



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη επισημασμένων παραγώγων του
νευροπροστατευτικού πεπτιδίου ουμανίνη
για βιολογικές μελέτες**

**ΜΥΡΤΑ ΚΩΣΤΟΜΟΙΡΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη επισημασμένων παραγώγων του
νευροπροστατευτικού πεπτιδίου ουμανίνη
για βιολογικές μελέτες**

**ΜΥΡΤΑ ΚΩΣΤΟΜΟΙΡΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη επισημασμένων παραγώγων του νευροπροστατευτικού πεπτιδίου ουμανίνη για βιολογικές μελέτες

ΜΥΡΤΑ ΚΩΣΤΟΜΟΙΡΗ

A.M.: 62724

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

A. Σιαφάκα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

M. Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

A. Σιαφάκα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

M. Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

A. Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Δ. Γεωργιάδης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

M. Αναγνωστούλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

M. Αντωνέλλου, Λέκτορας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 23/10/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κολιβελίνη (CL) είναι ένα υβριδικό 26-πεπτίδιο (SALLRSIPAPAGASR--LLLLTGEIDLTP) και το πλέον δραστικό μέλος της νευροπροστατευτικής οικογένειας πεπτιδίων της ουμανίνης (HN) με *in vitro* και *in vivo* δράση έναντι τοξικών εκδηλώσεων που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer (AD). Αντικείμενο της παρούσας Διατριβής είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων παραγώγων της CL, με απώτερο στόχο την ευρεία εφαρμογή τους στην διερεύνηση του τρόπου δράσης της οικογένειας της HN.

Στο πλαίσιο αυτό, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν τρία νέα παράγωγα της CL τα οποία φέρουν ομάδες-ιχνηθέτες: α) την φθορίζουσα ένωση FITC (CL-FITC), β) την βιοτίνη – ένωση που σχηματίζει εξαιρετικά σταθερά σύμπλοκα με την πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη (CL-βιοτίνη) και γ) το τριπεπτίδιο dimethylGly-Ser-Cys, χηλικό υποκαταστάτη του ραδιενεργού μετάλλου ^{99m}Tc (CL-CSG). Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Fmoc στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση, ο καθαρισμός έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και ο χαρακτηρισμός με ESI-MS και φασματοσκοπία NMR.

Δομική ανάλυση των παραγώγων με φασματοσκοπία NMR καθώς και πειράματα κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTT έδειξαν ότι η εισαγωγή της ομάδας-ιχνηθέτη δεν επιφέρει αλλαγές στην διαμόρφωση της CL ούτε καθιστά τοξικά τα νέα παράγωγα. Μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού με τη χρήση του παραγώγου CL-FITC έδειξαν πρόσδεση στην μεμβράνη των υβριδικών κυττάρων F11, η οποία ελαττώνεται όταν τα κύτταρα προεπώάζονται με περίσσεια CL. Σύμπλεξη του CL-CSG με ^{99m}Tc και *in vivo* πειράματα βιοκατανομής σε φυσιολογικούς ποντικούς έδειξαν την παρουσία ραδιενέργειας στον εγκέφαλο 2 min p.i. και απέκκριση μέσω του ουροποιητικού. Τέλος, *in vitro* μελέτες αλληλεπίδρασης του παραγώγου CL-βιοτίνη με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο της AD με μέθοδο τύπου ELISA (βιοτίνης/στρεπταβιδίνης), σε συνδυασμό με πειράματα κυκλικού διχρωισμού, δείχνουν αλληλεπίδραση της CL με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ουμανίνη, κολιβελίνη, νόσος του Alzheimer, β-αμυλοειδές πεπτίδιο, επισημασμένα πεπτιδικά παράγωγα

ABSTRACT

Colivelin (CL) is a hybrid 26-peptide (SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDL^P) and the most potent member of the humanin (HN) family of neuroprotective peptides with *in vitro* and *in vivo* rescuing action against insults related to Alzheimer's disease. The objective of the present study is the synthesis and structural characterization of new derivatives of CL, aiming at unraveling the still unknown mode of action of these peptides.

In this frame, three new CL derivatives bearing suitable labeling moieties were designed and synthesized. The tag molecules are: i. the fluorescent moiety FITC (CL-FITC), ii. the streptavidin-counterpart biotin (CL-biotin), and iii. the ^{99m}Tc-radiometal chelating unit dimethylGly-Ser-Cys (CL-CSG). The peptides were synthesized according to Fmoc-solid phase peptide synthesis strategy, purified with semi-preparative RP-HPLC and characterized with ESI-MS and NMR.

Structural and cell-toxicity evaluation of the derivatives, using NMR and MTT assay respectively, revealed that the presence of the tags does not introduce any modification at conformation of CL neither affect cell viability, rendering the derivatives safe for use in various assays.

Fluorescence microscopy studies using CL-FITC showed localization of CL to F11 cell periphery. Reduced fluorescence intensity upon pre-treatment with excess of unlabeled CL indicated specific binding.

CL-CSG was successfully complexed with ^{99m}Tc and utilized in biodistribution studies. Based on our results, radioactivity was detected in brain 2 min p.i and excreted mainly through the urinary tract.

The results of a (biotin-streptavidin) ELISA-type assay, utilizing CL-biotin, in combination with CD experiments support interaction of CL with β -amyloid peptide.

SUBJECT AREA: Biochemistry

KEYWORDS: humanin, colivelin, Alzheimer's disease, β -amyloid peptide, labeled derivatives

Στους ουράνιους και επίγειους αγγέλους μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:	
ΟΥΜΑΝΙΝΗ – ΚΟΛΙΒΕΛΙΝΗ: ΝΕΑ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	27
1.1 Ουμανίνη	27
1.1.1 Προέλευση-Έκφραση-Δομή	27
1.2 Νευροπροστατευτικά πεπτιδία της οικογένειας της ουμανίνης – Σχέση δομής-δραστικότητας	29
1.2.1 Κολιβελίνη, το δραστικότερο πεπτιδίο της οικογένειας της HN	32
1.3 <i>In vitro</i> και <i>in vivo</i> βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN	33
1.3.1 <i>In vitro</i> βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN	33
1.3.2 <i>In vivo</i> βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN	35
1.3.3 Πιθανοί μηχανισμοί βιολογικής δράσης των πεπτιδίων της οικογένειας της HN	38
1.3.3.1 Προτεινόμενος εξωκυτταρικός μηχανισμός δράσης	39
1.3.3.2 Προτεινόμενος ενδοκυτταρικός μηχανισμός δράσης	41
1.4 Σύνθεση πεπτιδίων της οικογένειας της HN	42
1.5 Δομικές μελέτες πεπτιδίων της οικογένειας της HN με NMR και CD	44
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER ΚΑΙ β-ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΣ ΠΕΠΤΙΔΙΟ	47
2.1 Γενικά στοιχεία	47
2.2 Πεπτιδίο Αβ	51
2.2.1 Προέλευση Αβ - Αποικοδόμηση APP	51
2.2.2 Πολυμερισμός και συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ	52
2.2.3 Νευροτοξική δράση του πεπτιδίου Αβ	56
2.3 Θεραπευτική «στόχευση» του πεπτιδίου Αβ	59
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ	63

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	67
4.1 Σύνθεση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός των πεπτιδίων	67
4.1.1 Πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση	67
4.1.1.1 Γενικές αρχές	67
4.1.1.2 Το στερεό υπόστρωμα (Ρητίνη)	68
4.1.1.3 Προστατευτικές ομάδες	69
4.1.1.4 Μέθοδοι σύζευξης – Πεπτιδικός δεσμός	71
4.1.1.5 Πειραματική πορεία	75
4.1.2 Καθαρισμός και ανάλυση της συνθετικής CL και των παραγώγων της με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	78
4.1.2.1 Αρχή μεθόδου	78
4.1.2.2 Πειραματική διαδικασία	80
4.1.3 Ταυτοποίηση συνθετικών πεπτιδίων με τη μέθοδο της φασματομετρίας με τη μέθοδο ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS)	82
4.1.3.1 Αρχή μεθόδου	82
4.1.3.2 Πειραματική διαδικασία	85
4.2 Πειράματα Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	85
4.2.1 Αρχή μεθόδου	85
4.2.2 Πειραματική διαδικασία	90
4.3 <i>In vitro</i> πειράματα	90
4.3.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών	90
4.3.1.1 Αρχή μεθόδου	90
4.3.1.2 Πειραματική διαδικασία	91
4.3.2 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTT	94
4.3.2.1 Αρχή μεθόδου	94
4.3.2.2 Πειραματική διαδικασία	95
4.3.3 Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού με τη χρήση του παραγώγου CL-FITC	96
4.3.3.1 Αρχή μεθόδου	96
4.3.3.2 Πειραματική διαδικασία	98

4.4	<i>In vivo</i> μελέτες με το ^{99m}Tc -ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο του παραγώγου CL-CSG (CL-CSG- ^{99m}TcO)	100
4.4.1	Θεωρητικό υπόβαθρο	101
4.4.1.1	Το τεχνητίο (Tc)	101
4.4.1.2	Το ρήνιο (Re)	102
4.4.1.3	Η χημεία των ενώσεων του τεχνητίου και του ρηνίου	102
4.4.1.4	Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων οξο-τεχνητίου και οξο-ρηνίου	104
4.4.2	Πειραματική διαδικασία	105
4.4.2.1	Σύμπλέξη του πεπτιδίου CL-CSG με ψυχρό $^{185/187}\text{Re}$ - Παρασκευή του CL-CSG- ^{99m}ReO	106
4.4.2.2	Ραδιοεπισήμανση του CL-CSG με ^{99m}Tc – Παρασκευή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m}TcO	106
4.4.2.3	Μελέτες σταθερότητας	107
4.4.2.4	Χορήγηση του CL-CSG- ^{99m}TcO σε φυσιολογικά πειραματόζωα – Μελέτες <i>in vivo</i> βιοκατανομής	109
4.5	Μελέτη της <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης CL και β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ) με τη χρήση του παραγώγου CL-βιοτίνη σε μέθοδο τύπου ELISA	111
4.5.1	Αρχή μεθόδου	111
4.5.2	Πειραματική διαδικασία	113
4.6	Πειράματα Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωισμού (CD)	118
4.6.1	Αρχή μεθόδου	118
4.6.2	Πειραματική διαδικασία	121
4.7	Χρώση θειοφλαβίνης (ThT)	123
4.7.1	Αρχή μεθόδου	123
4.7.2	Πειραματική διαδικασία	123
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	125
5.1	Πεπτιδική σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση της CL και των παραγώγων της	125
5.2	Δομικές μελέτες με NMR	132
5.3	Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των παραγώγων της CL, σε σύγκριση με τη μητρική CL, με τη μέθοδο MTT	135

5.4 Μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού με εφαρμογή του παραγώγου CL-FITC	138
5.5 <i>In vivo</i> μελέτες με εφαρμογή του παραγώγου CL-CSG, υπό τη μορφή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m} TcO	143
5.5.1 Ραδιοεπισήμανση του CL-CSG με ^{99m} Tc – Παρασκευή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m} TcO	143
5.5.2 Μελέτες σταθερότητας του CL-CSG- ^{99m} TcO	145
5.5.2.1 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m} TcO συναρτήσει του χρόνου	145
5.5.2.2 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m} TcO παρουσία περίσσειας κυστεΐνης συναρτήσει του χρόνου	146
5.5.2.3 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m} TcO παρουσία πλάσματος ανθρώπινου αίματος συναρτήσει του χρόνου	147
5.5.3 <i>In vivo</i> μελέτες βιοκατανομής	150
5.6 Εφαρμογή του παραγώγου CL-βιοτίνη σε μέθοδο τύπου ELISA για τη διερεύνηση αλληλεπίδρασης CL και Αβ	154
5.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης CL και CL-βιοτίνης με Αβ σε πειράματα CD	157
5.8 Έλεγχος σχηματισμού β-αμυλοειδών ινιδίων παρουσία CL με την δοκιμασία της Θειοφλαβίνης T	163
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	165
Δ. ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	175
Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	177
ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	179
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	183

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση των πρωτεολυτικών μονοπατιών της APP και των μεταβολικών παραγώγων της.	51
Σχήμα 2: (α) Η αμινοξική αλληλουχία των πεπτιδίων Αβ(1-40) και Αβ(1-42), (β) Στάδια πολυμερισμού του πεπτιδίου Αβ και μετάπτωση από τυχαίες ελικοειδείς διαμορφώσεις σε δομές με β-διαμόρφωση.	54
Σχήμα 3: Δομή εμπορικά διαθέσιμης Rink amide ρητίνης.	69
Σχήμα 4: Οι προστατευτικές ομάδες Boc- (αριστερά) και Fmoc- (δεξιά).	70
Σχήμα 5: Δομή του προστατευμένου αμινοξέος Fmoc-Lys(Dde)-OH.	71
Σχήμα 6: Αντίδραση νινυδρίνης για την ανίχνευση ελεύθερων αμινομάδων (Kaiser test).	73
Σχήμα 7: Πειραματική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων βάσει της μεθοδολογίας στερεάς φάσης.	74
Σχήμα 8: Σχηματικό διάγραμμα μίας πηγής ηλεκτροψεκασμού (ESI).	84
Σχήμα 9: Σχηματικό διάγραμμα του μηχανισμού δημιουργίας ιόντων κατά τον ηλεκτροψεκασμό.	84
Σχήμα 10: Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 τα πυρηνικά spins προσανατολίζονται τυχαία, ενώ με την εφαρμογή ενός τέτοιου πεδίου αποκτούν συγκεκριμένο προσανατολισμό. Μερικά spins είναι διατεταγμένα παράλληλα και κάποια άλλα αντιπαράλληλα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο.	86
Σχήμα 11: Η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζώντων κυττάρων και εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος από ασθενώς κίτρινο σε έντονο κυανό.	94
Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση διάσπασης του ^{99}Mo και παραγωγής ^{99m}Tc .	101
Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση διπλής – «sandwich» ELISA.	112
Σχήμα 14: Μέθοδος τύπου ELISA, σύστημα Α: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την μελέτη της διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης CL-Αβ <i>in vitro</i> .	115

Σχήμα 15: Μέθοδος τύπου ELISA, σύστημα B: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την μελέτη της διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης CL-Aβ <i>in vitro</i> .	115
Σχήμα 16: Κυκλικά πολωμένο φως αναλυμένο σε δύο συνιστώσες, αριστερόστροφα (L) και δεξιόστροφα (R) κυκλικά πολωμένο, με διανύσματα ηλεκτρικών πεδίων E_L και E_R , αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα του φαινομένου του κυκλικού διχρωισμού στις δύο ακτίνες που έχουν περάσει από οπτικά ενεργό μέσο: τα μέτρα των διανυσμάτων της έντασης των δύο ακτίνων είναι άνισα, και η σύνθεσή τους δίνει ελλειπτικά πολωμένο φως.	118
Σχήμα 17: Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού των τύπων των δευτεροταγών δομών της α-έλικας, β-φύλλου, β-στροφής και τυχαίου σπειράματος.	121
Σχήμα 18: Δομή ThT.	123
Σχήμα 19: Η CL και τα παράγωγά της: CL-FITC, CL-βιοτίνη, CL-CSG και CL-CSG-MO.	126
Σχήμα 20: Σχηματική απεικόνιση των τριών επισημασμένων παραγώγων της CL.	128
Σχήμα 21: Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC: α. ακατέργαστης (crude) και β. καθαρής (pure) συνθετικής CL.	129
Σχήμα 22: Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC: α. ακατέργαστου (crude) και β. καθαρού (pure) συνθετικού παραγώγου της CL (I. CL-FITC, II. CL-βιοτίνη, III. CL-CSG).	130
Σχήμα 23: Δομικός χαρακτηρισμός της CL και των παραγώγων της με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR.	133
Σχήμα 24: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL στις κυτταρικές σειρές F11 και SK-N-SH με τη μέθοδο MTT.	136
Σχήμα 25: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων παραγώγων της CL σε κύτταρα F11 με τη μέθοδο MTT.	137
Σχήμα 26: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων παραγώγων της CL σε κύτταρα SK-N-SH με τη μέθοδο MTT.	138

Σχήμα 27: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού - Εντοπισμός της CL με παράλληλη χρώση του πυρήνα στην κυτταρική σειρά F11.	139
Σχήμα 28: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού- Εντοπισμός της CL στην κυτταρική σειρά F11, SK-N-SH και Neuro-2a.	140
Σχήμα 29: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού- Εντοπισμός της CL στην κυτταρική σειρά F11 συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας επώασης.	142
Σχήμα 30: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του επισημασμένου με ^{99m}Tc συμπλόκου του παραγώγου CL-CSG (CL-CSG- ^{99m}TcO).	144
Σχήμα 31: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG- ^{99m}TcO (σε απομονωμένη μορφή), 6 h μετά την παρασκευή του.	145
Σχήμα 32: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του απομονωμένου παραγώγου CL-CSG- ^{99m}TcO μετά από επώαση με περίσσεια Cys (10^{-5} M) για 30 min.	146
Σχήμα 33: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του CL-CSG- ^{99m}TcO μετά από επώασή του με περίσσεια Cys (10^{-4} M) για 60 min.	147
Σχήμα 34: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG- ^{99m}TcO μετά από επώαση με ανθρώπινο πλάσμα για 2 min.	149
Σχήμα 35: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG- ^{99m}TcO μετά από επώαση με ανθρώπινο πλάσμα για 30 min.	149
Σχήμα 36: <i>In vivo</i> κατανομή της ραδιενέργειας (% ID/g) 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m}TcO σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.	151
Σχήμα 37: <i>In vivo</i> κατανομή της ραδιενέργειας (% ID/όργανο) 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- ^{99m}TcO σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.	152
Σχήμα 38: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα δείγματος ούρων ποντικού 30 min μετά την χορήγηση του CL-CSG- ^{99m}TcO .	153
Σχήμα 39: Καμπύλη «τιτλοδότησης» παρουσία Αβ και αυξανόμενων συγκεντρώσεων CL-βιοτίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Α.	156

Σχήμα 40: Καμπύλη «τιτλοδότησης» παρουσία Αβ και αυξανόμενων συγκεντρώσεων CL-βιοτίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο B.	157
Σχήμα 41: Φάσματα CD του Αβ(1-40) σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.	158
Σχήμα 42: Φάσματα CD της CL σε συγκεντρώσεις (α) 50 μ M και (β) 100 μ M σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.	159
Σχήμα 43: Φάσματα CD του παραγώγου CL-βιοτίνης σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.	160
Σχήμα 44: Φάσματα CD του μίγματος Αβ(1-40) και σε PB σε αναλογία 1:1 συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.	161
Σχήμα 45: Φάσματα CD του μίγματος Αβ(1-40) και σε PB σε αναλογία 1:2 συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.	162
Σχήμα 46: Πεπτίδιο Αβ(1-40), συγκέντρωσης 25 μ M επωάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PB 0,01 M pH 7,4 παρουσία και απουσία CL σε αναλογίες 1:1 και 1:2. Σε χρονικό διάστημα 15 ημερών τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς τον σχηματισμό ινιδίων με χρώση ThT, c=5 μ M.	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της διατομής, φυσιολογικού (αριστερά) και δεξιά με AD εγκεφάλου. Η απώλεια της μνήμης και των γνωστικών λειτουργιών οφείλεται στην απώλεια νευρώνων που εμφανίζεται ως ατροφία του εγκεφάλου.	49
Εικόνα 2: Κύρια νευροπαθολογικά ευρήματα της AD: οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια, τα οποία εντοπίζονται μεταξύ και εντός των νευρώνων, αντίστοιχα. Σύγκριση νευρώνων εγκεφάλου ασθενούς με φυσιολογικούς νευρώνες.	50
Εικόνα 3: Τα μικροσκοπικά νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της AD: α. Οι αμυλοειδείς πλάκες, β. Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια.	50
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με ακτίνες laser.	97

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Πεπτίδια της οικογένειας της HN που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία: Επίδραση τροποποιήσεων της πρωτοταγούς δομής στη βιοδραστικότητα.	31
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά διαφορετικών ειδών HPLC.	80
Πίνακας 3: Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης συναρτήσει του χρόνου για τον καθαρισμό της CL και των παραγώγων της.	81
Πίνακας 4: Αναλυτική RP-HPLC: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης συναρτήσει του χρόνου για τον καθαρισμό της CL και των παραγώγων της.	82
Πίνακας 5: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης των συμπλόκων του $^{185/187}\text{Re}$ και $^{99\text{m}}\text{Tc}$ κατά την αναλυτική RP-HPLC.	107
Πίνακας 6: Αποτελέσματα της ανάλυσης ESI-MS για τη συνθετική CL, τα συνθετικά παράγωγα της CL και το σύμπλοκο CL-CSG- ^{185}ReO .	131
Πίνακας 7: <i>In vivo</i> κατανομή της ραδιενέργειας 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του παραγώγου CL-CSG- $^{99\text{m}}\text{TcO}$ σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.	150

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια “Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR)” του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών και “Ανοσοπεπτιδικής Χημείας” του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Πελεκάνου και της Δρ. Ευαγγελίας Λιβανίου. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον Τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και την υπευθυνότητα της Καθηγήτριας κ.Ντίας Γαλανοπούλου.

Ευχαριστώ το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την παροχή υποτροφίας (11/2008-11/2012) και όλα τα Εργαστήρια με τα οποία συνεργάστηκα για τη διάθεση της υποδομής και των πρώτων υλών, που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη Δρ. Μαρία Πελεκάνου, για την καθοδήγηση, την συστηματική υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Την ευχαριστώ ακόμα, για το χρόνο που μου αφιέρωσε μέσα στο πλήθος των ποικίλων υποχρεώσεών της και το αμείωτο ενδιαφέρον της κατά την πρόοδο κι εξέλιξη της εργασίας μου.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ευαγγελία Λιβανίου, η προσωπικότητα της οποίας λειτούργησε ως καταλύτης καθ’ όλη τη χρονική διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας μελέτης, για την ακούραστη υποστήριξή της, την υπομονή της και την ανιδιοτελή προσφορά της εντός και εκτός εργαστηρίου.

Ευχαριστώ επίσης την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου κ. Ντία Γαλανοπούλου για τις καίριες παρατηρήσεις και τις χρήσιμες υποδείξεις που μου παρείχε σ’ όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Ευχαριστώ, παράλληλα την Καθηγήτρια κ. Αθανασία Σιαφάκα, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, που στέκεται δίπλα μου από τα προπτυχιακά μου χρόνια με την τότε ιδιότητα της Ακαδημαϊκής Συμβούλου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στα άλλα μέλη της Εξεταστικής Επταμελούς Επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αθ. Γκιμήση, Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Γεωργιάδη, Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μ. Αναγνωστούλη και την Λέκτορα κ. Μ. Αντωνέλου για το χρόνο που μου διέθεσαν και την κριτική συμβολή τους στην βελτίωση της παρούσας Διατριβής .

Στον Δρ. Χρήστο Ζήκο οφείλω πολλά κι ειλικρινή ευχαριστώ για τις γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ ανήκει στην Δρ. Δήμητρα Μπενάκη, χωρίς την οποία η λήψη και η ερμηνεία των φασμάτων NMR θα ήταν αδύνατη, για την ουσιαστική βοήθεια και στήριξη της καθώς και για τις πολύωρες επιστημονικές και μη συζητήσεις μας, πολλά βράδια αργά στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Αγγελική Παναγιωτοπούλου για την συμπαράστασή της και την καλή διάθεση που πάντα μου μετέφερε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή και Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο από το εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής, την εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών και τις διορθώσεις τους επί της συγγραφής της Διατριβής μου.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Μαρία Παραβατού, στο εργαστήριο της οποίας πραγματοποιήθηκαν τα *in vitro* πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Μαρίνα Σαγνού για την βοήθειά της στα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Παράλληλα, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη, από το εργαστήριο «Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού» του Ινστιτούτου Παστέρ, για τη φιλοξενία που μου παρείχε, την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και συμβολή της στα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Κώστα Σταματάκη για την επιστημονική του συνδρομή στις μελέτες με την δοκιμασία της θειοφλαβίνης.

Τέλος, ευχαριστώ ειλικρινά τους φίλους και συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άφογη συνεργασία μας και την πολύπλευρη υποστήριξή τους σε ποικίλα πρακτικά και όχι μόνο ζητήματα. Ευχαριστώ μέσα απ' την καρδιά μου την Βυρωνία Βασιλακοπούλου, την Χρύσα Καραχάλιου, την Έφη Νικολάκη, την Αμαλία Παπαδάκη, τον Χάρη Τριάντη και τον Άγγελο Θανάσουλα, που ήταν πάντα πρόθυμοι και διαθέσιμοι να με βοηθήσουν σε οποιαδήποτε δυσκολία

συναντούσα κατά τη διάρκειά της εργασίας μου και συνέβαλαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, στην ολοκλήρωση αυτής της Διατριβής.

Τέλος, την βαθιά μου ευγνωμοσύνη εκφράζω στην οικογένειά μου, η αγάπη και η καθολική στήριξη της οποίας με συνοδεύει σε κάθε μου βήμα και σ' όλους εκείνους, που μου δίνουν την δύναμη να αγωνίζομαι, να ονειρεύομαι και να χαμογελώ.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

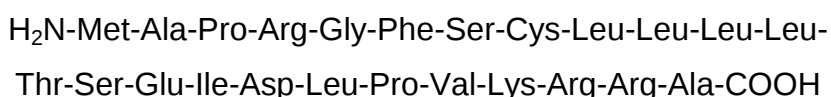
ΟΥΜΑΝΙΝΗ – ΚΟΛΙΒΕΛΙΝΗ:

ΝΕΑ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

1.1 Ουμανίνη

1.1.1 Προέλευση - Έκφραση - Δομή

Η ουμανίνη είναι ένα βιοδραστικό πεπτίδιο που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2001 από Ιάπωνες ερευνητές με την χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας. Η προσέγγιση της ομάδας βασίστηκε στην παρατήρηση ότι ο ινιακός λοβός των ασθενών με νόσο Alzheimer (AD) παραμένει σχετικά ανέπαφος συγκριτικά με άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος ή ο βρεγματικός λοβός, παρατήρηση που οδήγησε στην υπόθεση περί έκφρασης κάποιου νευροπροστατευτικού παράγοντα στο συγκεκριμένο τμήμα του εγκεφάλου. Έτσι απομονώθηκε mRNA από ινιακό λοβό ασθενούς με AD, κατασκευάστηκε η βιβλιοθήκη cDNA και με βάση τη μεθοδολογία “Death-trap screening” διερευνήθηκε η πιθανή παρουσία στον ινιακό λοβό γονιδίων με νευροπροστατευτική δράση. Το αποτέλεσμα της ανωτέρω μελέτης ήταν η ανακάλυψη τμήματος cDNA που κωδικοποιούσε ένα 24-πεπτίδιο με την ακόλουθη αμινοξική αλληλουχία:



Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε ουμανίνη (HN) [1,2] και έδειξε να έχει νευροπροστατευτική δράση από τις πρώτες δοκιμασίες που μελετήθηκε. Συγκεκριμένα, προσθήκη HN στο υλικό καλλιέργειας επιμολυσμένων νευρικών κυττάρων, που εξέφραζαν μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης APP (London type APP mutant, V642I) που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, επέτρεπε την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, η HN απέτρεψε τον θάνατο νευρικών κυττάρων, τον επαγόμενο από την δράση νευροτοξικών παραγόντων, όπως διάφορες μορφές του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Aβ) της AD [1,2].

Από την πρωτοταγή δομή της HN, διαπιστώνεται ότι η HN είναι ένα σχετικά υδρόφοβο γραμμικό πεπτίδιο και περιέχει μια θετικά φορτισμένη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο (Met1-Arg4), μια κεντρική υδρόφοβη περιοχή (Leu9-Leu12) και μια περισσότερο πολική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο (Pro19-Ala24). Τα ανωτέρω στοιχεία ικανοποιούν τα κριτήρια για τον χαρακτηρισμό μιας πεπτιδικής αλληλουχίας ως σηματοδοτική [3]. Η HN ως «σηματοδοτικό» πεπτίδιο είναι πιθανόν να εκκρίνεται έξω από το κύτταρο μέσω του εκκριτικού μονοπατιού του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi και να δρα εξωκυτταρικά [2].

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA της HN αποτελείται από 1567 βάσεις και βρέθηκε να είναι κατά 99% όμοια με τμήμα του πυρηνικού DNA [4], αλλά και κατά 99% όμοια με την περιοχή 1679-3230 του μιτοχονδριακού DNA [5,6,7] που κωδικοποιεί για την 16S rRNA ριβοσωμική υπομονάδα [8]. Το γεγονός αυτό θέτει το ερώτημα εάν το γονίδιο της HN είναι μιτοχονδριακής ή πυρηνικής προέλευσης.

Παρόλο που η HN μέχρι στιγμής δεν έχει απομονωθεί από βιολογικά δείγματα, πιστεύεται ότι εκφράζεται *in vivo*. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί «ανοσοδραστικότητα τύπου HN» σε ανέπαφους νευρώνες ινιακού λοβού και σε κύτταρα γλοίας ιπποκάμπου ασθενών με AD, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοια ανοσοδραστικότητα σε νευρώνες άλλων περιοχών του εγκεφάλου ή σε εγκεφάλους – μάρτυρες ασθενών της ίδιας ηλικίας, που δεν έπασχαν από νευροεκφυλιστική νόσο. Επίσης, ανοσοδραστικότητα τύπου HN βρέθηκε στους όρχεις και στο παχύ έντερο νεαρών ποντικών ηλικίας 3 εβδομάδων, αλλά μόνο στους όρχεις ποντικών 12 εβδομάδων, γεγονός το οποίο μπορεί να συσχετισθεί με ηλικιοεξαρτώμενη έκφραση της HN και σε άλλους ιστούς, πέραν του νευρικού [5].

Πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν τον εντοπισμό της HN σε ανθρώπινο σπέρμα και όρχεις με τεχνική ανοσοφθορισμού [9,10,11]. Παράλληλα, με πειράματα αποτύπωσης Northern σε ανθρώπινους ιστούς, ανιχνεύθηκε poly(A)+ RNA της HN στην καρδιά, τους σκελετικούς μυς, τους νεφρούς και το ήπαρ [2].

Οι Caricasole και συνεργάτες απομόνωσαν από αρουραίο cDNA το οποίο κωδικοποιεί πεπτιδίο-ομόλογο της HN, που ονομάστηκε ρατίνη (Rattin, RN). Η ρατίνη αποτελείται από 38 αμινοξέα, τα 24 πρώτα από τα οποία παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την πρωτοταγή δομή της HN, και βρέθηκε να ασκεί επίσης *in vitro* νευροπροστατευτική δράση [12]. Η ρατίνη ανιχνεύθηκε σε όρχεις αρουραίων ηλικίας 10 έως 60 ημερών με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωσης και προτείνεται να έχει αντι-αποπτωτική δράση [13,14].

1.2 Νευροπροστατευτικά πεπτιδία της οικογένειας της ουμανίνης – Σχέση δομής-δραστικότητας

Εκτεταμένες μελέτες έχουν αποκαλύψει την άμεση σχέση της πρωτοταγούς δομής της HN με την *in vitro* και *in vivo* δραστικότητα του μορίου. Λεπτομερειακή ανάλυση της δομής της HN έχει αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες για το ποια αμινοξέα ή περιοχές του πεπτιδίου είναι απαραίτητα για τη δράση της καθώς και πώς επηρεάζουν αντικαταστάσεις ή απαλοιφές αμινοξέων τη βιολογική συμπεριφορά των πεπτιδίων που προκύπτουν, σε σχέση με τη μητρική HN. Το μητρικό μόριο και τα ανωτέρω πεπτιδία συγκροτούν μια μεγάλη οικογένεια βιοδραστικών πεπτιδίων, που είναι γνωστή ως οικογένεια της HN (Πίνακας 1).

Μελέτες σε σύστημα κυττάρων F11 (υβριδική κυτταρική νευρική σειρά που προκύπτει από σύντηξη πρωτογενών εμβρυικών νευρώνων αρουραίου με την κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού N18TG2) έδειξαν ότι οι ελλειμματικές στα Met1-Ala2 στο N-τελικό άκρο μορφές του πεπτιδίου εμφάνισαν μειωμένη προστατευτική δράση, ενώ η απουσία και του τρίτου κατά σειρά αμινοξέος, Pro3, οδήγησε σε απώλεια της δράσης του. Παρόμοιες μελέτες στο C-τελικό άκρο αποκάλυψαν ότι το πενταπεπτιδίο Val20-Lys-Arg-Arg-Ala24 δεν θεωρείται απαραίτητο για τη διατήρηση της προστατευτικής δράσης της HN, σε αντίθεση με την Pro19, ενώ η ελάχιστη περιοχή της HN, που διατηρεί τη δραστικότητα του μητρικού πεπτιδίου, είναι η περιοχή Pro3-Pro19, αποτελούμενη από 17 αμινοξέα, που ονομάζεται HN17 [1].

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιολογικής δραστηριότητας της HN φαίνεται να έχει η Ser14. Αντικατάσταση αυτής της Ser από Ala στο πεπτίδιο HN17 οδήγησε σε πλήρη απώλεια της προστατευτικής δράσης του πεπτιδίου έναντι νευροτοξικότητας επαγόμενης από το Αβ [1]. Παράλληλα, με την αντικατάσταση της Ser14 στο μόριο της μητρικής HN από Gly προκύπτει το πεπτίδιο HNG, με δραστηριότητα αυξημένη κατά 1000 φορές σε σχέση με την HN, εκδηλώνοντας δράση σε συγκέντρωση 10 nM [1]. Στην ίδια συγκέντρωση εμφανίζει νευροπροστατευτική δράση και το πεπτίδιο HNG17, που είναι αντίστοιχο με το πεπτίδιο HN17, αλλά διαθέτει Gly στη θέση της Ser14 (αρίθμηση με βάση τη δομή της μητρικής HN). Σε ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις, της τάξης pM, δρα το παράγωγο AGA-HNG, που προκύπτει με αντικατάσταση της Arg4 και της Phe6 από Ala στη δομή της HNG.

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 1, το παράγωγο που προκύπτει με αντικατάσταση της L-Ser από D-Ser στη θέση 14 εμφανίζει 10^6 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από την μητρική HN, (δράση σε συγκεντρώσεις 100-300 pM).

Σπουδαίο ακόμα ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα της HN έχει βρεθεί να κατέχει η Ser7. Αντικατάσταση της Ser7 από Ala οδήγησε σε ανάλογο με μηδενική δραστηριότητα έναντι νευροτοξικότητας επαγόμενης από μεταλλαγμένη μορφή της APP (V642I-APP) ή από το πεπτίδιο Αβ, ενώ η παρουσία της D-Ser στην ίδια θέση δεν διαφοροποίησε τη βιολογική δραστηριότητα του αντίστοιχου πεπτιδίου [15].

Ιδιαίτερα σημαντικός για τη δράση της HN φαίνεται να είναι και ο ρόλος της Cys8. Αντικατάσταση της Cys8 από Ala οδηγεί σε πλήρη απώλεια της δράσης του πεπτιδίου ενώ η αντικατάστασή της από Lys ή Arg δεν φαίνεται να μειώνει την κυτταροπροστατευτική δράση της. Μάλιστα, η αντικατάσταση της Cys8 από Arg στο πεπτίδιο AGA-HNG17 έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός ακόμη δραστικότερου πεπτιδίου της οικογένειας της HN, του AGA-(C8R)-HNG17, το οποίο εμφανίζει κυτταροπροστατευτική δράση σε συγκέντρωση 10 pM [15].

**Πίνακας 1: Πεπτίδια της οικογένειας της HN που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία:
Επίδραση τροποποιήσεων της πρωτοταγούς δομής στη βιοδραστικότητα.**

Πεπτίδιο	Αμινοξική αλληλουχία (με βάση τον συμβολισμό ενός γράμματος)	Συγκέντρωση απαραίτητη για την επίδειξη in vitro νευρο- προστατευτικής δράσης	Ref.
HN	MAPRGFSCLLLLTSEIDL PVKRRRA	10 μM	[1]
HNG	MAPRGFSCLLLLT <u>G</u> EIDL PVKRRRA	10 nM	[1]
AGA-HNG	MAP <u>A</u> G <u>A</u> SCLLLLT <u>G</u> EIDL PVKRRRA	100-300 pM	[1]
AGA-HN [D-Ser ¹⁴]	MAP <u>A</u> G <u>A</u> SCLLLLT <u>s</u> EIDL PVKRRRA	100-300 pM	[15]
HN17	PRGFSCLLLLTSEIDL P	10 μM	[1]
HNG17	PRGFSCLLLLT <u>G</u> EIDL P	10 nM	[1]
AGA-HN [D-Ser ¹⁴] ₁₇	P <u>A</u> G <u>A</u> SCLLLLT <u>s</u> EIDL P	100-300 pM	[15]
AGA- (C8R)HNG17	P <u>A</u> G <u>A</u> S <u>R</u> LLLLLT <u>G</u> EIDL P	10 pM	[15]
Κολιβελίνη ADNF-9 / AGA- (C8R)HNG17	<u>SALLRSIPA</u> – P <u>A</u> G <u>A</u> S <u>R</u> LLLLLT <u>G</u> EIDL P	100 fM	[16]

Τα αμινοξέα που διαφέρουν από τα αντίστοιχα της HN παρουσιάζονται με έντονους, υπογραμμισμένους χαρακτήρες.

Το δραστικότερο μέλος της οικογένειας πεπτιδίων της HN είναι η κολιβελίνη (CL), ένα υβριδικό παράγωγο που προέρχεται από σύζευξη του πεπτιδίου AGA-(C8R)-HNG17 με το τμήμα ADNF-9 του νευροτροφικού παράγοντα ADNF και το οποίο αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

1.2.1 Κολιβελίνη, το δραστικότερο παράγωγο της οικογένειας της HN Δομή

Στην προσπάθεια ανάπτυξης αναλόγων της HN με ενισχυμένη νευροπροστατευτική δραστικότητα, συνετέθη το 2005 ένα υβριδικό πεπτίδιο που ονομάζεται κολιβελίνη (CL, SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDL) και αποτελεί το πλέον δραστικό παράγωγο της HN, με δραστικότητα της τάξης femtoM (100 fM) (Πίνακας 1). Το νέο πεπτίδιο δημιουργήθηκε με πρόσδεση του νευροτροφικού παράγοντα ADNF-9 (SALLRSIPA, δραστικό εννεαπεπτίδιο του Activity Dependent Neurotrophic Factor) στο αμινοτελικό άκρο του δραστικού HN-πεπτιδίου, AGA-(C8R)-HNG17 [16].

Ο ADNF-9 αποτελεί το μικρότερο δραστικό τμήμα του νευροπροστατευτικού παράγοντα ADNF και αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό τμήμα του ADNF-14, με αλληλουχία Ser-Ala-Leu-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala, ενώ τα σημαντικά αμινοξέα για την εκδήλωση της δράσης του είναι τα Ser1, Ile7-Pro8-Ala9 [17]. Συγκρινόμενος με το μητρικό μόριο (δηλαδή τον ADNF), ο ADNF-9 εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα της τάξης femtoM, ενώ χάνει τη δραστικότητά του σε συγκεντρώσεις της τάξης 1 nM για άγνωστους μέχρι στιγμής λόγους [18].

Ο ADNF-9 καταστέλλει τον επαγόμενο από το τοξικό Αβ πεπτίδιο, από οξειδωτικό στρες ή από άλλους παράγοντες θάνατο νευρικών κυττάρων, σε μια σειρά κυτταρικών μοντέλων [19,20,21,22]. Παράλληλα, παρέχει νευροπροστασία *in vivo*, όπως π.χ. προστασία έναντι πειραματικώς επαγόμενης απώλειας της βραχύχρονης μνήμης, ενώ καταστέλλει το θάνατο νευρικών κυττάρων, επαγόμενο από μεταλλάξεις στο γονίδιο *SOD-1* (γονίδιο που σχετίζεται με την εκδήλωση οικογενών μορφών της πλάγιας αμυοτροφικής σκλήρυνσης) κ.ά. [23,24,25].

1.3 *In vitro* και *in vivo* βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN

Η οικογένεια της HN έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας από την στιγμή της ανακάλυψής της με αυξανόμενο ρυθμό δημοσιεύσεων που προσεγγίζει τις 200. Βάσει πλήθους συστηματικών μελετών, τα μέλη της εμφανίζουν *in vitro* προστατευτική δράση έναντι τοξικών εκδηλώσεων που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer και παράλληλα εμφανίζουν την ικανότητα να αναστρέφουν *in vivo* φαρμακολογικώς προκαλούμενα προβλήματα μνήμης, μάθησης και προσανατολισμού σε πειραματόζωα.

1.3.1 *In vitro* βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN

Από τις πρώτες δημοσιεύσεις, η *in vitro* δράση της HN και άλλων HN-πεπτιδίων συνδέθηκε με την AD και με την προστασία των νευρικών κυττάρων από τοξικότητα επαγόμενη από γονίδια οικογενών μορφών της AD (Familial Alzheimer Disease, FAD) - μεταλλαγμένων μορφών της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης APP και των πρεσινιλινών I και II - καθώς και από διάφορες μορφές του αμυλοειδούς πεπτιδίου Αβ. Η HN απέτρεψε επιπλέον σε σημαντικό βαθμό τον κυτταρικό θάνατο πρωτογενών νευρώνων που καλλιεργήθηκαν παρουσία αντι-APP αντισώματος, ενώ δεν φάνηκε αποτελεσματική έναντι νευροτοξικότητας προκαλούμενης από γλουταμινικό οξύ ή μεταλλαγμένες μορφές της δισμουτάσης του υπεροξειδίου 1 (superoxide dismutase 1), υπεύθυνων για τη νόσο του Huntigton και την πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση [1].

Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι η HN καταστέλλει την επαγόμενη από Αβ πεπτίδια τοξικότητα και την αποικοδόμηση της α-ακτίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων των εγκεφαλικών αγγείων, χωρίς να επηρεάζει ωστόσο την εναπόθεση του Αβ στην επιφάνεια των κυττάρων ή τον σχηματισμό ινιδίων [26]. Έχει επιπλέον βρεθεί η προστατευτική δράση της HN και της HNG (με 500 φορές υψηλότερη δραστικότητα από αυτήν της HN) σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού αρουραίου έναντι της νευροτοξικότητας που επάγεται από το διαλυτό θραύσμα του πεπτιδίου prion, PrP (118-135) [27]. Στην κυτταρική

σειρά PC12 κατάλληλα επιμολυσμένη, η HN κατέστειλε μερικώς το σχηματισμό συσσωματωμάτων και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από πρωτεΐνες με εκτεταμένες περιοχές πολύ-γλουταμίνης (polyQ stretches), χαρακτηριστικό γνώρισμα της αυτοσωμικά κληρονομούμενης νευροεκφυλιστικής διαταραχής, που είναι γνωστή ως DRPLA (dentatorubral-pallidoluysian atrophy) [28]. Στην ίδια κυτταρική σειρά επίσης η HNG ανέστειλε την επαγόμενη από το Αβ(25-35) μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τον κυτταρικό θάνατο καταστέλλοντας τη δράση της κασπάσης-3 [29].

Σε κύτταρα του ΚΝΣ, η πρωτεΐνη IGFBP-3 (Insulin Growth Factor Binding Protein-3) βρέθηκε να ενισχύει τη νευροπροστατευτική δράση της HNG έναντι της επαγόμενης από το Αβ τοξικότητας [30]. Ως εκ τούτου διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η IGFBP-3 μπορεί να ρυθμίζει τη βιοκατανομή και την ιστο-ειδική δράση της HN *in vivo*, με άλλα λόγια να αποτελεί την πρωτεΐνη-φορέα της HN μέσα στο σώμα, να ρυθμίζει τα επίπεδα της HN στο αίμα και να μεταφέρει την HN από περιφερικούς ιστούς, όπου πιθανόν παράγεται, στο ΚΝΣ.

Παρά την αρχική θεώρηση ότι η HN και τα πεπτιδία της οικογένειας της HN παρουσιάζουν εξειδικευμένη προστατευτική δράση έναντι της AD και άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών, μεταγενέστερες μελέτες υποστηρίζουν την ευρύτερη κυτταροπροστατευτική δράση της οικογένειας αυτής έναντι διαφόρων εκδηλώσεων σε διάφορα μοντέλα στρες σε πλήθος κυτταρικών σειρών.

Συνολικά, η κυτταροπροστατευτική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN φαίνεται να σχετίζεται με αντι-αποπτωτική, αντι-φλεγμονώδη και μεταβολική (βελτίωση μιτοχονδριακής βιοδραστικότητας) δράση, πιθανόν μέσω ανταγωνισμού ή/και αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες ή πρόσδεση σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας [31].

Πιο συγκεκριμένα: Η HN ή άλλα HN-πεπτιδία (π.χ HNG) παρέτειναν την επιβίωση κυττάρων PC12, K562 (ανθρώπινη λευχαιμία) ή ανθρώπινων λεμφοκυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού. [32,33,34,35]. Πρόσφατη μελέτη των Zacharias και συνεργατών αναφέρει για πρώτη φορά ότι η HN είναι παρούσα σε αθηροσκληρωτικές πλάκες

καρωτίδας και ότι η έκφρασή της είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς που εκδηλώνουν συμπτώματα της νόσου, αποδίδοντας στην HN ρόλο ενδογενούς μορίου απόκρισης στις φλεγμονώδεις και αποπτωτικές διεργασίες της αθηρωμάτωσης [36]. Παράλληλα η HN βρέθηκε να εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινων αρτηριών και φλεβών, ενώ η εξωγενής χορήγηση της HN σε καλλιέργεια των κυττάρων αυτών αποδείχθηκε αποτελεσματική έναντι της απόπτωσης και του σχηματισμού ROS (Reactive Oxygen Species) προκαλούμενων από οξειδωμένες μορφές της LDL (Low Density Lipoproteins), υποδηλώνοντας ότι η HN μπορεί να δρα προστατευτικά σε πρώιμη αθηροσκλήρωση [37]. Τέλος, μελέτες δείχνουν τον προστατευτικό ρόλο της HN σε ασθένειες που σχετίζονται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων [38,39,40].

Ειδικά σε ό,τι αφορά το δραστικότερο πεπτίδιο της οικογένειας της HN, την CL, η *in vitro* δράση της περιλαμβάνει i. την καταστολή της τοξικότητας που επάγεται από το πεπτίδιο Αβ, ii. την αναστολή του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από μεταλλαγμένες μορφές της APP ή της PS1 iii. την αναστολή του κυτταρικού θανάτου που οφείλεται σε υπερδιεγερσιμότητα επαγόμενη από γλουταμινικό οξύ [16]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις 2 πρώτες περιπτώσεις η προστατευτική δράση της CL παρατηρήθηκε σε C=100 fM, δηλ. ήταν 10^8 φορές ισχυρότερη από την αντίστοιχη της HN, ενώ αναφερόμενοι στην τρίτη περίπτωση η HN, σε αντίθεση με την CL, δεν φάνηκε αποτελεσματική στην καταπολέμηση της προκαλούμενης από γλουταμινικό νευροτοξικότητας. Επομένως η CL φαίνεται να έχει και ισχυρότερη, αλλά και ευρύτερη *in vitro* νευροπροστατευτική δράση, σε σχέση με την HN.

1.3.2 *In vivo* βιολογική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN

In vivo μελέτες δείχνουν ότι η HN και τα πεπτίδια της οικογένειας της HN μπορούν να δράσουν προστατευτικά έναντι μαθησιακών-γνωστικών δυσλειτουργιών (που συνδέονται με μνήμη-μάθηση) καθώς και φλεγμονωδών αντιδράσεων προκαλούμενων από διάφορους νευροτοξικούς παράγοντες (όπως, πεπτίδια Αβ, ανταγωνιστές της

ακετυλοχολίνης π.χ. σκοπολαμίνη και 3-QNB 3-quinuclidinyl benzilate) σε μοντέλα ποντικού ή αρουραίου.

Η *in vivo* δράση της HN και των HN-πεπτιδίων αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Mamiya και συνεργάτες. Βάσει των αποτελεσμάτων δοκιμασίας Υ-λαβυρίνθου (Y-maze test) (ως δείκτη βραχείας/βραχυπρόθεσμης μνήμης), η ενδοεγκεφαλική ένεση HNG ανέστρεψε τις διαταραχές μνήμης-μάθησης που δημιουργήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα ποντικών μετά από χορήγηση σκοπολαμίνης, ουσίας-ανταγωνιστή του μουσκαρινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης [41].

Επιπλέον μελέτες σε πειραματόζωα απέδειξαν ότι η ενδοεγκεφαλική αλλά και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της HNG μείωσε σημαντικά τις επαγόμενες από το Αβ(25-35) (νευρο)φλεγμονώδεις αποκρίσεις και την απόπτωση κυττάρων του εγκεφάλου ενώ βελτίωσε σημαντικά την απόδοση των γνωστικών λειτουργιών σε συγκεκριμένες δοκιμασίες [42,43]. Παράλληλα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες εγκεφάλου ποντικού έπειτα από *in vivo* χορήγηση πεπτιδίων Αβ και HNG, έδειξαν ότι η HNG εμποδίζει σημαντικά την απώλεια χολινεργικών νευρώνων που προκαλείται λόγω της τοξικής δράσης του πεπτιδίου Αβ σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου [43].

Σε αντίστοιχο *in vivo* πειραματικό μοντέλο η χορήγηση των θραυσμάτων Αβ(25-35) και Αβ(31-35) κατέστειλε την μακρόχρονη ενίσχυση των συνάψεων (Long Term Potentiation, LTP) στον ιππόκαμπο αρουραίων. Η καταστολή αυτή, με τη σειρά της, απετράπη αποτελεσματικά με τη χορήγηση HNG κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [44].

Επίσης μελετήθηκε η *in vivo* δράση της HNG και του παραγώγου des-Leu-AGA-(C8R)HNG17 (παραγώγο με τρεις, αντί τέσσερις, συνεχόμενες Leu στην πρωτοταγή του δομή, PAGASRLLLTGEIDL) σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων, στους οποίους είχε χορηγηθεί το αντιχολινεργικό φάρμακο 3-QNB, που προκαλεί προβλήματα μνήμης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δοκιμασίας Τ-λαβυρίνθου (T-maze test) παρατηρήθηκε ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση καθενός εκ των δύο παραπάνω πεπτιδίων επαναφέρει τη μνήμη στα πειραματόζωα. Μάλιστα, προτείνεται ότι τα πεπτίδια μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είναι πιθανόν να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ασκούν την προστατευτική δράση τους απευθείας στο ΚΝΣ [45].

Ακόμα, σε *in vivo* μελέτη με τριπλά διαγονιδιακούς ποντικούς, που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια των APP, PS1 και tau (πρωτεΐνών που σχετίζονται με την AD), η ενδορρινική χορήγηση HNG οδήγησε σε βελτίωση των γνωσιακών λειτουργιών και σε άμβλυνση των προβλημάτων μνήμης-μάθησης, σε προστασία των συνάψεων έναντι εκφυλισμού και σε μείωση του φορτίου των αμυλοειδών πλακών [46].

Με *in vivo* μελέτες υποστηρίζεται επίσης η αποτελεσματική δράση της HNG στην περίπτωση εγκεφαλικής ισχαιμίας/απόφραξης εγκεφαλικής αρτηρίας (MCAO: middle cerebral artery occlusion) και των επακόλουθων νευρολογικών διαταραχών [47].

Πέραν της νευροπροστατευτικής δράσης, η οικογένεια πεπτιδίων της HN φαίνεται να δρα προστατευτικά *in vivo* και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Ειδικότερα, η HN εμφανίζει ευεργετική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης, ενώ επίσης ελαττώνει τη φλεγμονή και την απόπτωση στα πρώιμα στάδια της νεφρικής νόσου σε υπερχοληστερολαιμικούς ποντικούς με ανεπάρκεια ως προς το γονίδιο της ApoE [48].

Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η HN διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης [10]. Η ρυθμιστική επίδραση της HN επί του μεταβολισμού της γλυκόζης περιλαμβάνει επίσης την προστασία των β-παγκρεατικών κυττάρων. Η μελέτη των Hoang και συνεργατών έδειξε ότι η HN μπορεί να αποτελεί ένα ισχυρό παράγοντα επιβίωσης των παγκρεατικών β-κυττάρων και να καθυστερεί την εμφάνιση του διαβήτη σε μη παχύσαρκους διαβητικούς ποντικούς [49].

Ειδικά σε ό,τι αφορά την CL, η *in vivo* δράση της (όπως και η *in vitro*) είναι κατ'εξοχήν νευροπροστατευτική. Η *in vivo* δράση της CL εξετάσθηκε σε μοντέλα ποντικών, στα οποία είχε προκληθεί επιδείνωση της εν ενεργεία μνήμης του χώρου (spatial working memory) μετά από επαναληπτικές ενδοεγκεφαλικές χορηγήσεις πεπτιδίου Αβ ή/και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του αντιχολινεργικού παράγοντα 3-QNB. Με δοκιμασίες συμπεριφοράς η CL βρέθηκε να βελτιώνει τα επαγόμενα από το Αβ και την 3-QNB προβλήματα μνήμης. Επιπλέον, ένεση πεπτιδίου Αβ(1-42) στον ιππόκαμπο των παραπάνω μοντέλων οδήγησε σε θάνατο των νευρικών

κυττάρων, όπως έδειξαν ιστολογικές μελέτες, γεγονός που αποφεύχθηκε με προεπώαση του Αβ με την CL.

Σημαντική θεωρείται η παρατήρηση ότι η χορήγηση μίγματος ADNF και AGA(C8R)HNG17 δεν παρουσίασε τόσο ισχυρή νευροπροστατευτική δράση *in vivo*, όσο η CL, εύρημα που υποδεικνύει ότι το υβριδικό πεπτιδίο που προκύπτει από την ομοιοπολική σύζευξη των δύο αρχικών πεπτιδίων προσφέρει επιπλέον πλεονεκτήματα συγκριτικά με καθένα από τα επιμέρους μητρικά μόρια [16].

Μία εναλλακτική προσέγγιση ως προς την οδό χορήγησης χρησιμοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα των Yamada και συνεργατών, οι οποίοι πρότειναν την ενδορρινική χορήγηση της CL, ως λιγότερο παρεμβατική μέθοδο για τα πειραματόζωα και ασφαλέστερη για θεραπευτικούς σκοπούς. Η μελέτη αναφέρει τη δυνατότητα *in vivo* μεταφοράς της CL προς το κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω του οσφρητικού συστήματος και των οπτικών νεύρων και την εν συνεχεία άσκηση κεντρικής νευροπροστατευτικής δράσης [50].

Επιπλέον της ευεργετικής επίδρασης σε προβλήματα μνήμης, η CL εμφάνισε νευροπροστατευτική δράση έναντι και άλλων παθολογικών καταστάσεων. Αναλυτικότερα, ενδοεγκεφαλική χορήγηση CL βελτίωσε τις κινητικές ικανότητες και παρέτεινε το χρόνο επιβίωσης σε ποντικούς-μοντέλα πλάγιας αμυοτροφικής σκλήρυνσης (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) τη στιγμή που ο ADNF σε αντίστοιχα πειράματα βελτίωσε μόνο τις κινητικές επιδόσεις των διαγονιδιακών ζώων [24]. Επίσης, ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση CL ανέστειλε το θάνατο εμβρυϊκών νευρικών κυττάρων εγκεφάλου ποντικού, που επήλθε μετά από έκθεση σε αιθυλική αλκοόλη [51].

1.3.3 Πιθανοί μηχανισμοί βιολογικής δράσης των πεπτιδίων της οικογένειας της HN

Πολλές ερευνητικές προσπάθειες διεθνώς επικεντρώνονται στην μελέτη του τρόπου κυτταροπροστατευτικής δράσης της HN και των πεπτιδίων της οικογένειάς της. Παρά τα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν συνδεθεί με την δράση των HN-πεπτιδίων, δεν έχει περιγραφεί ακόμα ακριβής μηχανισμός. Από τις μέχρι τώρα μελέτες, προτείνεται ότι τα

πεπτιδία της οικογένειας της HN δρουν είτε εξωκυτταρικά, προσδενόμενα σε πιθανούς υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, είτε ενδοκυτταρικά αλληλεπιδρώντας στο κυτταρόπλασμα με προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες και αποτρέποντας τελικά τον κυτταρικό θάνατο.

1.3.3.1 Προτεινόμενος εξωκυτταρικός μηχανισμός δράσης

Από σειρά πειραμάτων με κύτταρα που είχαν κατάλληλα επιμολυνθεί, ώστε να εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της HN, αποδείχθηκε ότι «μεταλλαγμένα» πεπτιδία που δεν έχουν την ικανότητα εξόδου από το κύτταρο δεν εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση. Συγκεκριμένα, το πεπτιδίο L9R-HN (HNR) το οποίο δεν έχει την ικανότητα να εκκρίνεται έξω από τα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορισθεί έμμεσα εάν η μητρική HN ασκεί τη νευροπροστατευτική της λειτουργία δρώντας από το εξωτερικό ή στο εσωτερικό του κυττάρου [2]. Όπως παρατηρήθηκε, όταν το πεπτιδίο HNR προστίθεται στο υλικό καλλιέργειας, ο θάνατος των νευρικών κυττάρων που οφείλεται στη μετάλλαξη V642I της πρωτεΐνης APP καταστέλλεται δραστικά. Αντίθετα, όταν το HNR-cDNA εκφράζεται ενδοκυτταρικά, η οφειλόμενη στη μετάλλαξη V642I κυτταροτοξικότητα δεν καταστέλλεται. Μπορεί, συνεπώς, να θεωρηθεί από τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης ότι η κυτταροπροστατευτική δράση του cDNA της HN προϋποθέτει την εξωκυτταρική έκκριση και δράση του αντίστοιχου πεπτιδίου και όχι την παρουσία του μέσα στο κύτταρο. Με άλλα λόγια, η HN φαίνεται να δρα από την εξωτερική πλευρά του κυττάρου, πιθανότατα με τη διαμεσολάβηση ειδικού υποδοχέα. Η φύση του υποδοχέα αυτού, έως και σήμερα, δεν είναι γνωστή, παρόλο που έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις στη βιβλιογραφία, οι οποίες αναφέρονται στη συνέχεια.

