ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Διαμορφωτική Ανάλυση Βιοδραστικών Πεπτιδίων κατά της κατάθλιψης και της σκλήρυνσης κατά πλάκας

ΒΑΝΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ
2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Διαμορφωτική Ανάλυση Βιοδραστικών Πεπτιδίων κατά της κατάθλιψης και της σκλήρυνσης κατά πλάκας

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ
ΒΑΝΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

Α.Μ.: 31306

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Θ. Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θ. Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γ. Λιαπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτη

Θ. Τσέλιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Χημικό Τμήμα Πανεπιστημίου Πατρών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 1/10

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν οι δομές βιοδραστικών πεπτιδίων κατά της κατάθλιψης και της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Ο δομές προς μελέτη ταυτοποιήθηκαν και ακολούθησε εφαρμογή Μοριακής Μοντελοποίησης για τη μελέτη της διαμορφωτικής τους ανάλυσης. Η ταυτοποίηση των δομών έγινε με συνδυαστική χρήση πειραμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Υπολογιστικής Χημείας. Οι πληροφορίες που λήφθησαν από τη διαμορφωτική ανάλυση των πεπτιδίων αυτών έδωσαν σημαντικά στοιχεία για την κατανόηση των φαρμακοφόρων τμημάτων τους που είναι υπεύθυνα για τη βιολογική τους δράση. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκε η δομή των βιοδραστικών τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle που πιθανά έχουν ευεργετική δράση κατά της κατάθλιψης. Τα αποτελέσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού για τα τριπεπτίδια έδειξαν πως πρόκειται για ανοιχτές δομές. Ακολούθησαν *in silico* πειράματα μοριακής δυναμικής χωρίς και με την παρουσία του υποδοχέα CRF1. Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως τα τριπεπτίδια διατηρούν ημίκλειστες δομές τόσο πριν, όσο και μετά την πρόσδεση. Σε όλα τα πειράματα μοριακής δυναμικής δεν παρατηρήθηκε σε καμία πόζα να σχηματίζεται κυκλική δομή. Να σημειωθεί ότι στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης προέκυψαν ευνοϊκότερες βαθμονομήσεις όταν ο υποδοχέας ήταν εύκαμπτος. Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι για να επιτευχθεί βιολογική δράση, το σύστημα τριπεπτίδιο-υποδοχέας πρέπει να παρουσιάζει κάποια ευελιξία. Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας ταυτοποιήθηκε η δομή του επίτοπου πεπτιδίου MOG_{35-55} της μυελίνης που εμπλέκεται στη σκλήρυνση κατά πλάκας και μελετήθηκε η διαμορφωτική του ανάλυση. Από την ταυτοποίηση και τη μελέτη των σημάτων NOE προέκυψε ότι ο επίτοπος δεν εντοπίζεται σε ανοιχτή δομή, αντιθέτως αναδιπλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας μια ακανόνιστη θηλιά. Στη συνέχεια για καλύτερη κατανόηση της τρισδιάστασης απεικόνισης του πεπτιδίου ακολούθησαν πειράματα μοριακής δυναμικής. Αρχικά το πεπτίδιο ελαχιστοποιήθηκε ενεργειακά, επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα NOE, καθώς προτίμησε μια αναδιπλωμένη διαμόρφωση παρά την ανοιχτή δομή. Στο επόμενο βήμα τα δεδομένα NOE τέθηκαν ως περιορισμοί (constraints) για να ακολουθήσουν τα πειράματα μοριακής δυναμικής που έδειξαν αρκετά μεγάλη ομοιότητα με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Συμπερασματικά, το πεπτίδιο εμφάνισε τη μεγαλύτερη σταθερότητα όταν βρισκόταν σε κλειστή δομή με τα δυο του άκρα να προσεγγίζουν χωρικά και την Ιστιδίνη να εντοπίζεται στο κέντρο του μορίου.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κατάθλιψη, Τριπεπτίδιο LeuMetIle**,** σκληρυνση κατά πλάκας, επίτοπος μυελίνης MOG_{35-55}, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), ταυτοποίηση, μοριακή δυναμική, μοριακή πρόσδεση

ABSTRACT

In this thesis, the conformations of bioactive peptides that may show bioactivity against depression and multiple sclerosis were studied. The given structures were structurally elucidated and their conformational analysis was achieved using a combination of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and *in silico* computational analysis. The acquired information on the peptide's conformational analysis gave important clues for the understanding of the pharmacophore features responsible for their biological activity. Specifically, the structures of the bioactive tripeptides, LeuMetIle and DLeuMetIle were identified. These tripeptides might have significant activity against depression. The results from NMR experiments for these peptides showed that they are found in the solvent mainly in open conformations. Molecular dynamics simulations were executed for the tripeptides alone. These simulations showed that the peptides are found in open conformation. During all the molecular dynamics simulations the peptides have never adopted a cyclic conformation. Induced fit docking results increased the binding affinity of the two tripeptides. This showed that in order to achieve biological activity the system CRF1-peptide must be a flexible one. In the second part of the thesis the structure of the epitope MOG_{35-55} was structurally elucidated and conformationally analyzed. This peptide seems to play an important role in the therapy of multiple sclerosis. The characterization and the studying of the NOE signals showed that the epitope is not found in open conformations, on the contrary folds in space forming an irregular loop. In order to fully understand the three dimensional structure of the peptide molecular dynamics simulations were performed. First, the peptide was minimized and confirming the NOE results, seemed to prefer the folded conformation. On the next step, the NOE results were set as constraints for the Molecular dynamics simulations and the results showed great similarity with the previous ones. In conclusion, the peptide has shown great stability when found in close conformation with the N-terminal and C-terminal amino interacting each other. Histidine49 is placed in the center of the molecule and interacted with most of the aminoacids of the epitope.

KEYWORDS: Depression, tripeptide LeuMetIle, multiple sclerosis, epitope MOG_{35-55} of myelin, Nuclear Magnetic Resonance (NMR), molecular dynamics, molecular docking

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Θωμά Μαυρομούστακο για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γιώργο Λιαπάκη και τη συνεργάτη του Κατερίνα Σπυριδάκη για τις πολύτιμες πληροφορίες που μου παρείχαν στο θεωρητικό υπόβαθρο για το τριπεπτίδιο και το πώς αυτό εμπλέκεται στη θεραπεία της κατάθλιψης.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Θεόδωρο Τσέλιο και την υποψήφια Διδάκτορα Γκόλφω Κορδοπάτη για τη σύνθεση των δύο τριπεπτιδίων και του επίτοπου της μυελίνης που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γ. Σπυρούλια και του συνεργάτες του στο εργαστήριο του οποίου εκτελέστηκαν τα πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού καθώς επίσης και τον Δρ Κ. Μαρούση για τη συνεργασία.

Εγκάρδιες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον Δρ Δημήτρη Ντουντανιώτη για την υπομονή, τις υποδείξεις του κι όλη τη βοήθεια που μου παρείχε στην ανάλυση των φασμάτων και στην εξαγωγή συμπερασμάτων από τα αποτελέσματα.

Ευχαριστίες απονέμω και στον Msc Tahsin Kellici και στον Msc Γιάννη Ανδρεαδέλη για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκτέλεση *in silico* πειραμάτων Μοριακής Δυναμικής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους οικείους ανθρώπους μου που ήταν πάντα κοντά μου και στήριξαν την προσπάθεια μου αυτή, καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του Καθηγητή Θ. Μαυρομούστακο για όλες τις ευχάριστες και εποικοδομητικές στιγμές που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 [Το τριπεπτίδιο Leu Met Ile & Κατάθλιψη].....17

1.1 Κατάθλιψη.....18
1.2 Άξονας ΥΥΕ - Κορτικοτροπίνη CRF- Τριπετίδιο..... 18
1.3 Σύνθεση τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle.....19

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 [Ο επίτοπος της μυελίνης MOG_{35-55} & σκλήρυνση κατά πλάκας]...23

2.1 Σκλήρυνση κατά πλάκας - Μυελίνη (πρωτεΐνη MOG).....24
2.2 Επίτοπος MOG_{35-55}.....24

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 [Στοχοθεσία και Μέθοδοι].....27

3.1 Στόχος Διπλωματικής Εργασίας.....28
3.2 Πειραματικές Τεχνικές- Μεθοδολογία.....29
3.2.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δύο διαστάσεων (2D-NMR).....29
3.2.2 Μέθοδοι Υπολογιστικής Χημείας.....31

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 [Ταυτοποίηση και Διαμορφωτική ανάλυση των τριπεπτιδίων Leu MetIle και DLeuMetIle].....35

4.1 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου H-LeuMetIle-OH σε H_2O/d_6-DMSO (9:1).....36
4.2 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου H-DLeuMetIle-OH σε H_2O/d_6-DMSO (9:1).....47
4.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....56
4.3.1 Σύγκριση Φασμάτων των διαστερεοϊσομεών τριπεπτιδίων H_2N-Leu-Met-Ile-COOH και H_2N-DLeu-Met-Ile-COOH 56

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 [Πειράματα Πρόσδεσης των τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMet Ile στον υποδοχέα CRF_1].....59

5.1 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης των τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle στον υποδοχέα CRF_1.....60

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 [Ταυτοποίηση & Διαμορφωτική ανάλυση του επίτοπου MOG_{35-55}]95

- 6.1 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου του επιτόπου της μυελίνης, MOG_{35-55}.....96
- 6.2 Υπολογισμός αποστάσεων από NOE δεδομένα.....121
- 6.3 Πειράματα μοριακής δυναμικής για την πλήρη κατανόηση της τρισδιάστατης δομής του επιτόπου MOG_{35-55}.....140

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 [Γενικά Συμπεράσματα].....145

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....149

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....157

10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Άξονας YYE.....19

Σχήμα 1.2 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI).....20

Σχήμα 1.3 Συνθετική πορεία σε στερεά φάση των πεπτιδίων 1 και 2.....21

Σχήμα 3.1 Συσχέτιση πυρήνων πρωτονίων του αμινοξέος, Ισολευκίνη, στο πείραμα 2D-TOCSY στο οποίο παρατηρούνται και συζεύξεις μεγάλης εμβέλειας……29

Σχήμα 3.2 NOE αλληλεπιδράσεις του τύπου dNα(i,i), dαN(i,i+1) και dNN(i,i+1) που αναμένονται σε ένα φάσμα 2D NOESY ενός πεπτιδίου.....30

Σχήμα 3.3 Συσχέτιση πυρήνων στο ^{15}N -^{1}H 2D-HSQC αζώτου-πρωτονίου του αμινοξέος Ισολευκίνη.....31

Σχήμα 4.1 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI).....36

Σχήμα 4.2 Απεικόνιση Στρατηγικής Ταυτοποίησης.....37

Σχήμα 4.3 Φάσμα ^{15}N HSQC του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....38

Σχήμα 4.4 Φάσμα 2D HSQC του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....39

Σχήμα 4.5 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....40

Σχήμα 4.6 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή.....41

Σχήμα 4.7 Φάσμα 2D NOESY (400ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....43

Σχήμα 4.8 Φάσμα 2D NOESY του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην περιοχή 0,00-2,50 ppm ……44

Σχήμα 4.9 Φάσμα ^{1}H NMR του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....45

Σχήμα 4.10 Δομή του πεπτιδίου H-LeuMetIle-OH με τις θεωρητικές και πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.....46

Σχήμα 4.11 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI).....47

Σχήμα 4.12 Φάσμα ^{15}N-HSQC του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....48

Σχήμα 4.13 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°.....49

Σχήμα 4.14 Φάσμα 2D HSQC του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....50

Σχήμα 4.15 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου DLeuMetIle στην αλειφατική περιοχή 51

Σχήμα 4.16 Φάσμα 2D NOESY (400ms) του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....52

Σχήμα 4.17 Φάσμα 2D NOESY του τριπεπτιδίου DLeuMetIle στην περιοχή 0,00-2,50ppm.....53

Σχήμα 4.18 Φάσμα H^1NMR του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....54

Σχήμα 4.19 Δομή του πεπτιδίου H-DLeuMetIle-OH με τις θεωρητικές και πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.....55

Σχήμα 4.20 Σύγκριση φασμάτων H^1NMR των τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.....57

Σχήμα 5.1 Απεικόνιση διαγράμματος ροής.....60

Σχήμα 5.2 Κρυσταλλογραφική μελέτη του υποδοχέα CRF_1 με κωδικό όνομα 3EHU (Pioszak. 2008). Αριστερά(πράσινο χρώμα) φαίνεται η εξωκυττάρια περιοχή (sushi domain). όπου γίνεται η πρόσδεση. Στην ενδοκυττάρια περιοχή (δεξιά) τα μόρια που διακρίνονται είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη και μαλτόζη. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιήθησαν κατά τη λήψη των ακτίνων-Χ προς καταβύθιση του υποδοχέα.....69

Σχήμα 6.1 Δομή του πεπτιδίου MOG_{35-55}.....96

Σχήμα 6.2 Απεικόνιση στρατηγικής ταυτοποίησης του πεπτιδίου MOG_{35-55}.....99

Σχήμα 6.3 Περιοχή NH/H του φάσματος 2D-TOCSY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO 101

Σχήμα 6.4 Φάσμα 2D-TOCSY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO 102

Σχήμα 6.5 Περιοχή NH/H του φάσματος 2D-NOESY που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO, στην οποία περιγράφεται ενδεικτικά ένα μέρος της πορείας ταυτοποίησης της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου MOG_{35-55}.....103

Σχήμα 6.6 Φάσμα 2D-NOESY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO.....104

Σχήμα 6.7 Φάσμα ^{1}H-NMR του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO στην περιοχή 6,6-11,0ppm…….....……105

Σχήμα 6.8 Φάσμα ^{1}H-NMR του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO στην περιοχή 0,8-4,8ppm…….....…..106

Σχήμα 6.9 Φάσμα 2D-^{15}N-HSQC του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25oC και σε διαλύτη d6-DMSO.....119

Σχήμα 6.10 (Αριστερά) Η σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας στα 50 ps της θέρμανσης. (Δεξιά) Η κινητική ενέργεια (πράσινο), η ολική ενέργεια (μπλε) και η δυναμική ενέργεια (κόκκινο).....141

Σχήμα 6.11 RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σε σχέση με το χρόνο.....141

Σχήμα 6.12 Η δομή του πεπτιδίου: A) μετά από την ελαχιστοποίηση, B) μετά από την θέρμανση στα 325 K, C) μετά από 200 ns, D) μετά από 1 μs και E) στο τέλος της προσομοίωσης.....142

Σχήμα 6.13 (Αριστερά) Η δομή ελάχιστης ενέργειας μετά από μοριακή δυναμική με περιορισμούς. (Δεξιά) Ο σκελετός του πεπτιδίου σε 10 δομές ελάχιστης ενέργειας όπως προέκυψε μετά τη μοριακή δυναμική.....143

Σχήμα 6.14 Το RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σε σχέση με το χρόνο.....144

Σχήμα 6.15 (A) Το πεπτίδιο μετά από 60 ns προσομοίωσης, (B) Το πεπτίδιο μετά από 280 ns προσομοίωσης.....144

Σχήμα 7.1 Ορθολογικός Σχεδιασμός καινοτόμων φαρμάκων.....146

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: Κατά προσέγγιση χημικές μετατοπίσεις για τα 3 φυσικά αμινοξέα σε D_2O..36

Πίνακας 4.2: Χημικές μετατοπίσεις ^1H του πεπτιδίου LeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO (δ^1_H=4.70). Σε παρένθεση εμφαίνονται οι τιμές σε διαλύτη D_2O.....45

Πίνακας 4.3: Χημικές μετατοπίσεις ^1H του πεπτιδίου DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO (δ^1_H=4.70).....54

Πίνακας 4.4: Χημικές μετατοπίσεις ^1H των δύο πεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO (δ^1_H=4.70).....57

Πίνακας 5.1: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο LeuMetIle.....62

Πίνακας 5.2: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο DLeuMetIle.....64

Πίνακας 5.3: Ο αριθμός και το ποσοστό των διαμορφώσεων που παρεκκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα όπως προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.....67

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα CRF_1 για το LeuMetIle.....70

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα CRF_1 για το DLeuMetIle.....73

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα Πειραμάτων Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1 για το LeuMetIle.....77

Πίνακας 5.7: Αποτελέσματα Πειραμάτων Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1 για το DLeuMetIle.....81

Πίνακας 5.8: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο LeuMetIle, όπως προέκυψαν από τα πειράματα Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1.....85

Πίνακας 5.9: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο DLeuMetIle, όπως προέκυψαν από τα πειράματα Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1.....87

Πίνακας 5.10: Ο αριθμός και το ποσοστό των διαμορφώσεων που παρεκκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα όπως προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.....90

Πίνακας 5.11: Τιμές RMSD - Σύγκριση δομών MD και IFD για το LeuMetIle.....91

Πίνακας 5.12: Δομές LeuMetIle σε υπέρθεση. Καλύτερες τιμές RMSD.....91

Πίνακας 5.13: Τιμές RMSD - Σύγκριση δομών MD και IFD για το DLeuMetIle.....93

Πίνακας 5.14: Δομές DLeuMetIle σε υπέρθεση. Καλύτερες τιμές RMSD.....93

Πίνακας 6.1: Κατά προσέγγιση χημικές μετατοπίσεις για τα 20 φυσικά αμινοξικά κατάλοιπα σε D_2O.....96

Πίνακας 6.2: Πλήρης ταυτοποίηση ^{1}H του MOG_{35-55}.....107

Πίνακας 6.3: Ταυτοποίηση των ^{15}N του πεπτιδίου MOG_{35-55}.....120

Πίνακας 6.4: Υπολογισμός αποστάσεων πρωτονίων του MOG_{35-55} σε χωρική εγγύτητα.123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΤΟ ΤΡΙΠΕΠΤΙΔΙΟ Leu Met Ile

&

ΚΑΤΑΘΛΙΨΗ

1.1 Κατάθλιψη

Το έντονο άγχος και η κατάθλιψη αποτελούν σοβαρότατες ασθένειες που επηρεάζουν μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού. Η κατάθλιψη συγκεκριμένα βρίσκεται στον κατάλογο με τις δέκα σοβαρότερες ασθένειες διότι όχι μόνο καθιστά το άτομο σχεδόν ανίκανο να επιτελέσει βασικές ατομικές και κοινωνικές δραστηριότητες, αλλά οδηγεί πολύ συχνά και στον θάνατο μέσω των αυτοκτονιών [1-2].

Τα εμπορικώς διαθέσιμα αντικαταθλιπτικά στοχεύουν στα συστήματα νευροδιαβιβαστών σεροτονίνης ή νοραδρεναλίνης ενώ τα αγχολυτικά στο σύστημα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος [2]. Παρόλη την ποικιλία των φαρμάκων αυτών, υπάρχουν πολυάριθμες παρενέργειες ενώ υπάρχει ένα τμήμα των ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στα ήδη συνταγογραφούμενα φάρμακα [2-5]. Για τον λόγο αυτόν υπάρχει ανάγκη εξεύρεσης νέων τρόπων αντιμετώπισης των ασθενειών αυτών. Πρόσφατες μελέτες με στόχο τη θεραπεία της κατάθλιψης στρέφονται στον άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων (Άξονας ΥΥΕ) και στην εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRF)

1.2 Άξονας ΥΥΕ – Κορτικοτροπίνη CRF – Τριπεπτίδιο

Απαραίτητο στοιχείο για την καλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού αποτελεί η διατήρηση της ομοιόστασής του. Το σώμα μας διαθέτει ένα σύστημα εξισορρόπισης, ώστε να εξασφαλίζει τη σταθερότητα του σε καταστάσεις έντονου αγχους και στρες, τον άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων (Άξονας ΥΥΕ). Το σύστημα αυτό έχει ως εξής. Απαντώντας σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα στον υποθάλαμο του εγκεφάλου εκκρίνεται η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRF) και προσδένεται στους CRF υποδοχείς προκαλώντας την έκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την αδενοϋπόφυση. Το σήμα μεταδίδεται στα γλυκοκορτικοειδή των επινεφριδίων, όπου με παλίνδρομη ρύθμιση επαναφέρεται ο οργανισμός σε φυσιολογικά επίπεδα [6,7].

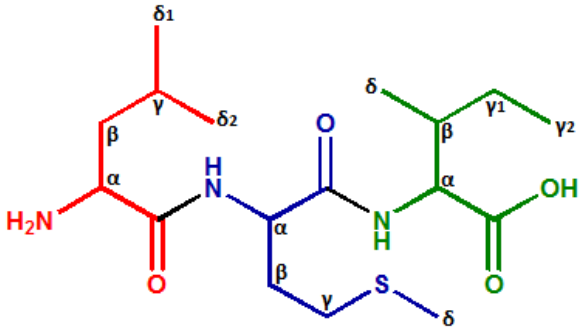
Σημαντικό ρόλο στο σύστημα αυτό παίζει η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRF), ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που εμπλέκεται μεταξύ άλλων σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες καθώς λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα τελευταία χρόνια έχει συντεθεί εργαστηριακά ένας μεγάλος αριθμός μη πεπτιδικών αναλόγων της CRF, κάποια από τα οπόια σε πρόσφατες κλινικές δοκιμές έδειξαν πιθανή ευεγερτική δράση στη θεραπεία της κατάθλιψης. Δύο μη πεπτιδικά ανάλογα που εμφάνισαν αναστολή του CRF_1 υποδοχέα είναι δύο διαστερεοϊσομερή του

τριπεπτιδίου LeuMetIle [6,8], τα οποία θα αποτελέσουν και το αντικείμενο μελέτης στο πρώτο μέρος αυτής της διπλωματικής διατριβής. Τα τριπεπτίδια θα μελετηθούν ως προς τη διαμόρφωσή τους στο χώρο και την ικανότητα πρόσδεσής τους στον υποδοχέα CRF_1.

Σχήμα 1.1 Άξονας ΥΥΕ

1.3 Σύνθεση τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle

Στο εργαστήριο του Αναπ. Καθ. Θ. Τσέλιου του Πανεπιστημίου Πατρών συντέθηκαν από την Υποψήφια Διδάκτορα Γκόλφω Κορδοπάτη τα δύο διαστερεοϊσομερή του τριπεπτιδίου Λευκίνη-Μεθειονίνη-Ισολευκίνη (LeuMetIle ή LMI χάριν συντομίας) (Σχήμα 1.1). Η διαφορά των δύο αναλόγων έγκειται στην απόλυτη απεικόνιση του πρώτου κατά σειρά αμινοξέος του τριπεπτιδίου, τη Λευκίνη. Στο πρώτο συνθετικό τριπεπτίδιο η Leu έχει απεικόνιση L, είναι δηλαδή το τριπεπτίδιο LeuMetIle και στο δεύτερο η Leu έχει απεικόνιση D και το τριπεπτίδιο είναι δηλαδή το DLeuMetIle. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για το χειρόμορφο κέντρο της πλευρικής αλυσίδας της Λευκίνης. Αυτό δηλαδή μπορεί να είναι L ή D.



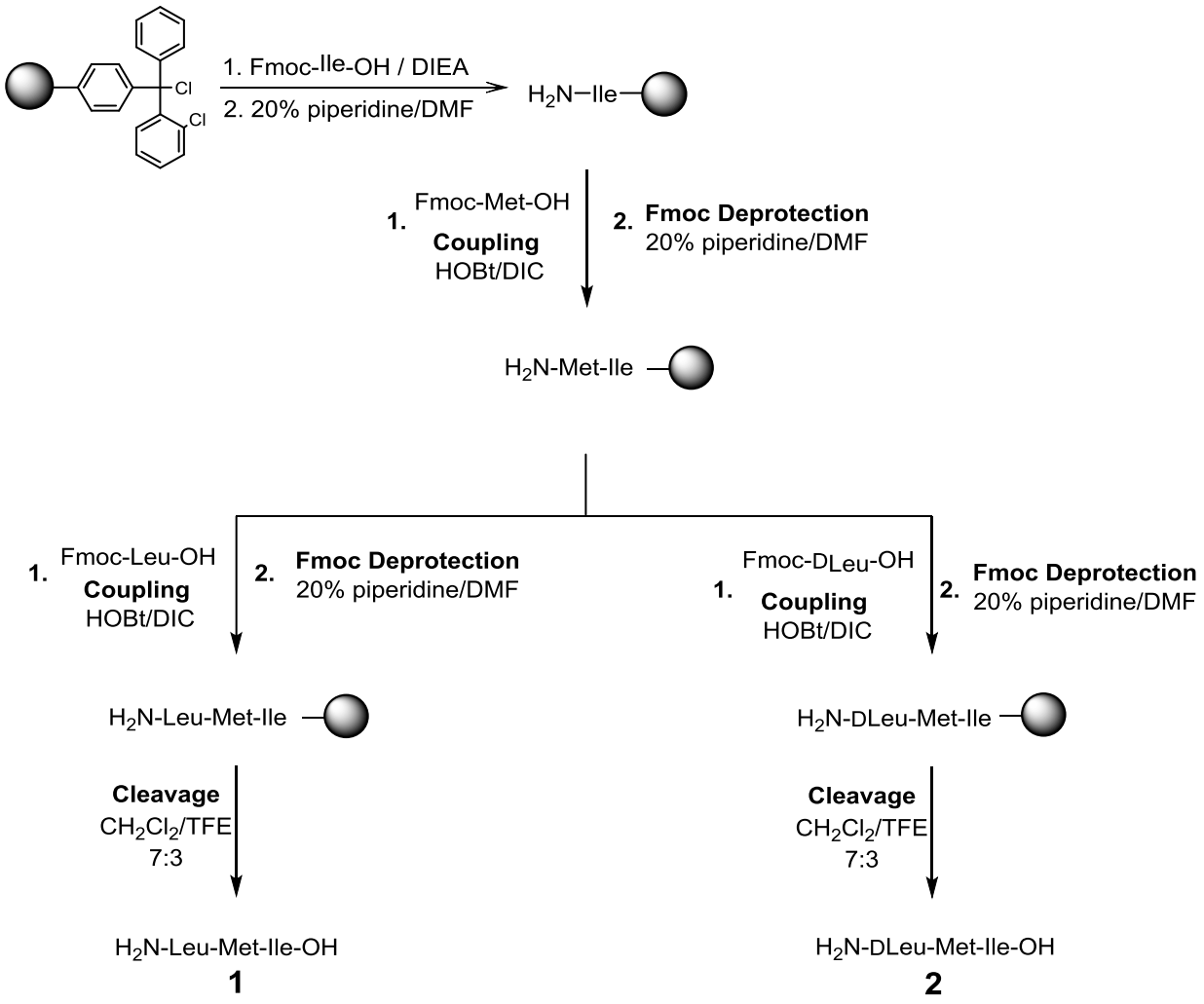
Σχήμα 1.2 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI)

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου σε στερεά φάση χρησιμοποιήθηκε η 2-χλωροτριτυλοχλωρίδιο ρητίνη πολυστυρενίου (1% DVB. 200–400 mesh) σε συνδυασμό με την Fmoc/tBu μεθοδολογία. Η ρητίνη και τα προστατευμένα αμινοξέα Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH και Fmoc-DLeu-OH προμηθεύτηκαν από την εταιρία Chemical and Biopharmaceutical Laboratories της Πάτρας, ενώ όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια από τις εταιρίες Merck, Sigma-Aldrich και Fluka.

Η παρακολούθηση της πορείας των συνθέσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε πλάκες DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα καθαρίστηκε με το Milli-Q Water Purification System με την αντίσταση του νερού να είναι μεγαλύτερη από 18 MegaΩ/cm.

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των ενδιαμέσων και των προϊόντων έγινε χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) της εταιρίας Waters (600E controller) με λειτουργικό σύστημα Millenium 2.1 και ανιχνευτή Waters 996 (photodiode array UV detector). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντίστροφης φάσης Nucleosil C-18 (250x10mm) με διάμετρο σωματιδίων 7nm.

Τέλος, τα πειράματα φασματομετρίας μάζας ιοντισμού από ηλεκτρικό πεδίο με ψεκασμό (ESI-MS) πραγματοποιήθηκαν σε TSQ 7000 Φασματομετρητή (Electrospray Platform LC of Micromass) που διαθέτει λειτουργικό σύστημα MassLynx NT 2.3. Τα δύο πεπτίδια βρέθηκαν να είναι αναλυτικής καθαρότητας >98%. Παρακάτω παριστάνεται η συνθετική πορεία σε στερεά φάση και για τα δύο τριπεπτίδια (Σχήμα 1.3)



Σχήμα 1.3 Συνθετική πορεία σε στερεά φάση των πεπτιδίων 1 και 2.

Τα πεπτίδια 1 και 2 συντέθηκαν σε στερεή φάση με χρήση της Fmoc/tBu μεθοδολογία σε CLTR-Cl ρητίνη (1.00g). Η σύνθεση ξεκίνησε με το πρώτο Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ, Fmoc-Ile-OH (1 ισοδύναμο) να εστεροποιείται πάνω στη ρητίνη παρουσία διισοπροπυλεθυλαμίνης (DIEA. 4.5 ισοδύναμα) σε διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2. 14 mL) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στη συνέχεια προστέθηκαν μεθανόλη (CH_3OH, 2 mL) και 1mL DIEA επιπλέον και το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου. Η ρητίνη με συνδεδεμένο το πρώτο αμινοξύ πλύθηκε με διάλυμα CH_2Cl_2/CH_3OH/DIEA (80:15:5, 3 × 20 mL για 5 λεπτά), διμεθυλφορμαμίδιο (DMF, 5 × 15 mL) και ισοπροπανόλη (*i*PrOH, 3 × 15 mL). Η σύζευξη της υπόλοιπης πεπτιδικής αλυσίδας με τα κατάλληλα αμινοξέα (2.5 ισοδύναμα) πραγματοποιήθηκε παρουσία διισοπροπυλκαρβοδιιμιδίου (DIC, 2.75 ισοδύναμα) και 1-υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBt, 3.75 ισοδύναμα) σε διμεθυλακεταμίδιο (DMA) για 4-6 ώρες κι ακολούθησαν τρεις Fmoc-

αποπροστασίες με πιπεριδίνη (20% in DMF) για 5, 10 και 15 λεπτά αντίστοιχα. Με αυτή τη γενική μέθοδο εστεροποίησης και σύζευξης συζεύχθηκαν και τα υπόλοιπα προστατευμένα αμινοξέα Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH και Fmoc-DLeu-OH.

Για να ελεγχθεί η συνθετική πορεία σε κάθε στάδιο. μετά από κάθε κύκλο σύζευξης και αποπροστασίας χρησιμοποιήθηκε το Kaiser-test και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (CH_3CN/H_2O 2:1). Το συντεθειμένο πεπτίδιο στη ρητίνη διηθήθηκε υπό κενό και έπειτα έμεινε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα CH_2Cl_2/TFE (7,3 v/v). Το μείγμα, στη συνέχεια, διηθήθηκε για να απομακρυνθεί η ρητίνη και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Με προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα (Et_2O) το ελαιώδες πεπτίδιο καταβυθίστηκε σε μορφή λευκού στερεού.

Στο τελευταίο στάδιο, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων με χρήση ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC (σε στήλη Nucleosil C-18, 7 μm, 250 x 10 mm και με κινητή φάση: A: 0,08% TFA/H_2O, B: 0,08% TFA / CH_3CN, σταδιακή έκλουση: από 10% σε 70% B για 45 λεπτά, ταχύτητα ροής: 3 mL/min, ανίχνευση: 230 nm, 254 nm. ταυτοποίηση με ESI-MS). Η καθαρότητα των τελικών προϊόντων μετρήθηκε με χρήση αναλυτικής RP-HPLC (σε στήλη Lichrosorb C18, 5 μm, 250 × 4.6 mm, και με κινητή φάση: A: 0,08% TFA/H_2O, B: 0,08% TFA/CH_3CN, σταδιακή έκλουση: από 10% σε 100% B για 30 λεπτά, ταχύτητα ροής: 1 mL/min, ανίχνευση: 214 nm ή 254 nm) και βρέθηκε ~ 98%.

Τα τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με χρήση ESI-MS και πειράματα NMR. Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^{1}H NMR, ^{1}H-^{1}H 2D TOCSY, ^{1}H-^{1}H 2D NOESY, ^{1}H-^{15}N HSQC,^{13}C HSQC) και για τα δύο τριπεπτίδια ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη H_2O/d_6-DMSO (9:1) στο εργαστήριο του Καθ. Γ. Σπυρούλια.

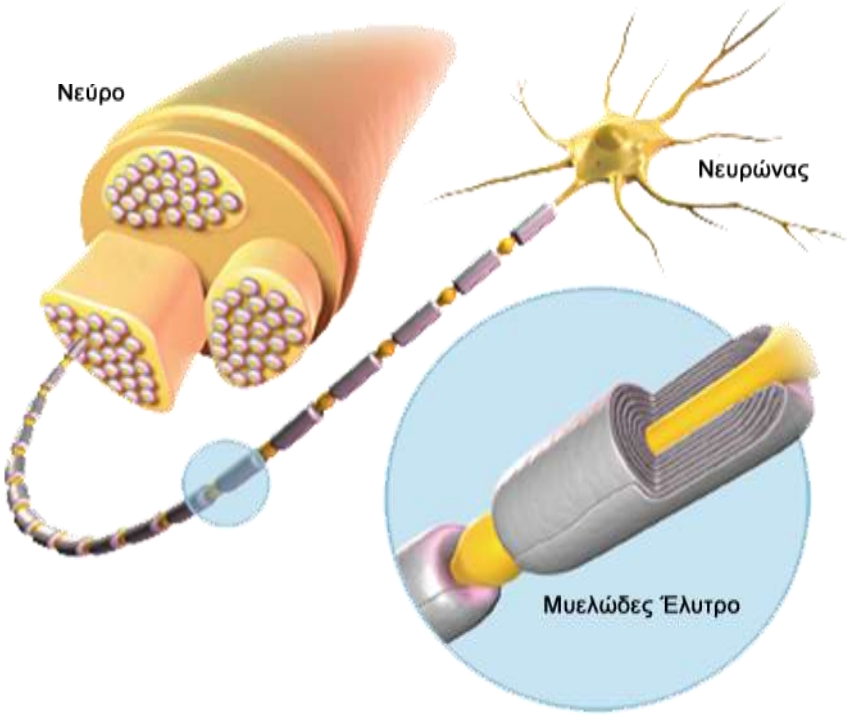
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

Ο ΕΠΙΤΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΥΕΛΙΝΗΣ

MOG_{35-55}

&

ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ



2.1 Σκλήρυνση κατά πλάκας - Μυελίνη (πρωτεΐνη MOG)

Η Σκλήρυνση κατά πλάκας (Σ.Κ.Π) είναι μία χρόνια και φλεγμονώδης ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), που χαρακτηρίζεται από απομυελίνωση και απώλεια νευρολογικής λειτουργίας [9-13]. Η Σ.Κ.Π θεωρείται αυτοάνοση ασθένεια κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται συνδιαστικά και καταστρέφει τα δομικά στοιχεία της μυελίνης, που αποτελεί το μαλακό περίβλημα των νευρώνων στον εγκέφαλο και τη σπονδυλική στήλη [11,14-16]. Αυτή η καταστροφή διαταράσσει την ικανότητα τμημάτων του νευρικού συστήματος να επικοινωνούν, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα ενδείξεων και συμπτωμάτων.

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα ΠΑΕ (Experimental autoimmune encephalomyelitis-EAE) είναι ένα από τα ευρέως διαδεδομένα *in vivo* πειραματικά μοντέλα ζώων με Σ.Κ.Π για την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων [17,18]. Τα υποψήφια αυτοαντιγόνα περιλαμβάνουν δομικά στοιχεία της μυελίνης, όπως η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin Basic Protein-MBP), η πρωτεϊνολιπιδική πρωτεΐνη (Proteolipid Protein-PLP) και η γλυκοπρωτεΐνη, ολιγοδενδροκυτταρική-μυελίνη (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-MOG) [19-20].

2.2 Επίτοπος MOG_{35-55}

Η MOG είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ΚΝΣ και εντοπίζεται στην εξωκυττάρια επιφάνεια του μυελώδους ελύτρου που περιβάλλει τους νευρώνες. Θεωρείται ότι είναι ένα απ' τα αυτοαντιγόνα που σχετίζονται με τη Σ.Κ.Π. στους ανθρώπους [21-25]. Η περιοχή της MOG πρωτεΐνης με την κυρίαρχη ανοσολογική δράση είναι ο επίτοπος 35-55 και μπορεί ίσως να αποτελέσει ένα πρωτο στόχο στην ενεργοποίηση των ανοσοποιητικών Τ-κυττάρων, που εμπλέκονται στις αυτοάνοσες ασθένειες του ΚΝΣ [26-29]. Οι επίτοποι της μυελίνης με ανοσολογική δράση μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμοι στο σχεδιασμό πεπτιδομιμητικών αναλόγων (APLs - Altered Peptide Ligands) για την αναστολή της ΠΑΕ.

Στην προσπάθεια ανάπτυξης πεπτιδίων-ανταγωνιστών για την πιθανή δράση τους στην αναστολή της ΠΑΕ [30-32], στο δεύτερο μέρος της εργασίας θα ταυτοποιηθεί και θα αναλυθεί διαμορφωτικά ο επίτοπος MOG_{35-55}, που βασίζεται στην ανθρώπινη MOG αλληλουχία *MetGluValGlyTrpTyrArg*^{41}*Pro*^{42}*ProPheSerArg*^{46}*ValValHisLeuTyrArgAsnGlyLys*.

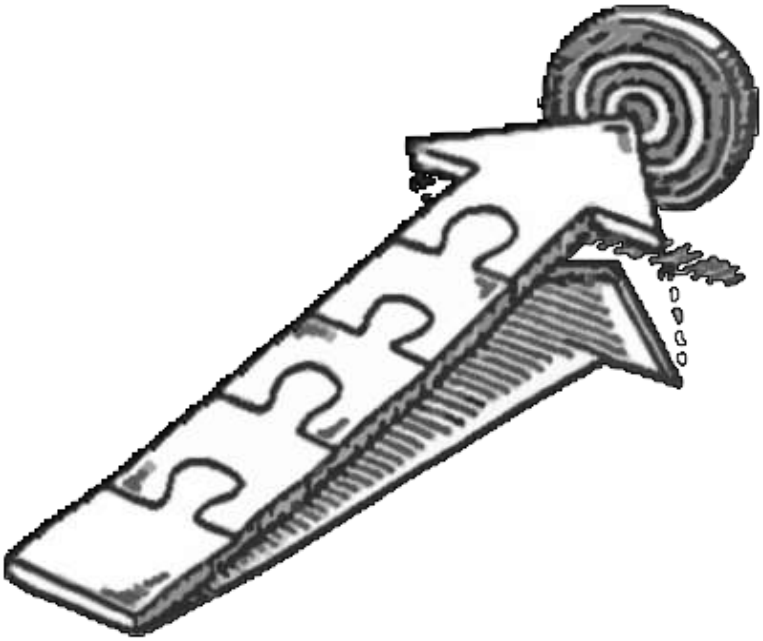
Η ανθρώπινη αλληλουχία διαφέρει από αυτήν των ποντικών στο αμινοξύ 42, όπου βρίσκεται μια Pro αντί για μία Ser. Επιπλέον, η ανθρώπινη MOG είναι ασθενώς εγκεφαλογενής σε αντίθεση με αυτή των C57BL/6 ποντικών κι αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχουν δύο μηχανισμοί χορήγησης της ΠΑΕ, ο πρώτος μέσω ενός εγκεφαλογενούς Τ-λεμφοκυττάρου που απαντά στον MOG_{35-55} επίτοπο των ποντικών και ο άλλος από ένα εγκεφαλογενές Β-κύτταρο που απαντά στον αντίστοιχο ανθρώπινο επίτοπο [33]. Στην παρούσα έρευνα θα γίνει η ταυτοποίηση του επιτόπου MOG_{35-55} που εντοπίζεται στα ποντίκια. Για τη σύνθεση του επιτόπου σε στερεά φάση χρησιμοποιήθηκε η 2-χλωροτριτυλοχλωρίδιο ρητίνη πολυστυρενίου σε συνδυασμό με την Fmoc/tBu μεθοδολογία. Τα τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με χρήση ESI-MS και πειράματα NMR. Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^{1}H NMR, ^{1}H-^{1}H 2D TOCSY, ^{1}H-^{1}H 2D NOESY, ^{15}N HSQC) για τον επίτοπο ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO στο εργαστήριο του Καθ. Γ. Σπυρούλια [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

ΣΤΟΧΟΘΕΣΙΑ

και

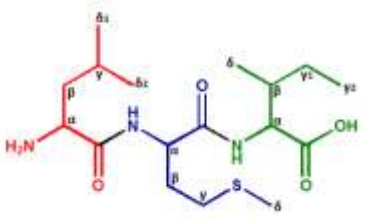
ΜΕΘΟΔΟΙ



3.1. Στόχος Διπλωματικής Εργασίας

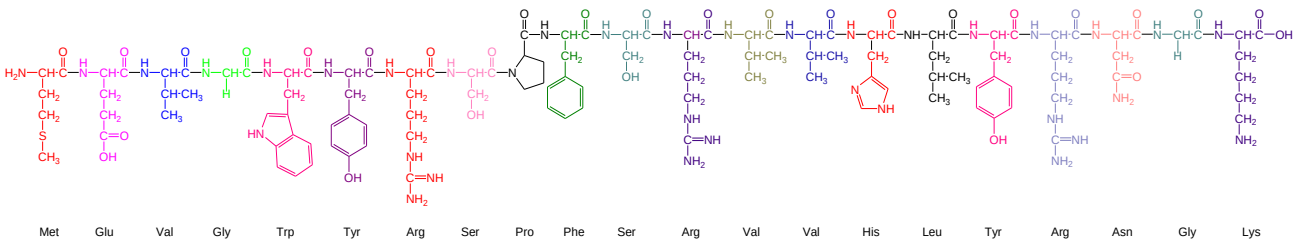
Στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η ταυτοποίηση της δομής βιοδραστικών πεπτιδίων και εφαρμογή Μοριακής Μοντελοποίησης για τη μελέτη της διαμορφωτικής τους ανάλυσης. Η ταυτοποίηση των δομών έγινε με συνδυαστική χρήση πειραμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Υπολογιστικής Χημείας.

Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκε η δομή των βιοδραστικών τριπεπτιδίων H_2N-LeuMetIle-COOH και H_2N-DLeuMetIle-COOH που πιθανά έχουν ευεργετική δράση κατά της κατάθλιψης, καθώς επίσης μελετήθηκε η διαμορφωτική τους ανάλυση



Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI)

Επίσης ταυτοποιήθηκε η δομή του επίτοπου πεπτιδίου MOG_{35-55} που εμπλέκεται στη σκλήρυνση κατά πλάκας και μελετήθηκε η διαμορφωτική του ανάλυση.



Δομή του επίτοπου MOG_{35-55}

Για τις μελέτες ταυτοποίησης και διαμορφωτικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα πειραμάτων μίας και δύο διαστάσεων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. που εκτελέστηκαν στο εργαστήριο του Καθηγητή Γ. Σπυρούλια. Η ελαχιστοποίηση των πεπτιδίων επιτεύχθηκε με το λογισμικό Maestro 9.9 της εταιρίας Schrödinger. Η Μοριακή Δυναμική των δύο τριπεπτιδίων επιτεύχθηκε με το λογισμικό Maestro 9.9 και του επίτοπου

πεπτιδίου MOG_{35-55} με το πρόγραμμα Amber 12.1. Στα δύο τριπεπτίδια εφαρμόστηκε Μοριακή Πρόσδεση με χρήση του λογισμικού Glide της εταιρίας Schrődinger.

Οι πληροφορίες που λήφθησαν από τη διαμορφωτική ανάλυση είναι κρίσιμες στην κατανόηση των φαρμακοφόρων τμημάτων των πεπτιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη βιολογική τους δράση.

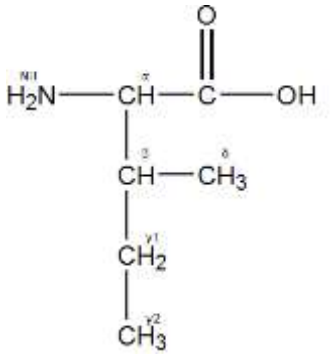
3.2 Πειραματικές Τεχνικές- Μεθοδολογία

Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά τα πειράματα φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δύο διαστάσεων. Περισσότερες πληροφορίες για τα πειράματα μπορούν να αντληθούν από τη βιβλιογραφία [34].

3.2.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δύο διαστάσεων (2D-NMR)

A) Το πείραμα TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

Ανήκει στα ομοπυρηνικά πειράματα δύο διαστάσεων συσχετισμού που μέσω αυτών ταυτοποιούνται γειτονικούς και μη γειτονικούς πυρήνες πρωτονίων. Η διαγώνιος αποτελείται από κορυφές που αντιστοιχούν στο μονοδιάστατο πείραμα, ενώ οι κορυφές εκτός διαγωνίου συσχετίζουν συζεύξεις μεταξύ γειτονικών και μη πρωτονίων μέσω δεσμού. Συγκεκριμένα στο φάσμα TOCSY, κατά τη διάρκεια της παλμικής ακολουθίας εφαρμόζεται "κλείδωμα" των σπιν (spin lock), με αποτέλεσμα η μαγνήτιση να διαδίδεται μέσω δεσμών σε όλο το σύστημα σπιν κάθε αμινοξέος στο μελετώμενο πεπτίδιο.



Ισολευκίνη, Ile

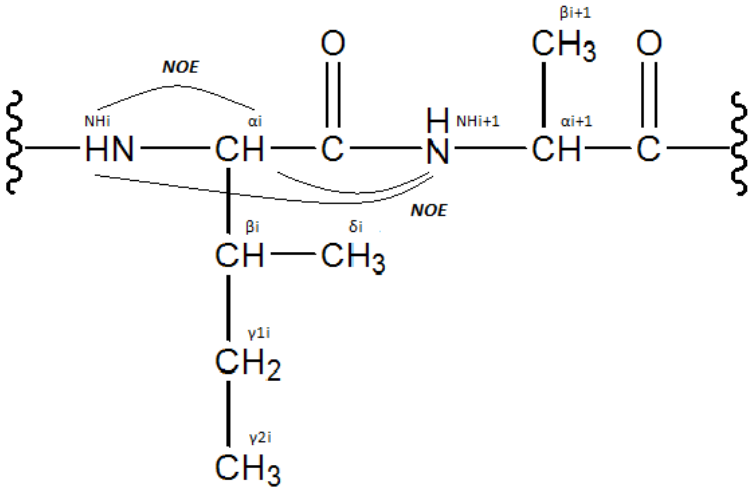
Συσχετισμοί TOCSY στο αμινοξύ της Ισολευκίνης

NH-α	NH-β	NH-γ1	NH-γ2	NH-δ
α-β	α-γ1	α-γ2	α-δ	
β-γ1	β-γ2	β-δ		
γ1-γ2	γ1-δ			
γ2-δ				

Σχήμα 3.1 Συσχέτιση πυρήνων πρωτονίων του αμινοξέος Ισολευκίνη στο πείραμα 2D-TOCSY στο οποίο παρατηρούνται και συζεύξεις μεγάλης εμβέλειας.

Β) Το πείραμα NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)

Το ομοπυρηνικό φάσμα 2D-NOESY στηρίζεται στο φαινόμενο NOE, εξαιτίας του οποίου μεταβάλλεται η ένταση απορρόφησης ενός πρωτονίου, όταν ακτινοβολείται ένα άλλο πρωτόνιο που βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα. Ουσιαστικά πραγματοποιείται μεταφορά μαγνήτισης μέσω του μηχανισμού αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτονίων προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη διαμόρφωση των πεπτιδίων. Ισχυρά NOE σήματα αντιστοιχούν σε αποστάσεις πυρήνων μέχρι 2,5 Å, μετρίας έντασης σήματα αντιστοιχούν σε αποστάσεις 2,5-3,7 Å,. ενώ οι ασθενείς NOE αλληλεπιδράσεις σε αποστάσεις από 3,7-5,0 Å.

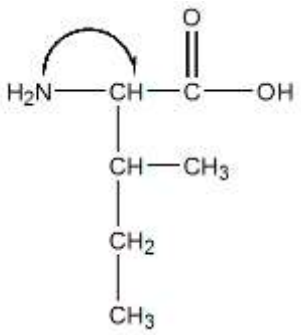


Ισολευκίνη, Ile *Αλανίνη, Ala*

Σχήμα 3.2 NOE αλληλεπιδράσεις του τύπου dNα(i,i), dαN(i,i+1) και dNN(i,i+1) που αναμένονται σε ένα φάσμα 2D NOESY του διπεπτιδίου, Ισολευκίνη-Αλανίνη (Ile-Ala).

Γ) Το πείραμα ^{15}N -^{1}H 2D-HSQC (Heteronclear Single Quantum Coherence)

Στο ετεροπυρηνικό φάσμα ^{15}N 2D-HSQC ανιχνεύονται οι ετεροπυρηνικές συζεύξεις $^{1}J_{N-H}$. Αφού γίνει επισήμανση του δείγματος με ^{15}N, το δείγμα ακτινοβολείται για να ληφθεί το φάσμα. Το πείραμα 2D-HSQC προκύπτει από την αλληλεπίδραση των πυρήνων ^{15}N με τα ^{1}H μέσω μεταφοράς μαγνήτισης από τον ένα πυρήνα στον άλλο κατά την αποδιέγερση, αλλά και με σύζευξη μεταξύ τους



Σχήμα 3.3 Συσχέτιση πυρήνων στο ^{15}N -^{1}H 2D-HSQC αζώτου-πρωτονίου του αμινοξέος Ισολευκίνη

3.2.2 Μέθοδοι Υπολογιστικής Χημείας

Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά οι μέθοδοι υπολογιστικής Χημείας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Περισσότερες πληροφορίες για τις μεθόδους μπορούν να αντληθούν από τη βιβλιογραφία [35].

Α) Ελαχιστοποίηση Ενέργειας

Η δυναμική ενέργεια ενός μορίου είναι συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων του. Η διευθέτηση των ατόμων ενός μορίου στο χώρο που αντιστοιχεί στη μικρότερη για τα μόρια δυναμική ενέργεια είναι και η περισσότερο σταθερή διαμόρφωση. Ένα μόριο Ν ατόμων προσδιορίζεται από 3Ν καρτεσιανές συντεταγμένες (ή 3Ν-6 εσωτερικές) και αυτές ορίζουν την πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (PES Potential Energy Surface). Κάθε ένα σημείο της επιφάνειας αντιστοιχεί σε μία διαμόρφωση του μορίου που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Σε μια επιφάνεια ενέργειας μπορεί να υπάρχουν πολλά ενεργειακά ελάχιστα (τοπικά ελάχιστα). Αυτό που θα αντιστοιχεί στη μικρότερη ενέργεια όλων είναι γνωστό ως το ολικό ελάχιστο. Στη Μοριακή Μοντελοποίηση εφαρμόζονται οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας (minimization algorithms), προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των διευθετήσεων των ατόμων του μορίου οι οποίες αντιστοιχούν στα σημεία της επιφάνειας με τη χαμηλότερη ενέργεια. Υπάρχουν πολλοί αλγόριθμοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτό το σκοπό και συνηθέστερο κριτήριο επιλογής του κατάλληλου είναι ο χρόνος που απαιτείται για να προσεγγισθεί το τοπικό ενεργειακό ελάχιστο. Οι αλγόριθμοι αυτοί χρησιμοποιούν την εναρκτήρια διαμόρφωση του μορίου. Η ενέργεια της εναρκτήριας διαμόρφωσης μέσω της χρήσης αλγόριθμου 'κατέρχεται' την επιφάνεια ενέργειας και σταματά στο πρώτο ενεργειακό ελάχιστο. Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας κατατάσσονται ανάλογα με την τάξη

τους, δηλαδή ανάλογα με τη μεγαλύτερη παράγωγο της συνάρτησης που χρησιμοποιείται σε κάθε αλγόριθμο. Στους αλγόριθμους πρώτης 'τάξης' γίνεται χρήση της πρώτης παραγώγου. Οι κυρίως χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι πρώτης τάξεως είναι ο αλγόριθμος Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descend) και ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient). Η διαφορά τους εντοπίζεται στο σημείο έναρξης, όπου για τον αλγόριθμο Βαθμιδωτής Σύζευξης κάθε βήμα προκύπτει από το αμέσως προηγούμενο, ενώ για τον αλγόριθμο βαθύτατης κατάδυσης δε λαμβάνεται υπόψη καμία πληροφορία από το προηγούμενο βήμα.

Β) Μοριακή Πρόσδεση

Ενα από τα συχνά χρησιμοποιούμενα λογισμικά μοριακής πρόσδεσης είναι το Glide της εταιρίας Schrödinger. Ο υποδοχέας μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη ή ένας μη πρωτεϊνικός συμπαράγοντας. Η μοριακή πρόσδεση με το Glide μπορεί να γίνει θεωρώντας τον προσδέτη άκαμπτο ή εύκαμπτο, ενώ ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων). Εάν επιλεγεί ο προσδέτης να είναι άκαμπτος τότε αυτός προσδένεται στον υποδοχέα ως έχει, ενώ εάν επιλεγεί να είναι εύκαμπτος δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει πριν ξεκινήσει η πρόσδεση. Η θέση και ο προσανατολισμός κάθε προσδέτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ονομάζεται 'πόζα' (pose). Οι αρχικές διαμορφώσεις που δημιουργούνται από τη χρήση του προγράμματος περνούν μέσα από μια σειρά φίλτρων ιεράρχησης που εκτιμούν και αξιολογούν την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Τα αρχικά φίλτρα ελέγχουν το μέγεθος του προσδέτη και τη συμπληρωματικότητα των αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χρησιμοποιώντας μια μέθοδο πλέγματος (grid based) βασισμένη στην εμπειρική συνάρτηση. Στον αλγόριθμο Glide, θεωρώντας δεδομένη την ευκαμψία του προσδέτη, πραγματοποιείται εκτεταμένη αναζήτηση διαμορφώσεων και απορρίπτονται οι διαμορφώσεις που δεν προσαρμόζονται στην πρωτεϊνική κοιλότητα που μελετάται.

Κατά τη μοριακή πρόσδεση, το εύκαμπτο τμήμα του μορίου προσαρμόζεται στο ενεργό κέντρο δημιουργώντας ένα σύνολο πιθανών διαμορφώσεων, οι οποίες στη συνέχεια αξιολογούνται από το λογισμικό ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους. Οι διαμορφώσεις με την ευνοϊκότερη ικανότητα πρόσδεσης, με βάση τα φίλτρα αξιολόγησης του προγράμματος, ελαχιστοποιούνται ενεργειακά και επανεξετάζονται ως προς τις γωνίες των δεσμών τους με σκοπό να βρεθεί μια ακόμη πιο ευνοϊκή ενεργειακά διαμόρφωση. Στη συνέχεια, το σύνολο των δομών με την πιο ικανοποιητική ενεργειακά διαμόρφωση

αξιολογείται από τη συνάρτηση GlideScore (GS) και λαμβάνει την τελική βαθμολογία πρόσδεσης GS.

Γ) Μοριακή Δυναμική

Στη μεθοδολογία της μοριακής δυναμικής, το μόριο αρχικά ελαχιστοποιείται, έπειτα θερμαίνεται σταδιακά μέχρι να φτάσει μια τελική θερμοκρασία και στη συνέχεια αφήνεται να έρθει σε ισορροπία. Η θερμοκρασία που δίδεται στο σύστημα αυξάνει την κινητική του ενέργεια με αποτέλεσμα αυτό να μπορεί να υπερπηδήσει τα ενεργειακά φράγματα και συνεπώς να είναι δυνατή η μελέτη διαφορετικών περιοχών της επιφάνειας της Δυναμικής Ενέργειας. Μια τεχνική που χρησιμοποιείται σε αυτή την κατηγορια για τη διερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου είναι η ηψηλής θερμοκρασίας ανόπτηση μοριακής δυναμικής (Simulated Annealing) [36]. Η διαδικασία που ακολουθείται με χρήση αυτής της τεχνικής χωρίζεται σε κύκλους. Κάθε κύκλος ξεκινά με αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος έως ένα μέγιστο που έχουμε ορίσει, ώστε να αυξηθεί η κινητική ενέργεια του μορίου, να υπάρξει ελεύθερη περιστροφή των δεσμών και να υπερπηδήσει τα μόριο τα ενεργειακά φράγματα. Η θερμοκρασία αυτή παραμένει σταθερή για κάποιο διάστημα έως ότου το μόριο αναδιευθετηθεί σε μια νέα διαμόρφωση. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται και με χρήση αλγόριθμου ελαχιστοποίησης λαμβάνεται ένα τοπικό ελάχιστο, καταγράφεται η τελική διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας και έτσι ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της διαδικασίας. Η πορεία αυτή επαναλαμβάνεται και για τους υπόλοιπους κύκλους. Η αυξομείωση της θερμοκρασίας και ο χρόνος προσομοίωσης εξαρτάται από το υπό μελέτη σύστημα, καθώς αν η προσομοίωση γίνει σε εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία υπάρχει πιθανότητα να παραμορφωθεί η γεωμετρία του μορίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

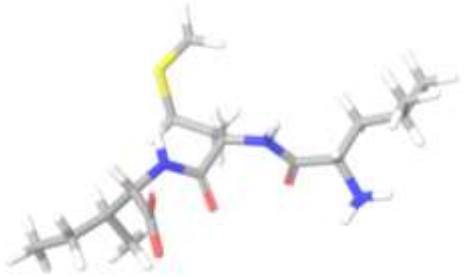
&

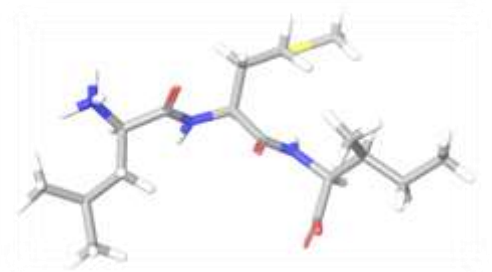
ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΤΩΝ

ΤΡΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

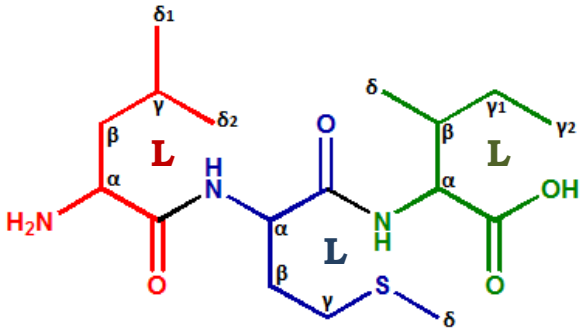
LeuMetIle & DLeuMetIle





4.1 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου H-LeuMetIle-OH σε H_2O/d_6-DMSO (9:1)

Η πλήρης ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού του ^{1}H NMR φάσματος του τριπεπτιδίου LeuMetIle (Σχήμα 4.9) σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) βασίστηκε στη συνδυασμένη χρήση 2D ^{1}H-^{15}N HSQC,^{13}C HSQC, 2D TOCSY, 2D NOESY και 1D ^{1}H NMR. Επιπλέον, χρήσιμο εργαλείο για την πορεία της ταυτοποίησης αποτέλεσε κι ο Πίνακας 4.1 [37]., ο οποίος εμπεριέχει τις θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων για κάθε αμινοξύ ξεχωριστά σε δευτεριωμένο ύδωρ.



Σχήμα 4.1 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI).

