

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ CATHELICIDIN LL-37 ΚΑΙ  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ  
ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

υπό

Βασίλειο Μιχαήλ

Μεταπτυχιακή Εργασία υποβληθείσα για την εκπλήρωση των  
προϋποθέσεων απονομής Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης  
στη ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ  
ΕΝΩΣΕΙΣ του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

2016

© Βασίλειος Μιχαήλ



ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ CATHELICIDIN LL-37 ΚΑΙ  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ  
ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

υπό

Βασίλειο Μιχαήλ

Μεταπτυχιακή Εργασία υποβληθείσα για την εκπλήρωση των  
προϋποθέσεων απονομής Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης  
στη ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ  
ΕΝΩΣΕΙΣ του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

2016

© Βασίλειος Μιχαήλ



## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα Οκτώμβριος 2014-2016.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ευγενία Πάνου-Πομώνη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής, την καθοδήγηση καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές της. Την ευχαριστώ πολύ για όλα όσα μου δίδαξε καθώς και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που είχαμε καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα. Μαρία-Ελένη Λέκκα για την αμέριστη υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων ελέγχου της κυτταροτοξικής δράσης στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα A549 που πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Τεχνικών Υποδομών και Μεθόδων Χαρακτηρισμού και Ελέγχου Βιοδραστικότητας Ουσιών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου για τις πολύτιμες συμβουλές της και το ειλικρινές ενδιαφέρον της κατά τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων ελέγχου της αντιμικροβιακής δράσης και αιμολυτικής σταθερότητας που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας.

Σεβασμό και ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Καθηγήτρια κα. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για τις πολύτιμες συμβουλές της καθώς και για το ενδιαφέρον που έδειξε σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ένα θερμό και ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω να δώσω στον Δημήτριο Κρικoriάν και στο Βασίλειο Μούση για τις πολύτιμες συμβουλές τους, την αμερόληπτη βοήθειά τους και το συνεχές ενδιαφέρον τους σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων.

Ένα πολύ μεγάλο και θερμό ευχαριστώ οφείλω να δώσω στους φίλους και συναδέλφους μου Κωνσταντίνο Χιώνη, Ιωάννη Αγγελή, Κωνσταντίνα Ασημακίδου, Ευγενία Φώτου, Αλεξία Τσαπίνου, Μαργαρίτα Τσιρογιάννη, Παρασκευή Τρύπου, Ορνέλα

Τζούμπα, Σοφία Σιδηροπούλου και Εύη Φώτου για όλες τις όμορφες, τις χαρούμενες καθώς και τις δύσκολες στιγμές που ζήσαμε μαζί τα τελευταία δύο χρόνια. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Μικαέλα Arstad-Καρυπίδου για την στήριξη, την απεριόριστη βοήθεια και την ενθάρρυνσή της για την επίτευξη των στόχων μου όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ένα βαθύτατο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου για την στήριξή τους σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Μιχαήλ Βασίλειος

Ιωάννινα 2016



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Θεωρητικό μέρος

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Μικροοργανισμοί και καλλιέργειες

1.1	Εισαγωγή	19
1.2	Ονοματολογία και ταξινόμηση των μικροοργανισμών	28
1.2.1	Βακτήρια	30
1.2.2	Αρχαία	31
1.2.3	Πρωτόζωα	32
1.2.4	Μύκητες	33
1.2.5	Φύκη	34
1.3	Προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό κύταρο	35
1.4	Χρώση Gram	37
1.5	Κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων	40
1.5.1	Κυτταρικό τοίχωμα gram-θετικών βακτηρίων	42
1.5.2	Κυτταρικό τοίχωμα gram-αρνητικών βακτηρίων	43
1.6	Καλλιέργειες μικροοργανισμών	44
1.6.1	Υλικά καλλιέργειας	45
1.6.2	Τεχνικές καλλιέργειας μικροοργανισμών	46
1.7	Καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων	48
1.8	Έμμεση μέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού: θολερότητα	51
1.9	Βιβλιογραφία	53

### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Αντιμικροβιακά και αντικαρκινικά κατιονικά πεπτίδια

2.1	Αντιβιοτικά	57
2.1.1	Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών	57
2.1.2	Μικροβιακή αντίσταση στα αντιβιοτικά και οι μηχανισμοί της	60



2.2 Κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια	62
2.2.1 Δομή των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων	63
2.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και οι μηχανισμοί δράσης τους	67
2.2.3 Μεμβrano-αποδιοργανωτικά κατιονικά πεπτίδια	71
2.2.4 Μη μεμβrano-αποδιοργανωτικά κατιονικά πεπτίδια	74
2.2.5 Καθελισιδίνες	75
2.2.5.1 Ανθρώπινη καθελισιδίνη LL-37	76
2.2.5.2 Δομή της ανθρώπινης καθελισιδίνης LL-37	77
2.2.5.3 Αλληλεπίδραση του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 με βιολογικές μεμβράνες	78
2.2.5.4 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37	79
2.3 Καρκίνος	80
2.4 Κατιονικά αντικαρκινικά πεπτίδια	83
2.4.1 Μηχανισμοί δράσης των κατιονικών αντικαρκινικών πεπτιδίων	85
2.4.2 Αντικαρκινική δράση του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37	87
2.5 Βιβλιογραφία	88

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Πεπτιδική σύνθεση

3.1 Αμινοξέα	94
3.2 Πεπτιδικός δεσμός	101
3.3 Πρωτεΐνες	104
3.4 Εισαγωγή στη χημεία των πεπτιδίων	108
3.5 Βασικές αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης	109
3.6 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού	112
3.6.1 Καρβοδιμίδια	114
3.6.2 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα	120
3.7 Το αδιάλυτο στερεό υπόστρωμα	123
3.7.1 Ρητίνες συμβατές με την Fmoc στρατηγική	125

3.7.2 Ρητίνες συμβατές με την Boc στρατηγική	127
3.8 N <sup>α</sup> -άμινο προστατευτικές ομάδες	128
3.8.1 Η Fmoc ομάδα	130
3.9 Παράπλευρες προστασίες των δραστικών ομάδων των N <sup>α</sup> -άμινο-προστατευμένων αμινοξέων	132
3.10 Διαλύτες στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση	136
3.11 Δοκιμές χρωματομέτρησης ρητίνης	137
3.12 Αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη	139
3.13 Ρακεμοποίηση στην πεπτιδική σύνθεση	142
3.14 Σχηματισμός Δικετοπιπεραζίνης	144
3.15 Σιαλικά οξέα-Δομή και Λειτουργία	145
3.16 Χημειοεκλεκτική σύνδεση γλυκοπεπτιδίων-Δεσμός Οξίμης	146
3.17 Βιβλιογραφία	149

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> Τεχνικές ταυτοποίησης, καθαρισμού και προσδιορισμού της δομής των πεπτιδίων

4.1 Φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy)	156
4.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)	161
4.3 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού CD (Circular Dichroism Spectroscopy)	163
4.4 Βιβλιογραφία	168

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Σκοπός της εργασίας

171

## Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων

6.1 Μέθοδος πεπτιδικής σύνθεσης	180
6.1.1 Διαλύτες	180
6.1.2 Αντιδραστήρια σύζευξης	182
6.1.3 Αντιδραστήρια του χρωματομετρικού ελέγχου ρητίνης Test Kaiser	182
6.1.4 Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα	183
6.2 Πορεία σύνθεσης	184
6.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων	187

### Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> Μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

7.1 Πειραματική πορεία	206
7.2 Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) των πεπτιδίων σε κάθε διαλύτη	207
7.3 Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) κάθε πεπτιδίου σε όλους τους διαλύτες	209
7.4 Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού (CD)	210

### Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> Βιολογικά πειράματα

8.1 Μικροβιακά στελέχη και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των πεπτιδίων	215
8.2 Μελέτη ανθεκτικότητας των μικροβιακών στελεχών στα πεπτίδια	216
8.2.1 Πειραματική πορεία	217
8.2.2 Αποτελέσματα	219
8.3 Κυτταρική σειρά A549	221

8.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων A549	222
8.3.2 Πειραματική πορεία καλλιέργειας κυττάρων A549	224
8.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας-Μέθοδος MTT	226
8.4.1 Αντιδραστήρια-Σκεύη	227
8.4.2 Πειραματική πορεία μεθόδου MTT	227
8.4.3 Αποτελέσματα	228
8.5 Μελέτη τοξικότητας των πεπτιδίων	240
8.5.1 Πειραματική πορεία	241
8.5.2 Αποτελέσματα	242

## Κεφάλαιο 9<sup>ο</sup> Αποτελέσματα και συζήτηση

9.1 Εισαγωγή	247
9.2 Διαμορφωτική μελέτη με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	250
9.3 Αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων	251
9.4 Κυτταροτοξική δράση των πεπτιδίων στα κύτταρα A549	252
9.5 Αιμολυτική σταθερότητα	253

## Κεφάλαιο 10<sup>ο</sup> Συμπεράσματα

255

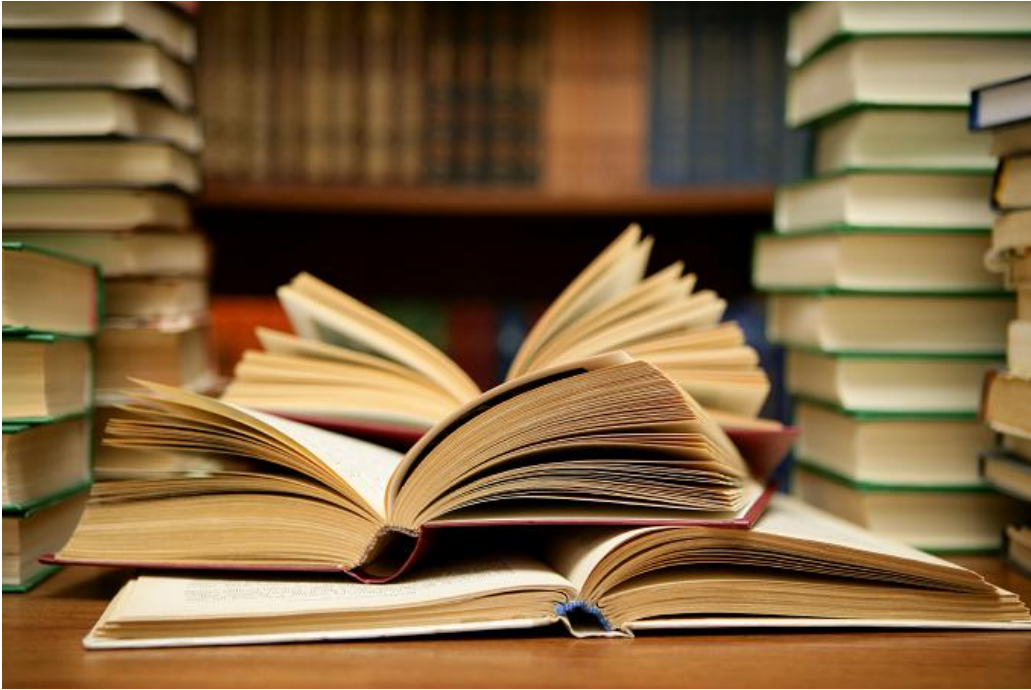
## Κεφάλαιο 11<sup>ο</sup> Περίληψη και παράρτημα

11.1 Περίληψη	262
11.2 Παράρτημα	266

*Αφιερώνεται στους γονείς μου,  
Αβραάμ και Ευαγγελία  
και στη Μικαέλα*



## Θεωρητικό μέρος







## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

### Μικροοργανισμοί και καλλιέργειες





## 1.1 Εισαγωγή

Η Μικροβιολογία είναι η επιστήμη που μελετά τη δομή και τη βιολογική λειτουργία των μικροοργανισμών. Ερευνά την ποικιλομορφία και την εξέλιξη των μικροοργανισμών, πώς προέκυψαν τα διάφορα είδη και γιατί. Επίσης, εξετάζει την επίδραση των μικροοργανισμών στο περιβάλλον, την ανθρώπινη κοινωνία, το ανθρώπινο σώμα, τα ζώα και τα φυτά.

Γενικά ως **μικροοργανισμός** ή **μικρόβιο** χαρακτηρίζεται ο οργανισμός, ο οποίος δεν είναι ορατός με γυμνό οφθαλμό, διότι έχει μέγεθος μικρότερο από 0,1 mm. Διακρίνονται σε 4 μεγάλες ομάδες, τα βακτήρια, τους μύκητες, τα παράσιτα (πρωτόζωα και μετάζωα) και τους ιούς. Οι μικροοργανισμοί διαβιούν είτε ως ανεξάρτητοι μονοκύτταροι οργανισμοί, είτε ως ομάδες κυττάρων, δηλαδή ως πολυκύτταροι μικροοργανισμοί. Οι μικροοργανισμοί επηρεάζουν όλες τις άλλες μορφές ζωής στη Γη, επομένως η σημασία τους είναι τεράστια. Παρακάτω αναφέρονται, ενδεικτικά, μερικές από τις λειτουργίες των μικροοργανισμών, που τους καθιστούν ως τους πλέον σημαντικούς παράγοντες για την υποστήριξη και τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη.

- 1) Το οξυγόνο που αναπνέουμε είναι προϊόν μικροβιακής δράσης.
- 2) Οι μικροοργανισμοί που διαβιούν στα γλυκά και θαλασσινά ύδατα αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας των ωκεανών, των λιμνών και των ποταμών.
- 3) Οι μικροοργανισμοί που ζουν στο έδαφος αποσυνθέτουν τη νεκρή οργανική ύλη και ενσωματώνουν το άζωτο της ατμόσφαιρας σε οργανικές ενώσεις, τις οποίες λαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της τροφής.
- 4) Κάποια μικρόβια παίζουν σημαντικό ρόλο στη **φωτοσύνθεση**, τη σημαντικότερη διεργασία για τη διατήρηση της ζωής.
- 5) Η διαδικασία της πέψης στο γαστρεντερικό σύστημα των ανώτερων οργανισμών (άνθρωπος, ζώα), καθώς και η σύνθεση βιταμινών οφείλεται στη δράση μικροβίων.

Οι μικροοργανισμοί έχουν πρακτικές εφαρμογές στην ανθρώπινη κοινωνία, καθώς χρησιμοποιούνται στους τομείς της κτηνοτροφίας, της γεωργίας, της βιοτεχνολογίας, της βιομηχανίας τροφίμων και της ιατρικής με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και τη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου.

Ορισμένες πρακτικές εφαρμογές των μικροοργανισμών αναφέρονται παρακάτω.

- 1) Μαζική παραγωγή χημικών προϊόντων, όπως ακετόνη, οργανικά οξέα, ένζυμα, αλκοόλες και πολλά φάρμακα.
- 2) Παρασκευή κρασιού, γιαουρτιού, ψωμιού, τυριού, βουτύρου κ.λπ.
- 3) Ένζυμα από μικρόβια μπορούν να τροποποιηθούν, ώστε τα μικρόβια να παρασκευάσουν ουσίες, που κανονικά δε θα συνέθεταν, όπως κυτταρίνη, βοηθήματα πέψης, καθαρτικά και θεραπευτικές ουσίες (ινσουλίνη).

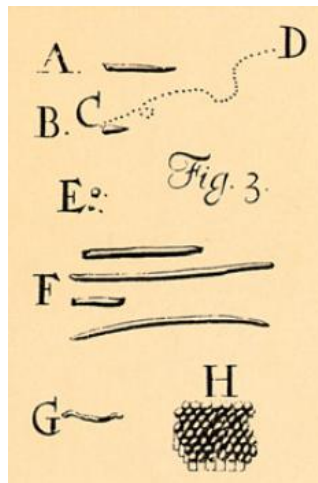
Η μειονότητα, ευτυχώς, των μικροοργανισμών αποτελείται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι εισβάλλουν είτε στον άνθρωπο, τα ζώα και τα φυτά είτε σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης, προκειμένου να αναπαραχθούν, προκαλώντας ωστόσο σοβαρές ασθένειες.<sup>[2],[5]</sup>

Η επιστήμη της Μικροβιολογίας συνδέεται άμεσα με την εφεύρεση του μικροσκοπίου. Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στην ιστορία της Μικροβιολογίας έγινε το 1665 με τη βοήθεια ενός απλού μικροσκοπίου, με το οποίο ο Άγγλος φυσικός και φιλόσοφος **Robert Hooke** παρατήρησε για πρώτη φορά έναν κυανόχρωμο μύκητα (μούχλα), ο οποίος αναπτύσσεται στην επιφάνεια δερμάτων.



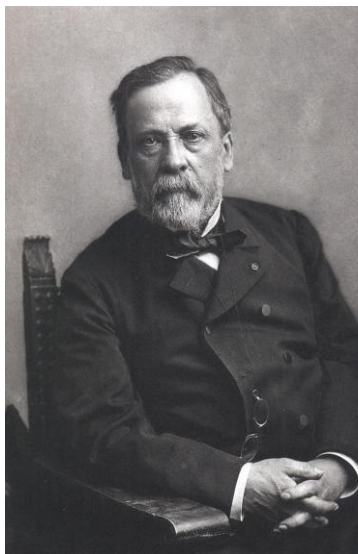
**Σχήμα 1.1:** Σχέδιο του Robert Hooke, που αντιπροσωπεύει την πρώτη περιγραφή μικροοργανισμού με μικροσκόπιο. Στο σχέδιο απεικονίζεται ένας κυανόχρωμος μύκητας (μούχλα) και οι σφαιρικές δομές περιέχουν τα σπόρια του μύκητα.

Ωστόσο, ο πρώτος άνθρωπος που παρατήρησε λεπτομερώς τους μικροοργανισμούς ήταν ο Ολλανδός έμπορος και ερασιτέχνης κατασκευαστής μικροσκοπίων **Anton van Leeuwenhoek**. Ο Anton van Leeuwenhoek έφτιαξε λεπτομερή σχέδια των μικροοργανισμών που παρατήρησε και τα ονόμασε **απειροελάχιστα ζωομόρια**. Τα σχέδια αυτά απεικονίζουν τα πρώτα βακτήρια και πρωτόζωα που παρατηρήθηκαν από τον άνθρωπο.



**Σχήμα 1.2:** Μερικά από τα σκίτσα του Anton van Leeuwenhoek, τα οποία απεικονίζουν βακτήρια που παρατήρησε, δημοσιευμένα το 1684. Τα γράμματα αντιπροσωπεύουν διάφορα σχήματα βακτηρίων, ενώ η διακεκομμένη γραμμή C-D περιγράφει την κίνηση ενός βακτηρίου, όπως την παρατήρησε ο van Leeuwenhoek.

Η Μικροβιολογία εξελίχθηκε ως επιστήμη το 19<sup>ο</sup> αιώνα με τη βελτίωση των μικροσκοπίων, που επέτρεψε την αναλυτικότερη παρατήρηση των μικροοργανισμών και την ανάπτυξη των βασικών εργαστηριακών τεχνικών, απαραίτητων για τη μελέτη των μικροοργανισμών. Η περίοδος από το 1857 έως το 1914 ονομάστηκε ‘Χρυσή Εποχή της Μικροβιολογίας’, λόγω των σπουδαίων ανακαλύψεων κυρίως των **Louis Pasteur** και **Robert Koch**. Οι ανακαλύψεις αυτές έθεσαν τις βάσεις της επιστήμης της σύγχρονης Μικροβιολογίας.

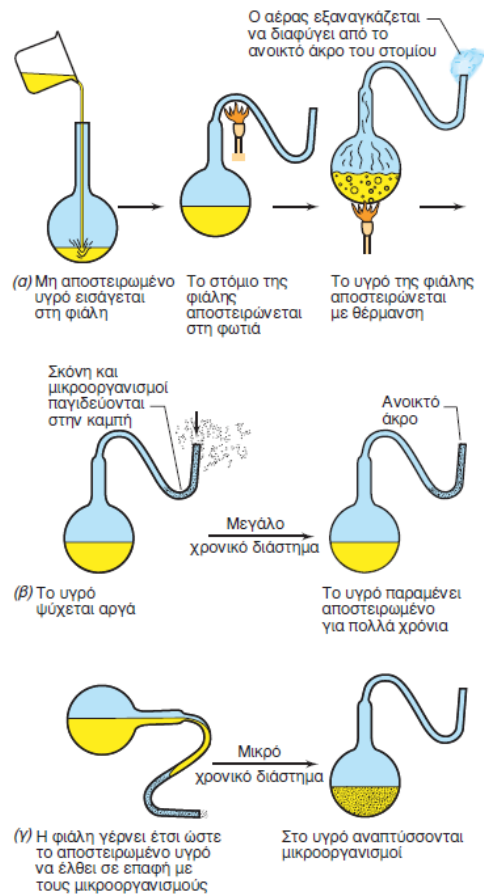


Ο Γάλλος χημικός Louis Pasteur (1822-1895) ανακάλυψε το 1857, μέσω πειραμάτων, ότι η μετατροπή των σακχάρων, που περιέχονται στα αλκοολούχα ποτά, σε αλκοόλες οφείλεται στη δράση μικροοργανισμών, τις ζύμες, οι οποίες αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες. Η διαδικασία αυτή ονομάστηκε **ζύμωση**. Ο Pasteur ανακάλυψε, πρώτος, τον τρόπο για να αποτρέπεται το ξίνισμα του γάλακτος, του κρασιού ή της μύρας. Έτσι, ζέστανε το γάλα, το κρασί και τη μύρα, τόσο ώστε να καταστρέφονται, σε μεγάλο ποσοστό, μόνο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αλλοιώνουν το τρόφιμο.

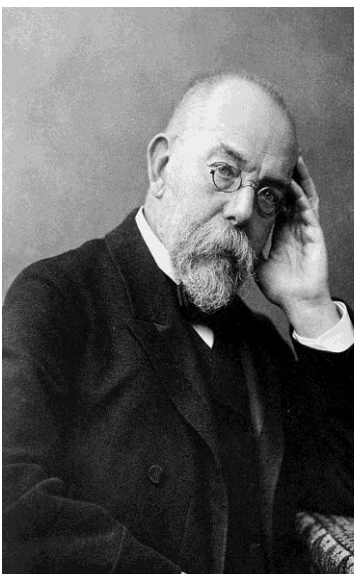
Η διαδικασία αυτή πήρε το όνομά του και ονομάζεται **παστερίωση**.

Ο Pasteur ήταν ο επιστήμονας που κατέρριψε, το 1861, τη θεωρία της **αυθόρμητης γένεσης**, σύμφωνα με την οποία όταν ένα τρόφιμο εκτίθεται στον αέρα για ένα μικρό χρονικό διάστημα, αποσυντίθεται λόγω της αυθόρμητης ανάπτυξης μικροοργανισμών από τα "μη ζωντανά" υλικά της τροφής, που χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον αέρα. Ο Pasteur υποστήριξε ότι ένα τρόφιμο αποσυντίθεται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν, συνεχώς, στον ατμοσφαιρικό αέρα και ότι, φυσικά, δεν τους "δημιουργεί" ο αέρας αυθόρμητα. Έτσι, απέδειξε, με απλό και έξυπνο τρόπο, ότι εάν ένα τρόφιμο που έχει αποστειρωθεί με θέρμανση και έχει προστατευθεί κατάλληλα, ώστε να μην έρθει σε επαφή με οποιοδήποτε μικροοργανισμό του αέρα, τότε το τρόφιμο δεν πρόκειται να αποσυντεθεί. Το πείραμα του Pasteur περιγράφεται στα ακόλουθα βήματα.

- 1) Αποστειρώνεται το στόμιο της φιάλης, έπειτα διαμορφώνεται ο λαιμός της σε σχήμα S και τέλος αποστειρώνεται το περιεχόμενο της φιάλης.
- 2) Καθώς το υγρό αποκτά τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ο αέρας εισέρχεται στη φιάλη, ωστόσο η σκόνη και οι μικροοργανισμοί που μεταφέρει παγιδεύονται στην καμπή του στομίου σχήματος S. Επομένως, όσο χρονικό διάστημα η φιάλη παραμένει σε όρθια θέση, το υγρό διατηρείται αποστειρωμένο.
- 3) Όταν η φιάλη γείρει, οι μικροοργανισμοί έρχονται σε επαφή με το περιεχόμενο υγρό της φιάλης και το μολύνουν.



**Σχήμα 1.3: Το πείραμα του Pasteur με τη φιάλη με μακρύ λαιμό σχήματος S κεκαμμένου στομίου, η οποία ονομάζεται σήμερα φιάλη Pasteur.**

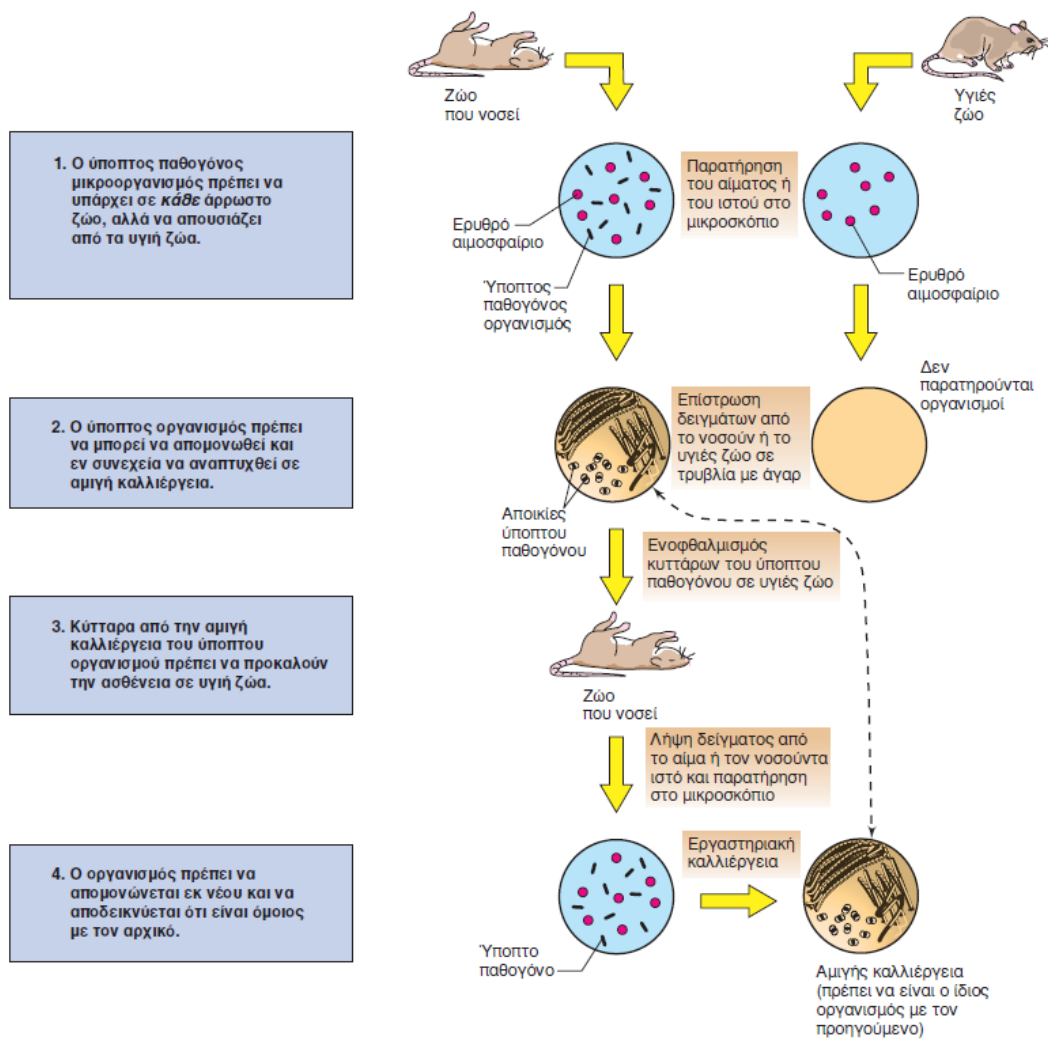


Ο Γερμανός γιατρός Robert Koch (1843-1910) διατύπωσε με σαφήνεια και επιστημονική ακρίβεια τη **μικροβιακή θεωρία για τις ασθένειες**. Το 1876 απέδειξε, με προσεκτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο δειγμάτων αίματος από άρρωστα ποντίκια (το ζώο που χρησιμοποιούσε ως πειραματόζωο), ότι το σποριογονικό βακτήριο *Bacillus Anthracis* προκαλεί τη νόσο του άνθρακα, μία ασθένεια των βοοειδών που εμφανίζεται περιστασιακά και στον άνθρωπο και οδηγεί στο θάνατο. Ο Koch προχώρησε τα πειράματά του με το αίμα των ποντικών ακόμα παραπέρα, αναπτύσσοντας μεθόδους καθαρής καλλιέργειας του βακτηρίου σε υγρά θρεπτικά υλικά εκτός του σώματος του ζώου.

Στη συνέχεια, χορήγησε τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες σε υγιή

ποντίκια. Όταν τα ποντίκια αυτά αρρώστησαν και πέθαναν, ο Koch απομόνωσε τα βακτήρια από το αίμα τους και, αφού τα ανέπτυξε σε καλλιέργειες, τα συνέκρινε με τα αρχικά, διαπιστώνοντας ότι οι δύο τύποι βακτηρίων ήταν ίδιοι.

Ο Koch, χάρη σε αυτές τις μελέτες, καθιέρωσε μία σειρά πειραματικών βημάτων για τη σχέση ενός μικροβίου με μια συγκεκριμένη ασθένεια. Τα βήματα αυτά είναι γνωστά ως **αξιώματα του Koch** και περιγράφονται αναλυτικά στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 1.4: Τα αξιώματα του Koch

Το σκεπτικό του Koch για τη διατύπωση των παραπάνω αξιωμάτων στηριζόταν στο γεγονός ότι μία ασθένεια συνδέεται με ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό, όταν πρώτα ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί και στη συνέχεια αναπτυχθεί σε καλλιέργεια. Αυτού



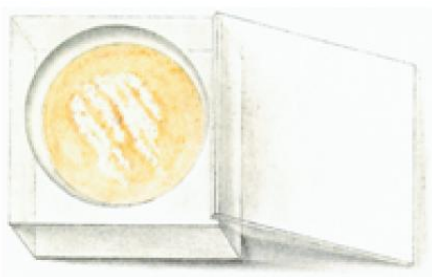
του είδους η καλλιέργεια, η οποία περιέχει ένα μόνο είδος μικροοργανισμού ονομάζεται **αμιγής καλλιέργεια**.<sup>[1],[2]</sup>

Ο Koch ήταν ο πρώτος άνθρωπος που καλλιέργησε βακτήρια σε στερεά θρεπτικά μέσα, προκειμένου να αναπτύξει μία αμιγή καλλιέργεια. Η πρώτη του απόπειρα για την ανάπτυξη αμιγών καλλιεργειών ήταν η χρήση μιας φέτας πατάτας, η οποία κατά την επώασή της στον αέρα οδηγούσε στο σχηματισμό βακτηριακών συνόλων διαφορετικού σχήματος και χρώματος. Παρατηρώντας τα σχέδια πάνω στη φέτα της πατάτας, συμπέρανε ότι κάθε σχέδιο προκύπτει από ένα και μόνο βακτηριακό κύτταρο και αναπαριστά μια αμιγή καλλιέργεια. Στη συνέχεια, χρησιμοποίησε θρεπτικά διαλύματα καθορισμένης σύνθεσης για κάθε μικροοργανισμό που ήθελε να αναπτύξει και τα στερεοποίησε, αρχικά, με ζελατίνη και αργότερα με **άγαρ**. Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από τα ερυθρά φύκη του γένους *Gelidium* και είναι ο **στερεοποιητικός παράγοντας** που χρησιμοποιείται ευρύτατα στα μικροβιολογικά εργαστήρια για την παρασκευή και διατήρηση αμιγών καλλιεργειών διαφόρων μικροοργανισμών.

Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε στερεά θρεπτικά μέσα, ο Koch επινόησε τις υάλινες **οριζόντιες πλάκες**, όπου βρίσκονταν το στερεό μέσο, και τις προφύλασσε από μόλυνση, τοποθετώντας τις σε ένα υάλινο κουτί.

Ο Koch ανακάλυψε το 1882, ακολουθώντας τη μέθοδο της αμιγής καλλιέργειας, το **βάκιλο της φυματίωσης του ανθρώπου**, το *Mycobacterium tuberculosis*, γνωστό ως ο **“Βάκιλος του Κοχ”**.

Οι τεχνικές καλλιέργειας που εφάρμοσε ο Koch, χρησιμοποιούνται έως και σήμερα στα μικροβιολογικά εργαστήρια.



**Σχήμα 1.5: Ανάπτυξη μικροοργανισμού σε υάλινες οριζόντιες πλάκες μέσα σε υάλινο κουτί (με ανοιχτό κάλυμμα)**



Το 1887, ο Γερμανός μικροβιολόγος **Julius Richard Petri**, βοηθός και συνεργάτης του Koch, δημοσίευσε μια τροποποίηση της τεχνικής του Koch για τις οριζόντιες πλάκες. Ο Petri (1852-1921) χρησιμοποίησε το ζεύγος υάλινων ανεστραμμένων δίσκων που φέρουν σήμερα το όνομά του, τα **τρυβλία Petri**. Τα τρυβλία αυτά μπορούν να τοποθετηθούν το ένα πάνω στο άλλο και να αποστειρωθούν χωριστά από το θρεπτικό μέσο. Αφού προστεθεί το υγρό θρεπτικό υλικό με το

άγαρ στον υάλινο δίσκο, χρησιμοποιείται ο έτερος μεγαλύτερος δίσκος ως καπάκι προστασίας της καλλιέργειας από τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος χώρου.

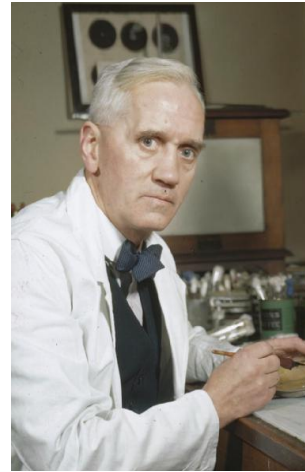
Τα τρυβλία Petri κατασκευάζονται είτε από ανακυκλωμένο γυαλί είτε από πλαστικό μιας χρήσης. Ο σχηματισμός του μικροοργανισμού στην επιφάνεια των τρυβλίων Petri ονομάζεται **αποικία**.<sup>[1]</sup>



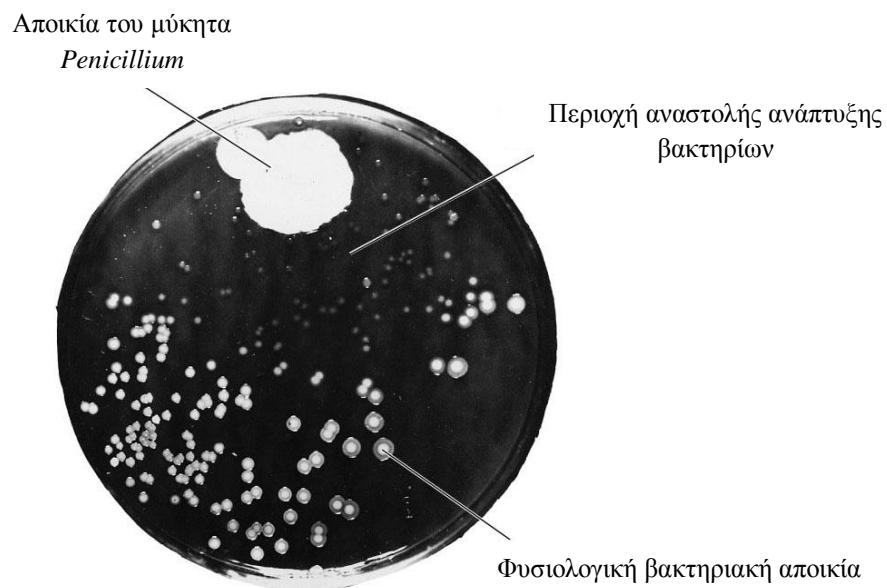
Σχήμα 1.6: Απεικόνιση υάλινου τρυβλίου Petri

Ένας σημαντικός σταθμός στην επιστήμη της Μικροβιολογίας είναι η ανακάλυψη των αντιβιοτικών. Τα **αντιβιοτικά** είναι χημικές ενώσεις με **αντιμικροβιακή** δράση που παράγονται από βακτήρια, μύκητες και φυτά. Τα αντιβιοτικά δρουν είτε βακτηριολυτικά είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μπορεί να έχουν δράση ενάντια σε μύκητες και παράσιτα, ωστόσο δεν είναι αποτελεσματικά έναντι των ιών, καθώς οι ιοί διαθέτουν δικό τους μεταβολικό μηχανισμό, αφού αποτελούν υποχρεωτικά κυτταρικά παράσιτα. Μέχρι σήμερα, 4.000 αντιβιοτικά έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες μικροβίων και 30.000 έχουν παρασκευασθεί ημισυνθετικά.

Το πρώτο αντιβιοτικό ανακαλύφθηκε τυχαία από τον Σκωτσέζο γιατρό και βακτηριολόγο **Alexander Fleming**, όταν παρατήρησε ότι η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων είχε ανασταλεί σε καλλιέργειες που είχαν επιμολυνθεί από ένα μύκητα του γένους *Penicillium*. Ο Fleming (1881-1955), τυχαία, παρατήρησε ότι στην περιοχή του τρυβλίου γύρω από τις αποικίες του μύκητα διακόπτονταν απότομα οι αποικίες του βακτηρίου. Το 1929, ονόμασε την ουσία που παράγει ο συγκεκριμένος μύκητας ως **πενικιλίνη**. Ο μύκητας είχε ήδη



ταυτοποιηθεί στο είδος *Penicillium chrysogenum*. Ο Fleming βραβεύθηκε, για την ανακάλυψη της πενικιλίνης, με το Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1945.<sup>[2]</sup>



**Σχήμα 1.7:** Φωτογραφία που τράβηξε ο Alexander Fleming το 1928, στην οποία φαίνεται το τρυβλίο μιας βακτηριακής καλλιέργειας, μολυσμένης με τον μύκητα *Penicillium*. Η φωτογραφία αυτή αποτελεί τεκμήριο της ανακάλυψης του πρώτου αντιβιοτικού, της πενικιλίνης.

## 1.2 Ονοματολογία και ταξινόμηση των μικροοργανισμών

Κάθε ζωντανός οργανισμός προσδιορίζεται με δύο **συστατικά ονόματα**, σύμφωνα με τους κανόνες που καθόρισε ο Σουηδός γιατρός και βοτανολόγος **Carolus Linnaeus** το 1735. Τα συστατικά ονόματα επικράτησε να γράφονται στα Λατινικά για λόγους συνήθειας της εποχής. Πρώτα γράφεται το όνομα του **γένους** με κεφαλαίο το πρώτο γράμμα και ακολουθεί το όνομα του **είδους** γραμμένο με μικρά γράμματα. Τα δύο ονόματα είναι είτε υπογραμμισμένα είτε γράφονται με πλάγια γραφή.

Στην επιστημονική ονοματολογία χρησιμοποιούνται ονόματα που περιγράφουν μία ιδιότητα του οργανισμού, ονόματα προς τιμήν ενός επιστήμονα ή ονόματα που περιγράφουν μία συνήθεια του οργανισμού. Για παράδειγμα, το όνομα του γένους του βακτηρίου *Escherichia coli* προέρχεται από τον επιστήμονα που το ανακάλυψε, τον **Theodor Escherich** και το όνομα του είδους *,coli*, προέρχεται από το κόλον του παχέος εντέρου, στο οποίο ζει το βακτήριο.

Ο Linnaeus εισήγαγε, το 1735, ένα σύστημα ταξινόμησης των ζωντανών οργανισμών, κατατάσσοντάς τους σε δύο Βασίλεια, το **Βασίλειο των Φυτών** (Plantae) και το **Βασίλειο των Ζώων** (Animalia).

Το 1866, ο Γερμανός βιολόγος και φυσιοδίφης **Ernst Haeckel** πρότεινε τη δημιουργία του **Βασιλείου των Πρωτίστων**, το οποίο περιλάμβανε βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες και φύκη.

Με την ανακάλυψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου παρατηρήθηκαν οι δομές των κυττάρων και έτσι, το 1937, ο Γάλλος Βιολόγος **Éduard Chatton** διέκρινε για πρώτη φορά κύτταρα που δε διέθεταν πυρήνα από τα κύτταρα των φυτών και των ζώων και εισήγαγε τον όρο του “**προκαρυωτικού**” κυττάρου.

Το 1969, ο Αμερικανός βιολόγος **Robert H. Whittaker** πρότεινε το σύστημα ταξινόμησης των ζωντανών οργανισμών σε πέντε Βασίλεια, το Βασίλειο των Φυτών (Plantae), των Ζώων (Animalia), των Μυκήτων (Fungi), των Πρωτίστων (Protista) και των Προκαρυωτών (Prokaryotae) ή αλλιώς Μονήρων (Monera).

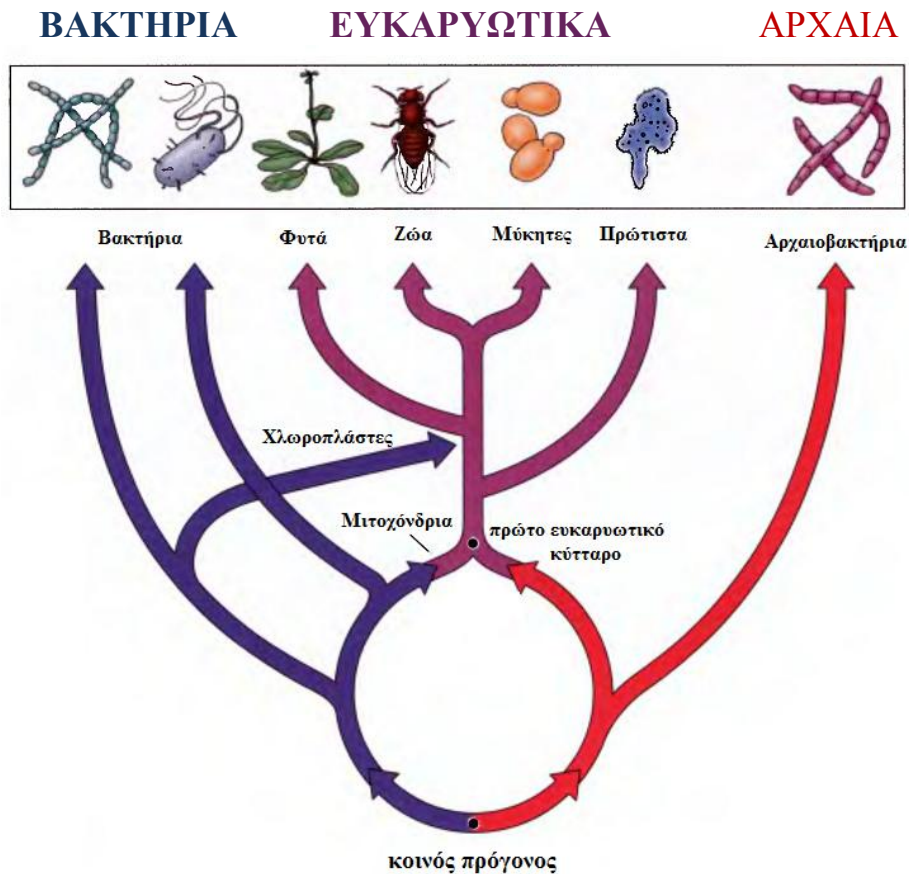
Το 1978, ο Αμερικανός βιολόγος **Carl R. Woese**, ακολουθώντας το σκεπτικό ότι σε όλα τα κύτταρα υπάρχουν **ριβοσώματα**, σύγκρινε την αλληλουχία του 16S ριβοσωμικού RNA διαφόρων κυττάρων και αποκάλυψε την ύπαρξη ενός ακόμα τύπου προκαρυωτικού κυττάρου, που το ονόμασε **Αρχαία**. Έτσι, πρότεινε την ταξινόμηση των ζωντανών

οργανισμών, ανάλογα με τον κυτταρικό τους τύπο, σε τρεις ‘‘Επικράτειες’’ (Domains), τα **Βακτήρια**, τα **Ευκαρυωτικά** και τα **Αρχαία**. Κάθε Επικράτεια αποτελείται από επιμέρους Βασίλεια. Στην Επικράτεια Ευκαρυωτικά (Domain Eukarya) ανήκουν το Βασίλειο των Ζώων, των Φυτών, των Μυκήτων και των Πρωτίστων. Στην Επικράτεια Βακτήρια ανήκουν όλοι οι παθογόνοι προκαρυωτικοί, καθώς και πολλοί μη παθογόνοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ζουν στο έδαφος και το νερό. Η Επικράτεια Αρχαία (Archaea) αποτελείται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα **αρχαία** ή **αρχαιοβακτήρια**, οι οποίοι απαντώνται σε ακραία περιβάλλοντα και διακρίνονται σε τρεις κύριες ομάδες.

- 1) Τα **μεθανογόνα**: αυστηρώς αναερόβια μικρόβια, που παράγουν μεθάνιο ( $\text{CH}_4$ ) από διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο, ως παραπροϊόν του μεταβολισμού τους.
- 2) Τα **αλόφιλα**: αρχαιοβακτήρια, που επιβιώνουν σε περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση αλάτων, όπως η Νεκρά Θάλασσα.
- 3) Τα **θερμόφιλα**: αρχαιοβακτήρια, που αναπτύσσονται σε θερμά νερά με υψηλή συγκέντρωση θειούχων ενώσεων, όπως οι θερμές πηγές.

Τα αρχαιοβακτήρια δεν προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο.

Μελέτες του ριβοσωμικού RNA (rRNA) απέδειξαν ότι τα αρχαία και τα βακτήρια προήλθαν από έναν κοινό πρόγονο. Επομένως, ένα πολύ πρώιμο γεγονός κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ήταν η διαφοροποίηση ενός κοινού προγόνου προς δύο εξελικτικές γραμμές, που οδήγησαν στη δημιουργία των αρχαίων και των βακτηρίων. Σύμφωνα με τη θεωρία της συμβίωσης, τα οργανίδια του ευκαρυωτικού κυττάρου (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες) αποτελούν εξέλιξη των προκαρυωτικών κυττάρων, τα οποία ζούσαν στο εσωτερικό των προγόνων των ευκαρυωτών. Έτσι, θεωρείται ότι ένα **αερόβιο βακτήριο** εισήλθε στο κυτταρόπλασμα ενός πρωτόγονου ευκαρυωτικού κυττάρου και του προμήθευε ενέργεια, εξασφαλίζοντας ως αντάλλαγμα την προστασία του από το εξωτερικό περιβάλλον, καθώς και τη μόνιμη παροχή θρεπτικών υλικών. Αυτό το αερόβιο βακτήριο ήταν ο πρόδρομος του **μιτοχονδρίου**. Αντίστοιχα, η συμβίωση ενός φωτοσυνθετικού βακτηρίου (κυανοβακτήριο) στο κυτταρόπλασμα ενός πρωτόγονου ευκαρυωτικού κυττάρου έδωσε την ικανότητα στο τελευταίο να καλύπτει τις ενεργειακές του ανάγκες μέσω φωτοσύνθεσης. Το φωτοσυνθετικό βακτήριο ήταν ο πρόδρομος του **χλωροπλάστη**.<sup>[2],[4],[7]</sup>



Σχήμα 1.8: Απεικόνιση της εξέλιξης των κυττάρων και της ταξινόμησής τους σε τρεις Επικράτειες.

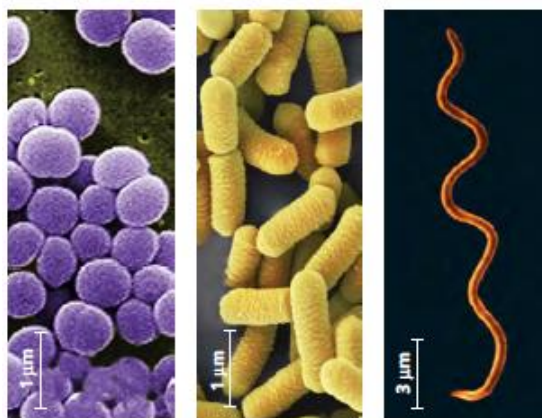
## 1.2.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι απλοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και εμφανίζουν ποικιλία μεγεθών και σχημάτων. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν διάμετρο από 0,2 έως 2,0μm και μήκος από 2 έως 8μm. Διακρίνονται σε τρία βασικά σχήματα:

- a) σφαιρικό
- b) ραβδόμορφο
- c) σπειροειδές

Ο κόκκος (coccus) έχει σφαιρικό ή ελλειψοειδές σχήμα, ο βάκιλλος (bacillus) έχει ραβδόμορφο σχήμα και το σπειροειδές έχει ελικοειδές ή καμπυλωτό σχήμα, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Υπάρχουν ορισμένα βακτήρια που έχουν αστερόμορφα ή κυβοειδή σχήματα. Τα βακτήρια διατάσσονται στο χώρο σε ζεύγη ή σε αλυσίδες ή σε διατάξεις χαρακτηριστικές για το γένος ή το είδος του βακτηρίου.

Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιέχει **πεπτιδογλυκάνη**, ένα δίκτυο πολυμερών αποτελούμενο από υδατάνθρακες που συνδέονται μεταξύ τους με πολυπεπίδια μικρού μήκους. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με απλή διχοτόμηση, που οδηγεί στη δημιουργία δύο ομοειδών θυγατρικών κυττάρων. Για τη διατροφή τους, τα βακτήρια χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις, προϊόντα ζωντανών ή νεκρών οργανισμών. Ορισμένα βακτήρια παράγουν την τροφή τους με φωτοσύνθεση, όπως τα κυανοβακτήρια, ενώ κάποια άλλα χρησιμοποιούν ανόργανες ενώσεις. Συνήθως μετακινούνται "κολυμπώντας", χρησιμοποιώντας εξωκυτάρια εξαρτήματα, που αποκαλούνται **μαστίγια**.<sup>[1],[2],[3],[5],[6]</sup>

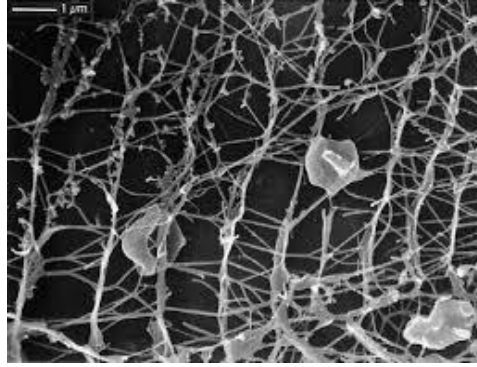


**Σχήμα 1.9:** Απεικόνιση των πιο συνηθισμένων σχημάτων των βακτηρίων. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι κόκκοι, με κίτρινο χρώμα οι βάκιλλοι, ενώ με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται μία σπειροχαίτη, ένα σπειροειδές βακτήριο.

## 1.2.2 Αρχαία

Όπως και τα βακτήρια, τα αρχαία είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί και η κύρια διαφορά τους από τα βακτήρια είναι ότι το κυτταρικό τους τοίχωμα δεν περιέχει πεπτιδογλυκάνη. Επίσης, το ριβοσωμικό RNA των αρχαίων έχει διαφορετική αλληλουχία από αυτό των βακτηρίων. Τα κύτταρα των Αρχαίων εμφανίζουν μορφολογία κόκκου, βακίλλου και έλικας, ωστόσο ορισμένα έχουν ιδιόμορφα σχήματα. Κάποια αρχαία διαιρούνται με απλή διχοτόμηση, ενώ άλλα με κατακερματισμό ή εκβλάστηση. Όσον αφορά την ανάπτυξή τους, υπάρχουν χημειοαυτότροφα, φωτοαυτότροφα και χημειοετερότροφα αρχαιοβακτήρια. Το χαρακτηριστικό στοιχείο των Αρχαίων είναι η επιβίωσή τους σε ακραία περιβάλλοντα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.<sup>[1],[2],[3]</sup>





**Σχήμα 1.10:** Απεικόνιση του αρχαιοβακτηρίου *Pyrodictium abyssi*, το οποίο αναπτύσσεται μέσα στα ιζήματα σε μεγάλα ωκεάνια βάθη και σε θερμοκρασία 110°C. Τα κύτταρα είναι δισκοειδούς σχήματος με δίκτυο σωληνίσκων.

### 1.2.3 Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και ζουν είτε ως αυτότροφοι είτε ως ετερότροφοι οργανισμοί. Πολλαπλασιάζονται είτε με αναπαραγωγή (αμφιγονική σύζευξη) είτε μονογονικά με απλή διχοτόμηση, εκβλάστηση ή σχιζογονία. Έχουν ποικίλα σχήματα και μετακινούνται με τη βοήθεια ψευδοποδίων, μαστιγίων ή βλεφαρίδων. Ζουν στο νερό και το έδαφος και από τα 20.000 είδη πρωτοζώων, λίγα είναι τα παθογόνα, όπως το πλασμώδιο, η ιστολυτική αμοιβάδα και το τοξόπλασμα.<sup>[1],[2],[3]</sup>



**Σχήμα 1.11:** Απεικόνιση του πρωτόζωου *Vorticella convallaria*, το οποίο προσκολλάται σε επιφάνειες μέσα στο νερό με τη βάση του "μίσχου" του. Ο σπειροειδής μίσχος επιτρέπει στο πρωτόζωο να λαμβάνει τα θρεπτικά υλικά από διαφορετικές περιοχές.



## 1.2.4 Μύκητες

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί με διακριτό πυρήνα, που περιέχει το γενετικό υλικό (DNA) και περιβάλλεται από ειδικό φάκελο, την πυρηνική μεμβράνη. Πολλαπλασιάζονται μονογονικά είτε με απλή διχοτόμηση είτε με εκβλάστηση. Οι πολυκύτταροι μύκητες, τα μανιτάρια, έχουν εμφάνιση παρόμοια με τα φυτά, όμως δεν φωτοσυνθέτουν. Οι πιο συνηθισμένοι μονοκυτταρικοί μύκητες είναι οι ζύμες και οι μούχλες. Όλοι οι μύκητες είναι χημειοετερότροφοι και προσλαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά με απορρόφηση. Οι λοιμώξεις που προκαλούν στον άνθρωπο οι παθογόνοι μύκητες ονομάζονται **μυκητιάσεις**.<sup>[1],[2],[3]</sup>



**Σχήμα 1.12:** Απεικόνιση ενός τυπικού μανιταριού που ανήκει στο Φύλο Βασιδομύκητες και ονομάζεται *Amanita muscaria*. Αναπτύσσεται σε στενή επαφή με ρίζες φυτών και παράγει χημικές ουσίες με πιθανή αντικαρκινική δράση.



**Σχήμα 1.13:** Απεικόνιση ενός Ζυγομύκητα με την ονομασία *Rhizopus stolonifer*, ένας μύκητας μαύρου χρώματος, ο οποίος αναπτύσσεται στο ψωμί, σχηματίζοντας υφές.

### 1.2.5 Φύκη

Τα φύκη είναι φωτοσυνθετικοί πολυκύτταροι και μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που εμφανίζουν ποικιλία σχημάτων. Βρίσκονται στο έδαφος, στο γλυκό και αλμυρό νερό. Πολλαπλασιάζονται είτε με αναπαραγωγή είτε με κυτταρική διαίρεση. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από κυτταρίνη και στο κυτταρόπλασμα διαθέτουν χλωροπλάστες, όπως και τα φυτά. Χρειάζονται φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα για την παραγωγή της τροφής τους. Τα φύκη είναι σημαντικός παράγοντας ενός οικοσυστήματος, καθώς μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε υδατάνθρακες, που είναι απαραίτητοι για τους χημειοτερότροφους οργανισμούς. Τα φύκη παράγουν οξυγόνο ως παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης και δεδομένου ότι το 75% του πλανήτη καλύπτεται από νερό, τα πλακτονικά φύκη παράγουν το 80% του συνολικού οξυγόνου.<sup>[1],[2]</sup>



α)



β)

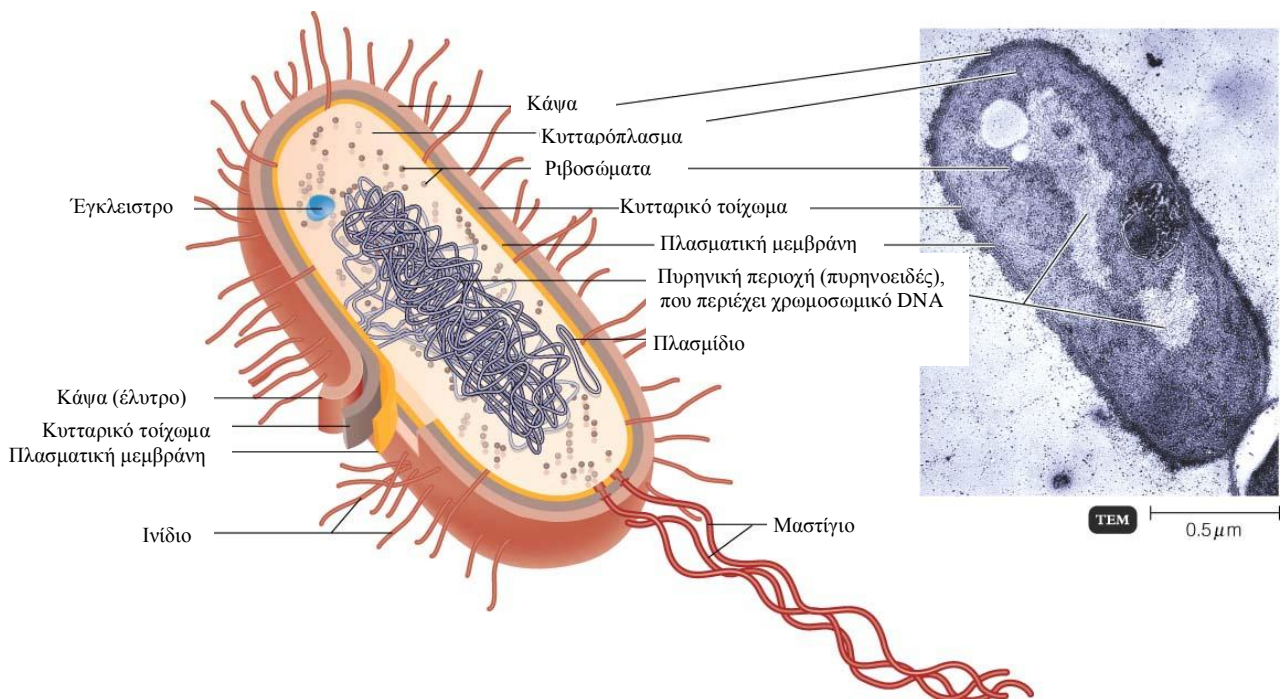
**Σχήμα 1.14: Πράσινα Φύκη. α) Φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο ενός μονοκύτταρου οργανισμού, που ανήκει στο Φύλο Chlorophyta και ονομάζεται *Micrasterias*. Διακρίνονται οι σπειροειδείς χλωροπλάστες με το πράσινο χρώμα. β) Φωτογραφία του green alga *Chara*, ένας πολυκύτταρος οργανισμός του Φύλου Chlorophyta, που μοιάζει με φυτό.**

### 1.3 Προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό κύτταρο

Όλα τα κύτταρα ταξινομούνται, ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους, σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά. Γενικά, τα προκαρυωτικά κύτταρα είναι απλούστερα στη δομή, μικρότερα σε μέγεθος από τα ευκαρυωτικά και δε διαθέτουν πυρήνα.

Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός προκαρυωτικού κυττάρου είναι τα εξής.

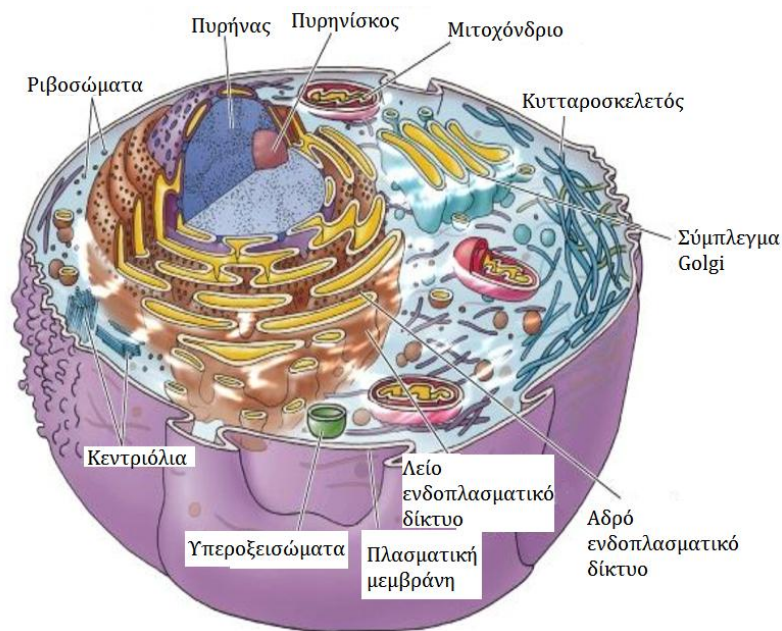
- 1) Το γενετικό υλικό (DNA) είναι απλό και οργανώνεται σε ένα ενιαίο, κυκλικό χρωμόσωμα, που δεν περιβάλλεται από μεμβράνη.
- 2) Το DNA δεν συνδέεται με ιστόνες (ειδικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες που απαντώνται στα ευκαρυωτικά κύτταρα), αλλά διαθέτουν άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA.
- 3) Δε διαθέτει οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη.
- 4) Περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο σε όλα τα βακτήρια περιέχει τον πολυσακχαρίτη πεπτιδογλυκάνη.
- 5) Διαιρείται συνήθως με διχοτόμηση.



Σχήμα 1.15: Τυπική δομή προκαρυωτικού κυττάρου. Στο σχήμα απεικονίζεται ένα βακτήριο.

Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός ευκαρυωτικού κυττάρου είναι τα ακόλουθα.

- 1) Το DNA είναι σύνθετο, γραμμικό και οργανώνεται σε πολλά χρωμοσώματα στον πυρήνα του κυττάρου, ο οποίος περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη (πυρηνικός φάκελος).
- 2) Το DNA συνδέεται με ιστόνες.
- 3) Διαθέτει αρκετά διαφορετικά οργανίδια, τα οποία περιβάλλονται από μεμβράνη και έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες.
- 4) Πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση, που περιλαμβάνει τη μίτωση, κατά την οποία τα χρωμοσώματα αντιγράφονται και τα νέα χρωμοσώματα σχηματίζουν καινούργιο πυρήνα.
- 5) Όταν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα, η δομή του είναι απλούστερη από αυτή του προκαρυωτικού κυττάρου και δε διαθέτει πεπτιδογλυκάνη.



**Σχήμα 1.16:** Τυπική δομή ζωϊκού ευκαρυωτικού κυττάρου.





Σχήμα 1.17: Τυπική δομή φυτικού ευκαρυωτικού κυττάρου.

Να σημειωθεί ότι τόσο το προκαρυωτικό όσο και το ευκαρυωτικό κύτταρο διαθέτουν **ριβοσώματα**, οργανίδια στα οποία γίνεται η πρωτεϊνوسύνθεση και το κυτταρόπλασμα περιβάλλεται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, την **κυτταροπλασματική μεμβράνη**.<sup>[1],[2],[4]</sup>

## 1.4 Χρώση Gram

Η **χρώση Gram** αναπτύχθηκε το 1884 από το Δανό βακτηριολόγο **Hans Christian Gram**. Με τη χρώση Gram τα βακτήρια ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: Τα gram-θετικά και τα gram-αρνητικά βακτήρια.

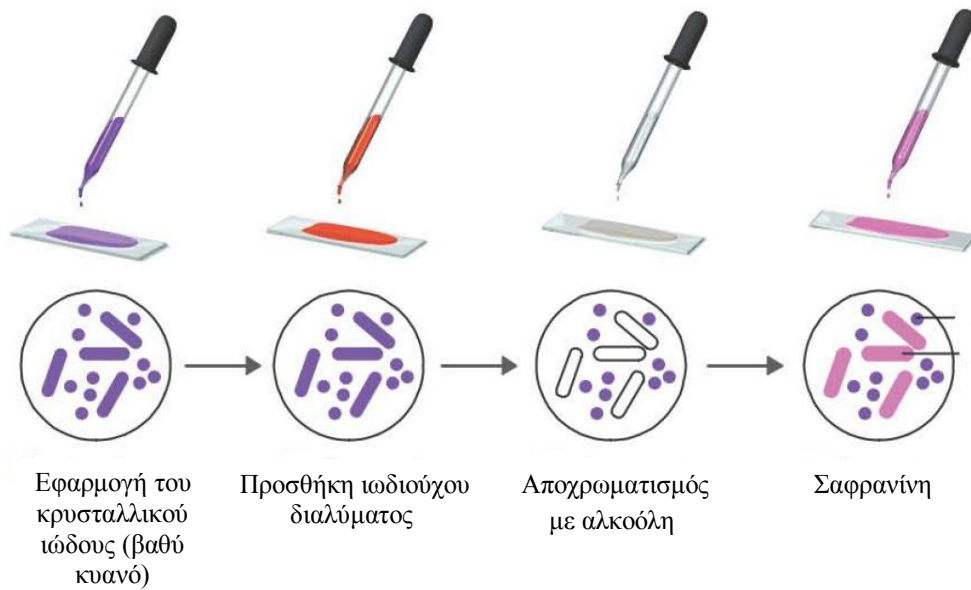
Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διαφορετική χημική σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων, με αποτέλεσμα το κάθε είδος βακτηρίου να χρωματισθεί διαφορετικά. Έτσι, στο τελικό στάδιο της διαδικασίας χρώσης, τα βακτήρια που έχουν ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης αποκτούν μία ιώδης απόχρωση και ονομάζονται gram-θετικά, ενώ εκείνα που έχουν ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, καθώς και ένα

στρώμα λιποπολυσακχαριτών αποκτούν μία ρόδινη απόχρωση και ονομάζονται gram-αρνητικά βακτήρια.

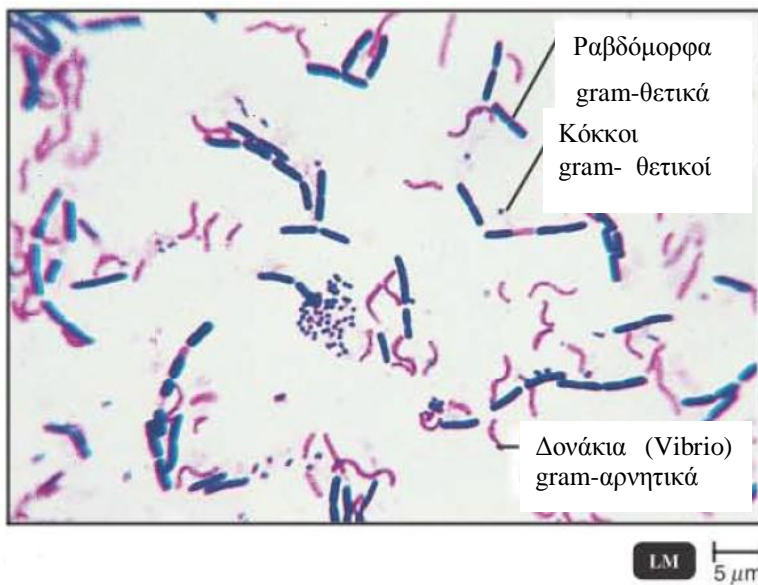
Τα στάδια της χρώσης Gram είναι τα ακόλουθα.

- 1) Το δείγμα των βακτηρίων καλύπτεται με μία βασική ιώδη χρωστική, συνήθως κρυσταλλικό ιώδες, το οποίο βάφει όλα τα κύτταρα με ένα βαθύ κυανό χρώμα. Το κρυσταλλικό ιώδες είναι η **κύρια χρωστική**.
- 2) Μετά από επεξεργασία με την κύρια χρωστική για 1 λεπτό, η περίσσεια της χρώσης απομακρύνεται με νερό και το δείγμα επεξεργάζεται με διάλυμα ιωδίου για 3 λεπτά. Το ιώδιο έχει το ρόλο του σταθεροποιητή και σχηματίζει μία σύμπλοκη ένωση με τη χρωστική στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Όλα τα βακτήρια εμφανίζονται ιώδη ή σκούρα ερυθρά.
- 3) Το δείγμα ξεπλένεται με αλκοόλη ή διάλυμα αλκοόλης με ακετόνη και στη συνέχεια με νερό. Μετά την έκπλυση, ορισμένα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν το ιώδες χρώμα, ενώ κάποια άλλα αποχρωματίζονται.
- 4) Αφού ξεπλυθεί η αλκοόλη, προστίθεται στο δείγμα μία βασική κόκκινη χρωστική, η **σαφρανίνη**. Το δείγμα ξεπλένεται, αφήνεται να στεγνώσει και εξετάζεται στο μικροσκόπιο.

Τα βακτήρια που διατηρούν το ιώδες χρώμα, στο στάδιο μετά την έκπλυση με αλκοόλη, ονομάζονται gram-θετικά και εκείνα που αποχρωματίζονται ονομάζονται gram-αρνητικά βακτήρια. Τα gram-θετικά βακτήρια διατηρούν το ιώδες χρώμα, διότι το σύμπλοκο του ιωδίου με την κύρια χρωστική δεν μπορεί να εξέλθει από το κύτταρο, λόγω της **πεπτιδογλυκάνης**, που δρα ως φυσικός φραγμός. Τα gram-αρνητικά βακτήρια αποχρωματίζονται, διότι η αλκοόλη αναδιατάσσει το στρώμα λιποπολυσακχαριτών και το σύμπλοκο απομακρύνεται εύκολα μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Η χρωστική σαφρανίνη χρωματίζει τα άχρωμα gram-αρνητικά βακτήρια ροζ, επειδή αυτά δεν είναι ορατά στο μικροσκόπιο. Ωστόσο, η σαφρανίνη δεν επηρεάζει το ιώδες χρώμα των gram-θετικών βακτηρίων.<sup>[2],[3]</sup>



α)



β)

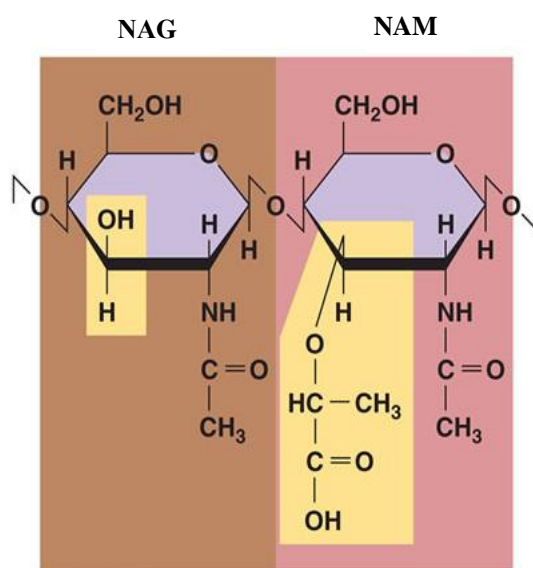
Σχήμα 1.18: Χρώση Gram. α) Στάδια χρώσης. β) Απεικόνιση των βακτηρίων βαμμένων με χρώση Gram. Τα ραβδόμορφα και οι κόκκοι έχουν ιώδες χρώμα, ενώ τα δονάκια (Vibrio) είναι ρόδινα.

## 1.5 Κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων

Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων είναι μία σύνθετη, ανθεκτική και ημισυμπαγής δομή, που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και προστατεύει το κυτταρόπλασμα από τις μεταβολές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Αποτελείται από πολυσακχαρίτες και πεπτίδια. Είναι πορώδες, με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό από ποικιλία μορίων. Η σημαντικότερη λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος είναι ότι αποτρέπει τη ρήξη του βακτηριακού κυττάρου, λόγω της διαφοράς πίεσης του εσωτερικού του κυττάρου και του περιβάλλοντος. Επίσης, διατηρεί το σχήμα του κυττάρου και αποτελεί σταθερό σημείο πρόσδεσης των μαστιγίων.

Το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα περιέχει **πεπτιδογλυκάνη** (ή μουρεΐνη), ένα δίκτυο πολυμερών αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες συνδεδεμένους με πολυπεπτίδια μικρού μήκους. Αυτή η μοριακή κατασκευή περικλείει ολόκληρο το βακτηριακό κύτταρο και χρησιμεύει για να συγκρατεί μόρια που φέρει στην επιφάνειά του. Να σημειωθεί ότι το κυτταρικό τοίχωμα των αρχαιοβακτηρίων περιέχει μία μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών, αλλά δεν περιέχει πεπτιδογλυκάνη. Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, επίσης, δεν περιέχει πεπτιδογλυκάνη.

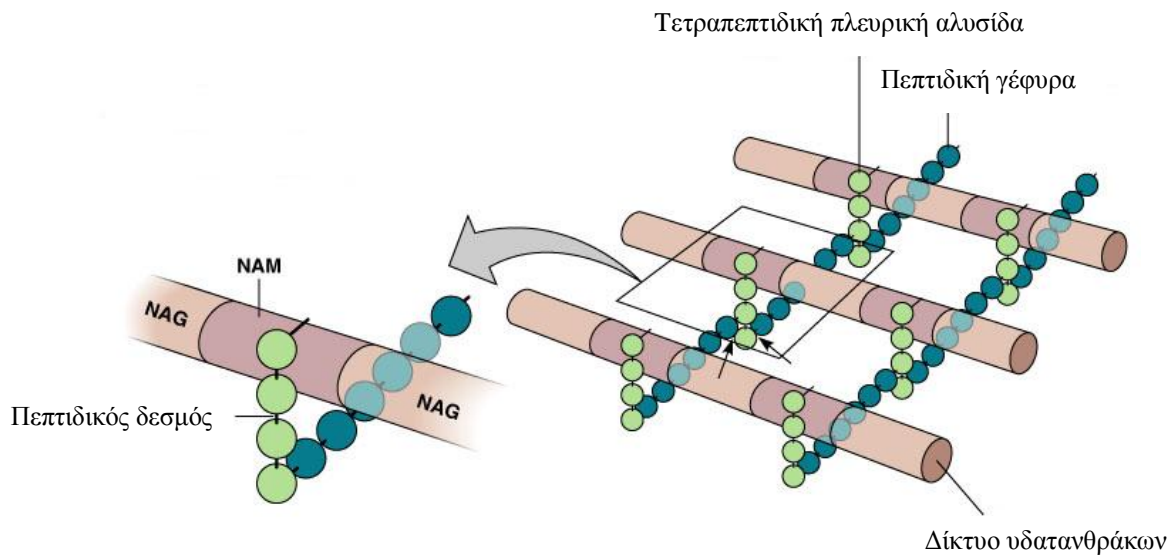
Κάθε μόριο δισακχαρίτη της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από τους μονοσακχαρίτες **N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη (NAG)** και **N-ακέτυλο-μουραμικό οξύ (NAM)**, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με  $\beta$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.



Σχήμα 1.19: Η N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη (NAG) και το N-ακέτυλο-μουραμικό οξύ (NAM) συνδέονται με  $\beta$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι κίτρινες περιοχές δείχνουν τις διαφορές των δύο μορίων.

