

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΔΑΡΒΑΡΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ από Α-Ι: ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΑΝΤΙΑΘΗΡΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321957



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΔΑΡΒΑΡΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ απόΑ-I: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΑΘΗΡΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
2. Κων/νος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
2. Κων/νος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Ιωάννης Ελεμές, Αν. Καθηγητής Οργανικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αν. Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων



Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο: «Σχεδιασμός και σύνθεση μοντέλων της αροΑ-I: Μελέτη της αντιαθηρογόνου δράσης τους» είναι μέρος του προγράμματος ΠΕΝΕΔ_2003/12002 με τίτλο έργου «Μελέτη του ρόλου και της συνεισφοράς επιμέρους συστατικών της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) στις αντιαθηρογόνες δράσεις της» της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας.

Το συγκεκριμένο έργο συγχρηματοδοτείται

- ♦ 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
- ♦ 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
- ♦ και από τον Ιδιωτικό Τομέα

στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Γ' ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



Ιωάννινα, 20-5-2009

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κας **Μαρίας Δαρβάρη**, Βιοχημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Τετάρτη 20 Μαΐου 2009, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: "Σχεδιασμός και σύνθεση μοντέλων της αρσΑ-Ι: Μελέτη της αντιαθηρογόνου δράσης τους".

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη, και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση της υποψήφιας είναι ευρεία και ολοκληρωμένη. Με βάση τα παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποφάσισε να γίνει η απονομή του τίτλου του διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων στην κα Μαρία Δαρβάρη με βαθμό **Άριστα**.

Με τιμή

Τα μέλη της εξεταστικής Επιτροπής

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

2. Κων/νος Δραΐνας, Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

3. Βασίλειος Τσούκας, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

4. Ευγενία Πάνου-Ηομώνη, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

5. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

6. Ιωάννης Ελεμές, Αν. Καθηγητής Οργανικής Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων



*Σοφία αναπόδεικτος
Τέχνη άδηλος
Ισχύς αναγώνιστος
Λόγος αδύνατος
Υγείας απούσης*

Ηρόφιλος (331-280 π.Χ.)



Αφιερωμένο στους γονείς μου
και τα αδέρφια μου



ΠΡΟΛΟΓΟΣ



Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 01.01.2006 έως 31.12.2008.

Η ανάθεση του θέματος έγινε από τον κ. Τσελέπη Αλέξανδρο, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ_2003/12002 με τίτλο έργου «Μελέτη του ρόλου και της συνεισφοράς επιμέρους συστατικών της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL) στις αντιαθηρογόνες δράσεις της» της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας. Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή αποτελείται από τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δραΐνα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη.

Τα βιολογικά πειράματα διεξήχθησαν στο ερευνητικό εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μέρος των βιολογικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». Τέλος, τα πειράματα Κυκλικού Διχρωϊσμού πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο για την τιμή που μου έκανε να με συμπεριλάβει στο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή της γνωριμίας μας.

Ευχαριστίες απευθύνω στον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, ως επιβλέποντα στην παρούσα διδακτορική διατριβή και ως επιστημονικό υπεύθυνο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ_2003/12002, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό. Οι εποικοδομητικές συζητήσεις και συναντήσεις μας καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής συνέβαλε τα μέγιστα στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για το συνεχές ενδιαφέρον της όσον αφορούσε την πρόοδο και την εξέλιξη της παρούσας διατριβής καθώς επίσης για την πολύτιμη βοήθεια της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη για την πολύτιμη βοήθεια της και για τις σημαντικές γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκου και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Ελεμέ.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην ερευνήτρια Γ του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» κ. Χρόνη Αγγελική και στις συναδέρφους και φίλες Πετράκη Μαρία και Μαντάνη Ξένια για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης θερμά όλους τους συναδέρφους μου στο εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και στο εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών του τμήματος Χημείας για τη φιλική τους διάθεση και για την πολύτιμη βοήθεια τους.

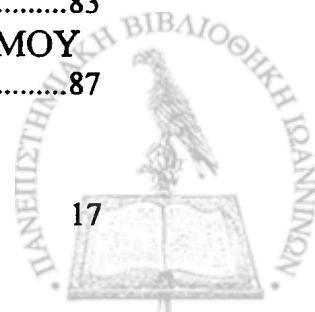
Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου για την αγάπη τους, την κατανόηση τους και τη συμπαράσταση τους στην πραγματοποίηση των ονείρων μου.

Μαρία Ι. Δαρβάρη

Ιωάννινα 2009



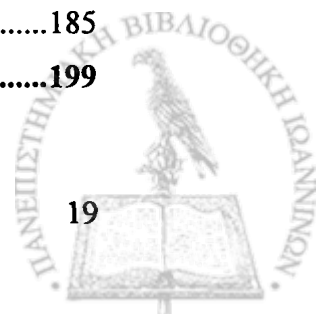
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	23
1 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	25
ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDL) ΚΑΙ ΑΠΟΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-I (ΑΡΟΑ-I).....	25
ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDL)	27
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ HDLS	29
ΑΠΟΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-I (ΑΡΟΑ-I).....	30
1. Φυσικοχημικές ιδιότητες	30
2. Δευτεροταγής ανάλυση της apoA-I. Η αμφιπαθητική α-έλικα.....	31
ΔΟΜΗ ΑΡΟΑ-I ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	35
1. Εισαγωγή.....	35
2. apoA-I ελεύθερης λιπιδίων (lipid-free apoA-I)	38
3. apoA-I δεσμευμένη με λιπίδια (lipid-bound apoA-I).....	42
4. Μοντέλα της δεσμευμένης με λιπίδια apoA-I.....	46
5. Ο ρόλος της μεθειονίνης στα άκρα της apoA-I.....	49
6. Σφαιρικές HDL.....	50
2 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	51
ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (LDL).....	51
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	53
ΛΠΙΔΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ LDL.....	54
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL (ox-LDL) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	55
1. Η οξειδωμένη μορφή της LDL.....	55
2. Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL.....	58
3. Τρόποι οξείδωσης της LDL.....	59
3 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	61
ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ.....	61
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	63
ΑΜΙΝΟΞΕΑ	64
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ	66
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ.....	69
ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ.....	71
ΣΤΑΔΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ	73
ΤΟ ΑΔΙΑΛΥΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ (ΡΗΤΙΝΗ).....	76
ΡΗΤΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ.....	76
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ N ^Α -ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ.....	81
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.....	83
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΜΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ	87



1. Καρβοδιϊμίδια.....	88
2. Φωσφονικά ή Ουρονικά παράγωγα.....	93
ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ	96
Αποκοπή με TFA	98
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ.....	98
1. Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου.....	99
2. Προτεινόμενοι μηχανισμοί σχηματισμού ασπαρταμιδίου κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την Boc/Bzl και την Fmoc/tBu στρατηγική.....	100
3. Τρόποι αντιμετώπισης του παραπάνω προβλήματος.....	103
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΗΣ.....	105
ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ ΜΕ ΟΞΕΑ.....	108
Αλκυλίωση	108
4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	109
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CD).....	109
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	111
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	116
ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ CD	117
1. α-έλικα.....	119
2. β-στροφή.....	120
3. Τυχαία διαμόρφωση.....	121
ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	122
Γενικές αρχές.....	122
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ CD	124
1. Πολυγραμμική μέθοδος παλινδρόμησης (<i>Multilinear Regression Method</i>)	124
2. Μέθοδος <i>Singular Value Decomposition (SVD)</i>	124
3. Μέθοδος <i>Convex Constraint Analysis (CCA)</i>	125
4. Μέθοδος <i>Ridge Regression (Constrained statistical regularization)</i>	125
5. Μέθοδος <i>Singular Value Decomposition με επιλογή μεταβλητών (variable selection)</i>	126
6. Μέθοδος <i>self-consistent</i>	126
7. Μέθοδος ανάλυσης με νευρωνικά δίκτυα (<i>Neural Network Analysis</i>).....	127
5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	129
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)	129
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	131
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΩΝ ΜΑΖΩΝ	132



1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	133
2. Πηγές ιόντων.....	134
3. Αναλυτής μαζών.....	136
4. Ανιχνευτής ιόντων.....	138
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ	138
1. Ταυτοποίηση και μελέτη δομής.....	138
2. Έλεγχος προσμείξεων.....	139
3. Ποσοτική ανάλυση μείγματος.....	139
4. Ισοτοπική επισήμανση με σταθερά ισότοπα.....	140
6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	141
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	141
7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	149
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-I (ΑΡΟΑ-I)	149
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	151
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-I (ΑΡΟΑ-I)	157
1. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH ₂ (1), περιοχή 104-117, έλικα 4, Met ¹¹² → Ala ¹¹² , τάξη G.....	157
2. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂ (2), περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A.....	160
3. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂ (3), περιοχή 147-159, έλικα 6, Met ¹⁴⁸ → Ala ¹⁴⁸ , τάξη A.....	162
4. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNVaOrnRARA AVDAL-NH ₂ (4), περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg ¹⁴⁹ Nva ¹⁴⁹ , Asp ¹⁵⁰ Orn ¹⁵⁰ , His ¹⁵⁵ Ala ¹⁵⁵ , τάξη G.....	164
5. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂ (5), περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A.....	166
6. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂ (6), περιοχή 152-164, έλικα 6, Thr ¹⁶¹ → Lys ¹⁶¹ , τάξη G.....	168
7. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂ (7), περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10, τάξη G.....	170
8. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH ₂ (8), περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10, Asp ²¹³ Orn ²¹³ , Ser ²²⁴ Lys ²²⁴ τάξη A.....	172
8^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	175
ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ	175
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	177
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ	178
ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ	185
9^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	199



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι 199

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 201

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ 201

1. Αρχή της μεθόδου 201

2. Αντιδραστήρια-Όργανα 201

3. Παρασκευή διαλυμάτων 202

4. Προετοιμασία της LDL για οξείδωση 202

5. Οξείδωση της LDL 202

ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΑ-Ι 203

1. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂, περιοχή 104-117, έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G 205

2. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂, περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A 208

3. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂, περιοχή 147-159, έλικα 6, Met¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸, τάξη A 210

4. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNVaOrnRARAVIDAL-NH₂, περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵, τάξη G 212

5. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂, περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A 216

6. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALKHLA-NH₂, περιοχή 152-164, έλικα 6, Thr¹⁶¹ → Lys¹⁶¹, τάξη G 218

7. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂, περιοχή 209-219 των ελίκων 9 και 10, τάξη G 221

8. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), περιοχή 209-219 των ελίκων 9 και 10, Asp²¹³·Orn²¹³, Ser²²⁴·Lys²²⁴ τάξη A 223

10^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 233

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΡΟΡC MLVS ΜΕ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι (ΑΡΟΑ-Ι) 233

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ 235

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 235

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ 235

Μηχανισμός 235

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 236

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΡΟΡC MLVs ΜΕ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι (ΑΡΟΑ-Ι) 236

1. Παρασκευή συμπλεγμάτων ΡΟΡC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), περιοχή 104-117, έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G 238



2. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂ (2), περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A.....	241
3. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂ (3), περιοχή 147-159, έλικα 6, Met ¹⁴⁸ → Ala ¹⁴⁸ , τάξη A.....	243
4. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMNValOrnRARAAVDAL-NH ₂ (4), περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg ¹⁴⁹ ·Nva ¹⁴⁹ , Asp ¹⁵⁰ ·Orn ¹⁵⁰ , His ¹⁵⁵ ·Ala ¹⁵⁵ , τάξη G.....	246
11^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	251
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΑ-I ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ LCAT	251
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ.....	253
ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	254
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	254
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ HDL ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ ΑΡΟΑ-I	255
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	256
12^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	257
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	257
13^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	265
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	265
14^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	271
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	271
15^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	277
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	277
16^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	297
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	297

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

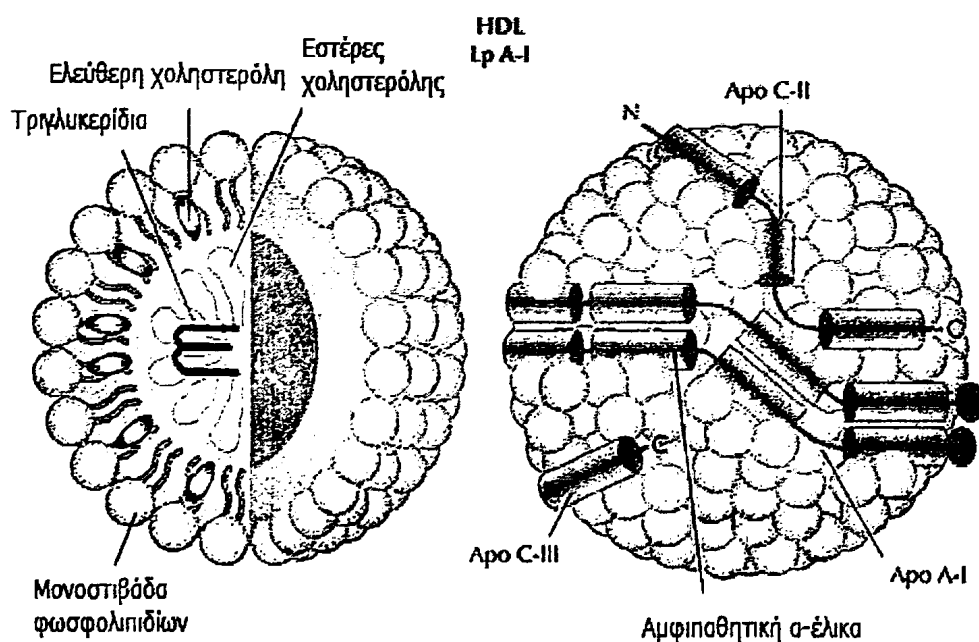


1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDL) ΚΑΙ
ΑΠΟΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Α-I (apoA-I)



ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (HDL)

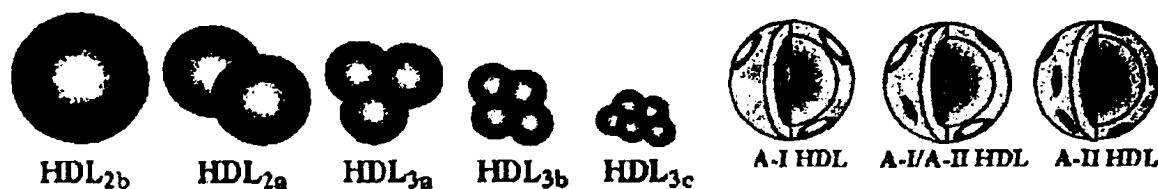
Οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDLs) είναι οι μικρότερες (7-12 nm σε διάμετρο) αλλά οι πυκνότερες ($1.063 < d < 1.25$ g/ml) από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Οι κυριότερες απολιποπρωτεΐνες των HDLs είναι η apoA-I και η apoA-II αν και οι HDLs εμπεριέχουν επιπλέον apoA-IV, apoA-V (1) apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoJ και apoL (2). Οι HDLs είναι επιπλέον μεταφορείς για τις πρωτεΐνες του πλάσματος που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων π.χ. για την πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων της χοληστερόλης (CETP) (3-6), την LCAT (3, 4) και την πρωτεΐνη μεταφοράς των φωσφολιπιδίων (PLTP) (7).



Εικόνα 1.1: Δομή της HDL.

Το κλάσμα των HDLs στο ανθρώπινο πλάσμα είναι ετερογενές ως προς το σχήμα, το μέγεθος, την πυκνότητα, τη σύσταση και το φορτίο της επιφάνειας. Με βάση την πυκνότητα (με υπερφυγοκέντρηση) οι HDLs χωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες, τις HDL₂ ($1.063 < d < 1.125$ g/ml) και τις HDL₃ ($1.125 < d < 1.21$ g/ml) και σε μια μικρότερη κατηγορία τις VHDL ($1.21 < d < 1.25$ g/ml). Με βάση το σχήμα με ηλεκτροφόρηση σε non-denaturing polyacrylamide gradient gel χωρίζονται σε πέντε διακριτές υποδιαίρεσεις: HDL_{2b} (με διάμετρο 10.6 nm), HDL_{2a} (9.2 nm) HDL_{3a} (8.4 nm), HDL_{3b} (8.0 nm) HDL_{3c} (7.6 nm). Με

βάση τη σύσταση των απολιποπρωτεϊνών που εμπεριέχουν οι HDLs χωρίζονται στις HDLs που έχουν μόνο την apoA-I και όχι την apoA-II (A-I HDLs) και στις HDLs που εμπεριέχουν και τις 2 (A-I/A-II HDLs) (8, 9). Η apoA-I κατανέμεται ισόποσα μεταξύ των A-I HDLs και των A-I/A-II HDLs ενώ η apoA-II βρίσκεται μόνο στις A-I/A-II HDLs (10). Οι A-I/A-II HDLs βρίσκονται στα HDL₃ σωματίδια ενώ οι A-I HDLs είναι κυρίαρχα συστατικά των HDL₂ και των HDL₃ (8). Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης οι HDLs εμφανίζουν α, pre-α, pre-β ή γ μετανάστευση σε σχέση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (11-14). Τα α σωματίδια είναι οι σφαιρικές λιποπρωτεΐνες και υπολογίζονται για το κύριο ποσοστό των HDLs στο πλάσμα. Περιλαμβάνουν τις HDL₂ τις HDL₃ τις A-I HDLs και τις A-I/A-II HDLs. Τα pre-β σωματίδια HDLs είναι είτε apoA-I φτωχές σε λιπίδια ή δισκοειδή σωματίδια τα οποία περιλαμβάνουν ένα ή δυο μόρια apoA-I μαζί με φωσφολιπίδια και ίσως μια μικρή ποσότητα μη εστεροποιημένης χοληστερόλης (15). Οι γ- HDLs εμπεριέχουν apoE και καθόλου apoA-I (12).



Εικόνα 1.2: Η ετερογένεια ως προς το μέγεθος και τη σύσταση των σωματιδίων της λιποπρωτεΐνης HDL: HDL_{2b} (μέση διάμετρος 10.6 nm), HDL_{2a} (9.2 nm), HDL_{3a} (8.4 nm), HDL_{3b} (8.0 nm), HDL_{3c} (7.6 nm). Οι διαφορές ως προς τη σύσταση σε απολιποπρωτεΐνες της HDL αναδεικνύουν 3 ακόμη ξεχωριστά σωματίδια: τις LpA-I HDL, που περιέχουν μόνο την απολιποπρωτεΐνη A-I και, αντίστοιχα, τις LpA-I/A-II HDL και LpA-II HDL.

Τέλος η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR παρέχει έναν εναλλακτικό τρόπο μέτρησης των επιπέδων HDL και των υποδιαιρέσεων της στο πλάσμα (16, 17). Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στα ανιχνεύσιμα πλάτη των φασματικών σημάτων που εκπέμπονται από τις υποτάξεις των HDLs με διαφορετικό μέγεθος. Κάθε σήμα μιας υπόταξης των HDLs πηγάζει από το συνολικό αριθμό των τελικών μεθυλικών ομάδων πάνω στα λιπίδια που εμπεριέχονται στα σωματίδια των HDLs. Αυτή η τεχνική αναγνωρίζει πέντε

υποτάξεις των HDLs με διαμέτρους σωματιδίων 10-13 nm, 8.8-10 nm, 8.2-8.8 nm, 7.8-8.2 nm, και 7.3-7.7 nm.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ HDLs

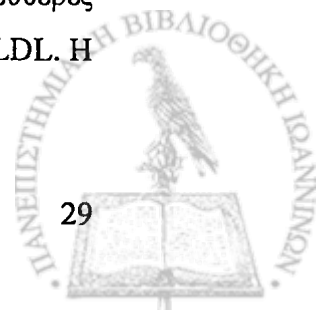
♦ Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης

Η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (18, 19) είναι η διαδικασία στην οποία χοληστερόλη από τους περιφερικούς ιστούς μεταφέρεται διαμέσου του πλάσματος στο ήπαρ για ανακύκλωση ή απέκκριση από το σώμα μέσω της χολής. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αρκετά διακριτά στάδια:

1. Μεταφορά φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης από τις κυτταρικές μεμβράνες σε απολιποπρωτεΐνες π.χ. apoA-I, φτωχές σε φωσφολιπίδια που οδηγεί στο σχηματισμό δισκοειδών HDLs. Το στάδιο αυτό εξαρτάται από τον μεμβρανικό μεταφορέα ABCA1.
2. Τα δισκοειδή σωματίδια HDLs μετατρέπονται σε ώριμα σφαιρικά με τη βοήθεια του ενζύμου LCAT.
3. Η αλληλεπίδραση των σφαιρικών HDLs με το ένζυμο CETP το οποίο μεταφέρει τους εστέρες της χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής (LDL) και πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL).
4. Μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης στο ήπαρ διαμέσου του υποδοχέα των LDL είτε μέσω του SR-B1.

♦ Αντιοξειδωτικές δράσεις

Η οξείδωση της LDL αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην έναρξη και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η LDL εισχωρεί στον υπενδοθηλιακό χώρο και υφίσταται οξείδωση. Η οξειδωμένη LDL ελκύει χημειοεκλεκτικά τα μονοκύτταρα, συμμετέχει στη διαδικασία μετατροπής των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα, επιφέρει κυτταροτοξικά αποτελέσματα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διεγείρει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (20). Η HDL έχει την ικανότητα να εισέρχεται στον υπενδοθηλιακό χώρο και να επιστρέφει στην κυκλοφορία. Μέσω πολλαπλών μηχανισμών η HDL αναστέλλει την οξείδωση της LDL από ιόντα μετάπτωσης όπως και από το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων μέσω του μονοπατιού της 12/15 λιποξυγενάσης. Λιπόφιλα αντιοξειδωτικά συστατικά που εμπεριέχονται στο σωματίδιο της HDL μπορούν να αφαιρούν τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του καταρράκτη οξείδωσης της LDL. Η



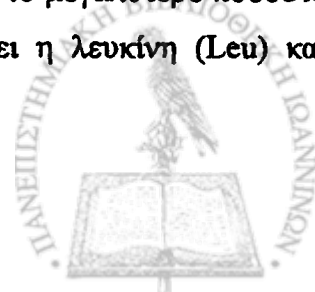
αντιοξειδωτική δράση της HDL έχει συνδεθεί επίσης με το απολιποπρωτεϊνικό της περιεχόμενο και συγκεκριμένα με τις apoA-I και apoA-II. Συγκεκριμένα προκαλείται μείωση των υπεροξειδίων των φωσφολιπιδίων και των εστέρων της χοληστερόλης που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL μέσω αναγωγής των εν λόγω λιπούπεροξειδίων προς τα αντίστοιχα υδροξύλια τους με ταυτόχρονη οξείδωση του θείου (σχηματισμός σουλφο-ομάδας) των μεθειονίνων που εντοπίζονται στις αλληλουχίες των συγκεκριμένων απολιποπρωτεϊνών (21). Η σουλφοοξείδωση της μεθειονίνης φαίνεται να μην επηρεάζει τις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL και κατά επέκταση της apoA-I. Αντίθετα η οξειδωτική τροποποίηση των τυροσινών της apoA-I από υποχλωριώδες οξύ ή νιτρώδες άλας φαίνεται να προκαλούν εξασθένιση της δράσης της apoA-I όσον αφορά τη συμμετοχή της στην εκροή χοληστερόλης από τα κύτταρα προς τα HDL σωματίδια μέσω του ABCA1 υποδοχέα (22).

ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ A-I (apoA-I)

1. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η ανθρώπινη apoA-I αποτελεί το 70% της πρωτεϊνικής μάζας των σωματιδίων HDL. Η αλληλουχία της apoA-I καθορίστηκε από την ερευνητική ομάδα του Brewer (23) και ακολούθησε κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του cDNA της (24-27) και του γενωμικού DNA της (28, 29). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την apoA-I βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q23 και είναι μέλος μιας υπεροικογένειας απολιποπρωτεϊνών που περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ανταλλάξιμες απολιποπρωτεΐνες (apoA-I, A-II, Cs, και E) (30). Πιστεύεται ότι η υπεροικογένεια αυτών των γονιδίων έχει εξελιχθεί από έναν κοινό πρόγονο μέσω της διαδικασίας της αφαίρεσης ή του διπλασιασμού ενός μοτίβου 33 αμινοξέων.

Η apoA-I είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, μήκους 267 αμινοξέων και μοριακού βάρους ~30 kDa που συντίθεται στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο. Πριν την έκκριση της στην κυκλοφορία η apoA-I υπόκειται σε ενδοκυττάρια επεξεργασία στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκειμένου να αποκοπεί το αρχικό πεπτίδιο μήκους 24 αμινοξέων. Το τελικό ώριμο πολυπεπτίδιο που δεν έχει καμία γλυκοσυλίωση ή δισουλφιδικές γέφυρες αποτελείται από 243 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 28 kDa. Η αλληλουχία της apoA-I δεν εμπεριέχει καθόλου τα αμινοξέα κυστεΐνη (Cys) και ισολευκίνη (Ile). Επιπλέον το μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής στην αμινοξική αλληλουχία της apoA-I καταλαμβάνει η λευκίνη (Leu) και



ακολουθούν το γλουταμινικό οξύ (Glu) και η λυσίνη (Lys), ένα αρνητικά και ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ αντίστοιχα.

ApoA-I human

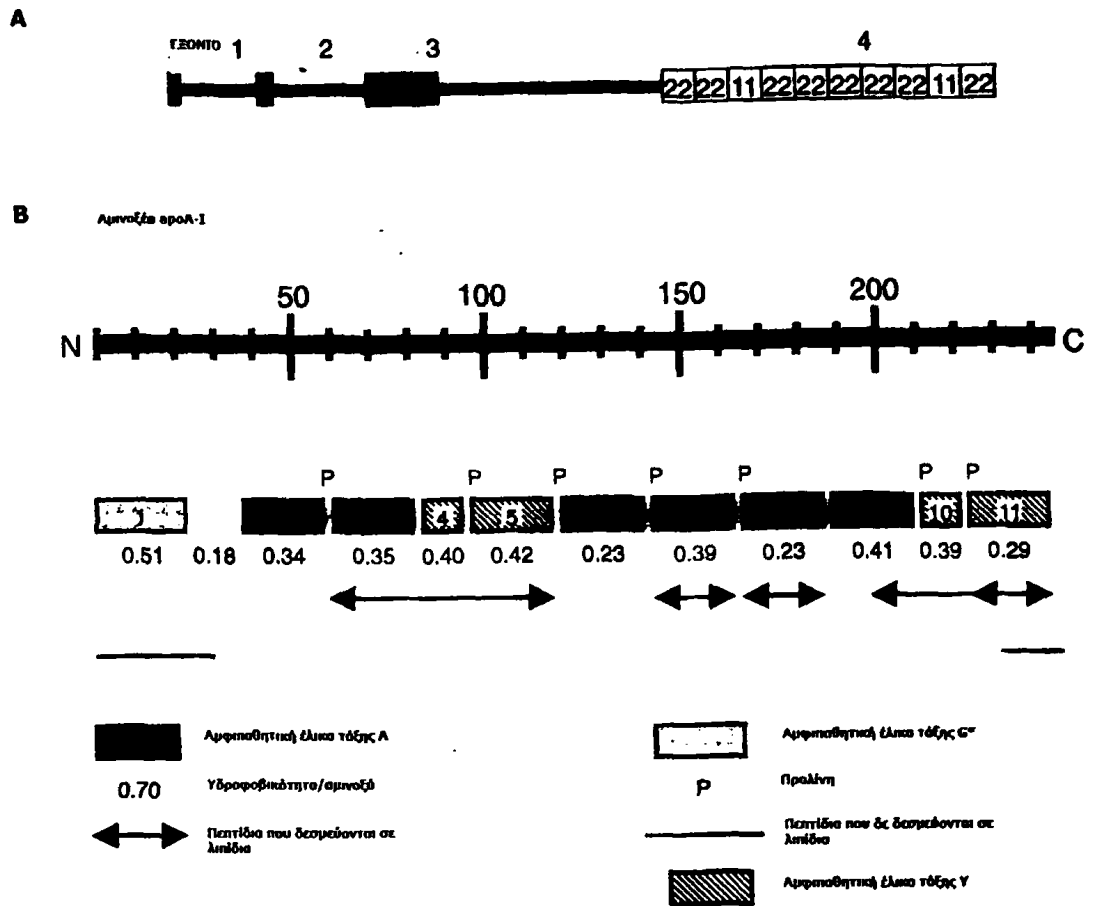
```
1      10      20      30      40      50
DEPPQSPWDR VKDLATVYVD VLKDSGRDYV SQFEGSALGK QLNKLLDNW
                                          100
DSVTSTFSKL REQLGPNVQE FWDNLEKETE GLRQEMSKDL EEVKAKVQPY
                                          150
LDDFQKKWQE EMELYRQKVE PLRAELQEGA RQKLHELQEK LSPLGEEMRD
                                          200
RRAHVVDALR THLAPYSDEL RQRLAARLEA LKENGARLA EYHAKATEHL
                                          240
STLSEKAKPA LEDLRQGLLP VLESFKVSFL SALEEYTKKL NTQ
```

Εικόνα 1.3: Αμινοξική αλληλουχία του μορίου της apoA-I.

2. Δευτεροταγής ανάλυση της apoA-I. Η αμφιπαθητική α-έλικα

Η δευτεροταγής δομή της apoA-I χαρακτηρίζεται από την αμφιπαθητική φύση της. Μόρια τα οποία έχουν μια συγκεκριμένη κατανομή των πολικών και των μη-πολικών ομάδων τους καλούνται αμφιπαθητικά και χαρακτηρίζονται από τη τάση τους να δεσμεύονται σε μια διεπιφάνεια π.χ. αέρα/νερού ή μονοστιβάδα λιπιδίων/νερού.

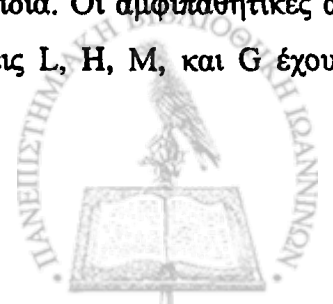
Οι ανταλλάξιμες απολιποπρωτεΐνες και μαζί τους και η apoA-I θεωρούνται αμφιπαθητικά μόρια με συγκεκριμένες ιδιότητες. Έχει βρεθεί ότι η λεγόμενη «εύκαμπτη» περιοχή (flexible domain) 1-43 της apoA-I, κωδικοποιείται από το εξόνιο 3 του γονιδίου της πρωτεΐνης και σχηματίζει τρεις 11-μερείς α-έλικες (G1: 1-21, G2: 22-32, G3: 33-43) (31). Η C-τελική περιοχή (44-243) συνδέεται με λιπίδια και κωδικοποιείται από το εξόνιο 4 του γονιδίου της apoA-I. Αυτή αποτελείται από 10 διαδοχικές αμφιπαθητικές α-έλικες: οκτώ 22-μερείς και δύο 11-μερείς (που αποτελούνται από 22 και 11 αμινοξέα, αντίστοιχα), που συχνά διακόπτονται από προλίνες.



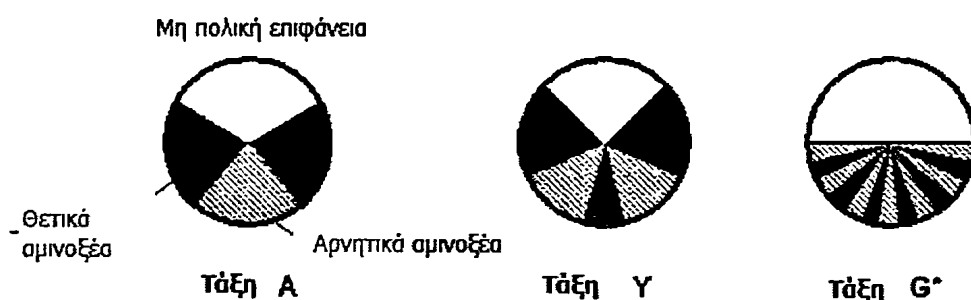
Εικόνα 1.4: Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της ανθρώπινης apoA-I. Α. Δομή του γονιδίου Β. Αμφιπαθητικές α-έλικες μέσα στο μόριο της apoA-I.

Η ερευνητική ομάδα που πρότεινε για πρώτη φορά, την ύπαρξη αμφιπαθητικών α-ελίκων στις απολιποπρωτεΐνες ως μια πιθανή εξήγηση για τον τρόπο που αλληλεπιδρούν οι απολιποπρωτεΐνες με τα λιπίδια ήταν η ομάδα του Segrest (32). Η συμμετοχή της α-έλικας στη δέσμευση των φωσφολιπιδίων αποδείχθηκε μετρώντας τη διαφορά στην ελλειπτικότητα στα 222 nm μετά τη δέσμευση της απολιποπρωτεΐνης με το φωσφολιπίδιο. Η ελεύθερη από λιπίδια apoA-I αποτελείται κατά 40-50% από α-έλικες ενώ το συγκεκριμένο ποσοστό αυξάνεται σε 75% στη δεσμευμένη με φωσφολιπίδια apoA-I και εξαρτάται άμεσα από τον τύπο των λιπιδίων και των σωματιδίων που σχηματίζονται (14, 33). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η ανοσοδραστικότητα της apoA-I προς τα μονοκλωνικά αντισώματα επηρεάζεται από την παρουσία των λιπιδίων (34, 35) γεγονός που αποδεικνύει τις διαμορφωτικές αλλαγές που γίνονται και επηρεάζουν τις περιοχές που δεσμεύονται με τα λιπίδια.

Η ερευνητική ομάδα του Segrest (31) πρότεινε ότι οι α-έλικες των απολιποπρωτεϊνών δεν είναι όλες ισοδύναμες ως προς την συγγένεια τους για τα λιπίδια. Οι αμφιπαθητικές α-έλικες των απολιποπρωτεϊνών σχηματίζουν την τάξη A. Οι τάξεις L, H, M, και G έχουν

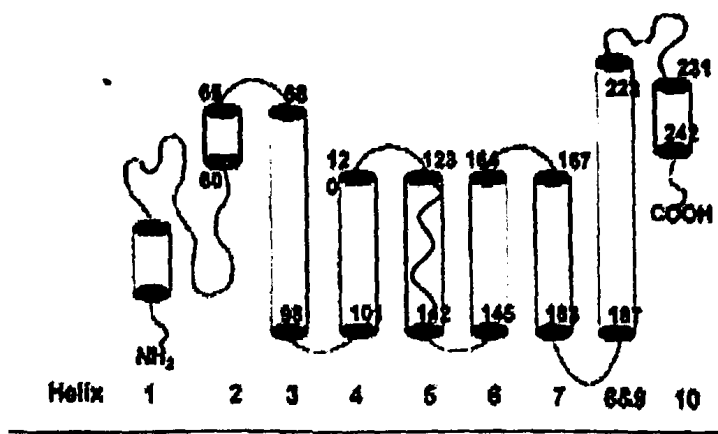


χρησιμοποιηθεί για να αναγνωρίσουν αμφιπαθητικές α-έλικες στις λυτικές, ορμονικές, διαμεμβρανικές και σφαιρικές πρωτεΐνες αντίστοιχα. Η τάξη A χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό μέσο όρο υδροφοβικότητας και μια κατανομή των αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα να βρίσκονται ομαδοποιημένα στην διεπιφάνεια πολικής-μη πολικής φάσης και τα αρνητικά να βρίσκονται συγκεντρωμένα στο κέντρο της πολικής επιφάνειας. Στον τύπο Y οι δυο πλευρές της διεπιφάνειας καταλαμβάνονται από θετικά αμινοξέα. Η πολική πλευρά καταλαμβάνει κυρίως αρνητικά αμινοξέα και στο κέντρο της υπάρχουν θετικά κατάλοιπα. Τέλος η πολική πλευρά της G τάξης χαρακτηρίζεται από τυχαία εναλλαγή θετικών και αρνητικών αμινοξέων.

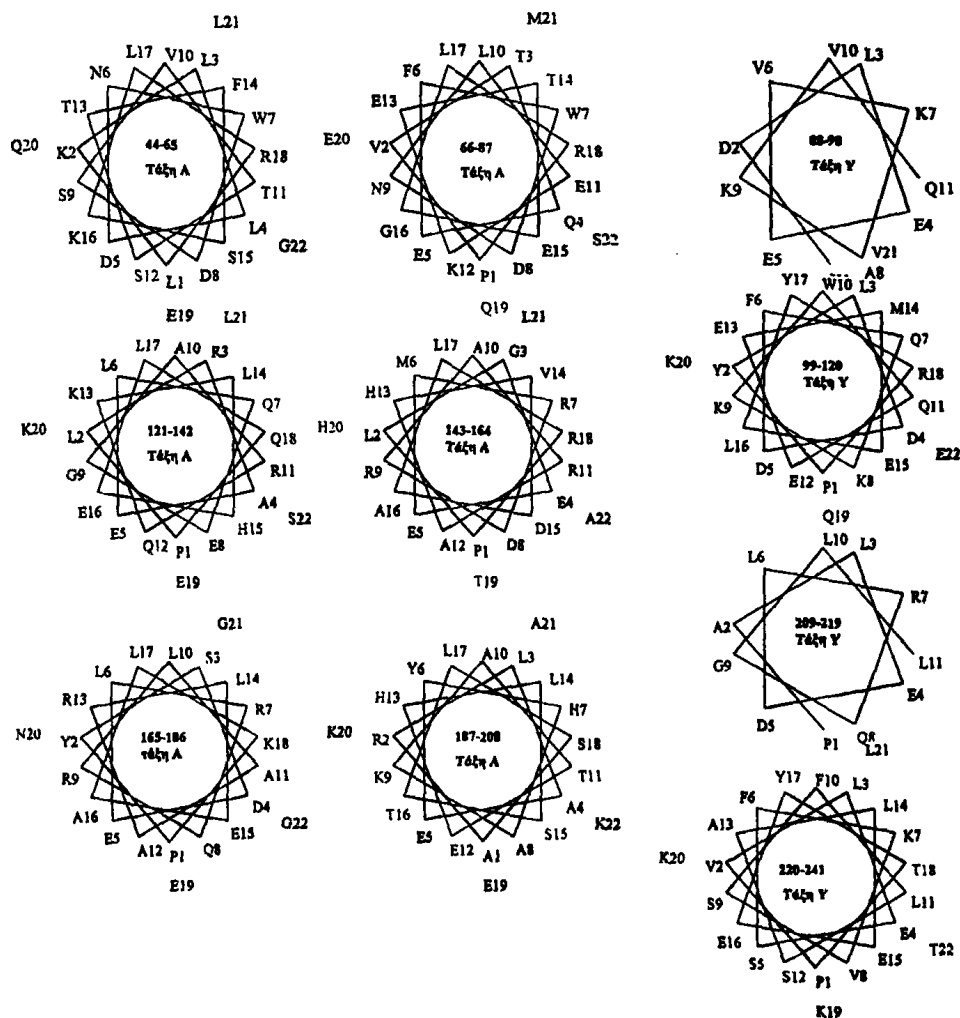


Εικόνα 1.5: Αμφιπαθητικές α-έλικες τύπου A, Y και G* (36).

Για την αρoA-I, 6 από τις 10 έλικες έχουν βρεθεί ότι εμφανίζουν τη συγκεκριμένη κατανομή αμινοξέων της τάξης A: οι έλικες 44-65, 66-87, 121-142, 143-164, 166-186, 187-208. Επιπλέον έχουν αναγνωρισθεί και δυο ακόμα τάξεις για την αρoA-I η τάξη G :έλικα 8-33 και η τάξη Y: 88-98, 99-120, 209-219, 220-241.



Εικόνα 1.6: 10 αμφιπαθητικές α-έλικες της apoA-I σε αντιπαράλληλη διάταξη.



Εικόνα 1.7: Αναπαραστάσεις κατά Edmundson των 10 αμφιπαθητικών α-ελίκων τάξης A και Y του μορίου της apoA-I. Με κόκκινο συμβολίζονται τα θετικά αμινοξέα και με μπλε τα αρνητικά κατάλοιπα. Μαύρα εμφανίζονται τα υδρόφοβα και με πράσινο χρώμα τα ουδέτερα αμινοξέα.



ΔΟΜΗ apoA-I ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

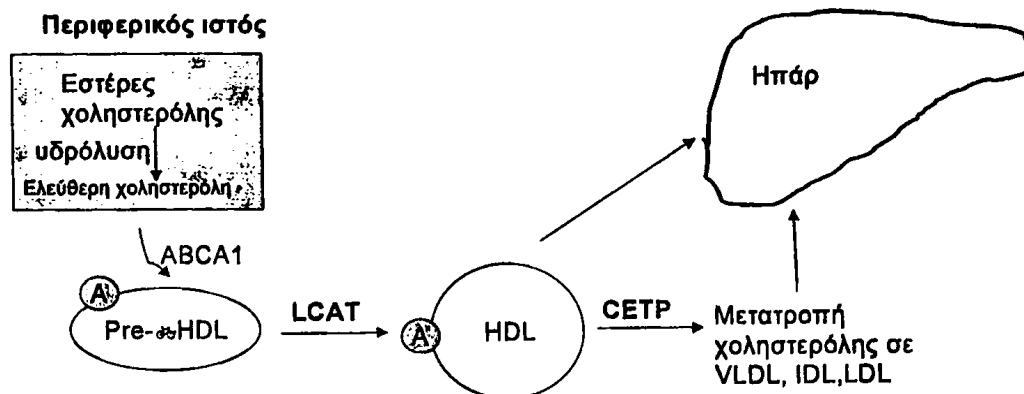
1. Εισαγωγή

Για να κατανοήσουν το μηχανισμό μέσω του οποίου η apoA-I που βρίσκεται στην HDL προστατεύει από την ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων, οι πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διττή λειτουργία της apoA-I που περιλαμβάνει την εκροή λιπιδίων από τα κύτταρα (37-40) και τη ρύθμιση της ανοσολογικής ενεργοποίησης των κυττάρων (41-46). Τα εργαστήρια που ασχολούνται με την apoA-I έχουν δώσει την προσοχή τους στην κατανόηση της τρισδιάστατης δομής της apoA-I και στον τρόπο που αυτή αποκτά φωσφολιπίδια και χοληστερόλη με στόχο τη δημιουργία νεοσυντιθέμενων λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.

Η apoA-I είναι μια πρωτεΐνη 28 kDa που συντίθεται στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό, στο μεταβολισμό αλλά και στον καταβολισμό των HDL. Τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης HDL στο πλάσμα είναι στενά συνδεδεμένα με την προστασία από τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων ακόμα και σε ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης (47). Ο σχηματισμός των σωματιδίων HDL εξαρτάται εξολοκλήρου από την αρχική λιπιδίωση της apoA-I από τον μεμβρανικό μεταφορέα ABCA1 (48-50). Η apoA-I, είτε είναι χωρίς φωσφολιπίδια, είτε εμπεριέχει ένα πολύ μικρό ποσοστό, σχηματίζει διμερή τα οποία αποκτούν φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από τη μεμβράνη με τη βοήθεια του ABCA1 και σχηματίζουν τις διάφορες τάξεις των νεοσυντιθέμενων σωματιδίων HDL (51). Υπάρχουν όμως και κατηγορίες νεοσυντιθέμενων σωματιδίων HDL τα οποία εμπεριέχει παραπάνω από 2 μόρια apoA-I ανά σωματίδιο και μεγάλες ποσότητες φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης (52-54).

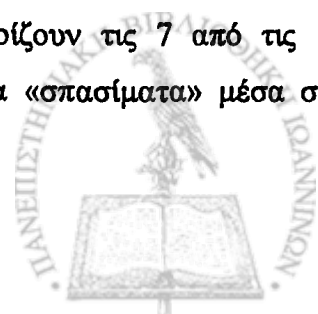
Ένα δεύτερο βήμα λιπιδίωσης στην διαδικασία ωρίμανσης των HDL σωματιδίων είναι η ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT από τη δεσμευμένη με λιπίδια apoA-I. Η ενεργοποίηση του ενζύμου οδηγεί στη σύνθεση εστέρων χοληστερόλης στα σωματίδια HDL (55) δίνοντας έναν υδρόφοβο πυρήνα και μετατρέποντας τα από δισκοειδή σε σφαιρικά. Από μελέτες ανθρώπινων ανεπαρκειών έχει προκύψει ότι όταν ο ABCA1 ή το ένζυμο LCAT είναι ανενεργά σε δράση τα επίπεδα της apoA-I HDL στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλά εξαιτίας της γρήγορης απομάκρυνσης της από την κυκλοφορία (56, 57). Συμπερασματικά, τα δυο στάδια της λιπιδίωσης της apoA-I είναι απαραίτητα και καθοριστικά για το σχηματισμό ώριμων σφαιρικών σωματιδίων HDL στο πλάσμα τα οποία θα είναι και λειτουργικά συνάμα (58-60).





Εικόνα 1.8: Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και ο ρόλος της apoA-I στη δημιουργία των HDL.

Η apoA-I έχει μια πρωτοταγή δομή από 243 αμινοξέα με δευτεροταγή δομικά μοτίβα παρόμοια με αυτά άλλων απολιποπρωτεϊνών. Η συνολική δομή της apoA-I ελεύθερης λιπιδίων έχει περιγραφεί ως «χυτά σφαιροειδής» (molten globular) [δομής «ρευστής σταγόνας»] (61) δομή που προτείνει μια σαν «ατόφια» δευτεροταγή δομή αλλά έχει μια τεταρτοταγή δομή που είναι λιγότερο οργανωμένη. Στην κατάσταση που περιγράφηκε ως «χυτά σφαιροειδής» οι περιοχές της πρωτεΐνης που έχουν α-έλικα παραμένουν ανέπαφες με τα β-πτυχωτά φύλλα και οι περιοχές σύνδεσης εξαφανίζονται ή γίνονται λιγότερο οργανωμένες. Για αυτού του είδους τις πρωτεΐνες οι υδροφοβικές περιοχές είναι στραμμένες προς το εσωτερικό της δομής και οι υδροφιλικές επιφάνειες αλληλεπιδρούν με το υδατικό περιβάλλον. Η α-έλικα είναι το κύριο δομικό χαρακτηριστικό μοτίβο της ελεύθερης λιπιδίων apoA-I. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα πρώτα 43 αμινοξέα του N-τελικού άκρου του μορίου της apoA-I είναι σχετικά αποδιοργανωμένα αλλά εμπεριέχουν μια G* αμφιπαθητική α-έλικα δημιουργούμενη από τα αμινοξέα 8-33 (62). Τα αμινοξέα 44-243 που αποτελούν το 80% της πρωτεΐνης δημιουργούν μια σειρά από 10 επαλαμβανόμενες εν σειρά δομικές μονάδες με υψηλά συντηρημένες αμινοξικές αλληλουχίες μέσα στις επαναλήψεις αυτές. Οι 8 από αυτές τις δομικές μονάδες εμπεριέχουν 22 αμινοξέα και οι 2 περιέχουν 11 αμινοξέα. Αμινοξέα που σταματούν την έλικα όπως η προλίνη (63) χωρίζουν τις 7 από τις 10 επαναλήψεις και αρκετοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι αυτά τα «σπασίματα» μέσα στο



μόριο της apoA-I της δίνουν την χαρακτηριστική ευλυγισία που χρειάζεται για να καμφθεί περιφερικά του σφαιρικού σωματιδίου της HDL (64, 65).

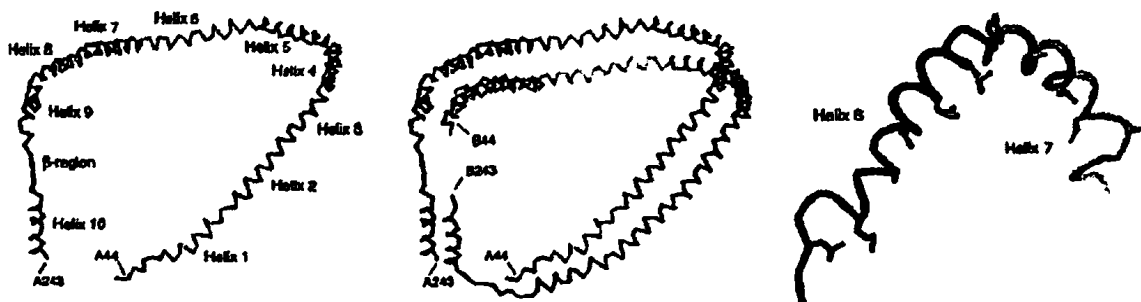
Η περιγραφή της δομής της apoA-I ως «χυτά σφαιροειδής» δεν έρχεται σε αντίθεση με τις αναφορές που υποστηρίζουν ότι η apoA-I περιέχει δυο διακριτές αποδιατεταγμένες περιοχές, μια που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του μορίου της και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-187 και μια στο C-τελικό άκρο αριθμώντας τα αμινοξέα 188-243 αλλά προτείνει ότι οι αμινοξικές αλυσίδες δεν έχουν καταφέρει να είναι στενά πακεταρισμένες. Μια πρόσφατη μελέτη του Brouillette (66) προτείνει ότι το N-τελικό άκρο της apoA-I ίσως έχει μια πιο συμπαγή δομή από αυτή που είχε προταθεί αρχικά και υποδηλώνει ότι η αδιαμφισβήτητη τάση της apoA-I να ολιγομερίζεται (67) ίσως να εξηγεί τις πρόσφατες μελέτες που προτείνουν τη δομή της ως «χυτά σφαιροειδής». Συνολικά, η θεωρία προτείνει ότι η «χυτά σφαιροειδής» διαμόρφωση αντιπροσωπεύει μια θερμοδυναμική κατάσταση που επιτρέπει στην πρωτεΐνη να έχει διαφορετικές λειτουργίες που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση της με τα μεμβρανικά λιπίδια.

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της apoA-I είναι η ασύμμετρη κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος της επιφάνειας της κάθε α-ελικοειδούς επανάληψης είτε αυτή αποτελούνταν από 22 είτε από 11 αμινοξέα, που σχηματίζει μια δομή που καλείται αμφιπαθητική α-έλικα τάξης A (31), η οποία προτάθηκε για πρώτη φορά από το Segrest το 1974 (32). Κάθε μια από τις 10 ελικοειδείς επαναλήψεις της apoA-I έχει μια επιφάνεια πλούσια στα υδρόφοβα αμινοξέα και η απέναντι επιφάνεια είναι γεμάτη αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα. Η περιοχή ανάμεσα στην υδρόφιλη και στην υδρόφοβη επιφάνεια είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα κυρίως λυσίνη και αργινίνη. Είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι η υδρόφοβη επιφάνεια στην κάθε αμφιπαθητική έλικα αλληλεπιδρά με τις ακυλαλυσίδες των φωσφολιπιδίων στα σωματίδια της HDL για να βοηθήσει στη διαλυτοποίηση του σωματιδίου στο πλάσμα. Τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα της υδρόφιλης επιφάνειας κάθε έλικας υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση με την υδατική φάση, ενώ ο ρόλος των υψηλά συντηρημένων θετικών αμινοξέων παραμένει αδιευκρίνιστος. Έχει προταθεί η υπόθεση «αναπνευστήρα» (snorkel hypothesis) για την εξήγηση του ρόλου των θετικών αμινοξέων στα σωματίδια της HDL που αναφέρει ότι τα θετικά αμινοξέα αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των φωσφορικών που βρίσκονται στη κεφαλή των φωσφολιπιδίων (32, 68). Μάλιστα ο MacRaid και οι συνεργάτες του έχουν πραγματοποιήσει μελέτες NMR και έβγαλαν αποτελέσματα σύμφωνα με την υπόθεση

«αναπνευστήρα» για την απολιποπρωτεΐνη C-II, μια απολιποπρωτεΐνη που εμπεριέχει αμφιπαθητικές έλικες που αλληλεπιδρούν με μικκύλια δωδεκυλφωσφοχολίνης (69).

2. apoA-I ελεύθερης λιπιδίων (lipid-free apoA-I)

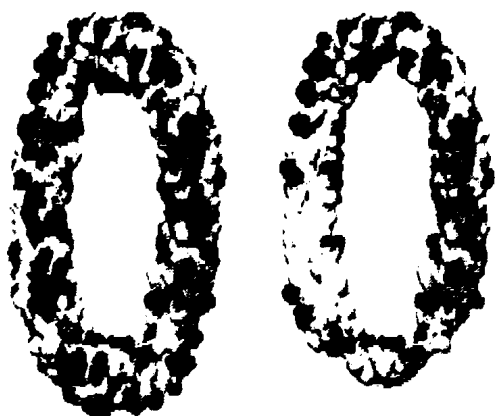
Από μελέτες αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης έχει προταθεί ότι η ελεύθερης λιπιδίων apoA-I όταν βρίσκεται σε διάλυμα είναι σε ισορροπία μεταξύ δυο διαμορφώσεων: μιας χαλαρά αναδιπλωμένης ελικοειδής δέσμης και μιας επιμήκης ελικοειδούς δομής που ονομάζεται «επιμήκης ελικοειδής φουρκέτα» (elongated helical hairpin) (70). Το μοντέλο της «επιμήκης φουρκέτας» για την apoA-I είναι σύμφωνο με το μεγάλο ποσοστό της α-έλικας που έχει υπολογιστεί από το CD όπως επίσης και με αναλύσεις ακτίνων X για παρόμοια μόρια και άλλες φυσικό-βιοχημικές παραμέτρους (70-73). Η πρώτη απόπειρα για τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής της apoA-I έγινε σε ανάλυση 3.6 Å για μια μεταλλαγμένη της apoA-I ($\Delta 43$ apoA-I) από τον Borhani και τους συνεργάτες του (64).



Εικόνα 1.9: Δομή της $\Delta(1-43)$ A-I από τη κρυσταλλογραφική μελέτη του Borhani et al, 1997 (64). Αριστερά και στη μέση το μονομερές και το διμερές της $\Delta(1-43)$ A-I και δεξιά η δομή NMR για τις έλικες 6 και 7 της apoA-I.

Στην ελεύθερη από λιπίδια μορφή της η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει δομή σαν ένα «ελλειπτικό δαχτυλίδι» που αποτελείται από 4 μόρια της apoA-I. Κατόπιν τα 4 αυτά μόρια αλληλεπιδρούν διαμέσου των υδροφοβικών επιφανειών των αμφιπαθητικών ελίκων τους και σχηματίζουν μια συστάδα 4 ελίκων. Η ασύμμετρη ομάδα της apoA-I $\Delta(1-43)$ περιλαμβάνει δύο διμερή, όπου το καθένα αποτελείται από ένα ζεύγος αντιπαράλληλων μονομερών τα

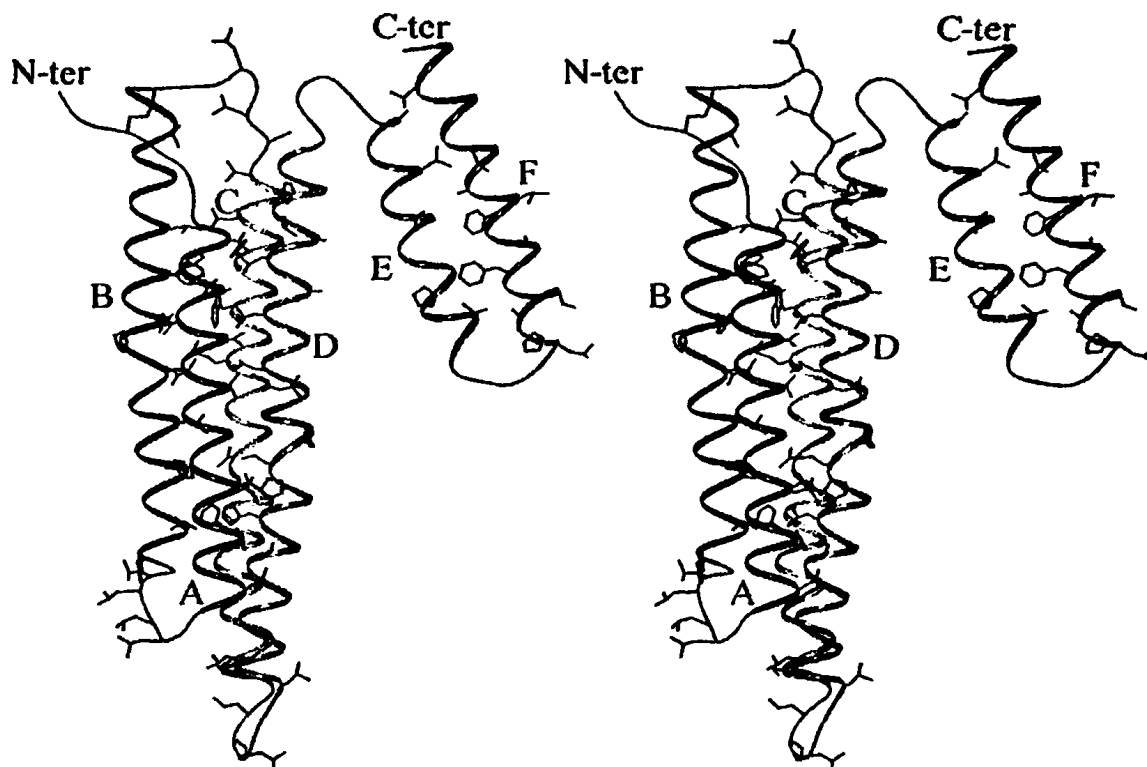
οποία έχουν παρόμοιες αλλά μοναδικές διαμορφώσεις στο χώρο. Η αντιπαράλληλη διάταξη των μονομερών φέρνει τις N-τελικές και τις C-τελικές έλικες κάθε μορίου κοντά. Σε αυτή τη κρυσταλλική δομή οι προβλεπόμενες διακοπές των 10 ελίκων από προλίνες και γλυκίνες δεν χαρακτηρίζονται ως β-στροφές αλλά ως συστροφές σε αυτά τα υπολείμματα μέσα στο ελλειψοειδές δαχτυλίδι κάθε μονομερούς.



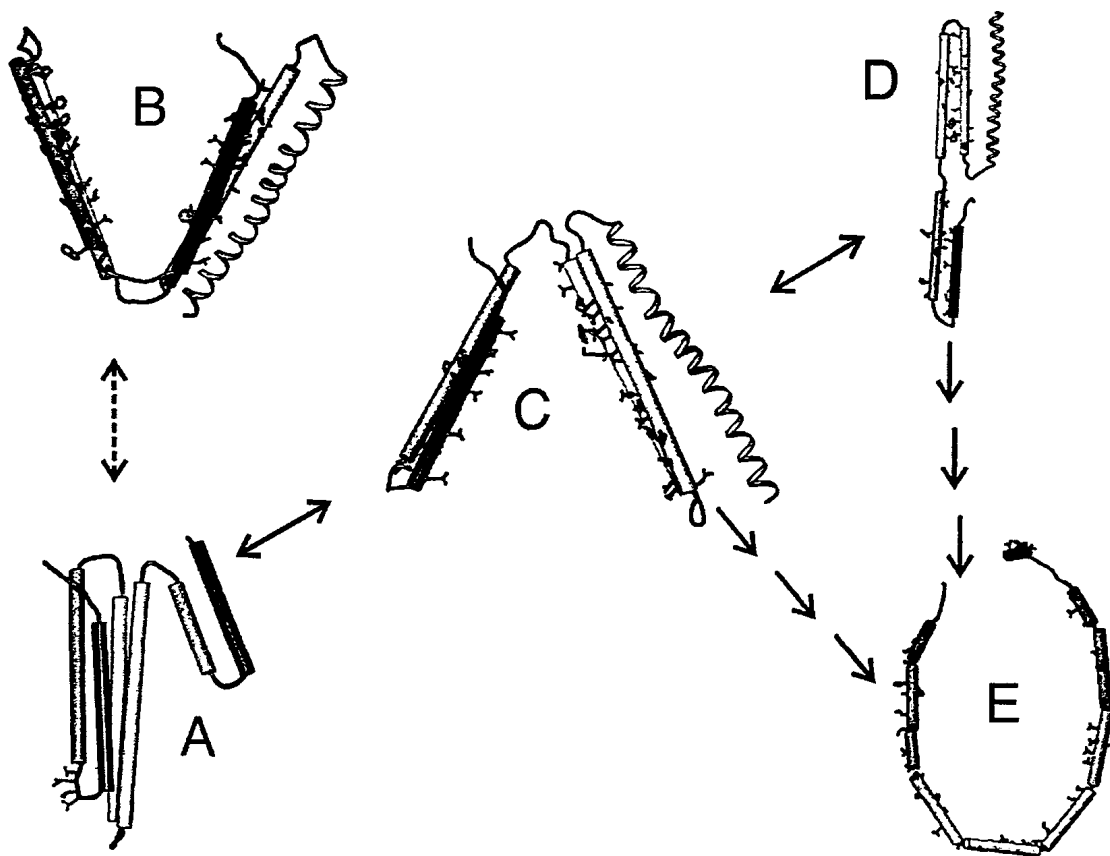
Εικόνα 1.10: Η δομή του τετραμερούς (αριστερά) και του διμερούς (δεξιά) της $\Delta(1-43)A-I$ όπως έχει προκύψει από τη μελέτη των Borhani et al, 1997 (64). Οι πλευρικές αλυσίδες της Arg και της Lys είναι μπλε, των Asp και Glu κόκκινες, των Phe, Tyr, Trp, Leu, Met, και Val κίτρινες και των Pro πράσινες, οι υπόλοιπες άσπρες.

Μετά από δυο χρόνια, η ίδια ερευνητική ομάδα αποφάσισε να κρυσταλλώσει για δεύτερη φορά τη συγκεκριμένη μεταλλαγμένη μορφή της apoA-I. Αν και η πλήρης δομή παρέμεινε για μια ακόμα φορά αδιευκρίνιστη έγινε αποδεκτό το γεγονός ότι η $\Delta 43$ apoA-I οργανώνονταν σε μια δέσμη από 4 έλικες (74) όπως είχε νωρίτερα προταθεί από το Rogers και τους συνεργάτες του (70), από μελέτες φθορισμού (FRET) (66) και από μελέτες που έγιναν στην απολιποπρωτεΐνη E (75). Μετά από 10 χρόνια, το 2006 η ερευνητική ομάδα του Ajees (76) ανέλυσε με κρυσταλλογραφία ανάλυσης 2.4 Å, παρουσία τρις-ακετυλοξικού χρωμίου (chromium tris-acetylacetonate), τη δομή ολόκληρης της apoA-I χωρίς λιπίδια και απέδειξε ότι το κυρίαρχο μοτίβο των αμινοξέων 1-187 του N-τελικού άκρου (2/3 του μορίου) ήταν πράγματι μια δέσμη 4 ελίκων και θυμίζει τις κρυσταλλικές δομές της μονομερούς apoE και της απολιποφορίνης III των εντόμων (77). Η τετραμερής έλικα της apoA-I είναι μέτριας σταθερότητας γιατί οι δεσμοί υδρογόνου ανά αμινοξύ είναι 0.71 σε αντίθεση με το 1.03 της apoE. Το C τελικό άκρο των 50 αμινοξέων σχηματίζει μια ανεξάρτητη περιοχή φουρκέτας που αλληλεπιδρά με τις αντίστοιχες περιοχές στα 2 άλλα μόρια της apoA-I μέσα στον κρύσταλλο. Αυτή η διαμόρφωση συμφωνεί με προηγούμενες προτάσεις ότι η apoA-I υιοθετεί μια τέτοια οργάνωση από δομικής και λειτουργικής άποψης όπου το C τελικό άκρο

διαμεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις με τα λιπίδια με ένα επακόλουθο μη αναδιπλούμενο N-τελικό άκρο (78, 79).



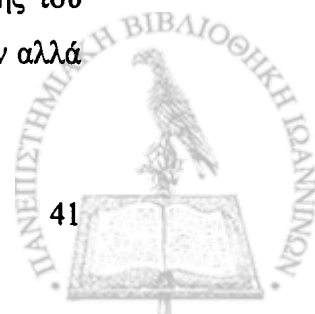
Εικόνα 1.11: Κρυσταλλική δομή της proA-I από τον Ajees και την ερευνητική του ομάδα (2006). Οι 6 έλικες στη δομή αποδίδονται ως Ca άτομα και χρωματίζονται με μπλε (A), ροζ (B) κίτρινο (C), μοβ (D), κυανό (E) και κόκκινο (F). Οι θηλιές απεικονίζονται με χρυσό χρώμα και τα υδρόφοβα αμινοξέα φαίνονται πράσινα.



Εικόνα 1.12: Προτεινόμενα μοντέλα για τη μετατροπή της apoA-I όταν συνδέεται με τα λιπίδια. Α. Αρχική δομή της apoA-I χωρίς λιπίδια. Β και C. Οι δυο γεωμετρικά πιθανές ανοικτές διαμορφώσεις όταν η apoA-I αλληλεπιδρά με τα λιπίδια με πιθανότερη τη δομή C. D. Αναδιαμόρφωση της δομής για να δημιουργηθεί ένα σταθερότερο ενδιάμεσο έλικας-φουρκέτας. E. Υποθετική διαμόρφωση της πρωτεΐνης Δ(1-43)A-I στα HDL σωματίδια.

Μια ακόμη μελέτη για την εξακρίβωση της δομής της apoA-I χωρίς λιπίδια έγινε από το Brouillette (86), ο οποίος έδειξε ότι η N-τελική περιοχή του μορίου είναι αρκετά συμπαγής ενώ το εναπομείναν C-τελικό άκρο είναι μέρος μια περιοχής που είναι σημαντική για τη δέσμευση των λιπιδίων (80, 81). Οι ερευνητικές ομάδες των Ren (82) και Davidson (83) χρησιμοποιώντας μια πληθώρα τεχνικών και μεθόδων παρείχαν στοιχεία για την επιβεβαίωση της άποψης ότι το N-τελικό άκρο της apoA-I χωρίς λιπίδια είναι μια συμπαγής δέσμη ελίκων. Αυτές οι μελέτες δεν απέκλεισαν την πιθανότητα η apoA-I χωρίς λιπίδια να βρίσκεται σε ισορροπία και στις δυο μορφές, αφενός της συμπαγής δέσμης αλλά και αφετέρου της «επιμήκης ελικοειδούς φουρκέτας» (86).

Μελέτες χημικής διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking) και φασματοσκοπίας μάζας (CCL/MS) σε συνδυασμό με ομόλογη μοντελοποίηση έδωσαν επιπρόσθετες πληροφορίες για τη δομή της apoA-I (84) σύμφωνες με τα αποτελέσματα της μελέτης του Ajees ότι το κύριο δομικό μοτίβο της apoA-I χωρίς λιπίδια είναι η δέσμη των 4 ελίκων αλλά



είναι περισσότερο εύκαμπτη και λιγότερο οργανωμένη από την κρυσταλλική δομή αποδίδοντας τον ελικοειδή χαρακτήρα του μορίου κυρίως στις 4 πρώτες επαναλήψεις (70, 78). Οι μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στις δυο μελέτες του Silva (84) και του Ajees (76) αφορούν το N-τελικό και C-τελικό άκρο του μορίου και κυρίως τα αμινοξέα 1-24 και 181-243. Μια πρόσφατη μελέτη φασματοσκοπίας ηλεκτρικού παραμαγνητικού συντονισμού υποστήριξε ότι η δομή και η διαμόρφωση της apoA-I χωρίς λιπίδια στην N-τελική περιοχή (85, 86) διαφέρει από την κρυσταλλική δομή.

Συνοψίζοντας αρκετές μελέτες για τη δομή της apoA-I χωρίς λιπίδια προτείνουν ότι υπάρχει μια διακριτή δομική περιοχή στο N-τελικό άκρο του μορίου περιλαμβάνοντας τα αμινοξέα 1-187 και μια περιοχή στο C-τελικό άκρο (188-243). Οι διαφορές στις δομικές δομές που έχουν βρεθεί κατά καιρούς έχουν να κάνουν με το κοινώς αποδεκτό γεγονός ότι η apoA-I είναι ένα δυναμικό και εύκαμπτο μόριο (61) του οποίου η διαμόρφωση μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια διεργασιών όπως είναι η κρυστάλλωση.

3. apoA-I δεσμευμένη με λιπίδια (lipid-bound apoA-I)

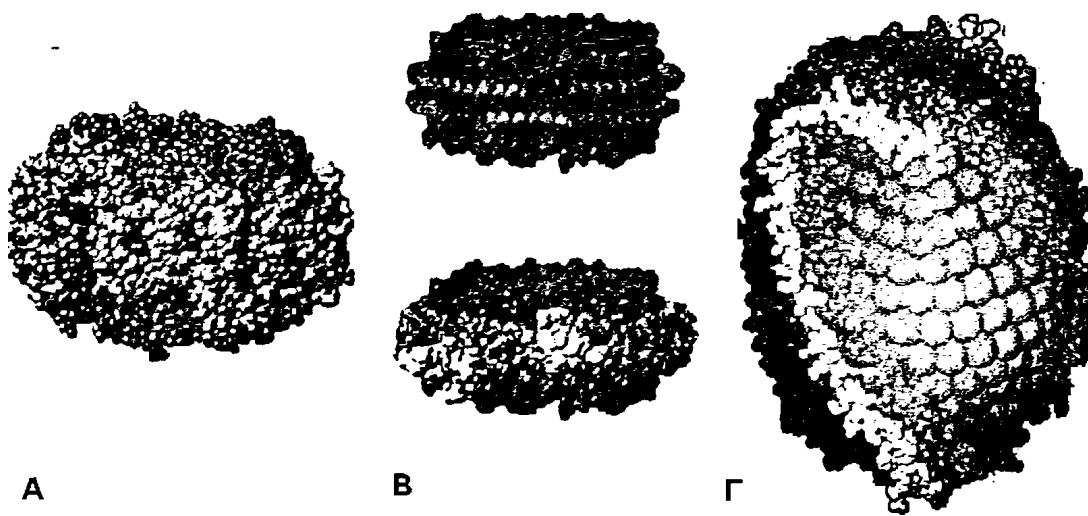
Από τις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για τη λειτουργικότητα περιοχών μέσα στην apoA-I έχουν προκύψει ενδιαφέροντα μα συνάμα και αντιφατικά συμπεράσματα. Από τις μελέτες στις οποίες έχει αφαιρεθεί η N-τελική περιοχή του μορίου της apoA-I έχει προκύψει ότι η πρωτεΐνη χάνει την ικανότητα της να αναδιπλώνεται και αυτό επηρεάζει τη συνολική σταθερότητα της (87) ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η αφαίρεση της συγκεκριμένης περιοχής μεταβάλλει την ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύεται με τα λιπίδια (88) π.χ. μια απλή μετάλλαξη σημείου G26R μειώνει την δεσμευτική ικανότητα του μορίου στα λιπίδια (89). Η C-τελική περιοχή του μορίου (έλικες 8 έως και 10) ενισχύει την αλληλεπίδραση της apoA-I με τον εαυτό της (89-91) αλλά και με τα λιπίδια (81, 87). Αν και οι έλικες 1 και 10 έχουν τη μεγαλύτερη συγγένεια για τα λιπίδια (92) η απομάκρυνσή τους από το μόριο της apoA-I αφήνει στην πρωτεΐνη που μένει να αλληλεπιδρά εύκολα με τα φωσφολιπίδια (93).

Η δομή της δεσμευμένης με λιπίδια apoA-I έχει μια σημαντική πλειάδα μοναδικών βιολογικών λειτουργιών και για αυτό το λόγο αρκετά ερευνητικά εργαστήρια ανά τον κόσμο έχουν επικεντρωθεί στην επίλυση της δομής της χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα



σωματίδια HDL (rHDL) που περιέχουν 1-παλμιτοϋλ-2-ολεοϋλ-sn-γλυκερολ-3-φωσφοχολίνη (POPC). Χρονολογικά οι πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν στην κρυσταλλική δομή της Δ43 apoA-I (64) εισάγοντας τον όρο «μοντέλο ζώνης» (belt model) για να περιγράψει τα δυο αντιπαράλληλα μονομερή της Δ43 apoA-I που τυλίγονται γύρω από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων (94, 95) με την υδρόφοβη επιφάνεια της αμφιπαθητικής α-έλικας σε στενή αλληλεπίδραση με τις ακυλαλυσίδες των λιπαρών οξέων (96).

Εκτός του μοντέλου ζώνης, έχει προταθεί και ένα ακόμα μοντέλο στο οποίο οι έλικες της πρωτεΐνης περικλείουν τα λιπίδια και βρίσκονται κάθετα ως προς την περιφέρεια του δίσκου, σε αντιπαράλληλη μεταξύ τους διάταξη και επειδή μοιάζουν με πασσάλους ενός φράχτη ονομάστηκε «picket fence model» (97, 98).



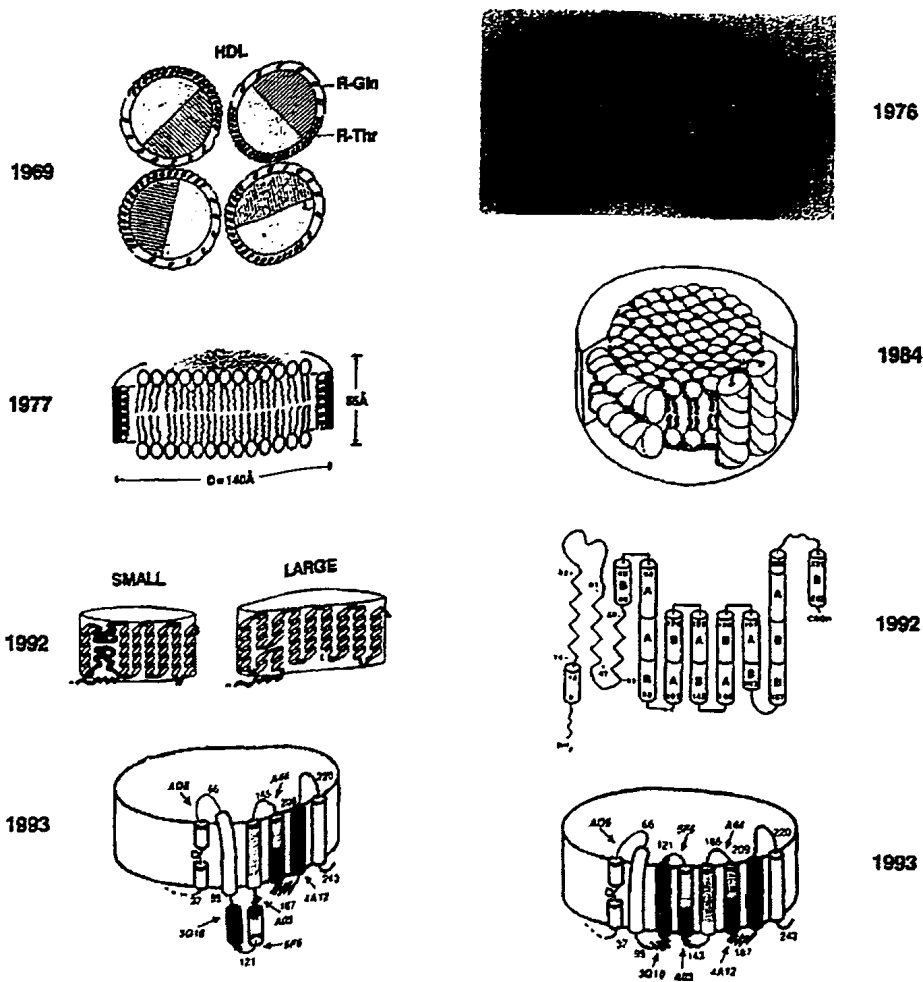
Εικόνα 1.13: Τρία μοντέλα για τη HDL. Α. Το μοντέλο του «φράχτη» των Phillips et al (98). Τα δύο μόρια της apoA-I είναι χρυσαφί και μοβ, οι πολικές κεφαλές των λιπιδίων (άτομα C και N) είναι μπλε, άτομα O κόκκινα και τα άτομα P κίτρινα, ενώ οι αλειφατικές αλυσίδες των λιπιδίων είναι μαύρες. Β. Το μοντέλο «ζώνης» των Segrest et al. (94) και Γ. Το θεωρητικό μοντέλο των Borhani et al. για τη δομή των σφαιρικών HDL βασισμένο στην Δ(1-43)A-I (64). Τα φωσφολιπίδια απεικονίζονται ως μπλε σφαίρες.

Αλλά η μελέτη των rHDL με φθορισμό (FRET) επιβεβαίωσε τη κρυσταλλική δομή της Δ43 apoA-I και έδειξε ότι η έλικα 5 (αμινοξέα 121-142) του ενός μορίου της apoA-I κείται γειτονικά στην 5' έλικα του δεύτερου μορίου της apoA-I (99-101). Τόσο η μελέτη

μέσω FRET όσο και οι μετρήσεις φθορισμού (lifetime) έδειξαν ότι τα 2 μόρια της apoA-I που δεσμεύονται είτε στα rHDL είτε στα σφαιρικά σωματίδια της HDL, μπορούν να αποκτήσουν μια ευμετάβλητη δομή (registry) έλικας με έλικα που έχει το κέντρο της στην έλικα 5 σε αντίθεση με τη σταθερή δομή των μορίων της apoA-I που προκύπτει από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της Δ43 apoA-I (64).

Οι γέφυρες άλατος που σχηματίζονται από τα δυο μόρια της apoA-I θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δομής του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου (92, 94) αν και δεν υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα για να υποστηρίξουν τη συγκεκριμένη άποψη. Η πιθανότητα το μόριο της apoA-I να υφίσταται μεγάλες μεταστροφές (shift) δεν αποδείχθηκε από μελέτες φθορισμού (102) αλλά οι μικρότερες μεταστροφές έδωσαν ώθηση στην ιδέα ότι η apoA-I είναι ένα δυναμικό μόριο π.χ. η έλικα 5 του πρώτου μορίου μπορεί να αλληλεπιδρά και με την έλικα 4 και με τη 5 του δεύτερου μορίου (102). Επιπλέον μέσα από μια μελέτη με NO spin labels δείχθηκε ο δυναμικός «χαρακτήρας» του μορίου της apoA-I όπου οι έλικες 5,6,7 (121-186) εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην έκθεση τους στα λιπίδια και ήταν και οι τρεις αρκετά δυναμικές (103). Έτσι οι συγγραφείς κατέληξαν ότι υπάρχει μια κεντρική «στρόφιγγα» (hinge) περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάμετρο του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου ή για το περιεχόμενο των λιπιδίων μέσα στο σωματίδιο και αυτό επιτυγχάνεται μέσω δίπλωσης και αναδίπλωσης της συγκεκριμένης περιοχής. Η παραπάνω θεωρία βρήκε υποστήριξη και από τη μελέτη (104) που έδειξε τη ευκαμπτότητα μέσα στην συγκεκριμένη περιοχή.

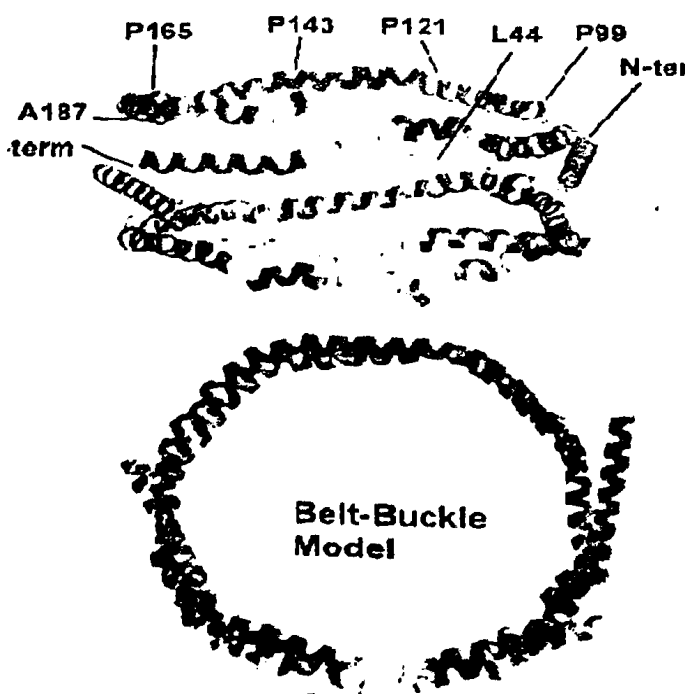




Εικόνα 1.14: Δομικά μοντέλα λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoA-I στο πέρασμα των χρόνων (97). 1969: Τομή σε ένα μοντέλο HDL. Τα λιπίδια εσωτερικά και η πρωτεΐνη (R-Thr = apo HDL-Thr) εξωτερικά (μεγάλο ποσοστό έλικας και η R-Gln = apo HDL-Gln μικρό ποσοστό έλικας. 1976: Τομή σε ένα σωματίδιο DMPC/apo A-I. 1977: Σχηματική απεικόνιση σωματιδίου apoHDL/DMPC που περιέχει περίπου 60% DMPC. 1984: Δισκοειδή μικκύλια DMPC/apo A-I δείχνοντας τις δυο πιθανές διαμορφώσεις της α

4. Μοντέλα της δεσμευμένης με λιπίδια apoA-I

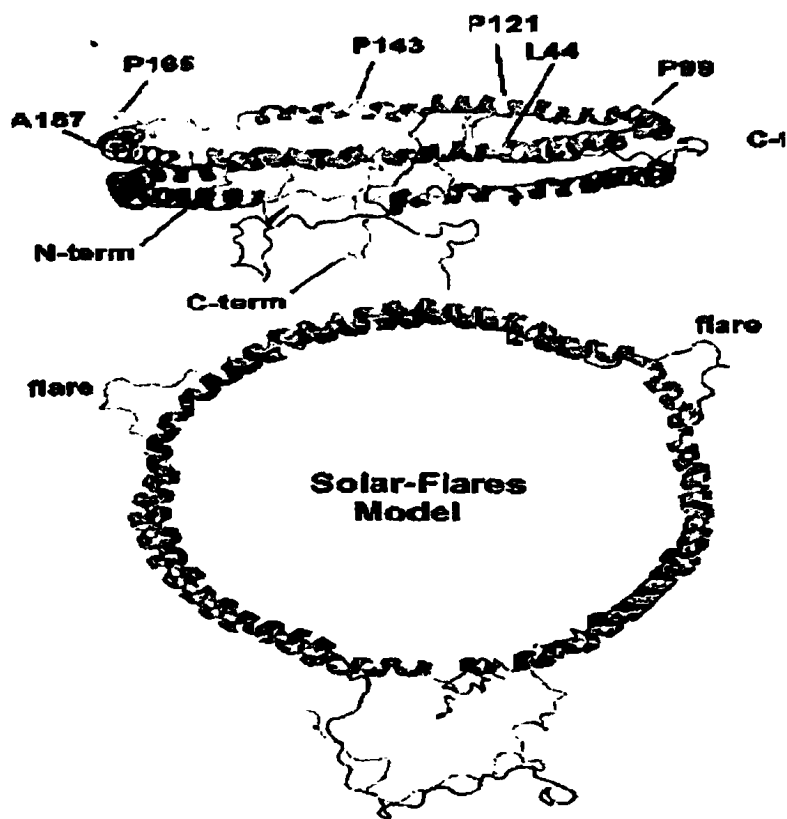
Σήμερα υπάρχουν πολλά μοριακά εργαλεία για την διερεύνηση της διαμόρφωσης της apoA-I πάνω στα rHDL όπως CCL/MS, spin labeling, ανταλλαγή υδρογόνου /δευτέριου (H/DX). Το 2003 ο Davidson και ο Hilliard ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν τη χρήση CCL/MS για να περιγράψουν τη διαμόρφωση της apoA-I σε POPC rHDL 96 Å. Πρότειναν ότι τα αποτελέσματα τους ήταν σύμφωνα με το «μοντέλο ζώνης», υποστηρίζοντας μια «ελικοειδή φουρκέτα» παρά τη «Z-ζώνη» διαμόρφωση (105). Το 2005 ο Silva (106) εφάρμοσε και πάλι τη μέθοδο CCL/MS και απέκλεισε τις διαμορφώσεις της Z-ζώνης και ελικοειδούς φουρκέτας από τη διαμόρφωση της apoA-I και έδειξε ότι η apoA-I έχει παρόμοιες διαμορφώσεις ζώνης και στα σωματίδια rHDL με διάμετρο 96 Å και 80 Å (107). Επιπλέον το 2005 ο Bhat και οι συνεργάτες του (108) περιέγραψαν τη διαμόρφωση του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου rHDL με διάμετρο 96 Å με την ίδια μέθοδο. Βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα με τον Silva αλλά υπήρξαν και σημαντικές διαφορές. Ο Bhat ανακάλυψε ότι τα δυο διαφορετικά διμερή της apoA-I διαχωρίζονταν σε SDS PAGE 12% και ότι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές διαμοριακές συνδέσεις του N-τελικού άκρου και της κεντρικής περιοχής της πρωτεΐνης (108). Έτσι προτάθηκε ότι το N-τελικό και το C-τελικό μέρος αλληλεπιδρούν και φτιάχνουν μια «θυλακωτήρι» ή «πόρπη» (108, 109)



Εικόνα 1.15: Τρισδιάστατο μοντέλο "Belt-Buckle" για ~96 Å rHDL με 2 μόρια apoA-I δεσμευμένα με 75 μόρια POPC. Τα λιπίδια έχουν αφαιρεθεί (109).