Σύμφωνα με τους Ying και συνεργάτες, η HN παρεμποδίζει τη δράση του τοξικού πεπτιδίου Αβ(1-42) μέσω ανταγωνιστικής πρόσδεσης στον κοινό με το Αβ(1-42) υποδοχέα FPRL1 (G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1) και τον ισοδύναμο σε ποντικό υποδοχέα FPRL2, που είχε υπερεκφρασθεί σε ανθρώπινα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα [52]. Με βάση την συγκεκριμένη μελέτη, η HN αποτρέπει τη δέσμευση του πεπτιδίου Αβ(1-42) στον υποδοχέα FPRL1, μειώνει την ενδοκυτταρική συσσώματωση

των συμπλεγμάτων υποδοχέα-Aβ(1-42) και το σχηματισμό ινιδίων και καταστέλλει την επαγόμενη τοξικότητα. Παράλληλα, μελέτη των Harada και συνεργατών δείχνει ότι η HN, αλλά και το παράγωγό της HNG, αποτελούν προσδέτες των υποδοχέων FPRL1 και FPRL2 και εμποδίζουν τη δέσμευση του Αβ σε αυτούς, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την επαγόμενη από το Αβ τοξικότητα [53].

Στην συνέχεια όμως, οι Hashimoto και συνεργάτες έπειτα από μελέτες στην υβριδική νευρική σειρά F11 έδειξαν ότι η αποσιώπηση της έκφρασης του FPRL2 στα F11 δεν οδήγησε σε απώλεια της νευροπροστατευτικής δράσης της HN και των παραγώγων της έναντι διαταραχών σχετιζόμενων με την AD και πρότειναν την πιθανή ύπαρξη άλλου υποδοχέα, μέσω του οποίου (δια)μεσολαβείται η δράση των HN-παραγώγων [54,55,56,57]. Επίσης, ισχυρίζονται ότι η δράση της HN σχετίζεται με συγκεκριμένες κινάσες της τυροσίνης, καθώς και με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 [57]. Άλλη μελέτη της ίδιας ομάδας αναφέρει ότι η HN είναι πιθανόν να ασκεί την κυτταροπροστατευτική της δράση παρεμποδίζοντας την JNK κινάση (c-Jun N-τελική κινάση), η οποία υπεισέρχεται στο μηχανισμό με τον οποίο επάγεται κυτταροτοξικότητα από όλες τις FAD μεταλλάξεις [54]. Η ίδια ερευνητική ομάδα υπέδειξε ότι η επαγόμενη από την HN νευροπροστατευτική δράση μπορεί να ανασταλεί από τη γενιστεΐνη (genistein), αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης, ενώ αναστολείς της κινάσων PI3 και MAP δεν επηρεάζουν τη δράση της HN [2]. Σε μία ακόμα μελέτη έχει αναφερθεί ότι η HN αποτρέπει την επαγόμενη από μεταλλαγμένες μορφές της APP νευροτοξικότητα μέσω καταστολής του μονοπατιού ASK/JNK (Apoptosis signal-regulating kinase/ c-Jun N-terminal kinases [58].

Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η HN καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο μετά την πρόσδεσή της σε υποδοχέα της οικογένειας των κυτταροκινών, αποτελούμενο από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, τις CNTFR (Ciliary Neurotrophic Factor Receptor), gp-130 (κοινή υπομονάδα υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων IL-6) και WSX-1 (υποδοχέα ο οποίος απαντάται σε νευρικά κύτταρα), εκ των οποίων οι CNTFR και WSX-1 θεωρούνται απαραίτητες για την κυτταρική απόκριση [59,60].

Διαφορετική από τις προαναφερθείσες μελέτη, που δεν περιλαμβάνει τη διαμεσολάβηση υποδοχέων, αναφέρει ότι η HN αλληλεπιδρά άμεσα με τα Αβ πεπτίδια, ενώ η HNG φαίνεται να παρεμποδίζει τη δράση των Αβ πεπτιδίων, με επίδραση στον ρυθμό συσσωμάτωσής τους, στην αλλαγή της διαμόρφωσής τους προς σχηματισμό ινιδίων και τελικά αδιάλυτων αμυλοειδών πλακών καθώς και στην αποσταθεροποίηση ήδη διαμορφωμένων αθροισμάτων πεπτιδίου Αβ [61,62].

Τέλος, σύμφωνα με άλλη μελέτη η HN δύναται να δρα νευροπροστατευτικά εμποδίζοντας την συσσωμάτωση των Αβ πεπτιδίων μέσω δέσμευσής τους με τα ιόντα Zn^{2+} , τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αμυλοειδείς πλάκες [63].

Σε ό,τι αφορά ειδικά την CL, η δράση της έχει αποδοθεί σε συνδυασμό των μηχανισμών μέσω των οποίων δρουν τα πεπτίδια από τα οποία προέρχεται, δηλ. το HN-πεπτίδιο AGA-(C8R)-HNG17 και το πεπτίδιο ADNF-9. Για τον μηχανισμό δράσης του AGA-(C8R)-HNG17, ισχύουν οι υποθέσεις που αναφέρθηκαν συνολικά για τα πεπτίδια της οικογένειας της HN.

Ο μηχανισμός δράσης του ADNF-9 δεν έχει διευκρινισθεί έως σήμερα, ούτε έχουν ταυτοποιηθεί υποδοχείς που να σχετίζονται με τη δράση του. Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, η προστατευτική αντι-αποπτωτική δράση του είναι πιθανόν να περιλαμβάνει ενεργοποίηση των παραγόντων NFκB [64], CREB [65], CaMKIV [24], της μεταγραφής του IGF-1 [66] και την αύξηση των επιπέδων της hsp60 [19].

Είναι συνεπώς προφανές, ότι σειρά πιθανών μονοπατιών και υποδοχέων έχει σχετιστεί με την δράση της οικογένειας της HN, χωρίς να υπάρχει συμφωνία και συγκεκριμένη μηχανιστική πρόταση.

1.3.3.2 Προτεινόμενος ενδοκυτταρικός μηχανισμός δράσης

Ο πιθανός ενδοκυτταρικός μηχανισμός έχει συνδεθεί με την καταστολή της κυτταρικής απόπτωσης μέσω δέσμευσης της HN στις προαποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας Bcl-2, Bax, Bid και Bim [67].

Επιπλέον μελέτες δείχνουν τη δέσμευση της HN και σε άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bid και η BimEL (extra long isoform of

Bim). Αναλυτικότερα, η πρόσδεση συνθετικής HN στις Bid και BimEL καταστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση των κασπασών και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο [68,69,70].

Από τις προηγούμενες παραγράφους (1.3.3.1 και 1.3.3.2), συμπεραίνεται ότι παρά τις διάφορες προτεινόμενες θεωρίες ο ακριβής μηχανισμός δράσης της HN και των πεπτιδίων της οικογένειάς της παραμένει αδιευκρίνιστος.

1.4 Σύνθεση πεπτιδίων της οικογένειας της HN

Η ευρεία κυτταροπροστατευτική δράση των πεπτιδίων της οικογένειας της HN καθιστά εξαιρετικά ενδιαφέρουσα την διενέργεια περαιτέρω μελετών γύρω από τα πεπτίδια αυτά. Ωστόσο, η αδυναμία απομόνωσης της HN και άλλων HN-πεπτιδίων από βιολογικά δείγματα καθιστά απαραίτητη την παρασκευή τους με εργαστηριακές μεθόδους, σε ικανές ποσότητες, ώστε οι μελέτες αυτές να είναι υλοποιήσιμες.

Η δυνατότητα χημικής σύνθεσης πεπτιδίων της οικογένειας της HN στο εργαστήριο παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα, ειδικά στο θέμα της παραλαβής μεγάλων ποσοτήτων, ικανών όχι μόνο για βιολογικές μελέτες, αλλά και για μελέτες δομής. Επιπλέον υπάρχει η ευελιξία σχεδιασμού πολλών και διαφορετικών πεπτιδίων, με κορμό τη δομή της HN, καθώς και η δυνατότητα ενσωμάτωσης φυσικών ή μη αμινοξέων, που δεν απαντούν στο μητρικό πεπτίδιο. Για παράδειγμα, η προσθήκη Tyr στην αμινοξική αλληλουχία ενός πεπτιδίου, το καθιστά ικανό να επισημανθεί με ραδιενεργό ιώδιο, επεκτείνοντας με τον τρόπο αυτό το εύρος των δυνατικών πειραματικών εφαρμογών του [71].

Υψηλής συνολικής απόδοσης σύνθεση της HN και άλλων HN-πεπτιδίων, όπως η HNG, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», λίγο καιρό μετά την ανακάλυψη του πεπτιδίου, ακολουθώντας την Fmoc/t-Bu στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση [72]. Για τη σύνθεση της HN χρησιμοποιήθηκε, ως στερεά φάση, εργαστηριακά παρασκευασμένη τριτυλο-ρητίνη (2-Cl-τριτυλο-

αμιδομεθυλο-πολυστευρόλιο) [73] και ακολουθήθηκε, αρχικά, ένα σύνηθες πρωτόκολλο της βιβλιογραφίας.

Ωστόσο, με εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου, η πεπτιδική σύνθεση οδήγησε στη δημιουργία πλήθους παραπροϊόντων, ενώ η συνθετική HN παραλήφθηκε με ιδιαίτερα χαμηλή απόδοση (7%). Πιθανή αιτία των αρχικών πειραματικών αποτελεσμάτων θεωρήθηκε η ατελής σύζευξη των αμινοξέων, ιδιαίτερα στην περιοχή Leu9-Leu12. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, αναπτύχθηκε ένα νέο πρωτόκολλο, το οποίο διέφερε από το αρχικό, κατά κύριο λόγο, στο ακόλουθο σημείο: Μετά από κάθε στάδιο σύζευξης ενός νέου αμινοξέος (στην αλυσίδα που αναπτύσσεται επάνω στη ρητίνη), το στάδιο απομάκρυνσης της Fmoc ομάδας του αμινοξέος αυτού (δηλαδή της N^α-προστατευτικής ομάδας του αμινοξέος, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, παρ. 4.1.1.4) ελέγχεται φασματοφωτομετρικά (301 nm), και όπου χρειάζεται, επιμηκύνεται χρονικά, ώστε να εξασφαλισθεί η πλήρης απομάκρυνση της Fmoc ομάδας (και η αποπροστατευμένη-ελεύθερη, πλέον, N^α-αμινομάδα να είναι διαθέσιμη για τη σύζευξη του επόμενου αμινοξέος). Με την εφαρμογή του νέου πρωτοκόλλου, η HN παραλήφθηκε με πολύ υψηλότερη απόδοση (45%) και σε πολύ υψηλή καθαρότητα.

Το εργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» προχώρησε στη συνέχεια στη σύνθεση CL και συναφών με την CL πεπτιδίων. Η σύνθεση έγινε με την Fmoc/t-Bu στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση, όπως και στην περίπτωση της HN [72], αλλά με χρήση διαφορετικών ρητινών και πρωτοκόλλων. Βέλτιστα αποτελέσματα ελήφθησαν με τη χρήση ρητίνης τύπου Rink amide, που είχε παρασκευασθεί στο εργαστήριο κατά τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται αφενός βελτιστοποιημένη κατανομή των λειτουργικών χημικών ομάδων (αμινομάδων) στα «ενεργοποιημένα» σωματίδια της και, επομένως, εύκολη πρόσβαση των διαλυτών και των αντιδραστηρίων της πεπτιδικής σύνθεσης στα ενεργοποιημένα σωματίδια και, αφετέρου, ώστε να εξασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναπτυσσόμενων πεπτιδικών αλυσίδων [74]. Η χρήση της ρητίνης αυτής οδήγησε σε πολύ καλή συνολική απόδοση ακόμη και όταν κατά την πεπτιδική σύνθεση ακολουθήθηκε ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο, συμβατικό πρωτόκολλο –και

όχι το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της σύνθεσης της HN. Να σημειωθεί ότι η χρήση της ρητίνης τύπου Rink amide οδήγησε στην παραλαβή της CL με τη μορφή του καρβαμιδικού παραγώγου. Η ρητίνη και το πρωτόκολλο που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκαν και στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος.

Πέραν των όσων αναφέρθηκαν, αρκετά άρθρα της βιβλιογραφίας αναφέρονται στην χρήση HN-πεπτιδίων, χωρίς ωστόσο εκτενή περιγραφή των πειραματικών συνθηκών και της συνθετικής πορείας, ούτε ειδική συζήτηση των αποτελεσμάτων της σύνθεσης [32,43,45,69].

1.5 Δομικές μελέτες πεπτιδίων της οικογένειας της HN με NMR και CD

Ο δομικός χαρακτηρισμός των πεπτιδίων της οικογένειας της HN με μελέτες NMR και CD είναι ιδιαίτερης σημασίας, με δεδομένη την άμεση σχέση δομής-δραστικότητας, που έχει ήδη αναφερθεί.

Οι πρώτες σχετικές δημοσιεύσεις προέρχονται από το εργαστήριο των Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και αναφέρονται στη μελέτη της δομής συνθετικής HN και συνθετικής HNG με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD). Βάσει των φασμάτων CD, η HN εμφανίζει σε υδατικό διάλυμα δομή τυχαίου σπειράματος και μικρής έκτασης οργάνωση. Παράλληλα, μελέτες NMR και τρισδιάστατη «μοντελοποίηση» υποδεικνύουν ότι η HN δεν έχει σταθερή δευτεροταγή δομή, αλλά αποτελείται από αλληλομετατρεπόμενες διαμορφώσεις με ευέλικτες στροφές, με τις περιοχές Gly5-Leu9 και Glu15-Leu18 να παρουσιάζονται πιο οργανωμένες [75]. Η δομή αυτή μεταβάλλεται με προσθήκη 30% τριφθοροαιθανόλης (TFE), δηλαδή σε συνθήκες που προσεγγίζουν το λιπόφιλο περιβάλλον των κυτταρικών μεμβρανών, όπου παρατηρείται ελικοειδής διαμόρφωση. Από την άλλη πλευρά, η HNG φαίνεται να υιοθετεί, σε υδατικό περιβάλλον, μια «ευέλικτη» - εύκαμπτη διαμόρφωση με στροφές (turn-like), ικανή να αλληλεπιδρά με πιθανούς υποδοχείς, μέσω των οποίων η HNG είναι πιθανόν να εκδηλώνει τη δράση της. Παράλληλα,

παρουσία 30% TFE το πεπτιδίο τείνει να αποκτήσει δομή α-έλικας, δομή που είναι αναγκαία για μια πιο εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με πιθανό υποδοχέα αλλά και για διέλευση μέσω μεμβρανών [76].

Στο μικτό αυτό περιβάλλον νερού-TFE, η HNG αυτοοργανώνεται σε α-έλικα από το αμινοξύ Phe6 έως την Thr13, σε αντίθεση με το μητρικό πεπτιδίο HN, όπου σε αντίστοιχες συνθήκες η δομή της α-έλικας εκτείνεται σε μεγαλύτερο τμήμα της αλληλουχίας, από την Gly5 έως την Leu18. Και για τα δύο πεπτιδία, ανάλυση NMR σε υδατικό περιβάλλον υποδεικνύει την ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Phe6 και Leu9-Leu10, ένα δομικό χαρακτηριστικό που είναι γνωστό ότι ενισχύει και σταθεροποιεί δομές έλικας.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η αυξημένη νευροπροστατευτική δράση της HNG σε σχέση με τη μητρική HN, είναι δυνατόν να συσχετισθεί δομικά με την αντικατάσταση της Ser14 από Gly, η οποία προσδίδει ευκαμψία στο μόριο, διευκολύνοντας τις πιθανές αλληλεπιδράσεις του με ομάδες-στόχους. Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με εφαρμογή τρισδιάστατης μοντελοποίησης, αντικατάσταση αμινοξέων της μητρικής HN από Ala οδηγεί σε μια πιο «συμπαγή» ελικοειδή διαμόρφωση του πεπτιδίου, δομή που περιορίζει αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια-πιθανούς υποδοχείς. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την ελαττωμένη ικανότητα νευροπροστασίας που παρουσιάζουν τα ανωτέρω πεπτιδία, σε σχέση με τη μητρική HN [75].

Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της HNG και του πεπτιδίου AGA-(C8R)HNG17 (Πίνακας 1) πραγματοποιήθηκε με πειράματα CD και από άλλες ομάδες. Βάσει των σχετικών δημοσιεύσεων, η δομή της HNG σε υδατικό περιβάλλον είναι δομή τυχαίου σπειράματος. Η δομή αυτή παραμένει σταθερή σε εύρος συγκεντρώσεων 0,1 - 1 mg/ml, ανεξάρτητα από την μελετώμενη συγκέντρωση. Αντίθετα, η δευτεροταγής δομή του πεπτιδίου μεταβάλλεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), με μετατόπιση του ελαχίστου προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (στα 216 nm), γεγονός που καταδεικνύει τάση για συσσωμάτωση [77]. Παρόμοιες αλλαγές στα φάσματα με αύξηση του αρνητικού σήματος στα 216 nm παρατηρούνται τόσο με αύξηση της θερμοκρασίας όσο και της συγκέντρωσης. Το πεπτιδίο AGA-(C8R)HNG17 αποκτά οργάνωση β-φύλλου σε υδατικό διάλυμα με ταυτόσημα φάσματα, σε εύρος

συγκεντρώσεων 0,1-2 mg/ml. Παρόμοια συμπεριφορά του πεπτιδίου εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της 0,5 mg/ml σε διάλυμα PBS, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το πεπτίδιο αναφέρεται να έχει δομή τυχαίου σπειράματος.

Σε ό,τι αφορά ειδικά την CL, δομικές μελέτες με CD τόσο σε νερό όσο και σε PBS και σε συγκεντρώσεις 0,1-0,5 mg/ml έδειξαν ότι το πεπτίδιο υιοθετεί δομή τυχαίου σπειράματος. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η δομή καθορίζεται από την παρουσία του ADNF-9, που έχει επίσης δομή τυχαίου σπειράματος ενώ το δεύτερο συστατικό του AGA-(C8R)HNG17 δείχνει στην ίδια συγκέντρωση τάσεις συσσωμάτωσης σε δομές β-φύλλου [23].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

2.1 Γενικά στοιχεία

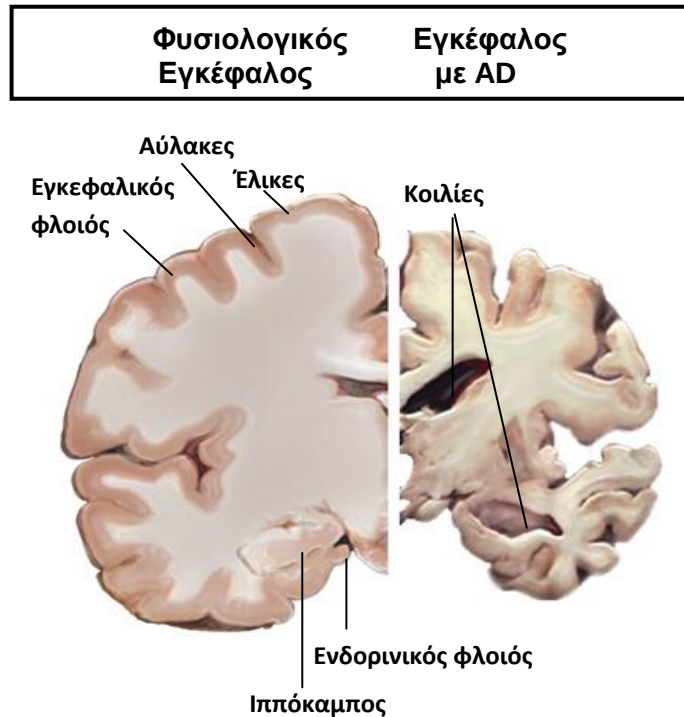
Η νόσος Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) αποτελεί μια προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου, που χαρακτηρίζεται από έκπτωση των νοητικών ικανοτήτων και της καθημερινής λειτουργικότητας. Η AD αποτελεί την πιο κοινή αιτία άνοιας μεταξύ των ανθρώπων ηλικίας 65 ετών και άνω και την τέταρτη αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες μετά τις καρδιακές παθήσεις, τον καρκίνο και τα εγκεφαλικά επεισόδια. Το 2006 οι ασθενείς στην Ευρώπη ξεπερνούσαν τα 7.000.000 και σε όλο τον κόσμο τα 26.000.000 [78]. Έως το 2050 εκτιμάται ότι ο αριθμός των ασθενών παγκοσμίως θα ανέλθει στα 106.000.000 και η συχνότητα εμφάνισης AD σε άνδρες και γυναίκες θα είναι 1/6 και 1/4, αντίστοιχα [79,80].

Η AD θεωρείται μια πολυπαραγοντική ασθένεια που προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Υπάρχουν δύο κύριες μορφές της AD: η γενετική ή κληρονομική και η σποραδική, που αφορούν το 5% και το 95% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Όσον αφορά την κληρονομική μορφή, έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρόδρομη αμυλοειδή πρωτεΐνη (APP) προκαλούν την ασθένεια σε ηλικίες μεταξύ 30 και 60 ετών. Επιπλέον, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες πρεσινιλίνη 1 (PS1) και πρεσινιλίνη 2 (PS2), μέρος του συμπλόκου της γ-εκκριτάσης, προκαλούν τη νόσο σε ηλικίες μικρότερες των 50 ετών. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι μεταλλάξεις προκαλούν την AD δεν είναι γνωστός. Ένας γενετικός παράγοντας που αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για την ανάπτυξη της AD είναι η κληροδότηση του αλληλομόρφου E4 του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E. Το γονίδιο αυτό υπάρχει σε τρεις μορφές (E2, E3 και E4) και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της χοληστερόλης στους νευρώνες [81,82]. Οι αμυλοειδείς πλάκες εμφανίζονται επίσης και στους ασθενείς με σύνδρομο Down κατά την τέταρτη και πέμπτη δεκαετία της ζωής τους, επειδή παρατηρείται ένα

επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος 21, δηλαδή ένα επιπλέον αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόδρομη αμυλοειδή πρωτεΐνη (APP). Όσον αφορά τη σποραδική μορφή, επιδημιολογικές αλλά και νευροπαθολογικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι διάφοροι παράγοντες όπως η οξειδωτική βλάβη, η φλεγμονή, ορμονικές μεταβολές (εμμηνόπαυση), τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, η αθηροσκλήρωση, η υψηλή πίεση και το εγκεφαλικό τραύμα σε συνδυασμό με άγνωστους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου.

Η AD ξεκινά βαθιά στην περιοχή του ενδορινικού φλοιού του εγκεφάλου. Καθώς η νόσος εξελίσσεται οι υγιείς νευρώνες του ενδορινικού φλοιού αρχίζουν να δυσλειτουργούν, χάνουν την ικανότητα να επικοινωνούν μεταξύ τους και τελικά πεθαίνουν. Η πορεία αυτή στη συνέχεια απλώνεται στον γειτονικό ιππόκαμπο (Εικόνα 1), που παίζει σημαντικό ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη και σταδιακά σε όλες τις προσβαλλόμενες από τη νόσο περιοχές του εγκεφάλου [83].

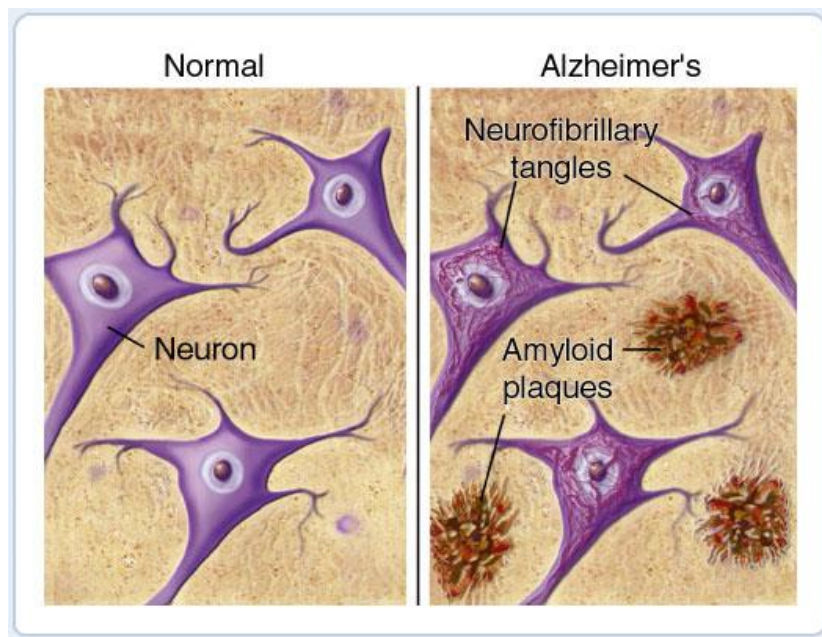
Η εκτεταμένη απώλεια των νευρώνων οδηγεί σε ατροφία του εγκεφάλου, η οποία εκδηλώνεται με τη συρρίκνωση και την απώλεια σημαντικού μέρους της μάζας του. Στην αξονική και τη μαγνητική τομογραφία η ατροφία αναγνωρίζεται από τη σμίκρυνση των ελίκων, τη διεύρυνση των αυλάκων και τη διάταση των κοιλιών του εγκεφάλου .



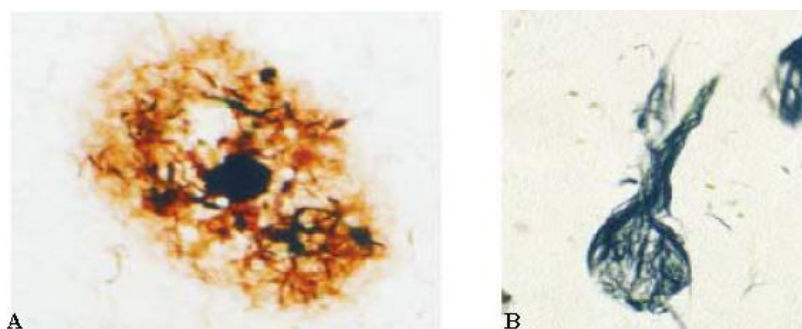
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της διατομής, φυσιολογικού (αριστερά) και με AD (δεξιά) εγκεφάλου [τροποποιημένο από Braak]. Η απώλεια της μνήμης και των γνωστικών λειτουργιών οφείλεται στην απώλεια νευρώνων που εμφανίζεται ως ατροφία του εγκεφάλου.

Στα παθολογοανατομικά ευρήματα της AD συμπεριλαμβάνονται η ταυτόχρονη παρουσία στον εγκέφαλο των νευροϊνιδιακών δεματίων και των αμυλοειδών (νευριτικών) πλακών [84]. Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια αποτελούν ενδοκυττάρειες εναποθέσεις ζευγών ελικοειδών ινιδίων, αποτελούμενων κυρίως από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη τ au. Η ύπαρξή τους σε νευρώνες έχει συνδεθεί με τον εκφυλισμό τους. Όσον αφορά τις αμυλοειδείς πλάκες, πρόκειται για εξωκυττάρειες αδιάλυτες εναποθέσεις μίγματος συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και συσσωρευμένου πεπτιδίου A β σε μορφή πολυμερούς. Η διάμετρος των πλακών κυμαίνεται από 50 έως 100 μ m, η πυκνότητα και η περιεκτικότητά τους σε A β ποικίλλει ενώ ο σχηματισμός τους είναι προοδευτικός και μπορεί να διαρκέσει από μερικούς μήνες έως χρόνια [85]. Σύμφωνα με την υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς (Amyloid Cascade Hypothesis), διάφοροι παράγοντες ή μεταλλαγμένα προϊόντα γονιδίων αυξάνουν την παραγωγή του A β , το οποίο συσσωματώνεται, καθιζάνει και δημιουργεί τις αμυλοειδείς πλάκες.

Οι πλάκες αυτές είναι νευροτοξικές και καταλήγουν σε θάνατο των νευρικών κυττάρων [86]



Εικόνα 2: Κύρια νευροπαθολογικά ευρήματα της AD: οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια, τα οποία εντοπίζονται μεταξύ και εντός των νευρώνων, αντίστοιχα. Σύγκριση νευρώνων εγκεφάλου ασθενούς με φυσιολογικούς νευρώνες [<http://columbiasciencereview.com/2015/04/18/a-promising-cure-for-alzheimers-disease/>].

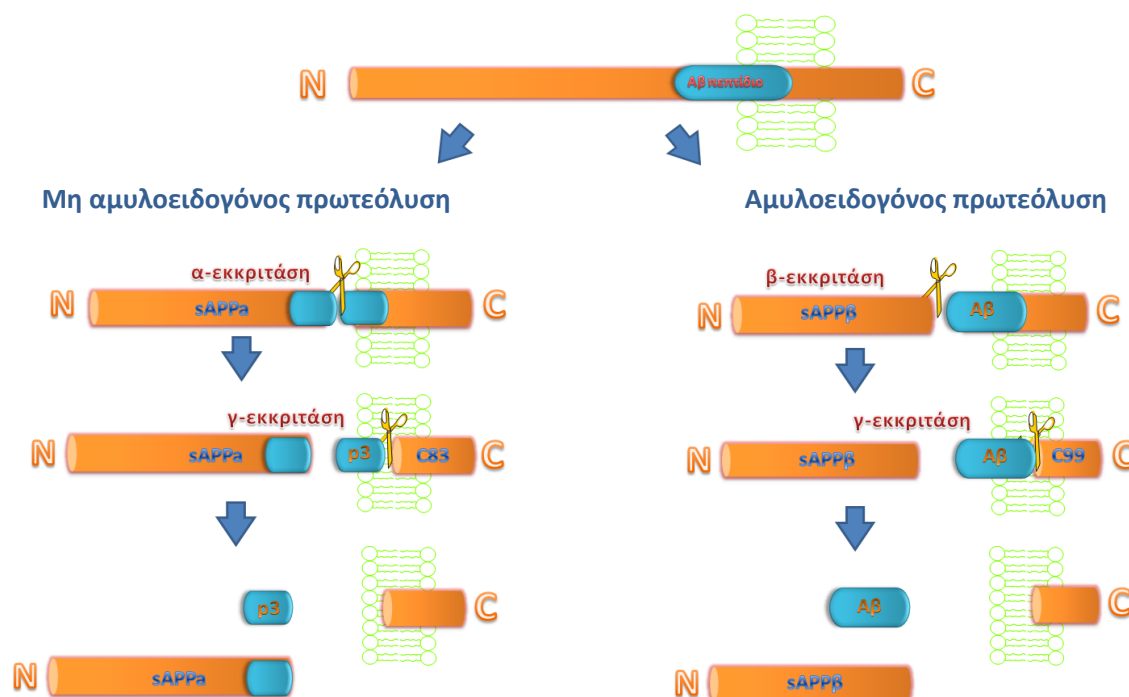


Εικόνα 3: Τα μικροσκοπικά νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της AD: Α. Οι αμυλοειδείς πλάκες, Β. Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια [84].

2.2 Πεπτίδιο Αβ

2.2.1 Προέλευση Αβ – Αποικοδόμηση APP

Το πεπτίδιο Αβ είναι ένα πεπτίδιο 39-42 αμινοξέων κι αποτελεί το προϊόν ενζυμικής διάσπασης της πρόδρομης αμυλοειδούς πρωτεΐνης (Amyloid Precursor Protein, APP), η οποία είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη [87,88].



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση των πρωτεολυτικών μονοπατιών της APP και των μεταβολικών παραγώγων της. Η πρωτεόλυση της APP από α- ή β- εκκριτάσες οδηγεί στην παραγωγή των διαλυτών αμινοτελικών θραυσμάτων sAPPα και sAPPβ και των μεμβρανοσύνδετων τμημάτων C83 και C99, αντίστοιχα. Τα δύο τελευταία υφίστανται περαιτέρω τη δράση της γ-εκκριτάσης, που οδηγεί στην απελευθέρωση του πεπτιδίου p3 και του Αβ, αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα και βάσει του Σχήματος 1, το πεπτίδιο Αβ προκύπτει κατά την πρωτεόλυση της APP με την διαδοχική δράση των ενζύμων β- και γ-εκκριτασών, κατά το αμυλοειδογόνο μονοπάτι [89,90].

Οι δύο κύριες μορφές του εκκρινόμενου πεπτιδίου Αβ είναι το Αβ(1-40) και το Αβ(1-42). Το 90% του συνολικά εκκρινόμενου πεπτιδίου αποτελείται από το Αβ(1-40) [91] ενώ το υπόλοιπο 10% αποτελείται από το Αβ(1-42), το

οποίο ωστόσο αποτελεί το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών [92]. Οι νευρώνες αποτελούν την κύρια πηγή του εκκρινόμενου Αβ στον εγκέφαλο [93] το οποίο μπορεί παράλληλα να εντοπιστεί και στον ενδοκυττάριο χώρο [94].

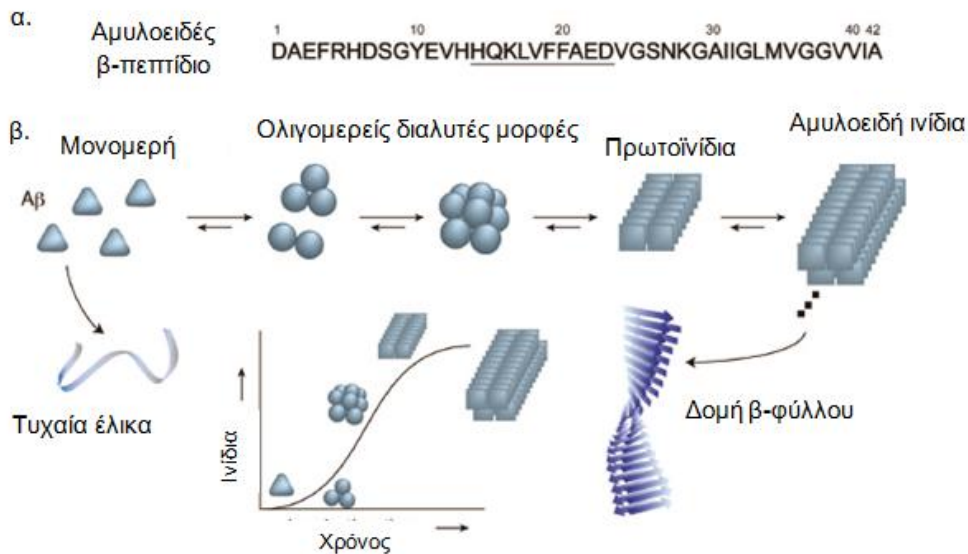
Το πεπτιδίο Αβ είναι γνωστό ότι παράγεται σε φυσιολογικές συνθήκες στον εγκέφαλο. Η συγκέντρωσή του στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι της τάξης των 3-8 nM [95], ενώ στο πλάσμα είναι της τάξης των 500 pM [96]. Καθώς η παραγωγή του είναι συνεχής, η αύξηση της συγκέντρωσής του μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό του και τον επακόλουθο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων και πλακών. Η αυξημένη συγκέντρωση του πεπτιδίου μπορεί να οφείλεται είτε στην υπερπαραγωγή του, κατά τον μεταβολισμό της APP, ή στην μείωση του ρυθμού απομάκρυνσής του από τον εγκέφαλο. Η πρώτη περίπτωση πιθανόν να σχετίζεται, με την εμφάνιση κυρίως των οικογενών μορφών AD καθώς οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις των γονιδίων των ενζύμων που μεταβολίζουν την APP αλλά και σε μεταλλάξεις του γονιδίου της APP. Η δεύτερη περίπτωση πιθανόν σχετίζεται με την εμφάνιση των σποραδικών μορφών της ασθένειας, χωρίς να έχει διευκρινιστεί η αιτία και ο μηχανισμός εμφάνισης των μορφών αυτών.

2.2.2 Πολυμερισμός και συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην AD το μόριο του Αβ συναθροίζεται μέσω διασύνδεσης πολυμερισμένων μορφών του σε ολιγομερείς μορφές, ινίδια και τελικά σε αμυλοειδείς πλάκες που θεωρούνται τοξικές [97]. Παρά τις διάφορες προτεινόμενες θεωρίες περί της έναρξης και των αιτιών της παρατηρούμενης νευροεκφύλισης, τόσο με τη θεωρία του καταρράκτη αμυλοειδούς όσο και με τη θεωρία των ολιγομερών, η παθογένεια της νόσου έχει συσχετισθεί με τη συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ. Οι αλυσίδες του Αβ πεπτιδίου συνενώνονται μέσω δεσμών υδρογόνου και σχηματίζουν β-αντιπαράλληλο πτυχωτό φύλλο. Ο άξονας του ινιδίου είναι κάθετος προς την κατεύθυνση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και παράλληλος προς τους δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι τις ενώνουν. Γειτονικά β-πτυχωτά φύλλα συνδέονται μεταξύ τους με ιοντικές ή/και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλαγίων ομάδων -R των αμινοξέων.

Αναλυτικότερα, ο σχηματισμός των αμυλοειδών ινιδίων είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε διαδοχικά στάδια (σχήμα 2) [98,99]. Αρχική φάση είναι η δημιουργία πενταμερών – εξαμερών ολιγομερών που στη συνέχεια διασυνδέονται και σχηματίζουν μεγαλύτερα ολιγομερή και πρωτοϊνίδια. Τα πρωτοϊνίδια είναι ελαστικά μικροϊνίδια διαμέτρου ~ 30 Å [100,101,102]. Για τη δημιουργία τους απαιτείται μικρός αριθμός μορίων πεπτιδίου Αβ (~ 20 μόρια), τα οποία συμπλέκονται έτσι, ώστε να σχηματίζουν μια δομή αποτελούμενη από τέσσερα στρώματα β-πτυχωτής επιφάνειας [103]. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την επιμήκυνση των πρωτοϊνιδίων η οποία πραγματοποιείται με συγχώνευση των παραπάνω πρωτοϊνιδίων, ενώ στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται ο σχηματισμός των αμυλοειδών ινιδίων. Τα συγκεκριμένα ινίδια δημιουργούνται από την συσσώρευση πέντε ή έξι πρωτοϊνιδίων διαμέτρου ~ 25 - 30 Å τα οποία περιελίσσονται γύρω από τον ινιδιακό άξονα. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την επιμήκυνση των αμυλοειδών ινιδίων [104,105,106].

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι αν τα ολιγομερή του Αβ αποτελούν υποχρεωτικό ενδιάμεσο στη διαδικασία σχηματισμού ινιδίων ή αν αντιπροσωπεύουν ένα εναλλακτικό μονοπάτι που πιθανόν μπορεί να οδηγεί στη δημιουργία ινιδίων αλλά όχι αναγκαστικά. Πρόσφατες μελέτες βασιζόμενες σε αναστολείς πολυμερισμού και συσσωμάτωσης του πεπτιδίου υποδεικνύουν ότι οι δύο διαδικασίες είναι διακριτές και ανεξάρτητες μεταξύ τους, δεδομένου ότι κάποιοι εκ των εξεταζόμενων παραγόντων ανέστειλαν μόνο τη μία διαδικασία ενώ υπήρχαν και άλλοι που σταθεροποιούσαν διαμορφώσεις του πεπτιδίου που δεν ευνοούσαν τη συσσωμάτωση. Οι τελευταίοι επιτύγχαναν συγχρόνως αναστολή τόσο του ολιγομερισμού όσο και της ινιδιοποίησης του Αβ [107,108,109].



Σχήμα 2: (α) Η αμινοξική αλληλουχία των πεπτιδίων Αβ(1-40) και Αβ(1-42), (β) Στάδια πολυμερισμού του πεπτιδίου Αβ και μετάπτωση από τυχαίες ελικοειδείς διαμορφώσεις σε δομές με β-διαμόρφωση [110].

Σε κάθε περίπτωση, ο ολιγομερισμός του Αβ και η δημιουργία των πρωτοϊνιδίων αποτελεί ουσιώδη ανακατάταξη διαμόρφωσης, κατά την οποία ακανόνιστες μορφές μετατρέπονται σε δομές β-φύλλων.

Το β-αμυλοειδές πεπτιδίο φαίνεται να υιοθετεί συνδυασμό δομών τυχαίου σπειράματος, α-έλικας και β-φύλλου ανάλογα με τη φύση του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται. Τα υδρόφοβα αμινοξέα εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου Αβ(1-42) και είναι εκείνα τα οποία εμπλέκονται στα αρχικά στάδια αναδίπλωσής του. Αντίθετα, για τα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου ο σχηματισμός β-δομής εξαρτάται περισσότερο από το pH του περιβάλλοντος χώρου [111].

Το μονομερές πεπτιδίο Αβ όταν διαλυθεί σε οργανικούς διαλύτες (μη πολικό περιβάλλον) έχει διαμόρφωση α-έλικας (μονομερές) [112,113,114] ενώ σε υδατικό διάλυμα (πολικό περιβάλλον) η κύρια δομή που αποκτά είναι της β-πτυχωτής επιφάνειας [115,116,117]. Σε διαλύτες που μιμούνται το μεμβρανικό περιβάλλον εντοπίζεται δομή α-έλικας μεταξύ των αμινοξέων 10-24 και 28-42 [118] ενώ κατά την διάρκεια της αμυλοειδογένεσης η διαμόρφωση του πεπτιδίου μεταπίπτει από την δομή της α-έλικας σε β-φύλλου [114,118]. Οι περιοχές του πεπτιδίου που εμπλέκονται περισσότερο σε αυτή την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής του

εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο και συγκεκριμένα στο υδρόφοβο αμινοξικό τμήμα 13-20. Αντικατάσταση μάλιστα των υδρόφοβων αμινοξέων στα σημεία 17-20 της αμινοξικής αλληλουχίας από περισσότερο υδρόφιλα αμινοξέα μειώνουν την αμυλοειδογένεια του Αβ κι ελαττώνουν το ποσοστό των β-φύλλων, επιβεβαιώνοντας την πρόταση ότι ένας υδρόφοβος κορμός είναι απαραίτητος για την έναρξη πολυμερισμού του πεπτιδίου (κατά το nucleation dependent polymerization process). [119].

In vitro μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το μονομερές Αβ συσσωματώνεται σε αμυλοειδή ινίδια, μέσω μιας διαδικασίας, η οποία μπορεί να επιταχυνθεί δραματικά παρουσία πυρήνων συσσωμάτωσης, που αποτελούν το καθοριστικό βήμα για την κινητική της αντίδρασης [120]. Η κεντρική υδρόφοβη αμινοξική αλληλουχία Leu-Val-Phe-Phe, γύρω από τα κατάλοιπα 16-20 του Αβ, αποτελεί την αλληλουχία-κλειδί για τον ομοπολυμερισμό του πεπτιδίου σε αμυλοειδή ινίδια [110]. Παράλληλα, πειραματικά δεδομένα συμφωνούν στο ότι το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου είναι σημαντικό για την συσσωμάτωση και την καταβύθισή του τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Η κινητική του σχηματισμού των ινιδίων έχει μελετηθεί με τεχνικές μικροσκοπίας αλλά και διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους, όπως με σκέδαση φωτός ή κυκλικό διχρωισμό [121]. Έτσι, έχειδειχθεί ότι ο πολυμερισμός και η κατακρήμνιση του πεπτιδίου είναι μια διαδικασία η οποία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, η συγκέντρωση, η θερμοκρασία αλλά και η παρουσία άλλων ενώσεων ή ιόντων, όπως φωφολιπιδίων ή πρωτεογλυκανών [122,123]. Στον εγκέφαλο ασθενών, μάλιστα, τα αμυλοειδή ινίδια ευρίσκονται συνδεδεμένα με διάφορους παράγοντες όπως απολιποπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, μικρογλοιακά κύτταρα κλπ, οι οποίοι και χαρακτηρίζουν την καλούμενη “ώριμη” αμυλοειδή πλάκα. Σημαντικό ρόλο στην κατακρήμνιση του πεπτιδίου Αβ έχουν επίσης τα μεταλλικά ιόντα (Cu, Zn, Fe, Al), που μπορούν να προκαλέσουν τον ολιγομερισμό ή να επιταχύνουν τη διαδικασία πολυμερισμού του πεπτιδίου ακόμη και σε ιχνοποσότητες [124]. Άλλωστε το Αβ(1-42) το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό των αμυλοειδών

πλακών, κατακρημνίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από το Αβ(1-40) και εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια για μεταλλικά ιόντα [125].

Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρονται στην επίδραση της θερμοκρασίας στον σχηματισμό ινιδίων του αμυλοειδούς πεπτιδίου [126,127]. Δημοσίευση της ομάδας των Sabate και συνεργατών αναφέρεται συγκεκριμένα στην επίδραση της θερμοκρασίας στο πρώτο στάδιο της δημιουργίας του «πυρήνα» - απαρχή της διαδικασίας συσσωμάτωσης του Αβ και την αύξηση του ρυθμού πολυμερισμού με την αύξηση της θερμοκρασίας [126].

Τέλος, έχουν μελετηθεί οι επαγόμενες από το pH μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές στις συσσωματωμένες μορφές του πεπτιδίου Αβ. Με δεδομένο ότι το pI του Αβ υπολογίζεται στο 5,5, η ταχεία συσσωμάτωσή του πραγματοποιείται σε pH που κυμαίνεται στο 5-6, τιμή που θεωρείται ιδανική για την έναρξη σχηματισμού ινιδίων. Συγκριτική μελέτη της πορείας συσσωμάτωσης και της φύσης των συναθροίσεων σε pH 5,8 και 7,4 έδειξε την διαφορά στην εξέλιξη του πολυμερισμού στη χαμηλότερη τιμή pH, παρατήρηση που συνάδει με την υπόθεση περί έναρξης της δημιουργίας ινιδιακών διαμορφώσεων του πεπτιδίου σε οργανίδια με όξινο pH, όπως τα λυσοσώματα [128,129].

2.2.3 Νευροτοξική δράση του Αβ

Η ικανότητα του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου να συσσωματώνεται σε αδιάλυτα ινίδια θεωρείται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επίδειξη νευροτοξικότητας δηλαδή στην παθολογική ανάπτυξη και τον πρόωρο θάνατο των νευρικών κυττάρων που χαρακτηρίζουν την νόσο. Η σχέση συσσωμάτωσης-κυτταροτοξικότητας έχει δειχθεί και μελετηθεί σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων *in vitro* τόσο για το πεπτίδιο Αβ όσο και για διάφορα συνθετικά τμήματά του [130].

Το πεπτίδιο Αβ έχει νευροτοξική δράση στους νευρώνες καθώς ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στον εκφυλισμό τους. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί ένας μεγάλος αριθμός μηχανισμών μεταγωγής σήματος αποπτωτικού θανάτου και κυτταρικής νέκρωσης που επάγονται από το αμυλοειδές πεπτίδιο [131].

Η παρουσία πολυμερισμένου πεπτιδίου Αβ έχει βρεθεί ότι διαταράσσει την ομοιόσταση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του Ca^{2+} προκαλώντας σημαντική αύξηση αυτών [132,133]. Η αυξημένη ενδοκυτταρική συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} επηρεάζει αφενός μεν την κυτταρική επιβίωση, επάγοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε απόπτωση [134], αφετέρου δε την συναπτική πλαστικότητα όπως υπέδειξαν πειράματα μέτρησης της ενίσχυσης μακράς διάρκειας [135], η οποία αποτελεί την πιθανή κυτταρική βάση της μάθησης και της αποθήκευσης της μνήμης.

Επιπλέον, η συσσώρευση του πεπτιδίου Αβ υπό την μορφή αδιάλυτων σχηματισμών στον εγκέφαλο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων ως μακροφάγων [136]. Η συσσώρευση των παραπάνω κυττάρων στην περιφέρεια των αμυλοειδών πλακών, καθώς και η συνεχής ενεργοποίησή τους, δεδομένου ότι αποτυγχάνουν να αποικοδομήσουν τις αμυλοειδείς πλάκες, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία χρόνιων τοπικών φλεγμονών, που χαρακτηρίζουν την νόσο, ενισχύοντας την νευροτοξική δράση των αμυλοειδών πλακών [137,138].

Τέλος, το πολυμερισμένο πεπτίδιο Αβ επάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (ROS) προκαλώντας στα κύτταρα οξειδωτικό στρες [139,140], συνέπεια του οποίου είναι γενικότερα η οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων των μεμβρανών και η οξείδωση των πρωτεϊνών [141]. Επίσης το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το πεπτίδιο Αβ μέσω των ελευθέρων ριζών προκαλεί αλλοιώσεις στην φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων [142,143]. Έχει βρεθεί, ότι το πεπτίδιο Αβ αλλοιώνει ή και αναστέλλει τη δραστηριότητα ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των νευρικών κυττάρων όπως η οξειδάση του κυτοχρώματος c, η πυροσταφυλική και η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση [144,145]. Ο ατελής ενεργειακός μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια οδηγεί στην επιπλέον παραγωγή ελευθέρων ριζών [146].

Για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, επικρατούσε η άποψη ότι το πεπτίδιο Αβ έπρεπε να συναθροιστεί σε εξωκυττάρια αμυλοειδή ινίδια για να εκδηλώσει την κυτταροτοξική δράση του. Την τελευταία όμως δεκαετία, δεδομένα προερχόμενα από τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων, κυτταρικών

καλλιέργειών, διαγονιδιακών ποντικών και μελέτες ανθρώπινου εγκεφάλου προτείνουν ότι προϊνιδιακά διαλυτά συσσωματώματα του Αβ είναι επίσης νευροτοξικά [147].

Τα διαλυτά ολιγομερή έχουν εμπλακεί και σε άλλες αμυλοειδο-σχετιζόμενες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η PD ή η HD, υποδεικνύοντας ότι τα ολιγομερή που σχηματίζονται στα αρχικά στάδια της διαδικασίας συσσωμάτωσης μπορεί να αποτελούν κοινό μεσολαβητή στα πρώιμα συμπτώματα των νόσων αυτών [148].

Διαλυτά ολιγομερή τόσο του Αβ(1-40) όσο και του Αβ(1-42) εμφάνισαν τοξικότητα σε νευρικά κύτταρα, ενώ ο σχηματισμός ινιδίων των πεπτιδίων Αβ παρουσίασε χαμηλότερη τοξικότητα. Το Αβ*56, διαλυτό αμυλοειδές πολυμερές μοριακού βάρους ~56 kDa, απομονωμένο από εγκέφαλο σε διαγονιδιακούς ποντικούς, διαταράσσει τις σχετιζόμενες με μνήμη λειτουργίες του ΚΝΣ όταν χορηγείται σε νεαρούς αρουραίους [149]. Επιπλέον, αλλοιώσεις τόσο στη μορφολογία όσο και στη συμπεριφορά που παρατηρήθηκαν σε διάφορα είδη APP διαγονιδιακών ποντικών και οι οποίες είχαν προηγηθεί της παρουσίας των ινιδιακών μορφών, συνηγορούν στο ότι τα διαλυτά μονομερή ή ολιγομερή Αβ μπορεί να διαμεσολαβούν στη βλάβη των νευρικών κυττάρων που παρατηρήθηκε σε αυτά τα ζώα. Έτσι, ποντικοί που υπερεκφράζουν ανθρώπινη APP αγρίου τύπου υφίστανται πρώιμη και ηλικιοεξαρτώμενη απώλεια των προσυναπτικών απολήξεων χωρίς να παρατηρούνται ανοσοϊστοχημικά ανιχνεύσιμες εναποθέσεις Αβ, υποδεικνύοντας ότι τα διαλυτά ολιγομερή είναι ικανά να προκαλέσουν τον κυτταρικό θάνατο νευραξόνων [150].

Ακόμα, σε μερικούς διαγονιδιακούς ποντικούς, ο εμβολιασμός εναντίον του πεπτιδίου Αβ απέτρεψε την ηλικιοεξαρτώμενη απώλεια μνήμης – χαρακτηριστική των ζώων – ενώ ελαττώθηκε ελάχιστα το “φορτίο” των αμυλοειδών πλακών (amyloid plaque burden). Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της βελτίωσης μνήμης και του φορτίου αμυλοειδούς πλάκας υποδεικνύει ότι τα παραγόμενα από τον εμβολιασμό αντισώματα εξουδετέρωσαν εξωκυττάρια ολιγομερή υπεύθυνα για την απώλεια μνήμης σ’ αυτούς τους ποντικούς, ενώ ο αριθμός των πολυμερών ινιδίων-πλακών παραμένει αναλλοίωτος [151].

Τέλος, στην περίπτωση του ανθρώπινου εγκεφάλου, έχει σημειωθεί ότι ο αριθμός των αμυλοειδών πλακών δεν συσχετίζεται με το μέγεθος της άνοιας. Σε αντίθεση, έχει παρατηρηθεί ισχυρή διασύνδεση μεταξύ επιπέδων διαλυτού Αβ και της έκτασης απώλειας συνάψεων καθώς και της έντασης γνωστικών δυσλειτουργιών [152,153,154].

Είναι επομένως προφανές ότι παρά την σύνδεση του Αβ με τις εκδηλώσεις της AD, η ακριβής σχέση μεταξύ του βαθμού πολυμερισμού του πεπτιδίου και της εξέλιξης της νόσου παραμένουν αδιευκρίνιστα.

2.3 Θεραπευτική «στόχευση» του πεπτιδίου Αβ

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται σε ασθενείς με AD ανακόπτουν την εξέλιξη των συμπτωμάτων της νόσου αλλά δεν θεραπεύουν. Τα εγκεκριμένα από τον FDA (Food and Drug Administration) φάρμακα που χορηγούνται σήμερα είναι αναστολείς της χολινεστεράσης [Razadyne (γαλανθαμίνη), Exelon (ριβαστιγμίνη), Aricept (ντονεπεζίλη) και Cognex (τακρίνη)] (με σκοπό την διευκόλυνση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης και την επιβράδυνση της αποικοδόμησης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνης), ή ανταγωνιστές των γλουταμινεργικών NMDA υποδοχέων [Namenda® (μεμαντίνη)] (για την προστασία των νευρώνων από τη νευροτοξικότητα του γλουταμινικού) [155,156]. Από τις μέχρι σήμερα μελέτες φαίνεται ότι τα ανωτέρω φάρμακα βελτιώνουν τις νοητικές λειτουργίες, τις διαταραχές συμπεριφοράς και τις δραστηριότητες στην καθημερινή ζωή των ασθενών με AD. Ωστόσο αποτελούν συμπτωματική θεραπεία της ήπιας έως μετρίως σοβαρής AD και δεν αντιμετωπίζουν το αίτιο της νόσου. Για τους λόγους αυτούς, ενισχύεται η προσπάθεια ανίχνευσης της νόσου σε πρώιμα στάδια και παράλληλα εξελίσσεται διαρκώς η έρευνα στον τομέα της αποτελεσματικής θεραπείας της.

Με δεδομένα την εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη, τη φλεγμονή και τις μιτοχονδριακές διαταραχές που χαρακτηρίζουν την AD, πολλές προσπάθειες στοχεύουν στην συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου με αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ενώσεις, που συνεισφέρουν στην αποτροπή της βαθμιαίας αύξησης των ROS και στην προστασία των

ζώντων οργανισμών εναντίον του οξειδωτικού στρες [157,158]. Παράλληλα, πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι αποτελούν μόρια που συμμετέχουν στην συσσωμάτωση και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, κυρίου συστατικού των νευροϊνιδιακών δεματίων [159].

Δεδομένης όμως της σημασίας του Αβ στην παθογένεση και εξέλιξη της AD, το επιστημονικό ενδιαφέρον στρέφεται στα ολιγομερή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, που φαίνεται να διαταράσσουν τη λειτουργία των εγκεφαλικών συνάψεων και να πυροδοτούν σταδιακά τη νευροεκφυλιστική διεργασία. Η διατήρηση των επιπέδων του Αβ σε συγκεντρώσεις μικρότερες αυτών που απαιτούνται για ολιγομερισμό και η αποτροπή σχηματισμού των τοξικών συναθροίσεων είναι ιδιαίτερα ελκυστική ως θεραπευτική προσέγγιση.

Η “ανάπτυξη” εξειδικευμένων αναστολέων της β- και γ-εκκριτάσης (ενζύμων που συμμετέχουν στην αμυλοειδογενή πρωτεόλυση της APP) που θα μπορούσαν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μειώσουν την παραγωγή του Αβ αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Ωστόσο, μια κλινική μελέτη αναστολέα της γ-εκκριτάσης φάσης III διεκόπη λόγω των παρενεργειών που περιελάμβαναν ακόμα και επιδείνωση των γνωστικών διαταραχών [160]. Εναλλακτικά, ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι θεωρούνται ενισχυτές της δράσης των α-εκκριτασών, άρα και του μη αμυλοειδογόνου μονοπατιού πρωτεόλυσης της APP [161,162].

Σε αρχικό στάδιο βρίσκονται ακόμα προσπάθειες “ανάπτυξης” μικρών μορίων που θα μπορούσαν να αυξάνουν την έκκριση ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό του Αβ όπως οι ζελατινάσες, NEP, IDE ή Cathepsin B [163]. Η χρήση αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου Αβ, τα οποία αναγνωρίζουν τοξικά ολιγομερή και έχουν την ικανότητα πρόσδεσης και εξουδετέρωσης των νευροτοξικών ολιγομερών του πεπτιδίου, μπορεί να αποτρέψει την κυτταροτοξικότητα. Η παρατήρηση όμως παρενεργειών οδήγησε σε διακοπή των κλινικών εφαρμογών αυτών των αντισωμάτων [164,165,166]. Αισιοδοξία γεννούν πρόσφατα αποτελέσματα δύο κλινικών μελετών φαρμακευτικού σκευάσματος, το οποίο φαίνεται να επιτίθεται εναντίον των αμυλοειδών πεπτιδίων και να επιβραδύνει συνεπώς τον σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών και την εξέλιξη της νόσου.

Σημαντικά θεωρούνται επίσης μικρά μόρια, με ικανότητα πρόσδεσης και σταθεροποίησης του μονομερούς πεπτιδίου Αβ, αποτρέποντας τον ολιγομερισμό και διευκολύνοντας τη φυσική απομάκρυνση του μονομερούς με το μηχανισμό αποικοδόμησής του στον εγκέφαλο [167].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ

Η κολιβελίνη (CL, SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDL^P) είναι ένα υβριδικό πεπτιδίο 26 αμινοξέων και το δραστικότερο παράγωγο της οικογένειας της HN.

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η ανάπτυξη ειδικών επισημασμένων παραγώγων της CL και η επακόλουθη αξιοποίησή τους σε *in vitro* και *in vivo* βιολογικές μελέτες, με απώτερο στόχο τη συλλογή πληροφοριών που θα συμβάλουν στην κατανόηση του μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστου μηχανισμού δράσης του πεπτιδίου.

Αναλυτικότερα, στα πλαίσια της παρούσας Διατριβής πραγματοποιήθηκε:

- α. ο σχεδιασμός και η σύνθεση τριών παραγώγων της CL, που φέρουν διαφορετικά μόρια - ιχνηθέτες: i) την φθορίζουσα ένωση FITC (παράγωγο CL-FITC), ii) την βιοτίνη – ένωση που σχηματίζει εξαιρετικά σταθερά σύμπλοκα με την πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη (παράγωγο CL-βιοτίνη) και iii) το τριπεπτιδίο dimethylGly-Ser-Cys, χηλικό υποκαταστάτη του ραδιενεργού μετάλλου ^{99m}Tc (παράγωγο CL-CSG),
- β. η αξιολόγηση των συνθετικών παραγώγων με βιολογικές (MTT) και δομικές μεθόδους (NMR) και η σύγκριση της δράσης τους με την αντίστοιχη της μητρικής CL, έτσι ώστε να ελεγχθεί κι εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η καταλληλότητά τους για την περαιτέρω αξιοποίησή τους,
- γ. η εφαρμογή τους σε βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες.