Πίνακας 4.1: Κατά προσέγγιση χημικές μετατοπίσεις για τα 3 φυσικά αμινοξέα σε D_2O[5]

Αμινοξέα	NH	αH	βH	Άλλα
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH_2 1.48, 1.19 γCH_3 0.95 δCH_3 0.89
Leu	8.42	4.38	1.65	γCH 1.64 δCH_3 0.94, 0.90
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2 2.64 δCH_2 2.13

Η στρατηγική ταυτοποίησης που ακολουθήθηκε βήμα προς βήμα δείχνεται στο Σχήμα 4.2

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

1ο Βήμα **2ο Βήμα** **3ο Βήμα**

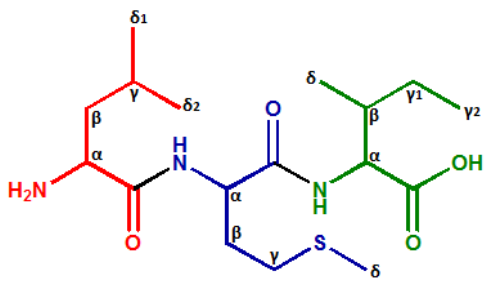
^{15}N HSQC —(2D TOCSY, Πίνακας 1.1)→ CONH (Met) —(2D TOCSY, Πίνακας 1.1)→ H α, β, γ, δ (Met)

^{15}N HSQC —(2D TOCSY, Πίνακας 1.1)→ CONH (Ile) —(2D TOCSY, Πίνακας 1.1)→ H α, β , γ1, γ2, δ (Ile) —(2D HSQC [γ1 (CH_2)])→ γi γii (Ile)

4ο Βήμα (ταυτοποίηση εναπομένοντος αμινοξέος. Leu)

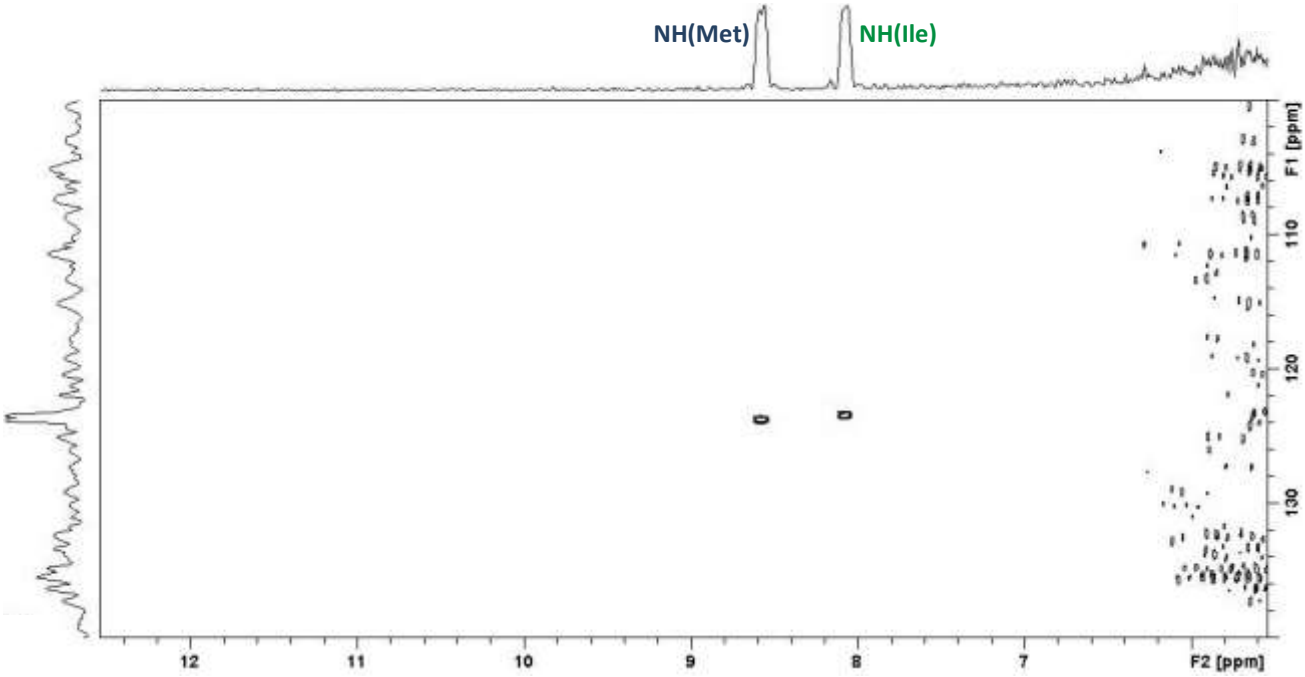
2D TOCSY —(^{1}H-NMR (0.00-1.00ppm), Πίνακας 1.1)→ H $^{2\delta}$ (Leu) (0.84ppm) + H $^{\gamma 2}$ (Ile) (0.80ppm)

H $^{2\delta}$ (Leu) —(2D TOCSY, Πίνακας 1.1)→ H α, β, γ (Leu)



Σχήμα 4.2 Απεικόνιση Στρατηγικής Ταυτοποίησης.

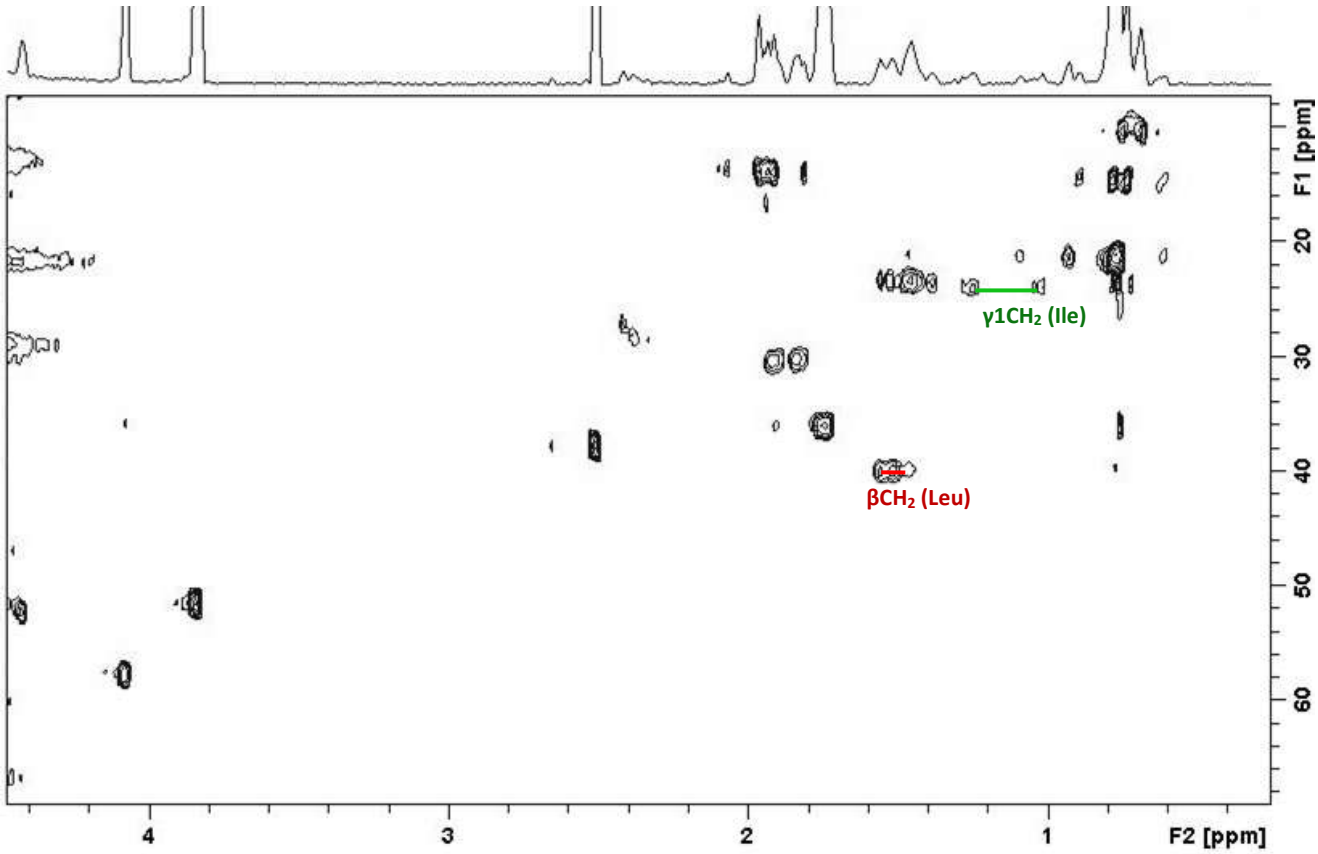
Όπως παριστάνεται στο Σχήμα 4.2 η πορεία ταυτοποίησης αρχίζει από τη περιοχή NH του φάσματος ^{1}H NMR. Στις συνθήκες υπό τις οποίες ελήφθησαν τα φάσματα εμφανίζονται δύο οξείες κορυφές με μεγαλύτερες τιμές του 8.00 ppm, οι οποίες σύμφωνα με το φάσμα ^{15}N HSQC (Σχήμα 4.3) σε συνδυασμό με τον Πίνακα 4.1 και το φάσμα TOCSY αντιστοιχούν στις αμινομάδες της μεθειονίνης (Met^{2}) και της ισολευκίνης (Ile^{3}) (βλ. Πίνακα 4.1). Τα πρωτόνια της τελικής αμινομάδας της Λευκίνης (Leu^{1}) δεν συντονίζονται στα φάσματα.



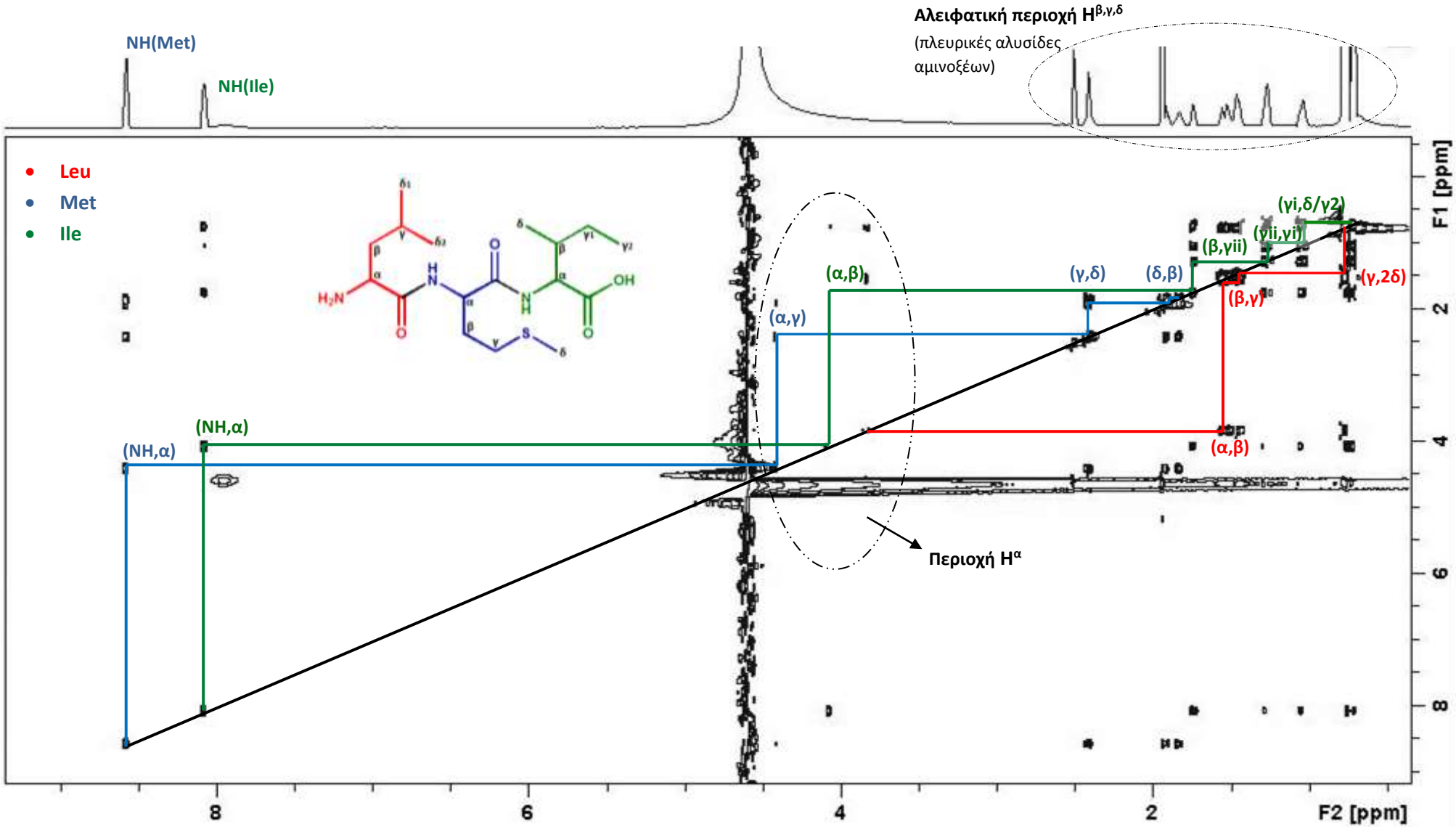
Σχήμα 4.3 Φάσμα ^{15}N HSQC του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.

Το επόμενο βήμα για την ταυτοποίηση των αλληλουχιών των αμινοξέων του πεπτιδίου πραγματοποιείται με τη βοήθεια του φάσματος 2D TOCSY (Σχήμα 4.5), όπου παρατηρούνται συσχετίσεις ανάμεσα σε πρωτόνια του ίδιου αμινοξέος. Κατά συνέπεια, αφού κάθε αλληλουχία πρωτονίων στο φάσμα 2D TOCSY αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ μπορούν να ταυτοποιηθούν τα πρωτόνια H^{α}, H^{β}, H^{γ} και H^{δ} κάθε αμινοξέος. Συγκεκριμένα στην περιοχή από 0,00 έως 2,50 ppm (αλειφατική περιοχή), εμφανίζονται οι κορυφές των $H^{\beta,\gamma,\delta}$ των πλευρικών αλυσίδων κάθε αμινοξέος, ενώ στην περιοχή κοντά στα 4,00 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των H^{α} κάθε αμινοξέος. Από τον Πίνακα 4.1, παρατηρείται ότι όλα τα πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας της Μεθειονίνης εντοπίζονται σε περιοχή μεγαλύτερη από 2 ppm, γεγονός που επαληθεύεται και στο φάσμα 2D TOCSY κι αποδεικνύει ότι στην περιοχή NH, η πιο αποθωρακισμένη κορυφή αντιστοιχεί στην αμινομάδα της Μεθειονίνης [NH (Met)].

Η ταυτοποίηση συνεχίζεται με το φάσμα 2D HSQC (Σχήμα 4.4), στο οποίο τα σημεία διασταύρωσης αντιστοιχούν σε αλληλεπίδραση ενός ατόμου άνθρακα με το πρωτόνιο με το οποίο συνδέεται μέσω δεσμού. Από τα $H^{\alpha,\beta,\gamma..}$ φέρνοντας τις οριζόντιες γραμμές βρίσκεται το σημείο τομής με τον άξονα των απορροφήσεων συντονισμού. το οποίο αντιστοιχεί στη συχνότητα συντονισμού του πυρήνα $C^{\alpha,\beta,\gamma...}$. Συγκεκριμένα, εξετάσθηκαν πρωτόνια με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις που βρίσκονται στον ίδιο άνθρακα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.4, οι κορυφές στα 1,13 και 1,35 ppm εμφανίζουν σημείο διασταύρωσης στον ίδιο άνθρακα, που σημαίνει ότι το δίδυμο ζεύγος πρωτονίων παρουσιάζει διαφορετική χημική μετατόπιση γιατί είναι διαστερεοτοπικά, βρίσκονται δηλαδή δίπλα από χειρόμορφο κέντρο. Με τη βοήθεια του 2D TOCSY και του Πίνακα 4.1 διαπιστώνεται ότι το ζεύγος αυτό ανήκει στο αμινοξύ της Ile στη θέση γ1. Επιπλέον, στα 1,60 και 1,64 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στην αιθυλενομάδα της Λευκίνης στη θέση β. Τα δύο υδρογόνα είναι επίσης διαστεροτοπικά γιατί γειτνιάζουν με χειρόμορφο κέντρο.

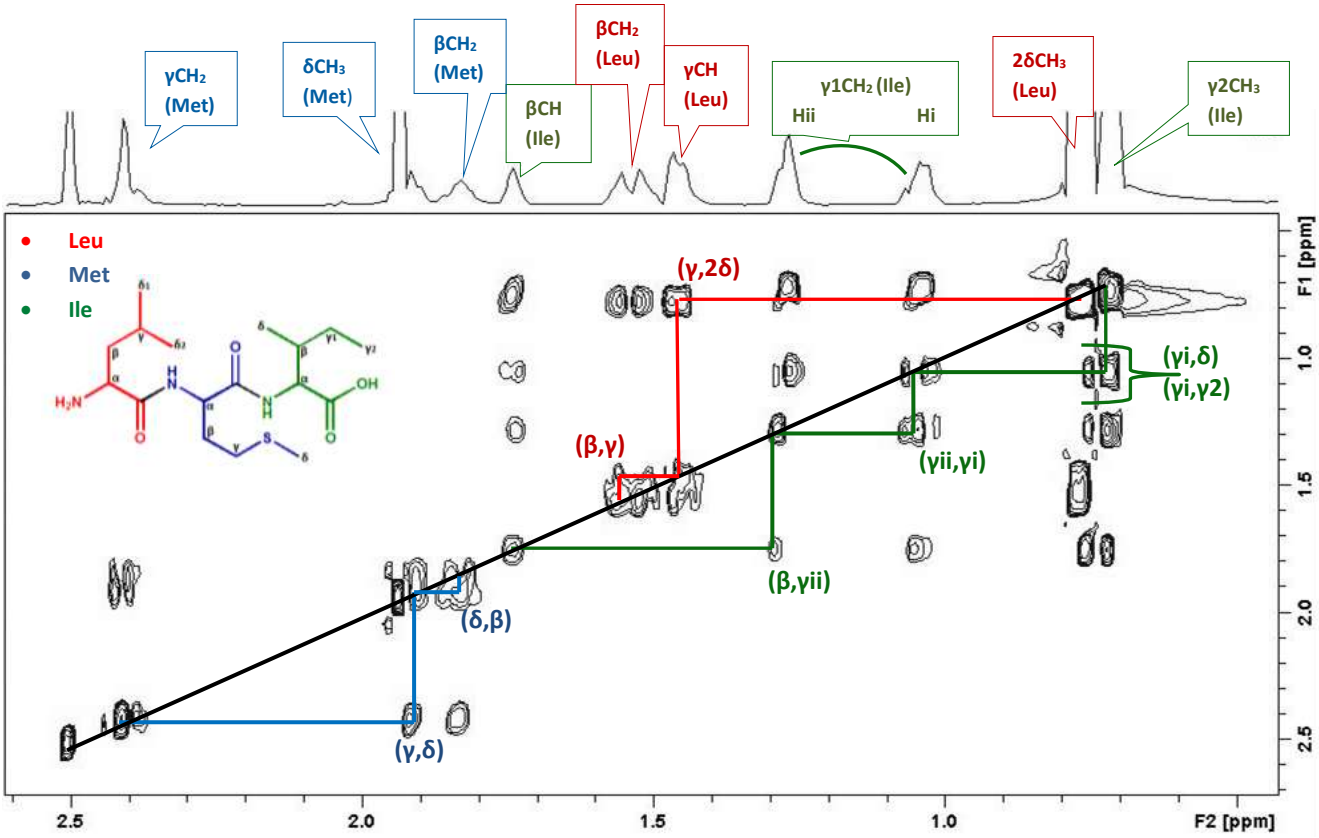


Σχήμα 4.4 Φάσμα 2D HSQC του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25ºC.



Σχήμα 4.5 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25ºC.

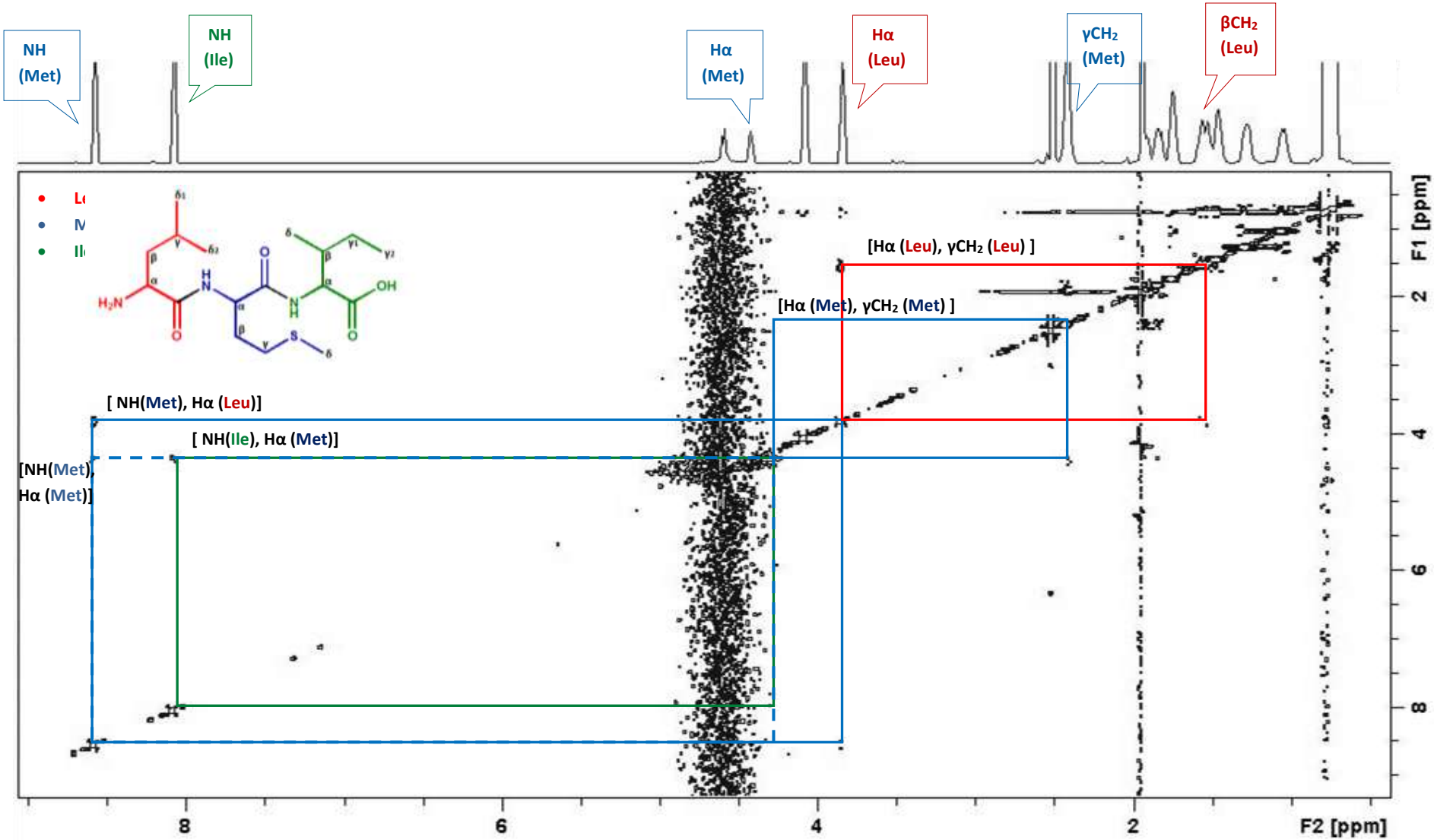
Έχοντας συλλέξει πληροφορίες από τα φάσματα ^{1}H NMR, ^{1}H-^{15}N HSQC, ^{13}C HSQC, 2D TOCSY και με τη βοήθεια του Πίνακα 4.1 που περιέχει κατά προσέγγιση χημικές μετατοπίσεις των $H^{\alpha,\beta,\gamma}$ κάθε αμινοξέος, ελέγχθηκε και ταυτοποιήθηκε κάθε κορυφή ξεχωριστά. Μελετώντας το φάσμα 2D TOCSY (Σχήμα 4.6), στην περιοχή 0,80-0,84 ppm εμφανίζονται δύο οξείες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα μεθύλια των αμινοξέων Leu και Ile. Σύμφωνα με το 2D TOCSY, τα λιγότερο θωρακισμένα είναι τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων του αμινοξέος της Leu. Στη μικρότερη χημική μετατόπιση εμφανίζονται τα δύο μεθύλια (γ και δ) της Ile. Τέλος με τη βοήθεια τον Πίνακα 4.1 ταυτοποιήθηκαν και τα υπόλοιπα πρωτόνια ($H^{\beta,\gamma,\delta}$) των πλευρικών αλυσίδων κάθε αμινοξέος στην αλειφατική περιοχή του φάσματος 2D TOCSY (0,0 έως 2,50 ppm), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.6 παρακάτω.



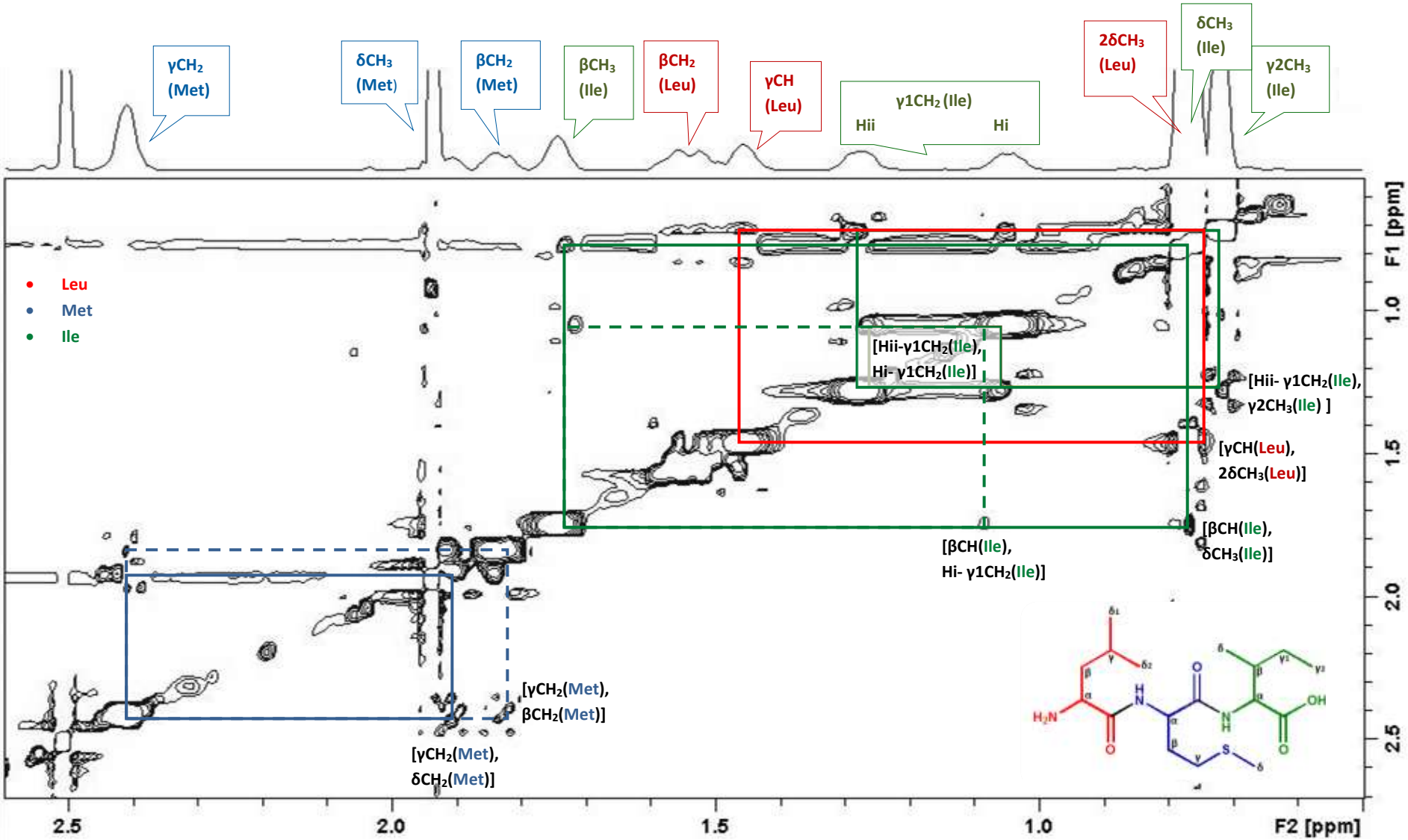
Σχήμα 4.6 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή.

Στη συνέχεια, για να ελεγχθεί και να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση, μελετήθηκε το φάσμα 2D NOESY (Σχήματα 4.7 και 4.8), στο οποίο παρατηρούνται τόσο οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων του ίδιου αμινοξέος, όσο και μεταξύ πρωτονίων διαδοχικών αμινοξέων ή διαφορετικά συζεύξεις μεταξύ πρωτονίων που απέχουν μικρότερη απόσταση από 5Å. Από τα φάσματα 2D NOESY δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των πλευρικών

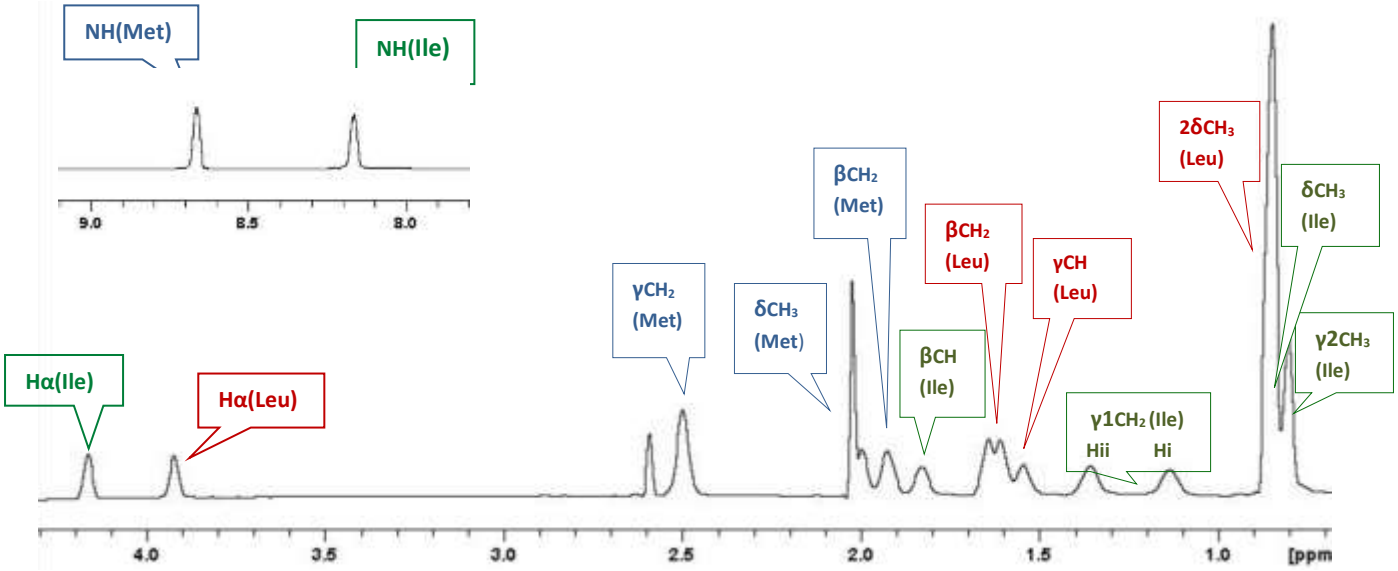
αλυσίδων. Αυτό δηλώνει ότι η διαμόρφωση του τριπεπτιδίου είναι «ανοιχτή» αφού δεν υπάρχει γειτνίαση μεταξύ των πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων από κάθε αμινοξύ. Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζεται το φάσμα ^{1}H-NMR του τριπεπτδίου με επισημασμένη την ταυτότητα κάθε κορυφής ξεχωριστά. Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας (Πίνακας 4.2) με τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.



Σχήμα 4.7 Φάσμα 2D NOESY (400ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25ºC.



Σχήμα 4.8 Φάσμα 2D NOESY του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην περιοχή 0,00-2,50 ppm.



Σχήμα 4.9 Φάσμα ^{1}H NMR του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.

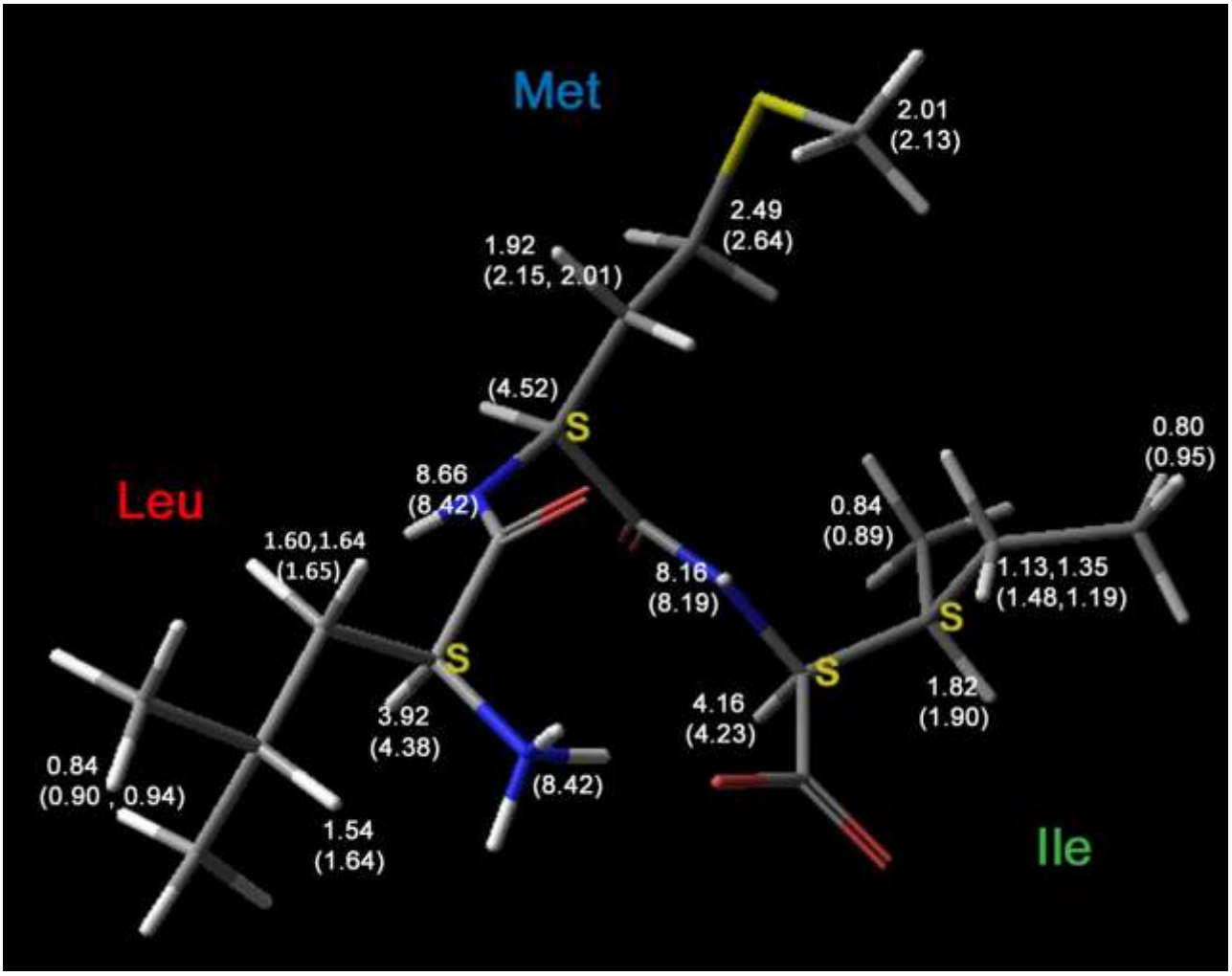
Πίνακας 4.2: Χημικές μετατοπίσεις ^{1}H του πεπτιδίου LeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO (δ^1_H=4.70). Σε παρένθεση εμφαίνονται οι τιμές σε διαλύτη D_2O.

Αμινοξέα	NH	αH	βH	Άλλα	
Leu^1	- (8.42)	3.92 (4.38)	1.60, 1.64 (1.65)	γCH	1.54 (1.64)
				δCH$_3$	0.84 (0.90,0.94)
Met^2	8.66 (8.42)	** (4.52)	1.92 (2.15, 2.01)	γCH$_2$	2.49 (2.64)
				δCH$_3$	2.01 (2.13)
Ile^3	8.16 (8.19)	4.16 (4.23)	1.82 (1.90)	γCH$_2$	1.13, 1.35 (1.48, 1.19)
				γCH$_3$	0.80 (0.95)
				δCH$_3$	0.84 (0.89)

** Η χημική μετατόπιση επικαλύπτεται με το σήμα νερού στο φάσμα ^{1}H NMR.

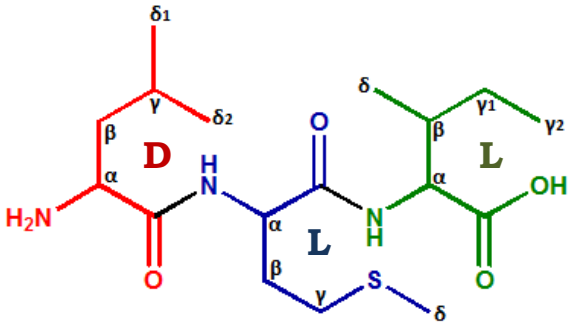
Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος Maestro σχεδιάστηκε η πιθανή τρισδιάστατη δομή του τριπεπτιδίου NH_2-LeuMetIle-COOH (Σχήμα 4.10), όπου

αναγράφονται οι θεωρητικές και οι πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.



Σχήμα 4.10 Δομή του πεπτιδίου H-LeuMetIle-OH με τις θεωρητικές και πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.

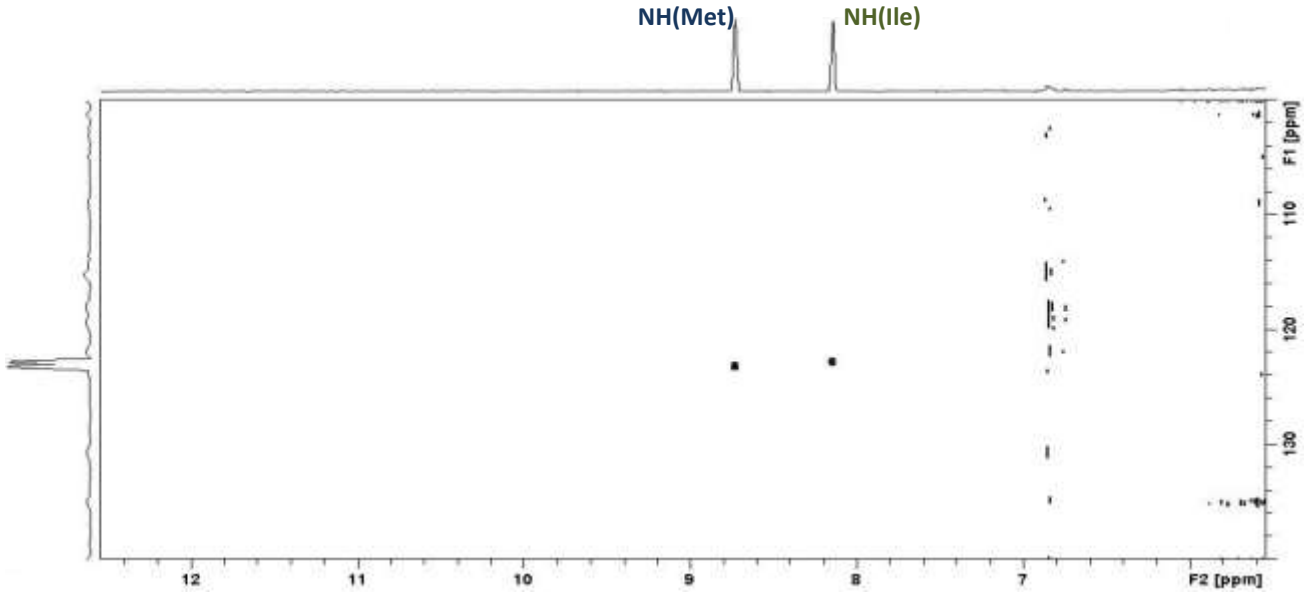
4.2 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου H-DLeuMetIle-OH σε H_2O/d_6-DMSO (9:1)



Σχήμα 4.11 Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI).

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για το τριπεπτίδιο LeuMetIle. επιτεύχθηκε κι η ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού του ^{1}H-NMR φάσματος του διαστερεομερούς του. D-LeuMetIle. σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1). Όπως και πριν, έγινε συνδυασμένη χρήση 2D TOCSY, 2D NOESY, ^{1}H-^{15}N HSQC και ^{13}C HSQC πειραμάτων, καθώς και του Πίνακα 4.1 που περιέχει τις προσεγγιστικές χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων κάθε αμινοξέος. Ακολουθήθηκε η ίδια στρατηγική ταυτοποίησης, όπως και πριν (Σχήμα 4.2).

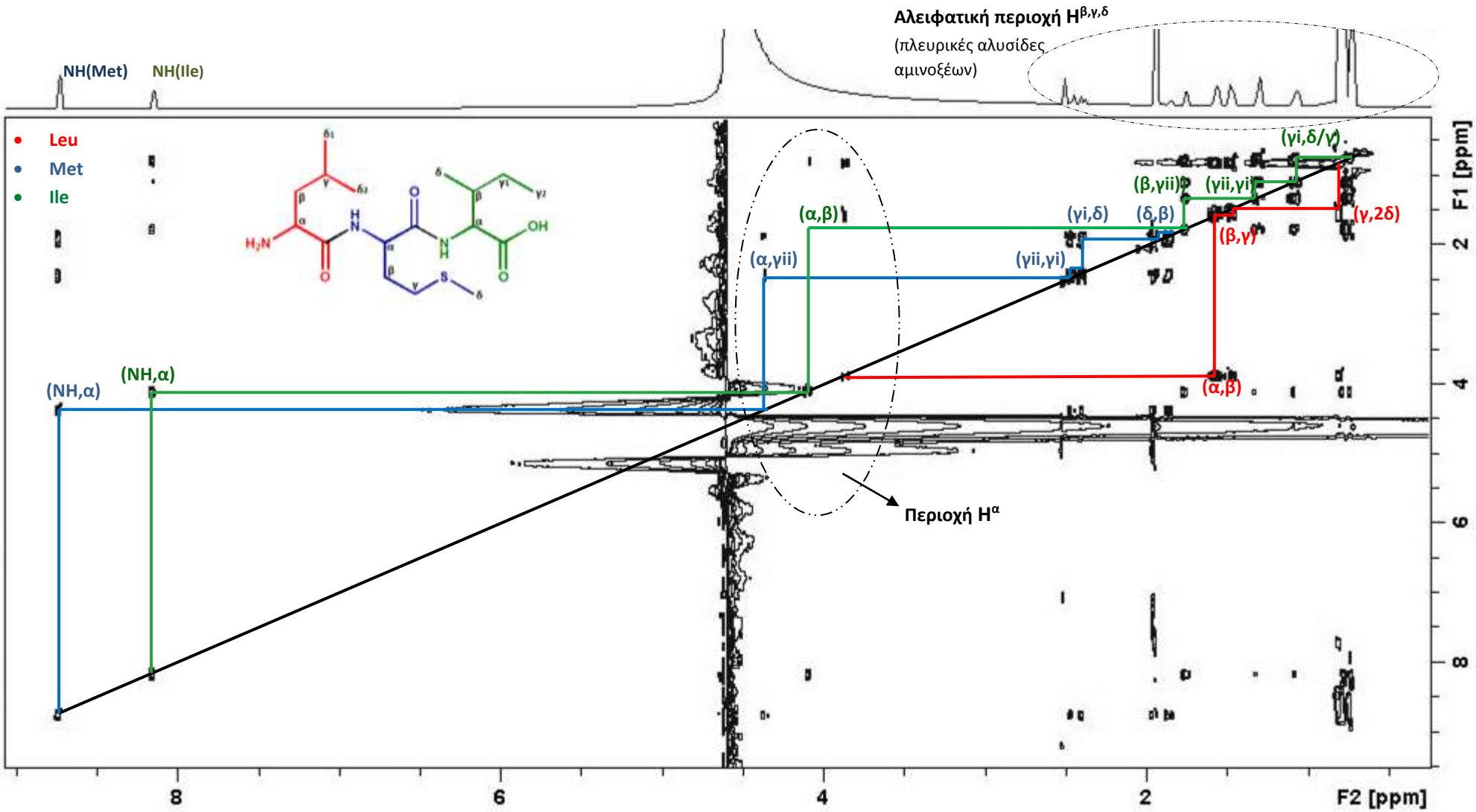
Η πορεία ταυτοποίησης αρχίζει με το φάσμα ^{15}N HSQC (Σχήμα 4.12) σε συνδυασμό με το 2D TOCSY και τη περιοχή NH του φάσματος ^{1}H NMR στην περιοχή 7,00- 8,00 ppm, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια των αμινομάδων της μεθειονίνης (Met^2) και της ισολευκίνης (Ile^3). Τα πρωτόνια της τελικής αμινομάδας της Λευκίνης (Leu^1) δεν συντονίζονται στα φάσματα.



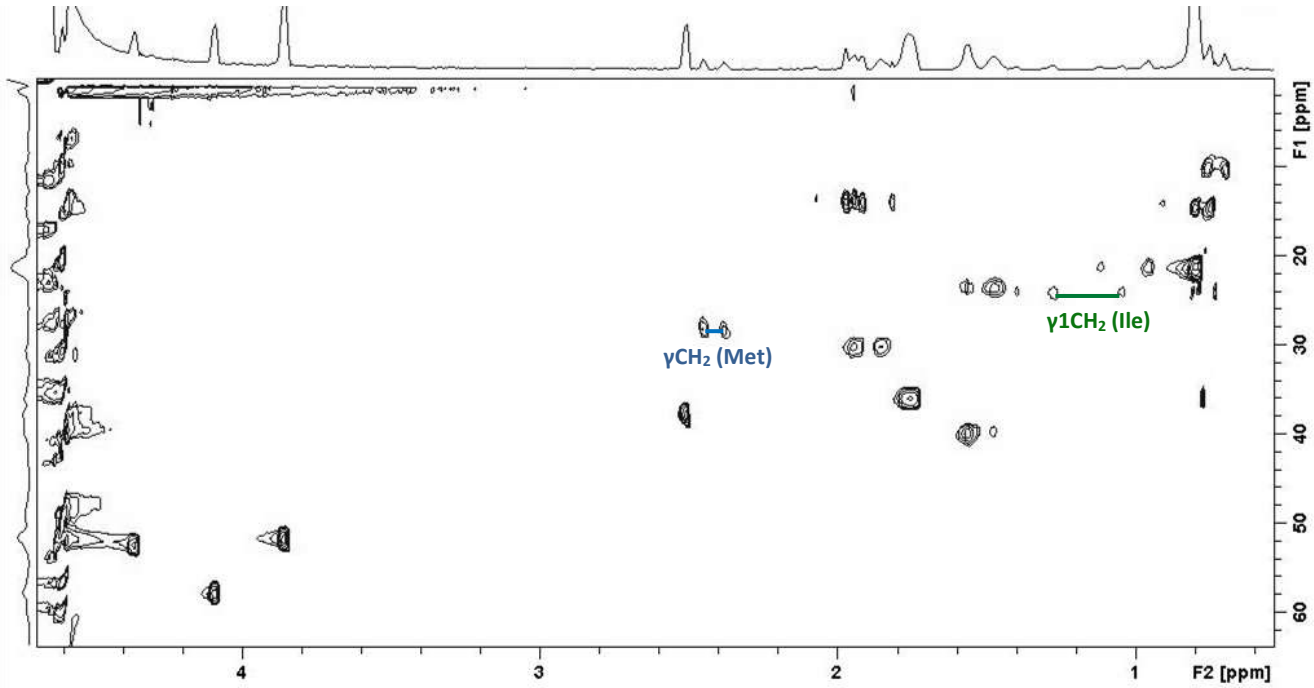
Σχήμα 4.12 Φάσμα ^{1}H-^{15}N-HSQC του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.

Στην συνέχεια. με τη βοήθεια του φάσματος 2D TOCSY (Σχήμα 4.13), παρατηρήθηκαν οι συσχετίσεις ανάμεσα σε πρωτόνια του ίδιου αμινοξέος και ομαδοποιήθηκαν οι κορυφές των πρωτονίων για κάθε αμινοξύ ξεχωριστά. Με χρήση των πληροφοριών από το φάσμα 2D TOCSY σε συνδυασμό με τον πίνακα 4.1 ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια H^{α}, H^{β}, H^{γ} και H^{δ} (αλειφατική περιοχή) κάθε αμινοξέος.

Στο επόμενο βήμα ελέγχθηκε το φάσμα 2D HSQC (Σχήμα 4.14) για να εντοπιστούν τυχόν συσχετίσεις πρωτονίων που βρίσκονται στον ίδιο άνθρακα. Όπως και πριν, εντοπίστηκε το δίδυμο ζεύγος πρωτονίων στη θέση γ1 της Ile και μία ακόμα σύζευξη στα 2,53 και 2,48 ppm. που έδειξε τα δύο πρωτόνια της αιθυλενομάδας της Μεθειονίνης στη θέση γ [γCH_2 (Met)].



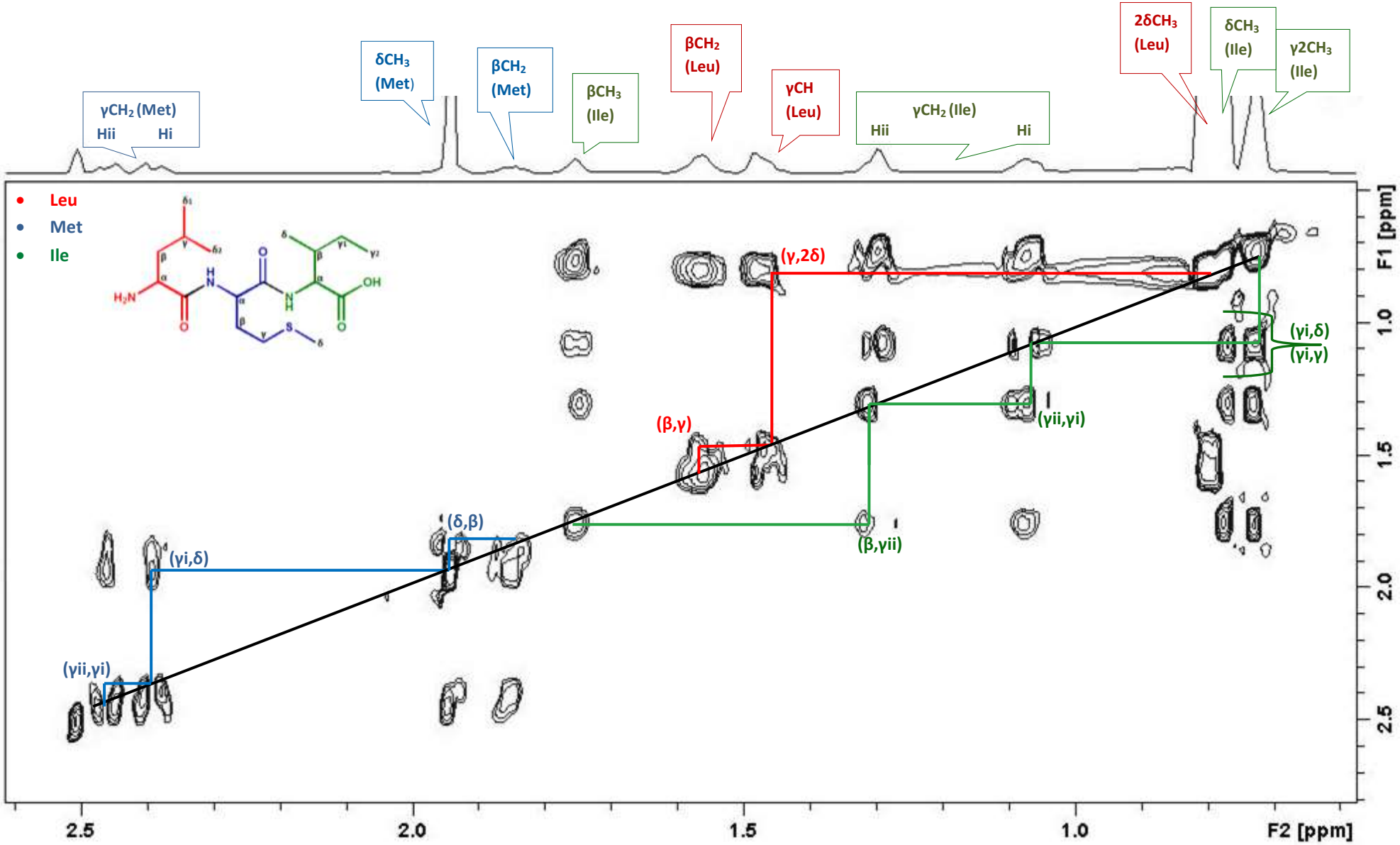
Σχήμα 4.13 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°.



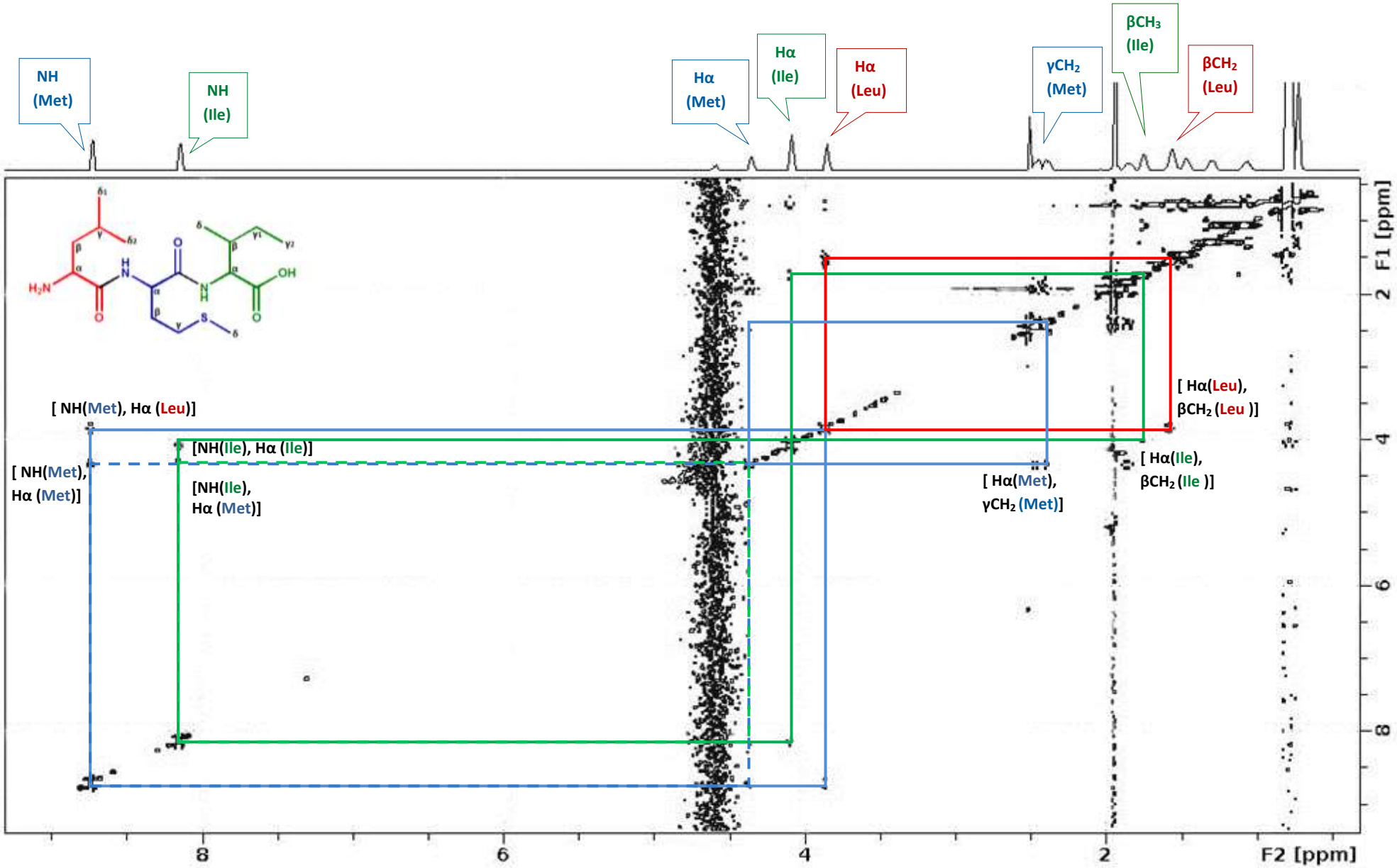
Σχήμα 4.14 Φάσμα 2D HSQC του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25ºC.

Η ταυτοποίηση προχώρησε με εκτενή ανάλυση του φάσματος 2D TOCSY, κυρίως στην αλειφατική περιοχή που εντοπίζονται τα πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας κάθε αμινοξέος. Σε συνδυασμό με τον Πίνακα 4.1 ταυτοποιήθηκαν σε πρώτο επίπεδο οι κορυφές κάθε αμινοξικής αλληλουχίας. Στο Σχήμα 4.15 εμφανίζονται αναλυτικά οι συζεύξεις στο φάσμα 2D TOCSY και η ταυτότητα κάθε κορυφής ξεχωριστά.

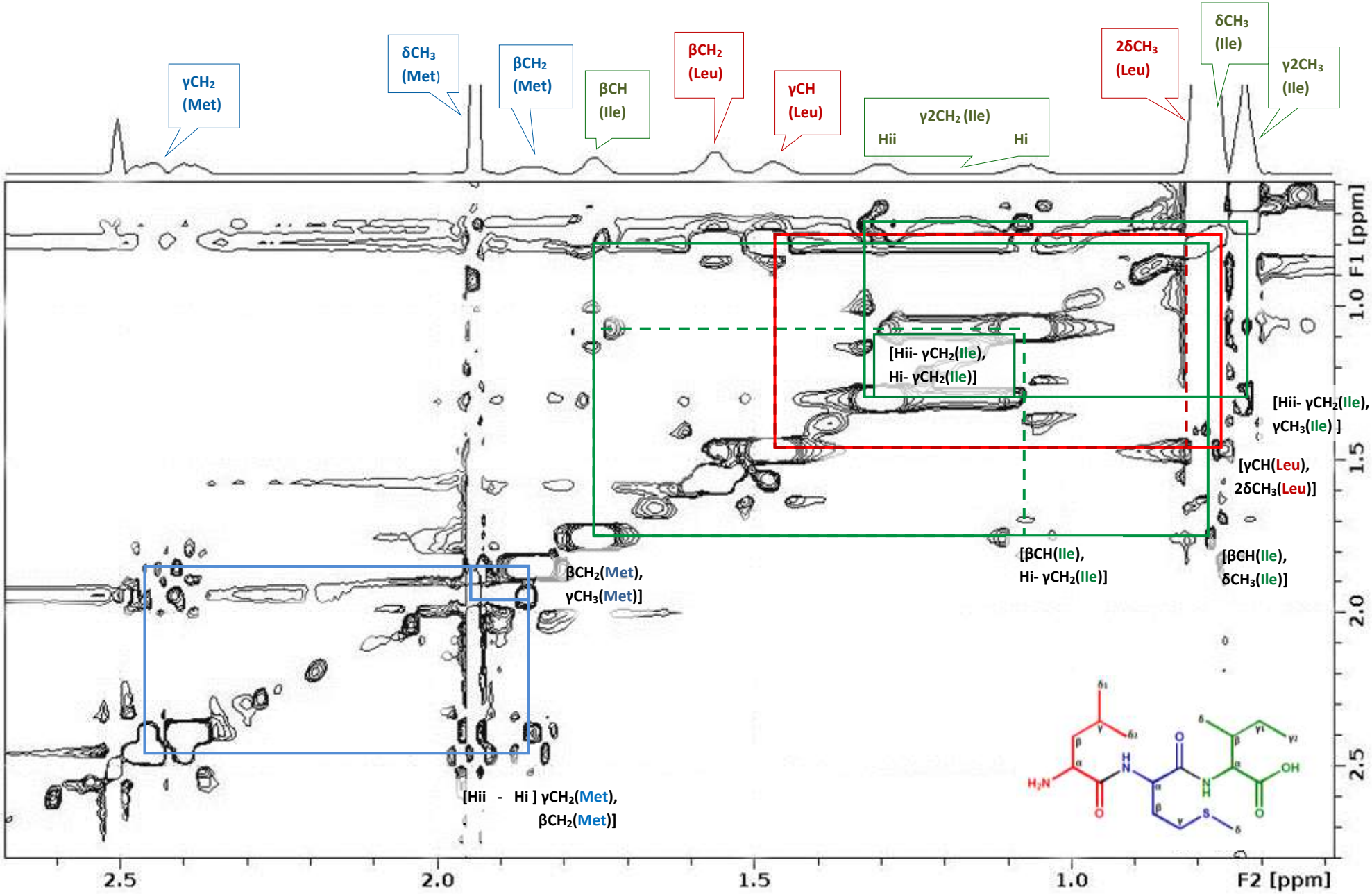
Στο τελευταίο στάδιο, όπως και πριν, μελετήθηκε το φάσμα 2D NOESY (Σχήμα 4.16 και 4.17), έτσι ώστε να ελεγχθεί και να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση. Το 2D NOESY επιβεβαίωσε τις αρχικές υποθέσεις κι έδωσε επιπλέον πληροφορίες για τη δομή του τριπεπτιδίου D-LeuMetIle στο χώρο. Όπως και προηγουμένως. η μελέτη του φάσματος έδειξε ότι η διαμόρφωση του τριπεπτιδίου είναι ανοιχτή και δεν υπάρχει γειτνίαση μεταξύ των πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων από κάθε αμινοξύ. Παρακάτω, παρατίθεται πλήρως ταυτοποιημένο το φάσμα ^{1}H NMR (Σχήμα 4.18) του τριπεπτιδίου και ακολουθεί αναλυτικός πίνακας (Πίνακας 4.3) με τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων.



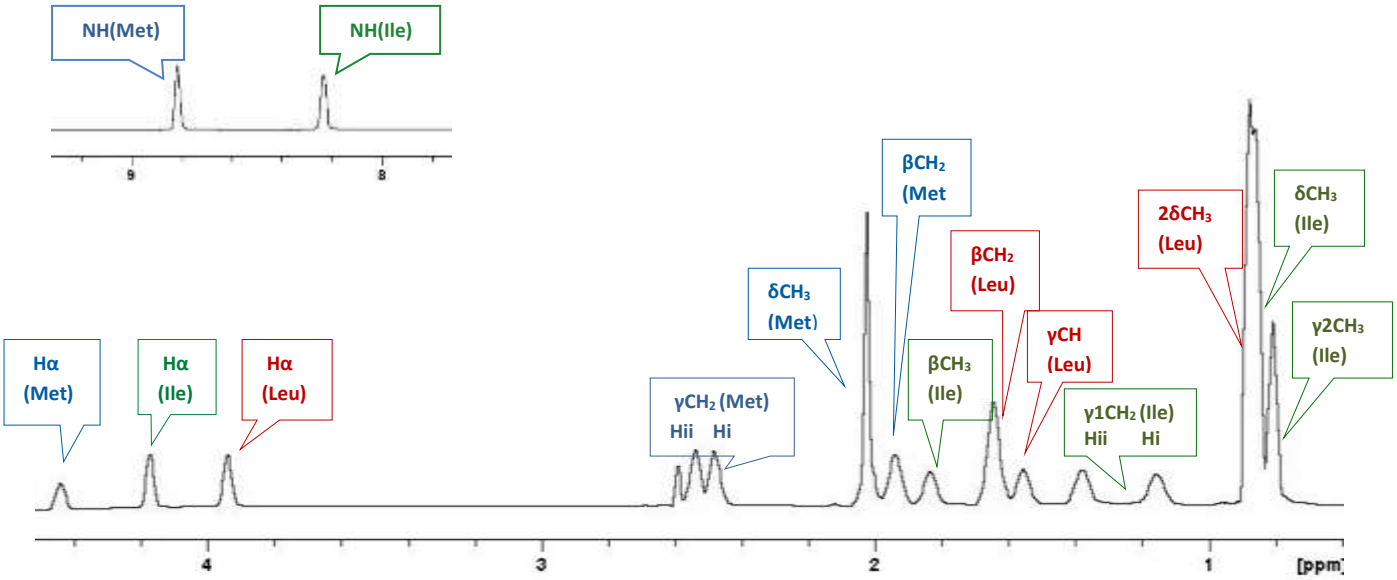
Σχήμα 4.15 Φάσμα 2D TOCSY του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή.