Συνεχιζόμενη έρευνα από τον Bhat και τους συνεργάτες του (109) έδειξε ότι τα rHDL με διάμετρο 80 Å προσλαμβάνουν την ίδια διαμόρφωση με αυτά των 96 Å αλλά τα τελικά άκρα N και C φαίνονται να είναι πάνω στη ζώνη αναδιπλωμένα προτείνοντας ότι οι διαμορφώσεις ζώνης και φουρκέτας ίσως και οι δυο να συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της apoA-I δεσμευμένης με λιπίδια (99, 100). Με βάση τις παραπάνω μελέτες έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι αναδιπλώσεις στο N-τελικό και το C-τελικό άκρο λειτουργούν δίνοντας στην πρωτεΐνη τη δυνατότητα να οργανώνεται και να διαλυτοποιεί διαφορετικές ποσότητες φωσφολιπιδίων και να αυξάνονται τα μόρια της apoA-I ή άλλων πρωτεϊνών καθώς τα σωματίδια της HDL μεταβολίζονται στο πλάσμα.

Ο Wu και οι συνεργάτες του (110) χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία μάζας και τη μέθοδο ανταλλαγής υδρογόνου /δευτέρου (H/DX) έβγαλαν συμπεράσματα για την διαμόρφωση της ελεύθερης λιπιδίων και δεσμευμένης σε λιπίδια apoA-I σε POPC rHDL διαμέτρου 104 Å. Έτσι χρησιμοποίησαν το μοντέλο ζώνης (94), τα δεδομένα από την παραπάνω μελέτη πληροφορίες από τις μελέτες CCL/MS (105, 108) και προσπάθησαν να μοντελοποιήσουν υπολογιστικά την apoA-I πάνω στα σωματίδια rHDL. Μετά από 2500 βήματα ελαχιστοποίησης ενέργειας πήραν το μοντέλο «ηλιακών ακτινών» (solar flares).



Εικόνα 1.16: Τρισδιάστατο μοντέλο “Belt-Buckle” για ~104 Å rHDL με 2 μόρια apoA-I δεσμευμένα με 100 μόρια POPC. Τα λιπίδια έχουν αφαιρεθεί (110). Το όνομα έχει προκύψει από τις περιοχές της apoA-I που είναι πιο προσιτές στο διαλύτη και φαίνονται σαν ακτίνες (αα 159-178). Αυτό το μοντέλο δείχνει ότι το N-τελικό άκρο προεξέχει προς το διαλύτη ενώ η υδρόφοβη έλικα 100 αλληλεπιδρά με την περιοχή 1-43 αλλά όχι με τα λιπίδια.

Το συγκεκριμένο μοντέλο ήταν σύμφωνο με τα υπόλοιπα μοντέλα που προκύπτουν από τη δέσμευση της apoA-I πάνω στα σωματίδια rHDL μιας και βασίστηκε στο μοντέλο ζώνης αποτελούμενο από 2 μόρια apoA-I όπου υπάρχει η αλληλεπίδραση των 5-5' ελίκων των δυο μορίων. Σε αντίθεση με το μοντέλο «πόρπης», το μοντέλο των «ηλιακών ακτινών» προβλέπει ότι τα δυο N-τελικά άκρα των μορίων της apoA-I σχηματίζουν μια συμμετρική σφαιρική περιοχή με τα αμινοξέα 14-18 των δυο μορίων να βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση. Στο μοντέλο αυτό τα C-τελικά άκρα των δυο μορίων apoA-I αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και τα υδρόφοβα, περιφερικά αμινοξέα 236-243 της έλικας 10 είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη.

Το μοντέλο των «ηλιακών ακτινών» πήρε το όνομα του από τα αμινοξέα 159-178 (τμήματα των ελίκων 6 και 7) τα οποία προεξέχουν από την άκρη του δισκίου. Αυτές οι θηλιές είναι οι προτεινόμενες θέσεις για τη δέσμευση της LCAT (110). Έχουν γίνει μελέτες με αρκετές τεχνικές οι οποίες προτείνουν ότι οι έλικες 6 και 7 εμπλέκονται στη δέσμευση και



στην ενεργοποίηση της LCAT (56)77,78). Έχει επίσης προταθεί ότι στις έλικες 5,6 και 7 υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή φορτισμένων αμινοξέων (93, 111) που είτε αλληλεπιδρά άμεσα με την LCAT είτε συμμετέχει στις ενδομοριακές γέφυρες άλατος που δημιουργούνται τοπικά ώστε να ενεργοποιηθεί και να αλληλεπιδράσει το συγκεκριμένο ένζυμο. Πριν από τον Wu είχε ήδη προταθεί η ιδέα της «ενδομοριακής φουρκέτας» για μια κεντρική περιοχή μέσα στην apoA-I δεσμευμένης λιπιδίων και αυτή η περιοχή είναι μέσα στις έλικες 5,6,7 (130-174) (103). Αργότερα ο Martin και οι συνεργάτες του (71) πρότειναν μια περιοχή θηλιάς ανάμεσα στα αμινοξέα 133-146 (τμήματα των ελίκων 5 και 6). Εκτός από την περιοχή της apoA-I που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της LCAT και βρίσκεται στο κέντρο της πρωτεΐνης (159-178), η λιπιδίωση της apoA-I από τον ABCA1 απαιτεί την αλληλεπίδραση του με το C-τελικό της πρωτεΐνης (αμινοξέα 220-231) (36, 112), επιτρέποντας πιο πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ apoA-I και ABCA1 για να σχηματιστούν τα σωματίδια της HDL (113, 114).

5. Ο ρόλος της μεθειονίνης στα άκρα της apoA-I

Το ποσοστό που τα N και C τελικά άκρα είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη μπορούν να προκύψουν και από τη περιορισμένη πρωτεόλυση της apoA-I που είναι δεσμευμένη στα σωματίδια rHDL. Αν τμήματα της apoA-I είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη τότε είναι ευπαθή σε πρωτεόλυση. Έτσι ο Lins και οι συνεργάτες του (115) πήραν σωματίδια rHDL με DMPC (1,2 διμυριστολ-sn-γλυκερολ-3-φωσφοχολίνη) και apoA-I και εφήρμοσαν περιορισμένη πρωτεόλυση με τρυψίνη, πρωτεΐνάση K και πρωνάση και βρήκε σημεία πρωτεόλυσης στα αμινοξέα 43, 45, 47 ή 48 και 65. Επιπλέον οι Dalton και Swaney (116) εφήρμοσαν πάνω σε apoA-I POPC rHDL περιορισμένη πρωτεόλυση με τα ένζυμα τρυψίνη, V8 και ελαστάση και έδειξαν ότι τα αμινοξέα 208, 103 και 92-94 είναι στόχοι αυτών των ενζύμων. Δυο ακόμα μελέτες (117, 118) χρησιμοποιώντας τη θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη βρήκαν ένα σημείο κοψίματος την τυροσίνη στη θέση 192 (117, 118). Ενώ μια ακόμα μελέτη με τα ένζυμα χυμοθρυψίνη και V8 έδειξε ότι το σημείο Y₁₉₂ βρίσκεται κυρίως στην ελεύθερη apoA-I ενώ η δεσμευμένη με λιπίδια apoA-I δεν έδειξε σημείο κοψίματος στη θέση Y₁₉₂ μόνο όταν οι μεθειονίνες της ήταν οξειδωμένες (119). Επομένως η οξείδωση των δυο μεθειονίνων τροποποίησε το πρωτεολυτικό προφίλ κάνοντας το σημαντικότερο σημείο κοψίματος Y₁₉₂ να εξαφανίζεται και να δημιουργούνται άλλα (119). Η παραπάνω μελέτη ενισχύει την άποψη ότι



η οξείδωση των δυο από τις τρεις μεθειονίνες στο μόριο της apoA-I που είναι δεσμευμένη με λιπίδια προκαλεί δραματική αλλαγή στη διαμόρφωση της με τη N-τελική περιοχή να γίνεται περισσότερο εκτεθειμένη στον διαλύτη από ότι η φυσική μη οξειδωμένη μορφή της (119).

6. Σφαιρικές HDL

Η πλειονότητα των HDL που κυκλοφορούν στο πλάσμα προέρχεται από τα δυο στάδια λιπιδίωσης της apoA-I. Πρώτον ο ABCA1 προσθέτει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη και προκύπτουν τα νεοσυντιθέμενα σωματίδια και κατόπιν η LCAT τροποποιεί τα συγκεκριμένα σωματίδια εστεροποιώντας του εστέρες χοληστερόλης και έτσι προκύπτουν τα ώριμα σφαιρικά σωματίδια. Η μεγαλύτερη προσπάθεια για να κατανοήσουμε τη δομή της apoA-I με λιπίδια αφορά τη μελέτη rHDL που παράγονται κατά το ίδιο μέγεθος και σύσταση. Τα σωματίδια HDL που κυκλοφορούν στο πλάσμα είναι σφαιρικά και όπως προτάθηκε από τον Borhani (64) η apoA-I επιπλέει πάνω στην επιφάνεια του σωματιδίου (εικόνα 1.13Γ) με τις υδρόφοβες επιφάνειες κάθε έλικας να διεισδύουν στις πολικές κεφαλές για να αλληλεπιδράσουν με τις ακυλ-αλυσίδες των λιπαρών οξέων (68, 120). Ο Jonas και οι συνεργάτες του (121) μέσα από μια σειρά πειραμάτων που περιελάμβανε το ποσοστό του περιεχομένου σε α-έλικα, μετρήσεις φθορισμού και δέσμευσης αντισωμάτων της apoA-I πάνω σε 93 Å POPC σφαιρικά σωματίδια και 96Å POPC δισκοειδή σωματίδια πρότεινε ότι η δευτεροταγής δομή της apoA-I ήταν παρόμοια και στα 2 σωματίδια. Επιπλέον μελέτες FRET σφαιρικών rHDL με σημασμένη apoA-I που σχηματίζονται με τη δράση της LCAT από δισκοειδή rHDL έδειξαν ότι οι σημασμένες ελικοειδείς περιοχές ήταν μακριά στις σφαίρες παρά στα δισκοειδή σωματίδια (102) και ότι όπως και οι σφαιρικές HDL στο πλάσμα όπως και η rHDL αποτελούνταν από 3 μόρια apoA-I. Τέλος πρόσφατα οι θεωρητικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο σφαιρικό μοντέλο που αποτελείται από 2 μόρια apoA-I, 56 μόρια POPC και 16 εστέρες ολεϊκού οξέος και προτείνουν ένα επιμήκης ελλειψοειδές σχήμα (122) και δείχνουν ότι οι εστέρες της χοληστερόλης έρχονται σε επαφή με τα μόρια της apoA-I και συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση και στη ρύθμιση της δομής και της λειτουργίας του σωματιδίου.

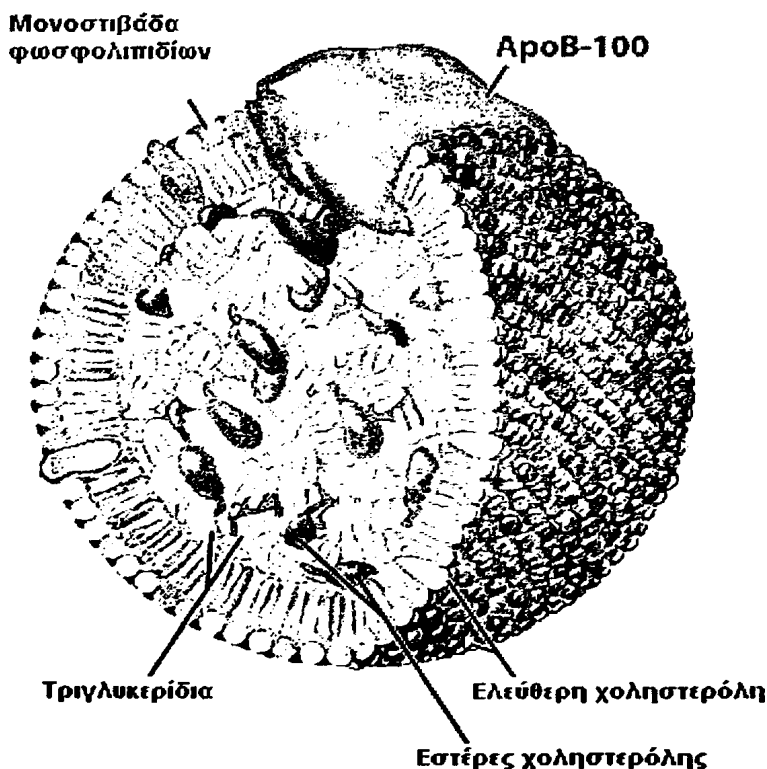


2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (LDL)



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) του ανθρώπινου πλάσματος είναι ένας ετερογενής πληθυσμός σωματιδίων τα οποία εμφανίζουν διαφορές όσον αφορά το μέγεθος, την πυκνότητα, τη σύσταση, το ισοηλεκτρικό σημείο, το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο, τις φυσικό-χημικές ιδιότητες καθώς και την ανοσοδραστικότητα τους (123-125). Η πυκνότητα κυμαίνεται από 1.019-1.063 g/ml (126-128), η διάμετρος από 19-25 nm και το μοριακό τους βάρος από 1800-2800 kDa. Τα σωματίδια της LDL είναι σφαιρικά πολυμοριακά συμπλέγματα. Απαρτίζονται από έναν υδρόφοβο πυρήνα που περιέχει 1600 μόρια εστέρων χοληστερόλης και 170 μόρια τριγλυκεριδίων, ο οποίος, περιβάλλεται από 700 μόρια φωσφολιπιδίων, 600 μόρια ελεύθερης χοληστερόλης και ένα μόριο της apoB-100, που είναι η μοναδική απολιποπρωτεΐνη της LDL. Η εξωτερική επιφάνεια της LDL περιβάλλεται από την απολιποπρωτεΐνη B-100 και μόνο (124). Η apoB-100 βιοσυντίθενται στο ήπαρ και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσληψη της LDL. Περιβάλλει ολόκληρη την επιφάνεια του σωματιδίου σαν «χταπόδι» και περιέχει 4536 αμινοξέα (129).



Εικόνα 2.1: Δομή σωματιδίου LDL.

Ο κυριότερος ρόλος της LDL είναι η μεταφορά χοληστερόλης από το ήπαρ σε όλους τους περιφερικούς ιστούς. Η LDL μπορεί να διέρχεται από τις συνδέσεις που υπάρχουν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και μέσω των LDL υποδοχέων να τροφοδοτεί τα κύτταρα με χοληστερόλη για τις διάφορες μεταβολικές τους ανάγκες.

ΛΙΠΔΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ LDL

Τα κυριότερα φωσφολιπίδια που απαντούν στην LDL είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (περίπου 450 μόρια ανά σωματίδιο LDL, ποσοστό περίπου 63%) και σε μικρότερο βαθμό η σφιγγομυελίνη (περίπου 185 μόρια ανά σωματίδιο LDL, ποσοστό περίπου 26%). Η LDL περιέχει επίσης λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (περίπου 80 μόρια ανά σωματίδιο LDL), φωσφατιδύλοιθανολαμίνη (περίπου 10 μόρια ανά σωματίδιο LDL), διακυλογλυκερόλη (περίπου 7 μόρια ανά σωματίδιο LDL), κεραμίδια (περίπου 2 μόρια ανά σωματίδιο LDL) και μικρό ποσοστό φωσφατιδυλοϊνσιτόλης. Οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων προσανατολίζονται στην επιφάνεια του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου επιτρέποντας στα LDL σωματίδια να βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και να αλληλεπιδρούν με τους διάφορους ιστούς.

Το 50% των λιπαρών οξέων του σωματιδίου της LDL είναι πολυακόρεστα (PUFAs) με κύριο εκπρόσωπό τους το λινελαϊκό (C18:2) και το αραχιδονικό (C20:4) οξύ. Το λινελαϊκό οξύ βρίσκεται κυρίως με τη μορφή εστέρων χοληστερόλης, ενώ το αραχιδονικό οξύ βρίσκεται κυρίως στα φωσφολιπίδια. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL προστατεύονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών και την οξειδωση από έναν αριθμό λιπόφιλων συστατικών που υπάρχουν στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά.

Το κυριότερο αντιοξειδωτικό συστατικό που απαντά στο σωματίδιο της LDL είναι η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) σε ποσοστό περίπου έξι μόρια ανά λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο. Η δράση της βιταμίνης E ως αντιοξειδωτικό οφείλεται στην ικανότητά της να μετατρέπει τις αλυσίδες των σχηματιζόμενων ριζών υπεροξειδίου προς υδροϋπεροξειδία και ρίζα της βιταμίνης E, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί προς α-τοκοφερόλη διαμέσου αντίδρασής της με κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό, κυρίως ασκορβικό οξύ. Σε μικρότερα ποσά απαντούν η γ-τοκοφερόλη, το α- και β-καροτένιο καθώς και άλλες υδρογονωμένες και οξυγονωμένες



μορφές καρτενοειδών, το λυκοπένιο, η κρυπτοξανθίνη, η λουτεΐνη και η ουβικινόλη-10 (130, 131).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ LDL (ox-LDL) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

1. Η οξειδωμένη μορφή της LDL

Είναι γνωστό πως ο κυριότερος φορέας χοληστερόλης στο πλάσμα είναι η LDL, η οποία είναι υπεύθυνη και για την εναπόθεση της χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα. Αυξημένα επίπεδα LDL συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης (132). Υπάρχουν πλέον ερευνητικά δεδομένα τα οποία επιβεβαιώνουν πως η LDL περνά το ενδοθηλιακό τοίχωμα, οξειδώνεται *in vivo* και η οξειδωμένη μορφή της εμπλέκεται στη δημιουργία των πρώιμων αθηροσκληρωτικών πλακών (133). Έχει βρεθεί πως η οξειδωμένη μορφή της LDL (ox-LDL) έχει χημειοτακτικές ιδιότητες και όταν είναι παρούσα στον έσω χιτώνα των αρτηριών προκαλεί τη μετανάστευση των μονοκυττάρων του αίματος τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν την ox-LDL με μηχανισμό που δεν εμφανίζει κορεσμό και δημιουργούν τα πλούσια σε λιπίδια αφρώδη κύτταρα (134). Επιπλέον η ox-LDL είναι κυτταροτοξική και θεωρείται υπεύθυνη για τη βλάβη του ενδοθηλίου. Επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (124).

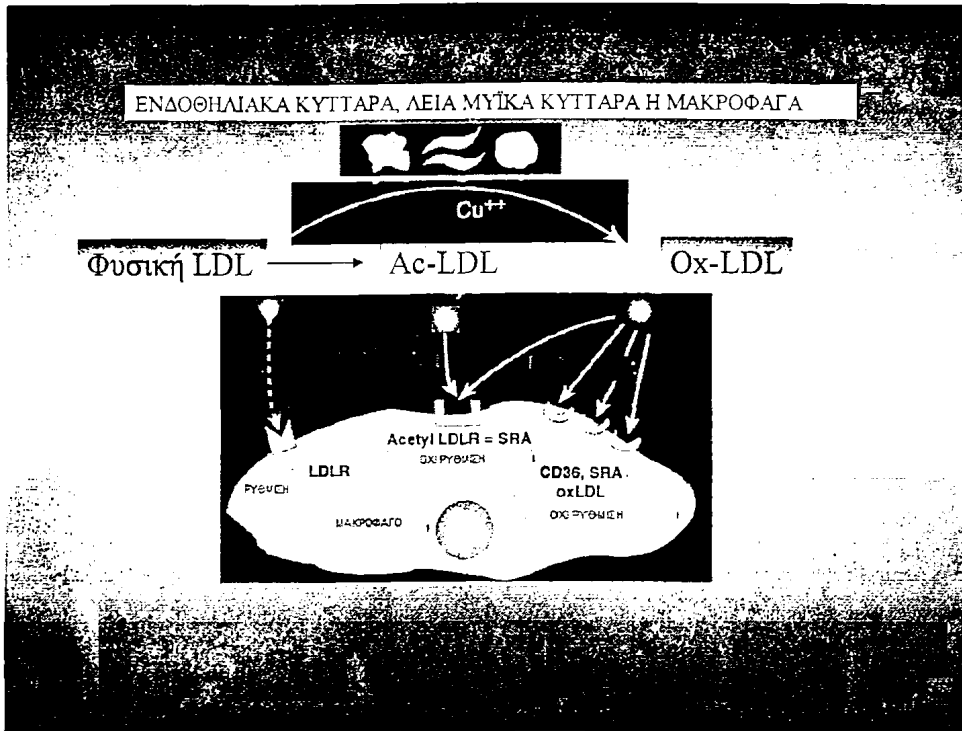
Οι πρώιμες αθηροσκληρωτικές βλάβες χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αφρωδών κυττάρων τα οποία είναι πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης. Οι εστέρες της χοληστερόλης στο κυτόπλασμα των μακροφάγων φαίνονται σαν σταγονίδια λίπους και δίνουν στα κύτταρα αυτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την αφρώδη όψη από την οποία παίρνουν και το όνομα τους (135-139). Η φυσική LDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα και σε καλλιέργειες όπου τα μακροφάγα επώαστηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα με υψηλές συγκεντρώσεις LDL δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης στο κυτόπλασμα τους ούτε και μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (140). Η πρόσληψη της φυσικής LDL γίνεται μόνο μέσω του κλασικού LDL υποδοχέα και ρυθμίζεται από τα επίπεδα της ενδοκυττάριας χοληστερόλης (140, 141). Αντίθετα η ox-LDL ή άλλες τροποποιημένες μορφές της LDL προσλαμβάνονται από τους υποδοχείς εκκαθαριστές που εκφράζονται στα μακροφάγα και



δεν υπόκεινται σε ρύθμιση από τα ενδοκυττάρια επίπεδα της χοληστερόλης. Οι υποδοχείς-εκκαθαριστές ανακαλύφθηκαν σε πειράματα που έγιναν για να εξεταστεί ο ρόλος της οξειδωσης της LDL κατά την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, όπου χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μορφή της LDL, η ακετυλιωμένη LDL. Κατεργασία της LDL με οξικό ανυδρίτη οδηγεί στην ακετυλίωση των ε αμινομάδων των λυσινών, του πρωτεϊνικού τμήματος της LDL με αποτέλεσμα να αυξάνει το ηλεκτρικώς φορτισμένο τμήμα του σωματιδίου. Ο κλασικός LDL υποδοχέας αναγνωρίζει μια θετικά φορτισμένη περιοχή της apoB-100 που δημιουργείται από απολήξεις λυσίνης, αργινίνης και ιστιδίνης. Όταν για τον οποιοδήποτε λόγο η περιοχή αυτή τροποποιηθεί, η αναγνώριση της LDL από τον υποδοχέα μειώνεται ή χάνεται τελείως (141). Από την άλλη μεριά ο υποδοχέας εκκαθαριστής φαίνεται να αναγνωρίζει αρνητικά φορτισμένες περιοχές της apoB-100 και τεχνητή αύξηση του αρνητικού φορτίου επιφανείας με χημικές τροποποιήσεις συνήθως οδηγεί σε αυξημένη αναγνώριση της LDL και ανεξέλεγκτη πρόσληψη χοληστερόλης από τον υποδοχέα αυτό (142). Τροποποιημένες LDL που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα εκκαθαριστή είναι αυτές που προκύπτουν με ακετυλίωση, με ακετοακετυλίωση, με καρβαμυλίωση και με κατεργασία με γλουταραλδεΐδη (143, 144). Όλες αυτές οι κατεργασίες αποσκοπούν στην τροποποίηση των ελεύθερων αμινομάδων της apoB-100, όμως καμία από αυτές δεν συμβαίνει *in vivo*.

Στην κυτταρική επιφάνεια των μακροφάγων εκφράζονται τουλάχιστον έξι δομικά διαφορετικοί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται τα τροποποιημένα LDL σωματίδια, οι υποδοχείς εκκαθαριστές A (SR-A) και B (SR-BI), ο CD36 (145), ο CD68, ο lectin like oxLDL υποδοχέας (LOX-1) και ο υποδοχέας-εκκαθαριστής που προσδένεται με τις φωσφατιδυλοσερίνες (SR-PSOX) (146-149). Οι SR-A και CD36 έχουν καταγραφεί ως οι κύριοι υποδοχείς υπεύθυνοι για την πρόσληψη τροποποιημένης LDL που οδηγεί στην λιπιδιακή φόρτωση των μακροφάγων (132, 150).





Εικόνα 2.2: Τροποποίηση της LDL για το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων.

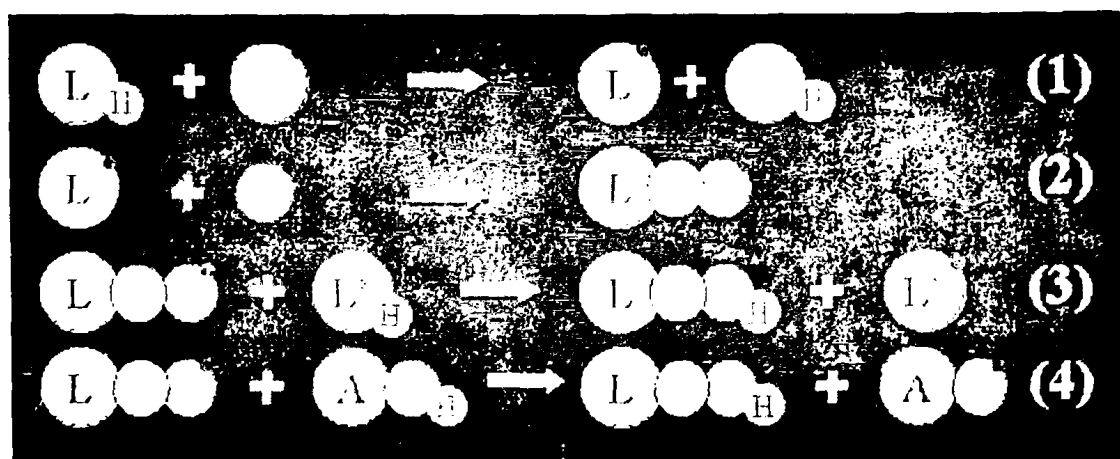
Κατά την διάρκεια οξείδωσης της LDL, τα λιπίδια αλλά και η apoB τροποποιούνται. Δραστικές ρίζες οξυγόνου προκαλούν κατάτμηση της apoB με ταυτόχρονη παραγωγή πεπτιδίων που κυμαίνονται από 14 kDa στα 500 kDa (151). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των εστέρων της χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων και των τριγλυκεριδίων υπόκεινται επίσης οξείδωση η οποία προκαλείται από ελεύθερες ρίζες με ταυτόχρονη παραγωγή ενός ευρέως συνόλου μικρότερων μορίων σε μέγεθος όπως αλδεύδες και κετόνες οι οποίες μπορούν να συνδεθούν στα αμινο λιπίδια ή στην apoB (152). Τα μόρια αυτά μπορούν επίσης να λάβουν μέρος σε αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες αναπαράγουν και ενισχύουν την βλάβη.

Συμπερασματικά, η ox-LDL είναι παρούσα στις πρώιμες αθηρωματικές βλάβες αλλά και στις προχωρημένες αθηρωματικές πλάκες ως συστατικό του νεκρωτικού πυρήνα. Η υπόθεση πως η ox-LDL παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της αθηροσκλήρωσης επιβεβαιώνεται και από έμμεσες ενδείξεις όπως είναι η εύρεση λιποϋπεροξειδίων στις περιοχές της αθηροσκληρωτικής βλάβης, ο βαθμός υπεροξείδωσης των οποίων σχετίζεται με την έκταση της βλάβης. Επίσης αυξημένα επίπεδα λιποϋπεροξειδίων έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο, σε χρόνιους καπνιστές καθώς και σε διαβητικούς (153). Για

αυτούς τους λόγους τα πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αναγνωρίζουν ως θεραπευτικούς στόχους στη συγκεκριμένη ασθένεια α) τη μείωση της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα και αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της αντίστροφης μεταφορά χοληστερόλης και β) την αναστολή της οξείδωσης της LDL (154).

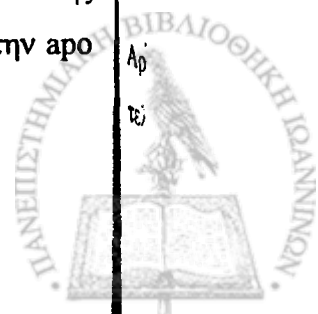
2. Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL

Η οξείδωση της LDL περιλαμβάνει μία διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων που περιέχει, η οποία πυροδοτείται από ελεύθερες ρίζες. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL τόσο το λιπιδιακό, όσο και το πρωτεϊνικό περιεχόμενό της υπόκεινται σε μια ποικιλία από χημικές μεταβολές διαμέσου αντιδράσεων ελευθέρων ριζών καθώς επίσης και τροποποιήσεων από χημικώς δραστικά προϊόντα που σχηματίζονται στα oxLDL σωματίδια. Η οξείδωση αρχίζει με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL από μία αρχική ρίζα X^* , σύμφωνα με την αντίδραση 1 (Εικόνα 2.3). Η ρίζα L^* που προκύπτει αντιδρά ταχύτατα με μοριακό οξυγόνο (O_2) προς σχηματισμό ρίζας λιπούπεροξειδίου, LOO^* (αντίδραση 2, Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Αντιδράσεις οξείδωσης LDL.

Κατόπιν η ρίζα λιπούπεροξειδίου αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από παρακείμενο λιπαρό οξύ, LH, προς το σχηματισμό υδρολιπούπεροξειδίου, LOOH, και νέας ελεύθερης ρίζας, L^* (αντίδραση 3, Εικόνα 2.3). Τα υδρολιπούπεροξείδια των λιπιδίων διασπώνται παρουσία μεταλλικών ιόντων προς αλδεύδες (MDA, 4-HNE) και υδρογονάνθρακες. Τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων της LDL αντιδρούν με την apo B-100. Η καρβονυλική ομάδα της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) αντιδρά με τις ε-NH₂ των λυσινών που περιέχονται στην apo



B-100 προς το σχηματισμό ευαίσθητων ενώσεων που είναι γνωστές ως βάσεις Schiff. Παρουσία φαινολικών αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E, η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων αναστέλλεται με την αντίδραση της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου με το αντιοξειδωτικό σύμφωνα με την αντίδραση 4. Η φαινοξυ-ρίζα AO^{\bullet} έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και κατά συνέπεια δεν μπορεί να επιμηκύνει την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων (Εικόνα 2.3).

Χαρακτηριστικό της oxLDL είναι ότι το επιφανειακό φορτίο της είναι περισσότερο αρνητικό απ'ότι της φυσικής LDL. Η οξειδωμένη μορφή της LDL (oxLDL) έχει μεγαλύτερη διάμετρο από τη φυσική LDL και παρουσιάζει αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Περιέχει επίσης ισχυρά τοξικά προϊόντα των οποίων η απελευθέρωση στο αρτηριακό τοίχωμα μπορεί να προκαλέσει διάφορες αντιδράσεις, όπως τη νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την έκκριση διαφόρων αυξητικών παραγόντων.

3. Τρόποι οξείδωσης της LDL

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι οξείδωσης της LDL που περιλαμβάνουν οξείδωση της LDL με ένζυμα όπως είναι η μυελοϋπεροξειδάση και η λιποξυγονάση ή με τη βοήθεια θειολών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ακολουθήθηκε ο πιο συνηθισμένος τρόπος οξείδωσης της LDL *in vitro* που είναι η επώαση της με ιόντα μετάλλων.

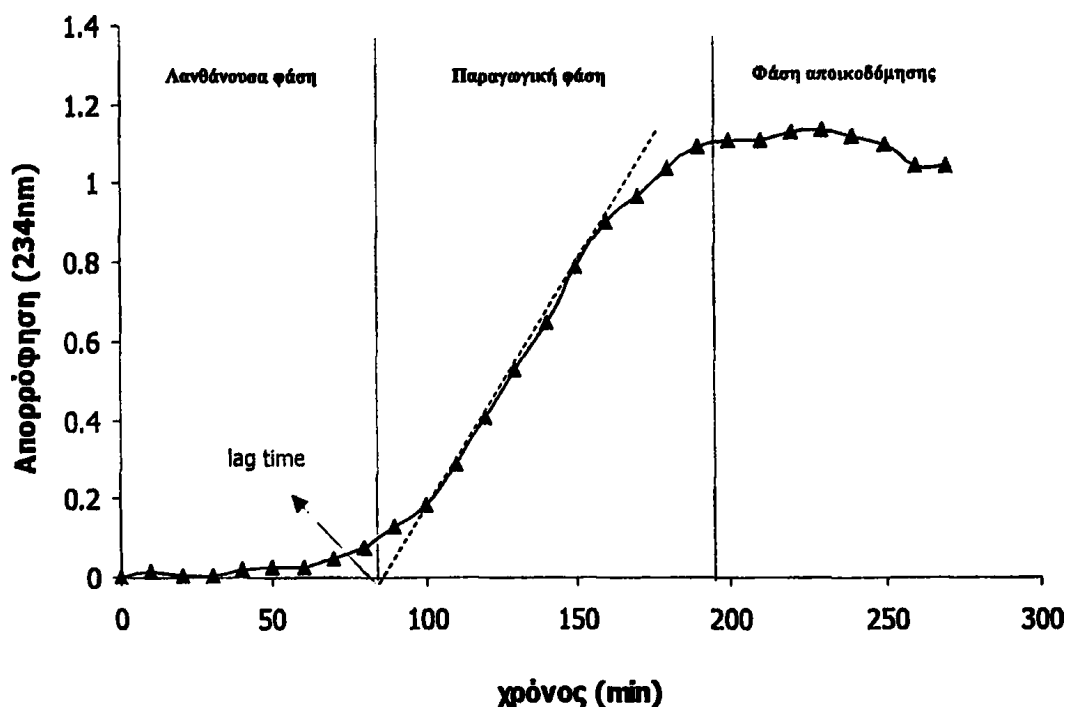
Μεταλλικά ιόντα

Ο χαλκός και άλλα δισθενή ιόντα οξειδώνουν ταχύτατα την LDL. Ενδεχομένως η διαδικασία της οξείδωσης να ξεκινά από την αναγωγή μεταλλικών ιόντων από αναγωγικά στοιχεία των κυττάρων όπως οι θειόλες και το ανιόν του υπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$. Έχει βρεθεί ότι η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) είναι ικανή να απελευθερώσει σίδηρο από την φερριτίνη (155), έτσι η ρίζα αυτή θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη της οξειδωτικής τροποποίησης όσο και στην παραγωγή μετάλλων μετάπτωσης στο αρτηριακό τοίχωμα.

Η οξείδωση της LDL από μεταλλικά ιόντα (Cu^{2+}) *in vitro* λαμβάνει χώρα σε τρεις φάσεις: Αρχικά καταναλώνεται η α-τοκοφερόλη και ακολουθούν τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά με τελευταίο το β-καροτένιο. Κατά τη λανθάνουσα φάση παράγεται ένας πολύ μικρός αριθμός



υπεροξειδίων. Η μικρή ποσότητα αυτών οφείλεται στη δράση της βιταμίνης E η οποία αντιδρά με τις ρίζες των σχηματιζόμενων λιπούπεροξειδίων.



Εικόνα 2.4: Μια τυπική καμπύλη οξείδωσης της LDL.

Μετά την κατανάλωση των αντιοξειδωτικών της LDL, αρχίζει η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων και η οξείδωση της LDL οδηγείται στην εκθετική (παραγωγική) φάση. Οι ρίζες που έχουν σχηματιστεί από τη λανθάνουσα φάση, διαμέσου σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων, σχηματίζουν νέες ελεύθερες ρίζες λιπούπεροξειδίων.

Το σημείο στο οποίο η παραγωγή των συζυγών διενίων είναι μέγιστη, σημαίνει το τέλος της παραγωγικής φάσης και την αρχή της φάσης αποικοδόμησης, στην οποία τα λιπούπεροξείδια μετατρέπονται σε αλδεύδες, όπως η μηλονική διαλδεύδη (MDA) και 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE), οι οποίες με τη σειρά τους θα αντιδράσουν με τις ε-NH₂ των λυσινών της apo B-100 (Εικόνα 2.4).

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από όλες τις κατηγορίες των βιολογικά ενεργών μακρομορίων, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες είναι εκείνα τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη δομική και λειτουργική πολυμορφία. Ο όρος «πρωτεΐνη» προέρχεται από την ελληνική λέξη πρώτος ή πρωταρχικός (156), πράγμα που φανερώνει τη σημαντικότητα αυτής της ομάδας των μορίων. Σήμερα πιστεύεται ότι σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως η αναπαραγωγή, η ενζυμική αναστολή, η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο έλεγχος της θερμοκρασίας, η αναλγησία, η εκμάθηση και η μνήμη πολύ πιθανά ρυθμίζονται από διάφορα πεπτίδια (157). Ο όρος «πεπτίδιο» προέρχεται από τη λέξη πέψη ή πεπτόνη (προϊόντα πέψης των πρωτεϊνών) και αναφέρεται σε μικρές ενώσεις, οι οποίες μοιάζουν με τις πρωτεΐνες, με διαφορά ότι οι τελευταίες είναι ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Ωστόσο δεν είναι σαφές το όριο το οποίο διαχωρίζει αυτές τις δύο ομάδες. Συνήθως μόρια που αποτελούνται από 50 αμινοξέα ή περισσότερα θεωρούνται πρωτεΐνες, ενώ μόρια που αποτελούνται από λιγότερα αμινοξέα θεωρούνται πεπτίδια.

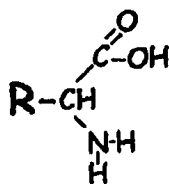
Σήμερα πλέον τα συνθετικά πεπτίδια μας δίνουν τη δυνατότητα να μελετήσουμε τα φυσικά απαντώμενα πεπτίδια ή πρωτεΐνες. Από τις αρχές του 20ου αιώνα όταν για πρώτη φορά ο Emil Fischer (157) προσπάθησε να συνθέσει ένα πεπτίδιο, η επιστήμη έχει σημειώσει τεράστια πρόοδο στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για τη σύνθεση πεπτιδίων. Η πρόοδος αυτή περιλαμβάνει την ανάπτυξη της εκλεκτικής απομάκρυνσης προστατευτικών ομάδων (158), τη βελτίωση των αντιδραστηρίων σύζευξης (159), τρόπους για την εύκολη αποπροστασία των παράπλευρων προστατευμένων αλυσίδων (160) και τη χρήση των αδιάλυτων στερεών πολυμερών υποστρωμάτων για την απλοποίηση και επιτάχυνση της διαδικασίας σύνθεσης (161). Πολλές ωστόσο ήταν και οι αλλαγές στη χημεία και στις μεθόδους σύζευξης από το 1960 οι οποίες βελτίωσαν περαιτέρω την παραγωγή και την καθαρότητα των συνθετικών πεπτιδίων (162).

Παρόλο που η χημεία πεπτιδίων παρουσίασε τεράστιες βελτιώσεις παραμένει μια επιστήμη αρκετά δαπανηρή και επίπονη που οφείλεται κατά κύριο λόγο στα προβλήματα διαλυτότητας των ενδιάμεσων προϊόντων. Επανάσταση στη σύνθεση πεπτιδίων αποτέλεσε η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση (SPPS), η οποία αναπτύχθηκε από τον R. B. Merrifield και με την πάροδο του χρόνου αποτέλεσε την κύρια μέθοδο επιλογής για τη σύνθεση πεπτιδίων και μικρών πρωτεϊνών (161, 163).

Η σύνθεση σε στερεά φάση βασίζεται στην ομοιοπολική σύνδεση της αυξανόμενης πεπτιδικής αλυσίδας σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη), με σκοπό την απομάκρυνση των μη αντιδρώντων διαλυτών αντιδραστηρίων με απλή διήθηση και πλύση χωρίς απώλειες. Η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας πάνω στην αδιάλυτη ρητίνη γίνεται με μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων. Για να γίνουν ποσοτικά οι αντιδράσεις γίνεται η χρήση περίσσειας διαλυτών αντιδραστηρίων. Η ταχύτητα καθώς επίσης και η απλότητα των επανειλημμένων βημάτων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των πεπτιδίων σε στερεά φάση παρέχει τη δυνατότητα της αυτοματοποίησης. Με την περάτωση της σύνθεσης ακολουθεί αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα (ρητίνη) κάτω από συνθήκες οι οποίες να μην το επηρεάζουν. Τέλος ακολουθεί ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός του πεπτιδίου που συντέθηκε με διάφορες τεχνικές.

ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Τα αμινοξέα (α-άμινο καρβοξυλικά οξέα) είναι τα βασικά δομικά μόρια από τα οποία αποτελούνται οι πρωτεΐνες (164). Ένα α-αμινοξύ, εκτός από την προλίνη, αποτελείται από μια αμινομάδα, μια καρβόξυλο-ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R δεσμευμένη στο άτομο του άνθρακα που λέγεται α-άνθρακας γιατί είναι γειτονικός με την καρβοξυλική (όξινη) ομάδα. Η ομάδα R ονομάζεται πλευρική αλυσίδα (side chain). Η προλίνη είναι το μόνο κυκλικό αμινοξύ με δευτεροταγή αμίνη. Με εξαίρεση τη γλυκίνη όλα τα άλλα αμινοξέα είναι χειρικά, και ανήκουν στην L-στεreoχημική σειρά. Σ' όλα τα αμινοξέα ο α-άνθρακας είναι S στεreoχημείας, εκτός από την Cys που είναι R. Η γενική μορφή των αμινοξέων φαίνεται στην εικόνα 3.1.

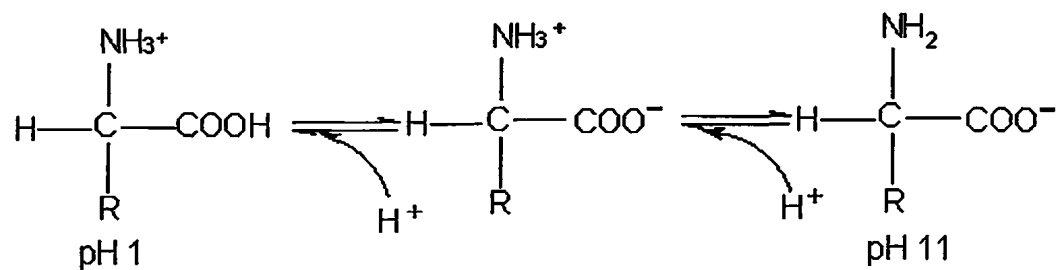


Εικόνα 3.1: Γενική μορφή των αμινοξέων.

Τα αμινοξέα σε διάλυμα σε τιμές pH που αντιστοιχούν στο ισοηλεκτρικό σημείο είναι κυρίως διπολικά ιόντα. Στη διπολική του μορφή ένα αμινοξύ έχει πρωτονιωμένη αμινομάδα ($-\text{NH}_3^+$) και αποπρωτονιωμένη καρβοξυλική ομάδα ($-\text{COO}^-$). Ο βαθμός ιοντισμού ενός



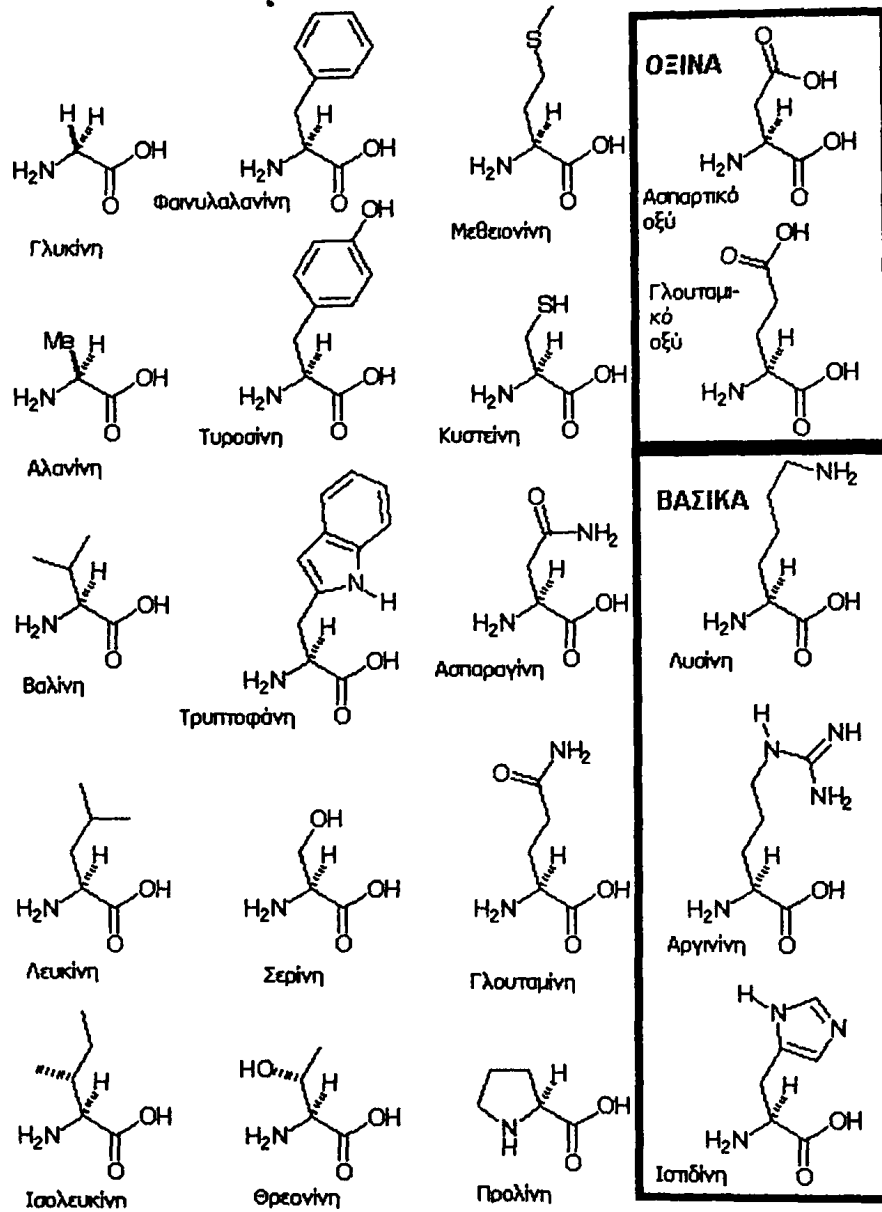
αμινοξέος μεταβάλλεται με το pH (Εικόνα 3.2). Σε όξινα διαλύματα (pH = 1) η καρβοξυλική ομάδα δεν είναι ιοντισμένη (-COOH), ενώ η αμινομάδα είναι ιοντισμένη (-NH₃⁺), ενώ σε αλκαλικά διαλύματα (pH = 11) συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο.



Εικόνα 3.2: Οι καταστάσεις ιοντισμού ενός αμινοξέος εξαρτώνται από το pH.

Τα αμινοξέα ανάλογα με την ομάδα R που διαθέτουν στο μόριό τους διακρίνονται σε αλειφατικά, αρωματικά, θειούχα, βασικά, όξινα (165). Όλες οι πρωτεΐνες δομούνται από το ίδιο σύνολο των είκοσι αμινοξέων. Στον Πίνακα 3.1 δίνονται ο συμβολισμός, η ονομασία και οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που απαντώνται στις πρωτεΐνες. Τα αμινοξέα συμβολίζονται συνήθως είτε με σύντμηση τριών, είτε με ένα γράμμα για ευκολία.

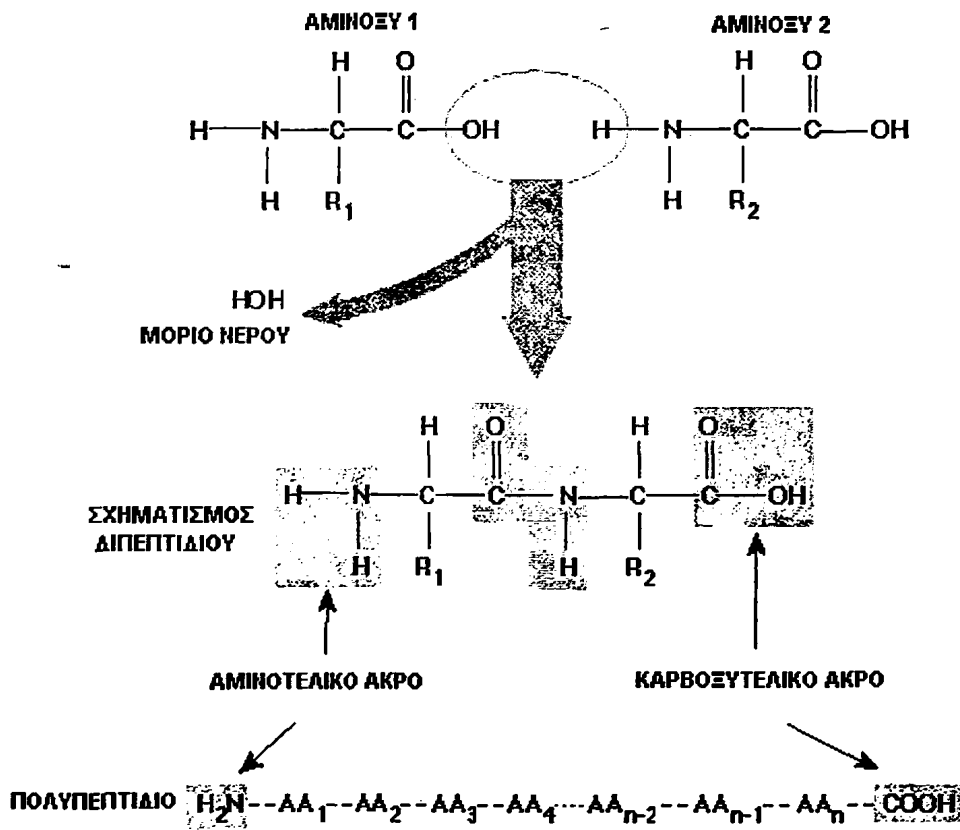
Πίνακας 3.1: Τα 20 φυσικά αμινοξέα.



ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ



Η σύνδεση των αμινοξέων προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού (166) επιτυγχάνεται κατά την πυρηνόφιλη προσβολή της α-αμινομάδας του ενός αμινοξέος στον καρβονυλικό άνθρακα του άλλου αμινοξέος και ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Το αποτέλεσμα της παραπάνω αντίδρασης (σύζευξης) είναι ο σχηματισμός ενός διπεπτιδίου. Διαδοχική επανάληψη της παραπάνω αντίδρασης οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολυπεπτιδίου. Στην εικόνα 3.3 φαίνεται ο σχηματισμός ενός πολυπεπτιδίου.



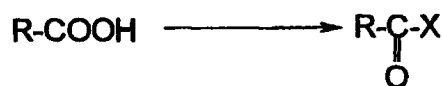
Εικόνα 3.3: Σχηματισμός πολυπεπτιδίου.

Η σύνθεση ενός διπεπτιδίου ωστόσο, δεν είναι τόσο απλή όσο φαίνεται. Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης βρίσκεται προς την πλευρά της υδρόλυσης, παρά της σύνθεσης. Συνεπώς ο σχηματισμός πεπτιδικών δεσμών απαιτεί την κατανάλωση ελεύθερης ενέργειας (ενδόθερμη αντίδραση περίπου 4 Kcal/mol), ενώ η υδρόλυση απελευθερώνει ενέργεια. Έτσι ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων δεν είναι δυνατός με μια απλή ανάμιξη.

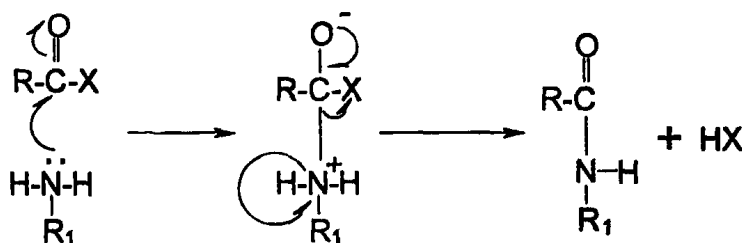
Από αυτά προκύπτει ότι αυθόρμητα, χωρίς παροχή ενέργειας έχουμε διάσπαση ενός πεπτιδίου σε αμινοξέα (υδρόλυση) και όχι σύζευξη. Επίσης, οι αντιδράσεις καρβοξυλικών οξέων με αμίνες γίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες είναι ακατάλληλες για τα πεπτίδια τα οποία είναι θερμοευαίσθητες ενώσεις.

Τα πεπτίδια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες ενώσεις γεγονός που απαιτεί τη χρήση ήπιων συνθηκών κατά τη σύνθεση τους. Το καθοριστικό βήμα για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, είναι η ενεργοποίηση μιας από τις δραστικές ομάδες των αμινοξέων. Η πειραματική πορεία που εφαρμόζεται είναι η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος και η μετατροπή του σε κάποιο δραστικό παράγωγο καρβοξυλικού οξέος, ώστε να είναι εφικτή η πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα ενός δεύτερου αμινοξέος. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με την υποκατάσταση της $-OH$ του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος από υποκαταστάτη δέκτη ηλεκτρονίων (X), με στόχο την αύξηση της πολικότητας του καρβονυλίου, υποβοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης μεταξύ των δύο αμινοξέων (Εικόνα 3.4).

Ενεργοποίηση:



Σύζευξη:



Εικόνα 3.4: Ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος. Πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα από την αμινομάδα ενός δεύτερου αμινοξέος και σύζευξη.

Παρόλα αυτά η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου δεν επαρκεί για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος. Κατά τη σύνθεση ενός πεπτιδίου πρέπει να ληφθούν υπόψη μια σειρά από παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα την ολοκλήρωση της σύνθεσης και τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος. Σημαντικό ρόλο παίζουν οι δραστικές ομάδες των πλευρικών



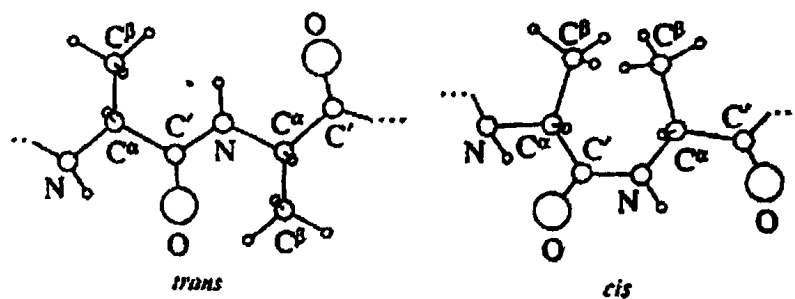
αλυσίδων των αμινοξέων οι οποίες οδηγούν σε μια σειρά ανεπιθύμητων αντιδράσεων (παράπλευρες αντιδράσεις) με συνέπεια το σχηματισμό παραπροϊόντων. Είναι λοιπόν αναγκαία η εισαγωγή ομάδων, οι οποίες να δρουν προστατευτικά και να αναστέλλουν τη δράση αυτών των ομάδων. Επιτακτική είναι και η επιλογή ομάδων οι οποίες θα προστατέψουν την N^α-αμινομάδα καθώς και την C^α-καρβοξυλομάδα που δεν παίρνουν μέρος στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.

Όπως φαίνεται, η σύνθεση των πεπτιδίων είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία που απαιτεί μεγάλη προσοχή στο σχεδιασμό και στη διεξαγωγή της.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Στα τέλη της δεκαετίας του 1930 οι Linus Pauling και Robert Corey, με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, προσπάθησαν να προσδιορίσουν τη δομή των αμινοξέων και των πεπτιδίων. Βασικός τους στόχος ήταν να προσδιορίσουν τα πρότυπα μήκη των δεσμών και τις γωνίες γι' αυτά τα δομικά στοιχεία και στη συνέχεια με τη βοήθεια των αποτελεσμάτων τους να καθορίσουν τη στερεοδιάταξη των πεπτιδίων. Από τις μελέτες τους προέκυψε ότι η πεπτιδική μονάδα είναι άκαμπτη και επίπεδη. Το υδρογόνο της αμινομάδας βρίσκεται σχεδόν πάντοτε σε trans θέση ως προς το οξυγόνο του καρβονυλίου, ενώ δεν υπάρχει ελευθερία στροφής, γύρω από τον δεσμό του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα και του αζώτου στην πεπτιδική μονάδα (C-N).

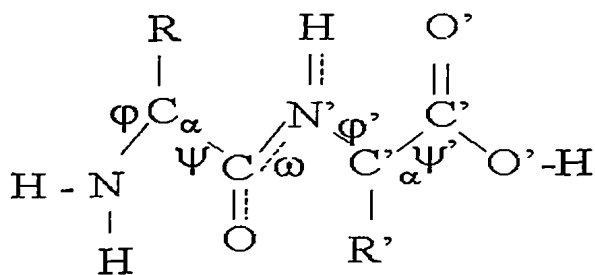
Η βραχεία απόσταση άνθρακα-αζώτου (1.32 Å) συγκρινόμενη με το σύνηθες μήκος του απλού δεσμού άνθρακα-αζώτου (1.47 Å), υποδηλώνει ότι ο συγκεκριμένος δεσμός έχει σημαντικό χαρακτήρα διπλού δεσμού σε ποσοστό περίπου 50%. Αυτό οφείλεται στη μεσομέρεια του πεπτιδικού δεσμού, η οποία δεν επιτρέπει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμό άνθρακα-αζώτου και οδηγεί στη δημιουργία δύο ισομερών μορφών (167, 168) (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Cis και trans διάταξη του πεπτιδικού δεσμού.

Η διάταξη που ευνοείται θερμοδυναμικά είναι η trans (κατά 2kcal/mol). Η μικρότερη σταθεροποίηση που εμφανίζει η cis-διάταξη οφείλεται κυρίως σε απώσεις μεταξύ των παράπλευρων ομάδων R_1 και R_2 των δύο C^α ατόμων άνθρακα. Ωστόσο cis-διατάξεις έχουμε στις περιπτώσεις των δεσμών Xaa-Pro και στις δικετοπιπεραζίνες, οι οποίες αποτελούν τα απλούστερα κυκλικά πεπτίδια που σχηματίζονται από δύο αμινοξέα.

Η ελευθερία περιστροφής των υπόλοιπων δεσμών έχει ως αποτέλεσμα την περιστροφή της κύριας αλυσίδας είτε από την μια, είτε από την άλλη πλευρά του άκαμπτου πεπτιδικού δεσμού. Η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ του αζώτου και του α-άνθρακα στην κύρια αλυσίδα ονομάζεται *δίεδρη γωνία ϕ* (γωνία στρέψης), ενώ η γωνία μεταξύ του α-άνθρακα και του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα καλείται *γωνία ψ* . Όταν είναι γνωστές οι τιμές των γωνιών στρέψης ϕ και ψ , τότε μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η στερεοδιάταξη της κύριας πεπτιδικής αλυσίδας (Εικόνα 3.6). Ο G.N. Ramachandran πρώτος παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος τιμών ϕ και ψ . Ορισμένοι συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερικής παρεμπόδισης, ενώ τα επιτρεπτά όρια των ϕ και ψ γωνιών μπορούν να προβλεφθούν (διαγράμματα Ramachandran).



Εικόνα 3.6: Στερεοδιάταξη της κύριας πεπτιδικής αλυσίδας.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

Οι πρώτες προσπάθειες σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού, έγιναν από τους Curtius (1881) και Fischer (1902) στα τέλη του περασμένου αιώνα και έδωσαν εντυπωσιακά, αλλά όχι πρακτικά αποτελέσματα. Η εισαγωγή της αμινο-προστατευτικής βενζυλοξυκαρβονυλομάδας (Bergmann και Zervas 1932) (169) αποτέλεσε το έναυσμα για τη σημαντική ανάπτυξη της πεπτιδικής σύνθεσης. Βελτιώσεις στις μεθόδους σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού έγιναν με την ανακάλυψη των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων, του δικυκλοεξυλ-καρβοδιϊμιδίου (170, 171) καθώς και με την ανακάλυψη ενός μεγάλου αριθμού προστατευτικών ομάδων (όπως της tert.βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδας (172, 173), της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο ομάδας κ.λ.π) (174).

Η σύνθεση των πεπτιδίων είναι δυνατόν να γίνει είτε σε στερεή είτε σε υγρή φάση. Η σύνθεση ωστόσο σε υγρή φάση εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα, διότι σε κάθε βήμα της σύνθεσης είναι αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων. Όλη αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη δύσκολη σύνθεση σχετικά μεγάλων πεπτιδίων, ενώ ακόμη και στην περίπτωση μικρών πεπτιδίων αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα



διαδικασία. Σταθμός στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης ήταν η ανακάλυψη της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση από τον R.B. Merrifield (1963) (161). Στην SPPS θα γίνει εκτενής αναφορά στη συνέχεια.

Συνοπτικά τα στάδια που ακολουθούνται στην πεπτιδική σύνθεση είναι τα εξής:

- Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα X, η οποία να μειώνει την πυρηνοφιλία της ώστε να αποφύγουμε την πιθανή πρόσδεση άλλου αμινοξέος και επομένως τη δημιουργία ανεπιθύμητου αποτελέσματος. Οι προστατευτικές ομάδες X πρέπει να μην αλλοιώνουν τη στερεοχημεία του αμινοξέος ή του πεπτιδίου, να είναι σταθερές κατά την διάρκεια της σύζευξης, να μην ευνοούν την ρακεμοποίηση και η απομάκρυνσή τους από το πεπτίδιο να γίνεται εύκολα και εκλεκτικά σε συνθήκες και με αντιδραστήρια που να μην επηρεάζουν τον πεπτιδικό δεσμό. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες για την προστασία των α-αμινομάδων είναι η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z) (169), η t-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) (175), η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc), η τριφαινυλομεθυλομάδα (Tf) (176, 177), η διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβονυλομάδα (Bpoc) (178), η αλλυλοξυκαρβονυλομάδα (Alloc) (179) κ.λ.π.
- Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα, η οποία συνήθως γίνεται με εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας (μεθυλ-, αιθυλ-, t-βουτυλ-, ή βενζυλ-εστέρας). Η προστασία αυτή είναι αναγκαία στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση, ενώ αντίθετα στην περίπτωση της σύνθεσης σε στερεή φάση, η καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος είναι συζευγμένη πάνω στο στερεό υπόστρωμα (ρητίνη).
- Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έτσι ώστε να μην αντιδράσουν κατά την διάρκεια της σύζευξης. Τέτοιες δραστικές ομάδες είναι η ε-NH₂ της λυσίνης, το β-COOH του ασπαρτικού οξέος, το γ-COOH του γλουταμινικού οξέος, η -SH της κυστεΐνης, το -OH της σερίνης και της τυροσίνης, η γουανιδινομάδα της αργινίνης, κ.λ.π.
- Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού με ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του N-τελικού αμινοξέος και ακολούθως σύζευξη με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία πεπτιδικού δεσμού. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου είναι:



μέθοδος των χλωριδίων, των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων, καθώς επίσης και η μέθοδος με την χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων σύζευξης.

- Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται μέχρι τη σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας. Μόλις αυτό επιτευχθεί, ακολουθεί αποπροστασία της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος, της αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος καθώς επίσης και των παράπλευρων αλυσίδων όλων των αμινοξέων με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και να λαμβάνεται το πεπτίδιο στην ελεύθερη μορφή του.

ΣΤΑΔΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

Κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση όπως εισήχθη από τον Bruce Merrifield το 1963 (161), σε μια προσπάθεια να ξεπεραστούν πολλά από τα προβλήματα της σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση, το πεπτίδιο συντίθεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα (ρητίνη) (180). Το C-τελικό αμινοξύ προσδέεται ομοιοπολικά πάνω στη ρητίνη, ενώ η N^α-αμινομάδα του και η παράπλευρη αλυσίδα του, όποτε αυτό είναι απαραίτητο, είναι κατάλληλα προστατευμένες. Επειδή το πεπτίδιο μένει συνδεδεμένο πάνω στην αδιάλυτη ρητίνη, η περίσσεια των αντιδραστηρίων σύζευξης και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση της ρητίνης με κατάλληλους διαλύτες και διήθηση αυτών. Η πεπτιδική σύνθεση από το σημείο αυτό και μετά συνεχίζεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους εκπλύσεων, αποπροστασιών και ακυλιώσεων (συζεύξεων) της ελεύθερης αμινομάδας μέχρι να ολοκληρωθεί η επιθυμητή αλληλουχία των αμινοξέων, πάντα από το C-τελικό άκρο προς το N-τελικό άκρο και χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντιδραστήρια ανάλογα με τη στρατηγική που θα ακολουθηθεί. Οι δύο στρατηγικές που ακολουθούνται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση είναι η Boc και η Fmoc.

Όταν η σύνθεση ολοκληρωθεί το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση του επιθυμητού προϊόντος και περιορισμός της ρακεμοποίησης αυτού.

Με τη μεθοδολογία αυτή είναι δυνατή η σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα και σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Επίσης δεν προκύπτουν προβλήματα διαλυτότητας των ενδιάμεσων προϊόντων λόγω του ότι το πεπτίδιο μένει προσδεμένο στο αδιάλυτο πολυμερές καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης.

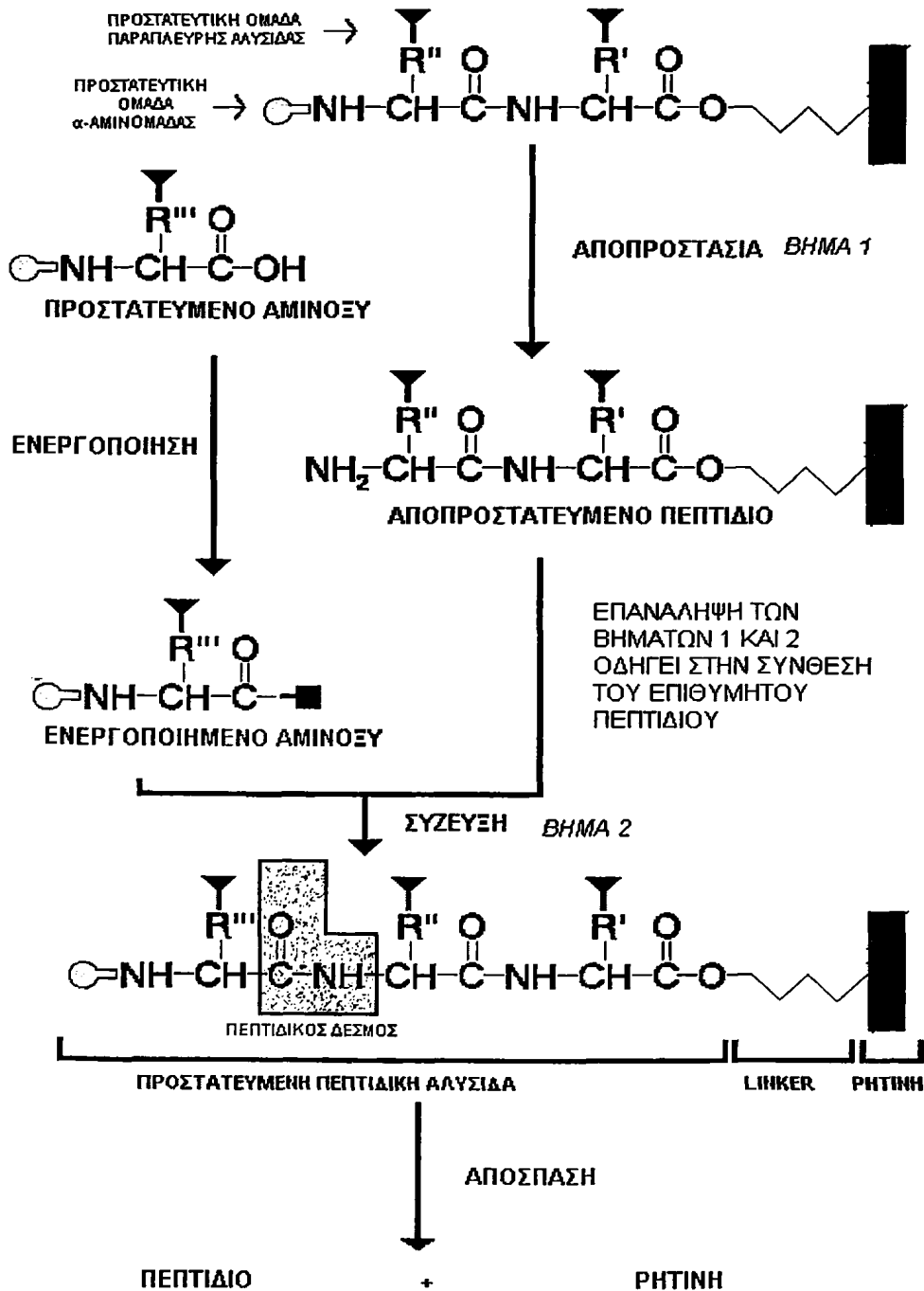


Ως μειονεκτήματα της μεθόδου μπορούν να αναφερθούν τα εξής: Ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του πεπτιδίου γίνονται στο τελικό προϊόν και έτσι μόνο μετά τη διεξαγωγή ολόκληρης της σύνθεσης μπορεί να ελεγχθεί το πεπτίδιο. Επίσης, αν η αποπροστασία της N^α-αμινομάδας και η αντίδραση σύζευξης δεν γίνουν ποσοτικά, τότε στο τέλος μαζί με το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται μια σειρά παραπροϊόντων, τα οποία δυσχεραίνουν τον καθαρισμό. Εντούτοις, η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία και τα μειονεκτήματα της θεωρούνται ασήμαντα σε σχέση με τα πλεονεκτήματά της.

Η βασική μεθοδολογία της σύνθεσης σε στερεά φάση παριστάνεται στην εικόνα 3.7.



ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ



Εικόνα 3.7: Γενικό σχήμα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.

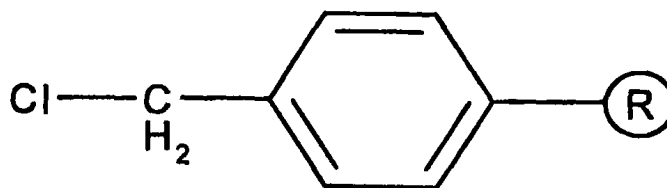
ΤΟ ΑΔΙΑΛΥΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ (ΡΗΤΙΝΗ)

Η μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεό πολυμερές παραμένει μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως και μόνο λίγες τροποποιήσεις έχουν επέλθει στα πρωτόκολλα της μεθόδου, ενώ σημαντική πρόοδος επιτεύχθηκε στην κατεύθυνση ανάπτυξης βελτιωμένων πολυμερικών υποστρωμάτων. Στη συνέχεια δίνονται οι ιδιότητες που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν για την επιλογή του στερεού πολυμερούς στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (SPPS).

- Να είναι αδιάλυτο στους διαλύτες και στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SPPS καθώς επίσης και να μην αντιδρά με αυτά.
- Να αποτελείται από σωματίδια κατάλληλου μεγέθους και σχήματος, τα οποία να φέρουν δραστικές ομάδες, στις οποίες το πρώτο αμινοξύ να μπορεί να προσκολληθεί εύκολα με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού.
- Να μπορεί να αποκοπεί εύκολα από το πεπτίδιο μετά το τέλος της σύνθεσης.
- Να έχει αρκετά σημεία πρόσδεσης έτσι ώστε να λαμβάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις και να ελαχιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων που είναι προσκολλημένα στα σημεία αυτά.
- Τα σωματίδια της ρητίνης να έχουν την ικανότητα να διογκώνονται με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS έτσι ώστε να επιτρέπεται η εύκολη διάχυση των αντιδραστηρίων καθώς και η εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων της αντίδρασης με απλή διήθηση.

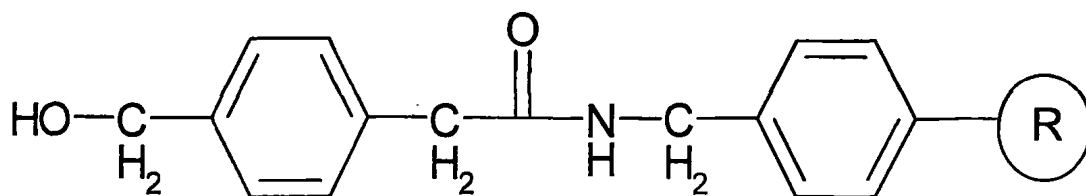
ΡΗΤΙΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

- Ρητίνη Merrifield



Η πρώτη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε από τον Merrifield είναι ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου (ρητίνη του Merrifield) (181, 182) πάνω στην οποία προσδένεται το C-τελικό αμινοξύ με εστερικό δεσμό. Η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος, μέσω της καρβοξυλομάδας του, επιτυγχάνεται με τη χρήση άλατος του καισίου του αντίστοιχου προστατευμένου αμινοξέος και την παρουσία KI σε διαλύτη DMF και θέρμανση. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με τη χρήση ισχυρών οξέων (συνήθως με υγρό υδροφθόριο, HF ή με τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ, TFMSA) και το πεπτίδιο λαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μικρού ή μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων ακολουθώντας την Boc-στρατηγική. Η περιορισμένη χρήση της ρητίνης του Merrifield, οφείλεται στη σχετικά μικρή σταθερότητα του εστερικού δεσμού, μεταξύ πεπτιδίου-πολυμερικού υποστρώματος κατά την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ για την αποκοπή της Boc-ομάδας.

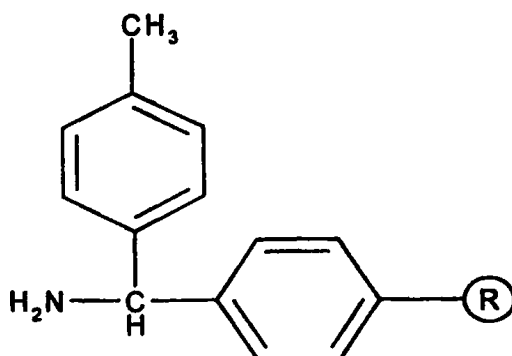
□ PAM ρητίνη



Για τη σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χρησιμοποιείται η PAM ρητίνη (4-υδροξυ-μεθυλ-φαινυλ-ακεταμιδο-μεθυλο-ρητίνη) (183, 184). Αυτό συμβαίνει διότι ο εστερικός δεσμός αμινοξέος-ρητίνης σταθεροποιείται από την παρουσία μιας ηλεκτρονιοελκτικής ακετάμιδο-ομάδας που βρίσκεται σε πάρα θέση στο βενζολικό δακτύλιο, στον οποίο προσδένεται το πεπτίδιο με συνέπεια μικρή σταθεροποίηση του προκύπτοντος κατιόντος μετά την αποκοπή. Η φαινυλ-ακετάμιδο μεθυλομάδα της PAM ρητίνης σταθεροποιεί τον εστερικό δεσμό περίπου 100 φορές περισσότερο από την ρητίνη του Merrifield. Με αυτό το τρόπο ελαχιστοποιούνται οι απώλειες κατά την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία με TFA. Η ρητίνη αυτή είναι συμβατή με τη Boc-στρατηγική. Τέλος το πεπτίδιο μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη, η οποία γίνεται με χρήση ισχυρών οξέων (συνήθως HF και TFMSA), παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

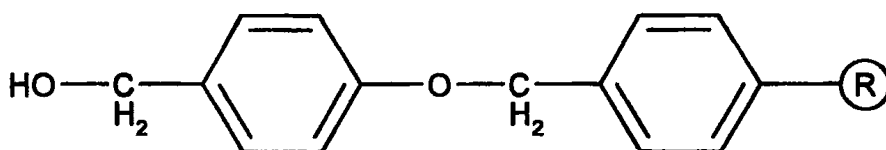


□ MBHA ρητίνη



Η MBHA ρητίνη (4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) (185, 186) χρησιμοποιείται ευρέως για τη σύνθεση πεπτιδίων τα οποία επιθυμούμε να τα παραλάβουμε με το C-τελικό άκρο στην αμιδική μορφή (-CONH₂). Πρόκειται για μια ρητίνη η οποία είναι συμβατή με τα πρωτόκολλα και της Boc και της Fmoc-στρατηγικής. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από την MBHA ρητίνη πραγματοποιείται μετά από κατεργασία με ισχυρά οξέα όπως άνυδρο HF, TFMSA, κ.τ.λ.

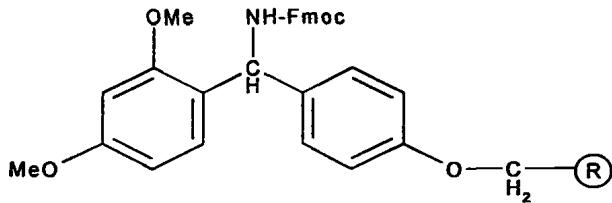
□ Wang ρητίνη



Η Wang ρητίνη (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη) (187-189) χρησιμοποιείται στη σύνθεση πεπτιδίων με τη Fmoc στρατηγική. Όταν το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Το πεπτίδιο είναι προσδεδεμένο στο στερεό πολυμερές με εστερικό δεσμό. Ο αλκοξυ υποκαταστάτης στην πάρα-θέση της βενζυλικής αλκοόλης αυξάνει την ευαισθησία του εστερικού δεσμού στα οξέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη σε πιο ήπιες συνθήκες (TFA) και με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι δραστικές συνθήκες (χρήση HF) που απαιτούνται σε άλλου τύπου ρητίνες.

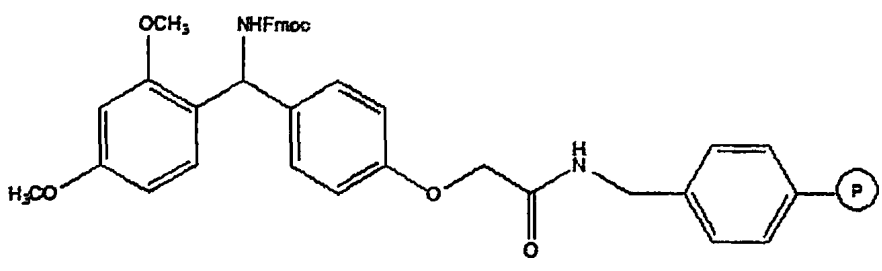


□ Rink amide MBHA ρητίνη



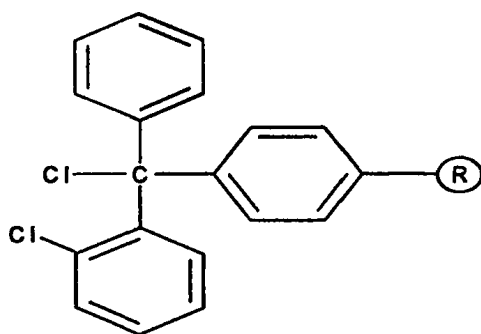
Η Rink amide MBHA ρητίνη (4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλ-9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλο-αμινομεθυλο)-MBHA ρητίνη) (190, 191) χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων στη C-τελική αμιδική τους μορφή και είναι συμβατή με τη Fmoc στρατηγική. Η ρητίνη φέρει μια πρόσθετη ομάδα (linker), η οποία είναι ευαίσθητη στα οξέα, οπότε η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη μπορεί να γίνει με TFA και άρα αποφεύγεται η χρήση ισχυρών οξέων (HF). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της σύνθεσης υπάρχει κίνδυνος σχάσης κατά την κατεργασία με πυκνά διαλύματα TFA η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του linker, με συνέπεια το σχηματισμό παραπροϊόντων τα οποία δεν μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος μπορεί να αντιμετωπισθεί με τη χρήση μικρών συγκεντρώσεων TFA σε μια κατεργασία δύο σταδίων, με την ταυτόχρονη προσθήκη τριαλκυλοσιλανίων.

□ Rink amide AM ρητίνη



Η Rink amide AM ρητίνη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων στη C-τελική αμιδική τους μορφή και είναι συμβατή με την Fmoc στρατηγική. Είναι παρόμοια με τη ρητίνη Rink amide MBHA αλλά έχει ένα μικρότερο εύρος χημικής συμβατότητας. Επιπλέον είναι λιγότερο ευαίσθητη σε κατεργασία με 95% TFA σε σχέση με τη Rink amide MBHA. Η συγκεκριμένη ρητίνη χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των πεπτιδίων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

□ 2-χλωροτριτυλο ρητίνη

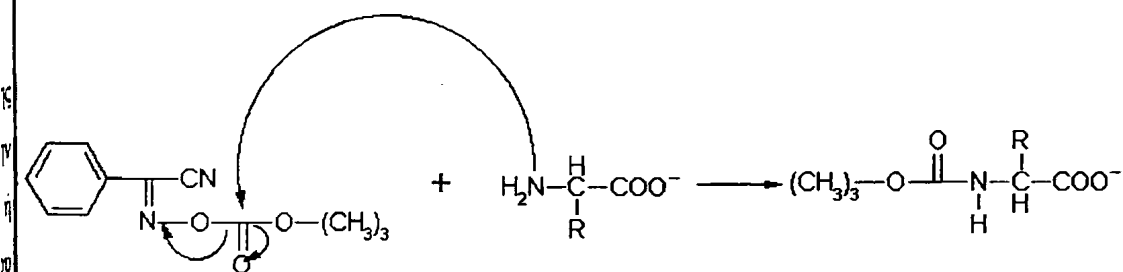


Η 2-χλωροτριτυλο ρητίνη (192) χρησιμοποιείται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Fmoc-στρατηγικής. Η μεγάλη ευαισθησία της 2-χλωροτριτυλομάδας στα οξέα, επιτρέπει την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη μετά από κατεργασία με 1% TFA ή AcOH/TFE/DCM (1:2:7). Τα τριτυλοκατιόντα που προκύπτουν κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι πολύ σταθερά και συνεπώς πολύ ασθενή ηλεκτρονιόφιλα και δεν συμμετέχουν σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις αλκυλίωσης. Με τη χρήση της 2-χλωροτριτυλο ρητίνης αποφεύγεται ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης στην περίπτωση που έχουμε προλίνη στην πρώτη ή δεύτερη θέση από το C-τελικό άκρο (193, 194). Αυτό οφείλεται στην στερεοχημική παρεμπόδιση που επάγουν οι βενζολικοί δακτύλιοι της τριτυλ-ομάδας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη και παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ Ν^α-ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ

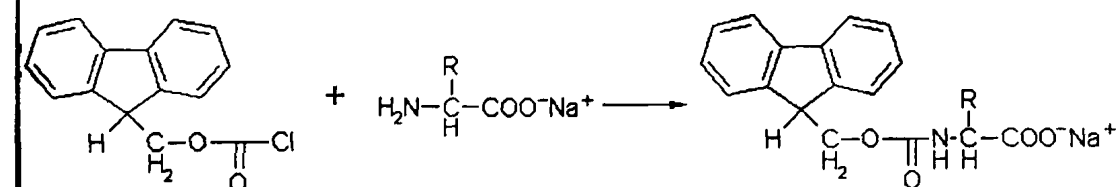
Η παροδική προστασία της α-αμινο-ομάδας είναι από τα πλέον σημαντικά σημεία στην πεπτιδική σύνθεση αφού με τον τρόπο αυτό ελαττώνεται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της και αποφεύγεται η εμπλοκή της ομάδας αυτής σε παράπλευρες αντιδράσεις και δημιουργία παραπροϊόντων. Σημαντική πρόοδος στη σύνθεση πεπτιδίων επήλθε μόνο μετά την ανακάλυψη της βενζυλοξυ-καρβονυλο-ομάδας (καρβοβενζοξυ: Cbz ή Z ομάδα), που πρότειναν το 1932 ο Bergmann και ο Zervas.