Συγκεκριμένα, το επισημασμένο με FITC παράγωγο χρησιμοποιήθηκε σε *in vitro* μελέτες με τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού με σκοπό τον προσδιορισμό πιθανών σημείων σύνδεσης και αλληλεπίδρασης της CL με κυτταρικά στοιχεία. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά F11 (κυριότερο κυτταρικό σύστημα, στο οποίο μελετάται η δράση της CL) αλλά και σε άλλες σειρές νευρικού και μη- τύπου, όπως οι SK-N-SH, Neuro-2A και MDA. Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση παραμέτρων όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης στην κυτταρική δέσμευση, που θα έδινε πληροφορίες για την κινητική της πιθανής αλληλεπίδρασης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μελέτες κορεσμού με προεπώαση των

κυττάρων με μητρική - μη επισημασμένη CL, που θα βοηθήσουν στην αναγνώριση εξειδικευμένων θέσεων πρόσδεσης της CL.

Το παράγωγο CL-CSG συμπλέχθηκε με το ευρύτατα χρησιμοποιούμενο στην πυρηνική ιατρική ραδιενεργό ισότοπο ^{99m}Tc και διενεργήθηκαν εν αρχή οι απαραίτητοι έλεγχοι σταθερότητας του ραδιοσυμπλόκου, που εξασφάλισαν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που ελέφθησαν κατά την περαιτέρω εφαρμογή του. Στη συνέχεια, το CL-CSG- ^{99m}TcO αξιολογήθηκε σε *in vivo* μελέτες βιοκατανομής μετά την ενδοφλέβια χορήγησή του σε φυσιολογικούς λευκούς ποντικούς τύπου Swiss.

Η βιοτινυλιωμένη CL (CL-βιοτίνη) αξιοποιήθηκε σε πειράματα τύπου ELISA με στόχο την διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασης της CL με το β -αμυλοειδές πεπτίδιο A β (1-40), κύριο συστατικό των τοξικών αμυλοειδών πλακών της νόσου Alzheimer (AD). Η μελέτη αυτή συνδυάστηκε με πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD) και χρώσης ThT, όπου εξετάσθηκε η συμμετοχή-παρέμβαση της CL στη διαδικασία συσσωμάτωσης και σχηματισμού ινιδίων του A β (1-40) .

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

4.1 Σύνθεση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός των πεπτιδίων

4.1.1 Πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση

4.1.1.1 Γενικές αρχές

Το ευρύτατο φάσμα εφαρμογών πρωτεϊνικών μορίων στην Έρευνα και στις Επιστήμες Ζωής οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στα επιτεύγματα της Χημείας στον τομέα της συνθετικής παρασκευής πεπτιδίων.

Η εισαγωγή της μεθόδου Πεπτιδικής Σύνθεσης σε Στερεά Φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) από τον R.B. Merrifield το 1963 αποτέλεσε σταθμό και τροποποίησε ριζικά την χρησιμοποιούμενη μέχρι τότε μεθοδολογία [168]. Σύμφωνα με την τεχνική της Στερεάς Φάσης, η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιείται με την διαδοχική προσθήκη α-αμινο- και παράπλευρα προστατευμένων αμινοξέων σε ένα αδιάλυτο πολυμερές στερεό υπόστρωμα, την ρητίνη [169]. Το καρβοξυτελικό αμινοξύ του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί προσδένεται ομοιοπολικά μέσω της καρβοξυλομάδας του στη ρητίνη, συνήθως μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου-συνδέσμου και σχηματισμό ενός εστερικού ή αμιδικού δεσμού. Στην συνέχεια το πεπτίδιο αναπτύσσεται πάνω στο πολυμερές, με την προσθήκη κάθε φορά ενός αμινοξέος. Επιγραμματικά, μετά τη σύζευξη του κάθε αμινοξέος ακολουθεί η αποπροστασία της α-αμινομάδας του, σε συνθήκες που η προστασία των πλευρικών ομάδων παραμένει σταθερή, και η σύζευξή της με την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του επόμενου αμινοξέος μέσω σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού.

Με την ανάπτυξη των πεπτιδίων στη ρητίνη, η διαδικασία καθαρισμού απλοποιείται, εφόσον τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων και η περίσσεια των αντιδραστηρίων είναι ευδιάλυτα στο διαλύτη της αντίδρασης (DMF) και απομακρύνονται με απλή διήθηση και εκπλύσεις. Όταν η επιθυμητή αλληλουχία έχει επιτευχθεί, το πεπτίδιο αποκόπτεται από το πολυμερές με την επίδραση οξέων και ταυτόχρονα ελευθερώνεται από τις προστατευτικές

ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Επακολουθεί προσεκτικός καθαρισμός και χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου πρέπει να αναζητηθούν στην ταχύτητά της, στη σχετική ευκολία εφαρμογής και στο γεγονός ότι είναι εφικτή η μερική ή πλήρης αυτοματοποίησή της. Για την ανωτέρω τεχνική, ο Merrifield τιμήθηκε το 1984 με το βραβείο Νόμπελ στη Χημεία.

4.1.1.2 Το στερεό υπόστρωμα (Ρητίνη)

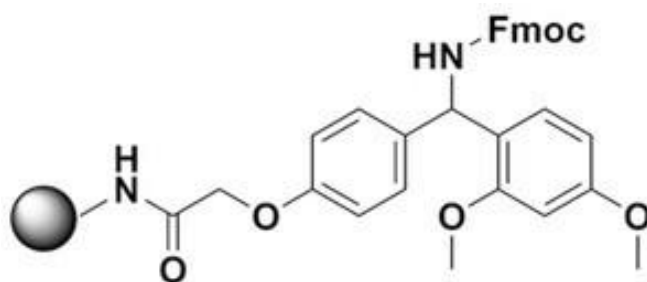
Ως στερεά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ρητίνες με επαρκή μηχανική σταθερότητα και επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες. Αναλυτικότερα, τα γενικά χαρακτηριστικά ενός ιδανικού στερεού υποστρώματος είναι: α. φυσική και χημική σταθερότητα σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, β. ικανοποιητικός αριθμός ενεργών ομάδων ανά μονάδα μάζας για την οικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας (δηλαδή ικανοποιητικός «βαθμός υποκατάστασης») [170], γ. δομή τέτοια που να επιτρέπει την ταχεία και χωρίς στερεοχημικούς περιορισμούς αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με τα διάφορα αντιδραστήρια, δ. δυνατότητα διαχωρισμού του στερεού υποστρώματος από την υγρή φάση σε κάθε στάδιο της σύνθεσης.

Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας προϋποθέτει την διόγκωση της ρητίνης, έτσι ώστε οι περιοχές, που φέρουν τις ενεργές ομάδες επί των οποίων θα οικοδομηθούν τα πεπτιδικά μόρια, να είναι εύκολα προσβάσιμες στους διαλύτες και τα αντιδραστήρια της πεπτιδικής σύνθεσης.

Οι πιο διαδεδομένες ρητίνες είναι οι υποκατεστημένες πολυστυρολικές ρητίνες, όπως πολυστυρόλιο συμπολυμερισμένο με 1% 1,3-διβινυλοβενζόλιο (PS-DVB) καθώς και οι συμπολυμερισμένες ρητίνες του πολυστυρολίου με πολυαιθυλενογλυκόλη (PS-PEG).

Μεταξύ του στερεού πολυμερούς υποστρώματος και του υπό ανάπτυξη πεπτιδίου παρεμβάλλεται συχνά ένα ενδιάμεσο μόριο-σύνδεσμος (linker), το οποίο είναι ομοιοπολικά ενωμένο στην ρητίνη. Τα μόρια αυτά είναι δυνατόν να φέρουν $-OH$ ή $-NH_2$, όπου και θα προσδεθεί η καρβοξυλομάδα του πρώτου αμινοξέος της υπό σύνθεση αλληλουχίας και να οδηγήσουν στην παραλαβή του πεπτιδίου με τη μορφή οξέος ή αμιδίου(στο C-τελικό αμινοξύ), αντίστοιχα.

Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή είναι μία ρητίνη τύπου PS-DVB, που έχει υποστεί κατάλληλη ενεργοποίηση (αμινομεθυλίωση), υπό συνθήκες, μάλιστα, που ευνοούν την καλύτερη δυνατή κατανομή των ενεργών ομάδων (αμινομάδων) στην επιφάνεια της ρητίνης [74]. Στην ενεργοποιημένη ρητίνη έχει, στη συνέχεια, εισαχθεί το εμπορικά διαθέσιμο μόριο-σύνδεσμος Rink-amide linker. Η εργαστηριακά παρασκευασμένη ρητίνη, τύπου Rink amide (Σχήμα 3), χρησιμοποιείται ευρύτατα στην Fmoc/tBu χημεία (βλ. 4.1.1β) και οδηγεί στη σύνθεση πεπτιδίων με τη μορφή αμιδίου στο C-τελικό αμινοξύ.



Σχήμα 3: Δομή εμπορικά διαθέσιμης Rink amide ρητίνης [<http://cempeptides.com/high-loading-rink-amide-spheritide.html>].

4.1.1.3 Προστατευτικές ομάδες

Η προστασία των δραστικών ομάδων των αμινοξέων γίνεται με κατάλληλες προστατευτικές ομάδες, η επιλογή των οποίων εξαρτάται από τον τρόπο οικοδόμησης της πεπτιδικής αλυσίδας και είναι πρωταρχικής σημασίας για την επιτυχία της σύνθεσης. Οι προστατευτικές ομάδες διακρίνονται σε εκείνες που παρέχουν παροδική προστασία στην α-αμινομάδα των αμινοξέων και σε εκείνες που χρησιμοποιούνται στη μόνιμη προστασία των πλευρικών δραστικών ομάδων των αμινοξέων μέχρι του σταδίου αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

Η προστασία της α-αμινομάδας του προς σύζευξη αμινοξέος στοχεύει στη μείωση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του α-ατόμου αζώτου (N^a) έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η αντίδραση με τα ενεργοποιημένα καρβόξυ παράγωγα προς σχηματισμό ανεπιθύμητου αμιδικού δεσμού. Η προστασία της α-αμινομάδας είναι παροδική και η αποπροστασία της εύκολη, γρήγορη και εκλεκτική. Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αμινοπροστατευτικών ομάδων,

σημαντικότερες εκ των οποίων είναι οι ουρεθανικού τύπου και οι πλέον χρησιμοποιούμενες εξ αυτών είναι η Boc και η Fmoc [169,171]. Η Boc-ομάδα (tert-βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδα) είναι μια ευαίσθητη στα οξέα ομάδα, που απομακρύνεται με TFA ή HCl σε οργανικούς διαλύτες και εμφανίζει σταθερότητα σε βασικές συνθήκες.



Σχήμα 4: Οι προστατευτικές ομάδες Boc- (αριστερά) και Fmoc- (δεξιά)

[από https://en.wikipedia.org/wiki/Tert-Butyloxycarbonyl_protecting_group και <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/160512?lang=en®ion=GR>, αντίστοιχα].

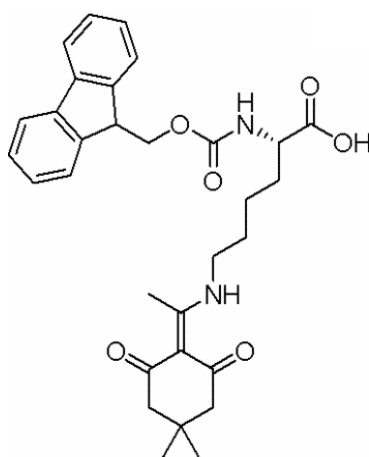
Το 1970 ο Carpiño και οι συνεργάτες του παρουσίασαν μια νέα προστατευτική ομάδα ουρεθανικού τύπου, την Fmoc (9-φλουρενυλομεθοξυκαρβονυλομάδα). Η ομάδα αυτή διαφέρει σε σχέση με άλλες στο γεγονός ότι η απομάκρυνσή της γίνεται σε συγκεκριμένο βασικό περιβάλλον, ενώ είναι απόλυτα σταθερή σε επίδραση οξέων. Η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας πραγματοποιείται γρήγορα με επίδραση δευτεροταγών αμινών (κυρίως πιπεριδίνης).

Η προστασία των πλευρικών ομάδων στα προς σύζευξη αμινοξέα γίνεται για διάφορους λόγους, όπως, κατά κύριο λόγο, για να αποτραπεί η δημιουργία διακλαδισμένων παραπροϊόντων καθώς επίσης και για λόγους αύξησης της διαλυτότητας σε οργανικούς διαλύτες.

Η προστασία των δραστικών πλευρικών ομάδων πραγματοποιείται με ομάδες οι οποίες είναι συμβατές με την N^α-προστατευτική ομάδα, υπό την έννοια ότι δεν πρέπει να απομακρύνονται στις συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται η αποπροστασία της α-αμινομάδας (εξ ου και η ονομασία μόνιμες προστατευτικές ομάδες). Η απομάκρυνση των προστατευτικών αυτών ομάδων γίνεται συνήθως στο τέλος της σύνθεσης ταυτόχρονα με την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη. Έτσι και βάσει των προαναφερθέντων, οι μόνιμες προστατευτικές ομάδες χωρίζονται σε δυο

κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται όσες είναι συμβατές με τη χρήση της Boc-ομάδας ως α-αμινοπροστατευτικής, ενώ στη δεύτερη κατηγορία όσες είναι συμβατές με τη χρήση της Fmoc-ομάδας ως α-αμινοπροστατευτικής. Οι ομάδες της πρώτης κατηγορίας είναι βενζυλο-τύπου (Bzl) και απομακρύνονται κυρίως σε ισχυρά όξινες συνθήκες. Για το λόγο αυτό η σύνθεση πεπτιδίων με τη χρήση της Boc-ομάδας ως α-αμινοπροστατευτικής αναφέρεται συχνά ως Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης. Αντίστοιχα, η Fmoc α-αμινο-προστατευτική ομάδα μπορεί να συνδυαστεί με πλάγιες προστατευτικές ομάδες τύπου *t*-βουτυλο (*t*Bu) οι οποίες απομακρύνονται σε πιο ήπιες όξινες συνθήκες και αποτελούν την δεύτερη κατηγορία. Η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων στην περίπτωση αυτή ονομάζεται συχνά Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία.

Ένα προστατευμένο αμινοξύ που αξίζει να αναφερθεί ιδιαίτερα είναι η Fmoc-Lys(Dde)-OH (Σχήμα 5). Η Fmoc-ομάδα απομακρύνεται με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF, ενώ η Dde-ομάδα παραμένει υπό τις συνθήκες απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας και απομακρύνεται εκλεκτικά με τη χρήση διαλύματος 2% υδραζίνης σε DMF, πριν την απομάκρυνση των λοιπών μόνιμων προστατευτικών ομάδων.



Σχήμα 5: Δομή του προστατευμένου αμινοξέος Fmoc-Lys(Dde)-OH. Το αμινοξύ φέρει την Fmoc ομάδα στην N^ε αμινομάδα της και την ομάδα Dde στην N^ε αμινομάδα της [[www. sigmaaldrich.com/](http://www.sigmaaldrich.com/)].

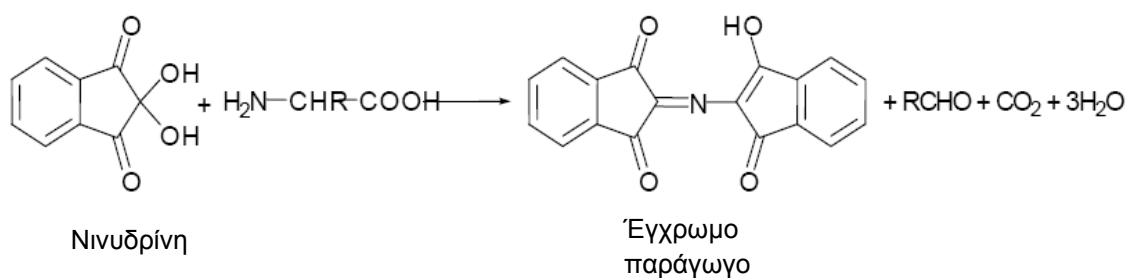
4.1.1.4 Μέθοδοι σύζευξης – Σχηματισμός Πεπτιδικού δεσμού

Για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού απαιτείται η ενεργοποίηση της τελικής καρβοξυλομάδας του προστιθέμενου αμινοξέος, ώστε να αντιδράσει ποσοτικά με την ελεύθερη α-αμινομάδα του ήδη προσδεδεμένου στη ρητίνη

αμινοξέος. Η κυριότερη μέθοδος σύζευξης που χρησιμοποιείται στην πεπτιδική σύνθεση είναι η μέθοδος των καρβοδιιμιδίων. Με τη χρήση καρβοδιιμιδίων προκαλείται *in situ* ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του αμινοξέος και ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται σε ήπιες συνθήκες. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι αυτών των αντιδραστηρίων είναι το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC) και το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC). Η αντίδραση των καρβοδιιμιδίων με την $-COOH$ των N^α-προστατευμένων αμινοξέων περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός ενεργοποιημένου ενδιάμεσου, της O-ακυλουρίας, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με την ελεύθερη αμινομάδα των προσδεδωμένων στη ρητίνη αμινοξέων ή των πεπτιδίων σχηματίζοντας τα επιθυμητά αμίδια.

Κατά τη χρήση των DCC και DIC στην πεπτιδική σύνθεση, παράγεται ως παραπροϊόν η N,N'-δικυκλοεξυλουρία (DCU) και η N,N'-δισοπροπυλουρία, αντίστοιχα. Η N,N'-δικυκλοεξυλουρία είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτη ένωση στους οργανικούς διαλύτες, ενώ η N,N'-δισοπροπυλουρία είναι ευδιάλυτη στους συνηθισμένους διαλύτες της πεπτιδικής σύνθεσης, με αποτέλεσμα να προτιμάται η χρήση του DIC κατά την πεπτιδική σύνθεση. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου των καρβοδιιμιδίων, συνηθίζεται η παράλληλη προσθήκη αντιδραστηρίων που χαρακτηρίζονται πρόσθετα (additives) και που περιορίζουν την έκταση διαφόρων παράπλευρων αντιδράσεων. Ως πρόσθετο χρησιμοποιείται ευρέως το υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt), το οποίο ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο επιταχύνει την σύζευξη αντιδρώντας γρήγορα με το ενδιάμεσο της O-ακυλουρίας και δεν επιτρέπει ρακεμίσωση του παρακείμενου οπτικά ενεργού κέντρου, ούτε σχηματισμό παραπροϊόντων. Τα τελευταία χρόνια, στη θέση του HOBt χρησιμοποιείται ευρέως το αντιδραστήριο Oxyma (ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate) [172].

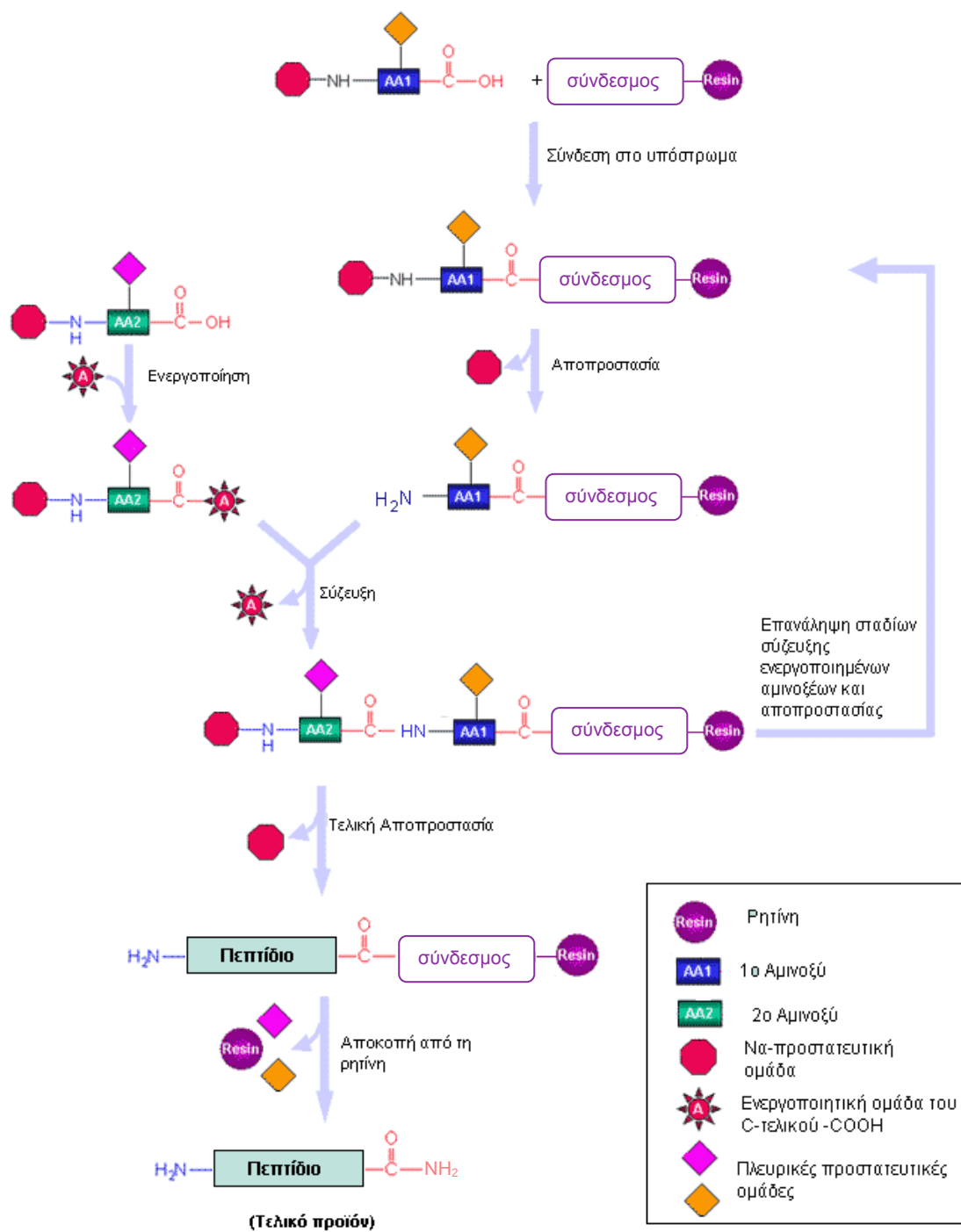
Για τον έλεγχο κάθε σταδίου σύζευξης, χρησιμοποιείται η δοκιμασία της νινυδρίνης (Kaiser test) [173], η οποία είναι η συνηθέστερη μέθοδος για την ανίχνευση των πρωτοταγών αμινών και συνεπώς τον έλεγχο της ολοκλήρωσης της σύζευξης. Η δοκιμασία βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος μετά από αντίδραση της νινυδρίνης με ελεύθερες α-αμινομάδες (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Αντίδραση νινυδρίνης για την ανίχνευση ελεύθερων αμινομάδων (Kaiser test) [<http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/peptide/terminals.htm>].

Θετική δοκιμασία νινυδρίνης, δηλαδή σχηματισμός έγχρωμου προϊόντος, υποδηλώνει την παρουσία ελεύθερων α-αμινομάδων στο υπό σύνθεση πεπτίδιο, άρα, ατελή σύζευξη του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος. Αντίθετα, αρνητική δοκιμασία νινυδρίνης υποδηλώνει την απουσία ελεύθερων αμινομάδων και, επομένως, ποσοτική σύζευξη του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος.

Η σύνθεση ολοκληρώνεται με αλληλοδιαδοχή κύκλων σύζευξης και Fmoc-αποπροστασίας (Σχήμα 7) και ακολουθεί απομάκρυνση των μόνιμων προστατευτικών ομάδων και αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.



Σχήμα 7: Πειραματική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων βάσει της μεθοδολογίας στερεάς φάσης.

4.1.1.5 Πειραματική πορεία

Υλικά και όργανα

- Ρητίνη Rink amide, παρασκευασμένη στο εργαστήριο
- Fmoc-παράγωγα L-αμινοξέων, Χημικά και Βιοφαρμακευτικά Εργαστήρια Πατρών (CBL Patras)
- N,N'-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), διχλωρομεθάνιο (DCM), Merck
- 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt), N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), Sigma (για τη σύζευξη των αμινοξέων)
- Διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε DMF (v/v)
- Νινυδρίνη, φαινόλη, απόλυτη αιθανόλη, πυριδίνη, Merck (Kaiser test)
- Υδατικό διάλυμα KCN 0,001 M
- Οξικός ανυδρίτης, Merck, δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA), Sigma (capping)
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), τρισοπροπυλοσιλάνιο (TIPS), αιθανοδιθειόλη (EDT), διαιθυλαιθέρας (Et₂O), Sigma
- Απιονισμένο H₂O
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 mL (falcon)

ΑΓΚΥΡΟΒΟΛΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

Η CL και τα πεπτιδικά της παράγωγα CL-FITC, CL-biotin and CL-CSG συντέθηκαν σε παρασκευασμένη στο εργαστήριο ρητίνη τύπου Rink amide [74,174], με βαθμό υποκατάστασης 0,6 mmol/g, ακολουθώντας τη στρατηγική Fmoc/tBu [171]. Τα στάδια σύζευξης πραγματοποιήθηκαν σε DMF χρησιμοποιώντας περίσσεια από το αντίστοιχο Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ, παρουσία DIC/HOBt. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης των συζεύξεων έγινε με βάση τη δοκιμασία νινυδρίνης (Kaiser test) [173]. Σε περίπτωση ατελούς σύζευξης (θετική δοκιμασία νινυδρίνης), έγινε επανάληψη του σταδίου της σύζευξης και στη συνέχεια ακετυλίωση των αμινομάδων. Η Fmoc-αποπροστασία του κάθε αμινοξέος έγινε με 20% διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF [175]. Η αποπροστασία της N^ε-Dde ομάδας πραγματοποιήθηκε με 2% διάλυμα υδραζίνης σε DMF (3 εκπλύσεις x 2,5 min η καθεμία) [176]. Η

σύνθεση συνεχίστηκε με αλληλοδιαδοχή κύκλων σύζευξης και αποπροστασίας. Πιο αναλυτικά:

Αρχικά, ζυγίζεται επαρκής ποσότητα της Fmoc προστατευμένης ρητίνης και τοποθετείται σε σύριγγα με ειδικό ηθμό, ο οποίος συγκρατεί τη ρητίνη και τα προϊόντα που είναι προσδεμένα σ' αυτήν.

Η ρητίνη διογκώνεται με εκπλύσεις με CH_2Cl_2 (2x1 min) και DMF (4x1 min) και ακολουθεί η αποπροστασία της με διάλυμα πιπεριδίνης 20% (v/v) σε DMF. Μετά την παρέλευση του συνολικού χρόνου αποπροστασίας (25 min) η ρητίνη εκπλένεται με DMF (10x1 min).

Για την αγκυροβόληση του πρώτου αμινοξέος στη ρητίνη, ζυγίζεται περίσσεια ποσότητας Fmoc προστατευμένου αμινοξέος (4 eq) και HOBt (4 eq), διαλύονται σε DMF και το διάλυμα παραμένει σε πάγο (5 min). Ακολουθεί η προσθήκη 4 eq DIC, το νέο διάλυμα παραμένει σε πάγο (10 min) και κατόπιν προστίθεται στη σύριγγα που περιέχει την αποπροστατευμένη ρητίνη. Το σύστημα παραμένει προς αντίδραση επί 2 h, υπό ήπια ανάδευση, και ακολούθως διηθείται και εκπλένεται με DMF (5x1 min). Η επιτυχής ολοκλήρωση της σύζευξης ελέγχεται με την δοκιμασία της νινυδρίνης.

Η σύζευξη των επόμενων αμινοξέων και η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας επιτυγχάνεται με την επανάληψη των ανωτέρω βημάτων.

Ειδικά, όσον αφορά τη σύζευξη του αμινοξέος *dmGly* (στο παράγωγο CL-CSG), ακολουθείται η εξής πορεία: 3 eq του αμινοξέος διαλύονται σε DMF με ισομοριακή ποσότητα του αντιδραστήριου HATU και στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα 9 eq DIEA. Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 2 min και στη συνέχεια προστίθεται στη ρητίνη, όπου και αφήνεται να αντιδράσει για 2 h.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ - KAISER TEST

Για τον έλεγχο κάθε σταδίου σύζευξης, χρησιμοποιείται η δοκιμασία της νινυδρίνης [173] ως εξής:

Δοκιμασία νινυδρίνης (Kaiser test): για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας νινυδρίνης απαιτούνται τρία είδη αντιδραστηρίων (Kaiser 1, 2 και 3):

Kaiser 1: 500 mg καθαρής νινυδρίνης σε 10 mL απόλυτης αιθανόλης

Kaiser 2: 80 g καθαρής φαινόλης σε 20 mL απόλυτης αιθανόλης

Kaiser 3: 2 mL υδατικού διαλύματος 0,001 M KCN σε 98 mL πρόσφατα απεσταγμένης πυριδίνης πάνω από νινυδρίνη

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγεται πολύ μικρή ποσότητα ρητίνης (~0,5 mg) και προστίθενται με τη σειρά 30 μ L των παραπάνω διαλυμάτων Kaiser. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος στους 100 °C για 5 min. Θετική δοκιμασία Kaiser εκδηλώνεται με το μπλε χρωματισμό των κόκκων της ρητίνης (και του διαλύματος) και υποδηλώνει την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδική αλυσίδα άρα και ατελή σύζευξη. Στην περίπτωση αυτή η σύζευξη επαναλαμβάνεται (double coupling). Εάν και μετά την επανάληψη του σταδίου της σύζευξης η δοκιμασία νινυδρίνης παραμένει θετική, ακολουθεί ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων (capping) με προσθήκη μίγματος οξικού ανυδρίτη/ DMF/ DIEA 1:1:1 (v/v/v) και ανάδευση για 30 min. Αντίθετα, όταν το διάλυμα παραμένει κίτρινο και το χρώμα της ρητίνης δεν μεταβάλλεται, η δοκιμασία θεωρείται αρνητική ως προς την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων και, επομένως, η σύζευξη θεωρείται πλήρης.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η ρητίνη με το συντεθέν πεπτίδιο εκπλύνεται διαδοχικά με DMF (10x1 min), CH_2Cl_2 (4x1 min) και πετρελαϊκό αιθέρα (4x1 min) και ακολούθως ξηραίνεται σε ξηραντήρα υψηλού κενού.

ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΠΛΕΥΡΙΚΩΝ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ

Η αποπροστασία των πλευρικών ομάδων και η αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών μιγμάτων αποκοπής, αποτελούμενων κυρίως από TFA και κατάλληλα αντιδραστήρια (αντιδραστήρια-scavengers, π.χ. EDT, TIPS). Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν TFA/ H_2O /TIPS (95/2,5/2,5, v/v/v) και η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 2 h σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στη συνέχεια, η ρητίνη διηθείται και τα ακατέργαστα πεπτιδικά παράγωγα που βρίσκονται στο υγρό διήθησης παραλαμβάνονται μετά από διαδοχικά στάδια φυγοκέντρωσης και έκπλυσης με διαιθυλαιθέρα (3 φορές). Το ακατέργαστο πεπτίδιο παραλαμβάνεται ως ίζημα (η ρητίνη παραμένει επί του ηθμού) και φυλάσσεται στους -35 °C μέχρι το στάδιο του καθαρισμού του και την μετέπειτα λυοφιλοποίησή του.

4.1.2 Καθαρισμός και ανάλυση της συνθετικής CL και των παραγώγων της με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

4.1.2.1 Αρχή μεθόδου

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί μία αναλυτική τεχνική, η οποία εκτός από τον διαχωρισμό των συστατικών, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση κάθε συστατικού σε ένα μίγμα. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στην υπό πίεση διέλευση ενός υγρού διαλύματος (κινητή φάση) μέσω μιας στήλης με κατάλληλο πληρωτικό υλικό (στατική φάση). Η HPLC αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική, λόγω του μικρού χρόνου που απαιτεί ο διαχωρισμός καθώς και της μεγάλης ποικιλίας στατικών και κινητών φάσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, με αποτέλεσμα η μέθοδος να μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ πεδίο αναλύσεων.

Η στατική φάση αποτελείται είτε από ένα πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορφή ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών.

Οι προς ανάλυση χημικές ουσίες ενίενται στο σύστημα και κινούνται κατά μήκος της αναλυτικής στήλης με την άσκηση πίεσης (από την αντλία). Το κάθε συστατικό του μίγματος κατανέμεται, ανάλογα με τη χημική δομή, με διαφορετικό τρόπο μεταξύ των δύο φάσεων και μετακινούμενο με διαφορετική ταχύτητα, διαχωρίζεται και εξέρχεται τελικά από τη χρωματογραφική διάταξη με διαφορά χρόνου που «καταγράφεται» από έναν ανιχνευτή.

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από: α. *δύο δοχεία αποθήκευσης διαλυτών* (Α, υδατικού και Β, οργανικού), τα οποία είναι συνήθως συνδεδεμένα με απαερωτή, για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα, β. *βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών*, γ. *αντλίες*, που εξασφαλίζουν την υψηλή πίεση που πρέπει να εφαρμοστεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, δ. *βαλβίδα εισαγωγής δείγματος*, ε. *προστήλη*, η οποία δρα ως χημικό φίλτρο απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες

ενώσεις που είναι δυνατό να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν τη διάρκεια ζωής της, στ. *στήλη*, ζ. *ανιχνευτή* και η. *καταγραφέα*.

Ανάλογα με τον τύπο του διαχωρισμού, οι μέθοδοι HPLC μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες. Στην περίπτωση των συνθετικών πεπτιδίων, ευρύτερα χρησιμοποιούμενη είναι η μέθοδος αντίστροφης φάσης (reverse-phase chromatography, RP-HPLC). Η στατική φάση που χρησιμοποιείται στις μεθόδους RP-HPLC είναι οξείδιο του πυριτίου (Silica). Η στατική φάση φέρει στην επιφάνειά της αλκυλο-πυριτικές ομάδες, συνήθως δεκαοκτυλο-πυριτικές (C_{18}), που της προσδίδουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Η κατακράτηση στη στήλη των προς καθαρισμό ή ανάλυση ουσιών οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της επιφάνειας της στατικής φάσης. Για την έκλουση των ουσιών χρησιμοποιείται κυρίως μία πολική κινητή φάση, αποτελούμενη συνήθως από H_2O και CH_3CN , CH_3CN ή κάποιον άλλον οργανικό διαλύτη αναμίξιμο με H_2O . Οι διάφορες ουσίες εκκλούνται κατά σειρά αύξουσας υδροφοβικότητας [177].

Η μέθοδος RP-HPLC έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, εκτός από την ανάλυση, και για τον καθαρισμό πολλών συνθετικών πεπτιδίων. Συγκεκριμένα, ο καθαρισμός των ακατέργαστων πεπτιδικών παραγώγων, με στόχο την παραλαβή ικανής ποσότητας του επιθυμητού προϊόντος από πιθανά παραπροϊόντα, πραγματοποιείται σε σύστημα παρασκευαστικής ή ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα συλλογής των κλασμάτων που αντιστοιχούν στο καθαρό πεπτίδιο. Ο εν συνεχεία έλεγχος της καθαρότητας του δείγματος (ανάλυση δείγματος), πραγματοποιείται σε αναλυτική RP-HPLC.

Η εσωτερική διάμετρος της στήλης, η ποσότητα του δείγματος και οι ταχύτητες ροής που χρησιμοποιούνται συνήθως στην παρασκευαστική, ημιπαρασκευαστική και αναλυτική RP-HPLC παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά διαφορετικών ειδών HPLC.

Περιγραφή	Εσωτερική διάμετρος στήλης (mm ID)	Ταχύτητα ροής κινητής φάσης (mL/min)	Ποσότητα δείγματος
Παρασκευαστική HPLC	20-50	10-150	> 30 mg
Ημι-παρασκευαστική HPLC	10-20	2-10	5 mg
Αναλυτική HPLC	4-8	0,4-2	100 µg

4.1.2.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), Sigma
- Τριφθοροξικό οξύ, TFA, Merck
- Σύστημα ημιπαρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης, (RP-HPLC) Waters (ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) Model 484)
- Σύστημα αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αντίστροφης φάσης, Waters, αποτελούμενο από αντλία Model 616E και ανιχνευτή τύπου 996 PDA
- Στήλη 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID), Macherey-Nagel
- Στήλη Symmetry 300TM C4 (4,6 x 250 mm ID), Waters
- Συσκευή λυοφιλοποίησης Christ, Beta 1-8

Καθαρισμός συνθετικής CL και παραγώγων

Ο καθαρισμός των πεπτιδικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC [αντλία Waters 600E, ανιχνευτής Waters UV-484], σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

Στήλη: 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID, Macherey Nagel)

Διαλύτες έκλουσης: A: 0,05% TFA / H₂O (v/v)

B: 40% (0,05% TFA/H₂O)/ 60% (0,05% TFA/CH₃CN)(v/v)

Ταχύτητα ροής: 3,0 mL/min

Ανίχνευση: UV (220 nm)

Γραμμική μεταβολή σύστασης του διαλύματος έκλουσης: όπως φαίνεται στον Πίνακα 3

Πίνακας 3: Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης συναρτήσει του χρόνου για τον καθαρισμό της CL και των παραγώγων της.

Χρόνος (min)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	100	0
3	90	10
60	20	80
67	100	0
69	0	0
80	0	0

Ανάλυση συνθετικής CL και παραγώγων

Ο έλεγχος της καθαρότητας των παραγώγων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC [αντλία Waters 616E, ανιχνευτής Waters 996 PDA], σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

Στήλη: Symmetry 300™ C4 (4.6 x 250 mm ID)

Διαλύτες έκλουσης: A: 0,05% TFA / 0,1 M NaCl (v/v)

B: 90% (0,05% TFA/H₂O)/10 % (0,05% TFA/CH₃CN) (v/v)

Ταχύτητα ροής: 1,0 mL/min

Ανίχνευση: UV (220 nm)

Γραμμική μεταβολή σύστασης του διαλύματος έκλουσης: όπως φαίνεται στον Πίνακα 4

Πίνακας 4: Αναλυτική RP-HPLC: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης συναρτήσει του χρόνου για την ανάλυση της συνθετικής CL και των παραγώγων της.

Χρόνος (min)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	80	20
1	80	20
20	20	80
23	20	80
25	80	20
30	80	20

Κατά τον καθαρισμό, μια ποσότητα (20 mg) του αρχικού μίγματος ακατέργαστου πεπτιδίου επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο μίγμα διαλυτών A και B. Το διάλυμα διηθείται και ενίεται στην ημι-παρασκευαστική RP-HPLC. Συλλέγονται διαδοχικά κλάσματα ανάλογα με την απορρόφησή τους, που αντιστοιχούν στην κύρια κορυφή κι αντιπροσωπεύουν το κύριο προϊόν. Μικρή ποσότητα των παραπάνω κλασμάτων (15-20 μ L από το καθένα) συνενώνεται και ενίεται στην αναλυτική RP-HPLC για τελικό έλεγχο της καθαρότητας του προϊόντος. Στη συνέχεια επιλέγονται τα κατάλληλα (καθαρότερα) κλάσματα, αναμιγνύονται και λυοφιλοποιούνται δίνοντας τα επιθυμητά πεπτίδια με τη μορφή λευκού στερεού. Τα ακριβή μοριακά βάρη της CL και των τριών παραγώγων ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική της φασματομετρίας μαζών μετά από ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

4.1.3 Ταυτοποίηση συνθετικών πεπτιδίων με την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας με τη μέθοδο ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry, ESI-MS)

4.1.3.1 Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μάζας, και συνεπώς του μοριακού βάρους (MW) κι εμμέσως παρέχει πληροφορίες για την δομή οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Η τεχνική βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων, την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του

ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Ο λόγος m/z λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος (m) με τον αριθμό (z) των φορτίων που φέρει.

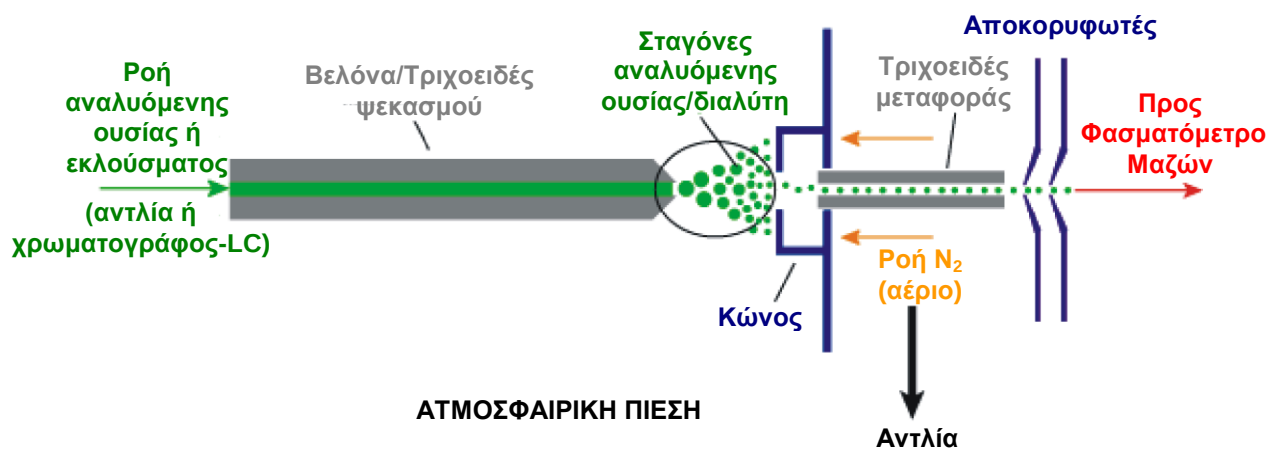
Η χρησιμοποίηση του ηλεκτροψεκασμού για ιοντισμό δειγμάτων στη φασματομετρία μαζών (ESI, electrospray ionization), ξεκίνησε στα τέλη του 1960, ενώ αργότερα αναπτύχθηκε η μέθοδος ESI-MS όπως είναι σήμερα γνωστή [178].

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό που το ξεχωρίζει από τις άλλες μεθόδους, είναι ότι μπορεί να μεταφέρει στην αέρια φάση άθικτα ιόντα που υπάρχουν στο διάλυμα, αποτελώντας ιδανική μέθοδο ανάλυσης για πρωτεϊνικά μόρια ή/και σύμπλοκά τους.

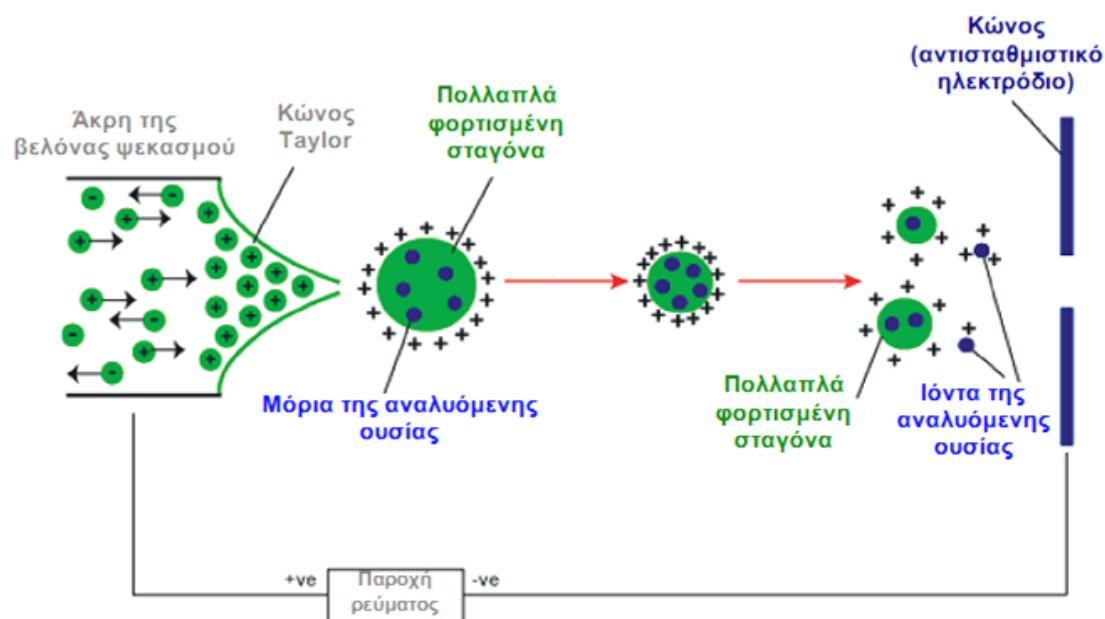
Κατά τη λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού (Σχήμα 8), η αναλυόμενη ουσία εισάγεται στην πηγή με τη μορφή διαλύματος, είτε απ' ευθείας είτε μέσω σύνδεσης με σύστημα υγρής χρωματογραφίας. Το διάλυμα της αναλυόμενης ουσίας διέρχεται με ταχύτητα 0,1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ μέσα από τη βελόνα ηλεκτροψεκασμού η οποία διατηρείται σε ένα υψηλό δυναμικό (σχετικά με ένα αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο), συνήθως μεταξύ 2,5 και 4 kV. Αυτή η διαφορά δυναμικού οδηγεί στον ψεκασμό από τη βελόνα φορτισμένων σταγονιδίων, τα οποία έχουν στην επιφάνειά τους φορτίο ίδιας πολικότητας με το φορτίο της βελόνας. Οι σταγόνες απωθούνται από τη βελόνα προς τον δειγματοληπτικό κώνο στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο και καθώς διασχίζουν το χώρο μεταξύ της άκρης της βελόνας και του κώνου πραγματοποιείται η εξάτμιση του διαλύτη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8 (μέσα στον κύκλο) και σε μεγέθυνση στο Σχήμα 9 (www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionization.html).

Καθώς πραγματοποιείται η εξάτμιση του διαλύτη, η σταγόνα συρρικνώνεται, ενώ το ολικό φορτίο στην επιφάνειά της διατηρείται σταθερό. Αυτό οδηγεί σε αστάθεια, καθώς οι απωθητικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις Coulomb στην επιφάνεια της σταγόνας αρχίζουν να υπερνικούν τη σχετική δύναμη της επιφανειακής τάσης (όριο Rayleigh), γεγονός που οδηγεί τελικά σε ρήξη της επιφάνειας και απόσπαση φορτισμένων σταγόνων από το διάλυμα. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται μικρότερες σταγόνες, οι οποίες και πάλι διασπώνται, μέχρι πλήρους εξάτμισης του διαλύτη και την δημιουργία τελικά φορτισμένων μορίων της αναλυόμενης ουσίας στην αέρια φάση, που

κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών (www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionization.html).



Σχήμα 8: Σχηματικό διάγραμμα μίας πηγής ηλεκτροψεκασμού (ESI).



Σχήμα 9: Σχηματικό διάγραμμα του μηχανισμού δημιουργίας ιόντων κατά τον ηλεκτροψεκασμό.

4.1.3.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Συνθετικά Πεπτίδια
- CH₃CN, H₂O
- Φασματογράφος μάζας τριπλού τετραπόλου 310-MS TQ Varian (Agilent Technologies, Foster City, CA, USA)

Χαρακτηρισμός συνθετικής CL και παραγώγων

Ο χαρακτηρισμός της CL και των παραγώγων της πραγματοποιήθηκε σε ένα φασματογράφο μάζας τριπλού τετραπόλου 310-MS TQ Varian (Agilent Technologies, Foster City, CA, USA). Τα λυοφιλοποιημένα πεπτίδια επαναδιαλύονται σε CH₃CN: νερό 1: 1 και σε συγκέντρωση περίπου 0,1 mg/mL. Το κάθε δείγμα ενίεται στο φασματογράφο MS/MS χρησιμοποιώντας μια αντλία σύριγγας της Harvard Apparatus (Holliston, MA). Τα πεπτιδικά παράγωγα αναλύονται με τη μορφή θετικού ιόντος. Η ταχύτητα ροής ορίστηκε σε 0,2 mL/min και οι υπόλοιπες παράμετροι ανίχνευσης του οργάνου προσδιορίστηκαν όπως περιγράφονται στη συνέχεια: τάση ανιχνευτή, 1300 V, δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, 3500 V, τάση ασπίδας εκνέφωσης 600 V, θερμοκρασία αερίου εκνέφωσης, 55 °C, θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 325 °C, πίεση αερίου εκνέφωσης 18,0 psi, πίεση αερίου ξήρανσης 19,0 psi. Ο έλεγχος του οργάνου, η λήψη των δεδομένων και η ποιοτική ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MS Workstation έκδοση 6.9.3 (Varian).

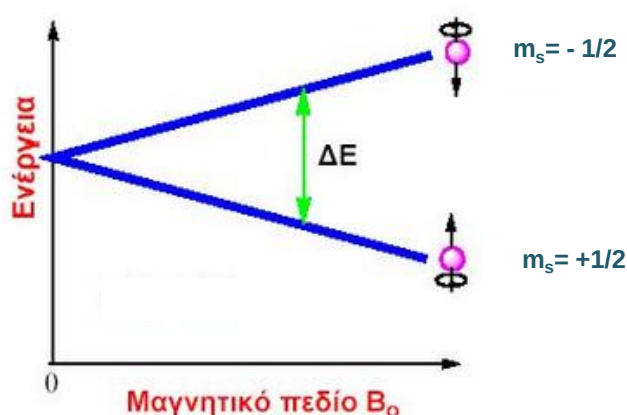
4.2 Πειράματα Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

4.2.1 Αρχή μεθόδου

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί σημαντική αναλυτική τεχνική για τη μελέτη της δομής και διαμόρφωσης ενώσεων καθώς και των δυναμικών και κινητικών ιδιοτήτων τους [179,180,181]. Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στις

μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων των ατόμων. Όλοι οι πυρήνες είναι θετικά φορτισμένα σωματίδια και ορισμένοι από αυτούς διαθέτουν αυτοστροφορμή (spin), περιστρέφονται δηλαδή γύρω από τον άξονά τους, φαινόμενο το οποίο χαρακτηρίζεται από τους κβαντικούς αριθμούς spin I . Το περιστρεφόμενο πυρηνικό φορτίο δημιουργεί μαγνητικό δίπολο κατά μήκος του άξονα περιστροφής, με αποτέλεσμα οι πυρήνες να συμπεριφέρονται σαν μικροσκοπικοί γραμμικοί μαγνήτες. Από τους πυρήνες με spin αυτοί που συνήθως παρατηρούνται στη φασματοσκοπία NMR είναι ο πυρήνας του υδρογόνου, (πρωτόνιο, ^1H) και ο πυρήνας του άνθρακα-13 (^{13}C) ισοτόπου του φυσικού άνθρακα-12 (^{12}C) που αποτελεί τον βασικό δομικό σκελετό όλων των οργανικών ενώσεων.

Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας NMR, με παράδειγμα το πρωτόνιο (^1H) που είναι και ο συνηθέστερα μελετώμενος πυρήνας. Το πρωτόνιο διαθέτει αριθμό spin $I = 1/2$ και σύμφωνα με την κβαντική θεωρία υπάρχουν $2I+1$ επιτρεπτοί προσανατολισμοί ($-1/2$ και $+1/2$) του πρωτονίου παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Επομένως όταν τα πρωτόνια βρεθούν υπό την επίδραση ενός ισχυρού μαγνητικού πεδίου (H_0), θα προσανατολιστούν είτε παράλληλα ($+1/2$) είτε αντιπαράλληλα ($-1/2$) με τις δυναμικές γραμμές αυτού του πεδίου, (Σχήμα 10). Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός των πυρήνων με τον προσανατολισμό αυτό να είναι μεγαλύτερος.



Σχήμα 10: Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 τα πυρηνικά spins προσανατολίζονται τυχαία, ενώ με την εφαρμογή ενός τέτοιου πεδίου αποκτούν συγκεκριμένο προσανατολισμό. Μερικά spins είναι διατεταγμένα παράλληλα και κάποια άλλα αντιπαράλληλα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο [<http://www.chemistry.uoc.gr/nmr/lectures/>].

Όταν τα προσανατολισμένα πρωτόνια ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, αυτά που βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, απορροφούν ενέργεια και μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με ταυτόχρονη αναστροφή spin. Η απορρόφηση συγκεκριμένου μήκους ακτινοβολίας από πυρήνες που βρίσκονται προσανατολισμένοι σε μαγνητικό πεδίο αποτελεί το φαινόμενο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Η τιμή της συχνότητας της ακτινοβολίας που είναι ικανή να προκαλέσει την αναστροφή spin ενός συγκεκριμένου πυρήνα ονομάζεται συχνότητα συντονισμού και εξαρτάται τόσο από το είδος αυτού του πυρήνα όσο και από την ένταση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.

Επομένως, ένα απομονωμένο πρωτόνιο θα έχει για κάθε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, μια χαρακτηριστική συχνότητα συντονισμού. Τα πρωτόνια όμως των ατόμων που συμμετέχουν στις χημικές ενώσεις δεν είναι απομονωμένα αλλά βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον το καθένα. Ανάλογα με αυτό το χημικό περιβάλλον κάθε πρωτόνιο υφίσταται την επίδραση ενός τοπικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου το οποίο επάγεται από την κίνηση των ηλεκτρονίων γύρω του. Το πεδίο αυτό μπορεί να αυξάνει ή να ελαττώνει την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που προκύπτει από το συνδυασμό του εξωτερικού και του τοπικού πεδίου είναι το επιδρών (effective) πεδίο και είναι αυτό που τελικά γίνεται «αντιληπτό» από το πρωτόνιο. Με τον τρόπο αυτό κάθε είδος πρωτονίου στην ένωση αντιλαμβάνεται διαφορετικό πεδίο και συντονίζεται σε διαφορετική συχνότητα συντονισμού. Στην περίπτωση που το επιδρών μαγνητικό πεδίο για ένα πρωτόνιο είναι μικρότερο από το εξωτερικό, η συχνότητα συντονισμού του είναι μικρότερη από αυτή που αντιστοιχεί σε ένα απομονωμένο πρωτόνιο και το φαινόμενο καλείται θωράκιση. Αντίθετα, όταν το επιδρών μαγνητικό πεδίο είναι μεγαλύτερο από το εξωτερικό, το πρωτόνιο θα συντονίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα και το φαινόμενο καλείται αποθωράκιση.

Σ'ένα τυπικό φασματόμετρο NMR, η υπό μελέτη χημική ένωση διαλύεται σε δευτεριωμένο, συνήθως, διαλύτη και το διάλυμα τοποθετείται σε ένα λεπτό γυάλινο σωλήνα. Ο σωλήνας τοποθετείται ανάμεσα στους πόλους ενός

ισχυρού μαγνήτη (εξωτερικό μαγνητικό πεδίο) και το δείγμα ακτινοβολείται με ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας.

Όταν σταματήσει η ακτινοβολήση το σύστημα επανέρχεται στην ισορροπία και η απορροφηθείσα ακτινοβολία εκπέμπεται. Η συνολική ακτινοβολία του δείγματος ανιχνεύεται από το φασματομέτρο και εμφανίζεται στην οθόνη του φασματομέτρου ως FID (Free Induction Decay), η οποία περιέχει τις χαρακτηριστικές συχνότητες συντονισμού όλων των ομάδων πρωτονίων του δείγματος. Η διάρκεια όλης της διαδικασίας είναι της τάξης του δευτερολέπτου, το δείγμα μπορεί να σαρωθεί αρκετές φορές και να προστεθούν μαθηματικά οι κορυφές, καθιστώντας δυνατή τη λήψη ευκρινών φασμάτων ακόμα και από πολύ αραιά δείγματα. Με μια μαθηματική διαδικασία, γνωστή ως μετασχηματισμός Fourier (Fourier transform), πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός του φάσματος συνάρτησης χρόνου $F(t)$ σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας $F(\omega)$, που αποτελεί το φάσμα NMR [182]. Το τυπικό φάσμα NMR περιέχει πολλές κορυφές, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε μία ομάδα πρωτονίων της μελετώμενης χημικής ένωσης. Συγκεκριμένα, η θέση της κορυφής που αντιστοιχεί στη συχνότητα απορρόφησης μιας συγκεκριμένης ομάδας πρωτονίων, ονομάζεται χημική μετατόπιση και αποτελεί ένα ακριβές μέτρο του χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται η ομάδα αυτή των πρωτονίων. Τα πρωτόνια μιας χημικής ένωσης που βρίσκονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον έχουν την ίδια χημική μετατόπιση και ονομάζονται ισοδύναμα.

Το φάσμα NMR βαθμονομείται σε μονάδες δέλτα (δ), όπου δ = μέρος ανά εκατομμύριο (ppm) της βασικής συχνότητας του φασματομέτρου. Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιείται το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), η απορρόφηση του οποίου ορίζεται αυθαίρετα ίση με 0 δ . Σε κάθε περιοχή της κλίμακας η οποία εκτείνεται συνήθως μέχρι τα 10 ppm εμφανίζονται συγκεκριμένες ομάδες πρωτονίων ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον. Σε ένα πεπτίδιο τα αμιδικά πρωτόνια εμφανίζονται στην περιοχή 7 - 8 ppm, ακολουθούν τα αρωματικά, τα πρωτόνια του Ca, των μεθυλενίων και των μεθυλίων.

Άλλα χαρακτηριστικά των κορυφών ενός φάσματος NMR που μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή της μελετώμενης ένωσης είναι η πολλαπλότητα των κορυφών του φάσματος και το ολοκλήρωμα κάθε

κορυφής. Το ολοκλήρωμα κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τον αριθμό των πρωτονίων στα οποία αντιστοιχεί και σε σύγκριση με τα ολοκληρώματα των άλλων κορυφών του φάσματος αποτελεί βασικό στοιχείο της δομικής ανάλυσης. Το φαινόμενο των πολλαπλών κορυφών αποκαλείται σχάση spin spin και οφείλεται στην αλληλεπίδραση του πρωτονίου στο οποίο αντιστοιχεί η πολλαπλή κορυφή, με τα γειτονικά του μη ισοδύναμα πρωτόνια, δηλαδή με τα πρωτόνια που απέχουν από αυτό το πολύ τρεις δεσμούς και βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον. Κάθε πρωτόνιο προκαλεί σχάση της κορυφής του γειτονικού του, μη ισοδύναμου πρωτονίου σε $2n+1$ επιμέρους κορυφές, όπου n ο αριθμός των γειτονικών μη ισοδύναμων πρωτονίων. Η απόσταση δυο διαδοχικών επιμέρους κορυφών μιας πολλαπλής κορυφής ονομάζεται σταθερά σύζευξης J και αποτυπώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης των πρωτονίων. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης J είναι ανεξάρτητη από την ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου και είναι η ίδια στις κορυφές που αντιστοιχούν στα συζευγμένα πρωτόνια.