Σχήμα 4.16 Φάσμα 2D NOESY (400ms) του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.



Σχήμα 4.17 Φάσμα 2D NOESY του τριπεπτιδίου DLeuMetIle στην περιοχή 0.00-2.50ppm.

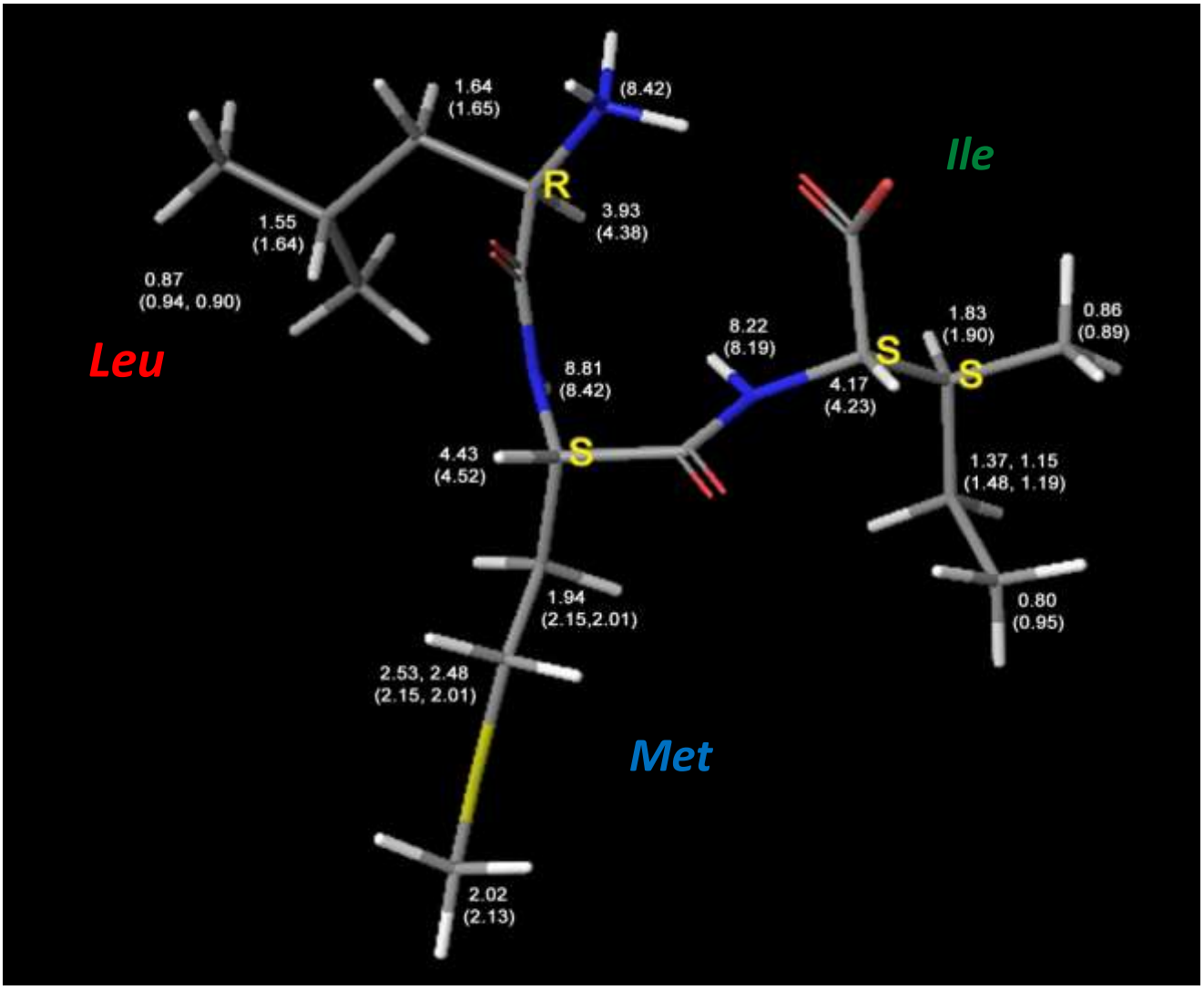


Σχήμα 4.18 Φάσμα H^1NMR του τριπεπτιδίου DLeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700MHz Varian Direct σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.

Πίνακας 4.3: Χημικές μετατοπίσεις ^{1}H του πεπτιδίου DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO ($\delta^1{}_H$=4.70).

Αμινοξέα	NH	αH	βH	Άλλα	
D-Leu[1]	- (8.42)	3.93 (4.38)	1.64 (1.65)	γCH	1.55 (1.64)
				δCH_3	0.87 (0.94, 0.90)
Met[2]	8.81 (8.42)	4.43 (4.52)	1.94 (2.15,2.01)	γCH_2	2.53, 2.48 (2.15, 2.01)
				δCH_3	2.02 (2.13)
Ile[3]	8.22 (8.19)	4.17 (4.23)	1.83 (1.90)	γCH_2	1.37, 1.15 (1.48, 1.19)
				γCH_3	0.80 (0.95)
				δCH_3	0.86 (0.89)

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος Maestro σχεδιάστηκε η πιθανή τριδιάστατη δομή του τριπεπτιδίου NH_2-**D**LeuMetIle-COOH (RSS) (Σχήμα 4.19), όπου αναγράφονται οι θεωρητικές και οι πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.



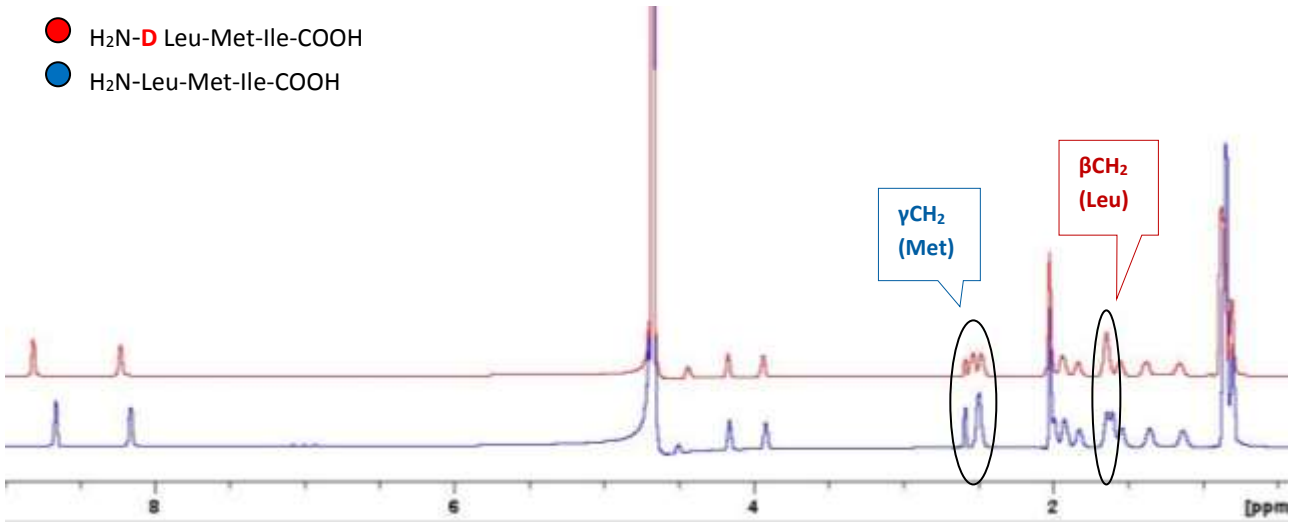
Σχήμα 4.19 Δομή του πεπτιδίου H-**D**LeuMetIle-OH με τις θεωρητικές και πειραματικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος.

4.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως προκύπτει από τα φάσματα 2D NOESY, δεν εμφανίζονται γειτνιάζοντα σήματα μεταξύ των πρωτονίων των πλευρικών ομάδων των δύο διαστερεομερών, όταν αυτά βρίσκονται σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC. Οι μεθυλομάδες τις Λευκίνης και της Ισολευκίνης φαίνεται να είναι απομακρυσμένες μεταξύ τους πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ανοιχτές δομές.

4.3.1 Σύγκριση Φασμάτων των διαστερεοϊσομεών τριπεπτιδίων H_2N-LeuMetIle-COOH και H_2N-DLeuMetIle-COOH

Αφού ελέγχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και οι δύο δομές του τριπεπτιδίου LeuMetIle, ακολούθησε σύγκριση των φασμάτων των δύο διαστερεομερών. Στο Σχήμα 4.20 παρακάτω εμφανίζονται τα φάσματα H^1 NMR των δύο διαστερεομερών. Όπως φαίνεται, τα φάσματα στο μεγαλύτερό τους τμήμα δείχνουν όμοια, εκτός από δύο σημεία. Η πρώτη διαφορά εντοπίζεται στα 1,64 ppm, στην κορυφή που αντιστοιχεί στην αιθυλενομάδα της Λευκίνης στη θέση β [βCH_2 (Leu)]. Συγκεκριμένα, στην L διαμόρφωση η κορυφή σχάζεται σε διπλή, ενώ στη D διαμόρφωση είναι απλή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διαφορετική στερεοχημεία του χειρόμορφου κέντρου της Λευκίνης. Τα β-CH_2 θα ανάμενε κάποιος να σχάζονται μεταξύ τους ως διαστερεοτοπικά ως επίσης και με τα αCH και γCH. Όμως, η διαμορφωτική δυσκαμψία των μορίων οδηγεί στην μη παρατήρηση αυτών των σχάσεων. Έτσι, παρατηρείται μία ευρεία κορυφή χωρίς σχάση στη περίπτωση που η Λευκίνη έχει D διαμόρφωση και σε διπλή κορυφή όταν η Λευκίνη έχει L διαμόρφωση, παρατηρείται δηλαδή στην τελευταία περίπτωση μερική άρση της διαμορφωτικής δυσκαμψίας. Η δεύτερη διαφορά εντοπίζεται στα 2,49 ppm και στην κορυφή που ανήκει στην αιθυλενομάδα της Μεθειονίνης στη θέση γ [γCH_2 (Met)]. Στην L διαμόρφωση το φάσμα παρουσιάζει απλή κορυφή, ενώ στη D διαμόρφωση η κορυφή σχάζεται σε διπλή. Στην περίπτωση των γCH_2 δεν υπάρχει διαφορά ως προς το άμεσο περιβάλλον στα δύο διαστερεομερή. Εδώ πιθανά καθοριστικό ρόλο να παίζει η επίδραση του θείου. Ανάλογα από αυτή την επίδραση η πλάτυνση της κορυφής είναι διαφορετική και μπορεί να εμφανίζεται με ή χωρίς σχάση. Τέλος, στην περιοχή NH τα πρωτόνια των αμινομάδων της διαμόρφωσης RSS είναι ελαφρώς πιο αποθωρακισμένα. Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις και των δύο πεπτιδίων (Πίνακας 4.4).



Σχήμα 4.20 Σύγκριση φασμάτων H^1NMR των τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C

Πίνακας 4.4: Χημικές μετατοπίσεις ^{1}H των δύο πεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle σε σύστημα διαλυτών H_2O/d6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C με σήμα αναφοράς το H_2O/d6-DMSO ($\delta^1{}_H$=4.70)

H_2N-DLeuMetIle-COOH | H_2N-LeuMetIle-COOH *

Αμινοξέα	NH	αH	βH	Άλλα	
Leu[1]	-	3.92 | 3.93	1.60, 1.64 | 1.64	γCH	1.54 | 1.55
				δCH_3	0.84 | 0.87
Met[2]	8.66 | 8.81	** | 4.43	1.92 | 1.94	γCH_2	2.49 | 2.53, 2.48
				δCH_3	2.01 | 2.02
Ile[3]	8.16 | 8.22	4.16 | 4.17	1.82 | 1.83	γCH_2	1.13, 1.35 | 1.37, 1.15
				γCH_3	0.80 | 0.80
				δCH_3	0.84 | 0.86

* Αριστερά αναγράφονται οι τιμές του DLeuMetIle και δεξιά οι τιμές του LeuMetIle.

** Η χημική μετατόπιση επικαλύπτεται με το σήμα νερού στο φάσμα H^1NMR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

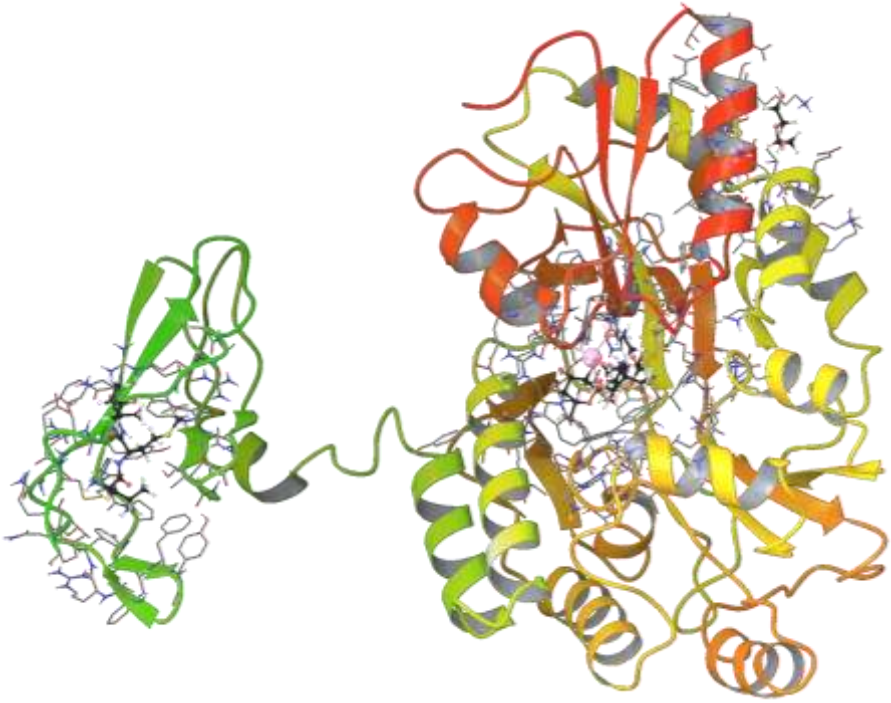
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

ΤΩΝ

ΤΡΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

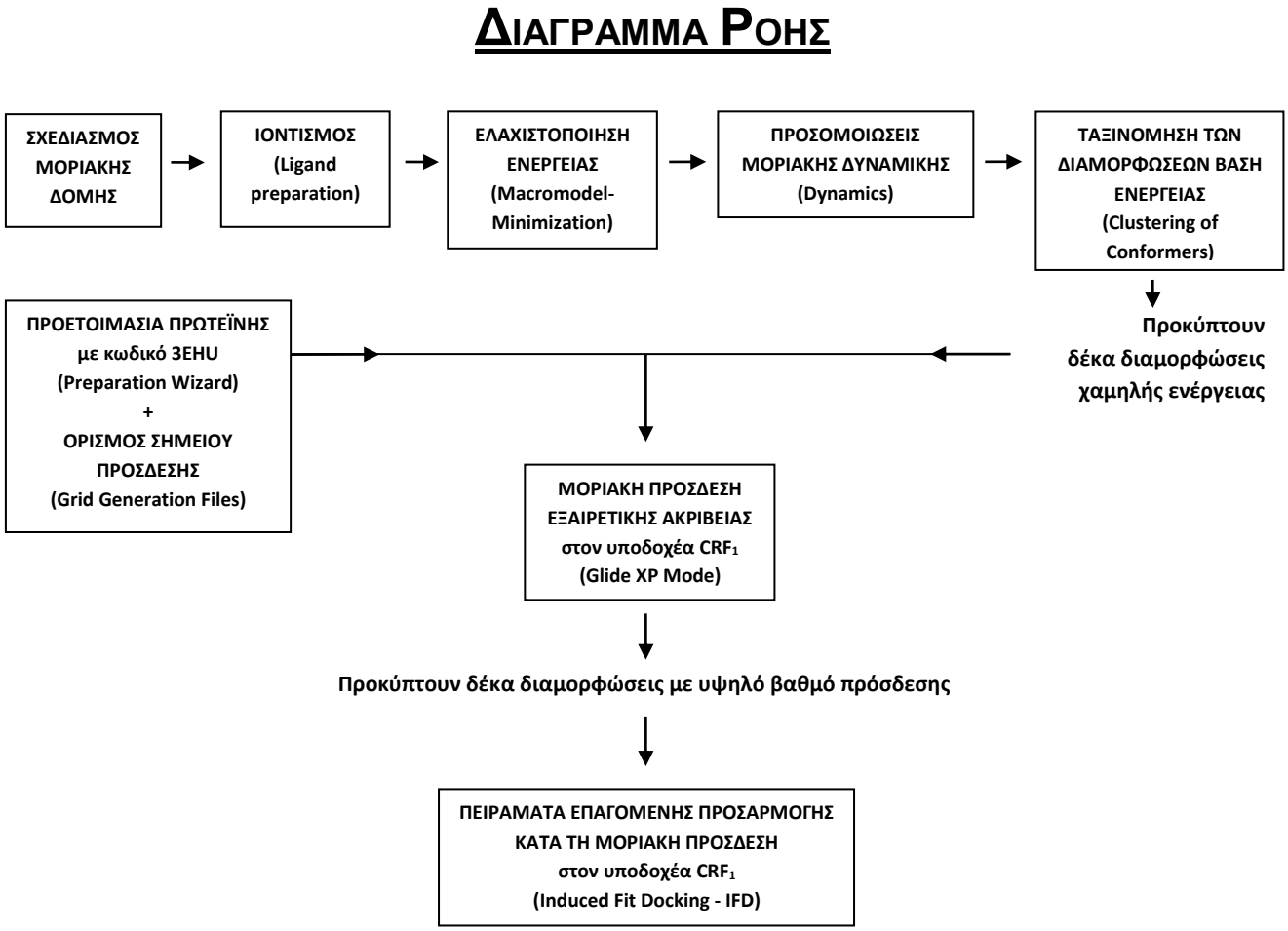
LeuMetIle & DLeuMetIle

ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ CRF_1



5.1 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης των τριπεπτιδίων LeuMetIle και DLeuMetIle στον υποδοχέα CRF_1

Αφού ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση των τριπεπτιδίων με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ακολούθησαν υπολογιστικά πειράματα μοριακής δυναμικής. Στη μεθοδολογία της μοριακής δυναμικής, το μόριο αφήνεται να εξισορροπήσει σε μία τελική θερμοκρασία και προσομοιώνεται η μοριακή του κίνηση δίνοντας ένα ορισμένο αριθμό διαμορφώσεων οι οποίες στη συνέχεια ελαχιστοποιούνται. Για την εκτέλεση των πειραμάτων μοριακής δυναμικής επιλέχθηκε η διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια. που συμφωνούσε με τα αποτελέσματα των πειραμάτων 2D NOESY, η οποία στη συνέχεια υποβλήθηκε σε πειράματα μοριακής πρόσδεσης στον υποδοχέα CRF_1. Ακολουθεί διάγραμμα ροής με τα βήματα που ακολουθήθηκαν μέχρι τη λήψη των τελικών αποτελεσμάτων.



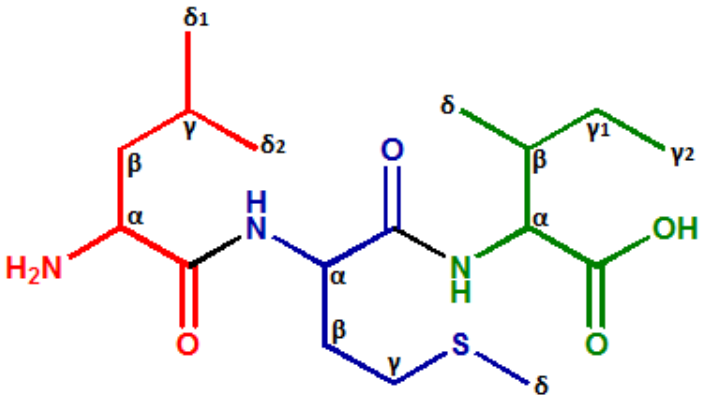
Σχήμα 5.1 Απεικόνιση διαγράμματος ροής

Α) Σχεδιασμός τριπεπτιδίων και ελαχιστοποίηση

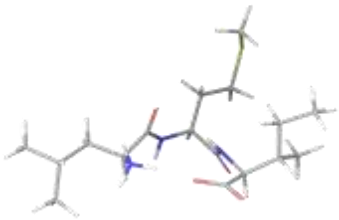
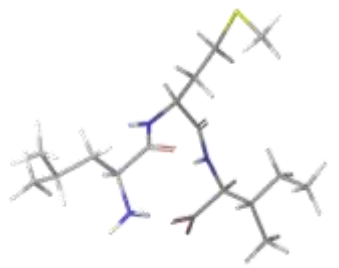
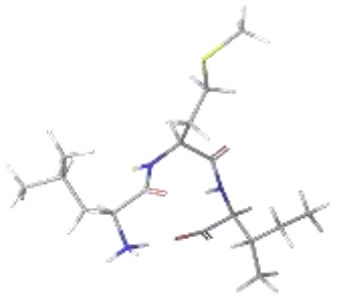
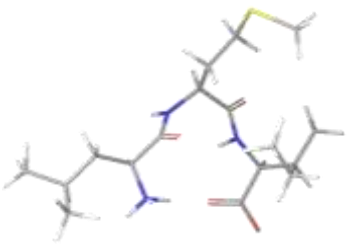
Η προετοιμασία των τριπεπτιδίων έγινε στο πρόγραμμα Maestro της εταιρείας Schrödinger. όπου αρχικά σχεδιάστηκαν τα τριπεπτίδια με κατάλληλη χειρομορφία (SSS και RSS). Ακολούθησε ο ιοντισμός τους σε ένα δεδομένο pH (7.00 ±0.00) με χρήση της εφαρμογής LigPrep. Στη συνέχεια με χρήση του Macromodel 9.0 (Minization) επιτεύχθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας στα μόρια. Ως μέθοδος ελαχιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε η PRCG (Polak-Ribiere Conjugate Gradient – Διαβαθμισμένη σύζευξη Polak-Ribiere). Ως μέγιστος αριθμός επαναλήψεων (maximum iterations) ορίσθηκε το 500. Για τον υπολογισμό του φορτίου χρησιμοποιήθηκε το OPLS2005, ενώ χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το νερό. Προέκυψε μία δομή για το κάθε τριπεπτίδιο, η οποία υποβλήθηκε σε πειράματα μοριακής δυναμικής.

Β) Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

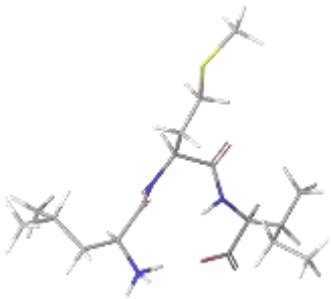
Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έγιναν με χρήση της υπορουτίνας Maestro του προγράμματος Schrödinger. Ως μέθοδος ελαχιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PRCG και η προσομοίωση έγινε σε διαλύτη νερό, σε τελική θερμοκρασία 300,0 K. Ο αριθμός των διαμορφώσεων (number of structures to sample) ορίσθηκε σε 2000, ως χρόνος εξισορρόπησης (equilibration time) τα 20,0 ns και ως χρόνος προσομοίωσης (simulation time) τα 1.000,0 ns. Στη συνέχεια. με χρήση της εφαρμογής Cheminformatics - Clustering of Conformers. οι 2000 διαμορφώσεις που προέκυψαν χωρίστηκαν σε 10 ομάδες (clusters) με βάση της ενέργειας τους. Από κάθε ομάδα επιλέχθηκε η διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια και μετρήθηκαν οι κρίσιμες αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων κάθε αμινοξέος. Τα αποτελέσματα αναφέρονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες και για τα δύο τριπεπτίδια (Πίνακας 5.1 για το LMI SSS και Πίνακας 5.2 για το LMI RSS).



Πίνακας 5.1: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο **LeuMetIle**

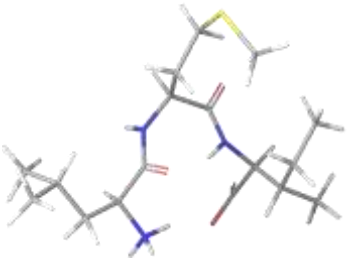
Διαμορφώσεις LeuMetIle	Κρίσιμες Αποστάσεις (Å)			
No.1 	**δ_1Leu-δIle** : 11.947 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 12.584 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.246 Å **δ_1Leu-βIle** : 11.314 Å **δ_1Leu-δMet** : 10.502 Å **δ_1Leu-γMet** : 10.186 Å **δ_1Leu-βMet** : 7.989 Å **δIle-δMet** : 6.007 Å **δIle-γMet** : 4.083 Å **δIle-βMet** : 5.620 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.630 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.757 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.499 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.848 Å **δ_2Leu-δMet** : 10.873 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.729 Å **δ_2Leu-βMet** : 8.044 Å **γ_2Ile-δMet** : 5.619 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.090 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.650 Å	**γLeu-δIle** : 10.192 Å **γLeu-γ_2Ile** : 10.574 Å **γLeu-γ_1Ile** : 8.331 Å **γLeu-βIle** : 9.153 Å **γLeu-δMet** : 9.497 Å **γLeu-γMet** : 9.176 Å **γLeu-βMet** : 7.107 Å **γ_1Ile-δMet** : 4.418 Å **γ_1Ile-γMet** : 4.489 Å **γ_1Ile-βMet** : 4.493 Å	**βLeu-δIle** : 9.189 Å **βLeu-γ_2Ile** : 10.038 Å **βLeu-γ_1Ile** : 7.650 Å **βLeu-βIle** : 8.840 Å **βLeu-δMet** : 7.828 Å **βLeu-γMet** : 7.291 Å **βLeu-βMet** : 5.159 Å **βIle-δMet** : 6.735 Å **βIle-γMet** : 5.760 Å **βIle-βMet** : 6.308 Å
No.2 	**δ_1Leu-δIle** : 11.123 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 10.958 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.519 Å **δ_1Leu-βIle** : 8.701 Å **δ_1Leu-δMet** : 9.585 Å **δ_1Leu-γMet** : 9.348 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.268 Å **δIle-δMet** : 8.303 Å **δIle-γMet** : 7.875 Å **δIle-βMet** : 7.248 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.092 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.918 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.005 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.120 Å **δ_2Leu-δMet** : 10.412 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.089 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.362 Å **γ_2Ile-δMet** : 5.402 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.782 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.005 Å	**γLeu-δIle** : 9.220 Å **γLeu-γ_2Ile** : 9.644 Å **γLeu-γ_1Ile** : 9.236 Å **γLeu-βIle** : 7.051 Å **γLeu-δMet** : 9.544 Å **γLeu-γMet** : 8.773 Å **γLeu-βMet** : 6.892 Å **γ_1Ile-δMet** : 5.272 Å **γ_1Ile-γMet** : 5.008 Å **γ_1Ile-βMet** : 4.777 Å	**βLeu-δIle** : 8.761 Å **βLeu-γ_2Ile** : 8.611 Å **βLeu-γ_1Ile** : 7.879 Å **βLeu-βIle** : 6.283 Å **βLeu-δMet** : 7.392 Å **βLeu-γMet** : 6.776 Å **βLeu-βMet** : 4.644 Å **βIle-δMet** : 6.277 Å **βIle-γMet** : 6.134 Å **βIle-βMet** : 4.862 Å
No.3 	**δ_1Leu-δIle** : 10.525 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 11.733 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.251 Å **δ_1Leu-βIle** : 8.616 Å **δ_1Leu-δMet** : 11.067 Å **δ_1Leu-γMet** : 8.730 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.980 Å **δIle-δMet** : 10.872 Å **δIle-γMet** : 8.528 Å **δIle-βMet** : 7.432 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.113 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.434 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.804 Å **δ_2Leu-βIle** : 7.760 Å **δ_2Leu-δMet** : 8.685 Å **δ_2Leu-γMet** : 6.920 Å **δ_2Leu-βMet** : 4.890 Å **γ_2Ile-δMet** : 8.163 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.534 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.303 Å	**γLeu-δIle** : 9.114 Å **γLeu-γ_2Ile** : 9.910 Å **γLeu-γ_1Ile** : 8.423 Å **γLeu-βIle** : 7.012 Å **γLeu-δMet** : 8.725 Å **γLeu-γMet** : 6.241 Å **γLeu-βMet** : 4.613 Å **γ_1Ile-δMet** : 8.198 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.419 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.192 Å	**βLeu-δIle** : 7.696 Å **βLeu-γ_2Ile** : 9.291 Å **βLeu-γ_1Ile** : 7.539 Å **βLeu-βIle** : 5.934 Å **βLeu-δMet** : 10.045 Å **βLeu-γMet** : 7.646 Å **βLeu-βMet** : 5.387 Å **βIle-δMet** : 8.984 Å **βIle-γMet** : 6.610 Å **βIle-βMet** : 5.099 Å
No.4 	**δ_1Leu-δIle** : 10.477 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 7.002 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 8.505 Å **δ_1Leu-βIle** : 9.519 Å **δ_1Leu-δMet** : 11.147 Å **δ_1Leu-γMet** : 9.839 Å **δ_1Leu-βMet** : 7.578 Å **δIle-δMet** : 4.289 Å **δIle-γMet** : 4.561 Å **δIle-βMet** : 5.345 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.667 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 9.475 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.548 Å **δ_2Leu-βIle** : 11.179 Å **δ_2Leu-δMet** : 11.857 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.853 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.773 Å **γ_2Ile-δMet** : 4.463 Å **γ_2Ile-γMet** : 5.158 Å **γ_2Ile-βMet** : 4.116 Å	**γLeu-δIle** : 10.031 Å **γLeu-γ_2Ile** : 8.094 Å **γLeu-γ_1Ile** : 8.730 Å **γLeu-βIle** : 9.154 Å **γLeu-δMet** : 11.070 Å **γLeu-γMet** : 9.069 Å **γLeu-βMet** : 7.129 Å **γ_1Ile-δMet** : 5.938 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.614 Å **γ_1Ile-βMet** : 7.554 Å	**βLeu-δIle** : 8.957 Å **βLeu-γ_2Ile** : 6.758 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.015 Å **βLeu-βIle** : 8.694 Å **βLeu-δMet** : 9.099 Å **βLeu-γMet** : 7.213 Å **βLeu-βMet** : 5.062 Å **βIle-δMet** : 6.343 Å **βIle-γMet** : 6.337 Å **βIle-βMet** : 6.379 Å

No.5



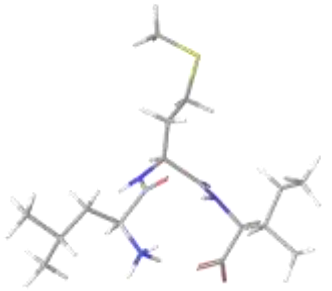
δ_1Leu-δIle : 10.420 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.057 Å	**γLeu-δIle** : 8.991 Å	**βLeu-δIle** : 9.164 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 11.030 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.889 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 9.445 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.689 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 8.848 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.875 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 7.279 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 6.713 Å
δ_1Leu-βIle : 10.145 Å	**δ_2Leu-βIle** : 10.854 Å	**γLeu-βIle** : 9.037 Å	**βLeu-βIle** : 8.515 Å
δ_1Leu-δMet : 10.770 Å	**δ_2Leu-δMet** : 11.042 Å	**γLeu-δMet** : 8.955 Å	**βLeu-δMet** : 10.768 Å
δ_1Leu-γMet : 7.980 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.719 Å	**γLeu-γMet** : 6.391 Å	**βLeu-γMet** : 8.039 Å
δ_1Leu-βMet : 6.531 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.656 Å	**γLeu-βMet** : 4.491 Å	**βLeu-βMet** : 5.991 Å
δIle-δMet : 6.723 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.308 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.188 Å	**βIle-δMet** : 8.907 Å
δIle-γMet : 5.100 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.696 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.054 Å	**βIle-γMet** : 6.779 Å
δIle-βMet : 5.531 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.977 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.042 Å	**βIle-βMet** : 6.587 Å

No.6



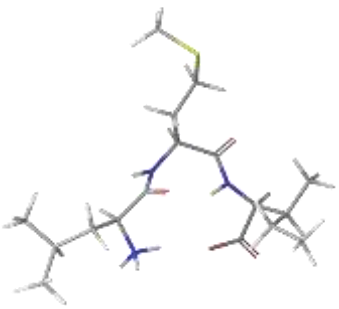
δ_1Leu-δIle : 10.825 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.901 Å	**γLeu-δIle** : 9.256 Å	**βLeu-δIle** : 8.797 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 10.546 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.396 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 8.490 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 9.138 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 9.378 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.825 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 7.243 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 7.450 Å
δ_1Leu-βIle : 8.609 Å	**δ_2Leu-βIle** : 8.459 Å	**γLeu-βIle** : 6.920 Å	**βLeu-βIle** : 6.375 Å
δ_1Leu-δMet : 9.382 Å	**δ_2Leu-δMet** : 8.661 Å	**γLeu-δMet** : 6.976 Å	**βLeu-δMet** : 8.496 Å
δ_1Leu-γMet : 7.905 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.485 Å	**γLeu-γMet** : 6.153 Å	**βLeu-γMet** : 8.154 Å
δ_1Leu-βMet : 5.886 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.159 Å	**γLeu-βMet** : 3.978 Å	**βLeu-βMet** : 6.012 Å
δIle-δMet : 6.914 Å	**γ_2Ile-δMet** : 4.413 Å	**γ_1Ile-δMet** : 3.992 Å	**βIle-δMet** : 5.874 Å
δIle-γMet : 7.649 Å	**γ_2Ile-γMet** : 5.103 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.775 Å	**βIle-γMet** : 6.674 Å
δIle-βMet : 7.455 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.417 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.982 Å	**βIle-βMet** : 5.712 Å

No.7

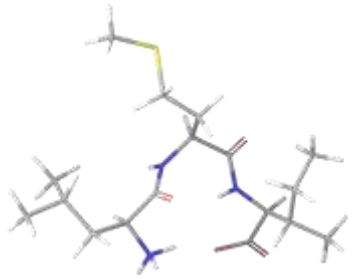
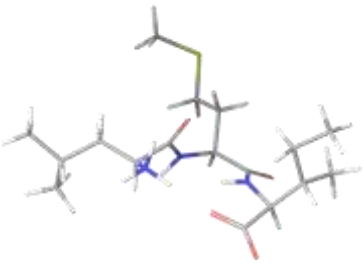


δ_1Leu-δIle : 10.867 Å	**δ_2Leu-δIle** : 9.731 Å	**γLeu-δIle** : 8.728 Å	**βLeu-δIle** : 8.584 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 10.450 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.387 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 8.786 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.150 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 9.957 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.521 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.424 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 7.352 Å
δ_1Leu-βIle : 8.530 Å	**δ_2Leu-βIle** : 7.713 Å	**γLeu-βIle** : 6.519 Å	**βLeu-βIle** : 6.199 Å
δ_1Leu-δMet : 9.787 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.432 Å	**γLeu-δMet** : 10.432 Å	**βLeu-δMet** : 10.162 Å
δ_1Leu-γMet : 9.561 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.287 Å	**γLeu-γMet** : 9.287 Å	**βLeu-γMet** : 9.169 Å
δ_1Leu-βMet : 7.357 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.592 Å	**γLeu-βMet** : 7.084 Å	**βLeu-βMet** : 4.822 Å
δIle-δMet : 10.898 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.476 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.917 Å	**βIle-δMet** : 9.254 Å
δIle-γMet : 7.905 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.318 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.260 Å	**βIle-γMet** : 6.613 Å
δIle-βMet : 7.681 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.598 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.999 Å	**βIle-βMet** : 5.743 Å

No.8

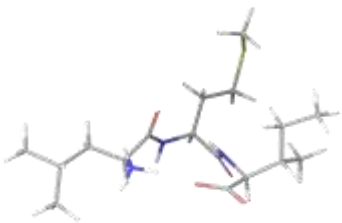
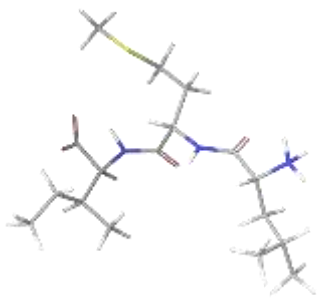


δ_1Leu-δIle : 11.299 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.321 Å	**γLeu-δIle** : 10.124 Å	**βLeu-δIle** : 8.665 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 10.022 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.058 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 9.720 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.016 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 8.209 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.900 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 7.548 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 5.951 Å
δ_1Leu-βIle : 10.161 Å	**δ_2Leu-βIle** : 10.846 Å	**γLeu-βIle** : 9.191 Å	**βLeu-βIle** : 7.382 Å
δ_1Leu-δMet : 10.810 Å	**δ_2Leu-δMet** : 8.713 Å	**γLeu-δMet** : 9.548 Å	**βLeu-δMet** : 7.933 Å
δ_1Leu-γMet : 10.387 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.848 Å	**γLeu-γMet** : 8.731 Å	**βLeu-γMet** : 7.404 Å
δ_1Leu-βMet : 8.018 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.679 Å	**γLeu-βMet** : 6.568 Å	**βLeu-βMet** : 5.027 Å
δIle-δMet : 8.624 Å	**γ_2Ile-δMet** : 10.338 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.618 Å	**βIle-δMet** : 10.102 Å
δIle-γMet : 5.706 Å	**γ_2Ile-γMet** : 8.160 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.393 Å	**βIle-γMet** : 7.164 Å
δIle-βMet : 6.322 Å	**γ_2Ile-βMet** : 7.672 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.567 Å	**βIle-βMet** : 7.138 Å

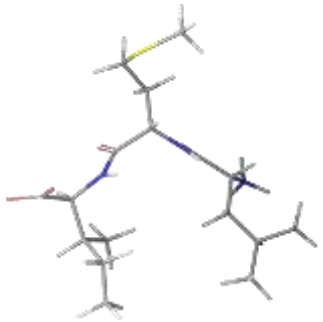
No.9 	**δ_1Leu-δIle** : 10.648 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 9.687 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 8.868 Å **δ_1Leu-βIle** : 8.531 Å **δ_1Leu-δMet** : 11.903 Å **δ_1Leu-γMet** : 5.162 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.552 Å **δIle-δMet** : 11.360 Å **δIle-γMet** : 8.589 Å **δIle-βMet** : 6.525 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.416 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.813 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.418 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.060 Å **δ_2Leu-δMet** : 7.107 Å **δ_2Leu-γMet** : 6.306 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.796 Å **γ_2Ile-δMet** : 8.705 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.216 Å **γ_2Ile-βMet** : 3.974 Å	**γLeu-δIle** : 9.652 Å **γLeu-γ_2Ile** : 8.553 Å **γLeu-γ_1Ile** : 7.392 Å **γLeu-βIle** : 7.382 Å **γLeu-δMet** : 5.105 Å **γLeu-γMet** : 5.825 Å **γLeu-βMet** : 5.319 Å **γ_1Ile-δMet** : 8.592 Å **γ_1Ile-γMet** : 5.801 Å **γ_1Ile-βMet** : 3.859 Å	**βLeu-δIle** : 8.832 Å **βLeu-γ_2Ile** : 8.791 Å **βLeu-γ_1Ile** : 7.290 Å **βLeu-βIle** : 6.479 Å **βLeu-δMet** : 7.690 Å **βLeu-γMet** : 5.854 Å **βLeu-βMet** : 6.468 Å **βIle-δMet** : 9.710 Å **βIle-γMet** : 6.858 Å **βIle-βMet** : 5.125 Å
No.10 	**δ_1Leu-δIle** : 11.547 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 11.313 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 9.135 Å **δ_1Leu-βIle** : 10.755 Å **δ_1Leu-δMet** : 7.060 Å **δ_1Leu-γMet** : 7.404 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.057 Å **δIle-δMet** : 9.436 Å **δIle-γMet** : 7.227 Å **δIle-βMet** : 5.288 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.388 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.133 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.784 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.740 Å **δ_2Leu-δMet** : 7.209 Å **δ_2Leu-γMet** : 6.171 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.335 Å **γ_2Ile-δMet** : 10.155 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.883 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.571 Å	**γLeu-δIle** : 9.942 Å **γLeu-γ_2Ile** : 9.904 Å **γLeu-γ_1Ile** : 7.628 Å **γLeu-βIle** : 8.846 Å **γLeu-δMet** : 7.713 Å **γLeu-γMet** : 7.016 Å **γLeu-βMet** : 7.387 Å **γ_1Ile-δMet** : 8.483 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.029 Å **γ_1Ile-βMet** : 4.954 Å	**βLeu-δIle** : 8.872 Å **βLeu-γ_2Ile** : 8.851 Å **βLeu-γ_1Ile** : 6.648 Å **βLeu-βIle** : 8.328 Å **βLeu-δMet** : 5.296 Å **βLeu-γMet** : 5.080 Å **βLeu-βMet** : 5.349 Å **βIle-δMet** : 10.261 Å **βIle-γMet** : 8.150 Å **βIle-βMet** : 6.316 Å

***** Με κίτρινο χρώμα οι αποστάσεις <5Å

Πίνακας 5.2: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο D**LeuMetIle**

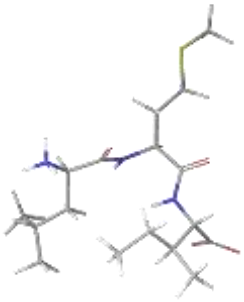
Διαμορφώσεις D**LeuMetIle**	**Κρίσιμες Αποστάσεις (Å)**			
No.1 	**δ_1Leu-δIle** : 9.356 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 12.168 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.571 Å **δ_1Leu-βIle** : 9.978 Å **δ_1Leu-δMet** : 12.118 Å **δ_1Leu-γMet** : 10.047 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.200 Å **δIle-δMet** : 6.719 Å **δIle-γMet** : 6.669 Å **δIle-βMet** : 7.243 Å	**δ_2Leu-δIle** : 9.946 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 12.059 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.281 Å **δ_2Leu-βIle** : 11.204 Å **δ_2Leu-δMet** : 10.974 Å **δ_2Leu-γMet** : 8.902 Å **δ_2Leu-βMet** : 6.840 Å **γ_2Ile-δMet** : 4.758 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.195 Å **γ_2Ile-βMet** : 7.709 Å	**γLeu-δIle** : 10.162 Å **γLeu-γ_2Ile** : 12.560 Å **γLeu-γ_1Ile** : 10.661 Å **γLeu-βIle** : 11.167 Å **γLeu-δMet** : 7.074 Å **γLeu-γMet** : 9.194 Å **γLeu-βMet** : 11.609 Å **γ_1Ile-δMet** : 3.601 Å **γ_1Ile-γMet** : 4.133 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.535 Å	**βLeu-δIle** : 7.567 Å **βLeu-γ_2Ile** : 10.001 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.129 Å **βLeu-βIle** : 8.528 Å **βLeu-δMet** : 9.473 Å **βLeu-γMet** : 7.216 Å **βLeu-βMet** : 5.401 Å **βIle-δMet** : 5.846 Å **βIle-γMet** : 5.917 Å **βIle-βMet** : 7.061 Å
No.2 	**δ_1Leu-δIle** : 6.410 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 10.663 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 9.931 Å **δ_1Leu-βIle** : 9.714 Å **δ_1Leu-δMet** : 12.813 Å **δ_1Leu-γMet** : 10.184 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.517 Å **δIle-δMet** : 8.256 Å **δIle-γMet** : 6.931 Å **δIle-βMet** : 6.762 Å	**δ_2Leu-δIle** : 6.404 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 9.203 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.418 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.967 Å **δ_2Leu-δMet** : 11.572 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.384 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.579 Å **γ_2Ile-δMet** : 8.574 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.599 Å **γ_2Ile-βMet** : 8.994 Å	**γLeu-δIle** : 7.671 Å **γLeu-γ_2Ile** : 10.884 Å **γLeu-γ_1Ile** : 9.762 Å **γLeu-βIle** : 10.108 Å **γLeu-δMet** : 11.786 Å **γLeu-γMet** : 9.183 Å **γLeu-βMet** : 7.169 Å **γ_1Ile-δMet** : 6.412 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.330 Å **γ_1Ile-βMet** : 6.800 Å	**βLeu-δIle** : 5.714 Å **βLeu-γ_2Ile** : 9.199 Å **βLeu-γ_1Ile** : 7.966 Å **βLeu-βIle** : 7.935 Å **βLeu-δMet** : 10.057 Å **βLeu-γMet** : 7.380 Å **βLeu-βMet** : 5.739 Å **βIle-δMet** : 7.415 Å **βIle-γMet** : 6.864 Å **βIle-βMet** : 7.570 Å

No.3



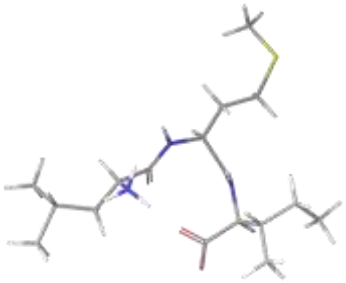
δ_1Leu-δIle : 5.533 Å	**δ_2Leu-δIle** : 7.305 Å	**γLeu-δIle** : 5.707 Å	**βLeu-δIle** : 4.061 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 5.458 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 8.124 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 7.007 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 5.540 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 5.679 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.661 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 6.957 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 4.827 Å
δ_1Leu-βIle : 7.038Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.107 Å	**γLeu-βIle** : 7.793 Å	**βLeu-βIle** : 5.874 Å
δ_1Leu-δMet : 10.014 Å	**δ_2Leu-δMet** : 8.698 Å	**γLeu-δMet** : 9.381 Å	**βLeu-δMet** : 7.540 Å
δ_1Leu-γMet : 10.019 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.574 Å	**γLeu-γMet** : 9.275 Å	**βLeu-γMet** : 7.246 Å
δ_1Leu-βMet : 8.436 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.734 Å	**γLeu-βMet** : 7.351 Å	**βLeu-βMet** : 5.623 Å
δIle-δMet : 9.076 Å	**γ_2Ile-δMet** : 10.917 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.850 Å	**βIle-δMet** : 9.796 Å
δIle-γMet : 7.052 Å	**γ_2Ile-γMet** : 9.580 Å	**γ_1Ile-γMet** : 7.676 Å	**βIle-γMet** : 7.570 Å
δIle-βMet : 6.128 Å	**γ_2Ile-βMet** : 8.933 Å	**γ_1Ile-βMet** : 7.267 Å	**βIle-βMet** : 7.304 Å

No.4



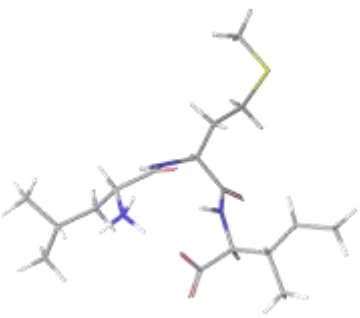
δ_1Leu-δIle : 6.351 Å	**δ_2Leu-δIle** : 9.192 Å	**γLeu-δIle** : 8.252 Å	**βLeu-δIle** : 6.222 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 4.541 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 6.631 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 5.005 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 3.757 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 6.118 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.431 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 6.182 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 4.201 Å
δ_1Leu-βIle : 5.096 Å	**δ_2Leu-βIle** : 6.813 Å	**γLeu-βIle** : 6.110 Å	**βLeu-βIle** : 3.941 Å
δ_1Leu-δMet : 12.613 Å	**δ_2Leu-δMet** : 11.465 Å	**γLeu-δMet** : 11.656 Å	**βLeu-δMet** : 9.833 Å
δ_1Leu-γMet : 9.968 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.098 Å	**γLeu-γMet** : 9.270 Å	**βLeu-γMet** : 7.221 Å
δ_1Leu-βMet : 8.237 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.446 Å	**γLeu-βMet** : 7.168 Å	**βLeu-βMet** : 5.454 Å
δIle-δMet : 11.267 Å	**γ_2Ile-δMet** : 10.099 Å	**γ_1Ile-δMet** : 9.211 Å	**βIle-δMet** : 10.384 Å
δIle-γMet : 8.715 Å	**γ_2Ile-γMet** : 8.722 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.717 Å	**βIle-γMet** : 7.628 Å
δIle-βMet : 7.914 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.942 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.195 Å	**βIle-βMet** : 6.577 Å

No.5



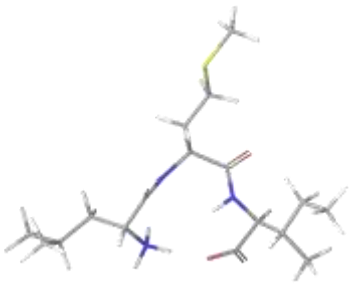
δ_1Leu-δIle : 9.401 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.660 Å	**γLeu-δIle** : 9.046 Å	**βLeu-δIle** : 7.544 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 11.447 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.907 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 10.843 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.967 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 10.703 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 11.042 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 9.652 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 8.320 Å
δ_1Leu-βIle : 8.624 Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.297 Å	**γLeu-βIle** : 7.656 Å	**βLeu-βIle** : 6.481 Å
δ_1Leu-δMet : 12.363 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.647 Å	**γLeu-δMet** : 10.400 Å	**βLeu-δMet** : 9.857 Å
δ_1Leu-γMet : 10.830 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.804 Å	**γLeu-γMet** : 9.389 Å	**βLeu-γMet** : 8.048 Å
δ_1Leu-βMet : 9.295 Å	**δ_2Leu-βMet** : 9.308 Å	**γLeu-βMet** : 7.489 Å	**βLeu-βMet** : 6.744 Å
δIle-δMet : 10.565 Å	**γ_2Ile-δMet** : 8.919 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.769 Å	**βIle-δMet** : 8.377 Å
δIle-γMet : 7.554 Å	**γ_2Ile-γMet** : 5.578 Å	**γ_1Ile-γMet** : 4.903 Å	**βIle-γMet** : 5.710 Å
δIle-βMet : 7.405 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.577 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.170 Å	**βIle-βMet** : 5.105 Å

No.6



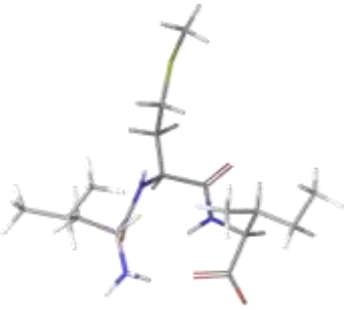
δ_1Leu-δIle : 9.407 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.621 Å	**γLeu-δIle** : 8.428 Å	**βLeu-δIle** : 8.012 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 11.513 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 12.076 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 10.252 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 9.263 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 9.579 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.132 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.462 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 7.140 Å
δ_1Leu-βIle : 8.689 Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.245 Å	**γLeu-βIle** : 7.211 Å	**βLeu-βIle** : 6.695 Å
δ_1Leu-δMet : 11.536 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.334 Å	**γLeu-δMet** : 10.367 Å	**βLeu-δMet** : 8.529 Å
δ_1Leu-γMet : 9.737 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.481 Å	**γLeu-γMet** : 8.871 Å	**βLeu-γMet** : 6.759 Å
δ_1Leu-βMet : 8.433 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.615 Å	**γLeu-βMet** : 7.046 Å	**βLeu-βMet** : 5.415 Å
δIle-δMet : 10.810 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.152 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.571 Å	**βIle-δMet** : 9.039 Å
δIle-γMet : 6.899 Å	**γ_2Ile-γMet** : 6.703 Å	**γ_1Ile-γMet** : 4.775 Å	**βIle-γMet** : 6.582 Å
δIle-βMet : 7.601 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.767 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.811 Å	**βIle-βMet** : 5.665 Å

No.7



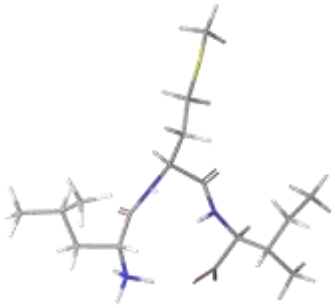
δ_1Leu-δIle : 11.864 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.701 Å	**γLeu-δIle** : 9.652 Å	**βLeu-δIle** : 9.398 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 13.077 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.428 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 10.041 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 10.342 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 11.558 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.366 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 9.791 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 8.691 Å
δ_1Leu-βIle : 10.389 Å	**δ_2Leu-βIle** : 8.852 Å	**γLeu-βIle** : 8.175 Å	**βLeu-βIle** : 7.838 Å
δ_1Leu-δMet : 12.245 Å	**δ_2Leu-δMet** : 11.456 Å	**γLeu-δMet** : 11.806 Å	**βLeu-δMet** : 9.489 Å
δ_1Leu-γMet : 9.855 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.157 Å	**γLeu-γMet** : 9.202 Å	**βLeu-γMet** : 6.968 Å
δ_1Leu-βMet : 8.007 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.876 Å	**γLeu-βMet** : 7.192 Å	**βLeu-βMet** : 5.198 Å
δIle-δMet : 10.101 Å	**γ_2Ile-δMet** : 8.301 Å	**γ_1Ile-δMet** : 6.902 Å	**βIle-δMet** : 8.799 Å
δIle-γMet : 7.961 Å	**γ_2Ile-γMet** : 6.976 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.066 Å	**βIle-γMet** : 6.587 Å
δIle-βMet : 7.866 Å	**γ_2Ile-βMet** : 7.094 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.531 Å	**βIle-βMet** : 5.945 Å

No.8



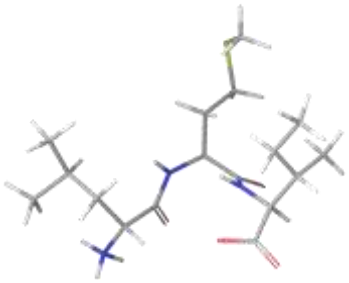
δ_1Leu-δIle : 7.207 Å	**δ_2Leu-δIle** : 4.574 Å	**γLeu-δIle** : 5.248 Å	**βLeu-δIle** : 5.585 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 10.335 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.705 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 8.701 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 9.049 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 10.182 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.632 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 7.977 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 8.366 Å
δ_1Leu-βIle : 9.103 Å	**δ_2Leu-βIle** : 6.549 Å	**γLeu-βIle** : 7.380 Å	**βLeu-βIle** : 6.984 Å
δ_1Leu-δMet : 9.449 Å	**δ_2Leu-δMet** : 7.356 Å	**γLeu-δMet** : 9.370 Å	**βLeu-δMet** : 8.009 Å
δ_1Leu-γMet : 7.066 Å	**δ_2Leu-γMet** : 5.199 Å	**γLeu-γMet** : 6.685 Å	**βLeu-γMet** : 5.104 Å
δ_1Leu-βMet : 8.151 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.997 Å	**γLeu-βMet** : 7.804 Å	**βLeu-βMet** : 5.683 Å
δIle-δMet : 7.082 Å	**γ_2Ile-δMet** : 7.770 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.834 Å	**βIle-δMet** : 6.299 Å
δIle-γMet : 4.888 Å	**γ_2Ile-γMet** : 6.779 Å	**γ_1Ile-γMet** : 7.081 Å	**βIle-γMet** : 4.510 Å
δIle-βMet : 6.280 Å	**γ_2Ile-βMet** : 8.095 Å	**γ_1Ile-βMet** : 7.877 Å	**βIle-βMet** : 5.232 Å

No.9



δ_1Leu-δIle : 9.557 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.537 Å	**γLeu-δIle** : 9.589 Å	**βLeu-δIle** : 9.104 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 9.549 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.385 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 9.472 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 9.979 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 7.841 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.397 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.246 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 8.526 Å
δ_1Leu-βIle : 7.267 Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.467 Å	**γLeu-βIle** : 7.579 Å	**βLeu-βIle** : 7.200 Å
δ_1Leu-δMet : 9.110 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.677 Å	**γLeu-δMet** : 8.323 Å	**βLeu-δMet** : 10.414 Å
δ_1Leu-γMet : 6.940 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.469 Å	**γLeu-γMet** : 5.892 Å	**βLeu-γMet** : 7.913 Å
δ_1Leu-βMet : 5.036 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.421 Å	**γLeu-βMet** : 4.800 Å	**βLeu-βMet** : 6.583 Å
δIle-δMet : 10.519 Å	**γ_2Ile-δMet** : 7.696 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.014 Å	**βIle-δMet** : 9.540 Å
δIle-γMet : 8.364 Å	**γ_2Ile-γMet** : 6.180 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.315 Å	**βIle-γMet** : 7.182 Å
δIle-βMet : 7.385 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.720 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.842 Å	**βIle-βMet** : 5.648 Å

No.10



δ_1Leu-δIle : 10.035 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.126 Å	**γLeu-δIle** : 9.040 Å	**βLeu-δIle** : 8.378 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 9.378 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.212 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 9.344 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.057 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 7.608 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.344 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 7.291 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 5.939 Å
δ_1Leu-βIle : 9.707 Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.087 Å	**γLeu-βIle** : 9.035 Å	**βLeu-βIle** : 7.614 Å
δ_1Leu-δMet : 7.761 Å	**δ_2Leu-δMet** : 9.985 Å	**γLeu-δMet** : 7.540 Å	**βLeu-δMet** : 7.712 Å
δ_1Leu-γMet : 7.884 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.053 Å	**γLeu-γMet** : 6.539 Å	**βLeu-γMet** : 7.269 Å
δ_1Leu-βMet : 5.583 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.086 Å	**γLeu-βMet** : 4.589 Å	**βLeu-βMet** : 6.349 Å
δIle-δMet : 5.119 Å	**γ_2Ile-δMet** : 4.817 Å	**γ_1Ile-δMet** : 4.681 Å	**βIle-δMet** : 6.220 Å
δIle-γMet : 4.414 Å	**γ_2Ile-γMet** : 6.306 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.244 Å	**βIle-γMet** : 6.135 Å
δIle-βMet : 5.137 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.782 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.177 Å	**βIle-βMet** : 5.877 Å

***** Με κίτρινο χρώμα οι αποστάσεις <5Å

Συμπεράσματα

Στον πίνακα 5.3 καταγράφονται ο αριθμός και το ποσοστό των διαμορφώσεων που παρεκκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα όπως προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Μετρήθηκαν 40 κρίσιμες αποστάσεις στις 10 χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεις που έχουν ληφθεί από τη Μοριακή Δυναμική. Οι αποστάσεις οι οποίες είναι χρωματισμένες με κίτρινο χρώμα αντιστοιχούν σε αυτές που είναι <5 Å και επομένως θα έπρεπε να παρατηρηθεί NOE. Είναι οι αποστάσεις δηλαδή που αποκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα αφού κανένα NOE δεν έχει παρατηρηθεί μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων.

Στον παρακάτω πίνακα εμφαίνεται το ποσοστό απόκλισης από τα πειραματικά δεδομένα (0-12,5%). Παρατηρείται ότι όλες οι χαμηλά ενεργειακά διαμορφώσεις που έχουν ληφθεί από τη MD βρίσκονται σε ικανοποιητική συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα NOE.