Η προστασία της α-αμινομάδας είναι παροδική διότι απομακρύνεται σε κάθε κύκλο σύζευξης, σε συνθήκες οι οποίες δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα των τυχόν προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, καθώς και του πεπτιδικού δεσμού. Στη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση η προστασία της α-αμινομάδας γίνεται συνήθως είτε με την *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα) είτε με την 9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc-ομάδα) (Εικόνα 3.10). Για την εισαγωγή της Boc-ομάδας χρησιμοποιείται συνήθως ο δι-τριτοταγής βουτυλο-δι-ανθρακικός εστέρας (195) (Boc)₂O ή το *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλοξιμινο-2-φαινυλακετονιτρίλιο (196) (BocON) (Εικόνα 3.8).

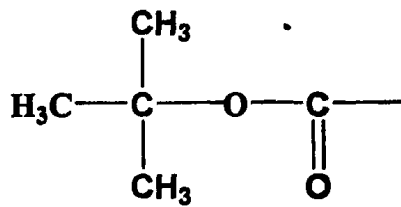


Εικόνα 3.8: Εισαγωγή της Boc ομάδας στα αμινοξέα με τη χρήση του BocON.

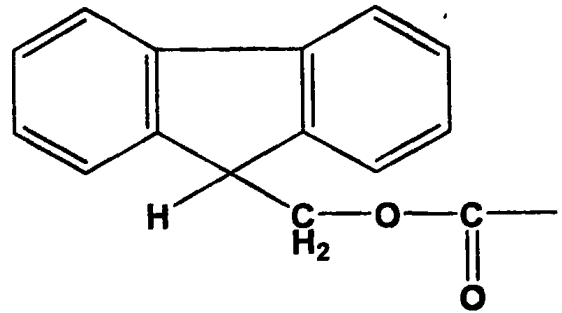
Στην περίπτωση της εισαγωγής της Fmoc-ομάδας γίνεται χρήση του N-(9-φλουορενυλο-μεθοξυκαρβονυλοξυ ηλεκτριμιδίου FmocOSu, (197), και του 9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλο χλωριδίου FmocCl (174) (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9: Εισαγωγή της Fmoc ομάδας στα αμινοξέα με τη χρήση του FmocCl.



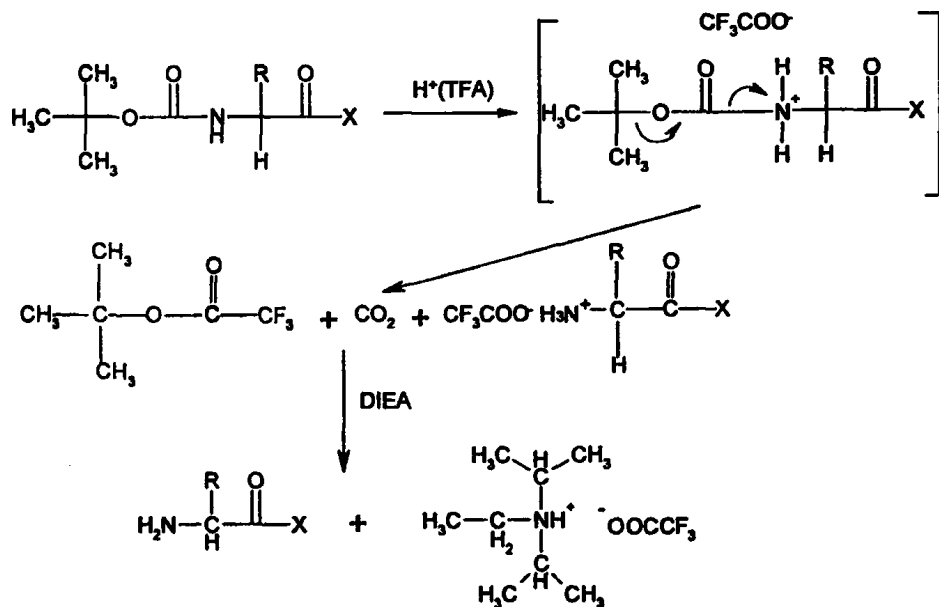
Boc-ομάδα



Fmoc-ομάδα

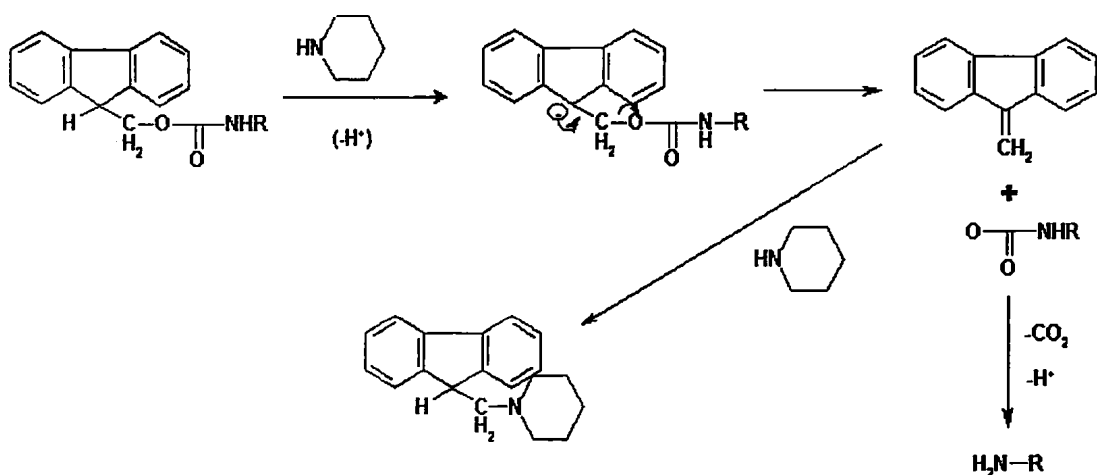
Εικόνα 3.10: Προστατευτικές ομάδες της N^α-αμινομάδας των αμινοξέων.

Στην περίπτωση σύνθεσης πεπτιδίων με την Boc στρατηγική, η προστατευτική ομάδα απομακρύνεται με τη χρήση οξέων, συνήθως με τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) (30-40 % v/v). Στη συνέχεια το άλας του τριφθοροξικού οξέος που σχηματίζεται εξουδετερώνεται με προσθήκη διαλύματος δίσοπροπυλ-αιθυλαμίνης (DIEA) σε DCM (7-10% v/v) (Εικόνα 3.11). Οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να είναι σταθερές στην επαναλαμβανόμενη επεξεργασία του πεπτιδίου με TFA. Η τελική απομάκρυνση τους γίνεται στο τέλος της σύνθεσης με χρήση πολύ ισχυρών οξέων όπως είναι το υγρό υδροφθόριο (HF).



Εικόνα 3.11: Αντίδραση απομάκρυνσης της N^α-Boc-προστατευτικής ομάδας.

Κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την Fmoc στρατηγική, η Fmoc α-αμινοπροστατευτική ομάδα είναι ασταθής σε διαλύματα δευτεροταγών αμινών. Για την απομάκρυνσή της χρησιμοποιείται διάλυμα πιπεριδίνης 20% v/v σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) ή διάλυμα 1% NMP (N-μέθυλο-πιπεριδίνη) σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Δημιουργείται έτσι ένα καρβαμυδικό οξύ, το οποίο όμως στην συνέχεια απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα παρέχοντας την ελεύθερη αμίνη. Ο μηχανισμός της απομάκρυνσής της Fmoc-ομάδας φαίνεται στην εικόνα 3.12. Το παραπροϊόν, το διφαινυλοφουλβένιο (DBF), αντιδρά με τη δευτεροταγή αμίνη και δίνει μια σταθερή τριτοταγή βάση η οποία όμως δεν παρεμβαίνει στην αντίδραση ή στην απομόνωση του προϊόντος. Το γεγονός ότι οι αμινομάδες είναι πράγματι ελεύθερες και όχι πρωτονιωμένες, όπως κατά την αποπροστασία με επίδραση οξέων, είναι ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα της μεθόδου.



Εικόνα 3.12: Απομάκρυνση της N^o-Fmoc- προστατευτικής ομάδας.

Οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη Fmoc στρατηγική, είναι ασταθείς στα οξέα. Η απομάκρυνσή τους γίνεται συνήθως με ήπια οξέα, όπως είναι το τριφθοροξικό οξύ (περίπου 95% v/v) κατά τη διάρκεια της αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη.

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Εκτός από τις α-άμινο προστατευτικές ομάδες υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων.

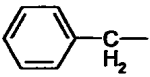
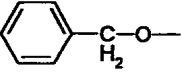
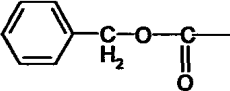
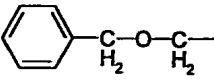
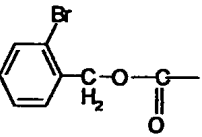
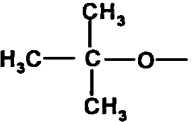
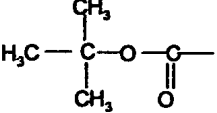


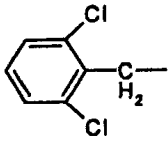
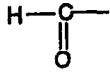
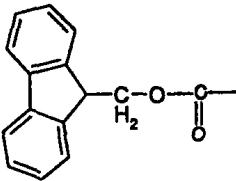
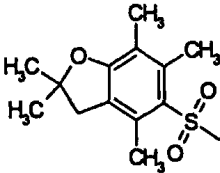
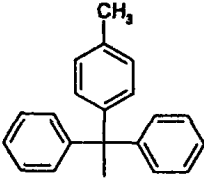
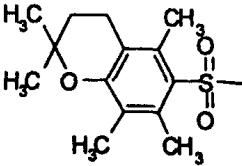
Η προστασία των ομάδων αυτών είναι απαραίτητη, για τους ίδιους λόγους που είναι απαραίτητη και η προστασία των α-αμινομάδων των εκάστοτε αμινοξέων, δηλαδή προς αποφυγή εμπλοκής των, σε μια σειρά ανεπιθύμητων αντιδράσεων, με τα προβλήματα που αυτές συνεπάγονται. Η επιλογή της προστασίας που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται τόσο από τη στρατηγική που πρόκειται να ακολουθηθεί για τη σύνθεση ενός πεπτιδίου όσο και από τις εκάστοτε χρησιμοποιούμενες μεθόδους σύζευξης (198). Δύο ακόμα παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των προστασιών αυτών είναι η διαλυτότητα του αμινοξέος καθώς επίσης και η αλληλουχία του σχηματιζόμενου πεπτιδίου. Οι ομάδες αυτές πρέπει να είναι σταθερές στις συνθήκες αποπροστασίας της α-αμινομάδας, να είναι σταθερές στις συνθήκες σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού και να απομακρύνονται εύκολα ή/ και εκλεκτικά. Κάποια από τα αμινοξέα μπορούν να ενσωματωθούν στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς προστασία της παράπλευρης ομάδας τους. Τέτοια αμινοξέα είναι η μεθειονίνη, η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη.

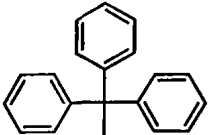
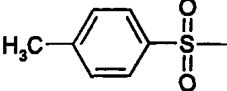
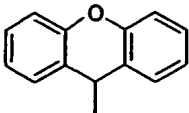
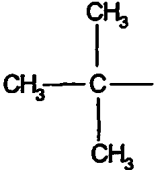
Στον Πίνακα 3.2 φαίνονται οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται σήμερα, για την σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.

Πίνακας 3.2: Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των παράπλευρων ομάδων των αμινοξέων στην σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.

Προστατευτική ομάδα	Τύπος	Στρατηγική	Αμινοξέα στα οποία χρησιμοποιείται
Acetamidomethyl Ακεταμιδομεθυλομάδα Ac _m (199)		Boc, Fmoc	Cys
Allyloxycarbonyl Αλλυλοξυκαρβονυλο Alloc (200, 201)		Boc	Lys

Benzyl Βενζυλο Bzl (202)		Boc	Tyr, Thr, Ser
Benzyloxy Βενζυλοξομάδα BzlO (203)		Boc	Glu, Asp
Benzyloxycarbonyl Βενζυλοξοκαρβονυλο Z (204)		Boc	Lys
Benzyloxymethyl Βενζυλοξομεθυλο Bom (205, 206)		Boc	His
2-Bromobenzyloxycarbonyl 2-Βρωμοβενζυλοξοκαρβονυλο 2-Br-Z (204)		Boc	Tyr
t-Butoxy t-Βουτοξυ t-BuO (207)		Fmoc	Glu, Asp
t-Butoxycarbonyl t-Βουτοξοκαρβονυλο Boc (208)		Fmoc	Trp, Lys

2,6-Dichlorobenzyl 2,6-Διχλωροβενζυλομάδα 2,6-Di-Cl-Bzl (204)		Boc	Tyr
Formyl Φορμυλο For (209)		Boc	Trp
Fluorenylmethoxycarbonyl Φλουορενυλμεθοξυκαρβό νυλο (Fmoc)		Boc	Lys
2,2,4,6,7-Pentamethyl- dihydrobenzofurane-5- sulfonyl 2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο- διϋδροφουράνο-5- σουλφόνυλο Pbf (210)		Fmoc	Arg
4-Methyltrityl 4-Μεθυλοτριτυλο Mtt		Boc, Fmoc	Lys
2,2,5,7,8-Pentamethyl- chromane-6-sulfonyl 2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο- χρωμανο-6-σουλφόνυλο Pmc (211)		Fmoc	Arg

Trityl Τριτυλο Trt (212)		Fmoc	Ser, His, Gln, Cys, Asn,
Tosyl Τοζυλ Tos (213, 214)		Boc	His, Arg
Xan Ξανθένυλο Xan (215)		Boc	Asn, Gln
t-Butyl t-Βουτυλο tBu (216-218)		Fmoc	Cys, Ser, Thr, Tyr

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ - ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΜΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Όπως αναφέρθηκε, όταν η α-αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά με την α-καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός δεσμού, που ονομάζεται πεπτιδικός (ή αμιδικός) δεσμός.

Οι κυριότερες μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού είναι:

- Μέθοδος των χλωριδίων
- Μέθοδος των αζιδίων
- Μέθοδος των ανυδριτών
- Μέθοδος των ενεργών εστέρων
- Σχηματισμός δεσμού που καταλύεται από ένζυμα
- Αντιδραστήρια σύζευξης

Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού στη σύνθεση των πεπτιδίων είναι αυτή των αντιδραστηρίων σύζευξης λόγω της απλότητάς

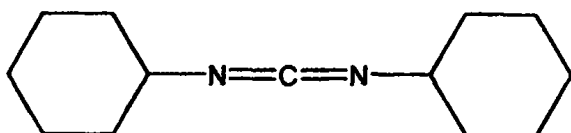
της και της ταχύτητάς της. Τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι ουσίες οι οποίες προστίθενται στο μίγμα ενός α-άμινο προστατευμένου αμινοξέος το οποίο όμως διατηρεί ελεύθερη την καρβοξυλομάδα του και ενός δεύτερου α-καρβόξυλο προστατευμένου αμινοξέος με ελεύθερη την α-αμινομάδα του, έτσι ώστε να λάβει χώρα η σύζευξη. Βασική προϋπόθεση για τη χρησιμοποίηση ενός αντιδραστήριου ως αντιδραστήριου σύζευξης είναι:

- Να είναι αδρανές ως προς το αμινο-συστατικό.
- Να μη 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.

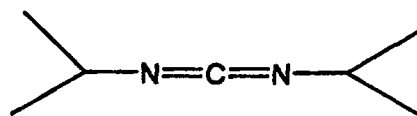
Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι κυριότερες κατηγορίες των αντιδραστηρίων σύζευξης.

1. Καρβοδιϊμίδια

Η εισαγωγή των καρβοδιϊμιδίων και ιδιαίτερα του N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου (DCC, DCCI) (161, 170) σαν αντιδραστήρια για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, από τους Sheehan και Hess το 1955, αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης και εξακολουθεί μέχρι και σήμερα να αποτελεί το κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο σύζευξης στη μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων. Το διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) (219) είναι εξίσου αποτελεσματικό ως αντιδραστήριο σύζευξης με το DCC και σχηματίζει ως παραπροϊόν μια περισσότερο ευδιάλυτη μορφή της ουρίας (Εικόνα 3.13). Η καινοτομία των αντιδραστηρίων αυτών είναι το γεγονός ότι μπορούσαν να προστεθούν στο μίγμα του καρβόξυλο και του αμινο-συστατικού. Έτσι ήταν εφικτή η ταυτόχρονη ενεργοποίηση και η σύζευξη.



DCC



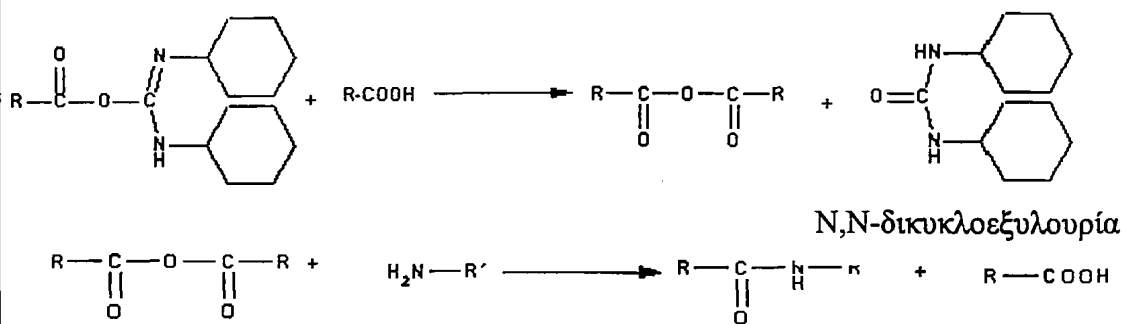
DIC

Εικόνα 3.13: Συντακτικοί τύποι του N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου (DCC) και διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμιδίου (DIC).



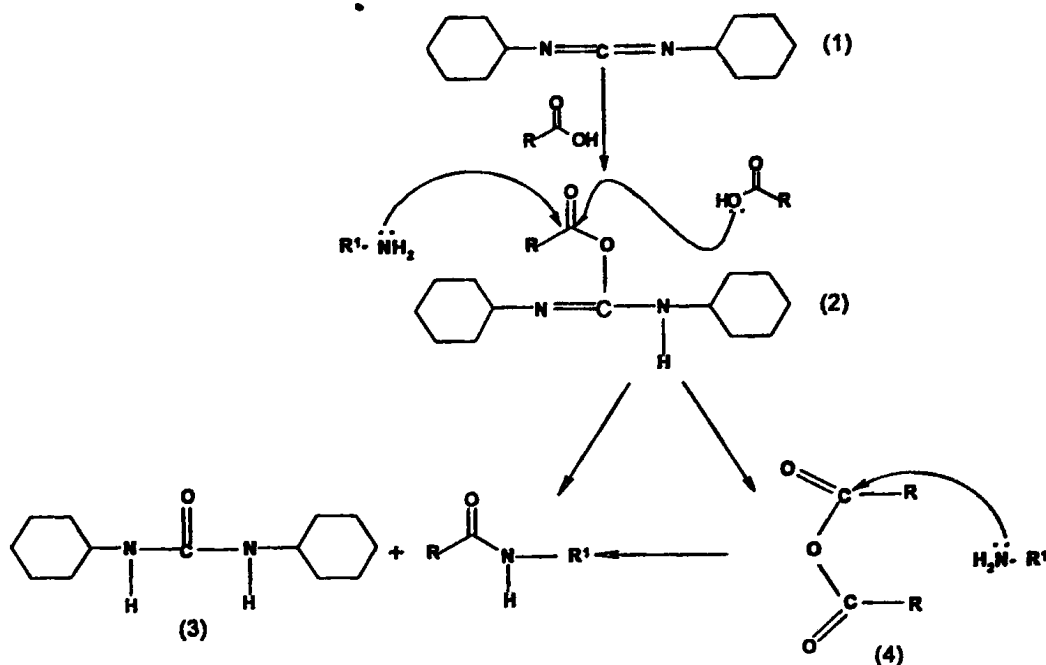
Ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρα το DCC, φαίνεται στην εικόνα 3.14.

Παρόλο που οι αμίνες, αντιδρούν με τα καρβοδιϊμίδια δίνοντας παράγωγα γουανιδίνης, η ταχύτητα αυτής της αντίδρασης είναι πάρα πολύ μικρή έναντι της ταχύτητας που παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη των καρβοξυλικών οξέων σε έναν από τους διπλούς δεσμούς του καρβοδιϊμιδίου (Εικόνα 3.14).



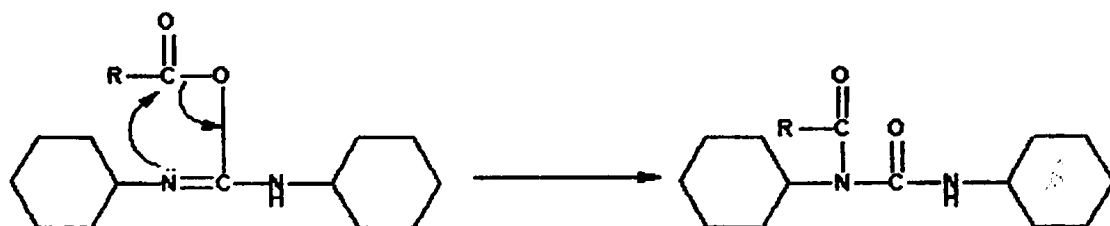
Εικόνα 3.14: Αντιδράσεις του DCC με το καρβοξυ-συστατικό και με το αμινο-συστατικό.

Αρχικά, η προσβολή από το καρβοξύλιο του N^a- προστατευμένου αμινοξέος στον ένα δεσμό N=C του DCC (1) (Εικόνα 3.15) δίνει το ενδιάμεσο O-ακυλο-ισοουρία (2). Το DCC μπορεί να αντιδράσει και με αμίνες H₂N-R σχηματίζοντας παράγωγα της γουανιδίνης. Η αντίδραση αυτή όμως είναι πολύ αργή σε σχέση με το σχηματισμό της O-ακυλο-ισοουρίας. Ακολούθως, η O-ακυλο-ισοουρία υφίσταται αμινόλυση από το αμινο-συστατικό, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του πεπτιδίου και της δικυκλο-εξυλουρίας (3) ως παραπροϊόν (δυσδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, εκτός από τις αλκοόλες). Επίσης, η O-ακυλο-ισοουρία μπορεί να αντιδράσει με ένα ακόμα μόριο καρβοξυλικού οξέος, σχηματίζοντας ένα συμμετρικό ανυδρίτη (4), ο οποίος εν συνέχεια αντιδρά με το αμινο-συστατικό και δίνει το πεπτίδιο. Η γρήγορη εκτέλεση της ενεργοποίησης και της σύζευξης σε ένα στάδιο και η εύκολη απομάκρυνση του παραπροϊόντος, της N,N'-δικυκλοεξυλουρίας (DCU), με διήθηση, συμβάλλουν στη μεγάλη δημοτικότητα της μεθόδου DCC στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση.



Εικόνα 3.15: Μηχανισμός σύζευξης με DCC για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού.

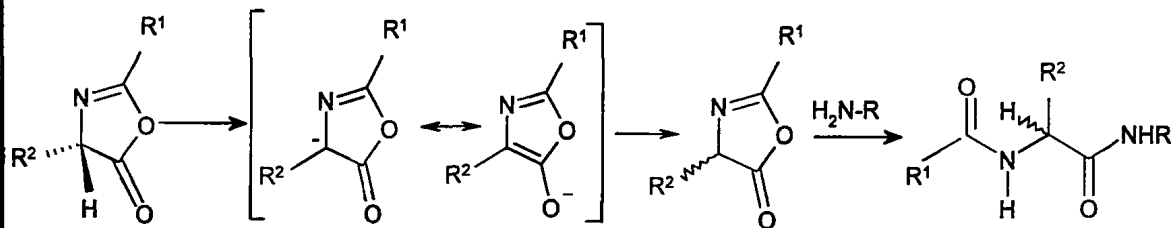
Το βασικό μειονέκτημα της χρήσης του DCC είναι ο σχηματισμός της μη δραστικής N-ακυλοουρίας (220) μέσω της ενδομοριακής μετάθεσης O-N που υφίσταται η O-ακυλοουρία (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: Σχηματισμός της N-ακυλοουρίας.

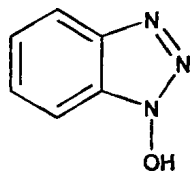
Ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας είναι δυνατός και κατά την αντίδραση της δικυκλοεξυλοουρίας με το συμμετρικό ανυδρίτη του αμινοξέος. Στην περίπτωση όμως που ως διαλύτης χρησιμοποιείται το διχλωρομεθάνιο ή το ακετονιτρίλιο, η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα πολύ αργά, ενώ όταν χρησιμοποιείται διμεθυλο-φορμαμίδιο, είναι πολύ πιο γρήγορη. Ωστόσο η χρησιμοποίηση πολικού διαλυτή (DMF <50%) είναι αναγκαία στην σύζευξη για την αποφυγή ένδο- και δια-μοριακών δεσμών υδρογόνου.

Ένα άλλο μειονέκτημα της χρήσης του DCC είναι ο σχηματισμός της οξαζολόνης (221, 222), η οποία είναι ανεπιθύμητη, επειδή ευνοεί τη ρακεμοποίηση των αμινοξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Εικόνα 3.17). Η οξαζολόνη παράγεται από ενδομοριακή κυκλοποίηση του N^α-προστατευμένου αμινοξέος, O-ακυλοϊσοουρία ή ανυδρίτη.

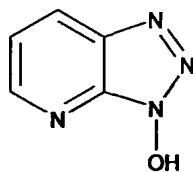


Εικόνα 3.17: Ρακεμοποίηση ως συνέπεια του σχηματισμού της οξαζολόνης.

Για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της μεθόδου σύζευξης με DCC (η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός N-ακυλοουρίας) χρησιμοποιούνται βοηθητικά πυρηνόφιλα όπως το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBT) (223-225), ενώ πρόσφατα έχει προταθεί η χρησιμοποίηση του αζαβενζοτριαζολίου (HOAt) (226-228).



HOBT

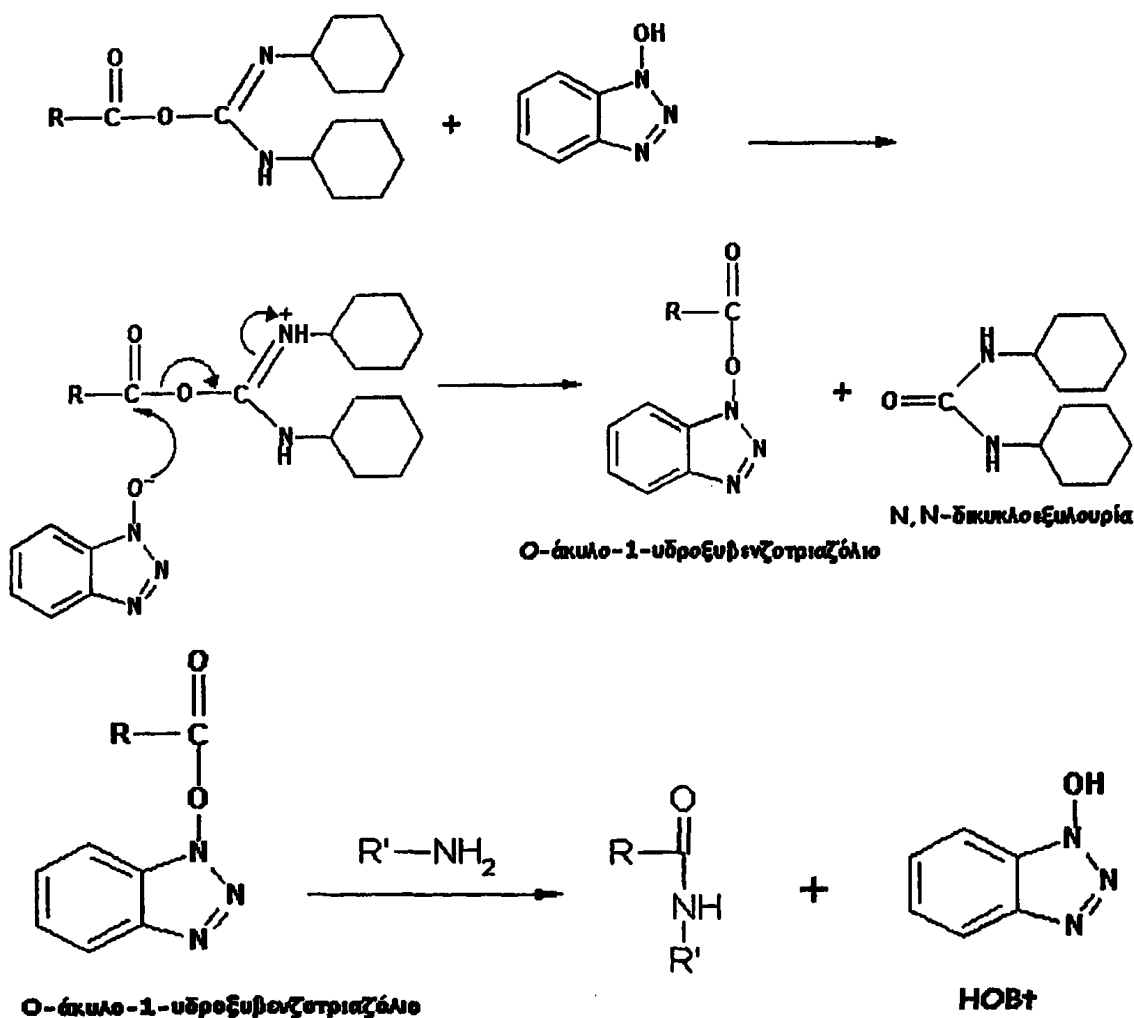


HOAt

Η ουσία αυτή προσβάλλει το ενεργό ενδιάμεσο με αποτέλεσμα το σχηματισμό O-ακυλο-1-υδροξυ-βενζοτριάζολιου που είναι ισχυρό ακυλιωτικό μέσο των -NH₂ ομάδων. Ο μηχανισμός δράσης του DCC παρουσία HOBT φαίνεται στην εικόνα 3.18.

Η παρουσία ενός δεύτερου πυρηνόφιλου στο μίγμα της αντίδρασης, μειώνει τη συγκέντρωση και το χρόνο ζωής της O-ακυλο-ισοουρίας (επομένως περιορίζει την έκταση της O-N ακυλο-μετατόπισης που οδηγεί σε σχηματισμό των παραγώγων της N-ακυλοουρίας) και ως εκ τούτου την έκταση της ρακεμοποίησης.

Επίσης το HOBt ως ασθενές οξύ, εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικά ενεργό άτομο άνθρακα και έτσι συμβάλλει με ένα δεύτερο τρόπο στη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας. Το HOBt αναγεννάται κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης και έτσι η συγκέντρωσή του παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης.

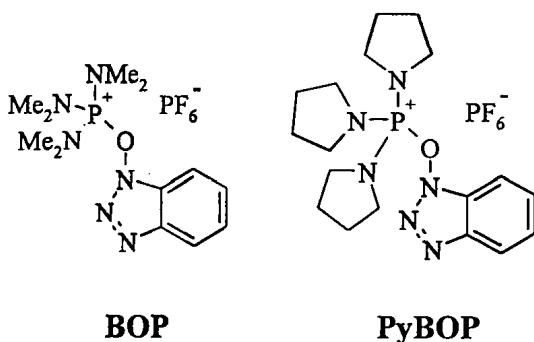


Εικόνα 3.18: Μηχανισμός της σύζευξης με DCC παρουσία HOBt.

2. Φωσφονικά ή Ουρονικά παράγωγα

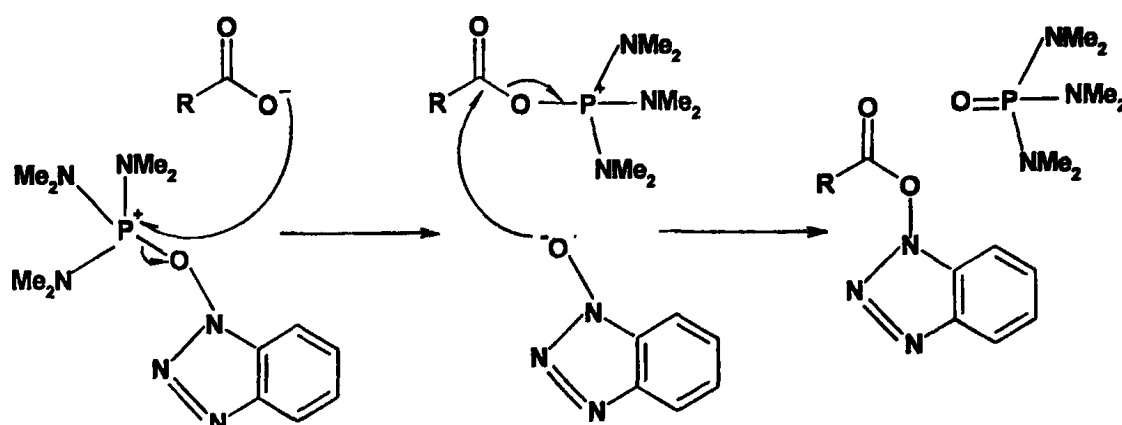
Παρόλο που η χρήση του DCC ως αντιδραστηρίου σύζευξης, παραμένει ιδιαίτερα διαδεδομένη ακόμα και σήμερα, τα τελευταία χρόνια εισήχθησαν μια σειρά από βελτιωμένα αντιδραστήρια.

Η χρήση των αλκυλοφωσφονικών αλάτων ως αντιδραστήρια σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Kenner (229) το 1969, ωστόσο οι ενώσεις αυτές καθιερώθηκαν με την εισαγωγή από τον Castro του αντιδραστηρίου 1*H*-βενζοτριαζολυλο *N*-οξυτρι(διμεθυλαμινο) φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP) (230, 231).



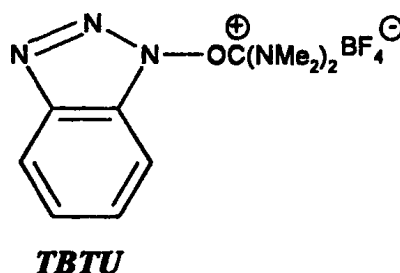
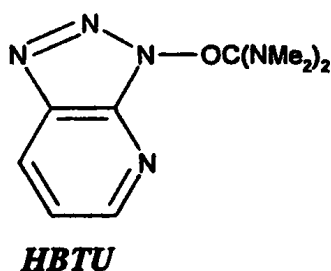
Η ευρύτατη χρήση του αντιδραστηρίου BOP στην πεπτιδική σύνθεση οφείλεται στο γεγονός ότι είναι εύκολο στο χειρισμό του, δίνει προϊόντα υψηλής οπτικής καθαρότητας και ο χρόνος που απαιτείται για τη σύζευξη είναι πολύ μικρός έναντι άλλων αντιδραστηρίων. Σημαντική επίσης είναι η σχετική ευκολία στο χειρισμό του. Το μειονέκτημά του είναι ότι ως παραπροϊόν δίνει το εξαμεθυλοφωσφοτριαμίδιο, μια ιδιαίτερα τοξική ουσία. Έτσι ακολουθήσε μια πιο βελτιωμένη έκδοση το 1*H*-βενζοτριαζολυλο *N*-οξυ-τρι(πυρρολιδινο) φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP) (232, 233) το οποίο παρουσιάζει όλα τα πλεονεκτήματα του BOP με τη σημαντική διαφορά ότι το παραπροϊόν του δεν παρουσιάζει τοξικότητα. Τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν να προστεθούν στο μίγμα της αντίδρασης πευθείας (αμινοσυστατικό + καρβοξυσυστατικό) αφού αντιδρούν μόνο με το καρβοξυ

συστατικό. Συνήθως χρησιμοποιείται μια τριτοταγής αμίνη ως βάση για το σχηματισμό του καρβοξυλικού ανιόντος (Εικόνα 3.19).



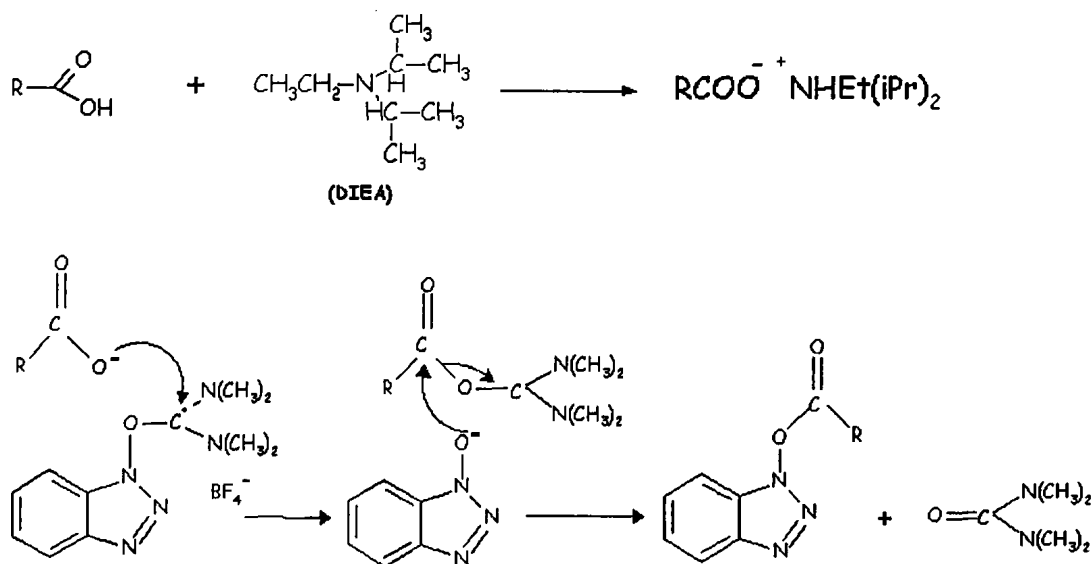
Εικόνα 3.19: Μηχανισμός σύζευξης με το BOP αντιδραστήριο.

Μια άλλη κατηγορία βελτιωμένων αντιδραστηρίων σύζευξης, με τεράστια εφαρμογή σήμερα στην πεπτιδική σύνθεση, είναι τα ουρονικά άλατα. Η πρώτη ένωση από την κατηγορία αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση ήταν το Ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό τετραβορο-φωσφορικό άλας (TBTU) (234, 235), το 1978 από τον Dourtoglou και τους συνεργάτες του, ενώ ένα πιο σύγχρονο είναι το (Ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό-εξαφθοροφωσφορικό άλας) (HBTU) (236, 237).



Σημαντικά πλεονεκτήματα των αντιδραστηρίων αυτών είναι ότι περιορίζουν σημαντικά τη ρακεμοποίηση, ο χρόνος αντίδρασης είναι πολύ μικρός, περίπου 15 min, ενώ η απόδοση στο τελικό προϊόν είναι πολύ μεγάλη. Ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα ουρονικά παράγωγα είναι παρόμοιος με αυτόν των φωσφονικών παραγώγων (Εικόνα 3.20). Τα φωσφονικά παράγωγα όπως και τα καρβοδιϊμίδια δεν αντιδρούν με τις α-αμινομάδες των αμινοξέων, με αποτέλεσμα να προστίθενται απευθείας στο μίγμα του καρβόξυλο και αμινο-συστατικού. Αντίθετα τα ουρονικά άλατα αντιδρούν με την α-αμινομάδα δίνοντας τετραμεθυλογουανιδίνο παράγωγα και συνεπώς υπάρχει σοβαρός κίνδυνος μη αντιστρεπτής δέσμευσης του αμινοσυστατικού, κατά την προσθήκη των συγκεκριμένων αντιδραστηρίων στο μείγμα της αντίδρασης. Για το λόγο αυτό το καρβόξυ συστατικό θα πρέπει να ενεργοποιείται με τα ουρονικά αντιδραστήρια, πριν προστεθεί στο αμινο-συστατικό.

Πρέπει να τονιστεί ότι είναι αναγκαία η παρουσία τριτοταγούς βάσης όπως είναι η διισοπροπυλο-αιθυλαμίνη (DIEA), για να αποσπά ένα πρωτόνιο και να ιοντίζει το καρβόξυλιο. Το ενδιάμεσο που παράγεται είναι ιδιαίτερα δραστικό και προσβάλλεται από το ανιόν του 1-υδροξυβενζοτριάζολιου, δίνοντας έναν βενζοτριάζολυλο εστέρα, ο οποίος με τη σειρά του υφίσταται αμινόλυση προς την παραγωγή του τελικού επιθυμητού προϊόντος. Η χρήση μεγάλης ποσότητας ουρονικών αλάτων πρέπει να αποφεύγεται.



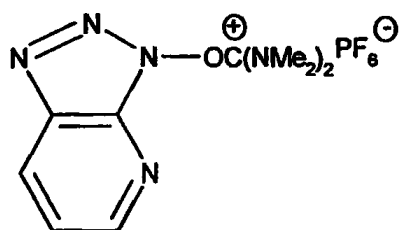
Εικόνα 3.20: Ο μηχανισμός της αντίδρασης του TBTU.

Τα φωσφονικά και ουρονικά άλατα προτιμούνται σήμερα σε αρκετές περιπτώσεις στην πεπτιδική σύνθεση έναντι του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου. Ιδιαίτερα, όταν πρόκειται για σύζευξη αμινοξέων με υψηλή στερεοχημική παρεμπόδιση λόγω μεγάλων πλευρικών

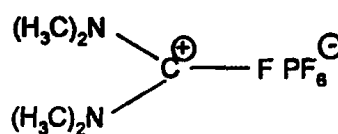


αλυσίδων, ή κατά τη σύνθεση με τη βοήθεια αυτόματων μηχανημάτων (synthesizers) όπου μειώνουν σε μεγάλο βαθμό την χρονική διάρκεια των συζεύξεων.

Μια άλλη σειρά ουρονικών και φωσφονικών αλάτων βασίζεται στην ένωση 7-αζατριαζολιο (HOAt)(238), ένωση ανάλογη του HOBt. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι το HATU (238) και το TFFH (239).

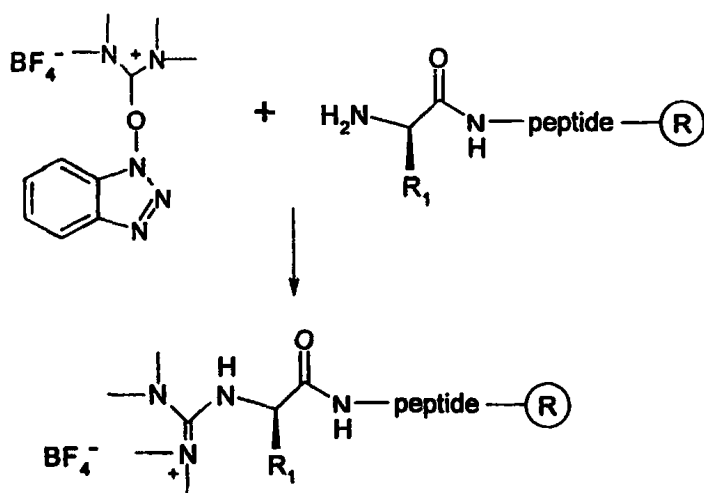


HATU



TFFH

Έχει αναφερθεί ότι όταν σαν αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιηθούν ουρονικά ή αμινικά αντιδραστήρια, όπως το TBTU μπορεί να παρατηρηθεί η παράπλευρη αντίδραση της γουανυλίωσης (Εικόνα 3.21). Η παράπλευρη αυτή αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί όταν το εισερχόμενο αμινοξύ είναι προενεργοποιημένο.



Εικόνα 3.21: Αντίδραση γουανυλίωσης του αμινοσυστατικού με TBTU.

ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ

Το τελικό βήμα, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου πάνω στο στερεό πολυμερές είναι η απόσπαση αυτού από τη ρητίνη με τη χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου.



Είναι το πιο σημαντικό στάδιο της πορείας, διότι θα πρέπει να επιλεγθούν συνθήκες αρκετά δραστικές για την απόσπαση, αλλά και ήπιες παράλληλα, για τη διατήρηση των δομικών στοιχείων του πεπτιδίου (240). Η χημική μέθοδος που επιλέγεται συνήθως είναι η επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με ισχυρά οξέα. Η διαδικασία που επιλέγεται κάθε φορά εξαρτάται:

- από τον τύπο της ρητίνης που χρησιμοποιήθηκε
- το δεσμό που συνδέει το C-τελικό αμινοξύ με τη ρητίνη
- την επιθυμία διατήρησης ή αποκοπής των προστατευτικών ομάδων των δραστικών ομάδων των αμινοξέων καθώς επίσης και
- από το είδος των δραστικών ομάδων που υπάρχουν στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων.

Στα πρώτα χρόνια της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση ως τέτοιο αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε το υδροβρωμικό οξύ σε τριφθοροξικό οξύ. Ωστόσο μερικές από τις προστατευτικές ομάδες είναι αρκετά ανθεκτικές σ' αυτό το αντιδραστήριο.

Έτσι, κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση με τη Boc στρατηγική απαιτείται η χρήση πολύ ισχυρών οξέων όπως είναι το υγρό υδροφθόριο, HF (241) ή το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ, TFMSA (242) για την απομάκρυνση του πεπτιδίου από την στερεό πολυμερές. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδική συσκευή, καθώς είναι ιδιαίτερα τοξική, ενώ το άνυδρο υδροφθωρικό οξύ διαβρώνει και το γυαλί. Για πεπτίδια που συντίθενται με τη Fmoc-στρατηγική χρησιμοποιούνται πιο ήπια οξέα, όπως το τριφθοροξικό οξύ, TFA, για την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές (243).

Ταυτόχρονα με την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έχουμε και την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Ως συνέπεια αυτού, το μίγμα της αντίδρασης αποκοπής είναι πλούσιο σε ηλεκτρονιόφιλα αλκυλιωτικά ενδιάμεσα. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων του πεπτιδίου με αυτά τα ενδιάμεσα αυτά, η αποκοπή γίνεται πάντα παρουσία μορίων-παγίδων (γνωστά ως scavengers) που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τα καρβοκατιόντα. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μόρια παγίδες είναι η ανισόλη, η φαινόλη και παράγωγα θειολών.

Αποκοπή με TFA

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία πλεονεκτεί έναντι αυτής του HF, τόσο ως προς την ευκολία διεξαγωγής, όσο και ως προς την ταχύτητα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι το TFA είναι λιγότερο ισχυρό οξύ από το HF. Η χημική αυτή πορεία ακολουθείται μετά από τη σύνθεση του πεπτιδίου με τη Fmoc στρατηγική. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στο στάδιο πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, ώστε να απομακρυνθεί η N-τελική Fmoc ομάδα που απαιτεί βασικές συνθήκες (20% πιπεριδίνη). Και εδώ είναι απαραίτητη η προσθήκη μορίων-παγίδων (ανισόλη, p-κρεζόλη, θειόλες, H₂O, παράγωγα του σιλανίου πχ τριόξοπροπυλοσιλάνιο TIS κ.α.) (244) για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Ο χρόνος που αφήνεται η αντίδραση ποικίλει από 2 έως 6 ώρες ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί. Η αντίδραση γίνεται παρουσία ενός επιπλέον διαλύτη για την ικανοποιητική διάγκωση του πολυμερούς (ρητίνη) όπως είναι το διχλωρομεθάνιο (DCM). Στις περιπτώσεις αμινοξέων που οι προστατευτικές τους ομάδες αποκόπονται δύσκολα, ο χρόνος παραμονής του μίγματος πεπτιδορητίνη-TFA-scavengers-DCM μπορεί να παραταθεί μέχρι και έξι ώρες [π.χ Arg(Mtt)]. Στη συνέχεια το TFA εξατμίζεται, σε περιστροφικό εξατμιστήρα, και το πεπτίδιο καταβυθίζεται με τη βοήθεια αιθέρα και διηθείται. Το ίζημα διαλύεται σε CH₃COOH 2N και λυοφιλοποιείται.

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

Αν και η χρησιμοποίηση προστατευτικών ομάδων στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση περιόρισε σημαντικά τις διάφορες δυσκολίες, ωστόσο προκύπτουν προβλήματα που οφείλονται σε παράπλευρες αντιδράσεις των υποκαταστατών ή σε συγκεκριμένες αμινοξικές ακολουθίες. Διαφορετικές παράπλευρες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα και σε διαφορετικό βαθμό, οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από το πεπτίδιο που συντίθεται και τη στρατηγική σύνθεσης που χρησιμοποιείται (Boc/Bzl ή Fmoc/tBu). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να λαμβάνεται μίγμα πεπτιδίων και η απόκτηση του επιθυμητού προϊόντος πρέπει να εξασφαλισθεί με καθαρισμό που μπορεί να απαιτεί αρκετά βήματα και μερικές φορές επίπονες και χρονοβόρες επεξεργασίες. Είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε αυτές τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις, να τις προβλέπουμε και όταν είναι δυνατό να τις αποτρέπουμε.



Παρακάτω αναφέρονται τα πιο σημαντικά προβλήματα που συναντώνται κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης.

I. Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου

Μια παράπλευρη αντίδραση που εμφανίζεται στην πεπτιδική σύνθεση είναι η κυκλοποίηση του ασπαρτικού οξέος προς σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου. Το πρόβλημα εμφανίζεται κυρίως όταν σε ένα πεπτίδιο υπάρχει μια από τις παρακάτω αμινοξικές ακολουθίες: Asp-Gly, Asp-Ala και Asp-Ser. Το πρόβλημα αυτό εμφανίζεται τόσο σε όζινες όσο και σε βασικές συνθήκες. Η ταχύτητα με την οποία κλείνει ο δακτύλιος εξαρτάται από την προστατευτική ομάδα του ασπαρτικού οξέος, από τη στρατηγική που ακολουθείται (245), από τις συνθήκες αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη (Boc/Bzl στρατηγική) (246) καθώς επίσης και από την σειρά των αμινοξέων στην πεπτιδική αλληλουχία. Είναι δηλαδή γρήγορη αν $R=H$ (όπου R συμβολίζεται η παράπλευρη αλυσίδα του αμινοξέος που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο του ασπαρτικού οξέος), δηλαδή σε πεπτίδια που περιέχουν τη σειρά -Asp-Gly- γίνεται αργότερη αν το ασπαρτικό οξύ ακολουθείται από ένα αμινοξύ με μια ογκώδη παράπλευρη αλυσίδα, όπως είναι η βαλίνη. Στην περίπτωση άλλων αμινοξέων οι στεरिकές παρεμποδίσεις για την κυκλοποίηση συνήθως εμποδίζουν την αντίδραση. Οι αμινοξικές αλληλουχίες που διευκολύνουν τη δημιουργία ασπαρτιμιδίου κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την Fmoc/tBu και την Boc/Bzl στρατηγική, έχουν διερευνηθεί από τους Yang et al (Πίνακας 3).

Πίνακας 3.3: Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την Fmoc/tBu και την Boc/Bzl στρατηγική (με + και – δηλώνεται η έκταση του σχηματιζόμενου ασπαρτιμιδίου).

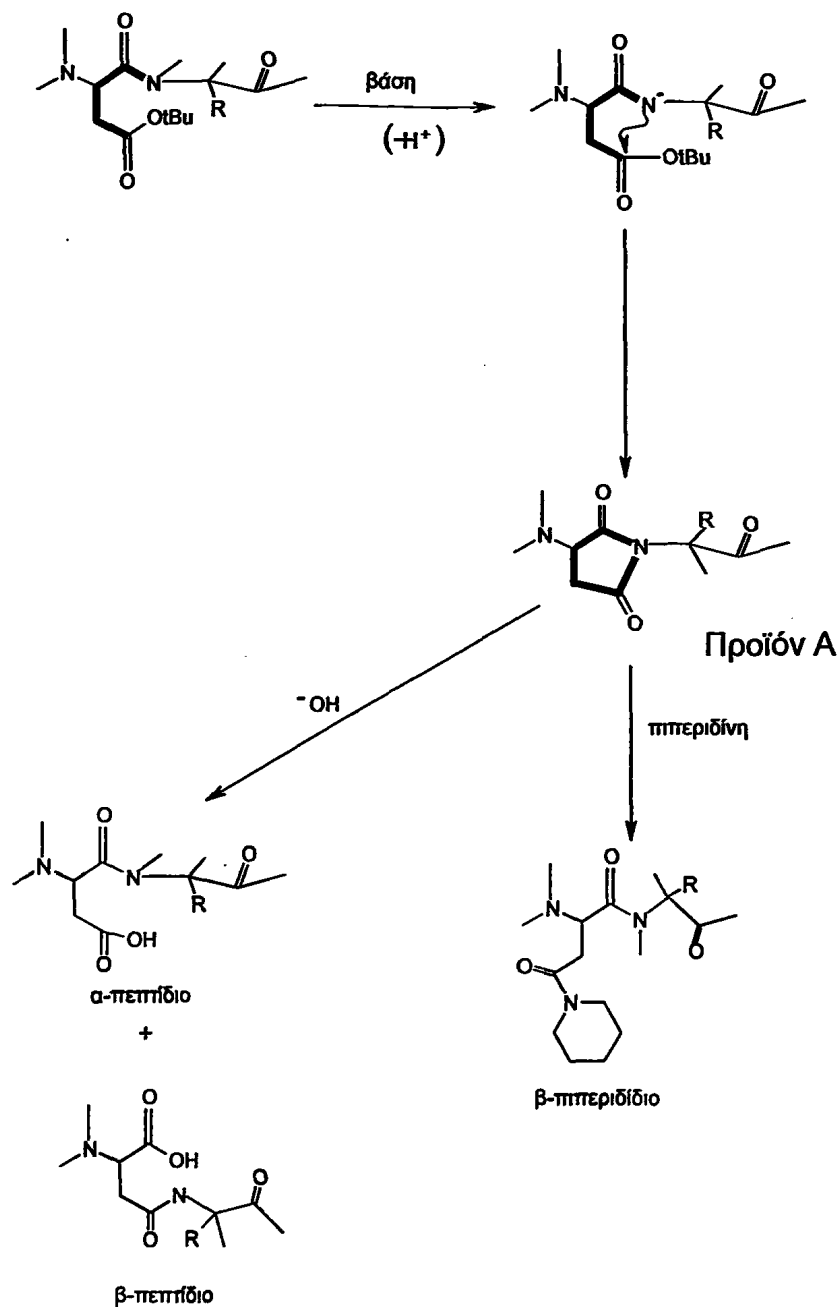
Αμινοξική αλληλουχία	Fmoc-στρατηγική -Asp(OtBu)-	Boc στρατηγική -Asp(OBzl)-
-Asp-Ala-	+	+
-Asp-Asn-	+++	++
-Asp-Gly-	+++	+++
-Asp-Gln-	+	-
-Asp-His-	-	++
-Asp-Ser-	-	+++
-Asp-Thr-	-	++

Από τον Πίνακα 3.3 φαίνεται ότι ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν χρησιμοποιείται η Boc/Bzl στρατηγική, ενώ περιορίζεται όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu στρατηγικής. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το κλείσιμο του δακτυλίου εξαρτάται και από τη θέση των παραπάνω αμινοξικών αλληλουχιών στον πεπτιδικό σκελετό (247). Έτσι όσο πλησιέστερα είναι οι αλληλουχίες αυτές στο C-τελικό άκρο του πεπτιδικού σκελετού τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του ασπαρτιμιδίου που λαμβάνεται, ενώ μειώνεται σημαντικά όσο οι παραπάνω αμινοξικές αλληλουχίες πλησιάζουν το N-τελικό άκρο.

2. Προτεινόμενοι μηχανισμοί σχηματισμού ασπαρταμιδίου κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την Boc/Bzl και την Fmoc/tBu στρατηγική

Ο καταλυόμενος με βάση σχηματισμός ασπαρτιμιδίου παρατηρείται στην Fmoc/tBu στρατηγική κατά τη διάρκεια της απομάκρυνσης της Fmoc ομάδας με τη χρήση πιπεριδίνης. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού ασπαρτιμιδίου φαίνεται στην εικόνα 3.22.





Εικόνα 3.22: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού ασπαρτιμιδίου κατά τη σύνθεση πεπτιδίων με την αμφοτερο/tBu στρατηγική.

Ο σχηματιζόμενος δακτύλιος του υμιδίου (δύο άκυλο-ομάδες είναι συνδεδεμένες με ένα άτομο N, προϊόν Α) μπορεί να

- είτε να σπάσει και ο καρβοξυλικός άνθρακας της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος να δεχθεί πυρηνόφιλη προσβολή από το ζεύγος ηλεκτρονίων του N της πιπεριδίνης

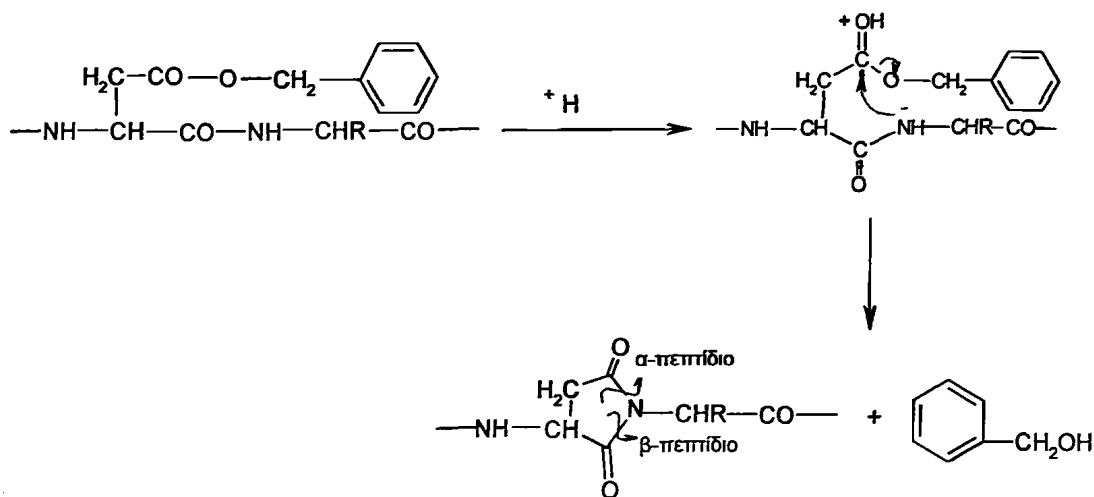
- είτε να υδρολυθεί κατά τον καθαρισμό.

Στην πρώτη περίπτωση-έχουμε το σχηματισμό πιπεριδιδίων η ύπαρξη των οποίων μπορεί να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ευρεθέν Μοριακό Βάρος = αναμενόμενο Μοριακό Βάρος + 67). Στη δεύτερη περίπτωση λαμβάνουμε ένα μίγμα του επιθυμητού πεπτιδίου και ενός προϊόντος στο οποίο το καρβοξύλιο της παράπλευρης αλυσίδας σχηματίζει μέρος του πεπτιδικού σκελετού (β-πεπτίδιο). Σε αυτή τη περίπτωση η ύπαρξη των α και β πεπτιδίων δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS) δεδομένου ότι τα μοριακά ιόντα τους αντιστοιχούν στην ίδια αναμενόμενη μάζα. Η ανίχνευση τους είναι δυνατή και με άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους όπως είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Ο παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός εξαρτάται σημαντικά από τις στερικές και τις ηλεκτρονιακές επιδράσεις της προστατευτικής ομάδας της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος. Έτσι, ομάδες που έλκουν ηλεκτρόνια όπως είναι οι νιτροβενζυλεστέρες είναι πιο ευαίσθητες στο σχηματισμό του πενταμελούς δακτυλίου (ιμιδίου) σε σχέση με τις βενζυλικές προστατευτικές ομάδες. Αντίθετα, ομάδες πλούσιες σε ηλεκτρόνια όπως είναι οι tetr-βουτυλεστέρες είναι πιο ανθεκτικοί στο σχηματισμό ασπαρτιμιδίου. Συνεπώς το κλείσιμο του δακτυλίου επιταχύνεται παρουσία ηλεκτραρνητικών ομάδων, ενώ επιβραδύνεται παρουσία ηλεκτροθετικών ομάδων. Μια τέτοια ομάδα που παρουσιάζει και στερεοχημική παρεμπόδιση είναι η tetr - βουτυλομάδα η οποία θεωρείται και η πλέον κατάλληλη για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος στην μέθοδο της Fmoc/tBu στρατηγικής.

Στην περίπτωση που η σύνθεση του πεπτιδίου γίνεται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Boc/Bzl στρατηγικής και όταν μάλιστα η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με κατεργασία ισχυρών οξέων (HF ή TFMSA-TFA) ο όξινα καταλυόμενος σχηματισμός ασπαρτιμιδίου είναι ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα. Σε αυτή τη περίπτωση ο σχηματισμός του ιμιδίου (πενταμελής δακτύλιος) γίνεται πολύ γρήγορα (Εικόνα 3.23).





Εικόνα 3.23: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού ασπαρτιμιδίου καταλυόμενος από ισχυρά οξέα.

Ωστόσο και εδώ το ποσοστό του σχηματιζόμενου ασπαρτιμιδίου εξαρτάται από στερικούς και πολικούς παράγοντες της προστατευτικής ομάδας της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος. Μια τέτοια ομάδα που έχει την τάση να δίνει ηλεκτρόνια και να αποτρέπει σημαντικά το σχηματισμό ασπαρτιμιδίου είναι η κυκλοξυλ-ομάδα (-OCH_x), η οποία δίνει πολύ πιο σταθερούς εστέρες σε σύγκριση με την βενζυλ-ομάδα και θεωρείται η πιο κατάλληλη για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος στην Boc/Bzl στρατηγική.

β. Τρόποι αντιμετώπισης του παραπάνω προβλήματος

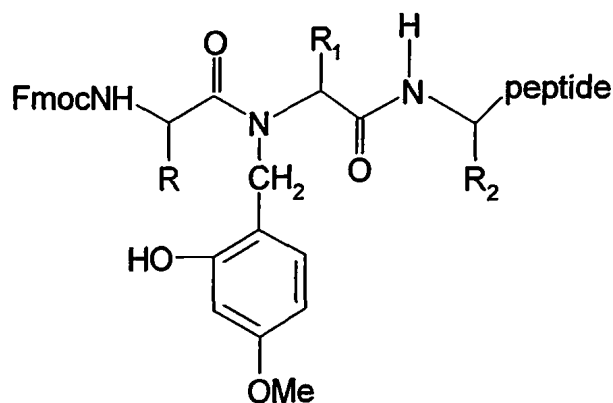
Ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου είναι μια παράπλευρη αντίδραση που πραγματοποιείται σε μεγάλο εύρος όξινων και βασικών συνθηκών και συνεπώς δύσκολα αποφεύγεται. Ο περιορισμός του ωστόσο επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους†

- χρησιμοποιώντας κατάλληλες προστατευτικές ομάδες όπως είναι η χρήση της κυκλοξυλ-ομάδας (-OCH_x) κατά τη σύνθεση πεπτιδίων τόσο με την Boc/Bzl, η εισαγωγή της tetr - βουτυλομάδας ως προστατευτικής ομάδας του ασπαρτικού οξέος όταν ακολουθείται η Fmoc/tBu στρατηγική,
- με προσθήκη 1-υδροξυβενζοτρίαζολίου (HOBt) ή 2,4-δινιτροφαινόλης στο διάλυμα αποπροστασίας της Fmoc ομάδας (0.1 M σε 20% πιπεριδίνη-DMF) όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται με την Fmoc/tBu στρατηγική (248),

- χρησιμοποιώντας κατάλληλες συνθήκες κατά το στάδιο αποκοπής του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται με την Boc/Bzl στρατηγική. Ο χρόνος παραμονής της πεπτιδορητίνης στο διάλυμα αποκοπής, καθώς επίσης και η θερμοκρασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι δύο παράγοντες που μπορούν να αποτρέψουν το σχηματισμό ασπαρτιμιδίου. Οι καλύτερες συνθήκες παραλαβής του πεπτιδίου σε ελεύθερη μορφή είναι στους -15°C για 2 ώρες. Στις συνθήκες αυτές λαμβάνεται μικρό ποσοστό ασπαρτιμιδίου (0,01%/min), καλή απόδοση κοψίματος του πεπτιδίου από τη ρητίνη και ικανοποιητικό ποσοστό απομάκρυνσης των προστατευτικών ομάδων,
- με χρήση κατάλληλων συνδιαλυτών (όπως ανισόλη, τετραϋδροφουράνιο, φαινόλη, p-κρεσόλη, πυριδίνη, τριαιθυλαμίνη, βενζόλιο, τολουόλιο) στο διάλυμα αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη (HF ή TFMSA-TFA) μεταβάλλεται η οξύτητα του ισχυρού οξέος και έτσι ελαχιστοποιείται το ποσοστό σχηματισμού ασπαρτιμιδίου. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται χρησιμοποιώντας ανισόλη, τετραϋδροφουράνιο, φαινόλη, ή p-κρεσόλη ως συνδιαλύτη σε 80% HF (ή TFMSA-TFA). Με τον τρόπο αυτό τόσο η ρητίνη όσο και οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται από το πεπτίδιο σε ικανοποιητικό ποσοστό. Στην περίπτωση που η παράπλευρη αλυσίδα του ασπαρτικού οξέος είναι σε μορφή βενζυλεστέρας η αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων από το πεπτίδιο μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δύο στάδια (χαμηλής – υψηλής συγκέντρωσης HF). Στο στάδιο χαμηλής συγκέντρωσης HF, ο βενζυλεστέρας απομακρύνεται από το ασπαρτικό οξύ και έτσι η καρβοξυλομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος μένει απροστάτευτη. Με αύξηση της συγκέντρωσης HF απομακρύνονται και οι άλλες προστατευτικές ομάδες και τελικά το πεπτίδιο αποκόπεται από την ρητίνη. Έτσι μειώνεται ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου κατά 4 φορές συγκρινόμενος με άμεση κατεργασία σε πυκνό HF. Το ποσοστό μειώνεται ακόμα πιο πολύ στην περίπτωση που η παράπλευρη αλυσίδα του ασπαρτικού οξέος είναι προστατευμένη με την κυκλοεξυλ-ομάδα (-OCHx) (2.8% ο παρατηρούμενος σχηματισμός ασπαρτιμιδίου).

Ένας άλλος τρόπος περιορισμού σχηματισμού ασπαρτιμιδίου προτάθηκε από τους Packman et al, με τον καταλυόμενο είτε από οξέα, είτε από βάσεις σχηματισμό ασπαρτιμιδίου. Αυτός ο τρόπος στηρίζεται στην προστασία του αζώτου του πεπτιδικού σκελετού με την 2-υδροξυ 4-μεθοξυ βενζυλομάδα (Hmb) όπως φαίνεται στην εικόνα 3.24.





όπου R η προστατευμένη παράπλευρη αλυσίδα του ασπαρτικού οξέος

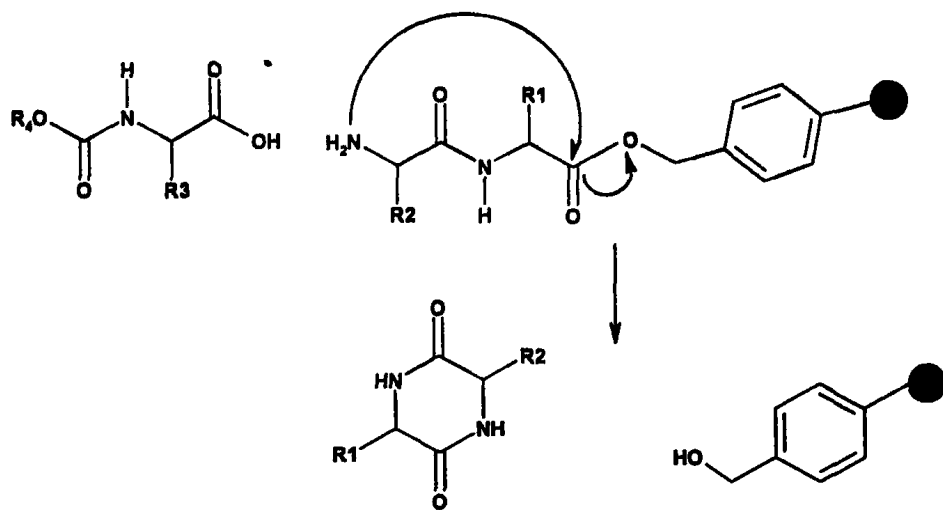
Εικόνα 3.24: Προστασία του αζώτου του αμιδικού δεσμού που έπεται του ασπαρτικού καταλοίπου.

ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΗΣ

Κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση όταν το πεπτίδιο έχει το C τελικό του άκρο ελεύθερο, μερικές φορές η σύζευξη του τρίτου αμινοξέος απαιτεί ειδικό πρωτόκολλο. Επειδή το N της ελεύθερης NH₂ του διπεπτιδίου μπορεί να προσβάλει τον C του καρβοξυλίου που ενώνει το πεπτίδιο με την ρητίνη, σχηματίζοντας το κυκλικό διπεπτίδιο, ανωστό ως δικετοπιπεραζίνη (249).

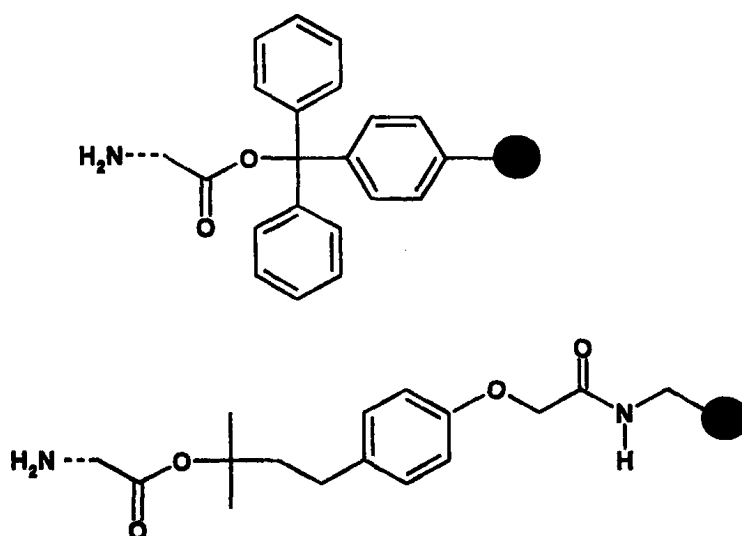
Ο σχηματισμός τους ευνοείται κινητικά και θερμοδυναμικά και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του πεπτιδίου από τη ρητίνη στην οποία έχει συντεθεί το διπεπτίδιο καθώς επίσης και την ταυτόχρονη μείωση της ενσωμάτωσης του τρίτου αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα. Επιπρόσθετα, σχηματίζονται υδροξυλομάδες πάνω στην ρητίνη οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν άλλες παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Ο σχηματισμός των δικετοπιπεραζινών φαίνεται στην εικόνα 3.25.

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν το ποσοστό σχηματισμού δικετοπιπεραζινών στην PPS. Οι σημαντικότεροι είναι ο τύπος του δεσμού μεταξύ της ρητίνης και του πεπτιδίου, η φύση των αμινοξέων του διπεπτιδίου καθώς και η μέθοδος σύζευξης που χρησιμοποιείται. Η ενδομοριακή κυκλοποίηση μπορεί να ευνοηθεί από την παρουσία καλώς αποχωρούντων ομάδων στο σημείο πρόσδεσης του πεπτιδίου με τη ρητίνη. Στην περίπτωση που το πεπτίδιο προσδέεται στην ρητίνη ως βενζυλεστέρας, αυτή η παράπλευρή αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα σε μεγάλο βαθμό. Η παρουσία ομάδων στον αρωματικό δακτύλιο της ρητίνης που αποκουν ηλεκτρόνια έχουν ως αποτέλεσμα την επιδείνωση του προβλήματος.



Εικόνα 3.25: Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης κατά την ενσωμάτωση του τρίτου αμινοξέος.

Το ποσοστό σχηματισμού της δικετοπιπεραζίνης ελαττώνεται όταν ο δεσμός του C-τελικού πεπτιδίου με τη ρητίνη έχει μεγάλη στερική παρεμπόδιση όπως συμβαίνει σε ρητίνες που βασίζονται στην τρίτυλ- ή στην tert-βουτυλ ομάδα (192, 194, 250). Στη σύνθεση πεπτιδίων που το C-τελικό άκρο είναι στην αμιδική μορφή, ο σχηματισμός της δικετοπιπεραζίνης μειώνεται διότι οι βενζυλαμίνες είναι κακές αποχωρούσες ομάδες (Εικόνα 3.26).



Εικόνα 3.26: Ρητίνες που δεν ευνοούν, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, το σχηματισμό δικετοπιπεραζινών.

Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό δικετοπιπεραζινών παίζει η φύση του πρώτου και του δεύτερου αμινοξέος. Σημαντικά προβλήματα μπορούν να δημιουργηθούν από την παρουσία αμινοξέων που μπορούν εύκολα να σχηματίσουν πεπτιδικό δεσμό *cis* διαμόρφωσης, όπως η Pro ή η Gly, αλλά και η παρουσία ενός L- και ενός D- αμινοξέος στο διπεπτίδιο (251). Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μικρότερες οι στεरिकές παρεμποδίσεις για την κυκλοποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό δικετοπιπεραζινών (252).

Ο σχηματισμός δικετοπιπεραζινών καταλύεται από ασθενώς όξινες ή βασικές συνθήκες (253-255). Εκτός ορισμένων περιπτώσεων, η παράπλευρη αυτή αντίδραση μπορεί να ελεγχθεί ακολουθώντας ειδικά πρωτόκολλα είτε για την αποπροστασία της N^α-προστατευτικής ομάδας του διπεπτιδίου, είτε για την σύζευξη του τρίτου αμινοξέος, είτε και για τα δύο. Κατά την Boc στρατηγική ο σχηματισμός δικετοπιπεραζινών σε όξινες συνθήκες μπορεί να προκληθεί κατά την επαφή μεταξύ του ουδέτερου (εξουδετερωμένου) διπεπτιδίου και της καρβοξυ-ομάδας του τρίτου αμινοξέος. Αυτό μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την προσθήκη του αντιδραστήριου σύζευξης καρβοδιϊμιδίου πριν την προσθήκη του τρίτου αμινοξέος, μια μέθοδος γνωστή σαν αντεστραμμένη προσθήκη. Εναλλακτικά μπορεί η εξουδετέρωση να γίνει *in situ* κατά τη διάρκεια της σύζευξης και όχι σε ξεχωριστό βήμα πριν τη σύζευξη. Κατά τη Fmoc στρατηγική οι βασικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται καθώς και το γεγονός ότι δεν γίνεται να έχουμε *in situ* εξουδετέρωση κατά τη διάρκεια της σύζευξης οδηγεί πολλές φορές σε αξιόλογη απώλεια ποσότητας διπεπτιδίου. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα γίνονται τροποποιήσεις στη μέθοδο αποκοπής της Fmoc προστατευτικής ομάδας. Όταν χρησιμοποιείται πιπεριδίνη σε DMF με μείωση του χρόνου το πρόβλημα μειώνεται. Επίσης σαν αντιμετώπιση του προβλήματος έχει αναφερθεί η αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας να γίνεται με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο και μεθανόλη. Ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ρητίνες που αποτρέπουν την ανεπιθύμητη αυτή κυκλοποίηση. Για εναλλακτική μέθοδο αλλά πιο χρονοβόρα είναι η προσθήκη του δεύτερου και τρίτου αμινοξέος ως προστατευμένο διπεπτίδιο.



ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ ΜΕ ΟΞΕΑ

Αλκυλίωση

Τα ελεύθερα καρβοκατιόντα τα οποία παράγονται κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, είτε με υδροφθόριο είτε με τριφθοροξικό οξύ, μπορούν να προσβάλλουν ευαίσθητα αμινοξέα όπως είναι η τρυπτοφάνη, η μεθειονίνη, η κυστεΐνη και η τυροσίνη. Ειδικότερα για την τρυπτοφάνη έχει βρεθεί ότι υπόκειται σε σημαντική αλκυλίωση κατά την αποκοπή με υδροφθόριο όταν βρίσκεται δίπλα σε κυστεΐνη ή μεθειονίνη. Μια πιθανή λύση είναι η προσθήκη περίσσειας τρυπτοφάνης στο μίγμα κατά την αποκοπή (256). Η αποκοπή και αποπροστασία πεπτιδορητινών, οι οποίες συντέθηκαν με την Fmoc/tBu στρατηγική, έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό *tert*-βουτυλο κατιόντων και *tert*-βουτυλοτριφθοροξικού άλατος στο μίγμα της αντίδρασης. Αυτά μπορούν να προκαλέσουν σημαντική *tert*-βουτυλίωση του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης (257). Επιπλέον, πεπτιδορητίνες οι οποίες περιέχουν αργινίνη προστατευμένη με τις Mtt ή Pmc ομάδες, μπορούν επίσης να προκαλέσουν μη αντιστρεπτή αλκυλίωση της τρυπτοφάνης (258, 259).

Αλκυλίωση άλλων αμινοξέων, ειδικά του θειοαιθέρα της μεθειονίνης, και σε μικρότερο βαθμό, των παράπλευρων αλυσίδων της τυροσίνης και της κυστεΐνης, μπορεί να συμβεί κατά την αποκοπή αν και η *tert*-βουτυλίωση της μεθειονίνης είναι αντιστρεπτή (260). Η αποπροστασία της Cys(Trt) με τριφθοροξικό οξύ είναι αντιστρεπτή απουσία μορίων παγίδων (scavengers) και η προσθήκη σιλανίων έχει προταθεί ώστε να αποφευχθεί η επαναλκυλίωση (261).



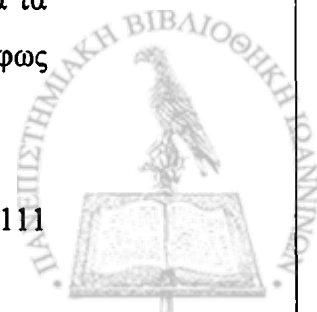
4° ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CD)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για να κατανοήσουμε επακριβώς το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού, πρέπει προηγουμένως να έχουμε υπόψη μας τις έννοιες: ηλεκτρομαγνητικά κύματα και πόλωση φωτός. Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι περιοδικές μεταβολές ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων στο χώρο και στο χρόνο, τα οποία διαδίδονται με την ταχύτητα του φωτός $c = 3 \times 10^8$ m/sec (δυναμικότητα της φύσης του φωτός ως κύμα και ως σώμα). Σε οποιοδήποτε σημείο μιας δέσμης φωτός, τα δυο αυτά πεδία -ηλεκτρικό και μαγνητικό- είναι πάντα κάθετα τόσο μεταξύ τους όσο και ως προς τη διεύθυνση διάδοσης τους και μάλιστα με διαφορά φάσης μηδέν. Εάν τώρα θεωρήσουμε ότι αυτή η δέσμη φωτός τέμνεται με ένα συγκεκριμένο σημείο στο χώρο, το οποίο βρίσκεται σε επίπεδο κάθετο ως προς την κατεύθυνση διάδοσής της, τότε το ηλεκτρικό της πεδίο (αντίστοιχα και το μαγνητικό) μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα, το οποίο εκτελεί ταλάντωση πάνω σε έναν νοητό άξονα. Το μήκος και η διεύθυνση του διανύσματος αντιπροσωπεύουν την ισχύ και τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου στο συγκεκριμένο σημείο. Αν το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου ταλαντώνεται κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής, τότε τα κύματα ονομάζονται επίπεδα πολωμένα ή γραμμικά πολωμένα κύματα.

Επομένως, πόλωση είναι η ταλάντωση ενός κύματος σε μια προτιμητέα διεύθυνση και αν προκειμένου πάνω σε μια ευθεία γραμμή, η οποία ονομάζεται και άξονας πόλωσης του κύματος. Η πόλωση είναι ένα φαινόμενο δύσκολο στην περιγραφή του, γιατί έχει να κάνει με πολύ αφαιρετικές έννοιες όπως είναι η κυματική φύση του φωτός και η ταλάντωση στοιχειωδών δομικών λίθων της ύλης.

Το φυσικό φως λοιπόν (όπως είναι το φως του ήλιου) είναι μη πολωμένο. Υπάρχει μάλιστα ένα τρόπο να μετατρέψουμε το μη πολωμένο φως σε πολωμένο, δηλαδή να πάρουμε ένα συνιστάμενο κύμα το οποίο ταλαντώνεται σε διάφορες τυχαίες διευθύνσεις και να το κάνουμε να ταλαντώνεται σε μία και μοναδική προτιμητέα διεύθυνση. Ένας τεχνητός τρόπος για να γίνει αυτό είναι με ειδικά υλικά τα οποία ονομάζονται «πολωτές» ή «φύλλα Polaroid». Τα Polaroid κατασκευάζονται έτσι ώστε τα άτομά τους να είναι διατεταγμένα με τέτοιο τρόπο που να παρουσιάζουν έναν «οπτικό άξονα», ή αλλιώς μια διεύθυνση στην οποία «επιτρέπεται» η ταλάντωση των προσπιπτόντων κυμάτων. Περιληπτικά, όταν μια δέσμη φωτός πέσει πάνω στα πλακίδια Polaroid, αυτά αφήνουν να περάσουν μόνο εκείνα τα κύματα που ταλαντώνονται παράλληλα με τον οπτικό άξονά τους (του φύλλου). Έτσι, το φως



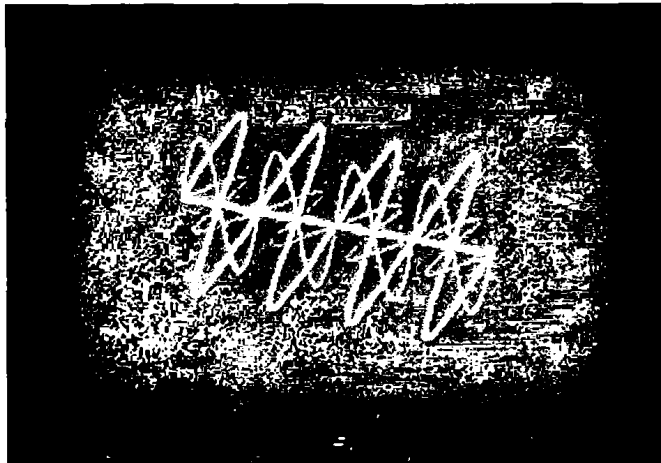
που βγαίνει από τους πολωτές είναι αναγκαστικά γραμμικά πολωμένο κατά τη διεύθυνση του οπτικού τους άξονα.