Εκτός από αυτές τις πληροφορίες που μπορεί να δώσει το απλό φάσμα NMR μίας διάστασης, η δομή μιας χημικής ένωσης μπορεί να μελετηθεί ακόμα πιο διεξοδικά χρησιμοποιώντας φάσματα NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR). Στα φάσματα 2D η διαγώνιος είναι το φάσμα 1D και οι κορυφές εκτός διαγωνίου (κορυφές συσχέτισης) δηλώνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρήνων οι οποίες δυνατόν να οφείλονται σε σύζευξη γειτονικών πυρήνων μέσω δεσμών ή σε αλληλεπίδραση πυρήνων μέσω του χώρου. Στην συγκεκριμένη διατριβή για την απόδοση των κορυφών των πεπτιδικών παραγώγων χρησιμοποιήθηκαν τα εξειδικευμένα πειράματα:

- TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), όπου οι κορυφές συσχέτισης αφορούν πρωτόνια τα οποία αλληλεπιδρούν μαγνητικά μέσω δεσμών. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν εμφανίζονται μόνο οι συσχετίσεις γειτονικών πρωτονίων (που απέχουν 2 ή και 3 δεσμούς) αλλά όλες οι διαδοχικές συσχετίσεις που ενυπάρχουν σε ένα κλειστό σύστημα spin, όπως π.χ. είναι το κάθε αμινοξύ μιας αλληλουχίας.
- ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY), όπου οι κορυφές συσχέτισης συνδέουν πρωτόνια που αλληλεπιδρούν μαγνητικά μέσω του χώρου σε απόσταση μέχρι $4,5 \text{ \AA}$. Το πείραμα αυτό έχει μεγάλη σημασία για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής ενός πεπτιδικού μεγαλομορίου γιατί

αποκαλύπτει συσχετίσεις ανάμεσα σε πρωτόνια που απέχουν πολύ στην πεπτιδική αλληλουχία αλλά λόγω της αναδίπλωσης της αλυσίδας έρχονται κοντά και αλληλεπιδρούν μαγνητικά.

4.2.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Δευτεριωμένοι διαλύτες
- 500 MHz Bruker DRX Avance spectrometer με μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας BVT3000

Δομικός χαρακτηρισμός της CL και των παραγώγων της – Λήψη φασμάτων NMR

Τα πειράματα ^1H NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο Avance DRX-500 (500 MHz) και Avance III 600 MHz της εταιρείας Bruker. Τα φάσματα των παραγώγων ελήφθησαν σε υδατικό διάλυμα $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$ 9:1, σε θερμοκρασία 25°C . Η ρύθμιση της κλίμακας των χημικών μετατοπίσεων έγινε με την απόδοση στα 0.00 ppm της συχνότητας συντονισμού των μεθυλίων της ένωσης DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid).

4.3 *In vitro* πειράματα

4.3.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

4.3.1.1 Αρχή μεθόδου

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών. Τα κύτταρα των περισσότερων κυτταρικών σειρών προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης σχηματίζοντας το λεγόμενο μονοκυτταρικό ταπήτιο. Η προσκόλληση οφείλεται στην έκκριση από τα κύτταρα διάφορων ινωδών πρωτεϊνών και συστατικών προσκόλλησης, όπως η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο. Μετά το πέρας της διαδικασίας προσκόλλησης, τα κύτταρα λαμβάνουν χαρακτηριστική μορφολογία (ινοβλαστών, επιθηλιακών κυττάρων κλπ). Η ανάπτυξη της καλλιέργειας *in vitro* πραγματοποιείται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό (εμπλουτισμένο με βόειο ορό, ανόργανα άλατα,

αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες), με σταθερό pH (συνήθως μεταξύ 7,2 – 7,4) και θερμοκρασία (περίπου 37 °C για κύτταρα θηλαστικών) ενώ η ατμόσφαιρα του χώρου καλλιέργειας περιέχει σταθερό ποσοστό οξυγόνου (συνήθως 95%) και διοξειδίου του άνθρακα (συνήθως 5%).

Ο ορός περιέχει πλήθος αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν διεγερτικά (ως μιτογόνα) και ωθούν τα κύτταρα σε διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Η απενεργοποίηση του ορού με επώαση επί 45 min στους 56 °C, πριν τη χρήση του, είναι απαραίτητη, για την καταστροφή του θερμοευαίσθητου συστήματος του συμπληρώματος, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε καλλιέργεια. Τα αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη) προστίθενται στο θρεπτικό υλικό με σκοπό να αποφευχθεί η επιμόλυνση της καλλιέργειας από βακτήρια ή άλλους μικροοργανισμούς.

Για τις ανακαλλιέργειες των κυττάρων εφαρμόζεται η τεχνική της θρυψινοποίησης, που επιτυγχάνεται με την έκθεση των κυττάρων στο πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, η οποία πέπτει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-επιφάνειας φιάλης. Το ένζυμο αυτό έχει μεγαλύτερη δραστικότητα μετά την απομάκρυνση των ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , τα οποία χρειάζονται οι ιντεγκρίνες για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες για την κυτταρική προσκόλληση. Η απομάκρυνση αυτών των κατιόντων γίνεται με τη βοήθεια της χηλικής ένωσης EDTA.

4.3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις κυτταρικές σειρές: η κυτταρική σειρά F11, υβριδικά κύτταρα από πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων εμβρύου αρουραίου 13 ημέρων (διασταυρωμένα) με νευροβλάστωμα ποντικού N18TG2 (a hybrid of a rat embryonic day 13 primary cultured neuron and a mouse neuroblastoma N18TG2), η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ανθρώπου SK-N-SH, η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a και η κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπου MDA.

Η υβριδική κυτταρική σειρά F11 αποτελεί ευγενική προσφορά του Καθηγητή Masaaki Matsuo (Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Τόκυο).

- Τα κύτταρα F11 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Ham's F12 εμπλουτισμένο με 18% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη. Το πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας για τα SK-N-SH κύτταρα αποτελείτο από Minimum Essential Medium Eagle (MEM-Earle) με 10% βόειο ορό (FBS), 2mM L-γλουταμίνη, 1,5 g/L όξινο ανθρακικό νάτριο, 0,1 mM διαλύματος μη απαραίτητων αμινοξέων, 1,0 mM πυροσταφυλικό νάτριο, 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη. Τέλος, για τις καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών Neuro-2a και MDA χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, αντίστοιχα, που περιείχε 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη. Για την ανακαλλιέργεια των παραπάνω σειρών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης 0,05% (w/v)/Na₂EDTA 0,02% (w/v). Όλα τα προαναφερθέντα υλικά αγοράστηκαν από την εταιρεία Biochrom ενώ το κρυοπροστατευτικό DMSO ήταν της Sigma.
- Τα αποστειρωμένα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες, όπως φιάλες 25 cm² ή 75 cm², τρυβλία, πλάκες πολλαπλών φρεατίων, κωνικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης, σιφώνια μιας χρήσεως και κρυοφιαλίδια (cryotubes) ήταν της εταιρείας Greiner.
- Επωαστικός κλίβανος κυττάρων, FORMA
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow), ELMED
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Zeiss
- Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Labofuge 400R (Heraeus Instruments)
- Αιματοκυτόμετρο Bright-Line Hematocytometer (Hausser Scientific Horsham, PA)

Διατήρηση – Ανάπτυξη κυττάρων

Στην παρούσα εργασία, όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37 °C και περιεκτικότητα 5% σε CO₂) ενώ η ανάπτυξή τους ελέγχεται στο μικροσκόπιο. Για τη διατήρηση της

καλλιέργειας, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φιάλες καλλιέργειας των 75 cm² ή 25 cm² μέχρι ποσοστού κάλυψης της επιφάνειάς τους περίπου 80%, οπότε ανακαλλιεργούνται με θρυψινοποίηση. Αναλυτικότερα, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φιάλη, τα κύτταρα υφίστανται πλύση με διάλυμα θρυψίνης/EDTA και στη συνέχεια επωάζονται με το ίδιο διάλυμα για 3-5 min στους 37 °C, ώστε να επιτραπεί η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου. Η απενεργοποίηση της θρυψίνης γίνεται με προσθήκη θρεπτικού υλικού που περιέχει 10% ορό, οι πρωτεΐνες του οποίου απενεργοποιούν το ένζυμο. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονται σε κατάλληλη αραίωση/συγκέντρωση σε νέες φιάλες καλλιέργειας.

Τα κύτταρα F11 χρησιμοποιούνται σε πειράματα μεταξύ 5^{ης} και 15^{ης} ανακαλλιέργειας, σύμφωνα με τις οδηγίες του Καθηγητή Masaaki Matsuoka.

Κατάψυξη – Απόψυξη κυττάρων

Για την κατάψυξη των κυττάρων, το ίζημα μετά την θρυψινοποίηση επαναιωρείται σε διάλυμα 90% ορού-10% DMSO και κατανέμεται σε κρυοφιαλίδια. Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό μέσο, εμποδίζοντας το σχηματισμό παγοκρυστάλλων και τη διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης που επέρχεται από την αύξηση του κυτταρικού όγκου κατά την κυτταρική ψύξη. Η ψύξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά με διαδοχική τοποθέτηση των φιαλιδίων με τα κύτταρα για 1 h στους 4 °C, 1 h στους -20 °C, 16-20 h στους -80 °C και τελικά μεταφορά σε ειδικές φιάλες αζώτου (-196 °C). Κατά την απόψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα αποψύχονται ταχύτατα με τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, φυγοκεντρούνται στις 1200 rpm για 10 min και εν συνεχεία το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται προσεκτικά σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε νέες φιάλες καλλιέργειας.

Μέτρηση κυττάρων

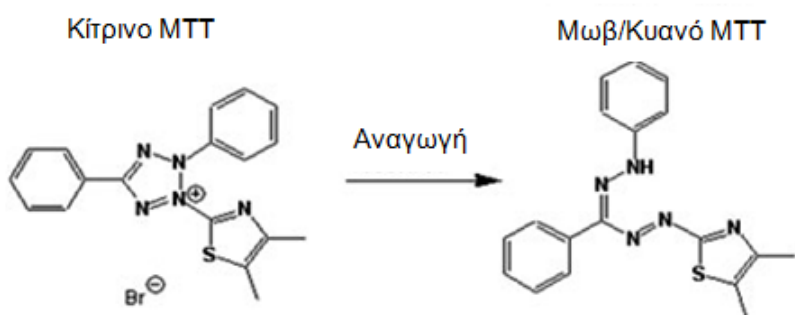
Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιματοκυττομέτρου (πλάκα Neubauer). Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες, κάθε

μια εκ των οποίων αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος. Κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1mm^2 , ενώ κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Τοποθετείται μία καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα Pasteur τοποθετούνται 10 μL από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα διαμερίσματα στις άκρες του αιματοκυτταρομέτρου μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος ισούται με τον μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων στα τέσσερα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου επί 10^4 .

4.3.2 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

4.3.2.1 Αρχή μεθόδου

Η εργαστηριακή μέθοδος MTT αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην ικανότητα μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των ζώντων κυττάρων να διασπούν τον τετραζολικό δακτύλιο του ασθενώς κίτρινου άλατος MTT, με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανών κρυστάλλων ενός παραγώγου φορμαζάνης (Σχήμα 11) [183].



Σχήμα 11: Η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζώντων κυττάρων και εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος από ασθενώς κίτρινο σε έντονο κυανό [<http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>].

Σε αντίθεση με το MTT, οι κρύσταλλοι του παραγώγου φορμαζάνης δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά. Με

την προσθήκη ενός παράγοντα διαλυτοποίησης (π.χ. DMSO), οι σχηματισθέντες κρύσταλλοι διαλύονται και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, ο δε αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζώντων κυττάρων. Η ποσοτικοποίηση του έγχρωμου (κυανού) διαλύματος γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 590 nm σε φωτόμετρο πλακιδίων ELISA.

Η παρατηρούμενη αντίδραση αναγωγής λαμβάνει χώρα μόνο όταν τα αναγωγικά ένζυμα είναι ενεργά, κατά συνέπεια αυτή η αλλαγή χρώματος αποτελεί μέτρο προσδιορισμού των ζώντων κυττάρων. Συγκρίνοντας το ποσό του παραγόμενου κυανού παραγώγου φορμαζάνης σε κύτταρα καλλιεργημένα παρουσία και απουσία του προς μελέτη παράγοντα, ελέγχεται η πιθανή τοξικότητά του ή και η ευεργετική δράση του στην βιωσιμότητα των κυττάρων.

4.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), Sigma
- DMSO, Sigma
- Φωτόμετρο μικροπλακιδίων ELISA, Sirio S, SEAK
- Panasonic KX-P1124, 24Pin, Multi-Mode Printer

Μελέτη της βιωσιμότητας κυττάρων παρουσία κολιβελίνης και παραγώγων με τη δοκιμασία MTT

Κύτταρα F11 και SK-N-SH επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων σε πυκνότητα 1×10^4 και 2×10^4 κύτταρα/φρεάτιο, αντίστοιχα, για 24 h παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού (18% και 10% FBS, αντίστοιχα). Την επόμενη μέρα προστέθηκε η CL και τα παράγωγά της σε συγκεντρώσεις 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M και 5 μ M σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσία της μισής συγκέντρωσης ορού (9% και 5% FBS, αντίστοιχα) και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 h επιπλέον. Εν συνεχεία, προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT (5 mg MTT/mL PBS) σε φρέσκο θρεπτικό υλικό έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0,65 mg/mL και ακολούθησε επώαση για 3

η στους 37 °C. Μετά την επώαση και τον έλεγχο των κυττάρων στο μικροσκόπιο, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και οι σχηματισθέντες κρύσταλλοι διαλυτοποιήθηκαν σε 100 μ L DMSO για 30 min υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος του πειράματος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων με χρήση φωτομέτρου πλακιδίων ELISA και η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράστηκε ως το % ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα που επωάσθηκαν στο καλλιεργητικό υλικό, απουσία οποιουδήποτε παράγοντα).

4.3.3 Πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού με τη χρήση του παραγώγου CL-FITC

4.3.3.1 Αρχή μεθόδου

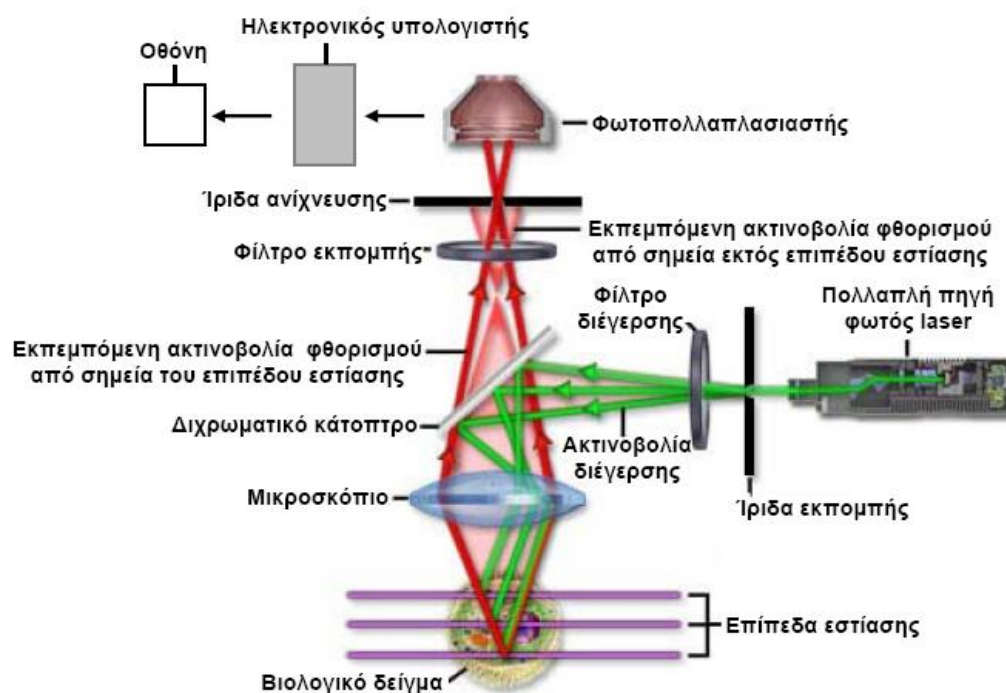
Συνεστιακή μικροσκοπία είναι μια τεχνική οπτικής απεικόνισης που χρησιμοποιείται για την αύξηση της ευκρίνειας και της αντίθεσης του οπτικού μικροσκοπίου αλλά και για την εξάλειψη του φωτός από τα μη εστιασμένα σημεία του αντικειμένου.

Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης έχει συμβάλει σημαντικά στην μελέτη της τρισδιάστατης δομής κυττάρων και οργανιδίων και προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι των κοινών οπτικών μικροσκοπίων ευρέος πεδίου. Σε αυτά περιλαμβάνονται το επιφανειακό βάθος πεδίου (including shallow depth of field), η εξάλειψη της μη εστιασμένης ακτινοβολίας (elimination of out-of-focus glare) και η λήψη διαδοχικών οπτικών τομών με τη δυνατότητα ανάλυσης του βάθους των δειγμάτων, εφαρμογές ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση δειγμάτων με μεγάλο πάχος (π.χ τμημάτων ιστών ή εμβρύων πειραματοζώων).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το φθορισμό. Φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος όπως κύτταρα ή τομές ιστών δεν απεικονίζονται καλά με μικροσκοπία φθορισμού ευρέος πεδίου, διότι φθορίζοντα σήματα από μόρια που ευρίσκονται εκτός αλλά κοντά στο επίπεδο εστίασης ανιχνεύονται, αυξάνουν το σήμα υποβάθρου (background signal) και δίνουν εικόνες με χαμηλή αντίθεση. Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser επιλύει το πρόβλημα διότι

το δείγμα φωτίζεται σημείο προς σημείο και το φως που δεν προέρχεται από το σημείο εστίασης του δείγματος απορρίπτεται. Τελικά παρατηρούνται οπτικές «τομές» του παρασκευάσματος [184].

Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες laser αποτελείται από: πολλαπλές πηγές φωτός laser, μικροσκόπιο φθορισμού, την κεφαλή σάρωσης με οπτικά και ηλεκτρονικά στοιχεία, ηλεκτρονικό υπολογιστή, λογισμικό και οθόνες για συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση της εικόνας. Το laser (εικόνα 4) παρέχει τη φωτεινή δέσμη η οποία υπό τον έλεγχο ηλεκτρονικού υπολογιστή «σαρώνει» το παρασκεύασμα. Η κεφαλή σάρωσης κατευθύνει τα φθορίζοντα σήματα από το παρασκεύασμα σε μία μικρή οπή μεταβλητής διαμέτρου όσο η κεφαλή καρφίτσας (ίριδα ανίχνευσης, pinhole) και τον φωτοπολλαπλασιαστή.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με ακτίνες laser [τροποποιημένο από <http://www.olympusconfocal.com/theory/>].

Όπως φαίνεται παραστατικά στην εικόνα 4, το laser παρέχει την ακτινοβολία διέγερσης, η οποία αφού διέλθει από το φίλτρο διέγερσης αντανακλάται σε ένα διχρωματικό κάτοπτρο και στη συνέχεια μέσω μιας σειράς από οριζόντια και κάθετα, κινούμενα, σαρωτικά κάτοπτρα (μικροσκόπιο) προσπίπτει στο

δείγμα σημείο προς σημείο. Η χρωστική στο δείγμα διεγείρεται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία και φθορίζει. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία φθορισμού μέσω των ίδιων κατόπτρων περνά το διχρωματικό κάτοπτρο και εστιάζεται στην ίριδα ανίχνευσης. Η ύπαρξη της ίριδας ανίχνευσης μας δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας οπτικών τομών στο δείγμα, καθώς απορρίπτονται οι ακτίνες που δεν προέρχονται από το σημείο εστίασης. Τελικά, όση ακτινοβολία περάσει το μικρό αυτό άνοιγμα εισέρχεται στον φωτοπολλαπλασιαστή και οπτικοποιείται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η εικόνα του confocal δεν δημιουργείται στο μικροσκόπιο και μπορούμε να τη δούμε μόνο στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή με ειδικά προγράμματα που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας (διαδοχικών οπτικών τομών).

4.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Παραφορμαλδεΰδη (PFA) (Applichem)
- Διάλυμα μονιμοποίησης (4% PFA w/v σε PBS)

Το διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής: 4 g PFA διαλύονται αρχικά σε 60 mL υπερκάθαρου νερού και θερμαίνονται στους 60 – 70 °C υπό μαγνητική ανάδευση. Προστίθενται σταγόνες διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 1 N, Applichem) που βοηθούν στη διαύγαση του διαλύματος, 10 mL PBS 10X, η υπόλοιπη απαιτούμενη ποσότητα νερού και 4 g σακχαρόζης που βοηθά στη διατήρηση της μεμβράνης των κυττάρων. Το διάλυμα διηθείται, μοιράζεται σε erpendorf ανά 1 mL και φυλάσσεται στους -20° C.

- RNάση A, Sigma
- Ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), Sigma
- Διάλυμα αντιδραστηρίου μονιμοποίησης Mowiol 4-88, Calbiochem (περιέχει 10% w/v Mowiol, 25% v/v γλυκερόλη, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5)
- Βερνίκι
- Καλυπτρίδες 13 mm, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Πλάκες 12 φρεατίων (12-well plates)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser/φθορισμού, (TCS-SP Leica)

- Μικροσκόπιο ευρέος πεδίου Olympus X81
- Υπολογιστικό πρόγραμμα Icy Software

***In vitro* μελέτες αλληλεπίδρασης του CL-FITC με κυτταρικές σειρές**

Για τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού, κύτταρα F11, SK-N-SH, Neuro-2a και MDA καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 4×10^4 κύτταρα/φρεάτιο σε πλάκες 12 φρεατίων, στις θέσεις των οποίων έχουν τοποθετηθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες των 13 mm. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C απουσία ή παρουσία CL-FITC σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,1, 1, 2 και 5 μM και οι χρόνοι επώασης κυμαίνονται από $t = 0$ μέχρι 2 h.

Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται αρχικά με PBS και στη συνέχεια με PBS που περιέχει Ca^{2+} και Mg^{2+} , επωάζονται με διάλυμα μονιμοποίησης (4% PFA w/v σε PBS) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία με διάλυμα 50 mM NH_4Cl σε PBS για 10 min, για την απόσβεση (quenching) των ομάδων αλδεϋδης που δεν έχουν αντιδράσει. Ακολουθεί έκπλυση 3 φορές με PBS, οι καλυπτρίδες ανασηκώνονται από τα φρεάτια με χρήση βελόνας και μεταλλικής λαβίδας, αποστραγγίζονται σε διηθητικό χαρτί και τοποθετούνται ανεστραμμένες στις αντικειμενοφόρους πλάκες με την μεσολάβηση 5 μL διαλύματος υποστήριξης. Τα άκρα της καλυπτρίδας καλύπτονται με βερνίκι για τη διατήρηση του παρασκευάσματος και οι καλυπτρίδες φυλάσσονται στους 4 °C μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς F11, η παραπάνω πορεία επαναλήφθηκε με επώαση των κυττάρων στους 4 °C, με σκοπό τη μελέτη συμμετοχής ή μη μιας ενεργειο-εξαρτώμενης διαδικασίας. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κορεσμού (blocking), που περιελάμβαναν επώαση των F11 κυττάρων με 50x πλάσια συγκέντρωση «ψυχρής» CL, πριν την προσθήκη του CL-FITC, για να ελεγχθεί η εξειδίκευση ή μη της κυτταρικής πρόσδεσης-δέσμευσης του CL-FITC.

Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού με ακτίνες Laser (TCS-SP Leica) με καθορισμένες ρυθμίσεις (άνοιγμα ίριδας: 1, 8 λήψεις/scans, ταχύτητα λήψεων 400 Hz, PMT1 50%, 950 V). Οι οπτικές τομές X-Y έγιναν με βήμα 1 μm , με μεγέθυνση 40x ή 63x. Η ποσοτικοποίηση

των εικόνων που προέκυψαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο και ο μέτρηση της έντασης φθορισμού/κύτταρο έγινε με τη χρήση του λογισμικού Icy Software (icy.bioimageanalysis.org), βασιζόμενοι στην υπέρθεση 5 οπτικών τομών κατά τον άξονα Z (maximum projection).

Τέλος, για την περαιτέρω αξιολόγηση του εντοπισμού του CL-FITC στα κύτταρα F11 υπό τις κατά το δυνατόν ηπιότερες συνθήκες που να προσομοιάζουν τις φυσικές, μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε live μικροσκόπιο ευρέος πεδίου (Wide-field microscopy - live-cell imaging Olympus Time-lapse Cell R IX-81). Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του φθορίζοντος πεπτιδίου σε ειδικά τρυβλία με γυάλινη βάση για μέγιστο χρόνο 2 h. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε, αντικαταστάθηκε με νέο και το δείγμα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο.

Για τη χρώση των πυρήνων, χρησιμοποιήθηκε η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική PI (propidium iodide) σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$. Η επώαση των κυττάρων με τη χρωστική έγινε για 15 min σε διάλυμα PBS 0,1 % Tween – BSA 1 mg/mL , αφού είχε προηγηθεί κατεργασία με RNάση σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/mL}$ για 15 min στο ίδιο διάλυμα.

4.4 *In vivo* μελέτες με το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο του παραγώγου CL-CSG (CL-CSG- $^{99\text{m}}\text{TcO}$)

Ραδιοϊσότοπο ή ραδιονουκλίδιο καλείται κάθε ισότοπο ενός χημικού στοιχείου, το οποίο χαρακτηρίζεται από ασταθή πυρήνα και οδηγείται σε ραδιενεργό διάσπαση εκπέμποντας ραδιενέργεια (σωματίδια α , σωματίδια β , ακτινοβολία γ). Ραδιοϊσότοπα απαντώνται στη φύση αλλά τα περισσότερα παράγονται τεχνητά από τον άνθρωπο. Τα ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται στην πυρηνική ιατρική εκπέμπουν είτε ακτινοβολία γ , είτε ακτινοβολία β , είτε και τις δύο ταυτόχρονα. Κατά προτίμηση στις διαγνωστικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ακτινοβολία γ , ενώ στις θεραπευτικές εφαρμογές εκείνα που εκπέμπουν β .

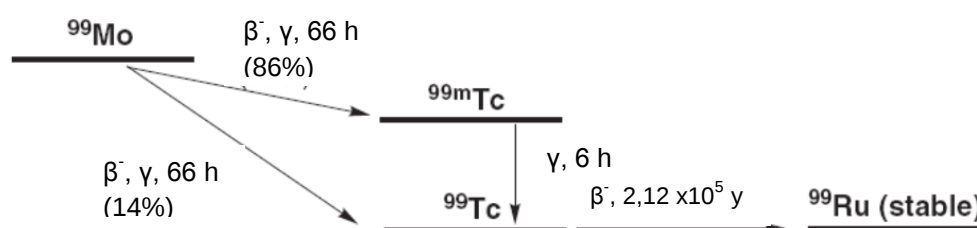
4.4.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

4.4.1.1 Το τεχνητίο (Tc)

Το τεχνητίο ($Z = 43$) βρίσκεται στη 2^η σειρά των στοιχείων μετάπτωσης και συγκεκριμένα ανήκει στην 5^η περίοδο και 7^η (VII_B) υποομάδα του Περιοδικού Πίνακα. Το τεχνητίο δεν βρίσκεται ελεύθερο στη φύση κι αποτελεί το πρώτο στοιχείο που παρασκευάστηκε τεχνητά από τον άνθρωπο [185].

Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 20 ραδιονουκλίδια του Tc, σημαντικότερα των οποίων είναι το ψευδοσταθερό ^{99}Tc , με χρόνο ημιζωής $2,1 \times 10^5$ έτη και το βραχύβιο μετασταθερό ισότοπό του, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, με εκτεταμένη χρήση στη Διαγνωστική Πυρηνική Ιατρική.

Το τεχνητίο $^{99\text{m}}\text{Tc}$ παράγεται κατά τη διάσπαση του μητρικού ραδιονουκλιδίου ^{99}Mo , απ' όπου διαχωρίζεται βάσει των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δύο νουκλιδίων [186]. Εν συνεχεία, το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ μεταπίπτει προς το ^{99}Tc , το οποίο και υφίσταται μεταστοιχείωση προς το σταθερό ^{99}Ru . Οι ανωτέρω πυρηνικές αντιδράσεις περιγράφονται συνοπτικά στο σχήμα 12 [187].



Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση διάσπασης του ^{99}Mo και παραγωγής $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [187].

Η εκτεταμένη χρήση του μετασταθερού $^{99\text{m}}\text{Tc}$ στην πυρηνική ιατρική ως διαγνωστικού παράγοντα, οφείλεται στις πολύ καλές φυσικές του ιδιότητες. Ο βραχύς - αλλά ικανοποιητικός για χημική σύνθεση και διαγνωστική εφαρμογή – χρόνος υποδιπλασιασμού του τεχνητίου $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6.03 \text{ h}$) [188] καθώς και η χαμηλής ενέργειας μονοενεργητική ακτινοβολία γ (140 KeV) που εκπέμπεται κατά τη διάσπαση του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ με ταυτόχρονη απουσία σωματιδιακής ακτινοβολίας β έχουν ως αποτέλεσμα την μικρή επιβάρυνση

του ασθενούς με ακτινοβολία. Στα πλεονεκτήματά αυτά προστίθεται το συγκριτικά μικρό κόστος παρασκευής του καθώς και η δυνατότητα διάθεσής του σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο παραγωγής του μέσω φορητών γεννητριών $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ [189]. Τέλος, η χημεία του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ είναι “ευέλικτη”, και επιτρέπει τον σχεδιασμό και την παραγωγή ιχνηθετημένων παραγώγων καθώς και την ενσωμάτωση του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ σε πλήθος βιολογικά ενεργών ουσιών.

4.4.1.2 Το ρήνιο (Re)

Το ρήνιο ανήκει στην 6^η περίοδο και 7^η (VII_B) υποομάδα του Περιοδικού Πίνακα κι αποτελεί το 75^ο στοιχείο αυτού. Το φυσικό ρήνιο ($Z=75$, μέση ατομική μάζα 186,2) υπάρχει ως μίγμα δύο νουκλιδίων, του μοναδικού σταθερού ισοτόπου του, ^{185}Re (37,4%) και του ασταθούς αλλά εξαιρετικά μακρόβιου ραδιοϊσοτόπου ^{187}Re (62,6%, $t_{1/2} = 7 \times 10^{10}$ y) που εκπέμπει ασθενή ακτινοβολία β^- ($\beta^-_{\text{max}} = 0.003$ MeV) σε αναλογία 2:1 [190,191]. Εκτός από τα δύο αυτά φυσικά νουκλίδια του ρηνίου έχουν παραχθεί και τεχνητά ραδιονουκλίδια.

Η χημική ομοιότητα του ρηνίου με το τεχνητό καθιστά το φυσικό ρήνιο ($^{185}\text{Re} / ^{187}\text{Re}$) ικανό να χρησιμοποιείται εναλλακτικά με το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ για την ταυτοποίηση των συμπλόκων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$, τα οποία ως ραδιενεργά και παραγόμενα σε συγκεντρώσεις 10^{-9} M δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τις κλασσικές μεθόδους. Το φυσικό ρήνιο διατίθεται σε χαμηλότερες τιμές από το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ και ως σταθερό μέταλλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κοινά εργαστήρια χημείας.

4.4.1.3 Η χημεία των ενώσεων του τεχνητίου και ρηνίου

Όπως έχει αναφερθεί, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ρηνίου και του τεχνητίου, ως στοιχείων μετάπτωσης της 7^{ης} Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα (VII_B), είναι παρόμοιες. Η χημική αυτή συμπεριφορά είναι γενική για τα στοιχεία μετάπτωσης της δεύτερης και της τρίτης σειράς, τα οποία ανήκουν στην ίδια υποομάδα και οφείλεται στη λανθανιδική συστολή. Η αναμενόμενη αύξηση της ατομικής ακτίνας μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου στοιχείου μετάπτωσης της ίδιας ομάδας δεν πραγματοποιείται παρά μόνο ελάχιστα εξαιτίας της συμπλήρωσης των εσωτερικών τροχιακών 4f, οπότε έχουμε

παραπλήσιους ατομικούς όγκους. Έτσι, οι ατομικές ακτίνες του τεχνητίου και του ρηνίου είναι ισοδύναμες και επομένως τα δύο στοιχεία έχουν σε μεγάλο βαθμό παρόμοιες ιδιότητες.

Τα ηλεκτρόνια των συμπληρωμένων 4f τροχιακών, που ευρίσκονται πλησίον του πυρήνα των ατόμων και ιόντων των λανθανιδών, προασπίζονται από τις στοιβάδες 5s και 5p κι επομένως οι αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον έχουν μικρή χημική σημασία. Όμως, η ύπαρξη κενών θέσεων στις ημισυμπληρωμένες d υποστοιβάδες δίνει στα στοιχεία μετάπτωσης όξινο χαρακτήρα κατά Lewis (δέχονται e^-), οπότε σχηματίζουν ενώσεις τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές καταστάσεις οξείδωσης.

Το τεχνητίο και το ρήνιο, όπως και τα περισσότερα στοιχεία μετάπτωσης σχηματίζουν ενώσεις συναρμογής με διάφορους συναρμοτές, οι οποίοι σταθεροποιούν το μέταλλο σε διαφορετικές βαθμίδες οξείδωσης. Μέχρι σήμερα, έχουν παρασκευαστεί και χαρακτηριστεί σταθερά σύμπλοκα των δύο στοιχείων, όπου τα μέταλλα βρίσκονται σε οξειδωτικές βαθμίδες από (-I) έως (VII).

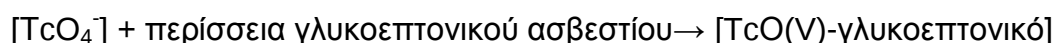
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οξειδωτική βαθμίδα V του τεχνητίου-99m, διότι υπάρχει μεγάλος αριθμός συναρμοτών με άτομα-δότες ηλεκτρονίων (S, N, O, P) που σταθεροποιούν το τεχνητίο (V). Ανάμεσα στις πολλές κατηγορίες ενώσεων του τεχνητίου που μπορούν να δώσουν αντιδράσεις αντικατάστασης για το σχηματισμό τελικών συμπλόκων του τεχνητίου σε βαθμίδα οξείδωσης (V), αποτελούν τα σύμπλοκά του με διάφορα υδροξυοξέα, όπως το γλυκονικό, το γλυκοεπτονικό κ.ά. Τα σύμπλοκα αυτά παρασκευάζονται εύκολα σε υδατικά διαλύματα με αναγωγή των υπερτεχνητικών ανιόντων από χλωριούχο κασσίτερο (SnCl_2), παρουσία περίσσειας του υδροξυοξέος ή του μετά ασβεστίου ή νατρίου αλατός του.

Η συνηθέστερη οξειδωτική βαθμίδα του Re είναι η (VII), η οποία λαμβάνεται με ήπια οξείδωση του μετάλλου και των περισσότερων ενώσεών του παρουσία νερού. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τις ομοιότητές του με το Tc, οι ενώσεις του Re οξειδώνονται ευκολότερα και είναι κινητικά αδρανέστερες.

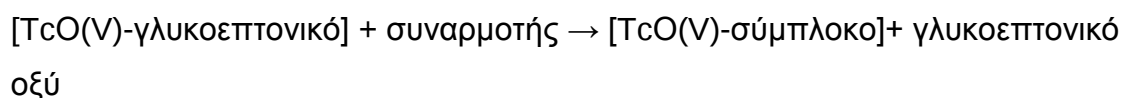
4.4.1.4 Μέθοδοι παρασκευής συμπλόκων οξο-τεχνητίου και οξο-ρηνίου

Σχεδόν σε όλες τις μεθόδους σύνθεσης συμπλόκων του τεχνητίου, ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται τα υπερτεχνητικά ιόντα TcO_4^- (το μέταλλο βρίσκεται σε οξειδωτική βαθμίδα VII), επειδή είναι εύκολα διαθέσιμα μέσω γεννητριών μολυβδαινίου-τεχνητίου. Γενικά, για τη σύνθεση συμπλόκων του Tc απαιτείται αρχικά η αναγωγή των υπερτεχνητικών ιόντων σε χαμηλότερη οξειδωτική βαθμίδα και κατόπιν η συναρμογή του ανηγμένου μεταλλικού κέντρου με τον κατάλληλο συναρμοτή, ο οποίος και σταθεροποιεί το μέταλλο.

Συνήθης τρόπος παραλαβής των συμπλόκων του τεχνητίου, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή, είναι η μέθοδος αντικατάστασης με την χρήση ενός προδρόμου συμπλόκου, κυρίως με γλυκοεπτονικό οξύ, στην οξειδωτική βαθμίδα (V).



Εν συνεχεία, τα πρόδρομο σύμπλοκο του $\text{TcO(V)}\text{-γλυκοεπτονικού}$ αντιδρά με κατάλληλους συναρμοτές για την δημιουργία οξοσυμπλόκων του τεχνητίου (V).



Μετά την αντίδραση αναγωγής των υπερτεχνητικών ανιόντων μία μόνο οξοομάδα παραμένει συνδεδεμένη με το μέταλλο, με τις υπόλοιπες να πρωτονιώνονται και να απομακρύνονται υπό την μορφή του νερού. Η οξοομάδα του μεταλλικού πυρήνα εξουδετερώνει την μεγάλη έλλειψη ηλεκτρονιακού φορτίου του μετάλλου. Οι υπόλοιπες κενές θέσεις καταλαμβάνονται από άτομα δότες του συναρμοτή. Η μεθοδολογία αυτή οδηγεί στη δημιουργία λιγότερων παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα την πιο εύκολη απομόνωση συμπλόκων σε καθαρότερη μορφή.

4.4.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

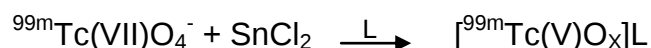
- CH_3OH , Merck
- $[\text{Bu}_4\text{N}][^{185/187}\text{ReOCl}_4]$
- γλυκοεπτονικό ασβέστιο ($\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{16}\text{Ca}$)
- άνυδρος χλωριούχος κασσίτερος (SnCl_2)
- τριφθοροξικό οξύ (TFA), Sigma
- όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3), Fluka
- φυσιολογικός ορός (0,9% NaCl), DEMO
- διάλυμα $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (τα διαλύματα του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ που χρησιμοποιούνται προέρχονται κατά κανόνα από γεννήτριες $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ και είναι πολύ χαμηλής συγκέντρωσης, της τάξης $10^{-6} - 10^{-8} \text{ M}$)
- Αιθανόλη, Riedel de Haen
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος RC5C, Sorvall
- Το σύστημα αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αντίστροφης φάσης, της Waters, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση, την ταυτοποίηση και την απομόνωση των συμπλόκων του ρηνίου και του τεχνητίου αποτελείται από αντλία Model 600E, ανιχνευτή 2487 Dual λ Absorbance UV της εταιρίας Waters, ο οποίος έχει συνδεθεί στην έξοδο της αναλυτικής στήλης και παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής φασμάτων έντασης απορρόφησης σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (οι ρυθμίσεις είναι στα 220 και στα 254 nm) και ανιχνευτή ακτινοβολίας γ τύπου Gabi της εταιρίας Raytest, για την ανίχνευση ραδιενέργειας, ο οποίος έχει συνδεθεί σε σειρά μετά τον ανιχνευτή UV.
- Αναλυτική στήλη 10 μm τύπου Techsil CN/Nucleosil (250 mm x 4.6 mm ID), HPLC Technology
- Αιθέρας
- Πλαστικοί σωλήνες πολυστυρολίου μιας χρήσης
- Κλωβοί ομαδικής στέγασης πειραματοζώων
- Μετρητής ακτινοβολίας-γ πολλαπλών δειγμάτων, MINAXI 5000 Auto Gamma Counter της εταιρείας Packard

4.4.2.1 Σύμπλεξη του πεπτιδίου CL-CSG με ψυχρό ^{185/187} Re – Παρασκευή του συμπλόκου CL-CSG-ReO

Για τη σύμπλεξη του πεπτιδίου CL-CSG με το ψυχρό ^{185/187} Re, μεθανολικό διάλυμα του αντίστοιχου παραγώγου (12 mg, 3,9 μmol) αναμιγνύεται με το αντιδραστήριο [Bu₄N][^{185/187}ReOCl₄] (5 mg σε 0,5 mL μεθανόλης). Το μίγμα ανακινείται και αφήνεται να αντιδράσει για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το προκύπτον σύμπλοκο καθαρίζεται με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC και συλλέγονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην κύρια κορυφή. Ο έλεγχος της καθαρότητας του συμπλόκου έγινε με αναλυτική RP-HPLC και η ταυτοποίησή του με φασματομετρία μάζας ESI-MS.

4.4.2.2 Ραδιοεπισήμανση του CL-CSG με ^{99m}Tc – Παρασκευή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO

Η επισήμανση του παραγώγου CL-CSG με το ^{99m}Tc (CL-CSG-^{99m}TcO) πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 700 μL διαλύματος Na^{99m}TcO₄ (5 – 20 mCi) και 50 μL υδατικού διαλύματος, που περιείχε 4 mg γλυκοεπτονικό ασβέστιο και 4 μg χλωριούχο κασσίτερο, σε 50 μg λυοφιλοποιημένου πεπτιδίου CL-CSG (= συναρμοτής, L). Η αντίδραση σύμπλεξης ολοκληρώνεται με επώαση του μίγματος για 30 min σε θερμοκρασία 37 °C.



Στο πέρας του χρόνου επώασης, δείγμα του μίγματος αντίδρασης ενίεται στην RP-HPLC προς έλεγχο. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (*gradient*), όπως περιγράφεται στον Πίνακα 5.

Η ανάλυση του CL-CSG-^{99m}TcO πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, σύμφωνα με τις κατωτέρω συνθήκες:

Στήλη: C-18 RP column (250 x 4 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm)

Διαλύτες έκλουσης: A: 0,1 % TFA / MeOH (v/v)

B: 0,1 % TFA / H₂O (v/v)

Ταχύτητα ροής: 1,0 mL/min

Γραμμική μεταβολή σύστασης του διαλύματος έκλουσης: όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Μεταβολή των συνθηκών έκλουσης των συμπλόκων του $^{185/187}\text{Re}$ και του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ κατά την αναλυτική RP-HPLC.

Χρόνος (min)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	5	95
1,01	5	95
15,00	95	5
25,00	95	5
25,01	100	0
30,00	100	0
31,00	5	95

Το ραδιοσύμπλοκο CL-CSG- $^{99\text{m}}\text{TcO}$ μελετήθηκε ως προς τη σταθερότητά του στις πιο κάτω συνθήκες:

4.4.2.3 Μελέτες σταθερότητας του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- $^{99\text{m}}\text{TcO}$

Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG- $^{99\text{m}}\text{TcO}$ σε θερμοκρασία δωματίου σε συνάρτηση με το χρόνο

Δείγμα 100 μL του μίγματος αντίδρασης παρασκευής του ραδιοσυμπλόκου ενίεται στην RP-HPLC. Βάσει του χρωματογραφήματος επισήμανσης του ραδιοπεπτιδίου συλλέγεται ποσοτικά σε γυάλινο φιαλίδιο η κορυφή που αντιστοιχεί στο χρόνο έκλουσης του συμπλόκου και το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 6 h μετά την επισήμανση. Ο έλεγχος της σταθερότητας πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος με RP-HPLC βάσει της παραγράφου 4.4.2.2.

Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO παρουσία περίσσειας κυστεΐνης συναρτήσει του χρόνου

Η σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου (στο μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του, αλλά και ως απομονωμένο προϊόν) μελετήθηκε παρουσία περίσσειας κυστεΐνης, που θεωρείται ανταγωνιστής σύμπλεξης με το ραδιομέταλλο [192].

Για τον σκοπό αυτό δείγματα από το μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του ραδιοσυμπλόκου και από το απομονωμένο ραδιοσύμπλοκο, προστέθηκαν σε υδατικά διαλύματα Cys τελικής συγκέντρωσης 10^{-4} M και 10^{-5} M, αντίστοιχα.

Τα νέα διαλύματα επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C για χρονικά διαστήματα 60 και 30 min, αντίστοιχα. Στο τέλος του χρόνου επώασης πραγματοποιείται έλεγχος με ραδιο-RP-HPLC.

Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO παρουσία πλάσματος ανθρώπινου αίματος συναρτήσει του χρόνου (plasma stability)

Από υγιή άτομα-δότες λαμβάνεται ολικό αίμα σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου, τα οποία περιέχουν ξηρό αντιπηκτικό (ηπαρίνη). Τα σωληνάκια φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 15 min και συλλέγεται το υπερκείμενο, που αποτελεί το πλάσμα.

Σε 900 μ L ανθρώπινου πλάσματος προστίθενται 100 μ L διαλύματος του ραδιοσυμπλόκου (4mCi/800 μ L) και το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 2 min ή και 30 min. Η επώαση διακόπτεται στο τέλος των προαναφερθέντων χρονικών διαστημάτων με προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης (900 μ L απόλυτης αιθανόλης σε 450 μ L δείγματος), έτσι ώστε να επιτευχθεί η καταβύθιση των πρωτεϊνών του πλάσματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 30 min και συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος. Ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας τόσο στο ίζημα, όσο και στο υπερκείμενο διάλυμα (καθώς και στο ειδικό φίλτρο, 0,22 μ m, απ' όπου διηθείται το υπερκείμενο, προκειμένου να διασφαλισθεί η απομάκρυνση τυχόν μικροσωματιδίων). Τέλος το υπερκείμενο αναλύεται με ραδιο-RP-HPLC.

4.4.2.4 Χορήγηση του CL-CSG-^{99m}TcO σε φυσιολογικά πειραματόζωα – Μελέτες *in vivo* βιοκατανομής

Τα πειραματόζωα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες βιοκατανομής του CL-CSG-^{99m}TcO ήταν λευκά αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss Albino μέσου βάρους 26 ± 3 g. Η προμήθειά τους έγινε από το εκτροφείο πειραματοζώων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Ο πειραματισμός έγινε σύμφωνα με τις προδιαγραφές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής για χρήση πειραματοζώων. Η μελέτη του επισημασμένου παραγώγου πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 2 min, 30 min και 120 min. Για κάθε χρονικό διάστημα μελετήθηκε μία ομάδα τριών πειραματοζώων.

Τα επί μέρους κύρια διαλύματα και το ακριβές πρωτόκολλο της *in vivo* χορήγησης περιγράφονται στη συνέχεια:

Διάλυμα του ραδιοσυμπλόκου για τις *in vivo* μελέτες βιοκατανομής:

Δείγμα από το μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO ενίεται στη ραδιο-RP-HPLC και συλλέγονται τα κλάσματα που αντιστοιχούν στο ραδιοσύμπλοκο. Από τα κλάσματα αυτά (~1 mL, ~200-300 μCi) εκδιώκεται η μεθανόλη, με ρεύμα αζώτου, και το υπόλειμμα αραιώνεται μέχρι τα 10 mL με φυσιολογικό ορό, ώστε η τελική τιμή ραδιενέργειας ανά όγκο να είναι περίπου 20-30 μCi/mL.

Πρότυπο διάλυμα αναφοράς του ραδιοσυμπλόκου:

Όγκος 1 mL του προς χορήγηση διαλύματος του ραδιοσυμπλόκου μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και η φιάλη πληρούται με φυσιολογικό ορό. Μέρος του διαλύματος αυτού διανέμεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες ανά 1 mL. Η ραδιενέργεια κάθε σωλήνα αντιστοιχεί στο 10% της χορηγούμενης στο πειραματόζωο δόσης ραδιενέργειας. Η ραδιενέργεια των διαλυμάτων αυτών μετράται μαζί με τα δείγματα των ιστών/οργάνων για να γίνει διόρθωση της απώλειας της ραδιενέργειας λόγω διάσπασης του ^{99m}Tc.

Πρωτόκολλο in vivo μελετών βιοκατανομής - Εκτέλεση του πειράματος:

Τα πειράματα της βιοκατανομής πραγματοποιήθηκαν με το ραδιοσύμπλοκο CL-CSG-^{99m}TcO σε απομονωμένη μορφή. Τα πειραματόζωα ακινητοποιούνται σε ειδική διάταξη (παγίδα) και το προς μελέτη ραδιοσύμπλοκο χορηγείται με ενδοφλέβια ένεση στη φλέβα της ουράς κάθε πειραματόζωου (1-2 μ Ci σε 100 μ L διαλύματος μεθανόλης:φυσιολογικού ορού 1:9). Ταυτόχρονα σημειώνεται ο χρόνος χορήγησης και το πειραματόζωο φέρεται σε ειδικό θάλαμο που επιτρέπει τη συλλογή των απεκκρινόμενων ούρων και παραμένει εκεί μέχρι τη στιγμή της θυσίας του. Ένα λεπτό πριν την παρέλευση του προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος, το πειραματόζωο αναισθητοποιείται σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς αιθέρα και με τη συμπλήρωση του χρόνου θυσιάζεται με καρδιακτομή. Λαμβάνονται δείγματα του αίματός του, τα οποία τοποθετούνται σε προζυγισμένους σωλήνες, αφαιρείται η ουρά και καταγράφεται το βάρος του ζώου. Στη συνέχεια το ζώο ανατέμνεται και συγκεντρώνονται τα προς μελέτη όργανα (ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η καρδιά, το στομάχι, τα νεφρά, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, τα έντερα) καθώς και δείγματα μυών. Τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα χαρτιά ζύγισης, ζυγίζονται και καταγράφεται το βάρος τους και τέλος τοποθετούνται σε αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα μεγαλύτερα όργανα (π.χ. ήπαρ, έντερα) μοιράζονται σε περισσότερους σωλήνες, ώστε να αποφευχθούν σφάλματα μετρήσεων οφειλόμενα στη γεωμετρία των δειγμάτων. Τα απεκκρινόμενα ούρα του ζώου που έχουν συλλεγεί καθώς και η ουρά του, τοποθετούνται επίσης σε αριθμημένους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς ζύγιση. Η ραδιενέργεια των δειγμάτων μετράται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας πολλαπλών δειγμάτων με ανιχνευτή σπινθηρισμών, όπου μετράται και καταγράφεται ο αριθμός των κρούσεων ανά min (counts per minute, cpm) του κάθε δείγματος και γίνεται διόρθωση των μετρήσεων βάσει προτύπου διαλύματος, το οποίο αντιστοιχεί στο 10% της χορηγούμενης δόσης.

Από τα cpm του διαλύματος αναφοράς ανά πειραματόζωο (10% της χορηγούμενης δόσης ακτινοβολίας) αφαιρούνται οι κρούσεις της ουράς και υπολογίζεται η ραδιενέργεια ανά όργανο και ανά γραμμάριο βάρους για κάθε πειραματόζωο, σύμφωνα με τις σχέσεις που ακολουθούν.

$$\% \text{ Δόση / όργανο} = \frac{\text{cpm δείγματος οργάνου} \times \text{βάρους οργάνου, g}}{(\text{cpm διαλ.αναφοράς} \times 10 - \text{cpm ουράς}) (\text{βάρους δείγματος, g})} \times 100$$

$$\% \text{ Δόση / g} = \frac{\text{cpm δείγματος οργάνου}}{(\text{cpm διαλ.αναφοράς} \times 10 - \text{cpm ουράς}) (\text{βάρους δείγματος, g})} \times 100$$

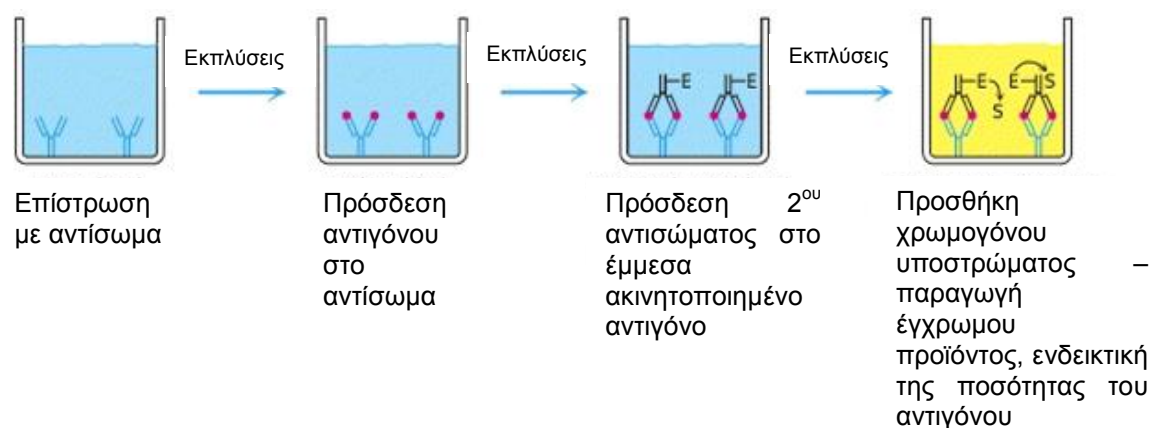
Για τον υπολογισμό της δόσης ανά όργανο στο αίμα και τους μυς, γίνεται η παραδοχή ότι αυτά αποτελούν το 7% και το 43% αντίστοιχα του μέσου βάρους του σώματος του κάθε πειραματοζώου.

4.5 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της CL με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο με μέθοδο τύπου ELISA

4.5.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Μέθοδος Προσδιορισμού ή Ενζυμοανοσοανάλυση Στερεάς Φάσεως) αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο των ανοσοενζυμικών αναλυτικών τεχνικών, με τις οποίες καθίσταται εφικτή η ποιοτική ανίχνευση της παρουσίας ή ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα άγνωστο δείγμα [193,194]. Στην ευρύτερα χρησιμοποιούμενη εκδοχή της μεθόδου αυτής (sandwich ELISA) ένα ειδικό αντίσωμα (capture antibody), που είναι «ακινητοποιημένο» (immobilized) στα μικροφρεάτια ELISA, αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε συγκεκριμένη περιοχή (επίτοπο) του προς ανίχνευση αντιγόνου ενώ ένα διαφορετικό ειδικό αντίσωμα, επισημασμένο με ένζυμο (labeled antibody), αναγνωρίζει και προσδένεται σε διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου, οδηγώντας στη δημιουργία ενός “sandwich” (Σχήμα 13). Σε μερικές περιπτώσεις, το αντίσωμα που προστίθεται για το σχηματισμό του “sandwich” δεν είναι άμεσα ιχνηθετημένο, οπότε ακολουθεί προσθήκη αντι-αντισώματος (δεύτερο αντίσωμα, second antibody) ιχνηθετημένου με ένζυμο. Σε τελικό στάδιο προστίθεται ειδικό ενζυμικό υπόστρωμα το οποίο παρουσία του ενζύμου

μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Η ανάπτυξη χρώματος είναι ενδεικτική της παρουσίας του αντιγόνου στο άγνωστο δείγμα ενώ η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης μπορεί να οδηγήσει σε ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσής του μέσω πρότυπης καμπύλης [193].



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση διπλής – «sandwich» ELISA. Όπου E: ένζυμο (enzyme), S: υπόστρωμα (substrate).

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης CL και Αβ στηρίζεται στη βασική αρχή της ELISA, αλλά είναι πιο σύνθετη [195,196]. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή στηρίζεται α) στη χρήση του παραγώγου CL-βιοτίνη, σε συνδυασμό με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν είτε το πεπτιδίο Αβ είτε το παράγωγο CL-βιοτίνη, και, β) στην αξιοποίηση του συστήματος βιοτίνη-(στρεπ्ट)αβιδίνης.

Η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση της γλυκοπρωτεΐνης αβιδίνης και της βακτηριακής προέλευσης ανάλογης πρωτεΐνης, στρεπταβιδίνης, με την βιοτίνη χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια ($K_d \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [197] και παράλληλα εμφανίζεται ανθεκτική σε αλλαγές θερμοκρασίας και pH. Η σταθερά σχηματισμού του συμπλέγματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης συγκαταλέγεται μεταξύ των υψηλοτέρων, που έχουν παρατηρηθεί σε βιολογικά συστήματα. Το χαρακτηριστικό αυτό σε συνδυασμό με την ιδιότητα της βιοτίνης να μην επηρεάζει τη βιολογική δράση των περισσότερων μορίων όταν συζευχθεί ομοιοπολικά σ' αυτά, οδηγούν στην ευρεία χρήση του παραπάνω συστήματος (σύστημα βιοτίνης-(στρεπ्ट)αβιδίνης) ως βιοαναλυτικού εργαλείου με πλήθος βιοχημικών και ιδιαίτερα ανοσοχημικών εφαρμογών.

Το σύστημα βιοτίνης-(στρεπ्ट)αβιδίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες τύπου ELISA όχι μόνο στο τελικό στάδιο ανίχνευσης και προσδιορισμού της μελετώμενης αλληλεπίδρασης αλλά και σε αρχικό στάδιο της πειραματικής πορείας, για την επίστρωση των μικροφρεατίων.

4.5.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και Όργανα

- Αβ(1-40), Anaspec
- CL-βιοτίνη
- Στρεπταβιδίνη, Sigma
- BSA, Sigma
- Tween 20, Sigma
- Μονοκλωνικό αντίσωμα 6E10 έναντι του Αβ, Covance
- Αντίσωμα έναντι της IgG ποντικού συζευγμένο με HRP (anti-mouse IgG/HRP), Sigma
- Αντίσωμα έναντι της IgG κουνελιού συζευγμένο με HRP (anti-rabbit IgG/HRP), Sigma
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι βιοτίνης, ανεπτυγμένο in-house σε κουνέλι [198]
- Διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων (PBS) 0,01 M pH 7,4
 - KH₂PO₄ 0,204 g
 - NaHPO₄ · 2H₂O 1,424 g
 - KCl 0,201 g
 - NaCl 8,766 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε ~800 mL H₂O, το pH ρυθμίζεται σε 7,4 και στη συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρις ενός 1 L .

- Διάλυμα φωσφορικών (PB) 0,01 M pH 7,4
 - KH₂PO₄ 0,204 g
 - NaHPO₄ · 2H₂O 1,424 g

Τα συστατικά διαλύονται σε ~800 mL H₂O, το pH ρυθμίζεται σε 7,4 και στη συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O μέχρις ενός 1 L .

- Διάλυμα ανθρακικών 0,05 M pH 9,6

Na₂CO₃ 0,159 g

NaHCO₃ 0,253 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 100 mL H₂O.

