



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Σχεδιασμός και ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων πρόληψης και αντιμετώπισης του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter*»

Ελισάβετ Αβραμίδου

Χημικός

Ιωάννινα, 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Σχεδιασμός και ανάπτυξη βιολογικών παραγόντων πρόληψης και αντιμετώπισης του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter*»

Ελισάβετ Αβραμίδου

Χημικός

Ιωάννινα, 2024

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Ιατρική Χημεία» κατά τη χρονική περίοδο 2022-2024.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βασίλειο Τσίκαρη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου έδινε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Του είμαι ευγνώμων, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεισδύσω στο χώρο της έρευνας, σ' ένα τόσο κάλο και φιλικό περιβάλλον.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος ΕΔΙΠ κ. Βασίλειο Μούση για την στήριξη και τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, στην διδάκτορα Ευγενία Φώτου, στην υποψήφια διδάκτορα Βασιλική Μουλασιώτη και στην μεταπτυχιακό Μαρία Παπαδάμη, που πάντα με καλή διάθεση και ενδιαφέρον στάθηκαν δίπλα μου, στηρίζοντας, βοηθώντας και συμπαραστέκοντας με καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που δίχως τη βοήθεια, την υπομονή και τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, τίποτα από όσα ισχύουν σήμερα δεν θα είχαν επιτευχθεί.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract.....	7
1. Το παθογόνο βακτήριο <i>Campylobacter</i>	8
1.1. Ιστορικά δεδομένα	8
1.2. Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά του <i>Campylobacter</i>	9
1.2.1. Ταξινόμια	9
1.2.2. Μικροβιολογία.....	10
1.2.3. Το γονιδίωμα του <i>Campylobacter jejuni</i>	11
1.3. Πηγές μόλυνσης από το <i>Campylobacter jejuni</i>	12
1.4. Κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία της λοίμωξης από το <i>Campylobacter jejuni</i>	13
1.5. Αντιγόνα του <i>Campylobacter jejuni</i>	15
1.5.1. Λιποολιγοσακχαρίτης LOS και κάψουλα.....	17
1.5.2. Μαστίγια και χημειοτακτισμός.....	17
1.5.3. Προσκόλληση και εισβολή	20
1.5.4. Τοξίνες	23
1.6. Παθογένεια του <i>Campylobacter jejuni</i>	24
2. Αντισώματα IgY	28
2.1. Ανοσοσφαιρίνες.....	28
2.2. Ανοσοσφαιρίνη IgY των ορνίθων.....	29
2.4. Παραγωγή και απομόνωση αντισωμάτων IgY	31
2.4.1. Ανοσοποιήσεις ορνίθων.....	31
2.4.2. Απομόνωση IgY ανοσοσφαιρίνης από αυγά όρνιθας.....	33
2.5. Εφαρμογές IgY αντισωμάτων.....	34
2.6. Τεχνολογίες εμβολίων	37

2.6.1.	Εμβόλια βασισμένα σε πεπτίδια	38
2.7.	Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (SOCn).....	40
3.	Πεπτιδική Σύνθεση.....	42
3.1.	Αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες	42
3.2.	Πεπτιδικός δεσμός	44
3.3.	Πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης	45
3.4.	Στερεό πολυμερικό υπόστρωμα.....	47
3.5.	Προστατευτικές ομάδες	48
3.6.	Αντιδραστήρια σύζευξης	51
3.7.	Αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη	55
3.8.	Μετασυνθετική ανάλυση	57
3.6.1.	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	57
3.6.2.	Φασματομετρία μάζας	58
3.6.3.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	59
4.	Σκοπός	62
5.	Πειραματικό μέρος	63
5.1.	Αντιδραστήρια και διαλύτες	63
5.2.	Επιλογή του αντιγόνου και της πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου.....	64
5.3.	Σύνθεση πεπτιδίου-επιτόπου	65
5.4.	Καθαρισμός πεπτιδίου-επιτόπου με RP-HPLC	67
5.5.	Ταυτοποίηση πεπτιδίου-επιτόπου με ESI-MS	67
5.6.	Ταυτοποίηση πεπτιδίου-επιτόπου με NMR.....	67
5.7.	Σχεδιασμός και σύνθεση πεπτιδικού φορέα	68
5.8.	Καθαρισμός πεπτιδίου-φορέα μέσω RP-HPLC.....	68
5.9.	Ταυτοποίηση πεπτιδίου-φορέα μέσω ESI-MS	69
5.10.	Σύνθεση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω θειοαιθερικού δεσμού.....	69
5.11.	Καθαρισμός συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου με RP-HPLC	70

5.12. Ταυτοποίηση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω ESI-MS	70
6. Αποτελέσματα	72
6.1. Επιλογή του αντιγόνου και της πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου.....	72
6.2. Σύνθεση πεπτιδίου-επιτόπου	81
6.3. Σχεδιασμός και σύνθεση πεπτιδικού φορέα	87
6.4. Σύνθεση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω θειοαιθερικού δεσμού.....	89
7. Συμπεράσματα	93
8. Μελλοντικοί στόχοι	94
Βιβλιογραφία	95
Συνομογραφίες.....	103

Περίληψη

Το παθογόνο βακτήριο *Campylobacter jejuni* έχει σημαντική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, καθώς αποτελεί αιτία για ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων με ανθρώπινη εντερική νόσο, η οποία ονομάζεται καμπυλοβακτηρίωση. Οι όρνιθες είναι ο κυριότερος φυσικός ξενιστής του *Campylobacter jejuni* και, εξαιτίας αυτού, το μολυσμένο κρέας κοτόπουλου αποτελεί την πιο συχνή πηγή μόλυνσης για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Ωστόσο, ενώ η μόλυνση των κοτόπουλων με το *Campylobacter jejuni* είναι ασυμπτωματική, η ανθρώπινη απόκριση στο παθογόνο είναι συμπτωματική. Η ανθρώπινη λοίμωξη εμφανίζεται συνήθως ως οξεία γαστρεντερίτιδα που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, κοιλιακό άλγος, πυρετό και διάρροια.

Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται πως η μείωση του αποικισμού του *Campylobacter* στο φυσικό-ξενιστή του αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση της συχνότητας της ανθρώπινης λοίμωξης. Έτσι, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση ενός ανοσογονικού συμπλέγματος ικανού να προκαλέσει την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter jejuni* όταν αυτό χορηγηθεί σε όρνιθες.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά, μελετήθηκαν διάφορες πρωτεΐνες-αντιγόνα του *Campylobacter jejuni* με στόχο την επιλογή μιας πεπτιδικής αλληλουχίας κατάλληλης να προκαλέσει την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων κατά του βακτηρίου-στόχου. Η αλληλουχία που επιλέχθηκε ως επίτοπος είναι η R²⁷¹SYNQKLSERRA²⁸² της πρωτεΐνης CadF. Το πεπτίδιο-επίτοπος επιλέχθηκε με βάση την ομολογία του με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες-αντιγόνα του βακτηρίου, την ύπαρξη γραμμικού επίτοπου στην δομή του, την υδροφιλικότητα, την προσβασιμότητα της επιφάνειάς του, την ευελιξία της δομής του, καθώς και με συνθετικά κριτήρια.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πεπτιδίου αυτού με τη μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης στερεής φάσης (SPPS), καθώς, επίσης, και ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του.

Έπειτα, ακολούθησε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μετασυνθετική ανάλυση ενός πεπτιδικού φορέα, πάνω στον οποίον, στη πορεία, τοποθετήθηκε το πεπτίδιο-επίτοπος, για την αύξηση της ανοσογονικότητάς του. Ο φορέας αυτός αποτελεί μια

παραλλαγή των ολιγοπεπτιδικών φορέων SOC και CPSOC, που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας.

Τα πεπτίδιο-επίτοπος συζεύχθηκε με τον φορέα, μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, για να σχηματίσουν ένα ανοσογονικό σύμπλεγμα. Τέλος, το ανοσολογικό σύμπλεγμα καθαρίστηκε και ταυτοποιήθηκε.

Abstract

The pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* has a significant impact on human health, as it is the cause of many cases of human intestinal disease, called campylobacteriosis. Poultry are the main natural host of *Campylobacter jejuni* and, due to this, contaminated chicken meat is the most common source of human infection. However, while the infection of chickens with *Campylobacter jejuni* is asymptomatic, the human response to the pathogen is symptomatic. Human infection usually presents as acute gastroenteritis characterized by inflammation, abdominal pain, fever and diarrhea.

Based on the above, it can be concluded that reducing *Campylobacter*'s colonization to its natural host is an effective strategy to decrease the incidence of human infection. Consequently, this master's thesis aimed to design and synthesize an immunogenic complex capable of inducing the production of specific antibodies against the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* when it is administered to hens.

For this purpose, initially, various antigens/proteins of *Campylobacter jejuni* were studied to select a peptide sequence-epitope capable of inducing the production of specific antibodies against the target bacterium. The sequence, which was selected as the epitope, is R²⁷¹SYNQKLSERRA²⁸² of the CadF protein. The peptide sequence was selected based on its homology with the other antigens/proteins of the bacterium, the existence of a linear epitope in its structure, its hydrophilicity, its surface accessibility, its structural flexibility and synthetic criteria, as well.

Subsequently, the antigenic peptide was synthesized by the solid-phase peptide synthesis (SPPS) methodology, and then, it was purified and identified.

Then, the design, the synthesis, and the post-synthetic analysis of a peptide carrier were followed. This carrier is a variant of the oligopeptide carriers SOC and CPSOC, which were developed in our laboratory.

The peptide-epitope were conjugated to the carrier, via thioether bonds, in order to increase its immunogenicity. Finally, the immunogenic complex was purified and identified.

1. Το παθογόνο βακτήριο *Campylobacter*

1.1. Ιστορικά δεδομένα

Η ιστορία του γένους *Campylobacter* ξεκινά το 1886, όταν έγινε η ανακάλυψη του από τον Theodor Escherich, ο οποίος παρατήρησε ένα σπειροειδές βακτήριο στο κόλον βρεφών που είχαν πεθάνει από αυτό που ονόμασε «infantum cholera»¹.

Οι πρώτες αναγνωρισμένες λοιμώξεις από το *Campylobacter* αναφέρθηκαν στις αρχές του 20ου αιώνα και εμφανίστηκαν σε ζώα φάρμας. Οι λοιμώξεις αυτές αποδόθηκαν σε ένα βακτήριο που προσομοιάζει με το *Vibrio*, το οποίο τώρα είναι γνωστό ότι πρόκειται για το *Campylobacter fetus*, και οι κτηνίατροι συμπέραναν ότι αποτελούσε την αιτία σηπτικών αμβλώσεων σε πρόβατα και βοοειδή.

Παρά το γεγονός ότι το *Campylobacter* είχε χαρακτηριστεί ως κτηνιατρική ασθένεια, για δεκαετίες δεν είχε αναγνωριστεί ως αιτία ανθρώπινης λοίμωξης. Πρώτη φορά, το 1947, ένα βακτήριο που προσομοιάζει με το *Vibrio* αναφέρθηκε ως υπεύθυνο για τη σηπτική αποβολή μιας γυναίκας. Ωστόσο, για τις επόμενες 3 δεκαετίες, θεωρούταν ότι ήταν ένα σπάνιο, ευκαιριακό, διεισδυτικό παθογόνο που εμφανιζόταν κυρίως σε εξασθενημένους ξενιστές². Παρόλα αυτά, σήμερα είναι γνωστό ότι η πρώτη τεκμηριωμένη ανθρώπινη μόλυνση που οφείλεται σ' αυτό το βακτήριο εμφανίστηκε το 1938 ανάμεσα σε κρατουμένους στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής σε ένα περιστατικό που σχετίζεται με το γάλα.

Το 1963, έγινε η μετονομασία του παθογόνου αυτού σε *Campylobacter* εξαιτίας της διαπίστωσης διαφορών με το βακτήριο *Vibrio* σε σχέση με τη σύνθεση των βάσεων του DNA, τις απαιτήσεις ανάπτυξης, καθώς και τον μεταβολισμό τους.

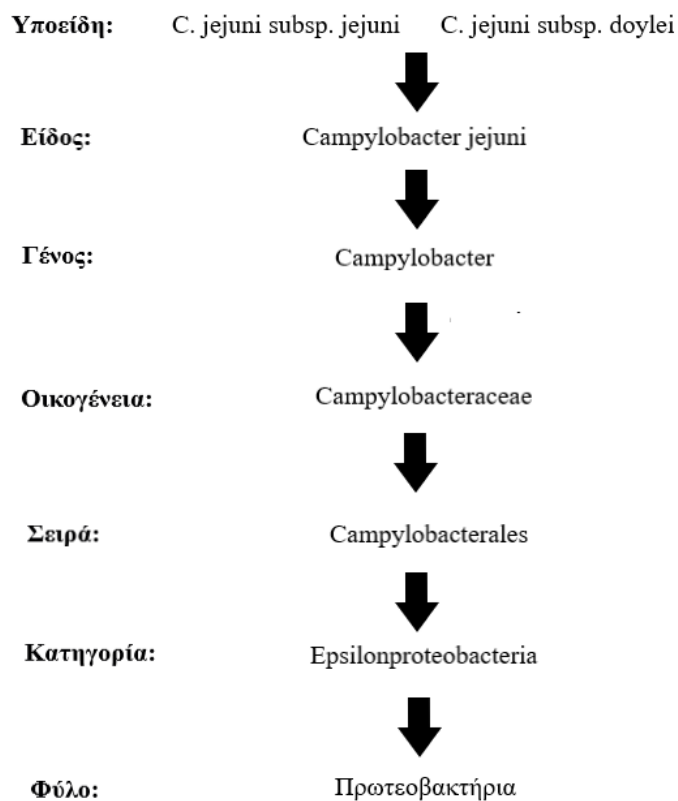
Ωστόσο, χρειάστηκε μέχρι το 1972 για να γίνει η απομόνωση του *Campylobacter* από τους Dekyser και Butzler, μέσω της ανάπτυξη μιας ειδικής τεχνικής διήθησης, από το αίμα και τα κόπρανα προηγουμένως υγιούς νεαρής γυναίκας με οξεία εμπύρετη αιμορραγική εντερίτιδα³.

Τέλος, η ανάπτυξη και η χρήση μεθόδων απομόνωσης του *Campylobacter* από δείγματα κοπράνων οδήγησε στην αναγνώριση της λοίμωξης από αυτό ως αιτία ανθρώπινης γαστρεντερικής νόσου, στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Έτσι, στα τέλη της δεκαετίας του 1980, έγινε η αποδοχή του *Campylobacter* ως μία από τις πιο κοινές βακτηριακές αιτίες διάρροιας παγκοσμίως².

1.2. Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά του *Campylobacter*

1.2.1. Ταξινόμια

Το γένος *Campylobacter* ανήκει στην οικογένεια *Campylobacteraceae*, που ταξινομείται στη σειρά *Campylobacterales*, στην κατηγορία *Epsilonproteobacteria*, η οποία ανήκει στο φύλο πρωτεοβακτήρια, όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Η εργασία αυτή εστιάζει στο είδος *Campylobacter jejuni*, το οποίο έχει δύο υποείδη, τα *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* και *Campylobacter jejuni subsp. doylei*⁴.



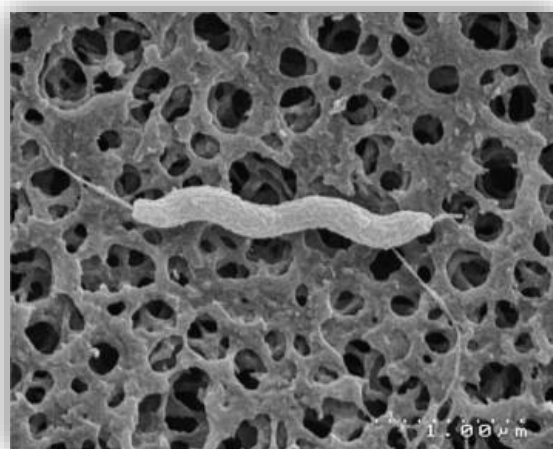
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης του είδους *Campylobacter jejuni*, καθώς, επίσης και της διαφοροποίησής του στα δυο υποείδη του.

Τα βακτήρια του γένους *Campylobacter* εμφανίζονται κυρίως ως κοινά παθογόνα σε ανθρώπους και οικόσιτα ζώα. Τα θερμοφιλά είδη *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lardis* και *Campylobacter upsaliensis* σχετίζονται περισσότερο με την ανθρώπινη γαστρεντερική νόσο², με κυριότερα τα *Campylobacter coli* και *Campylobacter jejuni* που αφορούν το 90% των περιπτώσεων³.

1.2.2. Μικροβιολογία

Το *Campylobacter jejuni* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που χαρακτηρίζεται ως μικροαερόφιλο και καπνοφιλικό και, συνεπώς, απαιτεί για την βέλτιστη ανάπτυξη του ατμόσφαιρες με 3-15% οξυγόνο, συμπληρωμένο με 2-10% διοξείδιο του άνθρακα, με εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης τους 30 με 47 °C⁴.

Από μορφολογική άποψη, τα κύτταρα του *Campylobacter jejuni* είναι συνήθως λεπτά, καμπυλοειδή, σχήματος S ή σπειροειδείς ράβδοι με έως και τέσσερις «περιελίξεις», έχοντας κωνικά άκρα. Το εύρος μεγεθών τους είναι 0,2–0,8 μm πλάτος και 0,5–5,0 μm μήκος και, επιπλέον, έχει ένα πολικό μαστίγιο στο ένα ή και στα δύο άκρα του κυττάρου και αυτό, πιθανώς υποβοηθούμενο από τη σπειροειδή μορφολογία του, προσδίδει υψηλό βαθμό κινητικότητας στο κύτταρο⁵. Μετά από έκθεση σε δυσμενείς συνθήκες, τα κύτταρα μπορεί να στρογγυλοποιηθούν σε κοκκοειδές σχήμα. Στην εικόνα 2 φαίνεται ένα τυπικό καμπυλωτό κύτταρο του *Campylobacter*⁶.



Εικόνα 2: Τυπικό καμπυλωτό κύτταρο *Campylobacter*.

Το *Campylobacter jejuni*, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Campylobacteraceae* λαμβάνουν ενέργεια από αμινοξέα ή ενδιάμεσα του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος, καθώς είναι μη σακχαρολυτικά και δεν ζυμώνουν ούτε οξειδώνουν τους υδατάνθρακες. Επιπλέον, δεν σχηματίζει σπόρους και είναι θετικό στην οξειδάση, στην καταλάση και στην ιππουρικάση, με τη τελευταία να αποτελεί το σημείο διάκρισης του με το *Campylobacter coli*¹.

1.2.3. Το γονιδίωμα του *Campylobacter jejuni*

Το γονιδίωμα του *Campylobacter jejuni* (συγκεκριμένα του *Campylobacter jejuni* NCTC11168) έχει εκτιμώμενο μέγεθος 1,64 Mb με ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης 30,6%. Το *Campylobacter jejuni* έχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα, το οποίο θεωρείται ότι κωδικοποιεί 1.654 πρωτεΐνες και 54 είδη RNA.

Το γονιδίωμα του θεωρείται ασυνήθιστο, καθώς έχει έλλειψη αλληλουχιών παρεμβολής (IS elements), τρανσποζονίων και αλληλουχιών που συσχετίζονται με προφάγους και, επιπλέον, έχει λίγες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες⁷.

Επιπρόσθετα, το *Campylobacter jejuni* εμφανίζει εκτεταμένη γενετική ποικιλομορφία, η οποία εκτιμάται ότι έχει προκύψει από ενδογονιδιωμιατικούς μηχανισμούς καθώς και από τη γενετική ανταλλαγή μεταξύ στελεχών⁸. Στο γονιδίωμα του υπάρχει έντονη παρουσία υπερμεταβλητών αλληλουχιών. Αυτές είναι σύντομες ομοπολυμερικές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων (homopolymeric tracts), οι οποίες έχουν βρεθεί κυρίως σε γονίδια που κωδικοποιούν τη βιοσύνθεση ή την τροποποίηση επιφανειακών δομών, όπως η κάψουλα, ο λιποολιγосακχαρίτης (LOS) και το μαστίγιο^{7,8}. Η ποικιλομορφία σε αυτές τις δομές θεωρείται ότι προκύπτει από μηχανισμούς όπως η παραλλαγή φάσης, ο διπλασιασμός και η διαγραφή γονιδίων, οι μετατοπίσεις πλαισίων ανάγνωσης και οι σημειακές μεταλλάξεις⁸. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία που εμφανίζει το *Campylobacter jejuni* υποδηλώνει ότι μπορεί να έχει έλλειψη ενζύμων επιδιόρθωσης DNA και αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι πολλά γονίδια επιδιόρθωσης του DNA που βρέθηκαν στο *Escherichia coli* δεν μπορούν να εντοπιστούν στο *Campylobacter jejuni*⁹.

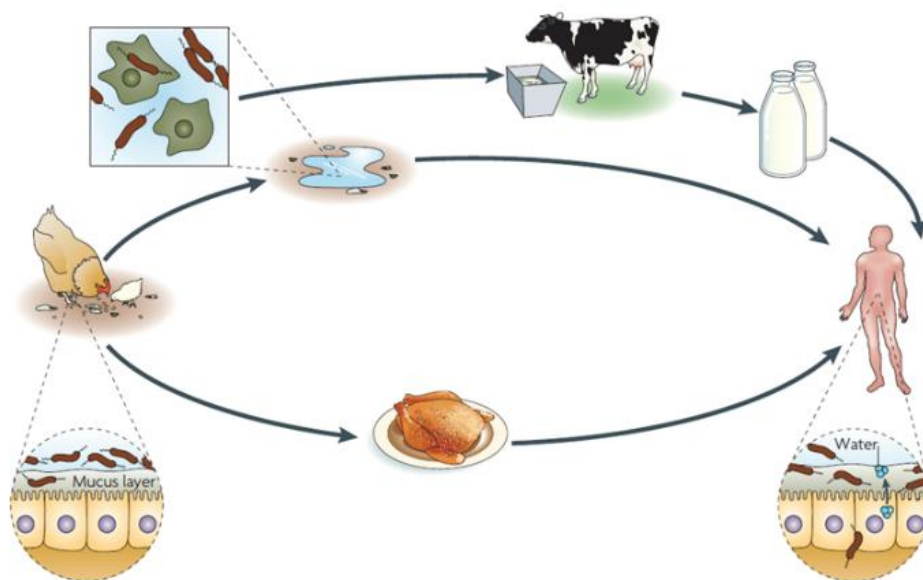
Ο υψηλός ρυθμός διακύμανσης αυτών των αλληλουχιών πιθανόν να είναι σημαντικός στη στρατηγική επιβίωσης του βακτηρίου⁷ και θεωρείται ότι η ταχεία αυτή διακύμανση των ιδιοτήτων της επιφάνειας του μπορεί να έχει μεγαλύτερη σχέση με τον αποικισμό ενός δυναμικού εντερικού περιβάλλοντος παρά με την ανοσολογική αποφυγή.

Συνεπώς, τα υψηλά επίπεδα διακύμανσης που παρατηρούνται στην αλληλουχία του *Campylobacter jejuni* σημαίνουν ότι δεν είναι δυνατό να παραχθεί μία μόνο αποδεκτή αλληλουχία για το γονιδίωμα του⁹.

1.3. Πηγές μόλυνσης από το *Campylobacter jejuni*

Τα διάφορα είδη *Campylobacter* θεωρούνται φυσιολογική μικροχλωρίδα της γαστρεντερικής οδού διαφόρων ζώων και πτηνών, όπως τα εμπορικά κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, τα οποία αποτελούν τους κύριους φορείς του. Υποστηρίζεται ότι τα πουλερικά είναι ο φυσικός ξενιστής για τα θερμόφιλα είδη *Campylobacter*, συμπεριλαμβανομένου του *Campylobacter jejuni*, και αποτελούν πηγή μόλυνσης περίπου για το 80% των ασθενειών. Επίσης, το *Campylobacter jejuni* αποτελεί συμβιωτικό βακτήριο στις γαστρεντερικές οδούς πολλών ζώων, όπως πτηνά και πουλερικά, χοίροι, πρόβατα, βοοειδή και κατοικίδια ζώα. Ακόμη, το μη επεξεργασμένο νερό και γάλα έχουν αναγνωριστεί ως αιτίες ορισμένων περιπτώσεων μόλυνσης από το βακτήριο αυτό³.

Έτσι, λοιπόν, πηγές μόλυνσης για τον άνθρωπο αποτελούν το πόσιμο νερό και τα διάφορα ζώα. Ωστόσο, καθώς η υδατογενής μόλυνση είναι λιγότερο πιθανή στον ανεπτυγμένο κόσμο, τα ζώα αποτελούν τη κύρια πηγή μόλυνσης. Συνεπώς, η κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων, όπως το μη παστεριωμένο γάλα ή το κρέας και, κυρίως, τα μολυσμένα προϊόντα κοτόπουλου, αποτελεί συχνό παράγοντα κινδύνου⁸. Το μολυσμένο νερό συμβάλλει στη μετάδοση του *Campylobacter* στα πτηνά και σε άλλα ζώα, ενώ η χρήση κοπριάς από διάφορα ζώα μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση των πηγών νερού, ολοκληρώνοντας έναν κύκλο μεταδόσης¹⁰. Στην εικόνα 3 φαίνονται οι πηγές μόλυνσης του ανθρώπου από το *Campylobacter*.



Εικόνα 3: Πηγές μόλυνσης από το *Campylobacter jejuni*⁸.

Το ευρύ φάσμα των ξενιστών σε συνδυασμό με την υψηλή γενετική ποικιλομορφία του *Campylobacter* καθιστούν δύσκολη την ανίχνευση και την απόδοση της αρχικής πηγής μόλυνσης. Ωστόσο, μοριακές τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου ή η μέθοδος τυποποίησης με βάση την αλληλουχία πολλαπλών γενετικών τόπων (MLST), που βασίζονται στη γενετική ομοιότητα μεταξύ στελεχών από ανθρώπους και τις διάφορες πηγές μόλυνσης, μπορούν να επιτρέψουν την αναγνώριση της προέλευσης των λοιμώξεων από *Campylobacter* στον άνθρωπο³.

1.4. Κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία της λοίμωξης από το *Campylobacter jejuni*

Η νόσος από το *Campylobacter* ονομάζεται καμπυλοβακτηρίωση και εμφανίζεται στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Η ασθένεια προκαλείται κυρίως από το *Campylobacter jejuni*, λιγότερο συχνά από το *Campylobacter coli* και, σπανιότερα, από άλλα είδη *Campylobacter*. Επιπλέον, υπολογίζεται ότι προκαλεί το 5-14% της διάρροιας σε παγκόσμιο επίπεδο¹¹. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει ότι οι λοιμώξεις από το *Campylobacter* είναι περισσότερο συχνές κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών¹⁰.

Τα πιο κοινά συμπτώματα της λοίμωξης από το *Campylobacter* είναι η οξεία διάρροια, το κοιλιακό άλγος, ο πυρετός και ο πονοκέφαλος. Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσος είναι αυτοπεριοριζόμενη, ωστόσο, περίπου το ένα δέκατο των εργαστηριακά επιβεβαιωμένων κρουσμάτων απαιτεί νοσηλεία¹².

Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από το *Campylobacter coli* δεν μπορεί να διακριθεί κλινικά από αυτή του *Campylobacter jejuni*. Η έναρξη των συμπτωμάτων εμφανίζεται συνήθως από 24 έως 72 ώρες μετά την μόλυνση και η κορύφωση της νόσου μπορεί να διαρκέσει από 24 έως 48 ώρες, περιλαμβάνοντας σε κάποιες περιπτώσεις κοιλιακό άλγος που μιμείται τη σκωληκοειδίτιδα¹⁰.

Σημαντικό είναι, επίσης, το γεγονός ότι υπάρχουν μερικές σπάνιες επιπλοκές που σχετίζονται με τη μόλυνση από *Campylobacter*. Μια από αυτές είναι το σύνδρομο Guillain-Barré (GBS), το οποίο εκτιμάται ότι εμφανίζεται σε 1 στις 1.000 περιπτώσεις μόλυνσης από το *Campylobacter jejuni*. Αποτελεί μια ασθένεια του

νευρικού συστήματος που μπορεί να οδηγήσει σε οξεία νευρομυϊκή παράλυση¹². Αιτία για τη εμφάνιση αυτής της επιπλοκής, καθώς, επίσης, και του συνδρόμου Miller-Fisher, που είναι μια παραλλαγή του προηγούμενου⁸, πιθανολογείται η δομική ομοιότητα ενός λιποολιγοσακχαρίτη (LOS) της επιφάνειας του *Campylobacter jejuni* με τα ανθρώπινα γαγγλιοσίδια. Αυτό έχει ως συνέπεια τα αντισώματα που παράγονται έναντι του *Campylobacter* να αναγνωρίζουν τα γαγγλιοσίδια του ξενιστή οδηγώντας στις προηγούμενες αυτοάνοσες διαταραχές¹¹. Ακόμη, μια τέτοια επιπλοκή αποτελεί το σύνδρομο Reiter, που επηρεάζει περίπου το 1% των περιπτώσεων μόλυνσης. Αποτελεί μια αντιδραστική αρθρίτιδα που μπορεί να επηρεάσει πολλές αρθρώσεις προκαλώντας πόνο¹². Τόσο τα σύνδρομα GBS και Miller-Fisher όσο και το σύνδρομο Reiter πιστεύεται ότι είναι αυτοάνοσες αποκρίσεις που πυροδοτούνται από μόλυνση¹³.

Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν την αύξηση της παγκόσμιας επίπτωσης από το *Campylobacter* την τελευταία δεκαετία. Ο αριθμός των λοιμώξεων έχει αυξηθεί στη Βόρεια Αμερική, στην Ευρώπη και στην Αυστραλία. Τα επιδημιολογικά δεδομένα από την Αφρική, την Ασία και τη Μέση Ανατολή είναι ελλιπή, ωστόσο, τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η μόλυνση από *Campylobacter* είναι ενδημική σε αυτές τις περιοχές.

Ο επιπολασμός των μολύνσεων ανάμεσα σε διαφορετικές χώρες ή περιοχές εντός της ίδιας χώρας μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως η ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης, η αυστηρότητα των πρωτοκόλλων βιοελέγχου, η επιτήρηση, οι πρακτικές τροφίμων και η διαθεσιμότητα των φυσικών πηγών μόλυνσης από το *Campylobacter jejuni* σε κάθε περιοχή. Επιπλέον, ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που θεωρείται ότι επηρεάζει τον επιπολασμό των λοιμώξεων από το *Campylobacter* είναι η ανοσία σε επίπεδο πληθυσμού¹⁰.

Έτσι, η μόλυνση των ανθρώπων από το *Campylobacter jejuni* είναι πολύ πιο συχνή στις αναπτυσσόμενες σε σχέση με τις αναπτυγμένες χώρες και επιπλέον στις δύο αυτές κατηγορίες παρουσιάζονται διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, συμπτωματική λοίμωξη εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά μικρής ηλικίας. Επιπλέον, στις αναπτυσσόμενες χώρες η φλεγμονώδης διάρροια είναι σημαντικά λιγότερο συχνή μεταξύ των ασθενών σε σχέση με τις αναπτυγμένες χώρες, ενώ η συμπτωματική λοίμωξη μεταξύ των ενηλίκων είναι ασυνήθιστη. Αυτά τα σημάδια οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στις

αναπτυσσόμενες χώρες έχει αναπτυχθεί ανοσία, η οποία πιθανολογείται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει υψηλή έκθεση των κατοίκων των χωρών αυτών στο παθογόνο στην πρώιμη ζωή τους¹⁴.

Πίνακας 1: Σύγκριση των χαρακτηριστικών της λοίμωξης από το *Campylobacter jejuni* στις αναπτυγμένες με αυτών στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Χαρακτηριστικό	Αναπτυγμένες χώρες	Αναπτυσσόμενες χώρες
Μέσος αριθμός μολύνσεων ισοβίως	0-1	>5
Κυρία ηλικιακή ομάδα που προσβάλλεται	Νέοι ενήλικες	Παιδιά < 2 χρόνων
Κύρια εκδήλωση της ασθένειας	Φλεγμονώδη διάρροια	Απλή διάρροια
Εκτεταμένη ανοσία ανάμεσα στους ενήλικες	Όχι	Ναι
Κύρια πηγή μόλυνσης	Πουλερικά	Άγνωστη

1.5. Αντιγόνα του *Campylobacter jejuni*

Για τη μείωση των ανθρώπινων λοιμώξεων από το *Campylobacter* απαιτείται η καλύτερη κατανόηση των βιολογικών πτυχών του παθογόνου και κυρίως των μηχανισμών λοιμογόνου δράσης του, που συμβάλλουν άμεσα στην παθογένεια της νόσου. Ωστόσο, οι μοριακές βάσεις αυτών μηχανισμών δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως¹⁵. Ο αποικισμός του *Campylobacter* στα κύτταρα-ξενιστές απαιτεί κινητικότητα, προσκόλληση, εισβολή και παραγωγή τοξινών¹⁶. Οι κύριοι βακτηριακοί παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου από το *Campylobacter jejuni* φαίνονται στον πίνακα 2 και εξετάζονται στην συνέχεια του κειμένου.