Το κύμα που τελικά περνά από τον πολωτή είναι μικρότερης έντασης από το αρχικό και ο άξονας πόλωσης του είναι στραμμένος κατά γωνία θ σε σχέση με τον αρχικό και φυσικά παράλληλος με τον οπτικό άξονα του πολωτή. Έτσι, ανάλογα με τη γωνία που σχηματίζει ο άξονας πόλωσης του προσπίπτοντος κύματος με τον οπτικό άξονα του πολωτή, κάποιο ποσοστό της έντασης του προσπίπτοντος κύματος θα περάσει από το φίλτρο με αποτέλεσμα το ποσοστό της να μειωθεί, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\text{Ένταση_τελική} = \text{Ένταση_αρχική} \times (\cos\theta)^2$$

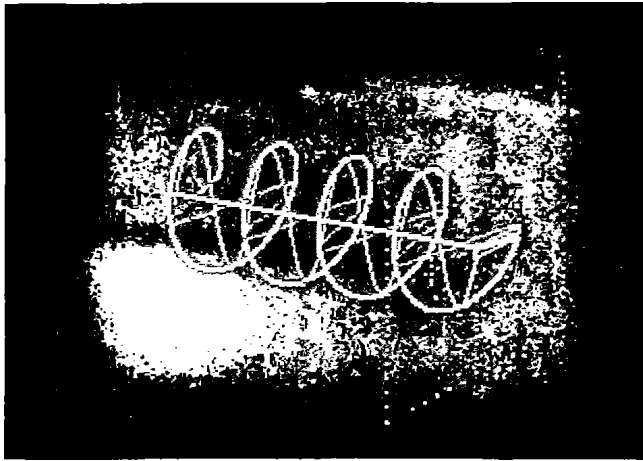
όπου θ είναι η γωνία μεταξύ του άξονα πόλωσης και του οπτικού άξονα του πολωτή.

Στην περίπτωση που δύο ευθύγραμμα πολωμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με το ίδιο πλάτος και μήκος ταλαντώνονται κάθετα και στην ίδια φάση, τότε προκύπτει ένα τρίτο γραμμικά πολωμένο κύμα που σχηματίζει γωνία 45° με τα αρχικά κύματα. Το διάνυσμα του τρίτου κύματος αποτελεί τη συνισταμένη των διανυσμάτων των δυο αρχικών κυμάτων.



Εικόνα 4.1: Αναπαράσταση του γραμμικού πολωμένου κύματος (γαλάζια γραμμή).

Ακόμα μια περίπτωση είναι όταν τα δύο γραμμικά πολωμένα κύματα εμφανίζουν μια διαφορά φάσης 90° , δηλαδή το ένα κύμα βρίσκεται στο μέγιστό του, ενώ το άλλο τέμνει τη γραμμή μηδέν και τότε προκύπτει ένα ειδικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το κυκλικά πολωμένο. Σε μια τρισδιάστατη εικόνα, το κύμα αυτό σχηματίζει σπειροειδή γραμμή και το διάνυσμα του ηλεκτρικού του πεδίου περιστρέφεται σε κύκλο δεξιόστροφα, διατηρώντας το μήκος του σταθερό.



Εικόνα 4.2: Αναπαράσταση του κυκλικά πολωμένου κύματος (γαλάζια γραμμή).

Κατά τον ίδιο τρόπο, όταν τα δυο κύματα εμφανίζουν διαφορά φάσης -90° , τότε προκύπτει ένα κυκλικά πολωμένο κύμα, που σχηματίζει μια αριστερόστροφη σπείρα και το άνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου περιστρέφεται αντίστροφα από τους δείκτες του ρολογιού. Για να ληφθούν, διαχωρίζουμε το δεξιόστροφο από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Η αναπόθεση των δυο αυτών κυμάτων με το ίδιο πλάτος το ένα πάνω στο άλλο οδηγεί σε ένα επίπεδα πολωμένο φως.

Αναλυτικότερα, το επίπεδο ημιτονοειδές κύμα του πολωμένου φωτός που μπορεί να παρασταθεί γραφικά με το άνυσμα E του ηλεκτρικού πεδίου, μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα δυο ακτίνων κυκλικά πολωμένου φωτός με το ίδιο μήκος κύματος και ένταση, που αντιστρέφονται με τα ανύσματα E_L και E_R (αριστερόστροφης και δεξιόστροφης αντίστοιχα συνιστώσας) που διαγράφουν μια ελλειψοειδή τροχιά με αντίθετη φορά.

Όταν το πολωμένο φως διέρχεται μέσα από συμμετρικές ουσίες ή διαλύματα αυτών, οι ακτίνες E_L και E_R έχουν το ίδιο μήκος κύματος και την ίδια ένταση και τα ανύσματα E_L και E_R είναι ίσα, το δε άθροισμα τους δίνει το επίπεδα πολωμένο φως. Όταν το υλικό διαμέσου του οποίου διέρχεται το επίπεδα πολωμένο φως είναι μια οπτικά ενεργή ουσία ή διάλυμα οπτικής, τότε οι δυο κυκλικά συνιστώσες E_L και E_R προχωρούν με διαφορετική ταχύτητα και τους αντιστοιχούν διαφορετικοί δείκτες διάθλασης n_L και n_R , με αποτέλεσμα να στραφεί το επίπεδο πόλωσης κατά μια γωνία α . Σε μια τέτοια περίπτωση, το υλικό μέσο παρουσιάζει το φαινόμενο της κυκλικής διάθλασης (birefringence circulaire).

Η γωνία στροφής α , της ευθύγραμμο πολωμένης ταλάντωσης υπολογίζεται από τον νόμο του Fresnel:

$$(\alpha_{\text{rad}}) = \frac{\pi}{\lambda} (n_L - n_R)$$

όπου

n_L, R = δείκτες διάθλασης για το αριστερόστροφο και δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως αντίστοιχα

l = μήκος διαμέσου του οποίου διέρχεται το φως σε cm

λ = μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου πολωμένου φωτός

Συνήθως χρησιμοποιούνται οι όροι:

Ειδική στροφική ικανότητα ή ειδική στροφή

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{lc}$$

όπου

α = γωνία που εκφράζεται σε βαθμούς

l = μήκος που εκφράζεται σε dm

c = συγκέντρωση που εκφράζεται σε g/ml

Μοριακή στροφική ικανότητα

$$[M] = \frac{[\alpha]M}{100}$$

όταν η γωνία α αναφέρεται σε συγκέντρωση 1 M.

Στην περιοχή απορρόφησης, οι ακτίνες του προς τα δεξιά (E_R) και προς τα αριστερά (E_L) κυκλικά πολωμένου φωτός δεν διαδίδονται μόνο με διαφορετικές ταχύτητες ($n_L \neq n_R$) μέσα στα ασύμμετρα μόρια, αλλά απορροφώνται διαφορετικά, δηλαδή τα ανύσματα E_L και E_R γίνονται συγχρόνως και άνισα, οπότε η συνισταμένη E διαγράφει μια έλλειψη, της οποίας η γωνία θ δίνεται από τη σχέση:

$$\epsilon\phi\theta = \frac{E_L - E_R}{E_L + E_R}$$

και το φως που εξέρχεται είναι ελλειπτικά πολωμένο

$$\text{Επειδή: } E_L - E_R \ll \frac{E_L + E_R}{2} \rightarrow \theta_{\text{rad}} \approx \epsilon\phi\theta$$



$$\theta_{\text{rad}} = \frac{\ln 10}{4} cl(\epsilon_L - \epsilon_R) \rightarrow \theta_{\text{deg}} \approx 33 cl(\epsilon_L - \epsilon_R)$$

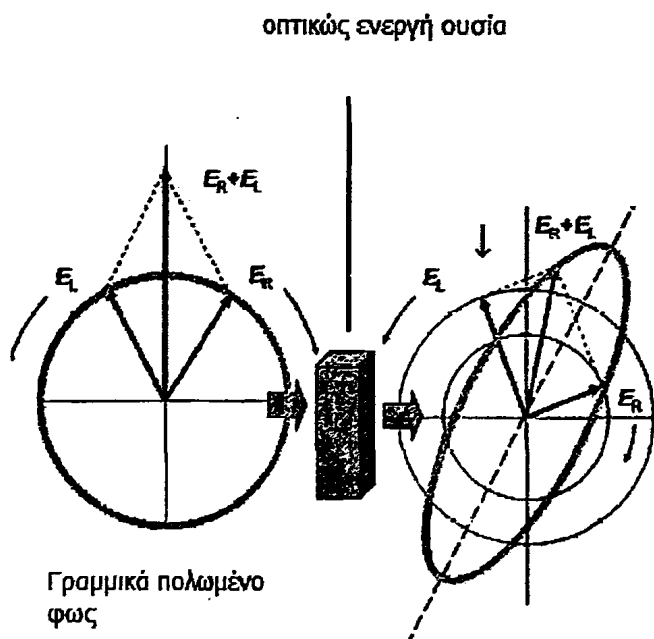
Ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης είναι η $\epsilon\phi\Theta$ όπου Θ η γωνία ελλειπτικότητας ή απλώς ελλειπτικότητα, η οποία είναι ανάλογη των διαφορών των μοριακών συντελεστών απορρόφησης.

$$\theta = \frac{\theta_{\text{deg}}}{cl} 100 \rightarrow \Theta = 3300 \Delta\epsilon$$

στην πράξη χρησιμοποιείται ο όρος μοριακή ελλειπτικότητα $[\Theta]$:

$$[\Theta] = \frac{\theta_{\text{deg}}}{cl} 100$$

Η διαφορά απορρόφησης $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ συναρτήσει του μήκους κύματος λ , ονομάζεται κυκλικός διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD).



Εικόνα 4.3: Φαινόμενο κυκλικού διχρωϊσμού. E_R και E_L τα διανύσματα των ηλεκτρικών πεδίων που αντιστοιχούν στο δεξιόστροφο και στο αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως.

Για να μελετηθεί μια ουσία με τη φασματοσκοπία CD θα πρέπει να διαθέτει χρωμοφόρες ομάδες. Χρωμοφόρες είναι ομάδες ατόμων μέσα σε ένα μόριο, οι οποίες απορροφούν ενέργεια μιας ορισμένης ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται εύκολα με κάποια φασματοσκοπική μέθοδο. Μια πρωτεΐνη περιλαμβάνει γενικά πολλές χρωμοφόρες ομάδες. Στη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σχετική θέση των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων.

Οι χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω δύο κατηγορίες:

1. Αυτές που από μόνες τους είναι ασύμμετρες
2. Αυτές που είναι συμμετρικές αλλά τοποθετούνται σε ασύμμετρο περιβάλλον

Η καρβονυλομάδα των α-αμινοξέων αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας χρωμοφόρων ομάδων. Στην περίπτωση ενός αμιδικού δεσμού, η παρουσία ενός ασύμμετρου κέντρου (α-άτομο C) εισάγει μια ασυμμετρία στην ηλεκτρονιακή κατανομή. Μια άλλη χρωμοφόρος ομάδα, η οποία είναι συμμετρική, αλλά συχνά βρίσκεται σε ασύμμετρο περιβάλλον είναι ο φαινολικός δακτύλιος της τυροσίνης.

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

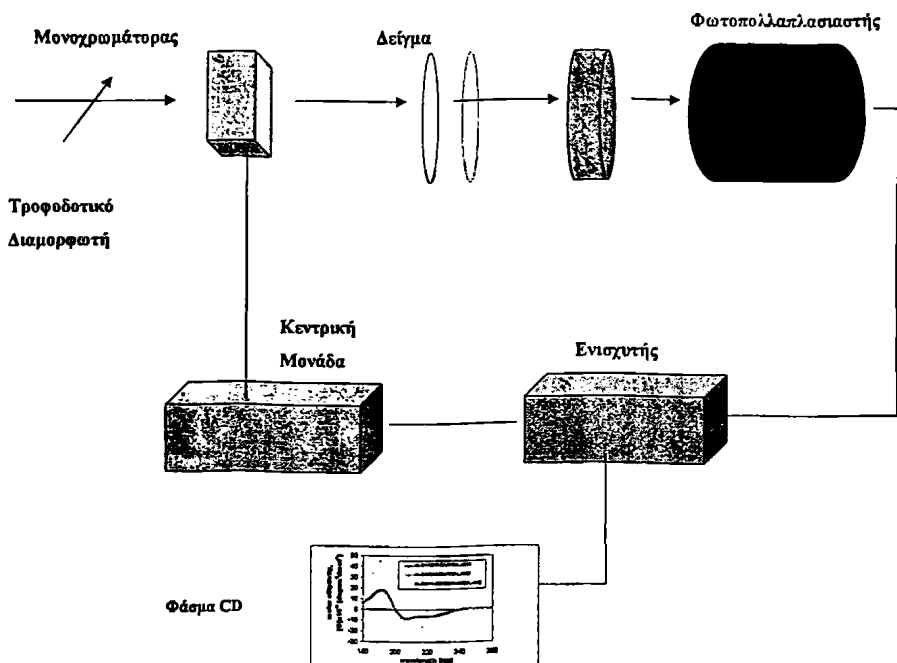
Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού, που παρατηρείται όταν μια οπτικώς ενεργή ουσία απορροφά σε διαφορετικό βαθμό το αριστερόστροφο και δεξιόστροφο πολωμένο φως, καταγράφεται με τη βοήθεια ενός φασματοφωτομέτρου CD.

Το όργανο πρέπει να έχει τη δυνατότητα να μετράει με ακρίβεια στο μακρινό UV (200-300 nm), σε μήκη κύματος μεγαλύτερα της περιοχής 170-190 nm. Οι πιο διαδεδομένες συσκευές είναι τα μοντέλα Jasco και Jobin Yvon. Στον οπτικό θάλαμο διοχετεύεται ξηρό άζωτο, απαλλαγμένο από οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός όζοντος σε μικρά μήκη κύματος.

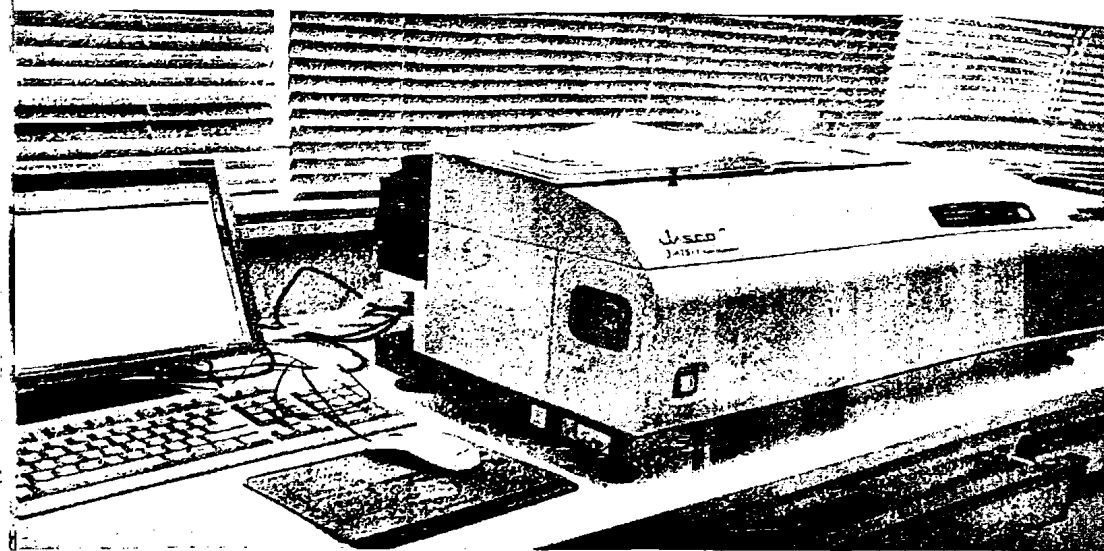
Τα βασικά τμήματα ενός CD φασματοφωτομέτρου είναι τα εξής:

- Λάμπα ξένου υψηλής πίεσης
- Μονοχρωμάτορας
- Τμήμα ηλεκτρονικού ελέγχου





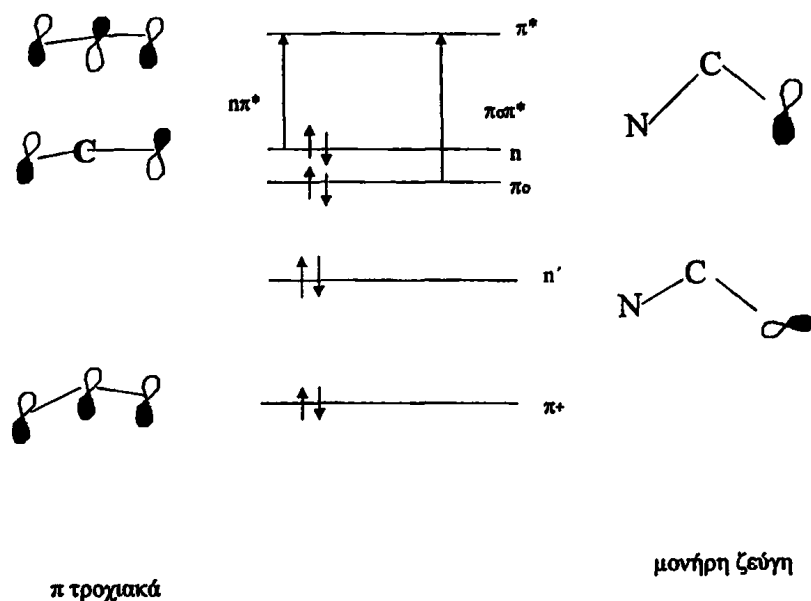
Εικόνα 4.4: Τυπική διάταξη φασματοφωτόμετρου CD.



Εικόνα 4.5: Απεικόνιση της συσκευής του CD φασματοφωτόμετρου Jasco-815 από το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδικών αναλόγων της παρούσας διατριβής.

ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ CD

Η χρωμοφόρος ομάδα που συνήθως μελετάται με φασματοσκοπία CD στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες είναι ο αμιδικός δεσμός, ο οποίος διαθέτει 3π κέντρα και επομένως φέρει 3π-τροχιακά.



Εικόνα 4.6: Μοριακά τροχιακά και ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις του αμιδικού δεσμού.

Με 4π-ηλεκτρόνια θα υπάρχουν $2\pi^*$ μεταπτώσεις, η γνωστή γύρω στα 190 nm, NV_1 ή $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ διέγερση, και η άλλη σε υψηλότερη ενέργεια, NV_2 ή $\pi_+ \rightarrow \pi^*$ διέγερση, που δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί.

Εκτός των π-τροχιακών, υπάρχουν δυο μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων στο καρβονυλικό οξυγόνο. Το μονήρες ζεύγος υψηλής ενέργειας (n τροχιακό) είναι σε μεγάλο βαθμό (80-90%) εντοπισμένο στο καρβονυλικό σε ένα σχεδόν καθαρά 2p-τροχιακό, που ο άξονας του βρίσκεται πάνω στο επίπεδο του αμιδικού δεσμού και έχει κατεύθυνση κάθετη στον καρβονυλικό δεσμό. Το άλλο μονήρες ζεύγος (n') είναι σαφώς μικρότερης ενέργειας και αναμιγνύεται πιο ισχυρά με τα σ-τροχιακά. Έχει και τους 2 χαρακτήρες 2s και 2p, ο δε άξονάς του προσανατολίζεται κατά μήκος της διεύθυνσης του καρβονυλικού δεσμού.

Η $n \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση είναι η μετάπτωση μικρότερης ενέργειας στον αμιδικό δεσμό και εμφανίζεται γύρω στα 220 nm. Η $n' \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση δεν έχει ταυτοποιηθεί, αλλά κάποιοι ημιεμπειρικοί υπολογισμοί μοριακών τροχιακών (262), την τοποθετούν σε ενέργεια ακριβώς πάνω από αυτήν της μετάπτωσης $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 190 nm.

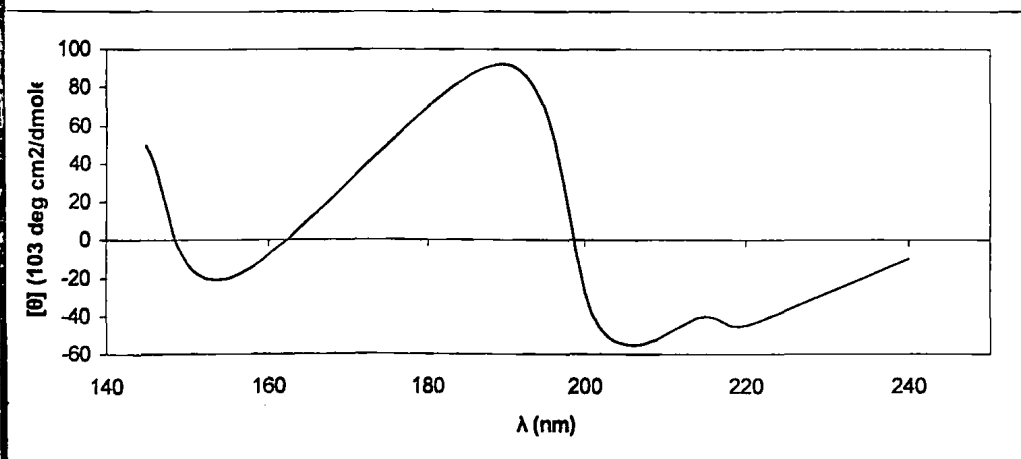


Η ακριβής τιμή του μήκους κύματος της αμιδικής μετάπτωσης π^* επηρεάζεται από τη φύση του διαλύτη (263) και κυμαίνεται από ~225 nm σε μη πολικούς διαλύτες, μέχρι ~115 nm σε πολικούς διαλύτες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Το ακριβές μήκος κύματος για την μετάπτωση π^* (263) εξαρτάται από το αν το αμίδιο είναι δευτεροταγές (190 nm) όπως σε όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεϊνών εκτός από αυτών του τύπου X-Pro. Η επίδραση του διαλύτη στο μήκος κύματος της π^* μετάπτωσης είναι σαφώς μικρότερη από τι στην αντίστοιχη περίπτωση της π^* μετάπτωσης. Η τιμή της π^* μετάπτωσης μετατοπίζεται μόνο κατά 2-3 nm προς το ερυθρό όταν ένα αμίδιο μεταφέρεται από το κλωροφόρμιο (σαν διαλύτης) στο νερό.

α-έλικα

Η διαμόρφωση της α-έλικας έχει συγκεκριμένο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. Το φάσμα CD της α-έλικας (264) φαίνεται στην εικόνα 4.7.

Η θεωρητική επεξεργασία αυτού του φάσματος έρχεται σε συμφωνία με τις δυο χαρακτηριστικές αμιδικές ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η αρνητική κορυφή με μέγιστο στα 222 nm ταυτοποιήθηκε (265) ότι ανήκει



Εικόνα 4.7: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του poly(GluOMe) σε εξαφθοροπροπανόλη-2 σύμφωνα με τους Johnson και Tinoco.

στην π^* διέγερση, η οποία δίνει αρνητική γωνία στρέψης για αυτή τη διέγερση σε μια αξιόστροφη α-έλικα.

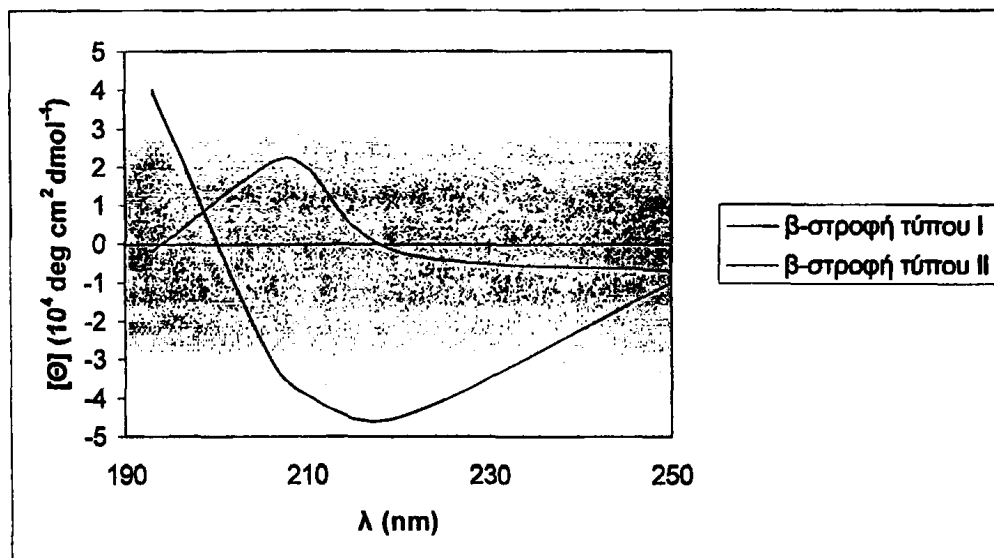
Η αρνητική κορυφή στα 208 nm και η θετική στα 190 nm προκύπτουν από τη σχέση της κορυφής που οφείλεται στην π^* διέγερση, σε ένα μεγάλο μήκους κύματος συστατικό

που είναι πολωμένο κατά μήκος του άξονα της έλικας στα 208 nm και ενός μικρού μήκους κύματος εκφυλισμένου ζεύγους κορυφών, πολωμένο κάθετα στον άξονα της έλικας στα 190 nm (εικόνα 4.7) όπως προβλέφθηκε από τον Moffitt (266).

Η θετική προεξοχή στα 175 nm και οι δυο κορυφές σε ακόμα μικρότερα μήκη κύματος δεν έχουν προσδιοριστεί οριστικά, αν και οι Johnson και Tinoco (264) πρότειναν ότι η θετική προεξοχή στα 175 nm οφείλεται σε μια $n\sigma^*$ διέγερση του καρβοξυλίου.

2. β-στροφή

Η β-στροφή είναι ένα σημαντικό δομικό στοιχείο της διαμόρφωσης των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Οι δύο κύριοι τύποι β-στροφής, τύπου I και τύπου II, που μπορεί κανείς να συναντήσει σε πεπτίδια και πρωτεΐνες εμφανίζουν φάσματα CD όπως αυτά που απεικονίζονται στην εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8: CD φάσμα β-στροφής. Τύπος I β-στροφής του κυκλο(L-Ala-L-Ala-Aca) (Aca=α-αμινοκαπροϊκό οξύ) και τύπος II του κυκλο(L-Ala-D-Ala-Aca). Τα δυο φάσματα CD ελήφθησαν σε υδατικά διαλύματα στους 22°C.

Το φάσμα CD του τύπου I β-στροφής, ποιοτικά μοιάζει με αυτό της α-έλικας σε μεγάλα μήκη κύματος με τη διαφορά ότι η θετική κορυφή σε μικρότερα μήκη κύματος είναι ασθενέστερη στα φάσματα των β-στροφών. Η β-στροφή τύπου II δίνει φάσμα παρόμοιο με ένα β-πτυχωτό φύλλο με τη διαφορά ότι είναι μετατοπισμένο προς το ερυθρό κατά 5-10 nm.

Ο Woody (267) χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία του Bayley (268) προέβλεψε το φάσμα CD πολλών β-στροφών. Λόγω της ποικιλίας των διαμορφώσεων που μπορούν να



θεωρηθούν ως β-στροφές, μια ποικιλία CD φασματικών τύπων προβλέφθηκαν, αλλά οι περισσότερες β-στροφές του τύπου I και II έδωσαν ένα φάσμα που παρατηρείται μόνο στον τύπο II β-στροφής. Αυτή η πρόβλεψη έγινε πριν οι β-στροφές χαρακτηριστούν πειραματικά με CD. Αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι σωστός ο χαρακτηρισμός για τύπου II β-στροφές, αλλά όχι για τις τύπου I. Μοντέλα β-στροφών με την αλληλουχία κυκλο(L-Ala-X-Aca), όπου X=Gly, L-Ala ή D-Ala και Aca=ε-αμινοκαπροϊκό οξύ, έχουν εξεταστεί (269, 270) με υπολογισμούς ελαχιστοποίησης ενέργειας, NMR, IR και φάσματα CD. Όλα αυτά οδηγούν στην ταυτοποίηση ενός τύπου I β-στροφής με X=L-Ala, ενός τύπου II β-στροφής με X=D-Ala και ενός μίγματος τύπων I και II για X=Gly. Θεωρητικοί υπολογισμοί προέβλεψαν ένα φάσμα τύπου I και τύπου II β-στροφής και αντίστροφα. Αυτές οι ασυμφωνίες προκύπτουν, κατά κύριο λόγο, από προσεγγίσεις με τη μέθοδο του Bayley (π.χ. αγνοείται η επίδραση του υδατικού διαλύτη (271)).

2. Τυχαία διαμόρφωση

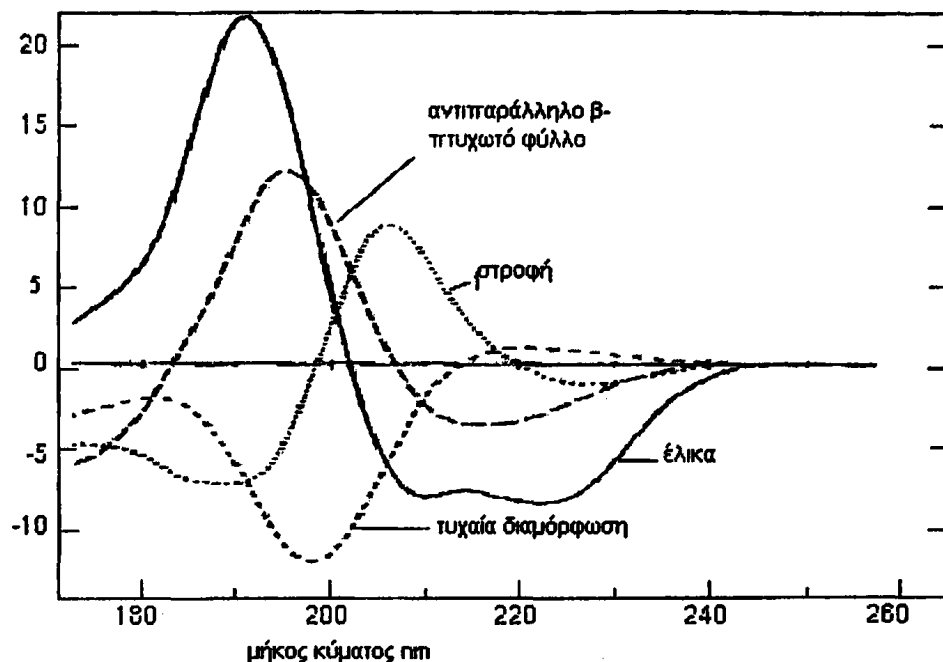
Τα πεπτίδια των οποίων η διαμόρφωση δεν παρουσιάζει κάποια κανονικότητα, θα μπορούσαν αναμενόμενο να έχουν αρκετά μεταβλητό φάσμα CD. Παρόλα αυτά, η τυχαία διαμόρφωση παρουσιάζει συγκεκριμένο τύπο φάσματος με μια μεγάλη αρνητική κορυφή κοντά στα 220 nm και μια δεύτερη χαρακτηριστική σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, κοντά στα 200 nm, η οποία είναι είτε θετική είτε αρνητική. Η ποικιλία των CD φασμάτων που παρατηρούνταν εκφράζεται περισσότερο με μεταβολές στην ένταση των δυο κορυφών.

Το CD φάσμα της poly(Lys) σε ουδέτερο pH μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με το αντίστοιχο της poly(Pro) II, όπως περιγράφεται από τους Tiffany και Krimm (272), οι οποίοι πρότειναν ότι τα πολυπεπτίδια που υιοθετούν τυχαία διαμόρφωση με το συγκεκριμένο τύπο φάσματος εμφανίζουν σε σημαντικό βαθμό έλικα τύπου poly(Pro) II, με τη μορφή μικρών τμημάτων πεπτιδίων. Αυτή η πρόταση έτυχε μεγάλης υποστήριξης (273), ειδικά από μελέτες O (274), ηλεκτρονικά CD σε χαμηλές θερμοκρασίες (275) και από αναλύσεις της δομής τμηματικών πρωτεϊνών (276).

Ο άλλος τύπος πολυπεπτιδίου που υιοθετεί τυχαία διαμόρφωση όπως αναφέρθηκε εμφανίζει επίσης μια ισχυρή αρνητική κορυφή γύρω στα 200 nm, αλλά η κορυφή στα 220 nm εμφανίζει θετική τιμή. Αυτός ο τύπος φάσματος αντανακλά την κυριαρχία αμινοξέων που συμμετέχουν σε περιοχές α-έλικας και β-πτυχωτού φύλλου στο χάρτη του Ramachandran και



πιθανά προσλαμβάνουν μια πιο τυχαία διαμόρφωση σε σχέση με τα πολυπεπίδια του προηγούμενου τύπου (που εμφανίζουν CD φάσμα παρόμοιο με αυτό της poly(Pro)).



Εικόνα 4.9: Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για διάφορες δευτεροταγείς δομές.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η σχέση μεταξύ της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης και του αντίστοιχου φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού (CD) έχει περιγραφεί και συζητηθεί σε πολλά άρθρα ανασκόπησης (273, 277-279).

Γενικές αρχές

Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού μιας πρωτεΐνης $S(\lambda)$ μπορεί να αναλυθεί με τη βοήθεια μίας βάσης δεδομένων φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού $B_k(\lambda)$ ως εξής:

$$S(\lambda) = \sum_{k=1}^N f_k B_k(\lambda)$$

που N είναι ο αριθμός των δευτεροταγών δομών και f_k είναι το κλάσμα της k δευτεροταγούς δομής. Οι περιορισμοί για το f_k είναι:

$$\sum_{k=1}^N f_k = 1 \text{ και } f_k \geq 0$$

Τα φάσματα της βάσης δεδομένων $B_k(\lambda)$ υπολογίζονται από τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού ενός συνόλου πρωτεϊνών αναφοράς γνωστής τρισδιάστατης δομής (συνήθως από X-ray κρυσταλλογραφική ανάλυση).

Οι όροι φάσμα βάσης δεδομένων και φάσμα αναφοράς φαίνεται ότι έχουν αντιστραφεί. Αρχικά το φάσμα αναφοράς ορίζονταν ως το φάσμα για την καθαρή δευτεροταγή δομή (280) π.χ. 100% α-έλικα, και φάσμα της βάσης δεδομένων ως ένας συνδυασμός φασμάτων (281) με στατιστικό βάρος δευτεροταγών δομών. Σήμερα, ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν τον όρο φάσμα αναφοράς αναφερόμενοι στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού μιας πρωτεΐνης και ονομάζουν το σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς μια βάση δεδομένων.

Συχνά χρησιμοποιούνται δυο μεγέθη για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας κυκλικού διχρωϊσμού αλλά και για να συγκριθούν δύο μεθοδολογίες μεταξύ τους. Τα δυο μεγέθη είναι ο συντελεστής συσχέτισης (r) και η ρίζα του τετραγώνου (σ). Τιμές κοντά στο r κοντά στη μονάδα υποδηλώνει επιτυχή πρόβλεψη του περιεχομένου ποσοστού της δευτεροταγούς δομής. Μια τιμή κοντά στο μηδέν υποδηλώνει μεγάλο ποσοστό σφάλματος και τέλος r που πλησιάζει το -1 υποδηλώνει πλήρη διαφωνία μεταξύ της ανάλυσης του CD φάσματος και της X-ray κρυσταλλογραφίας.

Ο υπολογισμός της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης και η σύγκριση των διαφορετικών μεθοδολογιών εξαρτώνται:

1. Από την επιλογή των CD φασμάτων των πρωτεϊνών αναφοράς, τη φύση και τον αριθμό των πρωτεϊνών αναφοράς που θα επιλεγούν καθώς επίσης και το εύρος του μήκους κύματος για το οποίο καταγράφεται το φάσμα και συλλέγονται στοιχεία
2. Από τη μεθοδολογία προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών αναφοράς (X-ray κρυσταλλογραφία, NMR, κλπ)
3. Από τη μαθηματική μεθοδολογία (μαθηματικό μοντέλο) επεξεργασίας του CD φάσματος



ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ CD

1. Πολυγραμμική μέθοδος παλινδρόμησης (Multilinear Regression Method)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το CD φάσμα μιας ουσίας αναλύεται ως γραμμικός συνδυασμός φασμάτων CD μιας βάσης δεδομένων, η οποία αποτελείται είτε από πολυπεπτίδια γνωστής δομής (282, 283) είτε από πρωτεΐνες με κρυσταλλική δομή που έχει αναλυθεί (284). Η προσομοίωση του CD φάσματος της ουσίας στηρίζεται στη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (282).

Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να προβλεφθεί το επί % ποσοστό ελικοειδούς δομής με σφάλμα 5%, για τις πρωτεΐνες με μεγάλο ποσοστό τυχαίας διαμόρφωσης (285).

Επεκτείνοντας το εύρος των μετρήσεων μέχρι τα 165 nm εκτός από την α-έλικα, το β-φύλλο και την τυχαία διαμόρφωση είναι εφικτό να αναλυθούν και δομές β-στροφών (282) τύπου I, II, III. Μολονότι η πρόβλεψη για το περιεχόμενο ποσοστό της α-έλικας είναι ικανοποιητικό, οι προβλέψεις για το β-φύλλο και τη β-στροφή εμπεριέχουν σφάλματα. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν λαμβάνει υπόψη της, τις συνεισφορές και άλλων χρωμοφόρων ομάδων (π.χ. αρωματικά αμινοξέα, δισουλφιδικές γέφυρες). Τα τρία προγράμματα που χρησιμοποιούν τη μέθοδο αυτή είναι το MLR, το Gand F και το LINCOMB (278).

2. Μέθοδος Singular Value Decomposition (SVD)

Κατά την αρχική σύλληψη της ιδέας της μεθόδου, οι εμπνευστές της Hennessey και Johnson (281) το 1981 χρησιμοποίησαν τα CD φάσματα μεταξύ των 178-260 nm από 15 πρωτεΐνες αναφοράς γνωστής δομής από X-ray κρυσταλλογραφικά δεδομένα και ενός πολυπεπτιδίου (Glu)_n. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, οκτώ τύποι δευτεροταγούς δομής μπορούν να υπολογιστούν: α-έλικα, παράλληλο και αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο, β-στροφές τύπου I, II, III και τυχαία διαμόρφωση. Το υπολογιστικό πρόγραμμα της μεθόδου είναι το SVD (278). Τα αποτελέσματα εμφανίζουν βελτιωμένη πρόβλεψη για το περιεχόμενο ποσοστό της α-έλικας, αλλά οι προβλέψεις για τη β-στροφή είναι σαφώς χειρότερες.



πυκνιζόμενες με τις αντίστοιχες των άλλων μεθοδολογιών. Η μέθοδος απαιτεί τη λήψη πολλών σημείων, αφού τα φάσματα CD πρέπει να καταγράφονται στην περιοχή 178-260 nm.

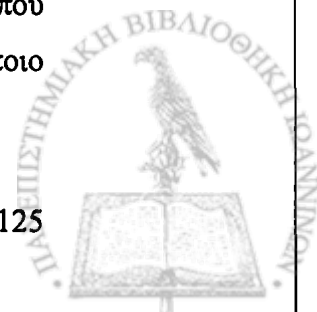
γ. Μέθοδος Convex Constraint Analysis (CCA)

Η μεθοδολογία αυτή δεν χρησιμοποιεί X-ray κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Χρησιμοποιώντας έναν νέο περιορισμό, που ονομάζεται ελαχιστοποίηση όγκου, αποδίδει τα φάσματα της βάσης δεδομένων από πειραματικά φάσματα CD ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών (286, 287). Ουσιαστικά, συσχετίζει την αναλογία διαφορετικών τύπων δευτεροταγών δομών με τις αλλαγές που παρατηρούνται στη μοριακή ελλειπτικότητα. Το υπολογιστικό πρόγραμμα της μεθόδου είναι το CCA (287). Η εκτίμηση του ποσοστού έλικας είναι πολύ καλή αλλά οι προβλέψεις για το β-φύλλο και τη β-στροφή δεν είναι και τόσο κανονποιητικές.

Και οι τρεις παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούν σαν βάση δεδομένων στοιχεία από φάσματα CD ενός συνόλου πρωτεϊνών. Πρέπει όμως να υπολογίσει κανείς ότι στις πρωτεΐνες υπάρχουν και άλλες χρωμοφόρες ομάδες που συνεισφέρουν στο CD φάσμα και μάλιστα το ποσοστό αυτών ποικίλλει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη. Οι παρακάτω μέθοδοι χρησιμοποιούν μεθοδολογίες επιλογής οι οποίες οδηγούν σε βελτιωμένες βάσεις δεδομένων που αποτελούνται από πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά δευτεροταγούς δομής με την προς εξέταση πρωτεΐνη ή πεπτίδιο.

δ. Μέθοδος Ridge Regression (Constrained statistical regularization)

Αντί να χρησιμοποιηθούν καθαρά συστατικά δευτεροταγούς δομής, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί γραμμικό συνδυασμό μιας μεγάλης βάσης δεδομένων πρωτεϊνών με γνωστή δομή από X-ray κρυσταλλογραφία (288). Για να μειωθεί η αβεβαιότητα που προκύπτει από τη χρήση πολλών παραμέτρων, χρησιμοποιείται μια επιπλέον στατιστική διαδικασία κανονικοποίησης. Το υπολογιστικό πρόγραμμα της μεθόδου αυτής είναι το CONTIN. CONTIN (288) και λαμβάνονται βελτιωμένες εκτιμήσεις σε σχέση με τις προηγούμενες μεθοδολογίες, ειδικά όσον αφορά το ποσοστό της β-στροφής. Η μεθοδολογία αυτή στηρίζεται στη λογική ότι αν η άγνωστη πρωτεΐνη εμφανίζει κάποια συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά που αντικεινίζονται στο CD φάσμα της και το CD φάσμα αυτό φέρει πολλές ομοιότητες με κάποιο



CD φάσμα μιας πρωτεΐνης αναφοράς, τότε το τελευταίο επιλέγεται αυτόματα και χαρακτηρίζεται με μεγάλο συντελεστή βαρύτητας για την προσομοίωση του φάσματος CD της άγνωστης πρωτεΐνης.

5. Μέθοδος Singular Value Decomposition με επιλογή μεταβλητών (variable selection)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί το συνδυασμό δυο άλλων μεθόδων (289). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η βάση δεδομένων αποτελείται από μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών αναφοράς. Από τα κύρια σημεία της μεθόδου, είναι ότι οι πρωτεΐνες με φάσμα CD παρόμοιο με εκείνο της εξεταζόμενης ουσίας πρέπει να τοποθετηθεί στο σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, υπολογίζονται όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί (δυνατά υποσύνολα) των πρωτεϊνών της βάσης δεδομένων. Κάθε φορά αποκλείονται τρεις πρωτεΐνες και η ομάδα που προκύπτει χρησιμοποιείται στη συνέχεια των υπολογισμών. Θεωρώντας όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, αποκλείονται οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για αποκλίσεις. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να προκύψουν ικανοποιητικά αποτελέσματα χωρίς μεγάλες αποκλίσεις. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιεί τη μέθοδο αυτή ονομάζεται Varselec (289) και δίνει αρκετά καλή εκτίμηση για τη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης σε διάλυμα. Μειονέκτημα της αποτελεί το γεγονός ότι, είναι πολύ αργή μεθοδολογία σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (278), επειδή εξετάζει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς για τις πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων.

6. Μέθοδος self-consistent

Η μέθοδος αυτή είναι μια τροποποίηση της variable selection μεθόδου και βελτιώνει την ταχύτητα και την ακρίβεια της (278). Κατά τη μέθοδο αυτή, το φάσμα της πρωτεΐνης που εξετάζεται συμπεριλαμβάνεται στη βάση δεδομένων. Με την άγνωστη πρωτεΐνη στις πρωτεΐνες αναφοράς, γίνεται μια πρώτη προσέγγιση-πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής. Η μήτρα που προκύπτει, επιλύεται με βάση τον λογάριθμο της singular decomposition value οπότε η αρχική πρόβλεψη αντικαθίστανται από την τελική (290). Με αυτή τη μέθοδο, μπορεί να δοθεί εκτίμηση και για την PII διαμόρφωση (291). Η PII διαμόρφωση (πολυπρολίνης II) είναι μια αριστερόστροφη εκτεταμένη έλικα και ενοείται σε πολυπεπτιδία με μεγάλα



ποσοστό σε προλίνη. Το πρόγραμμα ανάλυσης που χρησιμοποιεί την παραπάνω μέθοδο είναι το SELCON. SELCON και δίνει πολύ καλές εκτιμήσεις (278, 292) για τα ποσοστά α-έλικας, β-φύλλου και β-στροφής. Μπορεί επίσης με καλή προσέγγιση να χρησιμοποιηθούν δεδομένα μόνο της περιοχής 200-240 nm.

2. Μέθοδος ανάλυσης με νευρωνικά δίκτυα (Neural Network Analysis)

Η μέθοδος των νευρωνικών δικτύων εφαρμόστηκε πρόσφατα και για την εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής πεπτιδίων και πρωτεϊνών (293, 294). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μπορούν να αναλυθούν πέντε διαφορετικές δευτεροταγείς δομές. Η μέθοδος δίνει πολύ καλά αποτελέσματα στη περιοχή 178-260 nm αλλά όταν τα δεδομένα περιοριστούν στο διάστημα 200-250 nm η πρόβλεψη για το αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο χαρακτηρίζεται από αποκλίσεις. Ένα πρόγραμμα που στηρίζεται στην παραπάνω αρχή είναι το k2D (293, 295). Δίνει πολύ καλούς συντελεστές συσχέτισης (α-έλικα 0.93, β-φύλλο 0.87 και τυχαία αμόρφωση 0.82), αλλά δεν δίνει εκτίμηση για το ποσοστό της β-στροφής. Επίσης ένα άλλο υπολογιστικό πρόγραμμα που βασίζεται στις ίδιες αρχές είναι το BPNN (294) (Back propagation Neural Network)=CDNN.



5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΩΝ (MS)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όταν ηλεκτρόνια, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούσουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται στην αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό, συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη κινείται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζας/ ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα, που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (πάντοτε σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες), ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ουσίας. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Το μοριακό βάρος εκφράζεται στις συνήθεις μονάδες ατομικής μάζας (amu, atomic mass units), με βάση το πρότυπο ^{12}C που, κατά συνθήκη, αντιστοιχεί ακριβώς σε 12,000000 amu.



Εικόνα 5.1: Γενική αρχή της φασματομετρίας μάζας.

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ουσίας από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) και δεν αποτελεί φασματοσκοπική τεχνική. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της.

Σήμερα η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής διαφόρων οργανικών ενώσεων κατά τη συνθετική πορεία (όπως π.χ. νέων φαρμάκων) και για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων και σε μικρότερο βαθμό στην ποσοτική ανάλυση.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών είναι η αυξημένη ευαισθησία της, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, και η υψηλή εξειδίκευσή της κατά την ταυτοποίηση ουσιών ή την επιβεβαίωση της παρουσίας ύποπτων ουσιών, όπως π.χ. κατά τον έλεγχο ντοπαρίσματος των αθλητών και λήψης ναρκωτικών ουσιών. Ως μειονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών μπορεί να θεωρηθούν το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το μεγάλο κόστος λειτουργίας και συντήρησης τους και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης του χρήστη για το χειρισμό σχετικών συσκευών και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων μάζας (296).

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΩΝ ΜΑΖΩΝ

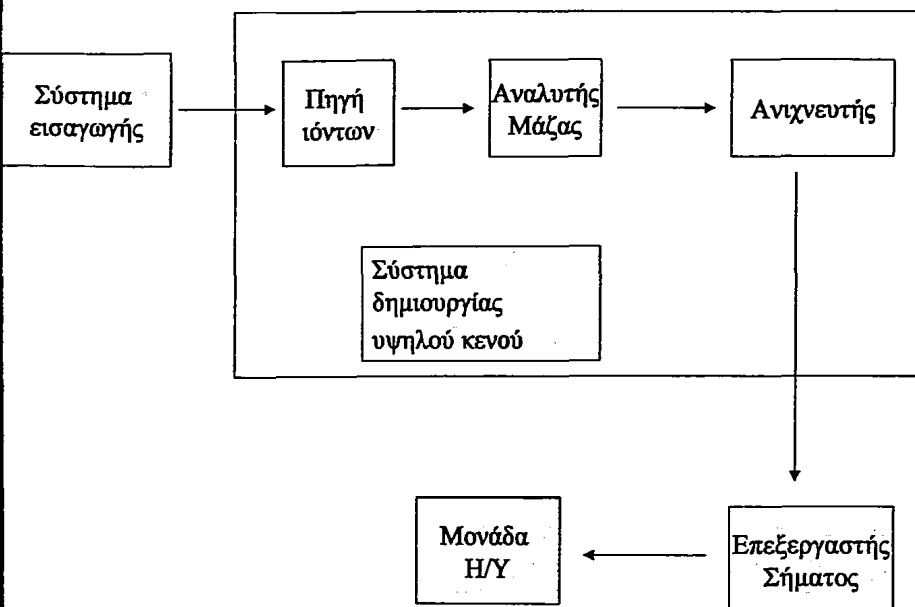
Τα φασματοόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτά τμήματα:

1. το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
2. την πηγή ιόντων
3. τον αναλυτή μαζών
4. τον ανιχνευτή

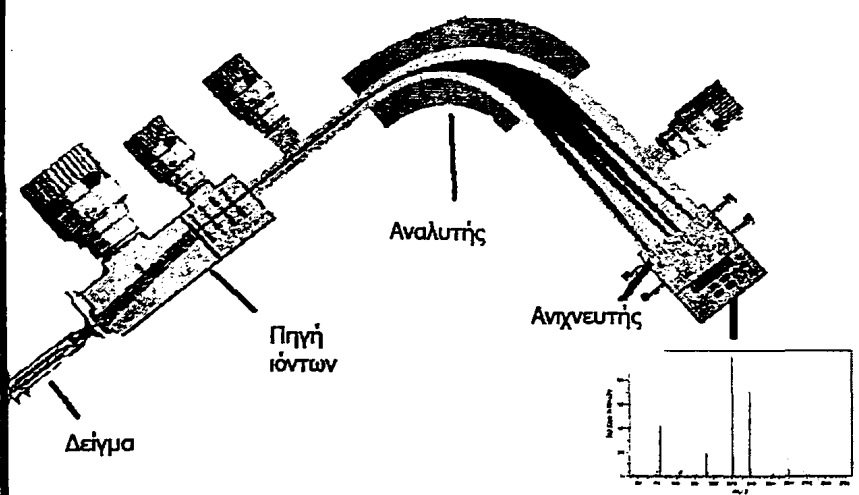
Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματοόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσίασης των φασμάτων, όπως π.χ. καταγραφείς και παλμογράφους. Τα σύγχρονα φασματοόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για τη ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος. Ένα φασματοόμετρο μαζών μπορεί να περιγραφεί γενικά με το παρακάτω σχήμα:

Σύστημα εισαγωγής δείγματος • Πηγή ιόντων • Αναλυτής μάζας • Ανιχνευτής • Επεξεργαστής σήματος • Μονάδα Η/Υ





Εικόνα 5.2: Απεικόνιση τυπικής διάταξης φασματομέτρου μάζας. Τα επιμέρους τμήματα είναι συνδεδεμένα με ένα σύστημα δημιουργίας υψηλού κενού.



Εικόνα 5.3: Στο εσωτερικό ενός φασματομέτρου μάζας.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

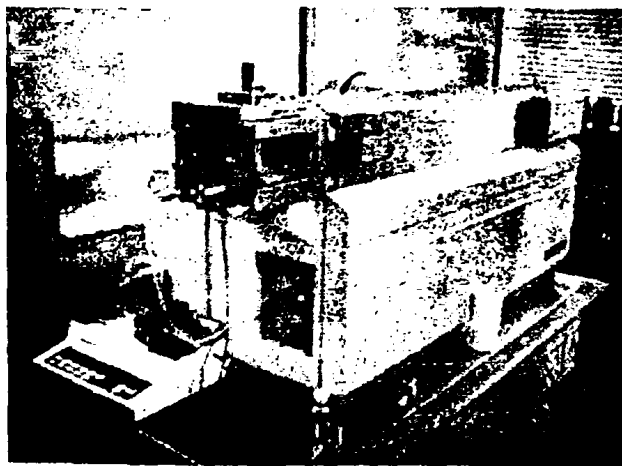
Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Στην περίπτωση δειγμάτων ενώσεων με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών, η εξαέρωση τους διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. Το δοχείο δείγματος έχει όγκο 1 έως 5 L και η πίεση, που επικρατεί σε αυτό, είναι της τάξεως του 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το αέριο δείγμα εισάγεται στον ενδιάμεσο χώρο με ακόμη μικρότερη πίεση (τυπικά 10^{-5} Torr) από όπου με σταθερή παροχή, εισάγεται στο χώρο ιοντισμού, όπου επικρατεί ακόμη χαμηλότερη πίεση (τυπικά 10^{-7} Torr), ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων. Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται ποικίλλει από 1 mg έως 1 ng, εξαρτώμενη από τον τύπο του φασματομέτρου (296).

2. Πηγές ιόντων

Η παραγωγή ιόντων χαρακτηριστικών της υπό προσδιορισμό ουσίας πραγματοποιείται στην πηγή ιόντων (ion-source), με μονομοριακές (πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ιοντισμός με πεδίο) ή διμοριακές (χημικός ιοντισμός) τεχνικές.

Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (Electron Spray Ionization ESI)

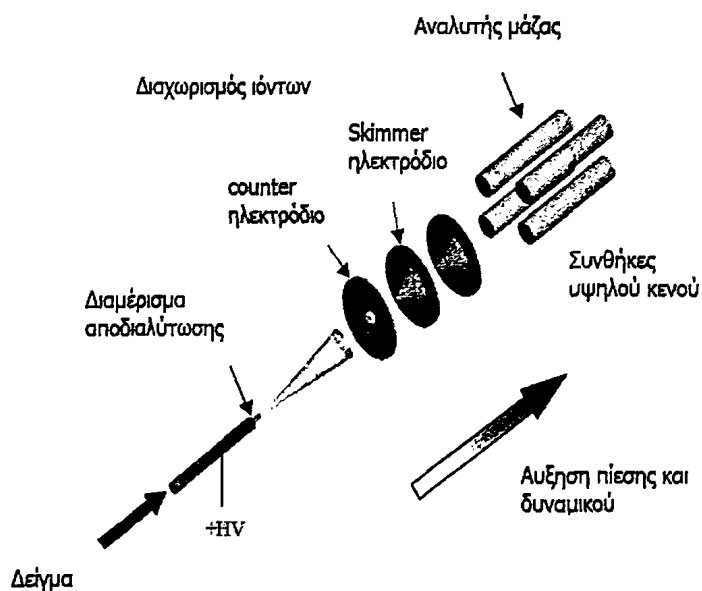
Στην παρούσα διατριβή η ταυτοποίηση όλων των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση του Electro spray Ionization (ESI-MS) (297).



Εικόνα 5.4: Απεικόνιση της συσκευής του ESI-MS Micromass Platform LC Quadrupole.

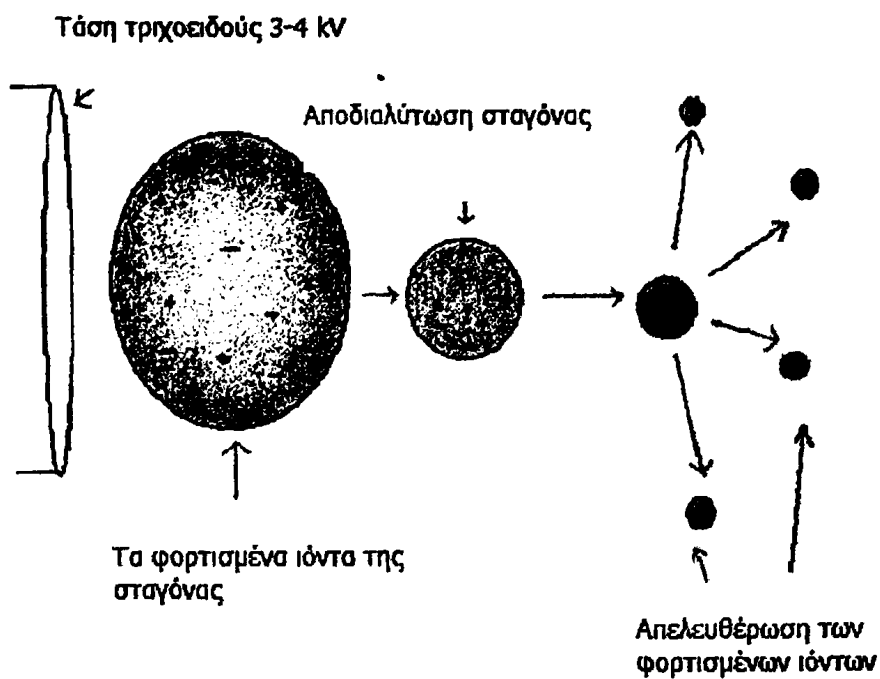
Η συγκεκριμένη μέθοδος ιοντισμού αναπτύχθηκε αρχικά από τον Fenn και τους συνεργάτες του το 1989 (298). Το ESI-MS χαρακτηρίζεται ως ήπια μέθοδος ιοντισμού για μομόρια και μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις.

Στο σχήμα φαίνεται μια τυπική σχηματική διάταξη ενός φασματογράφου μαζών Electro spray Ionization (ESI-MS).



Εικόνα 5.5: Διάταξη ενός φασματογράφου μάζας ESI-MS.

Κατά την τεχνική αυτή, τα σταγονίδια διέρχονται από ένα διαμέρισμα αποδιαλύτωσης», ο διαλύτης εξατμίζεται και η πυκνότητα του φορτίου αυξάνεται σημαντικά. Έτσι το φορτίο της σταγόνας κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διασπάται λόγω απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται εξαιτίας της διάσπασης της ακτίνας, έτσι ώστε να έχουμε την απελευθέρωση των φορτισμένων ιόντων, τα οποία μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών. Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι των άλλων διότι δεν παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα, αλλά εξάγει τα ήδη υπάρχοντα (299-2).



Εικόνα 5.6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας εξαγωγής των ιόντων στο ESI-MS.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της μεθόδου ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Πίνακας 5.1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Ανάλυση ουσιών με Μ.Β. έως και 70.000 Da	Μικρό περιθώριο εφαρμογής σε άλατα
Μεγάλη ευαισθησία ($10^{-15} - 10^{-12}$ mole)	Δυσκολία στον καθαρισμό του οργάνου
Τεχνική «ήπιου» ιοντισμού. Εύκολη ενσωμάτωση υγρής χρωματογραφίας (LC) και του τετραπολικού ανιχνευτή μάζας για μεγαλύτερη απόδοση του οργάνου	Μικρό περιθώριο εφαρμογής σε μίγματα ουσιών
Πολλαπλή φόρτιση-ανάλυση ιόντων με μεγάλη μάζα και μεγαλύτερη ακρίβεια	Πολλαπλή φόρτιση-ασάφεια στην ανάλυση μιγμάτων ουσιών

3. Αναλυτής μαζών

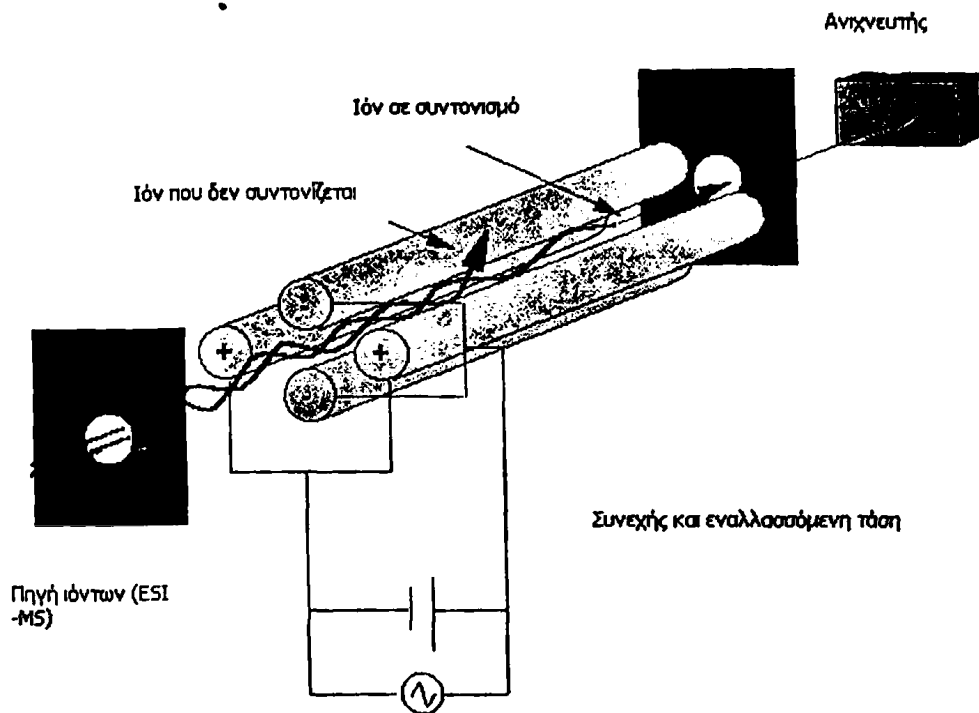
Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών σε ένα φασματόμετρο μαζών είναι να διαχωρίσει τα ιόντα, που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές



ων λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος, έτσι ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα (resolution) του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματομέτρου μαζών. Η διαχωριστική (ή διακριτική) ικανότητα (R) ορίζεται από τη σχέση $R=m/\Delta m$ όπου m και Δm αντιστοιχούν σε λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι πετυχαίνεται, όταν περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος, που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών.

Τα φασματομέτρα μαζών διακρίνονται σε φασματομέτρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Με τα πρώτα, που έχουν διαχωριστική ικανότητα από 100 έως 1000, τα διάφορα ιόντα διακρίνονται με βάση την ονομαστική μάζα (nominal mass), που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς το μοριακό βάρος. Με ένα τέτοιο φασματομέτρο, δεν διακρίνεται το CO από το N_2 γιατί και τα δυο έχουν τον ίδιο αριθμό ακέραιων μονάδων μάζας. Με τα φασματομέτρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας όμως $\approx 10^4-10^5$ μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα, αλλά διαφορετικές ακριβείς μάζας (exact mass), που διαφέρουν στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι: 1) Αναλυτές απλής εστίασης με μαγνητική εκτροπή (single-focusing analyzers with magnetic deflection) 2) Αναλυτές διπλής εστίασης (double-focusing analyzers) 3) Τετραπολικόι αναλυτές μαζών (quadrupole mass analyzers): Οι βασικές αρχές του τετραπολικού ανιχνευτή δημοσιεύτηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '50, αλλά ο τετραπολικός ανιχνευτής εξοπλίζει, ακόμα και σήμερα, ευρέως χρησιμοποιούμενους, φασματογράφους μάζας εξαιτίας της ευκολίας στη χρήση του, στο μικρό του μέγεθος και στο σχετικά μικρό του κόστος (303). Σε αυτόν τον τύπο φασματομέτρου μάζας, αντί για μαγνητικός αναλυτής χρησιμοποιείται τετραπολικός. Όπως γίνεται και στη παρακάτω εικόνα ο τετραπολικός ανιχνευτής αποτελείται από τέσσερα κυλινδρικά ηλεκτρόδια που διαγώνια τροφοδοτούνται με εναλλασσόμενη αλλά και συνεχή τάση. Έτσι τα ιόντα εστιάζονται και κινούνται κατά μήκος του άξονα y , μεταβάλλοντας τα δυναμικά εναλλασσόμενου και συνεχούς ρεύματος και φτάνουν στον ανιχνευτή και στη συνέχεια καταγράφονται. Ο ιοντισμός του δείγματος γίνεται όπως στα συνηθισμένα φασματομέτρα. 4) Αναλυτές «χρόνου πτήσεως» (time-of-flight analyzers).





Εικόνα 5.7: Ο αναλυτής τετραπόλου (Quadrupole analyzer).

4. Ανιχνευτής ιόντων

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδο του στην χρονική μονάδα. Ως ανιχνευτής ιόντων μπορεί να θεωρηθεί και το φωτογραφικό φιλμ. Οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών είναι: 1) Φαρανταϊκό κύπελλο (faradaic cup) 2) Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier) και 3) η φωτογραφική πλάκα.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

1. Ταυτοποίηση και μελέτη δομής

Οι κύριες εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών είναι η ταυτοποίηση και η εξεύρεση του τύπου οργανικών (κυρίως) ενώσεων. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης (θραυσματογράφημα)



μαζών) αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» της, γιατί το μόριο κάθε ένωσης θραύεται και αντίζεται στο φασματομέτρο μαζών με τέτοιο τρόπο, ώστε να παρέχει πληροφορίες, για τη δομή μιας ένωσης. Για το σκοπό αυτό η φασματομετρία μαζών συνεπικουρείται από τις φασματοσκοπίες υπεριώθρου και NMR, που είναι περισσότερο κατάλληλες για τη διαπίστωση χαρακτηριστικών ομάδων στο εξεταζόμενο μόριο. Η εξαιρετικά μικρή ποσότητα δείγματος ($10^{-6} - 10^{-9}$ g), που απαιτείται για ταυτοποίηση και για ποσοτική ανάλυση σε ορισμένες περιπτώσεις, με τη φασματομετρία μαζών, καθιστά την τεχνική ιδιαίτερα πολύτιμη.

2. Έλεγχος προσμειξων

Το φασματομέτρο μαζών μπορεί να ανιχνεύει μικροποσότητες της τάξης των ppm, μιας πρόσμειξης σε μια ένωση, ιδιαίτερα αν η δομή της πρόσμειξης είναι αρκετά διαφορετική και αν το μοριακό της βάρος είναι μεγαλύτερο από αυτό του κύριου συστατικού. Η εμφάνιση επιπρόσθετων κορυφών στο φάσμα μαζών της κύριας ένωσης δείχνει την ύπαρξη πρόσμειξεων. Η δυνατότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή στον έλεγχο ποιότητας φαρμακευτικών πρώτων υλών και στην Ιατροδικαστική, στην οποία η φύση των πρόσμειξεων σε μία ένωση μπορεί να προσδιορίσει την ταυτότητα του παρασκευαστή ή τον τόπο προέλευσης του δείγματος (π.χ. ναρκωτικά, δηλητήρια).

Ποσοτική ανάλυση μείγματος

Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στο ότι τα ύψη των κορυφών σε ένα φάσμα μαζών είναι ευθέως ανάλογα της πίεσης του δείγματος στην πηγή ιόντων και επομένως και της ποσότητας (και άρα της συγκέντρωσης) της προσδιοριζόμενης ένωσης. Στην περίπτωση μείγματος ουσιών, τα ύψη είναι ευθέως ανάλογα των μερικών πιέσεων μιας και ο νόμος του Dalton λέει ότι η μερική πίεση κάθε συστατικού είναι ανάλογη της ποσότητάς του στο μείγμα. Για να επιτευχθεί η ποσοτική ανάλυση μείγματος οργανικών ουσιών πρέπει να τηρούνται οι επόμενες προϋποθέσεις:

- Κάθε συστατικό να παρουσιάζει μια κορυφή που διαφέρει σε σχετική ένταση σημαντικά από τις αντίστοιχες κορυφές των άλλων ενώσεων (η κορυφή αυτή ονομάζεται «αναλυτική κορυφή»)
- Να υπάρχει γραμμική προσθετικότητα των εντάσεων κάθε συστατικού στο σχηματισμό κάθε κορυφής



- Η ευαισθησία του φασματομέτρου μαζών (ύψος κορυφής /μερική πίεση συστατικού) για κάθε συστατικό να είναι σταθερή
- Να υπάρχουν κατάλληλα πρότυπα για βαθμονόμηση

4. Ισοτοπική επισήμανση με σταθερά ισότοπα

Η χρησιμοποίηση ραδιενεργών ισωτόπων για την παρακολούθηση πολλών χημικών, βιοχημικών και βιοφαρμακευτικών διαδικασιών είναι εξαιρετικά διαδεδομένη και απλή, εξαιτίας της εύκολης παρακολούθησης της πορείας του επισημαντή, π.χ. του ραδιενεργού φαρμάκου, στα διάφορα τμήματα του οργανισμού. Σε περιπτώσεις που δεν επιτρέπεται η χρησιμοποίηση ραδιενεργών επισημαντών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενώσεις στοιχείων εμπλουτισμένων, ως προς ένα σταθερό ισότοπο, που κανονικά εμπεριέχεται σε μικρή αναλογία στο φυσικό στοιχείο (π.χ. οργανικές ενώσεις με ^{13}C). Η πορεία, απομάκρυνση, αραίωση του στοιχείου ή της αντίστοιχης ένωσης στο χημικό σύστημα και στο ζωικό οργανισμό μπορεί να εξακριβωθεί με δειγματοληψία και μέτρηση του λόγου των ισωτόπων ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Έτσι η χρήση της τεχνικής MS στη μελέτη του μεταβολισμού και της φαρμακοκινητικής των φαρμάκων αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμη. Φάρμακα επισημασμένα με σταθερό ισότοπο, χρησιμοποιούνται επίσης ως εσωτερικά πρότυπα για τον προσδιορισμό των αντίστοιχων φαρμάκων σε βιολογικά υγρά για την παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων. Η φασματομετρία μαζών αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον στην ιατρική και φαρμακευτική επιστήμη. Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός φαρμάκων, μεταβολιτών, τοξινών, ναρκωτικών και δηλητηρίων είναι πεδία εφαρμογής της τεχνικής. Η χρήση θραυσματογραφημάτων μαζών των βιολογικών υγρών μπορεί επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη στη διάγνωση ασθενειών, αφού η διατάραξη των ισορροπιών των βιοχημικών αντιδράσεων, που προκαλούν οι ασθένειες, αλλάζει χαρακτηριστικά τη μορφή του φάσματος μαζών (296, 304, 305).



6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



LIBRARY



Η υψηλής πυκνότητα λιποπρωτεΐνη (HDL) εμφανίζει σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα η οποία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της HDL, πολλά σημεία δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, ιδιαίτερα ως προς το ρόλο που καταδραματίζουν τα επιμέρους συστατικά της HDL στις αντιαθηρογόνες δράσεις της. Παράλληλα, ένας νέος θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της αθηρωμάτωσης και της καρδιαγγειακής νόσου αποτελεί σήμερα η αύξηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα καθώς και η βελτίωση και ενίσχυση των αντιαθηρογόνων χαρακτηριστικών της π.χ. αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Για την επίτευξη αυτών των στόχων είναι απαραίτητη η κατανόηση σε βάθος του ρόλου των επιμέρους συστατικών της HDL όπως η apoA-I.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνάται ο ρόλος της apoA-I στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL καθώς και στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης.

Η βιογένεση της HDL αρχίζει με τη σταδιακή λιπιδίωση της apoA-I που οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων δισκοειδών και τελικά σφαιρικών σωματιδίων HDL. Έχει προταθεί ότι το δισκοειδές σωματίδιο της HDL αποτελείται από δύο μόρια apoA-I, τα οποία καρτίζονται κυρίως από αμφιπαθητικές α-έλικες σε αντιπαράλληλη διάταξη και σχηματίζουν μια ζώνη η οποία καλύπτει τις υδρόφοβες λιπαρές αλυσίδες της φωσφολιπιδικής πλοστοιβάδας. Η σταδιακή λιπιδίωση της apoA-I γίνεται διαμέσου της αλληλεπίδρασής της με το μεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 διαμέσου του οποίου προσλαμβάνει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από τα διάφορα κύτταρα. Μεταλλάξεις ή απουσία του ABCA1 δεν επιτρέπουν το σχηματισμό της HDL και οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις.

Η μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων της HDL σε σφαιρικά (ωρίμανση HDL) απαιτεί τη συνεχή εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, η οποία γίνεται με τη δράση της LCAT για την ενεργοποίηση της οποίας είναι απαραίτητη η παρουσία της apoA-I. Κατά τη διάρκεια αυτής της ωρίμανσης, τα αντιπαράλληλα μόρια της apoA-I επαναδιευθετούνται στο σφαιρικό σωματίδιο.

Η apoA-I συνίσταται από επαναλαμβανόμενες μονάδες που σχηματίζουν δέκα αμφιπαθητικές α-έλικες που αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια. Μοντέλα αμφιπαθητικής έλικας έχουν θεωρηθεί ως οι καταλληλότερες διαμορφώσεις για αλληλεπιδράσεις με λιπίδια. Έτοιμα μοντέλα χαρακτηρίζονται από μια κατάλληλη διεύθυνση των αμινοξέων έτσι ώστε να απορροφούν ελικοειδείς διατάξεις που στη μια πλευρά της έλικας εντοπίζονται τα φορτισμένα



αμινοξέα (πολικά), ενώ στην άλλη πλευρά εντοπίζονται τα υδρόφοβα αμινοξέα (μη πολικά). Μεταξύ των δυο πλευρών παρεμβάλλονται αμινοξέα που σχηματίζουν μια διεπιφάνεια.

Οι λειτουργικά σημαντικές περιοχές της apoA-I είναι σήμερα πολύ καλά τεκμηριωμένες. Έτσι, το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 6 θεωρείται υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της LCAT, ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 9 συνδεδεμένο με το αμινο-τελικό άκρο της έλικας 10 αλληλεπιδρά λειτουργικά με το μεταφορέα ABCA1. Επίσης οι έλικες 4 και 6 που περιέχουν τη Met112 και Met148 αντίστοιχα λειτουργούν πολύ πιθανόν και ως «παγίδες οξειδωσης», συμβάλλοντας στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL. Οι μεθειονίνες του μορίου της apoA-I φαίνεται να επεμβαίνουν στις αλυσιδωτές αυτοκαταλυόμενες αντιδράσεις των λιποϋπεροξειδίων που οδηγούν στο σχηματισμό των ox-LDL σωματιδίων δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται. Συγκεκριμένα η apoA-I ανάγει τα λιποϋπεροξειδία (LOOH) που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε αντίστοιχα υδροξύλια (LOH) με ταυτόχρονη δημιουργία σουλφοξειδίου στη θέση του θείου της μεθειονίνης.

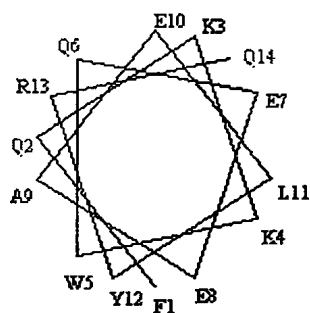
Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν μοντέλα των ελικοειδών τμημάτων της apoA-I ώστε να μελετηθεί διεξοδικά η αντιαθηρογόνος δράσης τους. Ο σχεδιασμός των μοντέλων της apoA-I έγινε με βάση α) τη διατήρηση της αμφιπαθητικότητας της έλικας και την παρουσία θετικών και αρνητικών φορτίων, κατά το δυνατόν, σε θέσεις i , $i+3$ και $i+4$, ώστε να σταθεροποιούνται ιοντικές αλληλεπιδράσεις στην υδρόφιλη περιοχή της έλικας, β) την αντικατάσταση της Met με Ala, και γ) τη μεταβολή της τάξης της έλικας.

A. apoA-I μοντέλο της έλικας 4, περιοχή 104-117

Πεπτίδιο Ac-FQKKWQEEA¹¹²ELYR-NH₂, Met¹¹²→Ala¹¹², τάξη G

Ο σκοπός της σύνθεσης του πεπτιδίου αυτού είναι να μελετηθεί ο ρόλος της μεθειονίνης (Met¹¹²→Ala¹¹²) και η σημασία της μεταβολής της τάξης της έλικας 4 στην πιθανή αντιοξειδωτική δράση του μοντέλου της apoA-I. Η δράση αυτή μελετάται ως προς την ικανότητα του να αναστέλλουν την οξειδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης είτε μεμονωμένα είτε σε δισκοειδή σωματίδια HDL.





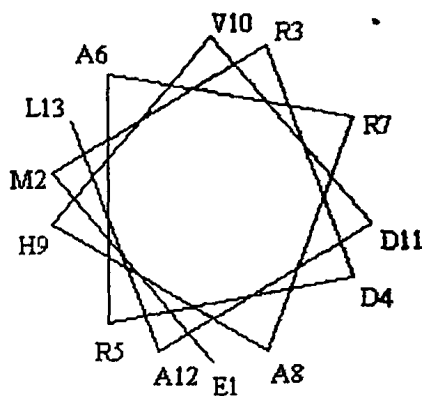
Εικόνα 6.1: Αναπαράσταση κατά Edmundson της έλικας 4 περιοχή 104-117, πεπτιδικό μοντέλο Ac-FQKKWQEEA¹¹²ELYR-NH₂ (Met¹¹²→Ala¹¹²). Τα αμινοξέα R13 και K4 ορίζουν τη διεπιφάνεια μεταξύ πολικής και μη πολικής επιφάνειας. Στην πολική επιφάνεια παρατηρείται τυχαία εναλλαγή θετικών (K3) και αρνητικών (E10, E7) αμινοξέων ενώ η μη πολική επιφάνεια αποτελείται από υδρόφοβα αμινοξέα π.χ. αλανίνη A9, φαιναλαλανίνη F1, τρυπτοφάνη W5.

β. apoA-I μοντέλο της έλικας 6, περιοχή 147-159

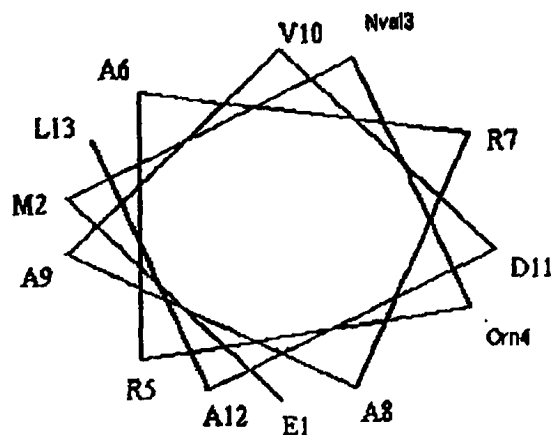
- α) Πεπτίδιο Ac-EM¹⁴⁸RDRARAHVDAL-NH₂, τάξη A
- β) Πεπτίδιο Ac-EA¹⁴⁸RDRARAHVDAL-NH₂, Met¹⁴⁸→Ala¹⁴⁸, τάξη A
- γ) Πεπτίδιο Ac-EM¹⁴⁸NVaOmRARA¹⁴⁹VDAL-NH₂, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Om¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵ τάξη G

Ο σκοπός της σύνθεσης των πεπτιδίων αυτών είναι να μελετηθεί ο ρόλος της μεθειονίνης (Met¹⁴⁸→Ala¹⁴⁸) και η σημασία της μεταβολής της τάξης της έλικας 6 στην πιθανή αντιοξειδωτική δράση των μοντέλων της apoA-I. Η δράση αυτή μελετάται ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης είτε μεμονωμένα είτε σε δισκοειδή σωματίδια HDL.

A



B



Εικόνα 6.2: Αναπαράσταση κατά Edmundson της έλικας 6 περιοχή 147-159. Α) Πεπτιδικό μοντέλο Ac-EM¹⁴⁸RDRARAHVDAL-NH₂. Τα αμινοξέα H9, R5 και R3, R7 ορίζουν τη διεπιφάνεια. Στην πολική επιφάνεια παρατηρούνται αρνητικά αμινοξέα E1, D4, και D11 ενώ στη μη πολική-υδρόφοβη επιφάνεια υπάρχουν τα υδρόφοβα αμινοξέα M2, L13, A6, V10. Το πεπτιδικό ανάλογο (2) προέκυψε με αντικατάσταση της M2 με A2. Β) Πεπτιδικό μοντέλο Ac-EM¹⁴⁸NvaOrnRARA AVDAL-NH₂. Διατηρείται η M2 αλλά ανήκει σε διαφορετική τάξη (G τάξη). Οι αργινίνες R5 και R7 ορίζουν τη διεπιφάνεια που χωρίζει τη πολική φάση (E1, Orn4, D11) από τη μη πολική φάση (A9, M2, L13, A6, V10, Nva3).

Γ. apoA-I μοντέλο της έλικας 6, περιοχή 152-164

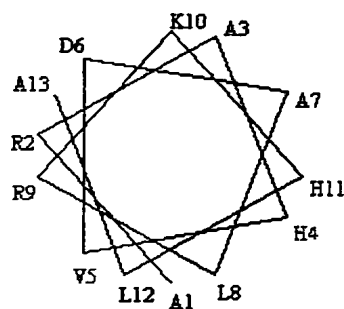
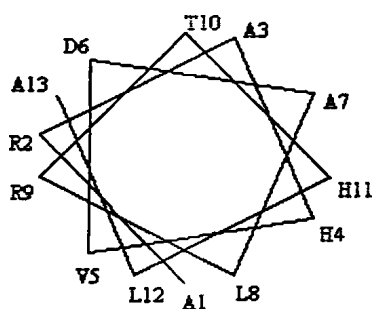
1) Πεπτίδιο Ac-ARAHVDALRT¹⁶¹HLA-NH₂ τάξη A

2) Πεπτίδιο Ac-ARAHVDALRK¹⁶¹HLA-NH₂, Thr¹⁶¹·Lys¹⁶¹, τάξη G

Ο σκοπός της σύνθεσης των πεπτιδίων αυτών είναι να μελετηθεί ο ρόλος της περιοχής αυτής στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης και συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT. Η αντικατάσταση της θρεονίνης στη θέση 161 από λυσίνη αναμένεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση της αμφιαθητικής έλικας, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ λυσίνης και ασπαρτικού στη θέση 157 σε θέσεις δηλαδή *i*, *i*+4, και πιθανόν στην ενίσχυση της ενεργοποίησης της LCAT και άρα στη βελτίωση της αντιαθηρογόνου δράσης των μοντέλων της apoA-I.