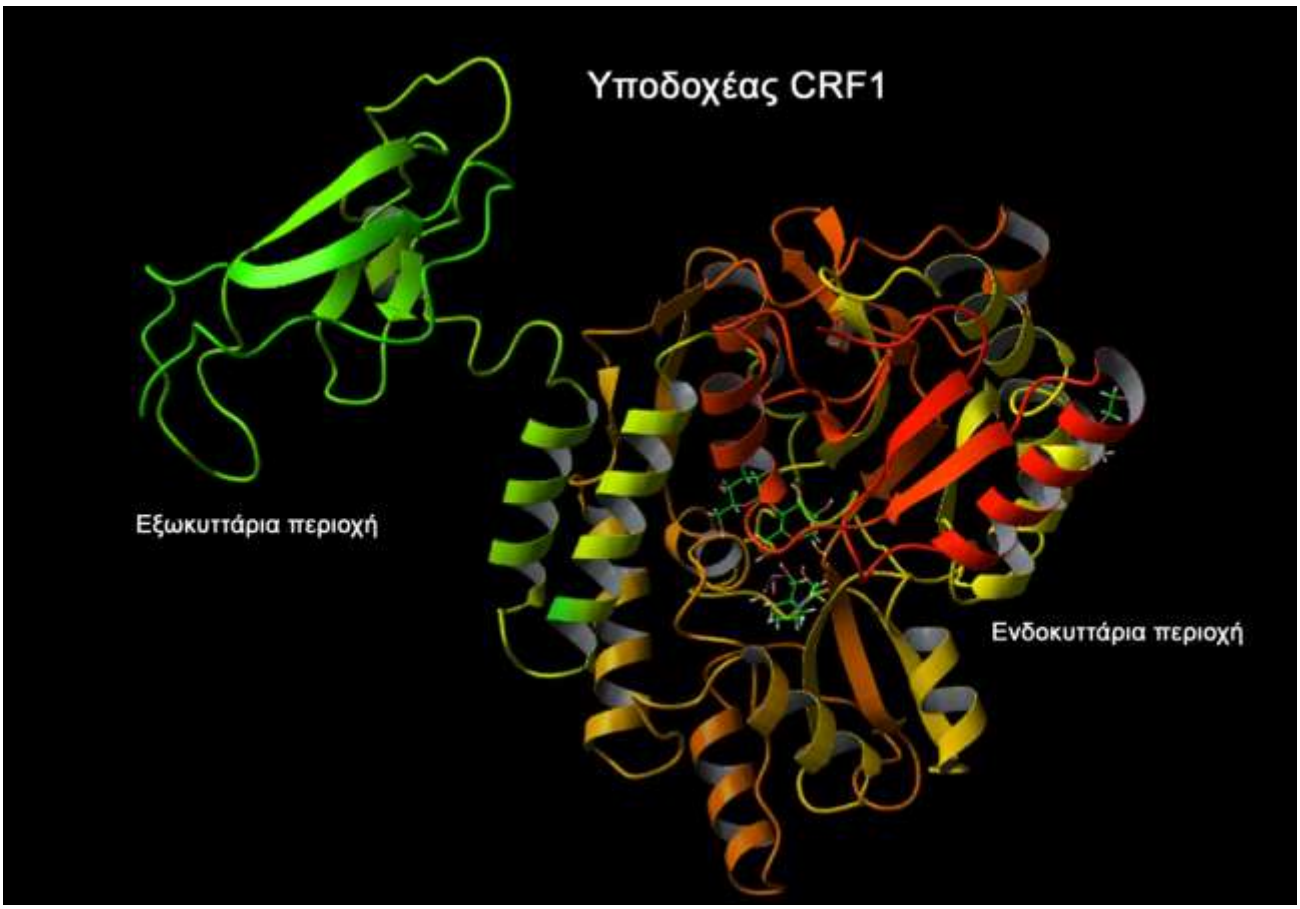
Οι διαμορφωτικά ευέλικτες δομές των δύο τριπεπτιδίων φέρουν τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων να προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρύνονται μεταξύ τους. Αυτό επιφέρει κάποια δυσκαμψία στο μόριο η οποία πειραματικά εντοπίστηκε στις μη αναμενόμενες παρατηρήσιμες σχάσεις των πρωτονίων των αλκυλικών αλυσίδων.

Πίνακας 5.3: Ο αριθμός και το ποσοστό των διαμορφώσεων που παρεκκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα όπως προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ		**LeuMetIle**	**DLeuMetIle**
No.**1**	→	4 (10%)	3 (7,5%)
No.**2**	→	3 (7,5%)	- (0%)
No.**3**	→	2 (5%)	2 (5%)
No.**4**	→	4 (10%)	4 (10%)
No.**5**	→	1 (2,5%)	1 (2,5%)
No.**6**	→	4 (10%)	2 (5%)
No.**7**	→	2 (5%)	- (0%)
No.**8**	→	- (0%)	3 (7,5%)
No.**9**	→	2 (5%)	2 (5%)
No.**10**	→	1(2,5%)	5 (12,5%)

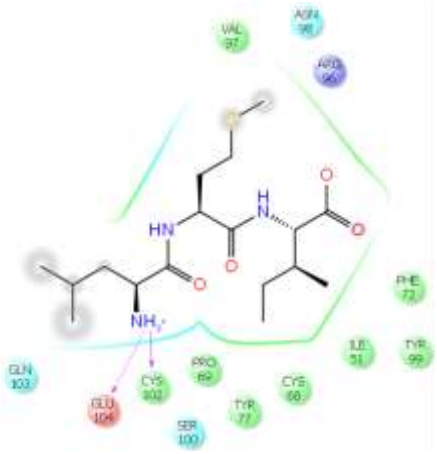
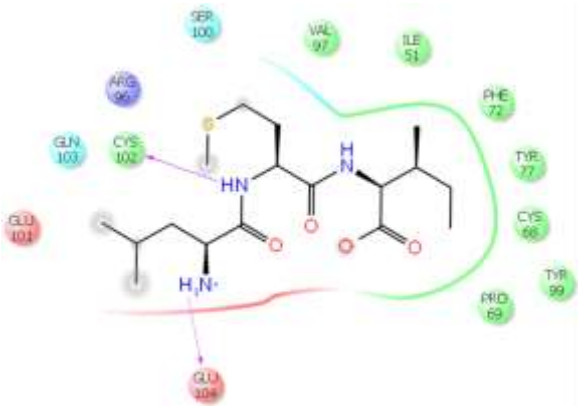
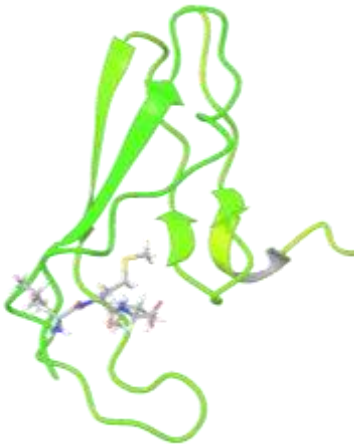
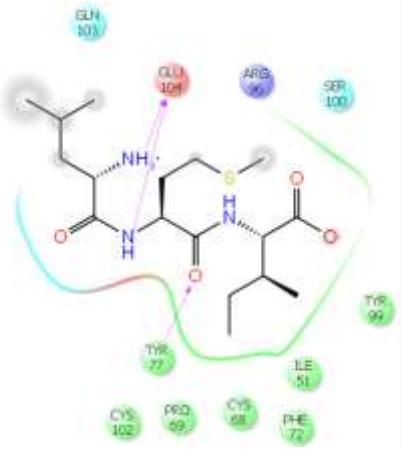
Γ) Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης Εξαιρετικής Ακρίβειας στον υποδοχέα CRF_1 (Glide)

Από τις 2000 διαμορφώσεις κάθε τριπεπτιδίου που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής δυναμικής επιλέχθηκαν δέκα βάση της ενέργειάς τους, οι οποίες .στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε πειράματα μοριακής πρόσδεσης στον υποδοχέα CRF_1. Η πρωτεϊνη-υποδοχέας CRF_1 (με κωδικό 3EHU, Pioszak, 2008) [38] (Σχήμα 5.2), πριν την πρόσδεση προετοιμάστηκε με την εφαρμογή PrepWiz του προγράμματος Maestro, ελαχιστοποιήθηκε και ορίστηκε το σημείο πρόσδεσης με δημιουργία αρχείων πλέγματος της πρωτεΐνης (Grid Generation Files). Ο διαμορφωτικός χώρος στον οποίο έγινε η πρόσδεση ορίστηκε ως ένας κύβος διαστάσεων 16X16X16 Å στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα (sushi domain). Ακολούθησαν τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Glide του εμπορικού πακέτου Maestro. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος υψηλής ακριβείας (XP mode) και τέθηκε η επιλογή για κάθε μια εναρκτήρια διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας των ενώσεων να προκύψουν δέκα πιθανές λύσεις (Write out at most 10 poses per ligand). Τα αποτελέσματα από τα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης για τα δύο τριπεπτίδια αναγράφονται στους Πίνακες 5.4 και 5.5 αντίστοιχα. Από τις 10 πιθανές λύσεις της κάθε διαμόρφωσης καταγράφονται μόνο οι χαμηλότερες ενεργειακά. Οι τιμές δεν ήταν ικανοποιητικές (> -6 kcal/mol), γι' αυτό εφαρμόστηκαν πειράματα επαγόμενης προσαρμογής όπου επιτρέπεται ευελιξία τόσο του προσδέτη όσο και του προσδέματος στις πλευρικές αλυσίδες. Στο πρόγραμμα glide τέτοια ευελιξία δεν είναι επιτρεπτή και αυτό ίσως να παρεμποδίζει η πρόσδεση να επιτυγχάνεται με ικανοποιητικό βαθμό αλληλεπιδράσεων που να προσδίδουν ΔG με μεγάλες αρνητικές τιμές.



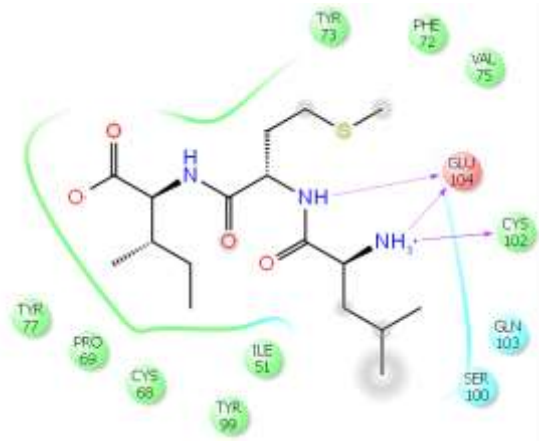
Σχήμα 5.2 Κρυσταλλογραφική μελέτη του υποδοχέα CRF_1 με κωδικό όνομα 3EHU (Pioszak. 2008). Αριστερά(πράσινο χρώμα) φαίνεται η εξωκυττάρια περιοχή (sushi domain). όπου γίνεται η πρόσδεση. Στην ενδοκυττάρια περιοχή (δεξιά) τα μόρια που διακρίνονται είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη και μαλτόζη. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιήθησαν κατά τη λήψη των ακτίνων-Χ προς καταβύθιση του υποδοχέα.

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα CRF_1 για το **LeuMetIle**

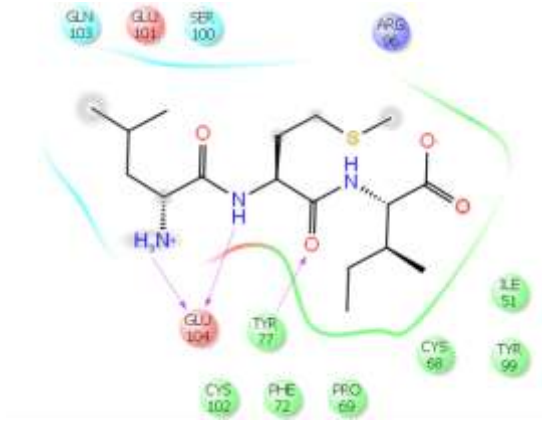
LeuMetIle	**Αλληλεπίδραση Προσδέτη στο ενεργό κέντρο (Ligand Interaction)**		**Glide XP Score**
No.1	**2D** 	**3D**	**-4.225**
No.2	**2D** 	**3D** 	**-5.124**
No.3	**2D** 	**3D**	**-4.778**

No.4	**2D**	**3D**	**-4.766**
No.5	**2D**	**3D**	**-4.460**
No.6	**2D**	**3D**	**-5.582**

No.7	**2D**	**3D**	**-4.126**
No.8	**2D**	**3D**	**-5.077**
No.9	**2D**	**3D**	**-4.696**

No.10	**2D**	**3D**	**-4.405**
			

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα CRF_1 για το D**LeuMetIle**

D**LeuMetIle**	**Αλληλεπίδραση Προσδέτη στο ενεργό κέντρο (Ligand Interaction)**		**Glide XP Score**
No.1	**2D**	**3D**	**-4.782**
			

No.2	**2D**	**3D**	**-4.472**
No.3	**2D**	**3D**	**-5.092**
No.4	**2D**	**3D**	**-5.238**

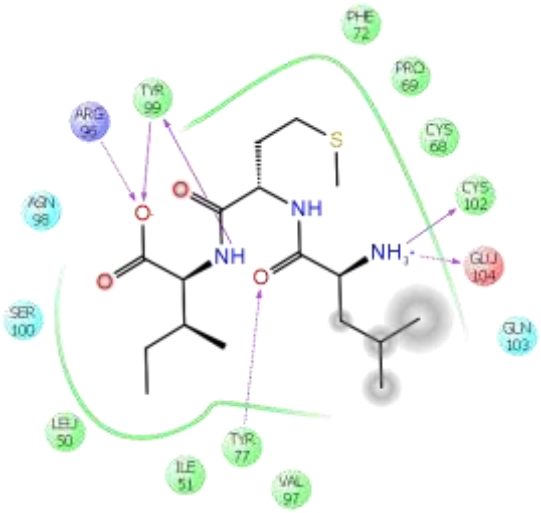
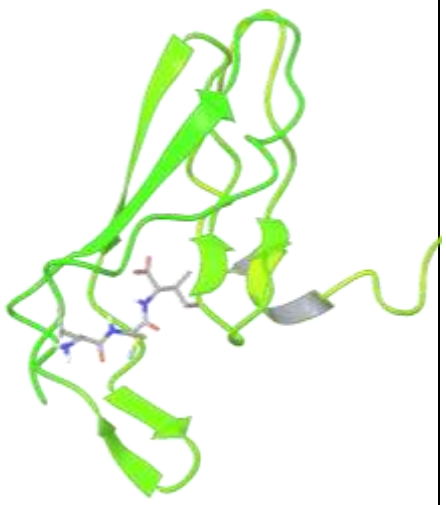
No.5	**2D**	**3D**	**-4.497**
No.6	**2D**	**3D**	**-4.762**
No.7	**2D**	**3D**	**-4.485**

No.8	**2D**	**3D**	**-3.972**
No.9	**2D**	**3D**	**-5.327**
No.10	**2D**	**3D**	**-5.010**

Δ) Πειράματα Επαγόμενης Προσαρμογής κατά τη Μοριακή Πρόσδεση (Induced Fit Docking-IFD) στον υποδοχέα CRF_1

Η διαμόρφωση με την υψηλότερη βαθμονόμηση (όπως προέκυψε στην υπορουτίνα Μοριακής Πρόσδεσης (Glide) προσδέθηκε στον υποδοχέα και ορίσθηκε ως δείκτης πρόσδεσης (Centroid of Workspace ligand). Στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι υπόλοιπες διαμορφώσεις, οι οποίες υποβλήθηκαν κι αυτές σε μοριακή πρόσδεση IFD. Τα πειράματα έλαβαν χώρα και για τα δύο τριπεπτίδια και παρήχθησαν συνολικά 156 διαμορφώσεις για το πρώτο και 156 για το δεύτερο. Από αυτές επιλέχθηκαν οι δέκα με το υψηλότερο βαθμό πρόσδεσης για το καθένα και τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 5.6 και 5.7 αντίστοιχα.

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα Πειραμάτων Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1 για το **LeuMetIle**

LeuMetIle	**Αλληλεπίδραση Προσδέτη στο ενεργό κέντρο (Ligand Interaction)**		**Induced Fit docking XPscore**
No.1'	**2D**	**3D**	**-7.445**
			

No.2'	**2D**	**3D**	**-6.847**
No.3'	**2D**	**3D**	**-8.698**
No.4'	**2D**	**3D**	**-7.340**

No.5'	**2D**	**3D**	**-7.470**
No.6'	**2D**	**3D**	**-7.920**
No.7'	**2D**	**3D**	**-7.224**

No.8'	**2D**	**3D**	**-7.132**
No.9'	**2D**	**3D**	**-7.849**
No.10'	**2D**	**3D**	**-7.605**

Πίνακας 5.7: Αποτελέσματα Πειραμάτων Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1 για το D**LeuMetIle**.

D**LeuMetIle**	**Αλληλεπίδραση Προσδέτη στο ενεργό κέντρο (Ligand Interaction)**		**Induced Fit docking XPscore**
No.1'	**2D**	**3D**	**-7.134**
No.2'	**2D**	**3D**	**-7.715**

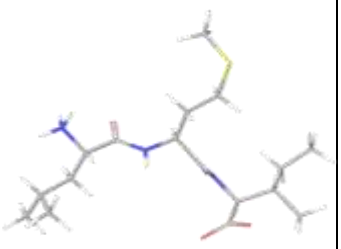
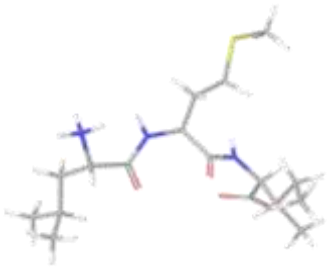
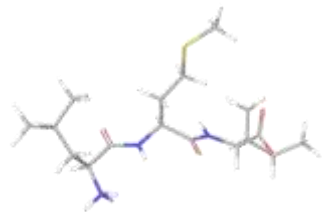
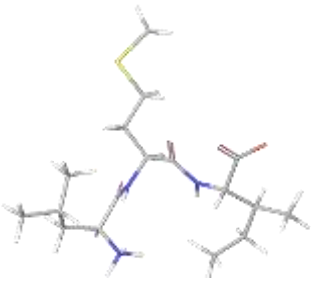
No.3'	**2D**	**3D**	**-8.338**
No.4'	**2D**	**3D**	**-8.205**
No.5'	**2D**	**3D**	**-7.521**

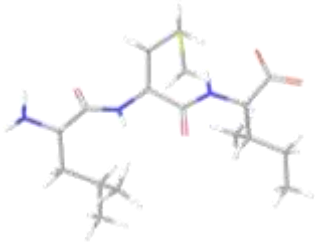
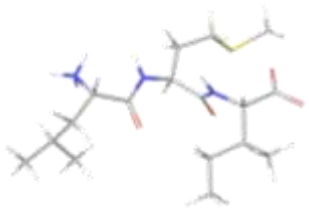
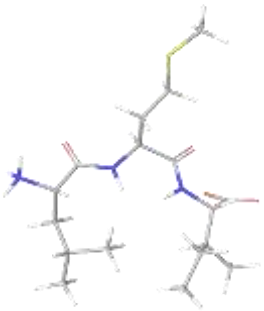
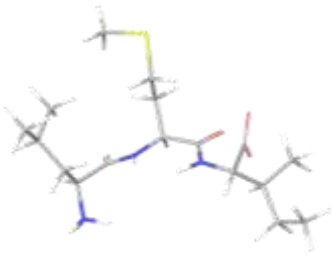
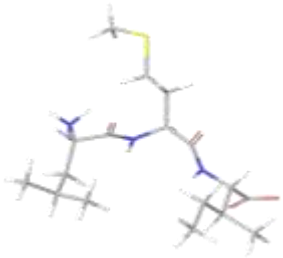
No.6'	**2D**	**3D**	**-7.500**
No.7'	**2D**	**3D**	**-8.101**
No.8'	**2D**	**3D**	**-7.796**

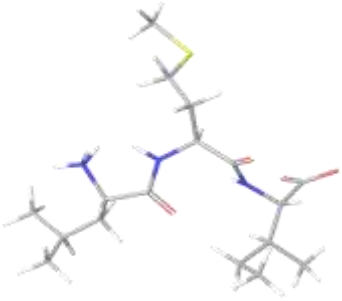
No.9'	**2D**	**3D**	**-7.738**
No.10'	**2D**	**3D**	**-7.237**

Στη συνέχεια, κι αφού καταγράφηκε η διαμόρφωση με τον υψηλότερο βαθμό πρόσδεσης από κάθε ομάδα, προέκυψαν 10 διαφορετικές δομές πρόσδεσης για το κάθε τριπεπτίδιο και μετρήθηκαν οι κρίσιμες αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων κάθε αμινοξέος. Τα αποτελέσματα αναφέρονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες και για τα δύο τριπεπτίδια (Πίνακας 5.8 για το LeuMetIle και Πίνακας 5.9 για το DLeuMetIle).

Πίνακας 5.8: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο **LeuMetIle,** όπως προέκυψαν από τα πειράματα Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1

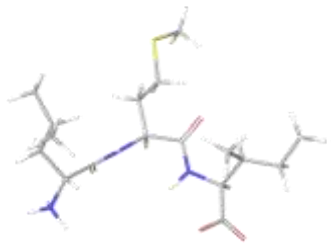
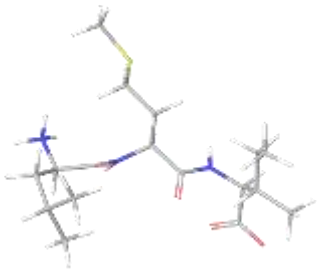
Διαμορφώσεις LeuMetIle	**Κρίσιμες Αποστάσεις (Å)**			
No.1' 	**δ_1Leu-δIle** : 11.822 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 12.836 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.731 Å **δ_1Leu-βIle** : 10.903 Å **δ_1Leu-δMet** : 11.419 Å **δ_1Leu-γMet** : 10.161 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.558 Å **δIle-δMet** : 9.711 Å **δIle-γMet** : 6.494 Å **δIle-βMet** : 7.315 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.413 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.621 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.814 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.795 Å **δ_2Leu-δMet** : 10.360 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.141 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.121 Å **γ_2Ile-δMet** : 7.246 Å **γ_2Ile-γMet** : 4.401 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.241 Å	**γLeu-δIle** : 11.748 Å **γLeu-γ_2Ile** : 12.324 Å **γLeu-γ_1Ile** : 10.462 Å **γLeu-βIle** : 10.333 Å **γLeu-δMet** : 9.812 Å **γLeu-γMet** : 9.151 Å **γLeu-βMet** : 7.155 Å **γ_1Ile-δMet** : 7.121 Å **γ_1Ile-γMet** : 3.729 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.272 Å	**βLeu-δIle** : 9.774 Å **βLeu-γ_2Ile** : 10.263 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.234 Å **βLeu-βIle** : 8.546 Å **βLeu-δMet** : 8.676 Å **βLeu-γMet** : 7.348 Å **βLeu-βMet** : 5.867 Å **βIle-δMet** : 7.360 Å **βIle-γMet** : 4.344 Å **βIle-βMet** : 4.958 Å
No.2' 	**δ_1Leu-δIle** : 9.897 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 9.459 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 9.850 Å **δ_1Leu-βIle** : 7.727 Å **δ_1Leu-δMet** : 12.498 Å **δ_1Leu-γMet** : 9.618 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.158 Å **δIle-δMet** : 8.805 Å **δIle-γMet** : 6.862 Å **δIle-βMet** : 7.866 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.951 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.261 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 11.031 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.978 Å **δ_2Leu-δMet** : 12.423 Å **δ_2Leu-γMet** : 9.726 Å **δ_2Leu-βMet** : 8.647 Å **γ_2Ile-δMet** : 8.442 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.488 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.545 Å	**γLeu-δIle** : 8.577 Å **γLeu-γ_2Ile** : 8.781 Å **γLeu-γ_1Ile** : 8.613 Å **γLeu-βIle** : 6.503 Å **γLeu-δMet** : 10.718 Å **γLeu-γMet** : 7.852 Å **γLeu-βMet** : 6.857 Å **γ_1Ile-δMet** : 6.355 Å **γ_1Ile-γMet** : 4.553 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.353 Å	**βLeu-δIle** : 10.357 Å **βLeu-γ_2Ile** : 9.919 Å **βLeu-γ_1Ile** : 9.579 Å **βLeu-βIle** : 8.066 Å **βLeu-δMet** : 10.413 Å **βLeu-γMet** : 7.806 Å **βLeu-βMet** : 6.272 Å **βIle-δMet** : 7.996 Å **βIle-γMet** : 5.489 Å **βIle-βMet** : 5.837 Å
No.3' 	**δ_1Leu-δIle** : 12.123 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 14.344 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 13.374 Å **δ_1Leu-βIle** : 11.490Å **δ_1Leu-δMet** : 10.287 Å **δ_1Leu-γMet** : 8.476 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.149 Å **δIle-δMet** : 5.988 Å **δIle-γMet** : 4.586 Å **δIle-βMet** : 6.577 Å	**δ_2Leu-δIle** : 9.341 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.838 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 11.081 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.105 Å **δ_2Leu-δMet** : 7.347 Å **δ_2Leu-γMet** : 5.534 Å **δ_2Leu-βMet** : 3.474 Å **γ_2Ile-δMet** : 7.986 Å **γ_2Ile-γMet** : 7.037 Å **γ_2Ile-βMet** : 8.737 Å	**γLeu-δIle** : 10.372 Å **γLeu-γ_2Ile** : 12.856Å **γLeu-γ_1Ile** : 11.669 Å **γLeu-βIle** : 9.628 Å **γLeu-δMet** : 9.470 Å **γLeu-γMet** : 7.220 Å **γLeu-βMet** : 5.175 Å **γ_1Ile-δMet** : 8.721 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.990 Å **γ_1Ile-βMet** : 8.297 Å	**βLeu-δIle** : 10.231 Å **βLeu-γ_2Ile** : 12.066 Å **βLeu-γ_1Ile** : 10.948 Å **βLeu-βIle** : 9.228 Å **βLeu-δMet** : 9.441 Å **βLeu-γMet** : 7.128 Å **βLeu-βMet** : 4.774 Å **βIle-δMet** : 7.513 Å **βIle-γMet** : 5.339 Å **βIle-βMet** : 6.557 Å
No.4' 	**δ_1Leu-δIle** : 8.262 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 5.977 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 7.848 Å **δ_1Leu-βIle** : 7.640 Å **δ_1Leu-δMet** : 6.969 Å **δ_1Leu-γMet** : 4.807 Å **δ_1Leu-βMet** : 2.381 Å **δIle-δMet** : 9.965 Å **δIle-γMet** : 7.708 Å **δIle-βMet** : 8.572 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.924 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.736 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.499 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.852 Å **δ_2Leu-δMet** : 9.917 Å **δ_2Leu-γMet** : 7.861 Å **δ_2Leu-βMet** : 5.521 Å **γ_2Ile-δMet** : 10.208 Å **γ_2Ile-γMet** : 7.345 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.946 Å	**γLeu-δIle** : 8.465 Å **γLeu-γ_2Ile** : 5.265 Å **γLeu-γ_1Ile** : 7.010 Å **γLeu-βIle** : 7.402 Å **γLeu-δMet** : 8.951 Å **γLeu-γMet** : 6.415 Å **γLeu-βMet** : 4.408 Å **γ_1Ile-δMet** : 9.963 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.227 Å **γ_1Ile-βMet** : 7.486 Å	**βLeu-δIle** : 10.220 Å **βLeu-γ_2Ile** : 6.654 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.067 Å **βLeu-βIle** : 8.787 Å **βLeu-δMet** : 9.978 Å **βLeu-γMet** : 7.529 Å **βLeu-βMet** : 5.298 Å **βIle-δMet** : 8.201 Å **βIle-γMet** : 5.769 Å **βIle-βMet** : 6.727 Å

No.5' 	**δ_1Leu-δIle** : 7.073 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 7.630 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 7.776 Å **δ_1Leu-βIle** : 5.283 Å **δ_1Leu-δMet** : 6.917 Å **δ_1Leu-γMet** : 7.288 Å **δ_1Leu-βMet** : 5.924 Å **δIle-δMet** : 3.178 Å **δIle-γMet** : 5.746 Å **δIle-βMet** : 6.557 Å	**δ_2Leu-δIle** : 6.936 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.491 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.577 Å **δ_2Leu-βIle** : 5.970 Å **δ_2Leu-δMet** : 7.177 Å **δ_2Leu-γMet** : 8.853 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.572 Å **γ_2Ile-δMet** : 6.452 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.225 Å **γ_2Ile-βMet** : 9.008 Å	**γLeu-δIle** : 5.619 Å **γLeu-γ_2Ile** : 7.185 Å **γLeu-γ_1Ile** : 7.380 Å **γLeu-βIle** : 4.678 Å **γLeu-δMet** : 5.100 Å **γLeu-γMet** : 6.405 Å **γLeu-βMet** : 5.083 Å **γ_1Ile-δMet** : 5.560 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.553 Å **γ_1Ile-βMet** : 7.776 Å	**βLeu-δIle** : 8.218 Å **βLeu-γ_2Ile** : 9.742 Å **βLeu-γ_1Ile** : 10.035 Å **βLeu-βIle** : 7.357 Å **βLeu-δMet** : 7.335 Å **βLeu-γMet** : 8.284 Å **βLeu-βMet** : 6.420 Å **βIle-δMet** : 4.206 Å **βIle-γMet** : 5.583 Å **βIle-βMet** : 6.067 Å
No.6' 	**δ_1Leu-δIle** : 8.617 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 6.101 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 5.302 Å **δ_1Leu-βIle** : 7.269 Å **δ_1Leu-δMet** : 10.652 Å **δ_1Leu-γMet** : 8.537 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.802 Å **δIle-δMet** : 8.370 Å **δIle-γMet** : 7.547 Å **δIle-βMet** : 8.255 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.310 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.906 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.206 Å **δ_2Leu-βIle** : 9.592 Å **δ_2Leu-δMet** : 13.148 Å **δ_2Leu-γMet** : 10.667 Å **δ_2Leu-βMet** : 8.850 Å **γ_2Ile-δMet** : 9.627 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.429 Å **γ_2Ile-βMet** : 8.249 Å	**γLeu-δIle** : 9.996 Å **γLeu-γ_2Ile** : 7.940 Å **γLeu-γ_1Ile** : 6.664 Å **γLeu-βIle** : 8.840 Å **γLeu-δMet** : 11.258 Å **γLeu-γMet** : 8.735 Å **γLeu-βMet** : 6.706 Å **γ_1Ile-δMet** : 8.017 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.359 Å **γ_1Ile-βMet** : 6.096 Å	**βLeu-δIle** : 8.214 Å **βLeu-γ_2Ile** : 6.558 Å **βLeu-γ_1Ile** : 5.211 Å **βLeu-βIle** : 7.661 Å **βLeu-δMet** : 10.968 Å **βLeu-γMet** : 8.335 Å **βLeu-βMet** : 6.784 Å **βIle-δMet** : 6.705 Å **βIle-γMet** : 6.023 Å **βIle-βMet** : 6.561 Å
No.7' 	**δ_1Leu-δIle** : 6.916 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 5.217 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 6.403 Å **δ_1Leu-βIle** : 4.952 Å **δ_1Leu-δMet** : 12.475 Å **δ_1Leu-γMet** : 9.562 Å **δ_1Leu-βMet** : 7.999 Å **δIle-δMet** : 10.552 Å **δIle-γMet** : 8.070 Å **δIle-βMet** : 8.024 Å	**δ_2Leu-δIle** : 5.235 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 3.394 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 3.624 Å **δ_2Leu-βIle** : 2.921 Å **δ_2Leu-δMet** : 9.852 Å **δ_2Leu-γMet** : 7.047 Å **δ_2Leu-βMet** : 5.490 Å **γ_2Ile-δMet** : 11.260 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.703 Å **γ_2Ile-βMet** : 7.570 Å	**γLeu-δIle** : 7.483 Å **γLeu-γ_2Ile** : 5.074 Å **γLeu-γ_1Ile** : 5.731 Å **γLeu-βIle** : 5.184 Å **γLeu-δMet** : 11.175 Å **γLeu-γMet** : 8.456 Å **γLeu-βMet** : 6.432 Å **γ_1Ile-δMet** : 9.075 Å **γ_1Ile-γMet** : 6.688 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.857 Å	**βLeu-δIle** : 7.632 Å **βLeu-γ_2Ile** : 6.489 Å **βLeu-γ_1Ile** : 6.624 Å **βLeu-βIle** : 5.197 Å **βLeu-δMet** : 10.331 Å **βLeu-γMet** : 7.499 Å **βLeu-βMet** : 5.839 Å **βIle-δMet** : 9.446 Å **βIle-γMet** : 6.652 Å **βIle-βMet** : 6.071 Å
No.8' 	**δ_1Leu-δIle** : 10.980 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 11.466 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.645 Å **δ_1Leu-βIle** : 9.592 Å **δ_1Leu-δMet** : 5.913 Å **δ_1Leu-γMet** : 5.527 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.811 Å **δIle-δMet** : 6.530 Å **δIle-γMet** : 6.434 Å **δIle-βMet** : 6.610 Å	**δ_2Leu-δIle** : 9.948 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 11.326 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.168 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.564 Å **δ_2Leu-δMet** : 3.518 Å **δ_2Leu-γMet** : 4.123 Å **δ_2Leu-βMet** : 4.356 Å **γ_2Ile-δMet** : 11.707 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.240 Å **γ_2Ile-βMet** : 8.998 Å	**γLeu-δIle** : 11.148 Å **γLeu-γ_2Ile** : 11.900 Å **γLeu-γ_1Ile** : 10.607 Å **γLeu-βIle** : 9.388 Å **γLeu-δMet** : 5.813 Å **γLeu-γMet** : 5.943 Å **γLeu-βMet** : 6.254 Å **γ_1Ile-δMet** : 10.820 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.587 Å **γ_1Ile-βMet** : 7.808 Å	**βLeu-δIle** : 9.116 Å **βLeu-γ_2Ile** : 9.455 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.271 Å **βLeu-βIle** : 7.316 Å **βLeu-δMet** : 6.335 Å **βLeu-γMet** : 4.881 Å **βLeu-βMet** : 5.684 Å **βIle-δMet** : 8.856 Å **βIle-γMet** : 5.823 Å **βIle-βMet** : 5.687 Å
No.9' 	**δ_1Leu-δIle** : 7.016 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 4.551 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 4.397 Å **δ_1Leu-βIle** : 4.916 Å **δ_1Leu-δMet** : 9.127 Å **δ_1Leu-γMet** : 6.932 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.465 Å **δIle-δMet** : 12.264 Å **δIle-γMet** : 9.395 Å **δIle-βMet** : 7.820 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.153 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.512 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.323 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.007 Å **δ_2Leu-δMet** : 8.861 Å **δ_2Leu-γMet** : 7.556 Å **δ_2Leu-βMet** : 7.815 Å **γ_2Ile-δMet** : 11.681 Å **γ_2Ile-γMet** : 9.070 Å **γ_2Ile-βMet** : 7.544 Å	**γLeu-δIle** : 8.763 Å **γLeu-γ_2Ile** : 6.572 Å **γLeu-γ_1Ile** : 6.508 Å **γLeu-βIle** : 6.390 Å **γLeu-δMet** : 9.326 Å **γLeu-γMet** : 7.417 Å **γLeu-βMet** : 7.755 Å **γ_1Ile-δMet** : 9.684 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.036 Å **γ_1Ile-βMet** : 5.347 Å	**βLeu-δIle** : 8.967 Å **βLeu-γ_2Ile** : 7.411 Å **βLeu-γ_1Ile** : 6.618 Å **βLeu-βIle** : 6.500 Å **βLeu-δMet** : 7.422 Å **βLeu-γMet** : 5.578 Å **βLeu-βMet** : 6.426 Å **βIle-δMet** : 10.602 Å **βIle-γMet** : 7.688 Å **βIle-βMet** : 6.583 Å

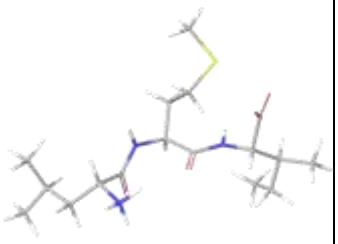
No.10' 	**δ_1Leu-δIle** : 9.362 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 7.739 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 6.238 Å **δ_1Leu-βIle** : 7.389 Å	**δ_2Leu-δIle** : 10.527 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 9.761 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.848 Å **δ_2Leu-βIle** : 8.149 Å	**γLeu-δIle** : 8.564 Å **γLeu-γ_2Ile** : 7.990 Å **γLeu-γ_1Ile** : 5.932 Å **γLeu-βIle** : 6.399 Å	**βLeu-δIle** : 7.220 Å **βLeu-γ_2Ile** : 6.676 Å **βLeu-γ_1Ile** : 4.622 Å **βLeu-βIle** : 4.836 Å
	δ_1Leu-δMet : 10.001 Å **δ_1Leu-γMet** : 8.168 Å **δ_1Leu-βMet** : 8.382 Å	**δ_2Leu-δMet** : 8.503 Å **δ_2Leu-γMet** : 7.642 Å **δ_2Leu-βMet** : 8.678 Å	**γLeu-δMet** : 9.459 Å **γLeu-γMet** : 8.182 Å **γLeu-βMet** : 8.604 Å	**βLeu-δMet** : 7.866 Å **βLeu-γMet** : 6.477 Å **βLeu-βMet** : 6.759 Å
	δIle-δMet : 11.281 Å **δIle-γMet** : 9.696 Å **δIle-βMet** : 8.294 Å	**γ_2Ile-δMet** : 10.791 Å **γ_2Ile-γMet** : 8.419 Å **γ_2Ile-βMet** : 6.704 Å	**γ_1Ile-δMet** : 9.834 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.775 Å **γ_1Ile-βMet** : 6.599 Å	**βIle-δMet** : 9.106 Å **βIle-γMet** : 7.589 Å **βIle-βMet** : 6.585 Å

***** Με κίτρινο χρώμα οι αποστάσεις <5Å

Πίνακας 5.9: Τιμές των κρίσιμων αποστάσεων για το τριπεπτίδιο D**LeuMetIle,** όπως προέκυψαν από τα πειράματα Επαγόμενης Προσαρμογής Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking) στον υποδοχέα CRF_1

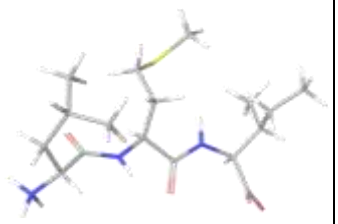
Διαμορφώσεις DLeuMetIle	**Κρίσιμες Αποστάσεις (Å)**			
No.1' 	**δ_1Leu-δIle** : 8.275 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 11.135 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 10.975 Å **δ_1Leu-βIle** : 8.677 Å	**δ_2Leu-δIle** : 6.759 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.048 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 9.686 Å **δ_2Leu-βIle** : 7.874 Å	**γLeu-δIle** : 6.152 Å **γLeu-γ_2Ile** : 9.107 Å **γLeu-γ_1Ile** : 8.738 Å **γLeu-βIle** : 6.158 Å	**βLeu-δIle** : 8.369 Å **βLeu-γ_2Ile** : 11.393 Å **βLeu-γ_1Ile** : 10.640 Å **βLeu-βIle** : 8.631 Å
	δ_1Leu-δMet : 8.664 Å **δ_1Leu-γMet** : 6.901 Å **δ_1Leu-βMet** : 4.571 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.141Å **δ_2Leu-γMet** : 7.813 Å **δ_2Leu-βMet** : 5.497 Å	**γLeu-δMet** : 7.732 Å **γLeu-γMet** : 5.435 Å **γLeu-βMet** : 3.082 Å	**βLeu-δMet** : 9.312 Å **βLeu-γMet** : 7.004 Å **βLeu-βMet** : 4.956 Å
	δIle-δMet : 8.486 Å **δIle-γMet** : 6.327 Å **δIle-βMet** : 5.779 Å	**γ_2Ile-δMet** : 8.638 Å **γ_2Ile-γMet** : 7.312 Å **γ_2Ile-βMet** : 7.818 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.830 Å **γ_1Ile-γMet** : 7.030 Å **γ_1Ile-βMet** : 7.593 Å	**βIle-δMet** : 6.617 Å **βIle-γMet** : 4.630 Å **βIle-βMet** : 5.055 Å
No.2' 	**δ_1Leu-δIle** : 8.694 Å **δ_1Leu-γ_2Ile** : 8.107 Å **δ_1Leu-γ_1Ile** : 8.021 Å **δ_1Leu-βIle** : 6.379 Å	**δ_2Leu-δIle** : 8.780 Å **δ_2Leu-γ_2Ile** : 6.932 Å **δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.466 Å **δ_2Leu-βIle** : 6.490 Å	**γLeu-δIle** : 11.089 Å **γLeu-γ_2Ile** : 9.061 Å **γLeu-γ_1Ile** : 9.251 Å **γLeu-βIle** : 8.041 Å	**βLeu-δIle** : 10.518 Å **βLeu-γ_2Ile** : 8.884 Å **βLeu-γ_1Ile** : 8.665 Å **βLeu-βIle** : 8.031 Å
	δ_1Leu-δMet : 9.115 Å **δ_1Leu-γMet** : 6.495 Å **δ_1Leu-βMet** : 6.243 Å	**δ_2Leu-δMet** : 8.399 Å **δ_2Leu-γMet** : 5.649 Å **δ_2Leu-βMet** : 5.460 Å	**γLeu-δMet** : 8.957 Å **γLeu-γMet** : 6.541 Å **γLeu-βMet** : 6.913 Å	**βLeu-δMet** : 6.852 Å **βLeu-γMet** : 4.770 Å **βLeu-βMet** : 5.769 Å
	δIle-δMet : 11.041 Å **δIle-γMet** : 8.709 Å **δIle-βMet** : 6.424 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.142 Å **γ_2Ile-γMet** : 6.722 Å **γ_2Ile-βMet** : 4.611 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.859 Å **γ_1Ile-γMet** : 5.748 Å **γ_1Ile-βMet** : 3.489 Å	**βIle-δMet** : 9.090 Å **βIle-γMet** : 6.515 Å **βIle-βMet** : 4.329 Å

No.3'



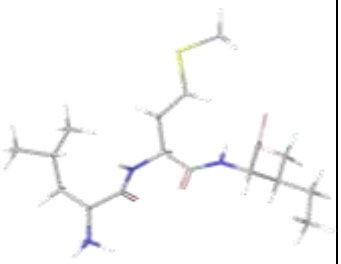
δ_1Leu-δIle : 13.055 Å	**δ_2Leu-δIle** : 12.488 Å	**γLeu-δIle** : 11.117 Å	**βLeu-δIle** : 10.826 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 10.388 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 10.516 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 8.483 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 8.924 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 10.936 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 10.990 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 9.193 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 8.959 Å
δ_1Leu-βIle : 11.724 Å	**δ_2Leu-βIle** : 11.119 Å	**γLeu-βIle** : 9.574 Å	**βLeu-βIle** : 9.849 Å
δ_1Leu-δMet : 11.039 Å	**δ_2Leu-δMet** : 9.053 Å	**γLeu-δMet** : 8.546 Å	**βLeu-δMet** : 9.972 Å
δ_1Leu-γMet : 9.147 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.122 Å	**γLeu-γMet** : 8.696 Å	**βLeu-γMet** : 8.115 Å
δ_1Leu-βMet : 8.242 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.546 Å	**γLeu-βMet** : 5.755 Å	**βLeu-βMet** : 6.848 Å
δIle-δMet : 8.629 Å	**γ_2Ile-δMet** : 7.818 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.807 Å	**βIle-δMet** : 6.670 Å
δIle-γMet : 7.030 Å	**γ_2Ile-γMet** : 4.690 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.132 Å	**βIle-γMet** : 4.643 Å
δIle-βMet : 7.408 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.162 Å	**γ_1Ile-βMet** : 6.845 Å	**βIle-βMet** : 5.583 Å

No.4'



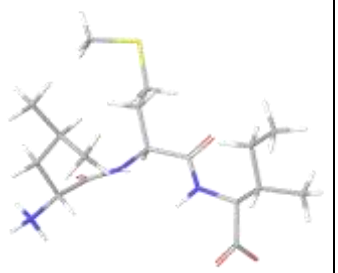
δ_1Leu-δIle : 8.928 Å	**δ_2Leu-δIle** : 8.890 Å	**γLeu-δIle** : 10.539 Å	**βLeu-δIle** : 10.663 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 8.697 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 9.536 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 10.713 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 11.422 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 6.681 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.642 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.714 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 9.225 Å
δ_1Leu-βIle : 8.890 Å	**δ_2Leu-βIle** : 9.709 Å	**γLeu-βIle** : 10.899 Å	**βLeu-βIle** : 11.019 Å
δ_1Leu-δMet : 6.611 Å	**δ_2Leu-δMet** : 6.513 Å	**γLeu-δMet** : 8.514 Å	**βLeu-δMet** : 9.099 Å
δ_1Leu-γMet : 4.357 Å	**δ_2Leu-γMet** : 3.398 Å	**γLeu-γMet** : 5.447 Å	**βLeu-γMet** : 5.822 Å
δ_1Leu-βMet : 3.817 Å	**δ_2Leu-βMet** : 3.995 Å	**γLeu-βMet** : 5.281 Å	**βLeu-βMet** : 5.786 Å
δIle-δMet : 3.827 Å	**γ_2Ile-δMet** : 5.168 Å	**γ_1Ile-δMet** : 4.428 Å	**βIle-δMet** : 5.618 Å
δIle-γMet : 5.996 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.279 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.573 Å	**βIle-γMet** : 7.271 Å
δIle-βMet : 5.321 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.858 Å	**γ_1Ile-βMet** : 3.808 Å	**βIle-βMet** : 5.804 Å

No.5'



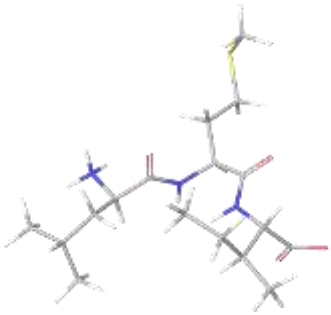
δ_1Leu-δIle : 9.166 Å	**δ_2Leu-δIle** : 11.732 Å	**γLeu-δIle** : 9.445 Å	**βLeu-δIle** : 10.165 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 11.271 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 12.930 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 10.481 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 11.241 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 11.092 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 13.227 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 10.108 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 11.640 Å
δ_1Leu-βIle : 9.006 Å	**δ_2Leu-βIle** : 11.116 Å	**γLeu-βIle** : 8.753 Å	**βLeu-βIle** : 9.233 Å
δ_1Leu-δMet : 7.815 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.371 Å	**γLeu-δMet** : 8.446 Å	**βLeu-δMet** : 10.250 Å
δ_1Leu-γMet : 5.675 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.306 Å	**γLeu-γMet** : 6.161 Å	**βLeu-γMet** : 7.621 Å
δ_1Leu-βMet : 3.983 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.095 Å	**γLeu-βMet** : 3.866 Å	**βLeu-βMet** : 5.834 Å
δIle-δMet : 5.693 Å	**γ_2Ile-δMet** : 8.878 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.435 Å	**βIle-δMet** : 7.243 Å
δIle-γMet : 4.482 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.403 Å	**γ_1Ile-γMet** : 6.435 Å	**βIle-γMet** : 5.274 Å
δIle-βMet : 6.448 Å	**γ_2Ile-βMet** : 8.256 Å	**γ_1Ile-βMet** : 7.952 Å	**βIle-βMet** : 6.438 Å

No.6'



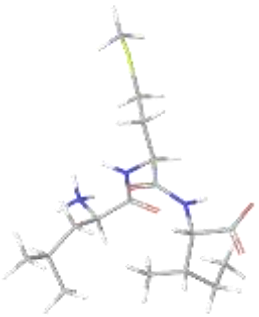
δ_1Leu-δIle : 10.730 Å	**δ_2Leu-δIle** : 8.171 Å	**γLeu-δIle** : 8.646 Å	**βLeu-δIle** : 10.482 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 8.740 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 6.558 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 7.154 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 9.400 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 7.648 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 5.554 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 5.594 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 7.820 Å
δ_1Leu-βIle : 8.620 Å	**δ_2Leu-βIle** : 5.812 Å	**γLeu-βIle** : 6.676 Å	**βLeu-βIle** : 8.331 Å
δ_1Leu-δMet : 6.078 Å	**δ_2Leu-δMet** : 7.394 Å	**γLeu-δMet** : 4.877 Å	**βLeu-δMet** : 6.089 Å
δ_1Leu-γMet : 7.395 Å	**δ_2Leu-γMet** : 7.133 Å	**γLeu-γMet** : 5.167 Å	**βLeu-γMet** : 6.721 Å
δ_1Leu-βMet : 5.109 Å	**δ_2Leu-βMet** : 4.855 Å	**γLeu-βMet** : 2.854 Å	**βLeu-βMet** : 4.722 Å
δIle-δMet : 10.796 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.697 Å	**γ_1Ile-δMet** : 7.826 Å	**βIle-δMet** : 9.762 Å
δIle-γMet : 7.917 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.779 Å	**γ_1Ile-γMet** : 5.581 Å	**βIle-γMet** : 7.336 Å
δIle-βMet : 7.586 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.567 Å	**γ_1Ile-βMet** : 4.578 Å	**βIle-βMet** : 6.326 Å

No.7'



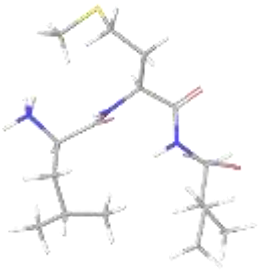
δ_1Leu-δIle : 10.206 Å	**δ_2Leu-δIle** : 7.798 Å	**γLeu-δIle** : 8.296 Å	**βLeu-δIle** : 7.253 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 6.822 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 5.736 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 5.035 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 3.500 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 8.850 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.174 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 6.828 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 5.568 Å
δ_1Leu-βIle : 7.789 Å	**δ_2Leu-βIle** : 5.505 Å	**γLeu-βIle** : 6.066 Å	**βLeu-βIle** : 4.888 Å
δ_1Leu-δMet : 10.859 Å	**δ_2Leu-δMet** : 11.044 Å	**γLeu-δMet** : 10.561 Å	**βLeu-δMet** : 8.418 Å
δ_1Leu-γMet : 9.565 Å	**δ_2Leu-γMet** : 9.294 Å	**γLeu-γMet** : 9.595 Å	**βLeu-γMet** : 7.578 Å
δ_1Leu-βMet : 7.505 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.681 Å	**γLeu-βMet** : 7.500 Å	**βLeu-βMet** : 5.459 Å
δIle-δMet : 10.057 Å	**γ_2Ile-δMet** : 7.530 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.579 Å	**βIle-δMet** : 8.841 Å
δIle-γMet : 8.737 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.072 Å	**γ_1Ile-γMet** : 8.076 Å	**βIle-γMet** : 7.274 Å
δIle-βMet : 8.308 Å	**γ_2Ile-βMet** : 5.408Å	**γ_1Ile-βMet** : 6.970 Å	**βIle-βMet** : 6.434 Å

No.8'



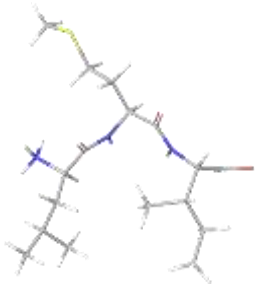
δ_1Leu-δIle : 3.790 Å	**δ_2Leu-δIle** : 4.674 Å	**γLeu-δIle** : 5.101Å	**βLeu-δIle** : 3.534 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 6.455 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 8.080 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 7.732 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 6.079 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 6.379 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 7.857 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.123 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 6.562 Å
δ_1Leu-βIle : 5.881 Å	**δ_2Leu-βIle** : 6.479 Å	**γLeu-βIle** : 7.379 Å	**βLeu-βIle** : 5.590 Å
δ_1Leu-δMet : 10.774 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.059 Å	**γLeu-δMet** : 9.244 Å	**βLeu-δMet** : 7.750 Å
δ_1Leu-γMet : 8.302 Å	**δ_2Leu-γMet** : 7.927 Å	**γLeu-γMet** : 7.224 Å	**βLeu-γMet** : 5.353 Å
δ_1Leu-βMet : 7.979 Å	**δ_2Leu-βMet** : 7.058 Å	**γLeu-βMet** : 7.189 Å	**βLeu-βMet** : 4.826 Å
δIle-δMet : 9.967 Å	**γ_2Ile-δMet** : 9.936 Å	**γ_1Ile-δMet** : 11.624 Å	**βIle-δMet** : 11.232 Å
δIle-γMet : 7.099 Å	**γ_2Ile-γMet** : 7.055 Å	**γ_1Ile-γMet** : 8.246 Å	**βIle-γMet** : 8.322 Å
δIle-βMet : 6.080 Å	**γ_2Ile-βMet** : 6.677 Å	**γ_1Ile-βMet** : 7. 771 Å	**βIle-βMet** : 6.837 Å

No.9'



δ_1Leu-δIle : 7.756 Å	**δ_2Leu-δIle** : 5.165 Å	**γLeu-δIle** : 7.266 Å	**βLeu-δIle** : 8.371 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 6.388 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 3.612 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 4.877 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 6.208 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 6.869 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 3.739 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 5.549 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 6.054 Å
δ_1Leu-βIle : 5.483 Å	**δ_2Leu-βIle** : 2.886 Å	**γLeu-βIle** : 5.122 Å	**βLeu-βIle** : 6.009 Å
δ_1Leu-δMet : 7.356 Å	**δ_2Leu-δMet** : 7.308 Å	**γLeu-δMet** : 8.042 Å	**βLeu-δMet** : 6.467 Å
δ_1Leu-γMet : 8.036 Å	**δ_2Leu-γMet** : 6.975 Å	**γLeu-γMet** : 7.687 Å	**βLeu-γMet** : 5.919 Å
δ_1Leu-βMet : 8.206 Å	**δ_2Leu-βMet** : 6.289 Å	**γLeu-βMet** : 7.598 Å	**βLeu-βMet** : 6.326 Å
δIle-δMet : 10.211 Å	**γ_2Ile-δMet** : 10.110 Å	**γ_1Ile-δMet** : 8.636 Å	**βIle-δMet** : 7.997 Å
δIle-γMet : 9.727 Å	**γ_2Ile-γMet** : 9.045 Å	**γ_1Ile-γMet** : 7.281 Å	**βIle-γMet** : 7.702 Å
δIle-βMet : 7.961 Å	**γ_2Ile-βMet** : 7.660 Å	**γ_1Ile-βMet** : 5.594 Å	**βIle-βMet** : 6.301 Å

No.10'



δ_1Leu-δIle : 4.714 Å	**δ_2Leu-δIle** : 5.616 Å	**γLeu-δIle** : 5.680 Å	**βLeu-δIle** : 3.607 Å
δ_1Leu-γ_2Ile : 6.015 Å	**δ_2Leu-γ_2Ile** : 7.212 Å	**γLeu-γ_2Ile** : 7.872 Å	**βLeu-γ_2Ile** : 6.316 Å
δ_1Leu-γ_1Ile : 6.447 Å	**δ_2Leu-γ_1Ile** : 8.264 Å	**γLeu-γ_1Ile** : 8.251 Å	**βLeu-γ_1Ile** : 6.692 Å
δ_1Leu-βIle : 6.887 Å	**δ_2Leu-βIle** : 7.795 Å	**γLeu-βIle** : 8.060 Å	**βLeu-βIle** : 5.836 Å
δ_1Leu-δMet : 10.050 Å	**δ_2Leu-δMet** : 10.487 Å	**γLeu-δMet** : 8.656 Å	**βLeu-δMet** : 8.216 Å
δ_1Leu-γMet : 7.790 Å	**δ_2Leu-γMet** : 8.639 Å	**γLeu-γMet** : 6.927 Å	**βLeu-γMet** : 6.063 Å
δ_1Leu-βMet : 8.212 Å	**δ_2Leu-βMet** : 8.745 Å	**γLeu-βMet** : 7.673 Å	**βLeu-βMet** : 5.931 Å
δIle-δMet : 9.473 Å	**γ_2Ile-δMet** : 12.797 Å	**γ_1Ile-δMet** : 11.734 Å	**βIle-δMet** : 10.770 Å
δIle-γMet : 6.705 Å	**γ_2Ile-γMet** : 9.935 Å	**γ_1Ile-γMet** : 8.795 Å	**βIle-γMet** : 7.941 Å
δIle-βMet : 5.681 Å	**γ_2Ile-βMet** : 8.878 Å	**γ_1Ile-βMet** : 7.792 Å	**βIle-βMet** : 6.345 Å

***** Με κίτρινο χρώμα οι αποστάσεις <5Å

Συμπεράσματα

Το πρώτο σημαντικό συμπέρασμα που εξάγεται από τα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης IFD είναι ότι οι τιμές πρόσδεσης είναι μικρότερες από -6 kcal/mol. Η πρόσδεση είναι κατά σημαντικό βαθμό ευνοϊκότερη όταν είναι επαγόμενη συγκριτικά με την άκαμπτη. Αυτό αποδεικνύει ότι τόσο ο υποδοχέας που προσδένονται τα πεπτίδια όσο και τα ίδια τα πεπτίδια έχουν κάποιο βαθμό ευελιξίας.

Από τον παρακάτω πίνακα (5.10) εμφαίνονται επίσης ότι οι διαμορφώσεις έχουν μικρό ποσοστό απόκλισης από τα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 5.10: Ο αριθμός και το ποσοστό των διαμορφώσεων που παρεκκλίνουν από τα πειραματικά δεδομένα όπως προέκυψαν από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ		**LeuMetIle**	**DLeuMetIle**
No.**1**	→	3 (7,5%)	3 (7,5%)
No.**2**	→	1 (2,5%)	4 (10%)
No.**3**	→	4 (10%)	2 (5%)
No.**4**	→	3 (7,5%)	7(17,5%)
No.**5**	→	3 (7,5%)	3 (7,5%)
No.**6**	→	0 (0%)	5(12,5%)
No.**7**	→	4 (10%)	2(5%)
No.**8**	→	4 (10%)	2(5%)
No.**9**	→	3 (7,5%)	4(10%)
No.**10**	→	2(5%)	2(5%)

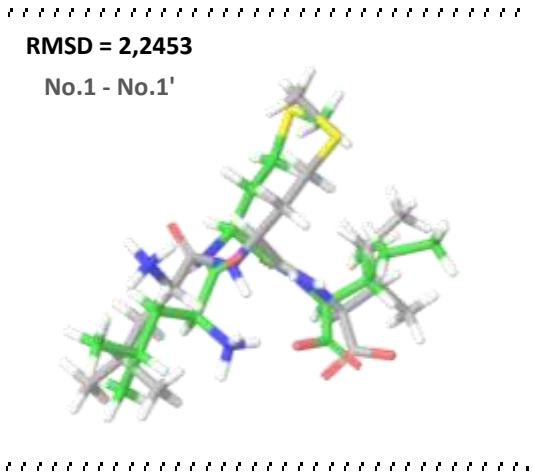
Τέλος, στο τελευταίο στάδιο της μελέτης έγινε σύγκριση των αρχικών δομών MD (πριν την πρόσδεση) με τις διαμορφώσεις που επιλέχτηκαν από τα πειράματα IFD. Οι τιμές RMSD (Root-mean-square deviation) για κάθε συνδυασμό εμφανίζονται στον πίνακα 5.11 και .όπως φαίνεται. κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 1,50 - 4,00. Αυτό σημαίνει πως τόσο οι αρχικές με τις τελικές διαμορφώσεις είναι σχεδόν ταυτόσημες και πως το τριπεπτίδιο κατά την πρόσδεση δεν υποβάλλεται σε σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές.

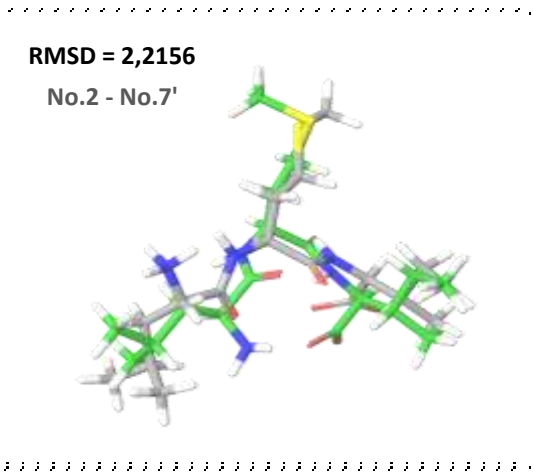
Πίνακας 5.11: Τιμές **RMSD** - Σύγκριση δομών MD και IFD για το **LeuMetIle**.