Πίνακας 2: Κύριοι βακτηριακοί παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου από το *Campylobacter jejuni*¹⁵.

Ρόλος	Βακτηριακοί παράγοντες	Χαρακτηριστικό
Κινητικότητα και χημοταξία	Flagellum	Ο-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση
	Flagellum FlgR-FlgS	Ρυθμιστής για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών των μαστιγίων
	Flagellum fliA(σ28)	Μεταγραφή γονιδίων του μαστίγιου
	Flagellum rpoN (σ54)	Μεταγραφή γονιδίων του μαστίγιου
	FlgP, FlgQ	Κινητικότητα μαστίγιου
	CheY	Ρυθμιστής της απόκρισης για την περιστροφή των μαστιγίων
Πρόσδεση και προσκόλληση	Flagellum	Μεταλλάξεις με μειωμένη κινητικότητα έχουν μειωμένη προσκόλληση
	LOS	Μοριακή μίμηση των γαγγλιοσιδίων που οδηγεί στο σύνδρομο Guillain-Barre
	CadF	Πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης που δεσμεύει τη ινονεκτίνη
	PEB1	Περιπλασματική πρωτεΐνη προσκόλλησης
	JlpA	Επιφανειακή λιποπρωτεΐνη
εισβολή	Flagellum	Μεταλλάξεις με μειωμένη κινητικότητα έχουν μειωμένη εισβολή
	LOS	Λιποολιγосακχαρίτης
	Cia (CiaB)	Αντιγόνα εισβολής
	CadF	Ενεργοποίηση των Rac1 και Cdc42
	CPS	Πολυσακχαρίτης κάψουλας
Τοξίνες	CdtA,B,C	Διακοπή του κυτταρικού κύκλου που οδηγεί σε απόπτωση και έκκριση της IL-8

1.5.1. Λιποολιγοσακχαρίτης LOS και κάψουλα

Η κυτταρική επιφάνεια του *Campylobacter jejuni* εμφανίζει διάφορες δομές, συμπεριλαμβανομένων πολλών πολυσακχαριτών, όπως είναι ο λιποολιγοσακχαρίτης LOS και η κάψουλα, που είναι σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου με τα κύτταρα-ξενιστές.

Ο λιποολιγοσακχαρίτης LOS έχει εξαιρετικά μεταβλητή δομή⁸. Το μόριο του LOS αποτελείται από έναν πυρήνα ολιγοσακχαρίτη και το λιπίδιο A και εξυπηρετεί διάφορες λειτουργίες, όπως η ανοσοδιαφυγή, η προσκόλληση και η εισβολή στο κύτταρο-ξενιστή. Η σιαλυλίωση του LOS αυξάνει την ικανότητα εισβολής, ενώ μειώνει την ανοσογονικότητα¹⁶. Ακόμη, όπως προαναφέρθηκε οι διάφορες δομές LOS του *Campylobacter jejuni* μοιάζουν με ανθρώπινα γαγγλιοσίδια και αυτή η μοριακή ομοιότητα θεωρείται ότι οδηγεί σε αυτοάνοσες διαταραχές.

Η κάψουλα αποτελεί, επίσης, έναν πολύ μεταβλητό πολυσακχαρίτη, που η δομή του έχει προσδιοριστεί για αρκετά στελέχη του *Campylobacter jejuni*. Είναι σημαντική για τη λοιμογόνο δράση, την προσκόλληση και την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Επιπλέον, ο πολυσακχαρίτης της κάψουλας είναι προσβάσιμος στο ανοσοποιητικό σύστημα και η εκτεταμένη διαφοροποίηση στη δομή του πιθανώς διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.

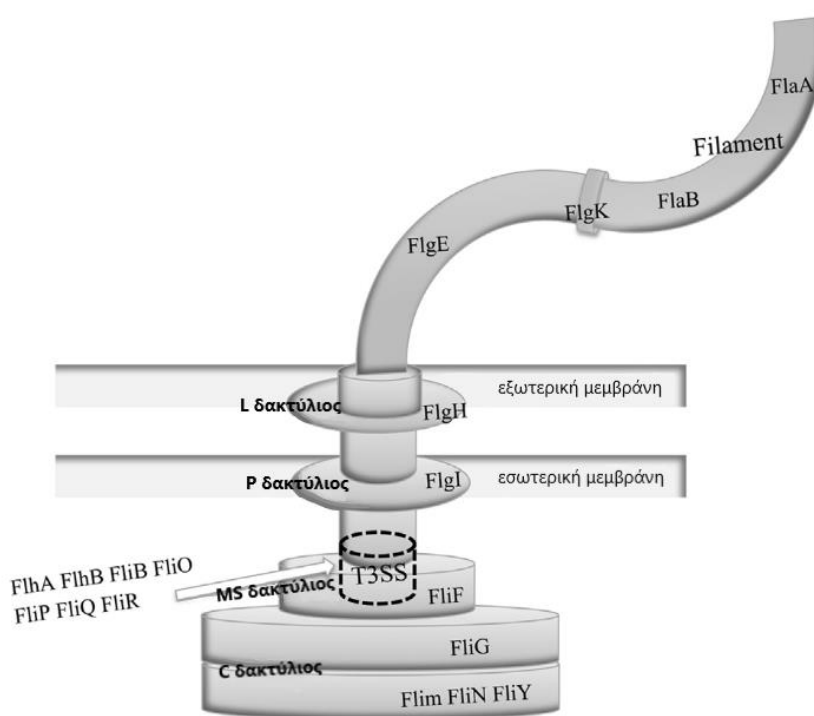
Άλλες δύο επιφανειακές δομές του *Campylobacter jejuni* είναι οι O-συνδεδεμένες γλυκάνες και οι N-συνδεδεμένες γλυκάνες. Οι N-συνδεδεμένες γλυκάνες, σε αντίθεση με άλλες δομές επιφανειακών υδατανθράκων, όπως το LOS και η κάψουλα διατηρείται σε όλα τα στελέχη *Campylobacter jejuni*, καθώς και στο *Campylobacter coli*⁸. Η N-γλυκοζυλίωση θεωρείται ότι διευκολύνει την ανοσοδιαφυγή, καθώς οδηγεί σε περιορισμένη παραγωγή αντισωμάτων έναντι του πρωτεϊνικού μέρους και, επιπλέον, οι N-συνδεδεμένες γλυκάνες προστατεύουν τις επιφανειακές πρωτεΐνες του *Campylobacter jejuni* έναντι των πρωτεασών του εντέρου¹⁶.

1.5.2. Μαστίγια και χημειοτακτισμός

Ιδιαίτερη σημασία για την βιολογία του *Campylobacter* έχουν τα μαστίγια του και ο χημειοτακτισμός του, δηλαδή η κινητικότητα των μαστιγίων του, καθώς

σχετίζονται με την εισβολή, την προσκόλληση, τον αποικισμό του στα κύτταρα-ξενιστές και τη λοιμογόνο δράση του⁸. Τα βακτήρια, όπως προαναφέρθηκε, είναι κινητά μέσω δύο μαστιγίων, ένα σε κάθε άκρο του βακτηριακού κυττάρου, δίνοντας του την δυνατότητα να κολυμπάει με μηχανισμό που μοιάζει με τιρμπουσόν (corkscrew-like mechanism). Το μαστίγιο, επίσης, συνεισφέρει στην έκκριση πρωτεϊνών στον εξωκυτταρικό χώρο¹⁷.

Το μαστίγιο αποτελείται από ένα κύριο σώμα και ένα εξωκυττάριο νήμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Το σώμα περιλαμβάνει: (1) μια βάση ενσωματωμένη στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, (2) μια ράβδο στο περίπλασμα και τις σχετικές δομές δακτυλίων και (3) ένα άγκυρο στην επιφάνεια. Το σύμπλεγμα του σώματος αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες. Μια από αυτές είναι η FliF, που σχηματίζει τον δακτύλιο MS στην εσωτερική μεμβράνη και συνδέει το συγκρότημα της ράβδου στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ και FliR συγκροτούν το σύστημα έκκρισης τύπου 3 (T3SS), που χρησιμεύει ως συσκευή εξαγωγής και έκκρισης πρωτεϊνών κατά την εισβολή στον ξενιστή. Ο δακτύλιος C αποτελείται από τις πρωτεΐνες FliG, FliM, FliN και FliY. Η πρωτεΐνη FlgI σχηματίζει τον P δακτύλιο στην πεπτιδογλυκάνη και η FlgH τον L δακτύλιο στην εξωτερική μεμβράνη. Οι FlgE και FliK συγκροτούν το άγκυρο στην επιφάνεια. Το εξωκυττάριο νήμα αποτελείται από πολυμερή της πρωτεΐνης flagellin (FlaA και FlaB)¹⁶.



Εικόνα 4: Το συγκρότημα του μαστίγιου με τα κύρια συστατικά και τις σχετικές πρωτεΐνες¹⁶.

Το μαστίγιο του *Campylobacter jejuni* είναι Ο-γλυκοζυλιωμένο μέσω ενός συστήματος πρωτεϊνογλυκοζυλίωσης που τροποποιεί τα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης στην πρωτεΐνη flagellin (FlaA και FlaB) του μαστιγίου⁸. Η Ο-γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης flagellin είναι απαραίτητη για τη σωστή συναρμολόγηση του νήματος του μαστιγίου, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι η Ο-γλυκάνη μπορεί να παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων flagellin μεταξύ τους ή με άλλα στοιχεία της συσκευής του μαστιγίου¹⁷. Πειράματα σε κουνάβια έδειξαν ότι ελλαττωματική Ο-γλυκοζυλίωση έχει ως αποτέλεσμα απώλεια κινητικότητας, μείωση της προσκόλλησης και εισβολής στα κύτταρα-ξενιστές και μειωμένη λοιμογόνο δράση⁸.

Ένα σύστημα μεταγωγής σήματος δύο συστατικών (FlgS και FlgR) είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της μεταγραφή πολλών γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση των μαστιγίων του *Campylobacter jejuni*. Επιπλέον, οι ρυθμιστές fliA (σ28), groN (σ54) και το γονίδιο housekeeping groD (σ70) συνδυάζονται για να εκφράσουν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα, στην έκκριση πρωτεϊνών (Cia) και στην εισβολή του βακτηρίου στα κύτταρα-ξενιστές. Ακόμη, έχουν αναγνωριστεί δύο πρωτεΐνες, γνωστές ως FlgP και FlgQ, οι οποίες θεωρούνται απαραίτητες για την κινητικότητα των μαστιγίων του αλλά ο ρόλος τους παραμένει ακόμα ασαφής. Επιπλέον, ρυθμιστές γονιδίων των μαστιγίων, όπως οι FlhC και FlhD, που είναι ζωτικής σημασίας σε άλλα είδη, απουσιάζουν στο γονιδίωμα του *Campylobacter jejuni*^{8,15}.

Τα βακτήρια και τα αρχαία κατευθύνουν την κίνηση των μαστιγίων τους σύμφωνα με την παρουσία συγκεκριμένων χημικών ουσιών, μια διαδικασία που ονομάζεται χημειοτακτισμός. Οι δομικές προϋποθέσεις του χημειοτακτισμού είναι η παρουσία τουλάχιστον ενός μαστιγίου, η ύπαρξη ενός συνόλου διαφορετικών υποδοχέων και, τέλος, η ύπαρξη ενός συστήματος μεταγωγής σήματος που να συνδέει τα δύο προηγούμενα¹⁸.

Έτσι, η αλλαγή της κατεύθυνσης της κίνησης του *Campylobacter* συμβαίνει ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα μέσω εναλλαγής μεταξύ της δεξιόστροφης και αριστερόστροφης περιστροφής του μαστιγίου. Μ' αυτό τον τρόπο, τα βακτήρια κινούνται προς ευνοϊκά περιβάλλοντα και απομακρύνονται από δυσμενή περιβάλλοντα. Τα εξωκυττάρια σήματα, τα οποία συχνά είναι σάκχαρα ή αμινοξέα, γίνονται αισθητά από υποδοχείς που ονομάζονται πρωτεΐνες χημειοτακτισμού που αποδέχονται το μεθύλιο (MCPs)⁸. Για το ανθρώπινο έντερο, τα εξωκυττάρια σήματα

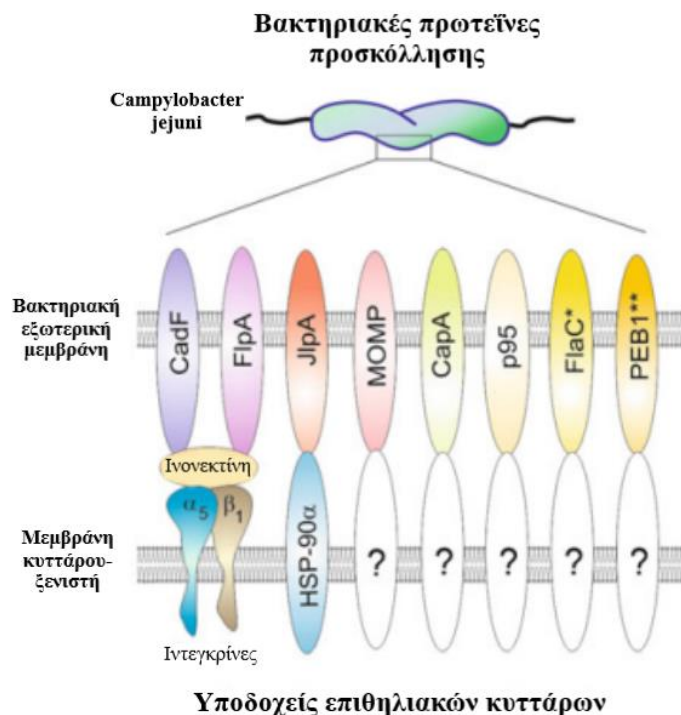
είναι κυρίως το ασπαρτικό οξύ, η ασπαραγίνη και το γαλακτικό γαλακτικό, ενώ στο έντερο του κοτόπουλου υπάρχει L-φουκόζη¹⁷.

Στην αλληλουχία του γονιδιώματος του *Campylobacter jejuni*, έχουν εντοπιστεί τα γονίδια χημειοτακτισμού: cheA, cheW, cheV, cheY, cheR και cheB. Το CheY, ως ρυθμιστής απόκρισης που ελέγχει την περιστροφή των μαστιγίων, παίζει τον κεντρικό ρόλο στην κινητικότητα και είναι ζωτικής σημασίας για τη λοιμογόνο δράση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο χημειοτακτισμός έχει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και την εισβολή στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα INT 407, καθώς τα βακτήρια που στερούνται γονιδίων χημειοτακτισμού, αν και είναι σε θέση να μεταναστεύσουν προς τη βλέννα μέσα στις κρύπτες του εντέρου, ωστόσο, δεν μπορούν να διεισδύσουν σ' αυτή και να προκαλέσουν νόσο.

Συνολικά, τα βακτηριακά μαστίγια και ο χημειοτακτισμός είναι σημαντικοί παράγοντες για την αρχική αλληλεπίδραση του *Campylobacter jejuni* με τα κύτταρα του ξενιστή και διευκολύνουν τον αποικισμό του εντέρου. Ωστόσο, οι οδοί μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την κινητικότητα και το χημειοτακτισμό του *Campylobacter jejuni* εξακολουθούν να παραμένουν ανοιχτές περιοχές για περαιτέρω έρευνες¹⁵.

1.5.3. Προσκόλληση και εισβολή

Οι μικροοργανισμοί τυπικά απαιτούν παράγοντες προσκόλλησης για τον αποικισμό τους στα κύτταρα των ξενιστών. Αρκετές πρωτεΐνες συμβάλλουν στην προσκόλληση του *Campylobacter jejuni* στα ευκαρυωτικά κύτταρα, πολλές από τις οποίες διακρίνονται στην εικόνα 5. Ωστόσο, στις περισσότερες πειπτώσεις, δεν είναι γνωστοί οι εμπλεκόμενοι υποδοχείς στα κύτταρα-ξενιστές⁸. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας των κλινικών συμπτωμάτων και του βαθμού στον οποίο τα στελέχη του *Campylobacter jejuni* προσκολλώνται στα κύτταρα του ξενιστή¹⁵.



Εικόνα 5: : Οι κύριες πρωτεΐνες προσκόλλησης του *Campylobacter jejuni* και οι εμπλεκόμενοι υποδοχείς των κυττάρων-ξενιστών¹⁷.

Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη CadF (*Campylobacter* adhesion to Fibronectin) συνδέεται ειδικά με τη ινονεκτίνη των επιθηλιακών κυττάρων. Η περιοχή δέσμευσης στην ινονεκτίνη της CadF αποτελείται από τα αμινοξέα 134-137 (FRLS). Έχει βρεθεί ότι η παρουσία της CadF απαιτείται για τη μέγιστη δέσμευση και εισβολή του *Campylobacter jejuni* στα κύτταρα-ξενιστές, καθώς οι μεταλλάξεις του γονιδίου *cadF* μειώνουν σημαντικά τον αποικισμό στις όρνιθες σε σύγκριση με την πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο άγριου τύπου¹⁹. Η CadF παίζει διπλό ρόλο καθώς πυροδοτεί την προσκόλληση του βακτηρίου στα κύτταρα-ξενιστές και, ταυτόχρονα, ενεργοποιεί διεργασίες σηματοδότησης που οδηγούν στην ενεργοποίηση των μικρών GTPασών, όπως είναι το Rac1 και το Cdc42, προκαλώντας έτσι την εσωτερίκευση του βακτηρίου¹⁵.

Ένας άλλος παράγοντας προσκόλλησης του *Campylobacter jejuni* που δρα μέσω αλληλεπίδρασης με τη ινονεκτίνη είναι η πρωτεΐνη FlpA. Η διαγραφή του γονιδίου *flpA* οδηγεί σε σημαντική μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης στα κύτταρα του εντέρου. Συνεπώς, είναι φανερό ότι τόσο η CadF όσο και η FlpA επιτρέπουν τη σύνδεση του *Campylobacter* στα κύτταρα-ξενιστές μέσω της ινονεκτίνης με συνεργατικό τρόπο¹⁷.

Μια άλλη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη προσκόλλησης είναι η JlpA, που αποτελεί μια επιφανειακή λιποπρωτεΐνη του *Campylobacter jejuni*. Η JlpA συνδέεται με το Hsp90α (heat shock protein 90 alpha) και η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί την κινάση της πρωτεΐνης NF-κB και την ενεργοποιημένην από μιτογόνο ρ38 (MAP) κινάση, που συμβάλλουν στις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Μια άλλη λιποπρωτεΐνη που ενοχοποιήθηκε, επίσης, ως πιθανή πρωτεΐνη προσκόλλησης είναι η CapA, που είναι ένας αυτομεταφορέας. Τα μεταλλαγμένα βακτήρια που φέρουν έλλειψη της CapA έχουν μειωμένη προσκόλληση στα κύτταρα Caco-2 του παχέος εντέρου και μειωμένο αποικισμό σε πειραματικά μοντέλα κοτόπουλου.

Παραδόξως, ορισμένες υποτιθέμενες πρωτεΐνες προσκόλλησης του *Campylobacter jejuni* εντοπίζονται στο περίπλασμα. Η πρωτεΐνη Peb1 είναι μια τέτοια πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται πως είναι σημαντική για την προσκόλληση παρά το γεγονός ότι βρίσκεται στο περίπλασμα⁸. Η Peb1 στην πραγματικότητα λειτουργεί ως μέρος ενός συστήματος μεταφορέα ασπαρτικού/γλουταμινικού ABC (ATP-binding cassette transporters), το οποίο απαιτείται για τη βέλτιστη μικροαερόβια ανάπτυξη σε δικαρβοξυλικά αμινοξέα¹⁷. Τα μεταλλαγμένα στελέχη του *Campylobacter jejuni* με έλλειψη του γονιδίου *peb1* δεν μπορούν να αναπτυχθούν εάν αυτά τα αμινοξέα είναι η κύρια πηγή άνθρακα και, επιπλέον, αποικίζουν στα ποντίκια σε μικρό βαθμό, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην απώλεια είτε της προσκόλλησης είτε των λειτουργιών μεταφοράς αμινοξέων ή και των δύο. Μια άλλη περιπλασματική πρωτεΐνη, η γλυκοπρωτεΐνη Cj1496c, η οποία έχει ομολογία με έναν μεταφορέα μαγνησίου και απαιτείται, επίσης, για την προσκόλληση στα κύτταρα ξενιστές. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτές οι περιπλασματικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στην προσκόλληση του *Campylobacter jejuni* στα κύτταρα-ξενιστές είναι ασαφής⁸.

Η πρωτεΐνη MOMP (major outer membrane protein), η οποία είναι επίσης γνωστή ως PorA, έχει επίσης προταθεί ότι συμβάλλει στην προσκόλληση του *Campylobacter jejuni* στα κύτταρα-ξενιστές. Ωστόσο, ο κύριος ρόλος της φαίνεται να είναι η μεταφορά θρεπτικών ουσιών και άλλων μικρών μορίων¹⁷.

Επιπλέον, το *Campylobacter jejuni* εκκρίνει μια πρωτεΐνη, που ονομάζεται CiaB, η οποία απαιτείται για την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε στελέχη που στερούνται το γονίδιο *ciaB* εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα αποικισμού σε κοτόπουλα. Ο μηχανισμός της έκκρισης CiaB και ο ρόλος του στην εισβολή έχει παρομοιαστεί με το μοντέλο των συστημάτων έκκρισης τύπου III, στα

οποία οι τελεστές εγγέονται απευθείας στα κύτταρα-ξενιστές. Ωστόσο, το *Campylobacter jejuni* δεν κωδικοποιεί σύστημα έκκρισης τύπου III και λείπουν στοιχεία για την άμεση έγχυση της CiaB. Αντίθετα, η CiaB και άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες Cia (CiaA-H) εκκρίνονται χρησιμοποιώντας το σύστημα έκκρισης του μαστιγίου, που προσομοιάζει στο σύστημα έκκρισης τύπου III. Το *Campylobacter jejuni* εκκρίνει, ακόμα, τη πρωτεΐνη FlaC, η οποία, επίσης, απαιτείται για την εισβολή. Έτσι, η συσκευή εξαγωγής των μαστιγίων είναι ένας σημαντικός μηχανισμός έκκρισης στο *Campylobacter jejuni* και απαιτείται για την εισβολή στα κύτταρα-ξενιστές⁸.

1.5.4. Τοξίνες

Τα μόνα γονίδια τοξίνης που υπάρχουν στο *Campylobacter* είναι κυτταροθανατηφόρες διασταλτικές τοξίνες (CDTs)¹⁵. Όταν κύτταρα-ξενιστές εκτίθενται στις τοξίνες αυτές οδηγούνται σε μια χαρακτηριστικά διευρυμένη κυτταρική επιφάνεια και σε κυτταρικό θάνατο, γεγονός που έδωσε στην τοξίνη το όνομά της¹⁷.

Η δραστική ολοτοξίνη αποτελείται από ένα τριμερές σύμπλεγμα των CdtA, CdtB και CdtC. Από αυτά, το CdtB είναι το τοξικό συστατικό, καθώς η επιμόλυνση των κυττάρων-ξενιστών μόνο μ' αυτή την υπομονάδα οδηγεί στα ίδια αποτελέσματα που παρατηρούνται από την ολοτοξίνη. Επίσης, εμφανίζει ενζυμική δράση DNάσης που, τελικά, οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στον κυτταρικό θάνατο⁸. Τα CdtA και CdtC είναι απαραίτητα για τη σύνδεση του βακτηρίου στο κύτταρο-ξενιστή¹⁵ και είναι υπεύθυνα για τη μετατόπιση του CdtB κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή. Η ολοτοξίνη CDT είτε εκκρίνεται απευθείας στον εξωκυτταρικό χώρο είτε συσκευάζεται σε κυστίδια, εισέρχοντας στον ξενιστή με σύντηξη στη μεμβράνη.

Μόλις το CdtB φτάσει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου, μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια της συσκευής Golgi για να εισέλθει στον κυτταρικό πυρήνα. Τόσο η ακτίνη όσο και τα συστήματα μικροσωληνίσκων βοηθούν στη μεταφορά του CdtB στον πυρήνα¹⁷. Η είσοδος της CdtB στον πυρήνα, η οποία εξαρτάται από ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού, είναι σημαντική για την

κυτταροτοξική δράση¹⁵. Μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, η CdtB προκαλεί θραύσματα διπλού κλώνου DNA, προκαλώντας διακοπή στη μετάβαση G1/S ή G2/M του κυτταρικού κύκλου, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου⁸. Αυτός ο μηχανισμός έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και την απενεργοποίηση της πυρηνικής κινάσης CDC2 μέσω φωσφορυλίωσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την είσοδο στη μίτωση, οδηγώντας σε απόπτωση του κυττάρου¹⁷.

Τέλος, η CDT είναι σε θέση να πυροδοτήσει την έκκριση της IL-8 στον άνθρωπο ως ανοσοαπόκριση, η οποία οδηγεί στη στρατολόγηση μακροφάγων και ουδετερόφιλων στο σημείο της μόλυνσης. Αντίθετα, στα κοτόπουλα δεν προάγει τη φλεγμονή του εντερικού επιθηλίου. Ομοίως, η CDT επάγει την παραγωγή αντισωμάτων μόνο στον άνθρωπο, αλλά όχι στα κοτόπουλα, γεγονός που υποδεικνύει την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων του *Campylobacter jejuni* από κάθε ξενιστή¹⁵.

1.6. Παθογένεια του *Campylobacter jejuni*

1.6.1. Επίδραση στον άνθρωπο

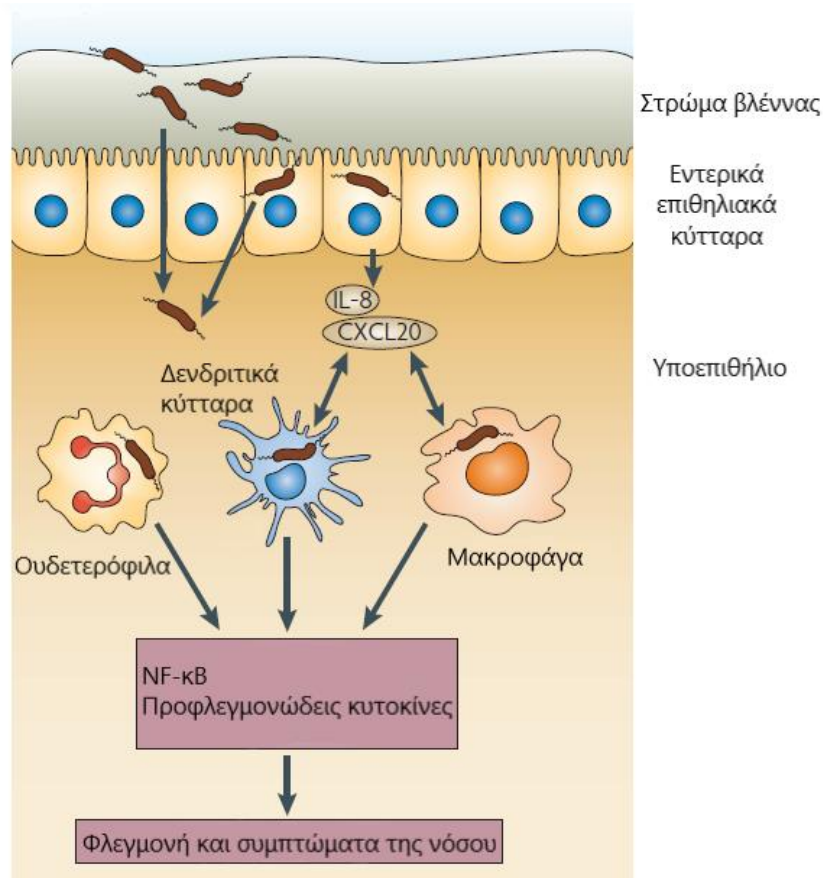
Το *Campylobacter jejuni* αποικίζει στην κατώτερη εντερική οδό στον άνθρωπο συχνά χωρίς να προκαλεί συμπτώματα¹⁵. Για να δημιουργηθεί μια λοίμωξη, το *Campylobacter jejuni* πρέπει να παρακάμψει τους μηχανικούς και ανοσολογικούς φραγμούς του γαστρεντερικού σωλήνα. Το στρώμα βλέννας των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα χρησιμεύει ως πρώτη γραμμή άμυνας, αλλά η κινητικότητα, η μορφολογία και η σχετικά μικρή Ο-πλευρική αλυσίδα του LOS συμβάλλουν στην ικανότητα του βακτηρίου να διεισδύει σ' αυτό το φράγμα. Μόλις το *Campylobacter jejuni* περάσει μέσα από το στρώμα βλέννας, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα υποκείμενα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιώντας τους διάφορους μηχανισμούς που περιεγράφηκαν παραπάνω⁸.

Έτσι, λοιπόν, στον άνθρωπο, το *Campylobacter jejuni* παρακάμπτει το βλενογόνο στρώμα και, έπειτα, αλληλεπιδρά και εισβάλλει στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας την παραγωγή κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη (IL)-8, η οποία είναι μία προφλεγμονώδης κυτοκίνη. Έτσι, αν και το *Campylobacter jejuni* διαθέτει μηχανισμούς εισβολής για να παραβεί το φυσικό φράγμα που παρουσιάζεται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, τα τελευταία στρατολογούν, με τη σειρά τους, στο

σημείο της μόλυνσης, φλεγμονώδη κύτταρα, δηλαδή δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα, τα οποία αλληλεπιδρούν με το *Campylobacter jejuni*^{8,15}. Επίσης, έχει βρεθεί πως η έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων στο *Campylobacter jejuni* έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της CXCL20, μιας κυτοκίνης που έχει εμπλακεί στη στρατολόγηση των δενδριτικών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την έκκριση αρκετών κυτοκινών, που οδηγούν τελικά στη φλεγμονή και στην εκδήλωση της νόσου⁸.

Επιπλέον, οι παράγοντες που περιγράφηκαν παραπάνω και παράγονται από το *Campylobacter jejuni* μπορούν να πυροδοτήσουν πυρηνικές αποκρίσεις όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η βλάβη του DNA, η απόπτωση και η προφλεγμονώδης παραγωγή κυτοκινών, που οδηγούν στη στατολόγηση ανοσοκυττάρων στα σημεία μόλυνσης. Η παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου και άλλων αντιβακτηριακών αποκρίσεων ενισχύουν την κυτταρική βλάβη, οδηγώντας σε καμπυλοβακτηρίωση και τελικά σε βακτηριακή κάθαρση¹⁷.

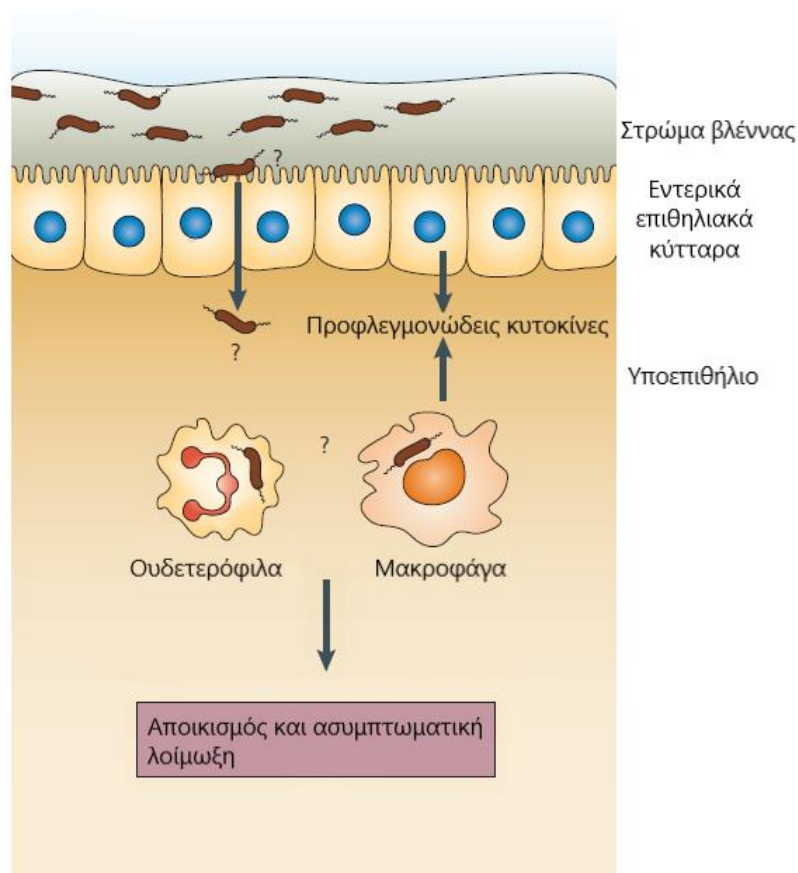
Στην εικόνα 6 φαίνονται σχηματικά όσα περιεγράφηκαν παραπάνω.



Εικόνα 6: Μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης απόκρισης στο *Campylobacter jejuni*⁸.