A

B

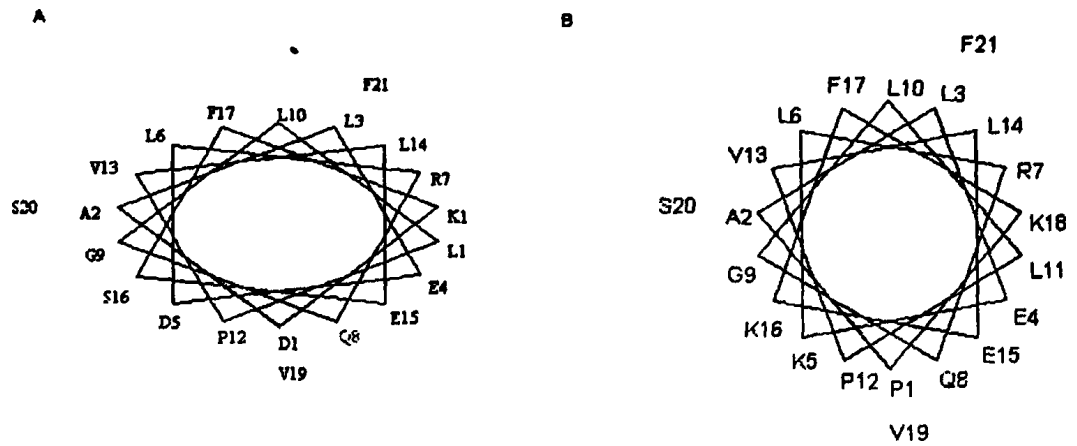


Εικόνα 6.3: Αναπαράσταση κατά Edmundson της έλικας 6 περιοχή 152-164. Α) Πεπτιδικό μοντέλο Ac-ARAHVDALRT¹⁶¹HLA-NH₂. Τα αμινοξέα R2,R9 και H11,H4 ορίζουν τη διεπιφάνεια. Β) Πεπτιδικό μοντέλο Ac-ARAHVDALRK¹⁶¹HLA-NH₂. Η αντικατάσταση της θρεονίνης T10 με λυσίνη K10 αλλάζει την τάξη από Α σε G.

Δ. αρoA-I μοντέλο της έλικας 9 (περιοχή 209-219) και του καρβόξυ τελικού άκρου (περιοχή 220-229) της έλικας 10

- 1) Πεπτίδιο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ τάξη G
- 2) Πεπτίδιο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂, Asp²¹³·Orn²¹³, Ser²²⁴·Lys²²⁴ τάξη Α

Ο σκοπός της σύνθεσης των πεπτιδίων αυτών είναι να μελετηθεί η σημασία της μεταβολής της τάξης των ελίκων 9 και 10 στη βιολογική δράση τους, μιας και το πεπτίδιο (1) είναι η φυσική αλληλουχία της περιοχής 209-229 της αρoA-I και ανήκει στην τάξη G και το πεπτίδιο (2) προέρχεται από το (1) με τις αντικαταστάσεις Asp²¹³·Orn²¹³ και Ser²²⁴·Lys²²⁴ οπότε να είναι τάξης Α.



Εικόνα 6.4: Αναπαράσταση κατά Edmondson της έλικας 9 και 10 περιοχή 209-229 Α. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVVSF-NH₂, τάξης G. Τα αμινοξέα R7 και S16 ορίζουν τη διεπιφάνεια που χωρίζει τη πολική από τη μη πολική επιφάνεια. Στην πολική επιφάνεια υπάρχει τυχαία εναλλαγή θετικών και αρνητικών αμινοξέων. Β. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVVSF-NH₂ τάξης Α. Τα αμινοξέα K16, K5 και K18, R7 ορίζουν τη διεπιφάνεια πολικών-μη πολικών επιφανειών.

Μελετήθηκαν επίσης τα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά των πεπτιδικών μοντέλων της αροΑ-Ι που παρασκευάστηκαν, με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού σε υδατικό περιβάλλον και στη συνέχεια παρουσία λιπιδίων παραγώγων της φωσφατιδυλοχολίνης POPC (MLVs), ώστε να συσχετισθεί η βιολογική τους δράση με τη διαμόρφωσή τους.

7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-I (apoA-I)

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

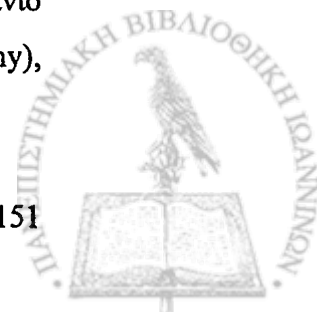
Στην παρούσα διατριβή έγινε η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των πεπτιδικών αναλόγων της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης A-I που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7.1 Πεπτιδικά ανάλογα της apoA-I που συντέθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

<u>Πεπτιδικό αντίλογο</u>	<u>Έλικα και Τάξη</u>	<u>Περιοχή</u>	<u>Αλληλουχία</u>
	4 Τάξη G	104-117 Met ¹¹² →Ala ¹¹²	Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH ₂
	6 Τάξη A	147-159	Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂
	6 Τάξη A	147-159 Met ¹⁴⁸ →Ala ¹⁴⁸	Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂
	6 Τάξη G	147-159 Arg ¹⁴⁹ ·Nva ¹⁴⁹ Asp ¹⁵⁰ ·Orn ¹⁵⁰ His ¹⁵⁵ ·Ala ¹⁵⁵	Ac-EMNVaOrnRARA AVDAL-NH ₂
	6 Τάξη A	152-164	Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂
	6 Τάξη G	152-164 Thr ¹⁶¹ →Lys ¹⁶¹	Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂
	9-10 Τάξη G	209-229	Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂
	9-10 Τάξη A	209-229 Asp ²¹³ ·Orn ²¹³ Ser ²²⁴ ·Lys ²²⁴	Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH ₂

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield.

Για την παρασκευή των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂, DCM 99.8%, LAB-SCAN Dublin, Ireland, >99.9% Fluka-Schnelldorf, Germany),



διμεθυλοφορμαμίδιο [(CH₃)₂NCHO, DMF>99.9%, Fluka-Schnelldorf, Germany, >99.8% Panreac, España], το οποίο κατεργάστηκε με molecular sieves 0.4 nm (Riedel-de Haën) με σκοπό να δεσμευτούν οι δευτεροταγείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του, και επιπλέον η ισοπροπανόλη στις εκκλύσεις της πεπτιδορητίνης (CH₃CHOHCH₃, propanol-2 99.8%, Panreac, España). Ως αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: πιπεριδίνη (C₅H₁₁N, ≥99% Fluka) για την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας, διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (C₈H₁₉N, DIEA>98%, Merck, Germany) στη σύζευξη των αμινοξέων, τριφθοροξικό οξύ (CF₃COOH 99.9%, Merck, Schuchardt, Germany) για την αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη. Χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο σύζευξης το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU, G. L. Biochem, Sangai, China) και ως βοηθητικό πυρηνόφιλο το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt, G. L. Biochem, Sangai, China). Ως μόρια-παγίδες (scavengers) των καρβοκατιόντων που παράγονται κατά την αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη χρησιμοποιήθηκαν το τρισοπροπυλσιλάνιο (C₉H₂₂Si, TIS 99% Aldrich, Germany). Επίσης, για την αποφυγή της οξείδωσης της μεθειονίνης (σχηματισμός σουλφοξειδίου) κατά την αποκοπή όσων πεπτιδίων περιείχαν το αμινοξύ, προστέθηκε ως μόριο παγίδα το διμεθυλοσουλφίδιο (C₂H₆S, DMS>99%, Fluka, Germany) που οξειδώνεται αντί της μεθειονίνης προς DMSO.

Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν σε ρητίνη Fmoc-Rink Amide AM (G. L. Biochem, Sangai, China 0.67 mmol/g). Πριν την αποκοπή τους από τη ρητίνη έγινε ακετυλίωση της αμινοτελικής ομάδας.

Τα Fmoc προστατευμένα αμινοξέα (G. L. Biochem, Sangai, China, CBL Patras-Barlos) που χρησιμοποιήθηκαν στις συνθέσεις ήταν:



Πίνακας 7.2: Τα Fmoc παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των μοντέλων της apoA-I.

	Fmoc-Phe-OH
	Fmoc-Lys (Boc)-OH
	Fmoc-Glu (OtBu)-OH
	Fmoc-Leu-OH
	Fmoc-Trp(Boc)-OH
	Fmoc-Gln(Trt)-OH
	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
	Fmoc-Ala-OH
	Fmoc-Pro-OH
0	Fmoc-Gly-OH
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH
2	Fmoc-His(Boc)-OH
3	Fmoc-Val-OH
4	Fmoc-Thr(tBu)-OH
5	Fmoc-Nle-OH
6	Fmoc-Nva-OH
7	Fmoc-Orn(Boc)-OH
8	Fmoc-Met-OH
9	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
0	Fmoc-Asp(OtBu)-OH

Οι συζεύξεις των αμινοξέων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την αναλογία ισοδυνάμων ως εξής: αμινοξύ:TBTU:HOBt:DIEA:ρητίνη = 3:3:3:6:1 σε μίγμα διαλυτών DCM:DMF 1/1. Ακολουθεί ένα παράδειγμα της πορείας σύνθεσης των πεπτιδικών αναλόγων.

Fmoc-Rink Amide AM ρητίνη

Βήμα 1

Εκπλύσεις
για διόγκωση των κόκκων της ρητίνης

3x1 min DMF
3x1 min DCM

Αποκοπή της Fmoc-ομάδας
1x5 min 20% διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF
1x15 min 20% διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF
Test Kaiser (+)

H₂N-Rink Amide AM ρητίνη

Βήμα 2

3 ισοδύναμα Fmoc-Gln(Trt)-OH
3 ισοδύναμα TBTU
3 ισοδύναμα HOBt
6 ισοδύναμα DIEA
Ανάδευση για 3 ώρες
Εκπλύσεις: 3x1 min DMF, ισοπροπανόλη, DCM
Test Kaiser (-)

Fmoc-Gln(Trt)-Rink Amide AM ρητίνη

Επανάληψη των βημάτων 1 και 2
προσθέτοντας διαδοχικά όλα τα κατάλληλα
Fmoc-αμινοξέα

Fmoc-Phe-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Leu-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Rink Amide

Επανάληψη του βήματος 1, ακετυλίωση και
αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με:
95% TFA/2.5% H₂O/2.5% Tis

Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂

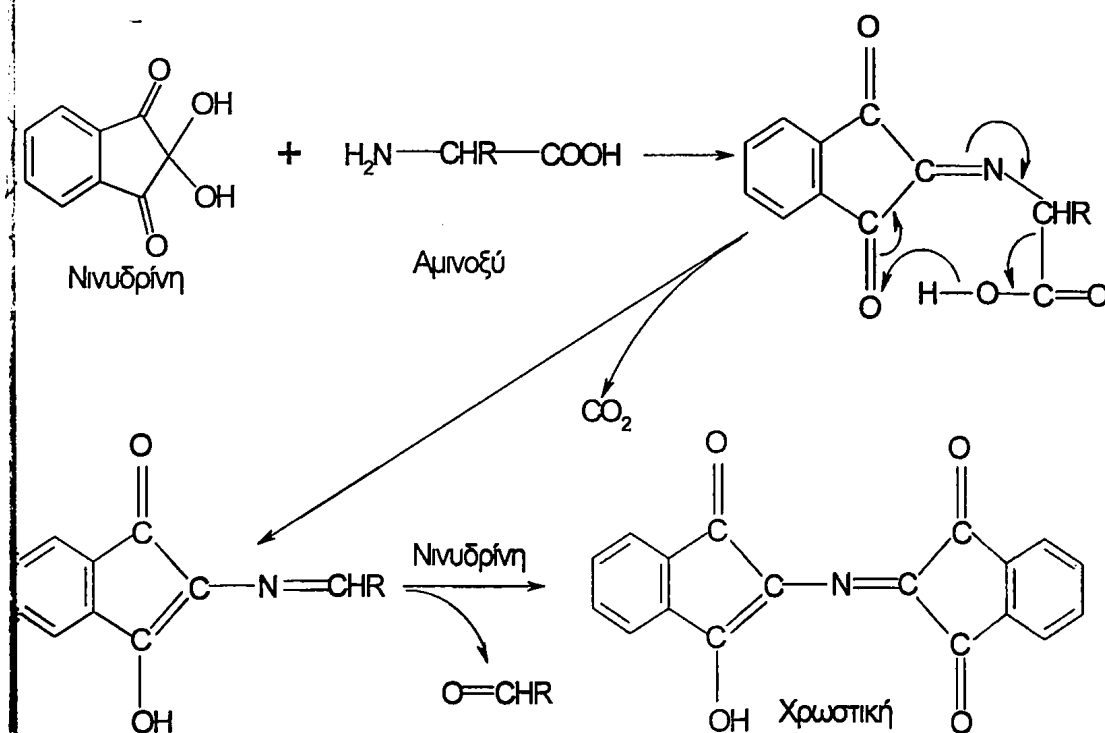
Εικόνα 7.1: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του πεπτιδίου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) με την Fmoc/tBu στρατηγική.



Ο έλεγχος για την ολοκλήρωση των επιμέρους συζεύξεων ή για την πλήρη απομάκρυνση των Fmoc ομάδων πραγματοποιήθηκε με το τεστ Kaiser. Για τη διεξαγωγή του τεστ Kaiser τοποθετούνται εντός δοκιμαστικού σωλήνα λίγοι κόκκοι πεπτιδορητίνης και 3 σταγόνες από τα παρακάτω διαλύματα:

- 2 ml KCN 0.001M/ 100 ml πυριδίνης
- 5g νινυδρίνης/ 100 ml αιθανόλης
- 400 mg φαινόλης/ 100 ml αιθανόλης

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο 100 °C για 30-60 sec. Η εμφάνιση χρώματος στους κόκκους (συνήθως μπλε) ή και στο διάλυμα υποδηλώνει την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων (θετικό τεστ Kaiser). Αν οι κόκκοι παραμένουν λευκοί και το διάλυμα παραμένει το χαρακτηριστικό υποκίτρινο χρώμα (όπως και πριν τη θέρμανση του) τότε το τεστ Kaiser είναι αρνητικό δηλαδή δεν πιστοποιείται η ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων.



Εικόνα 7.2: Αντίδραση νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες.

Τα πεπτίδια που δεν περιέχουν μεθειονίνη αποκόπηκαν από τη ρητίνη εντός φαιρικής φιάλης σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση με διάλυμα: 95% τριφθοροξικό οξύ (TFA) : 2.5% τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) : 2.5% H₂O (v/v). Τα πεπτίδια που περιέχουν μεθειονίνη αποκόπηκαν από τη ρητίνη με διάλυμα 92.5% TFA : 2.5% TIS:

2.5% H₂O: DMS (v/v). Για την ποσοτική αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη η περιεκτικότητα του διαλύματος αποκοπής σε TFA δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 90%. Η διάρκεια της αντίδρασης αποκοπής ήταν 3-4 ώρες. Μετά το χρονικό διάστημα 4 ωρών το TFA εξατμίζεται υπό κενό στο flash evaporator, ενώ στο υπόλειμμα προστίθεται DCM/εξάνιο (1/1 v/v) και ακολουθεί πάλι συμπύκνωση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3-4 φορές προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απομάκρυνση του TFA.

Όλα τα πεπτίδια καταβυθίστηκαν με παγωμένο διαιθυλαιθέρα (C₄H₁₀O 99.5%, Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien). Η παραλαβή των πεπτιδίων και η λυοφιλιοποίηση τους πραγματοποιήθηκε με διάλυμα οξικού οξέος 2N (CH₃COOH 2N). Η ταυτοποίηση όλων των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS.

Ο καθαρισμός τους έγινε με ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ανάστροφης φάσης, RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). Η πιστοποίηση του καθαρισμού των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC και ESI-MS. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για αυτές τις πειραματικές διαδικασίες ήταν: μεθανόλη MeOH (99.9% analytical reagent, LAB-SCAN Dublin, Ireland), ακετονιτρίλιο CH₃CN (99.9% analytical reagent, LAB-SCAN Dublin, Ireland) και δις-απεσταγμένο και απιονισμένο H₂O.



ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΛΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ A-I (apoA-I)

1. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), περιοχή 104-117, έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G

Το πεπτίδιο (MT=C₈₈H₁₃₀N₂₄O₂₅ MB=1924.15) συντέθηκε σε στερεή φάση κατά Merrifield, σε 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)-αμινομεθυλ]-φαινοξυ-ρητίνη (Rink Amide AM resin) σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική. Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου σε ρητίνη Rink Amide υποκατάστασης 0.67 mmol/g προστίθηκαν 0.75 g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως Fmoc-αμινοξέα παράγωγα. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το TBTU και ως βοηθητικό αμφοφιλικό το HOBt. Για κάθε ένα ισοδύναμο αμινομάδων της ρητίνης προστέθηκαν 3 ισοδύναμα προστατευμένου αμινοξέος, TBTU, και HOBt και έξι ισοδύναμα DIEA. Οι Fmoc-προστατευτικές ομάδες απομακρύνθηκαν με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 20% πυριδίνης σε DMF (μία φορά επί 5 min για την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους των Fmoc-ομάδων και μία φορά επί 15 min για την ποσοτική τους απομάκρυνση).

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-FQKKWQEEAELYRQ-R η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.91 g. Ο υπολογισμός της απόδοσης σύνθεσης του προστατευμένου πεπτιδίου έγινε με βάση τη σχέση $\alpha_{\text{σύνθ}} = \frac{m_{\text{πεπτίνης πρακτ.}}}{m_{\text{πεπτίνης θεωρητ.}}} = (1.91 \text{ g} / 2.44 \text{ g}) \times 100\% = 78.6\%$. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.96 g) μετά την αποπροστασία του ελευταίου αμινοξέος που προστέθηκε στην πεπτιδορητίνη (απομάκρυνση της Fmoc ομάδας του Fmoc-Phe-OH) και τις εκκλύσεις με DCM, ισοπροπανόλη και DMF, ακολούθησε εκτεταμένη εκκλύση της πεπτιδορητίνης με 0.56 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 15 ml πυριδίνης για 20 min. Ακολούθησαν εκκλύσεις, διήθηση της πεπτιδορητίνης υπό κενό και ξήρανση υπό κενό, μέχρι σταθερού βάρους. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 95% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 2 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια απομακρύνθηκε η ρητίνη με διήθηση υπό κενό και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού με τη βοήθεια μίγματος εξανίου/DCM 1:1 (v/v), για την

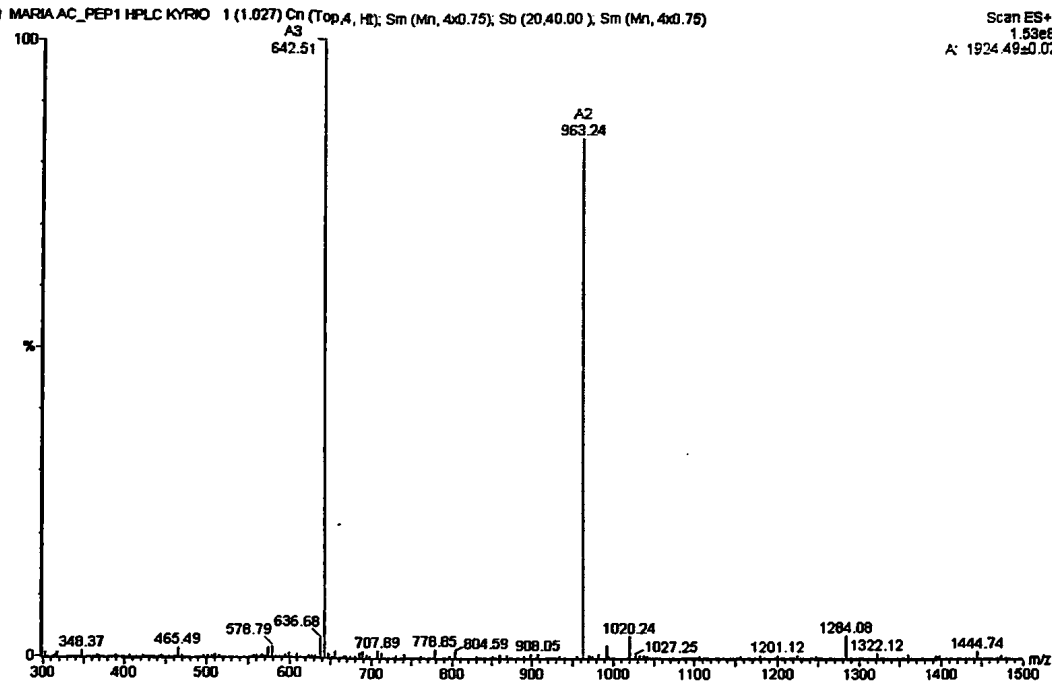


καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Το πεπτίδιο καταβυθίστηκε με κρύο διαιθυλαιθέρα και ψύξη σε παγόλουτρο. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων. Ακολούθησε η ξήρανση του πεπτιδίου μέχρι σταθερού βάρους. Ελήφθησαν 0.27 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 70.7%. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:4.5 v/v), σύστημα διαλυτών A ($\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA) και B ($\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50, χρόνο έκλυσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 33.32 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 19.08 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{\text{καθαρ}}=57.3\%$.

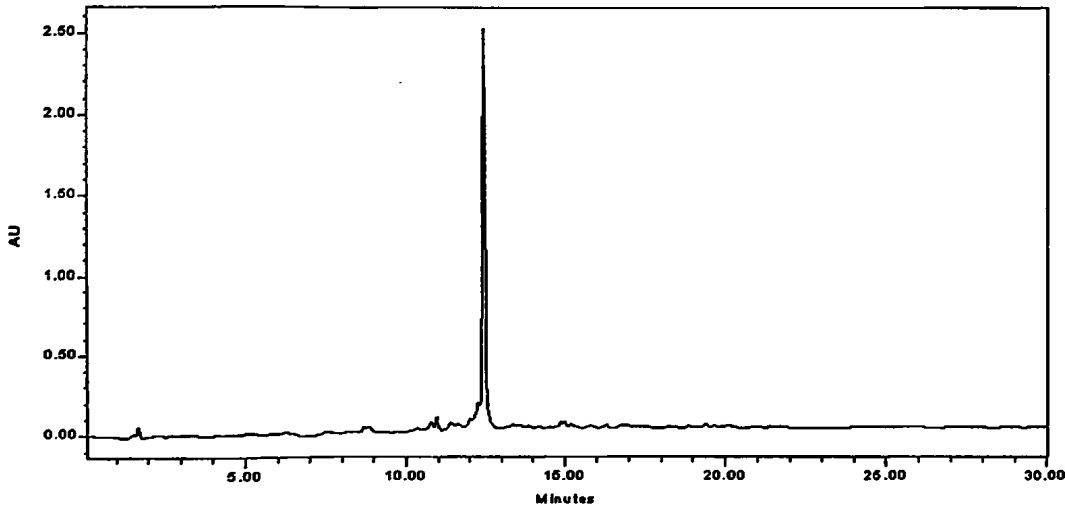
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος (Εικόνα 7.3) 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 1 ml $\text{H}_2\text{O}/0.05\%$ TFA. Με κόκκινες γραμμές στο φάσμα συμβολίζονται τα θετικά μοριακά ιόντα του πεπτιδίου που ανιχνεύτηκαν. Στη θέση A_2 βρίσκεται το μοριακό ιόν $(M + 2H^+)/2$ (όπου M = η μοριακή μάζα του δείγματος και H^+ = η μάζα του πρωτονίου) και στη θέση A_3 το $(M + 3H^+)/3$. Τα θετικά μοριακά ιόντα που μπορούν να προκύψουν στο συγκεκριμένο πεπτίδιο με αλληλουχία αμινοξέων Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ προέρχονται από την πρόσληψη ενός πρωτονίου από τις ε-αμινομάδες των δυο λυσινών και από την αμινομάδα της αργινίνης.





Εικόνα 7.3: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1924.15 ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1924.49.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.4: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλουσης: Α (H₂O/0.1 % TFA) και Β (CH₃CN/0.1 % TFA) από Α:Β= 95:5 σε Α:Β= 30:70.

2. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A

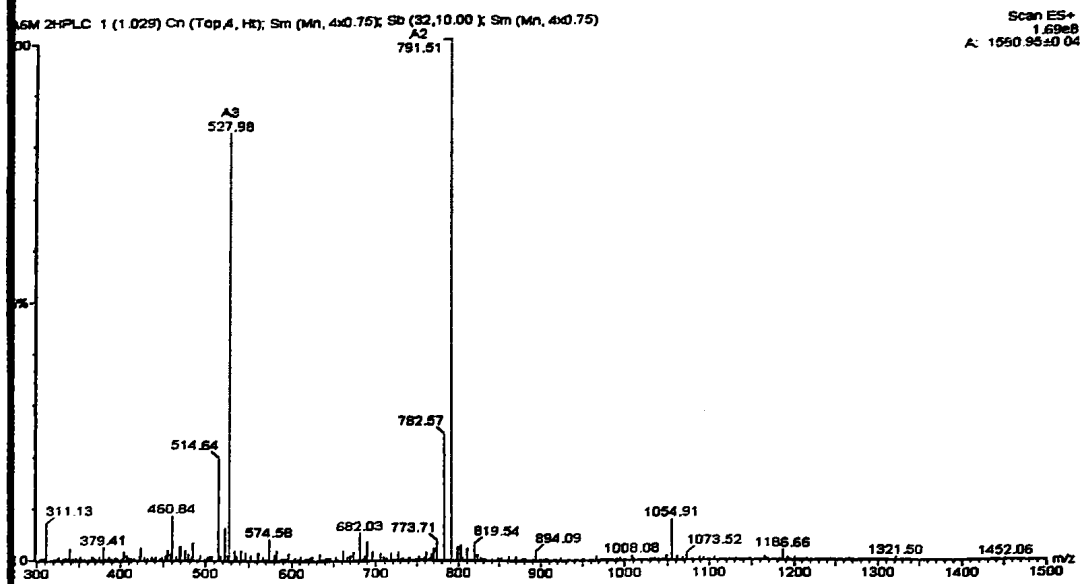
Για την παρασκευή 0.8 mmol πεπτιδίου (MT=C₆₄H₁₀₉N₂₅O₂₀S MB=1580.78) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 1.19 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-EMRDRARAHVDAL-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 2.48 g και η απόδοση σύνθεσης 80.4%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (1.24 g) προστέθηκε 1 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 30 ml πυριδίνης για 20 min, διαδικασία που επαναλήφθηκε δυο φορές. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 25 ml διαλύματος αποκοπής 94% TFA : 2% TIS: 2% H₂O: 2%DMS (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.48 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 94.4 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (1:4.5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 100.8 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 42.2 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{καθαρ}$ = 41.9%.

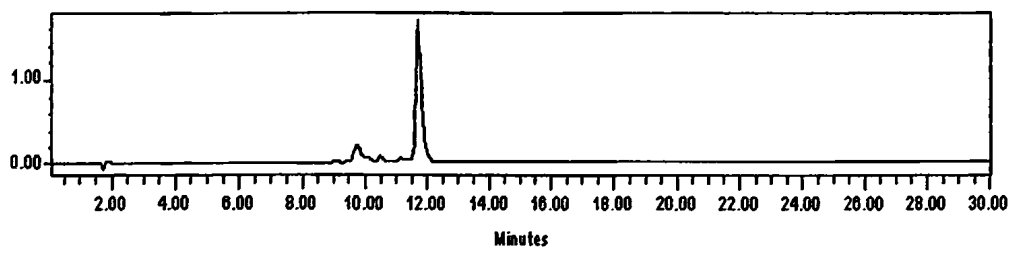
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων).





Εικόνα 7.5: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1580.78, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1580.95.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.6: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλυσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 95:5 σε A:B= 30:70.



3. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3), περιοχή 147-159, έλικα 6, Met¹⁴⁸→Ala¹⁴⁸, τάξη A

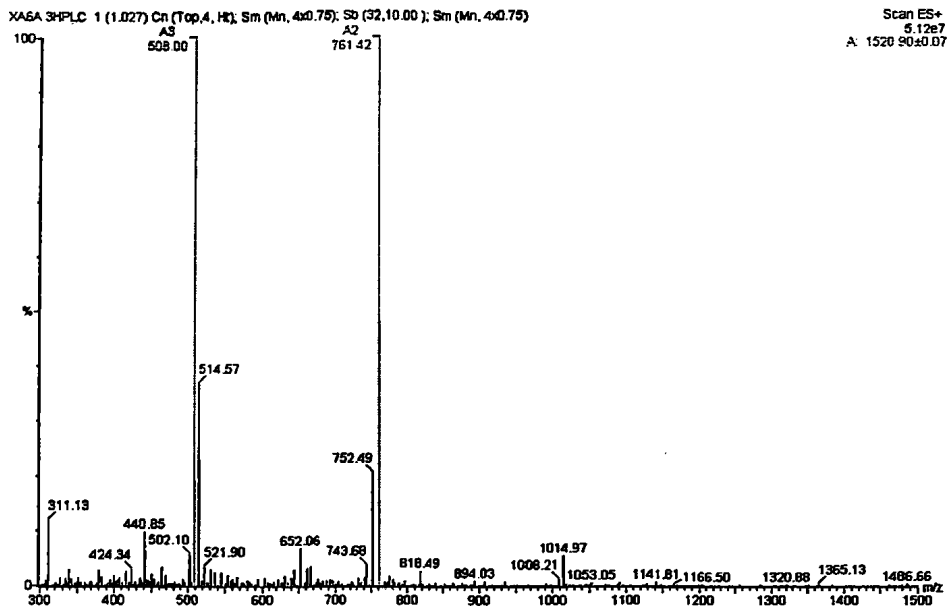
Για την παρασκευή 0.8 mmol πεπτιδίου (MT=C₆₂H₁₀₅N₂₅O₂₀ MB=1520.67) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 1.19 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-EARDRARAHDAL-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 2.48 g και η απόδοση σύνθεσης 80.4%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (1.24 g) προστέθηκε 1 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 30 ml πυριδίνης για 20 min. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 92.5% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.46 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 95.3%. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (1:4.5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 60:40, χρόνο έκλυσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 51.24 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 22.41 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{\text{καθαρ}}$ =43.7%.

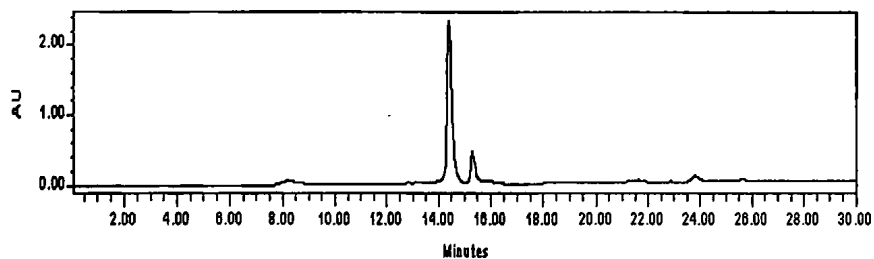
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων).





Εικόνα 7.7: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1520.67, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1520.90.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.8: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλουσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 95:5 σε A:B= 30:70.

4. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNVaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4), περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵, τάξη G

Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου (MT=C₆₁H₁₀₉N₂₁O₁₈S MB=1456.72) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 0.75 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-EMNVaOrnRARAAMDAL-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.53 g και η απόδοση σύνθεσης 86.7%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.77 g) ακολούθησε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 0.61 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 15 ml πυριδίνης για 20 min. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 92.5% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O: DMS (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.30 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 93.4 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

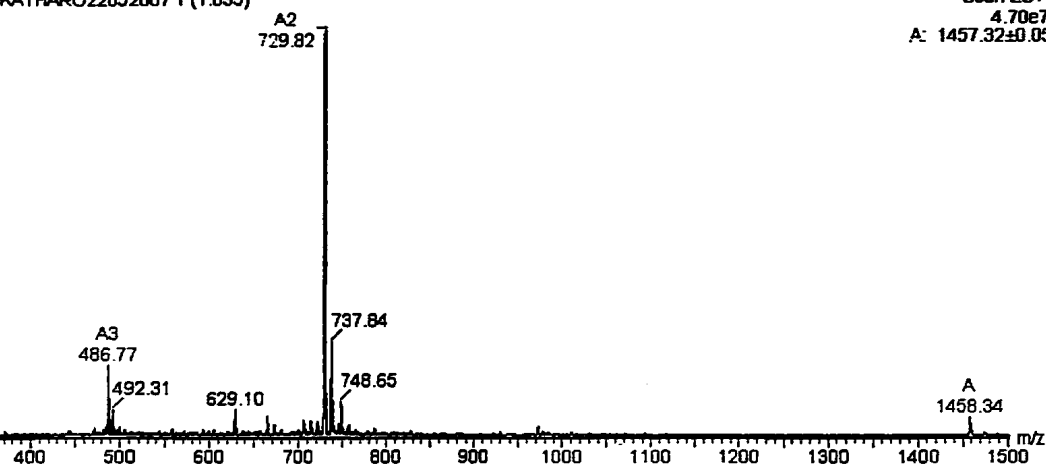
Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (0.5:5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 40:60, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 41.18 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 20.14 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{\text{καθαρ}}$ = 48.9 %.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 0.9 ml H₂O/0.05% TFA και 0.1 ml CH₃CN/ 0.05% TFA.



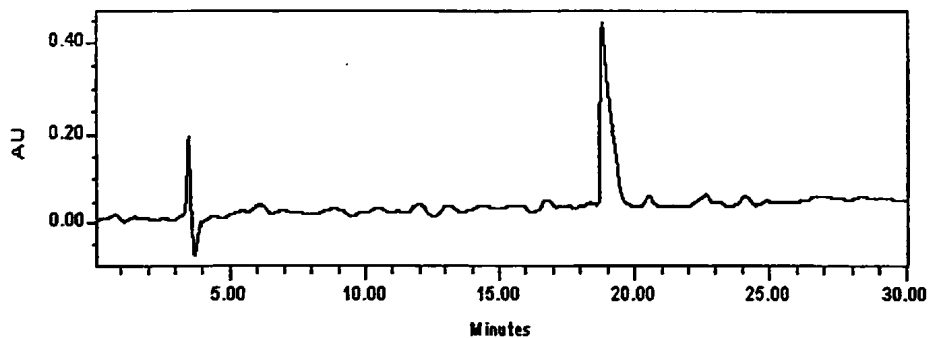
PEP6KATHARO22052007 1 (1.035)

Scan ES+
4.70e7
A: 1457.32±0.05



Εικόνα 7.9: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-EMNVaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1456.72, ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1457.32.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.10: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-EMNVaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλουσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 40:60.

5. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5), περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A

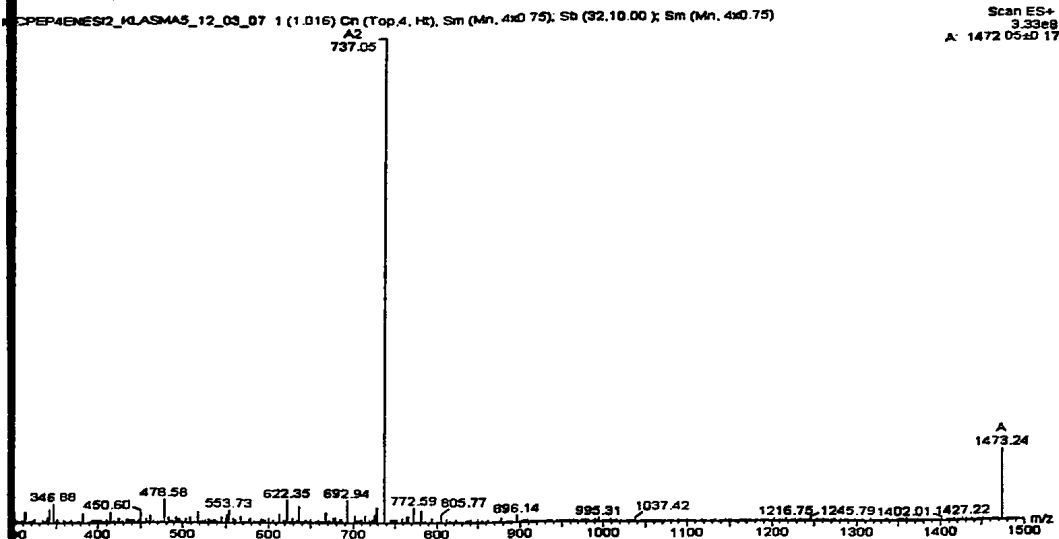
Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου (MT=C₆₃H₁₀₆N₂₄O₁₇ MB=1471.70) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 0.75 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-ARAHVDALRTHLA-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.33 g και η απόδοση σύνθεσης 66.4%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.67 g) ακολούθησε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 0.47 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 15 ml πυριδίνης για 20 min. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 95% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.17 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 72.7 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (1:4.5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 29 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 19.8 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{\text{καθαρ}}$ = 68.2 %.

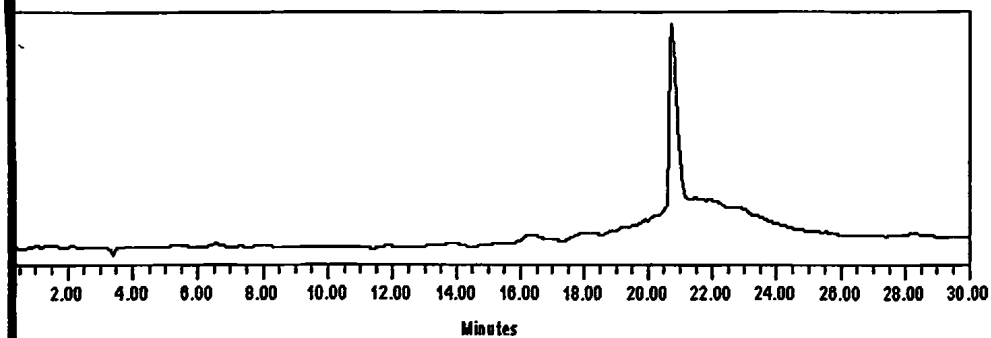
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 0.5 ml H₂O/0.05% TFA και 0.5 ml CH₃CN/ 0.05% TFA.





Εικόνα 7.11: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1471.70 ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1472.05.

καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.12: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλυσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50.

6. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6), περιοχή 152-164, έλικα 6, Thr¹⁶¹ → Lys¹⁶¹, τάξη G

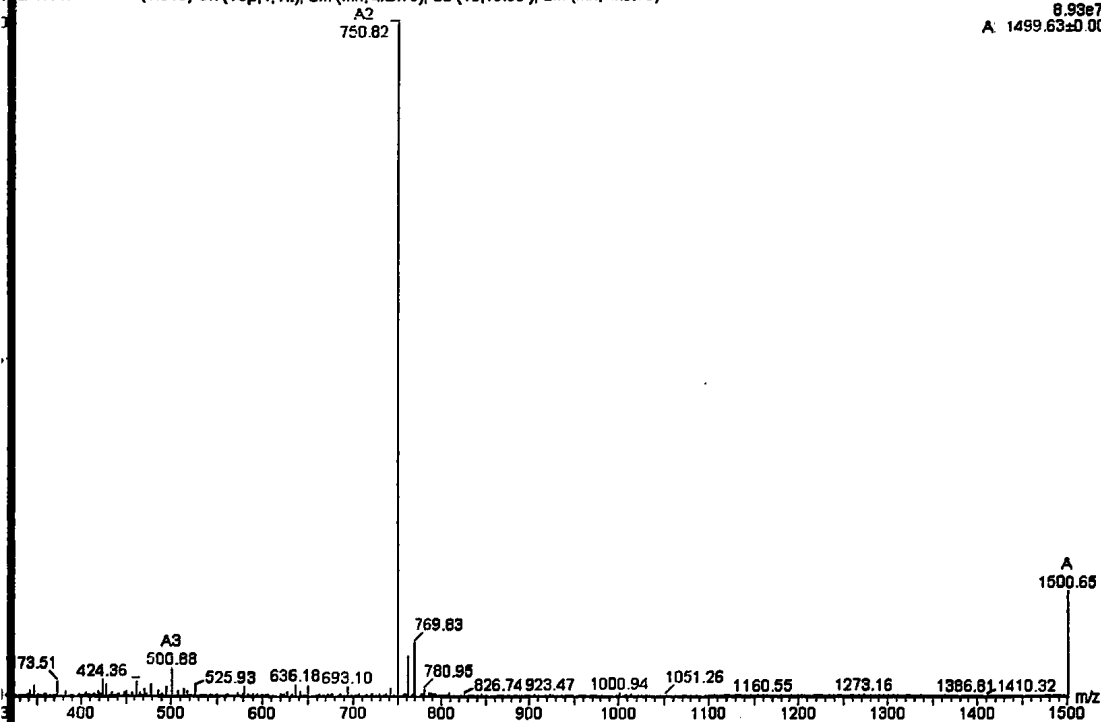
Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου (MT=C₆₅H₁₁₁N₂₅O₁₆ MB=1498.8) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 0.75 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-ARAHVDALRKHLA-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.77 g και η απόδοση σύνθεσης 86.6%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.89 g) ακολούθησε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 0.61 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 15 ml πυριδίνης για 20 min. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 95% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.31 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 99 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (0.5:5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 26.39 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 14.28 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{\text{καθαρ}} = 54.1 \%$.

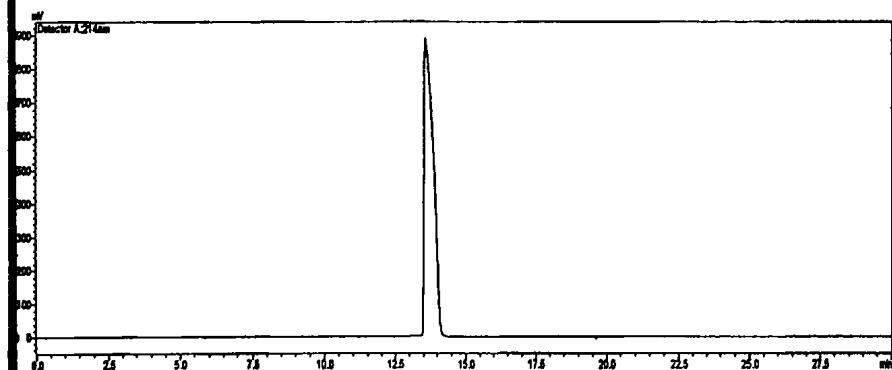
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 0.5 ml H₂O/0.05% TFA και 0.5 ml CH₃CN/ 0.05% TFA.





Εικόνα 7.13: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=1498.80 ευρεθέν μοριακό βάρος MB=1499.63.

καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.14: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλουσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 50:50.

**7. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7),
περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10, τάξη G**

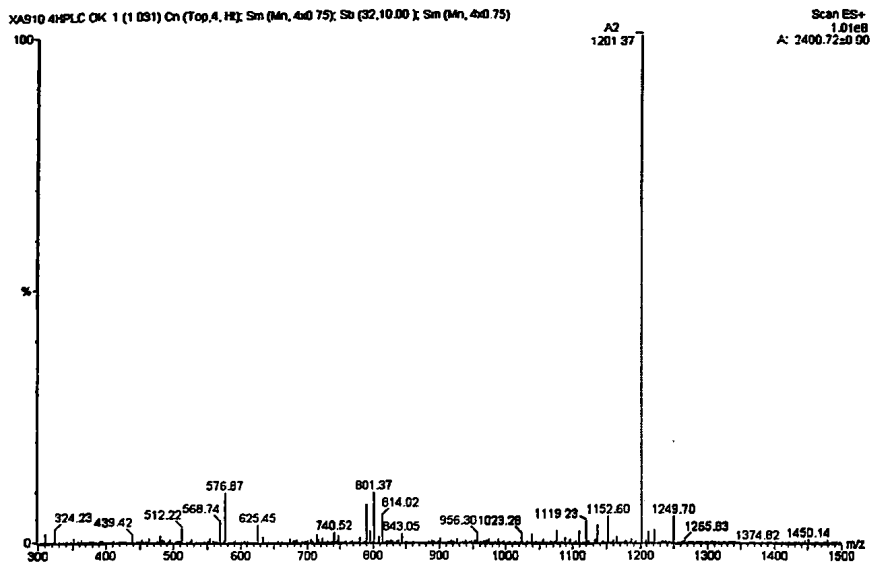
Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου (MT= C₁₁₂H₁₇₉N₂₇O₃₁ MB=2399.82) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 0.75 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.69 g και η απόδοση σύνθεσης 74.1 %. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.75 g) ακολούθησε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 1 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 29 ml πυριδίνης για 20 min, διαδικασία που επαναλήφθηκε δυο φορές. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 95% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.43 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 96 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (1:4.5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 70:30 σε A:B= 20:80, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 111 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 10 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού α_{καθαρ}= 11.1%.

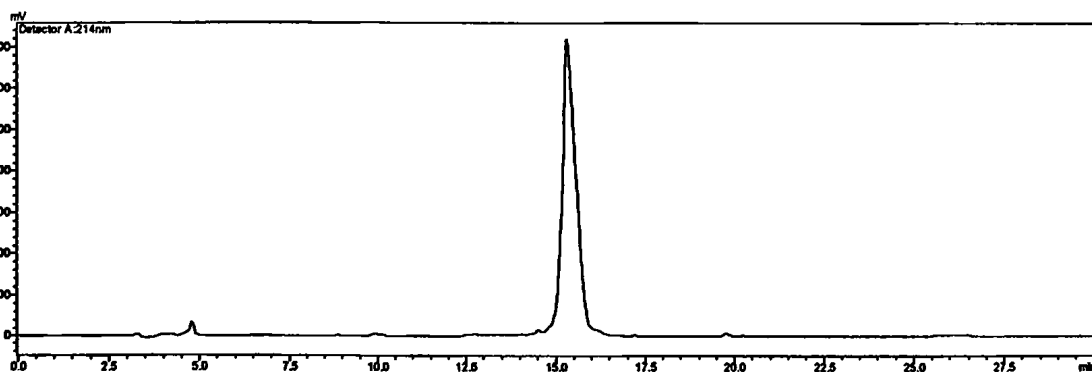
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 0.5 ml H₂O/0.05% TFA και 0.5 ml CH₃CN/ 0.05% TFA.





Εικόνα 7.15: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=2399.82 ευρεθέν μοριακό βάρος MB=2400.72.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.16: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλυσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 70:30 σε B= 20:80.

8. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10, Asp²¹³·Orn²¹³, Ser²²⁴·Lys²²⁴ τάξη A

Για την παρασκευή 0.5 mmol πεπτιδίου (MT= C₁₁₆H₁₉₁N₂₉O₂₈ MB=2439.96) σε ρητίνη Rink Amide AM υποκατάστασης 0.67 mmol/g ζυγίστηκαν 0.75 g ρητίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc- PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-R η μάζα της πεπτιδορητίνης ήταν 1.58 g και η απόδοση σύνθεσης 65%. Στη συνέχεια, στο μισό της ποσότητας (0.79 g) ακολούθησε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 0.46 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 15 ml πυριδίνης για 20 min. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης σε 20 ml διαλύματος αποκοπής 95% TFA : 2.5% TIS: 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαδικασίες για την παραλαβή του πεπτιδίου ήταν αυτές που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ελήφθησαν 0.39 g πεπτιδίου. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν 81.9 %. Το πεπτίδιο παρελήφθη ποσοτικά με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε.

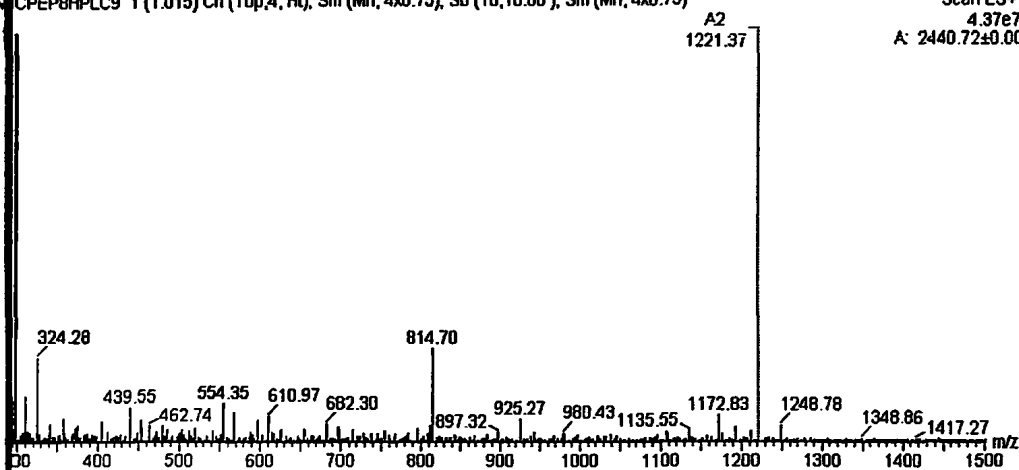
Ακολούθησε ο καθαρισμός του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: 7-9 mg ανά ένεση (5.5 ml) διαλύοντας το πεπτίδιο σε μίγμα CH₃CN: H₂O (2:3.5 v/v), σύστημα διαλυτών A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε A:B= 20:80, χρόνο έκλουσης 30 min και ροή διαλυτών 4.7 ml/min. Έγινε καθαρισμός 51.95 mg πεπτιδίου και παρελήφθησαν 17.89 mg καθαρού πεπτιδίου. Απόδοση καθαρισμού $\alpha_{καθαρο}$ = 34.5 %.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (ανίχνευση θετικών ιόντων). Για τη λήψη του φάσματος 0.2 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε 0.5 ml H₂O/0.05% TFA και 0.5 ml CH₃CN/ 0.05% TFA.



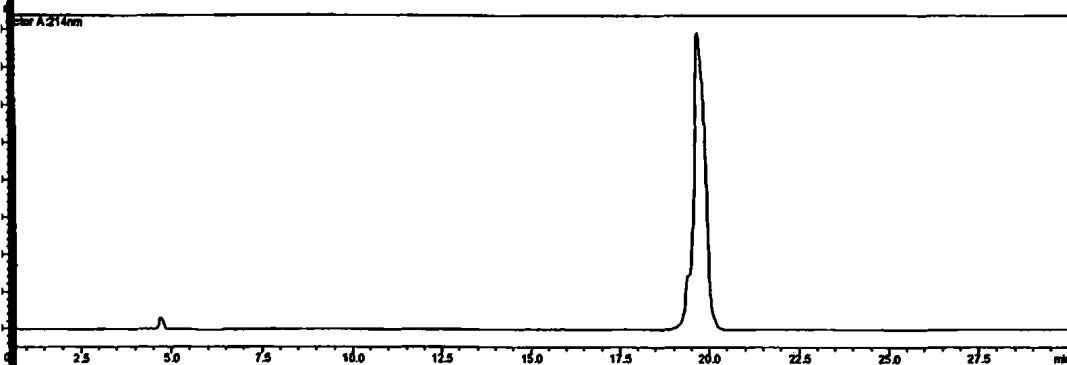
CPEP8HPLC9 1 (1.015) Cn (Top,A, Ht); Sm (Mn, 4x0.75); Sb (10,10.00); Sm (Mn, 4x0.75)

Scan ES+
4.37e7
A: 2440.72±0.00



Εικόνα 7.17: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), υπολογισθέν μοριακό βάρος MB=2439.96 ευρεθέν μοριακό βάρος MB=2440.72.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με την αναλυτική RP-HPLC.



Εικόνα 7.18: Φάσμα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρισμένου πεπτιδίου Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8). Συνθήκες λήψης φάσματος: Ροή διαλυτών 1 ml/min, χρόνος=30 min, σύστημα έκλουσης: A (H₂O/0.1 % TFA) και B (CH₃CN/ 0.1 % TFA) από A:B= 90:10 σε B= 20:80.



Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται συνοπτικά τα οκτώ πεπτιδικά ανάλογα της απολιποπρωτεΐνης A-I που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή καθώς και η απόδοση σύνθεσης και καθαρισμού τους.

Πίνακας 7.3: Πεπτιδικά ανάλογα της apoA-I, απόδοση σύνθεσης και καθαρισμού τους.

	<u>Έλικα-Τάξη Και Περιοχή</u>		<u>Απόδοση σύνθεσης</u>	<u>Απόδοση καθαρισμού</u>
1	4 Τάξη G	104-117 Met ¹¹² →Ala ¹¹²	78.6 %	57.3 %
2	6 Τάξη A	147-159	80.4 %	41.9 %
3	6 Τάξη A	147-159 Met ¹⁴⁸ →Ala ¹⁴⁸	80.4 %	43.7 %
4	6 Τάξη G	147-159 Arg ¹⁴⁹ ·Nva ¹⁴⁹ Asp ¹⁵⁰ ·Orn ¹⁵⁰ His ¹⁵⁵ ·Ala ¹⁵⁵	86.7 %	48.9 %
5	6 Τάξη A	152-164	66.4 %	68.2 %
6	6 Τάξη G	152-164 Thr ¹⁶¹ →Lys ¹⁶¹	86.6 %	54.1 %
7	9-10 Τάξη G	209-229	74.1 %	11.1 %
8	9-10 Τάξη A	209-229 Asp ²¹³ ·Orn ²¹³ Ser ²²⁴ ·Lys ²²⁴	65 %	34.5 %



8° ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πεπτιδία που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (8.1) μελετήθηκαν ως προς τη συμμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με φασματοφωτόμετρο Jasco J-815.

Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 100 μ M. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω διαλύτες:

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS buffer pH 7.4
- ◆ Μίγμα τριφθοροαιθανόλης/νερού, TFE/H₂O 50/50 (v/v)
- ◆ Διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε συγκέντρωση 8 mM
- ◆ Διάλυμα δεκατετραφωσφορυλοχολίνης C₁₄PC σε συγκέντρωση 5 mM

Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε ως εξής:

1. Περιοχή (range): 190-250 nm
2. Ευαισθησία (sensitivity): 100 mdeg
3. Ανάλυση (resolution): 0.2 nm
4. Επισυσσώρευση (accumulation): 2
5. Εύρος ζώνης (bandwidth): 1.0 nm
6. Ταχύτητα σάρωσης (scan speed): 50 nm/min



Πίνακας 8.1: Πεπτιδικά μοντέλα της αρσΑ-I που μελετήθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού CD.

Πεπτιδικό μοντέλο	Έλικα και Τάξη	Περιοχή	Αλληλουχία
1	4 Τάξη G	104-117 Met ¹¹² → Ala ¹¹²	Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH ₂
2	6 Τάξη A	147-159	Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂
3	6 Τάξη A	147-159 Met ¹⁴⁸ → Ala ¹⁴⁸	Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂
4	6 Τάξη G	147-159 Arg ¹⁴⁹ , Nva ¹⁴⁹ Asp ¹⁵⁰ , Orn ¹⁵⁰ His ¹⁵⁵ , Ala ¹⁵⁵	Ac-EMNVaOmRARA AVDAL-NH ₂
5	6 Τάξη A	152-164	Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂
6	6 Τάξη G	152-164 Thr ¹⁶¹ → Lys ¹⁶¹	Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂
7	9-10 Τάξη G	209-229	Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂
8	9-10 Τάξη A	209-229 Asp ²¹³ , Orn ²¹³ Ser ²²⁴ , Lys ²²⁴	Ac-PALEOmLRQGLLPVLEKFKVSF-NH ₂

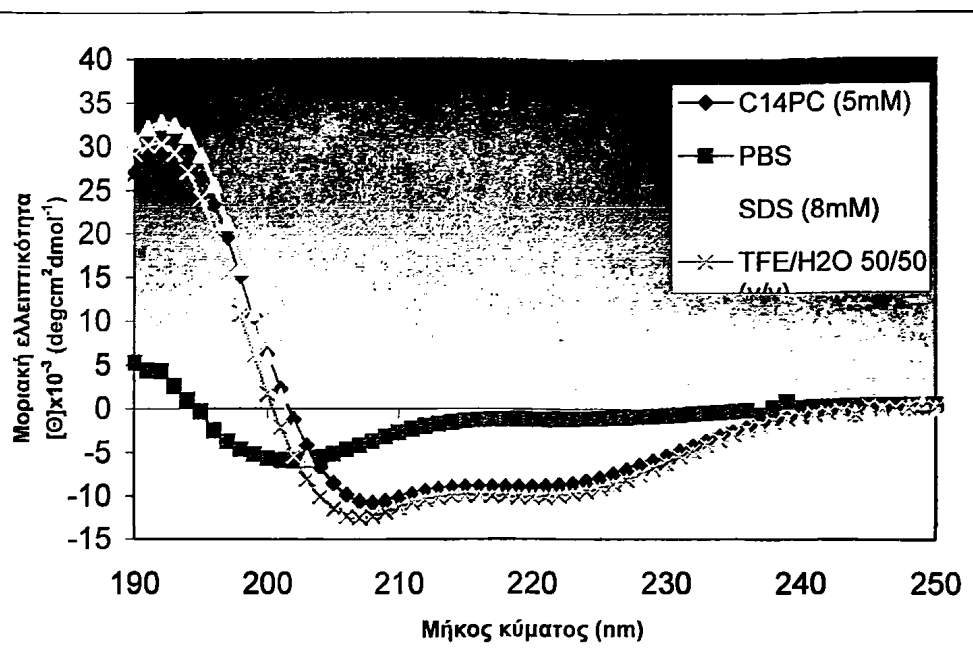
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ



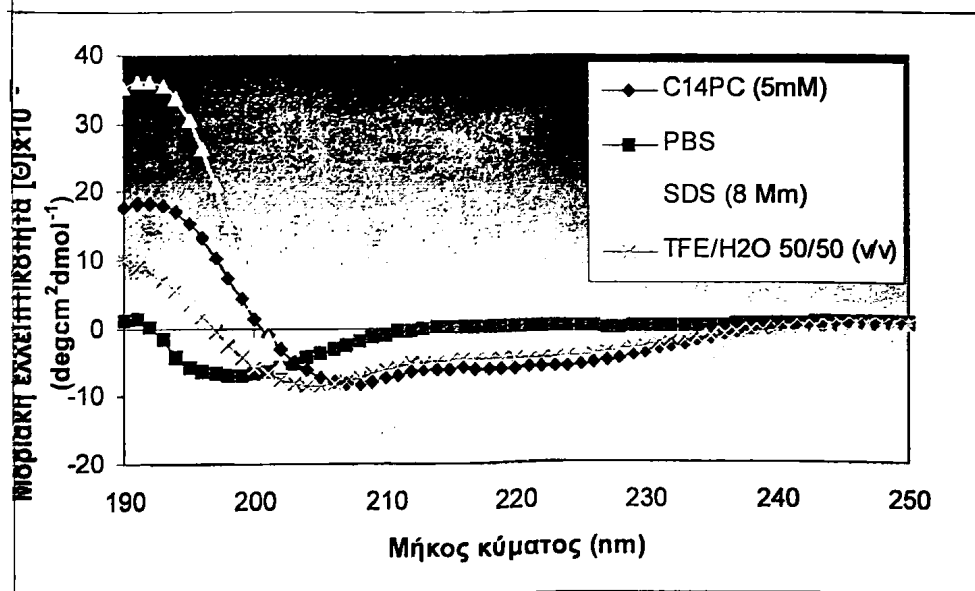
Μεταφρασμένη από το βιβλίο...

Στα σχήματα 1-8 απεικονίζονται τα CD φάσματα των πεπτιδίων 1-8 στους διαλύτες

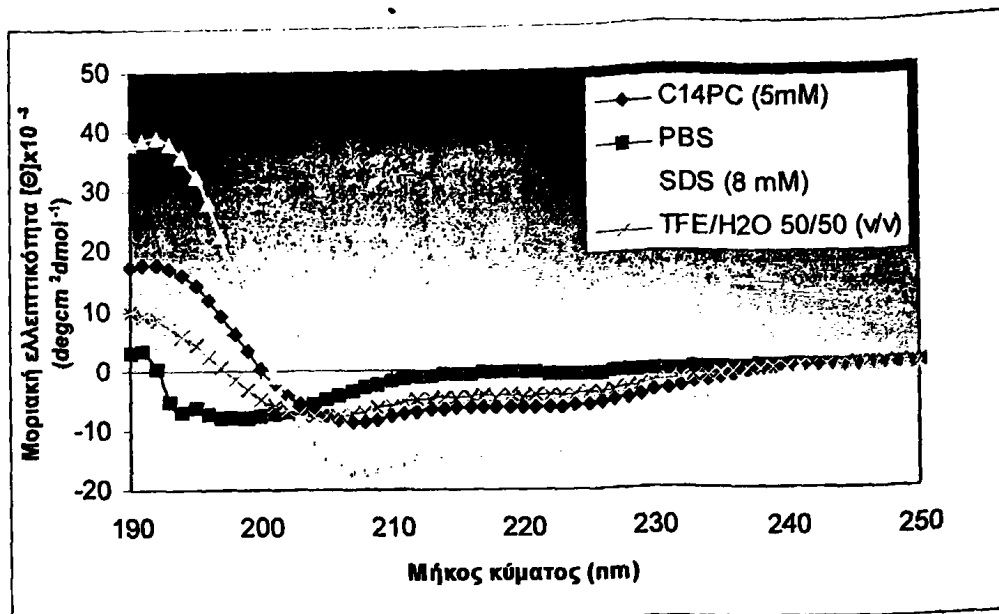
που προαναφέρθηκαν.



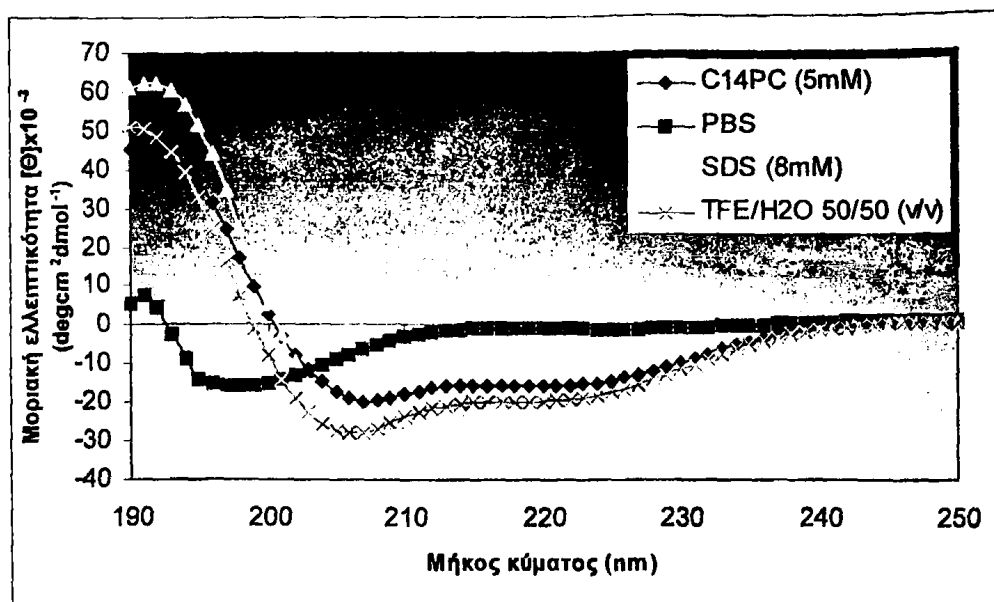
Σχήμα 8.1: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



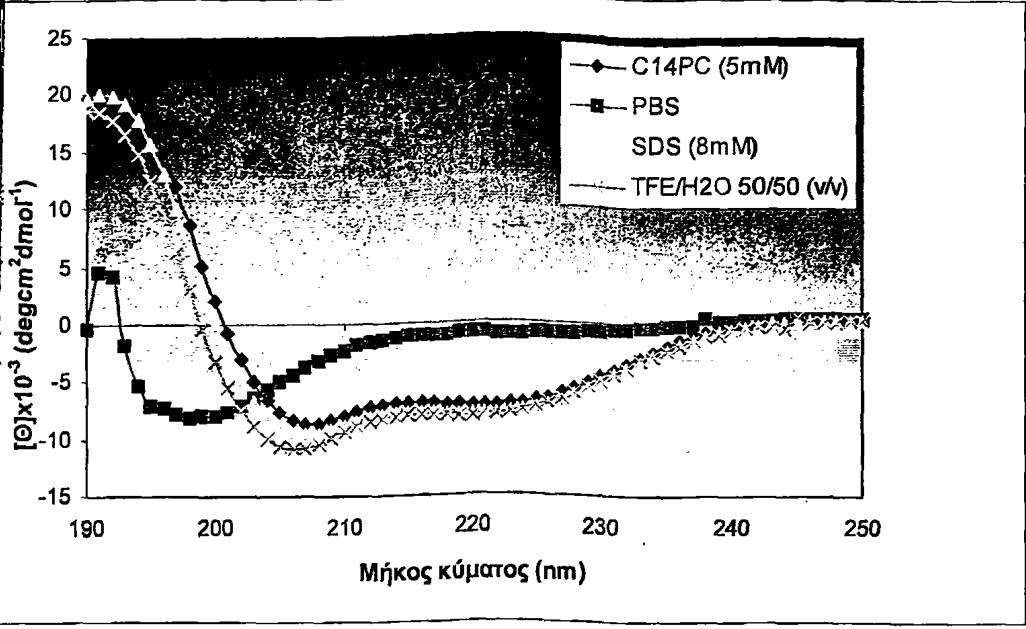
Σχήμα 8.2: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



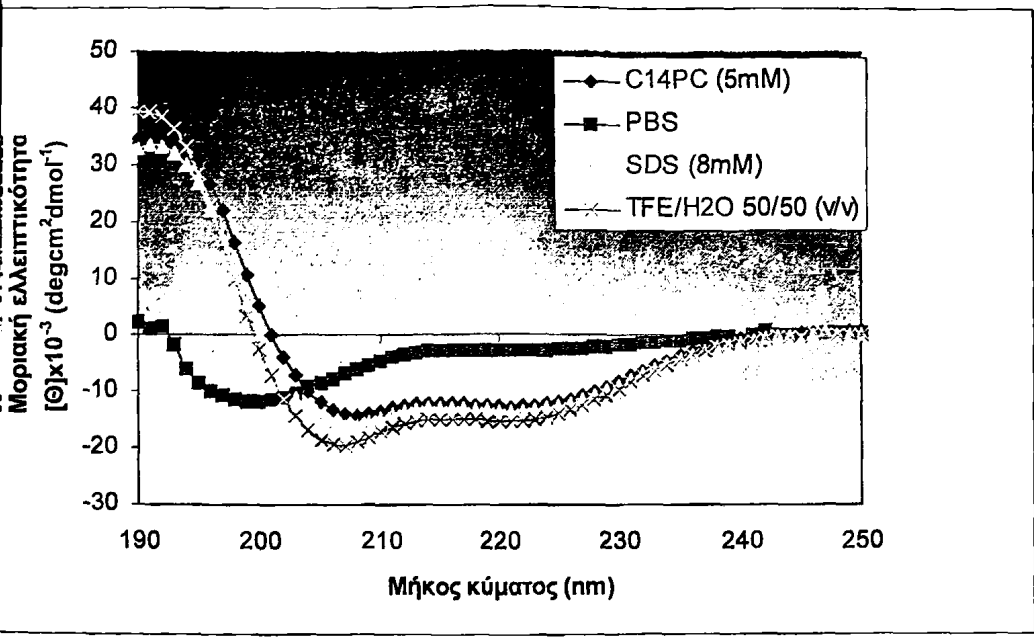
Εικόνα 8.3 CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



Εικόνα 8.4: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-EMNvaOrnRARAAVDAL-NH₂ (4) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).

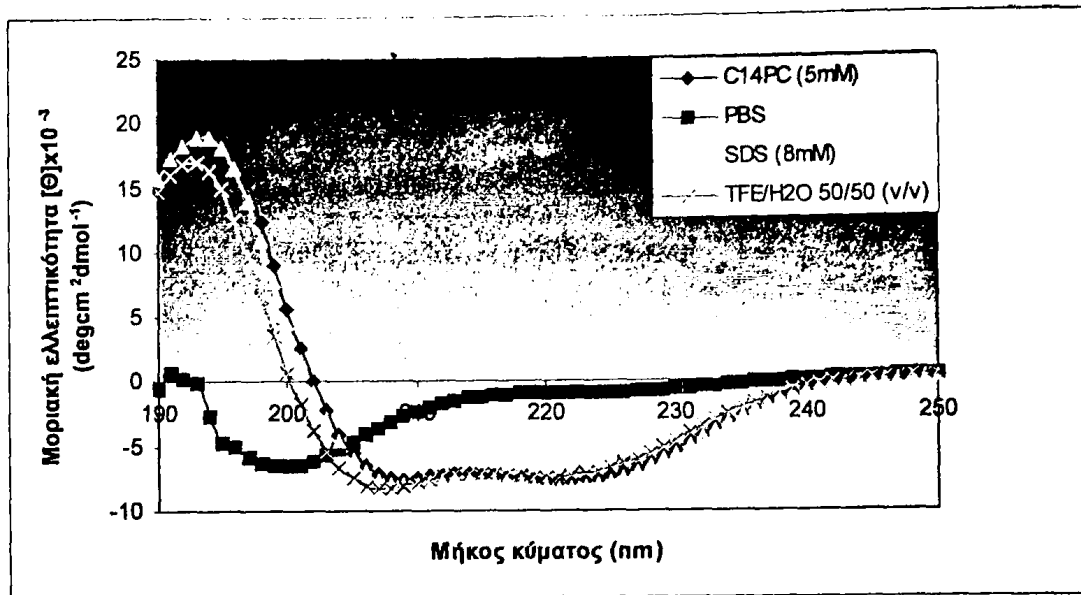


Εικόνα 8.5: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).

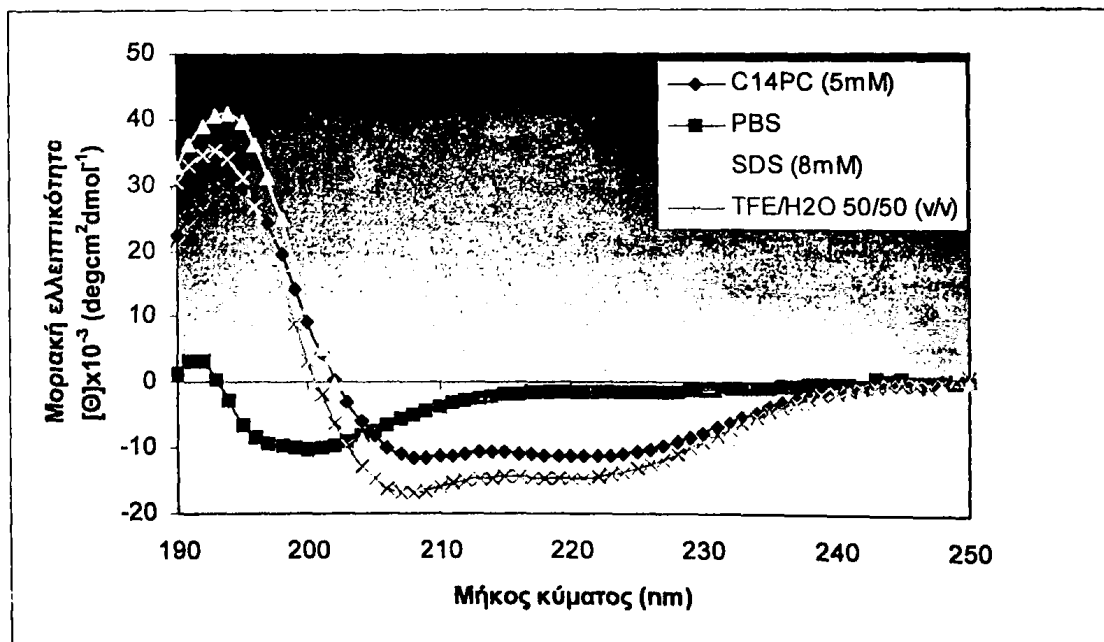


Εικόνα 8.6: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).





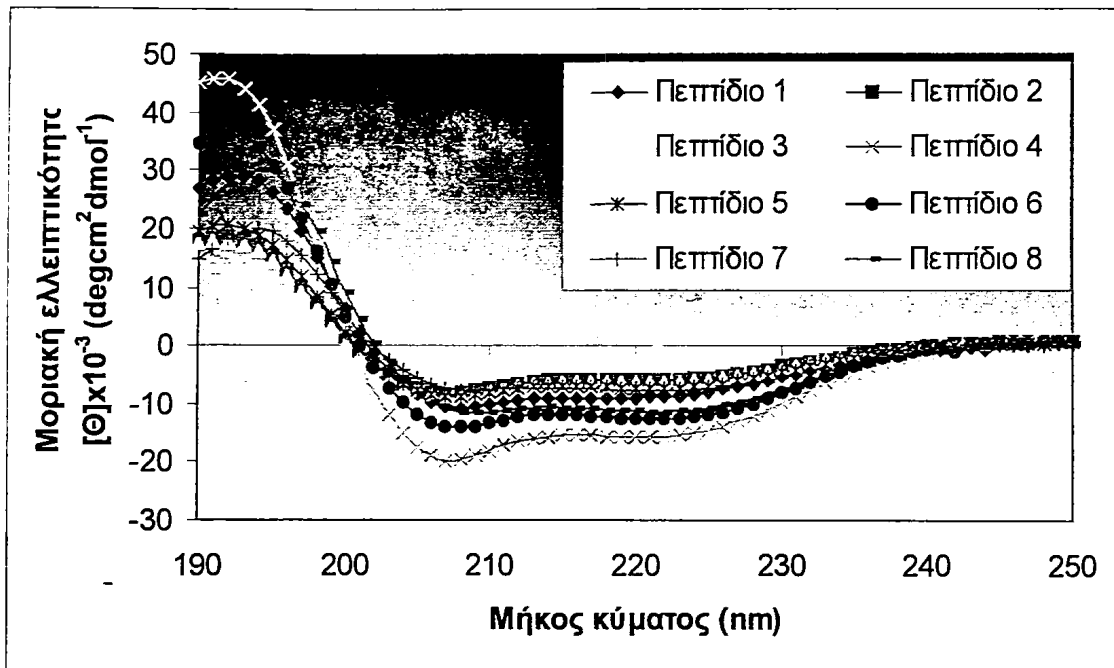
Εικόνα 8.7: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



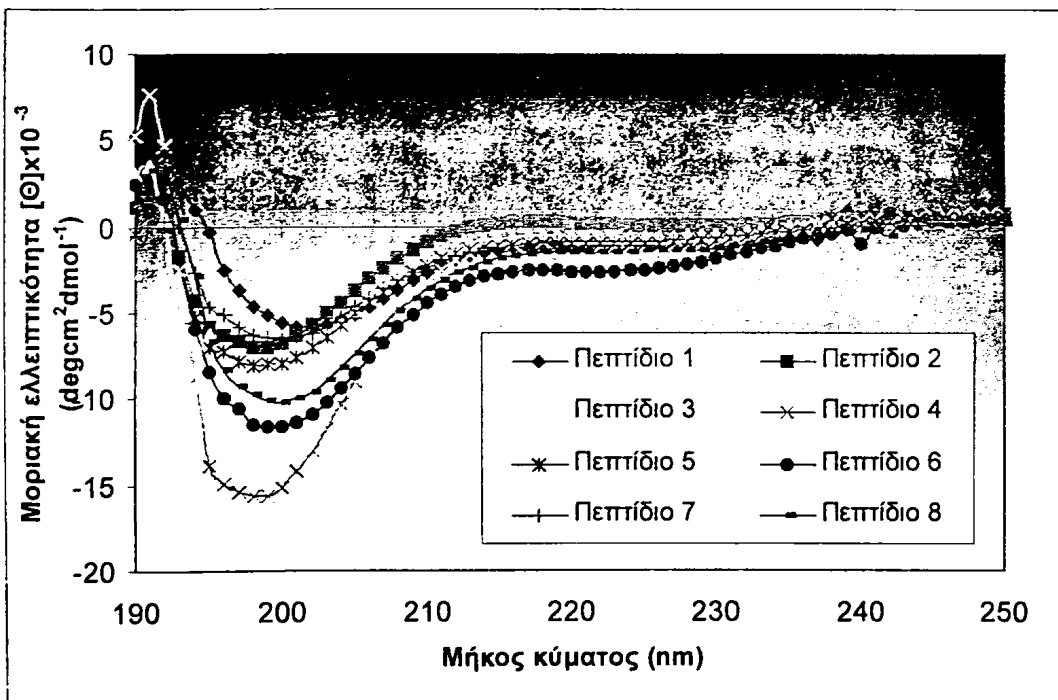
Εικόνα 8.8: CD φάσματα του πεπτιδίου Ac-PALEORnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).

Στα σχήματα που ακολουθούν απεικονίζονται τα φάσματα CD των πεπτιδίων 1-8

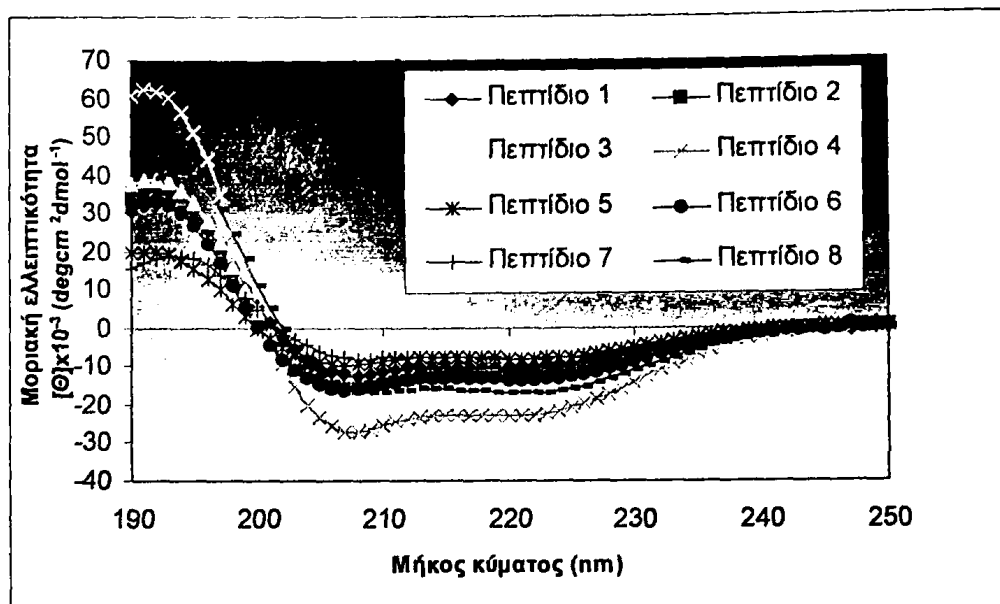
στον ίδιο διαλύτη.



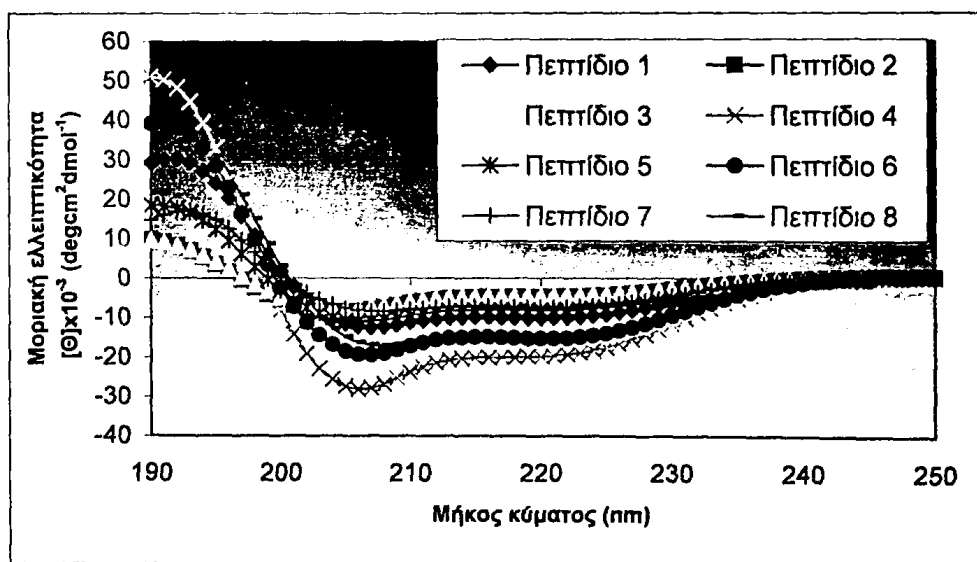
Εικόνα 8.9: CD φάσματα των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε $C_{14}PC$ 5mM.



Εικόνα 8.10: CD φάσματα των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε PBS.



Εικόνα 8.11: CD φάσματα των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε SDS 8mM.



Εικόνα 8.12: CD φάσματα των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε TFE/H₂O 50/50 (v/v).

ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΚΥΚΛΑΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ

Τα δεδομένα των ληφθέντων φασμάτων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα CDNN. Επιλέχθηκε η ομάδα με το μικρότερο αριθμό πρωτεϊνικών φασμάτων CD αναφοράς- επιλογή "Net using 13 base spectra (complex CD spectra).

Τα τελικά δεδομένα των αναλύσεων των φασμάτων από το πρόγραμμα CDNN αφορούν στο επί τοις εκατό ποσοστό της κάθε δομής (έλικα, αντιπαράλληλο φύλλο, παράλληλο φύλλο, β-στροφή, τυχαία διαμόρφωση) που λαμβάνει το κάθε πεπτίδιο, οι οποίες συνεισφέρουν στην τελική του διαμόρφωση.

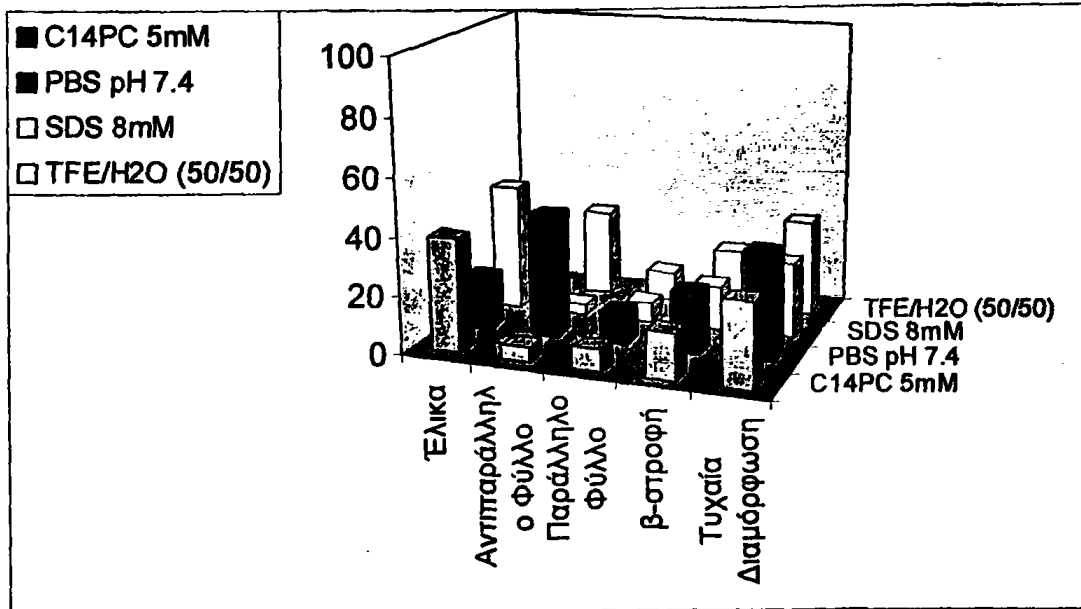
Ως πλέον αξιόπιστες αναλύσεις θεωρούνται αυτές των οποίων το άθροισμα των ποσοστών των επιμέρους δομών είναι πλησιέστερα στο 100%, ή έχουν απόκλιση το πολύ $\pm 5-10\%$. Τέτοια αποτελέσματα βρέθηκε ότι λαμβάνονται στην περιοχή 190-260 nm (μετά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων όλων των αναλύσεων), και αυτά θεωρούνται ως τα τελικά αποτελέσματα (Πίνακας 8.2).