IFD / MD	No.1'	No.2'	No.3'	No.4'	No.5'	No.6'	No.7'	No.8'	No.9'	No.10'
No.1	2.2453	2.3833	2.6248	2.6997	2.8245	2.6165	2.5845	2.7800	2.8121	2.7950
No.2	2.4646	2.3140	2.5602	2.4746	2.4883	2.7260	2.2156	2.5126	3.0466	2.7965
No.3	2.5244	2.8233	2.6064	2.2.8814	2.4721	2.7040	2.9888	2.8165	2.8596	2.7247
No.4	3.1080	2.8546	2.6203	2.9201	2.5331	2.8638	2.6979	2.5411	2.7691	2.8298
No.5	3.3274	3.4628	3.6225	3.4157	3.5235	3.5470	3.4562	3.4208	3.8351	3.6920
No.6	3.1393	3.1374	3.1338	3.0339	2.9942	3.2686	3.0171	2.9478	3.4888	3.3598
No.7	3.2764	3.0269	3.0218	3.0417	3.0234	3.3187	2.7158	2.8832	3.3922	3.2640
No.8	2.9532	2.9888	2.7995	3.1643	2.6277	2.9658	2.8930	2.4669	2.4856	2.3887
No.9	3.3897	3.0288	2.9684	3.2467	3.0544	3.3188	2.5708	2.5879	2.8504	2.7383
No.10	3.1602	2.8479	2.7273	3.0674	2.7943	3.0973	2.4093	2.4777	2.7266	2.5705

Οι τιμές RMSD, που είναι υπογραμμισμένες με κίτρινο χρώμα είναι οι χαμηλότερες, που σημαίνει πως οι διαμορφώσεις που έχουν συγκριθεί είναι διαμορφωτικά πλησιέστερες. Με λίγα λόγια, σύμφωνα με τα δεδομένα (Πίνακας 5.11), η διαμόρφωση No.1 προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό τη No.1', η No.2 την No.7' κ.ο.κ. Υπολογισμοί των τιμών RMSD έγιναν και για το τριπεπτίδιο **DLeuMetIle** και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.13. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι δομές με την καλύτερη τιμή RMSD σε υπέρθεση (Πίνακες 5.12 και 5.14)

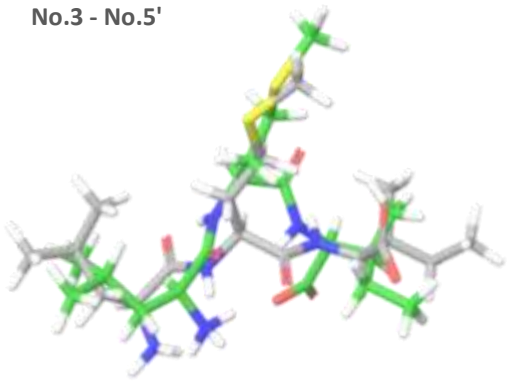
Πίνακας 5.12: Δομές **LeuMetIle** σε υπέρθεση. Καλύτερες τιμές RMSD





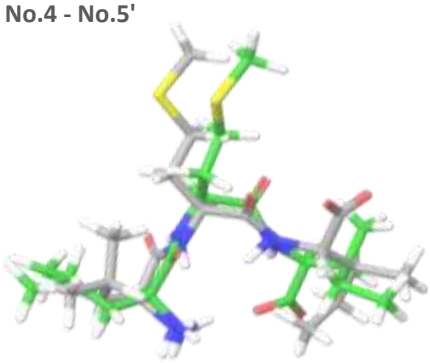
· RMSD = 2,4721

No.3 - No.5'



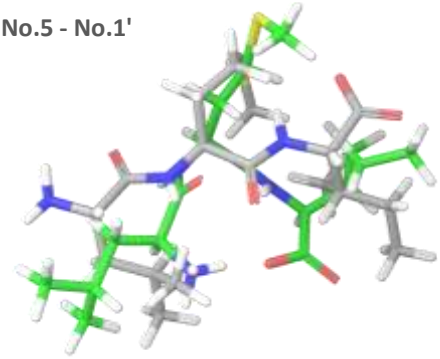
RMSD = 2,5334

No.4 - No.5'



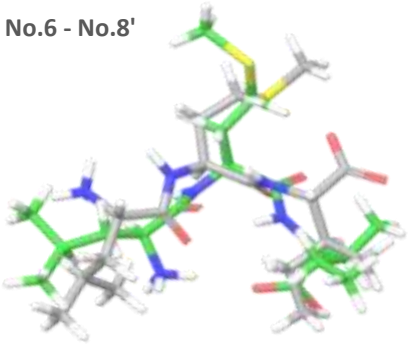
RMSD = 3,3274

No.5 - No.1'



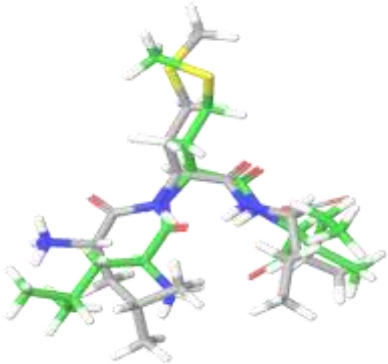
RMSD = 2,9478

No.6 - No.8'



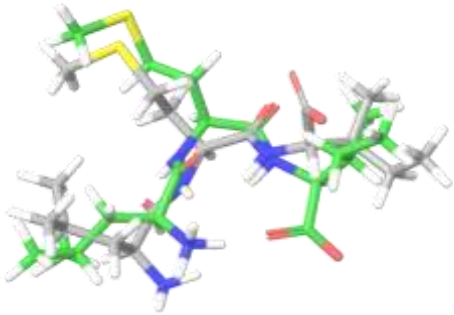
RMSD = 2,7158

No.7 - No.7'



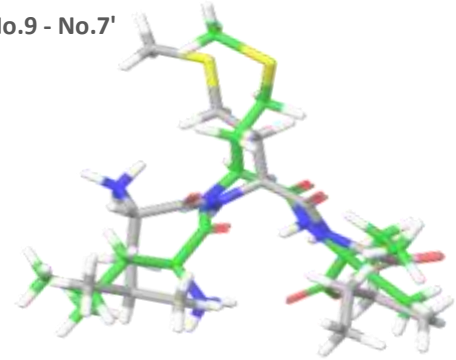
RMSD = 2,3887

No.8 - No.10'



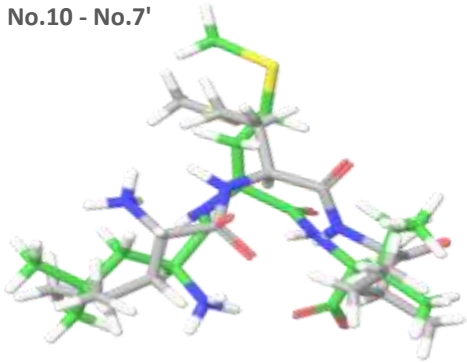
RMSD = 2,5708

No.9 - No.7'



RMSD = 2,4093

No.10 - No.7'



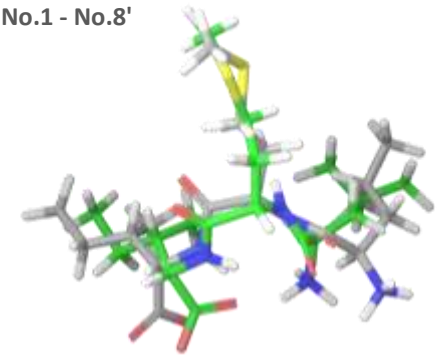
Πίνακας 5.13: Τιμές **RMSD** - Σύγκριση δομών MD και IFD για το **DLeuMetIle**.

IFD / MD	No.1'	No.2'	No.3'	No.4'	No.5'	No.6'	No.7'	No.8'	No.9'	No.10'
No.1	3.3147	2.8659	3.3413	3.1791	2.5671	2.5908	2.0393	1.8060	1.8592	2.0737
No.2	3.3386	2.9486	2.9869	2.4661	2.8120	2.6498	2.4645	2.6789	2.6014	2.7671
No.3	2.3854	2.7250	2.8665	3.2358	2.3830	2.5420	2.6950	3.2783	2.6338	2.8539
No.4	3.2015	3.3495	3.9317	3.7239	3.3449	3.3082	2.7800	2.6490	2.5636	1.7990
No.5	2.7713	3.0043	3.4285	3.5811	3.0052	2.9014	2.6204	2.9783	2.6018	2.4918
No.6	3.8187	3.3134	3.2600	2.8049	2.9882	2.7998	2.4995	2.3279	2.1910	2.1974
No.7	3.1180	2.6275	2.4469	1.4684	2.5654	2.4034	2.4895	2.6940	2.6662	2.7571
No.8	3.2756	2.3188	2.2911	2.8618	2.9730	3.0604	3.2270	3.0234	3.0709	3.4800
No.9	3.5843	2.9972	2.1730	1.9684	3.2472	3.1052	3.3155	3.2187	3.3180	3.5539
No.10	3.5114	2.5097	1.7581	2.1881	3.0908	3.0263	3.2358	2.9147	3.3225	3.5161

Πίνακας 5.14: Δομές **DLeuMetIle** σε υπέρθεση. Καλύτερες τιμές RMSD

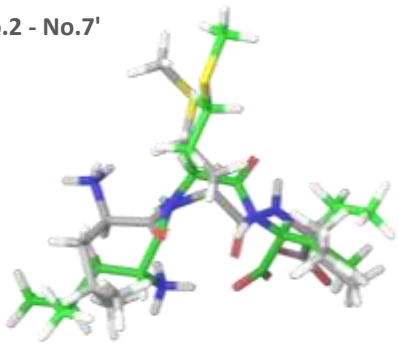
RMSD = 1,8060

No.1 - No.8'



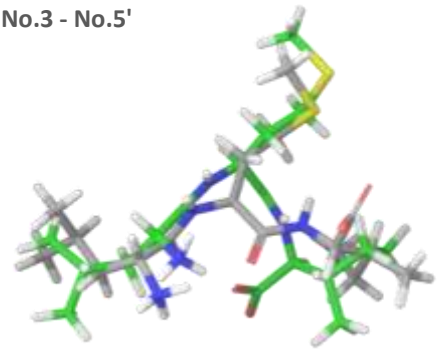
RMSD = 24645

No.2 - No.7'



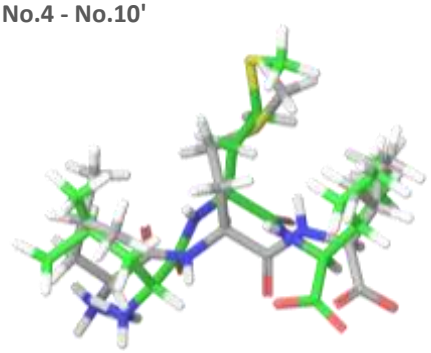
RMSD = 2,3830

No.3 - No.5'



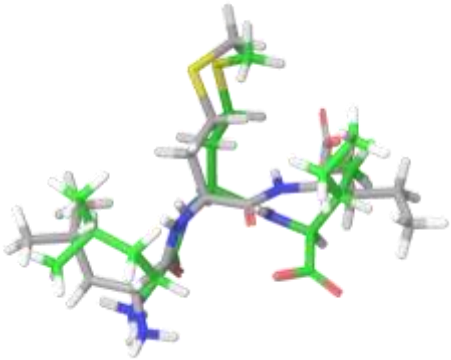
RMSD = 1,7990

No.4 - No.10'



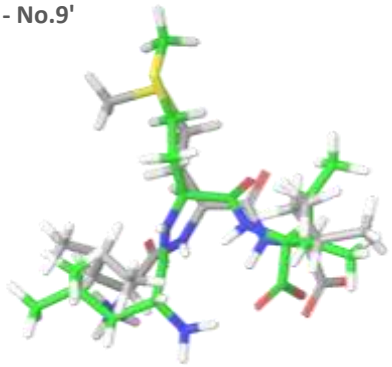
RMSD = 2,4918

No.5 - No.10'



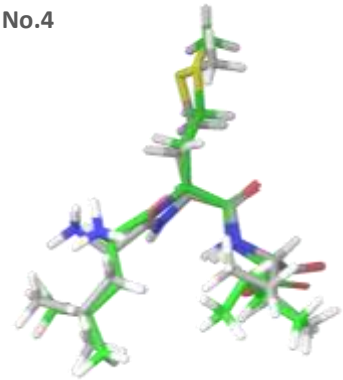
RMSD = 2,1910

No.6 - No.9'



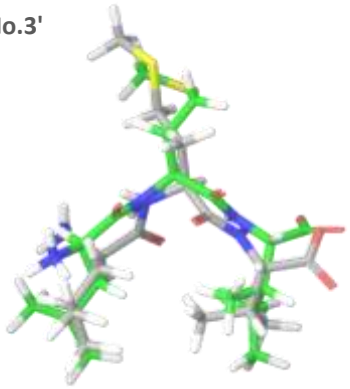
RMSD = 1,4684

No.7 - No.4



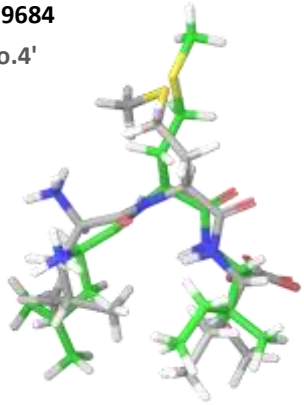
RMSD = 2,2911

No.8 - No.3'



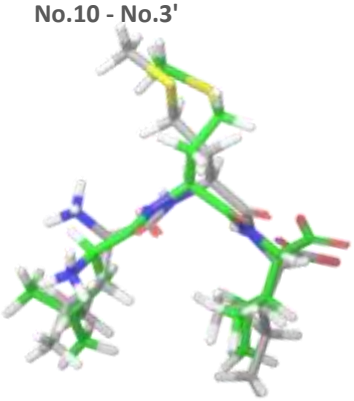
RMSD = 1,9684

No.9 - No.4'



RMSD = 1,7581

No.10 - No.3'



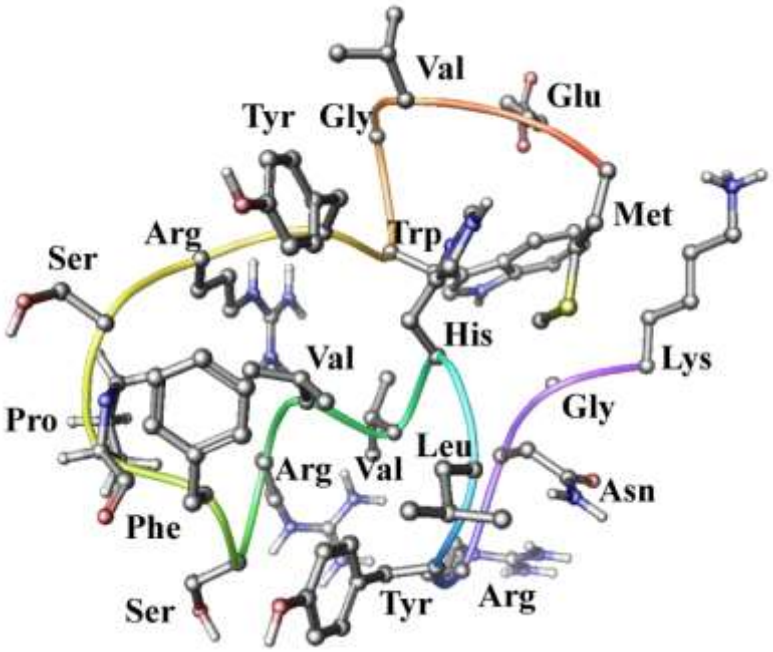
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

&

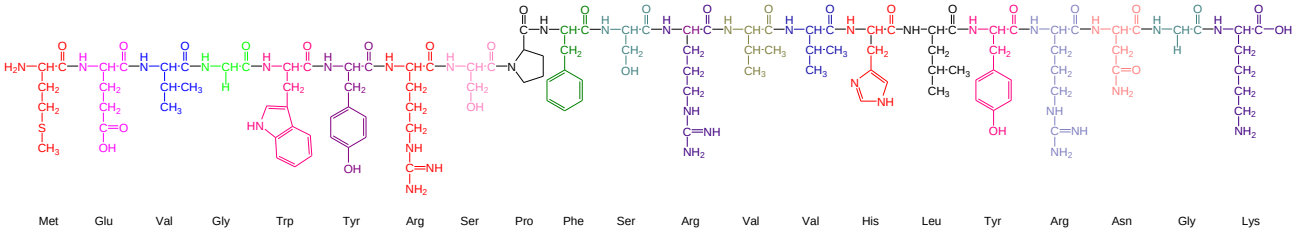
ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΤΟΥ ΕΠΙΤΟΠΟΥ MOG$_{35-55}$



6.1 Διαμορφωτική Ανάλυση του πεπτιδικού αναλόγου του επιτόπου της μυελίνης, MOG_{35-55}

Η πλήρης ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού του ^{1}H NMR φάσματος του επίτοπου της μυελίνης, MOG_{35-55} με αλληλουχία αμινοξέων H_2N-Met^{35}-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr^{40}-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser^{45}-Arg-Val-Val-His-Leu^{50}-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys-COOH (Σχήμα 6.1) σε σύστημα διαλυτών *d_6*-DMSO βασίστηκε στη συνδυασμένη χρήση 2D ^{1}H-^{15}N HSQC, 2D TOCSY, 2D NOESY και 1D NMR. Επιπλέον, χρήσιμο εργαλείο για την πορεία της ταυτοποίησης αποτέλεσε κι ο Πίνακας 6.1, ο οποίος εμπεριέχει τις θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων για κάθε αμινοξύ ξεχωριστά σε δευτεριωμένο ύδωρ.



Σχήμα 6.1 Δομή του πεπτιδίου MOG_{35-55}

Πίνακας 6.1: Κατά προσέγγιση χημικές μετατοπίσεις για τα 20 φυσικά αμινοξικά κατάλοιπα σε D_2O.

Αμινοξέα	NH	αH	βH	Άλλα	
Gly	8.39	3.97			
Ala	8.25	4.35	1.39		
Val	8.44	4.18	2.13	γCH_2	0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH_2	1.48, 1.19
				γCH_3	0.95
				δCH_3	0.89
Leu	8.42	4.38	1.65	γCH	1.64
				δCH_3	0.94, 0.90
Pro		4.44	2.28, 2.02	γCH_2	2.03
				δCH_2	3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88		
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH_3	1.23
Asp	8.41	4.76	2.84, 2.75		
Glu	8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH_2	2.31, 2.28

Lys	8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH_2	1.45
				δCH_2	1.70
				εCH_2	3.02
				εNH_3^+	7.52
Arg	8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH_2	1.70
				δCH_2	3.32
				εNH	7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH	7.56, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH_2	2.38
				δNH_2	6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2	2.64
				δCH_3	2.13
Cys	8.31	4.69	3.28, 2.96		
Trp	8.09	4.70	3.32, 3.19	2H	7.24
				4H	7.65
				5H	7.17
				6H	7.24
				7H	7.50
				1NH	10.22
Phe	8.23	4.66	3.22, 2.99	2,6H	7.30
				3,5H	7.39
				4H	7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13, 2.92	2,6H	7.15
				3,5H	6.89
His	8.41	4.63	3.26, 3.20	2H	8.12
				4H	7.14

* Με σκούρο χρώμα τα αμινοξέα που εμπεριέχονται στον επίτοπο MOG_{35-55}

Μεθοδολογία

Στο πρώτο στάδιο της διαμορφωτικής ανάλυσης πραγματοποιείται η ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού όλων των πρωτονίων στο φάσμα ^1H NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού των πεπτιδίων μπορούν να διακριθούν στις εξής περιοχές:

α) Στην περιοχή 7,5–9 ppm συντονίζονται τα αμιδικά πρωτόνια των πεπτιδικών δεσμών (συντονισμός σε πεδία χαμηλότερα συγκριτικά με όλων των υπολοίπων πρωτονίων των αμινοξέων).

β) Στην περιοχή 3,5–5 ppm συντονίζονται τα H^{α} πρωτόνια των αμινοξέων.

γ) Σε υψηλότερα πεδία (0,5–4ppm) συντονίζονται τα $H^{\beta,\gamma,\delta....}$ πρωτόνια των πλευρικών αλυσίδων.

δ) Τα αρωματικά πρωτόνια των πλευρικών ομάδων όπως της Phe, της Tyr και της Trp καθώς και τα NH πρωτόνια των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Arg, His, Asn, Lys, Gln συντονίζονται μεταξύ 6,5 και 7,5 ppm.

Η ταυτοποίηση των κορυφών των πρωτονίων του πεπτιδίου MOG_{35-55} βασίστηκε στη συνδυασμένη χρήση των φασμάτων ^{1}H-NMR, 2D-TOCSY, NOESY, COSY και ^{1}H-^{15}N HSQC.

Στα φάσματα δύο διαστάσεων, η πορεία ταυτοποίησης αρχίζει από την NH/H περιοχή του φάσματος 2D TOCSY. Το πρώτο αμιδικό πρωτόνιο που ταυτοποιείται είναι το αμινοξύ με τα πιο αποθωρακισμένα πρωτόνια, που συντονίζεται στη μεγαλύτερη συχνότητα. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν τα $H^{\alpha,\beta,\gamma....}$ του συγκεκριμένου αμινοξέος. Το δεύτερο βήμα για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας του πεπτιδικού αναλόγου γίνεται με συνδυασμό των φασμάτων 2D TOCSY και 2D NOESY. Ο συνδυασμός αυτός αξιοποιεί το γεγονός ότι στο 2D TOCSY φάσμα παρατηρούνται συσχετίσεις ανάμεσα σε πρωτόνια του ίδιου αμινοξέος ενώ στο 2D NOESY φάσμα εκτός των συσχετίσεων αυτών παρατηρούνται και συσχετίσεις πρωτονίων ανάμεσα σε διαδοχικά αμινοξέα του τύπου dNN(i,i+1) και dαN(i.i+1). Στην περιοχή NH/H^{α} του 2D NOESY φάσματος προσδιορίζεται η αμινοξική αλληλουχία. Η φερόμενη οριζόντιος γραμμή από το σημείο του άξονα των απορροφήσεων συντονισμού που αντιστοιχεί στο NH του πρώτου αμινοξέος που ταυτοποιήθηκε. συναντά την κορυφή διασταύρωσης που αναμένεται να αντιστοιχεί στην NH/NH αλληλεπίδραση με το επόμενο (γειτονικό αμινοξύ που συνδέεται με το προηγούμενο μέσω αμιδικού δεσμού) αμινοξύ. Φέροντας την κάθετη και ορίζόντια γραμμή, ο άξονας απορροφήσεων συντονισμού τέμνεται στο σημείο που αντιστοιχεί στο NH με τα γειτονικά αμινοξέα. Με το ίδιο σκεπτικό προσδιορίζονται οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των NH και H^{α} με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της αλληλουχίας του πεπτιδίου. Στη συνέχεια από το φάσμα 2D-TOCSY ταυτοποιούνται και τα υπόλοιπα πρωτόνια των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων (H^{β}, H^{γ}, H^{δ} κλπ). Η ταυτοποίηση του αμινοξέος Pro, η οποία δεν διαθέτει πρωτόνιο στο άζωτό της αφού είναι ιμινοξύ, επιτυγχάνεται μέσω του φάσματος 2D-TOCSY στην περιοχή όπου εμφανίζονται τα H^{α}, H^{β}, H^{γ} και H^{δ}. Τα αρωματικά πρωτόνια ταυτοποιούνται με τη χρήση 2D-TOCSY και 2D-NOESY.

Στο παρακάτω σχήμα 6.2 απεικονίζεται η στρατηγική που ακολουθήθηκε με στόχο την ταυτοποίηση των αμινοξέων του επιτόπου MOG_{35-55}.

Στρατηγική Ταυτοποίησης

1ο Βήμα (ταυτοποίηση του αμινοξέος με τα πιο αποθωρακισμένα πρωτόνια)

2D-TOCSY —Πίνακας 6.1→ **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma1,\gamma2}$ (Glu^{36})**

2ο Βήμα (συλλογή πληροφοριών για τα αμινοξέα του πεπτιδίου από το φάσμα 2D-TOCSY)

2D-TOCSY —Πίνακας 6.1→
- **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma1,\gamma2}$ (Met)**
- **NH, $H^{\alpha,\beta,\gamma1,\gamma2}$ (x3) (Val)**
- **NH, $H^{\alpha1,\alpha2}$ (x2) (Gly)**
- **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma1,\gamma2,\delta1,\delta2,\varepsilon}$ (x3) (Arg)**
- **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2}$ (x2) (Ser)**
- **$H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma1,\gamma2,\delta1,\delta2}$ (Pro)**
- **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma,\delta1,\delta2}$ (Leu)**
- **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2,\gamma1,\gamma2,\delta1,\delta2,\varepsilon1,32}$ (Lys)**

2D-TOCSY (αρωματική περιοχή και περιοχή NH/H) —Πίνακας 6.1→
- **2H,4H,5H,6H,7H,1NH (Trp)**
- **2,6H, 3,5H (x2) (Tyr)**
- **2,6H, 3,5H,4H (Phe)**
- **γ1NH, γ2NH (Asn)**
- **2H, 4H (His)**

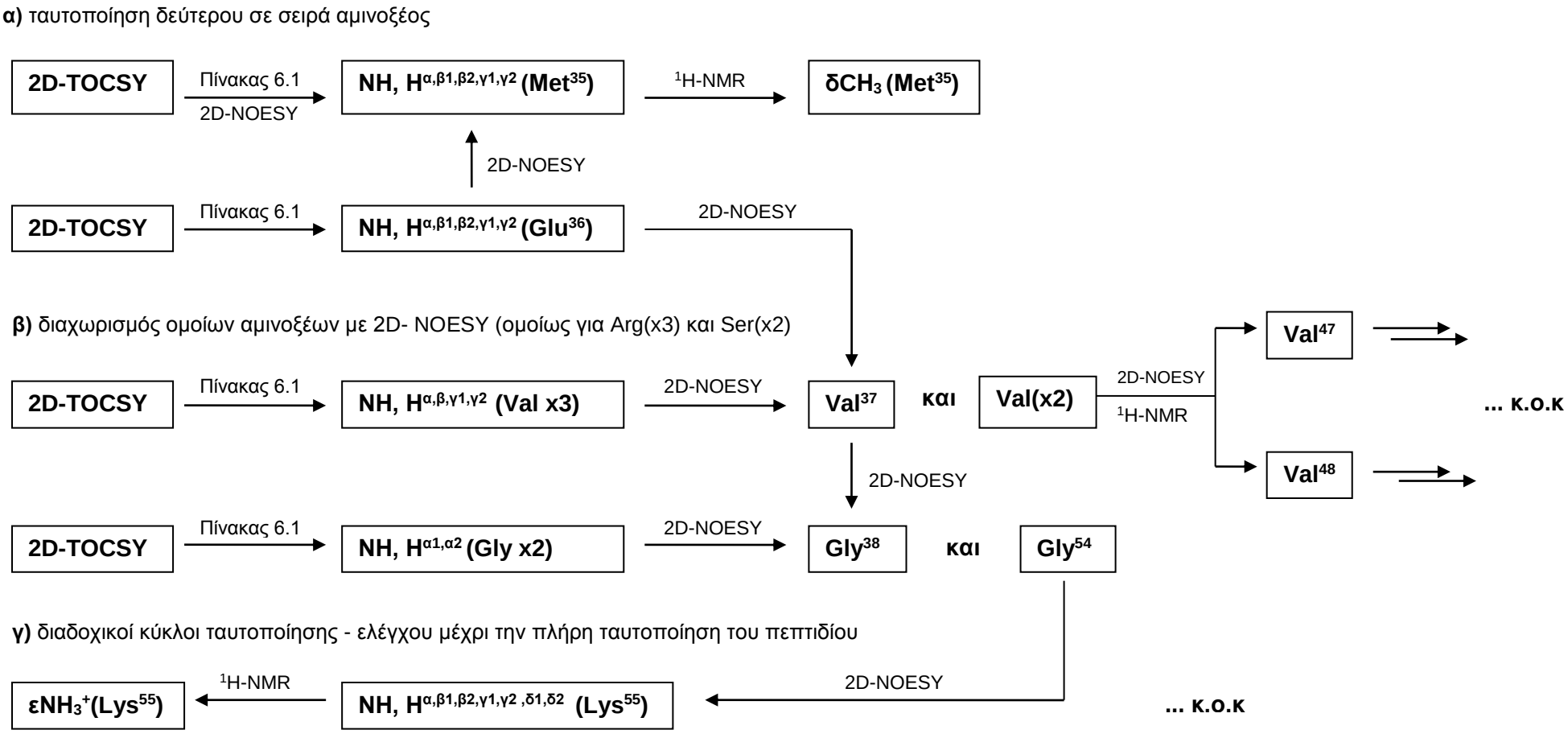
2D-TOCSY —Πίνακας 6.1→ **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2}$ (x6)**

* ↓ 2D-NOESY

Trp Tyr(x2) Phe Asn His

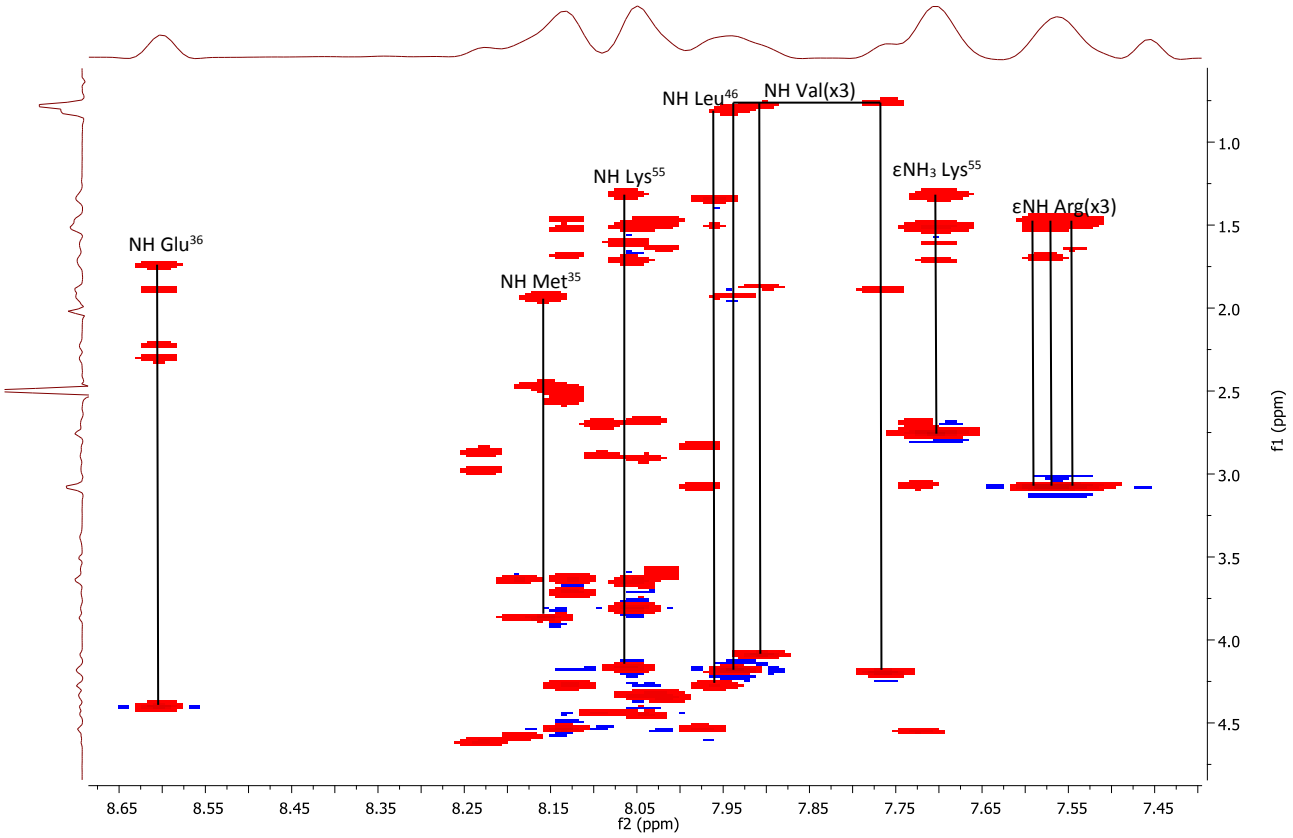
***3ο Βήμα** (σημειώθηκαν έξι παραπλήσιες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα αμινοξέα Trp, Tyr(x2), Phe, His, Asn και τα αρωματικά / αμιδικά τους πρωτόνια καί με τη βοήθεια του φάσματος 2D-NOESY ταυτοποιήθηκαν)

4ο Βήμα (ταυτοποίηση των υπόλοιπων αμινοξέων στην πεπτιδική αλληλουχία με συνδυασμό πληροφοριών από τα φάσματα 2D-TOCSY και 2D-NOESY)

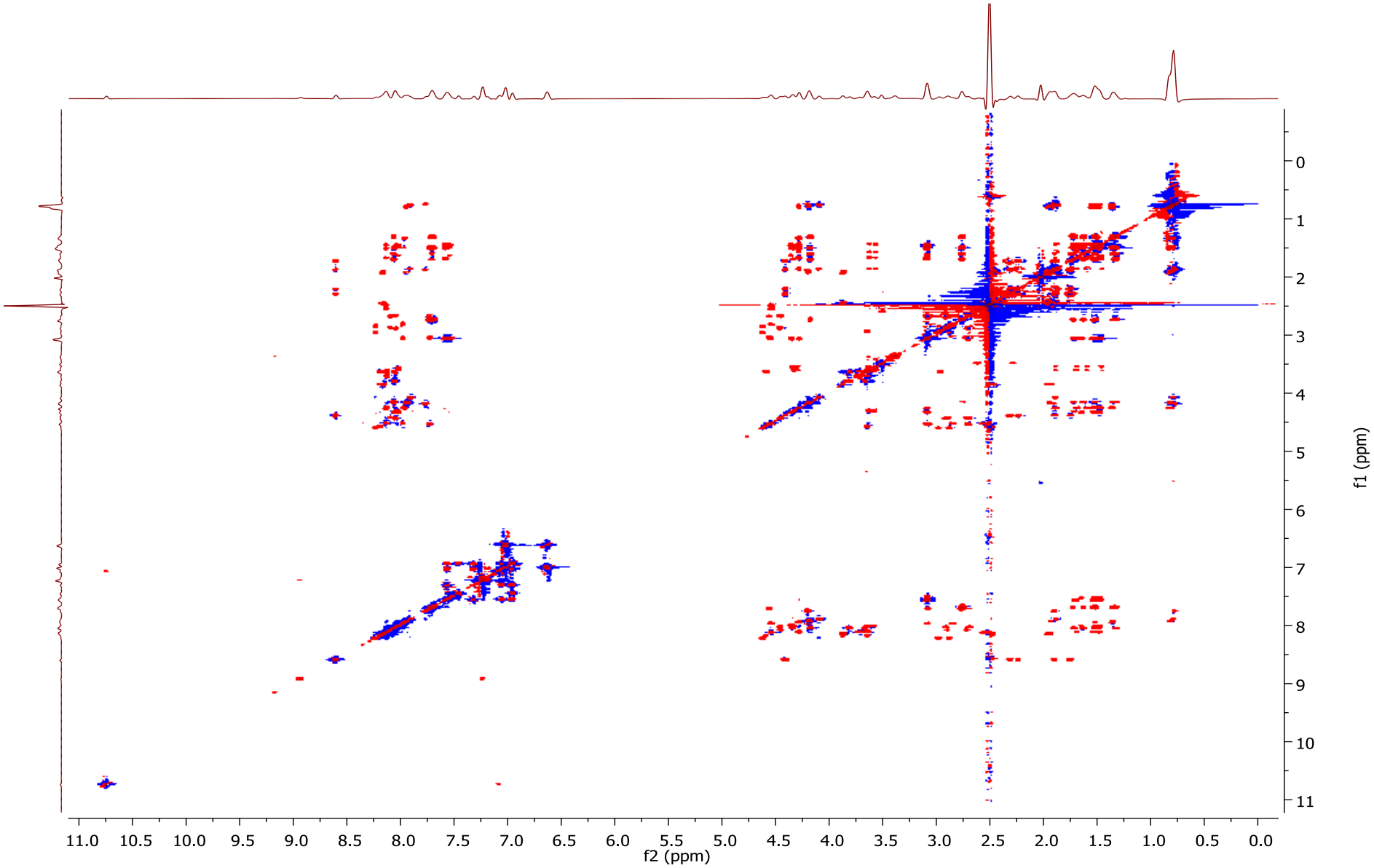


Σχήμα 6.2 Απεικόνιση στρατηγικής ταυτοποίησης του πεπτιδίου MOG_{35-55}

Η διαδικασία ταυτοποίησης ξεκινάει από την περιοχή NH/H και την ταυτοποίηση του αμινοξέος με τα πιο αποθωρακισμένα πρωτόνια, στην περίπτωσή αυτή το Glu^{36}. Ακολουθεί συλλογή πληροφοριών από το φάσμα 2D-TOCSY (σχήμα 6.4) σε συνδυασμό με τον πίνακα 6.1. Από αυτή τη διαδικασία ξεχωρίζουν αμέσως οι αλληλουχίες των αμινοξέων Met, Pro, Leu και Lys λόγω της διαφορετικότητάς τους. Η Met, λόγω των υψηλών τιμών που οφείλονται στο θείο, η Pro λόγω έλλειψης πρωτονίου NH, η Leu λόγω των μεθυλίων που εμφανίζονται σε υψηλότερο πεδίο και τέλος η Lys λόγω της χαρακτηριστικής πλευρικής αλυσίδας της που φέρει τέσσερα διαδοχικά ζεύγη πρωτονίων. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας πως το MOG στην αμινοξική του αλληλουχία περιέχει τρεις Val, δύο Gly, τρεις Arg και δύο Ser, σημειώνονται τέσσερις ομάδες με παραπλήσιες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα αμινοξέα αυτά, χωρίς όμως ακόμα να μπορούν να ταυτοποιηθούν ως προς τη θέση τους πάνω στο πεπτίδιο. Στο επόμενο βήμα συλλέγονται οι πληροφορίες για τα αμινοξέα με αρωματικές / αμιδικές πλευρικές αλυσίδες (Trp, Tyr, Phe, Asn), που εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές **NH, $H^{\alpha.\beta1.\beta2}$**. Εξετάζοντας την περιοχή 6,5 - 7,5ppm του φάσματος 2D-TOCSY διαχωρίζονται οι αρωματικοί δακτύλιοι της Trp, των δύο Tyr και της Phe, ενώ ξεχωρίζει επίσης τα αμιδικό ζεύγος πρωτονίων της Asn. Στο σχήμα 6.3 δίνεται η περιοχή NH/H περιοχή του φάσματος και σημειώνονται ενδεικτικά κάποιες αμινοξικές αλληλουχίες.

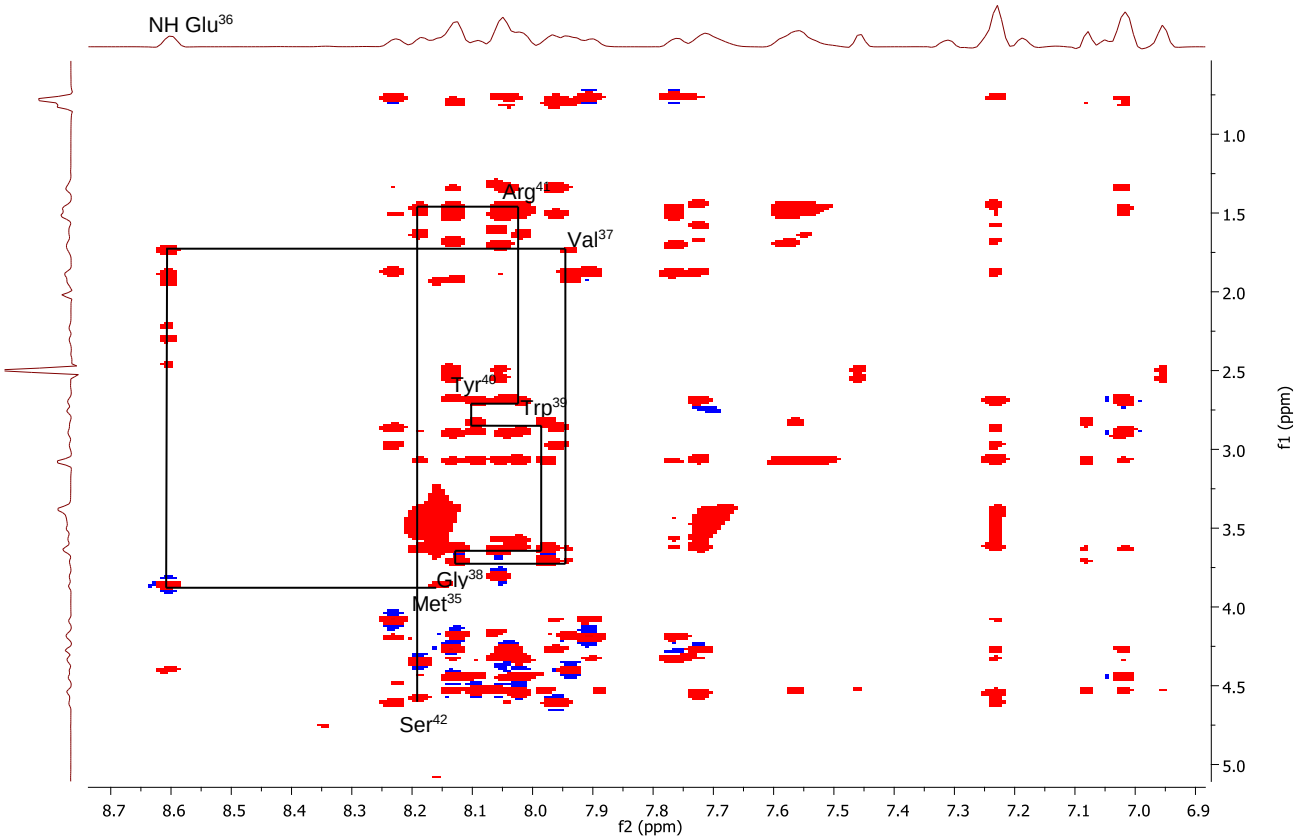


Σχήμα 6.3 Περιοχή NH/H του φάσματος 2D-TOCSY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO.



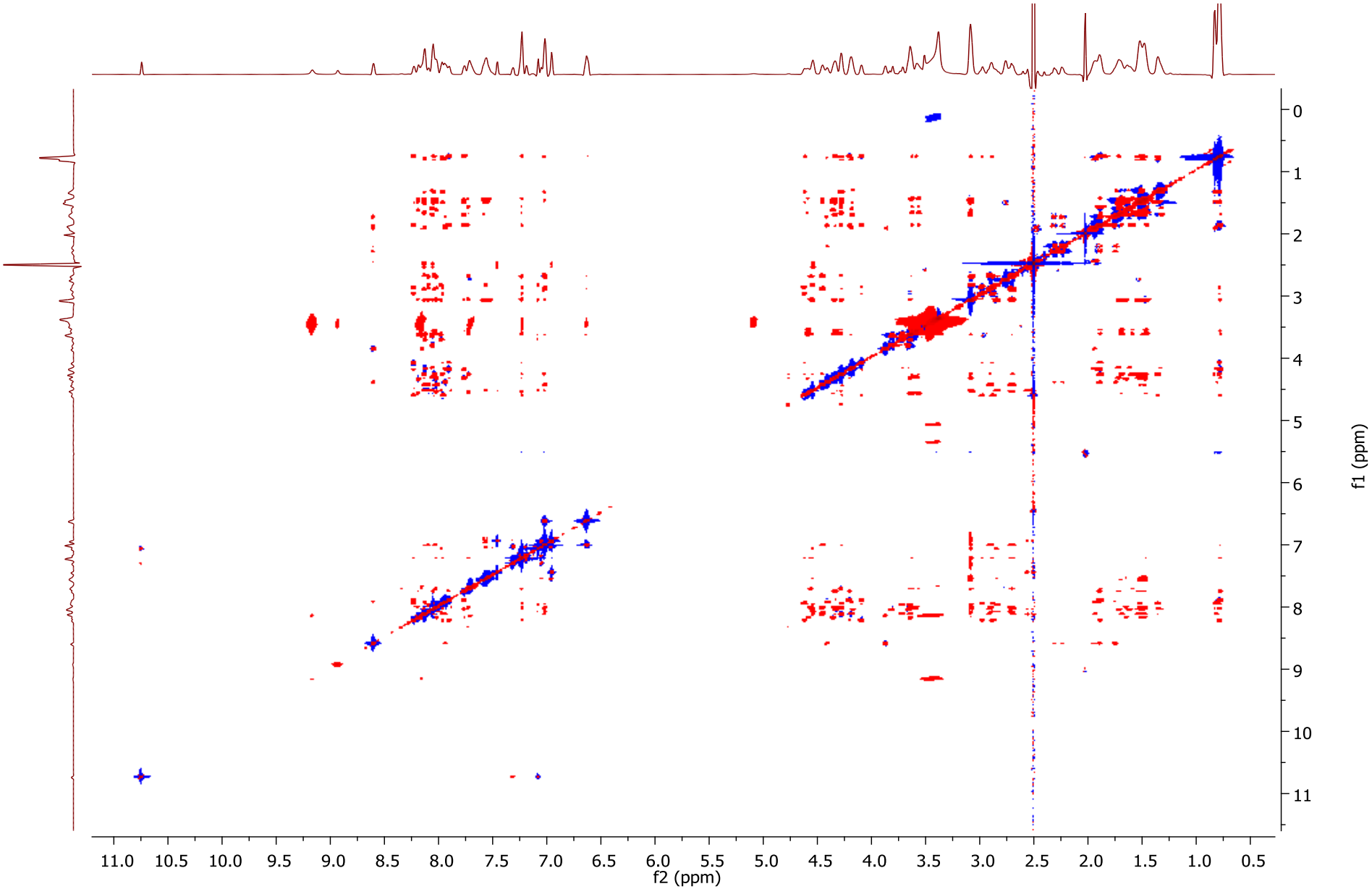
Σχήμα 6.4 Φάσμα 2D-TOCSY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO.

Στο επόμενο βήμα ακολουθεί συνδυαστική χρήση όλων των πληροφοριών από τα φάσματα 2D-TOCSY και του 2D-NOESY. Στο 2D-NOESY εμφανίζονται οι συσχετίσεις πρωτονίων τόσο στο ίδιο αμινοξύ όσο και σε διαδοχικά αμινοξέα του τύπου dNN(i,i+1) και dαN(i,i+1). Έτσι συμπληρώθηκαν όλα τα πρωτόνια των αμινοξέων που δεν ακολουθούσαν διαδοχική σειρά και δεν εντοπίζονταν στο 2D-TOCSY και αντιστοιχήθηκαν οι γραμμικές αλληλουχίες **NH, $H^{\alpha,\beta1,\beta2}$** με τα αρωματικά / αμιδικά τμήματα των πλευρικών τους αλυσίδων (αμινοξέα Trp, Tyr(x2), Phe, Asn). Στη συνέχεια. ξεκινώντας από το Glu^{36}, σημειώθηκαν αλυσιδωτά όλες οι συσχετίσεις πρωτονίων σε διαδοχικά αμινοξέα και τελικά ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση του πεπτιδίου MOG_{35-55} και ως προς τη θέση τους στην αμινοξική αλληλουχία. Στο παρακάτω σχήμα 6.5 εμφαίνεται η περιοχή NH/H περιοχή του φάσματος 2D-NOESY και αναγράφονται ενδεικτικά κάποιες συσχετίσεις πρωτονίων διαδοχικών αμινοξέων, ξεκινώντας την πορεία από το Glu^{36}.

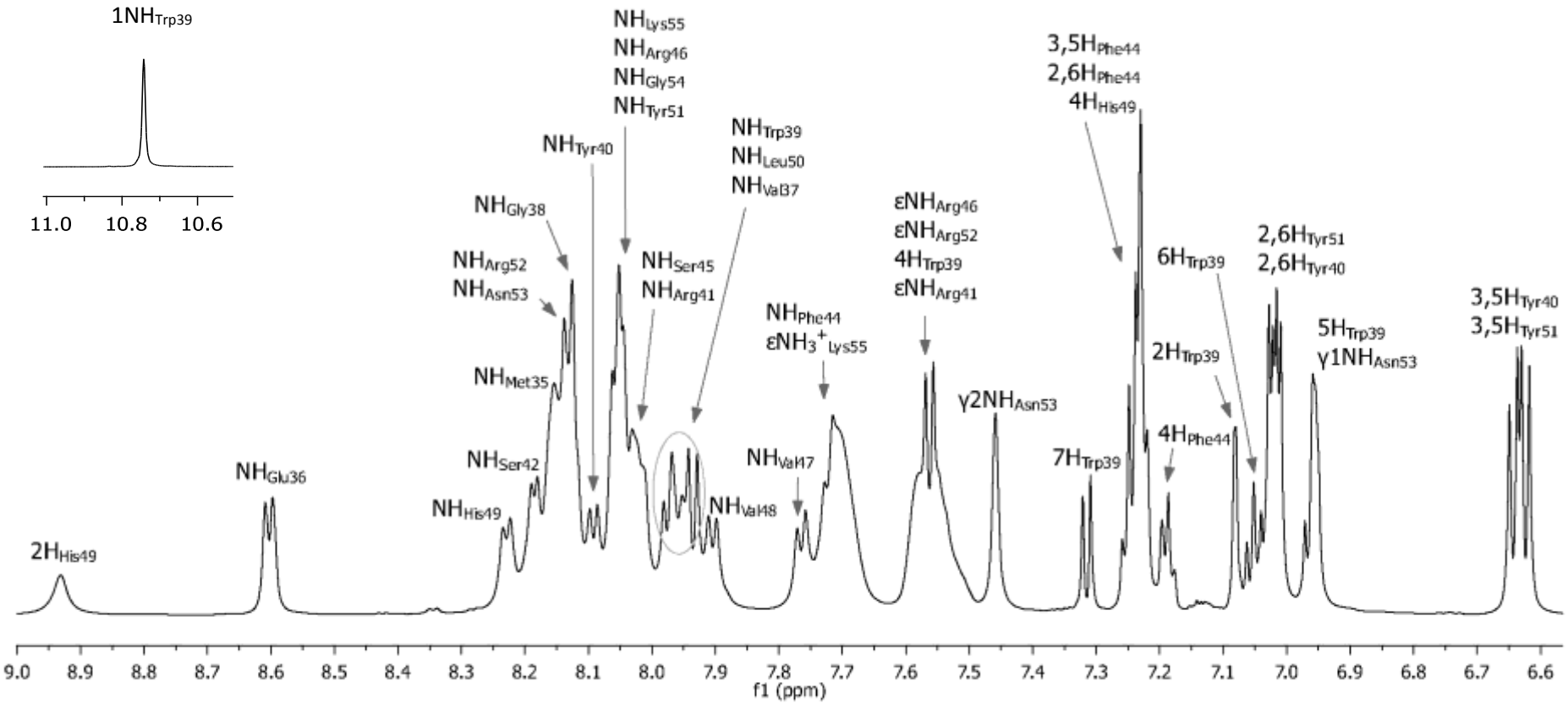


Σχήμα 6.5 Περιοχή NH/H του φάσματος 2D-NOESY που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO, στην οποία περιγράφεται ενδεικτικά ένα μέρος της πορείας ταυτοποίησης της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου MOG_{35-55}.

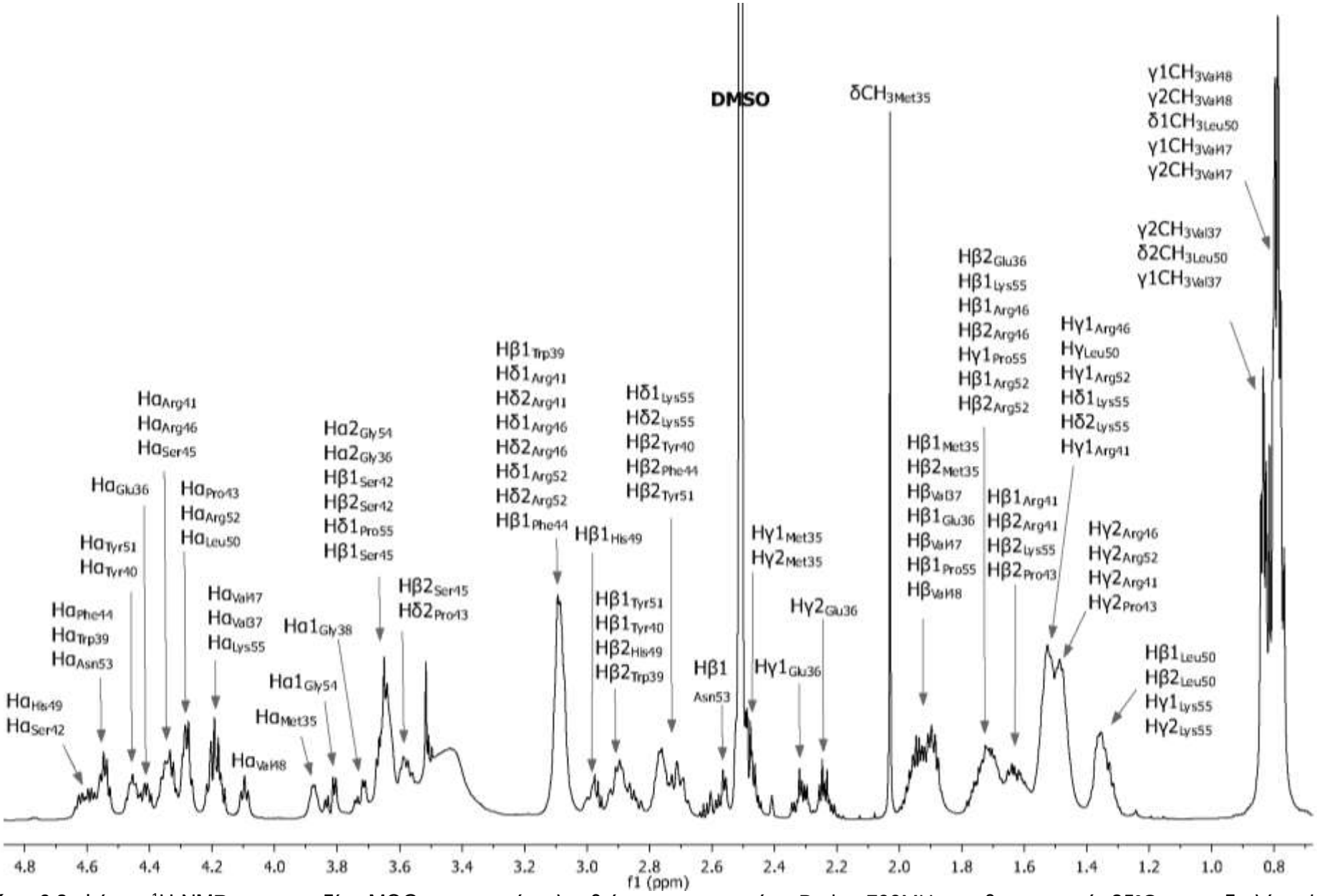
Αφού ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση όλων των κορυφών συντονισμού του φάσματος ^{1}H-NMR (Σχήμα 6.7 και 6.8) σημειώθηκαν από το φάσμα 2D-NOESY (Σχήμα 6.6) και όλες οι συσχετίσεις πρωτονίων σε χωρική εγγύτητα μεταξύ τους που έδωσαν πολύτιμες πληροφορίες για την τρισδιάστατη απεικόνιση του πεπτιδίου MOG_{35-55}.



Σχήμα 6.6 Φάσμα 2D-NOESY του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO.



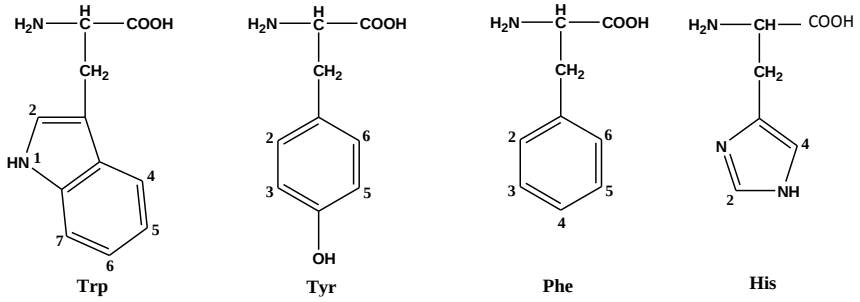
Σχήμα 6.7 Φάσμα ^{1}H-NMR του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz. σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO στην περιοχή 6,6-11,0ppm



Σχήμα 6.8 Φάσμα ^{1}H-NMR του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz. σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d_6-DMSO στην περιοχή 0,8-4,8ppm

Στον **Πίνακα 6.2** που ακολουθεί, είναι καταγεγραμμένη η πλήρης ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων του πεπτιδίου (πρώτη και δεύτερη στήλη). Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό των δεδομένων του φασμάτος TOCSY (τρίτη στήλη) και των δεδομένων του φάσματος NOESY (τέταρτη στήλη). Ειδικά στην τέταρτη στήλη τα σήματα χωρικής εγγύτητας για κάθε πρωτόνιο είναι ταξινομημένα ανά αμινοξύ. Πρώτα αναγράφονται τα σήματα χωρικής εγγύτητας στο ίδιο το αμινοξύ και στη συνέχεια τα σήματα με πρωτόνια άλλων αμινοξέων.

Για διευκόλυνση του αναγνώστη δίνεται ο τρόπος αρίθμησης των αμινοξέων που φέρουν αρωματικό δακτύλιο (Trp, Tyr, Phe, His).



Πίνακας 6.2: Πλήρης ταυτοποίηση ^{1}H του MOG_{35-55}.