1.6.2. Επίδραση στις όρνιθες

Στις όρνιθες το *Campylobacter jejuni* κατοικεί κυρίως στη βλεννογόνο στοιβάδα στο τυφλό του εντέρου. Στοιχεία *in vitro* έχουν δείξει ότι το *Campylobacter jejuni* μπορεί να διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών από επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα, αλλά η επακόλουθη απόκριση του ξενιστή δεν οδηγεί τυπικά σε φλεγμονώδη απόκριση στα κοτόπουλα, όπως διακρίνεται στην εικόνα 7. Άγνωστοι παράγοντες είτε μειώνουν την ανοσολογική απόκριση είτε την ανακατευθύνουν προς την ανοχή. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα μπορεί επίσης να διαδραματίσουν ρόλο στον αποικισμό του *Campylobacter jejuni* στα κοτόπουλα, αλλά τυπικά δεν αναφέρεται εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα⁸.



Εικόνα 7:Μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά της απόκρισης των ορνίθων στο *Campylobacter jejuni*⁸.

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ της μόλυνσης του κοτόπουλου και των ανθρώπινων ξενιστών είναι η αξιοσημείωτα υψηλότερη ικανότητα του

Campylobacter jejuni να εισβάλει στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου έναντι των πτηνών. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η προσκόλληση του *Campylobacter jejuni* και η εισβολή στο επιθήλιο σχετίζεται πιθανότατα με την έκβαση της νόσου. Έτσι, ενώ η ανθρώπινη απόκριση στη μόλυνση είναι συμπτωματική, η μόλυνση των κοτόπουλων με το *Campylobacter jejuni* είναι κυρίως ασυμπτωματική⁸.

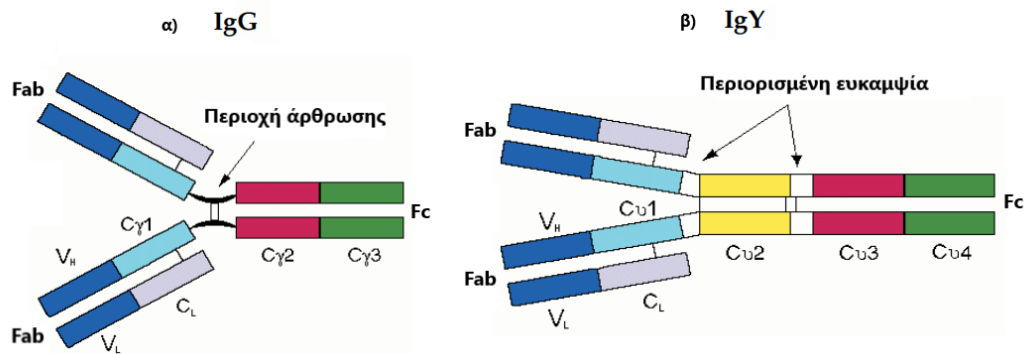
2. Αντισώματα IgY

2.1. Ανοσοσφαιρίνες

Τα αντισώματα, επίσης γνωστά και ως ανοσοσφαιρίνες (Igs), είναι γλυκοπρωτεΐνες που επιτρέπουν την αναγνώριση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου στον ορό. Παράγονται από κύτταρα πλάσματος που προέρχονται από B-κύτταρα. Τα αντισώματα εντοπίζονται κυρίως στο αίμα, τη σπλήνα, το μυελό των οστών, τον κρόκο του αυγού για τα πτηνά. Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσουν και να εξουδετερώσουν αντιγόνα, δηλαδή εισβάλλοντα βακτήρια, παράσιτα, τοξίνες, ιούς και άλλες ξένες ενώσεις.

Η βασική μονάδα του μορίου των ανοσοσφαιρινών αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο πανομοιότυπες ελαφριές και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες. Οι τέσσερις αυτές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ δύο διατηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης και σχηματίζουν το μόριο του αντισώματος που έχει μόρφη «Y». Κάθε ελαφριά αλυσίδα έχει δύο περιοχές που αποτελούνται από μια μεταβλητή περιοχή (V_L) στο αμινοτελικό της άκρο και μια σταθερή περιοχή (C_L) στο καρβοξυτελικό της άκρο, ενώ κάθε βαριά αλυσίδα περιέχει μια μεταβλητή περιοχή (V_H) στο αμινοτελικό της άκρο και τρεις σταθερές περιοχές (C_{H1-3}) στο καρβοξυτελικό της άκρο²⁰. Όλα τα αντισώματα εκτελούν ειδική δέσμευση με καθορισμένα αντιγόνα μέσω των μεταβλητών περιοχών τους. Η σύζευξη μιας ολόκληρης ελαφριάς αλυσίδας, L, ($V_L C_L$) με την πρώτη περιοχή της βαριάς αλυσίδας, H, ($V_H C_{H1}$) οδηγεί στο ($V_L C_L$)($V_H C_{H1}$), που ονομάζεται Fab (Fragment antigen binding, κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου), ενώ η σύζευξη C_{H2} και C_{H3} από τις δύο βαριές αλυσίδες, H, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ($C_{H2} C_{H3}$)($C_{H2} C_{H3}$), που ονομάζεται περιοχή Fc (Fragment crystalline, κρυσταλλικό κλάσμα). Στα περισσότερα Igs υπάρχουν, επομένως, δύο περιοχές Fabs και μία περιοχή Fc²¹. Στην εικόνα 8α φαίνονται οι δομές αυτές για την IgG ανοσοσφαιρίνη.

Οι ανοσοσφαιρίνες των θηλαστικών ταξινομούνται σε πέντε τάξεις, που είναι οι: IgA (διμερές), IgD (μονομερές), IgE (μονομερές), IgG (μονομερές) και IgM (πενταμερές). Σχεδόν και οι πέντε τάξεις, αποτελούνται από την ίδια βασική μονάδα ανοσοσφαιρίνης με ορισμένες τροποποιήσεις²⁰.



Εικόνα 8: α) Δομή IgG ανοσοσφαιρίνης και β) δομή IgY ανοσοσφαιρίνης²².

2.2. Ανοσοσφαιρίνη IgY των ορνίθων

Η ανοσοσφαιρίνη IgY παράγεται στα πτηνά, στα ερπετά και στα αμφίβια. Η IgY είναι η αντίστοιχη της IgG των θηλαστικών, καθώς θεωρείται εξελικτικός πρόγονος της τελευταίας²³.

Στα πτηνά οι ανοσοσφαιρίνες είναι τριών κύριων κατηγοριών, η IgA, η IgM και η IgY. Ωστόσο, μικρές ποσότητες των IgA και IgM ανιχνεύονται στο ασπράδι του αυγού, ενώ η IgY εντοπίζεται αποκλειστικά στον κρόκο του αυγού²⁴, καθώς μεγάλες ποσότητες του IgY του ορού των ωοπαραγωγών ορνίθων εναποτίθενται σ' αυτόν ώστε να προστατευθεί το αναπτυσσόμενο έμβρυο από πιθανά παθογόνα²⁵.

Η IgY, όπως και η IgG, αποτελείται από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες. Η βαριά αλυσίδα υποδεικνύεται με το ελληνικό γράμμα Y ή υ. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη βαριά αλυσίδα, γ, της IgG ανοσοσφαιρίνης των θηλαστικών, η βαριά αλυσίδα του IgY αποτελείται από τέσσερις σταθερές περιοχές. Το IgG περιέχει μια ευλύγιστη περιοχή μεταξύ C_{H1} και C_{H2}, που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης, ενώ στο IgY υπάρχουν δύο περιοχές, η μία μεταξύ C_{H1} και C_{H2} και η μία μεταξύ C_{H2} και C_{H3}, που περιέχουν κατάλοιπα προλίνης και γλυκίνης και επιτρέπουν περιορισμένη ευκαμψία²⁰. Στην εικόνα 8 διακρίνονται οι δομές των δυο αυτών ανοσοσφαιρινών. Η δομή της ανοσοσφαιρίνης IgY φαίνεται στην εικόνα 8β.

Υπάρχει κάποια ομολογία μεταξύ των περιοχών C_{γ3} και C_{γ4} της IgY και των περιοχών C_{γ2} και C_{γ3} της IgG θηλαστικών, ενώ η περιοχή C_{γ2} θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την ευκίνητη περιοχή της IgG. Η μειωμένη ευκαμψία του τμήματος Fab, με τη σειρά του, μπορεί να είναι ο λόγος για ορισμένες διαφορές μεταξύ IgY και

IgG όσον αφορά την αναγνώριση του επιτόπου ενός αντιγόνου. Όπως και στη IgG, η περιοχή Fc της IgY είναι η θέση πρόσδεσης των περισσότερων βιολογικών τελεστών. Τέλος, η ανοσοσφαιρίνη IgY περιέχει στη περιοχή Fc δύο πλευρικές αλυσίδες υδατανθράκων, σε αντίθεση με το IgG που πειέχει μόνο μία²⁴.

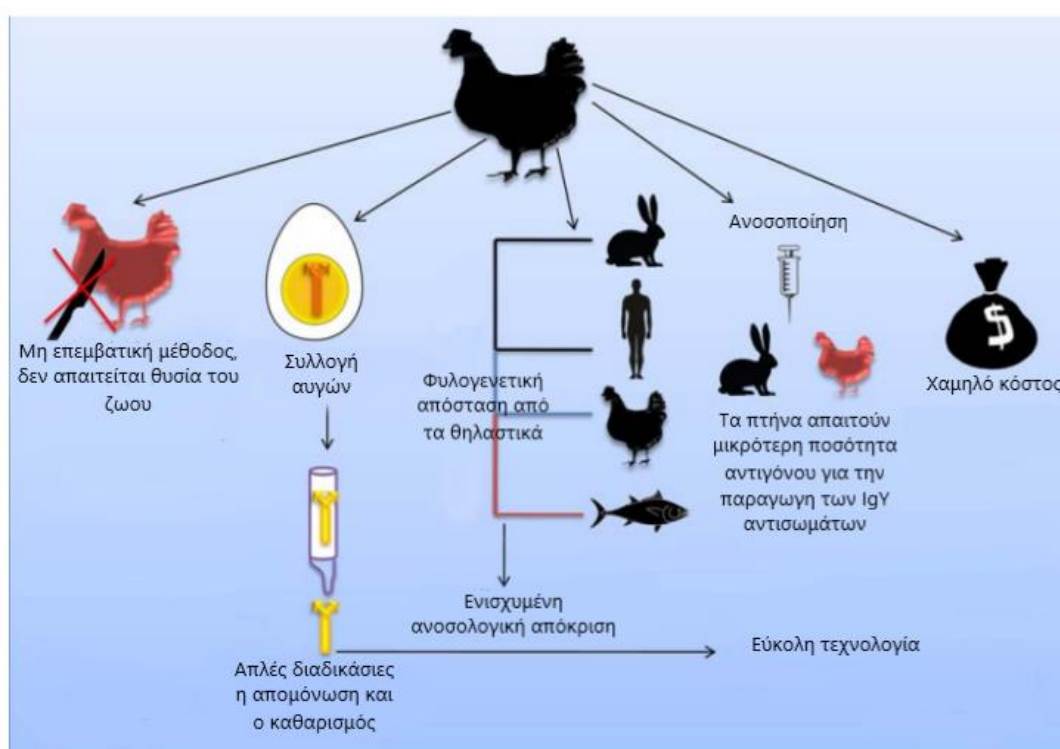
2.3. Πλεονεκτήματα IgY αντισωμάτων όρνιθας

Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα, στη διάγνωση και στη θεραπεία, συνήθως με τη μορφή μονοκλωνικών αντισωμάτων θηλαστικών, που παράγονται κυρίως από ποντίκια, ή ως πολυκλωνικά αντισώματα θηλαστικών, που τα παίρνουμε κυρίως από κουνέλια.

Ωστόσο, η παραγωγή αντισωμάτων στα θηλαστικά έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Το κύριο πρόβλημα της παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι ορισμένα αντιγόνα προκαλούν ασθενείς ή καθόλου ανοσοαποκρίσεις στα ποντίκια. Όσον αφορά την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων, ο καθαρισμός αντισωμάτων από το αίμα των θηλαστικών είναι δύσκολος και χαμηλής απόδοσης. Επιπλέον, η παραγωγή αντισωμάτων στα θηλαστικά περιλαμβάνει διαδικασίες που προκαλούν πόνο και στρες στα ζώα, όπως είναι η ίδια η ανοσοποίηση, η συλλογή δειγμάτων αίματος και η θυσία. Τα μειονεκτήματα των διαθέσιμων τεχνικών και το ενδιαφέρον για τα δικαιώματα των ζώων ενισχύουν την προσπάθεια ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων για την παραγωγή αντισωμάτων²⁶.

Εξαιτίας των παραπάνω, η χρήση πτηνών αντί θηλαστικών για την παραγωγή αντισωμάτων έχει αυξηθεί. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης πτηνών είναι ότι είναι μία μη επεμβατική μέθοδος, καθώς τα αντισώματα μπορούν να συλλεχθούν από τον κρόκο του αυγού αντί για τον ορό, καθιστώντας έτσι την αιμοληψία και τη θυσία του ζώου απαρχαιωμένες μεθόδους²⁷. Επιπλέον, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του IgY στον κρόκο του αυγού είναι υψηλή (15–25 mg/ml) και ότι μπορεί να ανακτηθεί από τα αυγά των ορνίθων για παρατεταμένες περιόδους, το IgY μπορεί να παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες, παρέχοντας, έτσι, υψηλές αποδόσεις αντισωμάτων (40 g/έτος/κότα). Επίσης, η εξελικτική απόσταση μεταξύ θηλαστικών και ορνίθων κάνει το IgY ένα μοναδικό μόριο, το οποίο δεν αλληλεπιδρά με τον ρευματοειδή παράγοντα, τους υποδοχείς Fc θηλαστικών και τα συστατικά του συστήματος συμπληρώματος²⁵. Ένα άλλο πλεονέκτημα βασίζεται στη φυλογενετική απόσταση

που έχουν τα πτηνά από τα θηλαστικά, το οποίο οδηγεί στο γεγονός ότι τα πτηνά έχουν ενισχυμένη ανοσολογική απόκριση έναντι συντηρημένων πρωτεϊνών των θηλαστικών, πράγμα που καθιστά την παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών των πρωτεϊνών πιο επιτυχημένη στις όρνιθες σε σύγκριση με τα θηλαστικά. Τέλος, η απομόνωση των αντισωμάτων μέσω της τεχνολογίας αυτής είναι εύκολη και με χαμηλό κόστος²⁸. Στην εικόνα 9 συνοψίζονται τα πλεονεκτήματα της χρήσης πτηνών για την παραγωγή αντισωμάτων.



Εικόνα 9: Πλεονεκτήματα χρήσης πτηνών για την παραγωγή αντισωμάτων²⁹.

2.4. Παραγωγή και απομόνωση αντισωμάτων IgY

2.4.1. Ανοσοποιήσεις ορνίθων

Η ανάπτυξη και η παραγωγή αντισωμάτων ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησης δεν είναι πολύ προβλέψιμες διαδικασίες. Τουλάχιστον τέσσερις μεταβλητές επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση του ανοσοποιημένου κοτόπουλου: το αντιγόνο (δόση,

μοριακό βάρος), το ανοσοενισχυτικό που χρησιμοποιείται, η οδός εφαρμογής και η ίδια η όρνιθα (όπως συνθήκες διατήρησης, ηλικία κτλ.)²⁴.

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί τύποι αντιγόνων για την παραγωγή IgY αντισωμάτων σε πτηνά. Τέτοιοι μπορεί να είναι είτε σύνθετα αντιγόνα (ιοί, βακτήρια και παράσιτα), είτε μεμονωμένα αντιγόνα (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, πεπτίδια και νουκλεϊκά οξέα)³⁰.

Η δόση αντιγόνου που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την προκύπτουσα ανοσοαπόκριση και τον τίτλο του αντισώματος. Για κάθε αντιγόνο, η βέλτιστη δόση που απαιτείται για μια επιτυχημένη ανοσοποίηση πρέπει να ελεγχθεί πειραματικά.

Η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων διευκολύνεται από τη χρήση ρυθμιστών που διεγείρουν τα Β-κύτταρα, δηλαδή ανοσοενισχυτικών. Παρά το γεγονός ότι η διέγερση αυτή είναι ανεξάρτητη από το αντιγόνο και επομένως δεν είναι ειδική, βελτιώνει την ανοσολογική απόκριση. Ωστόσο, η ανοσοποίηση των ορνίθων χωρίς τη χρήση οποιουδήποτε ανοσοενισχυτικού έχει, επίσης, ως αποτέλεσμα αποδεκτούς τίτλους αντισωμάτων. Υπάρχουν διάφορα ανοσοενισχυτικά και αυτά διαφέρουν ως προς τα χημικά τους χαρακτηριστικά, την αποτελεσματικότητά τους και τις δευτερεύουσες παρενέργειές τους στις εμβολιασμένες όρνιθες. Το πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (FCA) θεωρείται το πιο αποτελεσματικό ανοσοενισχυτικό, αλλά, δυστυχώς, αυτό το πλεονέκτημα συνδέεται με την ισχύ του να καταστρέφει τους ιστούς. Το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (FIA) είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το FCA, ωστόσο οδηγεί σε λιγότερες παρενέργειες.

Η πιο κοινή οδός ανοσοποίησης στις όρνιθες είναι η ενδομυϊκή οδός. Ωστόσο, η υποδόρια θεωρείται ότι προκαλεί υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων. Η ενδοφλέβια οδός πρέπει να πραγματοποιείται μόνο χωρίς τη χρήση ανοσοενισχυτικών. Επιπλέον, ένας συνδυασμός ενδομυϊκής και ενδοφλέβιας ανοσοποίησης συχνά αυξάνει σημαντικά τον τίτλο αντισωμάτων. Ωστόσο, ενδοφλέβια ανοσοποίηση πρέπει να γίνεται πολύ αργά (περίπου 500 μl σε 15 λεπτά) για να αποφευχθεί η αναφυλακτική αντίδραση.

Επιπλέον, η επιτυχία μιας ανοσοποίησης εξαρτάται από τα χρονικά διαστήματα μεταξύ της πρώτης, της δεύτερης και των επόμενων ανοσοποιήσεων. Η γενική σύσταση αναφέρει ότι το διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ένεσης αντιγόνου πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 εβδομάδες. Αυτό αντανakλά την ανοσολογική μνήμη, στην οποία πρέπει να δοθεί χρόνος για να αναπτυχθεί. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εφαρμογή συχνών ανοσοποιήσεων σε σύντομες χρονικές

περιόδους έχει ως αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή και όχι την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης.

Μετά την ανοσοποίηση το ανοσοποιητικό σύστημα δημιουργεί μια πρωτογενή απόκριση, ακολουθούμενη από μια δευτερογενή απόκριση που προκαλείται μετά την έγχυση της δεύτερης δόσης του ίδιου αντιγόνου. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες κινητικές του τίτλου αντισωμάτων στις όρνιθες μετά την πρώτη ανοσοποίηση δείχνουν μια παροδική αύξηση της IgY και η δεύτερη ανοσοποίηση χαρακτηρίζεται από μια αρχική αύξηση του τίτλου αντισωμάτων εντός περίπου 10 ημερών, ακολουθούμενη από πλάττώ για άλλες 10 ημέρες και έπειτα μείωση²⁴.

2.4.2. Απομόνωση IgY ανοσοσφαιρίνης από αυγά όρνιθας

Όσον αφορά την απομόνωση των αντισωμάτων, αρχικά, διαχωρίζεται ο κρόκος από το ασπράδι του αυγού με ένα διαχωριστικό. Στη συνέχεια, ο κρόκος μεταφέρεται σε διηθητικό χαρτί και αφήνεται να κυλήσει πάνω του για να αφαιρεθεί το υπόλοιπο ασπράδι του αυγού. Τέλος, κόβεται η μεμβράνη που περιβάλλει τον κρόκο και καταγράφεται ο όγκος του κρόκου³¹.

Έπειτα, σύμφωνα με τη μέθοδο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), ακολουθεί η διαδικασία της απολιπίδωσης. Προστίθεται PBS όγκου δύο φορές τον όγκο του κρόκου του αυγού και αναμειγνύεται με τον κρόκο. Στη συνέχεια προστίθεται PEG σε αναλογία 3,5 % w/v του συνολικού όγκου και αναδεύεται. Στο στάδιο αυτό το προκύπτον υγρό θα διαχωριστεί σε δύο φάσεις, η μία φάση αποτελείται από τα λιπίδια και τα στερεά του κρόκου και η άλλη φάση περιέχει το IgY. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).

Στη συνέχεια ακολουθεί η εκχύλιση των IgY. Για το σκοπό αυτό, συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο διηθείται και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα. Έπειτα, 8,5 % w/v PEG προστίθενται στο σωληνάριο. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm) και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα διαλύεται προσεκτικά σε 1 ml PBS και, έπειτα, PBS προστίθεται μέχρι τελικό όγκο 10 ml. Το διάλυμα αναμειγνύεται με 1,2 g PEG (12% w/v) και φυγοκεντρούνται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm). Το ίζημα διαλύεται προσεκτικά σε 800 μl PBS. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το εκχύλισμα σε νέα σωληνάριο, ξεπλένουμε τον αρχικό σωλήνα με 400 μl PBS και το προσθέτουμε στο νέο.

Τέλος, ακολουθεί η διαδικασία της διαπίδυσης για τον καθαρισμό των IgY. Έτσι, λοιπόν, το εκχύλισμα υποβάλλεται σε διαπίδυση κατά τη διάρκεια της νύχτας σε 0,1% w/v αλατούχο διάλυμα και αναδεύεται ήπια μέσω ενός μαγνητικού αναδευτήρα. Το επόμενο πρωί, το αλατούχο διάλυμα αντικαθίσταται από PBS και υποβάλλεται σε διαπίδυση για άλλες τρεις ώρες^{31,32}.

2.5. Εφαρμογές IgY αντισωμάτων

Στην ιατρική, τα IgY αντισώματα ορνίθων έχουν παραχθεί ενάντια σ' έναν μεγάλο αριθμό αντιγόνων και έχουν εφαρμοστεί για διάφορους σκοπούς, παρέχοντας μια εξαιρετική εναλλακτική των ομολόγων τους που προέρχονται από τα θηλαστικά²². Τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας IgY της έχουν επιτρέψει να χρησιμοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές στην ανθρώπινη και κτηνιατρική υγεία, που αφορούν τόσο θεραπευτικούς σκοπούς όσο και διαγνωστικούς³⁰.

Συνοπτικά, οι θεραπευτικές εφαρμογές των αντισωμάτων IgY θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τις διάφορες δράσεις τους στις εξής:

i. Αντιμικροβιακά:

Τα ειδικά αντισώματα IgY αποτελούν μια εναλλακτική λύση ως αντιμικροβιακά στην ανθρώπινη και κτηνιατρική υγεία ενόψει της εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων. Για παράδειγμα, σκόνη ολόκληρων αυγών ή κρόκων αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί ως φθηνή εναλλακτική λύση για τη θεραπεία εντερικών ασθενειών στην κτηνιατρική. Το πιο διάσημο παράδειγμα επιτυχούς θεραπευτικής και προφυλακτικής χρήσης του IgY είναι η θεραπεία μόσχων και χοιριδίων κατά του *Escherichia coli*. Συνεπώς, η χρήση της τεχνολογίας IgY για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων στα ζώα θα μπορούσε να βοηθήσει στο περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, ώστε να περιοριστεί το πρόβλημα ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών³⁰.

ii. Αντι-ιικοί παράγοντες:

Η θεραπευτική δυνατότητα των αντισωμάτων IgY έναντι ιογενών λοιμώξεων του γαστρεντερικού σωλήνα σε ζώα έχει διερευνηθεί εκτενώς. Για παράδειγμα, η από του στόματος χορήγηση σκόνης κρόκου αυγού πλούσιας σε IgY κατά του ροταϊού της ομάδας A των βοοειδών (RVA) πραγματοποιήθηκε σε μόσχους που είχαν μολυνθεί

από τον ιό και είχε ως αποτέλεσμα εξασθένιση της νόσου. Επιπλέον, η προστατευτική δράση του IgY έναντι του ιού της γρίπης έχει μελετηθεί ευρέως. Αντισώματα IgY κατά του ιού της γρίπης των πτηνών (H5N1) απομονώθηκαν από αυγά που διατίθενται σε σούπερ μάρκετ του Βιετνάμ, όπου απαιτείται ο εμβολιασμός των κοτόπουλων κατά του ιού H5N1. Το Anti-H5N1 IgY χορηγήθηκε ενδορινικά σε ποντίκια πριν και μετά τη μόλυνση τους με H5N1 και H5N2 και απέτρεψε πλήρως την εμφάνιση της νόσου³⁰.

iii. Αντιπαρασιτικοί παράγοντες:

Μια άλλη προσέγγιση αφορά την προφυλακτική θεραπεία των ζώων κατά των εντερικών παρασίτων. Στην κτηνοτροφία, τα ζώα έχουν πολύ στενή επαφή μεταξύ τους και επομένως έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης μέσω των δικών τους κοπράνων. Η εντατική εκτροφή αυξάνει επίσης τη συχνότητα λοιμώξεων από εντερικά παράσιτα, όπως για παράδειγμα το *Strongylides*, γεγονός που προκαλεί μεγάλα προβλήματα στους αγρότες. Συνεπώς, η χρήση IgY αντισωμάτων για αντιπαρασιτικές θεραπείες θα ήταν χρήσιμη προκειμένου να αποφευχθεί η προφυλακτική αντιβιοτική θεραπεία²⁴.

iv. Αντικαρκινικά:

Όπως προαναφέρθηκε, η φυλογενετική απόσταση μεταξύ πτηνών και θηλαστικών οδηγεί σε μια ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση των πτηνών έναντι αντιγόνων των θηλαστικών. Αυτό το χαρακτηριστικό θα μπορούσε να είναι ευνοϊκό για την παραγωγή IgY έναντι ανθρώπινων αντιγόνων όγκου. Με βάση αυτό έχει γίνει παραγωγή εξαιρετικά ειδικών IgY έναντι μιας αλληλουχίας 21 αμινοξέων που υπάρχουν στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα TRAIL-R2 (DR5), ενός συζευγμένου με TNF υποδοχέα που επάγει απόπτωση. Τα αντισώματα δεσμεύτηκαν στην αλληλουχία αμινοξέων και ενεργοποίησαν τους υποδοχείς DR5 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF7, ενεργώντας ως αγωνιστής του TRAIL και πυροδότησαν την απόπτωση. Συμπερασματικά, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα αντισώματα IgY που παράγονται έναντι των αντιγόνων όγκου είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση για μια πιο επιλεκτική αντικαρκινική θεραπεία³⁰.

Όσον αφορά τις εφαρμογές των IgY αντισωμάτων στη διάγνωση μπορούν να συνοψιστούν στις εξής:

i. Διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων:

Τα αντισώματα IgY βρίσκουν εφαρμογή στη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων. Μια από τις πιο μελετημένες περιπτώσεις διαγνωστικής ικανότητας των IgY είναι κατά του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Το γεγονός ότι το τμήμα Fc του IgG αντιδρά με τη σταφυλοκοκκική πρωτεΐνη A, ενώ λόγω δομικών διαφορών, το τμήμα Fc του IgY δεν αντιδρά, καθιστά το IgY καλύτερο για πιο ειδική ανίχνευση διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου και των τοξινών τους³³. Στην ίδια βάση έγινε παραγωγή IgY αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης που δεσμεύει το ινωδογόνο (Efb) του *Staphylococcus aureus* και ενάντια σε έναν πεπτιδικό επίτοπο που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 127-140 της πρωτεΐνης Efb. Τόσο τα αντισώματα Anti-Efb όσο και τα anti-Efb¹²⁷⁻¹⁴⁰ παρουσίασαν υψηλούς τίτλους στην ELISA, υποδεικνύοντας τη πολλά υποσχόμενη χρήση στη διάγνωση³⁴.

ii. Διάγνωση ιογενών λοιμώξεων:

Η ικανότητα του IgY να ανιχνεύει ιικά παθογόνα της γαστρεντερικής οδού σε ανθρώπους και ζώα έχει μελετηθεί ευρέως. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη IgY αντισωμάτων έναντι ιικών σωματιδίων *Parvovirus* που χρησιμοποιήθηκαν στην ELISA και στην ανοσοχρωματογραφία, δείχνοντας ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση του *Parvovirus* σε δείγματα κοπράνων σκύλων³⁵. Μια ακόμη ενδιαφέρουσα προσέγγιση αφορά τη παραγωγή IgY αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (NP) του κοροναϊού. Το Anti-NP IgY, που χρησιμοποιείται ως αντίσωμα στην ELISA για την ανίχνευση του NP, μείωσε το όριο ανίχνευσης σε επίπεδο pgr, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αντισώματα IgY είναι πολλά υποσχόμενο για χρήση στη διάγνωση του οξέος αναπνευστικού συνδρόμου που σχετίζεται με τον κοροναϊό (SARS-CoV) και είναι αρκετά ευαίσθητο ώστε να ανιχνεύει μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης NP³⁶.

iii. Διάγνωση παρασιτικών λοιμώξεων:

Ακόμη, η χρήση των αντισωμάτων IgY για τη διάγνωση παρασιτικών λοιμώξεων αποτελεί σημείο έρευνας. Ένα παράδειγμα είναι η αξιολόγηση της δυνατότητας του IgY στην ανίχνευση του πρωτοζώου *Toxoplasma gondii*, παράγοντας IgY έναντι της επιφανειακής πρωτεΐνης SAG-1, η οποία αντέδρασε με το αντιγόνο-στόχο σε ELISA και Western blot³⁷. Σε άλλη ενδιαφέρουσα έρευνα, αναπτύχθηκε μια έμμεση ELISA που χρησιμοποιεί αντισώματα IgY για την ανίχνευση της καθεψίνης F, μιας

πρωτεΐνης κυστεΐνης που υπάρχει στο *Opisthorchis viverrini*. Αυτή η ανάλυση έδειξε καλή ευαισθησία στην ανίχνευση του *Opisthorchis viverrini* σε δείγματα κοπράνων από ανθρώπους που ζούσαν σε ενδημικά μέρη. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις και, συνεπώς, απαιτούνται βελτιώσεις για την διαθεσιμότητα αυτής της τεχνολογίας³⁸.

iv. Διάγνωση όγκων:

Η δυνατότητα χρήσης του IgY στην ανίχνευση καρκινικών δεικτών έχει ερευνηθεί αρκετά. Εξαιτίας της φυλογενετική απόσταση μεταξύ πτηνών και θηλαστικών και της επακόλουθης ισχυρότερης ανοσολογικής απόκρισης των πτηνών έναντι αντιγόνων των θηλαστικών, καθίσταται η παραγωγή IgY αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων όγκου επωφελής όχι μόνο για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αλλά και για την ανίχνευση όγκων σε ανθρώπους³⁰. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα IgY αντισώματα έναντι του πεπτιδικού αντιγόνου CA 15-3, που είναι ένας κοινώς χρησιμοποιούμενος δείκτης του καρκίνου του μαστού. Τα αντισώματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ως δευτερογενές αντίσωμα σε ELISA σάντουιτς με στόχο την ανίχνευση του CA 15-3, δείχνοντας δυνατότητα κλινικής χρήσης³⁹.

2.6. Τεχνολογίες εμβολίων

Η συμβολή των εμβολίων στην πρόληψη ασθενειών είναι αδιαμφισβήτητη. Συνεπώς, η ανάγκη για την ανάπτυξη επιτυχημένων εμβολίων οδήγησε στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος τεχνολογιών με την πάροδο των χρόνων. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν: ζώντα εξασθενημένα βακτήρια και ιούς, αδρανοποιημένα βακτήρια και ιούς, εμβόλια υπομονάδων (χρησιμοποιούν τμήμα του παθογόνου, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, πολυσακχαρίτες κτλ.), σωματίδια που μοιάζουν με ιούς (VLPs), τεχνολογία mRNA, ανάπτυξη και χρήση ανοσοενισχυτικών, κ.α.^{40,41}

Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα εμβόλια σήμερα βασίζονται είτε σε αδρανοποιημένα είτε σε ζώντα εξασθενημένα βακτήρια και ιούς και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την αντιμετώπιση πολλών κτηνιατρικών και ανθρώπινων ασθενειών. Ωστόσο, εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα.

Όσον αφορά τα αδρανοποιημένα εμβόλια, αυτά πρέπει να είναι εντελώς αβλαβή και μη μολυσματικά. Σε μερικές περιπτώσεις, έχουν εμφανιστεί προβλήματα που οφείλονταν σε ελλιπή αδρανοποίηση τους. Επιπλέον, η κατασκευή τέτοιων εμβολίων απαιτεί την καλλιέργεια μεγάλων ποσοτήτων του μολυσματικού παράγοντα και, συνεπώς, υπάρχει κίνδυνος για το προσωπικό και το περιβάλλον. Τα εμβόλια που καλλιεργούνται σε αυγά, ιστοκαλλιέργειες ή απλά μέσα καλλιέργειας μπορεί να περιέχουν ανεπιθύμητες «ξένες» πρωτεΐνες, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανοσογονικότητα ή να είναι δυνητικά αλλεργιογόνα. Τέλος, τα αδρανοποιημένα εμβόλια, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να προκαλέσουν περιορισμένη και μικρής διάρκειας ανοσολογική απόκριση.