- Διάλυμα έκπλυσης: 0,1% Tween 20 σε PBS 0,01 M pH 7,4
- Διάλυμα κορεσμού: 2% BSA σε PB 0,01 M pH 7,4 (πρωτόκολλο A) ή 5% BSA σε PBS 0,01 M pH 7,4 (πρωτόκολλο B)
- Διάλυμα αραίωσης A: 2% BSA- 0,1% Tween 20 σε PBS 0,01 M pH 7,4 (πρωτόκολλο A) ή 5% BSA- 0,1% Tween 20 σε PBS 0,01 M pH 7,4 (πρωτόκολλο B)
- Διάλυμα αραίωσης B: 0,2% BSA- 0,05% Tween 20 σε PBS 0,01 M pH 7,4
- Διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος (ABTS/H₂O₂)

Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄ · 2H₂O) 8,900 g

Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇) 10,537 g

Υπερβορικό νάτριο (NaBO₃) 0,241 g

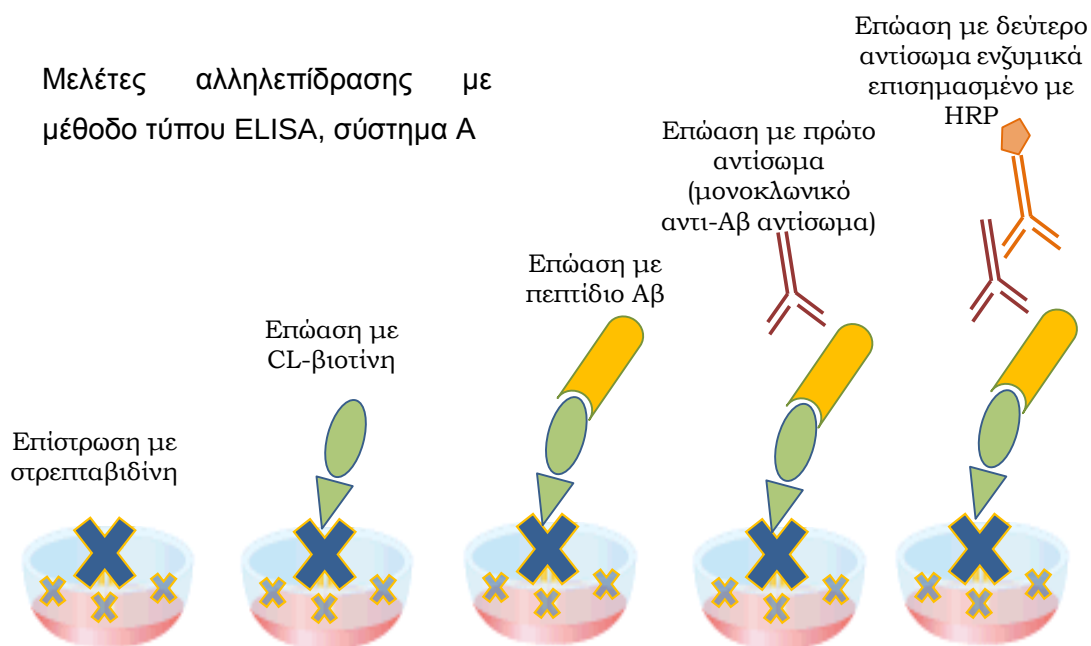
Τα παραπάνω συστατικά αυτά διαλύονται σε ~400 mL H₂O, το pH ρυθμίζεται σε 4,4 με NaOH 1N και συμπληρώνεται ο όγκος έως 500 mL με H₂O. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,5 g ABTS και ακολουθεί ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης.

- Πλακίδια μικροπιλοδότησης ELISA, Costar
- Επωαστικός κλίβανος Precision, 4EG
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων ELISA, Model Multiwash II (Tricontinent)
- Φωτόμετρο πλακιδίων ELISA, Model Sirio S (Seac)

Στα πλαίσια του σχεδιασμού και της βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας, δοκιμάστηκαν και αναπτύχθηκαν διάφορες εκδοχές της μεθόδου ELISA (συστήματα ELISA) , που διέφεραν κατά βάση στη σειρά προσθήκης των επιμέρους αντιδραστηρίων κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και στις συνθήκες του κάθε σταδίου επώασης.

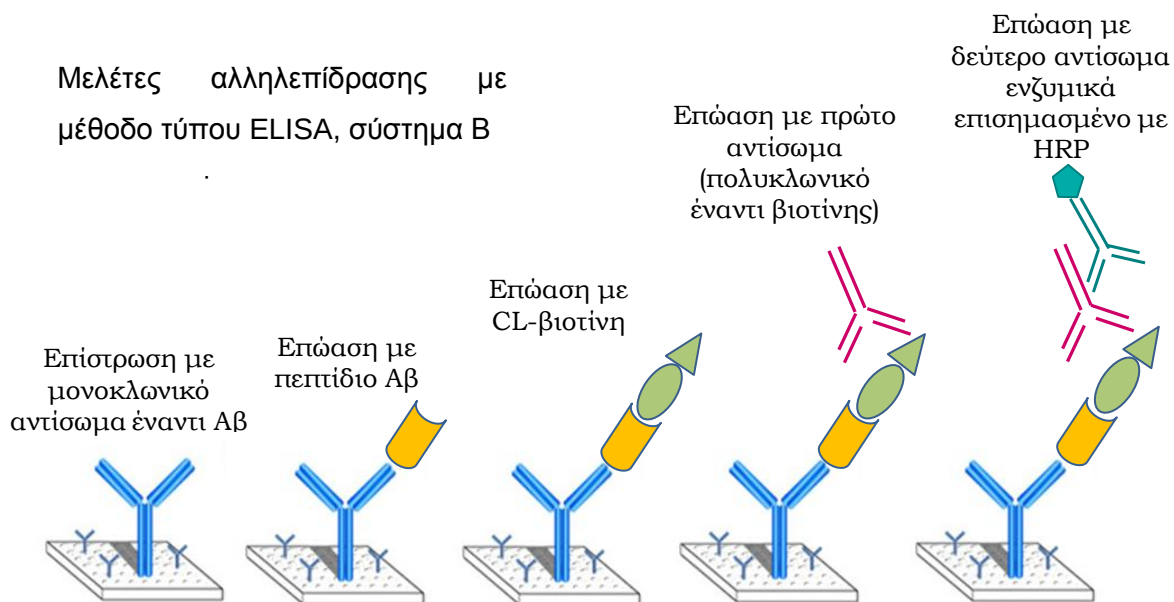
Από τα συστήματα που δοκιμάστηκαν εφαρμόστηκαν τελικά δύο, τα A και B, οι πορείες των οποίων παρουσιάζονται στα Σχήματα 14 και 15.

Μελέτες αλληλεπίδρασης με
μέθοδο τύπου ELISA, σύστημα A



Σχήμα 14: Μέθοδος τύπου ELISA, σύστημα A: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την μελέτη της διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης CL-Aβ *in vitro*.

Μελέτες αλληλεπίδρασης με
μέθοδο τύπου ELISA, σύστημα B



Σχήμα 15: Μέθοδος τύπου ELISA, σύστημα B: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την μελέτη της διερεύνησης της πιθανής αλληλεπίδρασης CL-Aβ *in vitro*.

Τα αναλυτικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ανά σύστημα είναι:

Πρωτόκολλο Α: Πλάκες μικροτιτλοδότησης από πολυστυρόλιο 96 φρεατίων, επιστρώνονται με στρεπταβιδίνη, 10 µg/mL σε PB, (100 µL/φρεάτιο) και παραμένουν για 16-20 h στους 37°C. Την επόμενη ημέρα, αποχύνεται το υγρό, ακολουθεί έκπλυση (250 µL PBS/φρεάτιο) και οι τυχόν ελεύθερες θέσεις δέσμευσης των φρεατίων καλύπτονται με διάλυμα κορεσμού (200 µL/φρεάτιο) για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια εκπλένονται 1 φορά (300 µL PBS/φρεάτιο) και αποστραγγίζονται σε διηθητικό χαρτί. Κατόπιν προστίθεται το παράγωγο CL-βιοτίνη, 5 µg/mL, σε διάλυμα αραίωσης Α (100 µL/φρεάτιο) και οι πλάκες επωάζονται για 90 min στους 37 °C. Η υγρή φάση αποχύνεται και τα φρεάτια εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα έκπλυσης. Ακολουθεί η προσθήκη 0-20 µg/mL Αβ σε διάλυμα αραίωσης Α (100 µL/φρεάτιο). Το σύστημα αφήνεται να επωαστεί για 2 h στους 37 °C. Μετά από 3 πλύσεις με το διάλυμα έκπλυσης, τα φρεάτια επωάζονται με μονοκλωνικό αντι-Αβ αντίσωμα 6E10 (1 µg/mL), σε διάλυμα αραίωσης Β (100 µL/φρεάτιο) για 2 h στους 37 °C. Τα φρεάτια εκπλένονται και πάλι και αποστραγγίζονται σε διηθητικό χαρτί. Ακολουθεί επώαση με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών IgG ποντικού συζευγμένο με την HRP (αραίωση 1:1500 από το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα αντισώματος), σε διάλυμα αραίωσης Β (100 µL/φρεάτιο) για 2 h στους 37 °C. Οι εκπλύσεις των φρεατίων επαναλαμβάνονται. Τελικά οι πλάκες επωάζονται με το διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος (100 µL/φρεάτιο), επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από φως για την ανάπτυξη χρώματος και μετράται η οπτική απορρόφηση στα 405 nm σε φωτόμετρο πλακιδίων ELISA.

Ο έλεγχος μη ειδικών προσδέσεων πραγματοποιείται σε όλα τα επιμέρους στάδια της πειραματικής διαδικασίας με τη χρήση αρνητικών μαρτύρων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται: φρεάτια στα οποία δεν επιστρώνεται στρεπταβιδίνη (επώαση μόνο με PB), φρεάτια τα οποία επωάζονται με διαφορετικό βιοτινυλιωμένο πεπτίδιο αντί του παραγώγου CL-βιοτίνη, και φρεάτια τα οποία επωάζονται με διαφορετικό πεπτίδιο αντί του Αβ. Επιπλέον, ελέγχεται τυχόν μη ειδική πρόσδεση του πρώτου αντισώματος, με χρήση γ-ανοσοσφαιρίνης ποντικού (mouse IgG) στη θέση του ειδικού μονοκλωνικού αντι-Αβ αντισώματος (6E10) στο αντίστοιχο στάδιο.

Πρωτόκολλο B: Πλάκες μικροτιτλοδότησης από πολυστυρόλιο 96 φρεατίων επικαλύπτονται με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι Αβ (6E10), 1 µg/mL σε διάλυμα ανθρακικών (100 µL/φρεάτιο) και παραμένουν για 16-20 h στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα αποχύνεται το υγρό κι ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων (250 µL PBS/φρεάτιο). Στη συνέχεια προστίθεται στην πλάκα διάλυμα κορεσμού (200 µL/φρεάτιο) για την κάλυψη των τυχόν ελεύθερων θέσεων δέσμευσης της στερεής επιφάνειας και το σύστημα επωάζεται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια εκπλένονται 1 φορά με διάλυμα έκπλυσης και αποστραγγίζονται σε διηθητικό χαρτί. Κατόπιν προστίθεται το πεπτιδίο Αβ (0-10 µg/mL) σε διάλυμα αραιώσης Α (100 µL/φρεάτιο), και οι πλάκες επωάζονται για 16-20 h στους 4 °C. Η υγρή φάση αποχύνεται και ακολουθεί επώαση με το παραγώγο CL-βιοτίνη (0-10 µg/mL) σε διάλυμα αραιώσης Α (100 µL/φρεάτιο), για 2 h στους 37 °C. Μετά από 5 πλύσεις με το διάλυμα έκπλυσης, τα φρεάτια επωάζονται με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βιοτίνης, αραιωμένο 1:5000 σε διάλυμα αραιώσης Β (100 µL/φρεάτιο). Τα φρεάτια εκπλένονται και πάλι 3 φορές και αποστραγγίζονται σε διηθητικό χαρτί. Ακολουθεί επώαση με δεύτερο αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών IgG κουνελιού συζευγμένο με την HRP (αραιώση 1:3000 από το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα anti-rabbit IgG/HRP) σε διάλυμα αραιώσης Β (100 µL/φρεάτιο), για 2 h στους 37 °C. Επαναλαμβάνονται οι εκπλύσεις των φρεατίων και αν συνεχεία οι πλάκες επωάζονται με το διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος (100 µL/φρεάτιο). Η επώαση πραγματοποιείται επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από φως για την ανάπτυξη χρώματος. Τέλος μετράται η οπτική απορρόφηση στα 405 nm σε φωτόμετρο πλακιδίων ELISA.

Ο έλεγχος μη ειδικών προσδέσεων πραγματοποιείται σε όλα τα επιμέρους στάδια της πειραματικής διαδικασίας, με τη χρήση αρνητικών μαρτύρων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται: φρεάτια τα οποία δεν επιστρώνονται με το ειδικό αντι-Αβ μονοκλωνικό αντίσωμα (επίστρωση με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ή με διάλυμα γ-ανοσοσφαιρίνης ποντικού, 1 µg/mL, σε PB), φρεάτια τα οποία επωάζονται με διαφορετικό πεπτιδίο αντί του Αβ, φρεάτια τα οποία επωάζονται με διαφορετικό βιοτινυλιωμένο πεπτιδίο αντί του παραγώγου CL-βιοτίνη. Επιπλέον, ελέγχεται η μη ειδική πρόσδεση του

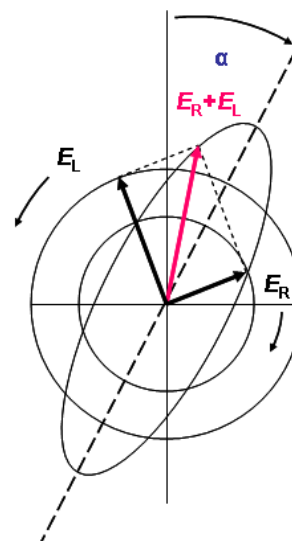
πρώτου αντισώματος, με επώαση των φρεατίων με γ-ανοσοσφαιρίνη κουνελιού (rabbit IgG), στη θέση του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι βιοτίνης, στο αντίστοιχο στάδιο.

4.6 Πειράματα Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD)

4.6.1 Αρχή μεθόδου

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού παρατηρείται όταν δέσμη κυκλικά πολωμένου φωτός αλληλεπιδρά με ασύμμετρα (μόρια που δεν συμπίπτουν με το κατοπτρικό τους είδωλο) – οπτικώς ενεργά - μόρια, που απορροφούν σε διαφορετικό βαθμό το δεξιόστροφο από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Η αλληλεπίδραση ενός οπτικώς ενεργού μέσου με κυκλικά πολωμένο φως, έχει ως αποτέλεσμα τη στροφή του επιπέδου πόλωσης του κυκλικά πολωμένου φωτός και τη μετατροπή του σε ελλειπτικά πολωμένο [199].

Σχήμα 16: Κυκλικά πολωμένο φως αναλυμένο σε δύο συνιστώσες, αριστερόστροφα (L) και δεξιόστροφα (R) κυκλικά πολωμένο, με διανύσματα ηλεκτρικών πεδίων E_L και E_R , αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα του φαινομένου του κυκλικού διχρωϊσμού στις δύο ακτίνες που έχουν περάσει από οπτικά ενεργό μέσο: τα μέτρα των διανυσμάτων της έντασης των δύο ακτίνων είναι άνισα, και η σύνθεσή τους δίνει ελλειπτικά πολωμένο φως. Με α συμβολίζεται η γωνία στροφής του επιπέδου πόλωσης. Ως θ ορίζεται η γωνία της οποίας η εφαπτομένη είναι ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης [<http://www.ruppreweb.org/cd/cdtutorial.htm>].



Ο διχρωϊσμός για κάθε μήκος κύματος εκφράζεται ως διαφορά απορρόφησης των δυο συστατικών του φωτός (ΔA) είτε ως ελλειπτικότητα (ellipticity) σε τιμές θ . Παρόλο που η τιμή που λαμβάνεται κατά το πείραμα είναι η διαφορά απορρόφησης $\Delta A = A_l - A_r$, το φασματοπολωσίμετρο καταγράφει το φάσμα του κυκλικού διχρωϊσμού σε μονάδες μοριακής ελλειπτικότητας, θ (millidegrees),

έναντι του μήκους κύματος λ . Η σχέση της ελλειπτικότητας θ με τη διαφορά απορρόφησης ΔA δίνεται από τον τύπο

$$\vartheta = \frac{2.303 \cdot \Delta A}{4} \quad (rad)$$

$$\vartheta = \frac{360 \cdot 2.303 \cdot \Delta A}{2\pi \cdot 4} = 32.98 \Delta A \quad (deg)$$

[200,201,202,203,204,205]

Τα φάσματα των πρωτεϊνών που καταγράφονται με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας συνήθως χωρίζονται στην «εγγύς» και στην «άπω» υπεριώδη περιοχή. Η εγγύς υπεριώδης περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος 250-300 nm, που ονομάζεται και αρωματική επειδή σε αυτή την περιοχή απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των αμινοξέων. Η άπω υπεριώδης περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος <250 nm, όπου απορροφούν οι πεπτιδικοί δεσμοί («πεπτιδικός κορμός») των πρωτεϊνών (190-250 nm).

Η απορρόφηση του πεπτιδικού κορμού ενός πεπτιδίου στην άπω περιοχή του φάσματος UV οφείλεται στην ύπαρξη μη δεσμικών ηλεκτρονίων σε άτομα οξυγόνου και αζώτου, π ηλεκτρόνια, τα οποία κατανέμονται μεταξύ των ατόμων του άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου και σ δεσμικά ηλεκτρόνια. Η μικρότερη ενεργειακή μετάπτωση του πεπτιδικού κορμού είναι η μετάπτωση $n \rightarrow \pi^*$ η οποία συμβαίνει σε μήκη κύματος 210-230 nm και έχει ως αποτέλεσμα την πόλωση του καρβονυλικού δεσμού. Η μεγαλύτερη ενεργειακή μετάπτωση είναι η $\pi \rightarrow \pi^*$ και το ηλεκτρικό δίπολο αυτής εμφανίζεται μεταξύ των ατόμων αζώτου και οξυγόνου και παρατηρείται περίπου σε μήκος κύματος 190 nm.

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού συνεισφέρει στην εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής και έχει το βασικό πλεονέκτημα της ταχύτατης εκτίμησης των εκατοστιαίων ποσοστών των δευτεροταγών δομών που υπάρχουν στο διάλυμα μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου. Λόγω του πολύ μικρού όγκου και της μικρής συγκέντρωσης που απαιτείται, η τεχνική χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα. Η φασματοσκοπία CD χρησιμοποιείται

κατά κύριο λόγο σε μελέτες σταθερότητας δομής λόγω α) μεταβολής θερμοκρασίας, β) μεταβολής του χημικού περιβάλλοντος (ιοντική ισχύς, pH) γ) μεταλλάξεων για τον έλεγχο του ρόλου των αμινοξέων στη δομή ή/και στη δράση του βιομορίου. Τέλος, εξαιρετικά σημαντική είναι η φασματοσκοπία CD στη μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών όπως ενζύμων με υποστρώματα ή συνενζύμων, και πρωτεΐνης-προσδέτη όπως πρόσδεσης ιόντων, δραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, χρωστικών.

Ανάλυση βάσει του μοντέλου των πολυπεπτιδίων

Η εκτίμηση δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνικών μορίων από τα φάσματα CD στις μεθόδους ανάλυσης φασμάτων CD στηρίζεται στη βασική παραδοχή ότι οι οπτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα βιομόρια, λόγω της δομής τους στον χώρο, συνεισφέρουν αθροιστικά.

Τα φάσματα CD των τεσσάρων βασικών δευτεροταγών δομών [206,207,208]. είναι η α-έλικα, η β-πτυχωτή επιφάνεια (β-φύλλο), η β-στροφή και το τυχαίο σπείραμα, που περιγράφονται συνοπτικά στο Σχήμα 17.

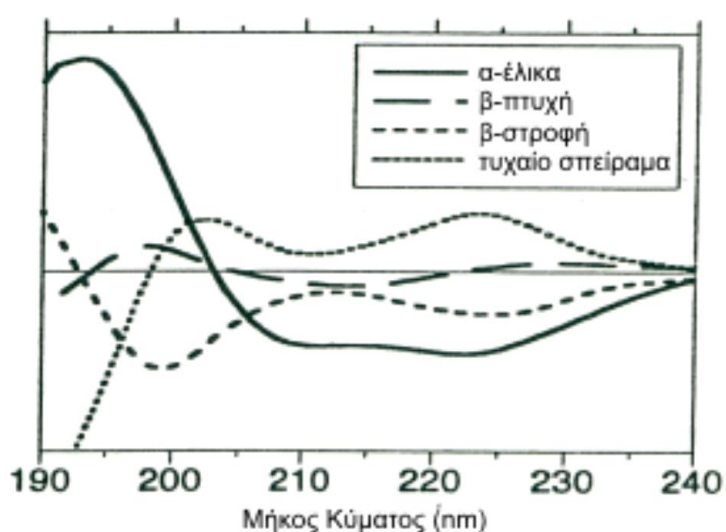
α. Η α-έλικα αποτελεί τη δευτεροταγή δομή που απαντάται πιο συχνά στα βιολογικά μόρια. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της α-έλικας χαρακτηρίζεται από μία ευρεία και υψηλής έντασης αρνητική ταινία απορρόφησης με δύο ελάχιστα στα 222 nm και 208 nm κι ένα θετικό σήμα στα 190 nm.

β. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της διαμόρφωσης του β-φύλλου είναι πιο δύσκολο να διερευνηθούν αφ' ενός λόγω του ότι μία πρωτεΐνη που εμφανίζει μεγάλο ποσοστό στο μοτίβο του β-φύλλου συνήθως εμφανίζει μικρή διαλυτότητα, αφ' ετέρου λόγω του ότι τα δομικά του χαρακτηριστικά είναι λιγότερο καθορισμένα (μπορεί να είναι παράλληλα ή αντιπαράλληλα και μεταβλητού μήκους και πλάτους). Τα γενικά χαρακτηριστικά του φάσματος του κυκλικού διχρωισμού μπορεί να είναι η εμφάνιση μίας αρνητικής τιμής σε μήκος κύματος περίπου 216 nm, μικρής έντασης, και μίας θετικής τιμής ίδιας ή μεγαλύτερης έντασης σε μήκος κύματος περίπου 195 nm

γ. Ως β-στροφή ορίζεται οποιαδήποτε αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (και όχι μόνο η στροφή που αντιστοιχεί στην δημιουργία ενός αντιπαράλληλου β-φύλλου). Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού μίας β-στροφής εμφανίζει μία ασθενή αρνητική $n \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση σε μήκος κύματος περίπου

225 nm, μία ισχυρή θετική $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση σε μήκος κύματος 200-205 nm και μία ισχυρή αρνητική απορρόφηση σε μήκος κύματος 180-190 nm.

δ. Τέλος, ως τυχαία σπειράματα ορίζονται τα τμήματα εκείνα της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης τα οποία δεν μπορούν να καταταχθούν σε καμία από τις προηγούμενες διαμορφώσεις. Το φάσμα αυτών των τμημάτων μίας πρωτεΐνης παρουσιάζει μία ισχυρή αρνητική απορρόφηση σε μήκος κύματος λίγο χαμηλότερο από τα 200 nm και μία 2^η σε μήκος κύματος περίπου στα 218 nm. Σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζεται μία αδύναμη αρνητική απορρόφηση σε μήκος κύματος 235 nm.



Σχήμα 17: Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των τύπων των δευτεροταγών δομών της α-έλικας, β-φύλλου, β-στροφής και τυχαίου σπειράματος.

4.6.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,01 M (PB, Phosphate Buffered), pH=7,4 (για τις συνθήκες μελέτης του πεπτιδίου Aβ(1-40))
- Κυψελίδα χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1 mm (Hellma Analytics)
- Φασματοπολωσίμετρο (Jasco-715)
- Θερμοστάτης (Jasco PTC-348 WI Peltier)

Μελέτη αλληλεπίδρασης CL - Αβ - Λήψη φασμάτων CD

Τα πειράματα CD πραγματοποιήθηκαν στο φασματοπολωσίμετρο J-715 της εταιρείας Jasco. Το όργανο είναι εφοδιασμένο με θερμοστάση Peltier, για τον έλεγχο της θερμοκρασίας στο θάλαμο που βρίσκεται η κυψελίδα. Η βαθμονόμηση του φασματοπολωσίμετρου ελέγχεται με 0.10% υδατικό διάλυμα d-10-καμφορο-σουλφονικού οξέος (d-10-camphorsulfonic acid, CSA), συγκέντρωσης 60 mg/ 100 mL στην περιοχή του φάσματος από 350 έως 220 nm. Για τη λήψη των φασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1 mm και τα δείγματα μελετήθηκαν για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων.

Η σωστή λειτουργία του οργάνου απαιτεί αναμονή 30 min περίπου μετά την ενεργοποίηση της λυχνίας XENON, για την αποκατάσταση της ισορροπίας του συστήματος. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπάρχει συνεχής ροή αζώτου στο οπτικό σύστημα και τον μονοχρωμάτορα, για την απομάκρυνση του οξυγόνου.

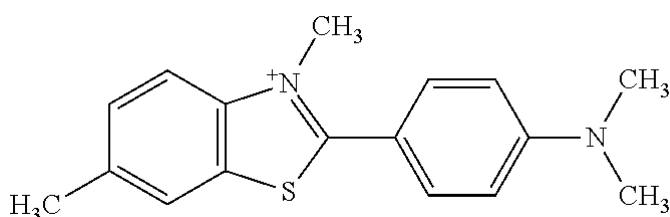
Τα φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190-260 nm) και σε θερμοκρασία 33 °C. Τα φάσματα ελήφθησαν με ταχύτητα σάρωσης 50 nm/min, ανάλυση 0,2 nm, απόκριση 2 s, εύρος ζώνης 1 nm. Το κάθε φάσμα προήλθε από την άθροιση 8-10 σαρώσεων, χωρίς μαθηματική διεργασία εξομάλυνσης. Για την επίτευξη της σωστής γραμμής βάσης και για την εξάλειψη της συνεισφοράς του διαλύτη και της απορρόφησης της κυψελίδας, μετά τη λήψη κάθε φάσματος ακολούθησε μαθηματική αφαίρεση του φάσματος του καθαρού διαλύτη. Σε όλες τις μετρήσεις η τιμή υψηλής τάσης (*High Tension Voltage, HTV*) του φωτοπολλαπλασιαστή του δέκτη ήταν μικρότερη από 700 V και η απορρόφηση της κυψελίδας και του διαλύτη μαζί μικρότερη από 1, σε όλη την κλίμακα των μετρήσεων.

Η επεξεργασία των φασμάτων και η κατασκευή των φασματογραφημάτων, όπου απεικονίζονται τα δεδομένα, δηλ. τα ζεύγη τιμών ελλειπτικότητα – μήκος κύματος, και απ' όπου είναι δυνατή η εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής των μορίων στο διάλυμα πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Origin.

4.7 Χρώση θειοφλαβίνης (ThT)

4.7.1 Αρχή μεθόδου

Η επίδραση της CL στη συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ μελετήθηκε με τη μέθοδο της θειοφλαβίνης T (ThT) [209,210,211]. Η θειοφλαβίνη είναι μία κατιονική χρωστική βενζοθειαζόλης (παράγωγο βενζοθειαζολίου), η οποία χαρακτηρίζεται από την αύξηση της έντασης φθορισμού κατά την πρόσδεσή της σε αμυλοειδή ινίδια με δομή αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας. Ως εκ τούτου, η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μελέτη της πορείας πολυμερισμού του Αβ, μέσω της ανίχνευσης σχηματισθαισών β-δομών.



Σχήμα 18: Δομή ThT.

4.7.2 Πειραματική διαδικασία

Υλικά και όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,01 M (PB, Phosphate Buffer), pH=7,4
- Γυάλινοι σωλήνες
- Διάλυμα ThT
- Φθορισμόμετρο Hitachi F-2500

Μελέτη αλληλεπίδρασης CL - Αβ - Λήψη φασμάτων ThT

Τα πεπτίδια Αβ(1-40) και CL διαλύθηκαν αρχικά σε PB με συγκέντρωση 100 και 200 μM, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το αρχικό διάλυμα κάθε πεπτιδίου αραιώθηκε κατάλληλα με PB, ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκέντρωσης 50 και 100 μM και τα τελικά διαλύματα των δύο πεπτιδίων αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 και 1:2, v/v. Ακολούθησε επώαση στους 33 °C για συνολικό διάστημα 15 ημερών, στο τέλος του οποίου πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φθορισμού των δειγμάτων. Μικρή ποσότητα (75 μL) από κάθε δείγμα Αβ

απουσία ή παρουσία CL (τελική συγκέντρωση $A\beta = 25 \mu M$), μεταφέρθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος ThT σε Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , συγκέντρωσης $5 \mu M$, έτσι ώστε να υπάρχει γραμμομοριακή αναλογία $A\beta:ThT$, 5:1. Στις ίδιες συνθήκες και ακολουθώντας την ίδια πορεία εξετάσθηκαν τα διαλύματα της CL, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας εξετάσθηκε διάλυμα της χρωστικής ThT. Ο φθορισμός μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο με μήκος κύματος διέγερσης 440 nm και εκπομπής 460 nm. Οι λοιπές παράμετροι ρυθμίστηκαν EX και EM slit= 2,5 nm, PMT Voltage 700 V, Απόκριση 0,4 s.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

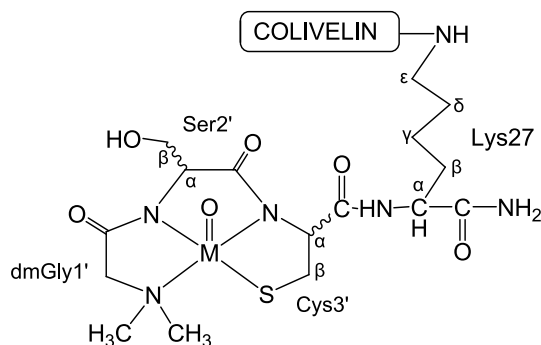
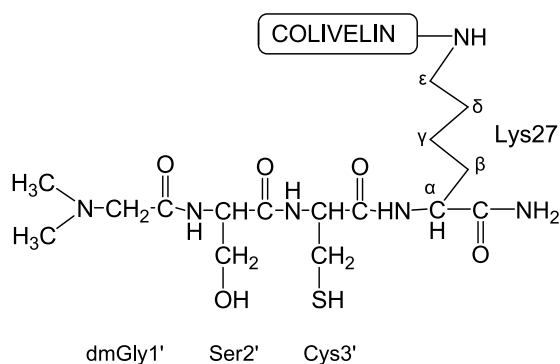
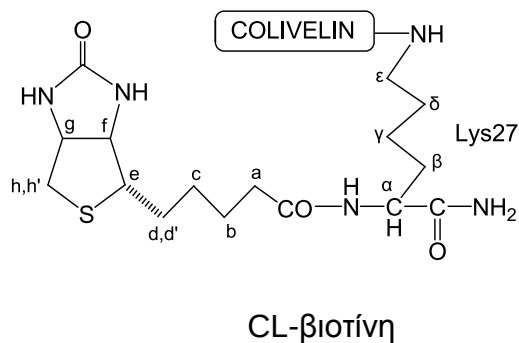
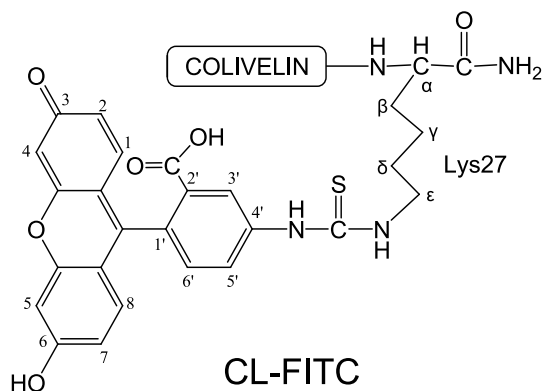
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Πεπτιδική σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση της CL και των παραγώγων της

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση 3 ειδικών πεπτιδικών παραγώγων του νευροπροστατευτικού πεπτιδίου CL, επισημασμένων με διαφορετικά μόρια ιχνηθέτες: α. τη φθορίζουσα ένωση FITC (CL-FITC), β. την βιοτίνη (CL-βιοτίνη), γ. το τριπεπτίδιο dimethylGly-Ser-Cys (CL-CSG). Η αμινοξική αλληλουχία της μητρικής CL και η δομή των τριών παραγώγων της παρατίθενται στο Σχήμα 19 που ακολουθεί.

Ser1-Ala2-Leu3-Leu4-Arg5-Ser6-Ile7-Pro8-Ala9-Pro10-Ala11-Gly12-Ala13-Ser14-Arg15-Leu16-Leu17-Leu18-Leu19-Thr20-Gly21-Glu22-Ile23-Asp24-Leu25-Pro26

ΚΟΛΙΒΕΛΙΝΗ (CL)



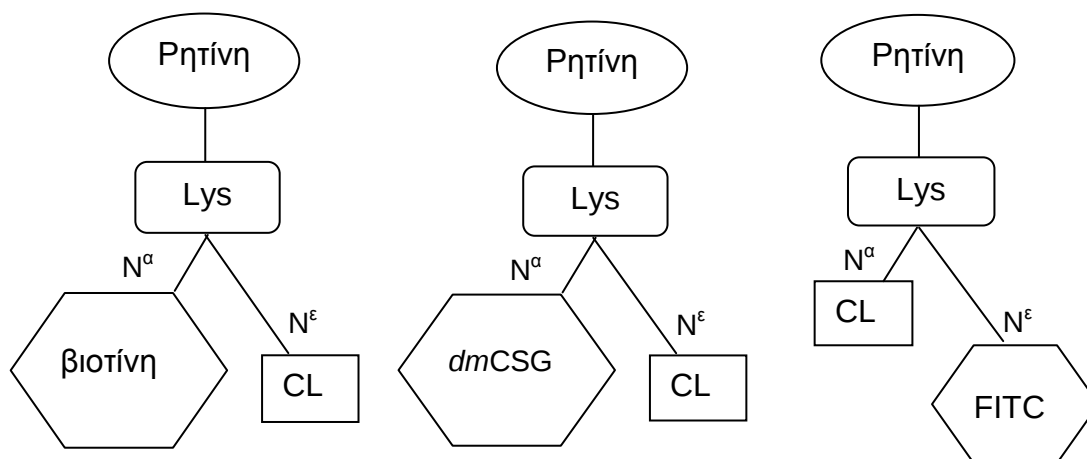
Σχήμα 19: Η CL και τα παράγωγά της: CL-FITC, CL-βιοτίνη και CL-CSG. Στο σχήμα φαίνονται επίσης τα σύμπλοκα του παραγώγου CL-CSG με ^{99m}Tc και ψυχρό Re.

Η επιλογή της ένωσης FITC βασίζεται στο ότι η ένωση αυτή αποτελεί μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες χρωστικές με μεγάλο εύρος χημικών και βιολογικών εφαρμογών, λόγω της υψηλής έντασης φθορισμού και της σταθερότητας του δεσμού με τον οποίο προσδένεται σε διάφορα βιομόρια [212]. Η επιλογή της βιοτίνης βασίζεται στη γνωστή από τη βιβλιογραφία σύμπλεξη της βιοτίνης με την πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη, η οποία

χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση [213] και η οποία επιτρέπει τη χρήση του συστήματος βιοτίνης – (στρεπ्ट)αβιδίνης σε πληθώρα *in vitro* εφαρμογών, όπως σε πειράματα εντοπισμού, ανίχνευσης, απομόνωσης, κλπ. Το τρίτο παράγωγο είναι ικανό να ραδιοεπισημανθεί και να χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία σε ειδικές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, εφόσον περιέχει στο μόριό του έναν χηλικό παράγοντα πεπτιδικής δομής, το τριπεπτίδιο διμεθυλογλυκίνη-σερίνη-κυστεΐνη [214], το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι ικανό να συμπλέκει ευχερώς μέταλλα (M) όπως το τεχνήτιο (Tc) και το ρήνιο (Re) και να δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα [215]. Η δομή των συμπλόκων αυτών παρουσιάζεται επίσης στο Σχήμα 19.

Η σύνθεση της CL και των πεπτιδικών παραγώγων έγινε με τη μέθοδο της Σύνθεσης Πεπτιδίων σε Στερεά Φάση, ακολουθώντας την Fmoc/t-Bu στρατηγική. Η οικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε σε ρητίνη Rink-amide, η οποία οδηγεί στην παραλαβή του πεπτιδίου υπό μορφή αμιδίου στο C-τελικό του άκρο. Η ρητίνη είχε παρασκευασθεί παλαιότερα στο εργαστήριό μας [74] και είχε βαθμό υποκατάστασης (δηλ. αριθμό ενεργών ομάδων, όπου είναι δυνατόν να προσδεθεί το πρώτο αμινοξύ ανά g ρητίνης) 0,6 mmol/g. Το πρωτόκολλο της πεπτιδικής σύνθεσης που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο «Μέθοδοι και Υλικά», παρ. 4.1.1.5.

Η σύνθεση και των τριών παραγώγων ξεκίνησε με την πρόσδεση της διδραστικής Lys27 (Σχήμα 20), με τη μορφή Fmoc-Lys(Dde)-OH, ως πρώτου αμινοξέος στη ρητίνη. Η χρήση της Lys ως αμινοξέος-γέφυρας βασίστηκε σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα: Η παρουσία των δύο αμινομάδων, N^α (Fmoc) και N^ε (Dde), παρέχει τη δυνατότητα επιτυχούς ανάπτυξης επισημασμένων παραγώγων, με την σύνθεση-σύζευξη, επάνω στη ρητίνη, αφενός του μητρικού πεπτιδίου (CL) και αφετέρου της ομάδας-ιχνηθέτη (Σχήμα 20). Επιπλέον, εξασφαλίζεται με τον τρόπο αυτό η μικρότερη δυνατή παρέμβαση στην αμινοξική αλληλουχία του μητρικού βιοδραστικού πεπτιδίου (CL), ενώ η απόσταση μεταξύ της CL και της προστιθέμενης ομάδας-ιχνηθέτη παρέχει ευελιξία στο βιοδραστικό μητρικό μόριο να βρει πιθανούς στόχους του.



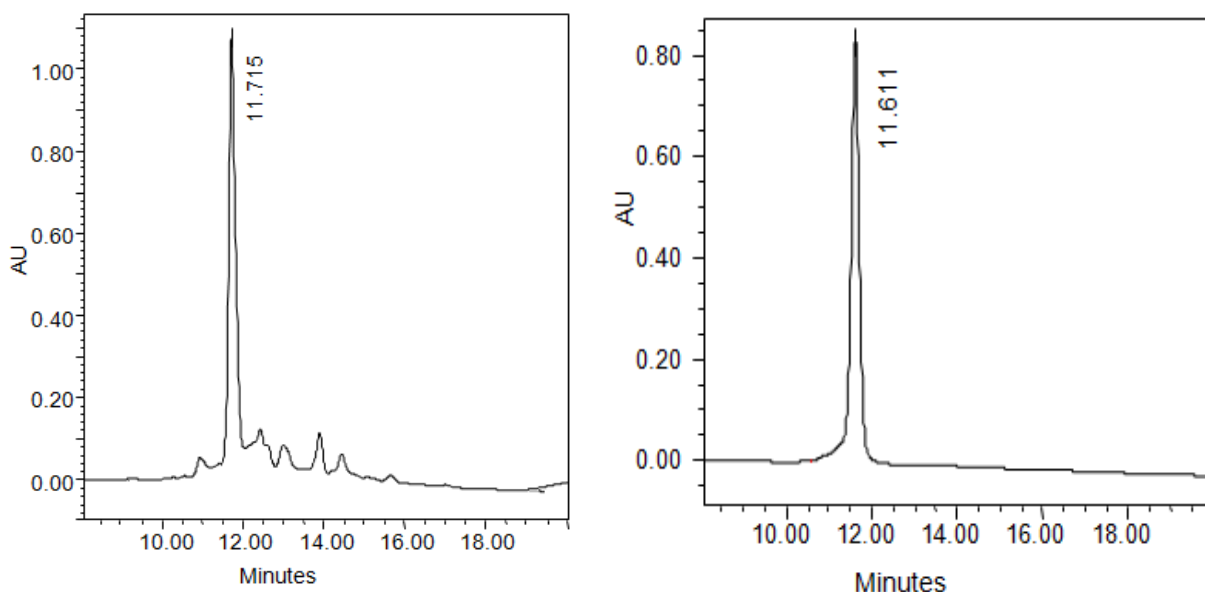
Σχήμα 20: Σχηματική απεικόνιση των τριών επισημασμένων παραγώγων της CL.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των παραγώγων CL-βιοτίνη και CL-CSG, η εισαγωγή της βιοτίνης ή του τριπεπτιδίου (dimethylGlySerCys), αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε μέσω της (αποπροστατευμένης) N^{α} ομάδας της Lys27, στην αρχή της συνθετικής διαδικασίας, και ακολούθησε η σύνθεση της αλληλουχίας CL, μετά την απομάκρυνση της N^{ϵ} -Dde προστατευτικής ομάδας. Αντίθετα, στο παράγωγο CL-FITC, το αντιδραστήριο FITC προστέθηκε στην (αποπροστατευμένη) N^{ϵ} ομάδα της Lys27 στο τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας, ενώ η σύνθεση της αμινοξικής αλληλουχίας της CL έγινε στην αρχή, μέσω της (αποπροστατευμένης) N^{α} ομάδας. Η σύζευξη του αντιδραστηρίου FITC έγινε, στην περίπτωση αυτή, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης της CL λόγω του φωτοευαίσθητου χαρακτήρα του.

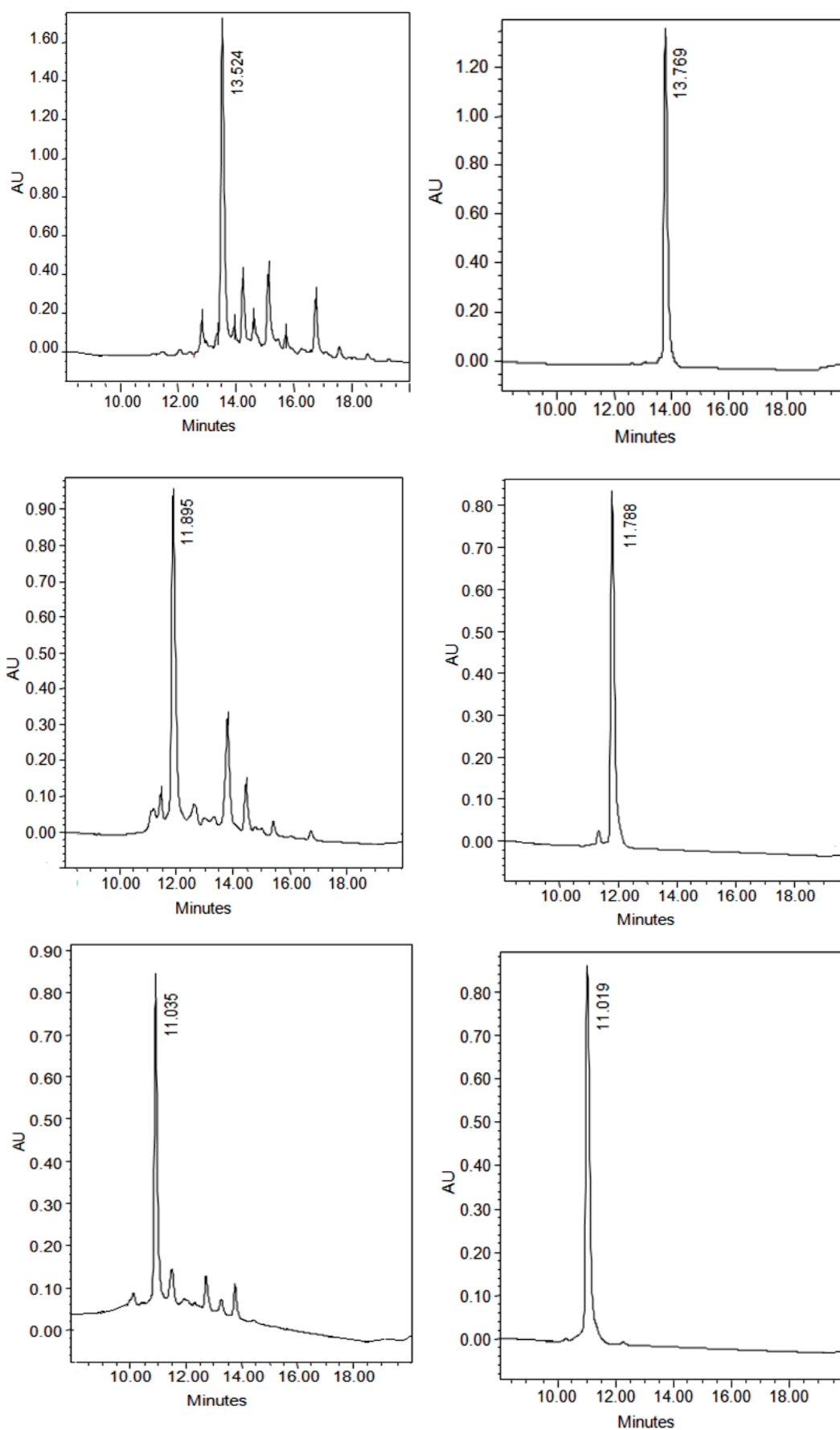
Κατά τη σύνθεση των παραγώγων της CL, πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση των τυχόν ελεύθερων αμινομάδων μετά την προσθήκη των αμινοξέων Leu3 και Arg5 της αλληλουχίας του βιοδραστικού μητρικού πεπτιδίου. Διπλή σύζευξη ακολουθούμενη από ακετυλίωση (λόγω ατελούς σύζευξης) κρίθηκε απαραίτητη μετά την προσθήκη των Leu17, Leu16 και Arg15 δεδομένης της ατελούς πρώτης σύζευξης, όπως προέκυψε από την δοκιμασία νινυδρίνης. Σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης του Εργαστηρίου μας σχετικά με τη σύνθεση της HN, η κεντρική υδρόφοβη περιοχή της πεπτιδικής αλυσίδας που αποτελείται από τις διαδοχικές Leu (Leu9-Leu10-Leu11-Leu12) και έχει χαρακτηριστεί ως «δύσκολη αλληλουχία», πιθανόν να οδηγεί σε συσσωμάτωση της αλυσίδας λόγω υδροφοβικότητας και δυσκολίας στην

πρόσβαση των αντιδραστηρίων. Ως εκ τούτου η περιοχή αυτή μπορεί να επηρεάσει τη διαμόρφωση της αναπτυσσόμενης πεπτιδικής αλυσίδας. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι οι Leu17, Leu16 και Arg15 της αλληλουχίας της CL αντιστοιχούν στα αμινοξέα Leu10, Leu9 και Cys8 της αλληλουχίας της HN, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την προαναφερθείσα δημοσίευση της ομάδας μας για την αναγκαιότητα διπλής σύζευξης κατά την προσθήκη των αμινοξέων αυτών [72].

Η CL και τα παράγωγά της, μετά την αποκοπή τους από τη ρητίνη, καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC υπό τις συνθήκες που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο «Μέθοδοι και Υλικά» (παρ. 4.1.1.2). Κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων συλλέχθηκαν τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στην κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος και λυοφιλοποιήθηκαν. Τα καθαρά πεπτίδια ταυτοποιήθηκαν με αναλυτική RP-HPLC και με ESI-MS. Τα χρωματογραφήματα των ακατέργαστων και καθαρών συνθετικών πεπτιδίων παρουσιάζονται στα Σχήματα 21 και 22.



Σχήμα 21: Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC: α. ακατέργαστης (crude) και β. καθαρής (pure) συνθετικής CL.



Σχήμα 22: Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC: α. ακατέργαστου (crude) και β. καθαρού (pure) συνθετικού παραγώγου της CL (I. CL-FITC, II. CL-βιοτίνη, III. CL-CSG).

Από τη συγκριτική μελέτη των αναλυτικών RP-HPLC-χρωματογραφημάτων των τριών συνθετικών παραγώγων της CL σε ακατέργαστη μορφή (Σχήμα 22), διαπιστώθηκε η παρουσία λιγότερων παραπροϊόντων στα παράγωγα CL-βιοτίνη και CL-CSG, σε σχέση με το παράγωγο CL-FITC, γεγονός που οδήγησε σε ευκολότερο καθαρισμό και υψηλότερη συνολική απόδοση. Η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις >95%.

Βάσει των αποτελεσμάτων της ανάλυσης ESI-MS, οι θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των σχετικών μοριακών μαζών (MW) της συνθετικής CL, των συνθετικών παραγώγων της καθώς και του συμπλόκου CL-CSG-ReO επιβεβαιώθηκαν από τις πειραματικά ληφθείσες. Τα κύρια ιόντα προέκυψαν από τριπλό, τετραπλό ή πενταπλό ιοντισμό, δίνοντας τις τιμές m/z που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα της ανάλυσης ESI-MS για τη συνθετική CL, τα συνθετικά παράγωγα της CL και το σύμπλοκο CL-CSG-¹⁸⁵ReO.

Πεπτίδιο	Υπολογισμένο MW	Φορτισμένο ιόν (m/z)	Θεωρητικά αναμενόμενη τιμή μοριακού ιόντος	Πειραματικά ευρεθείσα τιμή μοριακού ιόντος
CL	2644,14	[M+4H] ⁴⁺ [M+5H] ⁵⁺	662,04 529,83	662,1 529,9
CL-FITC	3161,70	[M+4H] ⁴⁺	791,43	791,9
CL-βιοτίνη	2998,62	[M+3H] ³⁺	1000,54	1000,5
CL-CSG	3047,58	[M+4H] ⁴⁺	762,90	762,9
CL-CSG- ¹⁸⁵ ReO	3245,58	[M+3H] ³⁺	1082,86	1083,0

5.2 Δομικές μελέτες με NMR

Η CL και όλα τα παράγωγά της μελετήθηκαν λεπτομερώς με φασματοσκοπία NMR. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 25 °C, σε H₂O / D₂O 90%, προκειμένου να ανιχνευθούν τα αμιδικά πρωτόνια των πεπτιδικών δεσμών, που είναι απαραίτητο για την απόδοση των κορυφών του φάσματος του πεπτιδίου με την μέθοδο της ακολουθιακής απόδοσης (sequential assignment) [216].

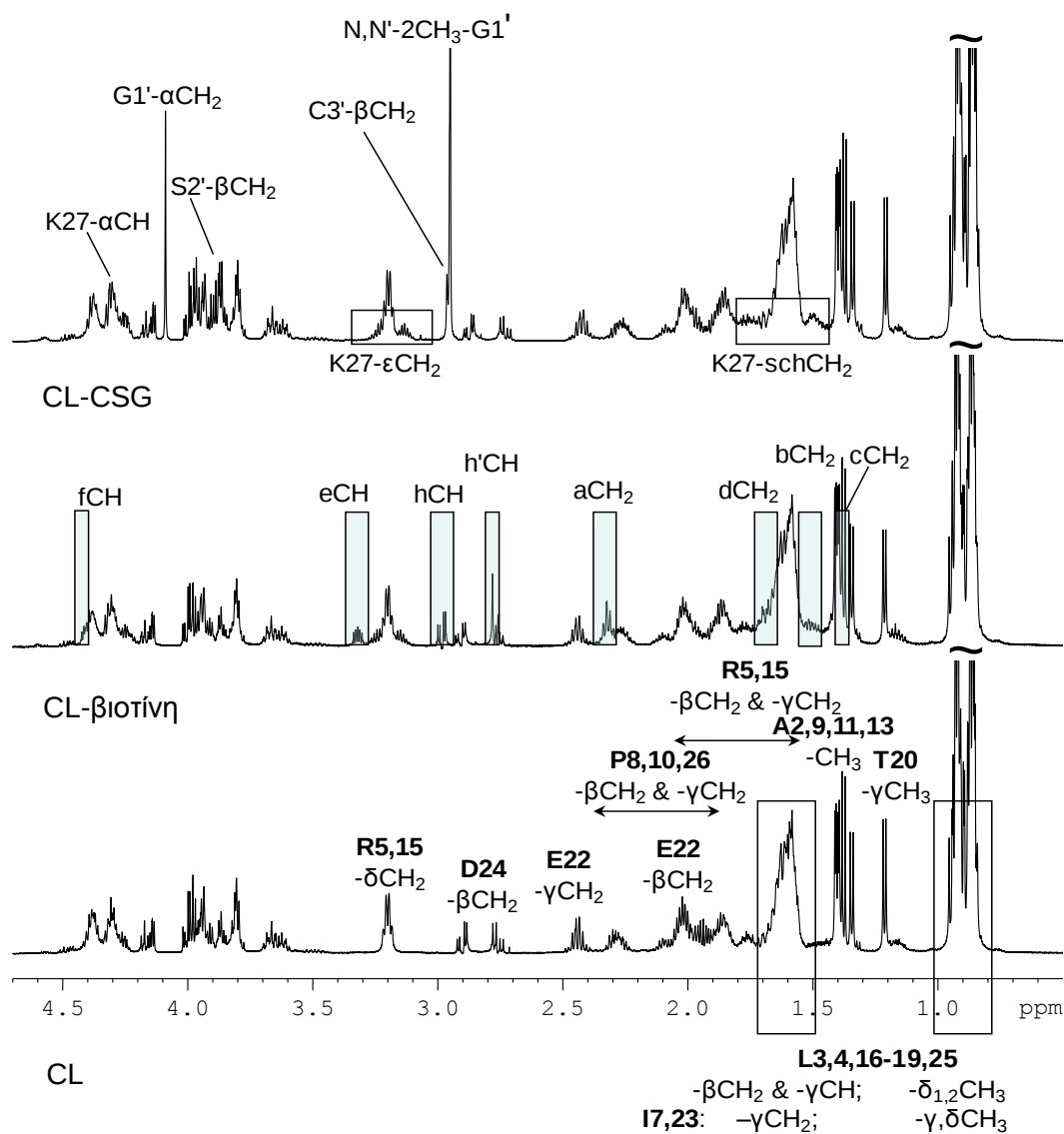
Τα διαλύματα της CL και των παραγώγων της, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη με NMR, ήταν συγκέντρωσης ~3 mM, συγκέντρωση ικανή για τη λήψη φασμάτων ¹H NMR μίας διάστασης όσο και φασμάτων δύο διαστάσεων ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής (¹H-¹³C) συσχέτισης. Εξαίρεση υπήρξε στην περίπτωση του παραγώγου CL-FITC, όπου λόγω του αρωματικού συστήματος της ομάδας FITC, η διαλυτότητα του παραγώγου μειώθηκε σημαντικά με συνέπεια τα φάσματα NMR ¹H να χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές λόγου σήμα / θόρυβο και να μην είναι δυνατή η λήψη φασμάτων δύο διαστάσεων.

Στο φάσμα ¹H μίας διάστασης οι κορυφές συντονισμού της CL παρουσιάζουν σημαντική διασπορά γεγονός που διευκόλυνε σημαντικά την ανάλυση η οποία επιτεύχθηκε με συνδυασμό φασμάτων TOCSY και ROESY.

Τα φάσματα NMR των παραγώγων της CL ελήφθησαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το μητρικό πεπτίδιο, προκειμένου να προσδιοριστούν πιθανές δομικές τροποποιήσεις λόγω της παρουσίας των ομάδων-ιχνηθετών, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες Π1-Π4 του Παραρτήματος.

Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή (4,7-0,5 ppm) του φάσματος ¹H NMR των CL, CL-βιοτίνης και CL-CSG, όπου είναι εμφανής η ομοιότητα των χημικών μετατοπίσεων μεταξύ της CL και των παραγώγων της. Στο φάσμα ¹H NMR της CL-βιοτίνης, η ομάδα της βιοτίνης του πεπτιδίου προσδιορίσθηκε εύκολα μέσω της σύγκρισης με το φάσμα του μορίου της βιοτίνης σε H₂O/D₂O. Σε σύγκριση με το φάσμα NMR ¹H 1D της CL, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο φάσμα του παραγώγου CL-βιοτίνη,

με μόνη διαφορά την μετατόπιση του αCH της Pro26 και του Leu25 NH σε υψηλότερα πεδία (κατά 0,06 και 0,07 ppm, αντίστοιχα).



Σχήμα 23: Δομικός χαρακτηρισμός της CL και των παραγώγων της με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR [217]. Η απεικόνιση της αλειφατικής περιοχής (0,5 – 4,7 ppm) από φάσμα 1D της CL (γ) και των παραγώγων της, CL-CSG (α) και CL-βιοτίνη (β) παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα. Τα αμινοξέα παρουσιάζονται στα φάσματα NMR βάσει του κώδικα ενός γράμματος και η ταυτοποίηση της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο της ακολουθιακής απόδοσης.

Στο ¹H NMR φάσμα του παραγώγου CL-CSG, η σύζευξη του τριπεπτιδίου ιχνηθέτη dmGly1'-Ser2'-Cys3' επιβεβαιώθηκε από την εμφάνιση δύο

πρόσθετων κορυφών (8,82 και 8,62 ppm), η ολοκλήρωση των οποίων ισοδυναμεί με πρωτόνια που αποδίδονται στα αμιδικά πρωτόνια των Ser2' και Cys3' και στις δύο χημικά ισοδύναμες ομάδες μεθυλίου της dmGly1. Όμοια με την περίπτωση της CL-βιοτίνης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις της αλληλουχίας αμινοξέων του παραγώγου CL-CSG, συγκριτικά με το φάσμα της μητρικής CL, με μόνες την μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία του αCH της Pro26 κατά 0,06 ppm και του Leu25 NH κατά 0,04 ppm.

Αν και η αNH της Lys27 μετατοπίζεται διαφορετικά στα δύο παράγωγα CL-βιοτίνη και CL-CSG, αντανakλώντας τη διαφορετική χημική φύση των δύο υποκαταστατών, οι χημικές μετατοπίσεις της Pro26 είναι ταυτόσημες στα δύο παράγωγα, υποδεικνύοντας ότι η διαμεσολάβηση της αλυσίδας Lys27 μεταξύ της CL και της ομάδας-ιχνηθέτη, προστατεύει αποτελεσματικά το χημικό περιβάλλον της CL.

Η μελέτη του παραγώγου CL-FITC περιορίστηκε λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του στην σύγκριση του φάσματος μίας διάστασης με το αντίστοιχο του μητρικού πεπτιδίου. Η χαμηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, αλλά και η κινητική κατάσταση του μορίου στο διάλυμα είχαν ως συνέπεια την εμφάνιση ευρειών κορυφών στο φάσμα, που δυσχεραίνουν την επεξεργασία και την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι χημικές μετατοπίσεις της αλληλουχίας CL ήταν παρόμοιες με αυτές του μητρικού πεπτιδίου, όπως και στην περίπτωση των άλλων παραγώγων, με ελάχιστες εξαιρέσεις, που συγκεντρώνονται στην γειτονία του τμήματος FITC.