ΑΜΙΝΟΞΥ	**^{1}H (ppm)**	**TOCSY**	**NOESY**
Met35			
NH_{2Met35}	8.15	$Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$	$Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36} **Gly38:** $Hα1_{Gly38}$, $Hα2_{Gly38}$ **His49:** $2H_{His49}$, $4H_{His49}$ **Lys55:** $εNH_3^{+}{}_{Lys55}$
$Hα_{Met35}$	3.87	NH_{2Met35}, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$	NH_{2Met35}, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36}, $Hα_{Glu36}$, $Hβ2_{Glu36}$, $Hγ1_{Glu36}$ **Val37:** NH_{Val37}
$Hβ1_{Met35}$	1.95	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36} **Val37:** $γ1CH_{3Val37}$, $γ2CH_{3Val37}$
$Hβ2_{Met35}$	1.95	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hγ1_{Met35}$, $Hγ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36} **Val37:** $γ1CH_{3Val37}$, $γ2CH_{3Val37}$
$Hγ1_{Met35}$	2.48	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36} **Val37:** NH_{Val37}
$Hγ2_{Met35}$	2.48	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$	NH_{2Met35}, $Hα_{Met35}$, $Hβ1_{Met35}$, $Hβ2_{Met35}$ **Glu36:** NH_{Glu36} **Val37:** NH_{Val37}
$δCH_{3\ Met35}$	2.03	-	-
Glu36			

NH_{Glu36}	8.60	$H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$	$H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Met35:** NH_{2Met35}, $H\alpha_{Met35}$, $H\beta1_{Met35}$, $H\beta2_{Met35}$, $H\gamma1_{Met35}$, $H\gamma2_{Met35}$ **Val37:** NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$
$H\alpha_{Glu36}$	4.41	NH_{Glu36}, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$	NH_{Glu36}, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Met35:** $H\alpha_{Met35}$ **Val37:** NH_{Val37}, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$ **Gly38:** NH_{Gly38}
$H\beta1_{Glu36}$	1.90	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Val37:** NH_{Val37}
$H\beta2_{Glu36}$	1.74	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Met35:** $H\alpha_{Met35}$ **Val37:** NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$
$H\gamma1_{Glu36}$	2.31	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Met35:** $H\alpha_{Met35}$ **Val37:** NH_{Val37}
$H\gamma2_{Glu36}$	2.23	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$	NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$ **Val37:** NH_{Val37}
Val37			
NH_{Val37}	7.93	$H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$	$H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$ **Glu36:** NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$, $H\beta1_{Glu36}$, $H\beta2_{Glu36}$, $H\gamma1_{Glu36}$, $H\gamma2_{Glu36}$ **Gly38:** NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Met35:** $H\alpha_{Met35}$, $H\gamma1_{Met35}$, $H\gamma2_{Met35}$ **Trp39:** $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$
$H\alpha_{Val37}$	4.18	NH_{Val37}, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$	NH_{Val37}, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$ **Glu36**: NH_{Glu36}, $H\beta2_{Glu36}$ **Gly38:** NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Trp39:** NH_{Trp39}
$H\beta_{Val37}$	1.93	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$ **Glu36:** NH_{Glu36}, $H\alpha_{Glu36}$ **Gly38:** NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Trp39 :** NH_{Trp39} **Tyr40 :** $2,6H_{Tyr40}$, $3,5\ H_{Tyr40}$
$\gamma1CH_{3Val37}$	0.82-0.83	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$ **Glu36:** $H\alpha_{Glu36}$ **Gly38:** NH_{Gly38} **Met35:** $H\beta1_{Met35}$, $H\beta2_{Met35}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $3,5\ H_{Tyr40}$
$\gamma2CH_{3Val37}$	0.83-0.85	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$	NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$ **Glu36:** $H\alpha_{Glu36}$ **Gly38:** NH_{Gly} **Met35:** $H\beta1_{Met35}$, $H\beta2_{Met35}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $3,5\ H_{Tyr40}$
Gly38			
NH_{Gly38}	8.12	$H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$	$H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Val37:** NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$ **Glu36:** $H\alpha_{Glu36}$ **Trp39:** NH_{Trp39}
$H\alpha1_{Gly38}$	3.72	NH_{Gly38}, $H\alpha2_{Gly38}$	NH_{Gly38}, $H\alpha2_{Gly38}$

			Val37: NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$ **Trp39:** NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, 3,5 H_{Tyr40} **Met35:** NH_{2Met35}
$H\alpha2_{Gly38}$	3.64	NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$	NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$ **Val37:** NH_{Val37}, $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$ **Trp39:** NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $2,6H_{Tyr40}$, 3,5 H_{Tyr40} **Met35:** NH_{2Met35}
Trp39			
NH_{Trp39}	7.97	$H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$	$H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$ **Gly38:** NH_{Gly38}, $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$ **Val37:** $H\alpha_{Val37}$, $H\beta_{Val37}$
$H\alpha_{Trp39}$	4.54	NH_{Trp39}, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$	NH_{Trp39}, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$, $1NH_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$
$H\beta1_{Trp39}$	3.08	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, ($2H_{Trp39}$)	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $1NH_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$, 3,5 H_{Tyr40} **Val37:** NH_{Val37}
$H\beta2_{Trp39}$	2.84	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, ($2H_{Trp39}$)	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$, $1NH_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$ **Val37:** NH_{Val37}
$2H_{Trp39}$	7.08	$1NH_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$. $H\beta2_{Trp39}$	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $1NH_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}
$4H_{Trp39}$	7.56	$5H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$	NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$
$5H_{Trp39}$	6.96	$4H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$	$H\beta1_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$
$6H_{Trp39}$	7.05	$4H_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$	$4H_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$
$7H_{Trp39}$	7.32	$4H_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$	$1NH_{Trp39}$, $5H_{Trp39}$, $6H_{Trp39}$
$1NH_{Trp39}$	10.74	$2H_{Trp39}$	$H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $7H_{Trp39}$
Tyr40			
NH_{Tyr40}	8.09	$H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$	$H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Trp39:** NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$, $2H_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$, $H\alpha2_{Gly38}$ **Val37:** $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$
$H\alpha_{Tyr40}$	4.44	NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$	NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$, 3,5 H_{Tyr40} **Trp39 :** $H\beta1_{Trp39}$, $4H_{Trp39}$

			Arg41: NH_{Arg41}, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Ser42:** NH_{Ser42} **His49:** NH_{His49}, $4H_{Trp39}$
$H\beta1_{Tyr40}$	2.89	NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$	NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$, $3,5\ H_{Tyr40}$ **Trp39 :** NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Ser42:** NH_{Ser42} **His49:** NH_{His49}
$H\beta2_{Tyr40}$	2.70	NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$	NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$, $3,5\ H_{Tyr40}$ **Trp39:** NH_{Trp39}, $H\alpha_{Trp39}$, $H\beta1_{Trp39}$, $H\beta2_{Trp39}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **His49:** NH_{His49}
$2,6H_{Tyr40}$	7.01	$3,5\ H_{Tyr40}$	NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $3,5\ H_{Tyr40}$ **Trp39 :** $H\alpha_{Trp39}$. $H\beta1_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha2_{Gly38}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$ **Val37:** $H\beta_{Val37}$
$3,5\ H_{Tyr40}$	6.64	$2,6H_{Tyr40}$	$H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Trp39:** $H\beta1_{Trp39}$ **Gly38:** $H\alpha1_{Gly38}$. $H\alpha2_{Gly38}$ **Val37:** $H\beta_{Val37}$, $\gamma1CH_{3Val37}$, $\gamma2CH_{3Val37}$
Arg41			
NH_{Arg41}	8.01	$H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$	$H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **His49:** NH_{His49}
$H\alpha_{Arg41}$	4.35	NH_{Arg41}, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$	NH_{Arg41}, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$
$H\beta1_{Arg41}$	1.65	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** $H\alpha_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Pro43:** $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$
$H\beta2_{Arg41}$	1.65	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** $H\alpha_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Pro43:** $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$
$H\gamma1_{Arg41}$	1.50	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$
$H\gamma2_{Arg41}$	1.46	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Tyr40:** NH_{Tyr40}, $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$

$H\delta1_{Arg41}$	3.08	$H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Ser42:** NH_{Ser42}
$H\delta2_{Arg41}$	3.08	$H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, εNH_{Arg41}	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Ser42:** NH_{Ser42}
εNH_{Arg41}	7.54	$H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$	NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$ **Ser42:** NH_{Ser42}
Ser42			
NH_{Ser42}	8.18	$H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$	$H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$, $H\delta1_{Arg41}$, $H\delta2_{Arg41}$, εNH_{Arg41} **Pro43:** $H\beta1_{Pro43}$ **Tyr40:** $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $2,6H_{Tyr40}$ **Phe44:** NH_{Phe44}, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$ **Val47:** NH_{Val47} **Lys55:** $\varepsilon NH_3^+{}_{Lys55}$
$H\alpha_{Ser42}$	4.58	NH_{Ser42}, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$	NH_{Ser42}, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$ **Pro43:** $H\alpha_{Pro43}$, $H\beta1_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$ **Tyr40:** $2,6H_{Tyr40}$ **Phe44:** NH_{Phe44}
$H\beta1_{Ser42}$	3.64	NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$	NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Pro43:** $H\alpha_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$
$H\beta2_{Ser42}$	3.64	NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$	NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$ **Arg41:** NH_{Arg41}, $H\alpha_{Arg41}$, $H\beta1_{Arg41}$, $H\beta2_{Arg41}$, $H\gamma1_{Arg41}$, $H\gamma2_{Arg41}$ **Pro43:** $H\alpha_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$
Pro43			
$H\alpha_{Pro43}$	4.28	$H\beta1_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$. $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$. $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$	$H\beta1_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$ **Ser42:** $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Phe44:** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$, $2,6H_{Phe44}$, $3,5\ H_{Phe44}$
$H\beta1_{Pro43}$	1.89	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$ **Ser42:** NH_{Ser42}, $H\alpha_{Ser42}$ **Phe44:** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$, $2,6H_{Phe44}$, $3,5\ H_{Phe44}$ **Ser45:** NH_{Ser45}
$H\beta2_{Pro43}$	1.59	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta1_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta1_{Pro43}$, $H\gamma1_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$ **Ser42:** $H\alpha_{Ser42}$ **Phe44:** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$, $2,6H_{Phe44}$
$H\gamma1_{Pro43}$	1.69	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta1_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$	$H\alpha_{Pro43}$, $H\beta1_{Pro43}$, $H\beta2_{Pro43}$, $H\gamma2_{Pro43}$, $H\delta1_{Pro43}$, $H\delta2_{Pro43}$ **Ser42 :** $H\alpha_{Ser42}$, $H\beta1_{Ser42}$, $H\beta2_{Ser}$ **Phe44 :** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$,

			Hβ2$_{Phe44}$, 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$
Hγ2$_{Pro43}$	1.46	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ **Ser42:** Hα$_{Ser42}$ **Phe44:** NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$, 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$, 4H$_{Phe44}$
Hδ1$_{Pro43}$	3.62	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ **Arg41:** Hβ1$_{Arg41}$, Hβ2$_{Arg41}$
Hδ2$_{Pro43}$	3.56	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$, Hδ1$_{Pro43}$	Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$, Hδ1$_{Pro43}$ **Arg41:** Hβ1$_{Arg41}$, Hβ2$_{Arg41}$
Phe44			
NH$_{Phe44}$	7.72	Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$	Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$**,** 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45:** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$ * Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$ **Ser42:** NH$_{Ser42}$, Hα$_{Ser42}$ **Val47 :** γ1CH$_{3Val47}$, γ2CH$_{3Val47}$
Hα$_{Phe44}$	4.55	NH$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$	NH$_{Phe44}$. Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$, 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45:** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$, * Hδ1$_{Pro43}$. Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$
Hβ1$_{Phe44}$	3.07	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$. Hβ2$_{Phe44}$. 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45 :** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$ * Hδ1$_{Pro43}$. Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$ **Ser42:** NH$_{Ser42}$
Hβ2$_{Phe44}$	2.70	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, 2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45:** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$ * Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$ **Ser42:** NH$_{Ser42}$
2,6H$_{Phe44}$	7.24	4H$_{Phe44}$	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$, 4H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro,}$ Hβ1$_{Pro43}$, Hβ2$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45:** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$ * Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$
3,5 H$_{Phe44}$	7.22	4H$_{Phe44}$	NH$_{Phe44}$, Hα$_{Phe44}$, Hβ1$_{Phe44}$, Hβ2$_{Phe44}$, 2,6H$_{Phe44}$, 4H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hα$_{Pro43}$, Hβ1$_{Pro43}$, Hγ1$_{Pro43}$, Hγ2$_{Pro43}$ **Ser45:** NH$_{Ser45}$, Hα$_{Ser45}$ * Hδ1$_{Pro43}$, Hδ2$_{Pro43}$ ή Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$
4H$_{Phe44}$	7.19	2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$	2,6H$_{Phe44}$, 3,5 H$_{Phe44}$ **Pro43:** Hγ2$_{Pro43}$
Ser45			
NH$_{Ser45}$	8.02	Hα$_{Ser45}$, Hβ1$_{Ser45}$,	Hα$_{Ser45}$, Hβ1$_{Ser45}$, Hβ2$_{Ser45}$,

		$H\beta2_{Ser45}$	**Phe44:** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$, $2,6H_{Phe44}$, $3,5\ H_{Phe44}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$ **Pro43:** $H\beta1_{Pro43}$ **His49:** NH_{His49}
$H\alpha_{Ser45}$	4.32	NH_{Ser45}, $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$	NH_{Ser45}, $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$, **Phe44:** NH_{Phe44}, $H\alpha_{Phe44}$, $H\beta1_{Phe44}$, $H\beta2_{Phe44}$, $2,6H_{Phe44}$, $3,5\ H_{Phe44}$ **Arg46:** NH_{Arg46}
$H\beta1_{Ser45}$	3.62	NH_{Ser45}, $H\alpha_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$	NH_{Ser45}, $H\alpha_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Arg46:** NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$ **Val47:** $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$
$H\beta2_{Ser45}$	3.58	NH_{Ser45}, $H\alpha_{Ser45}$, $H\beta1_{Ser45}$	NH_{Ser45}, $H\alpha_{Ser45}$, $H\beta1_{Ser45}$, **Arg46:** NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$. $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$ **Val47:** $H\alpha_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$
Arg46			
NH_{Arg46}	8.05	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$ **Ser45:** NH_{Ser45}, $H\alpha_{Ser45}$, $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\beta_{Val47}$
$H\alpha_{Arg46}$	4.34	NH_{Arg46}, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Val48:** NH_{Val48} **Asn53:** NH_{Asn53}
$H\beta1_{Arg46}$	1.71	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Val48:** NH_{Val48} **His49:** NH_{His49}
$H\beta2_{Arg46}$	1.71	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Val48:** NH_{Val48} **His49:** NH_{His49}
$H\gamma1_{Arg46}$	1.53	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$ **His49:** NH_{His49}
$H\gamma2_{Arg46}$	1.49	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$ **His49:** NH_{His49}
$H\delta1_{Arg46}$	3.08	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$. $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$.	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, εNH_{Arg46}

		$H\gamma2_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	**Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$
$H\delta2_{Arg46}$	3.08	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, εNH_{Arg46}	NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$
εNH_{Arg46}	7.58	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$	$H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$ **Val47:** $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$
Val47			
NH_{Val47}	7.76	$H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$	$H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Arg46:** NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$ **His49:** NH_{His49} **Ser42:** NH_{Ser42}
$H\alpha_{Val47}$	4.20	NH_{Val47}, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$	NH_{Val47}, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$, $H\delta1_{Arg46}$, $H\delta2_{Arg46}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$ **Ser45:** $H\beta2_{Ser45}$ **His49:** NH_{His49}
$H\beta_{Val47}$	1.90	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Arg46:** NH_{Arg46}, $H\alpha_{Arg46}$ **Val48:** NH_{Val48} **His49:** NH_{His49}
$\gamma1CH_{3Val47}$	0.77	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Phe44:** NH_{Phe44}
$\gamma2CH_{3Val47}$	0.78	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma2CH_{3Val47}$	NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$, $\gamma1CH_{3Val47}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, εNH_{Arg46} **Ser45:** $H\beta1_{Ser45}$, $H\beta2_{Ser45}$ **Phe44:** NH_{Phe44}
Val48			
NH_{Val48}	7.90	$H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$, $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val47}$	$H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$, $\gamma1CH3_{Val48}$, $\gamma2CH3_{Val47}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$ **His49:** NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$, $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$
$H\alpha_{Val48}$	4.09	NH_{Val48}, $H\beta_{Val48}$, $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$	NH_{Val48}. $H\beta_{Val48}$. $\gamma1CH_{3Val48}$. $\gamma2CH_{3Val48}$ **Val47 :** NH_{Val47}. $H\alpha_{Val47}$ **His49 :** NH_{His49}. $H\alpha_{His49}$. $H\beta1_{His49}$. $H\beta2_{His49}$. $4H_{His49}$ **Arg46:** $H\gamma1_{Arg46}$. $H\gamma2_{Arg46}$ **Leu50:** NH_{Leu50}
$H\beta_{Val48}$	1.88	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ **His49:** NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Tyr51:** $2,6H_{Tyr51}$, $3,5\ H_{Tyr51}$
$\gamma1CH_{3Val48}$	0.79	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$
$\gamma2CH_{3Val48}$	0.79	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$,	NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$

		$H\beta_{Val48}$, $\gamma1CH_{3Val48}$	
His49			
NH_{His49}	8.23	$H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$	$H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$ **Leu50:** NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$ * $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Val47:** NH_{Val47}, $H\alpha_{Val47}$, $H\beta_{Val47}$ **Tyr51:** $2,6H_{Tyr51}$ **Tyr40:** $H\alpha_{Tyr40}$, $H\beta1_{Tyr40}$, $H\beta2_{Tyr40}$ **Arg41:** NH_{Arg41} **Ser45:** NH_{Ser45} **Arg46:** $H\beta1_{Arg46}$, $H\beta2_{Arg46}$, $H\gamma1_{Arg46}$, $H\gamma2_{Arg46}$
$H\alpha_{His49}$	4.62	NH_{His49}, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$	NH_{His49}, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$ **Leu50:** NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$. * $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Tyr51 :** NH_{Tyr51}
$H\beta1_{His49}$	2.98	NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$ $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$	NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$ **Leu50:** NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$ * $\gamma1CH_{3Val48}$. $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Tyr51:** NH_{Tyr51} **Trp39:** $H\alpha_{Trp39}$
$H\beta2_{His49}$	2.87	NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $4H_{His49}$	NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$,$H\beta1_{His49}$, $4H_{His49}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$ **Leu50:** NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$ * $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Tyr51:** $2,6H_{Tyr51}$, $3,5\ H_{Tyr51}$
$2H_{His49}$	8.93	$4H_{His49}$	$4H_{His49}$ * $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Met35:** NH_{2Met35}
$4H_{His49}$	7.23	$H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $2H_{His49}$	NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $2H_{His49}$ **Val48:** NH_{Val48}, $H\alpha_{Val48}$, $H\beta_{Val48}$ **Leu50:** NH_{Leu50}, $H\gamma_{Leu50}$ * $\gamma1CH_{3Val48}$, $\gamma2CH_{3Val48}$ ή/και $\delta1CH_{3Leu50}$ **Tyr51:** NH_{Tyr51} **Met35:** NH_{2Met35} **Tyr40:** $H\alpha_{Tyr40}$
Leu50			
NH_{Leu50}	7.96	$H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$	$H\alpha_{Leu50}$, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$, $\delta1CH_{3Leu50}$, $\delta2CH3_{Leu50}$ **His49:** NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$, $4H_{His49}$ **Tyr51:** NH_{Tyr51}, $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$, $2,6H_{Tyr51}$ **Val48:** $H\alpha_{Val48}$
$H\alpha_{Leu50}$	4.27	NH_{Leu50}, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$, $\delta1CH_{3Leu50}$, $\delta2CH_{3Leu50}$	NH_{Leu50}, $H\beta1_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$, $\delta1CH_{3Leu50}$, $\delta2CH_{3Leu50}$ **His49:** NH_{His49}, $H\alpha_{His49}$, $H\beta1_{His49}$, $H\beta2_{His49}$
$H\beta1_{Leu50}$	1.36	NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\beta2_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$,	NH_{Leu50}, $H\alpha_{Leu50}$, $H\gamma_{Leu50}$, $\delta1CH_{3Leu50}$, $\delta2CH_{3Leu50}$

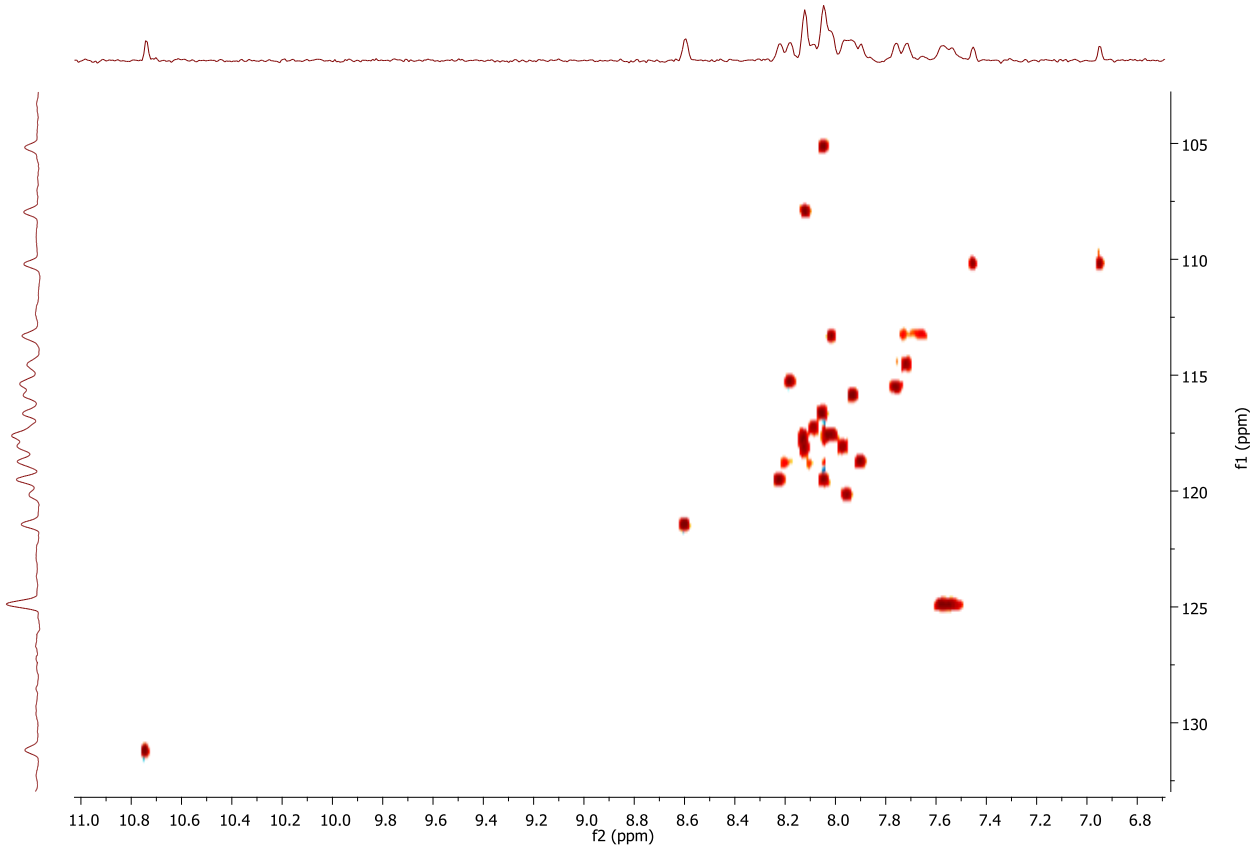
		δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$	**His49:** NH$_{His49}$, Hα$_{His49}$, Hβ1$_{His49}$, Hβ2$_{His49}$ **Tyr51:** NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$ *NH$_{Asn53}$ ή/και NH$_{Arg52}$
Hβ2$_{Leu50}$	1.36	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$ **His49:** NH$_{His49}$, Hα$_{His49}$, Hβ1$_{His49}$, Hβ2$_{His49}$ **Tyr51:** NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$. 3,5 H$_{Tyr51}$ *NH$_{Asn53}$ ή/και NH$_{Arg52}$
Hγ$_{Leu50}$	1.52	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$ **His49:** NH$_{His49}$, Hα$_{His49}$, Hβ1$_{His49}$, Hβ2$_{His49}$, 4H$_{His49}$ **Tyr51:** Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$
δ1CH$_{3Leu50}$	0.79	Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$ **Tyr51:** NH$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$
δ2CH$_{3Leu50}$	0.83	Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$	NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$ **Tyr51:** NH$_{Tyr51}$
Tyr51			
NH$_{Tyr51}$	8.04	Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$	Hα$_{Tyr51}$. Hβ1$_{Tyr51}$. Hβ2$_{Tyr51}$. 2,6H$_{Tyr51}$ **Leu50:** NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$, δ2CH$_{3Leu50}$ **Arg52:** NH$_{Arg52}$ * Hα$_{Leu50}$ ή/και Hα$_{Arg52}$ **His49:** Hα$_{His49}$, Hβ1$_{His49}$, 4H$_{His49}$
Hα$_{Tyr51}$	4.45	NH$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$	NH$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$ **Leu50:** Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$ **Arg52:** NH$_{Arg52}$, Hβ1$_{Arg52}$, Hβ2$_{Arg52}$, Hγ1$_{Arg52}$, Hγ2$_{Arg52}$ **Asn53:** Hβ1$_{Asn53}$
Hβ1$_{Tyr51}$	2.91	NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$	NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$ **Leu50:** NH$_{Leu50}$, Hα$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$ **Arg52:** NH$_{Arg52}$, Hγ1$_{Arg52}$, Hγ2$_{Arg52}$, Hδ1$_{Arg52}$, Hδ2$_{Arg52}$
Hβ2$_{Tyr51}$	2.68	NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$	NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, 2,6H$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$ **Leu50:** NH$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$, δ1CH$_{3Leu50}$ **Arg52:** NH$_{Arg52}$, Hγ1$_{Arg52}$, Hγ2$_{Arg52}$, Hδ1$_{Arg52}$, Hδ2$_{Arg52}$
2,6H$_{Tyr51}$	7.02	3,5 H$_{Tyr51}$	NH$_{Tyr51}$, Hα$_{Tyr51}$, Hβ1$_{Tyr51}$, Hβ2$_{Tyr51}$, 3,5 H$_{Tyr51}$ **Leu50:** NH$_{Leu50}$, Hβ1$_{Leu50}$, Hβ2$_{Leu50}$, Hγ$_{Leu50}$,δ1CH$_{3Leu50}$ **Arg52:** NH$_{Arg52}$, Hγ1$_{Arg52}$, Hγ2$_{Arg52}$ * Hα$_{Leu50}$ ή/και Hα$_{Arg52}$ **His49:** NH$_{His49}$ **Asn53:** Hβ1$_{Asn53}$, Hβ2$_{Asn53}$ **Val48:** Hβ$_{Val48}$

3,5 H_{Tyr51}	6.62	2,6H_{Tyr51}	NH_{Tyr51}, $H\alpha_{Tyr51}$, $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$, 2,6H_{Tyr51} **Leu50:** $\delta1CH_{3Leu50}$ * $H\alpha_{Leu50}$ ή/και $H\alpha_{Arg52}$ **Asn53:** $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$ **Val48:** $H\beta_{Val48}$
Arg52			
NH_{Arg52}	8.13	$H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$	$H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** NH_{Tyr51}, $H\alpha_{Tyr51}$, $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$, 2,6H_{Tyr51}
$H\alpha_{Arg52}$	4.28	NH_{Arg52}, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** NH_{Tyr51} **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$
$H\beta1_{Arg52}$	1.69	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\alpha_{Tyr51}$ **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$
$H\beta2_{Arg52}$	1.69	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\alpha_{Tyr51}$ **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$
$H\gamma1_{Arg52}$	1.53	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\alpha_{Tyr51}$, $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$, 2,6H_{Tyr51} **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$
$H\gamma2_{Arg52}$	1.47	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\alpha_{Tyr51}$, $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$, 2,6H_{Tyr51} **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$
$H\delta1_{Arg52}$	3.08	$H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$
$H\delta2_{Arg52}$	3.08	$H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, εNH_{Arg52}	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, εNH_{Arg52} **Tyr51:** $H\beta1_{Tyr51}$, $H\beta2_{Tyr51}$
εNH_{Arg52}	7.57	$H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$	NH_{Arg52}, $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$
Asn53			
NH_{Asn53}	8.13	$H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$	$H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$, $\gamma2NH_{Asn53}$ **Gly54:** $H\alpha1_{Gly54}$ **Arg46:** $H\alpha_{Arg46}$
$H\alpha_{Asn53}$	4.54	NH_{Asn53}, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$	NH_{Asn53}, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$, $\gamma2NH_{Asn53}$ **Arg52:** $H\alpha_{Arg52}$, $H\beta1_{Arg52}$, $H\beta2_{Arg52}$, $H\gamma1_{Arg52}$, $H\gamma2_{Arg52}$ **Gly54:** NH_{Gly54}, $H\alpha1_{Gly54}$, $H\alpha2_{Gly54}$ **Lys55:** NH_{Lys55}
$H\beta1_{Asn53}$	2.56	NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$	NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$, $\gamma2NH_{Asn53}$ **Arg52:** $H\alpha_{Arg52}$ **Gly54:** NH_{Gly54} **Tyr51:** $H\alpha_{Tyr51}$, 2,6H_{Tyr51}, 3,5 H_{Tyr51}

$H\beta2_{Asn53}$	2.51	NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$	NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$, $\gamma2NH_{Asn53}$ **Arg52:** $H\alpha_{Arg52}$ **Gly54:** NH_{Gly54} **Tyr51:** $2,6H_{Tyr51}$, $3,5\ H_{Tyr51}$
$\gamma1NH_{Asn53}$	6.95	$\gamma2NH_{Asn53}$	NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma2NH_{Asn53}$ **Gly54:** NH_{Gly54} **Arg52:** $H\gamma1_{Arg52}$ $H\gamma2_{Arg52}$ **Lys55:** $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\delta1_{Arg52}$, $H\delta2_{Arg52}$
$\gamma2NH_{Asn53}$	7.46	$\gamma1NH_{Asn53}$	NH_{Asn53}. $H\alpha_{Asn53}$, $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$ **Gly54:** NH_{Gly54}
Gly54			
NH_{Gly54}	8.05	$H\alpha1_{Gly54}$, $H\alpha2_{Gly54}$	$H\alpha1_{Gly54}$, $H\alpha2_{Gly54}$ **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$ $H\beta1_{Asn53}$, $H\beta2_{Asn53}$, $\gamma1NH_{Asn53}$. $\gamma2NH_{Asn53}$
$H\alpha1_{Gly54}$	3.81	NH_{Gly54}, $H\alpha2_{Gly54}$	NH_{Gly54}, $H\alpha2_{Gly54}$ **Asn53:** NH_{Asn53}, $H\alpha_{Asn53}$ **Lys55:** $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$
$H\alpha2_{Gly54}$	3.66	NH_{Gly54}, $H\alpha1_{Gly54}$	NH_{Gly54}, $H\alpha1_{Gly54}$ **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$
Lys55			
NH_{Lys55}	8.06	$H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$	$H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$ **Asn53:** $H\alpha_{Asn53}$
$H\alpha_{Lys55}$	4.17	NH_{Lys55}, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$	NH_{Lys55}, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$
$H\beta1_{Lys55}$	1.72	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$. $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$. εNH_3^+	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$ **Asn53:** $\gamma1NH_{Asn53}$
$H\beta2_{Lys55}$	1.62	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$, $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$, εNH_3^+	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$ **Asn53:** $\gamma1NH_{Asn53}$
$H\gamma1_{Lys55}$	1.33	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$. $H\beta2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$, $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$, εNH_3^+	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$ **Gly54:** $H\alpha1_{Gly54}$
$H\gamma2_{Lys55}$	1.33	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$, $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$, εNH_3^+	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\delta1_{Lys55}$, $H\delta2_{Lys55}$ **Gly54:** $H\alpha1_{Gly54}$
$H\delta1_{Lys55}$	1.52	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$,	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta1_{Lys55}$, $H\beta2_{Lys55}$, $H\gamma1_{Lys55}$, $H\gamma2_{Lys55}$, $H\varepsilon1_{Lys55}$, $H\varepsilon2_{Lys55}$ **Asn53:** $\gamma1NH_{Asn53}$

		εNH_3^+	
$H\delta 2_{Lys55}$	1.52	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta 1_{Lys55}$, $H\beta 2_{Lys55}$, $H\gamma 1_{Lys55}$, $H\gamma 2_{Lys55}$, $H\varepsilon 1_{Lys55}$, $H\varepsilon 2_{Lys55}$, εNH_3^+	NH_{Lys55}, $H\alpha_{Lys55}$, $H\beta 1_{Lys55}$, $H\beta 2_{Lys55}$, $H\gamma 1_{Lys55}$, $H\gamma 2_{Lys55}$, $H\varepsilon 1_{Lys55}$, $H\varepsilon 2_{Lys55}$ **Asn53:** $\gamma 1NH_{Asn53}$
$H\varepsilon 1_{Lys55}$	2.76	$H\beta 1_{Lys55}$, $H\beta 2_{Lys55}$, $H\gamma 1_{Lys55}$, $H\gamma 2_{Lys55}$, $H\delta 1_{Lys55}$, $H\delta 2_{Lys55}$, εNH_3^+	$H\delta 1_{Lys55}$, $H\delta 2_{Lys55}$, εNH_3^+
$H\varepsilon 2_{Lys55}$	2.76	$H\beta 1_{Lys55}$, $H\beta 2_{Lys55}$, $H\gamma 1_{Lys55}$, $H\gamma 2_{Lys55}$, $H\delta 1_{Lys55}$, $H\delta 2_{Lys55}$, εNH_3^+	$H\delta 1_{Lys55}$, $H\delta 2_{Lys55}$, εNH_3^+
$\varepsilon NH_3^+{}_{Lys55}$	7.70	$H\beta 1_{Lys55}$, $H\beta 2_{Lys55}$, $H\gamma 1_{Lys55}$, $H\gamma 2_{Lys55}$, $H\delta 1_{Lys55}$, $H\delta 2_{Lys55}$, $H\varepsilon 1_{Lys55}$, $H\varepsilon 2_{Lys55}$, εNH_3^+	$H\varepsilon 1_{Lys55}$, $H\varepsilon 2_{Lys55}$ **Met35:** NH_{2Met35} **Ser42:** NH_{Ser42}

Για την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης και την επαλήθευση των αποτελεσμάτων, στη συνέχεια, ακολούθησε η πλήρης ταυτοποίηση του φάσματος των ^{15}N του πεπτιδίου. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω των δεδομένων του δισδιάστατου ετεροπυρηνικού φάσματος ^{1}H-^{15}N-HSQC (Σχήμα 6.9) και όλα τα δεδομένα τοποθετήθηκαν στον πίνακα 6.3.



Σχήμα 6.9 Φάσμα 2D ^{1}H-^{15}N-HSQC του πεπτιδίου MOG_{35-55}, που έχει ληφθεί σε φασματογράφο Bruker 700MHz, σε θερμοκρασία 25°C και σε διαλύτη d6-DMSO.

Πίνακας 6.3 Ταυτοποίηση των ^{15}N του πεπτιδίου MOG_{35-55}

ΑΜΙΝΟΞΥ		**^{15}N-HSQC**
Met35		
NH_{2Met35}	-	Χωρίς σήμα
Glu36		
NH_{Glu36}	121.44	N**H**$_{Glu36}$
Val37		
NH_{Val37}	115.89	N**H**$_{Val37}$
Gly38		
NH_{Gly38}	107.98 ή 117.82 ή 118.12	N**H**$_{Gly38}$
Trp39		
NH_{Trp39}	118.08	N**H**$_{Trp39}$
1**N**H_{Trp39}	131.15	1N**H**$_{Tr39}$
Tyr40		
NH_{Tyr40}	117.24	N**H**$_{Tyr40}$
Arg41		
NH_{Arg41}	117.57	N**H**$_{Arg41}$
ε**N**H_{Arg41}	124.88	εN**H**$_{Arg41}$
C=**N**H_{Arg41}	-	Χωρίς σήμα
C-**N**H_{2Arg41}	-	Χωρίς σήμα
Ser42		
NH_{Ser42}	115.27	N**H**$_{Ser42}$
Pro43		
-	-	-
Phe44		
NH_{Phe44}	114.52	N**H**$_{Phe44}$
Ser45		
NH_{Ser45}	113.31	N**H**$_{Ser45}$
Arg46		
NH_{Arg46}	105.65 ή **119.47**	N**H**$_{Arg46}$
ε**N**H_{Arg46}	124.88	εN**H**$_{Arg46}$
C=**N**H $_{Arg46}$	-	Χωρίς σήμα
C-**N**$H_{2\ Arg46}$	-	Χωρίς σήμα
Val47		
NH_{Val47}	115.52	N**H**$_{Val47}$
Val48		
NH_{Val48}	118.72	N**H**$_{Val48}$
His49		
NH_{His49}	119.51	N**H**$_{His49}$
3NH_{His49}	-	Χωρίς σήμα
Leu50		

NH$_{Leu50}$	120.15	N**H$_{Leu50}$**
Tyr51		
NH$_{Tyr51}$	117.59	N**H$_{Tyr51}$**
Arg52		
NH$_{Arg52}$	107.98 ή 117.82 ή 118.12	N**H$_{Arg52}$**
ε**N**H$_{Arg52}$	124.88	εN**H$_{Arg52}$**
C=**N**H $_{Arg52}$	-	Χωρίς σήμα
C-**N**H$_{2\ Arg52}$	-	Χωρίς σήμα
Asn53		
NH$_{Asn53}$	107.98 ή 117.82 ή 118.12	N**H$_{Asn53}$**
γ1.2**N**H$_{Asn53}$	110.21	γ1N**H$_{Asn53}$**. γ2N**H$_{Asn53}$**
Gly54		
NH$_{Gly54}$	**105.65** ή 119.47	N**H$_{Gly54}$**
Lys55		
NH$_{Lys55}$	116.63	N**H$_{Lys55}$**
εNH$_3^+$ $_{Lys55}$	7.70	Χωρίς σήμα

6.2 Υπολογισμός αποστάσεων από NOE δεδομένα

Από το φάσμα 2D-NOESY υπολογίζονται με τη μέθοδο ολοκλήρωσης (integration) όλοι οι όγκοι που αφορούν στις συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων στο ίδιο αμινοξύ αλλά και σε διαφορετικά αμινοξέα και στη συνέχεια ορίζονται οι αντίστοιχες αποστάσεις σε τιμές Å.

Συγκεκριμένα, οι αποστάσεις μεταξύ γειτονικών στο χώρο πρωτονίων υπολογίζονται από τον όγκο των εκτός διαγωνίου κορυφών χωρικού συσχετισμού στα NOESY φάσματα. Ένα φάσμα απορροφήσεων μπορεί να χωριστεί σε διάφορες περιοχές ανάλογα με το είδος των χημικών απορροφήσεων που αναμένονται σε κάθε περιοχή. Για τη μετατροπή του όγκου, που λαμβάνεται ως μέση τιμή των όγκων των δύο συμμετρικών εκτός διαγωνίου κορυφών διασταύρωσης, σε απόσταση μεταξύ των γειτονικών χωρικά πρωτονίων. ακολουθήθηκε η εξής επεξεργασία:

- Ο μέσος όγκος κανονικοποιήθηκε ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που συμμετείχαν στο NOE σήμα.
- Επιλέχθηκε ο όγκος αναφοράς ο οποίος αντιστοιχεί σε δεδομένη απόσταση αναφοράς. Η επιλογή βασίζεται στη διαχωριστικότητα και στην παρουσία χαμηλού επιπέδου θορύβου. ώστε η κορυφή διασταύρωσης NOE να είναι ευκρινής και να μην επιδέχεται αμφιβολία ότι ο όγκος που μετρήθηκε αφορούσε σαφώς σήμα και δεν περιλάμβανε θόρυβο.

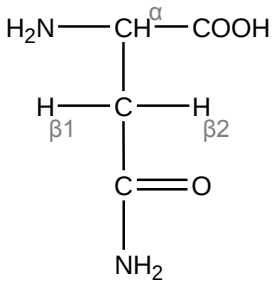
- Υπολογίσθηκε η απόσταση για τα υπόλοιπα σήματα NOE βάση τη σχέση (i):

$$r = r_{ref}\sqrt[6]{\frac{V_{ref}}{V}} \qquad \text{(i)}$$

όπου V_{ref} και r_{ref} ο όγκος και απόσταση αναφοράς ενώ V και r ο όγκος και η προκύπτουσα απόσταση για τα υπόλοιπα NOE σήματα.

Η απόσταση που υπολογίζεται με τον παραπάνω τρόπο δε χρησιμοποιείται ως απόλυτος αριθμός, αλλά ως μέτρο για την κατάταξη όλων των αποστάσεων σε τρεις περιοχές έντασης: ισχυρής (μέχρι 2,8 Ǻ), μέτριας (2,8-3,5 Ǻ) και ασθενούς (3,5-5 Ǻ). [39]

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία αρχικά επιλέχθηκε ο όγκος αναφοράς, ο οποίος αντιστοιχεί στην απόσταση των πρωτονίων $H\alpha_{Asn}$ -$H\beta1_{Asn}$ στο αμινοξύ της Ασπαραγίνης στη θέση 53.



Asn

Η **θεωρητική απόσταση** μεταξύ των πρωτονίων $H\alpha_{Asn}$ -$H\beta1_{Asn}$ ισούται με :

$\mathbf{r_{ref}}$ = 2,550 Ǻ

Ο **μέσος όγκος αναφοράς** στη δεδομένη απόσταση $H\alpha_{Asn}$ -$H\beta1_{Asn}$ όπως προέκυψε από τα NOE δεδομένα ισούται με :

$\mathbf{V_{ref}}$ = 1,105

Τα παραπάνω δεδομένα τοποθετούνται κατάλληλα στον τύπο και προκύπτει η σχέση (ii) βάση της οποίας υπολογίστηκαν όλα τα υπόλοιπα σήματα NOE.

$$r = 2.550\sqrt[6]{\frac{1.105}{V}} \qquad \text{(ii)}$$

Στον παρακάτω πίνακα 6.4 καταγράφονται κατά σειρά:

i) οι συζεύξεις των πυρήνων που παρατηρούνται στο φάσμα NOESY (πρώτη στήλη)

ii) **Vμέσος**: η μέση τιμή των όγκων των δύο συμμετρικών εκτός διαγωνίου σημάτων (δεύτερη στήλη)

iii) η απόσταση ***r*** για κάθε ζεύγος πυρήνων σε σύζευξη (στο φάσμα NOESY), η οποία υπολογίζεται από τον τύπο $r = 2.550\sqrt[6]{\frac{1.105}{V}}$ (ii). .

(τρίτη στήλη – οι υπολογισμοί έχουν πραγματοποιηθεί με προσέγγιση στο πρώτο δεκαδικό ψηφίο).

iv) η απόσταση ***r*** υπολογισμένη σε περίπτωση σφάλματος ±15% (τέταρτη και πέμπτη στήλη αντίστοιχα – οι υπολογισμοί έχουν πραγματοποιηθεί με προσέγγιση στο πρώτο δεκαδικό ψηφίο)

v) με πράσινο χρώμα σημειώνονται οι συσχετίσεις πρωτονίων μεταξύ αμινοξέων που απέχουν μεταξύ τους δύο θέσεις (1-3), ενώ με πορτοκαλί χρώμα σημειώνονται οι συσχετίσεις πρωτονίων μεταξύ αμινοξέων που απέχουν μεταξύ τους τρεις θέσεις και πάνω (≥1-4)

Πίνακας 6.4 Υπολογισμός αποστάσεων πρωτονίων του MOG_{35-55} σε χωρική εγγύτητα

Πρωτόνια σε χωρική εγγύτητα	**V μέσος**	**Απόσταση r (Å)**	**Απόσταση r x1.15 (Å)**	**Απόσταση r x0.85 (Å)**
Met35				
NH_{2Met35} - $H_{\alpha Met35}$	0.28	**3.2**	3.7	**2.7**
NH_{2Met35} - $H_{\beta 1Met35}$	0.0725	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{2Met35} - $H_{\beta 2Met35}$	0.0725	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{2Met35} - $H_{\gamma 1Met35}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
NH_{2Met35} - $H_{\gamma 2Met35}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
NH_{2Met35} - NH_{Glu36}	0.0475	**4.3**	5.0	**3.7**
NH_{2Met35} - $H\alpha 1_{Gly38}$	0.1425	**3.6**	4.1	**3.0**
NH_{2Met35} - $H\alpha 2_{Gly38}$	0.15	**3.6**	4.1	**3.0**
NH_{2Met35} - $2H_{His49}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
NH_{2Met35} - $4H_{His49}$	0.0225	**4.9**	5.6	**4.1**
NH_{2Met35} - $\varepsilon NH_3^+{}_{Lys55}$	0.0475	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\beta 1_{Met35}$	0.1975	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\beta 2_{Met35}$	0.1975	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\gamma 1_{Met35}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\gamma 2_{Met35}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha_{Met35}$ - NH_{Glu36}	2.785	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\alpha_{Glu36}$	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\beta 2_{Glu36}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha_{Met35}$ - $H\gamma 1_{Glu36}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\alpha_{Met35}$ - NH_{Val37}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta 1_{Met35}$ - $H\gamma 1_{Met35}$	0.1325	**3.6**	4.2	**3.1**
$H\beta 1_{Met35}$ - $H\gamma 2_{Met35}$	0.1325	**3.6**	4.2	**3.1**
$H\beta 1_{Met35}$ - NH_{Glu36}	0.1425	**3.6**	4.1	**3.0**

$H\beta2_{Met35}$ - $\gamma1CH_{3Val37}$	0.1225	**3.7**	4.2	**3.1**
$H\beta2_{Met35}$ - $\gamma2CH_{3Val37}$	0.1225	**3.7**	4.2	**3.1**
$H\gamma1_{Met35}$ - NH_{Glu36}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\gamma1_{Met35}$ - NH_{Val37}	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\gamma2_{Met35}$ - NH_{Glu36}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\gamma2_{Met35}$ - NH_{Val37}	0.02	**4.9**	5.7	**4.2**
Glu36				
NH_{Glu36} -$H\alpha_{Glu36}$	0.23	**3.3**	3.8	**2.8**
NH_{Glu36} - $H\beta1_{Glu36}$	0.60	**2.8**	3.2	**2.4**
NH_{Glu36} -$H\beta2_{Glu36}$	0.92	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Glu36} -$H\gamma1_{Glu36}$	0.285	**3.2**	3.7	**2.7**
NH_{Glu36} -$H\gamma2_{Glu36}$	0.19	**3.4**	3.9	**2.9**
NH_{Glu36} -NH_{Val37}	0.275	**3.2**	3.7	**2.7**
NH_{Glu36} -$H\alpha_{Val37}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
NH_{Glu36} -$H\beta_{Val37}$				
$H\alpha_{Glu36}$ -$H\beta1_{Glu36}$	0.66	**2.7**	3.2	**2.4**
$H\alpha_{Glu36}$ -$H\beta2_{Glu36}$	0.595	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\alpha_{Glu36}$ -$H\gamma1_{Glu36}$	0.21	**3.4**	3.9	**2.8**
$H\alpha_{Glu36}$ -$H\gamma2_{Glu36}$	0.355	**3.1**	3.5	**2.6**
$H\alpha_{Glu36}$ -NH_{Val37}	2.97	**2.2**	2.5	**1.8**
$H\alpha_{Glu36}$ -$H\beta_{Val37}$	0.10	**3.8**	4.4	**3.2**
$H\alpha_{Glu36}$ - $\gamma1CH_{3Val37}$	0.037	**4.5**	5.2	**3.8**
$H\alpha_{Glu36}$ -$\gamma2CH_{3Val37}$	0.037	**4. 5**	5.2	**3.8**
$H\alpha_{Glu36}$ -NH_{Gly38}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\beta1_{Glu36}$ - $H\beta2_{Glu36}$	5.86	**1.9**	2.2	**1.6**
$H\beta1_{Glu36}$ - $H\gamma1_{Glu36}$	0.40	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\beta1_{Glu36}$ - $H\gamma2_{Glu36}$	0.37	**3.1**	3.5	**2.6**
$H\beta1_{Glu36}$ -NH_{Val37}	0.565	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta2_{Glu36}$ - $H\gamma1_{Glu36}$	0.625	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta2_{Glu36}$ - $H\gamma2_{Glu36}$	0.70	**2.8**	3.2	**2.3**
$H\beta2_{Glu36}$ -NH_{Val37}	0.25	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\beta2_{Glu36}$ -$H\alpha_{Val37}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\gamma1_{Glu36}$ - $H\gamma2_{Glu36}$	9.91	**1.8**	2.0	**1.5**
$H\gamma1_{Glu36}$ - NH_{Val37}	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**

$H\gamma2_{Glu36}$ - NH_{Val37}	0.095	**3.8**	4.4	**3.3**
Val37				
NH_{Val37} - $H\alpha_{Val37}$	0.53	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{Val37} - $H\beta_{Val37}$	0.425	**3.0**	3.4	**2.5**
NH_{Val37} - $\gamma1CH_{3Val37}$	0.176	**3.5**	4.0	**2.9**
NH_{Val37} - $\gamma2CH_{3Val37}$	0.176	**3.5**	4.0	**2.9**
NH_{Val37} - NH_{Gly38}	0.32	**3.1**	3.6	**2.7**
NH_{Val37} - $H\alpha1_{Gly38}$	0.22	**3.3**	3.8	**2.8**
NH_{Val37} - $H\alpha2_{Gly38}$	0.21	**3.4**	3.9	**2.9**
NH_{Val37} - $H\beta1_{Trp39}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
NH_{Val37} - $H\beta2_{Trp39}$	0.16	**3.5**	4.0	**3.0**
$H\alpha_{Val37}$ - $H\beta_{Val37}$	1.175	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Val37}$ - $\gamma1CH_{3Val37}$	1.31	**2.5**	2.9	**2.1**
$H\alpha_{Val37}$ - $\gamma2CH_{3Val37}$	1.31	**2.5**	2.9	**2.1**
$H\alpha_{Val37}$ - NH_{Gly38}	2.885	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Val37}$ - $H\alpha1_{Gly38}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Val37}$ - $H\alpha2_{Gly38}$	0.205	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{Val37}$ - NH_{Trp39}	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\beta_{Val37}$ - NH_{Gly38}	0.62	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta_{Val37}$ - $H\alpha1_{Gly38}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta_{Val37}$ - $H\alpha2_{Gly38}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta_{Val37}$ - NH_{Trp39}	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta_{Val37}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.015	**5.2**	6.0	**4.4**
$H\beta_{Val37}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.01	**5.6**	6.4	**4.7**
$\gamma1CH_{3Val37}$ - NH_{Gly38}	0.072	**4.0**	4.6	**3.4**
$\gamma2CH_{3Val37}$ - NH_{Gly38}	0.072	**4.0**	4.6	**3.4**
Gly38				
NH_{Gly38} - $H\alpha1_{Gly38}$	1.08	**2.6**	2.9	**2.2**
NH_{Gly38} - $H\alpha2_{Gly38}$	1.05	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Gly38} - NH_{Trp39}	0.215	**3.3**	3.9	**2.8**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $H\alpha2_{Gly38}$	7.885	**0.6**	0.7	**0.5**
$H\alpha1_{Gly38}$ - NH_{Trp39}	1.865	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $H\alpha_{Trp39}$	0.095	**3.8**	4.4	**3.3**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $H\beta1_{Trp39}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**

$H\alpha1_{Gly38}$ - $H\beta2_{Trp39}$	0.13	**3.6**	4.2	**3.1**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $2H_{Trp39}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $4H_{Trp39}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\alpha1_{Gly38}$ - NH_{Tyr40}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\alpha1_{Gly38}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.025	**4.8**	5.5	**4.1**
$H\alpha2_{Gly38}$ - NH_{Trp39}	1.855	**0.7**	0.9	**0.6**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $H\alpha_{Trp39}$	0.10	**3.8**	4.4	**3.2**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $H\beta1_{Trp39}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $H\beta2_{Trp39}$	0.0145	**5.3**	6.0	**4.5**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $2H_{Trp39}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $4H_{Trp39}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha2_{Gly38}$ - NH_{Tyr40}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha2_{Gly38}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
Trp39				
NH_{Trp39} - $H\alpha_{Trp39}$	0.86	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Trp39} - $H\beta1_{Trp39}$	0.825	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Trp39} - $H\beta2_{Trp39}$	1.21	**2.5**	2.9	**2.1**
NH_{Trp39} - $2H_{Trp39}$	0.265	**3.2**	3.7	**2.7**
NH_{Trp39} - $4H_{Trp39}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
NH_{Trp39} - NH_{Tyr40}	0.48	**2.9**	3.4	**2.5**
NH_{Trp39} - $H\beta1_{Tyr40}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
NH_{Trp39} - $H\beta2_{Tyr40}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha_{Trp39}$ - $H\beta2_{Trp39}$	1.065	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Trp39}$ - $2H_{Trp39}$	0.29	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Trp39}$ - $4H_{Trp39}$	0.275	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Trp39}$ - $1NH_{Trp39}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha_{Trp39}$ - NH_{Tyr40}	2.395	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Trp39}$ - $H\beta1_{Tyr40}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha_{Trp39}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Trp39}$ - $H\beta1_{His49}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\beta1_{Trp39}$ - $H\beta2_{Trp39}$	0.483	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{Trp39}$ - $2H_{Trp39}$	0.56	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta1_{Trp39}$ - $5H_{Trp39}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta1_{Trp39}$ - $1NH_{Trp39}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\beta1_{Trp39}$ - NH_{Tyr40}	0.435	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{Trp39}$ - $H\alpha_{Tyr40}$	0.125	**3.7**	4.2	**3.1**
$H\beta1_{Trp39}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.0725	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta1_{Trp39}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.375	**3.1**	3.5	**2.6**

$H\beta2_{Trp39}$ - $2H_{Trp39}$	0.515	**2.9**	3.3	**2.5**
$H\beta2_{Trp39}$ - $4H_{Trp39}$	0.355	**3.1**	3.5	**2.6**
$H\beta2_{Trp39}$ - $1NH_{Trp39}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta2_{Trp39}$ - NH_{Tyr40}	0.50	**2.9**	3.3	**2.5**
$2H_{Trp39}$ - $1NH_{Trp39}$	1.405	**0.8**	0.9	**0.7**
$2H_{Trp39}$ - NH_{Tyr40}	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$4H_{Trp39}$ - $5H_{Trp39}$	1.10	**2.6**	2.9	**2.2**
$4H_{Trp39}$ - $6H_{Trp39}$	0.14	**3.6**	4.1	**3.1**
$4H_{Trp39}$ - NH_{Tyr40}	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$4H_{Trp39}$ - $H\alpha_{Tyr40}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$5H_{Trp39}$ - $6H_{Trp39}$	2.62	**2.2**	2.5	**1.9**
$5H_{Trp39}$ - $7H_{Trp39}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$6H_{Trp39}$ - $7H_{Trp39}$	1.36	**2.5**	2.8	**2.1**
$7H_{Trp39}$ - $1NH_{Trp39}$	0.535	**2.9**	3.3	**2.4**
Tyr40				
NH_{Tyr40} - $H\alpha_{Tyr40}$	1.115	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Tyr40} - $H\beta1_{Tyr40}$	1.33	**2.5**	2.8	**2.1**
NH_{Tyr40} - $H\beta2_{Tyr40}$	0.86	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Tyr40} - $2.6H_{Tyr40}$	0.395	**3.0**	3.5	**2.6**
NH_{Tyr40} - NH_{Arg41}	0.29	**3.2**	3.7	**2.7**
NH_{Tyr40} - $H\alpha_{Arg41}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
NH_{Tyr40} - $H\gamma1_{Arg41}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
NH_{Tyr40} - $H\gamma2_{Arg41}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Tyr40}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.325	**3.1**	3.6	**2.7**
$H\alpha_{Tyr40}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\alpha_{Tyr40}$ - NH_{Arg41}	2.30	**2.3**	2.6	**1.9**
$H\alpha_{Tyr40}$ - $H\beta1_{Arg41}$	0.0675	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\alpha_{Tyr40}$ - $H\beta2_{Arg41}$	0.0675	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\alpha_{Tyr40}$ - NH_{Ser42}	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\alpha_{Tyr40}$ - NH_{His49}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\alpha_{Tyr40}$ - $4H_{His49}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta1_{Tyr40}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.71	**2.7**	3.2	**2.3**
$H\beta1_{Tyr40}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.095	**3.8**	4.4	**3.3**
$H\beta1_{Tyr40}$ - NH_{Arg41}	0.77	**2.7**	3.1	**2.3**

$H\beta1_{Tyr40}$ - $H\alpha_{Arg41}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\beta1_{Tyr40}$ - $H\gamma1_{Arg41}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\beta1_{Tyr40}$ - $H\gamma2_{Arg41}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta1_{Tyr40}$ - NH_{Ser42}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta1_{Tyr40}$ - NH_{His49}	0.0195	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\beta2_{Tyr40}$ - $2.6H_{Tyr40}$	0.66	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta2_{Tyr40}$ - $3.5H_{Tyr40}$	0.035	**4.5**	5.2	**3.9**
$H\beta2_{Tyr40}$ - NH_{Arg41}	1.12	**2.5**	2.9	**2.2**
$H\beta2_{Tyr40}$ - $H\alpha_{Arg41}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\beta2_{Tyr40}$ - $H\gamma1_{Arg41}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\beta2_{Tyr40}$ - $H\gamma2_{Arg41}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta2_{Tyr40}$ - NH_{His49}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$2.6H_{Tyr40}$ - NH_{Arg41}	0.2225	**3.3**	3.8	**2.8**
$2.6H_{Tyr40}$ - NH_{Ser42}	0.035	**4.5**	5.2	**3.9**
$2.6H_{Tyr40}$ - $H\alpha1_{Ser42}$	0.035	**4.5**	5.2	**3.9**
Arg41				
NH_{Arg41} - $H\alpha_{Arg41}$	0.51	**2.9**	3.3	**2.5**
NH_{Arg41} - $H\beta1_{Arg41}$	0.36	**3.1**	3.5	**2.6**
NH_{Arg41} - $H\beta2_{Arg41}$	0.36	**3.1**	3.5	**2.6**
NH_{Arg41} - $H\gamma1_{Arg41}$	1.03	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Arg41} - $H\gamma2_{Arg41}$	0.97	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Arg41} - εNH_{Arg41}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
NH_{Arg41} - NH_{Ser42}	0.505	**2.9**	3.3	**2.5**
NH_{Arg41} - $H\alpha_{Ser42}$	0.595	**2.8**	3.3	**2.4**
NH_{Arg41} - $H\beta1_{Ser42}$	0.12	**3.7**	4.2	**3.1**
NH_{Arg41} - $H\beta2_{Ser42}$	0.12	**3.7**	4.2	**3.1**
NH_{Arg41} - NH_{His49}	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\alpha_{Arg41}$ - $H\beta1_{Arg41}$	1.005	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Arg41}$ - $H\beta2_{Arg41}$	1.005	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Arg41}$ - εNH_{Arg41}	0.09	**3.9**	4.45	**3.3**
$H\alpha_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	2.745	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Arg41}$ - $H\alpha_{Ser42}$	0.30	**3.2**	3.6	**2.7**
$H\alpha_{Arg41}$ - $H\beta1_{Ser42}$	0.95	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\alpha_{Arg41}$ - $H\beta2_{Ser42}$	0.95	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\beta1_{Arg41}$ - $H\gamma1_{Arg41}$	1.455	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\beta1_{Arg41}$ - $H\gamma2_{Arg41}$	1.655	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\beta1_{Arg41}$ - $H\delta1_{Arg41}$	0.15125	**3.6**	4.1	**3.0**

$H\beta1_{Arg41}$ - $H\delta2_{Arg41}$	0.15125	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\beta1_{Arg41}$ - εNH_{Arg41}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta1_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.275	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta1_{Arg41}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\beta2_{Arg41}$ - $H\gamma1_{Arg41}$	1.455	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\beta2_{Arg41}$ - $H\gamma2_{Arg41}$	1.655	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\beta2_{Arg41}$ - $H\delta1_{Arg41}$	0.15125	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\beta2_{Arg41}$ - $H\delta2_{Arg41}$	0.15125	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\beta2_{Arg41}$ - εNH_{Arg41}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta2_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.275	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta2_{Arg41}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\gamma1_{Arg41}$ - εNH_{Arg41}	0.15	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\gamma1_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.445	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\gamma2_{Arg41}$ - εNH_{Arg41}	0.15	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\gamma2_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.44	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\delta1_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\delta2_{Arg41}$ - NH_{Ser42}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
εNH_{Arg41} - NH_{Ser42}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
Ser42				
NH_{Ser42} - $H\alpha_{Ser42}$	0.71	**2.7**	3.2	**2.3**
NH_{Ser42} - $H\beta1_{Ser42}$	1.095	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Ser42} - $H\beta2_{Ser42}$	1.095	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Ser42} - $H\beta1_{Pro43}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
NH_{Ser42} - NH_{Phe44}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{Ser42} - $H\beta1_{Phe44}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
NH_{Ser42} - $H\beta2_{Phe44}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
NH_{Ser42} - NH_{Val47}	0.16	**3.5**	4.0	**3.0**
NH_{Ser42} - $\varepsilon NH_3^+{}_{Lys55}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\alpha_{Ser42}$ - $H\beta1_{Ser42}$	1.675	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\alpha_{Ser42}$ - $H\beta2_{Ser42}$	1.675	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\alpha_{Ser42}$ - $H\alpha_{Pro43}$	0.165	**3.5**	4.0	**3.0**

$H\alpha_{Ser42}$ - $H\beta1_{Pro43}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\alpha_{Ser42}$ - $H\beta2_{Pro43}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\alpha_{Ser42}$ - NH_{Phe44}	0.20	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\beta1_{Ser42}$ - $H\alpha_{Pro43}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{Ser42}$ - $H\alpha_{Pro43}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
Pro43				
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\beta2_{Pro43}$	1.59	**2.4**	2.8	**2.0**
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\delta1_{Pro43}$	0.25	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.39	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\alpha_{Pro43}$ - NH_{Phe44}	2.065	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\alpha_{Phe44}$	0.285	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\beta1_{Phe44}$	0.32	**3.1**	3.6	**2.7**
$H\alpha_{Pro43}$ - $H\beta2_{Phe44}$	0.23	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{Pro43}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha_{Pro43}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\beta2_{Pro43}$	4.62	**2.0**	2.3	**1.7**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\gamma1_{Pro43}$	0.54	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\gamma2_{Pro43}$	0.725	**2.7**	3.1	**2.3**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\delta1_{Pro43}$	0.415	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.395	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\beta1_{Pro43}$ - NH_{Phe44}	0.495	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\alpha_{Phe44}$	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\beta1_{Phe44}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\beta1_{Pro43}$ - $H\beta2_{Phe44}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta1_{Pro43}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
$H\beta1_{Pro43}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta1_{Pro43}$ - NH_{Ser45}	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\gamma1_{Pro43}$	1.59	**2.4**	2.8	**2.0**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\gamma2_{Pro43}$	0.56	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\delta1_{Pro43}$	0.375	**3.1**	3.5	**2.6**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.415	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\beta2_{Pro43}$ - NH_{Phe44}	0.425	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\alpha_{Phe44}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{Pro43}$ - $H\beta2_{Phe44}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta2_{Pro43}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\gamma1_{Pro43}$ - $H\delta2_{Pro43}$	0.75	**2.7**	3.1	**2.3**
$H\gamma1_{Pro43}$ - NH_{Phe44}	0.225	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\gamma1_{Pro43}$ - $H\beta2_{Phe44}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**

$H\gamma1_{Pro43}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\gamma1_{Pro43}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\gamma2_{Pro43}$ - $H\delta2_{Pro43}$	1.21	**2.5**	2.9	**2.1**
$H\gamma2_{Pro43}$ - NH_{Phe44}	0.30	**3.2**	3.6	**2.7**
$H\gamma2_{Pro43}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\gamma2_{Pro43}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\gamma2_{Pro43}$ - $4H_{Phe44}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
Phe44				
NH_{Phe44} - $H\alpha_{Phe44}$	0.92	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Phe44} - $H\beta1_{Phe44}$	0.83	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Phe44} - $H\beta2_{Phe44}$	1.17	**2.5**	2.9	**2.1**
NH_{Phe44} - $2.6H_{Phe44}$	0.1175	**3.7**	4.3	**3.1**
NH_{Phe44} - $3.5H_{Phe44}$	0.1175	**3.7**	4.3	**3.1**
NH_{Phe44} - NH_{Ser45}	0.83	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Phe44} - $H\alpha_{Ser45}$	0.37	**3.1**	3.5	**2.6**
NH_{Phe44} - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.026	**4.8**	5.5	**4.0**
NH_{Phe44} - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.026	**4.8**	5.5	**4.0**
$H\alpha_{Phe44}$ - $H\beta2_{Phe44}$	1.02	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\alpha_{Phe44}$ - NH_{Ser45}	2.435	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{Phe44}$ - $H\alpha_{Ser45}$	0.175	**3.5**	4.0	**2.9**
$H\beta1_{Phe44}$ - $H\beta2_{Phe44}$	3.86	**2.1**	2.4	**1.8**
$H\beta1_{Phe44}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.43	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{Phe44}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.22	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\beta2_{Phe44}$ - $2.6H_{Phe44}$	0.4385	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta2_{Phe44}$ - $3.5H_{Phe44}$	0.225	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\beta2_{Phe44}$ - $H\alpha_{Ser45}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$2.6H_{Phe44}$ - $4H_{Phe44}$	1.395	**0.8**	0.9	**0.7**
$2.6H_{Phe44}$ - NH_{Ser45}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$3.5H_{Phe44}$ - $4H_{Phe44}$	0.96	**2.6**	3.0	**2.2**
$3.5H_{Phe44}$ - NH_{Ser45}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
Ser45				
NH_{Ser45} - $H\alpha_{Ser45}$	0.57	**2.8**	3.3	**2.4**
NH_{Ser45} - $H\beta1_{Ser45}$	0.705	**2.7**	3.2	**2.3**
NH_{Ser45} - $H\beta2_{Ser45}$	0.835	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Ser45} - $H\alpha_{Arg46}$	0.295	**3.2**	3.7	**2.7**

NH_{Ser45} - NH_{His49}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha_{Ser45}$ - $H\beta1_{Ser45}$	1.44	**2.4**	2.8	**2.1**
$H\alpha_{Ser45}$ - $H\beta2_{Ser45}$	1.24	**2.5**	2.9	**2.1**
$H\alpha_{Ser45}$ - NH_{Arg46}	1.625	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\beta1_{Ser45}$ - NH_{Arg46}	0.35	**3.1**	3.6	**2.6**
$H\beta1_{Ser45}$ - $H\alpha_{Arg46}$	0.90	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\beta1_{Ser45}$ - $H\beta1_{Arg46}$	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
$H\beta1_{Ser45}$ - $H\beta2_{Arg46}$	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
$H\beta2_{Ser45}$ - NH_{Arg46}	0.335	**3.1**	3.6	**2.6**
$H\beta2_{Ser45}$ - $H\alpha_{Arg46}$	0.91	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\beta2_{Ser45}$ - $H\beta1_{Arg46}$	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\beta2_{Ser45}$ - $H\beta2_{Arg46}$	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\beta2_{Ser45}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta2_{Ser45}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{Ser45}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
Arg46				
NH_{Arg46} - $H\alpha_{Arg46}$	2.28	**2.3**	2.6	**1.9**
NH_{Arg46} - $H\delta1_{Arg46}$	0.345	**3.1**	3.6	**2.6**
NH_{Arg46} - $H\delta2_{Arg46}$	0.345	**3.1**	3.6	**2.6**
NH_{Arg46} - NH_{Val47}	0.905	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Arg46} - $H\beta_{Val47}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\alpha_{Arg46}$ - $H\beta1_{Arg46}$	0.53	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\alpha_{Arg46}$ - $H\beta2_{Arg46}$	0.53	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\alpha_{Arg46}$ - εNH_{Arg46}	0.095	**3.8**	4.4	**3.3**
$H\alpha_{Arg46}$ - NH_{Val47}	4.22	**2.0**	2.3	**1.7**
$H\alpha_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.095	**3.8**	4.4	**3.3**
$H\alpha_{Arg46}$ - $H\beta_{Val47}$	0.195	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{Arg46}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.1125	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Arg46}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.1125	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Arg46}$ - NH_{Val48}	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Arg46}$ - NH_{Asn53}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta1_{Arg46}$ - $H\delta1_{Arg46}$	0.1675	**3.5**	4.0	**3.0**
$H\beta1_{Arg46}$ - $H\delta2_{Arg46}$	0.1675	**3.5**	4.0	**3.0**
$H\beta1_{Arg46}$ - εNH_{Arg46}	0.145	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\beta1_{Arg46}$ - NH_{Val47}	0.3125	**3.1**	3.6	**2.7**
$H\beta1_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.10	**3.8**	4.4	**3.2**