Τα εξασθενημένα εμβόλια πρέπει να ελέγχονται με μεγάλη ακρίβεια ώστε, παρέχοντας το απαιτούμενο επίπεδο προστατευτικής ανοσίας, να μην προκαλούν σημαντικά συμπτώματα ασθένειας στο ξενιστή. Υπάρχει, επίσης, χαμηλός κίνδυνος το εξασθενημένο αντιγόνο να επανέλθει στη μολυσματική του μορφή και γι' αυτό πρέπει να πραγματοποιούνται προσεκτικές μελέτες. Επιπλέον, κατά την καλλιέργεια του αντιγόνου, είναι πιθανό να εισαχθούν άλλοι μολυσματικοί παράγοντες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες ενέργειες.

Εξαιτίας των παραπάνω, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών εμβολίων^{41,42}.

2.6.1. Εμβόλια βασισμένα σε πεπτίδια

Τα εμβόλια που βασίζονται σε ζώντες εξασθενημένες ή αδρανοποιημένες μορφές μικροβιακών παθογόνων περιέχουν εκατοντάδες πρωτεΐνες, η πλειονότητα των όποιων δεν είναι απαραίτητες για την επαγωγή προστατευτικής ανοσίας και μπορεί να προκαλέσουν αλλεργιογόνες και/ή αντιδραστικές αποκρίσεις. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη των εμβολίων υπομονάδας που χρησιμοποιούν επιλεγμένες πρωτεΐνες των μικροβίων για την επαγωγή της προστατευτικής ανοσίας. Ωστόσο, οι μεμονωμένες πρωτεΐνες περιέχουν αμινοξικά κατάλοιπα που δεν είναι όλα απαραίτητα για την επαγωγή της ανοσοαπόκρισης, ενώ ορισμένα μπορεί να είναι ακόμη και επιζήμια. Η σκέψη αυτή έχει δημιουργήσει ένα ενδιαφέρον για την ανάπτυξη των εμβολίων που βασίζονται σε πεπτίδια, τα οποία περιέχουν μόνο

επιτόπους ικανούς να επάγουν την επιθυμητή ανοσολογική απόκριση με τη μεσολάβηση των T κυττάρων και των B κυττάρων^{43,44}.

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα εμβόλια είναι μικρές αλληλουχίες αμινοξέων που συντίθενται για να σχηματίσουν ένα ανοσογονικό πεπτιδικό μόριο που αντιπροσωπεύει τον ειδικό επίτοπο ενός αντιγόνου. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν τους διαφόρους επίτοπους είτε με τρόπο που εξαρτάται από τη διαμόρφωση τους (επίτοποι διαμόρφωσης) είτε από την αλληλουχία των αμινοξέων τους (γραμμικοί επίτοποι). Στους γραμμικούς επίτοπους, τα αμινοξέα δεν χρειάζεται να είναι σε ειδική διαμόρφωση για να αναγνωρίζονται από το αντίσωμα, ωστόσο, συνήθως προκαλούνται να υιοθετήσουν κάποια τοπική δευτεροταγή δομή κατά τη δέσμευση του αντισώματος. Οι γραμμικοί επίτοποι βρίσκονται σε πρωτεϊνικές θηλίες και είναι κύριοι υποψήφιοι για σχεδιασμό εμβολίων βασισμένα σε πεπτίδια⁴³.

Κατά τον σχεδιασμό ενός εμβολίου βασισμένου σε πεπτίδια πρέπει να ληφθούν υπόψη ποικίλοι παράγοντες. Το κυριότερο είναι ο εντοπισμός ανοσοκυρίαρχων περιοχών επιτόπων που είναι ικανοί να επάγουν προστατευτική ανοσοαπόκριση όσον αφορά τη χυμική ή/και την κυτταρική ανοσία έναντι του επιθυμητού αντιγόνου. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλά εργαλεία βιοπληροφορικής που χρησιμοποιούν διάφορους αλγόριθμους πρόβλεψης επιτόπων. Επιπρόσθετα, για την ανάπτυξη ενός εμβολίου που να είναι αποτελεσματικό κατά πολλών διαφορετικών στελεχών ενός παθογόνου, είναι απαραίτητος ο εντοπισμός των υψηλά συντηρημένων ανοσοκυρίαρχων περιοχών επιτόπων.

Δεδομένου ότι οι επίτοποι είναι οι αντιγονικοί καθοριστές σε μεγαλύτερες πρωτεΐνες, αυτά τα πεπτίδια θεωρούνται επαρκή για την ενεργοποίηση των κατάλληλων κυτταρικών και χυμικών αποκρίσεων, ενώ εξαλείφουν τις αλλεργιογόνες και/ή αντιδραστικές αποκρίσεις. Επιπλέον, τα εμβόλια που βασίζονται σε πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή ανοσίας έναντι διαφορετικών στελεχών ενός δεδομένου παθογόνου, διαλέγοντας πεπτιδικές αλληλουχίες συντηρημένες μεταξύ διαφορετικών στελεχών του παθογόνου. Τέλος, τα πεπτιδικά εμβόλια είναι μια ασφαλής και οικονομική τεχνολογία σε σύγκριση με τα παραδοσιακά εμβόλια. Η παραγωγή ενός εμβολίου που βασίζεται σε πεπτίδια είναι σχετικά φθηνή λόγω της ευκολίας παραγωγής και σύνθεσης των πεπτιδίων⁴⁴.

Από την άλλη πλευρά, τα πεπτίδια αυτά μπορεί να αντιμετωπίσουν ορισμένους περιορισμούς σχετικά με την ανοσογονικότητά τους, εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, σε σχέση με τα εμβόλια των αδρανοποιημένων ή εξασθενημένων παθογόνων.

Έτσι, τα εμβόλια των υπομονάδων σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούν πολλαπλές ανοσοποιήσεις ώστε να επιτευχθούν παρόμοια επίπεδα ανοσοαπόκρισης. Ωστόσο, μια ποικιλία προσεγγίσεων έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση των αποκρίσεων των εμβολίων υπομονάδας, όπως η χρήση ανοσοενισχυτικών ή η σύζευξη τους με μόρια φορείς, για την επαγωγή μιας ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης^{43,44}.

2.7. Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (SOCn)

Λόγω του μικρού τους μεγέθους, οι πεπτιδικοί επίτοποι μπορεί να μην είναι ανοσογόνοι από μόνοι τους. Για την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης κατά την χρήση συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων-επιτόπων μιας πρωτεΐνης σημαντική είναι η σύζευξη τους με έναν φορέα, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό ισχυρών αντιγόνων και στη δημιουργία ειδικών αντισωμάτων έναντι της συγγενούς αλληλουχίας της φυσικής πρωτεΐνης.

Παραδείγματα πρωτεϊνικών φορέων αποτελούν η αλβουμίνη του ορού βοοειδών, ωολευκωματίνη, αιμοκυανίνη κ.α.. Ωστόσο, παρά την επιτυχημένη χρήση τους σε κάποιες περιπτώσεις φέρουν ορισμένα μειονεκτήματα όπως: (i) η πρόκληση ανοσοαπόκρισης κατά του ίδιου του φορέα, (ii) η σύνθεση και η δομή τους είναι διαφορετικές, (iii) είναι πιθανό να προκαλέσουν αλλαγή της βιολογικά δραστικής διαμόρφωσης του συζευγμένου πεπτιδίου-επιτόπου και (iv) μπορεί να οδηγήσουν σε ένα μικρό κλάσμα ειδικών αντισωμάτων κατά του πεπτιδίου-επιτόπου, καθώς αυτό αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό μέρος του συνολικού συμπλέγματος πεπτιδίου με τον φορέα. Για την αποφυγή αυτών των προβλημάτων σχεδιάστηκαν διάφοροι συνθετικοί φορείς^{45,46}.

Οι επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (SOCn) αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο μας και αποτελούν μία σημαντική κατηγορία τέτοιων φορέων. Σχηματίζονται από το διαδοχικό μοτίβο τριπεπτιδίου Lys-Aib-Gly και επιτυγχάνουν την βελτιστοποίηση της παρουσίασης των ομοιοπολικά συζευγμένων πεπτιδίων και την μίμηση των εγγενών δομών τους.

Η ενσωμάτωση του α-αμινο ισοβουτυρικού οξέος (Aib), το οποίο είναι ένα ανάλογο αλανίνης, ευνοεί τον σχηματισμό μιας παραμορφωμένης ελικοειδής δομής, 3_{10} , λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που επιβάλλονται από τη δεύτερη ομάδα μεθυλίου στο α-άτομο άνθρακα. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπει έναν

εκτεθειμένο προσανατολισμό των πλευρικών αλυσίδων της λυσίνης (Lys). Επιπλέον, δεδομένου ότι το Aib δεν ανήκει στα φυσικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, τα πεπτίδια που περιέχουν Aib είναι πιθανό να είναι πιο ανθεκτικά στην ενζυμική αποικοδόμηση. Η Lys αποτελεί την θέση σύνδεσης των πεπτιδίων-επιτόπων στον φορέα, μέσω της ε-αμινομάδας της. Τέλος, η επιλογή της γλυκίνης (Gly) έγινε με βάση τον μικρό στερεοχημικό της όγκο. Έτσι, η άκαμπτη διαμόρφωση του SOCn που προκύπτει συμβάλλει στη μείωση της στερεοχημικής παρεμπόδισης και επιτρέπει στα αγκυροβολημένα πεπτίδια, να διατηρούν τις αρχικές ενεργές μορφές τους, χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα, ευνοώντας τη λειτουργία τους ως ισχυρά αντιγόνα⁴⁵⁻⁴⁸.

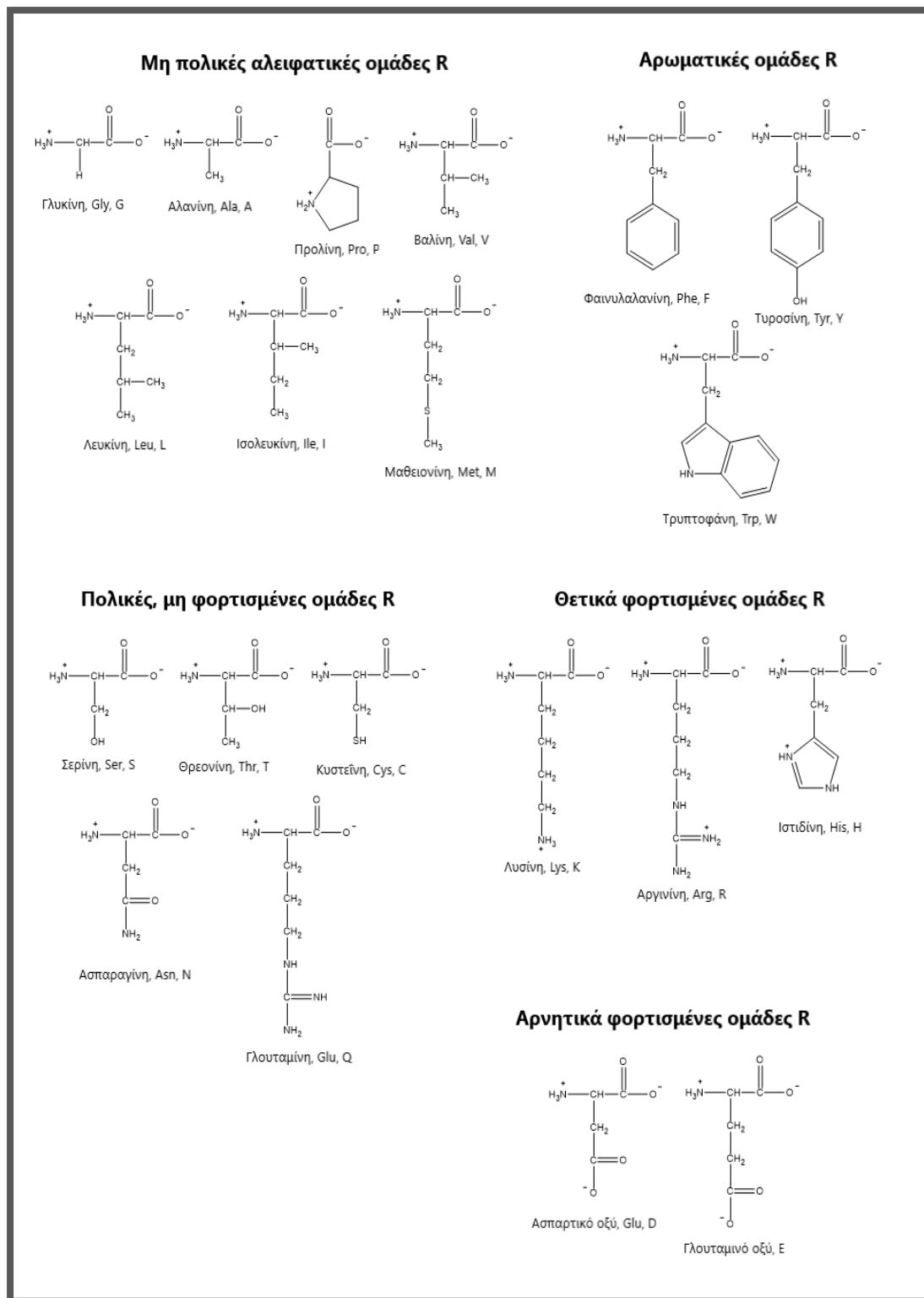
Ακόμη, μια παραλλαγή του φορέα SOC αποτελεί η ανάπτυξη του φορέα CPSOC. Η δομή του φορέα αυτού είναι η: Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂ και σχεδιάστηκε έτσι ώστε να μπορεί να συζευχθεί με ένα βιολογικά δραστικό μόριο με σχηματισμό θειοαιθερικού δεσμού μέσω της σουλφυδρυλομάδας των κυστεϊνών του⁴⁹.

3. Πεπτιδική Σύνθεση

3.1. Αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες

Τα αμινοξέα, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας για όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε έναν οργανισμό. Τα αμινοξέα αποτελούν τις δομικές μονάδες των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Ως πεπτίδια χαρακτηρίζονται τα σχετικά βραχέα πολυμερή αμινοξέων με μοριακά βάρη μικρότερα από 6000 Daltons (Da) (λιγότερα από 50 κατάλοιπα αμινοξέων), ενώ πρωτεΐνες ονομάζονται οι μεγαλύτερες πεπτιδικές αλυσίδες με μοριακό βάρος συνήθως μεγαλύτερη από περίπου 6.000 Da (περισσότερα από 50 κατάλοιπα αμινοξέων).

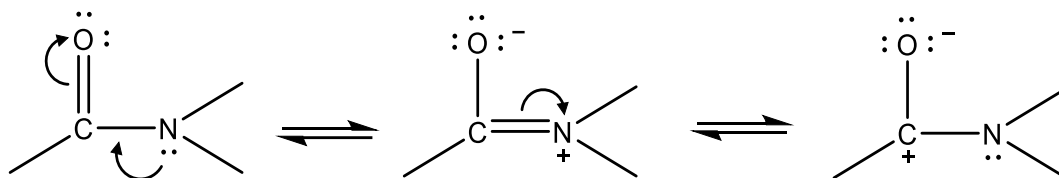
Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν μια αμινομάδα ($-NH_2$) και μια καρβοξυλομάδα ($-COOH$) ή μια άλλη όξινη ομάδα. Τα φυσικά αμινοξέα που συνιστούν τα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες είναι είκοσι και είναι α -αμινοξέα. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα βιολογικά αμινοξέα α -αμινοξέα. Με εξαίρεση τη γλυκίνη, σε όλα τα α -αμινοξέα ο α -άνθρακας αποτελεί ένα ασύμμετρο κέντρο. Κατά συνέπεια, τα αμινοξέα μπορούν να υιοθετήσουν είτε διαμόρφωση D είτε διαμόρφωση L. Ωστόσο, τα αμινοξέα που συνιστούν τις πρωτεΐνες υιοθετούν την διαμόρφωση L. Η ομάδα R αντιπροσωπεύει την πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων, που είναι συνδεδεμένη στον α -άνθρακα, και είναι υπεύθυνη για τις χημικές ιδιότητες αυτών. Στην εικόνα 10 φαίνονται οι χημικές δομές των φυσικών αμινοξέων που συνιστούν τα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες⁵⁰.



Εικόνα 10: Τα είκοσι φυσικά αμινοξέα που συνιστούν τις πρωτεΐνες ταξινομημένα με βάση την πλευρική τους ομάδα R.

3.2. Πεπτιδικός δεσμός

Ο πεπτιδικός δεσμός αποτελεί έναν αμιδικό δεσμό και σχηματίζεται μεταξύ της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος και της καρβοξυλομάδας ενός δεύτερου αμινοξέος. Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X, ότι το μήκος του δεσμού C-N στον πεπτιδικό δεσμό είναι μεταξύ ενός απλού δεσμού C-N (1.49 Å) και ενός διπλού δεσμού C=N (1.27Å), έχοντας μήκος 1.32 Å. Ο πεπτιδικός δεσμός έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού που οφείλεται στον απεντοπισμό του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου⁵¹, σύμφωνα με τις δομές συντονισμού της εικόνας 11.



Εικόνα 11: Δομές συντονισμού πεπτιδικού δεσμού.

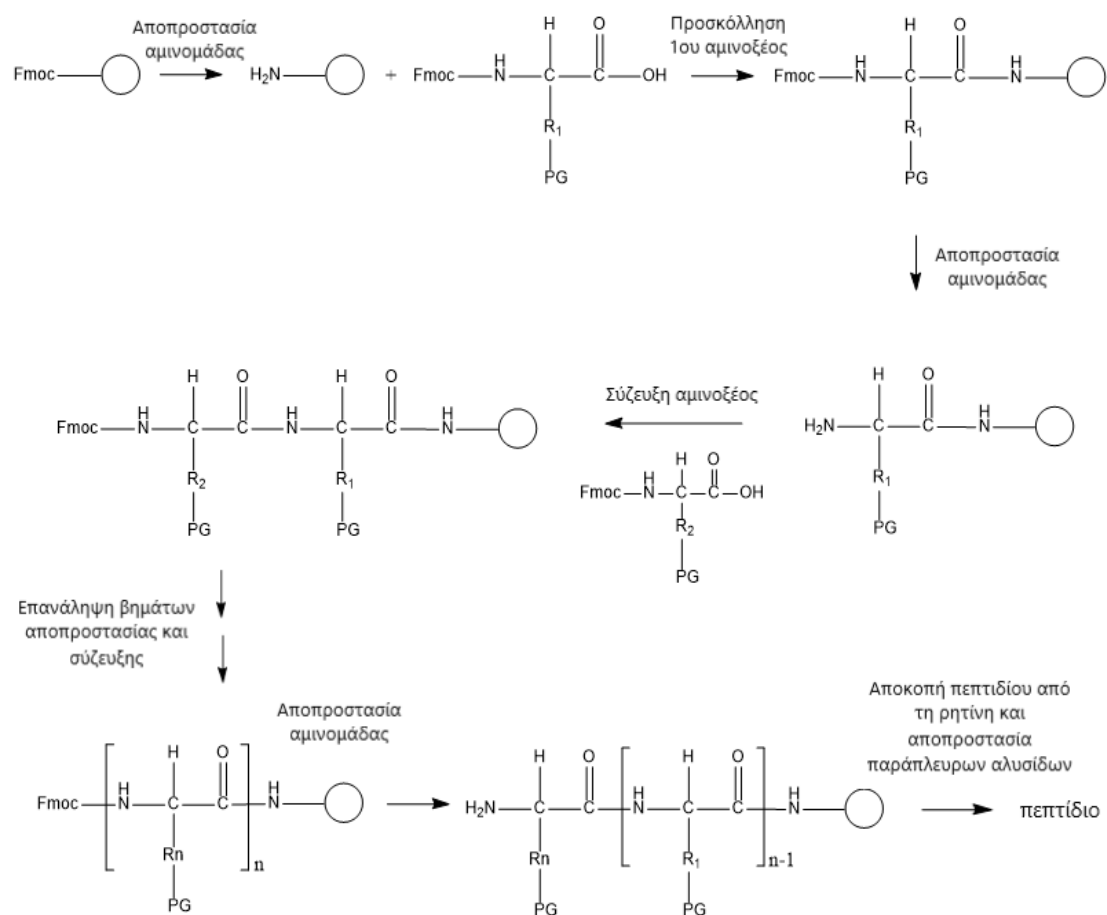
Ο μερικός χαρακτήρας διπλού δεσμού του πεπτιδικού δεσμού έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της ελεύθερης περιστροφής του δεσμού C-N και, επιπλέον, οδηγεί στο γεγονός ότι τα άτομα C, O, N και H βρίσκονται όλα στο ίδιο επίπεδο. Εξαιτίας αυτού, ο πεπτιδικός δεσμός εμφανίζεται σε δύο μόνο διαμορφώσεις βασικής κατάστασης στις φυσικές πρωτεΐνες, την cis διαμόρφωση και τη trans διαμόρφωση. Στη διαμόρφωση trans, τα δύο α- άτομα άνθρακα δύο γειτονικών αμινοξέων βρίσκονται εκατέρωθεν του πεπτιδικού δεσμού, ενώ στη cis διαμόρφωση είναι στην ίδια πλευρά ως προς τον πεπτιδικό δεσμό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, στις πρωτεΐνες οι πεπτιδικοί δεσμοί υιοθετούν την trans διαμόρφωση. Αυτή η προτίμηση μπορεί να εξηγηθεί από τις στεरिकές παρεμποδίσεις που συμβαίνουν μεταξύ των ομάδων που συνδέονται με τα α- άτομα άνθρακα στη περίπτωση της cis διαμόρφωση, εμποδίζοντας το σχηματισμό της⁵².

3.3. Πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης

Ο Bruce Merrifield ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) και άλλαξε σημαντικά τη στρατηγική της σύνθεσης πεπτιδίων, καθώς απλοποίησε τα επίπονα και απαιτητικά βήματα καθαρισμού της σύνθεσης σε διάλυμα. Επιπλέον, η ανάπτυξη της SPPS επέτρεψε την αυτοματοποίηση της διαδικασίας και την παραγωγή ρομποτικών οργάνων που μπορούν να εκτελέσουν αυτόματα όλα τα βήματα που απαιτούνται για την επιτυχημένη σύνθεση ενός πεπτιδίου. Με αυτόν τον τρόπο, η SPPS αποτελεί, σήμερα, τη μέθοδο εκλογής για την παραγωγή πεπτιδίων.

Καθώς σύνθεση ενός πεπτιδίου περιλαμβάνει πολλά επαναλαμβανόμενα στάδια, η χρήση ενός στερεού πολυμερικού υποστρώματος προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Σε ένα τέτοιο σύστημα μια περίσσεια διαλυτών αντιδραστηρίων σε υψηλή συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει στην ολοκλήρωση των αντιδράσεων σύζευξης και, στη συνέχεια, η περίσσεια αυτών των αντιδραστηρίων, καθώς και τα παραπροϊόντα που προκύπτουν μπορούν να διαχωριστούν από το αναπτυσσόμενο και αδιάλυτο πεπτίδιο με απλή διήθηση και εκπλύσεις. Με αυτόν τον τρόπο, όλα τα στάδια σύνθεσης μπορούν να εκτελεστούν στο ίδιο δοχείο χωρίς μεταφορά υλικού^{53,54}.

Η γενική πορεία της SPPS, όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 είναι η εξής: Σ' ένα γυάλινο δοχείο με ηθμό στο κάτω άκρο, ώστε να συγκρατεί τους κόκκους της ρητίνης, αρχικά γίνεται η διόγκωση των κόκκων αυτής. Ακολουθεί η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας από την δραστική ομάδα της ρητίνης και, στη συνέχεια, ένα N^α-προστατευμένο αμινοξύ προσκολλάται μέσω της α-καρβοξυλομάδας του στην δραστική ομάδα της ρητίνης. Μετά την προσκόλληση του πρώτου αμινοξέος, ακολουθεί η αποπροστασία της α-αμινομάδας του και η σύζευξη του με το επόμενο αμινοξύ. Η επιθυμητή πεπτιδική αλληλουχία συντίθεται με γραμμικό τρόπο από το C-άκρο στο N-άκρο με επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιδράσεων αποπροστασίας της α-αμινομάδας και σύζευξης αμινοξέων. Τέλος, το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τη ρητίνη και ταυτόχρονα αφαιρούνται οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων. Οι λειτουργικές ομάδες της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων πρέπει να είναι προστατευμένες με κατάλληλες προστατευτικές ομάδες που είναι σταθερές στις συνθήκες των αντιδράσεων που χρησιμοποιούνται κατά την επιμήκυνση του πεπτιδίου⁵³.



R: παράπλευρη αλυσίδα , PG: προστατευτική ομάδα

Εικόνα 12: Σχηματική πορεία SPPS.

Στην SPPS, χρησιμοποιούνται δύο κύριες στρατηγικές: η Boc/Bzl και η Fmoc/tBu στρατηγική. Η πρώτη στρατηγική βασίζεται στη διαβαθμισμένη όξινη αστάθεια των προστατευτικών ομάδων. Στην μέθοδο αυτή, η ομάδα Boc αφαιρείται με καθαρό τριφθοροξικό οξύ (TFA) ή TFA σε διχλωρομεθάνιο, ενώ η αφαίρεση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων και η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιούνται στο τέλος της σύνθεσης με επεξεργασία με ένα ισχυρό οξύ, όπως το άνυδρο υδροφθορικό οξύ (HF). Αν και αυτή η μέθοδος επιτρέπει αποτελεσματικές συνθέσεις μεγάλων πεπτιδίων, η χρήση του εξαιρετικά τοξικού HF, η ανάγκη για ειδική συσκευή με επένδυση πολυτετραφθοροαιθυλενίου και το γεγονός

ότι η χρήση ισχυρά όξινων συνθηκών μπορεί να προκαλέσει επιβλαβείς αλλαγές στη δομή των συντιθέμενων πεπτιδίων περιορίζουν την εφαρμογή της.

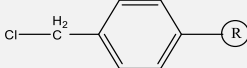
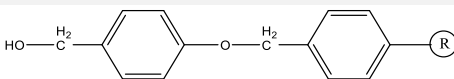
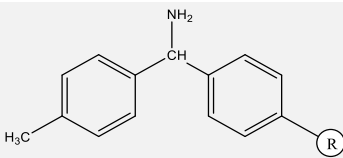
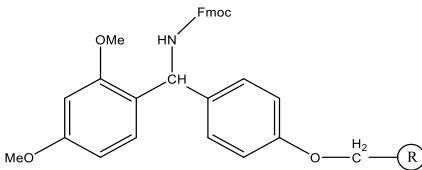
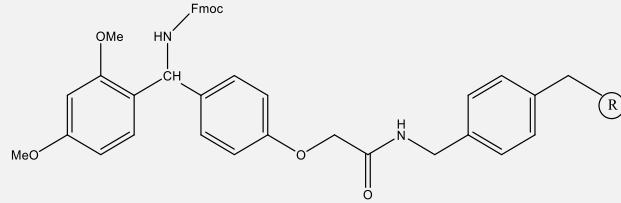
Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος Fmoc/tBu βασίζεται στην ασταθή στη βάση Fmoc ομάδα για προστασία της α-αμινομάδας, στις ασταθείς σε οξύ προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων και στους ασταθείς σε οξύ δεσμούς πεπτιδίου-ρητίνης. Αυτή η στρατηγική έχει το πλεονέκτημα ότι οι διάφορες προστασίες αφαιρούνται με διαφορετικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν τη χρήση ηπιότερων όξινων συνθηκών για τελική αποπροστασία και αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Για όλους αυτούς τους λόγους, η Fmoc/tBu στρατηγική είναι πλέον η μέθοδος εκλογής για τη σύνθεση πεπτιδίων⁵³.

3.4. Στερεό πολυμερικό υπόστρωμα

Το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα ή αλλιώς ρητίνη έχει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία μιας πεπτιδικής σύνθεσης και, γι' αυτό, πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά. Η ιδανική ρητίνη πρέπει να πληροί μια σειρά από σημαντικά κριτήρια. Αρχικά, θα πρέπει να μπορεί να διογκώνεται έτσι ώστε η προσκόλληση του πρώτου αμινοξέος να επιτυγχάνεται εύκολα και σε υψηλή απόδοση και, ακόμη, τα αντιδραστήρια να έχουν εύκολη πρόσβαση στις ενεργές της θέσεις. Επιπλέον, το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα θα πρέπει να προσφέρει σταθερότητα στη μηχανική ανάδευση σ' ένα ευρύ φάσμα διαλυτών και θερμοκρασιών. Επιπρόσθετα, καθώς η επιλογή των προστατευτικών ομάδων, των αντιδραστηρίων σύζευξης και των συνθηκών αποκοπής συνδέονται άμεσα με την επιλογή του πολυμερικού υποστρώματος, είναι σημαντική η σταθερότητα του προηγούμενου στη χημεία που χρησιμοποιείται κατά τη σύνθεση και η δυνατότητα χρήσης συνθηκών αποκοπής που δεν βλάπτουν το τελικό προϊόν. Ακόμη, το κόστος της ρητίνης είναι ένας βασικός παράγοντας. Τέλος, οι ρητίνες επιλέγονται με βάση την επιθυμητή τροποποίηση του C-τελικού άκρου του συντιθέμενου πεπτιδίου, οδηγώντας είτε σε ελεύθερο καρβοξύλιο, είτε σε αμίδιο.

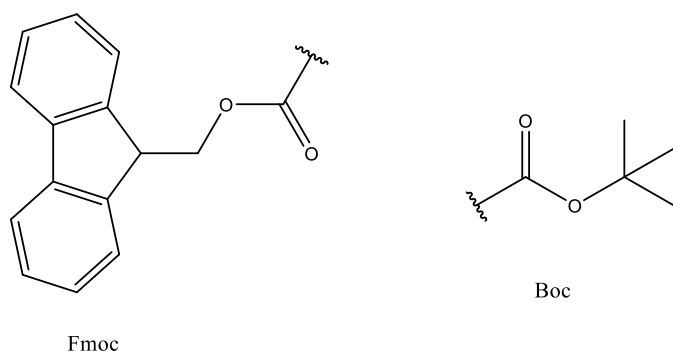
Το πρώτο πολυμερές υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε από τον Bruce Merrifield ήταν το πολυστυρένιο, το οποίο χρησιμοποιείται ακόμη. Μέχρι σήμερα, μία μεγάλη σειρά από ρητίνες έχουν αναπτυχθεί, επιτρέποντας ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών⁵⁵. Μερικές από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ρητίνες κατά την SPPS φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Μερικές από τις ρητίνες που χρησιμοποιούνται κατά την SPPS^{55,56}.

Όνομα	Δομή	Τροποποίηση C-τελικού άκρου συντιθέμενου πεπτιδίου
<i>Merrified</i>		Ελεύθερο καρβοξύλιο
<i>Wang</i>		Ελεύθερο καρβοξύλιο
<i>MBHA</i>		Αμίδιο
<i>Rink Amide</i>		Αμίδιο
<i>Rink Amide AM</i>		Αμίδιο

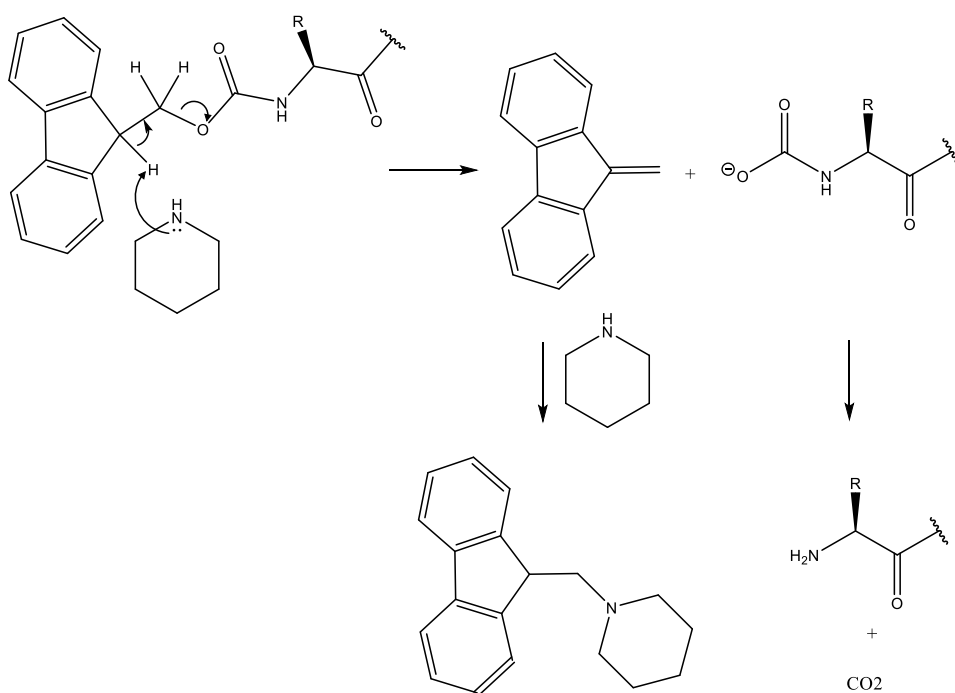
3.5. Προστατευτικές ομάδες

Με βάση τις δυο κύριες στρατηγικές της SPPS, που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας είναι η φθορέν-9-υλομεθυλοξυκαρβονύλιο (Fmoc) και η τριτ-βουτοξυκαρβονύλιο (Boc), η δομές των οποίων φαίνονται στην εικόνα 13.