Στο φάσμα ^1H NMR της CL-CSG-ReO η απουσία των αμιδικών πρωτονίων των Ser2' και Cys3' παρείχε την πρώτη άμεση ένδειξη του σχηματισμού του συμπλόκου. Η σύμπλεξη του dmCSG στον πυρήνα του ReO(V)^{3+} έγινε με τον σχηματισμό τριών πενταμελών χηλικών δακτυλίων, οι οποίοι προσδίδουν μεγάλη σταθερότητα στη νέα δομή. Ως αποτέλεσμα, η σύμπλεξη με τον μεταλλικό πυρήνα επιτρέπει τον διαχωρισμό των μεθυλομάδων του dimethylGly1 αλλά και των πρωτονίων του τριπεπτιδίου που παρουσιάζονταν ισοδύναμα στην ελεύθερη μορφή του (μεθύλια και αCH₂dmGly1', βCH₂Ser2' και βCH₂Cys3') [217].

5.3 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των παραγώγων της CL, σε σύγκριση με τη μητρική CL, με τη μέθοδο MTT

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρούσα εργασία αφορά στην ανάπτυξη και αξιολόγηση ειδικών παραγώγων της CL που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακά εργαλεία στην έρευνα για την κατανόηση του τρόπου δράσης του μορίου.

Ένα από τα πρώτα βήματα της μελέτης ήταν ο έλεγχος πιθανής τοξικότητας των συντεθέντων παραγώγων της CL για την εξασφάλιση της καταλληλότητάς τους και την περαιτέρω εφαρμογή τους σε βιοχημικές μεθοδολογίες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική φωτομετρική μέθοδος MTT, βάσει της οποίας προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα (δύο) κυτταρικών σειρών παρουσία και απουσία της CL και των παραγώγων της.

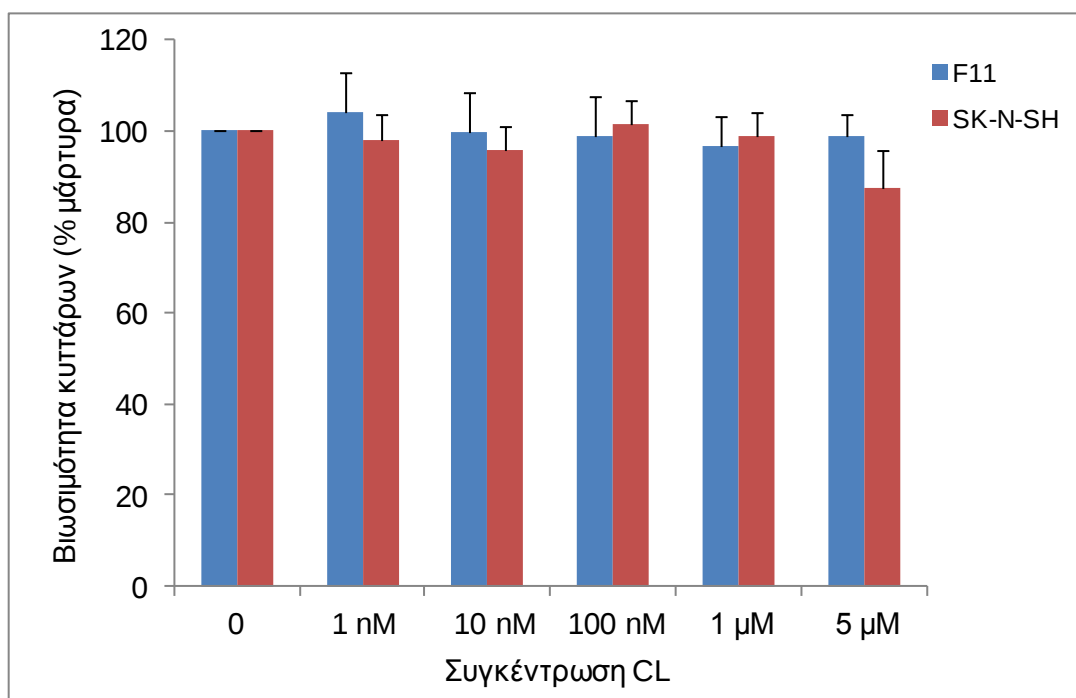
Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα F11 και SK-N-SH, τα οποία καλλιεργήθηκαν για 24 h παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL ή/και παραγώγων της, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0 έως 5 μM . Η επιλογή της υβριδικής κυτταρικής σειράς F11 βασίζεται στο ότι αποτελεί, βάσει της βιβλιογραφίας, την κύρια σειρά που χρησιμοποιείται σε πειράματα με CL. Παράλληλα, η κυτταρική σειρά SK-N-SH χρησιμοποιείται εκτενώς ως *in vitro* μοντέλο νευρικών κυττάρων.

Στο σχήμα 24 παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων F11 και SK-N-SH παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων CL. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων, υπολογίσθηκε το επί τοις εκατό (%) ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία CL ως προς την αντίστοιχη τιμή απουσία του πεπτιδίου.

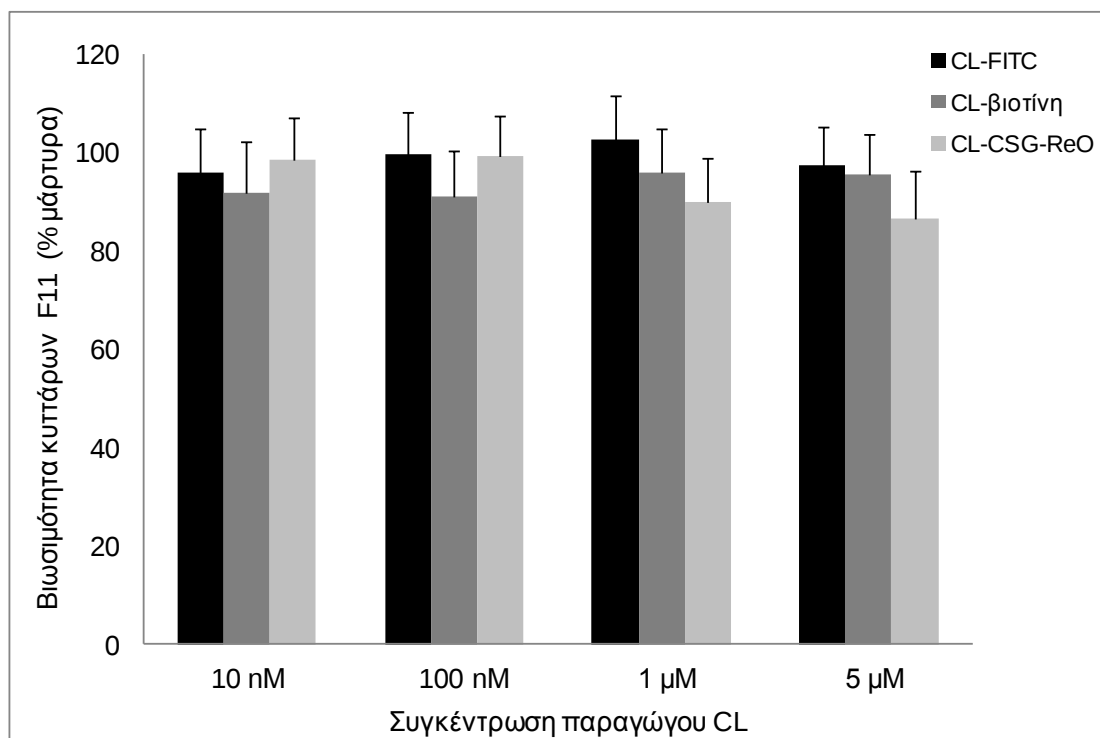
Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η CL δεν είναι κυτταροτοξική σε καμία εκ των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων και σε καμία κυτταρική σειρά.

Στα Σχήματα 25 και 26 παρουσιάζεται η κυτταροτοξικότητα των παραγώγων CL-FITC και CL-βιοτίνη καθώς και του συμπλόκου CL-CSG-ReO συγκριτικά με τη μητρική CL. Η μελέτη του συμπλόκου CL-CSG-ReO πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια προσέγγισης της πιθανής κυτταροτοξικότητας του, δομικώς ανάλογου, ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO, το οποίο προορίζεται για *in vivo* μελέτες. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 10 nM, 100 nM, 1 μM και 5 μM , και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % ποσοστό της βιωσιμότητας

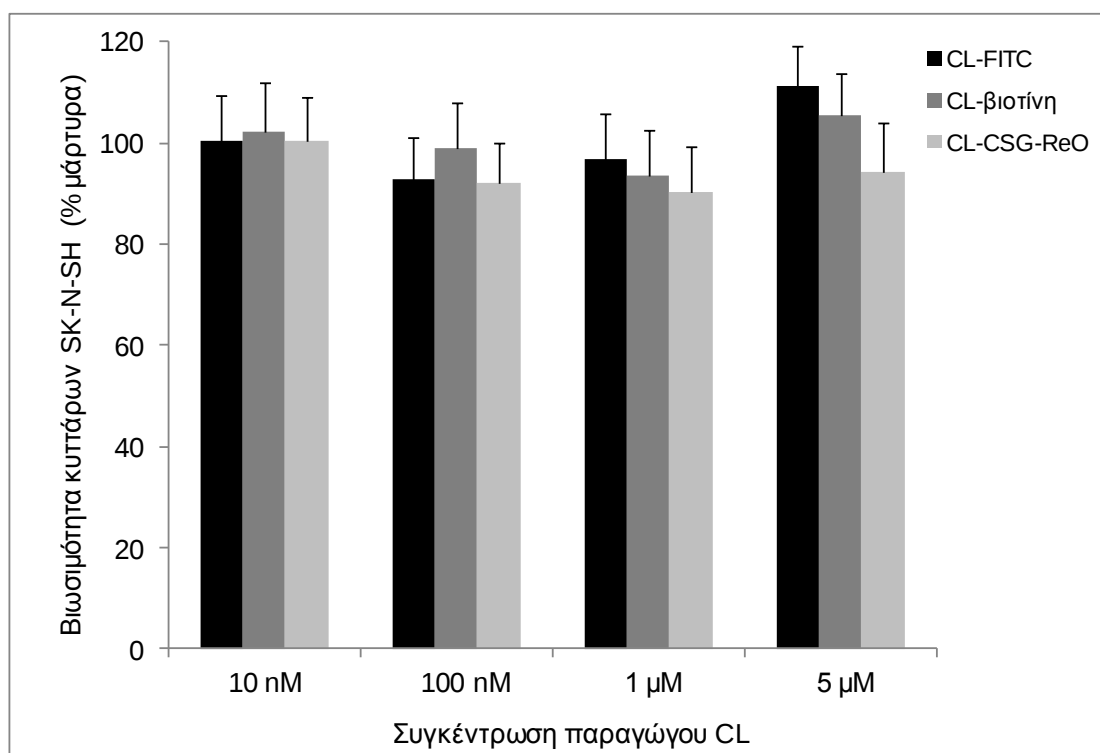
κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης CL. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 25 και 26, η προσθήκη των ομάδων-ιχνηθετών (ακόμα και η παρουσία του μετάλλου Re στο σύμπλοκο CL-CSG-ReO), δεν μεταβάλλει σε σημαντική έκταση την κυτταρική βιωσιμότητα στα F11, ούτε στα SK-N-SH. Επομένως τα παράγωγα κρίνονται ασφαλή για χρήση σε βιολογικές δοκιμασίες στο προαναφερθέν εύρος συγκεντρώσεων.



Σχήμα 24: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL στις κυτταρικές σειρές F11 και SK-N-SH με τη μέθοδο MTT. Κύτταρα F11 και SK-N-SH καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 10^4 και 2×10^4 κύτταρα/φρεάτιο, αντίστοιχα, για 24 h σε πλάκες 96 φρεατίων, απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL. Οι τιμές βιωσιμότητας αποτελούν μέσους όρους $\pm$ SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. (μάρτυρας: κύτταρα καλλιεργημένα απουσία CL).



Σχήμα 25: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων παραγώγων της CL σε κύτταρα F11 με τη μέθοδο MTT. Κύτταρα F11 καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 10^4 κύτταρα/φρεάτιο για 24 h σε πλάκες 96 φρεατίων, απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL-FITC, CL-βιοτίνης και CL-CSG-ReO. Οι τιμές βιωσιμότητας αποτελούν μέσους όρους $\pm$ SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. (μάρτυρας: κύτταρα F11 καλλιεργημένα παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης CL).

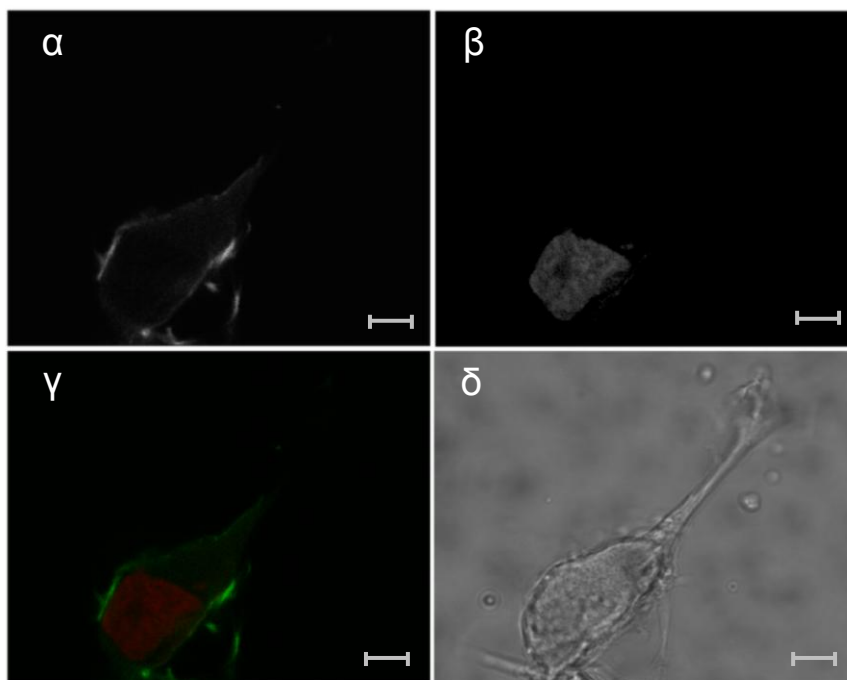


Σχήμα 26: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων παραγώγων της CL σε κύτταρα SK-N-SH με τη μέθοδο MTT. Κύτταρα SK-N-SH καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 2×10^4 κύτταρα/φρεάτιο για 24 h σε πλάκες 96 φρεατίων, απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων CL-FITC, CL-βιοτίνης και CL-CSG-ReO. Οι τιμές βιωσιμότητας αποτελούν μέσους όρους $\pm$ SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα (μάρτυρας: κύτταρα SK-N-SH καλλιεργημένα παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης CL).

5.4 Μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού με εφαρμογή του παραγώγου CL-FITC

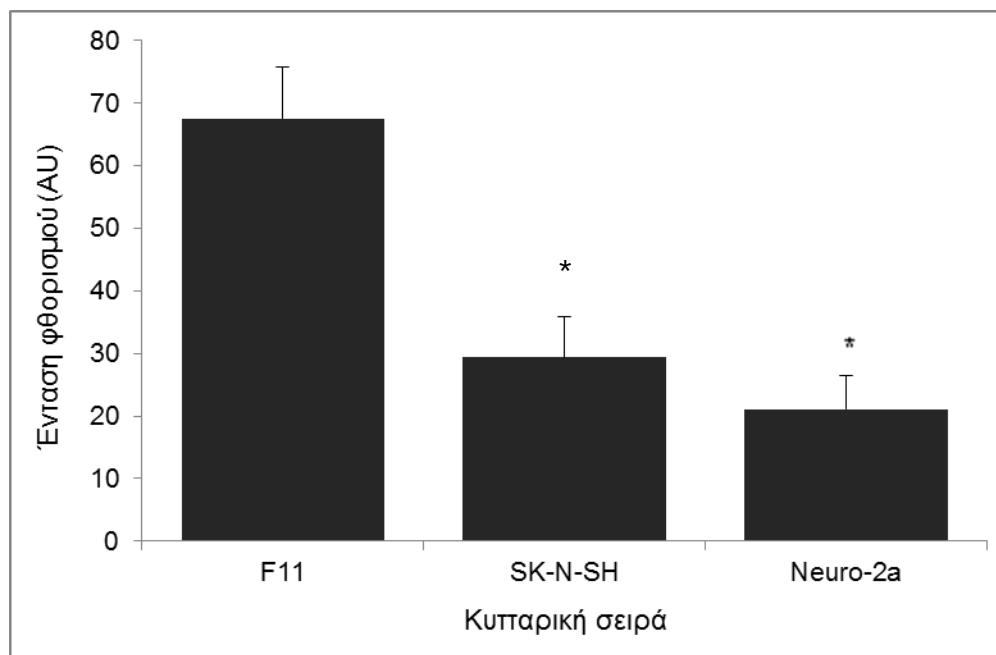
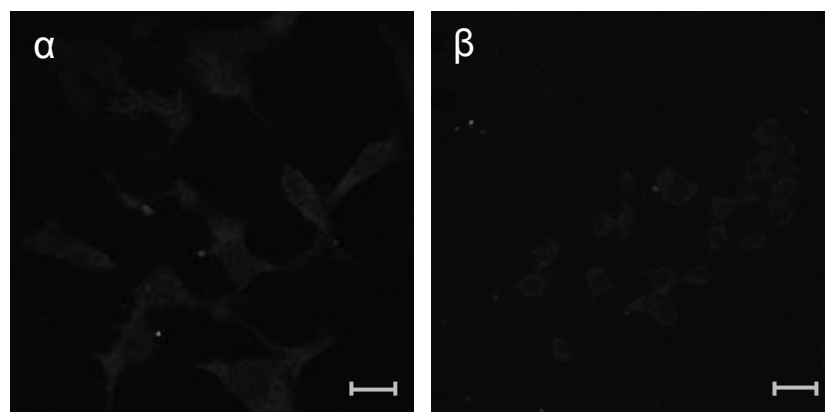
Τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού διεξήχθησαν προκειμένου να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με πιθανή πρόσδεση του CL-FITC στην κυτταρική επιφάνεια ή/και την εσωτερίκευσή του. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά F11, οι κυτταρικές σειρές νευρικού τύπου SK-N-SH και Neuro-2a, καθώς και η σειρά καρκίνου του μαστού MDA, ως αρνητικός μάρτυρας. Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 27 κατά την επώαση των κυττάρων F11 με CL-FITC ο φθορισμός εντοπίστηκε στην περιφέρεια των κυττάρων, ασύμμετρα κατανομημένος, σχηματίζοντας κατά τόπους συσσωματώματα σε τοξοειδείς σχηματισμούς.

Χαμηλής έντασης φθορισμός ανιχνεύθηκε επίσης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενδεικτικός μικρής εσωτερίκευσης, ενώ το σήμα στον πυρήνα ήταν στα επίπεδα του σήματος υποβάθρου.



Σχήμα 27: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού - Εντοπισμός της CL με παράλληλη χρώση του πυρήνα στην κυτταρική σειρά F11. Κύτταρα F11 καλλιιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/φρεάτιο σε πλάκες 12 φρεατίων στους 37°C για 30 min παρουσία $1\mu\text{M}$ CL-FITC. Ακολούθησε χρώση του πυρήνα με ιωδιούχο προπύδιο (PI) και ανάλυση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Μέγεθος εικονιζόμενης κλίμακας = 8 μm . (α) Ο πράσινος φθορισμός του πεπτιδίου και (β) η χρώση πυρήνα με το κόκκινο PI παρουσιάζονται σε ασπρόμαυρες εικόνες. (γ) Η υπέρθεση των εικόνων α και β, όπως διαμορφώθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Adobe Photoshop και (δ) η αντίστοιχη εικόνα με τεχνική αντίθεσης φάσης (phase contrast).

Επώαση της κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος ανθρώπου SK-N-SH με το παράγωγο CL-FITC κάτω από τις ίδιες συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα ασθενή ενδοκυτταρικό φθορισμό ομοιόμορφα κατανεμημένο στην επιφάνεια των κυττάρων χωρίς συγκεκριμένο εντοπισμό. Τέλος, στην περίπτωση των κυτταρικών σειρών Neuro-2a και MDA δεν ανιχνεύθηκε ειδικό σήμα φθορισμού (πέραν του σήματος υποβάθρου) στο κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη (Σχήμα 28).



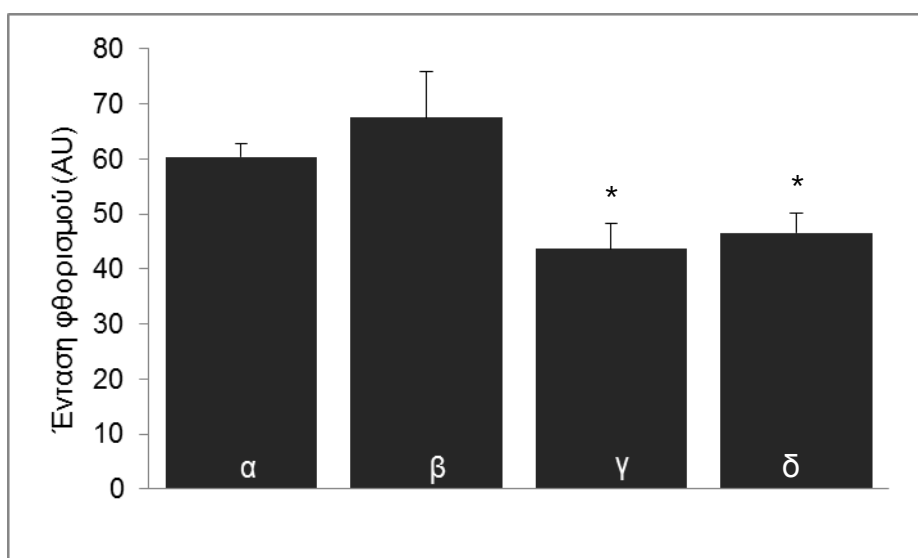
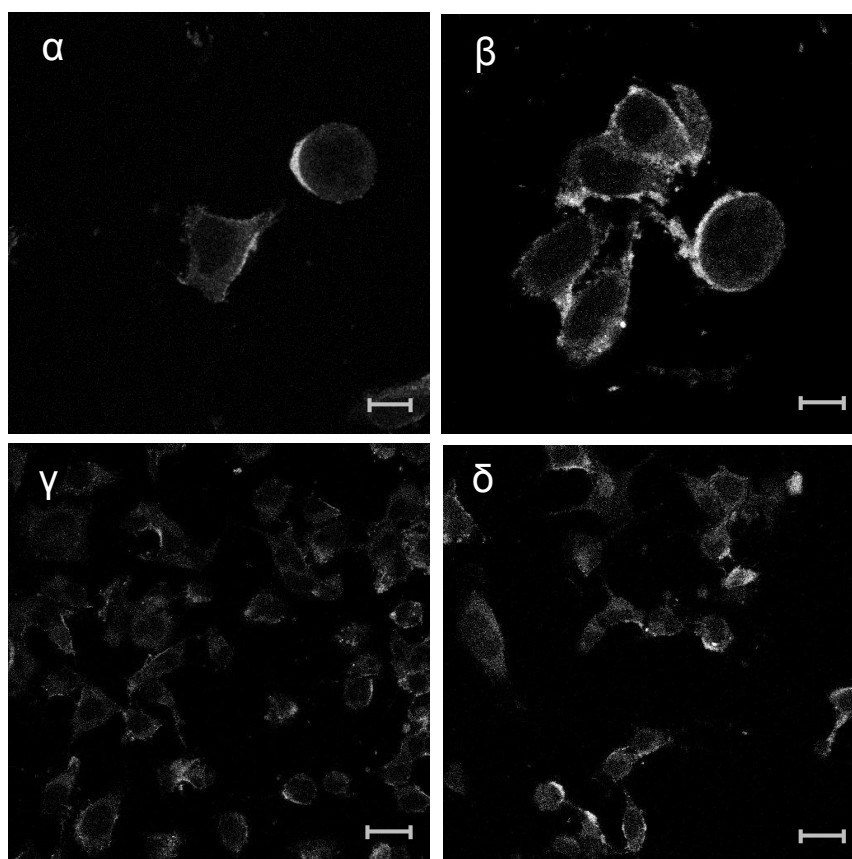
Σχήμα 28: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού- Εντοπισμός της CL στην κυτταρική σειρά F11, SK-N-SH και Neuro-2a. Κύτταρα F11 (σχήμα 27, ομάδα ελέγχου), (α) SK-N-SH και (β) Neuro-2a καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/φρεάτιο σε πλάκες 12 φρεατίων, στους 37°C για 30 min. Μέγεθος κλίμακας = 20 μm για το α και 40 μm για το β. (γ) Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων της έντασης φθορισμού / κύτταρο σε κάθε κυτταρική σειρά ως προς την F11. Αναλύθηκαν 100-150 κύτταρα από μέγιστο 15 οπτικών πεδίων. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους $\pm$ SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Prism. * : $p < 0,05$ ως προς την ομάδα ελέγχου.

Παράλληλα, πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού ευρέος πεδίου για παρατήρηση ζωντανών κυττάρων, επιβεβαίωσαν την προαναφερθείσα εκλεκτική πρόσδεση της CL στη μεμβράνη των F11 κυττάρων. Είναι

αξιοσημείωτο ότι ο φθορισμός ανιχνεύθηκε στην κυτταρική επιφάνεια ακόμη και σε χρόνο επώασης $t = 0$, υποδεικνύοντας ταχεία αλληλεπίδραση του CL-FITC με τα F11 (Σχήμα 29α). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ένταση φθορισμού ή στις περιοχές εντοπισμού του πεπτιδίου κατά τις διάφορες περιόδους επώασης που διήρκεσαν έως και 2 h. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο σήμα φθορισμού μετά από επώαση των κυττάρων σε συγκεντρώσεις CL-FITC που κυμαίνονταν από 0,1 έως 5 μM , υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση στο παραπάνω εύρος συγκεντρώσεων βρίσκεται σε κατάσταση κορεσμού.

Η (εξ)ειδίκευση και η εκλεκτικότητα της παρατηρούμενης πρόσδεσης του CL-FITC στα F11 εξετάσθηκε με προ-επώαση των κυττάρων με 50πλάσια συκέντρωση μητρικής, «μη επισημασμένης» CL πριν την προσθήκη του CL-FITC. Όπως φαίνεται στο σχήμα 29γ, ο φθορισμός δεν ανιχνεύθηκε συγκεντρωμένος-εντοπισμένος σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης, όπως εμφανίζεται μετά την επώαση των F11 με το φθορίζον πεπτιδικό παράγωγο. Επεξεργασία και ποσοτική ανάλυση των δεδομένων της μικροσκοπίας έδειξαν ελάττωση της έντασης του φθορισμού σε ποσοστό περίπου 30%, γεγονός που υποδεικνύει ότι ένα ικανό ποσοστό των θέσεων πρόσδεσης του CL-FITC έχει καταληφθεί από την CL.

Για να μελετηθεί το αν η παρατηρούμενη πρόσδεση είναι ενεργειο-εξαρτώμενη διαδικασία, τα κύτταρα επώαστηκαν με CL-FITC για 30 min στους 4 °C, θερμοκρασία στην οποία αναστέλλονται όλες οι ενεργειακά εξαρτώμενες κυτταρικές λειτουργίες. Όπως είναι εμφανές, βάσει του Σχήματος 29δ το σήμα του φθορισμού ήταν μειωμένο κατά 30% και παράλληλα δεν παρατηρήθηκε η ασύμμετρη κατανομή του στο μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων.



Σχήμα 29: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού- Εντοπισμός της CL στην κυτταρική σειρά F11 συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας επώασης. Κύτταρα F11 καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/φρεάτιο σε πλάκες 12 φρεατίων, σε διάφορες συνθήκες: (α) στους 37 °C για 0 min ($t=0$), (β) στους 37 °C για 30 min (ομάδα ελέγχου), (γ) στους 37 °C για 30 min μετά από προ-επώαση με 50x CL (για 30 min) και (δ) στους 4 °C για 30 min. Μέγεθος εικονιζόμενης κλίμακας = 8 μ m (α και β), 40 μ m (γ και δ). (ε) Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων της έντασης φθορισμού / κύτταρο σε

κάθε συνθήκη α, β, γ και δ. Αναλύθηκαν 100-150 κύτταρα από το μέγιστο 15 οπτικά πεδία. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους $\pm$ SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα εις τριπλούν. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Prism. * : $p < 0,05$ ως προς την ομάδα ελέγχου.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι σε πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη μόνο της χρωστικής FITC σε κύτταρα F11 δεν παρατηρήθηκε κυτταρική πρόσδεση ή πρόσληψη της χρωστικής, υποδεικνύοντας ότι ο φθορισμός που παρατηρείται μετά την επώαση των κυττάρων με CL-FITC οφείλεται στην παρουσία του ακέραιου παραγώγου.

Τα ανωτέρω δεδομένα συνηγορούν υπέρ της παρουσίας συγκεκριμένων θέσεων πρόσδεσης της CL στην επιφάνεια των κυττάρων F11, στις οποίες η CL δεσμεύεται εκλεκτικά ακολουθώντας μια ενεργειοεξαρτώμενη πορεία.

5.5 *In vivo* μελέτες με εφαρμογή του παραγώγου CL-CSG, υπό τη μορφή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO

5.5.1 Ραδιοεπισήμανση του CL-CSG με ^{99m}Tc – Παρασκευή του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO

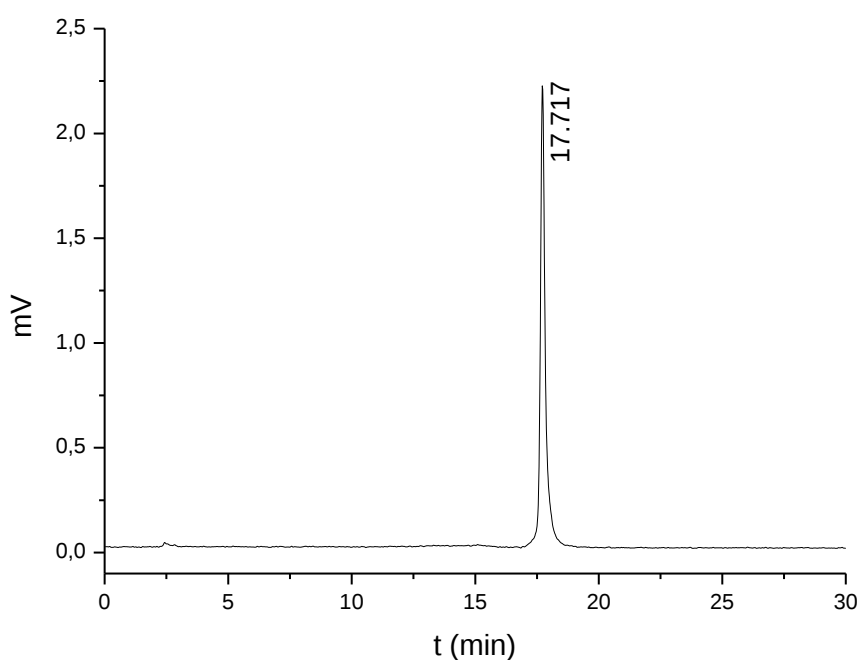
Το παράγωγο CL-CSG, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχεδιάστηκε έτσι ώστε να συμπλέκεται επιτυχώς μέσω της ομάδας dmGlySerCys με μέταλλα όπως το ραδιομέταλλο ^{99m}Tc, παρέχοντας μέσω ραδιοχημικών μελετών τη δυνατότητα για βιολογική αξιολόγηση του παραγώγου *in vivo*.

Η σύνθεση περιλαμβάνει αναγωγή του μετάλλου με SnCl₂ από την (VII) στην (V) οξειδωτική βαθμίδα (^{99m}TcO^(V)), και τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου πρόδρομου συμπλόκου, του ^{99m}TcO(V)-γλυκοεπτονικού. Στη συνέχεια δημιουργείται το τελικό ραδιοσύμπλοκο, με θέρμανση στους 37°C με τον χηλικό παράγοντα dmCSG, που αποτελεί τμήμα του παραγώγου CL-CSG. Η σύμπλεξη του μετάλλου πραγματοποιήθηκε μέσω των ατόμων N των αμινοξέων dmGly, Ser και Cys και του S της Cys του προσαρτημένου χηλικού παράγοντα dmCSG [218], όπως περιγράφεται στο Σχήμα 19.

Η ταυτοποίηση των ραδιοσυμπλόκων του ^{99m}Tc επιτυγχάνεται μέσω συγχρωματογράφησης με τα αντίστοιχα, πλήρως χαρακτηρισμένα σύμπλοκα του ρηνίου, λόγω των κοινών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Τα ραδιενεργά

σύμπλοκα του τεχνητίου- ^{99m}Tc και τα ψυχρά του ρηνίου, ενίενται ταυτόχρονα σε σύστημα HPLC, το οποίο έχει τη δυνατότητα ραδιομετρικής και φωτομετρικής ανίχνευσης, διαθέτοντας παράλληλα συνδεδεμένους έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας γ (σύμπλοκα ^{99m}Tc) και έναν ανιχνευτή UV-Vis (σύμπλοκα Re). Αν οι χρόνοι έκλουσης των δύο ενώσεων είναι παραπλήσιοι, αυτό συνιστά ισχυρή ένδειξη ότι τα σύμπλοκα έχουν παρόμοια δομή.

Η ανάλυση του ^{99m}Tc -ραδιοσυμπλόκου του παραγώγου CL-CSG με ραδιο-RP-HPLC φαίνεται στο Σχήμα 30, όπου παρουσιάζεται μία μόνο κορυφή ραδιενεργού προϊόντος, παραχθέντος σε υψηλή απόδοση.



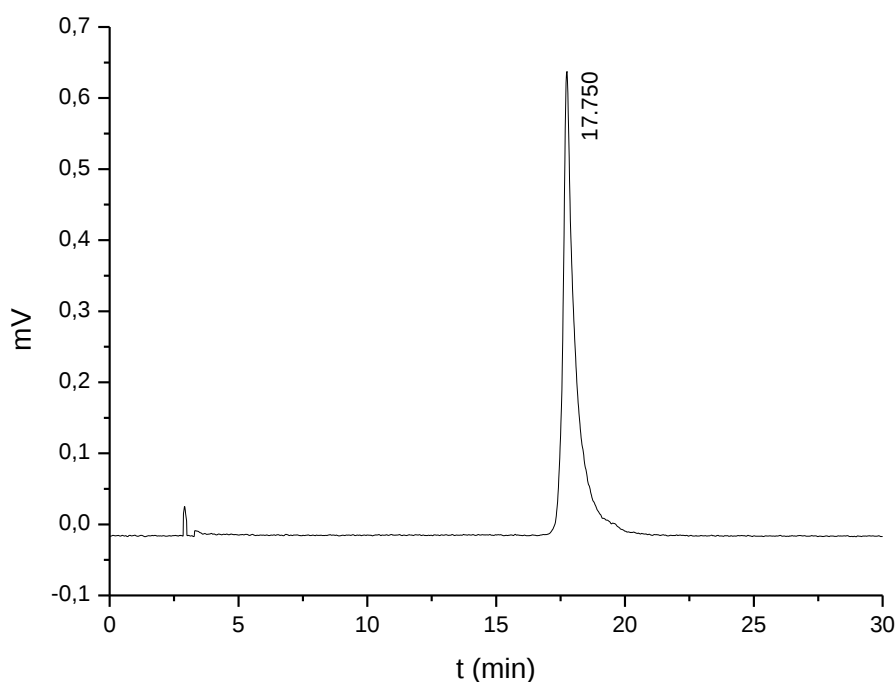
Σχήμα 30: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του επισημασμένου με ^{99m}Tc συμπλόκου του παραγώγου CL-CSG (CL-CSG- ^{99m}TcO).

Η συγχρωματογράφιση (co-injection) μίγματος του ραδιοσυμπλόκου ($t_R = 17,717$ min) με το χαρακτηρισμένο, ψυχρό σύμπλοκο CL-CSG-ReO ($t_R = 17.650$ min), έδειξε ότι οι χρόνοι έκλουσης των δύο συμπλόκων είναι παρόμοιοι, οπότε συμπεραίνεται η χημική δομή του ραδιοσυμπλόκου ως CL-CSG- ^{99m}TcO , είναι παρόμοια με αυτήν του χαρακτηρισμένου ψυχρού συμπλόκου CL-CSG-ReO.

5.5.2 Μελέτες σταθερότητας του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO

5.5.2.1 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO συναρτήσει του χρόνου

Η σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO, μετά την απομόνωσή του από το μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του (με ραδιο-RP-HPLC), μελετήθηκε 6 h μετά την παρασκευή του (που είναι ο χρόνος ημιζωής του ^{99m}Tc), διάστημα κατά το οποίο φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η μελέτη της σταθερότητας έγινε επίσης με ραδιο-RP-HPLC.



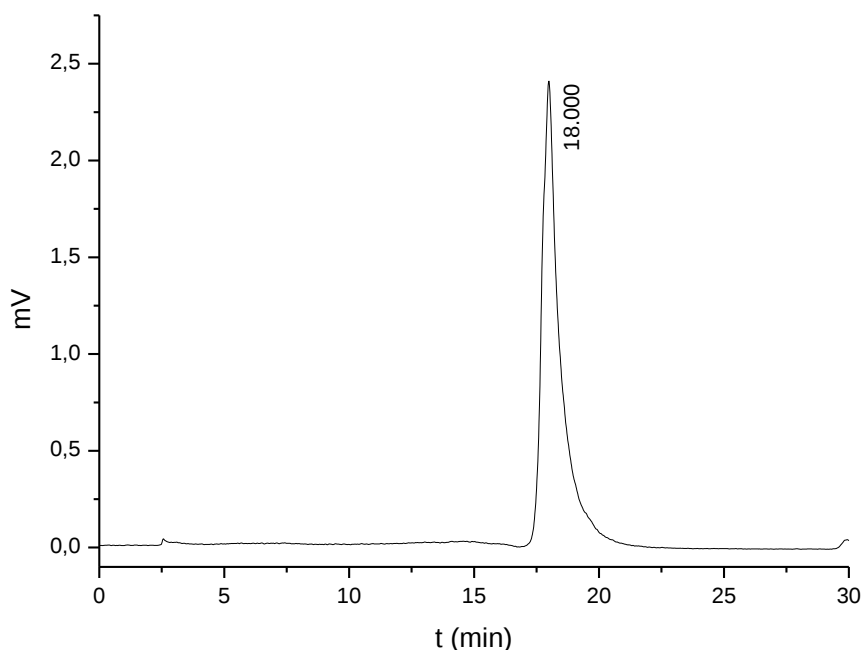
Σχήμα 31: Ραδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG-^{99m}TcO (σε απομονωμένη μορφή), 6 h μετά την παρασκευή του.

Το απομονωμένο ραδιοσύμπλοκο εμφανίζει υψηλή σταθερότητα, >98%, μετά την παραμονή του σε θερμοκρασία δωματίου επί 6 h. Η πολύ μικρή, δεύτερη κορυφή, που φαίνεται στο χρωματογράφημα (Σχήμα 31), μπορεί να οφείλεται σε μικρής έκτασης αποσυμπλοκοποίηση και επανοξείδωση του Tc(V) σε ^{99m}TcO₄⁻, αφού η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο χρόνο έκλουσης των ^{99m}TcO₄⁻ (κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες).

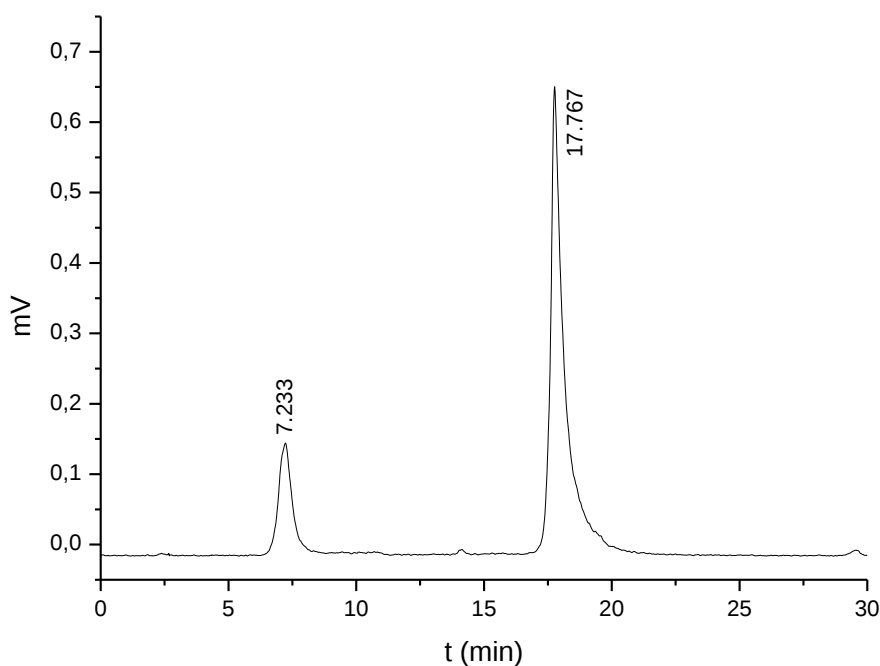
5.5.2.2 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO παρουσία περίσσειας κυστεΐνης συναρτήσει του χρόνου (*Cys challenge*)

Εν συνεχεία, ακολούθησε έλεγχος της σταθερότητας του CL-CSG-^{99m}TcO παρουσία περίσσειας Cys, που θεωρείται ανταγωνιστής του τριπεπτιδίου για σύμπλεξη με το ραδιομέταλλο (^{99m}Tc) [192]. Διάλυμα του επισημασμένου παραγώγου στο αρχικό μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του επωάζεται στους 37 °C με περίσσεια ανταγωνιστή (Cys) τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁴ M για 60 min. Παράλληλα, διάλυμα του επισημασμένου παραγώγου μετά την απομόνωσή του από την HPLC επωάζεται στους 37°C με περίσσεια ανταγωνιστή (Cys) τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁵ M για 30 min. Το απομονωμένο σύμπλοκο εμφανίζει μικρότερη σταθερότητα από το σύμπλοκο στο μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του, όπου συνυπάρχει με τον προσδότη του και βάσει χημικής ισορροπίας, η αντίδραση ευνοείται προς τα δεξιά (προς το σχηματισμό δηλαδή νέου ραδιοσυμπλόκου).

Ο έλεγχος έγινε με ραδιο-RP-HPLC όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο «Μέθοδοι και Υλικά». Τα αποτελέσματα φαίνονται στα Σχήματα 32 και 33.



Σχήμα 32: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του απομονωμένου παραγώγου CL-CSG-^{99m}TcO μετά από επώαση με περίσσεια Cys (10⁻⁵ M) για 30 min.



Σχήμα 33: Ραδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης παρασκευής του CL-CSG-^{99m}TcO μετά από επώασή του με περίσσεια Cys (10^{-4} M) για 60 min.

Όπως προκύπτει από τα πειραματικά δεδομένα μας, το απομονωμένο ραδιοσύμπλοκο εμφανίζεται εξαιρετικά σταθερό (100%) μετά από επώαση με διάλυμα κυστεΐνης, 10^{-5} M, επί 30 min (Σχήμα 32). Στο μίγμα αντίδρασης παρασκευής, όπου η μελέτη πραγματοποιήθηκε με μεγαλύτερη συγκέντρωση Cys και σε μεγαλύτερο χρόνο επώασης του δείγματος, παρατηρείται επίσης εξίσου ικανοποιητική εικόνα με σταθερότητα >80%.

5.5.2.3 Σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO παρουσία πλάσματος ανθρώπινου αίματος συναρτήσει του χρόνου (plasma stability)

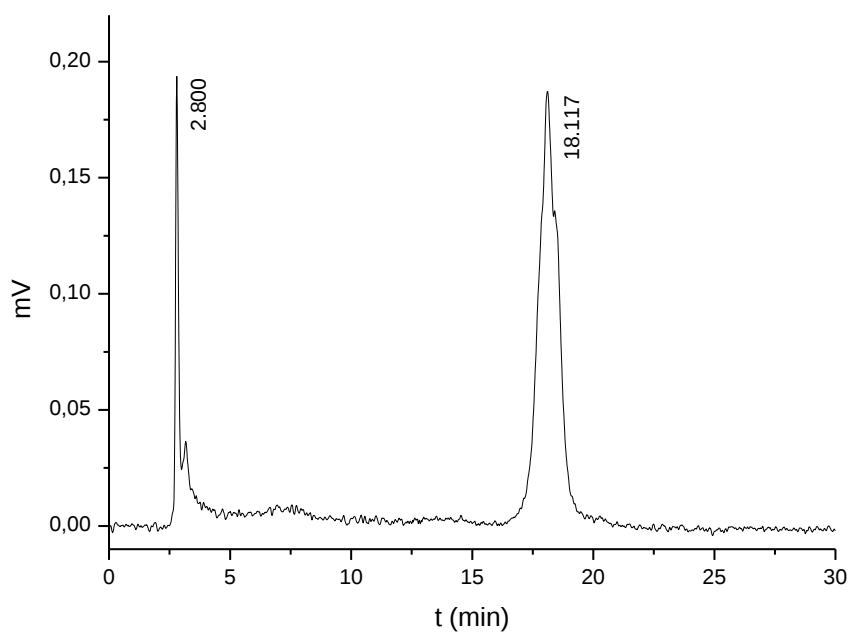
Η μελέτη σταθερότητας παρουσία πλάσματος αίματος γίνεται για τον έλεγχο της σταθερότητας του ραδιοεπισημασμένου παραγώγου σε βιολογικό μέσο καθώς και τον προσδιορισμό του ποσοστού πρόσδεσης αυτού στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το πλάσμα περιέχει πεπτιδάσες, οι οποίες ενδεχομένως, να

αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία του πεπτιδίου, με αποτέλεσμα να καταστρέφουν τον πεπτιδικό δεσμό στο σημείο αυτό. Επιπλέον, η δράση πεπτιδασών μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο στην μετέπειτα διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς είναι δυνατόν να διασπούν το πεπτίδιο σε συγκεκριμένα σημεία, με επακόλουθο την απώλεια της βιολογικής του δράσης.

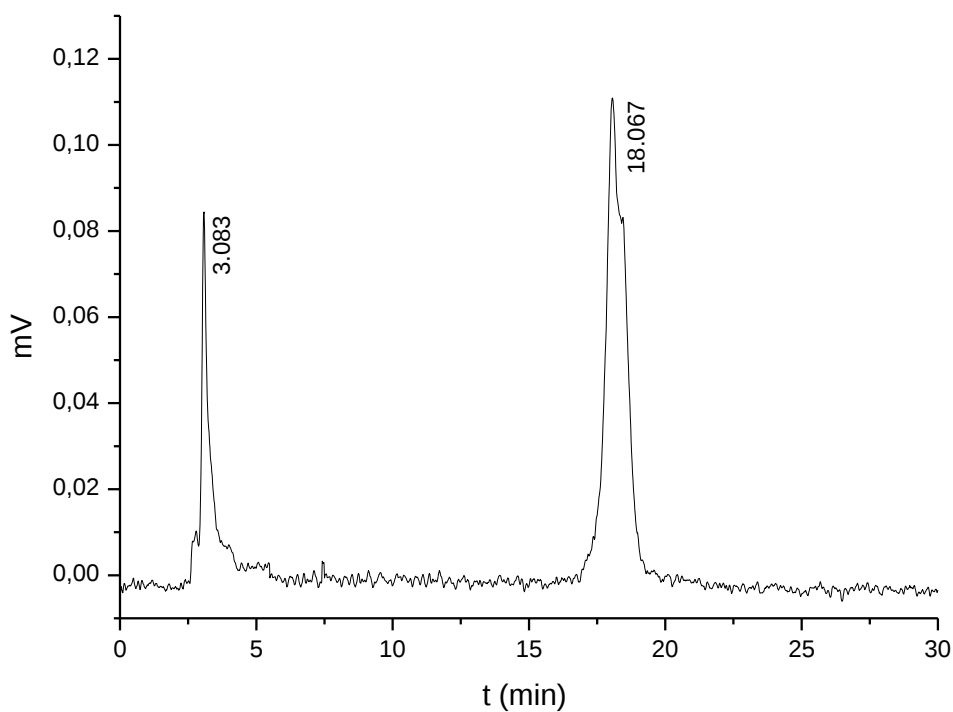
Η σταθερότητα του ραδιοσυμπλόκου μελετήθηκε με ανθρώπινο πλάσμα μετά από επώαση για 2 και 30 min στους 37 °C.

Συγκεκριμένα, μετά την απομόνωση του πλάσματος από αίμα, ακολούθησε επώαση με το ραδιοεπισημασμένο παράγωγο CL-CSG-^{99m}TcO σε αναλογία παράγωγο:πλάσμα 1:10 στους 37 °C για 2 και 30 min. Στα δύο διαφορετικά αυτά χρονικά σημεία λαμβάνεται δείγμα και ακολουθεί καταβύθιση πρωτεϊνών με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης (αναλογία 1:2). Μετά από φυγοκέντρηση (στις 14000 rpm για 30 min) μετρείται σε ειδικό μετρητή ραδιενέργειας η ραδιενέργεια τόσο του υπερκείμενου υγρού, όσο και του ιζήματος. Ακολουθώντας το υπερκείμενο υγρό, που περιέχει το επισημασμένο παράγωγο, διηθείται με τη βοήθεια ειδικού φίλτρου, έτσι ώστε να διασφαλισθεί ότι στο υπό ανάλυση δείγμα δεν υπάρχουν ίχνη πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατακρατηθείσα ραδιενέργεια μετά τη διήθηση και στη σύριγγα ήταν αμελητέα. Μετά την ένεση του τελικού υπερκείμενου διαλύματος (που έχει ληφθεί μετά τη φυγοκέντρηση και τη διήθηση), η κορυφή που παραλαμβάνεται στο χρόνο έκλουσης του ραδιοπεπτιδίου αντιστοιχεί σε ποσοστό >75% του ενεθέντος στην HPLC και στα δύο μελετώμενα χρονικά διαστήματα.

Βάσει του λόγου της ραδιενέργειας του ιζήματος, που περιέχει τις πρωτεΐνες του πλάσματος, ως προς την συνολική ραδιενέργεια, που περιέχεται στο υπερκείμενο όσο και στο ίζημα, προκύπτει το ποσοστό της πρόσδεσης του παραγώγου μας στις πρωτεΐνες του πλάσματος, το οποίο είναι και στα 2 χρονικά σημεία 45%.



Σχήμα 34: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG-^{99m}TcO μετά από επώαση με ανθρώπινο πλάσμα για 2 min.



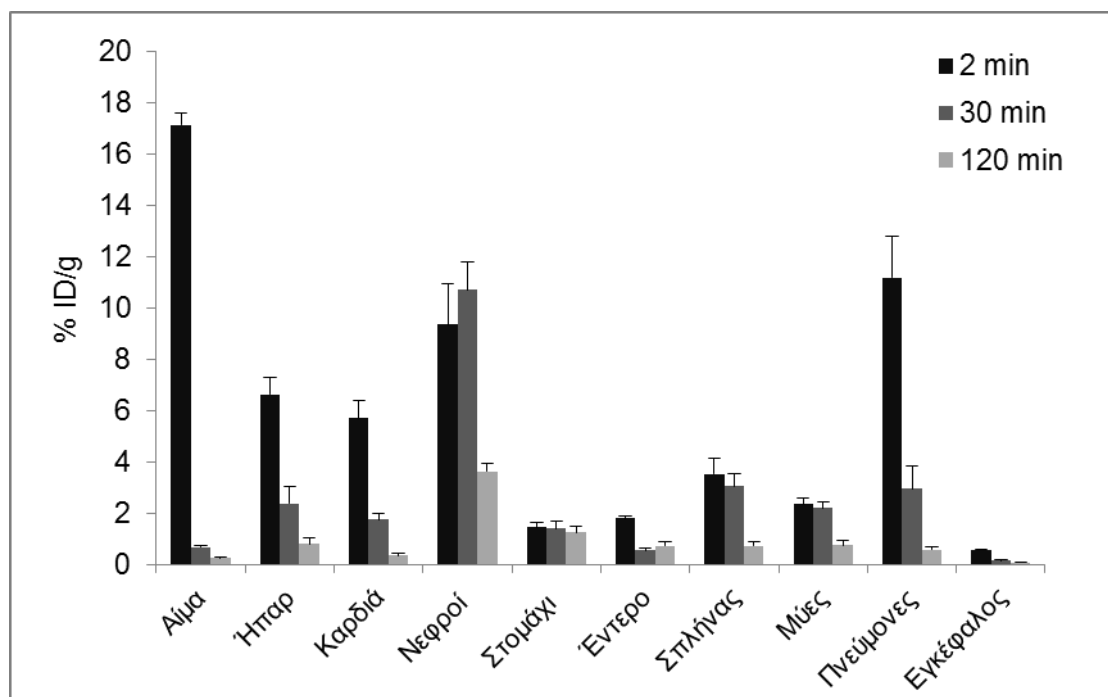
Σχήμα 35: Ράδιο-RP-HPLC χρωματογράφημα του CL-CSG-^{99m}TcO μετά από επώαση με ανθρώπινο πλάσμα για 30 min.

5.5.3 *In vivo* μελέτες βιοκατανομής

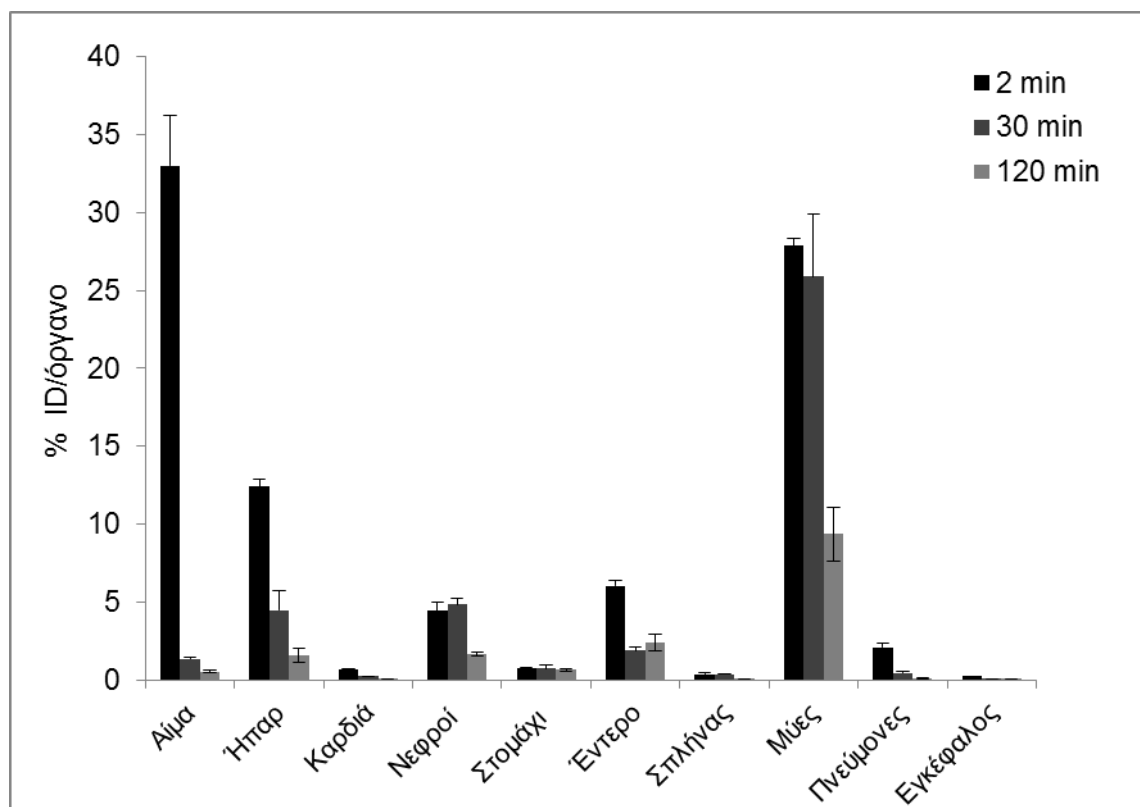
Η βιοκατανομή του CL-CSG-^{99m}TcO μελετήθηκε για τα χρονικά διαστήματα των 2, 30 και 120 min από τη στιγμή της χορήγησής του στα πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7, εκφραζόμενα ως % ενεθείσας δόσης ανά όργανο (% ID/ όργανο) και % δόση ανά g (% ID/g). Επιπλέον, στα σχήματα 36 και 37 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με τη μορφή ραβδογραμμάτων.

Πίνακας 7: *In vivo* κατανομή της ραδιενέργειας 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του παραγώγου CL-CSG-^{99m}TcO σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.

	% Δόση ραδιενέργειας /g						% Δόση ραδιενέργειας/όργανο					
	2 min		30 min		120 min		2 min		30 min		120 min	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
Αίμα	17,12	0,49	0,68	0,08	0,26	0,04	33,02	3,22	1,35	0,13	0,52	0,07
Ήπαρ	6,62	0,68	2,37	0,68	0,80	0,25	12,41	0,51	4,48	1,25	1,53	0,46
Καρδιά	5,70	0,69	1,74	0,25	0,35	0,07	0,68	0,06	0,21	0,04	0,05	0,01
Νεφροί	9,36	1,58	10,70	1,07	3,62	0,30	4,42	0,56	4,83	0,43	1,65	0,15
Στομάχι	1,45	0,17	1,39	0,31	1,25	0,24	0,78	0,01	0,74	0,17	0,62	0,12
Έντερο	1,80	0,10	0,54	0,08	0,72	0,15	6,03	0,34	1,89	0,20	2,41	0,52
Σπλήνας	3,53	0,62	3,06	0,47	0,73	0,16	0,37	0,05	0,34	0,06	0,06	0,01
Μύες	2,36	0,20	2,20	0,23	0,76	0,17	27,88	0,48	25,90	3,98	9,37	1,73
Πνεύμονες	11,17	1,64	2,96	0,86	0,58	0,10	2,08	0,22	0,43	0,07	0,11	0,03
Εγκέφαλος	0,58	0,02	0,16	0,01	0,08	0,02	0,23	0,01	0,06	0,00	0,03	0,00



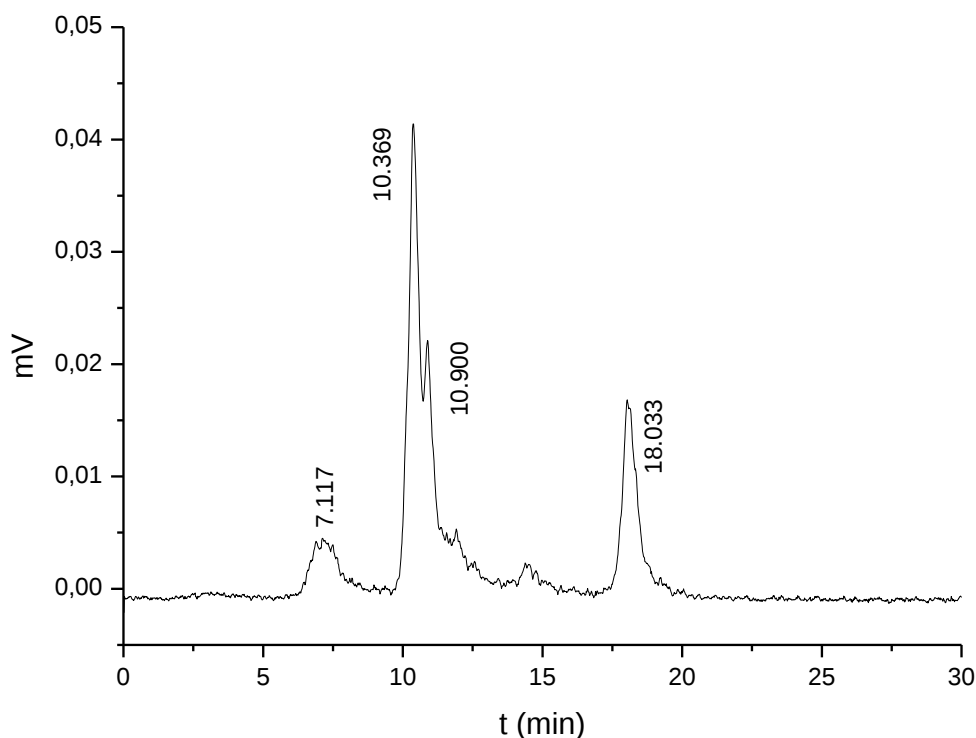
Σχήμα 36: *In vivo* κατανομή της ραδιενέργειας (% ID/g) 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.