$H\beta1_{Arg46}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.043	**4.4**	5.0	**3.7**
$H\beta1_{Arg46}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta1_{Arg46}$ - NH_{Val48}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta1_{Arg46}$ - NH_{His49}	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\beta2_{Arg46}$ - $H\delta1_{Arg46}$	0.1675	**3.5**	4.0	**3.0**
$H\beta2_{Arg46}$ - $H\delta2_{Arg46}$	0.1675	**3.5**	4.0	**3.0**
$H\beta2_{Arg46}$ - εNH_{Arg46}	0.145	**3.6**	4.1	**3.0**
$H\beta2_{Arg46}$ - NH_{Val47}	0.3125	**3.1**	3.6	**2.7**
$H\beta2_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.10	**3.8**	4.4	**3.2**
$H\beta2_{Arg46}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.043	**4.4**	5.0	**3.7**
$H\beta2_{Arg46}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{Arg46}$ - NH_{Val48}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta2_{Arg46}$ - NH_{His49}	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\gamma1_{Arg46}$ - NH_{Val47}	0.62	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\gamma1_{Arg46}$ - NH_{Val48}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\gamma1_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val48}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\gamma1_{Arg46}$ - NH_{His49}	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\gamma2_{Arg46}$ - NH_{Val47}	0.575	**2.8**	3.3	**2.4**
$H\gamma2_{Arg46}$ - NH_{Val48}	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\gamma2_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val48}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\gamma2_{Arg46}$ - NH_{His49}	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\delta1_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\delta2_{Arg46}$ - $H\alpha_{Val47}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
Val47				
NH_{Val47} - $H\alpha_{Val47}$	1.095	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Val47} - $H\beta_{Val47}$	1.29	**2.5**	2.9	**2.1**
NH_{Val47} - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.3767	**3.1**	3.5	**2.6**
NH_{Val47} - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.3767	**3.1**	3.5	**2.6**
NH_{Val47} - NH_{Val48}	0.669	**2.8**	3.2	**2.4**
NH_{Val47} - $H\alpha_{Val48}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
NH_{Val47} - NH_{His49}	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\alpha_{Val47}$ - $H\beta_{Val47}$	1.505	**0.8**	0.9	**0.7**

$H\alpha_{Val47}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.68	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\alpha_{Val47}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.68	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\alpha_{Val47}$ - NH_{Val48}	5.78	**1.9**	2.2	**1.6**
$H\alpha_{Val47}$ - $H\alpha_{Val48}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\alpha_{Val47}$ - NH_{His49}	0.235	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\beta_{Val47}$ - $\gamma1CH_{3Val47}$	0.561	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta_{Val47}$ - $\gamma2CH_{3Val47}$	0.561	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta_{Val47}$ - NH_{Val48}	0.35	**3.1**	3.6	**2.6**
$H\beta_{Val47}$ - NH_{His49}	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
Val48				
NH_{Val48} - $H\alpha_{Val48}$	1.145	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Val48} - $H\beta_{Val48}$	2.22	**2.3**	2.6	**1.9**
NH_{Val48} - $\gamma1CH3_{Val48}$	0.5425	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{Val48} - $\gamma2CH_{3Val48}$	0.5425	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{Val48} - NH_{His49}	1.115	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{Val48} - $H\alpha_{His49}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
NH_{Val48} - $H\beta1_{His49}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{Val48} - $H\beta2_{His49}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{Val48} - $4H_{His49}$	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\alpha_{Val48}$ - $H\beta_{Val48}$	1.575	**0.8**	0.9	**0.6**
$H\alpha_{Val48}$ - $\gamma1CH_{3Val48}$	0.465	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\alpha_{Val48}$ - $\gamma2CH_{3Val48}$	0.465	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\alpha_{Val48}$ - NH_{His49}	4.61	**2.0**	2.3	**1.7**
$H\alpha_{Val48}$ - $H\alpha_{His49}$	0.29	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Val48}$ - $H\beta1_{His49}$	0.245	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{Val48}$ - $H\beta2_{His49}$	0.34	**3.1**	3.6	**2.6**
$H\alpha_{Val48}$ - $4H_{His49}$	0.115	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Val48}$ - NH_{Leu50}	0.155	**3.5**	4.1	**3.0**
$H\beta_{Val48}$ - $\gamma1CH_{3Val48}$	1.39	**2.5**	2.8	**2.1**
$H\beta_{Val48}$ - $\gamma2CH_{3Val48}$	1.39	**2.5**	2.8	**2.1**
$H\beta_{Val48}$ - NH_{His49}	0.895	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\beta_{Val48}$ - $H\alpha_{His49}$	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\beta_{Val48}$ - $H\beta1_{His49}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta_{Val48}$ - $H\beta2_{His49}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\beta_{Val48}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\beta_{Val48}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**

His49				
NH_{His49} - $H\alpha_{His49}$	0.945	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{His49} - $H\beta1_{His49}$	1.055	**0.8**	0.9	**0.7**
NH_{His49} - $H\beta2_{His49}$	1.05	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{His49} - $4H_{His49}$	0.22	**3.3**	3.8	**2.8**
NH_{His49} - NH_{Leu50}	0.56	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{His49} - $H\alpha_{Leu50}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
NH_{His49} - $H\beta1_{Leu50}$	0.0425	**4.4**	5.0	**3.7**
NH_{His49} - $H\beta2_{Leu50}$	0.0425	**4.4**	5.0	**3.7**
NH_{His49} - $H\gamma_{Leu50}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{His49} - $2.6H_{Tyr51}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$H\alpha_{His49}$ - $H\beta1_{His49}$	1.485	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{His49}$ - $H\beta2_{His49}$	1.345	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{His49}$ - $4H_{His49}$	0.26	**3.2**	3.7	**2.8**
$H\alpha_{His49}$ - NH_{Leu50}	3.785	**0.7**	0.8	**0.6**
$H\alpha_{His49}$ - $H\alpha_{Leu50}$	0.015	**5.2**	6.0	**4.4**
$H\alpha_{His49}$ - $H\beta1_{Leu50}$	0.19	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{His49}$ - $H\beta2_{Leu50}$	0.19	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\alpha_{His49}$ - $H\gamma_{Leu50}$	0.24	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{His49}$ - NH_{Tyr51}	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta1_{His49}$ - $H\beta2_{His49}$	7.885	**0.6**	0.7	**0.5**
$H\beta1_{His49}$ - $4H_{His49}$	0.425	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{His49}$ - NH_{Leu50}	0.54	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta1_{His49}$ - $H\alpha_{Leu50}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta1_{His49}$ - $H\beta1_{Leu50}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta1_{His49}$ - $H\beta2_{Leu50}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta1_{His49}$ - NH_{Tyr51}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta2_{His49}$ - $4H_{His49}$	0.43	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta2_{His49}$ - NH_{Leu50}	0.67	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta2_{His49}$ - $H\alpha_{Leu50}$	0.065	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\beta2_{His49}$ - $H\gamma_{Leu50}$	0.055	**4.2**	4.8	**3.6**
$H\beta2_{His49}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{His49}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$2H_{His49}$ - $4H_{His49}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$4H_{His49}$ - NH_{Leu50}	0.14	**3.6**	4.1	**3.1**
$4H_{His49}$ - $H\gamma_{Leu50}$	0.14	**3.6**	4.1	**3.1**

$4H_{His49}$ - NH_{Tyr51}	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
Leu50				
NH_{Leu50} - $H\alpha_{Leu50}$	0.965	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Leu50} - $H\beta1_{Leu50}$	1.05	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Leu50} - $H\beta2_{Leu50}$	1.05	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Leu50} - $H\gamma_{Leu50}$	0.84	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Leu50} - $\delta1CH3_{Leu50}$	0.19	**3.4**	3.9	**2.9**
NH_{Leu50} - $\delta2CH3_{Leu50}$	0.19	**3.4**	3.9	**2.9**
NH_{Leu50} - NH_{Tyr51}	0.13	**3.6**	4.2	**3.1**
NH_{Leu50} - $H\beta1_{Tyr51}$	0.09	**3.9**	4.5	**3.3**
NH_{Leu50} - $H\beta2_{Tyr51}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
NH_{Leu50} - $2.6H_{Tyr51}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\alpha_{Leu50}$ - $H\beta1_{Leu50}$	1.142	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Leu50}$ - $H\beta2_{Leu50}$	1.142	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Leu50}$ - $\delta1CH_{3Leu50}$	1.55	**2.4**	2.8	**2.0**
$H\alpha_{Leu50}$ - $\delta2CH_{3Leu50}$	0.102	**3.8**	4.4	**3.2**
$H\alpha_{Leu50}$ - $H\beta1_{Tyr51}$	0.375	**3.1**	3.5	**2.6**
$H\beta1_{Leu50}$ - $\delta1CH_{3Leu50}$	0.466	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\beta1_{Leu50}$ - $\delta2CH_{3Leu50}$	0.505	**2.9**	3.3	**2.5**
$H\beta1_{Leu50}$ - NH_{Tyr51}	0.665	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta1_{Leu50}$ - $H\alpha_{Tyr51}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta1_{Leu50}$ - $H\beta1_{Tyr51}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta1_{Leu50}$ - $H\beta2_{Tyr51}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta1_{Leu50}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.195	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\beta1_{Leu50}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta2_{Leu50}$ - $\delta1CH_{3Leu50}$	0.466	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\beta2_{Leu50}$ - $\delta2CH_{3Leu50}$	0.505	**2.9**	3.3	**2.5**
$H\beta2_{Leu50}$ - NH_{Tyr51}	0.665	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta2_{Leu50}$ - $H\alpha_{Tyr51}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\beta2_{Leu50}$ - $H\beta1_{Tyr51}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\beta2_{Leu50}$ - $H\beta2_{Tyr51}$	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\beta2_{Leu50}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.195	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\beta2_{Leu50}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$\delta1CH_{3Leu50}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.20	**3.4**	3.9	**2.9**
$\delta1CH_{3Leu50}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.13	**3.6**	4.2	**3.1**
Tyr51				
NH_{Tyr51} - $H\alpha_{Tyr51}$	0.585	**2.8**	3.3	**2.4**
NH_{Tyr51} - $H\beta1_{Tyr51}$	1.10	**2.6**	2.9	**2.2**
NH_{Tyr51} - $H\beta2_{Tyr51}$	1.56	**2.4**	2.8	**2.0**
NH_{Tyr51} - $2.6H_{Tyr51}$	0.1975	**3.4**	3.9	**2.9**

NH_{Tyr51} - NH_{Arg52}	0.29	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Tyr51}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.395	**3.0**	3.5	**2.6**
$H\alpha_{Tyr51}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\alpha_{Tyr51}$ - NH_{Arg52}	2.78	**2.2**	2.5	**1.9**
$H\alpha_{Tyr51}$ - $H\beta1_{Arg52}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\alpha_{Tyr51}$ - $H\beta2_{Arg52}$	0.045	**4.3**	5.0	**3.7**
$H\alpha_{Tyr51}$ - $H\beta1_{Asn53}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\beta1_{Tyr51}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.61	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta1_{Tyr51}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.2725	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta1_{Tyr51}$ - NH_{Arg52}	0.85	**2.7**	3.1	**2.3**
$H\beta2_{Tyr51}$ - $2.6H_{Tyr51}$	0.635	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta2_{Tyr51}$ - $3.5H_{Tyr51}$	0.0675	**4.1**	4.7	**3.5**
$H\beta2_{Tyr51}$ - NH_{Arg52}	0.635	**2.8**	3.2	**2.4**
$2.6H_{Tyr51}$ - NH_{Arg52}	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
$2.6H_{Tyr51}$ - $H\beta1_{Asn53}$	0.015	**5.2**	6.0	**4.4**
$2.6H_{Tyr51}$ - $H\beta2_{Asn53}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
$3.5H_{Tyr51}$ - $H\beta1_{Asn53}$	0.015	**5.2**	6.0	**4.4**
$3.5H_{Tyr51}$ - $H\beta2_{Asn53}$	0.02	**5.0**	5.7	**4.2**
Arg52				
NH_{Arg52} - $H\alpha_{Arg52}$	4.365	**0.6**	0.7	**0.5**
NH_{Arg52} - $H\beta1_{Arg52}$	0.56	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{Arg52} - $H\beta2_{Arg52}$	0.56	**2.9**	3.3	**2.4**
NH_{Arg52} - $H\gamma1_{Arg52}$	1.27	**2.5**	2.9	**2.1**
NH_{Arg52} - $H\gamma2_{Arg52}$	1.195	**0.8**	0.91	**0.7**
NH_{Arg52} - $H\delta1_{Arg52}$	0.1525	**3.5**	4.1	**3.0**
NH_{Arg52} - $H\delta2_{Arg52}$	0.1525	**3.5**	4.1	**3.0**
NH_{Arg52} - εNH_{Arg52}	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**
$H\alpha_{Arg52}$ - $H\delta1_{Arg52}$	0.23	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{Arg52}$ - $H\delta2_{Arg52}$	0.23	**3.3**	3.8	**2.8**
$H\alpha_{Arg52}$ - εNH_{Arg52}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$H\alpha_{Arg52}$ - $H\alpha_{Asn53}$	0.29	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\alpha_{Arg52}$ - $H\beta1_{Asn53}$	0.125	**3.7**	4.2	**3.1**
$H\alpha_{Arg52}$ - $H\beta2_{Asn53}$	0.135	**3.6**	4.2	**3.1**
$H\gamma2_{Arg52}$ - $\gamma1NH_{Asn53}$	0.07	**4.0**	4.6	**3.4**

Asn53				
NH_{Asn53} - $H\alpha_{Asn53}$	0.87	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Asn53} - $H\beta1_{Asn53}$	0.82	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Asn53} - $H\beta2_{Asn53}$	0.78	**2.7**	3.1	**2.3**
NH_{Asn53} - $\gamma1NH_{Asn53}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
NH_{Asn53} - $\gamma2NH_{Asn53}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
NH_{Asn53} - $H\alpha1_{Gly54}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\alpha_{Asn53}$ - $H\beta1_{Asn53}$	1.105	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\alpha_{Asn53}$ - $H\beta2_{Asn53}$	1.01	**2.6**	3.0	**2.2**
$H\alpha_{Asn53}$ - $\gamma1NH_{Asn53}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$H\alpha_{Asn53}$ - $\gamma2NH_{Asn53}$	0.085	**3.9**	4.5	**3.3**
$H\alpha_{Asn53}$ - NH_{Gly54}	1.415	**0.8**	0.9	**0.7**
$H\alpha_{Asn53}$ - $H\alpha1_{Gly54}$	0.11	**3.7**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Asn53}$ - $H\alpha2_{Gly54}$	0.08	**3.9**	4.5	**3.4**
$H\beta1_{Asn53}$ - $\gamma1NH_{Asn53}$	0.295	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta1_{Asn53}$ - $\gamma2NH_{Asn53}$	0.61	**2.8**	3.2	**2.4**
$H\beta1_{Asn53}$ - NH_{Gly54}	0.42	**3.0**	3.4	**2.5**
$H\beta2_{Asn53}$ - $\gamma1NH_{Asn53}$	0.26	**3.2**	3.7	**2.8**
$H\beta2_{Asn53}$ - $\gamma2NH_{Asn53}$	0.54	**2.9**	3.3	**2.4**
$H\beta2_{Asn53}$ - NH_{Gly54}	0.37	**3.1**	3.5	**2.6**
$\gamma1NH_{Asn53}$ - $\gamma2NH_{Asn53}$	10.455	**0.6**	0.6	**0.5**
$\gamma1NH_{Asn53}$ - NH_{Gly54}	0.05	**4.3**	4.9	**3.6**
$\gamma1NH_{Asn53}$ - $H\beta1_{Lys55}$	0.06	**4.1**	4.8	**3.5**
$\gamma1NH_{Asn53}$ - $H\beta2_{Lys55}$	0.075	**4.0**	4.6	**3.4**
Gly54				
NH_{Gly54} - $H\alpha1_{Gly54}$	2.505	**0.7**	0.8	**0.6**
NH_{Gly54} - $H\alpha2_{Gly54}$	2.23	**2.3**	2.6	**1.9**
$H\alpha1_{Gly54}$ - $H\alpha2_{Gly54}$	8.20	**1.8**	2.1	**1.6**
$H\alpha1_{Gly54}$ - $H\gamma1_{Lys55}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
$H\alpha1_{Gly54}$ - $H\gamma2_{Lys55}$	0.04	**4.4**	5.1	**3.8**
Lys55				
NH_{Lys55} - $H\alpha_{Lys55}$	0.64	**2.8**	3.2	**2.4**
NH_{Lys55} - $H\beta2_{Lys55}$	1.03	**2.6**	3.0	**2.2**
NH_{Lys55} - $H\gamma1_{Lys55}$	0.2575	**3.3**	3.7	**2.8**
NH_{Lys55} - $H\gamma2_{Lys55}$	0.2575	**3.3**	3.7	**2.8**

$H\alpha_{Lys55}$ - $H\beta1_{Lys55}$	0.525	**2.9**	3.3	**2.5**
$H\alpha_{Lys55}$ - $H\beta2_{Lys55}$	0.465	**2.9**	3.4	**2.5**
$H\alpha_{Lys55}$ - $H\gamma1_{Lys55}$	0.14	**3.6**	4.1	**3.1**
$H\alpha_{Lys55}$ - $H\gamma2_{Lys55}$	0.14	**3.6**	4.1	**3.1**
$H\alpha_{Lys55}$ - $H\delta1_{Lys55}$	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
$H\alpha_{Lys55}$ - $H\delta2_{Lys55}$	0.105	**3.8**	4.3	**3.2**
$H\beta1_{Lys55}$ - $H\beta2_{Lys55}$	5.99	**1.9**	2.2	**1.6**
$H\beta1_{Lys55}$ - $H\gamma1_{Lys55}$	0.285	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta1_{Lys55}$ - $H\gamma2_{Lys55}$	0.285	**3.2**	3.7	**2.7**
$H\beta2_{Lys55}$ - $H\gamma1_{Lys55}$	0.1975	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\beta2_{Lys55}$ - $H\gamma2_{Lys55}$	0.1975	**3.4**	3.9	**2.9**
$H\delta1_{Lys55}$ - $H\varepsilon1_{Lys55}$	0.09125	**3.9**	4.4	**3.3**
$H\delta1_{Lys55}$ - $H\varepsilon2_{Lys55}$	0.09125	**3.9**	4.4	**3.3**
$H\delta2_{Lys55}$ - $H\varepsilon1_{Lys55}$	0.09125	**3.9**	4.4	**3.3**
$H\delta2_{Lys55}$ - $H\varepsilon2_{Lys55}$	0.09125	**3.9**	4.4	**3.3**

Συμπεράσματα

Από τα δεδομένα των σημάτων NOE, που σημειώνονται στους πίνακες 6.2 και 6.4 προκύπτει το συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο MOG_{35-55} δεν πρόκειται για μία ανοιχτή δομή, αλλά αντιθέτως αναδιπλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας μια ακανόνιστη θηλιά. Χαρακτηριστική είναι η συσχέτιση πρωτονίων μεταξύ του πρώτου (Met^{35}) και του τελευταίου αμινοξέος(Lys^{55}), ενώ σημαντικό στοιχείο αποτελεί η τοποθέτηση της Ιστιδίνης στο κέντρο του μορίου, αφού από τα NOE δεδομένα φαίνεται να προσεγγίζει αρκετά μακρινά αμινοξέα από διαφορετικές κατευθύνσεις (Met^{35}, Tyr^{40}, Arg^{41}, Ser^{45}, Val^{47}, Tyr^{51}, Arg^{52}). Για καλύτερη κατανόηση της τρισδιάστασης απεικόνισης του πεπτιδίου ακολουθούν πειράματα μοριακής δυναμικής.

6.3 Πειράματα μοριακής δυναμικής για την πλήρη κατανόηση της τρισδιάστατης δομής του επιτόπου MOG_{35-55}

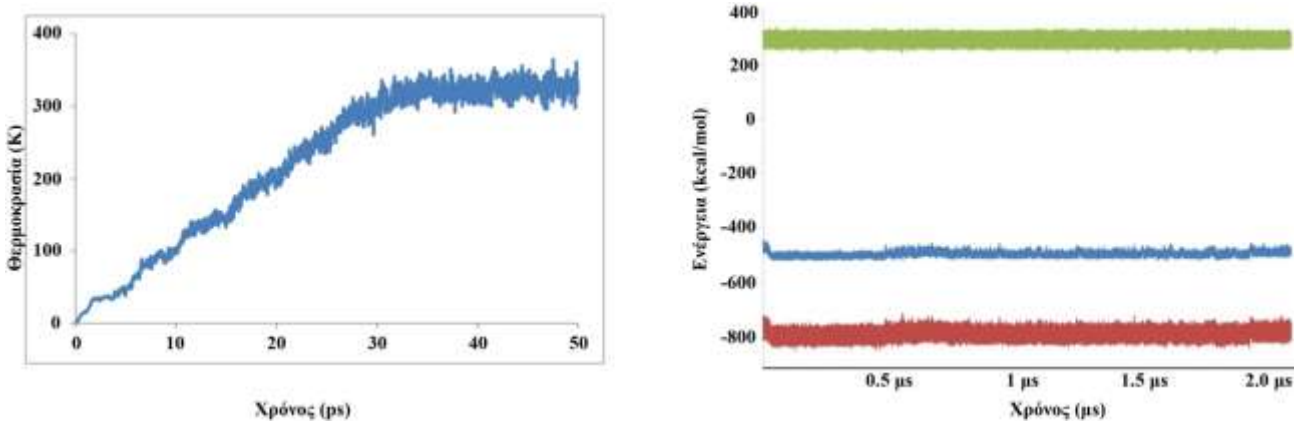
Α) Μοριακή δυναμική με τη μέθοδο της έμμεσης επιδιαλύτωσης (implicit solvent)

Μέθοδος

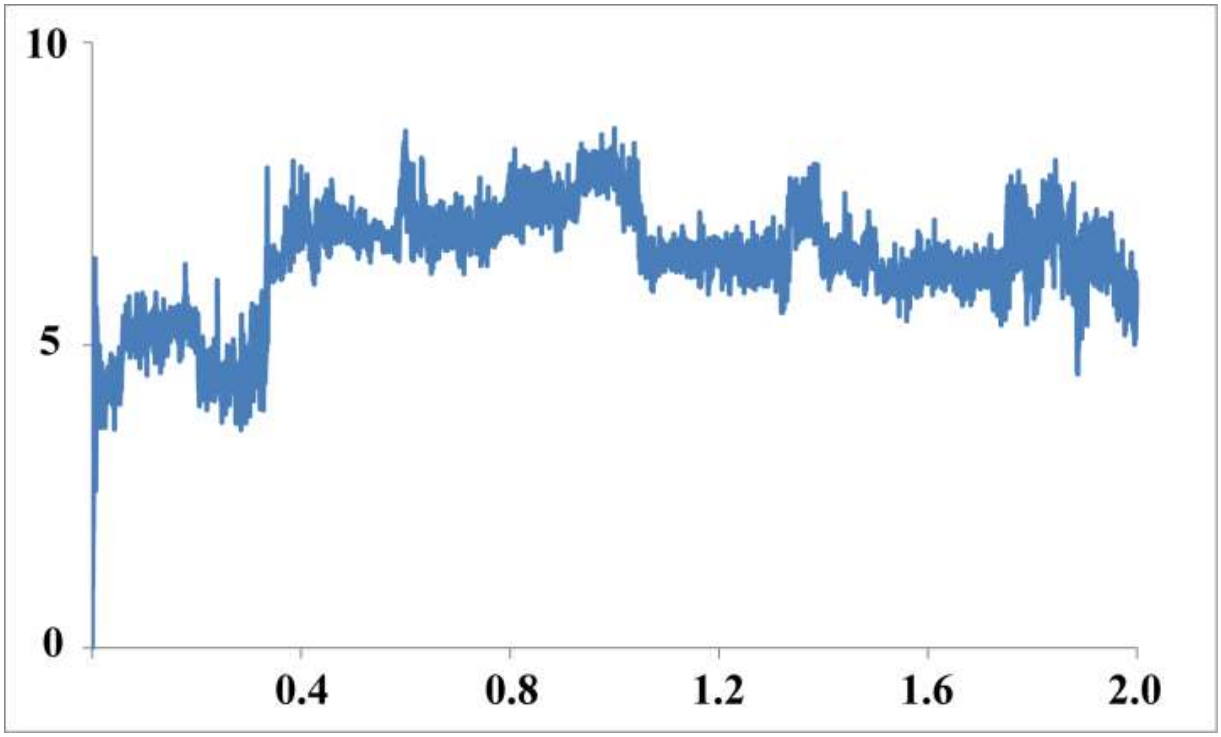
Η μέθοδος της έμμεσης επιδιαλύτωσης μπορεί να βελτιώσει και να επιταχύνει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης λόγω του μικρότερου ιξώδους που διευκολύνει τη διάχυση των αλυσίδων. Αυτή η μέθοδος σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μοριακή δυναμικής μπορούν να αναπαράγουν με αρκετή ακρίβεια την τριδιάστατη δομή μίας πρωτεΐνης. Το 21-πεπτίδιο δομήθηκε σε ευθεία αλυσίδα χρησιμοποιώντας το λογισμικό tleap (υπορουτίνα του προγράμματος Amber14). Χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων ff14SB για την ελαχιστοποίηση του συστήματος. Η ελαχιστοποίηση έγινε σε 1000 βήματα (500 βήματα βαθύτατης κατάδυσης-Steepest Descent και 500 συζυγούς βαθμίδας-Conjugate Gradient). Η θέρμανση του συστήματος έγινε σταδιακά σε 7 στάδια. Η τελική θερμοκρασία του συστήματος έφτασε στους 325 K. Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, ο κίνδυνος να εγκλωβιστεί το σύστημα σε κάποιο τοπικό ελάχιστο κινητικής ενέργειας μειώθηκε αρκετά. Η μοριακή δυναμική του συστήματος εκτελέστηκε για 2.2 μs. Ο αλγόριθμος SHAKE έχει χρησιμοποιηθεί για τον περιορισμό δεσμών μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και των βαρύτερων ατόμων. Ο θερμοστάτης Berendsen χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 325 K καθ’ όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Ανάλυση

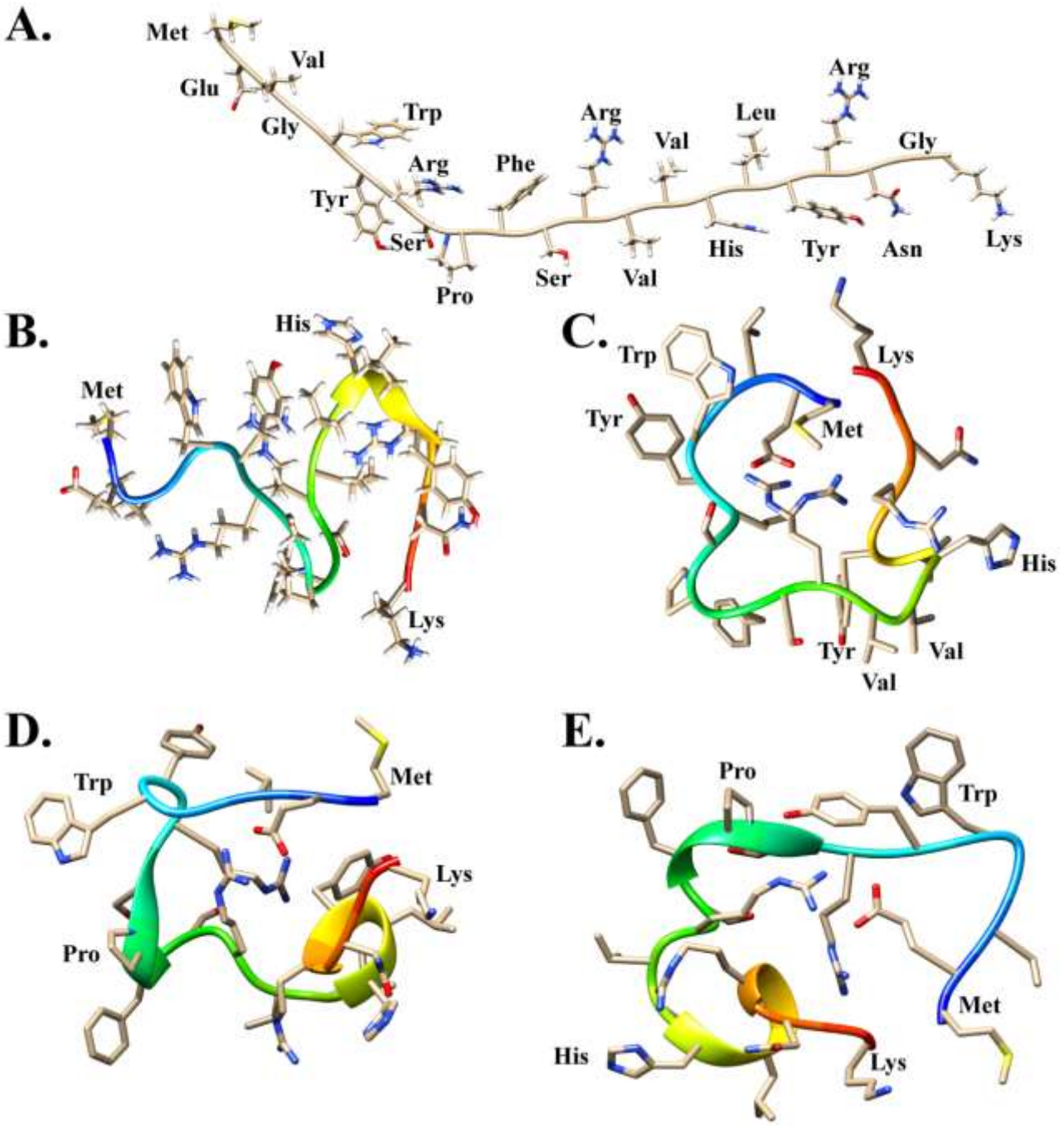
Όπως διακρίνεται στο σχήμα 6.10 η θερμοκρασία του συστήματος έχει ανέβει ομαλά στους 325 K, χωρίς ξαφνικές αυξομειώσεις. Η κινητική ενέργεια του συστήματος παραμένει σταθερή στη διάρκεια των 2.2 μs. Η ολική ενέργεια και η δυναμική ενέργεια δείχνουν μια αρχική μείωση και μετά σταθεροποίηση των τιμών που δείχνει ότι το σύστημα έχει μικρότερη ενέργεια όταν η πρωτεΐνη είναι αναδιπλωμένη παρά όταν είναι στην ανοιχτή της μορφή. Από το RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σε σχέση με το χρόνο συμπεραίνουμε ότι μετά από 1.5 μs το πεπτίδιο σταθεροποιείται (Σχήμα 6.11). Στο σχήμα 6.12 παρατηρούνται οι διάφορες διαμορφώσεις του πεπτιδίου. Στο τέλος της θέρμανσης είναι ξεκάθαρο ότι το πεπτίδιο προτιμά μια διπλωμένη διαμόρφωση παρά την ανοιχτή δομή. Στο τέλος των πρώτων 200 ns η λυσίνη (το τελευταίο αμινοξύ) και η μεθειονίνη προσεγγίζουν χωρικά δίνοντας έτσι στο πεπτίδιο μια σχεδόν κλειστή διαμόρφωση. Αυτό, όπως φαίνεται στα στιγμιότυπα που παρατίθενται μετά από 1 μs και 2 μs, διατηρείται για τον περισσότερο χρόνο της προσομοίωσης.



Σχήμα 6.10 (Αριστερά) Η σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας στα 50 ps της θέρμανσης. (Δεξιά) Η κινητική ενέργεια (πράσινο), η ολική ενέργεια (μπλε) και η δυναμική ενέργεια (κόκκινο).



Σχήμα 6.11 RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σε σχέση με το χρόνο.

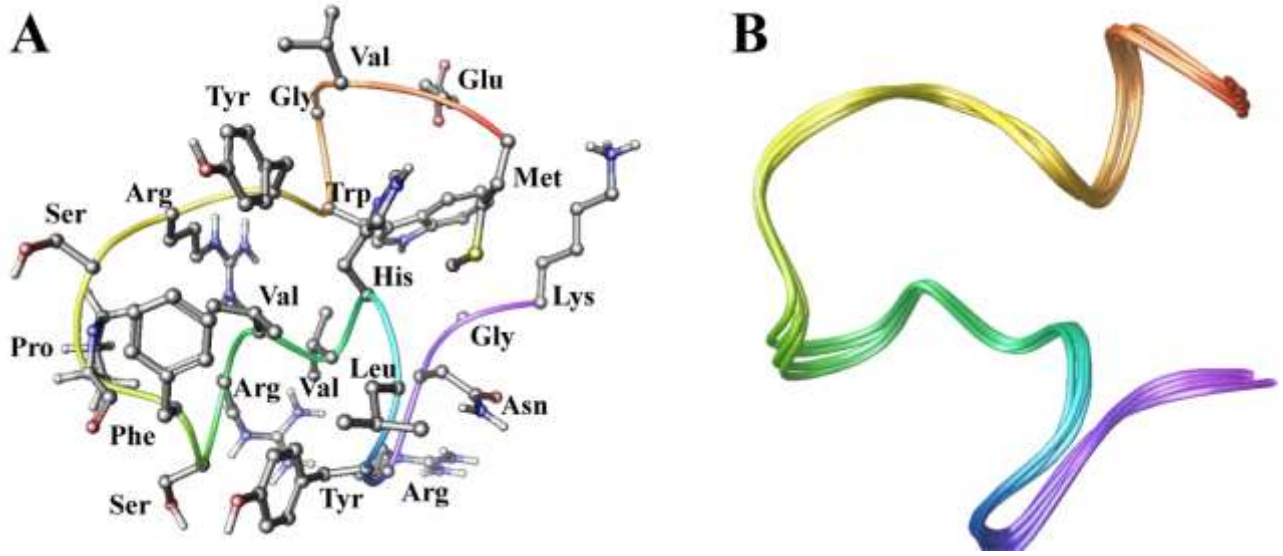


Σχήμα 6.12 Η δομή του πεπτιδίου: A) μετά από την ελαχιστοποίηση, B) μετά από την θέρμανση στα 325 K, C) μετά από 200 ns, D) μετά από 1 μs και E) στο τέλος της προσομοίωσης.

B) Μοριακή δυναμική με περιορισμούς

Η μοριακή δυναμική με περιορισμούς πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού MacroModel 10.8 (Schrödinger Suite 2015.2). Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε είναι το πεδίο OPLS3, το πιο καινούργιο και βελτιωμένο πεδίο της οικογένειας OPLS. Ως διηλεκτρική σταθερά ορίσθηκε η τιμή 46.7. Ως περιορισμοί χρησιμοποιήθηκαν οι αποστάσεις που προέκυψαν από τα σήματα NOE μεγάλης εμβέλειας (long range). Η

σταθερά δύναμης που συγκρατεί αυτούς τους περιορισμούς ορίσθηκε στα 100 kJ $mol^{-1}Å^{-2}$. Η ελαχιστοποίηση έγινε με τη μέθοδο της βαθμιδωτής σύζευξης σε 2500 βήματα. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της στοχαστικής δυναμικής. Η θερμοκρασία της προσομοίωσης ορίσθηκε στους 300 K. Το σύστημα εξισορροπήθηκε για 1 ns ενώ η δυναμική έτρεξε για 40 ns. 2000 χιλιάδες δομές αποθηκεύθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της δυναμικής. Αντιπροσωπευτική δομή ελάχιστης ενέργειας φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα. Σε όλες τις δομές με μικρή ενέργεια ο σκελετός του πεπτιδίου διαφέρει ελάχιστα. Μια σύγκριση με τις δομές που προέκυψαν από τη μοριακή δυναμική χωρίς περιορισμούς δείχνει μια αρκετά μεγάλη ομοιότητα. Καταρχήν τα δύο άκρα του πεπτιδίου (η λυσίνη και η μεθειονίνη) προσεγγίζουν χωρικά δίνοντάς του μια κλειστή σχεδόν δομή. Η θηλιά που έχει δημιουργηθεί έχει μια ακανόνιστη δομή στο χώρο (Σχήμα 6.13). Η ιστιδίνη έχει τοποθετηθεί στο κέντρο του πεπτιδίου για να μπορέσει να ικανοποιήσει όλους του περιορισμούς, που προέκυψαν από τα NOE δεδομένα..

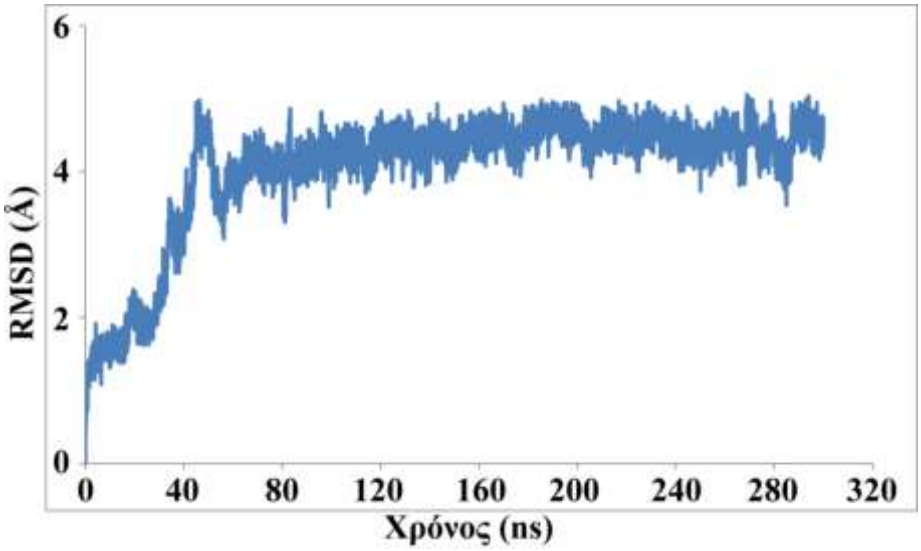


Σχήμα 6.13 (Αριστερά) Η δομή ελάχιστης ενέργειας μετά από μοριακή δυναμική με περιορισμούς. (Δεξιά) Ο σκελετός του πεπτιδίου σε 10 δομές ελάχιστης ενέργειας όπως προέκυψε μετά τη μοριακή δυναμική.

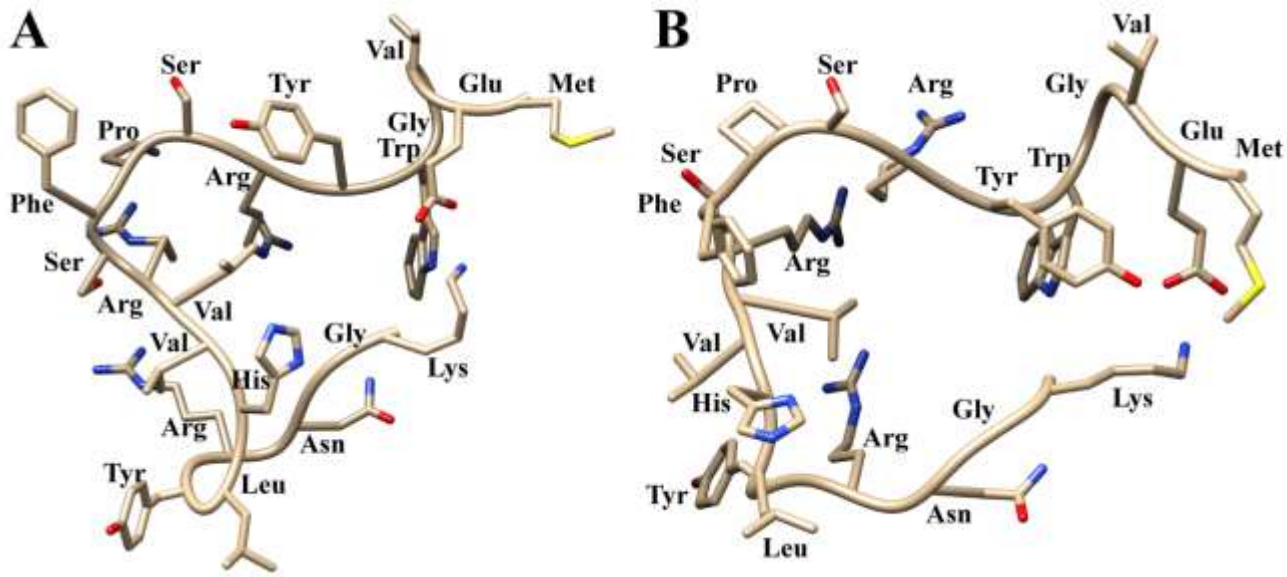
Γ) Μοριακή δυναμική σε διαλύτη DMSO

Η δομή ελάχιστης ενέργειας που προέκυψε μετά από το MacroModel υποβλήθηκε σε μοριακή δυναμική με άμεση επιδιαλύτωση (explicit solvent). Η δομή του πεπτιδίου εισάχθηκε σε ένα οκταεδρικό κιβώτιο με διαλύτη DMSO και με πλευρές 10 Å. Το σύστημα θερμάνθηκε στους 300 K με το θερμοστάτη Berendsen. Η δυναμική αυτή συνεχίσθηκε για

300 ns. Το σύστημα όπως παρατηρείται στο σχήμα 6.13, όπου φαίνεται το RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σταθεροποιείται. Από την ανάλυση των δεσμών υδρογόνου φαίνεται ότι η καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού (αμινοξύ 2) με την αμινομάδα της λυσίνης αναπτύσσουν σταθερούς δεσμούς υδρογόνου καθ' όλη τη διάρκεια της δυναμικής. Επίσης, η καρβοξυλομάδα της λυσίνης αναπτύσσει σταθερούς δεσμούς υδρογόνου με το HE1 της θρυπτοφάνης, εξηγώντας έτσι την προτίμηση της κλειστής δομής (Σχήμα 6.14).



Σχήμα 6.14 Το RMSD του σκελετού του πεπτιδίου σε σχέση με το χρόνο.



Σχήμα 6.15 (A) Το πεπτίδιο μετά από 60 ns προσομοίωσης, (B) Το πεπτίδιο μετά από 280 ns προσομοίωσης.

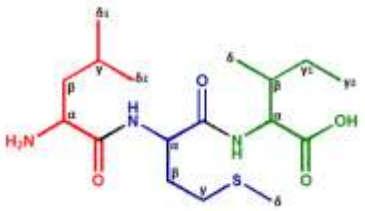
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η ταυτοποίηση και η διαμορφωτική ανάλυση βιοδραστικών πεπτιδίων κατά της κατάθλιψης και της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Χρησιμοποιήθηκαν πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συνδυασμό με Υπολογιστική Χημεία. Οι πληροφορίες που εξήχθησαν θα βοηθήσουν μελλοντικά στο να κατανοηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί πρόσδεσης του όπως επίσης και να αντληθούν πληροφορίες για τα φαρμακοφόρα τμήματα. Αυτές οι πληροφορίες είναι καθοριστικές στην προαγωγή της έρευνας με βάση τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων φαρμάκων προς την καταπολέμηση των υπό μελέτη ασθενειών.

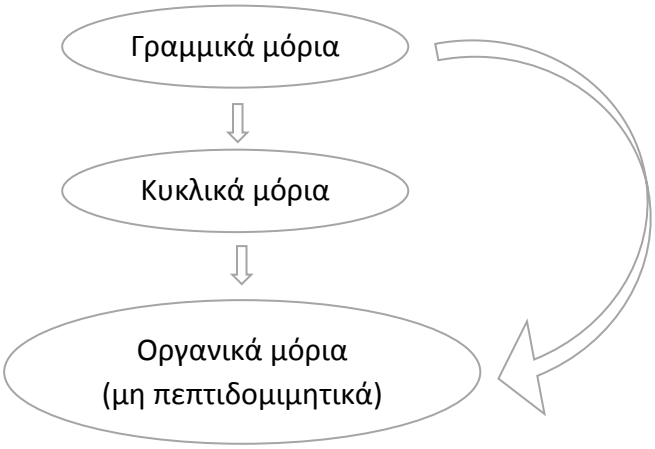
Α) Τριπεπτίδιο LeuMetIle

Από τα πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ταυτοποιήθηκαν οι δομές των δύο διαστερεοϊσομερών του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LeuMetIle και DLeuMetIle).



Δομή του τριπεπτιδίου LeuMetIle (LMI)

Τα αποτελέσματα 2D NOESY έδειξαν απουσία σημάτων NOE μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων και στα δύο τριπεπτίδια. Το συμπέρασμα που προέκυψε από την απουσία αυτών των NOE είναι ότι τα τριπεπτίδια απαντούνται σε ανοιχτές δομές και με αυτά τα δεδομένα ακολούθησαν πειράματα μοριακής δυναμικής και μοριακής πρόσδεσης στον υποδοχέα CRF_1. Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως τα τριπεπτίδια διατηρούν ημίκλειστες δομές τόσο πριν, όσο και μετά την πρόσδεση που σημαίνει πως στον ορθολογικό σχεδιασμό θα πρέπει να απορριφθεί το στάδιο των κυκλικών δομών.

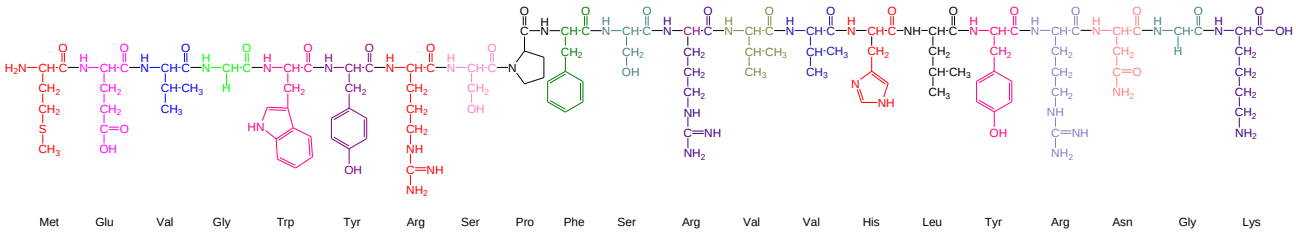


Σχήμα 7.1 Ορθολογικός Σχεδιασμός καινοτόμων φαρμάκων

Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα υπολογιστικής χημείας με το πρόγραμμα Maestro 9.9 της εταιρίας Schrödinger. Με τη μέθοδο ελαχιστοποίησης ενέργειας και μοριακής δυναμικής προέκυψαν κάποιες δομές από τις οποίες επιλέχθηκαν αυτές που ικανοποιούσαν τα NOE δεδομένα. Αφού προετοιμάστηκε κι ο υποδοχέας CRF_1, έλαβαν χώρα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης στα οποία προσδέθηκαν στον υποδοχέα οι διαμορφώσεις των τριπεπτιδίων οι οποίες ήταν σύμφωνες με τα πειραματικά δεδομένα. Στα πειράματα αυτά τα τριπεπτίδια ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα πρόσδεσης τους στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα CRF_1, όταν αυτός παρέμενε άκαμπτος (Μοριακή Πρόσδεση με Glide) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, αλλά κι όταν ήταν εύκαμπτος (Μοριακή Πρόσδεση Επαγόμενης Προσαρμογής, IFD). Ευνοϊκότερες βαθμονομήσεις προέκυψαν όταν ο υποδοχέας παρείχε ευκαμψία, πράγμα που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι για να επιτευχθεί βιολογική δράση το σύστημα τριπεπτίδιο-υποδοχέας πρέπει να παρουσιάζει κάποια ευελιξία.

Β) Ο επίτοπος MOG_{35-55}

Από τα πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ταυτοποιήθηκε η δομή του επίτοπου της μυελίνης MOG_{35-55} και από τα δεδομένα NOE που συλλέχθηκαν, εξήχθησαν σημαντικές πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή του πεπτιδίου.

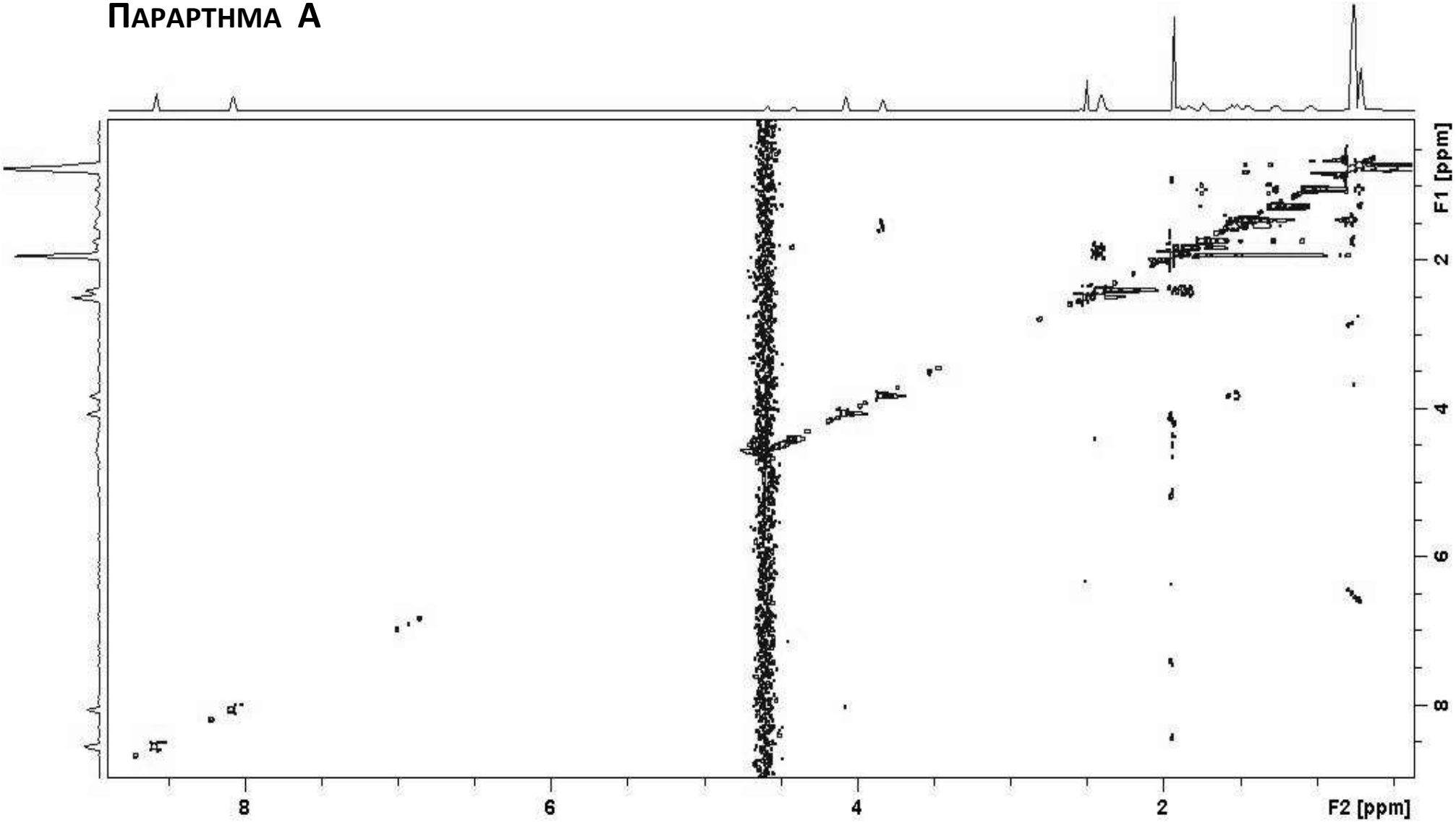


Δομή του επίτοπου MOG_{35-55}

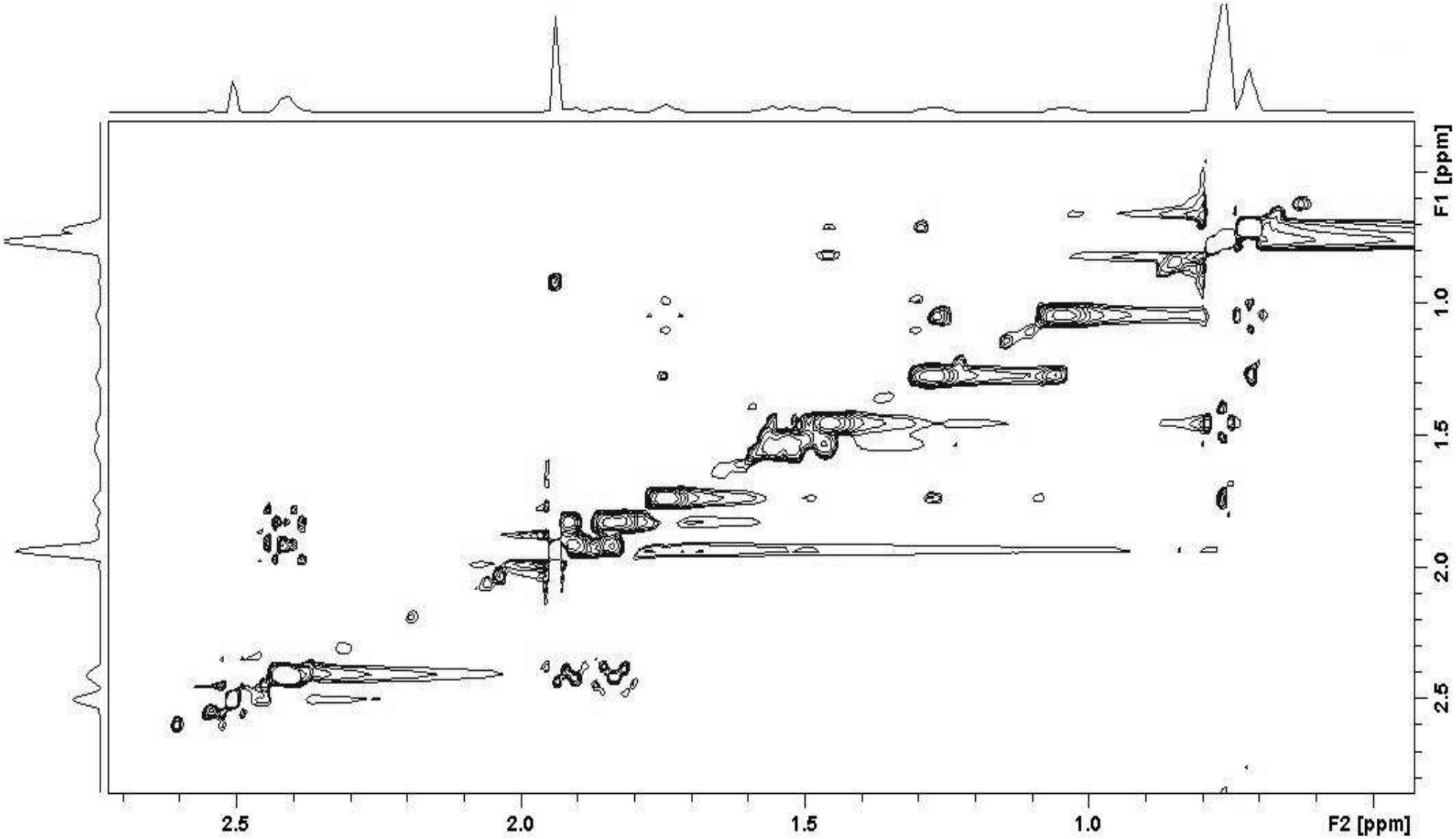
Σημειώθηκαν όλες οι αλληλεπιδράσεις NOE μεταξύ των αμινοξέων και υπολογίσθηκαν όλες οι αποστάσεις έως 5,0 Å. Από τα αποτελέσματα προέκυψε το συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο αναδιπλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας θηλιά. Στη συνέχεια έλαβαν χώρα πειράματα μοριακής δυναμικής με τη μέθοδο έμμεσης επιδιαλύτωσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Amber14. Το 21-πεπτίδιο εισήχθηκε αρχικά στο πείραμα με μορφή ευθείας αλυσίδας και ακολούθησε ελαχιστοποίηση ενέργειας κι εξισορρόπηση του συστήματος σε ορισμένη θερμοκρασία. Με το πέρας του πειράματος επιβεβαιώθηκε πως το πεπτίδιο εμφανίζει την τάση να αναδιπλώνεται στο χώρο από το να διατηρεί ανοιχτή δομή. Στο επόμενο βήμα τα δεδομένα NOE που προέκυψαν κατά την ταυτοποίηση τέθηκαν ως περιορισμοί (constraints) στα πειράματα μοριακής δυναμικής. Το μόριο της Ιστιδίνης,

His_{49}, τοποθετήθηκε στο κέντρο του μορίου με τα δύο άκρα του (Met_{35} και Lys_{55}) να πλησιάζουν χωρικά σχηματίζοντας μία σχεδόν κλειστή δομή. Κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής αποθηκεύτηκαν πολλές διαμορφώσεις, αλλά σ' όλες τις δομές με τη χαμηλότερη ενέργεια ο σκελετός του πεπτιδίου διέφερε ελάχιστα. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις δομές αυτές με εκείνες που προέκυψαν από τη μοριακή δυναμική χωρίς περιορισμούς τα αποτελέσματα εμφανίζουν αρκετά μεγάλη ομοιότητα. Στο τελευταίο στάδιο, η δομή χαμηλότερης ενέργειας που επιλέχθηκε από τη μοριακή δυναμική με περιορισμούς υποβλήθηκε σε μοριακή δυναμική με άμεση επιδιαλύτωση σε διαλύτη DMSO. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων εξηγήθηκε η προτίμηση του πεπτιδίου να εμφανίζει κλειστή δομή μέσω των δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα η λυσίνη, Lys_{55}, με την αμινομάδα της, αναπτύσσει σταθερούς δεσμούς υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού Glu_{36} και με την καρβοξυλομάδα της με το πρωτόνιο $1NH_{Trp}$ της θρυπτοφάνης, Trp_{39}.