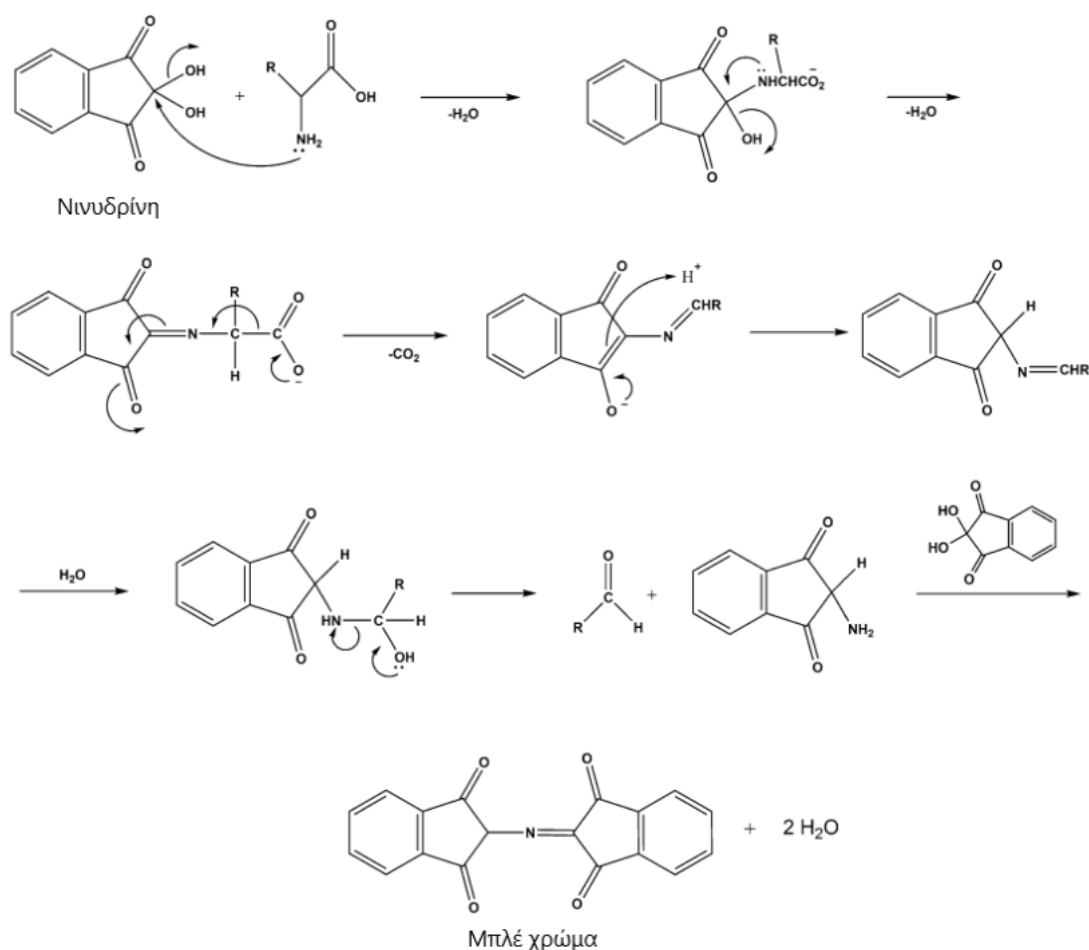
Εικόνα 13: Κύριες προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας.

Μετά από κάθε σύζευξη, οι προστατευτικές αυτές ομάδες αφαιρούνται. Οι χημικές συνθήκες για την απομάκρυνση αυτών των παροδικών προστατευτικών ομάδων, δηλαδή βάση ή οξύ, ορίζουν τα υπόλοιπα βήματα της στρατηγικής της SPPS. Στην περίπτωση της στρατηγικής Boc/Bzl, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απομάκρυνση της Boc γίνεται παρουσία TFA, ενώ η τελική αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και η αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων πραγματοποιείται με HF. Αντίθετα, στην στρατηγική Fmoc/tBu, η Fmoc ομάδα αφαιρείται υπό ήπιες βασικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας 20% v/v πιπεριδίνη σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), με τον μηχανισμό της εικόνας 14. Οι περισσότερες από τις προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων είναι αδρανείς υπό αυτές τις συνθήκες, ενώ είναι ασταθείς σε διάφορα όξινα διαλύματα, που συχνά περιέχουν TFA^{55,57,58}.



Εικόνα 14: Απομάκρυνση της Fmoc ομάδας από την α-αμινομάδας με επεξεργασία με πιπεριδίνη⁵⁷.

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της απομάκρυνσης της Fmoc ομάδας, καθώς, και της σύζευξης κάθε αμινοξέος κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της σύνθεσης, διεξάγεται μια χρωματομετρική δοκιμασία με την οποία ελέγχεται η παρουσία ή μη ελεύθερης αμινομάδας. Η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται είναι το τεστ Kaiser, δηλαδή η δοκιμασία με νινυδρίνη. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αντίδραση των πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινών με τη νινυδρίνη, δίνοντας μια σκούρα μπλε ένωση ή μια καφέ ένωση αντίστοιχα⁵⁸, με βάση τον μηχανισμό της εικόνας 15.



Εικόνα 15: Μηχανισμός της αντίδρασης της νινυδρίνης με την α-αμινομάδα ενός αμινοξέος⁵⁸.

Για την πραγματοποίηση του τεστ Kaiser, μετά την αποπροστασία της α-αμινομάδας ή μίας αντίδρασης σύζευξης, 5-10 κόκκοι πεπτιδορηνίνης τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 2-3 σταγόνες από τα εξής διαλύματα:

1. 5% w/v νινυδρίνη σε αιθανόλη
2. 2% v/v διάλυμα 0,001 M KCN σε πυριδίνη
3. 80 g φαινόλης σε 20 ml αιθανόλης

Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 1 λεπτό. Η αλλαγή του χρώματος των κόκκων της ρητίνης από αχνό κίτρινο σε μπλε ή καφέ, για τις πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, αντίστοιχα, υποδηλώνει την παρουσία μιας ελεύθερης αμινομάδας, και κατά συνέπεια, την αποπροστασία της πεπτιδορητίνης. Αντίθετα, η περίπτωση που δεν παρατηρείται αλλαγή του χρώματος των κόκκων της ρητίνης υποδεικνύει μία προστατευμένη α-αμινομάδα⁵⁸.

Επιπλέον, για τη σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου, μετά την επιλογή της κατάλληλης ρητίνης και στρατηγικής σύνθεσης, ορίζεται η επιλογή κατάλληλων προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέα. Οποιοδήποτε αμινοξύ περιέχει μια χημικά δραστική πλευρική αλυσίδα πρέπει να καλυφθεί προσωρινά με μια προστατευτική ομάδα κατά την επιμήκυνση του πεπτιδίου προκειμένου να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις και ο σχηματισμός παραπροϊόντων⁵⁵. Στον πίνακα 4 φαίνονται οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες στην Fmoc/tBu στρατηγική^{55,57}.

Πίνακας 4: Ευρέως χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες στην Fmoc/tBu στρατηγική^{53,55}.

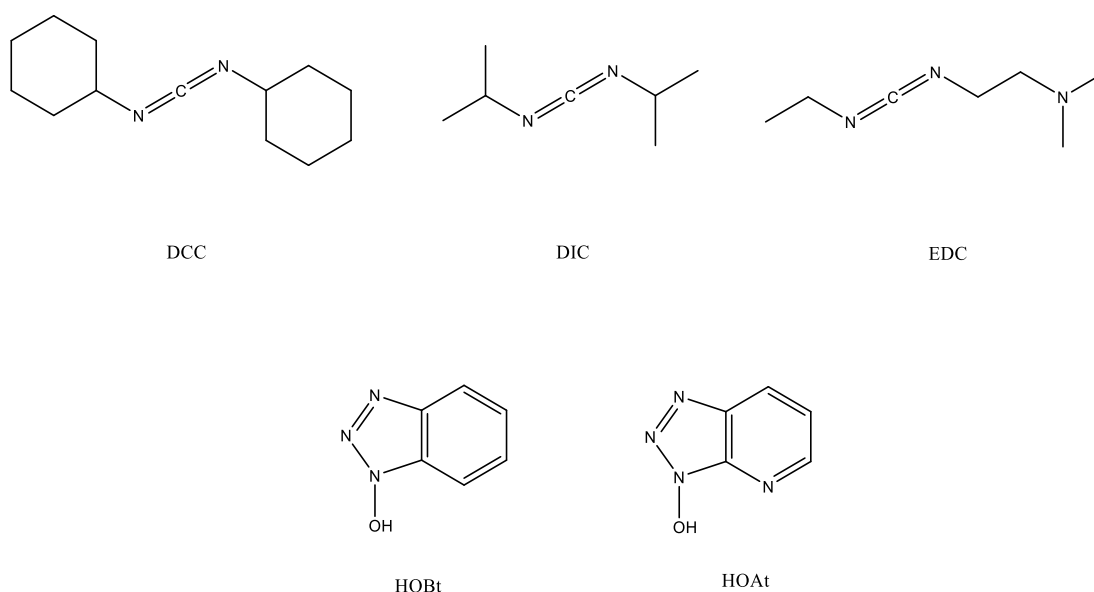
Αμινοξύ	Προστατευτική ομάδα
Arg	Pmc,Pbf
Asp/Glu	OtBu
Asn/Gln	Trt
Cys	Trt
His	Trt
Lys	Boc
Ser/Thr/Tyr	tBu
Trp	Boc

3.6. Αντιδραστήρια σύζευξης

Η πεπτιδική σύνθεση διεξάγεται προς το N-τελικό άκρο της αλυσίδας. Συνεπώς, η πυρηνόφιλη ομάδα της ρητίνης αντιδρά με την καρβοξυλομάδα του αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο. Στη συνέχεια, προστίθενται με τη σειρά τα υπόλοιπα αμινοξέα της πεπτιδικής αλυσίδας⁵⁸.

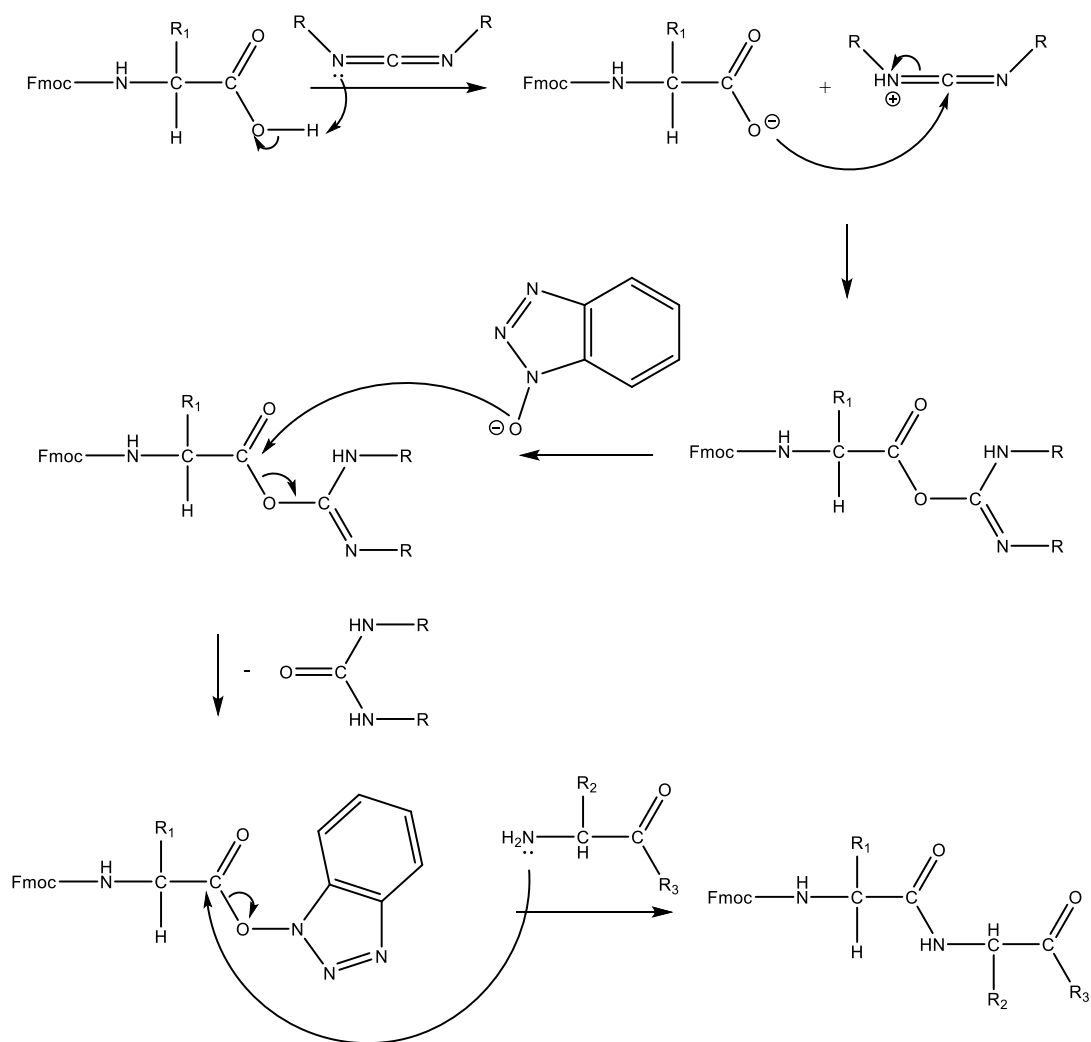
Για τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού στην SPPS χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια σύζευξης. Οι κυριότερες κατηγορίες αντιδραστηρίων σύζευξης είναι τα καρβοδιμίδια και τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα.

Σημαντικότεροι αντιπρόσωποι των καρβοδιμιδίων είναι το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο (DCC) και το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC) και το N-αιθύλο,N'-[3-(διμέθυλο) πρόπυλο] καρβοδιμίδιο (EDC), οι δομές των οποίων φαίνονται στην εικόνα 16. Το DIC προτιμάται στην SPPS, καθώς η ουρία που προκύπτει είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες όπως το DMF ή το DCM^{55,57}.



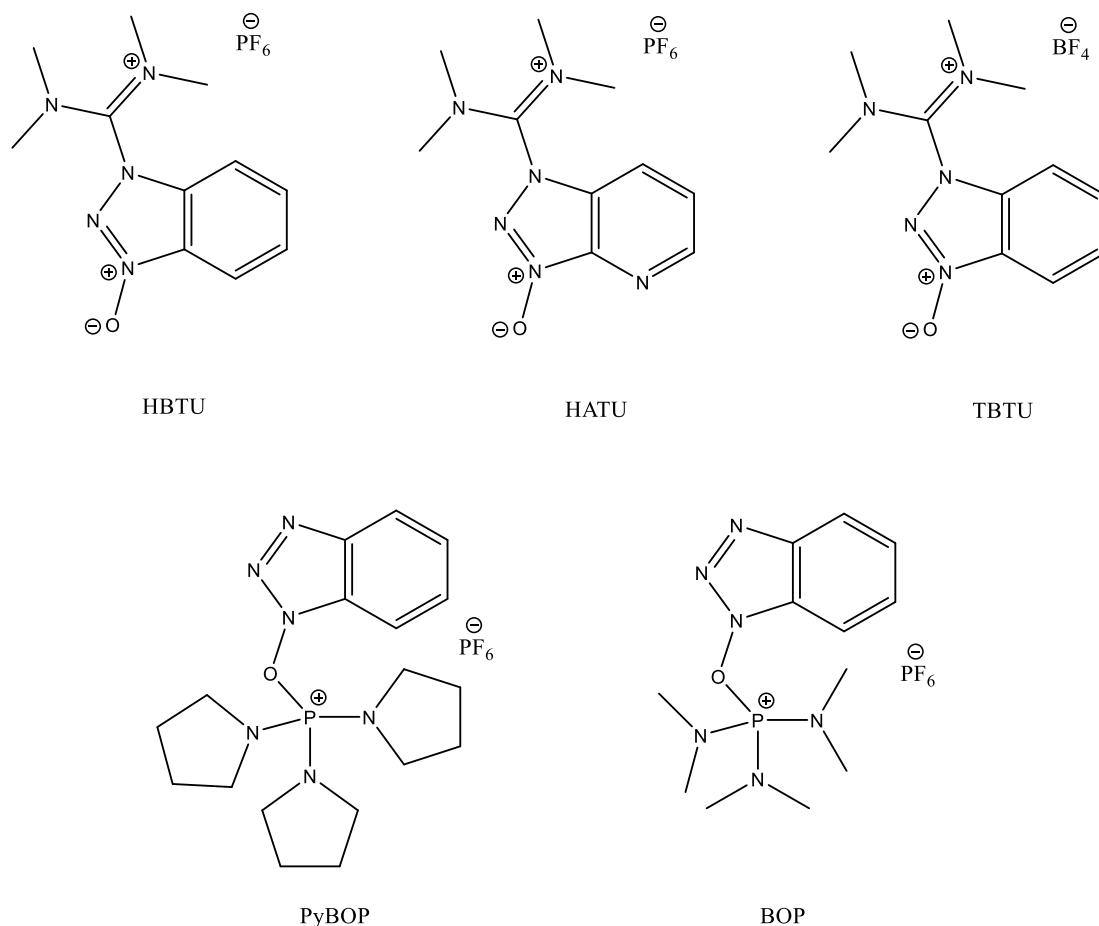
Εικόνα 16: Τα κυριότερα καρβοδιμίδια που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση σύζευξης στην SPPS και τα βοηθητικά τους πυρηνόφιλα.

Τα καρβοδιμίδια περιέχουν δύο άτομα αζώτου που είναι ελαφρώς βασικά και λόγω αυτού δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη μιας οργανικής βάσης για την αποπρωτονίωση του καρβοξυλικού οξέος. Έτσι, ενεργοποιείται η αντίδραση μεταξύ του οξέος και του καρβοδιμιδίου, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου O-ακυλισουρίας, όπως φαίνεται στην εικόνα 17. Για την αποφυγή της ρακεμοποίησης, η προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως η 1-υδροξυβενζοτριάζολη (HOBT) ή η 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριάζολη (HOAt) (εικόνα 16), είναι απαραίτητη, επειδή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του λιγότερο ενεργού ενδιάμεσου. Στην εικόνα 17 φαίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός⁵⁸.



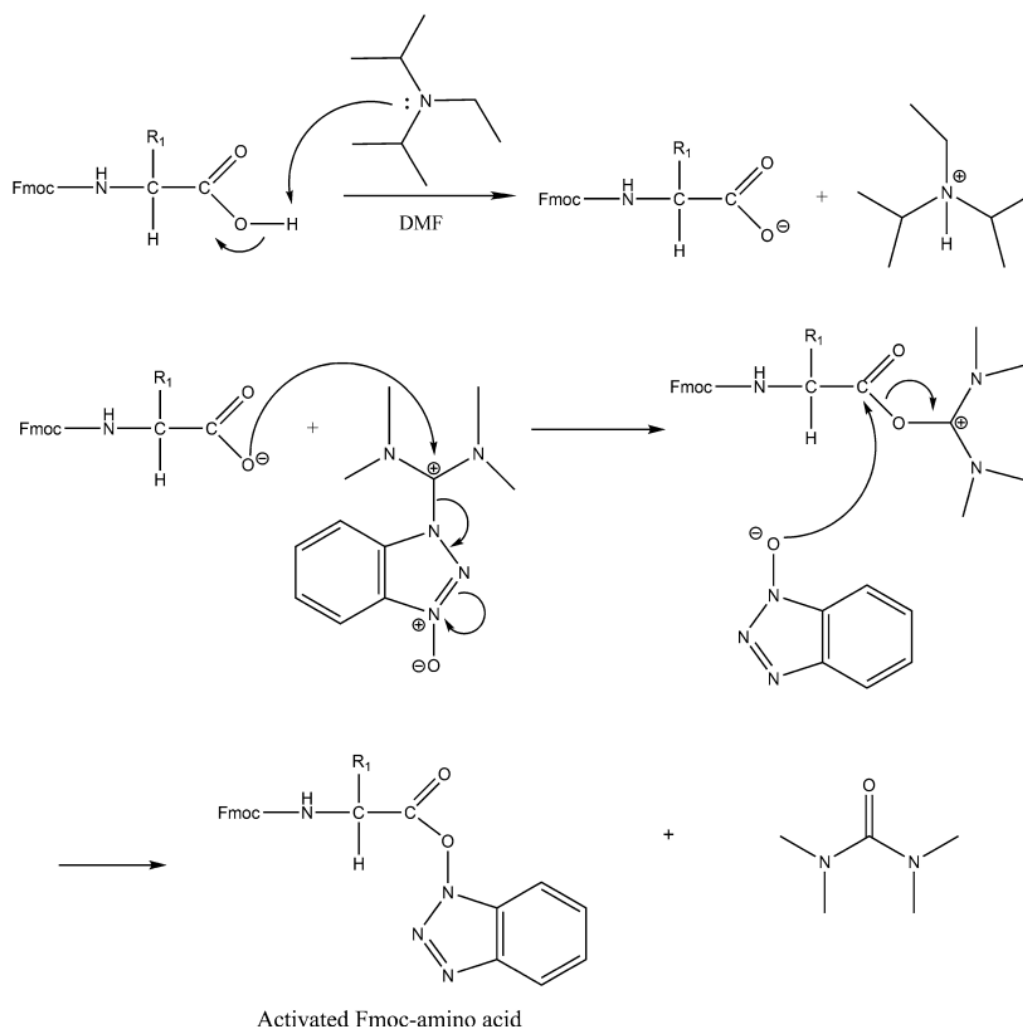
Εικόνα 17: Μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης μέσω καρβοδιμιδίων^{55,58}.

Μια δεύτερη κατηγορία αντιδραστηρίων σύζευξης είναι τα φωσφορικά και ουρονικά παράγωγα. Το HBTU (εξαφθοροφωσφορικό άλας της 2-(1H-βενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας), το TBTU (τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1H-βενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας), το HATU (εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας), το BOP (εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλοξυ-τρις(διμεθυλαμινο)-φωσφονίου) και το PyBOP (εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλοξυ-τρις-πυρρολιδινοφωσφονίου) αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας^{57,58}, οι δομές των οποίων φαίνονται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18: Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται κατά την αντίδραση σύζευξης στην SPPS⁵⁷.

Η αντίδραση σύζευξης με τα αντιδραστήρια αυτής της κατηγορίας απαιτεί την παρουσία βάσης, συνήθως χρησιμοποιείται η N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA), με σκοπό την αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του Fmoc-αμινοξέος, σε διαλύτη DMF. Αρχικά, το όξινο πρωτόνιο του Fmoc-αμινοξέος απομακρύνεται από την DIPEA ή κάποια άλλη οργανική βάση. Στη συνέχεια, το αποπρωτονιωμένο Fmoc-αμινοξύ προσβάλλει το HBTU, οδηγώντας στην αποβολή ενός παραγώγου υδροξυβενζοτρίαζολίου, που, στην πορεία, προσβάλλει την καρβonyλομάδα του Fmoc-αμινοξέος, οδηγώντας στον σχηματισμό του τελικού προϊόντος, του ενεργοποιημένου Fmoc-αμινοξέος, με πυρηνόφιλη υποκατάσταση⁵⁸. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης ενεργοποίησης του Fmoc-αμινοξέος με το HBTU και η αποπρωτονίωση από το DIPEA φαίνεται στην εικόνα 19.

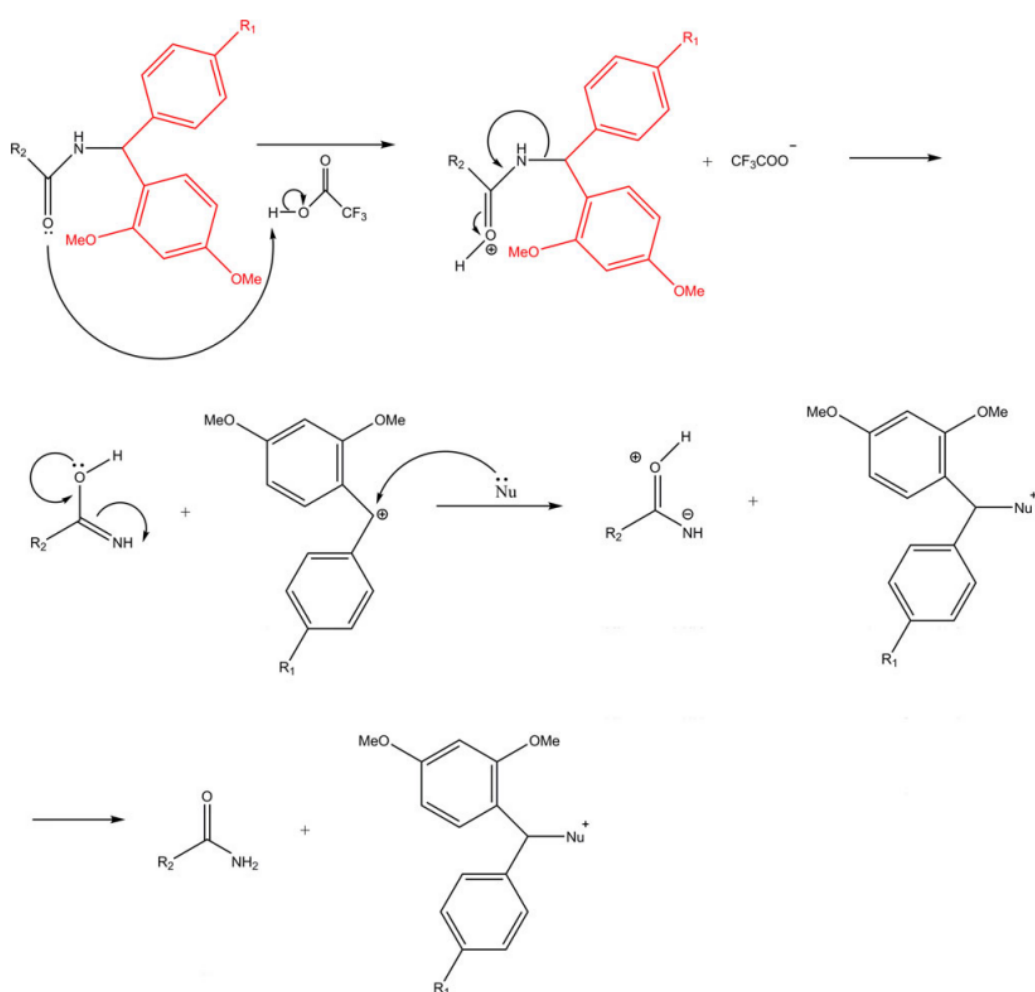


Εικόνα 19: Μηχανισμός της αντίδρασης της ενεργοποίησης του Fmoc-αμινοξέος με το HBTU και η αποπρωτονίωση από το DIPEA⁵⁸.

3.7. Αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη

Μετά την προσθήκη όλων των αμινοξέων στην πεπτιδική αλληλουχία, το επόμενο στάδιο είναι η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και η αφαίρεση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων και, έτσι, η παραλαβή του επιθυμητού πεπτιδίου. Για τον σκοπό αυτό, η πειραματική διαδικασία αφορά την επεξεργασία της πεπτιδο-ρητίνης με ένα διάλυμα οξέος, συγκεκριμένα τριφθοροξικού οξέος (TFA) στην περίπτωση της Fmoc/tBu στρατηγικής, παρουσία μορίων-παγίδων, δηλαδή πυρηνόφιλων, δεσμευτών καρβοκατιόντων (scavengers).

Κατά την επεξεργασία με TFA στην διαδικασία της αποκοπής σχηματίζονται καρβοκατιόντα που είναι ενδιάμεσα με υψηλή αντιδραστικότητα. Μπορούν συγκεκριμένα να αντιδράσουν με τις πλευρικές αλυσίδες της τυροσίνης, της τρυπτοφάνης, της μεθειονίνης και της κυστεΐνης, που είναι πλούσιες σε ηλεκτρόνια, δημιουργώντας ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Για να αποφευχθεί αυτό, προστίθενται μόρια-παγίδες, που είναι καλά πυρηνόφιλα στην αντίδραση. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι: η θειοανισόλη, η ανισόλη, η φαινόλη, το νερό, η 1,2-αιθανοδιθειόλη (EDT) και το τρισοπροπολυοσιλάνιο (TIS)⁵⁸. Ο μηχανισμός αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη φαίνεται στην εικόνα 20.



Εικόνα 20: Μηχανισμός αποκοπής πεπτιδίου από την ρητίνη⁵⁸.

Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση και μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται η εξάτμιση των διαλυτών. Γενικά, το μίγμα της αποκοπής είναι δύσκολο να προεπιλεγεί καθώς εξαρτάται από την πεπτιδική αλληλουχία, τις προστατευτικές

ομάδες των πλευρικών αλυσίδων και τη ρητίνη. Ο χρόνος αντίδρασης είναι τυπικά 2-4 ώρες. Μεγαλύτεροι χρόνοι αντίδρασης αυξάνουν, συνήθως, την πιθανότητα παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ μικρότεροι έχουν ως αποτέλεσμα τη μη ποσοτική αποκοπή και αποπροστασία των πλευρικών αλυσίδων. Έπειτα, ακολουθεί η έκπλυση του πεπτιδίου, κατά προτίμηση, με ψυχρό δισοπροπυλαιθέρα. Στη συνέχεια, το πεπτίδιο εκχυλίζεται με ένα υδατικό διάλυμα οξέος, για διατήρηση του πεπτιδίου υπό ελαφρά όξινη κατάσταση, και, τέλος, λυοφιλοποιείται^{55,58}.

3.8. Μετασυνθετική ανάλυση

3.6.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης ενός πεπτιδίου ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού του. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί την τεχνική εκλογής για την απομόνωση και τον καθαρισμό πολλών διαφορετικών πεπτιδικών αλληλουχιών⁵⁷.

Η αρχή της HPLC είναι ότι το προς καθαρισμό δείγμα σε μορφή διαλύματος εγχέεται σε μια στήλη πορώδους υλικού, που αποτελεί την στατική φάση, και μία υγρή φάση, που ονομάζεται κινητή φάση, αντλείται με υψηλή πίεση μέσω της στήλης. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους έκλουσης τους μέσω της στήλης, που προκύπτουν από τη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.

Η HPLC μπορεί να ταξινομηθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Έτσι, με βάση την κλίμακα λειτουργίας της χωρίζεται σε παρασκευαστική, προπαρασκευαστική και αναλυτική HPLC. Ακόμη, βάσει της αρχής του διαχωρισμού ταξινομείται σε χρωματογραφία συγγένειας, χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, χρωματογραφία χειρόμορφης φάσης κ.α.. Σε σχέση με την τεχνική έκλουσης, διακρίνεται ο βαθμωτός διαχωρισμός, στον οποίο η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με τον χρόνο, και ο ισοκρατικός διαχωρισμός, όπου η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή στον χρόνο. Τέλος, με βάση τον τρόπο

λειτουργίας, χωρίζεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης και χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η κινητή φάση είναι μη πολική, ενώ η στατική φάση είναι πολική. Η αύξηση της πολικότητας μίας ένωσης αυξάνει την ικανότητα προσρόφησης της στην στατική φάση λόγω πολικών αλληλεπιδράσεων και οδηγεί σε αυξημένο χρόνο έκλουσης. Έτσι, οι πολικές ενώσεις του θα διατηρηθούν περισσότερο στο πολικό πυρίτιο από τις μη πολικές ενώσεις, οι οποίες θα περάσουν πιο γρήγορα από τη στήλη.

Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη πολική στατική φάση και μια πολική ή μέτρια πολική κινητή φάση. Η RP-HPLC βασίζεται στην αρχή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Έτσι, σε ένα μείγμα διάφορων ενώσεων, οι αναλυόμενες ενώσεις που είναι λιγότερο πολικές θα διατηρηθούν από τη μη πολική στατική φάση περισσότερο από αυτές που είναι περισσότερο πολικές. Επομένως, σ' αυτή την περίπτωση, οι πιο πολικές ενώσεις εκλούνται πρώτες⁵⁹.

Όσον αφορά τα πεπτίδια, η RP-HPLC είναι πιο διαδεδομένη τεχνική για τον καθαρισμό αυτών. Επιπλέον, υπάρχουν τρεις συνήθεις τύποι στήλης που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση των πεπτιδίων, οι C4, C8 και C18 (σίλικα τροποποιημένη με αλειφατικές αλυσίδες 4, 8 και 18 ατόμων άνθρακα αντίστοιχα). Γενικά, οι στήλες C18 χρησιμοποιούνται για πεπτίδια μικρού έως μεσαίου μεγέθους που είναι υδρόφιλα, και οι στήλες C4 και C8 χρησιμοποιούνται συνήθως για μεσαία ή μεγάλα πεπτίδια καθώς και για πιο υδρόφοβες αλληλουχίες. Ακόμη, οι αμιδικοί δεσμοί των πεπτιδίων παρακολουθούνται σε μήκος κύματος περίπου στα 215 nm, ενώ οι πεπτιδικές αλληλουχίες που περιέχουν Tyr, Phe ή Trp έχουν ισχυρές απορροφήσεις που προέρχονται από τους αρωματικούς δακτυλίους και διακρίνονται στα 254 nm περίπου⁵⁷.