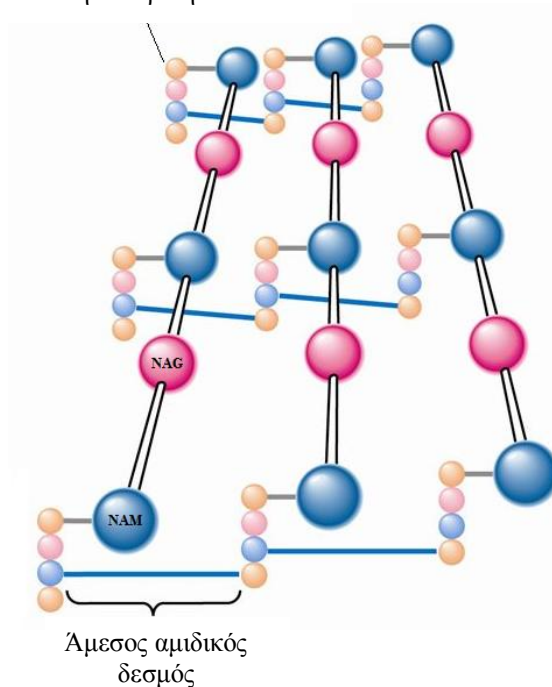


Τα συστατικά της πεπτιδογλυκάνης συνδέονται απ'ευθείας στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι δισακχαρίτες συνδέονται μεταξύ τους μέσω των μονομερών τους NAG και NAM, σχηματίζοντας ένα δίκτυο υδατανθράκων, που αποτελείται από σειρές 10 έως 65 σακχάρων. Οι γειτονικές σειρές συνδέονται με πολυπεπίδια. Τα πολυπεπίδια είναι τετραπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες, που αποτελούνται από εναλασσόμενα D και L αμινοξέα. Τα 4 αμινοξέα, που είναι συνήθως L-αλανίνη, D-γλουταμινικό, L-λυσίνη και D-αλανίνη προσδένονται με το NAM. Στα gram-αρνητικά βακτήρια, οι παράλληλες τετραπεπτιδικές αλυσίδες συνδέονται άμεσα η μία με την άλλη, ενώ στα gram-θετικά βακτήρια οι διασυνδέσεις γίνονται με πεπτιδικές γεφυρώσεις από πρόσθετα αμινοξέα, οι τύποι και οι αριθμοί των οποίων ποικίλλουν με το είδος του gram-θετικού βακτηρίου.



Σχήμα 1.20: Δομή πεπτιδογλυκάνης στα gram-θετικά βακτήρια

Τετραπεπτιδική πλευρική αλυσίδα



Σχήμα 1.21: Δομή πεπτιδογλυκάνης στα gram-αρνητικά βακτήρια

### 1.5.1 Κυτταρικό τοίχωμα gram-θετικών βακτηρίων

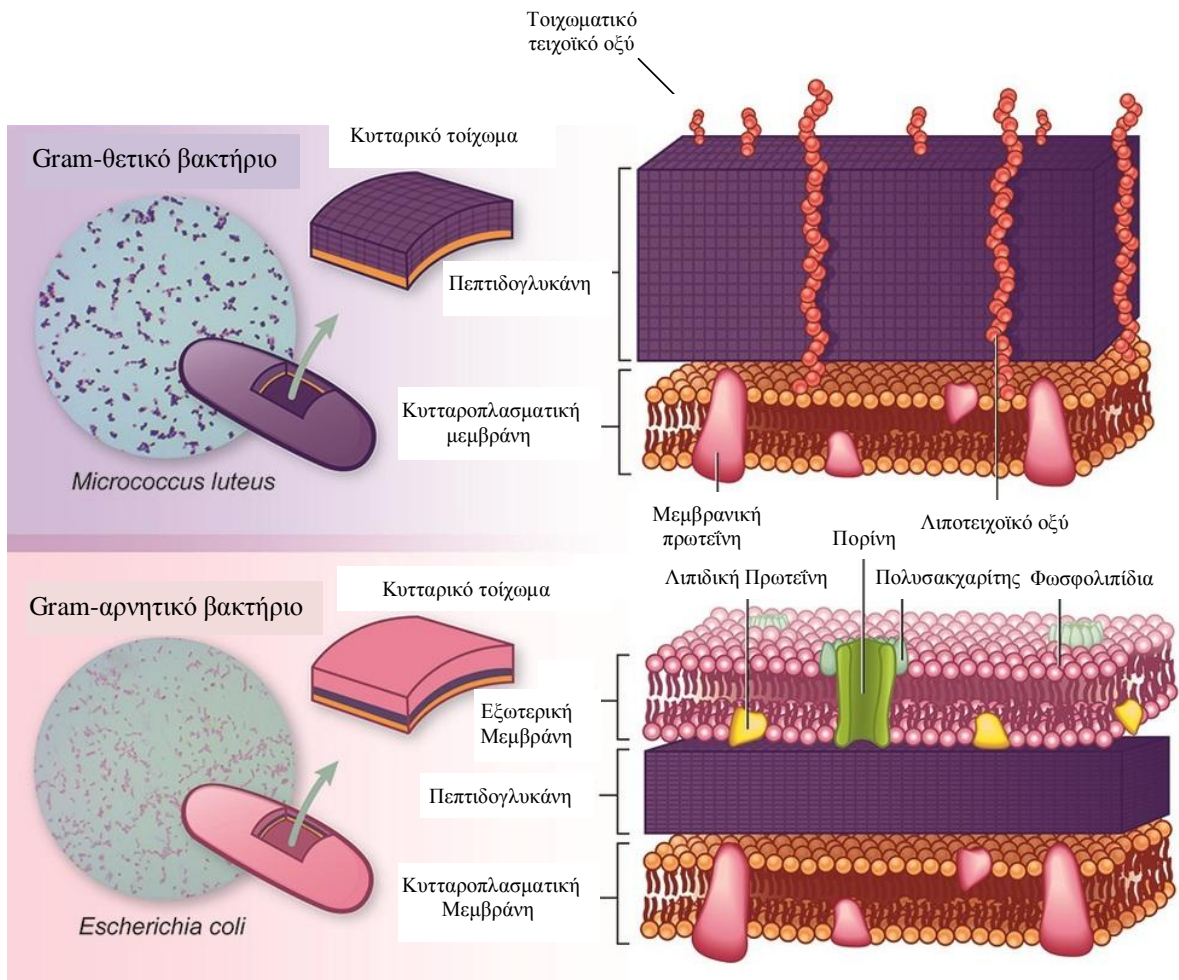
Το κυτταρικό τοίχωμα των gram-θετικών βακτηρίων αποτελείται από πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης, διαμορφώνοντας μία παχιά και άκαμπτη δομή. Περιέχει, επίσης, όξινους πολυσακχαρίτες που ονομάζονται **τειχοϊκά οξέα**. Τα τειχοϊκά οξέα αποτελούνται από μία φωσφορική γλυκερόλη ή μία φωσφορική ριβιτόλη. Οι πολυαλκοόλες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοεστερικούς δεσμούς και συνήθως συνδέονται μαζί τους άλλα σάκχαρα ή D-αλανίνη. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου, ρυθμίζουν τη διέλευση κατιόντων μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Τα τειχοϊκά οξέα που συνδέονται με το στρώμα πεπτιδογλυκάνης ονομάζονται **τοιχωματικά τειχοϊκά οξέα**.

Ορισμένα τειχοϊκά οξέα συνδέονται με λιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ονομάζονται **λιποτειχοϊκά οξέα**.

## 1.5.2 Κυτταρικό τοίχωμα gram-αρνητικών βακτηρίων

Το κυτταρικό τοίχωμα των gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από μία εξωτερική μεμβράνη και ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Η πεπτιδογλυκάνη συνδέεται με **λιποπρωτεΐνες** της εξωτερικής μεμβράνης και βρίσκεται στον **περιπλασματικό χώρο**, ένα κολλοειδές ρευστό μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ο περιπλασματικός χώρος περιέχει υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ενζύμων και πρωτεϊνών μεταφοράς. Τα τειχοϊκά οξέα απουσιάζουν από το κυτταρικό τοίχωμα των gram-αρνητικών βακτηρίων.

Η **εξωτερική μεμβράνη** λειτουργεί ως ηθμός των χημικών ενώσεων, εμποδίζοντας την είσοδο σε ορισμένα αντιβιοτικά (πενικιλίνη), σε πεπτικά ένζυμα, σε απορρυπαντικά, σε βαρέα μέταλλα, σε χολικά άλατα και σε ορισμένες χρωστικές, ενώ παράλληλα επιτρέπει τη διέλευση θρεπτικών ουσιών. Αποτελείται από **λιποπολυσακχαρίτες (LPSs)**, λιποπρωτεΐνες, μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την **πορίνη**, η οποία σχηματίζει πόρους, μέσω των οποίων διαχέονται μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως νουκλεοτίδια, αμινοξέα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία. Οι λιποπολυσακχαρίτες δε βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και επειδή είναι τοξικοί για τα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο, ονομάζονται **ενδοτοξίνες**. Η τοξικότητα των LPSs οφείλεται στο υδρόφοβο τμήμα τους, που αποτελείται από τα **A-λιπίδια**. Στο υδρόφιλο τμήμα των LPSs βρίσκονται οι **πολυσακχαρίτες O**, οι οποίοι λειτουργούν ως αντιγόνα και είναι χρήσιμοι για τη διάκριση των gram-αρνητικών βακτηρίων.<sup>[1],[2],[3],[5],[6]</sup>



Σχήμα 1.22: Δομή του κυτταρικού τοιχώματος ενός Gram-θετικού και ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου. Στο σχήμα απεικονίζεται η μικρογραφία των βακτηρίων βαμμένων κατά gram.

## 1.6 Καλλιέργειες μικροοργανισμών

Με τον όρο **μικροβιακή ανάπτυξη**, εννοείται η αύξηση του αριθμού των κυττάρων και όχι το μέγεθός τους. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται, αυξάνονται σε αριθμό και δημιουργούν αποικίες, που κυμαίνονται σε αριθμό κυττάρων από εκατοντάδες χιλιάδες μέχρι και δισεκατομμύρια. Οι αποικίες αυτές είναι ορατές με γυμνό μάτι.

Με την ανάπτυξη τεχνικών για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε καθαρή μορφή στο εργαστήριο, έγινε δυνατός ο έλεγχος της ανάπτυξης μικροβίων που προκαλούν λοιμώξεις και αλλοίωση των τροφίμων. Οι τεχνικές καλλιέργειας βασίστηκαν στις απαιτήσεις κάθε μικροβίου για ανάπτυξη υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, οσμωτικής πίεσης (φυσικές απαιτήσεις), καθώς και θρεπτικών συστατικών, που χρησιμεύουν ως πηγές άνθρακα, αζώτου, θείου, φωσφόρου, ιχνοστοιχείων και οξυγόνου (χημικές απαιτήσεις), απαραίτητων για την επιβίωσή τους.

### 1.6.1 Υλικά καλλιέργειας

Ένα θρεπτικό υλικό που προορίζεται για την εργαστηριακή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού ονομάζεται **καλλιεργητικό υλικό**. Η εισαγωγή μικροβίων σε ένα υλικό καλλιέργειας καλείται **ενοφθαλμισμός**. Τα μικρόβια που αναπτύσσονται σε ένα θρεπτικό υλικό ονομάζονται **καλλιέργημα** του μικροβίου. Το θρεπτικό υλικό πρέπει να είναι **αποστειρωμένο**, δηλαδή απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς, ώστε η τελική καλλιέργεια να είναι **αμιγής**.

Τα θρεπτικά υλικά, ως προς τη φυσική τους κατάσταση, είναι υγρά και στερεά. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται στην επιφάνεια των στερεών θρεπτικών υλικών, σχηματίζοντας αποικίες.

Για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υλικών, χρησιμοποιείται ένας στερεοποιητικός παράγοντας, το **άγαρ**, που προστίθεται στο υγρό θρεπτικό υλικό. Το άγαρ, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε από τα φύκη του γένους *Gelidium*, και χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μικροβιολογία, χωρίς να έχει βρεθεί ακόμα ικανοποιητικό υποκατάστατό του. Λίγα μικρόβια διασπούν το άγαρ και επομένως δεν καταναλώνεται κατά την καλλιέργεια. Το άγαρ υγροποιείται στους 100°C και παραμένει υγρό σε θερμοκρασίες μέχρι 40°C, ενώ στερεοποιείται σε θερμοκρασίες κάτω από 40°C. Διατηρείται σε υδατόλουτρα στους 50°C, θερμοκρασία, στην οποία δεν επηρεάζει τα περισσότερα βακτήρια. Μόλις στερεοποιηθεί, μπορεί να επωαστεί σε θερμοκρασίες μέχρι και 100°C χωρίς να τακεί, μία πολύ χρήσιμη ιδιότητα για την καλλιέργεια θερμοφίλων βακτηρίων. Τα καλλιεργητικά υλικά με άγαρ, αφού προηγουμένως τοποθετηθούν σε κλίβανο αποστείρωσης, τοποθετούνται σε στείρα υάλινα ή πλαστικά τρυβλία Petri, όπου και παραμένουν σε θάλαμο νηματικής ροής (θάλαμος hood) μέχρι να σταθεροποιηθεί το άγαρ.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες μικροοργανισμών κατατάσσονται, ως προς τη σύστασή τους, σε δύο κύριες κατηγορίες.

- 1) Τα χημικώς καθορισμένα (συνθετικά)
- 2) Τα χημικώς μη καθορισμένα (φυσικά)

Συνθετικά είναι τα θρεπτικά υλικά, των οποίων η χημική σύσταση είναι πλήρως καθορισμένη, όπως τα διαλύματα αλάτων, βιταμινών και σακχάρων. Φυσικά αποκαλούνται τα θρεπτικά υλικά που παραλαμβάνονται από διάφορες φυσικές πηγές και

επομένως η σύστασή τους δεν είναι πλήρως γνωστή, όπως εκχυλίσματα φυτών ή κρέατος, γάλα, αίμα ζώων.

Ωστόσο, υπάρχουν θρεπτικά υλικά που χαρακτηρίζονται ως ημι-συνθετικά. Τέτοια είναι συνθετικά υλικά, στα οποία έχει προστεθεί, συνήθως σε μικρές ποσότητες, μία φυσική ουσία, όπως πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) ως πηγή αυξητικών παραγόντων.

## 1.6.2 Τεχνικές καλλιέργειας μικροοργανισμών

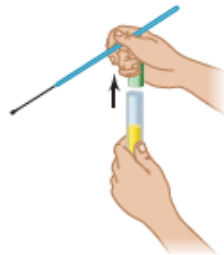
Για την εργαστηριακή μελέτη ενός μικροοργανισμού ή για την απομόνωσή του από μία μικτή υγρή καλλιέργεια, απαιτείται η δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας και ο έλεγχος της καθαρότητάς της στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού. Η δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας επιτυγχάνεται με τη μέθοδο του ενοφθαλμισμού σε τρυβλία Petri. Η επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου επιστρώνεται με τον μικροοργανισμό, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο **βρόχο** ή **βελόνα ενοφθαλμισμού** (αποκαλείται επίσης μικροβιολογικός κρίκος ή θηλειά). Το στερεό θρεπτικό υλικό ακινητοποιεί τα μικροβιακά κύτταρα στην επιφάνειά του και τα επιτρέπει να αυξηθούν και να σχηματίσουν αποικίες, οι οποίες είναι ορατές με γυμνό μάτι. Επομένως, ο μικροβιολόγος μπορεί να ελέγξει οπτικά την καθαρότητά τους, παρατηρώντας το σχήμα, το μέγεθος, καθώς και το χρώμα των αποικιών. Τρυβλία με πάνω από έναν τύπο αποικίας αποτελούν ένδειξη ότι η καλλιέργεια δεν είναι αμιγής, αλλά έχει μολυνθεί με ένα ή περισσότερα διαφορετικά είδη μικροοργανισμού. Τα τρυβλία Petri έχουν χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο καθαρότητας μιας καλλιέργειας εδώ και τουλάχιστον 100 χρόνια.

Ένα στερεό θρεπτικό μέσο υπόκειται σε ενοφθαλμισμό από προηγούμενη αμιγή καλλιέργεια, προκειμένου να αρχίσει και πάλι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η επιτυχία της επαναδημιουργίας μιας αμιγούς καλλιέργειας επιτυγχάνεται με τη χρήση της **ασηπτικής τεχνικής**. Ασηπτική τεχνική είναι ένα σύνολο διεργασιών που χρησιμοποιούνται για την αποφυγή μόλυνσης κατά τον χειρισμό των καλλιεργειών και των θρεπτικών μέσων. Συνηθέστερο πρόβλημα είναι η μόλυνση με τον αέρα, διότι ο αέρας περιέχει πάντα σωματίδια σκόνης, τα οποία συνήθως φιλοξενούν ομάδες μικροοργανισμών.

Η μεταφορά και ο επανανοφθαλισμός μιας απομονωμένης αποικίας με τη μέθοδο της επίστρωσης, χρησιμοποιώντας παράλληλα την ασηπτική τεχνική, είναι η σημαντικότερη μέθοδος που διαθέτουμε για τη δημιουργία αμιγών καλλιεργειών.<sup>[1],[2],[5]</sup>



Ο βρόχος ενοφθαλισμού αποστειρώνεται σε φλόγα λύχνου Bunsen και ψύχεται για λίγο στον αέρα.



Αφαιρείται το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα.

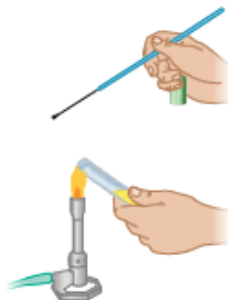


Αποστειρώνεται το άκρο του σωλήνα στη φλόγα.

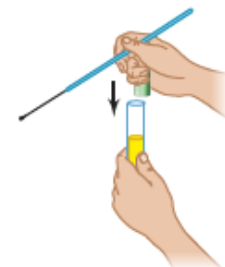


Το δείγμα μεταφέρεται στον αποστειρωμένο βρόχο.

Μόνο το αποστειρωμένο τμήμα του βρόχου εισέρχεται στο σωλήνα.



Ο σωλήνας αποστειρώνεται πάλι στη φλόγα.



Επανατοποθετούμε το πώμα στο σωλήνα. Ο βρόχος ενοφθαλισμού αποστειρώνεται πάλι στη φλόγα.

**Σχήμα 1.23: Απεικόνιση ασηπτικής τεχνικής.**



**Σχήμα 1.24: Μέθοδος επίστρωσης μικροοργανισμών σε στερεά θρεπτικά μέσα για τη δημιουργία αμιγών καλλιιεργειών.**

## 1.7 Καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων

Κατά τον κύκλο της κυτταρικής διαίρεσης, όλα τα δομικά στοιχεία του βακτηριακού κυττάρου διπλασιάζονται. Το διάστημα, κατά το οποίο σχηματίζονται δύο κύτταρα από έναν πρόγονο ονομάζεται **γενεά**. Ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστούν τα κύτταρα ενός βακτηριακού πληθυσμού ονομάζεται **χρόνος γενεάς**. Ως συνώνυμος όρος χρησιμοποιείται ο **χρόνος διπλασιασμού**. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων αναφέρεται ως **εκθετική** (ή **λογαριθμική**) αύξηση και ουσιαστικά είναι μία γεωμετρική πρόοδος με λόγο 2.

$$2^0 \text{ -----} \rightarrow 2^1 \text{ -----} \rightarrow 2^2 \text{ -----} \rightarrow 2^3 \text{ -----} \rightarrow \dots \rightarrow 2^v$$

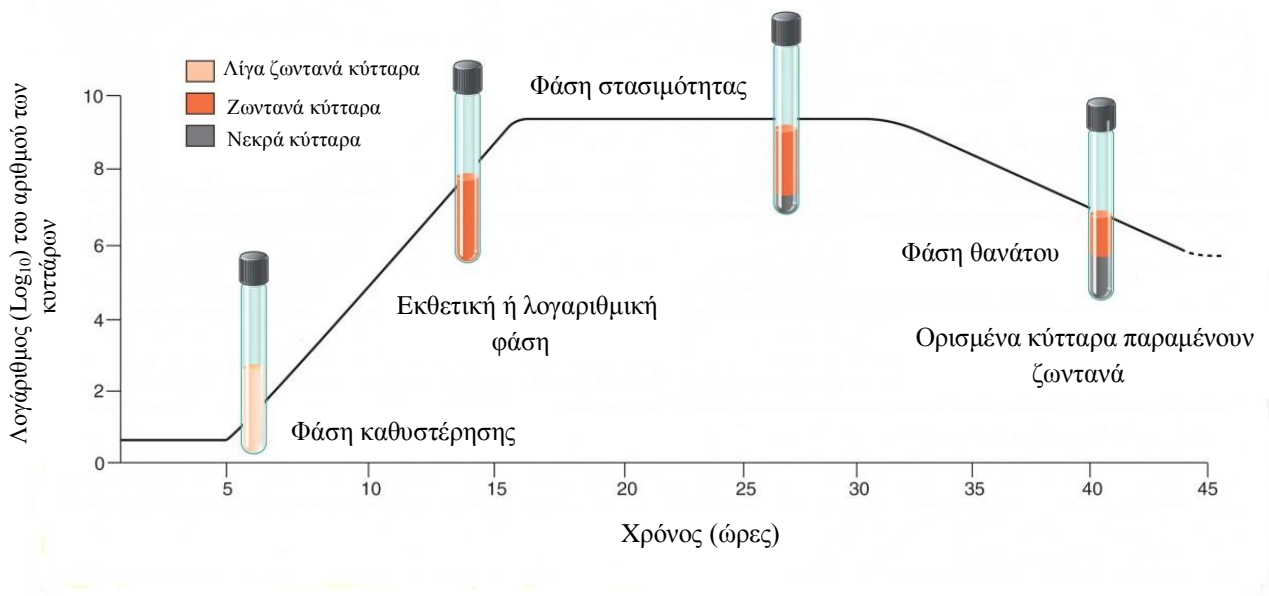
Λόγω αυτής της γεωμετρικής προόδου, υπάρχει άμεση αντιστοιχία ανάμεσα στον αρχικό αριθμό των κυττάρων μιας καλλιέργειας και στον αριθμό των κυττάρων μετά από ένα χρονικό διάστημα εκθετικής αύξησης, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$N = N_0 2^v$$



, όπου  $N$  είναι ο τελικός αριθμός κυττάρων,  $N_0$  είναι ο αρχικός αριθμός κυττάρων και  $n$  ο αριθμός γενεών που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της εκθετικής αύξησης. Επειδή ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων αυξάνεται εκθετικά στη μονάδα του χρόνου, με αποτέλεσμα μετά από αρκετές γενιές ένα μεμονωμένο αρχικό κύτταρο να δίνει γένεση σε αριθμό κυττάρων με πολλά μηδενικά, είναι δύσκολο να αποδοθούν αυτές οι μεταβολές υπό αριθμητική κλίμακα. Για παράδειγμα, το βακτήριο *E.coli* όταν αναπτυχθεί υπό ευνοϊκές συνθήκες, δίνει γένεση μετά από 20 γενιές σε περισσότερα από 1 εκατομμύριο κύτταρα και σε λιγότερο από 7 ώρες. Σε 24 ώρες ο πληθυσμός θα ήταν ένας αριθμός με 21 μηδενικά. Για το λόγο αυτό, ο ρυθμός της βακτηριακής αύξησης αποδίδεται γραφικά υπό λογαριθμική κλίμακα.

Όταν μικρός αριθμός βακτηρίων ενοφθαλμιστεί σε υγρό θρεπτικό υλικό και μετρηθεί ο αναπτυσσόμενος πληθυσμός ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σχεδιάζεται μία **καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης**, που παρουσιάζει την κυτταρική αύξηση συναρτήσει του χρόνου, δηλαδή το ρυθμό αύξησης. Η καμπύλη ανάπτυξης έχει 4 φάσεις: τη φάση καθυστέρησης, την εκθετική φάση, τη φάση στασιμότητας και τη φάση θανάτου.



Σχήμα 1.25: Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων.

Κατά τη **φάση καθυστέρησης**, ο αριθμός των κυττάρων δεν μεταβάλλεται ή μεταβάλλεται ελάχιστα, διότι τα κύτταρα προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες. Η περίοδος αυτή μπορεί να διαρκέσει από 1 ώρα έως αρκετές ημέρες. Ο βακτηριακός πληθυσμός διέρχεται σε μία περίοδο έντονης μεταβολικής δραστηριότητας, κατά την οποία συντίθενται νέα ένζυμα και πρωτεΐνες. Ουσιαστικά, πρόκειται για το στάδιο προετοιμασίας πριν ξεκινήσει η κυτταρική διαίρεση.

Στην **εκθετική ή λογαριθμική φάση**, τα κύτταρα αρχίζουν να διαιρούνται και ο χρόνος γενεάς μειώνεται δραματικά. Η λογαριθμική απεικόνιση αυτής της φάσης είναι μία σχεδόν ευθεία γραμμή, όπως φαίνεται στο **σχήμα 1.25**, διότι ο χρόνος γενεάς παραμένει σταθερός. Τα κύτταρα φθάνουν στο μέγιστο μεταβολικό τους ρυθμό, ωστόσο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ακτινοβολία, τα **αντιμικροβιακά φάρμακα** και άλλους παράγοντες, οι οποίοι ασκούν τη μέγιστη επίδραση στα κύτταρα παρεμποδίζοντας τις μεταβολικές οδούς τους. Επίσης, τα κύτταρα μπορούν να υποστούν αλλαγές στο μέγεθος. Στο τέλος της φάσης γίνεται αναστολή της ανάπτυξής τους, λόγω εξάντλησης των αρχικών θρεπτικών υλικών.

Κατά τη **φάση στασιμότητας**, ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων επιβραδύνεται, λόγω έλλειψης θρεπτικών υλικών, μείωσης του ποσοστού οξυγόνου, επιβλαβείς αλλαγές στο pH και συσσώρευση προϊόντων αποβολής των κυττάρων. Παρατηρείται, επομένως, ένα μικρό ποσοστό νεκρών κυττάρων. Στη φάση αυτή, δεν παρατηρείται καθαρή αύξηση ή μείωση του αριθμού των κυττάρων.

Στη **φάση θανάτου**, που ονομάζεται και **φάση λογαριθμικής πτώσης**, ο ρυθμός κυτταρικού θανάτου υπερβαίνει τον ρυθμό αύξησης. Πολλά βακτηριακά κύτταρα συχνά εκφυλίζονται κατά τη φάση θανάτου, που σημαίνει ότι αλλάζει η μορφολογία τους, με αποτέλεσμα να μην ταυτοποιούνται εύκολα. Η φάση θανάτου συνεχίζεται έως ότου παραμείνει ένα μικρό κλάσμα του πληθυσμού ή το συνολικό ποσοστό αποτελείται, πλέον, από νεκρά κύτταρα. Σε πολλές περιπτώσεις, ο θάνατος συνοδεύεται από λύση των κυττάρων (νέκρωση).<sup>[1],[2],[7]</sup>

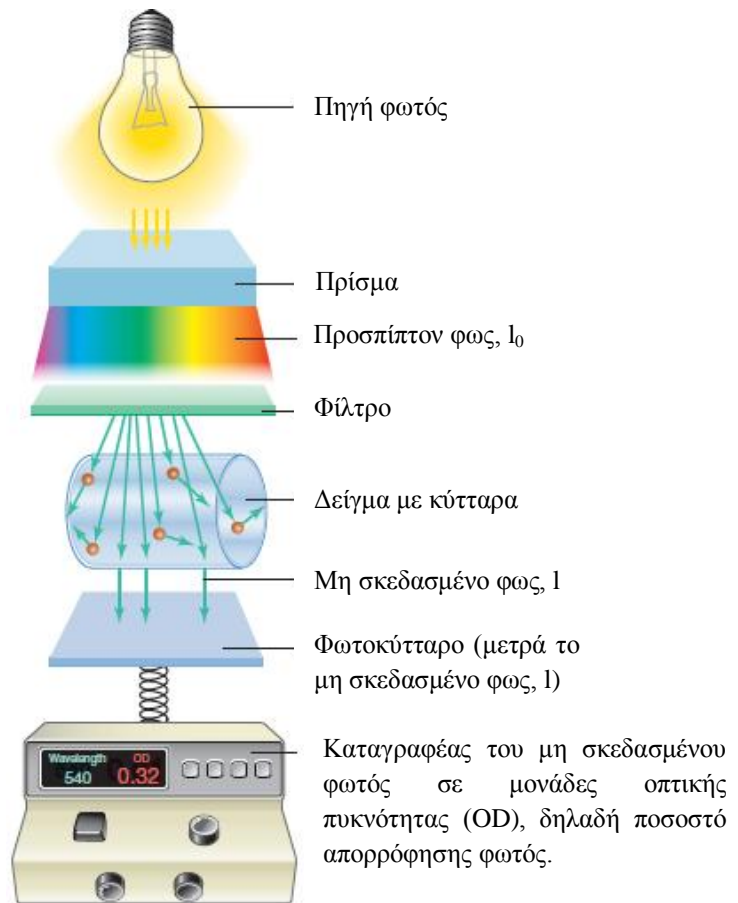
## 1.8 Έμμεση μέτρηση του βακτηριακού πληθυσμού: θολερότητα

Μια γρήγορη και χρήσιμη μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων είναι ο υπολογισμός της **θολερότητας**. Ένα εναιώρημα κυττάρων φαίνεται θολό στο μάτι, διότι τα κύτταρα σκεδάζουν το φως που διέρχεται από αυτό. Όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν τόσο περισσότερο φως σκεδάζεται και τόσο θολότερο φαίνεται το εναιώρημα.

Το όργανο που χρησιμοποιείται για να μετρήσει τη θολερότητα είναι ένα **φωτόμετρο** ή **χρωματόμετρο**. Στο φασματοφωτόμετρο, διοχετεύεται φως μέσα από ένα εναιώρημα κυττάρων και ένας φωτοευαίσθητος ανιχνευτής (φωτοκύτταρο) ανιχνεύει την ποσότητα του φωτός που εξέρχεται χωρίς να σκεδαστεί. Το φασματοφωτόμετρο διαθέτει ένα πρίσμα ή ένα φράγμα περίθλασης για την παραγωγή δέσμης προσπίπτοντος φωτός με εύρος μηκών κύματος εξαιρετικά μικρό. Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται συνήθως για μετρήσεις θολερότητας στα βακτήρια είναι 540nm (πράσινο φως), 600nm (πορτοκαλί φως), 660nm (ερυθρό φως).

Η ένταση του φωτός που εξέρχεται από το εναιώρημα (μη σκεδασμένο φως) σε σχέση με την ένταση του φωτός που διοχετεύεται σε αυτό ονομάζεται **ποσοστό διέλευσης**. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης εκφράζονται σε **ποσοστό απορρόφησης φωτός** ή αλλιώς **μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD)**. Στους μονοκύτταρους οργανισμούς, οι μονάδες οπτικής πυκνότητας ή μονάδες OD είναι ανάλογες προς τον αριθμό των κυττάρων. Κατά συνέπεια, οι μετρήσεις θολερότητας χρησιμοποιούνται για τη γραφική απεικόνιση της μικροβιακής ανάπτυξης. Στην εκθετική φάση των κυττάρων, η γραφική παράσταση της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου είναι μία ευθεία γραμμή.

Τέλος, ο υπολογισμός της θολερότητας δεν εφαρμόζεται σε αραιά εναιωρήματα, διότι απαιτούνται περίπου 10 εκατομμύρια έως 100 εκατομμύρια κύτταρα ανά ml, προκειμένου ένα εναιώρημα να ανιχνευτεί από το φασματοφωτόμετρο.<sup>[1],[2],[8]</sup>



**Σχήμα 1.26: Υπολογισμός της θολερότητας μικροβιακών πληθυσμών.**

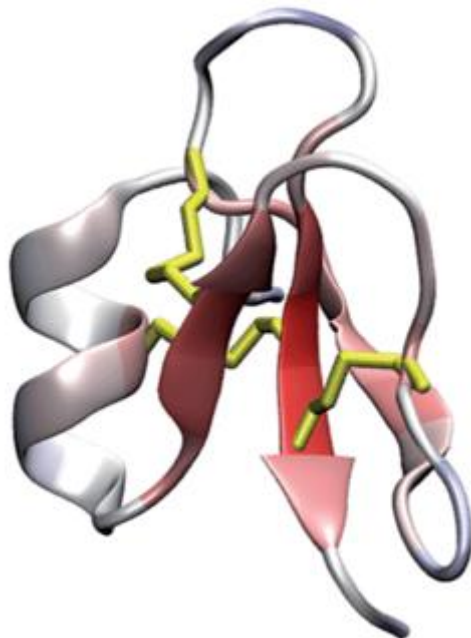
## 1.9 Βιβλιογραφία

- [1] Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker, <<ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ>>, Τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005.
- [2] Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, <<Εισαγωγή στη Μικροβιολογία>>, Τόμος 1, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, 2009.
- [3] Neil A. Campbell, Jane B. Reece, Lisa A. Curry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson, <<ΒΙΟΛΟΓΙΑ>>, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2011.
- [4] Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman, <<THE CELL-A Molecular Approach>>, Fourth Edition, ASM Press Washington D.C., Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts, 2007.
- [5] Γ. Αγγέλης, <<Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία>>, Εκδόσεις Α.Θ. Σταμούλης, Αθήνα 2007.
- [6] Αντωνιάδης Αντώνιος, Λεγάκης Ι. Νικόλαος-Στέφανος, Μαυρίδης Κ. Ανέστης, Μανιάτης Αντώνιος, Τσελέντης Ιωάννης, <<Ιατρική Μικροβιολογία>>, Τόμος Α', 3<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Αθήνα 2000.
- [7] Ι. Σαββαΐδης, <<ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ>>, ΓΕΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, Ιωάννινα 2007.
- [8] John M. Clark, Jr. & Robert L. Switzer, <<ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ>>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.



## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Αντιμικροβιακά και αντικαρκινικά κατιονικά πεπτίδια







## 2.1 Αντιβιοτικά

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα **αντιβιοτικά** είναι χημικές ουσίες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς με σκοπό την αναστολή της αύξησης ή τη θανάτωση άλλων μικροοργανισμών. Τα αντιβιοτικά που προκαλούν αναστολή της αύξησης των μικροοργανισμών ονομάζονται **μικροβιοστατικά**, ενώ αυτά που προκαλούν το θάνατο των μικροοργανισμών ονομάζονται **μικροβιοκτόνα**. Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού εναντίον του οποίου δρουν, διαχωρίζονται σε **βακτηριοκτόνα** ή **μυκητοκτόνα** και σε **βακτηριοστατικά** ή **μυκητοστατικά** αντίστοιχα.

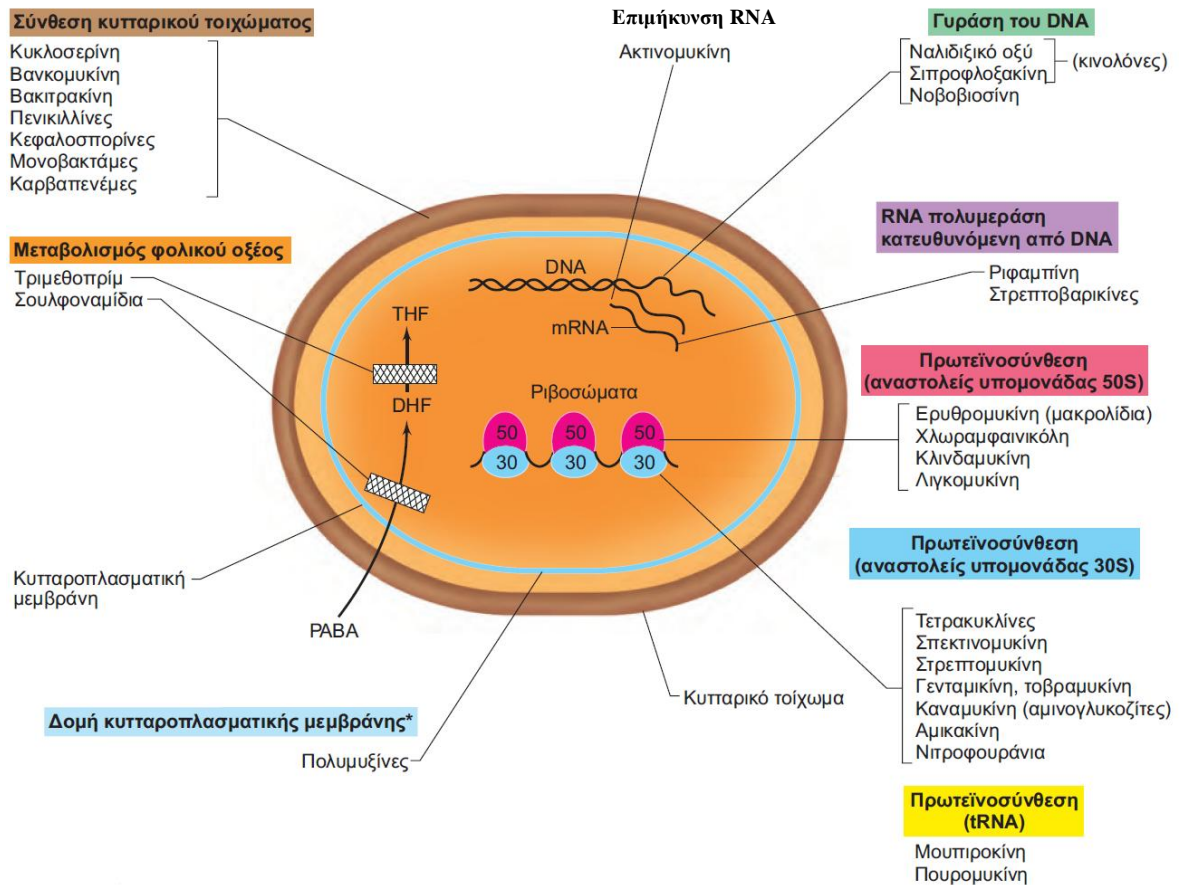
Σήμερα ο όρος αντιβιοτικό έχει αντικατασταθεί από τον όρο **αντιμικροβιακό φάρμακο**. Ως αντιμικροβιακά φάρμακα θεωρούνται όλα τα φυσικά αντιβιοτικά καθώς και τα **ημισυνθετικά αντιβιοτικά**, τα οποία προκύπτουν ύστερα από χημική τροποποίηση των φυσικών στο εργαστήριο. Το φάσμα δράσης των αντιβιοτικών περιλαμβάνει κυρίως τα βακτήρια και λιγότερο τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, όπως μύκητες και πρωτόζωα. Τα αντιβιοτικά που δρουν τόσο έναντι των gram-θετικών όσο και έναντι των gram-αρνητικών βακτηρίων ονομάζονται **αντιβιοτικά ευρέως φάσματος**. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, οι ημισυνθετικές πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι σουλφοναμίδες και οι αμινολυκοσίδες. Τα **αντιβιοτικά περιορισμένου φάσματος** δρουν εναντίον μίας ομάδας μικροοργανισμών. Η πενικιλίνη και η λινκομυκίνη δρουν μόνο εναντίον gram-θετικών βακτηρίων, ενώ η αζτρεονάμη, η πολυμυξίνη, η μεκιλλινάμη και το ναλιδικό οξύ στοχεύουν μόνο gram-αρνητικά βακτήρια.<sup>[1]</sup>

### 2.1.1 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά ομαδοποιούνται με βάση τη χημική δομή και τον τρόπο δράσης τους. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα αντιβιοτικά δρουν σύμφωνα με τους εξής μηχανισμούς.

- 1) Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (β-λακταμικά αντιβιοτικά, βανκομυκίνη, βακιτρακίνη, κυκλοσερίνη).
- 2) Αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (πολυμυξίνες, αμφοτερικίνη Β, νυστατίνη).

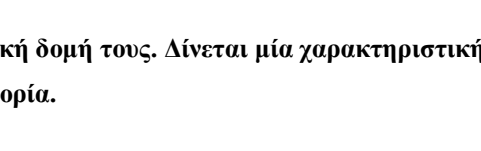
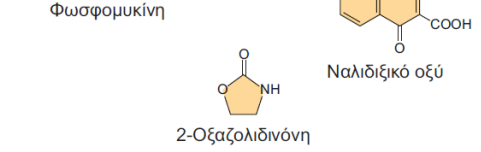
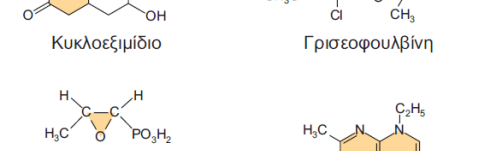
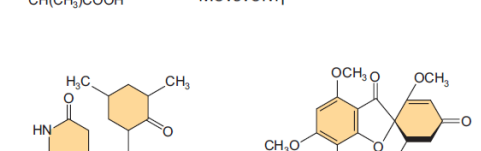
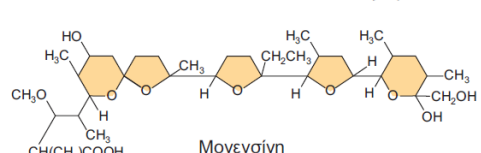
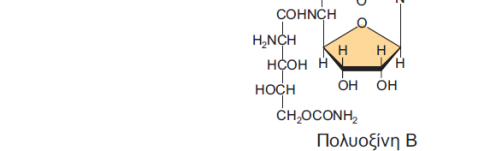
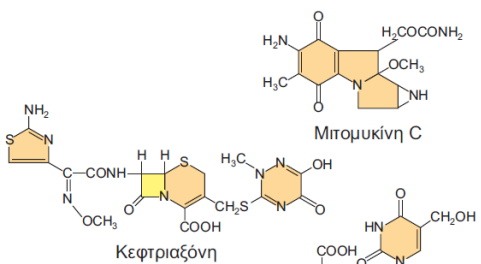
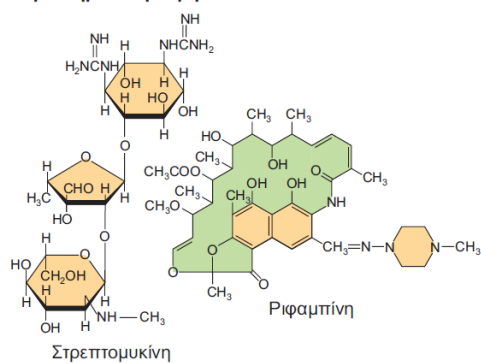
- 3) Αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης (αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνες, λινκοζαμίδες).
- 4) Αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων (σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη, κινολόνες, ριφαμπικίνη, νοβοβοικίνη).<sup>[2]</sup>



**Σχήμα 2.1: Μοριακοί στόχοι των αντιβιοτικών σε ένα βακτηριακό κύτταρο. THF: τετραϋδροφολικό άλας, DHF: διυδροφολικό άλας.**

Κατηγορία αντιβιοτικού	Υποκατηγορία	Παράδειγμα
I. Ενώσεις που περιέχουν υδατάνθρακες	Καθάρη σάκχαρα Αμινογλυκοζίτες Ορθοσομικίνες N-Γλυκοζίτες C-Γλυκοζίτες Γλυκολιπίδια	Νοζιριμικίνη Στρεπτομικίνη Εβερνινομικίνη Στρεπτοθρικίνη Βανκομικίνη Μοενομικίνη
II. Μακροκυκλικές λακτόνες	Μακρολιδικά αντιβιοτικά Αντιβιοτικά πολυενίου Ανσαμικίνες Μακροετρολιδία	Ερυθρομικίνη Κανδισιδίνη Ριφαμπίνη Τετρανακίνη
III. Κιόνες και συναφείς ενώσεις	Τετρακυκλίνες Ανθρακυκλίνες Ναφθοκινόνες Βενζοκινόνες	Τετρακυκλίνη Αδριαμικίνη Ακτινοροδίνη Μιτομικίνη
IV. Ανάλογα αμινοξέων και πεπτιδίων	Παράγωγα αμινοξέων Αντιβιοτικά β-λακτάμης  Πεπτιδικά αντιβιοτικά Χρωμοπεπτιδία Δεμιπεπτιδία Χηλικοποιητικά πεπτιδία	Κυκλοσερίνη Πενικιλίνη, κεφτριαξόνη Βακτρακίνη Ακτινομικίνη Βαλινομικίνη Βλεομικίνη
V. Ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο	Νουκλεοζιτικά αντιβιοτικά	Πολυοξίνες
VI. Ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο	Αντιβιοτικά πολυαιθέρα	Μονενσίνη
VII. Αλικυκλικά παράγωγα	Παράγωγα κυκλοαλκανίων Στεροειδή αντιβιοτικά	Κυκλοεξιμίδιο Φουσιδικό οξύ
VIII. Αρωματικές ενώσεις	Παράγωγα βενζολίου Συμπυκνωμένα αρωματικά Αρωματικός αιθέρας	Χλωραμφαινικόλη Γρισεοφουλβίνη Νοβοβιοσίνη
IX. Αλειφατικές ενώσεις	Ενώσεις που περιέχουν φωσφόρο	Φωσφομικίνη
X. Ενώσεις της κινολόνης	4-Κινολόνη Φθορο-4-κινολόνη	Ναλιδιξικό οξύ Σιπροφλοξακίνη
XI. Οξαζολιδινόνη	Κυκλική λακτόνη	2-Οξαζολιδινόνη

### Χαρακτηριστική δομή



Σχήμα 2.2: Ταξινόμηση των αντιβιοτικών με βάση τη χημική δομή τους. Δίνεται μία χαρακτηριστική δομή για κάθε κατηγορία.

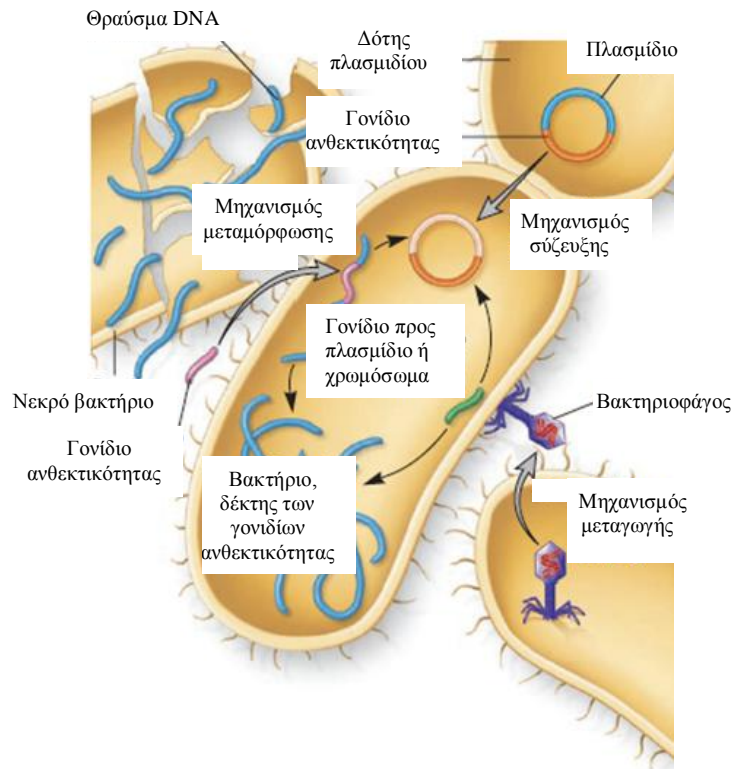
## 2.1.2 Μικροβιακή αντίσταση στα αντιβιοτικά και οι μηχανισμοί της

Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία λοιμώξεων. Μικροβιακή αντίσταση ονομάζεται η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αντιστέκεται στην επίδραση κάποιου αντιβιοτικού, έναντι του οποίου είναι ευπαθής υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι περισσότερες περιπτώσεις αντοχής σε κάποιο αντιβιοτικό οφείλονται σε **γονίδια ανθεκτικότητας**, τα οποία μεταφέρονται με μηχανισμούς γενετικής ανταλλαγής μεταξύ των μικροβίων. Οι μηχανισμοί γενετικής ανταλλαγής είναι οι εξής.

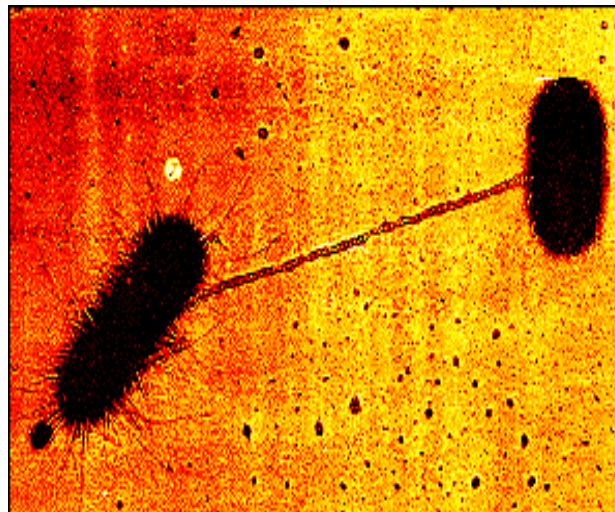
- 1) **Σύζευξη**, σύμφωνα με την οποία ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας μεταφέρονται με πλασμίδια. Απαιτείται άμεση επαφή μεταξύ των μικροβιακών κυττάρων, που εξασφαλίζεται με ειδικά ινίδια. Εφαρμόζεται, κυρίως, στα gram-αρνητικά βακτήρια.
- 2) **Μεταμόρφωση**, σύμφωνα με την οποία τα μικρόβια προσλαμβάνουν μόρια χρωμοσωματικού DNA, το οποίο προέκυψε από τη λύση άλλων μικροβιακών κυττάρων. Το ξένο DNA ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα, εφόσον προέρχεται από συγγενή μικρόβια. Εφαρμόζεται, κυρίως, σε gram-θετικούς κόκκους.
- 3) **Μεταγωγή**, κατά την οποία η μεταβίβαση των γονιδίων ανθεκτικότητας γίνεται μέσω βακτηριοφάγων ανάμεσα σε δύο "συγγενή" βακτηρία.

Ένας μικροοργανισμός καθίσταται ανθεκτικός σε κάποιο αντιβιοτικό, σύμφωνα με τους παρακάτω τέσσερις βασικούς αμυντικούς μηχανισμούς, τους οποίους κωδικεύουν τα γονίδια ανθεκτικότητας.

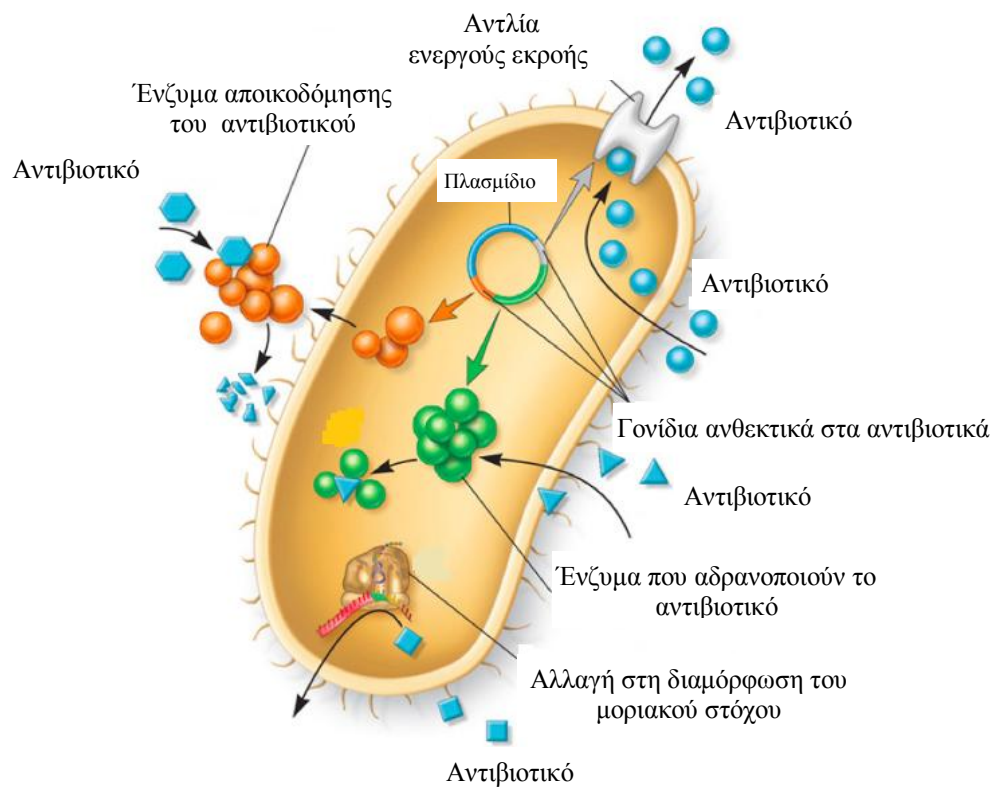
- 1) Αλλαγή του μοριακού στόχου του αντιβιοτικού (αλλαγή ενός και μόνο αμινοξέος στο ριβόσωμα είναι αρκετή για την αντοχή σε κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών).
- 2) Αδρανοποίηση του αντιβιοτικού με παραγωγή υδρολυτικών ή τροποποιητικών ενζύμων (δράση των β-λακταμασών).
- 3) Ελαττωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου του αντιβιοτικού στο κύτταρο.
- 4) Ταχεία αποβολή του αντιβιοτικού από το μικροβιακό κύτταρο με τη βοήθεια αντλιών ενεργούς εκροής.<sup>[2],[3],[4]</sup>



Σχήμα 2.3: Μηχανισμοί μεταβίβασης των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ βακτηρίων.



Σχήμα 2.4: Σύζευξη δύο στελεχών του βακτηρίου *Escherichia coli* με ειδικά ινίδια. Το σχήμα είναι φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

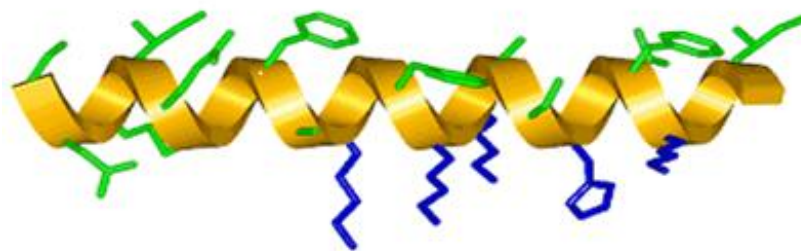


Σχήμα 2.5: Μηχανισμοί μικροβιακής αντίστασης στα αντιβιοτικά.

## 2.2 Κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια

Τα **κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια** (AMPs) παράγονται, στη φύση, από όλους τους οργανισμούς ως τμήμα της φυσικής ανοσίας τους απέναντι στην εισβολή των παθογόνων μικροοργανισμών και επομένως χαρακτηρίζονται και ως **φυσικά αντιβιοτικά**. Έχουν σχετικά μικρή μάζα (<10 kDa), οι αλληλουχίες τους κυμαίνονται από 10 έως και 50 αμινοξέα, φέρουν θετικό φορτίο με αριθμό οξείδωσης τουλάχιστον +2 (συνήθως 4, 5, 6, 9), λόγω ύπαρξης των βασικών αμινοξέων αργινίνης, λυσίνης και ιστοδίνης, διαθέτουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% υδρόφοβα αμινοξέα και μπορούν να αναδιπλώνονται σε μία τριτοταγή δομή, την **αμφιπαθητική διαμόρφωση**, όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των βακτηρίων. Σύμφωνα με αυτή τη δομή, το υδρόφιλο τμήμα του πεπτιδίου, αποτελούμενο από τις πλευρικές αλυσίδες των θετικά φορτισμένων αμινοξέων, συγκεντρώνεται προς μία κατεύθυνση στο χώρο και το υδρόφοβο τμήμα, δηλαδή οι πλευρικές αλυσίδες των μη πολικών αμινοξέων, προς μία άλλη.





**Σχήμα 2.6:** Αμφιπαθητική δομή  $\alpha$ -έλικας. Οι πλευρικές αλυσίδες των υδρόφοβων αμινοξέων (πράσινο χρώμα) συγκεντρώνονται από τη μία πλευρά και οι πλευρικές αλυσίδες των υδρόφιλων αμινοξέων (μπλε χρώμα) από την άλλη.

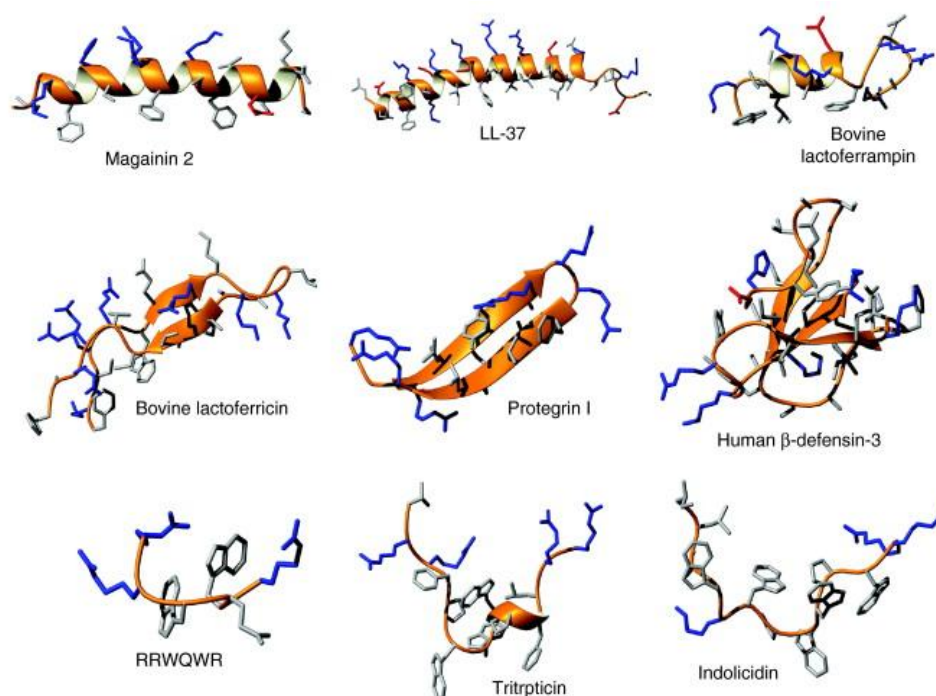
Μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγκεκριμένα πεπτίδια έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, που περιλαμβάνει gram-αρνητικά και gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα. Επίσης, εμφανίζουν αντικαρκινική δράση, ενώ κάποια από αυτά έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού της γρίπης τύπου A (influenza A virus), του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus) και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1).

Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων λόγω του αυξανόμενου αριθμού των ανθεκτικών, στη χρήση αντιβιοτικών, βακτηριακών στελεχών έχει οδηγήσει την έρευνα στην κατεύθυνση των αντιμικροβιακών κατιονικών πεπτιδίων. Το κίνητρο των ερευνητών στηρίζεται στο εύρος των εφαρμογών που προσφέρουν αυτά τα πεπτίδια, καθώς μπορούν να δράσουν ως αποτελεσματικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες είτε μόνα τους είτε σε συνεργασία με άλλα αντιβιοτικά καθώς και άλλα αντιμικροβιακά πεπτίδια, οδηγώντας σε γρήγορο θάνατο του παθογόνου, να εξουδετερώσουν τις ενδοτοξίνες που ελευθερώνονται μετά τον θάνατο του βακτηρίου, να ρυθμίσουν τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας, καθώς και να προάγουν την αγγειογένεση και την επούλωση τραυμάτων.

### 2.2.1 Δομή των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων

Έως τώρα έχουν απομονωθεί περισσότερα από 500 κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια από ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, εκ των οποίων 8 είδη σπονδυλωτών, 6 είδη αρθρόποδων, 6 είδη φυτών, τρία είδη εντόμων, τρία είδη βακτηρίων, ενός είδους μαλάκιου. Ο άνθρωπος αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος, καθώς έχουν απομονωθεί

από αυτόν 6 διαφορετικά κατιονικά πεπτίδια. Σήμερα έχουν προσδιοριστεί με ακρίβεια 50 πεπτιδικές δευτεροταγείς δομές με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων πρωτονίου (2D-<sup>1</sup>H NMR). Από αυτές τις 50 δομές, οι 36 αναφέρονται σε φυσικά κατιονικά πεπτίδια και οι 14 σε συνθετικά ανάλογα.



Σχήμα 2.7: Απεικόνιση διαφόρων δομών αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

Τα κατιονικά πεπτίδια ταξινομούνται, σύμφωνα με τη δευτεροταγή δομή τους, στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες.

- ❖ **Α-ελικοειδή πεπτίδια**, έχουν αλληλουχίες 13-40 αμινοξέων, σχηματίζουν κατιονικές αμφιπαθητικές α-έλικες, όταν αλληλεπιδρούν με τις βακτηριακές μεμβράνες και δεν διαθέτουν κατάλοιπα κυστεΐνης. Το πιο γνωστό κατιονικό πεπτίδιο της κατηγορίας είναι η **μαγγαΐνίνη** (magainin), η οποία αποτελείται από 23 αμινοξέα και εκκρίνεται από το δέρμα του αφρικανικού βατράχου με νύχια, *Xenopus laevis*.
- ❖ **Πεπτίδια β-πτυχωτού φύλλου**, διαθέτουν δύο έως τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, τα οποία σταθεροποιούνται από δύο ή τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Το πιο γνωστό

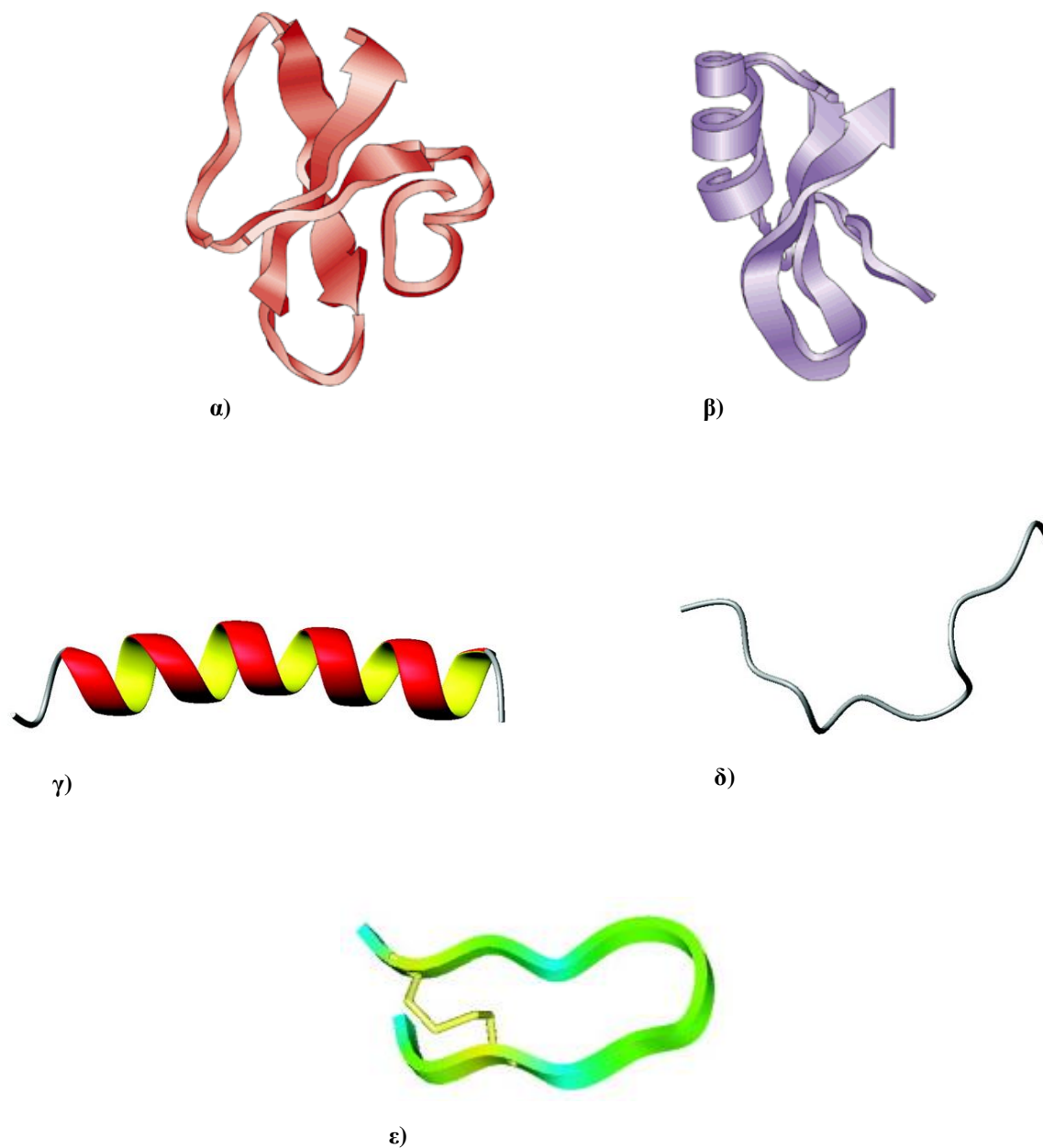


πεπτιδίο της κατηγορίας είναι οι **ντεφενσίνες** (defensins), μία ομάδα πεπτιδίων που αποτελείται από 29-50 αμινοξέα, παράγεται και αποθηκεύεται στους κόκκους των ουδετερόφιλων, όπου και συμμετέχουν στη φυσική ανοσία του οργανισμού. Έχουν βρεθεί στους ιστούς θηλαστικών, εντόμων και φυτών. Οι ντεφενσίνες των φυτών και των εντόμων διαθέτουν ένα επιπρόσθετο μοτίβο α-έλικας.

- ❖ **Πεπτίδια εκτεταμένης δομής**, δεν διαθέτουν δευτεροταγή δομή, επειδή η αλληλουχία τους είναι πλούσια σε ένα ή περισσότερα συγκεκριμένα αμινοξέα. Για παράδειγμα, η **απιδαικίνη** (apidaecin), που απομονώθηκε από τις μέλισσες και τις σφήκες, είναι πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, όπως και η **ινδολισιδίνη** (indolicidin), η οποία παράγεται στα ουδετερόφιλα του βοός. Η **ιστατίνη** (histatin), που βρίσκεται στο σάλιο, είναι πλούσια σε κατάλοιπα ιστιδίνης.
- ❖ **Πεπτίδια με δομή θηλιάς**, τα οποία διαθέτουν μία θηλιά και μία ουρά. Η δομή σταθεροποιείται με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Παράδειγμα κατιονικού πεπτιδίου που ανήκει στην κατηγορία είναι η βακτηνεκίνη βοός (bovine bactenecin).

Πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια αποκτούν τη δευτεροταγή δομή τους μόνο όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες, ενώ όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα δεν έχουν μία καθορισμένη δομή. Ένα παράδειγμα είναι η ινδολισιδίνη των ουδετερόφιλων του βοός, η οποία όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα έχει ακαθόριστη δομή, ενώ υιοθετεί μία δομή βάρκας όταν αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Επίσης, τυπικά αμφιπαθητικά α-ελικοειδή πεπτίδια, όπως οι μαγγαϊνίνες (magainins) και οι κεκροπίνες (cecropins) αποκτούν τη διαμόρφωση α-έλικας, μόνο όταν έρχονται σε επαφή με τις μεμβράνες.

Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι μικρά πεπτίδια β-πτυχωτού φύλλου, όπως η ταχυπλεσίνη (tachyplesin) και η λακτοφερρικήνη Β (lactoferricin Β) διατηρούν τη δευτεροταγή δομή τους σε υδατικό διάλυμα. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη των **δισουλφιδικών δεσμών**, οι οποίοι σταθεροποιούν τη δομή.<sup>[5],[6],[7],[8],[9],[10]</sup>



**Σχήμα 2.8:** Απεικόνιση των δευτεροταγών δομών κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων. α) β-πτυχωτό φύλλο, HDB2 (β-defensin), β) β-πτυχωτό φύλλο, ντεφενσίνη Α εντόμων (insect defensin A), γ) α-ελικοειδές, μαγγαϊνίνη 2 (magainin 2), δ) εκτεταμένη δομή, ινδολισιδίνη (indolicidin), ε) θηλιά, βακτενεκίνη βοός (bovine bactenecin).

## 2.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και οι μηχανισμοί δράσης τους

Η πιο ευρέως μελετημένη τάξη των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων είναι τα πεπτίδια που εμφανίζουν **αντιβακτηριακή δράση**, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούν λύση των ερυθροκυττάρων (Red Blood Cells). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αντιβακτηριακή καθώς και την αιμολυτική δράση αυτών των πεπτιδίων είναι οι ακόλουθοι.

- ❖ Το **θετικό φορτίο**, που είναι το άθροισμα όλων των φορτίων των ιοντιζόμενων ομάδων του κατιονικού πεπτιδίου (καθαρό φορτίο), το οποίο τους επιτρέπει να αλληλεπιδράσουν με την αρνητικά φορτισμένη εξωτερική επιφάνεια της βακτηριακής μεμβράνης. Αλλαγή στην τιμή του θετικού φορτίου μεταβάλλει την αντιβακτηριακή και αιμολυτική δράση του πεπτιδίου.
- ❖ Η **υδροφοβικότητα**, απαραίτητη ιδιότητα των AMPs προκειμένου να διαπεράσουν τη μεμβράνη. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση της υδροφοβικότητας προσδίδει στο πεπτίδιο κυτταροτοξική δράση απέναντι στα κύτταρα των θηλαστικών και μειώνει την εξειδικευμένη αντιμικροβιακή δράση. Από μελέτες τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της υδροφοβικότητας και της ικανότητας των πεπτιδίων να προκαλούν λύση των ερυθροκυττάρων (αιμόλυση). Οι ερευνητές **Blondelle** και **Houghten** απέδειξαν ότι μειώνοντας την υδροφοβικότητα με αντικατάσταση ενός καταλοίπου λευκίνης με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο υδρόφοβο τμήμα ενός α-ελικοειδούς συνθετικού πεπτιδίου, μειώθηκε και η αιμολυτική του δράση. Αντίστοιχα, αυξάνοντας την υδροφοβικότητα με αντικατάσταση ενός καταλοίπου λυσίνης με ένα κατάλοιπο λευκίνης στην υδρόφιλη περιοχή, αυξήθηκαν τα ποσοστά αιμόλυσης.
- ❖ Η **αμφιπαθητικότητα** είναι η ικανότητα του πεπτιδίου να αναδιπλώνεται στην **αμφιπαθητική διαμόρφωση**, αφού έρθει σε επαφή με τη μεμβράνη. Η αμφιπαθητικότητα εκφράζεται με ένα πλήθος δευτεροταγών δομών, ωστόσο η πιο απλή και ίσως η πιο κοινή δομή είναι αυτή της **α-έλικας**. Η αμφιπαθητική α-έλικα έχει περιοδικότητα κάθε τρία με τέσσερα κατάλοιπα και είναι η καταλληλότερη δομή για να αλληλεπιδράσει με τις αμφιπαθητικές βιολογικές μεμβράνες. Η αμφιπαθητικότητα μετράται ποσοτικά με την **υδροφοβική στιγμή** (hydrophobic

moment ,  $M_H$ ), που ορίζεται ως το διανυσματικό άθροισμα της υδροφοβικότητας κάθε αμινοξέος. Καθώς αυξάνεται η υδροφοβική στιγμή, αυξάνεται η ικανότητα του πεπτιδίου να διαπερνά τη μεμβράνη, όπως και να προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Το 1995, ο **Pathak** και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η **αμφιπαθητικότητα** είναι πιο σημαντική από την **υδροφοβικότητα** και την **α-ελικοειδή δομή** όσον αφορά την πρόσδεση των πεπτιδίων στη βακτηριακή μεμβράνη και την περαιτέρω διάσπασή της.

- ❖ Η **διαμόρφωση**, η δομή που παίρνει το πεπτίδιο προκειμένου να αλληλεπιδράσει με μία βιολογική μεμβράνη. Οι δύο συχνότερες δομές που παρατηρούνται στα AMPs είναι η α-έλικα και το β-πτυχωτό φύλλο και τα πεπτίδια αυτά συνήθως περιέχουν ένα ή περισσότερα από τα αμινοξέα προλίνη, αργινίνη ή τρυπτοφάνη. Πολλές μελέτες απέδειξαν ότι η ελικοειδής διαμόρφωση των AMPs επηρεάζει περισσότερο την τοξικότητα σε μεμβράνες ευκαρυωτικών κυττάρων συγκριτικά με την αντιμικροβιακή δράση τους.
- ❖ Η **πολική γωνία**,  $\theta$ , η οποία αποτελεί το μέτρο της αναλογίας της πολικής ως προς τη μη πολική πλευρά ενός αμφιπαθητικού πεπτιδίου με δομή α-έλικας. Υποθετικά μιλώντας, εάν υπήρχε ένα α-ελικοειδές πεπτίδιο, του οποίου η μία πλευρά αποτελούνταν εξ'ολοκλήρου από υδρόφοβα κατάλοιπα και η άλλη από υδρόφιλα κατάλοιπα, τότε η πολική γωνία του θα ήταν  $180^\circ$ . Σε πολλές μελέτες πάνω σε φυσικά και συνθετικά πεπτίδια αποδείχθηκε ότι εάν μειωθεί η πολική γωνία, τότε αυξάνεται η αναλογία του υδρόφοβου τμήματος σε σχέση με το υδρόφιλο τμήμα του πεπτιδίου (μεγαλύτερη επιφάνεια καταλαμβάνεται από υδρόφοβα κατάλοιπα) και κατά συνέπεια αυξάνεται και η ικανότητα των πεπτιδίων να εισχωρούν στις μεμβράνες. Η πολική γωνία επηρεάζει και τη σταθερότητα των διαμεμβρανικών πόρων που σχηματίζονται από τα AMPs. Βρέθηκε ότι πεπτίδια με μικρότερες πολικές γωνίες (περισσότερο υδρόφοβα) σχηματίζουν ασταθέστερους πόρους συγκριτικά με πεπτίδια με μεγαλύτερες πολικές γωνίες (περισσότερο υδρόφιλα).
- ❖ Το **μήκος**, το οποίο επηρεάζει την αντιμικροβιακή και αιμολυτική δράση των AMPs. Προκειμένου να σχηματισθεί μία απλή αμφιπαθητική έλικα δύο στροφών, χρειάζονται τουλάχιστον 7-8 αμινοξέα, λαμβάνοντας υπόψιν ότι για μία στροφή χρειάζονται 3-4 κατάλοιπα αμινοξέων. Η **Benincasa** και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι ένα συνθετικό πεπτίδιο 15 αμινοξέων, που αντιστοιχεί στο C-τελικό άκρο του φυσικού πεπτιδίου melittin, έδειξε ότι έχει 5-7 φορές μικρότερη

αντιμικροβιακή δράση, ωστόσο εμφάνισε 300 φορές μικρότερη αιμολυτική δράση συγκριτικά με το melittin.

Αρχικά, ο μηχανισμός που προτάθηκε για να περιγράψει την αντιβακτηριακή δράση των κατιονικών πεπτιδίων ήταν η διάσπαση της βακτηριακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη νέκρωση του κυττάρου. Τα πεπτίδια αυτά ονομάζονται **μεμβρανο-αποδιοργανωτικά** πεπτίδια (membrane disruptive peptides). Ωστόσο, νέες μελέτες έδειξαν ότι κάποια AMPs στοχεύουν πολλά ενδοκυττάρια τμήματα του βακτηρίου, οδηγώντας σε απόπτωση, καθώς διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη χωρίς να διαταράζουν την ακεραιότητά της. Τα πεπτίδια της κατηγορίας αυτής ονομάζονται **μη μεμβρανο-αποδιοργανωτικά** πεπτίδια (membrane non-disruptive peptides). Ανεξάρτητα με τον τρόπο δράσης τους, όλα τα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια πρέπει να αλληλεπιδράσουν με τη βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη.