Σχήμα 37: *In vivo* κατανομή της ραδιενέργειας (% ID/όργανο) 2, 30 και 120 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοσυμπλόκου CL-CSG-^{99m}TcO σε φυσιολογικούς ποντικούς Swiss Albino.

Τα ποσοστά της ραδιενέργειας στο αίμα μειώνονται από 17,2% της ενεθείσας δόσης ανά γραμμάριο «ιστού» 2 min μετά την ένεση (p.i.) στα 0,68% και 0,26% στα 30 και 120 min, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ταχεία αιματική κάθαρση του ραδιοσυμπλόκου. Οι χαμηλές τιμές ραδιενέργειας στο στομάχι και τον σπλήνα υποδηλώνουν την απουσία υπερτεχνητικών ή κολλοειδούς ^{99m}Tc, αντίστοιχα, και συνηγορούν στην *in vivo* σταθερότητα του συμπλόκου. Χαμηλή συσσώρευση παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα όργανα, όπως το ήπαρ, τα έντερα και οι μύες, ενώ η απέκκριση του παραγώγου πραγματοποιήθηκε κυρίως μέσω του ουροποιητικού και όχι του ηπατοχολικού συστήματος. Σύμφωνα με την ανάλυση HPLC των δειγμάτων ούρων που συλλέχθηκαν 30 min μετά την ένεση, το 40% της ραδιενέργειας αντιστοιχούσε σε ανέπαφο CL-CSG-^{99m}TcO, εύρημα που υποδηλώνει τη σημαντική μεταβολική σταθερότητα του ραδιοεπισημασμένου παραγώγου *in vivo*.

Τέλος, η μετρηθείσα ραδιενέργεια στον εγκέφαλο (0,58% ID/g στα 2 min και 0,16% ID/g στα 30 min p.i.) είναι ενδεικτική της πιθανότητας ανίχνευσης ακέραιου του πεπτιδίου στον εγκέφαλο. Με βάση τα ποσοστά αυτά και λαμβάνοντας υπ' όψιν την μεταβολική σταθερότητα του CL-CSG-^{99m}TcO, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, φαίνεται πιθανό ότι έστω ένα ποσοστό της ραδιενέργειας που ανιχνεύθηκε στον εγκέφαλο οφείλεται στο ακέραιο ραδιοεπισημασμένο παράγωγο της CL. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την παρουσία του ανέπαφου CL-CSG-^{99m}TcO στον εγκέφαλο.



Σχήμα 38: Ραδιο-RP HPLC χρωματογράφημα δείγματος ούρων ποντικού 30 min μετά την χορήγηση του επισημασμένου παραγώγου CL-CSG-^{99m}TcO.

5.6 Εφαρμογή του παραγώγου CL-βιοτίνη σε μέθοδο τύπου ELISA για τη διερεύνηση αλληλεπίδρασης CL και Αβ

Στα πλαίσια διερεύνησης του μηχανισμού της νευροπροστατευτικής δράσης της CL, μελετήθηκε *in vitro* η πιθανή αλληλεπίδρασή της με το πεπτίδιο Αβ, κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της AD. Η ικανότητα πρόσδεσης του Αβ στην CL διερευνήθηκε με μέθοδο τύπου ELISA (βιοτίνης-στρεπταβιδίνης), χρησιμοποιώντας το βιοτινυλιωμένο παράγωγο της CL (CL-βιοτίνη) και αξιοποιώντας τις ιδιότητες του συστήματος βιοτίνη-(στρεπτ)αβιδίνη, όπως εξηγήθηκε στο Κεφάλαιο «Μέθοδοι και Υλικά» , παρ.4.5.

Η αρχική μεθοδολογία βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας [219] καθώς και σε μία πρόσφατη βιβλιογραφική εργασία αναφερόμενη στα πεπτίδια HN [195]. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν εναλλακτικές εκδοχές της μεθόδου ELISA (συστήματα ELISA), ενώ εξετάσθηκαν διάφορες παράμετροι για τη βελτιστοποίηση των αντίστοιχων πειραματικών πρωτοκόλλων.

Πιο συγκεκριμένα, μετά από αρκετές προσπάθειες, κατά τις οποίες διαφοροποιήθηκε κυρίως ο σχεδιασμός της διαδοχής των επιμέρους σταδίων προσθήκης των αντιδρώντων στα μικροφρεάτια ELISA και, παράλληλα, βελτιστοποιήθηκαν οι χρόνοι επώασης, η σύσταση των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων και άλλες παράμετροι, αναπτύχθηκαν τελικά δύο πειραματικά συστήματα, τα πρωτόκολλα των οποίων παρουσιάζονται στην παράγραφο 4.5.2 του Κεφαλαίου «Μέθοδοι και Υλικά». Τα δύο συστήματα σχηματικά αναπαρίστανται στα Σχήματα 14 και 15 του ίδιου Κεφαλαίου.

Το πρωτόκολλο Α περιλαμβάνει επίστρωση των φρεατίων με στρεπταβιδίνη και διαδοχικές επώσεις με CL-βιοτίνη, πεπτίδιο Αβ, μονοκλωνικό αντί-Αβ αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα), αντίσωμα εναντίον γ-ανοσοσφαιρινών ποντικού, επισημασμένο με το ένζυμο HRP (ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα) και τέλος χρωμογόνο ενζυμικό υπόστρωμα (ABTS/H₂O₂). Στο πρωτόκολλο Β τα φρεάτια επικαλύπτονται με το μονοκλωνικό αντι-Αβ αντίσωμα και ακολουθεί επώαση με το πεπτίδιο Αβ, το παράγωγο CL-βιοτίνη, πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βιοτίνης, ανεπτυγμένο σε κουνέλι (πρώτο αντίσωμα), αντίσωμα εναντίον γ-ανοσοσφαιρινών κουνελιού, επισημασμένο με HRP (ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα) και χρωμογόνο ενζυμικό υπόστρωμα (ABTS/H₂O₂).

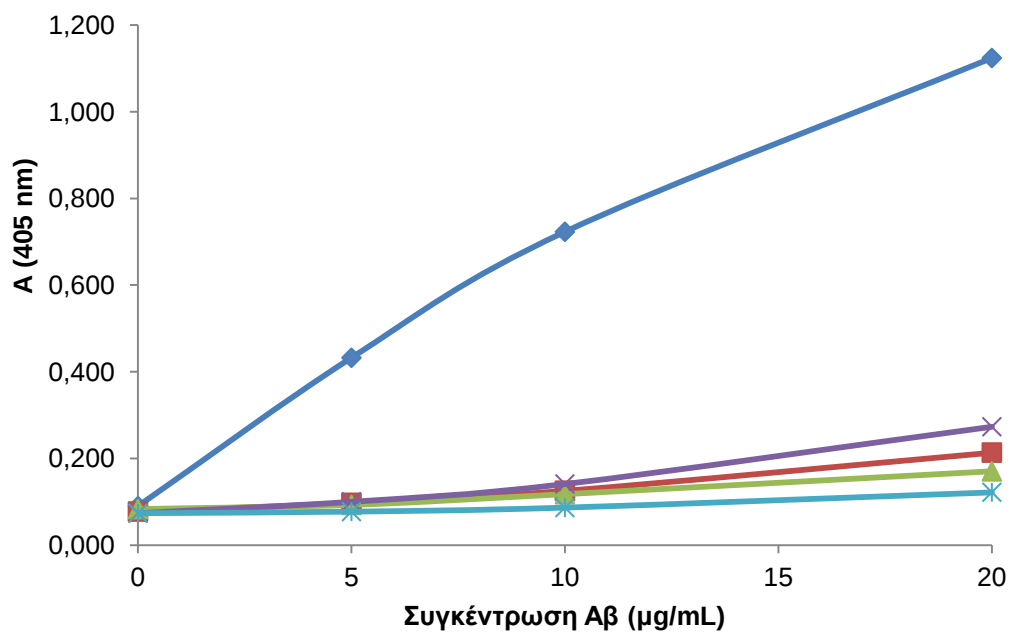
Και στις δύο περιπτώσεις, μελετήθηκαν παράλληλα αρνητικοί μάρτυρες, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και η εξειδίκευση της τυχόν αλληλεπίδρασης. Για τον σκοπό αυτό συμπεριελήφθησαν φρεάτια που προέκυψαν από: α. αρχική επίστρωση με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM (για αρχική επίστρωση με 6E10) ή PB 0,01M (για αρχική επίστρωση με στρεπταβιδίνη) ή με διάλυμα γ-ανοσοσοφαιρίνης ποντικού στη θέση του μονοκλωνικού αντι-Αβ αντισώματος, β. επώαση με το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ή με διαφορετικά συνθετικά πεπτίδια (π.χ. με θυμοσίνη β4) [73] στη θέση του πεπτιδίου Αβ, γ. επώαση με διαφορετικά βιοτινυλιωμένα πεπτίδια (π.χ. με βιοτινυλιωμένο συνθετικό πεπτίδιο-τμήμα της φωσφολιπάσης Cζ) [220] στη θέση της CL-βιοτίνης.

Ενδεικτικές καμπύλες τιτλοδότησης, που υποδηλώνουν την *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ CL και Αβ φαίνονται στα Σχήματα 39 και 40.

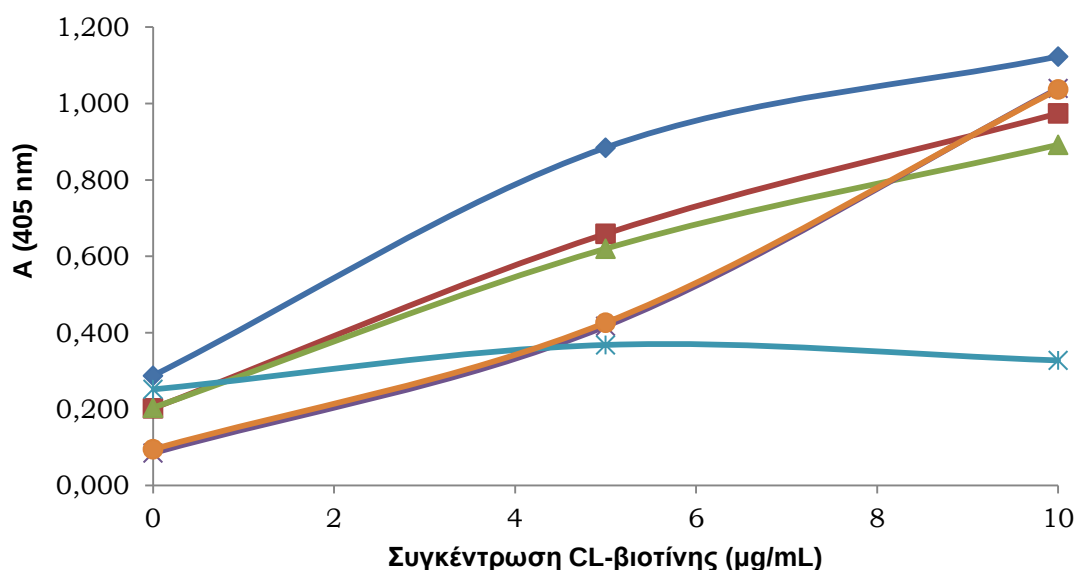
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και των δύο συστημάτων τύπου ELISA, η CL φαίνεται να αλληλεπιδρά με το Αβ.

Στην περίπτωση του πρωτοκόλλου Α οι τιμές μη ειδικού σήματος ήταν σε όλες τις περιπτώσεις εξαιρετικά χαμηλές, ενισχύοντας την αξιοπιστία των πειραματικών μας αποτελεσμάτων, σύμφωνα με τα οποία υφίσταται *in vitro* δοσοεξαρτώμενη αλληλεπίδραση μεταξύ CL και Αβ.

Από την άλλη πλευρά, εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο Β οι τιμές οπτικής απορρόφησης για τους αρνητικούς μάρτυρες ήταν αρκετά υψηλές. Ακόμη υψηλότερες τιμές μη ειδικού σήματος παρατηρήθηκαν όταν στη θέση του πρώτου αντισώματος έναντι βιοτίνης (σε συνδυασμό με το ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα) χρησιμοποιήθηκε ενζυμικώς επισημασμένη στρεπταβιδίνη. Ως εκ τούτου, μελλοντικές μελέτες θα πραγματοποιηθούν σύμφωνα με την μεθοδολογία του πρωτοκόλλου Α.



Σχήμα 39: Καμπύλη «τιτλοδότησης» CL παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων πεπτιδίου Αβ, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Α (♦). Αρνητικοί μάρτυρες: επίστρωση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αντί στρεπταβιδίνης (■), επώαση με διαφορετικό βιοινυλιωμένο πεπτίδιο αντί του παραγώγου CL-βιοτίνη (▲), επώαση με διάλυμα αραίωσης αντί του Αβ (×), επώαση με διάλυμα γ-ανοσοσφαιρίνης ποντικού αντί του μονοκλωνικού αντι-Αβ αντισώματος (*). Οι αρνητικοί μάρτυρες οδήγησαν σε πολύ χαμηλές τιμές μη ειδικού σήματος. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης (A) αποτελούν τους μέσους όρους τριών τιμών (ενδεικτικό πείραμα).



Σχήμα 40: Καμπύλη «τιτλοδότησης» Αβ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων CL-βιοτίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Β (♦). Αρνητικοί μάρτυρες: επίστρωση με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών στη θέση του μονοκλωνικού αντι-Αβ αντισώματος (▲), επίστρωση με γ-ανοσοσφαιρίνη ποντικού στη θέση του μονοκλωνικού αντι-Αβ αντισώματος (■), επώαση με διάλυμα αραίωσης αντί του Αβ (●), επώαση με διαφορετικό συνθετικό πεπτιδίο αντί του Αβ (×), επώαση με διαφορετικό βιοτινυλιωμένο πεπτιδίο αντί του ειδικού παραγώγου CL-βιοτίνη (*). Οι περισσότεροι αρνητικοί μάρτυρες οδήγησαν σε υψηλές τιμές μη ειδικού σήματος. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης (A) αποτελούν τους μέσους όρους τριών τιμών (ενδεικτικό πείραμα).

5.7 Μελέτη της αλληλεπίδρασης CL και CL-βιοτίνης με Αβ σε πειράματα CD

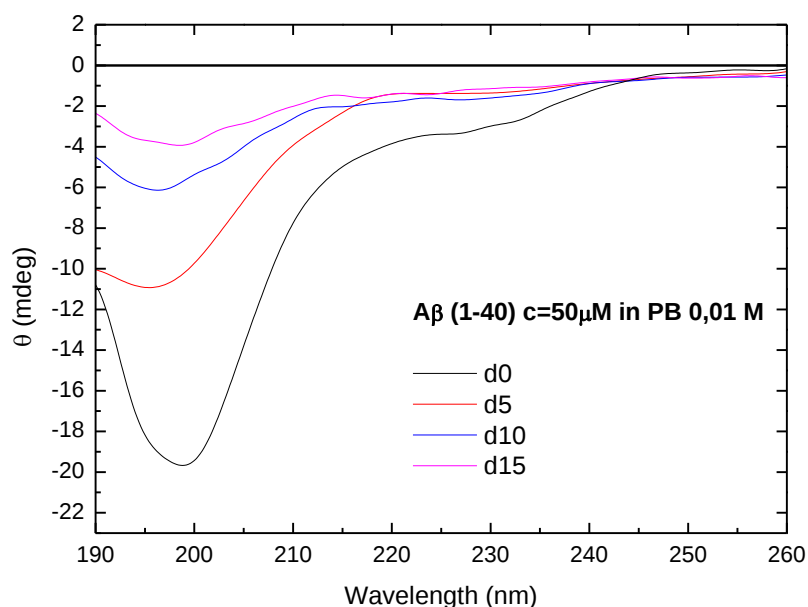
Η *in vitro* μελέτη της αλληλεπίδρασης CL και Αβ συνεχίστηκε με πειράματα φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού (CD).

Συγκεκριμένα, διαλύματα του πεπτιδίου Αβ(1-40), σε συγκέντρωση 50 μM σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, επώαστηκαν απουσία και παρουσία CL σε αναλογία συγκεντρώσεων Αβ:CL 1:1 και 1:2. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση του Αβ επιλέχθηκε ως μια συγκέντρωση που επιτρέπει, με βάση την εμπειρία του Εργαστηρίου αλλά και τα δεδομένα της βιβλιογραφίας την ευχερή μελέτη της συσσωμάτωσης του Αβ σε εύλογο χρονικό διάστημα [221,222,223]. Σχετικά με την πορεία συσσωμάτωσης των πεπτιδίων Αβ, οι χρόνοι επώασης βάσει βιβλιογραφικών μελετών κυμαίνονται από μερικές ώρες μέχρι περίπου

2 εβδομάδες [224]. Στην παρούσα Διατριβή τα φάσματα CD ελήφθησαν ανά 24 h για συνολική διάρκεια 15 ημερών.

Τα φάσματα του μίγματος Αβ:CL συγκρίθηκαν τόσο με τα φάσματα του διαλύματος Αβ όσο και με τα φάσματα των διαλυμάτων της CL στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις και στο ίδιο χρονικό διάστημα [224,225]. Η σύγκριση αυτή επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ύπαρξη αλληλεπίδρασης της CL με το Αβ.

Κατ' αρχάς μελετήθηκε το πεππίδιο Αβ40 σε διάλυμα PB pH 7,4 και σε συγκέντρωση 50 μ M. Το Αβ βρέθηκε να υιοθετεί αρχικά τη δευτεροταγή δομή τυχαίου σπειράματος όπως υποδηλώνει το αρνητικό ελάχιστο στα 198 nm και η οποία αποτελεί μία κατάσταση δυναμικής ισορροπίας μεταξύ τυχαίων δομών.

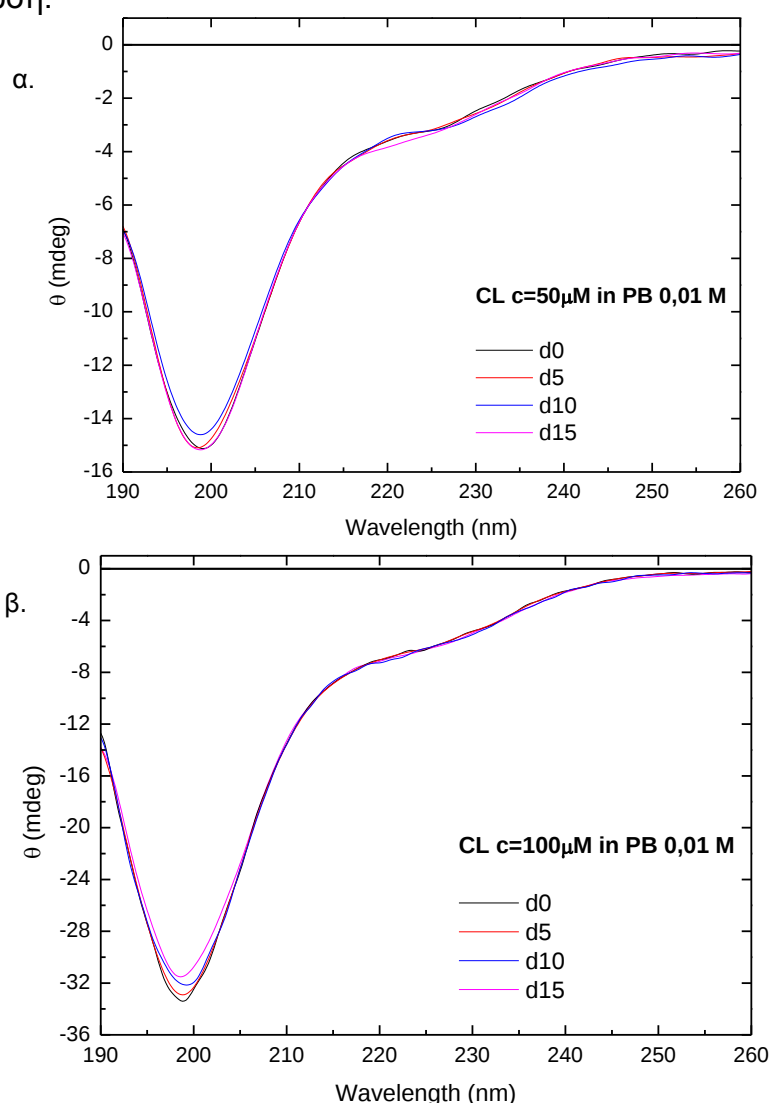


Σχήμα 41: Φάσμα CD του Αβ(1-40) σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.

Στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες και σε διάρκεια περίπου μίας εβδομάδας η ένταση του σήματος μειώνεται περίπου στο 50% (Σχήμα 41) και παρατηρείται η συσσώρευση αδιάλυτης ουσίας. Η παρατήρηση αυτή συνδέεται με τη δημιουργία πολυμερικών ή/και μακρομοριακών σχηματισμών οι οποίοι καθιζάνουν ως αδιάλυτοι, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η συνεισφορά τους στο φάσμα CD του διαλύματος. Παράλληλα, με το πέρασμα του χρόνου και μέχρι το διάστημα 15 ημερών συνεχίζεται η σταδιακή απώλεια

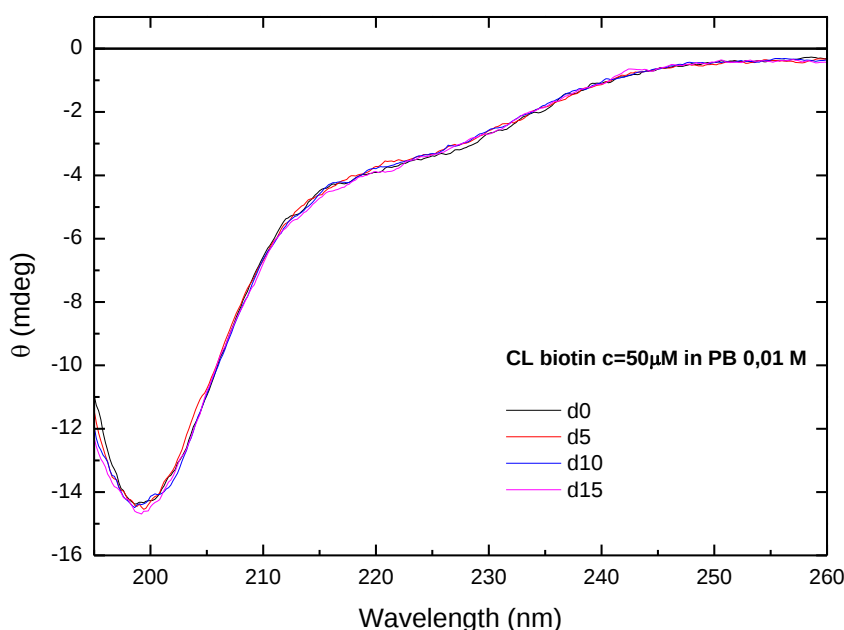
της δομής του τυχαίου σπειράματος, ενώ η ένταση απορρόφησης του διαλύματος βρίσκεται στο επίπεδο του θορύβου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύνολο των μορίων του πεπτιδίου έχει περιέλθει σε αδιάλυτη μορφή.

Το φάσμα της CL εμφάνισε δομή τυχαίου σπειράματος (ελάχιστο στα 198 nm) και παρέμεινε σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης (Σχήμα 42). Η σταθερότητα του φάσματος διαπιστώθηκε και στις δύο μελετώμενες συγκεντρώσεις, ενώ η ένταση του σήματος ήταν διπλάσια στην περίπτωση της διπλάσιας συγκέντρωσης του πεπτιδίου, γεγονός που συνεπάγεται ότι η δομική της οργάνωση υπό αυτές τις συνθήκες δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση.



Σχήμα 42: Φάσματα CD της CL σε συγκεντρώσεις (α) 50 μM και (β) 100 μM σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.

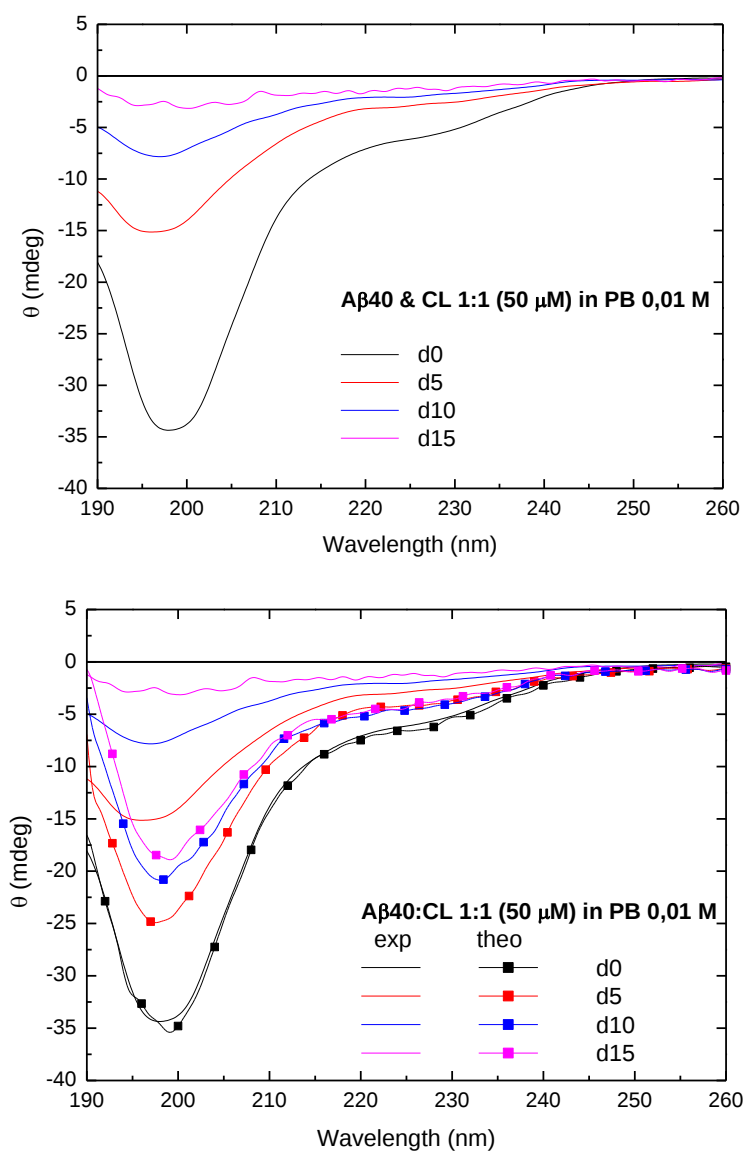
Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το αποτέλεσμα ότι η ίδια δευτεροταγής δομή παρατηρήθηκε και στην περίπτωση μελέτης της CL-βιοτίνης, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η παρουσία της ομάδας-ιχνηθέτη δεν επιφέρει αλλαγές στη δομή και οργάνωση του μορίου. Η δομή του τυχαίου σπειράματος συμφωνεί με δημοσιευμένη εργασία δομικής μελέτης της CL, όπου το φάσμα της σε PBS και στην ίδια με τη δική μας κλίμακα συγκεντρώσεων (0,1-0,2 mg/mL) παρουσιάζει την ίδια δευτεροταγή δομή [226].



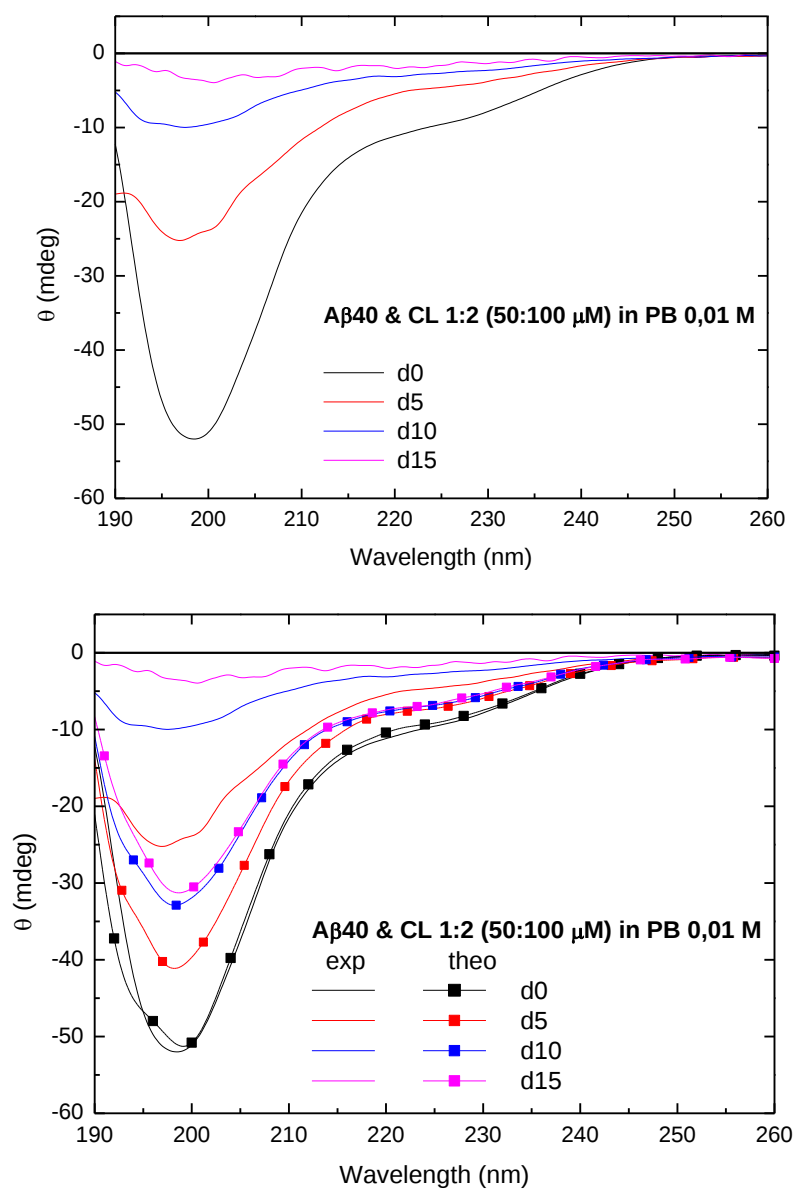
Σχήμα 43: Φάσμα CD του παραγώγου CL-βιοτίνης σε PB συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών.

Τα φάσματα των μιγμάτων Αβ:CL συγκρίθηκαν με τα φάσματα των δύο επιμέρους συστατικών-πεπτιδίων, δηλαδή του πεπτιδίου Αβ και της CL. Τα πειραματικώς λαμβανόμενα φάσματα του δείγματος Αβ:CL 1:1, σε συγκεντρώσεις πεπτιδίων 50 μM, εμφανίζονται αρχικά ως τυχαία σπειράματα, τα οποία στη διάρκεια της μελέτης χάνουν σταδιακά σήμα καθώς τα πεπτίδια καταβυθίζονται σε αδιάλυτες δομές. Συγκρινόμενα με τα φάσματα του Αβ(1-40) την αντίστοιχη ημέρα μελέτης, παρατηρήθηκε τις πρώτες ημέρες του πειράματος η ίδια διαμόρφωση, ενώ η εικόνα τους διαφοροποιήθηκε στη διάρκεια της μελέτης, όπου παρατηρείται μια πιο ταχεία κι απότομη πτώση του σήματος, ενδεικτική για την ύπαρξη μιας ισχυρής και άμεσης αλληλεπίδρασης των δύο πεπτιδικών μορίων στο διάλυμα, που επιταχύνει την

καταβύθιση. Παρόμοια συμπεριφορά εμφάνισε και το μίγμα στην αναλογία Αβ: CL 1:2 (50:100 μM), όπου η εικόνα του μίγματος διαφοροποιήθηκε από την αντίστοιχη του θεωρητικού και του Αβ μόνου του από την 4^η ημέρα της επώασης, ακολουθώντας μια ταχύτερη απώλεια σήματος και της δομής του τυχαίου σπειράματος.



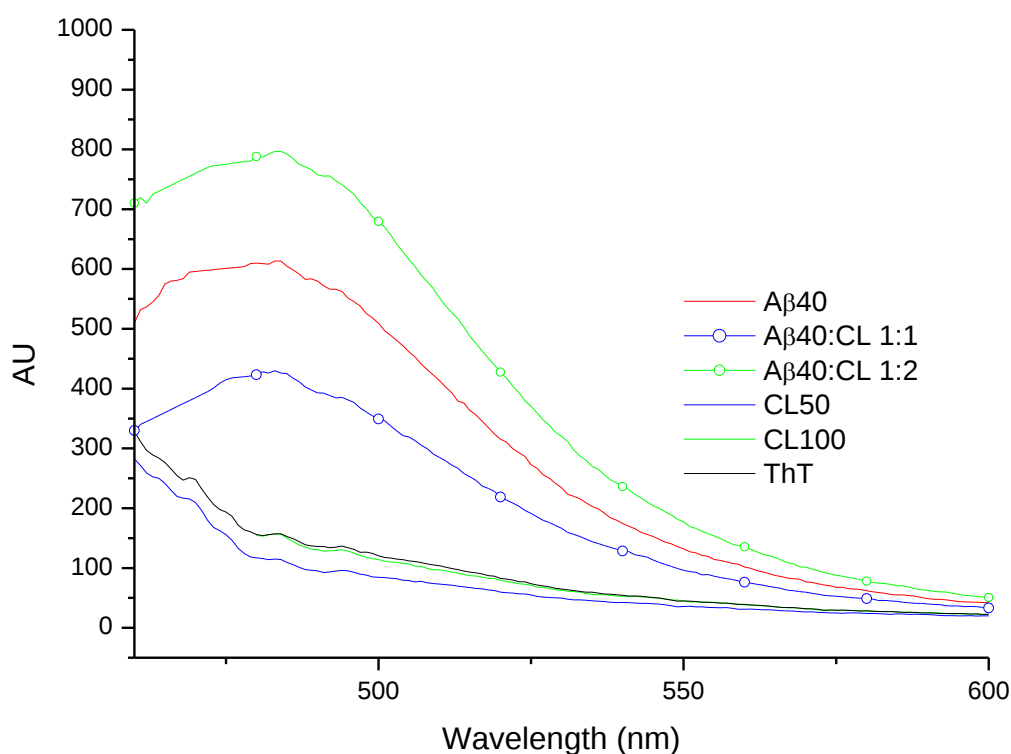
Σχήμα 44: (α) Φάσμα CD του μίγματος Αβ(1-40) και CL σε PB σε αναλογία 1:1 συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών. (β) Σύγκριση του φάσματος Αβ:CL 1:1 με το άθροισμα των φασμάτων των επιμέρους πεπτιδίων. Όπου exp:πειραματικό φάσμα, theo: το θεωρητικό φάσμα, που προκύπτει με άθροισμα των φασμάτων των συστατικών-πεπτιδίων.



Σχήμα 45: (α) Φάσμα CD του μίγματος Αβ(1-40) και CL σε PB σε αναλογία 1:2 συναρτήσει του χρόνου για περίοδο επώασης 15 ημερών. (β) Σύγκριση του φάσματος Αβ:CL 1:2 με το άθροισμα των φασμάτων των επιμέρους πεπτιδίων. Όπου exp:πειραματικό φάσμα, theo: το θεωρητικό φάσμα, που προκύπτει με άθροισμα των φασμάτων των συστατικών-πεπτιδίων.

5.8 Έλεγχος σχηματισμού β-αμυλοειδών ινιδίων παρουσία CL με την δοκιμασία της Θειοφλαβίνης T

Σε συνέχεια της μελέτης CD, όπου ήταν εμφανής η επίδραση της CL στην ταχύτητα καταβύθισης του πεπτιδίου Αβ(1-40), εξετάσθηκε περαιτέρω η παρέμβασή της στον σχηματισμό ινιδίων του αμυλοειδούς πεπτιδίου. Το Αβ(1-40) επωάστηκε απουσία και παρουσία CL για το ίδιο χρονικό διάστημα που πραγματοποιούνταν τα πειράματα CD, ώστε να υπάρχει δυνατότητα άμεσης σύγκρισης των αποτελεσμάτων που προέκυπταν.



Σχήμα 46: Πεπτίδιο Αβ(1-40), συγκέντρωσης 25 μM επωάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PB 0,01 M pH 7,4, παρουσία και απουσία CL σε αναλογίες 1:1 και 1:2. Σε χρονικό διάστημα 15 ημερών τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς το σχηματισμό ινιδίων με χρώση ThT, C=5 μM . Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ThT.

Βάσει του Σχήματος 46, και παρουσία CL σε αναλογία 1:1 παρατηρείται ελάττωση της έντασης φθορισμού του ενώ κατά την επώαση του μίγματος Αβ:CL 1:2 αύξηση του σήματος, υποδεικνύοντας ότι στην πρώτη περίπτωση τα ινίδια που σχηματίζονται είναι λιγότερα από εκείνα που σχηματίζει το Αβ μόνο του ενώ κατά την επώαση του μίγματος Αβ:CL 1:2 τα ινίδια που

δημιουργούνται είναι περισσότερα. Είναι συνεπώς πιθανόν από την ποσοτική αυτή διαφοροποίηση ότι η CL συμμετέχει στην διαδικασία πολυμερισμού του Αβ πιθανότατα μέσω σχηματισμού άλλου τύπου ινιδίων που περιλαμβάνει και τα δύο πεπτίδια. Με άλλα λόγια, οι αδιάλυτοι σχηματισμοί που δημιουργούνται με τη συμμετοχή της CL πιθανόν να διαφέρουν δομικά από τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τα πειραματικά δεδομένα της ELISA και του CD τόσο σε επίπεδο αλληλεπίδρασης των δύο πεπτιδίων όσο και στην απομάκρυνση του Αβ από το διάλυμα κατά την συνεπώασή του με CL.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κολιβελίνη (CL, SALLRSIPAPAGASRLLLLTGEIDL) είναι ένα υβριδικό πεπτιδίο 26 αμινοξέων που εμφανίστηκε στη βιβλιογραφία το 2005 κι αποτελεί το προϊόν σύζευξης του νευροτροφικού παράγοντα ADNF-9 (Activity Dependent Neurotrophic Factor-9, SALLRSIPA) με το αμινοτελικό άκρο του δραστικού παραγώγου της ουμανίνης (HN), AGA(C8R)HNG17, όπως αυτό προέκυψε μετά από εκτεταμένες μελέτες δομής – δραστικότητας. Ο συνδυασμός των νευροπροστατευτικών δράσεων των τμημάτων αυτού του υβριδικού πεπτιδίου οδηγεί σε εξαιρετικά υψηλή *in vitro* νευροπροστατευτική δραστικότητα (100 fM, 10^8 φορές υψηλότερη από της μητρικής HN), με αποτέλεσμα η CL να αποτελεί, μέχρι στιγμής, το πλέον δραστικό μέλος της οικογένειας της HN. Παρ' όλες τις προσπάθειες της διεθνούς ερευνητικής κοινότητας ο ακριβής μηχανισμός δράσης της οικογένειας αυτής νευροπροστατευτικών πεπτιδίων παραμένει άγνωστος.

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση επισημασμένων παραγώγων της CL που δύνανται να αξιοποιηθούν ως μοριακοί ανιχνευτές, με απώτερο στόχο την διερεύνηση του τρόπου δράσης της CL. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση 3 παραγώγων, κατάλληλα επισημασμένων ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε ειδικές *in vitro* και *in vivo* βιολογικές μελέτες καθώς και σε μελέτες αλληλεπίδρασης με το πεπτιδίο Αβ, παράγοντα που αποτελεί το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών που χαρακτηρίζουν τη νόσο Alzheimer.

Αναλυτικότερα τα 3 ειδικά παράγωγα της CL που συνετέθησαν έφεραν τις ακόλουθες ομάδες-ιχνηθέτες:

α. τη φθορίζουσα ένωση FITC (CL-FITC), με επιδίωξη την ανάπτυξη ενός επισημασμένου παραγώγου που μπορεί να αξιοποιηθεί σε μελέτες με τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού [212].

β. την βιοτίνη (CL-βιοτίνη), με στόχο την εφαρμογή του παραγώγου σε μελέτες ανίχνευσης/προσδιορισμού αλληλεπίδρασης πεπτιδίων (π.χ. μελέτες τύπου ELISA), αξιοποιώντας τον σχηματισμό του σταθερού συμπλόκου βιοτίνης-στρεπταβιδίνης [213].

γ. το τριπεπτίδιο dimethylGly-Ser-Cys, χηλικό υποκαταστάτη/συμπλέκτη του ραδιενεργού μετάλλου ^{99m}Tc (CL-CSG), με απώτερο στόχο την χορήγηση του παραγώγου σε κατάλληλα μοντέλα πειραματόζων και την πραγματοποίηση *in vivo* μελετών βιοκατανομής [215].

Η σύνθεση των παραγώγων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση, ακολουθώντας την μεθοδολογία Fmoc/tBu. Η σύνθεση περιέλαβε την ανάπτυξη των παραγώγων σε μια διλειτουργική Lys, που αγκυροβολήθηκε με την μορφή Fmoc-Lys(Dde)-OH, ως πρώτο αμινοξύ στο στερεό υπόστρωμα (ρητίνη). Η Lys έχει χρησιμοποιηθεί ως αμινοξύ-γέφυρα στην παραγωγή πεπτιδικών παραγώγων, λόγω της παρουσίας – πέραν της α-αμινομάδας - και μιας δεύτερης αμινομάδας, στην πλευρική βουτυλοαμινο-αλυσίδα της, δεκτικής σε παραγωγοποίηση. Έτσι, η διλειτουργική αυτή Lys παρέχει τη δυνατότητα, μέσω των 2 αμινομάδων N^{α} και N^{ϵ} , να πραγματοποιήσουμε τη σύνθεση της επιθυμητής πεπτιδικής αλληλουχίας (CL) μέσω της μιας αμινομάδας και παράλληλα να προσθέσουμε την ομάδα-ιχνηθέτη στη δεύτερη αμινομάδα της. Η προσέγγιση αυτή είναι εφικτή εφόσον οι προστατευτικές ομάδες Fmoc και Dde των N^{α} και N^{ϵ} -αμινομάδων αντίστοιχα της Lys, απομακρύνονται σε διαφορετικές συνθήκες με αποτέλεσμα η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας να πραγματοποιείται σε συνθήκες που δεν οδηγούν σε απομάκρυνση της ομάδας Dde. Να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με το σχεδιασμό, το αμινοξύ-γέφυρα Lys (Lys27) βρίσκεται στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου της CL, προκειμένου να παραμείνει ανεπηρέαστο το σημαντικό για την δραστικότητα της CL τμήμα του ADNF. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι, το μήκος της πλευρικής αλυσίδας της Lys27 παρέχει επαρκή απόσταση μεταξύ της ομάδας ιχνηθέτη και της βιολογικά δραστικής αλληλουχίας της CL, εξασφαλίζοντας την ελαχιστοποίηση κάθε πιθανής παρεμβολής ή και στερεοχημικών παρεμποδίσεων.

Η σύνθεση του πεπτιδικού τμήματος και η προσθήκη της εκάστοτε ομάδας – ιχνηθέτη πραγματοποιήθηκαν στις N^{α} και N^{ϵ} θέσεις της Lys27, διαφορετικά ανά περίπτωση, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του παραγώγου CL-FITC και λόγω του φωτοευαίσθητου χαρακτήρα της φλουορεσκεΐνης, πραγματοποιήθηκε πρώτα η σύνθεση της

(αμινοξικής αλληλουχίας της) CL στην N^α της Fmoc-Lys(Dde)-OH και ακολούθησε στην N^ε ομάδα η σύζευξη της ένωσης FITC. Στην περίπτωση των παραγώγων CL-βιοτίνη και CL-CSG, η σύνθεση της CL πραγματοποιήθηκε σε τελικό στάδιο στη N^ε ομάδα της Lys, μετά την εισαγωγή της βιοτίνης ή τη σύνθεση του τριπεπτιδίου (dimethylGlySerCys) αντίστοιχα, μέσω της N^α ομάδας. Η FITC προστέθηκε στη Lys μετά από απομάκρυνση της Dde ομάδας σχηματίζοντας ένα σταθερό ομοιοπολικό δεσμό [227], η βιοτίνη προσδέθηκε μέσω ενός αμιδικού δεσμού με την αλυσίδα βαλερικού οξέος [228], ενώ στην περίπτωση του dmCSG λόγω της πεπτιδικής φύσης του ακολουθήθηκε η γνωστή πορεία της σύνθεσης. Σε όλες τις περιπτώσεις ακολουθήθηκε πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστηριακό μέρος της Διατριβής και δημοσιεύθηκε πρόσφατα [217].

Η παραλαβή των καθαρών πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση ημι-παρασκευαστικής RP-HPLC, ο έλεγχος της καθαρότητάς τους με αναλυτική RP-HPLC και η εύρεση των μοριακών βαρών τους έγινε με φασματομετρία μαζών ESI-MS.

Λεπτομερής δομική ανάλυση των παραγώγων με NMR έδειξε, ότι με εξαίρεση την Pro26 οι χημικές μετατοπίσεις των υπολοίπων αμινοξέων της αλληλουχίας CL παραμένουν ουσιαστικά ανεπηρέαστες. Επίσης δεν εμφανίζονται στα φάσματα NOESY νέα στοιχεία δευτεροταγούς δομής που να αποδίδονται στην προσθήκη των ομάδων επισήμανσης. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεσολάβηση της Lys27 θωρακίζει αποτελεσματικά την αλληλουχία της CL από χημικές μεταβολές ή αλλαγές στη διαμόρφωση που οφείλονται στην παρουσία των ομάδων ιχνηθετών. Τα αποτελέσματα από τη δομική ανάλυση των παραγώγων, ενισχύονται και από την *in vitro* αξιολόγηση της πιθανής κυτταροτοξικής τους δράσης με την δοκιμασία MTT. Τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η παρουσία των μορίων-ιχνηθετών δεν μεταβάλλει τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων F11 και SK-N-SH που καλλιεργήθηκαν με τα παράγωγα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα παρουσία της μητρικής CL.

Βάσει των ανωτέρω, τα συντεθέντα παράγωγα κρίνονται κατάλληλα για περαιτέρω αξιοποίηση και εφαρμόσιμα σε βιοχημικές διεργασίες/μελέτες.

Το πρώτο παράγωγο CL-FITC χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες μικροσκοπίας φθορισμού προκειμένου να διερευνηθεί εάν και πώς η CL αλληλεπιδρά με νευρικά και μη κύτταρα. Τα πειράματά μας πραγματοποιήθηκαν στις

κυτταρικές σειρές F11, SK-N-SH, Neuro-2a και MDA. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η CL μπορεί να προσδένεται εκλεκτικά στη μεμβράνη των F11, όπως υποδεικνύεται από τις στικτές κηλίδες φθορισμού που εντοπίζονται ασύμμετρα κατανεμημένες στην επιφάνεια των κυττάρων. Η απουσία παρόμοιας εικόνας στις άλλες εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές σε συνδυασμό με τη σημαντική μείωση της έντασης φθορισμού μετά από προεπώαση των F11 με περίσσεια μη επισημασμένου πεπτιδίου συνηγορούν στην εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης και στην πιθανή ύπαρξη ειδικών θέσεων πρόσδεσης για την CL στην περιφέρεια των κυττάρων. Επιπλέον, η αντίστοιχη μείωση στις περιοχές έντονου φθορισμού μετά από επώαση των κυττάρων στους 4 °C υποδηλώνει ότι η πρόσδεση του πεπτιδίου CL-FITC στην περιφέρεια των κυττάρων F11 περιλαμβάνει ένα ενεργειο-εξαρτώμενο μηχανισμό.

Ένας αριθμός μελετών στη βιβλιογραφία προτείνουν ότι η νευροπροστατευτική δράση της οικογένειας της HN ασκείται μέσω ενός υποδοχέα ή συμπλέγματος υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη, η φύση του οποίου είναι ακόμη άγνωστη [59,60]. Τα πειραματικά δεδομένα μας υποδηλώνουν την ύπαρξη ειδικών, ενεργειοεξαρτώμενων θέσεων πρόσδεσης της CL στα κύτταρα F11, και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν την πιθανή παρουσία υποδοχέων της CL στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, ακόμη και αν δεν αποδεικνύεται η ύπαρξή τους.

Δεδομένου ότι τα F11 είναι προϊόν σύντηξης πρωτογενούς καλλιέργειας νευρώνων εμβρύου αρουαίου με κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού (N18TG2), η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου μόνο με την υβριδική σειρά F11 θέτει το ερώτημα αν οι θέσεις πρόσδεσης είναι αποτέλεσμα της σύντηξης των δύο κυτταρικών σειρών από τα οποία προέρχεται ή αν προϋπάρχουν σε μία τουλάχιστον εξ αυτών. Για το λόγο αυτό, θα παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η πραγματοποίηση των ανωτέρω μελετών στις δύο επιμέρους κυτταρικές σειρές.

Συγχρόνως, η απουσία περιοχών δέσμευσης της CL στις υπόλοιπες μελετηθείσες σειρές υποδεικνύει ότι ο τρόπος εκδήλωσης της νευροπροστατευτικής δράσης των HN-πεπτιδίων δεν επιτυγχάνεται αποκλειστικά μέσω πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένες θέσεις-υποδοχείς,

αλλά επιτελείται πιθανόν με εναλλακτικούς έμμεσους τρόπους, όπως π.χ. αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου με κυτταρικά στοιχεία ή/και πρωτεΐνες.

Παράλληλα με τις *in vitro* μελέτες, πραγματοποιήθηκαν και *in vivo* πειράματα με το παράγωγο CL-CSG. Το παράγωγο αυτό, που σχεδιάστηκε έτσι ώστε στη συνέχεια να ραδιοεπισημανθεί, συμπλέχθηκε επιτυχώς με το ^{99m}Tc προς το παράγωγο CL-CSG- ^{99m}TcO σε υψηλή απόδοση.

Μελέτες σταθερότητας του επισημασμένου παραγώγου CL-CSG- ^{99m}TcO έδειξαν ικανοποιητική σταθερότητα του συμπλόκου σε συνάρτηση με το χρόνο, ακόμα και παρουσία κυστεΐνης, ως ανταγωνιστή του τριπεπτιδίου dmGSC για σύμπλεξη με το ραδιομέταλλο, ή ανθρωπίνου πλάσματος (βιολογικό μέσο). Τα πειραματικά αυτά δεδομένα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων και εξασφαλίζουν συγχρόνως την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα από τα *in vivo* πειράματα βιοκατανομής της CL-CSG- ^{99m}TcO σε ποντικούς τύπου Swiss Albino έδειξαν σημαντική μεταβολική σταθερότητα του συμπλόκου, ταχεία απομάκρυνση της ραδιενέργειας από το αίμα, απέκκριση κυρίως μέσω του ουροποιητικού συστήματος, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσσώρευση σε κάποιο κύριο όργανο. Η αξιοσημείωτη ποσότητα 0,58% ID/g της ραδιενέργειας που ανιχνεύθηκε/μετρήθηκε στον εγκέφαλο 2 min p.i. σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη σταθερότητα του ραδιοεπισημασμένου παραγώγου υποδηλώνει ότι η CL-CSG- ^{99m}TcO μπορεί να είναι παρούσα στον εγκέφαλο. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να συσχετισθεί με την προστατευτική δράση της CL και πεπτιδίων της οικογένειας της HN έναντι της αμνησίας.

Μελέτες με ραδιοεπισημασμένα μόρια/παράγοντες δεν έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής για τα πεπτίδια της οικογένειας της HN, εκτός από μια παλαιότερη μελέτη της ομάδας μας που βασίστηκε στη χρήση επισημασμένων με ^{125}I πεπτιδικών παραγώγων της HN (^{125}I -Y-HN5: ^{125}I -Tyr-desLeu-AGA(C8R)HNG17) και CL (^{125}I -Y-HN8: ^{125}I -Tyr-desLeu-Colivelin) [71]. Με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας σε πειράματα βιοκατανομής παρατηρήθηκαν ασυνήθιστα αυξημένες τιμές ραδιενέργειας στο στομάχι των ζώων, που αποδόθηκαν στη δράση των αποϊωδασών και την συσσώρευση ελεύθερων ιόντων ιωδίου στο στομάχι, ενώ στην περιοχή του

εγκεφάλου τα ποσοστά ραδιενέργειας ήταν της τάξης 0,2-0,4% ID/g. Έτσι, τα αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής αποτελούν τα πρώτα στοιχεία σχετικά με βιοκατανομή πεπτιδίου της οικογένειας της HN, επισημασμένου με ^{99m}Tc , σε φυσιολογικούς μυς.

Όπως έχει ήδη σημειωθεί παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος ο ακριβής μηχανισμός εκδήλωσης της κυτταροπροστατευτικής δράσης των πεπτιδίων της οικογένειας της HN έναντι παραγόντων που συνδέονται με την εκδήλωση της AD. Βιβλιογραφικές αναφορές εστιάζουν τόσο σε άμεση δράση μέσω πρόσδεσης σε πιθανό υποδοχέα και επαγωγής κατάλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών όσο και σε έμμεση δράση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, π.χ. με παρέμβαση στην πορεία συσσωμάτωσης του Αβ.

Προκειμένου να διερευνηθεί ένας τέτοιος πιθανός μηχανισμός, τμήμα της παρούσας Διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση πιθανής *in vitro* αλληλεπίδρασης της CL με το πεπτίδιο Αβ, κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της AD. Στην κατεύθυνση αυτή αξιοποιήθηκε το παράγωγο CL-βιοτίνη σε μελέτες αλληλεπίδρασης με το Αβ, με μέθοδο τύπου ELISA (βιοτίνης-στρεπταβιδίνης). Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD) με το μητρικό πεπτίδιο CL αλλά και με το παράγωγο CL-βιοτίνη.

Στις μελέτες τύπου ELISA ήταν εμφανής η αλληλεπίδραση CL και Αβ(1-40). Ο προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πεπτιδίων έγινε με μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm ενώ η ένταση του παραγόμενου χρώματος ήταν ανάλογη με την ποσότητα του πεπτιδίου Αβ που έχει δεσμευθεί στην CL, υποδεικνύοντας μια δόσοεξαρτώμενη σχέση. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι ειδική, όπως προκύπτει από τις χαμηλές τιμές των αρνητικών μαρτύρων. Ένα ακόμη ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι οι θέσεις αλληλεπίδρασης του Αβ με την CL πιθανόν να βρίσκονται στην κεντρική ή/και την C-τελική περιοχή του Αβ, εφόσον η N-τελική περιοχή του πεπτιδίου δεσμεύεται από το μονοκλωνικό αντι-Αβ αντίσωμα (6E10) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ELISA, σύμφωνα με τις πληροφορίες του κατασκευαστή, και δεν είναι επομένως διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με την CL. Τα συμπεράσματα της μελέτης μας συνάδουν με βιβλιογραφική αναφορά των Maftai και συν. [195], οι οποίοι ασχολήθηκαν με την μοριακή

αλληλεπίδραση μεταξύ HN και Αβ(1-40) με ένα συνδυασμό αναλυτικών τεχνικών, συμπεριλαμβάνοντας και μέθοδο τύπου ELISA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς τους, η HN δεσμεύεται ειδικά με το Αβ(1-40), ενώ η περιοχή αλληλεπίδρασης των δύο πεπτιδίων φαίνεται να περιλαμβάνει τα αμινοξέα 5-15 της HN και την αλληλουχία L¹⁷VFF²⁰ της κεντρικής περιοχής του Αβ40. Η ερευνητική ομάδα, αν και ασχολήθηκε επιπλέον της HN και με τροποποιημένα παράγωγα αυτής, δεν περιέλαβε στα πειράματα της την CL. Ως εκ τούτου τα αποτελέσματά της παρούσας Διατριβής είναι τα πρώτα που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση του Αβ με την CL και προσθέτουν νέα δεδομένα/στοιχεία στον τομέα αλληλεπίδρασης του αμυλοειδούς πεπτιδίου με μέλη της νευροπροστατευτικής οικογένειας της HN.

Η αλληλεπίδραση Αβ και CL επιβεβαιώθηκε από πειράματα CD όπου μελετήθηκε η παρέμβαση της CL στον πολυμερισμό του Αβ. Αρχικά μελετήθηκαν τα πεπτίδια μόνα τους σε διάλυμα για να αποτελέσουν την βάση σύγκρισης των μιγμάτων Αβ:CL. Το πεπτίδιο Αβ(1-40) σε διάλυμα φωσφορικών pH=7,4 και C=50 μM, υιοθετεί δομή τυχαίου σπειράματος, η ένταση της οποίας ελαττώνεται με το χρόνο επώασης, καθώς το πεπτίδιο συσσωματώνεται και καταβυθίζεται σε αδιάλυτες δομές.