3.6.2. Φασματομετρία μάζας

Για να εξασφαλιστεί ότι έχει παραχθεί το επιθυμητό πεπτίδιο είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός του. Για το σκοπό αυτό, η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί την πιο άμεση και αποτελεσματική τεχνική, ανάμεσα στο πλήθος των διαθέσιμων τεχνικών για την διευκρίνιση της δομής των συντιθέμενων πεπτιδίων.

Το όνομα «φασματομετρία μάζας» είναι μια λανθασμένη ονομασία, καθώς αυτό που μετράται δεν είναι η μάζα, αλλά ο λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) ή μια ιδιότητα που σχετίζεται με το m/z . Ένα φάσμα μάζας αποτελεί μια γραφική παράσταση της αφθονίας ιόντων προς το m/z . Υπάρχουν τρία κύρια στοιχεία ενός φασματομέτρου μάζας: μια πηγή ιονισμού, ένας αναλυτής μάζας και ένας ανιχνευτής⁶⁰.

Ένας αριθμός τεχνικών φασματομετρίας μάζας είναι ευρέως διαθέσιμες για την ανάλυση των συντιθέμενων πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένου του βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (FAB), του ιονισμού εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενου από υλικό μήτρας (MALDI), του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), κ.α.^{60,61}.

Το σύστημα ιονισμού ESI-MS θεωρείται μία από τις καλύτερες και πιο ήπιες μεθόδους ιονισμού. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη τεχνική το δείγμα εισέρχεται σε έναν τριχοειδή σωλήνα, όπου και υφίσταται την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου στο άκρο αυτού. Με αυτόν τον τρόπο, το διαλυμένο δείγμα μετατρέπεται σε νεφέλωμα φορτισμένων σωματιδίων. Στη συνέχεια, τα φορτισμένα σωματίδια εξέρχονται του τριχοειδούς σωλήνα και εισέρχονται σε μία περιοχή «αποδιαλύτωσης», στην οποία εξατμίζεται ο διαλύτης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των φορτισμένων ιόντων. Τέλος, τα ιόντα κατευθύνονται προς τον αναλυτή μάζας του φασματομέτρου, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το m/z ⁶⁰.

3.6.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια τεχνική που παρέχει πληροφορίες για τα τοπικά μαγνητικά πεδία γύρω από τους ατομικούς πυρήνες. Η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η εξής:

Τα πρωτόνια και τα νετρόνια είναι περιστρεφόμενα σωματίδια και μαζί σχηματίζουν τους ατομικούς πυρήνες, των οποίων το μαγνητικό περιεχόμενο περιγράφεται από το πυρηνικό spin (I). Όταν ο αριθμός των πρωτονίων ή/και των νετρονίων είναι άρτιος, τότε όλα τα αντίθετα spin είναι ζευγαρωμένα και $I=0$, ενώ όταν ο αριθμός των πρωτονίων ή/και των νετρονίων είναι περιττός τότε το I λαμβάνει τιμές που είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του $\frac{1}{2}$. Η τιμή I υποδεικνύει τον συνολικό αριθμό καταστάσεων spin που μπορεί να λάβει ένας πυρήνας και ισούται με $2I+1$. Οι

πυρήνες με $I=0$ έχουν μόνο μία κατάσταση σπιν και, έτσι, δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και, συνεπώς, δεν δίνουν σήματα NMR.

Οι πυρήνες των στοιχείων κατά την περιστροφή τους συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα, δημιουργώντας μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής τους. Η ένταση των πεδίων εξαρτάται από την μαγνητική ροπή, η οποία αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα των πυρήνων. Απουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα διανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο. Υπό την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, η αλληλεπίδραση της πυρηνικής μαγνητικής ροπής και του μαγνητικού πεδίου είναι κβαντισμένη και η μαγνητική ροπή προσανατολίζεται ομόρροπα ή αντίρροπα προς το πεδίο. Ο ομόρροπος προσανατολισμός ονομάζεται α κατάσταση spin ενώ όταν το πρωτόνιο προσανατολίζεται αντίρροπα προς το μαγνητικό πεδίο λαμβάνει κατάσταση β spin. Όταν ένας πυρήνας που βρίσκεται στην α κατάσταση spin απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που ισούται με την διαφορά ενέργειας (ΔE) μεταξύ των δύο καταστάσεων spin, τότε η απορρόφηση προκαλεί την μετάβαση του πυρήνα στην β κατάσταση spin και ο πυρήνας βρίσκεται σε συντονισμό. Κατά την αποδιέγερση του πυρήνα, εκπέμπεται ραδιοσυχνότητα συγκεκριμένης ενέργειας, η οποία αποτελεί και το σήμα του NMR.

Η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων στις διάφορες ομάδες δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον και το είδος του δεσμού. Η μεγάλη σημασία της φασματοσκοπίας NMR οφείλεται στην ύπαρξη αυτού του φαινομένου, που είναι γνωστό ως χημική μετατόπιση^{62,63}.

Η φασματοσκοπία NMR επιτρέπει τον προσδιορισμό των δομών πεπτιδίων και μικρών πρωτεϊνών σε διάλυμα. Λόγω του μεγάλου αριθμού πρωτονίων ανά κατάλοιπο αμινοξέος και της προκύπτουσας επικάλυψης των χημικών μετατοπίσεων τους, ακόμη μικρά πεπτίδια δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν από φάσματα μιας διάστασης (1D) αλλά απαιτούν τη χρήση δισδιάστατων (2D) φασμάτων συσχέτισης. Για μικρά πεπτίδια συνήθως καταγράφεται ένα σύνολο τριών διαφορετικών φασμάτων: ένα COSY, ένα TOCSY και το NOESY. Το COZY (Correlation Spectroscopy) εμφανίζει συσχετίσεις του ίδιου πυρήνα λόγω συζεύξεων μέσω δεσμών. Ένα πείραμα TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) περιέχει όλες τις κορυφές που οφείλονται σε συζεύξεις πρωτονίων του ίδιου συστήματος spin, δηλαδή ανήκουν στο ίδιο αμινοξύ. Το πείραμα NOESY βασίζεται στο πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE), που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις

μέσω χώρου μεταξύ διαφορετικών πυρήνων. Είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα, στο οποίο οι κορυφές οφείλονται σε συζεύξεις διπόλου-διπόλου που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις των spin των πυρήνων μέσω του χώρου και επομένως εξαρτώνται μόνο από την απόσταση αλλά όχι από τον αριθμό των ενδιάμεσων δεσμών^{64,65}.

4. Σκοπός

Τα μέτρα ελέγχου της μόλυνσης από το *Campylobacter*, για τους ανθρώπινους πληθυσμούς, θα μπορούσαν να είναι πιο επιτυχημένα εάν στόχευαν στη μείωση του αποικισμού του στους φυσικούς ξενιστές του. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι όρνιθες αποτελούν τον κύριο φυσικό ξενιστή για το *Campylobacter*, καθώς και ότι ένα υψηλό ποσοστό του κρέατος κοτόπουλου λιανικής είναι μολυσμένο με αυτό, οι όρνιθες αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα έκθεσης του ανθρώπου σ' αυτό το παθογόνο. Συνεπώς, τα μέτρα προστασίας για τους ανθρώπινους πληθυσμούς θα μπορούσαν να είναι πιο επιτυχημένα εάν στόχευαν στη μείωση του αποικισμού του *Campylobacter* στα κοτόπουλα.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη ενός ανοσογονικού συμπλέγματος ικανού να επάγει μια ανοσολογική απόκριση ευρέως φάσματος έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter jejuni* στις όρνιθες.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού επιλέχθηκε η παρέμβαση σε δύο επίπεδα:

- α) Την επιλογή ανοσογονικής περιοχής κατάλληλου αντιγόνου του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter jejuni* με τη μεγαλύτερη εφικτή αμινοξική ομολογία με το πλήθος των αντιγόνων που ταυτοποιήθηκαν στο παθογόνο βακτήριο με στόχο να προκληθεί η μέγιστη διασταυρωτή ανοσολογική κάλυψη έναντι του παθογόνου και
- β) Την ανάπτυξη ενός εύχρηστου, από συνθετικής οπτικής, φορέα ανοσογονικών πεπτιδικών αλληλουχιών κατάλληλου να επάγει ανοσολογική απόκριση.

5. Πειραματικό μέρος

5.1. Αντιδραστήρια και διαλύτες

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα εξής:

- {4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ}-ρητίνη ή Rink Amide AM ρητίνη (G.L. Biochem, Shanghai, China)
- Διγλωρομεθάνιο (Fluka, Germany).
- Διμέθυλοφορμαμίδιο (Fluka, Germany)
- N^a-Fmoc- και R- προστατευμένα αμινοξέα (G.L. Biochem, Shanghai, China)
- Τριφθοροξικό οξύ (Riedel, Germany)
- Πιπεριδίνη (Riedel-de Haen, Germany)
- Διαιθυλαιθέρας (Riedel-de Haen, Germany)
- Εξάνιο (LAB-SCAN, Dublin, Ireland)
- Ισοπροπανόλη (Fluka, Switzerland)
- Μεθανόλη (LAB-SCAN, Dublin, Ireland)
- Ακετονιτρίλιο (LAB-SCAN, Dublin, Ireland)
- Τριόξοπροπυλοσιλάνιο (Acros Organics, USA)
- Διόξοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA, Merck)
- Οξικός ανυδρίτης (Merk, Germany)
- Διόξοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο ή DIC (Fluka, Germany)
- 1-υδροξυβενζοτριάζολιο ή HOBt (G.L. Biochem, Shanghai, China)
- εξαφθοροφωσφορικό άλας της 2- (1H-βενζοτριάζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθουρίας ή HBTU (Fluka, Germany)
- Νινυδρίνη (Sigma-Aldrich, USA)
- Κυανιούχο κάλιο (Fluka, Switzerland)
- Αιθανόλη (Fluka, Switzerland)
- Φαινόλη (Fluka, Switzerland)
- Πυριδίνη (Merk, Darmstadt, Germany)
- Ιωδοξικό οξύ (Sigma-Aldrich, Switzerland)

- Οξικό οξύ (Sigma-Aldrich, Germany)
- Tris base (Fluka, Switzerland)
- Υδροχλωρικό οξύ (Riedel-de Haen, Germany)

5.2. Επιλογή του αντιγόνου και της πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου

Αρχικά, έγινε η μελέτη διαφόρων πρωτεϊνών-αντιγόνων του *Campylobacter jejuni* (NCBI taxonomy ID: 197), έτσι ώστε, στη συνέχεια, να γίνει η επιλογή από της κατάλληλης πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου που θα συνδεθεί, στη συνέχεια, με τον πεπτιδικό φορέα.

Κάθε μια από τις πρωτεΐνες αυτές μελετήθηκαν ως προς την πιθανότητα ύπαρξης γραμμικού επιτόπου στην αλληλουχία τους, την υδροφιλικότητα τους, την προσβασιμότητα της επιφάνειας τους και την ευελιξία της δομής τους με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων.

Συγκεκριμένα, με τον αλγόριθμο Beripred Linear Epitope Prediction 2.0 έγινε η πρόβλεψη της θέσης των γραμμικών επιτόπων Β-κυττάρων στις πρωτεΐνες. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε 85 γνωστούς επίτοπους Β-κυττάρων⁶⁶.

Ο προσδιορισμός της προσβασιμότητας της επιφάνειας των αντιγόνων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Emini Surface Accessibility Prediction. Μέσω της οποίας προσδιορίζονται οι πεπτιδικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης που έχουν αυξημένη πιθανότητα να βρεθούν στην επιφάνεια του μορίου⁶⁷.

Επιπλέον, η υδροφιλικότητα υπολογίστηκε με τον αλγόριθμο Parker Hydrophilicity Prediction. Βάση της μεθόδου αποτελεί μια υδρόφιλη κλίμακα που στηρίζεται στους χρόνους κατακράτησης διαφόρων πεπτιδίων κατά τη διάρκεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε στήλη αντίστροφης φάσης⁶⁸.

Η μέτρηση της ευελιξίας της δομής των πρωτεϊνών έγινε με τον αλγόριθμο Karplus & Schulz Flexibility Prediction. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κινητικότητα των πρωτεϊνικών τμημάτων 31 γνωστών πρωτεϊνών⁶⁹.

Από τις μελέτες αυτές προέκυψαν ορισμένες πεπτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες έχουν αυξημένες τις προηγούμενες παραμέτρους.

Επιπλέον, για να γίνει η επιλογή του πεπτιδίου-επιτόπου, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ομολογίας για κάθε μία από τις πεπτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες-αντιγόνα.

5.3. Σύνθεση πεπτιδίου-επιτόπου

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Rink Amide AM και όλα τα αμινοξέα που προστέθηκαν ήταν N^α-Fmoc παράγωγα με τις παράπλευρες αλυσίδες τους προστατευμένες. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH. Ως αντιδραστήριο σύζευξης των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε το DIC παρουσία του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt, καθώς και το HBTU παρουσία της βάσης DIEA. Η σύσταση του διαλύματος αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη και απομάκρυνσης των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων ήταν: TFA/θειανισόλη/φαινόλη/H₂O/EDT/TIS σε αναλογία 81,5:5:5:5:2,5:1.

Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Αρχικά, με σκοπό τη διόγκωση των κόκκων της ρητίνης πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με τους διαλύτες DMF και DCM ως εξής: 15 λεπτά με DMF, 15 λεπτά με DCM και τέλος 15 λεπτά με DMF. Στην συνέχεια, έγινε η απομάκρυνση της Fmoc προστατευτικής ομάδας από την δραστική ομάδα της ρητίνης χρησιμοποιώντας διάλυμα 20% v/v πιπεριδίνης σε DMF, σε δύο στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται η απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται (2 λεπτά ανάδευση), ενώ, στη συνέχεια, η ποσοτική απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας (10 λεπτά ανάδευση). Στην πορεία, ακολούθησαν εκπλύσεις της ρητίνης με DMF και DCM (3×1 λεπτό DMF, 3×1 λεπτό DCM, 3×1 λεπτό DMF). Τέλος, διαπιστώθηκε η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας μέσω του τεστ Kaiser με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.5.

Στη συνέχεια, έγινε η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος στην δραστική ομάδα της ρητίνης. Μετά την προσκόλληση του πρώτου αμινοξέος, ακολουθεί η αποπροστασία της α-αμινομάδας του και η σύζευξή του με το επόμενο αμινοξύ κ.ο.κ..

Η σύζευξη των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 3 ισοδύναμα του προστατευμένου αμινοξέος και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Συγκεκριμένα, η αναλογία αμινοξέος, DIC, HOBt, ρητίνης ήταν 3/3/3/1 και ο διαλύτης ήταν μίγμα DCM/DMF αναλογίας 1:1. Αρχικά, το Fmoc-προστατευόμενο αμινοξύ και το HOBt διαλύθηκαν στο μίγμα DMF/DCM και προστέθηκε το αντιδραστήριο σύζευξης DIC. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 0 °C για περίπου 20 λεπτά. Τέλος, το διάλυμα σύζευξης προστέθηκε στη πεπτιδορητίνη και η αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησαν εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης με DCM και DMF. Στις περιπτώσεις που δεν ήταν αποδοτική η μέθοδος των καρβοδιμιδίων, χρησιμοποιήθηκε το HBTU με την παρουσία της βάσης DIEA μέσω της ίδιας διαδικασίας. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης πραγματοποιήθηκε μέσω του τεστ Kaiser.

Επιπλέον, καθώς το πεπτίδιο θα συνδεόταν στην συνέχεια με τον πεπτιδικό φορέα μέσω θειοαιθερικού δεσμού, πραγματοποιήθηκε η ιωδοακετυλίωση του στο N-τελικό άκρο. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά έγινε η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από το N-τελικό αμινοξύ και, στην συνέχεια, προστέθηκε η ιωδοακετυλομάδα. Η διαδικασία είναι αντίστοιχη αυτής της σύζευξης ενός αμινοξέος, μόνο που στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 10 ισοδύναμα του ιωδοοξικού οξέος του αντιδραστηρίου σύζευξης DIC και του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt και το vessel της αντίδρασης καλύφθηκε, έτσι ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το φως, καθώς το ιώδιο είναι φωτοευαίσθητο. Ακολούθησαν εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης με DCM και DMF και η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε μέσω του τεστ Kaiser.

Τέλος, έγινε η απελευθέρωση του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων. Το πεπτίδιο ελήφθη στην ελεύθερη μορφή του μετά από επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με το διάλυμα αποκοπής. Για τον σκοπό αυτό, η πεπτιδορητίνη και το διάλυμα αποκοπής μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκαν για ανάδευση για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε διήθηση τις ρητίνης και το TFA εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα, προσθέτοντας διάλυμα DCM:εξάνιου (1:1) με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων του TFA. Στη συνέχεια, το πεπτίδιο καταβυθίστηκε με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Ακολούθησε διήθηση και κατεργασία με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, το πεπτίδιο διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκε^{53,70}.

5.4. Καθαρισμός πεπτιδίου-επιτόπου με RP-HPLC

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC (Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, το πεπτίδιο διαλύθηκε σε 5,5 ml μίγματος H₂O/0.1% TFA και CH₃CN/0.1% TFA αναλογίας 90/10. Έπειτα, το κάθε δείγμα εισήχθη στην HPLC. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA και το σύστημα έκλουσης ήταν βαθμωτό και ξεκινούσε από (A)/(B):90/10, φτάνοντας σε (A)/(B):50/50. Ο χρόνος έκλουσης ήταν 30 min, η ανίχνευση έγινε στα 214 nm, στα 254 nm και στα 280 nm και η ταχύτητα ροής ήταν 20 ml/min.

5.5. Ταυτοποίηση πεπτιδίου-επιτόπου με ESI-MS

Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας με την τεχνική ESI προετοιμάστηκαν διαλύματα του πεπτιδίου σε H₂O/CH₃CN αναλογίας 8/2 v/v, συγκέντρωσης 10 ppm. Τα διαλύματα οξινίστηκαν με φορμικό οξύ με σκοπό τον ιονισμό του πεπτιδίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ένεση στο MS και λήφθηκαν τα φάσματα μάζας. Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας Xevo G2-X2 Q-ToF (Waters, Manchester, UK) συνδεδεμένο στο σύστημα ACQUITY UPLC iClass Plus (Waters, Milford, MA, ΗΠΑ).

5.6. Ταυτοποίηση πεπτιδίου-επιτόπου με NMR

Για την καταγραφή των φασμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων (¹H, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹H NOESY) των συντιθέμενων πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε όργανο Bruker Avance με συχνότητα συντονισμού ¹H 500MHz.

Για την λήψη των φασμάτων, αρχικά, έγινε η μετατροπή του πεπτιδίου σε χλωριούχο άλας. Για το σκοπό αυτό, το πεπτίδιο διαλύθηκε σε νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 4,9 με την προσθήκη διαλυμάτων HCl και NaOH. Στη συνέχεια, έπειτα από τη λυοφιλοποίηση των πεπτιδίων, αυτά διαλύθηκαν σε DMSO-d₆, ώστε

να γίνει η παρατήρηση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων. Η θερμοκρασία καταγραφής 298 K και η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 3mM.

5.7. Σχεδιασμός και σύνθεση πεπτιδικού φορέα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα πεπτίδια εξαιτίας του μικρού μοριακού τους βάρους δεν είναι ικανά να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση από μόνα τους και λόγω αυτού είναι απαραίτητη η σύζευξη τους με έναν φορέα. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτό σχεδιάστηκε ένας πεπτιδικός φορέας βασισμένος στους ολιγοπεπτιδικούς φορείς SOC και CPSOC, που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας. Έτσι, νέος φορέας που αναπτύχθηκε είναι ο Ac-(Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Cys)₂-NH₂, και σχεδιάστηκε έτσι ώστε να μπορεί να συζευχθεί μέσω της σουλφυδρυμάδας των κυστεϊνών με το πεπτίδιο-επίτοπο. Η παραλλαγή αυτή αφορά την δυσκολία πρόσδεσης τεσσάρων αντιγράφων του πεπτιδίου-επιτόπου στον φορέα CPSOC.

Η σύνθεση του πεπτιδικού φορέα έγινε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Rink Amide AM και όλα τα αμινοξέα ήταν N^α-Fmoc παράγωγα με τις παράπλευρες αλυσίδες τους προστατευμένες. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH. Ως αντιδραστήριο σύζευξης των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε το DIC με τη παρουσία του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt. Η σύσταση του διαλύματος αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη και απομάκρυνσης των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων ήταν: TFA/H₂O/EDT/TIS σε αναλογία 94:2,5:2,5:1. Η συνολική διαδικασία είναι αντίστοιχη μ' αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 5.2.

5.8. Καθαρισμός πεπτιδίου-φορέα μέσω RP-HPLC

Ο καθαρισμός του φορέα πραγματοποιήθηκε μέσω ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC (Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, το πεπτίδιο διαλύθηκε σε 5,5 ml διαλύματος H₂O/0.1% TFA και

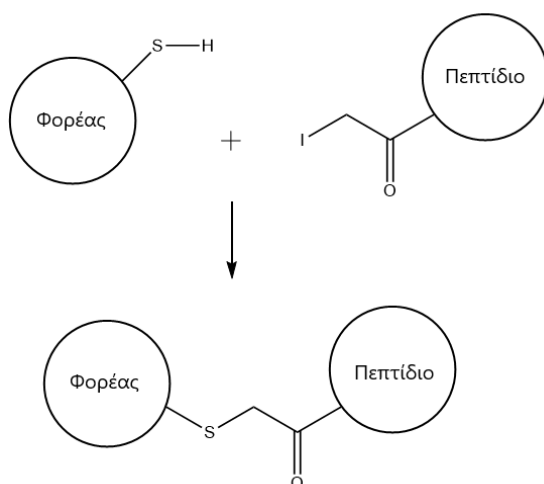
CH₃CN/0.1% TFA αναλογίας 90/10. Έπειτα, το κάθε δείγμα εισήχθη στην HPLC. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA και το σύστημα έκλουσης ήταν βαθμωτό ξεκινώντας από (A)/(B):90/10, φτάνοντας σε (A)/(B):50/50. Ο χρόνος έκλουσης ήταν 30 min, η ανίχνευση έγινε στα 214 nm και η ταχύτητα ροής ήταν 20 ml/min.

5.9. Ταυτοποίηση πεπτιδίου-φορέα μέσω ESI-MS

Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας με την τεχνική ESI, αρχικά, προετοιμάστηκαν διαλύματα του πεπτιδίου σε H₂O, συγκέντρωσης 10 ppm. Τα διαλύματα οξινίστηκαν με φορμικό οξύ με σκοπό τον ιονισμό του πεπτιδίου. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ένεση του προς ανάλυση πεπτιδίου στο MS και λήφθηκαν τα φάσματα μάζας. Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα φασματομετρίας μάζας υψηλής ευκρίνειας και ακρίβειας LC-MS/LTQ-ORBITRAP.

5.10. Σύνθεση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω θειοαιθερικού δεσμού

Ο θειοαιθερικός δεσμός σχηματίστηκε μέσω της ελεύθερης κυστεΐνης του πεπτιδικού φορέα και της ιωδοακετυλομάδας του πεπτιδίου-επιτόπου, όπως φαίνεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού μέσω της ελεύθερης κυστεΐνης του πεπτιδικού φορέα και της ιωδοακετυλομάδας του πεπτιδίου-επιτόπου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Σε 4,9 ml διαλύματος Tris buffer/AcN αναλογίας 1:1 διαλύθηκαν 15,5 mg πεπτιδίου, το PH ρυθμίστηκε στο 8,2 και αφέθηκε υπό ανάδευση σε αδρανείς συνθήκες αζώτου και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε σταδιακά ο πεπτιδικός φορέας σε διάστημα 1 ώρας, ελέγχοντας και διατηρώντας το PH στο 8,2. Μετά την προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του φορέα, η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για άλλες 3 ώρες και τερματίστηκε με την ρύθμιση του PH στο 3 προσθέτοντας 10 μl φορμικού οξέος. Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης λυοφιλοποιήθηκε⁴⁹.

5.11. Καθαρισμός συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου με RP-HPLC

Ο καθαρισμός του συμπλέγματος του φορέα με το πεπτίδιο πραγματοποιήθηκε μέσω ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC (Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF). Για την προετοιμασία του δείγματος το ανοσογονικό σύμπλεγμα διαλύθηκε σε 5,5 ml διαλύματος H₂O/0.1% TFA και CH₃CN/0.1% TFA αναλογίας 90/10 v/v. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ένεση του κάθε δείγματος στην HPLC. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: (A) H₂O παρουσία 0.1% TFA και (B) CH₃CN παρουσία 0.1% TFA. Το σύστημα έκλουσης ήταν βαθμωτό ξεκινώντας από αναλογία (A)/(B) : 90/10 καταλήγοντας σε αναλογία (A)/(B) : 50/50. Ο χρόνος έκλουσης ήταν 30 min, ενώ η ανίχνευση έγινε στα 214 nm και η ταχύτητα ροής ήταν 20 ml/min.

5.12. Ταυτοποίηση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω ESI-MS

Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας με την τεχνική ESI, αρχικά, προετοιμάστηκαν διαλύματα του ανοσογονικού συμπλέγματος σε μίγμα H₂O/CH₃CN αναλογίας 8/2 v/v, συγκέντρωσης 10 ppm. Τα διαλύματα οξινίστηκαν με φορμικό οξύ με σκοπό τον ιονισμό του ανοσογονικού συμπλέγματος. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ένεση στο MS και λήφθηκαν τα φάσματα μάζας. Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας Xeno

G2-X2 Q-ToF (Waters, Manchester, UK) συνδεδεμένο στο σύστημα ACQUITY
UPLC iClass Plus (Waters, Milford, MA, ΗΠΑ).

6. Αποτελέσματα

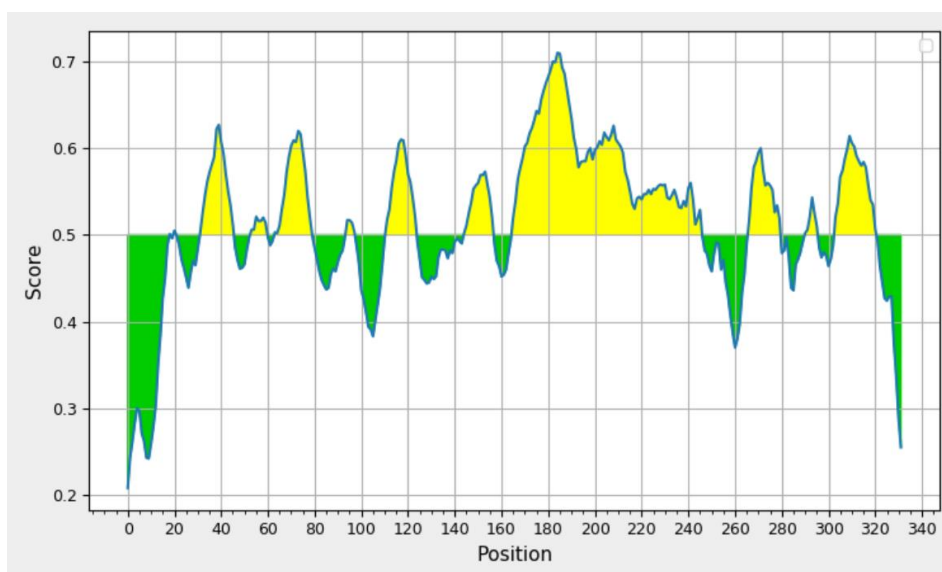
6.1. Επιλογή του αντιγόνου και της πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου

Αρχικά, έγινε η μελέτη διάφορων πρωτεϊνών-αντιγόνων του *Campylobacter*, έτσι ώστε, στη συνέχεια, να γίνει η επιλογή από της κατάλληλης πεπτιδικής αλληλουχίας-επιτόπου που θα συνδεθεί, στη συνέχεια, με τον πεπτιδικό φορέα ώστε να σχηματιστεί το ανοσογονικό σύμπλεγμα. Τα αντιγόνα τα οποία μελετήθηκαν, καθώς και ο ρόλος τους στον αποικισμό και στην μόλυνση του ξενιστή φαίνονται στον πίνακα 5⁷¹:

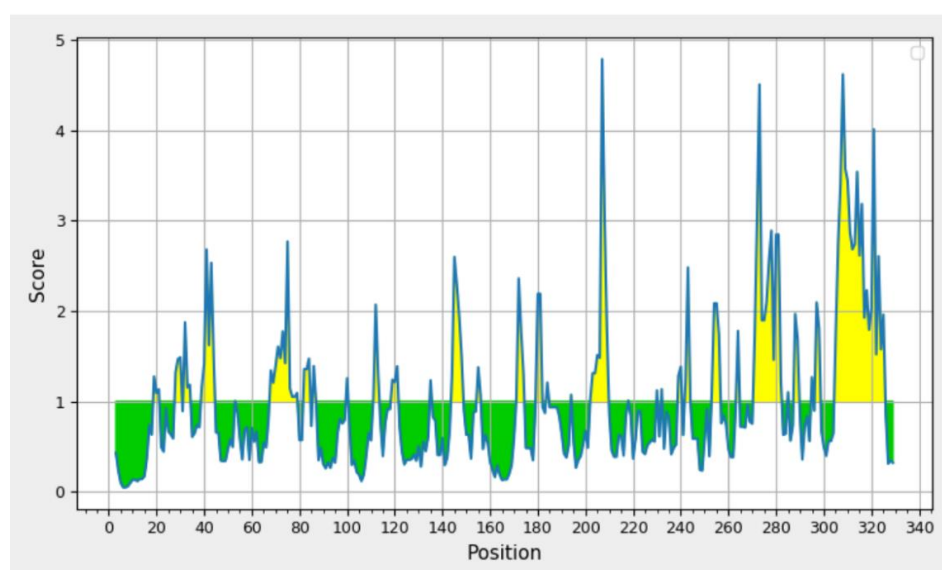
Πίνακας 5: Πρωτεΐνες-αντιγόνα του *Campylobacter jejuni* και ο ρόλος τους στον αποικισμό και στην μόλυνση του ξενιστή.

Αντιγόνα	Ρόλος αντιγόνου
<i>C. jejuni</i> glycoprotein (Cj1496)	Εισβολή στα κύτταρα ξενιστές
<i>Campylobacter</i> adhesion protein to fibronectin (CadF)	Προσκόλληση στα κύτταρα ξενιστές
<i>Campylobacter</i> invasion antigen B (CiaB)	Εισβολή στα κύτταρα ξενιστές
<i>Campylobacter</i> surface-exposed lipoprotein A (JlpA)	Προσκόλληση στα κύτταρα ξενιστές
Component of multidrug efflux pump (CmeC)	Σύστημα εκροής πολλαπλών παραγόντων
Flagellar hook-associated protein (FlgK)	Κινητικότητα
Flagellar hook-basal body complex protein (FlgE-1)	Κινητικότητα και παράδοση αντιγόνων εισβολής (πρωτεΐνες Cia)
Flagellin A protein (FlaA)	Κινητικότητα, προσκόλληση και εισβολή
Flagellin B protein (FlaB)	Κινητικότητα, προσκόλληση και εισβολή
Flagellin protein family (FlgL)	Παράδοση αντιγόνων εισβολής (πρωτεΐνες Cia)
Hemolysin co-regulated protein (Hcp)	Μέσο έκκρισης και πρωτεΐνη-τελεστής στο σύστημα έκκρισης τύπου VI
N-linked protein glycosylation (N-glycan)	Προστασία πρωτεϊνών από την εντερική πρωτεάση και προσκόλληση
Peptidoglycan-associated essential protein (PAL; Omp18; CjaD)	Διατήρηση κυτταρικού τοιχώματος
Major outer membrane protein (MOMP)	Προσκόλληση και εισβολή
Ferric enterobactin receptor (CfrA)	Προσκόλληση και εισβολή
Cysteine ABC transporter substrate-binding protein (CjaA)	Πρωτεΐνη δέσμευσης και συστατικό του συστήματος μεταφοράς ABC
DNA binding protein for biofilm formation (Dps)	Σχηματισμός Biofilm
Cell binding factor (Peb1)	Προσκόλληση στα κύτταρα ξενιστές
Fibronectin-like protein FlpA (Cj1279c)	Προσκόλληση στα κύτταρα ξενιστές

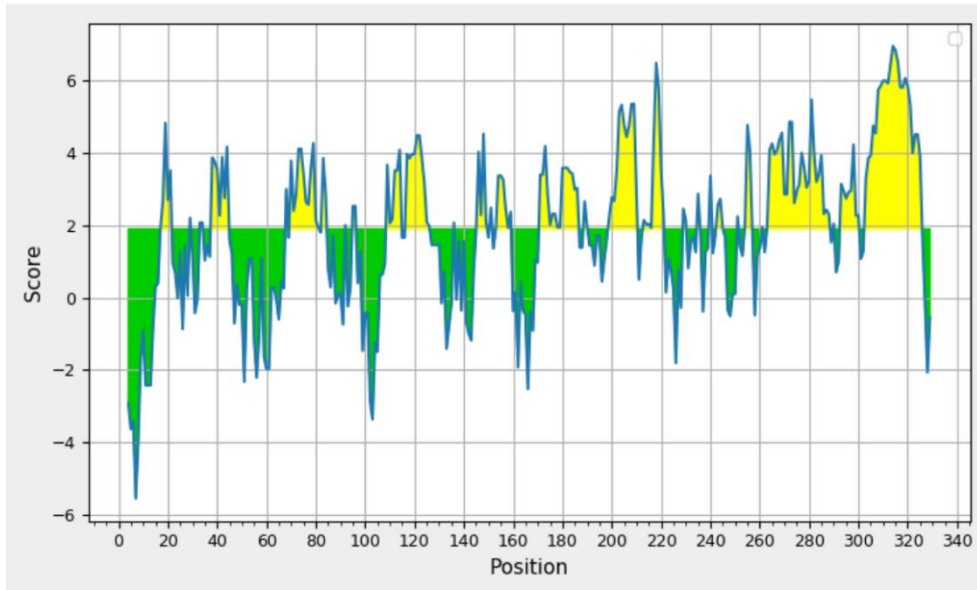
Κάθε μια από τις πρωτεΐνες αυτές μελετήθηκαν ως προς την πιθανότητα ύπαρξης γραμμικού επιτόπου στην δομή τους, την υδροφιλικότητα τους, την προσβασιμότητα της επιφάνειάς τους και την ευελιξία της δομής τους με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (Immune Epitope Database Analysis Resource). Στις εικόνες 22, 23, 24 και 25 βλέπουμε τα ενδεικτικά τα διαγράμματα για μία από αυτές τις πρωτεΐνες, συγκεκριμένα της πρωτεΐνης CadF. Η ίδια πορεία ακολουθήθηκε και για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες.