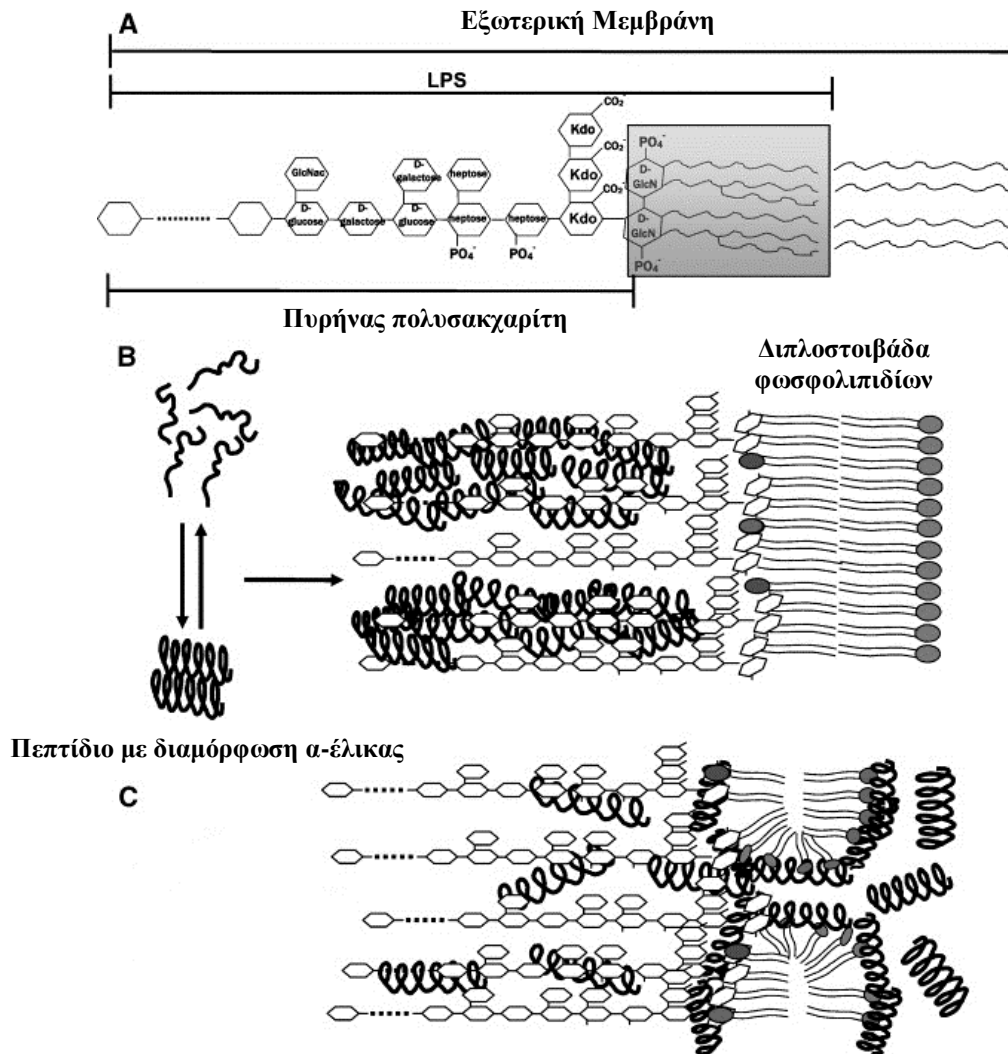
Τα γενικά βήματα που ακολουθεί ένα κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο με στόχο την καταστροφή ενός βακτηρίου δίνονται παρακάτω.

- 1) Το πεπτίδιο αλληλεπιδρά με το κύτταρο-στόχο μέσω **ηλεκτοστατικών δεσμών**, οι οποίοι οφείλονται στην έλξη μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινοξέων του πεπτιδίου (λυσίνες, αργινίνες, ιστιδίνες) και των ανιοντικών φωσφορικών ομάδων των λιποπολυσακχαριτών, που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων και αντίστοιχα των λιποτοιχοϊκών οξέων στα gram-θετικά βακτήρια. Στο σημείο αυτό, το πεπτίδιο συνήθως αναδιπλώνεται στην αμφιπαθητική διαμόρφωση, προκειμένου να διαπεράσει την υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή της εξωτερικής μεμβράνης ενός gram-αρνητικού βακτηρίου και αντίστοιχα το παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης ενός gram-θετικού βακτηρίου.
- 2) Στη συνέχεια, έρχεται σε επαφή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το πεπτίδιο αλληλεπιδρά και πάλι μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών με τις ανιοντικές "κεφαλές" των φωσφολιπιδίων στην εξωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα φωσφολιπίδια που απαρτίζουν τη διπλοστιβάδα των βακτηριακών εσωτερικών μεμβρανών είναι η **φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE)**, η **φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG)**, η **φωσφατιδυλοσερίνη (PS)** και η **καρδιολιπίνη (CL)**. Η PE ωστόσο δεν έχει

φορτίο και ο κύριος ρόλος της είναι να διαχέει το αρνητικό φορτίο των ανιοντικών μεμβρανικών φωσφολιπιδίων (PG, PS, CL).

- 3) Αφού το πεπτίδιο προσδεθεί στην εξωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τότε λαμβάνουν χώρα οι διαφορετικοί μηχανισμοί που θα ακολουθήσει, ανάλογα με το πεπτίδιο, προκειμένου να καταστρέψει το βακτηριακό κύτταρο, είτε διαταράσσοντας την ακεραιότητα της μεμβράνης είτε αλληλεπιδρώντας με ενδοκυττάριους στόχους.

Ο μηχανισμός της αρχικής πρόσδεσης του πεπτιδίου στα gram-αρνητικά βακτήρια είναι πιο πολύπλοκος απ'ότι στα gram-θετικά βακτήρια, διότι τα πρώτα διαθέτουν μία επιπλέον διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, την **εξωτερική μεμβράνη**, η οποία περιβάλλει τον βακτηριακό φάκελο. Δεδομένου του περιορισμένου μεγέθους των διαμεμβρανικών πόρων που σχηματίζουν οι πορίνες, τα κατιονικά AMPs, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών με τους **λιποπολυσακχαρίτες (LPSs)** στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης και απομακρύνουν τα κατιόντα μαγνησίου και ασβεστίου ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), τα οποία δεσμεύονταν αρχικά στις ανιοντικές φωσφορικές ομάδες των LPSs, σταθεροποιώντας την άκαμπτη δομή της μεμβράνης. Κατά συνέπεια, δημιουργούνται ρήγματα σε διάφορα σημεία της μεμβράνης, από τα οποία περνούν εύκολα και εισέρχονται στον περιπλασματικό χώρο διάφορα πεπτιδικά και άλλα μόρια καθώς και το ίδιο κατιονικό πεπτίδιο που τα προκάλεσε. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **αυτό-επαγόμενη πρόσληψη (self-promoted uptake)**.



Σχήμα 2.9: Μηχανισμός πρόσδεσης στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων.

A: Σχηματική απεικόνιση της εξωτερικής μεμβράνης. Kdo, 3-δεοξυ-D-μαννο-οκτα-2-ουλοπυρανοσονικό οξύ; P, φωσφορικό. B: Αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με τους λιποπολυσακχαρίτες και συσσώρευση πολλών πεπτιδίων στην εξωτερική μεμβράνη. C: Αφού το πεπτίδιο φθάσει μία οριακή συγκέντρωση, διαπερνάει την εξωτερική μεμβράνη δημιουργώντας ρήγματα (μοντέλο μικυλλίων).

### 2.2.3 Μεμβρανο-αποδιοργανωτικά κατιονικά πεπτίδια

Τα μεμβρανο-αποδιοργανωτικά κατιονικά πεπτίδια διασπούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε σχηματίζοντας πεπτιδικούς πόρους, είτε διαταράσσοντας την άκαμπτη δομή της επιφάνειάς της. Το κλειδί για τη δράση των μεμβρανο-αποδιοργανωτικών πεπτιδίων είναι η **αμφιπαθητική διαμόρφωση**, μία τριτοταγής δομή που επιτρέπει στα υδρόφοβα τμήματα των AMPs να αλληλεπιδρούν με τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων καθώς και

στα υδρόφιλα τμήματα των AMPs να αλληλεπιδρούν με τις ανιοντικές κεφαλές αυτών. Τα κατιονικά πεπτίδια, καθώς αναδιπλώνονται στη δομή αυτή, προσανατολίζονται παράλληλα προς τη μεμβράνη και εισέρχονται στα όρια επαφής της εξωτερικής μονοστιβάδας με το διαμεμβρανικό χώρο, δηλαδή στην περιοχή όπου οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων συναντούν τις λιπαρές αλυσίδες αυτών (membrane interface).

Τα μοντέλα που εξηγούν το μηχανισμό δράσης των μεμβrano-αποδιοργανωτικών κατιονικών πεπτιδίων είναι τα ακόλουθα.

- Μοντέλο **“barrel-stave”**
- Μοντέλο **“toroidal-pore”**
- Μοντέλο τάπητα **“carpet”**
- Μοντέλο μικυλλίων **“aggregate model”**

Στο μοντέλο **“barrel-stave”**, τα αμφιπαθητικά πεπτίδια προσανατολίζονται κάθετα προς τη μεμβράνη και ευθυγραμμίζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες τους στρέφονται προς το εξωτερικό λιπιδικό περιβάλλον (υδρόφοβος διαμεμβρανικός χώρος), ενώ οι πολικές πλευρικές αλυσίδες τους προσανατολίζονται στην κοιλότητα, σχηματίζοντας τους διαμεμβρανικούς πόρους. Για την καλύτερη κατανόηση του μοντέλου, ας υποθέσουμε ότι τα πεπτίδια που σχηματίζουν τους διαμεμβρανικούς πόρους λειτουργούν όπως οι σανίδες σε ένα βαρέλι. Οι πόροι επιτρέπουν τη διαφυγή των συστατικών του κυτταροπλάσματος και οδηγούν σε διάσπαση της μεμβράνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο διαμεμβρανικός πόρος έχει μια δυναμική δομή καλά καθορισμένη και ότι τα μεμβρανικά λιπίδια δεν περιλαμβάνονται στο εσωτερικό του, όπως επίσης δεν κάμπτονται μαζί με τα πεπτίδια κατά τον σχηματισμό του.

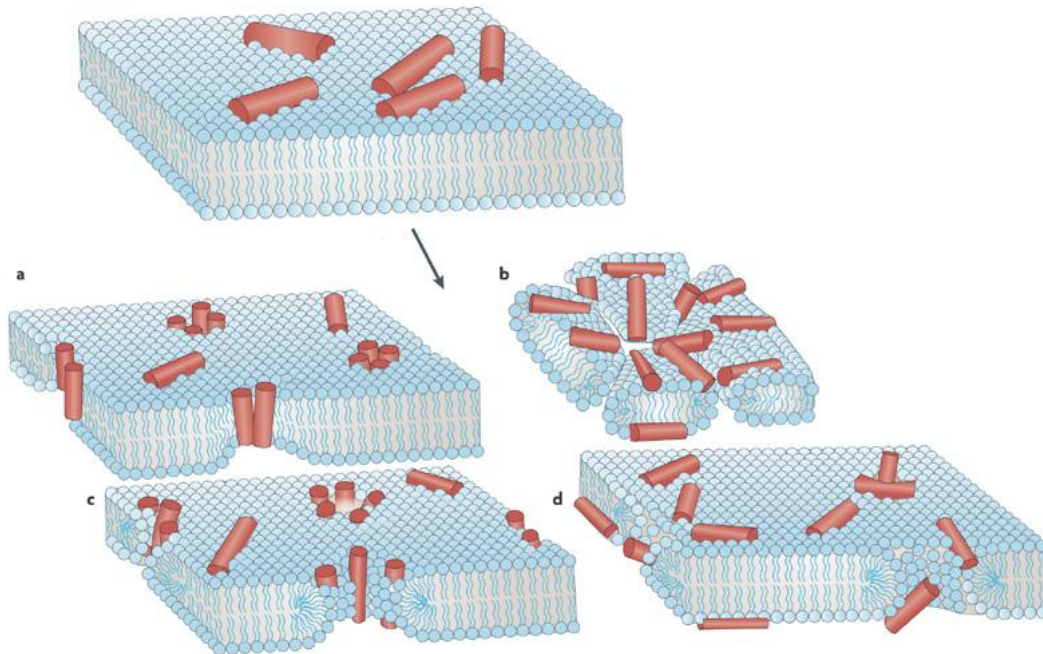
Στο μοντέλο **“toroidal pore”**, τα πεπτίδια προσανατολίζονται κάθετα προς τη μεμβράνη, όπως και στο μοντέλο **“barrel-stave”**, σχηματίζοντας διαμεμβρανικούς πόρους. Η μεμβράνη συμμετέχει στον σχηματισμό των πόρων, καθώς κάμπτεται προς τα μέσα, διαμορφώνοντας ένα κυλινδρικό διάυλο. Οι πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων της αλληλεπιδρούν με τις πολικές πλευρικές αλυσίδες των πεπτιδίων και σχηματίζουν το εσωτερικό των πόρων, ενώ τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων της αλληλεπιδρούν με τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες και στρέφονται προς το διαμεμβρανικό χώρο. Αξίζει να προστεθεί ότι τα λιπίδια που συμμετέχουν στο σχηματισμό των πόρων μετατοπίζονται συνεχώς. Χαρακτηριστικά παραδείγματα AMPs που σχηματίζουν μαζί με τα μεμβρανικά



λιπίδια τέτοιους πόρους είναι οι μαγγαϊνίνες, η μελιτίνη και η ανθρώπινη καθελισιδίνη LL-37.

Στο μοντέλο τάπητα **“carpet”**, τα πεπτίδια προσανατολίζονται παράλληλα προς την λιπιδική διπλοστιβάδα και καλύπτουν τμήματα αυτής, ακριβώς όπως ένα χαλί καλύπτει μία επιφάνεια. Σε επαρκείς συγκεντρώσεις, τα πεπτίδια αποσταθεροποιούν την άκαμπτη δομή της επιφάνειας της μεμβράνης, μετατοπίζοντας τα φωσφολιπίδια από τη θέση τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία επιφανειακών ρηγμάτων, έως ότου η μεμβράνη καταρρεύσει. Χαρακτηριστικό αυτού του μοντέλου είναι ότι τα πεπτίδια δεν αλληλεπιδρούν με τον υδρόφοβο πυρήνα της μεμβράνης και άρα η μεμβράνη διασπάται χωρίς τον σχηματισμό διαμεμβρανικών πόρων.

Στο μοντέλο μικυλλίων **“aggregate model”**, τα πεπτίδια προσανατολίζονται τυχαία και αφού εισέλθουν στη μεμβράνη, σχηματίζουν σύμπλοκα μικυλλίων με τα μεμβρανικά λιπίδια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων διαφόρων μεγεθών, οι οποίοι επιτρέπουν την έξοδο συστατικών του κυτταροπλάσματος και προκαλούν, τελικά, το θάνατο του κυττάρου.



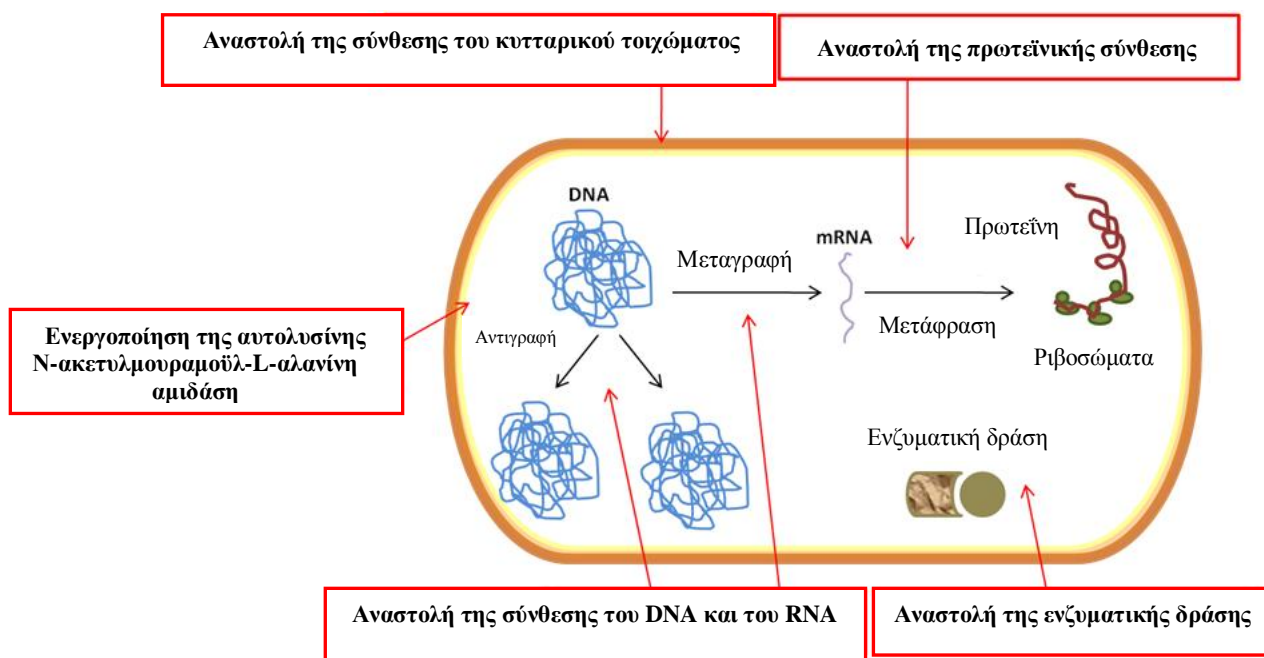
**Σχήμα 2.10:** Μηχανισμοί δράσης των μεμβrano-αποδιοργανωτικών πεπτιδίων. Αρχικά, τα πεπτίδια (κόκκινοι κύλινδροι) προσανατολίζονται παράλληλα προς τη βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια τη διασπούν, σύμφωνα με τέσσερα μηχανιστικά μοντέλα.

a: Μοντέλο **“barrel-stave”**, b: Μοντέλο τάπητα **“carpet”**, c: Μοντέλο **“toroidal-pore”**, d: Μοντέλο μικυλλίων **“aggregate-model”**.

## 2.2.4 Μη μεμβρανο-αποδιοργανωτικά κατιονικά πεπτίδια

Ένας μεγάλος αριθμός κατιονικών πεπτιδίων διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων, χωρίς να προκαλεί τη διάσπασή της και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, αλληλεπιδρώντας με διάφορους ενδοκυττάριους στόχους, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο. Τα πεπτίδια αυτά αλληλεπιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα DNA, RNA, ένζυμα και πρωτεΐνες, προκαλώντας αναστολή της σύνθεσής τους, αναστολή της ενζυματικής δράσης καθώς και της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος.

Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο **bufforin II** εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E.coli* και συνδέεται ισχυρά στο DNA και το RNA παράλληλα. Ομοίως,  $\alpha$ -ελικοειδή πεπτίδια, όπως **παράγωγα της πλευροκιδίνης** (pleurocidin), ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου που παράγεται στα ψάρια, και η **δερμασεπτίνη** (dermasseptin), που απομονώθηκε από το δέρμα βατράχου, προκαλούν αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA στις ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής τους (MICs), χωρίς να διαταράσσουν την ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του βακτηρίου *E.coli*.<sup>[5],[9],[10],[11],[12],[13],[14],[15]</sup>



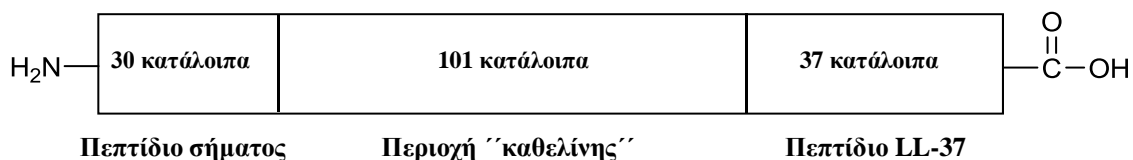
Σχήμα 2.11: Μηχανισμοί δράσης των μη μεμβρανο-αποδιοργανωτικών πεπτιδίων.

## 2.2.5 Καθελισιδίνες

Οι καθελισιδίνες (cathelicidins) είναι μικρού μεγέθους, κατιονικά, αντιμικροβιακά πεπτίδια που βρίσκονται στον άνθρωπο και σε άλλα είδη σπονδυλωτών, όπως τα θηλαστικά καθώς και ορισμένα είδη ψαριών. Περίπου 30 μέλη της οικογένειας των καθελισιδινών έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί σε διάφορα είδη θηλαστικών. Ωστόσο, μεμονωμένες καθελισιδίνες (single cathelicidins) βρέθηκαν μόνο στον άνθρωπο, τις μαϊμούδες rhesus, τα ποντίκια, τους αρουραίους και τα ινδικά χοιρίδια και ονομάζονται LL-37, RL-37, mCramp, rCramp και CAP11 αντίστοιχα. Οι καθελισιδίνες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, για πρώτη φορά, στα κύτταρα του νωτιαίου μυελού των θηλαστικών (bone marrow myeloid cells) και γι' αυτό ονομάστηκαν επίσης **πεπτίδια MAP** (myeloid antimicrobial peptides). Οι καθελισιδίνες αποτελούν τμήμα της φυσικής ανοσίας του οργανισμού και παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος αντιμικροβιακής δράσης έναντι βακτηρίων (bacteria), μυκήτων (fungi) και περιτυλιγμένων ιών (enveloped viruses).

Στη φύση, συμπεριφέρονται ως πρόδρομα μόρια (precursor molecules), τα οποία απελευθερώνουν το αντιμικροβιακό πεπτίδιο ύστερα από πρωτεολυτική σχάση. Τα πρόδρομα μόρια είναι αποθηκευμένα σε ουδετερόφιλα κοκκία (neutrophil granules), όπου και παραμένουν ανενεργά. Το "ώριμο" αντιμικροβιακό πεπτίδιο απελευθερώνεται ύστερα από σχάση της πρόδρομης πρωτεΐνης από ουδετερόφιλες ελαστάσες. Η δομή της πρόδρομης πρωτεΐνης των καθελισιδινών αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη N-τερματική περιοχή και μία ετερογενής C-τερματική περιοχή, στην οποία βρίσκεται η αλληλουχία του αντιμικροβιακού πεπτιδίου. Η ετερογένεια της C-τερματικής περιοχής περιγράφεται από διαφορετικές αλληλουχίες αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως πεπτίδια πλούσια σε προλίνες, αργινίνες ή τρυπτοφάνες, ελικοειδή πεπτίδια, κυκλικά δωδεκαπεπτίδια με ένα δισουλφιδικό δεσμό, πεπτίδια που περιέχουν περισσότερους από ένα δισουλφιδικούς δεσμούς, καθώς και μικρά πεπτίδια που οργανώνονται σε επαναλαμβανόμενες δομές, όπως οι βακτενεκίνες (bactenecins). Η N-τερματική περιοχή περιέχει, στο N-τελικό άκρο, μία αλληλουχία, μήκους 30 περίπου καταλοίπων αμινοξέων, που ονομάζεται **πεπτίδιο σήματος** και την περιοχή της "**καθελίνης**", που αποτελείται από 100 περίπου κατάλοιπα αμινοξέων και σε αυτή οφείλεται η ονομασία των καθελισιδινών. Η περιοχή ονομάστηκε περιοχή "**καθελίνης**" χάρη στην υψηλή ομολογία της με τον **αναστολέα καθεψίνης L** (cathepsin L inhibitor).

Ο όρος “καθελιδίνη” αναφέρονταν, αρχικά, για όλη την πρόδρομη πρωτεΐνη, ενώ τώρα χρησιμοποιείται για την ονομασία των “ώριμων” αντιμικροβιακών πεπτιδίων του C-τελικού άκρου.<sup>[16],[17],[18],[20]</sup>



Σχήμα 2.12: Απεικόνιση της πρόδρομης ανθρώπινης καθελιδίνης hCAP-18, που αποτελεί το πρότυπο σχήμα για την τοπολογία όλων των καθελιδινών.

### 2.2.5.1 Ανθρώπινη καθελιδίνη LL-37

Η ανθρώπινη καθελιδίνη **LL-37** (Human cathelicidin LL-37) ανήκει στην οικογένεια των καθελιδινών και είναι το πρώτο αμφιπαθητικό α-ελικοειδές πεπτίδιο που βρέθηκε στον άνθρωπο. Το πεπτίδιο αποτελείται από 37 αμινοξέα και περιέχει 2 λευκίνες στην αρχή της αλληλουχίας του (N-τελικό άκρο). Από αυτά τα δύο χαρακτηριστικά προέκυψε η ονομασία του, LL-37. Το πρόδρομο μόριο του πεπτιδίου LL-37 ονομάζεται **hCAP-18**, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο σχήμα (Σχήμα 2.12). Εκτός από αυτή την ονομασία, είναι επίσης γνωστό ως **FALL-39** ή **CAMP-ανθρώπινο κατιονικό αντιμικροβιακό πεπτίδιο**. Η ανάλυση της ακολουθίας του hCAP-18 έδειξε ότι το πεπτίδιο LL-37 αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 3-39 του πρόδρομου μορίου. Η ακολουθία του LL-37 είναι η ακόλουθη.

**LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES**

Η ακολουθία αποκαλύπτει την “υψηλά φορτισμένη” φύση του πεπτιδίου. Σε φυσιολογικές τιμές pH, 16 από τα 37 κατάλοιπα αμινοξέων είναι φορτισμένα, εκ των οποίων 6 κατάλοιπα λυσίνης και 5 κατάλοιπα αργινίνης φέρουν 11 θετικά φορτία, ενώ 3 κατάλοιπα γλουταμινικού και 2 κατάλοιπα ασπαρτικού φέρουν 5 αρνητικά φορτία. Το τελικό φορτίο του πεπτιδίου σε φυσιολογικές τιμές pH είναι +6.

Το γονίδιο που κωδικεύει το πεπτίδιο Cathelicidin LL-37 ονομάζεται **CAMP** και αποτελεί το μοναδικό γονίδιο καθελιδινών που υπάρχει στον άνθρωπο. Το γονίδιο

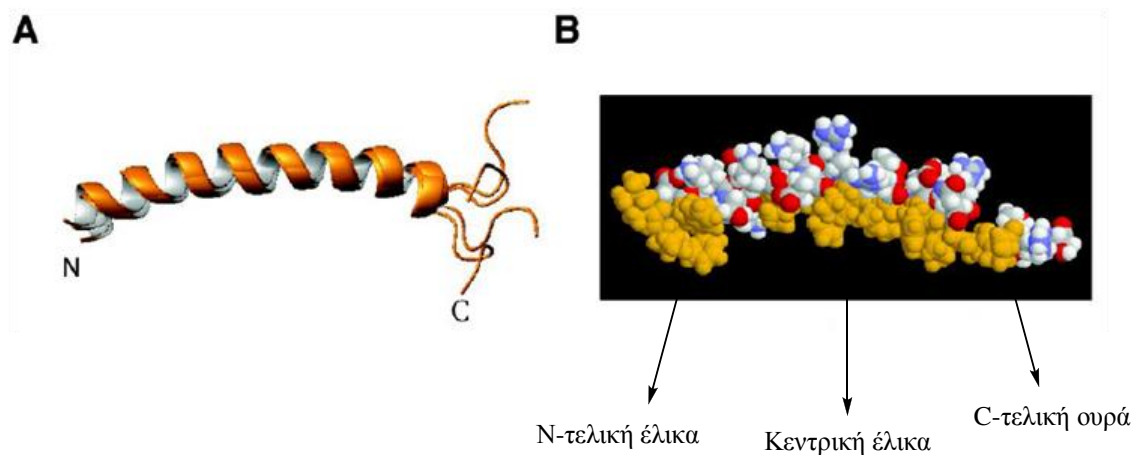
**CAMP** βρέθηκε ότι επάγεται στα ανθρώπινα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας του δέρματος κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους διεργασίας. Αυτό εξηγεί τον ρόλο που παίζει το Cathelicidin LL-37 στην πρωτογενή άμυνα του οργανισμού απέναντι σε τοπικές μολύνσεις και στην εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών στις περιοχές φλεγμονής και τραύματος. Ειδικότερα, ενεργοποιεί και συντονίζει την απελευθέρωση των **κυτοκινών** από τα κύτταρα της φυσικής και επίκτητης ανοσίας (Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες). Επομένως, έχει τα χαρακτηριστικά των **αλαρμινών**, ενδογενών μορίων που απελευθερώνονται λόγω βλάβης στον ιστό και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, το Cathelicidin LL-37 ρυθμίζει την απόπτωση, ξεκινά την αγγειογένεση και προάγει την επούλωση του τραύματος. Κατά συνέπεια, το πεπτίδιο ανιχνεύθηκε σε ανθρώπινα τραύματα και υγρό φλύκταινας (blister fluid).

Το Cathelicidin LL-37 παρατηρήθηκε ότι εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς, όπως στα ουδετερόφιλα του κυκλοφορικού συστήματος, τα κύτταρα του μυελού των οστών, τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, την περιοχή του γαστρεντερικού συστήματος, όπως επίσης και την επιδιδυμίδα και τους πνεύμονες. Έκφραση του πεπτιδίου ανιχνεύθηκε και στο πλακώδες επιθήλιο του στόματος, της γλώσσας, του οισοφάγου καθώς και στον επιθηλιακό βλεννογόνο των βρόγχων. Επιπλέον, η παραγωγή του Cathelicidin LL-37 στα μακροφάγα κύτταρα διεγείρεται από τη βιταμίνη D κατά την απελευθέρωσή της από το ηλιακό φως μέσω του δέρματος. Πιθανότατα, η έκθεση στον ήλιο, ιδανική για τη θεραπεία της φυματίωσης, αυξάνει την ικανότητα του πεπτιδίου να σκοτώνει το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[17],[19],[20],[21],[32]</sup>

### 2.2.5.2 Δομή της ανθρώπινης καθελιδίνης LL-37

Η ανθρώπινη καθελιδίνη LL-37 διαθέτει μία μεγάλη αμφιπαθητική έλικα, που καλύπτει τα κατάλοιπα 2-31 ακολουθούμενη από μία ουρά ακαθόριστης δομής που καλύπτει τα κατάλοιπα 32-37 του C-τελικού άκρου. Η αμφιπαθητική ελικοειδής δομή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του πεπτιδίου στις βακτηριακές μεμβράνες (εξωτερική, εσωτερική μεμβράνη). Η ουρά σχετίζεται με τη συσσώρευση του πεπτιδίου, άρα επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση του. Η N-τερματική περιοχή είναι λιγότερο σημαντική για αντιβακτηριακή δράση, καθώς το πεπτίδιο Cathelicidin LL-23, ένα φυσικό θραύσμα του LL-37, εμφανίζει δράση μόνο στα ευαίσθητα στελέχη του *E.coli* και του *S.aureus*.

Η ασθενής δράση του Cathelicidin LL-23 ενισχύεται από το υδρόφιλο κατάλοιπο Ser9, το οποίο χωρίζει την υδρόφοβη περιοχή του πεπτιδίου σε δύο τμήματα. Το κατάλοιπο Ser9 χωρίζει, επίσης, την υδρόφοβη επιφάνεια του LL-37 σε δύο τμήματα. Έχει αποδειχθεί ότι η κεντρική έλικα του LL-37 επηρεάζει την αντιβακτηριακή και αντι-ϊική δράση.<sup>[16],[21],[22],[32]</sup>



**Σχήμα 2.13:** Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της ανθρώπινης καθελισιδίνης LL-37, προσδιοριζόμενη με φασματοσκοπία NMR. Στο σχήμα A διακρίνεται ένα σύνολο 5 δομών, προκειμένου να απεικονισθεί καλύτερα η C-τερματική ουρά. Στο σχήμα B δίνεται το μοντέλο πλήρωσης χώρου για να δείξει το διαχωρισμό της υδρόφοβης επιφάνειας (χρυσό) σε δύο περιοχές. Η μεγαλύτερη υδρόφοβη περιοχή αντιστοιχεί στην κεντρική έλικα και είναι σημαντική για την αντιβακτηριακή και αντι-ϊική δράση του πεπτιδίου.


### 2.2.5.3 Αλληλεπίδραση του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 με βιολογικές μεμβράνες

Μελέτες έδειξαν ότι η καθελισιδίνη LL-37 έχει χαμηλή εκλεκτικότητα στο να αναγνωρίζει βακτηριακά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ευνοείται η αλληλεπίδραση με βακτηριακές μεμβράνες επειδή περιέχουν αρνητικά φορτισμένους λιποπολυσακχαρίτες (gram-αρνητικά βακτήρια) και λιποτειχοϊκά οξέα (gram-θετικά βακτήρια) σε σχέση με τις επαμφοτερίζουσες (ουδέτερο φορτίο) ευκαρυωτικές μεμβράνες. Η μόνη εξαίρεση ευκαρυωτικής μεμβράνης είναι αυτή των ερυθροκυττάρων, διότι περιέχει **σιαλικό οξύ**. Επομένως, υψηλή συγκέντρωση του LL-37 στο αίμα προκαλεί αιμόλυση. Η παρουσία **χοληστερόλης** στις ευκαρυωτικές μεμβράνες μειώνει τη δράση του πεπτιδίου, καθώς σταθεροποιεί τη λιπιδική διπλοστιβάδα και εξουδετερώνει το φορτίο των AMPs. Παρ'όλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι το Cathelicidin LL-37 μπορεί και αλληλεπιδρά με τις ευκαρυωτικές μεμβράνες.<sup>[21]</sup>

## 2.2.5.4 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37

Έχει προταθεί ότι το πεπτίδιο Cathelicidin LL-37 διασπά τις βακτηριακές μεμβράνες, δρώντας ως μεμβρανο-αποδιοργανωτικό πεπτίδιο. Αρχικά, το κατιονικό πεπτίδιο αναγνωρίζει και καλύπτει την ανιοντική επιφάνεια των βακτηριακών μεμβρανών. Αφού προσδεθεί στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων ή στα λιποτειχοϊκά οξέα των gram-θετικών βακτηρίων, διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη και το παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης αντίστοιχα και φθάνει στην εσωτερική μεμβράνη (κυτταροπλασματική μεμβράνη). Αρχικά προσδένεται με τη μεμβράνη προσανατολισμένο παράλληλα προς την επιφάνειά της και τη διασπά σύμφωνα με το μοντέλο τάπητα **“carpet”**, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.3.1. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, το πεπτίδιο διασπά τη μεμβράνη σύμφωνα με το μοντέλο μικυλλίων **“aggregate model”**. Εναλλακτικά, το πεπτίδιο μπορεί να προσανατολισθεί κάθετα προς την επιφάνεια της μεμβράνης και να σχηματίσει διαμεμβρανικούς πόρους.

Σύμφωνα με το **μοντέλο Shai Matsuzaki Huang (SMH model)**, αφού το πεπτίδιο Cathelicidin LL-37 προσδεθεί, με παράλληλο προσανατολισμό, στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ενός gram-αρνητικού βακτηρίου και φθάσει ένα συγκεκριμένο όριο συγκέντρωσης, η συσσώρευση του προκαλεί θετική καμπύλωση της μεμβράνης

(κυρτότητα, δηλαδή η καμπύλη έχει κατεύθυνση προς τα έξω).  Στη συνέχεια, τα μονομερή του πεπτιδίου μετατοπίζονται από την εξωτερική μεμβράνη στον περιπλασματικό χώρο και έρχονται σε επαφή με την εσωτερική μεμβράνη. Κατά τη μετατόπιση των μονομερών, σχηματίζονται πόροι στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης, όπως στο μοντέλο **“toroidal-pore”**, προκαλώντας διαρροή. Εν συνεχεία, η εσωτερική μεμβράνη καλύπτεται από τα πεπτίδια σύμφωνα με μοντέλο τάπητα **“carpet”** και διαταράσσεται η ακεραιότητά της, καθώς δημιουργούνται επιφανειακά ρήγματα μέχρι την ολοκληρωτική κατάρρευση της, ενώ παράλληλα παρατηρείται διάχυση των πεπτιδίων από την επιφάνεια της μεμβράνης σε ενδοκυττάριους στόχους και πρόσδεση σε αυτούς, όπως το DNA.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το Cathelicidin LL-37 διευκολύνει τη μεταφορά ειδικού φορτίου στο εσωτερικό του ευκαρυωτικού κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, το πεπτίδιο ενισχύει τη μεταφορά ιϊκού και βακτηριακού πλασμιδικού DNA στους

ενδοκυτταρικούς υποδοχείς Toll-like (υποδοχείς που ενεργοποιούν τις ανοσοαποκρίσεις), με αποτέλεσμα μία ισχυρή υϊκή ή βακτηριακή ανοσοαπόκριση. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου προκαλούν διαρροή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθιστώντας το κυτταροτοξικό. Τέλος, ένας έμμεσος μηχανισμός, με τον οποίο το πεπτίδιο ασκεί αντιβακτηριακή δράση είναι το να αυξάνει την ακαμψία και, παράλληλα, να μειώνει τη διαπερατότητα των επιθηλιακών κυττάρων, αποτρέποντας την μόλυνσή τους από κάποια βακτήρια.<sup>[16],[21]</sup>

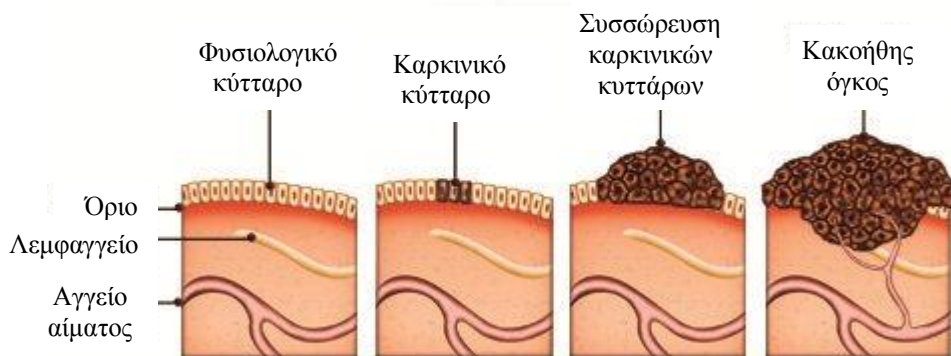
## 2.3 Καρκίνος

Ο **καρκίνος** είναι το σημαντικότερο νόσημα των ιστών και, σύμφωνα με τις στατιστικές μελέτες, αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική, ένας στους τέσσερις ανθρώπους πεθαίνει από καρκίνο. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, ωστόσο υπάρχουν μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε άτομα νεαρής ηλικίας καθώς και σε παιδιά.

Τα κύτταρα διαιρούνται και πεθαίνουν με ένα αυστηρά ελεγχόμενο σύνολο μηχανισμών, το οποίο συντονίζει τη συμπεριφορά κάθε ξεχωριστού κυττάρου με τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Το κύτταρο, δηλαδή, πρέπει να ζει όσο είναι απαραίτητο για τον οργανισμό και να πεθάνει όταν σταματά να είναι απαραίτητο. Επίσης, πρέπει να διατηρεί τον εξειδικευμένο χαρακτήρα του και να καταλαμβάνει τη σωστή θέση στον οργανισμό χωρίς να "μεταναστεύει" σε άλλες επικράτειες.

Τα **καρκινικά κύτταρα**, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, διαιρούνται ανεξέλεγκτα αφηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς και αποικίζουν περιοχές που αποτελούν την επικράτεια άλλων κυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται **όγκος** ή **νεόπλασμα** (tumor). Οι όγκοι είναι **καλοήθεις** ή **κακοήθεις**. Στην περίπτωση ενός καλοήθους όγκου, τα καρκινικά κύτταρα δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Συνήθως αφαιρούνται πλήρως με χειρουργική επέμβαση. Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους, τα κύτταρα εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφαγγεία και σχηματίζουν **δευτεροπαθείς όγκους** σε άλλα σημεία του σώματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **μετάσταση**. Όσο περισσότερες είναι οι μεταστάσεις, τόσο πιο δύσκολα μπορεί να αντιμετωπιστεί ο καρκίνος.





**Σχήμα 2.14:** Στάδια σχηματισμού όγκου. Εφόσον τα καρκινικά κύτταρα περνούν στην κυκλοφορία του αίματος ή τα λεμφαγγεία, πρόκειται για έναν κακοήθη όγκο.

Ο καρκίνος είναι **γενετικό νόσημα**, δηλαδή προκύπτει από μεταλλάξεις γονιδίων που προσδίδουν στα κύτταρα ένα συναγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των γειτονικών κυττάρων με καταστροφικές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Η φυσική επιλογή ευνοεί κύτταρα με μεταλλάξεις που εξασφαλίζουν την επιβίωσή τους, με αποτέλεσμα τη γένεση καρκινικών κυττάρων, τα οποία πολλαπλασιάζονται σε τέτοια έκταση, ώστε εκτοπίζουν τα φυσιολογικά γειτονικά κύτταρα και εξασφαλίζουν αιματική παροχή επαρκή για τη θρέψη του αναπτυσσόμενου όγκου. Η καρκινογένεση οφείλεται και στη μετάλλαξη των γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή **επιδιορθωτικών ενζύμων**. Τα επιδιορθωτικά ένζυμα διορθώνουν λάθη που προκαλούνται είτε από εξωτερικούς παράγοντες είτε από τυχαία σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA. Οι παράγοντες, επομένως, που προδιαθέτουν την ανάπτυξη του καρκίνου, είναι **μεταλλαξιγόνοι** και αναφέρονται παρακάτω.

- **Περιβαλλοντικοί παράγοντες**, όπως η ιοντίζουσα ακτινοβολία και οι χημικές ενώσεις.
- **Μολυσματικοί παράγοντες**, όπως οι ιοί.
- **Ο καθημερινός τρόπος ζωής** (κάπνισμα, κατάχρηση αλκοόλ, διατροφικές συνήθειες)
- **Αυθόρμητες μεταλλάξεις** του γενετικού υλικού. Το καρκινικό κύτταρο προκύπτει από διαδοχικές και σε βάθος χρόνου μεταλλάξεις που υφίσταται το γονιδίωμα ενός φυσιολογικού κυττάρου ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$  μεταλλάξεις ανά γονίδιο ανά κυτταρική διαίρεση).

Τα καρκινικά κύτταρα, ανεξάρτητα από τον τύπο καρκίνου, έχουν τα ακόλουθα κοινά χαρακτηριστικά που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα.

- 1) Δεν βασίζονται σε σήματα από άλλα κύτταρα (εξωκυττάρια σήματα) για την αύξηση και τη διαίρεσή τους. Αντίθετα, έχουν τα δικά τους σήματα ανάπτυξης.
- 2) Παρακάμπτουν το ενδοκυττάριο πρόγραμμα θανάτου.
- 3) Απενεργοποιούν τα σήματα αναστολής της αύξησης και πολλαπλασιάζονται απεριόριστα (διατήρηση αγγειογένεσης).
- 4) Είναι γενετικώς ασταθή με αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων, πράγμα που διευκολύνει την ανάπτυξη του καρκίνου.
- 5) Παρουσιάζουν παθολογική διεισδυτικότητα, καθώς δε διαθέτουν ειδικά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (καντερίνες), που συγκρατούν τα φυσιολογικά κύτταρα στη σωστή θέση.
- 6) Εισβάλλουν σε ξένους ιστούς

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα στη Μοριακή Βιολογία έχει στραφεί στα γονίδια των καρκινικών κυττάρων και έχει εντοπίσει δύο κατηγορίες γονιδίων, τα **ογκογονίδια** και τα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια, τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον καρκίνο. Τα ογκογονίδια ανακαλύφθηκαν αρχικά σε διάφορους ιούς, οι οποίοι έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Παρόμοια γονίδια βρέθηκαν, στη συνέχεια, και στα φυσιολογικά κύτταρα και ονομάστηκαν **πρωτοογκογονίδια**. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, γονιδιακές μεταλλάξεις ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι δυνατόν να μετατρέψουν τα γονίδια αυτά σε ογκογονίδια, με συνέπεια την εμφάνιση καρκίνου. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως δηλώνει το όνομά τους, καταστέλλουν την ανάπτυξη όγκων, ρυθμίζοντας τη δράση των πρωτοογκογονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η απενεργοποίησή τους με γονιδιακή μετάλλαξη ή χρωμοσωμική ανωμαλία έχει ως συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η μελέτη των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των προϊόντων τους μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένες μεθόδους θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου.

Εάν κατανοήσουμε εις βάθος τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να εισβάλλουν σε διαφορετικούς ιστούς, τότε ίσως βρούμε και αποτελεσματικούς τρόπους θεραπείας του καρκίνου. Ωστόσο, το έργο των επιστημόνων είναι αρκετά δύσκολο, καθώς τα καρκινικά κύτταρα μεταλλάσσονται και αναπτύσσουν γρήγορα αντοχή στη θεραπεία. Ακόμα, επειδή οι

μεταλλάξεις συμβαίνουν τυχαία, κάθε τύπος καρκίνου είναι μοναδικός. Τέλος, ο όγκος δεν ανιχνεύεται μέχρι να αποκτήσει διάμετρο τουλάχιστον 1 cm. Στο χρόνο αυτό, αποτελείται ήδη από εκατομμύρια καρκινικά κύτταρα με γενετική ποικιλότητα. Οι θεραπείες που εφαρμόζονται σήμερα είναι οι ακόλουθες.

- ❖ Η **χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης όγκου**, με την προϋπόθεση να μην έχουν γίνει πολλαπλές μεταστάσεις του καρκίνου.
- ❖ Η **ακτινοθεραπεία** (radiation therapy, RT), μία σχετικά ακριβής θεραπεία, η οποία βασίζεται στον τοπικό έλεγχο του καρκίνου.
- ❖ Η **χημειοθεραπεία** (chemotherapy, CT), δηλαδή η θεραπεία με αγωγή "αντικαρκινικών" φαρμακευτικών ουσιών, η οποία έχει ένα ευρύ φάσμα αντιμετώπισης του καρκίνου.

Παράλληλα, διεξάγεται εντατική έρευνα για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων κατά του καρκίνου. Μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική αντιμετώπισης του καρκίνου είναι η αναστολή του σχηματισμού των νέων αιμοφόρων αγγείων που κανονικά σχηματίζονται σε έναν αυξανόμενο όγκο. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα έχουν ανεπαρκή αιματική παροχή και αναχαιτίζεται η αύξηση του όγκου. Μία άλλη στρατηγική βασίζεται σε αντισώματα που προσδένονται σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων. Τα αντισώματα αυτά είναι συζευγμένα με τοξίνες ή ένζυμα, που θανατώνουν τα στοχευμένα καρκινικά κύτταρα.<sup>[23],[24]</sup>

## 2.4 Κατιονικά αντικαρκινικά πεπτίδια

Οι συμβατικές θεραπευτικές μέθοδοι που έχουν εφαρμοσθεί έως τώρα για την αντιμετώπιση του καρκίνου περιορίζονται στη μαζική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων χωρίς να εμφανίζουν εκλεκτικότητα στον όγκο με αποτέλεσμα να προκαλούν επιβλαβείς παρενέργειες και να εμφανίζουν τοξικότητα στα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αναπτύσσουν αντίσταση στους συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες μέσω αλλαγών του γενετικού υλικού. Επομένως, το πεδίο της έρευνας πρέπει να στραφεί στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία θα στοχεύουν, εκλεκτικά και αποτελεσματικά, τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα των

γειτονικών ιστών και θα μπορούν να παρακάμπτουν τους μηχανισμούς αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα (multidrug-resistance mechanisms).

Ορισμένα **φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια** και τα **συνθετικά ανάλογά** τους είναι, εκλεκτικά, τοξικά σε καρκινικά κύτταρα, ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών. Ως αντιμικροβιακά πεπτίδια, αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων χωρίς να έρθουν σε επαφή με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της (non-receptor-mediated pathway), άρα τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να αναπτύξουν αντίσταση στα AMPs. Επίσης, είναι ευδιάλυτα στον οργανισμό, μία ιδιότητα που εξασφαλίζει υψηλή πρόσληψη στους καρκινικούς ιστούς και γρήγορη απομάκρυνση από το αίμα. Χάρη σε αυτές τις ιδιότητες, τα AMPs που εμφανίζουν τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα και αναφέρονται ως αντικαρκινικά πεπτίδια (ACPs), ανήκουν στις πολλά υποσχόμενες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών καρκινικών φαρμάκων. Τα ACPs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, όπως φαίνεται παρακάτω.

- 1) Αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία δρουν εναντίον βακτηρίων και καρκινικών κυττάρων, αλλά δεν έχουν καμία δράση απέναντι στα φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών.
- 2) Αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία είναι κυτταροτοξικά σε βακτήρια, σε καρκινικά κύτταρα, καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα των θηλαστικών.

Οι μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων έχουν θεμελιώδεις διαφορές από αυτές των φυσιολογικών κυττάρων των θηλαστικών και αυτό εξηγεί την εκλεκτική δράση ορισμένων AMPs εναντίον των καρκινικών κυττάρων. Οι μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων διαθέτουν αρνητικό φορτίο λόγω της, υψηλότερης του φυσιολογικού, έκφρασης ανιοντικών μορίων στην εξωτερική επιφάνειά τους, όπως η **φωσφατιδυλοσερίνη**, οι **Ο-γλυκοζιτικές μυκίνες** (υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνες, που διαθέτουν Ο-γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης και είναι πλούσιες σε αρνητικά φορτισμένα σιαλικά οξέα και άλατα θειϊκού οξέος), οι **γαγγλιοζίτες** (ενώσεις, αποτελούμενες από γλυκοσφιγγολιπίδια και ένα ή περισσότερα σιαλικά οξέα) και οι **θειϊκές ηπαράνες** (heparan sulfates). Αντίθετα, η εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών των φυσιολογικών κυττάρων αποτελείται, κυρίως, από ουδέτερα επαμφοτερίζοντα φωσφολιπίδια (σφιγγομυελίνη, φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοεθανολαμίνη) και χοληστερόλη, η οποία σταθεροποιεί τη ρευστότητα της

κυτταροπλασματικής μεμβράνης και εξουδετερώνει το φορτίο των AMPs. Επομένως, η μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων είναι περισσότερο ασταθής από τη μεμβράνη των φυσιολογικών, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη ρευστότητα και άρα διευκολύνεται η διάρρηξή της από τα αντικαρκινικά πεπτιδία. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής από τα φυσιολογικά, λόγω της παρουσίας περισσότερων **μικρολαχνών** (microvilli), που είναι μικρές προεκβολές στην επιφάνεια των μεμβρανών. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αλληλεπιδράσουν με ένα αρκετά μεγάλο αριθμό αντικαρκινικών πεπτιδίων.<sup>[24],[25],[26],[27],[29],[30]</sup>

#### 2.4.1 Μηχανισμοί δράσης των κατιονικών αντικαρκινικών πεπτιδίων

Παρόμοια δράση με αυτή των αντιμικροβιακών πεπτιδίων που διασπών το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων φαίνεται ότι έχουν και τα αντικαρκινικά πεπτιδία, τα οποία προκαλούν επιλεκτική λύση της μεμβράνης του καρκινικού κυττάρου, οδηγώντας στη νέκρωση του κυττάρου. Η αρχική ένδειξη για μεμβρανο-αποδιοργανωτική δράση των ACPs ανακαλύφθηκε σε μία μελέτη της μαγγαϊνίνης (magainin) και των συνθετικών αναλόγων της εναντίον αιματοποιητικών και συμπαγών όγκων. Η κρίσιμη διαπίστωση αυτής της μελέτης ήταν ότι το συνολικό αρνητικό φορτίο κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ήταν η αιτία για τη διάσπασή της. Επιπλέον, η αντικατάσταση των L-αμινοξέων της μαγγαϊνίνης με D-αμινοξέα διατήρησε την αντικαρκινική δράση, αποκλείοντας την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Δύο είναι οι πιθανοί μηχανισμοί διάσπασης των μεμβρανών των καρκινικών κυττάρων από τα ACPs, το μοντέλο τάπητα **''carpet''** και το μοντέλο **''barrel-stave''** (αναλυτική περιγραφή των μοντέλων στην παράγραφο 2.2.3). Η μεμβρανο-αποδιοργανωτική δράση των ACPs δεν περιορίζεται μόνο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων, αλλά στοχεύει και τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων τους. Τα ACPs, αφού περάσουν στο κυτταρόπλασμα, προσδένονται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και τη διασπών, απελευθερώνοντας το **κυτόχρωμα c**, το οποίο επάγει την απόπτωση του καρκινικού κυττάρου. Έχει βρεθεί, επίσης, ότι η ικανότητα διάσπασης των μεμβρανών από τα ACPs ενισχύεται από τη **συναγωνιστική δράση** τους με συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η κεκροπίνη (cecropin), για

παράδειγμα, που είναι ένα κατιονικό αντικαρκινικό πεπτίδιο με δράση εναντίον του καρκίνου των ωοθηκών, του στήθους και των κυττάρων λευχαιμίας, συνεργάζεται με τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα S-fluorouracil και cytarabine για την αντιμετώπιση των οξέων λεμφοβλαστικών κυττάρων λευχαιμίας. Άλλο παράδειγμα παρόμοιας δράσης είναι η συνεργασία του πεπτιδίου μαγγαϊνίνη (magainin) με τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες cisplatin, doxorubicin και etoposide, που έδειξε ενισχυμένη δράση εναντίον καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η συναγωνιστική δράση των παραπάνω αντικαρκινικών πεπτιδίων δεν επηρεάστηκε στο ελάχιστο από το γονίδιο *mdr1* (multidrug resistance 1 gene).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα αντικαρκινικά πεπτίδια δε στοχεύουν τις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων και των μιτοχονδρίων τους, αλλά διαθέτουν εναλλακτικούς μηχανισμούς καταστροφής του καρκίνου. Για παράδειγμα, η μελιττίνη (melittin) είναι ένα κατιονικό αμφιπαθητικό πεπτίδιο, αποτελούμενο από 26 αμινοξέα, το οποίο επιλέγει, εκλεκτικά, κύτταρα, στα οποία έχει υπερ-εκφρασθεί το ογκογονίδιο *ras*. Το πεπτίδιο ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) των κυττάρων με το ογκογονίδιο *ras*, με αποτέλεσμα την εκλεκτική καταστροφή τους. Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι αντικαρκινικά κατιονικά πεπτίδια πλούσια σε κατάλοιπα ιστιδίνης, που ονομάζονται αλλοφερόνες (alloferons) ενεργοποιούν, *in vitro*, τα λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ πειράματα *in vivo* έδειξαν ότι επάγουν την ιντερφερόνη στα ποντίκια. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι **αλλοφερόνες** θα χρησιμοποιηθούν, μελλοντικά, για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Η **αγγειογένεση** παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την εισβολή και τη μετάσταση του όγκου, παρέχοντας θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στα καρκινικά κύτταρα και, παράλληλα, αποβάλλει απόβλητα του μεταβολισμού. Επομένως, η χρήση πεπτιδίων που διακόπτουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αυξητικών παραγόντων, που σχετίζονται με την αγγειογένεση, και των υποδοχέων τους είναι αναγκαία για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Τα πεπτίδια αυτά προκαλούν αναστολή σχηματισμού του όγκου.

Τέλος, τα αντικαρκινικά πεπτίδια αλληλεπιδρούν με **λειτουργικές πρωτεΐνες** που σχετίζονται με την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου, προκαλώντας, τελικά, την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.<sup>[28],[29]</sup>

## 2.4.2 Αντικαρκινική δράση του πεπτιδίου Cathelicidin LL-37

Από βιολογικές μελέτες διαφόρων τύπων καρκίνου, αποδεικνύεται ότι το Cathelicidin LL-37 παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, μία μελέτη απέδειξε ότι το πεπτίδιο έχει αντικαρκινική δράση εναντίον του γαστρικού καρκίνου και των T λευχαιμικών κυττάρων. Το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου, που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα αμινοξέων 6-32 επάγει την απόπτωση στα επιθηλιοειδή καρκινικά κύτταρα του στόματος του ανθρώπου που εμφανίζουν αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι η αποπόλωση των μιτοχονδρίων χωρίς ενεργοποίηση του ενζύμου κασπάση-3 (caspase-3). Από άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το πεπτίδιο επάγει την απόπτωση σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων από το κόλον. Επιπλέον, ποντίκια με έλλειψη καθελιδίνης εξέφρασαν αυξημένη ευαισθησία στην επαγόμενη, από αζοξυμεθάνιο, καρκινογένεση στο κόλον (azoxymethane-induced colon carcinogenesis). Αυτές οι ανακαλύψεις αποτελούν το επιστημονικό υπόβαθρο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Από την άλλη μεριά, η έκφραση σε υπέρμετρο βαθμό του Cathelicidin LL-37 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης στη διάγνωση του εκάστοτε τύπου καρκίνου.<sup>[16],[27],[31]</sup>

## 2.5 Βιβλιογραφία

- [1] Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker, <<ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ>>, Τόμος ΙΙ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007.
- [2] J. Deasy, <<Antibiotic resistance: The ongoing challenge for effective drug therapy>>, 2009, *JAAPA*, 22: 19-22.
- [3] P.M. Hawkey, <<The origins and molecular basis of antibiotic resistance>>, *BMJ*, vol.317, no. September, 657-660 (1998).
- [4] A.M. Sefton, <<Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium>>, *Drugs*, vol.62, no.4, 557-566 (2002).
- [5] Powers J. S. & Hancock R. E. W. , <<The relationship between peptide structure and antibacterial activity>>, **24**, 1681–1691 (2003).
- [6] Lin M., Hui C., Chen J. & Wu, J. Peptides , <<Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant Staphylococcus aureus>>, *Peptides* **44**, 139–148 (2013).
- [7] Jenssen H., Hamill P. & Hancock, R. E. W., <<Peptide Antimicrobial Agents>>, **19**, 491–511 (2006).
- [8] Marr A. K., Gooderham W. J. & Hancock, R. E. W., <<Antibacterial peptides for therapeutic use : obstacles and realistic outlook>>, 468–472 (2006).
- [9] Reddy K. V. R., Yedery R. D. & Aranha C., <<Antimicrobial peptides : premises and promises>>, **24**, 536–547 (2004).
- [10] Huang Y., Huang J. & Chen Y. Protein & Cell REVIEW, <<Alpha-helical cationic antimicrobial peptides : relationships of structure and function>>, **1**, 143–152 (2010).
- [11] Epanand R. M. & Vogel H. J., <<Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action>>, 1462, (1999).
- [12] Hancock R. E. W., <<Peptide antibiotics>>, **349**, 418–422 (1997).
- [13] Hancock R. E. W. & Rozek A., <<Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides>>, **206**, 143–149 (2002).



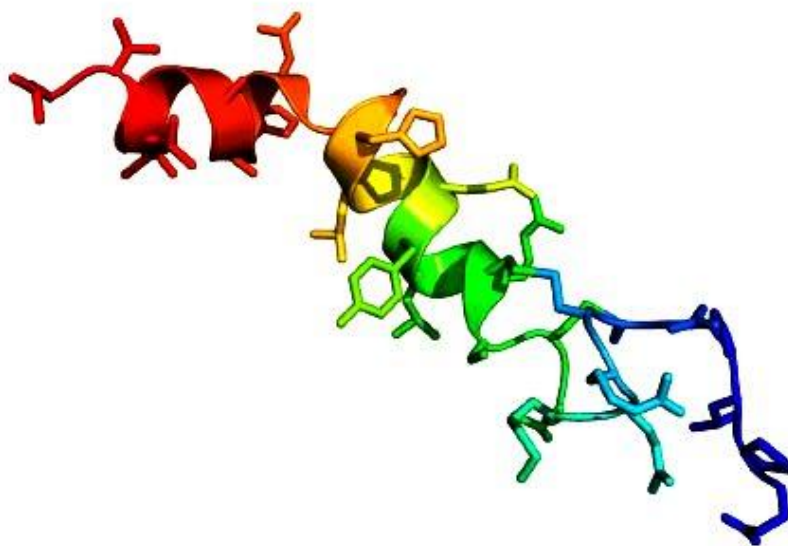
- [14] Hancock R.E.W. , Diseases, L. I. Review, <<Cationic peptides : effectors in innate immunity and novel antimicrobials>>, **1**, (2001).
- [15] Ageitos J. M., Sánchez-pérez A., Calo-mata P. & Villa, T. G., <<Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria>>, *Biochem. Pharmacol.* (2016).
- [16] Wang G., Pharmaceuticals, Review, <<Human Antimicrobial Peptides and Proteins>>, 545–594 (2014).
- [17] Strzałkowska N. & Jo A., <<Cathelicidins : family of antimicrobial peptides . A review>>, 10957–10970 (2012).
- [18] Abba J. Kastin, Andrew V. Scally, <<Handbook of Biologically Active Peptides>>, ELSEVIER, Academic Press, pp. 67-74, 2006.
- [19] Oren Z., Lerman J. C., Gudmundsson G. H., Agerberth B. & Shai, Y., <<Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes : relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity>>, **513**, 501–513 (1999).
- [20] Dürr U. H. N., Sudheendra U. S. & Ramamoorthy A., <<LL-37 , the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides>>, **1758**, 1408–1425 (2006).
- [21] Vandamme D., Landuyt B., Luyten W. & Schoofs, L., <<A comprehensive summary of LL-37 , the factotum human cathelicidin peptide>>, *Cell. Immunol.* **280**, 22–35 (2012).
- [22] Li X., Li Y., Han H., Miller D. W. & Wang G., <<Solution Structures of Human LL-37 Fragments and NMR-Based Identification of a Minimal Membrane-Targeting Antimicrobial and Anticancer Region>>, 5776–5785 (2006).
- [23] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, <<Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας>>, Τόμος II, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Αθήνα 2006.
- [24] Harris F., Dennison S. R., Singh J. & Phoenix D. A., <<On the Selectivity and Efficacy of Defense Peptides With Respect to Cancer Cells>>, 190–234 (2011).
- [25] Wang C. *et al.*, <<Anticancer mechanisms of temporin-1CEa , an amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide , in Bcap-37 human breast cancer cells>>, *Life Sci.* **92**, 1004–1014 (2013).

- [26] Chen C. *et al.*, <<Molecular mechanisms of anticancer action and cell selectivity of short  $\alpha$ -helical peptides>>, *Biomaterials* **35**,1552–1561 (2014).
- [27] Hoskin D.W. & Ramamoorthy A., <<Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides>>, **1778**, 357–375 (2008).
- [28] Wu D. *et al.*, <<Peptide-based cancer therapy : Opportunity and challenge>>, *Cancer Lett.* **351**,13–22 (2014).
- [29] Schweizer F., <<Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity>>, *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 190–194 (2009).
- [30] Deng X. *et al.*, <<Design, synthesis and biological evaluation of novel peptides with anti-cancer and drug resistance-reversing activities>>, *Eur. J. Med. Chem.* **89**, 540–548 (2015).
- [31] Ren S. X. *et al.*, <<FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells>>, **8**, 1–9 (2013).
- [32] Wang G., Mishra B., Epand R. F. & Epand R. M., <<High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments>> *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 2160–2172 (2014).



## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Πεπτιδική σύνθεση



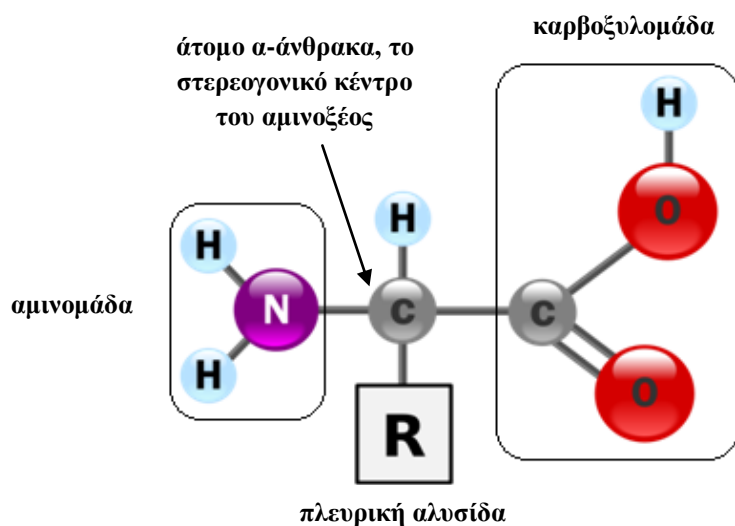


### 3.1 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Όπως υποδηλώνει η ονομασία του, κάθε αμινοξύ διαθέτει μία **αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>)** και μία **καρβοξυλομάδα (-COOH)** που αποτελούν τις λειτουργικές του ομάδες. Εκτός από τις δύο λειτουργικές ομάδες, κάθε αμινοξύ διαθέτει δύο επιπλέον ομάδες, μία **πλευρική αλυσίδα (-R)**, χαρακτηριστική για κάθε αμινοξύ και ένα **άτομο υδρογόνου**. Αυτές οι τέσσερις ομάδες συνδέονται σε ένα κεντρικό άτομο άνθρακα.

Τα αμινοξέα που απαντούν στη φύση είναι 20 στον αριθμό και ονομάζονται **πρωτεϊνικά αμινοξέα**, διότι χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών των ζωντανών οργανισμών του πλανήτη. Στον άνθρωπο, 9 από τα 20 πρωτεϊνικά αμινοξέα δεν συντίθενται από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνονται μέσω της τροφής, για το λόγο αυτό ονομάζονται **απαραίτητα αμινοξέα** (βαλίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη). Ένα διαιτολόγιο με ανεπαρκείς ποσότητες των απαραίτητων αμινοξέων μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Ο οργανισμός των παιδιών δεν μπορεί να συνθέσει 4 από τα 9 απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία ονομάζονται **ημιαπαραίτητα αμινοξέα**. Τα υπόλοιπα 11 αμινοξέα συντίθενται μέσω των μεταβολικών οδών από τον οργανισμό. Όλα τα πρωτεϊνικά αμινοξέα (συνήθη αμινοξέα) είναι **α-αμινοξέα**, δηλαδή η αμινομάδα συνδέεται με το άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο της καρβοξυλομάδας. Από εδώ και εμπρός, όταν μιλούμε για αμινοξέα θα εννοούμε τα α-αμινοξέα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κάθε αμινοξύ αποτελείται από τέσσερις ομάδες, συνδεδεμένες με ένα κεντρικό άτομο άνθρακα. Με εξαίρεση τη γλυκίνη, το απλούστερο αμινοξύ, η οποία διαθέτει ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα της, το κεντρικό άτομο άνθρακα όλων των αμινοξέων συνδέεται με τέσσερις διαφορετικές ομάδες, μία ιδιότητα που καθιστά τα αμινοξέα χειρόμορφα (chiral). Αυτή η δομή έχει το σχήμα τετραέδρου και το κεντρικό άτομο άνθρακα καλείται στερεογονικό κέντρο.



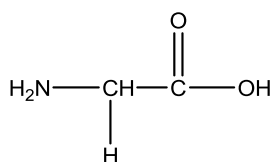
Σχήμα 3.1: Δομή ενός α-αμινοξέος.

Πίνακας 3.1: Κατάταξη των 20 φυσικών αμινοξέων.

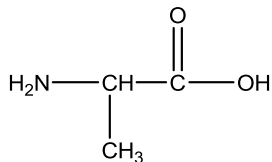
Κατηγορία αμινοξέων	Ονομασία	Συμβολισμός με τρία γράμματα	Συμβολισμός με ένα γράμμα	Μοριακό Βάρος
Ουδέτερα	Γλυκίνη	Gly	G	75,05
Αλειφατικά αμινοξέα	Αλανίνη	Ala	A	89,09
	Βαλίνη	Val	V	117,15
	Λευκίνη	Leu	L	131,18
	Ισολευκίνη	Ile	I	131,18
Όξινα αμινοξέα και τα αμιδιά τους	Ασπαραγινικό οξύ	Asp	D	133,11
	Ασπαραγίνη	Asn	N	132,12
	Γλουταμινικό οξύ	Glu	E	147,13
	Γλουταμίνη	Gln	Q	146,15
Βασικά αμινοξέα	Λυσίνη	Lys	K	146,19
	Αργινίνη	Arg	R	174,2
	Ιστιδίνη	His	H	155,18
Υδρόξυ αμινοξέα	Σερίνη	Ser	S	105,09
	Θρεονίνη	Thr	T	119,12
Αρωματικά αμινοξέα	Φαινυλαλανίνη	Phe	F	165,19
	Τυροσίνη	Tyr	Y	181,19
	Τρυπτοφάνη	Trp	W	204,24
Θειούχα αμινοξέα	Κυστεΐνη	Cys	C	121,16
	Μεθειονίνη	Met	M	149,21
Κυκλικά αμινοξέα	Προλίνη	Pro	P	115,13

Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η δομή των 20 φυσικών αμινοξέων.

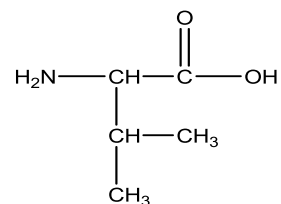
### Ουδέτερα αλειφατικά αμινοξέα



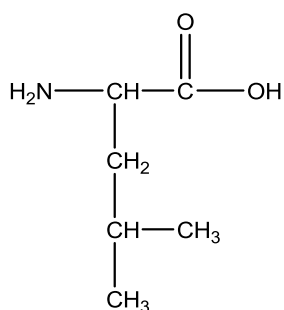
Γλυκίνη



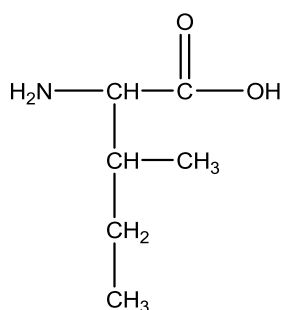
Αλανίνη



Βαλίνη

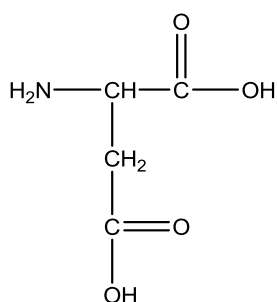


Λευκίνη

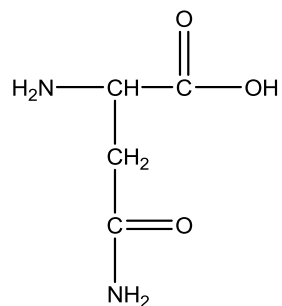


Ισολευκίνη

### Όξινα αμινοξέα και τα αμίδιά τους

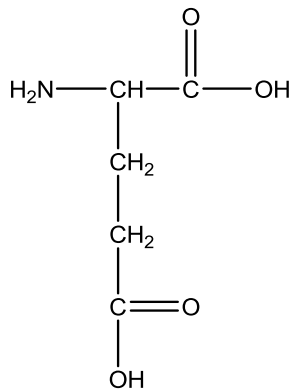


Ασπαραγινικό οξύ

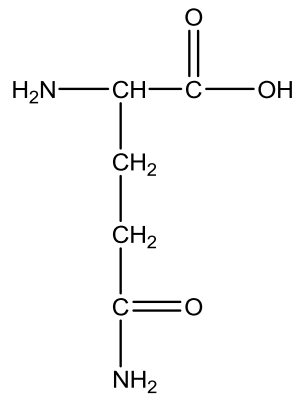


Ασπαραγίνη



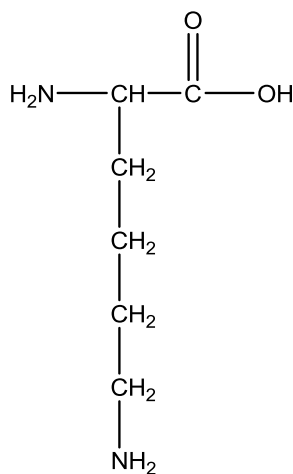


Γλουταμινικό οξύ

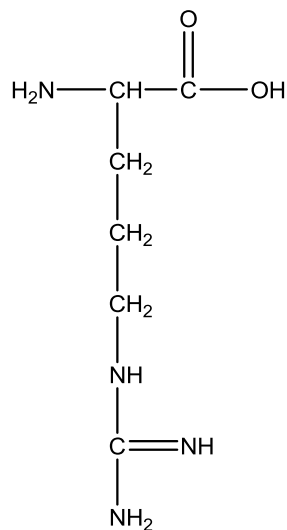


Γλουταμίνη

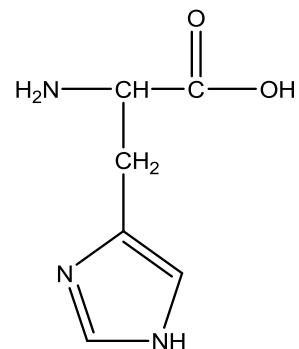
### Βασικά αμινοξέα



Λυσίνη

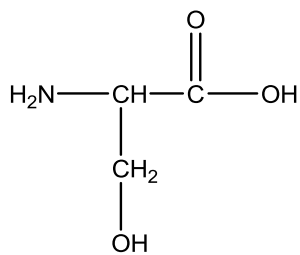


Αργινίνη

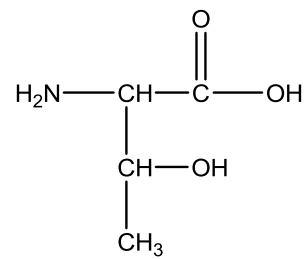


Ιστιδίνη

### Υδροξυαμινοξέα

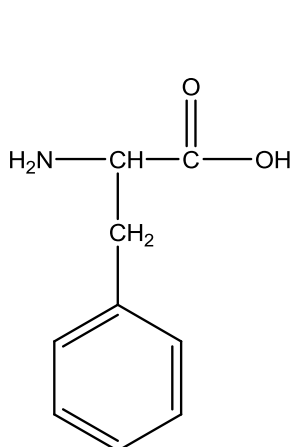


Σερίνη

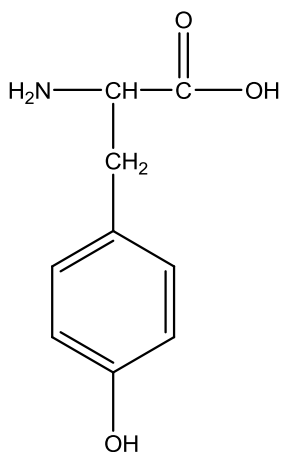


Θρεονίνη

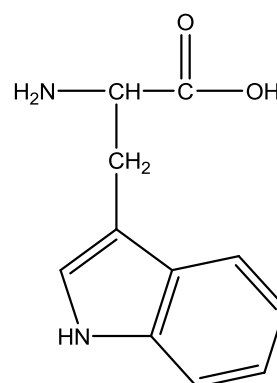
### Αρωματικά αμινοξέα



Φαινυλαλανίνη

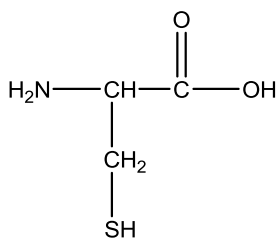


Τυροσίνη

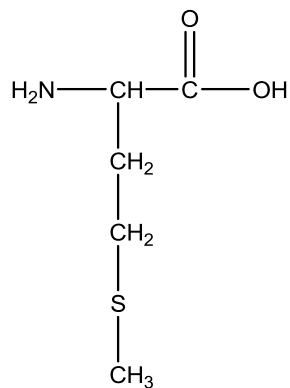


Τρυπτοφάνη

### Θειούχα αμινοξέα

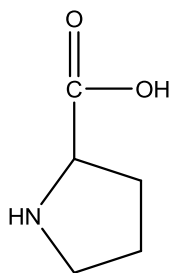


Κυστεΐνη



Μεθειονίνη

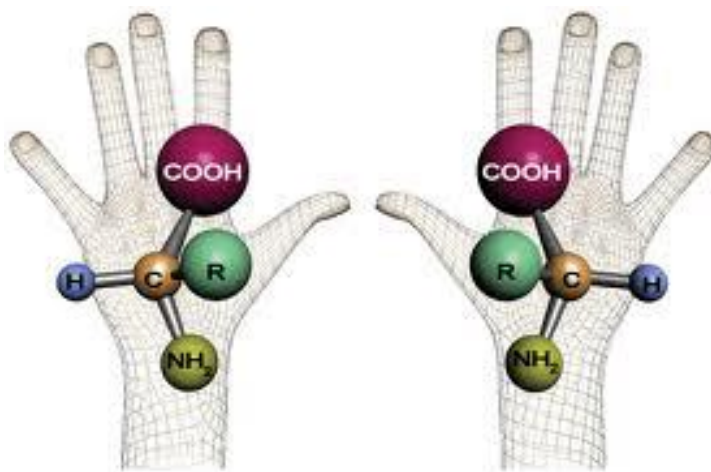
### Κυκλικό ίμινο οξύ



Προλίνη

Σχήμα 3.2: Η δομή των 20 φυσικών αμινοξέων.