Στις ίδιες συνθήκες, η CL εμφανίζει δομή τυχαίου σπειράματος, που παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων κι ανεξάρτητα από την μελετώμενη συγκεντρώνση του πεπτιδίου (50 μM και 100 μM). Η δομή του τυχαίου σπειράματος συνάδει με προηγούμενες μελέτες CD πεπτιδίων της οικογένειας HN όπου το φάσμα τους σε διάλυμα φωσφορικών και σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις (0,1-0,2 mg/mL) παρουσιάζει την ίδια δευτεροταγή δομή [77,229]. Παράλληλα, δημοσίευση των Arakawa και συν. αναφέρει ότι η CL σε συγκεντρώσεις 0,1-1 mg/mL σε PBS παρουσιάζει φάσμα τυχαίου σπειράματος και μάλιστα ότι τα δομικά χαρακτηριστικά της φαίνεται να καθορίζονται από τον ADNF και όχι από το τμήμα της HN [226]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι την ίδια εικόνα εμφάνισε και το διάλυμα CL-βιοτίνης, που χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ενίσχυση των αποτελεσμάτων από τις μελέτες ELISA. Η παρατήρηση της ίδια δομής μεταξύ της μητρικής CL και της CL-βιοτίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιβεβαιώνει ότι η προσθήκη της

ομάδας της βιοτίνης δεν επιφέρει μεταβολές στη διαμόρφωση και κατ' επέκταση τη βιολογική συμπεριφορά της CL.

Στην συνέχεια, για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης, τα φάσματα των μιγμάτων Αβ:CL (σε αναλογία συγκεντρώσεων 1:1 και 1:2) συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα του Αβ αλλά και με της CL. Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματά μας από τα πειράματα CD η CL φαίνεται να παρεμβαίνει στην πορεία συσσωμάτωσης του πεπτιδίου Αβ και να οδηγεί στην ταχύτερη απομάκρυνσή του από το διάλυμα. Ο σχηματισμός αδιάλυτων δομών κατά την συν-επώαση CL και Αβ συνάδει με προηγούμενη μελέτη [61], όπου η HN και το παράγωγό της HNG φαίνεται να επηρεάζουν δραστικά το σχηματισμό ινιδίων του Αβ(1-40). Με πειράματα σκεδασμού του φωτός (light scattering) και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για διάστημα 12 ημερών, τα δύο πεπτίδια φαίνεται να προάγουν τη συσσωμάτωση του Αβ, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της έντασης στο βαθμό σκεδασμού και το σχηματισμό ινιδίων μεγαλύτερης διαμέτρου με τάση για συνάθροιση – συγκριτικά με τις αντίστοιχες μετρήσεις στην περίπτωση του Αβ μόνου του. Ωστόσο, παρά την προώθηση του σχηματισμού ινιδίων, οι επαγόμενες από την HNG μορφολογικές διαφοροποιήσεις του Αβ(1-40) παρουσιάζουν σε σχέση με τις ινιδιακές μορφές του Αβ ασθενέστερη «επίδραση» στην ενδοκυτταρική εισροή ιόντων ασβεστίου, που θεωρείται από τα αρχικά γεγονότα των επαγόμενων από το Αβ εκδηλώσεων. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι η δομή και κατ' επέκταση οι ιδιότητες των ινιδίων παρουσία του HN πεπτιδίου είναι διαφορετικές από τις διαμορφώσεις που αποκτά το Αβ απουσία αυτού. Και στην δική μας περίπτωση, η δοκιμασία της ThT με την οποία ελέγχεται ο σχηματισμός τυπικών β-αμυλοειδών ινιδίων, έδειξε ότι η CL εμπλεκόμενη στην διαδικασία της συσσωμάτωσης του Αβ οδηγεί πιθανά στον σχηματισμό διαφοροποιημένων ινιδίων.

Η αλληλεπίδραση CL και Αβ, μπορεί να πραγματοποιείται με πρόσδεση της CL στο Αβ μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του λιπόφιλου τμήματός της και της υδρόφοβης περιοχής του Αβ, παρεμβαίνοντας στην προσέγγιση μορίων Αβ μεταξύ τους και τον επακόλουθο σχηματισμό τυπικών αμυλοειδών ινιδίων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η CL διαθέτει υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα καθώς και τρία αμινοξέα Pro, χαρακτηριστικά που εμφανίζουν ενώσεις με δράση «β-sheet breakers», γεγονός που ενισχύει την

δυνατότητα της παρέμβασης της στον σχηματισμό των τυπικών διαμοριακών β-φύλλων του αμυλοειδούς πεπτιδίου [225].

Συνοπτικά, στην παρούσα Διατριβή πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός καθώς και ενδεικτική βιολογική αξιοποίηση τριών νέων επισημασμένων παραγώγων της CL, του πλέον δραστικού πεπτιδίου της νευροπροστατευτικής οικογένειας της HN. Οι ομάδες-ιχνηθέτες που συζεύχθηκαν στο πεπτίδιο - η φθορίζουσα ένωση FITC, η βιοτίνη και το τριπεπτίδιο *dmCSG* - δεν επέφεραν τροποποίηση στη δομή αλλά και τη δράση τους συγκριτικά με τη μητρική CL. Η συνθετική πορεία οδήγησε στην παραλαβή επαρκών ποσοτήτων πεπτιδίων, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η περαιτέρω αξιοποίηση σε δομικές και βιολογικές δοκιμασίες. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιούνται μελέτες βιοκατανομής με πεπτίδιο της HN-οικογένειας, επισημασμένο με το ραδιοϊσότοπο ^{99m}Tc , αλλά και η πρώτη φορά που διαπιστώνεται η αλληλεπίδραση της CL με το Αβ, με διαφορετικές τεχνικές.

Περαιτέρω εφαρμογή των παραγώγων αυτών μπορεί να γίνει σε *in vitro* μελέτες κυτταρικής δέσμευσης με πρωτογενείς νευρώνες (με χρήση του παραγώγου CL-FITC), σε *in vitro* πειράματα συγκατακρήμνισης με πρωτεΐνες νευρικών κυττάρων παρουσία π.χ. σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη (με χρήση του παραγώγου CL-βιοτίνη) αλλά και σε *in vivo* μελέτες βιοκατανομής σε πειραματικά πρότυπα μοντέλα ποντικών με νευροεκφυλισμό (με χρήση του παραγώγου CL-CSG- ^{99m}TcO). Τα νέα παράγωγα καθίστανται αξιοποιήσιμα μοριακά εργαλεία στην προσπάθεια διασαφήνισης του μηχανισμού δράσης της CL και αναμένεται να συμβάλουν σημαντικά στην έρευνα της ευρύτερης νευροπροστατευτικής οικογένειας της HN.

Δ. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ABTS	2,2'-Azino-Bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium Salt
Ac ₂ O	Acetic anhydride
AD	Alzheimer's Disease
ADNF	Activity-dependent neurotrophic factor
APP	Amyloid Precursor Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Circular Dichroism
CL	Colivelin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethan
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	Diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N'</i> -dimethylformamide
dmGly	Dimethyl-glycine
DMSO	Dimethyl-sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI-MS	Electrospray-Ionization Mass Spectrometry
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothyocyanate
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HD	Huntigton's disease
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
ID	Injected Dose
MEM-Earle	Minimum Essential Medium Eagle

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MW	Molecular Weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nOe	Nuclear Overhauser Effect
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Parkinson's Disease
p.i.	Post Injection
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect correlation Spectroscopy
RP-HPLC	Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TFA	Trifluoroacetic Acid
TFE	Trifluoroethanol
TIPS	Triisopropylsilane
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
2D	two-dimensional
A β	Αμυλοειδές πεπτίδιο β
A β 40	Αμυλοειδές πεπτίδιο β (1-40)
A β 42	Αμυλοειδές πεπτίδιο β (1-42)
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Συντομογραφίες αμινοξέων

Αμινοξύ	Σύντμηση 3 γραμμάτων	Συμβολισμός 1 γράμματος
Αλανίνη	Ala	A
Αργινίνη	Arg	R
Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαραγινικό οξύ	Asp	D
Βαλίνη	Val	V
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E
Γλυκίνη	Gly	G
Θρεονίνη	Thr	T
Ισολευκίνη	Ile	I
Ιστιδίνη	His	H
Κυστεΐνη	Cys	C
Λευκίνη	Leu	L
Λυσίνη	Lys	K
Μεθειονίνη	Met	M
Προλίνη	Pro	P
Σερίνη	Ser	S
Θρυπτοφάνη	Trp	W
Τυροσίνη	Tyr	Y
Φαινυλαλανίνη	Phe	F

ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Πίνακας Π1: Χημικές μετατοπίσεις (ppm) ^1H NMR της CL σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ στους 25 °C, ως προς DSS.				
Αμινοξύ	NH	αCH	βCH	Άλλες
Ser1		4.14	3.98	
Ala2	8.68	4.39	1.38	
Leu3	8.28	4.32	1.59	γCH : 1.59 δCH_3 : 0.92 / 0.87
Leu4	8.26	4.38	1.62	γCH : 1.58 δCH_3 : 0.92/0.86
Arg5	8.33	4.38	1.85 / 1.75	γCH_2 : 1.62 δCH_2 : 3.20 NH: 7.20/6.67
Ser6	8.30	4.47	3.80	
Ile7	8.23	4.50	1.86	γCH_2 : 1.50/1.16 γCH_3 : 0.95 δCH_3 : 0.86
Pro8		4.38	2.27 / 1.98	γCH_2 : 2.03/1.89 δCH_2 : 3.87/3.68
Ala9	8.36	4.58	1.35	
Pro10		4.40	2.30 / 1.91	γCH_2 : 2.03 δCH_2 : 3.82/3.62
Ala11	8.44	4.30	1.40	
Gly12	8.40	3.95		
Ala13	8.16	4.32	1.41	
Ser14	8.30	4.38	3.91 / 3.87	
Arg15	8.30	4.30	1.87 / 1.78	γCH_2 : 1.62 δCH_2 : 3.21 NH: 7.21/6.67
Leu16	8.08	4.25	1.63	γCH : 1.60 δCH_3 : 0.93/0.88
Leu17	8.04	4.33	1.63	γCH : 1.59 δCH_3 : 0.92/0.86
Leu18	8.03	4.36	1.67	γCH : 1.60

				δCH_3 : 0.91/0.85
Leu19	8.15	4.42	1.70	γCH : 1.64 δCH_3 : 0.93/0.87
Thr20	7.99	4.30	4.27	γCH_3 : 1.22
Gly21	8.35	3.97		
Glu22	8.12	4.40	2.11 / 1.99	γCH_2 : 2.44
Ile23	8.13	4.17	1.86	γCH_2 : 1.46/1.17 γCH_3 : 0.88 δCH_3 : 0.86
Asp24	8.50	4.75	2.90 / 2.77	
Leu25	8.20	4.63	1.62	γCH : 1.58 δCH_3 : 0.92/0.89
Pro26		4.38	2.26 / 1.95	γCH_2 : 2.03/1.87 δCH_2 : 3.82/3.66
-CO-NH ₂	7.59/6.97			

Πίνακας Π2: Χημικές μετατοπίσεις (ppm) ¹H NMR του παραγώγου CL-βιοτίνης σε H₂O/D₂O στους 25 °C, ως προς DSS. Οι χημικές μετατοπίσεις του τμήματος Ser1-Asp24 της αλληλουχίας είναι οι ίδιες με της CL που παρουσιάζονται στον πίνακα Π1 .

Αμινοξύ	NH	αCH	βCH	Άλλες
Leu25	8.13	4.63	1.62	γCH : 1.58 δCH_3 : 0.91
Pro26		4.32	2.03	γCH_2 : 1.93 δCH_2 : 3.84/3.66
Lys27	8.27	4.23	1.80/1.69	γCH_2 : 1.42/1.34 δCH_2 : 1.52 ϵCH_2 : 3.25/3.15 ϵNH : 7.87
-CO-NH ₂	7.66/7.04			
Ομάδα βιοτίνης: aCH ₂ : 2.32; bCH ₂ : 1.62; cCH ₂ : 1.41; d1,2CH ₂ : 1.70, 1.57; eCH ₂ : 3.32; fCH: 4.41; gCH: 4.60; h,h'CH ₂ : 2.98, 2.76, NH: 6.46				

Πίνακας Π3: Χημικές μετατοπίσεις (ppm) ^1H NMR του παραγώγου CL-FITC σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ στους 25 °C, ως προς DSS. Οι χημικές μετατοπίσεις του τμήματος της αλληλουχίας που δεν αναφέρονται είναι οι ίδιες με της CL που παρουσιάζονται στον πίνακα Π1.				
Αμινοξύ	NH	αCH	βCH	Άλλες
Glu22	8.15 / 8.09	4.40	2.11 / 1.99	γCH_2 : 2.39/2.33
Asp24	8.45 / 8.38	4.75	2.79 / 2.66	
Leu25	8.25	4.63	1.66	γCH : 1.66 δCH_3 : 0.93
Lys27	8.23	4.30	1.83 / 1.74	γCH_2 : 1.34 δCH_2 : 1.52/1.61 ϵCH_2 : 3.18 ϵNH : 7.95
-CO-NH ₂	7.60 / 7.06			
Ομάδα FITC H-1,8: 6.81; H-2,7: 7.15; H-4,5: 6.93; H-3': 7.97; H-5': 7.71; H-6': 7.28				

Πίνακας Π4: Χημικές μετατοπίσεις (ppm) ^1H NMR του παραγώγου CL-CSG σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ στους 25 °C, ως προς DSS. Οι χημικές μετατοπίσεις του τμήματος Ser1-Ile23 της αλληλουχίας είναι οι ίδιες με της CL που παρουσιάζονται στον πίνακα Π1.				
Αμινοξύ	NH	αCH	βCH	Άλλες
Asp24	8.47	4.74	2.89 / 2.77	
Leu25	8.16	4.61	1.63	γCH : 1.58 δCH_3 : 0.92/0.89
Pro26		4.32	2.03	γCH_2 : 1.93 δCH_2 : 3.81/3.67
Lys27	8.40	4.24	1.81 / 1.72	γCH_2 : 1.40/1.34 δCH_2 : 1.51 ϵCH_2 : 3.22/3.14 ϵNH : 7.92
-CO-NH ₂	7.60/7.10			
Cys3'	8.62	4.58	2.96	
Ser2'	8.82	4.57	3.88	
Gly1'		4.09/4.08		$\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 2.95

Πίνακας Π5: Χημικές μετατοπίσεις (ppm) ^1H NMR του συμπλόκου CL-CSG-ReO σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ στους 25 °C, ως προς DSS. Στα στερεοϊσομερή *syn* και *anti* οι χημικές μετατοπίσεις του τμήματος Ser1-Ile23 είναι οι ίδιες με της CL που παρουσιάζονται στον Π1 [230].

Αμινοξύ	NH	αCH	βCH	Άλλες
Asp24	8.47	4.73	2.89 / 2.77	
Leu25	8.15	4.61	1.62	γCH : 1.58 δCH_3 : 0.91
Pro26		4.26	2.03	γCH_2 : 1.93 δCH_2 : 3.84/3.66
Syn στερεοϊσομερές				
Lys27	8.45	4.21	1.81 / 1.73	γCH_2 : 1.40/1.28 δCH_2 : 1.52 ϵCH_2 : 3.25/3.17 ϵNH : 7.93
-CO-NH ₂		7.58 / 7.00		
Cys3'		5.20	4.08 / 3.60	$J = 8.84 \text{ Hz}$
Ser2'		4.85	4.25 / 4.12	
Gly1'		4.74 / 4.52		1,1' $\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 3.74/2.61
Anti στερεοϊσομερές				
Lys27	7.93	4.24	1.76 / 1.63	γCH_2 : 1.33/1.34 δCH_2 : 1.44 ϵCH_2 : 3.22/3.18 ϵNH : 7.78
-CO-NH ₂		7.60 / 7.07		
Cys3'		5.40	3.67 / 3.57	$J = 4.40 \text{ Hz}; 8.83 \text{ Hz}$
Ser2'		4.98	4.35 / 3.95	
Gly1'		5.00 / 4.76		1,1' $\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 3.75/2.70

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Y. Hashimoto, T. Niikura, Y. Ito, H. Sudo, M. Hata, E. Arakawa, Y. Abe, Y. Kita, I. Nishimoto, Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults, *J Neurosci* 21 (2001) 9235-9245.
- [2] Y. Hashimoto, T. Niikura, H. Tajima, T. Yasukawa, H. Sudo, Y. Ito, Y. Kita, M. Kawasumi, K. Kouyama, M. Doyu, G. Sobue, T. Koide, S. Tsuji, J. Lang, K. Kurokawa, I. Nishimoto, A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 6336-6341.
- [3] G. von Heijne, Signal sequences. The limits of variation, *J Mol Biol* 184 (1985) 99-105.
- [4] H. pubmed-OMIM, created by McKusick V., 2001.
- [5] H. Tajima, T. Niikura, Y. Hashimoto, Y. Ito, Y. Kita, K. Terashita, K. Yamazaki, A. Koto, S. Aiso, I. Nishimoto, Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults, *Neurosci Lett* 324 (2002) 227-231.
- [6] T. Niikura, T. Chiba, S. Aiso, M. Matsuoka, I. Nishimoto, Humanin: after the discovery, *Mol Neurobiol* 30 (2004) 327-340.
- [7] M. Bodzioch, K. Lapicka-Bodzioch, B. Zapala, W. Kamysz, B. Kiec-Wilk, A. Dembinska-Kiec, Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms, *Genomics* 94 (2009) 247-256.
- [8] V. Maximov, A. Martynenko, G. Hunsmann, V. Tarantul, Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy, *Med Hypotheses* 59 (2002) 670-673.
- [9] B. Zapala, L. Kaczynski, B. Kiec-Wilk, T. Staszal, A. Knapp, G.H. Thoresen, I. Wybranska, A. Dembinska-Kiec, Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti-inflammatory properties, *Pharmacol Rep* 62 (2010) 767-777.
- [10] R.H. Muzumdar, D.M. Huffman, G. Atzmon, C. Buettner, L.J. Cobb, S. Fishman, T. Budagov, L. Cui, F.H. Einstein, A. Poduval, D. Hwang, N. Barzilai, P. Cohen, Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action, *PLoS One* 4 (2009) e6334.
- [11] E. Moretti, V. Giannerini, L. Rossini, M. Matsuoka, L. Trabalzini, G. Collodel, Immunolocalization of humanin in human sperm and testis, *Fertil Steril* 94 (2010) 2888-2890.
- [12] A. Caricasole, V. Bruno, I. Cappuccio, D. Melchiorri, A. Copani, F. Nicoletti, A novel rat gene encoding a Humanin-like peptide endowed with broad neuroprotective activity, *FASEB J* 16 (2002) 1331-1333.

- [13] I. Nishimoto, M. Matsuoka, T. Niikura, Unravelling the role of Humanin, *Trends Mol Med* 10 (2004) 102-105.
- [14] M.L.S. E. Colón, C. Carlsson-Skwirut, A. Wahlgren, K.V. Svechnikov, P. Cohen, O. Söder, Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis, *J Cell Physiol* (2006) 373-385.
- [15] K. Terashita, Y. Hashimoto, T. Niikura, H. Tajima, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, M. Kawasumi, T. Chiba, K. Kanekura, M. Yamada, M. Nawa, Y. Kita, S. Aiso, I. Nishimoto, Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity: functional potentiation by isomerization and dimerization, *J Neurochem* 85 (2003) 1521-1538.
- [16] T. Chiba, M. Yamada, Y. Hashimoto, M. Sato, J. Sasabe, Y. Kita, K. Terashita, S. Aiso, I. Nishimoto, M. Matsuoka, Development of a femtomolar-acting humanin derivative named colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus: characterization of colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults in vitro and in vivo, *J Neurosci* 25 (2005) 10252-10261.
- [17] D.E. Brenneman, J. Hauser, E. Neale, S. Rubinraut, M. Fridkin, A. Davidson, I. Gozes, Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides, *J Pharmacol Exp Ther* 285 (1998) 619-627.
- [18] T. Chiba, I. Nishimoto, S. Aiso, M. Matsuoka, Neuroprotection against neurodegenerative diseases: development of a novel hybrid neuroprotective peptide Colivelin, *Mol Neurobiol* 35 (2007) 55-84.
- [19] R. Zamostiano, A. Pinhasov, M. Bassan, O. Perl, R.A. Steingart, R. Atlas, D.E. Brenneman, I. Gozes, A femtomolar-acting neuroprotective peptide induces increased levels of heat shock protein 60 in rat cortical neurons: a potential neuroprotective mechanism, *Neurosci Lett* 264 (1999) 9-12.
- [20] A. Kumral, D.C. Yesilirmak, U. Sonmez, H. Baskin, K. Tugyan, O. Yilmaz, S. Genc, N. Gokmen, K. Genc, N. Duman, H. Ozkan, Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, *Brain Res* 1115 (2006) 169-178.
- [21] G.W. Glazner, A. Boland, A.E. Dresse, D.E. Brenneman, I. Gozes, M.P. Mattson, Activity-dependent neurotrophic factor peptide (ADNF9) protects neurons against oxidative stress-induced death, *J Neurochem* 73 (1999) 2341-2347.
- [22] P. Gressens, S. Marret, C. Bodenant, L. Schwendimann, P. Evrard, Activity-dependent neurotrophic factor-14 requires protein kinase C and mitogen-associated protein kinase kinase activation to protect the developing mouse brain against excitotoxicity, *J Mol Neurosci* 13 (1999) 199-210.

- [23] I. Gozes, E. Giladi, A. Pinhasov, A. Bardea, D.E. Brenneman, Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze, *J Pharmacol Exp Ther* 293 (2000) 1091-1098.
- [24] T. Chiba, Y. Hashimoto, H. Tajima, M. Yamada, R. Kato, T. Niikura, K. Terashita, H. Schulman, S. Aiso, Y. Kita, M. Matsuoka, I. Nishimoto, Neuroprotective effect of activity-dependent neurotrophic factor against toxicity from familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 in vitro and in vivo, *J Neurosci Res* 78 (2004) 542-552.
- [25] M. Bassan, R. Zamostiano, A. Davidson, A. Pinhasov, E. Giladi, O. Perl, H. Bassan, C. Blat, G. Gibney, G. Glazner, D.E. Brenneman, I. Gozes, Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide, *J Neurochem* 72 (1999) 1283-1293.
- [26] S.S. Jung, W.E. Van Nostrand, Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity, *J Neurochem* 84 (2003) 266-272.
- [27] I. Sponne, A. Fife, V. Koziel, B. Kriem, T. Oster, T. Pillot, Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis, *Mol Cell Neurosci* 25 (2004) 95-102.
- [28] S. Kariya, M. Hirano, Y. Nagai, Y. Furiya, N. Fujikake, T. Toda, S. Ueno, Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches, *J Mol Neurosci* 25 (2005) 165-169.
- [29] H. Jin, T. Liu, W.X. Wang, J.H. Xu, P.B. Yang, H.X. Lu, Q.R. Sun, H.T. Hu, Protective effects of [Gly14]-Humanin on beta-amyloid-induced PC12 cell death by preventing mitochondrial dysfunction, *Neurochem Int* 56 (2010) 417-423.
- [30] M. Ikonen, B. Liu, Y. Hashimoto, L. Ma, K.W. Lee, T. Niikura, I. Nishimoto, P. Cohen, Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 13042-13047.
- [31] L.E. Klein, L. Cui, Z. Gong, K. Su, R. Muzumdar, A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts, *Biochem Biophys Res Commun* 440 (2013) 197-203.
- [32] S. Kariya, N. Takahashi, N. Ooba, M. Kawahara, H. Nakayama, S. Ueno, Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells, *Neuroreport* 13 (2002) 903-907.
- [33] S. Kariya, N. Takahashi, M. Hirano, S. Ueno, Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes, *Mol Cell Biochem* 254 (2003) 83-89.

- [34] S. Kariya, M. Hirano, Y. Furiya, S. Ueno, Effect of humanin on decreased ATP levels of human lymphocytes harboring A3243G mutant mitochondrial DNA, *Neuropeptides* 39 (2005) 97-101.
- [35] D. Wang, H. Li, H. Yuan, M. Zheng, C. Bai, L. Chen, X. Pei, Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase, *Apoptosis* 10 (2005) 963-971.
- [36] D.G. Zacharias, S.G. Kim, A.E. Massat, A.R. Bachar, Y.K. Oh, J. Herrmann, M. Rodriguez-Porcel, P. Cohen, L.O. Lerman, A. Lerman, Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic [corrected] plaques in humans, *PLoS One* 7 (2012) e31065.
- [37] A.R. Bachar, L. Scheffer, A.S. Schroeder, H.K. Nakamura, L.J. Cobb, Y.K. Oh, L.O. Lerman, R.E. Pagano, P. Cohen, A. Lerman, Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress, *Cardiovasc Res* 88 (2010) 360-366.
- [38] K. Ijiri, H. Tsuruga, H. Sakakima, K. Tomita, N. Taniguchi, K. Shimoonoda, S. Komiya, M.B. Goldring, H.J. Majima, T. Matsuyama, Increased expression of humanin peptide in diffuse-type pigmented villonodular synovitis: implication of its mitochondrial abnormality, *Ann Rheum Dis* 64 (2005) 816-823.
- [39] T. Kin, K. Sugie, M. Hirano, Y. Goto, I. Nishino, S. Ueno, Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia, *J Hum Genet* 51 (2006) 555-558.
- [40] S. Kariya, M. Hirano, Y. Furiya, K. Sugie, S. Ueno, Humanin detected in skeletal muscles of MELAS patients: a possible new therapeutic agent, *Acta Neuropathol* 109 (2005) 367-372.
- [41] T. Mamiya, M. Ukai, [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo, *Br J Pharmacol* 134 (2001) 1597-1599.
- [42] J. Miao, W. Zhang, R. Yin, R. Liu, C. Su, G. Lei, Z. Li, S14G-Humanin ameliorates Abeta25-35-induced behavioral deficits by reducing neuroinflammatory responses and apoptosis in mice, *Neuropeptides* 42 (2008) 557-567.
- [43] H. Tajima, M. Kawasumi, T. Chiba, M. Yamada, K. Yamashita, M. Nawa, Y. Kita, K. Kouyama, S. Aiso, M. Matsuoka, T. Niikura, I. Nishimoto, A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice, *J Neurosci Res* 79 (2005) 714-723.
- [44] F. Guo, W. Jing, C.G. Ma, M.N. Wu, J.F. Zhang, X.Y. Li, J.S. Qi, [Gly(14)]-humanin rescues long-term potentiation from amyloid beta protein-induced impairment in the rat hippocampal CA1 region in vivo, *Synapse* 64 (2010) 83-91.

- [45] G. Krejčová, J. Patocka, J. Slaninová, Effect of humanin analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats, *J Pept Sci* 10 (2004) 636-639.
- [46] T. Niikura, E. Sidahmed, C. Hirata-Fukae, P.S. Aisen, Y. Matsuoka, A humanin derivative reduces amyloid beta accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice, *PLoS One* 6 (2011) e16259.
- [47] X. Xu, C.C. Chua, J. Gao, R.C. Hamdy, B.H. Chua, Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke, *Stroke* 37 (2006) 2613-2619.
- [48] X. Zhang, V.H. Urbieto-Caceres, A. Eirin, C.C. Bell, J.A. Crane, H. Tang, K.L. Jordan, Y.K. Oh, X.Y. Zhu, M.J. Korsmo, A.R. Bachar, P. Cohen, A. Lerman, L.O. Lerman, Humanin prevents intra-renal microvascular remodeling and inflammation in hypercholesterolemic ApoE deficient mice, *Life Sci* 91 (2012) 199-206.
- [49] P.T. Hoang, P. Park, L.J. Cobb, V. Paharkova-Vatchkova, M. Hakimi, P. Cohen, K.W. Lee, The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice, *Metabolism* 59 (2010) 343-349.
- [50] M. Yamada, T. Chiba, J. Sasabe, K. Terashita, S. Aiso, M. Matsuoka, Nasal Colivelin treatment ameliorates memory impairment related to Alzheimer's disease, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 2020-2032.
- [51] Y. Sari, T. Chiba, M. Yamada, G.V. Rebec, S. Aiso, A novel peptide, colivelin, prevents alcohol-induced apoptosis in fetal brain of C57BL/6 mice: signaling pathway investigations, *Neuroscience* 164 (2009) 1653-1664.
- [52] G. Ying, P. Iribarren, Y. Zhou, W. Gong, N. Zhang, Z.X. Yu, Y. Le, Y. Cui, J.M. Wang, Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor, *J Immunol* 172 (2004) 7078-7085.
- [53] M. Harada, Y. Habata, M. Hosoya, K. Nishi, R. Fujii, M. Kobayashi, S. Hinuma, N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2, *Biochem Biophys Res Commun* 324 (2004) 255-261.
- [54] Y. Hashimoto, O. Tsuji, T. Niikura, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, M. Kawasumi, T. Chiba, K. Kanekura, M. Yamada, E. Tsukamoto, K. Kouyama, K. Terashita, S. Aiso, A. Lin, I. Nishimoto, Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death, *J Neurochem* 84 (2003) 864-877.
- [55] T. Niikura, H. Tajima, Y. Kita, Neuronal cell death in Alzheimer's disease and a neuroprotective factor, humanin, *Curr Neuropharmacol* 4 (2006) 139-147.
- [56] Y. Hashimoto, Y. Kaneko, E. Tsukamoto, H. Frankowski, K. Kouyama, Y. Kita, T. Niikura, S. Aiso, D.E. Bredesen, M. Matsuoka, I. Nishimoto, Molecular

characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD, *J Neurochem* 90 (2004) 549-558.

[57] Y. Hashimoto, H. Suzuki, S. Aiso, T. Niikura, I. Nishimoto, M. Matsuoka, Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection, *Life Sci* 77 (2005) 3092-3104.

[58] Y. Hashimoto, T. Niikura, T. Chiba, E. Tsukamoto, H. Kadowaki, H. Nishitoh, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, M. Yamada, M. Nawa, K. Terashita, S. Aiso, H. Ichijo, I. Nishimoto, The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization, *J Pharmacol Exp Ther* 306 (2003) 889-902.

[59] M. Matsuoka, Y. Hashimoto, Humanin and the receptors for humanin, *Mol Neurobiol* 41 (2010) 22-28.

[60] Y. Hashimoto, M. Kurita, S. Aiso, I. Nishimoto, M. Matsuoka, Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130, *Mol Biol Cell* 20 (2009) 2864-2873.

[61] P. Zou, Y. Ding, Y. Sha, B. Hu, S. Nie, Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Abeta(1-40), *Peptides* 24 (2003) 679-685.

[62] W. Zhang, Y. Du, M. Bai, Y. Xi, Z. Li, J. Miao, S14G-humanin inhibits Abeta1-42 fibril formation, disaggregates preformed fibrils, and protects against Abeta-induced cytotoxicity in vitro, *J Pept Sci* 19 (2013) 159-165.

[63] A. Armas, V. Sonois, E. Mothes, H. Mazarguil, P. Faller, Zinc(II) binds to the neuroprotective peptide humanin, *J Inorg Biochem* 100 (2006) 1672-1678.

[64] G.W. Glazner, S. Camandola, M.P. Mattson, Nuclear factor-kappaB mediates the cell survival-promoting action of activity-dependent neurotrophic factor peptide-9, *J Neurochem* 75 (2000) 101-108.

[65] D.M. White, S. Walker, D.E. Brenneman, I. Gozes, CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor, *Brain Res* 868 (2000) 31-38.

[66] S.J. Servoss, S.J. Lee, G. Gibney, I. Gozes, D.E. Brenneman, J.M. Hill, IGF-I as a mediator of VIP/activity-dependent neurotrophic factor-stimulated embryonic growth, *Endocrinology* 142 (2001) 3348-3353.

[67] B. Guo, D. Zhai, E. Cabezas, K. Welsh, S. Nouraini, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation, *Nature* 423 (2003) 456-461.

- [68] D. Zhai, F. Luciano, X. Zhu, B. Guo, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak, *J Biol Chem* 280 (2005) 15815-15824.
- [69] J. Choi, D. Zhai, X. Zhou, A. Satterthwait, J.C. Reed, F.M. Marassi, Mapping the specific cytoprotective interaction of humanin with the proapoptotic protein bid, *Chem Biol Drug Des* 70 (2007) 383-392.
- [70] F. Luciano, D. Zhai, X. Zhu, B. Bailly-Maitre, J.E. Ricci, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL, *J Biol Chem* 280 (2005) 15825-15835.
- [71] A. Evangelou, C. Zikos, D. Benaki, M. Pelecanou, P. Bouziotis, M. Papadopoulos, L. Borovickova, I. Vesela, T. Elbert, G. Kunesova, I. Pirmettis, M. Paravatou-Petsotas, J. Slaninova, E. Livaniou, In vitro binding and in vivo biodistribution studies of the neuroprotective peptide humanin using [125I]humanin derivatives, *Peptides* 30 (2009) 2409-2417.
- [72] A. Evangelou, C. Zikos, E. Livaniou, G.P. Evangelatos, High-yield, solid-phase synthesis of humanin, an Alzheimer's disease associated, novel 24-mer peptide which contains a difficult sequence, *J Pept Sci* 10 (2004) 631-635.
- [73] C. Zikos, E. Livaniou, L. Leondiadis, N. Ferderigos, D.S. Ithakissios, G.P. Evangelatos, Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis, *J Pept Sci* 9 (2003) 419-429.
- [74] C.Z. N. Ferderigos, Solid-phase peptide synthesis, in: P. Cordopatis (Ed.), *Essays on Contemporary Peptide Synthesis*, 2011, pp. 19-40.
- [75] D. Benaki, C. Zikos, A. Evangelou, E. Livaniou, M. Vlassi, E. Mikros, M. Pelecanou, Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity, *Biochem Biophys Res Commun* 329 (2005) 152-160.
- [76] D. Benaki, C. Zikos, A. Evangelou, E. Livaniou, M. Vlassi, E. Mikros, M. Pelecanou, Solution structure of Ser14Gly-humanin, a potent rescue factor against neuronal cell death in Alzheimer's disease, *Biochem Biophys Res Commun* 349 (2006) 634-642.
- [77] T. Arakawa, T. Niikura, H. Tajima, Y. Kita, The secondary structure analysis of a potent Ser14Gly analog of antiAlzheimer peptide, Humanin, by circular dichroism, *J Pept Sci* 12 (2006) 639-642.
- [78] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, H.M. Arrighi, Forecasting the global burden of Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement* 3 (2007) 186-191.
- [79] M.J. Stampfer, Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links, *J Intern Med* 260 (2006) 211-223.

- [80] K. Ziegler-Graham, R. Brookmeyer, E. Johnson, H.M. Arrighi, Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates, *Alzheimers Dement* 4 (2008) 316-323.
- [81] R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, Y. Huang, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 5644-5651.
- [82] C.C. Liu, T. Kanekiyo, H. Xu, G. Bu, Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy, *Nat Rev Neurol* 9 (2013) 106-118.
- [83] K.D.T. H. Braak, Staging of cortical neurofibrillary inclusions of the Alzheimer's type: Alzheimer: 100 Years and Beyond, Springer, 2006.
- [84] N. Bogdanovic, Alzheimer's disease: plaques and tangles, *J Cell Mol Med* 4 (2000) 304-305.
- [85] D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiol Rev* 81 (2001) 741-766.
- [86] A. Kowalska, Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's disease, *Pol J Pharmacol* 56 (2004) 171-178.
- [87] V.W. Chow, M.P. Mattson, P.C. Wong, M. Gleichmann, An overview of APP processing enzymes and products, *Neuromolecular Med* 12 (2010) 1-12.
- [88] Y. Ling, K. Morgan, N. Kalsheker, Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease, *Int J Biochem Cell Biol* 35 (2003) 1505-1535.
- [89] G. Evin, A. Weidemann, Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides, *Peptides* 23 (2002) 1285-1297.
- [90] D.M. Walsh, D.B. Teplow, Alzheimer's disease and the amyloid beta-protein, *Prog Mol Biol Transl Sci* 107 (2012) 101-124.
- [91] A. Asami-Odaka, Y. Ishibashi, T. Kikuchi, C. Kitada, N. Suzuki, Long amyloid beta-protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells, *Biochemistry* 34 (1995) 10272-10278.
- [92] C.F. Lippa, L.E. Nee, H. Mori, P. St George-Hyslop, Abeta-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease, *Lancet* 352 (1998) 1117-1118.
- [93] P. Seubert, T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal, et al., Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide, *Nature* 361 (1993) 260-263.
- [94] S.J. Fuller, E. Storey, Q.X. Li, A.I. Smith, K. Beyreuther, C.L. Masters, Intracellular production of beta A4 amyloid of Alzheimer's disease: modulation

by phosphoramidon and lack of coupling to the secretion of the amyloid precursor protein, *Biochemistry* 34 (1995) 8091-8098.

[95] R. Motter, C. Vigo-Pelfrey, D. Kholodenko, R. Barbour, K. Johnson-Wood, D. Galasko, L. Chang, B. Miller, C. Clark, R. Green, et al., Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 38 (1995) 643-648.

[96] D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, S. Younkin, Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease, *Nat Med* 2 (1996) 864-870.

[97] H. LeVine, 3rd, Small molecule inhibitors of Abeta assembly, *Amyloid* 14 (2007) 185-197.

[98] M.D. Kirkitadze, A. Kowalska, Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease, *Acta Biochim Pol* 52 (2005) 417-423.

[99] D.M. Walsh, B.P. Tseng, R.E. Rydel, M.B. Podlisny, D.J. Selkoe, The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain, *Biochemistry* 39 (2000) 10831-10839.

[100] J.D. Harper, P.T. Lansbury, Jr., Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Annu Rev Biochem* 66 (1997) 385-407.

[101] D.M. Walsh, A. Lomakin, G.B. Benedek, M.M. Condron, D.B. Teplow, Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate, *J Biol Chem* 272 (1997) 22364-22372.

[102] W.B. Stine, Jr., S.W. Snyder, U.S. Lador, W.S. Wade, M.F. Miller, T.J. Perun, T.F. Holzman, G.A. Krafft, The nanometer-scale structure of amyloid-beta visualized by atomic force microscopy, *J Protein Chem* 15 (1996) 193-203.

[103] A.T. Petkova, W.M. Yau, R. Tycko, Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, *Biochemistry* 45 (2006) 498-512.

[104] M.O. Chaney, S.D. Webster, Y.M. Kuo, A.E. Roher, Molecular modeling of the Abeta₁₋₄₂ peptide from Alzheimer's disease, *Protein Eng* 11 (1998) 761-767.

[105] T. Miyakawa, S. Katsuragi, K. Watanabe, A. Shimoji, Y. Ikeuchi, Ultrastructural studies of amyloid fibrils and senile plaques in human brain, *Acta Neuropathol (Berl)* 70 (1986) 202-208.

- [106] H.K. Narang, High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 39 (1980) 621-631.
- [107] M. Necula, R. Kaye, S. Milton, C.G. Glabe, Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct, *J Biol Chem* 282 (2007) 10311-10324.
- [108] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P.P. Chen, R. Kaye, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo, *J Biol Chem* 280 (2005) 5892-5901.
- [109] M. Necula, L. Breydo, S. Milton, R. Kaye, W.E. van der Veer, P. Tone, C.G. Glabe, Methylene blue inhibits amyloid Aβ oligomerization by promoting fibrillization, *Biochemistry* 46 (2007) 8850-8860.
- [110] T. Takahashi, H. Mihara, Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid beta-peptide aggregation, *Acc Chem Res* 41 (2008) 1309-1318.
- [111] C.J. Barrow, A. Yasuda, P.T. Kenny, M.G. Zagorski, Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra, *J Mol Biol* 225 (1992) 1075-1093.
- [112] C.J. Barrow, M.G. Zagorski, Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition, *Science* 253 (1991) 179-182.
- [113] J. Talafous, K.J. Marciniowski, G. Klopman, M.G. Zagorski, Solution structure of residues 1-28 of the amyloid beta-peptide, *Biochemistry* 33 (1994) 7788-7796.
- [114] M.G. Zagorski, C.J. Barrow, NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix---beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment, *Biochemistry* 31 (1992) 5621-5631.
- [115] P.E. Fraser, J.T. Nguyen, H. Inouye, W.K. Surewicz, D.J. Selkoe, M.B. Podlisny, D.A. Kirschner, Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid beta-protein, *Biochemistry* 31 (1992) 10716-10723.
- [116] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C.L. Masters, K. Beyreuther, Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease, *J Mol Biol* 218 (1991) 149-163.
- [117] S.J. Wood, B. Maleeff, T. Hart, R. Wetzel, Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Aβ, *J Mol Biol* 256 (1996) 870-877.

- [118] H. Shao, S. Jao, K. Ma, M.G. Zagorski, Solution structures of micelle-bound amyloid beta-(1-40) and beta-(1-42) peptides of Alzheimer's disease, *J Mol Biol* 285 (1999) 755-773.
- [119] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C.L. Masters, K. Beyreuther, Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides, *J Mol Biol* 228 (1992) 460-473.
- [120] O.K. N. Benseny-Cases, J. Cladera In vitro oligomerization and fibrillogenesis of amyloid-beta peptides, in: J.R. Harris (Ed.), *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, 2012, pp. 53-74.
- [121] A.E. Langkilde, B. Vestergaard, Methods for structural characterization of prefibrillar intermediates and amyloid fibrils, *FEBS Lett* 583 (2009) 2600-2609.
- [122] C.L. Masters, D.J. Selkoe, Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2012) a006262.
- [123] W.E. Klunk, C.J. Xu, R.J. McClure, K. Panchalingam, J.A. Stanley, J.W. Pettegrew, Aggregation of beta-amyloid peptide is promoted by membrane phospholipid metabolites elevated in Alzheimer's disease brain, *J Neurochem* 69 (1997) 266-272.
- [124] C.C. Curtain, F.E. Ali, D.G. Smith, A.I. Bush, C.L. Masters, K.J. Barnham, Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide with membrane lipid, *J Biol Chem* 278 (2003) 2977-2982.
- [125] C.S. Atwood, X. Huang, A. Khatrri, R.C. Scarpa, Y.S. Kim, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.E. Roher, A.I. Bush, Copper catalyzed oxidation of Alzheimer Abeta, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46 (2000) 777-783.
- [126] R. Sabate, M. Gallardo, J. Estelrich, Temperature dependence of the nucleation constant rate in beta amyloid fibrillogenesis, *Int J Biol Macromol* 35 (2005) 9-13.
- [127] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D.B. Teplow, G.B. Benedek, Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 12277-12282.
- [128] Y. Su, P.T. Chang, Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide, *Brain Res* 893 (2001) 287-291.
- [129] B.M. S.J. Wood, T. Hart, R. Wetzel Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Abeta, *J Mol Biol* 256 (1996) 870-877.

- [130] M. Stefani, Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits, *Prog Neurobiol* 99 (2012) 226-245.
- [131] D.H. Small, S.S. Mok, J.C. Bornstein, Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom, *Nat Rev Neurosci* 2 (2001) 595-598.
- [132] M.P. Mattson, B. Cheng, A.R. Culwell, F.S. Esch, I. Lieberburg, R.E. Rydel, Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein, *Neuron* 10 (1993) 243-254.
- [133] M.P. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, R.E. Rydel, beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity, *J Neurosci* 12 (1992) 376-389.
- [134] M.S. Lee, Y.T. Kwon, M. Li, J. Peng, R.M. Friedlander, L.H. Tsai, Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain, *Nature* 405 (2000) 360-364.
- [135] S. Impey, K. Obrietan, D.R. Storm, Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity, *Neuron* 23 (1999) 11-14.
- [136] P.L. McGeer, E.G. McGeer, The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases, *Brain Res Brain Res Rev* 21 (1995) 195-218.
- [137] L. Meda, M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos, Jr., P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, F. Rossi, Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma, *Nature* 374 (1995) 647-650.
- [138] D. Giulian, Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system, *J Neurosci Res* 18 (1987) 155-171, 132-153.
- [139] C. Behl, J.B. Davis, R. Lesley, D. Schubert, Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity, *Cell* 77 (1994) 817-827.
- [140] D.A. Butterfield, K. Hensley, M. Harris, M. Mattson, J. Carney, beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease, *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1994) 710-715.
- [141] D.A. Butterfield, C.M. Lauderback, Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 32 (2002) 1050-1060.
- [142] L. Canevari, J.B. Clark, T.E. Bates, beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria, *FEBS Lett* 457 (1999) 131-134.

- [143] W.D. Parker, Jr., N.J. Mahr, C.M. Filley, J.K. Parks, D. Hughes, D.A. Young, C.M. Cullum, Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease, *Neurology* 44 (1994) 1086-1090.
- [144] R.H. Swerdlow, S.J. Kish, Mitochondria in Alzheimer's disease, *Int Rev Neurobiol* 53 (2002) 341-385.
- [145] C.S. Casley, J.M. Land, M.A. Sharpe, J.B. Clark, M.R. Duchen, L. Canevari, Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons, *Neurobiol Dis* 10 (2002) 258-267.
- [146] K. Hirai, G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R.L. Russell, C.S. Atwood, A.B. Johnson, Y. Kress, H.V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A.D. Cash, S.L. Siedlak, P.L. Harris, P.K. Jones, R.B. Petersen, G. Perry, M.A. Smith, Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *J Neurosci* 21 (2001) 3017-3023.
- [147] D.M. Walsh, D.J. Selkoe, A beta oligomers - a decade of discovery, *J Neurochem* 101 (2007) 1172-1184.
- [148] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition, *Biochem Soc Trans* 30 (2002) 552-557.
- [149] S. Lesne, M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K.H. Ashe, A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory, *Nature* 440 (2006) 352-357.
- [150] L. Mucke, E. Masliah, G.Q. Yu, M. Mallory, E.M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, L. McConlogue, High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J Neurosci* 20 (2000) 4050-4058.
- [151] D. Morgan, D.M. Diamond, P.E. Gottschall, K.E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, G.W. Arendash, A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature* 408 (2000) 982-985.
- [152] D.W. Dickson, H.A. Crystal, C. Bevona, W. Honer, I. Vincent, P. Davies, Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly, *Neurobiol Aging* 16 (1995) 285-298; discussion 298-304.
- [153] L.F. Lue, Y.M. Kuo, A.E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J.H. Kurth, R.E. Rydel, J. Rogers, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease, *Am J Pathol* 155 (1999) 853-862.
- [154] C.A. McLean, R.A. Cherny, F.W. Fraser, S.J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, C.L. Masters, Soluble pool of Abeta amyloid as a

determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 46 (1999) 860-866.

[155] L.S. Schneider, P.S. Insel, M.W. Weiner, Treatment with cholinesterase inhibitors and memantine of patients in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, *Arch Neurol* 68 (2011) 58-66.

[156] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones, Alzheimer's disease, *Lancet* 377 (2011) 1019-1031.

[157] H.P. Lee, X. Zhu, G. Casadesus, R.J. Castellani, A. Nunomura, M.A. Smith, H.G. Lee, G. Perry, Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease, *Expert Rev Neurother* 10 (2010) 1201-1208.

[158] G.M. Cole, S.A. Frautschy, Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9 (2010) 140-148.

[159] M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, L. Mucke, The many faces of tau, *Neuron* 70 (2011) 410-426.

[160] N.F. Schor, What the halted phase III gamma-secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us, *Ann Neurol* 69 (2011) 237-239.

[161] B. De Strooper, R. Vassar, T. Golde, The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease, *Nat Rev Neurol* 6 (2010) 99-107.

[162] M. Citron, Alzheimer's disease: strategies for disease modification, *Nat Rev Drug Discov* 9 (2010) 387-398.

[163] M.A. Leissring, W. Farris, A.Y. Chang, D.M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M.P. Frosch, D.J. Selkoe, Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron* 40 (2003) 1087-1093.

[164] J.C. Dodart, K.R. Bales, K.S. Gannon, S.J. Greene, R.B. DeMattos, C. Mathis, C.A. DeLong, S. Wu, X. Wu, D.M. Holtzman, S.M. Paul, Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model, *Nat Neurosci* 5 (2002) 452-457.

[165] I. Klyubin, D.M. Walsh, C.A. Lemere, W.K. Cullen, G.M. Shankar, V. Betts, E.T. Spooner, L. Jiang, R. Anwyl, D.J. Selkoe, M.J. Rowan, Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo, *Nat Med* 11 (2005) 556-561.

[166] S. Gilman, M. Koller, R.S. Black, L. Jenkins, S.G. Griffith, N.C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M.B. Rovira, F. Forette, J.M. Orgogozo, Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial, *Neurology* 64 (2005) 1553-1562.

[167] F. Gervais, J. Paquette, C. Morissette, P. Krzykowski, M. Yu, M. Azzi, D. Lacombe, X. Kong, A. Aman, J. Laurin, W.A. Szarek, P. Tremblay,

Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis, *Neurobiol Aging* 28 (2007) 537-547.

[168] R.B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis*, I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J Am Chem Soc* 85 (1963) 2149-2154.

[169] M. Amblard, J.A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis*, *Mol Biotechnol* 33 (2006) 239-254.

[170] Χ. Ζήκος, Συμβολή στη μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων με τη μέθοδο στερεής φάσης, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1999.

[171] G.B. Fields, R.L. Noble, *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*, *Int J Pept Protein Res* 35 (1990) 161-214.

[172] R. Subiros-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion, *Chemistry* 15 (2009) 9394-9403.

[173] V.K. Sarin, S.B. Kent, J.P. Tam, R.B. Merrifield, Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction, *Anal Biochem* 117 (1981) 147-157.

[174] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry*, *Chem Rev* 100 (2000) 2091-2158.

[175] M.S.B. H-G. Chao, G.R. Matsueda, Preparation and use of the 4-[1-[N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino]-2-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyacetic linkage agent for solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides : Improved yields of tryptophan-containing peptides, *J Org Chem* 58 (1993) 2640-2646.

[176] B.H. S.R. Chhabra , D.J. Evans, P.D. White, B.W. Bycroft, W.C. Chan An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis, *Tetrahedron Letters* 39 (1998) 1603-1606.

[177] K.D. Setchell, M.B. Welsh, C.K. Lim, High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection, *J Chromatogr* 386 (1987) 315-323.

[178] J.B. Fenn, Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time, *J Am Soc Mass Spectrom* 4 (1993) 524-535.

[179] A.T. I. Gerothanassis, V. Exarchou, K. Barbarossou, *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine*, *Chemistry Education: Research and Practice in Europe* 3 (2002) 229-252.

- [180] L.E. Kay, NMR studies of protein structure and dynamics, *J Magn Reson* 173 (2005) 193-207.
- [181] K. Wuthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance, *J Mol Biol* 155 (1982) 311-319.
- [182] W.A.A. R.R. Ernst, Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance The Review of Scientific Instruments 37 (1965) 93-102.
- [183] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods* 89 (1986) 271-277.
- [184] S.W. Paddock, Principles and practices of laser scanning confocal microscopy, *Mol Biotechnol* 16 (2000) 127-149.
- [185] R. Alberto, Technetium, Elsevier, 2003.
- [186] V. Husak, J. Vlcek, Some remarks on 99Mo-99mTc generator kinetics, *Eur J Nucl Med* 7 (1982) 331-332.
- [187] R.A. U. Abram, Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications *J Braz Chem Soc* 17 (2006) 1486-1500.
- [188] E.M. Smith, Internal Dose Calculation for 99mtc, *J Nucl Med* 6 (1965) 231-251.
- [189] F.P. Castronovo, Jr., Technetium-99m: basic nuclear physics and chemical properties, *Am J Hosp Pharm* 32 (1975) 480-488.
- [190] E. Deutsch, K. Libson, J.L. Vanderheyden, A.R. Ketring, H.R. Maxon, The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine, *Int J Rad Appl Instrum B* 13 (1986) 465-477.
- [191] R.D. Peacock, The chemistry of technetium and rhenium, Elsevier Publishing Company, 1966.
- [192] D.J. Hnatowich, F. Virzi, M. Fogarasi, M. Rusckowski, P. Winnard, Jr., Can a cysteine challenge assay predict the in vivo behavior of 99mTc-labeled antibodies?, *Nucl Med Biol* 21 (1994) 1035-1044.
- [193] Ε.Λ. Α. Λεοντιάδης, Ε. Βασιλειάδου, Δ. Ιθακήσιος, Γρ. Ευαγγελάτος, Ενζυμοανοσοανάλυσεις: Αρχές και Μεθοδολογία, *Φαρμακευτική* 9 (1996) 83-96.
- [194] R.M. Lequin, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin Chem* 51 (2005) 2415-2418.
- [195] M. Maftai, X. Tian, M. Manea, T.E. Exner, D. Schwanzar, C.A. von Arnim, M. Przybylski, Interaction structure of the complex between

neuroprotective factor humanin and Alzheimer's beta-amyloid peptide revealed by affinity mass spectrometry and molecular modeling, *J Pept Sci* 18 (2012) 373-382.

[196] A.A. Golabek, C. Soto, T. Vogel, T. Wisniewski, The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation, *J Biol Chem* 271 (1996) 10602-10606.

[197] M. Wilchek, E.A. Bayer, O. Livnah, Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction, *Immunol Lett* 103 (2006) 27-32.

[198] I. Papasarantos, P. Klimentzou, V. Koutrafouris, M. Anagnostouli, C. Zikos, M. Paravatou-Petsotas, E. Livaniou, Solid-phase synthesis of a biotin derivative and its application to the development of anti-biotin antibodies, *Appl Biochem Biotechnol* 162 (2010) 221-232.

[199] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim Biophys Acta* 1751 (2005) 119-139.

[200] N.J. Greenfield, Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, *Anal Biochem* 235 (1996) 1-10.

[201] N.J. Greenfield, Analysis of circular dichroism data, *Methods Enzymol* 383 (2004) 282-317.

[202] N.J. Greenfield, Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions, *Nat Protoc* 1 (2006) 2527-2535.

[203] E.H. Strickland, Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins, *CRC Crit Rev Biochem* 2 (1974) 113-175.

[204] R.W. Woody, A significant role for high-energy transitions in the ultraviolet circular dichroism spectra of polypeptides and proteins, *Chirality* 22 Suppl 1 (2010) E22-29.

[205] A.J. Adler, N.J. Greenfield, G.D. Fasman, [27] Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides, *Methods Enzymol*, Academic Press, 1973, pp. 675-735.

[206] K. Rosenheck, P. Doty, The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 47 (1961) 1775-1785.

[207] N. Greenfield, G.D. Fasman, Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* 8 (1969) 4108-4116.

[208] R.W. Woody, Circular dichroism of peptides and proteins in Circular dichroism, principles and applications, New York: VCH, 1994.

- [209] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal Biochem* 177 (1989) 244-249.
- [210] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta* 1804 (2010) 1405-1412.
- [211] M. Groenning, Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status, *J Chem Biol* 3 (2010) 1-18.
- [212] L.D. Burtnick, Modification of actin with fluorescein isothiocyanate, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 791 (1984) 57-62.
- [213] E.P. Diamandis, T.K. Christopoulos, The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology, *Clin Chem* 37 (1991) 625-636.
- [214] P. Klimentzou, A. Beck, A. Varvarigou, O. Tsitsilonis, W. Voelter, I. Pirmettis, M. Papadopoulos, E. Livaniou, C. Zikos, Solid-phase synthesis of a peptide derivative of thymosin alpha1 and initial studies on its (99m)Tc-radiolabelling, *Chem Biol Drug Des* 70 (2007) 40-46.
- [215] C.J. Smith, H. Gali, G.L. Sieckman, D.L. Hayes, N.K. Owen, D.G. Mazuru, W.A. Volkert, T.J. Hoffman, Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH₂: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells, *Nucl Med Biol* 30 (2003) 101-109.
- [216] G. Wider, K.H. Lee, K. Wuthrich, Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra. Glucagon bound to perdeuterated dodecylphosphocholine micelles, *J Mol Biol* 155 (1982) 367-388.
- [217] M. Kostomoiri, C. Zikos, D. Benaki, C. Triantis, M. Sagnou, M. Paravatou-Petsotas, A. Papadaki, H. Boleti, M. Papadopoulos, I. Pirmettis, M. Pelecanou, E. Livaniou, New labeled derivatives of the neuroprotective peptide colivelin: synthesis, characterization, and first in vitro and in vivo applications, *Arch Biochem Biophys* 567 (2015) 83-93.
- [218] M. Fani, H.R. Maecke, Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39 Suppl 1 (2012) S11-30.
- [219] A. Neokosmidi, V. Ragoussis, C. Zikos, M. Paravatou-Petsotas, E. Livaniou, N. Ragoussis, G. Evangelatos, Synthesis of haptens and development of an immunoassay for the olive fruit fly pheromone, *J Agric Food Chem* 52 (2004) 4368-4374.
- [220] Β. Βασιλακοπούλου, Ανάπτυξη αντι-πεπτιδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την ανθρώπινη φωσφολιπάση Cζ (PLCζ), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.

- [221] E.Y. Chi, S.L. Frey, A. Winans, K.L. Lam, K. Kjaer, J. Majewski, K.Y. Lee, Amyloid-beta fibrillogenesis seeded by interface-induced peptide misfolding and self-assembly, *Biophys J* 98 (2010) 2299-2308.
- [222] A. Thapa, E.R. Woo, E.Y. Chi, M.G. Sharoar, H.G. Jin, S.Y. Shin, I.S. Park, Biflavonoids are superior to monoflavonoids in inhibiting amyloid-beta toxicity and fibrillogenesis via accumulation of nontoxic oligomer-like structures, *Biochemistry* 50 (2011) 2445-2455.
- [223] W.B. Stine, Jr., K.N. Dahlgren, G.A. Krafft, M.J. LaDu, In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis, *J Biol Chem* 278 (2003) 11612-11622.
- [224] J.J. Valle-Delgado, M. Alfonso-Prieto, N.S. de Groot, S. Ventura, J. Samitier, C. Rovira, X. Fernandez-Busquets, Modulation of Abeta42 fibrillogenesis by glycosaminoglycan structure, *FASEB J* 24 (2010) 4250-4261.
- [225] M. Janusz, M. Woszczyna, M. Lisowski, A. Kubis, J. Macala, T. Gotszalk, J. Lisowski, Ovine colostrum nanopeptide affects amyloid beta aggregation, *FEBS Lett* 583 (2009) 190-196.
- [226] T. Arakawa, T. Niikura, F. Arisaka, Y. Kita, Activity-dependent neurotrophic factor, ADNF, determines the structure characteristics of Colivelin, a fusion protein of ADNF9 and Humanin analog, *J Pept Sci* 14 (2008) 631-636.
- [227] D. Boturyn, J.L. Coll, E. Garanger, M.C. Favrot, P. Dumy, Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis, *J Am Chem Soc* 126 (2004) 5730-5739.
- [228] P.C. Trippier, Synthetic strategies for the biotinylation of bioactive small molecules, *ChemMedChem* 8 (2013) 190-203.
- [229] F. Arisaka, T. Niikura, T. Arakawa, Y. Kita, The structure analysis of Humanin analog, AGA-(C8R)HNG17, by circular dichroism and sedimentation equilibrium: comparison with the parent molecule, *Int J Biol Macromol* 43 (2008) 88-93.
- [230] D. Benaki, C. Zikos, C.E. Karachaliou, O. Tsitsilonis, L. Leondiadis, H. Kalbacher, W. Voelter, M. Papadopoulos, I. Pirmettis, M. Pelecanou, E. Livaniou, Complexes of an alpha thymosin derivative with (1)(8)(5)/(1)(8)(7)Re and ((9)(9)m)Tc: structural analysis and initial biological evaluation, *Chem Biol Drug Des* 80 (2012) 545-553.