....	62-64
Φάσματα ¹³ C-NMR.....	64-65



Φαινόμενο Overhauser (NOE: Nuclear Overhauser Effect).....	65-66
Διδιάστατη φασματοσκοπία (2D-NMR).....	66-67
Ομοκυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης H,H COSY.....	67-68
Φασματοσκοπία NOESY περιστρεφόμενου πλαισίου (ή ROESY).....	68
Φασματοσκοπία TOCSY ολικής συσχέτισης (ή HOHAHA: Homonuclear Hartmann-Hahn: ομοκυρηνικό πείραμα Hartmann-Hahn).....	69
Μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων σε διάλυμα με $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία μιας και δυο διαστάσεων.....	69-73

IV. ELECTROSPRAY IONIZATION ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ74-78

Γενικά.....	74
Φασματόμετρο μάζας.....	75-78

V. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ.....79-84

Γενικά.....	79
A. Μη ανταγωνιστική έμμεση ELISA για τον προσδιορισμό αντισώματος.....	80
B. Ανταγωνιστική ELISA του τύπου σάντουιτς για το προσδιορισμό αντιγόνου.....	81
Κάλυψη πλακιδίου.....	82
Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.....	82-83
Εφαρμογές ELISA	84

VI. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....85-115

VIA. Σύνθεση.....	85-86
Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	87-89
Στάδιο Αποπροστασίας-Εξουδετέρωσης.....	90-91
Εισαγωγή του πρώτου αμινοξέος.....	91-92
VIB. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων zif-1, zif-1b, zif-2, zif-2b.....	93-104



VIB ₁ . Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1.....	93-95
VIB ₂ . Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-1b.....	96-98
VIB ₃ . Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2.....	99-101
VIB ₄ . Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2b.....	102-104
VIG. Παρασκευή και ταυτοποίηση των συμπλόκων zif-1/Zn⁺², zif-2/Zn⁺² και zif-2b/Zn⁺² με ESI-MS φασματοσκοπία μάζας	105-115
VIG ₁ . Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-1/Zn ⁺² σε αναλογία 1:1.....	105-106
VIG ₂ . Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-1/Zn ⁺² σε αναλογία 2:1.....	107-108
VIG ₃ . Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-1/Zn ⁺² σε αναλογία 1:2.....	109-110
VIG ₄ . Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-2/Zn ⁺² σε αναλογία 1:1.....	111-113
VIG ₅ . Παρασκευή και ταυτοποίηση του συμπλόκου zif-2b/Zn ⁺² σε αναλογία 1:1.....	114-115
<u>VII. Ταυτοποίηση του πεπτιδίου zif-2 και του συμπλόκου zif-2/Zn⁺² με ¹H-NMR φασματοσκοπία μιας και δύο διαστάσεων.....</u>	116-122
<u>VIII. Βιολογικά Πειράματα.....</u>	123-126
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</u>	127-129
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	130-146
<u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</u>	147-148
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</u>	149-150
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 11.....</u>	151
<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....</u>	152-155





1A1F: Μεταγραφικός Παράγοντας



1A1G: Μεταγραφικός Παράγοντας

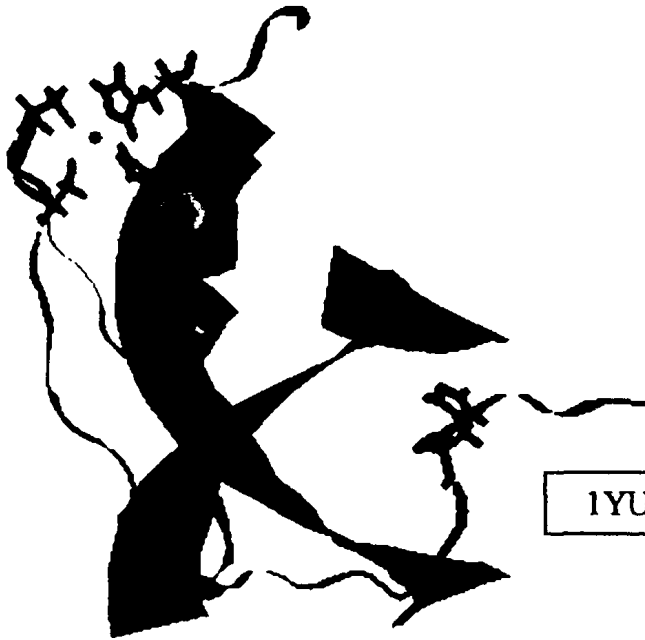


INPS: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



IBDU: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ





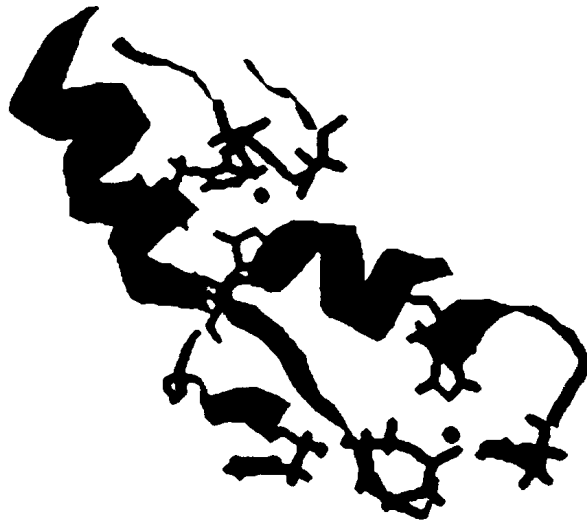
IYUI: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



3ZNF: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



ΙΑΑΥ: Μεταγραφικός Παράγοντας



ΙΒΒΟ: Μεταγραφικός Παράγοντας