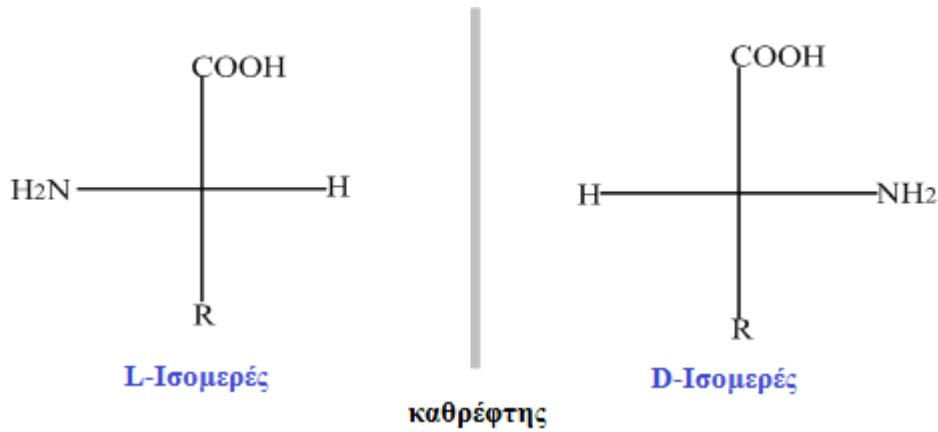
Όπως είναι γνωστό από την οργανική χημεία, χειρόμορφο ή χειρικό καλείται το μόριο με ένα ασύμμετρο κέντρο (τετραεδρικό άτομο άνθρακα) και χωρίς επίπεδο συμμετρίας, πράγμα που σημαίνει ότι έχει σχέση με το κατοπτρικό του είδωλο, ακριβώς όπως το δεξί με το αριστερό χέρι. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν σε μια ειδική κατηγορία στερεοϊσομερών, τα εναντιομερή, και έχουν αντίθετη απεικόνιση σε όλα τα στερεογονικά τους κέντρα.



Σχήμα 3.3: Απεικόνιση χειρικότητας-σχέση δεξιού με αριστερό χέρι.

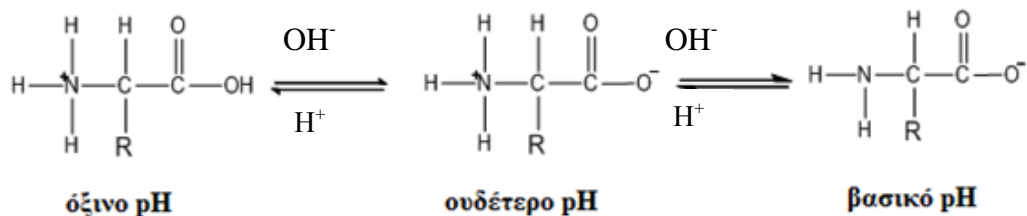
Τα αμινοξέα, ως χειρόμορφες ενώσεις, απαντούν σε δύο εναντιομερείς μορφές, το L- και D-ισομερές, ωστόσο μόνο τα L-ισομερή είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Για όλα σχεδόν τα αμινοξέα, το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R. Η φύση επέλεξε τυχαία από τα πρώτα βήματα της εξέλιξης το L-ισομερές σε σχέση με το D-ισομερές.

Σε μία προβολή κατά Fischer, τα αμινοξέα απεικονίζονται με την ομάδα  $-\text{COOH}$  στην κορυφή και την πλευρική αλυσίδα στη βάση της κορυφής. Η διάκριση μεταξύ L- και D-ισομερούς γίνεται από τη θέση που καταλαμβάνει η αμινομάδα. Άρα, σε ένα L-ισομερές η αμινομάδα τοποθετείται αριστερά και το υδρογόνο αναγκαστικά δεξιά ενώ σε ένα D-ισομερές η αμινομάδα βρίσκεται στα δεξιά και, αντίστοιχα, το υδρογόνο στα αριστερά.



Σχήμα 3.4: Απεικόνιση L- και D-ισομερούς ως κατοπτρικά είδωλα.

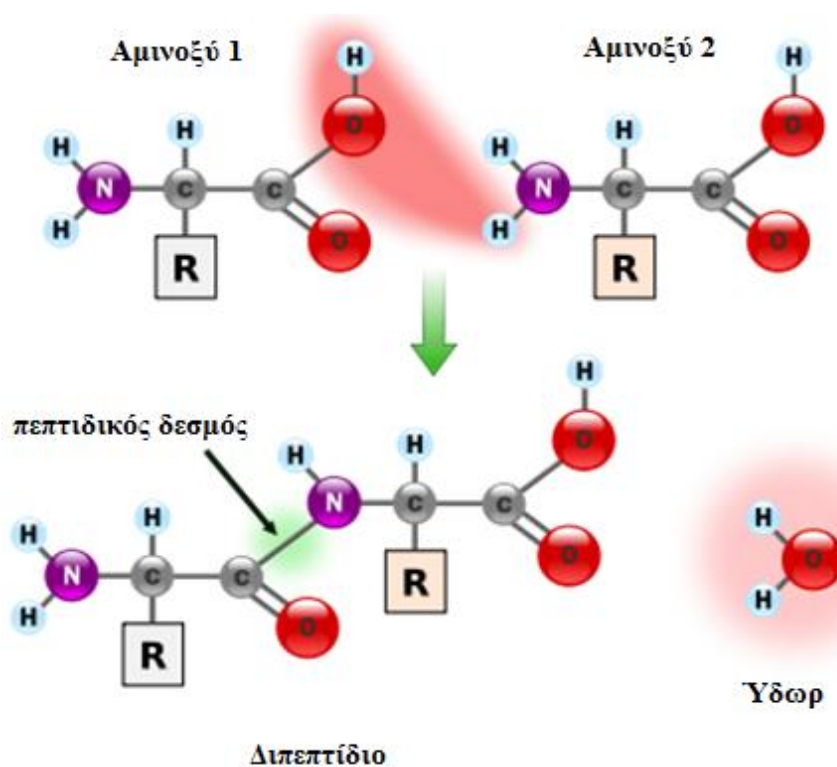
Τα αμινοξέα έχουν μία όξινη και μία βασική λειτουργική ομάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν τον βαθμό ιονισμού τους ανάλογα με το pH στο οποίο βρίσκονται. Σε όξινο pH ( $\text{pH} \approx 1$ ), η αμινομάδα είναι ιονισμένη ( $-\text{NH}_3^+$ ) ενώ η καρβοξυλομάδα είναι ηλεκτρικώς ουδέτερη ( $-\text{COOH}$ ) και το αμινοξύ είναι ένα κατιόν. Σε βασικό pH ( $\text{pH} \approx 11$ ) αντίστοιχα, η καρβοξυλομάδα είναι ιοντισμένη ( $-\text{COO}^-$ ) ενώ η αμινομάδα είναι ηλεκτρικώς ουδέτερη ( $-\text{NH}_2$ ) και το αμινοξύ είναι ένα ανιόν. Σε ουδέτερο pH το αμινοξύ εξισορροπεί ανάμεσα στην κατιονική και την ανιονική του μορφή και απαντά με τη μορφή του διπολικού ιόντος ή του αμφοτερικού ιόντος. Η τιμή αυτή του pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο. Επειδή τα αμινοξέα αντιδρούν, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, είτε ως οξέα είτε ως βάσεις, είναι **επαμφοτερίζουσες ενώσεις**.<sup>[1],[2],[3],[4],[5],[6]</sup>



Σχήμα 3.5: Οι καταστάσεις ιονισμού ενός αμινοξέος.

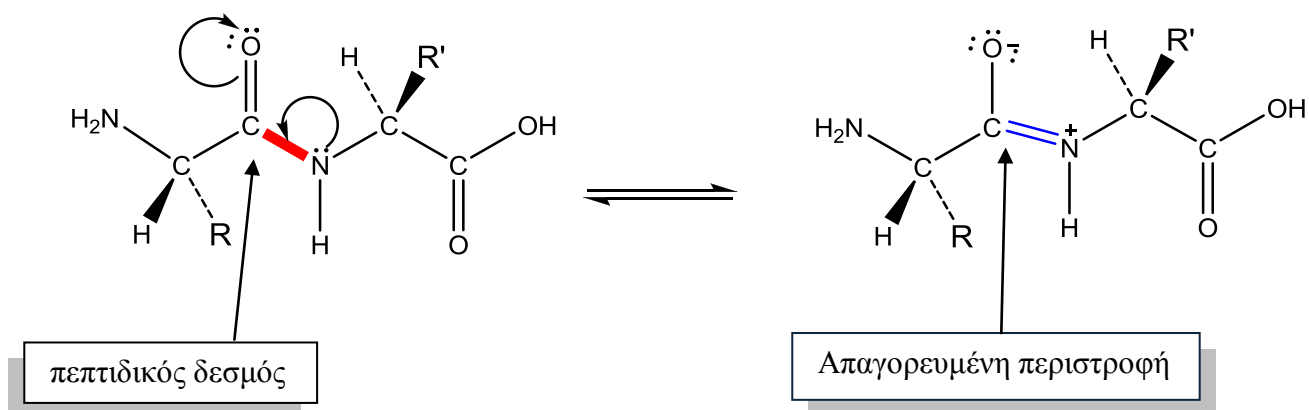
## 3.2 Πεπτιδικός δεσμός

Τα αμινοξέα έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν πεπτιδικές αλυσίδες μεγάλου μήκους, καθώς συνδέονται μεταξύ τους μέσω **αμιδικών δεσμών**. Ο αμιδικός δεσμός προκύπτει από την αντίδραση της αμινομάδας (-NH<sub>2</sub>) του ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα (-COOH) ενός άλλου και συνοδεύεται από την απελευθέρωση ενός μορίου νερού (συμπύκνωση). Ο δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ των αμινοξέων ονομάζεται **πεπτιδικός δεσμός**. Οι αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα ονομάζονται **πεπτίδια** ενώ αλυσίδες με μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων ονομάζονται **πρωτεΐνες**.



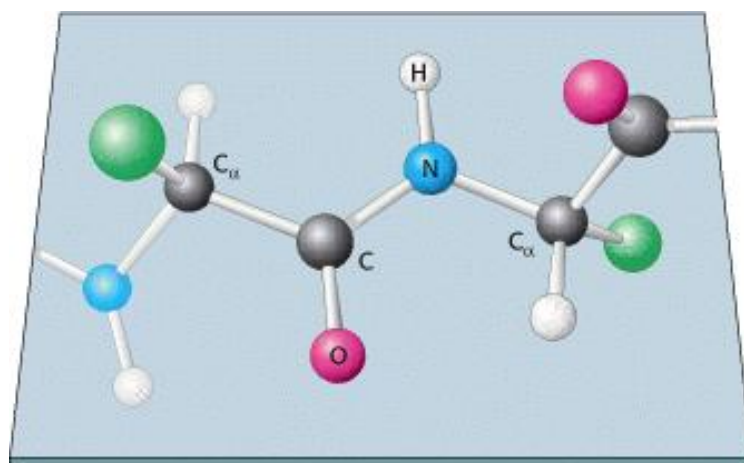
Σχήμα 3.6: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.

Ο πεπτιδικός δεσμός έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ελεύθερη περιστροφή του. Αυτό συμβαίνει, επειδή το άτομο του αζώτου που συμμετέχει στο δεσμό αλληλεπικαλύπτεται από τα τροχιακά της γειτονικής καρβονυλομάδας, με αποτέλεσμα να χαθεί ο βασικός του χαρακτήρας, λόγω απεντοπισμού του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του.



Σχήμα 3.7: Φαινόμενο συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού.

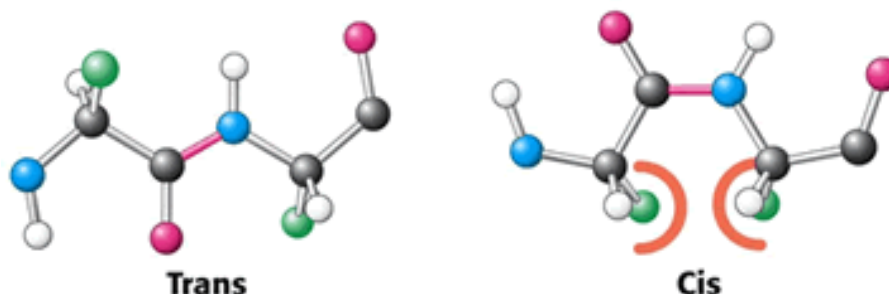
Ο πεπτιδικός δεσμός είναι επίπεδος, δεν περιστρέφεται και υπάρχουν έξι άτομα που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο για κάθε ζεύγος αμινοξέων: το άτομο α-άνθρακα και η καρβοξυλομάδα του πρώτου αμινοξέος, καθώς και η αμινομάδα και το άτομο α-άνθρακα του δεύτερου αμινοξέος. Το μήκος του πεπτιδικού δεσμού είναι  $1,32\text{\AA}$ , δηλαδή έχει τιμή μικρότερη από αυτή του απλού δεσμού ( $1,47\text{\AA}$ ) και μεγαλύτερη από τον διπλό δεσμό ( $1,27\text{\AA}$ ).



Σχήμα 3.8: Απεικόνιση επίπεδου πεπτιδικού δεσμού.

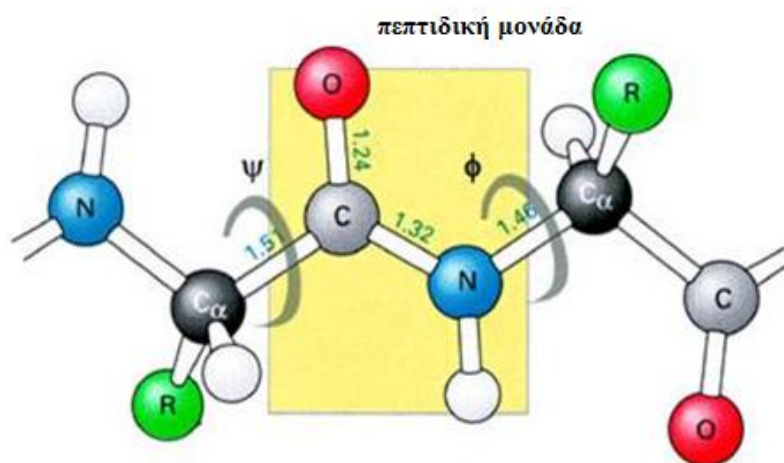
Ο πεπτιδικός δεσμός έχει δύο δυνατές διαμορφώσεις, τη διαμόρφωση cis και trans. Στη trans διαμόρφωση τα δύο άτομα α-άνθρακα βρίσκονται απέναντι, ενώ στη cis διαμόρφωση είναι στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού. Ευνοείται η trans διαμόρφωση, επειδή στη μορφή cis υπάρχουν προβλήματα χωροδιάταξης και στερεικών

αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων R των αμινοξέων, με εξαίρεση την προλίνη και κάποια μη φυσικά αμινοξέα.



Σχήμα 3.9: Απεικόνιση trans και cis διαμόρφωσης του πεπτιδικού δεσμού.

Οι δεσμοί που ενώνουν την αμινομάδα με το άτομο α-άνθρακα, καθώς και την καρβοξυλομάδα με το άτομο α-άνθρακα είναι αμιγώς απλοί δεσμοί και επομένως μπορούν να περιστραφούν ελεύθερα. Η ελευθερία περιστροφής των δεσμών αυτών επιτρέπει στις πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν με πολλούς και διάφορους τρόπους. Οι περιστροφές γύρω από τους δεσμούς προσδιορίζονται από τις δίεδρες γωνίες,  $\phi$  και  $\psi$ . Η γωνία  $\phi$  είναι η γωνία περιστροφής του δεσμού μεταξύ του ατόμου αζώτου και του α-ατόμου άνθρακα. Η γωνία  $\psi$  είναι η γωνία περιστροφής του δεσμού μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα και του α-ατόμου άνθρακα. Οι γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  καθορίζουν την κατεύθυνση της πεπτιδικής αλυσίδας.<sup>[1],[2],[3],[4],[5]</sup>



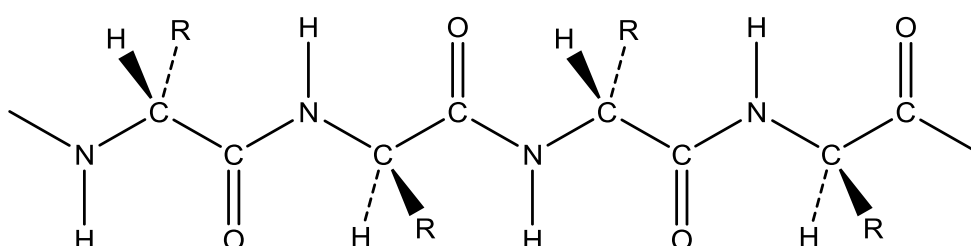
Σχήμα 3.10: Απεικόνιση της ελευθερίας περιστροφής γύρω από τον πεπτιδικό δεσμό.

### 3.3 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το δομικό στοιχείο όλων των κυττάρων, των ενζύμων, των αντισωμάτων και των περισσότερων ορμονών ενός οργανισμού.

Κάθε πρωτεΐνη περιγράφεται από τέσσερα διαφορετικά επίπεδα δομής, την πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.

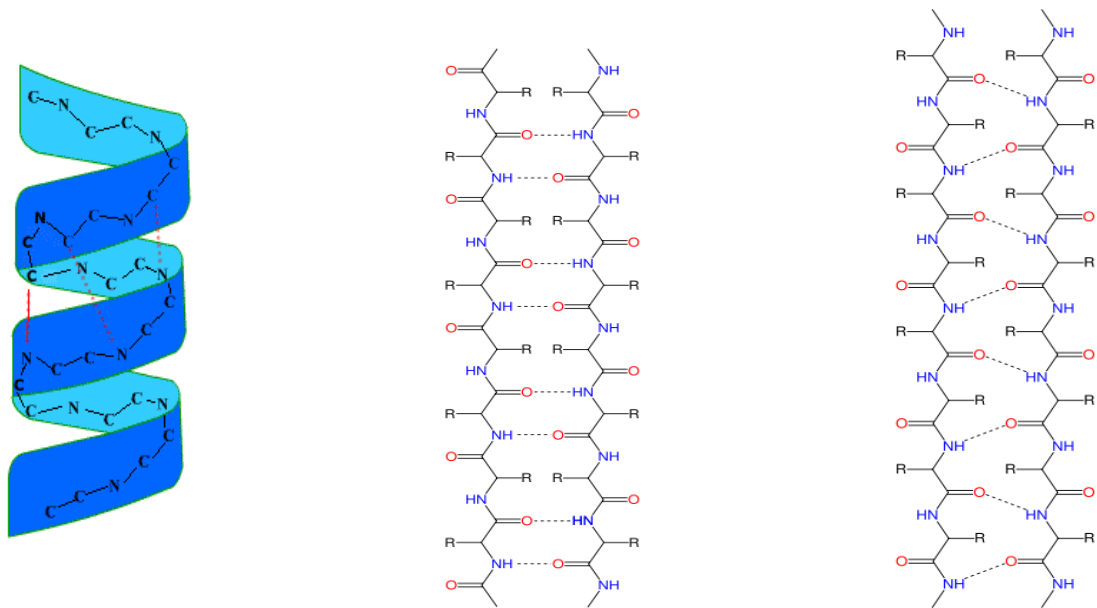
Η πρωτοταγής δομή είναι η αλληλουχία και ο αριθμός των αμινοξέων που αποτελούν την πρωτεΐνη.



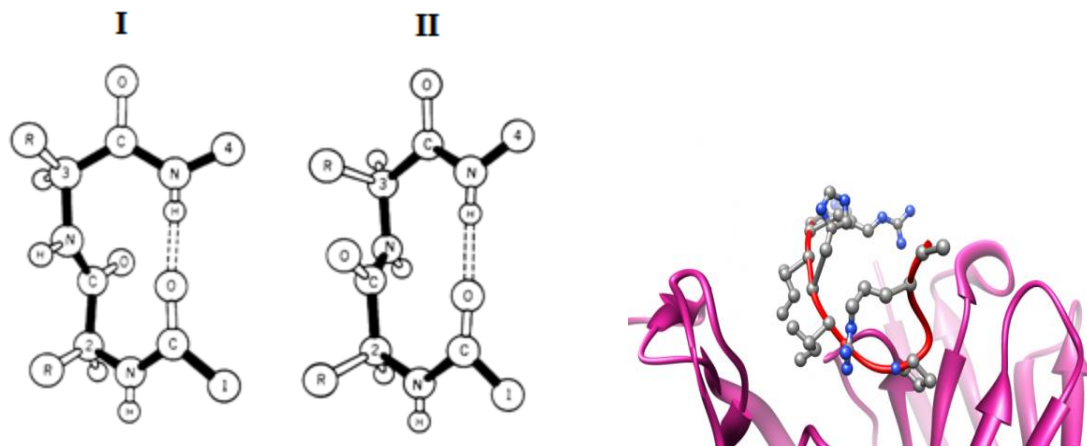
Σχήμα 3.11: Απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

Η δευτεροταγής δομή προκύπτει όταν τμήματα μιας πεπτιδικής αλυσίδας προσανατολίζονται στο χώρο μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων προς σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου και του αμινικού υδρογόνου μη γειτονικών αμινοξέων. Η πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να πάρει πολλά σχήματα, όπως είναι οι δομές της  $\alpha$ -έλικας, της  $\beta$ -πτυχωτής επιφάνειας καθώς και της  $\beta$ -στροφής και  $\Omega$ -θηλιάς.



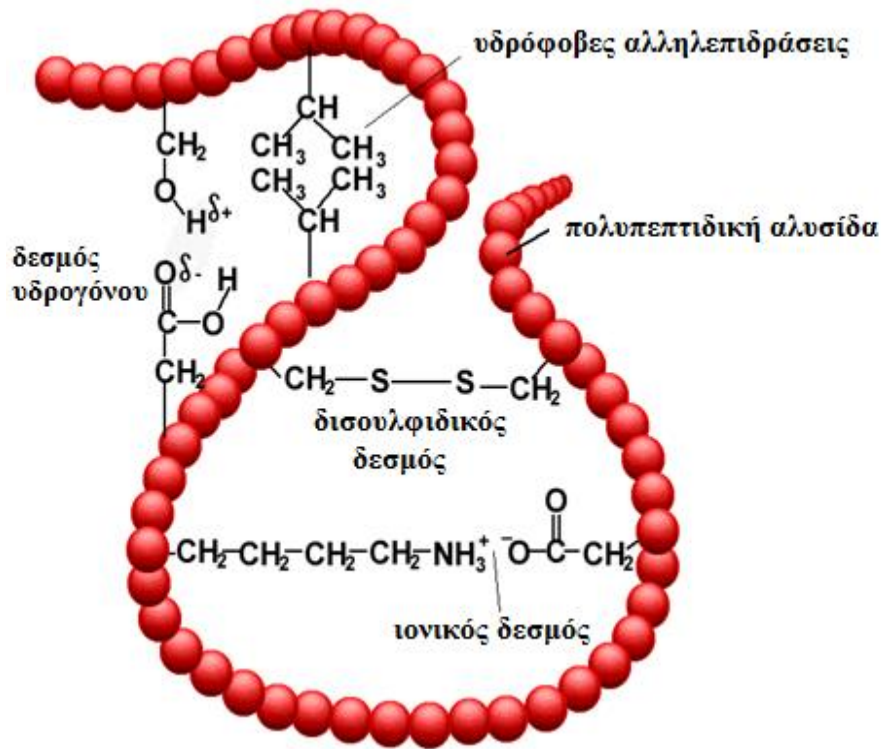


Σχήμα 3.12: Απεικόνιση α-έλικας, αντιπαράλληλης και παράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας.



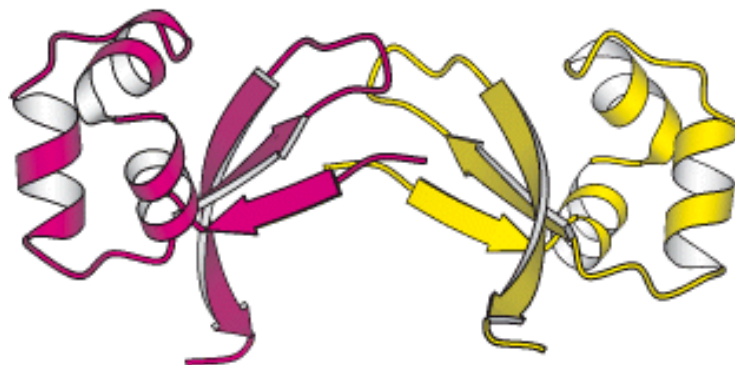
Σχήμα 3.13: Απεικόνιση β-στροφής τύπου I και II και Ω-θηλιάς.

Η τριτοταγής δομή αποτελεί το τελικό και λειτουργικό σχήμα της πεπτιδικής αλυσίδας και προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των θειούχων αμινοξέων (κυστεΐνη, μεθειονίνη), δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις Van der Waals), αλληλεπιδράσεις στιγμιαίων διπόλων καθώς και ιοντικούς δεσμούς.

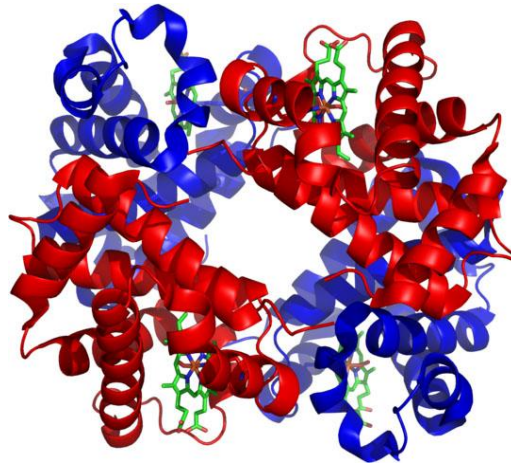


Σχήμα 3.14: Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

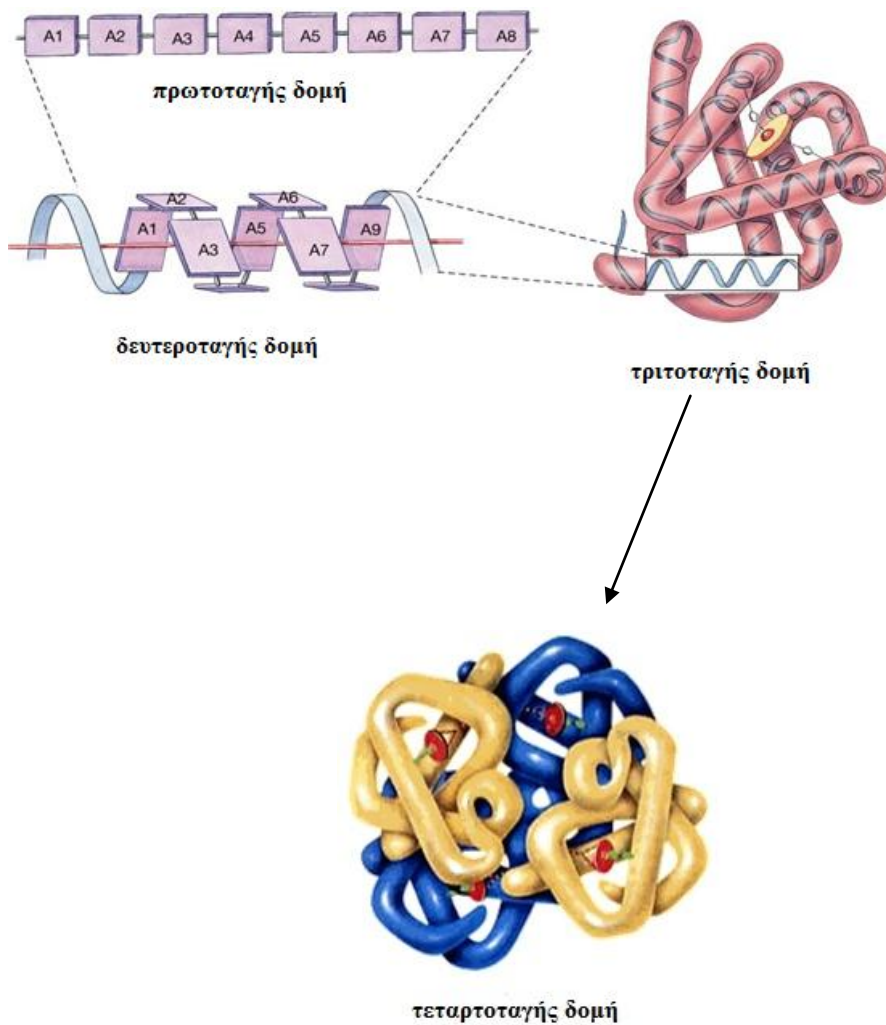
Η τεταρτοταγής δομή είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης δύο και παραπάνω πεπτιδικών αλυσίδων και η τελική διάταξή τους στο χώρο δίνει την οριστική μορφή μιας πρωτεΐνης. Η απλούστερη τεταρτοταγής δομή είναι το διμερές, που αποτελείται από την συνένωση δύο ίδιων πεπτιδικών αλυσίδων. Ένα άλλο παράδειγμα τεταρτοταγούς διαμόρφωσης είναι η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη.<sup>[2],[3],[4],[5],[6],[7]</sup>



Σχήμα 3.15: Απεικόνιση μιας τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών με διαμόρφωση στο χώρο δύο πεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίες διακρίνονται με μωβ και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα.



Σχήμα 3.16: Απεικόνιση της δομής της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης. Η συγκεκριμένη διαμόρφωση προκύπτει από την αλληλεπίδραση τεσσάρων πεπτιδικών αλυσίδων.



Σχήμα 3.17: Απεικόνιση των διαφόρων επιπέδων δομής των πρωτεϊνών.

### 3.4 Εισαγωγή στη χημεία των πεπτιδίων

Το όραμα και ταυτόχρονα η ιδέα της σύνθεσης πεπτιδίων γεννήθηκαν στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν φάνηκε η τεράστια σημασία των ενώσεων αυτών στη δομή και τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών. Οι βάσεις της πεπτιδικής χημείας τέθηκαν από τις μελέτες των **Thomas Curtius** και **Emile Fischer**. Οι μελέτες αυτές έριξαν φως στην στερεοχημική διάταξη και τη σύνταξη των περισσότερων αμινοξέων.

Η εξέλιξη της σύγχρονης πεπτιδικής χημείας οφείλεται στο έργο των **Bergmann** και **Zέρβα**, οι οποίοι εισήγαγαν το 1932 την καρβοβενζοξυ-ομάδα (Cbz ή Z). Η απήχηση του έργου τους φαίνεται έως και σήμερα, καθώς είναι ευρύτατη η χρήση της Z-προστατευτικής ομάδας, λόγω της εύκολης εισαγωγής της, του ήπιου τρόπου απομάκρυνσής της και της σταθερότητας που επιδεικνύει στις συνθήκες των αντιδράσεων σύζευξης.

Η σύνθεση πεπτιδικών αλυσίδων μεγάλου μήκους με σταδιακή προσθήκη ενός αμινοξέος ήταν ένα χρονοβόρο και επίπονο έργο, το οποίο απλοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό με την εφαρμογή της μεθόδου σύνθεσης στερεής φάσης κατά Merrifield (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS). Η μέθοδος αυτή άλλαξε ριζικά τη σύνθεση πεπτιδίων και αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία της πεπτιδικής χημείας. Οι γνώσεις που προσέφερε ο **Merrifield** μέσω της εργασίας του ήταν τόσο σημαντικές ώστε να βραβευθεί με το Nobel Χημείας το 1984.

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη της πεπτιδικής χημείας σημείωσε ανάπτυξη με ρυθμούς γεωμετρικής προόδου. Οι σημαντικότεροι σταθμοί στην εξέλιξη της πεπτιδικής χημείας είναι οι εξής.

- 1) Η χρήση του **υδροφθορίου** (HF) ως αντιδραστήριο για την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές, το 1967.
- 2) Η εισαγωγή της Fmoc-ομάδας ως **N<sup>α</sup>-προστατευτικής ομάδας**, το 1970.
- 3) Η εισαγωγή της **ρητίνης του Wang**, το 1973.
- 4) Η χρήση της **υγρής χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης** (RP-HPLC) για τον καθαρισμό των πεπτιδίων, το 1976.
- 5) Η εισαγωγή της ρητίνης **Rink Amide** για την σύνθεση είτε αμιδικών είτε προστατευμένων πεπτιδίων, το 1987.

- 6) Η εισαγωγή της **2-γλωροτριφαίνυλο-ρητίνης** για την σύνθεση είτε αμιδικών είτε προστατευμένων πεπτιδίων, το 1988.
- 7) Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας για τη χημική σύνθεση πρωτεϊνών (native chemical ligation) από τον **S.Kent** και τους συνεργάτες του, το 1994.

Τα συνθετικά πεπτίδια βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στη ρύθμιση της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης, στον έλεγχο του πόνου, στην αντιμετώπιση του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων, στη θεραπευτική αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων, ως διαγνωστικά αλλά και ως αντιβιοτικά έναντι παθογόνων βακτηρίων.<sup>[8]</sup>

### 3.5 Βασικές αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης

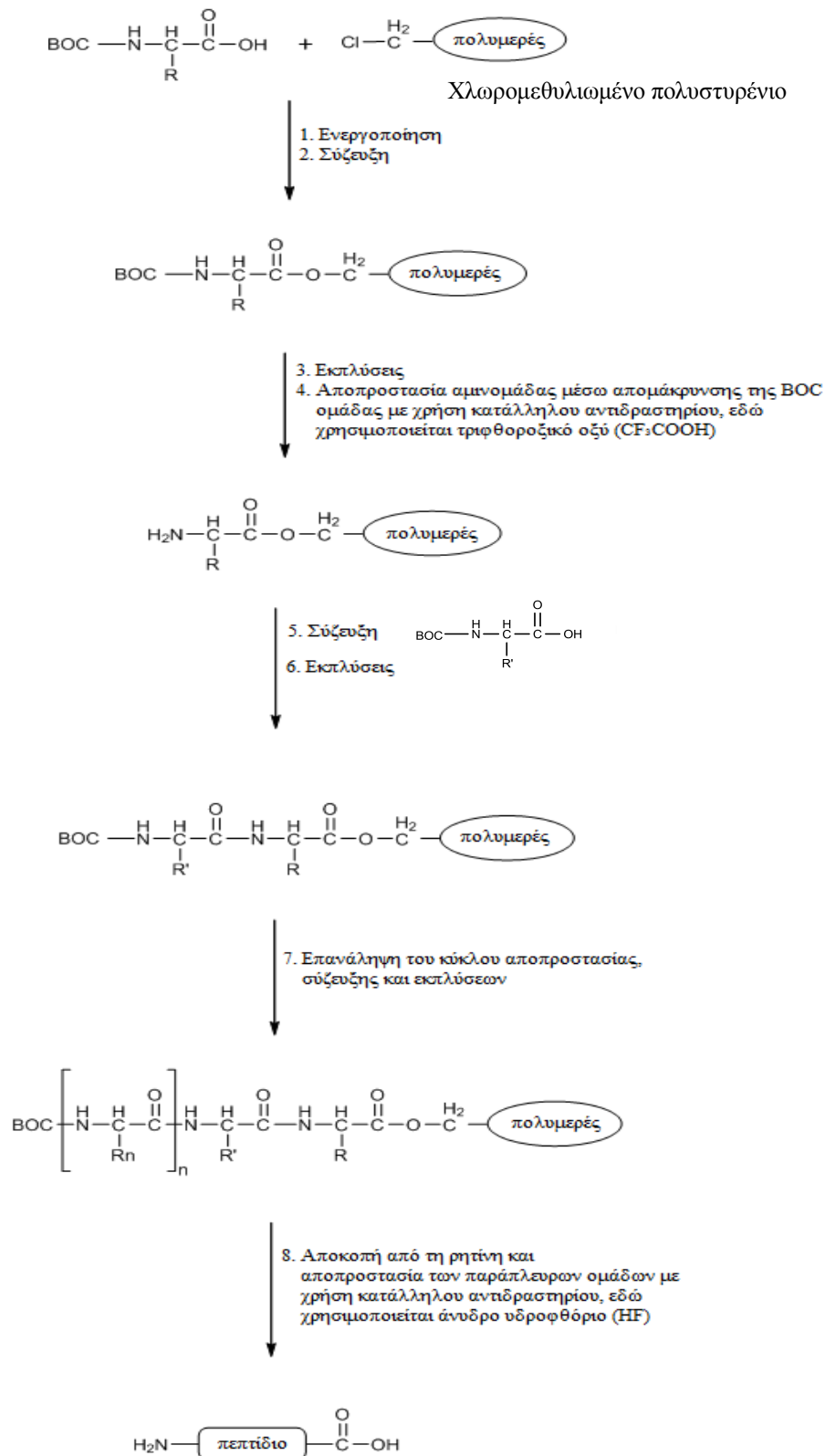
Η σύνθεση των πεπτιδίων μπορεί να γίνει είτε σε υγρή είτε σε στερεή φάση, είτε με συνδυασμό των δύο μεθόδων.

Κατά τη σύνθεση σε υγρή φάση όλες οι διεργασίες γίνονται σε διάλυμα και περιλαμβάνουν τα στάδια σύζευξης, εκχυλίσεις, καταβυθίσεις και ανακρυσταλλώσεις με σκοπό τον καθαρισμό και ταυτοποίηση του κάθε ενδιάμεσου προϊόντος. Επομένως, η μέθοδος είναι χρονοβόρα, ενώ πολλές φορές προκύπτουν και προβλήματα διαλυτότητας των ενδιάμεσων προϊόντων.

Συνοπτικά, η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση, σύμφωνα με τη μέθοδο του Merrifield, πραγματοποιείται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη), όπου το N-προστατευμένο C-τελικό αμινοξύ προσδένεται ομοιοπολικά, μέσω της καρβοξυλομάδας του, στις δραστικές ομάδες της ρητίνης. Η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται σε σχετικά μικρό χρόνο με επαναλαμβανόμενα βήματα αποπροστασιών, συζεύξεων και εκπλύσεων μέχρι την ολοκλήρωσή της, με αποτέλεσμα την αυτοματοποίηση της μεθόδου. Οι περίσσειες των αντιδραστηρίων και τα παραπροϊόντα διαχωρίζονται από το επιθυμητό πεπτίδιο με απλή διήθηση και το πεπτίδιο παραμένει προσδεμένο στη ρητίνη για όλη τη διάρκεια της σύνθεσης. Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας του πεπτιδίου, αυτό αποσπάται από τη ρητίνη και παράλληλα απομακρύνονται οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι, εκτός από την αυτοματοποίηση και τον μικρό χρόνο σύνθεσης, το χαμηλό κόστος, ο ικανοποιητικός βαθμός καθαρότητας του τελικού προϊόντος καθώς και ότι δεν προκύπτουν προβλήματα διαλυτότητας των ενδιάμεσων προϊόντων. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του πεπτιδίου γίνονται μόνο μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης.

Οι δύο μεθοδολογίες που ακολουθούνται για τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση είναι η Boc και η Fmoc στρατηγική. Στην επόμενη σελίδα δίνεται, σχηματικά, ένα παράδειγμα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση, σύμφωνα με τη Boc στρατηγική.<sup>[14],[15]</sup>

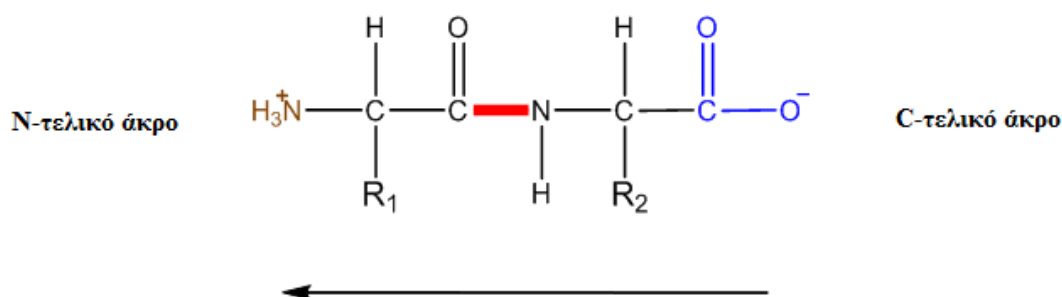


Σχήμα 3.18: Μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση, σύμφωνα με τη Boc στρατηγική.

Τα πεπτίδια, είτε γραμμικά είτε διακλαδισμένα, συντίθενται με δύο διαφορετικές τεχνικές, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται κάθε φορά (υγρή, στερεή φάση).

- I. **Πεπτιδική σύνθεση κατά βήμα (Step by Step)**, σύμφωνα με την οποία κάθε αμινοξύ που εισάγεται στην πεπτιδική αλυσίδα για τον σχηματισμό πεπτιδίου είναι προστατευμένο
- II. **Πεπτιδική σύνθεση μέσω συμπύκνωσης πεπτιδικών τμημάτων (Fragment Condensation)**, κατά την οποία κατάλληλα προστατευμένα πεπτίδια δύο ή περισσότερων αμινοξέων (fragments) συνδέονται μέσω πεπτιδικού δεσμού προς σχηματισμό μεγαλύτερων μορίων, συνθέτοντας τον πεπτιδικό σκελετό. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το υψηλό ποσοστό ρακεμοποίησης.

Η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιείται από δεξιά προς τα αριστερά, δηλαδή από το C-τελικό άκρο προς το N-τελικό άκρο. Έτσι, αποφεύγεται η ρακεμοποίηση και το τελικό πεπτίδιο λαμβάνεται σε υψηλές αποδόσεις.<sup>[12],[16],[17]</sup>



Σχήμα 3.19: Κατεύθυνση επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας.

### 3.6 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται, όπως ήδη είναι γνωστό, από την αντίδραση μιας αμινομάδας ενός αμινοξέος με μια καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος. Ωστόσο, οι αντιδράσεις μεταξύ καρβοξυλικών οξέων και αμινών πραγματοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες και αν λάβουμε υπ' όψιν ότι τα πεπτίδια είναι θερμοευαίθητες ενώσεις, οδηγούμαστε σε αδιέξοδο όσον αφορά την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Λύση στο αδιέξοδο αυτό είναι η ενεργοποίηση είτε της α-αμινομάδας είτε της



α-καρβοξυλομάδας. Επιλέγεται η ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας, όταν η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται από το C-τελικό άκρο προς το N-τελικό άκρο, σύμφωνα με το προηγούμενο σχήμα (σχήμα 3.19). Η ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας είναι απαραίτητη, αφού σε θερμοκρασία δωματίου τα καρβοξυλικά οξέα σχηματίζουν άλατα με την ελεύθερη αμινομάδα.

Προϋποθέσεις επιλογής της κατάλληλης ομάδας για ενεργοποίηση του καρβοξυλίου.

- 1) Εύκολη και γρήγορη απόσπαση κατά την σύζευξη των δύο αμινοξέων
- 2) Αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων
- 3) Δέκτης ηλεκτρονίων για αύξηση του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου C του καρβονυλίου, με αποτέλεσμα το πυρηνόφιλο άζωτο της αμινομάδας να δώσει ευκολότερα το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του προς δημιουργία πεπτιδικού δεσμού

Οι κυριότερες μέθοδοι για τον σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού είναι:

- 1) Μέθοδος των χλωριδίων
- 2) Μέθοδος των αζιδίων
- 3) Μέθοδος των ανυδριτών
- 4) Μέθοδος των ενεργών εστέρων
- 5) Κατάλυση από ένζυμα
- 6) Αντιδραστήρια Σύζευξης

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

- 1) να σχηματίζεται γρήγορα ο πεπτιδικός δεσμός
- 2) η απόδοση της σύνθεσης να είναι υψηλή
- 3) να μην ευνοούνται οι παράπλευρες αντιδράσεις
- 4) να μην ευνοείται η ρακεμοποίηση

Οι αντιδράσεις σύζευξης θα πρέπει να είναι ποσοτικές, διότι μεσολαβούν πολλές συζεύξεις μέχρι τη σύνθεση του τελικού πεπτιδίου. Έτσι, ακόμη και μικρή απώλεια στην απόδοση της σύζευξης μεγεθύνεται στη συνέχεια με αποτέλεσμα να μην λαμβάνεται το πεπτίδιο στην επιθυμητή απόδοση.

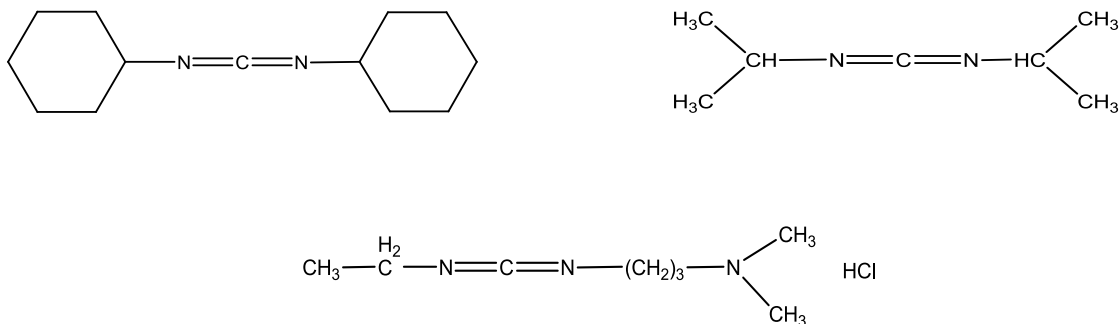
Η πιο γνωστή μέθοδος για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού είναι η **μέθοδος των αντιδραστηρίων σύζευξης**, επειδή διακρίνεται για την απλότητα και την ευκολία χειρισμού της. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η **in situ ενεργοποίηση** της καρβοξυλομάδας, δηλαδή η ενεργοποίηση και η σύζευξη γίνονται ταυτόχρονα στο Vessel.<sup>[18]</sup>

Τα αντιδραστήρια σύζευξης διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- I. Καρβοδιϊμίδια
- II. Φωσφονικά παράγωγα
- III. Ουρονικά παράγωγα

### 3.6.1 Καρβοδιϊμίδια

Τα καρβοδιϊμίδια είναι τα πλέον δημοφιλή **in situ** αντιδραστήρια ενεργοποίησης στην πεπτιδική σύνθεση. Γνωστά καρβοδιϊμίδια είναι το DCC(δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο), DIC(διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο) και το N-αίθυλο,N'-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλο] καρβοδιϊμίδιο, γνωστό ως EDC.

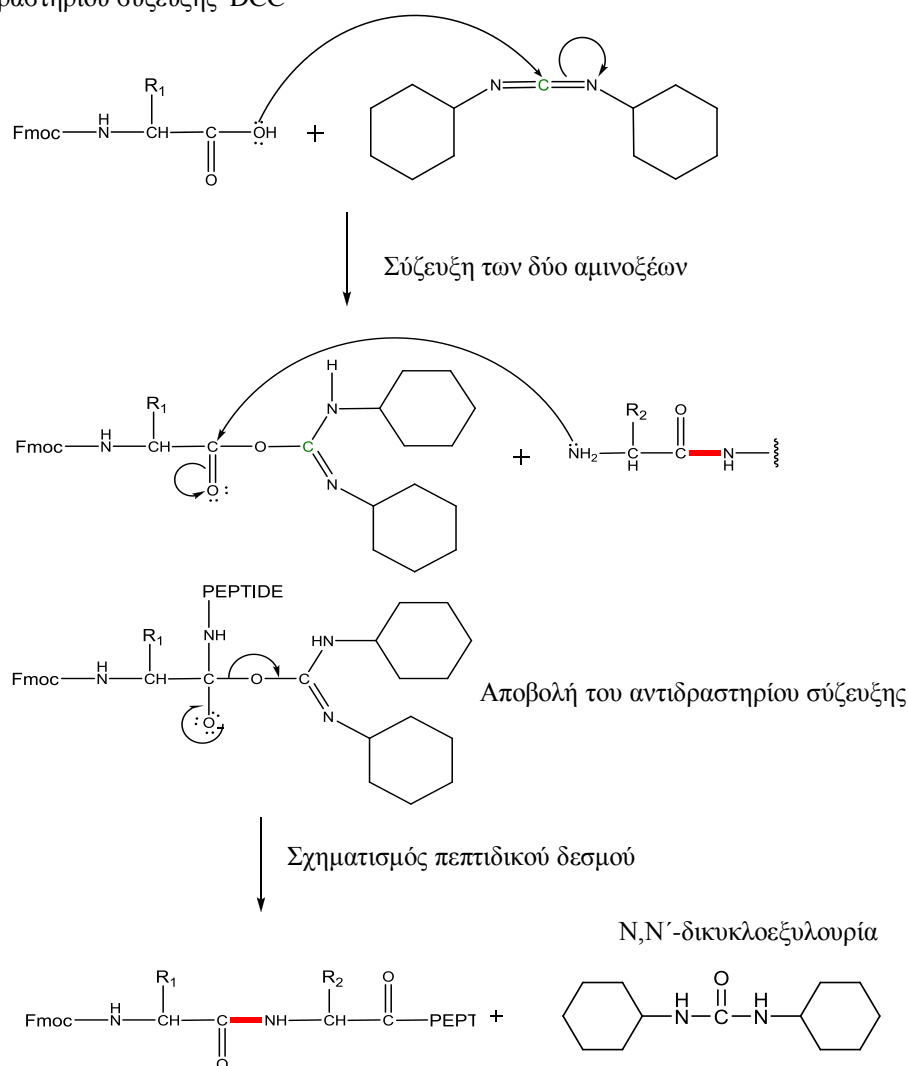


Σχήμα 3.20: Συντακτικός τύπος του DCC (πάνω αριστερά), DIC (πάνω δεξιά) και EDC (κάτω).

Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μέσω του αντιδραστηρίου DCC περιλαμβάνει αρχικά την προσθήκη της ελεύθερης α-καρβοξυλομάδας του N<sup>α</sup>-άμινο προστατευμένου αμινοξέος σε έναν από τους διπλούς δεσμούς του καρβοδιϊμιδίου, δίνοντας ως ενδιάμεσο προϊόν την **O-ακυλο-ισουουρία**, ένα δραστικό ακυλιωτικό μέσο. Έτσι, ευνοείται η πυρηνόφιλη προσβολή του αμινοξυ-συστατικού στον καρβονυλικό άνθρακα της O-ακυλο-ισουουρίας και σχηματίζεται ο αμιδικός δεσμός μεταξύ των δύο αμινοξέων καθώς

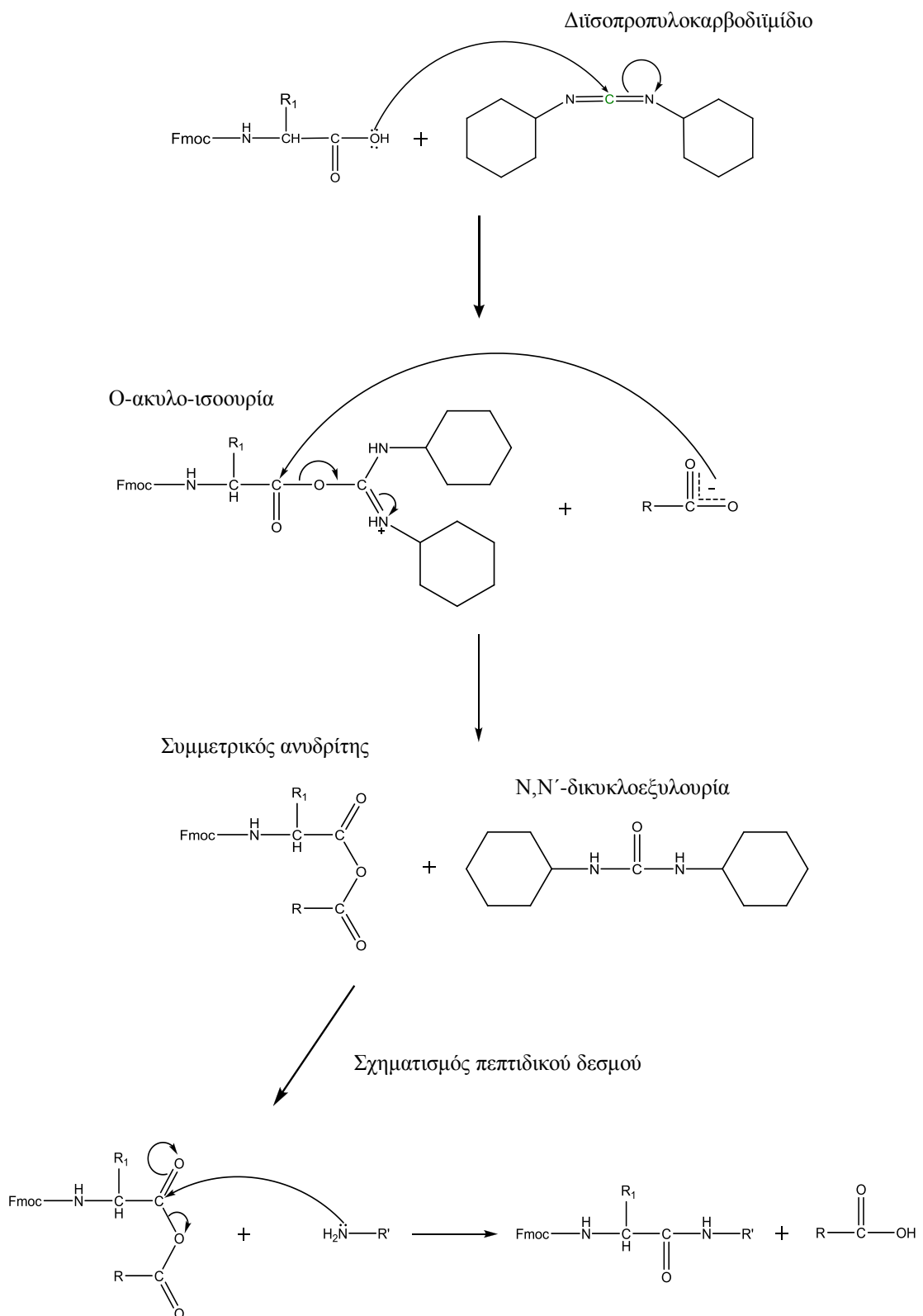
και **N,N'-δικυκλοεξυλουρία** (DCU). Ωστόσο, η **N,N'-δικυκλοεξυλουρία** είναι δυσδιάλυτη στο νερό. Για το λόγο αυτό πλεονεκτεί το **διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο** (DIC) έναντι του αντιδραστηρίου DCC, καθώς το παραπροϊόν που σχηματίζεται είναι υδατοδιαλυτό.

Ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας μέσω του αντιδραστηρίου σύζευξης DCC



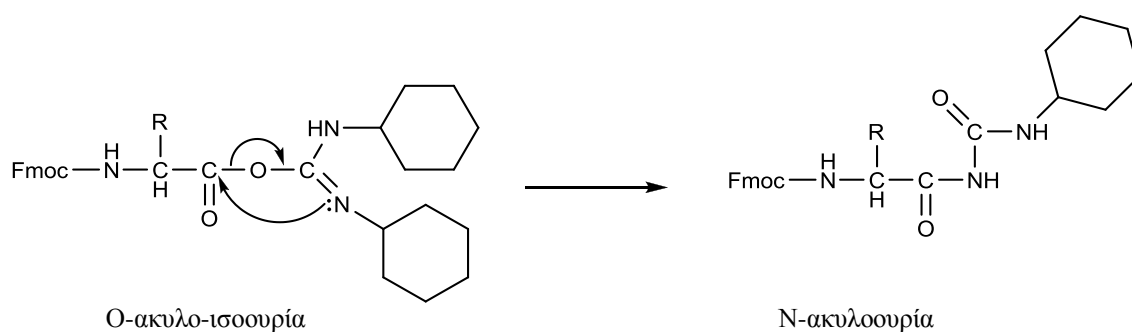
**Σχήμα 3.21:** Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μέσω ενεργοποίησης του καρβοξυλίου με DCC.

Ένα δεύτερο μόριο καρβοξυ-συστατικού μπορεί να αντιδράσει με την Ο-ακυλο-ισοουρία προς σχηματισμό ενός **συμμετρικού ανυδρίτη**, ένα ενεργοποιημένο καρβοξυ-παράγωγο, το οποίο εύκολα υπόκειται πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινο-συστατικό προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.



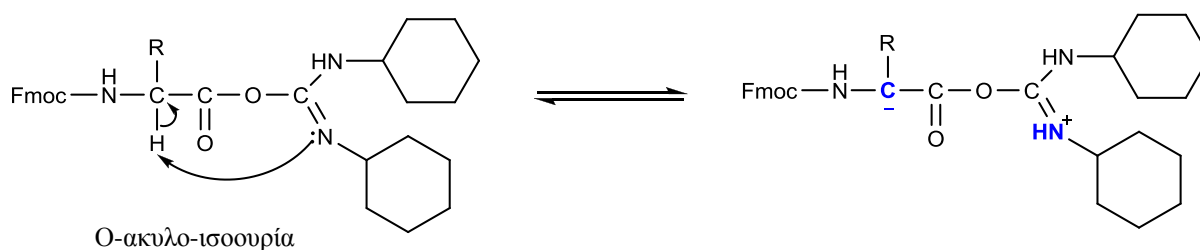
**Σχήμα 3.22: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μέσω ενεργοποιημένου συμμετρικού ανυδρίτη.**

Το βασικό μειονέκτημα της παραπάνω μεθόδου σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού είναι ότι το πυρηνόφιλο κέντρο της Ο-ακυλο-ισοουρίας, ( $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}=\text{C}-$ ), είναι δυνατόν να προσβάλλει ενδομοριακά τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα του Ν<sup>α</sup>-άμινο προστατευμένου αμινοξέος με άκυλο μετάθεση Ο→Ν, προς σχηματισμό μη δραστικών παραγώγων της Ν-ακυλοουρίας.



**Σχήμα 3.23:** Σχηματισμός Ν-ακυλοουρίας μέσω ενδομοριακής άκυλο μετάθεσης Ο→Ν.

Άλλο ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η απώλεια της οπτικής καθαρότητας του ενεργοποιημένου αμινοξέος κατά το στάδιο της σύζευξης, δηλαδή **ρακεμοποίηση**. Η ρακεμοποίηση οφείλεται στην ενδομοριακή απόσπαση του Η<sup>α</sup> πρωτονίου από το πυρηνόφιλο κέντρο της Ο-ακυλο-ισοουρίας, ( $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}=\text{C}-$ ), με αποτέλεσμα ο α-άνθρακας να χάσει την οπτική του καθαρότητα και, αφού επαναπροσλάβει ένα πρωτόνιο, να δώσει τελικά ένα **ρακεμικό μίγμα**, δηλαδή ένα ισομοριακό μίγμα των δύο εναντιομερών (L- και D-αμινοξέων) που δεν έχει στροφική ικανότητα.



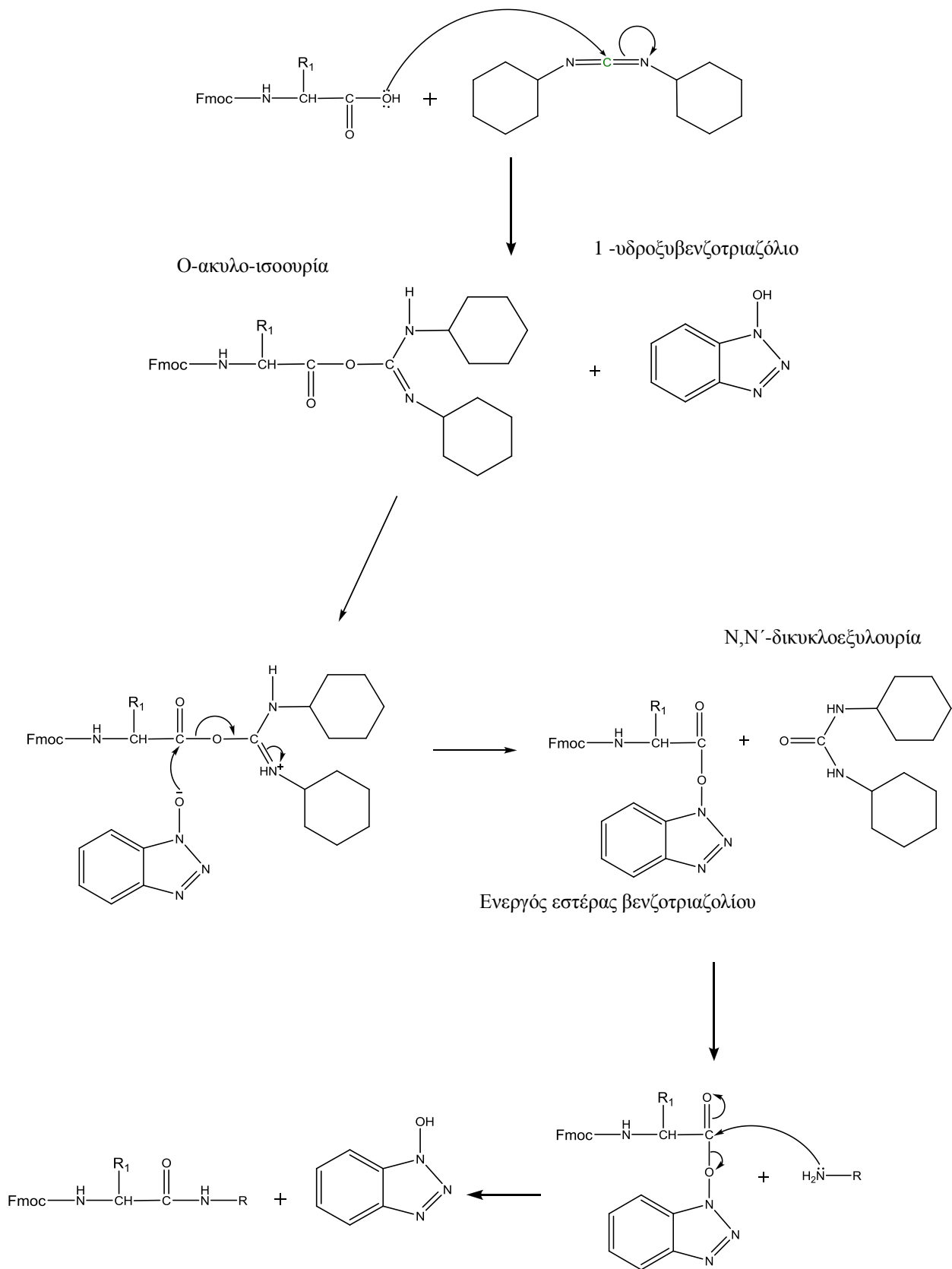
**Σχήμα 3.24:** Απώλεια της οπτικής καθαρότητας του ενεργοποιημένου αμινοξέος.

Η προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων αντιδραστηρίων, κατά το στάδιο της σύζευξης, λύνει τα προβλήματα της ρακεμοποίησης και του σχηματισμού της N-ακυλοουρίας. Τέτοια αντιδραστήρια είναι το HOBt (1-υδροξυβενζοτριάζολιο) και το HOAt (1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριάζολιο).



**Σχήμα 3.25:** Συντακτικοί τύποι των βοηθητικών πυρηνόφιλων, τα οποία χρησιμοποιούνται στο σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με τη μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων.

Το HOBt προσβάλλει το ενεργό ενδιάμεσο της O-ακυλο-ισοουρίας προς σχηματισμό ενός ισχυρού ακυλιωτικού μέσου, του **ενεργού εστέρα βενζοτριάζολιου**, ο οποίος αντιδρά ταχύτατα με την αμινομάδα του αμινοξυ-συστατικού για τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Το HOAt βοηθάει στην σύζευξη "ογκωδών" αμινοξέων με στερεοχημική παρεμπόδιση.<sup>[19],[20],[21]</sup>



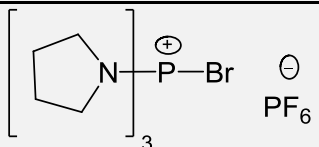
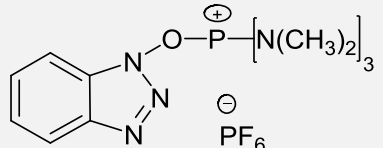
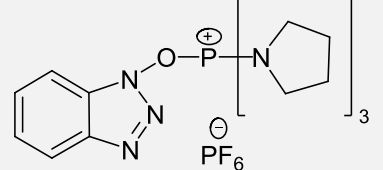
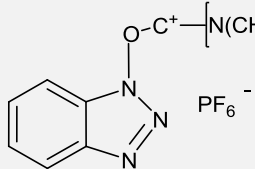
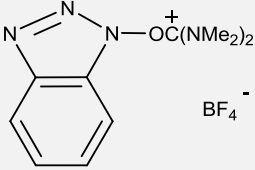
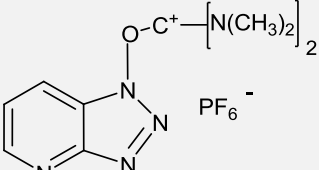
**Σχήμα 3.26: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με αντιδραστήριο σύζευξης το DCC και βοηθητικό πυρηνόφιλο το HOBt.**

### 3.6.2 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα χρησιμοποιούνται αρκετά στη σύνθεση πεπτιδίων, επειδή έχουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- 1) Παραγωγή **in situ** ενεργών εστέρων
- 2) Ευκολία χειρισμού
- 3) Εφαρμογή τόσο στην υγρή όσο και την στερεή φάση
- 4) Οι αντιδράσεις σύζευξης γίνονται γρήγορα και σε υψηλές αποδόσεις

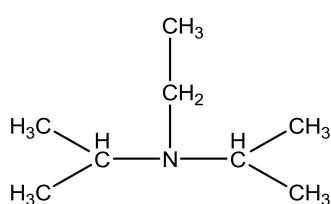
Πίνακας 3.2: Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα.

Όνομασία	Συντακτικός τύπος
Βρωμο-τρεις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBrop)	
Βενζοτριαζολ-οξυ-τρεις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP)	
Βενζοτριαζολ-οξυ-τρεις-πυρολιδινο-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP)	
Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU)	
Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- τετραφθοροβορικό άλας (TBTU)	
Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)- 1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας (HATU)	

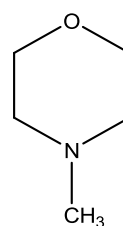


Τα φωσφορικά και ουρονικά παράγωγα αντιδρούν μόνο με καρβοξυλικά ανιόντα και επομένως είναι απαραίτητη η παρουσία μιας **οργανικής βάσης** στο διάλυμα σύζευξης. Οι βάσεις που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση παρουσία φωσφορικών και ουρονικών παραγώγων είναι οι εξής:

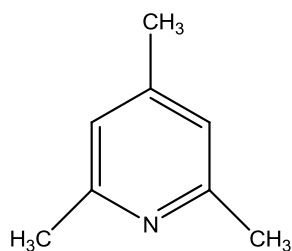
- 1) DIEA (διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη)
- 2) NMM (N-μεθυλομορφολίνη)
- 3) TMP (κολλιδίνη)
- 4) DB (DMAP) [2,6-δι-τριτοταγής βουτυλο-4-(διμεθυλοαμινο)πυριδίνη]



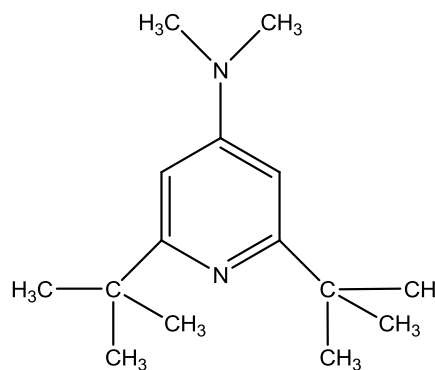
DIEA



NMM



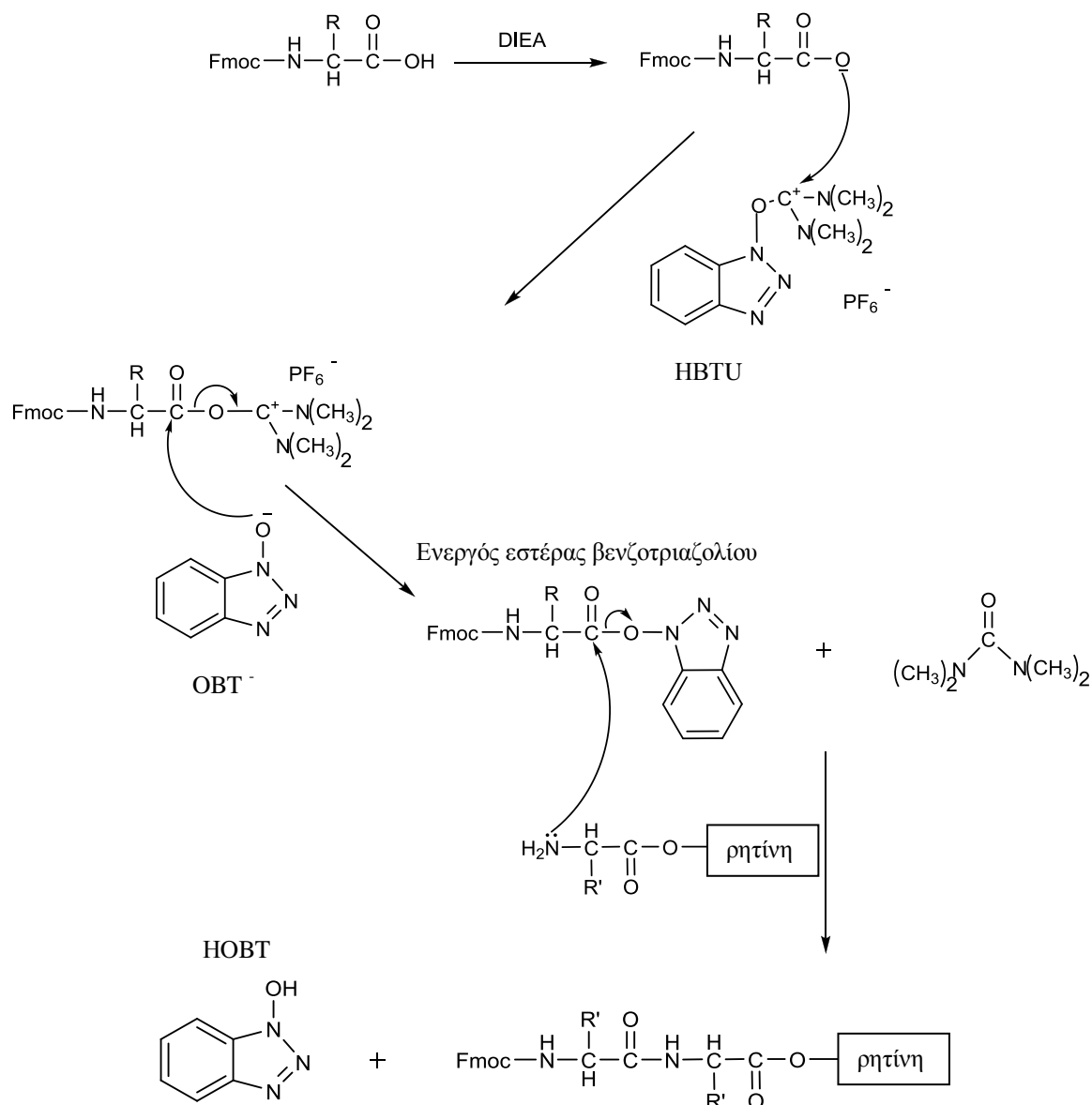
TMP



DB(DMAP)

**Σχήμα 3.27:** Συντακτικοί τύποι των οργανικών βάσεων, οι οποίες χρησιμοποιούνται στον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με τη μέθοδο των φωσφορικών και ουρονικών παραγώγων.

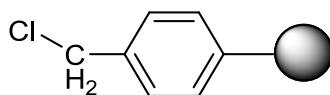
Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με τη μέθοδο των φωσφονικών και ουρονικών παραγώγων περιλαμβάνει, αρχικά, την απόσπαση του πρωτονίου της ελεύθερης α-καρβοξυλομάδας του N<sup>α</sup>-άμινο προστατευμένου αμινοξέος από την οργανική βάση και το αμινοξύ μετατρέπεται σε καρβοξυλικό ανιόν, ένα ισχυρό ακυλιωτικό μέσο. Στη συνέχεια, το καρβοξυλικό ανιόν αντιδρά με το φωσφονικό ή ουρονικό παράγωγο προς σχηματισμό ενός δραστικού ακυλοφωσφονικού ή ακυλουρονικού παραγώγου, το οποίο, με τη σειρά του, αντιδρά ταχύτατα με το βοηθητικό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο και σχηματίζεται ένα ακόμα πιο δραστικό ακυλιωτικό μέσο, ο ενεργός εστέρας του βενζοτρίαζολίου. Ο εστέρας αντιδρά, τέλος, με την αμινομάδα του αμινο-συστατικού και σχηματίζεται ο πεπτιδικός δεσμός.<sup>[22],[23],[24]</sup>



Σχήμα 3.28: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με το αντιδραστήριο σύζευξης HBTU, το βοηθητικό πυρηνόφιλο HOBT και την οργανική βάση DIEA.

### 3.7 Το αδιάλυτο στερεό υπόστρωμα

Ο Merrifield εισάγει το 1964 την ιδέα της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεό υπόστρωμα, συνθέτοντας το τετραπεπτίδιο Leu-Ala-Gly-Val πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές (ρητίνη). Το πολυμερές αυτό, η ρητίνη Merrifield, αποτελείται από σφαιρίδια συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου, τα οποία σε κάθε 100 περίπου βενζυλικούς δακτυλίους, φέρουν σε θέση πάρα- μία δραστική ομάδα (linker), τη χλωρομέθυλο ομάδα (-CH<sub>2</sub>Cl).



Σχήμα 3.29: Η ρητίνη Merrifield.

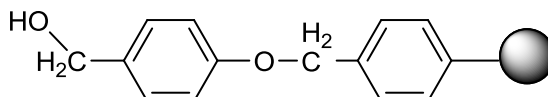
Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μία ρητίνη για να χρησιμοποιηθεί ως στερεό υπόστρωμα στην πεπτιδική σύνθεση είναι τα εξής:

- 1) να είναι αδιάλυτη στους διαλύτες και τα αντιδραστήρια κατά την πεπτιδική σύνθεση και να μην αντιδρά με αυτά
- 2) να αποτελείται από σωματίδια κατάλληλου μεγέθους και σχήματος, τα οποία φέρουν ικανοποιητικό αριθμό δραστικών ομάδων (linkers), πάνω στις οποίες θα συντεθεί η πεπτιδική αλυσίδα
- 3) να έχει αρκετά σημεία πρόσδεσης, ώστε να λαμβάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις
- 4) να μπορεί να αποκοπεί εύκολα από το πεπτίδιο μετά το τέλος της σύνθεσης
- 5) τα σωματίδια της ρητίνης να έχουν την ικανότητα να διογκώνονται με τους συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση, ώστε να επιτρέπεται η εύκολη διάχυση των αντιδραστηρίων μέσα από τους πόρους της ρητίνης
- 6) η περίσσεια των αντιδραστηρίων καθώς και τα παραπροϊόντα της αντίδρασης να απομακρύνονται εύκολα με απλή διήθηση σε κάθε στάδιο της σύνθεσης<sup>[25]</sup>

Η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος πάνω στο στερεό πολυμερές γίνεται με ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ της ελεύθερης α-καρβοξυλομάδας του αμινοξέος και της δραστικής ομάδας (linker), που φέρουν τα σφαιρίδια της ρητίνης. Το είδος της χαρακτηριστικής αυτής ομάδας καθορίζει τη φύση καθώς και την ισχύ του ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στο πεπτίδιο και τη ρητίνη και προσδιορίζει τη στρατηγική της πεπτιδικής σύνθεσης που θα εφαρμοσθεί (BOC, Fmoc στρατηγική).<sup>[14],[15]</sup>

### 3.7.1 Ρητίνες συμβατές με την Fmoc στρατηγική

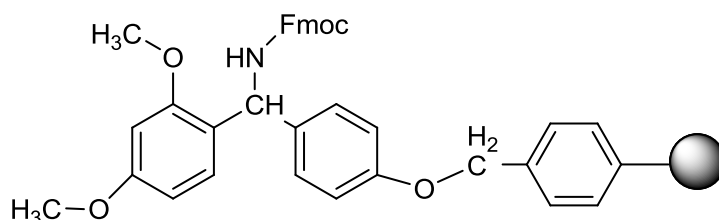
#### ❖ Wang ρητίνη



Η Wang ρητίνη (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλο ρητίνη) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη ρητίνη για τη λήψη πεπτιδίου με ελεύθερο C-τελικό καρβοξύλιο. Ο linker (4-υδροξυμεθυλ-φαινοξυμεθυλ-ομάδα) της Wang ρητίνης είναι ευαίσθητος στις όξινες συνθήκες και συνδέεται κατευθείαν με το βασικό πολυμερές, το πολυστυρένιο. Η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος στη ρητίνη γίνεται ομοιοπολικά, μέσω ενός εστερικού δεσμού, μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα του καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος και ενός αλκόξυ-ηλεκτρονιοδότη υποκαταστάτη στην πάρα θέση της βενζυλικής αλκοόλης του πολυστυρενίου.