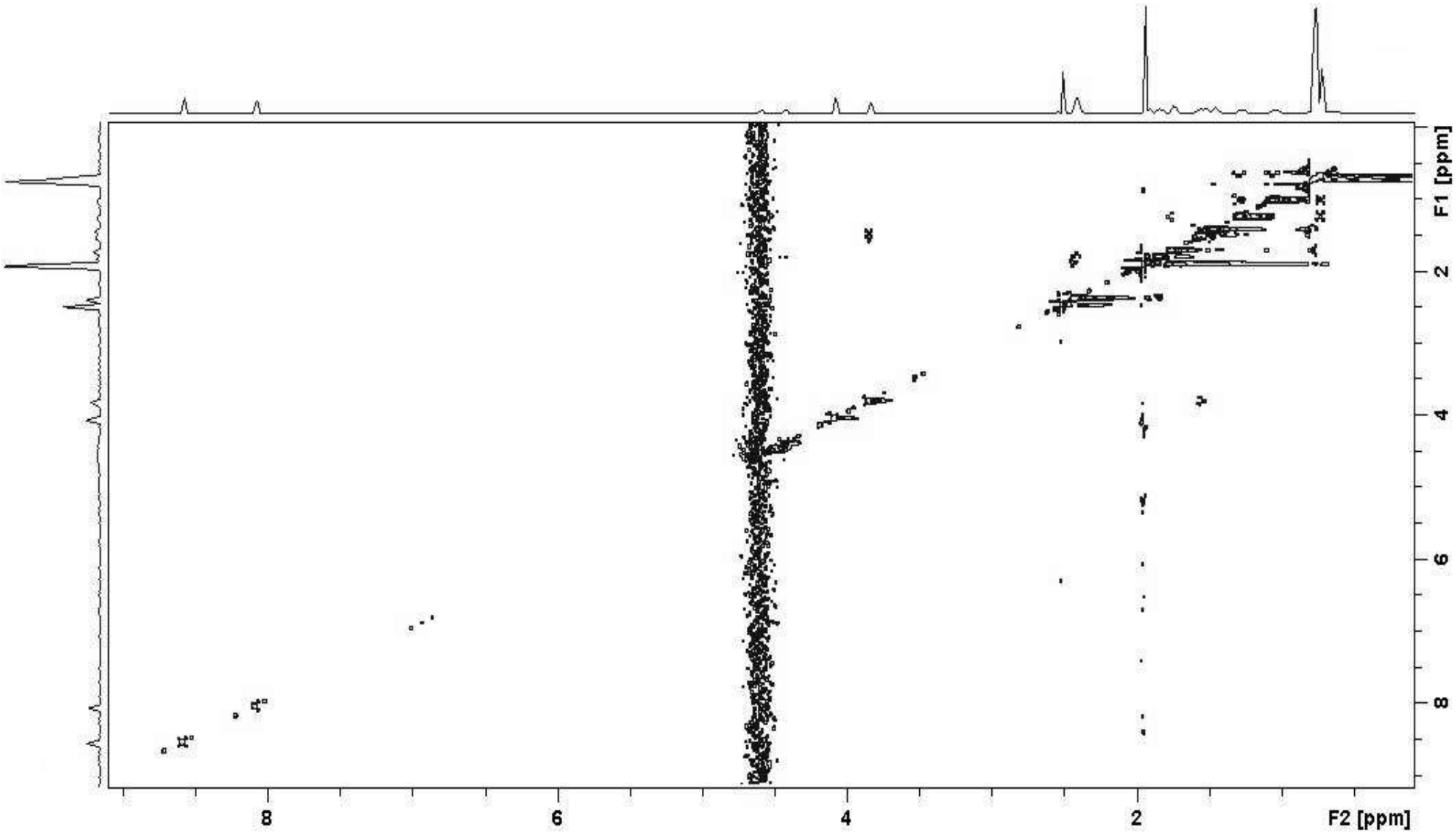
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α



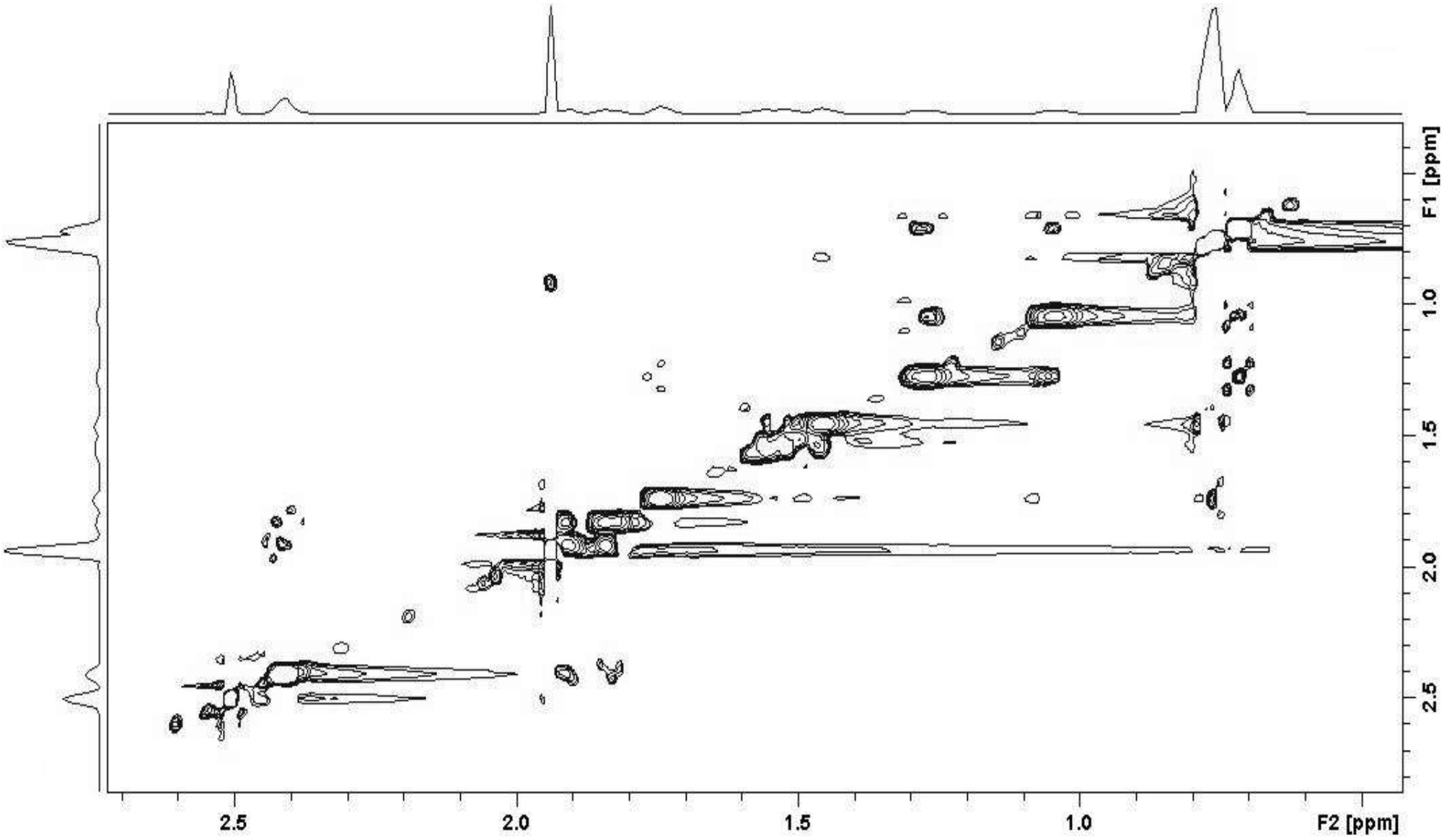
Σχήμα Α$_1$. Φάσμα 2D NOESY (150ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25°C.



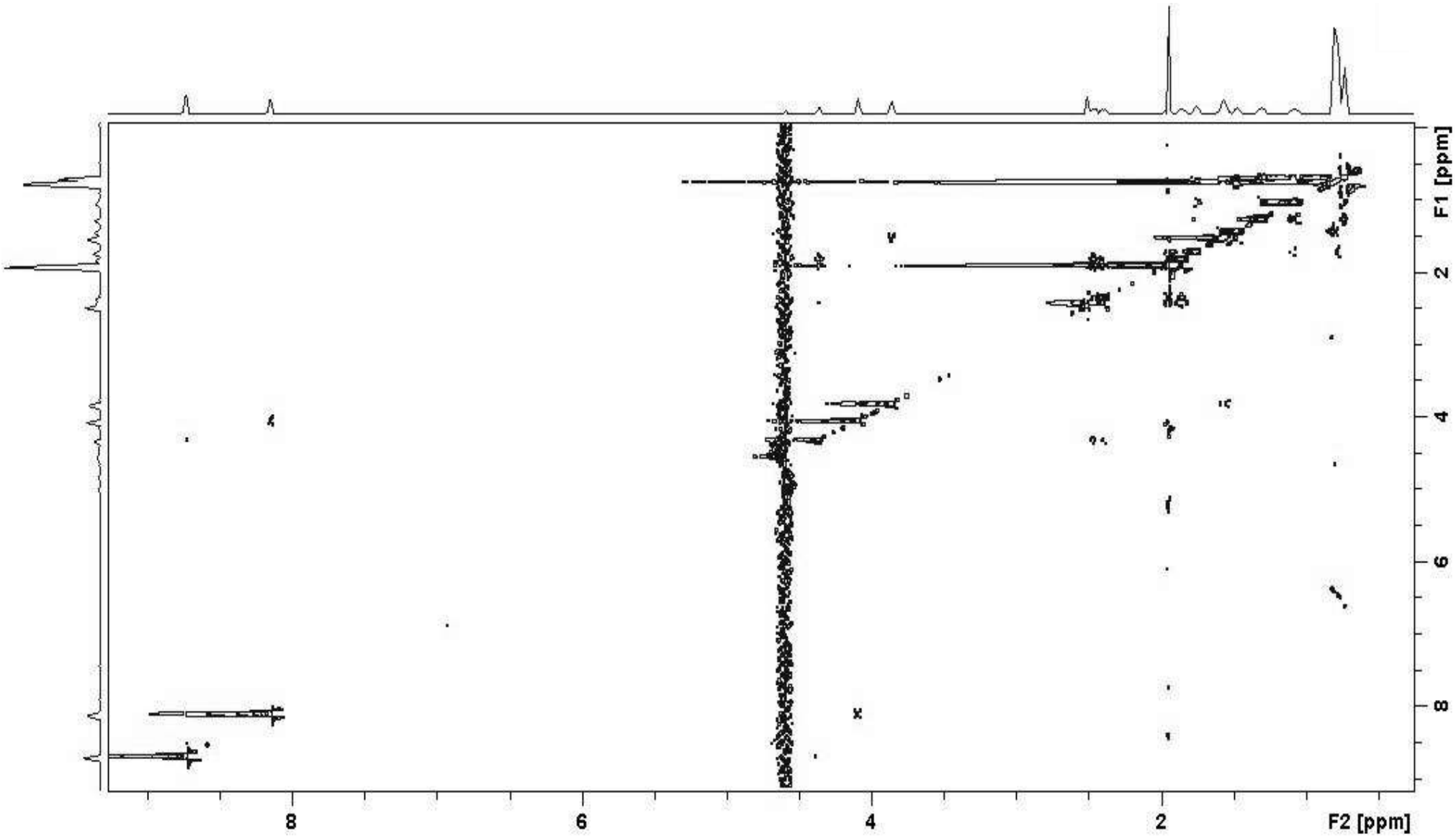
Σχήμα A2. Φάσμα 2D NOESY (150ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή



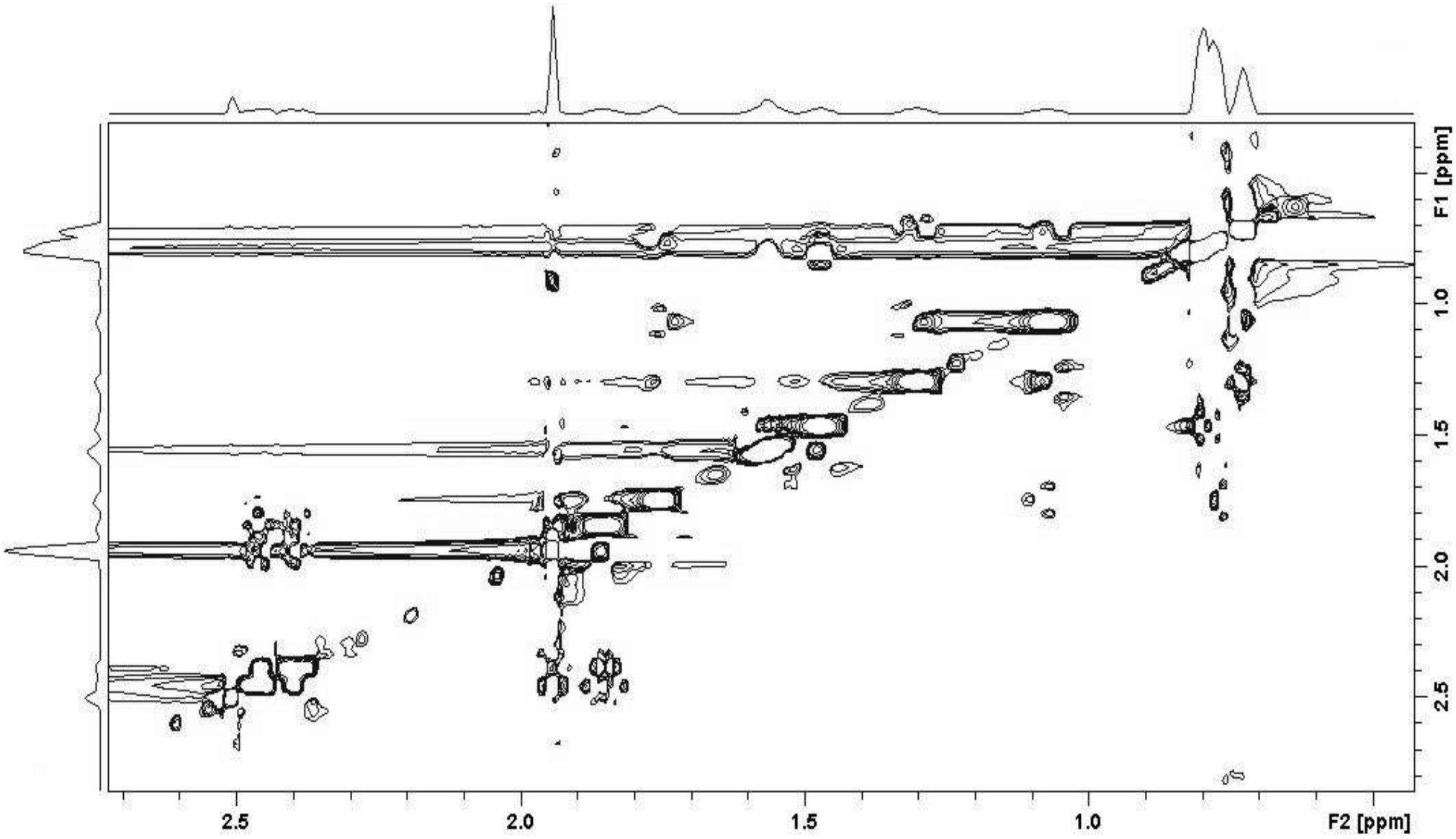
Σχήμα A3. Φάσμα 2D NOESY (250ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC.



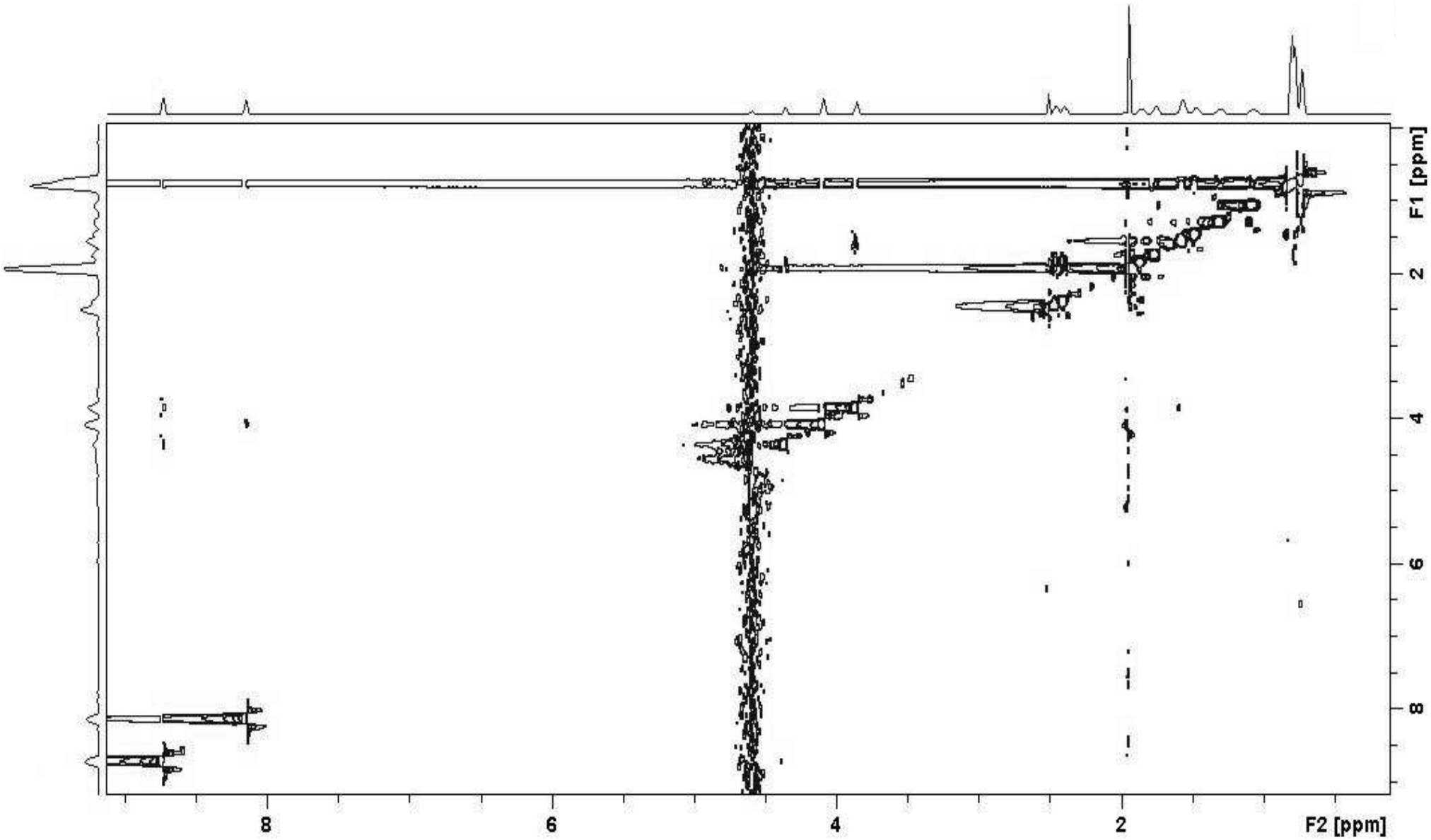
Σχήμα Α4. Φάσμα 2D NOESY (250ms) του τριπεπτιδίου LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή



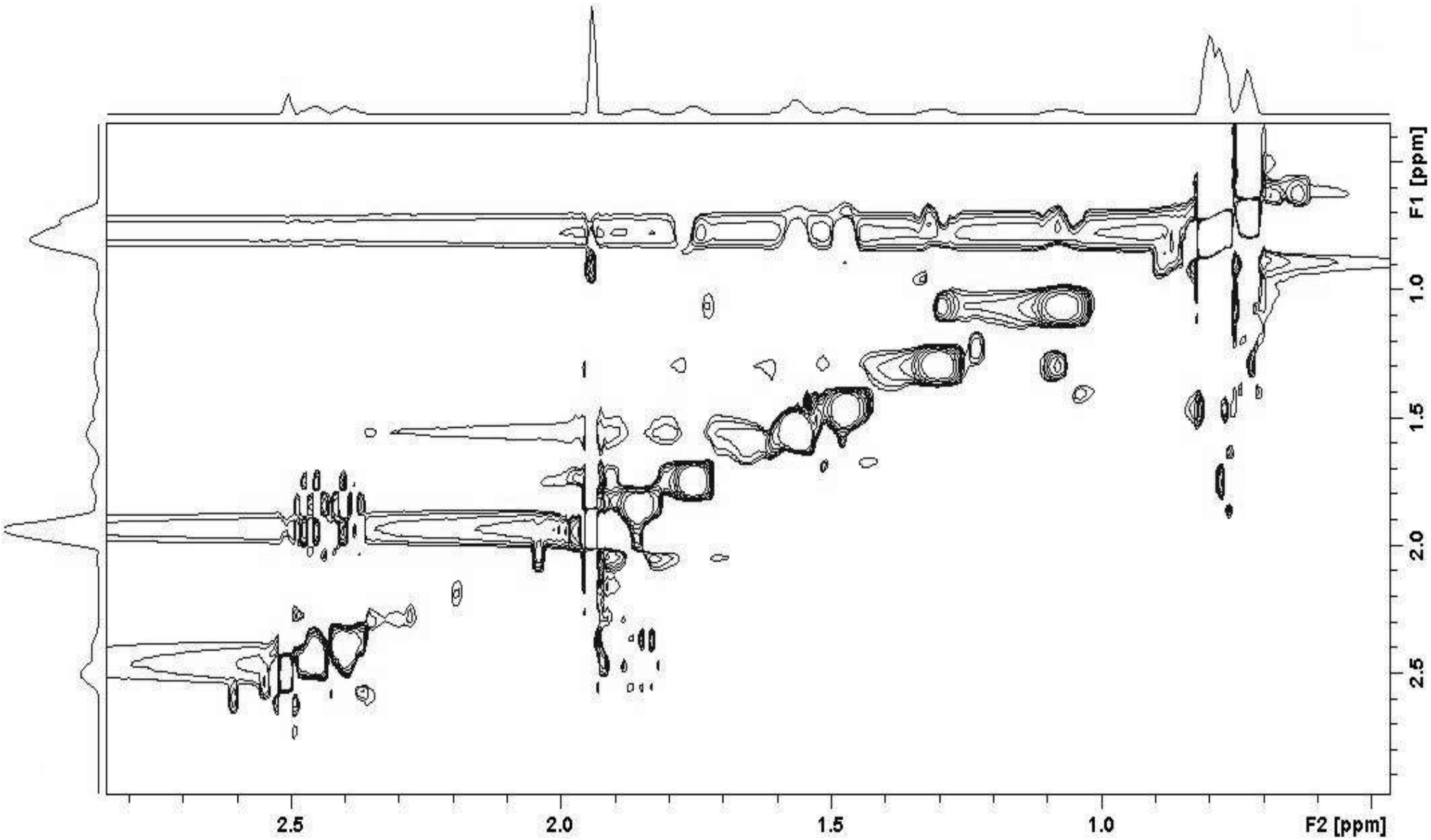
Σχήμα A5. Φάσμα 2D NOESY (150ms) του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC.



Σχήμα A6. Φάσμα 2D NOESY (150ms) του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή

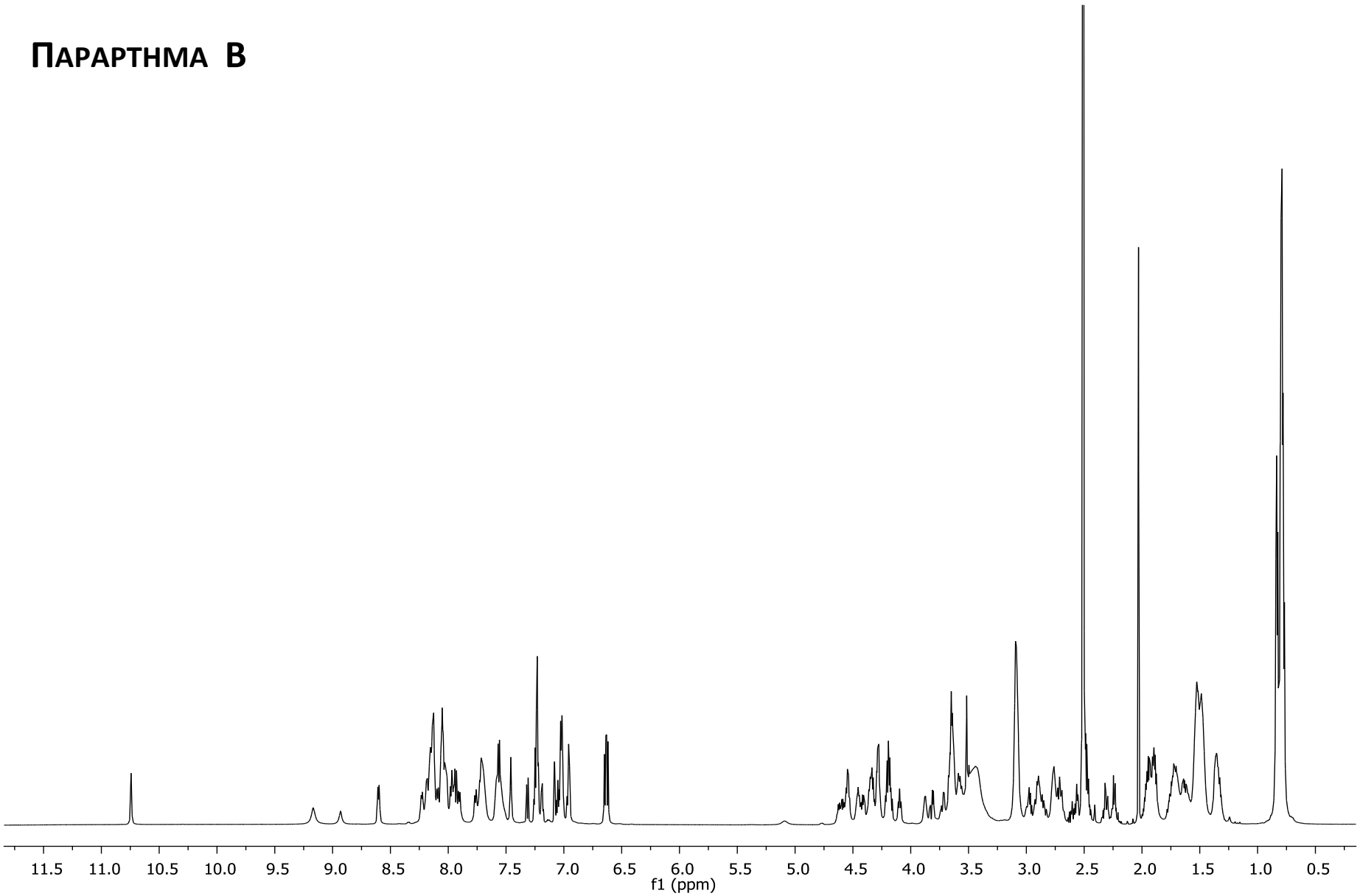


Σχήμα A7. Φάσμα 2D NOESY (250ms) του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε σύστημα διαλυτών H_2O/d_6-DMSO (9:1) και θερμοκρασία 25^oC.

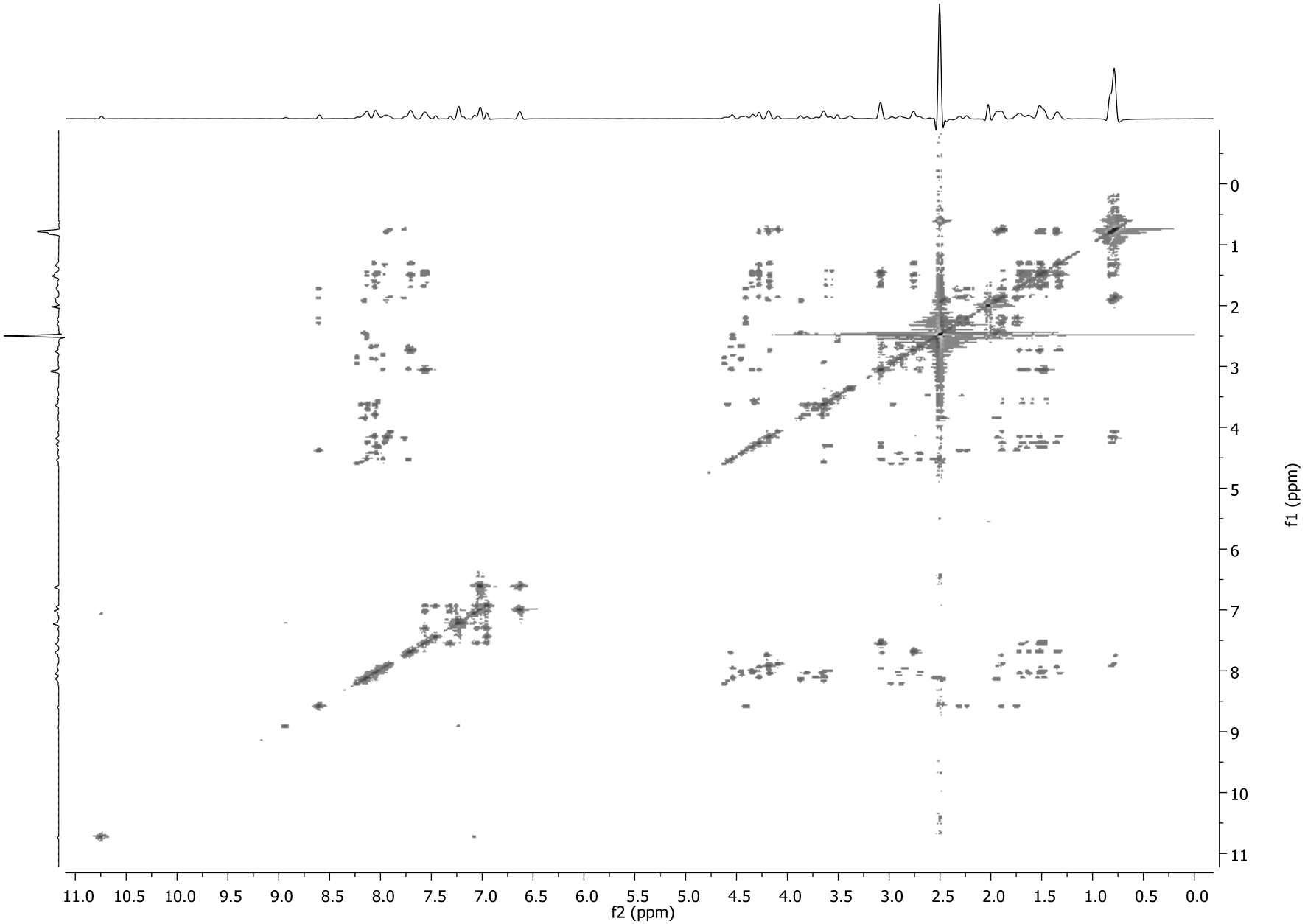


Σχήμα A8. Φάσμα 2D NOESY (250ms) του τριπεπτιδίου **D**LeuMetIle στην αλειφατική περιοχή

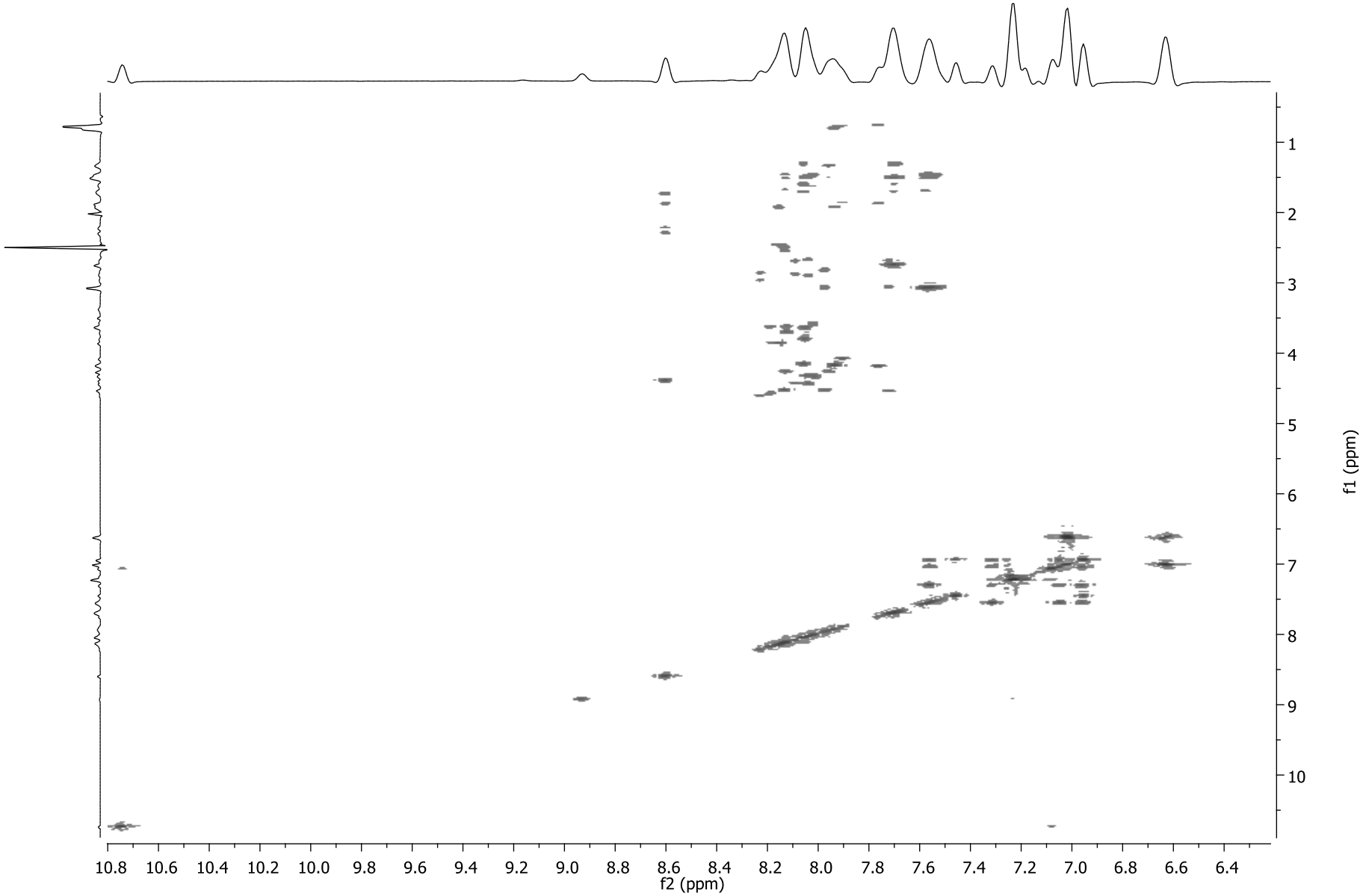
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β



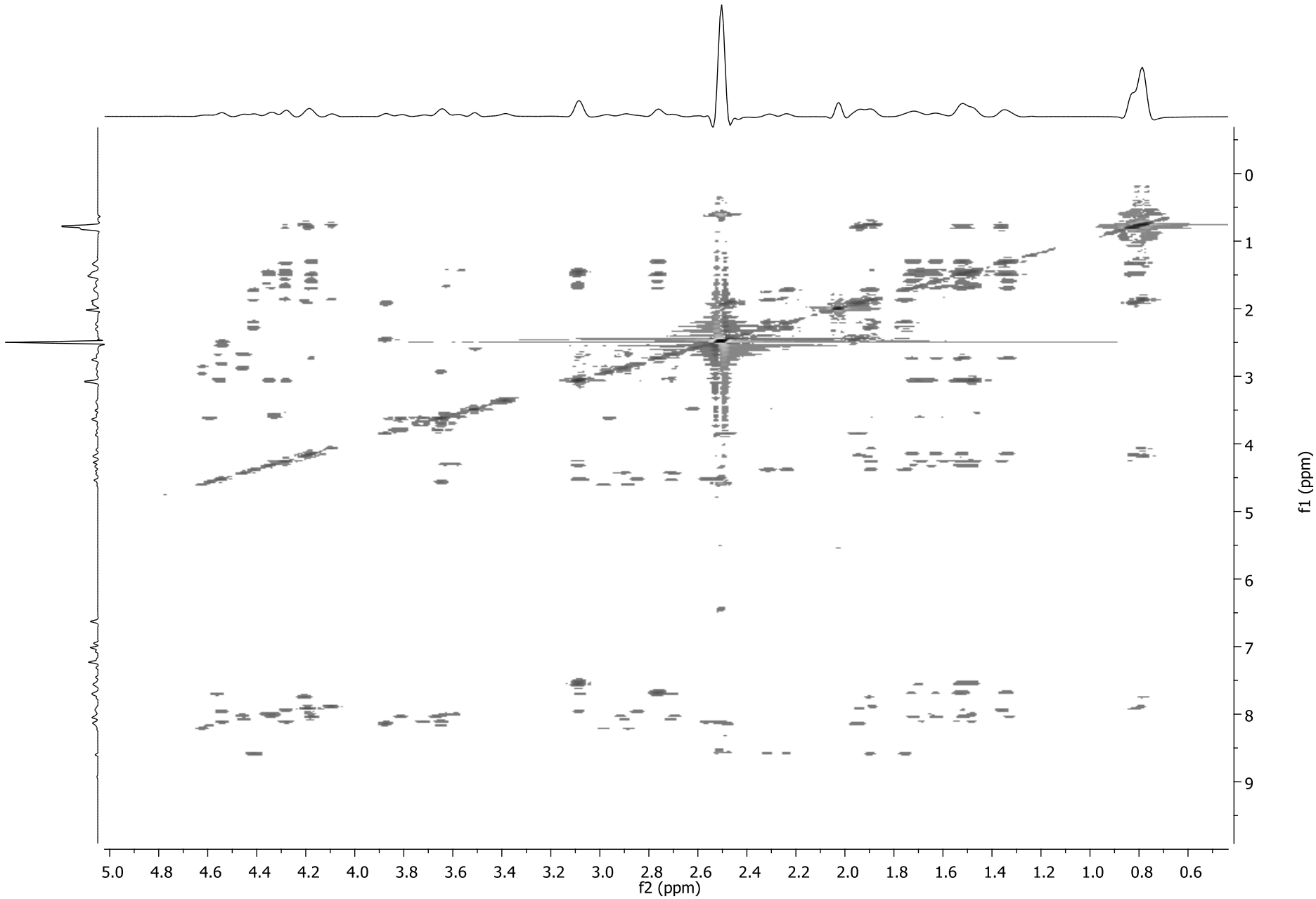
Σχήμα Β1. Φάσμα ^{1}H NMR του επίτοπου MOG_{35-55} που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε διαλύτη d_6-DMSO και θερμοκρασία 25°C.



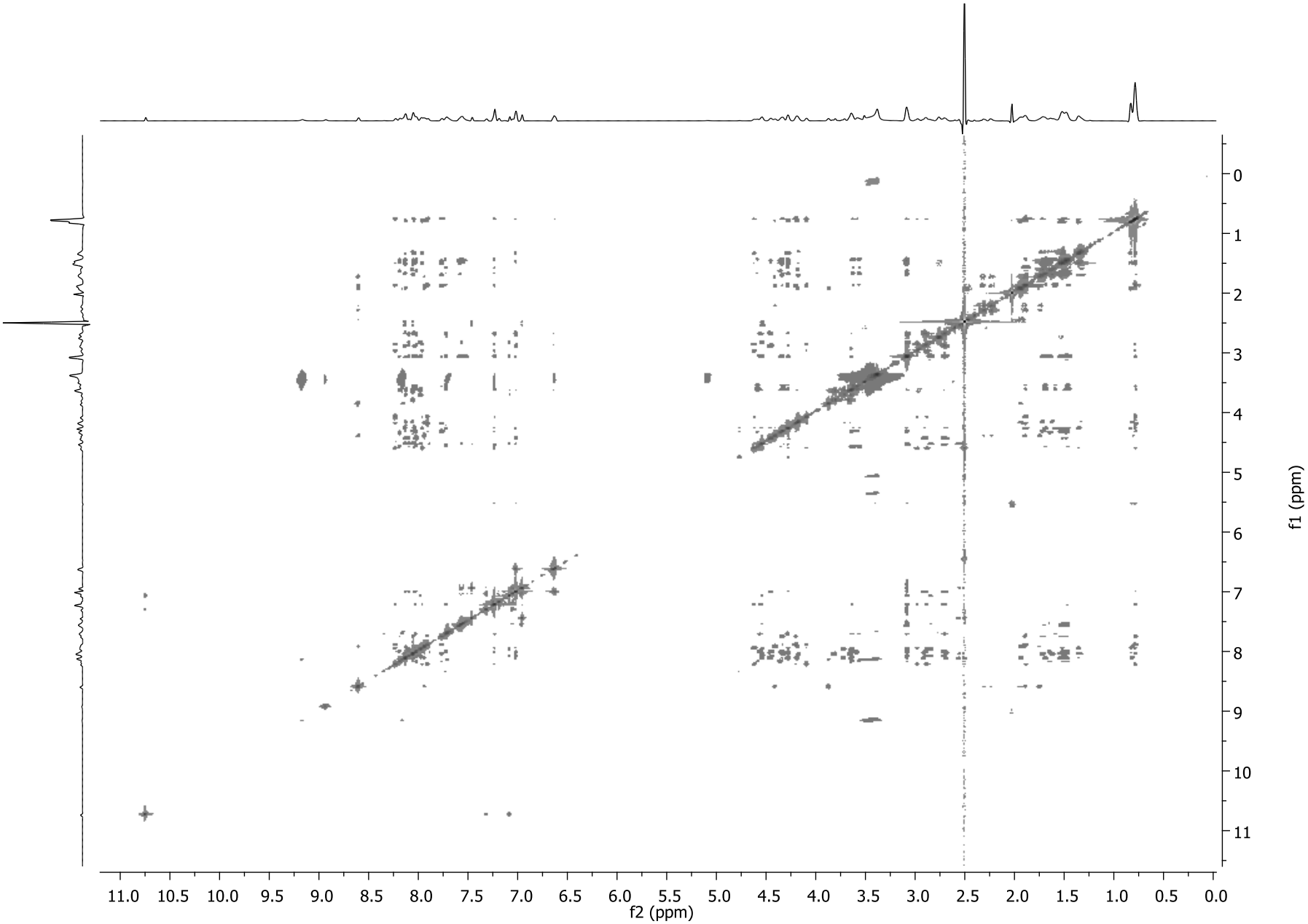
Σχήμα B2. Φάσμα 2D TOCSY του επίτοπου MOG_{35-55} που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε διαλύτη d_6-DMSO και θερμοκρασία 25°C.



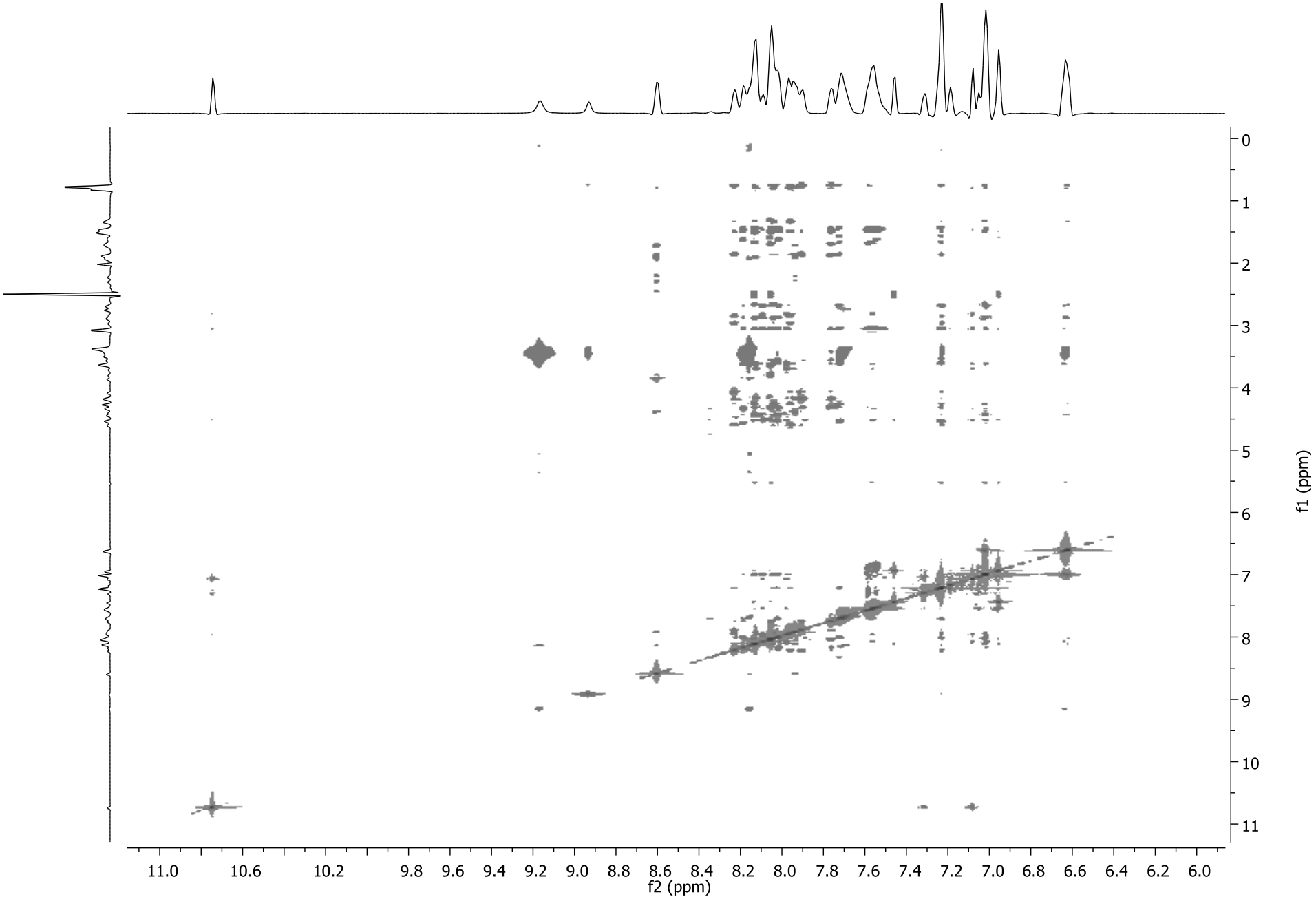
Σχήμα B3. Φάσμα 2D TOCSY του επίτοπου MOG_{35-55} στην περιοχή NH/H.



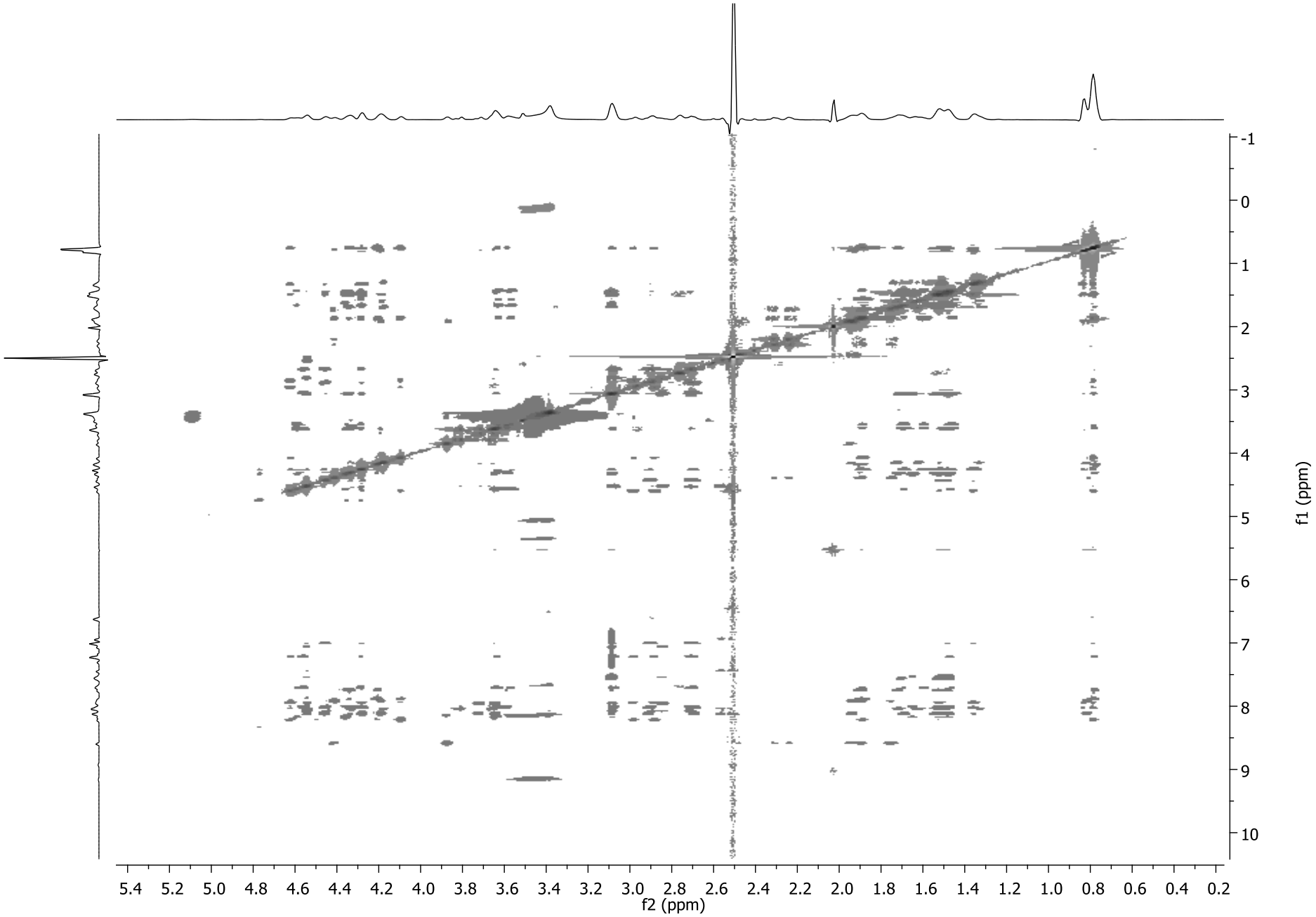
Σχήμα Β4. Φάσμα 2D TOCSY του επίτοπου MOG_{35-55} στην αλειφατική περιοχή.



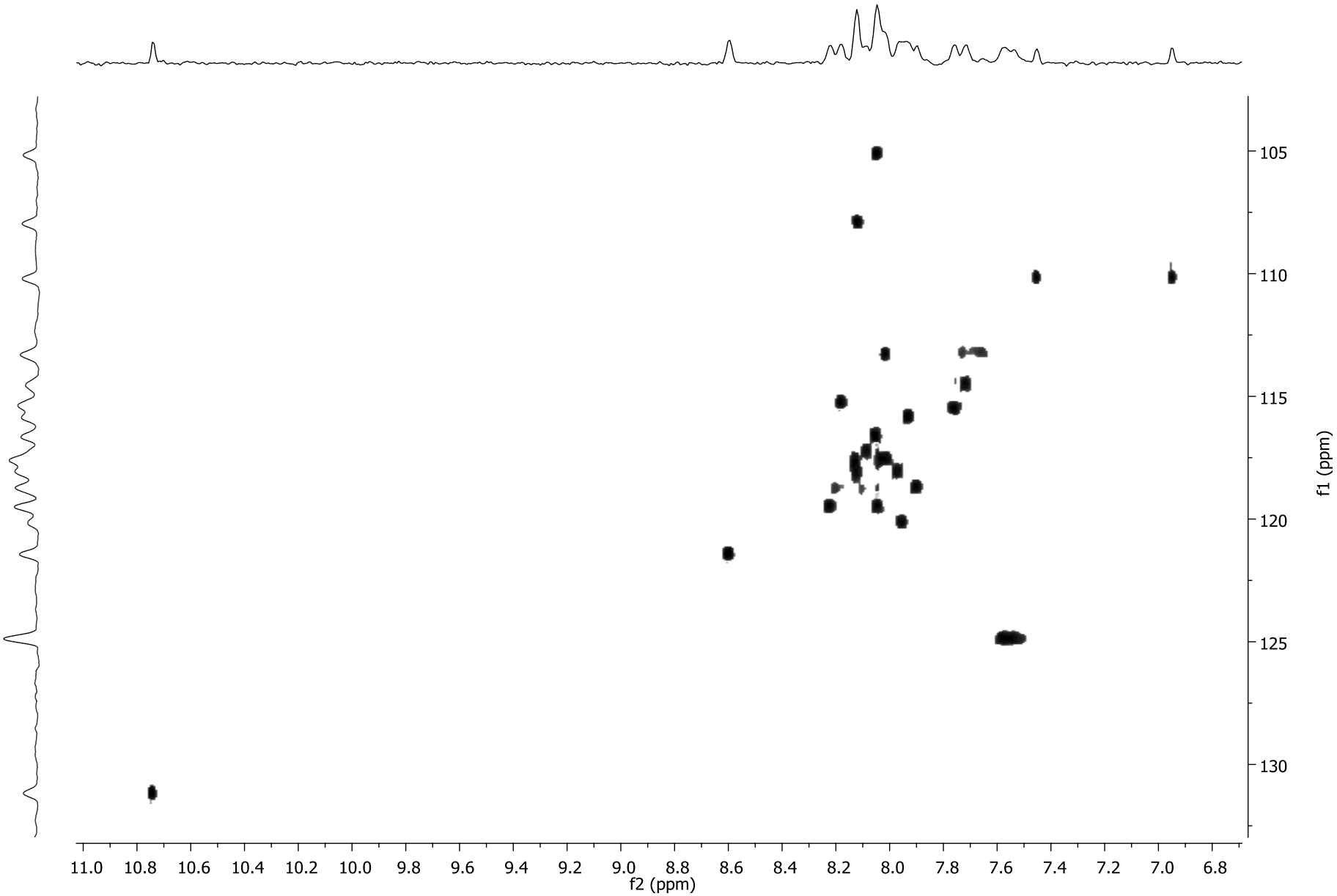
Σχήμα B5. Φάσμα 2D NOESY του επίτοπου MOG_{35-55} που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε διαλύτη d_6-DMSO και θερμοκρασία 25ºC.



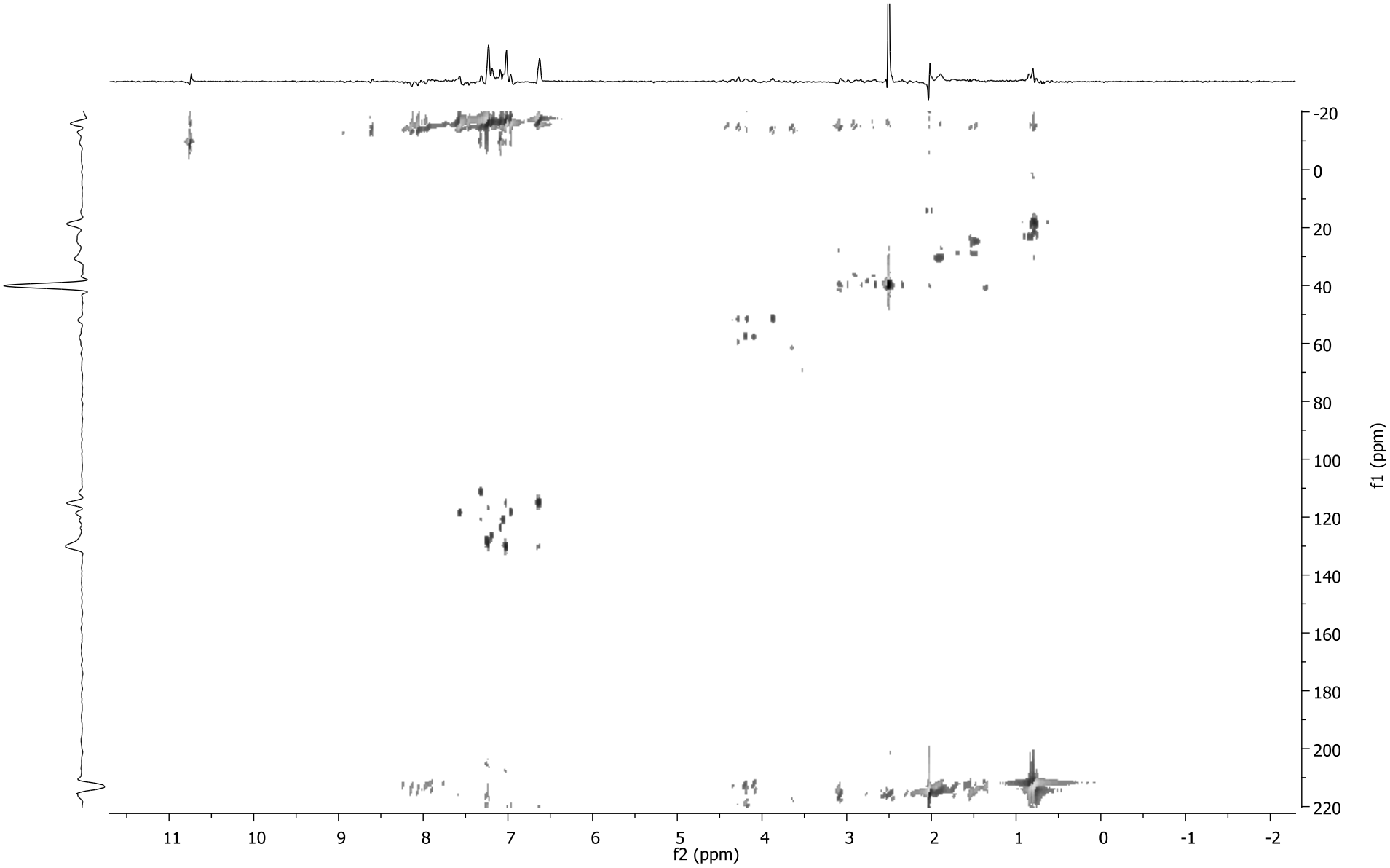
Σχήμα B6. Φάσμα 2D NOESY του επίτοπου MOG_{35-55} στην περιοχή NH/H.



Σχήμα B7. Φάσμα 2D NOESY του επίτοπου MOG_{35-55} στην αλειφατική περιοχή.



Σχήμα B9. Φάσμα ^{1}H-^{15}N HSQC του επίτοπου MOG_{35-55} που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε διαλύτη d_6-DMSO και θερμοκρασία 25ºC.



Σχήμα B9. Φάσμα ^{13}C HSQC του επίτοπου MOG_{35-55} που έχει ληφθεί σε φασματογράφο 700 MHz Bruker σε διαλύτη d_6-DMSO και θερμοκρασία 25ºC.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Lopez, A.D., et al. Lancet, 2006. 367(9524): p. 1747-57.

2. Stahl, S.M. Second ed. 2000, New York: Cambridge University Press.

3. Fava, M. Biol Psychiatry, 2003. 53(8): p. 649-59.

4. Baldessarini, R.J., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, J.G. Edit. Hardman, et al.,.1996, p. 431-460.

5. Baldessarini, R.J., The Pharmacological Basis of Therapeutics, J.G. Edit. Hardman, et al., 1996, p. 399-430.

6. Liapakis, G.; Venihaki, M.; Magriotis, A.; Grigoriadis, D.; Gkountelias, K. Members of CRF Family and their Receptors:From past to Future Curr Med Chem, 2011. 18(17): p.2583-600.

7. Vale, W.; Spiess, J.; Rivier, C.; Rivier, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science, 1981, 213(4514), 1394-1397.

8. Hoare, S.R., et al. Mol Pharmacol, 2003. 63(3): p. 751-65.

9. Tselios, T.; Aggelidakis, M.; Tapeinou, A.; Tseveleki, V.; Kanistras, I.; Gatos, D.; Matsoukas, J. Rational Design and Synthesis of Altered Peptide Ligands based on Human Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35–55 Epitope: Inhibition of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice, *Molecules* **2014**, *19*, 17968-17984; doi:10.3390/molecules191117968

10. Noseworthy, J.H.; Lucchinetti, C.; Rodriguez, M.; Weinshenker, B.G. Multiple sclerosis. *N. Engl J. Med.* 2000, *343*, 938–952.

11. Steinman, L. Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996, *85*, 299–302.

12. Mantzourani, E.D.; Mavromoustakos, T.M.; Platts, J.A.; Matsoukas, J.M.; Tselios, T. Structural requirements for binding of myelin basic protein (MBP) peptides to MHC II: Effects on immune regulation. *Curr. Med. Chem.* 2005, *12*, 1521–1535.

13. Lassmann, H. New concepts on progressive multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2007, *7*, 239–244.

14. Hemmer, B.; Cepok, S.; Zhou, D.; Sommer, N. Multiple sclerosis—A coordinated immune attack across the blood brain barrier. *Curr. Neurovasc. Res.* 2004, *1*, 141–150.

15 Τσακανίκας. Κ. Ιστορία της Σ.Κ.Π. Έκδοση χορηγία SERONO, ISBN 960-91325-0-2, Αθήνα 2000

16. Zach W. Hall. An introduction to Molecular Neurobiology, Chapter 9 – Myelin and Myelination 281-309. Publishers Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts 1992.

17. Martin, R.; McFarland, H.; McFarlin, D. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 1992, *10*, 153–187.

18. Martin, R.; McFarland, H.F. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1995, *32*, 121–182.

19. Theodore Tselios et al. Treatment of Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) Induced by Guinea Pig Myelin Basic Protein Epitope 72-85 with a Human MBP_{87-99} Analogue and Effects of Cyclic Peptides. Bioorganic & Medicinal Chemistry 8: 1903-1909, 2000

20. Theodore Tselios et al. Treatment of Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) by a Rationally Designed Cyclic Analogue of Myelin Basic Protein (MBP) $Epitope_{72-85}$, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 0:1-5, 2000

21. Kerlero de Rosbo, N.; Milo, R.; Lees, M.B.; Burger, D.; Bernard, C.C.; Ben-Nun, A. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Clin. Investig.* 1993, *92*, 2602–2608.

22. Linington, C.; Berger, T.; Perry, L.; Weerth, S.; Hinze-Selch, D.; Zhang, Y.; Lu, H.C.; Lassmann, H.; Wekerle, H. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* 1993, *23*, 1364–1372.

23. Amor, S.; Groome, N.; Linington, C.; Morris, M.M.; Dornmair, K.; Gardinier, M.V.; Matthieu, J.M.; Baker, D. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein

for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J. Immunol.* 1994, *153*, 4349–4356.

24. Ichikawa, M.; Johns, T.G.; Liu, J.; Bernard, C.C. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35–55. *J. Immunol.* 1996, *157*, 919–926.

25. Zhou, D.; Srivastava, R.; Nessler, S.; Grummel, V.; Sommer, N.; Brück, W.; Hartung, H.P.; Stadelmann, C.; Hemmer, B. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *12*, *103*, 19057–19062.

26. Kerlero de Rosbo, N.; Mendel, I.; Ben-Nun, A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur. J. Med. Chem.* 1995, *25*, 985–993.

27. Mendel, I.; Kerlero de Rosbo, N.; Ben-Nun, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Med. Chem.* 1995, *25*, 1951–1959.

28. Slavin, A.; Ewing, C.; Liu, J.; Ichikawa, M.; Slavin, J.; Bernard, C.C. Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Autoimmunity* 1998, *28*, 109–120.

29. Forsthuber, T.G.; Shive, C.L.; Wienhold, W.; de Graaf, K.; Spack, E.G.; Sublett, R.; Melms, A.; Kort, J.; Racke, M.K.; Weissert, R. T Cell Epitopes of Human Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Identified in HLA-DR4 (DRB1*0401) Transgenic Mice Are Encephalitogenic and Are Presented by Human B Cells. *J. Immunol.* 2001, *167*, 7119–7125.

30. Zamvil, S.; Steinman, L.; The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Ann Rev Immunol:579-621, 1990

31. Racke, M.; Dhib-Jalbut, S.; Cannella, B. et al. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. J Immunol 146:3012-7,1991

32. Zaller, D.; Osman, O.; Kanawaga, O.et all. Prevention and treatment of experimental allergic encephalomyelitis by T-cell receptor V-beta-specific antibodies. J Exp. Med, 171:1943-9,

33. Oliver, A.R.; Lyon, G.M.; Ruddle, N.H. Mechanisms in C57BL/6 Mice Autoimmune Encephalomyelitis by Different Glycoproteins Induce Experimental Rat and Human Myelin Oligodendrocyte. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 462–468.

34. Μαυρομούστακος, Θ; Ματσούκας, Ι. NMR. Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σχεδιασμό στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία και Χημεία Τροφίμων και Ποτών. Εκδόσεις Γ.Β Παρισιάνος, Αθήνα 2006

35. Μαυρομούστακος, Θ; Ζουμπουλάκης, Π. Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία. Εκδόσεις Γ.Β Παρισιάνος, Αθήνα 2008

36. C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg, and L.A Mitscher, *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1997). Annu. Rep. Med. Chem*, 1998; 33: pp. 385-395.

37. K. Wüthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, 1986

38. A. Pioszak, N. R. Parker, K. Suino-Powell and H. E. Xu, Molecular recognition of corticotropin releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(47), pp. 32900-32912.

39. Α.Πολίτη, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2009, 234-236