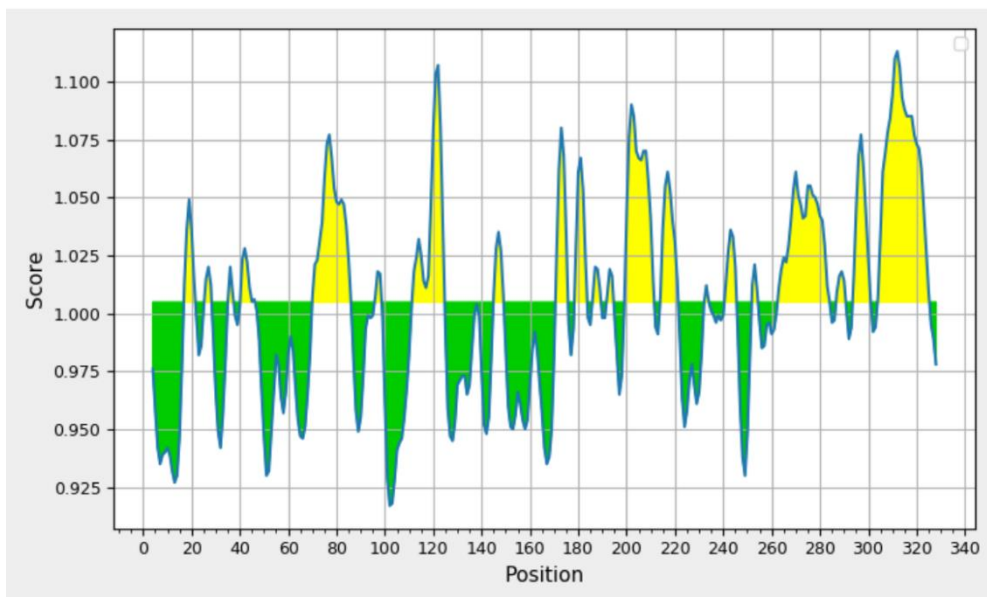
Εικόνα 22: Διάγραμμα πρόβλεψης ύπαρξης γραμμικού επιτόπου στη δομή της πρωτεΐνης CadF του *Campylobacter jejuni* σύμφωνα με τον αλγόριθμο *Beipred Linear Epitope Prediction 2.0*.



Εικόνα 23: Διάγραμμα προσβασιμότητας της πρωτεΐνης CadF του *Campylobacter jejuni* σύμφωνα με τον αλγόριθμο *Emini Surface Accessibility Prediction*.



Εικόνα 24: Διάγραμμα υδροφιλικότητας της πρωτεΐνης CadF του *Campylobacter jejuni* σύμφωνα με τον αλγόριθμο *Parker Hydrophilicity Prediction*.



Εικόνα 25: Διάγραμμα πρόβλεψης ευελιξίας της πρωτεΐνης CadF του *Campylobacter jejuni* σύμφωνα με τον αλγόριθμο *Karplus & Schulz Flexibility Prediction*.

Από τις παραπάνω μελέτες προέκυψαν οι πεπτιδικές αλληλουχίες που παρατίθενται στον πίνακα 6, οι οποίες έχουν αυξημένες τις προηγούμενες παραμέτρους.

Πίνακας 6: Πεπτιδικές αλληλουχίες με έχουν αυξημένες τις παραμέτρους της ύπαρξης γραμμικού επιτόπου, της υδροφιλικότητας, της προσβασιμότητας και της ευελιξία της δομής τους.

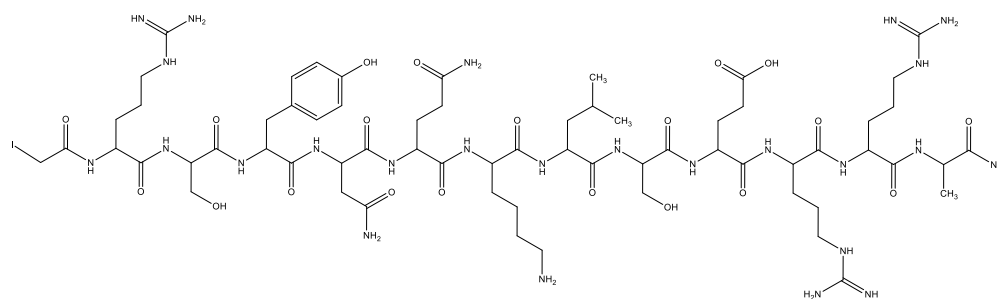
Πρωτεΐνη	Πεπτίδιο	Επίτοπος	Προσβασιμότητα	Υδροφιλικότητα	Ευελιξία
Cj1496	Q ³⁶ TREFDEARQS ⁴⁶	+++	+++	+++	+++
(Q0P8C1)	L ⁵⁵ QKERLENLEKKEA ⁷⁰	+++	+++	++	+++
CadF	H ⁶⁸ YSDVKYTNSTL ⁷⁹	+++	+++	+++	++
	R ²⁷¹ SYNQKLSERRA ²⁸²	+++	+++	+++	+++
	G ³⁰⁵ QDKPRSSNDTKEGRAD ³²¹	+++	+++	++	+++
CiaB	E ⁶⁸ WKKNNFKEEKIT ⁸⁰	+++	+++	++	+++
	L ⁸² KHKFYEEIRKIFYEKEH ⁹⁸	++	+++	++	+++
	S ⁶⁰¹ GEFERYKMQ ⁶¹⁰	+++	+++	++	+++
JlpA	K ²⁵ TVKKYENQL ³⁴	+++	+++	++	+++
Cmec	G ¹⁴⁷ KYRDTYRAS ¹⁵⁶	+++	+++	+++	+++
	Q ²³⁶ YNEAKLNKENY ²⁴⁷	+++	+++	++	++
	Q ⁴⁰¹ YDNAQASEQSYKRI ⁴¹⁵	+++	+++	++	++
	E ⁴⁷⁰ QSEDTSKNIKEESKNL ⁴⁸⁶	+++	+++	+++	+++
FlgK	T ⁷⁹ ATTNKENTAYKQQV ⁹³	+++	+++	++	++
	G ¹⁹² TTQNANLDRDKRDQ ²⁰⁶	+++	+++	++	++
	S ³⁹⁴ TTMDDTKQG ⁴⁰³	+++	+++	++	+++

	N ⁴¹¹ SDTDDNNGN ⁴²¹	+++	+++	+	+++
FlgE-1	G ²⁰⁰ YNKKDGTAKNEND ²¹³	+++	+++	+++	+++
	Y ⁵⁷² TDTQ GKISKND ⁵⁸³	+++	+++	++	++
FlaA	T ⁹¹ IKTKATQAAQDGQSLKTRT ¹¹⁰	+++	+	+	++
FlaB	T ⁹¹ IKTKATQAAQDGQSLKTRT ¹¹⁰	+++	+	+	++
FlgL	Q ⁶¹ VKESTSRAQEMT ⁷³	+++	+	++	+++
	N ²³⁰ GLDPDKDFEYDDS ²⁴³	+++	+++	++	+
	Q ³²⁸ FDDKTEMQKIEEEMK ³⁴⁶ KLN ³⁴⁶	+++	+++	++	+++
Hcp	G ²⁸ NRYKSGHED ³⁷	+++	++	+++	+++
	N ¹²⁹ AQESSNHDKTE ¹⁴⁰	+++	++	++	+++
PAL	D ³¹ ANKMSNNGMSNTDTMSDAE ⁵¹	+++	+++	+	+++
MOMP	S ⁵⁵ NLNNSKQDHYR ⁶⁷	+++	++	++	++
CfrA	K ⁵¹ KELQSKPYRD ⁶¹	+++	++	+++	+++
	D ²²⁷ QAQSPTKAN ²³⁶	+++	+++	+	+++
	S ²⁶¹ RNHYDNKQG ²⁷⁰	+++	+++	+++	++
	N ⁵⁰⁵ FKDKISTQRYNKDD ⁵¹⁹	+++	+	++	+++
FlpA	S ⁷⁶ SDENPDFKLVGTIKDKFQTHY ⁹⁷	+++	++	+	++
(Cj1279c)	D ¹⁷⁵ DKEFKKIAEVKNRLNA ¹⁹¹	+++	++	++	+

Με βάση τα παραπάνω, η αλληλουχία που επιλέχθηκε ως επίτοπος είναι η R²⁷¹SYNQKLSERRA²⁸² της πρωτεΐνης CadF του *Campylobacter jejuni*. Η επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας έγινε με βάση την υψηλή υδροφιλικότητα, ευκαμψία, επιφανειακή προσβασιμότητα, ύπαρξη γραμμικού επιτόπου και ομολογία με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες-αντιγόνα, καθώς, επίσης, με συνθετικά κριτήρια.

6.2. Σύνθεση πεπτιδίου-επιτόπου

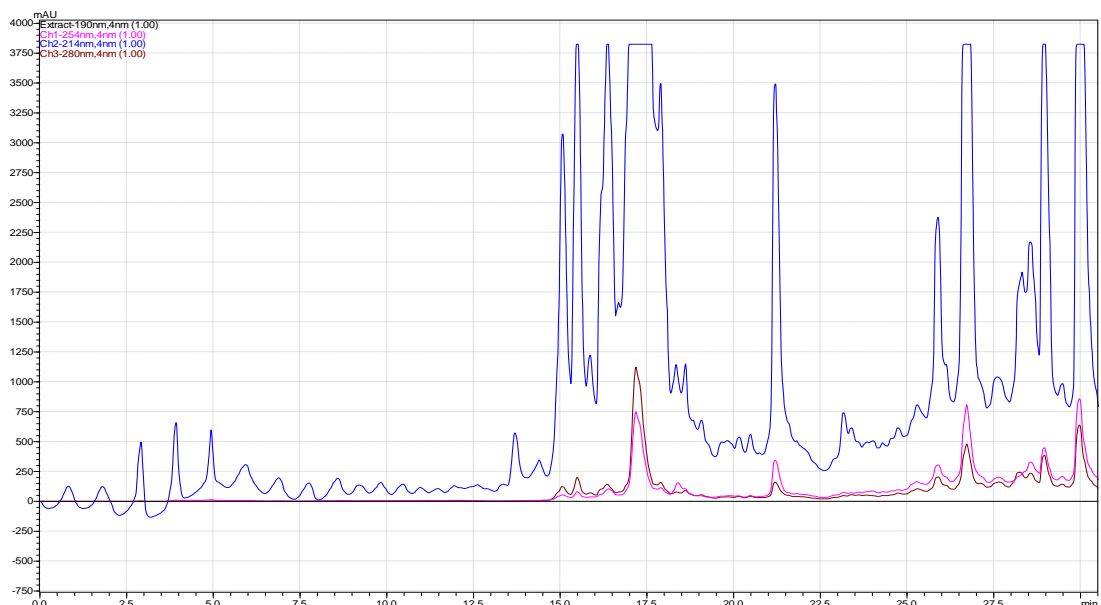
Μετά την επιλογή της κατάλληλης πεπτιδικής αλληλουχίας έγινε η σύνθεση του πεπτιδίου και η ταυτοποίηση του πεπτιδίου σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν παραπάνω. Ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου φαίνεται στην εικόνα 32.



Εικόνα 32: Συντακτικός τύπος πεπτιδίου-επιτόπου.

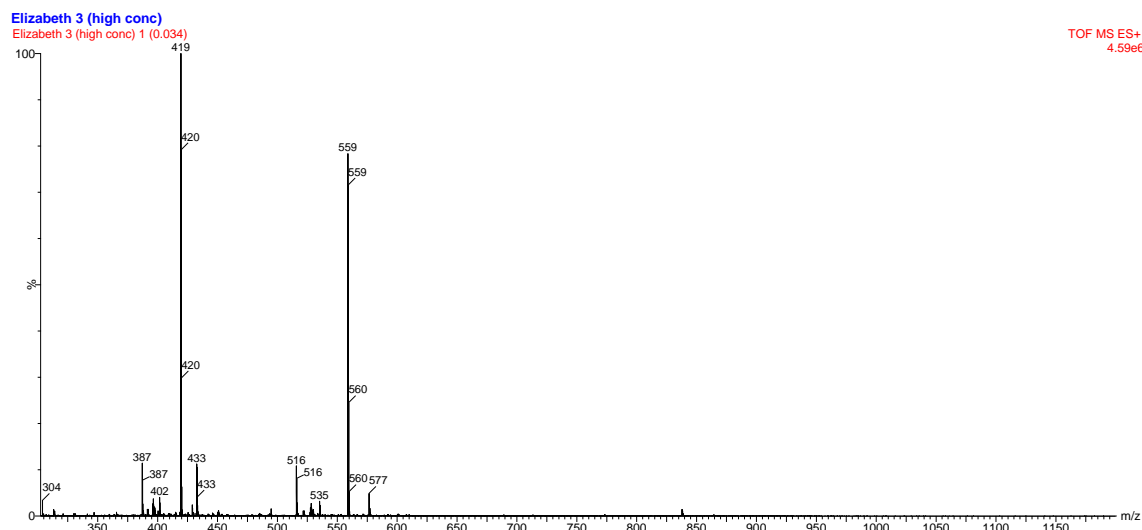
Η σύνθεση παρουσίασε ορισμένες δυσκολίες κατά την εισαγωγή ορισμένων αμινοξέων, όπως της δεύτερης αργινίνης, καθώς, επίσης, κατά την αποκοπή της Fmoc-ομάδας του γλουταμινικού. Η απόδοση σύνθεσης ήταν 84 %, ενώ η απόδοση μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και την απομάκρυνση των προστετικών ομάδων ήταν >100 %. Η απόδοση αυτή πιθανά οφείλεται σε μη ορθή εκτίμηση της υποκατάσταση της ρητίνης.

Ο καθαρισμός του ελεύθερου πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Στην εικόνα 33 παρατίθεται το χρωματογράφημα του πεπτιδίου. Η απόδοση μετά τον καθαρισμό ήταν 28 %.



Εικόνα 33: Ημιαρασκευαστική RP-HPLC οι διαλύτες έκλουσης ήταν: (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA, και το σύστημα έκλουσης: από (A)/(B):90/10 σε (A)/(B):50/50.

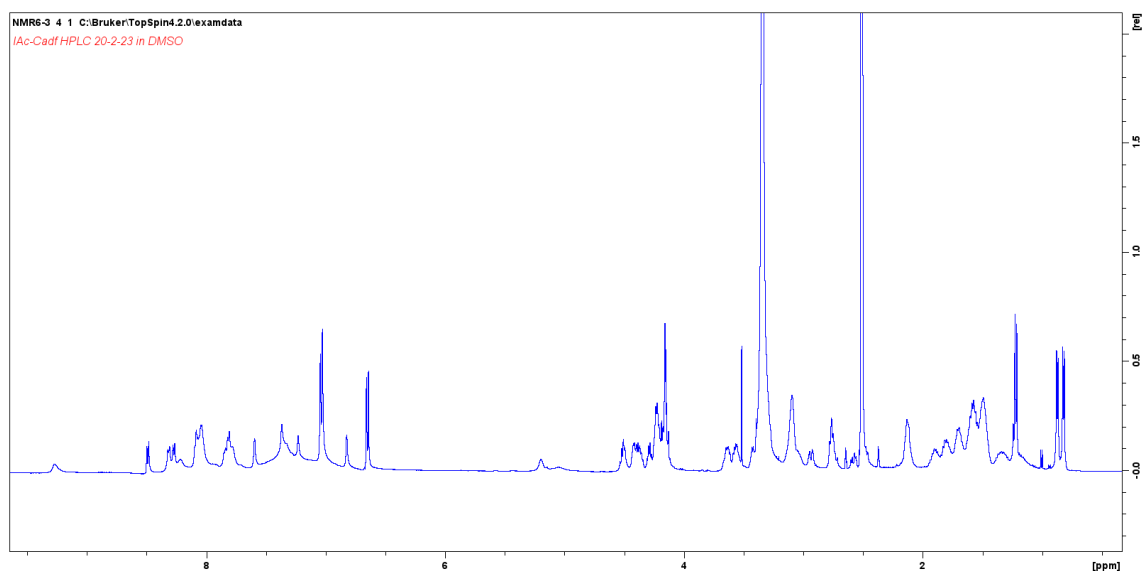
Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του πεπτιδίου ήταν η φασματομετρία μάζας ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στην εικόνα 34. Η κορυφή σε τιμή m/z στα 419 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν $[M+4H]^4+$, ενώ η κορυφή σε m/z = 559 amu στο $[M+3H]^3+$.



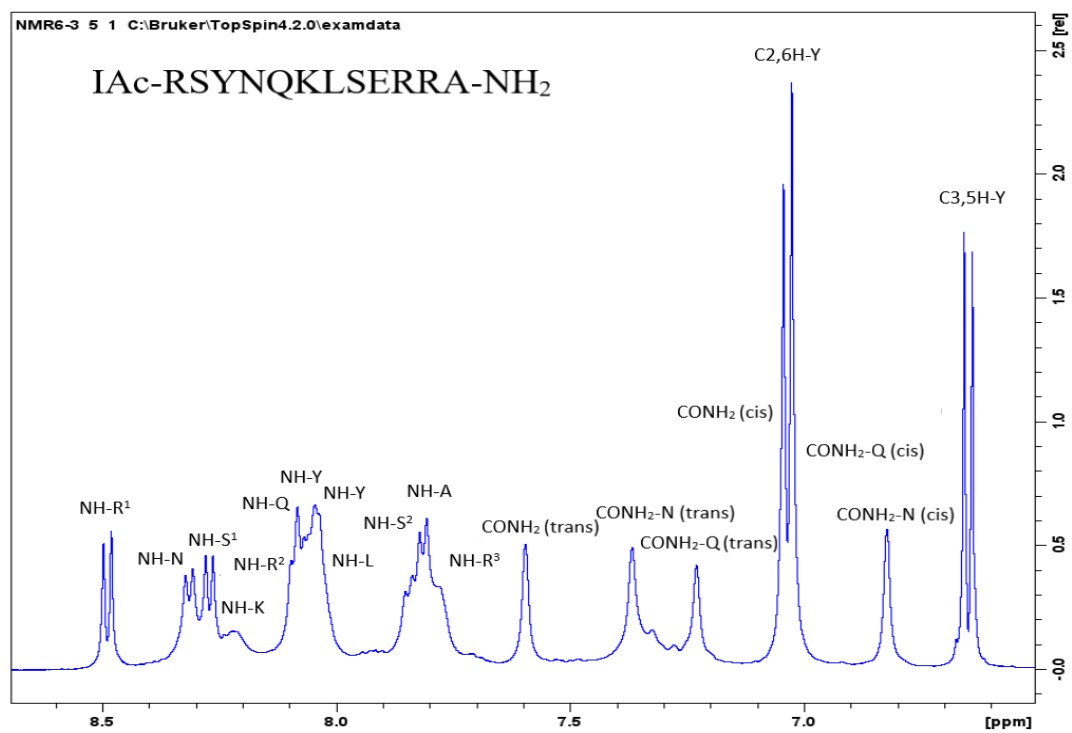
Εικόνα 34: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂. Αναμενόμενο MB: 1674,63 Da. Βρέθηκε: 1674 Da.

Επιπλέον, για τον πλήρη χαρακτηρισμό του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε και η φασματοσκοπία NMR. Τα φάσματα ¹H, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY και ¹H-¹H

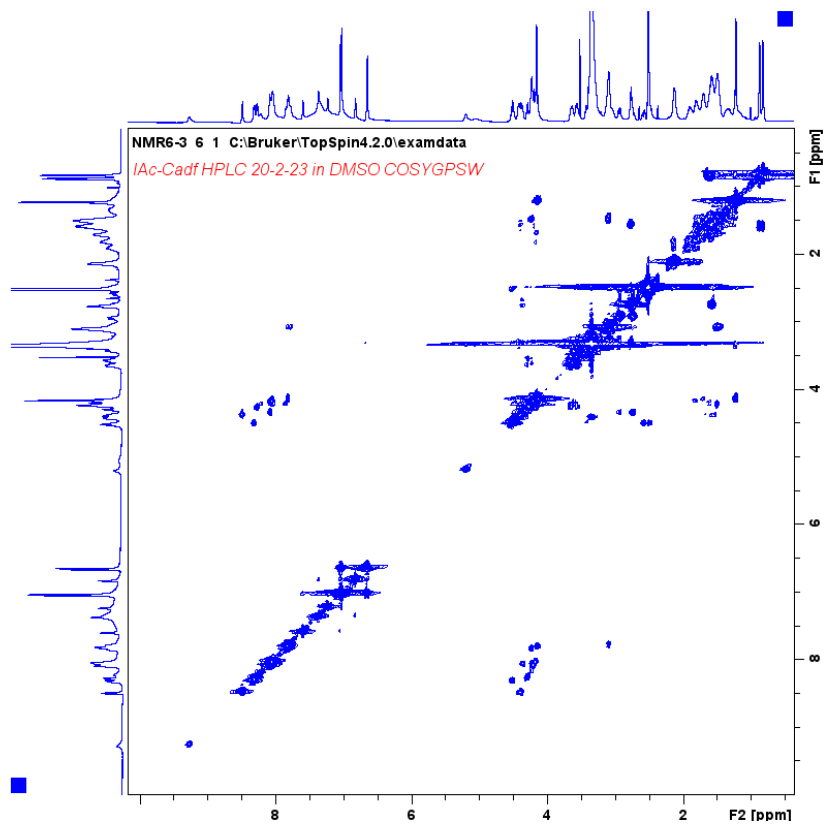
TOCSY φαίνονται στις εικόνες 35, 36, 37, 38, 39 και 40. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 7 και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές για παρόμοια πεπτίδια.



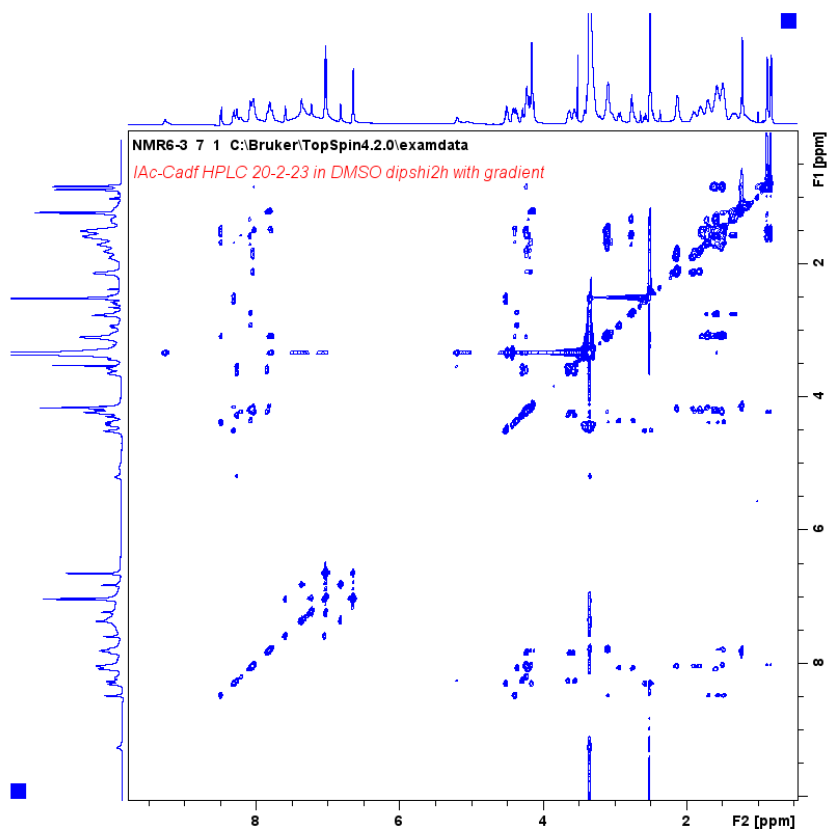
Εικόνα 35: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του πεπτιδίου $\text{IAc-RSYNQKLSERRA-NH}_2$ σε DMSO-d_6 .



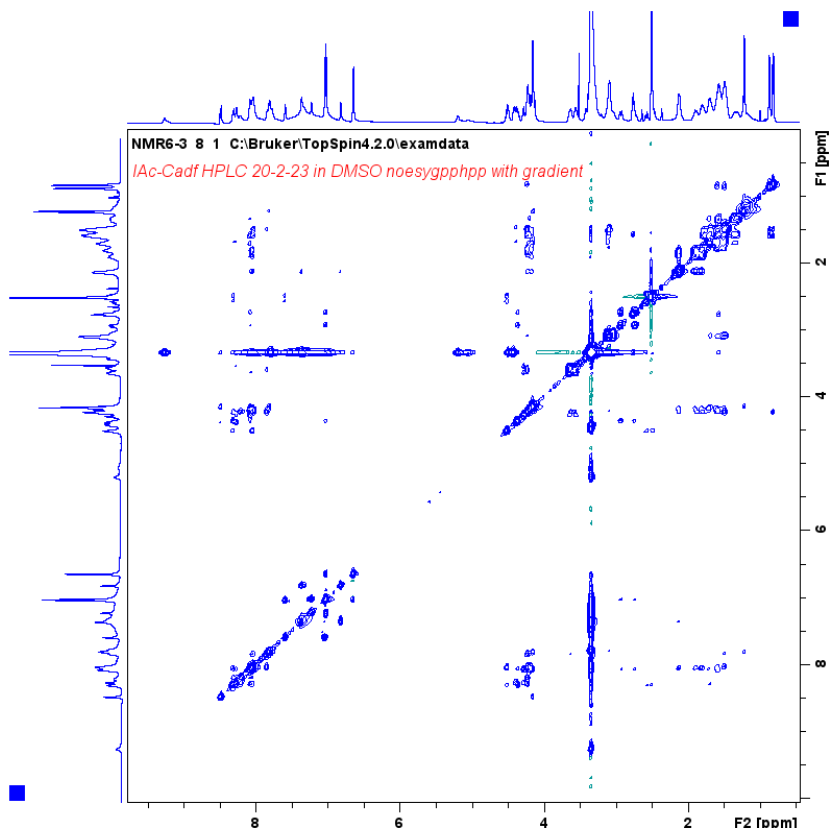
Εικόνα 36: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (6,5-8,2 ppm) του πεπτιδίου $\text{IAc-RSYNQKLSERRA-NH}_2$ σε DMSO-d_6 .



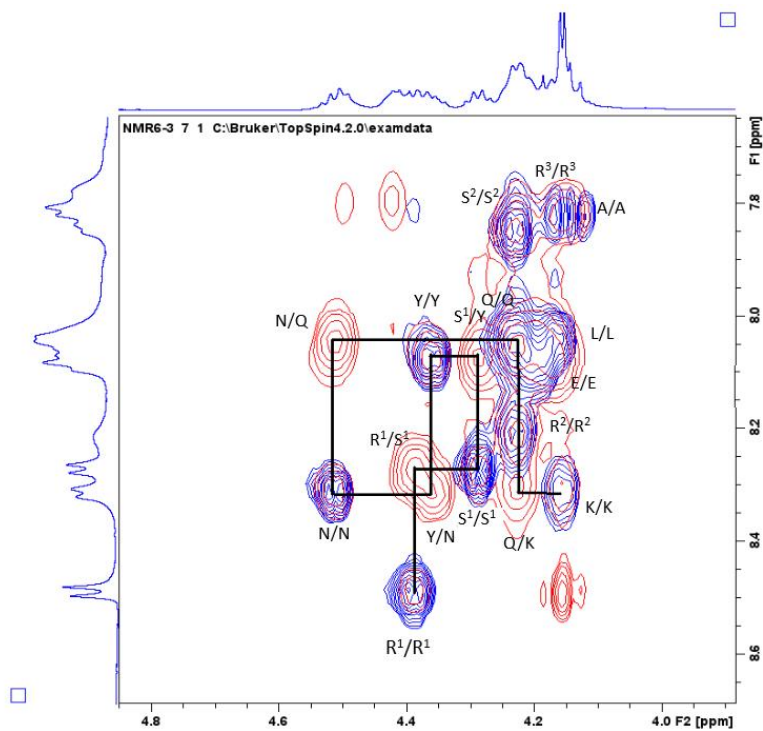
Εικόνα 37: Φάσμα ^1H - ^1H -TOCSY NMR του πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂ σε DMSO-d₆.



Εικόνα 38: Φάσμα ^1H - ^1H -TOCSY NMR του πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂ σε DMSO-d₆.



Εικόνα 39: Φάσμα ^1H - ^1H -NOESY NMR του πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂ σε DMSO-d₆.



Εικόνα 10: Φάσματα NMR ^1H - ^1H -COSY (μπλε) και ^1H - ^1H -NOESY (κόκκινο) σε σύγκριση του πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂ σε DMSO-d₆.

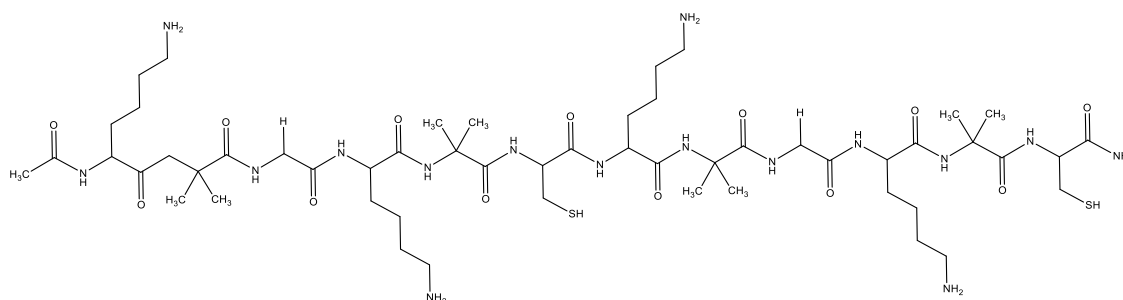
Πίνακας 7: Χημικές μετατοπίσεις ^1H του πεπτιδίου IAc-RSYNQKLSERRA-NH₂ (pH=4,9, T=298K).

Αμινοξέα	Χημικές μετατοπίσεις δ (ppm από το TMS)				
	NH	αCH	βCH	Others	
ICH ₂ CO-					3,51
Arg ¹	8,49	4,39	1,70	γCH ₂	1,56
			1,67		1,48
				δCH ₂	3,09
				εNH	7,80
Ser ¹	8,27	4,29	3,64	OH	5,20
			3,55		
Tyr	8,07	4,36	2,94	C3,5H	6,65
				C2,6H	7,03
			2,73	OH	9,27
Asn	8,32	4,49	2,49	CONH ₂	6,83
			2,46		7,37
Gln	8,09	4,21	1,70	γCH	1,59
				CONH ₂	7,02
			1,73		
					7,23
Lys	8,28	4,17	2,57	γCH ₂	1,51
				δCH ₂	1,69
			2,48	εCH ₂	4,17
				NH ₃ ⁺	8,04
Leu	8,04	4,24	1,59	γCH	1,60
				δCH ₃	0,87
			1,49		
					0,82
Ser ²	7,85	4,23	3,62	OH	5,19
			3,57		

Glu	8,05	4,25	1,81	γCH_2	2,13
				COOH	()
			1,90		
Arg ²	8,20	4,23	1,77	γCH_2	1,51
			1,79		1,58
				δCH_2	3,09
				ϵNH_2	7,80
Arg ³	7,80	4,15	1,68	γCH_2	1,56
					1,48
				δCH_2	3,09
				ϵNH_2	7,77
Ala	7,82	4,11	1,22	-	-
-NH ₂					7,04
					7,59

6.3. Σχεδιασμός και σύνθεση πεπτιδικού φορέα -CONH₂ (trans)

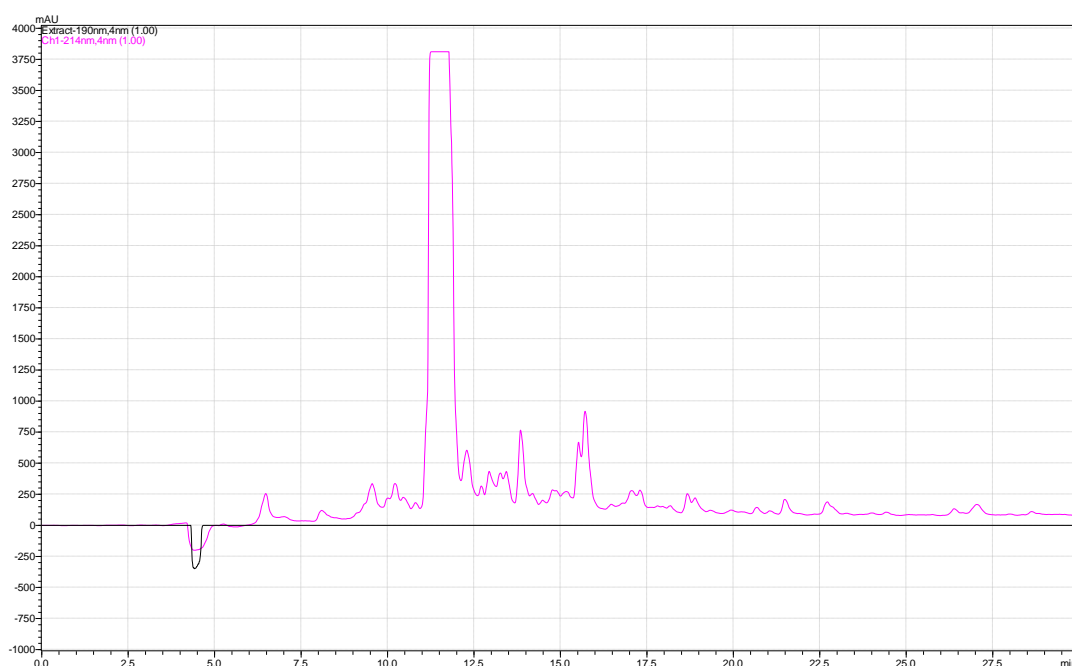
Η σύνθεση του φορέα Ac-(Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Cys)₂-NH₂ που σχεδιάστηκε και επιλέχθηκε για την πρόσδεση των ανοσογονικών επιτόπων έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Η δομή του πεπτιδικού φορέα φαίνεται στην εικόνα 41.