Το συντιθέμενο πεπτίδιο απομακρύνεται εύκολα από την ρητίνη ύστερα από κατεργασία με 95% TFA. Επομένως, λαμβάνεται το πεπτίδιο με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.<sup>[14],[26]</sup>

#### ❖ Rink Amide ρητίνη

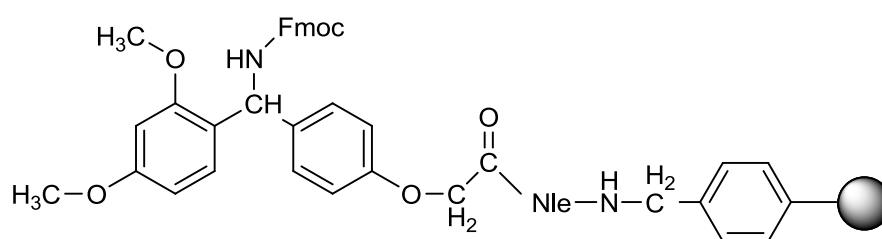


Η Rink Amide ρητίνη, [4-((2',4'-διμεθοξυφαινυλο)-(9-φλουορενυλ-μεθοξυ-καρβονυλ)αμινομεθυλο)] φαινοξυακεταμιδο-μέθυλο ρητίνη, χρησιμοποιείται για τη

σύνθεση C-τελικών αμιδικών πεπτιδίων σε μεγάλη απόδοση. Ο Fmoc-προστατευμένος linker [4-(2',4'-διμεθοξυφαινυλο-(9-φλουορενυλ-μεθοξυκαρβονυλ)αμινομέθυλο)-φαινοξυ ομάδα] της Rink Amide ρητίνης είναι πολύ ευαίσθητος στις όξινες συνθήκες και επομένως το πεπτίδιο απομακρύνεται από τη ρητίνη ύστερα από κατεργασία με διάλυμα 95% TFA σε DCM. Το πρώτο αμινοξύ προσδένεται στην αμινομάδα του linker της ρητίνης, ύστερα από απομάκρυνση της Fmoc ομάδας, σχηματίζοντας έναν αμιδικό δεσμό.

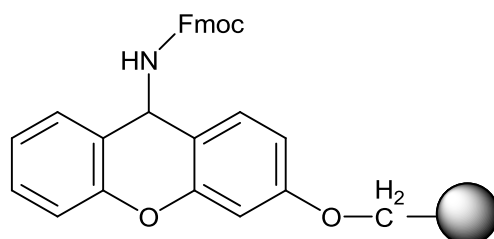
Μετά το πέρας της πεπτιδικής σύνθεσης, λαμβάνεται πεπτίδιο με ελεύθερη αμιδική ομάδα στο C-τελικό άκρο του.<sup>[18]</sup>

#### ❖ Rink Amide AM ρητίνη



Η Rink Amide AM ρητίνη αποτελεί την καλύτερη επιλογή για τη σύνθεση C-τελικών αμιδικών πεπτιδίων. Αποτελεί παραλλαγή της Rink Amide ρητίνης, διότι διαθέτει επιπλέον μία αμινομέθυλο ομάδα, ένα αμινοξύ νορλευκίνης και μία ακέτυλο ομάδα. Η τροποποίηση του linker κάνει τη ρητίνη πιο σταθερή στις όξινες συνθήκες του διαλύματος αποκοπής (διάλυμα TFA) και λαμβάνεται πεπτίδιο με ελεύθερη αμιδική ομάδα στο C-τελικό άκρο του, μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 95% TFA.

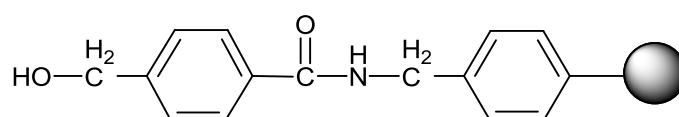
### ❖ Sieber Amide ρητίνη



Η Sieber Amide ρητίνη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αμιδικών πεπτιδίων. Η αμινομάδα που φέρει το πολυμερικό υπόστρωμα είναι λιγότερο παρεμποδισμένη συγκρινόμενη με την αντίστοιχη της Rink Amide ρητίνης και επομένως είναι ευκολότερη η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος. Το πεπτίδιο αποδεσμεύεται από την Sieber Amide ρητίνη ύστερα από κατεργασία με αραιό διάλυμα 1% TFA, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της ρητίνης στα οξέα.

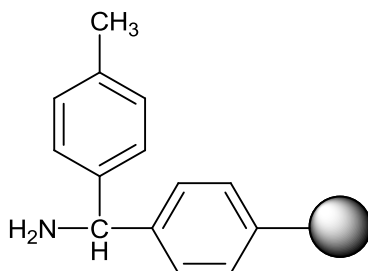
### 3.7.2 Ρητίνες συμβατές με την Boc στρατηγική

### ❖ PAM ρητίνη



Η PAM ρητίνη (φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη) φέρει μία ακετάμιδο ομάδα σε πάρα θέση στο βενζολικό δακτύλιο και έτσι σχηματίζεται ένας σταθερός εστερικός δεσμός με την α-καρβοξυλομάδα του αμινοξέος που προσδένεται στη ρητίνη. Η δομή, επομένως, του linker μειώνει τις απώλειες κατά τη συνεχή επεξεργασία με TFA. Το πεπτίδιο αποδεσμεύεται από τη ρητίνη, ύστερα από κατεργασία με υδροφθόριο (HF) και λαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.<sup>[15]</sup>

## ❖ MBHA ρητίνη



Η MBHA ρητίνη (4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη) χρησιμοποιείται για τη σύνθεση αμιδικών πεπτιδίων. Το πεπτίδιο απομακρύνεται από τη ρητίνη μετά από κατεργασία με υδροφθόριο και λαμβάνεται με ελεύθερη αμιδική ομάδα στο C-τελικό άκρο του ( $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{---NH}_2$ ).<sup>[15]</sup>

### 3.8 N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικές ομάδες

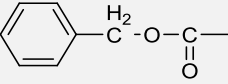
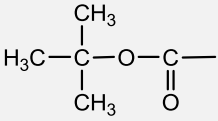
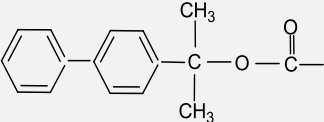
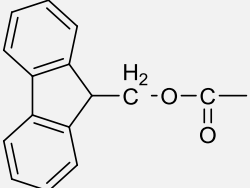
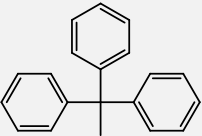
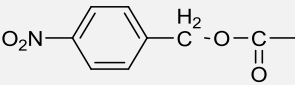
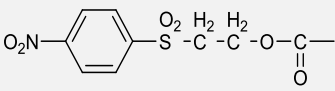
Κατά τη σύνθεση ενός πεπτιδίου είναι απαραίτητο να σχηματισθούν οι πεπτιδικοί δεσμοί με συγκεκριμένη σειρά και όχι τυχαία. Η προστασία του κάθε αμινοξέος αποτελεί λύση στην εκλεκτικότητα. Η επιθυμητή σύζευξη των αμινοξέων επιτυγχάνεται με την εκλεκτική προστασία όλων των α-αμινομάδων των αμινοξέων, που προσφέρουν την α-καρβοξυλομάδα προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού, με τις **N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικές ομάδες**. Η δράση των N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικών ομάδων βασίζεται στη μείωση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του αζώτου της α-αμινομάδας, έτσι ώστε να μην μπορεί να αντιδράσει με τον άνθρακα του καρβονυλίου μιας ενεργοποιημένης καρβοξυλομάδας προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Οι πιο, ευρέως, χρησιμοποιούμενες N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικές ομάδες είναι η Boc ομάδα (tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα) και η Fmoc ομάδα (9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα).<sup>[49]</sup>

Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικής ομάδας είναι τα εξής:

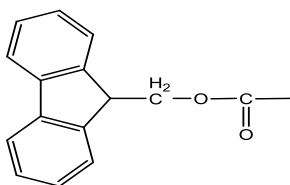
- 1) σταθερότητα κατά τη σύζευξη
- 2) εύκολη και εκλεκτική απομάκρυνση
- 3) δεν ευνοεί τη ρακεμοποίηση



Πίνακας 3.3: Οι κυριότερες N<sup>a</sup>-άμινο προστατευτικές ομάδες στην πεπτιδική σύνθεση.

Όνομασία	Συντακτικός Τύπος	Συνθήκες Αποπροστασίας	Σταθερότητα
<b>Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z-ομάδα)</b>		HBr/CH <sub>3</sub> COOH (25 °C), H <sub>2</sub> /Pd, TFMSA/TFA, HBr/SO <sub>2</sub> , HF, HBr/CF <sub>3</sub> COOH	Μερικώς όξινες, Βασικές συνθήκες
<b>t-Βουτοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα)</b>		30-50% TFA σε DCM, HF, αέριο HCl/CH <sub>3</sub> COOH, HCl σε διοξάνη	Βασικές συνθήκες, καταλυτική υδρογόνωση
<b>2-(π-Διφαινυλο)-2-προπυλοξυκαρβονυλομάδα (Broc-ομάδα)</b>		καταλυτική υδρογόνωση, ClCH <sub>2</sub> COOH σε DCM, 1% TFA	Βασικές συνθήκες
<b>9-Φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc-ομάδα)</b>		Πιπεριδίνη, Πιπεραζίνη, Διαθυλαμίνη, DBU/πιπεριδίνη, TBAF	Όξινες συνθήκες, καταλυτική υδρογόνωση
<b>Τριτυλομάδα (Trt-ομάδα)</b>		5% CH <sub>3</sub> COOH, 5% TFA παρουσία TIS PH~ 4	Βασικές συνθήκες
<b>p-Νιτροβενζυλοξυκαρβονυλομάδα (pNZ-ομάδα)</b>		καταλυτική υδρογόνωση	Όξινες, Βασικές συνθήκες
<b>2-(4-Νιτροφαινυλο) σουλφονυλοαιθοξυ καρβονυλομάδα (Nsc-ομάδα)</b>		1% DBU/20% πιπεριδίνη σε διοξάνη/DMF	Όξινες συνθήκες, καταλυτική υδρογόνωση

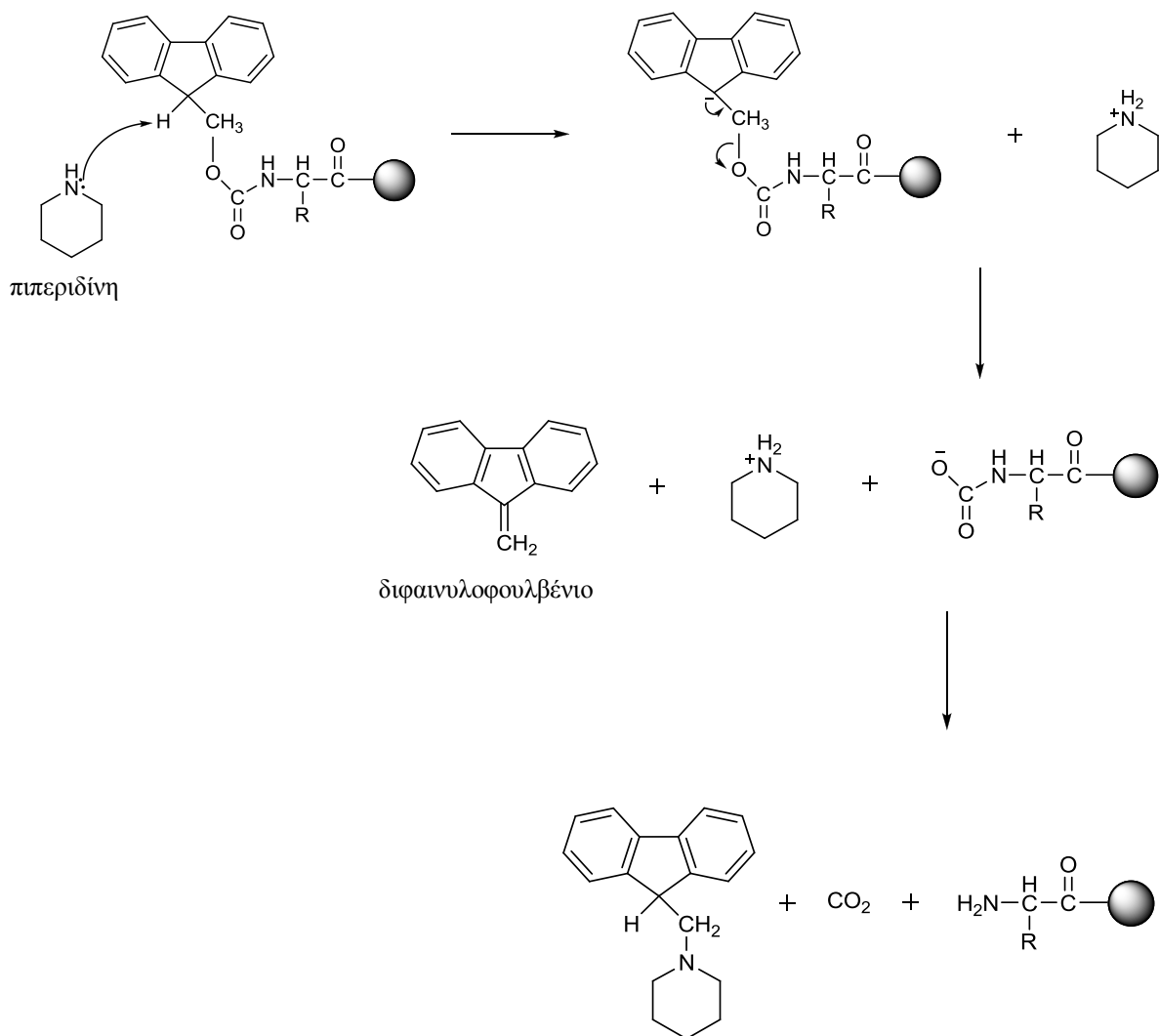
### 3.8.1 Η Fmoc ομάδα



Η Fmoc-ομάδα (9-φλουορενυλο-μεθυλοξυκαρβονυλομάδα) είναι η πιο διαδεδομένη Ν<sup>α</sup>-άμινο προστατευτική ομάδα, επειδή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

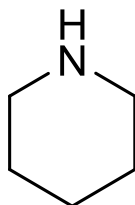
- 1) χρήση ήπιων συνθηκών καθ'όλη τη διάρκεια της σύνθεσης
- 2) σύνθεση προστατευμένων πεπτιδίων χρησιμοποιώντας ευαίσθητες, σε οξέα, ρητίνες
- 3) δυνατότητα ελέγχου της πορείας της σύνθεσης
- 4) αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων κατά την απομάκρυνσή της (δεν σχηματίζονται ανεπιθύμητα καρβοκατιόντα που ακυλιώνουν ευαίσθητα αμινοξέα)
- 5) υψηλός βαθμός καθαρότητας των τελικών προϊόντων

Η Fmoc-ομάδα είναι μια ουρεθανικού τύπου ομάδα, δηλαδή μια ουρεθάνη με μοριακό τύπο  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCONH}_2$  και εισήχθη από τους Carprino και Han το 1970. Πρόκειται για ένα αλκόξυ καρβόνυλο παράγωγο με τον δακτύλιο της φλουορένυλο ομάδας πλούσιο σε ηλεκτρόνια, έτσι ώστε το μοναδικό πρωτόνιο του β-ατόμου άνθρακα να είναι πολύ όξινο και άρα, υπό την επίδραση ασθενών βάσεων, να αποσπάται εύκολα. Το καρβανιόν που παράγεται υφίσταται αποκαρβοξυλίωση δίνοντας την ελεύθερη αμίνη, ενώ το παραπροϊόν, DBF (διφαινυλοφουλβένιο), αντιδρά με μία δευτεροταγή αμίνη, την πιπεριδίνη, προς μια σταθερή τριτοταγής βάση που απομακρύνεται εύκολα με τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης. Η α-αμινομάδα που ελευθερώνεται δεν είναι πρωτονιωμένη, πράγμα που είναι επιθυμητό για τον πορεία της πεπτιδικής σύνθεσης.<sup>[27],[28]</sup>



Σχήμα 3.30: Μηχανισμός απομάκρυνσης της Fmoc ομάδας με χρήση πιπεριδίνης.

Η πιπεριδίνη είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο για την αποκοπή της Fmoc-ομάδας κατά την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση.



Σχήμα 3.31: Δομή της πιπεριδίνης.

Το ποσοστό της πιπεριδίνης στο διάλυμα αποπροστασίας κυμαίνεται από 5 έως 20% και εξαρτάται από:

- 1) τη φύση του N<sup>α</sup>-Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος
- 2) τη θέση του αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα
- 3) τη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας στο σημείο αποκοπής
- 4) τη φύση του διαλύτη στο διάλυμα αποκοπής

Κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc στρατηγική η χρήση διαλύματος 20% πιπεριδίνης σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) για την αποπροστασία της α-αμινομάδας δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.<sup>[49]</sup>

**Πίνακας 3.4: Σταθερότητα της Fmoc ομάδας σε διάφορα είδη βάσεων.**

<b>% Ποσοστό βάσης (σε DMF)</b>	<b>Χρόνος ημιζωής της Fmoc ομάδας (στο αμινοξύ Fmoc-Val-OH)</b>
<b>20% Πιπεριδίνη</b>	<b>6s</b>
<b>5% Πιπεραζίνη</b>	<b>20s</b>
<b>50% Μορφολίνη</b>	<b>1 min</b>
<b>50% Δικυκλοεξυλοαμίνη</b>	<b>35 min</b>
<b>10% p-Διμεθυλοαμινοπυριδίνη</b>	<b>85 min</b>
<b>50% Αιθυλοδιϊσοπρυλοαμίνη</b>	<b>10.1 h</b>

### 3.9 Παράπλευρες προστασίες των δραστικών ομάδων των

#### N<sup>α</sup>-άμινο-προστατευμένων αμινοξέων

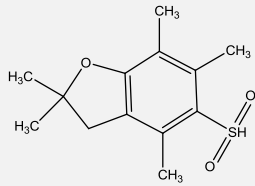
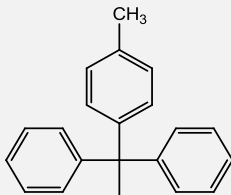
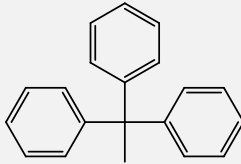
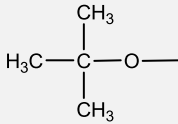
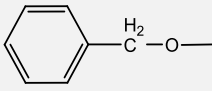
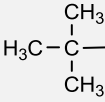
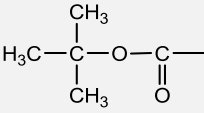
Κατά τη σύνθεση του πεπτιδίου οι δραστικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων θα πρέπει να είναι προστατευμένες, ώστε να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Η επιλογή της παράπλευρης προστασίας εξαρτάται όχι μόνο από τη φύση της N<sup>α</sup>-άμινο-προστατευτικής ομάδας (Boc και Fmoc ομάδα) αλλά και από τη μέθοδο σύζευξης, τη διαλυτότητα του αμινοξέος, όπως επίσης και

την αλληλουχία του υπό σύνθεση πεπτιδίου. Οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες πρέπει να μένουν ανέπαφες κατά την αποκοπή της N<sup>α</sup>-άμινο προστατευτικής ομάδας. Αυτό το πρόβλημα λύνεται χρησιμοποιώντας τα αμινοξέα με κατάλληλες **ορθογωνικές προστασίες**. Για παράδειγμα, η προστασία του υδροξυλίου της θρεονίνης με την t-βουτυλομάδα με παράλληλη προστασία της α-αμινομάδας με την 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλ ομάδα (Fmoc-ομάδα) αποτελεί ορθογωνική προστασία, διότι η κάθε μια μπορεί να απομακρυνθεί χωρίς να επηρεάζει την άλλη.

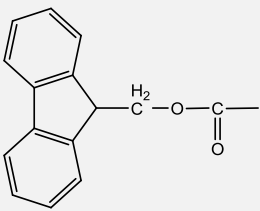
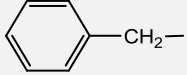
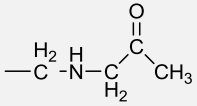
Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες N<sup>α</sup>-άμινο προστασίες είναι η Boc και η Fmoc ομάδα, επομένως οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες.<sup>[29]</sup>

- I. Οι προστατευτικές ομάδες που προσφέρουν ορθογωνικότητα με την N<sup>α</sup>-Boc προστατευτική ομάδα. Η πιο χαρακτηριστική ομάδα είναι η **βενζυλομάδα** (Bzl) και η σύνθεση των πεπτιδίων με τη μεθοδολογία αυτή αναφέρεται ως **Boc/Bzl στρατηγική**.
- II. Οι προστατευτικές ομάδες που προσφέρουν ορθογωνικότητα με την N<sup>α</sup>-Fmoc προστατευτική ομάδα. Η πιο χαρακτηριστική ομάδα είναι η **t-βουτυλομάδα** (tBu) και η αντίστοιχη μεθοδολογία που ακολουθείται κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων αναφέρεται ως **Fmoc/tBu στρατηγική**.

Πίνακας 3.5: Οι κυριότερες προστασίες των δραστικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των N<sup>α</sup>-Fmoc-προστατευμένων αμινοξέων.

Όνομασία	Συντομογραφία	Χημικός τύπος	Αμινοξύ που χρησιμοποιείται
2,2,4,6,7-Πενταμεθυλοδιϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα	Pbf		Αργινίνη
4-Μεθυλοτριτυλομάδα	Mtt		Λυσίνη, Ιστιδίνη
Τριτυλομάδα	Trt		Ασπαραγίνη, Γλουταμίνη, Σερίνη, Θρεονίνη, Τυροσίνη, Κυστεΐνη, Ιστιδίνη
t-Βουτοξυομάδα	OtBu		Ασπαραγινικό οξύ, Γλουταμινικό οξύ
Βενζυλοξυομάδα	OBzl		Ασπαραγινικό οξύ, Γλουταμινικό οξύ
t-Βουτυλομάδα	tBu		Σερίνη, Θρεονίνη, Τυροσίνη, Κυστεΐνη
t-Βουτοξυκαρβονυλομάδα	Boc		Λυσίνη, Τρυπτοφάνη

Πίνακας 3.5 (συνέχεια)

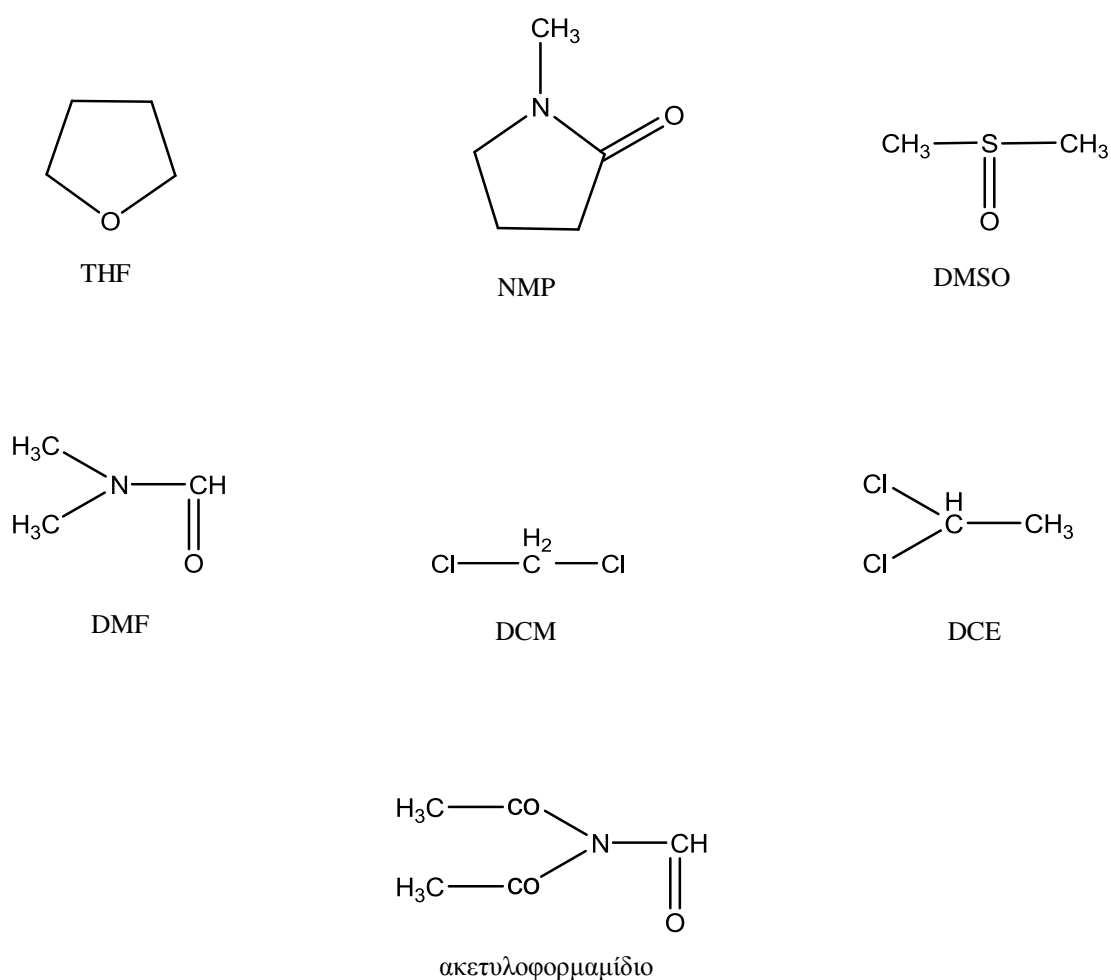
9-φλουορενυλο- μεθυλοξυκαρβονυλομάδα	Fmoc		Λυσίνη
Βενζυλομάδα	Bzl		Σερίνη, Θρεονίνη, Τυροσίνη
Ακεταμιδομεθυλομάδα	Acm		Κυστεΐνη

Πίνακας 3.6: Οι πλευρικές προστασίες των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται με την Fmoc/tBu και την BOC/Bzl στρατηγική.

Αμινοξύ	Πλευρικές προστασίες με την Fmoc/tBu στρατηγική	Πλευρικές προστασίες με την BOC/Bzl στρατηγική
Αργινίνη	Mts, Pbf, Pmc, Trt	Trt, Tos
Ασπαραγίνη, Γλουταμίνη	Trt	Trt, Xan
Ασπαραγινικό, Γλουταμινικό	QtBu, OAllyl	OBzl, Alloc, OcHx
Κυστεΐνη	Acm, tBu, Trt	Acm, Trt, pMeBzl
Ιστιδίνη	Boc, Trt	Bom, Tos, Dpn, Z
Λυσίνη	Boc, Fmoc, Alloc, inDde	Fmoc, Z, 2-Cl-z
Σερίνη, Θρεονίνη	tBu, Trt	Bzl
Τρυπτοφάνη	Boc	For, Mts
Τυροσίνη	tBu	Bzl, 2,6-di-Cl-Bzl, 2-Br-Z

### 3.10 Διαλύτες στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή του συστήματος διαλυτών είναι εξαιρετικής σημασίας για μία επιτυχή σύνθεση, ειδικά όταν πρόκειται για πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση είναι το διχλωρομεθάνιο (DCM), το 1,1-διχλωροαιθάνιο (DCE), το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το ακετυλοφορμαμίδιο, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το τετραϋδροφουράνιο (THF) και η N-μεθυλο-πυρολιδόνη (NMP).



Σχήμα 3.32: Συντακτικοί τύποι των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση.



Ένας καλός διαλύτης για την πεπτική σύνθεση σε στερεή φάση θα πρέπει να πληρεί τις εξής προϋποθέσεις:

- 1) να διαλύει εύκολα όλα τα αντιδρώντα
- 2) να διογκώνει αρκετά τους πόρους της ρητίνης
- 3) να αυξάνει την ταχύτητα των αντιδράσεων ενεργοποίησης και ακυλίωσης
- 4) να βοηθάει στην έκθεση της N-τελικής αμινομάδας στο ακυλιωτικό μέσο
- 5) να μην ευνοεί την ρακεμοποίηση

Το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση. Το φωτοευαίσθητο DMF διασπάται σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία φωτός και ελευθερώνονται επιβλαβείς αμίνες (κυρίως διμεθυλαμίνη), οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αποκοπή της Fmoc ομάδας. Επομένως, το DMF που θα χρησιμοποιηθεί κατά τη σύζευξη θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τέτοιου είδους προσμίξεις. Η χρήση των σωματιδίων molecular sieves (διάμετρος 4Å) δίνει τη λύση, καθώς προσροφούν στην επιφάνειά τους την επιβλαβή διμεθυλαμίνη.

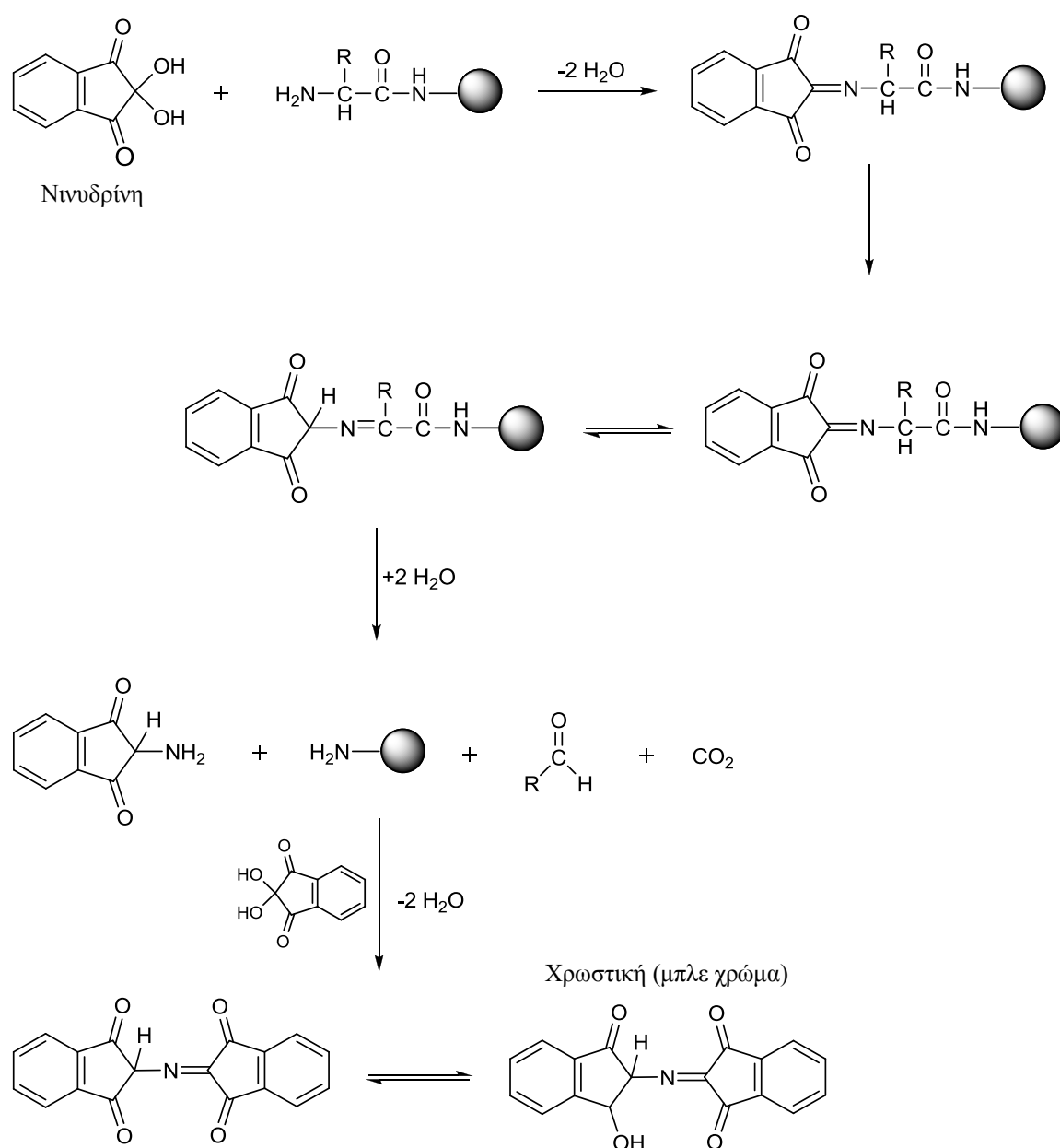
### 3.11 Δοκιμές χρωματομέτρησης ρητίνης

Κατά την πεπτιδική σύνθεση, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σύζευξης κάθε αμινοξέος καθώς και της αποπροστασίας της προστατευτικής ομάδας, προκειμένου να ληφθεί το επιθυμητό πεπτίδιο. Οι δοκιμές χρωματομέτρησης της ρητίνης πιστοποιούν την επιτυχία της σύζευξης ή της αποπροστασίας και έχουν τα εξής πλεονεκτήματα.

- 1) γρήγορη μέθοδος
- 2) απαιτείται μικρή ποσότητα ρητίνης (μερικοί κόκκοι είναι αρκετοί)
- 3) ανίχνευση μικροποσοτήτων των λειτουργικών ομάδων

Η πιο γνωστή μέθοδος χρωματομετρικού ελέγχου είναι η αντίδραση της νινυδρίνης (test Kaiser), η οποία ανιχνεύει πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αμίνες. Η νινυδρίνη αντιδρά με την ελεύθερη α-αμινομάδα της πεπτιδορητίνης και δίνει μία ένωση με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έτσι, αποδεικνύεται η αποπροστασία της προστατευτικής ομάδας. Σε

περίπτωση που η α-αμινομάδα είναι προστατευμένη, τότε η νινυδρίνη δεν αντιδρά με την αμινομάδα και οι κόκκοι της πεπτιδορρητίνης παραμένουν άχρωμοι. Κατ'αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η σύζευξη του N<sup>α</sup>-άμινο-προστατευμένου αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα. Το test Kaiser, εκτός από νινυδρίνη, περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια κυανιούχο κάλιο (KCN) 0,001 M, φαινόλη και πυριδίνη, τα οποία βελτιώνουν τις ιδιότητες του χρωμοφόρου, αυξάνοντας την ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος, με αποτέλεσμα οι μπλε κόκκοι της πεπτιδορρητίνης να είναι πιο ευδιάκριτοι στο μάτι.<sup>[16],[17],[30]</sup>



Σχήμα 3.33: Αντίδραση της νινυδρίνης με την ελεύθερη α-αμινομάδα της πεπτιδορρητίνης.

### 3.12 Αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη

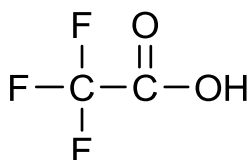
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, ακολουθεί η αποκοπή του από τη ρητίνη και η παραλαβή του στην επιθυμητή μορφή.

Η μέθοδος αποκοπής που ακολουθείται εξαρτάται από:

- 1) τον τύπο της ρητίνης που χρησιμοποιήθηκε
- 2) το δεσμό που συνδέει το C-τελικό αμινοξύ με τη ρητίνη
- 3) την επιθυμία διατήρησης ή αποκοπής των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, καθώς και της N<sup>α</sup>-αμινο-προστατευτικής ομάδας
- 4) την επιθυμία λήψης του πεπτιδίου ως αμίδιο, ως καρβοξυ-τελικό πεπτίδιο ή ως μερικώς προστατευμένο πεπτίδιο
- 5) το είδος των δραστικών ομάδων που υπάρχουν στις πλευρικές τους αλυσίδες<sup>[31]</sup>

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε κάθε μέθοδο αποκοπής δεν πρέπει, σε καμία περίπτωση, να καταστρέφουν το πεπτίδιο ή να οδηγούν στο σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.

Η αποκοπή του πεπτιδίου με τριφθοροξικό οξύ (TFA) είναι η καταλληλότερη και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος, όταν η πεπτιδική σύνθεση γίνεται με την Fmoc/tBu στρατηγική. Το TFA απελευθερώνει το πεπτίδιο από τη ρητίνη και, παράλληλα, απομακρύνει τις προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων.

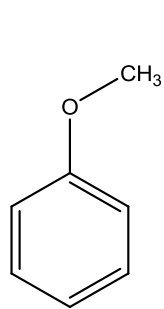


Σχήμα 3.34: Δομή του τριφθοροξικού οξέος.

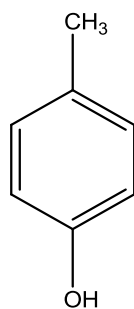
Τα πεπτίδια που συντίθενται με την BOC/Bzl στρατηγική, απομακρύνονται από τη ρητίνη και, παράλληλα, τα αμινοξέα τους αποδεσμεύονται από τις προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων με χρήση, κυρίως, του άνυδρου υδροφθορίου (HF), ενός ισχυρού οξέος.

Στο διάλυμα αποκοπής σχηματίζονται καρβοκατιόντα που προέρχονται είτε από την αποπροστασία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, είτε από την αποικοδόμηση του linker της ρητίνης, καθώς σε όξινες συνθήκες του διαλύματος αποκοπής ο βραχίονας της Rink Amide και της Wang ρητίνης αποικοδομείται. Τα κατιόντα αυτά μπορούν εύκολα να επαναπροσβάλουν και να αλκυλιώσουν ευαίσθητα αμινοξέα, όπως την τρυπτοφάνη (Trp), μεθειονίνη (Met), κυστεΐνη (Cys), δημιουργώντας ένα σημαντικό αριθμό παραπροϊόντων, τα οποία επηρεάζουν την απόδοση και την καθαρότητα του τελικού πεπτιδίου. Έτσι, στο διάλυμα αποκοπής προστίθενται ενώσεις που δεσμεύουν αυτά τα κατιόντα. Αυτές οι ενώσεις ονομάζονται **μόρια-παγίδες** (scavengers) και είναι η ανισόλη, η φαινόλη, η p-κρεζόλη, η θειοανισόλη, η 1,2-αιθανοδιθειόλη (EDT), η 2-μερκαπτοαιθανόλη, το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), η διθειοθρεϊτόλη (DTT) και το τριόξοπροπυλοσιλάνιο (TIS).

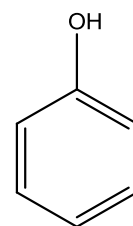
Επίσης, η προσθήκη νερού στο διάλυμα αποκοπής είναι πολύ σημαντική, καθώς δεσμεύει τα τριτοταγή βουτυλοκατιόντα και επιταχύνει την απομάκρυνση της Pmc ομάδας από την παράπλευρη αλυσίδα της αργινίνης.<sup>[32],[33],[34]</sup>



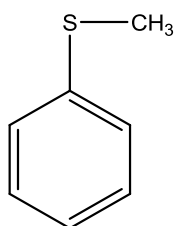
Ανισόλη



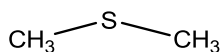
p-κρεζόλη



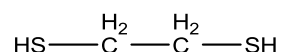
Φαινόλη



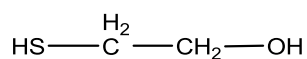
Θειοανισόλη



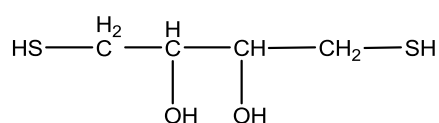
Διμεθυλοσουλφίδιο (DMS)



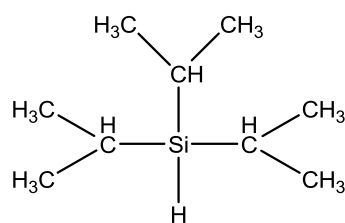
1,2-Αιθανοδιθειόλη (EDT)



2-μερκαπτοαιθανόλη



Διθειοθρεϊτόλη

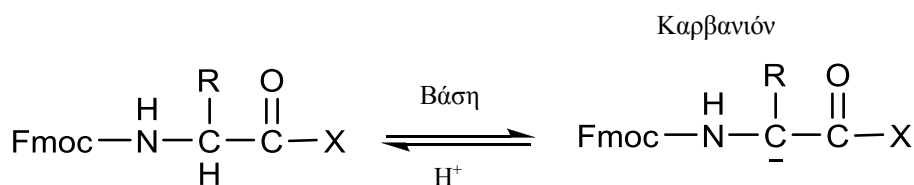


Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS)

**Σχήμα 3.35: Συντακτικοί τύποι των scavengers.**

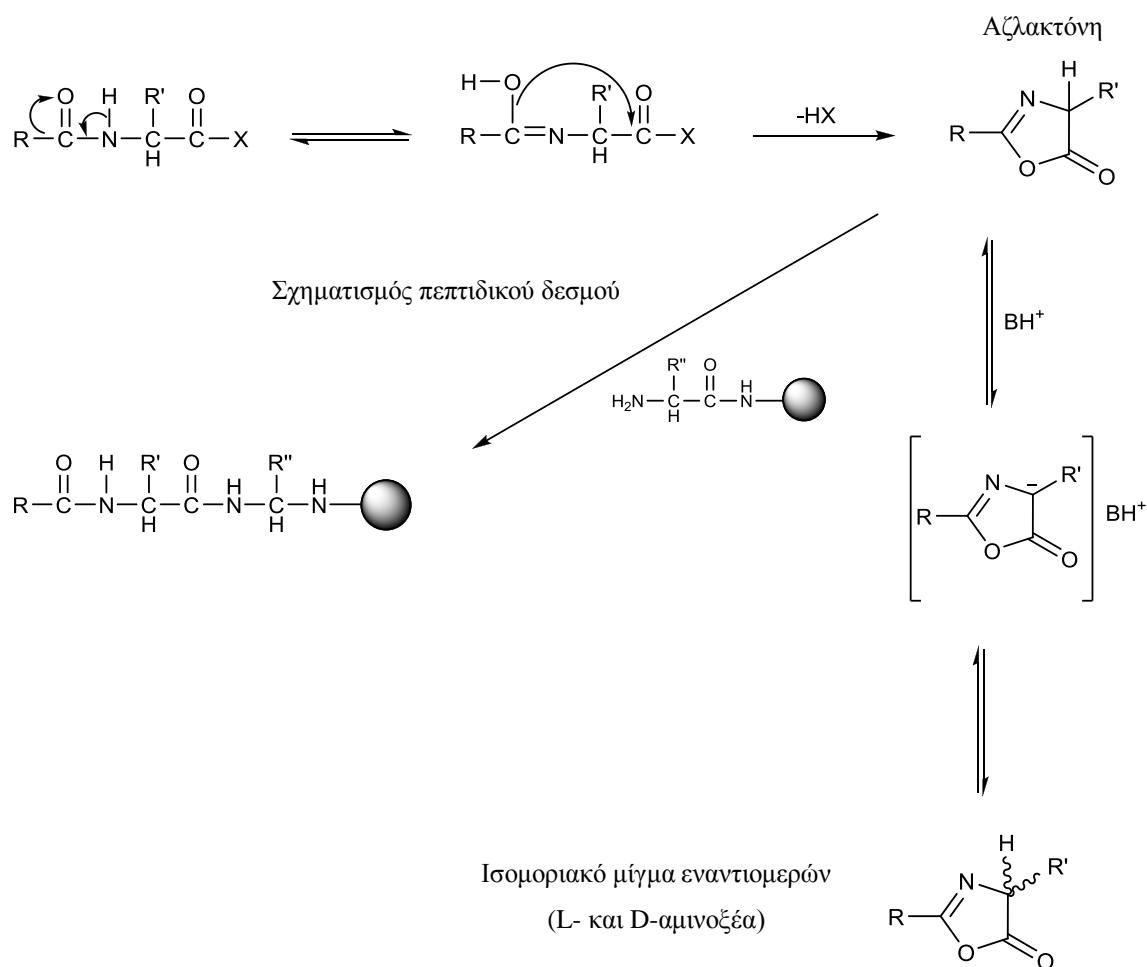
### 3.13 Ρακεμοποίηση στην πεπτιδική σύνθεση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ρακεμοποίηση οδηγεί σε απώλεια της οπτικής καθαρότητας του πεπτιδίου και οφείλεται στην απόσπαση του πρωτονίου από το α-άτομο άνθρακα, το οπτικώς ενεργό κέντρο του πεπτιδίου, υπό την επίδραση κάποιας βάσης. Η ρακεμοποίηση λαμβάνει χώρα στο στάδιο ενεργοποίησης της α-καρβοξυλομάδας ενός N<sup>α</sup>-προστατευμένου αμινοξέος πριν το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Η ενεργοποιημένη α-καρβοξυλομάδα (ομάδα X, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.35) είναι ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων και η επίδρασή της επεκτείνεται στο α-άτομο άνθρακα, διευκολύνοντας την απόσπαση του H<sup>α</sup> πρωτονίου από μία βάση. Το καρβανιόν που σχηματίζεται είναι σταθερό, λόγω της έλξης ηλεκτρονίων της ενεργοποιημένης α-καρβοξυλομάδας. Επομένως, αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής του στο διάλυμα σύζευξης και, κατά συνέπεια, το ποσοστό ρακεμοποίησης.

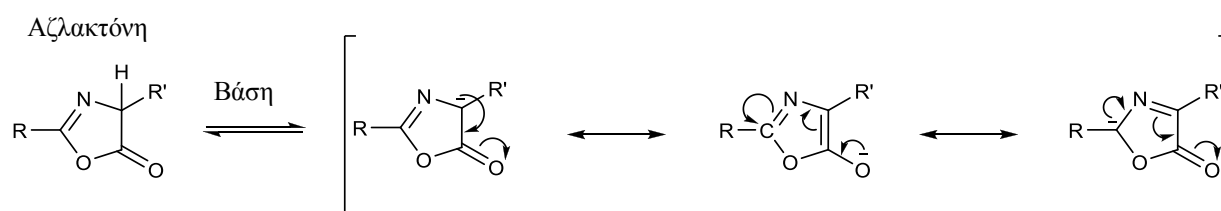


**Σχήμα 3.36: Αντίδραση ρακεμοποίησης στην πεπτιδική σύνθεση. Η ενεργοποιημένη α-καρβοξυλομάδα (  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{C} \\ | \\ \text{X} \end{array}$  ) σταθεροποιεί το καρβανιόν, αυξάνοντας το ποσοστό ρακεμοποίησης.**

Η ρακεμοποίηση περιλαμβάνει, εκτός από την απλή απόσπαση πρωτονίου, και το σχηματισμό **αζλακτόνης**. Η απόσπαση του H<sup>α</sup> πρωτονίου από μία βάση οδηγεί στην κυκλοποίηση του ενεργοποιημένου ακυλο-αμινοξέος προς σχηματισμό αζλακτόνης (κυκλικό ενδιάμεσο). Στη συνέχεια, το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί να υποστεί πυρηνόφιλη προσβολή από την ελεύθερη α-αμινομάδα του πεπτιδίου προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού (επιθυμητό προϊόν) ή να υποστεί απόσπαση H<sup>α</sup> πρωτονίου, προς σχηματισμό κυκλικού καρβανιόντος. Το κυκλικό καρβανιόν σταθεροποιείται με μεσομέρεια και, αφού επαναπροσλάβει ένα πρωτόνιο, δίνει ένα ισομοριακό μίγμα δύο εναντιομερών (L- και D-αμινοξέων) που δεν έχει στροφική ικανότητα.<sup>[35],[36],[37]</sup>



Σχήμα 3.37: Μηχανισμός ρακεμοποίησης με σχηματισμό αζλακτόνης.



Σχήμα 3.38: Σταθεροποίηση του κυκλικού καρβονιόντος με μεσομέρεια.

Η ρακεμοποίηση αντιμετωπίζεται με τους εξής τρόπους.

- 1) Επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας από δεξιά προς τα αριστερά, δηλαδή από το C-τελικό άκρο προς το N-τελικό άκρο.
- 2) Επιλογή κατάλληλης μεθόδου ενεργοποίησης και σύζευξης για την πεπτιδική σύνθεση (μέθοδος αζιδίων, ενεργών εστέρων, μικτών ανυδριτών, καρβοδιιμιδίων,

- φωσφονικών και ουρονικών παραγώγων με βοηθητικά πυρηνόφιλα HOBt ή HOAt)
- 3) Επιλογή κατάλληλης ορθογωνικής προστασίας για την προστασία της α-αμινομάδας και των πλευρικών αλυσίδων, ακολουθώντας είτε την Fmoc/tBu είτε την BOC/Bzl στρατηγική.
  - 4) Η χρήση μίγματος διαλυτών DMF/DCM, η οποία περιορίζει τον κίνδυνο της ρακεμοποίησης κατά τη διάρκεια της σύζευξης.
  - 5) Τα πεπτίδια με C-τελική κυστεΐνη και ιστιδίνη συντίθενται με στερεό υπόστρωμα τη 2-χλωροτρίτυλο-ρηΐνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή οπτικά καθαρών προϊόντων<sup>[15],[18],[39]</sup>

### 3.14 Σχηματισμός Δικετοπιπεραζίνης

Ένα μεγάλο πρόβλημα στην πεπτιδική σύνθεση αποτελεί ο σχηματισμός **δικετοπιπεραζίνης**. Η δικετοπιπεραζίνη σχηματίζεται είτε κατά την αποκοπή της N<sup>α</sup>-άμινο- προστατευτικής ομάδας του δεύτερου (από το C-τελικό άκρο) αμινοξέος είτε κατά την σύζευξη του τρίτου αμινοξέος. Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει την ενδομοριακή προσβολή της ελεύθερης αμινομάδας του διπεπτιδίου στον καρβονυλικό άνθρακα που συνδέει το πεπτίδιο με τη ρηΐνη. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός κυκλικών διπεπτιδίων, τις δικετοπιπεραζίνες.

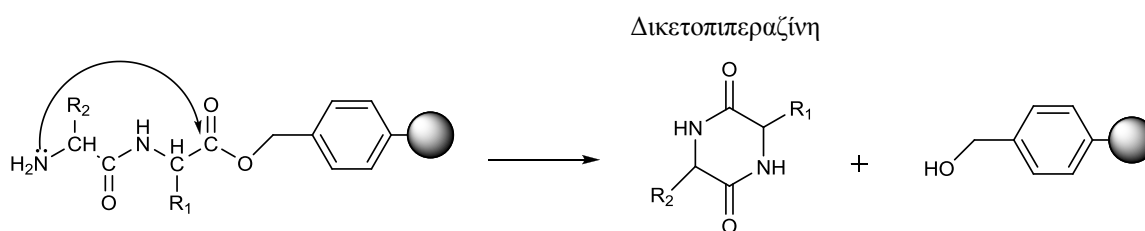
Επομένως, κατά τη σύζευξη του τρίτου αμινοξέος ένα ποσοστό θα συζευχθεί στις ελεύθερες υδροξυλομάδες της ρηΐνης, έτσι ώστε στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης να παραλάβουμε το επιθυμητό πεπτίδιο και ένα παραπροϊόν, που είναι το πεπτίδιο χωρίς τα δύο αμινοξέα που σχηματίζουν τη δικετοπιπεραζίνη.<sup>[40],[41],[49]</sup>

Η ενδομοριακή αυτή κυκλοποίηση εξαρτάται από τους εξής παράγοντες.

- 1) το είδος του δεσμού που συνδέει το πεπτίδιο με τη ρηΐνη (ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης ευνοείται όταν η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται σε υδρόξυ-πολυμερή ενώ συνήθως δε συμβαίνει όταν το πεπτίδιο συνδέεται μέσω αμιδικού δεσμού με τη ρηΐνη, όπως τη Rink Amide, τη Rink Amide AM, τη Sieber Amide)
- 2) τη δομή του στερεού πολυμερούς
- 3) τη φύση των δύο C-τελικών αμινοξέων



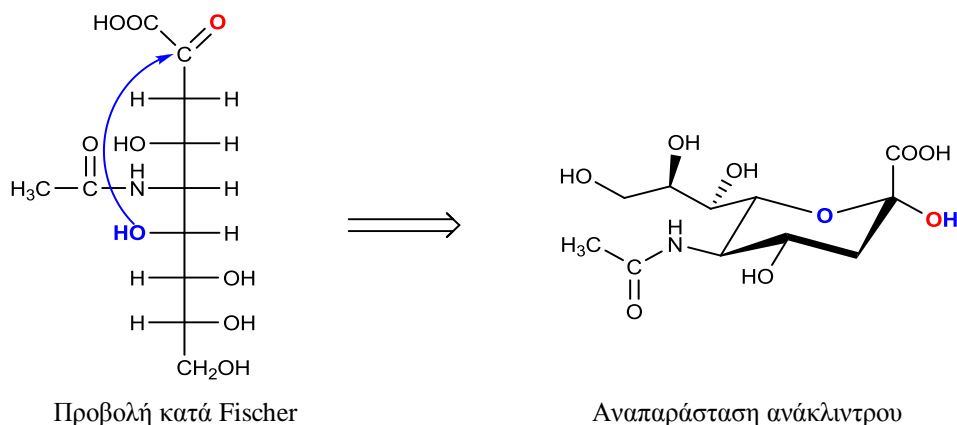
- 4) τη μεθοδολογία που ακολουθείται για τη σύνθεση των πεπτιδίων
- 5) τη φύση του τρίτου αμινοξέος, το οποίο επηρεάζει την έκταση σχηματισμού της δικετοπιπεραζίνης, εφόσον αμινοξέα με μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση οδηγούν σε χρονοβόρες συζεύξεις, με αποτέλεσμα να ευνοείται η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη έναντι του σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού<sup>[42],[43],[49]</sup>



**Σχήμα 3.39: Μηχανισμός σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης.**

### 3.15 Σιαλικά οξέα-Δομή και Λειτουργία

Ο όρος “**σιαλικά οξέα**” χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ομάδα ακετυλιωμένων παραγώγων του νευραμινικού οξέος (περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία πολλών βιολογικών συστημάτων και αποτελούν το τελικό άκρο αρκετών υδατανθράκων. Περιέχουν εννέα άτομα άνθρακα και απαντούν, εκτός της N-ακετυλο-μορφής, και στην N-γλυκολυλο-μορφή. Επιπλέον, είναι δυνατόν να περιέχουν ακετυλο-ομάδες στα άτομα C4, C7, C8 και C9. Στον άνθρωπο, το σιαλικό οξύ απαντάται ως επί το πλείστον με τη μορφή N-ακετυλιωμένου παραγώγου του νευραμινικού οξέος (C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>9</sub>) και αποτελεί συστατικό γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών. Έτσι, το σιαλικό οξύ μπορεί να συνδέεται με λιπίδια, πρωτεΐνες και πεπτίδια σχηματίζοντας **γαγγλιοσίδες**, μόρια αποτελούμενα από γλυκοσφιγγολιπίδια με ένα ή περισσότερα σιαλικά οξέα. Το πιο κοινό σιαλικό οξύ είναι το N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ, του οποίου ο συντακτικός τύπος είναι ο ακόλουθος.<sup>[44],[45],[48]</sup>



**Σχήμα 3.40: Δομή του N-ακετυλο-νευραμινικού οξέος (σιαλικό οξύ).**

Τα σιαλικά οξέα απαντούν ευρέως στους ζωικούς ιστούς και συνήθως βρίσκονται σε εξωτερικές και εσωτερικές μεμβράνες των λυσοσωμάτων. Ενώνονται, μέσω γλυκοζιτικών δεσμών, με τις καρβοξυλικές ομάδες σακχάρων, όπως γαλακτόζη, N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη ή με άλλα μόρια σιαλικού οξέος, γεγονός που τα καθιστά ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά των κυττάρων, που μεσολαβούν στη διακυτταρική επικοινωνία. Σε ουδέτερο pH τα σιαλικά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε μία πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, όπως αναφέρονται επιγραμματικά παρακάτω.<sup>[45],[46],[47]</sup>

- 1) Σταθεροποιούν τη δομή των γλυκοπρωτεϊνών και των κυτταρικών μεμβρανών.
- 2) Συμβάλλουν στη διακυτταρική αναγνώριση και επικοινωνία.
- 3) Βοηθούν τη διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών.
- 4) Δημιουργούν ειδικές θέσεις σύνδεσης με αντισώματα, ένζυμα, μικροβιακούς παράγοντες στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς.
- 5) Επηρεάζουν τη λειτουργία και το χρόνο ζωής των γλυκοπρωτεϊνών του αίματος.

### 3.16 Χημειοεκλεκτική σύνδεση γλυκοπεπτιδίων-Δεσμός Οξίμης

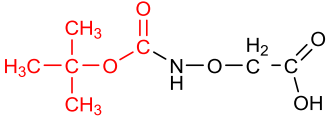
Η χημική σύνθεση πεπτιδίων και πρωτεϊνών μέσω **χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σύνδεσης** (chemoselective ligation) μη-προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων αποτελεί μία εναλλακτική λύση της κλασσικής μεθόδου πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση, κυρίως γιατί επιτρέπει τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος σε αρκετά υψηλή απόδοση. Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε υδατικά διαλύματα, συνήθως ρυθμιστικά

διαλύματα με παρουσία και οργανικών διαλυτών για τη βελτίωση της διαλυτότητας των πεπτιδίων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε δύο αρχές.<sup>[48]</sup>

- 1) Χρήση μη προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, που αυξάνει σημαντικά τη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα και αποφεύγεται η ρακεμοποίηση.
- 2) Χρήση μοναδικών και αμοιβαία δραστικών μεταξύ τους λειτουργικών ομάδων που δεν βρίσκονται στα φυσικά πεπτίδια και πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την τοπο-ειδική σύνδεση των πεπτιδικών τμημάτων που οδηγεί στη λήψη μεγαλύτερων και πιο πολύπλοκων πεπτιδικών αλυσίδων.

Ο δεσμός οξίμης (-CH=N-O-) είναι ένας ψευδο-πεπτιδικός δεσμός, ψ(-CH=N-O-), ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ ενός ατόμου καρβονυλικού άνθρακα αλδεΐδης ή κετόνης και ενός ατόμου αζώτου ενός παραγώγου υδροξυλαμίνης, συνήθως μιας αμινοοξυακετυλιωμένης ομάδας (NH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CO-). Ο δεσμός οξίμης δημιουργείται εκλεκτικά σε ελαφρά όξινο (pH 4,0-5,5) έως αρκετά όξινο (pH 2,0-3,0) διάλυμα με πυρηνόφιλη προσθήκη του αζώτου στον καρβονυλικό άνθρακα. Σε αυτές τις συνθήκες pH, η μόνη διαθέσιμη πυρηνόφιλη ομάδα που αντιδρά με τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα είναι η ασθενώς βασική αμινοοξυακετυλο-ομάδα, που παραμένει μη πρωτονιωμένη, ενώ οι ισχυρώς βασικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων είναι πρωτονιωμένες και άρα μη δραστικές.<sup>[48]</sup>

Η αμινοοξυακετυλο-ομάδα εισάγεται στο πεπτίδιο με μία αντίδραση ακετυλίωσης, όπως γίνεται η εισαγωγή των προστατευμένων αμινοξέων, σύμφωνα με την κλασική μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση. Το παράγωγο που, συνήθως, χρησιμοποιείται είναι το BOC-αμινοοξυ οξικό οξύ (BOC-aminooxy acetic acid) με

συντακτικό τύπο . Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ακετυλιώνεται

η επιθυμητή αμινομάδα, η οποία είτε βρίσκεται στο αμινο-άκρο του πεπτιδίου είτε στην παράπλευρη αλυσίδα μιας λυσίνης. Η χρήση του BOC-αμινοοξυ οξεικού οξέος είναι συμβατή με τις δύο μεθοδολογίες που ακολουθούνται για τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση, δηλαδή την BOC/Bzl και Fmoc/tBu στρατηγική. Η BOC-προστατευτική ομάδα απομακρύνεται παράλληλα με το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα και τις

παράπλευρες προστατευτικές ομάδες με διάλυμα HF (BOC/Bzl στρατηγική) και TFA (Fmoc/tBu στρατηγική).<sup>[48]</sup>

Η καρβονυλομάδα προέρχεται συνήθως από μια αλδεΐδη και σπανιότερα από κετόνη, που υφίσταται στην άκυκλη μορφή των σακχάρων ή των ολιγοσακχαριτών στο αναγωγικό τους άκρο. Το αποτέλεσμα της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης της αλδεϋδομάδας του σακχάρου με την αμινοοξυακέτυλο-ομάδα του πεπτιδίου είναι η σύνθεση ενός **γλυκοπεπτιδικού αναλόγου** που φέρει έναν N-γλυκοζιτικό δεσμό, αντίστοιχο με αυτόν των φυσικών πρωτεϊνών. Τα γλυκοπεπτίδια αυτά ονομάζονται **νεογλυκοπεπτίδια**, επειδή είναι μιμητικά ανάλογα.

Μειονέκτημα της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης γλυκοπεπτιδίων είναι το γεγονός ότι το παραγόμενο γλυκοπεπτιδικό ανάλογο βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ της κυκλικής και άκυκλης μορφής του σακχάρου που περιέχει. Στην περίπτωση της κυκλικής μορφής, το σάκχαρο βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ των E/Z (syn/anti) ισομερών, ενώ στην άκυκλη ή ανοιχτή μορφή παρατηρείται ισορροπία μεταξύ του α- ή β-γλυκοζιτικού δεσμού. Επομένως, πρόκειται για μια ισορροπία μεταξύ τεσσάρων ισομερών, η οποία επηρεάζει σημαντικά τη δράση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου.<sup>[48]</sup>

### 3.17 Βιβλιογραφία

- [1] Miklos Bodanzsky, <<Peptide Chemistry: A Practical Textbook>>, 2<sup>nd</sup> Rev. Edition, Springer Verlag, NewYork, 1993.
- [2] John McMurry, <<Οργανική Χημεία>>, Τόμος ΙΙ, 3<sup>η</sup> Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2004.
- [3] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, <<Βιοχημεία>>, Τόμος Ι, 3<sup>η</sup> Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007.
- [4] David L. Nelson, Michael M. Cox, <<Lehninger Βασικές Αρχές Βιοχημείας>>, Τόμος 1, 4<sup>η</sup> Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004.
- [5] Ι.Γ. Γεωργιάτσου, <<Εισαγωγή στη Βιοχημεία>>, 6<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη, 2005.
- [6] Barrett G.C., <<Chemistry and Biochemistry of the amino acids>>, Chapman and Hall, N.Y., 1985.
- [7] Banden C. & Tooze J., <<Introduction to Protein Structure>>, Garland Publishing Inc., N.Y., 1991.
- [8] S. Chandrudu, P. Simerska & I. Toth, <<Chemical Methods for peptide and protein production>>, *Molecules*, 18, 4373-88 (2013).
- [9] Albericio F., <<Developments in peptide and amide synthesis>>, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 211-221 (2004).
- [10] Merrifield R.B., <<Peptides. Synthesis, Structures and Applications>>, Academic Press, New York, 93 (1995).
- [11] Merrifield R.B., <<Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide>>, *J. Am. Chem. Soc.* (1963).
- [12] Carpino L.A., Han G.A., <<The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function. A new base-sensitive amino-protecting group>>, *J. Org. Chem.* 92, 5748-5756 (1970).
- [13] King D.S., <<A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis>>, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 36, 255-66 (1990).

- [14] Steinauer R., <<Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis>>, 3<sup>rd</sup> International Symposium, R. Epton (Eds), Mayflower Worldwide, 689, Birmingham (1993).
- [15] Barlos K., Chatzi O., Gatos D., Stavropoulos G., <<2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage>>, *Int. J. Pept. Protein Res*, **37(6)**, 513-520 (1991).
- [16] Bergman M. & Zervas L., <<Max Bergman and Leonidas Zervas: Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese>>, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **65**, 1192-1201 (1932).
- [17] Munson M. & Barany G., <<Synthesis of a-conotixin, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10203-10210 (1993).
- [18] Rink H., <<Solid -phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin>>, *Tetrahedron Lett.*, **28(33)**, 3787-3790 (1987).
- [19] Bernatowicz M.S., Daniels S.B. & Koster H., <<A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides>>, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 4645-4648 (1989).
- [20] Anderson G.H. & McGregor A.C., <<t-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6180-6183 (1957).
- [21] Loffet A. & Zhang H.X., <<Allyl-based groups for side-chain protection of amino-acids>>, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **42(4)**, 346-351 (1993).
- [22] Van der Eijik J.M.M., Nolte R.J.M. & Zwikker J.W., <<Simple and mild method for the removal of N<sup>im</sup>-Tosyl protecting group>>, *J. Org. Chem.*, **45**, 547-548 (1980).
- [23] Chillemi F. & Merrifield R.B., <<Use of N<sup>im</sup>-Dinitrophenylhistidine in the solid phase synthesis of tricosapeptides 124-146 of human hemoglobin  $\beta$ -chain>>, *Biochemistry*, **8**, 4344-4346 (1969).
- [24] Yamashiro D. & Li C.H., <<Protection of tryptophan with the formyl group in peptide synthesis>>, *J. Org. Chem.*, **38**, 2594-2597 (1973).
- [25] Cudic M. & Fields G.B., <<Solid-Phase Peptide Synthesis>>, *Molecular Biotechnology Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition επιμ., Walker J.M. και Rapley R., Humana Press, Totowa, NJ.

- [26] Barlos K., Gatos D, & Schäfer W., <<Darstellung geschützter peptid-fragmente unter Einsatz substituierter triphenylmethyl-harze>>, *Tetrahedron Lett.*, **30(30)**, 3943-3946 (1989).
- [27] Mitchell A.R., Kent S.B.H., Engelhard M. & Merrifield R.B., <<A new synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid phase peptide synthesis>>, *J. Org. Chem.*, **43**, 2845-2852 (1978).
- [28] Carpino L.A. & Han G.A., <<The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group>>, *J. Org. Chem.*, **37**, 3404-3409 (1972).
- [29] Lu G., Mosjov S., Tam P.J. & Merrifield R.B., <<Improved synthesis of 4-alkoxybenzyl alcohol resin>>, *J. Org. Chem.*, **46**, 3433-3436 (1981).
- [30] Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I., <<Color test of detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides>>, *Anal. Biochem.*, **34**, 595 (1970).
- [31] Erickson B.W. & Merrifield R.B., <<Use of Chlorinated Benzyloxycarbonyl Protecting Groups to Eliminate N<sup>ε</sup>-Branching at Lysine during Solid Phase Peptide Synthesis>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3757-3763 (1973).
- [32] Solé N.A. & Barany G., <<Optimization of solid-phase synthesis of [Ala<sup>8</sup>]-dynorphin A>>, *J. Org. Chem.*, **57**, 5399 (1992).
- [33] Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W. & Gillessen D., <<New coupling reagents in peptide chemistry>>, *Tetrahedron Lett.*, **30(15)**, 1927-1930 (1989).
- [34] Blake J. & Li C.H., <<Adrenocorticotropins. XXXIX. The solid phase synthesis of methion-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophyl-glycine>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **90(21)**, 5882-5884 (1968).
- [35] Han Y., Albericio F. & Barany G., <<Occurrence and minimization of cysteines racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis>>, *J. Org. Chem.*, **62**, 4307-4312 (1997).
- [36] Goodman M., Ingwall R.T. & Pierre S.St., *Macromolecules*, **9**, 1 (1976).
- [37] Kemp D.S. & Chien S.W., <<A new peptide coupling reagent>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2743-2745 (1967).

- [38] Angell Y.M., Alsina J., Albericio F. & Barany G., <<Practical Protocols for stepwise solid-phase synthesis of cysteines-containing peptides>>, *J. Peptide Res.*, **60**, 292-299 (2002).
- [39] Johnson B.J. & Cheng C., *J. Med. Chem.*, **16**, 415 (1973).
- [40] Gisin B.F. & Merrifield R.B., <<Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase synthesis>>, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3102-3106 (1972).
- [41] Fischer P.M., <<Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry>>, *Journal of Peptide Science*, **9**, 9-35 (2003).
- [42] Chiva C., Vilaseca M., Giralt E. & Albericio F., <<An HPLC-ESMS study on the solid-phase assembly of C-terminal proline peptides>>, *J. Pept. Sci.*, **5(3)**, 131-140 (1999).
- [43] Meldal M., Bielfeldt T., Peters S. *et al.*, <<Susceptibility of glycans to beta-elimination in Fmoc-based-O-glycopeptide synthesis>>, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **43**, 529-536 (1994).
- [44] ΧΑ Αντωνόπουλος, ΝΚ Καραμάνος, <<Χημεία Οργανικών Φυσικών Προϊόντων>>, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, 1989.
- [45] Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., Shaw L., <<Biochemistry and role of sialic acids>>, *Biology of sialic acids*, A. Rosenberg, Editor. Plenum: New York (1995).
- [46] Sillanauke P., Ponnio M., Jaaskelainen I.P., <<Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders>>, *Eur. J. Clin. Invest.*, **29(5)**, 413-25 (1999).
- [47] Lindberg G., <<Resialylation of sialic acid deficit vascular endothelium, circulating cells and macromolecules may counteract the development of atherosclerosis: a hypothesis>>, *Atherosclerosis*, **192(2)**, 243-5 (2007).
- [48] Ζευγίτη Φ. Στυλιανή (2009). <<ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ>>. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Σχολή θετικών επιστημών-Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα, Ελλάδα.
- [49] Τρύπου Παρασκευή (2015). <<ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ>>. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Σχολή θετικών επιστημών-Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα, Ελλάδα.





## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

### Τεχνικές ταυτοποίησης, καθαρισμού και προσδιορισμού της δομής των πεπτιδίων

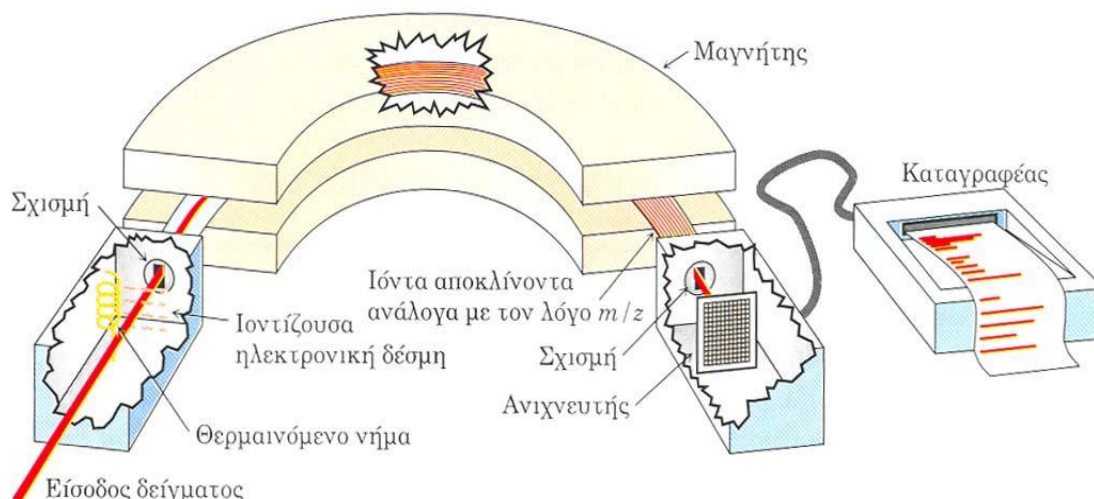




## 4.1 Φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy)

Βασική αρχή της **φασματοσκοπίας μάζας** (MS) είναι η δημιουργία ιόντων από μία ένωση, ο διαχωρισμός και η καταγραφή τους με βάση το λόγο της μάζας  $m$  προς το φορτίο τους  $z$  ( $m/z$ ). Επομένως, πρόκειται για μία τεχνική μέθοδος μέτρησης του **μοριακού βάρους** (MB) ενός μορίου. Επιπλέον, η φασματοσκοπία μάζας μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τον **μοριακό τύπο** μιας ένωσης, μετρώντας τη μάζα των θραυσμάτων που προκύπτουν κατά την αποσύνθεση της ένωσης. Το όργανο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία μάζας ονομάζεται **φασματόμετρο μάζας** και το πιο διαδεδομένο είναι το όργανο **ιοντισμού ηλεκτρονίων με μαγνητικό τμήμα**, όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα. Τα βασικά τμήματα του φασματομέτρου μάζας είναι τα ακόλουθα.

- **Σύστημα εισαγωγής**, το οποίο επιτρέπει την εισαγωγή αντιπροσωπευτικού δείγματος (από 0,1 mg έως και 1 ng) στο χώρο ιονισμού, την πηγή ιόντων, υπό σταθερή ροή και σε αέρια κατάσταση.
- **Πηγή ιόντων**, όπου το δείγμα ιοντίζεται, ανάλογα με το είδος της τεχνικής παραγωγής ιόντων, με διαφορετικές μεθόδους.
- **Αναλυτής μάζας**, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων με βάση τις διαφορετικές τιμές των λόγων  $m/z$ .
- **Ανιχνευτής ιόντων**, ο οποίος παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα, ανάλογο του αριθμού ιόντων και των φορτίων τους που δέχεται στην είσοδό του στη μονάδα του χρόνου.
- **Επεξεργαστής σήματος**, ο οποίος ενισχύει το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή και το στέλνει στον καταγραφέα προς μετατροπή του σήματος σε φάσμα μάζας.



**Σχήμα 4.1:** Απεικόνιση ενός τυπικού φασματομέτρου ιονισμού ηλεκτρονίων με μαγνητικό κύμα.

Η γενική πορεία που ακολουθεί το δείγμα αμέσως μετά την είσοδό του στο φασματομέτρο είναι η εξής:

- 1) **Εξαέρωση** του δείγματος σε υψηλή θερμοκρασία.
- 2) Το δείγμα βομβαρδίζεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας προς σχηματισμό **κατιοντικής ρίζας**.



- 3) Οι κατιοντικές ρίζες, λόγω υψηλής ενέργειας που μεταφέρεται στο μόριο, θραυματοποιούνται προς μικρότερα **θετικά φορτισμένα ιόντα** (fragment ions) και ηλεκτρικώς ουδέτερα θραύσματα.
- 4) Ισχυρό μαγνητικό πεδίο επιδρά στα θετικά φορτισμένα ιόντα και τα εκτρέπει ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (**m/z**). Τα ουδέτερα θραύσματα δεν επηρεάζονται από το μαγνητικό πεδίο.
- 5) Τα προσανατολισμένα θραύσματα ταξινομούνται από τον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει ηλεκτρικό σήμα στον καταγραφέα για την τελική λήψη του φάσματος.