Πίνακας 8.2: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση των πεπτιδίων, σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260 nm.

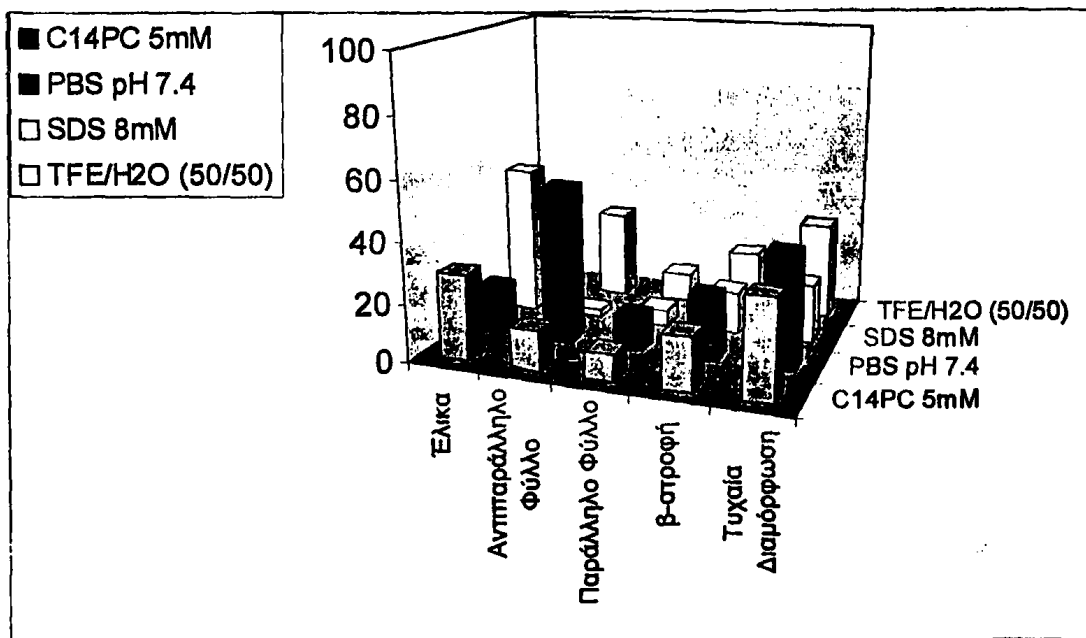


	Έλικα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 1: Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	39.5%	4.9%	7.4%	15.8%	28.8%
PBS pH 7.4	18.4%	42.7%	11.4%	21.0%	37.0%
SDS 8mM	44.0%	3.5%	6.6%	15.2%	25.6%
TFE/H ₂ O (50/50)	22.7%	30.1%	9.9%	20.0%	32.9%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 2: Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	29.0%	13.7%	9.1%	18.0%	33.2%
PBS pH 7.4	16.1%	52.6%	12.2%	21.8%	38.4%
SDS 8mM	50.6%	2.4%	5.3%	14.4%	19.8%
TFE/H ₂ O (50/50)	22.7%	30.1%	9.9%	20.0%	32.9%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 3: Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	29.0%	14.2%	9.0%	18.1%	32.4%
PBS pH 7.4	16.4%	52.6%	11.9%	21.8%	37.2%
SDS 8mM	54.3%	1.8%	4.8%	13.9%	17.9%
TFE/H ₂ O (50/50)	22.6%	29.6%	10.1%	19.9%	33.6%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 4: Ac-EMNV₃OrnRARA₃VDAL-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	62.2%	1.0%	3.8%	12.9%	13.4%
PBS pH 7.4	16.3%	59.8%	10.8%	22.5%	32.0%
SDS 8mM	82.8%	0.1%	1.8%	9.7%	5.3%
TFE/H ₂ O (50/50)	70.9%	0.9%	2.3%	12.4%	6.4%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 5: Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	31.2%	10.9%	8.7%	17.5%	32.3%
PBS pH 7.4	16.9%	50.8%	11.7%	21.6%	36.7%
SDS 8mM	31.6%	11.4%	8.4%	17.6%	30.5%
TFE/H ₂ O (50/50)	30.5%	14.2%	8.2%	18.1%	28.7%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 6: Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	49.0%	2.4%	5.7%	14.5%	22.1%
PBS pH 7.4	17.6%	52.2%	10.8%	21.9%	32.9%
SDS 8mM	48.4%	3.1%	5.4%	14.9%	19.6%
TFE/H ₂ O (50/50)	55.1%	2.2%	4.3%	14.2%	14.6%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 7: Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	31.3%	9.3%	9.3%	17.1%	35.3%
PBS pH 7.4	17.1%	49.0%	11.8%	21.5%	37.4%
SDS 8mM	31.4%	9.6%	9.1%	17.2%	34.4%
TFE/H ₂ O (50/50)	29.5%	13.2%	9.0%	17.9%	32.7%
ΠΕΠΤΙΑΙΟ 8: Ac-PALEOrnLRQGLLPVLGKFKVSF-NH₂					
C ₁₄ PC 5mM	42.9%	3.3%	7.1%	15.1%	28.7%
PBS pH 7.4	17.6%	50.6%	11.0%	21.7%	34.1%
SDS 8mM	59.7%	0.9%	4.7%	12.7%	18.8%
TFE/H ₂ O (50/50)	52.8%	2.1%	5.0%	14.2%	18.2%



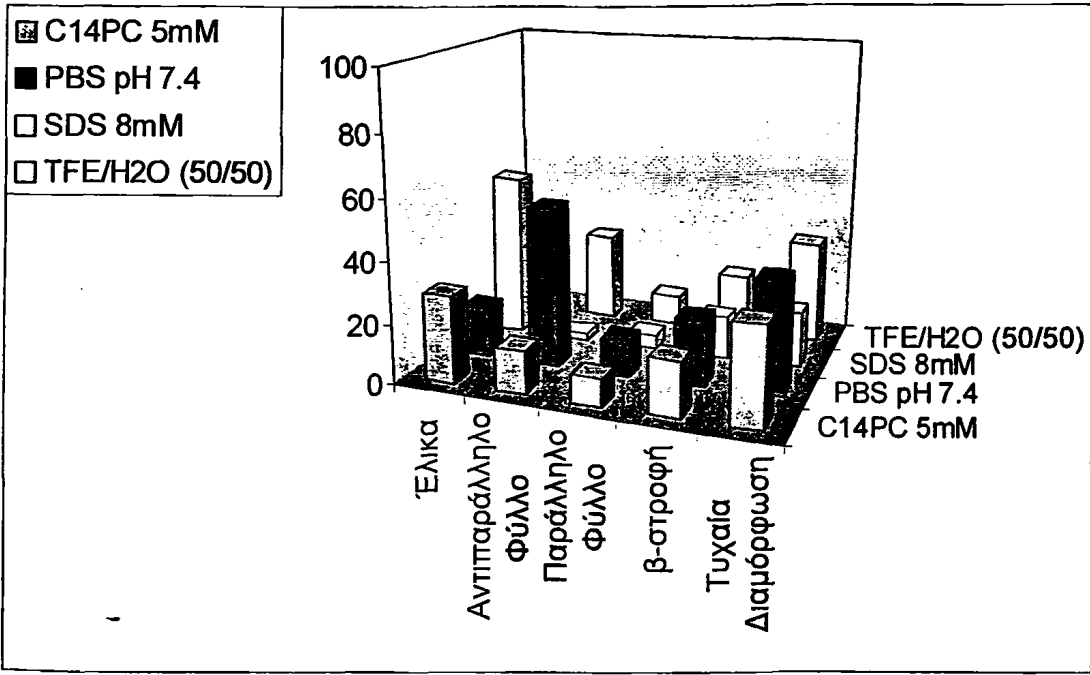


Εικόνα 8.13: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).

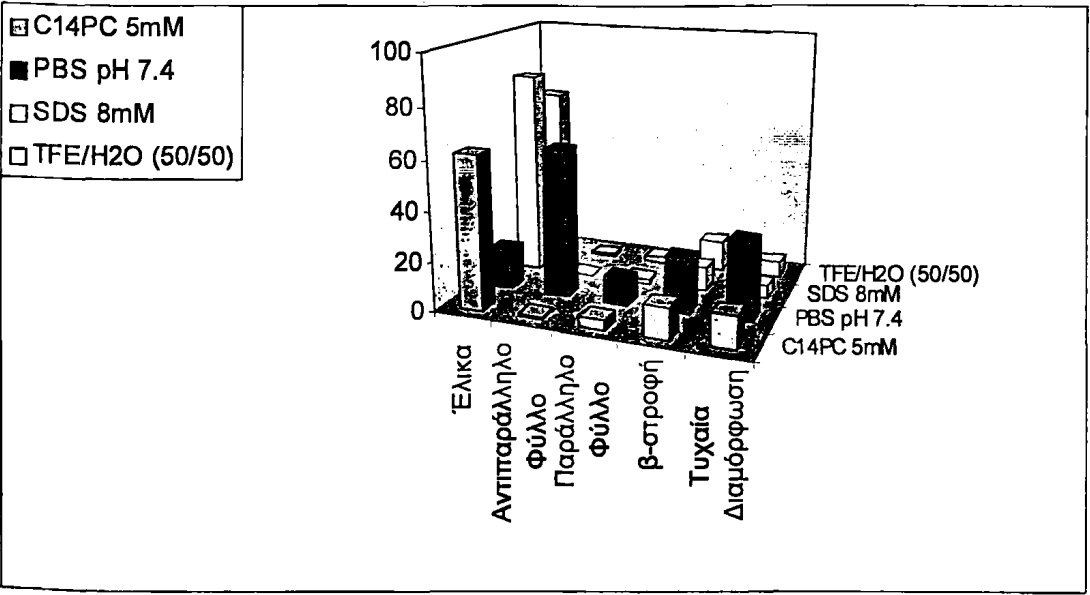


Εικόνα 8.14: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).

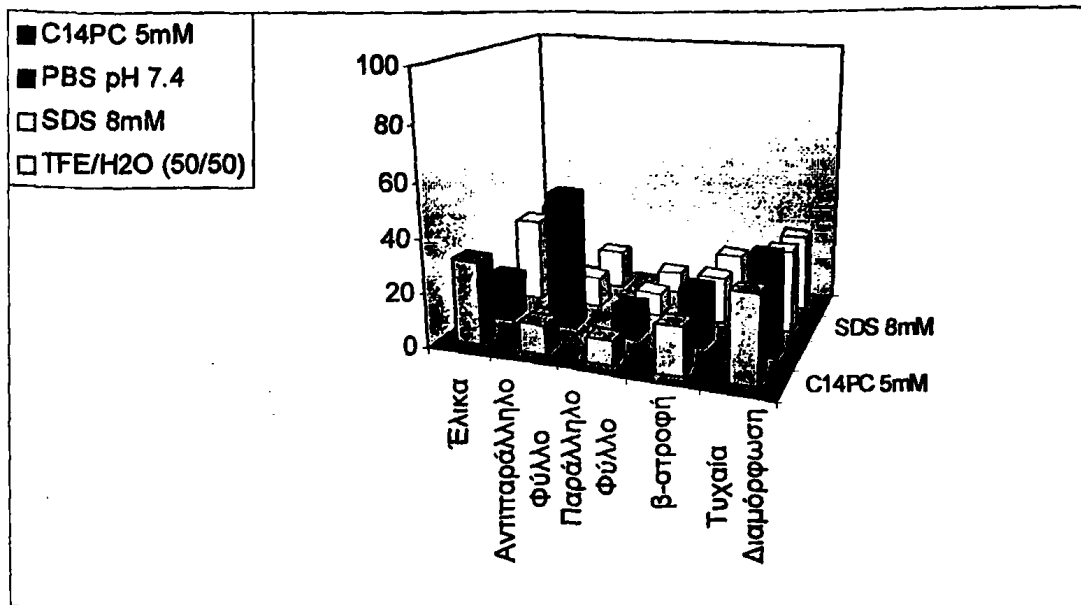




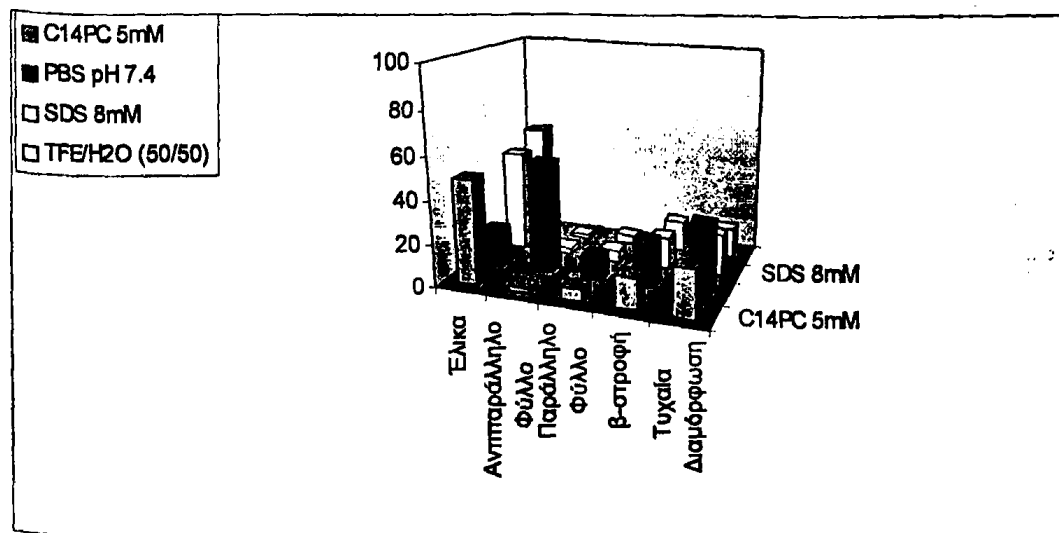
Εικόνα 8.15: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



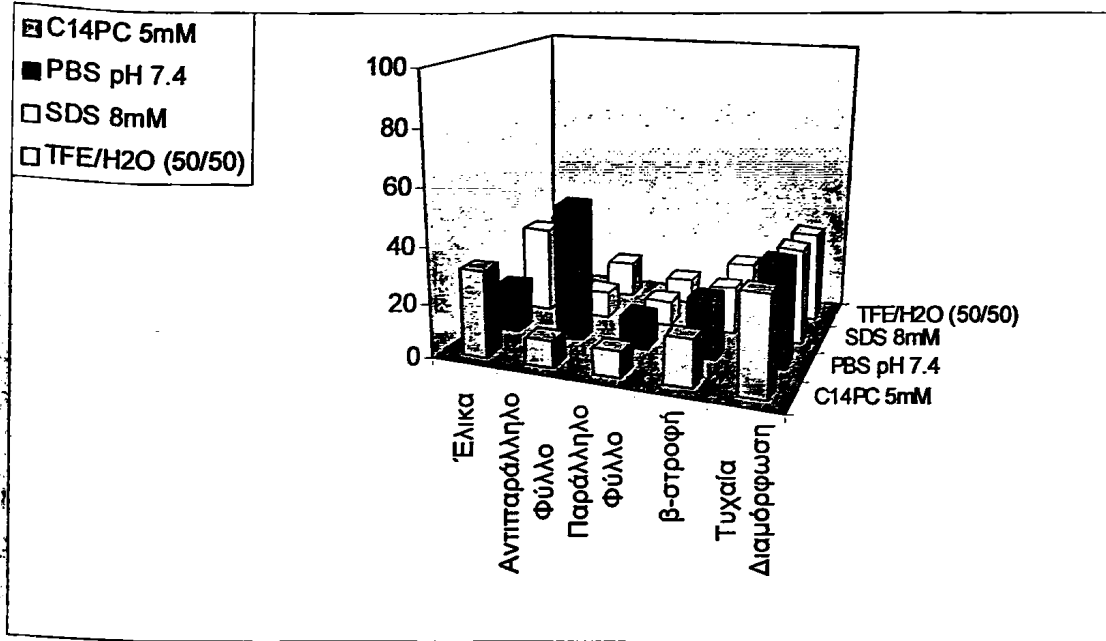
Εικόνα 8.16: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-EMNvaOgnRARAHDAL-NH₂ (4) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



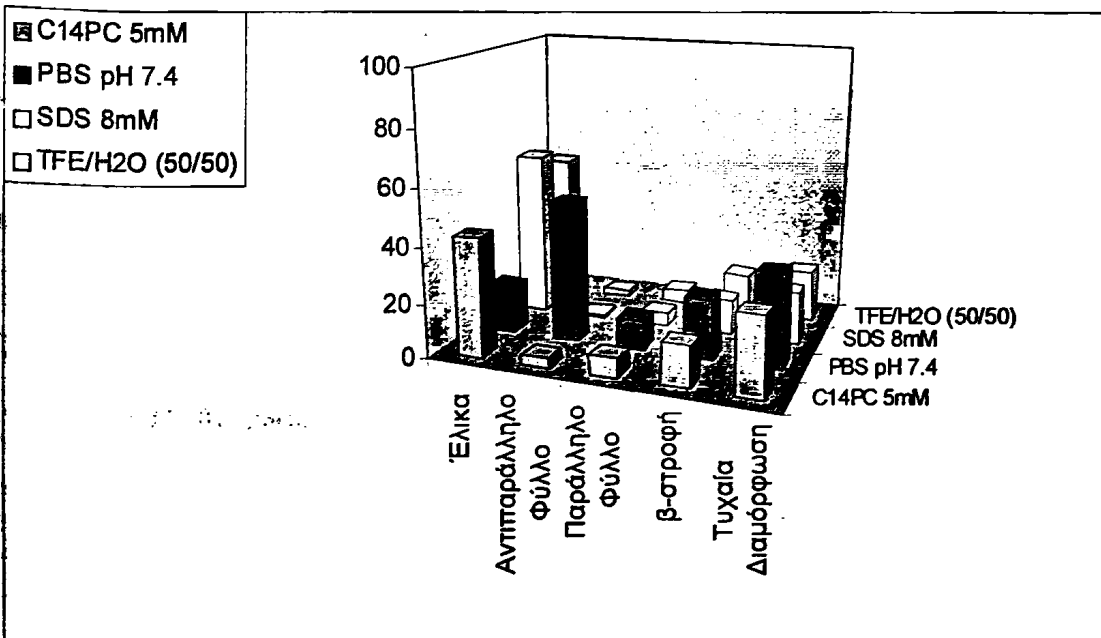
Εικόνα 8.17: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



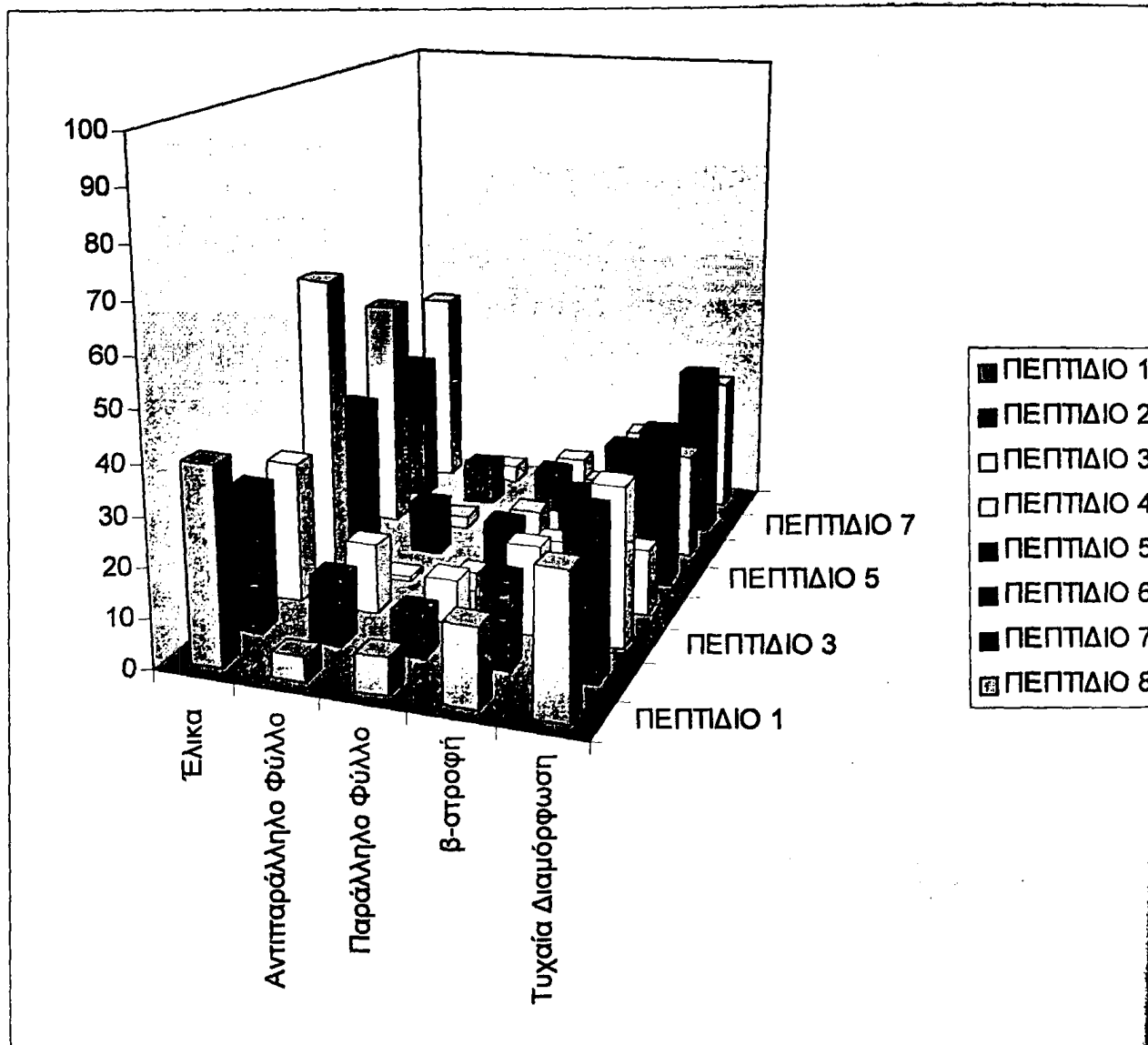
Εικόνα 8.18: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRKHELA-NH₂ (6) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



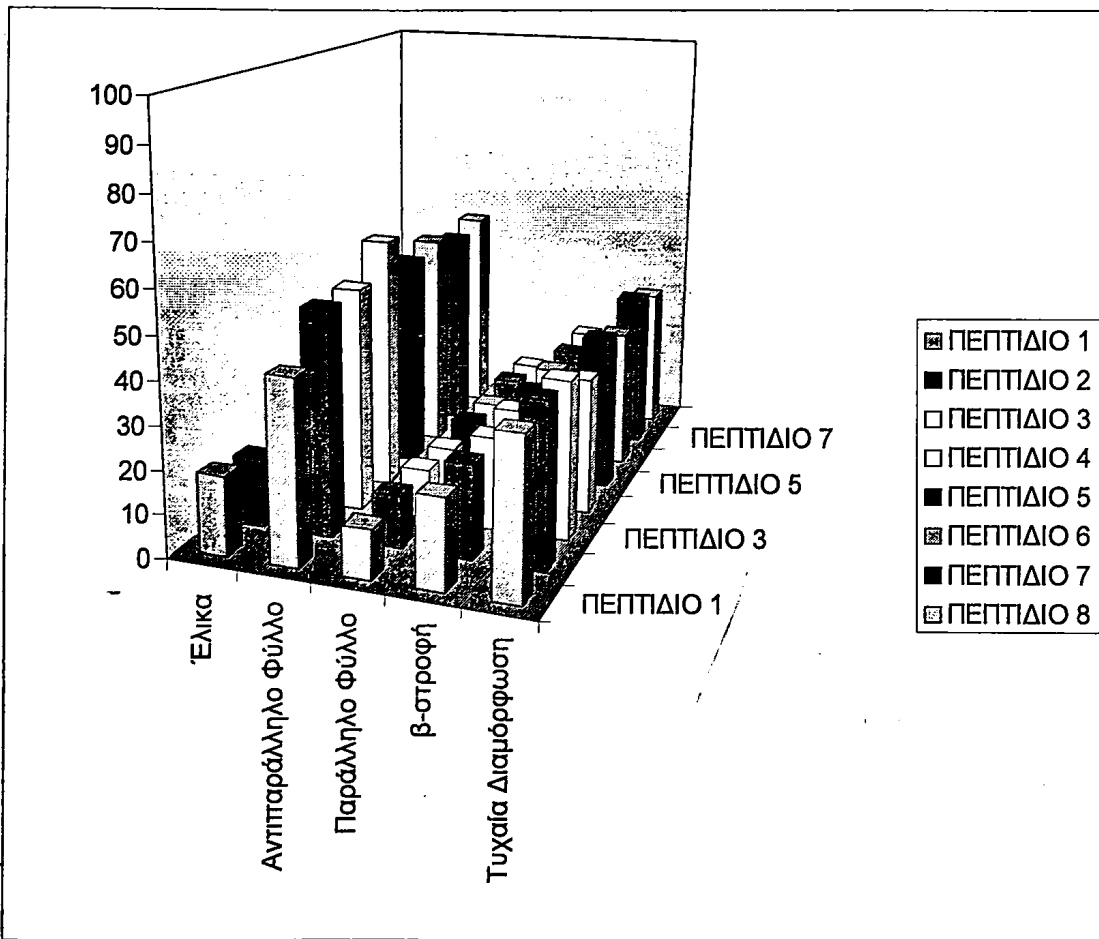
Εικόνα 8.19: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-PALEDLRQGLLPVLESEFKVSF-NH₂ (7) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



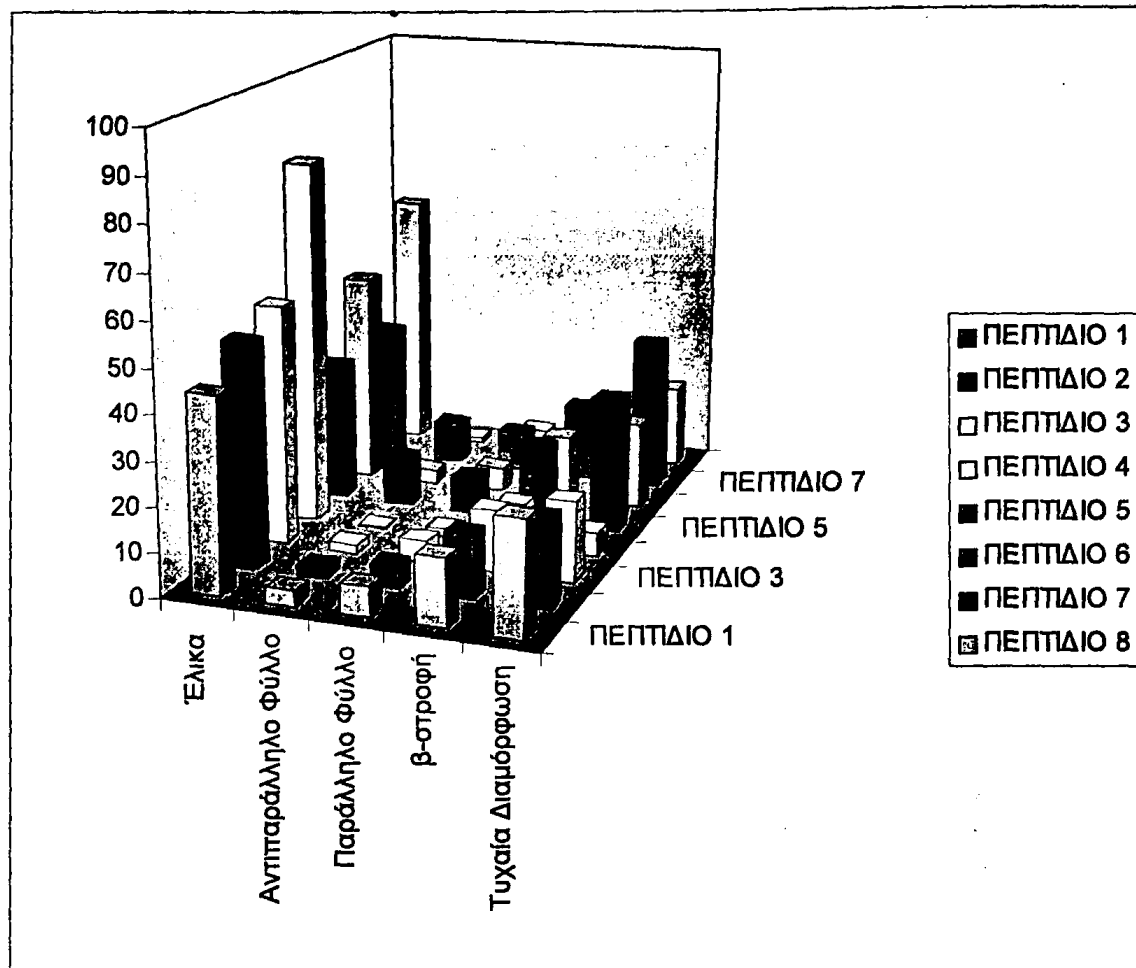
Εικόνα 8.20: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD του πεπτιδίου Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) 10⁻⁴ M σε C₁₄PC 5mM, PBS, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v).



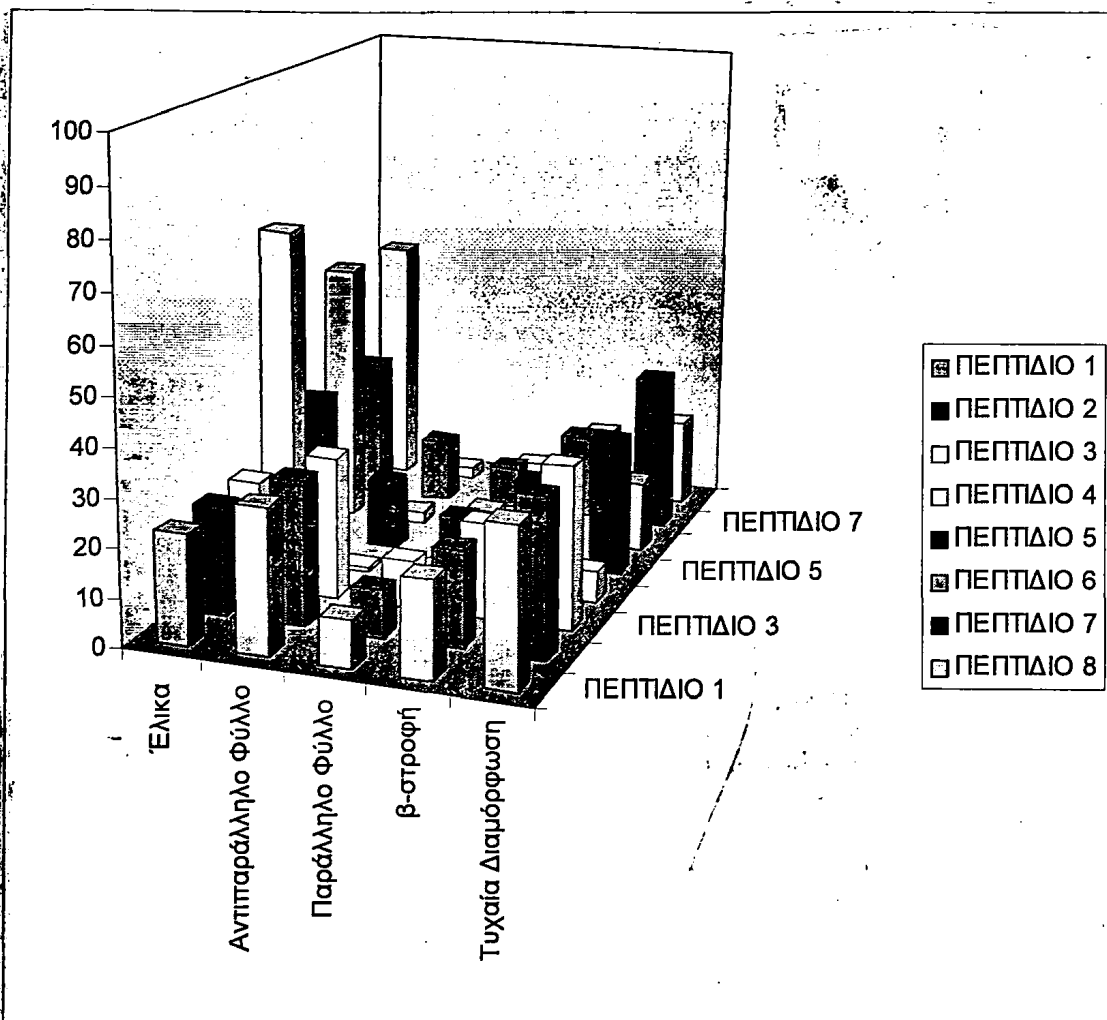
Εικόνα 8.21: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε $C_{14}PC$ 5mM.



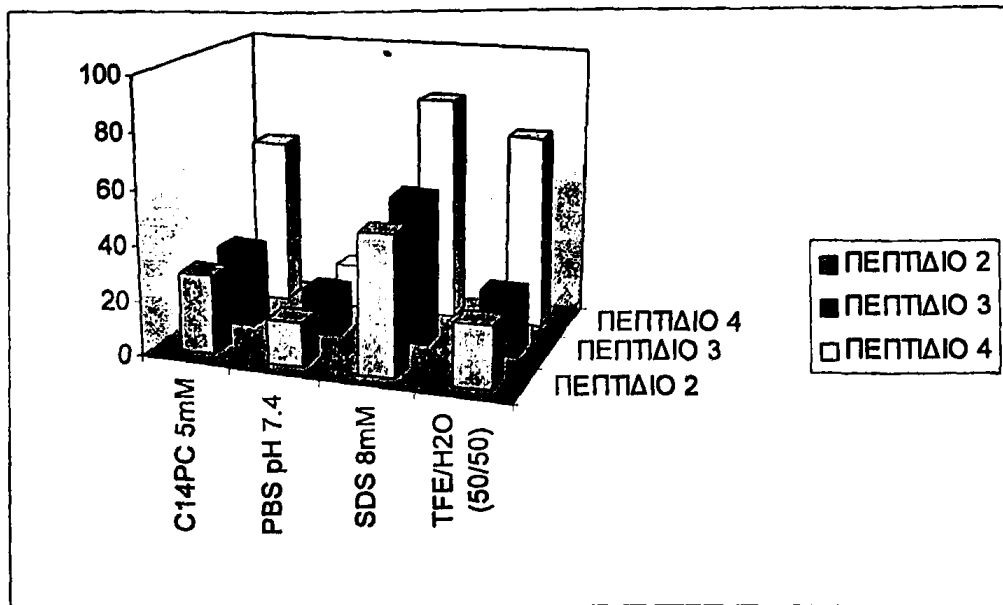
Εικόνα 8.22: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} Μ σε PBS.



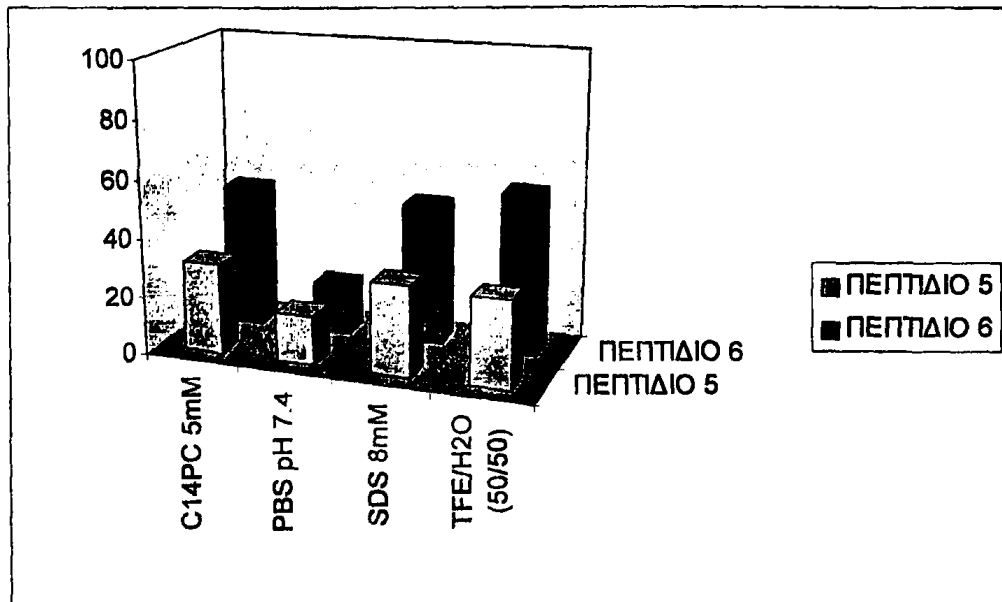
Εικόνα 8.23: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε SDS 8mM.



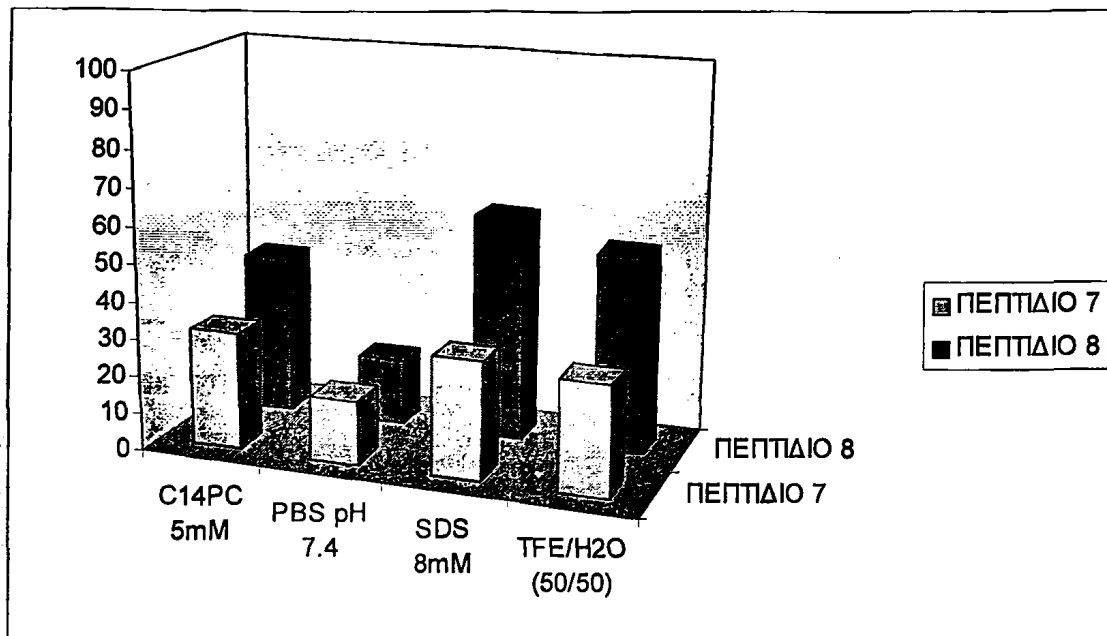
Εικόνα 8.24: Τα ποσοστά δομών από τις μελέτες CD των πεπτιδίων 1-8 συγκέντρωσης 10^{-4} M σε TFE/H₂O 50/50 (v/v).



Εικόνα 8.25: Η επίδραση του διαλύτη στην ελικοειδή διαμόρφωση των πεπτιδίων Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) και Ac-EMNVaOrnRARAAVDAL-NH₂ (4) περιοχή 147-159 της έλικας 6 της αραΑ-I.



Εικόνα 8.26: Η επίδραση του διαλύτη στην ελικοειδή διαμόρφωση των πεπτιδίων Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) και Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) περιοχή 152-164 της έλικας 6 της αραΑ-I.



Εικόνα 8.27: Η επίδραση του διαλύτη στην ελικοειδή διαμόρφωση των πεπτιδίων Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) και Ac-PALEOrnLRQGLLPVLGKFKVSF-NH₂ (8) περιοχή 209-229 της έλικας 9 και 10 της αρΑ-I.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 8.2, το πεπτίδιο (1), Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ της έλικας 4 της αρoA-I, περιοχή 104-117, τάξης G χαρακτηρίζεται κυρίως από α-ελικοειδή διαμόρφωση στους διαλύτες C₁₄PC 5mM και SDS 8mM, ενώ στο διαλύτη TFE/H₂O 50/50 (v/v) το συγκεκριμένο πεπτίδιο έχει τυχαία διαμόρφωση και στο διαλύτη PBS pH 7.4 διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου.

Στα πεπτίδια της έλικας 6 της αρoA-I, περιοχή 147-159: το πεπτίδιο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), τάξης A, χαρακτηρίζεται από α-έλικα μόνο στο διαλύτη SDS 8mM, στους C₁₄PC 5mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v) έχει τυχαία διαμόρφωση και στο PBS pH 7.4 δομή αντιπαράλληλου φύλλου. Παρόμοια διαμορφωτική συμπεριφορά έχει και το πεπτίδιο Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) Met¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸ τάξη A. Στο πεπτίδιο Ac-EMNVaOmRARA AVDAL-NH₂ (4), τάξης G, κυριαρχεί η δομή α-έλικα στους διαλύτες C₁₄PC 5mM, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v), ενώ στο PBS pH 7.4 τα δομικά χαρακτηριστικά του είναι αντιπαράλληλου φύλλου.

Τα πεπτίδια Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) και Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) της αρoA-I, περιοχή 152-164 τάξης A και G αντίστοιχα έχουν: Το (5) έχει χαρακτηριστικά α-έλικας στο διαλύτη TFE/H₂O 50/50 και SDS 8mM, τυχαία διαμόρφωση στο C₁₄PC 5mM και δομή αντιπαράλληλου φύλλου στο PBS pH 7.4. Το (6) προσλαμβάνει χαρακτηριστικά α-έλικας σε C₁₄PC 5mM, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v) και δομή αντιπαράλληλου φύλλου στο PBS pH 7.4.

Τέλος τα πεπτίδια Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7), τάξης G και Ac-PALEOmLRQGLLPVLGKFKVSF-NH₂ (8), τάξης A, περιοχή 209-229 που ανήκουν στην έλικα 9 και 10 της αρoA-I: Το (7) εμφανίζει υψηλά ποσοστά τυχαίας διαμόρφωσης σε C₁₄PC 5mM, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v) και διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου στο PBS pH 7.4. Το (8) εμφανίζει χαρακτηριστικά α-ελικοειδούς διαμόρφωσης στους διαλύτες C₁₄PC 5mM, SDS 8mM και TFE/H₂O 50/50 (v/v) και δομή αντιπαράλληλου φύλλου στο PBS pH 7.4.



9^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΠΟΛΙΠΩΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σημαντικός ρόλος της οξειδωτικά τροποποιημένης LDL στην έναρξη και στην εξέλιξη της νόσου της αθηροσκλήρωσης περιγράφηκε με αρκετές λεπτομέρειες στο 2^ο κεφάλαιο. Η πολυπλοκότητα της νόσου και οι πολυάριθμες βιοχημικές πορείες μέσω των οποίων εξελίσσεται, εισάγουν διάφορα σημεία-κλειδιά που μπορούν να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη αντιαθηρογόνων παραγόντων. Ένα τέτοιο σημείο (στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης) είναι η οξειδωτική τροποποίηση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης.

Η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων των πεπτιδικών αναλόγων της ανθρώπινης apoA-I που συντέθηκαν σε αυτή την εργασία περιλαμβάνει την εξέτασή τους έναντι της *in vitro* οξείδωσης της LDL του ανθρώπινου πλάσματος.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Όλα τα βιολογικά πειράματα διεξήχθησαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών του τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Υπεύθυνος: Καθηγητής κ. Αλέξανδρος Τσελέπης.

1. Αρχή της μεθόδου

Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL επιτυγχάνεται με την επώαση της, σε κατάλληλες συνθήκες, με ιόντα Cu^{2+} στους 37°C. Η παρακολούθηση της οξείδωσης γίνεται στα 234 nm, περιοχή όπου απορροφούν τα συζυγή διένια που σχηματίζονται στην LDL κατά την υπεροξείδωση των ενδογενών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

2. Αντιδραστήρια-Όργανα

- ♦ LDL. Η LDL απομονώνεται υπερφυγοκεντρικά και διατηρείται στο ψυγείο, στους 4 °C, παρουσία EDTA 0.05%.
- ♦ CuSO_4 (M.B.: 159.61 g/mol, Riedel-deHaen)
- ♦ Μembrάνη διαπίδυσης (Sigma). Η μεμβράνη ενεργοποιείται με PBS για 3h και κατακρατά οτιδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa

- ♦ Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- ♦ UV φωτόμετρο (SHIMADZU)

3. Παρασκευή διαλυμάτων

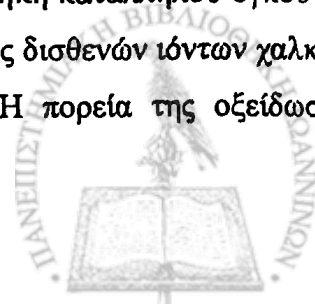
- ♦ Διάλυμα 10% EDTA, pH=7.0. Το διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής: 12.8247 g EDTANa₂·2H₂O (Titriplex III) διαλύονται σε 90 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με dH₂O. Διατηρείται στους 4 °C.
- ♦ Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH=7.4. 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄·H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλύονται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- ♦ Διάλυμα 20 mM CuSO₄. 0.0319 g CuSO₄ διαλυτοποιούνται σε 100 ml dH₂O δίνοντας διάλυμα 20 mM CuSO₄. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- ♦ Διάλυμα 0.5 mM CuSO₄. 0.25 ml διαλύματος 20 mM CuSO₄ αραιώνονται με 10 ml dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

4. Προετοιμασία της LDL για οξείδωση

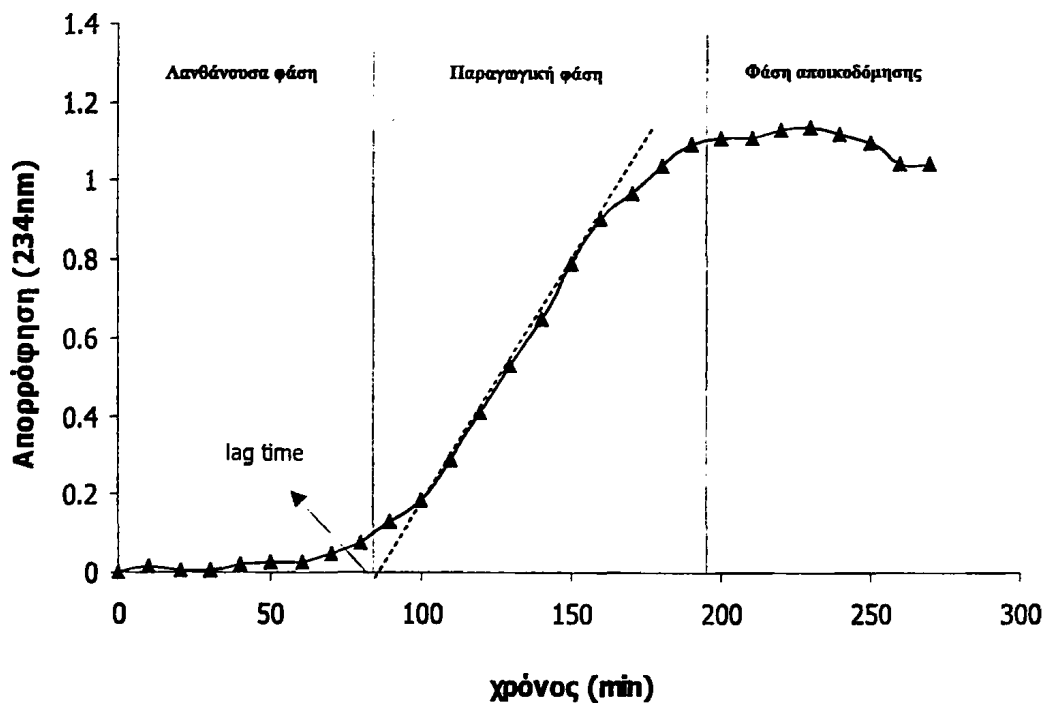
Η LDL διατηρείται στους 4 °C παρουσία 0.05% EDTA, οπότε πριν την οξείδωση υφίσταται εκτενή διαπίδυση για την απομάκρυνση του EDTA. Η LDL μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ποτήρι που περιέχει 200πλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο της LDL, 10 mM PBS, pH 7.4. Η διαπίδυση γίνεται στους 4 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από πέντε ώρες το PBS αντικαθίστανται με καινούργιο και η διαπίδυση συνεχίζεται για άλλες 19 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης η LDL συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και διηθείται από φίλτρο 0.20 μ . Ακολουθεί προσδιορισμός της πρωτεΐνης της LDL με τη μέθοδο BCA.

5. Οξείδωση της LDL

Η LDL αραιώνεται στα 100 μ g πρωτεΐνης/ml με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 10 mM PBS, pH 7.4. Η οξείδωση αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος δισθενών ιόντων χαλκού 0.5 mM CuSO₄ στους 37 °C σε ειδικά πλακίδια microelisa. Η πορεία της οξείδωσης



παρακολουθείται φωτομετρικά με φωτόμετρο UV. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται μια τυπική καμπύλη οξείδωσης της LDL. Η καμπύλη είναι σιγμοειδής και αποτελείται από 3 διακριτές περιοχές, ως αποτέλεσμα των τριών ξεχωριστών φάσεων της οξείδωσης της LDL. Στη λανθάνουσα φάση καταναλώνονται τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου (όπως α-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο). Στην παραγωγική φάση λαμβάνουν χώρα αυτοκαταλυόμενες αλυσιδωτές αντιδράσεις της υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων. Στη φάση της αποικοδόμησης έχει ήδη παραχθεί ο μέγιστος αριθμός των συζυγών διενίων και έπεται η αποικοδόμηση των λιποϋπεροξειδίων προς αλδεύδες, κετόνες, οξυστερόλες και άλλα συστατικά.



Εικόνα 9.1: Μια τυπική καμπύλη οξείδωσης της LDL.

ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΓΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ apoA-I

Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9.1: Πεπτιδικά μοντέλα της αρΑ-I που μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους στην οξειδωση της LDL *in vitro*.

<u>Πεπτιδικό μοντέλο</u>	<u>Έλικα και Τάξη</u>	<u>Περιοχή</u>	<u>Αλληλουχία</u>
1	4 Τάξη G	104-117 Met ¹¹² →Ala ¹¹²	Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH ₂
2	6 Τάξη A	147-159	Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂
3	6 Τάξη A	147-159 Met ¹⁴⁸ →Ala ¹⁴⁸	Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂
4	6 Τάξη G	147-159 Arg ¹⁴⁹ ·Nva ¹⁴⁹ Asp ¹⁵⁰ ·Otm ¹⁵⁰ His ¹⁵⁵ ·Ala ¹⁵⁵	Ac-EMNVaOtmRARAAVDAL-NH ₂
5	6 Τάξη A	152-164	Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂
6	6 Τάξη G	152-164 Thr ¹⁶¹ →Lys ¹⁶¹	Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂
7	9-10 Τάξη G	209-229	Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂
8	9-10 Τάξη A	209-229 Asp ²¹³ ·Otm ²¹³ Ser ²²⁴ ·Lys ²²⁴	Ac-PALEOtmLRQGLLPVLEKFKVSF-NH ₂

Οι συγκεντρώσεις που ελέχθησαν τα πεπτίδια ποικίλλουν από 10 μΜ έως και 848 μΜ ανάλογα με τη δραστηριότητα που παρουσίαζε το εκάστοτε πεπτίδιο. Σε όσα διαλύματα το πεπτίδιο δεν ήταν πλήρως διαλυτό προστέθηκε τόσο DMSO ώστε η περιεκτικότητά του στο πλακίδιο *microelisa* να μην ξεπερνά το 1% v/v.

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πεπτιδίων και την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων υπολογίστηκε ο λανθάνων χρόνος οξειδωσης (lag time) που

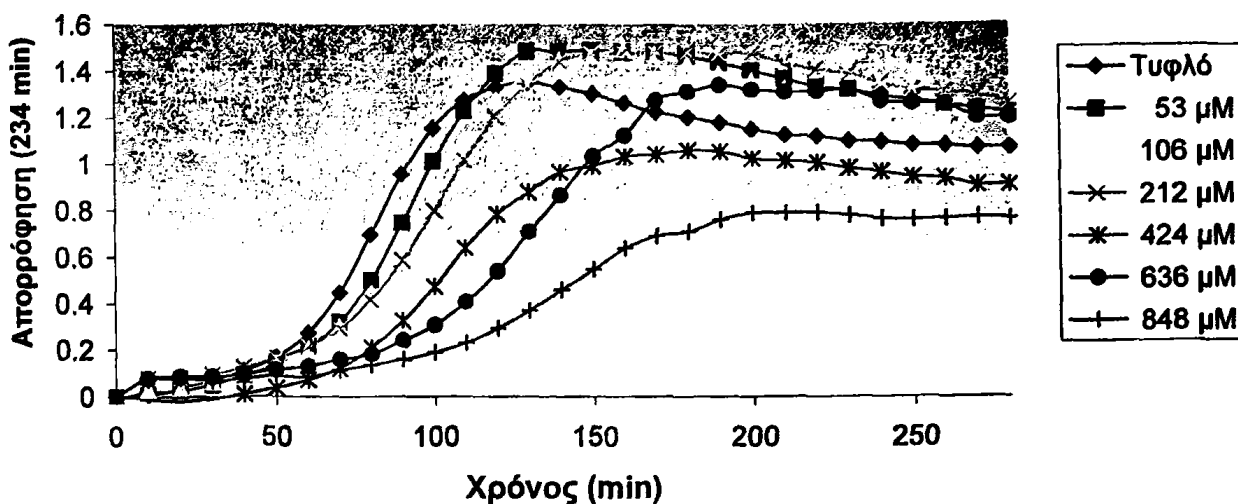


αποτελεί ένα μέτρο της ανθεκτικότητας της LDL στην οξειδωτική τροποποίηση της, ο ρυθμός της οξείδωσης της LDL που αντιστοιχεί στο ρυθμό παραγωγής συζυγών διενίων και ο μέγιστος αριθμός των συζυγών διενίων που παράγονται κατά την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης LDL.

1. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂, περιοχή 104-117, Έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G

Αρχικά έγιναν οξειδώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (1) από 53 μΜ έως και 848 μΜ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂

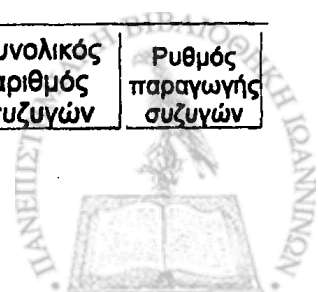


Εικόνα 9.2: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM και 424 μM, 636 μM και 848 μM.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

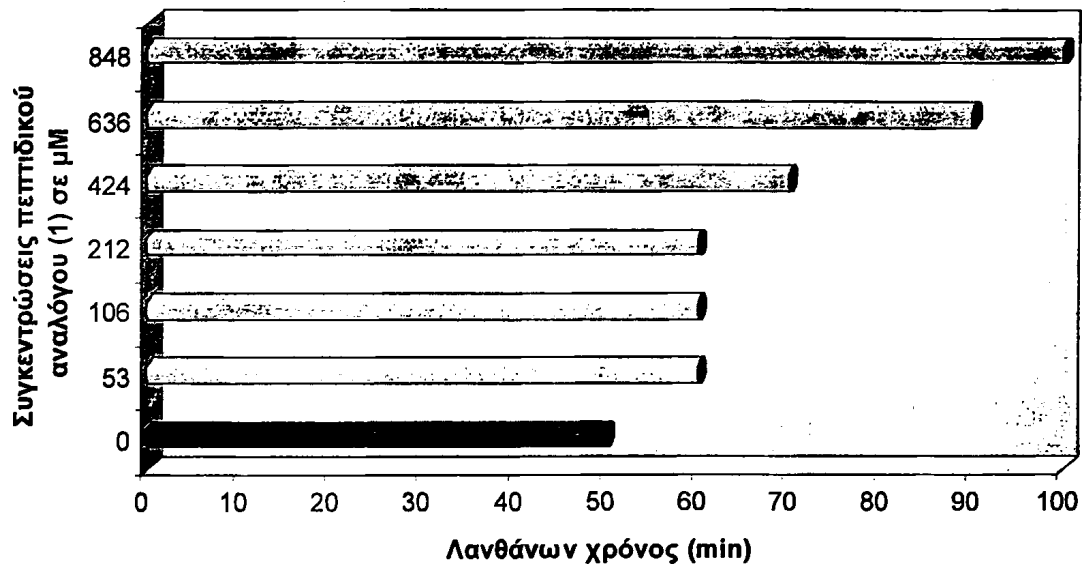
Πίνακας 9.2: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών	Ρυθμός παραγωγής συζυγών



		χρόνο			διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	διενίων (nmol/mg πρω- τεΐνης/min)
0 μ M (τυφλό)	50	0.17	110	1.28	432.2	0.0184
53 μ M	60	0.21	130	1.48	503.1	0.0182
106 μ M	60	0.21	130	1.39	469.8	0.0168
212 μ M	60	0.21	140	1.44	488.5	0.0153
424 μ M	70	0.12	150	0.99	336.3	0.0109
636 μ M	90	0.24	170	1.27	431.5	0.0129
848 μ M	100	0.19	178	0.71	240.7	0.0067

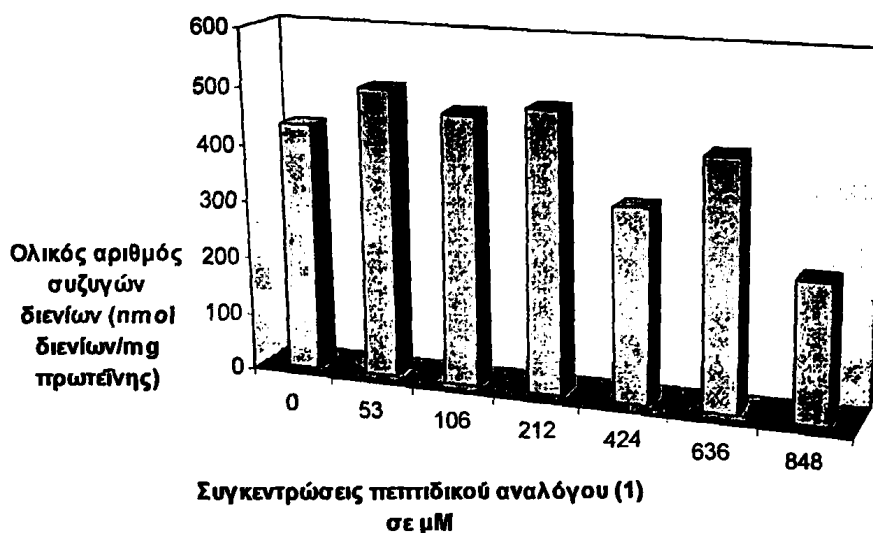
Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης (lag time) είναι μια παράμετρος πολύ σημαντική για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων της apoA-I. Μετράται σε λεπτά και είναι ο χρόνος που μεσολαβεί για τη μετάβαση από τη λανθάνουσα φάση στην παραγωγική κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL.



Εικόνα 9.3: Λανθάνων χρόνος (lag time) οξείδωσης της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-DFQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τα ολικά συζυγή διένια των οξειδωμένων λιπιδίων που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL αποτελούν μέτρο της έκτασης της οξείδωσης που οφείλεται στο αιμοπρωτεϊνικό σωματίδιο. Στο παρακάτω διάγραμμα εμφανίζεται η μεταβολή του ολικού

αριθμού των παραγόμενων συζυγών διενίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδικού αναλόγου (1).



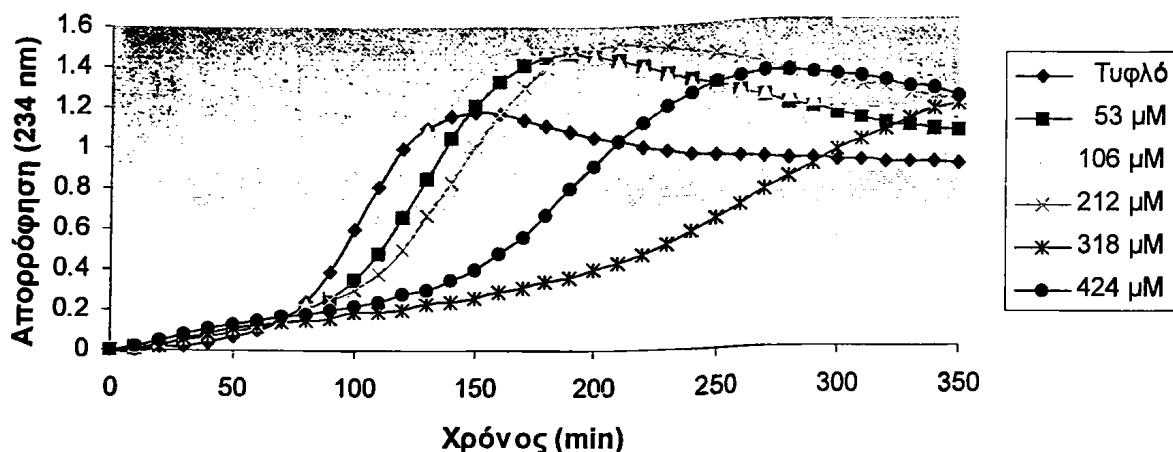
Εικόνα 9.4: Ο ολικός αριθμός παραγόμενων συζυγών διενίων κατά την οξείδωση της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (1) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το πεπτιδικό ανάλογο $\text{Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH}_2$ (1) έχει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση ενάντια στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL αλλά ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ($848 \mu\text{M}$) δεν εμφανίζει πλήρης αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ($848 \mu\text{M}$) που χρησιμοποιήθηκε ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης διπλασιάστηκε και ο ολικός αριθμός των συζυγών διενίων μειώθηκε κατά 44.3%.

2. Πεπτιδικό ανάλογο $\text{Ac-EMRDRARAHVDAL-NH}_2$, περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A

Το πεπτιδικό μοντέλο (2) μελετήθηκε ως προς την ικανότητα του να αναστέλλει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε διάφορες συγκεντρώσεις ($53\mu\text{M}$ - $424\mu\text{M}$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο παρακάτω διάγραμμα.

Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂



Εικόνα 9.5: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

Πίνακας 9.3: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	60	0.10	140	1.16	393.9	0.0133
53 μM	70	0.16	180	1.45	492.2	0.0144
106 μM	80	0.23	160	1.47	497.3	0.0155
212 μM	100	0.30	190	1.46	496.3	0.0129
318 μM	160	0.29	320	1.06	359.7	0.0048

424 μM	150	0.40	240	1.26	427.5	0.0095
-------------------	-----	------	-----	------	-------	--------

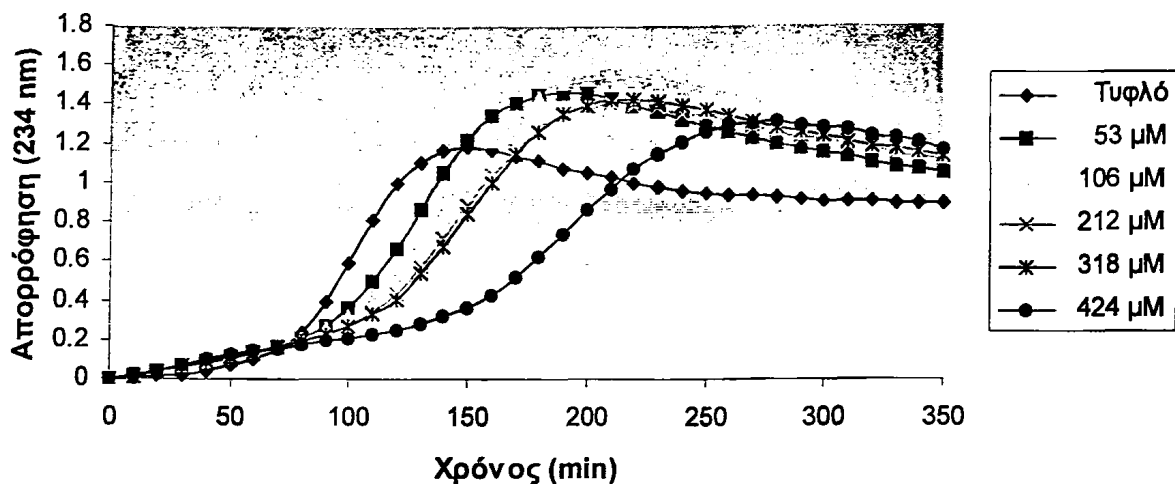
Από τις καμπύλες οξείδωσης της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) συμπεραίνουμε πως το συγκεκριμένο πεπτιδικό μοντέλο εμφανίζει δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL. Δεν παρουσιάζει πλήρη αναστολή σε καμία συγκέντρωση από αυτές που χρησιμοποιήσαμε και εμφανίζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στη συγκέντρωση 318 μM όπου ο λανθάνων χρόνος αυξήθηκε κατά 100 λεπτά σε σχέση με το τυφλό και ο συνολικός αριθμός συζυγών διενίων μειώθηκε κατά 9%.

3. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂, περιοχή 147-159, έλικα 6, Met¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸, τάξη A

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα οξειδώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (3) από 53 μM έως και 424 μM . Το παρακάτω διάγραμμα περιέχει τις πληροφορίες για την δράση του συγκεκριμένου πεπτιδίου ως προς την αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL).



Ac-EARDRARAHDAL-NH₂



Εικόνα 9.6: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

Ο παρακάτω πίνακας αναφέρει τον λανθάνων χρόνο οξείδωσης της LDL, τις τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και τη μέγιστη απορρόφηση, τον ολικό αριθμό σχηματισμένων συζυγών διενίων και το ρυθμό παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

Πίνακας 9.4: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	60	0.10	140	1.16	393.9	0.0133
53 μM	100	0.36	170	1.41	477.6	0.0149
106 μM	100	0.32	180	1.44	488.1	0.0140
212 μM	100	0.27	190	1.35	456.6	0.0119

318 μM	100	0.27	190	1.36	460.0	0.0120
424 μM	140	0.32	260	1.29	436.6	0.0081

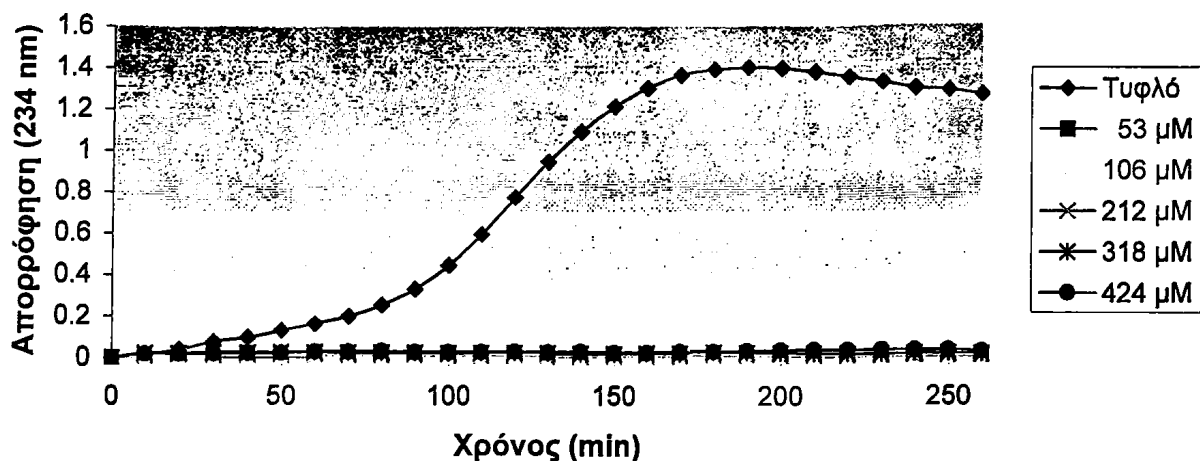
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το πεπτιδικό ανάλογο Ac-EARDRARAHDAL-NH₂ (3) εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση σε συγκεντρώσεις από 53 μM έως 424 μM έναντι της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL αλλά όχι πλήρη αναστολή. Ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση και φτάνει τα 140 λεπτά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 424 μM και τα συζυγή διένια μειώνονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πεπτιδίου.

4. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNVaOrnRARAAMDAL-NH₂, περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵, τάξη G

Αρχικά έγιναν οξειδώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (4) από 53 μM έως και 424 μM . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διάγραμμα.



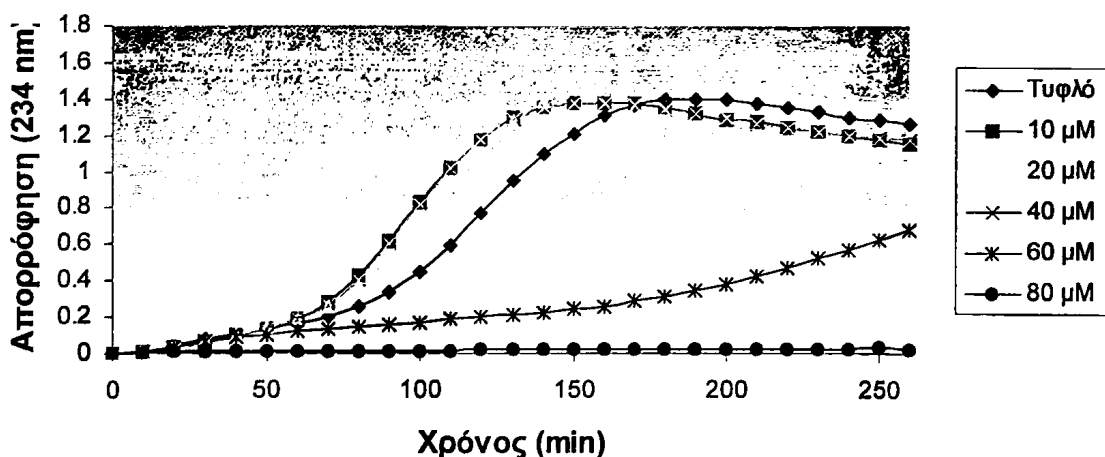
Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂



Εικόνα 9.7: Καμπύλες οξειδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

Κατόπιν επαναλήφθηκε το πείραμα οξειδωσης της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (4) αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις από 10 μM έως και 80 μM.

Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂



Εικόνα 9.8: Καμπύλες οξειδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4) σε συγκεντρώσεις 10μM, 20μM, 40μM, 60μM και 80 μM.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EMNVaOrnRARA¹⁴⁹VDAL-NH₂ (4) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

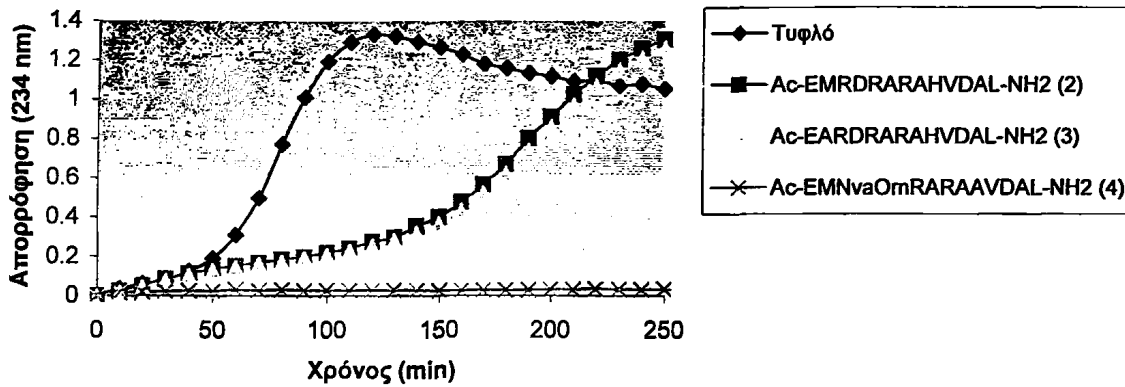
Πίνακας 9.5: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-EMNVaOrnRARA¹⁴⁹VDAL-NH₂ (4) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	70	0.20	170	1.36	462.4	0.0116
10 μM	70	0.28	130	1.29	438.0	0.0169
20 μM	70	0.26	150	1.47	497.7	0.0151
40 μM	70	0.27	130	1.28	434.9	0.0169

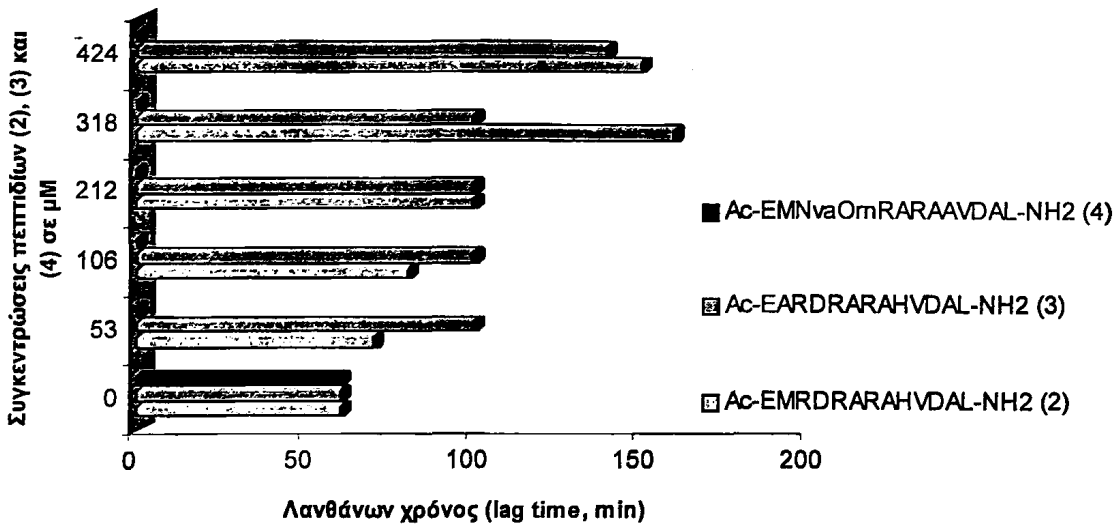
Συμπερασματικά, το πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNVaOrnRARA¹⁴⁹VDAL-NH₂ (4) εμφανίζει πλήρη ανασταλτική δράση έναντι της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 53 μM έως και 424 μM.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα για την αναστολή της οξείδωσης της LDL σε συγκέντρωση 424 μM, για το λανθάνοντα χρόνο και για τον αριθμό των παραγόμενων συζυγών διενίων για τα πεπτιδικά μοντέλα (2), (3) και (4) που ανήκουν στην έλικα 6 στην περιοχή 147-159 και είναι διαφορετικής τάξης. Το πεπτιδικό μοντέλο (2) αποτελεί τη φυσική αλληλουχία της apoA-I, το (3) προέρχεται από το (2) με αντικατάσταση της μεθειονίνης στη θέση 148 με το αμινοξύ αλανίνη. Τα δύο αυτά πεπτιδικά μοντέλα ανήκουν στην τάξη A. Το πεπτιδικό μοντέλο (4) έχει τη μεθειονίνη στη θέση 148 αλλά ανήκει στην τάξη G και προήρθε από τις αντικαταστάσεις Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵.

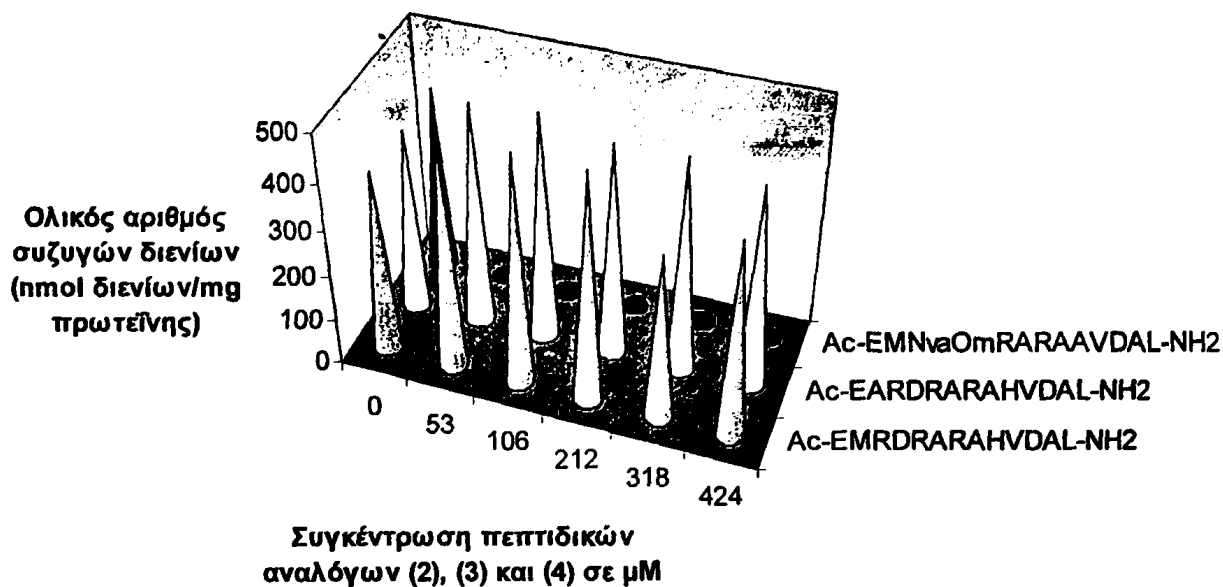




Εικόνα 9.9: Καμπύλες οξειδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία των πεπτιδίων Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), Ac- EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) και Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4) σε συγκέντρωση 424μΜ.



Εικόνα 9.10: Λανθάνων χρόνος (lag time) οξειδωσης LDL παρουσία των πεπτιδίων Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), Ac- EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) και Ac-EMNvaOrnRARAAMDAL-NH₂ (4) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



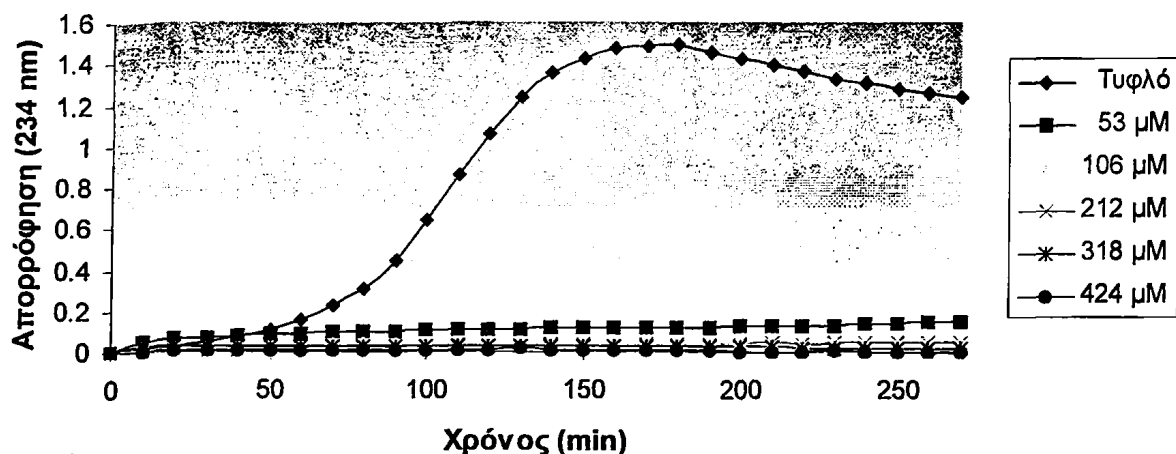
Εικόνα 9.11: Ο ολικός αριθμός παραγόμενων συζυγών διενίων κατά την οξείδωση της LDL παρουσία των πεπτιδίων Ac-EMRDRARAAMDAL-NH₂ (2), Ac-EARDRARAAMDAL-NH₂ (3) και Ac-EMNvaOmRARAAMDAL-NH₂ (4) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Από τα παραπάνω συγκριτικά δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα ότι από τα τρία πεπτιδικά ανάλογα της περιοχής 147-159 της έλικας 6, το πεπτιδικό ανάλογο Ac-EMNvaOmRARAAMDAL-NH₂ (4) εμφανίζει πλήρη ανασταλτική δράση στην οξείδωση της LDL στη συγκέντρωση 424 μM και άρα έχει καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ακολουθεί το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMRDRARAAMDAL-NH₂ (2) και κατόπιν το Ac-EARDRARAAMDAL-NH₂ (3).

5. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAAMDALRTHLA-NH₂, περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα οξειδώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (5) από 53 μM έως και 424 μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διάγραμμα.

Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂



Εικόνα 9.12: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

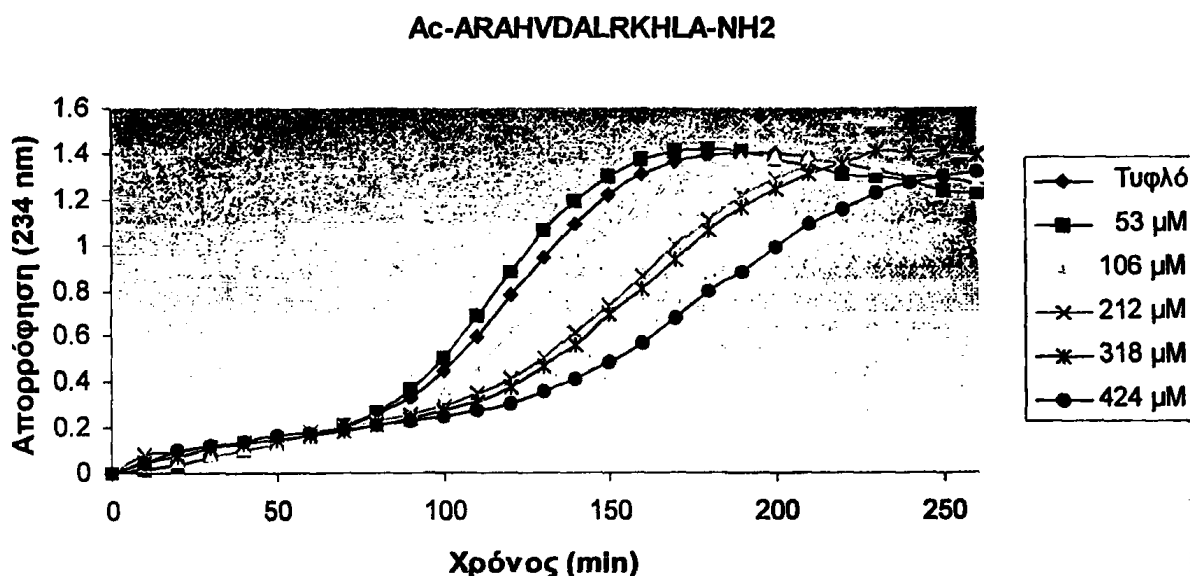
Πίνακας 9.6: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/ min)
0 μM (τυφλό)	60	0.10	140	1.16	393.9	0.0133
53 μM	-	-	-	-	-	-
106 μM	-	-	-	-	-	-
212 μM	-	-	-	-	-	-
318 μM	-	-	-	-	-	-
424 μM	-	-	-	-	-	-

Συμπερασματικά, το πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) εμφανίζει πλήρη ανασταλτική δράση έναντι της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 53 μΜ έως και 424 μΜ.

6. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALKHHLA-NH₂, περιοχή 152-164, έλικα 6, Thr¹⁶¹→Lys¹⁶¹, τάξη G

Στο πεπτίδιο (6) έγιναν οξειδώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις από 53 μΜ έως και 424 μΜ. Στο παρακάτω διάγραμμα αναφέρονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των οξειδώσεων.

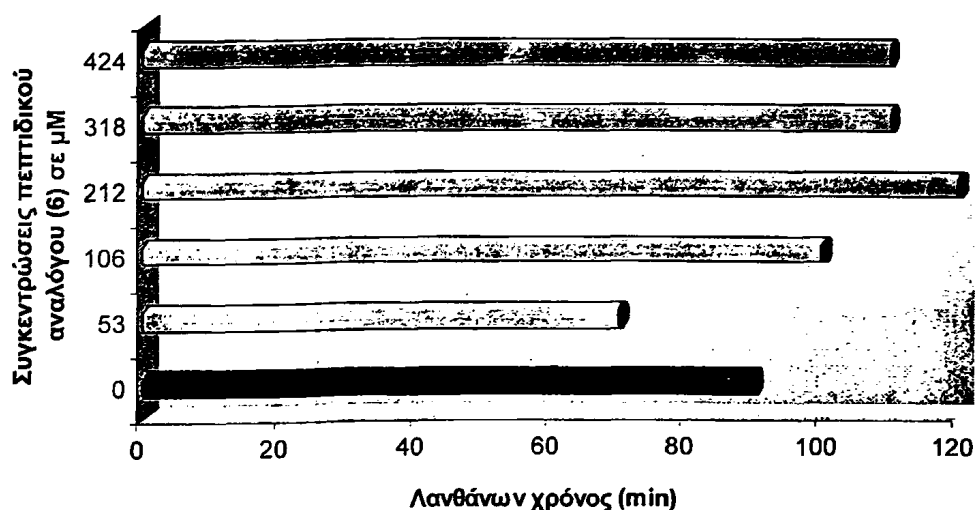


Εικόνα 9.13: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-ARAHVDALRKHHLA-NH₂ (6) σε συγκεντρώσεις 53μΜ, 106μΜ, 212μΜ, 318μΜ και 424 μΜ.

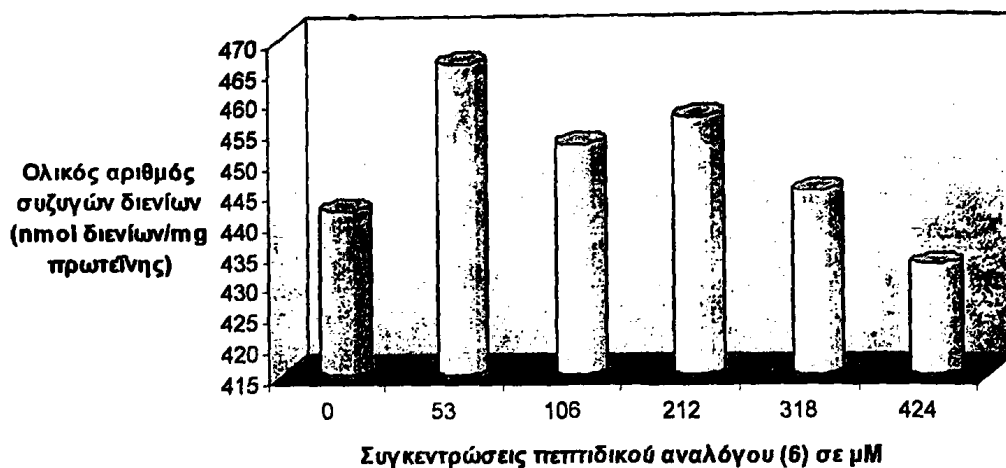
Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-ARAHVDALRKHHLA-NH₂ (6) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

Πίνακας 9.7: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	90	0.33	160	1.30	441.7	0.0139
53 μM	70	0.21	160	1.38	465.8	0.0130
106 μM	100	0.35	180	1.34	452.5	0.0123
212 μM	120	0.41	210	1.34	457.0	0.0104
318 μM	110	0.32	210	1.31	444.7	0.0099
424 μM	110	0.28	240	1.28	432.9	0.0077



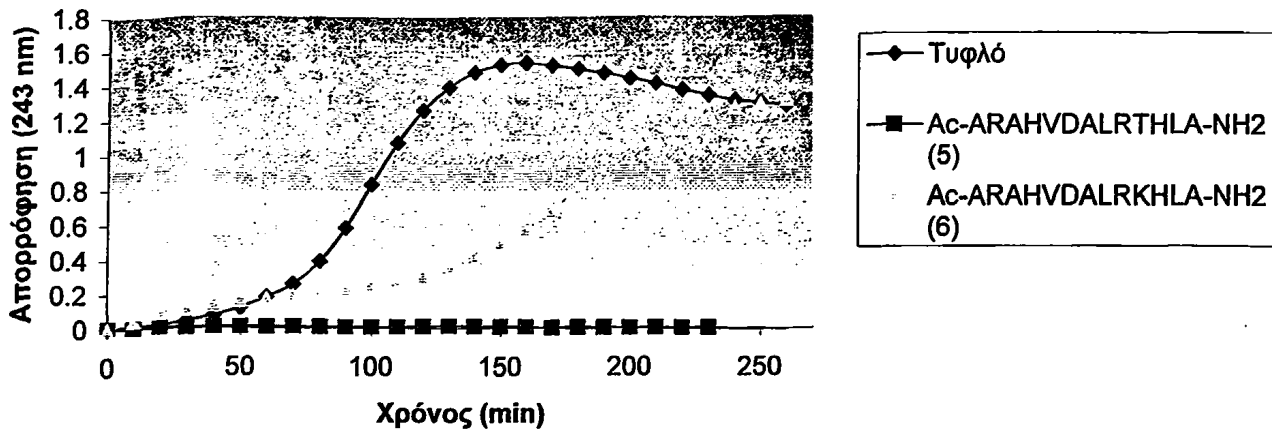
Εικόνα 9.14: Λανθάνων χρόνος (lag time) οξείδωσης της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 9.15: Ο ολικός αριθμός παραγόμενων συζυγών διενίων κατά την οξείδωση της LDL παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (6) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το πεπτιδικό ανάλογο Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) έχει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση ενάντια στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL αλλά ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) δεν εμφανίζει πλήρης αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) που χρησιμοποιήθηκε ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης αυξήθηκε κατά 30 λεπτά και ο ολικός αριθμός των συζυγών διενίων μειώθηκε κατά 2%.

Τέλος, στο παρακάτω διάγραμμα περιγράφονται συγκριτικά οι καμπύλες οξείδωσης της LDL για τα πεπτιδικά μοντέλα (5) και (6) σε συγκέντρωση 424 μM.



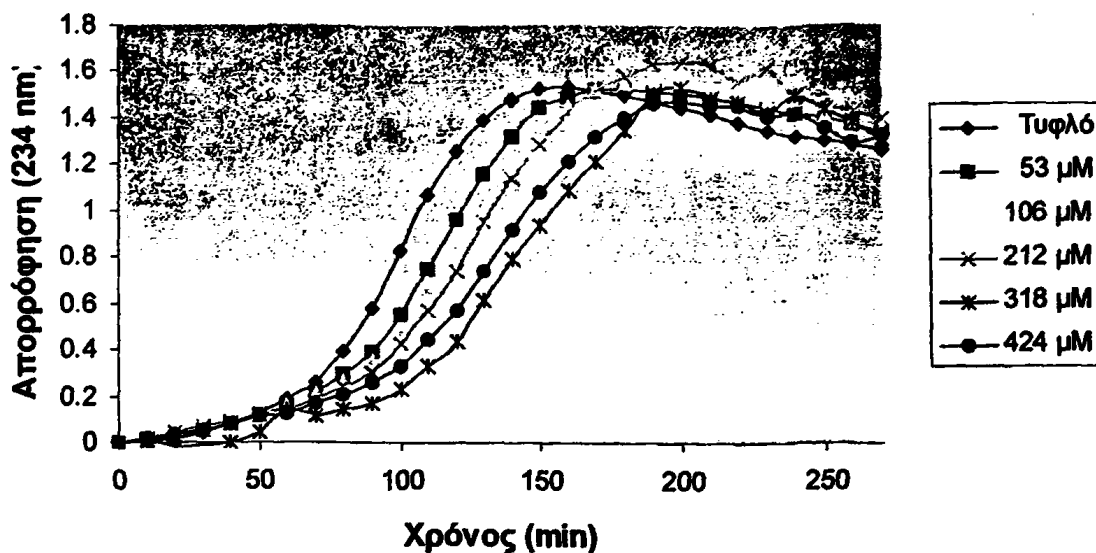
Εικόνα 9.16: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία των πεπτιδίων Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) και Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) σε συγκέντρωση 424μΜ.

Συγκριτικά, από τα πεπτιδικά μοντέλα (5) και (6) που αντιπροσωπεύουν την περιοχή 152-164 της αρoA-I, το πεπτιδικό μοντέλο (5) εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το (6) στη συγκέντρωση 424 μΜ.

7. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂, περιοχή 209-219 των ελίκων 9 και 10, τάξη G

Έγιναν οξειδώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (7) από 53 μΜ έως και 424 μΜ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διάγραμμα.

Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂



Εικόνα 9.17: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

Πίνακας 9.8: Λανθάνων χρόνος οξειδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

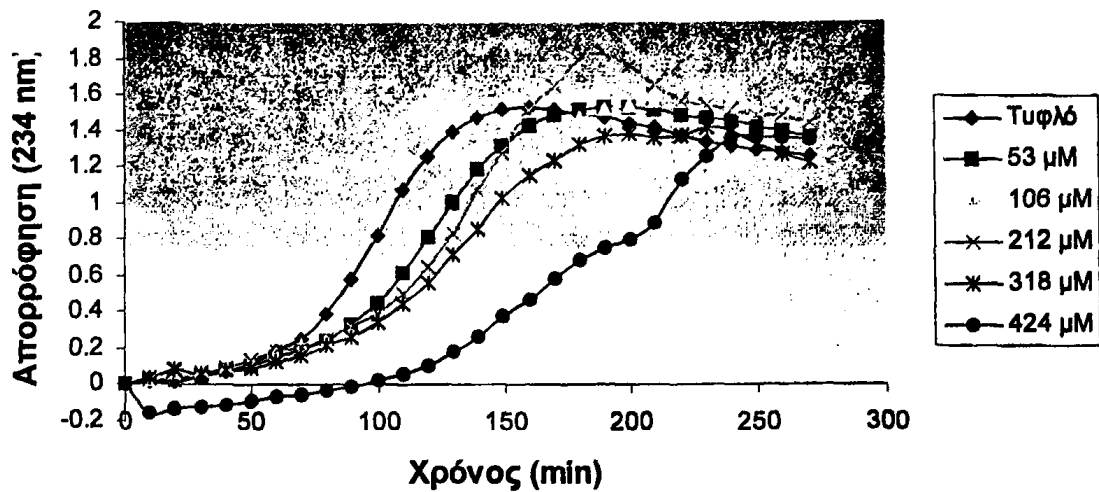
	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	70	0.26	140	1.48	501.0	0.0174
53 μM	80	0.29	160	1.49	505.1	0.0150
106 μM	90	0.36	170	1.53	518.0	0.0147
212 μM	70	0.19	180	1.58	533.9	0.0066
318 μM	115	0.23	190	1.46	494.9	0.0164
424 μM	90	0.26	180	1.40	473.9	0.0127

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) έχει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση ενάντια στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL αλλά ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) δεν εμφανίζει πλήρης αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) που χρησιμοποιήθηκε ο λανθάνων χρόνος οξειδωσης αυξήθηκε κατά 20 λεπτά και ο ολικός αριθμός των συζυγών διενίων μειώθηκε κατά 5.4%.

β. Πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), περιοχή 209-219 των ελίκων 9 και 10, Asp²¹³·Orn²¹³, Ser²²⁴·Lys²²⁴ τάξη A

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα οξειδώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου (8) από 53 μM έως και 424 μM. Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂



Εικόνα 9.18. Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδίου Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) σε συγκεντρώσεις 53μM, 106μM, 212μM, 318μM και 424 μM.

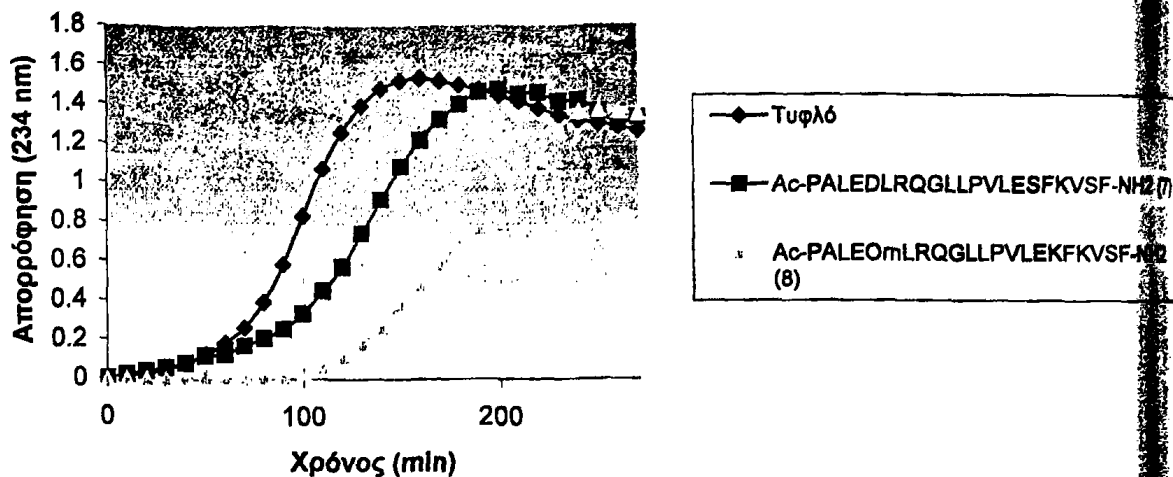
Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL, οι τιμές της απορρόφησης στον λανθάνοντα χρόνο και η μέγιστη απορρόφηση, ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων και ο ρυθμός παραγωγής τους, παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε.

Πίνακας 9.8: Λανθάνων χρόνος οξείδωσης, απορροφήσεις και σχηματισμός συζυγών διενίων παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

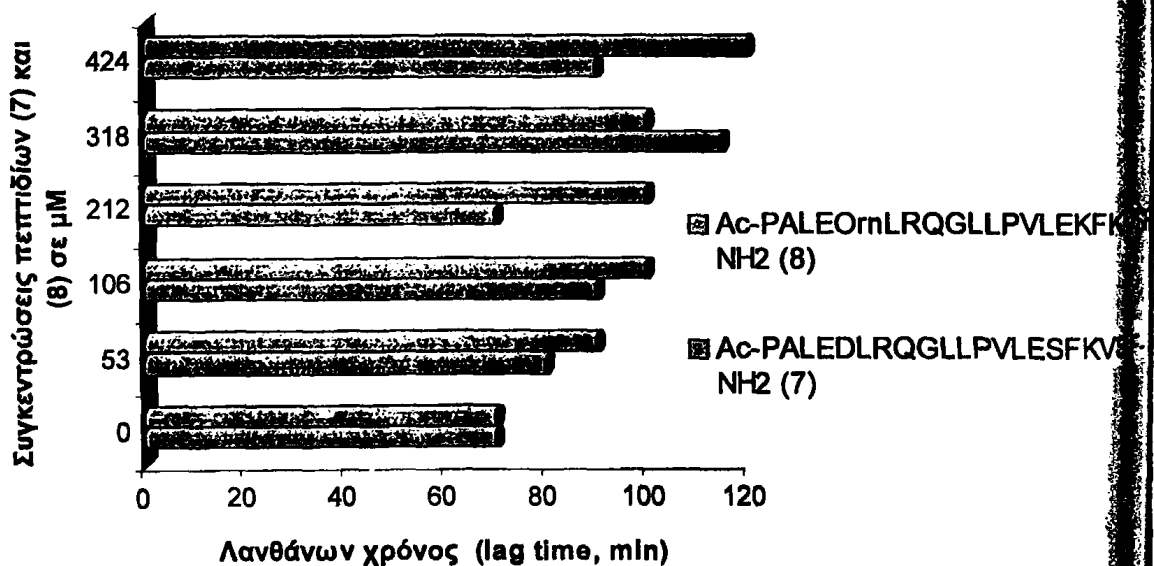
	Λανθάνων χρόνος (min)	Απορρόφηση στο λανθάνοντα χρόνο	Χρόνος μέγιστης απορρόφησης (min)	Μέγιστη απορρόφηση	Συνολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)	Ρυθμός παραγωγής διενίων (nmol/mg πρωτεΐνης/min)
0 μM (τυφλό)	70	0.26	140	1.48	501.0	0.0174
53 μM	90	0.33	170	1.49	504.7	0.0145
106 μM	100	0.38	180	1.52	516.6	0.0144
212 μM	100	0.40	180	1.79	607.1	0.0174
318 μM	100	0.35	180	1.33	449.8	0.0122
424 μM	120	0.11	240	1.36	460.3	0.0104

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως το πεπτιδικό ανάλογο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) έχει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση ενάντια στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL αλλά ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) δεν εμφανίζει πλήρης αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (424 μM) που χρησιμοποιήθηκε ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης αυξήθηκε κατά 50 λεπτά και ο ολικός αριθμός των συζυγών διενίων μειώθηκε κατά 8.1%.

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα για τις καμπύλες οξείδωσης LDL σε συγκέντρωση 424 μM, για το λανθάνοντα χρόνο και τον αριθμό των παραγόμενων συζυγών διενίων για τα δυο πεπτιδικά μοντέλα (7) και (8) που ανήκουν στην έλικα 9, 10 στην περιοχή 209-229 και είναι διαφορετικής τάξης. Το πεπτιδικό μοντέλο (7) αποτελεί την αλληλουχία της apoA-I για τη συγκεκριμένη περιοχή και είναι τάξης G, ενώ το (8) ανήκει στην τάξη A και έχει προκύψει από το (7) με τις εξής αντικαταστάσεις Asp²¹³•Orn²¹³, Ser²²⁴•Lys²²⁴.

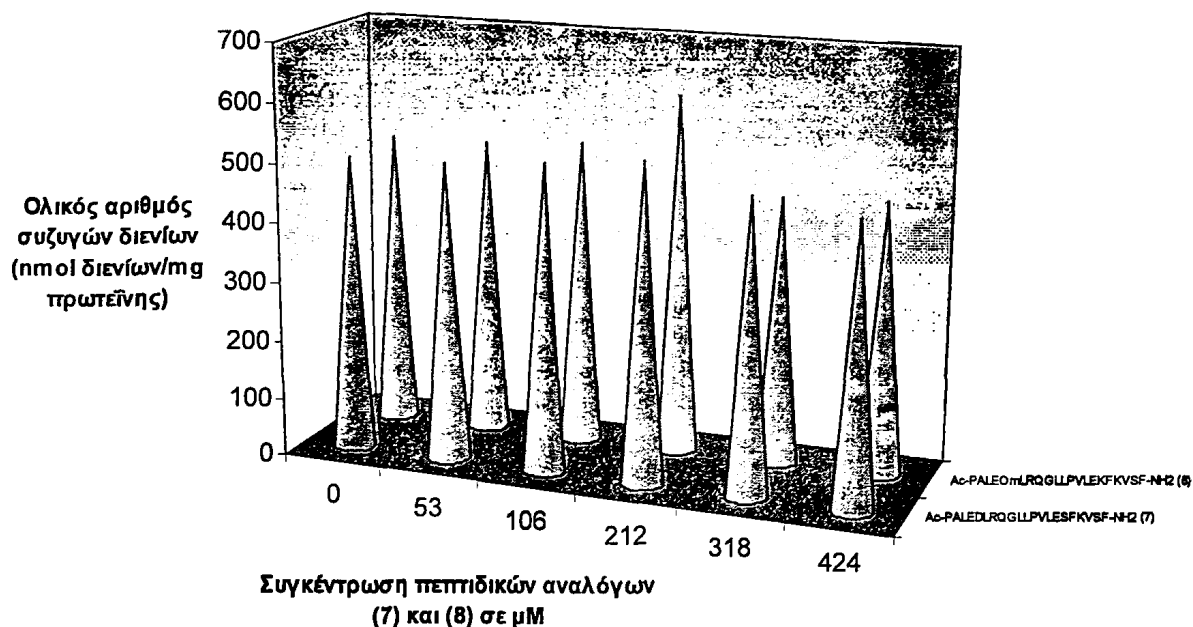


Εικόνα 9.19: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία των πεπτιδίων Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) και Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) σε συγκέντρωση 424 μΜ.



Εικόνα 9.20: Λανθάνων χρόνος (lag time) οξείδωσης LDL παρουσία των πεπτιδίων Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) και Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.





Εικόνα 9.21: Ο ολικός αριθμός παραγόμενων συζυγών διενίων κατά την οξείδωση της LDL παρουσία των πεπτιδίων Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7) και Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συγκριτικά, από τα πεπτιδικά μοντέλα (7) και (8) που αντιπροσωπεύουν την περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10 της apoA-I, το πεπτιδικό μοντέλο (8) εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το (7) στη συγκέντρωση 424 μM.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης και ο συνολικός αριθμός συζυγών διενίων για όλα τα πεπτιδικά ανάλογα της apoA-I που μελετήθηκαν.

Πίνακας 9.10: Λανθάνων χρόνος (lag time) οξειδωσης (μέσος όρος τουλάχιστον 2 πειραμάτων) της LDL παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων της apoA-I.

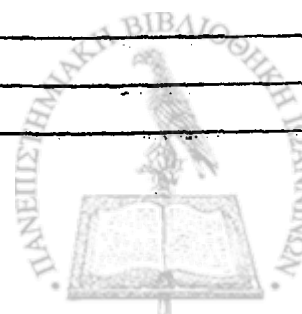
Πεπτίδια	Λανθάνων χρόνος οξειδωσης (min)
Οξείδωση της LDL απουσία πεπτιδίων	
Ac-FQKKWQEEA ¹¹² ELYRQ-NH ₂ (1) (3 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	50.5±1.3
53 μM	60±2.1
106 μM	60.6±2.1
212 μM	60.6±2.1
424 μM	70.1±0.7
Ac-EM ¹⁴⁸ RDRARAHVDAL-NH ₂ (2) (2 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	55±7.1
53 μM	70±0
106 μM	85±7.1
212 μM	115±21.2
424 μM	75±16.1
Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂ (3) (2 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	60±0
53 μM	50±70.7
106 μM	90±14.1
212 μM	115±21.2
424 μM	70±9.0
Ac-EMNVaOmRARA AVDAL-NH ₂ (4) (3 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	65±7.7
53 μM	-
106 μM	-
212 μM	-
424 μM	-
Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂ (5) (2 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	60±0
53 μM	-
106 μM	-
212 μM	-



424 μM	-
Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂ (6) (2 διαφορετικά πειράματα)	
0 μM	85 \pm 7.1
53 μM	75 \pm 7.1
106 μM	105 \pm 7.1
212 μM	110 \pm 14
424 μM	100 \pm 14
Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂ (7) (2 πειράματα)	
0 μM	70 \pm 0
53 μM	85 \pm 7.1
106 μM	95 \pm 7.1
212 μM	75 \pm 7.1
424 μM	85 \pm 7.1
Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH ₂ (8) (2 πειράματα)	
0 μM	65 \pm 7.1
53 μM	85 \pm 7.1
106 μM	105 \pm 7.1
212 μM	100 \pm 0
424 μM	115 \pm 7.1

Πίνακας 9.11: Ολικός αριθμός παραγόμενων συζυγών διενίων κατά την οξείδωση της LDL παρουσία των πεπτιδικών αναλόγων της apoA-I.

Πεπτίδια	Ολικός αριθμός συζυγών διενίων (nmol διενίων/mg πρωτεΐνης)
Οξείδωση της LDL απουσία πεπτιδίων	
Ac-FQKKWQEEA ¹¹² ELYRQ-NH ₂ (1)	
0 μM	432.4±1.2
53 μM	503.7±6.0
106 μM	469.2±14.3
212 μM	488.5±18.1
424 μM	336.3±2.3
Ac-EM ¹⁴⁸ RDRARAHVDAL-NH ₂ (2)	
0 μM	423.2±34.3
53 μM	482.2±14.2
106 μM	496.3±17.3
212 μM	484.1±17.3
424 μM	427.7±32.3
Ac-EA ¹⁴⁸ RDRARAHVDAL-NH ₂ (3)	
0 μM	423.2±34.3
53 μM	477.6±7.1
106 μM	491.9±5.3
212 μM	470±18.9
424 μM	436.6±14.1
Ac-EMNVaOmRARA AVDAL-NH ₂ (4)	
0 μM	432.2±7.1
53 μM	-
106 μM	-
212 μM	-
424 μM	-
Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂ (5)	
0 μM	457.6±7.1
53 μM	-
106 μM	-
212 μM	-
424 μM	-
Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂ (6)	
0 μM	437.2±6.4



53 μM	482.2 \pm 23.3
106 μM	455.8 \pm 4.6
212 μM	462.4 \pm 7.7
424 μM	438.9 \pm 8.5
Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH ₂ (7)	
0 μM	474.2 \pm 37.9
53 μM	514.6 \pm 13.5
106 μM	509.4 \pm 12.1
212 μM	540.9 \pm 9.9
424 μM	469.7 \pm 6.0
Ac-PALEOmLRQGLLPVLEKFKVSF- NH ₂ (8)	
0 μM	474.2 \pm 38.0
53 μM	505.0 \pm 0.4
106 μM	506.1 \pm 14.8
212 μM	598.6 \pm 12.0
424 μM	465.4 \pm 7.2

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα και τα οκτώ πεπτιδικά ανάλογα της apoA-I παρουσιάζουν μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση κατά τη λιπιδιακή υπεροξειδωση της LDL. Για τα πεπτιδικά μοντέλα 1, 2, 3, 6, 7, και 8 δεν έχει βρεθεί συγκέντρωση που να αναστέλλει πλήρως την οξειδωση της LDL ενώ τα πεπτιδικά μοντέλα 4 και 5 προκαλούν πλήρη αναστολή αυτής σε συγκέντρωση 53 μΜ.

Συγκρίνοντας τα πεπτιδικά μοντέλα της apoA-I ανεξάρτητα από την έλικα την οποία αντιπροσωπεύουν λαμβάνοντας υπόψη την αντιοξειδωτική δράση τους στην τροποποίηση της LDL, τη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση που προκαλεί πλήρη αναστολή της LDL, τη συγκέντρωση που προκαλεί διπλασιασμό του λανθάνοντα χρόνου κατά την οξειδωση της LDL, τα αντίστοιχα ολικά συζυγή διένια και το ρυθμό παραγωγής τους προκύπτει η εξής σειρά ως προς την αντιοξειδωτική δράση των πεπτιδικών αναλόγων:

Πεπτιδικό ανάλογο (4), έλικα 6, Ac-EMNVaOtmRARA^{AVDAL}-NH₂, περιοχή 149-157, τάξη G >

Πεπτιδικό ανάλογο (5), έλικα 6, Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂, περιοχή 152-164, τάξη A >

Πεπτιδικό ανάλογο (2), έλικα 6, Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂, περιοχή 149-157, τάξη A >

Πεπτιδικό ανάλογο (3), έλικα 6, Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂, περιοχή 149-157, τάξη A >

Πεπτιδικό ανάλογο (8), έλικα 9,10, Ac-PALEOtmLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂, περιοχή 209-229, τάξη A >

Πεπτιδικό ανάλογο (6), έλικα 6, Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂, περιοχή 152-164, τάξη G >

Πεπτιδικό ανάλογο (7), έλικα 9,10, Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂, περιοχή 209-229, τάξη G >

Πεπτιδικό ανάλογο (1), έλικα 4, Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂, περιοχή 104-117, τάξη G



10° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΡΟΡC MLVs ΜΕ ΤΑ
ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α-Ι
(apoA-I)**



ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- ♦ POPC, 1-παλμυτοΐλο-2-ολεΐλο-γλυκερο-*sn*-3-φωσφοχολίνη (25mg, $C_{42}H_{82}NO_8P$, M.B. =760.1 g/mol, Sigma)
- ♦ Αέριο N_2
- ♦ Γυάλινα σωληνάκια με καπάκια που διαθέτουν teflon
- ♦ Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM, pH=7.4
- ♦ Λυοφιλοποιητής
- ♦ $CHCl_3$ (absolute, M.B.=119.38 g/mol, Normapur)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- ♦ Διάλυμα POPC 20mg/ml. Το εμπορικά διαθέσιμο φωσφολιπίδιο (25mg) που βρίσκεται σε λυοφιλοποιημένη μορφή διαλυτοποιείται σε 1.25ml $CHCl_3$.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μηχανισμός

Τα λιπосώματα (σωματίδια λιπιδιακής φύσης) παρασκευάζονται όταν λεπτοί υμένες λιπιδιακής φύσης (films) ή στρώματα (cakes) ενυδατώνονται και οι σωροί των κρυσταλλοποιημένων διπλοστοιβάδων διογκώνονται και μεταφέρονται στην υγρή φάση. Τα ενυδατωμένα φύλλα λιπιδιακής φύσης αποκολλούνται κατά τη διάρκεια της ανάδευσης και «εσωκλείονται» προς σχηματισμό μεγάλου μεγέθους, πολύστοιβων σωματιδίων (multilamellar vesicles, MLV) που αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του υδρογονανθρακικού πυρήνα της διπλοστοιβάδας στις άκρες. Σε περίπτωση μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων απαιτείται επιπλέον ενέργεια υπό τη μορφή υπερηχητικής ενέργειας (sonication) ή μηχανικής ενέργειας (extrusion). Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζονται μικρού μεγέθους μονόστοιβα σωματίδια (SUVs, small unilamellar vesicles) ενώ στη δεύτερη μεγάλου μεγέθους μονόστοιβα σωματίδια (LUVs, large unilamellar vesicles).

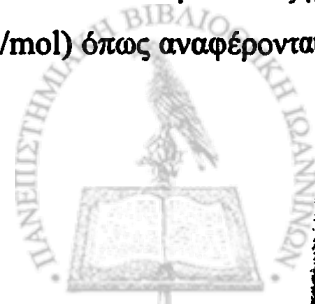
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα συμπλέγματα POPC/πεπτιδικό μοντέλο παρασκευάστηκαν προσθέτοντας τον απαραίτητο όγκο πεπτιδίου σε POPC MLVs. Τα τελευταία παρασκευάζονται ως εξής:

Συγκεκριμένη ποσότητα φωσφολιπιδιακού διαλύματος τοποθετείται σε γυάλινο σωληνάκι ενώ ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη, προς σχηματισμό φωσφολιπιδιακού υμένα, τοποθετώντας το κάτω από ήπια ροή N_2 . Είναι ύψιστης σημασίας η ροή του N_2 να είναι ήπια για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή του φωσφολιπιδίου κατά τη δημιουργία του υμένα. Ακολουθεί λυοφιλοποίηση για 24h με σκοπό την απομάκρυνση οποιουδήποτε ίχνους διαλύτη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απευθείας προσθήκη του PBS (ύγρανση του υμένα). Η θερμοκρασία του μέσου ενυδάτωσης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της θερμοκρασίας μετάβασης T_c του φωσφολιπιδίου από την κρυσταλλική στην υγρή φάση. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία για το POPC είναι $-2^\circ C$. Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex. Τα συμπλέγματα παρασκευάζονται σε θερμοκρασία δωματίου προσθέτοντας τον απαραίτητο όγκο πεπτιδικού διαλύματος με στόχο την επίτευξη της επιθυμητής μοριακής αναλογίας φωσφολιπιδίου/πεπτιδίου. Το μίγμα θα πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από την θερμοκρασία μετάβασης T_c του φωσφολιπιδίου τουλάχιστον για 24h. Μια πρώτη ένδειξη συσχέτισης ενός πεπτιδικού αναλόγου με το φωσφολιπίδιο είναι η διαύγαση του μίγματος αυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση του φωσφολιπιδίου, τόσο πιο χρονοβόρα καθίσταται η διαύγαση του μίγματος. Η αποθήκευση τόσο των POPC MLVs όσο και των συμπλεγμάτων αυτών με το πεπτίδιο πραγματοποιείται στους $+4^\circ C$.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ POPC MLVs ΜΕ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ A-I (αποA-I)

Στην παρούσα διατριβή παρασκευάστηκαν συμπλέγματα POPC MLVs με τα εξής πεπτιδικά μοντέλα της απολιποπρωτεΐνης A-I σε αναλογία 10:1 (mol/mol) όπως αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:



Πίνακας 10.1: Πεπτιδικά μοντέλα της apoA-I με τα οποία παρασκευάστηκαν συμπλέγματα POPC MLVs.

<u>Πεπτιδικά μοντέλα</u>	<u>Έλικα και Τάξη</u>	<u>Περιοχή</u>	<u>Αλληλουχία</u>
1	4 Τάξη G	104-117 Met ¹¹² →Ala ¹¹²	Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH ₂ (1)
2	6 Τάξη A	147-159	Ac-EMRDRARAHVDAL-NH ₂ (2)
3	6 Τάξη A	147-159 Met ¹⁴⁸ →Ala ¹⁴⁸	Ac-EARDRARAHVDAL-NH ₂ (3)
4	6 Τάξη G	147-159 Arg ¹⁴⁹ ·Nva ¹⁴⁹ Asp ¹⁵⁰ ·Otm ¹⁵⁰ His ¹⁵⁵ ·Ala ¹⁵⁵	Ac-EMNVaOtmRARA AVDAL-NH ₂ (4)

Σε όλα τα συμπλέγματα POPC MLVs με τα πεπτιδικά μοντέλα της απολιποπρωτεΐνης A-I έγιναν πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού CD για να διαπιστώσουμε τη δευτεροταγή δομή τους και να την συγκρίνουμε με τη δομή που είχαν τα πεπτιδικά χωρίς τη παρουσία των POPC/MLVs.

Τα λιποσώματα με τα πεπτιδικά μοντέλα (1), (2), (3), και (4) όπως αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αναστολής της οξείδωσης της LDL για να παρατηρήσουμε την αντιοξειδωτική δράση τους και να βγάλουμε συμπεράσματα μέσω της σύγκρισης της αντιοξειδωτικής τους δράσης των πεπτιδίων χωρίς να ενταχθούν στα λιποσώματα (αποτελέσματα κεφαλαίου 9) και όταν ενταχθούν μέσα στα λιποσώματα.

Στη συνέχεια αναφέρονται τα ποσοστά των δευτεροταγών διαμορφώσεων όπως αυτά προκύπτουν από τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού και από το στατιστικό πρόγραμμα CDNN καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα βιολογικά πειράματα της οξείδωσης της LDL *in vitro* παρουσία των POPC/MLVs.



1. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), περιοχή 104-117, έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G

Η αναλογία παρασκευής των συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο 1 είναι 10:1. Τα λιπосώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω έτσι ώστε να επιτευχθεί η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίου/πεπτιδίου.

Τα συμπλέγματα μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-815. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 1 mM. Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε ως εξής:

Περιοχή (range): 190-250 nm

Ευαισθησία (sensitivity): 100 mdeg

Ανάλυση (resolution): 0.2 nm

Επισυσσώρευση (accumulation): 2

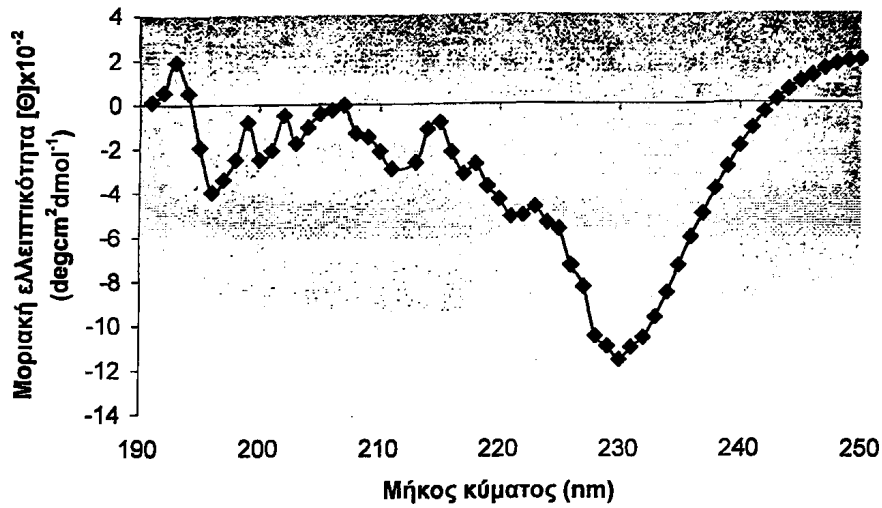
Εύρος ζώνης (bandwidth): 1.0 nm

Ταχύτητα σάρωσης (scan speed): 50 nm/min

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το φάσμα CD του συμπλέγματος POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (1).

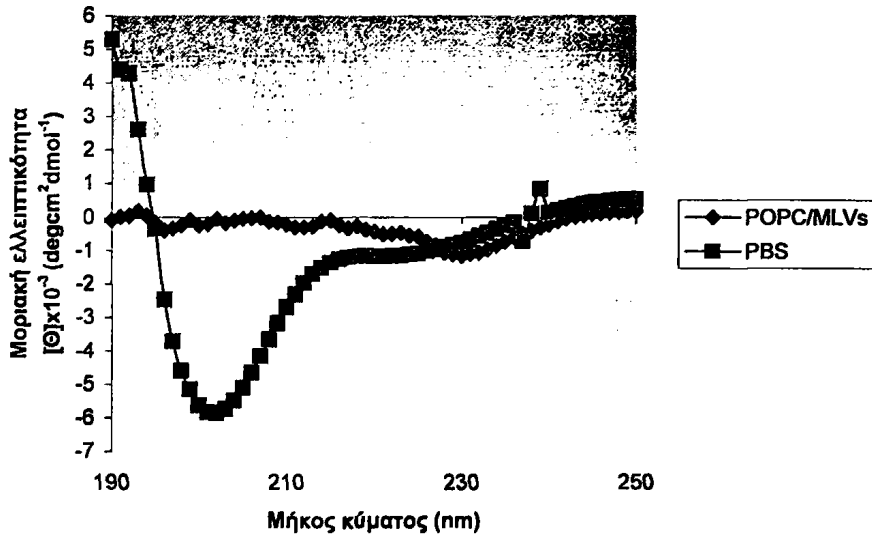


POPC/MLVs/Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂



Εικόνα 10.1: Φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (1).

Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του πεπτιδικού αναλόγου (1) στο διαλύτη PBS pH 7.4 και όταν αυτό δεσμεύεται με τα φωσφολιπίδια για να συγκριθεί η αλλαγή στη διαμόρφωση.

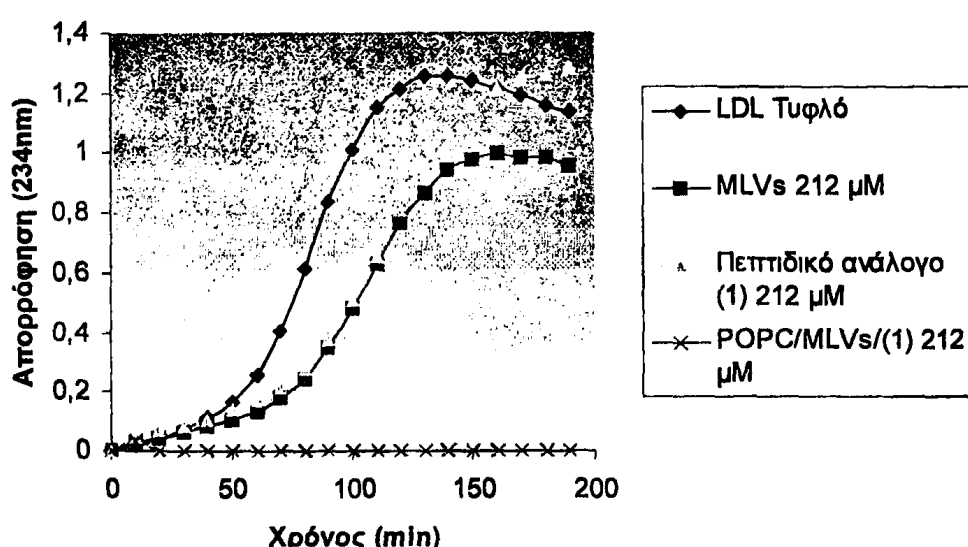


Εικόνα 10.2: Φάσματα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (1) και του πεπτιδικού μοντέλου (1) σε PBS pH 7.4.

Πίνακας 10.2: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση του πεπτιδίου (1) σε PBS και του POPC/MLVs με το (1), σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωσισμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260 nm.

	Έλικα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
Πεπτιδικό ανάλογο 1	18.4%	42.7%	11.4%	21.0%	37.0%
POPC/MLVs με το 1	17.0%	41.4%	13.1%	20.7%	43.5%

Το πεπτιδικό μοντέλο (1) και το λιπόσωμα που προέκυψε μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε συγκέντρωση 212 μM . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 10.3: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (1) και του λιποσωματιδίου POPC/MLVs/(1) σε συγκέντρωση 212 μM .

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης της LDL και ο ολικός αριθμός σχηματισμένων συζυγών διενίων για το πεπτιδικό ανάλογο (1) και το αντίστοιχο POPC/MLVs.



Πίνακας 10.3: Συγκριτικός πίνακας για το λανθάνοντα χρόνο οξείδωσης της LDL και του αριθμού των συζυγών διενίων που παράγονται παρουσία του πεπτιδίου (1) και του λιποσωματιδίου POPC/MLVs/(1) σε συγκέντρωση 212 μ M (μέσος όρος 3 πειραμάτων).

	Λανθάνων χρόνος (lag time, min)	Αριθμός διενίων	Ρυθμός παραγωγής διενίων
LDL Τυφλό	50.5 \pm 1.3	432.4 \pm 1.2	0.0164 \pm 3.5
POPC MLVs	65.5 \pm 4.7	403.1 \pm 14.5	0.0150 \pm 5.8
Πεπτιδικό ανάλογο 1	70 \pm 10	406.9 \pm 21.1	0.0153 \pm 7.1
POPC/MLVs με το 1	-	-	-

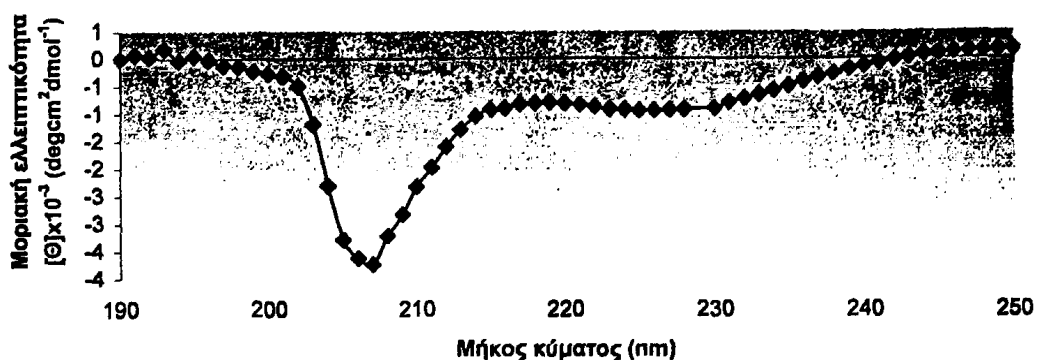
2. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-JEMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A

Η αναλογία παρασκευής των συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο 2 είναι 10:1. Τα λιποσώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω έτσι ώστε να επιτευχθεί η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίου/πεπτιδίου.

Τα συμπλέγματα μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 1 mM. Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε όπως προαναφέρθηκε.

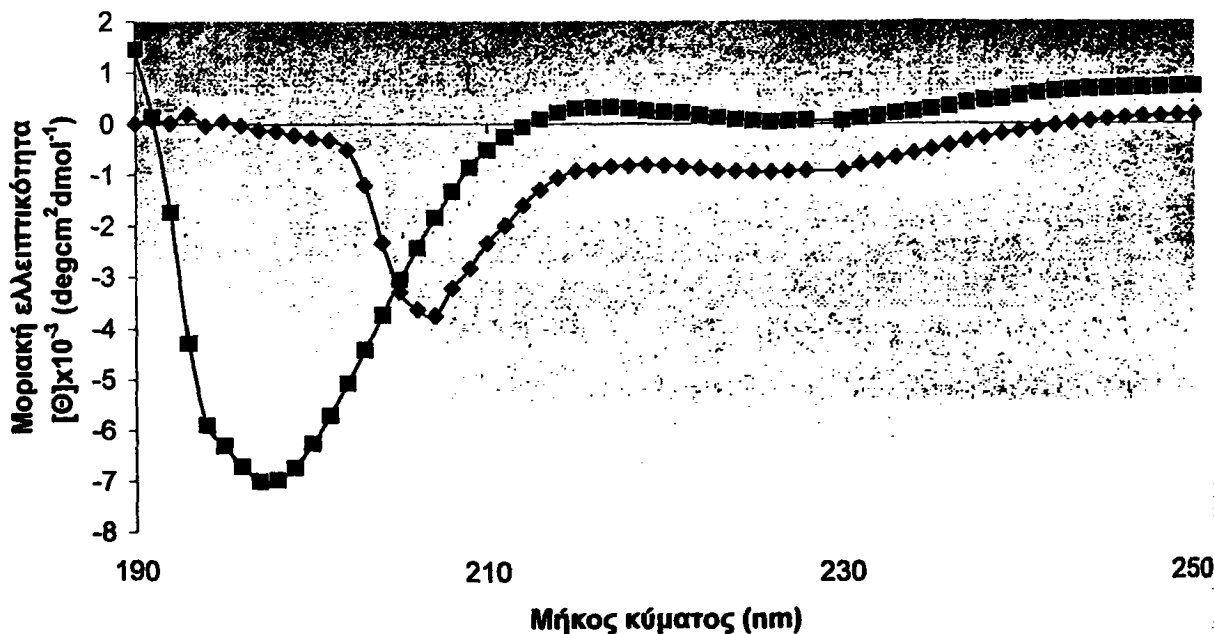
Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το φάσμα CD του συμπλέγματος POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (2).

POPC/MLVs/Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂



Εικόνα 10.4: Φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (2).

Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του πεπτιδικού αναλόγου (2) στο διαλύτη PBS pH 7.4 και όταν αυτό δεσμεύεται με τα φωσφολιπίδια για να συγκριθεί η αλλαγή στη διαμόρφωση.



Εικόνα 10.5: Φάσματα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (2) και του πεπτιδικού μοντέλου (2) σε PBS pH 7.4.

Πίνακας 10.4: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση του πεπτιδίου (2) σε PBS και του POPC/MLVs με το (2), σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260 nm.

	Έλικα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
Πεπτιδικό ανάλογο 2	16.1%	52.6%	12.2%	21.8%	38.4%
POPC/MLVs με το 2	18.1%	40.4%	12.2%	20.8%	40.4%

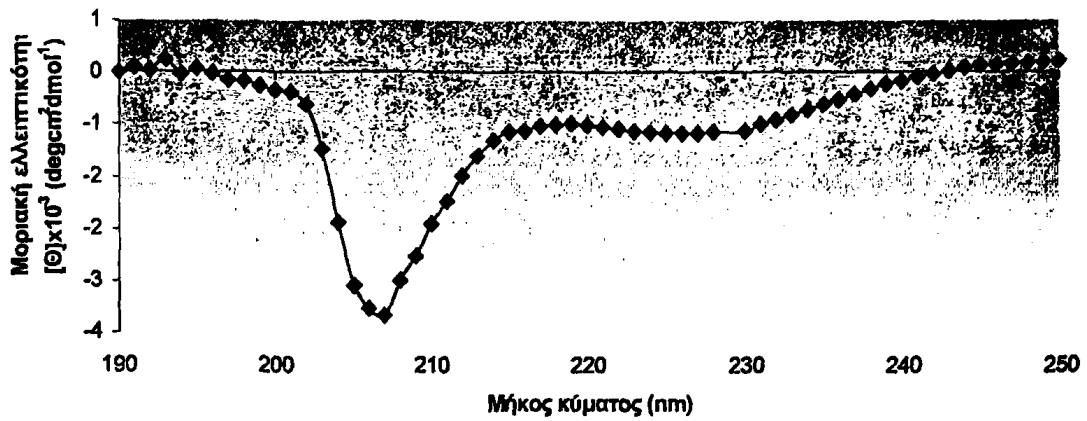
3. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EEARDRARAHDAL-NH₂ (3), περιοχή 147-159, έλικα 6, Met¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸, τάξη A

Η αναλογία παρασκευής των συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο 3 είναι 10:1. Τα λιποσώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω έτσι ώστε να επιτευχθεί η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίου/πεπτιδίου.

Τα συμπλέγματα μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 1 mM. Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε όπως προαναφέρθηκε.

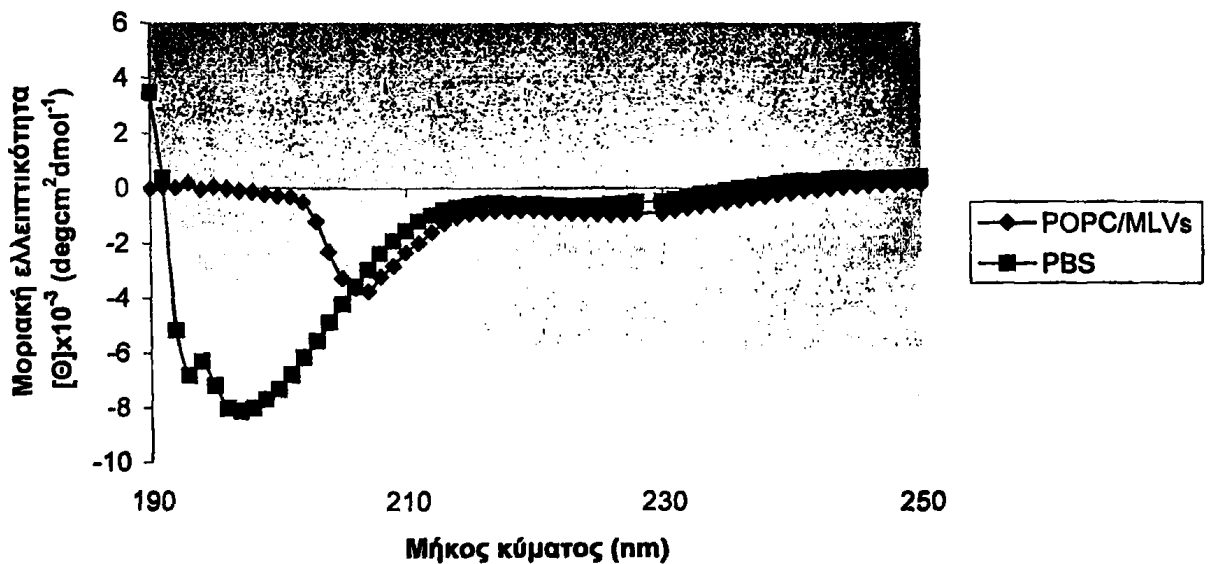
Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (3).

POPC/MLVs/Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂



Εικόνα 10.6: Φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (3).

Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του πεπτιδικού αναλόγου (3) στο διαλύτη PBS pH 7.4 και όταν αυτό δεσμεύεται με τα φωσφολιπίδια για να συγκριθεί η αλλαγή στη διαμόρφωση.

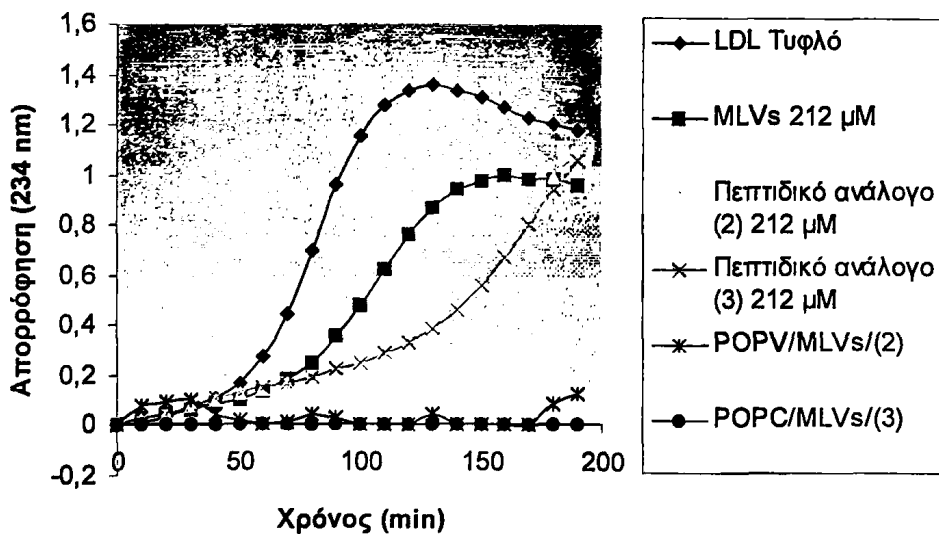


Εικόνα 10.7: Φάσματα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (3) και του πεπτιδικού μοντέλου (3) σε PBS pH 7.4.

Πίνακας 10.5: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση του πεπτιδίου (3) σε PBS και του POPC/MLVs με το (3), σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260 nm.

	Έλικα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
Πεπτιδικό ανάλογο 3	16.4%	52.6%	11.9%	21.8%	37.2%
POPC/MLVs με το 3	18.5%	40.4%	12.0%	20.5%	39.3%

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι καμπύλες οξείδωσης της LDL παρουσία των πεπτιδικών μοντέλων (2) και (3) και των αντίστοιχων λιποσωμάτων POPC/MLVs σε συγκέντρωση 212 μΜ.



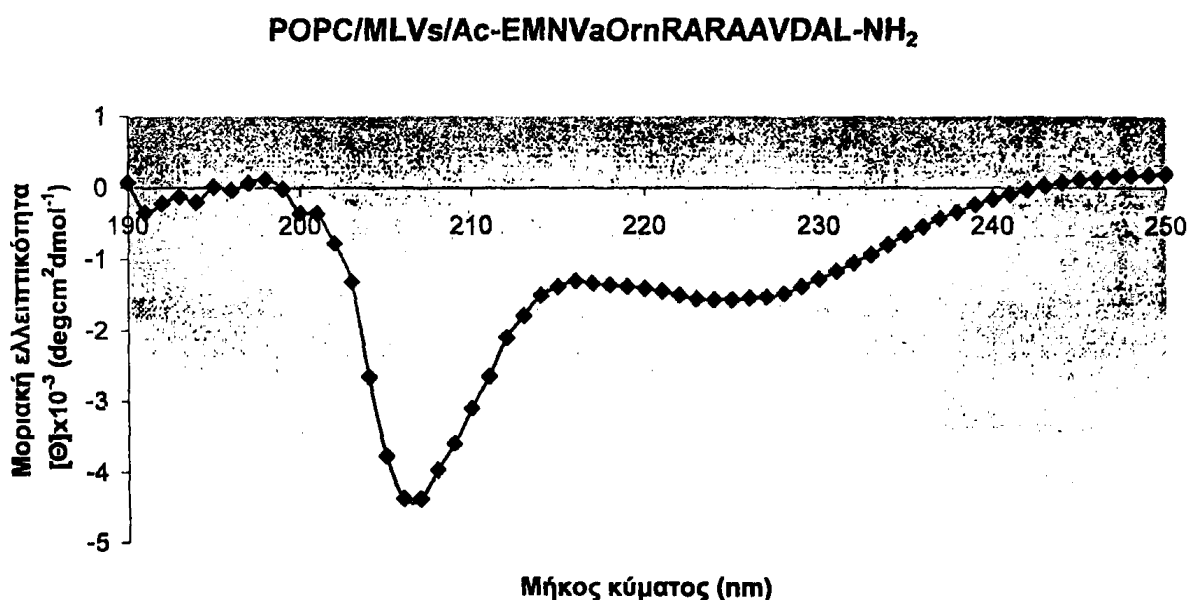
Εικόνα 10.8: Καμπύλες οξείδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (2) και (3) και του λιποσωματιδίου POPC/MLVs/(2) και του POPC/MLVs/(3) σε συγκέντρωση 212 μΜ.

4. Παρασκευή συμπλεγμάτων POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMNVaOrnRARA₁₄₇₋₁₅₉VDAL-NH₂ (4), περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵, τάξη G

Η αναλογία παρασκευής των συμπλεγμάτων POPC / MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο 4 είναι 10:1. Τα λιποσώματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω έτσι ώστε να επιτευχθεί η μοριακή αναλογία φωσφολιπιδίου/πεπτιδίου.

Τα συμπλέγματα μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 1 mM. Η ρύθμιση των παραμέτρων του οργάνου για τη λήψη των φασμάτων έγινε όπως προαναφέρθηκε.

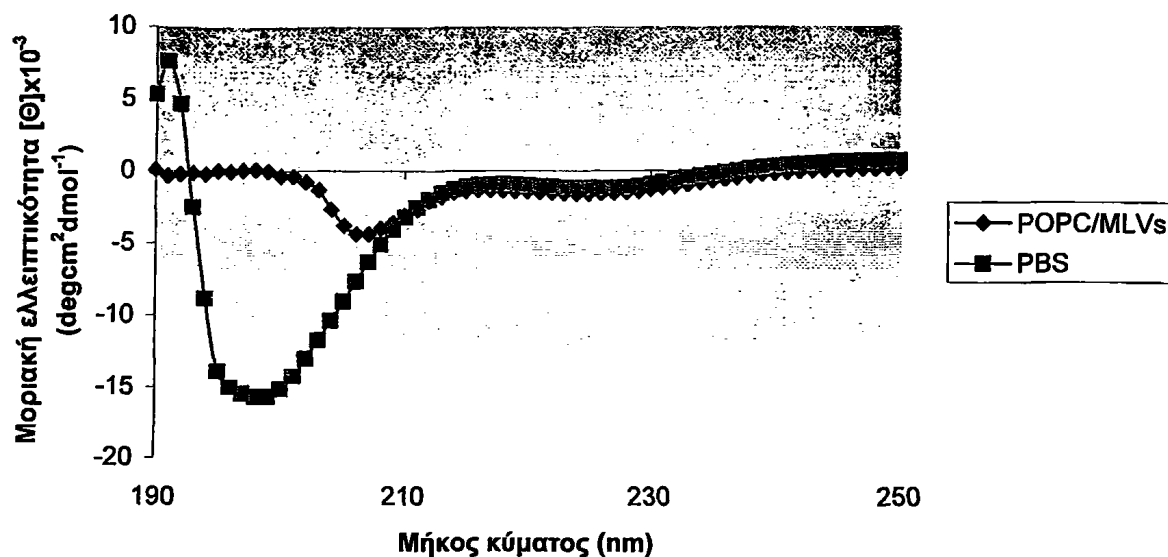
Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (4).



Εικόνα 10.9: Φάσμα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (4).

Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του πεπτιδικού αναλόγου (4) στο διαλύτη PBS pH 7.4 και όταν αυτό δεσμεύεται με τα φωσφολιπίδια για να συγκριθεί η αλλαγή στη διαμόρφωση.



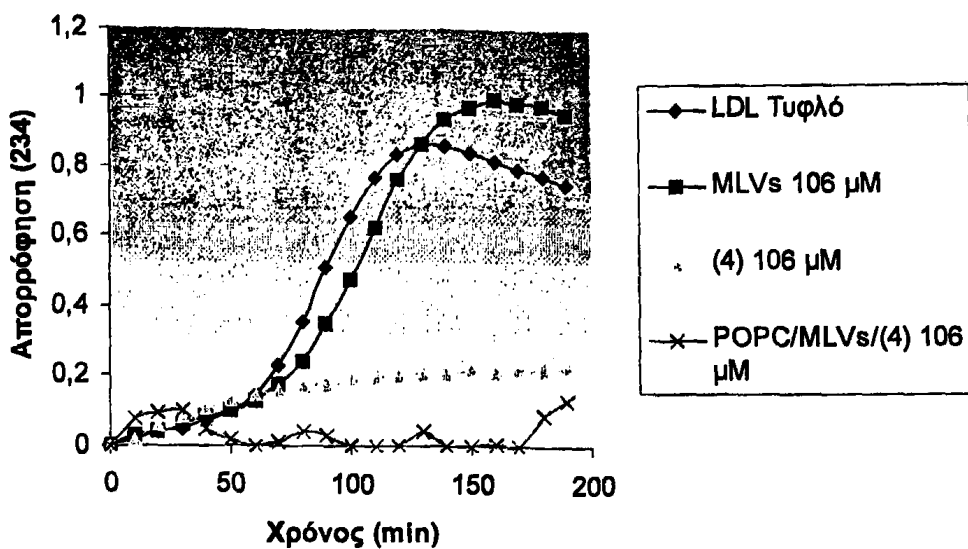


Εικόνα 10.10: Φάσματα CD του συμπλέγματος POPC/MLVs με το πεπτιδικό μοντέλο (4) και του πεπτιδικού μοντέλου (4) σε PBS pH 7.4.

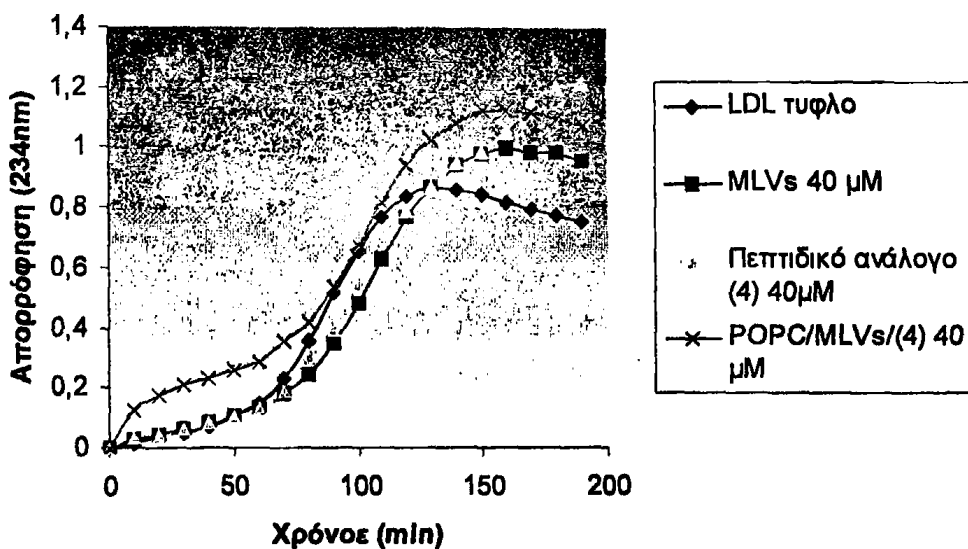
Πίνακας 10.6: Ποσοστά των επιμέρους δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση του πεπτιδίου (4) σε PBS και του POPC/MLVs με το (4), σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού από το πρόγραμμα CDNN για την περιοχή 190-260 nm.

	Έλικα	Αντιπαράλληλο Φύλλο	Παράλληλο Φύλλο	β-στροφή	Τυχαία Διαμόρφωση
Πεπτιδικό ανάλογο 4	16.3%	59.8%	10.8%	22.5%	32.0%
POPC/MLVs με το 4	18.4%	39.3%	12.1%	20.7%	39.9%

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες οξείδωσης της LDL παρουσία του πεπτιδικού μοντέλου (4) και του αντίστοιχου λιπιδώματος POPC/MLVs σε συγκεντρώσεις 53 μM και 40 μM . Στη συγκέντρωση 53 μM το πεπτιδικό μοντέλο (4) δίνει πλήρη αναστολή της οξείδωσης της LDL ενώ στη συγκέντρωση 40 μM καμία δράση.



Εικόνα 10.11: Καμπύλες οξειδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (4) και του λιπιδιοσωματιδίου POPC/MLVs/(4) σε συγκέντρωση 106 μΜ.



Εικόνα 10.12: Καμπύλες οξειδωσης της LDL (τυφλό απουσία πεπτιδίου) παρουσία του πεπτιδικού αναλόγου (4) και του λιπιδιοσωματιδίου POPC/MLVs/(4) σε συγκέντρωση 40 μΜ.



Συμπερασματικά, έχοντας υπόψη ότι τα πεπτιδικά μοντέλα (1), (2), (3) και (4) σε περιβάλλον PBS υιοθετούν διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου όπως φαίνεται από τα ποσοστά του πίνακα 8.2 τα παραπάνω φάσματα δείχνουν ότι το λιπόσωμα αποδιοργανώνει τη δομή των πεπτιδίων οδηγώντας σε αύξηση του ποσοστού της τυχαίας διαμόρφωσης.

Από τις καμπύλες οξείδωσης της LDL για τα πεπτιδικά ανάλογα (1), (2), (3), (4) γίνεται εμφανές ότι όταν το πεπτιδίο ενταχθεί στα δισκοειδή συμπλέγματα προκαλείται πλήρη αναστολή της οξείδωσης της LDL, ενώ η παρουσία του πεπτιδίου μόνου του κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL, στην ίδια συγκέντρωση, προκαλεί ηπιότερη αναστολή. Επίσης λογική απόρροια των παραπάνω καμπυλών είναι το γεγονός ότι η αναστολή της οξείδωσης της LDL δεν οφείλεται στη παρουσία του φωσφολιπιδίου (η παρουσία των POPC MLVs δεν προκαλεί καμία αναστολή της οξείδωσης), αλλά στη συνεργαστική δράση τόσο του φωσφολιπιδίου όσο και του πεπτιδικού αναλόγου της apoA-I υπό τη μορφή λιποσωμάτων.

11° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΤΗΣ apoA-I ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ LCAT



ΑΝΤΙΑΠΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΑ

- rHDL (με WT apoA-I και πεπτίδια της περιοχής 152-164)
- CHCl₃ (AppliChem)
- CH₃OH (Merck)
- Tris (AppliChem)
- NaCl (AppliChem)
- EDTA (Riedel de-Haën)
- SB 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1.5 M NaCl, 0.1% EDTA)
- SB 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150mM NaCl, 0.01% EDTA)
- BSA (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma)
- Χοληστερόλη (Sigma)
- Ολεϊκός εστέρας χοληστερόλης (Sigma)
- Διάλυμα εσωτερικών προτύπων (carrier solution): (5mg χοληστερόλη και 5 mg ολεϊκού εστέρα χοληστερόλης σε 1 ml CHCl₃-CH₃OH (2:1, v/v)
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): 40μl carrier solution σε 5 ml CHCl₃-CH₃OH (2:1, v/v)
- Πετρελαϊκός αιθέρας (AppliChem)
- Αιθυλαιθέρας (Sigma)
- Οξικό οξύ (Riedel de-Haën)
- Ιώδιο (AppliChem)
- 2,5-διφαινυλοξαζόλιο (PPO, Sigma)
- 1,4-δι[2-(5-φαινυλοξαζολο)]βενζόλιο (POPOP, Fluka)
- Τολουόλιο (Merck)
- Triton X-100 (Merck)
- Υγρό σπινθηρισμού: 1.1 g PPO, 0.2 g POPOP, 1266 ml τολουόλιο. Τα τρία αυτά συστατικά επωάζονται όλη νύχτα και την επόμενη μέρα προσθέτονται 660 ml Triton X-100
- Κυκλοαναδευτήρας (Rx³ Velp Scientifica)
- Πλαστικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου
- Υδατόλουτρο (Bioline Scientific)

- Οβίδα N₂
- Πιπέτες παστέρ
- Χρωματογραφική πλάκα ITLC (Pall Corporation, polysilica acid gel impregnated glass fiber sheets)
- Απαγωγός
- Φιαλίδια σπινθηρισμού
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (β-ακτινοβολίας) (TRI-CARB 2100TR Liquid Scintillation Analyzer)
- Καταγραφέας Epson LX-300

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η LCAT είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της FC, μεταφέροντας μακράς αλύσου FFA από τη φωσφατιδυλοχολίνη στη θέση 3 του μορίου της χοληστερόλης. Αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα κυρίως στην επιφάνεια των HDL και σε μικρότερο βαθμό στις LDL και VLDL.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο στόχος αυτού του πειράματος είναι να καθοριστεί η δραστικότητα του ενζύμου LCAT σε ανασυνδυασμένες μορφές HDL. Τα σωματίδια rHDL προσθέτονται (σε τόσο όγκο ώστε η τελική συγκέντρωση apoA-I να είναι 6μg/ml≈0.2μM) σε γυάλινο σωληνάριο μαζί με 50 μl από διάλυμα 40 mg/ml BSA, και 20 μl από διάλυμα 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 500 μl με την προσθήκη διαλύματος SB. Το μείγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και επωάζεται στους 37 °C για 30 min. Στη συνέχεια, προσθέτονται 5 μl δείγματος (rHDL) και η επώαση συνεχίζεται για επιπλέον 30 min. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 5 ml διαλύματος τερματισμού. Το μείγμα αναμιγνύεται ισχυρά (vortex) και μεταφέρεται στους 4 °C για τουλάχιστον 40 min, ώστε να διαχωριστούν η οργανική από την ανόργανη φάση. Η πάνω, υδατική φάση απομακρύνεται με πιπέτα παστέρ, και η κάτω, οργανική φάση, ξηραίνεται υπό N₂. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 500 μl γλωροφορμίου, αναμιγνύονται ισχυρά με vortex και κατόπιν ξηραίνονται υπό N₂. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 75 μl γλωροφορμίου και τοποθετείται σε χρωματογραφική πλάκα ITLC. Η πλάκα αυτή αναπτύσσεται για 5 min, σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα: αιθυλαιθέρα: οξικού οξέος (αναλογία όγκων 85:15:1) σε χρωματογραφικό θάλαμο. Οι ζώνες

των CE και της FC εμφανίζονται με έκθεση σε ατμούς ιωδίου για 10-20 sec. Οι θέσεις των CE και της FC σημειώνονται με μολύβι και το κίτρινα χρωματισμένο ιώδιο αφήνεται να εξαχνωθεί, μέχρι την πλήρη εξαφάνιση της χρώσης. Τότε, οι ζώνες της FC και των CE κόβονται χωριστά και τοποθετούνται σε σωλήνες σπινθηρισμού. Ακολουθεί προσθήκη 10 ml διαλύματος σπινθηρισμού και επώαση 30 min ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποσύνδεση των λιπιδίων από τη χρωματογραφική πλάκα. Τελικά, τα δείγματα μετρώνται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ HDL ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΗΣ apoA-I

Οι ανασυνδυασμένες μορφές HDL παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο των χολικών αλάτων στο εργαστήριο Λιποπρωτεϊνών και Λιπιδίων από την υποψήφια Διδάκτορα Πετράκη Μαρία. Τα πεπτιδικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

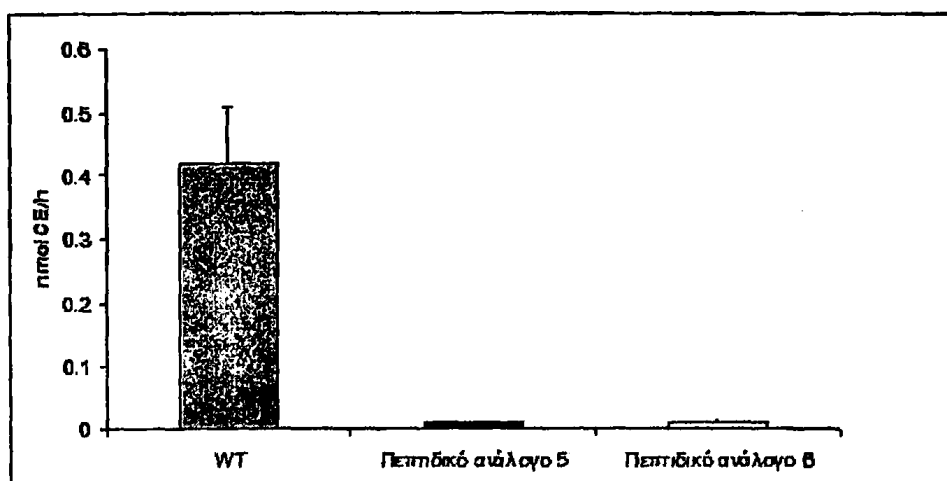
Πίνακας 11.1: Πεπτιδικά μοντέλα της apoA-I που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή ανασυνδυασμένων μορφών HDL.

<u>Πεπτιδικά μοντέλα</u>	<u>Έλικα και Τάξη</u>	<u>Περιοχή</u>	<u>Αλληλουχία</u>
5	6 Τάξη A	152-164	Ac-ARAHVDALRTHLA-NH ₂
6	6 Τάξη G	152-164 Thr ¹⁶¹ →Lys ¹⁶¹	Ac-ARAHVDALRKHLA-NH ₂

Τα πειράματα για την ενεργότητα της LCAT έγιναν στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» σε συνεργασία με την Έρευνήτρια Γ κ. Χρόνη Αγγελική.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται ενδεικτικά αποτελέσματα από τις σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Τα πειράματα ήταν επαναλήψιμα (3 επαναλήψεις) σε τουλάχιστον δυο πειραματικές διαδικασίες. Χρησιμοποιήσαμε μια συγκέντρωση υποστρώματος και μελετήσαμε την ικανότητα των ανασυνδυασμένων μορφών HDL είτε αυτά περιείχαν την απολιποπρωτεΐνη A-I (WT) είτε τα πεπτιδικά ανάλογα της έλικας, περιοχή 152-164 (πεπτιδικό ανάλογο 5 και 6), να ενεργοποιούν το ενζύμου LCAT.



Εικόνα 11.1: Δραστηριότητα του ενζύμου LCAT από τις ανασυνδυασμένες μορφές HDL (WT:recHDL_{apoA-I}, πεπτιδικό ανάλογο 5:recHDL/Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ και πεπτιδικό ανάλογο 6: recHDL/Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂) (nmol CE/h: nmol εστέρων χοληστερόλης/ώρα).

Όπως παρατηρούμε από το παραπάνω διάγραμμα τα σωματίδια που εμπεριέχουν την απολιποπρωτεΐνη A-I (WT) ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT ενώ τα σωματίδια με τα πεπτιδικά ανάλογα δεν εμφανίζουν καμία δράση.

12^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ





κο
αν
πο
δω
Πα
στ
κα
αν
επ
επ
αν
στ
στ
αν
στ
με
φρ
ΑΒ
επ
στ
στ
πο
μ
ε
ε
πο

Η υψηλής πυκνότητα λιποπρωτεΐνη (HDL) εμφανίζει σημαντικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα η οποία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της HDL, πολλά σημεία δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, ιδιαίτερα ως προς το ρόλο που διαδραματίζουν τα επιμέρους συστατικά της HDL στις αντιαθηρογόνες δράσεις της. Παράλληλα, ένας νέος θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της αθηρωμάτωσης και της καρδιαγγειακής νόσου αποτελεί σήμερα η αύξηση των επιπέδων της HDL στο πλάσμα καθώς και η βελτίωση και ενίσχυση των αντιαθηρογόνων χαρακτηριστικών της π.χ. αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Για την επίτευξη αυτών των στόχων είναι απαραίτητη η κατανόηση σε βάθος του ρόλου των επιμέρους συστατικών της HDL όπως η apoA-I.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνάται ο ρόλος της apoA-I στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL καθώς και στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης.

Η βιογένεση της HDL αρχίζει με τη σταδιακή λιπιδίωση της apoA-I που οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων δισκοειδών και τελικά σφαιρικών σωματιδίων HDL. Έχει προταθεί ότι το δισκοειδές σωματίδιο της HDL αποτελείται από δύο μόρια apoA-I, τα οποία κλαπάρνται κυρίως από αμφιπαθητικές α-έλικες σε αντιπαράλληλη διάταξη και σχηματίζουν μια ζώνη η οποία καλύπτει τις υδρόφοβες λιπαρές αλυσίδες της φωσφολιπιδικής διλοστοιβάδας. Η σταδιακή λιπιδίωση της apoA-I γίνεται διαμέσου της αλληλεπίδρασης της με τον μεμβρανικό μεταφορέα λιπιδίων ABCA1 διαμέσου του οποίου προσλαμβάνει φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από τα διάφορα κύτταρα. Μεταλλάξεις ή απουσία του ABCA1 δεν επιτρέπουν το σχηματισμό της HDL και οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις.

Η μετατροπή των δισκοειδών σωματιδίων της HDL σε σφαιρικά (ωρίμανση HDL) απαιτεί τη συνεχή εστεροποίηση της ελεύθερης χοληστερόλης, η οποία γίνεται με τη δράση της LCAT για την ενεργοποίηση της οποίας είναι απαραίτητη η παρουσία της apoA-I. Κατά τη διάρκεια αυτής της ωρίμανσης, τα αντιπαράλληλα μόρια της apoA-I επαναδιευθετούνται στο σφαιρικό σωματίδιο.

Η apoA-I συνίσταται από επαναλαμβανόμενες μονάδες που σχηματίζουν δέκα αμφιπαθητικές α-έλικες που αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια. Μοντέλα αμφιπαθητικής έλικας έχουν θεωρηθεί ως οι καταλληλότερες διαμορφώσεις για αλληλεπιδράσεις με λιπίδια. Έτοιμα μοντέλα χαρακτηρίζονται από μια κατάλληλη διεύθυνση των αμινοξέων έτσι ώστε να εφοκύψουν ελικοειδείς διατάξεις που στη μια πλευρά της έλικας εντοπίζονται τα φορτισμένα



αμινοξέα (πολικά) ενώ στην άλλη πλευρά εντοπίζονται τα υδρόφοβα αμινοξέα (μη πολικά). Μεταξύ των δυο πλευρών παρεμβάλλονται αμινοξέα που σχηματίζουν μια διεπιφάνεια.

Οι λειτουργικά σημαντικές περιοχές της apoA-I είναι σήμερα πολύ καλά τεκμηριωμένες. Έτσι, το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 6 θεωρείται υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της LCAT, ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 9 συνδεδεμένο με το αμινο-τελικό άκρο της έλικας 10 αλληλεπιδρά λειτουργικά με το μεταφορέα ABCA1. Επίσης οι έλικες 4 και 6 που περιέχουν τη Met¹¹² και Met¹⁴⁸ αντίστοιχα λειτουργούν πολύ πιθανόν και ως «παγίδες οξειδωσης», συμβάλλοντας στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL. Οι μεθειονίνες του μορίου της apoA-I φαίνεται να επεμβαίνουν στις αλυσιδωτές αυτοκαταλυόμενες αντιδράσεις των λιπούπεροξειδίων που οδηγούν στο σχηματισμό των ox-LDL σωματιδίων δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται. Συγκεκριμένα η apoA-I ανάγει τα λιπούπεροξειδία (LOOH) που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε αντίστοιχα υδροξύλια (LOH) με ταυτόχρονη δημιουργία σουλφοξειδίου στη θέση του θείου της μεθειονίνης.

Στην παρούσα διατριβή παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν, ως προς τις βιολογικές και διαμορφωτικές τους ιδιότητες, πεπτιδικά μοντέλα της απολιποπρωτεΐνης A-I (apoA-I), η οποία αποτελεί κύριο συστατικό της HDL και ευθύνεται για πολλές από τις αντιαθηρογόνες δράσεις της.

Τα πεπτιδικά μοντέλα που παρασκευάστηκαν είναι μοντέλα των ελίκων 4, 6 και 9-10. Στο μοντέλο (1), ανάλογο της έλικας 4 (104-117), η Met¹¹² αντικαταστάθηκε με Ala ώστε να μελετηθεί ο ρόλος της μεθειονίνης ως παγίδα οξειδωσης. Τα μοντέλα (2), (3) και (4) είναι ανάλογα της έλικας 6. Το μοντέλο (2) αντιστοιχεί στη φυσική αλληλουχία (147-159) της έλικας 6, το μοντέλο (3) είναι ανάλογο αυτής, στο οποίο η Met¹⁴⁸ αντικαταστάθηκε με Ala, ώστε να διερευνηθεί ο αντιοξειδωτικός ρόλος της Met, ενώ στο μοντέλο (4) έχουν γίνει κατάλληλες τροποποιήσεις (Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵) ώστε να προκύψει ένα ανάλογο της έλικας 6 (A τάξης) που να είναι G τάξης και να μελετηθούν οι πιθανές επιπτώσεις στις βιολογικές ιδιότητες της αρχικής έλικας 6. Το μοντέλο (5) αντιστοιχεί στην αλληλουχία 152-164 της έλικας 6, ενώ στο μοντέλο (6) η Thr¹⁶¹ έχει αντικατασταθεί με την Lys ώστε να προκύψει ένα μοντέλο έλικας τάξης G. Το μοντέλο (7) είναι η φυσική αλληλουχία της έλικας 9-10 (περιοχή 209-229, τάξης G), ενώ το μοντέλο (8) είναι ανάλογο της έλικας 9-10 τάξης A και προέκυψε από κατάλληλες τροποποιήσεις Asp²¹³·Orn²¹³ και Ser²²⁴·Lys²²⁴.



Η αναλυτική πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων περιγράφεται στο κεφάλαιο 7. Όλα τα πεπτιδικά ανάλογα παρασκευάστηκαν σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα.

Η διαμορφωτική μελέτη των πεπτιδίων 1-8 έγινε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού που ελήφθησαν φαίνονται στις εικόνες 1-12 του κεφαλαίου 8 ενώ ο Πίνακας 8.2 δίνει τα ποσοστά των δευτεροταγών δομών τους με τη χρήση του υπολογιστικού πακέτου CDNN.

Τα χαρακτηριστικά α-έλικας φαίνεται να κυριαρχούν σε όλους τους διαλύτες που μελετήθηκαν εκτός του PBS pH 7.4.

Σύγκριση του μοντέλου (1) με το Ac-FQKKWQEEMELYRQ-NH₂ της έλικας 4 που είχε συντεθεί στο εργαστήριο Χημείας των Πεπτιδίων κατά την μεταπτυχιακή εργασία του φοιτητή Κ. Χαριλόγη έδειξε ότι τα ποσοστά της ελικοειδούς διαμόρφωσης μειώθηκαν στο διαλύτη TFE/H₂O (50/50, v/v). Στη φυσική αλληλουχία της έλικας 4 ήταν 87% ενώ στο μοντέλο (1) μειώθηκε σε 23% ενώ στο διαλύτη SDS 8 mM εμφανίζουν παρόμοια ποσοστά α-ελικοειδούς διαμόρφωσης.

Τα πεπτιδικά μοντέλα (2), (3) και (4) της έλικας 6 της περιοχής 147-159 χαρακτηρίζονται από σημαντικά ποσοστά α-έλικας σε TFE/H₂O (50/50, v/v), SDS 8mM και C₁₄PC 5mM. Αντικατάσταση της Met¹⁴⁸ από Ala δεν φαίνεται να μεταβάλλει τα ποσοστά της ελικοειδούς διάταξης. Αντιθέτως μετατροπή του μοντέλου (4) σε διαφορετική τάξη (τάξη G) αυξάνει τα ποσοστά έλικας και σε μερικές περιπτώσεις τα διπλασιάζει (C₁₄PC 5mM) αποδεικνύοντας έτσι τη σημασία της τάξης της έλικας.

Αύξηση των ποσοστών α-έλικας παρατηρήθηκε όταν η Thr¹⁶¹ του μοντέλου (5) αντικαταστάθηκε με την Lys στο μοντέλο (6). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην μεγαλύτερη τάση που παρουσιάζει η λυσίνη να επιβάλλει δομές α-έλικας σε σχέση με τη θρεονίνη.