Εικόνα 41: Συντακτικός τύπος πεπτιδίου-φορέα.

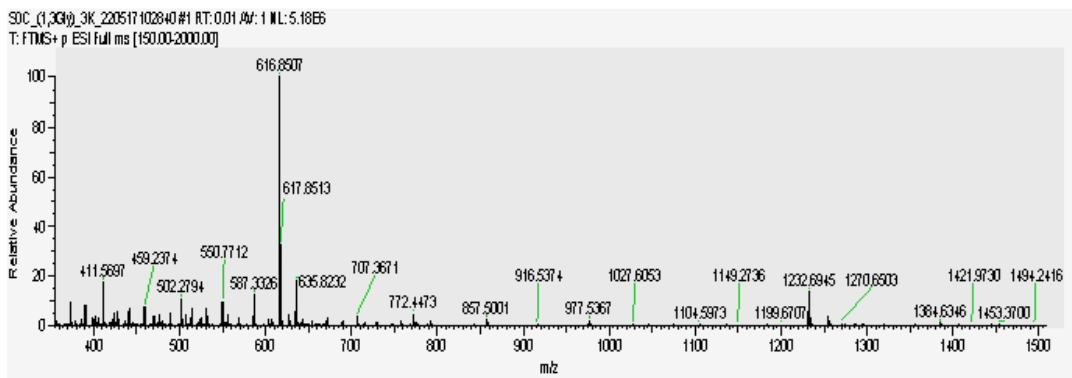
Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδικού φορέα ήταν 76 %. Στη συνέχεια, μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, ελήφθησαν 0,152g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη > 100 %. Η απόδοση αυτή πιθανά οφείλεται σε μη ορθή εκτίμηση της υποκατάστασης της ρητίνης.

Ο καθαρισμός του ελεύθερου πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Στην εικόνα 42 παρατίθεται το χρωματογράφημα του πεπτιδίου. Η απόδοση μετά τον καθαρισμό ήταν 55 %.



Εικόνα 42: Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC οι διαλύτες έκλουσης ήταν: (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA, και το σύστημα έκλουσης: από (A)/(B):90/10 σε (A)/(B):50/50.

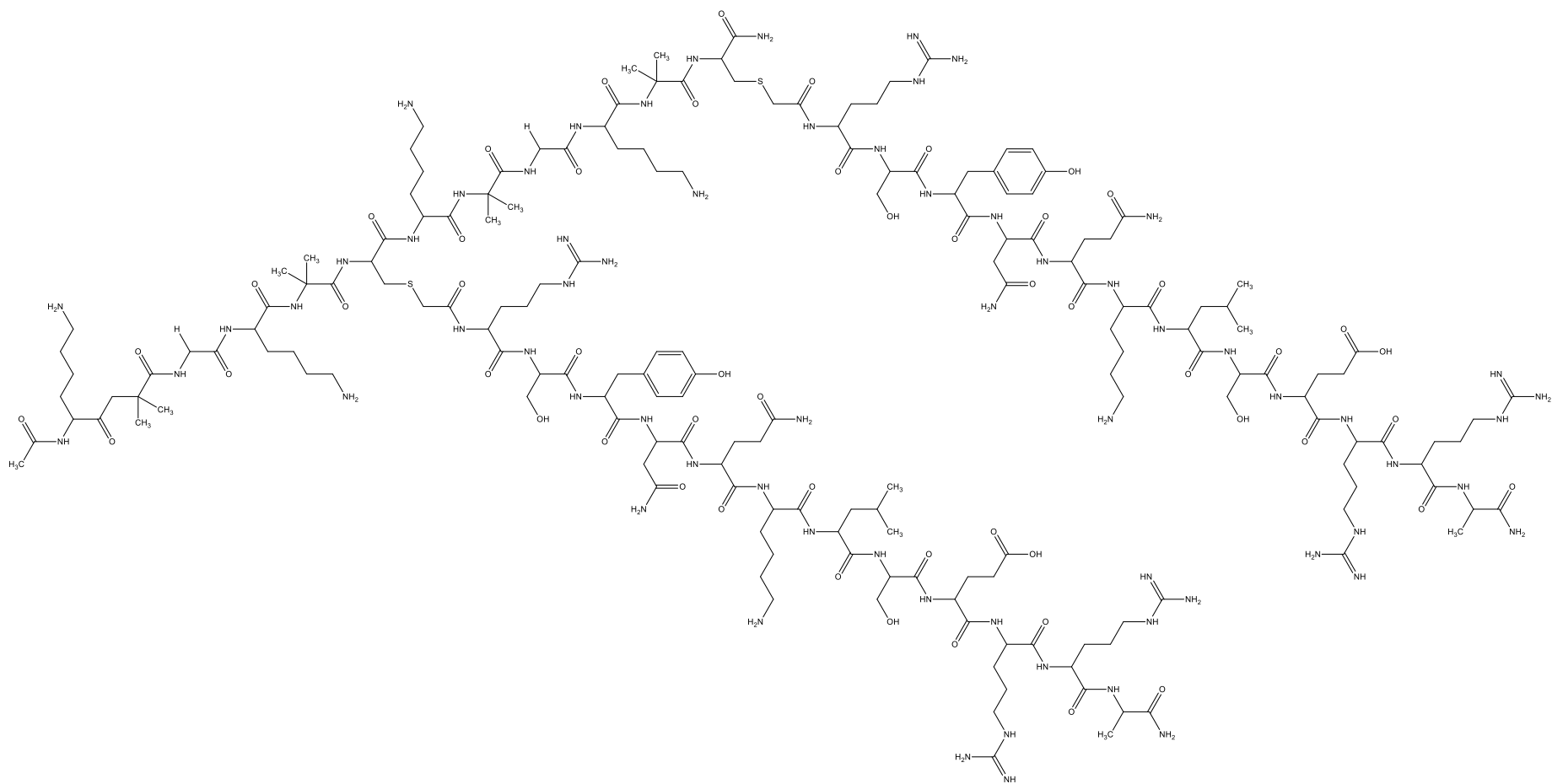
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματομετρίας μάζας ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στην εικόνα 43. Η κορυφή σε τιμή m/z στα 411 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [M+3H⁺]³⁺, η κορυφή σε m/z =616 amu στο [M+2H⁺]²⁺ και η κορυφή σε τιμή m/z στα 1232 στο [M+H⁺]⁺.



Εικόνα 43: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδικού φορέα *Ac-(Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Cys)2-NH2*. Αναμενόμενο MB: 1232,57 Da. Βρέθηκε: 1231,69 Da.

6.4. Σύνθεση συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου μέσω θειοαιθερικού δεσμού

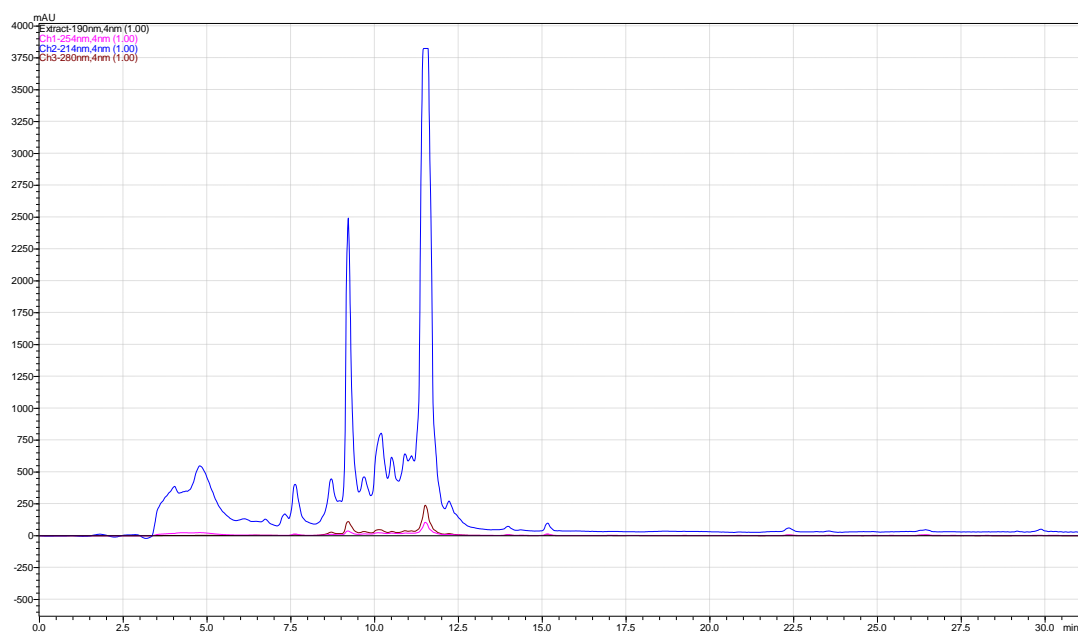
Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου. Ο συντακτικός τύπος του ανοσογονικού συμπλέγματος φαίνεται στην εικόνα 44.



Εικόνα 44: Συντακτικός τύπος συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου.

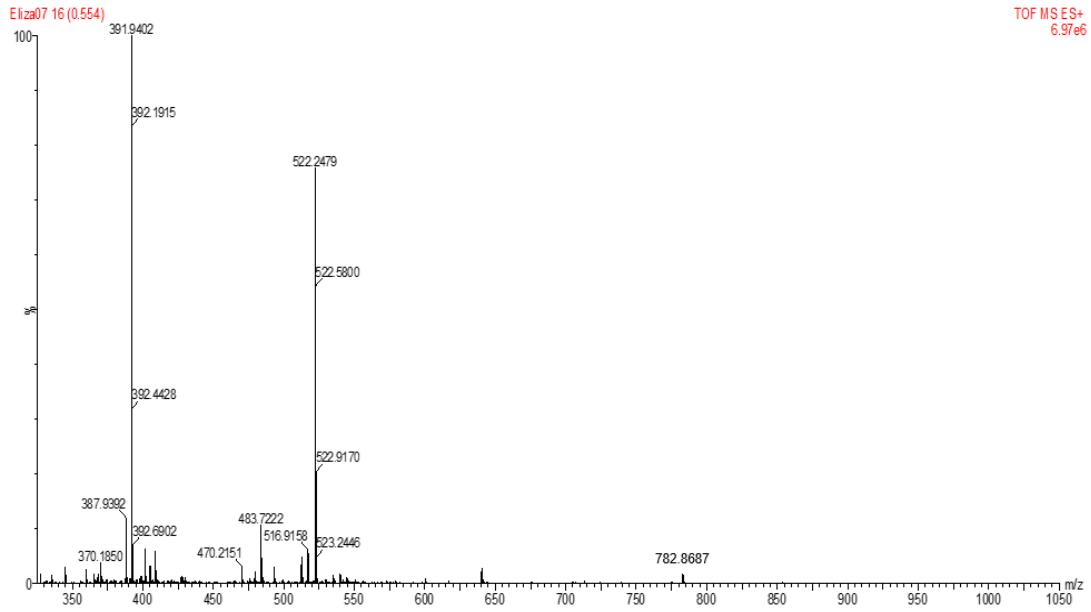
Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος έγινε χωρίς ιδιαίτερες δυσκολίες. Η απόδοση της αντίδρασης σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού ήταν 89 %.

Ο καθαρισμός του ανοσογονικού συμπλέγματος πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Στην εικόνα 45 παρατίθεται το χρωματογράφημα του συμπλέγματος. Η απόδοση μετά τον καθαρισμό ήταν 14 %.



Εικόνα 45: Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC οι διαλύτες έκλουσης ήταν: (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA, και το σύστημα έκλουσης: από (A)/(B):90/10 σε (A)/(B):50/50.

Η ταυτοποίηση του συμπλέγματος πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματομετρίας μάζας ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στην εικόνα 46. Η κορυφή σε τιμή m/z στα 392 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [M+12H⁺]¹²⁺, η κορυφή σε τιμή m/z στα 470 amu στο [M+10H⁺]¹⁰⁺, η κορυφή σε m/z =522 amu στο [M+9H⁺]⁹⁺ και η κορυφή σε τιμή m/z στα 783 στο [M+ 6H⁺]⁶⁺.



Εικόνα 46: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού ανοσογονικού συμπλέγματος φορέα-πεπτιδίου. Αναμενόμενο MB: 4325,02 Da. Βρέθηκε: 4326,14 Da.

7. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία σχεδιάστηκε και συντέθηκε ένα ανοσογονικό σύμπλεγμα με στόχο την πρόκληση ευρέως φάσματος ανοσολογικής απόκρισης έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Campylobacter jejuni*.

Η μελέτη αυτή ανέδειξε την πεπτιδική αλληλουχία R²⁷¹SYNQKLSERRA²⁸² της πρωτεΐνης CadF ως την πλέον κατάλληλη για τον επιδιωκόμενο στόχο καθώς:

- Διαθέτει όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ανοσογονικότητας, υδροφιλικότητας, προσβασιμότητα της επιφάνειας της και ευελιξίας,
- Διαθέτει ικανοποιητική ομολογία με πάνω από 6 περιοχές πρωτεϊνικών αντιγόνων που ταυτοποιήθηκαν στο παθογόνο βακτήριο *Campylobacter jejuni*.

Η σύνθεση της πεπτιδικής αλληλουχίας R²⁷¹SYNQKLSERRA²⁸² έγινε με επιτυχία και σε καλές αποδόσεις.

Επιπλέον, σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε ο πεπτιδικός φορέας Ac-(Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Cys)₂-NH₂ ο οποίος διευκολύνει τη συνθετική ανάπτυξη ανοσογονικών συμπλεγμάτων και διαθέτει στοιχεία αυξημένης διαλυτότητας, απαραίτητα για τη χρήση μορίων πολύ μεγάλου μοριακού βάρους.

Η σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος με δύο αντίγραφα επιτόπου, μεγάλου μοριακού βάρους (MB: 4325,02) έγινε με επιτυχία σε πολύ καλή απόδοση, γεγονός που επιβεβαιώνει την ορθότητα του σχεδιασμού

8. Μελλοντικοί στόχοι

Στις μελλοντικές προσεγγίσεις εντάσσεται η χρήση του ανοσογονικού συμπλέγματος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας για ανοσοποίηση ορνίθων, ο έλεγχος του επιπέδου ανοσολογικής απόκρισης, η αναγνώριση της πρωτεΐνης CadF καθώς και του παθογόνου *Campylobacter jejuni*. Τελικός στόχος μπορεί να είναι η πιστοποίηση της ανοσοπροστασίας που μπορεί να προσφέρει ένα τέτοιο ανοσογονικό σύμπλεγμα έναντι του παθογόνου και η χρήση του ως προστατευτικό εμβόλιο. Επιπλέον, η χρήση του πεπτιδικού φορέα που αναπτύχθηκε σε άλλες περιπτώσεις για την επίτευξη ανοσοπροστασίας ή παραγωγής αντισωμάτων ως διαγνωστικά εργαλεία αποτελούν σημαντικά βήματα εξέλιξης στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

Βιβλιογραφία

1. Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JSG. Campylobacter Jejuni. *Lett Appl Microbiol* 2005;41(4):297–302, DOI: 10.1111/J.1472-765X.2005.01788.X.
2. Allos BM. Campylobacter Jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clin Infect Dis* 2001;32(8):1201–1206, DOI: 10.1086/319760.
3. García-Sánchez L, Melero B, Rovira J. Campylobacter in the Food Chain. *Adv Food Nutr Res* 2018;86:215–252, DOI: 10.1016/BS.AFNR.2018.04.005.
4. Gundogdu O, Wren BW. Microbe Profile: Campylobacter Jejuni – Survival Instincts. *Microbiology (United Kingdom)* 2020;166(3):230–232, DOI: 10.1099/MIC.0.000906/CITE/REFWORKS.
5. Silvan JM, Martinez-Rodriguez AJ. Food By-Products as Natural Source of Bioactive Compounds Against Campylobacter. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* 2019;336–350, DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22139-2.
6. Donnison AM, Ross CM. MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | Thermotolerant Campylobacter. *Encyclopedia of Meat Sciences* 2004;798–804, DOI: 10.1016/B0-12-464970-X/00055-6.
7. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev A V., Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Van Vliet AHM, Whitehead S, Barrell BG. The Genome Sequence of the Food-Borne Pathogen Campylobacter Jejuni Reveals Hypervariable Sequences. *Nature* 2000 403:6770 2000;403(6770):665–668, DOI: 10.1038/35001088.
8. Young KT, Davis LM, DiRita VJ. Campylobacter Jejuni: Molecular Biology and Pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2007 5:9 2007;5(9):665–679, DOI: 10.1038/nrmicro1718.

9. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev A V., Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Van Vliet AHM, Whitehead S, Barrell BG. The Genome Sequence of the Food-Borne Pathogen *Campylobacter* *Jejuni* Reveals Hypervariable Sequences. *Nature* 2000 403:6770 2000;403(6770):665–668, DOI: 10.1038/35001088.
10. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):687–720, DOI: 10.1128/CMR.00006-15.
11. Ternhag A, Törner A, Svensson Å, Giesecke J, Ekdahl K. Mortality Following *Campylobacter* Infection: A Registry-Based Linkage Study. *BMC Infect Dis* 2005;5(1):1–5, DOI: 10.1186/1471-2334-5-70/TABLES/2.
12. Whiley H, van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The Role of Environmental Reservoirs in Human *Campylobacteriosis*. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(11):5886, DOI: 10.3390/IJERPH10115886.
13. Altekruze SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter* *Jejuni*--an Emerging Foodborne Pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999;5(1):28–35, DOI: 10.3201/EID0501.990104.
14. Blaser MJ. Epidemiologic and Clinical Features of *Campylobacter* *Jejuni* Infections. *J Infect Dis* 1997;176 Suppl 2(6 SUPPL.), DOI: 10.1086/513780.
15. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Groß U. *Campylobacter* *Jejuni*: A Brief Overview on Pathogenicity-Associated Factors and Disease-Mediating Mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology* 2010;300(4):205–211, DOI: 10.1016/J.IJMM.2009.07.002.
16. Bolton DJ. *Campylobacter* Virulence and Survival Factors. *Food Microbiol* 2015;48:99–108, DOI: 10.1016/J.FM.2014.11.017.
17. Tegtmeyer N, Sharafutdinov I, Harrer A, Soltan Esmaeili D, Linz B, Backert S. *Campylobacter* Virulence Factors and Molecular Host–Pathogen Interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 2021;431:169–202, DOI: 10.1007/978-3-030-65481-8_7/FIGURES/1.

18. Zautner AE, Malik Tareen A, Groß U, Lugert R. Chemotaxis in *Campylobacter* Jejuni. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012;2(1):24–31, DOI: 10.1556/EUJMI.2.2012.1.5.
19. Konkel ME, Christensen JE, Keech AM, Monteville MR, Klena JD, Garvis SG. Identification of a Fibronectin-Binding Domain within the *Campylobacter* Jejuni CadF Protein. *Mol Microbiol* 2005;57(4):1022–1035, DOI: 10.1111/J.1365-2958.2005.04744.X.
20. Ma H, O’Kennedy R. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol* 2015;1348:7–11, DOI: 10.1007/978-1-4939-2999-3_2.
21. Dias da Silva W, Tambourgi D V. IgY: A Promising Antibody for Use in Immunodiagnostic and in Immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;135(3–4):173–180, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2009.12.011.
22. Narat M. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol Biotechnol* 2003;41(3):259–267.
23. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: Clues to the Origins of Modern Antibodies. *Immunol Today* 1995;16(8):392–398, DOI: 10.1016/0167-5699(95)80008-5.
24. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-Technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *Altern Lab Anim* 2005;33(2):129–154, DOI: 10.1177/026119290503300208.
25. Redwan EM, Aljadawi AA, Uversky VN. Simple and Efficient Protocol for Immunoglobulin Y Purification from Chicken Egg Yolk. *Poult Sci* 2021;100:100956, DOI: 10.1016/j.psj.2020.12.053.
26. Narat M. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol Biotechnol* 2003;41(3):259–267.
27. Hau J, Hendriksen CFM. *Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolk.*

28. Kritratanasak S, Chiampanichayakul S, Kasinrerak W. Production of IgY Anti-Mouse IgG Antibodies from Chicken Eggs. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004.
29. Zorriehzahra MJ, Tiwari R, Sachan S, Karthik K, Malik YS, Dadar M, Sarwar M, Sayab M, Dhama K. Avian Egg Yolk Antibodies (IgY) and Their Potential Therapeutic Applications for Countering Infectious Diseases of Fish and Aquatic Animals. *International Journal of Pharmacology* 2016;12(8):760–768, DOI: 10.3923/IJP.2016.760.768.
30. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg Yolk Antibodies (IgY) and Their Applications in Human and Veterinary Health: A Review. *Int Immunopharmacol* 2019;73:293–303, DOI: 10.1016/J.INTIMP.2019.05.015.
31. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J Vis Exp* 2011;(51):3084, DOI: 10.3791/3084.
32. Fishman JB, Berg EA. Isolation of IgY from Chicken Eggs. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018(6):477–479, DOI: 10.1101/PDB.PROT099150.
33. Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM. The Binding of Staphylococcal Protein A by the Sera of Different Animal Species. *J Immunol* 1982;128(5):2300–2305.
34. Walczak M, Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Skoreński M, Bobrek K, Nowak D, Boivin S, Brown EL, Oleksyszyn J, Sińczyk M. Method for Generation of Peptide-Specific Igy Antibodies Directed to Staphylococcus Aureus Extracellular Fibrinogen Binding Protein Epitope. *Peptide Science* 2015;104(5):552–559, DOI: 10.1002/BIP.22695.
35. He J, Wang Y, Sun S, Zhang X. Evaluation of Chicken IgY Generated Against Canine Parvovirus Viral-Like Particles and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Assay for Canine Parvovirus Detection. *Viral Immunol* 2015;28(9):489–494, DOI: 10.1089/VIM.2015.0030.

36. Palaniyappan A, Das D, Kammila S, Suresh MR, Sunwoo HH. Diagnostics of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus (SARS-CoV) Nucleocapsid Antigen Using Chicken Immunoglobulin Y. *Poult Sci* 2012;91(3):636–642, DOI: 10.3382/PS.2011-01916.
37. Cakir-Koc R. Production of Anti-SAG1 IgY Antibody against *Toxoplasma Gondii* Parasites and Evaluation of Antibody Activity by ELISA Method. *Parasitology Research* 2016 115:8 2016;115(8):2947–2952, DOI: 10.1007/S00436-016-5047-9.
38. Teimoori S, Arimatsu Y, Laha T, Kaewkes S, Sereerak P, Sripa M, Tangkawattana S, Brindley PJ, Sripa B. Chicken IgY-Based Coproantigen Capture ELISA for Diagnosis of Human Opisthorchiasis. *Parasitol Int* 2017;66(4):443–447, DOI: 10.1016/J.PARINT.2015.10.011.
39. Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Walczak M, Idzi M, Bobrek K, Boivin S, Gaweł A, Stefaniak T, Oleksyszyn J, Sieńczyk M. Highly Sensitive Detection of Cancer Antigen 15-3 Using Novel Avian IgY Antibodies. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 2014;31(1):43–52, DOI: 10.14573/ALTEX.1309181.
40. Mao HH, Chao S. Advances in Vaccines. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2020;171:155–188, DOI: 10.1007/10_2019_107.
41. Loomis RJ, Johnson PR. Emerging Vaccine Technologies. *Vaccines*, 2015, 3, 429–447, DOI: 10.3390/vaccines3020429.
42. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2018;48(2):231, DOI: 10.1016/J.CVSM.2017.10.002.
43. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chem Rev* 2020;120(6):3210–3229, DOI: 10.1021/ACS.CHEMREV.9B00472.
44. Li W, Joshi MD, Singhanian S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, 2014, 2, 515–536, DOI: 10.3390/vaccines2030515.

45. Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Panou-Pomonis E, Sakarellos C. *Artificial Carriers: A Strategy for Constructing Antigenic/Immunogenic Conjugates*, Vol. 6. 2006.
46. Sakarellos-Daitsiotis M, Tsikaris V, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Sakarellos C. *Peptide Carriers: A Helicoid-Type Sequential Oligopeptide Carrier (SOC n) for Multiple Anchoring of Antigenic/Immunogenic Peptides*. 1999.
47. Keramisanou D, Tsikaris V, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Mikhailova AA, Strelkov LA, Tsikaris V. *Multiple Anchoring of Myelopeptides on Sequential Oligopeptide Carriers (SOC n): Synthesis, Conformation and Studies in Human Leukemia Cells*, Vol. 60. 2002.
48. Sakarellos C, Cung MT, Box P 0, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. *Vassilios Tsikaris Concept and Design of a New Class of Sequential Oligopeptide Carriers (SOC) for Covalent Attachment Of*. 1998.
49. Papadopoulos C, Fotou E, Moussis V, Ntoyhaniari A, Zografou S, Maltabe V, Kouklis P, Christoforidis S, Tsikaris V. Intracellular Targets: A Multiple Cargo Transporting Molecule. *Journal of Peptide Science* 2021;27(11), DOI: 10.1002/psc.3359.
50. Dietzen DJ. Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Principles and Applications of Molecular Diagnostics* 2018;345–380, DOI: 10.1016/B978-0-12-816061-9.00013-8.
51. Bhagavan N.V, Chung-Eun Ha. *Three-Dimensional Structure of Proteins*. Elsevier, 2011, DOI: 10.1016/B978-0-12-095461-2.00004-7.
52. Robinson SW, Afzal AM, Leader DP. Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data. In *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. Elsevier Inc., 2014; 259–287, DOI: 10.1016/B978-0-12-386882-4.00013-X.
53. Amblard M, Fehrentz J-A, Martinez J, Subra G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol Biotechnol* 2006.
54. Fields GB. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* 2001;26(1), DOI: 10.1002/0471140864.ps1801s26.

55. Petrou C, Sarigiannis Y. Peptide Synthesis: Methods, Trends, and Challenges. In *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2017; 1–21, DOI: 10.1016/B978-0-08-100736-5.00001-6.
56. Deng FK, Mandal K, Luisier S, Kent SBH. Synthesis and Comparative Properties of Two Amide-Generating Resin Linkers for Use in Solid Phase Peptide Synthesis. *Journal of Peptide Science* 2010;16(10):545–550, DOI: 10.1002/psc.1279.
57. Jensen KJ, Tofteng P, Søren S, Pedersen Editors L. *Peptide Synthesis and Applications*, 2nd ed. 2013, DOI: 978-1-62703-544-6.
58. Pires DAT, Bemquerer MP, Do Nascimento CJ. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int J Pept Res Ther* 2014;20(1):53–69, DOI: 10.1007/s10989-013-9366-8.
59. Vidushi Y, Meenakshi B. A Review on HPLC Method Development and Validation. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci* 2017;2(6):166–179, DOI: 10.26479/2017.0206.12.
60. Glish GL, Vachet RW. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003 2:2 2003;2(2):140–150, DOI: 10.1038/nrd1011.
61. Burdick DJ, Stults JT. [22] Analysis of Peptide Synthesis Products by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Methods Enzymol* 1997;289:499–519, DOI: 10.1016/S0076-6879(97)89061-1.
62. Tampieri A, Szabó M, Medina F, Gulyás H. A Brief Introduction to the Basics of NMR Spectroscopy and Selected Examples of Its Applications to Materials Characterization. *Physical Sciences Reviews* 2021;6(1), DOI: 10.1515/psr-2019-0086.
63. Edwards JC. *Principles of NMR*. 2009.
64. Zerbe, Bader. *PEPTIDE NMR*.
65. Wu S. *1D and 2D NMR Experiment Methods*. 2011.

66. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: Improving Sequence-Based B-Cell Epitope Prediction Using Conformational Epitopes. *Nucleic Acids Res* 2017;45(W1):W24–W29, DOI: 10.1093/NAR/GKX346.
67. Emini EA, Hughes J v, Perlow DS, Boger J. Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. *J Virol* 1985;55(3):836–839, DOI: 10.1128/JVI.55.3.836-839.1985.
68. Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-Ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 1986;25(19):5425–5432, DOI: 10.1021/BI00367A013.
69. Karplus PA, Schulz GE. Prediction of Chain Flexibility in Proteins. *Naturwissenschaften* 1985 72:4 1985;72(4):212–213, DOI: 10.1007/BF01195768.
70. Kates S, Alberico F. Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide. *Org Process Res Dev* 2001;5(6):667–668, DOI: 10.1021/OP000121J.
71. Pumtang-On P, Mahony TJ, Hill RA, Vanniasinkam T. A Systematic Review of Campylobacter Jejuni Vaccine Candidates for Chickens. *Microorganisms*, 2021, 9, 1–48, DOI: 10.3390/microorganisms9020397.

Συντομογραφίες

- Ac: Ακέτυλο ομάδα
- Aib: α-Άμινο ισοβουτυρικό οξύ
- Ala: Αλανίνη
- Arg: Αργινίνη
- Asn: Ασπαραγίνη
- Boc: Τριτ-βουτοξυκαρβονύλιο
- BOP: Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλοξυ-τρεις(διμεθυλαμινο)-φωσφονίου
- CadF: Campylobacter adhesion to Fibronectin
- CDTs: Κυτταροθανατηφόρες διασταλτικές τοξίνες
- Cys: Κυστεΐνη
- DCC: N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
- DCM: Διχλωρομεθάνιο
- DIC: N, N'-διϊσοπρόπυλοκαρβοδιιμίδιο
- DIPEA: Διϊσοπρόπυλαιθυλαμίνη
- DMF: Διμέθυλοφορμαμίδιο
- EDC: N-αίθυλο,N'-[3-(διμέθυλο) πρόπυλο] καρβοδιιμίδιο
- EDT: 1,2-Αιθανοδιθειόλη
- ESI-MS: Electrospray Ionization Mass Spectrometry
- Fab: Fragment antigen binding, κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου
- Fc: Fragment crystalline, κρυσταλλικό κλάσμα
- FCA: Πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund
- FIA: Ατελές ανοσοενισχυτικό Freund
- Fmoc: 9-Φλουορένυλομεθυλόξυκαρβόνυλο ομάδα
- GBS: σύνδρομο Guillain-Barré
- Glu: Γλουταμικό οξύ
- Gln: Γλουταμίνη
- Gly: Γλυκίνη
- HATU: Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας

- HBTU: Εξαφθοροφωσφορικό άλας της 2-(1H-βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας
- HF: Υδροφθορικό οξύ
- HOAt: 1-Υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλη
- HOBt: 1-Υδροξυβενζοτριαζόλιο
- Igs: Ανοσοσφαιρίνες
- Leu: Λευκίνη
- LOS: Λιπογισακχαρήτης
- Lys: Λυσίνη
- MeOH: Μεθανόλη
- MS: Φασματομετρία μάζας
- NMR: Nuclear Magnetic Resonance
- NOE: Nuclear Overhauser Effect
- NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- OBU: Τριτοταγής βουτυλόξυ ομάδα
- PyBOP: Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ-τρις-πυρρολιδινο-φωσφονίου
- RP-HPLC: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
- Ser: Σερίνη
- SOCN: Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς
- SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis, πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση
- TBTU: Τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1H-βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας
- tBu: Tert-βούτυλο ομάδα
- TFA: Trifluoroacetic acid, Τριφθοροξικό οξύ
- TIS: Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο
- TOCSY: Total Correlation Spectroscopy
- Trt: Τρίτυλο ομάδα
- Tyr: Τυροσίνη