Για τον υπολογισμό του λόγου  $m/z$  χρησιμοποιείται η ακόλουθη εξίσωση.

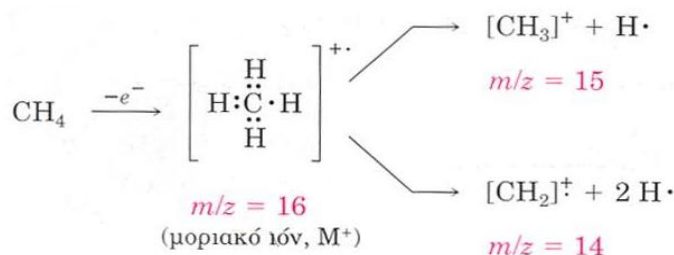
$$m/z = (M + nH^+)/n$$

M: μοριακή μάζα του δείγματος

n: αριθμός των θετικών φορτίων

$H^+$ : μάζα του πρωτονίου

Το **φάσμα μάζας** μιας ένωσης παριστάνεται ως γράφημα με το λόγο  $m/z$  στον άξονα των x και την ένταση (αριθμός των ιόντων δεδομένης τιμής  $m/z$  που φθάνουν στον ανιχνευτή) στον άξονα των y. Η υψηλότερη κορυφή του φάσματος, στην οποία αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100% ονομάζεται **βασική κορυφή**, ενώ η μη θραυσματοποιημένη κατιοντική ρίζα της ένωσης ονομάζεται **μητρική κορυφή** ή **μοριακό ιόν** ( $M^+$ ), η οποία προκύπτει με απώλεια ενός ηλεκτρονίου και αντιπροσωπεύει το μοριακό βάρος της ένωσης. Η ένταση των υπολοίπων κορυφών σε ένα φάσμα μάζας αναφέρεται ως **σχετική ένταση %**, δηλαδή εκφράζεται ως το % ποσοστό της κορυφής με τη μεγαλύτερη ένταση, τη βασική κορυφή.<sup>[1],[2],[3]</sup>



Σχήμα 4.2: Απεικόνιση της σχέσης του μοριακού ιόντος του μεθανίου ( $\text{CH}_4^+$ ) με λόγο  $m/z$  16 στα θετικά φορτισμένα ιόντα  $\text{CH}_3^+$  και  $\text{CH}_2^+$  με λόγο  $m/z$  15 και 14 αντίστοιχα.

Η φασματοσκοπία μαζών διακρίνεται, ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής ιόντων, στις εξής κατηγορίες:

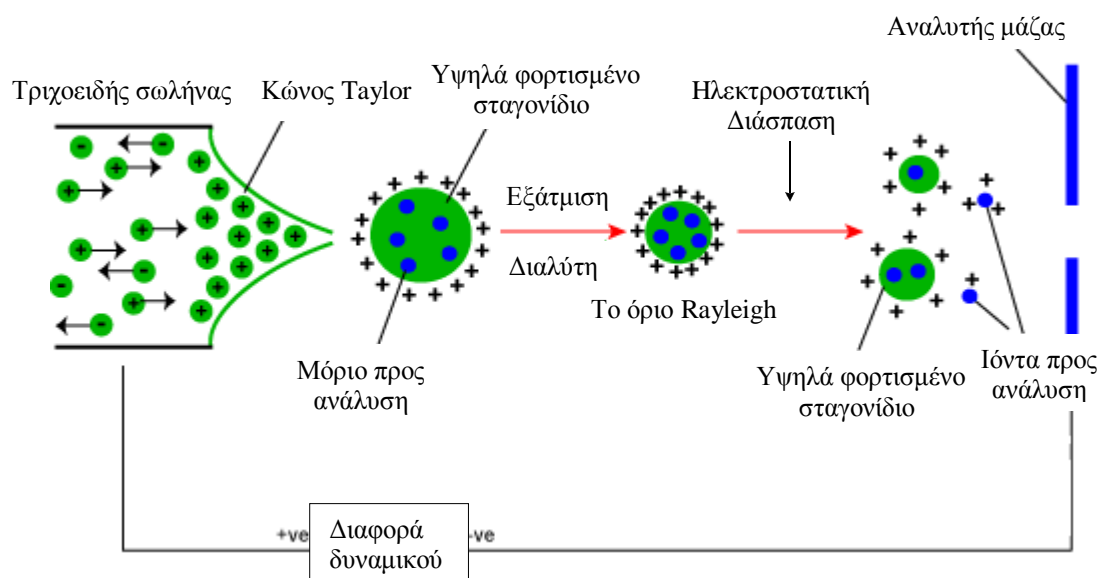
- 1) **Ιονισμός με δέσμη ηλεκτρονίων**, EI (Electron Ionisation), κατά τον οποίο τα μόρια εξαερώνονται και, στη συνέχεια, ιοντίζονται μέσω βομβαρδισμού με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, που εκπέμπονται από θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου.
- 2) **Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό**, ESI (Electrospray Ionisation), με τον οποίο προσδιορίζονται βιομόρια με μοριακό βάρος >100.000 Da σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία.
- 3) **Χημικός Ιονισμός**, CI (Chemical Ionization), κατά τον οποίο τα μόρια εξαερώνονται και στη συνέχεια ιοντίζονται μέσω σύγκρουσης με άλλα ιόντα, τα οποία δημιουργούνται με βομβαρδισμό ενός δραστικού αερίου με ηλεκτρόνια.
- 4) **Ιονισμός εκρόφησης πεδίου**, FD (Field Desorption), κατά τον οποίο το δείγμα ιοντίζεται με εφαρμογή υψηλού δυναμικού.
- 5) **Ιονισμός υποβοηθούμενος με υπόστρωμα και εκρόφηση με Laser**, MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), μία τεχνική για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους πολικών βιοπολυμερών.
- 6) **Βομβαρδισμός με ταχεία άτομα**, FAB (Fast Atom Bombardment), όπου τα δείγματα σε στερεή κατάσταση ιοντίζονται μέσω βομβαρδισμού με άτομα ξένου ή αργού μεγάλης ενέργειας(μερικά KeV).

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό, **ESI-MS** (Electrospray Ionisation Mass Spectroscopy), η οποία εισήχθη για πρώτη φορά το 1984 και θεωρείται από τις καλύτερες και πιο ήπιες μεθόδους ιονισμού για βιομόρια, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια, με μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 100.000 Da. Επιπλέον, επιτρέπει την ανάλυση αρκετά πολικών και μη πτητικών βιολογικών μορίων. Η πορεία που ακολουθεί το δείγμα στη φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό δίνεται παρακάτω.

- 1) Το υπό ανάλυση δείγμα διέρχεται με χαμηλή ροή (2-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) διαμέσου ενός τριχοειδούς σωλήνα, στο τέλος του οποίου εφαρμόζεται ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, διαφοράς δυναμικού της τάξεως των 3-4 kV, το οποίο ονομάζεται κόνος

**Taylor** (Taylor cone) και το δείγμα μετατρέπεται σε ένα νέφος υψηλά φορτισμένων σταγονιδίων.

- 2) Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια κινούνται προς τον αναλυτή μάζας, η ακτίνα τους μειώνεται καθώς εξατμίζεται ο διαλύτης, λόγω της θερμότητας που εφαρμόζεται, ωστόσο το φορτίο τους παραμένει σταθερό. Άρα, το φορτίο κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια. Σε ένα συγκεκριμένο σημείο, που καλείται το **όριο Rayleigh**, η ηλεκτροστατική δύναμη (Coulombic force) υπερβαίνει την επιφανειακή τάση του υγρού και επομένως το σταγονίδιο, λόγω των απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται στην επιφάνειά του, διασπάται σε μικρότερα φορτισμένα σωματίδια. Αυτή η ηλεκτροστατική διάσπαση μπορεί να επαναληφθεί σε αρκετούς κύκλους, απελευθερώνοντας τα φορτισμένα ιόντα.
- 3) Τα ιόντα διαχωρίζονται στον αναλυτή μάζας ανάλογα με το λόγο  $m/z$ .
- 4) Ο ανιχνευτής ιόντων, στη συνέχεια, παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και των φορτίων τους που δέχεται στην είσοδό του στη μονάδα του χρόνου.
- 5) Το ηλεκτρικό σήμα ενισχύεται από τον επεξεργαστή σήματος και αποστέλλεται στον καταγραφέα, προκειμένου να ληφθεί το φάσμα μάζας του δείγματος.



Σχήμα 4.3: Μέθοδος σχηματισμού ιόντων σύμφωνα με τη φασματοσκοπία μάζας ESI-MS.



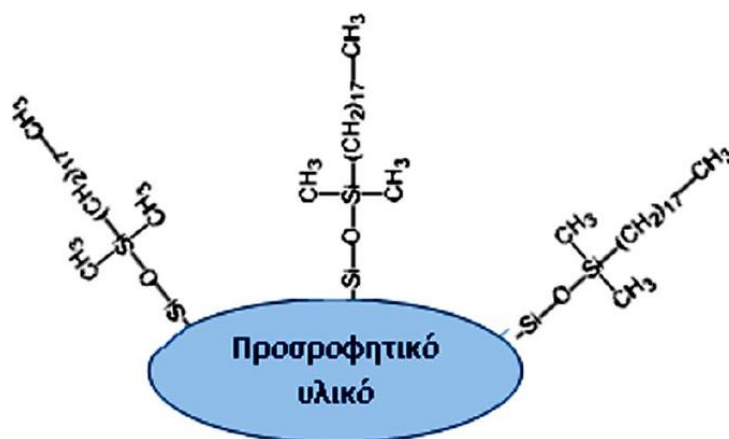
Συμπερασματικά, ο ήπιος ιονισμός, η υψηλή εκπομπή ιόντων, η βελτιωμένη ευαισθησία σε χαμηλούς ρυθμούς ροής, η ικανότητα ανάλυσης μεγάλων βιομορίων, η βελτιωμένη ακρίβεια μάζας καθώς και η ικανότητα να χρησιμοποιούνται φασματοόμετρα μάζας με χαμηλό όριο ανώτατης μάζας εξαιτίας των πολλών φορτίων πάνω σε ένα σωματίδιο, είναι σημαντικοί λόγοι για να επιλεγεί το ESI ως μέθοδος ιοντισμού.<sup>[3],[4],[5]</sup>

## 4.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)

Η **υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)** αποτελεί εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, καθώς η κινητή φάση δε ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Το χαρακτηριστικό αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που δίνεται για να αλληλεπιδράσει με τις ουσίες του δείγματος που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται πολύ καλός διαχωρισμός του δείγματος προς ανάλυση και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης.<sup>[6],[7]</sup>

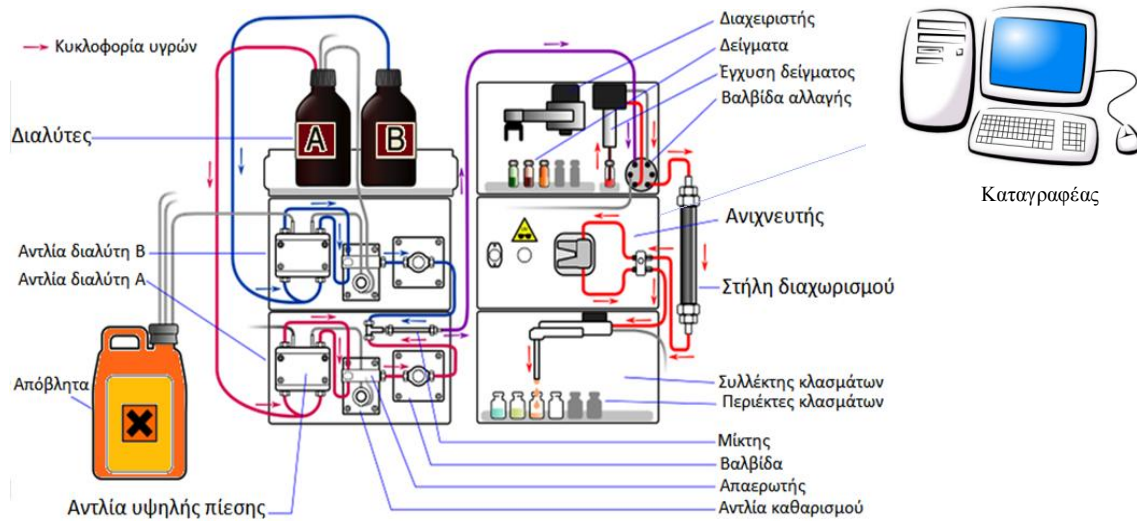
Για τον καθαρισμό των συνθετικών πεπτιδίων χρησιμοποιείται κυρίως η **υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)**. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην περίπτωση της RP-HPLC η **κινητή φάση** είναι πολική και αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό που διοχετεύονται συνεχώς, μέσω αντλιών, στη στατική φάση. Η **στατική φάση** είναι άπολη, καθώς αποτελείται από πολυμερή διοξειδίου του πυριτίου (silica), πάνω στα οποία προσδένονται διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλια, οκτύλια, δεκαοκτύλια), φαινύλια, διόλες, κυανομάδες. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη ανάστροφης φάσης επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης, όταν αυξήσουμε το περιεχόμενό της σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι, ελαττώνονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της άπολης στατικής φάσης, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή τους. Επομένως, όσο πιο άπολο είναι ένα μόριο του δείγματος, τόσο πιο ισχυρά θα αλληλεπιδράσει με τη στατική φάση

και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για την αποδέσμευση του μορίου. Αντίθετα, τα πολικά μόρια του δείγματος δεν αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση ή δεν προσδένονται τόσο ισχυρά με αυτή, με αποτέλεσμα να κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλούνται νωρίτερα. Τα πεπτίδια συγκρατούνται ισχυρά στη στατική φάση εξαιτίας της πολικότητας του νερού και γι' αυτό χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) στην κινητή φάση, που μειώνουν την πολικότητα και συμπαρασύρουν τα πεπτίδια, με αποτέλεσμα την έκλουσή τους από τη στήλη. Η σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να παραμένει σταθερή (ισοκρατικό σύστημα έκλουσης) ή και να μεταβάλλεται (βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης).<sup>[7],[8]</sup>



Σχήμα 4.4: Απεικόνιση της στατικής φάσης, από την οποία αποτελείται μία στήλη RP-HPLC C<sub>18</sub>.

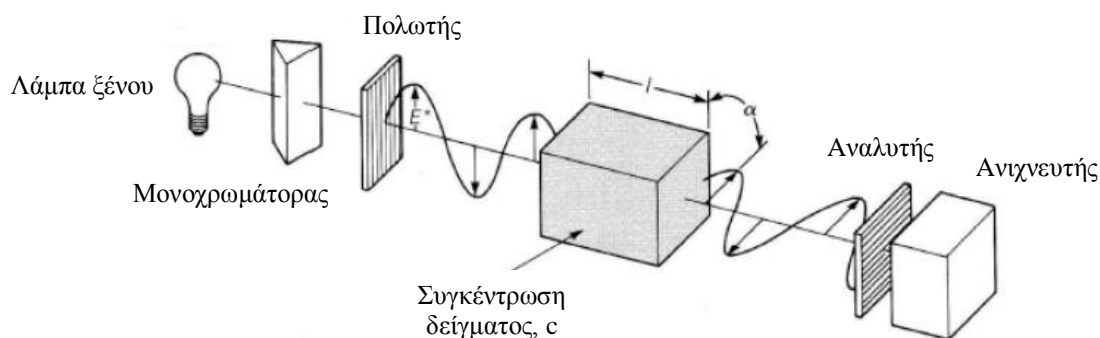
Για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιείται κυρίως ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας UV στα μήκη κύματος 214-220 nm, όπου απορροφάει ο πεπτιδικός δεσμός. Στην περίπτωση που το πεπτίδιο περιέχει αρωματικά αμινοξέα, όπως φαινυλαλανίνη (Phe), τυροσίνη (Tyr) ή τρυπτοφάνη (Trp), τότε η ανίχνευση πραγματοποιείται στα 240-280 nm, όπου απορροφάει ο αρωματικός δακτύλιος. Η καταγραφή της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου δίνει το χρωματογράφημα του δείγματος. Επίσης, είναι δυνατόν να υπολογισθεί και η συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος του δείγματος από το εμβαδόν της επιφάνειας των εκλούμενων κορυφών του χρωματογραφήματος.<sup>[8]</sup>



**Σχήμα 4.5:** Σχηματική διάταξη ενός οργάνου HPLC. Στη στήλη διαχωρισμού(στήλη HPLC) γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης γίνεται με την αντλία υψηλής πίεσης. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.

### 4.3 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού CD (Circular Dichroism Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism Spectroscopy) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη τεχνική για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πεπτιδίων και μελετήθηκε για πρώτη φορά από τους **Jean-Baptiste Biot**, **Agustin Fresnel** και **Aimé Cotton**. Το γραμμικά πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες, το αριστερόστροφα και το δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως. Ως γνωστόν, τα πεπτίδια είναι οπτικώς ενεργά χειρόμορφα μόρια, επομένως έχουν την ικανότητα να στρέφουν το πολωμένο φως είτε προς τα αριστερά (αντίθετα προς τη φορά των δεικτών του ρολογιού) είτε προς τα δεξιά (κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού). Η αρχή μεθόδου του κυκλικού διχρωϊσμού είναι η μέτρηση της διαφοράς απορρόφησης μεταξύ του αριστερόστροφα και του δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός,  $\Delta A = A_L - A_R$ , όπου  $A_L$  είναι η απορρόφηση του αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός και  $A_R$  είναι η απορρόφηση του δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός.<sup>[9],[10],[11]</sup>



**Σχήμα 4.6:** Σχηματική διάταξη ενός πολωσιμέτρου, του οργάνου που μετράει την στροφή του πολωμένου φωτός από μία οπτικώς ενεργή ουσία.

Επειδή το φως που διέρχεται από ένα οπτικά ενεργό μέσο, όπως τα πεπτίδια, πολώνεται ελλειπτικά, ο υπολογισμός του κυκλικού διχρωϊσμού πραγματοποιείται με τη μέτρηση της **ελλειπτικότητας,  $\theta$** . Η ελλειπτικότητα  $\theta$  συνδέεται με την απορρόφηση με τη σχέση

$$\theta = 32,98 (A_L - A_R)$$

, όπου το  $\theta$  μετράται σε μοίρες (millidegrees).

Για να είναι συγκρίσιμες οι τιμές  $\theta$  μεταξύ των διαφόρων μετρήσεων, υπολογίζεται η **γραμμομοριακή ελλειπτικότητα  $[\theta]$** , η οποία είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση και το μήκος της κυψελίδας (οπτική διαδρομή). Η  $[\theta]$  ορίζεται από την παρακάτω σχέση

$$[\theta] = 100\theta / lc = 3298 (A_L - A_R)$$

, όπου  $l$  είναι το μήκος της κυψελίδας,  $c$  είναι η συγκέντρωση και  $[\theta]$  η γραμμομοριακή ελλειπτικότητα που μετράται σε  $\text{degrees cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ .<sup>[12],[13]</sup>

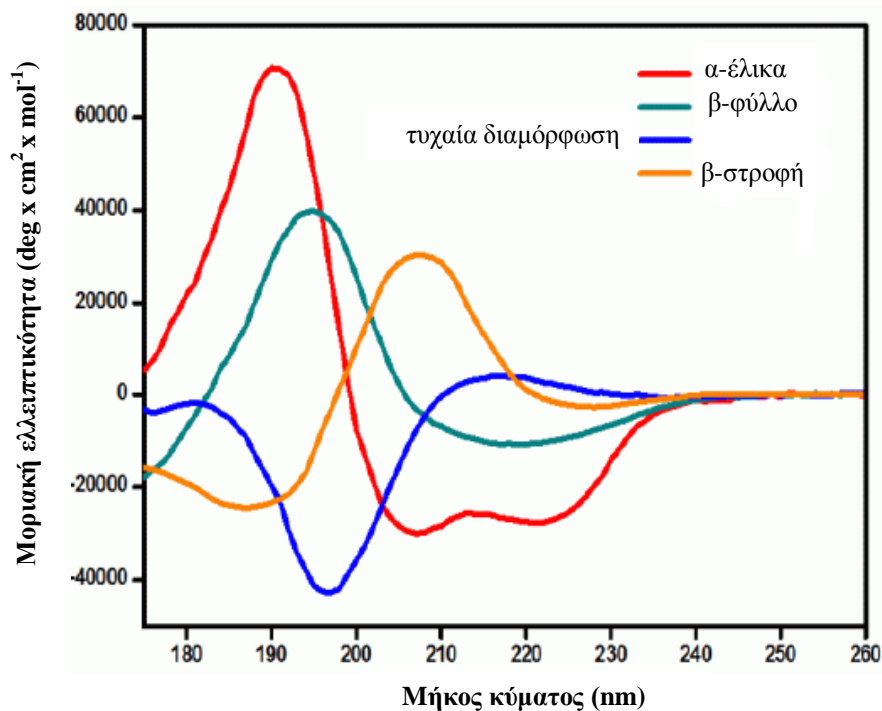
Τα οπτικώς ενεργά βιολογικά μόρια απορροφούν στα μήκη κύματος του ορατού και του υπεριώδους φάσματος. Σε αυτό το εύρος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας εμφανίζεται το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού. Πιο συγκεκριμένα, ο **πεπτιδικός δεσμός** δίνει χαρακτηριστικό φάσμα CD στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας UV <250 nm (αντιστοιχεί στην περιοχή του **άπω-υπεριώδους, far-UV**), οι **αρωματικοί δακτύλιοι** των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων φαινυλαλανίνης (Phe), τυροσίνης (Tyr) και τρυπτοφάνης (Trp), που παρουσιάζουν χαρακτηριστικές  $\pi^*$  απορροφήσεις στην περιοχή UV μεταξύ 250 και 300 nm (αντιστοιχεί στην περιοχή του **εγγύς-υπεριώδους, near-UV**) και τέλος οι διάφορες **χρωμοφόρες ουσίες** που απορροφούν στο φάσμα της

ορατής ακτινοβολίας στα 300-700 nm. Επιπλέον, παρατηρείται η  $n \rightarrow n^*$  μετατόπιση στα 222 nm (μετατόπιση χαμηλότερης ενέργειας), η οποία οφείλεται στη μεταφορά του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του καρβονυλικού οξυγόνου από το n τροχιακό στο κάθετο p τροχιακό.<sup>[9],[12],[13]</sup>

Η ανάλυση των φασμάτων CD γίνεται προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για τη **δευτεροταγή δομή** των πεπτιδίων, η οποία καθορίζεται στην περιοχή του άπω-υπεριώδους, far-UV **190-250 nm**. Στην περιοχή του εγγύς-υπεριώδους, near-UV μεταξύ **250-300 nm**, λαμβάνουμε πληροφορίες για την **τριτοταγή δομή** μιας πρωτεΐνης, καθώς εδώ κυριαρχούν οι απορροφήσεις των αρωματικών αλυσίδων.<sup>[9],[12],[13]</sup>

Ο προσδιορισμός των δευτεροταγών δομών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών που δείχνουν τις τιμές του μήκους κύματος ως συνάρτηση των μέγιστων ή ελάχιστων τιμών της μοριακής ελλειπτικότητας για κάθε δομή, όπως α-έλικα, β-φύλλο, β-στροφή, τυχαία διαμόρφωση. Το φάσμα CD της α-έλικας παρουσιάζει δύο αρνητικές κορυφές γύρω στα 222 και 208 nm και μία θετική κορυφή κοντά στα 190 nm. Το β-φύλλο δίνει μια απλούστερη μορφή φάσματος CD με μικρότερη ένταση από αυτό της α-έλικας. Το φάσμα αυτό παρουσιάζει μία αρνητική κορυφή στα 217 nm, μία θετική κοντά στα 195 nm και μία δεύτερη αρνητική γύρω στα 180 nm. Τέλος, το φάσμα CD της τυχαίας διαμόρφωσης χαρακτηρίζεται από μία αρνητική κορυφή κοντά στα 200 nm και μία θετική ή αρνητική κορυφή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, συνήθως γύρω στα 220 nm.<sup>[10],[11],[14],[15]</sup>

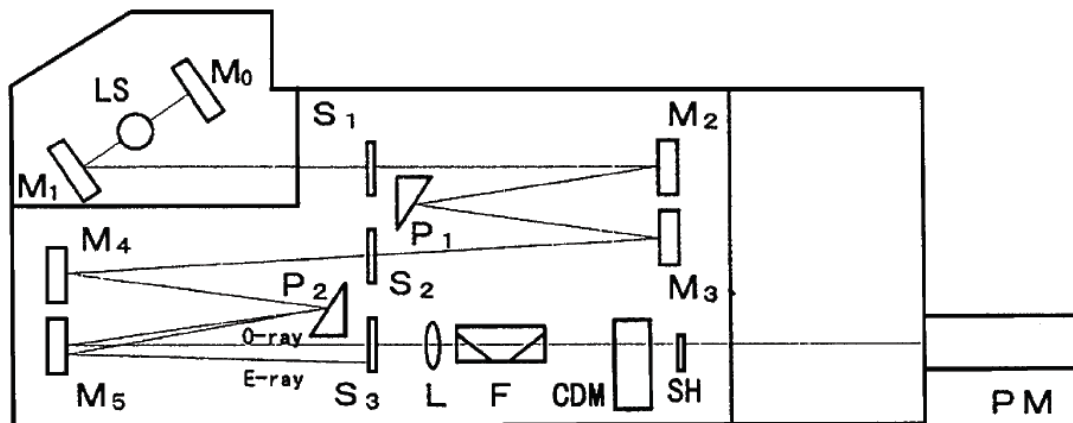
Τα πεπτίδια που έχουν ισορροπία ανάμεσα στην α-έλικα και την τυχαία διαμόρφωση, εμφανίζουν στο φάσμα CD **ισοδιχρωϊκό σημείο** κοντά στα 203 nm, όταν μεταβάλλεται η θερμοκρασία, ο διαλύτης, το pH ή η ιονική ισχύς. Η παρουσία ισοδιχρωϊκού σημείου υποδεικνύει ισορροπία μεταξύ των δύο δομών, που περιγράφεται με μία σταθερά ισορροπίας. Έτσι, η φασματοσκοπία του κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να μας δώσει θερμοδυναμικές πληροφορίες για το κάθε μόριο, όπως για την ενθαλπία και την ελεύθερη ενέργεια Gibbs. Ο υπολογισμός του **ποσοστού δομής** μπορεί να γίνει με σύγκριση των πειραματικών φασμάτων CD με πρότυπα φάσματα γνωστών δομών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.<sup>[11],[14],[15]</sup>



Σχήμα 4.7: Απεικόνιση πρότυπων καμπυλών χαρακτηριστικών δευτεροταγών δομών.

Τα δύο πιο διαδεδομένα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία του κυκλικού διχρωϊσμού είναι τα μοντέλα **Jasco** και **Jobin Yvon**. Στον οπτικό θάλαμο των οργάνων διοχετεύεται ξηρό άζωτο απαλλαγμένο από οξυγόνο προκειμένου να μην σχηματισθεί όζον σε μικρά μήκη κύματος. Τα δύο όργανα Jasco και Jobin Yvon αποτελούνται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα.<sup>[11],[12],[13]</sup>

- 1) Μονοχρωμάτορας
- 2) Λάμπα ξένου υψηλής τάσης
- 3) Τμήμα ηλεκτρικού ελέγχου



Σχήμα 4.8: Σχηματική διάταξη του φασματοφωτομέτρου Jasco J-810. Επίπεδη πολωμένη ακτινοβολία παράγεται καθώς περνάει δέσμη φωτός από την πηγή (LS, Light Source) διαμέσου δύο πρισμάτων (prisma) P<sub>1</sub> και P<sub>2</sub> και μιας ακολουθίας καθρεπτών (mirrors) από το M<sub>0</sub> στο M<sub>5</sub> και σχισμών (slits) από το S<sub>1</sub> στο S<sub>3</sub>. Η ακτίνα συγκεντρώνεται από τον φακό (lens) L και περνάει διαμέσου του φίλτρου (filter) F στον διαμορφωτή (modulator) CDM. Το κυκλικά πολωμένο φως περνάει μέσω του διαφράγματος (shutter) SH στο τμήμα εισαγωγής του δείγματος (sample compartment), αφού προηγουμένως έχει ανιχνευθεί από τον φωτοπολλαπλασιαστή (photomultiplier) PM.

## 4.4 Βιβλιογραφία

- [1] John McMurry, <<Οργανική Χημεία>>, Τόμος Ι, 5<sup>η</sup> Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005.
- [2] Awad H., Khamis M. & El-Aneed A., <<Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization>>, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **50**(2), 158-175 September (2014).
- [3] Domon B. & Aebersold R., <<Mass spectrometry and protein analysis>>, *Science*, **312**(5771), 212-7, April (2006).
- [4] Caprioli M.R., Malorni A. & Sindona G., <<Mass Spectrometry in Biomolecular Sciences>>, *Kluwer Academic Publishers* (1993).
- [5] Iribane J.V., Thomas B.A., <<On the evaporation of small ions from charged droplets>>, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287-2294 (1976).
- [6] Kazakevich V. & Lobrutto R., <<HPLC for pharmaceutical scientists>>, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2007.
- [7] Mant C.T., Chen Y., Yan Z. et al, <<HPLC analysis and purification of peptides>>, *Methods Mol. Biol.*, **386**, 3-55 (2007).
- [8] Carr D., <<The Handbook of the Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC>>, Third Edition, 2002.
- [9] Kelly S.M., Jess T.J. & Price N.C., <<How to study proteins by circular dichroism>>, *Biochim. Biophys. Acta*, **1751**(2), 119-39, August (2005).
- [10] Corrêa D.H.A & Ramos C.H.I., <<The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function>> *African J. Biochem. Res.*, **3**(5), 164-173 (2009).
- [11] Ferenc Z., Zsolt B., Ilona F. & Miklós S., <<Probing Protein Binding Sites by Circular Dichroism Spectroscopy>>, *Current Drug Discovery Technologies*, **1**, 133-153 (2004).
- [12] [www.ruppweb.org/cd/cdtutorial.htm](http://www.ruppweb.org/cd/cdtutorial.htm)
- [13] [www.ap-lab.com/circular\\_dichroism.htm](http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm)
- [14] Woody R.W., <<Circular dichroism>>, *Methods in Enzymology*, **246**, 34-71 (1995).



[15] Yang J.T., Wu C.C. & Martinez H.M., <<Calculation of protein conformation from circular dichroism>>, *Methods in Enzymology*, **130**, 208-269 (1986).



Σκοπός της εργασίας





Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων λόγω του αυξανόμενου αριθμού των ανθεκτικών, στη χρήση αντιβιοτικών, παθογόνων μικροοργανισμών έχει οδηγήσει την έρευνα στην κατεύθυνση των **αντιμικροβιακών κατιονικών πεπτιδίων**. Το κίνητρο των ερευνητών στηρίζεται στο εύρος των εφαρμογών που προσφέρουν αυτά τα πεπτίδια, καθώς μπορούν να δράσουν ως αποτελεσματικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες είτε μόνα τους είτε σε συνεργασία με άλλα αντιβιοτικά καθώς και άλλα αντιμικροβιακά πεπτίδια, οδηγώντας σε γρήγορο θάνατο του παθογόνου, εξουδετέρωση των ενδοτοξινών που ελευθερώνονται μετά τον θάνατο του βακτηρίου, ρύθμιση των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας, καθώς και στο να προάγουν την αγγειογένεση και την επούλωση τραυμάτων.

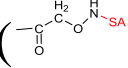
Τα συγκεκριμένα πεπτίδια έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, που περιλαμβάνει gram-αρνητικά και gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, ιούς, παράσιτα καθώς και πρωτόζωα. Ορισμένα από τα πεπτίδια εμφανίζουν αντικαρκινική δράση, ενώ κάποια άλλα έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού της γρίπης τύπου A (influenza A virus), του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus) και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1).

Αν και τα πεπτίδια αυτά παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, ωστόσο η βιολογική τους δράση έγκειται σε συγκεκριμένα κοινά δομικά χαρακτηριστικά, όπως το θετικό φορτίο λόγω της παρουσίας των αμινοξέων **αργινίνης** και **λυσίνης**, το οποίο τους επιτρέπει να προσδένονται ισχυρά στις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες των μεμβρανών των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, διαθέτουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% υδρόφοβα αμινοξέα, έτσι ώστε να αναδιπλώνονται σε μία τριτοταγή δομή, την **αμφιπαθητική διαμόρφωση**, όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των παθογόνων, προκαλώντας έτσι τη διάρρηξη των μεμβρανών και τη λύση του κυττάρου.

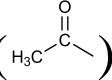
Τα αντιμικροβιακά κατιονικά πεπτίδια πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως **θεραπευτικά μέσα**. Έτσι θα πρέπει να έχουν, εκτός από υψηλή αντιμικροβιακή δράση, χαμηλή έως και μηδενική τοξικότητα απέναντι στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα καθώς και πρωτεολυτική σταθερότητα.

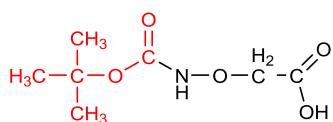
Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν κατιονικά πεπτιδικά ανάλογα του φυσικού ανθρώπινου αντιμικροβιακού πεπτιδίου **Cathelicidin LL-37** και μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση απέναντι σε τρία **gram-αρνητικά**, δύο **gram-θετικά**

**βακτήρια** και σε ένα **μύκητα**, καθώς και η κυτταροτοξική τους δράση απέναντι στην κυτταρική σειρά **A549**, που είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα από πνεύμονα ανδρός Καυκάσιας φυλής, ηλικίας 58 ετών. Οι αλληλουχίες των συντιθέμενων πεπτιδικών αναλόγων είναι οι ακόλουθες. Η πρώτη αλληλουχία αντιστοιχεί στο κεντρικό ελικοειδές τμήμα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37. Στα ανάλογά του έγιναν αντικαταστάσεις στις θέσεις **Phe<sup>17</sup>**, **Arg<sup>23</sup>** και **Lys<sup>25</sup>**.

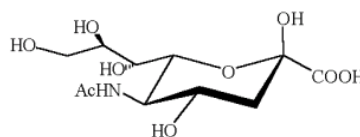
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Leu**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ala**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Το θετικό φορτίο των παραπάνω πεπτιδικών αναλόγων οφείλεται στα κατάλοιπα **λυσίνης** (Lys) και **αργινίνης** (Arg), ενώ το ποσοστό υδροφοβικότητας προκύπτει, κυρίως, από τα κατάλοιπα **λευκίνης** (Leu) και **φαινυλαλανίνης** (Phe). Σε δύο από τα έξι πεπτιδικά

ανάλογα προστέθηκε στο N-τελικό τους άκρο μία ακετυλο-ομάδα () και αντικαταστάθηκε η **Lys<sup>25</sup>** του Cathelicidin LL-37 με ένα κατάλοιπο **λευκίνης** (Leu), προκειμένου να εξετασθεί εάν οι αλλαγές αυτές βελτιώνουν την αντιμικροβιακή καθώς και κυτταροτοξική δράση του πεπτιδίου. Στο ακετυλιωμένο πεπτιδικό ανάλογο προστέθηκε στην αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της **K<sup>18</sup>** του Cathelicidin LL-37 ο φορέας **Boc**-αμινοοξύ οξικό οξύ (**Boc**-aminooxy acetic acid) με συντακτικό τύπο



και, αφού λήφθηκε το πεπτίδιο σε καθαρή μορφή αποδεσμευμένο από τη ρητίνη και τις πλευρικές προστασίες, πραγματοποιήθηκε χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του **αμινοοξυακετυλιωμένου πεπτιδίου** (NH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CO-peptide) και του **σιαλικού οξέος**



(N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ) με συντακτικό τύπο

Η πρόσδεση του πεπτιδικού αναλόγου με το σιαλικό οξύ έγινε προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό της κυτταροτοξικής του δράσης συγκρινόμενο με αυτό του πεπτιδικού αναλόγου που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου, καθώς και να μελετηθεί η αντιμικροβιακή του δράση.

Η διαμόρφωση των τριών πεπτιδικών αναλόγων μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) σε διαφορετικές συνθήκες. Επίσης, μελετήθηκε η αιμολυτική δράση όλων των πεπτιδικών αναλόγων (τοξικότητα απέναντι στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα).

## Πειραματικό μέρος

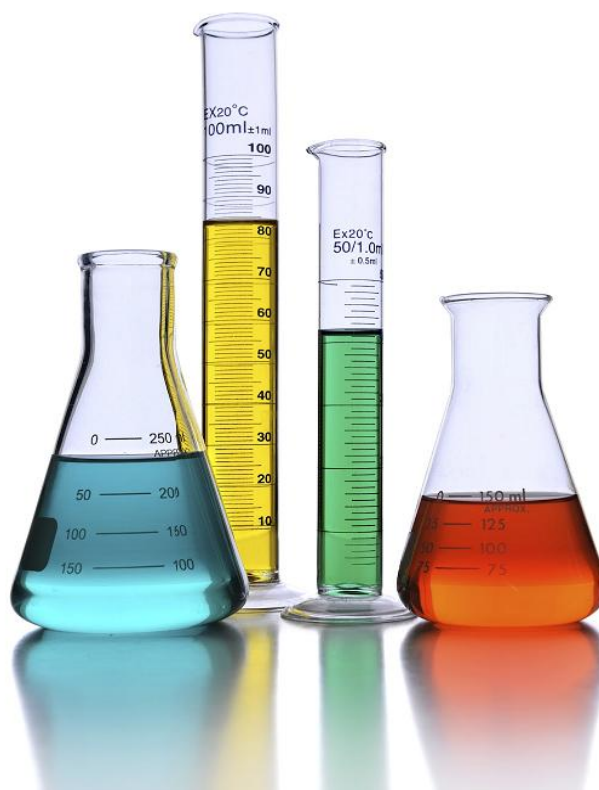






## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

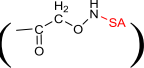
### Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων





## 6.1 Μέθοδος πεπτιδικής σύνθεσης

Στο εργαστήριο Πεπτιδοχημείας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση έξι πεπτιδικών αναλόγων του φυσικού αντιμικροβιακού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37. Η σύνθεση του τέταρτου πεπτιδίου έγινε από την Πετεινέλλη Κλεονίκη στα πλαίσια της πτυχιακής της εργασίας. Η αλληλουχία των συντιθέμενων πεπτιδίων δίνεται παρακάτω. Η πρώτη αλληλουχία αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield. Τα πεπτίδια συντέθηκαν σε στερεή φάση σύμφωνα με την **Fmoc- tBu στρατηγική**. Ως αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη **Rink Amide AM**, η οποία ονομάζεται κατά IUPAC ως 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ]-φαινοξυ-ρητίνη. Η ρητίνη χρησιμοποιήθηκε με υποκατάσταση **0,33 mmol/gr** καθώς και με υποκατάσταση **0,42 mmol/gr**. Παρακάτω αναφέρονται οι διαλύτες, τα αντιδραστήρια σύζευξης, τα Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα, καθώς και άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πεπτιδική σύνθεση.

### 6.1.1 Διαλύτες

- **Διχλωρομεθάνιο (DCM)**, το οποίο χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις και τη διόγκωση της ρητίνης.
- **Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)**, το οποίο χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις και τη διόγκωση της ρητίνης.

- **Διμεθυλοφορμαμίδιο επεξεργασμένο με molecular sieves** (DMF/molecular sieves). Το διμεθυλοφορμαμίδιο διασπάται, με έκθεσή του στο φως, προς μία δευτεροταγή βάση, τη διμεθυλαμίνη, η οποία απομακρύνει την Fmoc-προστατευτική ομάδα της ρητίνης και των αμινοξέων. Κατά συνέπεια, στις αντιδράσεις σύζευξης χρησιμοποιείται DMF που έχει επεξεργαστεί με **molecular sieves** (πορώδεις σφαιρικοί κόκκοι διαμέτρου 0,4 nm), οι οποίοι δεσμεύουν τις δευτεροταγείς αμίνες, προκειμένου να μην λάβουμε ανεπιθύμητα αποτελέσματα.
- **Πιπεριδίνη**, η οποία χρησιμοποιείται ως διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF (20% πιπεριδίνη/DMF) για την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας.
- **Τριφθοροξικό οξύ (TFA)** για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων.
- **Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS)**, το οποίο δεσμεύει τα καρβοκατιόντα που προκύπτουν από την αποπροστασία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και την αποικοδόμηση του "linker" της ρητίνης, καθώς στις όξινες συνθήκες του διαλύματος αποκοπής (95% TFA) ο βραχίονας της Rink Amide και της Wang ρητίνης αποικοδομείται.
- **Διαιθυλαιθέρας (DEE)** για την καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την απομάκρυνση της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Επίσης χρησιμοποιείται και στο στάδιο της ξήρανης, καθώς συρρικνώνει τους κόκκους της πεπτιδορητίνης.
- **Εξάνιο (n-Hexane)**, το οποίο χρησιμοποιείται ως διάλυμα εξανίου/νερού 1:1, προκειμένου να απομακρυνθεί το τριφθοροξικό οξύ (TFA) στον περιστροφικό εξατμιστήρα στο στάδιο της συμπύκνωσης του πεπτιδίου.
- **Οξικός ανυδρίτης (Ac<sub>2</sub>O)** για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων.
- **Οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH) 2N** για την παραλαβή του πεπτιδίου μετά την καταβύθιση.
- **Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN)**, το οποίο χρησιμοποιείται στο στάδιο καθαρισμού του πεπτιδίου.
- **Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH)** που χρησιμοποιείται στο στάδιο καθαρισμού του πεπτιδίου.

### 6.1.2 Αντιδραστήρια σύζευξης

- Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφθοροφωσφορικό άλας (**HBTU**) για την ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος.
- Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό άλας (**TBTU**) για την ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος.
- Διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (**DIC**) για την ενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος.
- 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (**HOBt**) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο στις αντιδράσεις σύζευξης.
- Διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (**DIEA**), μία τριτοταγής βάση που προστίθεται στο διάλυμα σύζευξης παρουσία φωσφονικών και ουρονικών αλάτων.

### 6.1.3 Αντιδραστήρια του χρωματομετρικού ελέγχου ρητίνης

#### Test Kaiser

- Νινυδρίνη ( $C_9H_6O_4$ )
- Κυανιούχο κάλιο (KCN)
- Αιθανόλη ( $C_2H_6O$ )
- Φαινόλη ( $C_6H_6O$ )
- Πυριδίνη ( $C_5H_5N$ )

#### 6.1.4 Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα

Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα	Μοριακό Βάρος (gr/mol)
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411,5
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8
Fmoc-Val-OH	339,4
Fmoc-Leu-OH	353,4
Fmoc-Ile-OH	353,4
Fmoc-Phe-OH	387,4
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,8
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7
Fmoc-Ala-OH	311,3

Στο ακετυλιωμένο πεπτιδικό ανάλογο προστέθηκε στην αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της **K<sup>18</sup>** του Cathelicidin LL-37 ο φορέας **Boc-αμινοοξύ οξικό οξύ** (Boc-aminooxy acetic acid) με μοριακό βάρος 191,2 gr/mol. Αφού ελήφθηκε το πεπτίδιο σε καθαρή μορφή αποδεσμευμένο από τη ρητίνη και τις πλευρικές προστασίες, πραγματοποιήθηκε χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του **αμινοοξυακετυλιωμένου πεπτιδίου** (NH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CO-peptide) και του **σιαλικού οξέος** (N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ) με μοριακό βάρος 309,27 gr/mol.



Σχήμα 6.1: Υάλινο δοχείο (Vessel), στο οποίο πραγματοποιείται η σύνθεση πεπτιδίου σε στερεή φάση.

## 6.2 Πορεία σύνθεσης

Η σύζευξη των αμινοξέων πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου σύζευξης HBTU παρουσία του βοηθητικού πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBT και της τριτοταγούς βάσης DIEA σε αναλογία 3/3/3/6/1 αμινοξύ/HBTU/HOBT/DIEA/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Το HOBT προστίθεται στο διάλυμα σύζευξης, διότι συμβάλλει στη δημιουργία ενός ισχυρού και δραστικού ακυλιωτικού μέσου, ενώ παράλληλα αποφεύγεται σε μεγάλο βαθμό ο κίνδυνος ρακεμοποίησης. Προστίθενται 6 ισοδύναμα βάσης, εκ των οποίων τα 3 ισοδύναμα συμβάλλουν στον ιονισμό του HOBT και τα υπόλοιπα 3 στο σχηματισμό του καρβοξυλικού άλατος. Εκτός από το HBTU, χρησιμοποιήθηκε και το αντιδραστήριο σύζευξης διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBT σε αναλογία 3/3/3/1 αμινοξύ/DIC/HOBT/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Το διάλυμα σύζευξης, που περιέχει το Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ, το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> και το DIC αφήνεται υπό ανάδευση σε παγόλουτρο για 20 λεπτά, προκειμένου να γίνει η προενεργοποίηση της α-καρβοξυλομάδας του αμινοξέος.

Η διάρκεια της αντίδρασης σύζευξης για κάθε αμινοξύ είναι 3 ώρες. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το αμινοξύ αργινίνη, η διάρκεια της σύζευξης είναι μεγαλύτερη (~4 ώρες), καθώς διαθέτει μία ογκώδη παράπλευρη προστατευτική ομάδα (Pbf-ομάδα). Η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από την α-αμινομάδα του εκάστοτε συζευγμένου αμινοξέος καθώς και την αμινομάδα της ρητίνης πραγματοποιείται με διάλυμα πιπεριδίνης σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), (20% πιπεριδίνη/DMF).

Ο ποιοτικός έλεγχος για την προσθήκη του κάθε Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα (απουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη) καθώς και για την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από κάθε συζευγμένο αμινοξύ (ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων) πραγματοποιείται με τη δοκιμή χρωματομέτρησης της ρητίνης, το **test Kaiser**. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει την προσθήκη μερικών κόκκων της πεπτιδορητίνης σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και με μία πιπέτα Pasteur προστίθενται 3 σταγόνες από τα παρακάτω διαλύματα.



- ❖ 2 mL KCN 0,001M σε 100 mL πυριδίνης
- ❖ 5 g νινυδρίνης σε 100 mL αιθανόλης
- ❖ 400 mg φαινόλης σε 100 mL αιθανόλης

Στη συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας προστίθεται σε υδρόλουτρο για 30 δευτερόλεπτα. Εάν οι κόκκοι αποκτήσουν μπλε χρώμα, τότε πιστοποιείται η ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη και το test Kaiser είναι θετικό (+), ενώ αν οι κόκκοι παραμείνουν λευκοί συμπεραίνουμε ότι η σύζευξη του αμινοξέος είναι επιτυχής, καθώς δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην πεπτιδορητίνη και το test Kaiser είναι αρνητικό (-).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων των αμινοξέων του πραγματοποιείται με την προσθήκη **τριφθοροξικού οξέος** (TFA) παρουσία **H<sub>2</sub>O** και **τριϊσοπροπυλοσιλανίου** (TIS) σε αναλογία **95/2,5/2,5** % v/v. Η πεπτιδορητίνη μεταφέρεται, ποσοτικά, σε σφαιρική φιάλη με διαδοχικές εκπλύσεις με το διάλυμα αποκοπής (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS) και αφήνεται υπό ανάδευση για 4-5 ώρες, διότι υπάρχουν τρία κατάλοιπα αργινίνης σε κάθε πεπτιδικό ανάλογο. Στη συνέχεια, η ρητίνη απομακρύνεται από το πεπτίδιο με διήθηση υπό κενό και το διήθημα (πεπτίδιο απαλλαγμένο από τη ρητίνη) μεταφέρεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (flash evaporator), όπου απομακρύνεται το TFA μέσω εξάτμισης υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα του πεπτιδίου προστίθεται μίγμα DCM/Εξανίου σε αναλογία 1:1 και το διάλυμα αφήνεται προς συμπύκνωση. Η προσθήκη του μίγματος DCM/Εξανίου επαναλαμβάνεται 3-4 φορές, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απομάκρυνση του TFA. Στη συνέχεια, το πεπτίδιο καταβυθίζεται με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα και αφήνεται στην κατάψυξη για λίγες ώρες. Έπειτα, το πεπτίδιο διηθείται υπό κενό και προστίθεται πάλι διαιθυλαιθέρας για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων (scavengers) τριϊσοπροπυλοσιλανίου (TIS). Το στερεό πεπτίδιο που βρίσκεται στον ηθμό (crude peptide) συλλέγεται σε προζυγισμένο φιαλίδιο και τοποθετείται στον ξηραντήρα για να απομακρυνθεί η υγρασία. Το στερεό υπόλειμμα του πεπτιδίου που έχει μείνει στον ηθμό διαλυτοποιείται με σταδιακή προσθήκη υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 2N, ώστε να γίνει ποσοτική παραλαβή και στη συνέχεια λυοφιλοποιείται για να ληφθεί σε στερεή μορφή.



Σχήμα 6.2: Θάλαμος λυοφιλιοποίησης με 12 υποδοχές.

Ο καθαρισμός των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) και πιο συγκεκριμένα με την **ημιπαρασκευαστική** και **παρασκευαστική RP-HPLC**.



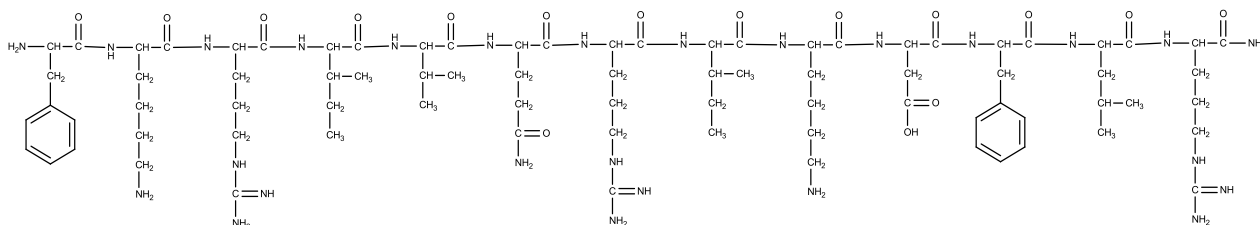
Σχήμα 6.3: Απεικόνιση οργάνου HPLC με ημιπαρασκευαστική στήλη RP-HPLC.

Ο έλεγχος της καθαρότητας των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με **αναλυτική RP-HPLC**, ενώ η ταυτοποίηση της δομής του με φασματοσκοπία μάζας **ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS** (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy) Micromass Platform LC Quadrupole.



Σχήμα 6.4: Απεικόνιση οργάνου ESI-MS.

### 6.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων



Μοριακό Βάρος: 1718,1 gr/mol

Μοριακός Τύπος: C<sub>80</sub>H<sub>136</sub>N<sub>26</sub>O<sub>16</sub>

Η σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου έγινε σε στερεή φάση σύμφωνα με την Fmoc-tBu στρατηγική και ως αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Rink Amide AM, η οποία ονομάζεται κατά IUPAC ως 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ]-φαινοξυ-ρητίνη. Για τη σύνθεση 1mmol πεπτιδίου ζυγίσθηκαν 3,03 gr ρητίνης με υποκατάσταση 0,33 mmol/gr. Ως αντιδραστήριο

σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το HBTU με βοηθητικό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο το HOBT και παρουσία της τριτοταγούς βάσης DIEA. Ως εναλλακτικό αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBT. Ύστερα από την προσθήκη του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) έγινε ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων της ρητίνης με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA) με αναλογία 1:1 v/v, προκειμένου να μην λάβουμε ανεπιθύμητα παραπροϊόντα στην εξέλιξη της πορείας της σύνθεσης. Πιο αναλυτικά, σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται ο οξικός ανυδρίτης (Ac<sub>2</sub>O), η τριτοταγής βάση DIEA και το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το οποίο δρα ως διαλύτης. Το διάλυμα αναδεύεται για μερικά λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται στο Vessel, όπου αφήνεται προς ανάδευση για 20 λεπτά. Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις με τους διαλύτες DCM και DMF<sub>molecular sieves</sub> και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για μία ακόμα φορά. Το test Kaiser είναι αρνητικό (-), υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στη ρητίνη.

Μετά την προσθήκη του 12<sup>ου</sup> αμινοξέος (Fmoc-Lys(Boc)-OH) στο N-τελικό άκρο, η πεπτιδορητίνη μεταφέρεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως ύστερα από διαδοχικές εκπλύσεις του Vessel με DCM και DMF<sub>molecular sieves</sub> (ποσοτική παραλαβή της πεπτιδορητίνης από το Vessel), εκπλύσεις με διαιθυλαιθέρα (συρρίκνωση των κόκκων) και διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση των διαλυτών. Η πεπτιδορητίνη, στη συνέχεια, τοποθετείται στο ξηραντήρα παρουσία ξηραντικού μέσου P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> για 4 ημέρες. Μετά το πέρας των 4 ημερών η πεπτιδορητίνη ζυγίστηκε και το βάρος της υπολογίστηκε ως  $m_{\text{πεπτιδορητίνης}} = 5,0583 \text{ gr}$ . Έπειτα, γίνεται διαμερισμός της πεπτιδορητίνης σε τρία ίσα μέρη. Κάθε τμήμα της πεπτιδορητίνης μεταφέρεται ποσοτικά σε διαφορετικό Vessel μέσω εκπλύσεων με DMF<sub>molecular sieves</sub> και DCM και προστίθεται σε αυτό από ένα διαφορετικό αμινοξύ. Πριν την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέος (13<sup>ο</sup> αμινοξύ), γίνεται αποκοπή της Fmoc-ομάδας της λυσίνης (12<sup>ο</sup> αμινοξύ) με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF.

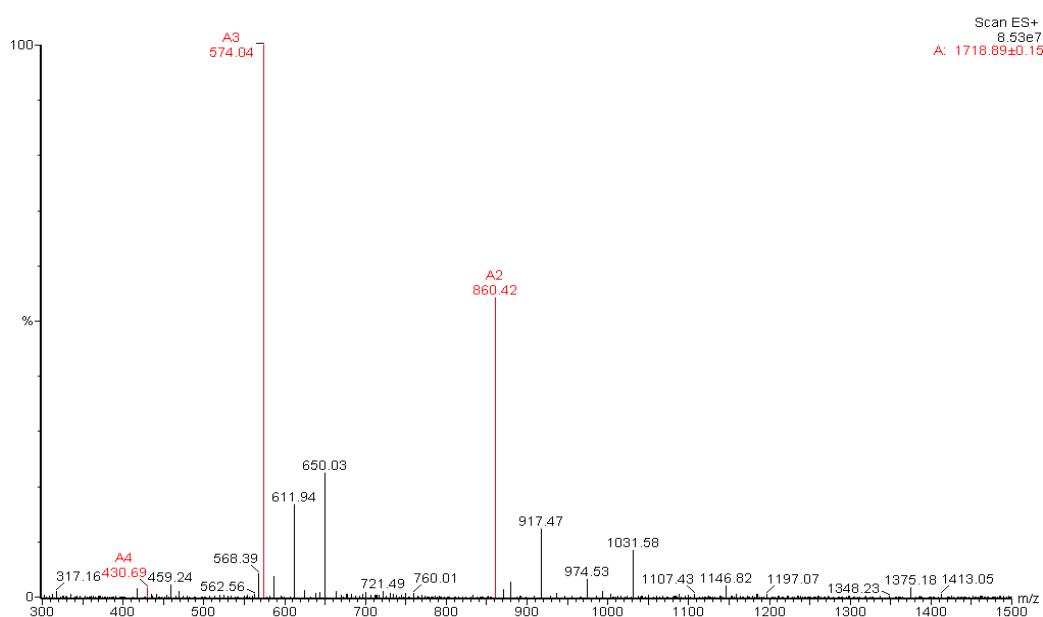
Στο πρώτο μέρος της πεπτιδορητίνης προστίθεται το αμινοξύ **Fmoc-Phe-OH** και το διάλυμα σύζευξης έχει αναλογία 3/3/3/6/1 αμινοξύ/HBTU/HOBT/DIEA/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Η επιτυχής σύζευξη του αμινοξέος Fmoc-Phe-OH ελέγχθηκε με test Kaiser. Τέλος, απομακρύνθηκε η Fmoc-ομάδα της φαινυλαλανίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF. Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη παραλαμβάνεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται στο ξηραντήρα για 3 ημέρες. Το ποσό της πεπτιδορητίνης που λήφθηκε είναι 1,478 gr για 0,33 θεωρητικά mmoles πεπτιδίου (1/3 της αρχικής θεωρητικής ποσότητας που ήταν 1 mmol

πεπτιδίου) και η απόδοση σύνθεσης είναι 77,09 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και τις παράπλευρες προστατευτικές ομάδες πραγματοποιείται με διάλυμα αποκοπής TFA/H<sub>2</sub>O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 % v/v. Ακολουθεί απομάκρυνση του TFA με εξάτμιση υπό κενό στον περιστροφικό εξάτμιστήρα και καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Μετά από ξήρανση και λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε ποσότητα crude πεπτιδίου 368 mg με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 85,7 %.

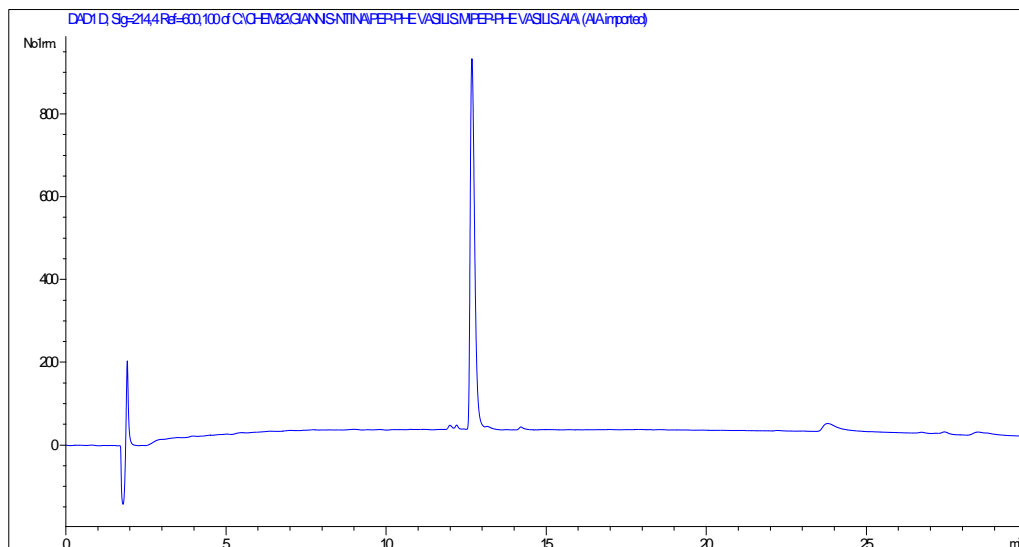
Το crude πεπτιδίο καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με σύστημα έκλουσης A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Το crude πεπτιδίο καθαρίστηκε και με παρασκευαστική RP-HPLC με τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC με μόνη διαφορά την ταχύτητα ροής που ρυθμίστηκε στα 20 mL/min. Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου είναι 46,9 %.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του πεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης των διαλυτών (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA και (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA, A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70%. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 1 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm.

Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 1718,1 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 1718,89 gr/mol.

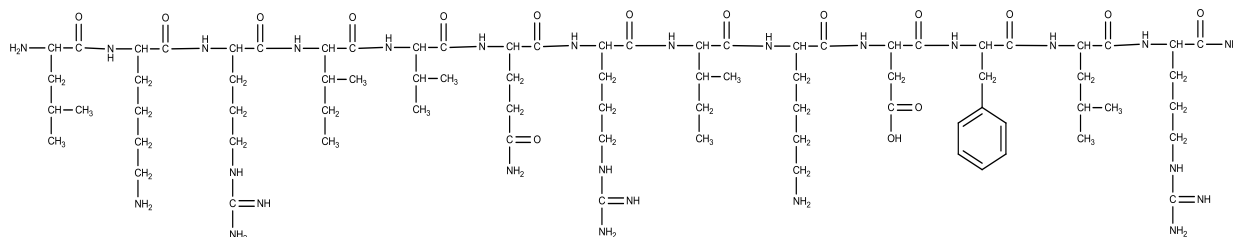


Σχήμα 6.5: Φάσμα μάζας ESI-MS του Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.



Σχήμα 6.6: Αναλυτική RP-HPLC του Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.

### Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



Μοριακό Βάρος: 1684,08 gr/mol

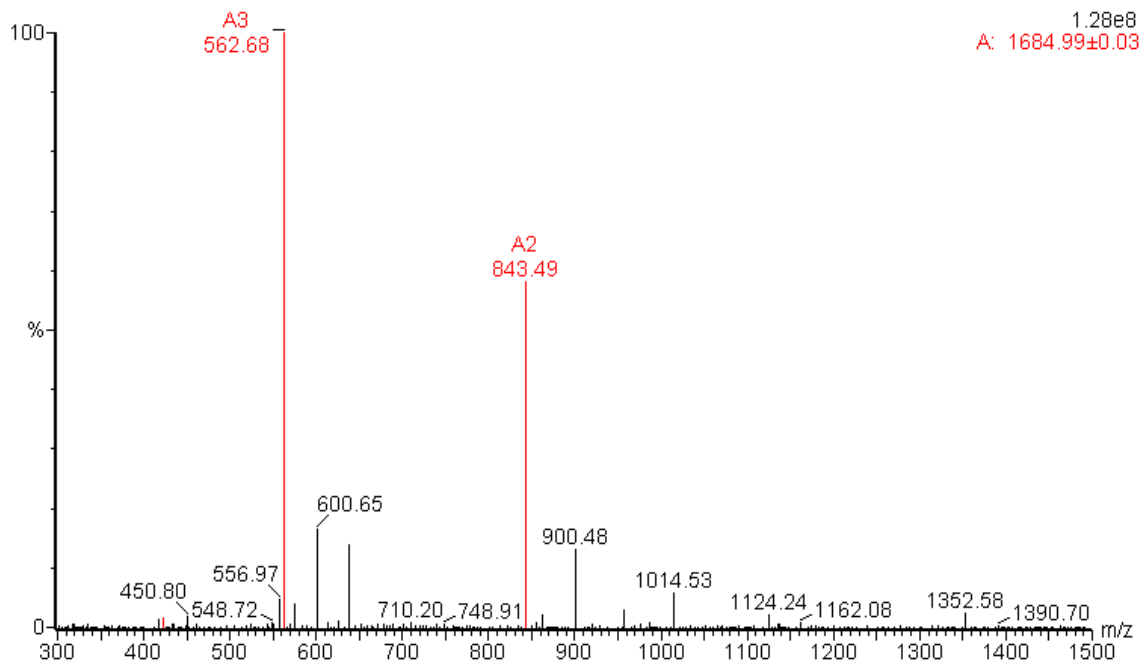
Μοριακός Τύπος: C<sub>77</sub>H<sub>138</sub>N<sub>26</sub>O<sub>16</sub>

Στο δεύτερο μέρος της πεπτιδορηντίνης προστίθεται το αμινοξύ **Fmoc-Leu-OH**, αφού πρώτα γίνει αποκοπή της Fmoc-ομάδας της λυσίνης (12<sup>ο</sup> αμινοξύ της πεπτιδικής ακολουθίας). Το διάλυμα σύζευξης έχει αναλογία 3/3/3/6/1 αμινοξύ/HBTU/HOBt/DIEA/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Η επιτυχής σύζευξη του αμινοξέος Fmoc-Leu-OH ελέγχθηκε με test Kaiser. Τέλος, απομακρύνθηκε η Fmoc-ομάδα της λευκίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF. Στη συνέχεια, η πεπτιδορηντίνη παραλαμβάνεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται στο ξηραντήρα για 3

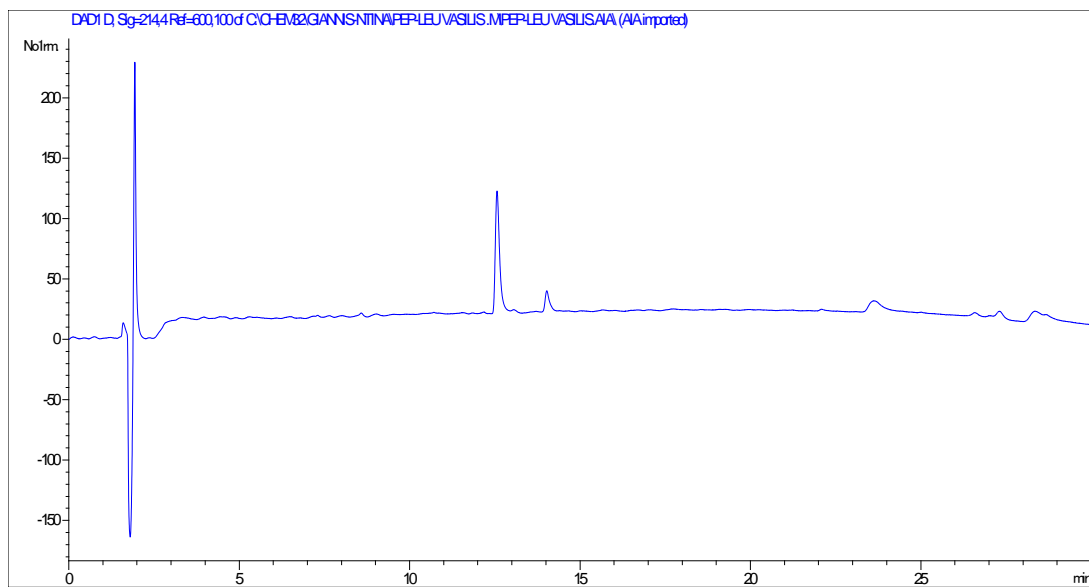
ημέρες. Το ποσό της πεπτιδορητίνης που λήφθηκε είναι 1,4287 gr για 0,33 θεωρητικά mmoles πεπτιδίου (1/3 της αρχικής θεωρητικής ποσότητας που ήταν 1 mmol πεπτιδίου) και η απόδοση σύνθεσης είναι 74,9 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και τις παράπλευρες προστατευτικές ομάδες πραγματοποιείται με διάλυμα αποκοπής TFA/H<sub>2</sub>O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 % v/v. Ακολουθεί απομάκρυνση του TFA με εξάτμιση υπό κενό στον περιστροφικό εξάτμιστήρα και καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Μετά από ξήρανση και λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε ποσότητα crude πεπτιδίου 315 mg με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 75,8 %.

Το crude πεπτίδιο καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με σύστημα έκλουσης A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm.

Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου είναι 45,1 %. Ο έλεγχος της καθαρότητας του πεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης των διαλυτών (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA και (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA, A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70%. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 1 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 1684,08 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 1684,99 gr/mol.



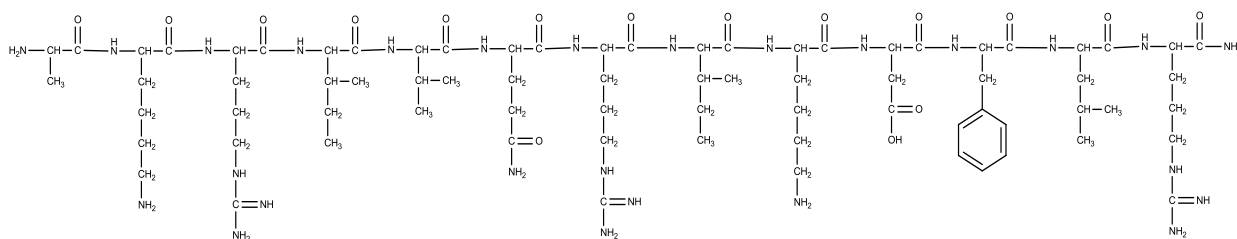
Σχήμα 6.7: Φάσμα μάζας ESI-MS του Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.



Σχήμα 6.8: Αναλυτική RP-HPLC του Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.



## Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



Μοριακό Βάρος: 1642,00 gr/mol

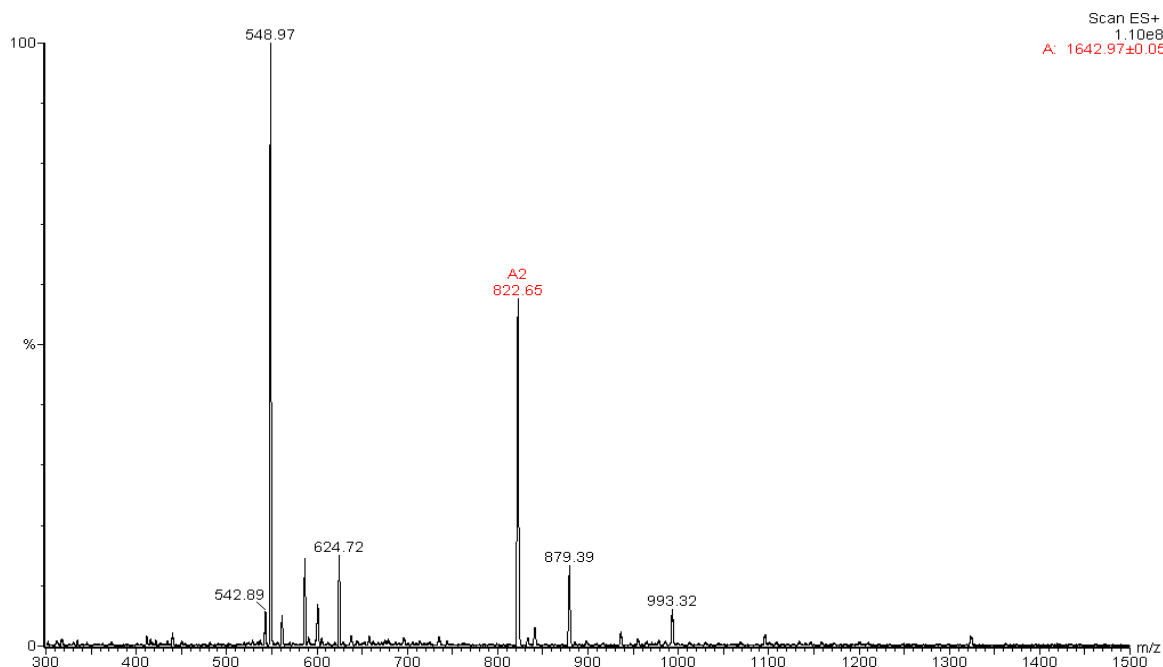
Μοριακός Τύπος: C<sub>74</sub>H<sub>132</sub>N<sub>26</sub>O<sub>16</sub>

Στο τρίτο μέρος της πεπτιδορητίνης προστίθεται το αμινοξύ **Fmoc-Ala-OH**, αφού πρώτα γίνει αποκοπή της Fmoc-ομάδας της λυσίνης (12<sup>ο</sup> αμινοξύ της πεπτιδικής ακολουθίας). Το διάλυμα σύζευξης έχει αναλογία 3/3/3/6/1 αμινοξύ/HBTU/HOBt/DIEA/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Η επιτυχής σύζευξη του αμινοξέος Fmoc-Ala-OH ελέγχθηκε με test Kaiser. Τέλος, απομακρύνθηκε η Fmoc-ομάδα της αλανίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF. Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη παραλαμβάνεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται στο ξηραντήρα για 3 ημέρες. Το ποσό της πεπτιδορητίνης που λήφθηκε είναι 1,5058 gr για 0,33 θεωρητικά mmoles πεπτιδίου (1/3 της αρχικής θεωρητικής ποσότητας που ήταν 1 mmol πεπτιδίου) και η απόδοση σύνθεσης είναι 79,6 %. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και τις παράπλευρες προστατευτικές ομάδες πραγματοποιείται με διάλυμα αποκοπής TFA/H<sub>2</sub>O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 % v/v. Ακολουθεί απομάκρυνση του TFA με εξάτμιση υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Μετά από ξήρανση και λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε ποσότητα crude πεπτιδίου 374 mg με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 86,9 %.

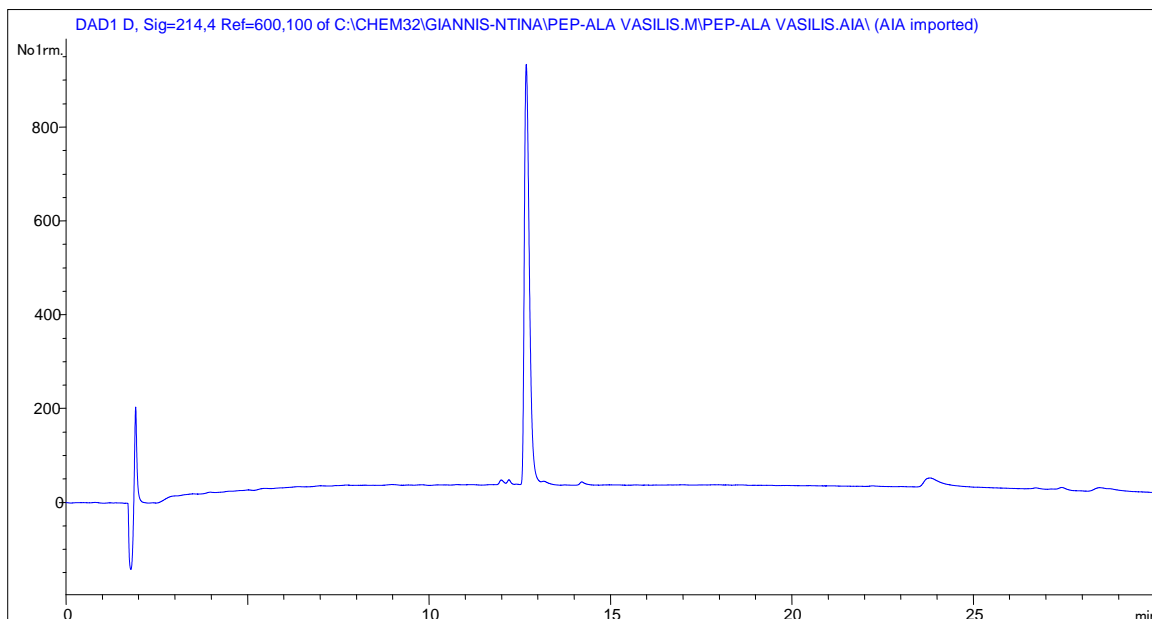
Το crude πεπτίδιο καθарίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με σύστημα έκλουσης A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι

30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου είναι 53,4 %.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του πεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης των διαλυτών (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA και (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA, A:B από 90:10% να καταλήγει σε 30:70%. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 1 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 1642,00 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 1642,97 gr/mol.

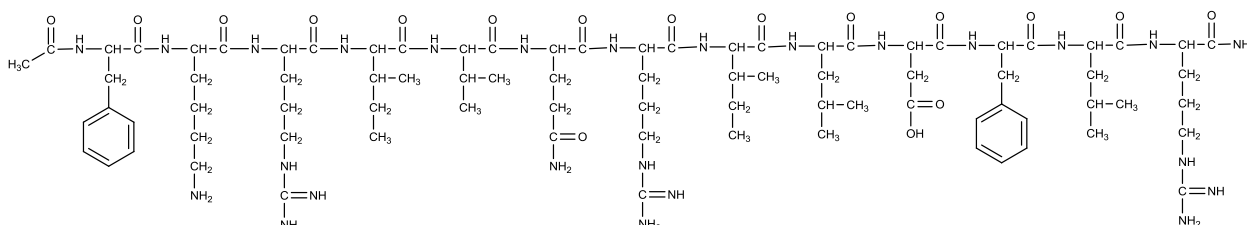


Σχήμα 6.9: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.



Σχήμα 6.10: Αναλυτική RP-HPLC του Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.

### Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



<C:\Users\user\Desktop\gia stathero pc\VASSILIS-analytical\pep-ala.doc> - Hlk466888007

Μοριακό Βάρος: 1745,12 gr/mol

Μοριακός Τύπος: C<sub>82</sub>H<sub>137</sub>N<sub>25</sub>O<sub>17</sub>

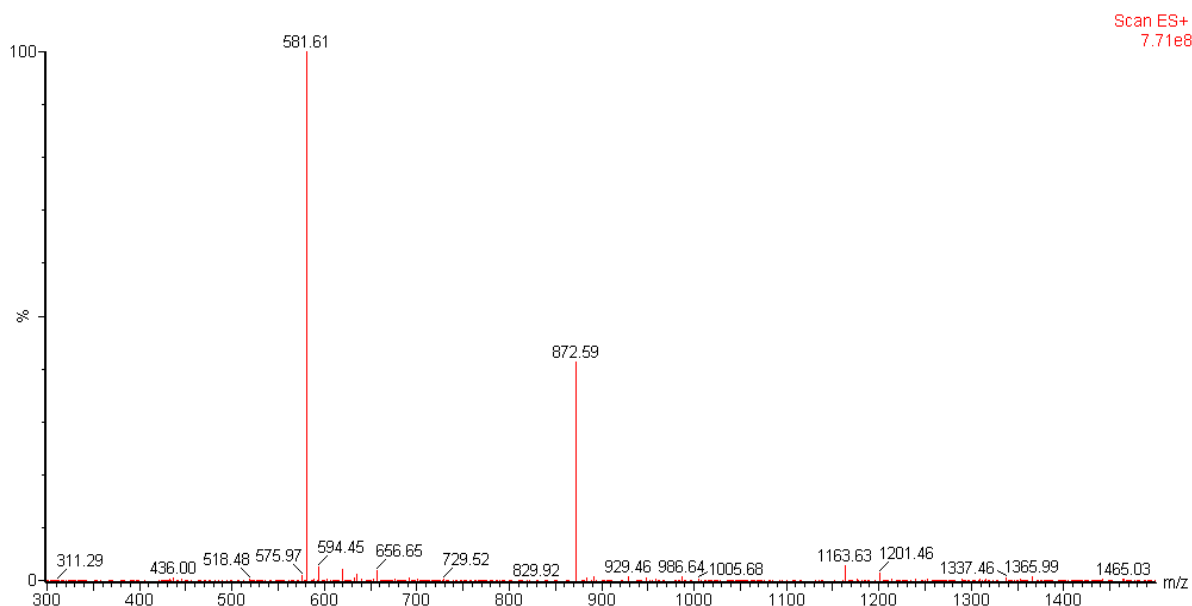
Η σύνθεση του παραπάνω πεπτιδίου έγινε σε στερεή φάση σύμφωνα με την Fmoc-tBu στρατηγική και ως αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Rink Amide AM. Για τη σύνθεση 0,8 mmol πεπτιδίου ζυγίσθηκαν 1,904 gr ρητίνης με υποκατάσταση 0,42 mmol/gr. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το HBTU με βοηθητικό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο το HOBT και παρουσία της τριτοταγούς βάσης

DIEA. Ως εναλλακτικό αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) παρουσία του πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου HOBt. Το κατάλοιπο λυσίνης  $K^{18}$  προστέθηκε ως Fmoc-Lys(Mtt)-OH, προκειμένου να γίνει εκλεκτική αποκοπή της προστατευτικής ομάδας (Mtt-ομάδα) από την ε-αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης, χωρίς να απομακρυνθούν οι υπόλοιπες παράπλευρες προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων καθώς και η ρητίνη από το πεπτίδιο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο στάδιο μετά την σύνθεση της παραπάνω πεπτιδικής ακολουθίας και περιγράφεται πιο αναλυτικά παρακάτω. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης των 13 αμινοξέων στην πεπτιδική ακολουθία έγινε αποκοπή της τελευταίας Fmoc-ομάδας της φαινυλαλανίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF και έπειτα πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση της  $N^{\alpha}$ -τελικής αμινομάδας της φαινυλαλανίνης με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA) με αναλογία 1:1 v/v για 20 min, διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην πρώτη παράγραφο του υποκεφαλαίου 6.3. Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη παραλαμβάνεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται στο ξηραντήρα για 4 ημέρες. Μετά το πέρας των 4 ημερών η πεπτιδορητίνη ζυγίστηκε και το βάρος της υπολογίστηκε ως  $m_{\text{πεπτιδορητίνης}} = 3,1583\text{gr}$  με απόδοση σύνθεσης 75,7 %. Έπειτα, γίνεται διαμερισμός της πεπτιδορητίνης σε δύο ίσα μέρη. Το ένα μέρος προστίθεται σε σφαιρική φιάλη με το με διάλυμα αποκοπής TFA/H<sub>2</sub>O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 % v/v, προκειμένου να απομακρυνθούν η ρητίνη και οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες από το πεπτίδιο. Ακολουθεί απομάκρυνση του TFA με εξάτμιση υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Μετά από ξήρανση και λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε ποσότητα crude πεπτιδίου 464,6 mg με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 90,03 %.

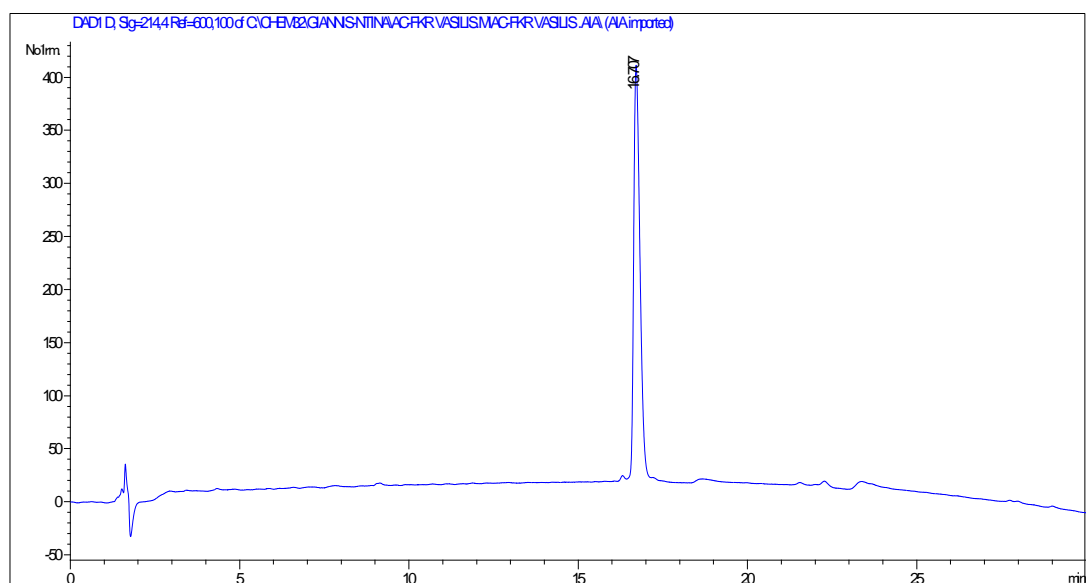
Το crude πεπτίδιο Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με σύστημα έκλουσης A:B από 80:20% να καταλήγει σε 20:80% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου είναι 50,8 %.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του πεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης των διαλυτών (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA και (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA, A:B από 80:20% να καταλήγει σε 20:80%. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 1 mL/min και

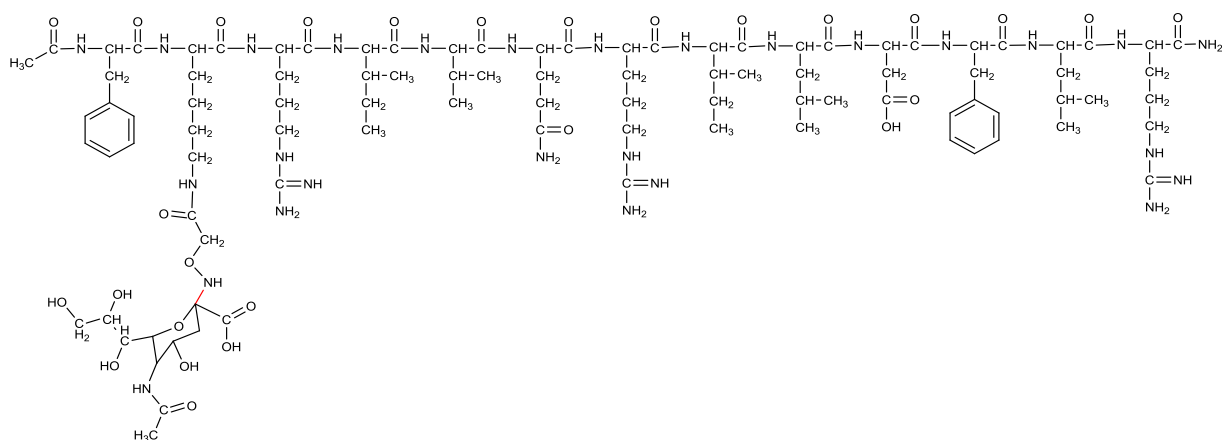
η ανίχνευση στα 214 nm. Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 1745,12 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 1743,2 gr/mol.



Σχήμα 6.11: Φάσμα μάζας ESI-MS του Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.



Σχήμα 6.12: Αναλυτική RP-HPLC του Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.

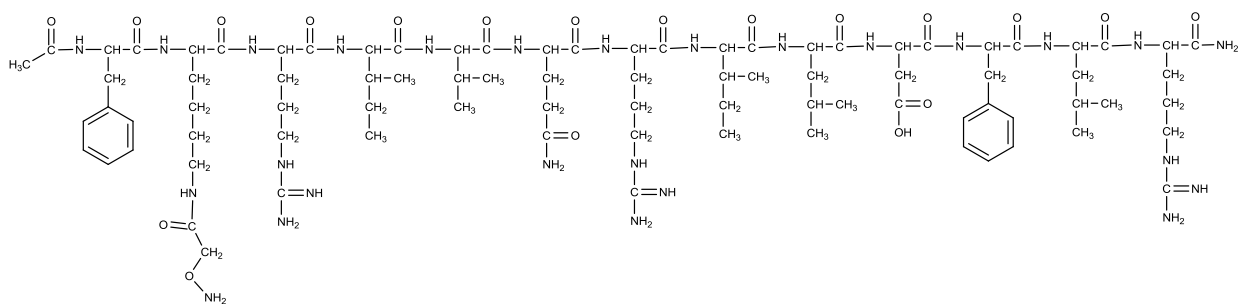
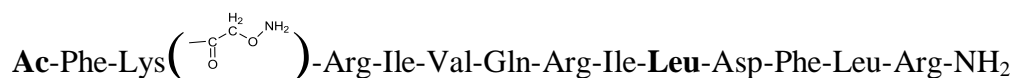


Μοριακό Βάρος: 2109,43 gr/mol

Μοριακός Τύπος: C<sub>95</sub>H<sub>157</sub>N<sub>27</sub>O<sub>27</sub>

Το δεύτερο μέρος της πεπτιδορητίνης μεταφέρεται, ποσοτικά, σε Vessel μέσω εκπλύσεων με DMF<sub>molecular sieves</sub> και DCM. Ακολουθεί εκλεκτική αποκοπή της Mtt-ομάδας από την ε-αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης, σε ελαφρώς όξινες συνθήκες, χωρίς να απομακρυνθούν οι υπόλοιπες παράπλευρες προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων καθώς και η ρητίνη από το πεπτίδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος αποκοπής 1,8 % TFA σε DCM (1,8 MI TFA και 98,2 MI DCM) στην πεπτιδορητίνη. Το διάλυμα αφήνεται προς ανάδευση για 3 min και στη συνέχεια απομακρύνεται από την πεπτιδορητίνη με εφαρμογή κενού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 9 φορές και ακολουθούν εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης με τους διαλύτες DCM και DMF. Το test Kaiser είναι θετικό (+), διότι λήφθησαν κόκκοι με έντονα μπλε χρώμα, υποδεικνύοντας την απομάκρυνση της Mtt-προστατευτικής ομάδας από την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης και άρα την αποπροστασία της ε-αμινομάδας. Προκειμένου να εξουδετερωθεί το άλας, το οποίο σχηματίζεται μεταξύ του τριφθοροξικού οξέος (TFA) και της ελεύθερης ε-αμινομάδας της λυσίνης, πραγματοποιούνται εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 7% DIEA, μία τριτοταγής βάση, σε DCM (7 MI DIEA και 93 MI DCM) για τη δέσμευση του TFA για 2 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία φορά και ακολουθούν εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης με τους διαλύτες DCM και DMF. Στη

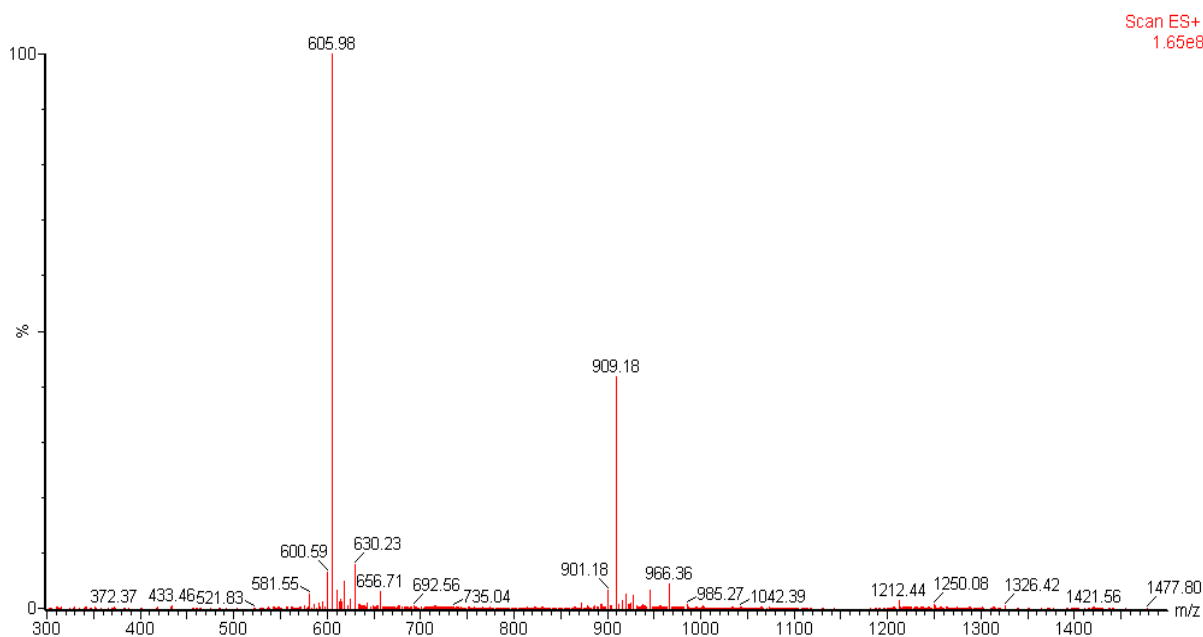
συνέχεια, γίνεται η σύζευξη του φορέα Boc-αμινοοξύ οξικό οξύ (Boc-aminooxy acetic acid) με μοριακό τύπο Boc-NHOCH<sub>2</sub>COOH στην ελεύθερη ε-αμινομάδα της λυσίνης. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το HBTU με βοηθητικό πυρηνόφιλο αντιδραστήριο το HOBT και παρουσία της τριτοταγούς βάσης DIEA σε αναλογία 3/3/3/6/1 φορέας/HBTU/HOBT/DIEA/ρητίνη και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DCM/DMF<sub>molecular sieves</sub> σε αναλογία 1:1. Το test Kaiser είναι αρνητικό (-), υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στη ρητίνη και άρα η σύζευξη του φορέα ήταν επιτυχής. Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη παραλαμβάνεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως και τοποθετείται στο ξηραντήρα για 3 ημέρες. Το ποσό της πεπτιδορητίνης που ελήφθηκε είναι 1,65 gr με απόδοση σύνθεσης 76,7 %. Η Boc-προστατευτική ομάδα απομακρύνθηκε κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με διάλυμα αποκοπής TFA/H<sub>2</sub>O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 % v/v. Ακολουθεί απομάκρυνση του TFA με εξάτμιση υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και καταβύθιση του πεπτιδίου με παγωμένο διαιθυλαιθέρα. Μετά από ξήρανση και λυοφιλοποίηση παραλήφθηκε ποσότητα crude πεπτιδίου 432,6 mg με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 77,52 %. Το crude πεπτίδιο που λήφθηκε είναι το ακόλουθο με μοριακό βάρος 1818,17.



Το crude πεπτίδιο καθарίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (A) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με σύστημα έκλουσης A:B από 80:20% να καταλήγει σε 20:80% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Το crude πεπτίδιο καθарίστηκε και με παρασκευαστική RP-HPLC με τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν

στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC με μόνη διαφορά την ταχύτητα ροής που ρυθμίστηκε στα 20 mL/min. Η απόδοση καθαρισμού του πεπτιδίου είναι 33 %.

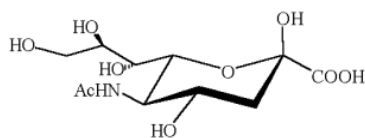
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 1818,17 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 1816,4 gr/mol.



Σχήμα 6.13: Φάσμα μάζας ESI-MS του αμινοξυακετυλιωμένου πεπτιδίου



Αφού ελήφθηκε το πεπτίδιο σε καθαρή μορφή αποδεσμευμένο από τη ρητίνη και τις πλευρικές προστασίες και ταυτοποιήθηκε η δομή του, πραγματοποιήθηκε χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του αμινοξυακετυλιωμένου πεπτιδίου (NH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CO-peptide) και του σιαλικού οξέος (N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ) με



συντακτικό τύπο και μοριακό βάρος 309,27. Η χημειοεκλεκτική σύνθεση του γλυκοπεπτιδίου λαμβάνει χώρα σε υγρή φάση και χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια.

- ❖ Οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH με μοριακό βάρος 60,05 και πυκνότητα d: 1,048 gr/MI)
- ❖ Οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa με μοριακό βάρος 82,04)

Τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής.



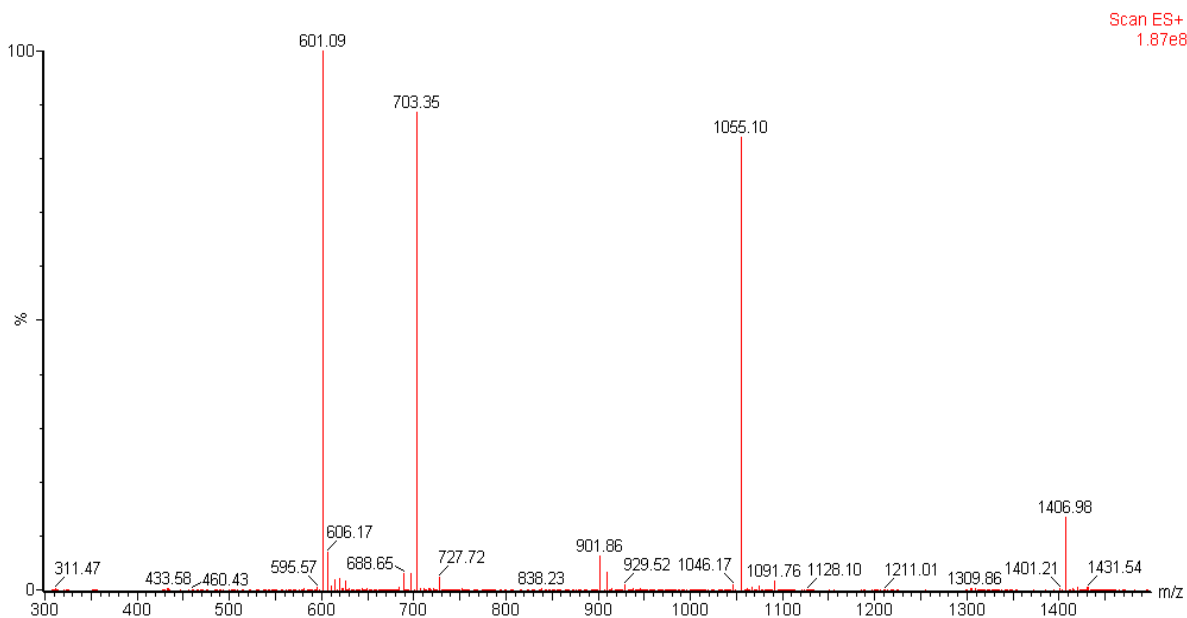
- ❖ **Διάλυμα Α**, υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 Μ.
- ❖ **Διάλυμα Β**, υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,2 Μ.
- ❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου** 0,1 Μ, pH 4,0.

Για την παρασκευή του διαλύματος Α εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL 2,89 mL πυκνού οξικού οξέος και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή. Για την παρασκευή του διαλύματος Β εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL 4,1 gr οξικού νατρίου και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται με την προσθήκη 41 mL διαλύματος Α και 9 mL διαλύματος Β σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή.

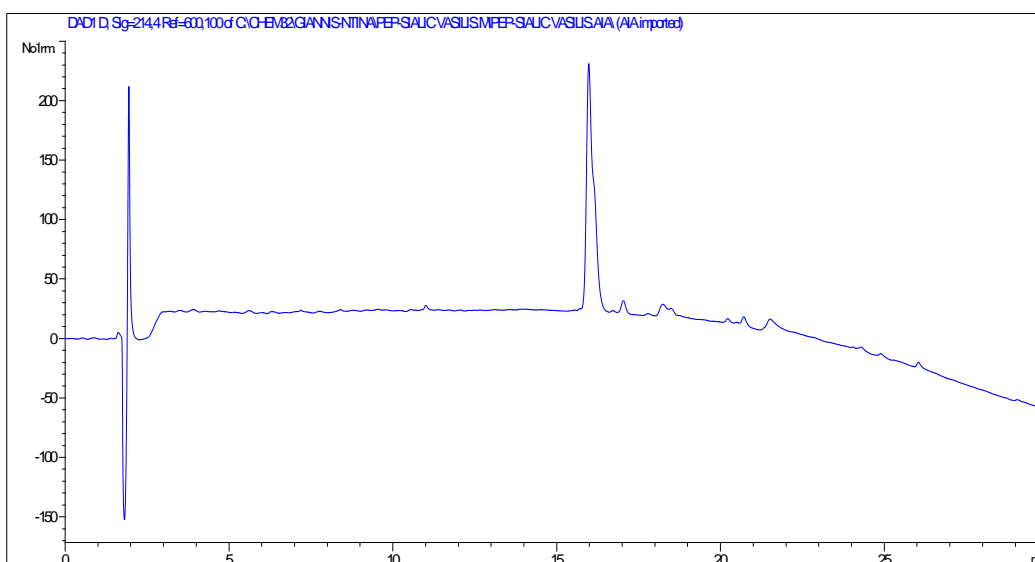
Ζυγίζουμε 18,2 mg (10μmol) πεπτιδίου, τα οποία διαλυτοποιούνται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1 Μ και pH 4 σε μικρή σφαιρική φιάλη, η οποία τοποθετείται σε υδρόλουτρο (35-40°C) υπό συνεχή ανάδευση. Ποσότητα 7,74 mg (25μmol) σιαλικού οξέος διαλυτοποιείται σε ίσο όγκο (1 mL) ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1 Μ και pH 4. Μόλις η θερμοκρασία στο υδρόλουτρο φθάσει τους 35-40°C, προστίθεται σταδιακά το διάλυμα του σιαλικού οξέος στη σφαιρική φιάλη. Προστίθενται 100 μL διαλύματος σιαλικού οξέος ανά 30 min. Μετά την προσθήκη της συνολικής ποσότητας του διαλύματος σιαλικού οξέος στη σφαιρική φιάλη, μετράται το pH του διαλύματος και ρυθμίζεται στην τιμή 3 είτε με προσθήκη διαλύματος NaOH 0,5N είτε διαλύματος HCl 0,1N. Με το πέρας 6 ωρών από την έναρξη της αντίδρασης παίρνουμε 25 μL από το διάλυμα, όπου γίνεται η αντίδραση σχηματισμού του δεσμού οξίμης και ελέγχεται η εξέλιξη της αντίδρασης με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Ο συνολικός χρόνος της αντίδρασης φθάνει έως και τις 3 ημέρες. Αφού περάσουν 3 ημέρες, γίνεται η ταυτοποίηση του προϊόντος (γλυκοπεπτιδίου) με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS και το μίγμα της αντίδρασης λυοφιλοποιείται. Στη συνέχεια, το επιθυμητό γλυκοπεπτιδίο απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες (Α) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA, (Β) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA με σύστημα έκλουσης Α:Β από 90:10% να καταλήγει σε 0:100% και οι διαλύτες CH<sub>3</sub>OH/0,1% TFA και CH<sub>3</sub>OH για τον καθαρισμό της στήλης. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής 4,7 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm με απόδοση σύνθεσης 46,9 %.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του γλυκοπεπτιδίου έγινε με αναλυτική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης των διαλυτών (Α) H<sub>2</sub>O/0,1% TFA και (Β) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA, Α:Β από 90:10% να καταλήγει σε 0:100%. Ο χρόνος έκλουσης είναι 30 min, η ταχύτητα ροής

1 mL/min και η ανίχνευση στα 214 nm. Η ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS με υπολογισθέν μοριακό βάρος 2109,43 gr/mol και ευρεθέν μοριακό βάρος 2108,2 gr/mol.



Σχήμα 6.14: Φάσμα μάζας ESI-MS του γλυκοπεπτιδίου

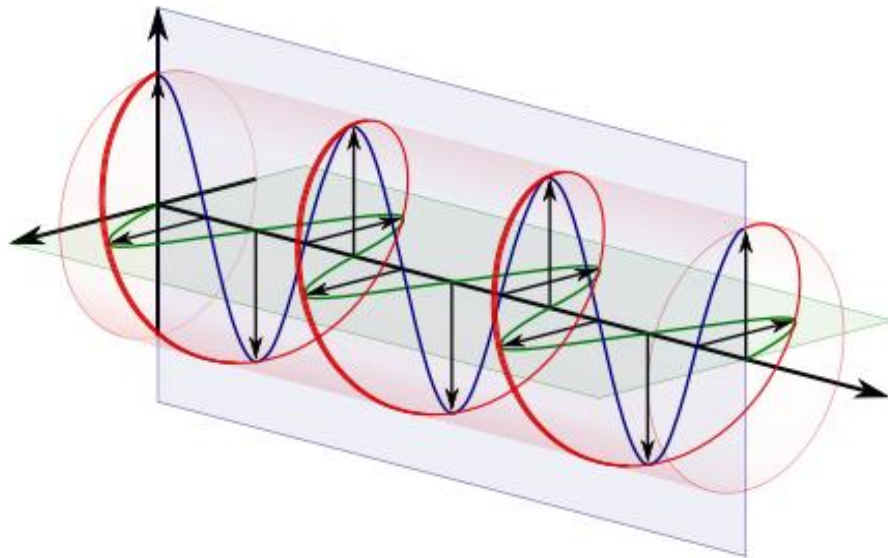


Σχήμα 6.15: Αναλυτική RP-HPLC του γλυκοπεπτιδίου





Μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων με φασματοσκοπία  
κυκλικού διχρωϊσμού





## 7.1 Πειραματική πορεία

Τα πειράματα για τη μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο Jasco J-815. Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι οι ακόλουθοι.

- ❖ Μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v).
- ❖ Διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) σε συγκέντρωση 8mM.

Ο διαλύτης **τριφθοροαιθανόλη** (TFE) ενισχύει την τάση των πεπτιδίων να σχηματίζουν ελικοειδή διαμόρφωση, ενώ το **δωδεκυλοθειϊκό νάτριο** SDS προσομοιάζει το λιπιδικό περιβάλλον των μεμβρανών και άρα είναι καθοριστικός παράγοντας για τη μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων, καθώς πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια αποκτούν τη δευτεροταγή δομή τους μόνο όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των μικροοργανισμών, ενώ όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα δεν έχουν μία καθορισμένη δομή. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων στους παραπάνω διαλύτες είναι 0,1 mM.

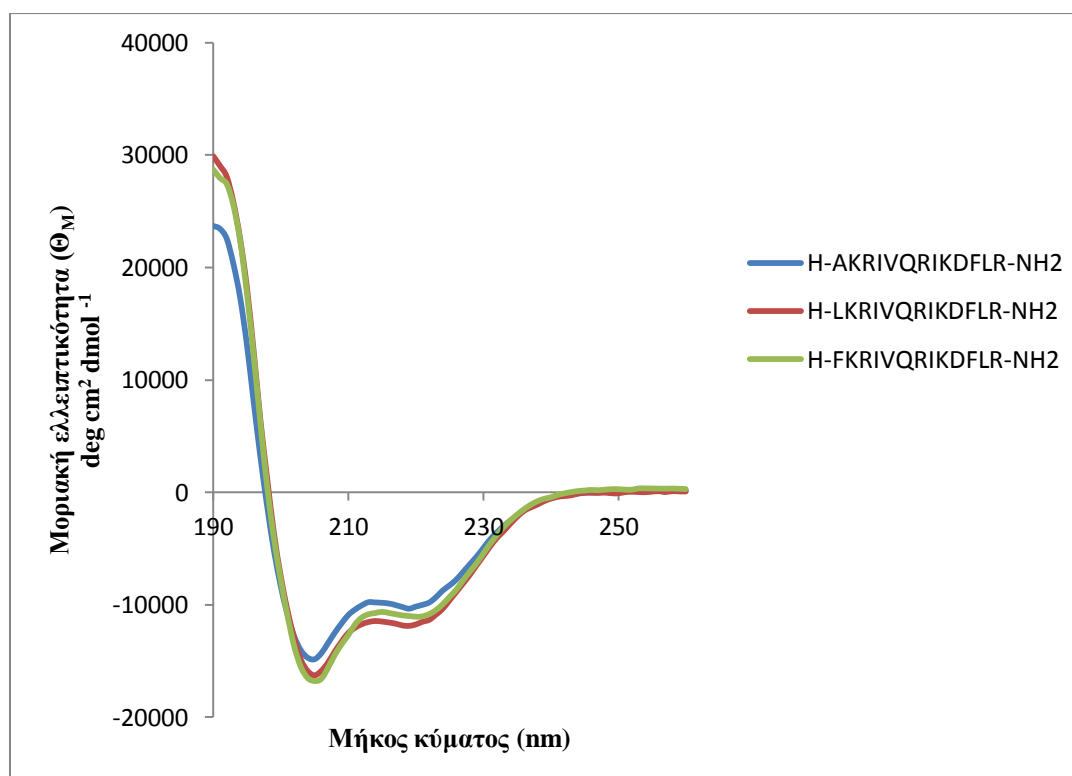
Τα πειράματα διεξήχθησαν στο όργανο του κυκλικού διχρωϊσμού υπό σταθερή ροή αζώτου (6,5 lt/min) υψηλής καθαρότητας (>99,999 vol%). Η θερμοκρασία του οργάνου ρυθμίζεται στους 20-25°C και η περιοχή μήκους κύματος στο εύρος των 190-260 nm. Η απορρόφηση μετράται σε κυψελίδα μήκους 0,1 cm και χωρητικότητας 300 μL. Οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίζονται ανάλογα, προκειμένου να γίνει η επιτυχής λήψη των φασμάτων. Η ρύθμιση των παραμέτρων δίνεται παρακάτω.

- Περιοχή (range): 190-260 nm
- Ανάλυση (resolution): 0,2 nm
- Ευαισθησία (sensitivity): 100 mdeg
- Επιρροή (accumulation): 2

- Εύρος ζώνης (bandwidth): 2 nm
- Ταχύτητα σάρωσης (scanning speed): 50 nm/min
- Θερμοκρασία: 20-25°C

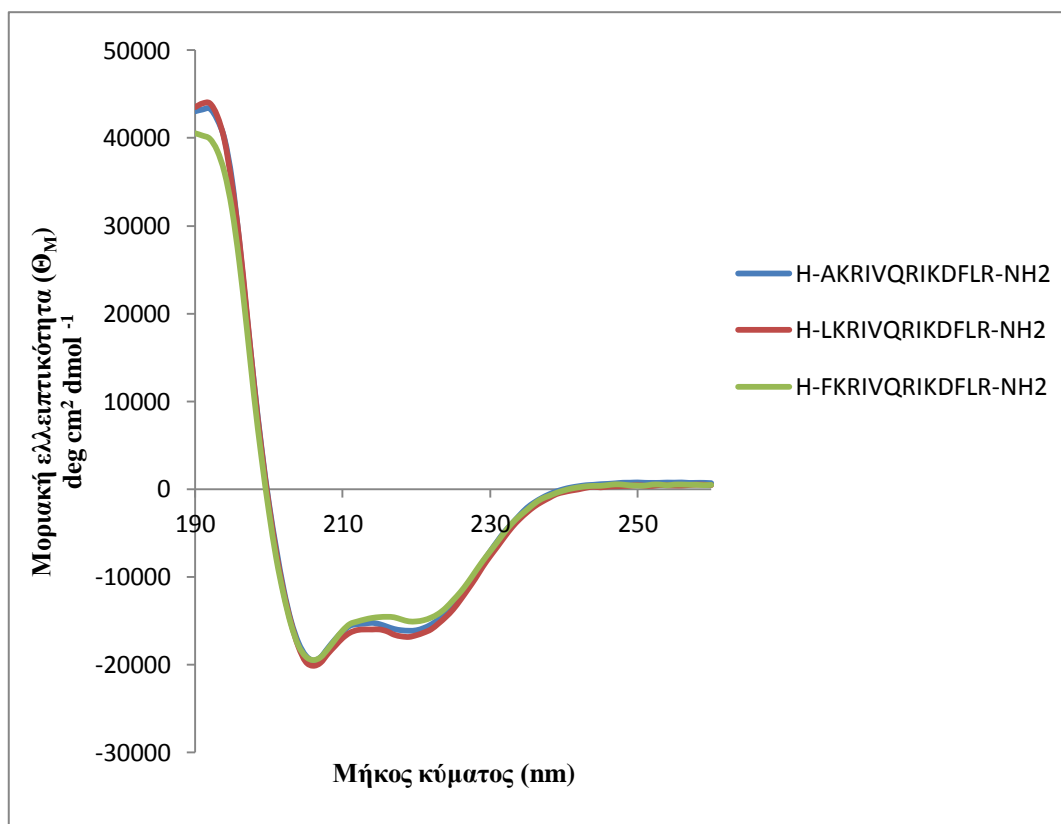
## 7.2 Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) των πεπτιδίων σε κάθε διαλύτη

- ❖ Μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v)



Σχήμα 7.1: Φάσματα CD των πεπτιδίων συγκέντρωσης 100 μM σε μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O.

- ❖ Διάλυμα δωδεκυλοθειικού νατρίου SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) σε συγκέντρωση 8mM

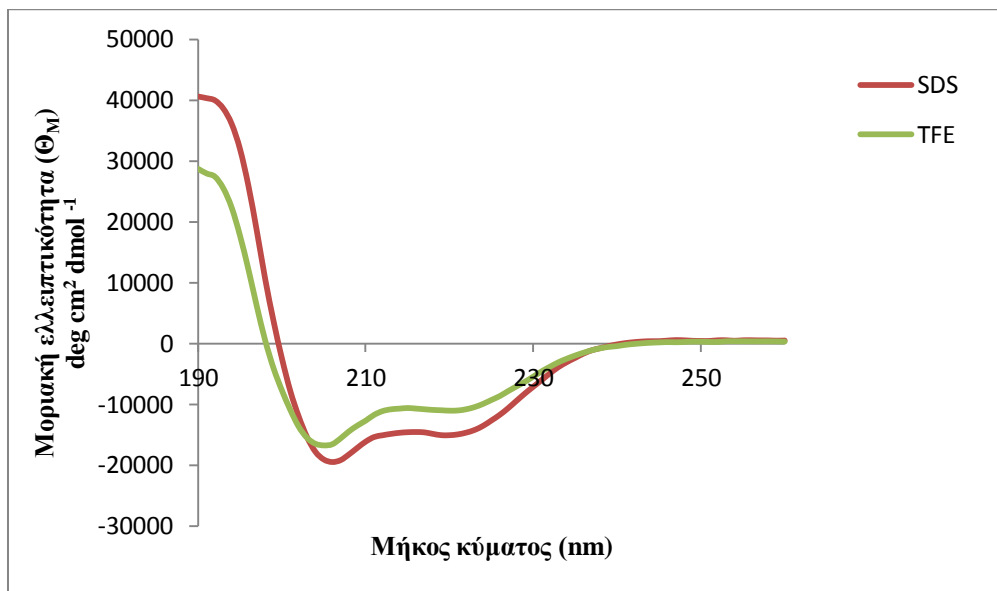


Σχήμα 7.2: Φάσματα CD των πεπτιδίων συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$  σε διάλυμα SDS συγκέντρωσης 8 mM.



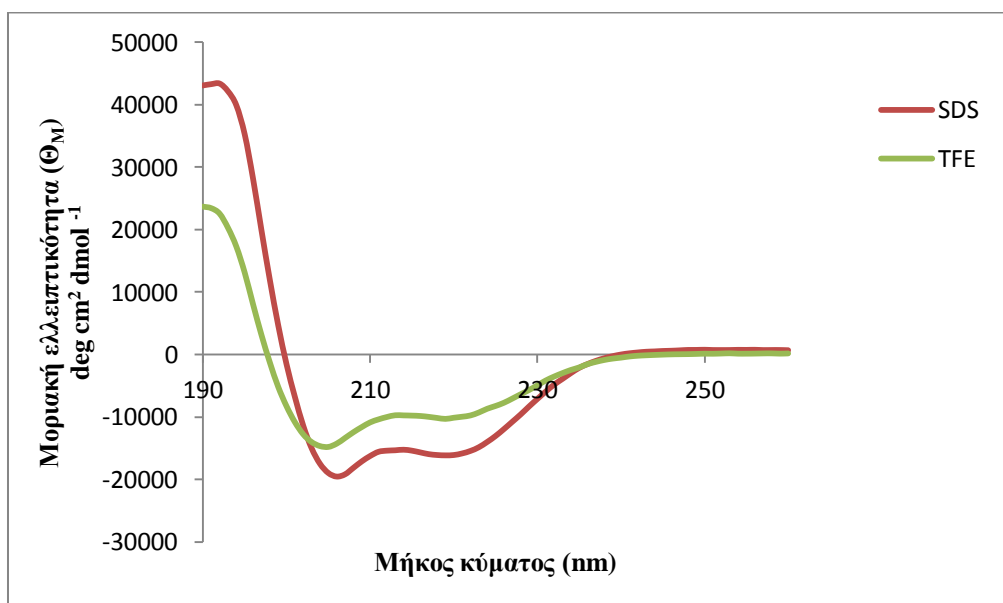
### 7.3 Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) κάθε πεπτιδίου σε όλους τους διαλύτες

Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



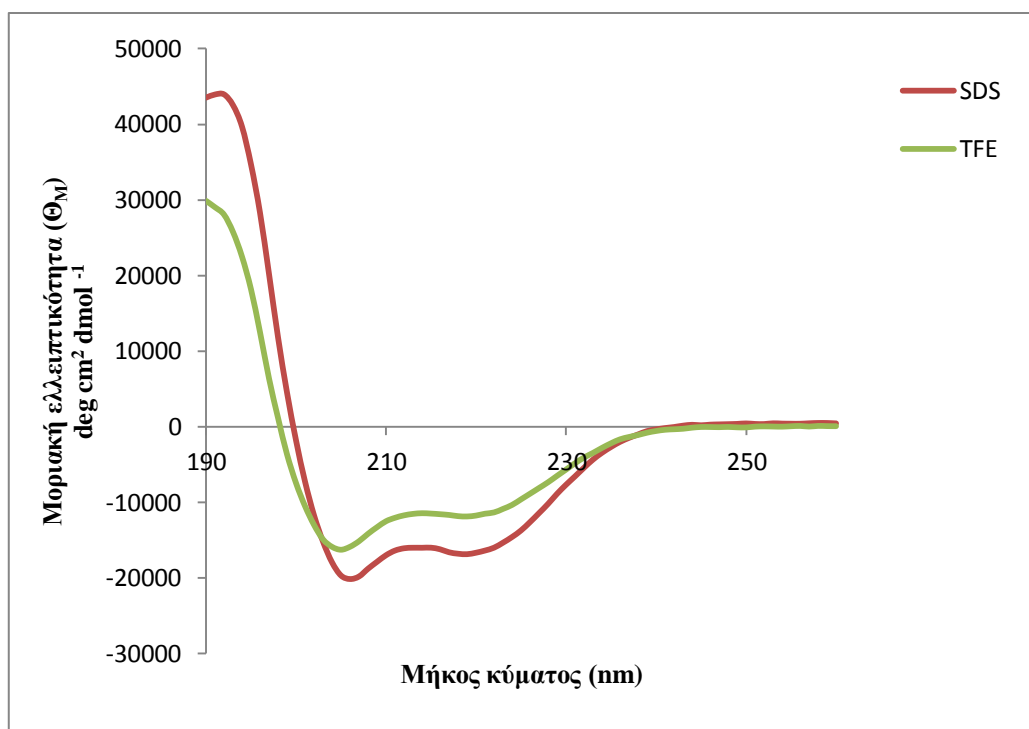
Σχήμα 7.3: Φάσματα CD του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες TFE και SDS.

Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



Σχήμα 7.4: Φάσματα CD του πεπτιδίου Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες TFE και SDS.

Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



Σχήμα 7.5: Φάσματα CD του πεπτιδίου Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> συγκέντρωσης 100 μM στους διαλύτες TFE και SDS.

#### 7.4 Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή της ελλειπτικότητας, Δε, σε μοριακή ελλειπτικότητα, [Θ<sub>M</sub>], είναι ο ακόλουθος.

$$[\Theta_M] = (\Delta\epsilon) \times 10^3 \times L/C_{\text{rep}} \cdot \{(\text{deg}) \times (\text{cm}^2)/(\text{dmol})\}$$

, όπου Δε → ελλειπτικότητα (mdeg)

L → μήκος κυψελίδας (cm)

C<sub>rep</sub> → συγκέντρωση πεπτιδίου

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για το ποσοστό της ελικοειδούς διαμόρφωσης είναι ο ακόλουθος.

$$\text{Ποσοστό ελικοειδούς διαμόρφωσης (\%)} = [\Theta]/[\Theta]^\infty \times (1-k/n)$$

, όπου  $k \rightarrow$  σταθερά ίση με 2,57

$n \rightarrow$  ο αριθμός των αμινοξέων που αποτελούν το πεπτίδιο

$[\Theta] \rightarrow$  η μοριακή ελλειπτικότητα στα 222 nm και μονάδες μέτρησης  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$

$[\Theta]^\infty \rightarrow -39.500$ , η μοριακή ελλειπτικότητα στα 222 nm για 100% έλικα με μονάδες μέτρησης  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$

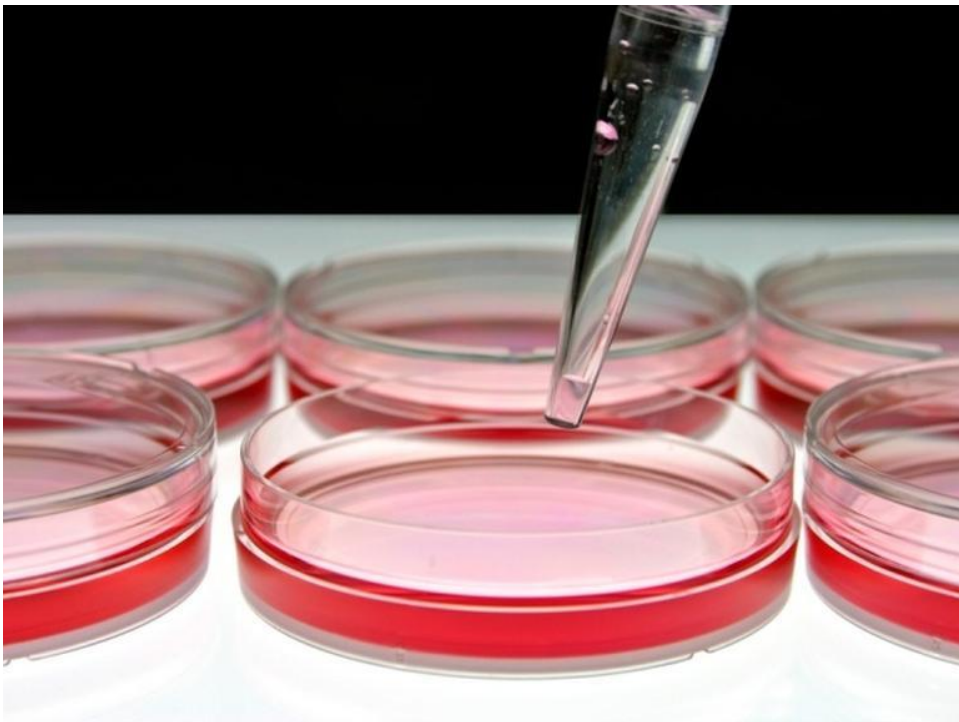
**Πίνακας 7.1: Ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης των πεπτιδίων σε διάφορους διαλύτες.**

	H-AKRIVQRIKDFLR-NH2	H-LKRIVQRIKDFLR-NH2	H-FKRIVQRIKDFLR-NH2
% ελικοειδή διαμόρφωση σε SDS (8mM)	48,86	50,43	46,19
% ελικοειδή διαμόρφωση σε TFE/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	30,84	35,75	34,06

Σύμφωνα με τις τιμές του παραπάνω πίνακα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα πεπτίδια αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση και στους δύο διαλύτες και σε ικανοποιητικά ποσοστά. Ωστόσο, σε διαλύτη SDS τα πεπτίδια εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης από ότι στο μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O.



Βιολογικά πειράματα





## 8.1 Μικροβιακά στελέχη και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των πεπτιδίων

Η αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων μελετήθηκε σε δύο gram-θετικά βακτήρια, τρία gram-αρνητικά βακτήρια και σε έναν μύκητα (fungus). Τα στελέχη των μικροοργανισμών δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8.1: Μικροβιακά στελέχη.

Gram-αρνητικά βακτήρια	gram-θετικά βακτήρια	μύκητας (fungus)
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>Bacillus subtilis</i> DELTA	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	
<i>Zymomonas mobilis</i> 10988		

Τα στερεά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των παραπάνω μικροβιακών στελεχών δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8.2 Στερεά θρεπτικά υλικά.

Luria Agar ( <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>M.smegmatis</i> )	Zymo Agar ( <i>Z.mobilis</i> )	Agar ζυμών ( <i>Candida parapsilosis</i> )
1% τρυπτόνη	0,1% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5% πεπτόνη
0,5% εκχύλισμα ζύμης	0,1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3% εκχύλισμα ζύμης
1% NaCl	0,05% MgSO <sub>4</sub>	0,3% εκχύλισμα μαλτόζης
0,15ml NaOH 1N	0,5% εκχύλισμα ζύμης	1% γλυκόζη
2% Agar	2% γλυκόζη	2% Agar
	2% Agar	

Για την ανάπτυξη του στελέχους *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 χρησιμοποιείται και **0,1% Tween**. Πρόκειται για απορρυπαντικό, το οποίο χρησιμοποιείται για την αποφυγή των συσσωματωμάτων.

Τα στερεά θρεπτικά υλικά προστίθενται σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 100 mL απεσταγμένο νερό και τοποθετούνται στον κλίβανο αποστείρωσης για 1h στους 121°C και υπό πίεση 1,5 bar. Μετά την αποστείρωση ακολουθεί προσθήκη του θρεπτικού μέσου σε στείρα τρυβλία (25 mL θρεπτικού μέσου/τρυβλίο) και στερεοποίησή του, που οφείλεται στο Agar, στερεοποιητικός παράγοντας, ο οποίος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περνάει από την υγρή στη στερεή φάση. Η προσθήκη του θρεπτικού μέσου λαμβάνει χώρα σε **θάλαμο νηματικής ροής** (θάλαμος hood), όπου εξασφαλίζονται στείρες συνθήκες.

Έπειτα, γίνεται εμβολιασμός των στελεχών των μικροοργανισμών σε τρυβλίο (1 στέλεχος/τρυβλίο) με χρήση, αποστειρωμένου σε φλόγα λύχνου Bunsen, βρόχου ενοφθαλμισμού και επώαση της αμιγούς καλλιέργειας στον επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες βέλτιστης θερμοκρασίας και για καθορισμένο χρονικό διάστημα για κάθε στέλεχος. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών των μικροοργανισμών.

**Πίνακας 8.3: Συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών των μικροοργανισμών.**

Μικροβιακά στελέχη	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)
<i>Escherichia coli DH5a</i>	37	24
<i>Pseudomonas aeruginosa PAO</i>	37	24
<i>Zymomonas mobilis 10988</i>	30	48-72
<i>Bacillus subtilis DELTA</i>	37	24
<i>Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155</i>	37	24
<i>Candida parapsilosis</i>	30	24

## 8.2 Μελέτη ανθεκτικότητας των μικροβιακών στελεχών στα πεπτίδια

Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή δράση τους στα gram-θετικά βακτήρια, gram-αρνητικά βακτήρια και τον μύκητα είναι πεπτιδικά ανάλογα του φυσικού αντιμικροβιακού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 και οι αλληλουχίες τους δίνονται παρακάτω.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Leu**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ala**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys( $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{N} \\ \quad \quad \quad \text{SA} \end{matrix}$ )-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>



## 8.2.1 Πειραματική πορεία

Ο χειρισμός των καλλιιεργειών, των θρεπτικών μέσων καθώς και των πεπτιδίων γίνεται σύμφωνα με την **ασηπτική τεχνική** για την αποφυγή μολύνσεων. Αρχικά, έγινε η παρασκευή της **προκαλλιέργειας** των στελεχών σε θάλαμο νηματικής ροής (θάλαμος hood), σύμφωνα με την παρακάτω πορεία.

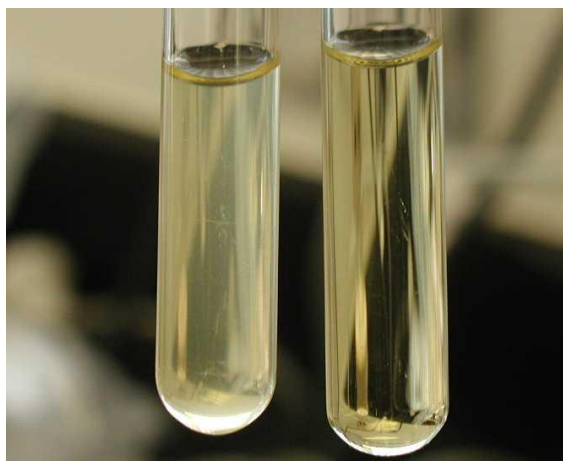
- Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα με πώμα προστίθενται 3 mL θρεπτικού υλικού ίδιας σύστασης με το στερεό θρεπτικό υλικό πλην άγαρ.
- Μεταφέρουμε μικρή ποσότητα κυττάρων κάθε στελέχους από την αναπτυγμένη αμιγή καλλιέργεια του τρυβλίου στον δοκιμαστικό σωλήνα με χρήση αποστειρωμένου βρόχου ενοφθαλμισμού.
- Ο αποστειρωμένος δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται και τοποθετείται σε επωαστήρα υπό ανάδευση. Ο χρόνος επώασης της προκαλλιέργειας εξαρτάται από το στέλεχος που μελετάται κάθε φορά.



Σχήμα 8.1: Θάλαμος νηματικής ροής (hood chamber).

Στη συνέχεια, γίνεται η παρασκευή της **νέας καλλιέργειας**, σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα.

- Μετά το πέρας του καθορισμένου χρόνου επώασης της προκαλλιέργειας, ελέγχουμε, αρχικά, με το μάτι εάν το εναιώρημα των κυττάρων σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα φαίνεται θολό (όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν τόσο περισσότερο φως σκεδάζεται και τόσο θολότερο φαίνεται το εναιώρημα). Στη συνέχεια μετρούμε, με ακρίβεια, την απορρόφηση φωτός κάθε δείγματος προκαλλιέργειας σε φωτόμετρο.



**Σχήμα 8.2: Παρατήρηση της θολερότητας των δειγμάτων προκαλλιέργειας στο φως. Όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν τόσο περισσότερο φως σκεδάζεται και τόσο θολότερο φαίνεται το εναιώρημα.**

- Προσθήκη 0,5 mL από το δείγμα προκαλλιέργειας και 0,5 mL θρεπτικού υλικού σε κυψελίδα.
- Μέτρηση της απορρόφησης, η οποία θέλουμε να βρίσκεται στο εύρος τιμών 0,5-0,7 Abs, τιμές απορρόφησης, που υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα του στελέχους βρίσκονται στην εκθετική φάση. Η μέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 600 nm σε φωτόμετρο SHIMADZU UV-1201.
- Με κατάλληλους υπολογισμούς πραγματοποιείται αραίωση της προκαλλιέργειας με την προσθήκη θρεπτικού υλικού διπλάσιας συγκέντρωσης για την Παρασκευή της **νέας καλλιέργειας**. Η προσθήκη θρεπτικού υλικού διπλάσιας συγκέντρωσης γίνεται, ώστε η νέα καλλιέργεια να έχει απορρόφηση στο εύρος τιμών 0,05-0,07 Abs και να υπάρξει η σωστή αραίωση μετά την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος πεπτιδίου (αναλογία 1:1).
- Προσθήκη 0,5 mL από το δείγμα της νέας καλλιέργειας και 0,5 mL αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O σε κυψελίδα.
- Μέτρηση της απορρόφησης της νέας καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm.

Ακολουθεί η αντίδραση των πεπτιδίων με τα στελέχη των μικροοργανισμών. Η προετοιμασία και η προσθήκη των πεπτιδίων στη νέα καλλιέργεια πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής (θάλαμος hood), σύμφωνα με την ακόλουθη πειραματική πορεία.

- Διαλυτοποίηση των πεπτιδίων σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O και διήθηση με φίλτρο Whatman 25 mm. Ακολουθούν αραιώσεις κάθε δείγματος διαλυτοποιημένου πεπτιδίου (stock διάλυμα) με αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O σε συγκεντρώσεις 200-5 μg/mL. Τα διαλύματα των πεπτιδίων έχουν διπλάσια συγκέντρωση, διότι προστίθενται σε αυτά ίσος όγκος νέας καλλιέργειας και άρα η συγκέντρωσή τους υποδιπλασιάζεται.
- Σε αποστειρωμένη πλάκα elisa 96 θέσεων (96-well elisa plate) προστίθενται για την εκάστοτε συγκέντρωση πεπτιδίου 100 μL διαλύματος πεπτιδίου και 100 μL νέας καλλιέργειας. Ο έλεγχος της πλήρους ανάπτυξης κάθε στελέχους πραγματοποιείται με το δείγμα αναφοράς (control), που περιέχει 100 μL νέας καλλιέργειας και 100 μL αποστειρωμένου νερού.
- Το plate τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κάθε στελέχους για 24 h.
- Αφού περάσει το χρονικό διάστημα των 24 ωρών, μετράται η απορρόφηση στο φωτόμετρο ELISA-READER στα 620 nm, μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών των μικροοργανισμών.
- Από τις τιμές απορρόφησης στα controls βγάζουμε συμπέρασμα για την αναστολή ανάπτυξης κάθε στελέχους στις διάφορες συγκεντρώσεις κάθε πεπτιδίου.

### 8.2.2 Αποτελέσματα

Η αντιμικροβιακή δράση κάθε πεπτιδίου προκύπτει από την ελάχιστη συγκέντρωσή του που προκαλεί αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού και ορίζεται ως MIC (Minimal Inhibitory Concentration) σε μg/mL. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες των αποτελεσμάτων της αντιμικροβιακής δράσης των πεπτιδίων.

**Πίνακας 8.4: Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC, µg/ml) των πεπτιδίων έναντι των gram-αρνητικών βακτηρίων.**

Πεπτίδια	Gram-αρνητικά βακτήρια		
	<i>E.coli DH5a</i>	<i>P.aeruginosa PAO</i>	<i>Z.Mobilis 10988</i>
	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
FKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	200	-	-
LKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	200	-	200
AKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	-	-
Ac-FK-(SA)RIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	-	-	-
Ac-FKRIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	100	-	-
FKRIVQKIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	-	200

**Πίνακας 8.5: Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC, µg/ml) των πεπτιδίων έναντι των gram-θετικών βακτηρίων.**

Πεπτίδια	Gram-θετικά βακτήρια	
	<i>B.Subtilis DELTA</i>	<i>M.Smegmatis mc<sup>2</sup> 155</i>
	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
FKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	<b>50</b>
LKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	200
AKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	200
Ac-FK-(SA)RIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	200	-
Ac-FKRIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	100	-
FKRIVQKIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-	<b>50</b>

**Πίνακας 8.6: Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC, µg/ml) των πεπτιδίων έναντι του μύκητα.**

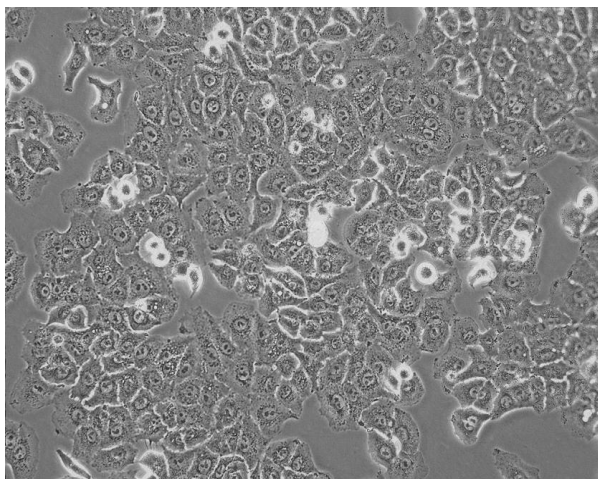
Πεπτίδια	Μύκητας
	<i>Candida Parapsilosis</i>
	MIC (µg/ml)
FKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	200
LKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-
AKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-
Ac-FK-(SA)RIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	-
Ac-FKRIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	-
FKRIVQKIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αναγράφονται στους παραπάνω πίνακες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο Ac-FKRIVQRILDFLR-NH<sub>2</sub> εμφάνισε μέτρια δράση έναντι του **gram-αρνητικού βακτηρίου** *E.coli DH5a* με MIC= **100 µg/ml**. Το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 και το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> , στο οποίο έγινε αντικατάσταση της **Arg**<sup>23</sup> του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 με ένα κατάλοιπο **λυσίνης** παρουσίασαν καλή δράση και προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης του gram-θετικού βακτηρίου *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* με MIC= **50 µg/ml**.

### 8.3 Κυτταρική σειρά A549

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των παραπάνω πεπτιδίων απέναντι στην **κυτταρική σειρά A549**, που είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από πνεύμονα ανδρός Καυκάσιας φυλής και ηλικίας 58 ετών. Η απομόνωση και η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε το 1972 από τον D.J. Giard και τους συνεργάτες του. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες και θεωρούνται κατάλληλα για τη μελέτη του μηχανισμού, με τον οποίο δρουν οι φαρμακευτικές ουσίες στον επιθήλιο του πνεύμονα.

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητά τους. Ανά 2-3 μέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού ώστε να ανανεώνονται τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η πρόσφυση των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με το είδος τους, όμως για την κυτταρική σειρά A549 απαιτούνται περίπου 24 ώρες. Όταν σχηματισθεί πλήρες ταπήτιο, σε διαφορετικό χρόνο για κάθε κύτταρο, ο οποίος επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες, γίνεται ανακαλλιέργεια των προσκολλημένων κυττάρων. Συνήθως πριν την εκτέλεση ενός πειράματος ενεργοποίησης, τα κύτταρα τίθενται σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό, απουσία ορού, για να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξή τους. Τα πειράματα γίνονται σε κύτταρα μετά τη δεύτερη ανακαλλιέργεια και όταν σχηματισθεί πλήρες ταπήτιο, η επιφάνεια του τρυβλίου είναι καλυμμένη κατά 80-90% από προσκολλημένα κύτταρα.



Σχήμα 8.3: Επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα A549. Η φωτογραφία είναι τραβηγμένη από οπτικό μικροσκόπιο.

### 8.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων A549

Οι συσκευές και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυττάρων A549 είναι τα ακόλουθα.

- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Επωαστικός θάλαμος CO<sub>2</sub>: Θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (37°C) και 5%CO<sub>2</sub>
- Καλυπτρίδες
- Αποστειρωμένα corning των 15 και 45 mL
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 180/20 mm, Cellstar
- Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 mL
- Ειδικές θήκες φύλαξης κυττάρων (52 θέσεων) στο υγρό άζωτο

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυττάρων A549 είναι τα ακόλουθα.

- **Θρεπτικό υλικό:** Ham's F12K (Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1x). Gibco-BRL (Life Technologies, Inc, Inchinnan, Scotland).
- **Ορός εμβρύου βοός** (Fetal Bovine Serum, FBS), χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων. (The Cell Culture Company).

- **L-Γλουταμίνη** (200 mM), φυλάσσεται στους -20 °C και χρησιμοποιείται ως τροφή για τα κύτταρα.
- **Αντιβιοτικό** (Antibiotic- antimycotic. Προετοιμασία: 10.000 µg/mL πενικιλίνη, 10.000 µg/mL θειϊκή στρεπτομυκίνη, 25 µg/mL αμφοτερικίνη B ως μυκητοκτόνο). Φυλάσσεται στους -20 °C και χρησιμοποιείται για την αποφυγή μολύνσεων.
- **Δισοξυκαρβονυλικό νάτριο**, για τη ρύθμιση του pH.
- **Αιθανόλη** (καθαρότητας 99,8%), για αποστείρωση.
- **Διμεθυλοσουλφοξείδιο** (DMSO), το οποίο χρησιμοποιείται στο πάγωμα με σκοπό τη διατήρηση των μεμβρανών στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων** (PBS 1x).
- **Βαφή Trypan blue** 0.4%, χρησιμοποιείται στο μέτρημα καθώς διαπερνά τις μεμβράνες των νεκρών κυττάρων δίνοντας ένα μπλε χρώμα.
- **Διάλυμα θρυψίνης-EDTA** (1x) (Trypsin- EDTA 1x, 0.5g/L trypsin, 0.2g/L EDTA σε PBS 1x).

Τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυττάρων A549 είναι τα ακόλουθα.

- **Αδρανοποίηση FBS**: Το παρασκεύασμα του εμπορίου απενεργοποιείται σε υδρόλουτρο στους 60°C για 30min. Στη συνέχεια, διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά conning των 50 mL σε στείρες συνθήκες, αφού πρώτα διηθηθεί με αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C.
- **Πλήρες θρεπτικό υλικό** για την καλλιέργεια κυττάρων A549: Σε 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50 mL αδρανοποιημένου FBS, 5 mL γλουταμίνης, 10 mL δικαρβονικού νατρίου και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.
- **Μη πλήρες θρεπτικό υλικό** για την καλλιέργεια κυττάρων A549: Σε 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 5mL γλουταμίνης, 10mL δικαρβονικού νατρίου και 5mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το μη πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

### 8.3.2 Πειραματική πορεία καλλιέργειας κυττάρων A549

- ❖ **Απόψυξη – Στρώσιμο κυττάρων:** Τα cryovials με τα stock κύτταρα, 1.000.000 κύτταρα/mL, μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε υδρόλουτρο στους 37°C, για 1-2min, μέχρι να ξεπαγώσουν. Με αποστειρωμένο σιφόνιο τα κύτταρα αναδιασπείρονται σχολαστικά και μεταφέρεται 1 mL από αυτά σε τρυβλίο. Προστίθενται 20 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο υπό συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C για 24h μέχρι να κολλήσουν τα κύτταρα. Μετά το πέρας των 24 ωρών γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού με σκοπό την απόρριψη του DMSO. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 mL θρεπτικού υλικού και το τρυβλίο επιστρέφεται στο θάλαμο επώασης μέχρι να είναι έτοιμο για ανακαλλιέργεια (splitting).
- ❖ **Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting):** Στο στάδιο αυτό γίνεται η ανανέωση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων για να αντικατασταθούν τα υλικά που έχουν καταναλωθεί. Αρχικά, παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο αν τα κύτταρα έχουν κολλήσει στο τρυβλίο και αν έχουν πλήρες ταπήτιο, δηλαδή ~80% κάλυψη του τρυβλίου. Έπειτα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, εκπλένεται το ταπήτιο των κυττάρων προσεκτικά 2 φορές με 3 mL PBS και προστίθενται 3 mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA στο τρυβλίο. Η πλύση με PBS είναι ένα βήμα απαραίτητο πριν την προσθήκη θρυψίνης, γιατί το θρεπτικό υλικό περιέχει πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη δράση της. Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη εκτός από την περίπτωση που αυτά ακολουθούνται από προλίνη. Στη συνέχεια, το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο CO<sub>2</sub> μέχρι να ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων (~10min). Ο χρόνος παραμονής των κυττάρων στη θρυψίνη πρέπει να είναι ο μικρότερος δυνατός, γιατί η επαφή μαζί τους για μεγάλο χρονικό διάστημα βλάπτει τα κύτταρα. Αφού περάσουν τα 10min, προστίθενται 7 mL PBS για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων για 5min στις 2000 στροφές και απόρριψη του υπερκείμενου που περιέχει PBS με θρυψίνη. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού και το ίζημα επαναδιαλύεται. Η ποσότητα του θρεπτικού υλικού που προστίθεται πρέπει να είναι ανάλογη του ιζήματος, έτσι ώστε σε 1 mL να μην υπάρχουν λιγότερα από 1.000.000 κύτταρα. Τέλος, πραγματοποιείται καταμέτρηση των κυττάρων και σε κάθε νέο

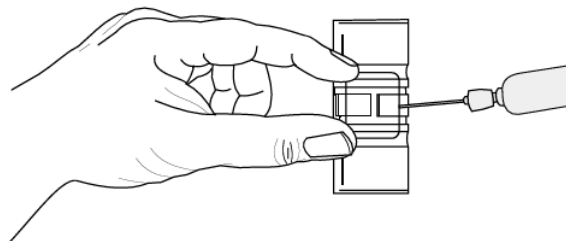


τρυβλίο τοποθετούνται περίπου  $1 \times 10^6$  κύτταρα. Τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο για προσκόλληση, μέχρι το ταπήτιο να καλυφθεί κατά 80% (μετά από χρονικό διάστημα 2-5 ημερών). Ανά δυο περίπου ημέρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού υλικού.

- ❖ **Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων:** Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με χρήση αιματοκυτομέτρου Neubauer. Για τη διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα γίνεται βαφή τους με Trypan blue ακολουθώντας την εξής διαδικασία. Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται 90  $\mu\text{L}$  βαφής Trypan Blue 1x (από το stock 10  $\mu\text{L}$  βαφής και 90  $\mu\text{L}$  dd  $\text{H}_2\text{O}$ ) και 10  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος κυττάρων. Στη συνέχεια, αναδεύονται επανειλημμένα με αυτόματη πιπέτα και τοποθετούνται 10  $\mu\text{L}$  στο αιματοκυτόμετρο μεταξύ πλάκας και καλυπτρίδας. Έπειτα, γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται ως «φωτεινά» ενώ τα νεκρά χρωματίζονται μπλε. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του δείγματος υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο.

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) \times (\text{αραίωση}) \times 10^4$$

Ο τύπος προκύπτει από τις διαστάσεις της πλάκας Neubauer.



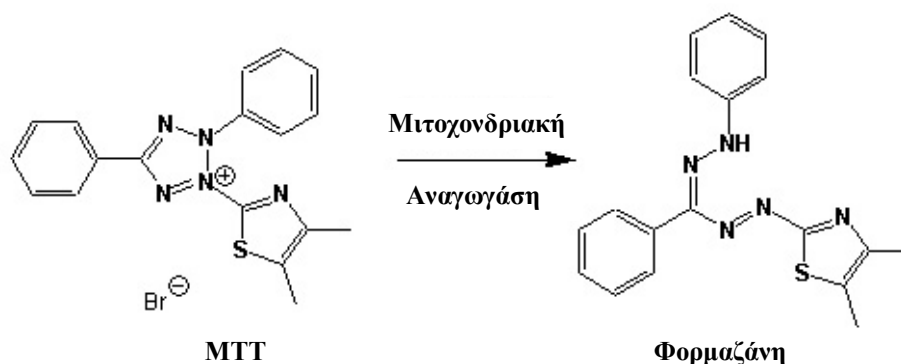
Σχήμα 8.4: Τοποθέτηση κυττάρων σε αιματοκυτόμετρο Neubauer.

- ❖ **Πάγωμα κυτταρικής καλλιέργειας:** Μετά την ανακαλλιέργεια (splitting) λαμβάνεται ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων για την πραγματοποίηση του πειράματος και ακολουθεί το δεύτερο splitting. Τα υπόλοιπα κύτταρα παγώνονται ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, παρασκευάζεται ένα υγρό από: 60% πλήρες θρεπτικό υλικό, 20% DMSO και 20% FBS, το οποίο αφήνεται να παγώσει για τουλάχιστον 1h. Ακολουθείται η διαδικασία του splitting, μέχρι το σημείο μέτρησης των κυττάρων και πραγματοποιείται επαναιώρηση σε τέτοιο όγκο, ώστε να υπάρχουν 2.000.000 κύτταρα/mL. Στη συνέχεια, προστίθεται το υγρό παγώματος σε αναλογία 1:1, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τελικά 1.000.000

κύτταρα/mL. Τα κύτταρα παγώνονται ανά mL σε cryovials, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C για 24h και τέλος αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο. Τα stock κύτταρα που προκύπτουν από τη διαδικασία του παγώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα.

#### 8.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας-Μέθοδος MTT

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των πεπτιδίων έγινε με τη **μέθοδο MTT**. Πρόκειται για χρωματομετρική μέθοδο, που βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων των **ζωντανών κυττάρων** να διασπούν τους δακτυλίους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT, [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων φορμαζάνης.



Σχήμα 8.5: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής του MTT σε φορμαζάνη.

Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να συσσωρεύονται στον ενδοκυττάριο χώρο των ζωντανών κυττάρων. Με την προσθήκη διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), οι κρύσταλλοι απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο και ο αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Το χρώμα που παράγεται μετράται φασματοφωτομετρικά, σε μήκος κύματος 540nm, με την ένταση του μωβ χρώματος να αποτελεί το μέτρο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

### 8.4.1 Αντιδραστήρια-Σκεύη

Τα αντιδραστήρια και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT είναι τα εξής.

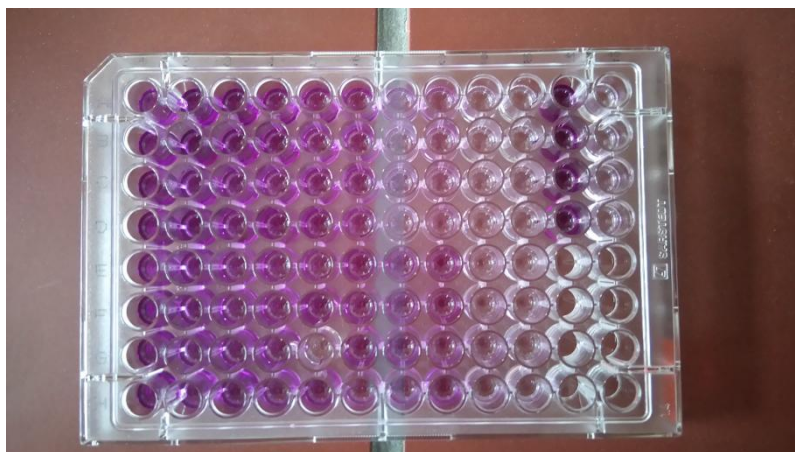
- **Αντιδραστήριο MTT:** άλας τετραζολίου, το οποίο φυλάσσεται στους 4°C.
- **Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)**, το οποίο χρησιμοποιείται για τη διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος.
- **Αποστειρωμένη πλάκα elisa 96 θέσεων** (96-well elisa plate).
- **Φωτόμετρο ELISA-READER.**

### 8.4.2 Πειραματική πορεία μεθόδου MTT

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται στη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα.

- Αρχικά, ζυγίζονται 2 mg από κάθε πεπτίδιο και διαλυτοποιούνται σε 1 mL μη πλήρους θρεπτικού υλικού με 5% FBS. Με τις κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν οι παρακάτω συγκεντρώσεις: 20μg/mL, 50μg/mL, 80μg/mL, 100μg/mL, 130μg/mL, 150μg/mL, 180μg/mL, 200μg/mL, 250μg/mL και 300μg/mL , με τις οποίες θα γίνει στη συνέχεια η επίδραση των κυττάρων.
- Σε αποστειρωμένη πλάκα elisa 96 θέσεων επιστρώνονται 18.000 κύτταρα/θέση. Ο αριθμός των κυττάρων ποικίλει για κάθε κυτταρική σειρά και υπολογίζεται κάθε φορά από την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Όσον αφορά τις θέσεις στην πλάκα, είναι κάθε φορά διαφορετικές, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται 4 κενές θέσεις που δεν έχουν κύτταρα και αντιδραστήρια ως αρνητικά δείγματα αναφοράς [control (-)], 4 θέσεις χωρίς κύτταρα αλλά με αντιδραστήρια ως θετικά δείγματα αναφοράς [control (+)] και 4 θέσεις για κάθε συγκέντρωση του πεπτιδίου.
- Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετείται σε θάλαμο επώασης για 6-48h (συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C), ώστε τα κύτταρα να αποκτήσουν εκθετική φάση ανάπτυξης. Αφού τα κύτταρα κολλήσουν, αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε θέση 100 μL μη πλήρους θρεπτικού υλικού, μέσα στο οποίο είναι διαλυμένο το πεπτίδιο. Η πλάκα επιστρέφεται στον επωαστικό θάλαμο και αφήνεται overnight (12h) για επώαση.

- Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 10  $\mu\text{L}$  MTT, συγκέντρωσης 5mg/ml, σε όλα τα δείγματα των πεπτιδίων καθώς και των controls, και ακολουθεί επώαση για 2-4 ώρες. Αφού πραγματοποιηθεί έλεγχος με μικροσκόπιο, το υπερκείμενο απορρίπτεται και οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιούνται με 100  $\mu\text{L}$  DMSO. Η πλάκα φυλάσσεται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 2h. Έπειτα, η πλάκα ανακινείται σε ειδική συσκευή για 10min και μετράται η απορρόφηση σε φωτόμετρο ELISA-READER. Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίζονται οι μέσοι όροι των επαναλήψεων των controls (+), controls (-) και των δειγμάτων των πεπτιδίων.



**Σχήμα 8.6:** Πλάκα elisa 96 θέσεων, στην οποία έγινε επίστρωση των κυττάρων και των διαλυμάτων πεπτιδίων για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT. Όσο πιο έντονο είναι το μωβ χρώμα τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων A549.

### 8.4.3 Αποτελέσματα

Η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο.

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{Ad}{A_{\text{control}}} \cdot 100\%$$

, όπου  $Ad = M.O_{\text{δείγματος}} - M.O_{\text{control(-)}}$

$$A_{\text{control}} = M.O_{\text{control (+)}} - M.O_{\text{control (-)}}$$

Από τα ποσοστά % βιωσιμότητας υπολογίζεται τόσο το τυπικό σφάλμα όσο και η τυπική απόκλιση για όλες τις συγκεντρώσεις των πεπτιδίων που δοκιμάστηκαν πειραματικά με τη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT. Στους παρακάτω πίνακες δίνονται οι

τιμές του ποσοστού βιωσιμότητας, της τυπικής απόκλισης και του τυπικού σφάλματος σε όλες τις συγκεντρώσεις για κάθε πεπτίδιο.