Τα ποσοστά α-έλικας του πεπτιδικού μοντέλου (7) της έλικας 9-10 κυμαίνονται στο 60% σε όλους τους διαλύτες (εκτός από PBS pH 7.4), ενώ στο πεπτιδικό μοντέλο (8) της έλικας 9-10 τα ποσοστά α-έλικας φτάνουν το 60% (SDS 8mM).

Όλα τα πεπτιδικά μοντέλα 1-8 εμφανίζουν χαρακτηριστικά αντιπαράλληλου φύλλου που κυμαίνονται από 40% μέχρι 60% σε διάλυμα PBS pH 7.4 επιβεβαιώνοντας τη σημασία του περιβάλλοντος μέσου στη διαμόρφωση των πεπτιδικών αναλόγων.

Στο κεφάλαιο 9 μελετήθηκε η βιολογική δράση των πεπτιδικών αναλόγων ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την οξειδωτική τροποποίηση της LDL *in vitro*.

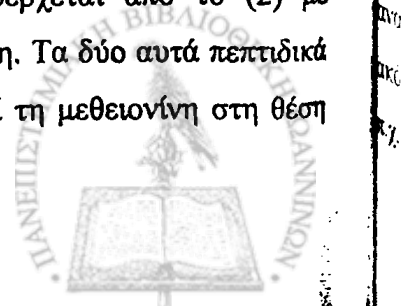
Το πεπτιδικό ανάλογο (1) όπως παρατηρείται από τις καμπύλες οξείδωσης της LDL (εικόνα 9.2, κεφαλαίου 9), τόσο στη μικρότερη συγκέντρωση 53μM έως και τη μεγαλύτερη

848 μ M δεν προστατεύει πλήρως την LDL από την οξειδωτική τροποποίηση αλλά παρατηρείται μια διαφοροποίηση στη δράση της αυξανόμενης συγκέντρωσης (δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση). Συγκρινόμενο με το πεπτιδικό ανάλογο Ac-FQKKWQEEMELYRQ-NH₂, το πεπτιδικό ανάλογο με τη μεθειονίνη στη θέση 112 εμφανίζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση αφού και στη συγκέντρωση 424 μ M δίνει πλήρη αναστολή της οξείδωσης της LDL (αποτελέσματα από προηγούμενη μελέτη).

Μια ιδιαίτερη σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πεπτιδικών αναλόγων της apoA-I είναι ο λανθάνων χρόνος οξείδωσης που όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 9 μετράται σε λεπτά και είναι ο χρόνος που μεσολαβεί για τη μετάβαση από τη λανθάνουσα φάση στην παραγωγική κατά την οξείδωση της LDL. Μεγαλύτεροι λανθάνοντες χρόνοι μεταφράζονται σε αυξημένη ανθεκτικότητα του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου έναντι της οξειδωτικής τροποποίησης. Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη του ανθρώπινου πλάσματος που απομονώθηκε επώαστηκε μαζί με τα πεπτίδια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πεπτιδίων. Με βάση την εικόνα 9.3 του κεφαλαίου 9 παρατηρούμε σημαντική καθυστέρηση της οξείδωσης της LDL ειδικά στις μεγάλες συγκεντρώσεις του (1) σε σχέση με το τυφλό αλλά στις μικρές συγκεντρώσεις 53-212 μ M η ανασταλτική δράση είναι μειωμένη μιας και οι λανθάνοντες χρόνοι είναι κατά 10 λεπτά μεγαλύτεροι από το λανθάνοντα χρόνο του τυφλού. Συγκρίνοντας το (1) με το Ac-FQKKWQEEMELYRQ-NH₂, στη συγκέντρωση 424 μ M ο λανθάνων χρόνος για το (1) είναι 70 min ενώ για το Ac-FQKKWQEEMELYRQ-NH₂ είναι 86.5 min σε σύγκριση με το τυφλό που είναι 50 min.

Τα ολικά συζυγή διένια των οξειδωμένων λιπιδίων που παράγονται κατά την οξείδωση της LDL αποτελούν μέτρο της έκτασης της οξείδωσης που υφίσταται το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο. Στην περίπτωση του πεπτιδικού αναλόγου (1), αυτό συνεισφέρει στη μειωμένη παραγωγή διενίων σε σύγκριση με τα τυφλό (οξείδωση LDL χωρίς την παρουσία πεπτιδίου) στις συγκεντρώσεις 424 μ M και 848 μ M (εικόνα 9.4). Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποδεικνύουν τη σημασία της Met ως παγίδα οξείδωσης της έλικας 4.

Για τα πεπτιδικά μοντέλα (2), (3) (Α τάξης) και (4) (Γ τάξης) της έλικας 6 της apoA-I, περιοχή 147-159, παρουσιάζονται οι καμπύλες οξείδωσης παρουσία των αναλόγων σε συγκεντρώσεις 53-424 μ M στις εικόνες 9.5-9.6 και 9.7 του κεφαλαίου 9. Το πεπτιδικό μοντέλο (2) αποτελεί την αλληλουχία της apoA-I, το (3) προέρχεται από το (2) με αντικατάσταση της μεθειονίνης στη θέση 148 με το αμινοξύ αλανίνη. Τα δύο αυτά πεπτιδικά μοντέλα ανήκουν στην τάξη Α. Το πεπτιδικό μοντέλο (4) διατηρεί τη μεθειονίνη στη θέση



148, αλλά ανήκει στην τάξη G και προήρθε από τις αντικαταστάσεις Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Otn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵.

Συγκριτικά αποτελέσματα για τα πεπτιδικά μοντέλα (2), (3) και (4) ως προς τη δράση τους στην αναστολή της οξειδωσης της LDL σε συγκεντρώση 424 μM (εικόνα 9.9), για το λανθάνοντα χρόνο (εικόνα 9.10) και για τον αριθμό των παραγόμενων συζυγών διενίων (εικόνα 9.11) μας δίνουν σημαντικές παρατηρήσεις για την αντιοξειδωτική τους δράση.

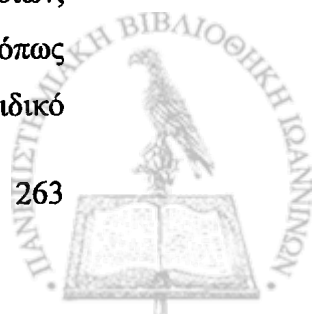
Από τα τρία πεπτιδικά μοντέλα το (4) παρουσιάζει τις καλύτερες αντιοξειδωτικές δράσεις αφού αναστέλλει πλήρως την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 53-424 μM. Τα πεπτιδικά μοντέλα (2) και (3) εμφανίζουν παρόμοιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες είναι καλύτερες σε μεγάλες συγκεντρώσεις (424 μM). Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία στα δομικά χαρακτηριστικά της έλικας, καθώς η τάξη G διαφέρει σημαντικά από την A.

Για τα πεπτιδικά μοντέλα (5) και (6) της έλικας 6 που αντιπροσωπεύουν την περιοχή 152-164 παρατηρούμε ότι το (5) δίνει πλήρη αναστολή της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 53-424 μM, ενώ το (6) στις ίδιες συγκεντρώσεις εμφανίζει μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση αλλά όχι πλήρη αναστολή. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι μετατροπή της έλικας 6 (περιοχή 152-164) από A σε G τάξη, με αντικατάσταση της Thr¹⁶¹ με Lys, οδηγεί σε πλήρη αναστολή της αντιοξειδωτικής δράσης του πεπτιδικού αναλόγου. Το γεγονός ότι διαφορετικής τάξης έλικα ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση των δυο τμημάτων της έλικας 6, αποδεικνύει τη διαφορετική λειτουργικότητα των δυο περιοχών της.

Ομοίως τα πεπτιδικά μοντέλα (7) και (8) που ανήκουν στις έλικες 9 και 10 της apoA-I παρουσιάζουν μια δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση ως προς την οξείδωση της LDL με τη καλύτερη δράση να εμφανίζεται στο πεπτιδικό ανάλογο (8), το οποίο είναι τάξης A και προέκυψε από αντικατάσταση του Asp²¹³ με Otn και της Ser²²⁴ με Lys.

Στο κεφάλαιο 10 παρασκευάστηκαν συμπλέγματα POPC MLVs με τα πεπτιδικά ανάλογα της apoA-I (1), (2), (3), (4), (7) και (8) και μελετήθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Τα POPC MLVs που παρασκευάστηκαν από τις έλικες 4 και 6 μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL.

Πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού των συμπλεγμάτων POPC/MLVs/πεπτιδικών αναλόγων έδειξαν ότι το λιπώσωμα αποσταθεροποιεί την ελικοειδή δομή των πεπτιδίων, εκκόμα και εκείνων που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά έλικας σε λιπδιακό περιβάλλον όπως π.χ. το πεπτιδικό ανάλογο (4) σε διαλύτη C₁₄PC. Το λιπώσωμα POPC/MLVs με το πεπτιδικό



ανάλογο (1) προκύπτει ότι αναστέλλει πλήρως την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε μια συγκέντρωση 212 μ M που το πεπτιδικό ανάλογο μόνο του δεν είχε δράση. Ομοίως συμβαίνει και για τα λιποσώματα POPC/MLVs με τα πεπτιδικά ανάλογα (2), (3) και (4).

Στο κεφάλαιο 11 μελετήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου LCAT παρουσία ανασυνδυασμένων μορφών HDL (reHDL). Τα σωματίδια reHDL που εμπεριέχουν την apoA-I και τα πεπτιδικά ανάλογα της έλικας 6 περιοχή 152-164 Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5) και Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6) δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των χολικών αλάτων. Από τα αποτελέσματα της εικόνας 11.1 του κεφαλαίου 11 προκύπτει ότι ενώ οι ανασυνδυασμένες μορφές HDL που εμπεριέχουν την apoA-I ενεργοποιούν το ένζυμο LCAT, τα reHDL με τα πεπτιδικά ανάλογα (5) και (6) δεν εμφανίζουν καμία δράση.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά πεπτιδικών μοντέλων των ελίκων 4, 6 και 9-10 της apoA-I. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η δράση της Met ως παγίδα οξείδωσης καθώς και η επίδραση της μεταβολής της τάξης της έλικας από A σε G και αντιστρόφως στη δράση των ελίκων 4, 6 και 9-10 μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις της πρωτοταγούς δομής.

Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τροποποιήσεις στην πρωτοταγή δομή των ελίκων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές τόσο στη διαμόρφωση όσο και στη βιολογική δράση των πεπτιδικών μοντέλων της apoA-I.



13^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



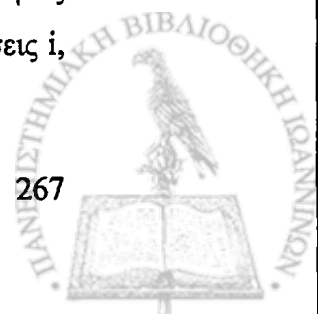
Η αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) στο πλάσμα και της αθηροσκλήρωσης έχει αποδοθεί στο ρόλο που διαδραματίζει η HDL και το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της, η απολιποπρωτεΐνη A-I (apoA-I) στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης καθώς επίσης στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της.

Η apoA-I είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 243 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 28 kDa και συντίθενται κυρίως στο ήπαρ και στο έντερο. Τα αμινοξέα της apoA-I οργανώνονται σε 10 διαδοχικές αμφιπαθητικές α-έλικες: οκτώ 22-μερείς και δύο 11-μερείς (που αποτελούνται από 22 και 11 αμινοξέα αντίστοιχα) που συχνά διακόπτονται από προλίνες. Κάθε μία από αυτές τις αμφιπαθητικές έλικες έχει ένα συγκεκριμένο ρόλο.

Οι λειτουργικά σημαντικές περιοχές της apoA-I είναι σήμερα πολύ καλά τεκμηριωμένες. Έτσι, το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 6 θεωρείται υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της LCAT, ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο της έλικας 9 συνδεδεμένο με το αμινο-τελικό άκρο της έλικας 10 αλληλεπιδρά λειτουργικά με το μεταφορέα ABCA1. Επίσης οι έλικες 4 και 6 που περιέχουν τη Met112 και Met148 αντίστοιχα λειτουργούν πολύ πιθανόν και ως «παγίδες οξειδωσης», συμβάλλοντας στις αντιοξειδωτικές δράσεις της HDL. Οι μεθειονίνες του μορίου της apoA-I φαίνεται να επεμβαίνουν στις αλυσιδωτές αυτοκαταλυόμενες αντιδράσεις των λιπούπεροξειδίων που οδηγούν στο σχηματισμό των οξ-LDL σωματιδίων δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται. Συγκεκριμένα η apoA-I παράγει τα λιπούπεροξειδία (LOOH) που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL σε αντίστοιχα υδροξύλια (LOH) με ταυτόχρονη δημιουργία σουλφοξειδίου στη θέση του θείου της μεθειονίνης.

Οι αμφιπαθητικές α-έλικες της apoA-I κατατάσσονται σε διάφορες τάξεις όπως είναι η A και η G. Η τάξη A χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό μέσο όρο υδροφοβικότητας και μια κατανομή των αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα να βρίσκονται ομαδοποιημένα στην διεπιφάνεια πολικής-μη πολικής φάσης και τα αρνητικά να βρίσκονται συγκεντρωμένα στο κέντρο της πολικής επιφάνειας ενώ η πολική πλευρά της G τάξης χαρακτηρίζεται από τυχαία εναλλαγή θετικών και αρνητικών αμινοξέων.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν μοντέλα των ελικοειδών επιμημάτων της apoA-I ώστε να μελετηθεί διεξοδικά η αντιαθηρογόνος δράση τους. Ο σχεδιασμός των μοντέλων της apoA-I έγινε με βάση α) τη διατήρηση της αμφιπαθητικότητας της έλικας και την παρουσία θετικών και αρνητικών φορτίων, κατά το δυνατόν, σε θέσεις i,



i+3 και i+4, ώστε να σταθεροποιούνται ιοντικές αλληλεπιδράσεις στην υδρόφιλη περιοχή της έλικας, β) την αντικατάσταση της Met με Ala, και γ) τη μεταβολή της τάξης της έλικας.

1. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), περιοχή 104-117, έλικα 4, Met¹¹² → Ala¹¹², τάξη G
2. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), περιοχή 147-159, έλικα 6, τάξη A
3. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3), περιοχή 147-159, έλικα 6, Met¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸, τάξη A
4. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-EMNVaOrnRARA AVDAL-NH₂ (4), περιοχή 147-159, έλικα 6, Arg¹⁴⁹·Nva¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰·Orn¹⁵⁰, His¹⁵⁵·Ala¹⁵⁵, τάξη G
5. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5), περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A
6. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6), περιοχή 152-164, έλικα 6, Thr¹⁶¹ → Lys¹⁶¹, τάξη G
7. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVVSF-NH₂ (7), περιοχή 209-229 έλικες 9 και 10, τάξη G
8. Πεπτιδικό μοντέλο Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVVSF-NH₂ (8), περιοχή 209-229 έλικες 9 και 10, Asp²¹³·Orn²¹³, Ser²²⁴·Lys²²⁴ τάξη A

Η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων της αρoA-I, έγιναν σύμφωνα με τις αρχές της σύνθεσης των πεπτιδίων σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την Fmoc στρατηγική με στερεό υπόστρωμα την ρητίνη RINK Amide AM (υποκατάσταση 0.67 mmol/g ρητίνης) ώστε τα πεπτίδια να απελευθερωθούν ως αμίδια. Πριν από την αποκοπή τους από τη ρητίνη έγινε ακετυλίωση της αμινοτελικής ομάδας των πεπτιδίων. Ο καθαρισμός των πεπτιδικών αναλόγων 1-8 έγινε με χρωματογραφία υψηλής διακριτικής ικανότητας HPLC αναλυτικής και ημιπαρασκευαστικής και τα σωστά προϊόντα ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS.

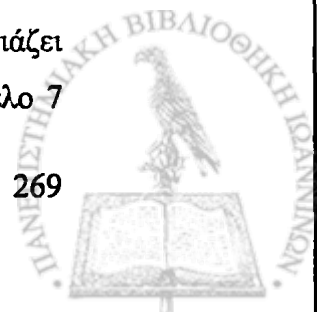
Όλα τα πεπτιδικά μοντέλα μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν σε διάφορους διαλύτες με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων σε όλα τα πειράματα ήταν 100 μΜ. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω διαλύτες: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS buffer pH 7.4, διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε συγκέντρωση 8 mM, μίγμα τριφθοροαιθανόλης/νερού, TFE/H₂O 50/50 (v/v) και διάλυμα δεκατετραφωσφορυλοχολίνης C₁₄PC σε συγκέντρωση 5 mM.



Τα βιολογικά πειράματα περιλαμβάνουν την οξειδωτική τροποποίηση της LDL *in vitro* παρουσία τόσο των πεπτιδικών μοντέλων όσο και των συμπλεγμάτων POPC/MLVs που εμπεριείχαν τα μοντέλα. Η οξείδωση της LDL αρχίζει με την προσθήκη διαλύματος δισθενών ιόντων χαλκού στους 37 °C. Η πορεία της οξείδωσης παρακολουθείται φασματομετρικά καταγράφοντας τη σιγμοειδής καμπύλη οξείδωσης στα 234 nm.

Τα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

- Παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν, ως προς τις βιολογικές και διαμορφωτικές τους ιδιότητες, πεπτιδικά μοντέλα της απολιποπρωτεΐνης A-I (apoA-I), η οποία αποτελεί κύριο συστατικό της HDL και ευθύνεται για πολλές από τις αντιαθηρογόνες δράσεις της.
- Τα πεπτιδικά μοντέλα που παρασκευάστηκαν είναι μοντέλα των ελίκων 4, 6 και 9-10. Όλα τα πεπτιδικά ανάλογα παρασκευάστηκαν σε καλές αποδόσεις με υψηλή καθαρότητα όπως προκύπτει από τα φάσματα μάζας και τις αναλυτικές HPLC των πεπτιδικών αναλόγων 1-8.
- Τα χαρακτηριστικά α-έλικας φαίνεται να κυριαρχούν σε όλους τους διαλύτες SDS, TFE/H₂O και C₁₄PC που μελετήθηκαν εκτός του PBS pH 7.4.
- Στο μοντέλο 1 που ανήκει στην περιοχή 104-117 με αντικατάσταση της μεθειονίνης στη θέση 112 με αλανίνη, τάξης G, συμπεραίνουμε πως η αλλαγή αυτή μειώνει τον αντιοξειδωτικό ρόλο του συγκεκριμένου πεπτιδίου και αναδεικνύει τη σημασία της μεθειονίνης ως παγίδα οξείδωσης στην έλικα 4.
- Για τα πεπτιδικά μοντέλα της έλικας 6 περιοχή 147-159, παρατηρούμε πως το μοντέλο 4 που ανήκει στην τάξη G παρουσιάζει τις καλύτερες αντιοξειδωτικές δράσεις ενώ τα μοντέλα 2 και 3 έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση που είναι καλύτερη σε μεγάλες συγκεντρώσεις π.χ 424 μM πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία στα δομικά χαρακτηριστικά της έλικας σε σχέση με τη βιολογική δράση μίας και η τάξη G διαφέρει σημαντικά από την A.
- Το πεπτιδικό μοντέλο 5, περιοχή 152-164, έλικα 6, τάξη A εμφανίζει ένα μικρότερο ποσοστό ελικοειδούς διαμόρφωσης αλλά μια καλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το πεπτιδικό μοντέλο 6 τάξης G. Επιπλέον τα πεπτιδικά μοντέλα 5 και 6 δεν έχουν καμία δράση στην ενεργοποίηση του ενζύμου LCAT και πιθανόν αυτή η περιοχή της apoA-I να μην είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενζύμου.
- Το πεπτιδικό μοντέλο 8, περιοχή 209-229 των ελίκων 9 και 10 τάξης A παρουσιάζει καλύτερα βιολογικά και διαμορφωτικά χαρακτηριστικά συγκριτικά με το μοντέλο 7



που ανήκει στην τάξη G. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σημασία στα δομικά χαρακτηριστικά της έλικας σε σχέση με τη βιολογική δράση.



14° ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



The inverse relationship between high density lipoprotein (HDL) plasma levels and atherosclerosis has been attributed to the role that HDL and its major constituent apolipoprotein A-I (apoA-I) play in reverse cholesterol transport, as well as to their antioxidant and anti-inflammatory activities.

ApoA-I consists of 243 amino acids residues with molecular weight about 28 kDa and is primarily synthesized in the liver and the intestine. The encoded amino acids form 22- and 110 repeats which, based on X-ray crystallography and computer modeling are organized in ten amphipathic α -helices. Each of these repeats has a specific role for example helix 6 is responsible for the activation of the enzyme LCAT, helix 9 and 10 are involved in formation of discoidal HDL interacting with ABCA1. Moreover apoA-I has four methionine residues in position 43, 86, 112, 148 that are thought to act as oxidation scavenger and protect LDL from oxidation.

Amphipathic helices of apoA-I are grouped into different classes. The most distinct feature of the class A amphipathic helix is the unique clustering of positively charged residues at the polar-nonpolar interface and of negatively charged residues at the center of the polar face. Class G helices have a random distribution of negative and positive charges around the perimeter of the polar face.

With the aim of validating the role of different classes, A and G, of the amphipathic apoA-I helix 4, 6 and 9, 10 in their biological functions, eight peptide models were designed, synthesized and tested.

1. Peptide model Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), region 104-117, helix 4, Met112 → Ala112, class G
2. Peptide model Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2), region 147-159, helix 6, class A
3. Peptide model Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3), region 147-159, helix 6, Met148 → Ala148, class A
4. Peptide model Ac-EMNVaOrnRARA AVDAL-NH₂ (4), region 147-159, helix 6, Arg149•Nva149, Asp150•Orn150, His155•Ala155, class G
5. Peptide model Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5), region 152-164, helix 6, class A
6. Peptide model Ac-ARAHVDALRKHLA-NH₂ (6), region 152-164, helix 6, Thr¹⁶¹ → Lys¹⁶¹, class G
7. Peptide model Ac-PALEDLRQGLLPVLESFKVSF-NH₂ (7), region 209-229 helices 9 and 10, class G



8. Peptide model Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), region 209-229 helices 9 and 10, Asp213•Orn213, Ser224•Lys224 class A

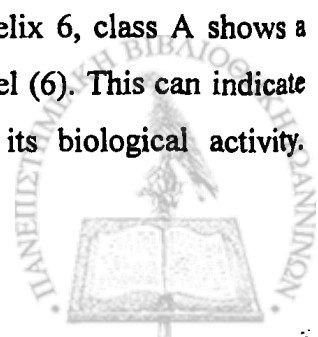
The syntheses of peptides 1-8 were carried out manually using the Fmoc-chemistry and the stepwise solid-phase procedure; on a Rink Amide AM resin (0.67mmol/g resin). The purity of the peptides was established by semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and the correct products were confirmed by analytical HPLC and electro spray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

The conformational studies of the peptide models were performed by circular dichroism spectrometry in sodium dodecyl-sulfate (SDS) and tetradecaphosphorylcholine (C₁₄PC)/peptide mixtures in a molar ratio 80:1 and 50:1 respectively, TFE/H₂O (50/50 v/v) and PBS pH=7.4.

The biological activity of the peptide models 1-8 (peptides or POPC/MLVs liposome with peptides) was tested for their ability to inhibit LDL oxidation *in vitro* in various concentrations. LDL (100 µg protein/mL) was incubated in the presence of copper sulfate (5 µM final concentration). The kinetic of the oxidations was determined by monitoring the increase in absorbance at 234 nm every 10 min for 4h.

The conclusions of this work can be summarized as follow:

- All the peptide models 1-8 were highly purified.
- Conformational studies by circular dichroism (CD) suggest the occurrence of well-defined structures in aqueous and micelles microenvironment.
- In peptide model Ac-FQKKWQEEAELYRQ-NH₂ (1), helix 4, region 104-117, class G, the substitution of Met in position 112 with Ala changes the conformational and biological properties of this peptide indicating the role of this amino acid in apoA-I as an antioxidant scavenger.
- From the peptides models corresponding region 147-159 of helix 6, model Ac-EMNVaOrnRARAAVDAL-NH₂ (4), class G, possesses the highest helical content and has the greatest antioxidant activity followed by model Ac-EMRDRARAHVDAL-NH₂ (2) and Ac-EARDRARAHVDAL-NH₂ (3) of A class. This leads to the conclusion that Met in apoA-I molecule plays an important role in LDL oxidation and the type of class is crucial for its biological activities.
- Model Ac-ARAHVDALRTHLA-NH₂ (5), region 152-164, helix 6, class A shows a lower helical content but a better antioxidant action than model (6). This can indicate the importance of alter the class of a peptide model in its biological activity.



Moreover, models (5) and (6) have no action in activation of LCAT and probably this region (152-164) of apoA-I molecule is not essential for LCAT activation.

- Model Ac-PALEOrnLRQGLLPVLEKFKVSF-NH₂ (8), region 209-229 helices 9 and 10, Asp213•Orn213, Ser224•Lys224, class A possess higher helical content and greater biological activity than peptide model (7). This can indicate the relationship between the type of the class of helices and their biological activity.

15^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Pennacchio, L. A., Olivier, M., Hubacek, J. A., Cohen, J. C., Cox, D. R., Fruchart, J. C., Krauss, R. M., and Rubin, E. M. (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing, *Science* 294, 169-173.

Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Orellana, R. E., Kunitake, S. T., Naya-Vigne, J., O'Connor, P. M., Malloy, M. J., and Kane, J. P. (1997) Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L, *J Biol Chem* 272, 25576-25582.

Cheung, M. C., Wolf, A. C., Lum, K. D., Tollefson, J. H., and Albers, J. J. (1986) Distribution and localization of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I-containing lipoproteins, *J Lipid Res* 27, 1135-1144.

Francone, O. L., Gurakar, A., and Fielding, C. (1989) Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol, *J Biol Chem* 264, 7066-7072.

Marcel, Y. L., McPherson, R., Hogue, M., Czarnecka, H., Zawadzki, Z., Weech, P. K., Whitlock, M. E., Tall, A. R., and Milne, R. W. (1990) Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects, *J Clin Invest* 85, 10-17.

Pattnaik, N. M., and Zilversmit, D. B. (1979) Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles, *J Biol Chem* 254, 2782-2786.

Tall, A. R., Forester, L. R., and Bongiovanni, G. L. (1983) Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma, *J Lipid Res* 24, 277-289.

Cheung, M. C., and Albers, J. J. (1982) Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II, *J Lipid Res* 23, 747-753.

Cheung, M. C., and Albers, J. J. (1984) Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II, *J Biol Chem* 259, 12201-12209.

Bekaert, E. D., Alaupovic, P., Knight-Gibson, C., Norum, R. A., Laux, M. J., and Ayrault-Jarrier, M. (1992) Isolation and partial characterization of lipoprotein A-II (LP-A-II) particles of human plasma, *Biochim Biophys Acta* 1126, 105-113.

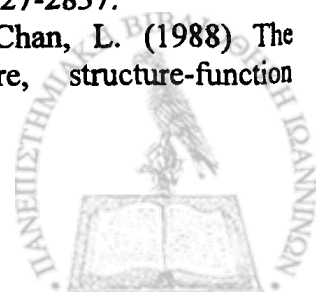
Asztalos, B. F., Sloop, C. H., Wong, L., and Roheim, P. S. (1993) Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations, *Biochim Biophys Acta* 1169, 291-300.

Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S., and Assmann, G. (1995) Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma, *J Clin Invest* 96, 2693-2701.

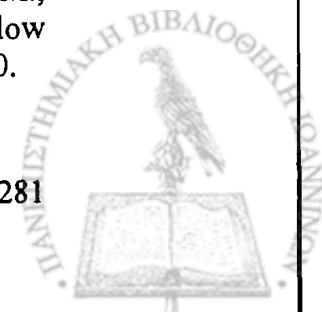
Kunitake, S. T., La Sala, K. J., and Kane, J. P. (1985) Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility, *J Lipid Res* 26, 549-555.



14. Sparks, D. L., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (1992) The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles, *J Biol Chem* 267, 25839-25847.
15. Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1995) Role of an N-ethylmaleimide-sensitive factor in the selective cellular uptake of low-density lipoprotein free cholesterol, *Biochemistry* 34, 14237-14244.
16. Otvos, J. D., Jeyarajah, E. J., Bennett, D. W., and Krauss, R. M. (1992) Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement, *Clin Chem* 38, 1632-1638.
17. Ala-Korpela, M., Korhonen, A., Keisala, J., Horkko, S., Korpi, P., Ingman, L. P., Jokisaari, J., Savolainen, M. J., and Kesaniemi, Y. A. (1994) ¹H NMR-based absolute quantitation of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma, *J Lipid Res* 35, 2292-2304.
18. Nicholls, S. J., Rye, K. A., and Barter, P. J. (2005) High-density lipoproteins as therapeutic targets, *Curr Opin Lipidol* 16, 345-349.
19. Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport, *J Lipid Res* 36, 211-228.
20. Kontush, A., and Chapman, M. J. (2006) Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall?, *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3, 144-153.
21. Navab, M., Ananthramiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J., and Fogelman, A. M. (2004) The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL, *J Lipid Res* 45, 993-1007.
22. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M. L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., Schmitt, D., Fu, X., Thomson, L., Fox, P. L., Ischiropoulos, H., Smith, J. D., Kinter, M., and Hazen, S. L. (2004) Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease, *J Clin Invest* 114, 529-541.
23. Brewer, H. B., Jr., Fairwell, T., LaRue, A., Ronan, R., Houser, A., and Bronzert, T. J. (1978) The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins, *Biochem Biophys Res Commun* 80, 623-630.
24. Breslow, J. L., Ross, D., McPherson, J., Williams, H., Kurnit, D., Nussbaum, A. L., Karathanasis, S. K., and Zannis, V. I. (1982) Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6861-6865.
25. Cheung, P., and Chan, L. (1983) Nucleotide sequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-I, *Nucleic Acids Res* 11, 3703-3715.
26. Law, S. W., Gray, G., and Brewer, H. B., Jr. (1983) cDNA cloning of human apoA-I: amino acid sequence of preproapoA-I, *Biochem Biophys Res Commun* 112, 257-264.
27. Shoulders, C. C., and Baralle, F. E. (1982) Isolation of the human HDL apoprotein A1 gene, *Nucleic Acids Res* 10, 4873-4882.
28. Karathanasis, S. K., Zannis, V. I., and Breslow, J. L. (1983) Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6147-6151.
29. Shoulders, C. C., Kornblihtt, A. R., Munro, B. S., and Baralle, F. E. (1983) Gene structure of human apolipoprotein A1, *Nucleic Acids Res* 11, 2827-2837.
30. Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S., and Chan, L. (1988) The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution, *J Lipid Res* 29, 245-271.



1. Segrest, J. P., Garber, D. W., Brouillette, C. G., Harvey, S. C., and Anantharamaiah, G. M. (1994) The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins, *Adv Protein Chem* 45, 303-369.
2. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D., and Gotto, A. M., Jr. (1974) A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins, *FEBS Lett* 38, 247-258.
3. Jonas, A., Kezdy, K. E., and Wald, J. H. (1989) Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs, *J Biol Chem* 264, 4818-4824.
4. Calabresi, L., Meng, Q. H., Castro, G. R., and Marcel, Y. L. (1993) Apolipoprotein A-I conformation in discoidal particles: evidence for alternate structures, *Biochemistry* 32, 6477-6484.
5. Collet, X., Perret, B., Simard, G., Raffai, E., and Marcel, Y. L. (1991) Differential effects of lecithin and cholesterol on the immunoreactivity and conformation of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins, *J Biol Chem* 266, 9145-9152.
5. Saito, H., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (2004) Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins, *Prog Lipid Res* 43, 350-380.
7. Zannis, V. I., Chroni, A., and Krieger, M. (2006) Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J Mol Med* 84, 276-294.
8. Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C., and Rothblat, G. H. (2003) Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 712-719.
9. Rader, D. J. (2006) Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies, *J Clin Invest* 116, 3090-3100.
0. Boden, W. E. (2000) High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial, *Am J Cardiol* 86, 19L-22L.
1. Luoma, P. V. (1997) Gene activation, apolipoprotein A-I/high density lipoprotein, atherosclerosis prevention and longevity, *Pharmacol Toxicol* 81, 57-64.
2. Kim, K. D., Lim, H. Y., Lee, H. G., Yoon, D. Y., Choe, Y. K., Choi, I., Paik, S. G., Kim, Y. S., Yang, Y., and Lim, J. S. (2005) Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation, *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1126-1136.
3. Norata, G. D., Marchesi, P., Pirillo, A., Uboldi, P., Chiesa, G., Maina, V., Garlanda, C., Mantovani, A., and Catapano, A. L. (2008) Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 925-931.
4. Gotsman, I., Gupta, R., and Lichtman, A. H. (2007) The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2493-2495.
5. Hansson, G. K., and Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword, *Nat Rev Immunol* 6, 508-519.
6. Binder, C. J., Chang, M. K., Shaw, P. X., Miller, Y. I., Hartvigsen, K., Dewan, A., and Witztum, J. L. (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis, *Nat Med* 8, 1218-1226.
7. Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J., Bittner, V., and Fruchart, J. C. (2007) HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events, *N Engl J Med* 357, 1301-1310.



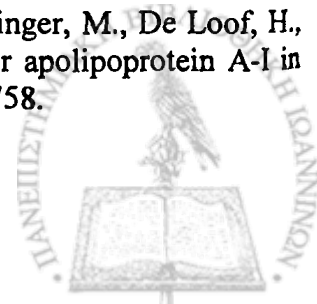
48. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I, *J Clin Invest* 115, 1333-1342.
49. Oram, J. F., and Heinecke, J. W. (2005) ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease, *Physiol Rev* 85, 1343-1372.
50. Brunham, L. R., Singaraja, R. R., and Hayden, M. R. (2006) Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis, *Annu Rev Nutr* 26, 105-129.
51. Krimbou, L., Hajj Hassan, H., Blain, S., Rashid, S., Denis, M., Marcil, M., and Genest, J. (2005) Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines, *J Lipid Res* 46, 1668-1677.
52. Duong, P. T., Collins, H. L., Nickel, M., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2006) Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I, *J Lipid Res* 47, 832-843.
53. Mulya, A., Lee, J. Y., Gebre, A. K., Thomas, M. J., Colvin, P. L., and Parks, J. S. (2007) Minimal lipidation of pre-beta HDL by ABCA1 results in reduced ability to interact with ABCA1, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1828-1836.
54. Duong, P. T., Weibel, G. L., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2008) Characterization and properties of pre beta-HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I, *J Lipid Res* 49, 1006-1014.
55. Curtiss, L. K., Valenta, D. T., Hime, N. J., and Rye, K. A. (2006) What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 12-19.
56. Sorci-Thomas, M. G., and Thomas, M. J. (2002) The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration, *Trends Cardiovasc Med* 12, 121-128.
57. von Eckardstein, A. (2006) Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes, *Atherosclerosis* 186, 231-239.
58. Koukos, G., Chroni, A., Duka, A., Kardassis, D., and Zannis, V. I. (2007) LCAT can rescue the abnormal phenotype produced by the natural ApoA-I mutations (Leu141Arg)Pisa and (Leu159Arg)FIN, *Biochemistry* 46, 10713-10721.
59. McPherson, P. A., Young, I. S., and McEneaney, J. (2007) A dual role for lecithin:cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) in lipoprotein oxidation, *Free Radic Biol Med* 43, 1484-1493.
60. Asztalos, B. F., Schaefer, E. J., Horvath, K. V., Yamashita, S., Miller, M., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2007) Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states, *J Lipid Res* 48, 592-599.
61. Gursky, O., and Atkinson, D. (1996) Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-I: implications for a lipid-free molten globular state, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2991-2995.
62. Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., Brouillette, C. G., Venkatachalapathi, Y. V., and Anantharamaiah, G. M. (1992) The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function, *J Lipid Res* 33, 141-166.
63. Chan, L. (1989) The apolipoprotein multigene family: structure, expression, evolution, and molecular genetics, *Klin Wochenschr* 67, 225-237.



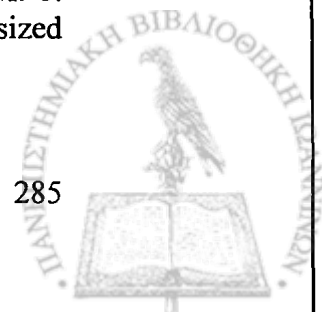
64. Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A., and Brouillette, C. G. (1997) Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12291-12296.
65. Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A., and Borhani, D. W. (2001) Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review, *Biochim Biophys Acta* 1531, 4-46.
66. Brouillette, C. G., Dong, W. J., Yang, Z. W., Ray, M. J., Protasevich, II, Cheung, H. C., and Engler, J. A. (2005) Forster resonance energy transfer measurements are consistent with a helical bundle model for lipid-free apolipoprotein A-I, *Biochemistry* 44, 16413-16425.
67. Yokoyama, S., Tajima, S., and Yamamoto, A. (1982) The process of dissolving apolipoprotein A-I in an aqueous buffer, *J Biochem* 91, 1267-1272.
68. Mishra, V. K., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., and Anantharamaiah, G. M. (1994) Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis, *J Biol Chem* 269, 7185-7191.
69. MacRaid, C. A., Howlett, G. J., and Gooley, P. R. (2004) The structure and interactions of human apolipoprotein C-II in dodecyl phosphocholine, *Biochemistry* 43, 8084-8093.
70. Rogers, D. P., Roberts, L. M., Lebowitz, J., Engler, J. A., and Brouillette, C. G. (1998) Structural analysis of apolipoprotein A-I: effects of amino- and carboxy-terminal deletions on the lipid-free structure, *Biochemistry* 37, 945-955.
71. Martin, D. D., Budamagunta, M. S., Ryan, R. O., Voss, J. C., and Oda, M. N. (2006) Apolipoprotein A-I assumes a "looped belt" conformation on reconstituted high density lipoprotein, *J Biol Chem* 281, 20418-20426.
72. Barbeau, D. L., Jonas, A., Teng, T., and Scanu, A. M. (1979) Asymmetry of apolipoprotein A-I in solution as assessed from ultracentrifugal, viscometric, and fluorescence polarization studies, *Biochemistry* 18, 362-369.
73. Rogers, D. P., Roberts, L. M., Lebowitz, J., Datta, G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A., and Brouillette, C. G. (1998) The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions, *Biochemistry* 37, 11714-11725.
74. Borhani, D. W., Engler, J. A., and Brouillette, C. G. (1999) Crystallization of truncated human apolipoprotein A-I in a novel conformation, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1578-1583.
75. Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., and Agard, D. A. (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E, *Science* 252, 1817-1822.
76. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M., and Murthy, H. M. (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2126-2131.
77. Wang, J., Sykes, B. D., and Ryan, R. O. (2002) Structural basis for the conformational adaptability of apolipoprotein III, a helix-bundle exchangeable apolipoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1188-1193.
78. Davidson, W. S., Hazlett, T., Mantulin, W. W., and Jonas, A. (1996) The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13605-13610.
79. Saito, H., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K. H., Phillips, M. C., and Lund-Katz, S. (2003) Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E, *J Biol Chem* 278, 40723-40729.



80. Tanaka, M., Koyama, M., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Nickel, M., Lund-Katz, S., Saito, H., and Phillips, M. C. (2008) Influence of tertiary structure domain properties on the functionality of apolipoprotein A-I, *Biochemistry* 47, 2172-2180.
81. Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Holvoet, P., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (2003) Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model, *J Biol Chem* 278, 23227-23232.
82. Ren, X., Zhao, L., Sivashanmugam, A., Miao, Y., Korando, L., Yang, Z., Reardon, C. A., Getz, G. S., Brouillette, C. G., Jerome, W. G., and Wang, J. (2005) Engineering mouse apolipoprotein A-I into a monomeric, active protein useful for structural determination, *Biochemistry* 44, 14907-14919.
83. Davidson, W. S., Arnvig-McGuire, K., Kennedy, A., Kosman, J., Hazlett, T. L., and Jonas, A. (1999) Structural organization of the N-terminal domain of apolipoprotein A-I: studies of tryptophan mutants, *Biochemistry* 38, 14387-14395.
84. Silva, R. A., Hilliard, G. M., Fang, J., Macha, S., and Davidson, W. S. (2005) A three-dimensional molecular model of lipid-free apolipoprotein A-I determined by cross-linking/mass spectrometry and sequence threading, *Biochemistry* 44, 2759-2769.
85. Lagerstedt, J. O., Budamagunta, M. S., Oda, M. N., and Voss, J. C. (2007) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of site-directed spin labels reveals the structural heterogeneity in the N-terminal domain of apoA-I in solution, *J Biol Chem* 282, 9143-9149.
86. Davidson, W. S., and Thompson, T. B. (2007) The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins, *J Biol Chem* 282, 22249-22253.
87. Rogers, D. P., Brouillette, C. G., Engler, J. A., Tendian, S. W., Roberts, L., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Ray, M. J. (1997) Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation, *Biochemistry* 36, 288-300.
88. Zhu, H. L., and Atkinson, D. (2004) Conformation and lipid binding of the N-terminal (1-44) domain of human apolipoprotein A-I, *Biochemistry* 43, 13156-13164.
89. Lagerstedt, J. O., Cavigliolo, G., Roberts, L. M., Hong, H. S., Jin, L. W., Fitzgerald, P. G., Oda, M. N., and Voss, J. C. (2007) Mapping the structural transition in an amyloidogenic apolipoprotein A-I, *Biochemistry* 46, 9693-9699.
90. Laccotripe, M., Makrides, S. C., Jonas, A., and Zannis, V. I. (1997) The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with high density lipoprotein, *J Biol Chem* 272, 17511-17522.
91. Oda, M. N., Forte, T. M., Ryan, R. O., and Voss, J. C. (2003) The C-terminal domain of apolipoprotein A-I contains a lipid-sensitive conformational trigger, *Nat Struct Biol* 10, 455-460.
92. Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Adeyeye, S. O., Alluri, S., Anantharamaiah, G. M., and Segrest, J. P. (1996) Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. Implications for HDL assembly, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 328-338.
93. Alexander, E. T., Bhat, S., Thomas, M. J., Weinberg, R. B., Cook, V. R., Bharadwaj, M. S., and Sorci-Thomas, M. (2005) Apolipoprotein A-I helix 6 negatively charged residues attenuate lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) reactivity, *Biochemistry* 44, 5409-5419.
94. Segrest, J. P., Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H., and Harvey, S. C. (1999) A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein, *J Biol Chem* 274, 31755-31758.



95. Koppaka, V., Silvestro, L., Engler, J. A., Brouillette, C. G., and Axelsen, P. H. (1999) The structure of human lipoprotein A-I. Evidence for the "belt" model, *J Biol Chem* 274, 14541-14544.
96. Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., Palgunachari, M. N., Chaddha, M., Sham, S. W., and Krishna, N. R. (2006) Association of a model class A (apolipoprotein) amphipathic alpha helical peptide with lipid: high resolution NMR studies of peptide.lipid discoidal complexes, *J Biol Chem* 281, 6511-6519.
97. Brouillette, C. G., and Anantharamaiah, G. M. (1995) Structural models of human apolipoprotein A-I, *Biochim Biophys Acta* 1256, 103-129.
98. Phillips, J. C., Wriggers, W., Li, Z., Jonas, A., and Schulten, K. (1997) Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks, *Biophys J* 73, 2337-2346.
99. Tricerri, M. A., Behling Agree, A. K., Sanchez, S. A., Bronski, J., and Jonas, A. (2001) Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments, *Biochemistry* 40, 5065-5074.
100. Li, H., Lyles, D. S., Thomas, M. J., Pan, W., and Sorci-Thomas, M. G. (2000) Structural determination of lipid-bound ApoA-I using fluorescence resonance energy transfer, *J Biol Chem* 275, 37048-37054.
101. Li, H. H., Thomas, M. J., Pan, W., Alexander, E., Samuel, M., and Sorci-Thomas, M. G. (2001) Preparation and incorporation of probe-labeled apoA-I for fluorescence resonance energy transfer studies of rHDL, *J Lipid Res* 42, 2084-2091.
102. Li, H. H., Lyles, D. S., Pan, W., Alexander, E., Thomas, M. J., and Sorci-Thomas, M. G. (2002) ApoA-I structure on discs and spheres. Variable helix registry and conformational states, *J Biol Chem* 277, 39093-39101.
103. Maiorano, J. N., Jandacek, R. J., Horace, E. M., and Davidson, W. S. (2004) Identification and structural ramifications of a hinge domain in apolipoprotein A-I discoidal high-density lipoproteins of different size, *Biochemistry* 43, 11717-11726.
104. Corsico, B., Toledo, J. D., and Garda, H. A. (2001) Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles, *J Biol Chem* 276, 16978-16985.
105. Davidson, W. S., and Hilliard, G. M. (2003) The spatial organization of apolipoprotein A-I on the edge of discoidal high density lipoprotein particles: a mass spectrometry study, *J Biol Chem* 278, 27199-27207.
106. Silva, R. A., Hilliard, G. M., Li, L., Segrest, J. P., and Davidson, W. S. (2005) A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins, *Biochemistry* 44, 8600-8607.
107. Davidson, W. S., and Silva, R. A. (2005) Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: belts, bundles, hinges and hairpins, *Curr Opin Lipidol* 16, 295-300.
108. Bhat, S., Sorci-Thomas, M. G., Alexander, E. T., Samuel, M. P., and Thomas, M. J. (2005) Intermolecular contact between globular N-terminal fold and C-terminal domain of ApoA-I stabilizes its lipid-bound conformation: studies employing chemical cross-linking and mass spectrometry, *J Biol Chem* 280, 33015-33025.
109. Bhat, S., Sorci-Thomas, M. G., Tuladhar, R., Samuel, M. P., and Thomas, M. J. (2007) Conformational adaptation of apolipoprotein A-I to discretely sized phospholipid complexes, *Biochemistry* 46, 7811-7821.



110. Wu, Z., Wagner, M. A., Zheng, L., Parks, J. S., Shy, J. M., 3rd, Smith, J. D., Gogonea, V., and Hazen, S. L. (2007) The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, *Nat Struct Mol Biol* 14, 861-868.
111. Roosbeek, S., Vanloo, B., Duverger, N., Caster, H., Breyne, J., De Beun, I., Patel, H., Vandekerckhove, J., Shoulders, C., Rosseneu, M., and Peelman, F. (2001) Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase, *J Lipid Res* 42, 31-40.
112. Leroy, A., and Jonas, A. (1994) Native-like structure and self-association behavior of apolipoprotein A-I in a water/n-propanol solution, *Biochim Biophys Acta* 1212, 285-294.
113. Chroni, A., Liu, T., Gorshkova, I., Kan, H. Y., Uehara, Y., Von Eckardstein, A., and Zannis, V. I. (2003) The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo, *J Biol Chem* 278, 6719-6730.
114. Chroni, A., Koukos, G., Duka, A., and Zannis, V. I. (2007) The carboxy-terminal region of apoA-I is required for the ABCA1-dependent formation of alpha-HDL but not prebeta-HDL particles in vivo, *Biochemistry* 46, 5697-5708.
115. Lins, L., Piron, S., Conrath, K., Vanloo, B., Brasseur, R., Rosseneu, M., Baert, J., and Ruyschaert, J. M. (1993) Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apo A-I complexes, *Biochim Biophys Acta* 1151, 137-142.
116. Dalton, M. B., and Swaney, J. B. (1993) Structural and functional domains of apolipoprotein A-I within high density lipoproteins, *J Biol Chem* 268, 19274-19283.
117. Ji, Y., and Jonas, A. (1995) Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins, *J Biol Chem* 270, 11290-11297.
118. Calabresi, L., Tedeschi, G., Treu, C., Ronchi, S., Galbiati, D., Airoidi, S., Sirtori, C. R., Marcel, Y., and Franceschini, G. (2001) Limited proteolysis of a disulfide-linked apoA-I dimer in reconstituted HDL, *J Lipid Res* 42, 935-942.
119. Roberts, L. M., Ray, M. J., Shih, T. W., Hayden, E., Reader, M. M., and Brouillette, C. G. (1997) Structural analysis of apolipoprotein A-I: limited proteolysis of methionine-reduced and -oxidized lipid-free and lipid-bound human apo A-I, *Biochemistry* 36, 7615-7624.
120. Hristova, K., Wimley, W. C., Mishra, V. K., Anantharamiah, G. M., Segrest, J. P., and White, S. H. (1999) An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method, *J Mol Biol* 290, 99-117.
121. Jonas, A., Wald, J. H., Toohill, K. L., Krul, E. S., and Kezdy, K. E. (1990) Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins, *J Biol Chem* 265, 22123-22129.
122. Catte, A., Patterson, J. C., Bashtovyy, D., Jones, M. K., Gu, F., Li, L., Rampioni, A., Sengupta, D., Vuorela, T., Niemela, P., Karttunen, M., Marrink, S. J., Vattulainen, I., and Segrest, J. P. (2008) Structure of spheroidal HDL particles revealed by combined atomistic and coarse-grained simulations, *Biophys J* 94, 2306-2319.
123. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radic Biol Med* 13, 341-390.



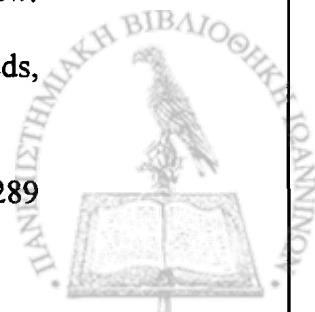
124. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G., and Jurgens, G. (1990) Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein, *Chem Res Toxicol* 3, 77-92.
125. Narvanen, O., Erkkila, A., and Yla-Herttuala, S. (2001) Evaluation and characterization of EIA measuring autoantibodies against oxidized LDL, *Free Radic Biol Med* 31, 769-777.
126. Chapman, M. J., Guerin, M., and Bruckert, E. (1998) Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches, *Eur Heart J* 19 Suppl A, A24-30.
127. Chapman, M. J., Laplaud, P. M., Luc, G., Forgez, P., Bruckert, E., Goulinet, S., and Lagrange, D. (1988) Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation, *J Lipid Res* 29, 442-458.
128. Shen, M. M., Krauss, R. M., Lindgren, F. T., and Forte, T. M. (1981) Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects, *J Lipid Res* 22, 236-244.
129. Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., and et al. (1987) Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon, *Science* 238, 363-366.
130. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G., and Jurgens, G. (1990) Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein., *Chem Res Toxicol* 3, 77-92.
131. H. Esterbauer, Gebicki, J., and Puhl, H. J., G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL., *Free Radical Biol & Med* 13, 341-390.
132. Hulthe, J., and Fagerberg, B. (2002) Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1162-1167.
133. Li, A. C., and Glass, C. K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention, *Nat Med* 8, 1235-1242.
134. Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime, *Nat Med* 8, 1211-1217.
135. Aqel, N. M., Ball, R. Y., Waldmann, H., and Mitchinson, M. J. (1984) Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis* 53, 265-271.
136. Fowler, S., Shio, H., and Haley, N. J. (1979) Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations, *Lab Invest* 41, 372-378.
137. Gerrity, R. G. (1981) The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions, *Am J Pathol* 103, 181-190.
138. Rosenfeld, M. E., Tsukada, T., Gown, A. M., and Ross, R. (1987) Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits, *Arteriosclerosis* 7, 9-23.
139. Ross, R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis--an update, *N Engl J Med* 314, 488-500.
140. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.



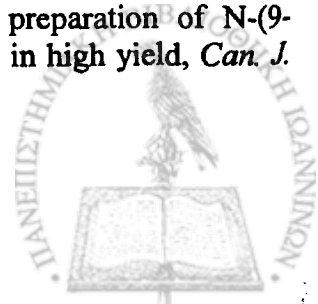
141. Gianturco, S. H., and Bradley, W. A. (1994) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins, *Curr Opin Lipidol* 5, 313-315.
142. Brown, M. S., Basu, S. K., Falck, J. R., Ho, Y. K., and Goldstein, J. L. (1980) The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages, *J Supramol Struct* 13, 67-81.
143. Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S., and Edwards, P. A. (1980) Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2214-2218.
144. Haberland, M. E., Olch, C. L., and Fogelman, A. M. (1984) Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages, *J Biol Chem* 259, 11305-11311.
145. Andrew C. Nicholson, and David. P. Hajjar. (2005) CD36, oxidized LDL and PPAR γ : pathological interactions in macrophages and atherosclerosis, *Vascular Pharmacology* 41, 139-146.
146. D.R. Greaves, and Gordon, S. (2005) Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors, *J Lipid Res* 46, 11-20.
147. T. Arai, Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C., and Tall, A. R. (1999) Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptordeficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene, *J Biol Chem* 274, 2366-2371.
148. T. Sawamura, Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., and et al. (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein, *Nature* 386, 73-77.
149. T. Shimaoka, Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T., and et al. (2000) Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages, *J Biol Chem* 275, 40663-40666.
150. V.V. Kunjathoor, Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., and et al. (2002) Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages, *J Biol Chem* 277, 49982-49988.
151. L.G. Fong, Parthasarathy, S., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1987) Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100, *J Lipid Res* 28, 1466-1477.
152. Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O., and Koller, E. (1987) Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes, *J Lipid Res* 28, 495-509.
153. Y., G. (1982) Lipid peroxides as a cause of vascular disease. In: Lipid Peroxides in Biology and Medicine (eds Yagi K) *Academic Press, Orlando San Diego and San Francisco*, 295-303.
154. Forrester, J. S. (2002) Prevention of plaque rupture: a new paradigm of therapy, *Ann Intern Med* 137, 823-833.
155. D. Steinberg. (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis, *Circulation* 95, 1062-1071.
156. Morrison, T. R., and Boyd, R. N. (1988) Αμινοξέα και πρωτεΐνες, *Οργανική Χημεία. Τόμος III. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ιωαννίνων*.
157. Fischer, E. (1906) *Ber* 39, 530-537.
158. Bergmann, M., and Zervas, L. (1935) *Science* 81, 180-181.



59. Sheehan, J. C., and Hess, G. P. (1955) A new method of forming peptide bonds, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067-1068.
60. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E., and Land Fenichel, R. L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 336-342.
61. Merrifield, R. B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
62. Barany, G. a. M., R.B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), *Academic Press, New York* vol. 2, pp. 1-284.
63. Barany, G. a. M., R.B. (1979) in *the Peptides. Analysis, Synthesis, Biology, Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*, Gross, E. and Meienhofer, Eds, *Academic Press, 1, New York* Vol.2.
64. Jones, M. J. (1997) Introduction to amino acids and polyamino acids (Peptides and Proteins), *Organic Chemistry New York*.
65. McMurry, J. (1999,) Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες, *Οργανική Χημεία Τόμος II. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*.
66. Bodanszky, M. (1993) *Peptide Chemistry: A Practical Textbook, 2nd Rev. Edition, Springer Verlag, New York*.
67. Pal, D., Chakrabarti, P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations, *J. mol. biol.* 194, 271-288.
68. Sager, C., Mutter, M., and Dümig, P. (1999) Influence of cis-trans isomerisation on pentapeptide cyclisation, *Tetrahedron Lett.* 40.
69. Bergman, M., and Zervas, L. (1932) Max Bergmann and Leonidas Zervas: Über ein allgemeines Verfahren der Peptide-Synthese, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 65, 1192-1201.
70. Sheehan, J. C., and Hess, G. P. (1955) A new method of forming peptide bonds, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067-1068.
71. Kalir, R., Warshawsky, A., Fridkin, M., and Patchornik, A. (1975) New useful reagents for peptide synthesis. Insoluble active esters of polystyrene-bound 1-hydroxybenzotriazole, *Eur. J. Biochem.* 59.
72. Carpino, L. A. (1975) New amine-masking groups for peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686-4960.
73. Anderson, G. W., and Mc Gregor, A. C. (1957) t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6180-6183.
74. Carpino, L. A., and Han, G. A. (1970) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group, *J. Org. Chem.* 92, 5748-5756.
75. Itoh, M., Daijiro, H., and Kamiya, T. (1977) *Bull. Chem. Soc. Jpn* 50, 718-721.
76. Munson, M., and Barany, G. (1993) Synthesis of a-conotixin, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10203-10210.
77. Zervas, L., and Theodoropoulos, D. M. (1956) N-tritylamino acids and Peptides. A new method of Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1359-1363.
78. Sieber, P., and Iselin, B. (1968) Peptide synthesis under application of the 2-(p-diphenyl)-isopropylloxycarbonyl (Bpoc)-amino protection groups, *Helv. Chim. Acta* 51, 614-621.
79. Kunz, H., and Unversagt, C. (1984) The allyloxycarbonyl (Alloc) moiety- conversion of an unsuitable into a valuable amino protecting group for peptide synthesis., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 436-437.
80. Meldal, M. (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis, *Methods in Enzymology* 289, Eds, Academic Press, San Diego, 83.



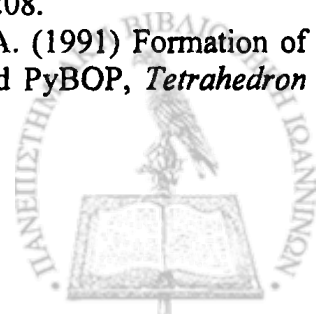
181. Merrifield, R. B. (1969) Solid-phase peptide synthesis, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 32, 221-296.
182. Marglin, A., and Merrifield, R. B. (1970) Chemical synthesis of peptides and proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 39, 841-866.
183. Mitchell, A. R., Erickson, B. W., Ryabtsev, M. V., Hodges, R. S., and Merrifield, R. B. (1976) tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl-resin, a more acid resistant support for solid phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 7357-7362.
184. Mitchell, A. R., Kent, S. B. H., Engelhard, M., and Merrifield R.B. (1978) A New Synthetic Route to tert-Butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl- resin, an Improved Support for Solid-Phase Peptide Synthesis, *J. Org. Chem.* 43, 2845-2852.
185. Matsueda, G. R., and Stewart, J. M. (1981) A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides, *Peptides* 2, 45-50.
186. Channabasavaiah, K., and Stuart, J. M. (1979) New analogs of luliberin which inhibit ovulation in the rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1266.
187. Wang, W. S. (1973) P-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxy carbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1328-1333.
188. Lu, G., Mosjov, S., Tam, P. J., and Merrifield, R. B. (1981) Improved synthesis of 4-alkoxybenzyl alcohol resin, *J. Org. Chem.* 46, 3433-3436.
189. Albericio, F., and Barany, G. (1984) Application of N,N dimethylformamide dimeopentyl acetal for efficient anchoring of N α -9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids as p-alkoxybenzyl esters in solid phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein. Res.* 23, 342-349.
190. Rink, H. (1987) Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.* 28, 3787-3790.
191. Bernatowicz, M. S., Daniels, S. B., and Koster, H. (1989) A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides, *Tetrahedron Lett.* 30, 4645-4648.
192. Barlos, K., Gatos, D., Kapos, S., Poulos, C., Schafer, W., and Wenqing, Y. (1991) Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine, *Int. J. Peptide Protein Res.* 38, 555-561.
193. Barlos, K., Gatos, D., and Schäfer, W. (1991) Synthesis of Prothymosin α (ProTa)- α Protein Consisting of 109 Amino Acids Residues, *Angew. Chem. Int. Edit.* 30, 590-593.
194. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., and Stavropoulos, G. (1991) 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37, 513-520.
195. Moroder, L., Hallet, A., Wunsch, E., Keller, O., and Wersin, G. (1976) Di-tert.-butyl-dicarbonate, a useful tert.-Butyloxycarbonylating reagent, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1651-1653.
196. Itoh, M., Hagiwara, D., and Kamiya, T. (1975) A new tert-butyloxycarbonylating reagent, 2-tert-butyloxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile, *Tetrahedron Lett.* 16, 4393-4394.
197. Paquet, A. (1982) Most efficient reagent for the selective preparation of N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-derivatives of hydroxy amino acids in high yield, *Can. J. Chem.* 60, 976.



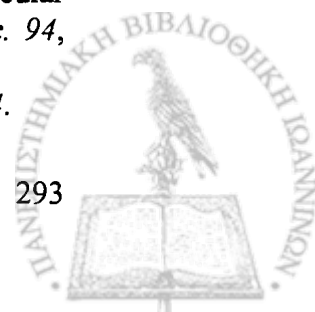
98. Lloyd-Williams, P., Albericio, F., and Girald, E. (1997) "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", *CRC Press, Boca Raton, New York*.
99. Veber, D. F., Milkowski, J. D., Varga, S. L., Denkwalter, R. G., and Hirschmann, R. (1972) Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5456-5461.
00. Loffet, A., and Zhang, H. X. (1993) Allyl-based groups for side-chain protection of amino-acids, *Int. J. Peptide Protein Res.* 42, 346-351.
01. Dangles, O., Guibe, F., Balavoine, G., Lavielle, S., and Market, A. (1987) Selective cleavage of the allyl and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis, *J. Org. Chem.* 52, 4984-4993.
02. Wunsch, E., and Jentsch, J. (1964) *Chem. Ber.* 97 2490.
03. Hong, Z., Yali, W., and Voelter, W. (1995) A New Strategy for the Synthesis of Asp-Gly Units-Containing Glycopeptides Using Fmoc/Bzl Protection., *Tetrahedron Letters* 36, 8767-8770.
04. Erickson, B. W., and Merrifield, R. B. (1973) Use of Chlorinated Benzyloxycarbonyl Protecting Groups to Eliminate N ϵ -Branching at Lysine during Solid-Phase Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3757-3763.
05. Kumagaye, K. Y., Inui, T., Nakajima, K., Kimura, T., and Sakakibara, S. (1991) Suppression of a side reaction associated with N(im)-benzyloxymethyl group during synthesis of peptides containing cysteinyl residue at the N-terminus, *Pept. Res.* 4, 84-87.
06. Maibaum, J., and Rich, D. H. (1989) Synthesis of the novel pi-(benzyloxymethyl)-protected histidine analogue of statine. Inhibition of penicillopepsin by pepstatin-derived peptides containing different statine side-chain derivatives, *J. Med. Chem.* 32, 1571-1576.
07. Chang, C. D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhorer, J., Lundell, E. O., and Haug, J. D., . (1980) Preparation and properties of Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection, *Int. J. Peptide Protein Res.* 15,, 56-66.
08. Fields, G. C., and B.G., F. (1993) Minimization of tryptophan alkylation following 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 34, 6661-6664.
09. Yamashiro, D., and Li, C. H. (1973) Protection of Tryptophan with the Formyl Group in Peptide Synthesis, *J. Org. Chem.* 38, 2594-2597.
10. Carpino, L. A., Schroff, H., Triolo, S. A., Mansour, E.-S. M. E., Wenschuh, H., and Albericio, F. (1993) The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant, *Tetrahedron Lett.* 34, 7829-7832.
11. Ramage, R., Green, J., and Blake, A. J. (1991) An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine, *Tetrahedron Lett.* 47, 6353-6370.
12. Sieber, P., and Riniker, B. (1987) Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group, *Tetrahedron Lett.* 28, 6031-6034.
13. Mazur, R. H., and Plume, G. (1968) Improved synthesis of bradykinin., *Experimentia* 24.
14. Ramachandran, J., and Li, C. H. (1962) Preparation of Crystalline NG-Tosylarginine Derivatives, *J. Org. Chem.* 27, 4006-4009.
15. Shimonishi, Y., Sakakibara, S., and Akabori, S. (1962) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 35, 1466.



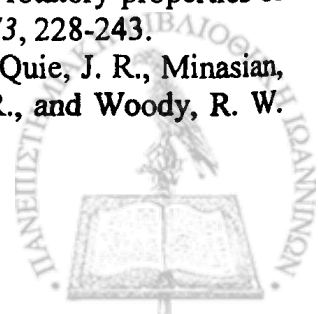
216. Sugano, H., and Miyoshi, M., A (1976) Convenient Synthesis of N-tert-Butyloxycarbonyl- O- benzyl-L-serine, *J. Org. Chem.* 41, 2352-2353.
217. Adamson, J. G., Blaskowitch, M. A., Groenvelt, H., and Lajoie, G. A. (1991) Simple and Convenient Synthesis of tert-Butyl Ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine, *J. Org. Chem.* 56, 3447-3449.
218. Weber, U., and Hartter, P. (1970,) S-Alkylmercapto groups for protection of the SH-function of cysteine. I. Synthesis and stability of some S-(Alkylmercapto) cysteines, *Hoppe-Seyler' s Z. Physiol. Chem.* 351, 1384-1388.
219. Sarantakis, D., Teichman, J., Clark, D. E., and Lien, E. L. (1977) A bicyclic somatostatin analog, highly specific for the inhibition of growth hormone release, *Biochem Biophys Res Commun* 75, 143-148.
220. Sarantakis, D., Teichman, J., Lien, E. L., and Fenichel, R. L. (1976) A novel cyclic undercapeptide, WY-40, 770, with prolonged growth hormone release inhibiting activity, *Biochem Biophys Res Commun* 73, 336-342.
221. Merrifield, R. B., and Wooley, D. W. (1956) The Synthesis of L-Seryl-L-histidyl-L-leucyl-L- valyl-L-glutamic Acid, a Peptide with Strepogenin Activity, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4646-4649.
222. Bergmann, M., Zervas, L. (1928) *Biochem. Z.* 280.
223. Betoiton, N. L. (1996) 2-alkoxy-5(4H)-oxazolones and the enantiomerization of N-alkoxycarbonylamino acids, *Pept. Sci.* 40, 245-254.
224. Konig, W., and Geiger, R. (1970) [A new method for the synthesis of peptides: activation of the carboxy group with dicyclohexylcarbodiimide and 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine], *Chem Ber* 103, 2034-2040.
225. Konig, W., and Geiger, R. (1970) [A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives], *Chem Ber* 103, 788-798.
226. Prasad, K. U., Iqbal, M. A., and Urry, D. W. (1985) Utilization of 1-Hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions, *Int. J. Pep. Protein. Res.* 25, 408-413.
227. Carpino, L. A. (1993) 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive the consideration that it incorporates within a single molecule *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4397-4398.
228. Angell, Y. M., Garcia-Echeverria, C., and Rich, D. H. (1996) Comparative studies of the coupling of N-methylated, sterically hindered amino acids during solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 35, 5981-5984.
229. Gawne, G., Kenner, G., and Sheppard, R. C. (1969) Acyloxyphosphonium Salts as Acylating Agents. A New Synthesis of Peptides *J. Am. Chem. Soc.* 91, 5669-5671.
230. Castro, B., Dormay, J. R., Evin, G., and Selve, C. (1975) Reactifs de couplage peptidique I (1)-l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.), *Tetrahedron Lett.* 16, 1219-1222.
231. Castro, B., Dourtoglou, B., Dormay, J. R., Evin, G., Serve, C., and Ziegler, J. C. (1976) Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazolylloxytris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent), *Synthesis* 18,, 751-752.
232. Coste, J., Le-Nguyen, D., and Castro, B. (1990) PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product, *Tetrahedron Lett.* 31, 205-208.
233. Hoeg-Jansen, T., Jakobsen, M. H., Olsen, C. E., and Holm, A. (1991) Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and PyBOP, *Tetrahedron Lett.* 32,, 7617-7820.



234. Dourtoglou, V., Ziegler, J. C., and Gross, B. (1978) Hexafluorophosphate of O-Benzotriazole-N,N-tetramethyurea - New and effective reagent of coupling peptide, *Tetrahedron Lett.* 15, 269-272.
235. Bernawarth, M. S., Daniels, S. B., and Koster, H. (1989) A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides, *Tetrahedron Lett.* 30,, 4645-4648.
236. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannawarth, W., and Gillsen, D. (1989) New coupling reagents in peptide chemistry, *Tetrahedron Lett.* 30, 1927-1930.
237. Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoulou, V., and Ziodrou, C. (1984) O-Benzotriazolyl-N, N, N', N'-tetramethyloronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest., *Synthesis*, 572-574.
238. Carpino, L. A., El-Faham, A., and Albericio, F. (1994) Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents, *Tetrahedron Lett.* 35, 2279-2282.
239. Carpino, L. A., and El-Faham, A. (1995) Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5401-5402.
240. Tam, J. P., and Merrifield, R. B. (1987) in: The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9, Special Methods in Peptide Synthesis, Part C, *Undenfriend, S., and Meienhofer, J., (Eds.), Academic Press, New York* 185.
241. Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B. (1983) SN2 deprotection of synthetic peptides with low concentration of HF in dimethyl sulfide evidence and application in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6442.
242. Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B. (1986) Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid trifluoroacetic-acid dimethyl sulfide, *J. Am. Chem. Soc.* 108.
243. Atherton, E., and Sheppard, R. C. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach, *IRL Press, Oxford*, 1.
244. Albericio, F., Kneib-Cordonier, N., Biancalana, S., Gera, L., Masada, R. I., Hudson, D., and Barany, G. (1990) Preparation and application of the 5-(4-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy- valeric acid (PAL) handle for the synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions, *J. Org. Chem.* 55, 3730.
245. Yang, Y., Sweeney, W. V., Schneider, K., Thornqvist, S., Chait, B. T., and Tam, J. P. (1994) Aspartimide formation in base-driven 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Chemistry, *Tetrahedron Lett.* 35, 9689-9692.
246. Tam, J. P., Riemen, M. W., and Merrifield, R. B. (1988) Mechanisms of aspartimide formation: The effects of protecting groups, acid, base, temperature and time, *Peptide Research* 1, 6.
247. Packman, L. C. (1995) N-2-Hydroxy-4-Methoxybenzyl (Hmb) backbone protection strategy prevents double aspartimide formation in a 'difficult' peptide sequence, *Tetrahedron Lett.* 36, 7523-7526.
248. Dolling, R., Beyermann, M., Haenel, J., Kernchen, F., Krause, E., Franke, P., Brudel, M., and Bienert, M. (1994) Piperidine-mediated side product formation for Asp(oBut)-containing peptides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 853-854.
249. Gisin, B. F., and Merrifield, R. B. (1972) Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 3102-3106.
250. Akaji, K., Kiso, Y., and Carpino, L. A. (1990) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 584.

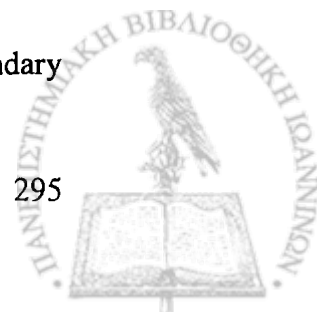


251. Alsina, J., Giralt, E., and Albericio, F. (1996) Use of N-Triethylamino Acids and PyAOP for the Suppression of Diketopiperazine Formation in Fmoc/tBu Solid-Phase Peptide Synthesis Using Alkoxybenzyl Ester Anchoring Linkages, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4195-4198.
252. Pedroso, E., Grandas, A., de las Heras, X., Eritja, R., and Giralt, E. (1986) Diketopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and fmoc-amino acids., *Tetrahedron Lett.* **27**, 743-746.
253. Meienhofer, J. (1970) Syntheses of actinomycin and analogs. 3. A total synthesis of actinomycin D (Cl) via peptide cyclization between proline and sarcosine., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3771-3777.
254. Khosla, M. C., Smeby, R. R., and Bumpus, F. M. (1972) Failure sequence in solid-phase peptide synthesis due to the presence of an N-alkylamino acid, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4721-4724.
255. Giralt, E., Eritja, R., and Pedroso, E. (1981) Diketopiperazine formation in acetamido- and nitrobenzamido-bridged polymeric supports, *Tetrahedron Lett.* **22**, 3779-3782.
256. Ponsati, B., Giralt, E., and Andreu, D. (1990) in Peptides. Chemistry, Structure and Biology, *Proceedings of the 11th American Peptides Symposium*, Rivier, J. E., Marshall, G. R., Eds., ESCOM, Leiden 960.
257. Yamada, S., Shioiri, T., Itaya, T., Hara, T., and Matsueda, R. (1965) Ind.-N-alkylation of tryptophan and synthesis of 1-alkyltryptophan hydrazides., *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **13**, 88-93.
258. Sieber, P. (1987) Modification of tryptophan residues during acidolysis of 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl groups. Effects of scavengers, *Tetrahedron Lett.* **28**, 1637-1640.
259. Stierandova, A., Sepetov, N. F., Nikiforovich, G. V., and Lebl, M. (1994) Sequence-dependent modification of Trp by the Pmc protecting group of Arg during TFA deprotection, *Int J Pept Protein Res.* **43**, 31-38.
260. Noble, R. L., Yamashiro, D., and H., L. C. (1976) Synthesis of a nonadecapeptide corresponding to residues 37-55 of ovine prolactin. 1 Detection and isolation of the sulfonium form of methionine-containing peptides, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2324-2328.
261. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L., and Guindon, C. A. (1989) Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2739-2742.
262. Manning, M. C., and Woody, R. W. (1991) Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors, *Biopolymers* **31**, 569-586.
263. Nielsen, E. B., and Schellman, J. A. (1967) The absorption spectra of simple amides and peptides, *J Phys Chem* **71**, 2297-2304.
264. Johnson, W. C., Jr., and Tinoco, I., Jr. (1972) Circular dichroism of polypeptide solutions in the vacuum ultraviolet, *J Am Chem Soc* **94**, 4389-4392.
265. Woody, R. W. a. T., I., . (1967) *J Chem Phys* **46**, 4927-4945.
266. Moffitt, W. (1956) The Optical Rotatory Dispersion of Simple Polypeptides. Ii, *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**, 736-746.
267. Woody, R. W. (1974) in *Peptides, Polypeptides and Proteins*, (Blout, E.R., Bovey, F.A., Goodman, M., and Lotan, N., eds.) *Wiley-Interscience, New York*, 338-350.
268. Bayley, P. M., Nielsen, E. B., and Schellman, J. A. (1969) The rotatory properties of molecules containing two peptide groups: theory, *J Phys Chem* **73**, 228-243.
269. Bandekar, J., Evans, D. J., Krimm, S., Leach, S. J., Lee, S., McQuie, J. R., Minasian, E., Nemethy, G., Pottle, M. S., Scheraga, H. A., Stimson, E. R., and Woody, R. W.



(1982) Conformations of cyclo(L-alanyl-L-alanyl-epsilon-aminocaproyl) and of cyclo(L-alanyl-D-alanyl-epsilon-aminocaproyl); cyclized dipeptide models for specific types of beta-bends, *Int J Pept Protein Res* 19, 187-205.

270. Deslauriers, R., Evans, D. J., Leach, S. J., Meinwald, Y. C., Minasian, E., Nemethy, G., Rae, I. D., Scheraga, H. A., Somorjai, R. L., Stimpson, E.R., and Woody, R.W., . (1981) Conformation of cyclo(L-alanyl-glycyl-epsilon-aminocaproyl), a cyclized dipeptide model for a β bend. 2. Synthesis, nuclear magnetic resonance, and circular dichroism measurements, *Macromolecules* 14, 985-996.
271. Sathyanarayana, B. K., and Applequist, J. (1986) Theoretical pi-pi absorption and circular dichroic spectra of beta-turn model peptides, *Int J Pept Protein Res* 27, 86-94.
272. Tiffany, M. L., and Krimm, S. (1968) New chain conformations of poly(glutamic acid) and polylysine, *Biopolymers* 6, 1379-1382.
273. Woody, R. W. (1992) *Adv Biophys Chem* 2, 37-79.
274. Yasui, S. C., and Keiderling, T. A. (1986) Vibrational circular dichroism of polypeptides. VI. Polytyrosine alpha-helical and random-coil results, *Biopolymers* 25, 5-15.
275. Drake, A. F., Siligardi, G., and Gibbons, W. A. (1988) Reassessment of the electronic circular dichroism criteria for random coil conformations of poly(L-lysine) and the implications for protein folding and denaturation studies, *Biophys Chem* 31, 143-146.
276. Adzhubei, A. A., and Sternberg, M. J. (1993) Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins, *J Mol Biol* 229, 472-493.
277. Adler, A. J., Greenfield, N. J., and Fasman, G. D. (1973) Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides, *Methods Enzymol* 27, 675-735.
278. Greenfield, N. J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, *Anal Biochem* 235, 1-10.
279. Johnson, W. C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide, *Proteins* 7, 205-214.
280. Chang, C. T., Wu, C. S., and Yang, J. T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns, *Anal Biochem* 91, 13-31.
281. Hennessey, J. P., Jr., and Johnson, W. C., Jr. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins, *Biochemistry* 20, 1085-1094.
282. Brahms, S., and Brahms, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism, *J Mol Biol* 138, 149-178.
283. Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* 8, 4108-4116.
284. Yang, J. T., Wu, C. S., and Martinez, H. M. (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism, *Methods Enzymol* 130, 208-269.
285. Toumadje, A., Alcorn, S. W., and Johnson, W. C., Jr. (1992) Extending CD spectra of proteins to 168 nm improves the analysis for secondary structures, *Anal Biochem* 200, 321-331.
286. Perczel, A., Hollosi, M., Tusnady, G., and Fasman, G. D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins, *Protein Eng* 4, 669-679.
287. Perczel, A., Park, K., and Fasman, G. D. (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide, *Anal Biochem* 203, 83-93.
288. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20, 33-37.



289. Manavalan, P., and Johnson, W. C., Jr. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Anal Biochem* 167, 76-85.
290. Sreerama, N., and Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal Biochem* 209, 32-44.
291. Sreerama, N., and Woody, R. W. (1994) Poly(pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis
Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods, *Biochemistry* 33, 10022-10025.
292. Sreerama, N., and Woody, R. W. (1994) Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods, *J Mol Biol* 242, 497-507.
293. Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., and Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng* 6, 383-390.
294. Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng* 5, 191-195.
295. Merelo, J. J., Andrade, M. A., Prieto, A., and Moran, F. (1994) *Neurocomputing* 6, 1-12.
296. Χατζηιωάννου Θ. Π., and Κούππαρη Μ. Α. (2000) Ενόργανη Ανάλυση, *Αθήνα 3η Ανατύπωση, Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτη*, 334-363.
297. Burdick, D. J., and Stults, J. T. (1997) Analysis of peptide synthesis products by electrospray ionization mass spectrometry, *Methods Enzymol* 289, 499-519.
298. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 246, 64-71.
299. Cole, R. B. (1997) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*
Wiley, New York
300. de la Mora, J. F., van Berkel, G. J., Enke, C. G., Cole, R. B., Martinez-Sanchez, M., and B., a. F. J. (2000) Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35, 939-952.
301. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1990) Electrospray ionization—principles and practice.
, *Mass Spectrom. Rev.* 9, 37-70.
302. Smith, R. D., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Barinaga, C. J., and Udseth, H. R. (1990) New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization, *Anal Chem* 62, 882-899.
303. Ikononou, M. G., Blades, A. T., and Kebarle, P. (1990) Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal Chem* 62, 957-967.
304. Chapman, J. R. *Practical Organic Mass Spectrometry John Willey and sons, Chichester, UK, 2nd.*
305. Gross, H. J. (2004) *Mass Spectrometry: A textbook, Springer*



16° ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

▪ 29.11.06- 02.12.06

2nd Hellenic Atherosclerosis Society Congress, Athens, Greece (Προφορική ανακοίνωση (3mim) και αναρτημένη ανακοίνωση)

▪ 23.04.07 –25.03.07

2^o Bioscience Conference, University of Patras (Αναρτημένη ανακοίνωση)

▪ 09.10.07-12.10.07

IAS-Sponsored Workshop on HDL: Structure, Protective Functions and Therapeutic Applications, Santorini, Greece (Αναρτημένη ανακοίνωση)

▪ 30.11.07-01.12.07

2nd Working Group's Symposium in Atherosclerosis, Athens, Greece (Προφορική ανακοίνωση)

▪ 14.03.08-15.03.08

13th Hellenic Symposium of Medicinal Chemistry, Athens, Greece (Προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση)

▪ 18.05.08-20.05.08

6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patra, Greece (2 Αναρτημένες ανακοινώσεις)

▪ 18.09.08-21.09.08

6th Hellenic Conference of Hellenic Society of Free Radicals and Oxidative Stress (H.S.F,R.O.S), Pramanta, Ioannina, Greece (Αναρτημένη ανακοίνωση)

▪ 03.12.08-06.12.08

3rd Hellenic Atherosclerosis Society Congress, Athens, Greece (Αναρτημένη ανακοίνωση)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (Abstracts) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

▪ M. Darvaris, M. Petraki, M. Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos and A. Tselepis (2006)

“Design, Synthesis and biological studies of amphipathic peptide models of apolipoprotein A-I (apoA-I)”, Book of Abstract of 2nd Hellenic Atherosclerosis Society Congress, Greece.



- M. Petraki, K. Harilogis, **M. Darvaris**, M. Sakarellos-Daitsiotis, and A. Tselepis (2006) "Peptide Models of apoA-I increase the antioxidant activity of HDL3c" Book of Abstract of 5th Hellenic Conference of Hellenic Society of Free Radicals and Oxidative Stress, Greece.
- **M. Darvaris**, M. Petraki, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and A. Tselepis (2007) «Design, Synthesis and biological studies of amphipathic peptide models of apolipoprotein A-I (apoA-I)», *Book of Abstract the 2nd Bioscience Conference of University of Patras, Greece.*
- M. Petraki, K. Harilogis, **M. Darvaris**, M. Sakarellos-Daitsiotis, and A. Tselepis (2007) "Peptide models of helices 4 and 6 of apoA-I improve the antioxidant activity of HDL3c" Book of Abstracts of Hellenic Forum of Lipids, Greece.
- **M.I. Darvaris**, M. Petraki, K. Harilogis, P.T Mantani, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and A. Tselepis (2007) "Model class A and G amphipathic helical models of apoA-I helix 6: conformation-biological function relationships" Book of Abstracts of IAS-Sponsored Workshop on HDL: Structure, Protective Functions and Therapeutic Applications, Greece.
- **M.I. Darvaris**, M. Petraki, K. Harilogis, P.T Mantani, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and A. Tselepis (2007) "Models class A and G of apoA-I helix 6: Study of their role in LDL Oxidation" Book of Abstracts of 2nd Working Group's Symposium in Atherosclerosis, Crece.
- **M.I. Darvaris**, M. Petraki, K. Harilogis, P.T Mantani, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and A. Tselepis (2008) "Amphipathic helical peptide models of helix 6 (147-159) of apoA-I" Book of Abstracts of 13th Hellenic Symposium of Medicinal Chemistry, Greece.
- **M.I. Darvaris**, A. Stavrakoudis, A. Tselepis, M. Sakarellos-Daitsiotis, and C. Sakarellos (2008) "Molecular Dynamics Simulation of Model Class G Amphipathic Helical Peptides of Helix 4 of apoA-I" Book of Abstracts of 13th Hellenic Symposium of Medicinal Chemistry, Greece.
- **M.I. Darvaris**, M. Petraki, K. Harilogis, P.T Mantani, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and A. Tselepis (2008), "Conformation and Biological Function of Amphipathic Helical Peptides of apoA-I helix 6", Book of Abstracts of 6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Greece.
- **M.I. Darvaris**, A. Stavrakoudis, A. Tselepis, M. Sakarellos-Daitsiotis, and C. Sakarellos (2008) "Structural studies of the apoA-I fragment 104-117 with molecular dynamics simulations" Proceedings of 6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Greece.
- **M. Darvaris**, M. Petraki, M. Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos and A. Tselepis (2008) "Design and Synthesis of peptide models of helix 6 (152-164) and helices 9,10 (209-229) of apoA-I: Conformation and Biological Function" Book of abstract of 6th Hellenic Conference of Hellenic Society of Free Radicals and Oxidative Stress (H.S.F.R.O.S), Greece.