**Πίνακας 8.7: Αποτελέσματα της μεθόδου MTT για το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.**

Συγκέντρωση (μg/mL)	% Βιωσιμότητα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
20	57,86	0,30	0,15
80	44,12	0,18	0,09
100	40,6	0,17	0,08
130	32,64	0,11	0,05
150	26,96	0,047	0,02
180	6,09	0,041	0,02
250	0	0	0
300	0	0	0

**Πίνακας 8.8: Αποτελέσματα της μεθόδου MTT για το πεπτίδιο Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.**

Συγκέντρωση (μg/mL)	% Βιωσιμότητα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
20	60,68	0,19	0,09
50	36,43	0,13	0,07
80	29,75	0,05	0,03
100	25,94	0,04	0,02
150	25,26	0,16	0,08
200	20,78	0,10	0,05
250	2,7	0,02	0,01
300	1,3	0,01	0,007

**Πίνακας 8.9: Αποτελέσματα της μεθόδου MTT για το πεπτίδιο**



Συγκέντρωση (μg/mL)	% Βιωσιμότητα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
20	86,1	0,46	0,23
50	64,3	0,23	0,11
80	51,53	0,11	0,058
100	44,26	0,105	0,061
130	37,16	0,102	0,051
150	7,41	0,028	0,014
180	0	0	0
200	0	0	0
250	0	0	0
300	0	0	0

**Πίνακας 8.10: Αποτελέσματα της μεθόδου MTT για το πεπτίδιο**



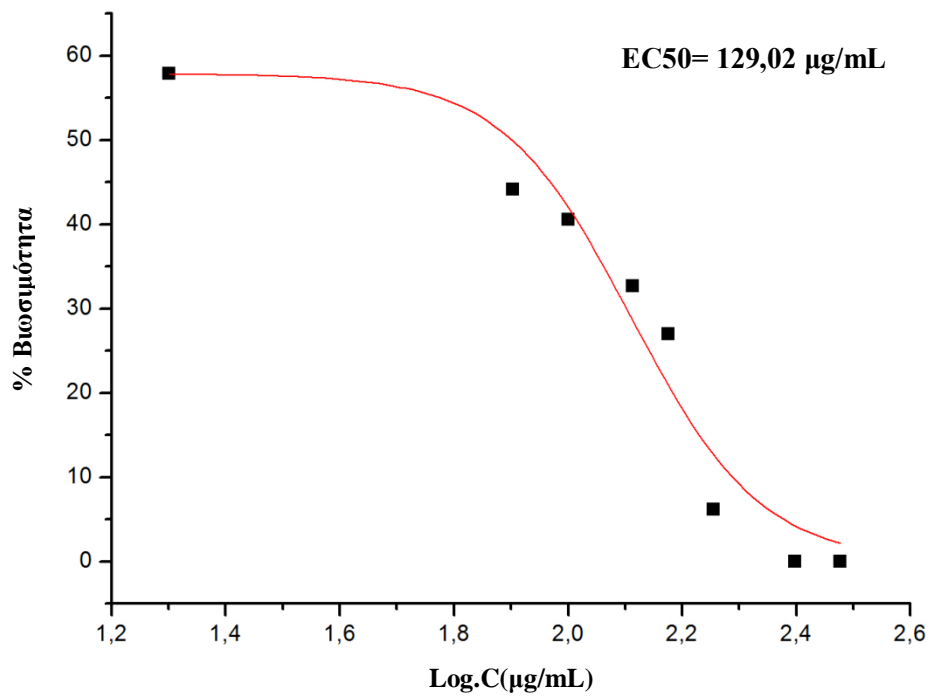
Συγκέντρωση (μg/mL)	% Βιωσιμότητα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
20	53,4	0,103	0,05
50	53,8	0,28	0,14
100	37,7	0,18	0,106
130	32,7	0,1	0,05
180	26,6	0,13	0,06
200	10,4	0,08	0,04
250	0	0	0
300	0	0	0

Πίνακας 8.11: Αποτελέσματα της μεθόδου MTT για το πεπτίδιο  
Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.

Συγκέντρωση (μg/mL)	% Βιωσιμότητα	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
20	0	0,003	0,001
50	14,6	0,2	0,12
80	0,28	0,016	0,008
100	0	0,019	0,009
130	0	0,006	0,003
150	0	0,015	0,007
180	0,03	0,011	0,006
200	1,4	0,07	0,036
250	0,2	0,01	0,004
300	0,3	0,011	0,005

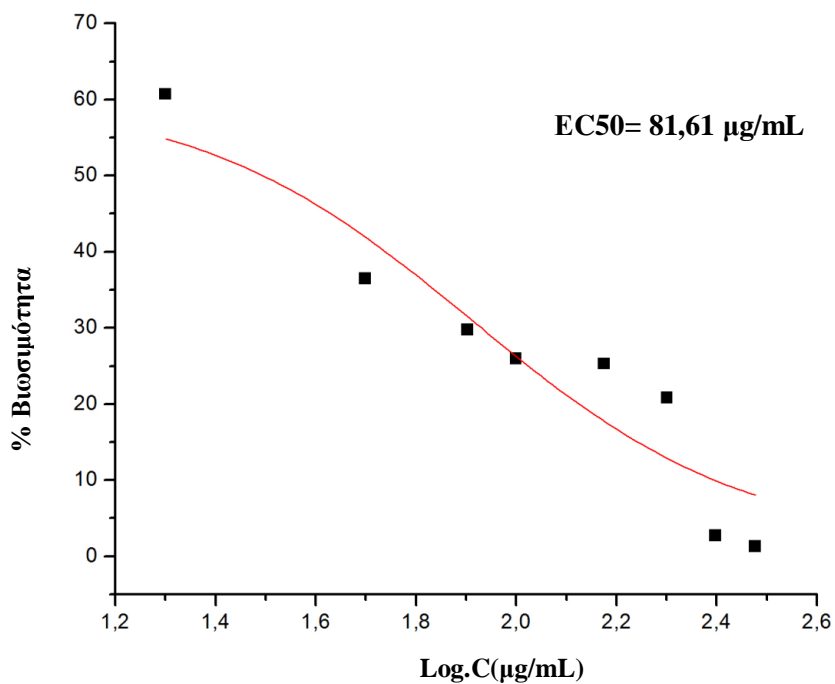
Από τους παραπάνω πίνακες συμπεραίνουμε ότι τα πεπτίδια έδειξαν ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα A549 ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πεπτίδιο που ξεχώρισε είναι το **Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>**, το οποίο έδειξε αρκετά υψηλή κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις του, ακόμα και στις χαμηλές, διότι λήφθησαν πάρα πολύ χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων A549. Το πεπτίδιο **Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** δεν έδειξε κυτταροτοξική δράση.

Παρακάτω δίνονται οι σιγμοειδείς καμπύλες και οι τιμές EC50 των πεπτιδίων. Δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή σιγμοειδούς καμπύλης και, κατά συνέπεια, η τιμή EC50 για το πεπτίδιο Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (σχεδόν μηδενικές τιμές βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων A549 σε όλες τις συγκεντρώσεις του).

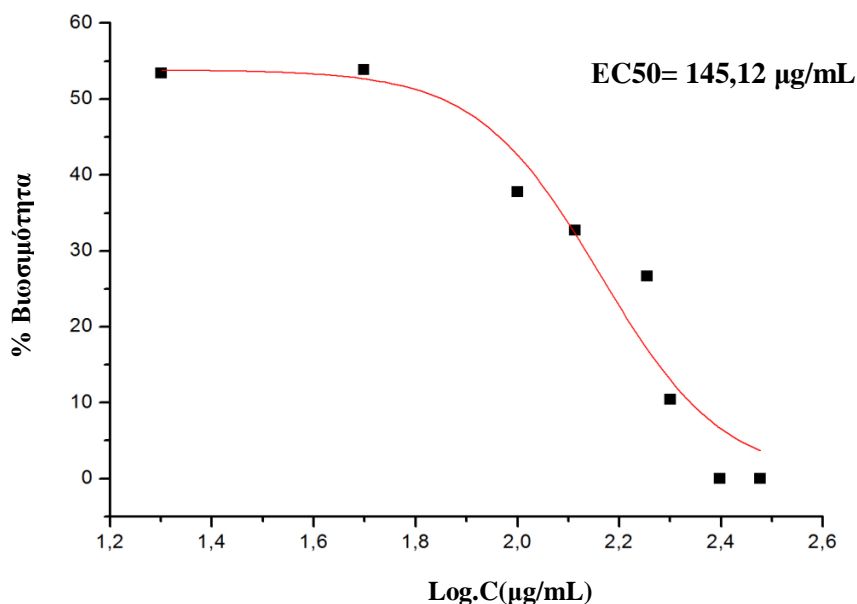


**Σχήμα 8.7:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει του λογάριθμου συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> με τιμή EC50 129,02 µg/mL.

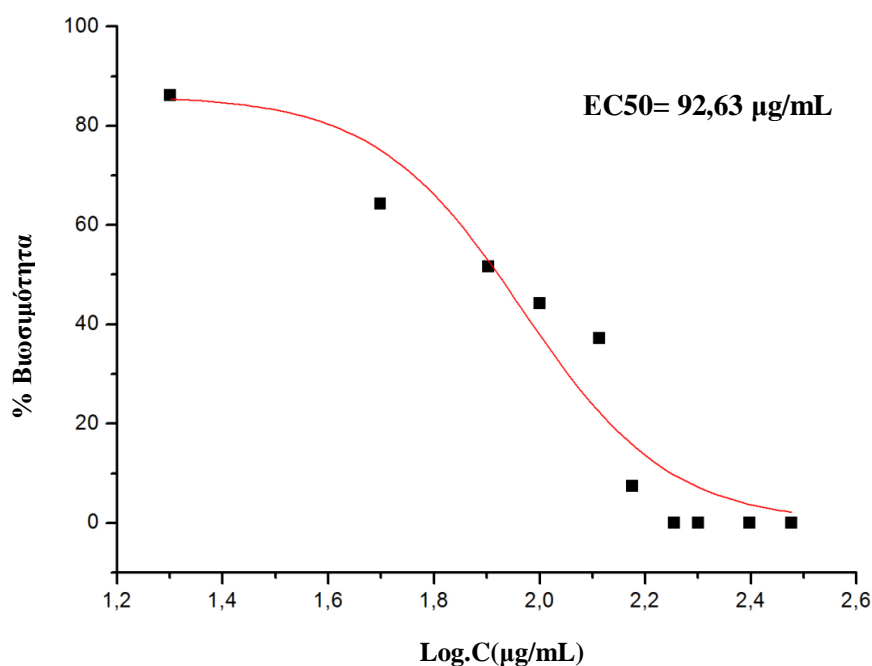


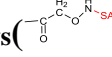


**Σχήμα 8.8:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει του λογάριθμου συγκέντρωσης του πεπτιδίου Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> με τιμή EC<sub>50</sub> 81,61 µg/mL.



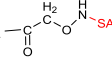
**Σχήμα 8.9:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει του λογάριθμου συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> με τιμή EC<sub>50</sub> 145,12 µg/mL.

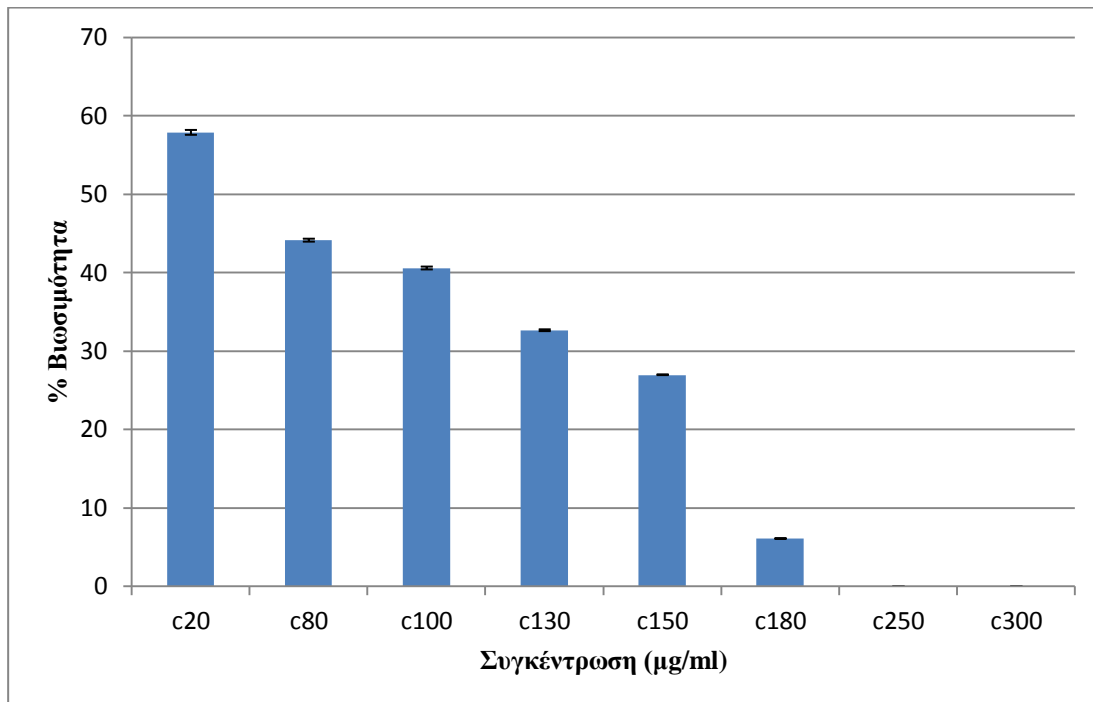


Σχήμα 8.10: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει του λογάριθμου συγκέντρωσης του πεπτιδίου Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> με τιμή EC<sub>50</sub> 92,63 μg/mL.

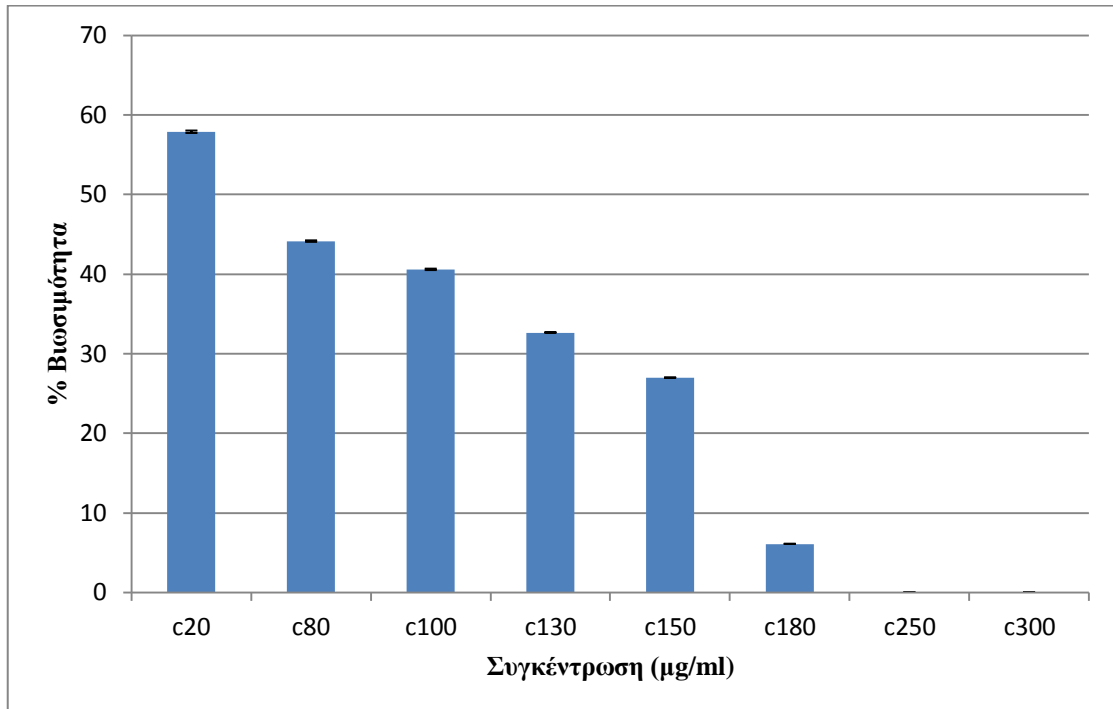
Πίνακας 8.12: Τιμές EC<sub>50</sub> των πεπτιδίων.

Πεπτίδια	Τιμές EC <sub>50</sub> (μg/mL)
FKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	129,02
LKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	81,61
AKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	-
Ac-FK-(SA)RIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	92,63
Ac-FKRIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	0% Βιωσιμότητα (πλήρης δράση)
FKRIVQKIKDFLR-NH <sub>2</sub>	145,12

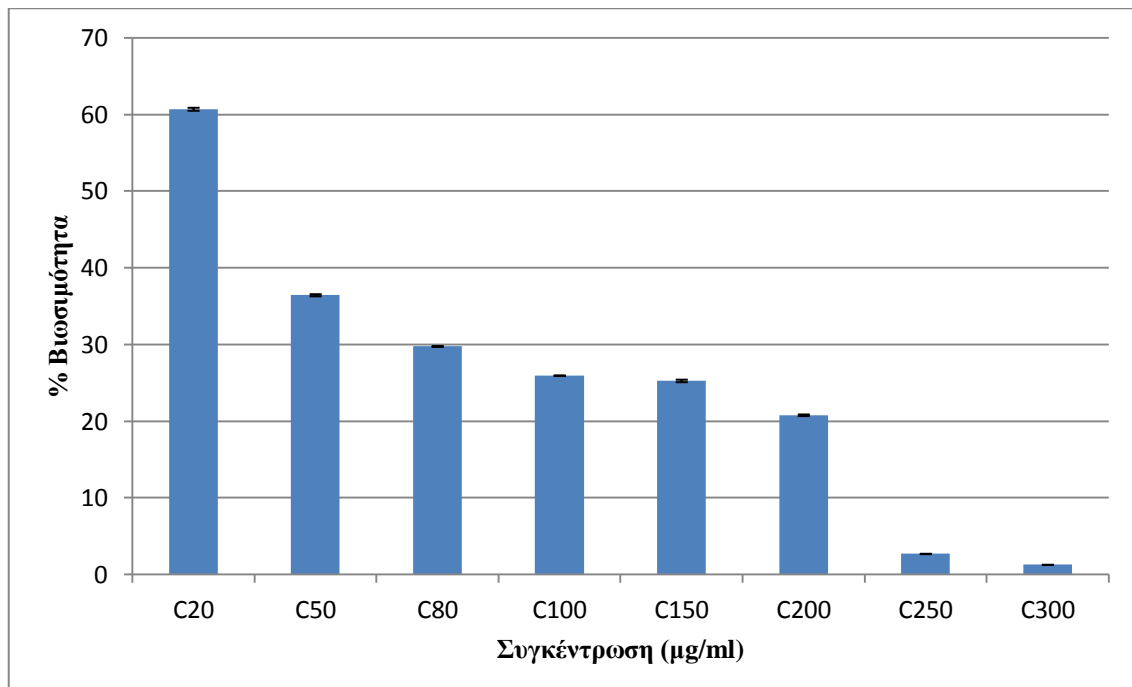
Από τις τιμές EC<sub>50</sub> συμπεραίνουμε ότι τα πεπτίδια Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> έχουν χαμηλότερες τιμές EC<sub>50</sub> από το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 (πρώτο πεπτίδιο του πίνακα 8.12).



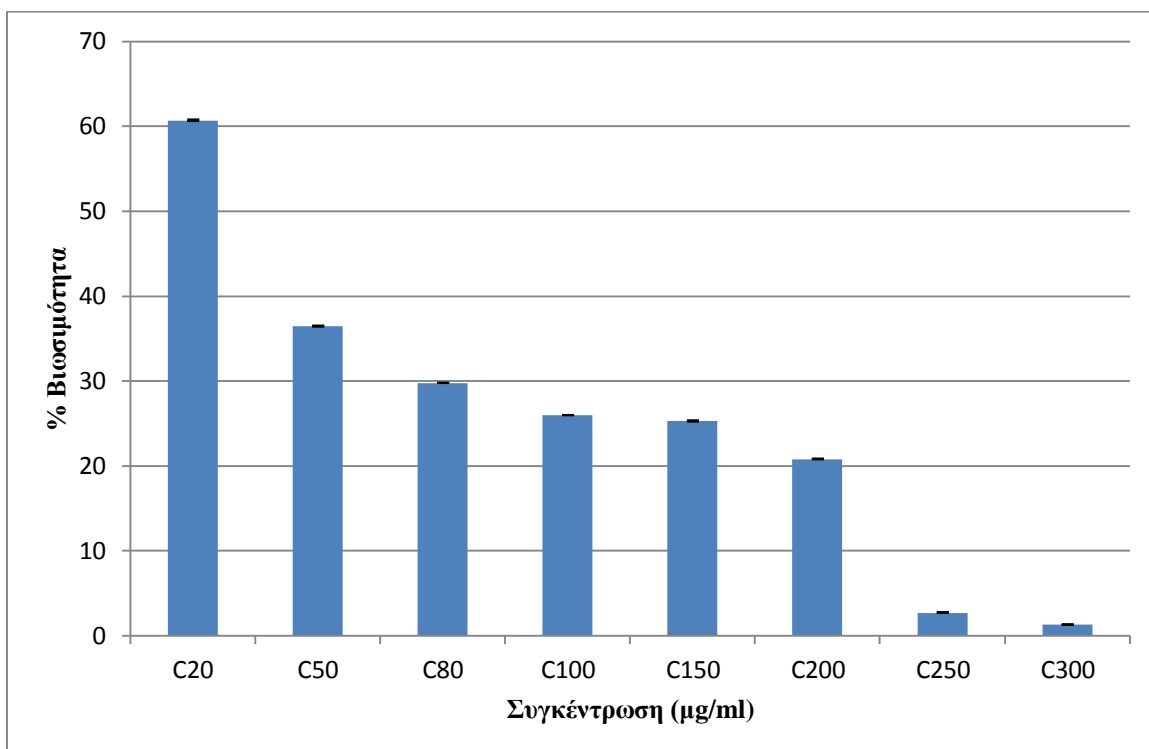
**Σχήμα 8.11:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπική απόκλιση).



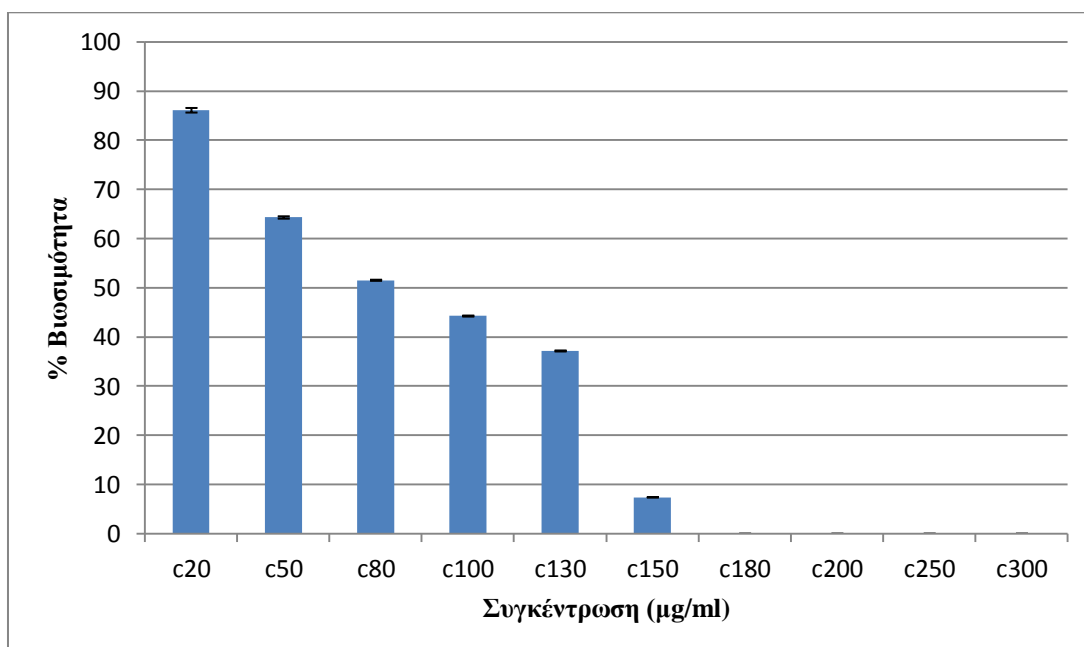
**Σχήμα 8.12:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπικό σφάλμα).



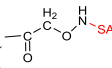
**Σχήμα 8.13:** Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπική απόκλιση).

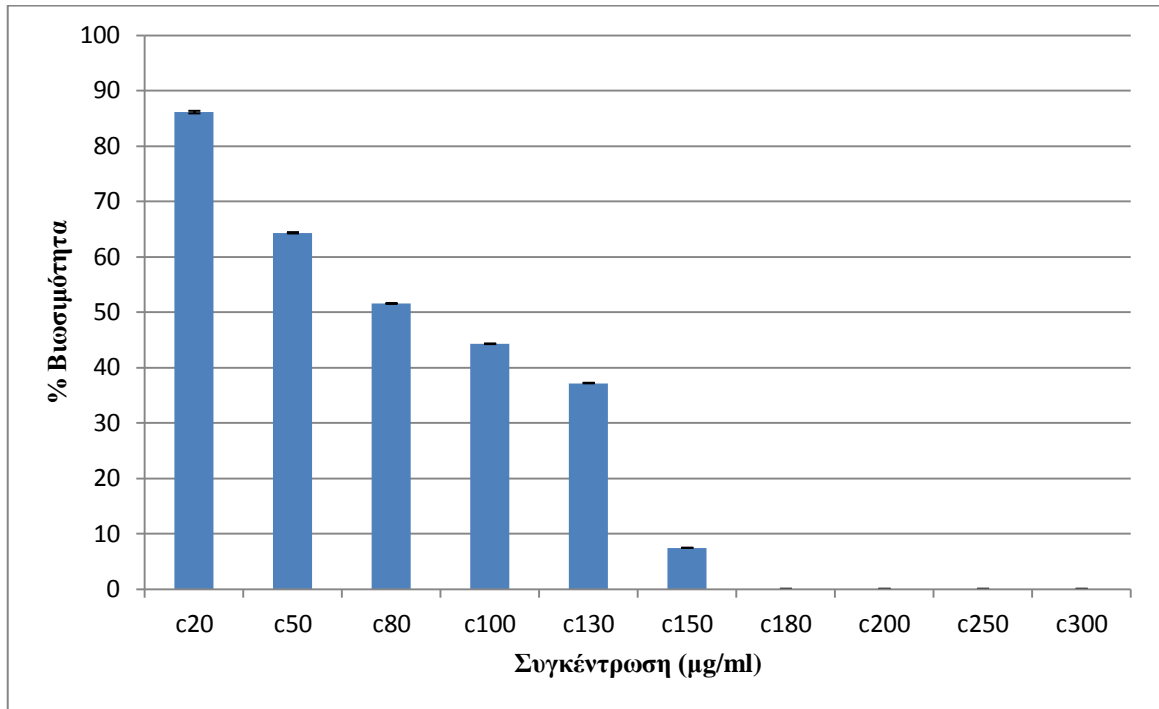


Σχήμα 8.14: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπικό σφάλμα).

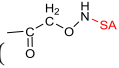


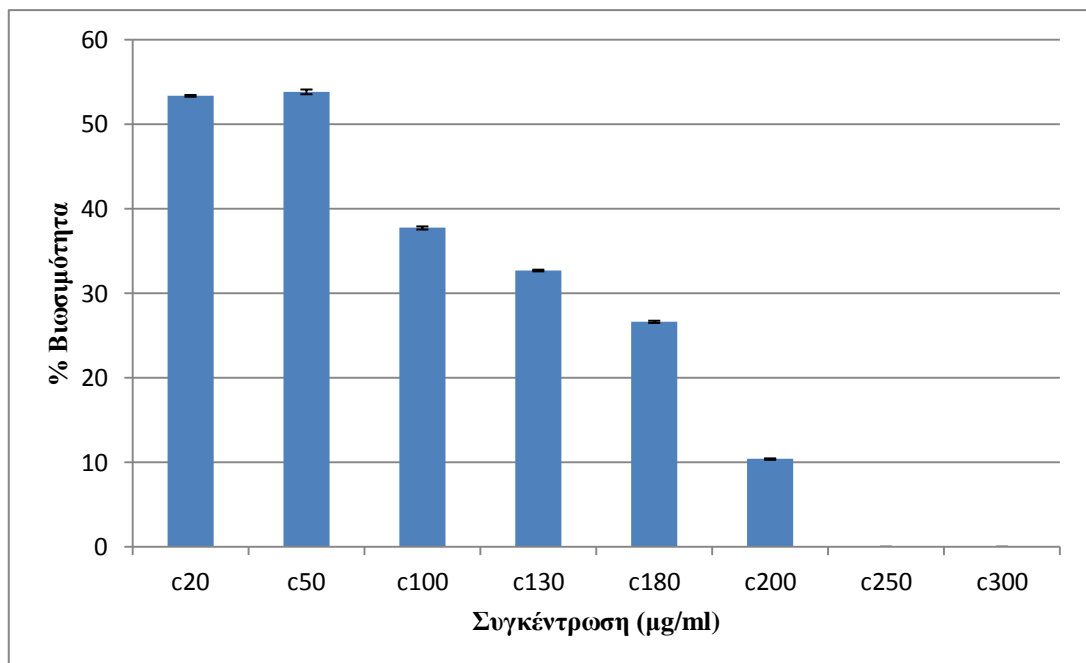
Σχήμα 8.15: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης

του πεπτιδίου Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπική απόκλιση).

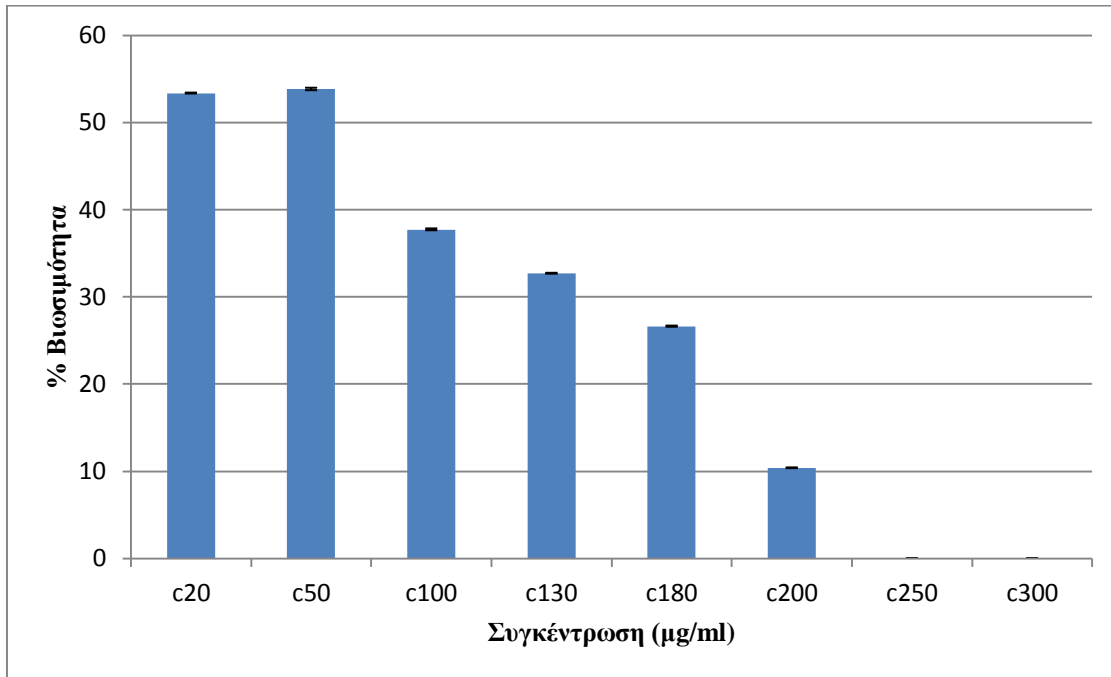


Σχήμα 8.16: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης

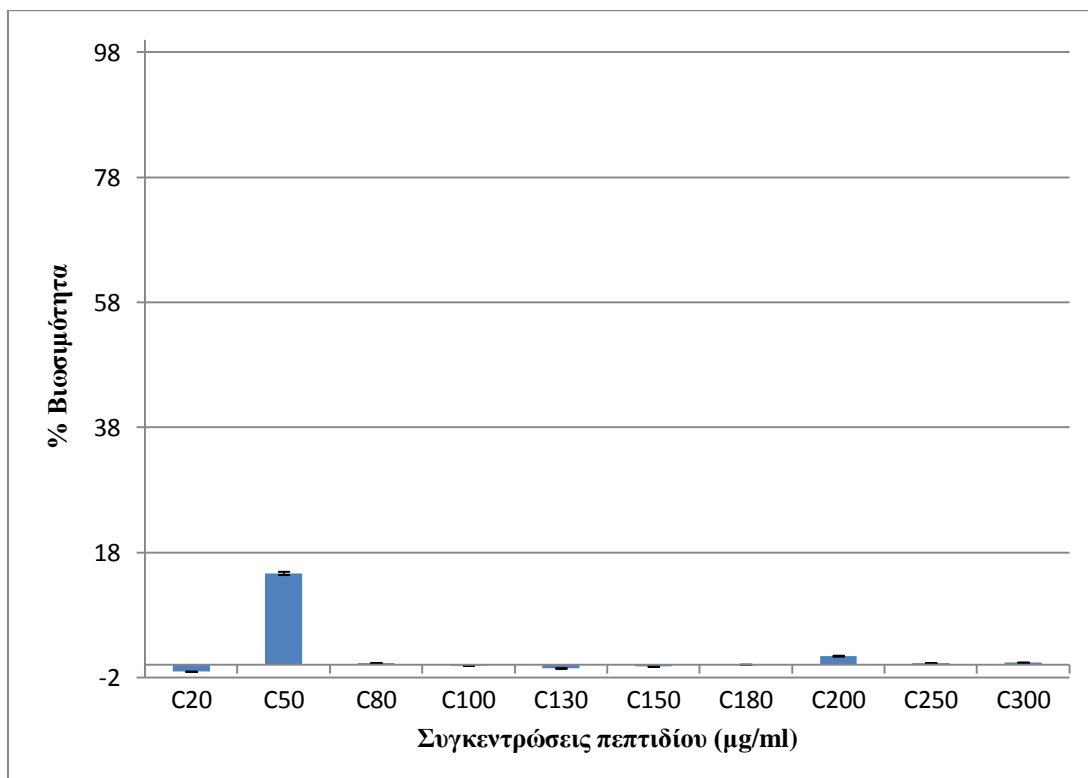
του πεπτιδίου Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπικό σφάλμα).



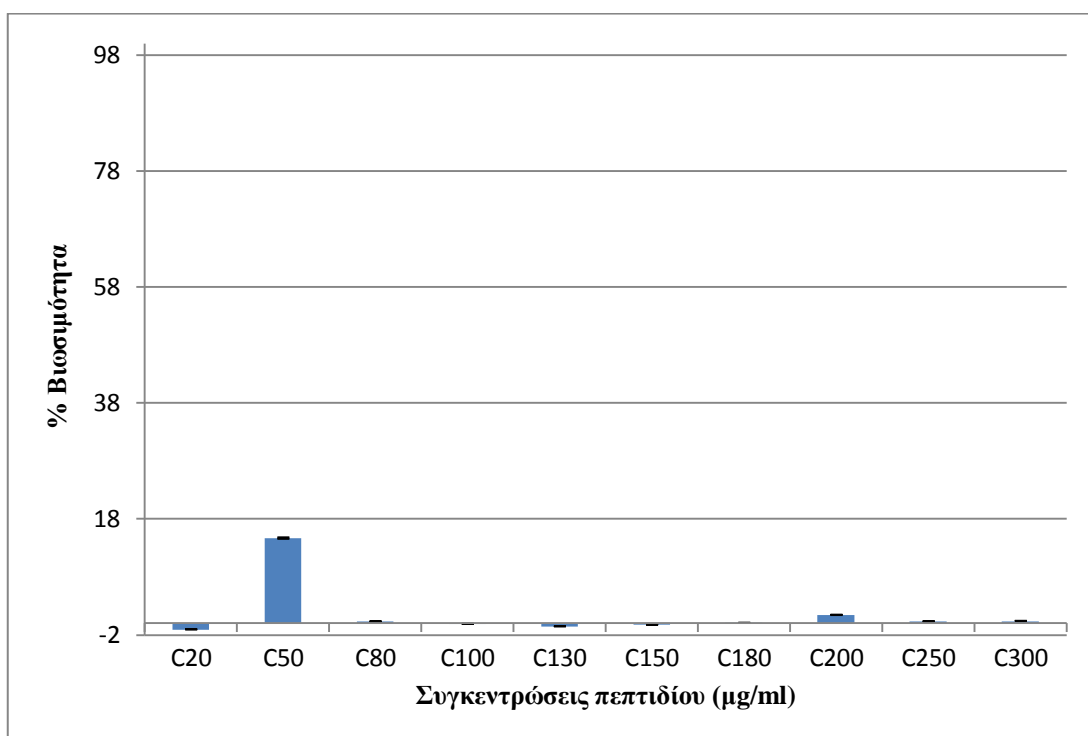
Σχήμα 8.17: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπική απόκλιση).



Σχήμα 8.18: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπικό σφάλμα).



Σχήμα 8.19: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπική απόκλιση).

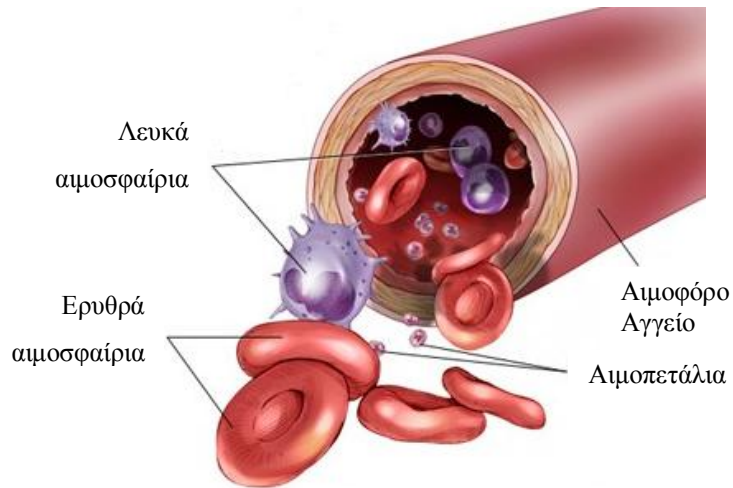


Σχήμα 8.20: Απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων A549 συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> (τυπικό σφάλμα).

## 8.5 Μελέτη τοξικότητας των πεπτιδίων

Τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους εναντίον των **ανθρώπινων ερυθροκυττάρων**, RBC (Red Blood Cells). Οι τοξικές ουσίες προκαλούν διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και απελευθέρωση των συστατικών του κυτταροπλάσματος προς τον περιβάλλοντα χώρο των ερυθροκυττάρων (ορός ή πλάσμα) με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η λύση των ερυθροκυττάρων που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο ονομάζεται **αιμόλυση** και ανιχνεύεται μέσω της απελευθέρωσης της **αιμογλοβίνης**, κύριο δομικό συστατικό των ερυθροκυττάρων, στον ορό ή το πλάσμα του αίματος. Κατά την απελευθέρωσή της από τα ερυθροκύτταρα, η αιμογλοβίνη δίνει ένα χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στον ορό.



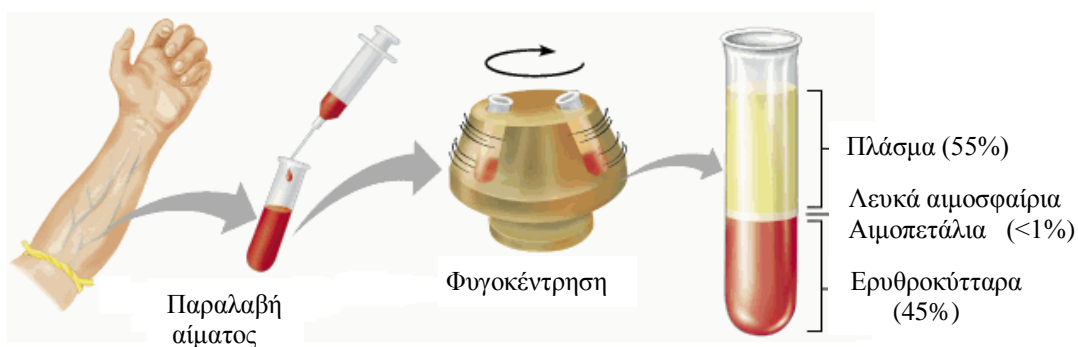


**Σχήμα 8.21: Τα βασικά συστατικά του αίματος.**

### 8.5.1 Πειραματική πορεία

- Διαλυτοποίηση των πεπτιδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα τρις(υδροξυλομεθυλο)αμινομεθάνιο, Tris buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) και παρασκευή διαλυμάτων των πεπτιδίων στις συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 και 500 μg/mL. Η διήθηση των διαλυμάτων γίνεται με φίλτρο Whatman 25 mm.
- Παραλαβή φρέσκου αίματος από το νοσοκομείο σε σωληνάκια ηπαρίνης (αντιπηκτικό υλικό).
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3000 στροφές επί 10 min, ώστε να διαχωριστεί ο ορός του αίματος (άνω στιβάδα) από τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (κεντρική πολύ λεπτή στιβάδα), καθώς και τα ερυθροκύτταρα (κάτω στιβάδα).
- Έκπλυση των ερυθροκυττάρων με διάλυμα Tris buffer. Η έκπλυση με Tris buffer γίνεται 3 φορές.
- Παρασκευή αιωρήματος ερυθροκυττάρων (RBC). Τα ερυθροκύτταρα αραιώνονται σε αναλογία 1:10 με διάλυμα Tris buffer.
- Προσθήκη 200 μL από το αιώρημα των ερυθροκυττάρων στα erpendorfs, όπου βρίσκονται τα διαλύματα πεπτιδίων με Tris buffer στις παραπάνω συγκεντρώσεις.
- Το τυφλό δείγμα (blank) που αντιπροσωπεύει 0% ποσοστό αιμόλυσης, περιέχει 200 μL αιωρήματος ερυθροκυττάρων και 1300 μL Tris buffer. Το δείγμα

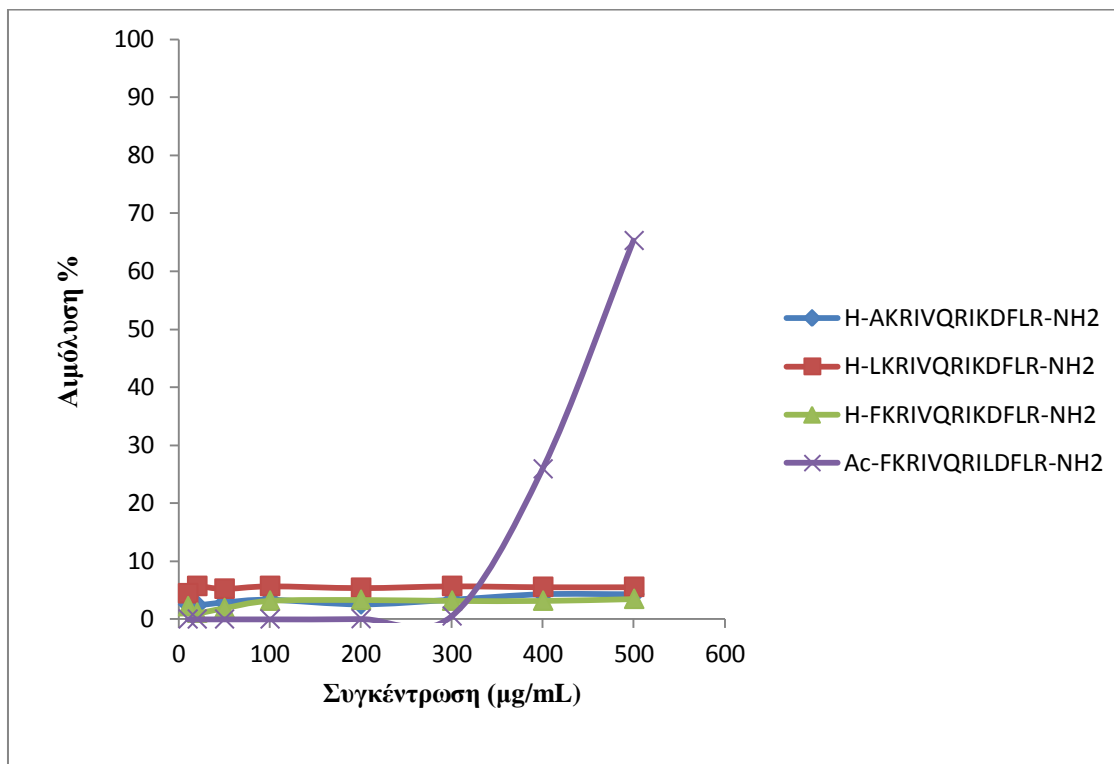
- αναφοράς (control) που αντιπροσωπεύει 100% ποσοστό αιμόλυσης περιέχει 200  $\mu\text{L}$  αιωρήματος ερυθροκυττάρων και 1300  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0,5%  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
- Επώαση των δειγμάτων στους  $37^\circ\text{C}$  για 30 min αφού τα έχουμε αναδεύσει ήπια.
  - Αφήνουμε τα διαλύματα να εγκληματισθούν με τη θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχρή φυγόκεντρο στους  $4^\circ\text{C}$  για 5 min στα 2000 g.
  - Προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο διάλυμα κάθε δείγματος σε erpendorf, στο οποίο έχουμε, ήδη, προσθέσει 900  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0,5%  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
  - Μεταφορά των διαλυμάτων αυτών σε κυψελίδες του 1 mL και φωτομέτρηση στα 540 nm σε φωτόμετρο SHIMADZU UV-1201.



Σχήμα 8.22: Παραλαβή και διαχωρισμός του αίματος στα συστατικά του.

### 8.5.2 Αποτελέσματα

Η αιμόλυση εκφράζεται με τον όρο  $\text{EC}_{50}$ , ο οποίος δηλώνει τη συγκέντρωση του πεπτιδίου ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) που προκαλεί λύση στο 50% του συνολικού πληθυσμού των ερυθροκυττάρων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τη μελέτη τοξικότητας των πεπτιδίων δίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 8.23: Διάγραμμα αιμόλυσης των πεπτιδίων

**Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** ,  
**Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** ,  
**Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** και  
**Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>**

Τα πεπτίδια **Ac-Phe-Lys**( $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{C} \\ / \backslash \\ \text{O} \quad \text{O} \end{matrix}$ )-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και **Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** παρουσιάζουν μηδενικά ποσοστά αιμόλυσης σε όλες τις συγκεντρώσεις. Από το σχήμα 8.23 παρατηρούμε ότι κανένα από τα πεπτίδια δεν προκαλεί αιμόλυση των ερυθροκυττάρων ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις με μόνη εξαίρεση το πεπτίδιο **Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>** , το οποίο παρουσίασε EC<sub>50</sub>=450μg/mL, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν ήταν τοξικό στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.



## Κεφάλαιο 9<sup>ο</sup>

### Αποτελέσματα και συζήτηση





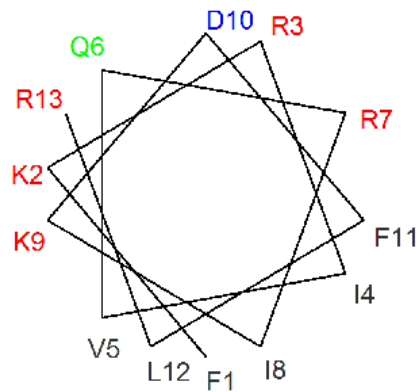
## 9.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, η ταυτοποίηση και ο καθαρισμός έξι κατιονικών πεπτιδικών αναλόγων του φυσικού ανθρώπινου αντιμικροβιακού πεπτιδίου **Cathelicidin LL-37** με στόχο την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών μέσων. Η σύνθεση του τέταρτου πεπτιδικού αναλόγου έγινε από την Πετεινέλλη Κλεονίκη στα πλαίσια της πτυχιακής της εργασίας. Σε δύο από τα έξι πεπτιδικά ανάλογα προστέθηκε στο N-τελικό τους άκρο μία

ακέτυλο-ομάδα ( $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ ). Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων δίνονται παρακάτω. Η πρώτη αλληλουχία αντιστοιχεί στο κεντρικό ελικοειδές τμήμα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Leu**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ala**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys( $\text{---}\overset{\text{H}_2}{\text{C}}\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{---SA}$ )-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

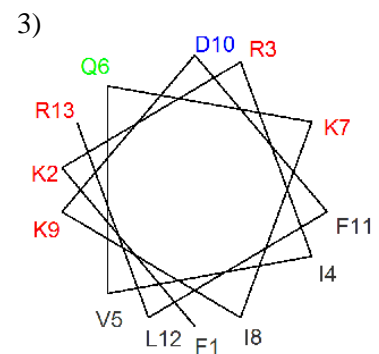
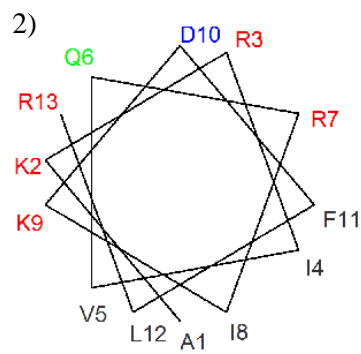
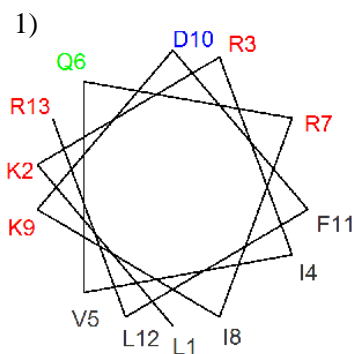
Ο σχεδιασμός των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με τις **προβολές κατά Schiffer-Edmundson**, ώστε να σχηματίζουν **αμφιπαθητική διαμόρφωση** όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και των καρκινικών κυττάρων. Η αμφιπαθητική διαμόρφωση των πεπτιδίων ευνοεί τη διάρρηξη των μεμβρανών, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2 (παράγραφοι 2.2.2 , 2.4 , 2.4.1). Στην προβολή κατά Schiffer-Edmundson για τα πεπτιδία που μελετούμε, τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα συγκεντρώνονται προς τη μία πλευρά του πεπτιδίου, ενώ τα μη πολικά αμινοξέα προς την αντίθετη πλευρά του.



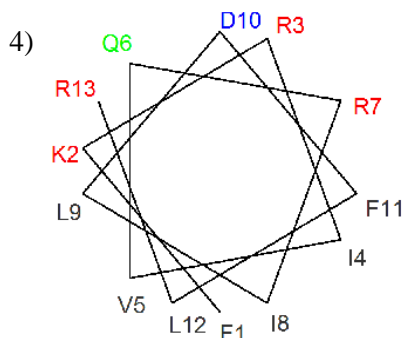
**Σχήμα 9.1:** Προβολή Schiffer-Edmundson του πεπτιδικού αναλόγου που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37.

Στα ανάλογα του παραπάνω πεπτιδίου (σχήμα 9.1) έγιναν αντικαταστάσεις στη θέση **Phe<sup>17</sup>** (**F1** του σχήματος 9.1) με λευκίνη (**Leu<sup>1</sup>**) και αλανίνη (**Ala<sup>1</sup>**), στη θέση **Arg<sup>23</sup>** (**R7** του σχήματος 9.1) με λυσίνη (**Lys<sup>7</sup>**) και στη θέση **Lys<sup>25</sup>** (**K9** του σχήματος 9.1) με λευκίνη (**Leu<sup>9</sup>**). Παρακάτω δίνονται οι προβολές κατά Schiffer-Edmundson των ακόλουθων πεπτιδικών αναλόγων.

- 1) **Leu<sup>1</sup>**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- 2) **Ala<sup>1</sup>**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- 3) Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys<sup>7</sup>**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- 4) Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu<sup>9</sup>**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

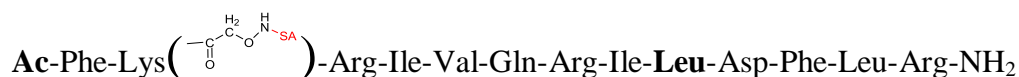




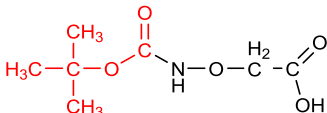


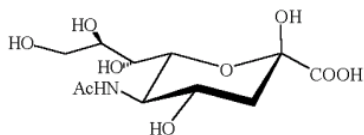
**Σχήμα 9.2: Προβολές κατά Schiffer-Edmundson των πεπτιδικών αναλόγων 1) Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, 2) Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, 3) Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και 4) Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>.**

Εκτός από τα παραπάνω πεπτιδικά ανάλογα συντέθηκε άλλο ένα πεπτίδιο με την ακόλουθη αλληλουχία.



Στο ακετυλιωμένο πεπτιδικό ανάλογο προστέθηκε στην αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της **Lys**<sup>18</sup> του Cathelicidin LL-37 ο φορέας **Boc**-αμινοοξύ οξικό οξύ

(**Boc**-aminooxy acetic acid) με συντακτικό τύπο  και, αφού λήφθηκε το πεπτίδιο σε καθαρή μορφή αποδεσμευμένο από τη ρητίνη και τις πλευρικές προστασίες, πραγματοποιήθηκε χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του **αμινοοξυακετυλιωμένου πεπτιδίου** (NH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CO-πεπτιδίου) και του **σιαλικού οξέος** (N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ) με συντακτικό τύπο



Τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, την κυτταροτοξική τους δράση σε μία καρκινική κυτταρική σειρά και την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Ο προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής (ποσοστό ελικοειδούς διαμόρφωσης) πραγματοποιήθηκε σε τρία από τα έξι συντιθέμενα πεπτίδια με την τεχνική της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι παράμετροι σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των πεπτιδίων.

**Πίνακας 9.1: Παράμετροι σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των πεπτιδίων. Α: H<sub>2</sub>O/0,1%TFA , Β: CH<sub>3</sub>CN/0,1%TFA. Υ: Υπολογισθέν μοριακό βάρος , Ε: Ευρεθέν μοριακό βάρος.**

Πεπτίδια	Απόδοση σύνθεσης	Απόδοση καθαρισμού	RP-HPLC Σύστημα έκλουσης	Χρόνος έκλουσης, t <sub>R</sub> (min)	ESI-MS
FKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	77,09%	46,9%	A:B 90:10 A:B 30:70	12,5	Υ: 1718,1 g/mol Ε: 1718,89 g/mol
LKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	74,9%	45,1%	A:B 90:10 A:B 30:70	12,5	Υ: 1684,08 g/mol Ε: 1684,99 g/mol
AKRIVQRIKDFLR-NH <sub>2</sub>	79,6%	53,4%	A:B 90:10 A:B 30:70	13	Υ: 1642,00 g/mol Ε: 1642,97 g/mol
Ac-FK-(SA)RIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	46,9%	46,9%	A:B 90:10 A:B 0:100	17	Υ: 2109,43 g/mol Ε: 2108,2 g/mol
Ac-FKRIVQRILDFLR-NH <sub>2</sub>	75,7%	50,8%	A:B 80:20 A:B 20:80	17	Υ: 1745,12 g/mol Ε: 1743,2 g/mol

## 9.2 Διαμορφωτική μελέτη με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Τα τρία από τα έξι πεπτίδια που συνθέσαμε μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν παρουσία διαλυτών με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Τα πεπτίδια που μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι.

- Μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v).
- Διάλυμα δωδεκυλοθειϊκού νατρίου SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) σε συγκέντρωση 8mM.

Ο διαλύτης **τριφθοροαιθανόλη** (TFE) ενισχύει την τάση των πεπτιδίων να σχηματίζουν ελικοειδή διαμόρφωση, ενώ το **δωδεκυλοθειϊκό νάτριο** SDS προσομοιάζει το λιπιδικό περιβάλλον των μεμβρανών και άρα είναι καθοριστικός παράγοντας για τη μελέτη της διαμόρφωσης των πεπτιδίων, καθώς πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια αποκτούν τη δευτεροταγή δομή τους μόνο όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των μικροοργανισμών, ενώ όταν βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα δεν έχουν μία καθορισμένη δομή. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων στους παραπάνω διαλύτες είναι 0,1 mM.

Στο σχήμα 7.1 παρουσιάζεται το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) των πεπτιδίων παρουσία του μίγματος τριφθοροαιθανόλης/νερού (TFE/H<sub>2</sub>O), ενώ στο σχήμα 7.2 παρουσιάζεται το φάσμα CD των πεπτιδίων παρουσία του διαλύτη δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS). Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα, στα οποία απεικονίζονται όλα τα πεπτίδια σε κάθε διαλύτη ξεχωριστά (σχήματα 7.3 , 7.4 , 7.5).

Από τις γραφικές παραστάσεις των φασμάτων συμπεραίνει κανείς ότι όλα τα πεπτίδια αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση, διότι παρουσιάζουν μία θετική κορυφή στα 192 nm και δύο αρνητικές κορυφές στα 208 nm και στα 222nm.

Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται τα ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης των πεπτιδίων. Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 7.1 συμπεραίνουμε ότι τα πεπτίδια αποκτούν ελικοειδή διαμόρφωση και στους δύο διαλύτες και σε ικανοποιητικά ποσοστά. Ωστόσο, σε διαλύτη SDS τα πεπτίδια εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης από ότι στο μίγμα TFE/H<sub>2</sub>O.

### 9.3 Αντιμικροβιακή δράση των πεπτιδίων

Η αντιμικροβιακή δράση των έξι πεπτιδίων μελετήθηκε σε δύο gram-θετικά βακτήρια, τρία gram-αρνητικά βακτήρια και σε έναν μύκητα (fungus). Τα στελέχη των μικροοργανισμών δίνονται στον πίνακα 8.1.

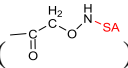
Τα πεπτίδια εμφανίζουν μέτρια δράση στα, υπό εξέταση, στελέχη των μικροοργανισμών με εξαίρεση το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 και το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, στο οποίο έγινε αντικατάσταση της Arg<sup>23</sup> του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 με ένα κατάλοιπο λυσίνης. Τα δύο πεπτίδια προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης του gram-θετικού βακτηρίου *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* με MIC= 50 µg/ml.

Οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των αντιμικροβιακών δράσεων των πεπτιδίων έναντι των μικροβιακών στελεχών μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική σύσταση του κυτταρικού φακέλου κάθε μικροοργανισμού. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης των πεπτιδίων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, διότι εξαρτάται τόσο από τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης όσο και από άλλα ενδοκυτταρικά μόρια του μικροοργανισμού.

#### 9.4 Κυτταροτοξική δράση των πεπτιδίων στα κύτταρα A549.

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των έξι πεπτιδίων απέναντι στην **κυτταρική σειρά A549**, που είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από πνεύμονα ανδρός Καυκάσιας φυλής και ηλικίας 58 ετών. Ο έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης έγινε με τη μέθοδο MTT, μία χρωματομετρική μέθοδος, που βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων των **ζωντανών κυττάρων** να διασπούν τους δακτυλίους τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT, [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], με αποτέλεσμα το σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων φορμαζάνης.

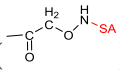
Τα πεπτίδια έδειξαν ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα A549 ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πεπτίδιο που ξεχώρισε είναι το **Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>**, το οποίο έδειξε αρκετά υψηλή κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις του, ακόμα και στις χαμηλές, διότι λήφθησαν πάρα πολύ χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων A549. Τα πεπτίδια Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-

NH<sub>2</sub> και Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> έχουν χαμηλότερες τιμές EC50 από το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του

φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37, που σημαίνει ότι έδειξαν καλύτερη κυτταροτοξική δράση από το φυσικό πεπτίδιο.

## 9.5 Αιμολυτική σταθερότητα

Τα έξι πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους εναντίον των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, RBC (Red Blood Cells). Η αιμόλυση εκφράζεται με τον όρο EC50, ο οποίος δηλώνει τη συγκέντρωση του πεπτιδίου (μg/mL) που προκαλεί λύση στο 50% του συνολικού πληθυσμού των ερυθροκυττάρων.

Από το σχήμα 8.25 παρατηρούμε ότι κανένα από τα πεπτίδια δεν προκαλεί αιμόλυση των ερυθροκυττάρων ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις με μόνη εξαίρεση το πεπτίδιο Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, το οποίο παρουσίασε EC50= 450μg/mL, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν ήταν τοξικό στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Τα πεπτίδια Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> παρουσιάζουν μηδενικά ποσοστά αιμόλυσης σε όλες τις συγκεντρώσεις.



Συμπεράσματα

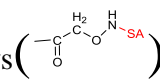






## 10. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, η ταυτοποίηση και ο καθαρισμός έξι κατιονικών πεπτιδικών αναλόγων του φυσικού ανθρώπινου αντιμικροβιακού πεπτιδίου **Cathelicidin LL-37** με στόχο την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών μέσων. Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων δίνονται παρακάτω. Η πρώτη αλληλουχία αντιστοιχεί στο κεντρικό ελικοειδές τμήμα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Leu**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ala**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Ο σκοπός της σύνθεσης των παραπάνω πεπτιδίων είναι η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μέσων. Επομένως, τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, την κυτταροτοξική τους δράση σε μία καρκινική κυτταρική σειρά και την τοξικότητά τους σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.

Τα τρία από τα έξι πεπτίδια που συνθέσαμε μελετήθηκαν ως προς τη διαμόρφωση που αποκτούν παρουσία διαλυτών με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι και τα τρία πεπτίδια αποκτούν ικανοποιητικά ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης παρουσία των διαλυτών SDS και μίγματος TFE/H<sub>2</sub>O.

Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης έδειξε ότι τα έξι πεπτίδια εμφανίζουν μέτρια δράση στα, υπό εξέταση, στελέχη των μικροοργανισμών με εξαίρεση το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 και το πεπτίδιο Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, στο οποίο έγινε αντικατάσταση της **Arg**<sup>23</sup> του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37 με ένα κατάλοιπο **λυσίνης**. Τα δύο πεπτίδια προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης του gram-θετικού βακτηρίου *Mycobacterium smegmatis mc*<sup>2</sup>*155* με MIC= **50 μg/ml**.

Από τα πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικής δράσης με τη μέθοδο MTT καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα πεπτίδια έδειξαν ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα A549 ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πεπτίδιο που ξεχώρισε είναι το **Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>**, το οποίο έδειξε αρκετά υψηλή κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις του, ακόμα και στις πιο χαμηλές, διότι λήφθησαν πάρα πολύ χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων A549. Τα πεπτίδια Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Ac-Phe-Lys( $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{C} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$ - $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{N} \end{matrix}$ -SA)-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> έχουν χαμηλότερες τιμές EC50 από το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37, που σημαίνει ότι έδειξαν καλύτερη κυτταροτοξική δράση από το φυσικό πεπτίδιο.

Κανένα από τα πεπτίδια που συνθέσαμε δεν προκαλεί αιμόλυση των ερυθροκυττάρων ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις με μόνη εξαίρεση το πεπτίδιο Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, το οποίο παρουσίασε EC50= 450μg/mL, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν ήταν τοξικό στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Τα πεπτίδια Ac-Phe-Lys( $\begin{matrix} \text{H}_2 \\ | \\ \text{C} \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$ - $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{N} \end{matrix}$ -SA)-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> παρουσιάζουν **μηδενικά ποσοστά αιμόλυσης** σε όλες τις συγκεντρώσεις.



Περίληψη και παράρτημα

*Summary*



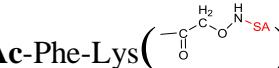
## 11.1 Περίληψη

Η Μικροβιολογία εξελίχθηκε ως επιστήμη το 19<sup>ο</sup> αιώνα με τη βελτίωση των μικροσκοπίων, που επέτρεψε την αναλυτικότερη παρατήρηση των μικροοργανισμών και την ανάπτυξη των βασικών εργαστηριακών τεχνικών, απαραίτητων για τη μελέτη των μικροοργανισμών. Η περίοδος από το 1857 έως το 1914 ονομάστηκε "Χρυσή Εποχή της Μικροβιολογίας", λόγω των σπουδαίων ανακαλύψεων των **Louis Pasteur** και **Robert Koch**. Οι ανακαλύψεις αυτές έθεσαν τις βάσεις της επιστήμης της σύγχρονης Μικροβιολογίας. Ένας σημαντικός σταθμός στην επιστήμη της Μικροβιολογίας είναι η ανακάλυψη των αντιβιοτικών. Τα **αντιβιοτικά** είναι χημικές ενώσεις με **αντιμικροβιακή** δράση που παράγονται από βακτήρια, μύκητες και φυτά. Το πρώτο αντιβιοτικό ανακαλύφθηκε τυχαία από τον Σκωτσέζο γιατρό και βακτηριολόγο **Alexander Fleming**, όταν παρατήρησε ότι η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων είχε ανασταλεί σε καλλιέργειες που είχαν επιμολυνθεί από ένα μύκητα του γένους *Penicillium*. Το 1929, ο Fleming ονόμασε την ουσία που παράγει ο συγκεκριμένος μύκητας ως **πενικιλίνη**. Από την ανακάλυψη της πενικιλίνης μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί 4.000 αντιβιοτικά από καλλιέργειες μικροβίων και 30.000 έχουν παρασκευασθεί ημισυνθετικά. Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία λοιμώξεων. Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων λόγω του αυξανόμενου αριθμού των ανθεκτικών, στη χρήση αντιβιοτικών, βακτηριακών στελεχών έχει οδηγήσει την έρευνα στην κατεύθυνση των **αντιμικροβιακών κατιονικών πεπτιδίων**.

Τα **κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια** (AMPs) παράγονται, στη φύση, από όλους τους οργανισμούς ως τμήμα της φυσικής ανοσίας τους απέναντι στην εισβολή των παθογόνων μικροοργανισμών και επομένως χαρακτηρίζονται και ως **φυσικά αντιβιοτικά**. Έχουν σχετικά μικρή μάζα (<10 kDa), οι αλληλουχίες τους κυμαίνονται από 10 έως και 50 αμινοξέα, φέρουν θετικό φορτίο με αριθμό οξείδωσης τουλάχιστον +2 (συνήθως 4, 5, 6), λόγω ύπαρξης των βασικών αμινοξέων αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης, διαθέτουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% υδρόφοβα αμινοξέα και μπορούν να αναδιπλώνονται σε μία τριτοταγή δομή, την **αμφιπαθητική διαμόρφωση**, όταν αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες των βακτηρίων. Το κίνητρο των ερευνητών στηρίζεται στο εύρος των εφαρμογών που προσφέρουν αυτά τα πεπτίδια, καθώς μπορούν να δράσουν ως αποτελεσματικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες είτε μόνα τους είτε σε συνεργασία με άλλα αντιβιοτικά καθώς

και άλλα αντιμικροβιακά πεπτιδία, οδηγώντας σε γρήγορο θάνατο του παθογόνου, να εξουδετερώσουν τις ενδοτοξίνες που ελευθερώνονται μετά τον θάνατο του βακτηρίου, να ρυθμίσουν τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας, καθώς και να προάγουν την αγγειογένεση και την επούλωση τραυμάτων. Μελέτες έδειξαν ότι τα AMPs έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, που περιλαμβάνει gram-αρνητικά και gram-θετικά βακτήρια, μύκητες, ιούς, παράσιτα καθώς και πρωτόζωα. Ορισμένα από τα πεπτιδία εμφανίζουν αντικαρκινική δράση, ενώ κάποια άλλα έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού της γρίπης τύπου A (influenza A virus), του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus) και του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Τα αντιμικροβιακά κατιονικά πεπτιδία πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως **θεραπευτικά μέσα**. Έτσι θα πρέπει να έχουν, εκτός από υψηλή αντιμικροβιακή δράση, χαμηλή έως και μηδενική τοξικότητα απέναντι στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα καθώς και πρωτεολυτική σταθερότητα.

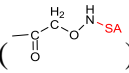
Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν έξι κατιονικά πεπτιδικά ανάλογα του φυσικού ανθρώπινου αντιμικροβιακού πεπτιδίου **Cathelicidin LL-37**. Οι αλληλουχίες των συντιθέμενων πεπτιδικών αναλόγων είναι οι ακόλουθες. Η πρώτη αλληλουχία αντιστοιχεί στο κεντρικό ελικοειδές τμήμα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37.

- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Leu**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ala**-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>
- ❖ **Ac**-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

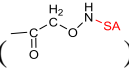
Τα πεπτιδία συντέθηκαν με τη μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield, σύμφωνα με την **Fmoc-tBu στρατηγική**. Ο καθαρισμός των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, **RP-HPLC** (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) και πιο συγκεκριμένα με την **ημιπαρασκευαστική** και **παρασκευαστική RP-HPLC**. Ο έλεγχος της καθαρότητάς τους πραγματοποιήθηκε με

**αναλυτική RP-HPLC**, ενώ η ταυτοποίηση της δομής τους με φασματοσκοπία μάζας **ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS** (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy). Η διαμόρφωση των τριών πεπτιδικών αναλόγων μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD). Όλα τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση απέναντι σε τρία **gram-αρνητικά**, δύο **gram-θετικά βακτήρια** και σε ένα **μύκητα**. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικής δράσης των πεπτιδίων με τη μέθοδο MTT απέναντι στην κυτταρική σειρά **A549**, που είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα από πνεύμονα ανδρός Καυκάσιας φυλής, ηλικίας 58 ετών. Επίσης, τα πεπτίδια μελετήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους εναντίον των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων.

Η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Πεπτιδοχημείας του Τμήματος Χημείας. Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης και της αιμολυτικής σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας. Η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης εναντίον των καρκινικών κυττάρων A549 πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Τεχνικών Υποδομών και Μεθόδων Χαρακτηρισμού και Ελέγχου Βιοδραστικότητας Ουσιών. Η διαμορφωτική μελέτη με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής.

Τα τρία από τα έξι πεπτίδια, στα οποία έγινε διαμορφωτική μελέτη με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού, αποκτούν ικανοποιητικά ποσοστά ελικοειδούς διαμόρφωσης παρουσία των διαλυτών SDS και μίγματος TFE/H<sub>2</sub>O. Τα αποτελέσματα των βιολογικών πειραμάτων έδειξαν μέτρια δράση στα, υπό εξέταση, στελέχη των μικροοργανισμών με εξαίρεση τα πεπτίδια Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Lys-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>, τα οποία προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης του gram-θετικού βακτηρίου *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* με MIC= **50 μg/ml**. Όλα τα πεπτίδια έδειξαν ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα A549 ακόμα και στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πεπτίδιο που ξεχώρισε είναι το **Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>**, το οποίο έδειξε αρκετά υψηλή κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις του, ακόμα και στις πιο χαμηλές. Τα πεπτίδια Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Ac-Phe-Lys()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> έχουν χαμηλότερες τιμές EC50 από το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 17-29 του φυσικού πεπτιδίου Cathelicidin LL-37, που σημαίνει ότι έδειξαν καλύτερη



κυτταροτοξική δράση από το φυσικό πεπτίδιο. Κανένα από τα πεπτίδια που συνθέσαμε δεν προκαλεί αιμόλυση των ερυθροκυττάρων ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις με μόνη εξαίρεση το πεπτίδιο Ac-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Leu-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> , το οποίο παρουσίασε EC50= 450μg/mL, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν ήταν τοξικό στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Τα πεπτίδια **Ac-Phe-Lys**()-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-**Leu**-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> και Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-**Lys**-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> παρουσιάζουν **μηδενικά ποσοστά αιμόλυσης** σε όλες τις συγκεντρώσεις.

## 11.2 Παράρτημα

### Συντομογραφίες

- ❖ **Ala (A):** (Alanine), Αλανίνη
- ❖ **Alloc:** (Alloxy carbonyl), Αλλυλοξυκαρβονυλο
- ❖ **Allyl:** Αλλυλομάδα
- ❖ **Arg (R):** (Arginine), Αργινίνη
- ❖ **Boc:** (tert-Butoxycarbonyl), tert-Βουτυλοξυκαρβόνυλο
- ❖ **Bom:** (Benzyloxymethyl), Βενζυλοξυμεθυλο
- ❖ **BOP:**[Benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate], Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλ-τρικ(διμεθυλαμινο) φωσφονίου
- ❖ **2-Br-Z:** (2-Bromobenzyloxycarbonyl), 2-Χλωροβενζυλοξυκαρβονυλο
- ❖ **Bzl:** (Benzyl), Βενζυλο
- ❖ **CD:** Circular Dichroism, Κυκλικός Διχρωϊσμός
- ❖ **Cys (C):** (Cysteine), Κυστεΐνη
- ❖ **DCC:** (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), N,N'-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
- ❖ **DCM:** (Dichloromethane), Διχλωρομεθάνιο
- ❖ **DIC:** (N,N'-Diisopropylcarbodiimide), N,N'-Δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο
- ❖  **DIEA:** (Diisopropylamine), Δίσοπροπυλοαιθυλαμίνη
- ❖ **DMF:**(Dimethylformamide), Διμεθυλοφορμαμίδιο
- ❖ **DMSO:** (Dimethylsulfoxide), Διμεθυλοσουλφοξειδίο
- ❖ **ELISA:** (Enzyme-linked immunosorbent assay), Ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου
- ❖ **EtOH:** (Ethanol), Αιθανόλη
- ❖ **ESI-MS:** (Electrospray Ionization- Mass Spectroscopy), Φασματοσκοπία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκάσμο
- ❖ **FBS:** (Fetal bovine serum), Ορός εμβρύου βοός
- ❖ **Fmoc:** (9-Fluorenylmethoxycarbonyl), 9-φλουορενελμεθοξυκαρβονυλο
- ❖ **Gln (Q):** (Glutamine), Γλουταμίνη
- ❖ **Glu (E):** (Glutamate), Γλουταμινικό

- ❖ **Gly (G):** (Glycine), Γλυκίνη
- ❖ **HF:** (Hydrogen Fluoride), Υγρό Υδροφθόριο
- ❖ **His (H):** (Histidine), Ιστιδίνη
- ❖ **HOBt:** (N-Hydroxybenzotriazole), N-Υδροξυβενζοτρίαζόλιο
- ❖ **HPLC:** High Performance Liquid Chromatography
- ❖ **Ile (I):** (Isoleucine), Ισολευκίνη
- ❖ **Leu (L):** (Leucine), Λευκίνη
- ❖ **Lys (K):** (Lysine), Λυσίνη
- ❖ **KCN:** (Potassiumcyanide), Κυανίουχο κάλιο
- ❖ **MBHA:** (4-methylbenzylamine), 4-μεθυλοβενζυλαμίνη
- ❖ **MeOH:** (Methanol), Μεθανόλη
- ❖ **Met (M):** (Methionine), Μεθειονίνη
- ❖ **MIC:** (Minimal Inhibitory Concentration), Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής
- ❖ **Mtt:** (4-Methyltrityl), 4-μεθυλοτριτυλο
- ❖ **MTT:**[3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
- ❖ **PAM:** Φαινυλοακεταμιδομεθυλ-ρητίνη
- ❖ **Pbf:** (2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl), 2,2,4,6,7-πενταμεθυλοδωδροβενζοφουρανο-5-σουλφόνυλο.
- ❖ **PBS:** (Phosphate-buffered saline), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- ❖ **Phe (F):** (Phenylalanine), Φαινυλαλανίνη
- ❖ **RP-HPLC:** Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography
- ❖ **Ser (S):** (Serine), Σερίνη
- ❖ **SPPS:** Solid Phase Peptide Synthesis
- ❖ **tBu:** (tert-Butyl), τερτ-Βουτυλο
- ❖ **TFA:** (Trifluoroacetic acid), Τριφθοροξικό οξύ
- ❖ **Thr (T):** (Threonine), Θρεονίνη
- ❖ **Tis:** Τριόξοπρόπυλοσιλάνιο

- ❖ **Tos:** (Tosyl), Τοζυλ
- ❖ **Tyr:** (Tyrosine), Τυροσίνη
- ❖ **Val:** (Valine), Βαλίνη
- ❖ **Wang:** (p-Benzyloxybenzyl Alcohol resin), (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη)
- ❖ **Xan:** (Xantyl), Ξανθενυλο
- ❖ **Z:** (Benzyloxycarbonyl), Βενζυλοξυκαρβονυλο

